

桑叶酚类化合物抑制脂肪酶的作用机制及构效关系

梅春莹^{1,2}, 李倩^{2*}, 刘凡², 邢东旭², 邹宇晓^{1,2*}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

(2. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 农业农村部功能食品重点实验室, 广东广州 510610)

摘要: 桑叶中酚类化合物可降低脂肪的消化吸收从而达到减肥的功效, 但其与脂肪酶的相互作用机制仍有待阐明。该研究通过体外脂肪酶活性实验考察桑叶中主要的 12 种酚类化合物对脂肪酶的抑制作用, 发现具有相同母核结构的金丝桃苷和芦丁抑制脂肪酶活性较好。采用荧光光谱分析、FTIR 分析结合分子对接模拟技术进一步研究金丝桃苷和芦丁对脂肪酶的抑制机理。荧光光谱分析表明, 金丝桃苷和芦丁与脂肪酶的猝灭方式为静态猝灭作用, 且在 25 °C 和 30 °C 时, 脂肪酶与金丝桃苷的结合常数 (365.79×10^{11} 、 136.27×10^{11} L/(mol s)) 大于与芦丁的结合常数 (4.50×10^{11} 、 2.08×10^{11} L/(mol s))。FTIR 分析表明, 金丝桃苷和芦丁与脂肪酶结合改变了脂肪酶的二级结构。分子对接分析表明, 金丝桃苷和芦丁通过氢键和疏水作用与脂肪酶进行结合, 从而抑制酶活性, 且脂肪酶与金丝桃苷的 ΔG (-29.21 kcal/mol) 小于与芦丁的 ΔG (-20.89 kcal/mol)。该研究揭示桑叶酚类化合物对脂肪酶的抑制机理, 为桑叶减肥功能食品研发奠定理论基础。

关键词: 酚类化合物; 脂肪酶; 相互作用; 分子对接

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.9.0892

The Mechanism and Structure-activity Relationship of Polyphenols in Mulberry Leaves Inhibiting Lipase

MEI Chunying^{1,2}, LI Qian², LIU Fan², XING Dongxu², ZOU Yuxiao^{1,2}

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. Sericulture and Agricultural Products Processing, Guangdong Academy of Agricultural Sciences Key Laboratory of Functional Food, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Research Institute, Guangzhou 510610, China)

Abstract: Polyphenols in mulberry leaves can reduce the digestion and absorption of fat to achieve weight loss, but the mechanism of their interaction with lipase remains to be clarified. In this study, the inhibitory effect of 12 polyphenols in mulberry leaves on lipase was investigated through lipase activity experiment *in vitro*. Hyperoside and rutin with the same parent structure were found to have better inhibitory activity on lipase. The inhibition mechanism of hyperoside and rutin on lipase was studied by fluorescence spectrum analysis, FTIR analysis and molecular docking simulation. The fluorescence spectrum analysis showed that the quenching mode of hyperoside and rutin with lipase was static quenching, and the binding constant of lipase with hyperoside 365.79×10^{11} , 136.27×10^{11} L/(mol s) was greater than that with rutin 4.50×10^{11} , 2.08×10^{11} L/(mol s) at 25 °C and 30 °C. FTIR analysis showed that hyperoside and rutin combined with lipase changed the secondary structure of lipase. Molecular docking analysis showed that hyperoside and rutin bind to lipase through hydrogen bonding and hydrophobic action, thus inhibiting enzyme activity, and the ΔG of lipase with hyperoside (-29.21 kcal/mol) is smaller than that of lipase with rutin (-20.89 kcal/mol). This study revealed the inhibition mechanism of phenolic compounds in mulberry leaves on lipase, and laid a theoretical foundation for the research and development of functional food for weight loss of mulberry leaves.

Keywords: polyphenols; lipase; interaction; molecular docking

收稿日期: 2024-06-25; 修回日期: 2024-07-28; 接受日期: 2024-08-08

基金项目: 国家重点研发计划项目课题 (2023YFD1600904); 广东省自然科学基金面上项目 (2024A1515011122); 广东省现代农业产业共性关键技术研发创新团队建设项目 (2024CXTD16)

作者简介: 梅春莹 (2001-), 女, 硕士, 研究方向: 食品工程, E-mail: 3530626182@qq.com

通讯作者: 邹宇晓 (1973-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 药食两用特色农产品资源开发, E-mail: yuxiaozou@163.com; 共同通讯作者: 李倩 (1989-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品科学、蚕桑与药食资源加工利用, E-mail: liqian.hubei@163.com

随着全球肥胖人数日益增多,肥胖已经成为世界范围内普遍存在的代谢性疾病,其特征是脂肪在体内过度堆积^[1]。肥胖会限制人们的活动,同时也会引起一系列并发症,例如心血管疾病、高脂血症、高血压、糖尿病等,严重影响人们日常生活^[2]。导致肥胖的一个重要原因是过量摄入甘油三酯^[3]。甘油三酯被脂肪酶水解后被吸收,因此,抑制脂肪酶活性可以减少甘油三酯的水解和进一步吸收,从而控制和预防肥胖。

奥利司他是临床治疗中常用的一种抗肥胖药物^[1],通过与脂肪酶的氨基酸结合使脂肪酶失活来抑制脂肪的利用和吸收^[4]。然而肠胃胀气、腹泻等胃肠道副作用使奥利司他的使用受到限制^[1]。因此,目前迫切需要探索无副作用的高效天然产物作为可以替代奥利司他临床使用的脂肪酶抑制剂来预防和控制肥胖。

桑树是我国重要的经济和生态树种,栽培历史悠久^[5]。桑叶作为药食同源的食物,具有降血脂、降血糖、抗炎等多种生理活性,可作为天然植物来源的脂肪酶抑制剂,以调节脂质代谢^[6]。酚类化合物是广泛存在于各种植物中的一类生物活性极高的天然产物,具有减肥、降脂等多种功效,且毒性和副作用低^[7-9]。桑叶具有降脂作用,与其含有的酚类化合物密切相关^[10]。桑叶总提取物降脂作用已有不少研究报道^[11],但对其含有的酚类化合物的降脂活性还缺乏系统性研究。

课题组前期发现桑叶中含有绿原酸、咖啡酸、金丝桃苷、芦丁、紫云英苷、槲皮素、龙胆酸、苯甲酸、香草酸、丁香酸、表儿茶素和儿茶素这 12 种酚类物质^[12-14]。本研究基于前期基础,进一步对桑叶中含有的多酚化合物进行体外脂肪酶抑制实验,比较其体外抑制脂肪酶活性强弱,并选择体外抑制酶活性最强的金丝桃苷和芦丁;进一步采用荧光光谱法、FTIR 分析和分子对接研究二者与脂肪酶的相互作用,以阐明酚类化合物和脂肪酶的相互作用机制,旨在揭示桑叶降脂的物质基础,为合理开发利用桑叶资源提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 材料及主要试剂

脂肪酶(CAS: 9001-62-1),购于上海麦克林生化科技股份有限公司;4-甲基伞形酮油酸酯(CAS:18323-58-5)、12 种酚类化合物(绿原酸、咖啡酸、金丝桃苷、芦丁、紫云英苷、槲皮素、龙胆酸、苯甲酸、香草酸、丁香酸、表儿茶素、儿茶素)和奥利司他,购于广州市齐云生物技术有限公司;其它试剂:国产分析纯;实验用水:超纯水。

1.1.2 主要仪器

TECAN infinite 200 型酶标仪,瑞士 TECAN 公司;FDU-2110 型冷冻干燥机,日本东京理化器械股份有限公司;SKE-3S 超声波清洗机,宁波科麦仪器有限公司;VERTEX 70 傅里叶变换红外光谱仪,德国 Bruker 公司;pH 计,梅特勒-托利多上海有限公司;BS124S 型分析天平,德国赛多利斯科学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 脂肪酶抑制作用研究

参照课题组前期的方法^[11]。在黑色 96 孔板中通过荧光法测定脂肪酶活力,以 4-甲基伞形酮油酸酯为底物分别测定不同酚类化合物对脂肪酶的抑制作用。配制 pH 值为 8.0 的缓冲液、pH 值为 4.2 的 0.1 mol/L 柠檬酸钠溶液终止液、50 U/mL 脂肪酶溶液(溶剂为缓冲液)、不同浓度样品溶液(溶剂为超纯水,不溶水加少量 DMSO)、0.1 mmol/L 4-甲基伞形酮油酸酯溶液(溶剂为缓冲液)后,向黑色 96 孔板中依次加入脂肪酶溶液、样品溶液后混匀静置 3 分钟,再加 4-甲基伞形酮油酸酯,在 25 °C 静置 30 min 后,加终止液终止反应,酶标仪设置激发波长 355 nm、发射波长 460 nm,振板后测荧光值。同时做空白组对照、样品组对照和样品背景组。加样体积见表 1。按公式(1)计算脂肪酶抑制率:

$$I/\% = [1 - (Aa - Ab)/(Ac - Ad)] \times 100\% \quad (1)$$

式中:

I——表示脂肪酶抑制率;

Aa——是样品组荧光强度;

Ab——是样品背景组荧光强度（无脂肪酶）；
Ac——是样品对照组荧光强度（无样品）；
Ad——代表空白组荧光强度（无脂肪酶、无样品）。

表 1 反应液组成与体积
Table 1 Composition and Volume of Reaction Solution

试剂名称	反应液体积/ μL			
	Aa	Ab	Ac	Ad
样品溶液	25	25	-	-
超纯水	-	-	25	25
脂肪酶	25	-	25	-
缓冲液	-	25	-	25
底物	50	50	50	50
终止液	100	100	100	100
总计	200	200	200	200

注：“-”为此项不添加，样品溶液用同等体积的超纯水代替，脂肪酶用同等体积 pH 值为 8.0 的缓冲液代替。

1.2.2 荧光光谱分析

荧光实验参照 Zhang 等^[2]的方法。配制浓度为 50 U/mL 脂肪酶溶液（溶剂为 pH 值为 8.0 的缓冲液）、不同浓度样品溶液（溶剂为超纯水，不溶水加少量 DMSO）。在黑色 96 孔板中分别添加脂肪酶溶液 25 μL 、不同浓度样品溶液 25 μL ，轻晃混匀，测量 25、30 和 37 $^{\circ}\text{C}$ 下不同酚类化合物对脂肪酶活性的影响。将混合液分别在 3 个不同温度孵育 5min 后对混合物进行扫描。将激发和发射狭缝的宽度固定在 5 nm，激发和发射波长分别为 280 nm 和 300~500 nm。同时，以相应浓度的酚类化合物溶液和缓冲液为样品背景组，以 50 U/mL 脂肪酶为和超纯水为样品对照组。对应的猝灭常数（Kq）根据 Stern-Volmer 方程计算：

$$F_0 / F = 1 + K_{SV} [Q] = 1 + K_q \tau_0 [Q]$$
(2)

式中：
F₀ 和 F——分别为脂肪酶在不存在和存在酚类化合物时的荧光强度；
[Q]——为酚类化合物的浓度，式（3）同；
K_{SV}——是猝灭常数（L/mol）；
K_q——是速率常数（L/mol s）；
 τ_0 ——是蛋白质的平均寿命（ $\tau_0=10^{-8}\text{ s}$ ）。

对应的结合常数 Ka 和结合位点数 n 可根据双对数方程计算：

$$\lg[(F_0 - F) / F] = \lg K_a + n \lg [Q]$$
(3)

式中：
K_a——表示结合常数（L/mol）；
n——表示结合位点数。

1.2.3 FTIR 分析

参照 Zhang 等^[15]的方法。将脂肪酶与酚类单体-脂肪酶复合物冻干后分别与干燥的溴化钾粉末混匀研细，压片后用傅里叶红外光谱仪的 ATR 模式扫描图谱。扫描结果用 Peakfit 4.12 软件进行分峰处理，利用酰胺I带的光谱数据进行线性拟合，得到图谱各特征峰峰面积，根据峰面积计算各二级结构占比含量，分析酚类化合物加入后对脂肪酶二级结构的影响。

1.2.4 分子对接

分子对接已被广泛用于研究酶与抑制剂之间的 3D 结合模式^[16]。通过分子对接，建立酚类化合物与脂肪酶的 3D 结合模式。在 AutoDock Vina 1.1.2 软件中进行分子对接，脂肪酶（PDB ID:1lpb）的晶体结构取自 Protein Data Bank 蛋白质数据库^[17]，酚类化合物的分子结构取自 PubChem 数据库^[18]。分子对接开始前，通过 Pymol 软件去除

脂肪酶的水分子、盐离子以及小分子，在 MMFF94 力场进行能量最小化，处理完，将酚类化合物小分子及脂肪酶通过 ADFRsuite 1.04 软件调整为对接使用的 PDBQT 格式^[19]。将全局搜索详尽度调整为 32，其余参数不变，之后进行分子对接。

1.2.5 数据统计分析

基于三个独立实验进行脂肪酶抑制实验，利用 SPSS 22 软件对实验数据进行分析处理。采用 Microsoft Excel 2010 进行统计分析、Origin 8.0 进行图表绘制。

2 结果与讨论

2.1 体外脂肪酶的抑制作用分析

奥利司他体外抑制脂肪酶的 IC₅₀ 值为 1.27 mmol/L，其中金丝桃苷、芦丁和紫云英苷优于奥利司他。比较桑叶中 12 种酚类化合物的脂肪酶抑制活性，发现酚类化合物的化学结构对脂肪酶抑制活性有显著影响，结果如表 2 所示，总结酚类化合物的母核结构，如图 1 所示，发现初步的构效关系为：（1）化合物母核结构的影响。抑制脂肪酶活性强弱与化合物的母核结构有关，母核活性大致趋势为I>III>IV>II，拥有母核I结构的化合物抑制脂肪酶的活性最强，其中金丝桃苷和芦丁的脂肪酶抑制活性最优，分别为 0.14 和 0.41 mmol/L。（2）苯环酚羟基数量的影响。对于母核结构相同的绿原酸和咖啡酸（III结构），其苯环上的酚羟基数更多的绿原酸对脂肪酶的抑制活性更强。（3）羟基和甲氧基的影响。拥有 I 母核结构的槲皮素显著弱于金丝桃苷，说明羟基的活性显著弱于糖苷基团；拥有III母核结构的绿原酸活性优于咖啡酸，说明奎宁酸的活性略强于羟基；IV母核结构中，羟基和甲氧基数量的增加显著增强化合物的脂肪酶抑制活性，苯甲酸的活性最弱，而拥有两个甲氧基和一个羟基的丁香酸活性最强，香草酸的活性优于龙胆酸，说明甲氧基的活性强于羟基。（4）糖苷基团的影响。金丝桃苷活性明显强于芦丁，说明I母核中单糖苷的活性优于二糖苷。后续选择脂肪酶抑制活性最强的金丝桃苷和芦丁进行机制探究。Martinez 等^[20]发现辣椒中含有的酚类化合物（咖啡酸、槲皮素、辣椒素、对香豆酸）体外抑制脂肪酶效果最强的是槲皮素（IC₅₀ 值为 6.1 μmol/L）。Zhou 等^[21]研究了槲皮素对胰脂肪酶的抑制作用，发现槲皮素是一种混合型脂肪酶抑制剂（IC₅₀ 值为 70 ug/mL）。而本研究发现槲皮素体外抑制脂肪酶的效果一般，IC₅₀ 值为 2.7 mmol/L。Huang 等^[22]通过体外脂肪酶抑制实验研究桔皮素、褐皮素及其酸性羟基化形式 5-去甲基褐皮素和 5-去甲基褐皮素对猪胰脂肪酶的抑制活性，发现褐皮素的抑制活性最优，提示甲氧基基团对脂肪酶抑制有促进作用。在本研究中发现IV母核结构中含有甲氧基基团的多酚单体体外抑制脂肪酶的作用更强，也提示甲氧基基团对脂肪酶抑制有促进作用。

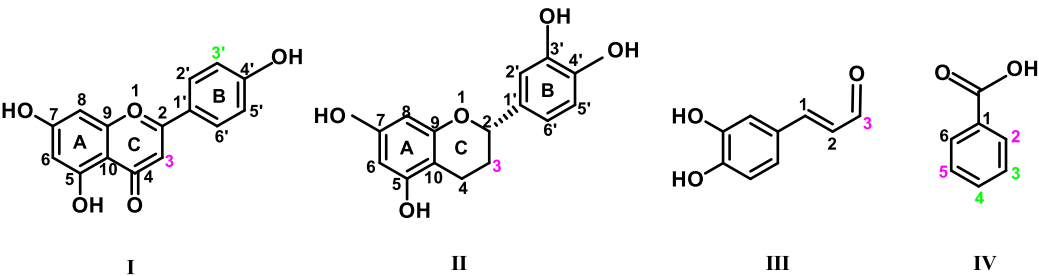


图 1 4 种酚类化合物的母核结构

Fig.1 4 parent nucleus structure of polyphenols

表 2 12 种酚类化合物的结构和 IC₅₀ 值（μg/mL）

Table 2 Structures and IC ₅₀ values of 12 phenolic compounds (ug/mL)								
序号	类型	名称	2	3	4	5	3'	IC ₅₀ /(mmol/L)
1	I	金丝桃苷		-吡喃半乳糖			-OH	0.14
2	I	芦丁		-葡萄糖-鼠李糖			-OH	0.41
3	I	紫云英苷		-葡萄糖				0.86
4	III	绿原酸		-奎尼酸				1.43
5	III	咖啡酸		-OH				1.45
6	IV	丁香酸		-OCH ₃	-OH	-OCH ₃		2.15

7	I	槲皮素	-OH	-OH	2.70
8	IV	香草酸	-OCH ₃	-OH	5.88
9	IV	龙胆酸	-OH	-OH	6.76
10	II	儿茶素	-OH		17.92
11	IV	苯甲酸			> 100

2.2 荧光分析

2.2.1 荧光猝灭类型分析

由图 2 和表 3 知，在实验浓度范围内，金丝桃苷和脂肪酶以及芦丁和脂肪酶的 Stern-Volmer 曲线均呈现良好的线性关系；随着温度升高，K_{SV} 值均降低，这表明金丝桃苷和芦丁分别与脂肪酶相互作用的猝灭机制可能是静态猝灭^[23]。前期研究表明，各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞猝灭常数为 2.0×10¹⁰ L/(mol s)^[24]。由表 3 可知，37℃下，金丝桃苷和芦丁的 K_q 值均远大于 2.0×10¹⁰ L/(mol s)，进一步证明猝灭是酚类单体-脂肪酶复合物形成的静态猝灭^[25]。Li 等^[23]采用多种光谱技术和计算模拟研究芹菜素对胰脂肪酶的抑制作用，发现在氢键的驱动下，芹菜素与胰脂肪酶之间形成复合物，导致胰脂肪酶通过静态方式进行荧光猝灭。

2.2.2 结合常数与结合位点数分析

根据双对数方程可求得三个温度下的 K_a 和 n 值，如表 3 所示。三个温度下，金丝桃苷与脂肪酶的结合位点数都接近 1，这表明它与酶的相互作用摩尔比为 1:1，拥有一个结合位点；芦丁与脂肪酶的结合位点数都接近 2，这表明它与酶的相互作用摩尔比为 1:2，拥有两个结合位点。随着温度的升高，它们的结合常数降低，因为升高的温度能够破坏非共价相互作用，降低复合物的稳定性^[26]。Wu 等^[25]通过荧光光谱发现槲皮素-鼠李糖苷对脂肪酶荧光猝灭作用较强，且随温度升高结合常数降低，结合位点数接近 1。

在所研究温度范围内，随温度的升高，金丝桃苷和芦丁的 K_a 值均降低，表明温度越高，复合物的稳定性越差^[27]。那么，在复合物稳定性较好的两个温度 25℃和 30℃时，金丝桃苷结合常数 K_a 分别为 365.79×10¹¹、136.27×10¹¹ L/mol，芦丁结合常数 K_a 分别为 4.50×10¹¹、2.08×10¹¹ L/mol。可以看出，这两个温度下金丝桃苷与脂肪酶的结合常数均远大于芦丁与脂肪酶的结合常数，表明金丝桃苷与脂肪酶之间有更强的结合能力。

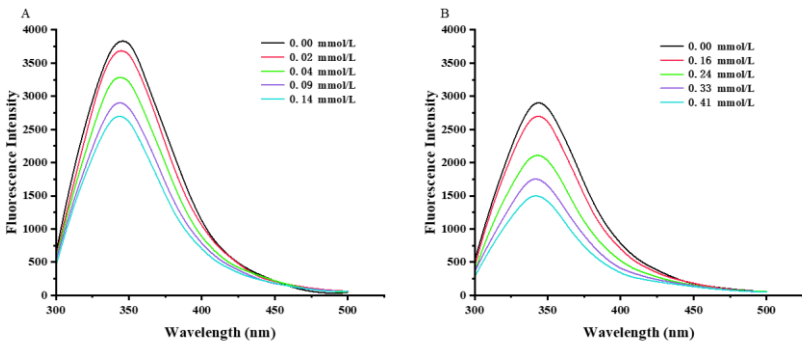


图 2 37℃下金丝桃苷和芦丁对脂肪酶荧光光谱的影响

Fig.2 Effect of hyperoside and rutin on the fluorescence spectra of lipase at 37 °C

表 3 金丝桃苷和芦丁与脂肪酶在 25、30 和 37℃下的猝灭常数、结合常数

Table 3 Quenching constants and binding constants of hyperoside, rutin and lipase at 25, 30 and 37 °C

酚类化合物	T/℃	K _{SV} /(×10 ³ L/mol)	K _q /(×10 ¹¹ L/(mol s))	K _a /(×10 ³ L/mol)	n
金丝桃苷	25	365.79±0.05	365.79±0.05	74.04±0.15	1.36
	30	136.27±0.04	136.27±0.04	45.92±0.30	1.21
	37	3.14±0.01	3.14±0.01	1.29±0.35	1.25
芦丁	25	4.50±0.01	4.50±0.01	35.02±0.22	1.83
	30	2.08±0.01	2.08±0.01	14.13±0.43	1.84
	37	1.16±0.01	1.16±0.01	4.86±0.80	1.90

2.3 FTIR 分析

酚类化合物与蛋白质的结合会改变蛋白的二级结构，从而影响蛋白的功能性质，FTIR 光谱进一步对酚类化合物-脂肪酶复合物进行研究，分析酚类化合物与脂肪酶的相互作用，以及添加酚类化合物后对脂肪酶二级结构的影响，结果如图 3 所示。

由红外光谱分析得出酰胺I带蛋白质二级结构相对含量，如表 4 所示，结果显示，添加金丝桃苷之后，脂肪酶的 α -螺旋、 β -反平行含量降低， β -折叠、 β -转角、无规则卷曲含量增加。 α -螺旋含量降低，表明除了 α -螺旋之外， β -折叠、 β -转角和无规则卷曲含量的增加对金丝桃苷-脂肪酶复合物的功能活性影响同样具有重要作用。而添加芦丁之后，脂肪酶的 β -折叠、 β -反平行含量下降， α -螺旋、 β -转角、无规则卷曲含量增加。 α -螺旋靠链内氢键维持^[28]， α -螺旋含量的升高表明芦丁的引入促进脂肪酶分子内新的氢键的形成。Jia 等^[29]利用 FTIR 光谱分析绿原酸及其两种异构体新绿原酸和隐原酸对 HSA 二级结构的影响，发现化学结构高度相似的新绿原酸与绿原酸分子诱导 HSA 发生的结构变化也类似，而具有 4-酯基结构的隐原酸分子表现出具有更大改变 HSA 构象的能力。

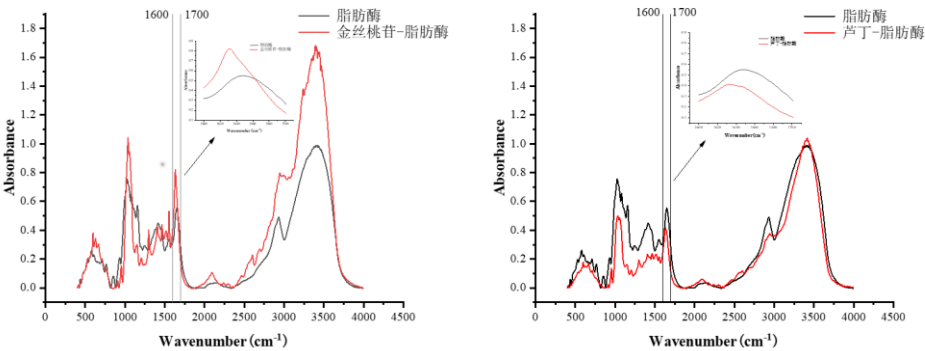


图 3 脂肪酶和酚类化合物-脂肪酶复合物的傅里叶变换红外光谱图

Fig.3 Fourier transform infrared spectra of Lipase and Polyphenol compound complex

表 4 脂肪酶和酚类化合物-脂肪酶复合物的酰胺 I 带蛋白质二级结构相对含量

Table 4 The relative content of secondary structure of protein in amide I band of Lipase and Polyphenol compound complex

样品	α -螺旋	β -折叠	β -转角	无规则卷曲	β -反平行
脂肪酶	30.52%	24.4%	21.78%	2.31%	20.98%
金丝桃苷-脂肪酶复合物	25.56%	24.56%	37.79%	7.26%	4.83%
芦丁-脂肪酶复合物	31.37%	31.23%	19.29%	8.75%	9.35%

2.4 分子对接分析

图 4A、B 为金丝桃苷和芦丁分别与脂肪酶相互作用示意图。表 5 为酚类化合物与脂肪酶的分子对接相互作用数据，数据表明，金丝桃苷与脂肪酶最佳构象的 ΔG (-29.21 kcal/mol) 小于芦丁与脂肪酶最佳构象的 ΔG (-20.89 kcal/mol)。 ΔG 的值越小，说明复合物结合的越稳定^[30]，所以金丝桃苷与脂肪酶结合的更加稳定。从图中可以看出，金丝桃苷和芦丁均位于脂肪酶中心处，并与周围的氨基酸形成相互作用^[31]。金丝桃苷和芦丁分别与周围的氨基酸产生疏水作用阻碍水分子的介入，使复合物的形成更稳定，并且脂肪酶分子中能发射荧光的色氨酸 (TRP-252)、酪氨酸 (TYR-114)、苯丙氨酸 (PHE-77, PHE-215) 也参与了氢键作用或疏水作用的形成(表 5)，进一步验证了荧光猝灭的结果。同时观察到，脂肪酶的活性中心位于酶分子内部。因此，当分子体积较大的芦丁进入时，需要克服的位阻要大于金丝桃苷，抑制性能也就弱于金丝桃苷^[32]。还发现一个相同点，金丝桃苷和芦丁中部氧原子都能够和脂肪酶内部的 SER-152 发生氢键作用，形成新的氢键，这也与 FTIR 分析一致。衡量 SER-152 氨基酸上的 OG 原子与金丝桃苷和芦丁上的氧原子的距离有助于理解小分子和脂肪酶结合相对位置以及氢键形成稳定性^[33]。因此，该实验监测了模拟过程中脂肪酶的 SER-152@OG 分别和金丝桃苷@O1、芦丁@O3 之间的距离。结果发现，金丝桃苷@O1 和芦丁@O3 分别和 SER-152@OG 的距离维持在 2.5-4 埃米，可以持续形成强氢键作用，意味着金丝桃苷、芦丁和脂肪酶是强结合，但是 SER-152@OG 和芦丁@O3 的距离在模拟后期被拉大，意味着芦

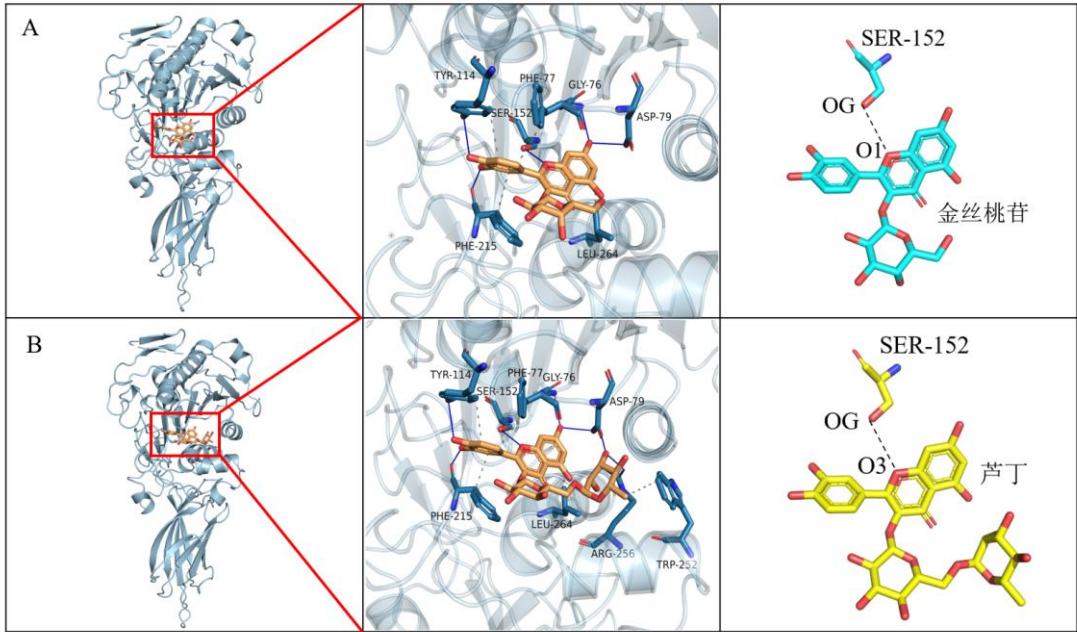


图 4 酚类化合物与脂肪酶最佳结合位点的空间结构图

Fig.4 Spatial structure of the optimal binding site of phenolic compounds and lipase

表 5 酚类化合物与脂肪酶的分子对接相互作用数据

Table 5 Molecular docking interaction data between phenolic compounds and lipases

	$\Delta G/(\text{kcal/mol})$	氢键作用	疏水作用
金丝桃苷-脂肪酶	-29.21 ± 1.04	TYR-114, PHE-215, SER-152, GLY-76, ASP-79	TYR-114, PHE-215, PHE-77, LEU-264
芦丁-脂肪酶	-20.89 ± 1.06	TYR-114, PHE-215, SER-152, GLY-76, ASP-79, ARG-256,	TYR-114, PHE-215, PHE-77, LEU-264, TRP-252,

3 结论

该研究比较了桑叶中 12 种酚类化合物对脂肪酶的抑制活性。抑制脂肪酶活性强弱与化合物的母核结构有关，母核活性大致趋势为母核结构I>III>IV>II。拥有母核I结构的化合物抑制脂肪酶的活性最强，其中金丝桃苷对脂肪酶的抑制活性最优，芦丁次之。荧光光谱分析表明，金丝桃苷和芦丁对脂肪酶均表现为静态猝灭作用，其中金丝桃苷与脂肪酶具有更高的结合能力。FTIR 分析发现，除了 α -螺旋之外， β -折叠、 β -转角和无规则卷曲含量的增加对金丝桃苷-脂肪酶复合物的功能活性影响同样具有重要作用。分子对接结果表明，金丝桃苷和芦丁主要通过氢键和疏水作用与脂肪酶结合形成复合物，从而抑制脂肪酶活性。其中，相比芦丁，与脂肪酶结合能力更强的金丝桃苷在分子对接中与脂肪酶结合成最佳构象需要更小的结合能 (ΔG)，即金丝桃苷与脂肪酶结合的更加稳定。该研究结果为桑叶减肥产品的开发奠定理论基础。基于该项目研究结果，课题组将在细胞水平或动物水平进一步进行实验，验证桑叶酚类化合物降脂功效及其作用机理。

参考文献

[1] 曹佳敏,李慧,孟银平,等.常用减肥药的研究与应用进展[J].预防医学论坛,2020,26(5):396-400.

[2] ZHANG X, LI D, WANG K, et al. Hyperoside inhibits pancreatic lipase activity *in vitro* and reduces fat accumulation *in vivo* [J]. Food & Function, 2023, 14(10): 4763-4776.

[3] CHOOI Y C, DING C, MAGKOS F. The epidemiology of obesity [J]. Journal of Obesity, 2019, 92: 6-10.

[4] HODKINSON A, GAMBLE C, SMITH C T. Reporting of harms outcomes: a comparison of journal publications with unpublished clinical study reports of orlistat trials [J]. Trials, 2016, 17: 11.

- [5] 廖慧怡,黎尔纳,李倩,等.桑叶抑制脂肪酶活性组分提取工艺优化及其成分分析[J].食品工业科技,2024,45(19):187-195.
- [6] ZHANG R, ZHANG Q, ZHU S, et al. Mulberry leaf (*Morus alba* L.): A review of its potential influences in mechanisms of action on metabolic diseases [J]. *Pharmacological Research*, 2022, 175: 106029.
- [7] WANG T Y, LI Q, BI K S. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate [J]. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018, 13(1): 12-23.
- [8] LIU J, HE Z, MA N, et al. Beneficial effects of dietary polyphenols on high-fat diet-induced obesity linking with modulation of gut microbiota [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(1): 33-47.
- [9] FRAGA C G, CROFT K D, KENNEDY D O, et al. The effects of polyphenols and other bioactives on human health [J]. *Food & Function*, 2019, 10(2): 514-528.
- [10] LI Q, LIU F, LIU J, et al. Mulberry leaf polyphenols and fiber induce synergistic antiobesity and display a modulation effect on gut microbiota and metabolites [J]. *Nutrients*, 2019, 11(5): 1017.
- [11] 师英春,廖森泰,杨琼,等.桑叶多酚、多糖及其复配物的体外模拟消化特性、降糖降脂和促益生菌增殖活性研究[J].食品安全质量检测学报,2023,14(8):128-137.
- [12] LI Q, WANG C, LIU F, et al. Mulberry leaf polyphenols attenuated postprandial glucose absorption via inhibition of disaccharidases activity and glucose transport in Caco-2 cells [J]. *Food & Function*, 2020, 11(2): 1835-1844.
- [13] 王晨,邹宇晓,李倩,等.桑叶酚类物质组成及富集工艺研究[J].蚕业科学,2018,44(5):729-737.
- [14] 王晨.桑叶多酚的物质组成分析及其对二糖消化的影响[D].广东湛江:广东海洋大学,2020.
- [15] ZHANG X Y, REHMAN R U, WANG S X, et al. Blue honeysuckle extracts retarded starch digestion by inhibiting glycosidases and changing the starch structure [J]. *Food & Function*, 2022, 13(11): 6072-6088.
- [16] 裘兰兰,李金贵,李芳,等.分子对接技术与光谱法分析薯蓣皂苷和人血清白蛋白的相互作用[J].现代食品科技,2020,36(10):93-99.
- [17] BURLEY S K, BERMAN H M, KLEYWEGT G J, et al. Protein Data Bank (PDB): The single global macromolecular structure archive [J]. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ), 2017, 1607: 627-641.
- [18] KIM S, THIESSEN P A, BOLTON E E, et al. PubChem Substance and Compound databases [J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(D1): D1202-D1213.
- [19] RAVINDRANATH P A, FORLI S, GOODSELL D S, et al. AutoDockFR: Advances in Protein-Ligand Docking with explicitly specified binding site flexibility [J]. *Plos Computational Biology*, 2015, 11(12): e1004586.
- [20] MARTINEZ-GONZALEZ A I, ALVAREZ-PARRILLA E, D ÁZ-S ÁNCHEZ A G, et al. *In vitro* inhibition of pancreatic lipase by polyphenols: A kinetic, fluorescence spectroscopy and molecular docking study [J]. *Food Technology and Biotechnology*, 2017, 55(4): 519-530.
- [21] 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.
- [22] HUANG X, ZHU J, 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.
- [23] LI S, HU X, 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: 12.
- [24] DU X P, BAI M L, HUANG Y, et al. Inhibitory effect of astaxanthin on pancreatic lipase with inhibition kinetics integrating molecular docking simulation [J]. *J Funct Food*, 2018, 48: 551-557.
- [25] WU D, DUAN R, TANG L, et al. Binding mechanism and functional evaluation of quercetin 3-rhamnoside on lipase [J]. *Food Chemistry*, 2021, 359: 9.
- [26] JI Y L, LIU D, JIN Y, et al. *In vitro* and *in vivo* inhibitory effect of anthocyanin-rich bilberry extract on α -glucosidase and α -amylase [J]. *Lwt-Food Science and Technology*, 2021, 145: 11.
- [27] 林金瓿,曹艳芸,韩剑,等.基于荧光猝灭法的复合 GA/EGCG 与热变性乳清蛋白相互作用机制[J].食品与机械,2023,39(8):34-41.
- [28] 郭时印,李林,周虹,等.1-脱氧野尻霉素对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用机制[J].食品科学,2019,40(5):45-50.
- [29] JIA J, GAO X, HAO M, et al. Comparison of binding interaction between β -lactoglobulin and three common polyphenols using

- multi-spectroscopy and modeling methods [J]. Food Chemistry, 2017, 228: 143-151.
- [30] LI S, PAN J H, HU X, et al. Kaempferol inhibits the activity of pancreatic lipase and its synergistic effect with orlistat [J]. Journal of Functional Foods, 2020, 72: 11.
- [31] 孔庆新,黄业传,徐伟平,等. β -乳球蛋白与 EGCG 结合规律的分子动力学探究[J].食品与生物技术学报,2022,41(1):51-59.
- [32] FAN Y, TAO Y, LIU G, et al. Interaction study of engeletin toward cytochrome P450 3A4 and 2D6 by multi-spectroscopy and molecular docking [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2022, 264(5): 120311.
- [33] HOU X D, GUAN X Q, CAO Y F, et al. Inhibition of pancreatic lipase by the constituents in St. John's Wort: *In vitro* and in silico investigations [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 145: 620-633.