

3 种黄酮联合阿卡波糖抑制 α -淀粉酶活性的机制

王昆山, 翟迎奥, 于增辉, 张璇, 周素珍, 范金波*

(渤海大学食品科学与工程学院 辽宁锦州 121013)

摘要 目的:探究 3 种黄酮【黄芩素(Bai)、金雀异黄酮(Gen)、异甘草素(Isl)】与阿卡波糖(Aca)联合抑制 α -淀粉酶(AMY)的作用机制。方法:通过抑制率试验、联合指数(CI)分析、荧光光谱分析、紫外光谱分析、红外光谱分析及分子动力学模拟等方法,系统研究联合抑制对 AMY 的抑制效果及机制。结果:Bai/Gen/IsI 与 Aca 在物质的量比为 2:1,3:1,4:1 的条件下,均对 AMY 的抑制效果显著增强($P<0.05$),其中 Bai-Aca 和 Isl-Aca 在物质的量比为 3:1 时,表现出强协同效应($CI<1$),而 Gen-Aca 仅在物质的量比为 3:1 时,且 $0.3<Fa<0.9$ 的特定条件下呈现协同作用。荧光光谱分析表明,联合抑制剂通过静态猝灭机制与 AMY 结合,IsI-Aca 与 AMY 的结合常数(K_a)最高【298 K 时, K_a 为 $(4.826\pm 0.206)\times 10^5$ L/mol;300 K 时, K_a 为 $(35.172\pm 0.255)\times 10^5$ L/mol】,且其亲和力随温度的升高显著增强($P<0.05$),表明其复合物稳定性最佳。热力学参数表明,Bai-Aca 和 Isl-Aca 与 AMY 结合以疏水相互作用为主,而 Gen-Aca 则依赖氢键结合。同步荧光及紫外光谱显示,联合抑制剂通过改变色氨酸(Trp)和酪氨酸(Tyr)残基的微环境调控 AMY 活性,其中 Trp 残基占主导。红外光谱与分子动力学模拟分析表明,Bai-Aca 和 Isl-Aca 促使 AMY 二级结构向更稳定的 β -转角转变,而 Gen-Aca 诱导 α -螺旋形成,后者复合物的自由能景观呈现分散能量簇,稳定性较弱。结论:Bai-Aca 和 Isl-Aca 联合抑制体系通过协同作用显著降低抑制剂用量,同时维持 AMY 复合物的高稳定性,为开发新型糖尿病治疗策略及功能性食品提供了理论参考。

关键词 联合抑制; 黄芩素; 金雀异黄酮; 异甘草素; 阿卡波糖; 分子动力学

文章编号 1009-7848(2026)01-0083-13 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2026.01.008

α -淀粉酶(α -Amylase, AMY)是一种关键的消化酶,属于糖苷水解酶家族。通过水解淀粉分子中的 α -1,4-糖苷键,将淀粉分解为麦芽糖和葡萄糖等小分子糖类,在碳水化合物的消化和吸收过程中发挥重要作用^[1-4]。作为消化系统中的关键酶,抑制 AMY 的活性可用于调控血糖水平,降低糖尿病、心血管疾病等慢性疾病的发病风险。

阿卡波糖(Acarbose, Aca)为一种糖苷酶抑制剂,能够抑制体内葡萄糖的生成,降低机体餐后血糖浓度,这种作用对正常人和糖尿病患者来说都是有益处的^[5-8]。然而,经常使用 Aca 治疗会产生不良反应。单一成分的天然黄酮类 AMY 抑制剂,如黄芩素(Baicalein, Bai)、金雀异黄酮(Genistein, Gen)和异甘草素(Isoliquiritigenin, Isl)在应用中通常需要较高剂量才能达到预期的抑制效果,这可能导致潜在的不良反应或副作用^[9-10]。单一抑制剂的应用存在一定的局限性。联合作用通过不同

小分子之间或小分子与酶之间的相互作用,可能产生协同增效作用,是一种具有潜力的研究方向。研究表明^[11],表儿茶素没食子酸酯(ECG)对 AMY 和 α -葡萄糖苷酶有强抑制作用。当 ECG 与 Aca 或表没食子儿茶素没食子酸酯以恒定的 IC_{50} 比例结合时,对 AMY 抑制呈现拮抗作用,而对 α -葡萄糖苷酶抑制表现为相加或协同效应。Peng 等^[12]研究发现,橙皮素-Cu(II)复合物与橙皮素相比,对 AMY 和 α -葡萄糖苷酶表现出更强的抑制能力。张静等^[13]研究发现,原花青素和原儿茶酸的复配浓度比为 1:21 时,对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果最优,当浓度比为 1:37 时,对 AMY 的抑制效果最优。两种物质复配浓度比为 1:21 时,CI 小于 1,对 α -葡萄糖苷酶表现出协同抑制作用;两种物质复配浓度比为 1:37 时,联合指数(Combination index, CI)小于 1,对 AMY 表现出协同抑制作用。

本研究通过联合作用指数评估不同组合的抑制效果,探究协同抑制机理,并采用光谱学方法研究其分子相互作用。联合抑制不仅能够降低单一抑制剂的使用剂量,还能实现多靶点协同作用,对血糖调控和糖尿病治疗具有重要的理论意义和应

收稿日期: 2025-02-14

基金项目: 国家重点研发计划项目(2023YFF1103502)

第一作者: 王昆山,男,硕士生

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

用价值,同时也为功能性食品或药物的开发提供了参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

猪胰腺 α -淀粉酶(α -Amylase, AMY, 8 U/mg),上海源叶生物技术有限公司;黄芩素(B107324,纯度 $\geq 98\%$),阿拉丁试剂(上海)有限公司;金雀异黄酮(纯度 $\geq 97\%$)、异甘草素(纯度 $\geq 98\%$)、阿卡波糖(纯度 $\geq 95\%$),北京J&K科学有限公司。

1.2 仪器与设备

Evolution201 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。

1.3 方法

1.3.1 联合抑制剂对 AMY 的抑制作用 参考 Liu 等^[14]的方法,测定 Bai/Gen/IsI 与 Aca 两两联合使用对 AMY 的抑制作用,配制一系列不同浓度的 Bai/Gen/IsI 与 Aca 混合溶液,且 Bai/Gen/IsI 与 Aca 物质的量比为 1:1,2:1,3:1,4:1,5:1。

1.3.2 联合指数模型的构建 参考 Peng 等^[12]的方法,使用 CompSyn 软件获得联合抑制的效应(Fa)-联合作用指数(CI)图。Fa 为联合抑制时的效应,利用其对应的 CI 值评估联合抑制作用的效果:CI<1,协同作用;CI=1,加和作用;CI>1,拮抗作用。

1.3.3 联合抑制剂对 AMY 抑制作用的荧光光谱分析 参考 Sun 等^[15]的方法,稍作修改,测量了不同浓度 Bai-Aca/Gen-Aca/IsI-Aca 对 AMY 荧光的猝灭作用。设置荧光光谱参数为:激发波长 280 nm,狭缝宽度 2.5 nm,扫描发射波长 290~450 nm。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。根据公式(1)和公式(2)进行描述。

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

$$\lg\left(\frac{F_0}{F} - 1\right) = \lg K_a + n \lg [Q] \quad (2)$$

式中: F 和 F_0 分别为不存在和存在猝灭剂时

荧光团或大分子(AMY)的发射荧光强度; $[Q]$ 为猝灭剂的浓度, mol/L; τ_0 为不存在猝灭剂时荧光团的寿命(对于生物分子, $\tau_0=10^{-8}$ s),s; K_{sv} 为猝灭常数, L/mol; K_q 为猝灭速率常数, L/(mol·s); K_a 为结合常数, L/mol; n 为结合位点的数量。

通过热力学参数进一步研究了 Bai/Que 与 AMY 的结合方式,参考 Jiang 等^[16]研究的方法,稍作修改。利用热力学公式(3)和公式(4)对不同温度下的发射荧光数据进行分析。

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H}{2.303RT} + \frac{\Delta S}{2.303R} = \Delta G \quad (3)$$

$$\ln\left(\frac{K_{a2}}{K_{a1}}\right) = \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right) \Delta H \times \frac{1}{R} \quad (4)$$

式中: ΔH 为焓变, kJ/mol; ΔS 为熵变, J/(mol·K); ΔG 为吉布斯自由能变, kJ/mol; R 为气体常数, J/(mol·K); T 为热力学温度, K。

1.3.4 联合抑制剂对 AMY 抑制作用的同步光谱分析 参考 Li 等^[17]的方法,稍作修改。设置 $\Delta\lambda_1=15$ nm 和 $\Delta\lambda_2=60$ nm($\Delta\lambda$ 表示激发和发射波长间隔)。发射波长范围为 260~340 nm。激发光谱和发射光谱的狭缝宽度均设置为 2.5 nm。其它参数参照荧光猝灭试验。

1.3.5 联合抑制剂对 AMY 抑制作用的 UV-Vis 光谱分析 参考 Oghenetega 等^[18]的方法,稍作修改。测定 AMY 和 AMY-联合抑制剂复合物的 UV-Vis 光谱,测量波长范围为 190~500 nm,采样间隔 1 nm。

1.3.6 联合抑制剂对 AMY 抑制作用的傅里叶红外光谱分析 傅里叶红外光谱法测量抑制剂不存在和存在时 AMY 的红外光谱。参考刘勇等^[19]的方法,稍作修改。使用溴化钾压片法,扫描范围 4 000~400 cm^{-1} ,得到 AMY 和 AMY-联合抑制剂的红外光谱。蛋白质的二级结构是通过 Peakfit 软件计算各结构的占比。

1.3.7 联合抑制剂对 AMY 抑制作用的分子动力学模拟 参考 Priyanka 等^[6]的试验方法,稍作修改。Bai-Aca/Gen-Aca/IsI-Aca-AMY 复合物作为初始结构分别进行全原子分子动力学模拟,模拟使用 GROMACS 2020.6 软件进行。AMY 和化合物分别采用 AMBER99SB-ILDN 力场和 GAFF 力场。在能量最小化, NVP 和 NPT 预平衡处理条件下进

行100 ns 的分子动力学模拟。

1.4 数据处理

所有试验均重复测定3次,数据以“平均值 \pm 标准差”表示,用ANOVA($P<0.05$)分析组间差异。采用IBM SPSS Statistics 26.0软件分析数据,O-rigin 2024b和DS软件作图。

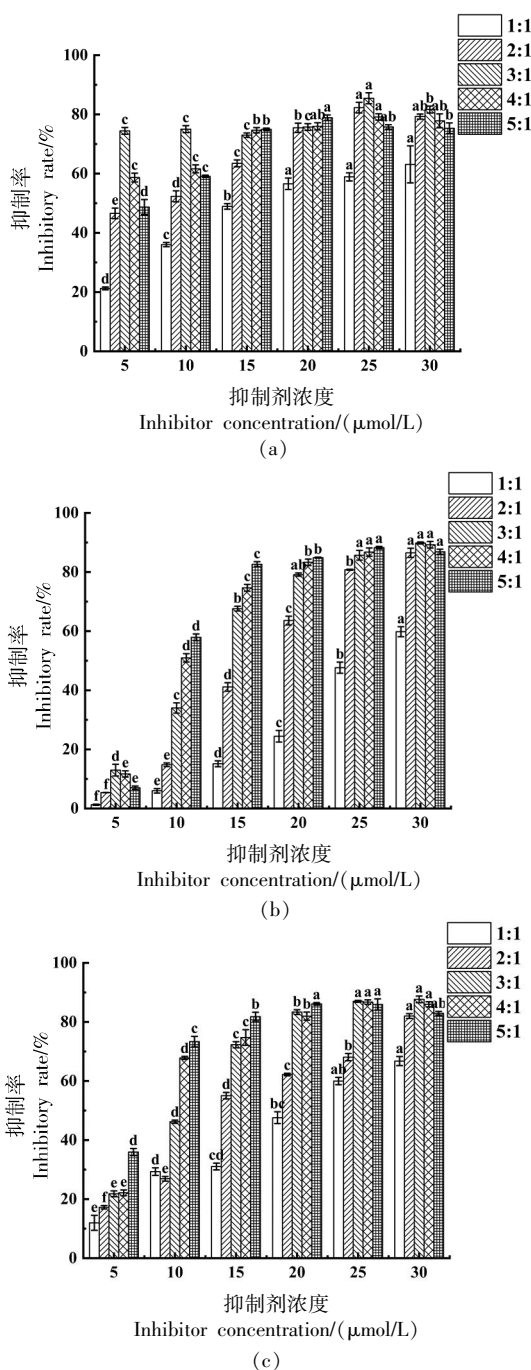
2 结果与分析

2.1 联合抑制剂对 AMY 的抑制作用

如图1所示,在Bai/Gen/IsI与Aca物质的量比为2:1,3:1,4:1时均表现出很强的抑制效果。当Bai/Gen/IsI与Aca物质的量比为1:1时,抑制能力显著低于其它组($P<0.05$),这可能是抑制剂与Aca产生了拮抗作用。而当Bai/Gen/IsI与Aca物质的量比为5:1时,抑制能力随浓度的增加先升高后下降,这可能是由于抑制剂与AMY之间形成的复合物稳定性降低,抑制剂从淀粉酶的活性位点上逐渐解离。因此,为进一步确定Bai/Gen/IsI与Aca间的相互作用是协同或拮抗,选择Bai/Gen/IsI与Aca物质的量比例为2:1,3:1,4:1进行CI等效图分析,对它们之间的相互作用进行定量。

2.2 联合指数模型分析

如图1所示,Bai/Gen/IsI与Aca联合使用时,总浓度越大,对AMY活性的抑制效果越好。效应(Fraction affected, Fa)表示使用联合抑制剂时,对AMY的抑制率。Bai/Gen/IsI与Aca联合抑制AMY时,浓度比值为2:1,3:1,4:1时获得的Fa值为0.15,0.30,0.45,0.60,0.75和0.90(图2)。在联合抑制模型中,联合指数(Combination index, CI)是用来量化两种抑制剂联合作用效果的一个指标。它可以帮助判断两种抑制剂是协同作用、相加作用还是拮抗作用。Bai和Aca联合抑制AMY试验获得的所有Fa值对应的CI值均小于1(图2a),相较于比例为2:1和4:1,Bai与Aca的联合比例为3:1时,CI值更低。这表明当浓度比例为3:1时,Bai和Aca联合抑制AMY表现为协同作用。Gen和Aca联合抑制AMY试验获得的Fa值对应的CI值只有当浓度比值为3:1且 $0.3<Fa<0.9$ 时小于1(图2b)。这表明当浓度比例为3:1时,Gen和Aca联合抑制AMY的抑制效应在 $0.3<Fa<0.9$ 这个范围内表现为协同作用。IsI和Aca联合抑制

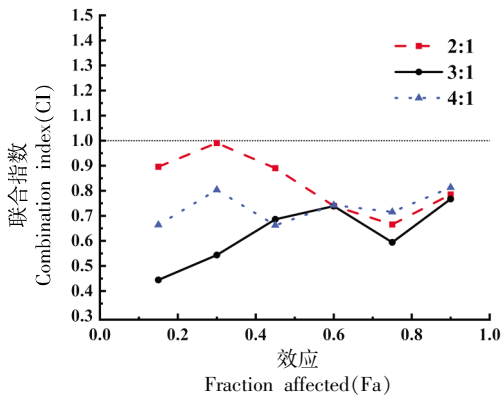


注:不同小写字母表示不同组别间的显著性差异($P<0.05$)。

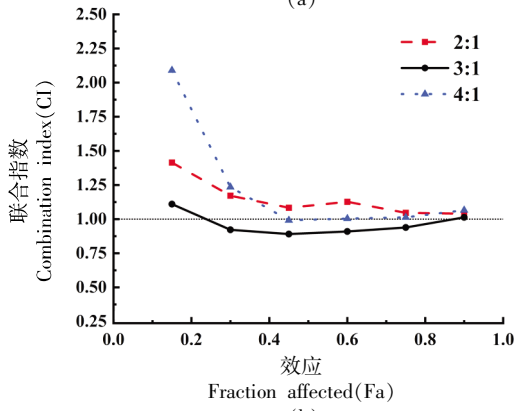
图1 Bai-Aca(a)、Gen-Aca(b)和IsI-Aca(c)对AMY的抑制作用

Fig.1 Inhibitory Effects of Bai-Aca (a), Gen-Aca (b), and IsI-Aca (c) on AMY

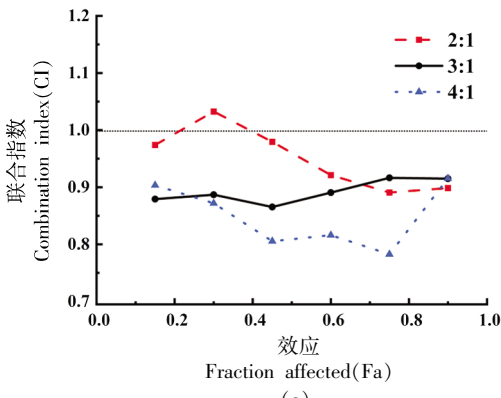
AMY的比例为2:1和4:1时,CI值表现出不稳定的状态,而当比例为3:1时,IsI和Aca联合抑制AMY的 $CI<0.9$,这表明IsI和Aca联合抑制AMY



(a)



(b)



(c)

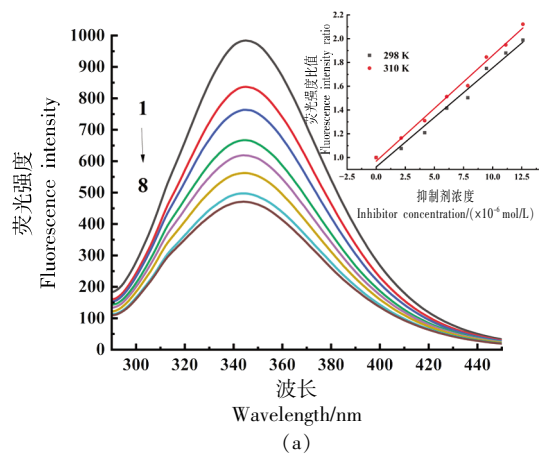
图2 不同比例 Bai-Aca(a)、Gen-Aca(b)和 Isl-Aca(c)对 AMY 的 CI 等效图

Fig.2 CI isobolograms of Bai-Aca (a), Gen-Aca (b), and Isl-Aca (c) at different ratios on AMY inhibition

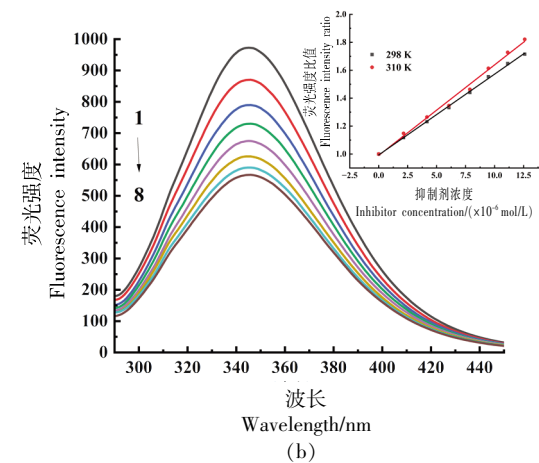
表现为协同作用(图 2c)。

2.3 联合抑制剂对 AMY 的荧光光谱分析

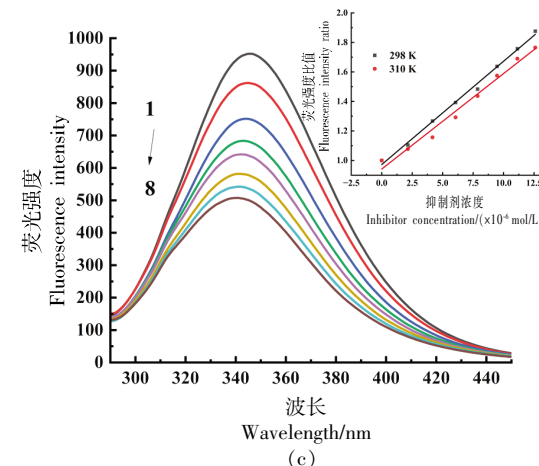
图 3 展示了 Bai-Aca/Gen-Aca/IsI-Aca 存在时 AMY 的荧光光谱。随着抑制剂浓度增加,AMY 荧光强度降低,出现明显猝灭效应,表明 3 种联合抑制剂与 AMY 相互作用形成复合物。荧光猝灭机



(a)



(b)



(c)

注: 曲线 1~8 的抑制剂浓度分别为 0,2.42,4.69,6.82,8.82,10.72,12.5,14.2 μmol/L。

图3 298 K 温度下 Bai-Aca(a)、Gen-Aca(b)和 Isl-Aca(c)与 AMY 相互作用的荧光光谱图

Fig.3 Fluorescence spectra of the interaction between Bai-Aca(a), Gen-Aca (b), and Isl-Aca (c) with AMY at 298 K

制分静态和动态,可根据温度和激发态寿命依赖性区分。当温度为 298 K 和 310 K 时,Bai-Aca/Gen-Aca/IsI-Aca 对 AMY 猝灭的 Stern-Volmer 曲线呈良好线性,说明 AMY-Bai-Aca/AMY-Gen-Aca/AMY-IsI-Aca 体系只有一种猝灭机制。由拟合斜率算得 K_{sv} 值和 K_q 值(表 1),AMY-IsI-Aca 体系 K_{sv} 值随温度升高而下降,其它两个体系则相反。3 种联合抑制剂 K_q 值远高于最大扩散碰撞猝灭常数 $2 \times 10^{10} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$,表明通过与 AMY 形成基态络合物造成静态猝灭。Gen-Aca 的 K_a 值随温度升高降低,说明温度越高,酶对 Gen-Aca 亲和

力越低,其复合物形成可逆^[20]。Bai-Aca/IsI-Aca 的 K_a 值随温度升高而增加,表明 AMY 抑制剂复合物稳定性随温度升高而增加。 K_a 值在 $10^4 \sim 10^7 \text{ L}/\text{mol}$ 范围内,说明 AMY 与抑制剂结合亲和力适中且可能可逆^[21]。当温度为 298 K 时,3 种联合抑制剂体系结合常数 K_a 顺序为 IsI-Aca > Bai-Aca > Gen-Aca,表明 IsI-Aca 更易与 AMY 结合,其 K_a 值与抑制结果一致,说明结果可靠。此外,不同温度下 n 值接近 1,表明 AMY 上只有一个最佳结合位点^[22]。

表 1 不同温度下联合抑制剂与 AMY 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 the interaction between combined inhibitors and AMY at different temperatures

联合抑制剂	T/K	$K_{sv}/(\times 10^4 \text{ L}/\text{mol})$	$K_q/[\times 10^{12} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})]$	R_a	$K_a/(\times 10^5 \text{ L}/\text{mol})$	R_b	n
Bai-Aca	298	8.284 ± 0.218	8.284 ± 0.218	0.993	1.491 ± 0.279	0.987	1.05
	310	8.347 ± 0.199	8.347 ± 0.199	0.992	1.927 ± 0.166	0.995	1.07
Gen-Aca	298	5.714 ± 0.048	5.714 ± 0.048	0.999	0.823 ± 0.067	0.999	1.03
	310	6.376 ± 0.115	6.376 ± 0.115	0.999	0.475 ± 0.233	0.989	0.98
IsI-Aca	298	6.699 ± 0.128	6.699 ± 0.128	0.994	4.826 ± 0.206	0.994	1.17
	310	5.840 ± 0.241	5.840 ± 0.241	0.998	35.172 ± 0.255	0.993	1.35

通过公式(3)和公式(4)计算抑制剂与 AMY 结合的热力学参数,见表 2。3 种联合抑制剂体系的 $\Delta G < 0$,表明它们与 AMY 的结合是自发的放热过程,此外,Bai-Aca/IsI-Aca 体系的 ΔH 与 ΔS 均

为正值,表明疏水相互作用为主要驱动力。Gen-Aca 的 ΔH 与 ΔS 均为负值,表明氢键相互作用为这两种联合抑制剂与 AMY 结合的主要驱动力。

表 2 不同温度下联合抑制剂与 AMY 相互作用的热力学常数

Table 2 Thermodynamic constants of the interaction between combined inhibitors and AMY at different temperatures

联合抑制剂	T/K	$\Delta H/(\text{kJ}/\text{mol})$	$\Delta S/[\text{J}/(\text{mol} \cdot \text{K})]$	$\Delta G/(\text{kJ}/\text{mol})$
Bai-Aca	298	16.42	154.1	-29.5249
	310			-31.3741
Gen-Aca	298	-35.19	-23.9	-28.0642
	310			-27.7774
IsI-Aca	298	127.25	535.6	-32.4391
	310			-38.8663

2.4 联合抑制剂对 AMY 的同步荧光光谱分析

利用同步荧光进一步研究 Bai-Aca/Gen-Aca/IsI-Aca 体系对 AMY 结合位点附近微环境的影响^[23]。在 $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 处,随着 Bai/Gen/IsI-Aca 体系浓度的增加,观察到明显的蓝移,表明 Aca 的加入增强了 Bai/Gen/IsI 对 AMY 中 Tyr 残基周围微环境的

影响,导致 Tyr 残基更多地暴露,疏水性增强(图 4a、4c、4e)。在 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 处,Bai-Aca/Gen-Aca 体系浓度的增加引起红移,表明 Trp 周围微环境影响增强,疏水性降低,亲水性增强(图 4b、4d)。而 IsI-Aca 体系则引起蓝移,导致 Trp 残基更多地暴露,疏水性增强(图 4f)。

通过计算同步荧光猝灭比率 (RSFQ), 发现 Bai-Aca/Gen-Aca/IsI-Aca 浓度达到 $18.92 \mu\text{mol/L}$ 时, Trp 荧光强度的下降幅度 (64.7%, 58.3%, 62%)

大于 Tyr 荧光强度的下降幅度 (42.9%, 41.4%, 35.1%), 表明 Bai-Aca/Gen-Aca/IsI-Aca 对 Trp 的抑制能力更强。

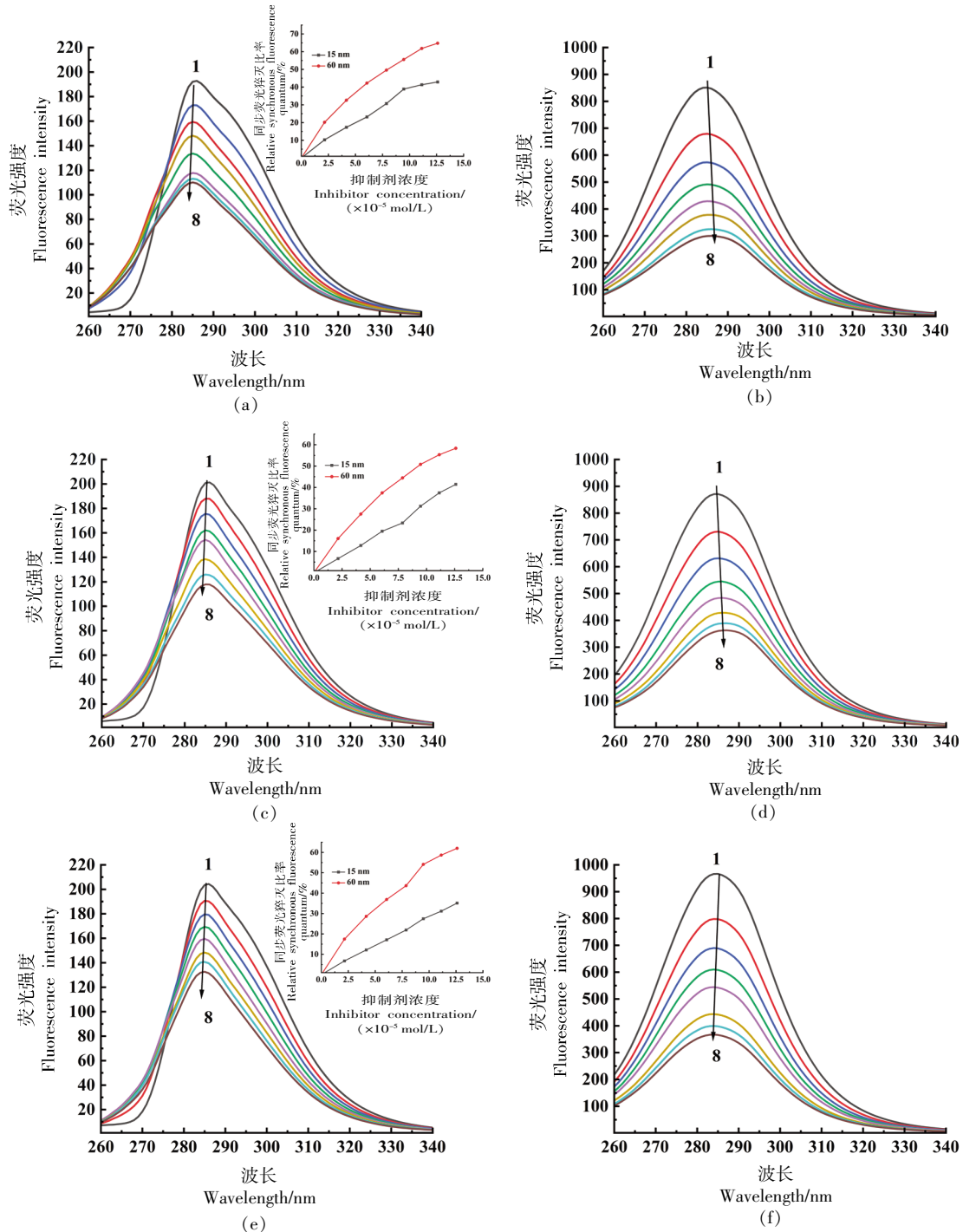


图 4 Bai-Aca(a、b)、Gen-Aca(c、d)和 IsI-Aca(e、f)对 AMY 同步荧光光谱的影响及 3 种黄酮类化合物联合阿卡波糖与 α -淀粉酶形成的复合物体系的 RSFQ 对比图

Fig.4 Effects of Bai-Aca (a, b), Gen-Aca (c, d), and IsI-Aca (e, f) on the synchronous fluorescence spectra of AMY and comparison of RSFQ in complex systems with four inhibitors

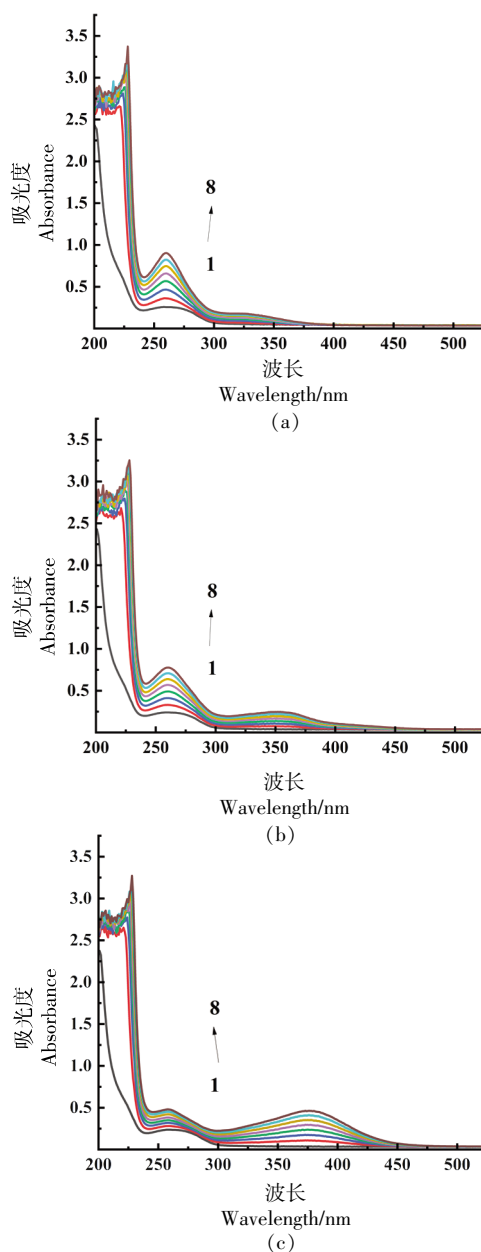
2.5 联合抑制剂对 AMY 的 UV-Vis 光谱分析

UV-Vis 光谱可以用来表征是否有复合物的生成,吸收峰变化可以表征复合物的结构变化,其位置移动表示蛋白质和氨基酸残基的微环境信息发生变化^[24]。图 5 显示 AMY 与 3 种联合抑制剂体系的 UV-Vis 光谱变化。从图中可以看出,在 AMY 溶液中加入 Bai-Aca/Gen-Aca 后,随着浓度的增加,AMY 的紫外吸收增加并出现了明显的红移,这说明了 Bai-Aca/Gen-Aca 与 AMY 的相互作用,完全填充了 AMY 的疏水区域,使得 AMY 的疏水部分被包裹在内部,导致疏水性降低,从而增强了它们的亲水性,在 AMY 溶液中加入 Isl-Aca 后,随着浓度的增加,AMY 的紫外吸收增加并出现了明显的蓝移,导致 AMY 肽链发生了延伸,使 AMY 内部的疏水基团中的 Trp 和 Tyr 残基更多地暴露,疏水性增强。该结论与同步荧光光谱结论一致。

2.6 联合抑制剂对 AMY 的傅里叶红外光谱分析

通过傅里叶变换红外光谱 (FT-IR) 分析了 AMY 的酰胺谱带 (I、A 和 III),以评估酶-配体相互作用。其中,酰胺 I 谱带($1700\sim 1600\text{ cm}^{-1}$)主要反映 C=O 伸缩振动,其吸收峰波数变化可用于追踪肽链运动及酶结构变化^[14]。加入 Bai-Aca/Gen-Aca/Isl-Aca 后,AMY 的酰胺 I 谱带峰值从 1654 cm^{-1} 分别移至 $1651\text{ cm}^{-1}/1641\text{ cm}^{-1}/1641\text{ cm}^{-1}$ (图 6),表明抑制剂与 C=O 基团相互作用,引起多肽重排。酰胺 III 谱带峰值从 1330 cm^{-1} 移至 $1311\text{ cm}^{-1}/1315\text{ cm}^{-1}/1327\text{ cm}^{-1}$,说明抑制剂与 C-N 键发生作用,导致 AMY 结构变化。酰胺 A 带峰值从 3446 cm^{-1} 移至 $3441\text{ cm}^{-1}/3441\text{ cm}^{-1}/3444\text{ cm}^{-1}$,表明氢键在 AMY 与抑制剂相互作用中起关键作用,稳定了复合物结构。

为了确定二级结构的变化,用曲线拟合分析了酰胺 I 带。酰胺 I 带可分为 4 个谱带范围, $1660\sim 1700\text{ cm}^{-1}$, $1650\sim 1660\text{ cm}^{-1}$, $1640\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ 和 $1600\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ 分别表征 β -转角、 α -螺旋、无规卷曲和 β -折叠结构^[25]。如表 3 所示,AMY 含有 20.8% 的 β -转角、5.85% 的无规卷曲和 73.36% 的 β -折叠,Gen-Aca 的加入主要是氢键促进 AMY 的 α -螺旋的形成;Bai-Aca/Isl-Aca 的加入主要是疏水作用驱使 β -折叠向 β -转角转变,增加蛋白结构的稳定性^[21],这与荧光作用力类型分



注: 曲线 1-8 的抑制剂浓度分别为 0, 2.42, 4.69, 6.82, 8.82, 10.72, 12.5, 14.2 $\mu\text{mol/L}$ 。

图 5 存在和不存在 Bai-Aca(a)、Gen-Aca(b) 和 Isl-Aca(c) 时 AMY 的 UV-Vis 光谱

Fig.5 UV-Vis spectra of AMY in the presence and absence of Bai-Aca (a), Gen-Aca (b) and Isl-Aca (c)

析结果一致。

2.7 联合抑制剂对 AMY 的分子动力学模拟分析

为了观察 AMY 和 AMY-配体复合物骨架原子的构象和结构变化,采用均方根偏差(RMSD)分

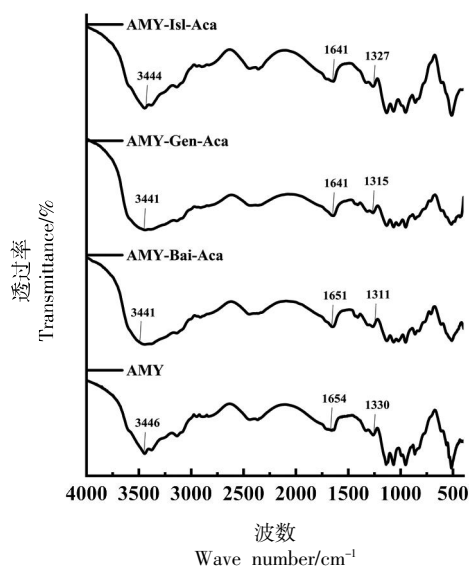


图6 联合抑制剂与AMY相互作用的红外光谱图

Fig.6 Infrared spectroscopy diagrams of the interaction between combined inhibitors and AMY

表3 联合抑制剂与AMY相互作用后的二级结构含量

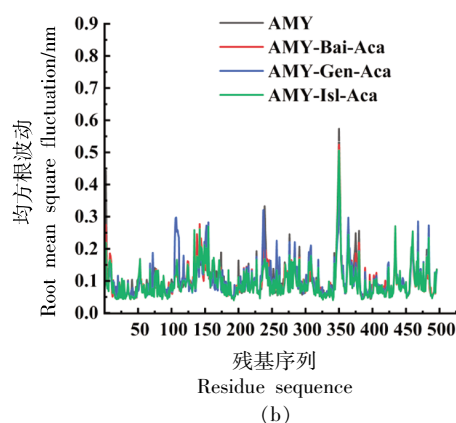
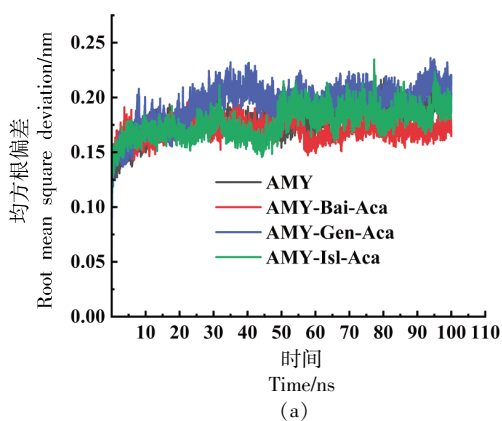
Table 3 The secondary structure content after the interaction between the combined inhibitor and AMY

样品名称	α -螺旋/%	β -折叠/%	β -转角/%	无规则卷曲
AMY	0.00 ^d	73.35 ^a	20.80 ^b	5.85 ^c
AMY-Bai-Aca	5.00 ^c	76.20 ^a	18.80 ^b	0.00 ^d
AMY-Gen-Aca	8.42 ^c	68.30 ^a	23.24 ^b	0.00 ^d
AMY-IsI-Aca	5.26 ^d	61.59 ^a	33.15 ^b	0.00 ^d

注:不同小写字母表示不同组别间的显著性差异($P<0.05$)。

析。图7a展示了100 ns轨迹下AMY和配体复合物的RMSD图。AMY-Bai-Aca复合物的RMSD平均值最低,为0.171 nm;其它配体的RMSD平均值与AMY近似,均在0.22 nm以下的可接受范围内^[6]。图7b展示了100 ns轨迹下AMY和配体复合物

的均方根波动(RMSF)图。曲线整体波动较小,曲线的起伏波动大体趋势一致^[26]。AMY的平均回旋半径(R_g)值为2.338 nm(图7c)。在所研究的复合物中,AMY-联合抑制剂复合物的 R_g 平均值与AMY的 R_g 值相当。这表明化合物结合对AMY的



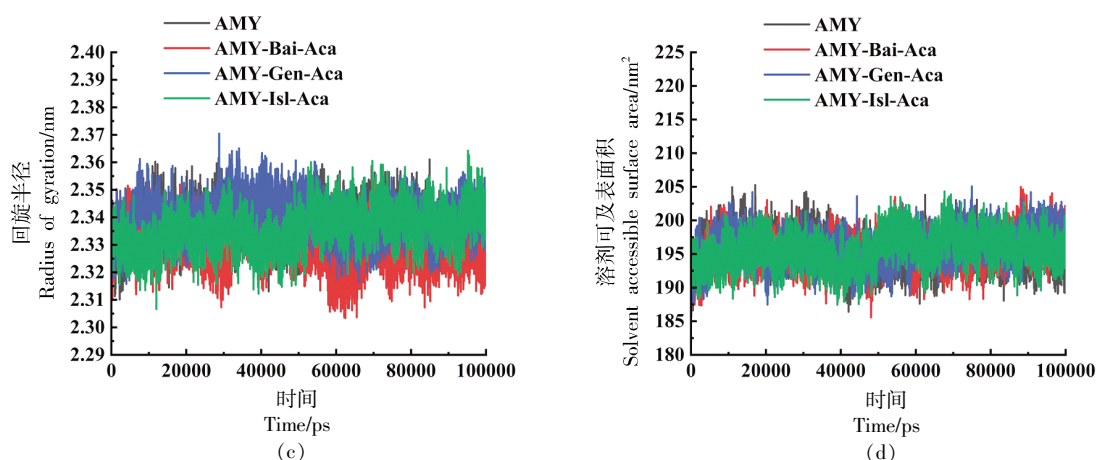


图 7 联合抑制剂与 AMY 相互作用的 MD 模拟图

Fig.7 Molecular dynamics (MD) simulation diagrams of the interaction between combined inhibitors and AMY

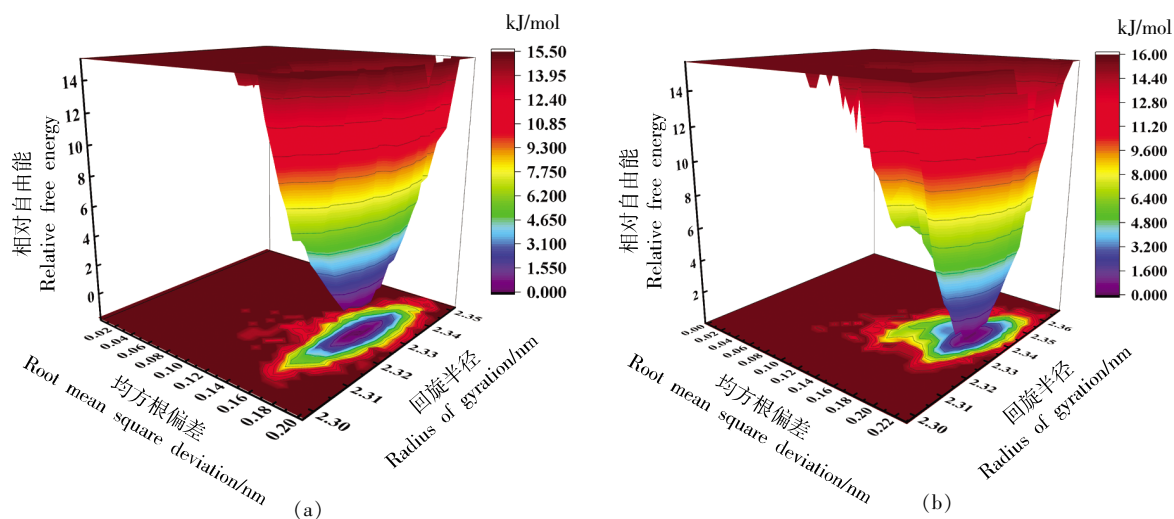
大小和结构变化没有什么影响,它们能完美结合,并具有良好的稳定性^[9,27-29]。AMY 的平均溶剂可及表面积(SASA)值为 195.562 nm²,由图 7d 可知,联合抑制剂复合物显示的 SASA 值与 AMY 的值都有上下波动,表明这些联合抑制剂都能影响 AMY 的表面疏水性。这与 Li 等^[30]分析的结果一致。

通过 RMSD 和 Rg 值计算了吉布斯相对自由能,并绘制了以 RMSD、Rg 和吉布斯相对自由能为轴的自由能形貌图,展示分子动力学模拟中复合结构的最低能量构象。蛋白质与配体相互作用较弱时,自由能景观呈现多个粗糙的最低能量簇;相互作用强且稳定时,则形成单一平滑的能量簇。紫色/蓝色斑点表示最稳定的结构,红色/黄色斑点代表不稳定结构^[26]。本研究中,如图 8 所示,在

AMY 与 Bai-Aca/Isl-Aca 的自由能景观图中,观察到几乎单一而平滑的最低能量簇。表明 AMY 与 Bai-Aca/Isl-Aca 形成的复合物具有良好的稳定性。另一方面,在 AMY-Gen-Aca 复合物的图中,观察到狭窄、粗糙和分散的能量簇,表明 Gen-Aca 与 AMY 形成的复合物稳定性较差。

3 结论

本研究通过多维度试验揭示了 Bai/Gen/Isl 与 Aca 联合抑制 AMY 的协同作用机制。抑制率试验表明,当 Bai/Gen/Isl 与 Aca 的物质的量比为 2:1, 3:1, 4:1 时,对 AMY 的抑制效果显著增强($P < 0.05$),其中 Bai-Aca 和 Isl-Aca 在 3:1 比例下协同指数(CI<1)最低,表现出强协同效应;而 Gen-



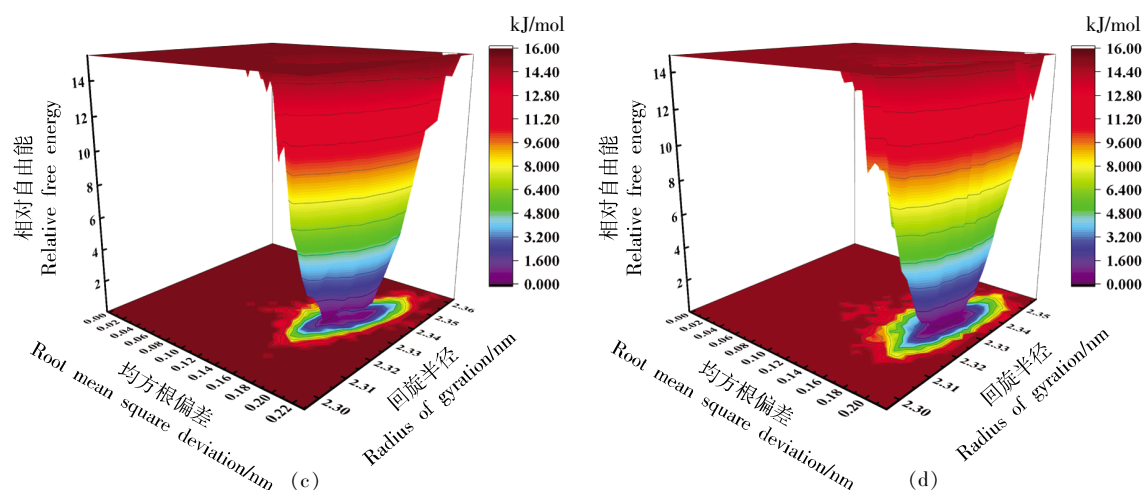


图8 Bai-Aca(a)、Gen-Aca(b)和Isl-Aca(c)与 AMY(d)相互作用的自由能景观图

Fig.8 Free energy landscape diagrams of the interactions between Bai - Aca (a), Gen - Aca (b), Isl - Aca (c) and AMY (d)

Aca 仅在特定条件下($0.3 < Fa < 0.9$)呈现协同作用。荧光光谱分析证实联合抑制剂通过静态猝灭机制与 AMY 结合, Isl-Aca 的结合常数(K_a)最高, 且其亲和力随温度升高显著增强($P < 0.05$), 提示其复合物稳定性最佳。热力学参数进一步表明, Bai-Aca/ Isl-Aca 以疏水作用为主要驱动力, 而 Gen-Aca 则依赖氢键结合。同步荧光及紫外光谱显示, 联合抑制剂通过改变 Trp 和 Tyr 残基的微环境(如疏水性增强或亲水性提升)调控 AMY 活性, 其中 Trp 残基的抑制作用占主导。红外光谱与分子动力学模拟试验表明, Bai-Aca/ Isl-Aca 促使 AMY 二级结构向更稳定的 β -转角转变, 而 Gen-Aca 诱导 α -螺旋形成, 但后者复合物的自由能景观呈现分散能量簇, 稳定性较弱。综上, Bai-Aca/ Isl-Aca 联合抑制体系通过多靶点协同作用显著降低抑制剂用量, 同时维持 AMY 复合物的高稳定性, 为开发基于黄酮类化合物的新型糖尿病治疗策略及功能性食品提供了理论参考。

参 考 文 献

- [1] YU M H, ZHU S, HUANG D J, et al. Inhibition of starch digestion by phenolic acids with a cinnamic acid backbone: Structural requirements for the inhibition of α -amylase and α -glucosidase[J]. Food Chem, 2024, 435: 137499.
- [2] LIU S W, MENG F N, GUO S, et al. Inhibition of α -amylase digestion by a *Lonicera caerulea* berry polyphenol starch complex revealed via multi-spectroscopic and molecular dynamics analyses[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 260: 129573.
- [3] LIU B H, ZHANG B, LI L, et al. Machine learning combined with molecular simulations to screen α -amylase inhibitors as compounds that regulate blood sugar[J]. Process Biochemistry, 2024, 136: 169181.
- [4] HUANG Y Y, SAMANTHA R, CHARLES S B, et al. Mechanistic insights into α -amylase inhibition, binding affinity and structural changes upon interaction with gallic acid[J]. Food Hydrocolloids, 2024, 148: 109467.
- [5] OUSSAMA A, IMANE Y, HASSAN N, et al. Structure-based virtual screening, admet analysis, and molecular dynamics simulation of moroccan natural compounds as candidates α -amylase inhibitors[J]. ChemistrySelect, 2023, 8(26): 2365-6549.
- [6] PRIYANKA S, TUSHAR J, TANUJA J, et al. Molecular dynamics simulation for screening phytochemicals as α -amylase inhibitors from medicinal plants[J]. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2020, 39(17): 6524-6538.
- [7] OUSSAMA A, OSSAMA D, SALAH B, et al. Design of novel benzimidazole derivatives as potential

- alpha-amylase inhibitors using QSAR, pharmacokinetics, molecular docking, and molecular dynamics simulation studies[J]. *J Mol Model*, 2022, 28(4): 106.
- [8] TAYE BEYENE D, SANTOSH B, MADHAV P G, et al. Identification of potential human pancreatic α -amylase inhibitors from natural products by molecular docking, MM/GBSA calculations, MD simulations, and ADMET analysis[J]. *Plos One*, 2023, 18(3): 1932–6203.
- [9] WEI Y S, DENG L, CHEN S L, et al. Isoliquiritigenin retards starch digestion by increasing resistant starch content and inhibiting the activities of α -amylase and α -glucosidase [J]. *Food Bioscience*, 2024, 59: 104227.
- [10] JIANG G L, LI S L, ZHU J Y, et al. Study on β -glucosidase activators by 3D-QSAR, molecular docking and molecular dynamics simulation[J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2024, 404: 124932.
- [11] WU X Q, HU M M, HU X, et al. Inhibitory mechanism of epicatechin gallate on α -amylase and α -glucosidase and its combinational effect with acarbose or epigallocatechin gallate[J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2019, 290: 111202.
- [12] PENG X, LIU K, HU X, et al. Hesperetin-Cu(II) complex as potential α -amylase and α -glucosidase inhibitor; Inhibition mechanism and molecular docking[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2023, 290(31): 1386–1425.
- [13] 张静, 焦洁帆, 云少君. 原花青素和原儿茶酸对淀粉消化酶的联合抑制作用[J]. *食品工业科技*, 2024, 45(20): 105–113.
- ZHANG J, JIAO J F, YUN S J. Combined inhibitory effects of proanthocyanidins and protocatechuic acid on starch digestive enzymes[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2024, 45(20): 105–113.
- [14] LIU H H, ZHENG C, LI Z L, et al. Inhibitory mechanism of phenolic compounds in rapeseed oil on alpha-amylase and alpha-glucosidase: Spectroscopy, molecular docking, and molecular dynamic simulation[J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2023, 289: 122251.
- [15] SUN F W, LI B L, GUO Y N, et al. Effects of ultrasonic pretreatment of soybean protein isolate on the binding efficiency, structural changes, and bioavailability of a protein-luteolin nanodelivery system[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2022, 88: 106075.
- [16] JIANG C, CHEN Y, YE X, et al. Three flavanols delay starch digestion by inhibiting alpha-amylase and binding with starch[J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 172: 503–514.
- [17] LI Y P, ZHANG Y Q, ZHAI Y H, et al. Investigation on the interaction mechanism of trilobatin with pepsin and trypsin by multi-spectroscopic and molecular docking methods[J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2024, 415: 126424.
- [18] OGHENETEGA J A, AKPOVWEHWEE A A, CHIAGOZIEM A. OTUECHERE, et al. α -Amylase inhibition, anti-glycation property and characterization of the binding interaction of citric acid with α -amylase using multiple spectroscopic, kinetics and molecular docking approaches[J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2022, 360: 119454.
- [19] 刘勇, 马文雅, 刘孝芳, 等. ϵ -聚赖氨酸盐酸盐接枝淀粉薄膜的制备及性质研究[J]. *包装工程*, 2024, 45(13): 35–41.
- LIU Y, MA W Y, LIU X F, et al. Preparation and characterization of ϵ -polylysine-HCl grafted starch-based antimicrobial films[J]. *Packaging Engineering*, 2024, 45(13): 35–41.
- [20] 周素珍, 邢莉, 范金波, 等. 分子对接结合荧光光谱法探究3种类胡萝卜素与HSA的相互作用[J]. *中国食品学报*, 2023, 23(2): 61–71.
- ZHOU S Z, XING L, FAN J B, et al. Exploring the interaction between three carotenes and HSA by molecular docking and fluorescence spectroscopy[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2023, 23(2): 61–71.
- [21] ZHANG Y X, BAN C Y, SU D Y, et al. Xanthine oxidase inhibitors: Virtual screening and mechanism of inhibition studies [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 281(3): 136281.
- [22] 张炎, 康柱, 苏冬雨, 等. 3种黄酮类化合物对胰脂肪酶的抑制作用及其结合机制[J]. *中国食品学报*, 2024, 24(7): 60–69.
- ZHANG Y, KANG Z, SU D Y, et al. Inhibitory effects of three flavonoids on pancreatic lipase and their binding mechanism[J]. *Journal of Chinese Insti-*

- tute of Food Science and Technology, 2024, 24 (7): 60–69.
- [23] TONG W H, LI Y Y, HUANG Z J, et al. Mechanism of molecular interaction between pyrazine flavor substances and lysozyme: Based on spectroscopy and molecular docking studies [J]. Journal of Molecular Liquids, 2023, 389(21): 0167–7322.
- [24] OGHENETEGA J A, TEMIDATO T O, FEANCIS O A, et al. Exploring the binding interactions of structurally diverse dichalcogenoimidodiphosphate ligands with alpha-amylase: Spectroscopic approach coupled with molecular docking[J]. Biochem Biophys Rep, 2020, 24: 100837.
- [25] 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.
- [26] FENG X R, WANG R, LU J N, et al. Taste properties and mechanism of umami peptides from fermented goose bones based on molecular docking and molecular dynamics simulation using umami receptor T1R1/T1R3[J]. Food Chemistry, 2024, 443: 138570.
- [27] LI Y F, CHEN L, SUN Y, et al. Exploring the effect of surfactants on the interaction between lactase and bisphenol A by molecular docking, molecular dynamics, and energy calculations[J]. Journal of Molecular Liquids, 2023, 382: 121928.
- [28] AMENEH J M Y, SOODEH M, MOHSEN N, et al. Rational approaches to discover SARS-CoV-2/ACE2 interaction inhibitors: Pharmacophore-based virtual screening, molecular docking, molecular dynamics and binding free energy studies[J]. Journal of Molecular Liquids, 2023, 375: 121345.
- [29] ALI SABER A, AHMED H B, AMER M A, et al. Unraveling the enigma: Probing the unconventional binding site and binding mechanism of entrectinib with human serum albumin through spectroscopic, molecular docking, and dynamic simulation analyses [J]. Journal of Molecular Liquids, 2024, 409: 125447.
- [30] LI J, NI Y, LI J W, et al. Unveiling the synergistic inhibition mechanism of polyphenols in *Flos Sophorae immaturus* tea on xanthine oxidase by multi-spectroscopy, molecular docking and dynamic simulation methods[J]. Journal of Molecular Liquids, 2024, 398(15): 124–245.

Mechanism of Three Flavonoids Combined with Acarbose in Inhibiting α -Amylase Activity

WANG Kunshan, ZHAI Yingao, YU Zenghui, ZHANG Xuan, ZHOU Suzhen, FAN Jinbo*
(College of Food Science and Technology, Bohai University, Jinzhou 121013, Liaoning)

Abstract Objective: To investigate the mechanism of synergistic inhibition of α -amylase (AMY) by three flavonoids [baicalein (Bai), genistein (Gen), isoliquiritigenin (Isl)] combined with acarbose (Aca). Through methods such as inhibition rate experiments, combination index (CI) analysis, fluorescence spectroscopy, ultraviolet spectroscopy, infrared spectroscopy, and molecular dynamics simulation, the inhibitory effects and action mechanisms of the combined inhibition on AMY were systematically studied. The results show that the inhibitory effects of Bai/Gen/Isl combined with Aca on AMY were significantly enhanced at molar ratios of 2:1, 3:1, and 4:1. Among them, Bai-Aca and Isl-Aca exhibited a strong synergistic effect at a molar ratio of 3:1 ($CI < 1$), while Gen-Aca showed synergism only at a molar ratio of 3:1 and under the specific condition of $0.3 < Fa < 0.9$ (fraction affected). Fluorescence spectroscopy analysis showed that the combined inhibitors bind to AMY via a static quenching mechanism. Among them, Isl-Aca exhibits the highest binding constant (K_a) with AMY [$K = (4.826 \pm 0.206) \times 10^5$ L/mol at 298 K; $K_a = (35.172 \pm 0.255) \times 10^5$ L/mol at 300 K], and its affinity is significantly enhanced with increasing temperature ($P < 0.05$), indicating that the complex formed by Isl-Aca and AMY has the optimal stability. Thermodynamic parameters indicated that hydrophobic interactions were the main driving force for Bai-Aca and Isl-Aca, while Gen-Aca relied on hydrogen-bond binding. Synchronous fluorescence and ultraviolet spectroscopy showed that the combined inhibitors regulated the activity of AMY by changing the microenvironment of tryptophan (Trp) and tyrosine (Tyr) residues, with the inhibitory effect of Trp residues being dominant. Infrared

spectroscopy and molecular dynamics simulation further revealed that Bai-Aca and Isl-Aca promoted the transformation of the secondary structure of AMY into a more stable β -turn, while Gen-Aca induced the formation of α -helix. However, the free-energy landscape of the latter complex presented a dispersed energy cluster, indicating weaker stability. In conclusion, the Bai-Aca and Isl-Aca combined inhibition systems significantly reduce the dosage of inhibitors through multi-target synergistic effects, while maintaining the high stability of the AMY complex. This provides a theoretical basis for the development of novel diabetes treatment strategies and functional foods based on flavonoids.

Keywords combined inhibition; baicalein; genistein; isoliquiritigenin; acarbose; molecular dynamics