DOI:10.12441/spyswjs.20221206005 [文章编号] 1673-1689(2024)08-0160-13

# 天然胰脂肪酶抑制剂的虚拟筛选及活性验证

郑啸丹 王 闪 樊筱園 荆慧娟 阚绮蕃 王洪新 娄在祥*

(江南大学食品学院,江苏 无锡, 214122)

**摘要:**为了快速筛选安全有效的天然胰脂肪酶(pancreatic lipase,PL)抑制剂,作者采用分子对接、分光光度法、正交*t*值法及荧光猝灭试验等技术,通过研究胰脂肪酶的构象、活性、动力学和热力学来探究酶与抑制剂之间的相互作用。结果表明,在筛选出的31种化合物中有28种对PL的抑制率超过了50%,其中11种半数抑制质量浓度(the half maximal inhibitory concentration,$IC_{50}$)低于100 μg/mL,特别是(−)-表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)和辅酶Q9(coenzyme Q9,CoQ9),其半数抑制质量浓度低于奥利司他。作者设计的复合配方包括了木犀草素、杨梅素、槲皮素、异槲皮苷和柚皮苷,当质量浓度为0.5 mg/mL,且各组分的体积比为7∶15∶6∶17∶5时,其抑制率达到了(98.79±2.46)%,效果优于单一组分。配方中的5种物质通过自发键合静态猝灭PL的固有荧光,与PL之间存在疏水相互作用、氢键、离子键及π−π堆积等非共价相互作用。该研究为胰脂肪酶抑制剂提供了多种候选物质。

**关键词:**胰脂肪酶;天然产物;分子对接;复方设计;荧光猝灭效应

# Virtual Screening and Activity Validation of Natural Pancreatic Lipase Inhibitors

*ZHENG Xiaodan WANG Shan FAN Xiaoyuan JING Huijuan KAN Qifan*
*WANG Hongxin LOU Zaixiang**

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** To rapidly identify safe and effective natural inhibitor of pancreatic lipase (PL), the author utilized molecular docking, spectrophotometry, the orthogonal *t*-value method, and fluorescence quenching experiments to investigate the interaction between PL and the inhibitors by analyzing PL's conformation, activity, kinetics, and thermodynamics. Results showed that of the 31 screened compounds, 28 exhibited more than 50% inhibition of PL activity, with 11 compounds demonstrating half-maximal inhibitory concentrations ($IC_{50}$) below 100 μg/mL. Notably, (−)-epigallocatechin gallate (EGCG) and coenzyme Q9 (CoQ9) displayed $IC_{50}$ values lower than that of orlistat. The author designed compound formula, comprising luteolin, myricetin, quercetin, isoquercetin, and naringin, achieved an inhibition rate of (98.79±2.46)% at a concentration of 0.5 mg/mL and a volume ratio of 15∶6∶17∶5, surpassing the efficacy of individual components. The five substances in the formulation spontaneously bind to PL, leading to the quenching of its intrinsic fluorescence through static quenching. Non-covalent interactions, including hydrophobic interactions, hydrogen bonds, ionic bonds, and π−π stacking, are observed between these substances and PL. This study provides multiple promising candidates for PL inhibitors.

**Keywords:** pancreatic lipase; natural product; molecular docking; compound formulation; fluorescence quenching effect

---

**基金项目:**国家"十四五"重点研发计划项目(2022YFD2101104)。

**通信作者:**娄在祥(1983—),男,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事天然产物分离纯化及其功能性研究。E-mail:lou-zaixiang@jiangnan.edu.cn

**收稿日期:**2022-12-06 **修回日期:**2022-12-19

长期摄入高脂高糖饮食和缺乏运动的生活方式导致肥胖、II型糖尿病、非酒精性脂肪肝、高血压以及其他心血管疾病的发病率逐渐增加[1]。摄入脂肪过多已成为一大健康隐患，胰脂肪酶是减少脂质积累和调节脂质稳态的关键靶点。PL主要将摄入的脂肪（主要是甘油三酯）水解成游离脂肪酸、单酰基甘油等物质，这些物质随后被人体吸收或储存，进而导致人体肥胖。通过抑制PL活性，使脂肪不被有效水解，而是以未水解的形式随粪便排出体外，从而降低发生肥胖的风险。奥利司他能够有效抑制PL的活性，是我国目前唯一仍被批准用于减肥的药物[2]。然而，奥利司他具有多种副作用，如肠胃胀气、脂肪泻、肾毒性、肾结石和胰腺炎[3]。因此开发安全有效的抑制PL的降脂药物显得尤为重要[4]。

许多传统中药具有药食同源的特性，相较于化学合成物质更健康安全，有很大的开发潜力[5-7]。近年来，研究人员在各种中药提取物中发现了许多PL抑制剂，如茯砖茶中的茶碱（$IC_{50}$为0.03~1.02 μg/mL）[8]、桑白皮中的酚类物质Morachalcone A（$IC_{50}$为6.2 μmol/L）[9]、光果甘草根中的黄烷类成分（异甘草素$IC_{50}$为7.3 μmol/L、3,3',4,4'-四羟基-2-甲氧基查耳酮$IC_{50}$为35.5 μmol/L、甘草苷$IC_{50}$为14.9 μmol/L、异甘草苷$IC_{50}$为37.6 μmol/L）[10]。此外，从茶叶中分离出的各种多酚，如原花青素、表儿茶素没食子酸酯（epicatechin gallate，ECG）、EGCG等，都对PL有很强的抑制作用[11-13]。

传统的化合物筛选试验成本高、周期长且工作量大，难以系统地研究成分和靶标之间的作用机制。分子对接技术能够识别有治疗潜力的新化合物，在分子水平上预测配体-受体相互作用，并描述构效关系[14]，有助于进一步解释中药减脂和减肥的机制[15]。Nguyen等[16]使用分子对接和分子动力学方法将模拟的天然4-苄氧基查耳酮衍生物鉴定为潜在的PL抑制剂，其中化合物C82在低浓度下就对PL具有强抑制作用，其$IC_{50}$为（1.01±0.86）μmol/L。通过高通量技术筛选出来的候选物质，需要结合体外试验才能得到可靠的结果[17]。探究不同天然产物对同一作用对象的协同拮抗作用一直是研究的热点，正交$t$值法通过“主药分析、辅药交互作用、剂量选择”三步走，可以精简处方，适用于较大规模方剂的研究[18]。通过科学配比，使复合组分在相同质量浓度下优于单一组分，或者达到低质量浓度下的等效效果。

为了快速筛选PL抑制剂，作者构建了一种基于配体分子对接的多构象虚拟筛选方法。根据结构分类，对得分较高的物质进行酶活力和酶动力学测定，采用正交$t$值法对多组分复方进行精简，获得最佳配方，并进一步考察组分对PL的荧光猝灭效应及相互作用力。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide，DMSO）、二水合磷酸二氢钠、十二水合磷酸氢二钠、N,N-二甲基甲酰胺（$p$-NPP）、对硝基苯酚（$p$-nitrophenol，$p$-NP）：国药集团化学试剂有限公司；4-硝基苯基丁酸酯（4-nitrophenyl butyrate，$p$-NPB）：上海麦克林生化科技有限公司；植醇（GC质量分数≥90%）、角鲨烯（纯度98%）、菜油甾醇（纯度≥98%）、辅酶Q9（纯度≥99%）：上海源叶生物科技有限公司；奥利司他（纯度98%）、橙皮苷（纯度97%）、维生素E（纯度97%）、辣椒素（纯度97%）、绞股蓝皂苷（纯度98%）、绿原酸（纯度98%）、（+）-儿茶素（纯度97%）、表儿茶素（纯度97%）、EGCG（纯度98%）、芦丁（纯度98%）、槲皮素（纯度97%）、木犀草素（纯度≥98%）、大黄素（纯度90%）、异槲皮苷（纯度95%）、柚皮苷（纯度95%）、苦杏仁苷（纯度95%）、佛手柑内酯（纯度98%）、杨梅素（纯度97%）、反式-橙花叔醇（纯度95%）、厚朴酚（纯度≥98%）、牛蒡子苷（纯度98%）、山柰酚（纯度97%）、6-姜酚（纯度98%）、人参皂苷Re（分析纯）、$\beta$-胡萝卜素（纯度≥98%）、西托糖苷（纯度≥98%）、黄芩苷（纯度95%）、视黄醇（纯度95%）等：上海麦克林生化科技有限公司。

### 1.2 仪器与设备

电子分析天平：AR224CN型，奥豪斯仪器有限公司；pH计：DELTA320型，梅特勒托利多仪器有限公司；荧光光谱仪：F-7000型，日本日立公司；酶标仪：M5型，美国Molecular Devices公司；台式高速离心机：SCILOGEX D3024型，上海科怀仪器有限公司；电热培养箱：DRP-9162型，上海培印实验仪器有限公司。

### 1.3 研究方法

#### 1.3.1 虚拟筛选

从中国知网和PubMed中检索与PL抑制剂相关的文献，最终选择了37种植物。根据类药物五原则，通过TCMSP网站（http://tcmspw.com/tcmsp.php）[19]整理了这些植物的成分，并构建了一个包含3 286种化合物的天然活性成分库。具体植物包括药食同源植物：党参、黄芪、杜仲叶、丁香、八角茴香、菊花、甘草、乌梅、决明子、山药、姜、茯苓、荷叶、砂仁、枸杞子、山楂、葛根、薏苡仁、桑白皮、桑叶；国家卫生健康委员会公布的可用于保健食品的中药：红花、厚朴花、牛蒡子、苦丁茶、绞股蓝、番泻叶、丹参、熟地黄、泽泻、女贞子、银杏叶、补骨脂、制大黄；普通食物：辣椒、陈皮、葱白、红参。

使用Chem3D对这些化合物的3D结构进行能量最小化处理，并通过聚类分析按结构进行分组。从RCSB蛋白质数据库（http://www.rcsb.org/pdb）[20]中下载PL的X射线晶体结构（1LPB），并去除晶体结构中的水分子、所有配体及无机离子，补全不完整残基并添加氢原子。在批量对接之前，将1LPB中的原始配体（MUP901）提取出来，重新对接到复合物的结合口袋中，并计算对接配体构象与原始晶体结构的均方根偏差（root-mean-square deviation，RMSD）。RMSD可以评判对接软件预测结合模式的能力，当RMSD≤2Å时，代表软件成功预测了该晶体的结合模式[21]。使用Autodock Vina（版本1.5.6，Molecular Graphics Lab，USA）探索配体和蛋白质之间的结合亲和力[22]。在原始配体位点生成一个对接盒（26.556Å×26.556Å×26.556Å）。不同结构组按比例筛选出打分排名靠前的配体，使用Sybyl-X（Tripos Inc.，St Louis，MO，USA）的Surflex-Dock Screen程序进行精准对接，并执行Cscore模块。对接结果进行交叉排序，选择在Autodock Vina和Sybyl-X中均表现良好且具有CAS号可购买的化合物进行体外酶活力测定。

#### 1.3.2 酶抑制率及酶动力学测定

以*p*-NPP为底物，采用分光光度法测定抑制剂对PL的抑制率[23]。检测体系包括500 μL用PBS（50 mmol/L，pH 7）溶解的质量浓度为2 mg/mL的PL和1 000 μL抑制剂（体积分数10% DMSO），在离心管中充分混合，并在37 ℃下孵育1 h。随后加入200 μL *p*-NPP溶液并摇匀，继续在37 ℃下孵育20 min。反应结束后在405 nm测定上清液的吸光度。按式（1）计算抑制剂对PL的抑制率。

$$Y=\left(1-\frac{A_1-A_0}{B_1-B_0}\right)\times 100\% \quad (1)$$

式中：

$Y$——PL抑制率，%；

$A_1$——抑制剂与PL反应后底物*p*-NPP的吸光度；

$A_0$——抑制剂与PBS及底物*p*-NPP的吸光度；

$B_0$——无抑制剂的体积分数10% DMSO溶液与PL及底物*p*-NPP的吸光度；

$B_1$——仅存在体积分数10% DMSO溶液及PBS时底物*p*-NPP的吸光度。

PL的抑制动力学参考Wilcox等[24]的方法测定。将500 μL的PBS（50 mmol/L，pH 7）、1 000 μL体积分数10%的DMSO溶液和200 μL不同浓度的*p*-NP混合均匀，在37 ℃下孵育20 min后测定混合物在405 nm处的吸光度。以*p*-NP浓度为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制*p*-NP−吸光度标准曲线。固定底物*p*-NPP的浓度（6 mmol/L）、改变PL质量浓度（0.5、1.0、2.0、4.0、6.0 mg/mL）；或固定PL的质量浓度（2.0 mg/mL）、改变底物*p*-NPP的浓度（2、4、6、8、10 mmol/L），测定存在抑制剂（质量浓度0.5 mg/mL）与不存在抑制剂对酶促反应初始速率的影响。以反应速率$V$为纵坐标，PL质量浓度[$C$]为横坐标拟合直线。如果线性拟合曲线穿过原点，则抑制剂表现为可逆抑制，否则为不可逆抑制[25]。以*p*-NPP溶液底物浓度的倒数1/[$S$]为横坐标，反应速率的倒数1/$V$为纵坐标绘制Lineweaver−Burk双倒数曲线，根据直线与坐标轴的交点位置及Michaelis−Menten方程判断抑制剂对PL的竞争抑制类型，见式（2）和式（3）。

$$\frac{1}{V}=\frac{K_m}{V_{max}}\cdot\frac{1}{[S]}+\frac{1}{V_{max}} \quad (2)$$

$$\frac{1}{V}=\frac{K_m}{V_{max}}\left(1+\frac{[I]}{K_{is}}\right)\cdot\frac{1}{[S]}+\frac{1}{V_{max}}\left(1+\frac{[I]}{K_{ii}}\right) \quad (3)$$

式中：

$V$——反应速率，mmol/（L·min）；

$K_m$——酶促反应速度为最大反应速度一半时的底物浓度，mmol/L；

$V_{max}$——酶完全被底物饱和时的反应速度，

mmol/(L·min)；

[*I*]——抑制剂质量浓度，mg/mL；

[*S*]——*p*-NPP溶液底物的浓度，mmol/L；

$K_{is}$——酶与抑制剂的解离平衡常数，mmol/(L·min)；

$K_{ii}$——酶底物复合物与抑制剂的解离平衡常数，mmol/(L·min)。

当$K_{ii}$=∞时，酶只能与底物或抑制剂之一结合，称为竞争性抑制；当$K_{is}$=∞时，酶先与底物结合后才能与抑制剂结合，称为反竞争性抑制；当$K_{ii}$和$K_{is}$都不为∞时，为非竞争性抑制[26]。

1.3.3 复方设计

1)主药分析：根据PL抑制剂的$IC_{50}$排名结果，确定各抑制剂的抑制率是否符合剂量依赖性特征，选择10种因素包括EGCG、槲皮素、柚皮苷、苦杏仁苷、木犀草素、佛手柑内酯、芦丁、异槲皮苷、表儿茶素、杨梅素，并分别命名为B~K。每个因素设2个水平，水平1为添加，水平2为不添加。固定每种抑制剂的质量浓度都为0.5 mg/mL，根据$IC_{50}$确定其在各组方中的体积比。试验采用$L_{11}$($2^{10}$)正交*t*值表，以PL抑制率作为响应值。

2)辅药交互作用：以作用显著的主因素为基础，选择不显著的因素进行辅药相互分析。以PL抑制率作为响应值。辅药包括槲皮素(C)、柚皮苷(D)、芦丁(H)、异槲皮苷(I)，并采用$L_8$($2^7$)来分析4种活性物质之间的相互作用关系。

3)剂量优化：经过试验确定，主药为木犀草素和杨梅素，辅药为槲皮素、柚皮苷和异槲皮苷，根据$IC_{50}$选择高、中、低3个水平，检测了质量浓度为0.5 mg/mL时不同剂量配比对PL抑制率的影响，并选出最优配比。

1.3.4 荧光光谱

参考作者所在实验室方法并略加修改[27]。将质量浓度为0.5 mg/mL的PL溶液与不同质量浓度的槲皮素、柚皮苷、木犀草素、异槲皮苷、杨梅素(溶剂为DMSO)混合，并在37 ℃下孵育30 min。经过预试验，抑制剂在测试体系中分为高质量浓度组(0.06~0.10 mg/mL)和低质量浓度组(0.01~0.05 mg/mL)。在1 mm狭缝石英皿中以280 nm的激发波长记录发射波长范围为290~450 nm的荧光强度，激发和发射带宽均为5 nm。使用DMSO作为空白对照，同时测量无PL存在时各抑制剂的荧光强度。使用Stern-Volmer方程(4)计算猝灭常数及猝灭类型。

$$\frac{F_0}{F}=1+K_q\tau_0[Q] \tag{4}$$

式中：

$F_0$——不存在猝灭剂时PL的荧光强度；

*F*——存在不同质量浓度猝灭剂时PL的荧光强度；

$K_q$——淬灭速率常数，L/mol；

$\tau_0$——PL发射激发态的平均寿命(约$10^{-8}$ s)；

[*Q*]——猝灭剂浓度，mol/L。

经过计算，5种猝灭剂对PL的猝灭作用均属于静态猝灭。猝灭剂与PL之间的表观结合常数($K_a$)和结合位点数(*n*)通过静态猝灭方程(5)计算。

$$\lg\left[\frac{F_0-F}{F}\right]=\lg K_a+n\lg[Q] \tag{5}$$

式中：

$F_0$——不存在猝灭剂时PL的荧光强度；

*F*——存在不同质量浓度猝灭剂时PL的荧光强度；

$K_a$——结合常数，L/mol；

*n*——结合位点的数量；

[*Q*]——猝灭剂浓度，mol/L。

不同温度下的热力学参数Δ*G*、Δ*H*、Δ*S*可根据热力学公式(6)~(8)计算。

$$\Delta G=-RT\ln K \tag{6}$$

$$\ln\left(\frac{K_2}{K_1}\right)=\frac{\Delta H\left(\frac{1}{T_1}-\frac{1}{T_2}\right)}{R} \tag{7}$$

$$\Delta S=\frac{\Delta H-\Delta G}{T} \tag{8}$$

式中：

Δ*G*——自由焓变，kJ/mol；

R——理想气体常数，8.314 J/(mol·K)；

*T*——温度，K；

Δ*H*——焓变，kJ/mol；

*K*——结合常数，L/mol；

$T_1$——298 K；

$T_2$——310 K；

$K_2$——298 K下的结合常数，L/mol；

$K_1$——310 K下的结合常数，L/mol；

Δ*S*——熵变，J/mol。

1.3.5 分子对接

使用Pymol软件分别生成槲皮素、柚皮苷、木犀草素、异槲皮苷及杨梅素与PL的复合物模型。利用LIGPLOT+进行绘图，并计算氨基酸残基侧链与配体之间形成的氢键、疏水相互作用及其他相互作用力，以进一步描述复杂结构中PL与小分子化合物之间可能发生的特异性相互作用[28]。

1.3.6 统计及分析

所有试验均进行3次重复，使用Origin 2018和Microsoft Excel 2019进行统计学分析，使用lg-Probit计算$IC_{50}$，结果表示为平均值±标准差。采用IBM SPSS Statistics 21软件对数据进行单因素方差分析（ANOVA），$P<0.05$为差异显著。

## 2 结果与讨论

### 2.1 虚拟筛选

1LPB的原配体（MUP901）使用Autodock Vina和Sybyl-X重对接后，RMSD分别为1.889 4Å和1.518 7Å，说明这两种软件都能较好地预测该配体与晶体的结合模式。

数据库中的化合物被FSFC-6分为7个主要簇，包括黄酮类、萜烯、酚酸、甾醇、饱和无环烃、木脂素、蒽醌，其中黄酮类化合物及萜类化合物的占比最大。Autodock Vina初筛和Sybyl-X复筛选后的打分数据见表1。黄酮类化合物中对接表现最好的是柚皮苷，其在Autodock Vina中的最低结合能为−41.84 kJ/mol，在Sybyl-X中总分为8.51（Cscore为5）。萜类化合物在两种软件中的表现有所差异，Autodock Vina中对接表现最好的是绞股蓝皂苷XVII（Autodock Vina中最低结合能为−41.42 kJ/mol），而在Sybyl-X中的总分为6.18（Cscore为3）。甾醇中的菜油甾醇和西托糖苷表现相似，在Autodock Vina中的最低结合能分别为−38.91 kJ/mol和−35.56 kJ/mol，在Sybyl-X中的总分分别为6.65和6.42（Cscore都为4）。在对接软件中表现良好，意味着这些化合物具有潜在的PL抑制活性，因此最终选择这31种化合物进行体外酶抑制试验。

### 2.2 酶抑制率及酶动力学

在测试的质量浓度下，31种化合物都显示出对PL具有抑制作用，见表2。除CoQ9和反式-橙花叔醇外，其余化合物对PL的抑制效果均呈剂量依赖性（$P<0.05$）。槲皮素、EGCG、绿原酸、异槲皮苷、西托糖苷、木犀草素、芦丁、佛手柑内酯在最高测试质量浓度下对PL的抑制率均大于90%，而6-姜酚、厚朴酚、山柰酚的抑制率均小于50%。6-姜酚在分子对接和体外试验中均表现不佳。山柰酚可能是因为分光光度法受样品颜色限制导致试验出现偏差，山柰酚质量浓度在100 μg/mL时样品溶液较黄。共计17种化合物的$IC_{50}$小于1 000 μg/mL，11种化合物的$IC_{50}$在1 000~5 000 μg/mL，而6-姜酚的$IC_{50}$为（7 046.13±322.59）μg/mL，厚朴酚、山柰酚的$IC_{50}$大于10 mg/mL。作为阳性对照的奥利司他，对PL的最大抑制率为（99.93±0.21）%，$IC_{50}$为（33.92±1.22）μg/mL。除了CoQ9和EGCG外，其他化合物的抑制效果都比合成药物奥利司他弱。辅酶Q是一类小分子醌类化合物，是电子传递链中天然存在的脂溶性成分，参与有氧细胞呼吸[29]。研究表明CoQ9对人血管内皮细胞氧化损伤具有预防和修复作用，而脂质超负荷会导致氧化应激诱导的心肌损伤，CoQ9最早是用于治疗心血管疾病的一种药物[30]。试验结果显示，CoQ9在质量浓度为100 μg/mL时，对PL的抑制率达到了（86.26±3.03）%，丰富了CoQ9的活性功能。Martinez-Gonzalez等[25]比较了辣椒中4种酚类化合物（咖啡酸、对香豆酸、槲皮素和辣椒素）对PL的抑制作用，发现槲皮素是最强的抑制剂，其$IC_{50}$为（6.1±2.4）μmol/L。此外，Kawaguchi等[31]发现与其他3种柑橘类黄酮单体相比，橙皮苷是最有效的PL抑制剂，其$IC_{50}$为32 μg/mL。

*p*-NP的标准曲线方程为$y=5.831\ 7x+0.043\ 4$，$R^2=0.999\ 8$。在不同酶质量浓度下，31种化合物存在时酶质量浓度和反应速率的拟合曲线通过原点，表明它们是可逆抑制。从Lineweaver−Burk图得到了在$x$正半轴、$y$负半轴、第二象限和第三象限相交的直线组，可以通过$V_{max}$、$K_m$、$K_{is}$、$K_{ii}$的增减来判断化合物对酶的抑制类型。31种化合物对PL的抑制类型主要包括：竞争性抑制、非竞争性抑制、反竞争性抑制、混合竞争−非竞争性抑制、混合非竞争性−反竞争性抑制，见表2。在没有抑制剂存在时，PL的$K_m$为（2.93±0.17）mmol/L，$V_{max}$为（9.48±0.27）μmol/（L·min）。绿原酸、辣椒素、橙皮苷、表儿茶素、山柰酚、槲皮素、芦丁对PL的抑制作用属于竞争性抑制，$V_{max}$不变，$K_m$增大，意味着抑

表1 分子对接排名打分数据

Table 1 Molecular docking ranking scoring data

| 化合物类别 | 化合物名称 | Autodock Vina结合能/（kJ/mol） | Sybyl-X总分 | Sybyl-X Cscore |
|---|---|---|---|---|
| 黄酮类 | 柚皮苷 | −41.84 | 8.51 | 5 |
| | 木犀草素 | −40.58 | 4.05 | 4 |
| | EGCG | −40.58 | 6.13 | 4 |
| | 橙皮苷 | −40.17 | 6.81 | 5 |
| | 山柰酚 | −37.66 | 5.19 | 5 |
| | (+)-儿茶素 | −37.24 | 5.68 | 2 |
| | 杨梅素 | −36.82 | 4.39 | 4 |
| | 黄芩苷 | −35.98 | 5.08 | 4 |
| | 芦丁 | −35.56 | 7.77 | 5 |
| | 表儿茶素 | −35.56 | 4.47 | 3 |
| | 槲皮素 | −35.15 | 5.06 | 5 |
| | 异槲皮苷 | −33.47 | 4.55 | 4 |
| | 6-姜酚 | −30.54 | 7.02 | 4 |
| 萜类 | 绞股蓝皂苷XVII | −41.42 | 6.18 | 3 |
| | 人参皂苷Re | −37.66 | 5.32 | 4 |
| | 维生素A | −33.47 | 4.36 | 5 |
| | *β*-胡萝卜素 | −30.96 | 5.49 | 4 |
| | 佛手柑内酯 | −30.96 | 3.65 | 4 |
| | 角鲨烯 | −30.12 | 8.10 | 5 |
| | 反式-橙花叔醇 | −27.20 | 6.07 | 3 |
| | 植醇 | −25.10 | 7.23 | 3 |
| 甾醇 | 菜油甾醇 | −38.91 | 6.65 | 4 |
| | 西托糖苷 | −35.56 | 6.42 | 4 |
| 蒽醌 | 大黄素 | −39.33 | 5.38 | 5 |
| | CoQ9 | −29.29 | 10.30 | 4 |
| 木脂素 | 牛蒡子苷 | −35.98 | 8.04 | 5 |
| | 厚朴酚 | −35.56 | 6.12 | 3 |
| 饱和无环烃 | 苦杏仁苷 | −35.56 | 6.54 | 3 |
| 酚酸 | 绿原酸 | −33.05 | 4.11 | 4 |
| 生物碱 | 辣椒素 | −32.22 | 6.00 | 3 |
| 吡啶类 | 维生素E | −31.80 | 8.89 | 4 |
| | 奥利司他 | −28.03 | 7.80 | 4 |

制剂会代替*p*-NPP与PL的活性位点结合，从而阻止酶催化反应。竞争性抑制容易受到底物浓度的影响，高浓度的底物会降低抑制作用，甚至完全消除抑制作用。*β*-胡萝卜素、牛蒡子苷、木犀草素、植醇、维生素E都属于反竞争性抑制剂，$V_{max}$降低，$K_m$降低，此时需要底物与酶同时存在，抑制剂通过与酶-底物复合物结合形成酶-底物-抑制剂复合物，从而降低酶的活性。EGCG、绞股蓝皂苷、厚朴酚、佛手柑内酯、角鲨烯属于非竞争性抑制剂，$V_{max}$降低，$K_m$不变，非竞争性抑制剂对酶的抑制程度取决于抑制剂的质量浓度，且增加底物浓度不会降低抑制剂对酶的抑制程度[32]。EGCG是一种典型的非竞争性PL抑制剂，可与PL的非活性位点结合，不改变PL对底物*p*-NPP的亲和力。$K_{is}$和$K_{ii}$越小，说明酶与抑制剂结合得越紧密。

### 2.3 正交*t*值法

由正交试验得出主药中具有显著作用的物质为木犀草素和杨梅素（$P<0.05$），在复合组分中起显著负作用的为EGCG、苦杏仁苷、佛手柑内酯和表儿茶素（$P<0.05$），主药无显著作用的有槲皮素、

表 2 PL 半抑制浓度及最大抑制率、抑制动力学统计

Table 2 Half maximal inhibitory concentration, maximum inhibition rate, and inhibition kinetics statistics of compounds in inhibiting PL

| 类型 | 名称 | $IC_{50}$/（μg/mL） | 最大抑制率/% | $V_{max}$/［μmol/（L·min）］ | $K_m$/（mmol/L） | $K_{is}$/［mmol/（L·min）］ | $K_{ii}$/［mmol/（L·min）］ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 无抑制 | | | | 9.48±0.027 | 2.93±0.17 | — | — |
| 竞争性抑制 | 绿原酸 | 570.34±8.02 | 99.36±0.87 | 9.48±0.11 | 3.87±0.06 | 4.38±0.19 | ∞ |
| | 辣椒素 | 3 103.11±167.71 | 62.64±2.36 | 9.49±0.36 | 4.82±0.27 | 2.65±0.08 | |
| | 橙皮苷 | 1 785.24±26.91 | 83.34±2.16 | 9.52±0.37 | 5.23±0.14 | 1.04±0.03 | |
| | 表儿茶素 | 156.17±13.65 | 72.29±1.69 | 9.59±0.16 | 5.84±0.13 | 1.74±0.07 | |
| | 山柰酚 | 1 800 884.69±90.49 | 29.42±1.30 | 9.44±0.23 | 6.78±0.23 | 1.33±0.11 | |
| | 槲皮素 | 34.24±0.51 | 99.60±0.46 | 9.58±0.12 | 7.99±0.07 | 0.96±0.09 | |
| | 芦丁 | 75.73±3.77 | 95.60±0.96 | 9.59±0.13 | 23.06±0.16 | 0.12±0.01 | |
| 反竞争性抑制 | *β*-胡萝卜素 | 3 545.92±121.40 | 53.34±2.20 | 2.48±0.24 | 0.76±0.08 | ∞ | 0.33±0.02 |
| | 牛蒡子苷 | 3 724.57±143.67 | 57.45±2.00 | 4.17±0.23 | 1.30±0.09 | | 0.74±0.02 |
| | 木犀草素 | 66.96±6.37 | 97.60±1.99 | 6.41±0.19 | 1.98±0.11 | | 3.65±0.26 |
| | 植醇 | 3 939.29±104.10 | 55.00±1.33 | 8.10±0.17 | 2.51±0.08 | | 9.93±0.34 |
| | 维生素 E | 1 483.02±18.52 | 67.64±1.59 | 8.19±0.15 | 2.53±0.09 | | 7.40±0.33 |
| 非竞争性抑制 | EGCG | 18.53±0.86 | 99.60±0.67 | 3.86±0.16 | 2.88±0.04 | 0.75±0.08 | 0.75±0.08 |
| | 绞股蓝皂苷 | 2 655.04±27.48 | 61.48±0.92 | 6.72±0.11 | 2.93±0.11 | 1.58±0.21 | 1.58±0.21 |
| | 厚朴酚 | 16 925.62±1 696.47 | 36.45±1.46 | 5.66±0.26 | 2.89±0.46 | 2.79±0.24 | 2.79±0.24 |
| | 佛手柑内酯 | 80.51±1.62 | 92.88±1.89 | 8.80±0.23 | 3.08±0.27 | 30.30±1.64 | 30.30±1.64 |
| | 角鲨烯 | 2 453.12±25.10 | 65.97±0.58 | 9.30±0.10 | 2.98±0.22 | 63.79±2.93 | 63.79±2.93 |
| 竞争-非竞争性抑制 | 反式-橙花叔醇 | 37.57±3.52 | 60.17±1.02 | 3.27±0.26 | 3.28±0.06 | 1.00±0.31 | 1.19±0.26 |
| | 菜油甾醇 | 70.53±1.40 | 79.56±2.16 | 2.14±0.027 | 3.51±0.19 | 0.29±0.01 | 0.36±0.02 |
| | 杨梅素 | 166.81±4.67 | 76.86±2.93 | 7.37±0.25 | 3.62±0.21 | 2.66±0.37 | 5.51±0.34 |
| | 西托糖苷 | 1 363.96±14.81 | 98.40±1.83 | 4.99±0.19 | 3.96±0.09 | 0.55±0.09 | 0.97±0.07 |
| | 大黄素 | 189.60±2.53 | 86.79±1.04 | 4.70±0.018 | 4.68±0.06 | 0.83±0.13 | 1.82±0.21 |
| | (+)-儿茶素 | 915.33±12.16 | 77.62±2.29 | 6.76±0.31 | 5.04±0.14 | 1.15±0.32 | 4.03±0.47 |
| | 黄芩苷 | 1 065.39±12.10 | 69.37±1.93 | 3.41±0.27 | 13.29±0.16 | 0.10±0.27 | 0.63±0.06 |
| 反竞争-非竞争性抑制 | 视黄醇 | 3 465.97±249.51 | 55.53±1.89 | 3.32±0.26 | 1.43±0.21 | 4.45±0.37 | 0.94±0.05 |
| | 6-姜酚 | 7 046.13±322.59 | 47.86±0.45 | 1.13±0.11 | 1.45±0.18 | 0.57±0.07 | 0.24±0.06 |
| | 柚皮苷 | 50.73±1.64 | 87.41±1.96 | 4.91±0.23 | 1.98±0.11 | 2.82±0.23 | 0.93±0.19 |
| | 辅酶 CoQ9 | 0.53±0.36 | 86.26±3.03 | 5.45±0.32 | 2.24±0.23 | 1.92±0.21 | 0.85±0.19 |
| | 人参皂苷 Re | 185.75±8.37 | 83.22±2.67 | 1.23±0.29 | 2.37±0.31 | 0.10±0.06 | 0.08±0.07 |
| | 苦杏仁苷 | 58.11±6.30 | 86.72±1.81 | 5.58±0.26 | 2.52±0.19 | 2.38±0.21 | 1.56±0.24 |
| | 异槲皮苷 | 89.13±2.68 | 98.67±2.28 | 5.32±0.32 | 2.54±0.14 | 1.98±0.09 | 1.38±0.06 |

柚皮苷、芦丁和异槲皮苷（$P$>0.05），对于无显著作用的这 4 种主药可以考虑将其作为辅药使用，见表 3。辅药交互试验结果见表 4，槲皮素、柚皮苷、异槲皮苷有显著的促进作用（$P$<0.05），芦丁有显著负作用（$P$<0.05），且与异槲皮苷起拮抗作用（$P$<0.05），芦丁和柚皮苷可能有拮抗作用，但结果不显著（$P$>0.05）。

剂量优化试验结果见表 5~6，其中 *F*1*K*1*C*3*I*3*D*3 对 PL 的抑制率最高，但试验中未涉及此组合，因此通过优化试验验证。当组合中木犀草素、杨梅素、槲皮素、异槲皮苷和柚皮苷的质量浓度均为 0.5 mg/mL，且各组分的体积比为 7∶15∶

表3 正交*t*值法主药分析表

Table 3 Analysis table of main drugs by the orthogonal *t*-value method

| 序号 | 空列 | 因素 | | | | | | | | | | *Y*/% |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | *B* | *C* | *D* | *E* | *F* | *G* | *H* | *I* | *J* | *K* | |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 14.81 |
| 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 41.44 |
| 3 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 57.46 |
| 4 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 42.75 |
| 5 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 57.61 |
| 6 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 31.29 |
| 7 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 75.46 |
| 8 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 18.68 |
| 9 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 40.82 |
| 10 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 26.43 |
| 11 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 50.03 |
| 12 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 93.72 |
| *m*1 | 40.89% | 41.44% | 47.26% | 42.12% | 39.91% | 51.77% | 41.19% | 44.33% | 43.22% | 29.13% | 52.29% | |
| *m*2 | 50.85% | 50.31% | 44.49% | 49.63% | 51.84% | 39.98% | 50.56% | 47.42% | 48.53% | 62.62% | 39.46% | |
| *R* | −0.60 | −0.53 | 0.17 | −0.45 | −0.72 | 0.71 | −0.56 | −0.18 | −0.32 | −2.01 | 0.77 | |
| *P* | | * | 0.479 | 0.063 | * | * | * | 0.431 | 0.182 | * | * | |

注：*m*1为水平为1时，*Y*数值的和除以6；*m*2为水平为2时，*Y*数值的和除以6；*R*为极差；*表示*P*<0.05水平上有显著差异。

表4 正交*t*值法辅药相互作用表

Table 4 Adjuvant interaction table by orthogonal *t*-value method

| 编号 | 因素 | | | | | | | *Y*/% |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *C* | *D* | *HI* | *H* | *DI* | *DH* | *I* | |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 54.89 |
| 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 78.77 |
| 3 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 44.39 |
| 4 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 89.40 |
| 5 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 13.33 |
| 6 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 71.54 |
| 7 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 6.13 |
| 8 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 31.55 |
| *m*1 | 66.86% | 54.63% | 42.84% | 29.68% | 50.59% | 47.29% | 55.49% | |
| *m*2 | 30.64% | 42.87% | 54.66% | 67.82% | 46.91% | 50.21% | 42.01% | |
| *R* | 0.36 | 0.12 | −0.12 | −0.38 | 0.04 | −0.03 | 0.13 | |
| *P* | ** | * | * | ** | 0.427 | 0.528 | ** | |

注：*m*1为水平为1时，*Y*数值的和除以6；*m*2为水平为2时，*Y*数值的和除以6；*R*为极差；*表示*P*<0.05水平上有显著差异；**表示*P*<0.01水平上有极显著差异。

6∶17∶5时，对PL的抑制率达到（98.79±2.46）%。而当物质的质量浓度为0.5 mg/mL时，奥利司他对PL的抑制率为（94.33±1.92）%，槲皮素为（94.66±1.61）%，异槲皮苷为（93.85±1.62）%，木犀草素为（94.52±2.18）%，柚皮苷为（83.94±1.44）%，杨梅素为（76.86±2.93）%。试验证明，复合配方可能存在协同效应，使复合配方对PL的抑制效果优于单个化合物。

### 2.4 荧光光谱

PL由于含有色氨酸（Trp）、酪氨酸（Tyr）和苯丙氨酸（Phe），因此具有内源性荧光。其中，Trp对荧光的贡献最大，其次是Tyr，而Phe的荧光最弱，Tyr

表5 剂量优化因素水平表

Table 5 Factor and level table of dose optimization

| 水平 | 因素 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | *F* | *K* | *C* | *I* | *D* |
| 1 | 70 | 147 | 30 | 84 | 45 |
| 2 | 94 | 196 | 40 | 112 | 59 |
| 3 | 141 | 293 | 60 | 168 | 89 |

和 Trp 的荧光峰主要集中在 313 nm 和 350 nm 附近[33]。在不同质量浓度的槲皮素、柚皮苷、木犀草素、异槲皮苷和杨梅素的作用下，PL 均表现出荧光猝灭现象，见图 1。随着这些化合物质量浓度的增加，PL 的荧光强度逐渐减弱，表明这 5 种化合物通过与 PL 结合改变了其微环境，进而影响了 PL 的构象和活性[34-35]。结合 2.2 中酶抑制试验结果，当抑制剂与酶结合后，会导致局部构象发生变化，使酶的结构变得松散，从而降低了酶活力。根据 Stern-Volmer 方程，在 298 K 和 310 K 条件下，5 种化合物的 $F_0/F$ 与 $[Q]$ 在测量范围内都呈线性关系，且 $K_q$ 远大于 $2.00\times10^{10}$ L/(mol·s)，表明它们与 PL 的结合都属于静态猝灭，见表 7。在 310 K 下，$K_a$ 都大于 $1.00\times10^5$ L/mol。同时，随着温度的上升 $K_a$ 增加，说明 5 种化合物与 PL 的结合都较为紧密，并且至少有一个结合位点。

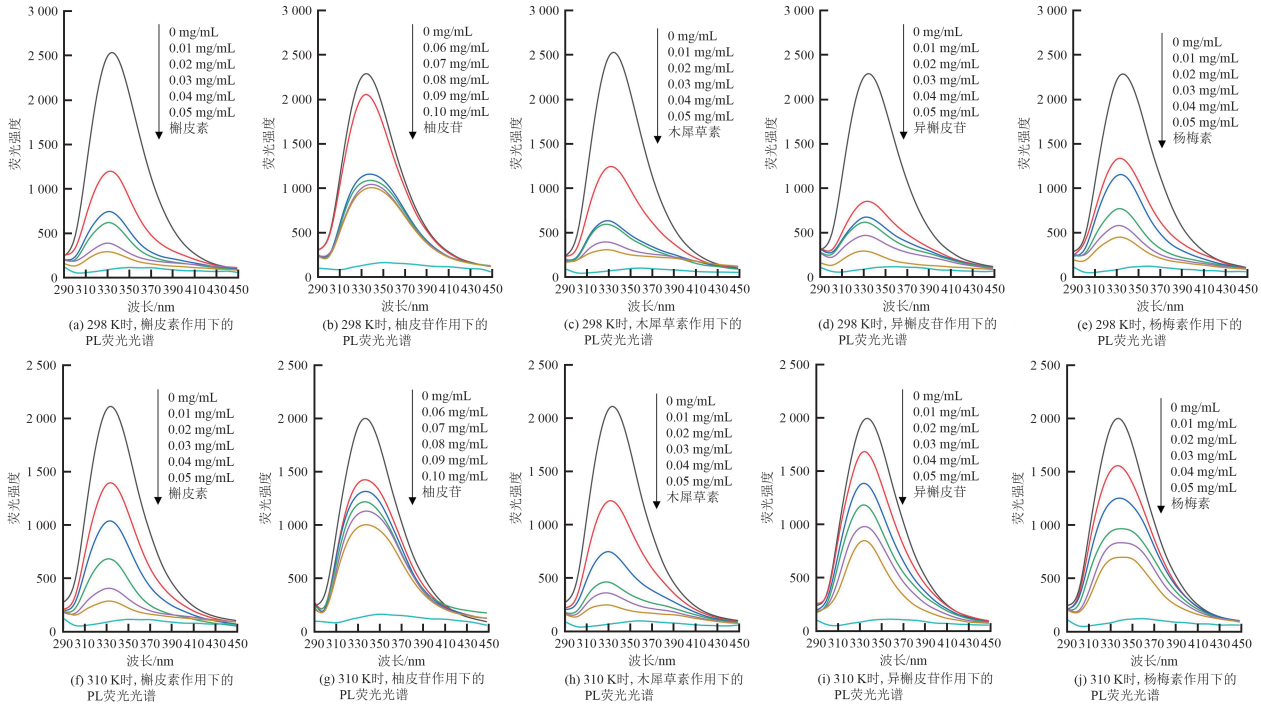
热力学结果见表 7，$\Delta G$ 为负值表明 5 种化合物能自发的与 PL 结合；$\Delta H$ 为正值说明它们的结合是一个吸热的过程，适当升高温度有利于这 5 种化合物与 PL 的结合，这与 $K_a$ 的变化趋势一致；$\Delta H$ 与 $\Delta S$ 均为正值，表明疏水作用在这些化合物与 PL 结合中起主导作用[36]。疏水作用是由于水与水之间形成氢键网络，导致疏水基团聚集而产生的能量效应和熵效应[37]。蛋白质内部的疏水相互作用对其结构的稳定

表6 正交 *t* 值法剂量优化表

Table 6 Dose optimization table by the orthogonal *t*-value method

| 编号 | 因素 | | | | | 空列 | 空列 | *Y*/% |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *F*1 | *K*1 | *C*3 | *I*3 | *D*3 | | | |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 87.67 |
| 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 3 | 3 | 2 | 97.40 |
| 3 | 1 | 2 | 1 | 3 | 3 | 2 | 3 | 98.44 |
| 4 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 4 | 0.68 |
| 5 | 1 | 3 | 2 | 3 | 2 | 1 | 5 | 56.91 |
| 6 | 1 | 3 | 3 | 2 | 1 | 2 | 6 | 98.06 |
| 7 | 2 | 1 | 1 | 3 | 2 | 3 | 6 | 96.61 |
| 8 | 2 | 1 | 3 | 1 | 3 | 2 | 5 | 0.34 |
| 9 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 74.17 |
| 10 | 2 | 2 | 3 | 3 | 1 | 1 | 2 | 92.46 |
| 11 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 4 | 56.99 |
| 12 | 2 | 3 | 2 | 1 | 1 | 3 | 3 | 0.69 |
| 13 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 4 | 94.35 |
| 14 | 3 | 1 | 3 | 2 | 2 | 1 | 3 | 84.49 |
| 15 | 3 | 2 | 1 | 2 | 1 | 3 | 5 | 0.81 |
| 16 | 3 | 2 | 2 | 1 | 3 | 1 | 6 | 29.73 |
| 17 | 3 | 3 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 0.68 |
| 18 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 1 | 88.09 |
| *m*1 | 73.19% | 76.81% | 56.87% | 19.97% | 62.34% | 68.04% | 41.66% | |
| *m*2 | 53.54% | 49.38% | 58.88% | 68.65% | 52.26% | 61.01% | 31.76% | |
| *m*3 | 49.69% | 50.24% | 60.69% | 87.81% | 61.83% | 47.38% | 30.60% | |
| *R* | 0.24 | 0.27 | 0.04 | 0.68 | 0.10 | 0.21 | 0.11 | |
| *P* | * | * | 0.821 | * | 0.360 | | | |

注：*m*1 为水平为 1 时，*Y* 数值的和除以 6；*m*2 为水平为 2 时，*Y* 数值的和除以 6；*m*3 为水平为 3 时，*Y* 数值的和除以 6；*R* 为极差；*表示 $P<0.05$ 水平上有显著差异。




最底部谱线为抑制剂本身荧光强度。

图1　PL与不同质量浓度抑制剂存在时的荧光光谱

Fig. 1　Fluorescence spectra of PL in the presence of different mass concentrations of inhibitors

表7　PL与槲皮素、柚皮苷、木犀草素、异槲皮苷、杨梅素在298 K和310 K下的$K_q$、$K_a$、$n$和热力学参数

Table 7　$K_q$, $K_a$, $n$, and thermodynamic parameters for interactions between PL and quercetin, naringin, luteolin, isoquercitrin, and myricetin at 298 K and 310 K

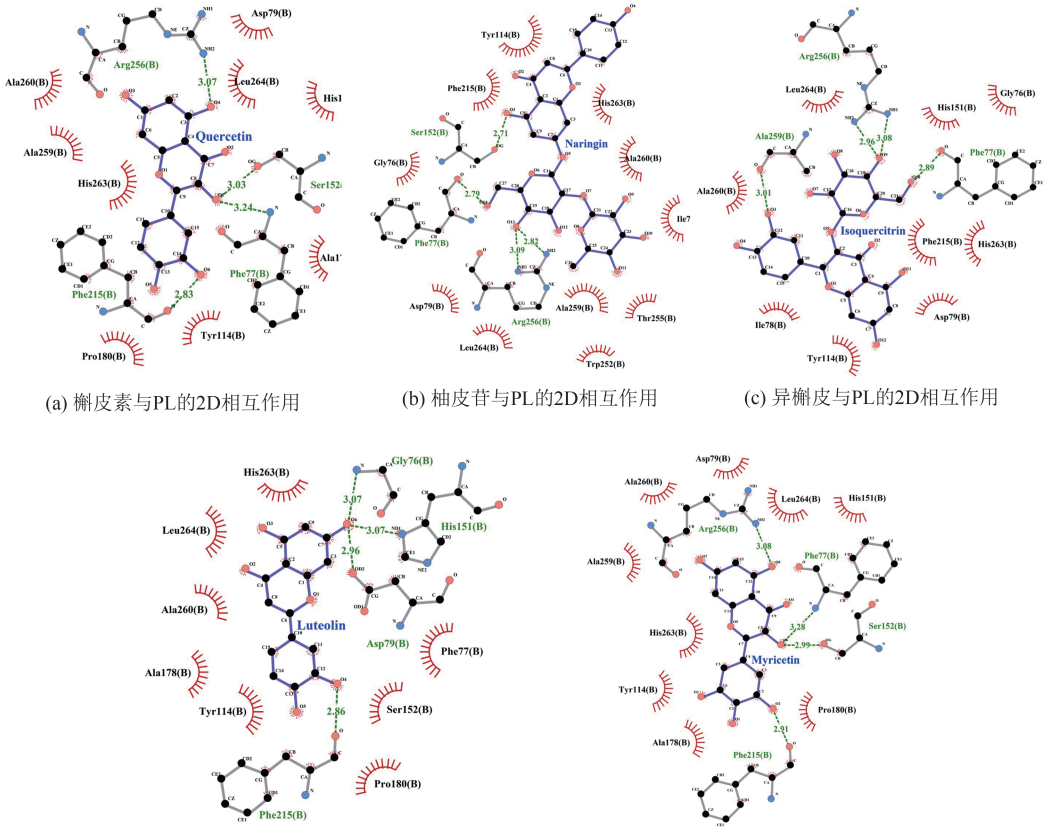
| 名称 | 温度/K | $K_q$/(×10$^{12}$ L/(mol·s)) | $n$ | $K_a$/(×10$^5$ L/mol) | Δ$H$/(kJ/mol) | Δ$G$/(kJ/mol) | Δ$S$/(J/(mol·K)) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 槲皮素 | 298 | 4.90±0.10 | 1.16±0.09 | 1.69±0.16 | 137.17±7.25 | −29.82±1.85 | 560.39±1.73 |
| | 310 | 3.80±0.07 | 1.44±0.09 | 14.40±0.15 | | −36.55±2.05 | 560.40±1.71 |
| 柚皮苷 | 298 | 0.63±0.04 | 1.14±0.07 | 0.01±0.07 | 472.37±11.05 | −17.13±1.71 | 1 642.64±2.01 |
| | 310 | 1.00±0.05 | 1.61±0.08 | 16.20±0.09 | | −36.84±1.96 | 1 642.66±2.09 |
| 木犀草素 | 298 | 4.40±0.12 | 1.17±0.15 | 1.73±0.25 | 104.00±2.52 | −29.88±1.04 | 449.26±1.93 |
| | 310 | 4.10±0.08 | 1.37±0.03 | 8.78±0.05 | | −35.27±2.11 | 449.27±1.91 |
| 异槲皮苷 | 298 | 2.20±0.09 | 1.01±0.07 | 0.007 0±0.000 2 | 522.50±4.67 | −16.38±0.95 | 1 808.33±0.90 |
| | 310 | 1.40±0.08 | 1.53±0.40 | 26.10±0.95 | | −38.08±1.17 | 1 808.35±0.83 |
| 杨梅素 | 298 | 2.70±0.13 | 1.08±0.06 | 0.45±0.02 | 88.31±2.81 | −26.56±0.92 | 385.47±0.41 |
| | 310 | 1.30±0.07 | 1.30±0.14 | 1.80±0.12 | | −31.19±1.04 | 385.49±0.42 |

性至关重要，是维持蛋白质空间结构稳定的关键因素，这一点可以与分子对接的结果进行比较验证。

## 2.5　分子对接相互作用

据报道，PL与其他脂肪酶家族成员相同，保留了丝氨酸(Ser)152-组氨酸(His)263-天冬氨酸(Asp)176的催化三联体[38]。奥利司他通过5个氢键和不同的疏水相互作用显示出与PL的强结合能力。奥利司他的内酯环和氨基酸侧链在与残基苯丙氨酸(Phe)77、His151、Ser152、脯氨酸(Pro)180、精氨酸(Arg)256形成这5个氢键中起关键作用[4]。奥利司他通过与脂肪酶活性位点的Ser152共价结合使酶失活，而许多成分通过与PL的非活性位点非共价结合来抑制酶活力。槲皮素、柚皮苷、木犀草素、异槲皮苷、杨梅素与PL的对接位点相互作用见图2。Phe77和Phe215主要与槲皮素、柚皮苷、木犀草素、杨梅素产生疏水相互作用，Asp79、His151

和 Ser152 主要与这 5 种化合物形成氢键，每种化合物的酚羟基都与 PL 活性位点形成超过两个氢键。His263 主要通过与化合物中的芳香环产生 π−π 堆积，并与组分产生电荷相互作用以巩固稳定的复合结构。此外，柚皮苷和异槲皮苷还能与 His263 形成离子键。统计显示，除催化三联体外，Phe77、Asp79、Phe215、Tyr114 和 His151 也在化合物抑制 PL 方面发挥了重要作用。




(a) 槲皮素与PL的2D相互作用　(b) 柚皮苷与PL的2D相互作用　(c) 异槲皮与PL的2D相互作用

(d) 木犀草素与PL的2D相互作用　(e) 杨梅素与PL的2D相互作用

图 2　不同化合物与 PL 的 2D 相互作用

Fig. 2　Interaction between PL and different compounds in 2D

## 3　结论

结合计算机虚拟筛选与体外试验，筛选出 31 种化合物，其中有 28 种对 PL 的抑制率大于 50%，其中 17 种 $IC_{50}$ 低于 1 000 μg/mL，11 种 $IC_{50}$ 低于 100 μg/mL。$IC_{50}$ 最小的化合物是辅酶 Q9 为（0.53±0.36）μg/mL。在质量浓度为 100 μg/mL 时，其对 PL 的抑制率可达（86.26±3.03）%。反式橙花叔醇、苦杏仁苷、菜油甾醇和佛手柑内酯的 $IC_{50}$ 都小于 100 μg/mL，且关于它们对 PL 的作用研究较少，试验结果为天然 PL 抑制剂提供了大量良好的候选物质。酶抑制动力学显示它们包含 5 种可逆竞争抑制类型。通过正交 *t* 值法获得复合配方，其中主药为木犀草素和杨梅素，辅药为槲皮素、异槲皮苷和柚皮苷。当质量浓度为 0.5 mg/mL，且各组分的体积比为 7∶15∶6∶17∶5 时，其抑制率达到了（98.79±2.46）%，效果优于单一组分。配方中的 5 种化合物通过自发键合静态猝灭 PL 的固有荧光，主要与 PL 活性位点的 Phe77 和 Phe215 产生疏水相互作用，与 Asp79、His151 和 Ser152 产生氢键，与 His263 生成离子键，以及与 His263 出现 π−π 堆积现象。然而，许多天然化合物较难在水中溶解，因此酶与这些天然化合物之间的相互作用有待进一步研究。

## 参考文献

[1] PI-SUNYER X. The medical risks of obesity[J]. Postgraduate Medicine, 2009, 121(6): 21-33.

[2] ZHI J, MELIA A T, GUERCIOLINI R, et al. Retrospective population-based analysis of the dose-response (fecal fat excretion) relationship of orlistat in normal and obese

volunteers[J]. Clinical Pharmacology and Therapeutics, 1994,56(1):82-85.

[3] DANESCHVAR H L,ARONSON M D,SMETANA G W. FDA-approved anti-obesity drugs in the United States[J]. The American Journal of Medicine, 2016, 129(8): 879. e1-879. e6.

[4] NGUYEN P T V,HUYNH H A,TRUONG D V,et al. Exploring aurone derivatives as potential human pancreatic lipase inhibitors through molecular docking and molecular dynamics simulations[J]. Molecules,2020,25(20):4657.

[5] NEWMAN D J, CRAGG G M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014[J]. Journal of Natural Products,2016,79(3):629-661.

[6] KARRI S,SHARMA S,HATWARE K,et al. Natural anti-obesity agents and their therapeutic role in management of obesity: a future trend perspective[J]. Biomedecine & Pharmacotherapie,2019,110:224-238.

[7] BUCHHOLZ T,CHEN C,ZHANG X Y,et al. Pancreatic lipase and $\alpha$-amylase inhibitory activities of plants used in Traditional Chinese Medicine (TCM)[J]. Pharmaceutical, 2016,71(7):420-424.

[8] LIU T T, LIU X T, HUANG G L, et al. Theophylline extracted from Fu Brick tea affects the metabolism of preadipocytes and body fat in mice as a pancreatic lipase inhibitor [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(5): 2525.

[9] JEONG J Y,JO Y H,KIM S B,et al. Pancreatic lipase inhibitory constituents from *Morus alba* leaves and optimization for extraction conditions[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters,2015,25(11):2269-2274.

[10] BIRARI R B, GUPTA S, MOHAN C G, et al. Antiobesity and lipid lowering effects of *Glycyrrhiza* chalcones: experimental and computational studies[J]. Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology,2011,18(8/9):795-801.

[11] GLISAN S L, GROVE K A, YENNAWAR N H, et al. Inhibition of pancreatic lipase by black tea theaflavins: comparative enzymology and in silico modeling studies[J]. Food Chemistry,2017,216:296-300.

[12] NAKAI M, FUKUI Y, ASAMI S, et al. Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase *in vitro*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005,53(11):4593-4598.

[13] SELLAMI M,LOUATI H,KAMOUN J,et al. Inhibition of pancreatic lipase and amylase by extracts of different spices and plants[J]. International Journal of Food Sciences and Nutrition,2017,68(3):313-320.

[14] VIVEK-ANANTH R P, RANA A, RAJAN N, et al. In silico identification of potential natural product inhibitors of human proteases key to SARS-CoV-2 infection[J]. Molecules,2020,25(17):3822.

[15] TAO X, HUANG Y K, WANG C, et al. Recent developments in molecular docking technology applied in food science: a review[J]. International Journal of Food Science & Technology,2020,55(1):33-45.

[16] NGUYEN L C, LE T T A, DANG T N, et al. Natural mimetic 4-benzyloxychalcones as potent pancreatic lipase inhibitors: virtual screening, synthesis and biological evaluation[J]. Phytochemistry Letters, 2022, 51: 28-33.

[17] WANG X Y, AI X, ZHU Z H, et al. Pancreatic lipase inhibitory effects of peptides derived from sesame proteins: in silico and *in vitro* analyses[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 222(Pt A): 1531-1537.

[18] 孙卫民,孙瑞元. 中药方剂研究的正交*t*值法[J]. 中药药理与临床,1992(1):41-45.
SUN W M,SUN R Y. Orthonal *t*-value method in traditional Chinese medicine formula research[J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica,1992 (1):41-45.(in Chinese)

[19] RU J L,LI P,WANG J N,et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. Journal of Cheminformatics,2014,6:13.

[20] EGLOFF M P,MARGUET F,BUONO G,et al. The 2.46 Å resolution structure of the pancreatic lipase-colipase complex inhibited by a C11 alkyl phosphonate [J]. Biochemistry,1995,34(9):2751-2762.

[21] MORRIS G M, HUEY R, LINDSTROM W, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility[J]. Journal of Computational Chemistry,2009,30(16):2785-2791.

[22] TROTT O,OLSON A J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading[J]. Journal of Computational Chemistry, 2010, 31(2): 455-461.

[23] 江慧芳,王雅琴,刘春国. 三种脂肪酶活力测定方法的比较及改进[J]. 化学与生物工程,2007,24(8):72-75.
JIANG H F, WANG Y Q, LIU C G. Comparison and improvement of three determination methods for lipase activity[J]. Chemistry & Bioengineering,2007,24(8): 72-75.(in Chinese)

[24] WILCOX M D,BROWNLEE I A,RICHARDSON J C, et al. The modulation of pancreatic lipase activity by alginates [J]. Food Chemistry, 2014, 146(100): 479-484.

[25] 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)：519-530.

[26] 刘睿，潘思轶，刘亮，等. 高粱原花青素对α-淀粉酶活力抑制动力学的研究[J]. 食品科学，2005，26(9)：189-192. LIU R，PAN S Y，LIU L，et al. Research of inhibition kinetics for activity of α-amylase by SPC[J]. Food Science，2005，26(9)：189- 192.(in Chinese)

[27] WANG S H，SUN Z Y，DONG S Z，et al. Molecular interactions between (−)-epigallocatechin gallate analogs and pancreatic lipase[J]. PLoS ONE，2014，9(11)：e111143.

[28] SALENTIN S，SCHREIBER S，HAUPT V J，et al. PLIP：fully automated protein-ligand interaction profiler[J]. Nucleic Acids Research，2015，43(W1)：W443-W447.

[29] YOUNGMAN L D，SHIGENAGA M，MOTCHNIK P，et al. Effects of a peroxisomal proliferator (PP) on plasma and tissue levels of Coenzyme Q9 (CoQ)，other antioxidants，and oxidative damage to DNA (oxo8dG)：evidence that PPs deplete antioxidants and increase oxidative damage to DNA[J]. Molecular Aspects of Medicine，1994，15(Suppl.1)：s131-s141.

[30] DLUDLA P V，SILVESTRI S，ORLANDO P，et al. Palmitate-induced toxicity is associated with impaired mitochondrial respiration and accelerated oxidative stress in cultured cardiomyocytes：the critical role of coenzyme $Q_{9/10}$[J]. Toxicology *in Vitro*，2020，68：104948.

[31] KAWAGUCHI K，MIZUNO T，AIDA K，et al. Hesperidin as an inhibitor of lipases from porcine pancreas and *Pseudomonas*[J]. Bioscience，Biotechnology，and Biochemistry，1997，61(1)：102-104.

[32] RAHIM A T M A，TAKAHASHI Y，YAMAKI K. Mode of pancreatic lipase inhibition activity *in vitro* by some flavonoids and non-flavonoid polyphenols[J]. Food Research International，2015，75：289-294.

[33] ZHANG G W，QUE Q M，PAN J H，et al. Study of the interaction between icariin and human serum albumin by fluorescence spectroscopy[J]. Journal of Molecular Structure，2008，881(1/2/3)：132-138.

[34] CHEN T T，ZHU S J，SHANG Y F，et al. Binding of dihydromyricetin to human hemoglobin：fluorescence and circular dichroism studies[J]. Spectrochimica Acta. Part A：Molecular and Biomolecular Spectroscopy，2012，93：125-130.

[35] DAS S，HAZARIKA Z，SARMAH S，et al. Exploring the interaction of bioactive kaempferol with serum albumin，lysozyme and hemoglobin：a biophysical investigation using multi-spectroscopic，docking and molecular dynamics simulation studies[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B：Biology，2020，205：111825.

[36] SHAHABADI N，MAGHSUDI M，KIANI Z，et al. Multispectroscopic studies on the interaction of 2-*tert*-butylhydroquinone (TBHQ)，a food additive，with bovine serum albumin[J]. Food Chemistry，2011，124(3)：1063-1068.

[37] XIAO F，CHEN Z，WEI Z X，et al. Hydrophobic interaction：a promising driving force for the biomedical applications of nucleic acids[J]. Advanced Science，2020，7(16)：2001048.

[38] BROWNLEE I A，FORSTER D J，WILCOX M D，et al. Physiological parameters governing the action of pancreatic lipase[J]. Nutrition Research Reviews，2010，23(1)：146-154.

（责任编辑：刘冬梅）