

文章编号: 1674-5566(2023)04-0865-09

DOI:10.12024/jsou.20220503858

## 华贵栉孔扇贝闭壳肌酶解物的辅助降血糖功能活性评价

林海生<sup>1,2</sup>, 廖津<sup>3</sup>, 秦小明<sup>1,2</sup>, 曹文红<sup>1,2</sup>, 陈忠琴<sup>1,2</sup>, 高加龙<sup>1,2</sup>, 郑惠娜<sup>1,2</sup>,  
章超桦<sup>1,2</sup>, 梁远维<sup>4</sup>, 陆韵琪<sup>1</sup>, 杨维<sup>5</sup>

(1. 广东海洋大学 食品科技学院, 广东 湛江 524088; 2. 大连工业大学 海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心, 辽宁 大连 116034; 3. 暨南大学 食品科学与工程系, 广东 广州 510632; 4. 广东海洋大学 化学与环境学院, 广东 湛江 524088; 5. 海南翔泰渔业股份有限公司, 海南 澄迈 571924)

**摘要:** 为挖掘华贵栉孔扇贝 (*Chlamys nobilis*) 高值化利用的潜力, 选用复合蛋白酶水解华贵栉孔扇贝的闭壳肌, 探讨华贵栉孔扇贝闭壳肌酶解物 (Enzymatic hydrolysate of *Chlamys nobilis* adductor muscle, EHCA) 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的影响和对 DPPH 自由基的清除能力, 并以空腹血糖浓度、血清胰岛素含量、肝脏丙二醛含量和超氧化物歧化酶活性等为指标, 评价 EHCA 对正常小鼠体内辅助降血糖功能和抗氧化活性。结果表明, EHCA 具有较好的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性, 且其 DPPH 自由基清除能力随着酶解物质量浓度增加而上升; 动物实验结果显示, 一定质量浓度的 EHCA 能增强小鼠的糖耐量, 并显著降低小鼠肝脏丙二醛浓度, 提高超氧化物歧化酶活性。复合蛋白酶能够有效酶解华贵栉孔扇贝闭壳肌, 其酶解物具有较好的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性和抗氧化活性, 具有一定的辅助降血糖作用。本研究结果为开发辅助降血糖海洋功能食品提供理论依据。

**关键词:** 酶解; 华贵栉孔扇贝; 降血糖活性; 抗氧化

**中图分类号:** TS 254.9 **文献标志码:** A

国际糖尿病联合会 (International Diabetes Federation, IDF) 糖尿病流行病学研究指南<sup>[1]</sup>指出, 近 50 年来糖尿病的全球发病率一直上升, 2021 年确诊和未确诊糖尿病患者人数估计达 5.37 亿人, 预计到 2045 年将上升至 7 亿人。糖尿病是一种复杂的代谢性疾病, 目前常见的治疗方法主要是通过增加胰岛素敏感性、提升机体抗氧化能力、抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性等<sup>[2-3]</sup>。盐酸二甲双胍和阿卡波糖等传统药物具有易产生耐药性, 造成肝脏和肾脏损伤等副作用<sup>[4-7]</sup>, 而开发通过其他途径治疗糖尿病的药物所产生的成本高、副作用大、原料来源困难等问题亟待攻克。具有降血糖功能的天然产物和食源性营养功能物质的研究与开发成为解决问题的重要方向之一, 其中包括多糖类、黄酮类、生物碱类、肽类等<sup>[8]</sup>。动物来源的天

然降血糖活性物质主要为蛋白肽类, 多以食源性蛋白为原料采用酶法降解获取<sup>[9-11]</sup>。这类活性肽可以通过调整胰岛素依赖性通路、改善抗氧化能力等相关蛋白的表达起到改善血糖水平和血脂代谢等功能, 其活性与肽的分子量、氨基酸组成及潜在的具有胰岛素增敏作用的特异性氨基酸有关<sup>[12-15]</sup>。

海洋生物源蛋白质的氨基酸组成结构新颖, 成为挖掘功能活性肽的重要原料<sup>[16-18]</sup>。目前已有不少关于贝类来源天然降血糖活性肽的研究如青蛤 (*Cyclina sinensis*)<sup>[19]</sup>、四角蛤蜊 (*Macrasteria veneriformis*)<sup>[20]</sup>、牡蛎 (*Crassostrea gigas*)<sup>[21]</sup> 等。华贵栉孔扇贝 (*Chlamys nobilis*) 属于广东、海南、福建等南方沿海养殖贝类, 其营养丰富<sup>[22-23]</sup>, 有抗氧化、抗癌<sup>[24]</sup>和促进生殖能力<sup>[25]</sup>等功能。《中华本草》中记载其闭壳肌干制品具有滋阴、补肾、

收稿日期: 2022-05-13

修回日期: 2022-07-25

**基金项目:** 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系项目 (CARS-49); 广东海洋大学创新强校工程重大科研成果培育计划 (GDOU2017052606); 广东省现代农业产业技术体系创新团队项目 (2021KJ146); 广东海洋大学博士启动项目 (R17082); 广东省高等学校科技创新团队项目 (2021KCXTD021)

**作者简介:** 林海生 (1985—), 男, 博士, 讲师, 研究方向为水产品高值化利用。E-mail: haishenglin@163.com

**通信作者:** 梁远维, E-mail: liangyw@gdou.edu.cn

版权所有 © 《上海海洋大学学报》编辑部 (CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

养血调中等功效,且含有丰富的蛋白质、脂肪、多糖、矿物质等营养物质,其蛋白含量极高。可控酶解为蛋白质高效利用的主要手段,也是制备食源性生物活性肽的重要途径,研究团队前期对华贵栉孔扇贝闭壳肌的酶解工艺进行了优化,并发现其酶解产物具有 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性<sup>[10]</sup>,极具开发成为新型天然降血糖活性物质的潜力。

本研究选用华贵栉孔扇贝闭壳肌为研究对象,采用酶法制备酶解产物(Enzymatic hydrolysate of *Chlamys nobilis* adductor muscle, EHCA),研究其对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的影响和对DPPH自由基的清除作用,同时,采用动物实验探讨其对正常小鼠糖耐量的影响及其体内抗氧化影响,为扇贝闭壳肌的高值化利用和开发新型潜在辅助降血糖的功能活性产品提供研究依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

华贵栉孔扇贝:购自湛江市雷州市流沙湾养殖场;复合蛋白酶(62 784 U/g):购于诺维信(中国)生物技术有限公司; $\alpha$ -葡萄糖苷酶、对硝基苯基- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷(p-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, pNPG):购于上海源叶生物科技有限公司;DPPH自由基清除能力试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)-WST-8法活性测定试剂盒、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量试剂盒:购于苏州格锐思生物科技有限公司;Accu-Chek Active 罗氏血糖试纸:购于罗氏诊断产品(上海)有限公司产品;小鼠胰岛素(INS)酶联免疫分析(ELISA)试剂盒:购于江苏雨桐生物科技有限公司;雄性昆明小鼠[体质量(25±3)g]:购于珠海百试通生物科技有限公司;碳酸钠、甲醛、盐酸、氢氧化钠、三氯乙酸等均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

UNIVERSAL 320R 台式高速冷冻离心机:德国 Hettich 科学仪器公司产品;VARIOSKAN FLASH 全波长扫描式多功能酶标仪:赛默飞世尔科技公司产品;Accu-Chek Active 罗氏活力血糖仪:罗氏诊断产品(上海)有限公司产品;FDU-551 真空冷冻干燥机、N-4000 真空旋转蒸发器: EYELA 东京理化器械株式会社产品。

### 1.3 研究方法

#### 1.3.1 华贵栉孔扇贝闭壳肌酶解物制备

参考林海生等<sup>[10]</sup>的方法,将新鲜采购的华贵

栉孔扇贝在实验室洗净后开壳取出闭壳肌,沸水漂烫 1 min,沥干冷却后,按料液比为 1 g : 3 mL 的比例加入蒸馏水匀浆,调节 pH 为 7,加入复合蛋白酶(按原料中每克粗蛋白含量添加 3 000 U),50 °C 酶解 4 h,沸水灭酶 5 min,在 4 °C 条件下离心 15 min (8 000 r/min),取上清液,冷冻干燥后,得到华贵栉孔扇贝闭壳肌酶解物(EHCA)。

#### 1.3.2 基本成分测定

水分含量参考 GB 5009.3—2016《食品中水分的测定》;灰分含量参考 GB 5009.4—2016《食品中灰分的测定》;蛋白质含量参考 GB 5009.5—2016《食品中蛋白质的测定》;总糖含量参考 GB/T 9695.31—2008《肉制品总糖含量测定》;脂肪含量参考 GB 5009.6—2016《食品中脂肪的测定》;低聚肽含量参考 GB/T 22729—2008《海洋鱼低聚肽粉》。

#### 1.3.3 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率测定

参考林海生等<sup>[10]</sup>方法进行修改。提前配制所需溶液:pH = 6.8, 0.2 mol/L 磷酸缓冲溶液、3.3 U/mL  $\alpha$ -葡萄糖苷酶、0.1 mol/L 碳酸钠溶液、1.25 mmol/L pNPG、样品溶液(15 mg/mL、30 mg/mL 和 60 mg/mL)。使用 96 孔板分别设空白孔、空白对照孔、样品孔、样品背景对照孔。每孔分别加入磷酸缓冲溶液 110  $\mu$ L、样品 20  $\mu$ L、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶 20  $\mu$ L,混匀放置于 37 °C 温育 10 min 后加入 pNPG 20  $\mu$ L,在 37 °C 反应 20 min。再加入 80  $\mu$ L 碳酸钠溶液终止反应。测定其在 405 nm 波长下吸光值(OD 值)。每组设 3 个平行孔。具体反应体系如表 1。

表 1  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性抑制体系表

Tab. 1  $\alpha$ -glucosidase activity inhibition system

试剂名称 Reagent	空白孔 Blank/ $\mu$ L	空白 对照孔 Blank control/ $\mu$ L	样品孔 Sample/ $\mu$ L	样品背景 对照孔 Background control/ $\mu$ L
磷酸缓冲溶液 PBS	110	110	110	110
样品 Sample	-	-	20	20
$\alpha$ -葡萄糖苷酶 $\alpha$ -glucosidase	20	-	20	-
蒸馏水 Distilled water	20	40	-	20
pNPG	20	20	20	20
碳酸钠溶液 NaHCO <sub>3</sub> solution	80	80	80	80

$\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率的计算如下:

$$W_{\alpha} = [1 - (A_3 - A_4)] \div (A_1 - A_2) \times 100\% \quad (1)$$

式中: $W_{\alpha}$  为  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率; $A_1$  为空白孔吸光值; $A_2$  为空白对照孔吸光值; $A_3$  为样品孔吸光值; $A_4$  为背景对照孔吸光值。

#### 1.3.4 DPPH 自由基清除能力测定

根据 DPPH 自由基清除能力试剂盒说明书操作,得到 DPPH 自由基清除率标准曲线  $y = 2.8486x + 0.7084$ , 其中: $x$  为 Trolox 质量浓度,  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;  $y$  为清除率, %。

#### 1.3.5 EHCA 对正常小鼠血糖的影响

参考延海莹等<sup>[26]</sup>方法, EHCA 以不同比例与水混溶后得到受试物。所有小鼠试验前适应性喂养一周, 禁食 12 h 后, 采用血糖试剂盒检测空腹血糖值, 根据血糖值随机分为 5 组, 不同剂量给药组(低给药组 500 mg/kg, 中给药组 1 000 mg/kg, 高给药组 2 000 mg/kg, 分别记为 L、M、H)、阳性对照组 [(Positive control, PC) 二甲双胍 150 mg/kg] 和空白对照组 (Negative control, NC), 每组 10 只小鼠。连续灌胃给药 3 d, 空白组灌胃蒸馏水, 记录体质量, 计算体质量增长率 (%)。灌胃 3 d 后, 禁食 12 h, 测定空腹血糖。各组与可溶性淀粉 250 mg/kg 混合同时灌胃, 测定给灌胃淀粉后各组 0.5 和 2 h 的血糖值, 并计算血糖曲线下面积 (Area under curve, AUC)  $Q_{AUC}$ 。

$$Q_{AUC} = (a + 4b + 3c) / 4 \quad (2)$$

式中: $a$ 、 $b$ 、 $c$  分别是灌胃 0 h 血糖值、灌胃 0.5 h 血糖值、灌胃 2 h 血糖值, mmol/L。

#### 1.3.6 空腹血糖的测定

小鼠禁食不禁水 12 h, 采用尾部静脉取小鼠尾尖血, 使用罗氏活力血糖仪及血糖试纸对灌胃前后小鼠测定空腹血糖, 重复 2 次。

$$W_c = (G_0 - G_1) / G_0 \times 100\% \quad (3)$$

式中: $W_c$  为降糖率, %;  $G_0$  为给药前空腹血糖值, mmol/L;  $G_1$  为给药结束后空腹血糖, mmol/L。

#### 1.3.7 EHCA 对血清胰岛素的影响

EHCA 对正常小鼠的影响试验结束后, 小鼠眼球取血, 以脱颈位法处死, 采集脏器并称量。

血液 (室温) 自然凝固 10~15 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 仔细收集上清液, 根据试剂盒使用说明操作, 测定在 450 nm 波长下吸光值绘制标准品标准曲线, 根据曲线计算各组小鼠血清胰

岛素 (Insulin, INS) 含量并计算出各组胰岛素敏感指数 ( $W_{ISI}$ ) 和胰岛素分泌指数 ( $W_{FBCI}$ )。

$$W_{ISI} = \ln [1 / (W_{FPG} \times W_{FINS})] \quad (4)$$

$$W_{FBCI} = W_{FINS} / W_{FPG} \quad (5)$$

式中: $W_{ISI}$  为胰岛素敏感指数;  $W_{FPG}$  为空腹血糖, mmol/L;  $W_{FINS}$  为空腹胰岛素含量,  $\mu\text{U}/\text{mL}$ ;  $W_{FBCI}$  为胰岛素分泌指数。

#### 1.3.8 EHCA 对肝脏丙二醛含量和超氧化物歧化酶活性的影响

取 0.5 g 肝脏加入 9 倍质量生理盐水后匀浆制备成组织匀浆液, 10 000 r/min 离心 10 min 取上清液, 根据丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 浓度 (nmol/mL) 试剂盒说明书和超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD)-WST-8 法活性测定试剂盒说明书操作, 测定小鼠肝脏组织 MDA 含量以及 SOD 活性。

#### 1.3.9 数据分析

运用 SPSS 25.0 软件做统计学处理, 比较对照组与给药组之间差异。数据以平均值  $\pm$  标准差 (Mean  $\pm$  SD) 表示, 进行单因素方差分析 (One way ANOVA) 与显著性检验,  $P < 0.05$  有显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 华贵栉孔扇贝闭壳肌及 EHCA 基本成分分析

华贵栉孔扇贝闭壳肌及 EHCA 基本成分见表 2。华贵栉孔扇贝闭壳肌的蛋白含量为 12.46 g/100 g (湿基), 脂肪含量为 0.58 g/100 g (湿基), 是一种高蛋白低脂肪的水产原料。经过酶解得到 EHCA, 其蛋白质含量达到 77.05 g/100 g, 低聚肽含量高达 70.20 g/100 g, 表明 EHCA 其主要成分为小分子肽。

表 2 华贵栉孔扇贝闭壳肌及其 EHCA 的一般成分

Tab. 2 General composition of *Chlamys nobilis*

	adductor muscle and EHCA						%
样品 Sample	水分 Water content	灰分 Ash	粗蛋白 CP	低聚肽 Oligopeptide	总糖 Total sugar	粗脂肪 Crude fat	
闭壳肌 Adductor muscle	82.15 $\pm$ 0.04	7.34 $\pm$ 0.04	12.46 $\pm$ 0.40	-	1.45 $\pm$ 0.08	0.58 $\pm$ 0.01	
EHCA	4.94 $\pm$ 0.52	4.45 $\pm$ 0.49	77.05 $\pm$ 2.05	70.20 $\pm$ 0.05	11.79 $\pm$ 0.40	-	

注:“-”表示未检测。

Notes: “-” indicates that it is not detected.

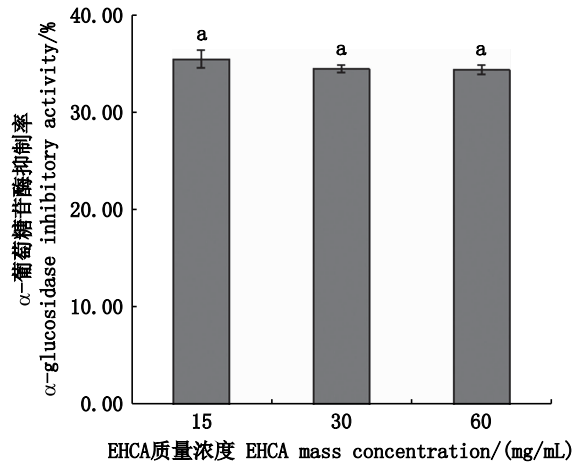
## 2.2 EHCA对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制活性

$\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂是通过抑制肠黏膜上的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶作用,使淀粉分解为葡萄糖的速度减缓,从而达到减少和延缓小肠对葡萄糖的吸收效果,故 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性可作为评价降血糖活性的重要指标<sup>[27]</sup>。EHCA对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制活性如图1所示,不同质量浓度EHCA的抑制率为34.36%~35.45%,在试验质量浓度范围内,组间无显著性差异( $P>0.05$ )。结果表明,EHCA对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制具有抑制活性,林海生等<sup>[10]</sup>亦在其他贝类酶解物中检测到相同的生理活性。

## 2.3 EHCA对DPPH自由基的清除能力

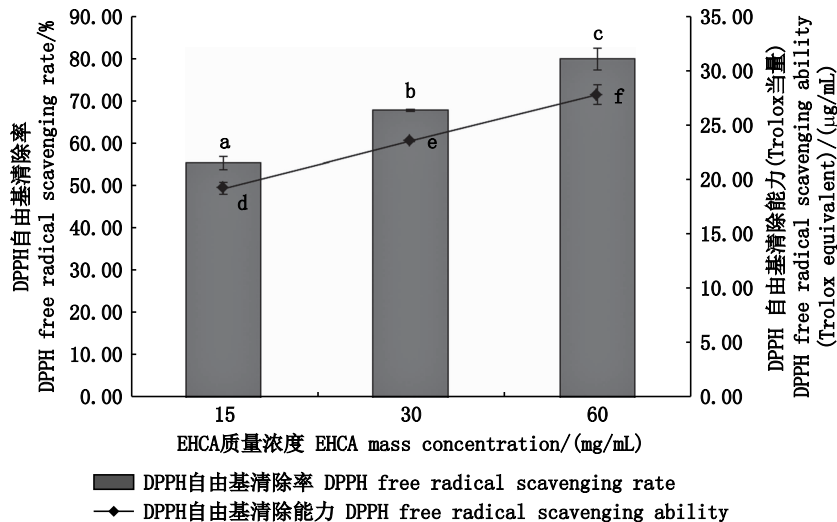
由图2可知:EHCA对DPPH自由基清除率及清除能力随样品质量浓度的升高而升高,组间有显著性差异( $P<0.05$ ),EHCA质量浓度为60 mg/mL条件下,其DPPH自由基清除率高达80.02%,清除能力为27.84  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。EHCA对DPPH

的清除能力与其质量浓度呈现正相关,田裕心等<sup>[28]</sup>在鲍鱼内脏抗氧化活性肽中的研究结果相似。



标有相同小写字母者表示组间无显著性差异( $P>0.05$ )。The means with different letters within the same group have significant differences at the 0.05 probability level.

图1 不同质量浓度EHCA的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率  
Fig.1  $\alpha$ -glucosidase inhibition rate of different mass concentrations EHCA



标有不同小写字母者表示组间有显著性差异( $P<0.05$ )。

The means with different letters within the same group have significant differences at the 0.05 probability level.

图2 不同质量浓度EHCA的DPPH自由基清除率和清除能力

Fig.2 DPPH free radical scavenging rate and scavenging capacity of different mass concentrations of EHCA

## 2.4 EHCA对小鼠血糖的影响

### 2.4.1 EHCA对小鼠体质量的影响

体外 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率试验结果表明,EHCA具有一定的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性,通过小鼠实验进一步验证其体内活性。EHCA对小鼠体质量影响的实验结果见表3。在灌胃给药第3

天后,各组小鼠体质量均有增长,其中PC组增长最为缓慢(7.97%),与NC组体质量增长率(11.05%)相比较,给药组体质量增长率呈递减趋势,但各组间无显著性差异( $P>0.05$ ),结果表明,EHCA对正常小鼠体质量无明显影响。

表 3 EHCA 对正常小鼠体质量的影响

Tab. 3 Effects of EHCA on body mass in normal mice

Mean±SD, n=10

分组 Group	给药剂量 Dosage/(mg/kg)	体质量 Body mass/g		体质量增长率 Body mass gain rate/%
		0 d	3 d	
NC 组 NC group	-	26.70±1.28 <sup>a</sup>	29.65±1.55 <sup>a</sup>	11.05 <sup>a</sup>
PC 组 PC group	150	25.86±2.77 <sup>a</sup>	27.92±2.26 <sup>a</sup>	7.97 <sup>a</sup>
EHCA-L 组 EHCA-Lgroup	500	26.30±2.32 <sup>a</sup>	29.36±2.50 <sup>a</sup>	11.63 <sup>a</sup>
EHCA-M 组 EHCA-Mgroup	1 000	25.22±2.28 <sup>a</sup>	27.97±2.18 <sup>a</sup>	10.90 <sup>a</sup>
EHCA-H 组 EHCA-Hgroup	2 000	27.97±1.63 <sup>a</sup>	30.20±2.27 <sup>a</sup>	7.97 <sup>a</sup>

注:同列中标有不同小写字母表示组间有显著性差异( $P<0.05$ )。

Notes: Data with different letters within the same column are significantly different at the 0.05 probability level.

## 2.4.2 EHCA 对小鼠血糖浓度及糖耐量的影响

参考延海莹<sup>[17]</sup>等的方法对实验组小鼠给予 EHCA 灌胃 3 d 干预,结果显示,与 NC 组相比,实验组小鼠的空腹血糖( $G_0$ )均有所降低,但无显著性差异( $P>0.05$ ),见表 4。与 NC 组相比,PC 组(35.02%)和给药组的降糖率均有一定程度提高。在华贵栉孔扇贝组中,EHCA-M 组的降糖率最高(34.40%),3 个给药组之间无显著性差异(表 4)。EHCA 对正常小鼠糖耐量影响的结果见表 5。灌胃 0.5 h 后,与 NC 组[(11.38±1.58) mmol/L]相比,PC 组及各给药组的小鼠血糖值均显著降低( $P<0.05$ ),其中 PC 组小鼠血糖值[(8.56±1.19) mmol/L]降低最显著,其次为 EHCA-H 组

[(9.48±1.28) mmol/L]。灌胃 2 h 后,与 NC 组[(9.57±1.56) mmol/L]相比,PC 组及各给药组的小鼠血糖值均显著降低( $P<0.05$ ),其中 PC 组小鼠血糖值[(6.87±1.14) mmol/L]降低最显著,其次为 EHCA-H 组[(7.46±1.43) mmol/L]。

相对于 NC 组小鼠的血糖曲线下面积[(19.60±2.16) mmol/(L·min)],EHCA 和二甲双胍均能显著降低 AUC 值( $P<0.05$ ),表明 EHCA 对小鼠糖耐量具有明显的改善作用。结果表明,连续给 EHCA 灌胃 3 d 后,可以改善正常小鼠糖耐量作用,这与王祖哲等<sup>[29]</sup>在海洋水产蛋白酶解物对大鼠葡萄糖耐量的影响测试中得出的结果一致。

表 4 EHCA 对正常小鼠空腹血糖的影响

Tab. 4 Effect of EHCA on fasting blood glucose in normal mice

Mean±SD, n=10

分组 Group	给药剂量 Dosage/(mg/kg)	血糖值 Blood glucose value/(mmol/L)		降糖率 Hypoglycemic rate/%
		$G_0$	$G_1$	
NC 组 NC group	-	4.18±1.33 <sup>a</sup>	3.70±0.99 <sup>a</sup>	11.48 <sup>a</sup>
PC 组 PC group	150	4.94±1.73 <sup>a</sup>	3.21±0.45 <sup>a</sup>	35.02 <sup>a</sup>
EHCA-L 组 EHCA-Lgroup	500	4.92±1.27 <sup>a</sup>	3.23±0.71 <sup>a</sup>	34.35 <sup>a</sup>
EHCA-M 组 EHCA-Mgroup	1 000	4.68±1.43 <sup>a</sup>	3.07±0.56 <sup>a</sup>	34.40 <sup>a</sup>
EHCA-H 组 EHCA-Hgroup	2 000	5.10±1.72 <sup>a</sup>	3.40±1.00 <sup>a</sup>	33.33 <sup>a</sup>

注:同列中标有不同小写字母表示组间有显著性差异( $P<0.05$ )。

Notes: Data with different letters within the same column are significantly different at the 0.05 probability level.

表 5 EHCA 对正常小鼠糖耐量的影响

Tab. 5 Effect of EHCA on sugar tolerance in normal mice

Mean±SD, n=10

分组 Group	给药剂量 Dosage/(mg/kg)	血糖值 Blood glucose value/(mmol/L)			AUC/[mmol/ (L·min)]
		$G_0$	0.5 h	2 h	
NC 组 NC group	-	4.18±1.33 <sup>a</sup>	11.38±1.58 <sup>Bc</sup>	9.57±1.56 <sup>Bc</sup>	19.60±2.16 <sup>Bc</sup>
PC 组 PC group	150	4.94±1.73 <sup>a</sup>	8.56±1.19 <sup>Aa</sup>	6.87±1.14 <sup>Aa</sup>	14.84±1.59 <sup>Aa</sup>
EHCA-L 组 EHCA-Lgroup	500	4.92±1.27 <sup>a</sup>	9.92±1.40 <sup>b</sup>	8.40±1.48 <sup>c</sup>	17.44±1.31 <sup>b</sup>
EHCA-M 组 EHCA-Mgroup	1 000	4.68±1.43 <sup>a</sup>	10.10±1.62 <sup>b</sup>	8.15±1.38 <sup>bc</sup>	17.38±1.33 <sup>b</sup>
EHCA-H 组 EHCA-Hgroup	2 000	5.10±1.72 <sup>a</sup>	9.48±1.28 <sup>Ab</sup>	7.46±1.43 <sup>Ab</sup>	16.39±1.62 <sup>Ab</sup>

注:同列中标有不同大写字母表示组间有极显著性差异( $P<0.01$ ),标有不同小写字母表示组间有显著性差异( $P<0.05$ )。

Notes: Data with different capital letters within the same column are very significantly different at the 0.01 probability level, and data with different letters are significantly different at the 0.05 probability level.

### 2.4.3 EHCA 对小鼠血清胰岛素的影响

EHCA 对正常小鼠胰岛素影响的结果见表 6。各组小鼠的空腹血清胰岛素间无显著差异 ( $P>0.05$ )。与 NC 组相比,各给药组的胰岛素敏感指数有所升高,但组间无显著性差异 ( $P>0.05$ )。实验结果表明,EHCA 辅助降血糖的机制与胰岛素的分泌没有明显关系。

### 2.4.4 EHCA 对小鼠肝脏丙二醛含量的影响

由图 3 可知:与 NC 组 [ $(8.08\pm 4.04)$  nmol/L] 相比,各给药组小鼠肝脏 MDA 含量均显著降低 ( $P<0.05$ ),与 PC 组 [ $(3.56\pm 1.86)$  nmol/L] 没有显著差异。结果表明,EHCA 具有显著的体内抗氧化活性。该结果与欧爱宁等<sup>[30]</sup>的研究结果一致,该团队发现糖尿病模型小鼠的 MDA 浓度明显升高,而降低 MDA 浓度是降血糖活性的一个有效指标。

表 6 EHCA 对正常小鼠胰岛素的影响

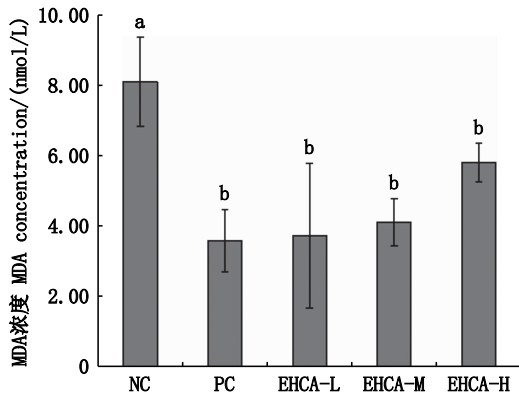
Tab. 6 Effects of EHCA on insulin in normal mice

Mean $\pm$ SD,  $n=10$

分组 Group	空腹血清胰岛素 Fasting serum insulin/(mIU/L)	胰岛素敏感指数 Insulin sensitivity index	胰岛素分泌指数 Insulin secretion index
NC 组 NC group	29.14 $\pm$ 4.96 <sup>a</sup>	2.14 $\pm$ 0.47 <sup>a</sup>	9.36 $\pm$ 4.36 <sup>a</sup>
PC 组 PC group	29.82 $\pm$ 5.50 <sup>a</sup>	2.13 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	8.50 $\pm$ 1.12 <sup>a</sup>
EHCA-L 组 EHCA-Lgroup	26.48 $\pm$ 6.86 <sup>a</sup>	2.16 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>	8.96 $\pm$ 2.32 <sup>a</sup>
EHCA-M 组 EHCA-Mgroup	28.34 $\pm$ 7.49 <sup>a</sup>	2.23 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	9.65 $\pm$ 2.75 <sup>a</sup>
EHCA-H 组 EHCA-Hgroup	29.36 $\pm$ 4.62 <sup>a</sup>	2.16 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>	8.97 $\pm$ 2.78 <sup>a</sup>

注:同列中标有不同小写字母表示组间有显著性差异 ( $P<0.05$ )。

Notes: Data with different letters within the same column are significantly different at the 0.05 probability level.



标有不同小写字母者表示组间有显著性差异 ( $P<0.05$ )。

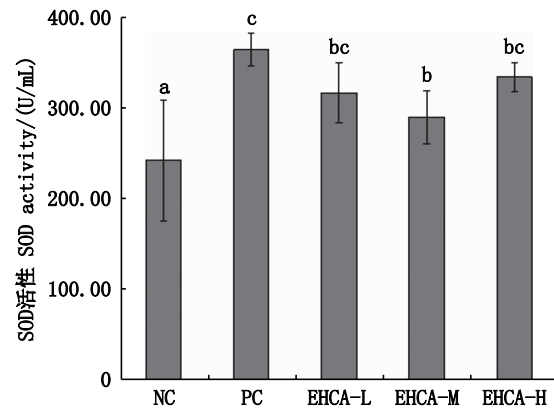
The means with different letters within the same group have significant differences at the 0.05 probability level.

图 3 EHCA 对小鼠肝脏丙二醛 (MDA) 浓度的影响  
Fig. 3 Effects of EHCA on malondialdehyde (MDA) concentration in mice liver

### 2.4.5 EHCA 对小鼠超氧化物歧化酶活性的影响

机体可通过清除自由基从而减少细胞损伤和凋亡起到预防糖尿病的作用<sup>[30]</sup>。由图 4 可知:与 NC 组 [ $(242.00\pm 66.43)$  U/mL] 相比,各给药组与 PC 组小鼠肝脏的 SOD 活性均显著提高 ( $P<0.05$ )。其中,PC 组 SOD 活性 [ $(363.55\pm 18.09)$  U/mL] 提高了 50.23%。EHCA-L 组 [ $(316.24\pm 65.96)$  U/mL]、EHCA-M 组 [ $(289.56\pm 29.29)$  U/mL]、EHCA-H 组 SOD 活性 [ $(333.58\pm 65.33)$  U/mL] 分别提升了 30.68%、19.63%、37.84%,各给药组与 PC 组的组间没有显著性差异 ( $P>$

0.05)。说明 EHCA 在不同剂量下对小鼠超氧化物歧化酶活性有提升作用,增强小鼠的抗氧化能力。



标有不同小写字母者表示组间有显著性差异 ( $P<0.05$ )。

The means with different letters within the same group have significant differences at the 0.05 probability level.

图 4 EHCA 对小鼠超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的影响  
Fig. 4 Effect of EHCA on superoxide dismutase (SOD) activity in mice

## 3 结论

本研究通过体外试验测定华贵栉孔扇贝闭壳肌酶解物 (EHCA) 对体外  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性及 DPPH 自由基清除能力,并通过动物实验评价其辅助降血糖功能。结果表明,不同质量浓度 (15、30、60 mg/mL) 的 EHCA 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶

均有抑制效果,抑制率为 34.4%~35.5%,同时,EHCA 也具有较好的抗氧化活性,其 DPPH 自由基清除率为 55.45%~80.02%,DPPH 自由基清除能力(Trolox 当量)为 19.22~27.84  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,且与 EHCA 质量浓度呈正相关。动物试验结果显示,EHCA 对小鼠的体质量以及胰岛素分泌方面的影响不显著;一定质量浓度的 EHCA 能增强小鼠的糖耐量,显著降低小鼠肝脏 MDA 含量,提高超氧化物歧化酶活性( $P<0.05$ )。综上结果表明,EHCA 具有体内抗氧化活性和潜在的辅助降血糖活功能,是制备海洋营养功能食品的来源。研究仅从  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性、抗氧化活性角度证实 EHCA 具有辅助降血糖的活性,对其降血糖活性成分及其作用机理的探索仍然不够深入。

#### 参考文献:

- [1] ASCHNER P, KARURANGA S, JAMES S, et al. The international diabetes federation's guide for diabetes epidemiological studies[J]. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2021, 172: 108630.
- [2] LOPES-VIRELLA M F, HUNT K J, BAKER N L, et al. High levels of AGE-LDL, and of IgG antibodies reacting with MDA-lysine epitopes expressed by oxLDL and MDA-LDL in circulating immune complexes predict macroalbuminuria in patients with type 2 diabetes[J]. *Journal of Diabetes and its Complications*, 2016, 30(4): 693-699.
- [3] JUNG H, KIM Y Y, KIM B, et al. Improving glycemic control in model mice with type 2 diabetes by increasing superoxide dismutase (SOD) activity using silk fibroin hydrolysate (SFH) [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, 493(1): 115-119.
- [4] AKHTER M S, UPPAL P. Toxicity of metformin and hypoglycemic therapies[J]. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 2020, 27(1): 18-30.
- [5] WANG P C, ZHAO S, YANG B Y, et al. Anti-diabetic polysaccharides from natural sources: A review [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 148: 86-97.
- [6] ZHU Y Q, ZHAO J R, LUO L B, et al. Research progress of indole compounds with potential antidiabetic activity[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2021, 223: 113665.
- [7] GHADGE A A, KUVALEKAR A A. Controversy of oral hypoglycemic agents in type 2 diabetes mellitus: Novel move towards combination therapies [J]. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 2016, 11(S 1): S5-S13.
- [8] 王涛,任顺成,李翠翠. 降血糖功能因子及其食物来源[J]. *中国食物与营养*, 2010(10): 28-31.
- [9] WANG T, REN S C, LI C C. Hypoglycemic functional factors and its food sources [J]. *Food and Nutrition in China*, 2010(10): 28-31.
- [9] WU C H, GUO H R, PATEL A K, et al. Production and characterization of lucrative hypoglycemic collagen-peptide-chromium from tilapia scale [J]. *Process Biochemistry*, 2022, 115: 10-18.
- [10] 林海生,廖津,章超桦,等. 华贵栉孔扇贝酶法制备  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽工艺优化[J]. *广东海洋大学学报*, 2020, 40(5): 97-104.
- [10] LIN H S, LIAO J, ZHANG C H, et al. Optimization of enzymatic preparation of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides from *Chlamys nobilis* [J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2020, 40(5): 97-104.
- [11] 肖婷,裴乐芸,王瑞艳,等. 甲鱼蛋  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽及其纳米运载体的体外胃肠消化特性[J]. *食品科学*, 2022, 43(3): 114-121.
- [11] XIAO T, QIU L Y, WANG R Y, et al. *In vitro* simulated gastrointestinal digestion properties of free and nanocapsulated  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptide from soft-shelled turtle egg [J]. *Food Science*, 2022, 43(3): 114-121.
- [12] 王婷婷. 海参肽对 II 型糖尿病大鼠血糖活性调节作用及其机制研究[D]. 南宁: 广西大学, 2021.
- [12] WANG TT. Hypoglycemic effects of peptides from sea cucumber (*Holothuria nobilis*) on type II diabetic rats and the related mechanisms [D]. Nanjing: Guangxi University, 2021.
- [13] 吴彤. 核桃降血糖活性肽的分离纯化、结构鉴定及降血糖作用机理研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2020.
- [13] WU T. Purification, identification and hypoglycemic mechanism of hypoglycemic peptides from walnut protein hydrolysate [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2020.
- [14] 朱作艺,张玉,王君虹,等. 蜂王浆蛋白肽的制备及其降血糖和抗氧化活性研究[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(17): 45-50, 57.
- [14] ZHU Z Y, ZHANG Y, WANG J H, et al. Preparation, hypoglycemic and antioxidative activity of peptide from royal jelly protein[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(17): 45-50, 57.
- [15] 赵荣涛. 海地瓜活性肽的筛选与评价[D]. 兰州: 兰州大学, 2020.
- [15] ZHAO R T. Screening and evaluation of bioactive peptides from *Acaudina molpadioides* [D]. Lanzhou: Lanzhou University. 2020.
- [16] 郎蒙,蒋蔚薇,孙慧敏,等. 响应面优化南极磷虾粉肽制备工艺及  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性分析[J]. *上海海洋大学学报*, 2022, 31(2): 564-573.
- [16] LANG M, JIANG W W, SUN H M, et al. Optimization of preparation technology of Antarctic krill powder peptide by response surface methodology and analysis of its inhibitory

- activity on  $\alpha$ -glucosidase [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2022, 31(2): 564-573.
- [17] 李艳敏, 郁书怀, 全艳军, 等. 裙带菜 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性肽的制备[J]. 食品工业科技, 2020, 41(20): 127-134.  
LI Y M, YU S H, TONG Y J, et al. Preparation of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides derived from sea mustard[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(20): 127-134.
- [18] 胡春芹, 龙婧, 周楠迪, 等. 紫菜酶解产物锌螯合- $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂活性肽的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(4): 143-149.  
HU C Q, LONG J, ZHOU N D, et al. Research of  $\alpha$ -glucosidase inhibitor from proteolytic product of *Porphyra yezoensis* chelated with zinc[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2019, 38(4): 143-149.
- [19] 牛红鑫, 李伟, 佟长青. 青蛤活性物质的研究现状[J]. 农产品加工, 2020, 22(11): 80-81, 86.  
NIU H X, LI W, TONG C Q. The study of bioactive compounds from *Cyclina sinensis* [J]. Farm Products Processing, 2020, 22(11): 80-81, 86.
- [20] 邱韵紫, 刘睿, 吴皓, 等. 四角蛤蜊不同水提醇沉部位降血糖作用及多糖和蛋白成分研究[J]. 南京中医药大学学报, 2018, 34(4): 391-394.  
QIU Y Y, LIU R, WU H, et al. Study on the anti-hyperglycemic activity and polysaccharide and protein components in different alcohol precipitate fraction of *Macrura veneriformis*[J]. Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, 2018, 34(4): 391-394.
- [21] 陈宏. 牡蛎DPP-IV抑制肽的分离纯化及其作用机理研究[D]. 厦门: 集美大学, 2020: 17-20.  
CHEN H. Purification and interaction mechanism of DPP-IV inhibitory peptides from pacific oyster (*Crassostrea gigas*) [D]. Xiamen: Jimei University, 2020: 17-20.
- [22] CHEN Z Q, ZHU Y H, CAO W H, et al. Novel insight into the role of processing stages in nutritional components changes and characteristic flavors formation of noble scallop *Chlamys nobilis* adductors[J]. Food Chemistry, 2022, 378: 132049.
- [23] 王仁佳, 曹文红, 章超桦, 等. 华贵栉孔扇贝富硒蛋白粉的酶法制备工艺优化及其营养评价[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(10): 84-92.  
WANG R J, CAO W H, ZHANG C H, et al. Optimization of enzymatic processing and nutritional evaluation of selenium-enriched protein powder of *Chlamys nobilis* [J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(10): 84-92.
- [24] CHENG D W, ZHANG H K, LIU H X, et al. Identification and molecular characterization of peroxiredoxin 6 from noble scallop *Chlamys nobilis* revealing its potent immune response and antioxidant property [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 100: 368-377.
- [25] 郑环宇. 华贵栉孔扇贝可食部分及性腺酶解产物对半去势雄性大鼠性功能的影响[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2021.  
ZHENG H Y. Effects of enzymatic hydrolysates from *Chlamys nobilis* and its gonad in the sexual function on hemi-castrated male rats [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2021.
- [26] 延海莹, 刘盟梦, 乔乐克, 等. 扇贝裙边活性肽的制备及其降血糖活性研究[J]. 食品工业, 2018, 39(3): 117-121.  
YAN H Y, LIU M M, QIAO L K, et al. Study on scallop skirt active peptide and glucose tolerance activity [J]. The Food Industry, 2018, 39(3): 117-121.
- [27] 王谦, 张璐, 边晓丽, 等.  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂及构效关系的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(2): 189-195.  
WANG Q, ZHANG L, BIAN X L, et al. Progress in research of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors and the structure-activity relationship [J]. Chinese Journal of New Drugs, 2014, 23(2): 189-195.
- [28] 田裕心, 彭亚博, 姚昱锴, 等. 响应面优化鲍鱼内脏抗氧化肽制备工艺及其活性[J]. 食品工业, 2019, 40(4): 110-115.  
TIAN Y X, PENG Y B, YAO Y K, et al. Optimization of preparation technology of antioxidant peptides from abalone viscera by response surface methodology and its antioxidant activity research [J]. The Food Industry, 2019, 40(4): 110-115.
- [29] 王祖哲, 马普, 左爱华, 等. 刺参低聚肽对糖尿病小鼠降血糖作用的研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(8): 85-90.  
WANG Z Z, MA P, ZUO A H, et al. Hypoglycemic effect of *Apostichopus japonicus* oligo-peptides in alloxan-induced diabetic mice [J]. Food Research and Development, 2019, 40(8): 85-90.
- [30] 欧爱宁. 基于抗氧化作用研究胶原蛋白肽干预糖尿病实验动物营养代谢特性[D]. 上海: 上海海洋大学, 2018.  
OU A N. Collagen peptide intervention nutrition and metabolism characteristics in diabetic experimental animal based on antioxygenation [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2018.



## Evaluation of the hypoglycemic activity of enzymatic hydrolysate of *Chlamys nobilis* adductor muscle

LIN Haisheng<sup>1,2</sup>, LIAO Jin<sup>3</sup>, QIN Xiaoming<sup>1,2</sup>, CAO Wenhong<sup>1,2</sup>, CHEN Zhongqin<sup>1,2</sup>, GAO Jialong<sup>1,2</sup>, ZHENG Huina<sup>1,2</sup>, ZHANG Chaohua<sup>1,2</sup>, LIANG Yuanwei<sup>4</sup>, LU Yunqi<sup>1</sup>, YANG Wei<sup>5</sup>

(1. College of Food Sciences and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, Guangdong, China; 2. Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning, China; 3. Department of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China; 4. College of Chemistry and Environment, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, Guangdong, China; 5. Hainan Xiangtai Fishery Company Limited, Chengmai 571924, Hainan, China)

**Abstract:** In order to tap the potential of high-value utilization of *Chlamys nobilis*, using compound protease to hydrolyze *Chlamys nobilis* adductor muscle, the effect of EHCA (enzymatic hydrolysate of *Chlamys nobilis* adductor muscle) on the activity of  $\alpha$ -glucosidase and the scavenging ability of DPPH free radicals was explored. The fasting blood glucose concentration, serum insulin content, liver malondialdehyde and superoxide dismutase content were used as indicators to evaluate the auxiliary hypoglycemic function and antioxidant activity of EHCA in normal mice. The results showed that EHCA had good  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity, and its DPPH free radical scavenging ability increased with the concentration of the enzymatic hydrolysate. The results of animal experiments showed that a certain concentration of EHCA could enhance the glucose tolerance of mice, significantly reduced the liver malondialdehyde and increase the activity of superoxide dismutase. In conclusion, the compound protease can effectively enzymolyze the adductor muscle of *Chlamys nobilis*, and its enzymatic hydrolysate has good  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity and antioxidant activity with a certain auxiliary hypoglycemic effect. The results may provide a theoretical basis for the development of auxiliary hypoglycemic marine functional foods.

**Key words:** enzymatic hydrolysate; *Chlamys nobilis*; hypoglycemic activity; antioxidant