

矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制动力学

王伟, 崔妍, 郑明珠, 蔡丹, 刘景圣, 刘美宏*, 刘回民*
(吉林农业大学食品科学与工程学院, 小麦和玉米深加工国家工程研究中心, 吉林 长春 130118)

摘要: 通过超滤-高效液相色谱、酶动力学以及分子对接等方法研究矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性抑制的机制。结果表明, 矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷以可逆非竞争性的方式抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的活性。此外, 荧光猝灭分析结果表明, 在疏水作用力驱动下, 矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷可与两种酶结合生成复合物。分子对接结果显示, 矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷通过氢键与疏水作用力与 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的关键氨基酸残基相互作用, 其结合能分别为 -7.8 kcal/mol和 -9.8 kcal/mol。本研究为矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷作为功能性膳食食品中 α -淀粉酶/ α -葡萄糖苷酶的潜在抑制剂的开发提供了新思路。

关键词: 黑米花色苷; 矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷; α -淀粉酶; α -葡萄糖苷酶; 抑制动力学

Inhibitory Kinetics of Cyanidin-3-*O*-glucoside against α -Amylase and α -Glucosidase

WANG Wei, CUI Yan, ZHENG Mingzhu, CAI Dan, LIU Jingsheng, LIU Meihong*, LIU Huimin*
(National Engineering Research Center for Wheat and Corn Deep Processing,
College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: The inhibitory mechanism of α -amylase and α -glucosidase by cyanidin-3-*O*-glucoside was investigated by ultrafiltration, high performance liquid chromatography (HPLC), enzyme kinetics, and molecular docking. The results indicated that cyanidin-3-*O*-glucoside inhibited α -amylase and α -glucosidase in a reversible and non-competitive manner. Besides, the fluorescence quenching analysis indicated that cyanidin-3-*O*-glucoside combined with the two enzymes by hydrogen bonds to form a complex. Molecular docking analysis showed that cyanidin-3-*O*-glucoside interacted with the key amino acid residues of α -amylase and α -glucosidase through hydrogen bonds and hydrophobic forces, and the binding energies were -7.8 and -9.8 kcal/mol, respectively. Our research suggests that cyanidin-3-*O*-glucoside has the potential to be used as an inhibitor of α -amylase and α -glucosidase in the development of functional foods.

Keywords: black rice anthocyanins; cyanidin-3-*O*-glucoside; α -amylase; α -glucosidase; inhibitory kinetics

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220921-203

中图分类号: TS201.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2023) 16-0185-07

引文格式:

王伟, 崔妍, 郑明珠, 等. 矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制动力学[J]. 食品科学, 2023, 44(16): 185-191. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220921-203. <http://www.spkx.net.cn>

WANG Wei, CUI Yan, ZHENG Mingzhu, et al. Inhibitory kinetics of cyanidin-3-*O*-glucoside against α -amylase and α -glucosidase[J]. Food Science, 2023, 44(16): 185-191. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220921-203. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2022-09-21

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (32201955);

吉林省中青年科技创新创业卓越人才 (团队) 项目 (创新类) (20210509026RQ)

第一作者简介: 王伟 (1998—) (ORCID: 0000-0001-8235-6577), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品生化工程与功能性食品。

E-mail: wangwei991216@163.com

*通信作者简介: 刘美宏 (1992—) (ORCID: 0000-0001-9306-2398), 女, 副教授, 博士, 研究方向为谷物化学与分子营养。

E-mail: liumh@jlau.edu.cn

刘回民 (1984—) (ORCID: 0000-0002-2265-2961), 男, 副教授, 博士, 研究方向为谷物化学与分子营养。

E-mail: liuhuimin@jlau.edu.cn

2型糖尿病是一种以慢性高血糖为特征的复杂代谢性疾病,其发病率在世界范围内呈现逐渐增高的趋势^[1]。通过抑制消化酶(如 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶)延缓肠道葡萄糖吸收是降低高血糖的有效手段^[2]。阿卡波糖、伏格列波糖等常用于治疗糖尿病的药物,是通过抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性减少碳水化合物的水解。然而,这些药物会对人体产生一定的副作用,例如胃肠道不适、肝酶损伤、肾功能损害等^[3-4]。因此,寻找具有轻微或无不良影响的新型 α -葡萄糖苷酶/ α -淀粉酶天然抑制剂应用于高血糖预防和治疗非常重要。研究指出,天然来源的植物多酚具有较强的消化酶抑制活性和较低的毒性^[5]。任顺成等^[6]发现栀子黄通过竞争性抑制的方式能显著抑制 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶的活性。此外,一些天然类黄酮化合物被发现可以通过非竞争性抑制模式显著抑制 α -淀粉酶/ α -葡萄糖苷酶的活性,例如芹菜素、杨梅素以及槲皮素等^[7-8]。

黑米花色苷(black rice anthocyanins, BRA)是黑米中的重要活性物质,主要是由矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷(cyanidin-3-*O*-glucoside, C3G)、花青素-3-葡萄糖苷和芍药素-3-葡萄糖苷组成^[9]。C3G属于多酚类黄酮物质,具有多种生物活性,如抗炎、抗胰岛素抵抗、调节血脂等^[10]。已有研究发现,C3G可以抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的活性,从而降低糖尿病小鼠的血糖水平并增强胰岛素敏感性^[11-12]。然而,C3G对 α -淀粉酶/ α -葡萄糖苷酶的具体抑制机制尚不清楚。因此,本研究通过酶动力学、荧光猝灭以及分子对接等方法对其抑制机制做进一步的解析,以期为其在降糖保健食品的应用提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

4-硝基苯基- α -*D*-吡喃葡萄糖苷(4-nitrophenyl- α -*D*-glucopyranoside, PNPG)、阿卡波糖、 α -葡萄糖苷酶、猪胰 α -淀粉酶、玉米淀粉 上海源叶生物科技有限公司; BRA、C3G 成都植化纯生物技术有限公司; 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

Fluostar omega多功能酶标仪 德国BMG Labtech公司; SQP电子天平 德国Sartorius公司; 1200高效液相色谱仪 美国Agilent公司; AllegraX-30R高速冷冻离心机 美国Beckman公司; LAMBDA365紫外-可见分光光度计 美国PerkinElmer公司; F7000荧光分光光度计 日本日立公司。

1.3 方法

1.3.1 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制效果测定

采用PNPG法测定BRA对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性^[13]。将25 μ L的样品溶液与25 μ L 0.5 U/mL的 α -葡萄糖苷酶溶液混合孵育15 min后,加入50 μ L 1 mmol/L PNPG底

物溶液。加入100 μ L 0.2 mol/L Na_2CO_3 溶液终止反应,随后使用多功能酶标仪在405 nm波长处测定其吸光度。

采用3,5-二硝基水杨酸法测定BRA对 α -淀粉酶的抑制活性^[14]。0.3 mL BRA溶液(1、3、5、7、9 mg/mL)加入0.3 mL 2.5 U/mL的 α -淀粉酶溶液。混合液在37 $^{\circ}\text{C}$ 预热5 min,加入预温的1%淀粉溶液反应15 min。使用多功能酶标仪在540 nm波长处测定吸光度。

1.3.2 超滤-高效液相色谱分析

将20 μ L BRA(10 mg/mL)、20 μ L α -淀粉酶(10 mg/mL)和160 μ L 0.01 mol/L磷酸盐缓冲液(pH 7.0)混合并孵育30 min。置于10 kDa分子质量的超滤离心管离心20 min以截留复合物,并洗涤除去未结合的组分。使用体积分数50%甲醇溶液使 α -淀粉酶变性。Ultimate LP-C₁₈色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m)。流动相A为甲醇,流动相B为0.5%甲酸溶液。洗脱方案如下:A相在0~2 min为90%,2~6 min为90%~80%,6~10 min为80%~70%,10~15 min为70%~65%,15~20 min为65%~50%,20~24 min为50%~10%,24~29 min为10%~90%,29~30 min为90%。柱温为30 $^{\circ}\text{C}$,流速为1 mL/min。结合率按下式计算:

$$\text{结合率}/\% = \frac{A_b - A_c}{A_a} \times 100 \quad (1)$$

式中: A_a 为超滤筛选前各化合物色谱峰面积; A_b 为亲和筛选作用后活性酶结合的各化合物色谱峰面积; A_c 为与变性酶结合的各化合物色谱峰面积。

1.3.3 酶抑制动力学

酶抑制动力学测定按照经典方法进行,略有修改^[15]。具体如下:底物PNPG浓度调整为1 mmol/L,设定不同浓度 α -葡萄糖苷酶(0.25、0.50、0.75、1.00、1.25 U/mL),添加不同浓度的C3G。根据酶浓度与酶反应速率变化关系图,判断酶促反应是否可逆。在 α -葡萄糖苷酶(0.5 U/mL)的条件下,随着PNPG浓度(0.25、0.50、1.00、2.00 mmol/L)增加,确定C3G对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制模式。

α -淀粉酶动力学研究是根据1.3.1节反应条件与各种质量浓度(0、1、3、5 mg/mL)的抑制剂进行,并且底物的质量浓度范围规定在5~15 mg/mL。同时,以 $1/V$ 对不同质量浓度底物的抑制剂质量浓度作图获得 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制剂常数^[16]。

1.3.4 紫外吸收光谱测定

根据刘硕等^[17]的方法稍作修改。C3G溶液与 α -淀粉酶溶液/ α -葡萄糖苷酶溶液的质量浓度比为0:1、2:1、4:1、6:1、8:1、10:1,振荡摇匀。在室温下反应15 min后,在200~400 nm波长范围测定混合液的紫外吸收光谱。

1.3.5 荧光光谱学测定

配制成酶-抑制剂混合体系:300 μ L α -葡萄糖苷酶溶液和100 μ L不同质量浓度的C3G溶液(0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12 mg/mL)。测定混合体系荧光强

度, 发射波长为300~450 nm, 狭缝宽度为10 nm。 α -淀粉酶与 α -葡萄糖苷酶荧光光谱测定方法类似, 其中C3G溶液质量浓度分别为0.6、0.8、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mg/mL。对照组: 磷酸盐缓冲液代替C3G。结合常数 (K_a)、荧光猝灭常数 (K_q) 和结合位点数 (n) 按式 (2) 和 (3) 计算:

$$\frac{F_0}{F} = K_q \tau_0 [Q] + 1 = K_{sv} [Q] + 1 \quad (2)$$

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = n \lg K_a - n \lg \frac{1}{[Q] - [P_0] \times \frac{F_0 - F}{F_0}} \quad (3)$$

式中: F_0 和 F 分别为 α -葡萄糖苷酶/ α -淀粉酶在没有抑制剂和有抑制剂的情况下的荧光强度; K_{sv} 为Stern-Volmer猝灭常数; τ_0 为不存在猝灭剂时荧光团的平均寿命 (其值约为 10^{-8} s); $[Q]$ 为C3G的质量浓度/(mg/mL); $[P_0]$ 为 α -葡萄糖苷酶/ α -淀粉酶的质量浓度/(mg/mL)。

1.3.6 分子对接实验

采用AutoDock 4.2分子模拟软件进行分子对接, 预测C3G与两种酶的结合模式和作用力。 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的PDB编号分别为3WY2、1DHK。酶蛋白结构从UniProt (<https://www.uniprot.org/>) 获取, C3G小分子结构从PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取。结合能被用来评估酶蛋白与小分子的结合亲和力。

1.4 数据分析

所有实验均重复3次, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用GraphPad Prism 9.0.0软件进行绘图与方程拟合。

2 结果与分析

2.1 BRA对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制作用

膳食淀粉可以被 α -淀粉酶消化成还原糖, 接着再被 α -葡萄糖苷酶消化为葡萄糖, 从而导致2型糖尿病患者的餐后血糖水平升高^[18-19]。因此, 抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性对于延缓碳水化合物降解和葡萄糖吸收至关重要。本研究发现BRA对 α -葡萄糖苷酶具有一定的抑制活性, 且对 α -葡萄糖苷酶的抑制呈现剂量依赖性。由图1A可知, 当BRA质量浓度达到0.1 mg/mL时, 其抑制率达到了81.22%。BRA对 α -淀粉酶/ α -葡萄糖苷酶的抑制效果可以通过半数抑制浓度 (IC_{50}) 表示, 即BRA引起的 α -淀粉酶/ α -葡萄糖苷酶活力降低50%的结果。通过线性拟合计算得出, 阿卡波糖 ($IC_{50}=0.214 \mu\text{g/mL}$) 对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果高于BRA ($IC_{50}=13 \mu\text{g/mL}$)。此外, 图1C、D显示, BRA对 α -淀粉酶的抑制作用与质量浓度呈正相关, 且抑制效果低于阿卡波糖。同时, 发现BRA对 α -淀粉酶的 IC_{50} (1.141 mg/mL) 远大于 α -葡萄糖苷酶, 其原

因可能是 α -淀粉酶与BRA中活性物质的亲和能力比 α -葡萄糖苷酶更弱。总而言之, BRA对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶具有较好的抑制作用, 可能作为潜在的 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制剂。

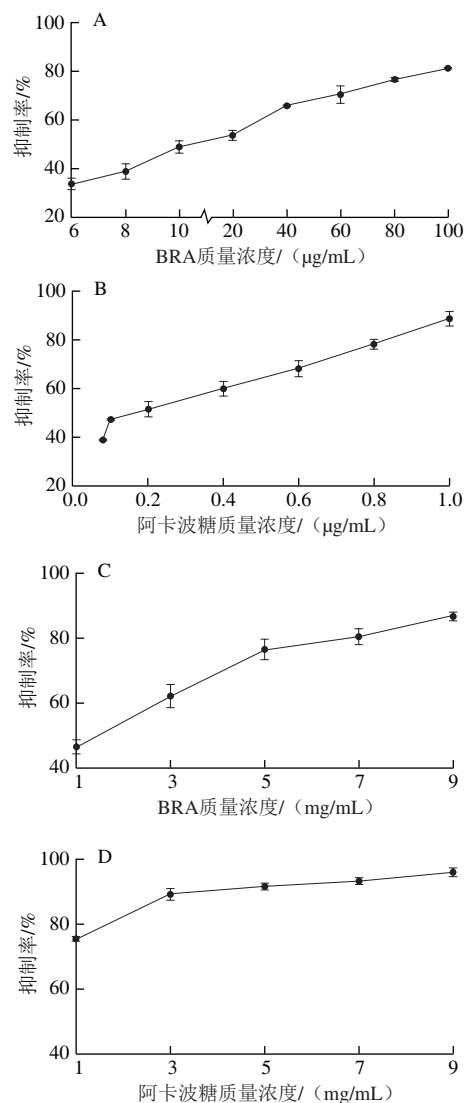


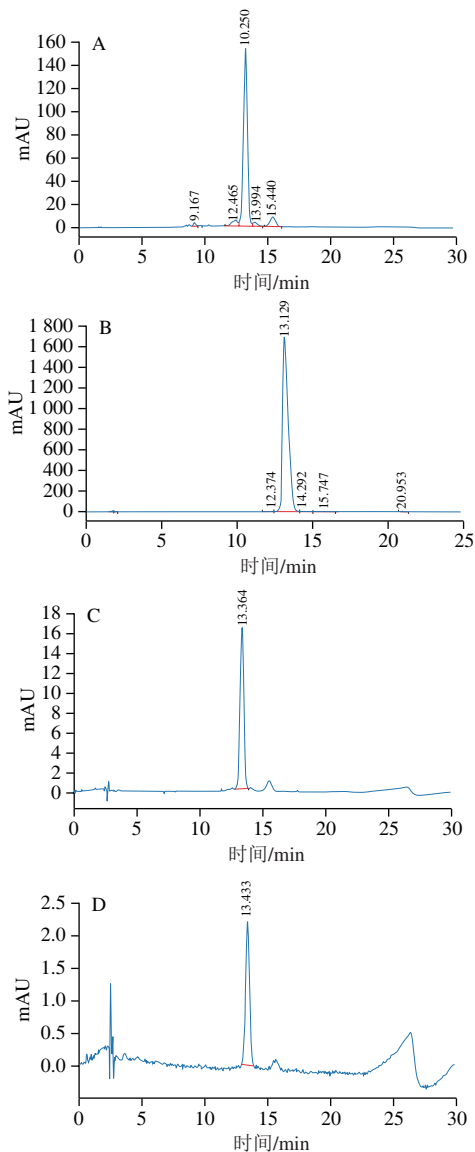
图1 BRA和阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶(A、B)和 α -淀粉酶(C、D)的抑制作用

Fig. 1 Inhibitory effects of BRA and acarbose against α -glucosidase (A and B) and α -amylase (C and D)

2.2 BRA的高效液相色谱分析

对BRA进行超滤-高效液相色谱分析, 以鉴定出BRA中与酶蛋白结合的主要活性成分。如图2A所示, 超滤筛选前BRA提取物高效液相色谱图中第3个样品峰的出峰时间为13.250 min, 与图2B中C3G标准品的出峰时间一致, 表明C3G是BRA的主要组分。此外, 由图2C可知, BRA中C3G与 α -淀粉酶发生特异性结合后, 活性酶组所捕获的配体所对应的波峰的强度与面积均大于失活酶组。因此, 可以通过比较波峰面积反映C3G与 α -淀粉酶

的结合率。高效液相色谱图数据显示 $A_a=3\ 421.625\ 49$ 、 $A_b=353.695\ 89$ 、 $A_c=48.329\ 20$ ，通过式(1)计算得C3G与 α -淀粉酶的结合率为8.9%。由此可知，BRA中的C3G是对 α -淀粉酶发挥抑制作用的主要活性成分。



A. 超滤筛选前BRA提取物; B. C3G标准品; C.亲和和筛选作用后与活性酶结合的单体; D.与变性酶结合的花色苷。

图2 BRA的高效液相色谱图

Fig. 2 High performance liquid chromatogram of BRA

2.3 α -淀粉酶与 α -葡萄糖苷酶的抑制动力学分析

表1 C3G抑制 α -淀粉酶的 V_{max} 和 K_m 值

Table 1 V_{max} and K_m values of C3G against α -amylase

抑制剂质量浓度/ (mg/mL)	双倒数曲线方程	R^2	K_m / (mg/mL)	V_{max} / (ΔA /min)
0	$y=177.7x-8.038$	0.997 8	22.114 1	0.124 4
1	$y=263.9x-11.95$	0.998 8	22.089 7	0.083 6
3	$y=362.7x-16.45$	0.992 4	22.114 1	0.060 8
5	$y=448.5x-20.26$	0.997 5	22.104 3	0.049 4

表2 C3G抑制 α -葡萄糖苷酶的 V_{max} 和 K_m 值

Table 2 V_{max} and K_m values of C3G against α -glucosidase

抑制剂质量浓度/ (mg/mL)	双倒数曲线方程	R^2	K_m / (mg/mL)	V_{max} / (ΔA /min)
0	$y=10.69x+1.733$	0.995 0	6.165 2	0.577 0
0.02	$y=18.84x+3.052$	0.993 7	6.172 8	0.327 7
0.06	$y=29.04x+4.697$	0.990 2	6.184 3	0.212 9
0.10	$y=35.85x+5.813$	0.996 6	6.169 0	0.171 9

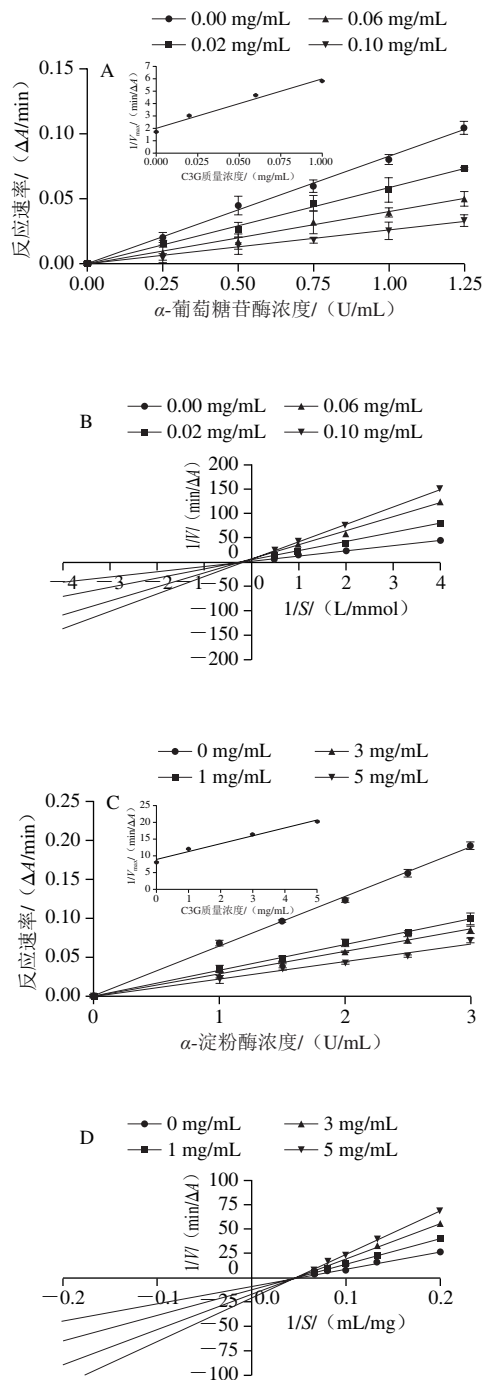


图3 C3G对 α -葡萄糖苷酶(A)与 α -淀粉酶(C)的可逆抑制作用以及对 α -葡萄糖苷酶(B)与 α -淀粉酶(D)的双倒数曲线图

Fig. 3 Reversible inhibition of α -glucosidase (A) and α -amylase (C) by C3G and double-reciprocal curves for α -glucosidase (B) and α -amylase (D)

对酶抑制剂的C3G单体进行动力学研究,以揭示C3G对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制机制。通过Lineweaver-Burk和Dixon图确定C3G对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制模式^[20-21]。如图3A、C所示,所有直线都经过原点,并且所有直线的斜率随着C3G质量浓度增加而减小,这表明C3G作为两种酶蛋白的可逆抑制剂发挥作用。图3B、D显示,不同反应体系的抑制曲线交点无限收敛于x正半轴。此外, V_{max} 持续下降,而 K_m 值几乎没有变化,这表明C3G作为两种酶蛋白的非竞争性可逆抑制剂起到了抑制作用(表1、2)。对于非竞争性可逆抑制,以Lineweaver-Burk方程中 $1/V_{max}$ 对相应的抑制剂浓度 I 进行二次绘图得到直线的横轴截距,可求出抑制常数 K_{iu} ^[22-23]。 $1/K_{iu}$ 值被用来衡量抑制剂与酶的亲和力程度^[24]。Dixon图结果表明, α -葡萄糖苷酶与C3G($K_{iu}=0.05$)间的相互作用比 α -淀粉酶与C3G($K_{iu}=3.723$)间的相互作用更强,这与酶活性抑制的结果保持一致(图3)。因此,C3G以可逆非竞争性的方式抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的活性,且与两种酶蛋白的亲和程度有差异。

2.4 α -淀粉酶与 α -葡萄糖苷酶的紫外吸收光谱分析

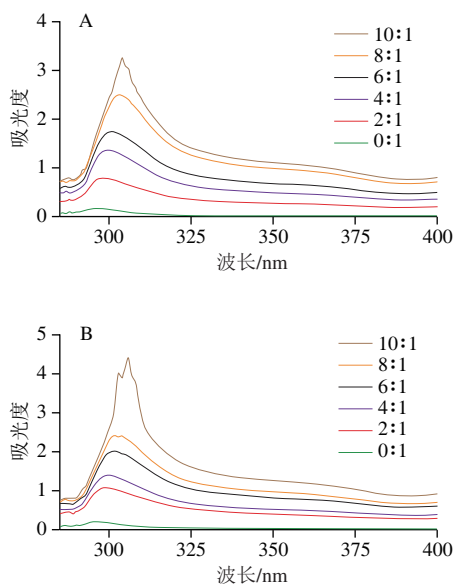


图4 C3G质量浓度对 α -淀粉酶(A)和 α -葡萄糖苷酶(B)紫外吸收光谱的影响

Fig. 4 Effect of different concentrations of C3G on the UV absorption spectra of α -amylase (A) and α -glucosidase (B)

如图4所示,复合物体系在295 nm处有吸收峰且发生红移现象(295~305 nm)。此外,固定 α -淀粉酶/ α -葡萄糖苷酶浓度,吸光度随着C3G溶液质量浓度的增大而增大。因此,这表明C3G与 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶相互作用,使 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的肽键C=O基团的 π - π^* 发生跃迁,导致酶的能量与活性降低。

2.5 C3G对 α -淀粉酶与 α -葡萄糖苷酶的荧光猝灭效应

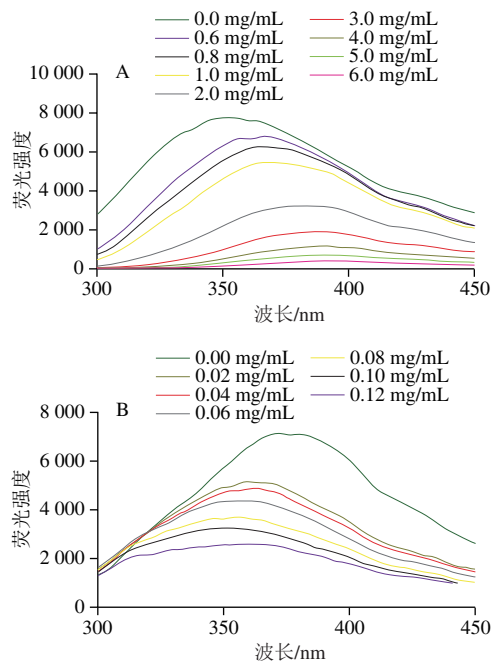


图5 C3G质量浓度对 α -淀粉酶(A)和 α -葡萄糖苷酶(B)荧光猝灭强度的影响

Fig. 5 Effects of different concentrations of C3G on the fluorescence quenching spectra of α -amylase (A) and α -glucosidase (B)

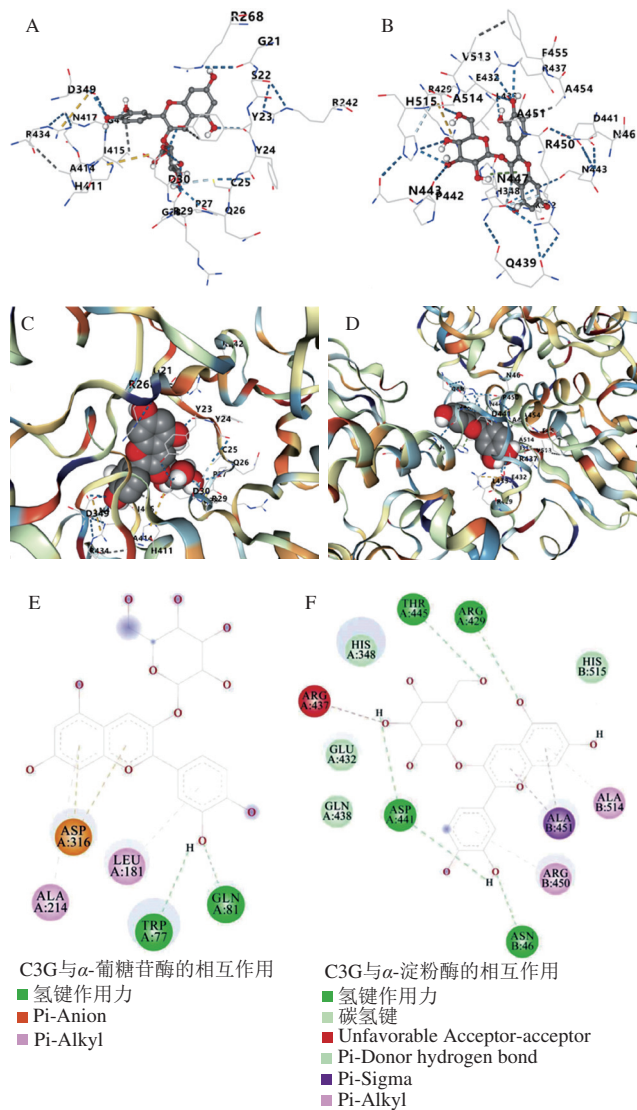
荧光光谱通过测量荧光强度和最大发射波长的变化监测 α -葡萄糖苷酶/ α -淀粉酶中色氨酸残基的微环境变化^[25-26]。如图5A所示,随着C3G质量浓度增大, α -淀粉酶中色氨酸残基的荧光强度显著降低,荧光光谱发生明显猝灭现象。在添加不同质量浓度C3G(0~6 mg/mL)的过程中,最大发射波长出现明显的蓝移现象(375~350 nm),这意味着C3G与 α -淀粉酶的结合引起了色氨酸残基周围的疏水性变化。同样地,C3G质量浓度增大导致 α -葡萄糖苷酶荧光强度呈规律性降低。此外,明显的红移(339~390 nm)现象表明,C3G会引起 α -葡萄糖苷酶疏水键的断裂,导致色氨酸等非极性氨基酸残基暴露于极性环境中。

因此,C3G是 α -淀粉酶/ α -葡萄糖苷酶荧光的猝灭剂,并改变了 α -淀粉酶/ α -葡萄糖苷酶的结构变化,这与高效液相色谱得出的结果保持一致。利用荧光光谱数据进一步分析得出 α -葡萄糖苷酶的荧光猝灭速率常数 $K_q=1.3 \times 10^{12} \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{s})$, α -淀粉酶的荧光猝灭速率常数 $K_q=3.8 \times 10^{11} \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{s})$ 。此外,两种糖苷酶的荧光猝灭速率常数 K_q 大于 $2 \times 10^{10} \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{s})$,进一步得出C3G荧光猝灭 α -淀粉酶/ α -葡萄糖苷酶的过程不是由分子扩散和动态碰撞引起的动态猝灭,而是形成复合物的静态猝灭过程。总而言之,C3G在疏水作用力驱动下可与两种酶结合生成复合物,从而引发酶的结构发生变化,导致酶的活性降低。

2.6 分子对接分析

表3 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的荧光参数

酶类型	K_d (L/(mol·s))	K_i (L/mol)	n	E_b (kcal/mol)
α -葡萄糖苷酶	1.3×10^{12}	1.3203×10^4	1.004	-9.8
α -淀粉酶	3.8×10^{11}	0.3799×10^4	1.569	-7.8

图6 C3G与 α -淀粉酶(A、C、E)和 α -葡萄糖苷酶(B、D、F)的分子对接结果Fig. 6 Molecular docking results of C3G with α -amylase (A, C and E) and α -glucosidase (B, D and F)

分子对接被应用于通过非共价键形成双分子复合物的分析, 主要包括疏水力和氢键^[27]。通过该分析方法, 获得化合物与蛋白质相互作用的结合亲和力和氨基酸残基。经线性拟合计算后, 发现C3G与 α -淀粉酶/ α -葡萄糖苷酶可能存在1个最佳结合位点(表3)。结合能 E_b 表示测试化合物对酶蛋白的结合亲和力^[28]。由表3可知, C3G与 α -淀粉酶的电离能 E_b 为-7.8 kcal/mol, 而与 α -葡萄糖苷

酶为-9.8 kcal/mol。此外, C3G与 α -葡萄糖苷酶之间的结合亲和力比 α -淀粉酶高, 这与荧光猝灭常数 K_q 和抑制常数 K_{i0} 结果一致。此外, E_b 值均为负值, 表明C3G-淀粉酶结合的相互作用是一个放热过程。

分子对接结果预测C3G与位于 α -淀粉酶/ α -葡萄糖苷酶非催化位点的氨基酸残基相互作用, 可能扰乱蛋白质结构, 并以非竞争方式抑制酶活性, 进而改变酶活力。如图6E所示, C3G与 α -淀粉酶结合位点附近对结合作用贡献较大的氨基酸残基为ASP316、LEU181、ALA214、TRP77和GLN81。与此同时, C3G和 α -葡萄糖苷酶之间形成了4个氢键(THR445、ARG429、ASP441、ASN46)相互作用。图6F显示, 当与 α -葡萄糖苷酶结合时, C3G主要被氨基酸残基HIS348、THR445、ARG429、HIS515、ASN46、GLU432、GLN438和ASP441包围。此外, 这些氨基酸残基增加了抑制剂-酶复合物的稳定性。总而言之, C3G可能是 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的潜在配体, 通过非共价力与关键氨基酸残基相互作用, 发挥其对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制作用。

3 结论

本研究揭示BRA中的C3G对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制机制。结果表明, C3G与两种酶的结合过程是自发的, 生成酶-抑制剂复合物, 导致 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的内在荧光猝灭。此外, 该抑制作用属于非竞争性可逆抑制。C3G与ASP441、TRP等残基以氢键结合, 并与周围众多的疏水残基存在疏水作用, 共同维持复合物的稳定结构。本研究对于开发新型的食源性 α -淀粉酶/ α -葡萄糖苷酶抑制剂, 推动C3G在功能性食品领域的应用具有一定的参考价值。

参考文献:

- MITRA A, DEWANJEE D, DEY B, et al. Mechanistic studies of lifestyle interventions in type 2 diabetes[J]. World Journal of Diabetes, 2020, 3(12): 201-207. DOI:10.1016/j.heliyon.2022.e09045.
- YAN W C, WANG M Z, ZHANG G Y, et al. Interaction between amylose and tea polyphenols modulates the postprandial glycemic response to high-amylose maize starch[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2013, 61(36): 8608-8615. DOI:10.1021/jf402821r.
- ZENG L, ZHANG G W, LIAO Y J, et al. Inhibitory mechanism of morin on α -glucosidase and its anti-glycation properties[J]. Food & Function, 2016, 7(9): 3953-3963. DOI:10.1039/C6FO00680A.
- 魏萍, 曹俊岭, 薛春苗, 等. 金芪降糖片与不同中药组方比较治疗2型糖尿病的网状Meta分析[J]. 中国药师, 2022, 25(2): 295-306. DOI:10.19962/j.cnki.issn1008-049X.2022.02.018.
- SUN L J, MIAO M. Dietary polyphenols modulate starch digestion and glycaemic level: a review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020, 60(4): 541-555. DOI:10.1080/10408398.2018.1544883.

- [6] 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. DOI:10.16429/j.1009-7848.2021.09.005.
- [7] ZENG L, ZHANG G W, LIN S Y, et al. Inhibitory mechanism of apigenin on α -glucosidase and synergy analysis of flavonoids[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(37): 6939-6949. DOI:10.1021/acs.jafc.6b02314.
- [8] MENG Y H, SU A P, YUAN S M, et al. Evaluation of total flavonoids, myricetin, and quercetin from *Hovenia dulcis* Thunb. as inhibitors of α -amylase and α -glucosidase[J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2016, 71(4): 444-449. DOI:10.1007/s11130-016-0581-2.
- [9] TAI L Y, HUANG S Y, ZHAO Z W, et al. Chemical composition analysis and antioxidant activity of black rice pigment[J]. Chemical Biology & Drug Design, 2021, 97(3): 711-720. DOI:10.1111/cbdd.13806.
- [10] XUE H K, TAN J Q, LI Q, et al. Cyanidin-3-O-glucoside protects RAW264.7 cells against hydrogen peroxide-induced oxidative damage[J]. 食品科学, 2021, 42(13): 103-113. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200622-299.
- [11] GUO H H, XIA M, ZOU T B, et al. Cyanidin 3-glucoside attenuates obesity-associated insulin resistance and hepatic steatosis in high-fat diet-fed and *dbl/db* mice via the transcription factor FoxO1[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2012, 23(4): 349-360. DOI:10.1016/j.bcp.2007.08.008.
- [12] SHI M, MATHAI M L, XU G Q, et al. The effects of supplementation with blueberry, cyanidin-3-O- β -glucoside, yoghurt and its peptides on obesity and related comorbidities in a diet-induced obese mouse model[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 56(9): 92-101. DOI:10.1016/j.jff.2019.03.002.
- [13] MPHEHLELE M J, MAGWAZA N M, MALINDISA S T, et al. Biological evaluation the 2-aryl-2,3-dihydrobenzodiazaborinin-4(1H)-ones as potential dual α -glucosidase and α -amylase inhibitors with antioxidant properties[J]. Chemical Biology & Drug Design, 2021, 98(2): 234-247. DOI:10.1111/cbdd.13893.
- [14] KAESWURM J A H, CLAASEN B, FISCHER M P, et al. Interaction of structurally diverse phenolic compounds with porcine pancreatic α -amylase[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(40): 11108-11118. DOI:10.1021/acs.jafc.9b04798.
- [15] 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. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180830-337.
- [16] 王静, 刁翠茹, 王华丽, 等. 鼠尾草酸对 α -淀粉酶的抑制作用[J]. 食品科学, 2020, 41(3): 12-17. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181211-137.
- [17] 刘硕, 王萌, 朱少华, 等. 紫甘薯花色苷与胰蛋白酶相互作用特性[J]. 食品科学, 2014, 35(23): 232-237. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201423045.
- [18] NANOK K, SANSENYA S. Combination effects of rice extract and five aromatic compounds against α -glucosidase, α -amylase and tyrosinase[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2021, 132(1): 9-17. DOI:10.1016/j.jbiosc.2021.02.003.
- [19] WANG Z H, PENG S, PENG M J, et al. Isolation of polyphenol compounds from olive waste and inhibition of their derivatives for α -glucosidase and α -amylase[J]. Natural Product Research, 2020, 34(16): 2398-2402. DOI:10.1080/14786419.2018.1538217.
- [20] WANG J, ZHAO J, YAN Y, et al. Inhibition of glycosidase by ursolic acid: *in vitro*, *in vivo* and *silico* study[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 100(3): 986-994.
- [21] MWAKALUKWA R, AMEN Y, NAGATA M, et al. Postprandial hyperglycemia lowering effect of the isolated compounds from olive mill wastes-an inhibitory activity and kinetics studies on α -glucosidase and α -amylase enzymes[J]. ACS Omega, 2020, 5(32): 20070-20079. DOI:10.1021/acsomega.0c01622.
- [22] 罗明昌, 张昱格, 朱宝燕, 等. 基于动力学分析 β -伴大豆球蛋白和大豆球蛋白抑制淀粉酶活性机制[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(2): 536-543. DOI:10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.2022.02.036.
- [23] KAZEEM M I, DANSU T V, ADEOL S A. Inhibitory effect of *Azadirachta indica* A. Juss leaf extract on the activities of α -amylase and α -glucosidase[J]. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2013, 16(21): 1358-1362. DOI:10.1016/j.jbiosc.2021.02.003.
- [24] SUN L, WARREN F J, NETZEL G, et al. 3 or 3'-Galloyl substitution plays an important role in association of catechins and theaflavins with porcine pancreatic α -amylase: the kinetics of inhibition of α -amylase by tea polyphenols[J]. Journal of Functional Foods, 2016, 26(7): 144-156. DOI:10.1016/j.jff.2016.07.012.
- [25] SU J H, WANG H X, MA C Y, et al. Hypocholesterolaemic mechanism of bitter melon aqueous extracts via inhibition of pancreatic cholesterol esterase and reduction of cholesterol micellar solubility[J]. International Journal of Food Sciences & Nutrition, 2016, 67(1): 20-28. DOI:10.3109/09637486.2015.1121470.
- [26] 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. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190620-234.
- [27] YANG J, LI H, WANG X, et al. Inhibition mechanism of α -amylase/ α -glucosidase by silibinin, its synergism with acarbose, and the effect of milk proteins[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(36): 10515-10526. DOI:10.1021/acs.jafc.1c01765.
- [28] MAGAÑA-BARAJAS E, BUITIMEA-CANTÚA G V, HERNÁNDEZ-MORALES A, et al. *In vitro* α -amylase and α -glucosidase enzyme inhibition and antioxidant activity by capsaicin and piperine from *Capsicum chinense* and *Piper nigrum* fruits[J]. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 2021, 56(3): 282-291. DOI:10.1080/03601234.2020.1869477.