

不同月份香椿不同部位叶片提取物中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的分布规律及其降血糖活性

曹佩, 徐佳悦, 张心悦, 侯莹钰, 张紫葳, 刘细霞*, 吴琴, 侯建军, 王友如

(湖北师范大学生命科学学院, 食用野生植物保育与利用湖北省重点实验室, 特色野菜良种繁育与利用湖北省工程研究中心, 生物学国家级实验教学示范中心, 湖北黄石 435002)

摘要: 为探究不同月份香椿不同部位叶片提取物中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的分布规律和降血糖效果, 2020年8~11月, 从3棵香椿树中采集36个样本, $\varphi=50\%$ 乙醇提取 α -葡萄糖苷酶抑制剂。分析香椿叶提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性、酶抑制动力学和荧光光谱特征。进而将不同浓度香椿叶提取物与质量分数为3%葡萄糖共暴露斑马鱼, 研究在斑马鱼体内的降血糖效果。结果表明: 香椿叶中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的时间分布规律为8月、11月抑制率较高, 可达99%; 空间分布规律为从上层到下层抑制率依次递减, α -葡萄糖苷酶的抑制活性在时间和空间呈现显著性差异。香椿叶提取物对 α -葡萄糖苷酶抑制的 IC_{50} 为0.45 mg/mL, 远低于阳性对照阿卡波糖 5.05 mg/mL。香椿叶提取物的酶抑制类型为竞争性抑制, 香椿叶提取物与酶的相互作用模式属于动态荧光猝灭。当香椿叶提取物暴露浓度为4 mg/L时, 斑马鱼体内血糖浓度与高糖组有显著性差异。该研究为从香椿叶中大量提取 α -葡萄糖苷酶抑制剂的采样方法设计及开发一种新型降血糖药物提供理论支持。

关键词: 香椿; α -葡萄糖苷酶; 分布规律; 体外酶抑制实验; 荧光光谱; 斑马鱼

文章编号: 1673-9078(2023)04-102-109

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.4.0678

Distribution Patterns and Hypoglycemic Activities of α -Glucosidase Inhibitors in Extracts from Different Parts of *Toona sinensis* Leaves Collected in Different Months

CAO Pei, XU Jiayue, ZHANG Xinyue, HOU Yingyu, ZHANG Ziwei, LIU Xixia*, WU Qin, HOU Jianjun, WANG Youru

(Hubei Key Laboratory of Edible Wild Plants Conservation and Utilization, Hubei Engineering Research Center of Typical Wild Vegetable Breeding and Comprehensive Utilization Technology, National Demonstration Center for Experimental Biology Education, Hubei Normal University, Huangshi 435002, China)

Abstract: In order to explore the distribution patterns and hypoglycemic effect of α -glucosidase inhibitors in the extracts from different parts of *Toona sinensis* collected in different months. From August to November of 2020, 36 samples were collected from three *Toona sinensis* trees respectively, and 50% ethanol was used to extract the inhibitors against α -glucosidase. The inhibitory activity, enzyme inhibition kinetics and fluorescence spectral characteristics of *Toona sinensis* leaf extract against α -glucosidase were analyzed. Furthermore, zebrafish was exposed to different concentrations of *Toona sinensis* leaf extract along with 3% glucose to study the hypoglycemic effect. The results showed that the

引文格式:

曹佩,徐佳悦,张心悦,等.不同月份香椿不同部位叶片提取物中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的分布规律及其降血糖活性[J].现代食品科技, 2023,39(4):102-109.

CAO Pei, XU Jiayue, ZHANG Xinyue, et al. Distribution patterns and hypoglycemic activities of α -glucosidase inhibitors in extracts from different parts of *toona sinensis* leaves collected in different months [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(4): 102-109.

收稿日期: 2022-05-27

基金项目: 国家级大学生创新创业项目(202110513002); 湖北省技术创新专项(重大项目)(2019ABA112)

作者简介: 曹佩(2001-), 女, 本科生, 研究方向: 食品营养与安全, E-mail: 2751334723@qq.com

通讯作者: 刘细霞(1983-), 女, 博士, 研究方向: 食品营养与安全, E-mail: liuxixia1@163.com

temporal distribution pattern of α -glucosidase inhibitors in *Toona sinensis* leaves was: the inhibitory rate was higher in August and November (up to 99%); the spatial distribution pattern was: the inhibitory rate decreased from the upper layer to the lower layer. The inhibitory activity against α -glucosidase showed significant differences in time and space. The half inhibitory concentration (IC_{50}) of *Toona sinensis* leaf extract against α -glucosidase was 0.45 mg/mL, which was much lower than the positive control acarbose (5.05 mg/mL). The enzyme inhibitory type of *Toona sinensis* leaf extract was competitive inhibition, and the interaction mode between the *Toona sinensis* extract and enzyme belonged to dynamic fluorescence quenching. When the exposure concentration of *Toona sinensis* leaf extract was 4 mg/L, the concentration of blood glucose in zebrafish was significantly different from that of high glucose group. This study provides a theoretical support for sampling method design for massive extraction of α -glucosidase inhibitors from *Toona sinensis* leaves and development of a new hypoglycemic drug.

Key words: *Toona sinensis*; α -glucosidase; distribution rules; *in vitro* enzyme inhibition; fluorescence spectrum; zebrafish

糖尿病是以高血糖为特征的内分泌代谢性疾病,与人体所处环境和遗传等有着紧密关联^[1]。糖尿病治疗药物以阿卡波糖、伏格列波糖和米格列醇为主,其制备工艺复杂,成本较高,通常伴随毒副作用。因此学者多愿意探索天然来源的抗糖尿病药物 α -葡萄糖苷酶抑制剂,其无毒副作用,控糖效果较好^[2]。 α -葡萄糖苷酶抑制剂是已被发现的抗糖尿病药物的重要组成部分^[3]。 α -葡萄糖苷酶可以水解 α -1,4糖苷键并从多糖的非还原端切割下葡萄糖。 α -葡萄糖苷酶活性强弱决定了机体对淀粉、糊精等碳水化合物的吸收利用程度^[4]。现已证实,天然产物中的黄酮类、生物碱类、多糖类、酚类等物质具有良好的 α -葡萄糖苷酶抑制活性^[5],具有广阔的选择空间。

香椿(*Toona sinensis* Roem.)在我国已有两千多年的栽培历史,是著名的药食同源植物。国内外学者从香椿叶中分离鉴定出约100多种化合物,其中香椿叶多酚提取物被证实具有抑制糖尿病小鼠血糖升高的功效^[6]。Wang等^[7]发现香椿叶提取物可通过改变动物脂肪葡萄糖的运输来缓解高血糖症。Zhang等^[8]研究香椿叶槲皮素对经诱导后患糖尿病小鼠的降血糖效果,结果表明口服香椿叶提取物可显著降低小鼠的血糖,改善高血糖症状。香椿具有明显的地域性和季节性差异,在不同产地、采收部位和采收时间下,香椿中各营养物质含量及其活性功能会有一定差异^[9-12],其中嫩叶中的营养物质及抗氧化能力均高于老叶^[11],并且刘常金等^[13]发现从5~11月份的香椿叶中黄酮与皂苷含量呈增长趋势,11月份含量达到最大值,但香椿叶提取物中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的时空变化规律尚不清晰。

斑马鱼作为重要的脊椎动物模式生物之一,相比于小鼠,具有发育周期短、体型小、易饲养的特点,与人类基因的同源性高,器官系统的发生与人类有很大相似性,通过运用分子生物学和细胞学的技术可以建立人类特殊疾病的模型。吉薇等^[14]基于糖尿病斑马鱼模型对南极磷虾酶解物的降血糖活性进行评价,发

现3000~100 u南极磷虾酶解物在斑马鱼体内具有一定的降血糖功效。王泽民^[15]通过3%葡萄糖浸泡和喂养高脂食物的方式,形成与哺乳动物模型类似的血管并发症。本课题组在研究过程中发现,采用斑马鱼作为降血糖功效评价模式生物,评价时间大大缩短,约6 d便可完成评价。

因此,本文研究不同部位香椿叶提取物中含有的 α -葡萄糖苷酶抑制剂在时间及空间上的分布规律,分析其与 α -葡萄糖苷酶的体外相互作用和在斑马鱼体内的降血糖效果,为推动香椿中天然 α -葡萄糖苷酶抑制剂的开发提供理论依据与技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料与试剂

香椿(来自湖北师范大学生物园香椿种植基地采集); α -葡萄糖苷酶(α -Glucosidase, EC3.2.1.20),美国Sigma公司;4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷(4-N-trophenyl- α -D-glucop Yranoside, PNPG, 026K1516),Biolabs公司,乙醇(分析纯),天津市科密欧化学试剂有限公司;0.1 mol/L pH值6.8的磷酸缓冲液,2.5 mmol/L PNPG,0.2 mol/L碳酸钠溶液。

1.1.2 采样点

- 1号树: N30°13.8515' E115°03.6040';
- 2号树: N30°13.9260' E115°03.4733';
- 3号树: N30°13.5954' E115°03.1573'.

1.1.3 主要仪器设备

WMK-02型离心机,武汉电控仪器厂;AB204-N型电子分析天平,梅特勒-托利多仪器上海有限公司;SpectraMax i3x多功能酶标仪,美谷分子仪器有限公司;HH-4型水浴锅,金坛市精达仪器制造有限公司;HP-02型多功能粉碎机,永康市帅通电器厂;安穩血糖仪,三诺生物传感股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 香椿叶的采集

分别在8月21日、9月24日、10月21日、11月21日对1、2、3号树进行采样。根据叶片分布位置,将香椿树分为上层、中层、下层,共选取样本类型36个。采样时尽量选取成熟叶片进行人工采摘。采摘时从香椿树枝的叶茎部分采摘,保留叶片脉络部分。

1.2.2 香椿叶中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的提取

采摘后的新鲜香椿叶,经清洗后晒干,将干燥后的香椿叶在粉碎机中粉碎成粉末。香椿叶粉末的提取条件为:料液比为1:40 (m/V),溶剂为 $\varphi=50\%$ 乙醇,浸提温度为 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$,浸提时间为2 h。在6 000 r/min离心15 min,收集上清液,在 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 挥干。将挥干所得到的物质加蒸馏水完全溶解,溶解完全后转移至EP管中,再次离心(6 000 r/min、15 min),取上清液作为样品液。

1.2.3 香椿叶提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性测定

参考文献^[16,17]中的方法稍作修改。取样品,在96孔板中先加 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS) $50\text{ }\mu\text{L}$,加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ 0.8 U/mL 的 α -葡萄糖苷酶,再加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ 香椿提取样品。在恒温培养箱中 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育10 min,加 $10\text{ }\mu\text{L}$ 2.5 mmol/L 底物PNPG, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育30 min。最后,加 $50\text{ }\mu\text{L}$ 0.2 mol/L 的 Na_2CO_3 溶液终止反应,用酶标仪在波长 405 nm 处测定其吸光度值。抑制率按以下公式计算:

$$R = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

R ——抑制率, %;

A_0 ——空白对照孔吸光度值;

A_1 ——加样品孔的吸光度值;

A_2 ——未加酶时的背景孔吸光度值。

1.2.4 香椿叶提取物对 α -葡萄糖苷酶的半抑制浓度测定

在96孔板中先加 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS) $50\text{ }\mu\text{L}$,加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ 0.8 U/mL 的 α -葡萄糖苷酶,再加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ 香椿提取样品(0.4 、 0.6 、 0.8 、 1 、 1.2 mg/mL)。在恒温培养箱中 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育10 min,加 $10\text{ }\mu\text{L}$ 2.5 mmol/L 底物PNPG, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育30 min。最后,加 $50\text{ }\mu\text{L}$ 0.2 mol/L 的 Na_2CO_3 溶液终止反应,在波长 405 nm 处测定其吸光度值。

1.2.5 阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶的半抑制浓度测定

在96孔板中先加 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS) $50\text{ }\mu\text{L}$,加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ 0.8 U/mL 的 α -葡萄糖苷酶,再加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ 阿卡波糖样品(2.5 、 3 、 4.2 、 5.2 、 8 、 10 mg/mL)。在恒温培养箱中 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育10 min,加 $10\text{ }\mu\text{L}$ 2.5 mmol/L 底物PNPG, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育30 min。最后,加 $50\text{ }\mu\text{L}$ 0.2 mol/L 的 Na_2CO_3 溶液终止反应,在波长 405 nm 处测定其吸光度值。

1.2.6 香椿叶提取物酶抑制动力学研究

固定底物PNPG浓度为 2.5 mmol/L ,样品质量浓度梯度为: 0 、 0.125 、 0.25 、 0.5 、 0.75 mg/mL ,测定不同 α -葡萄糖苷酶浓度(0 、 0.2 、 0.4 、 0.8 U/mL)下反应后在波长 405 nm 处的吸光度值。若抑制类型为可逆抑制,则固定 α -葡萄糖苷酶浓度为 0.8 U/mL ,分别加入样品质量浓度 0 、 0.125 、 0.25 、 0.5 、 0.75 mg/mL ,测定不同PNPG浓度下(0.5 、 1.0 、 1.5 、 2 、 2.5 mmol/L)反应体系在波长 405 nm 处的吸光度值。

1.2.7 香椿叶提取物作用于 α -葡萄糖苷酶的荧光分析

对 25 、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下香椿叶提取物对 α -葡萄糖苷酶的荧光强度进行测定。向荧光光谱孔板中加入样品(0 、 0.01 、 0.025 、 0.05 、 0.075 、 0.1 mg/mL) $50\text{ }\mu\text{L}$,再加入 0.6 U/mL α -葡萄糖苷酶 $50\text{ }\mu\text{L}$,分别置于 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的恒温箱中反应15 min,设置酶标仪温度为 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,狭缝宽为 2 nm , λ_{em} 为 $312\sim 550\text{ nm}$, λ_{ex} 为 287 nm ,测定体系的荧光发射光谱。

1.2.8 香椿叶提取物对斑马鱼体的降血糖活性研究

设置空白组(清水养殖)、高糖组($m=3\%$ 葡萄糖暴露)、高浓度组($m=3\%$ 葡萄糖+ 4 mg/L 香椿叶提取物)、中浓度组($m=3\%$ 葡萄糖+ 2 mg/L 香椿叶提取物)、低浓度组($m=3\%$ 葡萄糖+ 1 mg/L 香椿叶提取物)、阳性对照组($m=3\%$ 葡萄糖+ 2 mg/L 阿卡波糖)共6个实验组。按照上述组别,每组每缸雌雄随机,挑选体型类似的斑马鱼15条进行实验。实验开始时按上述组别相应换上葡萄糖水和药暴露,间隔48 h换水一次,喂食量和换水量保持一致。暴露144 h后,尾部采血,用安稳血糖仪测定血糖值,评价各实验组血糖的变化规律。

1.2.9 数据分析

将36个香椿叶提取物样本对 α -葡萄糖苷酶的抑制率进行统计,采用Origin 2019b、SPSS Statistics 23、GraphPad Prism 7.00进行处理,确定数据处理结果,分析得到相关结论。

2 结果与讨论

2.1 香椿叶提取物中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的

空间分布规律分析

由图 1 可知, 1 号树、2 号树、3 号树不同部位香椿叶提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制率不同。上层香椿叶提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制率最高, 下层香椿叶提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制率最低。香椿叶提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果为上层 > 中层 > 下层。

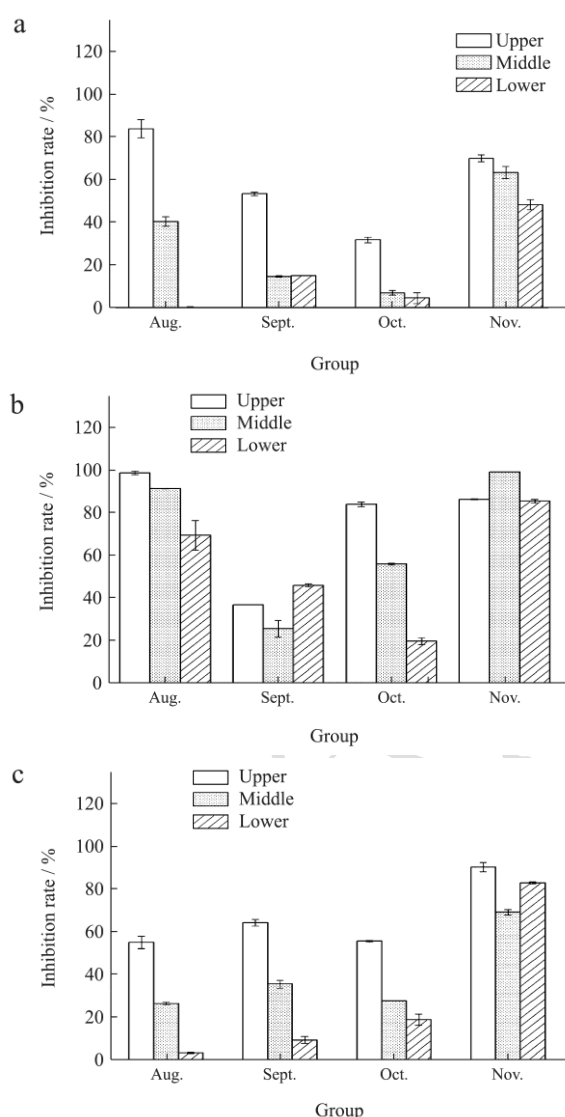


图 1 香椿叶提取物的空间分布规律研究

Fig.1 Study on spatial distribution of *Toona sinensis* extract

注: a 为 1 号树, b 为 2 号树, c 为 3 号树。

绝大部分香椿叶提取物样品符合在上层、中层、下层抑制率递减的空间分布规律, 只有 2 号树 9 月份、2 号树 11 月份、3 号树 11 月份香椿叶提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制率与此空间规律不完全重合。绝大多

数香椿叶提取物上层抑制率基本能达到 80% 及以上, 3 号树上层抑制率略低, 但也在 60% 左右; 中层和下层的抑制率明显低于上层, 除 11 月份样品外, 1 号树、3 号树下层抑制率绝大部分低于 20%, 2 号树抑制率略高, 但也明显低于上层样品。对香椿叶提取物在空间的分布情况进行显著性分析, $P=0.02$ ($P<0.05$), 表明香椿叶提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果随空间变化有显著性差异。

对香椿叶提取物中 α -葡萄糖苷酶抑制剂在空间分布规律呈现上层、中层、下层抑制效果依次递减的原因进行分析。香椿树上层主要是香椿嫩叶, 中层老叶嫩叶都有, 下层主要是老叶。即香椿嫩叶: 老叶比例在上层、中层、下层呈递减趋势。11 月份对香椿树进行采摘时, 香椿树上原有老叶较少, 新生长出的嫩叶增多。说明在采集的香椿中香椿嫩叶提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果明显优于香椿老叶提取物。猜测因为在香椿叶的生长过程中, 部分具有降血糖功效的活性物质分解消散。欧阳杰等^[18]在对香椿嫩芽和老叶萃取物的抗菌活性进行比较时发现香椿叶中的抑菌物质随着生长时间的延长而逐渐降低, 得出香椿幼叶药用物质的含量随其生长期的增加而降低。其结论与本研究猜测一致, 即在香椿叶成长过程中, 香椿幼叶中具有降血糖功能的药用物质含量随其生长期的增加而降低。

2.2 香椿叶提取物中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的

时间分布规律分析

对 8、9、10、11 月份的不同部位的香椿叶提取物进行了对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性测定, 发现 8 月份、11 月份抑制率整体相对较高, 9 月份、10 月份抑制率整体相对较低。香椿叶提取物在 8 月份、11 月份的抑制率多次高达 90%, 抑制率最高时可达 99%; 香椿叶提取物在 9 月份、10 月份, 除 10 月份 2 号树上层样品的抑制率可达 84% 外, 其他样品抑制率基本在 50% 及以下。编号不同的 1、2、3 号树在 11 月份时不同部位的抑制效果对比前一个月均有所好转。对香椿叶提取物在时间的分布情况进行显著性分析, 结果显示 $P=0.003$ ($P<0.01$), 表明香椿叶提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果随时间变化呈现极显著性差异。

Park 等^[19]发现华茅叶片中槲皮素和山奈酚的含量在整个生长期期间发生变化, 4 月份的含量高于 5 月和 9 月, 即生长初期叶片中槲皮素和山奈酚的含量较高。猜测上层香椿叶提取物在 8 月到 10 月处于成长期, 部分小分子活性物质如槲皮素等的含量发生改变, 导

致抑制效果发生明显差异。而下层香椿叶提取物中随着时间的推移以及采摘的影响，嫩叶与老叶的比例逐渐降低，所以抑制率逐渐提高。11月份时不同部位的抑制效果对比前一个月均有所好转，猜测可能是香椿中具有降血糖功效的次生代谢产物如黄酮等随着植物生长不断累积的原因。

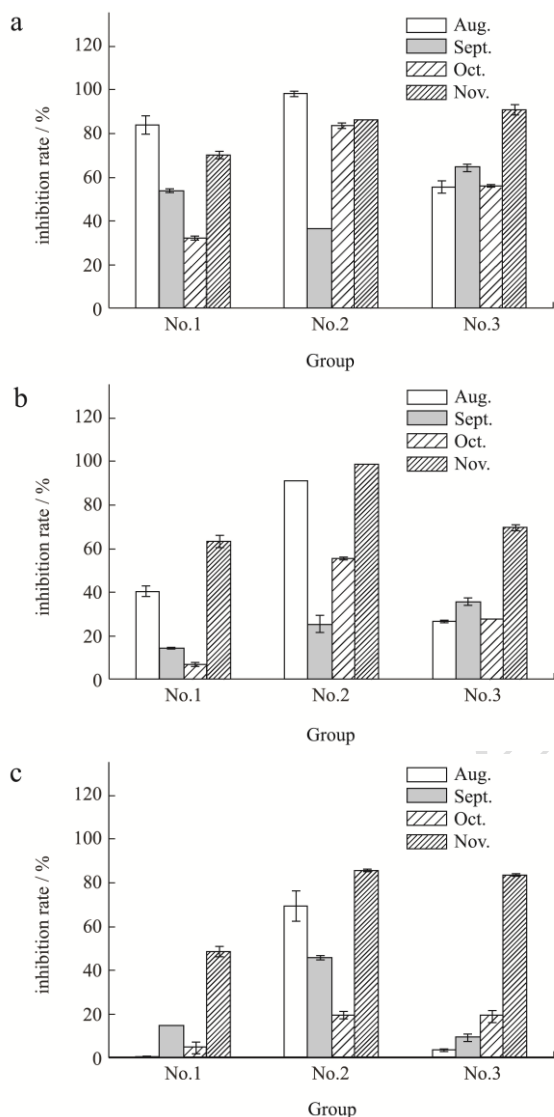


图2 香椿叶提取物的时间分布规律研究

Fig.2 Study on time distribution law of *Toona sinensis* extract

注：a 为上层，b 为中层，c 为下层。

2.3 香椿叶提取物对 α -葡萄糖苷酶的半抑制活性

香椿叶提取物对 α -葡萄糖苷酶抑制的 IC_{50} 结果如图 3 所示。阿卡波糖是在临床中被广泛使用的 α -葡萄糖苷酶抑制剂，以阿卡波糖作为阳性对照，有较好的参考意义。香椿叶提取物 IC_{50} 为 0.45 mg/mL (图 3a)，阿卡波糖的 IC_{50} 值为 5.05 mg/mL (图 3b)。香椿叶提

取物的 IC_{50} 远低于阳性对照阿卡波糖。韩林等^[20]研究黄酮类化合物杨梅素对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性机理，发现杨梅素对 α -葡萄糖苷酶活性远远高于阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用，两者的 IC_{50} 值分别为 0.99×10^{-5} 和 11.63×10^{-5} mol/L，杨梅素 IC_{50} 也约为阿卡波糖的 1/10。猜测香椿中黄酮类物质对 α -葡萄糖苷酶起主要抑制效果。因此，可判断香椿叶提取物对 α -葡萄糖苷酶有较好的抑制效果，可作为对 α -葡萄糖苷酶抑制剂良好来源。

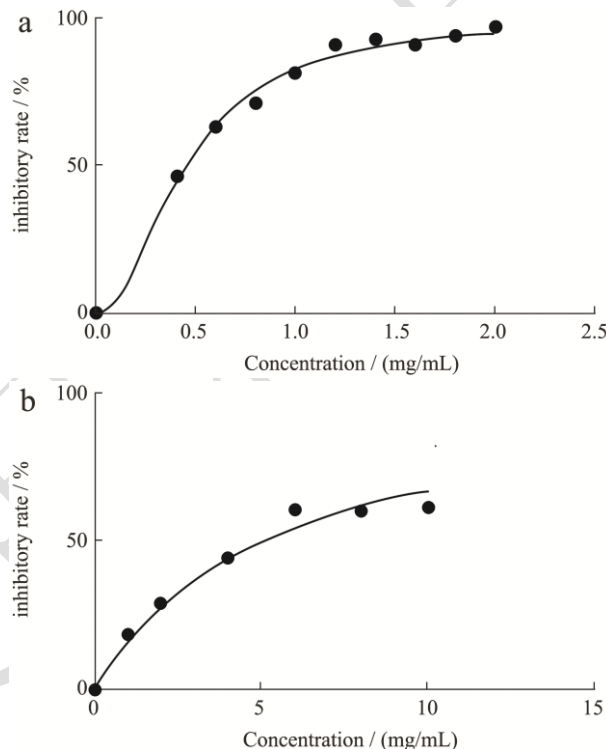


图3 香椿叶提取物的半抑制浓度分析

Fig.3 Analysis of semi inhibitory concentration of *Toona sinensis* extract

注：a 为香椿提取物，b 为阿卡波糖。

2.4 香椿叶提取物酶抑制动力学

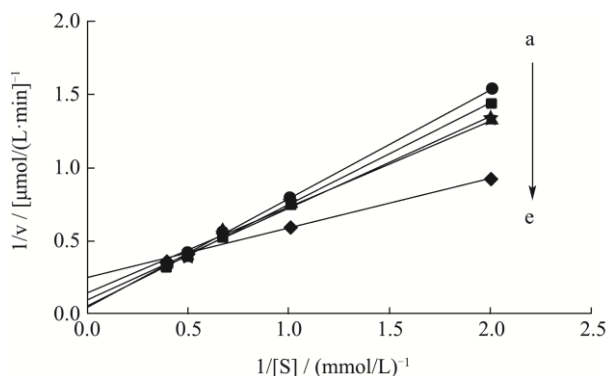


图4 酶抑制动力学分析

Fig.4 Kinetic analysis of enzyme inhibition

使用 Lineweaver-Burk (LB) 曲线来确定抑制类

型和机制,结果如图4所示。随着抑制剂浓度的增加,所有直线相交于第一象限,且直线的斜率随之减小,抑制常数 K_i 随抑制剂浓度增大而增大。当底物浓度的倒数趋近于零时,底物浓度趋于无限大。但倘若底物浓度过大,则会反向抑制酶活性,导致酶中毒。因此,所有直线相交于第一象限,即表明酶与底物已呈饱和状态,此时反应速度即为最大反应速度 V_{max} 。因此,香椿叶提取物的酶抑制类型为竞争性抑制类型^[21,22]。

2.5 荧光光谱分析

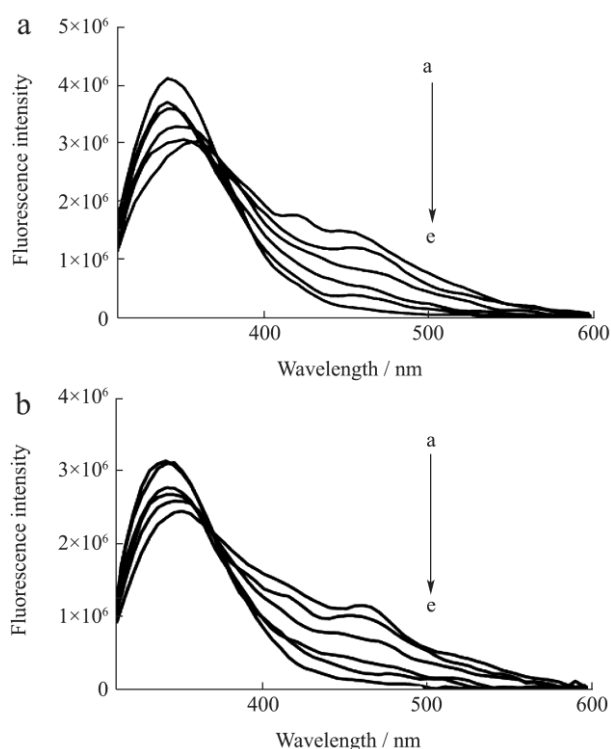


图5 荧光光谱分析

Fig.5 Fluorescence spectrum analysis

注: a 为 25 °C, b 为 37 °C。

如图5所示,图5a、5b分别显示了在25、37 °C两个不同温度下不同浓度的香椿叶提取物与 α -葡萄糖苷酶混合溶液在310~600 nm范围内的荧光发射光谱变化情况。随着香椿叶提取物浓度不断增加,荧光强度也在不断减弱, α -葡萄糖苷酶的荧光光谱峰发生红移感觉,说明香椿叶提取物与 α -葡萄糖苷酶发生了相互作用。

荧光猝灭通常可分为动态猝灭和静态猝灭,对于动态猝灭,随着温度的升高,将增加离子有效碰撞的数目,加剧电子转移,使荧光物质的猝灭常数随温度的升高而增大;对于静态猝灭,温度升高将降低复合物的稳定性,使猝灭常数减小。为了研究香椿叶提取物对 α -葡萄糖苷酶荧光的猝灭机制,考察了不同温度下 α -葡萄糖苷酶的荧光强度随提取物浓度的变化情

况,根据 Stern-Volmer 方程:

$$F_0 / F = K_q \tau_0 C + 1 = K_{sv} \times C + 1 \quad (2)$$

式中:

F_0 ——不加猝灭剂时的荧光强度;

F ——加猝灭剂时的荧光强度;

C ——猝灭剂浓度, mol/L;

K_q ——荧光猝灭速率常数, L/(mol s);

τ_0 ——荧光体平均寿命,对于生物大分子,平均值为 10^{-8} s 左右;

K_{sv} ——猝灭常数, L/g。

由方程(2),以荧光分子的荧光强度变化 F_0/F 对猝灭剂浓度 C 作图应为直线关系,直线斜率为纯化单体对 α -葡萄糖苷酶荧光猝灭的猝灭常数 K_{sv} ^[23]。

本实验分别研究了 25、37 °C 下的香椿提取物对 α -葡萄糖苷酶相互作用的荧光光谱,利用不同温度下的实验结果,根据公式(2)可计算出猝灭常数 K_{sv} ,如表1所示,当温度升高,荧光猝灭常数升高,证明反应为动态猝灭过程。

表1 香椿提取物对 α -葡萄糖苷酶的荧光猝灭常数

Table 1 Fluorescence quenching constant of *Toona sinensis*

extract on α -glucosidase			
名称	温度/°C	K_{sv} /(L/g)	R^2
香椿提取物	25	2.51×10^3	0.96
	37	4.15×10^3	0.91

2.6 香椿叶提取物在斑马鱼体内降血糖活性

研究

提取 1、2、4 mg/L 三个不同质量浓度的香椿叶提取物和阿卡波糖对斑马鱼进行 6 d 时间的暴露,结果如图7所示。相较于高糖组,使用香椿叶提取物进行暴露的斑马鱼血糖值均有下降的趋势,其中,高糖组暴露的斑马鱼血糖值为 5.8 mmol/L,质量浓度为 4 mg/L 的香椿叶提取物进行暴露的斑马鱼血糖值为 4.7 mmol/L,与使用阿卡波糖暴露的对照组相比,血糖值下降 2.69%。对香椿叶提取物在斑马鱼体内降血糖活性进行显著性分析, $P < 0.01$,表明香椿叶提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果随浓度有显著性差异。张俊芳等^[24]采用四氧嘧啶(Alloxan),通过烷化或诱导 DNA 破坏导致胰岛 β 细胞凋亡,造成胰岛素分泌量不足使血糖升高,由此建立小鼠的高血糖模型,研究发现香椿总黄酮(TSTF)对糖尿病小鼠动物模型具有降血糖作用,且使用高剂量的 TSTF 进行实验,给药前小鼠血糖为 23.65 mmol/L,给药后小鼠血糖为 16.38 mmol/L, TSTF 有明显的降血糖作用,因此猜测香椿提取物中黄酮类

物质对斑马鱼的降血糖效果起主要作用,质量浓度为4 mg/L的香椿叶提取物降血糖效果更好。本文采用斑马鱼作为模式生物,相较于小鼠模型,可以降低成本及操作难度,缩短实验周期,丰富实验数据。由于斑马鱼与人类基因的高度同源性,利用葡萄糖浸泡法建立高血糖模型,直接采血测得血糖浓度,结果更加直观清晰,可靠性强。

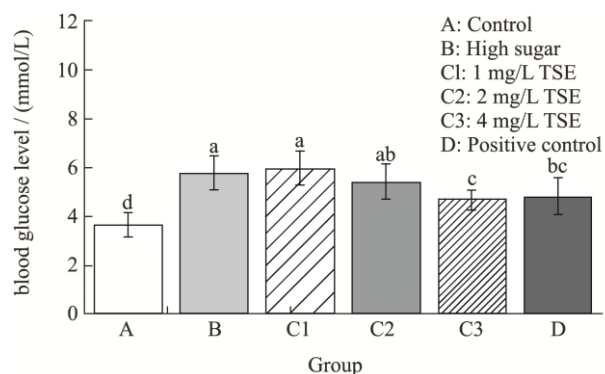


图6 降血糖活性分析

Fig.6 Hypoglycemic activity analysis

注: TSE为香椿提取物;不同小写字母表示0.05水平差异显著。

3 结论

本文以香椿为研究对象,研究36个香椿叶提取物样品对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性,得到香椿提取物中 α -葡萄糖苷酶剂在时间和空间的分布规律。在空间上,显示随着与地表距离的降低,上层中层下层抑制效果逐渐减弱;在时间上,8月份、11月份香椿叶提取物对 α -葡萄糖苷酶抑制率整体相对较高,且11月份香椿叶提取物的抑制率明显高于其他月份。香椿叶提取物对 α -葡萄糖苷酶的半抑制浓度约为阿卡波糖的1/10。通过对香椿叶提取物进行酶抑制动力学分析可知,香椿叶提取物的酶抑制类型为竞争性抑制类型。荧光光谱表明,香椿叶提取物与酶的相互作用模式属于静态猝灭类型,且作用力较强。同时,为了更加直观得到香椿叶提取物的降血糖效果,我们利用斑马鱼高血糖模型评价香椿叶提取物的降血糖效果。结果显示,4 mg/L香椿叶提取物可使高血糖斑马鱼体内的血糖浓度显著降低,但具体作用机理还待进一步研究。本文能为推动香椿中天然 α -葡萄糖苷酶抑制剂的大量提取提供支持。

参考文献

[1] 闫寒冰.中医药防治糖尿病及其并发症的研究[J].中国医药指南,2020,18(25):39-42.
[2] 苏娜,伊丽,吉日木图.鼠李糖乳杆菌GG发酵驼乳与牛乳的

发酵特性和降糖活性比较[J].食品工业科技,2019,40(24):14-19.

- [3] Zhang S, Wu D, Li H, et al. Rapid identification of α -glucosidase inhibitors from *Dioscorea opposita* Thunb peel extract by enzyme functionalized Fe₃O₄ magnetic nanoparticles coupled with HPLC-MS/MS [J]. Food & Function, 2017, 8(9): 3219-3227.
- [4] Guo Jianhua, Lin Xiaoling, Tian Chengwang, et al. Advancement in research of α -glucose in hibitors of Chinese herbal medicine [J]. Natural Product Research and Development, 2012, 24: 213-216.
- [5] 缪子敬,李志万,周学海,等. α -葡萄糖苷酶抑制剂的研究进展[J].广东化工,2019,46(17):96-101.
- [6] Zhang J, Yang J Y, Wen J, et al. Experimental studies on hypoglycemic effects of total flavonoid from *Tona sinensis* [J]. Zhong Yao Cai: Journal of Chinese Medicinal Materials, 2008, 31(11): 1712-1714.
- [7] Peihwei Wang, Mayjywan Tsai, Chiayu Hsu, et al. *Toona sinensis* Roem (Meliaceae) leaf extract alleviates hyperglycemia via altering adipose glucose transporter 4 [J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(7): 2554-2560.
- [8] Zhang Yali, Dong Huanhuan, Wang Mimi, et al. Quercetin isolated from *Toona sinensis* leaves attenuates hyperglycemia and protects hepatocytes in highcarbohydrate/high fat diet and alloxan induced experimental diabetic mice [J]. Journal of Diabetes Research, 2016, 2016: 11-15.
- [9] 杨玉珍,彭方仁,李洪岩.不同种源香椿芽菜营养成分的变化研究[J].河南农业科学,2007,4:83-85.
- [10] 王鹏程,涂炳坤,叶要妹,等.不同时期不同种源香椿芽营养成分分析[J].湖北农业科学,2001,6:56-57.
- [11] 王赵改,陈丽娟,张乐,等.不同采收期红油香椿营养成分和抗氧化活性分析[J].食品科学,2015,36(4):158-163.
- [12] 李晨晨.香椿老叶黄酮含量及抗氧化性研究[J].食品研究与开发,2021,42(13):34-39.
- [13] 刘常金,江慎华,王昌禄,等.不同季节与产地香椿黄酮及皂苷的含量变化[J].天津科技大学学报,2006,21(1):18-20.
- [14] 吉薇,章超桦.糖尿病斑马鱼模型的建立与南极磷虾酶解物降血糖活性评价[J].食品与机械,2019,35(6):24-29.
- [15] 王泽民.高糖高脂导致的斑马鱼血管病变[D].山东:山东大学医学院,2014.
- [16] Zhao J Q, Wang Y M, Yang Y L, et al. Antioxidants and α -glucosidase inhibitors from "Liucha" (young leaves and shoots of *Sibiraea laevigata*) [J]. Food Chemistry, 2017, 230: 117-124.
- [17] Zhang B, Li X, Sun W, et al. Dietary flavonoids and acarbose

- synergistically inhibit α -glucosidase and lower postprandial blood glucose [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(38): 8319-8330.
- [18] 欧阳杰,武彦文,卢晓蕊.香椿嫩芽和老叶萃取物抗菌活性的比较研究[J].天然产物研究与开发,2008,3:427-430.
- [19] Park J C, Yu Y B, Lee J H, et al. Phenolic compounds from the rachis of *Cedrela sinensis* [J]. Korean Journal of Pharmacognosy, 1996, 27: 219-223.
- [20] 韩林,刘益,罗梅,等.杨梅素对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性机理研究[J].食品工业科技,2017,38(22):51-55.
- [21] Ding H, Hu X, Xu X, et al. Inhibitory mechanism of two allosteric inhibitors, oleanolic acid and ursolic acid on α -glucosidase [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 107(Pt B): S0141813017336255.
- [22] Yue L M, Lee J, Zheng L, et al. Computational prediction integrating the inhibition kinetics of gallotannin on α -glucosidase [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017: S0141813017312588.
- [23] Zeng L, Zhang G, Lin S, et al. Inhibitory mechanism of apigenin on α -glucosidase and synergy analysis of flavonoids [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(37): 6939-6949.
- [24] 张俊芳,杨加域,温劲,等.香椿总黄酮降血糖作用的实验研究[J].中药材,2008,31(11):1712-1714.