

橡实不同极性萃取物对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制作用研究于聪聪^{1,2}, 姚玉阳^{1,2}, 耿雪莹¹,
苗启明¹, 郭俊霞^{1,2}, 张艳贞^{1,2}, 米生权^{1,2*}¹北京联合大学健康与环境学院; ²北京联合大学生物活性物质与功能食品(北京市)重点实验室, 北京 100021

摘要:探索橡实不同极性萃取物对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制作用。采用 40% 乙醇和纤维素酶组合提取, 石油醚、乙酸乙酯依次萃取分离, 获得橡实粗提物、石油醚相、乙酸乙酯相、萃余水相。通过测定酶抑制作用, 研究各极性萃取物的体外降糖活性, 并利用高效液相色谱(HPLC)和分子对接实验验证各提取物可能的活性成分。结果表明:橡实不同极性萃取物对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶均有明显的抑制作用, 其中乙酸乙酯相抑制效果最佳, 其对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶 IC_{50} 分别为 1.590 ± 0.073 mg/g、 3.927 ± 0.019 ($\times 10^{-3}$ mg/g); 通过 HPLC 含量测定发现乙酸乙酯相中 6 种活性成分含量最高, 鞣花酸含量为 500.75 ± 6.93 mg/g, 高于其他组分 10~50 倍; 分子对接结果表明只有鞣花酸与 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶有良好的结合活性。以上结果表明, 鞣花酸可能是橡实乙酸乙酯萃取物抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的主要活性成分。

关键词:橡实; 极性萃取物; α -淀粉酶; α -葡萄糖苷酶; HPLC

中图分类号: R282.6; TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022)11-1838-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.11.004

Inhibitory effects of different polar extracts of acorns on α -amylase and α -glucosidase

YU Cong-cong^{1,2}, YAO Yu-yang^{1,2}, GENG Xue-ying¹,
MIAO Qi-ming¹, GUO Jun-xia^{1,2}, ZHANG Yan-zhen^{1,2}, MI Sheng-quan^{1,2*}¹School of Health and Environment, Beijing Union University; ²Beijing Key Laboratory of Bioactive Substances and Functional Food, College of Biochemical Engineering, Beijing Union University, Beijing 100021, China

Abstract: To explore the inhibitory effects of different polar extracts of acorns on α -amylase and α -glucosidase. 40% ethanol and cellulase were combined for extraction, followed by extraction and separation with petroleum ether and ethyl acetate to obtain crude acorn extract, petroleum ether phase, ethyl acetate phase and raffinate water phase. The *in vitro* hypoglycemic activity of each polar component was studied by measuring enzyme inhibition, and the possible active components of each extract were verified by high performance liquid chromatography (HPLC) and molecular docking assay. The results showed that the all extracts of different polarities of acorn had obvious inhibitory effects on α -amylase and α -glucosidase, and the ethyl acetate phase had the best inhibitory effect ($IC_{50} = 1.590 \pm 0.073$ mg/g and 3.927 ± 0.019 ($\times 10^{-3}$ mg/g), respectively). It was found by the HPLC content assay that the content of 6 active ingredients in the ethyl acetate phase was the highest, and the content of ellagic acid was 500.75 ± 6.93 mg/g, which was 10-50 times higher than that of other components. Molecular docking results showed that only ellagic acid had good binding activity with α -amylase and α -glucosidase. The above results indicate that ellagic acid may be the main active component of acorn ethyl acetate extract to inhibit α -amylase and α -glucosidase.

Key words: acorn; polar extract; α -amylase; α -glucosidase; HPLC

2 型糖尿病 (T2DM) 是以餐后高血糖为特征的慢性代谢类疾病, 其碳水化合物、蛋白质、脂质代谢

异常, 导致血糖水平失控^[1]。临床研究发现 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制剂能够抑制餐后葡萄糖峰值, 延缓碳水化合物的消化, 减少葡萄糖水平的吸收^[2,3]。 α -淀粉酶抑制剂可作为碳水化合物的阻滞剂, 限制胃肠道饮食的消化率, 减少碳水化合物的摄

收稿日期: 2022-06-22

接受日期: 2022-09-19

基金项目: 北京联合大学人才强校优选计划 (BPHR2017CZ03)

* 通信作者 Tel: 86-013811326772; E-mail: msq365@hotmail.com

人和吸收^[4]。 α -葡萄糖苷酶抑制剂主要通过可逆占据酶与底物的结合位点,从而减少多糖的降解,延缓肠道对碳水化合物的吸收,最终达到降糖作用^[5,6]。因此, α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制剂被认为是高血糖预防性治疗的有效手段。然而,目前临床合成 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制剂仅限于阿卡波糖、米格列醇和伏格列波糖,虽然这些抑制剂能够延缓葡萄糖的吸收,但其在预防治疗过程中通常都伴有一定的副作用,如腹胀、腹泻、腹痛等^[7,8]。寻求具有更高效、更少副作用影响的抑制剂成为目前的研究热点。来自植物的天然酶抑制剂因其具有较少副作用和较高活性功能而被人们重点关注。

橡实是全皮栎和麻栎的果实,广泛分布于我国辽宁、河北、陕西等地,因其含有大量鞣质而被人们广泛关注。随着研究的不断深入,发现橡实含多种生物活性物质,如蛋白质、纤维素、黄酮类物质、多酚类物质等,具有较强的抗氧化、抗炎、抑菌、抗肿瘤和抗衰老作用,能够降低心血管疾病、糖尿病和微生物感染的发病风险^[9-12]。本文以全皮栎野生橡实为材料,研究其不同极性萃取物对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用,通过福林酚法、HPLC 法和分子对接技术追踪活性组分,推测橡实活性组分中的主要活性成分,以期为橡实降糖功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

全皮栎野生橡实; α -葡萄糖苷酶(1 kU/13.4 mg)、 α -淀粉酶(3700 U/g)、(4-硝基苯基)- α -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)、DNS 试剂、阿卡波糖(北京索莱宝科技有限公司);可溶性淀粉(MW = 342.3)、无水乙醇、色谱级甲醇、乙酸(鼎国有限公司);纤维素酶(10 000 U/g,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);鞣花酸(批号: B21073)、没食子酸(批号: B20851)、绿原酸(批号: B20782)、阿魏酸(批号: B20007)、原儿茶酸(批号: B21614)、(+)-儿茶素(批号: B21722)(纯度均为 HPLC \geq 98%,上海源叶生物科技有限公司)。

Y1-050ST 型超声清洗机(河北德科机械科技有限公司);UV-2550 型紫外分光光度计(日本岛津公司);DHG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海浦东荣丰科技仪器有限公司),RE52CS 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);HW-SY11-K 型电热恒温水浴锅(北京市长风仪器仪表公司);Agilent Techno-

logies 1200 Series 高效液相色谱仪、Diamondsil C₁₈ 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm \times 5 μ m,美国安捷伦公司)。

1.2 橡实不同极性萃取物的制备

将新鲜的橡实用清水洗净,用电热鼓风干燥机于 45 $^{\circ}$ C 干燥 48 h,去壳、去皮,粉碎过 80 目筛。

纤维素酶-超声辅助提取:准确称取 5.0 g 橡实粉末于三角瓶中,与 40% 乙醇溶液按料液比 1:20 g/mL 混合,加入纤维素酶(4 mg/mL),pH 调至 5,置于超声波清洗仪中。超声条件为 270 W 和 30 min。超声结束后在 100 $^{\circ}$ C,水浴 5 min,使酶灭活。旋转蒸发浓缩,最后用真空冷冻干燥机于 -50 $^{\circ}$ C 干燥 24 h 直至变成粉末状,密封 4 $^{\circ}$ C 下冷藏保存备用,即获得橡实粗提物。

不同极性萃取物的制备:将上述粗提物用蒸馏水溶解,按 1:1 的比例用石油醚萃取 3 次,得到石油醚相和水相一。水相一继续按以 1:1 的比例用乙酸乙酯萃取 3 次,得到乙酸乙酯相和萃余水相。旋转蒸发浓缩各萃取相,最后用真空冷冻干燥机于 -50 $^{\circ}$ C 干燥 24 h 直至变成粉末状,密封 4 $^{\circ}$ C 下冷藏保存备用,即获得石油醚相、乙酸乙酯相、萃余水相。

1.3 不同极性组分对 α -淀粉酶活性的影响

在 96 孔板中加入 50 μ L 不同浓度的样品或阿卡波糖(1、2、3、4、5、6、7、8 和 9 mg/mL),再加入 50 μ L 的 1.5% (W/V) 淀粉溶液,37 $^{\circ}$ C 水浴 10 min;再加入 10 μ L 含 α -淀粉酶溶液(0.5 mg/mL)的 0.02 mol/L PBS 缓冲溶液(pH = 6.9),37 $^{\circ}$ C 水浴 10 min;最后加入 20 μ L DNS 试剂,95 $^{\circ}$ C 水浴 8 min,冷却后用酶标仪在 540 nm 下测吸光度。用缓冲液代替酶溶液作为空白,用缓冲液代替样液作为对照。按公式(1)计算酶活抑制率及 IC₅₀ 值。

$$\text{抑制率} = \left(1 - \frac{A_3 - A_4}{A_1 - A_2}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中: A_1 为不含样品含有酶的吸光度, A_2 为不含样品不含酶的吸光度, A_3 为含有样品含有酶的吸光度, A_4 为含有样品不含酶的吸光度。

1.4 不同极性组分对 α -葡萄糖苷酶活性的影响

在 96 孔板中加入 50 μ L PBS 缓冲液(pH = 6.9)、20 μ L 样品或阿卡波糖(0、1、2、4、6、8、10、20、30、40、50 μ g/mL)、20 μ L 4-硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷(5 mmol/L),在 37 $^{\circ}$ C 反应 10 min,加入 10 μ L α -葡萄糖苷酶(0.1 U/mL),37 $^{\circ}$ C 再反应 10 min,加入 10 μ L 0.02 mol/L Na₂CO₃ 溶液终止反应,用酶标仪在 405 nm 下测吸光度。用 PBS 缓冲液(pH =

6.9) 代替酶溶液作为空白,用 PBS 缓冲液(pH = 6.9)代替样液作为对照。按公式(1)计算酶活抑制率及 IC_{50} 值。

1.5 多酚含量的测定

利用 Folin-酚试剂比色法测定总多酚含量。标准曲线的制作:以没食子酸作为标准样品,配制 0.1 mg/mL 的没食子酸标准母液。取 6 只 10 mL 容量瓶,精密吸取 0 (空白)、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 没食子酸标准母液于 10 mL 容量瓶中,分别加入 20% 福林酚试剂 1.0 mL,混匀,加入 15% Na_2CO_3 溶液 2.0 mL,混匀,加水定容、摇匀。反应静置 60 min 后测定 765 nm 处吸光度值。以标准溶液浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线。得线性回归方程为: $Y = 6.1043X + 0.0083$ ($r^2 = 0.9959$)。没食子酸在 0 ~ 10 mg/mL 范围内与吸光度有良好的线性关系。

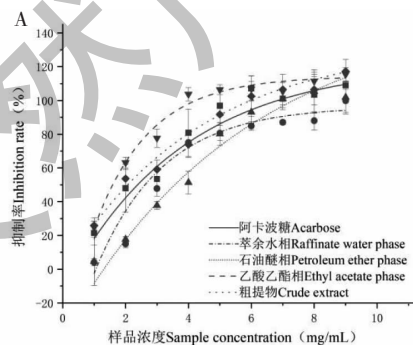
样品中多酚含量测定。取 0.2 mL 样品试液于 10 mL 容量瓶中,加入 20% 福林酚试剂 1.0 mL,加 5 mL 蒸馏水,混匀;加入 15% Na_2CO_3 溶液 2.0 mL,混匀,加水定容,摇匀。反应静置 60 min 后测定 765 nm 处吸光度值。按公式(2)计算橡胶各极性组分中的总多酚含量。

$$Y(\text{mg/g}) = \frac{C \times V \times n}{W} \quad (2)$$

Y : 提取物中多酚的含量, mg/g; C : 标准曲线查得的样品质量浓度, $\mu\text{g/mL}$; V : 样品溶液测定时的体积, mL; n : 样品稀释倍数; W : 测定样品质量, g。

1.8 HPLC 分析条件

Diamonsil- C_{18} 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5.0



μm); 进样量 10 μL ; 流速 1 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; DAD 检测波长: 280 nm; 流动相: B 相为 0.1% 乙酸水溶液, A 相为甲醇。梯度洗脱条件: 0 ~ 10 min, 86% B; 10 ~ 42 min, 86% B; 42 ~ 56 min, 60% B; 56 ~ 70 min, 50% B; 70 ~ 80 min, 30% B; 80 ~ 85 min, 86% B。

1.7 分子对接虚拟筛选

准备好靶点蛋白(α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶)、小分子(没食子酸、原儿茶酸、(+)-儿茶素、绿原酸、阿魏酸、鞣花酸)和 AutoDockTools 1.5.6 软件。靶点蛋白从 PDB 数据库(<https://www.resb.org/>)中搜索相应的靶点并选取蛋白保存为 PDB 格式,小分子从 PubChem 平台(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)查找,下载 SDF 格式。将小分子化合物运用 Open Babel 软件将 SDF 格式转化为 PDB 格式。运行 AutoDockTools 1.5.6 软件进行加氢、计算电荷等操作,并保存为 PDBQT 格式,导入 Pymol 软件进行分子对接。

1.8 数据处理

试验处理平行测定 3 次,数据以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s, n = 3$) 表示,采用 Excel 软件进行数据处理,采用 Origin 2021 软件绘图。

2 结果

2.1 不同极性组分对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性的影响

橡胶不同极性组分和阿卡波糖阳性对照组对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性的影响结果见图 1。

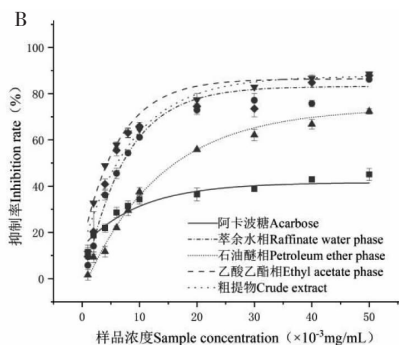


图 1 不同极性组分对 α -淀粉酶(A)和 α -葡萄糖苷酶(B)活性的影响

Fig. 1 Effect of different polar components on the- α -amylase (A) and- α -glucosidase (B) activities

随着样品浓度的增加,粗提物、乙酸乙酯相、萃余水相、石油醚相对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性抑制率不断增加。当乙酸乙酯相浓度大于 4 mg/mL

时, α -淀粉酶完全被抑制;当乙酸乙酯相浓度大于 0.015 mg/mL 时, α -葡萄糖苷酶的抑制作用趋于稳定。

通过曲线拟合后得出各极性组分对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的半数抑制浓度 IC_{50} 值如表 1 所示。

表 1 不同极性组分对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 值

Table 1 IC_{50} values of different polar components for α -amylase and α -glucosidase

样品 Sample	IC_{50}	
	α -淀粉酶 (mg/mL)	α -葡萄糖苷酶 ($\times 10^{-3}$ mg/mL)
阿卡波糖 Acarbose	2.191 \pm 0.450 ^a	-
粗提物 Crude extract	1.971 \pm 0.264 ^b	5.506 \pm 0.017 ^a
乙酸乙酯相 Ethyl acetate phase	1.590 \pm 0.073 ^c	3.927 \pm 0.019 ^b
萃余水相 Raffinate water phase	3.128 \pm 0.106 ^d	7.865 \pm 0.016 ^c
石油醚相 Petroleum ether phase	3.518 \pm 0.064 ^e	15.500 \pm 0.086 ^d

注:同一列不同字母表示在统计学上具有显著差异 ($P < 0.05$)。

Note: Different letters in the same column indicate a statistically significant difference ($P < 0.05$).

各极性组分对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性抑制强度依次为乙酸乙酯相 > 粗提物 > 阿卡波糖 > 萃余水相 > 石油醚相。与阿卡波糖相比,乙酸乙酯相和粗提物对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制能力较强,说明橡实中的有效活性成分被富集在了乙酸乙酯相,且其具有较强的 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性抑制效果。

2.2 总酚含量测定结果

利用 Folin-酚试剂比色法测得各极性组分总酚含量如表 2 所示。

结果显示,多酚类物质在乙酸乙酯相中具有较好的富集效果,且多酚含量与酶抑制活性成正比。可推测橡实提取物抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的活性成分很有可能是多酚类物质。

2.3 HPLC 含量测定结果

6 种标准品的 HPLC 色谱图见图 2,回归方程见

表 2 橡实不同极性萃取物的总酚含量

Table 2 Total phenolic content in acorn with different polar extracts

样品 Sample	含量 Content (mg/g)
粗提物 Crude extract	402.13 \pm 11.79 ^a
乙酸乙酯相 Ethyl acetate phase	753.23 \pm 32.18 ^b
萃余水相 Raffinate water phase	252.44 \pm 4.00 ^c
石油醚相 Petroleum ether phase	121.62 \pm 3.20 ^d

注:同一列不同字母表示在统计学上具有显著差异 ($P < 0.05$)。

Note: Different letters in the same column indicate a statistically significant difference ($P < 0.05$).

表 3。依次建立 HPLC 方法测定各极性组分中的活性成分,测定结果见表 4。乙酸乙酯相的 HPLC 结果和 6 种多酚类物质在各极性组分含量比较见图 3。

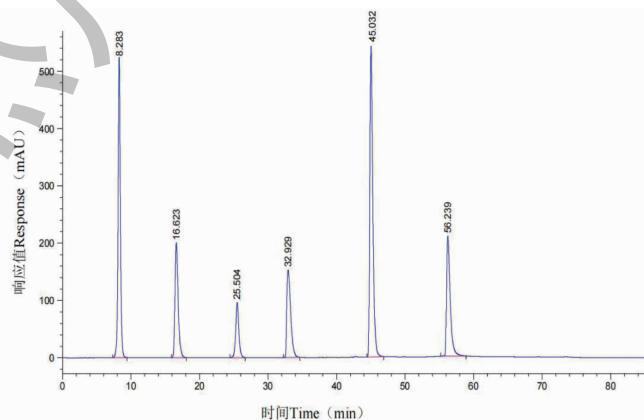


图 2 混合标准溶液 HPLC 图

Fig. 2 HPLC map of mixed standard solution

注:从左到右:没食子酸、原儿茶酸、(+)-儿茶素、绿原酸、阿魏酸、鞣花酸。Note: From left to right: gallic acid, procatechin acid, (+)-catechin, chlorogenic acid, ferulic acid, ellagic acid.

表3 6种酚类标准品的回归方程及线性范围

Table 3 The regression equations and linear ranges of 6 phenolic standards

成分 Compound	保留时间 Retention time (min)	回归方程 Regression equation	相关系数 r^2
没食子酸 Gallic acid	8.283	$y = 57\ 844x + 726.59$	0.996 6
原儿茶酸 Protocatechuic acid	16.627	$y = 15\ 329x + 469.9$	0.996 4
(+)-儿茶素 (+)-Catechin	25.498	$y = 7\ 084.8x + 229.01$	0.996 3
绿原酸 Chlorogenic acid	33.037	$y = 14\ 494x + 393.53$	0.996 5
阿魏酸 Ferulic acid	45.051	$y = 76\ 491x + 1347.9$	0.996 1
鞣花酸 Ellagic acid	56.306	$y = 7\ 945.1x + 948.43$	0.990 4

表4 各极性组分中6种多酚化合物的含量测定结果

Table 4 Results of six polyphenolic compounds in each polar component

样品 Sample	含量 Content (mg/g)					
	没食子酸 Gallic acid	原儿茶酸 Protocatechuic acid	(+)-儿茶素 (+)-Catechin	绿原酸 Chlorogenic acid	阿魏酸 Ferulic acid	鞣花酸 Ellagic acid
乙酸乙酯相 Ethyl acetate phase	10.61 ± 0.58 ^a	1.90 ± 1.77 ^a	4.88 ± 2.68 ^a	12.84 ± 2.74 ^a	0.36 ± 0.33 ^a	500.75 ± 6.93 ^a
萃余水相 Raffinate water phase	0.10 ± 0.08 ^b	7.15 ± 0.64 ^b	2.91 ± 0.66 ^b	0.15 ± 0.95 ^b	1.52 ± 0.03 ^b	9.90 ± 0.34 ^b
石油醚相 Petroleum ether phase	1.22 ± 0.26 ^c	5.74 ± 1.32 ^c	2.91 ± 2.51 ^c	1.21 ± 1.29 ^c	1.38 ± 0.09 ^c	23.00 ± 7.44 ^c
粗提物 Crude extract	1.02 ± 0.31 ^d	6.61 ± 1.43 ^d	1.74 ± 0.99 ^d	3.02 ± 1.50 ^d	1.11 ± 0.20 ^d	46.39 ± 6.43 ^d

注:同一列不同字母表示在统计学上具有显著差异($P < 0.05$)。

Note: Different letters in the same column indicate a statistically significant difference ($P < 0.05$).

由以上数据可知,各极性组分中均含有这6种化合物,可能是由于液液萃取不彻底,导致6种化合物存在于各极性组分。另外,乙酸乙酯相中的活性成分含量最高,其对没食子酸、绿原酸和鞣花酸的富集效果最好,含量分别为10.61 ± 0.58、12.84 ± 2.74和500.75 ± 6.93 mg/g。鞣花酸在各极性组分中的含量最高,是粗提物的10.79倍、石油醚相的21.77倍、萃余水相的50.58倍。乙酸乙酯相中鞣花酸的响应值可达1 000 mAU以上,而其余各成分响应值均小于300 mAU。因此,可推测鞣花酸是乙酸乙酯相中的主要活性成分,且此HPLC方法能够很好地检测鞣花酸的含量。

2.4 分子对接虚拟筛选结果

根据上述实验测定结果可知,乙酸乙酯相中活性成分含量最高,且活性最好。因此,将“2.3”中发现的乙酸乙酯相富集效果最好的3种化合物作为对接对象,分别与 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶进行对接打分。结果发现鞣花酸具有最低结合能,且通过

TCMSP数据库虚拟筛选发现只有鞣花酸满足口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$,类药性(drug-likeness, DL) ≥ 0.18 (见表5)。因此可以认为鞣花酸与 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶有较强的结合作用,是橡实中有效的活性成分。鞣花酸分别与 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的对接结果图见图4。结果表明,鞣花酸与 α -淀粉酶中的ARG-20、GLU-78、THR-114氨基酸残基形成氢键,与 α -葡萄糖苷酶中的HIS-382、GLN-380、ALA-417、ASP-27氨基酸残基形成氢键,结合效果好,结构稳定。因此,进一步确定鞣花酸在橡实提取物活性研究中占有主导地位。

3 讨论与结论

目前,对植物提取物的药理活性研究主要集中在抑菌、抗氧化和抗肿瘤等方面。Ayele等^[13]收集了6个不同地点的巴豆植物根,研究发现其提取物具有较强的抗氧化活性,其对肺炎葡萄球菌、大肠杆菌和肺炎克雷伯菌的抑制作用与阳性抗生素具有同等效力。Nakamura等^[14]使用HPLC在芍药叶中鉴

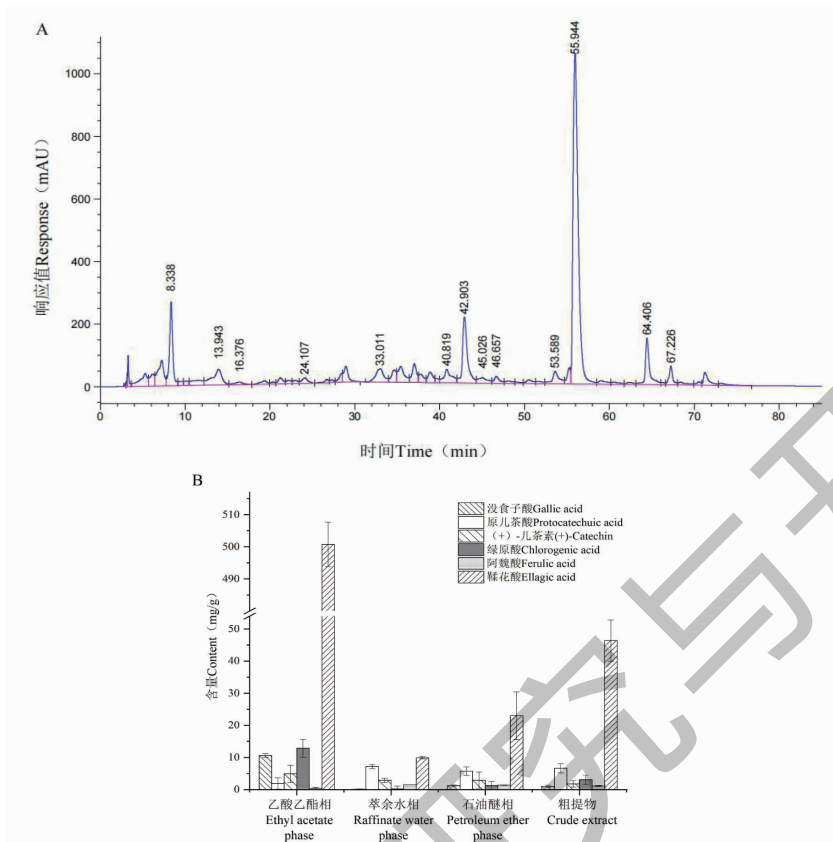


图3 橡实不同极性萃取物中6种多酚化合物的含量

Fig. 3 Contents of six polyphenolic compounds in different polar extracts of acorn

注:A:乙酸乙酯相的色谱图;B:不同组分中6种多酚化合物的含量比较。Note:A:Chromatogram of ethyl acetate phase;B:Content comparison of six polyphenolic compounds in different components.

表5 橡实活性成分与 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶对接打分结果

Table 5 Scoring results for docking of acorn active components with α -amylase and α -glucosidase

成分 Compound	分子量 Molecular weight	结合能 Binding energy (kJ/mol)		OB(%)	DL	分子结构 Molecular structure
		α -淀粉酶 α -Amylase	α -葡萄糖苷酶 α -Glucosidase			
没食子酸 Gallic acid	170.12	-3.30	-2.77	31.69	0.04	
绿原酸 Chlorogenic acid	354.31	-2.83	-2.01	11.93	0.33	
鞣花酸 Ellagic acid	302.28	-4.59	-3.41	43.06	0.43	

定出没食子酸甲酯、五没食子酰葡萄糖和芍药苷,发现其均具有抑制口腔鳞状癌细胞的增殖、凋亡和细

胞周期,表明芍药叶提取物具有潜在的抗肿瘤作用。除此之外,植物提取物还具有降糖、降脂等功能。橡

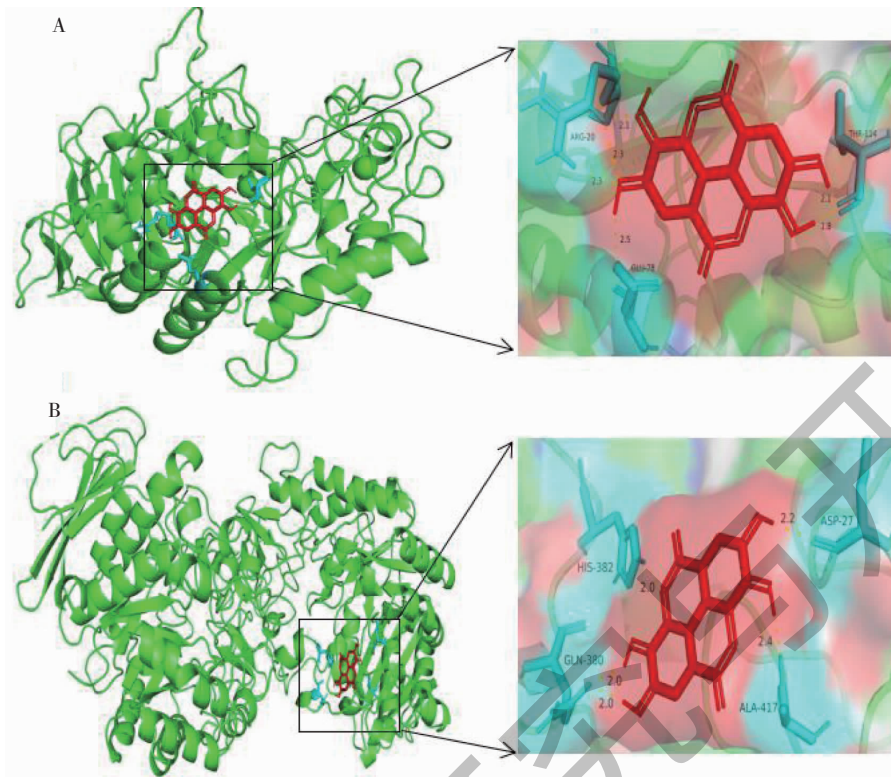


图4 鞣花酸与 α -淀粉酶(A)和 α -葡萄糖苷酶(B)对接结果

Fig. 4 Docking results of ellagic acid with α -amylase (A) and α -glucosidase (B)

树最早在欧洲被人们研究,法国橡实提取物已被申请专利,作为一种特效药在市场流通^[15]。但我国橡树鲜少受到人们的关注。已有的研究发现我国橡实提取物具有抑菌、抗氧化和抗肿瘤活性,但其对降糖作用的研究较少,降糖机制及降糖成分研究不够深入^[16]。本研究发现橡实不同极性萃取物均对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶有抑制作用,且乙酸乙酯相抑制效果远远高于阳性对照阿卡波糖组。其对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 分别为 1.590 ± 0.073 mg/g、 3.927 ± 0.019 ($\times 10^{-3}$ mg/g)。另外,研究获得橡实粗提物、乙酸乙酯相、石油醚相、萃余水中总酚含量分别为 402.13 ± 11.79 、 753.23 ± 32.18 、 121.62 ± 3.20 、 252.44 ± 4.00 mg/g,表明橡实乙酸乙酯相的酶抑制率与多酚含量成正比。这与Pan等^[17]的研究结果一致。

在证实橡实乙酸乙酯相中多酚含量最高,且其对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制效果最佳的基础上,本实验进一步检测橡实乙酸乙酯相多酚类单体物质,通过HPLC分析证明乙酸乙酯相中所测6种多酚化合物含量均高于其他极性组分,且乙酸乙酯相中的鞣花酸含量为 500.75 ± 6.93 mg/g,高于

其他组分10~50倍,表明乙酸乙酯对鞣花酸具有较好的富集效果,橡实乙酸乙酯相中的主要活性成分依然是多酚类物质,推测其酶活性抑制与鞣花酸有关。这与Ding等的研究结果一致^[18]。最后,本实验首次通过分子对接虚拟筛选,发现只有鞣花酸与 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶具有良好的结合活性,进一步验证鞣花酸对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶具有较强的抑制作用。

鞣花酸是一种具有生物活性的多酚化合物,存在于多种植物类群。在结构上,鞣花酸是六羟基联苯酸的二内酯,被认为是二聚没食子酸衍生物^[19]。主要通过鞣花单宁水解产生,鞣花单宁是一种广泛分布的植物次生代谢物。鞣花酸因其具有抗氧化、抗炎、抑菌、抗肿瘤、降糖、降脂等生物活性而被广泛关注。目前,研究表明鞣花酸能够在小肠中吸收,未吸收分子被大肠微生物代谢形成尿石素。尿石素可被吸收到血液中并参与全身循环,最终随尿液排出,或尿石素在肠细胞和肝细胞中进行生物转化,形成尿石素代谢物^[20]。因此,鞣花酸在医药领域具有重要的研究意义和开发前景。在降糖方面,植物提取物较合成降糖药物具有活性高、成本低、副作用少、

节能环保等优点^[21]。如本研究发现乙酸乙酯相对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制效果远远大于阿卡波糖,与 Alqahtani 等^[22]的研究一致。但也有人持相反观点,如 Hbika 等^[23]研究表明苦艾乙酸乙酯提取物在大鼠体内对肠道 α -葡萄糖苷酶没有抑制活性。这可能与不同植物种类和提取成分之间存在协同作用相关。不同活性物质之间具有未知的相互作用,这就需要我们不断研究,不断探索。目前,在不影响治疗效果的情况下减少合成药物对机体的副作用是治疗各种慢性病的挑战,探索阿卡波糖替代物或与阿卡波糖共同作用物是降糖药物研究的新方向。因此本研究有望为寻找合成药物的替代物或共作物奠定基础。

综上所述,橡实乙酸乙酯萃取相具有潜在的降糖作用。其鞣花酸含量丰富,由于鞣花酸含量可间接量化植物性食物中存在的鞣花单宁,因此本研究表明橡实材料可作为鞣花单宁的主要来源。另外,推测其降糖作用受鞣花酸含量影响,鞣花酸具有作为阿卡波糖替代物或共作物的潜力。

参考文献

- Elliott TL, Pfothner KM. Classification and diagnosis of diabetes[J]. Prim Care, 2022, 49:191-200.
- Dirir AM, Daou M, Yousef AF, et al. A review of alpha-glucosidase inhibitors from plants as potential candidates for the treatment of type-2 diabetes[J]. Phytochem Rev, 2021. DOI: 10.1007/s11101-021-09773-1.
- Derosa G, Maffioli P. α -Glucosidase inhibitors and their use in clinical practice[J]. Arch Med Sci, 2012, 8:899-906.
- Gong L, Feng D, Wang T, et al. Inhibitors of α -amylase and α -glucosidase: potential linkage for whole cereal foods on prevention of hyperglycemia[J]. Food Sci Nutr, 2020, 8: 6320-6337.
- Taylor R. Type 2 diabetes and remission: practical management guided by pathophysiology[J]. J Intern Med, 2021, 289:754-770.
- Fan L, Wang YL, Tang L. Progress in screening methods for natural source-glucosidase inhibitors[J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2016, 28:313-321.
- Alam F, Shafique Z, Amjad ST, et al. Enzymes inhibitors from natural sources with antidiabetic activity: a review[J]. Phytother Res, 2019, 33:41-54.
- Proença C, Ribeiro D, Freitas M, et al. Flavonoids as potential agents in the management of type 2 diabetes through the modulation of α -amylase and α -glucosidase activity: a review

- [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2022, 62:3137-3207.
- Ogata M, Saito Y, Matsuo Y, et al. Triterpene galloyl esters from edible acorn of *Castanopsis cuspidata* [J]. Nat Prod Commun, 2016, 11:179-181.
- Ryeom GGM, Bang WJ, Kim YB, et al. Gallotannin improves the photoaged-related proteins by extracellular signal-regulated kinases/c-jun n-terminal kinases signaling pathway in human epidermal keratinocyte cells[J]. J Med Food, 2018, 21:785-792.
- Sebai H, Rtibi K, Selmi S, et al. Modulating and opposite actions of two aqueous extracts prepared from *Cinnamomum cassia* L. bark and *Quercus ilex* L. on the gastrointestinal tract in rats[J]. RSC Adv, 2019, 9:21695-21706.
- Zhang F, Hu XX, Li DX, et al. Untargeted blood metabolomics to study the mechanism of development and intervention of ginkgo biloba extract in diabetic rats[J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2021, 56:1127-1136.
- Ayele DT, Akele ML, Melese AT. Analysis of total phenolic contents, flavonoids, antioxidant and antibacterial activities of *Croton macrostachyus* root extracts [J]. BMC Chem, 2022, 16:30.
- Nakamura S, Mukudai Y, Chikuda J, et al. Combinational anti-tumor effects of chemicals from *Paeonia lutea* leaf extract in oral squamous cell carcinoma cells[J]. Anticancer Res, 2021, 41:6077-6086.
- Belcaro G, Saggino A, Cornelli U, et al. Improvement in mood, oxidative stress, fatigue, and insomnia following supplementary management with Robuvit®[J]. J Neurosurg Sci, 2018, 62:423-427.
- Ahmadi S, Nagpal R, Wang S, et al. Prebiotics from acorn and sago prevent high-fat-diet-induced insulin resistance via microbiome-gut-brain axis modulation [J]. J Nutr Biochem, 2019, 67:1-13.
- Pan Y, Liu XL, Wang Y, et al. *In vitro* inhibitory activity of p -amylase and -glucosidase in blueberry leaf polyphenols[J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2022, 34:579-587.
- Ding X, Jian T, Wu Y, et al. Ellagic acid ameliorates oxidative stress and insulin resistance in high glucose-treated HepG2 cells via miR-223/keap1-Nrf2 pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 110:85-94.
- Lei Y, Jiang T, He L, et al. Ellagic acid attenuates beryllium sulphate-induced oxidative stress and histopathological alterations of spleen in rats [J]. Pharm Biol, 2022, 60: 1047-1054.