

多光谱法探究金雀异黄酮、柚皮素对胰脂肪酶的抑制机制

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 探究小分子对胰脂肪酶(PL)的抑制作用,已成为体外筛选具有抗肥胖作用活性成分的重要方法。通过荧光光谱法、非辐射能量转移理论及高效液相色谱法研究金雀异黄酮(Gen)和柚皮素(Nar)与 PL 的结合反应机制,利用三维荧光、表面疏水性、X 射线衍射、红外光谱、粒径、差示扫描量热法、扫描电镜对复合物进行结构表征,阐明它们对 PL 结构与性质的影响。结果显示,Gen、Nar 对 PL 猝灭均为静态猝灭,结合常数分别为 42.39 L/mg 和 22.57 L/mg,两者的加入使 PL 的 α -螺旋含量降低, β -转角、 β -折叠以及无规则卷曲含量增加,结晶度从 25.60%分别上升到 32.77%,38.00%,表面疏水性降低,热稳定性降低(变性温度从 76.04 °C 降低至 65.00 °C 和 65.05 °C),且 PL 由平滑的片状结构转变为棒状颗粒物。上述结果表明 Gen 和 Nar 显著影响 PL 的结构和性质,为开发新型 PL 抑制剂提供了新思路。

关键词 多光谱法; 金雀异黄酮; 柚皮素; 胰脂肪酶; 抑制机制

文章编号 1009-7848(2026)01-0109-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2026.01.010

肥胖已成为 21 世纪对公共健康最严重的威胁之一,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],寻找有效防治肥胖的方法十分必要。

胰脂肪酶(Pancreatic lipase, PL)在脂质代谢中是消化甘油三酯的关键酶,抑制 PL 活性可预防肥胖^[3-4]。奥利司他是特异性 PL 抑制剂,然而长期使用副作用强^[5-6]。多酚类化合物因结构多样性、低毒性、来源丰富而成为 PL 抑制剂的研究方向。如姜黄素及其衍生物对 PL 具有显著的抑制作用,且抑制机制为可逆性抑制^[7]。植物中提取的其它多酚类化合物,如黄烷醇类和花青素类,也显示出良好的 PL 抑制活性^[8]。金雀异黄酮(Genistein, Gen)、柚皮素(Naringenin, Nar)是普遍存在于果蔬、谷物中的黄酮类化合物,有多种健康益处^[9-10]。此外,有研究表明 Gen、Nar 可抑制 PL 活性^[11-12],从而减少脂肪的吸收,具有潜在的抗肥胖效果。分子对接显示, Nar 能与 PL 的关键氨基酸残基(Glu102、Ser129 等)稳定结合,抑制酶活性,体外试验也证实其抑制类型为非竞争性抑制^[13]。Gen 经荧光测定、酶动力学分析表现出竞争性抑制,分子对接模

拟证实了其 PL 的结合特性^[14],而具体抑制机制仍待查明。

近年来,研究发现多酚能抑制 PL 活性,主要是由于酚类化合物羟基与酶催化位点相互作用,可以在很大程度上影响其与酶结合的亲和力。本文采用荧光光谱法、非辐射能量转移及高效液相色谱法研究抑制剂(Gen、Nar)与 PL 的结合机制,并用三维荧光、表面疏水性、X 射线衍射、红外光谱、粒径、差示扫描量热法、扫描电镜,来阐明其结合方式对酶构象的影响。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

PL (猪胰腺, 15~35 units/mg), 4-硝基苯丁酸酯(4-Nitrophenyl butyrate p-NPB, 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(均为分析纯级), 天津市风船化学试剂科技有限公司; 8-苯氨基-1-萘磺酸(8-Anilino-1-naphthalenesulfonic acid, ANS), 上海麦克林生化科技股份有限公司; 甲酸(色谱级), 阿拉丁生化科技股份有限公司; 甲醇(色谱级), 赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.2 仪器与设备

PHS-25 pH 计, 上海仪电分析仪器有限公司

收稿日期: 2025-02-07

基金项目: 国家重点研发计划项目(2023YFF1103502)

第一作者: 翟迎奥, 女, 硕士生

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

司; Evolution 201 紫外-可见分光光度计, 美国 Thermo; F-7000 荧光分光光度计、S-480 扫描电镜, 日本日立高新技术公司; IR-Tracer-10 傅里叶变换红外光谱仪, 岛津企业管理(中国)有限公司; X 射线粉末衍射仪, 日本理学公司; 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; 1260 Infinity III 液相色谱仪, 安捷伦科技有限公司; FD-1A-50 型真空冷冻干燥机, 北京博医康实验仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 荧光光谱 参照 Zhou 等^[15]的方法并稍作修改, 将 0~70 $\mu\text{mol/L}$ 的 Nar/Gen 与 PL 溶液混合。在 298 K 和 310 K 下避光反应 30 min, 将激发波长设定为 280 nm, 发射波长设定为 290~450 nm, 测定混合物的荧光光谱。

1.3.2 非辐射能量转移 PL 发射光谱和抑制剂吸收光谱充分重叠, 可能发生非辐射能量转移。能量转移效率和结合距离可根据 Förster 理论方程(1~3)^[16]求得:

$$E = \frac{F_0 - F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (1)$$

$$R_0^6 = 8.79 \times 10^{-25} \kappa^2 N^{-4} \varphi J \quad (2)$$

$$J = \frac{\sum F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda}{\sum F(\lambda) \Delta\lambda} \quad (3)$$

式中: E 为能量转移效率; F 和 F_0 分别为有无配体时的荧光强度, a.u.; κ^2 为酶-配体随机分布的取向因子, 2/3; R_0 为 $E=50\%$ 时的临界距离, \AA ; φ 为 PL 的荧光量子产率, 0.118; N 为介质的折射率, 1.336; J 为光谱重叠积分, $\text{nm}^4 \cdot \text{L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$; $\varepsilon(\lambda)$ 为配体在波长 λ 处的摩尔吸收系数, $\text{L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$; $F(\lambda)$ 为 PL 在波长 λ 处的荧光强度, a.u.。

1.3.3 高效液相色谱法 (HPLC) 称取 Gen/Nar 对照品并用甲醇溶解, 制备成质量浓度为 50, 100, 150, 200, 250, 300 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液, 于 4 $^\circ\text{C}$ 冷藏备用。透析袋用超纯水浸泡后, 加入 0.5 mg/mL PL 溶液 1 mL, 两端扎紧, 置于含 10 mL Gen/Nar 透液的离心管中。调整透析袋的高度, 使袋内、外液面平齐, 防止贴壁。Gen/Nar 在透析袋

内、外达到动态平衡。Gen/Nar 与蛋白的结合常数 K 由方程(4)求得。

$$1/A = 1/A_{\text{max}} + 1/(A_{\text{max}} \times K \times C) \quad (4)$$

式中: A 为结合量, $\mu\text{g}/\text{mg}$; A_{max} 为最大结合量, $\mu\text{g}/\text{mg}$; C 为配体质量浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

色谱条件: C18 反相色谱柱; 流动相 A: 0.2% 甲酸水; B: 甲醇; 洗脱条件: 0~2 min, 10% B; 10%~25% B 线性梯度 2~4.5 min; 25% B, 4.5~7 min; 25%~90% B 线性梯度 7~22 min; 22~24 min, 90% B; 24~25 min 恢复到 10% B; 平衡 25~30 min。柱温 30 $^\circ\text{C}$; 进样量 10 μL 。

1.3.4 三维荧光光谱 参照 Chapleur 等^[17]的方法并修改, 固定 PL 浓度, 加入 Gen/Nar, 设定发射波长范围为 200~500 nm, 间隔为 1 nm, 激发波长 200~450 nm, 间隔为 5 nm, 扫描速度为 1 200 nm/min , 测量 PL 及加入配体后 PL 的三维荧光。

1.3.5 表面疏水性测定 用 ANS 荧光探针研究 Gen/Nar 对 PL 表面疏水性的影响^[18]。样品浓度 0~50 $\mu\text{mol/L}$, 向 4 mL 的 PL 和 Gen/Nar 的复合物中加入 20 μL 8 mmol/L 的 ANS 溶液, 混匀后避光反应 15 min。设定激发波长 380 nm, 扫描速率 1 200 nm/min , 测量 ANS 的荧光强度。表面疏水性指数 (S_0) 是荧光强度对蛋白质浓度作线性回归所得直线的斜率。

1.3.6 傅里叶红外光谱测定 参考康柱等^[19]的方法, 将 Gen/Nar 和 PL 混匀, 在 37 $^\circ\text{C}$ 下反应 10 min, 冷冻干燥后储存。样品与 KBr 混匀压片, 以 4 cm^{-1} 的分辨率扫描 400~4 000 cm^{-1} 的红外光谱, 扫描 32 次。截取波数为 1 700~1 600 cm^{-1} 的红外光谱, 用 Peakfit 4.12 软件拟合分析。

1.3.7 差示扫描量热法 (DSC) 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。在 5 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 的扫描速度下, 用空坩埚作参照, 扫描温度为 25~100 $^\circ\text{C}$ ^[20], 获得 DSC 图及热力学参数。

1.3.8 X 射线衍射图谱 (XRD) 参照宋亚楠等^[21]的方法, 将冷冻干燥样品在 25 $^\circ\text{C}$ 下平衡 24 h, 用 XRD 测定结晶特性。将电压、电流值分别调至 45 kV 和 200 mA, 用 Cu $K\alpha$ 辐射 ($\lambda = 0.154 \text{ nm}$) 进行晶体分析。检测角度范围 5 $^\circ$ ~50 $^\circ$ (2θ), 速度 5 $^\circ$ /

min。相对结晶度按式(5)计算:

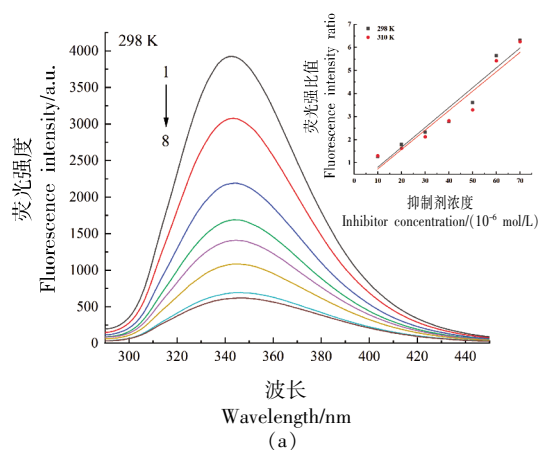
$$\text{相对结晶度}(\%) = (A_c - A_a) / A_c \times 100 \quad (5)$$

式中: A_c 是总面积; A_a 是非晶峰面积。

1.3.9 粒径测定 将 0~40 $\mu\text{mol/L}$ 的 Gen/Nar 与 PL 混合,室温下避光反应 15 min,采用激光粒度测定仪,分析溶液的粒径大小,温度设置为 25 $^{\circ}\text{C}$,恒温 300 s 进行测量。

1.3.10 扫描电子显微镜(SEM)观察 取冷冻干燥后样品,固定在 SEM 载物台上,用洗耳球吹掉多余样品,喷金后置于 SEM 载物腔内,在加速电压下扫描,观察样品表观结构^[22]。

1.3.11 统计分析 每个试验重复 3 次,数据表示为“ $\bar{x} \pm s$ ”,用 IBM SPSS Statistics 26 进行差异显著性分析,差异水平 $P < 0.05$ 。用 Origin 2021 和 PeakFit 4.12 进行数据分析和绘图处理。

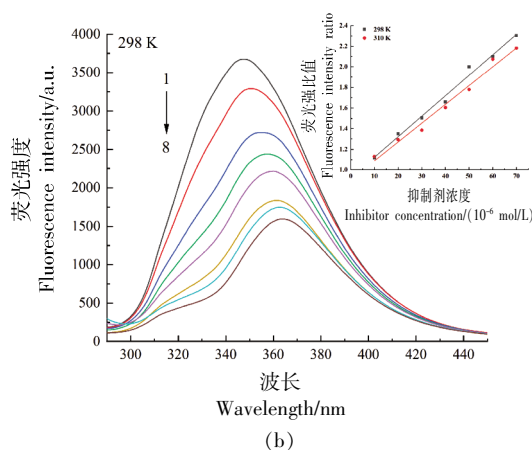


2 结果与分析

2.1 荧光光谱

酪氨酸(Tyr)、色氨酸(Trp)和苯丙氨酸(Phe)是蛋白质固有的荧光基团^[23]。通过检测内源荧光来获取 PL 微环境变化的信息,并揭示配体与蛋白的相互作用^[24]。

图 1 为 Gen/Nar 对 PL 的荧光猝灭结果,PL 荧光发射峰在 345 nm 附近,随着 Gen/Nar 浓度增加,PL 的荧光强度下降,峰型不变,峰位置移动,说明 Gen/Nar 与 PL 发生了结合反应,形成了复合物,导致 PL 的构象发生改变,降低了 PL 的活性,影响其荧光团的微环境^[25]。在 298 K,当抑制剂的浓度均为 7×10^{-5} mol/L 时,Gen、Nar 的荧光猝灭率分别为 84.17%、56.59%,其大小为 Gen>Nar。插图显示 Stern-Volmer 曲线线性较好,且斜率随着温度的升高而降低,表明它们对 PL 的荧光猝灭为静态猝灭。



注:1~8 分别为 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 $\mu\text{mol/L}$ 的 Nar/Gen 与 PL 溶液混合的体系。

图 1 Gen(a)、Nar(b)与 PL 结合的荧光发射光谱

Fig.1 Fluorescence emission spectra of Gen (a), and Nar (b) combined with PL

2.2 非辐射能量转移分析

图 2 为 Gen/Nar 与 PL 的光谱重叠曲线,根据式(1)~式(3)计算的 E 、 J 、 R_0 、 r 值见表 1,Gen、Nar 与 PL 的重叠光谱积分 J 值分别为 2.65×10^{-14} $\text{cm}^3 \cdot \text{L/mol}$ 和 2.93×10^{-14} $\text{cm}^3 \cdot \text{L/mol}$,结合距离 r 分别为 4.95 nm 和 5.22 nm,均未超出临界值(8 nm)^[26],均在 $0.5R_0 < r < 1.5R_0$ 范围内,结果表明,Gen/Nar 与 PL 在结合过程中存在非辐射能量转移,且 $r > R_0$ 进一步表明 Gen/Nar 主要通过静态猝灭来降低 PL 的荧光^[27]。

2.3 HPLC 分析

高效液相色谱可得到蛋白质与配体结合过程中的动力学参数、结合常数以及构象变化等信息,可用来研究它们的相互作用机制。以 Gen/Nar 质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标进行回归分析,结果见图 3,Gen 线性方程: $y = 26.703x - 173.853$, $r = 0.9977$;Nar 线性方程: $y = 8.998x - 8.666$, $r = 0.9993$ 。两者在 50~300 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度内线性关系良好。

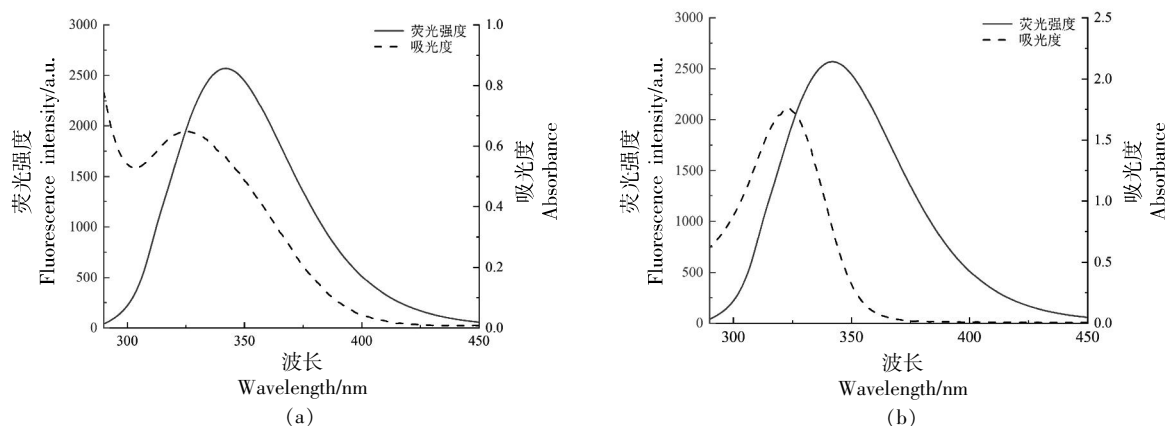


图2 PL的荧光光谱与Gen(a)、Nar(b)的UV-vis吸收光谱的重叠曲线

Fig.2 The overlap curve of the fluorescence spectrum of PL and the UV-vis absorption spectrum of Gen (a), Nar (b)

表1 Gen/Nar与PL的重叠积分(J)、临界距离(R_0)、组合距离(r)以及能量转移效率(E)

Table 1 Overlap integral (J), critical distance (R_0), combining distance (r) and energy transfer efficiency (E) of Gen/Nar interacting with PL

配体	E	$J/(\text{cm}^3 \cdot \text{L}/\text{mol})$	R_0/nm	R/nm
Gen	0.25	2.65×10^{-14}	4.12	4.95
Nar	0.21	2.93×10^{-14}	4.19	5.22

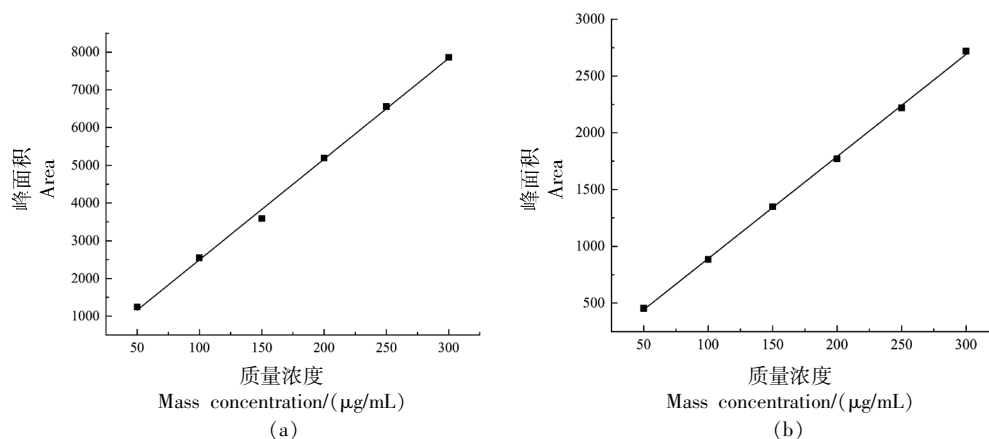


图3 Gen(a)和Nar(b)的线性关系曲线

Fig.3 The linear relationship curve between Gen (a) and Nar (b)

Gen、Nar与PL结合的双倒数曲线见图4,结合常数见表2。结合常数随着温度升高而降低,表明高温不利于Gen/Nar与PL结合,可能是高温下分子热运动加剧,破坏了稳定的相互作用,使得两者结合的紧密度降低,从而导致结合常数减小。

25 $^{\circ}\text{C}$ 时,Gen、Nar与PL的结合常数 K_a 分别为42.394 L/mg和22.574 L/mg,且 K_a 的顺序为Gen>Nar,与荧光光谱结果一致,进一步验证了Gen与PL结合能力更强。

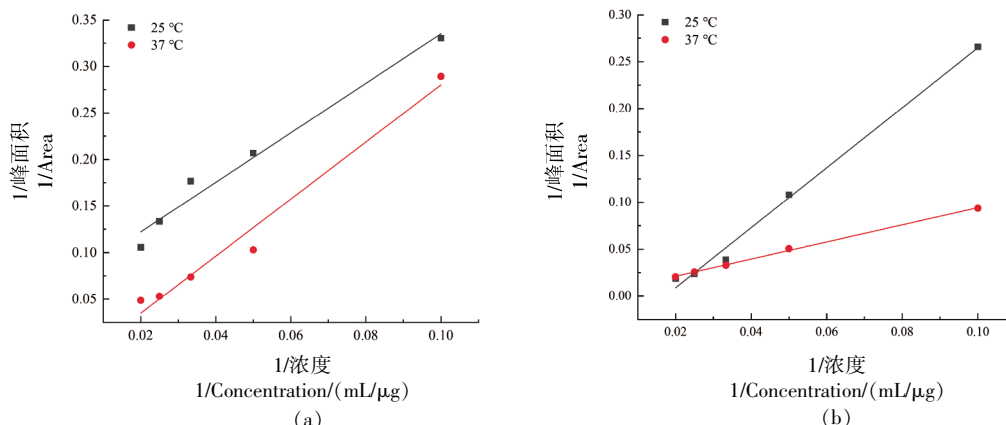


图 4 不同温度下,Gen(a)、Nar(b)与 PL 作用的双倒数曲线

Fig.4 Double reciprocal curves for the interaction of Gen (a), Nar(b) with PL at different temperatures

表 2 Gen、Nar 与 PL 作用的结合常数

Table 2 Binding constants for the interaction of Gen,

Nar with PL

配体	温度/°C	相关系数	结合常数/(L/mg)
Gen	25	0.9619	42.394
	37	0.9983	18.234
Nar	25	0.9776	22.574
	37	0.9996	1.566

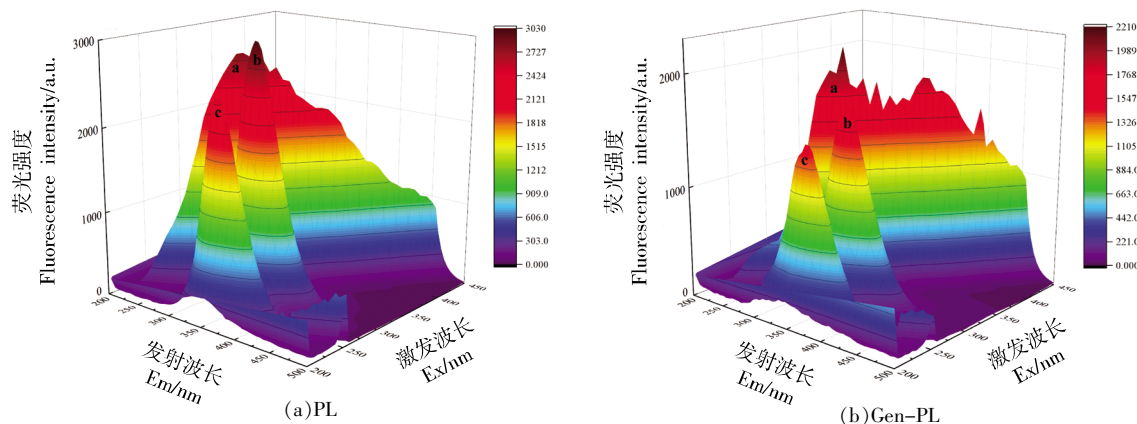
2.4 三维荧光光谱

三维荧光光谱测量灵敏度高,能同时显示峰强度和位置的变化,用于研究蛋白质与配体相互作用后结构微环境和构象变化^[28]。由图 5 所示,加入 Gen/Nar 后,PL 的峰 a、b、c 荧光强度均降低。其中 Gen、Nar 峰 b 的荧光强度分别从 3 026 降低到 1 732,2 276(下降约 42.76%,24.78%),表明 PL 与

Gen/Nar 结合后生成稳定复合物,使得 Trp 残基的荧光强度减弱,与发射荧光光谱结果一致。各峰轻微红移,表明抑制剂使 Trp 残基微环境的极性变强。峰 c 荧光强度分别从 2 494 降低到 1 512,2 233(下降约 39.37%,10.47%),表明 Gen、Nar 的加入会导致 PL 多肽骨链的稳定性发生改变。峰 a 强度的降低可能是由于蛋白质直径的减小,其表现为降低的瑞利散射效应^[29]。

2.5 表面疏水性分析

蛋白质表面疏水性是其重要特性之一,它是蛋白质折叠的主要驱动力,影响其结构和功能。外源 ANS 荧光探针可反映蛋白质表面疏水位点的暴露和构象变化,是预测和评价蛋白质表面特性的表征方法^[30]。如图 6 所示,在添加 Gen、Nar 后,复合物表面疏水性降低且呈浓度依赖性,当抑制剂浓度为 50 μmol/L 时,复合物表面疏水性分别下



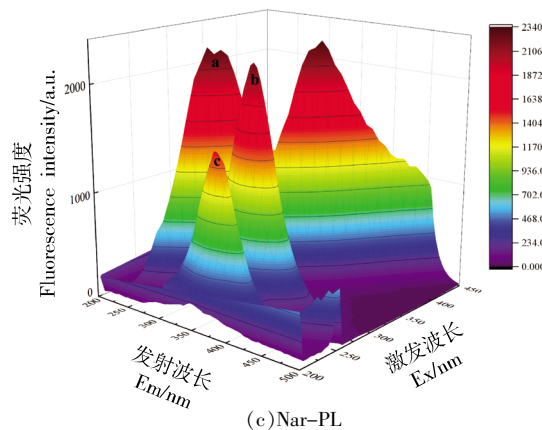


图5 PL与两种复合物的三维荧光图

Fig.5 Three-dimensional fluorescence spectra of PL and its two complexes

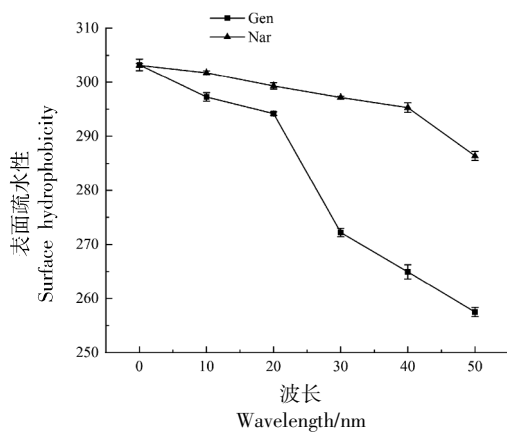


图6 Gen和Nar对PL疏水性的影响

Fig.6 The influence of Gen, and Nar on the hydrophobicity of PL

降了14.88%和5.53%。这可能是因为Gen/Nar填充了PL的疏水区域,使疏水部分被包裹在复合物内部,减少了与外界环境的接触,使得复合物的表面疏水性降低^[31]。

2.6 FTIR 光谱分析

傅里叶红外光谱通过测定蛋白质中特定氢键判断其二级结构是否改变^[32]。图7中复合物与PL红外谱图相似,未出现新官能团信号,表明Gen/Nar加入未改变PL官能团种类,而峰位置、峰形和峰强度发生变化,表明Gen/Nar影响PL的二级结构。与酰胺II带(1500~1600 cm⁻¹)相比,酰胺I带(1600~1700 cm⁻¹)对配体与蛋白结合诱导的构象变化敏感^[33],能有效监测蛋白质二级结构。PL中的酰胺I、酰胺II和酰胺A带分别位于1662.64,

1539.19,3280.91 cm⁻¹。加入Gen/Nar后,酰胺I带分别移动到1660.71 cm⁻¹(PL-Gen)和1654.92 cm⁻¹(PL-Nar),酰胺II带均移动到1541.12 cm⁻¹,酰胺A带分别移动到3275.13 cm⁻¹(PL-Gen)和3377.35 cm⁻¹(PL-Nar),这些变化表明PL与抑制剂结合后,酰胺I带的C=O键和酰胺II带的N-H和C-N键发生变化,氢键在PL酰胺基团和化合物羟基之间的相互作用中具有重要影响,推测PL的二级结构发生变化。

高斯拟合结果见图7,不同波段的峰表示不同的二级结构^[34]。Gen、Nar与PL结合后, α -螺旋明显下降,分别从20.54%下降到2.65%和2.41%,而 β -转角从17.28%上升到23.85%和78.28%,无规则卷曲从0上升到5.08%和3.26%, β -折叠从62.18%上升到68.42%和78.28%。其中, α -螺旋位于PL活性部位,对稳定和维持酶活性起重要作用,其含量降低导致PL活性降低,表明Gen/Nar可能影响PL折叠并诱导其二级结构重排。

2.7 XRD 分析

通过X射线衍射研究样品的结晶度,高结晶度聚合物XRD峰更尖锐、强烈,弱且宽峰表明存在无定形区域^[35]。图8为PL及复合物的XRD图,Gen、Nar粉末的XRD谱图尖峰多,表明它们以结晶态存在,结晶性高。同时发现PL在2 θ 为31.66°,32.96°,36.66°等位置有特征结晶峰,其结晶度为25.60%,PL-Gen、PL-Nar的结晶度分别为32.77%,38.00%。PL与Gen/Nar形成复合物后,Gen/Nar的特征峰消失,复合物相对结晶度增加,

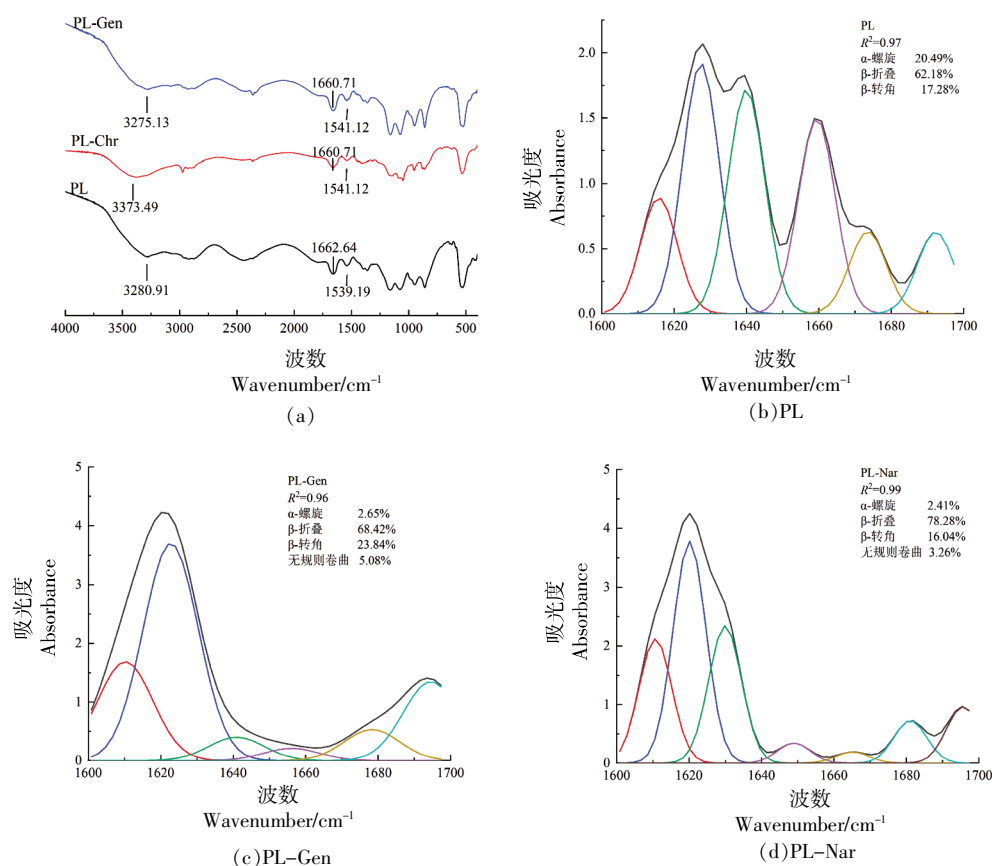


图 7 PL 和 2 种复合物的 FTIR 图(a)和 PL 及复合物的 FTIR 光谱中酰胺 I 带拟合图(b~d)

Fig.7 FTIR spectra of PL and two composites (a) and the fitting diagram of amide I band in FTIR spectra of PL and composites (b~d)

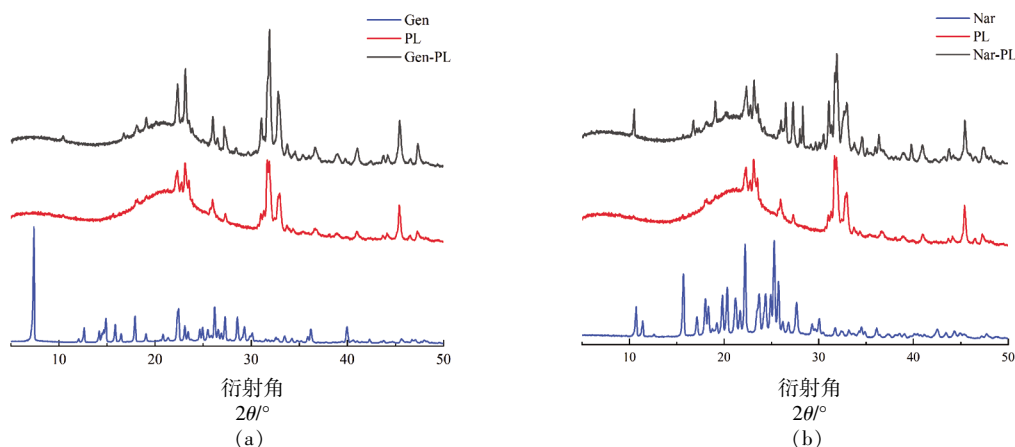


图 8 PL 与 Gen(a)、Nar(b)相互作用的 XRD 图

Fig.8 XRD patterns of the interaction between PL and Gen (a), Nar (b)

可能是氢键使蛋白分子结构更刚性、稳定,结晶时更易形成有序晶体结构。

2.8 相互作用对胰脂肪酶热稳定性的影响

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^[36]。

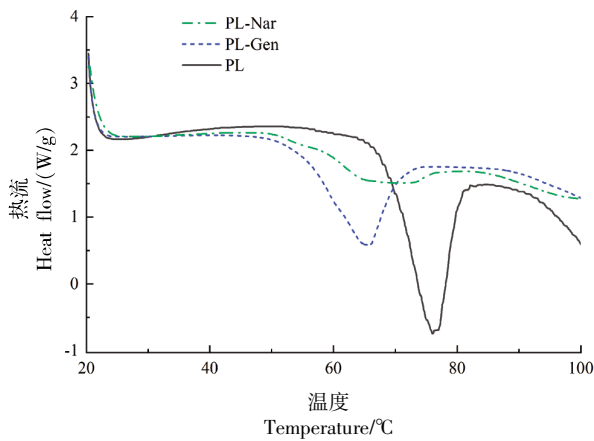


图9 PL和2种复合物的DSC图

Fig.9 DSC diagrams of the 2 kinds of compounds and PL

PL的 T_m 值代表其构象的稳定性,加热会改变其天然构型。由图9和表3可知,PL的 T_m 为76.04℃,ΔH为21.12 J/g。加入Gen、Nar后,PL的 T_m 分别降至65.00℃和65.05℃,表明Gen/Nar使PL结构被破坏,热稳定性降低,酶活性降低。ΔH分别降至15.63 J/g和5.93 J/g,说明结合后使酶变性,所需热量减少。推测Gen/Nar使PL结构剧烈重排或遭到破坏,热稳定性降低,与红外光谱的结果一致。

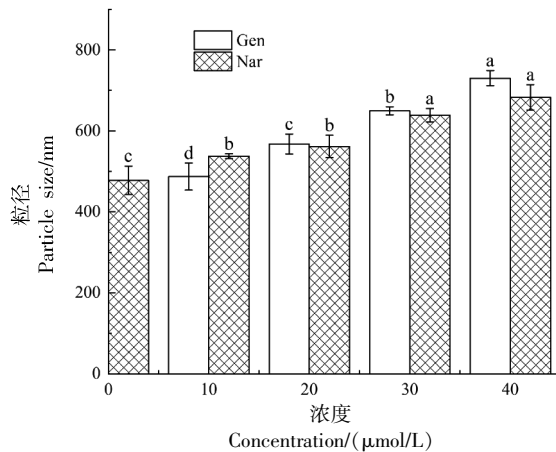
2.9 粒径分析

蛋白质与配体结合可能使蛋白质粒径发生变化,检测平均粒径能间接反映相互作用及聚集程度,反映蛋白质空间构象变化^[37]。如图10所示,添加Gen/Nar后,复合物的平均粒径显著增加且呈浓度依赖性,表明PL与Gen/Nar形成共价复合物,共价键的形成导致PL分子聚集形成更大聚集体,PL的疏水区域包裹在复合物内部,表面疏水性降低。由此可知,Gen/Nar使PL结构变化,且复

表3 PL和2种复合物的热变性温度和焓值

Table 3 Thermal denaturation temperature and enthalpy of the 2 kinds of compounds and PL

样品	$T_m/^\circ\text{C}$	$\Delta H/(\text{J/g})$
PL	76.04	21.12
PL-Gen	65.00	15.63
PL-Nar	65.05	5.93



注:不同小写字母表示不同组别间具有显著性差异($P<0.05$)。

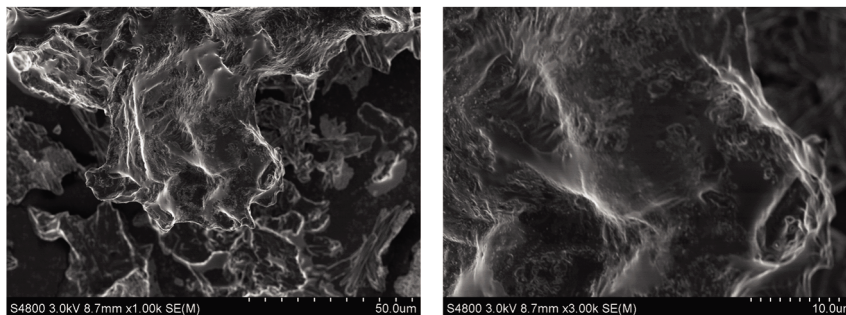
图10 PL与Gen和Nar相互作用的粒径图

Fig.10 The particle size diagram of the interaction between PL and Gen, Nar

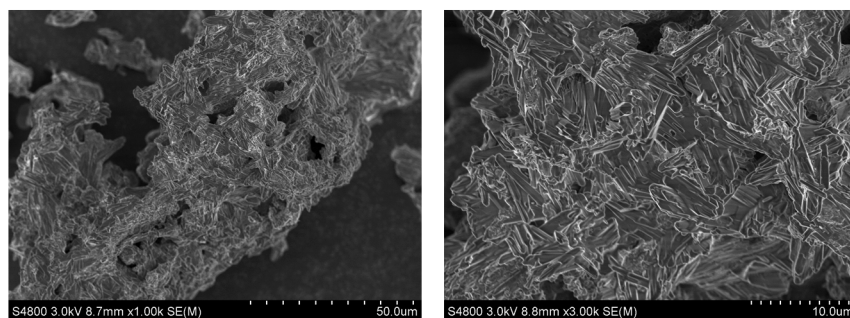
合物的表面疏水性降低,与表面疏水性的测定结果一致。

2.10 SEM 结果分析

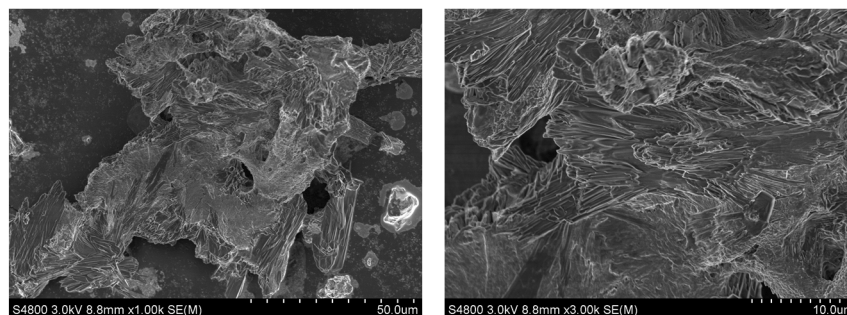
扫描电子显微镜用来观察复合物的微观结构,可直观观察蛋白质与配体结合前、后的形态和表面结构的改变^[38]。图11以1.00k倍和3.00k倍放大观察PL及复合物,PL呈片状结构,表面相对光滑,与Gen/Nar形成复合物后,由平滑的片状结



(a)PL扫描电镜图



(b)PL-Gen 扫描电镜图



(c)PL-Nar 扫描电镜图

注:左侧图放大倍数为 1.00k 倍,右侧图放大倍数为 3.00k 倍。

图 11 Gen、Nar 与 PL 相互作用后的扫描电镜图

Fig.11 SEM images of Gen, Nar interacting with PL

构转变为棒状颗粒物,表明 Gen/Nar 与 PL 的相互作用导致 PL 构象改变,影响了形态特征^[39]。这一结果与傅里叶红外光谱 (FTIR)、差示扫描量热 (DSC)和 X 射线衍射(XRD)的分析结果相互印证。

3 结论

本文探讨了 Gen 和 Nar 对 PL 的作用机制,并对复合物进行结构表征,它们通过静态猝灭机制与 PL 形成复合物,改变了 PL 的二级结构、结晶度、表面疏水性、热稳定性和形态特征。本研究为 Gen 和 Nar 对 PL 的抑制机制的研究提供了新思路,并表明富含 Gen/Nar 的食物可能在肥胖的干预中具有很大潜力。

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
- [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 X Q, ZOU H D, LIU Y, et al. Discovery of curcuminoids as pancreatic lipase inhibitors from medicine -and -food homology plants [J]. *Nutrients*, 2024, 16(15): 2566.
- [8] HE X, CHEN L Y, PU Y J, 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] 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 J J, RUAN Z. The alleviate effects of naringenin on high-fat and high-fructose diet fed non-alcoholic fatty liver disease mice[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2023, 23(9): 60-66.
- [10] KOSSAKOWSKI K, ŻWAWIAK J, CHERNIENKO A, et al. Molecular insights into genistein-NSAID hybrids-synthesis, characterisation and DFT study[J]. *Structural Chemistry*, 2024, 36(1): 55-72.
- [11] CHOI Y, SHIM J, KIM M. Genistin: A novel potent anti-adipogenic and anti-lipogenic agent [J]. *Molecules*, 2020, 25(9): 2042.
- [12] 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 S X. Inhibitory effect of naringin and naringenin on pancreatic lipase and its anti-obesity effect in rats[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2022.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 任顺成, 万毅, 李林政, 等. 槲皮素对淀粉消化酶的抑制动力学及相互作用研究[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(9): 38-47.
- REN S C, WAN Y, LI L Z, et al. Studies on the inhibition kinetics and interaction mechanism of garдения yellow on starch digestive enzyme[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(9): 38-47.
- [17] CHAPLEUR O, GUENNE A, RUTLEDGE D N, et al. Monitoring of cellulose-rich biowaste co-digestion with 3D fluorescence spectroscopy and mass spectrometry-based metabolomics[J]. *Chemosphere*, 2023, 349: 140824.
- [18] ZHANG X F, SUN X M, GAO F, et al. Systematical characterization of physiochemical and rheological properties of thermal - induced polymerized whey protein[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2018, 99(2): 923-932.
- [19] 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 Z, YAN H, ZHOU S Z, et al. Binding behavior between chitosan and casein by multi-spectroscopy method [J]. *Packaging Engineering*, 2023, 44(11): 99-107.
- [20] BORRO B C, BOHR A, BUCCIARELLI S, et al. Microfluidics-based self-assembly of peptide-loaded microgels: Effect of three dimensional (3D) printed micromixer design[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2019, 538: 559-568.
- [21] 宋亚楠, 朱玲, 张晖, 等. 4种白藜芦醇蛋白纳米颗粒的生物可及性研究[J]. *中国食品学报*, 2025, 25(1): 103-112.
- SONG Y N, ZHU L, ZHANG H, et al. Studies on bioavailability of four resveratrol protein nanoparticles [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2025, 25(1): 103-112.
- [22] XIE H J, LIU C Z, GAO J, et al. Fabrication of zein-lecithin-EGCG complex nanoparticles: Characterization, controlled release in simulated gastrointestinal digestion[J]. *Food Chemistry*, 2021, 365: 130542.
- [23] BAGHERI N, CHEN H J, RABASOVIC M, et al. Non-fluorescent transient states of tyrosine as a basis for label-free protein conformation and interaction studies[J]. *Scientific Reports*, 2024, 14(1): 6464.

- [24] HUSSAIN I, FATIMA S, AHMED S, et al. Bio-physical and molecular modelling analysis of the binding of β -resorcylic acid with bovine serum albumin[J]. *Food Hydrocolloids*, 2023, 135: 108175.
- [25] 张梦晴. 羊栖菜 α -葡萄糖苷酶抑制剂的分离纯化及特性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2020.
ZHANG M Q. Isolation, purification and characterization of α -glucosidase inhibitor from *Sargassum fusiforme*[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020.
- [26] WANG Y, ZHANG J, ZHANG L F. Study on the mechanism of non-covalent interaction between rose anthocyanin extracts and whey protein isolate under different pH conditions[J]. *Food Chemistry*, 2022, 384: 132492.
- [27] FAN M H, ZHANG G W, HU X, et al. Quercetin as a tyrosinase inhibitor: Inhibitory activity, conformational change and mechanism[J]. *Food Research International*, 2017, 100: 226-233.
- [28] YOU Y H, LIU Y, CHEN H, et al. Effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on the functional and structural properties of soybean protein isolate[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(7): 2306-2315.
- [29] AMEEN F, SIDDIQUI S, JAHAN I, et al. A detailed insight into the interaction of memantine with bovine serum albumin: A spectroscopic and computational approach[J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2020, 303: 112671.
- [30] TANG S, LI J S, HUANG G X, et al. Predicting protein surface property with its surface hydrophobicity[J]. *Protein & Peptide Letters*, 2021, 28(8): 938-944.
- [31] 孙焯, 李英浩, WULANDARI, 等. 超声波预处理对玉米醇溶蛋白结构及其 Pickering 乳液稳定性的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(1): 97-106.
SUN Y, LI Y H, WULANDARI, et al. Ultrasonic pretreatment improves the stability of zein and Pickering emulsion[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(1): 97-106.
- [32] DE MEUTTER J, GOORMAGHTIGH E. Evaluation of protein secondary structure from FTIR spectra improved after partial deuteration[J]. *European Biophysics Journal*, 2021, 50(3/4): 613-628.
- [33] JI Y, YANG X L, JI Z, et al. DFT-calculated IR spectrum amide I, II, and III band contributions of *N*-methylacetamide fine components[J]. *ACS Omega*, 2020, 5(15): 8572-8578.
- [34] TANG H J, HUANG L, SUN C Y, et al. Exploring the structure-activity relationship and interaction mechanism of flavonoids and α -glucosidase based on experimental analysis and molecular docking studies[J]. *Food & Function*, 2020, 11(4): 3332-3350.
- [35] UZUN İ. Methods of determining the degree of crystallinity of polymers with X-ray diffraction: A review[J]. *Journal of Polymer Research*, 2023, 30(10): 394.
- [36] SEELIG J, SEELIG A. Protein unfolding-thermodynamic perspectives and unfolding models[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(6): 5457.
- [37] VAN SCHAICK G, HASELBERG R, SOMSEN G W, et al. Studying protein structure and function by native separation-mass spectrometry[J]. *Nature Reviews Chemistry*, 2022, 6(3): 215-231.
- [38] BEGEMANN I, KELLER U, NÜSSE H, et al. Parallel acquisition of plasma membrane ultrastructure and cytosolic protein localisation in cultured cells via correlated immunogold SEM[J]. *Cells*, 2020, 9(6): 1329.
- [39] 曾珍. 金丝桃苷与脂肪酶的结合机理研究及其 β -环糊精包合物的制备与评价[D]. 成都: 成都大学, 2023.
ZENG Z. The binding mechanism of hyperoside to lipase and preparation and evaluation of β -cyclodextrin inclusion complex[D]. Chengdu: Chengdu University, 2023.

Exploring the Inhibition Mechanism of Genistein and Naringenin on Pancreatic Lipase Using Multispectral Methods

ZHAI Yingao, WANG Kunshan, YU Zenghui, ZHOU Suzhen, FAN Jinbo*

(College of Food Science and Technology, Bohai University, Food Safety Key Lab of Liaoning Province, National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology

for Fresh Agricultural and Aquatic Products, Jinzhou 121013, Liaoning)

Abstract Exploring the inhibitory effect of small molecules on pancreatic lipase (PL) has become an important method for screening active ingredients with anti-obesity effect *in vitro*. The binding reaction and mechanism of genistein (Gen) and naringenin (Nar) with PL were studied by fluorescence spectroscopy, non-radiative energy transfer theory and high performance liquid chromatography. At the same time, three-dimensional fluorescence, surface hydrophobicity, X-ray diffraction, infrared spectroscopy, particle size, differential scanning calorimetry, and scanning electron microscopy were used to characterize the structure of the composites from different angles, and their influence on the structure and properties of PL were comprehensively clarified. The results showed that the quenching of PL by Gen and Nar was static quenching, and the binding constants were 42.39 L/mg and 22.57 L/mg, respectively. The addition of both reduced the α -helix content of PL, increased the content of β -turn, β -sheet and random coil, and increased the crystallinity from 25.60% to 32.77% and 38.00%, respectively. The surface hydrophobicity decreased and the thermal stability decreased (the denaturation temperature decreased from 76.04 °C to 65.00 °C and 65.05 °C, respectively), and the PL changed from a smooth sheet structure to a rod-like particle. These results indicate that Gen and Nar significantly affect the structure and properties of PL, providing new ideas for the development of new PL inhibitors.

Keywords multispectral methods; genistein; naringenin; pancreatic lipase; inhibition mechanism