

枇杷幼果总黄酮提取物对脂肪酶的抑制效应及机制

黄桂丽, 马佳佳, 隋思瑶, 孙灵湘, 王毓宁*

(苏州市农业科学院, 苏州 215105)

摘要: **目的** 研究天然提取物枇杷幼果总黄酮对脂肪酶活性的抑制效应。**方法** 采用抑制率、抑制动力学以及荧光淬灭等方法研究枇杷幼果总黄酮对脂肪酶的作用。**结果** 枇杷幼果总黄酮对脂肪酶有较为显著的抑制作用, 半抑制浓度为 $(54.51 \pm 4.07) \mu\text{g/mL}$, 以竞争性与非竞争性相混合的方式抑制脂肪酶活性, 且枇杷幼果总黄酮能抑制脂肪酶的荧光强度。**结论** 枇杷幼果总黄酮提取物能与脂肪酶结合, 进而抑制脂肪酶的活性。

关键词: 枇杷幼果; 总黄酮; 脂肪酶; 抑制机制

Mechanism for the inhibitory effect of total flavonoids from young loquat fruit on lipase activity

HUANG Gui-Li, MA Jia-Jia, SUI Si-Yao, SUN Ling-Xiang, WANG Yu-Ning*

(Suzhou Academy of Agricultural Sciences, Suzhou 215105, China)

ABSTRACT: Objective To study the inhibitory effect of natural extract total flavonoids from young loquat fruit on lipase activity. **Methods** The effects of total flavonoids from young loquat fruit on lipase were examined by the inhibitory rate, kinetics and fluorescence quenching. **Results** The total flavonoids of loquat young fruit had a significant inhibitory effect on lipase, and the half inhibitory concentration was $(54.51 \pm 4.07) \mu\text{g/mL}$, which inhibited the lipase activity in a competitive and non competitive way, and the total flavonoids of loquat young fruit could inhibit the fluorescence intensity of lipase. **Conclusion** The total flavonoids extract of loquat young fruit can combine with lipase and inhibit the activity of lipase.

KEY WORDS: young loquat fruit; total flavonoids; lipase; inhibitory mechanism

0 引言

肥胖容易诱导引发各种代谢疾病, 特别是 II 型糖尿病、心脑血管疾病、高血压和高血脂, 同时会增加患胃肠道肿瘤的风险^[1]。肥胖的形成与人体脂肪代谢密切相关。脂肪酶是膳食脂肪水解的关键酶, 它可将脂肪水解成游离

脂肪酸、甘油和甘油单酯或二酯。BIALECKA 等^[2]研究发现通过抑制脂肪酶的活性, 降低膳食中脂肪的水解程度, 减少脂肪吸收, 可以起到减肥作用。目前, 脂肪酶抑制剂的开发和利用受到广泛关注。

枇杷(*Eriobotrya japonica* Lindl.)是蔷薇科枇杷属植物, 属于药食同源, 主要种植在浙江、江苏、福建、安徽、四

基金项目: 苏州市科技计划项目(SNG201909)、苏州市农业科学院资助项目(KJ(18)101)

Fund: Supported by the Project of the Science and Technology Foundation of Suzhou (SNG201909), and Suzhou Academy of Agricultural Sciences (KJ(18)101)

*通信作者: 王毓宁, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为果蔬保鲜加工。E-mail: wyn705@163.com

*Corresponding author: WANG Yu-Ning, Master, Associate Professor, Suzhou Academy of Agricultural Sciences, Suzhou 215105, China. E-mail: wyn705@163.com

川等长江以南各省,是我国南方最具发展潜力的特色水果之一^[3]。枇杷在种植的过程中,果农们会定期进行疏花疏果,以提高该果实品质^[4-5]。前期研究中我们优化提取了枇杷幼果的总黄酮^[5]。黄酮类化合物是植物次生代谢物,在医药、食品领域有着广泛的应用^[6],具有抑菌、消炎、降血压、抗肿瘤等多种生物学功能^[7-10]。公衍玲等^[6]发现盐地碱蓬总黄酮能够抑制胰脂肪酶的活性。

目前关于枇杷幼果总黄酮提取物对脂肪酶的作用尚未见相关报道。鉴于此,本研究拟通过酶抑制动力学、荧光淬灭等实验方法考察枇杷幼果总黄酮提取物对脂肪酶的影响,揭示枇杷幼果总黄酮提取物抑制脂肪酶的动力学机制。本研究对推动枇杷幼果总黄酮提取物在食品、医药领域的应用,开发新型降脂保健品具有一定的参考意义,并为肥胖的预防和治疗提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

枇杷幼果采于江苏省苏州市东山镇。

米黑毛霉脂肪酶[EC3.1.1.3],酶活 ≥ 1000 U/mg,上海阿拉丁公司;对硝基苯酚棕榈酸(4-nitrophenylpalmitat, 4-NPP, 纯度 $\geq 98\%$)、芦丁(纯度 $\geq 98\%$)(美国 Sigma 公司);无水乙醇(分析纯)、硝酸铝、氢氧化钠、亚硝酸钠(化学纯,上海国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

Beckman DU800 全自动多功能酶标仪(瑞士 Omega 公司);Cary Eclipse 荧光分光光度计(美国 Agilent 公司);ME104E 电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

1.3 实验方法

1.3.1 枇杷幼果总黄酮提取纯化

枇杷幼果→烘干→粉碎→过筛→称重→超声波浸提抽提→过滤→枇杷幼果总黄酮粗提液→AB-8 树脂纯化→枇杷幼果总黄酮纯化物。枇杷幼果总黄酮纯化物的纯度为 74.4%^[5]。

1.3.2 枇杷幼果总黄酮对脂肪酶活性的影响

参照 LIU 等^[11]的实验方法。在 3 mL 的反应体系中,依次加入 Tris-HCl 缓冲液 pH 7.8(50 mmol/L)、双蒸水、脂肪酶底物 4-NPP(0.75 mmol/L)、不同浓度的枇杷幼果总黄酮溶液,最后加入脂肪酶溶液混匀,在 37 °C、OD_{405 nm} 下进行测定。

1.3.3 枇杷幼果总黄酮对脂肪酶活性的抑制机制

参考 DU 等^[12]的实验方法。在 3 mL 的反应体系中,改变脂肪酶的浓度,测定不同抑制剂浓度下的酶反应初速度,以反应初速度对酶浓度作图。

1.3.4 枇杷幼果总黄酮对脂肪酶活力的抑制类型

在 3 mL 反应体系中,将酶浓度固定,改变底物

4-NPP 浓度,检测不同浓度的抑制剂对脂肪酶活性的影响,通过 Lineweaver-Burk 双倒数(1/v vs. 1/[S])作图判断抑制类型。

1.3.5 枇杷幼果总黄酮对脂肪酶作用的荧光发射光谱分析

采用荧光淬灭实验研究脂肪酶与枇杷幼果总黄酮的相互作用。实验方法参考 CHAI 等^[13]的研究方法。激发光波长设定为 280 nm,激发和发射光谱夹缝宽度为 5 nm,检测范围 300~450 nm。

1.4 数据处理与分析

采用 GraphPad Prism 6(San Diego, CA, USA)软件进行绘图与分析。

2 结果与分析

2.1 枇杷幼果总黄酮对脂肪酶的抑制效果

枇杷幼果总黄酮提取物对脂肪酶活性的抑制效果如图 1 所示。随着枇杷幼果总黄酮质量浓度增大,脂肪酶活性降低,且呈剂量依赖性。枇杷幼果总黄酮引起脂肪酶活性 50%损失的浓度 IC₅₀ 为(54.51±4.07) μg/mL。

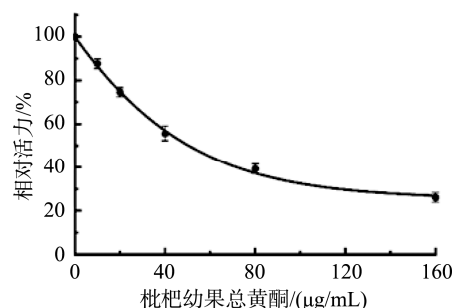


图1 枇杷幼果总黄酮对脂肪酶活性的影响(n=3)

Fig.1 Effect of total flavonoids from young loquat fruit on the activity of lipase (n=3)

2.2 枇杷幼果总黄酮对脂肪酶的抑制机制

进一步研究枇杷幼果总黄酮对脂肪酶催化 4-NPP 的抑制机制。在固定底物 4-NPP 的浓度(0.75 mmol/L)、不同枇杷幼果总黄酮质量浓度(0、10、20、40、80 μg/mL)条件下,测定脂肪酶反应的初速度,以脂肪酶的质量浓度为变量并对其作图,得到一组通过坐标原点的直线,如图 2 所示。随着枇杷幼果总黄酮质量浓度增大,直线的斜率降低,表明枇杷幼果总黄酮不仅能减少具有活性的脂肪酶总量,还能抑制脂肪酶的反应活力^[14],说明枇杷幼果总黄酮对脂肪酶的抑制为可逆抑制。

2.3 枇杷幼果总黄酮对脂肪酶的抑制类型

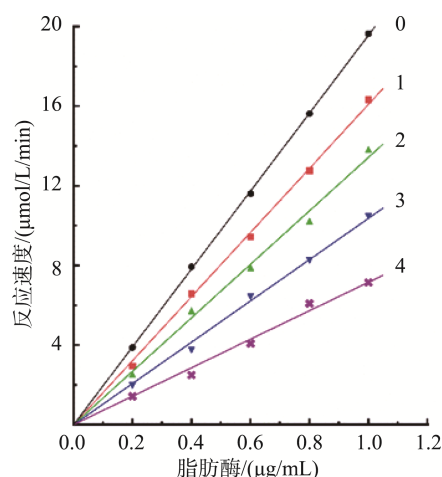
经 Lineweaver-Burk 双倒数作图,得到以反应速度的

倒数($1/v$)对底物浓度的倒数($1/[S]$)的线性回归关系(图3a)。随着枇杷幼果总黄酮质量浓度的升高,直线的斜率升高,且相交于第二象限,说明枇杷幼果总黄酮以竞争性与非竞争性相混合的方式抑制脂肪酶活性^[15]。枇杷幼果总黄酮对脂肪酶的抑制常数 K_I 可以从直线的斜率对枇杷幼果总黄酮浓度作图,计算得到与 X 轴的截距绝对值,即为 K_I (图3b),枇杷幼果总黄酮对脂肪酶-底物复合物的抑制常数 K_{IS} 可以从直线和纵轴的截距对枇杷幼果总黄酮的浓度作图,计算得到与 X 轴的截距绝对值 K_{IS} (图3c)。 K_I 和 K_{IS} 的值分别为 $99.16 \mu\text{g/mL}$ 和 $198.61 \mu\text{g/mL}$ 。由于枇杷幼果总黄酮对脂肪酶的 K_{IS} 大于 K_I ,可以说明枇杷幼果总黄酮对脂肪酶的结合能力大于对脂肪酶-底物复合物的结合能力^[16]。

2.4 枇杷幼果总黄酮对脂肪酶的荧光光谱分析

为进一步探讨枇杷幼果总黄酮对脂肪酶的抑制机制,利用荧光光谱分析。如图4所示,在激发波长 280 nm 的情况下,脂肪酶发射波长的吸收峰在 340 nm 。随着枇杷幼果总黄酮质量浓度增大,脂肪酶的荧光强度逐渐下降,说明枇杷幼果总黄酮能够与脂肪酶结合从而淬灭其内源荧光。当枇杷幼果总黄酮的质量浓度达到 $8 \mu\text{g/mL}$ 时,脂肪酶的

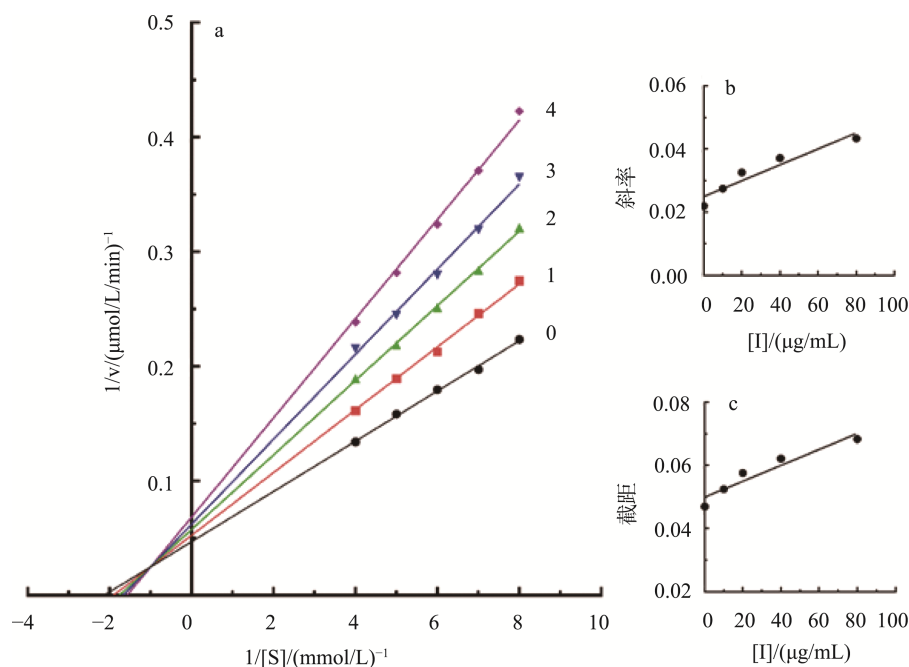
荧光强度下降到 59.18% (图5)。以上实验说明枇杷幼果总黄酮是很好的脂肪酶荧光淬灭剂。



注: 直线 0~4 对应的枇杷幼果总黄酮的浓度分别为: 0、10、20、40、80 $\mu\text{g/mL}$ 。

图2 枇杷幼果总黄酮对脂肪酶的抑制机制测定

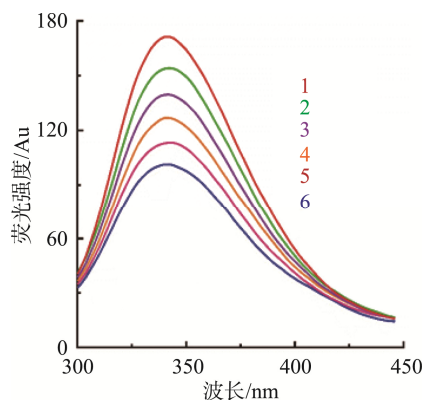
Fig.2 Inhibitory mechanism of total flavonoids from young loquat fruit on lipase



注: 直线 0~4 对应的枇杷幼果总黄酮的浓度分别为: 0、10、20、40、80 $\mu\text{g/mL}$; $[S]$ —4-NPP 的浓度(mmol/L); $[I]$ —枇杷幼果总黄酮浓度($\mu\text{g/mL}$)。

图3 枇杷幼果总黄酮对脂肪酶的抑制类型测定

Fig.3 Inhibitory type of total flavonoids from young loquat fruit on lipase



注: 从上到下曲线 1~6 对应的枇杷花多酚的浓度分别为: 0、1、2、4、6、8 $\mu\text{g/mL}$ 。

图4 不同浓度枇杷幼果总黄酮存在时脂肪酶荧光波谱
Fig.4 Fluorescence spectra of lipase in the presence of total flavonoids from young loquat fruit at different concentrations

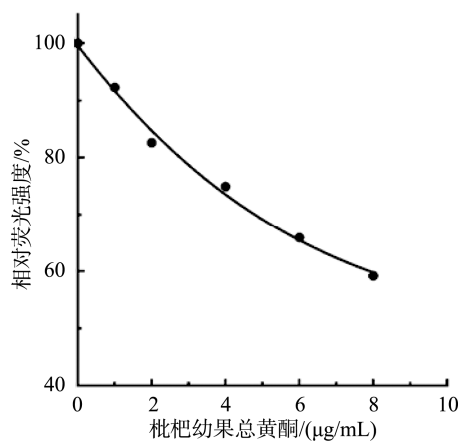


图5 不同浓度枇杷幼果总黄酮存在时脂肪酶的相对荧光强度
Fig.5 Relative intensity of lipase at different concentrations of total flavonoids from young loquat fruit

3 结论与讨论

随着生活水平的提高,肥胖逐渐成为威胁人类健康的问题。抑制消化道中脂肪酶的活性,是当前用来预防和治疗肥胖的最常用方法。天然活性成分具有低毒、高效、副作用少的特点,因此筛选脂肪酶的天然活性抑制剂成为当前减肥治疗药物的热门方向。本研究以枇杷种植过程中疏除的幼果为原料,提取黄酮类活性成分,发现枇杷幼果总黄酮能够抑制脂肪酶的活性,其半抑制率为 $(54.51 \pm 4.07) \mu\text{g/mL}$ 。进一步采用抑制动力学和荧光光谱法研究枇杷幼果总黄酮对脂肪酶的抑制机制。研究表明,枇杷幼果总黄酮抑制脂肪酶的抑制类型为混合型抑制,枇杷幼果总黄酮能够与脂肪酶形成复合物,使脂肪酶的内源荧光淬灭,可为枇杷幼果总黄酮提取物的应用开发提供依据。

参考文献

- [1] ARRIETA F, PEDRO-BOTET J. Recognizing obesity as a disease: A true challenge [J]. *Rev Clin Esp*, 2020, 32(7): 497–503.
- [2] BIALECKA FE, FABISZEWSKA AU, KRZYCKOWSKA J, *et al*. Synthetic and natural lipase inhibitors [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2018, 18(8): 672–683.
- [3] LIU Y, ZHANG W, XU C, *et al*. Biological activities of extracts from loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.): A review [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(12): 1983.
- [4] HUANG GL, MA JJ, SUI SY, *et al*. Optimization of extraction of loquat flowers polyphenolics and its antioxidant and anti-polyphenol oxidase properties [J]. *Bioengineered*, 2020, 11(1): 281–290.
- [5] 黄桂丽, 吴牧容, 马佳佳, 等. 枇杷幼果总黄酮提取工艺优化及其抗氧化活性分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(10): 3112–3118.
HUANG GL, WU MR, MA JJ, *et al*. Optimization of extraction of total flavonoids from young loquat fruit and its antioxidant activity [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(10): 3112–3118.
- [6] 公衍玲, 刘菲, 金宏. 响应面法优化盐地碱蓬总黄酮乙醇萃取工艺及其抗氧化、降糖、降脂活性[J]. *食品科学*, 2016, 37(8): 1–7.
GONG YL, LIU F, JIN H. Optimization of ethanol extraction of total flavonoids from suaeda salsa and its antioxidant, hypoglycemic and hypolipidemic activities [J]. *Food Sci*, 2016, 37(8): 1–7.
- [7] HAZAFA A, REHMAN KU, JAHAN N, *et al*. The role of polyphenol (flavonoids) compounds in the treatment of cancer cells [J]. *Nutr Cancer*, 2020, 72(3): 386–397.
- [8] 帕提曼·肖开提, 刘阳, 王晓梅, 等. 新疆蔷薇红景天总黄酮抗炎作用及急性毒性研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(9): 2590–2595.
PATIMAN XKT, LIU Y, WANG XM, *et al*. Anti-inflammatory activity and acute toxicity of the total flavonoids from *Rhodiola rosea* [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(9): 2590–2595.
- [9] 张伦宁, 刘珂, 黄潮, 等. 武功山紫红米总黄酮提取方法的优化[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(15): 5065–5068.
ZHANG LN, LIU K, HUANG C, *et al*. Optimization of extraction method of total flavonoids from purple red rice from Wugong mountain [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(15): 5065–5068.
- [10] EZZATI M, YOUSEFI B, VELAEI K, *et al*. A review on anti-cancer properties of quercetin in breast cancer [J]. *Life Sci*, 2020, 248: 117463.
- [11] LIU TT, HE XR, XU RX, *et al*. Inhibitory mechanism and molecular analysis of furoic acid and oxalic acid on lipase [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 120: 1925–1934.
- [12] DU XP, BAI ML, HUANG Y, *et al*. Inhibitory effect of astaxanthin on pancreatic lipase with inhibition kinetics integrating molecular docking simulation [J]. *J Funct Food*, 2018, 48: 551–557.
- [13] CHAI WM, LIN MZ, WANG YX, *et al*. Inhibition of tyrosinase by

(责任编辑: 于梦娇)

cherimoya pericarp proanthocyanidins: Structural characterization, inhibitory activity and mechanism [J]. Food Res Int, 2017, 100: 731–739.

- [14] LIN MZ, CHAI WM, ZHENG YL, *et al.* Inhibitory kinetics and mechanism of rifampicin on alpha-glucosidase: Insights from spectroscopic and molecular docking analyses [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 122: 1244–1252.

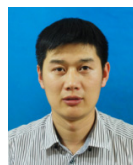
- [15] ZHENG L, LEE J, YUE LM, *et al.* Inhibitory effect of pyrogallol on alpha-glucosidase: Integrating docking simulations with inhibition kinetics [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 112: 686–693.

- [16] HUANG Q, CHAI WM, MA ZY, *et al.* Inhibition of alpha-glucosidase activity and non-enzymatic glycation by tannic acid: Inhibitory activity and molecular mechanism [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 141: 358–368.

作者简介



黄桂丽, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为果蔬保鲜加工。
E-mail: huanggl2015@163.com



王毓宁, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为果蔬保鲜加工。
E-mail: wyn705@163.com

“保健食品的研发与检测”专题征稿函

保健食品是指具有特定保健功能或者以补充维生素、矿物质为目的的食品。保健食品亦称功能性食品, 是特定的食品种类, 有调节人体功能的作用。

本刊特别策划了“保健食品的研发与检测”专题, 由北京联合大学 闫文杰副教授 担任专题主编。专题围绕但不限于保健食品的开发、功能性活性成分提取与检测、新型保健食品研发、功能性食品添加剂、保健食品配料、保健功能性物质(肽与蛋白质、功能性油脂、多糖、微量元素、维生素等)应用、研发与检测等方面, 或您认为有意义的相关领域开展论述和研究。

鉴于您在该领域丰富的研究经历和突出的学术造诣, 本刊主编吴永宁研究员、专题主编闫文杰副教授及编辑部全体成员特别邀请您为本专题撰写稿件。研究论文、综述、研究简报均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。

本专题计划于 2021 年 5~6 月出版, 请您于 2021 年 3 月 31 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

希望您通过各种途径宣传此专题, 并积极为本专题推荐稿件和约稿对象。

同时, 希望您能够推荐该领域的相关专家并提供电话和 E-mail。

谢谢您的参与和支持!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com(注明保健食品的研发与检测专题)

E-mail: jfoodsq@126.com(注明保健食品的研发与检测专题)

《食品安全质量检测学报》编辑部