

蓝莓叶多酚对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的体外抑制活性研究

潘 玥^{1,2}, 刘小莉², 王 英², 夏秀东², 陶宁萍¹, 吴 寒², 刘思远^{1,2}, 周剑忠^{1,2,3*}

¹ 上海海洋大学食品学院, 上海 201306; ² 江苏省农业科学院农产品加工研究所, 南京 210014;

³ 江苏大学食品与生物工程学院, 镇江 212013

摘要:采用超声法提取蓝莓叶多酚,测定纯化前后提取物中总酚含量。以对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制作用为评价指标研究其体外降血糖活性,并运用液相色谱-质谱联用(LC-MS)法对蓝莓叶多酚的化学成分进行鉴定。通过不同的温度和不同的pH处理蓝莓叶多酚,探究它的稳定性。以阿卡波糖为阳性对照,半数抑制浓度(IC_{50})为 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制活性评价指标,测定提取物的抑制活性。最后经酶促动力学与Lineweaver-Burk双倒数法探讨蓝莓叶多酚的抑制类型。结果表明,蓝莓叶多酚纯化后总酚含量、 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制率分别较纯化前增加了41.19%、138.70%和12.42%。蓝莓叶多酚在低温(30~50℃)和偏酸性(pH 2.0~8.0 和 3.0~5.0)环境下比较稳定,能够保持较高的 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制活性。蓝莓叶多酚对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 分别为10.926和7.276 μg/mL。动力学结果表明蓝莓叶多酚对两种酶的抑制作用均为混合型可逆抑制。以上结果表明蓝莓叶多酚提取物具有良好的体外降血糖活性,为蓝莓叶研究与开发提供理论性依据。

关键词:蓝莓叶;多酚; α -淀粉酶; α -葡萄糖苷酶;抑制类型;动力学

中图分类号:TS201.1

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)4-0579-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.4.005

Inhibitory effect of polyphenols from blueberry leaves on the activity of α -amylase and α -glucosidase *in vitro*

PAN Yue^{1,2}, LIU Xiao-li², WANG Ying², XIA Xiu-dong²,
TAO Ning-ping¹, WU Han², LIU Si-yuan^{1,2}, ZHOU Jian-zhong^{1,2,3*}

¹ College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

² Agricultural Products Processing Institute, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;

³ School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

Abstract: In this study, the polyphenols in blueberry leaves were extracted by ultrasonic method, and the total phenolic contents in the extracts before and after purification were determined. By using the liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), the phenolic composition was first identified. Then, the stabilities of polyphenols during treatments at different temperatures and pH values were investigated. The *in vitro* hypoglycemic activity of the purified polyphenols was evaluated based on their inhibitory effects on α -amylase and α -glucosidase, where the acarbose was used as the positive control. As to determine the type of inhibitory effects of blueberry leaf polyphenols against the hypoglycemic-related enzymes, the enzymatic kinetics and Lineweaver-Burk double reciprocal method were used. The results showed that the total phenol content increased by 41.19%, and the α -amylase and α -glucosidase inhibitory activities of polyphenols increased by 138.70% and 12.42%, respectively, compared with those before purification. The blueberry leaf polyphenols were proved to be stable at low temperature (30~50℃) and acidic environment (pH 2.0~8.0 and 3.0~5.0), possessing the high α -amylase and α -glucosidase inhibitory activities (IC_{50} of 10.926 and 7.276 μg/mL, respectively) in a mixed-reversible manner. These above results indicated that the purified polyphenol extracts obtained from blueberry leaves had great *in vitro* hypoglycemic activities and provides the theoretical basis for the research and development of blueberry resources.

Key words: blueberry leaves; polyphenols; α -amylase; α -glucosidase; type of inhibition; dynamics

收稿日期:2021-06-22 接受日期:2022-03-09

基金项目:农业自主创新(CX(18)2017);江苏省科技计划(BE2020380)

*通信作者 Tel:86-015850790179; E-mail:zjzluck@126.com

蓝莓是一种小浆果,甜酸适口,为鲜食佳品,属杜鹃花科,越橘属植物。在我国东北长白山、大兴安岭和小兴安岭林区有大量的野生蓝莓^[1]。蓝莓富含糖类、萜类、氨基酸和大量多酚类等化合物,具有较高的营养价值和保健作用^[2]。近年来,对其活性成分的研究日益增多。与蓝莓的果实和花相比,蓝莓叶的酚类物质含量更高^[3]。目前蓝莓叶多酚在抗氧化能力^[4]、降血压、抑菌^[5]方面的研究较多,降血糖方面的研究很少。如今糖尿病已成为威胁人类健康的重大疾病之一^[6]。 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶能够促进口腔、胃、肠道对食物的分解,释放葡萄糖进入血液,使血糖水平升高^[7,8]。服用抑制剂类药物是目前治疗糖尿病的首选方式。市面上化学类药物容易引起胀气、消化不良等副作用^[9],从天然物质中提取抑制剂更具安全性。已有研究报道植物提取物中多酚类、萜类衍生物^[10]、多糖^[11]、苯丙素类化合物^[12]等具有良好的 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制活性。多酚在预防和治疗糖尿病方面具有很大的潜力,Liu 等^[13]表明绿茶提取物中多酚具有抑制作用,能够抑制肠道上皮细胞 Caco-2 对葡萄糖的摄取和转运。Sun 等^[14]通过分子对接,探究出多酚能够与 α -淀粉酶活性位点的氨基酸残基结合改变酶的分子构象,从而抑制其与底物结合。本文研究了蓝莓叶多酚对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制作用和抑制类型,为蓝莓叶相关产品的开发提供理论依据。

2 材料与方法

1.1 材料与仪器

蓝莓叶 2020 年 7 月采自溧阳白露山生态农业发展有限公司蓝莓基地;AB-8 大孔树脂(上海蓝季科技发展有限公司);无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司);盐酸(成都市科龙化工试剂有限公司);氢氧化钠、酸二氢钠、磷酸氢二钠、碳酸钠、葡萄糖、苯酚和可溶性淀粉(西陇化工股份有限公司);没食子酸、福林酚试剂、对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷(pNPG)和阿卡波糖(麦克林); α -淀粉酶(猪胰腺)(10 U/mg)和 α -葡萄糖苷酶(上海源叶生物科技有限公司)。

Epoch 酶标仪(美国 Bioteck 仪器有限公司);ML204/02 电子分析天平、FE28-Meter 台式 pH 计(梅特勒-托利多仪器有限公司);Deltal 2-24/LSC 冷冻干燥机(德国 Christ 公司);3k15 台式高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司);RE-2000A 旋转蒸发仪(上

海亚荣生化仪器厂);KQ2 200DB 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);DK-98-II A 电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 蓝莓叶酚类物质的提取

参照 Wu 等^[15]方法稍作改变,将新鲜蓝莓叶切片,按照料液比为 1:10(g/mL)加入酸化乙醇(含有 0.5% 盐酸的 80% 乙醇)匀浆 2 min,超声辅助提取 20 min,功率为 800 W,超声结束后 5 000 r/min 离心 10 min 收集上清液。上述提取方法提取三次后合并溶剂。经 40 °C 50 r/min 旋转蒸发浓缩,得到蓝莓叶多酚粗提物,将其冻干后-20 °C 避光保存。

1.2.2 总酚含量的测定

参照 Wu 等^[15]的方法,将蓝莓叶多酚冻干样配制成 1 mg/mL 溶液,取 0.1 mL 加入 0.3 mL 10% 乙醇稀释,再分别加入 2.0 mL 0.5 mol/L 福林酚试剂,摇匀,反应 4 min,随后加入 2 mL 75 g/L 的饱和碳酸钠,摇匀,室温下暗反应 2 h。用蒸馏水做空白对照,利用酶标仪在 760 nm 处测定吸光度。以没食子酸(GA)在 760 nm 处的吸光值绘制标准曲线,公式为 $y = 1.744x + 0.021 (R^2 = 0.990)$ 。 y 为蓝莓叶多酚粗提液的吸光值, x 表示总酚含量,mg GA / mg (DW),DW 为干重。

1.2.3 蓝莓叶酚类物质的纯化

采用 AB-8 大孔吸附树脂对蓝莓叶多酚粗提物进行纯化,将 100 mg 粗提物溶于 50 mL 酸化乙醇中,经 0.45 μ m 有机针膜过滤,按照 Ma^[16]方法进行纯化,合并洗脱液。在 40 °C 旋转蒸发,蒸发至 1/4 体积停止,倒出溶液,-20 °C 下冻结溶液,冷冻干燥 24 h,得到纯化后蓝莓叶多酚。

1.2.4 蓝莓叶多酚的鉴定

1.2.4.1 样品处理

将纯化后的蓝莓叶多酚冻干样用 80% 甲醇溶解,过 0.22 μ m 有机滤膜,采用 LC-MS 鉴定。

1.2.4.2 液相色谱-质谱法(LC-MS)成分鉴定

样品采用 LC-MS 体系(G2-XS QToF, Waters)进行分析。将 2 μ L 样品注入 UPLC 柱(2.1 mm × 100 mm ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 柱,含有 1.7 μ m 粒子),流速为 0.35 mL/min。流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液,流动相 B 为 0.1% 甲酸乙腈水溶液。采用以下梯度程序:5% 流动相 B,0.5 min;5% → 40% 流动相 B,20 min;40% → 95% 流动相 B,2 min;95% 流动相 B,2 min。

质谱分析采用电喷雾源,正离子模式。MSe 采集模式,选择质量范围 50~1 200 m/z。使用亮氨酸-脑啡肽 (m/z 556.277 1) 校准质量。电离参数为:毛细管电压 2.5 kV,样品锥 40 V,源温度 120 ℃,脱溶剂气体温度为 400 ℃。使用 Masslynx 4.1 和 Unifi 进行数据采集和处理。成分鉴定参照南京农业大学标准谱库,鉴定匹配度高于 80% 的化学成分。

1.2.5 α -淀粉酶抑制实验

将蓝莓叶多酚浓度配制为 2.5、5.0、7.5、10.0、12.5、15.0、17.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,阿卡波糖浓度配制为 0、

2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。按照 Tian^[17] 方法稍作改变,以阿卡波糖作为阳性对照,按照表 1 进行 α -淀粉酶抑制实验, α -淀粉酶抑制率按下列公式计算。根据抑制率与蓝莓叶多酚浓度关系,通过 GraphPad Prism 8 软件拟合计算半抑制浓度 IC₅₀ 值。

$$\text{抑制率} = \left(1 - \frac{OD_A - OD_a}{OD_B - OD_b}\right) \times 100\%$$

式中: OD_A 为实验组吸光值; OD_a 为实验空白组吸光值; OD_B 为对照组吸光值; OD_b 为空白组吸光值。

表 1 α -淀粉酶抑制活性测定

Table 1 Determination of α -amylase inhibitory activity

试剂 Reagent	实验组 Experimental group	实验空白组 Experimental blank group	对照组 Control group	空白组 Blank group
1.25 U/mL α -淀粉酶溶液	0.05	0	0.05	0
抑制剂	0.05	0.05	0	0
pH 6.9 0.02 mol/L 磷酸缓冲液	0	0.05	0.05	0.1
1% 淀粉溶液	0.1	0.1	0.1	0.1
DNS 试剂	0.4	0.4	0.4	0.4
37 ℃水浴 10 min 沸水浴 10 min 后冷却至室温,加 1 mL 蒸馏水稀释 540 nm 测吸光度				

1.2.6 α -葡萄糖苷酶抑制实验

将蓝莓叶多酚和阿卡波糖浓度配制为 2、4、6、8、10、12、14 $\mu\text{g}/\text{mL}$,按照 Tian^[17] 方法稍作改变,以阿卡波糖为阳性对照,按照表 2 进行 α -葡萄糖苷酶抑制实验, α -葡萄糖苷酶抑制率按下列公式计算。根据抑制率与蓝莓叶多酚浓度关系,通过 GraphPad

Prism 8 软件拟合计算半抑制浓度 IC₅₀ 值。

$$\text{抑制率} = \left(1 - \frac{OD_A - OD_a}{OD_B - OD_b}\right) \times 100\%$$

式中: OD_A 为实验组吸光值; OD_a 为实验空白组吸光值; OD_B 为对照组吸光值; OD_b 为空白组吸光值。

表 2 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定

Table 2 Determination of α -glucosidase inhibitory activity

试剂 Reagent	实验组 Experimental group	实验空白组 Experimental blank group	对照组 Control group	空白组 Blank group
pH 6.8 0.1 mol/L 磷酸缓冲液	0	0.05	0.05	0.10
抑制剂	0.05	0.05	0	0
1.26 U/mL α -葡萄糖苷酶	0.05	0	0.05	0
37 ℃水浴 10 min 37 ℃水浴 30 min 最后加入 1 mL 1 mol/L Na ₂ CO ₃ 溶液终止反应,400 nm 测吸光度				
6 mmol/L pNPG 试剂	0.10	0.10	0.10	0.10

1.2.7 蓝莓叶多酚稳定性研究

1.2.7.1 蓝莓叶多酚对温度的稳定性

将纯化后的蓝莓叶多酚配制成 0.02 mg/mL 溶液, 分别在 30、40、50、60、70、80、90 ℃ 水浴中保温 30 min, 迅速冷却至室温, 测其 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制活性, 以温度为横坐标, 以酶抑制活性为纵坐标, 绘制曲线。

1.2.7.2 蓝莓叶多酚对 pH 的稳定性

将纯化后的蓝莓叶多酚配制成溶液, 分别用不同 pH(2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12)的 PBS 缓冲液溶解后于 37 ℃ 保温 4 h, 用缓冲液回调 pH 至 6.8 和 6.9, 再将各个 pH 条件下处理的多酚稀释至相同浓度, 测定其对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制活性, 以 pH 为横坐标, 以酶抑制活性为纵坐标, 绘制曲线。

1.2.8 抑制作用类型研究

1.2.8.1 α -淀粉酶抑制动力学

将纯化后蓝莓叶多酚配制成浓度为 0.02、0.04、0.06、0.08 mg/mL 的溶液, α -淀粉酶溶液设置为 0、0.15、0.3、0.45、0.6、0.75、0.9、1.05 mg/mL。计算酶促反应速率, 绘制酶促反应速率与 α -淀粉酶浓度的关系图。

将可溶性淀粉配制成 0.25%、0.33%、0.5%、1.0%、2.0%, 计算不同底物浓度和不同浓度蓝莓叶多酚下的酶促反应速率。绘制 Lineweaver-Burk 双倒数曲线图和 Dixon 图, 分析确定蓝莓叶多酚对 α -淀粉酶的抑制类型。

1.2.8.2 α -葡萄糖苷酶抑制动力学

将纯化后蓝莓叶多酚配制成浓度为 0.005、0.010、0.015、0.020 mg/mL 的溶液, α -葡萄糖苷酶溶液设置为 0、0.506、1.012、1.26、1.518、2.024 U/mL。计算酶促反应速率, 绘制酶促反应速率与 α -葡萄糖苷酶浓度的关系图。

将 pNPG 配制成 2.5、3.3、5、10、20 mmol/L, 计算不同底物浓度和不同浓度蓝莓叶多酚下的酶促反应速率。绘制 Lineweaver-Burk 双倒数曲线图和 Dixon 图, 分析确定蓝莓叶多酚对 α -葡萄糖苷酶的抑制类型。

1.3 数据处理

由 Origin 2019 软件绘制, 所有实验重复测定 3 次, 采用 IBM SPSS Statistics 21.0 软件整理及统计分析。

2 结果与分析

2.1 纯化前后蓝莓叶多酚含量及抑制活性的变化

为确定纯化前后蓝莓叶多酚含量和抑制活性, 将纯化前后蓝莓叶提取物冻干样配制成相同浓度, 按照“1.2.2”“1.2.5”和“1.2.6”方法分别测定并计算纯化前后总酚含量、 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制活性的变化。通过图 1 蓝莓叶粗提物经纯化后的总酚含量可知纯化后蓝莓叶多酚纯度为 36%, 较纯化前提高了 44.00%, α -淀粉酶抑制率提高了 138.70%, α -葡萄糖苷酶抑制率提高了 12.42%。纯化前后对 α -淀粉酶抑制和 α -葡萄糖苷酶活性提升极显著($P < 0.01$), 同等浓度下蓝莓叶多酚对 α -葡萄糖苷酶抑制率高于 α -淀粉酶。接下来的实验选择对纯化后蓝莓叶多酚, 对其成分、温度和 pH 的稳定性、半抑制浓度 IC_{50} 值及其抑制类型进行探究。

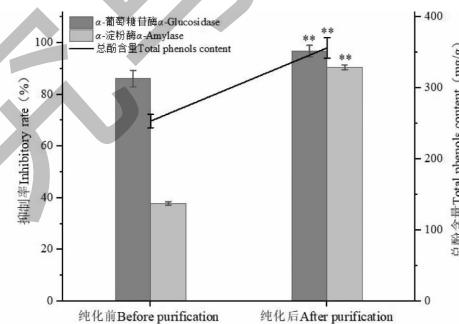


图 1 蓝莓叶多酚纯化前后总酚含量和抑制活性的变化

Fig. 1 Changes in content and inhibitory activity of polyphenols from blueberry leaves before and after purification

注: 纯化前后的样品相比较, ** $P < 0.01$ 。Note: Comparing samples before and after purification, ** $P < 0.01$.

2.2 蓝莓叶纯化后的多酚物质鉴定分析

从表 3 LC-MS 分析结果可以看出蓝莓叶提取物中多酚主要有绿原酸、5,6,7,3',4'-五氢化二异黄酮、槲皮素、原花青素、3'-羟基染料木素、槲皮素-4'-O-葡萄糖苷、1,5-二阿魏酰奎宁酸等 11 种多酚物质, 其中绿原酸含量最高。有研究表明, 绿原酸是蓝莓叶中含量最高的酚类物质^[18], 其中绿原酸、阿魏酸、槲皮素、原花青素等, 已被证明具有较强的 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制活性^[19]。由“2.1”结果可知蓝莓叶多酚提取物中总酚含量与对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制活性成正相关。结果表明, 蓝莓叶提取物中多酚类化合物是其抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的主要物质基础。

表 3 蓝莓叶提取物成分分析结果

Table 3 Analysis on phenolic composition of extracts from blueberry leaves

序号 No.	化合物名称 Compound	中性质量 Neutral quality(Da)	质荷比 <i>m/z</i>	保留时间 Retention time(min)	响应值 Response value
1	3'-羟基染料木素 3'-Hydroxygenistein	286.047 74	287.053	8.78	141 666
2	槲皮素 Quercetin	302.042 65	303.050 3	11.79	297 427
3	五氢化二异黄酮 5,6,7,3',4'-Pentahydroxyisoflavone	302.042 65	303.051 5	7.37	511 573
4	6-甲氧基藤黄素 Nepeitin	316.058 3	317.063 4	8.78	92 595
5	3-对香豆酰奎宁酸 3-p-Coumaroylquinic acid	338.100 17	339.104 7	4.94	84 807
6	新绿原酸 5-Caffeoylquinic acid	354.095 08	355.100 6	2.49	85 409
7	绿原酸 3-Caffeoylquinic acid	354.095 08	355.104	3.67	1 443 802
8	槲皮素 4'-O 葡萄糖苷 Quercetin 4'-O-glucoside	464.095 48	465.104 7	7.38	112 479
9	1,5-二阿魏酰奎宁酸 1,5-Diferuloylquinic acid	544.158 08	545.164 2	10.93	100 797
10	原花青素 B1 Procyanidin dimer B1	578.142 43	579.148 4	4.4	107 654
11	原花青素 B7 Procyanidin dimer B7	578.142 43	579.151 5	3.08	122 337

2.3 蓝莓叶多酚对温度的稳定性研究

由图 2 可知温度对蓝莓叶多酚抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制活性的影响趋势大致相同。当温度在 30 °C 和 40 °C 时, 蓝莓叶多酚对 α -淀粉酶的抑制率无显著性差异 ($P > 0.05$); 40 °C 之后随温度升高, 抑制率呈缓慢下降趋势, 80 °C 作用 30 min, 抑制剂活性较 40 °C 失去了 19.38%; 90 °C 作用 30 min 后, 蓝莓叶多酚完全失活。温度在 30 ~ 80 °C 时, 蓝莓叶多酚对 α -葡萄糖苷酶的抑制率呈下降趋势; 当温度在 80 °C 时, 相比 30 °C 抑制率失去了 14.75%; 90 °C 作用 30 min 后, 蓝莓叶多酚几乎完全失活。以上实验结果说明提取物中有效活性成分容易受高温影响发生氧化反应, 从而导致抑制率下降。

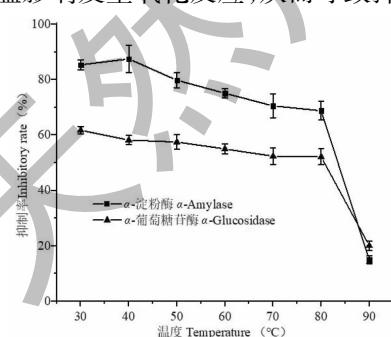


图 2 温度对蓝莓叶多酚抑制活性的影响

Fig. 2 Effect of temperature on inhibitory activity of polyphenols from blueberry leaves

蓝莓叶多酚对酶的抑制活性受温度影响较小。在 37 °C 具有较高的抑制活性, 说明其在人体内能够

保持良好的效果; 但当温度达到 90 °C 时对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制活性明显降低。在产品开发应用中应注意加工温度对其活性成分的影响, 不宜高温。

2.4 蓝莓叶多酚对 pH 的稳定性研究

由图 3 可知蓝莓叶多酚经 pH 2.0 ~ 8.0 环境处理后能够保持其对 α -淀粉酶的抑制活性, 抑制率都超过了 90%。当 pH > 8.0 时抑制率呈缓慢下降趋势, 当 pH 为 12.0 时抑制率骤降至 46.50%, 说明蓝莓叶多酚经过碱性条件处理后对 α -淀粉酶抑制活性影响较大。蓝莓叶多酚抑制 α -葡萄糖苷酶活性受 pH 的影响较大, pH 2.0 ~ 5.0 呈上升趋势, pH 5.0 时, 抑制率最大, 达到 73.06%。在 pH 5.0 之后, 随着 pH 升高, α -葡萄糖苷酶抑制率逐渐降低。pH 7.0 ~ 8.0 抑制率较 pH 7.0 骤降了 45.49%, pH 8.0 ~ 11.0 趋于稳定, pH 12.0 时完全失去抑制活性。

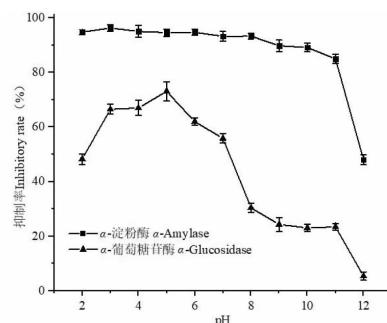


图 3 pH 对蓝莓叶多酚抑制活性的影响

Fig. 3 Effect of pH on inhibitory activity of polyphenols from blueberry leaves

性。蓝莓叶多酚经 pH 3.0~5.0 处理后,对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性比较稳定,在强酸和碱性条件下不稳定。

综上所述,蓝莓叶多酚在偏酸性条件下比较稳定,能够保持较高的抑制活性。而人体胃酸 pH 低于 2,肠道 pH 在 7.5 左右^[20],说明蓝莓叶多酚添加到食物中,在胃肠道消化环境下,仍能保持其抑制活性。在产品的开发研究中,将蓝莓叶多酚添加至酸性食品中,能够最大程度保持其功能活性。

2.5 蓝莓叶多酚对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制活性研究

由图 4 可以看出随着蓝莓叶多酚和阿卡波糖对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制作用随浓度增大而增大,且无限趋于 100%,这表明蓝莓叶多酚和阿卡波糖对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制作用与其活性成分含量有关。对其添加浓度(X)与抑制率(Y)之间的关系建立线性回归方程,并计算 IC_{50} 值(见表 4)。蓝莓叶多酚对 α -淀粉酶的 IC_{50} 值

(10.926 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 大于 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 值(7.276 $\mu\text{g}/\text{mL}$),表明蓝莓叶多酚对 α -葡萄糖苷酶的抑制率达到 50% 所需浓度低于对同等酶活下的 α -淀粉酶抑制率达到 50% 所需浓度,即在此范围内,蓝莓叶多酚对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性高于同等浓度的 α -淀粉酶的抑制活性。

阿卡波糖对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 值低于蓝莓叶多酚的,可知蓝莓叶多酚抑制效果不及阿卡波糖,这可能与蓝莓叶多酚提取纯度不高有关。由“2.1”结果可知,纯化后蓝莓叶多酚纯度为 36%,远低于阿卡波糖纯度(98%)。本文采用的纯化方法只粗略除去了水溶性杂质,而洗脱剂的选择、吸附流速、样品液浓度、洗脱流速等因素对纯化效果有一定的影响。为提高蓝莓叶多酚的体外降血糖活性,还需进一步优化纯化条件和方法。阿卡波糖应用于临床,患者服用此药物会有类似腹胀、腹泻的情况^[9]。而从蓝莓叶中提取的多酚是一种天然植物活性物质,用于降血糖食品药品研发更具安全性。

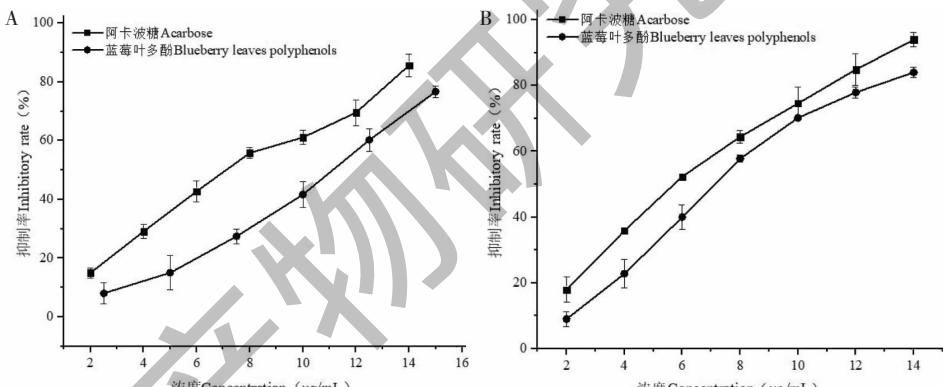


图 4 蓝莓叶多酚和阿卡波糖对 α -淀粉酶(A)和 α -葡萄糖苷酶(B)的抑制作用

Fig. 4 Inhibitory effects of blueberry leaf polyphenols and acarbose on α -amylase (A) and α -glucosidase (B)

表 4 蓝莓叶多酚和阿卡波糖对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制作用(IC_{50})比较

Table 4 Comparison of inhibitory activities (IC_{50}) of blueberry leaf polyphenols and acarbose on α -amylase and α -glucosidase

样品 Sample	α -淀粉酶 α -Amylase			α -葡萄糖苷酶 α -Glucosidase		
	线性回归方程 Linear regression equation	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		线性回归方程 Linear regression equation	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
蓝莓叶多酚 Blueberry leaf polyphenols	$Y = 5.633X - 11.089$ $R^2 = 0.9809$	10.926		$Y = 6.529X - 0.555$ $R^2 = 0.9723$	7.276	
阿卡波糖 Acarbose	$Y = 5.444X + 6.865$ $R^2 = 0.9845$	7.766		$Y = 6.225X + 10.770$ $R^2 = 0.9821$	6.200	

2.6 蓝莓叶多酚对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制类型

最后通过紫外光谱法研究了蓝莓叶多酚对 α -

淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制动力学,探究蓝莓叶多酚浓度、酶浓度与酶解速率之间的关系,判断抑制作用是否可逆。如图 5A 和 5D 所示,所有直线都基

本过原点。随着蓝莓叶多酚浓度增加,直线斜率逐渐下降,说明蓝莓叶多酚对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制作用是可逆性的^[21]。

为确定蓝莓叶多酚对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的可逆抑制类型,按照 Lineweaver-Burk 和 Dixon 双倒数曲线作图法,探究蓝莓叶多酚浓度、底物浓度与酶解速率之间的关系,确定抑制类型和抑制常数。由图 5B、5C、5E 和 5F 可知,反应体系中随着抑制剂浓度降低, α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的酶解反应速率明显升高。随着底物浓度的增加,酶解反应速率也在增加,并逐渐接近最大反应速率 V_{max} 。这一结果说明蓝莓叶多酚能够竞争底物,优先与酶相结合形成复合物,从而使酶失活^[22]。通过 Lineweaver-Burk 图监测米氏常数 K_m 和最大酶解速率 V_{max} 值的变化,斜率为 K_m 和 V_{max} 的比值,y 轴截距为 $1/V_{max}$ 值,直线斜率随蓝莓叶多酚浓度增大而增大。通过 Dixon 图可以看出随着蓝莓叶多酚浓度增大,x 轴截距减小,y 轴截距增大,即 V_{max} 值减小, K_m 增大。不同浓度多酚直线分别相交于第二象限和第三象限的一点,交点接近 y 轴,这种特征符合混合型抑制,蓝莓叶多酚属于混合型抑制剂。随着抑制剂浓度增

加,由于 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶被抑制改变了 V_{max} 和 K_m 值,表明蓝莓叶多酚对酶具有完整且单一的抑制位点或单一类别的抑制位点^[23],从而更容易与酶结合改变酶的活性中心构象,抑制 α -淀粉酶与淀粉生成葡萄糖, α -葡萄糖苷酶与对硝基苯酚- α -D-葡萄糖苷(pNPG)生成葡萄糖和对硝基苯酚(pNP)。这与阿卡波糖对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制效果是相同的^[24]。根据 Zhang^[25] 中所述,Lineweaver-Burk 图中交点横坐标绝对值为竞争性抑制常数 K_{ic} 值,而 Dixon 图中交点横坐标绝对值为非竞争性抑制常数 K_{iu} 。通过计算得出蓝莓叶多酚对 α -淀粉酶的 K_{ic} 为 1.041 5 mg/mL, K_{iu} 为 0.150 4 mg/mL。对 α -葡萄糖苷酶的 K_{ic} 为 0.222 9 mg/mL, K_{iu} 为 0.004 1 mg/mL。其竞争性常数 > 非竞争性常数,说明蓝莓叶多酚对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶都是竞争性大于非竞争性的混合可逆性抑制类型。而 K_{ic} 和 K_{iu} 值越低,1/ K_{ic} 和1/ K_{iu} 值越高,表明抑制剂与酶的结合越强。 α -淀粉酶的 K_{ic} 和 K_{iu} 值比 α -葡萄糖苷酶的高,则说明蓝莓叶多酚与 α -葡萄糖苷酶结合力比 α -淀粉酶结合力强。

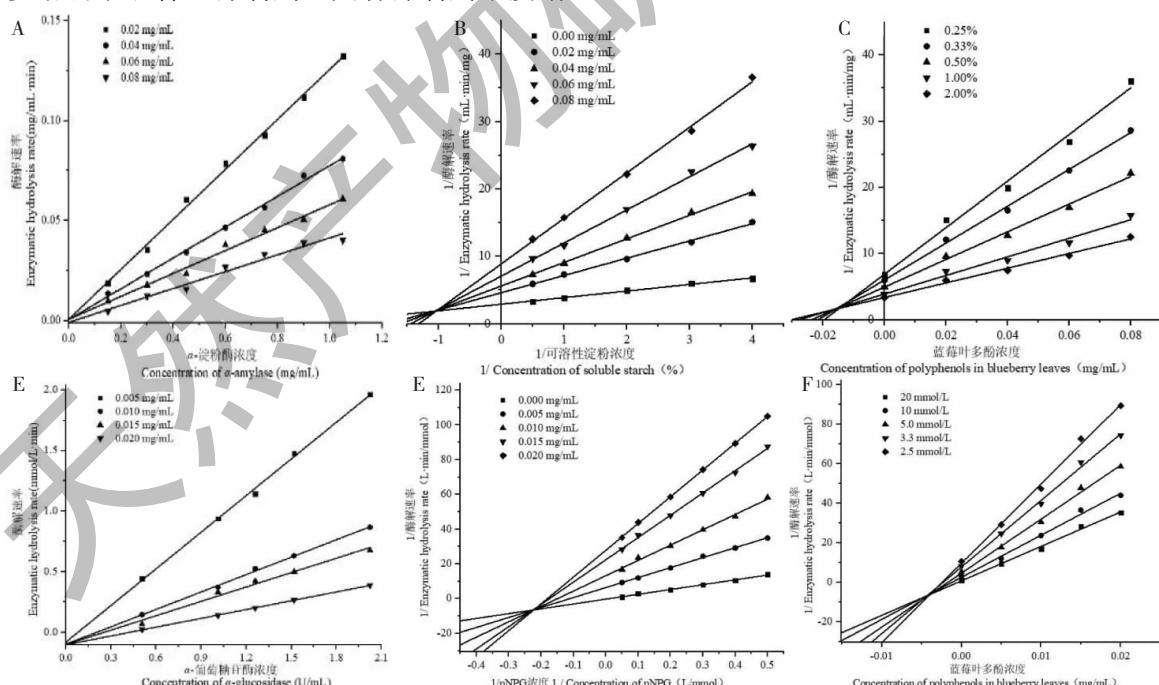


图 5 蓝莓叶多酚对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制动力学

Fig. 5 Enzyme kinetics of α -amylase and α -glucosidase influenced by blueberry leaf polyphenols

注:A ~ C 和 D ~ F 分别表示 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的酶解速率、Lineweaver-Burk 和 Dixon 曲线。Notes: A-C and D-F represented the enzymatic hydrolysis rates, Lineweaver-burk double inverted curves and Dixon curves of α -amylase and α -glucosidase, respectively.

3 结论

本文研究的蓝莓叶多酚提取物中主要成分有绿原酸、 $5,6,7,3',4'$ -五氢化二异黄酮、槲皮素、原花青素等。体外降血糖活性评价显示,蓝莓叶多酚具有较好的 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制作用,且抑制活性与总酚含量成正相关。通过探究温度和pH对蓝莓叶多酚抑制活性的影响,可知蓝莓叶多酚在低温($30\sim50^{\circ}\text{C}$)和偏酸性(pH 2.0~8.0 和 3.0~5.0)环境下比较稳定,能够保持较高的 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制活性。蓝莓叶多酚对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的半抑制浓度 IC_{50} 分别为10.926和7.276 $\mu\text{g}/\text{mL}$,此外动力学研究结果,发现其对两个酶的抑制类型均为竞争性大于非竞争性的混合性可逆抑制。

综上所述,蓝莓叶中多酚含量丰富,具有较好的体外 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制作用,揭示了蓝莓叶多酚具有潜在的降血糖作用,为蓝莓叶相关产品研发提供了一定的理论基础。

参考文献

- Tan MH, Yu LM, Gao LX, et al. Suggestions on blueberry product development and future development in China [J]. Storage Process(保鲜与加工), 2021, 21(5): 146-150.
- Zhou L, Xie MH, Yang F, et al. Antioxidant activity of high purity blueberry anthocyanins and the effects on human intestinal microbiota [J]. LWT-Food Sci Technol, 2020, 117: 108621.
- Li XY, Xue M, Fan WQ. Comparison of antioxidant activity and phenolic contents of blueberry flowers, stems and leaves [J]. Food Sci(食品科学), 2017, 38(3): 142-147.
- Yan HG, Li L, Yang Q, et al. Phenolic compounds and antioxidant activity of blueberry leaf [J]. Food Sci Technol(食品科技), 2018, 43(10): 285-288.
- Silva S, Costa EM, Veiga M, et al. Health promoting properties of blueberries: a review [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2020, 60: 181-200.
- He BQ, Zhang YY, Zhuang YB, et al. α -Glucosidase inhibitory activity of the extracts from *Tadehagi triquetrum* [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2020, 32: 2026-2030.
- Yang XQ, Sun JM, Wu N, et al. Inhibitory effects of extracts from different parts of maize on α -glucosidase and α -amylase [J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2021, 42(1): 15-21.
- Bharadwaj RP, Raju NG, Chandrashekaraiah KS. Purification and characterization of alpha-amylase inhibitor from the seeds of underutilized legume, *Mucuna pruriens* [J]. J Food Biochem, 2018, 42(6): 12686.
- Cao J, Zhang Y, Han L, et al. Both galloyl moiety number and molecular flexibility are important to alpha-amylase inhibition by galloyl-based polyphenols [J]. Food Funct, 2020, 11: 3838-3850.
- Fan MC, Lian WJ, Li TT, et al. Characterization of promising natural blue pigment from *Vaccinium bracteatum* Thunb. leaves: Insights of the stability and the inhibition of α -amylase [J]. Food Chem, 2020, 326(2): 126962.
- Su T, Xiao C, He H, et al. Inhibitory effects of crude polysaccharide of green brick tea on α -glucosidase activity [J]. Food Sci Technol(食品科技), 2019, 44(3): 194-199.
- Liu L, Zou M, Yin Q, et al. Phenylpropanoids from *Liparis nervosa* and their *in vitro* antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities [J]. Med Chem Res, 2021, 30: 1005-1010.
- Liu SY, Ai ZY, Qu FF, et al. Effect of steeping temperature on antioxidant and inhibitory activities of green tea extracts against α -amylase, α -glucosidase and intestinal glucose uptake [J]. Food Chem, 2017, 234(1): 168-173.
- Sun LJ, Wang YY, Miao M. Inhibition of α -amylase by polyphenolic compounds: substrate digestion, binding interactions and nutritional intervention [J]. Trends Food Sci Technol, 2020, 104: 190-207.
- Wu H, Chai Z, Hutabarat RP, et al. Blueberry leaves from 73 different cultivars in southeastern China as nutraceutical supplements rich in antioxidants [J]. Food Res Int, 2019, 122: 548-560.
- Ma RY. Study of the preparation and property of polysaccharide from red pulp pitaya stem [D]. Hainan: Hainan University(海南大学), 2018.
- Tian JL, Si X, Wang YH, et al. Bioactive flavonoids from *Rubus corchorifolius* inhibit α -glucosidase and α -amylase to improve postprandial hyperglycemia [J]. Food Chem, 2020, 341(1): 128149.
- Hua L, Hmp A, Hsj A, et al. Phenolic-enriched blueberry-leaf extract attenuates glucose homeostasis, pancreatic β -cell function, and insulin sensitivity in high-fat diet-induced diabetic mice [J]. Nutr Res, 2020, 73: 83-96.
- Prasad BJ, Sharavanan PS, Sivaraj R. Efficiency of *Oryza punctata* extract on glucose regulation: inhibition of α -amylase and α -glucosidase activities [J]. Grain Oil Sci Technol, 2019, 2(2): 44-48.
- Burgos-Edwards A, Martin-Perez L, Jimenez-Aspee F, et al. Anti-inflammatory effect of polyphenols from Chilean currants (*Ribes magellanicum* and *R. punctatum*) after *in vitro* gastro-

- intestinal digestion on Caco-2 cells; Anti-inflammatory activity of *in vitro* digested Chilean currants [J]. J Funct Foods, 2019, 59:329-336.
- 21 Liu SW, Yu JC, Guo S, et al. Inhibition of pancreatic α -amylase by *Lonicera caerulea* berry polyphenols *in vitro* and their potential as hyperglycemic agents [J]. LWT-Food Sci Technol, 2020, 126:109288.
- 22 Kato-Schwartz CG, Corrêa RCG, Lima DDS, et al. Potential anti-diabetic properties of Merlot grape pomace extract: an *in vitro*, *in silico* and *in vivo* study of α -amylase and α -glucosidase inhibition [J]. Food Res Int, 2020, 137:109462.
- 23 Cardullo N, Muccilli V, Pulvirenti L, et al. C-glucosidic ellagitannins and galloylated glucoses as potential functional food ingredients with anti-diabetic properties: a study of α -glucosidase and α -amylase inhibition [J]. Food Chem, 2019, 313:126099.
- 24 Dong Q, Tan L, Hu N, et al. Study on the optimization of the extraction technology by response surface methodology and inhibitory activity of α -glucoside of total saponins from the bran of the bran of *Chenopodium quinoa* Willd [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2021, 33:935-942.
- 25 Zhang JT, Sun LJ, Dong YS, et al. Chemical compositions and α -glucosidase inhibitory effects of anthocyanidins from blueberry, blackcurrant and blue honeysuckle fruits [J]. Food Chem, 2019, 299(30):125102.

萝卜硫素可通过 AMPK/Nrf2 途径调控铁死亡预防糖尿病心肌病

随着糖尿病的发病,全身性增加的葡萄糖水平增加了心脏细胞外基质中晚期糖基化终产物的产生,心肌细胞的代谢转变增加了脂肪酸的利用,导致细胞内脂质积累并产生了相关的脂毒性。晚期糖基化终产物积累和细胞内脂质积累都会导致活性氧和氮物质的过量产生,从而引发糖尿病性心肌病。铁死亡是一种非凋亡形式的调节性细胞死亡,由以铁依赖性方式过量产生的磷脂氢过氧化物诱导,在糖尿病心肌病发病机制中是否起关键作用还有待进一步的验证。

来自路易斯维尔大学医学院的 Lu Cai 及其团队研究了 AMP 活化蛋白激酶(AMPK)/核因子红细胞 2 相关因子(Nrf2)通路在调节糖尿病心肌病铁死亡中的潜在机制,并对天然活性化合物萝卜硫素的抗糖尿病心肌病作用进行了研究。结果显示,铁死亡在糖尿病性心肌病的发病机制中起着至关重要的作用。萝卜硫素激活的 Nrf2 通过上调铁蛋白和 SLC7A11 水平抑制晚期糖基化终产物诱导的工程心脏组织和糖尿病性心肌病小鼠心脏中的心脏细胞铁死亡,实验还证明萝卜硫素对铁死亡的保护作用是 AMPK 依赖性的,这表明萝卜硫素治疗糖尿病性心肌病是一种可行的方法。相关研究发表在《Acta Pharmaceutica Sinica B》杂志上。

胡乃华编译自:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8897044>

原文标题:Ferroptosis is essential for diabetic cardiomyopathy and is prevented by sulforaphane via AMPK/Nrf2 pathways