

杨梅花色苷体外降糖活性研究

章鸿彬, 刘合生, 陈杨, 蔡将波, 曹少谦, 戚向阳*
(浙江万里学院 生物与环境学院 浙江宁波 315100)

摘要 为了评价杨梅果实花色苷提取物(AECBF)的体外降糖活性,研究 AECBF 体外对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制作用及其动力学,以及对人肝癌 HepG2 细胞葡萄糖摄入和消耗的影响。结果表明:AECBF 对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶均具有较强的抑制作用,其 IC_{50} 值分别为 22.54 $\mu\text{g/mL}$ 和 3.51 $\mu\text{g/mL}$,酶促抑制动力学结果显示:其对 2 种酶的抑制类型均为混合型,对于 α -淀粉酶,竞争性抑制占主体,而对于 α -葡萄糖苷酶,反竞争性抑制是主要的。此外,0.1~10 $\mu\text{g/mL}$ 的 AECBF 作用 HepG2 细胞 24 h,未显示出明显细胞毒性($P>0.05$),而 1~5 $\mu\text{g/mL}$ 的 AECBF 作用 24 h 可显著增加 HepG2 细胞葡萄糖摄入和消耗($P<0.05$),且与未干预组比较,HepG2 细胞葡萄糖摄入水平和葡萄糖消耗量分别在 AECBF 质量浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ 和 5 $\mu\text{g/mL}$ 时最高,分别增加了 72%和 44%。这些研究结果说明杨梅花色苷体外具有显著的降糖活性。

关键词 杨梅果实;花色苷;淀粉消化酶;抑制动力学;葡萄糖摄入和消耗

文章编号 1009-7848(2024)08-0155-09 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.08.015

第 10 版全球糖尿病地图显示,2021 年中国糖尿病患者人数位居世界首位,高达 1.41 亿,未诊断人数近 0.73 亿,医疗支出 1 653 亿美元,因糖尿病引起的死亡人数达到 139.6 万^[1]。无论 1 型糖尿病还是 2 型糖尿病,最主要的病理特征为慢性空腹高血糖,长期高血糖未得到有效干预,易引发多种并发症,如糖尿病肾病、视网膜病变、神经病变等,因此降低糖尿病患者的高血糖症是对糖尿病干预的重要策略^[2]。目前商品化的降糖药物主要有双胍类、噻唑烷二酮类、磺脲类、 α -葡萄糖苷酶抑制等^[3]。糖尿病治疗方法因药物作用机制不同而有多种,其中一种有效的治疗策略是抑制消化道碳水化合物水解酶,如 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶,延缓葡萄糖吸收,以改善糖尿病患者的餐后高血糖^[4]。目前商品化的 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制剂类药物主要有阿卡波糖、米格列醇和伏格列波糖^[5-6]。这些抑制剂是 α -淀粉酶或 α -葡萄糖苷酶的底物类似物,竞争性结合,抑制反应产物葡萄糖的生成。此外,改善肝脏葡萄糖代谢,如抑制肝糖异生和糖原水解,促进肝细胞葡萄糖摄入

和糖酵解,降低肝糖输出,也是一种重要的降糖策略^[7]。然而,长期服用这些合成药物会引起多种毒副作用,如胃肠道失调、低血糖、诱发肝毒性等^[5-6,8]。迫切需要寻求替代方法或开发更安全、有效的降糖活性化合物。杨梅 (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.)是我国南方特有水果之一,因独特口味和诱人色泽而深受消费者喜爱。杨梅果实富含酚类化合物,如酚酸、黄酮醇苷和花色苷^[9-10],杨梅花色苷主要有矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷,以及少量的天竺葵花色苷元-3-*O*-单糖苷、飞燕草花色苷元-3-*O*-单糖苷和芍药素-3-*O*-葡萄糖苷^[11-12]。体内研究显示杨梅花色苷干预减轻链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠高血糖症状^[13],提示杨梅花色苷具有降糖和抗糖尿病活性,而该作用是否与其抑制消化道淀粉消化酶活性或改善肝脏糖代谢有关,尚不明确。本文研究杨梅花色苷对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制作用,以及对肝细胞葡萄糖摄入和消耗的影响,评价其体外降糖活性及可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

重组人 α -葡萄糖苷酶(来源于酿酒酵母)、猪胰腺 α -淀粉酶和 4-硝基苯基- β -*D*-吡喃葡萄糖苷(PNPG)、3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基-2H-四唑-3-鎓溴化物(MTT)、Folin & Cio-

收稿日期: 2023-08-07

基金项目: 浙江省“生物工程”一流学科开放基金项目(KF2021003);浙江省自然科学基金一般项目(LY19C200004)

第一作者: 章鸿彬,男,硕士生

通信作者: 戚向阳 E-mail: qixiangyang85@sina.com

calteu 试剂均购于 Sigma-Aldrich 公司;2-脱氧-2-[(7-硝基-2,1,3-苯并恶二唑-4-基)氨基]-D-葡萄糖(2-NBDG)来源于 Invitrogen 公司;芦丁标准品购于中国食品药品检定研究院;葡萄糖试剂盒(葡萄糖氧化酶法)购于南京建成生物工程研究所;重组人胰岛素购买于碧云天生物技术有限公司;3,5-二硝基水杨酸、马铃薯淀粉、重蒸苯酚、亚硫酸钠、酒石酸钾钠、无水乙酸钠等购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

7230G 可见分光光度计,上海舜宇恒平科学仪器有限公司;RE-2000A 旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂;DK-8D 数显控温水浴锅,上海维诚仪器有限公司;IX73 荧光倒置显微镜,日本奥林巴斯公司;Multiskan FC 酶标仪,Thermo-Fisher 公司;5804R 台式高速冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;AL204 电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;ALPHA 1-2 真空冷冻干燥机,德国 Christ 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 花色苷提取物制备 冷冻杨梅去核后,按照刘传菊^[11]的方法提取并略作修改。以 pH=3.0 的 70%乙醇溶液为提取溶剂,按料液比 1:10 加入 40 °C 水,浸提 2 h,真空抽滤,弃滤渣,滤液于 40 °C 条件下真空浓缩至浓稠液体,上 AB-8 大孔树脂柱,先用 5 倍柱床体积(Bed volume, BV)的酸化蒸馏水(盐酸调节 pH 值至 3.0)洗脱,以去除糖、少量蛋白质等杂质,接着用 20%乙醇洗脱约 3 BV,收集乙醇洗脱液,40 °C 条件下真空浓缩以挥发有机相,经真空冷冻干燥得到红褐色杨梅花色苷提取物(Anthocyanin extract of Chinese bayberry fruit, AECBF)粉末,-20 °C 密封、避光保持。

1.3.2 AECBF 化学组成分析 按照《食品安全国家标准 食品中水分的测定》(GB 5009.3-2016)中的第二法——减压干燥法测定样品水分含量;参考文献[11]中的 pH 示差法测定总花色苷含量;参考文献[14]中亚硝酸钠-硝酸铝比色法测定总黄酮含量;参考文献[15]中 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量。

1.3.3 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制试验 参照 Yang 等^[16]描述方法并作部分修改。0.5 mL 不同

质量浓度 AECBF 水溶液(10,20,40,80,160 $\mu\text{g}/\text{mL}$),加入 0.5 mL 马铃薯淀粉溶液(pH 6.9,0.1 mmol/L 磷酸盐缓冲液配制,10 g/L),摇匀,再加入猪胰腺 α -淀粉酶储备溶液(pH 6.9,0.1 mmol/L 磷酸盐缓冲液配制,12 U/mL)0.5 mL,于 37 °C 恒温水浴中准确反应 10 min 后,立即加入 3,5-二硝基水杨酸显色液(含 1% 3,5-二硝基水杨酸,0.2% 重蒸苯酚,0.05% 亚硫酸钠和 1% 氢氧化钠的混合溶液)2 mL 终止反应,于沸水浴加热 10 min 显色,再加入 2.0 mL 的 40% 酒石酸钾钠溶液,以稳定混合物颜色。冰浴冷却至室温,加蒸馏水定容至 25 mL,于波长 540 nm 处测定吸光度。对于 α -葡萄糖苷酶抑制试验,0.5 mL 不同质量浓度 AECBF 溶液(1.0,5.0,15.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)加入 1 mmol/L 的 4-硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)溶液(溶解于 pH 6.9 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液)0.5 mL,混匀,37 °C 恒温水浴预热 5 min,加入 0.2 U/mL 的 α -葡萄糖苷酶溶液 1.0 mL,混匀,37 °C 恒温水浴准确反应 5 min,加入 1.0 mol/L NaOH 溶液 2.0 mL 终止反应,于波长 405 nm 处测定吸光值。以不加抑制剂 AECBF 为对照组(AB),添加 AECBF 为样品组(AS),以不加 α -淀粉酶或 α -葡萄糖苷酶而含有 AECBF 为本底组(A_0)。按式(1)计算 α -淀粉酶或 α -葡萄糖苷酶抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = [A_B - (A_S - A_0)] / A_B \times 100 \quad (1)$$

1.3.4 Lineweaver-Burk 双倒数图及其二级图谱 参考文献[16-17]描述的方法,依据混合型酶促抑制动力学方程(2)绘制 Lineweaver-Burk 双倒数图及其二级图谱。对于 α -淀粉酶抑制试验,反应体系 AECBF 终质量浓度分别为 0,5,10,20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,底物马铃薯淀粉质量浓度分别为 2,2.5,3.3,5,10 mg/L;对于 α -葡萄糖苷酶抑制试验,AECBF 终质量浓度分别为 0,1,5,15 $\mu\text{g}/\text{mL}$,底物 PNPG 浓度分别为 0.03125,0.0625,0.125,0.25 mmol/L;参照上述 α -淀粉酶或 α -葡萄糖苷酶抑制方法,测定酶促反应初始速度(v , α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制试验分别以 $\Delta A_{540\text{nm}}/\text{min}$ 和 $\Delta A_{405\text{nm}}/\text{min}$ 表示),以 $1/[S]$ 为横坐标, $1/v$ 为纵坐标绘制混合抑制型 Lineweaver-Burk 双倒数图。

$$1/v = (K_m/v_{\max}) \times (1 + [I]/K_{EI}) / [S] + (1 + [I]/K_{ESI}) / v_{\max} \quad (2)$$

式中: v 为初始速率, $\Delta A_{405\text{nm}}/\text{min}$ ($\Delta A_{540\text{nm}}/\text{min}$);

v_{\max} 为最大初始反应速率, $\text{mg/mL}\cdot\text{min}$; $[S]$ 为底物质量浓度, mg/mL ; $[I]$ 为抑制剂质量浓度, $\mu\text{g/mL}$; K_m 为米氏常数, mg/mL ; K_{EI} 为酶-抑制剂复合物的解离平衡常数, $\mu\text{g/mL}$; K_{ESI} 为抑制剂-酶-底物复合物的解离平衡常数, $\mu\text{g/mL}$ 。

由方程 (2) 可知, 混合抑制型 Lineweaver-Burk 双倒数直线图的斜率 (Slope) 在一定反应条件及指定底物浓度下, 与抑制剂质量浓度 $[I]$ 具有线性关系, 见方程 (3)。以抑制剂 (AECBF) 质量浓度 (0, 1, 5, 15 $\mu\text{g/mL}$) $[I]$ 为横坐标, 对应的 Lineweaver-Burk 双倒数图的斜率 (Slope) 为纵坐标绘制直线图, 该直线延长线与 X 轴的交点即为酶-抑制剂复合物的解离平衡常数 (K_{EI})。

$$\text{斜率} = (K_m/v_{\max}) \times (1 + [I]/K_{EI}) = K_m \times [I] / (v_{\max} \times K_{EI}) + K_m/v_{\max} \quad (3)$$

类似地, 由方程 (2) 可知, 混合抑制型 Lineweaver-Burk 双倒数直线图的 Y 轴截距 (Y -intercept) 在一定反应条件及指定底物浓度下, 与抑制剂质量浓度 $[I]$ 具有线性关系, 见方程 (4)。以抑制剂 (AECBF) 质量浓度 (0, 1, 5, 15 $\mu\text{g/mL}$) $[I]$ 为横坐标, 对应的 Lineweaver-Burk 双倒数图在 Y 轴截距 (Y -intercept) 为纵坐标绘制直线图, 该直线延长线与 X 轴的交点即为抑制剂-酶-底物复合物的解离平衡常数 (K_{ESI})。

$$Y \text{ 轴截距} = (1 + [I]/K_{ESI})/v_{\max} = [I]/(v_{\max} \times K_{ESI}) + 1/v_{\max} \quad (4)$$

1.3.5 AECBF 抑制 α -葡萄糖苷酶活性的 IC_{50} 值

对于混合型抑制, 半数抑制率 IC_{50} 值可根据其 K_m 、 K_{EI} 和 K_{ESI} 按照方程 (5) 计算^[7]。

$$IC_{50} (\mu\text{g/mL}) = ([S] + K_m) / ([S]/K_{ESI} + K_m/K_{EI}) \quad (5)$$

式中: IC_{50} 为酶活性抑制 50% 所需的抑制剂质量浓度, $\mu\text{g/mL}$ 。

1.3.6 葡萄糖消耗试验 人肝癌细胞 HepG2 按照每孔 1×10^4 个接种于 96 孔培养板, 参照文献[18]报道的 MTT 方法, 测定终质量浓度 0.1~10 $\mu\text{g/mL}$ 的 AECBF 对 HepG2 细胞活力的影响, 以确定无显著细胞毒性的 AECBF 暴露质量浓度。在此基础上, 参照 Yao 等^[18]描述的方法, 并略作修改, 测定 AECBF 对 HepG2 细胞葡萄糖消耗的影响。培养 HepG2 细胞至汇合度约 80% 时, 传代并接种于 12 孔培养板 (每孔 2×10^5 个), 待细胞汇合度为 70%~

80% 时, 弃培养基, PBS 洗涤一遍, 加入无血清 DMEM 低糖培养基饥饿培养 12 h, 血清饥饿后, PBS 洗涤 2 遍, 加入含有 AECBF (终质量浓度分别为 0.5, 1.0, 2.0 $\mu\text{g/mL}$) 的 DMEM 低糖培养基继续培养 4 h, 移取 10 μL 培养基, 葡萄糖氧化酶法测定其葡萄糖浓度。葡萄糖消耗量等于培养基起始葡萄糖浓度减去培养结束后培养基的葡萄糖浓度。同时收集 HepG2 细胞, 经 RIPA 裂解液裂解后, BCA 法测定总蛋白浓度, 以校正葡萄糖消耗量。

1.3.7 葡萄糖摄入试验 参照文献[7]报道的方法并略作修改。HepG2 细胞按每孔 1×10^5 个接种于 24 孔培养板, 待细胞汇合度为 70%~80% 时, 弃培养基, PBS 洗涤一遍, 加入无血清 DMEM 低糖培养基饥饿培养 12 h, PBS 洗涤两遍, 加入含有 AECBF (终质量浓度分别为 0.5, 1.0, 2.0 $\mu\text{g/mL}$) 的 DMEM 低糖培养基继续培养 24 h, PBS 洗涤 2 遍, 加入含 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 2-NBDG 和 100 nmol/L 重组人胰岛素的 KRPH 缓冲液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% 二氧化碳培养箱中孵育 30 min, 弃培养液, 冰冷的 PBS 洗涤细胞 3 遍以除去未摄入的 2-NBDG, 立即置于荧光倒置显微镜下, 于激发波长 480 nm, 发射波长 525 nm 下观察荧光, 并显微拍照, ImageJ 软件测量 HepG2 细胞荧光强度。

1.3.8 统计分析 所有数据以均值 \pm 标准差表示, 进行单因素方差分析。对于 MTT、葡萄糖消耗和摄入试验, 正常组和 AECBF 处理组的组间差异采用 Dunnett's t 检验, $P < 0.05$ 表示具有统计学显著差异。

2 结果与分析

2.1 AECBF 化学组成

AECBF 的主要化学成分见表 1。经大孔树脂 AB-8 纯化后的 AECBF 主要成分为花色苷和黄酮类化合物, 其中, 花色苷类化合物是主要成分。此外, 还含有少量未完全去除的还原糖。

2.2 AECBF 对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

图 1 为不同 AECBF 抑制 α -淀粉酶的 Lineweaver-Burk 双倒数作图及其二级图谱。图 1a 显示, 所有拟合数据点拟合为直线, 且相交于第 2

表1 AECBF 化学组成分析

Table 1 Chemical composition of AECBF

化学组成	水分	总花色苷	总黄酮	还原糖
含量/%	5.32 ± 0.46	46.15 ± 1.38	15.69 ± 0.50	6.72 ± 0.23

象限中的一点,酶促反应最大初速度 v_{\max} 降低,米氏常数 K_m 增加,表明 AECBF 对 α -淀粉酶的抑制类型为混合型抑制^[6]。混合型抑制由竞争性抑制和反竞争性抑制构成,由 Lineweaver-Burk 二级图谱(图 1b、1c)得到 AECBF 与 α -淀粉酶的解离常数 K_E 为 14.57 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 其与 α -淀粉酶-底物复合物的解离常数 K_{ES} 为 22.55 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 且 K_E/K_{ES} 比值小于 1(表 2),提示 AECBF 与 α -淀粉酶分子的结合能力高于 AECBF 与 α -淀粉酶-底物复合物的结合能力,且竞争性抑制在混合抑制中是主要的^[17]。

类似地,对于 α -葡萄糖苷酶抑制试验,图 2a 显示,所有数据点拟合为直线,且相交于第 3 象限中的一点, v_{\max} 降低,米氏常数 K_m 增加,表明 AECBF 对 α -葡萄糖苷酶的抑制类型亦为混合型抑制^[6]。Lineweaver-Burk 二级图谱(图 2b、2c)得到 K_E 为 10.42 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 其与 α -淀粉酶-底物复合物的解离常数 K_{ES} 为 3.49 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 且 K_E/K_{ES} 比值大于 1(表 2),提示 AECBF 与 α -葡萄糖苷酶-底物复合物的结合能力高于其与 α -葡萄糖苷酶分子的结合能力,且反竞争性抑制在混合抑制中是主要的^[17]。

花色苷是一类存在于植物花、水果、蔬菜中的红色或蓝色水溶性色素^[9],是黄酮类化合物中一个亚类,这些植物的花色苷提取物或纯化的花色苷单体对 α -淀粉酶具有显著抑制活性^[16-17,19-20]。Kaeswurm 等^[19]研究发现不同母核结构、B 环取代和乙酰化的花色苷对 α -淀粉酶的抑制强度和抑制类型,结果显示不同结构的花色苷对 α -淀粉酶的抑制强度仅有较小差异,无统计学显著性,且均为混合型抑制, K_E/K_{ES} 比值均小于 1,表明该混合型抑制中竞争性抑制是主要的,其可能原因为底物与酶结合后阻止了抑制剂与酶-底物复合物的结合。Moein 等^[20]从刺楸(*Berberis integerrima*)中制备花色苷粗提物和纯化的花色苷提取物,两种提取物均显示明显的 α -淀粉酶抑制活性,且花色苷粗提物呈现混合型抑制,而纯化的花色苷显示反竞争性抑制。Kaeswurm 等^[17]报道矢车菊素-3-

O-葡萄糖苷(C3G)和矢车菊素-3-*O*-芸香糖苷(C3R)对 α -淀粉酶无抑制作用。锦葵素-3-*O*-葡萄糖苷对 α -淀粉酶具有较强的抑制作用。这些研究表明不同结构的花色苷对 α -淀粉酶抑制作用的强弱和抑制类型有显著差异,这种差异可能是由于花色苷结构、酶和底物类型、酶促反应条件、抑制常数计算模型的不同而引起。Kaeswurm 等^[19]研究显示,无论是否结合了底物,花色苷可通过非特异性疏水相互作用与 α -淀粉酶分子结合,也可通过花色苷共轭体系中的氢键和疏水相互作用特异性地与 α -淀粉酶分子结合,以增强花色苷对 α -淀粉酶的抑制作用。本研究中,富含花色苷的 AECBF 对 α -淀粉酶的抑制类型为混合型,且竞争性抑制占比更大,与多数花色苷的结果一致^[16-17,19],原因可能是杨梅花色苷既与 α -淀粉酶结合,又与 α -淀粉酶-底物复合物结合。值得注意的是 AECBF 含有少量非花色苷的黄酮类成分,这些成分可能也竞争性地抑制 α -淀粉酶,或者反竞争性地形成 α -淀粉酶-底物-抑制剂三元复合物,后续可进一步纯化 AECBF,排除其它组分的影响,明确其抑制机制。

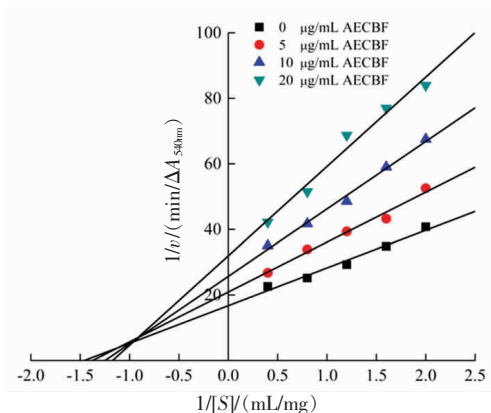
除了抑制 α -淀粉酶,花色苷及其苷元花色素还具有强烈的 α -葡萄糖苷酶抑制活性^[21-22],且其抑制能力与花色素结构中羟基数目和糖基化程度紧密相关,抑制活性与苷元糖基化呈负相关关系,而与羟基数目呈正相关关系^[21]。本研究中 AECBF 强烈抑制 α -葡萄糖苷酶($IC_{50}=3.51 \mu\text{g}/\text{mL}$),呈现混合型抑制,与 Promyos 等^[21]报道的结果一致,且 K_E/K_{ES} 比值大于 1,提示反竞争性抑制占主导。然而,也有研究显示 C3G 对 α -葡萄糖苷酶的抑制类型为竞争性抑制^[22],杨梅果实中的花色苷主要是 C3G^[11,23],据此推断 AECBF 的抑制类型为竞争性抑制,这与本研究结果不一致,其原因可能是 AECBF 还含有少量酚酸和其它黄酮类,如咖啡酸、阿魏酸、山奈酚、槲皮素、杨梅素,其对 α -葡萄糖苷酶的抑制类型为混合型,竞争性抑制占主体。

值得注意的是,AECBF 除了主要成分花色苷

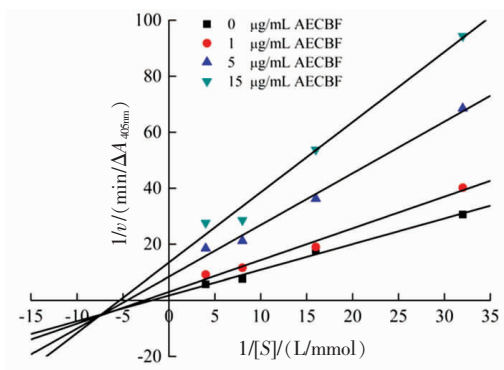
表 2 AECBF 对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制动力学

Table 2 Inhibitory kinetics of AECBF on α -amylase and α -glucosidase

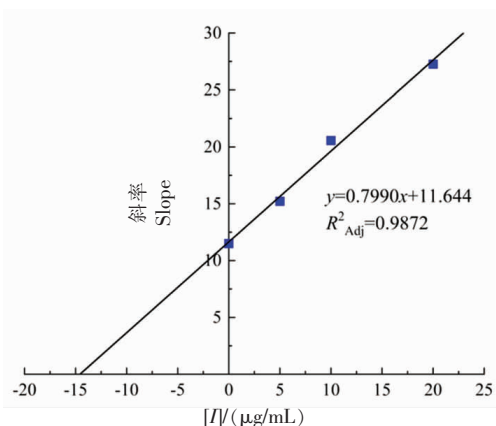
酶	抑制类型	$K_{EI}/(\mu\text{g/mL})$	$K_{ESI}/(\mu\text{g/mL})$	$IC_{50}/(\mu\text{g/mL})$
α -淀粉酶	混合型	14.57	22.55	22.54
α -葡萄糖苷酶	混合型	10.42	3.49	3.51



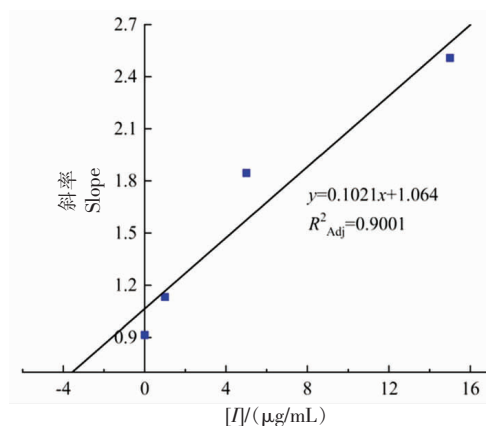
(a) Lineweaver-Burk 双倒数作图



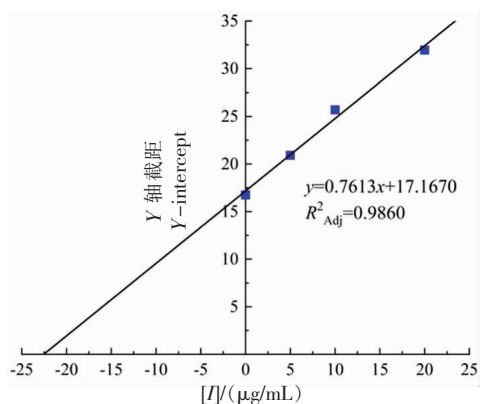
(a) Lineweaver-Burk 双倒数作图



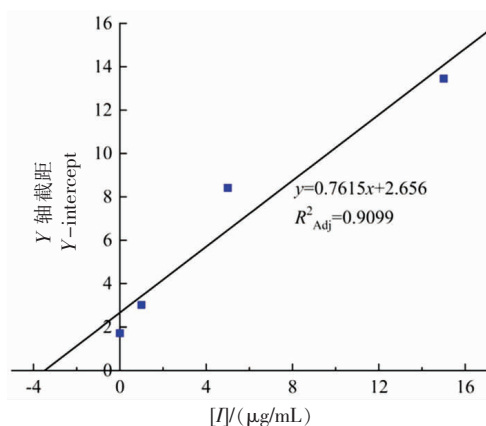
(b) 斜率对抑制剂质量浓度作图



(b) 斜率对抑制剂质量浓度作图



(c) Y 轴截距对抑制剂质量浓度作图



(c) Y 轴截距对抑制剂质量浓度作图

图 1 AECBF 对 α -淀粉酶的抑制作用

Fig.1 Inhibitory effect of AECBF on α -amylase

图 2 AECBF 对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

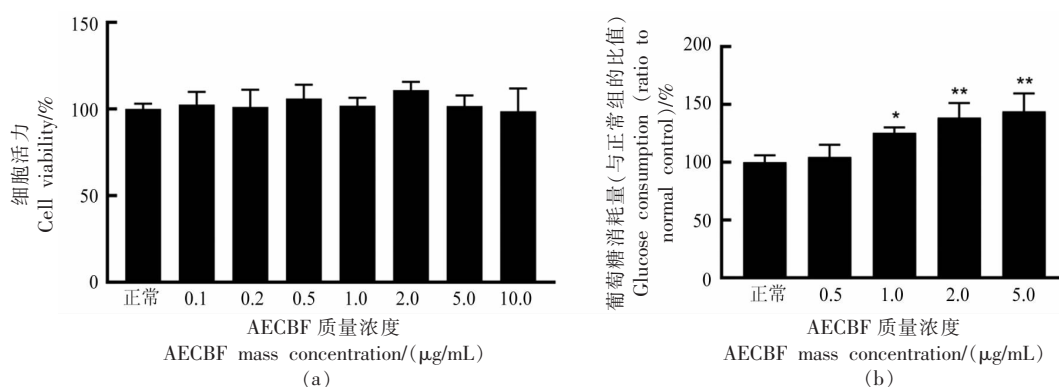
Fig.2 Inhibitory effect of AECBF on α -glucosidase

之外,还含有少量强烈 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的酚酸、非花色苷黄酮化合物、原花青素等成分^[24-26],为了排除这些影响,需进一步分离纯化出纯度高、 α -淀粉酶或 α -葡萄糖苷酶抑制活性强的花色苷单体,应用紫外-可见光谱、荧光淬灭光谱、圆二色谱、分子对接等方法表征该单体与 α -葡萄糖苷酶的相互作用,解析其作用机制。

2.3 AECBF 处理对 HepG2 葡萄糖消耗和摄入的影响

MTT 结果(图 3a)显示,与正常培养 HepG2 细胞比较,0.1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AECBF 作用于 HepG2 细胞 24 h,对其细胞活力无显著影响,在此基础上,研究了 0.5~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AECBF 处理对 HepG2 细胞葡萄糖消耗的影响,结果显示 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AECBF

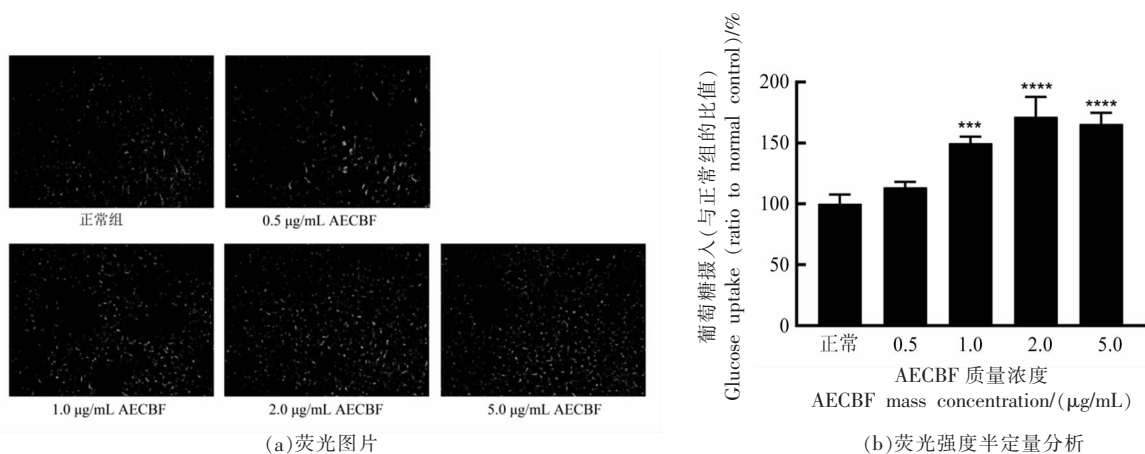
处理 24 h,葡萄糖消耗量无明显变化,而 1~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AECBF 处理显著增加葡萄糖消耗量,且呈现剂量依赖特征(图 3b)。此外,除了 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AECBF 对葡萄糖摄入量无显著影响以外($P>0.05$),1~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AECBF 处理 24 h 显著增强 HepG2 细胞葡萄糖摄入能力(图 4, $P<0.001$),与 AECBF 对葡萄糖消耗的影响趋势一致(图 3),这表明 AECBF 增强肝细胞葡萄糖摄入可能是其促进葡萄糖消耗的重要原因。目前多个研究组报道,天然花色苷可促进肝细胞葡萄糖摄入和消耗,从而发挥降糖功效^[27-30]。肝细胞葡萄糖消耗除了跟葡萄糖摄入密切相关,还与糖异生和糖原分解关联,增强的葡萄糖摄入和糖酵解以及抑制的糖异生和糖原分解,总的结果是葡萄糖消耗的增加^[31]。Zhang



注:* 和 ** 分别表示与正常组比较, $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 。

图 3 AECBF 对 HepG2 细胞活力和葡萄糖消耗的影响

Fig.3 Effect of AECBF treatment on cell viability and glucose consumption of HepG2 cell



注:*** 和 **** 分别表示与正常组比较, $P<0.001$ 和 $P<0.0001$ 。

图 4 AECBF 对 HepG2 细胞葡萄糖摄入的影响

Fig.4 Effect of AECBF treatment on glucose uptake of HepG2 cell

等^[2]研究发现富含 C3G 的杨梅提取物抑制肝细胞糖异生、增强糖酵解,而这与杨梅花色苷介导的 AMPK 激活有关。Luna-Vital 和 Gonzalez 探讨了紫玉米花色苷对 HepG2 细胞葡萄糖摄入的影响,结果显示 C3G 等多种花色苷显著增强葡萄糖摄入和糖酵解能力,以及降低糖异生关键酶表达水平,并激活 AMPK 通路^[32]。杨梅果实中丰度最高的花色苷为 C3G^[11],由此推断 AECBF 可能通过激活肝细胞 AMPK 通路而增强糖酵解和抑制糖异生,从而促进葡萄糖摄入和消耗。

3 结论

AECBF 在体外具有强烈的 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制活性,其 IC_{50} 值分别为 $3.51 \mu\text{g/mL}$ 和 $22.54 \mu\text{g/mL}$,酶促抑制动力学显示 AECBF 对这两种淀粉消化酶的抑制类型均为混合型非竞争性抑制,对于 α -淀粉酶,AECBF 与游离酶的结合能力强于与酶-底物复合物的结合能力,竞争性抑制占主体,其 K_{EI} 、 K_{ESI} 分别为 $14.57 \mu\text{g/mL}$ 和 $22.55 \mu\text{g/mL}$;而对于 α -葡萄糖苷酶,AECBF 与酶-底物复合物的结合能力强于与游离酶的结合能力,反竞争性抑制是主要的,其 K_{EI} 、 K_{ESI} 分别为 $10.42 \mu\text{g/mL}$ 和 $3.49 \mu\text{g/mL}$ 。此外,1~5 $\mu\text{g/mL}$ 的 AECBF 干预 24 h 显著增强 HepG2 细胞葡萄糖摄入和消耗,且与正常对照组比较,质量浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ 时葡萄糖摄入水平最高,增加了 72%,而质量浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 时葡萄糖消耗量最大,增加了 44%。这些研究提示杨梅花色苷是一种有待开发的,具有降糖功效的膳食补充剂。

参 考 文 献

- [1] International Diabetes Federation. Diabetes Atlas (10th edition)[R]. (2021-12-06)[2023-03-07]. <https://diabetesatlas.org/atlas/tenth-edition/>.
- [2] United Kingdom Prospective Diabetes Study. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes[J]. Lancet, 1998, 352: 837-853.
- [3] 姚佳舒, 孙子林, 袁扬. 2 型糖尿病降糖药物治疗进展: 更加关注心血管及肾脏结局[J]. 中国糖尿病杂志, 2021, 29(3): 224-228.
- [4] YAO J S, SUN Z L, YUAN Y. Advances in the treatment of type 2 diabetes mellitus with glucose? Lowering medications: More attention to cardiovascular and renal outcomes[J]. Chinese Journal of Diabetes, 2021, 29(3): 224-228.
- [5] WANG H, DU Y J, SONG H C. α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of guava leaves [J]. Food Chemistry, 2010, 123(1): 6-13.
- [6] CHIASSON J L, JOSSE R G, GOMIS R, et al. Acarbose treatment and the risk of cardiovascular disease and hypertension in patients with impaired glucose tolerance the STOP-NIDDM trial[J]. JAMA, 2003, 290(4): 486-494.
- [7] KAWAMORI R, TAJIMA N, IWAMOTO Y, et al. Voglibose for prevention of type 2 diabetes mellitus: A randomised, double-blind trial in Japanese individuals with impaired glucose tolerance [J]. Lancet, 2009, 373(9675): 1607-1614.
- [8] LIU H, LUO W, LIU J Z, et al. The glucotoxicity protecting effect of honokiol in human hepatocytes via directly activating AMPK[J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 1043009.
- [9] HSIAO S H, LIAO L H, CHENG P N, et al. Hepatotoxicity associated with acarbose therapy [J]. Annals of Pharmacotherapy, 2006, 40(1): 151-154.
- [10] BAO J S, CAI Y Z, SUN M, et al. Anthocyanins, flavonols, and free radical scavenging activity of Chinese bayberry (*Myrica rubra*) extracts and their color properties and stability[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(6): 2327-2332.
- [11] FANG Z X, ZHANG M, WANG L X. HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in bayberries (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) [J]. Food Chemistry, 2007, 100(2): 845-852.
- [12] 刘传菊. 杨梅中酚类物质的分离、分析、特性及应用研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- [13] LIU C J. Separation, analysis, characteristics and application of polyphenols from Chinese bayberry[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2008.
- [14] 叶兴乾, 陈健初, 苏平. 荸荠种杨梅的花色苷组分鉴定[J]. 浙江农业大学学报, 1994, 20(2): 188-190.
- [15] YE X Q, CHEN J C, SU P. Identification of constituent of anthocyanin in Yang-Mei (*Myrica rubra* cv. Boqi) [J]. Journal of Zhejiang Agricultural University, 1994, 20(2): 188-190.

- [13] SUN C D, ZHANG B, ZHANG J K, et al. Cyanidin-3-glucoside-rich extract from Chinese bayberry fruit protects pancreatic β cells and ameliorates hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. *Journal of Medicinal Food*, 2012, 15(3): 288-298.
- [14] WANG X Y, SU J Q, CHU X L, et al. Adsorption and desorption characteristics of total flavonoids from *Acanthopanax senticosus* on macroporous adsorption resins[J]. *Molecules*, 2021, 26(14): 4162.
- [15] AKKARACHIYASIT S, CHAROENLERTKUL P, YIBCHOK-ANUN S, et al. Inhibitory activities of cyanidin and its glycosides and synergistic effect with acarbose against intestinal α -glucosidase and pancreatic α -amylase [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2010, 11(9): 3387-3396.
- [16] YANG Y, ZHANG J L, SHEN L H, et al. Inhibition mechanism of diacylated anthocyanins from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) against α -amylase and α -glucosidase[J]. *Food Chemistry*, 2021, 359: 129934.
- [17] KAESWURM J A H, CLAASEN B, FISCHER M P, et al. Interaction of structurally diverse phenolic compounds with porcine pancreatic α -amylase [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(40): 11108-11118.
- [18] YAO M, XU F R, YAO Y J, et al. Assessment of novel oligopeptides from rapeseed Napin (*Brassica napus*) in protecting HepG2 cells from insulin resistance and oxidative stress[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(39): 12418-12429.
- [19] KAESWURM J A H, KNIGHOFER L, HOGG M, et al. Impact of B-ring substitution and acylation with hydroxy cinnamic acids on the inhibition of porcine α -amylase by anthocyanin-3-glycosides [J]. *Foods*, 2020, 9(3): 367.
- [20] MOEIN S, MOEIN M, JAVID H. Inhibition of α -amylase and α -glucosidase of anthocyanin isolated from *Berberis integririma* Bunge Fruits: A model of antidiabetic compounds[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022: 6529590.
- [21] PROMYOS N, TEMVIRIYANUKUL P, SUTTISANSANEE U. Investigation of anthocyanidins and anthocyanins for targeting α -glucosidase in diabetes mellitus[J]. *Preventive Nutrition and Food Science*, 2020, 25(3): 263-271.
- [22] ZHANG J J, XIAO J B, GIAMPIERI F, et al. Inhibitory effects of anthocyanins on α -glucosidase activity[J]. *Journal of Berry Research*, 2019, 9(1): 109-123.
- [23] 杜琪珍, 姜华, 徐渊金. 杨梅中主要花色苷的组成与结构[J]. *食品与发酵工业*, 2008, 34(8): 48-51, 55.
- DU Q Z, JIANG H, XU Y J. The structure composition analysis and elucidation of anthocyanins in waxberry[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2008, 34(8): 48-51, 55.
- [24] LIU Y L, ZHAN L H, XU C, et al. α -Glucosidase inhibitors from Chinese bayberry (*Morella rubra* Sieb. et Zucc.) fruit: Molecular docking and interaction mechanism of flavonols with different B-ring hydroxylations [J]. *RSC Advances*, 2020, 10(49): 29347-29361.
- [25] 肖会芝. 天然多酚对胰蛋白酶和 α -葡萄糖苷酶抑制机制的研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2016.
- XIAO H Z. Comparative evaluation of natural polyphenols inhibiting α -glucosidase and trypsin[D]. Chongqing: Chongqing University, 2016.
- [26] ZHENG Y X, TIAN J H, YANG W H, et al. Inhibition mechanism of ferulic acid against α -amylase and α -glucosidase[J]. *Food Chemistry*, 2020, 317: 126346.
- [27] ZHANG X N, LV Q, JIA S, et al. Effects of flavonoid-rich Chinese bayberry (*Morella rubra* Sieb. et Zucc.) fruit extract on regulating glucose and lipid metabolism in diabetic KK-Ay mice[J]. *Food & Function*, 2016, 7(7): 3130-3140.
- [28] TIAN J L, SI X, SHU C, et al. Synergistic effects of combined anthocyanin and metformin treatment for hyperglycemia *in vitro* and *in vivo*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(4): 1182-1195.
- [29] YE X, CHEN W, TU P C, et al. Antihyperglycemic effect of an anthocyanin, cyanidin-3-O-glucoside, is achieved by regulating GLUT-1 via the Wnt/ β -catenin-WISP1 signaling pathway[J]. *Food & Function*, 2022, 13(8): 4612-4623.
- [30] SU H M, XIE L H, XU Y, et al. Pelargonidin-3-O-glucoside derived from wild raspberry exerts anti-hyperglycemic effect by inducing autophagy and modulating gut microbiota[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(46): 13025-13037.

- [31] PETERSEN M C, SHULMAN G I. Mechanisms of insulin action and insulin resistance[J]. *Physiological Reviews*, 2018, 98(4): 2133–2223.
- [32] LUNA-VITAL D A, GONZALEZ D M E. Anthocyanins from purple corn activate free fatty acid-receptor 1 and glucokinase enhancing *in vitro* insulin secretion and hepatic glucose uptake[J]. *PLoS One*, 2018, 13(7): e0200449.

Studies on Hypoglycemic Activities of Chinese Bayberry Anthocyanins *in Vitro*

Zhang Hongbin, Liu Hesheng, Chen Yang, Cai Jiangbo, Cao Shaoqian, Qi Xiangyang*
(College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, Zhejiang)

Abstract Inhibition and kinetics of α -amylase and α -glucosidase, as well as glucose uptake and consumption of human hepatoma HepG2 cell were investigated to assess the *in vitro* glucose-lowering effect of anthocyanin extract of Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) fruit (AECBF). The results showed that AECBF exhibited potent inhibitory effect on α -amylase and α -glucosidase, with IC_{50} value of 22.54 $\mu\text{g/mL}$ and 3.51 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The results of enzymatic inhibition kinetics indicated that both α -amylase and α -glucosidase gave a mixed-type inhibition, and competitive inhibition was predominant in α -amylase while uncompetitive inhibition in α -glucosidase. In addition, no obvious cytotoxicity of HepG2 was observed after treated with AECBF for 24 h, ranged from 0.1 $\mu\text{g/mL}$ to 10 $\mu\text{g/mL}$ ($P>0.05$), and glucose uptake and consumption of HepG2 cells were increased notably after treatment with 1 $\mu\text{g/mL}$ to 5 $\mu\text{g/mL}$ for 24 h ($P<0.05$). Compared to normal control, AECBF-treated HepG2 cells gained the maximum glucose uptake and glucose consumption at 2 $\mu\text{g/mL}$ and 5 $\mu\text{g/mL}$, respectively, corresponding to an increase by 72% and 44%, respectively. These results indicated that Chinese bayberry anthocyanin exhibits potent *in vitro* hypoglycemic activities.

Keywords bayberry fruit; anthocyanins; starch-digesting enzymes; inhibition kinetics; glucose uptake and consumption