

3 种黄酮类化合物对胰脂肪酶的抑制作用及其结合机制

张 炎, 康 柱, 苏冬雨, 张瀛心, 班晨宇, 刘 伟, 周素珍, 范金波*

(渤海大学食品科学与工程学院 辽宁省食品安全重点实验室

生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心 辽宁锦州 121013)

摘要 探究小分子对胰脂肪酶(PL)的抑制作用已成为体外筛选具有抗肥胖作用活性成分的重要方法。采用分子对接法从黄酮类化合物中筛选具有强结合作用的活性成分,通过酶动力学研究抑制活性和抑制类型,结合荧光光谱法研究活性成分与 PL 的结合反应及机制。通过体外筛选得到 3 种黄酮类化合物:黄芩素(Bai)、槲皮素(Que)和漆黄素(Fis)。分子对接结果表明,3 种黄酮类化合物与 PL 的结合位于催化位点 Ser153-His264-Asp177 残基附近,主要作用力为疏水相互作用和氢键。Bai、Que 和 Fis 对 PL 抑制活性呈现剂量依赖性,其 IC_{50} 分别为 49.14, 57.78, 61.26 $\mu\text{g/mL}$ 。抑制动力学表明: Bai 和 Fis 对 PL 为竞争型抑制,而 Que 属于混合型抑制。荧光光谱法研究表明: 3 种黄酮类化合物对 PL 猝灭均属于静态猝灭,结合常数均大于 10^5 数量级,说明 Bai、Que 和 Fis 均与 PL 形成稳定的复合物。热力学参数分析表明: Bai 与 PL 结合主要作用力为氢键和范德华力, Que、Fis 和 PL 结合主要通过疏水相互作用。本研究将为开发新型 PL 抑制剂提供新思路。

关键词 黄芩素; 槲皮素; 漆黄素; 胰脂肪酶; 酶动力学; 荧光光谱

文章编号 1009-7848(2024)07-0060-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.07.006

肥胖不仅影响外表,还会导致单独或相关疾病,如高脂血症、高血压、冠心病、II 型糖尿病和其它严重疾病^[1-2]。身体活动少,饮食过量和摄入富含脂肪的食物是肥胖的主要原因^[3-4]。脂质代谢过程中,胰脂肪酶(Pancreatic lipase, PL)是有效消化甘油三酯最重要的酶。因此,通过抑制 PL 活性来抑制甘油三酯吸收,已成为预防肥胖的主要途径^[5-6]。目前,已开发许多 PL 抑制剂,大致可分为以下几类:合成化学品、可溶性微生物产物和天然植物提取物。如 2-氧代酰胺三酰甘油类似物、奥利司他和杉叶蕨藻、荷叶或葡萄藤中分离的提取物^[7]。

黄酮类化合物是植物化学物质中最大的家族,包括黄酮、黄酮醇、异黄酮、查耳酮和花色素等亚类^[8-9]。广泛分布于水果、蔬菜、谷物等物质中。黄酮类化合物因能够降低体重、血脂和胆固醇而被认为在预防和治疗肥胖症中发挥重要作用^[10-11]。黄芩素(Baicalein, Bai)、槲皮素(Quercetin, Que)、漆黄素(Fisetin, Fis)均属于黄酮类化合物。其中, Bai

是从黄芩中分离得到的,存在于黄芩的根中。动物和人摄入 Bai 后,主要代谢转化为黄芩苷^[12]。Wang 等^[13]报告表明 Bai 可以显著降低 PA 处理的 HepG2 细胞中的甘油三酯水平和脂质积累,包括抑制脂肪生成途径和预防血脂异常。人类每天 Que 平均摄入量约为 25 mg, Zhou 等^[14]体外试验表明 Que 在胰脂肪酶活性口袋附近有一个结合位点,体内实验表明,预给药 5 mg/kg bw 和 10 mg/kg bw, Que 可显著减少大鼠脂肪吸收, Que 对脂肪酶的抑制作用在体内至少能持续 2 h。Fis 常见于草莓、苹果、柿子等水果中。在细胞培养和与人类疾病相关的动物模型中具有抗癌和神经保护作用^[15]。

近年来,研究发现多酚对 PL 具有抑制活性,其主要原因是酚类化合物的羟基与酶催化位点之间的相互作用,在很大程度上决定其与酶结合的亲和力^[16]。目前,治疗肥胖的药物主要通过减少热量摄入并改善饮食效果来发挥作用,常因不良副作用而导致治疗中断^[17]。本文以黄酮类化合物为主,筛选符合 PL 外周靶点的新配体,通过分子筛选确定抑制剂结合位点,采用酶动力学特征和荧光光谱法研究抑制剂对 PL 的结合机制,以阐明这种结合如何影响酶构象的变化。

收稿日期: 2023-07-05

基金项目: 教育部中外语言交流合作中心 2021 国际中文教育创新项目(21YH009CX5)

第一作者: 张炎,女,硕士生

通信作者: 范金波 E-mail: jinbo_fan@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

胰脂肪酶(猪胰腺,15~35 units/mg)、4-硝基苯丁酸酯(4-Nitrophenyl butyrate,p-NPB 98%)、对硝基苯酚(p-Nitrophenol,pNP 98%),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;Bai(98%)、Que(98%)、Fis(98%),上海源叶生物科技有限公司;无水乙醇、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠(分析纯级),天津市北辰方正试剂厂。

1.2 仪器与设备

PE Victor X3 多功能酶标仪,珀金埃尔默企业管理(上海)有限公司;ZD-2 雷磁自动电位滴定仪,上海仪电科学仪器股份有限公司;F-7000 荧光分光光度计,日本日立高新技术公司。

1.3 方法

1.3.1 PL 抑制剂体外筛选 为寻找 PL 活性位点的最佳抑制剂,体外筛选 127 种黄酮类化合物,根据打分函数从高到低依次排列挑选前 3 位配体。利用 AutoDock 4.0 对接程序分析 Bai、Que、Fis 以及底物 p-NPB 如何与 PL 结合。PL(ID:1ETH)和 3 种配体 Bai (CID:5281605)、Que(CID:5280343)、Fis(CID:5281614)的晶体结构分别从蛋白数据库 RCSB PDB 和 PubChem 下载,在分子对接前对受体预处理:去水加氢,网格尺寸设置为 81 Å×61 Å×131 Å,以覆盖 PL 所有活性位点氨基酸残基,采用半柔性对接机制,其它对接参数都保留为默认参数^[8],选择最低对接构象进行研究。

1.3.2 Bai、Que 和 Fis 对 PL 抑制活性的测定 PL 活性测定参考 George 等^[9]的方法并稍作修改。取 1.5 mL 离心管,依次加入 PBS 缓冲溶液(pH 7.4),5 mL/mg 的 PL 储备液 300 μL,再加入(160~200 μL,150~200 μL,180~220 μL)1 mmol/L 的 3 组待测样品溶液(乙醇溶解),PBS 缓冲溶液稀释至 850 μL,37 °C 水浴 15 min 后,立即加入 10 mmol/L p-NPB 150 μL(已腈溶解),反应混合物中乙醇和已腈的最终体积分数均不超过 15%。溶液总量为 1 mL,摇匀使其充分反应后,再次 37 °C 水浴 15 min 后,终止反应。将反应混合物迅速转移到 96 孔酶标板上,每个孔重复 3 次,在波长 405 nm 处测吸光值。PL 抑制活性(%)计算公式如下:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{AE-AT}{AE} \times 100 \quad (1)$$

式中:AE 为酶对照时的吸光度(不含抑制剂);AT 为有抑制剂时与相应对照组吸光度之差。通过 GraphPad Prism 8 绘制线性回归曲线计算 IC₅₀。

1.3.3 Bai、Que 和 Fis 对 PL 抑制类型的测定 采用双倒数法测定抑制类型:固定体积浓度为 5 mL/mg 的 PL,样品浓度为 IC₅₀ 近似值,最后加入浓度为 4,5,6,8,10 mmol/L p-NPB,溶液体积总量为 1 mL,按照 1.3.2 节试验组进行反应。以不加样品组作为对照组。根据 pNP 标准曲线 $Y = 0.0072X + 0.0404, R^2 = 0.9993$ 计算反应速率。

1.3.4 Bai、Que 和 Fis 与 PL 相互作用的荧光光谱

3 组样品对 PL 的猝灭效果根据文献^[20]稍作修改。取 7 支规格为 5 mL 的离心管,将固定体积浓度 5 mL/mg 的 PL 分别加入到不同浓度的 3 组样品中,用 PBS 缓冲溶液稀释至 3 mL。在 298 K 和 310 K 下避光反应 30 min,扫描次数为 3,记录荧光参数:激发和发射狭缝宽度为 2.5 nm 和 5.0 nm;激发波长 280 nm。获得 290~450 nm 荧光数据通过公式(2)进行校正,以消除荧光内滤对 Bai、Que 和 Fis 的影响^[21]。

$$F_c = F_m e^{(A_1 + A_2)/2} \quad (2)$$

式中: F_m 和 F_c 为校正前、后荧光值; A_1 和 A_2 为在波长 280 nm 和 290~450 nm 处的紫外吸光值。

1.3.5 同步荧光光谱的测定 测定 3 组样品同步荧光光谱时,扫描波长分别为 $\Delta\lambda = 15$ nm 和 $\Delta\lambda = 60$ nm。发射数据记录在 240~340 nm。在扫描前,3 组样品避光反应 30 min。其它参数与荧光猝灭光谱相同。

1.4 数据处理

试验重复 3 次,结果表示为“平均值±标准差”。运用 Excel 进行数据处理,之后使用 Origin 2018 和 GraphPad Prism 8 软件绘图。

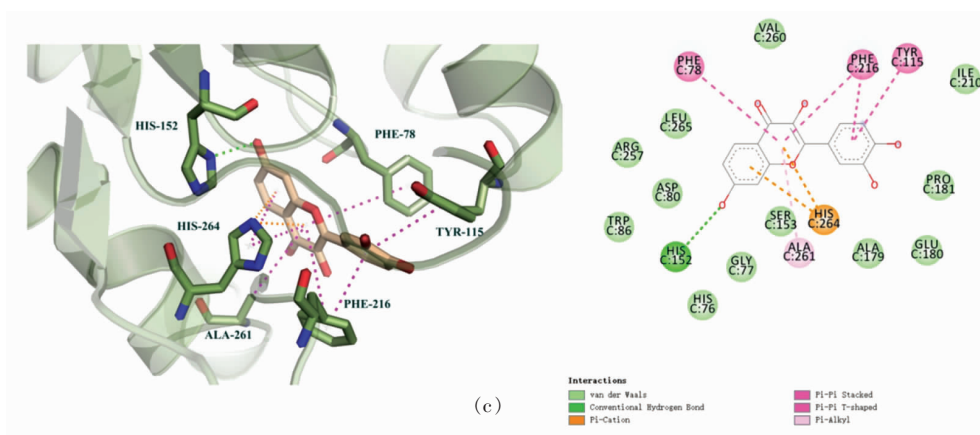
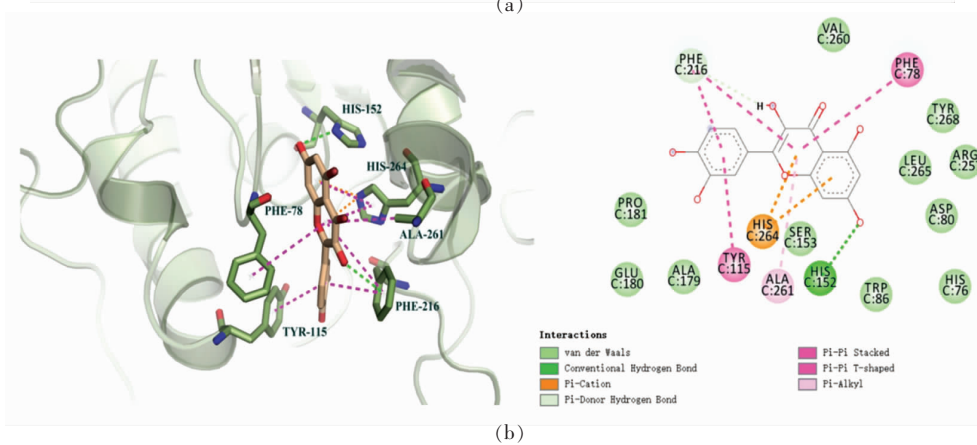
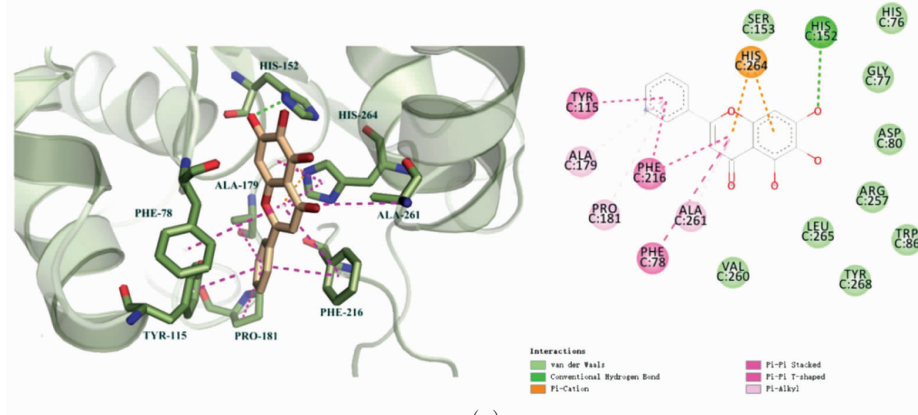
2 结果与分析

2.1 Bai、Que 和 Fis 与 PL 分子对接结果

分子对接可以为在分子水平上研究配体与 PL 之间的相互作用提供一个可见的、具体的视

角^[22]。根据对接结果,结合能打分前3位依次为 Bai(-10.7 kcal/mol)、Que(-9.9 kcal/mol)、Fis(-9.8 kcal/mol)。Bai、Que 和 Fis 与 PL 的吉布斯自由能分别为-44.79, -41.44, -41.02 kJ/mol, 解释了结合自由能越低,配体与其受体的结合越稳定^[23]。由图 1a 可知,当与 PL 结合时,Bai 被 His152 通过氢键包围,Tyr115、Ala179、Pro181、Phe216、Phe78、Ala261 残基通过疏水相互作用包围。由图 1b 可知,Que 被 Phe216、Tyr115、His264、Ala261、His152、Phe78 共 6 个氨基酸残基包围,主要通过疏水相互作用与 Phe216、Tyr115、Ala261 和 Phe78 结合,特殊的

是残基 Phe216 又通过氢键与 Que 结合。由图 1c 可知,Fis 同样通过疏水相互作用与 Phe78、Ala261、Phe216、Tyr115 结合。这也解释了两者吉布斯自由能差异微小的原因。由图 1d 可知,底物与残基 Phe216、Pro181、Tyr115、His264、Ala261 通过疏水相互作用相结合,与残基 Ser153 的作用力主要为氢键。研究发现 PL 的催化位点为 Ser153-His264-Asp177^[24]。根据对接结果,PL 活性位点附近的氨基酸 Ser152 和 His264 参与了相互作用,因此,PL 活性的降低可能与相互作用过程中结合的关键性氨基酸残基有关。



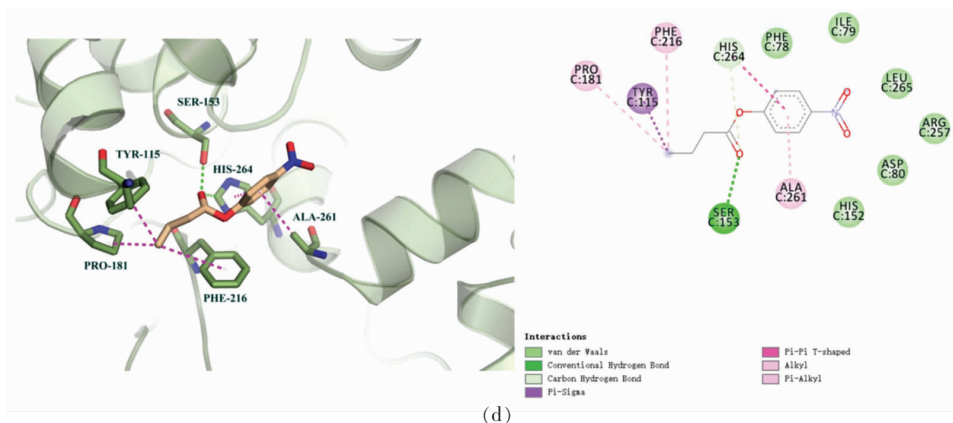


图 1 Bai(a)、Que(b)、Fis(c)和 p-NPB(d)与 PL 分子对接 3D 和 2D 构象图

Fig.1 Bai (a), Que (b), Fis (c) and p-NPB (d) docking with PL molecules 3D and 2D conformation diagrams

2.2 Bai、Que 和 Fis 对 PL 的抑制活性分析

Bai、Que 和 Fis 对 PL 的抑制率结果如图 2 所示。Bai、Que 和 Fis 对 PL 抑制活性呈剂量依赖性。

根据线性回归曲线计算 Bai、Que 和 Fis 的 IC₅₀ 值分别为 49.14, 57.78, 61.26 μg/mL, 表明黄酮类化合物与 PL 之间存在很强的相互作用。

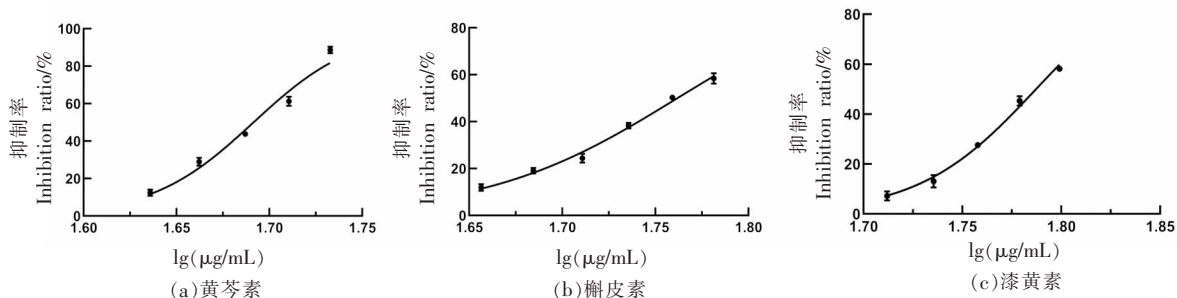


图 2 Bai、Que 和 Fis 对 PL 的抑制曲线

Fig.2 The inhibition curves of PL by Bai, Que and Fis

2.3 Bai、Que 和 Fis 对 PL 的抑制类型

抑制剂通过与酶结合使酶失活或降低, 通过动力学特征探究抑制剂类型^[25]。抑制剂对 PL 双倒

数图, 如图 3 所示。当 Bai 和 Fis 浓度增加到 IC₅₀ 值时, 两直线相交于 Y 轴, 横坐标截距值 K_m 增大, 纵坐标截距值 V_{max} 不变, 则 Bai 和 Fis 是典型的竞

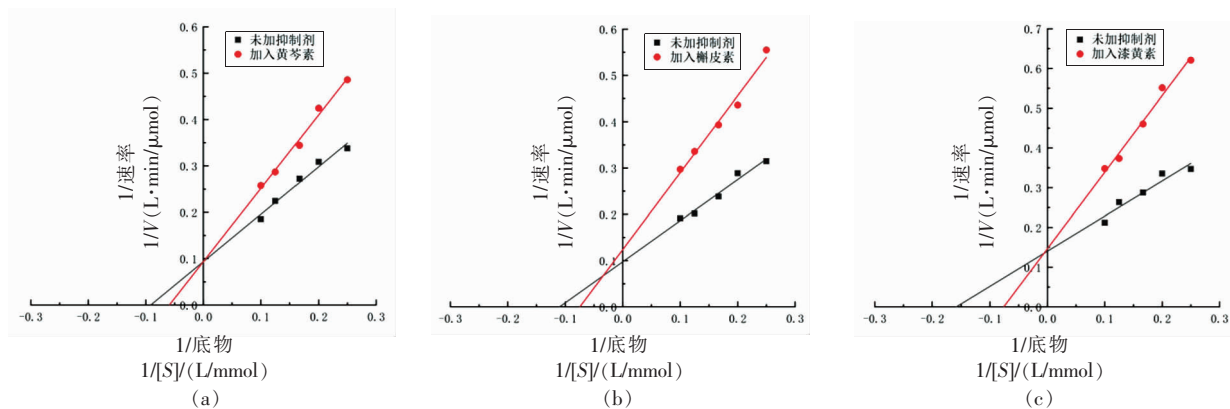


图 3 Bai(a)、Que(b)和 Fis(c)对 PL 的 Lineweaver-Burk 曲线

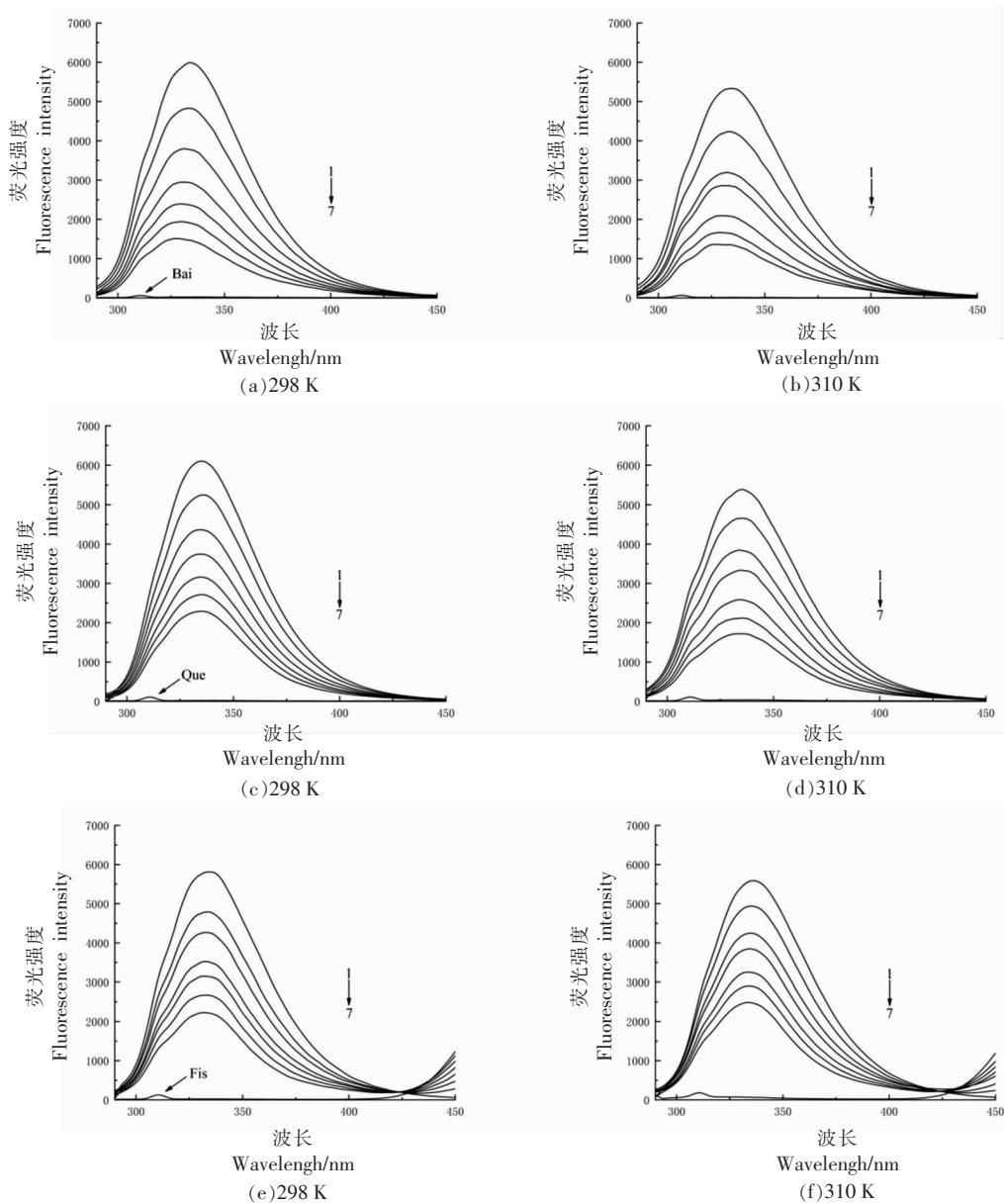
Fig.3 Lineweaver-Burk curves of Bai (a), Que (b) and Fis (c) against PL

争型抑制剂,这意味着 Bai 和 Fis 可以与酶的活性中心相互作用。酶抑制剂复合物的形成会干扰酶与底物的结合,从而降低酶的催化活性^[26]。在 Que 抑制剂的双倒数图中,两直线相较于象限内,Que 组 K_m 值为 13.37 mmol/L, V_{max} 值为 8.03 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$,对照组 K_m 值为 9.07 mmol/L, V_{max} 值为 10.10 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$, K_m 和 V_{max} 值相对于对照组发生变化,表明 Que 对 PL 的抑制是混合型。Martinez-Gonzalez 等^[27]研究也证实了 Que 对 PL 是混合型

抑制,归因于结构中羟基的增加,并解释当抑制剂存在时 K_m 值的变化意味着底物和抑制剂对各自位点的结合亲和力增加。验证分子对接过程中酶与底物结合位点对抑制剂竞争的影响。

2.4 Bai、Que 和 Fis 对 PL 荧光猝灭的影响

酪氨酸 (Tyrosine, Tyr)、色氨酸 (Tryptophan, Trp) 和苯丙氨酸 (Phenylalanine, Phe) 是蛋白质内在荧光团,它们负责蛋白质的内在荧光^[28]。通过检测荧光来获取 PL 微环境变化的信息。图 4 为 298



注:PL 质量浓度为 5 mg/mL, Bai、Que 和 Fis 浓度(1→7)依次为 0, 6.7, 13.3, 20, 26.7, 33.3, 40 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。

图 4 Bai(a,b)、Que(c,d)和 Fis(e,f)与 PL 结合的荧光发射光谱

Fig.4 Fluorescence emission spectra of Bai (a,b), Que (c,d) and Fis (e,f) binding to PL

K 和 310 K 条件下 Bai、Que 和 Fis 对 PL 荧光发射光谱图。由图可知,酶在波长 334 nm 附近处荧光发射值最大,主要来源于 Trp 和 Tyr 残基。而 Bai、Que 和 Fis 在此激发波长下的荧光值可忽略。在加入 3 种黄酮类化合物后,PL 随黄酮浓度的增加逐渐降低,并且随着 Bai 和 Fis 浓度增加,PL 峰值发生蓝移,而 Que 浓度增加,PL 发生红移,荧光数据表明这 3 种黄酮类化合物与 PL 结合,导致活性降低,并且改变了酶荧光团的微环境^[29]。当黄酮浓度为 4×10^{-5} mol/L 时,三者的荧光猝灭率大小依次为 Bai>Que>Fis,与测定 IC₅₀ 值顺序一致。在 298 K, Bai、Que 和 Fis 的质量浓度达到 10.81, 12.09, 11.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 三者的荧光猝灭率分别为

74.54%, 68.20%, 61.45%。

2.5 荧光猝灭机理与热力学分析

2.5.1 荧光猝灭机理 荧光猝灭数据的分析可用于确定荧光猝灭类型,计算结合常数、热力学参数和非辐射能量传递效率。根据 Stern-Volmer 方程(3)、Hill 方程(4)进行描述^[30]。

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

$$\lg(F_0/F - 1) = \lg K_a + n \lg [Q] \quad (4)$$

式中: F_0/F 为在最大发射波长处添加猝灭剂前、后 PL 荧光强度之比; K_q 、 K_a 为 PL 和配体猝灭速率常数和结合常数; τ_0 约为 10^{-8} s; $[Q]$ 为配体浓度(mol/L); n 为结合位点数目。

表 1 Bai、Que 和 Fis 与 PL 相互作用的猝灭常数、结合常数和结合位点

配体	T/K	$K_{sv}/(\text{L}/\text{mol})$	$K_q/[\text{L}/(\text{mol} \cdot \text{s})]$	R^a	$K_a/(\text{L}/\text{mol})$	R^b	n
Bai	298	6.32×10^4	6.32×10^{12}	0.9941	361×10^4	0.9989	1.393
	310	6.38×10^4	6.38×10^{12}	0.9934	169×10^4	0.9923	1.319
Que	298	3.75×10^4	3.75×10^{12}	0.9823	70.5×10^4	0.9994	1.284
	310	4.54×10^4	4.54×10^{12}	0.9900	101×10^4	0.9955	1.436
Fis	298	3.55×10^4	3.55×10^{12}	0.9791	14.0×10^4	0.9917	1.135
	310	2.81×10^4	2.81×10^{12}	0.9738	35.2×10^4	0.9978	1.245

注: R^a 为方程(3)拟合 K_{sv} 相关系数, R^b 为方程(4)拟合 K_a 相关系数。

相应计算结果如表 1 所示,在 298 K 和 310 K 时,3 种黄酮类化合物猝灭常数(K_q)均大于猝灭常数值 2.0×10^{10} L/(mol·s),表明 Bai、Que 和 Fis 对 PL 的猝灭机制为静态猝灭^[31]。在不同温度条件下,二者结合位点 n 近似等于 1,因此判断 3 种黄酮类化合物与 PL 可形成物质的量比为 1:1 的复合物,同时复合物的结合常数值均大于 10^5 L/mol,进一步证实二者间有强的结合行为。通常,随着 K_a 值的增加,复合物的亲和力变强,结果表明 Bai>Que>Fis,与荧光发射光谱分析结果一致。

2.5.2 热力学性质探究 通过热力学参数进一步研究了 Bai、Que 和 Fis 与 PL 的结合方式,利用热力学方程(5)和(6)对不同温度下的发射荧光数据进行分析^[32]。

$$\ln(K_2/K_1) = \Delta H(1/T_1 - 1/T_2)/R \quad (5)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K_a \quad (6)$$

式中: K_1 、 K_2 为 T_1 (298 K)、 T_2 (310 K) 的结合常数; R 为热力学常数值,8.314 J/(mol·K); ΔH 为焓变,kJ/mol; ΔS 为熵变,J/(mol·K); ΔG 为吉布斯自由能,kJ/mol。

表 2 Bai、Que 和 Fis 与 PL 相互作用的热力学常数

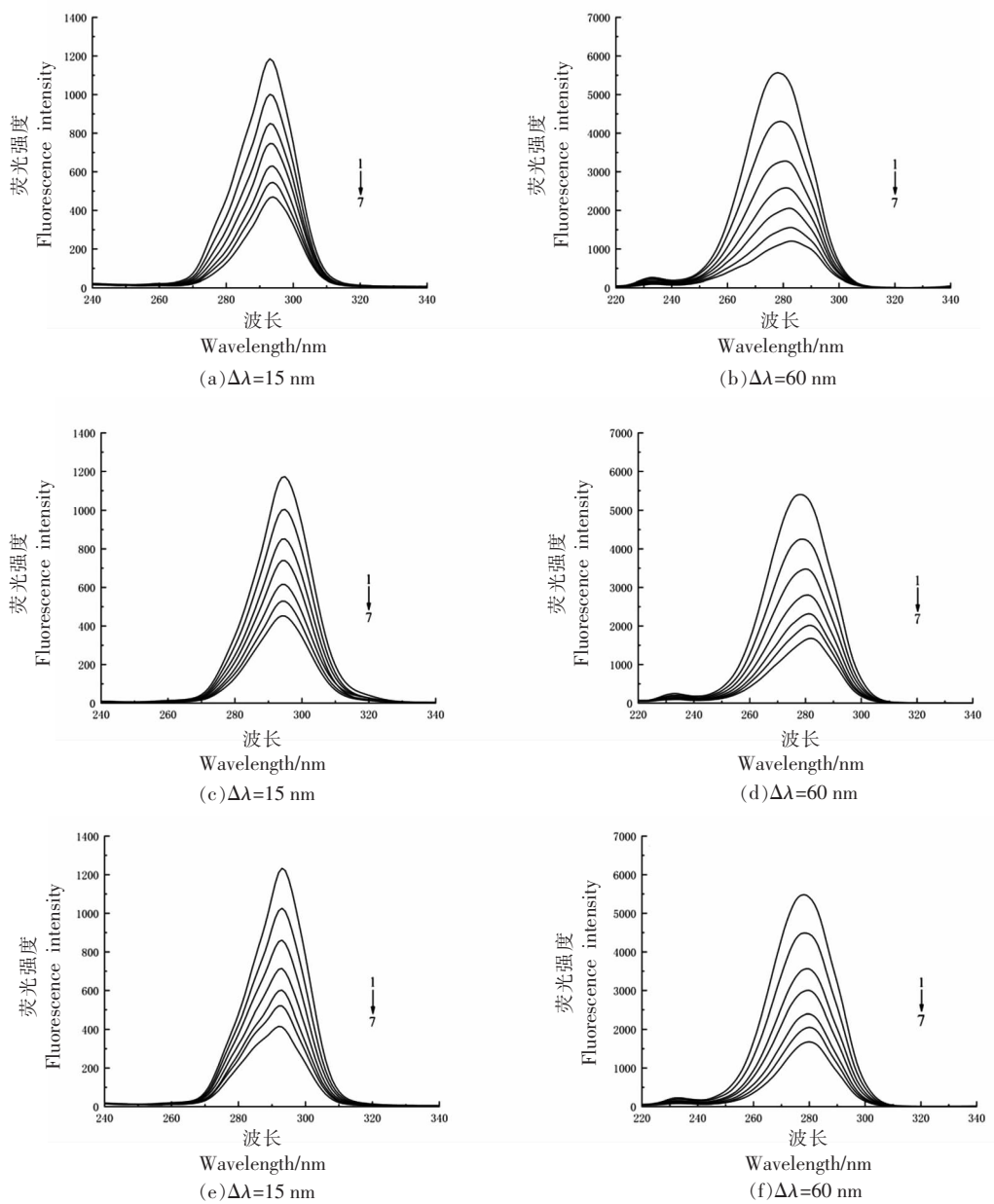
配体	T/K	$\Delta G/(\text{kJ}/\text{mol})$	$\Delta H/(\text{kJ}/\text{mol})$	$\Delta S/[\text{J}/(\text{mol} \cdot \text{K})]$
Bai	298	-37.412	-48.667	-37.768
	310	36.959		
Que	298	-33.364	111.191	485.08
	310	-39.185		
Fis	298	-29.357	59.105	296.85
	310	-32.919		

根据 $\Delta H > 0$ 和 $\Delta S > 0$; $\Delta H < 0$ 和 $\Delta S < 0$; $\Delta H < 0$ 和 $\Delta S > 0$, 判断两者之间主要作用力类型分别为疏水力、氢键和范德华力、静电力^[33]。由表 2 可知, 3 个体系的 ΔG 均小于 0, 说明 PL 与 3 种黄酮类化合物的结合是自发进行的。Bai 与 PL 主要作用类型为氢键和范德华力, Que 和 Fis 与 PL 相互作用过程中的主要作用力为疏水力。Jiang 等^[34]研究这与 3 种黄酮类化合物的结构有关。相邻的 3

个羟基位于 Bai 的 A 环上, 使得 Bai 更容易与 PL 形成氢键, 它们的结合更稳定, 此外 3 种黄酮类化合物都有羟基, 表明氢键也可能参与了相互作用过程。与分子对接过程中相互作用力类型一致。

2.6 同步荧光光谱

通过设置激发波长与发射波长之差值($\Delta\lambda$), 确定 Tyr 和 Trp 残基微环境的特征变化^[35]。结果如图 5 所示, Bai、Que 和 Fis 的加入降低了 PL 在 $\Delta\lambda$



注: PL 质量浓度为 5 mg/mL, Bai、Que 和 Fis 浓度(1→7)依次为 0, 6.7, 13.3, 20, 26.7, 33.3, 40 $\mu\text{mol/L}$ 。

图 5 Bai(a,b)、Que(c,d)和 Fis(e,f)与 PL 相互作用的同步荧光光谱

Fig.5 Synchronous fluorescence spectra of Bai (a,b), Que (c,d) and Fis (e,f) binding to PL

= 15 nm 和 $\Delta\lambda = 60$ nm 处的荧光强度,因此,酶的 Tyr 和 Trp 都参与了相互作用。从图 5 可以看出,3 种黄酮化合物在 $\Delta\lambda=60$ nm 处猝灭 PL 较明显,这一结果说明结合对 Trp 的影响更大,小分子的结合位置更接近 Trp。Bai、Que 和 Fis 在 $\Delta\lambda=60$ nm 时,分别发生红移(277.8 nm \rightarrow 283.2 nm,278 nm \rightarrow 282.6 nm,277.8 nm \rightarrow 280.8 nm),而 $\Delta\lambda=15$ nm 时变化不明显,由此可以推断主要干扰了酶 Trp 残基的微环境,极性增加,Trp 残基更多的暴露在溶剂中^[36]。综上所述,3 种黄酮化合物主要与酶结构中的 Trp 残基相互作用,提高抑制活性,并且改变了酶的构象。

3 结论

本文探讨了 Bai、Que 和 Fis 对降低脂质吸收的关键靶点 PL 的抑制作用及其作用机制。结果表明,3 种黄酮类化合物对 PL 均表现出较强的抑制作用,依次为 Bai>Que>Fis。抑制动力学分析表明,Bai 和 Fis 为竞争型抑制剂,而 Que 为混合型抑制剂。分子对接结果和热力学参数均表明 Bai 主要通过氢键,Que 和 Fis 主要通过疏水相互作用与底物竞争结合到 PL 的活性中心,降低 PL 的催化活性,进而发挥抑制作用。此外,三者与 PL 有相似的结合位点,然而结合的细微差异可能是它们抑制作用不同导致。荧光光谱进一步表征了 3 种黄酮类化合物通过静态猝灭机制与 PL 形成复合物的结合构象和性质。本试验为今后 Bai、Que 和 Fis 对 PL 的抑制机制的研究提供了新思路。同时,富含 3 种黄酮类化合物的食物可能在肥胖的干预中具有很大潜力。

参 考 文 献

- [1] SERGENT T, VANDERSTRAETEN J, WINAND J, et al. Phenolic compounds and plant extracts as potential natural anti-obesity substances[J]. Food Chemistry, 2012, 135(1): 68-73.
- [2] 刘嘉平, 王博, 张晓伟, 等. 绞股蓝皂苷饮食干预小鼠肥胖及肠道菌群研究[J]. 中国食品学报, 2022, 22(7): 88-96.
LIU J P, WANG B, ZHANG X W, et al. Effects of gynostaponin diet on obesity and intestinal microflora in mice[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(7): 88-96.
- [3] 刘德志, 武云娇, 王一飞, 等. 抗性糊精对面粉流变特性及糊化凝胶的影响[J]. 包装工程, 2023, 44(1): 253-258.
LIU D Z, WU Y J, WANG Y F, et al. Effect of resistant dextrin on rheological properties of flour and gelatinized gel[J]. Packaging Engineering, 2023, 44(1): 253-258.
- [4] AHMED B, ALI ASHFAQ U, USMAN MIRZA M. Medicinal plant phytochemicals and their inhibitory activities against pancreatic lipase: Molecular docking combined with molecular dynamics simulation approach[J]. Natural Product Research, 2018, 32(10): 1123-1129.
- [5] LI Y Q, YANG P, GAO F, et al. Probing the interaction between 3 flavonoids and pancreatic lipase by methods of fluorescence spectroscopy and enzymatic kinetics [J]. European Food Research and Technology, 2011, 233(1): 63-69.
- [6] MODANWAL S, MAURYA A K, MISHRA S K, et al. Development of QSAR model using machine learning and molecular docking study of polyphenol derivatives against obesity as pancreatic lipase inhibitor[J]. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2022, 41(14): 6569-6580.
- [7] WANG S H, DONG S Z, ZHANG R, et al. Effects of proanthocyanidins on porcine pancreatic lipase: Conformation, activity, kinetics and thermodynamics [J]. Process Biochemistry, 2014, 49(2): 237-243.
- [8] LI T, HU P, DAI T, et al. Comparing the binding interaction between β -lactoglobulin and flavonoids with different structure by multi-spectroscopy analysis and molecular docking [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2018, 201: 197-206.
- [9] ULUSOY H G, SANLIER N. A minireview of quercetin: from its metabolism to possible mechanisms of its biological activities[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020, 60(19): 3290-3303.
- [10] GHOSH N, CHAKRABORTY T, MALLICK S, et al. Synthesis, characterization and study of antioxidant activity of quercetin-magnesium complex [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and

- Biomolecular Spectroscopy, 2015, 151: 807–813.
- [11] CHOY K W, MURUGAN D, LEONG X F, et al. Flavonoids as natural anti-inflammatory agents targeting nuclear factor- κ B (NF κ B) signaling in cardiovascular diseases: A mini review[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2019, 10: 1295.
- [12] LIU B, LI L, LIU G, et al. Baicalein attenuates cardiac hypertrophy in mice via suppressing oxidative stress and activating autophagy in cardiomyocytes[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2021, 42(5): 701–714.
- [13] WANG Z Y, JIANG Z M, XIAO P T, et al. The mechanisms of baicalin ameliorate obesity and hyperlipidemia through a network pharmacology approach[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2020, 878: 173103.
- [14] ZHOU J F, WANG W J, YIN Z P, et al. Quercetin is a promising pancreatic lipase inhibitor in reducing fat absorption *in vivo*[J]. *Food Bioscience*, 2021, 43: 101248.
- [15] TAKAHASHI S, BHATTACHARJEE S, GHOSH S, et al. Preferential targeting cancer-related α -motif DNAs by the plant flavonol fisetin for theranostics applications[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 1–13.
- [16] SUN L, WARREN F J, GIDLEY M J, et al. Mechanism of binding interactions between young apple polyphenols and porcine pancreatic α -amylase[J]. *Food Chemistry*, 2019, 283: 468–474.
- [17] DEL CASTILLO-SANTAELLA T, HERNÁNDEZ-MORANTE J J, SUÁREZ-OLMOS J, et al. Identification of the thistle milk component Silibinin (A) and Glutathione-disulphide as potential inhibitors of the pancreatic lipase: Potential implications on weight loss[J]. *Journal of Functional Foods*, 2021, 83: 104479.
- [18] HU B, CUI F C, YIN F P, et al. Caffeoylquinic acids competitively inhibit pancreatic lipase through binding to the catalytic triad[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 80: 529–535.
- [19] GEORGE G, PAUL A T. Investigation of synergistic potential of green tea polyphenols and orlistat combinations using pancreatic lipase assay-based synergy directed fractionation strategy[J]. *South African Journal of Botany*, 2020, 135: 50–57.
- [20] 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.
- [21] XIE F, GONG S, ZHANG W, et al. Kinetics and molecular docking studies of activating effect of *Canna edulis* Ker residue lignin on the activity of lipase[J]. *Starch - Stärke*, 2021, 73(1/2): 2000154.
- [22] KHALILI L, DEGHAN G, MOOSAVI-MOVAHEDI A A, et al. *In vitro* and *in silico* insights into the molecular interaction mechanism of acetylshikonin with bovine serum albumin[J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2022, 365: 120191.
- [23] ZHOU L, XIONG Z Q, LIU W, et al. Different inhibition mechanisms of gentisic acid and cyaniding-3-O-glucoside on polyphenoloxidase[J]. *Food chemistry*, 2017, 234: 445–454.
- [24] LI S, HUX, PAN J H, et al. Mechanistic insights into the inhibition of pancreatic lipase by apigenin: Inhibitory interaction, conformational change and molecular docking studies[J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2021, 335: 116505.
- [25] URBIZO-REYES U, LICEAGA A M, REDDIVARI L, et al. Enzyme kinetics, molecular docking, and *in silico* characterization of canary seed (*Phalaris canariensis* L.) peptides with ACE and pancreatic lipase inhibitory activity[J]. *Journal of Functional Foods*, 2022, 88: 104892.
- [26] SU H, RUAN Y T, LI Y, et al. *In vitro* and *in vivo* inhibitory activity of taxifolin on three digestive enzymes[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 150: 31–37.
- [27] MARTINEZ-GONZALEZ A I, ALVAREZ-PARRILLA E, DÍAZ-SÁNCHEZ Á G, et al. *In vitro* inhibition of pancreatic lipase by polyphenols: A kinetic, fluorescence spectroscopy and molecular docking study[J]. *Food Technol Biotechnol*, 2017, 55(4): 519–530.
- [28] BI H N, TANG L, GAO X, et al. Spectroscopic analysis on the binding interaction between tetracycline hydrochloride and bovine proteins β -casein, α -lactalbumin[J]. *Journal of Luminescence*, 2016, 178: 72–83.
- [29] 张梦晴. 羊栖菜 α -葡萄糖苷酶抑制剂的分离纯化及

- 特性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2020.
- ZHANG M Q. Isolation, purification and characterization of α -glucosidase inhibitors from *Benthic laminae*[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020.
- [30] NASRI R, BIDE L P R, RUGANI N, et al. Inhibition of CpLIP2 lipase hydrolytic activity by four flavonols (galangin, kaempferol, quercetin, myricetin) compared to orlistat and their binding mechanisms studied by quenching of fluorescence[J]. *Molecules*, 2019, 24(16): 2888.
- [31] 任顺成, 万毅, 李林政, 等. 栀子黄对淀粉消化酶的抑制动力学及相互作用研究[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(9): 38-47.
- REN S C, WAN Y, LI L Z, et al. Inhibition kinetics and Interaction of *Gardenia* yellow on starch digestive enzymes[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(9): 38-47.
- [32] LELIS C A, NUNES N M, DE PAULA H M C, et al. Insights into protein-curcumin interactions: Kinetics and thermodynamics of curcumin and lactoferrin binding[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 105: 105825.
- [33] DAI T T, YAN X Y, Li Q, et al. Characterization of binding interaction between rice glutelin and gallic acid: Multi-spectroscopic analyses and computational docking simulation[J]. *Food Research International*, 2017, 102: 274-281.
- [34] JIANG Z M, LI T Q, Ma L, et al. Comparison of interaction between three similar chalconoids and α -lactalbumin: Impact on structure and functionality of α -lactalbumin[J]. *Food Research International*, 2020, 131: 109006.
- [35] WU D, DUAN R, TANG L, et al. Binding mechanism and functional evaluation of quercetin 3-rhamnoside on lipase[J]. *Food Chemistry*, 2021, 359: 129960.
- [36] LU Q, CHEN C Y, ZHAO S L, et al. Investigation of the interaction between gallic acid and α -amylase by spectroscopy[J]. *International Journal of Food Properties*, 2016, 19(11): 2481-2494.

Inhibitory Effects of Three Flavonoids on Pancreatic Lipase and Their Binding Mechanism

Zhang Yan, Kang Zhu, Su Dongyu, Zhang Yingxin, Ban Chenyu, Liu Yi, Zhou Suzhen, Fan Jinbo*
(College of Food Science and Technology, Bohai University, Food Safety Key Lab of Liaoning Province, National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, Jinzhou 121013, Liaoning)

Abstract The inhibition of small molecules on pancreatic lipase (PL) has become an important model for screening anti-obesity ingredients *in vitro*. In this paper, the active constituents with strong binding effect were screened from flavonoids by molecular docking method. The inhibitory activity and type of inhibition were studied by enzyme kinetics, and the binding reaction and mechanism of active constituents and PL were studied by fluorescence spectroscopy. Three flavonoids were selected *in vitro*: Baicalein (Bai), Quercetin (Que) and Fisetin (Fis). Molecular docking results showed that the binding of the three flavonoids to PL was located near the residues of Ser153-His264-Asp177 at the catalytic site, and the main forces were hydrophobic interaction and hydrogen bonding. Bai, Que and Fis showed dose-dependent inhibitory activity on PL, with IC_{50} values of 49.14, 57.78, 61.26 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Inhibition kinetics showed that Bai and Fis had competitive inhibition on PL, while Que was mixed inhibition. Fluorescence spectroscopy showed that the quenching of PL by the three flavonoids belonged to static quenching, and the binding constants were all greater than 10^5 orders of magnitude, indicating that Bai, Que and Fis formed stable complexes with PL. The analysis of thermodynamic parameters showed that the main binding forces of Bai and PL were hydrogen bond and van der Waals force, and the binding of Que, Fis and PL was through hydrophobic interaction. This paper will provide new ideas for the development of novel PL inhibitors.

Keywords baicalein; quercetin; fisetin; pancreatic lipase; enzyme kinetics; fluorescence spectrum