

大蒜硫醚对葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的抑制作用

吕航¹, 可钦², 檀德宏¹, 周倩¹, 吴朝霞¹, 纪淑娟¹, 白冰^{1*}

(¹ 沈阳农业大学食品学院 沈阳 110866)

(² 赤峰学院附属医院 内蒙古赤峰 024005)

摘要 从大蒜中提取大蒜油,采用气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)对其进行定性分析;采用酶活实时监测技术,揭示大蒜油、二烯丙基二硫醚(DADS)和二烯丙基三硫醚(DATS)对葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(Glucose 6 Phosphate Dehydrogenase, G6PD)活性的抑制作用。酶动力学分析表明 DADS/DATS 对 G6PD 的抑制作用属于竞争性与非竞争性的混合性抑制。分子荧光技术分析表明 DADS/DATS 可对 G6PD 蛋白产生内源荧光淬灭,且为静态淬灭,提示 DADS/DATS 和 G6PD 蛋白结合位点数近似为 1。热力学分析表明 DADS-G6PD 体系主要通过疏水作用结合,DATS-G6PD 体系主要通过氢键和范德华力结合。利用 3D 和 2D 分子对接技术展示 DADS/DATS 可进入 G6PD 分子内部,且 DADS 与 G6PD 结合性能更好。DADS 可与 G6PD 结合位点周围 Ala-377、Val-376、Phe-216、Gly-222、Phe-221、Pro-223 等疏水性氨基酸残基形成疏水作用,与 Arg-219、Asn-218、Lys-275、Arg-215、Trp-225 等极性氨基酸残基形成静电力,且以疏水作用为主。DATS 可与 G6PD 结合位点周围 Phe-253、Gly-254、Ala-335、Ile-472、Ile-255、Leu-469、Leu-305 等疏水性氨基酸残基形成疏水相互作用,与 Arg-175、Lys-476、Arg-257、Thr-334、Thr-333、Glu-473 等极性氨基酸残基形成静电吸引。DATS 中心位置的 S 可与 Phe235 形成氢键,键长为 3.2 Å。疏水作用、静电力和氢键是 DADS/DATS 对 G6PD 的主要作用方式。

关键词 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶;二烯丙基二硫醚;二烯丙基三硫醚;分子对接;机制

文章编号 1009-7848(2022)06-0133-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.06.014

大蒜为百合科葱属植物。大蒜不仅是重要的调味品,还具有抗氧化^[1-2]、抗菌^[3]、抗炎^[4-5]、抗癌^[6]、抗动脉粥样硬化^[7-8]、调节血糖^[9]、血脂^[10]、降压^[11]等功能。研究表明,大蒜的生物活性主要是源自于其含量较高的有机硫化物,目前在大蒜中检测出 30 多种硫化物^[12]。其中大蒜油是一种挥发油,主要由一些挥发性硫化物组成,包括二烯丙基二硫醚(Diallyl Disulfide, DADS)、二烯丙基三硫醚(Diallyl Trisulfide, DATS)^[13]。

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(Glucose 6 Phosphate Dehydrogenase, G6PD)是戊糖磷酸途径的限速酶,可催化 D-葡萄糖-6-磷酸氧化为 6-磷酸葡萄糖酸内酯。戊糖磷酸途径可提供增殖所需的核苷酸前体和 NADPH,在肿瘤细胞增殖过程中,G6PD 的表达都是上调的,以满足肿瘤细胞的生长需要^[14-16]。G6PD 在肿瘤细胞中的过表达和活性增加,进一步

导致肿瘤组织的快速扩张^[17-19]。对 G6PD 活性的抑制成为控制肿瘤增殖的一种重要方式,因此对 G6PD 抑制剂的研究也日渐增多。类固醇类抑制剂,如脱氢表雄甾酮(DHEA)^[20]、表雄甾酮(EA)^[21]等被证实可抑制 G6PD 活性。来自大蒜的脂溶性硫化物 DADS 和 DATS 对 G6PD 的抑制研究目前鲜有报道。

本研究以大蒜油的主要成分 DADS/DATS 为研究对象,利用分子荧光实时监测技术揭示 DADS/DATS 对 G6PD 的活性具有部分抑制效果。以酶动力学原理分析其抑制类型,采用分子荧光光谱揭示 DADS/DATS 对 G6PD 的荧光淬灭机制,并分析结合位点数、热力学参数和相互作用力。利用 3D 和 2D 分子对接技术印证 DADS/DATS 对 G6PD 的作用力种类和结合方式。

1 材料与amp;方法

1.1 试剂与仪器

大蒜(白皮大蒜),沈阳农业大学农贸市场;大蒜油(提取自大蒜),沈阳农业大学食品学院食品化学实验室提供;二烯丙基二硫醚、二烯丙基三硫

收稿日期: 2021-06-19

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项(2018 YFC1603703);国家自然科学基金项目(31571799)

作者简介: 吕航(1994—),女,硕士生

通信作者: 白冰 E-mail: baibing@syau.edu.cn

醚(优级纯),美国 Sigma 公司;葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(150 U/mg,微生物来源),上海源叶公司;*D*-葡萄糖-6-磷酸,上海麦克林公司;氧化型辅酶 NAD,北京索莱宝公司;其它试剂均为国产分析纯,国药公司。

7890A-5975C 气相色谱-质谱联用仪,安捷伦科技有限公司;F-4600 分子荧光光谱仪,日本日立公司;紫外可见分光光度计,北京普析通用公司;XMTD-8222 型电热恒温水浴锅,上海精宏公司;FA224 电子天平,上海舜宇恒平科学仪器有限公司;PHS-3C 型 pH 计,上海仪电公司;RE-52A 型旋转蒸发仪,上海中光仪器仪表有限公司。

1.2 方法

1.2.1 大蒜油的提取 提取方法参照文献,略有改动^[22]。新鲜大蒜去皮洗净捣碎,取适量蒜泥,40 ℃ pH 6.5 条件下使大蒜内蒜氨酸和蒜氨酸酶充分反应 1 h。按料液比 1:4(V/V)加入无水乙醇,40 ℃下超声提取 30 min,过滤并浓缩得到大蒜油。

GC-MS 方法参照文献,略有改动^[23];色谱柱:DB-17MS(30 m×0.25 μm);载气:He(纯度 99.999%);EI 离子源温度:230 ℃;进样口温度:250 ℃;监测器温度:250 ℃;程序升温条件:90 ℃保持 1 min,10 ℃/min 速度升温至 250 ℃;样品浓度:1 μL/L;进样量:1 μL;不分流模式。

1.2.2 大蒜油、DADS、DATS 对 G6PD 活性的影响

通用 Tris-HCl 缓冲液(0.1 mol/L,pH 7.5)。大蒜油/DADS/DATS 经乙醇溶解,分别配制成大蒜油(50~200 μL/mL)、DADS/DATS(1.25~5 mmol/L)。G6PD(0.1 mg/mL)分别与大蒜油/DADS/DATS 以 1:1(V/V)混匀,37 ℃水浴 30 min,作为酶处理液。

G6PD 酶活测定体系,Tris-HCl 缓冲液 400 μL、*D*-葡萄糖-6-磷酸 100 μL(0.03 mg/mL)、NAD 溶液 20 μL(10 mg/mL),最后加入酶处理液 40 μL,加盖摇匀,迅速放入分子荧光光谱仪,激发波长 350 nm,每 5 s 记录 460 nm 荧光强度,连续测定 195 s。

1.2.3 DADS、DATS 对 G6PD 抑制类型分析 反应体系,Tris-HCl 缓冲液 120 μL、*D*-葡萄糖-6-磷酸 50 μL(0.01~0.05 mg/mL),NAD 溶液 10 μL(10 mg/mL),最后加入酶处理液 20 μL,加盖摇匀,立

即监测 340 nm 处吸光值。绘制 Lineweaver-Burk 双倒数图,判定抑制类型。

1.2.4 DADS、DATS 对 G6PD 蛋白的荧光淬灭

G6PD(0.5 mg/mL)与 DADS/DATS(0~5 mmol/L)等体积混合,分别在 298,308,318 K 水浴 10 min。取此溶液 100 μL,加入 Tris-HCl 缓冲液 400 μL,加盖摇匀,迅速放入分子荧光光谱仪,激发波长 280 nm,扫描 290~450 nm 范围的荧光光谱。

1.2.5 荧光淬灭机理分析 结合 Stern-Volmer 方程(1),在 298,308,318 K 下,以未处理的 G6PD 的荧光强度(F_0)与加入 DADS/DATS 后 G6PD 的荧光强度(F)的比值对 DADS/DATS 浓度($[Q]$)作图。

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

式中: K_{sv} ——淬灭常数; K_q ——淬灭速率常数; τ ——生物分子的平均荧光寿命(10^{-8} s)。

1.2.6 DADS、DATS 与 G6PD 的结合常数和热力学参数 以 $\lg[(F_0-F)/F]$ 对 $\lg[Q]$ 作图,根据式(2)可求结合常数(K_a)和结合位点数(n)。

$$\lg \frac{F_0-F}{F} = \lg K_a + n \lg [Q] \quad (2)$$

以 $\ln K_a$ 对 $1/T$ 作图,根据式(3)可求焓变 ΔH 、熵变 ΔS ,由式(4)可求吉布斯自由能变 ΔG 。

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (3)$$

$$\Delta G = -RT \ln K_a = \Delta H - T \Delta S \quad (4)$$

1.2.7 分子对接技术 G6PD 晶体结构取自 PDB 蛋白数据库(PDBID:2BHL),DADS、DATS 的分子结构来自 ZINC 数据库(1531082,1633229)。利用软件 Autodock4.2 进行分子对接,使用拉马克遗传算法,选择自由能最低的结合模式分析,利用 PY-MOL 和 LIGPLOT 软件导出结果。

2 结果与分析

2.1 大蒜油的 GC-MS 分析

图 1 为大蒜油的总离子流图和质谱图,主要包含 2 种硫醚:DADS(图 1c 峰 1)、DATS(图 1c 峰 2)。DADS、DATS 保留时间分别为 4.9,6.8 min。图 1a 和图 1b 分别为保留时间 4.9,6.8 min 时的质谱图,质谱图中出现了质量/电荷比(m/z)为 41,73,113,146,178 的主要碎片, m/z 41 对应 $\text{CH}_2=\text{CH}-$

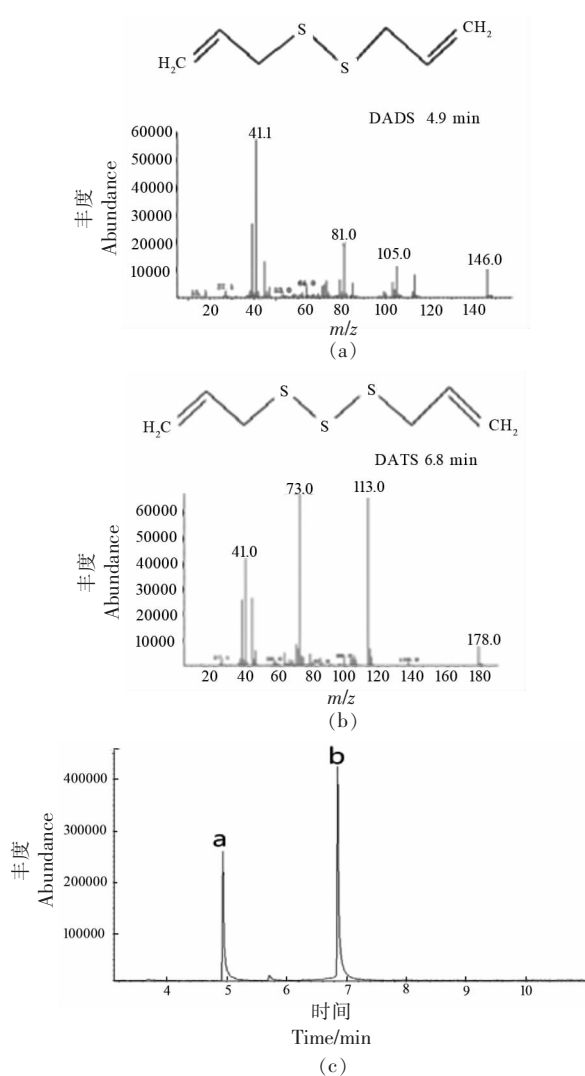


图 1 大蒜油总离子流图(TIC)(c)及 DADS(a)、DATS(b)的质谱图(MS)

Fig.1 Total ion current chromatogram (TIC) (c) and mass spectrum (MS) of DADS(a), DATS(b)

CH_2- , m/z 73 对应 $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}-$ 。146(Ma)和 178 (Mb) 分别为 DADS ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{S}_2$, 146) 和 DATS ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{S}_3$, 178) 的分子离子碎片。

2.2 大蒜油/DADS/DATS 对 G6PD 活性抑制作用

如图 2a~2c 所示, 利用分子荧光光谱仪实时监测了大蒜油对 G6PD 活性的影响, 荧光强度与酶活成正比, 发现 50~200 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 的大蒜油具有部分抑制 G6PD 活性作用。进一步考察大蒜油主要成分 DADS/DATS 对 G6PD 活性的影响, 1.25~5 mmol/L 的 DADS/DATS 均具有抑制 G6PD 活性的作用, 且呈浓度依赖关系。

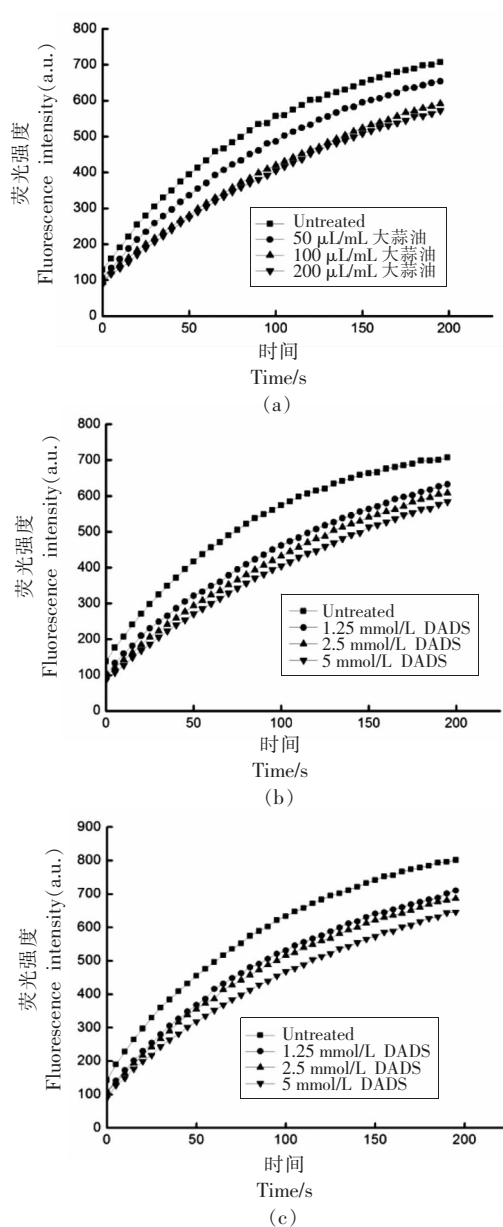


图 2 不同浓度的大蒜油(a)、DADS(b)、DATS(c)对 G6PD 活性影响

Fig.2 Impact on G6PD activity of different concentrations of garlic oil (a), DADS (b), DATS (c)

2.3 DADS/DATS 对 G6PD 的抑制类型

Lineweaver-Burk 双倒数曲线, 如图 3a 和 3b, 在反应体系中加入不同浓度的 DADS/DATS 后得到一簇斜率不同, 交于第二象限的直线。交点未落在 X 轴(非竞争性抑制)或者 Y 轴(竞争性抑制), 判断 DADS/DATS 对 G6PD 的抑制类型为可逆抑制中的混合性抑制, 即兼具竞争性抑制和非竞争性抑制。说明 DADS/DATS 可通过两种方式对

G6PD 产生抑制:一种方式是与底物竞争 G6PD 的结合位点产生竞争性抑制,另一种方式是和 G6PD

的非活性部位结合形成复合物产生非竞争性抑制。

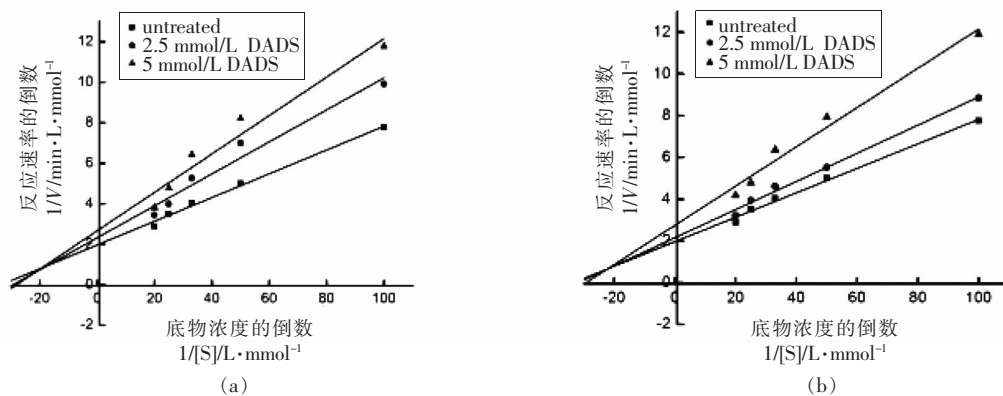


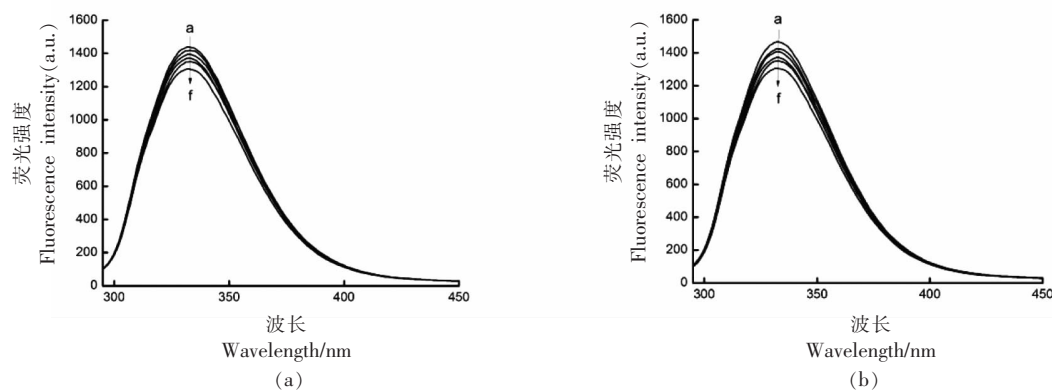
图3 DADS(a)/DATS(b)对 G6PD 抑制的 Lineweaver-Burk 图

Fig.3 Lineweaver-Burk plots for G6PD inhibition types of DADS (a)/DATS (b)

2.4 DADS/DATS 对 G6PD 的荧光淬灭

图 4a 和 4b 为 298 K 时不同浓度的 DADS/DATS 作用下的 G6PD 的荧光光谱,随着 DADS/

DATS 浓度(0~5 mmol/L)的增大,333 nm 处 G6PD 蛋白的荧光强度逐步降低,说明 DADS/DATS 与 G6PD 蛋白产生了相互作用,导致了荧光的淬灭。



注:a-f $C_{\text{DADS/DATS}}=0,1,2,3,4,5$ mmol/L; $\lambda_{\text{ex}}=280$ nm。

图4 不同浓度的 DADS(a)/DATS(b)作用下的 G6PD 荧光光谱

Fig.4 Fluorescence spectra of G6PD with different concentrations of DADS (a)/DATS (b)

2.5 DADS/DATS 对 G6PD 的荧光淬灭机理

荧光淬灭分为动态淬灭和静态淬灭,为判断其淬灭类型,分别在 298,308,318 K 3 个温度下,以 F_0/F 对 $[Q]$ (方程式 1)作图,绘制 Stern-Volmer 曲线,如图 5a 和 5b。由曲线的斜率可求 K_{sv} 和 K_q ,列于表 1。对于 DADS/DATS 而言,随着温度的升高, K_{sv} 值减小,且 K_q 值均大于淬灭剂对大分子物质的最大碰撞速率常数 2×10^{10} mol/L/s。因此,

DADS/DATS 对 G6PD 蛋白的荧光淬灭属于静态淬灭。

2.6 DADS/DATS 与 G6PD 相互作用的结合常数和结合位点数

分别在 298,308,318 K 3 个温度下,以 $\lg[(F_0-F)/F]$ 对 $\lg[Q]$ (方程式 2)作图,如图 6a 和 6b。通过曲线截距和斜率可求 DADS/DATS 与 G6PD 的结合常数 K_a 和结合位点数 n ,如表 2。所有 n 值

均接近于 1,说明 DADS/DATS 和 G6PD 之间存在一个结合位点。在 308,318 K 时,DADS 的 K_a 值大

于 DATS 的 K_a 值,说明在 308,318 K 时,DADS 与 G6PD 之间的结合力较强。

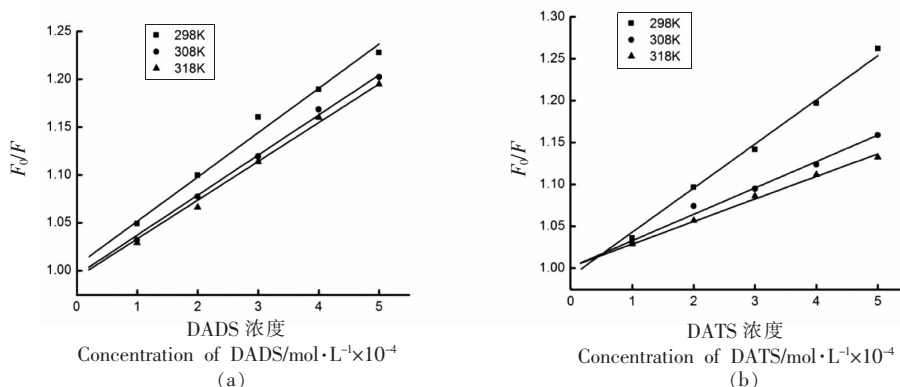


图 5 不同温度下 DADS(a)/DATS(b)与 G6PD 相互作用的 Stern-Volmer 曲线

Fig.5 Stern-Volmer curves of the interaction between DADS (a)/DATS (b) and G6PD at different temperatures

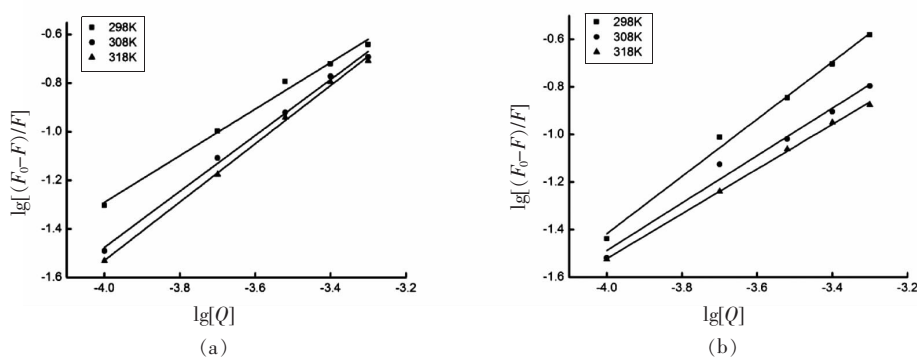


图 6 不同温度下 DADS(a)/DATS(b)与 G6PD 相互作用的双对数曲线

Fig.6 Double logarithmic curves of the interaction between DADS (a)/DATS (b) and G6PD at different temperatures

表 1 不同温度下 DADS/DATS 与 G6PD 相互作用的 K_{SV} 和 K_q 值

Table 1 K_{SV} and K_q values of the interaction between DADS/DATS and G6PD at different temperatures

| | 温度 T/K | 淬灭常数 | 速率常数 |
|------|----------|---|---|
| | | $K_{SV} \times 10^2 / \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ | $K_q \times 10^{10} / \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ |
| DADS | 298 | 4.64 | 4.64 |
| | 308 | 4.19 | 4.19 |
| | 318 | 4.06 | 4.06 |
| DATS | 298 | 5.26 | 5.26 |
| | 308 | 3.15 | 3.15 |
| | 318 | 2.69 | 2.69 |

表 2 不同温度下 DADS/DATS 与 G6PD 相互作用的 K_a 和 n 值

Table 2 K_a and n values of the interaction between DADS/DATS and G6PD at different temperatures

| | 温度 T/K | 结合常数 | 结合位点数 |
|------|----------|--|--------|
| | | $K_a \times 10^3 / \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ | n |
| DADS | 298 | 0.35 | 0.9586 |
| | 308 | 1.34 | 1.1506 |
| | 318 | 1.85 | 1.1993 |
| DATS | 298 | 2.51 | 1.2041 |
| | 308 | 0.32 | 0.9976 |
| | 318 | 0.18 | 0.9416 |

2.7 DADS/DATS 与 G6PD 相互作用的热力学参数和作用力

淬灭剂小分子与生物大分子之间可通过氢键、静电作用力、疏水相互作用和范德华力等相互作用。可通过反应的焓变 ΔH 、熵变 ΔS 、吉布斯自由能变 ΔG 来判断作用力类型。以 $\ln K_a$ 对 $1/T$ (方程式 3) 作图,如图 7a 和 7b。可通过曲线斜率和截距求出 ΔH 和 ΔS ,再根据热力学方程(方程式 4)可求 ΔG ,热力学参数列于表 3。对于 DADS, $\Delta H > 0$,且 $\Delta S > 0$,说明 DADS 和 G6PD 主要是通过疏水相互作用结合的;对于 DATS, $\Delta H < 0$,且 $\Delta S < 0$,说明 DATS 和 G6PD 主要是通过氢键和范德华力结合的。 ΔG 值均小于 0,说明 DADS/DATS 与 G6PD 相互作用都是自发进行的。

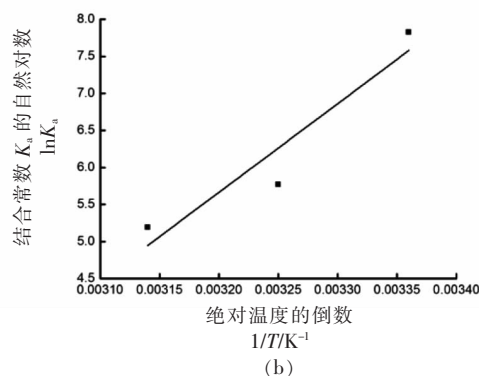
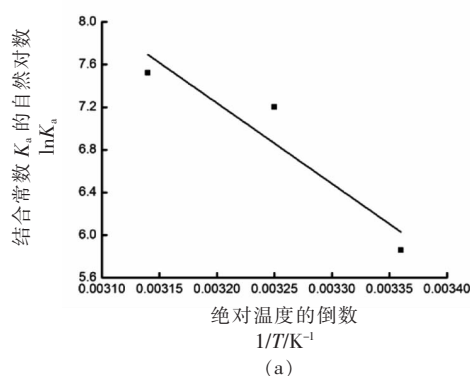


图 7 不同温度下 DADS(a)/DATS(b)与 G6PD 相互作用的 Van't Hoff 曲线

Fig.7 Van't Hoff curves of the interaction between DADS (a)/DATS (b) and G6PD at different temperatures

2.8 DADS/DATS 与 G6PD 蛋白的分子对接

进一步利用分子对接技术解释 DADS/DATS 与 G6PD 的相互作用机制。在对接结果中选择结合能最低的构象作为最优,进一步分析相互作用机制。结果表明 DADS 和 DATS 均可进入 G6PD 分子内部。其中 DADS 与 G6PD 结合能为 -2.69 kcal/mol,结合性能较好,见表 4。

DADS 与 G6PD 结合的 3D 图和 2D 图,如图 8a 和 8b,揭示出 DADS 与 G6PD 蛋白结合位点周围存在多个贡献较大的氨基酸残基。Ala-377、Val-376、Phe-216、Gly-222、Phe-221、Pro-223 等疏水性氨基酸残基可通过疏水作用与 DADS 结合,Arg-219、Asn-218、Lys-275、Arg-215、Trp-225 等极性氨基酸残基可通过静电吸引与 DADS 结合。

表 3 不同温度下 DADS/DATS 与 G6PD 作用的热力学参数

Table 3 Thermodynamic parameters of the interaction between DADS/DATS and G6PD at different temperatures

| | T/K | 焓变 ΔH / KJ·mol ⁻¹ | 熵变 ΔS / J·mol ⁻¹ · K ⁻¹ | 吉布斯自由能 变 ΔG / KJ·mol ⁻¹ |
|------|-----|---|---|--|
| DADS | 298 | | | -15.02 |
| | 308 | 62.92 | 261.53 | -17.63 |
| | 318 | | | -20.25 |
| DATS | 298 | | | -18.66 |
| | 308 | -99.58 | -271.56 | -15.94 |
| | 318 | | | -13.22 |

表 4 DADS/DATS 与 G6PD 蛋白分子对接的结合能

Table 4 The binding energies of the docking of DADS/DATS and G6PD

| 大蒜硫醚 | 结合自由能 E_b / kcal·mol ⁻¹ | 范德华力 E_{vdw} / kcal·mol ⁻¹ | 静电作用力 E_{ele} / kcal·mol ⁻¹ |
|------|--|---|--|
| DADS | -2.69 | -4.15 | -0.03 |
| DATS | -2.61 | -4.35 | -0.05 |

图 8c 和 8d 分别是 DATS 与 G6PD 结合的 3D 图和 2D 图。同样地,Phe-253、Gly-254、Ala-335、Ile-472、Ile-255、Leu-469、Leu-305 等疏水性氨基酸残基与 Arg-175、Lys-476、Arg-257、Thr-334、Thr-333、Glu-473 等极性氨基酸残基,分别对 DATS 形成疏水作用和静电吸引;且 Phe235 还可

与 DATS 中心位置的 S 形成氢键,键长为 3.2\AA ,作用力以氢键为主。这些结果与热力学分析表明的 DADS/DATS 和 G6PD 相互作用的结论相吻合。因此,DADS 与 G6PD 通过疏水作用和静电吸引等方

式实现相互作用的,以疏水相互作用为主;DATS 与 G6PD 通过疏水作用、静电吸引、氢键等方式实现相互作用,以氢键为主,进而实现 DADS/DATS 对 G6PD 活性的抑制。

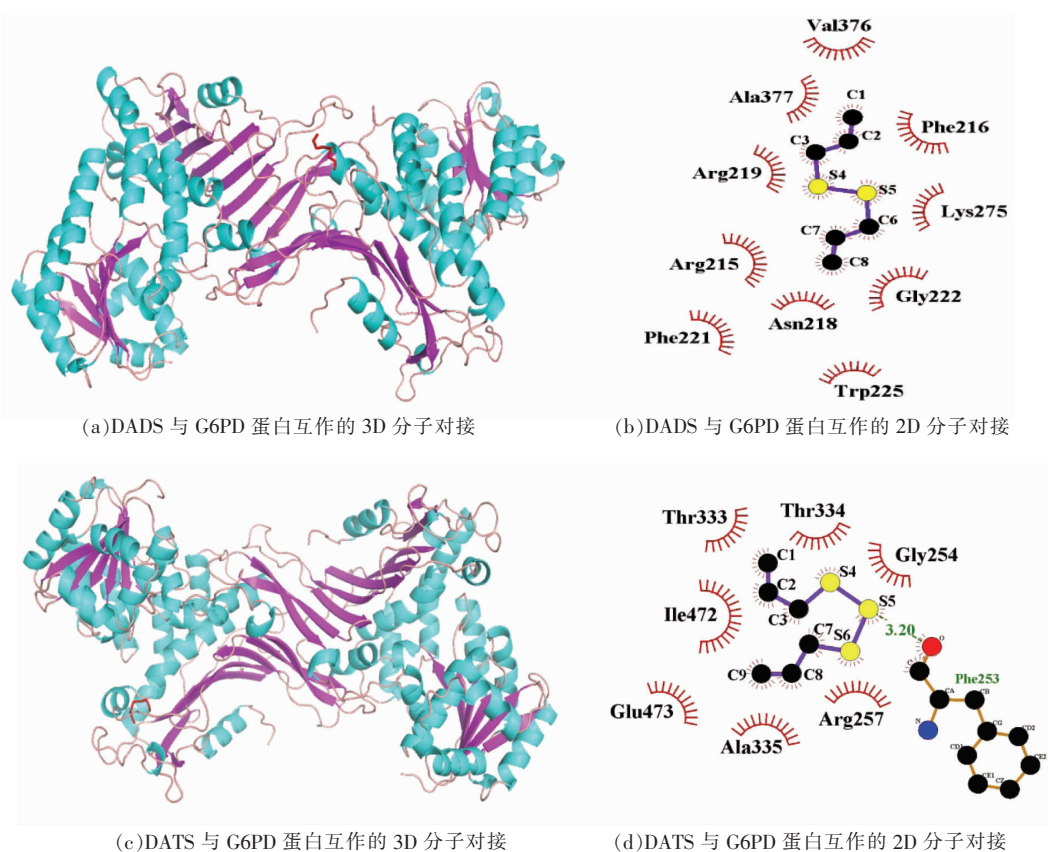


图 8 DADS 和 DATS 分别与 G6PD 相互作用的分子对接图

Fig.8 Molecular docking of G6PD interacted with DADS and DATS

3 结论

本研究从大蒜中提取了大蒜油并通过酶活实时监测、酶动力学分析、荧光光谱法以及分子对接等技术研究了 DADS/DATS 与 G6PD 蛋白的相互作用机制。结果表明,DADS/DATS 均可部分抑制 G6PD 的活性,且该抑制作用属于混合性抑制;DADS/DATS 均可使 G6PD 蛋白产生内源荧光淬灭,且为静态淬灭;分子荧光光谱和 3D/2D 分子对接技术共同揭示了 DADS 与 G6PD 以疏水作用和静电力相互作用,且以疏水作用为主,DATS 与 G6PD 蛋白以疏水作用、静电力和氢键相互作用,且以氢键为主。

参 考 文 献

- [1] CHAN J Y Y, TSUI H T, CHUNG I Y M, et al. Allicin protects rat cardiomyoblasts (H9c2 cells) from hydrogen peroxide-induced oxidative injury through inhibiting the generation of intracellular reactive oxygen species[J]. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2014, 65(7): 868-873.
- [2] JANG H J, LEE H J, YOON D K, et al. Antioxidant and antimicrobial activities of fresh garlic and aged garlic by-products extracted with different solvents[J]. Food Science and Biotechnology, 2017, 27(1): 219-225.
- [3] CASELLA S, LEONARDI M, MELAI B, et al. The role of diallyl sulfides and dipropyl sulfides in the

- vitro antimicrobial activity of the essential oil of garlic, *Allium sativum* L. and leek, *Allium porrum* L.[J]. *Phytotherapy Research*, 2013, 27(3): 380–383.
- [4] SARAY Q F, DANIEL O S, MANUEL V C, et al. Alliin, a Garlic (*Allium sativum*) compound, prevents LPS -induced inflammation in 3T3 -L1 adipocytes[J]. *Mediators Inflammation*, 2013, 12(1): 1–11.
- [5] JIN P, KIM J A, CHOI D Y, et al. Anti-inflammatory and anti-amyloidogenic effects of a small molecule, 2,4-bis (p-hydroxyphenyl)-2-butenal in Tg2576 Alzheimer's disease mice model[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2013, 10(1): 1–13.
- [6] LI Z, LE W, CUI Z. A novel therapeutic anticancer property of raw garlic extract via injection but not ingestion[J]. *Cell Death Discovery*, 2018, 4(108): 1–10.
- [7] LU Y, HE Z, SHEN X, et al. Cholesterol-lowering effect of allicin on hypercholesterolemic ICR mice[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012(14): 1–6.
- [8] MORIHARA N, HINO A, YAMAGUCHI T, et al. Aged garlic extract suppresses the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice[J]. *The Journal of Nutrition*, 2016, 146(2): 460S–463S.
- [9] PATEL D K, PRASAD S K, KUMAR R, et al. An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property[J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2012, 2: 320–330.
- [10] 孟令仪, 张晶莹, 宋忻恬, 等. 高峰大蒜油降血脂功能研究[J]. *中国卫生工程学*, 2016, 15(3): 247–249.
- MENG L Y, ZHANG J Y, SONG X T, et al. Study on the function of lowering blood lipid of garlic oil[J]. *Chinese Journal of Public Health Engineering*, 2016, 15(3): 247–249.
- [11] RIED K, FAKLER P. Potential of garlic (*Allium sativum*) in lowering high blood pressure: Mechanisms of action and clinical relevance[J]. *Integrated Blood Pressure Control*, 2014, 7: 71–82.
- [12] 刘玲, 陈瑜璐, 张瑶, 等. 大蒜烯丙基硫化物的分离鉴定及抗氧化性[J]. *农业工程学报*, 2015, 12(31): 268–274.
- LIU L, CHEN L L, ZHANG Y, et al. Isolation determination of garlic allyl sulfides and their antioxidant activity[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2015, 12(31): 268–274.
- [13] 白冰, 陈瑜璐, 李巧莲, 等. 鲜蒜嫩鳞被中半胱氨酸肽的制备及其对豆类铁锌生物利用率的影响[J]. *分析化学*, 2014, 42(10): 1507–1512.
- BAI B, CHEN L L, LI Q L, et al. Preparation and functional exploration of cysteine peptides from fresh garlic scales for improving bioavailability of food legume iron and zinc[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2014, 42(10): 1507–1512.
- [14] PATRA K C, HAY N. The pentose phosphate pathway and cancer[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2014, 39(8): 347–354.
- [15] JANG P, DU W, WU M. Regulation of the pentose phosphate pathway in cancer[J]. *Protein Cell*, 2014, 5(8): 592–602.
- [16] HORECKER B L. The pentose phosphate pathway[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(50): 47965–47971.
- [17] DU W J, JIANG P, MANCUSO A, et al. TAp73 enhances the pentose phosphate pathway and supports cell proliferation[J]. *Nature Cell Biology*, 2013, 15(8): 991–1000.
- [18] LIN R, ELF S, KANG H B, et al. 6-Phosphogluconate dehydrogenase links oxidative PPP, lipogenesis and tumour growth by inhibiting LKB1-AMPK signalling[J]. *Nature Cell Biology*, 2015, 17(10): 1484–1496.
- [19] JONES N P, SCHULZE A. Targeting cancer metabolism—aiming at a tumour's sweet-spot[J]. *Drug Discovery Today*, 2012, 17(5/6): 232–241.
- [20] ZHAO Z B, LIU Y, YAO Y. Computational determination of binding structures and free energies of glucose 6 -phosphate dehydrogenase with novel steroid inhibitors[J]. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 2014, 51(6): 168–172.
- [21] GIRON R A, MONTANO L F, ESCOBAR M L, et al. Dehydroepiandrosterone inhibits the proliferation and induces the death of HPV-positive and HPV-negative cervical cancer cells through an androgen- and estrogen-receptor independent mechanism[J]. *The FEBS Journal*, 2010, 276(19): 5598–5609.
- [22] 张轩. 酶促超声提取大蒜中大蒜油及其抗氧化性能的研究[J]. *食品科技*, 2019, 44(2): 239–244.
- ZHANG X. Ultrasonic-assisted enzymatic extraction

- and antioxidant activity of garlic oil from garlic[J]. Food Science and Technology, 2019, 44(2): 239-244.
- [23] 刘阳, 李莎莉, 吴琦, 等. 大蒜挥发油提取工艺优化及 GC-MS 分析[J]. 中国调味品, 2018, 43(8): 118-121.
- LIU Y, LI S S, WU Q, et al. Optimization on extraction process and GC-MS analysis of garlic volatile oil[J]. China Condiment, 2018, 43(8): 118-121.

Inhibitory Action of Garlic Thioether on Glucose 6 Phosphate Dehydrogenase

Lü Hang¹, Ke Qin², Tan Dehong¹, Zhou Qian¹, Wu Zhaoxia¹, Ji Shujuan¹, Bai Bing^{1*}

¹College of Food, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866

²Affiliated Hospital of Chifeng University, Chifeng 024005, Inner Mongolia)

Abstract Garlic oil was extracted from garlic and qualitatively analyzed by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). Using enzyme activity real-time monitoring technology, it was revealed that Garlic oil, diallyl disulfide (DADS) and diallyl trisulfide (DATS) had partial inhibitory effects on glucose 6 phosphate dehydrogenase (G6PD) activity, and the inhibition was a mixed inhibition of competitive and non-competitive by enzymatic reaction kinetics; Molecular fluorescence technique analysis further showed that DADS/DATS had static quenching effect on G6PD, and there was a binding site for DADS/DATS and G6PD protein; Thermodynamic analysis revealed that the DADS-G6PD system was mainly combined through hydrophobic interactions, and the DATS-G6PD system was mainly combined through hydrogen bond and van der Waals force; 3D molecular docking and 2D molecular docking techniques further confirmed that DADS/DATS could enter the G6PD molecule, and the binding performance of DADS and G6PD was better; DADS could form hydrophobic interactions with Ala-377, Val-376, Phe-216, Gly-222, Phe-221, Pro-223 and other hydrophobic amino acid residues around the G6PD binding site, and interacted with Arg-219, Asn-218, Lys-275, Arg-215, Trp-225 and other polar amino acid residues formed electrostatic attraction, and hydrophobic interactions were dominant. DATS could form hydrophobic interactions with Phe-253, Gly-254, Ala-335, Ile-472, Ile-255, Leu-469, Leu-305 and other hydrophobic amino acid residues around the G6PD binding site, and interacted with Arg-175, Lys-476, Arg-257, Thr-334, Thr-333, Glu-473 and other polar amino acid residues formed electrostatic attraction. In addition, S in the center of DATS could form a hydrogen bond with Phe235 of G6PD, with a bond length of 3.2 Å. Hydrophobic interaction, electrostatic force and hydrogen bonding were the main modes of action of DADS/DATS on G6PD.

Keywords glucose 6 phosphate dehydrogenase; diallyl disulfide; diallyl trisulfide; molecular docking; mechanism