

引用格式:洪蕴,罗君,晏晨. 芒果苷对胰脂肪酶抑制作用及其分子机制研究[J]. 贵州师范大学学报(自然科学版),2026,44(3):133-142. [Hong Yun,Luo Jun,Yan Chen. Inhibitory effect of mangiferin on pancreatic lipase and its molecular mechanism[J]. Journal of Guizhou Normal University (Natural Sciences),2026,44(3):133-142.]

芒果苷对胰脂肪酶抑制作用及其分子机制研究

洪蕴¹,罗君²,晏晨^{3*}

(1. 西南民族大学 药学与食品学院,四川 成都 610000;2. 贵州中医药大学 第一附属医院 药学部,贵州 贵阳 550001;3. 安顺市人民医院,贵州 安顺 561000)

摘要:为探究芒果苷(Mangiferin)对胰脂肪酶(Pancreatic lipase)的抑制作用及其分子机制,采用酶活性测定、荧光光谱(包括同步与三维荧光)、衰减全反射傅里叶变换红外光谱及分子对接等方法分析二者的相互作用。结果表明,芒果苷对胰脂肪酶的抑制呈浓度依赖性,其 IC_{50} 为 $14.555\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ($\approx 34.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。荧光猝灭实验显示,芒果苷可显著降低胰脂肪酶内源荧光强度,并伴随最大发射波长轻微蓝移。Stern-Volmer分析与热力学参数($\Delta H < 0, \Delta S < 0, \Delta G < 0$)表明,两者相互作用为自发的焓驱动静态-动态混合猝灭过程,主要由氢键和范德华力介导。同步及三维荧光光谱结果表明,芒果苷优先影响色氨酸(Trp)残基的微环境并诱导酶构象变化。ATR-FTIR光谱显示酰胺I带吸收强度下降,表明芒果苷对酶二级结构周围微环境产生一定影响。分子对接显示,芒果苷可结合于胰脂肪酶疏水腔附近,并与GLU22、CYS181、GLN183等残基形成氢键,从而可能阻碍底物进入活性中心。综上,芒果苷通过结合胰脂肪酶并诱导其构象变化抑制酶活性,为其作为潜在天然抗肥胖功能因子提供理论依据。

关键词:芒果苷;胰脂肪酶;荧光光谱;ATR-FTIR;分子对接;抑制机制

中图分类号:R914 文献标识码:A 文章编号:1004—5570(2026)03—0133—10

DOI:10.16614/j.gznj.zrb.2026.03.016

Inhibitory effect of mangiferin on pancreatic lipase and its molecular mechanism

Hong Yun¹, Luo Jun², Yan Chen^{3*}

(1. School of Pharmacy and Food Science, Southwest Minzu University, Chengdu, Sichuan 610000, China; 2. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou 550001, China; 3. Anshun People's Hospital, Anshun, Guizhou 561000, China)

Abstract: To investigate the inhibitory effect of mangiferin on pancreatic lipase and elucidate its underlying molecular mechanism, enzyme activity assays, fluorescence spectroscopy (including synchronous and three-dimensional fluorescence), attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy, and molecular docking were employed to characterize their interactions. The results showed that mangiferin inhibited pancreatic lipase in a concentration-dependent manner, with an IC_{50} of 14.555

收稿日期:2026-03-12

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 82460986);贵州省科技计划项目(黔科合支撑[2024]一般068)

*通信作者:晏晨(1980-),男,博士,主任药师,博士生导师,研究方向:天然药物化学成分及活性研究, E-mail:nazi3647@sina.com.

$\mu\text{g}/\text{mL}$ ($\approx 34.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). Fluorescence quenching analysis revealed that mangiferin markedly reduced the intrinsic fluorescence intensity of pancreatic lipase, accompanied by a slight blue shift in the maximum emission wavelength. Stern-Volmer analysis and thermodynamic parameters ($\Delta H < 0, \Delta S < 0, \Delta G < 0$) indicated that the interaction was a spontaneous, enthalpy-driven static-dynamic mixed quenching process, primarily mediated by hydrogen bonding and van der Waals forces. Synchronous and three-dimensional fluorescence spectra further suggested that mangiferin preferentially affected the microenvironment of tryptophan (Trp) residues, leading to conformational changes in the enzyme. ATR-FTIR spectra showed a decrease in the absorption intensity of the amide I band, indicating that mangiferin slightly altered the microenvironment surrounding the secondary structure of pancreatic lipase. Molecular docking demonstrated that mangiferin could bind near the hydrophobic cavity of pancreatic lipase and form hydrogen bonds with key residues such as GLU22, CYS181, and GLN183, which may hinder substrate access to the active site. Overall, mangiferin inhibits pancreatic lipase activity by binding to the enzyme and inducing conformational changes, providing theoretical support for its potential application as a natural anti-obesity agent.

Keywords: mangiferin; pancreatic lipase; fluorescence spectroscopy; ATR-FTIR; molecular docking; inhibitory mechanism

0 引言

肥胖是一种全球性的慢性代谢性疾病,是心血管疾病、2型糖尿病、冠心病及多种癌症的重要危险因素^[1]。近年来,由心血管疾病、糖尿病及部分恶性肿瘤等慢性病导致的死亡已占我国总死亡人数的近90%,而超重和肥胖是其主要危险因素之一^[2-3]。全球疾病负担研究(GBD 2023)进一步指出,肥胖已成为导致死亡率上升速度最快的可干预危险因素之一^[4]。因此,探索安全有效的体重控制策略具有重要意义。

在膳食脂肪的消化过程中,小肠腔内的脂肪酶发挥关键作用。其中,胰脂肪酶(Pancreatic lipase, EC 3.1.1.3)由胰腺分泌,是甘油三酯水解的主要酶,约承担50%~70%的脂肪水解过程^[5-6]。该酶将甘油三酯分解为甘油和游离脂肪酸,后者经肠道吸收后参与机体脂质代谢。因此,抑制胰脂肪酶活性、减少膳食脂肪吸收被认为是防治肥胖的重要策略之一。目前临床应用最广泛的胰脂肪酶抑制剂是奥利司他(Orlistat,商品名“赛尼可”)^[7-8]。但该药可能引起肝功能损伤、急性肾损伤以及结肠异常隐窝灶发生率升高等严重不良反应^[9-11]。此外,体外研究还表明奥利司他可能影响DNA修复相关酶(如MGMT)的活性^[12]。因此,其长期安全性仍存在争议。基于此,开发来源丰富、安全性较

高的天然胰脂肪酶抑制剂已成为抗肥胖研究的重要方向^[13-14]。

芒果苷(Mangiferin)是一种天然存在的C-葡萄糖基氧杂蒽酮,主要存在于漆树科芒果(*Mangifera indica*)的果实、树皮及叶片中,也是贵州苗药红花龙胆(苗药名“锐定谋”)的有效成分^[15-16]。研究表明,芒果苷具有抗氧化^[17]、抗炎^[18]、保肝^[19]、免疫调节^[20]、抗肿瘤^[21]及神经保护^[22]等多种药理活性。近年来,其在调节糖脂代谢方面的作用也受到关注。例如,芒果苷可降低糖尿病小鼠血糖并减轻肾损伤^[23]。同时可能通过激活APN并调控AMPK信号通路,提高IR-HepG2细胞对葡萄糖的摄取,从而改善胰岛素抵抗^[24]。此外,芒果苷元还可通过调节ChREBP/GLUT5及GLUT8通路改善代谢综合征,并抑制Caco-2细胞对果糖的摄取^[25]。这些研究提示芒果苷在糖脂代谢调控中具有重要作用。然而,现有研究主要集中于其整体代谢调节效应,其是否能够直接作用于脂肪消化关键酶——胰脂肪酶仍缺乏系统研究。芒果苷与胰脂肪酶之间的结合模式、相互作用机制及其对酶构象变化的影响仍有待阐明。基于上述背景,本研究以猪胰脂肪酶为模型,通过半抑制浓度(IC₅₀)测定、荧光猝灭光谱、同步与三维荧光光谱、衰减全反射傅里叶变换红外光谱(ATR-FTIR)及分子对接等方法,系统研究芒果苷对胰脂肪酶活性的抑制作用及其分子机制,从光谱学特征与分子结合构象角度揭示二者

的相互作用规律,为芒果苷作为天然抗肥胖功能因子的开发提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 实验试剂

芒果苷(成都普菲德生物技术有限公司,纯度99.72%),猪胰脂肪酶(上海麦克林生化科技股份有限公司,含量15~35 U·mg⁻¹),月桂酸4-硝基苯酯(上海麦克林生化科技股份有限公司,含量>98.0%),奥利司他(北京索莱宝科技有限公司,含量≥98.0%),二甲基亚砜(DMSO)(北京索莱宝科技有限公司,含量≥99.9%),Tris-HCl(北京索莱宝科技有限公司,含量≥99.5%),无水碳酸钠(天津博迪科技发展有限公司,分析纯),PBS缓冲液(北京索莱宝科技有限公司,含量>99%)。

1.2 实验仪器

F-4700 荧光分光光度计(HITACHI(日立公司)); Frontier 傅里叶变换红外光谱仪(PerkinElmer); MULTISKAN FC 酶标仪(Thermo Scientific); PHS-3E pH 计(上海雷磁仪器有限公司); Centrifuge 5810R 台式冷冻离心机(Eppendorf); KW-1000DC 数显恒温水浴锅(国华电器有限公司); DHP-9052 电热恒温培养箱(上海齐欣科学仪器有限公司); TopPette 微量移液器(大龙兴创实验仪器有限公司); ME204E 电子天平(METTLER TOLEDO)。

1.3 实验方法

1.3.1 芒果苷对胰脂肪酶活性的影响

通过测定抑制活性来体现芒果苷对胰脂肪酶活性的影响,步骤如下:

配制反应体系:称取7.88 g Tris-HCl 溶于PBS缓冲液中,定容至500 mL,用无水碳酸钠调节pH至8.0,制备Tris-HCl缓冲液。

配制胰脂肪酶溶液:称取1 g 猪胰脂肪酶溶于100 mL 上述Tris-HCl缓冲液中,以5 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液作为10 mg·mL⁻¹的酶储备液,于4℃保存备用。

配制底物溶液:准确称取40 mg 月桂酸4-硝基苯酯,用上述Tris-HCl缓冲液(pH 8.0)溶解并加0.4 mL 二甲基亚砜(DMSO)助溶,待完全溶解后,定容至50 mL,即得浓度0.8 mg·mL⁻¹的底物储备液。该体系中DMSO的终体积比百分数为0.8%。预实验表明,该浓度的DMSO对胰脂肪酶活性无显著影响。

配制芒果苷溶液:以体积比百分数为10%的DMSO为助溶剂配制(80、40、20、10、5、2 μg·mL⁻¹)。在100 μL反应体系中加入10 μL样品液,使DMSO终体积比百分数约为1.0%,底物带入DMSO约0.08%,体系DMSO终浓度约为1.08%,预实验表明对酶活性无显著影响(P>0.05)。酶活性测定参考Franco等方法^[26]并作适当修改。在96孔板中进行反应。向各孔中加入70 μL Tris-HCl缓冲液、10 μL 芒果苷溶液(实验组)或10 μL 10% DMSO(溶剂对照组)以及10 μL 胰脂肪酶储备液(10 mg·mL⁻¹),混匀后于37℃预孵育10 min。随后加入10 μL 底物溶液启动反应,于37℃反应30 min,反应体系最终体积为100 μL。体系中芒果苷终浓度为0~80 μg·mL⁻¹,胰脂肪酶终浓度为1 mg·mL⁻¹(约20~40 U·mL⁻¹),底物终浓度为0.08 mg·mL⁻¹。每个浓度设置3个复孔重复,同时设置无酶空白和无底物空白以扣除背景干扰。抑制率(IR)按公式(1)计算,式中A_{control}为阴性对照孔吸光度,A_{sample}为含芒果苷样品孔的吸光度。

抑制率(Inhibition rate, IR)计算公式如下:

$$I(\%) = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100\% \quad (1)$$

式中,I表示抑制率,IR,A_{control}为不含抑制剂的反应体系吸光度,A_{sample}为含芒果苷的反应体系吸光度。

1.3.2 芒果苷与胰脂肪酶的荧光光谱实验

使用F-4700 荧光分光光度计进行测定,测定条件参考Du等^[27]文献并作适当调整。激发波长设置为280 nm,发射光谱扫描范围300~500 nm,激发与发射狭缝宽度均为5 nm。所有测定均在石英比色皿中进行,温度为298~310 K(由恒温水浴循环系统控制),荧光测定时胰脂肪酶的最终质量浓度为1.0 mg·mL⁻¹(约20 μmol·L⁻¹,按分子量约50 kDa估算)。

1.3.2.1 荧光猝灭类型分析

固定胰脂肪酶浓度,逐步滴定不同浓度的芒果苷溶液,所有荧光测定均进行3次独立重复(n=3),并扣除缓冲液背景。记录荧光强度变化,并根据Stern-Volmer方程分析猝灭类型^[28]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{\text{sv}}[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q]$$

其中,F₀和F分别为加入猝灭剂(芒果苷)前、后的荧光强度;[Q]为猝灭剂浓度;K_{sv}为Stern-Volmer猝灭常数;k_q为双分子猝灭速率常数;τ₀为生物大分子的平均荧光寿命(本研究中取1×10⁻⁸ s)^[29]。

1.3.2.2 结合常数与热力学参数

对于静态猝灭过程,结合常数(K_a)和结合位点数(n)可通过双对数方程计算:

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_a + n \log [Q]$$

热力学参数(焓变 ΔH 、熵变 ΔS 、吉布斯自由能变 ΔG)根据 van't Hoff 方程和热力学基本关系式计算:

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R}$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

其中, R 为气体常数($8.314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$), T 为绝对温度。

为验证模型假设,同时采用非线性最小二乘法对荧光猝灭数据进行了拟合分析,2种方法所得结果相互印证。

1.3.2.3 同步荧光光谱分析

参考韩玲玲的实验方法^[30],样品的配置和实验操作同荧光滴定实验。设置波长差 $\Delta\lambda$ 为 15 nm (主要反映酪氨酸 Tyr 残基的微环境)和 60 nm (主要反映色氨酸 Trp 残基的微环境),扫描同步荧光光谱。通过观察峰位和峰强的变化,分析芒果苷对胰脂肪酶特定氨基酸残基微环境的影响。

1.3.2.4 三维荧光光谱分析

三维荧光光谱扫描范围:激发波长 200 ~ 500 nm,发射波长 200 ~ 600 nm。通过比较胰脂肪酶与芒果苷-胰脂肪酶复合物的三维荧光图,分析瑞利散射峰(Peak A)、特征荧光峰(Peak 1)及肽链骨架峰(Peak 2)的变化。

1.3.3 ATR-FTIR 光谱分析

采用 Frontier 傅里叶变换红外光谱仪(配备 ATR 附件)进行测定,实验条件参照文献[31]并作适当修改。扫描范围为 $1800 \sim 1400 \text{ cm}^{-1}$,分辨率为 4 cm^{-1} ,扫描次数为 32 次。将胰脂肪酶及芒果苷-胰脂肪酶复合物溶液滴加于 ATR 晶体上,室温干燥形成薄膜后测定。以空气为背景扣除本底,重点分析酰胺 I 带($1600 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$)的变化,用于定性表征蛋白质构象扰动。本研究未进行二阶导数或峰分离分析。

1.3.4 分子对接

受体蛋白准备:从蛋白质数据库(Protein data bank, PDB)下载猪胰脂肪酶的晶体结构(PDB ID: 1LPB)。使用 UCSF Chimera 1.17.1 软件移除水分

子和原有配体,添加氢原子,并进行能量最小化预处理。

配体准备:芒果苷的 3D 结构从 PubChem 数据库获取,在 Chimera 中进行能量最小化。

对接盒子定义:对接区域(盒子)以涵盖酶的活性中心及邻近的疏水口袋为目标。盒子的中心坐标设定为($x = 10.2 \text{ \AA}$, $y = 22.5 \text{ \AA}$, $z = 20.1 \text{ \AA}$),盒子尺寸设置为 $20 \text{ \AA} \times 20 \text{ \AA} \times 20 \text{ \AA}$,以确保充分覆盖潜在的结合位点。

分子对接及验证:使用 LeDock 软件进行半柔性分子对接。定义包含已知活性中心及附近疏水腔的区域作为对接盒子。为验证对接协议与参数设置的可靠性,首先进行了再对接验证:将 1LPB 晶体结构中的原配体提取出来,在相同对接盒子内进行再对接。计算所得最佳构象与晶体结构中的配体构象之间的均方根偏差(RMSD)为 1.2 \AA ,通常认为 $\text{RMSD} < 2.0 \text{ \AA}$ 表明对接方法可靠,证实了本研究所用对接参数能够较好地重现已知结合模式。随后,对芒果苷进行正式对接,对接运行多次,选取结合自由能最低的构象作为最可能的结合模式。

结果可视化与分析:使用 Schrödinger Maestro 13.5 软件对分子对接结果进行可视化分析,识别关键的相互作用残基、氢键及疏水接触。

1.3.5 数据分析

所有实验均独立重复 3 次,数据以“均值 \pm 标准差”表示。使用 Origin 8.5 和 Excel 2019 软件进行数据处理、曲线拟合及作图,采用非线性回归方法计算 IC_{50} 值。

2 结果与分析

2.1 芒果苷对胰脂肪酶活性的抑制作用

图 1 显示,随着芒果苷浓度升高,胰脂肪酶抑制率显著增加,表现出明显的浓度依赖性。非线性回归计算得到芒果苷对胰脂肪酶的半抑制质量浓度(IC_{50})为 $14.555 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($\approx 34.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。文献报道阳性对照奥利司他对胰脂肪酶的 IC_{50} 约为 $470 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($\approx 948 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[32]。由于不同研究体系(如酶来源、底物及反应条件)存在差异,数值比较需谨慎,但本研究结果表明芒果苷在当前体系下对胰脂肪酶具有较强的体外抑制潜力。结合其天然来源及较好的安全性,芒果苷具有作为潜在功能食品成分或膳食补充剂的研究价值。

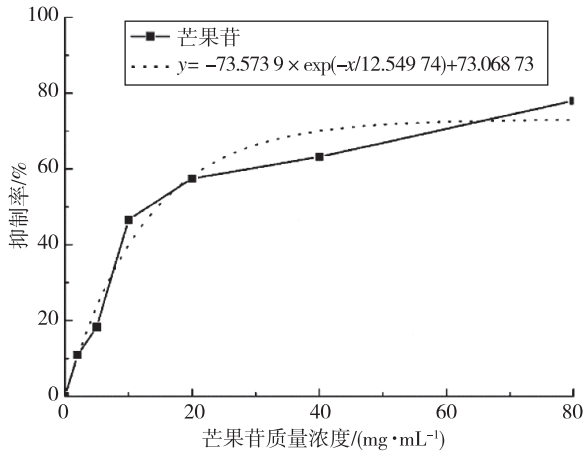


图1 芒果苷对胰脂肪酶的抑制作用

Fig.1 The inhibitory effect of mangiferin on pancreatic lipase

注:虚线为非线性回归拟合曲线。

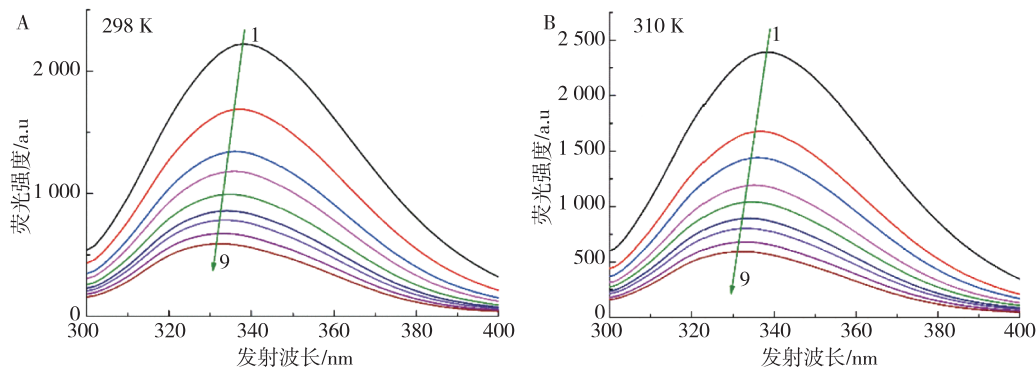


图2 不同温度下用芒果苷滴定的胰脂肪酶荧光猝灭光谱

Fig.2 Fluorescence quenching spectra of pancreatic lipase titrated with mangiferin at different temperatures

注:曲线1~9分别对应于芒果苷浓度为0、1.57、3.08、4.53、5.93、7.27、8.57、9.83、11.04 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.2.2 荧光猝灭机理分析

Stern-Volmer 曲线如图3所示。在低浓度范围内, F_0/F 与芒果苷浓度呈良好线性,随着浓度升高,曲线向上弯曲,偏离线性关系。这种现象提示猝灭过程并非单纯的动态碰撞猝灭,而是静态与动态猝灭并存的混合型机制,即体系中同时存在基态复合物形成和激发态碰撞猝灭2种过程^[35]。

计算得到猝灭常数 K_{SV} 和双分子猝灭速率常数 k_q 见表1。298 K 和 310 K 下的 k_q 值分别为 $9.99 \times 10^{12} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ 和 $1.101 \times 10^{13} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, 远高于生物分子体系的最大扩散碰撞猝灭常数 $2.0 \times 10^{10} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ 。这进一步表明了荧光猝灭过程中存在静态猝灭成分,即芒果苷与胰脂肪酶在基态形成了非荧光复合物,且静态猝灭行为占主导地位,而动态碰撞猝灭主要起辅助作用。结合 Stern-Volmer 曲线的向上弯曲形态,可以认为芒果苷-胰

2.2 芒果苷与胰脂肪酶相互作用的荧光光谱分析

2.2.1 荧光发射光谱变化

图2展示了298 K和310 K下,随着芒果苷浓度增加, $1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的胰脂肪酶在338 nm处的荧光强度逐渐降低,同时最大发射波长由338 nm蓝移至332.6 nm。该现象表明芒果苷与胰脂肪酶发生结合,并改变了色氨酸(Trp)等荧光发色团的微环境,使其疏水性增强^[33-34]。通常蓝移意味着发色团由极性环境转移至更疏水区域^[30],这说明芒果苷可能进入酶的疏水口袋或诱导蛋白构象紧缩,从而使部分荧光中心被包埋于更疏水环境中。

脂肪酶体系属于“静态猝灭占主导的混合型猝灭”过程。

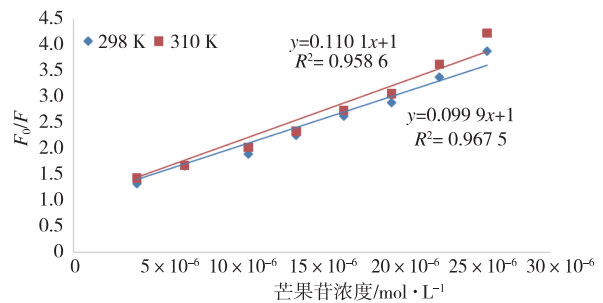


图3 芒果苷对胰脂肪酶荧光猝灭的 Stern-Volmer 图

Fig.3 Stern-Volmer plots for the fluorescence quenching of pancreatic lipase by mangiferin

注: F_0 和 F 分别为不加和添制剂时的荧光强度。

表 1 芒果苷猝灭胰脂肪酶荧光的 Stern-Volmer 方程及猝灭常数

Tab.1 Stern-Volmer equations and quenching constants for the fluorescence quenching of pancreatic lipase by mangiferin

温度/K	Stern-Volmer 方程	R^2	$K_{sv}/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$	$K_q/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$
298	$y = 0.0999x + 1$	0.9675	9.99×10^4	9.99×10^{12}
310	$y = 0.1101x + 1$	0.9586	1.101×10^5	1.101×10^{13}

注:线性浓度范围为 $4 \times 10^{-6} \sim 26 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 。

2.2.3 结合常数与热力学参数

双对数方程拟合得到的结合常数 K_a 和结合位点数 n 见表 2。在 2 个温度下,结合位点数 n 均接近 1,表明一分子芒果苷主要结合于一分子胰脂肪酶的一个特异性位点。随着温度从 298 K 升高至 310 K,结合常数 K_a 从 $4.34 \times 10^5 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ 下降至 $2.18 \times 10^5 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$,说明温度升高会削弱芒果苷与胰脂肪酶之间的亲和力,静态复合物的稳定性降低。这一现象通常与放热型结合过程相一致,即较低温度更有利于复合物的形成与稳定。

进一步计算得到的热力学参数列于表 3。在实验温度范围内, ΔG 为 $-32.16 \sim -31.68 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$,表明芒果苷与胰脂肪酶的结合是一个自发过程。 ΔH 为 $-44.08 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, ΔS 为 $-0.04 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$,说明该结合过程属于焓驱动(Enthalpy-Driven),伴随一定程度的熵降低。根据前人总结的规律^[21], $\Delta H < 0$ 且 $\Delta S < 0$ 通常提示氢键和范德华力是驱动复合物形成的主要相互作用形式。负熵变说明在复合物形成过程中,体系的有序程度增加,可能与芒

果苷进入酶活性位点后蛋白质局部构象被限制以及周围水分子重新排布有关。

结合常数计算方法的验证:双对数法适用于配体浓度与蛋白质浓度处于相近量级的情况。本实验中,固定胰脂肪酶浓度约为 $20 \mu\text{mol/L}$,而芒果苷浓度范围为 $0 \sim 26 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,满足该方法的前提条件。为验证结果的稳健性,同时采用非线性最小二乘拟合(基于静态猝灭模型: $F_0/F = 1 + K_a[Q]$)对相同数据进行了分析。在 298 K 下,非线性拟合获得的结合常数 K_a 为 $(4.12 \pm 0.31) \times 10^5 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ (均值 \pm 标准偏差),与双对数法所得结果 $4.34 \times 10^5 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ 高度一致,且拟合残差呈随机分布。2 种方法相互印证,表明在当前体系下,采用双对数法估算的结合常数是可靠的。表 2 所列 K_a 值为双对数法计算结果,其趋势与温度的关系与非线性拟合结果一致。

结合荧光光谱与分子对接结果,芒果苷结合后使胰脂肪酶 Trp 残基微环境疏水性增强,并通过氢键与范德华作用稳定复合物结构。

表 2 芒果苷与胰脂肪酶的结合常数(K_a)和结合位点数(n)

Tab.2 Binding constant (K_a) and number of binding sites (n) for the interaction between mangiferin and pancreatic lipase

温度/K	回归方程	R^2	$K_a/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$	n
298	$y = 1.137x + 5.6375$	0.9870	4.34×10^5	1.137
310	$y = 1.066x + 5.3375$	0.9780	2.18×10^5	1.066

表 3 芒果苷与胰脂肪酶相互作用的热力学参数

Tab.3 Thermodynamic parameters for the interaction between mangiferin and pancreatic lipase

T/K	$\Delta H/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$\Delta S/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1})$	$\Delta G/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$
298	-44.08	-0.04	-32.16
310	-44.08	-0.04	-31.68

注: ΔH 值由 van't Hoff 图斜率获得,并假设在实验温度范围内基本恒定; ΔG 由 $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ 计算得到。

2.2.4 同步荧光光谱分析

同步荧光光谱可特异性地反映 Tyr ($\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$) 和 Trp ($\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$) 残基微环境的变化。

如图 4 和图 5 所示,随着芒果苷浓度的增加,2 种波长差下的同步荧光峰强度均逐渐降低,表明芒果苷的结合影响了这 2 种芳香族氨基酸的微环境。同时,2 个峰的最大发射波长均发生了轻微的红移(Tyr 峰从 293.8 nm 移至 294.6 nm;Trp 峰从 287.6 nm 移至 288.8 nm)。红移通常意味着残基所处的微环境极性增强或亲水性增加。这可能是由于芒果苷的结合诱导了胰脂肪酶局部构象变化,使原本包埋于疏水核心的 Tyr 或 Trp 残基部分暴露于更亲水的溶剂环境中。其中 Trp 峰变化更为明显,说明芒果苷的结合位点更接近 Trp 残基区域^[36-37]。结合 2.2.1 节中整体光谱的蓝移结果,可以推测芒果

苷结合后,一方面使部分发色团迁移至更疏水的内部环境并被紧密包埋,导致整体发射峰出现蓝移;另一方面,同步荧光所捕捉到的局部 Tyr/Trp 残基则发生了不同程度的暴露和极性增强,表现为轻微红移。两者并不矛盾,而是共同反映了胰脂肪酶内部不同结构域在芒果苷作用下发生了精细的构象重排,而非简单的“整体疏水性增加或减少”。整体荧光蓝移提示部分色氨酸残基进入更疏水环境,而同步荧光中 Trp 残基的红移则可能反映结合位点附近局部极性增强。这种表现矛盾提示芒果苷的结合可能引起胰脂肪酶构象的局部调整,导致不同区域的微环境发生异质性变化。

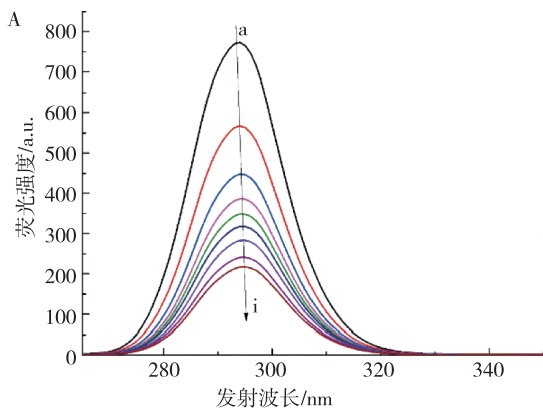


图4 胰脂肪酶与芒果苷的同步荧光光谱 ($\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$)
Fig. 4 Synchronous fluorescence spectra ($\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$) of pancreatic lipase with mangiferin

注:曲线 a~i 分别对应于芒果苷浓度为 0、1.57、3.08、4.53、5.93、7.27、8.57、9.83、11.04 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

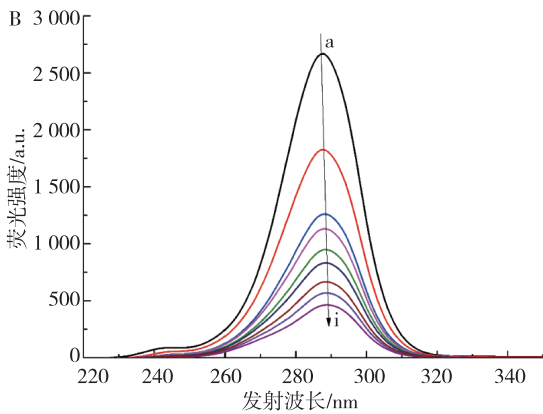


图5 胰脂肪酶与芒果苷的同步荧光光谱 ($\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$)
Fig. 5 Synchronous fluorescence spectra ($\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$) of pancreatic lipase with mangiferin

注:曲线 a~i 对应图 4 中的芒果苷浓度

2.2.5 三维荧光光谱分析

三维荧光光谱见图 6 和图 7。与游离酶相比,加入芒果苷后 Peak 1 (Tyr 和 Trp) 与肽链 Peak 2

(多肽骨架)的荧光强度均明显降低,瑞利散射峰 (Peak A) 的强度也略有减弱。

该结果表明:1)特征峰强度的普遍下降,与前述荧光猝灭结果一致,进一步印证了芒果苷与胰脂肪酶发色团(尤其是 Trp/Tyr)的紧密相互作用;2) Peak 2 强度的下降提示芒果苷的结合可能引起了胰脂肪酶多肽骨架的构象调整,影响了其二级结构,这与后续 ATR-FTIR 结果相互印证。峰形的轻微变钝和等高线的“塌陷”还暗示了酰胺骨架柔性降低或局部刚性增强的可能;3)整体荧光强度的减弱和散射峰的轻微变化,可能源于芒果苷结合后导致蛋白质分子发生一定程度的紧缩或聚集,使荧光中心被部分遮蔽,或发生了荧光共振能量转移 (FRET)。这些光谱特征的综合分析表明,芒果苷不仅与胰脂肪酶的特定位点结合,还可能引发酶分子更广泛的构象重排,这为解释其抑制活性提供了结构层面的线索。

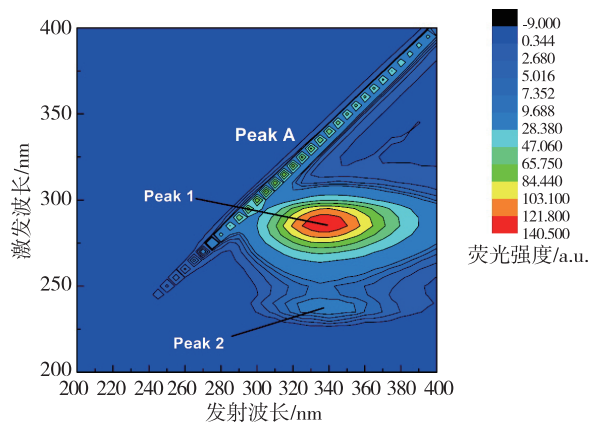


图6 胰脂肪酶溶液三维荧光等高线图

Fig. 6 Three-dimensional fluorescence contour map of pancreatic lipase solution

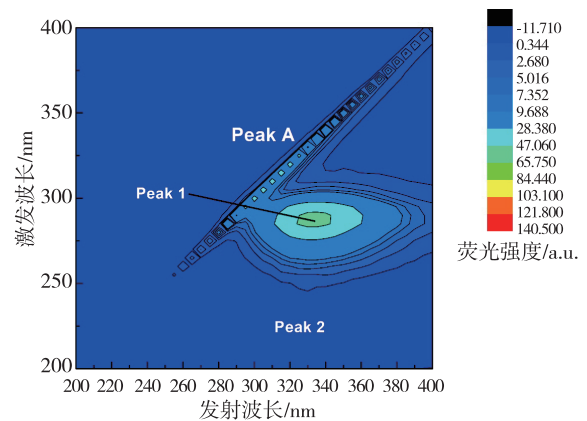


图7 芒果苷-胰脂肪酶溶液三维荧光图谱

Fig. 7 Three-dimensional fluorescence map of mangiferin-pancreatic lipase solution

2.3 ATR-FTIR 光谱分析

红外光谱是研究蛋白质二级结构的有效工具,其中酰胺 I 带($1700 \sim 1600 \text{ cm}^{-1}$, 主要归属为 C=O 伸缩振动)对二级结构的变化尤为敏感。如图 8 所示,游离胰脂肪酶在约 1620 cm^{-1} 处呈现明显的酰胺 I 带吸收峰。加入芒果苷形成复合物后,该吸收峰的强度显著降低,且峰形略有变化。从光谱细节来看,酰胺 I 带强度的下降通常与蛋白质二级结构含量和排布的改变有关^[38],与上述主峰轻微位移及谱带展宽的现象相结合,提示蛋白质骨架结构相关谱带特征可能发生变化,不排除二级结构组分分布发生调整的可能;但具体变化仍需结合二阶导数或峰拟合分析进一步确认。上述光谱变化表明芒果苷结合可能对胰脂肪酶骨架构象产生扰动。二级结构的改变很可能影响活性中心关键催化残基的空间取向、底物通道的几何形状或酶的局部柔韧性,从而最终导致其催化活性下降。ATR-FTIR 结果与荧光光谱显示的构象变化结论相呼应,共同从不同角度揭示了芒果苷诱导胰脂肪酶发生构象适应(Conformational adaptation)的机制。

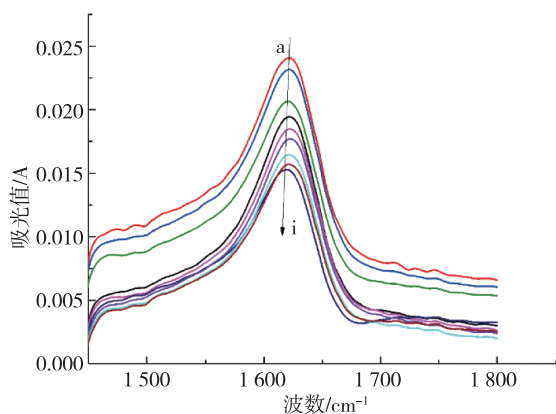


图 8 芒果苷与胰脂肪酶相互作用的 ATR-FTIR 光谱

Fig. 8 ATR-FTIR spectra of the interaction between mangiferin and pancreatic lipase

注:曲线 a~i 对应图 4 中的芒果苷浓度;
箭头表示酰胺 I 带强度的降低。

2.4 分子对接分析

为在原子水平上阐释相互作用机制,进行了分子对接模拟。对接结果表明,芒果苷能够稳定地结合于猪胰脂肪酶(1LPB)的疏水性口袋中,最佳结合自由能为 $-6.833 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$,提示芒果苷与胰脂肪酶之间具有一定的结合可能性和亲和力。

可视化分析(图 9~图 11)显示,芒果苷的结合位点位于酶分子表面一个富含疏水残基的腔穴开口处,该区域邻近酶的催化三联体(Ser153,

Asp177, His264)所在的活性中心。芒果苷的芳香环系统与 VAL210、ILE209、PRO208、TYR114 等多个疏水残基通过范德华力发生紧密的疏水相互作用,这与热力学分析中“焓驱动、以氢键和范德华力为主并伴随疏水接触”的结论相吻合,为两者相互作用机制提供了直接的结构证据。

此外,芒果苷分子上的多个羟基与胰脂肪酶活性中心附近的极性残基形成了关键的氢键网络(图 10):C7 位羟基与 GLU22 的羰基氧形成氢键;C6 位羟基与 CYS181 的主链羰基氧形成氢键;另一个糖环上的羟基与 GLN183 的侧链酰胺基形成氢键。这些氢键不仅增强了复合物的稳定性,更重要的是,它们可能通过直接或间接的方式影响活性中心关键残基(如 Ser153)的构象或动态,或者部分阻塞底物(甘油三酯)进入活性中心的通道。

综合来看,芒果苷通过氢键、范德华力及疏水作用与胰脂肪酶形成稳定复合物,从而干扰酶的正常催化功能。该作用模式不同于奥利司他与催化丝氨酸形成的共价不可逆抑制,更可能属于可逆的竞争性或混合型抑制,具体机制仍需进一步酶动力学实验验证。

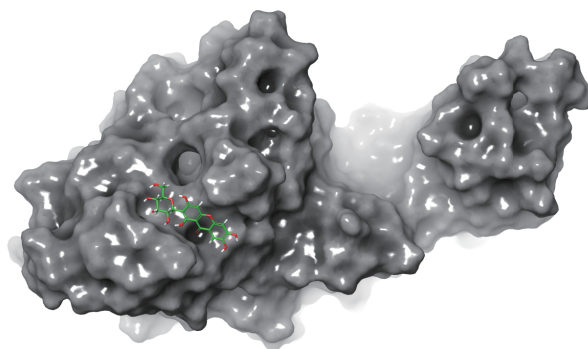


图 9 芒果苷与胰脂肪酶的整体分子对接模型(PDB:1LPB)

Fig. 9 Overall molecular docking model of mangiferin bound to pancreatic lipase (PDB:1LPB)

3 结论

本研究综合运用体外酶学、多种光谱技术及计算模拟方法,系统阐明了天然化合物芒果苷对猪胰脂肪酶的抑制作用及其分子机制,主要结论如下:

1)抑制活性确认:芒果苷对胰脂肪酶具有明确的浓度依赖性抑制作用,其 IC_{50} 为 $14.555 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($\approx 34.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。文献报道奥利司他对胰脂肪酶的半抑制浓度(IC_{50})约为 $470 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($\approx 948 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)^[32],但由于酶来源、底物及反应

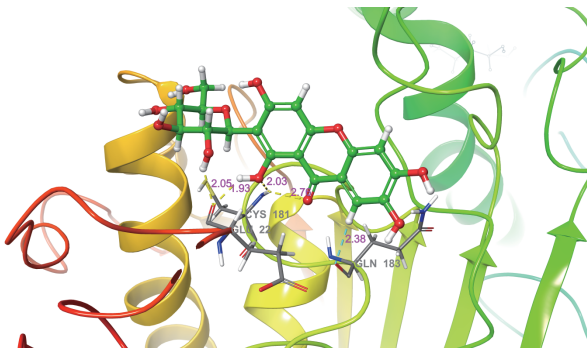


图 10 芒果苷与胰脂肪酶关键残基相互作用的详细视图

Fig. 10 Detailed view of the interaction between mangiferin and key residues of pancreatic lipase

注:氢键用虚线表示,芒果苷为黄色;蛋白质残基为绿色。

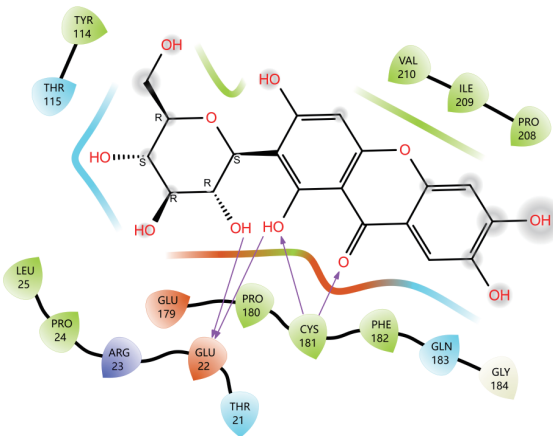


图 11 胰脂肪酶氨基酸残基与芒果苷相互作用示意图

Fig. 11 Schematic diagram of pancreatic lipase amino acid residues interacting with mangiferin

条件等实验体系存在差异,不同研究间的 IC_{50} 数值仅可作为参考。结果表明,芒果苷在体外条件下对胰脂肪酶具有一定的抑制作用,为其作为天然胰脂肪酶抑制剂的进一步研究提供了实验依据。

2) 相互作用的热力学与动力学性质: 荧光光谱分析表明,芒果苷对胰脂肪酶的荧光猝灭属于静态-动态混合机制。热力学参数 ($\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$, $\Delta G < 0$) 表明芒果苷与胰脂肪酶的结合为焓驱动的自发过程,主要由氢键和范德华力等特异性相互作用介导,疏水接触亦有助于复合物的稳定。一分子芒果苷主要结合于一分子酶的单一结合位点。

3) 酶构象变化的证据: 同步与三维荧光光谱结果表明,芒果苷的结合显著改变了胰脂肪酶中 Tyr 和 Trp 残基(尤其是 Trp)的微环境,使其极性增强,并诱导了蛋白质局部及整体构象的调整。ATR-FTIR 光谱进一步印证,相互作用导致了胰脂

肪酶酰胺 I 带的变化,提示其二级结构相关谱带特征可能发生扰动。这些构象扰动可能是酶活性受损的结构基础。

4) 分子层面的作用机制: 分子对接模拟从原子水平揭示了作用细节。芒果苷以较低的结合自由能 ($-6.833 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$) 结合于胰脂肪酶活性中心附近的疏水口袋。其结合模式涉及与 VAL210、ILE209 等残基的广泛疏水接触,以及与 GLU22、CYS181、GLN183 等关键残基形成的氢键网络。这种结合位置可能通过空间位阻效应部分阻碍底物通道,或通过变构效应影响催化中心的几何构象,从而实现对胰脂肪酶活性的抑制。

综上所述,本研究表明芒果苷可通过以氢键和范德华力为主导、疏水相互作用协同参与的非共价结合方式,与胰脂肪酶形成稳定的复合物,并诱导酶发生构象变化,最终导致其催化活性降低。这为将芒果苷开发为一种基于天然产物的胰脂肪酶抑制剂,用于辅助体重管理和肥胖防治,提供了坚实的体外实验证据与分子机制理论基础。未来研究可进一步聚焦于芒果苷在动物模型中的降脂功效及安全性评价,以推动其向实际应用转化。

4 讨论

本研究系统阐明了芒果苷抑制 PL 的体外效应与分子机制,但仍存在一定局限: 首先,酶抑制动力学类型(竞争性、非竞争性或混合型)尚未明确,需通过详细的底物浓度梯度实验予以确定; 其次,本研究的热力学分析仅基于 2 个温度点的数据,虽能揭示基本趋势,但在统计稳健性上存在局限,未来研究可通过设置更多温度梯度,并结合等温滴定量热等直接测量技术,以获取更精确可靠的热力学参数; 再次,分子对接预测的关键相互作用残基缺乏直接的实验验证; 最后,体外实验结论需在细胞及动物模型中得到功效与安全性的综合评价。

基于此,未来研究可围绕以下方向展开: 1) 开展系统的酶动力学研究,明确抑制类型; 2) 结合定点突变或荧光偏振等技术,验证关键结合残基; 3) 利用动物肥胖模型,评价芒果苷的体内降脂效果及长期安全性; 4) 基于本研究的结构-机制关系,对芒果苷进行结构修饰或衍生物筛选,以期获得活性更高、溶解性更好的先导化合物。

综上所述,本研究证实芒果苷是一种有效的猪胰脂肪酶抑制剂。其通过以氢键和范德华力为主

导的非共价作用,结合于酶活性中心附近的疏水区域,并诱导胰脂肪酶发生局部微环境改变及二级结构重排,最终导致酶活性降低。该研究从分子水平揭示了芒果苷作为天然胰脂肪酶抑制剂的作用机制,为其在体重管理和肥胖防治领域的应用开发提供了坚实的理论基础。

参考文献:

- [1] Wang Youfa, Zhao Li, Gao Liwang, et al. Health policy and public health implications of obesity in China[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2021, 9(7): 446-461.
- [2] 王友发, 孙明晓, 杨月欣, 等. 中国肥胖预防和控制蓝皮书[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2019.
- [3] Chen Zhengming, Iona A, Parish S, et al. Adiposity and risk of ischaemic and haemorrhagic stroke in 0.5 million Chinese men and women: a prospective cohort study[J]. *Lancet Glob Health*, 2018, 6(6): e630-e640.
- [4] Schumacher A E, Zheng Peng, Barber R M, et al. Global age-sex-specific all-cause mortality and life expectancy estimates for 204 countries and territories and 660 subnational locations, 1950—2023: a demographic analysis for the Global Burden of Disease Study 2023[J]. *The Lancet*, 2025, 406(10513): 1731-1810.
- [5] Birari R B, Bhutani K K. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential[J]. *Drug Discov Today*, 2007, 12(19/20): 879-889.
- [6] 张静, 米佳, 禄璐, 等. 黑果枸杞花色苷提取物对胰脂肪酶活性的影响[J]. *食品科学*, 2020, 41(5): 8-14.
- [7] 张涵, 易敏, 陈容平, 等. 奥利司他的疗效性及安全性研究进展[J]. *海南医学*, 2016, 27(18): 3026-3028.
- [8] Stoll M, Bitterlich N, Cornelli U. Randomised, double-blind, clinical investigation to compare orlistat 60 milligram and a customized polyglucosamine, two treatment methods for the management of overweight and obesity[J]. *BMC Obes*, 2017, 4(1): 4.
- [9] Sall D, Wang J, Rashkin M, et al. Orlistat-induced fulminant hepatic failure[J]. *Clin Obes*, 2014, 4(6): 342-347.
- [10] Morris M, Lane P, Lee K, et al. An integrated analysis of liver safety data from orlistat clinical trials[J]. *Obes Facts*, 2012, 5(4): 485-494.
- [11] Weir M A, Beyea M M, Gomes T, et al. Orlistat and acute kidney injury: an analysis of 953 patients[J]. *Arch Intern Med*, 2011, 171(7): 703-704.
- [12] Cioccoloni G, Bonmassar L, Pagani E, et al. Influence of fatty acid synthase inhibitor orlistat on the DNA repair enzyme O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human normal or malignant cells in vitro[J]. *Int J Oncol*, 2015, 47(2): 764-772.
- [13] 姜运耀, 吕国英, 李燕飞, 等. 植物来源的胰脂肪酶抑制剂研究进展[J]. *中国生化药物杂志*, 2012, 33(2): 199-202.
- [14] 黄雪薇, 雷嗣超, 涂芬, 等. 板栗壳黄酮结构分析及其对胰脂肪酶活力的抑制作用[J]. *食品科学*, 2021, 42(21): 111-118.
- [15] 罗君, 赵琳璐, 包江平, 等. UPLC-Q-TOF-MS 分析苗族药红花龙胆化学成分[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(24): 89-94.
- [16] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2025.
- [17] 王谦, 孙俐, 余雄武, 等. 芒果苷对抗氧化应激损伤改善精子冻融效果[J]. *婚育与健康*, 2025, 31(7): 52-54.
- [18] 张平, 周华, 邵美琳. 芒果苷对大鼠绝经后骨质疏松症的疗效及对炎症的作用[J]. *承德医学院学报*, 2025, 42(2): 96-100.
- [19] 王文祥, 王萍, 熊伟, 等. 芒果苷对 APAP 诱导小鼠急性药物性肝损伤的保护机制研究[J]. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 2025, 44(6): 810-816.
- [20] Chi Xiaojun, Meng Jianjun, Lin Chunyu, et al. Mangiferin inhibits human lung adenocarcinoma by suppressing MiR-27b and MiR-92a[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, 2021(1): 2822950.
- [21] 华炳红, 李馥伶, 陈琳. 基于 PI3K/Akt/mTOR 途径研究芒果苷对糖尿病诱导视网膜微血管损伤的保护作用及机制[J]. *广西医科大学学报*, 2022, 39(9): 1395-1401.
- [22] Yang Haiguang, Fang Lianhua, Du Guanhua. Research progress of pharmacological effects of mangiferin[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2016, 32(1): 5-8.
- [23] Tang Shaowei, Dou Qianqian, Mo Jinqiu, et al. Hypoglycemic effect of mangiferin and its derivatives on diabetic mice[J]. *Herald of Medicine*, 2018, 37(4): 441-444.
- [24] 黎梓霖, 金惠杰, 方佳, 等. 芒果苷对胰岛素抵抗 HepG2 细胞糖脂代谢的影响[J]. *中国药房*, 2021, 32(9): 1082-1088.
- [25] 黄静蕊. 基于 ChREBP/GLUT5&8 通路研究芒果苷元对高糖高脂饮食诱导的 C57BL/6J 小鼠代谢综合征的影响及机制[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2024.
- [26] Franco R R, Mota Alves V H, Ribeiro Zabisky L F, et al. Antidiabetic potential of *Bauhinia forficata* Link leaves: a non-cytotoxic source of lipase and glycoside hydrolase inhibitors and molecules with antioxidant and antiglycation properties[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 123: 109798.
- [27] Du Xiping, Bai Manli, Huang Ying, et al. Inhibitory effect of astaxanthin on Pancreatic lipase with inhibition kinetics integrating molecular docking simulation[J]. *Journal of Functional Foods*, 2018, 48: 551-557.
- [28] Bhogale A, Patel N, Sarpotdar P, et al. Systematic investigation on the interaction of bovine serum albumin with ZnO nanoparticles using fluorescence spectroscopy[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013, 102: 257-264.

(下转第 152 页)