

# 利用荧光光谱法初步筛选芦笋 抑制 AGEs 生成活性部位

董 光 华

(晋中职业技术学院科研处 山西省晋中市榆次区蕴华西街 229 号 030600)

**摘 要** 采用葡萄糖-牛血清白蛋白体系, 利用荧光光谱法对芦笋中抑制非酶糖化产物(AGEs)生成的活性组分进行了筛选。利用 D101 大孔吸附树脂对芦笋的正丁醇萃取物进行初步分离, 用水和不同浓度的乙醇水溶液洗脱, 然后对各洗脱物进行活性筛选。结果表明: 正丁醇萃取物中含有较强的抑制 AGEs 生成的活性成分, 其中 80% 乙醇洗脱组分抑制 AGEs 生成的  $IC_{50}$  为  $0.024 \text{ mg/mL}$ 。推测其主要活性成分可能为皂苷成分。

**关键词** 芦笋; 非酶糖化产物; 抑制剂

中图分类号: O657.32

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2010)02-0648-03

## 1 引言

非酶糖化(NEG)反应, 是指在不需酶参与的情况下, 还原性糖的醛基与蛋白质的氨基发生的一系列化学反应。NEG 反应以及其晚期非酶糖化产物(AGEs)在糖尿病并发症的发病机制中起着重要作用, 是导致糖尿病并发症的关键途径, 防止体内多种蛋白质非酶糖化, 对减缓糖尿病并发症的发生和发展具有重要意义。因此, 以 NEG 和 AGEs 为靶标, 寻找和筛选抑制 NEG 反应及 AGEs 生成的抗糖尿病并发症有效药物, 已受到医药界的广泛重视<sup>[1-3]</sup>。目前, 国内已报道的有些单味药和中药复方, 对阻止 AGEs 生成有一定作用, 其有效成分多为黄酮类<sup>[4]</sup>, 皂甙类及其某些生物碱, 化学合成药物有氨基胍、双胍类等, 但尚未见到从芦笋中筛选有关抑制 AGEs 生成的抑制剂的报道。本研究采用葡萄糖-牛血清白蛋白体系, 利用荧光光谱法对芦笋提取物经初步分离后的各组分进行了非酶糖化抑制剂的筛选, 以期为芦笋的开发利用提供科学依据。

## 2 实验部分

### 2.1 主要试剂和仪器

白芦笋购自山西永济; 大孔吸附树脂 D101(南开大学化学厂); 槲皮素(中国药品生物制品检定所); 牛血清白蛋白 V(美国 Sigma 公司分装); 其他试剂均为分析纯。实验用水为二次蒸馏水。

日立 F-2500 荧光光谱仪(日本日立公司); BS 110s 电子天平(北京塞多利斯天平有限公司); RE-52A 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); SHZ-C 型循环水式多用真空泵(巩义市英峪予华仪器厂)。

联系人, 电话: (0354)2668165; 手机: (0)13700553196; E-mail: dgh605@yahoo.com.cn

作者简介: 董光华(1962—), 男, 山西省平遥县人, 副教授, 主要从事化学教学与研究工作。

收稿日期: 2009-08-11; 接受日期: 2009-09-08

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 芦笋提取分离

白芦笋烘干, 粉碎, 分别用 20、15 倍量的 70% 乙醇回流提取 2 次, 每次 0.5h, 合并 2 次提取液, 过滤。上清液减压浓缩, 依次用石油醚(60—90)、乙酸乙酯、水饱和正丁醇萃取。正丁醇萃取液减压浓缩回收正丁醇, 残余物用蒸馏水溶解, 大孔吸附树脂 D101 柱层析, 依次用水、20%、40%、60%、80%、95% 乙醇洗脱。收集各洗脱液, 减压浓缩, 真空干燥得不同溶剂洗脱物, 备用。

### 2.2.2 样品配制

准确称取一定量的槲皮素和 2.2.1 项下经大孔吸附树脂 D101 柱层析所得的水洗组分、20% 乙醇洗脱组分、40% 乙醇洗脱组分、60% 乙醇洗脱组分、80% 乙醇洗脱组分, 分别溶于 1mL 二甲基亚砷中, 配制得系列样品储备溶液, 备用。

### 2.2.3 测定方法

按照 Nobuyasu Matsuura<sup>[5]</sup>改进方法测定。具体方法是: 取 800 $\mu$ g 的牛血清白蛋白和 36mg 的 D-葡萄糖, 溶于 980  $\mu$ L 磷酸盐缓冲液(50mmol/L, pH=7.4)中, 然后加入 20 $\mu$ L 的二甲基亚砷(阴性对照)或不同浓度的溶于二甲基亚砷的待测样品溶液。测定样品和阴性对照样品混合液在避光下恒温 60 $^{\circ}$ C 反应 48h, 同时另取测定样品组置 4 $^{\circ}$ C 避光 48h 作为空白对照组。待反应完成后, 将测定样品冷却至室温(25 $^{\circ}$ C), 加入 100 $\mu$ L 的 10% 的三氯乙酸(TCA)溶液沉淀蛋白, 4 $^{\circ}$ C 15000g 离心 4min, 弃去上清液, 沉淀用 1mL 的磷酸盐缓冲液(pH=10.0)溶解, 用日立 F-2500 荧光光谱仪测定 450nm 处的相对荧光强度(激发波长为 350nm, 激发和发射狭缝均为 10nm)。按下式计算表观抑制率  $I$ 。

$$I\% = (F_{\text{阴性}} - F_{\text{样品}}) \times 100\% / (F_{\text{阴性}} - F_{\text{空白}})$$

式中:  $F_{\text{阴性}}$ ——不加待测样品反应后的相对荧光强度;

$F_{\text{样品}}$ ——加入待测样品反应(恒温 60 $^{\circ}$ C 反应 48h)后的相对荧光强度;

$F_{\text{空白}}$ ——加入待测样品反应(恒温 4 $^{\circ}$ C 反应 48h)后的相对荧光强度。

## 3 结果与讨论

### 3.1 槲皮素对 AGEs 生成的抑制作用

葡萄糖-牛血清白蛋白体系中分别加入不同浓度( $C_5$ 、 $C_4$ 、 $C_3$ 、 $C_2$ 、 $C_1$  浓度逐渐增大)的槲皮素溶液, 按测定方法测定相对荧光强度(平行测定 3 次, 取平均值)。由图 1 可见, 450nm 处的相对荧光强度随槲皮素浓度增大逐渐减小, 说明槲皮素对 AGEs 的生成具有抑制作用。相对荧光强度随体系中槲皮素浓度变化见表 1。以槲皮素浓度  $\lg C$  对  $I\%$  作图得线性方程, 根据线性方程可求得抑制 AGEs 生成 50% 时的槲皮素浓度 ( $IC_{50}$ ) 为  $4 \times 10^{-3} \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 与文献报道值<sup>[4]</sup>相近, 说明该改进测定方法可行。

表 1 槲皮素对 AGEs 生成的抑制作用

$C \cdot 10^{-4} (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	0	4.4	44	88	220	440
$I\%$	0	10.1	58.0	71.2	81.5	86.4
$IC_{50} (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	0.004					

### 3.2 芦笋分离物各组分对 AGEs 生成的抑制作用

葡萄糖-牛血清白蛋白体系中分别加入不同浓度的芦笋分离物溶液, 按测定方法测定相对荧光强度(平行测定 3 次, 取平均值)。测定的荧光光谱图与图 1 相似, 450nm 处的相对荧光强度随样品

浓度增大逐渐减小,说明芦笋分离物各组分(除 60%乙醇洗脱组分外)对 AGEs 的生成均具有不同程度的抑制作用。体系相对荧光强度随样品浓度变化见表 2、表 3、表 4、表 5。

从上述实验数据可知,芦笋 80%乙醇洗脱组分对 AGEs 的生成具有较强的抑制作用, $IC_{50}$ 为 0.024 mg/mL。

#### 4 结论

芦笋中含有对 AGEs 的生成具有抑制作用的化学成分,由于本实验研究的主要是芦笋的正丁醇萃取物,因而抑制 AGEs 的活性成分可能主要为芦笋中的皂苷成分,具体化学成分尚有待进一步研究。

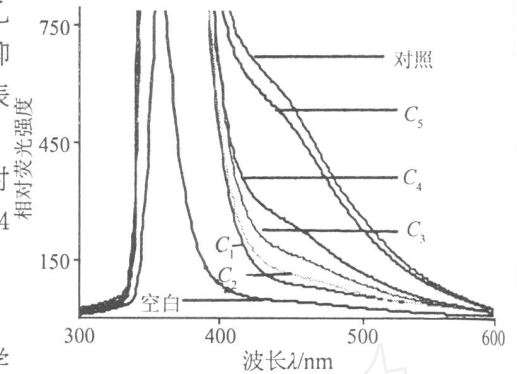


图 1 槲皮素对 AGEs 生成的抑制作用的荧光光谱图

$\lambda_{ex}=350\text{nm}; \lambda_{em}=450\text{nm}$ 。

表 2 水洗脱组分对 AGEs 生成的抑制作用

$C_{AGEs} \cdot 10^{-3} (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	0	5.4	27.1	54.2	135.6	271.2
抑制率(%)	0	3.8	15.5	27.3	33.3	37.9

表 3 20%乙醇洗脱组分对 AGEs 生成的抑制作用

$C_{AGEs} \cdot 10^{-3} (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	0	4.9	24.6	49.2	123	246
抑制率(%)	0	4.0	14.8	24.5	32.7	42.8

表 4 40%乙醇洗脱组分对 AGEs 生成的抑制作用

$C_{AGEs} \cdot 10^{-3} (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	0	3.9	19.6	39.2	98	196
抑制率(%)	0	5.9	13.8	17.8	24.6	29.8

表 5 80%乙醇洗脱组分对 AGEs 生成的抑制作用

$C_{AGEs} \cdot 10^{-3} (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	0	2.8	13.8	27.6	69	138
抑制率(%)	0	11.9	33.2	48.7	73.4	87.2
$IC_{50} (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	0.024					

#### 参考文献

- [1] Yoshikazu H, Akira S, Satoshi H *et al* Enhancing Effect of Advanced Glycation End Products on Serotonin Induced Platelet Aggregation in Patients with Diabetes Mellitus[J]. *Thrombosis Research*, 2002, **107**(6): 319—323
- [2] 钱萍萍, 刘长云. 糖尿病非酶糖化抑制剂研究进展[J]. 国外医学: 卫生学分册, 2003, **30**(3): 137—140
- [3] 刘长安, 赵帜平, 沈业寿等. 丹皮多糖 2b 对体外非酶糖化反应及终产物生成的抑制作用[J]. 生物学杂志, 2005, **22**(1): 20—21.
- [4] 葛勇, 张家庆, 周云平. 水飞蓟宾及槲皮素对体外白蛋白非酶糖化的抑制作用[J]. 第二军医大学学报, 1995, **16**(4): 333—336
- [5] Matsuura N, Aradate T, Sasaki C *et al* Screening System for the Maillard Reaction Inhibitor from Natural Product Extracts[J]. *Journal of Health Science*, 2002, **48**(6): 520—526

## Primary Screen of Active Sites from *Asparagus Officinalis* Linn for AGEs Inhibitor by Fluorescence Spectrum

DONG Guang-Hua

(College of Vocational Technology in Jinzhong, Jinzhong, Shanxi 030600, P. R. China)

**Abstract** AGEs inhibitors from *Asparagus officinalis* Linn were primary screened by fluorescence spectrum in glucose-bovine serum albumin system. *n*-butanol extracts of *Asparagus officinalis* Linn were separated by D101 macroporous adsorptive resins, using water and 20%, 40%, 60%, 80% ethanol as eluant. The activity of eluate were screened. The eluate of 80% ethanol has strong inhibiting activity for AGEs, and  $IC_{50}$  is 0.024 mg/mL. Its main active ingredient may be saponins.

**Key words** *Asparagus Officinalis* Linn; AGEs; Inhibitor