

麦源烷基间苯二酚抑制 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶活性作用及分子机制

温柔, 郭蒙蒙, 鲁航, 李书国*

(河北科技大学食品与生物学院, 河北石家庄 050018)

摘要: 该研究探讨了小麦烷基间苯二酚 (Alkylresorcinols, ARs) 对碳水化合物消化关键酶 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶的抑制效果及作用机制。采用体外 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制试验确定降糖作用; 通过酶促动力学与 Lineweaver-Burk 曲线推断 ARs 对二者的抑制作用类型; 利用分子对接和分子模拟动力学进一步阐明作用机理。当 ARs 质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时对 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶活性的抑制率分别为 58.68%、57.49%, 略低于质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的阳性对照 Acarbose 的抑制率 (63.51%、60.20%), ARs 的 IC_{50} 分别为 48.02 $\mu\text{g/mL}$ 和 33.29 $\mu\text{g/mL}$; 抑制作用均为可逆竞争性抑制; 对接得分为 -4.864, MM-GBSA 结果为 -44 kcal/mol, 对接得分和结合自由能较低, 表明 ARs 与 α -葡萄糖苷酶结合较稳定, 有较好的抑制作用。在分子层面, ARs 与 α -葡萄糖苷酶的结合起到重要作用的氨基酸主要有 PHE327、ASN544、LYS811 和 SER556, 其相互作用主要为氢键、疏水作用和水桥。试验研究和理论分析均表明麦源 ARs 具有较强抑制活性, 可作为一种天然 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶抑制剂, 对开发调节血糖功能性食品或低血糖生成指数 (Glycemic Index, GI) 食品具有指导意义。

关键词: 麦源烷基间苯二酚; α -淀粉酶; α -葡萄糖苷酶; 分子对接; 分子模拟动力学

文章编号: 1673-9078(2025)05-104-113

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.5.0279

Inhibitory Effects and Underlying Molecular Mechanisms of Wheat Alkylresorcinols on α -Glucosidase and α -Amylase Activities

WEN Rou, GUO Mengmeng, LU Hang, LI Shuguo*

(College of Food and Biology, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China)

Abstract: The inhibitory effects of wheat alkylresorcinols (ARs) on α -amylase and α -glucosidase (key enzymes in carbohydrate digestion) and the underlying mechanisms were examined. The hypoglycemic effect of wheat ARs was determined in *in vitro* α -glucosidase and α -amylase inhibition tests. The inhibition types of ARs towards α -amylase and α -glucosidase were inferred by enzymatic kinetics and Lineweaver-Burk curves. The underlying mechanisms were further evaluated through molecular docking and molecular simulation dynamics. When the mass concentration of ARs was 100 $\mu\text{g/mL}$, the inhibition rates of α -amylase and α -glucosidase activities were 58.68% and 57.49%, respectively, which were slightly

引文格式:

温柔, 郭蒙蒙, 鲁航, 等. 麦源烷基间苯二酚抑制 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶活性作用及分子机制[J]. 现代食品科技, 2025, 41(5): 104-113.

WEN Rou, GUO Mengmeng, LU Hang, et al. Inhibitory effects and underlying molecular mechanisms of wheat alkylresorcinols on α -glucosidase and α -amylase activities [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(5): 104-113.

收稿日期: 2024-03-07

项目基金: 河北省重点研发计划项目 (21327111D)

作者简介: 温柔 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 粮食加工技术原理, E-mail: 1550410892@qq.com

通讯作者: 李书国 (1969-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 粮油食品加工与安全, E-mail: shuguolee@126.com

lower than those of α -amylase and α -glucosidase activities (63.51% and 60.20%) at an acarbose (positive control) mass concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$. The half-maximal inhibitory concentration of ARs against α -amylase and α -glucosidase were 48.02 and 33.29 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The inhibition types were identified as reversible and competitive inhibitions for both enzymes. The docking score was -4.864, and the molecular mechanics with generalized Born and surface area solvation result was -44 kcal/mol. The low docking score and binding free energy indicated that ARs bound more stably to and had a greater inhibitory effect on α -glucosidase than on α -amylase. At the molecular level, ARs bound to the amino acids PHE327, ASN544, LYS811, and SER556 of α -glucosidase mainly through hydrogen bonds, hydrophobic interactions, and water bridges. Experimental studies and theoretical analysis showed that wheat ARs strongly inhibit α -amylase and α -glucosidase and thus can be used as a natural inhibitor of these enzymes. These findings may guide the development of functional foods or low-glycemic-index foods for regulating blood glucose.

Key words: wheat alkylresorcinol, α -amylase, α -glucosidase, molecular docking, molecular simulation dynamics

糖尿病是一类具有遗传倾向的内分泌系统疾病^[1],已成为全球性的健康问题。据统计,全球约20亿人受到其影响,主要表现为持续的高血糖状态。这种长期的血糖异常及其并发症不仅直接损害患者的身体健康,还对其生活质量产生严重影响^[2]。在糖尿病的治疗和控制中,饮食调控起着至关重要的作用,因此开发低血糖生成指数(Glycemic Index, GI)食品以及能够调节血糖的功能性食品成为了当前食品研究的热点课题^[3]。在碳水化合物消化过程中, α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶发挥着关键的作用^[4],它们能够分解食物中的淀粉和多糖,释放出葡萄糖供身体利用。然而,对于糖尿病患者来说,过多的葡萄糖吸收会导致血糖迅速升高,进而引发一系列健康问题。因此,通过抑制这两种酶的活性,减缓糖类物质的吸收,成为了控制餐后血糖升高的有效策略^[5]。寻找新型、安全有效、副作用小的 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶活性抑制剂对研发具有调节血糖功能的食品具有重要意义^[6,7]。

近年来,烷基间苯二酚(Alkylresorcinols, ARs)作为一种主要存在于谷物皮层中、具有多种生物活性的天然成分,受到了研究者的广泛关注。 α -葡萄糖苷酶是II型糖尿病治疗中的一个重要靶点,小麦来源的ARs对其活性具有抑制作用^[8],这为开发新型、安全有效的血糖调节剂提供了新的思路。然而,尽管已有相关数据表明麦源ARs对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用,但其在分子层面的研究较少,作用机理尚不明确^[6]。该文通过酶反应动力学试验研究了ARs对 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶的抑制效果和抑制作用类型,并利用分子对接和分子模拟动力学进一步从分子层面阐明了ARs对 α -葡萄糖苷酶的抑制机制,为开发低GI食品和调节血糖产品提供了理论基础,也为糖尿病的治疗和控制提供了新的策

略和方向。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

小麦及麦麸:石家庄市农科院、河北黑马面粉厂提供;过硫酸钾、无水乙醇、正己烷、甲醇、可溶性淀粉、酒石酸钾钠、苯酚、碳酸钾、冰乙酸、无水碳酸钠、亚硫酸钠,天津市永大化学试剂有限公司;5-十七烷基间苯二酚标准品(纯度98 wt.%以上)、固蓝RR盐、2 000 U/g α -淀粉酶(来源于枯草芽孢杆菌),上海宝曼生物科技有限公司;石油醚,天津市百世化工有限公司;对硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)、3,5-二硝基水杨酸、Acarbose,罗恩试剂;10 U α -葡萄糖苷酶(来源于酿酒酵母),美国Sigma公司。

1.2 仪器与设备

S4-M71 粉碎机,九阳股份有限公司;KQ3200DE型数控超声波清洗器,中国昆山市超声仪器有限公司;SZF-06A粗脂肪测定仪,中国上海新嘉电子有限公司;HH-S4电热恒温水浴锅,北京科伟永兴仪器有限公司;BE52CS-1旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;SHB-III循环水式真空泵,河南省予华仪器有限公司;ST3100 pH计,奥豪斯仪器有限公司;Multiskan FC型酶标仪,赛默飞世尔(上海)仪器有限公司;96孔可拆酶标板,美国康宁。

1.3 试验方法

1.3.1 麦麸中ARs的提取

具体操作流程见图1,并利用有机溶剂对甲醇粗提物萃取除杂后得到烷基间苯二酚系列物于4℃下保存备用。

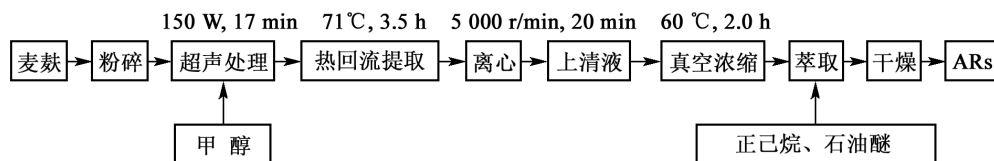


图1 麦麸 ARs 的提取流程

Fig.1 Extraction process of ARs from wheat bran

1.3.2 麦麸中ARs的含量测定

取 1 mL 甲醇溶解后得 ARs 样品溶液，用甲醇稀释 50 倍，混匀后，取 2 mL 稀释后得溶液，与 4 mL 固蓝 RR 盐工作液混合，加入适量质量分数为 5% 碳酸钾溶液，常温下反应 20 min 后使其显色反应稳定。以甲醇作为空白对照，在 480 nm 波长处测吸光值，重复三组平行试验。根据公式 (1) (2) 计算麦麸中 ARs 含量。

$$A = \frac{C \times V \times K}{m} \times 10^{-6} \times 100\% \quad (1)$$

$$C = \frac{B + 0.000125}{0.05152} \quad (2)$$

式中

A——得率，%；

C——样品中 ARs 的实际质量浓度，μg/mL；

V——所得提取液最终体积，mL；

K——稀释倍数（50 倍）；

m——称取粉碎紫小麦的质量，g；

B——ARs 样品在 480 nm 处测得的吸光值。

1.3.3 α-淀粉酶活性抑制试验

取 0.5 mL 1 U/mL α-淀粉酶溶液：用 pH 值为 6.8 磷酸盐溶液（Na₂HPO₄、NaH₂PO₄）配制，分别与 0.5 mL ARs 样品溶液混合，37 °C 水浴 10 min 后与 1 mL 0.5 wt.% 淀粉溶液混匀，再次水浴后加入 3,5-二硝基水杨酸（3,5-Dinitrosalicylic Acid, DNS）显色剂 2 mL，沸水浴 5 min 后冷却至室温，稀释 30 倍，于波长 540 nm 处测吸光值。以 Acarbose 作阳性对照。分别计算抑制率：

$$Y = \frac{A_1 - (A_2 - A_0)}{A_1} \times 100\% \quad (3)$$

式中：

Y——抑制率，%；

A₀——pH 值为 6.8 磷酸盐溶液测定吸光值；

A₁——甲醇测定吸光值；

A₂——样品测定吸光值。

并利用回归方程计算 ARs 及 Acarbose 的 IC₅₀ 值。

1.3.4 对α-淀粉酶抑制作用的动力学试验

绘制酶活力与反应速率关系曲线：淀粉质量浓度（10 mg/mL）不变，配制 5 个不同酶活力的 α-淀粉酶（0.5、1、2、3、4 U/mL），按 1.3.3 方法分别测定不同质量浓度 ARs 反应体系的吸光值，并计算反应速率。

绘制 Lineweaver-Burk 双倒数曲线：固定 α-淀粉酶酶活力（1 U/mL），以淀粉作为底物，分别配制 5 个不同质量百分比的淀粉溶液（0.5 wt.%、1.0 wt.%、1.5 wt.%、2.0 wt.%、2.5 wt.%），按 1.3.3 方法分别测定不同质量浓度 ARs 反应体系的吸光值，并计算酶反应速率。绘制二者关系图线，结合米氏方程确定小麦中 ARs 对 α-淀粉酶酶活力的抑制类型。

1.3.5 α-葡萄糖苷酶活性抑制试验

根据魏东伟^[9]的方法进行试验并在波长 405 nm 处测定反应体系吸光值；以 Acarbose 作阳性对照。分别计算抑制率：

$$Y = \frac{A_1 - (A_2 - A_0)}{A_1} \times 100\% \quad (4)$$

式中：

Y——抑制率，%；

A₀——缓冲溶液测定吸光值；

A₁——甲醇测定吸光值；

A₂——样品测定吸光值。

并利用回归方程计算 ARs 及 Acarbose 的 IC₅₀ 值。

1.3.6 对α-葡萄糖苷酶抑制作用的动力学试验

绘制酶活力与反应速率关系曲线：底物 PNPG 质量浓度（5 mmol/L）不变，改变 α-葡萄糖苷酶的酶活力（1.25、2.5、5、7.5、10 U/mL），按 1.3.3 方法分别测定不同质量浓度 ARs 反应体系的吸光值，并计算酶反应速率。

绘制 Lineweaver-Burk 双倒数曲线：α-葡萄糖苷酶酶活力（10 U/mL）不变，设置 4 个不同底物 PNPG 质量浓度（1.25、2.5、5、7.5、10 mmol/L），按 1.3.4 方法分别测定不同质量浓度 ARs 反应体系的吸光值，计算酶反应速率。

1.3.7 分子对接实验

1.3.7.1 蛋白质预处理

采用 AlphaFold2 预测 α -葡萄糖苷酶 (PDB ID : 5NN8) 对应的晶体结构。对获得的蛋白质晶体采用薛定谔软件的 Protein Preparation Wizard 模块分别进行 Protein preprocess, Regenerate states of native ligand, H-bond assignment optimization, Protein energy minimization and remove waters 的处理。

1.3.7.2 配体预处理

对系列物 ARs 的 2D sdf 结构文件, 采用薛定谔中 LigPrep 模块进行处理并生成其所有 3D 手性构象。

1.3.7.3 活性位点识别

先采用薛定谔中的 SiteMap 模块预测最佳的结合位点, 然后采用薛定谔中的 Receptor Grid Generation 模块, 设置最合适的 Enclosing box 将预测出来的结合位点完美包裹, 软件为 Maestro (Version 13.5, Schrodinger), 将活性口袋中心设置为 X=47.69Å、Y=112.81Å、Z=14.75Å; 口袋半径的 X、Y、Z 轴均设置为 10Å, 并在此基础上获取活性位点。

1.3.7.4 分子对接

将处理好的配体系列物 ARs 与 α -葡萄糖苷酶的活性位点进行分子对接 (采用最高精度 XP 对接)。

1.3.8 分子动力学模拟实验

为了进一步优化蛋白质-小分子复合物的结合模式, 使用德斯蒙德程序进行了常规分子动力学模拟。OPLS4 力场用于参数化蛋白质和小分子, 而 SPCE 模型用于水溶剂。将蛋白质-小分子复合物置于立方体水箱中并溶剂化。通过添加 0.150 mol/L 氯化物和钠离子来中和系统的电荷。系统的能量最初使用最陡的下降最小化方法最小化 50 000 步。随后, 重原子的位置被限制为 NVT 和 NPT 平衡的另外 50 000 步。系统温度保持在 300 K, 系统压力保持在 1 bar。完成两个平衡阶段后, 执行 100 ns 的无限制仿真。分析了相互作用, 并使用 Maestro 2023 生成了动态轨迹动画。

1.3.9 数据分析

每个试验均做三组平行试验, 数据均取三次平行试验的平均值, 试验数据采用 Origin 9.1 软件进行处理。

2 结果与讨论

2.1 ARs的提取

麦麸醇提取物中会混有很多其他活性物质, 因

此需要对本试验甲醇提取物进行萃取分离^[10,11]。根据 ARs 溶解性, 选择甲醇为提取溶剂对粉碎处理后的麦麸进行超声辅助提取得到含有许多活性物质的粗提取物。接着根据各物质的溶解性质, 选择不同溶剂萃取提取物进行除杂。使用正己烷脱去溶解的部分脂肪, 接着将剩余的甲醇溶液部分迅速冷冻结晶, 通过真空抽滤去除甾醇类物质^[12]。根据酚酸、黄酮等酚类物质不溶于石油醚, 而 ARs 可溶于热石油醚的特性, 再利用 30~60 °C 的热石油醚分 3 次萃取得到 ARs 石油醚溶液, 经过真空干燥后, 得到 0.325 mg/g 烷基间苯二酚系列物于 4 °C 下保存备用。

2.2 ARs对 α -淀粉酶活性的抑制作用

图 2 显示, 随着 ARs 质量浓度增加, ARs 对 α -淀粉酶活性抑制作用会逐渐增大后趋于平缓。阳性对照组 Acarbose 对 α -淀粉酶活性抑制作用趋势与 ARs 相同, 但抑制率始终大于 ARs, 抑制作用明显优于 ARs, 主要是因为 Acarbose 属于抑制剂类降糖药物。经计算 ARs 的 IC_{50} 值为 48.02 $\mu\text{g/mL}$, Acarbose 的 IC_{50} 值为 30.60 $\mu\text{g/mL}$ 。当 ARs 质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时, ARs 的抑制率可以达到 58.68%, 表明 ARs 对 α -淀粉酶活性具有一定的抑制效果。Acarbose 是生物合成药物, 具有副作用, 而 ARs 作为小麦麸皮天然成分, 对于 α -淀粉酶活性具有积极抑制作用, 因此具有较大的发展潜力。

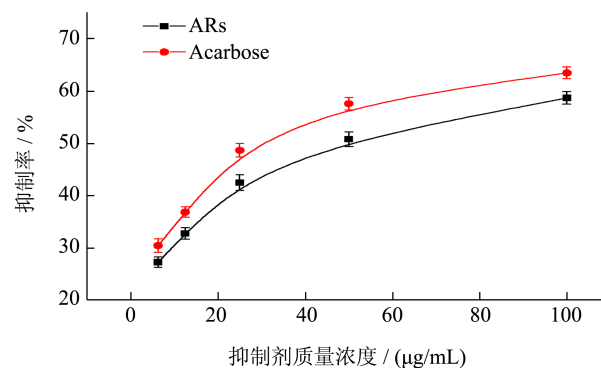


图 2 不同质量浓度的小麦 ARs 与 Acarbose 对 α -淀粉酶活性的抑制作用

Fig.2 Inhibition effects of different concentrations of wheat ARs and Acarbose on α -amylase activity

2.3 ARs对 α -淀粉酶的抑制类型的研究

由图 3 可知, 在 α -淀粉酶体系中加入不同质量浓度的小麦 ARs, 所得到的直线均通过原点, 有抑制剂存在时反应速率较低, 且直线斜率随着 ARs 质量浓度的增加而减小^[9,13]。由此可以判断, 该反应体

系中的抑制剂为可逆性抑制剂, 小麦 ARs 对 α -淀粉酶的抑制类型为可逆性抑制。

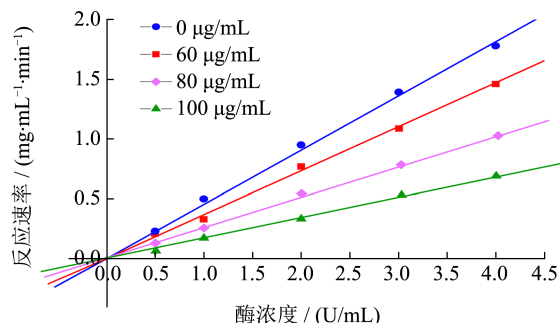


图3 小麦 ARs 对 α -淀粉酶的可逆性抑制作用

Fig.3 Reversible inhibition effects of wheat ARs on α -amylase activity

2.4 ARs对 α -淀粉酶的可逆性抑制类型的研究

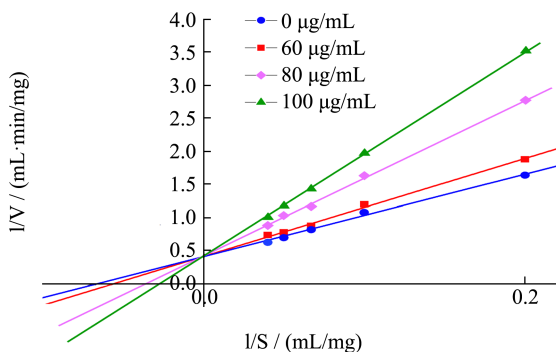


图4 小麦 ARs 对 α -淀粉酶抑制作用的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线

Fig.4 The Lineweaver-Burk double reciprocal curve of α -amylase inhibition by wheat ARs

如图4所示, 4条直线均交于纵轴, 且随着 ARs 质量浓度的增大, 直线斜率不断增大。当抑制剂质量浓度为 60 $\mu\text{g/mL}$ 参与反应时, 米氏常数 K_m 值为 17.83 mg/mL , 最大反应速率 V_m 为 2.41 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ 。当反应体系中无抑制剂条件时, α -淀粉酶催化淀粉分解的最大反应速率 V_m 为 2.42 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, V_m 值基本保持不变, 而米氏常数 K_m 值为 15.04 mg/mL , 有抑制剂较无抑制剂条件下增大, 说明 ARs 作为酶抑制剂符合竞争性抑制类型特点。由此可以判断, 小麦 ARs 抑制类型为竞争性抑制, 即 ARs 与 α -淀粉酶的结合部位与淀粉结合部位相似, 通过与底物竞争酶的活性位点达到降糖效果^[14]。图4显示, 有无抑制剂存在时, 两条图线相交于纵轴略有偏差, 可能是由于 ARs 提取物中存在其他活性物质如酚

酸、多酚等对反应的影响。

2.5 ARs对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用

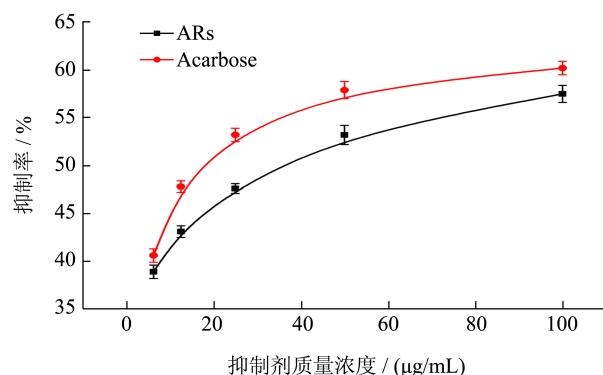


图5 不同质量浓度的小麦 ARs 与 Acarbose 对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用

Fig.5 Inhibition effects of different concentrations of wheat ARs and Acarbose on α -glucosidase activity

如图5所示, 随 ARs 的质量浓度的增加, ARs 对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制率不断增加, 后期逐渐平缓趋势, 呈现明显的量效关系, 说明 ARs 对 α -葡萄糖苷酶活性有明显的抑制作用。与 Acarbose 阳性对照组相比, ARs 抑制作用虽略低于 Acarbose, 但抑制趋势与其类似。

利用回归方程计算 ARs 及 Acarbose 的 IC_{50} 值^[15,16], 分别为 33.29、19.07 $\mu\text{g/mL}$ 。当 ARs 质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时, ARs 的抑制率为 (57.49%) 略低于 Acarbose 的抑制率 (60.20%), 但依旧具有良好的抑制效果。由此可知, ARs 对 α -葡萄糖苷酶活性有一定的抑制作用, 可以作为一种潜在的 α -葡萄糖苷酶抑制剂。

2.6 ARs对 α -葡萄糖苷酶的抑制类型的研究

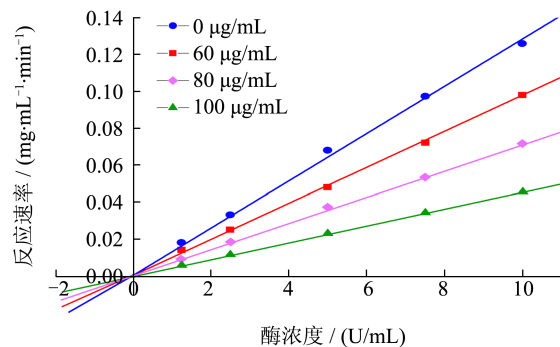


图6 小麦 ARs 对 α -葡萄糖苷酶的可逆性抑制作用

Fig.6 Reversible inhibition effects of wheat ARs on α -glucosidase

表 1 分子对接分数表
Table 1 Molecular docking score table

抑制剂 / 靶点	XP GScore/(kcal/mol)	MM-GBSADG Bind/(kcal/mol)	Glide emodel/(kcal/mol)
Acarbose/ α -葡萄糖苷酶	-12.384	-33.99	-70.189
ARs/ α -葡萄糖苷酶	-4.864	-44	-52.237

图 6 所示为在反应体系中有无抑制剂存在下， α -葡萄糖苷酶活力与反应速率的抑制动力学曲线，四条直线均过原点，且直线斜率随着抑制剂浓度增大而减小。由此可以说明 ARs 对 α -葡萄糖苷酶的抑制类型为可逆性抑制。

2.7 ARs对 α -葡萄糖苷酶的可逆性抑制类型的研究

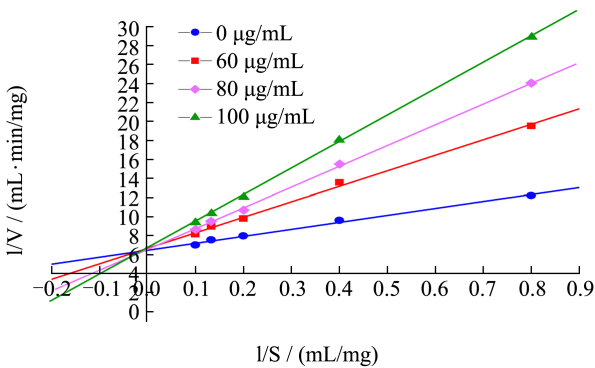


图 7 小麦 ARs 对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的
Lineweaver-Burk 双倒数曲线

Fig.7 The Lineweaver-Burk double reciprocal curve of α -glucosidase inhibition by wheat ARs

图 7 反映了底物 (PNPG) 倒数 (1/S) 与酶反应速率倒数 (1/V) 之间的关系。有无抑制剂的两条直线于纵轴处相交，且有抑制剂作用时的直线斜率大于无抑制剂作用时的直线斜率，根据回归方程可计算出，在抑制剂质量浓度为 60 $\mu\text{g/mL}$ 的条件下，米氏常数 K_m 值为 2.43 mg/mL ，最大反应速率 V_m 为 0.149 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ 。在抑制剂质量浓度为 0 $\mu\text{g/mL}$ 时， α -葡萄糖苷酶催化底物 PNPG 分解的最大反应速率 V_m 为 0.154 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ，米氏常数 K_m 值为 1.13 mg/mL 。 V_m 值与有抑制剂条件下相差较小，基本保持不变。而米氏常数 K_m 值，在有抑制剂条件下比无抑制剂条件下增大了，符合竞争性抑制类型特点^[17,18]。由此可以判断，小麦 ARs 对 α -葡萄糖苷酶抑制类型为竞争性抑制。表明 ARs 能够与底物共同竞争 α -葡萄糖苷酶的活性位点，进而降低酶活。图 7 显示，有无抑制剂存在时，两条图线相交于纵轴略有偏差，

可能是由于 ARs 提取物中存在其他活性物质对反应的影响。

2.8 分子对接分析

分子对接常用于评估受体 - 配体相互作用模式和结合亲和力^[19]。XP 对接结果需参考 XP Gscore，一般认为该值越小，表明配体与蛋白结合性能越稳定^[20-22]。MM-GBSA 分析结果则参考 MM-GBSADG Bind，当该值低于 -30 kcal/mol ，则表明结合自由能低，配体与蛋白结合稳定^[23,24]。Acarbose、ARs 对 α -葡萄糖苷酶的对接数据如表 1 所示。Acarbose、ARs 与 α -葡萄糖苷酶对接得分分别为 -12.384、-4.864，表明 Acarbose 与 α -葡萄糖苷酶结合更稳定；Acarbose、ARs 的 MM-GBSA 结果相近，结合自由能低，表明 ARs 与 α -葡萄糖苷酶结合较稳定。

综合分析 XP 对接与 MM-GBSA 结果^[25]，ARs 结合到 α -葡萄糖苷酶活性口袋的表面。由图 8a、8b 可知， α -葡萄糖苷酶活性中心为 THR542、ARG541 和 THR456，结合位点位于疏水结合腔内部。ARs 与 α -葡萄糖苷酶的残基 PRO453、LEU545 形成疏水作用力，与残基 ASN544、ASP812 各形成一个氢键，与残基 LYS569 形成一个氢键和一个 π -Cation (π 阳离子)。ARs 与 Acarbose 都能够与残基 ASN544、LYS569 形成氢键，且 Acarbose 能够与更多残基作用，因此抑制效果更佳，与前述实验结果一致。分析表明通过降低结合能以及增加与受体 α -葡萄糖苷酶结合的氢键、疏水作用力比例，能够有效提高 ARs 调节血糖功效的可能性^[26,27]。

2.9 分子动力学模拟分析

2.9.1 ARs与 α -葡萄糖苷酶RMSD、RMSF分析

为了推导 ARs 活性位点残基的动态行为，对 ARs 与 α -葡萄糖苷酶进行 100 ns 的 MD 模拟，并对其分子动力学轨迹进行分析^[28,29]。 α -葡萄糖苷酶 (蓝色) 与 ARs、Acarbose (红色) RMSD 结果如图 9a、9b 所示，其中较小的波动表明所有的配合物都获得了稳定的构象^[30]，结果显示 ARs 体系的

RMSD 值整体比 α -葡萄糖苷酶体系的数值低, 相较于 Acarbose 与 α -葡萄糖苷酶在 70 ns 之后相对稳定, ARs 与 α -葡萄糖苷酶在 10 ns 之后相对稳定, 系统处于平衡状态时间更短, 表明 ARs 的结合导致了酶体系趋于稳定^[31]。

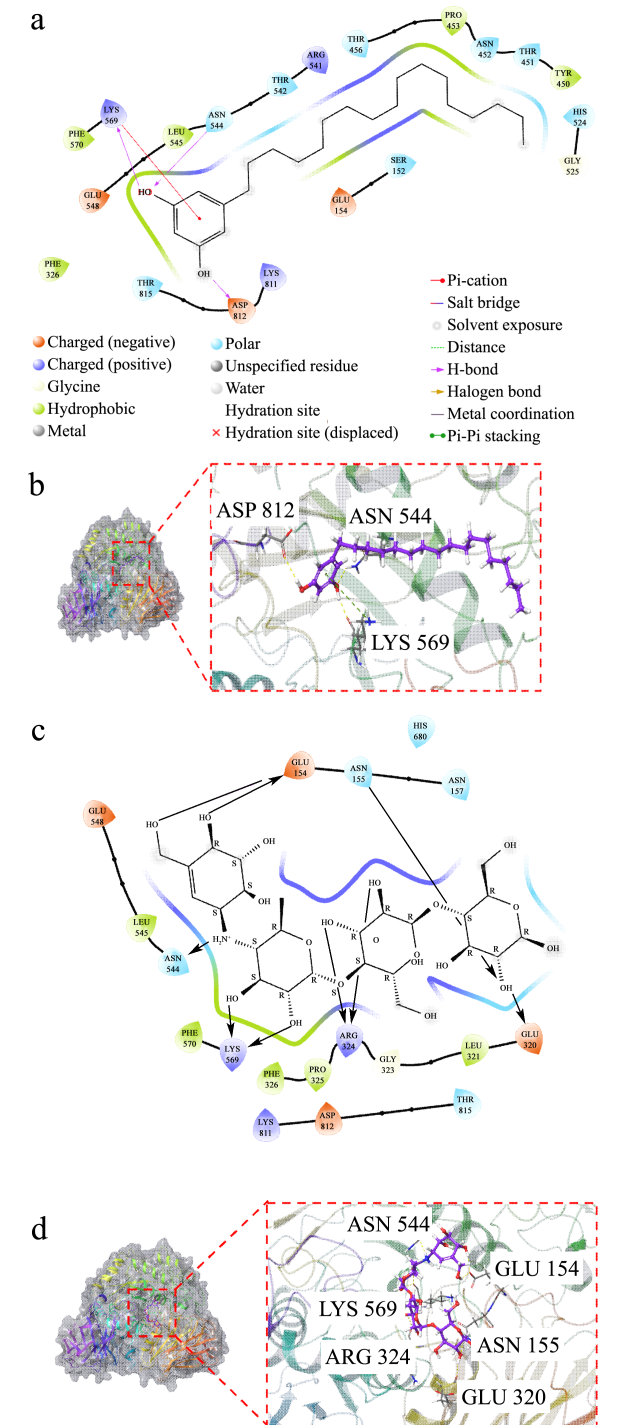


图 8 分子对接 2D、3D 图

Fig.8 2D and 3D diagrams of molecular docking
注: 黄色代表氢键, 绿色代表 π -Cation (π 阳离子) 键。
a、b 为 ARs 与 α -葡萄糖苷酶对接图, c、d 为 Acarbose 与 α -葡萄糖苷酶对接图。

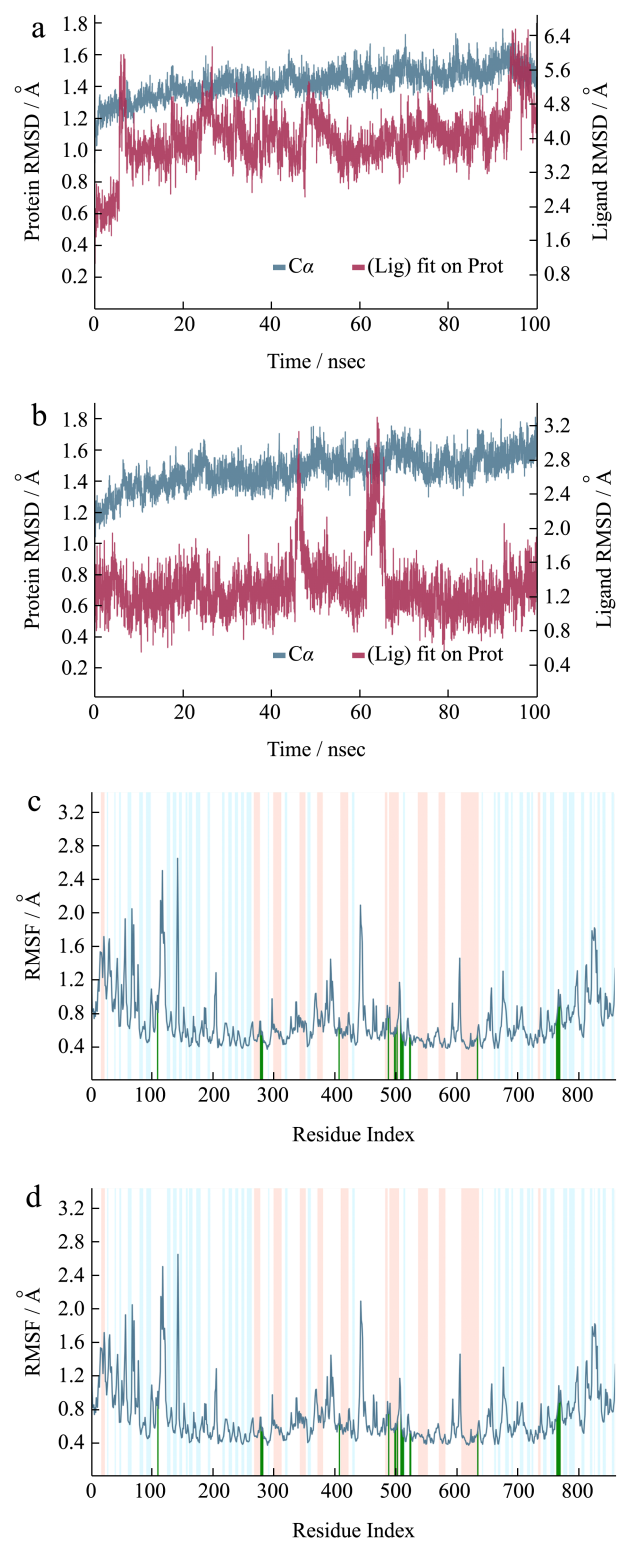


图 9 RMSD 结果及 RMSF 变化情况图

Fig.9 Results of RMSD and changes of RMSF
注: a、b 中蛋白为蓝色, 配体为红色。c、d 中红色代表 α 螺旋区域, 蓝色代表 β 折叠区域。a、c 为 ARs 与 α -葡萄糖苷酶, b、d 为 Acarbose 与 α -葡萄糖苷酶。

RMSF 可用于表征蛋白质链的局部变化, 能够指示蛋白结构灵活性, 峰值表示在模拟过程中波

动最大的蛋白质区域^[32,33]。结果如图 9c、9d 所示, ARs 与 α -葡萄糖苷酶的 C α 原子的平均 RMSF 值分别为 1.738 Å 和 1.257 Å, ARs 与 α -葡萄糖苷酶结合后, 蛋白在 110~120AA、130~135 AA、440~450 AA 等残基区域表现出较高的结构灵活性, 与阳性对照基本一致。

2.9.2 ARs与 α -葡萄糖苷酶相互作用分析

蛋白与配体的相互作用可以在整个模拟过程中进行监测, 其相互作用可分为四种类型: 氢键、疏水作用、离子桥和水桥。如图 10a、10b 所示, ARs 与 Acarbose 的结果差别较明显。对 ARs 与 α -葡萄糖苷酶的结合起到重要作用的氨基酸主要有 PHE327、ASN544、LYS811 和 ASP812, 其相互作用主要为氢键、疏水作用和水桥^[34]。

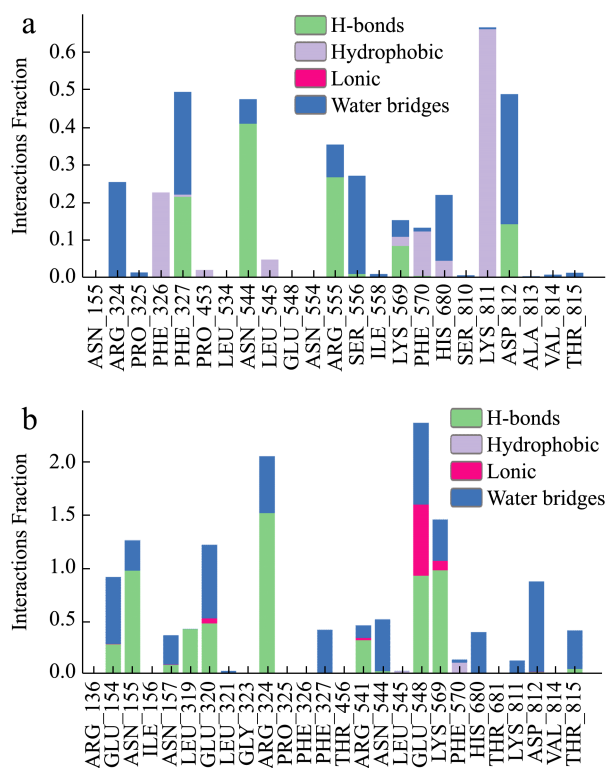


图 10 结合位点的氨基酸对蛋白结合的贡献

Fig.10 Contribution of amino acids at binding sites to protein binding

注: (a) ARs; (b) Acarbose。

化合物与蛋白质残基相互作用的详细示意图, 显示了在选定轨迹中发生超过 10.0% 模拟时间的相互作用^[35]。结果如图 11 所示, ARs 中起到关键结合作用的部位集中于间苯二酚结构, 而烷基链基本没有起到太多作用, 主要是因为苯环上的电子离域作用能够促进酚羟基发生离子化。苯环上的两个羟

基基团主要协调了氢键的相互作用, 与 α -葡萄糖苷酶的氨基酸残基形成了多个氢键。其中, ARs 与 α -葡萄糖苷酶的氨基酸残基 ARG555 (26%)、ASN544 (31%)、PHE327 (15%) 直接形成氢键, 与残基 PHE327 (24%)、SER556 (26%)、ASP812 (22%)、ARG324 (24%)、HIS680 (13%) 通过水桥间接形成氢键, 氢键的形成可以促进结合稳定性。残基 LYS811 和残基 PHE326 主要借助疏水作用力, 另外, ARs 与残基 LYS811 (65%) 直接形成 π -Cation (π 阳离子) 键, 与残基 PHE326 (14%) 直接形成 π - π 键。通过图 12 对比发现, Acarbose 与残基 ARG324 (81%)、ASN544 (37%)、ASP812 (50%)、PHE327 (40%) 也形成了氢键, 表明配体 ARs 在 α -葡萄糖苷酶活性位点保持稳定并与关键残基建立强相互作用的能力^[36]。

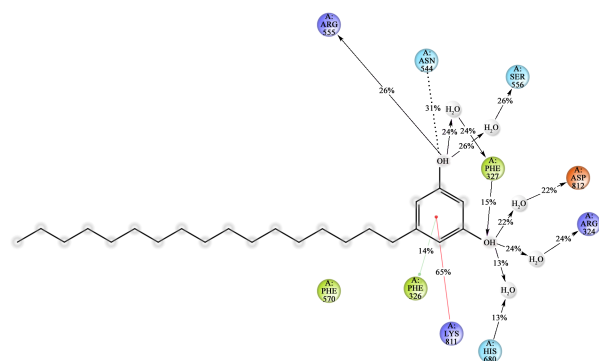


图 11 ARs 与 α -葡萄糖苷酶相互作用结果图

Fig.11 Results of ARs interaction with α -glucosidase

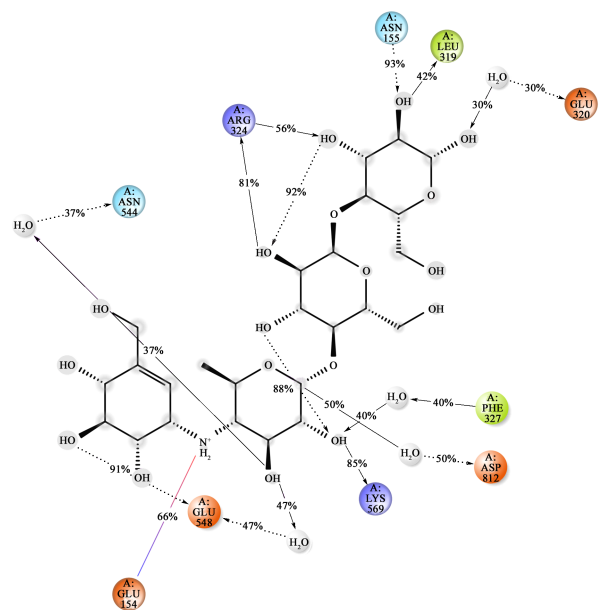


图 12 Acarbose 与 α -葡萄糖苷酶相互作用结果图

Fig.12 Results of interaction between Acarbose and α -glucosidase

3 结论

该文探究了小麦 ARs 对 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶的抑制作用, 并利用酶促动力学模型与 Lineweaver-Burk 曲线对其抑制类型进一步分析, 通过分子对接实验及模拟动力学讨论了 ARs 对 α -葡萄糖苷酶的抑制机理。根据酶促动力学模型分析, ARs 对 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶的抑制作用类型均属于可逆竞争性抑制, 即 ARs 与 PNPG 通过竞争方式与酶分子相关位点结合, 减少底物和酶的结合, 以此控制血糖。通过分子对接实验进一步得出 ARs 与 α -葡萄糖苷酶对接得分分为 -4.864, MM-GBSA 结果为 -44 kcal/mol, 结合自由能低, 结合较稳定。对 ARs 与 α -葡萄糖苷酶的结合起到重要作用的氨基酸主要有 PHE327、ASN544、LYS811 和 ASP812, ARs 结合到 α -葡萄糖苷酶的活性口袋的表面, 与 α -葡萄糖苷酶的残基 PRO453、LEU545 形成疏水作用力, 与残基 ASN544、ASP812 各形成一个氢键, 与残基 LYS569 形成一个氢键和一个 π -Cation (π 阳离子) 键。ARs 能够结合 α -葡萄糖苷酶催化位点, 与葡萄糖竞争 α -葡萄糖苷酶结合区域, 进而降低酶催化效率。参与氢键的残基在最初的分子对接和随后的 MD 模拟中保持一致, 表明这些特定的残基在与 ARs 相互作用中起着至关重要的作用, 进一步显示出 ARs 具备调节血糖的潜力。ARs 可作为一种天然 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶抑制剂, 对开发调节血糖功能性食品或低 GI 食品具有指导意义。

参考文献

- [1] 程艳刚,李国艳,谭金燕,等.分心木总黄酮体外抗氧化活性及对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制作用研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2018,20(8):22-25.
- [2] 郭祥倩.合理膳食 健康受益[N].中国家庭报,2024-02-26(2).
- [3] 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.
- [4] 闫苍,孙雅男,李书国.藜麦中酚类物质的种类、生物活性及其加工利用[J].粮食加工,2022,47(2):30-36.
- [5] 丘建媚,李菲菲,温正辉,等.琴叶榕根提取物对 α -葡萄糖苷酶、 α -淀粉酶的抑制作用[J].中国民族民间医药,2019,28(14):26-29.
- [6] 屠洁,刘冠卉,朱淑云,等.5-二十烷基间苯二酚抑制 α -葡萄糖苷酶活性的分子机制[J].食品科学,2017,38(19):116-121.
- [7] 魏爱红,李晓虹,曾煌,等.枇杷抑制 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶活性部位的筛选及其酶动力学[J].食品与发酵工业,2023,49(5):53-59.
- [8] 黄清清.麦麸中烷基间苯二酚的富集、纯化及其淀粉复合体外消化特性的研究[D].镇江:江苏大学,2022.
- [9] 魏东伟,刘欣,谢娟娟,等.金桂和丹桂对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的研究[J].食品科技,2022,47(12):200-208.
- [10] 杨新童,李亨,李书国.麦源烷基间苯二酚的提取及其功能特性研究进展[J].粮食与油脂,2022,35(2):6-9,24.
- [11] 黄清清.麦麸中烷基间苯二酚的富集、纯化及其淀粉复合体外消化特性的研究[D].镇江:江苏大学,2023.
- [12] MARYAM I, ZHANG H J, ASRA I, et al. Study on optimization of ultrasonic assisted extraction of phenolic compounds from rye bran [J]. Food Science and Technology, 2020, 134: 110243.
- [13] 李波,包怡红,高峰,等.红松球鳞片多酚对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制作用[J].食品工业科技,2015,36(1):63-65.
- [14] 马利华,郁曼曼.槐花醇提取物对 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶的抑制作用[J].食品工业,2019,40(4):161-164.
- [15] LUAN J S, HU B C, WANG S Z, et al. Selectivity mechanism of BCL-XL/2 inhibition through in silico investigation [J]. Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP, 2022, 24(28): 17105-17115.
- [16] LIN X. A review on applications of computational methods in drug screening and design [J]. Molecules, 2020, 25(6): 1375.
- [17] ALI S M, SINGH E, MUTHUKUMARAN J, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drug effect on the binding of plasma protein with antibiotic drug Ceftriaxime: Spectroscopic and in silico investigation [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(19): 14811.
- [18] HOU Y K, BINMAL C, KEMIN M, et al. Bioactivity of collagen peptides derived from commercial animals: In silico investigation [J]. Food Science and Technology, 2023, 187: 115381.
- [19] TIAN J L, SI X, WANG Y H, et al. Bioactive flavonoids from Rubus corchorifolius inhibit α -glucosidase and α -amylase to improve postprandial hyperglycemia [J]. Food Chemistry, 2021, 341: 128149.
- [20] NAOKI W, RYUNOSUKE Y, NOBUAKI Y, et al. Exploring the selectivity of inhibitor complexes with Bcl-2 and Bcl-XL: A molecular dynamics simulation approach [J]. Journal of Molecular Graphics and Modelling, 2018, 79, 166-174.
- [21] CHEN J Z, WANG W, PANG L X, et al. Unveiling conformational dynamics changes of H-Ras induced by mutations based on accelerated molecular dynamics [J]. Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP, 2020, 22(37): 21238-21250.
- [22] MADHAVI G S, ADZHIGIREY M, DAY T, et al. Protein

- and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments [J]. *Journal of Computer Aided Molecular Design*, 2013, 27(3): 221-234.
- [23] FRIESNER R A, MURPHY R B, REPASKY M P, et al. Extra precision glide: Docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2006, 49(21): 6177-6196.
- [24] 郭妍,郭怡琳,刘柏平,等.基于分子动力学模拟与实验验证探讨黄芩素抑制PD-1/PD-L1相互作用的分子机制[J]. *食品工业科技*, 2024, 45(2): 40-47.
- [25] CHEN D, OEZGUEN N, URVIL P, et al. Regulation of protein-ligand binding affinity by hydrogen bond pairing [J]. *Science Advances*, 2016, 2(3): 501240.
- [26] DEVLEENA S, JOSHUA W, WU Y J, et al. Prediction of absolute solvation free energies using molecular dynamics free energy perturbation and the OPLS force field [J]. *Journal of Chemical Theory and Computation: JCTC*, 2010, 6(5): 1509-1519.
- [27] LI J, ABEL R, ZHU K, et al. The VSGB 2.0 model: a next generation energy model for high resolution protein structure modeling [J]. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 2011, 79(10): 2794-2812.
- [28] IRINA M, PETER K A. Computational alanine scanning to probe protein-protein interactions: a novel approach to evaluate binding free energies [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1999, 121(36): 8133-8143.
- [29] WANG M, SUN Q, YANG C, et al. Molecular dynamics simulation of thermal de-icing on a nanochannel with hot fluids [J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2022, 354: 118859.
- [30] BAI M N, HUO E G, ZHANG W J, et al. Supercritical water gasification of waste R410A refrigerant mixture for the resource utilization: ReaxFF reactive molecular dynamic simulation and density functional theory calculation study [J]. *International Journal of Refrigeration*, 2024, 158: 25-34.
- [31] DENG X Q, XU X X, HUANG Y F, et al. A novel constant pressure control method for nucleation boiling of CO₂/lubricant in molecular dynamics simulation [J]. *International Journal of Refrigeration*, 2024, 158: 35-46.
- [32] MA Y F, JIN M, LI W W, et al. Effect of drying method on calcium silicate hydrate (C-S-H): Experiments and molecular dynamics simulations study [J]. *Construction and Building Materials*, 2024, 411: 134-367.
- [33] FAN J, LIU S S, GAO C, et al. Molecular dynamic simulation on the transport properties of alcohols [J]. *Case Studies in Thermal Engineering*, 2022, 32: 101888.
- [34] GAO J, WANG Y C, LI K H, et al. Comparative analysis of compound NSC13728 as Omomyc homodimer stabilizer by molecular dynamics simulation and MM/GBSA free energy calculation [J]. *Journal of Molecular Modeling*, 2022, 28(4): 92-92.
- [35] XIAO Z B, QU H L, MAO C T, et al. Study on the sweetening mechanism of aroma compounds in yangshan peach using sensory analysis, molecular docking, and molecular dynamics simulation techniques [J]. *Food Science and Technology*, 2024, 191: 115562.
- [36] MAHESWATA M, ANURADHA D, NARAYAN S S, et al. Evaluation of binding performance of bioactive compounds against main protease and mutant model spike receptor binding domain of SARS-CoV-2: Docking, ADMET properties and molecular dynamics simulation study [J]. *Journal of the Indian Chemical Society*, 2022, 99(4): 100417.