

# 黄柏碱对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的体外抑制作用

郑丽婷<sup>1</sup>, 周鸿<sup>1</sup>, 刘奕明<sup>1,2</sup>, 林爱华<sup>1</sup>

(1. 广州中医药大学第二附属医院, 广东 广州 510120; 2. 广东省中医证候临床研究重点实验室, 广东 广州 510120)

**摘要:**目的 研究黄柏碱对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的体外抑制作用、作用类型和分子机制。方法 建立  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂体外筛选模型, 测定黄柏碱对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制率, 并采用动力学方法研究黄柏碱的酶抑制作用类型。采用同源建模的方法构建酿酒酵母  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的三维结构, 并运用分子对接技术分析黄柏碱抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的分子作用机制。结果 黄柏碱对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 为 126.36 mg/L, 且抑制率随浓度增加而增加。酶动力学结果显示, 黄柏碱浓度增大, 反应速率降低,  $V_{max}$ 、 $K_m$  变小。分子对接结果显示, 黄柏碱与  $\alpha$ -葡萄糖苷酶位点 5 的结合能最低且其最好的对接构象结合能为 -31.4 kJ/mol。黄柏碱与  $\alpha$ -葡萄糖苷酶分子中的 LYS15、SER295、HIS258 等氨基酸残基形成氢键, 与残基 ALA289 形成疏水相互作用以及与残基 GLU10 形成  $\pi$ -阴离子相互作用。结论 黄柏碱是  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的可逆性反竞争性抑制剂, 氢键、疏水作用和  $\pi$ -阴离子相互作用是黄柏碱与  $\alpha$ -葡萄糖苷酶分子间的主要作用力。

**关键词:** 黄柏碱;  $\alpha$ -葡萄糖苷酶; 反竞争性抑制; 同源建模; 分子对接

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-0482(2020)06-0853-06

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2020.0853

引文格式: 郑丽婷, 周鸿, 刘奕明, 等. 黄柏碱对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的体外抑制作用[J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(6): 853-858.

## Inhibitory Effect of Phellodendrine on $\alpha$ -Glucosidase *in vitro*

ZHENG Li-ting<sup>1</sup>, ZHOU Hong<sup>1</sup>, LIU Yi-ming<sup>1,2</sup>, LIN Ai-hua<sup>1</sup>

(1. The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, 510120, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Clinical Research on Traditional Chinese Medicine Syndrome, Guangzhou, 510120, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To study the inhibitory effect and the inhibition type of phellodendrine on  $\alpha$ -glucosidase *in vitro* and explore the molecular mechanism. **METHODS** An inhibitor screening model was established *in vitro* to examine the inhibitory rate of phellodendrine on  $\alpha$ -glucosidase. The inhibition type was investigated by kinetic method. The three-dimensional structure of  $\alpha$ -glucosidase (*Saccharomyces cerevisiae*) was constructed by homology modeling method, and the inhibition molecular mechanism of phellodendrine on  $\alpha$ -glucosidase was analyzed by molecular docking technology. **RESULTS** Phellodendrine displayed obvious inhibitory activity on  $\alpha$ -glucosidase with an  $IC_{50}$  value of 126.36 mg/L, in a concentration-dependent manner. The results of enzyme kinetics indicated that the reaction rate was lowered and  $V_{max}$ ,  $K_m$  were decreased with the concentration increasing of phellodendrine. The results of molecular docking showed that the binding energy of phellodendrine to  $\alpha$ -glucosidase site 5 was the lowest, and its optimal docking conformation binding energy was -31.4 kJ/mol. Phellodendrine exerted its inhibitory activity by forming hydrogen bonds with amino acid residues such as LYS15, SER295, HIS258, hydrophobic interaction with ALA289 and  $\pi$ -anion interaction with GLU10. **CONCLUSION** Phellodendrine is a reversible uncompetitive inhibitor of  $\alpha$ -glucosidase. The hydrogen bond, hydrophobic interaction and  $\pi$ -anion interaction are main forces between phellodendrine and  $\alpha$ -glucosidase.

**KEYWORDS:** phellodendrine;  $\alpha$ -glucosidase; uncompetitive inhibition; homology modeling; molecular docking

糖尿病是一种以糖代谢紊乱为主的慢性综合性疾病, 它的死亡率仅次于肿瘤和心脑血管疾病, 位居第三<sup>[1]</sup>。降糖药可通过促进胰岛素分泌, 促进外周组织摄取葡萄糖, 抑制糖异生, 增强胰岛素敏感性,

抑制人体消化道对糖类的吸收等治疗和控制糖尿病及其并发症。近年来研究发现, 餐后高血糖是糖尿病发病过程中最先出现的症状, 能够诱发各种并发症, 提高糖尿病患者的死亡率<sup>[2]</sup>。 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑

收稿日期: 2020-04-30

基金项目: 广东省科技计划项目(2017B030314166, 2014A020221115)

第一作者: 郑丽婷, 女, 硕士研究生, E-mail: 1399079869@qq.com

通信作者: 林爱华, 男, 研究员, 主要从事药物新剂型及其生物有效性的研究, E-mail: linah76@163.com

制剂能通过抑制小肠上皮细胞绒毛膜上的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的活性,延缓对葡萄糖的吸收,控制餐后血糖的升高,有助于防治 2 型糖尿病及其并发症<sup>[3]</sup>。近年来从药用植物中筛选天然的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂成为国内外学者关注的热点<sup>[4-6]</sup>。

黄柏为芸香科植物黄皮树的干燥树皮。现代研究表明黄柏具有降血糖、抗氧化、抗炎、降压、免疫调节等多种药理活性。黄柏碱是黄柏的特征性成分和重要活性成分之一,在降血压、抗肾炎、抑制细胞免疫反应和中枢抑制等方面具有显著效果<sup>[7-8]</sup>。黄柏碱是否具有降糖相关作用而成为黄柏降血糖活性物质尚未见报道,故本实验通过建立  $\alpha$ -葡萄糖苷酶体外筛选模型,初步探讨黄柏碱对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的影响及其作用类型;采用同源模建的方法构建来源于酿酒酵母的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的三维结构,并借助分子对接的方法尝试性地阐释黄柏碱抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的机制,以期为后续探讨黄柏碱降糖作用提供基础。

## 1 材料

### 1.1 试剂

盐酸黄柏碱对照品,纯度 99.44%,批号: MUST-17112110,成都曼斯特生物科技有限公司;阿卡波糖,纯度 95%,批号: S11190,上海源叶生物科技有限公司;  $\alpha$ -葡萄糖苷酶(酿酒酵母),批号: S10050,上海源叶生物科技有限公司;对硝基苯- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG),批号: S10137,上海源叶生物科技有限公司;磷酸二氢钾,批号: S24278,上海源叶生物科技有限公司;氢氧化钠,分析纯,批号: 20171101-1,广州化学试剂厂;无水碳酸钠,分析纯,批号: 20000601-1,广州化学试剂厂。

### 1.2 仪器

Infinite M1000 PRO 多功能酶标仪(上海帝肯贸易有限公司);ZXDP-B2050 电热恒温培养箱(上海智城分析仪器制造有限公司);PL303 千分之一天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);MS105DU 十万分之一天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);MS3 数显型旋涡混匀器(德国 IKA 公司);SI4002 多微孔板振荡器(广州市浩瀚有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 溶液的配制

磷酸盐缓冲液(pH 6.8):取 0.2 mol/L 磷酸二氢钾溶液 250 mL,加 0.2 mol/L 氢氧化钠溶液 118 mL,用纯水稀释至 1 000 mL,摇匀即得。

$\alpha$ -葡萄糖苷酶溶液:称取适量  $\alpha$ -葡萄糖苷酶粉末,用磷酸盐缓冲液溶解定容,配成 2 U/mL 的母液,用磷酸盐缓冲液稀释至所需浓度。

PNPG 溶液:精密称取 188.31 mg,先加 1 mL DMSO 溶解,再加磷酸盐缓冲液定容至 25 mL,配制成 25 mmol/L 的母液,用磷酸盐缓冲液稀释至所需浓度。

黄柏碱溶液:精密称取 9.99 mg,用磷酸盐缓冲液溶解并定容至 5 mL,配制成浓度为 2 000 mg/L 的母液,用磷酸盐缓冲液稀释至所需浓度。

阿卡波糖溶液:精密称取 5.04 mg,用纯水溶解并定容至 5 mL,配制成 1 000 mg/L 的母液,用纯水稀释至所需浓度。

碳酸钠溶液:准确称取 5.30 g,加 250 mL 蒸馏水溶解,配制成 0.2 mol/L 碳酸钠溶液。

### 2.2 黄柏碱对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的抑制作用

以 PNPG 为底物,阿卡波糖为阳性对照,实验分为空白组(不加黄柏碱和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶液)、对照组(不加黄柏碱)、黄柏碱测定组、黄柏碱空白组(不加  $\alpha$ -葡萄糖苷酶液)、阳性对照组和阳性空白组(不加  $\alpha$ -葡萄糖苷酶液)。反应体系参照文献<sup>[9]</sup>方法,在 96 微孔板中加入适量(根据反应终止时体积为 200  $\mu$ L 计算)磷酸盐缓冲液,0.5 U/mL  $\alpha$ -葡萄糖苷酶溶液 20  $\mu$ L 和样品溶液 20  $\mu$ L(反应体系中黄柏碱终浓度分别为 20、50、100、150、200 mg/L;阿卡波糖的终浓度分别为 0.001、0.005、0.01、0.05、0.1 mg/L),低速振荡混匀,37  $^{\circ}$ C 放置 10 min,加入 10 mmol/L PNPG 20  $\mu$ L,低速振荡混匀,37  $^{\circ}$ C 反应 20 min,再加入 0.2 mol/L 的碳酸钠溶液 80  $\mu$ L 终止反应,于波长 405 nm 处测定吸光值。按下式计算目标化合物对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的抑制率。

$$I(\%) = \frac{(A_c - A_b) - (A_s - A_{sb})}{(A_c - A_b)} \times 100\%$$

$A_c$  为对照组,  $A_b$  为空白组,  $A_s$  为样品组,  $A_{sb}$  为样品空白组。

### 2.3 黄柏碱的酶抑制作用类型

2.3.1 可逆或不可逆抑制作用 选取反应后具有明显吸光度变化的酶浓度 0.125、0.25、0.5 U/mL,并选取最大酶量的饱和底物浓度 10 mmol/L 进行实验。实验分为实验组(1 000、2 000 mg/L 黄柏碱,加入到反应体系后对应的终浓度分别为 166.67、333.33 mg/L)和对照组(不加黄柏碱),反应体系参照文献<sup>[10]</sup>的方法,于 96 孔板加入磷酸盐缓冲液

60  $\mu\text{L}$ , 酶液 20  $\mu\text{L}$  和黄柏碱溶液 20  $\mu\text{L}$ , 低速振荡混匀, 37  $^{\circ}\text{C}$  放置 10 min, 加入 10 mmol/L PNP-G 20  $\mu\text{L}$ , 低速振荡混匀, 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 20 min, 于波长 405 nm 下读取吸光值  $A_1$ , 将 96 孔板放回恒温箱继续放置 10 min, 于波长 405 nm 下读取吸光值  $A_2$ , 以  $\alpha$ -葡萄糖苷酶浓度为横坐标, 反应速率为纵坐标作图, 其中反应速率为  $V$ , 由下式求出,  $\Delta T$  为 10 min。

$$V = \frac{A_2 - A_1}{\Delta T}.$$

2.3.2 可逆抑制作用的类型 选取 0.5 U/mL 酶浓度, 并选取有梯度的底物浓度 2.5、5、10、20 mmol/L 进行实验。实验分为实验组 (500、1 000 mg/L 黄柏碱, 加入到反应体系后对应的终浓度分别为 83.33、166.67 mg/L) 和对照组 (不加黄柏碱), 参照“2.3.1”项下的方法进行实验, 以底物浓度的倒数  $1/[S]$  为横坐标, 反应速率的倒数  $1/V$  为纵坐标作图, 分别绘制不同浓度黄柏碱的抑制作用动力学曲线, 确定抑制类型, 由公式 (1) 求出最大反应速度  $V_{max}$  和米氏常数  $K_m$ 。其中反应速率的倒数为  $1/V$ , 由公式 (2) 求出,  $\Delta T$  为 10 min。

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

$$\frac{1}{V} = \frac{\Delta T}{A_2 - A_1} \quad (2).$$

## 2.4 分子对接分析

2.4.1 同源建模及合理化评估 采用同源建模的方法构建酿酒酵母  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的三维结构。首先从 UniProt 蛋白序列数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 获得酿酒酵母  $\alpha$ -葡萄糖苷酶 MAL12 (P53341) 的一级序列。将 MAL12 氨基酸序列导入 SWISS-MODEL 服务器 (<http://swissmodel.expasy.org/>) 匹配获得同源性最高的蛋白序列, 若其相似性高于 30%, 则可作为 MAL12 建模模板, 并可进一步对其蛋白序列的三级结构进行预测。为了确保 MAL12 的模型质量, 结合 SWISS-MODEL 和 UCLA-DOE 服务器 (<https://www.doe-mbi.ucla.edu/>) 对模型质量进行评估, 主要以 GMQE (可信度范围为 0~1, 值越大表明质量越好)<sup>[11]</sup>、QMEAN (评价区间为 -4~0, 越接近 0, 评估待测蛋白与模板蛋白的匹配度越好)<sup>[12]</sup>、Verify-3D (超过 80% 的残基拥有大于 0.2 的 3D/1D 值, 则模型质量合格)<sup>[13]</sup>、PROCHECK (合格值为 90%)<sup>[14]</sup> 指标和程序检验模型质量的得分值, 为分子对接所需蛋白模

型的合理性提供依据。

2.4.2 分子文件准备及分子对接 利用 Chemdraw Ultra 14.0 绘画黄柏碱和阿卡波糖的化学结构, 再利用 ChemBio3D Ultra 14.0 将其转变为 3D 形式并优化其结构。使用 AutoDock Tools (ADT, v.1.5.6) 对配体和新建模型进行去水、加氢、计算电荷、赋予原子类型等预处理并保存为 PDBQT 格式备用。以  $\alpha$ -葡萄糖苷酶同源模型的结合位点设置配体对接空腔区域, 在默认参数中, 采用拉马克遗传算法进行对接计算, 每个配体进行 100 个实验。在分子对接的结果中, 对接能量最低的构象最有可能是此研究预测结合模式, 并使用 PYMOL (DeLano Scientific LLC 公司) 和 Discovery Studio 4.5 (DS, 北京迅利创成科技有限公司) 进行作图示意。酶动力学实验表明黄柏碱为反竞争性抑制剂, 因此首先应将 PNP-G 与  $\alpha$ -葡萄糖苷酶同源模型进行分子对接并将两者保存为 PNP-G- $\alpha$ -葡萄糖苷酶复合物文件, 再将黄柏碱与该复合物进行分子对接分析。

## 3 结果

### 3.1 黄柏碱对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的抑制作用

由表 1 可见, 黄柏碱和阿卡波糖对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制都呈剂量依赖关系, 随着剂量的加大, 抑制率增大。当黄柏碱浓度为 200 mg/L 时, 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制率达到 64.46%。黄柏碱对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 为 126.36 mg/L, 表明黄柏碱对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性具有一定的抑制作用, 但抑制作用弱于阿卡波糖。

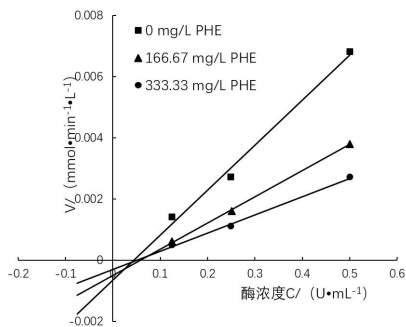
表 1 黄柏碱和阿卡波糖对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用  
( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	终浓度/ ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	抑制率/ %	$IC_{50}/$ ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )
黄柏碱	20.00	$9.39 \pm 0.03$	126.36
	50.00	$16.65 \pm 0.02$	
	100.0	$41.98 \pm 0.03$	
	150.0	$59.33 \pm 0.03$	
	200.0	$64.46 \pm 0.02$	
阿卡波糖	0.001	$70.99 \pm 0.02$	$3.72 \times 10^{-4}$
	0.005	$91.91 \pm 0.01$	
	0.010	$94.90 \pm 0.00$	
	0.050	$98.42 \pm 0.00$	
	0.100	$99.04 \pm 0.00$	

### 3.2 黄柏碱的酶抑制作用类型

3.2.1 可逆或不可逆抑制作用 由图 1 动力学曲线可以看出, 不同浓度抑制剂的曲线交于一点, 并且

随着反应体系中黄柏碱浓度的增大,反应速率降低,但未影响反应的发生,表明黄柏碱对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制属于可逆性抑制类型。



注:PHE.黄柏碱

图 1 黄柏碱对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的可逆性抑制动力学曲线

3.2.2 可逆抑制作用的类型 如图 2 所示,不同浓度抑制剂的曲线相互平行,且随着黄柏碱浓度的增加,动力学参数最大反应速率  $V_{max}$  (纵截距为  $\frac{1}{k_m}$ ) 变小,而米氏常数( $K_m$  值,横截距为  $-\frac{1}{k_m}$ )也变小,因此,黄柏碱对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用属于反竞争性抑制作用,即黄柏碱仅与酶和底物的中间复合物结合而抑制酶活性。根据反竞争性抑制作用的动力学方程求得  $V_{max}$  为  $1.58 \times 10^{-2}$  mmol/(L · min),  $K_m$  为 4.10 mmol/L。见表 2。

### 3.3 分子对接

3.3.1 同源建模及合理化评估 将  $\alpha$ -葡萄糖苷酶 MAL12 的氨基酸序列导入 SWISS-MODEL 服务

```

>sp|P53341|MAL12_YEAST Alpha-glucosidase MAL12
MTISDHPETEPKWWKEAITYQYPA5FKDSNDNDGWDLKGITSKLOYIKDLG
VDAIWVCPFYDSPQDMGYDISNYEKVWPTYGTNEDCFELIDKTHKLGMKFI
TDLVINHCSTEHWFKESR5SKTNPKRDFWFRPKRGYDAEGKPIPNWKS
FFGGSAWTDETTNEFYLRLEASRQVDLWNENEDCRRAIFESAVGFWLDHGV
DGRFIDTAGLYSKRPLGDPSPFDKTSKLGHPNWSGSHNGPRIHEYHQELHFRM
KNRVKDGREIMVGEVAGHSDNALYTSAAHYEVSEVPSFTHVVGTSPPFRY
NIVPFTLQWKEALASNFELINGDSWATTYIENHDSQARSITREADDSPKYRKI
SGKLLTLLECSLTGILYVYQQGEIQINFKWEPIEKYEDVDVKNNYEIHK.SFG
KNSKEMKDFFKGALLSRDHSRTPMPWTKDKPNAGFTGPDVVKPFWLLNESFE
QQINVEQESRDDSDVLENFWRKRALQARKKYEKLMYGYDFQFIDLSDQIFSFT
KEYEDKTLFAALNFSGEEIEFLPREGASLSFILNGYDDTDVSSRVLPWEGRI
YLVK

```

MAL12 的氨基酸序列

```

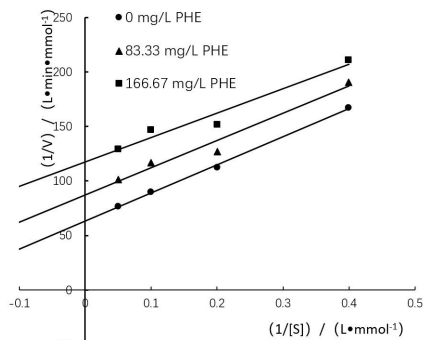
Model_01 MG1: MFTEP599WQVETIYI1SASBDSNDGWDLKGITSKLOYIKDLG 79
Seqh.1.A MTISDHPETEPKWWKEAITYQYPA5FKDSNDNDGWDLKGITSKLOYIKDLG 80
Model_01 MFTEP599WQVETIYI1SASBDSNDGWDLKGITSKLOYIKDLG 159
Seqh.1.A NPTVYGHDCFLI1KMGKGGKFDLIVINHCSTEHWFKESR5SKTNPKRDFWFRPKRGYDAEGKPIPNWKS 159
Model_01 MFTEP599WQVETIYI1SASBDSNDGWDLKGITSKLOYIKDLG 239
Seqh.1.A GGSATPDEAIFEFLELFSIQGLRWEHEDCRALRE5AVGKDRGVDGFRIDILISVGLPQFDMKSRQ 239
Model_01 MFTEP599WQVETIYI1SASBDSNDGWDLKGITSKLOYIKDLG 317
Seqh.1.A NPTVYGHDCFLI1KMGKGGKFDLIVINHCSTEHWFKESR5SKTNPKRDFWFRPKRGYDAEGKPIPNWKS 317
Model_01 MFTEP599WQVETIYI1SASBDSNDGWDLKGITSKLOYIKDLG 397
Seqh.1.A PFLKMKAAAFIDHSDWITVYENHQQRSITRFDS5PKRIS9GLLQLELITGLTYVQQGEQIN 397
Model_01 MFTEP599WQVETIYI1SASBDSNDGWDLKGITSKLOYIKDLG 477
Seqh.1.A KWFPEKEDVILINVI1KGGGUSENGFALIALSRDHSRTPMPWTKDKPNAGFTGPDVVKPFWLLNESFE 477
Model_01 MFTEP599WQVETIYI1SASBDSNDGWDLKGITSKLOYIKDLG 557
Seqh.1.A NYVEIEIDISVNFWRKRALQARKKYEKLMYGYDFQFIDLSDQIFSFTKEYEDKTLFAALNFSGEEIEFLPREGASLSFILNGYDDTDVSSRVLPWEGRI 557
Model_01 MFTEP599WQVETIYI1SASBDSNDGWDLKGITSKLOYIKDLG 587
Seqh.1.A NPTVYGHDCFLI1KMGKGGKFDLIVINHCSTEHWFKESR5SKTNPKRDFWFRPKRGYDAEGKPIPNWKS 587

```

3AXH 和 MAL12 的序列比对

通过 Verify-3D 程序检测氨基酸残基与序列中其他氨基酸的位置是否兼容来判定三维结构的合理性;模型中 95.16% 残基得分大于 0.2,说明建模结果

器匹配获得了 50 个模板,其中 MAL12 与 3AXH 序列残基相似性高达 72.51%,满足同源建模同源性的要求,可将 3AXH 作为模板对 MAL12 进行同源建模。将 3AXH 和 MAL12 的序列进行比对,同时进行同源建模,结果显示两者比对的 GMQE 和 QMEAN 分别为 0.92 和 -0.04,提示建立的蛋白模型质量水平高。见图 3。



注:PHE.黄柏碱

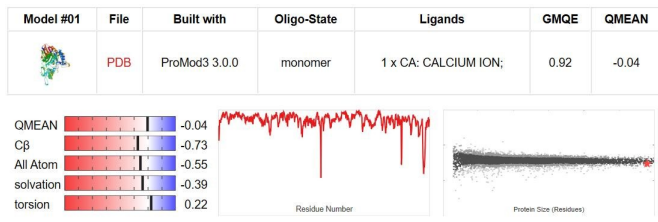
图 2 黄柏碱的双倒数抑制曲线

表 2 黄柏碱在  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制动力学中的动力学常数

浓度/ (mg · L <sup>-1</sup> )	$K_m$ 或 $K'_m$ / (mmol · L <sup>-1</sup> )	$V_{max}$ 或 $V'_{max}$ / [mmol · (L · min) <sup>-1</sup> ]	抑制常数 $K_i$ / (mg · L <sup>-1</sup> )
0	4.10	$1.58 \times 10^{-2}$	—
83.33	2.97	$1.15 \times 10^{-2}$	$1.32 \times 10^3$
166.67	2.20	$8.51 \times 10^{-3}$	$1.16 \times 10^3$

Template	Seq Identity	Oligo-state	QSQE	Found by	Method	Resolution	Seq Similarity	Coverage
3axh.1.A	72.51	monomer	-	BLAST	X-ray	1.80Å	0.54	1.00
3aj7.1.A	72.68	monomer	-	BLAST	X-ray	1.30Å	0.54	1.00
3axh.1.A	72.21	monomer	-	HHblits	X-ray	1.80Å	0.54	1.00
3aj7.1.A	72.21	monomer	-	HHblits	X-ray	1.30Å	0.54	1.00
5wcz.1.A	45.76	monomer	-	BLAST	X-ray	1.58Å	0.44	0.93
4maz.1.A	45.76	monomer	-	BLAST	X-ray	1.60Å	0.44	0.93
4mb.1.A	45.57	monomer	-	BLAST	X-ray	1.40Å	0.44	0.93
4mb.1.A	45.76	monomer	-	BLAST	X-ray	1.45Å	0.44	0.93
4m56.1.A	45.76	monomer	-	BLAST	X-ray	2.30Å	0.44	0.93
5wcz.1.A	42.91	monomer	-	HHblits	X-ray	1.58Å	0.43	0.94
4maz.1.A	43.07	monomer	-	HHblits	X-ray	1.60Å	0.43	0.94

匹配获得的 50 个模板



同源建模的质量评估结果

图 3 同源建模及合理化评估

较为合理(图 4)。结合 PROCHECK 程序生成的 Ramachandran plot 进行评估,以主链的构型中  $\phi$  和  $\varphi$  二面角的分布情形检测模型的质量,结果显示

共有 99.4% 的模型残基位于最佳区域和允许区域中 (图 5), 提示模建结构氨基酸的二面角是非常合理的。可见以 3AXH 为模板构建出来的模型是可靠

的, 该结果与以往研究结果基本一致<sup>[15]</sup>, 因此, 建立的模型可用于后续分子对接分析。

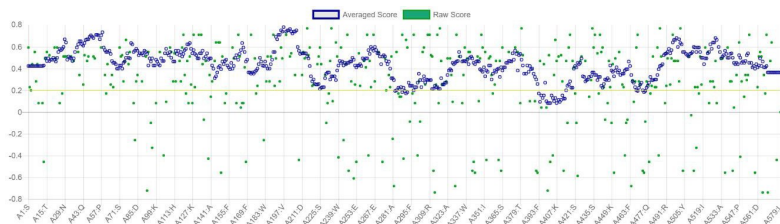


图 4 Verify-3D 程序对模型质量评估

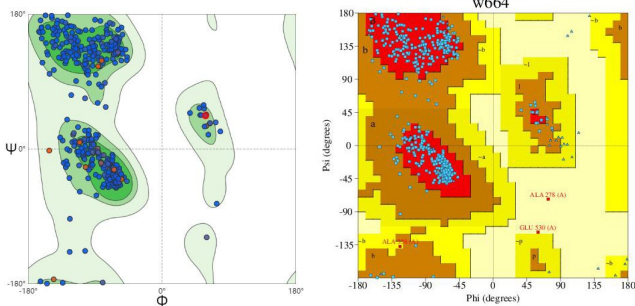
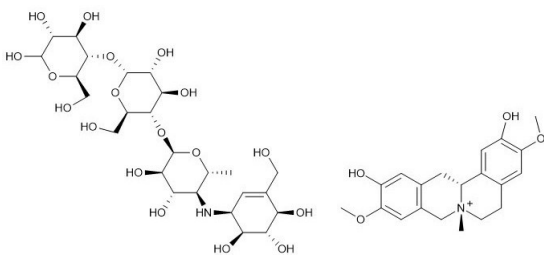


图 5 PROCHECK 对模型质量评估的 Ramachandran plot

3.3.2 配体和受体的分子模拟对接 利用 ADT、DS、PYMOL 等软件对配体和受体进行预处理和结构构建, 结果如图 6。根据文献研究可知<sup>[16]</sup>, 该构建的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶同源模型存在 5 个活性位点, 其中位点 1 (红色) 为竞争性位点, 其余 4 个皆定义为反竞争性位点, 位点 2 (绿色)、位点 3 (黄色)、位点 4 (灰色)、位点 5 (蓝色)。



阿卡波糖

黄柏碱

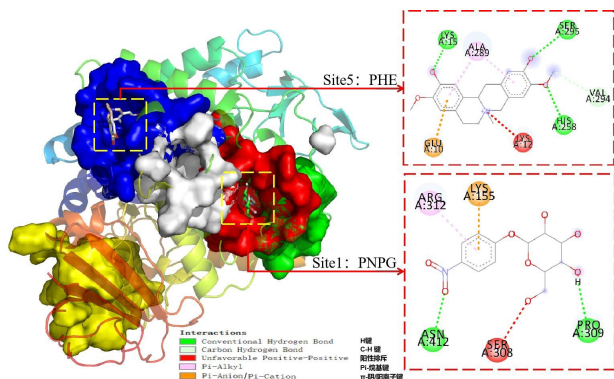
$\alpha$ -葡萄糖苷酶的同源模型 3D 结构

同源模型的结合位点

图 6 受体和配体及其对接区域的结构

将 PNPG、阿卡波糖、黄柏碱分别与  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的位点 1 进行对接, 三者与  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的结合能分别为 -32.2、-37.3、-28.0 kJ/mol, 提示 PNPG 与  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的结合强于黄柏碱, 而弱于阿卡波糖, 说明阿卡波糖能与底物 PNPG 竞争位点, 而黄柏碱则难以与底物 PNPG 竞夺结合空间, 这可能是黄柏碱作为反竞争性抑制剂的主要原因。将黄柏碱分别与  $\alpha$ -葡萄糖苷酶-PNPG 复合物的位点 2~5 进行分子对接, 结果显示, 黄柏碱与酶-底物复合物的 2~5 位点都有不同程度的亲和, 其中与位点 5 的结合能最低且其最好的对接构象结合能为 -31.4 kJ/mol, 说明相比其他位点, 黄柏碱与酶-底物复合物位点 5 的结合最为稳定, 提示黄柏碱最有可能与位点 5 结合而起到反竞争抑制作用。见表 3。如图 7 所示, 黄柏碱具有一定的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制

活性, 可能与其与 LYS15、SER295、HIS258 等氨基酸残基形成氢键, 与 ALA289 形成疏水相互作用以及与 GLU10 形成  $\pi$ -阴离子相互作用等有关。



注: PHE, 黄柏碱

图 7 黄柏碱与  $\alpha$ -葡萄糖苷酶-PNPG 复合物位点 5 的对接 3D 和 2D 图

表 3 分子对接的结合能结果(kJ·mol<sup>-1</sup>)

配体	位点 1	位点 2	位点 3	位点 4	位点 5
PNPG	-32.2	—	—	—	—
阿卡波糖	-37.3	—	—	—	—
黄柏碱	-28.0	-25.1	-28.5	-27.2	-31.4

#### 4 讨论

本实验通过建立酶-抑制剂模型研究黄柏碱对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的影响,结果显示黄柏碱对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性具有一定的抑制作用,且随着黄柏碱质量浓度的升高,其抑制作用逐渐增强。进一步的酶抑制动力学试验表明黄柏碱的抑制作用属于可逆性的反竞争性抑制类型,这与阿卡波糖的竞争性抑制作用形式不同<sup>[17]</sup>。而分子对接的实验结果也进一步验证了黄柏碱和阿卡波糖不同的抑制作用形式,阿卡波糖与  $\alpha$ -葡萄糖苷酶竞争性结合位点 1 的结合能最低,其次是底物 PNPG,提示阿卡波糖比底物 PNPG 更易与位点 1 结合。当向  $\alpha$ -葡萄糖苷酶-PNPG 体系中加入阿卡波糖时,阿卡波糖将与 PNPG 竞争  $\alpha$ -葡萄糖苷酶位点 1 的结合从而表现为竞争性抑制作用;而黄柏碱与位点 1 的结合弱于 PNPG,当向  $\alpha$ -葡萄糖苷酶-PNPG 体系中加入黄柏碱时,黄柏碱无法与 PNPG 竞争  $\alpha$ -葡萄糖苷酶位点 1 的结合,更易与反竞争性位点结合而表现为反竞争性抑制作用。

本研究结果显示,黄柏碱体外对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的 IC<sub>50</sub> 为 0.126 mg/mL,表明黄柏碱对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性有一定的抑制作用。小檗碱是黄柏生物碱中的主要成分<sup>[18]</sup>,有研究<sup>[19]</sup>考察了高纯度的小檗碱对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用,结果显示小檗碱的 IC<sub>50</sub> 为 2.02 mg/mL。小檗碱具有明确的降糖作用,从 IC<sub>50</sub> 的结果来看,黄柏碱明显低于小檗碱,提示黄柏碱可能有较好的降糖作用,可能成为黄柏降血糖作用的相关活性物质。

由于酿酒酵母  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的三维晶体结构尚未被解析,故本研究采用同源建模的方法建立了酿酒酵母来源的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的 3D 模型。经多指标的综合质量评估分析可知,建立的模型具有一定的可靠性;利用模型蛋白分析了黄柏碱与  $\alpha$ -葡萄糖苷酶相互作用的潜在机制,结果表明黄柏碱主要可能是通过与  $\alpha$ -葡萄糖苷酶形成氢键、疏水作用和  $\pi$ -阴离子相互作用而发挥抑制作用。本研究为黄柏碱的降糖作用研究提供一定的参考和依据,同时还可

为以黄柏碱为基础,通过结构优化,开发更加强效的黄柏碱衍生物的研究夯实了基础。

#### 参考文献:

- [1] 杨文英. 中国糖尿病的流行特点及变化趋势[J]. 中国科学:生命科学, 2018, 48(8): 812-819.
- [2] 王胜红, 罗超.  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的药理作用及研究进展[J]. 湖北成人教育学院学报, 2019, 25(2): 18-21.
- [3] 张燕, 李琳琳, 木合布力·阿布力孜, 等. 新疆昆仑雪菊 5 种提取物对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 166-169.
- [4] FLORES-BOCANEGRA L, GONZALEZ-ANDRADE M, BYE R, et al.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors from *Salvia circinata*[J]. J Nat Prod, 2017, 80(5): 1584-1593.
- [5] LIU X, ZHU L, TAN J, et al. Glucosidase inhibitory activity and antioxidant activity of flavonoid compound and triterpenoid compound from *Agrimonia pilosa* Ledeb[J]. BMC Complement Altern Med, 2014, 14: 12.
- [6] 陈哲, 张进, 钟振声. 金线莲  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂提取工艺优化研究[J]. 中国酿造, 2017, 36(7): 135-138.
- [7] HATTORI T, YAMADA S, FURUTA K, et al. Studies on antinephritic effects of plant components (5): Effects of pherodendrin on original and crescentic-type anti-GBM nephritis in rats [J]. Folia Pharmacol Japonica, 1992, 99(6): 391-399.
- [8] MORI H, FUCHIGAMI M, INOUE N, et al. Principle of the bark of *Phellodendron amurense* to suppress the cellular immune response[J]. Planta Med, 1994, 60(5): 445-449.
- [9] 张丽. 滇丁香、茜草抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性成分研究[D]. 郑州: 河南大学, 2010.
- [10] 李雅珊. 靛玉红类  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的活性与机理研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2016.
- [11] CHEN VB, ARENDALL WB III, HEADD JJ, et al. MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography[J]. Acta Crystallogr D Biol Cryst, 2010, 66(1): 12-21.
- [12] LIN LY, HAO ZY, CAO P, et al. Homology modeling and docking study of diamondback moth ryanodine receptor reveals the mechanisms for channel activation, insecticide binding and resistance[J]. Pest Manag Sci, 2020, 76(4): 1291-1303.
- [13] 徐雯, 曹艳华, 乔德水, 等.  $\alpha$ -葡萄糖苷酶三维结构的同源建模及其对接研究[J]. 药物生物技术, 2009, 16(3): 255-259.
- [14] GUPTA S, GUPTA V. Homology modeling, structural insights and *in-silico* screening for selective inhibitors of mycobacterial CysE[J/OL]. J Biomol Struct Dyn[2020-10-05]. https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07391102.2020.1734089?journalCode=tbsd20.
- [15] 王青云, 林亲录, 刘永乐, 等. 几种  $\alpha$ -葡萄糖苷酶结构与活性位点的预测和比较[J]. 计算机与应用化学, 2010, 27(5): 577-581.
- [16] SOHRETOGLU D, SARI S, OZEL A, et al.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory effect of *Potentilla astracanic* and some isoflavones: Inhibition kinetics and mechanistic insights through *in vitro* and *in silico* studies[J]. Int J Biol Macromol, 2017, 105: 1062-1070.
- [17] 范莉, 王业玲, 唐丽. 天然来源  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂筛选方法的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(2): 313-321, 306.
- [18] 董二会. 黄连及川黄柏抗糖尿病活性部位微量化学成分的研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2012.
- [19] 唐英, 刘春明, 李森林, 等. 黄连中  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的筛选分离及质谱分析[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(7): 1078-1083, 1077.

(编辑: 杨蕊敏)