

柚皮素对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用及其机制

周香菊, 陈雨琴, 尹忠平, 梁琦, 臧建威, 唐道邦, 陈继光

Inhibitory Effect of Naringin on α -Glucosidase and Its Mechanism

ZHOU Xiangju, CHEN Yuqin, YIN Zhongping, LIANG Qi, ZANG Jianwei, TANG Daobang, and CHEN Jiguang

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021080184>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

杨梅素对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性机理研究

The inhibition activity and mechanisms of myricetin on α -glucosidase

食品工业科技. 2017(22): 51-55

芫花素对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

Inhibitory Effect of Genkwanin on α -Glucosidase

食品工业科技. 2021, 42(15): 43-47

甜菊醇、异甜菊醇抑制 α -葡萄糖苷酶和HMG-CoA还原酶的分子机制研究

Molecular Mechanism of Inhibition of α -Glucosidase and HMG-CoA Reductase Activities by Steviol and Isosteviol

食品工业科技. 2021, 42(24): 8-15

橡子仁萃取物成分分析及对 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

Composition Analysis and Inhibitory Effect against α -Amylase and α -Glucosidase of Acorn Kernel Extractions

食品工业科技. 2021, 42(17): 47-55

丝胶肽F5-SPs对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用及其稳定性

The stability and inhibitory effect of F5-SPs derived from sericin peptides on α -Glucosidase

食品工业科技. 2018, 39(5): 90-93,100

玉蜀黍不同部位提取物对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制作用

Inhibitory Effects of Extracts from Different Parts of Maize on α -Glucosidase and α -Amylase

食品工业科技. 2021, 42(1): 15-21,27



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

周香菊, 陈雨琴, 尹忠平, 等. 柚皮素对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用及其机制 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(8): 157-164. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080184

ZHOU Xiangju, CHEN Yuqin, YIN Zhongping, et al. Inhibitory Effect of Naringin on α -Glucosidase and Its Mechanism[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(8): 157-164. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080184

· 生物工程 ·

柚皮素对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用及其机制

周香菊¹, 陈雨琴¹, 尹忠平¹, 梁琦¹, 臧建威¹, 唐道邦², 陈继光^{1,*}

- (1. 江西农业大学食品科学与工程学院, 江西省天然产物与功能食品重点实验室/江西省农产品加工与安全控制工程实验室, 江西南昌 330045;
2. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 广东省农产品加工重点实验室/功能食品重点实验室, 广东广州 510610)

摘要: 为研究柚皮素对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用, 本文采用酶动力学、荧光光谱和分子对接等方法研究了柚皮素对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果、抑制作用类型及其抑制作用的分子机制。柚皮素对 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 为 0.174 mmol/L, 显著低于阿卡波糖的 0.721 mmol/L, 为非竞争型抑制剂, K_i 值为 0.114 mmol/L; 柚皮素和 α -葡萄糖苷酶的结合导致了酶分子的内在荧光静态猝灭, 猝灭常数为 0.1598×10^4 L/mol, 结合位点数 n 为 1。分子对接结果显示, 在氢键、离子键、疏水作用、 π - π T 型堆积、静电作用五种作用力的驱动下, 柚皮素结合于 α -葡萄糖苷酶分子的一个疏水口袋中, 结合能为 -7.6 kJ/mol。本文研究结果表明, 柚皮素是一种较好的食源性 α -葡萄糖苷酶抑制剂, 在辅助治疗糖尿病功能食品中具有良好的应用前景。

关键词: 柚皮素, α -葡萄糖苷酶, 荧光光谱, 分子对接, 抑制

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)08-0157-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080184



本文网刊:

Inhibitory Effect of Naringin on α -Glucosidase and Its Mechanism

ZHOU Xiangju¹, CHEN Yuqin¹, YIN Zhongping¹, LIANG Qi¹, ZANG Jianwei¹, TANG Daobang²,
CHEN Jiguang^{1,*}

- (1. College of Food Science and Engineering, Jiangxi Key Laboratory of Natural Products and Functional Foods/Jiangxi Engineering Laboratory of Agricultural Products Processing and Safety Control, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;
2. Institute of Sericulture and Agro-Products Processing, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangdong Key Laboratory of Agro-Products Processing/Key Laboratory of Functional Food, Guangzhou 510610, China)

Abstract: To investigate the inhibitory activity and mechanism of naringin on α -glucosidase, the inhibition effect, type, and molecular mechanism of naringin on α -glucosidase were investigated by integrative analysis of enzyme kinetics, fluorescence spectroscopy and molecular docking simulation. The results showed that IC_{50} of naringin against α -glucosidase was 0.174 mmol/L, which was significantly lower than that of acarbose (IC_{50} =0.721 mmol/L). The inhibition type was non-competitive inhibition with a K_i of 0.114 mmol/L. The binding of naringin and α -glucosidase led to the internal fluorescence quenching of the enzyme molecule. Further analysis indicated that the quenching constant was 0.1598×10^4 L/mol, and there was only one binding site. The molecular docking results showed that naringin was bound to a hydrophobic pocket of α -glucosidase enzyme by the driving force of hydrogen bond, ionic bond, hydrophobic action, π - π T stacking, and electrostatic action, with a binding energy of -7.6 kJ/mol. The results indicated that naringin was a good foodborne α -glucosidase inhibitor, and therefore had a good application prospect in the adjuvant treatment of diabetes

收稿日期: 2021-08-18

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31460436); 国家自然科学基金项目 (31960515); 广州市科技计划项目 (201909020001); 江西省自然科学基金项目 (20192BAB204004)。

作者简介: 周香菊 (1997-) (ORCID: 0000-0003-2946-6181), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术与功能食品, E-mail: 821696748@qq.com。

* 通信作者: 陈继光 (1985-) (ORCID: 0000-0002-4110-9614), 男, 博士, 实验师, 研究方向: 天然产物与功能食品, E-mail: chenjiguang1@126.com。

functional food.

Key words: naringenin; α -glucosidase; fluorescence spectroscopy; molecular docking; inhibition

糖尿病及其并发症严重威胁人类健康,近年来发病率不断上升,已经被列为十大致死原因之一^[1]。据国际糖尿病联合会(IDF)报道,截止到2019年,全球约有4.63亿各类型的糖尿病患者,而我国就有1.164亿人,居世界首位^[2]。餐后高血糖是糖尿病的主要症状之一^[3],如果餐后血糖控制不好,会导致严重的并发症,因此控制餐后血糖是糖尿病患者的重要目标^[4]。

α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase, EC 3.2.1.20),是一类催化碳水化合物非还原末端的 α -1,4-糖苷键水解、释放出葡萄糖的酶,主要存在于唾液和小肠刷状缘上皮细胞,对碳水化合物的消化吸收和餐后血糖起着非常重要的作用。服用 α -葡萄糖苷酶抑制剂是抑制餐后血糖的有效方法。 α -葡萄糖苷酶抑制剂通过竞争性抑制或非竞争性抑制等机制来抑制 α -葡萄糖苷酶与底物的结合来减缓底物的降解,降低餐后血糖,从而缓解糖尿病及其症状^[5-7]。《II型糖尿病全球指南》和《中国II型糖尿病防治指南》指出,以提高糖尿病患者当前和今后长期生活质量为目标,服用葡萄糖苷酶抑制剂是治疗II型糖尿病的首选方法之一^[1]。

α -葡萄糖苷酶抑制剂种类繁多,按照其来源大致可分为三类,即微生物源性抑制剂、化学合成类抑制剂和植物源性抑制剂^[8-11]。微生物来源的主要有阿卡波糖、1-DNJ(1-脱氧野尻霉素)等;化学合成类抑制剂有吡啶2,4,6-三酮类衍生物、苯并噻唑类衍生物、1,2-环己二甲酸类化合物等^[12-14];植物源性抑制剂种类繁多,有黄酮类、生物碱类、多酚类、萜类、多糖等^[15-18]。阿卡波糖是一种常用于研究和临床使用的 α -葡萄糖苷酶抑制剂,降糖效果较好,同时也存在一些不良反应,如硬便、便秘、腹部气胀等^[19]。化学合成的米格列醇,抑制能力强,但是其副作用如软便和腹泻等相对明显^[20],天然产物类抑制剂的种类较多且研究较广,对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用较好且目前还尚未发现较强的副作用^[21]。因此,发掘新型、高效且低副反应的天然产物类 α -葡萄糖苷酶抑制剂具有重要的意义。

黄酮类化合物广泛存在于芸香科植物葡萄柚、西红柿、葡萄以及柑橘类水果中^[22],具有多种药理活性,如清除自由基、抗氧化、抗炎、抗病毒、抗肿瘤、降血糖、降血脂、抗骨质疏松等^[23]。植物源黄酮类物质对 α -葡萄糖苷酶有较好的抑制作用,且副作用较小,因而备受关注^[24-25]。本文以黄酮类物质柚皮苷水解后除去糖基部分的产物柚皮素(又名柚皮苷元)为研究对象,采用酶抑制动力学、荧光猝灭等研究方法,结合分子对接技术,探究了柚皮素对 α -葡萄糖苷酶的体外抑制效果及其作用机制,以期柚皮素在新型辅助降糖功能食品中的应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

α -葡萄糖苷酶(10 U/mg) EC 3.2.1.20,来自酿酒酵母, Sigma-Aldrich(中国上海);柚皮素(98%)、阿卡波糖(98%) 南京源植生物有限公司(中国南京);DMSO(二甲基亚砜) 分析纯,上海贸易有限公司;PNPG(对硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷, 4-Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside) 分析纯,上海梯希爱化成工业发展有限公司;甘油、磷酸盐标准缓冲液 分析纯,厦门海标科技有限公司;其他试剂 均为国产分析纯;溶液 均采用蒸馏水配制。

N12639-02型 Multiskan FC 酶标仪 中国上海赛默飞世尔仪器有限公司;970CRT型荧光分光光度计 中国上海精密科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定方法 参照杨丽珍等^[26]的方法并稍作修改,进行 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定,具体操作步骤如下:在反应孔中加入160 μ L PBS缓冲液(pH6),依次加入10 μ L不同浓度柚皮素(1.58、1.88、2.06、2.18、2.28、2.36、2.43、2.49 mmol/L),再加入10 μ L的1 U/mL的 α -葡萄糖苷酶溶液。在37 $^{\circ}$ C恒温下孵育20 min,同时37 $^{\circ}$ C水浴PNPG溶液20 min,后在反应孔中加入20 μ L PNPG溶液。PNPG可被 α -葡萄糖苷酶水解为黄色且在405 nm波长处有最大吸收的对硝基苯酚。在405 nm波长下,加入PNPG后每隔2 min测定一下吸光值,共测定11次。运用线性回归法计算吸光度的斜率k,根据公式1计算不同抑制剂浓度下 α -葡萄糖苷酶的相对活力,每个样品浓度重复四组,结果用均值 \pm 标准差表示,用Graphpad prism作非线性拟合酶的相对活力与抑制剂浓度的曲线,得到IC₅₀值。同时,采用相同的方法测定阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶抑制效果,分析比较柚皮素的抑制效果。

$$\alpha\text{-葡萄糖苷酶}(\%) = \frac{K_{\text{样品}}}{K_{\text{对照}}} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式中: $K_{\text{样品}}$ 为样品的吸光度; $K_{\text{对照}}$ 为空白样品的吸光度。

1.2.2 α -葡萄糖苷酶抑制剂抑制类型的判断方法 依据姜丽丽等^[27]的方法,按照1.2.1所述方法分别测定不同柚皮素浓度(0、0.077、0.154、0.231 mmol/L)在底物PNPG浓度为0.1、0.25、0.35、0.45、0.6、0.75、0.9、1.2 mmol/L时的酶反应速度, α -葡萄糖苷酶浓度为1 U/mL,运用GraphPad Prism8.0软件进行非线性回归方法计算抑制常数,以酶促速率(1/v)对PNPG浓度的倒数(1/[S])作图,得Lineweaver-Burk曲线图,以判断抑制类型,并计算抑制动力学

参数^[28]。

$$V = \frac{V_{\max}}{K_m \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S \left(1 + \frac{I}{\alpha K_i}\right)} \quad \text{式 (2)}$$

式中: S 是底物浓度, mmol/L; V 是有抑制剂或没有抑制剂时的初始反应速度; K_m 为米氏常数; V_{\max} 为最大酶速; I 为抑制剂浓度, mmol/L; K_i 为抑制常数; α 表示抑制剂对酶与底物亲和的影响。

1.2.3 荧光光谱扫描 结合韩芬霞等^[29]的方法进行荧光光谱分析, 略作修改。将 4 mL 的 α -葡萄糖苷酶 (0.5 U/mL) 与 1 mL 不同浓度柚皮素 (0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 mg/mL) 混合, 在 298 K 条件下反应 15 min 后对其进行荧光光谱扫描。以 287 nm 为激发波长, 扫描范围波长为 250~550 nm。

1.2.4 分子对接实验 参考林萍等^[20]的分子对接方法, 进行分子对接实验。目前酿酒酵母中 α -葡萄糖苷酶的三维结构未知, 从 NCBI 下载 α -葡萄糖苷酶的 FASTA 格式序列, 本文以同源性较高的 3AXH_A (相似性为 72%) 为模板, 通过 SWISS-MODEL 同源建模方法来获取酵母中葡萄糖苷酶的三维结构, 并使用 Ramachandran plot 和 Profile-3D 模型评价葡萄糖苷酶模型。从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中获取柚皮素的 3D 结构。采用 AUTODOCK-Vina 删除水分子和非必需子结构, 通过末端处理、加氢、分配原子类型、加电荷等步骤完成受体结构的准备, 使分子间相互作用的构象能最小化, 分析柚皮素与 α -葡萄糖苷酶的结合模式和作用力^[30]。立方体网格参数为 18 Å×18 Å×18Å, 对接参数为 x=36.877, y=-20.592, z=20.037, 对接后, 选用 Total score 最大且 Cscore 也较大的构象作为研究对象, 随后用 Pymol 和 Discovery Studio 2016 进行可视化作图。

1.3 数据处理

所有实验均重复处理 3 次, 各组数据用实验结果的平均值±标准差表示, 使用 SPSS17.0 软件进行单因素方差分析, 使用 Prism 进行作图分析。

2 结果与分析

2.1 柚皮素对 α -葡萄糖苷酶抑制效果

如图 1、图 2 所示, 在 2.0~2.5mmol/L 范围内柚皮素与阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶均有较好的抑制作用, 柚皮素和阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制率不同。随着柚皮素和阿卡波糖浓度的增大, α -葡萄糖苷酶的活性不断降低, 呈现良好的剂量效应关系。通过 Graphpad prism 非线性拟合可以得出, 柚皮素对 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 值为 0.174 mmol/L, 阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 值为 0.721 mmol/L。上述检测数据表明, 柚皮素的抑制效果明显强于阿卡波糖, 能较好抑制 α -葡萄糖苷酶的活性, 是一种较好的天然 α -葡萄糖苷酶抑制剂, 因此在食品和医药领域

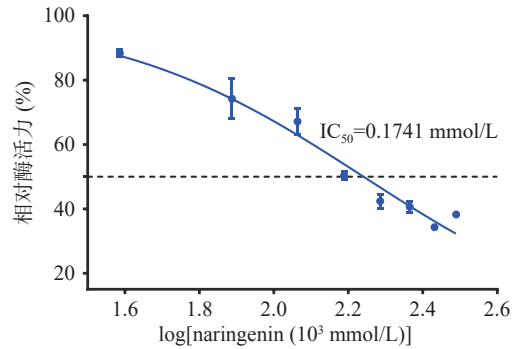


图 1 不同浓度柚皮素对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用效果
Fig.1 Inhibitory effect of naringin of different concentration on α -glucosidase activity

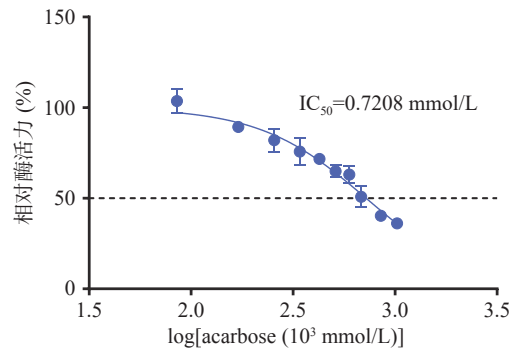


图 2 不同浓度阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用效果
Fig.2 Inhibitory effect of acarbose of different concentration on α -glucosidase activity

有良好的应用前景。

2.2 柚皮素对 α -葡萄糖苷酶的抑制动力学检测与分析

抑制剂对酶的抑制作用包括竞争性抑制、非竞争性抑制、反竞争性抑制和混合非竞争抑制 4 种类型^[31]。从 Lineweaver-Burk 图 (如图 3 所示) 得到 1/[S] 对 1/v 的线性回归关系, 随着柚皮素浓度的增加, 纵轴截距逐渐变大, 且各浓度回归线基本上与 x 轴交于负半轴一点, 即最大反应速度 V_{\max} 随抑制剂浓度的增大而减小, 米氏常数 K_m 基本上保持不变, 表明抑制剂浓度增大时, 底物与抑制剂可以同时与酶结合, 二者并不存在竞争作用, 因此柚皮素对酶的抑制作用为非竞争性抑制。根据式 2, 柚皮素的抑制常数 K_i 为 0.114 mmol/L。

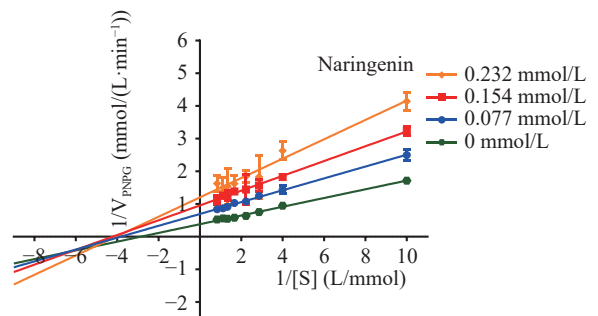


图 3 柚皮素对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的 Lineweaver-Burk 图
Fig.3 Lineweaver-Burk plot for the inhibition of α -glucosidase by naringenin

2.3 柚皮素作用下 α -葡萄糖苷酶的荧光光谱变化

荧光光谱是研究多酚类物质与蛋白质相互作用的一种有效方法,可以用来计算结合常数、结合位点和热力学参数等^[32]。 α -葡萄糖苷酶具有内源性荧光发色团,如色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸,都属于芳香族氨基酸^[33]。由图 4 可以看出,激发波长为 287 nm 时, α -葡萄糖苷酶的最大发射波长为 365.4 nm,在柚皮素浓度从 0~0.1 mg/mL 增加的过程中, α -葡萄糖苷酶的荧光强度呈规律性减小,说明 α -葡萄糖苷酶的内源性荧光不同程度地被猝灭剂所猝灭,且在猝灭过程中最大发射波长由 365.4 nm 红移到了 381.4 nm,红移量为 16 nm(± 1 nm)。

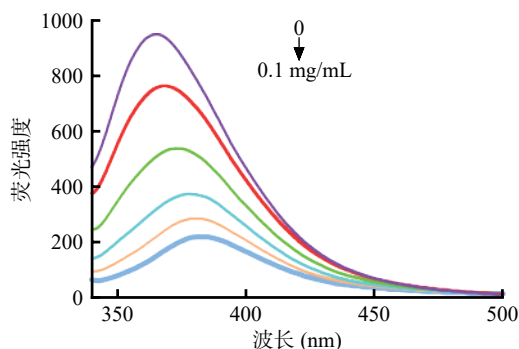


图 4 在 298 K 下柚皮素对 α -葡萄糖苷酶荧光的猝灭作用
Fig.4 Quenching effects of naringenin on the fluorescence of α -glucosidase at 298 K

研究表明,荧光猝灭主要有三种形式,分别为非辐射能量转移、静态猝灭和动态猝灭^[34],猝灭过程可以采用如下 Stern-Volmer 方程(公式(3))进行判断^[35]:

$$\frac{F_0}{F} = K_q \tau_0 [Q] + 1 = 1 + K_{sv} [Q] \quad \text{式 (3)}$$

式中: F_0 与 F 分别为未加入与加入猝灭剂后体系的荧光强度 (au); $[Q]$ 为猝灭剂浓度 (mol/mL); τ_0 是无猝灭剂时物质的荧光平均寿命/s,一般生物大分子的荧光平均寿命为 1×10^{-8} S; K_q 为荧光猝灭速率常数(L/(mol·s)), K_{sv} 为荧光猝灭常数(L/mol)。

利用公式 3 对图 5 中的数据点进行线性拟合计算,结果如图 5 所示,由斜率可得出荧光猝灭常数 K_{sv} 为 0.1598×10^4 L/mol; 荧光猝灭速率常数 K_q 为 1.598×10^{11} (mol·L⁻¹)⁻¹·S⁻¹,此 K_q 值大于生物大分子的最大散射碰撞猝灭速率常数 2×10^{10} (mol·L⁻¹)⁻¹·S⁻¹,此外,动态猝灭并不会影响荧光物质的吸收光谱,而基态配合物的形成会使荧光物质的吸收光谱发生变化,即红移现象的产生^[36]。由此可进一步判断出柚皮素猝灭 α -葡萄糖苷酶的过程不是由分子碰撞引起的动态猝灭,而是形成复合物的静态猝灭过程。

基于上述分析,本文以 $\lg[(F_0-F)/F]$ 为 Y 轴, $\lg[Q]$ 为 X 轴,对检测数据进行了进一步的双对数回归分析其中,斜率=结合位点数,纵轴截距= $\lg K_a$,结果如图 6 所示。根据曲线对应的公式 4,计算出柚皮素与 α -葡萄糖苷酶的结合位点数 n 约为 0.998,说明柚

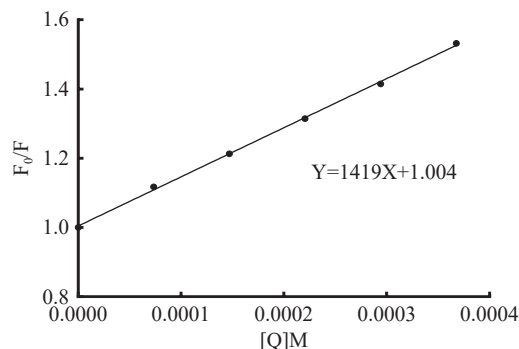


图 5 柚皮素猝灭 α -葡萄糖苷酶的 Stern-Volmer 图

Fig.5 Stern-Volmer plots for quenching of α -glucosidase by naringenin

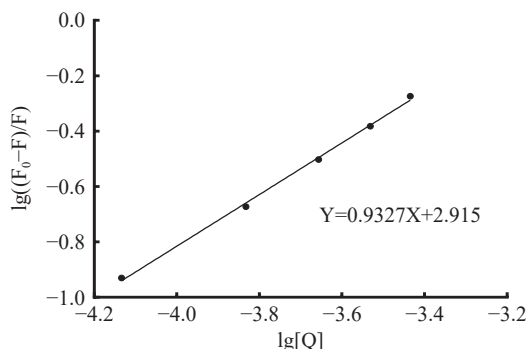


图 6 柚皮素对 α -葡萄糖苷酶在 298 K 时猝灭的 $\lg(F_0-F)/F$ 与 $\lg[Q]$ 曲线

Fig.6 $\lg(F_0-F)/F$ versus $\lg[Q]$ curve for the naringenin/ α -glucosidase system at 298K

皮素与 α -葡萄糖苷酶所形成的复合物中二者的比例接近 1:1,即 α -葡萄糖苷酶上与柚皮素只有一个结合位点。

$$\lg \frac{(F_0 - F)}{F} = \lg K_a + n \lg [Q] \quad \text{式 (4)}$$

式中: F_0 与 F 分别为未加入与加入猝灭剂后体系的荧光强度 (au); $[Q]$ 为 α -葡萄糖苷酶的浓度 (mol/mL); K_a 为荧光剂与猝灭剂的表现结合常数 (L/mol); n 为结合位点数。

2.4 分子对接分析柚皮素与 α -葡萄糖苷酶分子间的相互作用

上述研究可知,柚皮素与 α -葡萄糖苷酶发生非竞争性抑制,且柚皮素与 α -葡萄糖苷酶只有一个结合位点,因此可以推测柚皮素分子结合于 α -葡萄糖苷酶的非活性中心^[37-40]。为了进一步确定柚皮素在 α -葡萄糖苷酶上的结合,以同源性较高的 3AXH_A (相似性为 72%)为模板进行同源建模。图 7 为 α -葡萄糖苷酶的同源建模拉氏图,氨基酸大多位于“允许区”,结构可信。图 8 为柚皮素和阿卡波糖与 α -葡萄糖苷酶对接结果,阿卡波糖与 α -葡萄糖苷酶的活性位点结合,而柚皮素与阿卡波糖在 α -葡萄糖苷酶上结合位点的位置不同,柚皮素与 α -葡萄糖苷酶进行分子对接的结合位点为非活性位点。从分子水平表明柚皮素与 α -葡萄糖苷酶结合位点位于非竞争域,

并非活性位点, 属于非竞争性抑制, 与动力学结果一致。

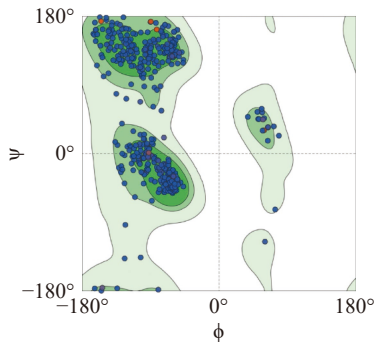


图 7 α -葡萄糖苷酶的同源建模拉氏图
Fig.7 Ramachandran plots of α -glucosidase

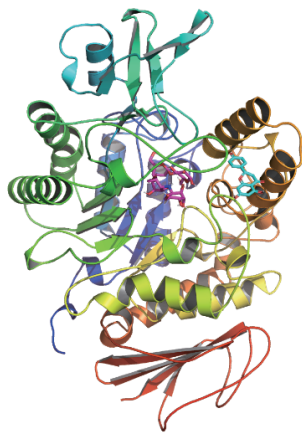


图 8 柚皮素与 α -葡萄糖苷酶的结合位点及活性位点的相对位置
Fig.8 Binding site of naringenin and α -glucosidase and the relative position of the active site
注: 紫色: 阿卡波糖; 蓝色: 柚皮素。

图 9 为柚皮素与 α -葡萄糖苷酶的三维相互作用, 图 10 为柚皮素在 α -葡萄糖苷酶同源模型结合袋中的二维相互作用, 可以看出柚皮素在氢键、离子键、疏水作用、 π - π T 型堆积、静电作用五种作用力下与 α -葡萄糖苷酶结合。表 1 为柚皮素与 α -葡萄糖苷酶的结合位点分析, 柚皮素与氨基酸 ASN 314、ASP 429 形成氢键, 其中氨基酸残基 ASN 314 的作用距离为 1.93Å, 是柚皮素与 α -葡萄糖苷酶结合过程中最重要且稳定的氢键, 增加了结合程度。另外, 柚皮素与氨基酸 THR 234 形成共价结合 Pi-Sigma 作用; 与氨基酸 ILE415、ILE416 形成疏水结合 Pi-Alkyl 作用; 与氨基酸 PHE 420 形成共价结合 Pi-Pi T-shaped 作用, 是一种同氢键同样重要的相互作用; 与氨基酸 ASP 232 形成静电结合 Pi-Anion 作用, 是一种新型非共价弱相互作用(见表 1)。分子对接结果显示, 在氢键、离子键、疏水作用、 π - π T 型堆积、静电作用五种作用力的驱动下, 柚皮素结合于 α -葡萄糖苷酶分子的一个疏水口袋中, 这种非竞争性的结合阻碍了酶分子与其底物的结合, 因此对该酶的活性产生了较强的抑制作用。

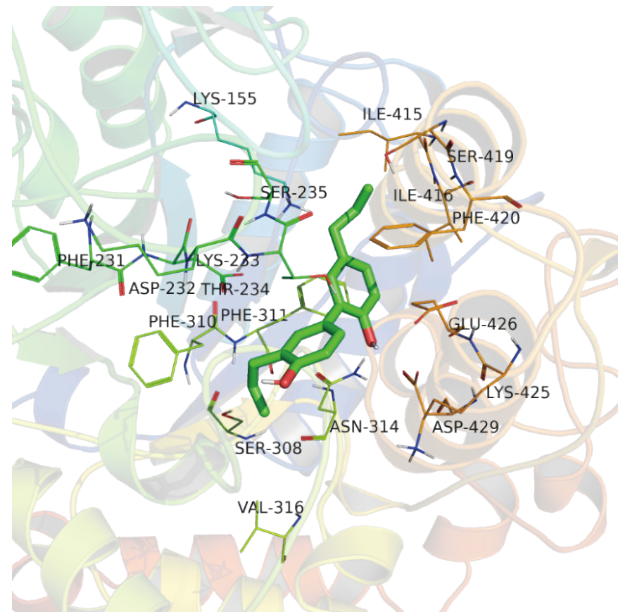


图 9 柚皮素与 α -葡萄糖苷酶同源模型的三维相互作用示意图

Fig.9 Schematic diagram of 3-D interaction between naringenin and α -glucosidase homologous model

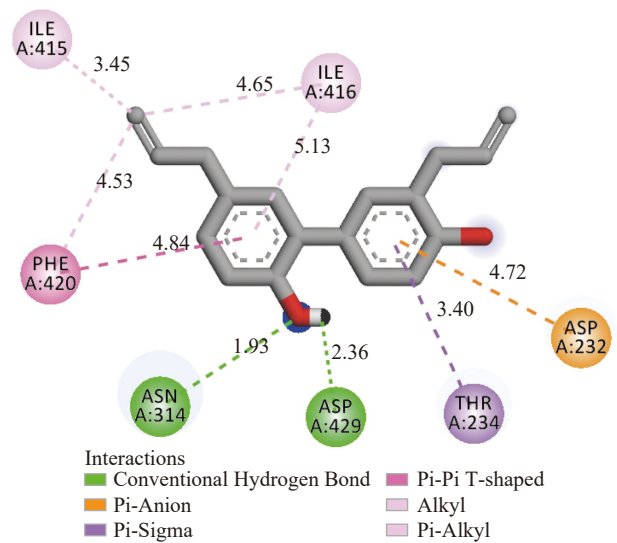


图 10 柚皮素在 α -葡萄糖苷酶同源模型结合袋中的二维相互作用示意图

Fig.10 Schematic diagram of 2-D interactions of naringenin in the binding pocket of the developed homology model of α -glucosidase

表 1 柚皮素与 α -葡萄糖苷酶结合的作用力及结合能
Table 1 Driving forces and binding energy of the interaction between naringenin and α -glucosidase

作用力	作用位点	作用距离	结合能
氢键	ASN 314	1.93Å	-7.6 kJ/mol
	ASP 429	2.36Å	
离子键Pi-Sigma	THR 234	3.4 Å	
	ILE415	3.45Å	
疏水结合Pi-Alkyl	ILE416	4.65, 5.13Å	
	PHE 420	4.53, 4.84 Å	
共价结合 π - π T型堆积			
π -阴离子作用	ASP 232	4.72Å	

3 讨论

α -葡萄糖苷酶,对碳水化合物的消化吸收和餐后血糖起着非常重要的作用,服用 α -葡萄糖苷酶抑制剂是治疗II型糖尿病的首选方法之一^[1]。

植物源性的 α -葡萄糖苷酶抑制剂种类较多,有黄酮类、生物碱类、多酚类、萜类、多糖等^[12-15],是目前的研究热点之一,研究主要集中在筛选、抑制动力学及抑制作用机理等方面^[25-26]。朱娟娟等^[41]基于 α -葡萄糖苷酶-PNPG体外反应体系,建立了微量、快速的 α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选模型,并采用Lineweaver-Burk Plots、Eadie-Hofstee Plots、Hanes-Wolff Plots、Eisenthal-Cornish-Bowden Direct Plots、Non-linear Regression Analysis五种方法对该酶促反应的动力学数据进行了详细的分析,阐述了这五种方法的主要优缺点,为 α -葡萄糖苷酶抑制剂的筛选提供了依据。王文玲等^[42]研究珊瑚真菌OUCMDZ-3658的发酵产物3、4对 α -葡萄糖苷酶有抑制作用,活性与阳性药阿卡波糖相当,IC₅₀值分别为0.87、1.14和1.11 mmol/L。张慧等^[43]研究了戈米辛D对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用,IC₅₀为1.95 mmol/L。户晶晶等^[44]的研究分析了Mn6对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果,计算出其抑制常数为0.156和0.319 mmol/L,为竞争型抑制。严晓琳等^[45]研究表明灯盏花皂素对 α -葡萄糖苷酶的半数抑制率(IC₅₀)为0.498 mmol/L。猝灭常数表示处于激发态的荧光分子与猝灭剂分子碰撞激活过程引起的荧光猝灭程度大小的一个常数,反映两种衰变途径之间的竞争,是双分子猝灭常数与单分子衰变速率常数的比值^[46]。本文的检测数据显示,柚皮素对 α -葡萄糖苷酶的IC₅₀为0.174 mmol/L,显著低于目前临床上常用的 α -葡萄糖苷酶抑制剂阿卡波糖(0.721 mmol/L),柚皮素的抑制常数为0.114 mmol/L,为非竞争型抑制剂,表明柚皮素是一种强效的天然 α -葡萄糖苷酶抑制剂,具有很好的应用前景。

汪大伟等^[47]的研究表明,山奈酚和 α -葡萄糖苷酶之间形成了氢键、疏水作用及范德华力等非共价键作用力,这些作用力对于维系蛋白受体-配体复合物构象的稳定和小分子对酶的抑制效应发挥着非常重要的作用。林萍等^[48]的研究表明 π - π T型堆积相互作用对化合物的抑制活性有显著影响, π - π T型堆积越多,对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用越强。本文的分子对接结果显示,在氢键、离子键、疏水作用、 π - π T型堆积、静电作用五种作用力的共同驱动下,柚皮素结合于 α -葡萄糖苷酶分子的一个疏水口袋中,而非酶的催化活性腔中,结合能为-7.6 kJ/mol,这与荧光猝灭实验结果一致。

4 结论

柚皮素通过非竞争性抑制的方式来抑制 α -葡萄糖苷酶的活性,其IC₅₀为0.174 mmol/L,显著低于阿卡波糖;荧光猝灭分析结果表明,柚皮素可与 α -葡萄糖苷酶结合生成复合物,结合位点数为1,属于静态

猝灭过程;分子对接结果显示,柚皮素结合于 α -葡萄糖苷酶分子的一个疏水口袋中,属于非竞争性抑制剂,两者的结合由氢键、离子键、疏水作用、 π - π T型堆积、静电作用五种作用力驱动。在实验过程中发现柚皮素微溶于水甚至不溶于水,因此在今后开发利用柚皮素时还需进一步优化生物利用度等方面。为了进一步阐明柚皮素对 α -葡萄糖苷酶的结合过程和抑制作用机理,本实验室后期将采用分子动力学模拟技术进行深入研究和探索,为其在降糖药物和辅助降血糖功能食品中的推广应用提供依据。

参考文献

- [1] 中华医学会糖尿病学会. 中国2型糖尿病防治指南(2017年版)[J]. 中国实用内科杂志, 2018, 38(4): 292-344. [Diabetes Association of Chinese Medical Association. Guidelines for the prevention and treatment of type 2 diabetes in China (2017 edition)[J]. Chinese Journal of Practical Internal Medicine, 2018, 38(4): 292-344.]
- [2] 赵能江, 张智海, 陈薇, 等. 中国2型糖尿病防治指南(2020年版)亮点解读及糖尿病中医指南分析[J]. 中国中西医结合杂志, 2021, 41(6): 652-655. [ZHAO N J, ZHANG Z H, CHEN W, et al. Analysis of Chinese medicine guidelines for diabetes and interpretation of highlights of guidelines for the prevention and treatment of type 2 diabetes in China(2020 Edition)[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2021, 41(6): 652-655.]
- [3] 王胜红, 罗超. α -葡萄糖苷酶抑制剂的药理作用及研究进展[J]. 湖北成人教育学院学报, 2019, 25(2): 18-21. [WANG S H, LUO C. Progress in research of α -glucosidase inhibitors and pharmacological effects[J]. Journal of Hubei Adult Education Institute, 2019, 25(2): 18-21.]
- [4] 刘树成. 口服降糖药物的分类和特点[J]. 北方药学, 2015, 12(12): 127. [LIU S C. Classification and characteristics of oral hypoglycemic drugs[J]. Journal of North Pharmacy, 2015, 12(12): 127.]
- [5] 孟爱莲, 陈媛媛, 马娜, 等. 苦笋壳提取物不同极性相抗氧化与降血糖活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2021, 48(3): 92-98. [MENG A L, CHEN Y Y, MA Y, et al. Antioxidant and hypoglycemic activities of different polar phases of bitter bamboo shoot husk extract[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 48(3): 92-98.]
- [6] 朱月霞, 邵仲柏, 吴小小, 等. 海洋天然产物中 α -葡萄糖苷酶抑制剂研究进展[J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37(2): 311-320. [ZHU Y X, SHAO Z B, WU X X, et al. Research progress of α -glucosidase inhibitors from marine natural products[J]. Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, 2021, 37(2): 311-320.]
- [7] 吴婕, 宫江宁. 大孔树脂纯化甜茶多酚及其对 α -葡萄糖苷酶抑制活性和DPPH抗氧化性的研究[J]. 中国农业科技导报, 2021, 23(6): 113-119. [WU J, GONG J N. Purification of polyphenols from sweet tea by the macroporous resins and its inhibitory activity on α -glucosidase and DPPH[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2021, 23(6): 113-119.]
- [8] 阎成灿, 郭崇真, 林建阳. 新型 α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选及

- 药理作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2021, 44(2): 440-445. [YAN C D, GUO C Z, LIN J Y. Research progress of screen and pharmacological effect for novel α -glucosidase[J]. Drug Evaluation Research, 2021, 44(2): 440-445.]
- [9] 季芳, 肖国春, 董莉, 等. 药用植物来源的 α -葡萄糖苷酶抑制剂研究进展[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(12): 1633-1640. [JI F, XIAO G C, DONG L, et al. Development of α -glucosidase inhibitor from medicinal herbs[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2010, 35(12): 1633-1640.]
- [10] COURAGEOT MP, FRENKIEL MP, SANTOS C D D, et al. α -Glucosidase inhibitors reduce dengue virus production by affecting the initial steps of virion morphogenesis in the endoplasmic reticulum[J]. Journal of Virology, 2000, 74(1): 564-572.
- [11] MELO E B D, GOMES A D S, CARVALHO I. α - and β -glucosidase inhibitors: Chemical structure and biological activity[J]. Science Direct, 2006, 62(1): 10277-10302.
- [12] BARAKAT A, SOLIMAN S M, AL-MAJID A M, et al. Synthesis and structure investigation of novel pyrimidine-2, 4, 6-trione derivatives of highly potential biological activity as anti-diabetic agent[J]. Journal of Molecular Structure, 2015, 1098(1): 365-376.
- [13] TAHA M, ISMAIL N H, LALANI S, et al. Synthesis of novel inhibitors of α -glucosidase based on the benzothiazole skeleton containing benzohydrazide moiety and their molecular docking studies[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2015, 92(1): 387-400.
- [14] BRAZDOVA B, TAN N S, SAMOSHINA N M, et al. Novel easily accessible glucosidase inhibitors: 4-Hydroxy-5-alkoxy-1, 2-cyclohexanedicarboxylic acids[J]. Carbohydrate Research, 2009, 344(1): 311-321.
- [15] 谭哲谔, 许利嘉, 陈四保. 植物来源 α -葡萄糖苷酶抑制剂的研究新进展[J]. 中南药学, 2018, 16(7): 982-987. [TAN Z X, XU L J, CHEN S B. Research progress of α -glucosidase inhibitors derived from plant sources[J]. Central South Pharmacy, 2018, 16(7): 982-987.]
- [16] YANG X, KONG F. Evaluation of the *in vitro* α -glucosidase inhibitory activity of green tea polyphenols and different tea types[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2016, 96(3): 777-782.
- [17] ZHANG J, ZHAO S, YIN P, et al. α -Glucosidase inhibitory activity of polyphenols from the burs of castanea mollissima blume[J]. Molecules, 2014, 19(6): 8373-8386.
- [18] DENG S, XIA L, XIAO H. Screening of α -glucosidase inhibitors from green tea extracts using immobilized enzymes affinity capture combined with UHPLC-QTOF MS analysis[J]. Chemical Communication, 2014, 50(20): 2582-2584.
- [19] 张文鑫, 王奎鹏, 曹英杰. 阿卡波糖不良反应文献分析[J]. 中国合理用药探索, 2020, 17(10): 7-10. [ZHANG W X, WANG K P, CAO Y J. Literature analysis on adverse drug reaction of acarbose[J]. Chinese Journal of Rational Drug Use, 2020, 17(10): 7-10.]
- [20] 林萍, 王梦, 曾凡新, 等. 齐墩果酸-1-脱氧野尻霉素衍生物的合成及其对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制[J]. 食品工业科技, 2019, 5(40): 53-60. [LIN P, WANG M, ZENG F X, et al. Synthesis of oleanolic acid-1-deoxyojirimycin derivatives and its inhibition on α -glucosidase activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 5(40): 53-60.]
- [21] 夏文凯, 孙成磊, 刘新灵, 等. α -糖苷酶抑制剂米格列醇的研究进展[J]. 药品评价, 2017, 14(13): 9-12. [XIA W K, SUN C L, LIU X L, et al. Progress of α -glycosidase inhibitor miglitol[J]. Drug Evaluation, 2017, 14(13): 9-12.]
- [22] LI T, HU P, DAI T, et al. Comparing the binding interaction between beta-lactoglobulin and flavonoids with different structure by multi-spectroscopy analysis and molecular docking[J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2018, 201(1): 197-206.
- [23] 王元, 曾凯宏, 邓波, 等. 柚皮素对高糖模型 MIN6 细胞的增殖和胰岛素分泌的影响[J]. 重庆医学, 2020, 49(17): 2844-2848. [WANG Y, ZENG K H, DENG B, et al. Effect of naringenin on cell proliferation and insulin secretion in high glucose model of MIN6 cells[J]. Chongqing Medicine, 2020, 49(17): 2844-2848.]
- [24] 江友姪, 陈琦, 张露, 等. 芫花素对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用[J]. 食品工业科技, 2021: 1-9. [JIANG Y Y, CHEN Q, ZHANG L, et al. Inhibitory effect of genkwanin against α -glucosidase[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021: 1-9.]
- [25] 姜丽丽, 尹航, 闫明睿, 等. 天然芪类化合物及其抗 α -葡萄糖苷酶活性的研究进展[J]. 上海中医药大学学报, 2021, 35(2): 116-124. [JIANG L L, YIN H, YAN M R, et al. Research progress on natural stilbenes and its inhibitory activity on α -glucosidase[J]. Academic Journal of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 2021, 35(2): 116-124.]
- [26] 杨丽珍, 邹波, 徐玉娟, 等. 荔枝壳多酚对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用[J]. 食品科技, 2017, 42(5): 174-179. [YANG L Z, ZOU B, XU Y J, et al. Inhibitory effect of free and bound phenolics from litchi pericarp on α -glycosidase[J]. Food Science and Technology, 2017, 42(5): 174-179.]
- [27] 姜丽丽, 张中民, 陈道玉, 等. 白藜芦醇对 α -葡萄糖苷酶的抑制动力学及抑制机制[J]. 食品科学, 2019, 40(11): 70-74. [JIANG L L, ZHANG Z M, CHEN D Y, et al. Inhibition kinetics and mechanisms of resveratrol on α -glucosidase[J]. Food Science, 2019, 40(11): 70-74.]
- [28] 郑丽婷, 周鸿, 刘奕明, 等. 黄柏碱对 α -葡萄糖苷酶的体外抑制作用[J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(6): 853-858. [ZHENG L T, ZHOU H, LIU Y M, et al. Inhibitory effect of phellodendrine on α -glucosidase *in vitro*[J]. Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, 2020, 36(6): 853-858.]
- [29] 韩芬霞, 范新景, 耿升, 等. 异甘草素抑制 α -葡萄糖苷酶的分子机制[J]. 食品科学, 2019, 40(15): 37-42. [HAN F X, FAN X J, DI S, et al. Inhibitory mechanism of isoliquiritigenin against α -glucosidase[J]. Food Science, 2019, 40(15): 37-42.]
- [30] CHEN J G, WU S F, ZHANG Q F, et al. α -Glucosidase inhibitory effect of anthocyanins from *Cinnamomum camphora* fruit: Inhibition kinetics and mechanistic insights through *in vitro* and *in silico* studies[J]. Int J Biol Macromol, 2020, 143(1): 696-703.
- [31] 余颖, 樊金玲, 程源斌, 等. 甘草酸提取废液 α -葡萄糖苷酶抑制剂的筛选与鉴定[J]. 食品科学, 2018, 39(13): 22-28. [YU

- Y, FAN J L, CHENG Y B, et al. Screening and identification of α -glucosidase inhibitor in waste liquid from glycyrrhizic acid extraction[J]. *Food Science*, 2018, 39(13): 22–28.]
- [32] SHAHABADI N, KHORSHIDI A, MOGHADAM N H. Study on the interaction of the epilepsy drug, zonisamide with human serum albumin (HSA) by spectroscopic and molecular docking techniques[J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2013, 114(1): 627–32.
- [33] 屠洁, 陈钧, 刘冠卉. 芹菜素抑制 α -葡萄糖苷酶的分子机制研究[J]. *生物技术*, 2015, 25(4): 369–374. [TU J, CHEN J, LIU G H. Study on the molecular inhibition mechanisms of apigenin on α -glucosidase[J]. *Biotechnology*, 2015, 25(4): 369–374.]
- [34] 杨文康, 李超, 喻柯柯, 等. 罗汉果皂甙粗提物的 α -葡萄糖苷酶体外抑制活性研究[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(24): 112–113. [YANG W K, LI C, YU K K, et al. Inhibitory effect of mogrosides crude extract on α -glucosidase *in vitro*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(24): 112–113.]
- [35] T P L, MONDAL M, RAMADAS K, et al. Molecular interaction of 2, 4-diacetylphloroglucinol (DAPG) with human serum albumin (HSA): The spectroscopic, calorimetric and computational investigation[J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2017, 183(1): 90–102.
- [36] 柳余莉, 杨文康, 刘合生, 等. 杨梅多酚粗提物对 α -葡萄糖苷酶体外抑制作用的研究[J]. *果树学报*, 2016, 33(1): 59–65. [LIU Y L, YANG W K, LIU H S, et al. Inhibitory effects of the polyphenol extracts from Chinese bayberry on α -glucosidase *in vitro*[J]. *Journal of Fruit Science*, 2016, 33(1): 59–65.]
- [37] LI Y Q, ZHOU F C, GAO F, et al. Comparative evaluation of quercetin, isoquercetin and rutin as inhibitors of alpha-glucosidase[J]. *Agric Food Chem*, 2009, 57(24): 11463–11468.
- [38] ALMAZROO O A, MIAH M K, VENKATARAMANAN R. Drug metabolism in the liver[J]. *Clin Liver Dis*, 2017, 21(1): 1–20.
- [39] 赵东方, 何荣景, 侯旭东, 等. 源于天然的酶抑制剂: 高效发现及评价新技术: 进展与展望[J]. *上海中医药大学学报*, 2021, 35(1): 1–19. [ZHAO D F, HE J R, HOU X D, et al. New technologies for efficient discovery and evaluation of natural enzyme inhibitors: Research progress and perspectives[J]. *Academic Journal of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine*, 2021, 35(1): 1–19.]
- [40] IJZERMAN A P, GUO D. Drug-target association kinetics in drug discovery[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2019, 44(10): 861–871.
- [41] 朱娟娟. 青钱柳悬浮培养细胞三萜抑制糖类消化酶活性及其作用机理[D]. 南昌: 江西农业大学, 2016. [ZHU J J. The inhibition effect and mechanism of triterpenoids, extracted from suspended cultured *Cyclocarya paliurus* cells on the activity of carbohydratedigestion enzymes[D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2016.]
- [42] 王文玲, 王立平, 王聪, 等. 珊瑚真菌 *Aspergillus* sp. OUCM-DZ-3658 产生的生物碱[J]. *中国海洋药物*, 2015, 34(6): 1–11. [WANG W L, WANG L P, WANG C, et al. Alkaloids from *Aspergillus* sp. OUCMDZ-3658 associated with soft coral[J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2015, 34(6): 1–11.]
- [43] 张慧, 吴媛媛, 黄晨晔, 等. 戈米辛 D 与 α -葡萄糖苷酶的相互作用研究[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(23): 4631–4635. [ZHANG H, WU Y Y, HUANG C Y, et al. Interaction between gomizine D and α -glucosidase[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2017, 42(23): 4631–4635.]
- [44] 户晶晶, 王瑞芳, 王力, 等. 轮型钼簇对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用[J]. *集美大学自然学报(自然科学版)*, 2020, 25(4): 265–271. [HU J J, WANG R F, WANG L, et al. Study on the inhibition of α -glucosidase by wheel-type molybdenum clusters[J]. *Journal of Jimei University (Natural Science)*, 2020, 25(4): 265–271.]
- [45] 严晓琳, 袁培耘, 李欣, 等. 灯盏花乙素与 α -葡萄糖苷酶相互作用的研究[J]. *贵州师范大学学报(自然科学版)*, 2013, 31(5): 79–83. [YAN X L, YUAN P Y, LI X, et al. Investigation of interaction between scutellarin and α -glucosidase[J]. *Journal of Guizhou Normal University (Natural Sciences)*, 2013, 31(5): 79–83.]
- [46] 尤进茂, 朱庆存, 车洪文. 3, 5—二溴水杨醛缩邻氨基酚的单分子猝灭效应及测定痕量铜的研究[J]. *曲阜师范大学学报(自然科学版)*, 1996, 22(3): 82–86. [YOU J M, ZHU Q C, CHE H W. Study on single-molecule fluorescence measurement of 3,5-dibromic salicylaldehyde o-aminophenol and determination of trace copper[J]. *Journal of Qufu Normal University(Natural Science Edition)*, 1996, 22(3): 82–86.]
- [47] 汪大伟, 赵杰, 唐红进. 天然黄酮山奈酚(Kaempfer)与 α -葡萄糖苷酶的相互作用机制分析[J]. *安徽工程大学学报*, 2020, 35(1): 20–32. [WANG D W, ZHAO J, TANG H J. Studies on the interaction of the natural flavonoid kaempferol and alpha-glucosidase[J]. *Journal of Anhui Polytechnic University*, 2020, 35(1): 20–32.]
- [48] LIN P, ZENG J C, CHEN J G, et al. Synthesis, *in vitro* inhibitory activity, kinetic study and molecular docking of novel N-alkyl-deoxyojirimycin derivatives as potential α -glucosidase inhibitors[J]. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2020, 35(1): 1879–1890.