

甘薯去氢表雄酮的体外抗氧化活性与抗癌功效初探

陈蓬凤¹, 邹浩峰^{1,2}, 黄师荣^{1,2}, 蔡芳¹, 隋勇¹, 熊添¹, 施建斌¹, 蔡沙¹, 陈学玲¹, 梅新^{1*}

(1. 湖北省农业科学院农产品加工与核农技术研究所, 湖北武汉 430064)

(2. 湘潭大学化工学院, 湖南湘潭 411105)

摘要: 该研究选取甘薯作为原料, 利用米曲霉发酵制取甘薯去氢表雄酮(DHEA), 探讨发酵后甘薯 DHEA 提取物纯化前后体外抗氧化、抗衰老、降血糖及抗癌功效。结果表明: 甘薯 DHEA 提取物经硅胶吸附纯化时, 样品保留时间为 11.21 min, 峰面积占比达 76.44%。随着浓度上升, 纯化前后甘薯 DHEA 提取物对 DPPH、ABTS、羟基自由基的清除力、总还原能力呈显著上升趋势($p < 0.05$), 在 0.10 mg/mL 时达到最大。纯化后 DHEA 提取物的 α -淀粉酶活性抑制率在 2.16%~55.54%之间, 在 0.80 mg/mL 时达到最大; 酪氨酸酶活性抑制率在 5.55%~50.57%之间, 在 0.10 mg/mL 时达到最大。纯化后的 DHEA 提取物仅对乳腺癌细胞 MCF-7 在 2.30 mmol/L 浓度水平时有显著的抑制效果($p < 0.05$), 抑制率达 47.50%, 而对肺癌细胞 A549、宫颈癌细胞 Hela 无显著的抑制效果($p > 0.05$)。该研究为甘薯 DHEA 的功能性食品的开发提供一定参考依据, 有利于甘薯天然产物的开发。

关键词: 甘薯; 去氢表雄酮; 功能特性; 抗氧化; 抗癌

文章编号: 1673-9078(2022)09-71-79

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.9.1171

In Vitro Antioxidant and Anticancer Properties of Dehydroepiandrosterone from Sweet Potato

CHEN Pengfeng¹, ZOU Haofeng^{1,2}, HUANG Shirong^{1,2}, CAI Fang¹, SUI Yong¹, XIONG Tian¹, SHI Jianbin¹, CAI Sha¹, CHEN Xueling¹, MEI Xin^{1*}

(1. Institute of Agro-Product Processing and Nuclear-Agricultural Technology, Hubei Academy of Agricultural Science, Wuhan 430064, China) (2. College of Chemical Engineering, Xiangtan University, Xiangtan 411105, China)

Abstract: In this study, sweet potato was selected as the raw material, dehydroepiandrosterone (DHEA) was prepared by *Aspergillus oryzae* fermentation. The *in vitro* antioxidant, anti-aging, hypoglycemic and anticancer effects of the DHEA extract from the fermented sweet potato before and after purification were examined. The results showed that the retention time was 11.21 min and the peak area was accounted for 76.44% when the sweet potato DHEA extract was purified by silica gel adsorption. With the increase of concentration, the scavenging abilities for DPPH, ABTS and hydroxyl radicals and the total reducing ability of the DHEA extract before and after purification increased significantly ($p < 0.05$), and reached the maximum at 0.10 mg/mL. The α -amylase activity inhibitory rates of the purified DHEA extract ranged from 2.16% to 55.54%, and reached the maximum at 0.80 mg/mL. The tyrosinase activity inhibitory rates of the purified DHEA extract were in the range of 5.55%~50.57%, and reached the maximum at 0.10 mg/mL. The purified DHEA extract only exhibited a significant inhibitory effect against the breast cancer cell MCF-7 at a concentration of 2.30 mmol/L ($p < 0.05$), with the inhibition rate being 47.50%. But the purified DHEA extract had insignificant effects against lung cancer cell A549 and cervical cancer cell Hela ($p > 0.05$). This study provides a reference for the development of functional foods using sweet potato DHEA, which is conducive to the development of sweet potato natural products.

Key words: sweet potato; dehydroepiandrosterone; functional properties; antioxidant; anti-cancer

引文格式:

陈蓬凤, 邹浩峰, 黄师荣, 等. 甘薯去氢表雄酮的体外抗氧化活性与抗癌功效初探[J]. 现代食品科技, 2022, 38(9): 71-79

CHEN Pengfeng, ZOU Haofeng, HUANG Shirong, et al. *In vitro* antioxidant and anticancer properties of dehydroepiandrosterone from sweet potato [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(9): 71-79

收稿日期: 2021-10-19

基金项目: 湖北省技术创新重大专项 (2019AEE022)

作者简介: 陈蓬凤 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品化学与营养科学, E-mail: 1725195801@qq.com

通讯作者: 梅新 (1978-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品化学与营养科学, E-mail: meixin0898@163.com

甘薯 (*Ipomoea batatas* Lan.) 又名甜薯、地瓜、番薯、白薯、红薯等, 属旋花科草质藤本作物, 起源于热带美洲, 于 16 世纪末从南洋传入中国^[1]。我国是世界上最大的甘薯生产国和消费国, 据 FAO 统计, 2019 年我国甘薯种植面积和产量分别为 $2.37 \times 10^6 \text{ hm}^2$ 和 $5.20 \times 10^7 \text{ t}$, 分别占世界甘薯种植面积的 30.55% 和产量的 56.62%。甘薯中含有酚醛酸 (例如绿原酸, 咖啡酸和二咖啡酰奎尼酸)、类胡萝卜素、花青素、黏蛋白、去氢表雄酮等多种生理活性物质。

去氢表雄酮 (Dehydroepiandrosterone, DHEA) 化学名称为 3 β -羟基雄甾-5-烯-17-酮, 分子式为 $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_2$, 分子量为 288.42, 是一种非共轭的 $\Delta^{5,6}$ -双键及可酯化的 3 β -羟基甾体。去氢表雄酮外观呈白色立方体晶体或结晶性粉末, 不溶于水, 溶于石油醚、苯、氯仿、甲醇等有机溶剂。在机体内, DHEA 是制造许多甾体激素的中间体, 也是睾酮和雌二醇性激素的前体物质^[2]。去氢表雄酮的硫酸盐代谢物 (DHEA-S) 是含量最丰富的内源性循环类固醇激素。DHEA 具有治疗肥胖、防治糖尿病、提高免疫力、保护神经、改善卵巢功能等多种生理功效^[3-9], 已应用于食品、医药、保健等领域, 目前, DHEA 主要依赖于化学合成, 且主要市售 DHEA 片剂或胶囊 (青春素) 均为进口, 价格不菲, 成品药在国际市场上的价格高达 52 000 元/kg^[10]。

目前, DHEA 主要获取途径是通过微生物降解或化学合成, 从天然产物中提取 DHEA 并研究其体外活性的研究报道较少^[11]。贺磊^[12]发现薯皮中 DHEA 含量远超薯肉, 预发酵时间、超声功率、pH、提取温度对 DHEA 提取有显著影响。Ran 等^[13]采用超声波-微波协同法提取甘薯渣中的 DHEA, 产量可达 $117.25 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ 。Wang 等^[14]指出 DHEA 能改善血管内皮细胞功能, 降低胰岛素抵抗。Mukohara 等^[15]对糖尿病大鼠实验发现 DHEA 是预防糖尿病、肌腱病的有效药物。本研究以甘薯中提取的 DHEA 为对象, 通过对 DPPH、ABTS、OH 自由基清除率、总还原力的测定, 旨在研究 DHEA 的抗氧化能力; 此外研究了 DHEA 对 α -淀粉酶、酪氨酸酶的活性抑制率, 为精准降低人体血糖水平及抗衰老提供科学依据, 同时对癌细胞的抑制作用作出探索, 为开发高品质 DHEA 功能产品及甘薯天然产物的利用提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

米曲霉孢子粉, 沂水锦润生物科技有限公司; 甘薯, 湖北省农业科学院粮食作物研究所种质资源圃;

乳腺癌细胞 MCF-7、宫颈癌细胞 HeLa、肺癌细胞 A549, 武汉恒意赛生物科技有限公司; 无水乙醇、过硫酸钾、石油醚、抗坏血酸、水杨酸, 国药集团化学试剂有限公司; DHEA 标准品, 西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司; DPPH (HPLC > 98%), 梯希爱化成工业发展有限公司; ABTS (HPLC > 98%), 西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司; 熊果苷, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; CCK-8 检测试剂盒, 碧云天生物技术有限公司; 胎牛血清, 杭州天杭生物科技有限公司; 胰酶-EDTA、PBS, 吉诺生物医药技术有限公司; 色谱甲醇, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; α -淀粉酶, 西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司; 多酚氧化酶, 上海源叶生物科技有限公司; DNS 显色液, 福州飞净生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

Waters alliance 高效液相色谱仪, 沃特世科技有限公司; BCM-1000 型生物洁净工作台, 苏州鸿基洁净科技股份有限公司; 压力蒸汽灭菌器, 上海三申医疗器械公司; 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器公司; 电子天平, 赛多利斯科学仪器有限公司; 紫外可见分光光度计, 尤尼科仪器有限公司; 高速冷冻离心机, 长沙平凡仪器仪表有限公司; CO_2 恒温培养箱, SHEL LAB; 倒置显微镜, OLYMPUS; 酶标检测仪, Diatek; 生化培养箱、鼓风干燥箱, 上海精宏试验设备有限公司; SB-5200D 超声波清洗器, 宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样品处理

将新鲜甘薯洗净、切片, 测完水分后置于 $65 \text{ }^\circ\text{C}$ 烘箱中干燥, 后磨粉过 80 目筛, 标记备用。

1.3.2 甘薯中 DHEA 提取物的制备

取少量米曲霉孢子粉于无菌条件下接种于 PDA 斜面培养基活化一周, 将活化后的米曲霉孢子用无菌生理盐水冲洗, 得到米曲霉孢子悬浮液作为接种液, 同时调整接种液的浓度约为每毫升 $1 \times 10^7 \sim 3 \times 10^7$ 个。按料液比 1:20 (m/V , g/mL) 将蒸馏水与甘薯粉末充分混匀, 加入 2 g/L 的蛋白胨, 在 $121 \text{ }^\circ\text{C}$ 下高压灭菌得发酵培养基, 以发酵培养基体积为基准, 按体积比 6% (V/V) 接入米曲霉孢子悬浮液, 于 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 下发酵 72 h 后高温灭菌停止发酵。发酵产物冷却至室温后于 4 000 r/min 下离心 10 min, 弃去上清液, 将沉淀干燥, 粉碎过 40 目筛, 按 1:15 料液比 (m/V , g/mL) 与石油醚混合超声密闭提取 3 次, 每次 20 min, 超声功率

为 500 W, 合并提取液, 过硅胶柱纯化, 减压浓缩后以色谱级甲醇定容至 5 mL, 得 DHEA 提取液。

1.3.3 DPPH 自由基清除能力测定

参考文献^[16]的方法, 稍做修改。取 0.1 mL 不同浓度的样品溶液, 加入 2 mL 0.2 mmol/L DPPH 甲醇溶液, 摇匀, 室温条件下避光反应 30 min, 于 517 nm 处测定吸光度 A_1 。以等量的甲醇代替样品溶液测定空白吸光度 A_0 。以抗坏血酸作阳性对照。按照公式 (1) 计算 DPPH 自由基清除率 (记为 F_1 , %), 并通过计算 IC_{50} 浓度 (清除率为 50% 时所需浓度) 比较样品抗氧化能力。

$$F_1 = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

1.3.4 ABTS⁺ 自由基清除能力测定

参考文献^[17]的方法, 稍做修改。准确量取 2 mL 20 mmol/L ABTS 溶液和 2 mL 2.45 mmol/L 过硫酸钾溶液, 将两溶液充分混合后在室温且避光的条件下静置 12~16 h, 取出 1 mL 混合液用甲醇稀释, 于 734 nm 下测定吸光度值, 调整其吸光度至 0.7 左右, 即可得到 ABTS 储备工作液。

取 0.1 mL 样品液与 3 mL ABTS 工作液, 混匀后于室温避光放置 30 min, 记录 734 nm 波长下的吸光值 A_1 , 以甲醇代替 ABTS 溶液测定不同浓度样品溶液吸光度 A_2 , 用蒸馏水代替样品测定吸光度 A_0 , Vc 作阳性对照。按照公式 (2) 计算 ABTS⁺ 自由基清除率 (记为 F_2 , %), 并通过计算 IC_{50} 浓度 (清除率为 50% 时所需浓度) 比较样品抗氧化能力。

$$F_2 = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \right) \times 100\% \quad (2)$$

1.3.5 羟基自由基清除率测定

参考文献^[18]的方法, 稍做修改。分别吸取 0.2 mL 不同浓度样品溶液, 依次加入 0.1 mL 9 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液, 0.1 mL 9 mmol/L $FeSO_4$ 溶液, 1 mL 8.8 mmol/L H_2O_2 溶液, 混匀, 静置 30 min, 于 510 nm 处测定吸光度 A_1 , 用蒸馏水代替 $FeSO_4$ 测定不同浓度样品溶液吸光度 A_2 , 用蒸馏水代替样品测定吸光度 A_0 , 以 Vc 作阳性对照。按照公式 (3) 计算羟基自由基清除率 (记为 F_3 , %), 并通过计算 IC_{50} 浓度比较样品抗氧化能力。

$$F_3 = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \right) \times 100\% \quad (3)$$

1.3.6 还原能力测定

参考文献^[18]的方法, 稍做修改。取磷酸二氢钠 1.74 g、磷酸氢二钠 2.70 g 与氯化钠 1.70 g, 加水溶解

定容至 400 mL, 即得 pH 为 6.6 的磷酸盐缓冲液。

分别吸取 1 mL 不同浓度样品溶液, 依次加入 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 (pH 值 6.6)、1% 铁氰化钾溶液各 1 mL, 混匀, 50 °C 水浴 20 min 后快速冷却, 加入 1 mL 10% 三氯乙酸 (Trichloroacetic Acid, TCA) 终止反应, 取 1 mL 样液, 依次加入 1 mL 蒸馏水、0.5 mL 0.1% $FeCl_3$ 溶液, 混匀, 静置 10 min 后于 700 nm 下测定吸光度, 以相应浓度 Vc 作阳性对照。测定结果越高证明样品的还原性越强。

1.3.7 α -淀粉酶活性抑制测定

参考文献^[19,20]的方法, 稍作修改。取 0.5 mL 样品溶液, 以 PBS 缓冲液 (pH 值 6.8) 定容至 1 mL, 加 0.5 mL α -淀粉酶溶液, 摇匀后于 37 °C 水浴 10 min, 再加 0.25 mL 0.5% 可溶性淀粉溶液, 混匀后于 37 °C 水浴 10 min, 加入 2 mL DNS 溶液, 置于沸水浴 5 min, 待冷却后于 540 nm 下测定吸光值。以不加淀粉酶作空白调零, PBS 缓冲液代替样品对照。

1.3.8 酪氨酸酶活性抑制测定

参考文献^[21]的方法, 稍作修改。取 0.5 mL 的不同浓度的提取液, 分别加入 1 mL PBS 缓冲液和酪氨酸酶 (375 U/mL) 水溶液, 30 °C 水浴 10 min, 再加入 2.5 mL 0.03% L-酪氨酸溶液混匀, 水浴 20 min, 于 475 nm 下测定吸光度。以熊果昔为阳性对照。

1.3.9 DHEA 提取物对癌细胞抑制效果

所选细胞株 (乳腺癌细胞 MCF-7、宫颈癌细胞 HeLa、肺癌细胞 A549) 均置于恒温恒湿培养箱 (37 °C、5% CO_2) 中, 接种于含 10% 灭活胎牛血清的高糖 DMEM (1640) 培养基中培养。用显微镜观察细胞生长情况, 每周更换 3 次培养基, 每 2 d 传代一次, 用胰蛋白酶消化传代, 通常取传代 4 次、处于对数生长期的细胞用于试验。

将对数生长期细胞用胰蛋白酶消化, 配制成每毫升 1×10^5 个细胞的细胞悬浮液, 按每孔 10 000 个细胞接种于 96 孔板, 每孔加 100 μ L 细胞悬浮液, 置于 CO_2 (5%) 培养箱中 37 °C 下培养 24 h。将培养基更换为 100 μ L 细胞样品各自对应的含有一定浓度药物的培养基, 对照组更换为含溶剂的培养基。所有孔中加入 10 μ L CCK-8 溶液, 培养箱中孵育 2 h, 使用酶标仪测定 450 nm 光吸收值 OD。

1.4 数据处理

所有试验均重复 3 次, 结果以平均数 \pm 标准差表示; 采用 SPSS 8.0、OriginPro 8.5 进行显著性分析及绘图。

2 结果与分析

2.1 甘薯 DHEA 提取物的纯化效果

将甘薯 DHEA 提取物经硅胶吸附柱纯化后,进行液相色谱分析得到色谱分离图如图 1 所示,经与标准品比对,样品中 DHEA 的保留值为 11.21 min,并结合 DHEA 的工作曲线: $Y=35\ 801X-113\ 428$ ($R^2=0.992\ 2$),样品中 DHEA 的峰面积占比达 76.44%。吴睿等^[22]利用超声波辅助提取薯皮中 DHEA,利用 HPLC 检测发现红薯中 DHEA 保留时间约为 2.70 min,并且在色谱分析中几乎没有杂质干扰。因此证明甘薯 DHEA 提取物纯化效果良好,可为进一步提纯优化做出参考。

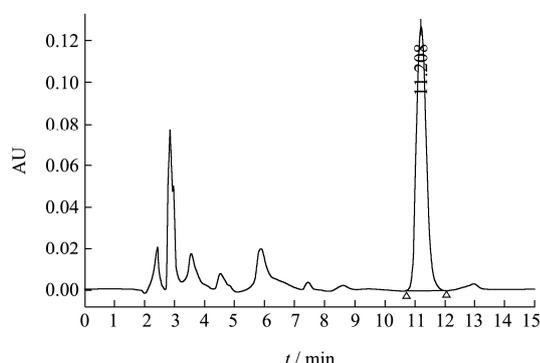


图 1 甘薯 DHEA 提取物纯化后液相色谱分离图

Fig.1 Separation of DHEA extracts from sweet potato by liquid chromatography

2.2 抗氧化活性测定结果

2.2.1 DPPH 自由基清除能力

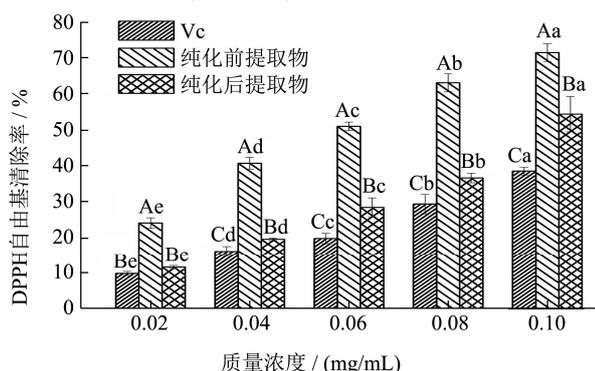


图 2 纯化前后的 DHEA 提取物的 DPPH 自由基清除能力

Fig.2 DPPH free radical scavenging ability of DHEA extracts before and after purification

注:大写字母不同表示不同样品间差异显著 ($p<0.05$),小写字母不同表示不同浓度间差异显著。下同。

以 Vc 为对照,纯化前后 DHEA 对 DPPH 自由基清除能力如图 2 所示,甘薯 DHEA 提取物对 DPPH 自由基的清除能力存在极显著的统计学差异 ($p<0.01$)。

在所选浓度范围内,随着浓度的增加,DPPH 自由基的清除率呈显著地线性增加的趋势 ($p<0.05$)。当质量浓度达到 0.10 mg/mL 时,样品与 Vc 的 DPPH 自由基清除率均达到最高。周旭珍^[23]研究甘薯清酒加工工艺时也得出一致结论,随着样品的用量的提高,DPPH 自由基清除能力随之增大。纯化前的 DHEA 提取物要比纯化后的 DPPH 自由基清除能力高,这可能是由于粗提取物中含有糖苷、黄酮等其他活性物质,对 DPPH 自由基产生一定清除能力^[24,25]。而纯化后的 DHEA 可能是由于硅胶柱吸附了一些物质导致其 DPPH 自由基清除能力有所下降,但仍比 Vc 要高。通过 SPSS 分析,Vc、纯化前、纯化后样品对 DPPH 自由基清除力的 IC_{50} 数值分别为 0.17、0.05、0.11 mg/mL,说明甘薯 DHEA 提取物对 DPPH 自由基有较好的清除力。

2.2.2 ABTS⁺ 自由基清除能力

纯化前后 DHEA 提取物对 ABTS⁺ 自由基清除能力的对比由图 3 可知,甘薯 DHEA 提取物纯化前后与 Vc 在相同浓度水平下对 ABTS⁺ 自由基的清除能力存在极显著差异 ($p<0.01$)。在所选浓度范围内,随着各样品浓度的增加,ABTS⁺ 自由基的清除率呈显著地线性增加的趋势 ($p<0.05$),在 0.10 mg/mL 时达到最大。当浓度在 0.02~0.06 mg/mL 时,纯化前的 DHEA 提取物的 ABTS⁺ 自由基清除率在三种样品间最高,而纯化后的样品与 Vc 的 ABTS⁺ 自由基清除率无显著性差异 ($p>0.05$)。另一方面,Vc 的 IC_{50} 为 0.06 mg/mL;纯化前的样品 IC_{50} 为 0.05 mg/mL;纯化后的样品 IC_{50} 为 0.09 mg/mL。说明甘薯 DHEA 提取物对 ABTS⁺ 自由基有较好的清除力。Ji 等^[26]对小鼠体内免疫功能的影响研究发现,DHEA 有较好的抗氧化能力,能对动物和人的炎症反应提供有效保护,赵志明等^[27]也得出相似结论,DHEA 能增加静脉血管内皮细胞的抗氧化能力,可能是预防动脉粥样硬化的有效机制之一。

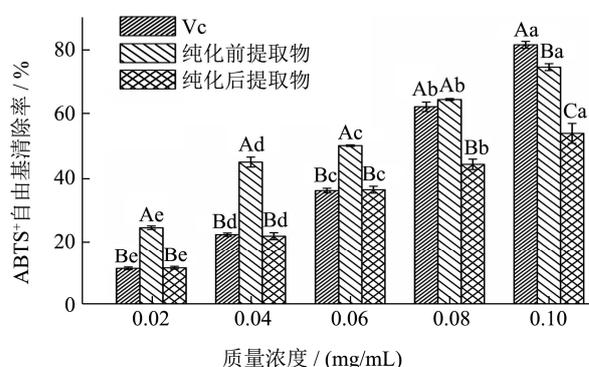


图 3 纯化前后 DHEA 提取物 ABTS⁺ 自由基清除能力

Fig.3 ABTS free radical scavenging ability of DHEA extracts before and after purification

2.2.3 羟基自由基清除力结果

纯化前后的样品与 Vc 对羟基自由基清除能力的对比由图 4 可知,甘薯 DHEA 提取物与 Vc 在相同浓度下的羟基自由基清除能力存在极显著差异 ($p < 0.01$)。Anna 等^[28]研究发现 DHEA 可降低地塞米松诱导的兔肾皮质氧化应激,并且能降低 NADPH 氧化酶活性,发现使用 DHEA 处理的兔子羟基自由基生成减少,证明 DHEA 对羟基自由基有较好的抑制能力。在所选浓度范围内,羟基自由基的清除率与样品浓度呈正相关趋势,不同浓度水平间的清除率具有极显著差异 ($p < 0.01$)。当质量浓度达到 0.10 mg/mL 时, DHEA 提取物与 Vc 的羟基自由基清除率均达到最高。当质量浓度在 0.02~0.06 mg/mL 时,纯化前提取物的羟基清除力显著高于另外二者,而当质量浓度为 0.08 mg/mL 时,三种样品间的羟基自由基清除力无显著性差异 ($p > 0.05$)。Ding 等^[29]研究发现, DHEA 预处理可增加过氧化物酶活性来防止由 H₂O₂ 引起的细胞氧化损伤,从而抑制羟基自由基的形成。此外,经 SPSS 分析得到 Vc、纯化前、纯化后样品的 IC₅₀ 值分别为 0.05、0.04、0.05 mg/mL。说明甘薯 DHEA 提取物对羟基自由基有较好的清除力。

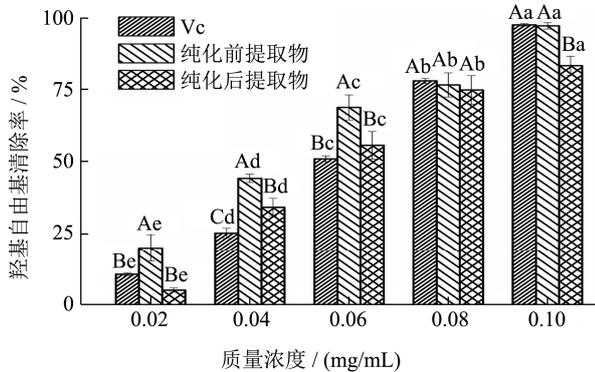


图 4 纯化前后的 DHEA 提取物羟基自由基清除能力

Fig.4 The hydroxyl radical scavenging ability of DHEA extracts before and after purification

2.2.4 总还原能力结果

纯化前后的样品与 Vc 的总还原能力的对比由图 5 可知,在所选浓度范围内,随着浓度的增加,吸光值越来越大,还原力呈显著地线性增加的趋势 ($p < 0.05$)。由图 5 可以看出,当质量浓度达到 0.10 mg/mL 时,样品与 Vc 的总还原能力均达到最高。当浓度为 0.02 mg/mL 时,各样品间总还原力差异极显著 ($p < 0.01$),大小排序为:纯化前>纯化后>Vc;当质量浓度在 0.04~0.06 mg/mL 时, DHEA 提取物纯化前后同一浓度下的还原力无显著性差异 ($p > 0.05$); DHEA 提取物纯化前后和 Vc 三者的还原力在 0.08 mg/mL 和 0.10 mg/mL 质量浓度下均无显著性差

异 ($p > 0.05$)。杨笋等^[30]曾研究 DHEA 对活性氧自由基的抗氧化作用,发现 DHEA 可明显抑制因氧化受损引起的胸腺细胞凋亡进而起到抗氧化损伤的作用。

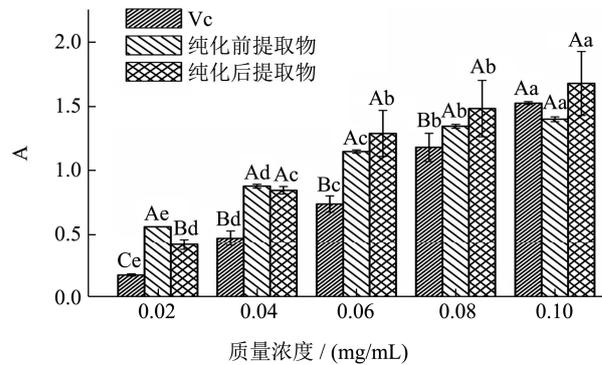


图 5 纯化前后 DHEA 提取物还原能力

Fig.5 The reduction ability of DHEA extracts before and after purification

2.3 α-淀粉酶活性抑制结果

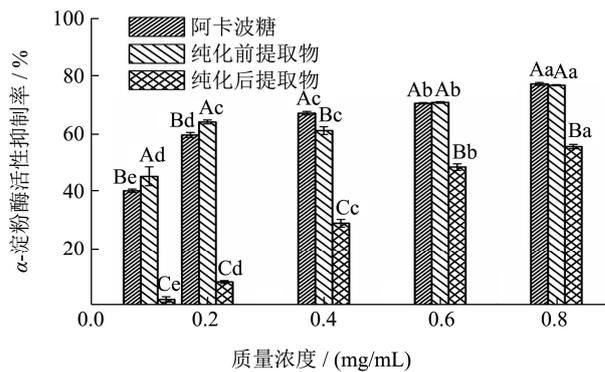


图 6 纯化前后 DHEA 提取物的 α-淀粉酶活性抑制能力

Fig.6 α-amylase activity inhibition ability of DHEA extracts before and after purification

α-淀粉酶是影响人体血糖水平的重要酶之一,可通过作用 α-1,4-糖苷键水解淀粉成低聚糖、葡萄糖等物质,同时也会造成血糖浓度升高^[31]。如图 6 所示,在选定的浓度范围内,甘薯 DHEA 提取物和阿卡波糖对 α-淀粉酶抑制作用随浓度的升高而增大,在质量浓度 0.80 mg/mL 时抑制率达到最大。袁向华等^[32]探究了以马铃薯淀粉为底物时阿卡波糖对胰 α-淀粉酶的抑制动力学,发现阿卡波糖在体外对胰 α-淀粉酶有明显的抑制作用,并且抑制作用随浓度的升高而增大,这与本实验研究结果一致。纯化后 DHEA 提取物的 α-淀粉酶活性抑制率在 2.16%~55.54%之间,并且远低于纯化前样品与阳性对照组。由图 6 可以看出,当质量浓度在 0.10~0.40 mg/mL 时,纯化前后的 DHEA 提取物与阿卡波糖的 α-淀粉酶抑制率差异极显著 ($p < 0.01$),纯化后提取物的 α-淀粉酶抑制率要远低于其他两者;当质量浓度在 0.60~0.80 mg/mL 时,纯

化前提取物与阿卡波糖的 α -淀粉酶抑制率无显著性差异 ($p>0.05$)。DHEA 纯化前后以及阿卡波糖对 α -淀粉酶活性抑制的 IC_{50} 值分别为: 0.05、0.68、0.13 mg/mL, 说明纯化前的 DHEA 提取物对 α -淀粉酶的抑制能力更高。Anna 等^[33]研究发现, DHEA 会影响肝脏和肾脏中不同结合位点的糖异生, 降低胰岛素敏感性和血浆葡萄糖水平, 具有一定的降血糖作用, 因此将纯化前的 DHEA 应用到临床治疗糖尿病是未来的研究方向之一。

2.4 酪氨酸酶活性抑制结果

如图 7 所示, 在选定的浓度范围, 甘薯 DHEA 提取物和熊果苷对酪氨酸酶抑制作用随浓度的升高而增大, 在质量浓度 0.10 mg/mL 时达到最大, 且不同样品间的差异极显著 ($p<0.01$)。从图 7 中可看出, 纯化后 DHEA 提取物的酪氨酸酶活性抑制率在 5.55%~50.57%之间。当浓度在 0.04 mg/mL 时, 纯化前提取物与纯化后提取物的酪氨酸酶活性抑制率无显著性差异 ($p>0.05$), 其他浓度水平下, 纯化前提取物的酪氨酸酶抑制率均显著高于纯化后提取物。纯化前 DHEA 提取物在质量浓度 0.08 mg/mL 和 0.10 mg/mL 浓度下的酪氨酸酶抑制率无显著性差异 ($p>0.05$)。通过计算得到熊果苷、纯化前、纯化后提取物对酪氨酸酶抑制作用的 IC_{50} 值分别为: 0.07、0.07、0.10 mg/mL, 说明甘薯 DHEA 提取物对酪氨酸酶有较强的抑制作用。殷复建等^[34]研究发现, DHEA 可能使机体内分泌激素改变, 同时改变某些相关基因的表达量, 进而减少机体内脂质过氧化物的形成, 从而达到延缓衰老进程的作用。Xu 等^[35]研究发现熊果苷酯通过使酪氨酸酶的二级结构更松散和更不稳定来抑制酪氨酸酶, 抑制率可达 15.60%, 这为之后研究 DHEA 对酪氨酸酶活性抑制机理提供了思路。

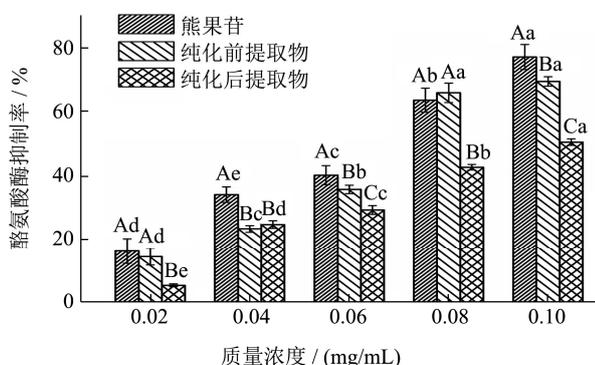


图 7 DHEA 提取物与熊果苷对酪氨酸酶活性的抑制

Fig.7 Inhibition of tyrosinase activity by sweet potato DHEA extract and arbutin

2.5 对癌细胞的抑制结果

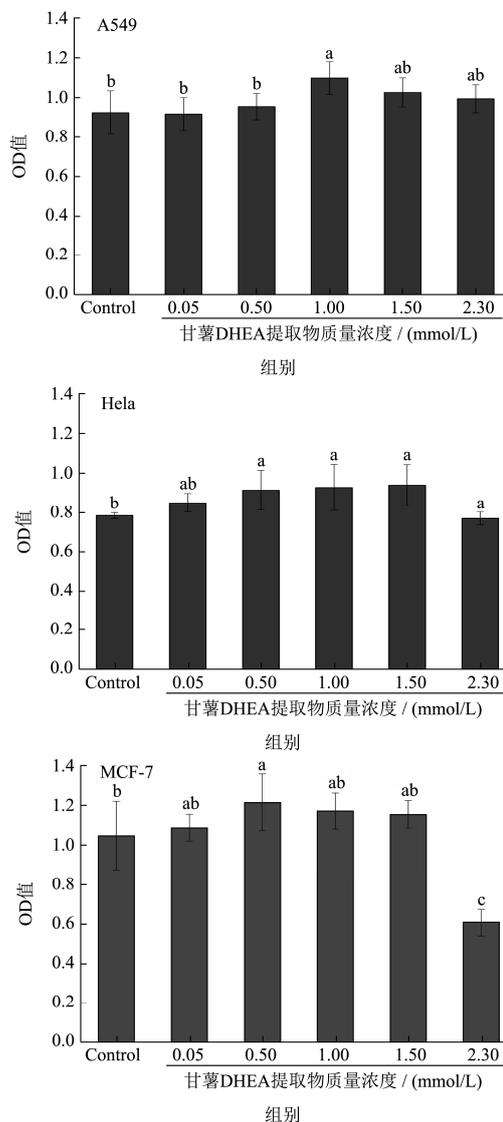


图 8 纯化后 DHEA 提取物对三种癌细胞的影响

Fig.8 Effect of purified DHEA extracts on three cancer cells

纯化后的甘薯 DHEA 提取物对三种癌细胞的抑制效果如图 8 所示。本研究选定了三种癌细胞进行活性筛选, 经统计学分析发现, DHEA 提取物对肺癌细胞 A549 的影响存在显著性差异 ($p<0.05$), 对宫颈癌细胞 HeLa、乳腺癌细胞 MCF-7 的影响存在极显著差异 ($p<0.01$)。通过计算发现, 在所选的浓度范围内, 以空白组作对照, 甘薯 DHEA 提取物仅在质量浓度 2.30 mmol/L 时对 MCF-7 细胞增殖有显著的抑制作用 ($p<0.05$), 抑制率达 47.50%, 而其余两种癌细胞未受到 DHEA 提取物的抑制作用。Rebeca 等^[36]对乳腺癌细胞 MCF-7、MDA-MB-231 和 Hs578T 进行研究, 发现 DHEA 诱导 MCF-7 细胞坏死增加 20%, 能抑制所有乳腺癌细胞的增殖和迁移, 是治疗乳腺癌的

有效药物。因此,可选乳腺癌细胞 MCF-7 做后续抑制试验研究对象。唐雪峰^[37]曾构建小鼠 S180 荷瘤模型研究山药 DHEA 提取物的抗肿瘤功效,发现各 DHEA 药物试验组的抗肿瘤效果均呈剂量效应关系,对小鼠肿瘤有显著地抑制效果。

3 结论

将甘薯 DHEA 提取物经硅胶吸附纯化后,样品中 DHEA 保留值为 11.21 min,峰面积占比达 76.44%。通过对 DPPH、ABTS⁺、羟基自由基清除率以及还原能力的测定来评价 DHEA 提取物的抗氧化活性,发现样品纯化前后的抗氧化活性均存在极显著差异($p < 0.01$),当质量浓度达到 0.10 mg/mL 时,抗氧化能力达到最强。由纯化前后样品以及 Vc 的 IC₅₀ 数值可以看出,DHEA 提取物在纯化前后均有很好的抗氧化活性。通过对 α -淀粉酶、酪氨酸酶抑制率的测定分别考察甘薯 DHEA 提取物的降血糖、抗衰老活性,并且同时与阳性对照,发现甘薯 DHEA 提取物在纯化前后均具有一定的抗衰老、降血糖效果。纯化后 DHEA 提取物的 α -淀粉酶活性抑制率在 2.16%~55.54%之间,酪氨酸酶活性抑制率在 5.55%~50.57%之间。此外,选取了三种癌细胞(肺癌细胞 A549、宫颈癌细胞 HeLa、乳腺癌细胞 MCF-7)作为 DHEA 对癌细胞抑制作用的活性筛选,通过与空白对照发现纯化后的 DHEA 提取物仅对 MCF-7 细胞在 2.30 mmol/L 质量浓度时有显著的抑制效果,而对其他两种癌细胞无显著的抑制效果。本研究通过对甘薯 DHEA 提取物的体外抗氧化、降血糖、抗衰老及癌细胞抑制作用的研究,为 DHEA 的功能性产品开发及甘薯天然活性成分的利用提供一定的依据。

参考文献

- [1] 杨婧,董清涛,邢丹英.甘薯富硒生产技术要点[J].农村实用技术,2019,7:26
YANG Jing, DONG Qingtao, XING Danying. Key points of selenium enriched production technology of sweet potato [J]. Applicable Technologies for Rural Areas, 2019, 7: 26
- [2] 杨红花,秦宏伟.去氢表雄酮生理活性及其提取纯化研究进展[J].粮食与油脂,2009,156(4):44-46
YANG Honghua, QIN Hongwei. Research progress on purification and function properties of dehydroepiandrosterone [J]. Cereals & Oils, 2009, 156(4): 44-46
- [3] Schwartz A G, Pashko L, Whitcomb J M. Inhibition of tumor development by dehydroepiandrosterone and related steroids [J]. Toxicologic Pathology, 1986, 14(3): 357-362

- [4] 张骁.20 世纪的重要发现-脱氢表雄酮[J].中国保健食品,2001,14(6):10-11
ZHANG Xiao. The discovery of the 20th century - dehydroepiandrosterone [J]. Chinese Health Food, 2001, 14(6): 10-11
- [5] 秦学孔.天然植物性激素 DHEA 的分离分析与提取工艺研究[D].大连:大连理工大学,2000
QIN Xuekong. Isolation, analysis and extraction of natural Plant sex hormone DHEA [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2000
- [6] 侯新伟,李唐,贺婉红,等.脱氢表雄酮抗糖尿病作用研究进展[J].中华糖尿病杂志,2014,6(10):773-775
HOU Xinwei, LI Tang, HE Wanhong, et al. Research progress of antidiabetic effect of dehydroepiandrosterone [J]. Chinese Journal of Diabetes Mellitus, 2014, 6(10): 773-775
- [7] Papadopoulou D, Shihan M, Scheiner-Bobis G. Physiological implications of DHEAS-induced non-classical steroid hormone signaling [J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2018, 179: 73-78
- [8] 赵小卫,韩伟,孟雪梅,等.脱氢表雄酮对早发性卵巢功能不全不孕症女性卵巢储备功能的影响[J].浙江医学,2019,41(21): 2312-2315
ZHAO Xiaowei, HAN Wei, MENG Xuemei, et al. Effect of dehydroepiandrosterone on ovarian reserve function in patients with premature ovarian insufficiency [J]. Zhejiang Medical Journal, 2019, 41(21): 2312-2315
- [9] Huang K, Cai H L, Wu L D. Potential of dehydroepiandrosterone in modulating osteoarthritis-related pain [J]. Steroids, 2019, 150: 108-433
- [10] 秦宏伟.甘薯功能因子分析及质量评价研究[D].泰安:山东农业大学,2006
QIN Hongwei. Studies on the analysis of functional components in sweet potato and its quality assessment [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2006
- [11] 孙俊良,杜寒梅,梁新红,等.甘薯渣中去氢表雄酮抑菌活性研究[J].食品工业科技,2018,39(22):6-11,16
SUN Junliang, DU Hanmei, LIANG Xinhong, et al. Antimicrobial activity of dehydroepiandrosterone in sweet potato residue [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(22): 6-11, 16
- [12] 贺磊.基于响应面法优化的红薯山药饮料研制及红薯中 DHEA 提取工艺研究[D].成都:西南交通大学,2019
HE Lei. Preparation of sweet potato and yam composite beverage and optimization of DHEA extraction from sweet potato by response surface methodology [D]. Chengdu:

- Southwest Jiaotong University, 2019
- [13] Ran Junjian, Liang Xinhong, Du Hanmei, et al. Optimization of DHEA extraction from sweet potato pomace by ultrasonic-microwave synergistic employing response surface methodology [J]. Journal of AOAC International, 2019, 102(2): 680-682
- [14] WANG Xiaoxue, FENG Helong, FAN Dehui, et al. The influence of dehydroepiandrosterone (DHEA) on fasting plasma glucose, insulin levels and insulin resistance (HOMA-IR) index: A systematic review and dose response meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Complementary Therapies in Medicine, 2020, 55: 102583
- [15] Mukohara Shintaro, Mifune Yutaka, Inui Atsuyuki, et al. *In vitro* and *in vivo* tenocyte-protective effectiveness of dehydroepiandrosterone against high glucose-induced oxidative stress [J]. BMC Musculoskeletal Disorders, 2021, 22(1): 519-530
- [16] 杨海艳,赵天明,张显权,等.黔产苹果不同部位精油化学成分分析及体外抗氧化活性评价[J].食品工业科技,2020,41(14): 52-57
YANG Haiyan, ZHAO Tianming, ZHANG Xianquan, et al. Chemical component analysis and *in vitro* antioxidant activity evaluation of essential oils from different parts of *Amomum tsaoko* in Guizhou Province [J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(14): 52-57
- [17] 张剑霜,王地平,侯忠华,等.赤水白茶总黄酮超声辅助提取工艺优化及其抗氧化活性[J].食品工业科技,2020,41(17):206-211
ZHANG Jianshuang, WANG Diping, HOU Zhonghua, et al. Optimization of ultrasonic assisted extraction of total flavonoids from Chishui white tea and its antioxidant activity [J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(17): 206-211
- [18] 郑斌,赵巧丽,文定青,等.提取方法对芒果核仁多酚提取率及抗氧化活性的影响[J].食品研究与开发,2020,41(9):76-87
ZHENG Bin, ZHAO Qiaoli, WEN Dingqing, et al. Effects of different extraction methods on the extraction yield and antioxidation of polyphenols from mango kernel [J]. Food Research and Development, 2020, 41(9): 76-87
- [19] 陈树俊,崔云.甘薯渣多糖提取、结构鉴定及体外功能研究[J].中国粮油学报,2021,9:67-73
CHEN Shujun, CUI Yun. Extraction, structure identification and *in vitro* function study of polysaccharides from sweet potato residue [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2021, 9: 67-73
- [20] 汤陈鹏,吕峰,王蓉琳.孔石莼多糖锌结构表征与体外降血糖活性[J].食品科学,2020,41(7):52-58
TANG Chenpeng, LYU Feng, WANG Ronglin. Structural characterization and hypoglycemic activity *in vitro* of *Ulva pertusa* polysaccharides-zinc complex [J]. Food Science, 2020, 41(7): 52-58
- [21] 刘梦洁,林丽静,姜永超.高良姜精油和纯露的体外抗氧化活性及酪氨酸酶抑制活性研究[J].食品研究与开发,2021,42(7):56-61
LIU Mengjie, LIN Lijing, JIANG Yongchao. Study on *in vitro* antioxidant activity and tyrosinase inhibitory activity of essential oil and hydrolate from *alpinia officinarum hance* [J]. Food Research and Development, 2021, 42(7): 56-61
- [22] 吴睿,穆俐俐,张丹,等.超声波辅助提取薯皮中去氢表雄酮的工艺研究[J].化学研究与应用,2021,33(8):1577-1581
WU Rui, MU Lili, ZHANG Dan, et al. Technical study for ultrasonic-assisted extraction of dehydroepiandrosterone from sweet potatoes skin [J]. Chemical Research and Application, 2021, 33(8): 1577-1581
- [23] 周旭珍.甘薯清酒加工工艺与品质特性研究[D].沈阳:沈阳农业大学,2020
ZHOU Xuzhen. Study on the processing technology and quality characteristics of sweet potato sake [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2020
- [24] 苟鼎,张腊梅,黄红琴,等.响应面优化微波辅助提取黑莓果渣黄酮及其生物活性研究[J].食品安全质量检测学报,2021,12(15):6026-6034
GOU Ding, ZHANG Lamei, HUANG Hongqin, et al. Optimization on microwave extraction of flavonoids from blackberry pomaces using response surface methodology and its biological activity [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2021, 12(15): 6026-6034
- [25] 林好,陈圻宇,黄庆谱,等.紫薯提取物中花色苷的含量测定及抗氧化活性研究[J].中国食品添加剂,2021,32(4):16-22
LIN Hao, CHEN Qiyu, HUANG Qingpu, et al. Determination of anthocyanins in purple sweet potato extract and study of its antioxidant activity [J]. China Food Additives, 2021, 32(4): 16-22
- [26] Ji Cao, Lei Yu, Jinlong Zhao, et al. Effect of dehydroepiandrosterone on the immune function of mice *in vivo* and *in vitro* [J]. Molecular Immunology, 2019, 112: 283-290
- [27] 赵志明,黄从新,王晶,等.去氢表雄酮对培养的人脐静脉血管内皮细胞抗氧化能力的影响[J].医学新知杂志,2001,2:76-77
ZHAO Zhiming, HUANG Congxin, WANG Jing, et al. The

- effect of dehydroepiandrosterone on anti-oxidation of cultured human umbilical vein endothelial cell [J]. *New Medicine*, 2001, 2: 76-77
- [28] Anna Kiersztan, Nina Trojan, Aleksandra Tempes, et al. DHEA supplementation to dexamethasone-treated rabbits alleviates oxidative stress in kidney-cortex and attenuates albuminuria [J]. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 174: 17-26
- [29] DING Xiao, YU Lei, GE Chongyang, et al. Protective effect of DHEA on hydrogen peroxide-induced oxidative damage and apoptosis in primary rat leydig cells [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(10): 16158-16169
- [30] 杨笋,韩锐.去氢表雄酮的抗氧化作用及其机理[J].*癌症*,2001, 12:1349-1354
YANG Sun, HAN Rui. Anti-oxidation activity of dehydroepiandrosterone and its mechanisms [J]. *Chinese Journal of Cancer*, 2001, 12: 1349-1354
- [31] 罗丽平,李冰晶,赵景芳,等.三种食用菌提取物体外抗氧化与降血糖活性研究[J].*食品工业科技*,2020,41(20):324-329
LUO Liping, LI Bingjing, ZHAO Jingfang, et al. Antioxidant and hypoglycemic activity in vitro of three edible fungus extracts [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(20): 324-329
- [32] 袁向华,周艳玲,勾洵,等.阿卡波糖对胰 α -淀粉酶的抑制动力学研究[J].*世界科技研究与发展*,2016,38(1):117-121
YUAN Xianghua, ZHOU Yanling, GOU Xun, et al. Researches on inhibition kinetics of pancreatic α -amylase by acarbose [J]. *World Sci-Tech R & D*, 2016, 38(1): 117-121
- [33] Anna Kiersztan, Andrzej Nagalski, Paweł Nalepa, et al. DHEA-induced modulation of renal gluconeogenesis, insulin sensitivity and plasma lipid profile in the control-and dexamethasone-treated rabbits. *Metabolic studies* [J]. *Biochimie*, 2016, 121: 87-101
- [34] 殷复建,刘琳,沈学怀,等.DHEA 对自然衰老大鼠抗氧化功能的影响[J].*畜牧与兽医*,2012,44(S1):285
YIN Fujian, LIU Lin, SHEN Xuehuai, et al. Effect of DHEA on antioxidant function of natural aging rats [J]. *Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2012, 44(S1): 285
- [35] XU Haixia, LI Xiaofeng, XIN Xuan, et al. Antityrosinase mechanism and antimelanogenic effect of arbutin esters synthesis catalyzed by whole-cell biocatalyst [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(14): 4243-4253
- [36] Rebeca López Marure, Piedad Gómez Contreras, Joseph S Dillon. Effects of dehydroepiandrosterone on proliferation, migration, and death of breast cancer cells [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2011, 660(2-3): 268-274
- [37] 唐雪峰.高脱氢表雄酮山药种质资源及其抗肿瘤和抗氧化的研究[D].福州:福建农林大学,2010
TANG Xuefeng. The studies of high DHEA *Dioscorea batatas* germplasm resource and function of anti-tumor and antioxidation [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2010