翟迎奥, 王昆山, 于增辉, 等. 三种黄酮两两联合对胰脂肪酶的抑制作用 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(4): 125−133. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030246

ZHAI Ying'ao, WANG Kunshan, YU Zenghui, et al. Inhibitory Effects of Pairwise Combinations of Three Flavonoids on Pancreatic Lipase[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(4): 125−133. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030246

·研究与探讨·

三种黄酮两两联合对胰脂肪酶的抑制作用

翟迎奥, 王昆山, 于增辉, 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: 研究三种黄酮类化合物两两联合使用对胰脂肪酶（Pancreatic lipase，PL）的抑制活性及作用机制，为开发天然抗肥胖药物提供理论依据。利用联合等效线图确定三种黄酮类化合物联用时的最佳添加比例，再通过紫外光谱和荧光光谱研究金雀异黄酮（Genistein，Gen）、白杨素（Chrysin，Chr）和柚皮素（Naringenin，Nar）与 PL 的结合反应及机制，同时利用同步荧光、红外光谱、差示扫描量热法及粒径分析从不同角度对复合物进行结构表征，全面阐明它们对 PL 结构与性质的影响。结果显示，3 种黄酮联合作用摩尔比为 4:1 时联合抑制效果最佳，表现为协同作用。内源荧光及紫外光谱表明，Gen-Chr、Gen-Nar、Nar-Chr 对 PL 的猝灭是静态猝灭，结合常数 K_a 分别为 1.63×10^5 L/mol、14.64×10^5 L/mol、7.07×10^5 L/mol；热力学参数显示，Gen-Chr-PL 以疏水相互作用为主，Gen-Nar-PL 以静电引力为主，Nar-Chr-PL 以氢键和范德华力为主。同步荧光及粒径结果表明，随着抑制剂浓度增加，复合物疏水性降低。红外光谱表明，抑制剂使 PL 二级结构变化。DSC 表明，三者与 PL 形成复合物后降低其热稳定性。这些结果表明 Gen、Chr、Nar 两两联合对 PL 活性有抑制作用，且能显著影响 PL 的结构和性质，为开发新型 PL 抑制剂提供新思路。

关键词: 胰脂肪酶, 联合抑制, 白杨素, 金雀异黄酮, 柚皮素

中图分类号: TS201.2　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)04−0125−09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030246　　本文网刊:

Inhibitory Effects of Pairwise Combinations of Three Flavonoids on Pancreatic Lipase

ZHAI Ying'ao, WANG Kunshan, YU Zenghui, ZHOU Suzhen, FAN Jinbo*

（National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, Food Safety Key Lab of Liaoning Province, College of Food Science and Technology, Bohai University, Jinzhou 121013, China）

Abstract: This study delved into the inhibitory activity and underlying mechanism of a combination of three flavonoids against pancreatic lipase (PL), aiming to furnish a robust theoretical foundation for the development of natural anti-obesity pharmaceuticals. The optimal proportion of these three flavonoids for combination was determined through the use of a combined equivalent line graph. Subsequently, ultraviolet (UV) spectroscopy and fluorescence spectroscopy were employed to explore the binding reactions and mechanisms between genistein (Gen), chrysin (Chr), naringenin (Nar), and PL. To comprehensively elucidate the impact of these flavonoids on the structure and properties of PL, synchronous fluorescence, infrared spectroscopy, differential scanning calorimetry, and particle size analysis were simultaneously utilised to characterize the formed complexes from multiple perspectives. The results showed that when the molar ratio of the three flavonoids was 4:1, the combined inhibitory effect was the most pronounced, exhibiting a synergistic action. Both endogenous fluorescence and UV spectrum demonstrated that the quenching of PL by Gen-Chr, Gen-Nar, and Nar-Chr was

收稿日期: 2025−03−18

基金项目: 国家重点研发计划课题（2023YFF1103502）。

作者简介: 翟迎奥（2000−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品活性成分开发及利用, E-mail: zhaiyingao10@163.com。

*** 通信作者:** 范金波（1977−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品加工及分子营养, E-mail: jinbo_fan@hotmail.com。

static quenching. The corresponding binding constants K_a were calculated to be 1.63×10^5 L/mol, 14.64×10^5 L/mol, and 7.07×10^5 L/mol, respectively. Thermodynamic parameter analysis indicated that hydrophobic interaction was the dominat force in the Gen-Chr-PL complex, electrostatic attraction played a predominant role in the Gen-Nar-PL complex, and hydrogen bonding along with van der Waals force were the main driving forces in the Nar-Chr-PL complex. The results from synchronous fluorescence and particle size results indicated that as the concentration of the inhibitors increased, the hydrophobicity of the complexes decreased. Infrared spectroscopy results indicated that the inhibitors altered the secondary structure of PL. Differential scanning calorimetry (DSC) results showed that the thermal stability of PL diminished after the formation of complexes with the three compounds. Collectively, these results suggest that the pairwise combinations of Gen, Chr, and Nar exert inhibitory effects on PL activity and can significantly alter the structure and properties of PL, providing new insights for the development of novel PL inhibitors.

Key words: pancreatic lipase; combined inhibiting; chrysin; genistein; naringenin

全球肥胖症的发病率激增，它与高血压、糖尿病、心脏病等多种慢性病的发生密切相关[1−2]，严重威胁人类的健康。胰脂肪酶（Pancreatic lipase, PL）作为消化过程中的关键酶之一，抑制其活性可预防肥胖[3−4]。奥利司他是临床已知的肥胖治疗药物，是一种特异性的 PL 抑制剂，但长期使用副作用强[5−6]。黄酮类化合物因结构多样性、低毒性、来源丰富，成为 PL 抑制剂研究热点[7−8]。桑白皮中的 6 种黄酮类化合物对 PL 有较强的抑制活性，IC_{50} 值在 0.77~20.56 μmol/L 之间[9]。Jeong 等[10] 从三尖杉中分离出的 5,7,4'-三羟基-6,8-二异戊烯基异黄酮对 PL 的 IC_{50} 为 65.0 μmol/L。同时研究表明，含木犀草素、杨梅素、槲皮素、异槲皮苷和柚皮苷的联合抑制剂在 0.5 mg/mL 浓度下，体积比为 7∶15∶6∶17∶5 时，PL 抑制率达 98.79%，优于单一成分[11]。

金雀异黄酮（Genistein, Gen）、白杨素（Chrysin, Chr）和柚皮素（Naringenin, Nar）是有潜在健康益处的黄酮类化合物，它们已被证实有抗氧化、抗炎和降血糖等多种生物活性[12−14]，且对 PL 有抑制活性[15−17]。体外实验证实 Nar 对 PL 的抑制类型为非竞争性抑制[18]。Gen 经荧光测定、酶动力学分析表现出竞争性抑制[19]。Chr 对 PL 表现出良好的亲和力，具有竞争性抑制作用[20]。然而，单一抑制剂往往效果有限，联合不同抑制剂有可能产生协同效应，增强对 PL 的抑制效果，同时降低单一药物的剂量，减少潜在副作用。

目前，关于 Gen、Chr、Nar 两两联合对 PL 的抑制活性及其机制的研究尚显不足。深入探究它们联合使用时对 PL 的抑制作用，不仅有助于揭示黄酮类化合物与 PL 之间的相互作用本质，为开发新型抗肥胖药物提供理论依据，也将为肥胖症及其相关疾病的防治提供新思路。基于此，本研究旨在系统地研究 Gen、Chr、Nar 两两联合对 PL 的抑制机制，以期为肥胖的防治提供新的策略和思路。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

PL（猪胰腺，15~35 units/mg）、4-硝基苯丁酸酯（4-nitrophenyl butyrate, p-NPB, 98%）、Chr（98%）、Nar（98%） 阿拉丁生化科技股份有限公司；Gen（98%） 上海麦克林生化科技股份有限公司；二甲基亚砜、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠 分析纯，天津市风船化学试剂科技有限公司。

Evolution 201 紫外-可见分光光度计 美国 Thermo 公司；F-7000 荧光分光光度计 日本日立高新技术公司；IR-Tracer-10 傅里叶变换红外光谱 岛津企业管理（中国）有限公司；Q2000 差示扫描量热仪 美国 TA 公司；Brookhaven 90 Plus 纳米粒度分析仪 美国布鲁克海文仪器公司；FD-1A-50 型真空冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 网络药理学

1.2.1.1 抗肥胖靶点筛选 使用 Pharmmapper 数据库（http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/）、GeneCards 数据库（http://www.genecards.org/）和 OMIM 数据库（https://www.omim.org/）获取肥胖相关靶点，三个数据库中的结果取交集，再借助 UniProt 数据库（https://www.uniprot.org/）获取靶标蛋白相对应的基因名。

1.2.1.2 抑制剂抗肥胖的靶点获取 在 PubChem 数据库（https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/）中检索 Chr、Gen、Nar，并保存二维结构，将其导入 Swiss Target Prediction 平台（http://www.swisstargetprediction.ch/）获得预测靶点。使用 Venny2.1.0（https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/）分析其作用靶点与抗肥胖靶点的交集，即 Chr、Gen、Nar 的抗肥胖作用靶点。

1.2.2 抑制剂联合抑制效应与指数测定 测定 Chr、Gen、Nar 两两联用对 PL 的抑制作用。将 Chr、Gen、Nar 稀释到 30、40、50、60、70 μmol/L，按不同的摩尔比（1∶1、1∶2、1∶3、1∶4、2∶1、3∶1、4∶1）两两混合，分别在 298 K 和 310 K 下避光保存 30 min。参照 George 等[21] 方法，在 405 nm 波长下测吸光度，判断 Gen-Chr, Gen-Nar, Nar-Chr 组合对 PL 的抑制作用。按式（1）计算，通过线性拟合算联合抑制剂对 PL 活力的半抑制浓度（IC_{50}）。实验重复 3 次，并采用 ANOVA 进行差异显著性分析。

$$抑制率(\%) = [1-(A_s-A_n)/A_s]\times 100 \qquad 式（1）$$

式中：A_s 是酶对照吸光度（不含抑制剂）；An 是有抑制剂时与相应对照组吸光度之差。

根据 Chou 等[22] 报道，用 CompSyn 软件获得联合抑制的效应（Fraction affected, Fa）-联合作用指数（Combination Index, CI）图。Fa 为联合抑制时的效应，CI 值用于评估联合抑制作用的效果。

1.2.3　荧光猝灭光谱　参照 Zhou 等[23] 方法并修改，按最佳比例加入不同浓度抑制剂（0、10、20、30、40、50、60、70 μmol/L），固定 PL 浓度，在 298 K 和 310 K 条件下，避光反应 30 min，在 280 nm 的激发波长，290~450 nm 的发射波长，测定混合物的荧光光谱，其中激发狭缝 2.5 nm，发射狭缝 5 nm。

1.2.3.1　荧光猝灭机理　荧光猝灭分为动态猝灭和静态猝灭。通过 Stern-Volmer 方程（2）来评估猝灭机制[24]：

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

式中 F 和 F_0 分别是存在和不存在抑制剂时的荧光强度；K_q 是双分子猝灭速率常数；[Q] 是抑制剂浓度；K_{SV} 是 Stern-Volmer 猝灭常数；τ_0 是荧光团分子的平均寿命，约 10^{-8} s。

1.2.3.2　结合常数、结合位点数的计算　配体与 PL 发生相互作用，一般是通过静电相互作用、疏水相互作用、氢键、范德华力等作用力连接。根据 Hill 方程（3）计算结合常数和结合位点数[25]：

$$\lg\frac{F_0-F_1}{F_1} = n\lg K_a + n\lg\frac{1}{[Q_t]-\dfrac{(F_0-F)[P_t]}{F_0}} \qquad 式（3）$$

式中，K_a 是结合常数；n 是结合位点；$[Q_t]$ 和 $[P_t]$ 分别是抑制剂和 PL 的浓度。

1.2.3.3　热力学参数计算　配体与 PL 结合的主要驱动力可以通过式（4）Van't-Hoff 方程和式（5）热力学关系式来表征。整个实验过程中温度的波动很小，因此焓变（ΔH）可以视为一个常数[26]：

$$\ln\left(\frac{K_2}{K_1}\right) = -\frac{\Delta H\left(\dfrac{1}{T_1}-\dfrac{1}{T_2}\right)}{R} \qquad 式（4）$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT\ln K_a \qquad 式（5）$$

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（8.314 J·mol^{-1}·K^{-1}）；K_a 为结合常数；ΔH 为焓变（kJ/mol）；ΔS 为熵变 [J/(mol·K)]；ΔG 为吉布斯自由能（kJ/mol）。

1.2.4　紫外-可见吸收光谱　参照范阳扬[27] 的方法并稍作修改，按照前面得到的最佳添加比例，加入不同浓度的抑制剂（0、10、20、30、40、50、60、70 μmol/L）与 PL 溶液混合，用紫外分光光度计在 220~400 nm 范围内扫描混合物的紫外-可见吸收光谱。

1.2.5　同步荧光光谱　按最佳添加比例加入不同浓度抑制剂（0、10、20、30、40、50、60、70 μmol/L），固定 PL 浓度，设定发射和激发波长差（Δλ）分别为 15 nm 和 60 nm。在 298 K 下，测定混合物在 200~400 nm 范围内不同 Δλ 前后的同步荧光光谱。

1.2.6　傅里叶红外光谱　参考康柱等[28] 的方法，将酶与联合抑制剂等比例增加，真空冷冻干燥成粉末，使用溴化钾压片法，在 4000~400 cm^{-1} 范围内扫描，设置扫描次数为 32 次。

1.2.7　差示扫描量热法　冷冻干燥后的样品称重置于坩埚中，用压盖器压紧，放入仪器检测室中。用空坩埚为参比，设置扫描速率为 5 ℃/min，扫描温度为 25~100 ℃，获得 DSC 图及热力学参数。

1.2.8　粒径测定　不同浓度联合抑制剂（0、10、20、30、40 μmol/L）与 PL 溶液混合。室温避光反应 15 min，用激光粒度仪测粒径，温度设为 25 ℃，恒温 300 s 进行测量。

1.3　数据处理

实验重复 3 次，数据表示为 $\bar{x}\pm s$，用 IBM SPSS Statistics 26 进行 ANOVA 差异显著性分析，差异水平 $P<0.05$。使用 Origin 2021 和 PeakFit 4.12 软件进行数据分析和绘图处理。

2　结果与分析

2.1　抑制剂的作用靶点获取结果

Chr、Gen、Nar 通过多靶点发挥药理作用，准确探索其作用靶点十分必要。由 PubChem 获得 Chr、Gen、Nar 的二维结构，上传至 Swiss TargetPrediction，分别预测获得 288、290、290 个抗肥胖靶点。

2.2　肥胖靶点预测及共同靶点筛选结果

从数据库筛选得到 2227 个肥胖相关靶基因，由 Venny2.1.0 绘制韦恩图，图 1 中 Chr 与肥胖有 116 个交集靶点，Gen 有 125 个，Nar 有 120 个，即为 Chr、Gen、Nar 潜在的抗肥胖靶点。同时，Chr、Gen、Nar 之间存在重叠部分，表明它们可能存在联合作用，可进一步深入研究抑制剂联合作用时对肥胖的影响。

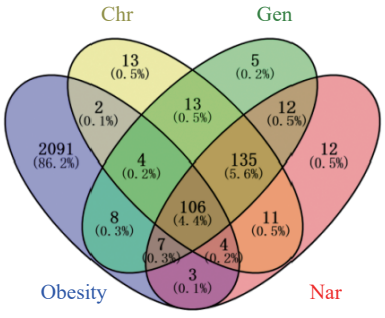


图 1　Chr、Gen、Nar 作用靶点与肥胖相关基因交集

Fig.1　Chr, Gen, Nar targets and obesity-related genes intersection

2.3　联合抑制剂对胰脂肪酶的抑制率

Chr、Gen、Nar 均能抑制 PL 活性[18−20]，为研究它们两两联合对 PL 的抑制机制，测定不同添加比例

和浓度下的抑制率。结果见图 2，所有比例下抑制率随抑制剂浓度增加而增大，且不同比例的复合物在相同浓度下抑制效果有差异，1∶1、1∶2、1∶3、4∶1 比例时抑制率较高。为定量分析它们的相互作用是协同、相加或拮抗，选择复合物 Gen-Chr，Gen-Nar，Nar-Chr 在 1∶1、1∶2、1∶3、4∶1 比例下进行 CI 等效图分析。

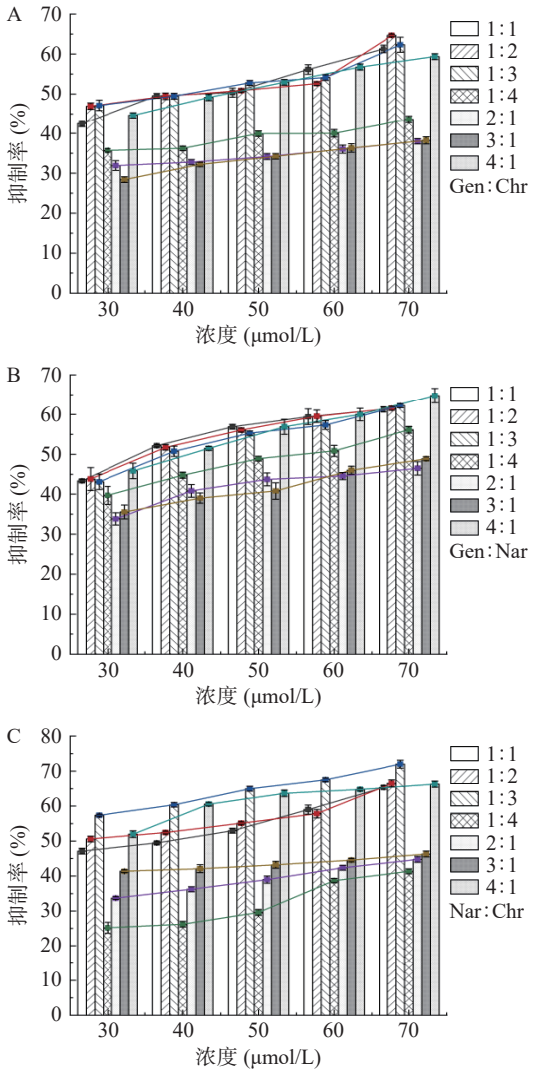


图 2 不同比例复合物对 PL 的抑制率

Fig.2 Inhibition rate of different proportions of complexes on PL

2.4 联合 CI 等效图分析

两种化合物单独具有生物活性时，组合可产生协同、相加或拮抗作用[29]。CI 等效线图方程可定量测定化合物相互作用，其中 CI<1 表示协同作用；CI=1 表示累加效应；CI>1 表示拮抗作用[30]。

图 3 是 Gen-Chr，Gen-Nar，Nar-Chr 抑制 PL 活性的效应-组合指数图。各比例 CI 值随 Fa 值增加而上升，表明联合效应强度随效应水平变化。在低浓度下表现出协同作用，高浓度下出现拮抗现象。Gen 与 Chr 联合，1∶1、1∶2 和 1∶3 比例下在大于 0.5 的 Fa 值时 CI 值高于 1，表明这些比例下抑制剂联合使用

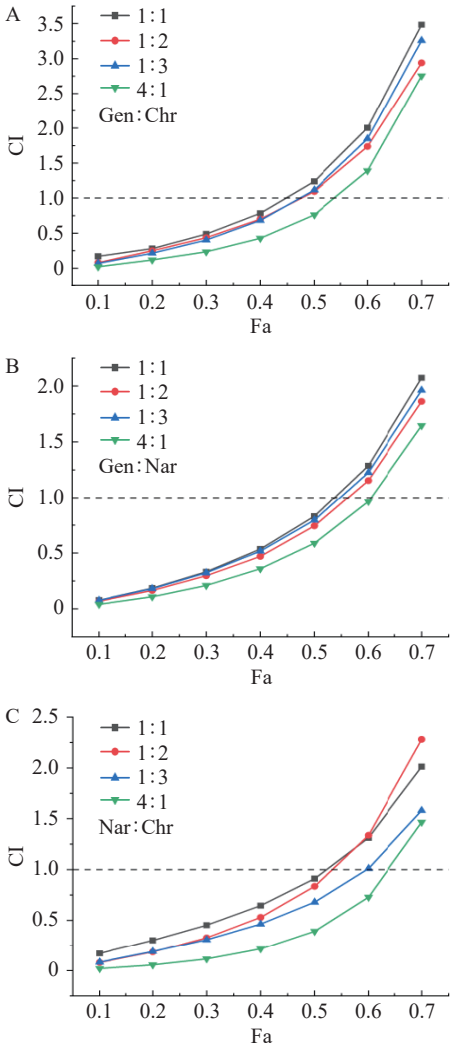


图 3 不同比例复合物联合抑制 PL 的效应–组合指数图

Fig.3 Fa-CI diagram of PL inhibition by different proportions of complexes

注：A：Gen-Chr；B：Gen-Nar；C：Nar-Chr。

可能存在拮抗效应。Gen 与 Nar 联合，1∶1、1∶2 和 1∶3 比例在大于 0.6 的 Fa 值时 CI 值高于 1，即这些比例下可能存在拮抗效应。4∶1 比例的 CI 值在 0.6 的 Fa 值时接近 1，即该比例下可能存在协同效应，4∶1 比例时 CI 值更低，为最佳摩尔比。Nar 与 Chr 联合时，1∶2 比例在大于 0.6 的 Fa 值下 CI 值高于其他比例，即该比例下存在强烈的拮抗效应。1∶1 和 1∶3 比例的 CI 值在 0.5 或 0.6 的 Fa 值时接近 1，表明这些比例下可能存在相加效应。4∶1 比例的 CI 值在小于 0.6 的 Fa 值时低于 1，表明在低浓度时该比例下存在协同效应。4∶1 比例在所有联合中小于 0.5 的 Fa 值时 CI 值均低于 1，表明这些效应水平下协同效应最佳，故选 4∶1 为最佳摩尔比用于后续研究。推测 Gen、Chr、Nar 两两联合使用时起到协同抑制效应时，Gen 和 Chr 联合时它们可能占据 PL 的催化中心和疏水口袋；Nar 和 Chr 结合时，可能共同阻断底物通道；而 Gen 和 Nar 结合因羟基竞争可能削弱结合，但仍可通过空间位阻部分抑制酶活。这些组合通过多点位结合和构象调控，可对 PL 的活性起

到协同抑制效果。

2.5　荧光猝灭机制及结合常数

荧光猝灭分为静态猝灭和动态猝灭两种，静态猝灭的猝灭常数与温度呈现负相关，会引起荧光团吸收光谱的扰动但不改变激发态；动态猝灭则相反，它仅会使荧光团的激发态发生改变，而吸收光谱强度没有变化[31]。

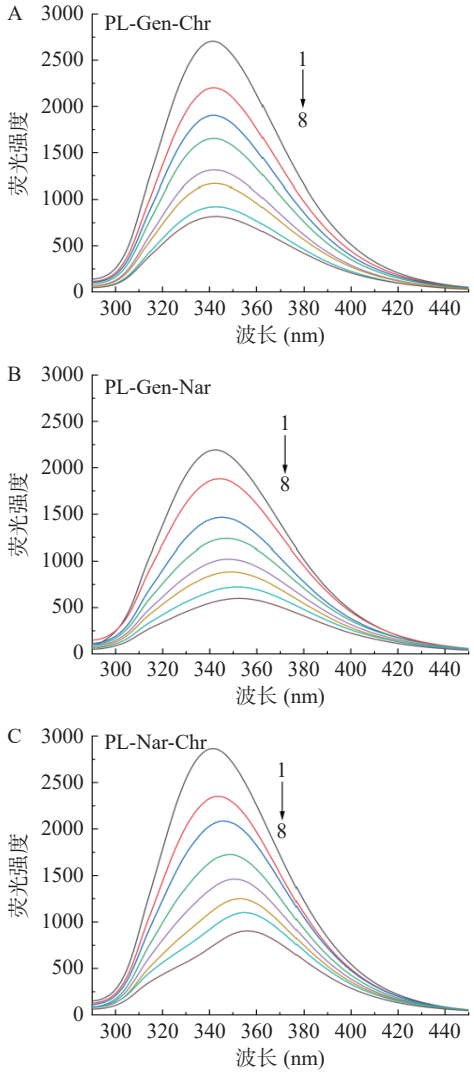


图 4　PL-Gen-Chr(A)、PL-Gen-Nar(B)、PL-Nar-Chr(C)的荧光发射光谱

Fig.4　Fluorescence spectrum of PL-Gen-Chr (A), PL-Gen-Nar (B), PL-Nar-Chr (C)

注：1~8 分别为 0、10、20、30、40、50、60、70 μmol/L 的联合抑制剂与 PL 溶液混合的体系。

图 4 是 PL 与联合抑制剂作用的荧光光谱。随着抑制剂浓度的增加，PL 荧光强度降低，即发生猝灭，且图 5 线性良好，随着温度的增加，K_{sv} 值也增加，表明有动态猝灭。计算得 K_q($K_{sv}=K_q\tau_0$)是 10^{12} 个数量级，远超生物分子最大扩散碰撞猝灭常数(2.0×10^{10} L·mol^{-1}·s^{-1})，说明有静态猝灭。故推测联合抑制剂对 PL 的猝灭既有静态猝灭又有动态猝灭，且静态猝灭起主导作用[32]。推测联合抑制剂可能通过多结合位点协同作用增强对 PL 的猝灭效应。

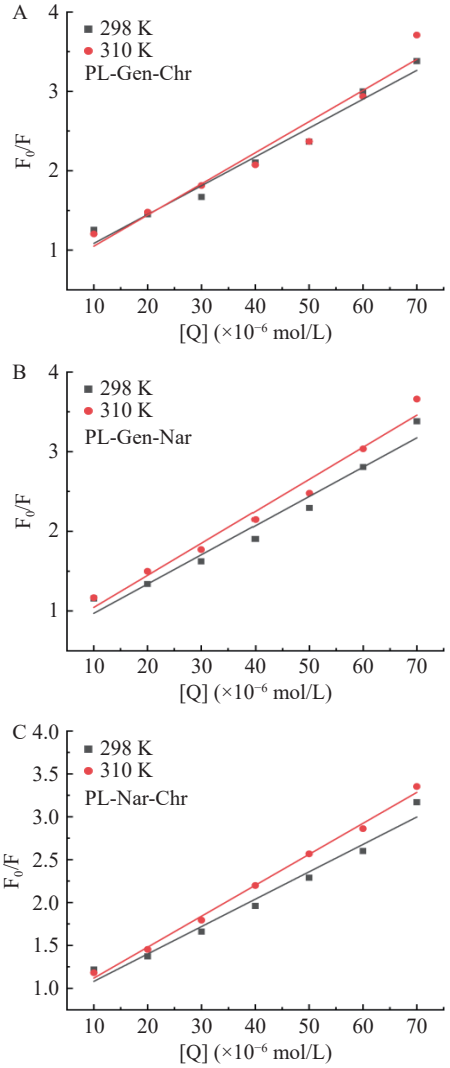


图 5　298 K 和 310 K 时 F_0/F 对各抑制剂浓度的结果

Fig.5　Results of F_0/F against the concentration of various inhibitors at 298 K and 310 K

通过双对数方程计算结合常数，结果见表 1，

表 1　Gen-Chr、Gen-Nar、Nar-Chr 与 PL 相互作用的猝灭常数、结合常数和结合位点

Table 1　Quenching constants, binding constants, and binding sites of Gen-Chr, Gen-Nar, Nar-Chr interacting with PL

配体	T(K)	K_{sv}(×10^4 L·mol^{-1})	K_q(×10^{12} L·mol^{-1}·s^{-1})	R_a	K_a(×10^5 L·mol^{-1})	R_b	n
Gen-Chr	298	3.0749	3.0749	0.9932	1.6398	0.9785	1.1747
	310	3.2370	3.2370	0.9888	4.6968	0.9915	1.2754
Gen-Nar	298	2.8767	2.8767	0.9878	14.6450	0.9926	1.4041
	310	3.3060	3.3060	0.9917	13.6080	0.9961	1.3793
Nar-Chr	298	3.1243	3.1243	0.9970	7.0697	0.9988	1.3169
	310	2.7162	2.7162	0.9946	1.6928	0.9850	1.1898

注：R_a和R_b分别是K_{sv}和K_a值拟合的相关系数。

298 K和310 K 下 Gen-Chr,Gen-Nar,Nar-Chr 与 PL 的 K_a均大于 10^5 L·mol^{-1}, 表明它们与 PL 的相互作用较强。Gen-Chr, Nar-Chr 的 K_a 随温度升高而增大, 表明升温可增加它们与 PL 的结合力, Gen-Nar 的 K_a 随温度升高而降低, 表明 Gen-Nar 与 PL 的结合能力随温度增加而减弱。不同温度下, Gen-Chr, Gen-Nar, Nar-Chr 的 n 值均接近 1, 说明它们在 PL 上仅存在一个或者一种类型结合位点。

2.6 热力学参数及作用力类型

Gen-Chr, Gen-Nar, Nar-Chr 的 K_{sv} 和 K_a 值随温度升高而变化, 表明其与 PL 的结合受温度影响。荧光实验计算的热力学参数如表 2 所示。在 298 K 和 310 K 下, 三者与 PL 结合的 ΔG 均为负值, 说明结合反应为自发进行。Gen-Chr-PL 的 ΔH>0, ΔS>0, 说明结合是吸热反应, 主要是疏水相互作用驱动, Gen 和 Chr 都具有较强的疏水性, 它们的疏水部分可以与 PL 的疏水口袋结合。Gen-Nar-PL 的 ΔH<0, ΔS>0, 说明结合是放热反应, 靠静电相互作用驱动的, Gen 与 Nar 结合后, 它们的羟基可以与 PL 表面的极性或带电残基发生较强的静电相互作用。Nar-Chr-PL 的 ΔH<0, ΔS<0 结合是放热反应, 主要驱动力是氢键和范德华力[33], Nar 和 Chr 的羟基可与 PL 表面的极性基团形成氢键, 且 Nar 和 Chr 的疏水部分也可以与 PL 的疏水口袋发生范德华力相互作用。这些化合物的结构差异导致了它们与 PL 结合时作用力的差异。

表 2 Gen-Chr、Gen-Nar、Nar-Chr 与 PL 相互作用热力学常数

Table 2 Thermodynamic constants for the interaction of Gen-Chr, Gen-Nar, Nar-Chr with PL

配体	T(K)	ΔH(kJ·mol^{-1})	ΔG(kJ·mol^{-1})	ΔS(J·mol^{-1}·K^{-1})
Gen-Chr	298	67.3498	−29.7495	325.8365
	310		−33.6596	
Gen-Nar	298	−14.7012	−35.1742	102.2600
	310		−36.4013	
Nar-Chr	298	−91.4896	−33.3698	-195.0231
	310		−31.0294	

2.7 同步荧光分析

同步荧光光谱显示联合抑制剂对 PL 荧光团周围极性微环境的影响[34]。结果如图 6 所示, Δλ=60 nm 时吸收峰变化更明显。Gen-Chr、Gen-Nar 浓度增加时, Δλ=15 nm 及 Δλ=60 nm 下波长轻微红移, 表明酪氨酸(Tyr)残基和色氨酸(Trp)残基周围的极性增加、疏水性降低。Nar-Chr 浓度增加时, Δλ=15 nm 下波长蓝移 2 nm, 表明其 Tyr 残基极性减弱、亲水性增强, 其 Δλ=60 nm 时发生了红移, 说明 Trp 残基疏水性降低。通过对比单个抑制剂对 PL 微环境的影响, 其中 Chr 使 Trp 残基微环境中的极性增强, Nar 使得 Trp 残基微环境中的极性减弱, Gen 对 Tyr 残基的微环境没有影响, 发现联合抑制剂对 PL 的 Trp 和 Tyr 残基均有一定的影响, 这表明联合抑制剂可能通过改变 PL 的微环境, 进而影响其构象和功能[35]。

构建 F/F_0(PL 的剩余同步荧光的比率, F 和 F_0 分别是在存在和不存在抑制剂的情况下 PL 的同步荧光强度)与抑制剂浓度的关系图, 如图 7 所示, Δλ=60 nm 的斜率均略大于 Δλ=15 nm, 表明 Trp 残基可能对 PL 的荧光猝灭贡献更大, Trp 残基周围的微环境对抑制剂更为敏感, 联合抑制剂与 PL 的 Trp 残基结合比与 Tyr 残基结合更近。

2.8 紫外光谱分析

紫外吸收光谱能反映分子构象变化, 是测定蛋

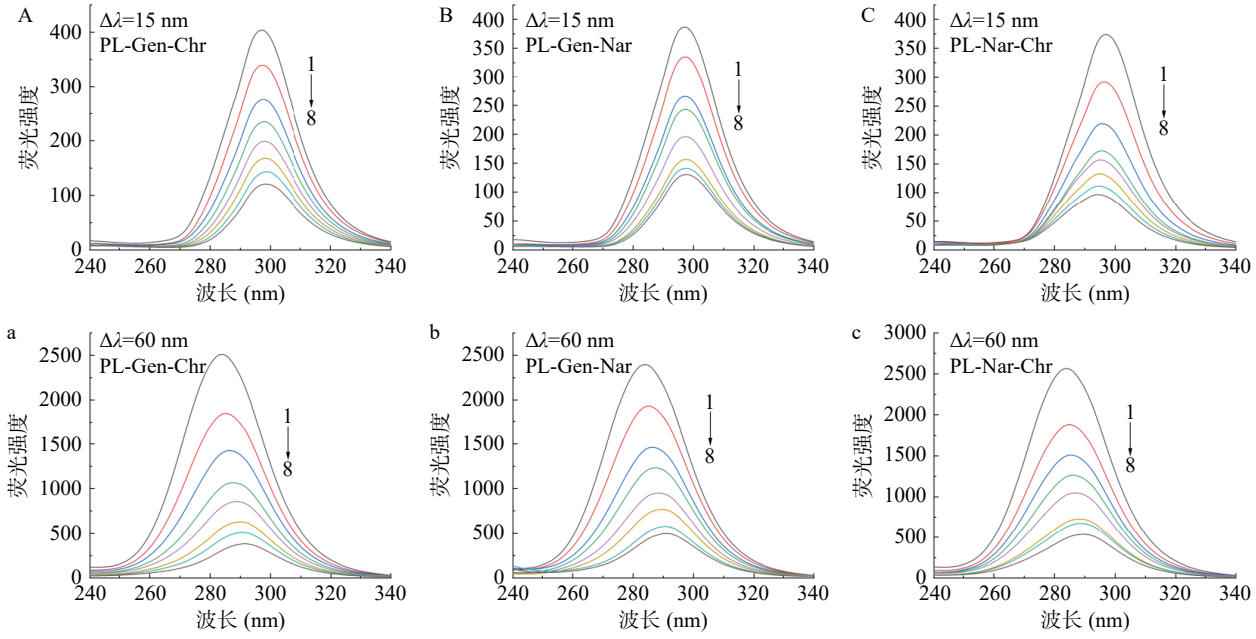


图 6 PL-Gen-Chr(A, a)、PL-Gen-Nar(B, b)、PL-Nar-Chr(C, c)的同步荧光光谱

Fig.6 Synchronous fluorescence spectra of PL-Gen-Chr (A, a), PL-Gen-Nar (B, b), PL-Nar-Chr (C, c)

注: 1~8 分别为 0、10、20、30、40、50、60、70 μmol/L 的联合抑制剂与 PL 溶液混合的体系。

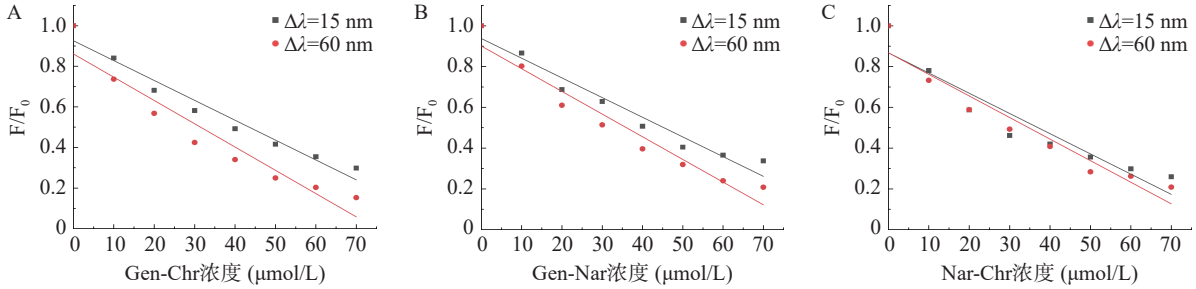


图 7　联合抑制剂猝灭 PL 的剩余同步荧光的比率

Fig.7　Ratio of quenching the residual synchronous fluorescence of PL by the combined inhibitor

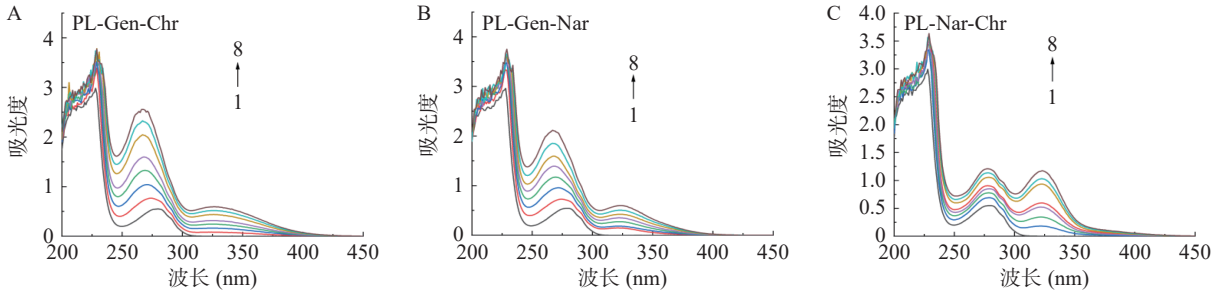


图 8　PL-Gen-Chr(A)、PL-Gen-Nar(B)、PL-Nar-Chr(C)的紫外光谱

Fig.8　UV spectra of PL-Gen-Chr (A), PL-Gen-Nar (B), PL-Nar-Chr (C)

注：1~8 分别为 0、10、20、30、40、50、60、70 μmol/L 的联合抑制剂与 PL 溶液混合的体系。

白质结构振动的重要方法[36]。图 8 所示，加入 Gen-Chr, Gen-Nar, Nar-Chr 后，在最大吸收峰 280 nm 附近分别发生蓝移(267、267、278 nm)，并在 322、319 和 324 nm 产生与苯环和羰基有关的新吸收峰，表明复合物与 PL 结合形成新吸收峰。吸收光谱变化说明复合物与 PL 之间发生了静态猝灭并形成了基态复合物[37]，与内源荧光结果一致，进一步证明 Gen-Chr, Gen-Nar, Nar-Chr 对 PL 的荧光猝灭中，静态猝灭占据主导地位。

2.9　红外光谱分析

红外光谱可分析分子振动和旋转，提供分子结构和化学键变化的信息[38]。由图 9 可知，单独 PL 的酰胺Ⅰ带、酰胺Ⅱ带和酰胺 A 带分别位于 1660.71、1541.12 和 3290.56 cm^{-1}。加入 Gen-Chr、Gen-Nar、Nar-Chr 后，酰胺Ⅰ带分别移至 1652.99、1652.99 和 1651.07 cm^{-1}；酰胺Ⅱ带移至 1539.19、1539.19 和 1537.27 cm^{-1}；酰胺 A 带移至 3375.43、3444.87 和 3439.08 cm^{-1}，代表着强的 N-H 伸缩振动，表明氢键在 PL 和配体相互作用中起重要作用。以上现象表明，Gen-Chr、Gen-Nar、Nar-Chr 与 PL 的 C=O 和 C-N 基团相互作用，导致多肽羰基氢键模式重排[39]，引起 PL 构象变化。

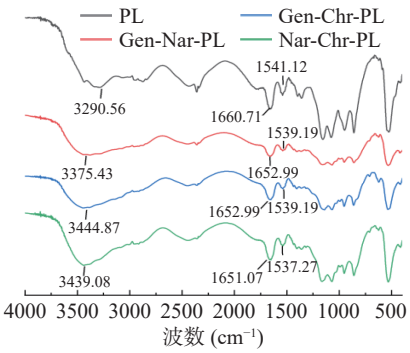


图 9　联合抑制剂与 PL 相互作用后的红外光谱

Fig.9　Infrared spectrum of PL after the interaction of the combined inhibitor with PL

配体-蛋白质结合时，酰胺Ⅰ带区域峰位置变化，表示蛋白质二级结构或天然构象完整性受损。对酰胺Ⅰ带光谱进行高斯线性拟合，各二级结构象变化如表 3 所示，Gen-Chr、Gen-Nar、Nar-Chr 与 PL 结合后，蛋白质内部氢键排布改变，α-螺旋的百分含量减小，无规则卷曲增加，Gen-Chr-PL、Nar-Chr-PL 的 β-折叠增加，β-转角减少，Nar-Chr 的 β-折叠减少，β-转角增加。这些结构变化使 PL 分子结构紊乱，酶活性几乎丧失。

表 3　联合抑制剂与 PL 相互作用后的二级结构含量

Table 3　Secondary structure contents after the interaction between the combined inhibitor and PL

样品名称	α-螺旋(%)	β-折叠(%)	β-转角(%)	无规则卷曲
PL	20.49±0.08^{a}	62.18±0.05^{c}	17.28±0.06^{b}	0±0.02^{d}
Gen-Chr-PL	2.7±0.02^{d}	78.3±0.12^{a}	10.2±0.02^{d}	8.8±0.02^{b}
Gen-Nar-PL	14.3±0.06^{b}	47.4±0.04^{d}	26.6±0.07^{a}	11.7±0.04^{a}
Nar-Chr-PL	3.1±0.01^{c}	77.7±0.15^{b}	15.6±0.05^{c}	3.6±0.01^{c}

注：同列不同字母表示存在显著性差异(P<0.05)。

2.10　DSC 分析

差示扫描量热法(DSC)可提供蛋白质折叠相关热力学参数，如变性温度(T_m)和变性焓值(ΔH)等[40]。加入 Gen-Chr、Gen-Nar、Nar-Chr 后，PL 变性温度

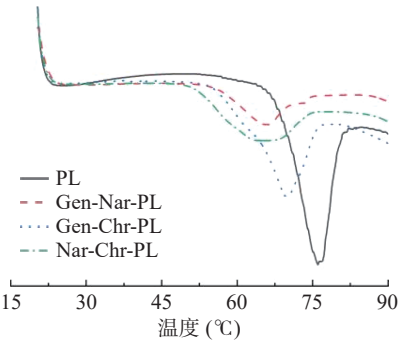


图 10 PL 和三种三元复合物的 DSC 图

Fig.10 DSC diagrams of PL and three ternary complexes

降低，结果如图 10 所示，ΔH 从 21.12 J/g 分别降至 16.38、7.14、11.49 J/g，说明结合后酶变性所需热量减少，推测复合物形成导致 PL 结构发生重排或破坏，降低热稳定性，使酶活性降低。与红外的结果一致，表明 Gen-Chr、Gen-Nar、Nar-Chr 对 PL 结构有显著影响。

2.11 粒径分析

加入 Gen-Chr、Gen-Nar、Nar-Chr 后，联合抑制剂与 PL 结合形成的复合物粒径改变，结果见图 11。随着 Gen-Chr、Gen-Nar、Nar-Chr 浓度增加，复合物粒径增大，表明高浓度下，抑制剂与 PL 形成更大复合物。粒径增大可能使复合物疏水性降低。联合抑制剂与 PL 结合后，复合物表面特性改变，疏水区域被掩盖或减少，降低疏水性，与同步荧光结果一致，进一步验证联合抑制剂会改变 PL 疏水性。

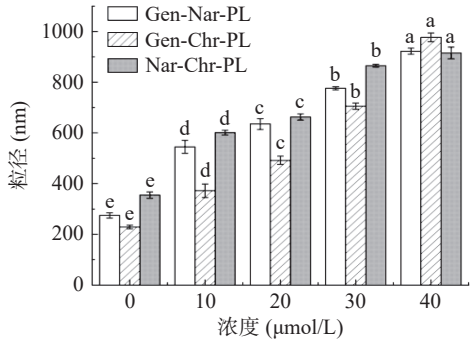


图 11 三种三元复合物的粒径图

Fig.11 Particle size diagrams of three ternary complexes

注：不同小写字母表示数据差异显著(P<0.05)。

3 结论

本研究综合多种实验方法，揭示了 Gen、Chr、Nar 联合使用时与 PL 的相互作用机制及其复合物的结构与性质。结果显示，Chr、Gen、Nar 以 4∶1 的摩尔比联合使用时效果最佳，显示出协同作用。荧光猝灭实验表明，联合抑制剂主要通过静态猝灭影响 PL，且在 298 K 时，Gen-Chr、Gen-Nar、Nar-Chr 的结合常数 K_a 值分别为 1.63×10^5 L/mol、14.64×10^5 L/mol、7.07×10^5 L/mol，其中 Gen-Nar 的结合能力最强，而 Gen-Chr 和 Nar-Chr 的结合能力相对较弱，结合过程主要由氢键、疏水作用和范德华力驱动。同步荧光分析显示，联合抑制剂与 PL 结合后，影响了 Tyr 和 Trp 残基的微环境。紫外和红外光谱结果揭示了联合抑制剂与 PL 形成新的基态复合物，导致 PL 的二级结构发生变化，DSC 数据显示复合物的热稳定性降低，粒径分析表明复合物的疏水性随抑制剂浓度增加而降低。这些结果表明，联合抑制剂能够显著改变 PL 的结构和功能，为了解小分子与蛋白质之间的相互作用提供理论依据，也为相关药物及功能性食品的研发提供参考。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] PLISSONNEAU C, SANTOSA S. Regional primary preadipocyte characteristics in humans with obesity and type 2 diabetes mellitus[J]. Heliyon, 2024, 10(21): e39710.

[2] SOOD S, MITTAL N, SINGH T G, et al. Pathogenesis of obesity-associated cardiovascular diseases: Key role of biomolecules [J]. Health Sciences Review, 2023, 7: 100098.

[3] KATO E, TSURUMA A, AMISHIMA A, et al. Proteinous pancreatic lipase inhibitor is responsible for the antiobesity effect of young barley (*Hordeum vulgare* L.) leaf extract[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2021, 85(8): 1885−1889.

[4] RAJAN L, PALANISWAMY D, MOHANKUMAR S K. Targeting obesity with plant-derived pancreatic lipase inhibitors: A comprehensive review[J]. Pharmacological Research, 2020, 155: 104681.

[5] AYDIN B, ONBASI K. Lipase inhibitor orlistat: An old but still effective weapon[J]. Medicine Science | International Medical Journal, 2021, 10(4): 1406.

[6] KATIMBWA D A, MA J, KIM C K, et al. Potato extract inhibits lipase activity and ameliorates gut microbiome dysbiosis and weight gain in mice fed a high-fat diet[J]. Applied Biological Chemistry, 2021, 64(1): 17.

[7] HE Xiaoqin, ZOU Haidan, LIU Yi, et al. Discovery of curcuminoids as pancreatic lipase inhibitors from medicine-and-food homology plants[J]. Nutrients, 2024, 16(15): 2566.

[8] HE Xu, CHEN Luyao, PU Yijing, et al. Fruit and vegetable polyphenols as natural bioactive inhibitors of pancreatic lipase and cholesterol esterase: Inhibition mechanisms, polyphenol influences, application challenges[J]. Food Bioscience, 2023, 55: 103054.

[9] HOU Xudong, GE Guangbo, WENG Zimiao, et al. Natural constituents from *Cortex mori* Radicis as new pancreatic lipase inhibitors[J]. Bioorganic Chemistry, 2018, 80: 577−584.

[10] JEONG J Y, JO Y H, LEE K Y, et al. Optimization of pancreatic lipase inhibition by *Cudrania tricuspidata* fruits using response surface methodology[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2014, 24(10): 2329−2333.

[11] 郑啸丹, 王闪, 樊筱圆, 等. 天然胰脂肪酶抑制剂的虚拟筛选及活性验证[J]. 食品与生物技术学报, 2024, 43(8): 160−172.
[ZHENG Xiaodan, WANG Shan, FAN Xiaoyuan, et al. Virtual screening and activity validation of natural pancreatic lipase inhibitors[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2024, 43(8): 160−172.]

[12] 葛晶晶, 阮征. 柚皮素对高脂与高糖诱导的小鼠非酒精性脂

肪肝病的干预作用[J]. 中国食品学报, 2023, 23(9): 60−66. [GE Jingjing, RUAN Zheng. Intervention effect of naringenin on high-fat and high-sucrose-induced nonalcoholic fatty liver disease in mice[J]. Chinese Journal of Food Science, 2023, 23(9): 60−66.]

[13] KOSSAKOWSKI K, ŻWAWIAK J, CHERNIIENKO A, et al. Molecular insights into genistein-NSAID hybrids: Synthesis, characterisation and DFT study[J]. Structural Chemistry, 2025, 36(1): 55−72.

[14] ADESINA A F, ADEWUYI A, OTUECHERE C A. Exploratory studies on chrysin *via* antioxidant, antimicrobial, ADMET, PASS and molecular docking evaluations[J]. Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine, 2024, 11: 100413.

[15] CHOI Y, SHIM J, KIM M. Genistin: A novel potent anti-adipogenic and anti-lipogenic agent[J]. Molecules, 2020, 25(9): 2042.

[16] 王松雪. 柚皮苷和柚皮素对胰脂肪酶的抑制作用及对大鼠的减肥作用[D]. 天津: 天津科技大学, 2022. [WANG Songxue. Inhibitory effects of naringin and naringenin on pancreatic lipase and their anti-obesity effects in rats[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2022.]

[17] 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 Technology and Biotechnology, 2017, 55(4).

[18] RAJAN L, DAS N, CHAKKYARATH V, et al. Pancreatic lipase related protein 1 as a potential target in triglyceride breakdown: A molecular docking studies with *in vitro* appraisal[J]. Results in Chemistry, 2023, 5: 100960.

[19] HONG J, CHOI Y, LEE J, et al. Inhibitory characteristics of flavonoids from soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) leaf against pancreatic lipase[J]. Food Bioscience, 2023, 56: 103311.

[20] PAI S A, MARTIS E A, MUNSHI R P, et al. Chrysin mitigated obesity by regulating energy intake and expenditure in rats[J]. Journal of Traditional and Complementary Medicine, 2020, 10(6): 577−585.

[21] GEORGE G, S˙N˙C˙ S, 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.

[22] CHOU T C, SHAPIRO T A, FU J N, et al. Computerized quantification of drugs synergism in animal studies or in clinical trials using only ten data points[J]. Synergy, 2019, 9: 100049.

[23] ZHOU Jianfeng, WANG Wenjun, YIN Zhongping, et al. Quercetin is a promising pancreatic lipase inhibitor in reducing fat absorption *in vivo*[J]. Food Bioscience, 2021, 43: 101248.

[24] GEHLEN M H. The centenary of the Stern-Volmer equation of fluorescence quenching: From the single line plot to the SV quenching map[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews, 2020, 42: 100338.

[25] PRINZ H. Hill coefficients, dose–response curves and allosteric mechanisms[J]. Journal of Chemical Biology, 2010, 3(1): 37−44.

[26] 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.

[27] 范阳扬. 水仙苷与 *α*-淀粉酶和 *α*-葡萄糖苷酶相互作用机制研究[D]. 长春: 长春师范大学, 2023. [FAN Yangyang. Study on the interaction mechanism between narcissoside and *α*-amylase and *α*-glucosidase[D]. Changchun: Changchun Normal University, 2023.]

[28] 康柱, 闫焕, 周素珍, 等. 多光谱法探究壳聚糖与酪蛋白的结合作用[J]. 包装工程, 2023, 44(11): 99−107. [KANG Zhu, YAN Huan, ZHOU Suzhen, et al. Investigation of the binding interaction between chitosan and casein by multi-spectroscopic methods[J]. Packaging Engineering, 2023, 44(11): 99−107.]

[29] 陈璇. 黄酮类化合物(槲皮素、木犀草素)与类胡萝卜素(番茄红素、叶黄素)协同抗氧化作用及分子机制[D]. 南昌: 南昌大学, 2022. [CHEN Xuan. Synergistic antioxidant effects and molecular mechanisms of flavonoids (Quercetin, Luteolin) and carotenoids (Lycopene, Lutein)[D]. Nanchang: Nanchang University, 2022.]

[30] 洪鑫月. 橙皮素和香叶木素对多酚氧化酶的抑制作用及机制研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2023. [HONG Xinyue. Inhibitory effects and mechanisms of hesperetin and diosmetin on polyphenol oxidase[D]. Nanchang: Nanchang University, 2023.]

[31] SAMARI F, HEMMATEENEJAD B, SHAMSIPUR M, et al. Affinity of two novel five-coordinated anticancer Pt(II) complexes to human and bovine serum albumins: A spectroscopic approach[J]. Inorganic Chemistry, 2012, 51(6): 3454−3464.

[32] ZHOU Kaili, PAN Dongqi, LOU Yanyue, et al. Intermolecular interaction of fosinopril with bovine serum albumin (BSA): The multi-spectroscopic and computational investigation[J]. Journal of Molecular Recognition, 2018, 31(8): e2716.

[33] GUO Xin, WEI Yabo, LIU Pingping, et al. Study of four polyphenol-*Coregonus peled* (C. peled) myofibrillar protein interactions on protein structure and gel properties[J]. Food Chemistry: X, 2024, 21: 101063.

[34] 温鹤迪, 宁珍珍, 李金铭, 等. 卵白蛋白与绿原酸分子互作对蛋白结构及乳液稳定性的影响[J]. 中国食品学报, 2022, 22(10): 66−76. [WEN Hedi, NING Zhenzhen, LI Jinming, et al. Effects of molecular interaction between ovalbumin and chlorogenic acid on protein structure and emulsion stability[J]. Chinese Journal of Food Science, 2022, 22(10): 66−76.]

[35] ZHAI Yingao, WANG Kunshan, YU Zenghui, et al. Pancreatic lipase inhibitors: Virtual screening and mechanistic analysis[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 310: 143128.

[36] LU Qiu, CHEN Chaoyin, ZHAO Shenglan, 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.

[37] SHI Ruijie, CHEN Wei, PAN Fei, et al. Characterization of the binding behavior, structure and foaming properties of bovine *α*-lactalbumin combined with saponin by the multi-spectroscopic and silico approaches[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 124: 107259.

[38] De MEUTTER J, GOORMAGHTIGH E. Evaluation of protein secondary structure from FTIR spectra improved after partial deuteration[J]. European Biophysics Journal, 2021, 50(3): 613−628.

[39] MAGALHÃES S, TRINDADE D, MARTINS T, et al. Monitoring plasma protein aggregation during aging using conformation-specific antibodies and FTIR spectroscopy[J]. Clinica Chimica Acta, 2020, 502: 25−33.

[40] SEELIG J, SEELIG A. Protein unfolding: Thermodynamic perspectives and unfolding models[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(6): 5457.