doi: 10.12301/spxb202200834 文章编号:2095-6002(2023)05-0110-13
引用格式:覃亚娟,王萍,陈小爱, 等. 3种黄酮类化合物对α-淀粉酶的抑制机制[J]. 食品科学技术学报,2023,41(5):110-122.
QIN Yajuan, WANG Ping, CHEN Xiaoai, et al. Inhibition mechanism of three flavonoids on α-amylase[J]. Journal of Food Science and Technology, 2023,41(5):110-122.

3种黄酮类化合物对α-淀粉酶的抑制机制

覃亚娟[1,3], 王 萍[1,2,*], 陈小爱[3], 徐 飞[3], 朱科学[3], 张彦军[3,*], 谭乐和[3]

(1. 东北林业大学 林学院,黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江省森林食品资源利用重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150040; 3. 中国热带农业科学院 香料饮料研究所/国家重要热带作物工程技术研究中心/海南省特色热带作物适宜性加工与品质控制重点实验室/海南省热带香料饮料作物工程技术研究中心,海南 万宁 571533)

摘 要: 黄酮类化合物可以通过抑制α-淀粉酶的活性来调节血糖水平,然而,黄酮类化合物对α-淀粉酶的抑制机制和二者构效关系的研究十分有限,特别是B环上的羟基化和C环上的糖基化对黄酮类化合物抑制α-淀粉酶的影响尚不清楚。为探究黄酮类化合物对α-淀粉酶的抑制机制和构效关系,分析了芦丁、槲皮素、山奈酚3种黄酮类化合物对α-淀粉酶的抑制类型、荧光淬灭特性、构象变化、结合力和结合位点。结果表明,山奈酚对α-淀粉酶的抑制能力最强,芦丁最弱。C环C3处的糖基化和B环C3'处的羟基化均削弱了黄酮类化合物对α-淀粉酶的抑制作用。淬灭亲和力被C环C3处的糖基增强,被B环C3'处的羟基削弱。3种黄酮类化合物主要通过氢键和疏水作用与α-淀粉酶自发结合,导致酶的结构和疏水微环境被改变,进而有效抑制α-淀粉酶的活性。研究旨在为富含黄酮类化合物的降血糖食品的开发和应用提供理论参考。

关键词: 黄酮类化合物; α-淀粉酶; 构效关系; 抑制机制; 分子对接
中图分类号: T201.2; TS231 **文献标志码**: A

淀粉是人类膳食的主要成分和最主要的能源物质,然而,淀粉类似于隐藏的糖,其快速消化会导致餐后血糖水平升高[1]。长期持续的餐后高血糖水平会造成胰岛素分泌异常,进而诱发糖尿病和心血管疾病等慢性病[2]。目前,预防和治疗高血糖主要通过改变饮食习惯,如控制高升糖食物的摄入或者在消化过程中干预葡萄糖的吸收等。据报道,α-淀粉酶是将淀粉水解为麦芽糖、低聚糖和少量葡萄糖的关键消化酶[3]。通过抑制α-淀粉酶的活性,能够延迟淀粉消化,抑制肠道对葡萄糖的吸收,有效调节体内血糖水平[4]。目前,一些抑制α-淀粉酶的药物常在临床上被用于降糖,如阿卡波糖、二甲双胍和瑞格列奈,但这些药物易引发低血糖、胃肠功能紊乱和体重增加等副作用[4]。因此,研究天然有效且副作

收稿日期: 2022-08-31
基金项目: 国家重点研发计划项目(2020YFD1001204); 中央级基本科研业务费项目(1630142022007); 海南省重点研发计划项目(ZDYF2022SHFZ122)。
Foundation: National Key Research and Development Program Project (2020YFD1001204); Central-Level Basic Research Business Fund (1630142022007); Hainan Province Key Research and Development Program Project (ZDYF2022SHFZ122).
第一作者: 覃亚娟,女,硕士研究生,研究方向为食品加工与食品安全。
*通信作者: 王 萍,女,教授,博士,主要从事植物活性物质分离及功能特性方面的研究;
张彦军,男,研究员,博士,主要从事热带作物加工方面的研究。

用少的 α-淀粉酶抑制剂是十分必要的。

黄酮类化合物是两个具有酚羟基的苯环通过中央三碳原子相互连结而成的天然化合物，其通常与羟基、糖基和甲氧基相连，广泛存在于各种植物中[5]。黄酮类化合物是一类有效的 α-淀粉酶抑制剂[6]。Wang 等[7]报道，荷叶类黄酮以混合型方式抑制 α-淀粉酶，其 IC_{50} 值为(5.58 ± 0.10) mg/mL；Zhou 等[8]研究发现，槲皮素能够通过抑制 α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶的活性来抑制苦荞淀粉的消化。此外，一些报道将抑制剂的结构与抑制能力进行关联，Yang 等[9]报道，黄芩素 C-6 处的甲氧基化显著降低了其对 α-葡萄糖苷酶的抑制能力；芹菜素上的 C2 ═C3 双键会削弱其对 α-淀粉酶的抑制作用[10]。目前，对黄酮类化合物和 α-淀粉酶的研究主要集中在分析植物提取物对 α-淀粉酶的抑制或对淀粉消化特性的影响方面。然而，对黄酮类化合物和淀粉酶之间作用机制及构效关系的研究鲜有报道，特别是 B 环上的羟基化和 C 环上的糖基化对黄酮类化合物抑制 α-淀粉酶的影响尚不清楚。

芦丁、槲皮素和山奈酚是 3 种典型的黄酮类化合物，广泛存在于多种热带植物中，如诺丽、番石榴和百香果等。此外，这 3 种黄酮类化合物的结构特征相似，区别在于其 B 环 C3' 和 C 环上 C3 的官能团有所不同。本研究拟选取这 3 种黄酮类化合物，通过考察它们对 α-淀粉酶的抑制作用，建立其抑制 α-淀粉酶的构效关系，确定黄酮类化合物发挥主要抑制作用的关键结构。采用抑制动力学、荧光光谱、圆二色谱探究这些关键结构对黄酮类化合物抑制 α-淀粉酶的影响，从而更好地理解黄酮类化合物抑制 α-淀粉酶的机制。此外，通过分子对接技术考察黄酮类化合物和 α-淀粉酶之间潜在的分子相互作用，探究黄酮类化合物抑制 α-淀粉酶的作用机制和构效关系，以期为具有更高降血糖活性的黄酮类化合物功能性食品的开发奠定理论基础。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

芦丁、槲皮素、山奈酚、阿卡波糖(质量分数均大于 98%)、猪胰腺 α-淀粉酶(14 U/mg)，上海源叶生物科技有限公司；可溶性淀粉，阿拉丁化工公司(上海)。其他试剂均为分析纯。

1.2　仪器与设备

SPECORD 250PLUS 型紫外可见分光光度计，德国耶拿公司；F-7000 型荧光分光光度计，日立高新技术公司；MOS-500 型圆二色谱仪，法国 Bio-Logic 公司；AL104 型电子天平，梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司；Cascada Ⅲ. Ⅰ10 型超纯水系统，美国 PALL 公司；GT SONIC-T20 型超声波清洗机，广东固特超声股份有限公司。

1.3　实验方法

1.3.1　黄酮类化合物对 α-淀粉酶抑制率的测定

根据 Zhang 等[11]的方法对 α-淀粉酶活性进行测定，稍加修改。将 500 μL 不同浓度的芦丁、槲皮素、山奈酚和阿卡波糖样品溶液分别与 250 μL 的 α-淀粉酶(7 U/mL)溶液在 37 ℃下孵育 20 min。将 500 μL 糊化后的可溶性淀粉溶液(10 mg/mL)添加到反应混合物中，在 37 ℃下孵育3 min。反应完毕后，迅速加入 1 mL 3,5-二硝基水杨酸试剂终止反应，并将反应产物在沸水中加热 8 min，冷却至室温后，用去离子水定容至 25 mL，用分光光度计记录溶液在 540 nm 处的吸光值。以阿卡波糖作为阳性对照。将所得结果代入式(1)计算样品对 α-淀粉酶的抑制率。用 Graphpad prism 9 计算 IC_{50} 值。

$$\text{抑制率} = \left[1 - \frac{A(\text{样品}) - A(\text{样品空白})}{A(\text{对照}) - A(\text{对照空白})}\right] \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中，A(样品)为样品溶液吸光值，A(样品空白)为样品空白溶液吸光值，A(对照)为对照溶液吸光值，A(对照空白)为对照空白溶液吸光值。

1.3.2　α-淀粉酶抑制动力学参数的计算

3 种黄酮类化合物对 α-淀粉酶的抑制模式由 **1.3.1** 中的方法确定。可溶性淀粉溶液的质量浓度为 5.0、7.5、10.0、12.5、15.0 mg/mL。米氏常数(K_m)和最大反应速度(V_{max})由 Lineweaver-Burk 方程确定，见式(2)。竞争性抑制常数(K_{ic})和非竞争性抑制常数(K_{iu})根据式(3)、式(4)通过二次线性拟合计算获得。

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

$$\text{斜率} = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{K_m}{K_{ic} V_{max}}[I]; \quad (3)$$

$$\text{截距} = \frac{1}{V'_{max}} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{1}{\alpha K_{iu} V_{max}}[I]。 \quad (4)$$

式(2)、(3)、(4)中,V 表示初始反应速率,mg/(mL·min);V_{max}表示最大反应速度,mg/(mL·min);K_m表示米氏常数,mg/mL;K_{ic}表示竞争性抑制常数,mg/mL;K_{iu}表示非竞争性抑制常数,mg/mL;[I]表示抑制剂质量浓度,mg/mL;α 表示表观系数。

1.3.3 荧光光谱分析

1.3.3.1 二维荧光光谱分析

采用荧光分光光度计测定 3 种黄酮类化合物与 α-淀粉酶的荧光淬灭光谱。将 0.2 mL 不同浓度的样品溶液与 3 mL α-淀粉酶溶液混合,分别在温度为 298、304、310 K 下反应 20 min。用磷酸盐缓冲液(PBS)代替样品作为对照组,激发波长 280 nm,发射波长 290 ~ 500 nm,狭缝宽度 5 nm。采用 Stern-Volmer 方程研究荧光淬灭类型,见式(5)。

$$\frac{F_0}{F}=1+K_q\tau_0[Q]=1+K_{sv}[Q]。\qquad(5)$$

式(5)中,F_0和 F 分别表示存在和不存在黄酮类化合物时的荧光强度;K_q表示荧光淬灭速率常数,L/(mol·s);τ_0表示荧光团的寿命,2.97 ns;K_{sv}表示 Stern-Volmer 淬灭常数,L/mol;[Q]表示淬灭剂的浓度,mol/L。

1.3.3.2 结合常数和结合位点数的计算

为进一步确定黄酮类化合物对 α-淀粉酶的抑制机制,参考 Yang 等[12]的方法,根据式(6)计算结合常数和结合位点数。

$$\lg\left(\frac{F_0-F}{F}\right)=\lg K_a+n\lg[Q]。\qquad(6)$$

式(6)中,K_a表示样品与 α-淀粉酶的结合常数,L/mol;n 是结合位点数;[Q]表示淬灭剂的浓度,mol/L。

1.3.3.3 热力学参数的计算

通过 van't Hoff 方程[式(7)和式(8)]计算与结合相互作用相关的热力学参数,以表征抑制剂与 α-淀粉酶结合的主要相互作用力。

$$\lg K_a=-\frac{\Delta G}{2.303R\cdot T}+\frac{\Delta S}{2.303R};\qquad(7)$$

$$\Delta G=\Delta H-T\Delta S。\qquad(8)$$

式(7)、(8)中,ΔH 表示焓变,kJ/mol;ΔS 表示熵变,kJ/(mol·K);ΔG 表示自由能变化,kJ/mol;R 表示气体常数,8.314 J/(mol·K);T 表示测试温度,K。

1.3.3.4 α-淀粉酶构象分析

采用荧光分光光度计检测 3 种黄酮类化合物与 α-淀粉酶三维荧光光谱。将 3 种黄酮类化合物和 α-淀粉酶溶液分别混合并孵育 20 min。激发波长(λ_{ex})为 200 ~ 350 nm,发射波长(λ_{em})为 200 ~ 400 nm,激发和发射间隔为 10 nm。

1.3.4 α-淀粉酶二级结构分析

采用圆二色谱仪分析 3 种黄酮类化合物对 α-淀粉酶二级结构的影响。将 0.5 mL 的样品溶液与 0.5 mL α-淀粉酶溶液混合,在 37 ℃下反应20 min。用 PBS 代替黄酮类化合物作为对照组。测定参数:路径长度为 0.1 cm,步长为 1 nm,波长为190 ~ 260 nm。在 DichroWeb 在线网站(http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk)上分析测试结果[12]。

1.3.5 分子对接

采用 AutoDock4.2 软件对 3 种黄酮类化合物与 α-淀粉酶进行分子对接,并得到结合能。α-淀粉酶(PDB ID:1OSE)的模型通过 RCSB 蛋白质数据库(http://www.rcsb.org/pdb)获得。芦丁、槲皮素和山奈酚的结构从 ZINC 数据库中下载。通过去除水分子、添加极性氢和 Kollman 联合原子电荷来处理黄酮类化合物和 α-淀粉酶的结构以获得 PDB 文件。采用拉马克遗传算法进行计算,搜索次数为 100 次。最后通过 PyMOL 和 Dicscover Studio 软件进行可视化分析,根据对接结果得到对接参数。

1.4 数据处理

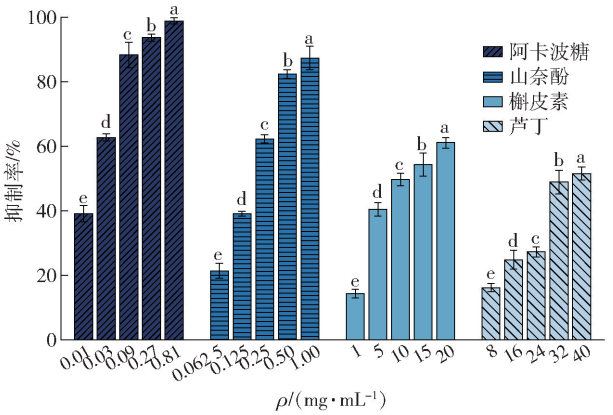
所有实验均重复 3 次,数据以平均值 ± 标准差表示。采用 SPSS 21.0.1 软件对实验结果进行显著性分析($P<0.05$ 为差异显著)。采用 Origin 2022 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 3 种黄酮类化合物对 α-淀粉酶的抑制效果

半数抑制浓度(IC_{50})通常被作为评价抑制剂对 α-淀粉酶的抑制活性的指标。3 种黄酮类化合物和阿卡波糖对 α-淀粉酶抑制率测定结果见图 1,3 种黄酮类化合物的分子结构见图 2,IC_{50}值的计算结果见表 1。

由图 1 可知,随着黄酮类化合物质量浓度的增加,其对 α-淀粉酶的抑制能力逐渐增强。由表 1 可知,3 种黄酮类化合物抑制 α-淀粉酶的 IC_{50}值的顺序由小到大依次为山奈酚、槲皮素、芦丁。由图 2 可知,山奈酚对 α-淀粉酶的抑制作用最强,这可能与其 B 环上 C3' 处的去羟基化有关。槲皮素 C



不同小写字母代表同一指标差异显著($P < 0.05$)。

图 1　3 种黄酮类化合物和阿卡波糖对 α-淀粉酶的抑制作用

Fig. 1　Inhibition effect of three flavonoids and acarbose on α-amylase

环上 C3 处的羟基糖基化后转变为芦丁，槲皮素抑制 α-淀粉酶的能力强于芦丁，可能与二者在此位置的基团不同有关。Wang 等[13]报道，从番石榴叶中分离出的槲皮素对 α-淀粉酶的抑制能力优于其糖苷，与本实验结果一致。虽然 3 种黄酮类化合物对 α-淀粉酶的抑制能力低于阿卡波糖，但其天然特性和酶抑制作用结果仍表明，黄酮类化合物可替代一部分阿卡波糖，进而减少降糖药物的用量。显然，黄酮类化合物对 α-淀粉酶的抑制作用与其分子结构密切相关，其中 B 环 C3' 处的羟基和 C 环 C3 处的糖基的有无对 α-淀粉酶的抑制作用十分重要。

2.2　3种黄酮类化合物对 α-淀粉酶的抑制类型分析

酶抑制动力学的类型分为竞争型、非竞争型和

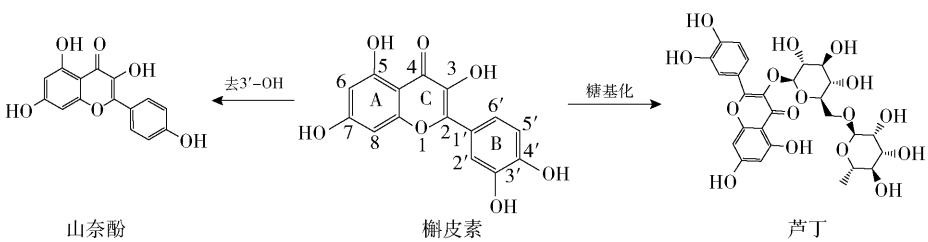


图 2　3 种黄酮类化合物的分子结构

Fig. 2　Molecular structures of three flavonoids

表 1　3 种黄酮类化合物和阿卡波糖抑制 α-淀粉酶的 IC_{50} 值

Tab. 1　IC_{50} values of three flavonoids and acarbose inhibiting α-amylase　　mg·mL^{-1}

	芦丁	槲皮素	山奈酚	阿卡波糖
IC_{50}	39.096 ± 3.134^{a}	10.413 ± 2.847^{b}	0.171 ± 0.021^{c}	0.015 ± 0.003^{c}

不同上标字母代表组间数据差异显著($P < 0.05$)。

混合型[14]，通过 Lineweaver-Burk 图可以确定 3 种黄酮类化合物对 α-淀粉酶的抑制类型和动力学参数，以更好地了解其抑制机制。3 种黄酮类化合物抑制 α-淀粉酶的 Lineweaver-Burk 图见图 3，动力学参数的计算结果见表 2。

由图 3（a）可见，不同浓度的芦丁对 α-淀粉酶的抑制曲线都呈线性拟合并相交于第二象限。同时，由表 2 可知，随着芦丁浓度的增加，V_{max} 值降低（$P < 0.05$），K_m 值增加（$P < 0.05$），表明芦丁诱导了混合型抑制的产生。槲皮素对 α-淀粉酶抑制类型亦为混合型抑制[图 3（b）]，另一项研究报道，槲皮素是 α-淀粉酶的竞争性抑制剂[8]，这种相反的结论，可能源于实验条件，特别是抑制剂浓度和酶纯度的差异[15]。另外，由图 3（c）可知，随山奈酚浓度的增加，V_{max} 基本不变（$P > 0.05$），但 K_m 值随着山奈酚浓度的增加而增加（$P < 0.05$），这表明山奈酚以竞争方式抑制 α-淀粉酶，意味着其可以与 α-淀粉酶的活性位点结合，与底物竞争。

抑制常数（K_i）是评估 α-淀粉酶与抑制剂结合能力的重要参数[3]，$1/K_i$ 值越高表明抑制剂与 α-淀粉酶的结合亲和力越强。由表 2 可知，芦丁的 K_{ic} 值和 K_{iu} 值分别为（9.31 ± 1.01 ）mg/mL 和（15.90 ± 0.88）mg/mL，K_{ic}/K_{iu} 的值低于 1，且 K_{ic} 值低于 K_{iu} 值，表明在混合型抑制中竞争型抑制占主导地位，意味着芦丁-α-淀粉酶复合物的结合能力高于芦丁-α-淀粉酶-底物。对于槲皮素而言，也可以得到相同

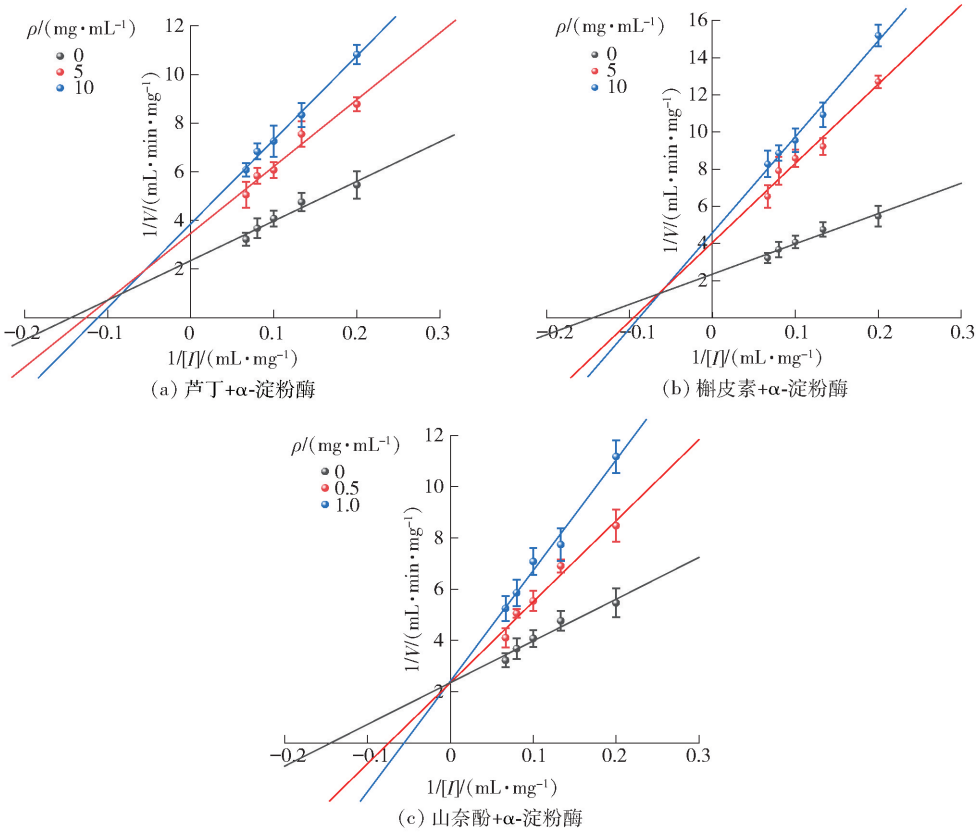


图 3 3 种黄酮类化合物抑制 α-淀粉酶的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线

Fig. 3 Lineweaver-burk double reciprocal curve of α-amylase inhibited by three flavonoids

表 2 3 种黄酮类化合物抑制 α-淀粉酶的动力学参数

Tab. 2 Kinetic parameters of α-amylase inhibited by three flavonoids mg·mL^{-1}

体系	ρ(黄酮类化合物)/(mg·mL^{-1})	抑制类型	V_{max}/(mg·mL^{-1}·min^{-1})	K_m	K_{ic}	K_{iu}
α-淀粉酶	0	–	0.43^{a}	6.94^{g}	*	&
芦丁+α-淀粉酶	5	混合型	0.29^{b}	7.94^{f}	9.31±1.01	15.90±0.88
	10		0.26^{c}	8.96^{e}		
槲皮素+α-淀粉酶	5	混合型	0.25^{d}	10.51^{d}	5.42±0.97	11.43±1.29
	10		0.22^{e}	11.28^{c}		
山奈酚+α-淀粉酶	0.5	竞争型	0.43^{a}	13.50^{b}	0.63±0.08	&
	1.0		0.42^{a}	17.94^{a}		

—表示无抑制类型，* 表示无竞争性抑制常数，& 表示无非竞争性抑制常数。同列数据不同上标字母代表组间数据差异显著($P<0.05$)。

的结论。由表 2 可知，芦丁的 K_{ic} 值远高于槲皮素，可能是其 C 环 C3 处的糖基增加了芦丁进入 α-淀粉酶活性腔时的空间位阻，阻碍了芦丁与 α-淀粉酶关键活性残基的结合，显著降低了芦丁与 α-淀粉酶的结合强度。山奈酚与 α-淀粉酶的结合亲和力[K_{ic} 值为(0.63±0.08) mg/mL]高于槲皮素[K_{ic} 值为(5.42±0.97) mg/mL]，这是由于其 B 环上 C3' 的去羟基化形成了竞争型抑制，导致山奈酚与 α-淀粉酶的结合更紧密。Lim 等[16]也报道了类似的结果，木樨草素(K_{ic} 值为 29.49 μmol·L^{-1})对 α-淀粉酶的结合亲和力高于 3′,4′-二羟基黄酮醇(K_{ic} 值为 399.92 μmol·L^{-1})。

2.3　3种黄酮类化合物对 α-淀粉酶荧光淬灭光谱的影响

2.3.1　淬灭类型分析

利用荧光淬灭光谱可以探究分子间的物理化学相互作用，例如碰撞淬灭、能量转移和基态复合物的形成等[17]。3 种黄酮类化合物与 α-淀粉酶相互作用的二维荧光光谱及 Stern-Volmer 图见图 4，荧光淬灭参数的计算结果见表 3。

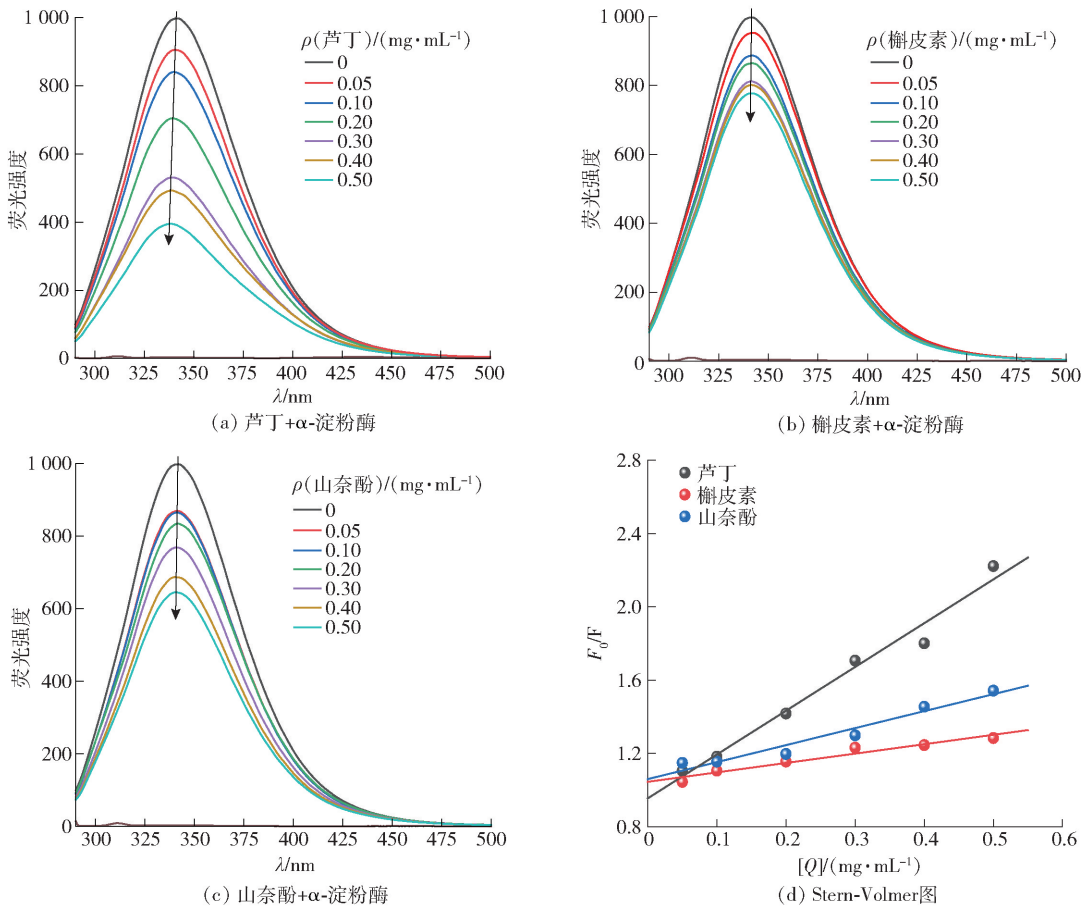


图 4　3 种黄酮类化合物与 α-淀粉酶相互作用的荧光光谱及 298 K 下 3 种黄酮类化合物抑制 α-淀粉酶的 Stern-Volmer 图

Fig. 4　Fluorescence spectra of interaction between three flavonoids and α-amylase, and Stern-Volmer plots of α-amylase inhibited by three flavonoids at 298 K

表 3　不同温度下 3 种黄酮类化合物抑制 α-淀粉酶的荧光淬灭参数和结合常数

Tab. 3　Fluorescence quenching parameters and binding constants of three flavonoids inhibiting α-amylase at different temperatures

黄酮类化合物	T/K	K_{SV}/(10^3 L·mol^{-1})	K_q/(10^{11} L·mol^{-1}·s^{-1})	R^a	K_a/(10^3 L·mol^{-1})	n	R^b
芦丁	298	1.901^a	6.406^a	0.978 2	6.924	1.193	0.985 7
	304	1.856^b	6.273^b	0.994 3	0.317	1.073	0.960 4
	310	1.762^c	5.973^c	0.972 6	0.181	0.936	0.981 2
槲皮素	298	0.153^a	0.521^g	0.984 7	0.040	0.880	0.966 7
	304	0.148^b	0.493^{gh}	0.990 5	0.023	0.929	0.969 1
	310	0.119^c	0.410^i	0.975 8	0.010	0.771	0.976 2
山奈酚	298	0.278^a	1.004^d	0.974 9	0.043	0.813	0.970 2
	304	0.267^b	0.921^e	0.989 4	0.030	0.885	0.974 0
	310	0.248^c	0.849^f	0.968 5	0.028	0.720	0.945 5

R^a是 K_{SV}值和 K_q值的相关系数，R^b是 K_a值的相关系数；同列数据不同上标字母代表组间数据差异显著（$P<0.05$）。

由图 4（a）、（b）和（c）可知，当激发波长位于 280 nm 时，在 342 nm 处出现 α-淀粉酶的最大发射峰。同时，最大发射峰的强度随着黄酮类化合物浓度的增加而降低，且最大发射波长出现蓝移。这表明，3 种黄酮类化合物可以通过与 α-淀粉酶结合来淬灭酶的固有荧光，并改变酶的构象和疏水微环境。橡子仁多酚对 α-葡萄糖苷酶的荧光发射光谱也显示了类似的影响，即微弱的蓝移表明 α-葡萄糖苷酶荧光团周围微环境的极性降低[18]。

由图 4（d）可知，3 种黄酮类化合物诱导的 α-淀粉酶的 Stern-Volmer 曲线都随着其浓度的增加呈现线性拟合，且 3 种黄酮类化合物对 α-淀粉酶的 K_{SV} 值与温度之间呈显著负相关（$P<0.05$）（表 3），这说明 3 种黄酮类化合物淬灭 α-淀粉酶的荧光过程中存在单一的淬灭机制。由表 3 可知，3 种黄酮类化合物的 K_q 值高于最大散射碰撞淬灭常数（2.0×10^{10} L/mol·s）（$P<0.05$），这进一步表明淬灭机制是静态淬灭而不是动态淬灭。此外，随着温度的升高，K_{SV} 值降低，表明较高的温度不利于黄酮类化合物与 α-淀粉酶结合，黄酮类化合物淬灭 α-淀粉酶的过程为放热反应过程。

2.3.2 结合常数和结合位点分析

为了进一步确定 3 种黄酮类化合物对 α-淀粉酶的抑制机制，分别计算了 3 种温度下 3 种黄酮类化合物对 α-淀粉酶荧光淬灭的结合常数 K_a 和结合位点数 n（表 3）。根据 Zheng 等[19]的研究，K_a 值代表抑制剂与酶的淬灭亲和力，K_a 值越大，抑制剂对酶的淬灭亲和力越强，抑制能力便越高。从表 3 可以看出，槲皮素的 K_a 值低于山奈酚，但其 IC_{50} 值高于山奈酚（表 1），该结果与 Zheng 等[19]的研究结论一致；相反，与槲皮素和山奈酚相比，芦丁的 K_a 值是最高的，但其对 α-淀粉酶的抑制能力却是最弱的。据 Soares 等[20]的研究，可能是芦丁的 C 环上 C3 处的糖基可以与 α-淀粉酶上更多的氨基酸残基结合，从而具有更高的 K_a 值，但芦丁与 α-淀粉酶的活性位点上的关键氨基酸残基的结合少于槲皮素和山奈酚，导致芦丁对 α-淀粉酶没有表现出强的抑制能力。此外，在 3 个温度下的 n 值都近似等于 1，这表明 3 种黄酮类化合物和 α-淀粉酶之间只有一个主要的结合位点[21]。

2.3.3 热力学参数和结合力分析

不同温度下 3 种黄酮类化合物与 α-淀粉酶相互作用的热力学参数计算结果见表 4。

表 4 不同温度下 3 种黄酮类化合物抑制 α-淀粉酶的热力学参数

Tab. 4 Thermodynamic parameters of three flavonoids inhibiting α-amylase at different temperatures

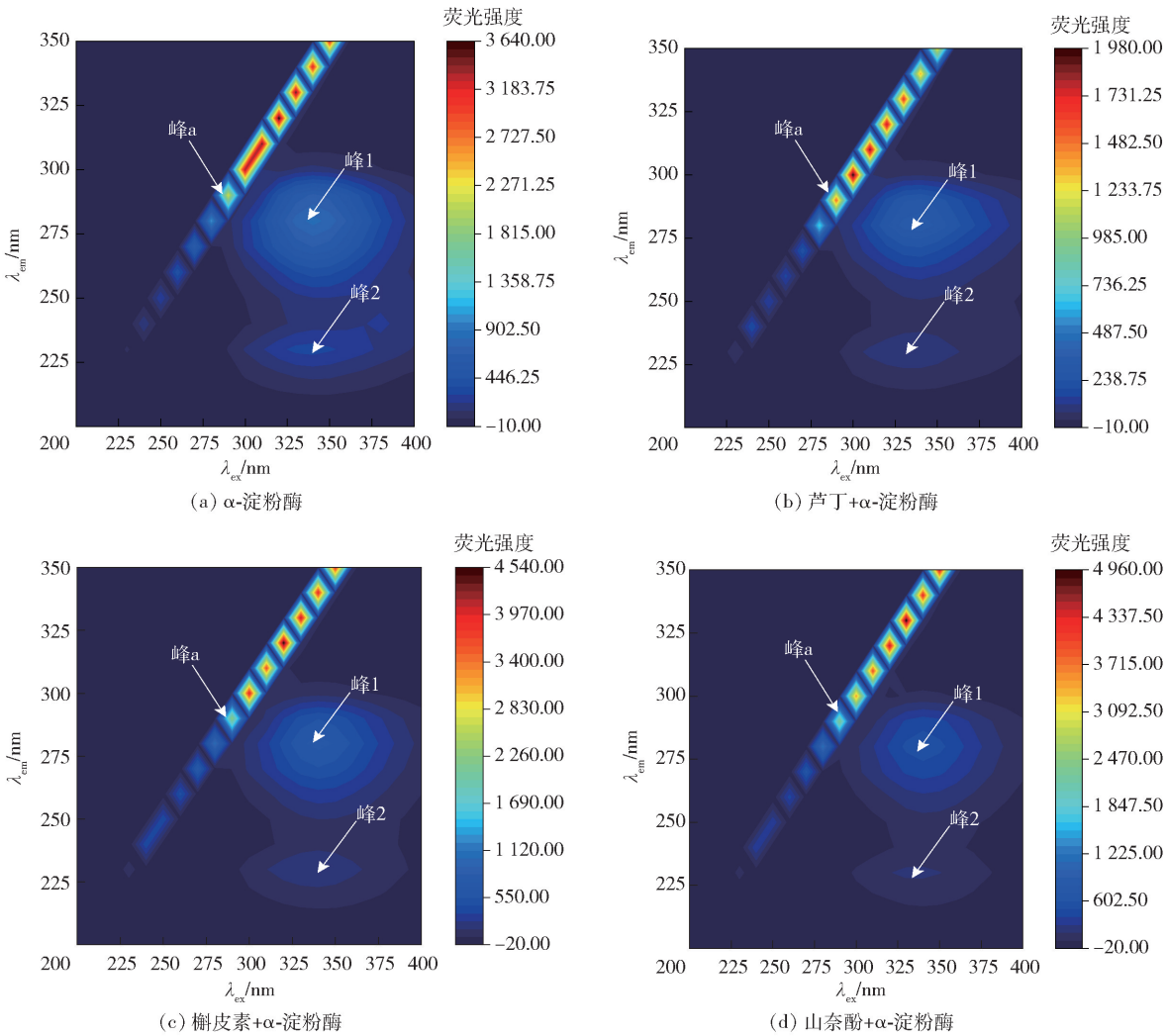
黄酮类化合物	T/K	ΔH/（kJ·mol^{-1}）	ΔS/（kJ·mol^{-1}·K^{-1}）	ΔG/（kJ·mol^{-1}）
芦丁	298	−220.58	−0.67	−20.13
	303			−16.77
	310			−12.06
槲皮素	298	−89.46	−0.27	−9.19
	303			−7.85
	310			−5.96
山奈酚	298	−19.99	−0.04	−9.07
	303			−8.88
	310			−8.63

由表 4 可知，在不同温度下，芦丁、槲皮素和山奈酚的 ΔG 值均为负值，表明了 3 种黄酮类化合物与 α-淀粉酶的相互作用是一个自发的过程。根据 Ross 等[22]的研究，$\Delta H<0$ 和 $\Delta S<0$ 表明黄酮类化合物和 α-淀粉酶的主要结合力为氢键。ΔG 和 ΔS 皆为负值表明结合反应主要是由焓驱动的放热反应过程，这与 K_{SV} 值随温度变化的结果一致。Yang 等[12]也报道了类似的结果，即紫甘薯中的二酰化花青素和 α-淀粉酶之间的结合反应是放热且由焓驱动的。

2.3.4 3种黄酮类化合物对 α-淀粉酶构象的影响

三维荧光光谱可用于进一步了解抑制剂与α-淀粉酶结合所引起的酶构象的变化。3 种黄酮类化合物对 α-淀粉酶的三维荧光光谱和荧光特征参数分别见图 5 和表 5。

据报道，天然的 α-淀粉酶中有 3 个峰，一个“脊状的”瑞利散射峰（峰 a）和两个“驼峰状”的主要荧光特征峰（峰 1 和峰 2）[14]。峰 1 主要反映了涉及 $\pi\rightarrow\pi^*$ 转变的蛋白质中色氨酸（Trp）和酪氨酸（Tyr）残基的光谱特征[23]。峰 2 是由多肽链骨架结构C ═O的 n→π * 电子跃迁产生的荧光峰，反映了 α-淀粉酶二级结构的修饰[24]。由图 5 可知，随着 3 种黄酮类化合物的加入，峰 1 和峰 2 的荧光强度降低。根据 Zhang 等[25]的说法，推断峰 1 的荧光强度降低可能是由于黄酮类化合物与 α-淀粉酶的稳定基态复合物的形成削弱了 α-淀粉酶中色氨酸和酪氨酸残基的荧光发射，进一步导致添加黄酮类化合



峰 a 为瑞利散射峰，峰 1、2 为主要荧光特征峰。

图 5　3 种黄酮类化合物与 α-淀粉酶相互作用的三维荧光光谱

Fig. 5　Three-dimensional fluorescence spectra of three flavonoids interacting with α-amylase

表 5　3 种黄酮类化合物与 α-淀粉酶相互作用的三维荧光特征参数

Tab. 5　Three-dimensional fluorescence characteristic parameters of interaction between three flavonoids and α-amylase

体系	峰	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$	Δλ/nm	荧光强度	强度下降率/%
α-淀粉酶	峰 1	280/340	60	853. 8	—
	峰 2	230/340	110	327. 5	—
α-淀粉酶 + 芦丁	峰 1	280/340	60	350. 8	58. 9
	峰 2	230/330	100	113. 8	65. 3
α-淀粉酶 + 槲皮素	峰 1	280/340	60	682. 8	20. 03
	峰 2	230/340	110	260	20. 6
α-淀粉酶 + 山奈酚	峰 1	280/340	60	568. 8	33. 38
	峰 2	230/330	100	209. 5	36. 1

—表示荧光强度无变化。

物后峰 1 的荧光强度降低。峰 2 的荧光强度显著降低,这可能是由于黄酮类化合物和 α-淀粉酶结合导致酶的多肽链失稳,改变了多肽链的疏水微环境,并暴露了一些先前埋藏的疏水区域[26]。与类黄酮相互作用的乳清蛋白分离物的荧光发射光谱显示了类似的结论[27]。由表 5 可知,3 种黄酮类化合物诱导 α-淀粉酶的荧光峰强度下降顺序由大到小为芦丁、山奈酚、槲皮素,这与 K_a 值的顺序一致。显然,3 种黄酮类化合物与 α-淀粉酶的结合影响了多肽链的延伸和折叠,导致 α-淀粉酶的构象发生变化,由此进一步证实了淬灭类型的结论。

2.4 3种黄酮类化合物对 α-淀粉酶二级结构的影响

圆二色谱可用于探究蛋白质二级结构的变化。有无黄酮类化合物时,α-淀粉酶的圆二色谱见图 6,二级结构的变化见表 6。

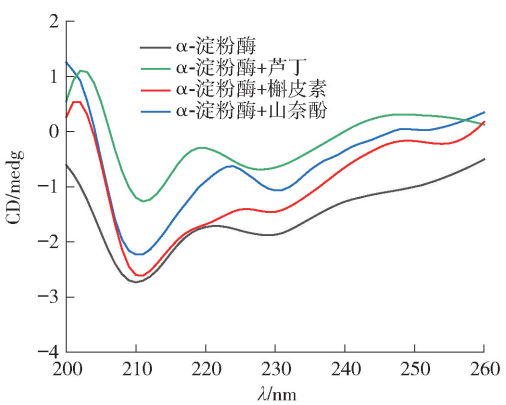


图 6 黄酮类化合物与 α-淀粉酶相互作用的圆二色谱

Fig. 6 Circular dichroism of flavonoids interacting with α-amylase

表 6 3 种黄酮类化合物对 α-淀粉酶二级结构的影响

Tab. 6 Effect of three flavonoids on secondary structure of α-amylase %

体系	α-螺旋	β-折叠	β-转角	无规则卷曲
α-淀粉酶	6.2	39.2	21.8	32.9
α-淀粉酶+芦丁	5.0	39.6	23.0	32.4
α-淀粉酶+槲皮素	5.8	38.1	22.9	33.1
α-淀粉酶+山奈酚	5.4	39.2	23.3	32.1

由图 6 可知,α-淀粉酶在 210、229 nm 波长处有两个负峰。随着黄酮类化合物的加入,两个负峰的强度显著降低,表明 α-淀粉酶的二级结构发生了改变。由表 6 可知,芦丁和山奈酚的加入降低了 α-螺旋和无规则卷曲的比例,增加了 β-转角的比例。槲皮素的加入降低了 α-螺旋和 β-折叠的比例,增加了 β-转角和无规则卷曲的比例。这表明 3 种黄酮类化合物诱导了 α-淀粉酶的二级结构的变化,改变了酶的空间构象,从而影响了底物与酶活性位点的结合。Dai 等[28]也报道了类似的结果,即表没食子儿茶素没食子酸酯改变了 α-淀粉酶的二级结构。

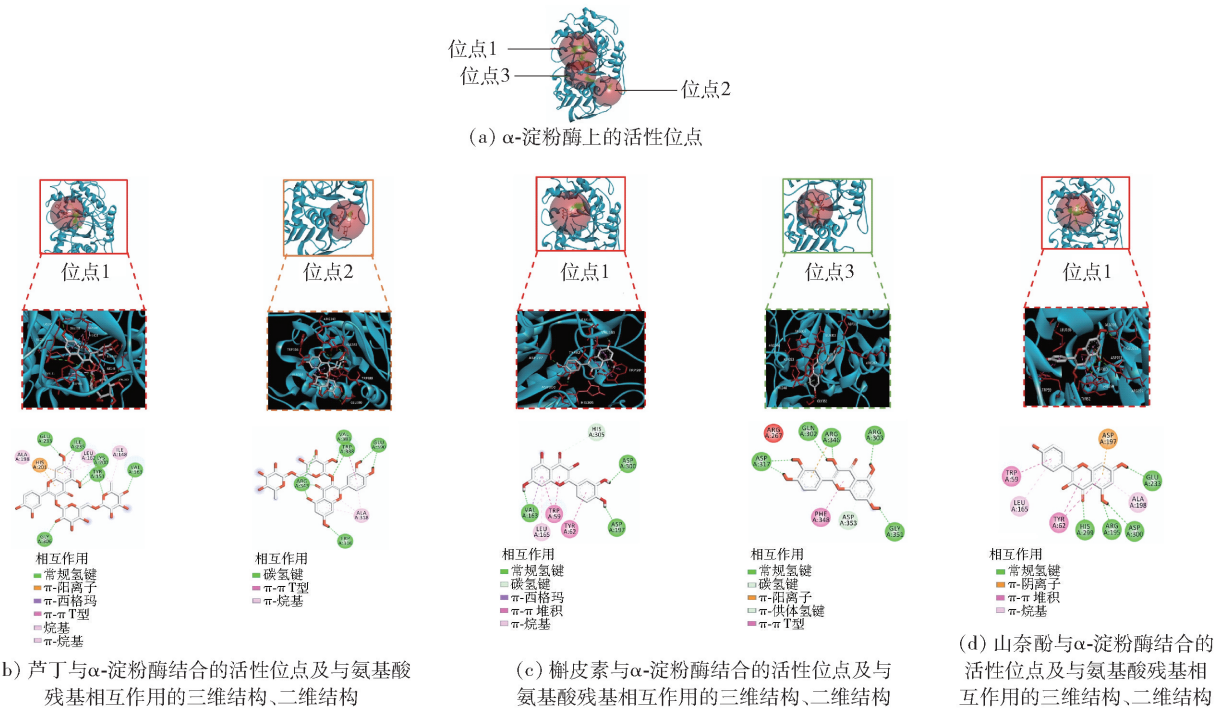
2.5 3种黄酮类化合物与 α-淀粉酶相互作用的可视化分析

分子对接是一种可视化小分子与蛋白质相互作用的结合力、结合位点和结合能的新型研究手段。图 7 是 3 种黄酮类化合物与 α-淀粉酶的对接结果。

由图 7 可知,芦丁、槲皮素和山奈酚均能与 α-淀粉酶的活性位点 1 结合,该位点由氨基酸残基 Glu-233、Ile-235、Leu-162、Lys-200、Tyr-151、Lie-148、Val-163、Gly-306、His-201、Ala-198、His-305, Tyr-62、Asp-300、Leu-165、Asp-197、His-299、Arg-195 和 Trp-59 构建。据报道,Asp-197、Glu-233 和 Asp-300 是 α-淀粉酶上的关键氨基酸残基,其在催化机制中起重要作用[29]。由此推断,3 种黄酮类化合物通过占据 α-淀粉酶上的主要活性位点,竞争性地阻碍底物进入主要活性位点,进而导致酶的催化活性降低。同时,芦丁、槲皮素和山奈酚的最低结合能分别为 −5.37、−6.68、−7.06 kcal/mol,该顺序与 IC_{50} 值和 K_{ic} 值的顺序一致(表 1 和表 2)。此外,由图 7 (b)和(c)可知,芦丁和槲皮素也能插入到位点 2 和位点 3 中,最低结合能分别为 −4.02、−4.28 kcal/mol,表明芦丁和槲皮素与 α-淀粉酶结合也表现出非竞争性行为。根据 Dai 等[30]的报道,小分子与蛋白质的结合能越低,结合结构越稳定。芦丁和槲皮素在竞争性模式下的结合能低于非竞争模式,说明两者主要以竞争性的方式抑制 α-淀粉酶,这与抑制动力学中抑制类型的结果一致。

图 7 (b)可知,芦丁主要被 10 个氨基酸残基包围,结合力主要为氢键和疏水作用。芦丁 C 环上 C3 处的糖基与 Tyr-151、Val-163 和 Gly-306 形成了 3 个氢键;与 Tyr-151 产生了 1 个 π-烷基;与 Leu-162 和 Lie-148 产生了 2 个烷基。与槲皮素和山奈酚相比,芦丁 C 环上 C3 处的糖基扩大了共轭体系,能够结合活性位点周围更多的氨基酸残基,进而产生最强的结合亲和力,即 K_a 值最高(表 3)。

由图 7 (c)可知,槲皮素主要被 7 个氨基酸残基包围,包括 Val-163、Trp-59、Leu-165、Tyr-62、Asp-197、Asp-300 和 His-305。Asp-300 和 Asp-197 分别



(a) α-淀粉酶上的活性位点

(b) 芦丁与α-淀粉酶结合的活性位点及与氨基酸残基相互作用的三维结构、二维结构

(c) 槲皮素与α-淀粉酶结合的活性位点及与氨基酸残基相互作用的三维结构、二维结构

(d) 山奈酚与α-淀粉酶结合的活性位点及与氨基酸残基相互作用的三维结构、二维结构

图 7　3 种黄酮类化合物与 α-淀粉酶的分子对接结果

Fig. 7　Molecular docking results of three flavonoids and α-amylase

与 B 环上 C 3' 和 C 4' 处的羟基形成氢键；与 Tyr-62 形成 π-π 堆积。Yang 等[9]的报道表明，抑制剂的抑制能力随着分子骨架上氢原子的羟基化而增加，但在本研究中，B 环上 C3' 处的羟基化削弱了槲皮素抑制 α-淀粉酶的能力，可能是由于槲皮素只能与关键活性位点残基 Asp-197 和 Asp-300 相互作用，进而造成其抑制 α-淀粉酶的能力强于芦丁（仅与 Glu-233 相互作用），弱于山奈酚（与 Asp-197、Glu-233 和 Asp-300 相互作用）。Liao 等[31]也报道了相似的结果，他们发现芹菜素（无 C3' 羟基）对 α-淀粉酶的抑制作用强于木樨草素（有 C3' 羟基）。

由图 7（d）可知，山奈酚和氨基酸残基（Glu-233、Asp-300、His-299 和 Arg-195）之间形成 4 个氢键。此外，还可以观察到 2 种疏水作用，包括 Leu-165 和 Ala-198 通过 2 个 π-烷基与山奈酚相互作用；Trp-59、Tyr-62 通过 4 个 π-π 堆积与山奈酚相互作用。研究证实，氢键会影响抑制剂的构象，进而影响抑制剂与固有荧光残基（Trp、Tyr 和 Phe）的相互作用[32-33]。由图 7（c）和（d）可知，相对于槲皮素，山奈酚 B 环上 C3' 处的去羟基化阻碍了 B 环上氢键的形成（Asp-300 和 Asp-197），使得山奈酚 B 环的旋转度大于槲皮素，进而增强了山奈酚 B 环的空间自由度。这种空间构型更有利于山奈酚与荧光残基（Trp-59 和 Tyr-62）产生 π-π 堆积，表现出更强的荧光淬灭效果，即 K_a 值大于槲皮素（表 3）。

3　结　论

研究了 3 种黄酮类化合物对 α-淀粉酶的抑制机制和构效关系。结果表明，三者均以浓度依赖性方式抑制 α-淀粉酶的活性，对 α-淀粉酶的抑制能力顺序由大到小依次为山奈酚、槲皮素、芦丁，其中，山奈酚竞争性地抑制 α-淀粉酶，芦丁和槲皮素则表现出混合抑制作用。3 种黄酮类化合物对 α-淀粉酶的抑制作用与其分子结构密切相关。C 环上 C3 处的糖基化削弱了芦丁对 α-淀粉酶的抑制能力，增强了淬灭亲和力；B 环上 C3' 处的羟基化降低了槲皮素对 α-淀粉酶的抑制能力和淬灭亲和力。荧光淬灭结果表明，黄酮类化合物通过单一的静态机制有效地淬灭 α-淀粉酶的固有荧光。结合常数和热力学参数进一步揭示了 α-淀粉酶上存在单个高亲和力结合位点，黄酮类化合物与 α-淀粉酶的结合是自发的由焓驱动的放热反应。三维荧光光谱研究表明，3 种黄酮类化合物诱导了 α-淀粉酶构象的变化，部分氨基酸残基的疏水微环境受到二者结合的调控。圆二色谱分析结果表明，黄酮类化合物的加入改变了 α-淀粉酶的二级结构。此外，通过分子对接观察了

3 种黄酮类化合物与 α-淀粉酶结合的可能构象,表明黄酮类化合物 B 环上 C3' 的羟基和 C 环上 C3 处的糖基与结合稳定性密切相关。研究结果旨在为黄酮类物质的改性和预防高血糖功能食品的开发等提供一定的理论参考。

参考文献:

[1] MOZAFFARIAN D. Dietary and policy priorities to reduce the global crises of obesity and diabetes[J]. Nature Food, 2020, 1(1): 38 – 50.

[2] ALATRACH M, AGYIN C, MEHTA R, et al. Glucose-mediated glucose disposal at baseline insulin is impaired in IFG[J]. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2019, 104(1): 163 – 171.

[3] SUN L J, WANG Y Y, MIAO M. Inhibition of α-amylase by polyphenolic compounds: substrate digestion, binding interactions and nutritional intervention[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 104: 190 – 207.

[4] LIU Y T, ZENG S Q, JI W, et al. Emerging theranostic nanomaterials in diabetes and its complications[J]. Advanced Science, 2022, 9(3): 2102466.

[5] SHEN N, WANG T F, GAN Q, et al. Plant flavonoids: classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity[J]. Food Chemistry, 2022, 383: 132531.

[6] RASOULI H, HOSSEINI-GHAZVINI S M, ADIBI H, et al. Differential α-amylase/α-glucosidase inhibitory activities of plant-derived phenolic compounds: a virtual screening perspective for the treatment of obesity and diabetes[J]. Food & Function, 2017, 8(5): 1942 – 1954.

[7] WANG M T, SHI J Y, WANG L, et al. Inhibitory kinetics and mechanism of flavonoids from lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) leaf against pancreatic α-amylase[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 120: 2589 – 2596.

[8] ZHOU Y M, JIANG Q Y, MA S J, et al. Effect of quercetin on the *in vitro* Tartary buckwheat starch digestibility [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 183: 818 – 830.

[9] YANG J C, YANG J C, WANG X L, et al. Comparative study of inhibition mechanisms of structurally different flavonoid compounds on α-glucosidase and synergistic effect with acarbose[J]. Food Chemistry, 2021, 347(9): 129056.

[10] TADERA K, MINAMI Y J, TAKAMATSU K, et al. Inhibition of α-glucosidase and α-amylase by favonoids [J]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 2006, 52(2): 149 – 153.

[11] ZHANG H L, WU Q X, QING X M. Camellia nitidissima Chi flower extracts inhibit α-amylase and α-glucosidase: *in vitro* by analysis of optimization of addition methods, inhibitory kinetics and mechanisms [J]. Process Biochemistry, 2019, 86(1): 177 – 185.

[12] YANG Y, ZHANG J L, SHEN L H, et al. Inhibition mechanism of diacylated anthocyanins from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) against α-amylase and α-glucosidase[J]. Food Chemistry, 2021, 359(35): 129934.

[13] WANG H, DU Y J, SONG H C. α-Glucosidase and α-amylase inhibitory activities of guava leaves[J]. Food Chemistry, 2010, 123(1): 6 – 13.

[14] ZHAO Y L, WANG M, HUANG G H. Structure-activity relationship and interaction mechanism of nine structurally similar flavonoids and α-amylase[J]. Journal of Functional Foods, 2021, 86(2): 104739.

[15] DESSEAUX V, STOCKER P, BROUANT P, et al. The mechanisms of alpha-amylase inhibition by flavan-3-Ols and the possible impacts of drinking green tea on starch digestion[J]. Journal of Food Science, 2018, 83(11): 2858 – 2865.

[16] LIM J B, FERRUZZIB M, HAMAKER B. Structural requirements of flavonoids for the selective inhibition of α-amylase versus α-glucosidase[J]. Food Chemistry, 2022, 370(9): 130981.

[17] SU H, RUAN Y T, LI Y, et al. *In vitro* and *in vivo* inhibitory activity of taxifolin on three digestive enzymes [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 150: 31 – 37.

[18] WU M X, YANG Q X, WU Y W, et al. Inhibitory effects of acorn (*Quercus variabilis* Blume) kernel-derived polyphenols on the activities of α-amylase, α-glucosidase, and dipeptidyl peptidase IV[J]. Food Bioscience, 2021, 43(4): 101224.

[19] ZHENG Y X, TIAN J H, YANG W H, et al. Inhibition mechanism of ferulic acid against α-amylase and α-glucosidase [J]. Food Chemistry, 2020, 317 (2): 126346.

[20] SOARES S, MATEUS N, FREITAS V. Interaction of different polyphenols with bovine serum albumin (BSA) and human salivary α-amylase (HSA) by fluorescence quenching[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(16): 6726 – 6735.

[21] 张南海, 金雨楠, 陈怡冉, 等. 阿魏酸对黄嘌呤氧化酶的抑制机理[J]. 食品科学技术学报, 2023, 41(1): 115 – 125.

ZHANG N H, JIN Y N, CHEN Y R, et al. Inhibitory mechanism of ferulic acid on xanthine oxidase[J]. Journal of Food Science and Technology, 2023, 41(1): 115 – 125.

[22] ROSS P D, SUBRAMANIAN S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability[J]. Biochemistry, 1981, 20(11): 3096 – 3102.

[23] GALDON B R, CORRALIZA C P, CARRILLO J J C, et al. Spectroscopic study of the interaction between lycopene and bovine serum albumin[J]. Luminescence, 2013, 28(5): 765 – 770.

[24] GLAZER A N, SMITH E L. Studies on the ultraviolet difference spectra of proteins and polypeptides[J]. Journal of Biological Chemistry, 1961, 236(11): 2942 – 2948.

[25] ZHANG K Y, WEN Q Y, LI T Q, et al. Comparison of interaction mechanism between chlorogenic acid/luteolin and glutenin/gliadin by multi-spectroscopic and thermodynamic methods[J]. Journal of Molecular Structure, 2021, 1246(3): 131219.

[26] CHEN Z Q, CHEN Y, XUE Z H, et al. Insight into the inactivation mechanism of soybean BowmanBirk trypsin inhibitor (BBTI) induced by epigallocatechin gallate and epigallocatechin: fluorescence, thermodynamics and docking studies[J]. Food Chemistry, 2021, 303(12): 125380.

[27] LI J Q, TIAN R, LIANG G Z, et al. Interaction mechanism of flavonoids with whey protein isolate: a spectrofluorometric and theoretical investigation[J]. Food Chemistry, 2021, 355(12): 129617.

[28] DAI T T, LI T, HE X H, et al. Analysis of inhibitory interaction between epigallocatechin gallate and alpha-glucosidase: a spectroscopy and molecular simulation study[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2020, 230, 118023.

[29] MACGREGOR E, JANEČEKB Š, SVENSSONC B. Relationship of sequence and structure to specificity in the α-amylase family of enzymes[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 2001, 1546(1): 1 – 20.

[30] DAI T, CHEN J, MCCLEMENTS D J, et al. Investigation the interaction between procyanidin dimer and α-glucosidase: spectroscopic analyses and molecular docking simulation[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 130(8): 315 – 322.

[31] LIAO L P, CHEN J, LIU L L, et al. Screening and binding analysis of flavonoids with alpha-amylase inhibitory activity from lotus leaf[J]. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2017, 29(3): 587 – 593.

[32] CHENG N, YI W, WANG Q, et al. Synthesis and α-glucosidase inhibitory activity of chrysin, diosmetin, apigenin, and luteolin derivatives[J]. Chinese Chemical Letter, 2014, 25(7): 1094 – 1098.

[33] MUNISHKINA L, FINK A. Fluorescence as a method to reveal structures and membrane-interactions of amyloidogenic proteins[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2007, 1768(8): 1862 – 1885.

Inhibition Mechanism of Three Flavonoids on α-Amylase

QIN Yajuan[1,3], WANG Ping[1,2,*], CHEN Xiaoai[3], XU Fei[3], ZHU Kexue[3], ZHANG Yanjun[3,*], TAN Lehe[3]

(1. *College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin* 150040, *China*; 2. *Key Laboratory of Forest Food Resources Utilization of Heilongjiang Province, Harbin* 150040, *China*; 3. *Spice and Beverage Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/National Center of Important Tropical Crops Engineering and Technology Research/Key Laboratory of Processing Suitability and Quality Control of the Special Tropical Crops of Hainan Province/Hainan Provincial Engineering Research Center of Tropical Spice and Beverage Crops, Wanning* 571533, *China*)

Abstract: Flavonoids can regulate blood sugar levels by inhibiting the activity of α-amylase. However, there were very limited research on the inhibitory mechanism and structure-activity relationship of flavonoids on α-amylase. Especially, the effects of hydroxylation on the B ring and glycosylation on the C ring related to the inhibitory ability of flavonoids on α-amylase were still unclear. Therefore, in order to

explore the inhibitory mechanism and structure-activity relationship of flavonoids on α-amylase, the types of inhibition, fluorescence quenching properties, conformational changes, binding force and binding sites of three flavonoids (rutin, quercetin and kaempferol) were investigated in this study. The results showed that kaempferol had the strongest ability to inhibit α-amylase and rutin had the weakest ability to inhibit α-amylase, respectively. The inhibitory effect of flavonoids was attenuated by glycosylation at C3 on the C ring and hydroxylation at C3' on the B ring. The quenching affinity was enhanced by a glycosyl group at C3 on the C ring and weakened by a hydroxyl group at C3' on the B ring. Hydrogen bonds and hydrophobic interactions caused the spontaneous binding between the flavonoids and α-amylase, which changed structure and hydrophobic microenvironment of α-amylase, and inhibited α-amylase activity effectively. The purpose of this study was to provide theoretical support for the development and application of hypoglycemic foods rich in flavonoids.

Keywords: flavonoids; α-amylase; structure-activity relationship; inhibition mechanisms; molecular docking

(责任编辑:叶红波)

(上接第 75 页)

corticosterone-induced damage of rat pheochromocytoma (PC12) cells by cell viability, cell apoptosis, leakage of extracellular lactate dehydrogenase, and intracellular calcium level, and investigated its mechanisms by western blotting. The results showed that WP (75, 150 μg/mL) pretreatment could protect cell by significantly reversing the cell viability decrease, cell apoptosis, LDH release increase, and overload of intracellular calcium in PC12 cells treated with corticosterone. In addition, WP significantly increased the activity of cAMP-dependent protein kinase A (PKA), reduced the level of Ser133 phosphorylation of cAMP response element binding protein (CREB) and the expression of downstream target protein brain-derived neurotrophic factor (BDNF), which were decreased by corticosterone treatment. Furthermore, pretreatment with PKA inhibitor H89 abolished the protective effects of WP on corticosterone induced PC12 cells, indicating that up-regulation of PKA/CREB/BDNF neurotrophic signaling pathway was required for WP neuroprotective effects against corticosterone. These results suggested that WP might have potential antidepressant activity and be an important material basis in the antidepressant effect of walnut diet. The cytoprotective effect of WP on PC12 cells was related to the up-regulation of PKA/CREB/BDNF neurotrophic signaling pathway. The research results aimed to explore the potential antidepressant activity and mechanism of walnut polyphenols, and provided theoretical reference for the high-value utilization of walnut meal.

Keywords: walnut polyphenols; corticosterone; PC12 cells; mental stress; neurotrophic pathway

(责任编辑:叶红波　郝一铭)