

枸杞叶黄酮对胰脂肪酶活性的抑制作用

廖家乐, 方甜, 范艳丽*
(宁夏大学食品与葡萄酒学院 银川 750021)

摘要 采用酶动力学法探讨枸杞叶黄酮对胰脂肪酶活性的抑制作用。采用紫外、荧光和红外光谱研究枸杞叶黄酮与胰脂肪酶相互作用的机理。结果表明:枸杞叶黄酮对胰脂肪酶活性有抑制作用,半抑制浓度(IC₅₀)为(0.910±0.008) mg/mL,抑制类型为可逆非竞争抑制,抑制常数为 6.04 mg/mL。紫外和荧光光谱显示:枸杞叶黄酮能使胰脂肪酶芳香氨基酸暴露,微环境和酶构象改变,内源荧光猝灭,猝灭类型为动态猝灭为主的混合型猝灭。热力学参数显示:枸杞叶黄酮与胰脂肪酶的相互作用力主要为疏水相互作用。红外光谱显示:枸杞叶黄酮对酶蛋白二级结构的影响,主要表现为复合物结构变得有序化,β-折叠向α-螺旋的转化。枸杞叶黄酮通过改变胰脂肪酶结构和微环境,进而抑制胰脂肪酶活性。

关键词 枸杞叶; 黄酮; 胰脂肪酶; 抑制作用

文章编号 1009-7848(2022)05-0043-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.05.006

肥胖症的形成,很大程度上是由不健康的饮食习惯和生活方式引起的,特别是长期过量摄入高脂膳食。肥胖不仅会影响形体外观审美,而且容易引起异常的生理代谢,从而引发一系列的生理、心理和社会问题^[1]。肥胖是导致许多慢性疾病发生的关键诱因,如高血压、高血脂、糖尿病、心脑血管疾病以及癌症等^[2-4]。肠道脂肪酶在人体脂肪消化中发挥着重要作用,其中胰脂肪酶是水解脂肪的关键酶,负责肠腔内 50%~70%总膳食脂肪的水解和吸收^[5-6]。胰脂肪酶能将膳食中的油脂分解为小分子的甘油和脂肪酸,人体可以吸收并参与新陈代谢。抑制肥胖的有效方法是通过抑制小肠中的胰脂肪酶活性,使胰脂肪酶丧失部分分解能力,从源头上控制脂肪进入血液,从而降低脂肪的消化和吸收,起到减肥降脂的作用。目前,市面上许多减肥药虽疗效显著但副作用明显,如奥利司它会导导致人体出现胃肠排气增多、脂肪泻等不良反应^[7]。从植物界寻找高效、低毒、低副作用的胰脂肪酶抑制剂,具有着重要意义。

枸杞叶,是茄科(*Solanaceae*)枸杞属(*Lycium*)植物枸杞的嫩叶。枸杞叶富含生物活性成分和微量元素,广泛应用于食品工业。在中国以及东南亚

和北美洲地区,枸杞叶被用作功能性茶、药用蔬菜和草药。过去枸杞叶并未受到重视,多用于土壤肥料和饲料配料,未能充分利用其价值,这严重阻碍了枸杞叶的应用与发展^[8]。研究表明,枸杞叶中富含黄酮类化合物,其含量要远高于果实^[9]。目前国内学者在类黄酮化合物抑制胰脂肪酶活性方面做了大量研究^[10-13],证实了从植物中提取出的类黄酮,具有胰脂肪酶活性抑制的作用。然而,枸杞叶黄酮对胰脂肪酶的作用却未见报道。

本文以宁夏地区枸杞叶黄酮提取物为研究对象,采用酶动力学法研究枸杞叶黄酮(*Lycium barbarum leaves flavonoids*, LBLF)对胰脂肪酶的抑制作用,借助紫外、荧光和红外光谱探讨枸杞叶黄酮与胰脂肪酶相互作用的机理。本试验结果为枸杞叶黄酮作为功能性食品原料和潜在替代药物的开发提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

枸杞叶茶购于银川育新枸杞有限公司;枸杞叶黄酮:实验室自制,总黄酮含量 83.0%(以芦丁为标准品计算)。

芦丁标准品(纯度≥98%),上海源叶生物公司;D101 大孔树脂,安徽三星树脂科技公司;猪胰脂肪酶(Type II)、三羟甲基氨基甲烷(Tris),美国 SIGMA 公司;棕榈酸对硝基苯酯(*p*-Nitrophenyl

收稿日期: 2021-05-19

基金项目: 宁夏自然科学基金项目(2020AAC03099)

作者简介: 廖家乐(1993—),男,硕士生

通信作者: 范艳丽 E-mail: fanyanli_fyl@163.com

palmitate, *p*-NPP), 麦克林生物公司; 对硝基苯酚、异丙醇、盐酸、氯化钙、氯化钠、二甲基亚砷(DM-SO)、曲拉通 X-100、阿拉伯树胶粉等其它试剂均为国产分析纯级, 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

ME203E/02、AL104 电子天平, 梅特勒-托利多公司; RE-52 旋转蒸发仪, 上海亚荣仪器公司; DF-2 数显磁力搅拌器, 常州诺基仪器公司; BSO-WX2200 卧式智能精密型摇床, 上海博迅医疗设备厂; F-7000 荧光分光光度计, 日本日立公司; UV-1800 紫外分光光度计, 日本岛津公司; Spectrum Two 傅里叶变换红外光谱仪、UATR Two 衰减全放射附件, 美国 PerkinElmer 公司; JDG-0.2 真空冻干实验机, 兰州科近真空冻干技术公司; ST70-2 微孔板恒温振荡器, 杭州米欧仪器公司; Multiskan Mk3 全波长酶标仪, 赛默飞世儿仪器公司; TDL-5-A 离心机, 上海安亭科学仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 枸杞叶类黄酮化合物的制备

1.3.1.1 提取 枸杞叶粉碎过筛, 按照料液比 1:70, 于 70 °C 下用 70% 乙醇磁力搅拌提取 2 h, 重复提取 1 次, 合并提取液, 5 000 r/min 下离心取上清液, 55 °C 旋转蒸发, 浓缩至一定体积后加入石油醚进行脱除叶绿素和脱脂处理。分液弃除石油醚层, 保留上层。旋转蒸发, 冷冻干燥, 得枸杞叶黄酮粗提物。

1.3.1.2 纯化 准确称取预处理过的 D101 大孔树脂 2.0 g 和样品 0.375 g (超纯水作溶剂), 加入 250 mL 具塞三角瓶中, 室温置于摇床上振荡吸附 24 h。将充分吸附后的树脂过滤, 置于 250 mL 三角瓶中, 加入 100 mL 70% 的乙醇, 相同条件下解吸 24 h, 经旋转蒸发浓缩, 冷冻干燥得到纯化产物。

1.3.2 总黄酮含量的测定

1.3.2.1 芦丁标准曲线的绘制 采用亚硝酸钠-硝酸铝比色法测定总黄酮含量^[14], 于波长 510 nm 处测定吸光值, 以芦丁质量浓度为横坐标, 吸光值为纵坐标, 绘制标准曲线。回归方程: $Y=7.0747X+0.0899$, $R^2=0.9992$ 。

1.3.2.2 样品测定 准确称取一定质量样品, 配成一定浓度的样液于比色管中测定样液吸光值。

根据标准曲线计算出黄酮的质量浓度, 按公式(1)计算总黄酮含量。

$$\text{总黄酮含量}(\%) = \frac{C \times V}{M \times 1000} \times 100 \quad (1)$$

式中, C ——为通过标准曲线得到的样品溶液中总黄酮的质量浓度, mg/mL; V ——样品溶液体积, mL; M ——称取的样品质量, g。

1.3.3 枸杞叶黄酮对胰脂肪酶活性的影响

1.3.3.1 枸杞叶黄酮抑制胰脂肪酶活性的测定

1) 溶液的配制 准确称取 3.0 g Tris, 0.731 g NaCl, 0.555 g CaCl₂, 溶于超纯水, 并定容至 500 mL, 盐酸调 pH 值为 8.0, 得 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液; 称取 0.5 g 胰脂肪酶, 溶于 50 mL Tris-HCl 缓冲液, 5 000 r/min 离心 10 min, 分离上清液, 得 10 mg/mL 胰脂肪酶储备液; 准确称取 3.02 mg *p*-NPP, 用缓冲溶液定容至 10 mL, 得 0.8 mmol/L 的 *p*-NPP 溶液 (含质量分数 0.5% 曲拉通 X-100, 质量分数 0.1% 阿拉伯树胶粉和体积分数 10% 异丙醇)。

2) 胰脂肪酶活性的测定 参照 Franco 等^[15]的方法并作略微改进。取 40 μL 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液、20 μL 一定浓度的枸杞叶黄酮溶液和 60 L 10 mg/mL 的胰脂肪酶溶液加入 96 孔板中混匀, 37 °C 温育 10 min 后, 加入 80 μL *p*-NPP 底物启动反应, 37 °C 温育 30 min, 酶标仪 405 nm 波长处测定吸光值。对照组用缓冲液替代酶液, 每组试验重复 3 次。反应体系见表 1。胰脂肪酶活性抑制率计算见公式(2)。

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{B-b}{A-a}\right) \quad (2)$$

式中, A ——对照试验组吸光值; B ——样品试验组吸光值; a ——对照空白组吸光值; b ——样品空白组吸光值。

表 1 胰脂肪酶活性测定反应体系

Table 1 Reaction system for determination of pancreatic lipase activity

组别	缓冲液/ μL	抑制剂/ μL	酶液/ μL	<i>p</i> -NPP /μL
对照试验组(A)	60	0	60	80
对照空白组(a)	120	0	0	80
样品试验组(B)	40	20	60	80
样品空白组(b)	100	20	0	80

1.3.3.2 枸杞叶黄酮对胰脂肪酶半抑制浓度(IC_{50})和抑制作用类型的确定 以不同质量浓度的枸杞叶黄酮为横坐标,胰脂肪酶活性抑制率为纵坐标,绘制抑制曲线图并进行线性回归拟合后求得半抑制浓度(IC_{50})。

固定底物浓度不变(0.8 mmol/L),分别测定添加 0.5 mg/mL 和不添加酶抑制剂时,不同酶浓度下的反应初速度。以初速度对酶质量浓度作图。由图判断抑制类型(可逆或不可逆),添加抑制剂会得到一条通过原点且斜率降低的直线,可确定为可逆抑制作用类型^[16]。

固定酶液质量浓度为 10 mg/mL,枸杞叶黄酮溶液质量浓度为 0,0.5,1 mg/mL,分别测定 p -NPP 浓度为 8,4,2,1 mmol/L 时的酶促反应初速度,反应体系同 1.3.3.1 节。以反应速率的倒数($1/v$)对底物浓度的倒数($1/[S]$)作图,得到 Lineweaver-Burk 双倒数曲线,确定反应最大速率(V_{max})、米氏常数(K_m)以及抑制常数(K_i)。曲线与 X 轴的截距= $-1/K_m$,与 Y 轴截距= $1/V_{max}$;抑制常数(K_i)由式(3)求得。根据 V_{max} 和 K_m 的变化可判断抑制类型,非竞争性抑制为 K_m 不变, V_{max} 变小;竞争性抑制为 K_m 增大, V_{max} 不变^[17]。每组试验重复 3 次,对照组用缓冲液替代。酶促反应速率(v)为反应体系吸光值(A)与反应时间的比值。

枸杞叶黄酮与胰脂肪酶相互作用的非竞争性抑制动力学方程见式(3):

$$V_{max}^* = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{k_i}} \quad (3)$$

式中, V_{max}^* ——添加酶抑制剂的最大反应速率, min^{-1} ; V_{max} ——不添加酶抑制剂的最大反应速率 min^{-1} ; $[I]$ ——抑制剂的质量浓度,mg/mL; k_i ——抑制常数,mg/mL。

1.3.4 枸杞叶黄酮对胰脂肪酶紫外光谱测定 根据张永军^[18]的方法,准确移取 3 mL 酶液(1 mg/mL)和 200 μL 不同质量浓度的样品溶液,常温下混匀静置 5 min,得到质量浓度为 0, 6.25×10^{-3} , 1.56×10^{-2} , 3.13×10^{-2} , 4.69×10^{-2} , 6.25×10^{-2} mg/mL 的样液,分别移取 2 mL 于石英比色皿中,放入紫外分光光度计中测定(扫描 250~400 nm 的波长)。

1.3.5 枸杞叶黄酮与胰脂肪酶相互作用的荧光光谱分析

1.3.5.1 荧光光谱的测定 根据范金波等^[19]的方法,准确移取 3 mL 酶液(1 mg/mL)和 50 μL 不同质量浓度的样品溶液,使溶液总体积达到 4 mL,得到浓度为 0, 1.25×10^{-3} , 3.125×10^{-3} , 6.25×10^{-3} , 1.25×10^{-2} , 2.50×10^{-2} , 5.00×10^{-2} mg/mL 的样液,分别在 20 $^{\circ}\text{C}$ 和 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下混匀静置 10 min,分别移取 2 mL 于荧光比色皿中,放入荧光光度计中测定(激发波长为 290 nm,发射波长扫描范围 300~500 nm,狭缝宽均为 5 nm)。

1.3.5.2 枸杞叶黄酮对胰脂肪酶的荧光猝灭机理研究 假设 LBLF 对胰脂肪酶的猝灭类型为动态猝灭,则符合 Stern-Volmer 方程:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q] \quad (4)$$

$$K_{sv} = K_q \tau_0 \quad (5)$$

式中, F_0 ——不加酶抑制剂时酶液的荧光强度; F ——加酶抑制剂时酶液的荧光强度; K_{sv} ——动态猝灭常数, L/mol ; $[Q]$ ——LBLF 摩尔浓度, mol/L ; K_q ——双分子碰撞过程猝灭常数, $\text{L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$; τ_0 ——无抑制剂时荧光分子的平均寿命(生物大分子平均寿命为 10^{-8} s),s。

1.3.5.3 枸杞叶黄酮与胰脂肪酶相互作用的作用力类型和热力学参数的确定 根据式(6),作 $\lg(F_0 - F)/F$ 关于 $\lg[Q]$ 的双对数曲线,分别求得 293 K 和 310 K 下 LBLF 与胰脂肪酶结合位点数(n)以及结合常数(K_a)。

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_a + n \lg [Q] \quad (6)$$

293 K(T_1)和 310 K(T_2)下的热力学参数,焓变(ΔH)、熵变(ΔS)和吉布斯自由能变(ΔG)由式(7)、(8)、(9)计算得到,并由此可知二者相互作用力类型。

$$\Delta H = \frac{\ln \frac{K_{a2}}{K_{a1}}}{\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}} \times R \quad (7)$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (8)$$

$$\Delta G = -RT \ln K_a \quad (9)$$

式中, R ——气体常数(8.314), $J/(\text{mol}\cdot\text{K})$;
 K_{d1} ——293 K 的结合常数, L/mol ; K_{d2} ——310 K
下的结合常数, L/mol 。

1.3.6 傅里叶衰减全放射红外光谱(ATR-FTIR)
测定 准确移取 50 mL 的酶液(10 mg/mL)和称取
不同质量的枸杞叶黄酮粉末(0,25,50,100,200,
300 mg),混匀,得到质量浓度为 0,0.5,1,2,4,6
mg/L 的样液,反应液置于摇床(37 °C,160 r/min)
上恒温振荡反应 30 min,取出进行冷冻干燥。移取
适量样品置于 ATR 附件的晶体上,拧紧螺旋压
实;光谱扫描范围:4 000~400 cm^{-1} ;扫描次数:32
次;分辨率:4 cm^{-1} ;每个样本采集 3 次,测定之前
扣除空气基底。

1.3.7 数据处理及统计分析 每组试验 3 次重
复,结果用平均值 \pm 标准差表示,采用 Excel 2019
作图。样品的红外图谱通过 PeakFit 4.12 在谱带
范围内(酰胺 I 带)校正基线、区分重叠峰,二阶
高斯拟合,根据峰面积计算酶蛋白的二级结构。酰
胺一带二阶导数图,由 Origin 8.0 作归一化并二
阶求导得到。

2 结果与讨论

2.1 枸杞叶黄酮对胰脂肪酶的抑制作用

课题组前期试验结果显示^[20],纯化后的枸杞
叶黄酮的总含量为 809.89 mg/g,进一步借助
HPLC 测得纯化产物主要为芦丁、槲皮素、绿原酸、
山奈酚等化合物,其中芦丁占检出物比例的 70%
以上。经检测,本试验中所使用的实验室自制枸杞
叶黄酮的总含量为 83.0%。

由图 1 可知,随着 LBLF 质量浓度的增大,
LBLF 对胰脂肪酶的抑制率也逐渐增大。通过多元
线性回归拟合曲线,求得 LBLF 对胰脂肪酶的半抑
制质量浓度(IC_{50})为(0.910 \pm 0.008) mg/mL。高畅
等^[21]发现,黄酮类化合物因提取溶剂和方法不同
对胰脂肪酶的抑制作用是不同的,其中桑叶黄酮
纯化产物对胰脂肪酶的半抑制浓度(IC_{50})为 1.19
mg/mL,抑制作用类型为非竞争性抑制;张忠^[22]发
现,市售的茶多酚能显著抑制胰脂肪酶活性,半数
抑制浓度(IC_{50})为 1.16 mg/mL,抑制类型为非竞争
性抑制;杨鹏等^[23]发现,荞麦黄酮醇提取物是一种胰

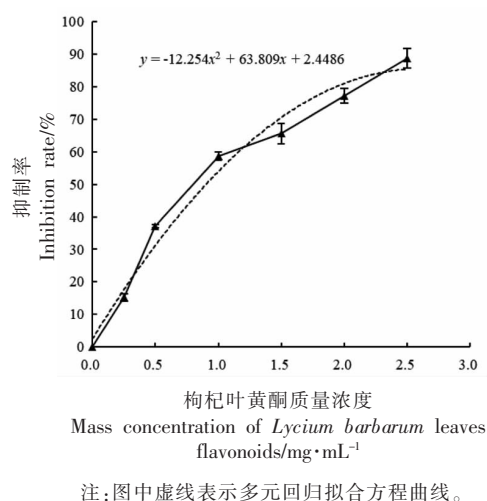


图 1 枸杞叶黄酮对胰脂肪酶的抑制效果

Fig.1 The inhibitory effect of *Lycium barbarum* leaves flavonoids on pancreatic lipase

脂肪酶的竞争性抑制剂,半数抑制浓度(IC_{50})为
2.53 mg/mL,而阳性对照奥利司他的半抑制浓度
为 0.47 mg/mL;范金波等^[24]发现,咖啡酸能非竞争
性抑制胰脂肪酶活性,半数抑制浓度(IC_{50})为 0.88
mg/mL。相比于茶多酚和桑叶黄酮,枸杞叶黄酮对
胰脂肪酶的抑制效果虽更好,但效果不如咖啡酸,这
可能由于咖啡酸是纯度更高的单体化合物。目前,
枸杞叶黄酮抑制胰脂肪酶的效果虽比不上化学合成
药物奥利司他,但枸杞叶黄酮作为天然活性产物,
不仅有着广泛的生物学功能,而且对人体有较低的
毒副作用。

2.2 枸杞叶黄酮对胰脂肪酶的抑制作用类型

由图 2 可知,抑制剂组和无抑制剂组拟合得
到的曲线都通过原点,且添加抑制剂后,曲线斜率
降低,说明枸杞叶黄酮对胰脂肪酶的抑制作用类
型为可逆抑制。枸杞叶黄酮能与酶以非共价键可
逆结合而引起酶活力的丧失或降低,影响酶催化
效率。

可逆抑制类型分为非竞争性、反竞争性以及
竞争性抑制 3 种。非竞争性抑制典型特征为 K_m
不变, V_{max} 变小。由图 3 可知,在底物浓度为 1~8
mmol/L 范围内,通过绘制不同质量浓度抑制剂组
和空白对照组的 Lineweaver-Burk 曲线发现,抑制
剂和无抑制剂组曲线相交于横轴,且直线在横轴

的截距保持不变,斜率变大,即 K_m 不变, V_{max} 变小,表明枸杞叶黄酮对胰脂肪酶的抑制作用类型

为非竞争性抑制。表 2 为通过计算得到的酶动力学参数和半抑制质量浓度。

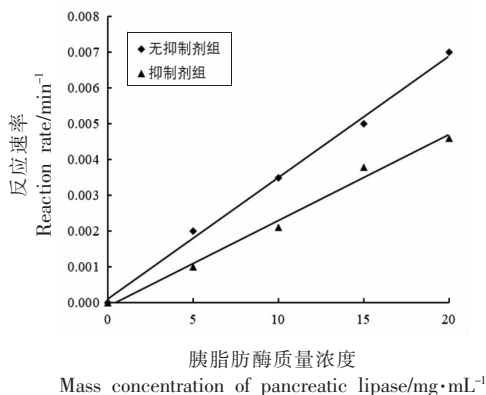
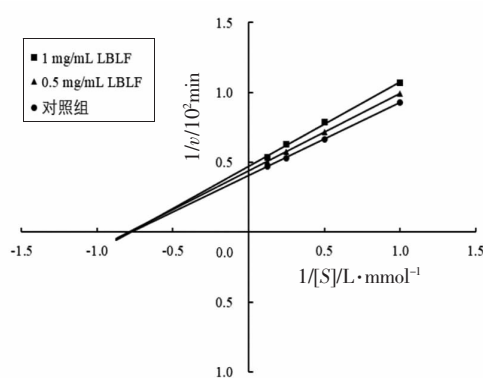


图 2 枸杞叶黄酮对胰脂肪酶的抑制作用类型

Fig.2 Types of inhibitory effects of *Lycium barbarum* leaves flavonoids on pancreatic lipase



注: v 表示酶促反应速率; $[S]$ 表示底物浓度。

图 3 枸杞叶黄酮对胰脂肪酶的可逆抑制 Lineweaver-Burk 曲线

Fig.3 Lineweaver-Burk curve of reversible inhibition of *Lycium barbarum* leaves flavonoids on pancreatic lipase

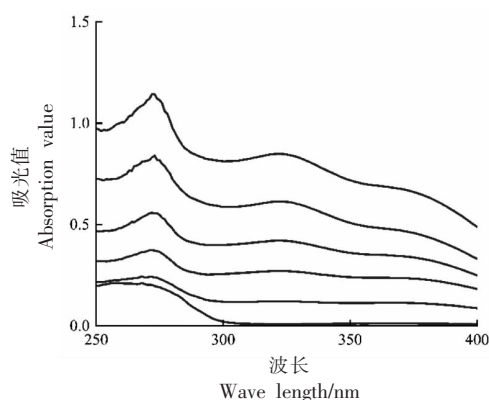
表 2 枸杞叶黄酮抑制胰脂肪酶的半抑制浓度和动力学参数

Table 2 The half inhibitory concentration and kinetic parameters of *Lycium barbarum* leaves flavonoids in inhibiting pancreatic lipase

组别	$IC_{50}/mg \cdot mL^{-1}$	$V_{max} \times 10^{-2}/min^{-1}$	$K_m/mmole \cdot L^{-1}$	$K_i/mg \cdot mL^{-1}$
对照组		2.47	1.28	
0.5 mg/mL LBLF	0.91	2.28	1.28	6.04
1 mg/mL LBLF	0.91	2.12	1.28	6.04

2.3 枸杞叶黄酮与胰脂肪酶相互作用的紫外光谱分析

由图 4 可知,胰脂肪酶在波长 260 nm 处有最大吸收峰,这是由于色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)和苯丙氨酸(Phe)的存在造成的。通过观察紫外图谱吸收峰强度和波长的变化,可判断 LBLF 与胰脂肪酶相互作用程度以及芳香族氨基酸微环境的状态,而所处微环境的变化会引起酶构象的改变。图 4 表明,加入不同质量浓度 LBLF 后观察到胰脂肪酶紫外吸收光谱发生变化,随着 LBLF 质量浓度增大,吸收峰增强并发生红移(260 nm→273 nm),然而 5 个样品间没有显著差异。上述结果说明,添加 LBLF 后两者相互作用程度加强,胰脂肪酶芳香族氨基酸残基的微环境和酶构象发生改变,导致酶活性降低,这可能是 LBLF 的存在导致胰脂肪酶结构发



注:图中曲线由下至上枸杞叶黄酮质量浓度依次为 0, 6.25×10^{-3} , 1.56×10^{-2} , 3.13×10^{-2} , 4.69×10^{-2} , 6.25×10^{-2} mg/mL。

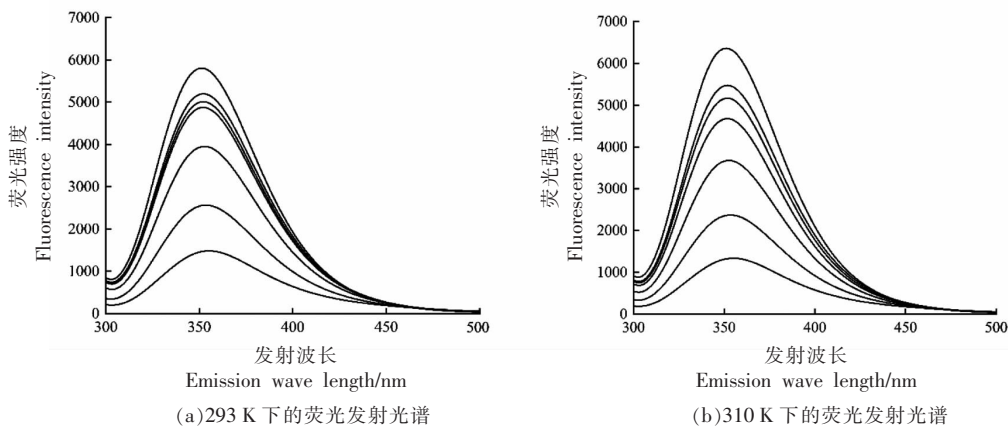
图 4 枸杞叶黄酮与胰脂肪酶相互作用的紫外光谱
Fig.4 Ultraviolet spectra of the interaction between *Lycium barbarum* leaves flavonoids and pancreatic lipase

生变化,更多芳香族氨基酸暴露所致^[25]。

2.4 枸杞叶黄酮与胰脂肪酶相互作用的荧光光谱结果分析

2.4.1 枸杞叶黄酮和胰脂肪酶相互作用的荧光发射光谱 胰脂肪酶中由于色氨酸 (Trp)、酪氨酸 (Tyr)和苯丙氨酸(Phe)的存在而具有内源荧光,其中对荧光贡献最大的是色氨酸,其次是酪氨酸,苯丙氨酸荧光最弱,而酪氨酸和色氨酸主要在波长 313 nm 和 350 nm 左右出现荧光峰^[26]。图 5 表明,胰脂肪酶的最大发射波长为 351 nm,随着 LBLF 质量浓度的增大,其荧光强度呈现规律性的

降低并发生红移(351 nm→354 nm),说明对胰脂肪酶荧光贡献最大的是色氨酸,且酶蛋白三级结构发生了一定程度的变化;小分子 LBLF 是胰脂肪酶的荧光猝灭剂,并存在一定的剂量依赖效应。荧光峰发生移位主要有两种说法:1)3种芳香氨基酸疏水性较高并聚集在一起,其所处环境极性的改变会导致红移或蓝移,LBLF 可以将色氨酸的微环境变为更亲水的环境,从而改变酶蛋白的构象和活性^[27-30]。2)酶是多畴结构,小分子物质 LBLF 可以进入酶蛋白的缝隙和空穴,从而改变酶的构象^[31]。



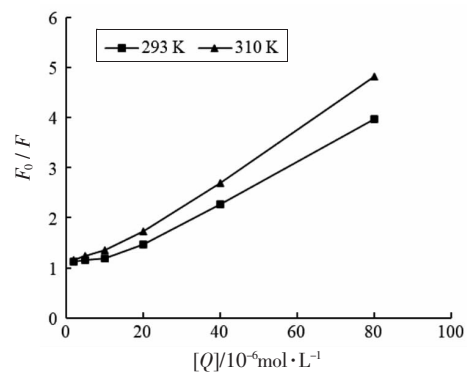
注:图中曲线由上至下枸杞叶黄酮质量浓度依次为 $0, 1.25 \times 10^{-3}, 3.125 \times 10^{-3}, 6.25 \times 10^{-3}, 1.25 \times 10^{-2}, 2.5 \times 10^{-2}, 5.00 \times 10^{-2}$ mg/mL。

图 5 枸杞叶黄酮与胰脂肪酶相互作用的荧光发射光谱

Fig.5 Fluorescence emission spectra of the interaction between *Lycium barbarum* leaves flavonoids and pancrelipase

2.4.2 枸杞叶黄酮对胰脂肪酶的荧光猝灭机理

荧光猝灭类型分为静态猝灭、动态猝灭以及混合猝灭,其中动态和静态猝灭的 Stern-Volmer 曲线均呈线性,混合猝灭曲线朝纵轴向上弯曲^[32]。图 6 可知,随温度升高,曲线斜率增大,且两条曲线随抑制剂质量浓度增大朝纵轴向上弯曲,初步确定 LBLF 对胰脂肪酶的荧光猝灭类型是以动态猝灭为主的混合型猝灭。由图 6 和表 3 可知,抑制剂浓度较低时,两条曲线均呈线性关系,温度升高,曲线斜率增大, K_{sv} 增大,其中 293 K 和 310 K 时 K_q 值分别为 1.94×10^{12} L/(mol·s) 和 3.15×10^{12} L/(mol·s), K_q 值均远高于由碰撞引起的最大猝灭常数 [2×10^{10} L/(mol·s)],进一步说明荧光猝灭类型为混合型,抑制剂在低浓度范围 (2×10^{-6} ~ 20×10^{-6} mol/L) 内动态猝灭尤为明显。



注: F_0 表示不加抑制剂时酶液的荧光强度, F 表示加酶抑制剂时酶液的荧光强度; $[Q]$ 表示抑制剂浓度。

图 6 枸杞叶黄酮猝灭胰脂肪酶荧光的 Stern-Volmer 曲线
Fig.6 Stern-Volmer curve of *Lycium barbarum* leaves flavonoids quenching pancrelipase fluorescence

表 3 枸杞叶黄酮(线性浓度范围 $2 \times 10^{-6} \sim 20 \times 10^{-6}$ mol/L)猝灭胰脂肪酶荧光的 Stern-Volmer 方程和猝灭常数

温度/K	Stern-Volmer 方程	R^2	$K_s/L \cdot \text{mol}^{-1}$	$K_q/L \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
293	$y=1.94 \times 10^4 x + 1.0735$	0.9826	1.94×10^4	1.94×10^{12}
310	$y=3.15 \times 10^4 x + 1.0627$	0.9918	3.15×10^4	3.15×10^{12}

2.4.3 枸杞叶黄酮与胰脂肪酶的结合常数(K_a)及热力学参数、作用力类型 表 4 说明,温度升高,结合常数和位点数都增大,该结合反应是吸热反

应;不同温度下结合位点数都趋近于 1,说明一个胰脂肪酶只能结合一个 LBLF 分子,升温更有利于结合。

表 4 枸杞叶黄酮和胰脂肪酶的结合常数(K_a)和结合位点数(n)

温度/K	回归方程	R^2	$K_a/L \cdot \text{mol}^{-1}$	n
293	$y=8.3 \times 10^{-1} x + 3.6318$	0.9893	4.3×10^3	0.83
310	$y=9.3 \times 10^{-1} x + 4.2955$	0.9864	2.0×10^4	0.93

酚类化合物与酶蛋白的相互作用力类型主要为氢键、范德华力以及疏水相互作用力等非共价键。由表 5 可知,不同温度下的 $\Delta G < 0$,表明该反应能自发进行; $\Delta H > 0$,说明该反应是吸热反应;通过比较 ΔG 、 ΔH 和 ΔS 三者的正负关系,可以判断 LBLF 与胰脂肪酶的作用力类型^[33]。本研究 $\Delta H > 0$ 、 $\Delta S > 0$ 、 $\Delta G < 0$,说明 LBLF 与胰脂肪酶形成的复合物主要靠疏水相互作用力维持。

2.5 枸杞叶黄酮与胰脂肪酶相互作用的 ATR-FTIR 光谱

峰强度和峰位的变化可以作为样品基团或化学键变化的判据,峰强度降低说明样品基团或化学键可能受到损伤,峰位发生偏移说明样品基团或化学键发生改变^[34]。

由图 7 可知,添加不同质量浓度 LBLF,胰脂肪酶特征峰位略微改变,且随着 LBLF 质量浓度的增大,红外吸收峰强度呈现先升高后降低的趋势,1 mg/mL LBLF 的样品峰强度最高,表明 1 mg/mL LBLF 对酶蛋白红外吸收振动化学键的保护作用最佳,同时酶蛋白的二级结构可能发生了一定程度的变化和转化。

二阶导数光谱的峰谷位置对应原光谱的峰尖和肩峰位置。LBLF 处理后胰脂肪酶谱图的变化不太明显。对原图谱相应谱带进行二阶导处理,将原图谱中细微的差别区分开来,可准确辨别出重叠子

表 5 枸杞叶黄酮和胰脂肪酶的热力学参数

Table 5 Thermodynamic parameters of *Lycium barbarum* leaves flavonoids and pancrelipase

T/K	$\Delta H/$ $\text{KJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\Delta S/$ $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$	$\Delta G/$ $\text{KJ} \cdot \text{mol}^{-1}$
293	68.41	303.03	-20.38
310		303.04	-25.53

峰和强峰的峰尖。

红外光谱是研究蛋白二级结构变化的经典方法,通过分析蛋白质的一组酰胺吸收带,获得酶蛋白基团、二级结构、微环境的变化信息,以确定分子间的作用力变化,其中酰胺 I 带吸收最强,最具有研究价值^[35]。酰胺 I 带主要涉及 -C=O 和双键的伸缩振动,其中 $1600 \sim 1640$, $1640 \sim 1650$, $1650 \sim 1660$, $1660 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ 特征峰分别代表 β -折叠、无规则卷曲、 α -螺旋以及 β -转角^[36]。由图 8 可知, β -折叠、无规则卷曲、 α -螺旋以及 β -转角分别占酶蛋白二级结构的 40.0%, 29.5%, 12.3% 和 18.4%。随着 LBLF 添加量增多, β -转角含量呈现先增高后降低的趋势,含量最高为 21.0%; α -螺旋含量由 12.3% 增加至 29.1%;无规则卷曲含量由 29.5% 减少至 17.2%; β -折叠含量由 40.0% 减少至 34.8%。 α -螺旋的增加,表明酶蛋白分子内氢键增多,结构凝集; β -折叠的减少,说明酶蛋白分子间

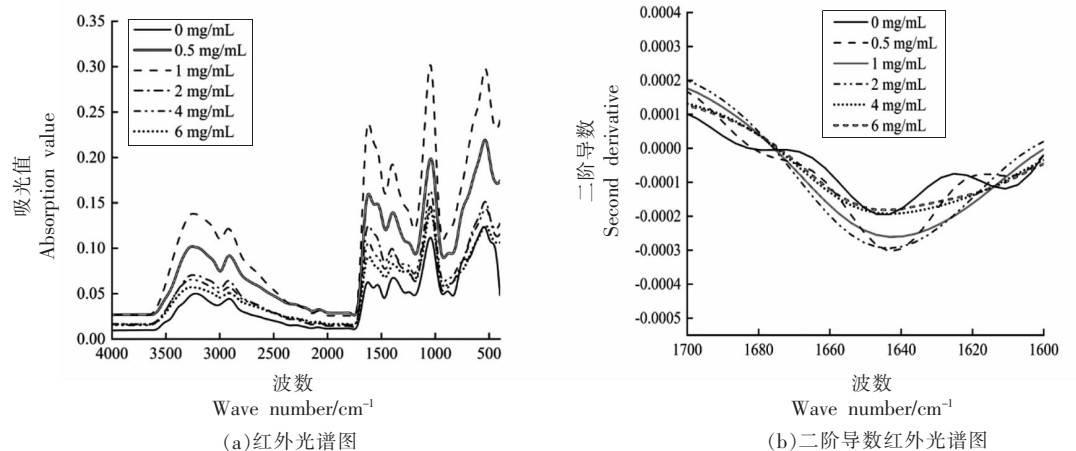


图7 枸杞叶黄酮与胰脂肪酶相互作用的红外光谱图及酰胺 I 带拟合二阶导数红外光谱图

Fig.7 Infrared spectra of the interaction between LBLF and pancrelipase and the second derivative infrared spectra of amide

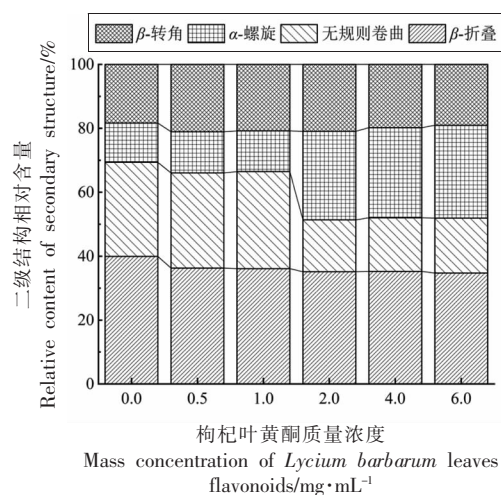


图8 胰脂肪酶蛋白二级结构含量变化

Fig.8 Changes in the secondary structure content of pancrelipase protein

氢键减少, 蛋白分子由伸展变的聚集, 而减少的 β -折叠更多地转化为 α -螺旋; 无规卷曲减少, 说明复合物结构倾向于有序化。上述结果表明, 添加不同质量浓度的 LBLF 一定程度上改变了酶蛋白的二级结构, 主要表现为复合物结构变得更为有序, β -折叠向 α -螺旋的转化。

3 结论

本文以宁夏地区丰富的枸杞叶资源为试验原料, 深入分析了从枸杞叶中提取的类黄酮化合物

的酶抑制剂效果。经研究发现, 枸杞叶黄酮提取物能显著抑制胰脂肪酶活性, 半数抑制浓度为 $(0.910\pm 0.008)\text{mg/mL}$, 抑制类型为可逆非竞争抑制。枸杞叶黄酮能与胰脂肪酶以疏水相互作用力结合, 猝灭酶蛋白内源荧光, 改变酶结构和微环境, 进而抑制胰脂肪酶活性。本试验的研究结果为阐述枸杞叶黄酮减肥降脂机理提供了一定的理论依据, 然而不同溶剂枸杞叶提取物及枸杞叶黄酮单体化合物对胰脂肪酶活性抑制的作用及二者的构效关系还有待进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] LIU T T, LIU X T, CHEN Q X, et al. Lipase inhibitors for obesity: A review [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2020, 128: 110314.
- [2] WEI HRAUCH-BLÜHER S, SCHWARZ P, KLUSMANN J H, et al. Childhood obesity: Increased risk for cardiometabolic disease and cancer in adulthood [J]. Metabolism, 2019, 92: 147-152.
- [3] EBRAHIMPOUR S, ZAKERI M, ESMAEILI A, et al. Crosstalk between obesity, diabetes, and Alzheimer's disease: Introducing quercetin as an effective triple herbal medicine [J]. Ageing Res Rev, 2020, 62(9): 101095.
- [4] CHOCKALINGAM A. Healthy weight-healthy blood pressure [J]. Canadian Journal of Cardiology, 2010,

- 26(5): 259–260.
- [5] BIRARI R B, BHUTANI K K. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: Unexplored potential[J]. *Drug Discov Today*, 2007, 12(19/20): 879–889.
- [6] 张静, 米佳, 禄璐, 等. 黑果枸杞花色苷提取物对胰脂肪酶活性的影响[J]. *食品科学*, 2020, 41(5): 8–14.
- ZHANG J, MI J, LU L, et al. Effect of anthocyanins extract from *Lycium ruthenicum* Murr. Fruit on pancreatic lipase activity[J]. *Food Science*, 2020, 41(5): 8–14.
- [7] 黄秋菊. 奥利司他疗效研究及不良反应[J]. *现代医药卫生*, 2018, 34(19): 3025–3027.
- HUANG Q J. Efficacy and side effects of orlistat[J]. *Journal of Modern Medicine & Health*, 2018, 34(19): 3025–3027.
- [8] LIU H H, FAN Y L, WANG W H, et al. Polysaccharides from *Lycium barbarum* leaves: isolation, characterization and splenocyte proliferation activity[J]. *Int J Biol Macromol*, 2012, 51(4): 417–422.
- [9] 邹耀洪. 枸杞叶的黄酮类化学成分[J]. *分析测试学报*, 2002(1): 76–78.
- ZOU Y H. Flavones in leaves of *Lycium chinese*[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2002(1): 76–78.
- [10] 郑丹, 张清峰. 黄酮“落新妇苷”对胰脂肪酶抑制作用研究[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(2): 172–175.
- ZHENG D, ZHANG Q F. The inhibiting effect of flavonoid “astilbin” on pancreatic lipase[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2018, 44(2): 172–175.
- [11] 钟英英, 谢勇鹏, 郭莎莎, 等. 辣木叶提取物对胰脂肪酶活性的抑制研究[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(19): 33–37.
- ZHONG Y Y, XIE Y P, GUO S S, et al. Effects of *Moringa oleifera* leaves extracts on lipase activity[J]. *Food Research and Development*, 2019, 40(19): 33–37.
- [12] RAJAN L, PALANISWAMY D, MOHANKUMAR S K. Targeting obesity with plant-derived pancreatic lipase inhibitors: A comprehensive review[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 155(4): 104681.
- [13] PATIL M, PATIL R, BHADANE B, et al. Pancreatic lipase inhibitory activity of phenolic inhibitor from endophytic *Diaporthe arengae* [J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2017, 10(4): 234–238.
- [14] 范艳丽, 韩丽娜, 付丽霞, 等. 枸杞叶黄酮类化合物体外清除自由基作用研究[J]. *中国调味品*, 2017, 42(12): 32–37.
- FAN Y L, HAN L N, FU L X, et al. Study on free radical scavenging effect of flavonoids from *Lyciumbarbarum* leaves *in vitro*[J]. *China Condiment*, 2017, 42(12): 32–37.
- [15] FRANCO R R, MOTA ALVES V H, RIBEIRO ZABISKY L F, et al. Antidiabetic potential of *Bauhinia forficata* Link leaves: A non-cytotoxic source of lipase and glycoside hydrolases inhibitors and molecules with antioxidant and antiglycation properties[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 123: 109798.
- [16] 董亚婷. 茶花粉提取物对胰脂肪酶及淀粉酶抑制作用的研究[D]. 厦门: 集美大学, 2014.
- DONG Y T. The inhibitory effects on pancreatic lipase and α -amylase of *Camellia pollen* extracts[D]. Xiamen: Jimei University, 2014.
- [17] 王远, 郑雯, 蔡珺珺, 等. 辣木叶黄酮结构分析及其对胰脂肪酶的抑制作用[J]. *食品科学*, 2018, 39(2): 31–37.
- WANG Y, ZHENG W, CAI J J, et al. Structural analysis and anti-pancreatic lipase activity of flavonoids from *Moringa oleifera* lam. leaves[J]. *Food Science*, 2018, 39(2): 31–37.
- [18] 张永军. 茶叶浸提物对功能性酶活性和二级结构的影响研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2010.
- ZHANG Y J. Studies of tea extracts on the activity and secondary structure of functional enzymes [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2010.
- [19] 范金波, 李鑫芮, 葛春辉, 等. 荧光光谱法研究绿原酸与胰脂肪酶相互作用[J]. *食品与发酵科技*, 2017, 53(6): 106–110.
- FAN J B, LI X R, GE C H, et al. Study on the interaction between chlorogenic acid and pancreatic lipase by fluorescence spectroscopy [J]. *Food and Fermentation Science & Technology*, 2017, 53(6): 106–110.
- [20] 陈瑾, 陈晶华, 刘利平, 等. 枸杞叶黄酮提取物的纯化及组成结构分析[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(18): 28–34, 40.

- CHEN J, CHEN J H, LIU L P, et al. Purification and structural analysis of flavonoids from *Lycium barbarum* leaves[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(18): 28–34, 40.
- [21] 高畅, 胡利, 迟原龙, 等. 桑叶黄酮对胰脂肪酶的抑制作用[J]. 食品科技, 2017, 42(5): 194–198.
- GAO C, HU L, CHI Y L, et al. Inhibitory effect of flavonoids from mulberry leaves on pancreatic lipase[J]. Food Science and Technology, 2017, 42(5): 194–198.
- [22] 张忠. 茶多酚对胰脂肪酶活性的抑制作用[J]. 食品工业, 2013, 34(8): 168–170.
- ZHANG Z. Inhibition of tea polyphenols on pancreatic lipase[J]. The Food Industry, 2013, 34(8): 168–170.
- [23] 杨鹏, 李艳琴. 荞麦黄酮和荞麦糖醇对胰脂肪酶的抑制作用[J]. 食品科学, 2015, 36(11): 60–63.
- YANG P, LI Y Q. Inhibitory effect of flavonoids and fagopyritols from buckwheat on pancreatic lipase[J]. Food Science, 2015, 36(11): 60–63.
- [24] 范金波, 王晓露, 姜海静, 等. 荧光光谱法研究咖啡酸与胰脂肪酶相互作用[J]. 食品工业科技, 2017, 38(2): 152–155.
- FAN J B, WANG X L, JIANG H J, et al. Study on the interaction between caffeic acid and pancreatic lipase by fluorescence spectroscopy[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(2): 152–155.
- [25] 费群勤. 乌龙茶多酚及其儿茶素单体抑制消化相关酶的活性及其机制的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- FEI Q Q. The study of Oolong tea polyphenols the role of digestive enzyme[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015.
- [26] ZHANG G, QUE Q M, PAN J H, et al. Study of the interaction between icariin and human serum albumin by fluorescence spectroscopy[J]. Journal of Molecular Structure, 2008, 881(1/2/3): 132–138.
- [27] CHEN T T, ZHU S J, SHANG Y F, et al. Binding of dihydromyricetin to human hemoglobin: Fluorescence and circular dichroism studies[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2012, 93: 125–130.
- [28] DAS S, HAZARIKA Z, SARMAH S, et al. Exploring the interaction of bioactive kaempferol with serum albumin, lysozyme and hemoglobin: A bio-physical investigation using multi-spectroscopic, docking and molecular dynamics simulation studies[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2020, 205(4): 111825.
- [29] SU H, RUAN Y T, LI Y, et al. *In vitro* and *in vivo* inhibitory activity of taxifolin on three digestive enzymes[J]. Int J Biol Macromol, 2020, 150: 31–37.
- [30] BI S Y, YAN L L, PANG B, et al. Investigation of three flavonoids binding to bovine serum albumin using molecular fluorescence technique[J]. Journal of Luminescence, 2012, 132(1): 132–140.
- [31] 刘天因, 徐梦佳, 胡冰, 等. 茯砖茶多酚类物质对胰脂肪酶活性的抑制作用[J]. 食品科学, 2015, 36(21): 46–49.
- LIU T N, XU M J, HU B, et al. Inhibitory activity of polyphenols from fuzhuan brick tea on pancreatic lipase[J]. Food Science, 2015, 36(21): 46–49.
- [32] ZHOU K L, PAN D Q, LOU Y Y, et al. Intermolecular interaction of fosinopril with bovine serum albumin (BSA): The multi-spectroscopic and computational investigation[J]. J Mol Recognit, 2018, 31(8): e2716.
- [33] HUANG X, ZHU J X, WANG L, et al. Inhibitory mechanisms and interaction of tangeretin, 5-demethyltangeretin, nobiletin, and 5-demethylnobiletin from citrus peels on pancreatic lipase: Kinetics, spectroscopies, and molecular dynamics simulation[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 164: 1927–1938.
- [34] 谢凤英, 马岩, 王晓君, 等. 拉曼光谱分析荞麦多酚对米糠蛋白结构的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(3): 32–36.
- XIE F Y, MA Y, WANG X J, et al. Effect of buckwheat polyphenols on the structure of rice bran proteins analyzed by Raman spectroscopy[J]. Food Science, 2017, 38(3): 32–36.
- [35] 王丽颖. 多酚与麦醇溶蛋白复合物的形成机制及结构表征[D]. 重庆: 西南大学, 2018.
- WANG L Y. Fabrication mechanism and structure characterization of polyphenols and gliadin complexes[D]. Chongqing: Southwest University, 2018.
- [36] 蓝蔚青, 胡潇予, 阮东娜, 等. 傅里叶红外结合拉曼分析卡拉胶寡糖对南美白对虾蛋白结构影响[J]. 光谱学与光谱分析, 2019, 39(8): 2507–2514.
- LAN W Q, HU X Y, RUAN D N, et al. Effect of

carrageenan oligosaccharide on protein structure of *Penaeus vannamei* by Fourier transform infrared spectroscopy and Raman spectroscopy[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2019, 39(8): 2507–2514.

Inhibitory Effects of *Lycium barbarum* Leaves Flavonoids on Pancreatic Lipase Activity

Liao Jiale, Fang Tian, Fan Yanli*

(College of Food & Wine, Ningxia University, Yinchuan 750021)

Abstract The inhibitory effect of *Lycium barbarum* leaves flavonoids on pancreatic lipase activity was explored by enzyme kinetics. The interaction mechanism between them was studied by ultraviolet, fluorescence and infrared spectroscopy. The results demonstrated that the flavonoids had an inhibitory effect on pancreatic lipase activity with a half-inhibitory concentration (IC_{50}) of (0.910 ± 0.008) mg/mL, inhibition type was reversible and non-competitive inhibition, and the constant of inhibition was 6.04 mg/mL. Ultraviolet and fluorescence spectra revealed that the flavonoids could result in the exposure of aromatic amino acids of pancrelipase, the change of microenvironment and enzyme conformation, and quenching of endogenous fluorescence. The quenching type was mainly dynamic quenching mixed quenching. Thermodynamic parameters showed that the interaction force between them was mainly hydrophobic force. Infrared spectroscopy revealed that the effect of the flavonoids on the secondary structure of enzyme protein was mainly as follows: the structure of the compound became orderly, and the β -sheet was transformed to α -helix. The flavonoids could change the structure and microenvironment of pancrelipase and then inhibit its activity.

Keywords *Lycium barbarum* leaves; flavonoids; pancreatic lipase; inhibition effect