

戚志强, 田颖刚. 芦笋水提物的不同膜分离部位对二肽基肽酶-IV 活性的影响及其成分分析 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(20): 34–41. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090224

QI Zhiqiang, TIAN Yinggang. Effect of Different Membrane Separation Parts on the Activity of Dipeptidyl Peptidase-IV in the Aqueous Extract of *Asparagus officinalis* and Its Compositional Analysis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(20): 34–41. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090224

· 研究与探讨 ·

芦笋水提物的不同膜分离部位对二肽基肽酶-IV 活性的影响及其成分分析

戚志强^{1,2,*}, 田颖刚^{1,2,*}

(1. 南昌大学食品科学与资源挖掘全国重点实验室, 江西南昌 330047;

2. 南昌大学生物质转化教育部工程研究中心, 江西南昌 330047)

摘要: 为明确芦笋水提物中抑制二肽基肽酶-IV (Dipeptidyl peptidase-4, DPP-4) 活性的主要功能成分, 本文通过膜分离技术, 制备了五种截留分子量不同的芦笋水提物部位, 包括>30、10~30、6~10、3~6 和<3 kDa, 并对各部位进行了 DPP-4 抑制效果比较, 对其总皂苷、总黄酮、总多糖、总多酚、总氮含量进行了比较分析。结果显示, 总氮含量与抑制率呈最高正相关性 ($P<0.01$), 截留分子量大于 30 kDa (UAI₁) 是总氮含量最高的部位并表现出最强的抑制作用, 其 IC₅₀ 值为 8.19 mg/mL, 属于混合型抑制类型。总多糖含量与抑制率呈极显著正相关性, 但次之 ($P<0.01$)。总多酚含量与抑制率也呈显著的正相关性 ($P<0.05$), 而总黄酮含量与抑制率呈极显著负相关性 ($P<0.01$)。总皂苷与抑制率之间无显著相关性。综合以上结果, 芦笋水提物中对 DPP-4 起主要抑制作用的组分为分子量大于 30 kDa 的蛋白组分。这一发现可为天然 DPP-4 抑制剂在降血糖保健食品及药物开发提供参考。

关键词: 芦笋水提物, 二肽基肽酶-IV, 抑制作用, 成分分析

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)20-0034-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090224



本文网刊:

Effect of Different Membrane Separation Parts on the Activity of Dipeptidyl Peptidase-IV in the Aqueous Extract of *Asparagus officinalis* and Its Compositional Analysis

QI Zhiqiang^{1,2,*}, TIAN Yinggang^{1,2,*}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Resources, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

2. Engineering Research Center for Biomass Conversion, Ministry of Education, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: To identify the main functional components of asparagus aqueous extract that inhibit dipeptidyl peptidase-IV (DPP-4) activity, five asparagus aqueous extract parts with different molecular weight cut-offs, including >30, 10~30, 6~10, 3~6, and <3 kDa, were successfully prepared by membrane separation technology in this study. The DPP-4 inhibition effect of each part was compared, and its total saponin, total flavonoid, total polysaccharide, total polyphenol, and total nitrogen contents were analysed. The results showed that the total nitrogen content showed the highest positive correlation with the inhibition rate ($P<0.01$), and the molecular weight cut-off (MWCO) greater than 30 kDa (UAI₁) was the site with the highest total nitrogen content and showed the strongest inhibition, with an IC₅₀ value of 8.19 mg/mL, which was of the mixed inhibition type. Total polysaccharide content had the second highest positive correlation with the inhibition rate ($P<0.01$), total polyphenol content also showed a significant positive correlation with the inhibition rate ($P<0.05$), while

收稿日期: 2023-09-21

基金项目: 运动-营养干预促进老年健康技术的建立 (2020YFC2002902)。

作者简介: 戚志强 (1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 生物与医药, E-mail: qizhiqiang@qq.com。

* 通信作者: 田颖刚 (1972-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食物资源开发与利用, E-mail: yinggangtian@163.com。

total flavonoid content showed a very significant negative correlation with the inhibition rate ($P < 0.01$). There was no significant correlation between total saponins and inhibition rate. In summary, the components in the aqueous extract of asparagus that exerted major inhibitory effects on DPP-4 were protein fractions with molecular weights greater than 30 kDa. This results would provide a reference for natural DPP-4 inhibitors in hypoglycaemic health food and drug development.

Key words: *Asparagus officinalis* aqueous extract; dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4); inhibition effect; compositional analysis

二肽基肽酶-IV (Dipeptidyl Peptidase-4, DPP-4) 是一种人体内存在的酶, 其主要作用是分解肽类激素的底物, 包括胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 和胰高血糖素样肽-2 (GLP-2) 等。这些肽类激素在血糖代谢过程中发挥着重要的生理作用, 随着碳水化合物的摄入从肠道释放, 通过葡萄糖浓度依赖的方式刺激胰岛素的分泌和抑制胰高血糖素释放来维持葡萄糖的平衡^[1], 然而这两种肠促胰岛素会被 DPP-4 迅速降解, 抑制 DPP-4 可以减少其对 GLP-1 等肽类激素的降解, 有效增加它们在体内的活性时间, 从而促进胰岛素的分泌、抑制胰高血糖素诱导的葡萄糖产生、减少胃肠反射、减缓肠蠕动和抑制食欲等多种作用, 最终达到降血糖的效果^[2-4]。目前市场上已经有一些可以抑制 DPP-4 活性的口服药物, 如西格列汀、沙格列汀、阿格列汀等, 这些口服降糖药在一定程度上能够维持血糖控制, 但长期使用可能会伴有鼻咽炎、头痛、上呼吸道感染等严重副作用^[5]。相比之下, 天然来源的 DPP-4 抑制剂能够延长肠促胰岛素的有效时间, 降低餐后血糖浓度, 具有安全性能高、不易诱发体重增长、低血糖等不良反应、有效性及耐受性较好等优点。因此, 毒副作用低且具有降低血糖活性的天然植物及其生物活性成分、功能因子成为了近年来的研究热点。

芦笋 (*Asparagus officinalis* L.) 为天门冬科天门冬属植物, 又名石刁柏, 不仅味道鲜美, 而且富含皂苷、多酚、黄酮、水溶性多糖、特殊氨基酸等多种活性成分, 具有抗氧化、抗肿瘤、提高机体免疫力、降血脂等特殊的药理活性和保健功能, 享有“蔬菜之王”的美誉^[6]。近年来, 抗糖尿病活性是芦笋功能研究的热点之一, 赵洪军等^[7]通过 α -葡萄糖苷酶体外抑制实验, 发现芦笋老茎提取液对大鼠小肠 α -葡萄糖苷酶活性有一定的抑制作用。Zhang 等^[8]研究发现芦笋老茎汁可降低糖尿病大鼠空腹血糖、糖化血清蛋白和丙二醛水平。Vadivelan 等^[9]通过研究不同芦笋提取物对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的活性影响, 发现芦笋水提取物对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶有抑制作用, 但抑制能力比阿卡波糖小。Adouni 等^[10]研究表明芦笋芽水提物不仅对 α -葡萄糖苷酶具有抑制作用, 还能降低餐后 30 min 内的葡萄糖水平。可见对于芦笋降糖活性的研究更倾向于干预 α -葡萄糖苷酶, 然而糖尿病的治疗早已不仅限抑制 α -葡萄糖苷酶活性, 还可通过抑制 DPP-4 等途径达到降糖目的。芦笋对 DPP-4 是否具有抑制作用这一研究, 目前尚未见报道。

本文对研究了芦笋水提物通过膜分离处理后, 芦笋水提物对 DPP-4 的抑制活性, 并探讨不同膜分离组分含量与 DPP-4 的抑制活性的关系, 明确 DPP-4 抑制活性的主要功能组分, 为更好地开发利用芦笋提供科学基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜绿芦笋 江西省农业科学院提供; 新鲜兔小肠 购于农贸市场; 维格列汀 购于益丰大药房; 菝葜皂苷元、芦丁、葡萄糖、没食子酸 H-Gly-Pro-pNA·HCl (生物技术级) 标准品, 上海源叶生物有限公司; PVDF 中空纤维超滤膜 (截留分子量为 30、10、6、3 kDa) 天津膜天膜科技股份有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

UV2800 紫外可见分光光度计 尤尼柯上海仪器有限公司; CTFD-18PT 冷冻干燥机 青岛永和创信电子科技有限公司; Multiskan FC 型酶标仪 赛默飞世尔仪器有限公司; XB-220A 型分析天平 瑞士普赛利斯公司; KQ-5200E 超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; DS-1 高速组织捣碎机 上海标本模型厂; RE-52 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 芦笋水提物的膜分离

1.2.1.1 芦笋水提物的制备 挑选新鲜、无损伤、无病虫害的芦笋, 然后进行清洗, 沥干, 切段, 待用。称取 5 kg 的处理好鲜芦笋, 使用高速组织捣碎机破碎后转移至提取罐中, 然后加入 15 kg 的水, 25 °C 提取 1.5 h, 过滤; 滤渣再次加入 7.5 kg 的水, 再提取 1.5 h 并过滤, 收集合并 2 次的滤液, 即水提取物, 待用。

1.2.1.2 膜分离工艺 将粗水提物通过膜分离工艺处理, 中空纤维微滤 (MOF-205, 0.1 μ m) 膜微滤, 得芦笋水提物 (MAJ) 后, 分别采用截留分子量为 30、10、6、3 kDa 的中空纤维超滤膜 (TZEW-030、TZEW-010、TZEW-006、TZEW-003) 依次超滤, 并收集 5 个分离部位: UAJ₁、UAJ₂、UAJ₃、UAJ₄、UAJ₅, 如图 1 所示。各膜分离部位样品置于旋转蒸发器真空浓缩, 再将其浓缩物置于真空冷冻干燥机中冷冻干燥后, 置干燥器中冷藏备用。

1.2.1.3 芦笋水提物不同膜分离部位的得率

$$W = \frac{m_i}{M} \times 100$$

式中: W 表示不同膜分离部位芦笋水提物得

率, %; M 表示 MAJ 膜分离部位总质量(以干基计), g; m_i 表示膜分离后各部位的总质量(以干基计), g。

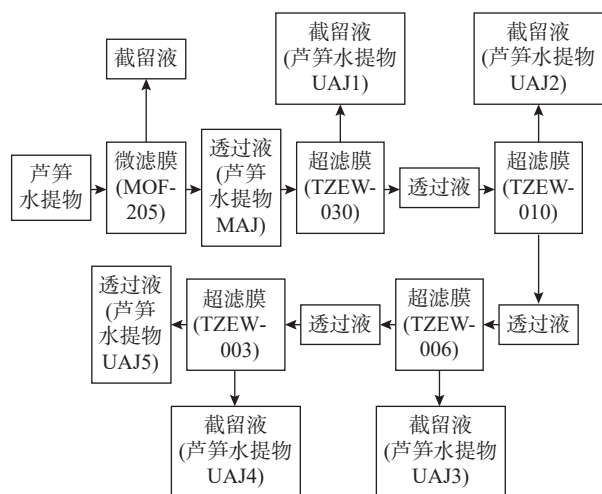


图1 膜分离工艺流程图

Fig.1 Flowchart of membrane separation process

1.2.2 活性组分含量测定

1.2.2.1 总皂苷含量测定 称取各样品冻干粉 0.2000 g, 滤纸包裹, 置于索氏提取器中, 用甲醇 80 ℃ 加热回流提取至提取液无色, 置旋转蒸发仪上回收甲醇溶液并挥干溶剂, 加入 20 mL 蒸馏水溶解, 用 25 mL 饱和的正丁醇萃取 3 次, 回收正丁醇溶液后, 转移至 50 mL 容量瓶, 用甲醇定容, 摇匀备用。

吸取不同浓度菝葜皂苷元标准品甲醇溶液 200 μ L 置于具塞试管中, 依次加入 5% 香草醛-冰醋酸溶液 200 μ L, 高氯酸 800 μ L, 混匀, 70 ℃ 孵育 15 min, 取出后冷却 5 min, 加入 5 mL 的冰乙酸, 混匀。以纯水作参比, 于 535 nm 处测定吸光度。以吸光度对菝葜皂苷元浓度绘制标准曲线^[11], 其回归方程为 $Y=2.26586X+0.03618$, $R^2=0.999$ 。精密吸取前处理样品溶液 50 μ L, 按照上述方法测定其吸光度, 根据标准曲线计算各样品中总皂苷含量, 总皂苷含量以 mg 菝葜皂苷元/g 干重表示。

1.2.2.2 总黄酮含量测定 称取各样品冻干粉 0.2000 g, 滤纸包裹, 置索氏提取器中, 用三氯甲烷 80 ℃ 加热回流提取至提取液无色, 挥干三氯甲烷后, 置于索氏提取器中, 再加入甲醇继续提取至无色, 回收甲醇后, 转移至 100 mL 容量瓶, 用无水乙醇定容, 摇匀备用。

吸取各浓度芦丁标准品乙醇溶液 1 mL, 依次加入 5% NaNO_2 溶液 500 μ L, 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 500 μ L, 5.0% NaOH 溶液 2.5 mL, 用蒸馏水至 10 mL, 混匀, 放置 20 min。在 500 nm 波长下, 以蒸馏水作为参照, 测定吸光度值。以吸光度与芦丁浓度绘制标准曲线^[12], 其回归方程为 $Y=3.80619X+0.0391$, $R^2=0.999$ 。按照上述方法测定其吸光度, 根据标准曲线计算各样品中的总黄酮含量, 总黄酮含量以 mg 芦丁/g 干重表示。

1.2.2.3 总多糖含量测定 称取各样品冻干粉 0.2000 g, 滤纸包裹, 置索氏提取器中, 用石油醚 90 ℃ 加热回流提取至提取液无色, 挥干石油醚后, 加入 80% 乙醇 150 mL, 90 ℃ 回流 1 h, 滤纸过滤收集滤渣, 重复此步骤两次, 滤渣加 100 mL 蒸馏水于沸水浴回流提取 1 h, 滤纸过滤收集滤液, 重复此步骤两次, 将两次滤液转移至 250 mL 容量瓶, 用蒸馏水定容, 摇匀备用。

分别吸取不同浓度葡萄糖对照品水溶液 1 mL 置于 10 mL 具塞试管中, 加入 5% 苯酚溶液 1 mL, 然后迅速与液面垂直加入硫酸 5.0 mL, 冷却 10 min, 混匀, 30 ℃ 水浴 20 min, 在 490 nm 波长下, 以蒸馏水作为参照, 测定吸光度值。以吸光度对葡萄糖浓度绘制标准曲线^[13], 其回归方程为 $Y=14.8825X+0.07195$, $R^2=0.999$ 。分别吸取各样品溶液 1 mL, 测定方法同上, 依据标准曲线计算各样品中总多糖的含量, 总多糖含量以 mg 葡萄糖/g 干重表示。

1.2.2.4 总多酚含量测定 称取各样品冻干粉 0.2000 g, 用蒸馏水配制成待测样品溶液。分别吸取不同浓度没食子酸对照品水溶液 1 mL 置于 10 mL 具塞试管中, 加入 1.0 mol/L 福林酚试剂 1 mL, 混匀后静置 5 min, 再加入 12% 碳酸钠溶液 2.0 mL, 加蒸馏水至 10.0 mL 刻度线, 将具塞试管放置于 30 ℃ 水浴中继续反应 90 min, 在 760 nm 波长下, 以蒸馏水作为参照, 测定吸光度值。以吸光度对没食子酸浓度绘制标准曲线^[14], 其回归方程为 $Y=16.1362X+0.09304$, $R^2=0.998$ 。分别吸取各样品溶液 1 mL, 测定方法同上, 依据标准曲线计算各样品中总多酚的含量, 总多酚含量以 mg 没食子酸/g 干重表示。

1.2.2.5 蛋白质含量测定 参考 GB/T 5009.5-2016 《食品中蛋白质的测定 自动凯氏定氮仪法》, 各样品消化处理后, 采用自动凯氏定氮仪进行测定, 蛋白含量以 g/100 g 干重表示。

1.2.3 DPP-4 酶活性测定

1.2.3.1 兔源 DPP-4 制备 取新鲜兔小肠, 生理盐水冲洗干净。在 4 ℃ 条件下, 小肠切开, 用干净的载玻片刮取肠黏膜及其表面粘液, 并加入等体积 PBS(pH 6.8), 低温下匀浆, 于 4 ℃, 4000 r/min 离心 20 min, 取上清, 真空冷冻干燥, -20 ℃ 保存备用^[15]。

1.2.3.2 兔源 DPP-4 的标定与相对酶活力标准曲线

将兔源 DPP-4 用 Tris-HCl 缓冲液 (0.1 mol/L, pH 8.0) 分别配制成 0、0.025、0.05、0.1、0.2、0.4 mg/mL 的酶工作液。取不同浓度的酶工作液 50 μ L 和 Tris-HCl 缓冲液 25 μ L 于 96 孔板, 混匀, 37 ℃ 孵育 5 min, 加入 H-Gly-Pro-pNA·HCl 溶液 (1.6 mmol/L) 25 μ L, 混匀, 37 ℃ 反应 60 min, 加入 100 μ L 乙酸钠缓冲液 (1.0 mol/L, pH4.0) 终止反应, 在 405 nm 波长处测定吸光度值^[16]。以对硝基苯胺浓度 (μ mol/L) 与酶浓度 (mg/mL) 作线性回归。

根据酶活力的国际单位(IU)定义为在 1 min 转换 1 μmol 底物所需的酶量,即在 1 min 内催化 H-Gly-Pro-pNA·HCl 反应生成 1 μmol 对硝基苯胺所需 DPP-4 的量为 1 个酶活力单位^[17]。测得该法制备的兔源 DPP-4 活力值为 0.0026 U/mg。

根据标定后的兔源 DPP-4,以对硝基苯胺盐酸盐浓度(μmol/L)与酶活力浓度(U/L)绘制相对酶活力标准曲线 $Y=0.00828X-0.58165$, $R^2=0.998$ 。作为测定反应体系中酶活力浓度的计算依据,式中:Y 表示为酶活力浓度,X 表示为吸光值。

1.2.3.3 芦笋水提物的不同膜分离部位对 DPP-4 作用的测定 将各样品用 Tris-HCl 缓冲液(0.1 mol/L, pH8.0)分别依次配制成 2、4、6、8、10、12、14 mg/mL 的待测样品溶液。取各待测样品溶液 25 μL 和 5.2 U/L 的酶工作液 50 μL 于 96 孔板,混匀,37 ℃ 孵育 5 min,加入 H-Gly-Pro-pNA·HCl 溶液(1.6 mmol/L) 25 μL,混匀,37 ℃ 反应 60 min,加入 100 μL 乙酸钠缓冲液(1.0 mol/L, pH4.0)终止反应,在 405 nm 波长处测定吸光度值。依据 1.2.3.2 相对酶活力标准曲线计算反应体系中酶活力浓度 E。计算样品对 DPP-4 的抑制率,计算公式如下:

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{E_3 - E_4}{E_1 - E_2}\right) \times 100$$

式中: E_1 表示缓冲液+酶+底物组的酶活力浓度; E_2 表示缓冲液+缓冲液+底物组的酶活力浓度; E_3 表示待测样品+酶+底物组的酶活力浓度; E_4 表示待测样品+缓冲液+底物组的酶活力浓度。

1.2.3.4 抑制动力学参数的测定 将底物 H-Gly-Pro-pNA·HCl 配制成 0、0.8、1.6、2.4、3.2 mmol/L 的工作液。在酶活力浓度固定在 5.2 U/L 条件下,依 1.2.3.3 加样方法测定不同浓度的芦笋待测液($[I_i]$),在底物 H-Gly-Pro-pNA·HCl 浓度分别为 0、0.8、1.6、2.4、3.2 mmol/L 时,60 min 内产物对硝基苯胺浓度的增加量。计算不同分离部位的芦笋待测液在不同浓度下 DPP-4 促反应速率($[V_i]$),取其倒数($1/[V_i]$)为纵坐标,以底物 H-Gly-Pro-pNA·HCl 浓度的倒数($1/[S]$)为横坐标,绘 Lineweaver-Burk 双倒数曲线图,得米氏方程的双倒数方程^[18],计算图中直线斜率(K_m/V_m)和 x 轴截距($-1/K_m$),求出酶促反应的米氏常数(K_m)、最大反应速率(V_m)、结合游离状态酶的常数(K_{ic})和结合酶-底物复合物的常数(K_{iu})。

1.2.4 各组分含量与抑制 DPP-4 相关性分析 将每个部位样品浓度确定为 10 mg/mL,参考 1.2.2 方法测定将每个部位样品的总氮、总多糖、总多酚、总黄酮、总皂苷成分含量和 DPP-4 抑制率。通过双变量 Pearson 相关性分析法,分析各组分含量与 DPP-4 抑制率做相关性^[19]。

1.3 数据处理

所有数据重复测定三次,结果以平均值±标准差

表示。通过 Origin 2023 软件绘图,采用 IBM SPSS Statistics 27 软件进行试验数据的统计分析,当 $P<0.05$ 时表明差异显著, $P<0.01$ 表明差异极显著。

2 结果与分析

2.1 芦笋水提物不同膜分离部位的得率及其活性成分分析

由图 1 可知,粗芦笋水提物通过微滤膜后得芦笋水提物(MAJ),且 MAJ 中包含 UAJ₁、UAJ₂、UAJ₃、UAJ₄、UAJ₅,共计 5 个不同部位。

芦笋水提物不同膜分离部位的得率和其活性成分含量,如表 1 和图 2 所示。由表 1 可知,芦笋水提物(MAJ)通过不同规格的超滤膜处理后得到 5 个分离部位,其得率由高到低依次是 UAJ₅(93.89%)>UAJ₁(2.41%)>UAJ₂(0.99%)>UAJ₃(0.34%)>UAJ₄(0.19%)。芦笋水提物经过膜分离后其中绝大部分为分子量小的物质,保留在 UAJ₅ 部位中,而 UAJ₁、UAJ₂ 为大分子部位的主体。

表 1 芦笋中不同膜分离部位的干物质转移率
Table 1 Dry matter transfer rate yields from different membrane separation sites in *Asparagus officinalis*

样品	MAJ	UAJ ₁	UAJ ₂	UAJ ₃	UAJ ₄	UAJ ₅
得率 (%)	100	2.41±0.050	0.99±0.017	0.34±0.008	0.19±0.003	93.89±2.037

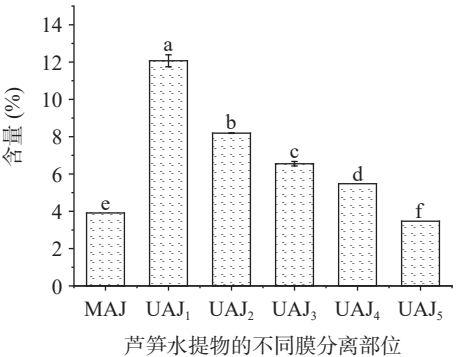
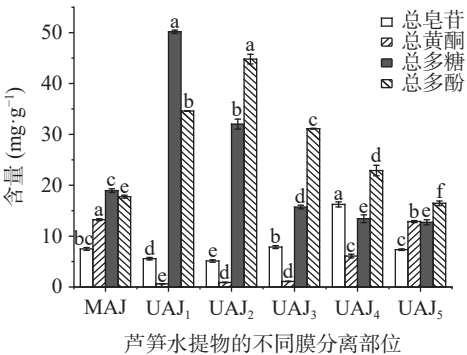


图 2 芦笋水提物的不同膜分离部位中主要化学成分含量
Fig.2 Content of major chemical components in different membrane separation parts of aqueous extracts of *Asparagus* spp.

注: 不同字母(a~f)表示不同组间存在显著差异($P<0.05$)。

由图 2 可知,芦笋水提物 MAJ 中含量最高的是蛋白质(总氮含量),其次是多糖类物质,这与关云静

等^[20]研究结果一致。MAJ 通过膜分离后,不同膜分离部位中均含有一定比例的功能成分,但各分离部位的功能活性组分含量有所不同,且不同部位间存在显著性差异($P<0.05$)。其中 UAJ₄ 部位中皂苷含量最高,而 MAJ 与 UAJ₅、MAJ 与 UAJ₃ 分离部位的皂苷含量并无显著差异;UAJ₅ 部位中黄酮含量最高,而 UAJ₂ 与 UAJ₃ 分离部位黄酮含量并无显著差异;UAJ₁ 部位中多糖含量最高,而 UAJ₄ 与 UAJ₅ 分离部位的多糖含量并无显著差异;UAJ₂ 总多酚含量显著高于其余部位($P<0.05$),UAJ₁、UAJ₃、UAJ₄、MAJ、UAJ₅ 的总多酚含量相对于 UAJ₂ 的总多酚含量均较低,且依次降低,但各部位间均具有显著性差异;UAJ₁ 蛋白含量最高,其次是 UAJ₂、UAJ₃ 部位的多肽及 UAJ₄ 部位的小分子肽,最后是 UAJ₅ 部位的氨基酸类物质。由孔径筛分效应^[21],各类组分呈现出截留率有所差异,从而导致芦笋水提物不同膜分离部位活性有所不同。

2.2 各分离部位对 DPP-4 的抑制作用

为明确各分离部位对 DPP-4 的抑制作用,根据实验测得不同质量浓度下各分离部位对 DPP-4 的反应速率。作为芦笋水提物 MAJ 在 2~14 mg/mL(以干物质计)浓度下,对 DPP-4 抑制效应很弱。通过膜分离后将 MAJ 分成 UAJ₁、UAJ₂、UAJ₃、UAJ₄、UAJ₅ 后,各分离部位对 DPP-4 均有抑制作用,其中 UAJ₁ 部位对酶活性抑制效应明显强于 MAJ 部位及其余分离部位,且在本实验条件下其半数抑制浓度 IC₅₀ 为 8.19 mg/mL,然后依次是 UAJ₄、UAJ₂、UAJ₃,只有 UAJ₅ 的抑制效应弱于 MAJ 部位,可见芦笋水提

物中抑制 DPP-4 的有效物质集中在 UAJ₁ 部位中,如图 3 所示。实验得出 UAJ₁ 部位的 DPP-4 的抑制率相比于维格列汀的 DPP-4 的抑制率略低,这可能是因为 UAJ₁ 部位中组分较多,因此可能会干扰 DPP-4 与有效组分之间复合物的形成^[22],需要对 UAJ₁ 部位进行进一步的分离提纯。

2.3 UAJ₁ 部位对 DPP-4 的酶反应动力学

为确定 UAJ₁ 抑制剂类型,将反应体系酶用量固定在 5.2 U/L,并加入不同浓度的 UAJ₁ 部位,对不同底物浓度与酶促反应速率按照 Lineweaver-Burk 作图法,探究 UAJ₁ 浓度([I])、底物([S])浓度与酶解速率(V)之间的关系,确定抑制类型及相应动力学参数,结果见表 2 和图 4。

表 2 DPP-4 酶反应动力学参数

Table 2 Kinetic parameters of DPP-4 enzyme reaction

UAJ ₁ 浓度 [I] (mg·mL ⁻¹)	Lineweaver-Burk 曲线方程	K _m (mg·mL ⁻¹)	V _m (μmol·L ⁻¹ ·min ⁻¹)
0	1/V=0.02574/[S]+0.02973, R ² =0.999	1.155	38.850
2.5	1/V=0.03641/[S]+0.03133, R ² =0.999	1.162	31.918
5	1/V=0.04735/[S]+0.03412, R ² =0.996	1.388	29.308

对不同底物浓度倒数与酶促反应速率倒数作线性回归方程,根据直线斜率和截距可计算出 K_m 和 V_m。如表 1 所示,当无抑制剂样品时,K_m 为 1.155,V_m 为 38.850;当样品浓度为 2.5 mg/mL 时,K_m 为 1.162,V_m 为 31.918;当样品浓度为 5 mg/mL 时,K_m 为 1.388,V_m 为 29.308。随着抑制剂(UAJ₁ 分离部位)浓度增加,对 DPP-4 的抑制作用增强,从而改变了 V_m 和 K_m 值,表明 UAJ₁ 部位中的有效物质对 DPP-4 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,抑制酶促反应。

UAJ₁ 部位的 Lineweaver-Burk 曲线的斜率及在纵坐标轴上的截距均随样品浓度增大而增大,即 V_m 值减小,K_m 增大,所有的线都被拟合且 R²>0.996 并相交于第二象限内,符合混合型抑制特征^[24],表明 UAJ₁ 是 DPP-4 的混合型抑制剂,如图 4A 所示。进而以 Lineweaver-Burk 双倒数图的斜率与截距对相

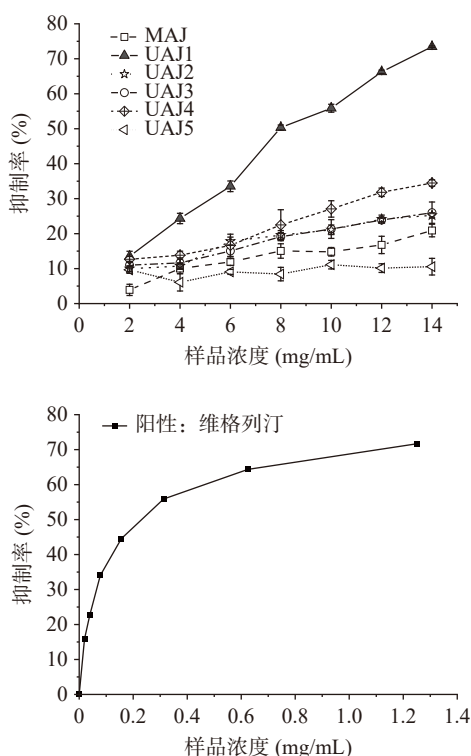
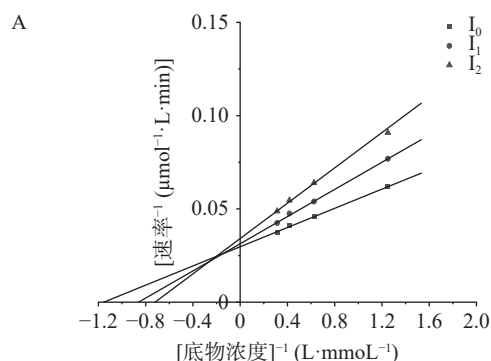


图 3 各部位对 DPP-4 的抑制作用

Fig.3 Inhibition effect of different parts on DPP-4



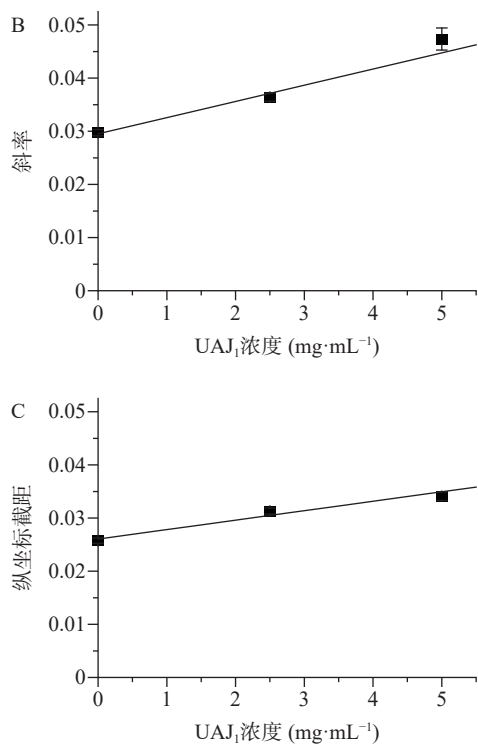


图 4 UAJ₁ 部位对 DPP-4 活性抑制的动力学分析

Fig.4 Kinetic analysis of the inhibitory effect of UAJ₁ on DPP-4 activity

注: A: UAJ₁ 的 Lineweaver-Burk 作图, I₀、I₁、I₂ 分别表示 UAJ₁ 浓度为 0、2.5、5 mg/mL; B: 斜率与样品浓度作图; C: 纵坐标截距与样品浓度作图

应的样液浓度二级作图分析,发现二级图曲线均呈直线,如图 4B~图 4C 所示。经线性回归计算结合游离

状态酶的常数($K_{ic}=9.679\text{ mg/mL}$)和结合酶-底物复合物的常数($K_{iu}=14.629\text{ mg/mL}$)。其结合酶-底物复合物的常数大于结合游离状态酶的常数,说明 UAJ₁ 部位中的有效物质和底物彼此妨碍对方与 DPP-4 结合,且 UAJ₁ 对酶-底物复合的亲合力比对游离状态 DPP-4 的亲合力强^[18,25]。

2.4 各组分含量与抑制 DPP-4 相关性分析

每个部位样品浓度在 10 mg/mL 时,相应组分含氮量、总多糖、总多酚、总黄酮、总皂苷等成分含量和 DPP-4 抑制率结果见表 3。

通过运用 IBM SPSS Statistics 27 软件将芦笋水提物中各组分含量对 DPP-4 抑制率进行相关性分析,结果见表 4。

通过双变量 Pearson 相关性分析可知,组分含氮量、多糖含量与抑制率呈极显著正相关性($P<0.01$),多酚含量与抑制率呈显著正相关性($P<0.05$),黄酮含量与抑制率呈极显著负相关性($P<0.01$),皂苷含量与抑制率没有显著相关性。提示芦笋水提物中起 DPP-4 抑制作用的主要有效部位为含氮类物质,得出 UAJ₁ 部位中起 DPP-4 酶抑制作用的有效组分为蛋白类成分。蛋白类成分(如米糠、豌豆、牛乳和鸡蛋中的)也有能够抑制 DPP-4 酶的相关报道^[26-28]。芦笋皂苷被认为具有抗氧化^[29-30]、降血糖^[31-32]和抗癌^[33]等多种生物活性和药理作用,但研究者们并未说明芦笋皂苷降糖作用途径是通过抑制 DPP-4 来实现的,这与本文结果芦笋中的皂苷类组分不是芦笋水提物抑制 DPP-4 的有效部位相一致。

表 3 芦笋膜分离后各组分含量及 DPP-4 抑制率

Table 3 Content of fractions and DPP-4 inhibition after membrane separation of *Asparagus officinalis*

样品	组分含氮量(mg·mL ⁻¹)	总多糖(mg·mL ⁻¹)	总多酚(mg·mL ⁻¹)	总黄酮(mg·mL ⁻¹)	总皂苷(mg·mL ⁻¹)	抑制率(%)
MAJ	0.455±0.0004	0.189±0.0038	0.178±0.0028	0.132±0.0018	0.075±0.0027	14.81±1.2
UAJ ₁	1.219±0.0454	0.502±0.0033	0.346±0.0006	0.006±0.0003	0.056±0.0024	55.85±1.14
UAJ ₂	0.819±0.0007	0.320±0.0097	0.448±0.0095	0.009±0.0005	0.051±0.0023	21.10±1.37
UAJ ₃	0.655±0.0102	0.157±0.0036	0.311±0.0009	0.011±0.0004	0.078±0.0029	21.33±2.68
UAJ ₄	0.455±0.004	0.189±0.0038	0.178±0.0028	0.132±0.0018	0.075±0.0027	14.81±1.21
UAJ ₅	0.347±0.0006	0.127±0.0052	0.165±0.0045	0.129±0.0020	0.073±0.0015	11.13±1.22

表 4 芦笋膜分离后各组分含量与抑制 DPP-4 相关性

Table 4 Correlation between the content of each fraction and the inhibition of DPP-4 after membrane separation of *Asparagus officinalis*

指标	组分含氮量	多糖含量	多酚含量	黄酮含量	皂苷含量	抑制率
组分含氮量	1					
多糖含量	0.941**	1				
多酚含量	0.736**	0.640**	1			
黄酮含量	-0.792**	-0.582**	-0.886**	1		
皂苷含量	-0.385	-0.542**	-0.420*	0.175	1	
抑制率	0.905**	0.838**	0.432*	-0.616**	-0.098	1

注: *在0.05级别(双尾),相关性显著, **在0.01级别(双尾),相关性显著。

3 结论

DPP-4 抑制剂因其作用机制独特,疗效确定,副

作用小等特点受到普遍关注,本研究通过膜分离将芦笋水提物分成五种部位,并对各部位进行了 DPP-4

抑制效果比较,最终确定芦笋水提取物中抑制 DPP-4 的有效物质集中在 UAJ₁ 部位中。该部位中皂苷、黄酮、多糖、多酚、蛋白等组分含量不同,通过活性组分含量与 DPP-4 抑制相关性分析,芦笋水提取物中起 DPP-4 抑制作用的主要有效部位为分子量大于 30 kDa 的蛋白组分,其通过与酶-底物复合物(ES)亲和结合为主,与底物竞争游离酶为辅的双重作用,表现出混合型抑制剂样作用,其 IC₅₀ 为 8.19 mg/mL,为拓宽绿芦笋深加工领域,开发新的芦笋抗 II 型糖尿病作用的物质,提供了一定的理论和数据基础。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] HAMMOUD R, DRUCKER D J. Beyond the pancreas: Contrasting cardiometabolic actions of GIP and GLP1[J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2022, 19(4): 201–216.
- [2] CHARBONNEL B, CARIOU B. Pharmacological management of type 2 diabetes: The potential of incretin-based therapies[J]. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 2011, 13(2): 99–117.
- [3] SONG J J, WANG Q, DU M, et al. Identification of dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides from mare whey protein hydrolysates[J]. *Journal of Dairy Science*, 2017, 100(9): 6885–6894.
- [4] DAQIAO Y, CHUNSHENG L, LAIHAO L, et al. Discovery and functional mechanism of novel dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides from Chinese traditional fermented fish (Chouguiyu)[J]. *Current Research in Food Science*, 2022, 5: 1676–1684.
- [5] YOU H X, WU T L, WANG W, et al. Preparation and identification of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides from quinoa protein[J]. *Food Research International*, 2022, 156: 111176.
- [6] 田颖刚, 牛俊卿, 张盼, 等. 芦笋植株欠开发部位营养、功能成分分析及比较[J]. *天然产物研究与开发*, 2014, 26(9): 1434–1439.
- [7] TIAN Y G, NIU J Q, ZHANG P, et al. Analysis and comparison of nutritional and functional ingredients of different parts of asparagus officinalis[J]. *Natural Product Research and Development*, 2014, 26(9): 1434–1439.
- [8] 赵洪军, 朱丹, 王珂, 等. 芦笋提取液体外抗氧化、细胞毒作用及抑制 α -葡萄糖苷酶活性研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2011, 23(2): 356–360.
- [9] ZHAO H J, ZHU D, WANG K, et al. Antioxidation, cytotoxicity and α -glucosidase inhibition activities of asparagus extract *in vitro*[J]. *Natural Product Research and Development*, 2011, 23(2): 356–360.
- [10] ZHANG W, WU W B, WANG Q, et al. The juice of asparagus by-product exerts hypoglycemic activity in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2014, 38(5): 509–517.
- [11] VADIVELAN R, KRISHNAN G R, KANNAN R. Antidiabetic potential of *Asparagus racemosus* Willd leaf extracts through inhibition of α -amylase and α -glucosidase[J]. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 2017, 9(1): 1–4.
- [12] ADOUNI K, ZOUAOUI O, CHAHDOURA H, et al. *In vitro* antioxidant activity, α -glucosidase inhibitory potential and *in vivo* protective effect of *Asparagus stipularis* Forssk aqueous extract against high-fructose diet-induced metabolic syndrome in rats[J]. *Journal of Functional Foods*, 2018, 47: 521–530.
- [13] 张若洁, 王鲁峰, 缪文华, 等. 超声波辅助提取芦笋总皂苷的工艺[J]. *食品科学*, 2011, 32(14): 47–51.
- [14] ZHANG R J, WANG L F, MIAO W H, et al. Use of response surface methodology for optimization of ultrasound-assisted extraction of total saponins from *Asparagus officinalis* L[J]. *Food Science*, 2011, 32(14): 47–51.
- [15] 国家药典委员会. 中国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [16] National Pharmacopoeia Committee. Chinese Pharmacopoeia[M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020.
- [17] 王文洁, 唐炜, 俞玲娜, 等. 蒽酮-硫酸法与苯酚-硫酸法测定凉粉草多糖的比较[J]. *食品科技*, 2017, 42(9): 274–279.
- [18] WANG W J, TANG W, YU L N, et al. Comparison of anthrone-sulfuric and phenol-sulfuric acid methods for determination of polysaccharide in *Mesona blume*[J]. *Food Science and Technology*, 2017, 42(9): 274–279.
- [19] HUANG Z T, CHEN Q Q, HU K X, et al. Effects of *in vitro* simulated digestion on the free and bound phenolic content and antioxidant activity of seven species of seaweeds[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2020, 56(5): 2365–2374.
- [20] 甲承立, Hussain Naveed, 董洁, 等. 以猪小肠黏膜提取物作为 α -葡萄糖苷酶和二肽基肽酶IV的酶活力分析体系的建立[J]. *食品科学*, 2019, 40(23): 44–51.
- [21] JIA C L, HUSSAIN N, DONG J, et al. Establishment of activity assays for α -glucosidase and dipeptidyl peptidase IV using porcine small intestine mucosal extracts[J]. *Food Science*, 2019, 40(23): 44–51.
- [22] KONG X Z, ZHANG L N, SONG W G, et al. Separation, identification and molecular binding mechanism of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides derived from walnut (*Juglans regia* L.) protein[J]. *Food Chemistry*, 2021, 347: 129062.
- [23] MARDIANIS Y, ANWAR C, HARYADI W. Synthesis of curcumin analogues monoketone from cinnamaldehyde and their inhibition assay against α -glucosidase enzyme[J]. *Materials Science Forum*, 2017, 4517: 110–117.
- [24] BISSWANGER H. 酶学实验手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2018.
- [25] BISSWANGER H. Practical enzymology[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2018.
- [26] 朱建新, 冯亭亭, 张景, 等. 知母中 4 种成分及对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用[J]. *中成药*, 2018, 40(5): 1120–1123.
- [27] ZHU J X, FENG T T, ZHANG J, et al. Four chemical constituents from *Ane-marrhenae rhizoma* and their α -glucosidase inhibitory effects[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2018, 40(5): 1120–1123.
- [28] 关云静, 周林燕, 毕金峰, 等. 绿芦笋不同部位营养成分及活性评价研究[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(5): 343–347.
- [29] GUAN Y J, ZHOU L Y, BI J F, et al. Evaluation of nutritive composition and antioxidant activity in different parts of green asparagus[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2015, 36(5): 343–347.
- [30] LI C Y, MA Y, LI H Y, et al. A convenient method for the determination of molecular weight cut-off of ultrafiltration membranes[J]. *Chin J Chem Eng*, 2017, 25(1): 62–67.
- [31] 杜月, 张政, 刘学军, 等. 软枣猕猴桃花粉多糖提取、表征及体外生物活性研究[J]. *粮食与油脂*, 2023, 36(6): 85–91.
- [32] DU Y, ZHANG Z, LIU X J, et al. Extraction, characterization and *in vitro* biological activity of polysaccharide from *Actinidia arguta* Planch. pollen[J]. *Cereals & Oils*, 2023, 36(6): 85–91.
- [33] 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 Chemistry*, 2020, 313(C): 126099.

- [24] 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(C): 126346.
- [25] HONG Y, LIAO X Y, CHEN Z L. Screening and characterization of potential α -glucosidase inhibitors from *Cercis chinensis* Bunge fruits using ultrafiltration coupled with HPLC-ESI-MS/MS [J]. *Food Chemistry*, 2022, 372: 131316–131316.
- [26] HATANAKA T, INOUE Y, ARIMA J, et al. Production of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides from defatted rice bran[J]. *Food Chemistry*, 2012, 134(2): 797–802.
- [27] ZHANG M K, ZHU L, WU G H, et al. Rapid screening of novel dipeptidyl peptidase-4 inhibitory peptides from pea (*Pisum sativum* L.) protein using peptidomics and molecular docking[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(33): 10221–10228.
- [28] LACROIX M I, LI-CHAN C E. Food-derived dipeptidyl-peptidase IV inhibitors as a potential approach for glycemic regulation-current knowledge and future research considerations[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2016, 54: 1–16.
- [29] VISAVADIYA N P, NARASIMHACHARYA A V R L. Asparagus root regulates cholesterol metabolism and improves antioxidant status in hypercholesteremic rats[J]. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: Ecam*, 2009, 6(2): 219–26.
- [30] 葛思琪, 赵庆生, 孙广利, 等. 芦笋总皂苷的提取纯化及抗氧化研究[J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(20): 57–62. [GE S Q, ZHAO Q S, SUN G L, et al. Study on extraction purification and antioxidant activity of total saponins from *Asparagus officinalis* L.[J]. *Food Research and Development*, 2018, 39(20): 57–62.]
- [31] PANDEY A R, AHMAD S, SINGH S P, et al. Furostanol saponins from *Asparagus racemosus* as potential hypoglycemic agents[J]. *Phytochemistry*, 2022, 201: 113286.
- [32] 朱兴磊, 张雯, 高云, 等. 芦笋老茎皂苷对糖尿病大鼠的降血糖作用研究[J]. *营养学报*, 2019, 41(3): 270–275. [ZHU X L, ZHANG W, GAO Y, et al. The hypoglycaemic activity of saponins from *Asparagus officinalis* L. by-products in diabetic rats[J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2019, 41(3): 270–275.]
- [33] ZHANG F, ZHANG Y Y, MA R H, et al. Multi-omics reveals the anticancer mechanism of asparagus saponin-asparanin A on endometrial cancer Ishikawa cells[J]. *Food & Function*, 2020, 12(2): 614–632.