

苦荞黄酮体外抑制黄嘌呤氧化酶活性的效果及其分子机制

鲁航, 常丁鑫, 尉凡, 刘金桃, 郭蒙蒙, 王佳, 李书国*
(河北科技大学食品与生物学院, 河北石家庄 050018)

摘要: 为了评估苦荞黄酮作为黄嘌呤氧化酶活性天然抑制剂的开发潜力, 该研究通过酶抑制试验、分子对接和分子动力学模拟探讨了苦荞黄酮对黄嘌呤氧化酶活性的抑制效果及作用机制。结果表明: 苦荞黄酮对黄嘌呤氧化酶活性具有较好的抑制效果, 其半抑制浓度 IC_{50} 值为 $0.83\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 当苦荞黄酮质量浓度为 $1.4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 抑制率为 60.43%, 抑制类型为可逆混合型抑制。苦荞黄酮的主要成分为芦丁、槲皮素, 芦丁与黄嘌呤氧化酶结合的活性位点为 *PHE1142*、*VAL1011*、*PHE1013*、*LEU1014*、*PHE649* 等, 主要作用力为氢键和 π - π 键, 二者结合自由能为 $-26.42\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$; 槲皮素与黄嘌呤氧化酶结合的活性位点为 *LEU648*、*VAL1011*、*PHE649*、*SER876*、*ASN768* 等, 主要作用力为疏水作用力、 π - π 键和氢键, 其结合自由能为 $-27.70\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$; 芦丁、槲皮素与黄嘌呤氧化酶结合稳定, 可有效抑制黄嘌呤氧化酶催化嘌呤氧化为尿酸。该研究为苦荞黄酮抑制黄嘌呤氧化酶活性提供了酶学和分子作用机制依据, 表明其在调节尿酸代谢、预防高尿酸血症和痛风病功能性食品开发中具有潜在应用价值。

关键词: 苦荞麦; 黄酮; 黄嘌呤氧化酶; 酶抑制作用; 分子机制

文章编号: 1673-9078(2026)07-85-94 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.7.0591

Inhibitory Effect of Tartary Buckwheat Flavonoids on Xanthine Oxidase Activity and Its Molecular Mechanism

LU Hang, CHANG Dingxin, YU Fan, LIU Jintao, GUO Mengmeng, WANG Jia, LI Shuguo*

(College of Food and Biology, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China)

Abstract: To evaluate the development potential of Tartary buckwheat flavonoids (TBF) as natural inhibitors of xanthine oxidase (XO) activity, this study investigated the inhibitory effect and mechanism of TBF on XO activity through enzyme inhibition assays, molecular docking, and molecular dynamics simulation. The results showed that TBF exhibited good inhibitory effects on XO activity, with a half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of $0.83\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. At a TBF concentration of $1.4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, the inhibition rate reached 60.43%, and inhibition followed a reversible mixed mode. The main TBF components were rutin and quercetin. The active binding sites of rutin with XO included *PHE1142*, *VAL1011*, *PHE1013*, *LEU1014*, and *PHE649*, primarily via hydrogen bonding and π - π interactions, with a binding free energy of $-26.42\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. The active binding sites of quercetin with XO included *LEU648*, *VAL1011*, *PHE649*, *SER876*, and *ASN768*, primarily via hydrophobic interactions, π - π bonds, and hydrogen bonding, with a binding free energy of $-27.70\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Both rutin and quercetin formed stable complexes with XO, thereby

引文格式:

鲁航,常丁鑫,尉凡,等.苦荞黄酮体外抑制黄嘌呤氧化酶活性的效果及其分子机制[J].现代食品科技,2026,42(7):85-94.

LU Hang, CHANG Dingxin, YU Fan, et al. Inhibitory effect of tartary buckwheat flavonoids on xanthine oxidase activity and its molecular mechanism [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(7): 85-94.

收稿日期: 2025-04-27; 修回日期: 2025-07-07; 接受日期: 2025-07-12
基金项目: 河北省重点研发计划项目 (21327111D)
作者简介: 鲁航 (2001-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 粮食的高值利用及其功能性成分的研究, E-mail: 624425716@qq.com
通讯作者: 李书国 (1969-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 新型粮油食品及加工关键技术研究, E-mail: shuguolee@126.com

effectively inhibiting XO-catalyzed oxidation of purine to uric acid. This study provides evidence for the enzymatic and molecular mechanisms by which TBF inhibits XO activity, indicating its potential for developing functional foods that regulate uric acid metabolism and help prevent hyperuricemia and gout.

Key words: Tartary buckwheat; flavonoids; xanthine oxidase; enzyme inhibition; molecular mechanism

苦荞 (*Fagopyrum tataricum*) 属于蓼科荞麦属, 是一种重要的“药食同源”小杂粮作物, 富含蛋白质、淀粉、黄酮等生物活性物质, 具有较高的营养和药用价值, 而黄酮类化合物是其典型的特征功能性成分^[1,2]。黄酮类化合物具有抵御自由基侵害, 清除体内毒素, 调节糖脂、尿酸代谢等功效, 并且还能够抑制癌细胞的扩散^[3,4]。目前苦荞的研究主要集中在对麸皮、壳、种子等部位的组分鉴定, 活性物质提取及功能性评价等方面^[5]。黄酮类化合物作为植物的次级代谢物, 具有 C3-C6-C3 的基础骨架^[6], 苦荞黄酮化合物的主要成分是芦丁, 其含量占苦荞总黄酮的 70%~90%。芦丁具有降低毛细血管脆性, 改善微循环的作用^[7]。除芦丁外, 苦荞中常见的黄酮类化合物, 如槲皮素、异槲皮素等在功能性食品开发中具有重要的开发应用价值^[8]。

尿酸在机体代谢过程中扮演着“双刃剑”的角色, 兼具保护与致病双重属性。一方面, 作为强效抗氧化剂, 尿酸能有效清除单线态氧分子、氧自由基和过亚硝酸根等活性物质, 防止进一步的氧化损伤, 维护细胞稳态; 另一方面, 当体内嘌呤代谢紊乱、肾脏排泄功能障碍时, 会出现尿酸生成过多或排泄不畅的情况, 导致尿酸水平超出正常范围。长期高尿酸血症会使尿酸晶体在关节内沉积, 引发痛风; 同时, 也可能加重血管性损伤, 增加糖尿病和心血管疾病的发病风险。目前, 高尿酸血症的患病率及痛风发病率正逐年上升, 截至 2019 年, 我国成年人高尿酸血症的总体患病率已达到 13.3%, 2022 年逐渐上升至 15.1%。其中, 老年人群的患病率较高, 男性 (24.5%) 的患病率高于女性 (3.6%), 痛风患者有 5 300 多万人, 因此高尿酸血症及痛风症成为继高血压、高血脂、高血糖之后第四大慢性病^[9,10]。

黄嘌呤氧化酶 (Xanthine Oxidase, XO) 是一种催化氧化酶^[11], 主要分布在肝脏, 能够特异性催化黄嘌呤和次黄嘌呤的氧化反应, 使其转化为尿酸。作为高尿酸血症治疗的关键靶点, 针对该酶开发的别嘌呤醇、非布司他、苯溴马隆等药物已在临床治疗中展现显著疗效。治疗高尿酸血症的关键在于降低血清尿酸浓度, 天然产物中的 XO 抑制剂, 如类黄酮、皂苷和多酚等化合物, 因其具有低毒高效的特性而受到关注。

这些抑制剂通过抑制 XO 活性来减少尿酸生成, 进而调节体内尿酸水平。经大量研究证明, 黄酮类化合物能够通过抑制 XO 活性、调节尿酸转运体表达来减少尿酸合成, 同时能够抑制肾脏尿酸重吸收并促进尿酸分泌, 进而起到改善高尿酸血症的功效^[12,13]。因此, 研究苦荞黄酮与 XO 的相互作用机理对于治疗高尿酸血症具有重要意义。

本研究通过酶抑制动力学试验考察苦荞黄酮对黄嘌呤氧化酶的抑制效果和类型, 利用分子对接和分子动力学模拟技术研究芦丁、槲皮素与黄嘌呤氧化酶之间的相互作用, 以探索苦荞黄酮对黄嘌呤氧化酶抑制的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

苦荞 (原粮产地四川大凉山), 德昌县佳信粮食有限公司; 芦丁、槲皮素标准品 ($\geq 95\%$, 源自苦荞), 北京索莱宝科技有限公司; 亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、无水乙醇、冰醋酸、乙酸钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾 (分析纯), 天津永大化学试剂有限公司; 纤维素酶 (酶活力 $10 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$), 上海易恩化学技术有限公司; 黄嘌呤氧化酶 (酶活力 $10 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$), Sigma-Aldrich (上海) 贸易有限公司。实验用水为超纯水。

1.2 仪器与设备

S4-M71 型粉碎机, 九阳股份有限公司; TCL-10B 型离心机, 上海安亭科学仪器厂; KQ3200DE 型超声波清洗器, 中国昆山超声仪器有限公司; 5500PC 型紫外-可见光分光光度计, 上海元析仪器有限公司; ST3100 型 pH 计, Ohaus (常州) 仪器有限公司; MultiskanF 型酶标仪, 赛默飞世尔科技有限公司; 酶标板 (96 孔), Corning (吴江) 有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 苦荞黄酮的提取

苦荞黄酮的提取参考方法^[14-16]并稍作修改, 称取苦荞粉约 2.0 g, 加入 0.16 g 纤维素酶, 以料液比 $1:60 (\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ 加入体积分数为 70% 的乙醇溶液, 调节体系 pH 值为

5, 置于超声清洗机中, 固定超声功率为 100 W, 在温度为 50 °C 条件下提取 1 h, 离心后收集上清液。重复操作两次, 合并上清液即得苦荞黄酮提取液, 于 4 °C 保存。采用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 显色法, 于波长 510 nm 处测定提取液吸光度, 以芦丁作为标准品绘制标准曲线 $y=10.544x-0.0051$, $R^2=0.9995$, 将提取液吸光度代入标准曲线公式中, 测得苦荞黄酮提取液质量浓度为 $0.2795\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

1.3.2 黄嘌呤氧化酶活性抑制试验

将苦荞黄酮提取液置于旋转蒸发仪中, 在 60 °C、减压条件下进行旋转蒸发浓缩操作, 测定旋转蒸发后溶液中苦荞黄酮质量浓度至达到 $2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。取浓缩后的提取液, 以 75% 乙醇作为稀释剂, 配制质量浓度梯度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的苦荞黄酮提取液。将 1 mL 不同质量浓度的苦荞黄酮提取液与 2.9 mL pH 值为 7.5 的磷酸盐缓冲液 (Na_2HPO_4 、 NaH_2PO_4) 及 0.1 mL 的黄嘌呤氧化酶 (酶活力为 $0.1\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) 混合均匀。随后, 在 25 °C 下静置 15 min, 再加入 2 mL 的黄嘌呤溶液 (摩尔浓度为 $150\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 以启动反应过程。反应在 25 °C 下持续进行 30 min。之后, 加入 1 mL 摩尔浓度为 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 HCl 来终止反应。利用分光光度计在 295 nm 波长下测定反应液的光吸收值, 并依据公式计算出抑制率。通过回归方程进一步确定苦荞黄酮的 IC_{50} 值。

$$D = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_4}) \times 100\% \quad (1)$$

式中:

D ——黄嘌呤氧化酶抑制率, %;

A_1 ——加酶样品溶液的吸光值;

A_2 ——不加酶样品溶液的吸光值;

A_3 ——缓冲液代替样品溶液的空白组的吸光值;

A_4 ——不加酶空白组的吸光值。

1.3.3 苦荞黄酮对黄嘌呤氧化酶抑制作用的动力学试验

黄嘌呤作为底物可以与黄嘌呤氧化酶在缓冲液体系中反应生成尿酸。绘制酶浓度与反应速率关系图: 固定黄嘌呤摩尔浓度为 $150\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 不变, 配制五种不同酶活力的黄嘌呤氧化酶溶液 (分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$)。按照 1.3.2 的实验步骤, 分别测定有无苦荞黄酮时的反应体系吸光值, 并计算出对应的反应速率。以酶浓度为横轴, 反应速率为纵轴, 绘制拟合曲线。通过观察曲线分析苦荞黄酮对黄嘌呤氧化酶的抑制类型是否可逆。

绘制 Lineweaver-Burk 双倒数曲线: 设定黄嘌呤氧

化酶活力为 $0.05\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, 以黄嘌呤作为反应底物。同样按照 1.3.2 的实验方法, 分别测定有无苦荞黄酮时反应体系的吸光值, 以反应时间为除数进行标准化处理, 计算出对应的酶促反应速率。以黄嘌呤浓度的倒数 $1/S$ 为横轴, 反应速率的倒数 $1/V$ 为纵轴, 绘制 Lineweaver-Burk 双倒数曲线。结合米氏方程推断出苦荞黄酮对黄嘌呤氧化酶浓度的抑制类型。

1.3.4 芦丁、槲皮素与黄嘌呤氧化酶的分子对接

与其他产地的苦荞相比, 四川凉山的苦荞黄酮类物质中芦丁和槲皮素含量最高^[17,18], 故采用芦丁、槲皮素标准品作为苦荞黄酮主要代表化合物进行分子对接实验, 进而探索苦荞黄酮化合物分子在目标黄嘌呤氧化酶活性位点中的所有可能的位置和姿态, 并利用评分函数用于评估每一个可能的位置和姿态的稳定性或优势。

1.3.4.1 预处理和活性位点识别

采用 AlphaFold2 预测黄嘌呤氧化酶对应的晶体结构, 并使用薛定谔的 LigPrep 模块, 将化合物的 2D sdf 结构转化为所有 3D 手性构象。通过薛定谔的 Receptor Grid Generation 模块预测并获取黄嘌呤氧化酶的活性位点。

1.3.4.2 分子对接

采用最高精度的 XP 对接方法, 将处理好的配体与黄嘌呤氧化酶活性蛋白的活性位点对接。得分越低, 结合稳定性越高。

1.3.4.3 MM-GBSA 分析

通过 MM-GBSA 计算分析, 评估芦丁、槲皮素与黄嘌呤氧化酶蛋白的结合自由能。结合自由能越低, 结合稳定性越高。

1.3.5 芦丁、槲皮素与黄嘌呤氧化酶的分子动力学模拟

分子动力学模拟 (Molecular Dynamics Simulation): 通常用于深入理解分子间的相互作用机制, 以及预测和解释实验观察到的现象, 分子对接和分子动力学模拟是药物设计中的两种重要计算方法。分子对接主要关注芦丁、槲皮素分子与目标黄嘌呤氧化酶的静态相互作用, 以预测芦丁、槲皮素的活性, 而分子动力学模拟主要分析分子系统的动态行为, 以理解芦丁、槲皮素等黄酮类化合物抑制黄嘌呤氧化酶的作用机制^[19,20]。

1.3.6 数据处理

本研究所有试验结果均为三次平行试验平均值。试验数据运用 SPSS 17.0 软件进行分析, 运用 Origin Pro 9 绘图。

2 结果与分析

2.1 苦荞黄酮对黄嘌呤氧化酶活性的抑制效果

苦荞黄酮质量浓度的差异会对黄嘌呤氧化酶的活性产生不同的抑制效果。如图1所示,随着苦荞黄酮的质量浓度增加,苦荞黄酮对黄嘌呤氧化酶活性的抑制率呈逐渐增加并趋于平缓的趋势,这可以说明苦荞中黄酮类化合物能够在一定程度上抑制黄嘌呤氧化酶活性。当苦荞黄酮质量浓度升高至 $1.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,高浓度的苦荞黄酮可能因为分子间自聚集使其无法自由扩散至酶活性中心,从而限制抑制率的进一步提升。此时,苦荞黄酮的抑制率为 60.43% 低于别嘌呤醇的抑制率 92.88%, 在质量浓度 $0.05 \sim 1.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内,别嘌呤醇对黄嘌呤氧化酶的抑制作用更强。苦荞黄酮的 IC_{50} 值为 $0.83 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。由此可以判断,苦荞黄酮对黄嘌呤氧化酶活性有一定的抑制作用,但其抑制作用低于阳性对照组别嘌呤醇的抑制作用。王亚楠等^[21]考察了紫苏叶提取物对黄嘌呤氧化酶的抑制效果,结果显示其 IC_{50} 值为 $5.80 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。与之相比,本研究中苦荞黄酮对黄嘌呤氧化酶的 IC_{50} 值更低,表明苦荞黄酮具有较好的黄嘌呤氧化酶抑制效果。

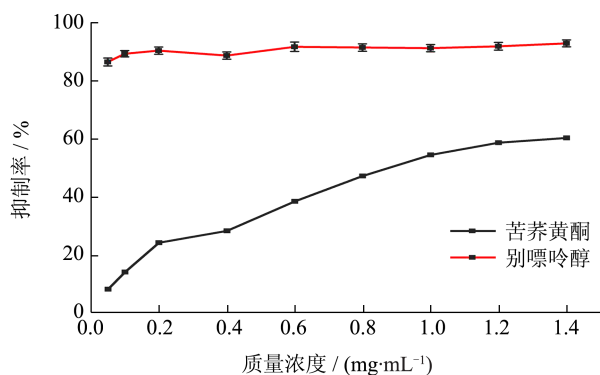


图1 不同质量浓度的苦荞黄酮与别嘌呤醇对黄嘌呤氧化酶活性的抑制效果

Fig.1 Inhibition of different concentrations of total flavonoids and allopurinol on xanthine oxidase activity

2.2 苦荞黄酮对黄嘌呤氧化酶的抑制类型的确定

抑制剂的有无和不同黄嘌呤氧化酶浓度均会对反应进行的速率产生一定的影响。图2显示了不同条件下黄嘌呤氧化酶浓度与反应速率之间的关系。从线性拟合结果来看,无论是否添加苦荞黄酮,拟合直线均呈现出过原点的特征。无抑制剂存在时,直线的斜率明显大于有抑制剂时的斜率,反应速率更快。特别是,当反应体系中存在可逆性抑制剂时,拟合直线会经过

原点;反之则不然。进一步说明苦荞黄酮对黄嘌呤氧化酶的抑制类型为可逆性抑制。

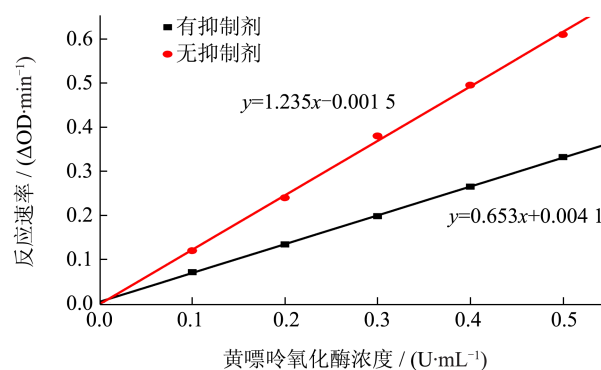


图2 苦荞黄酮对黄嘌呤氧化酶的可逆性抑制作用

Fig.2 Reversible inhibitory effect of Tartary buckwheat flavonoid extract on xanthine oxidase

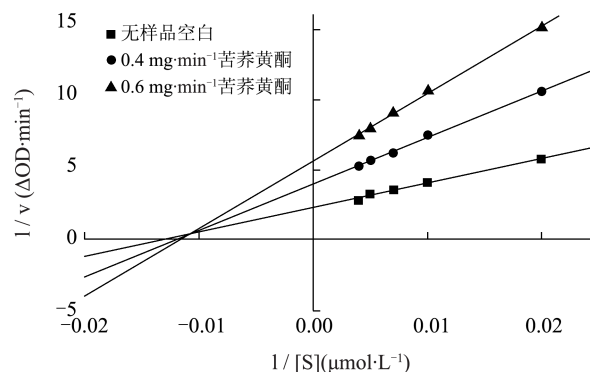


图3 苦荞黄酮对黄嘌呤氧化酶抑制作用的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线

Fig.3 Lineweaver-burk double reciprocal curve of inhibitory effect of buckwheat total flavonoids on xanthine oxidase

根据图3结果,利用双倒数作图法判断苦荞黄酮对黄嘌呤氧化酶的抑制类型,结果显示三条直线相交于第二象限,无样品空白组米氏常数 $K_m=72.82$,最大反应速率 $V_{max}=0.431 \mu\text{mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{min})^{-1}$; 加入质量浓度为 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的苦荞黄酮后 $K_m=80.74$, $V_{max}=0.247 \mu\text{mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{min})^{-1}$; 加入质量浓度为 $0.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的苦荞黄酮后 $K_m=84.93$, $V_{max}=0.176 \mu\text{mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{min})^{-1}$,随着苦荞黄酮质量浓度的增加, K_m 值增大, V_{max} 值减少,该抑制作用是一种竞争-非竞争混合型抑制,得出苦荞黄酮对黄嘌呤氧化酶(XO)的抑制方式属于混合型。这种混合型抑制意味着苦荞黄酮不仅能与黄嘌呤竞争性地结合到XO上,还能与已形成的XO-黄嘌呤复合物发生结合,进而实现对XO活性的有效抑制^{[22][23]}。佟思漫^[24]表征了槲皮素、芦丁和金丝桃苷对黄嘌呤氧化酶活性的影响,结果显示三种黄酮对黄嘌呤氧化酶为可逆的竞争-非竞争混合型抑制。本研究进一

步验证了黄酮类化合物对黄嘌呤氧化酶的抑制模式。

2.3 芦丁、槲皮素与黄嘌呤氧化酶分子对接结果分析

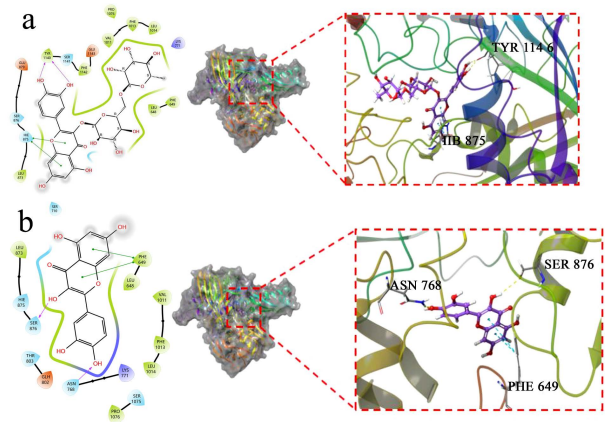


图 4 芦丁、槲皮素对黄嘌呤氧化酶分子对接结果的 3D 结构图
Fig.4 3D structural diagram of docking results of rutin and quercetin on xanthine oxidase molecules

注: (a) 芦丁; (b) 槲皮素。下同。

表 1 芦丁、槲皮素对黄嘌呤氧化酶分子对接结果分析
Table 1 Analysis of docking results of rutin and quercetin on xanthine oxidase molecules

Title	Compound	Target	XP Gscore	MM-GBSA dG Bind/ (kcal·mol ⁻¹)
5280805	芦丁	黄嘌呤氧化酶	-7.064	-26.42
5280343	槲皮素	黄嘌呤氧化酶	-6.995	-27.70

分子对接结果如图 4，氢键在生物分子识别中起着关键作用^[25]，它们能够稳定分子间的相互作用，并影响分子的构象和功能。氢键的数量和催化活性位点的残基类型对黄嘌呤氧化酶的抑制活性存在非常重要的作用。如图 4 所示，芦丁结合到黄嘌呤氧化酶蛋白的活性口袋的表面，芦丁能够与黄嘌呤氧化酶的活性位点（PHE1142、VAL1011、PHE1013、LEU1014、PHE649 等）结合，与残基 TYR1140 形成两个氢键，与残基 HIE875 形成两个 $\pi-\pi$ 键，是芦丁与黄嘌呤氧化酶相互作用的主要作用力。槲皮素结合到黄嘌呤氧化酶蛋白的活性口袋的表面，与黄嘌呤氧化酶蛋白的残基 LEU648、VAL1011、PHE649 等形成疏水作用力，与残基 PHE649 形成两个 $\pi-\pi$ 键，槲皮素与黄嘌呤氧化酶的活性位点残基 SER876、ASN768 各形成一个氢键，产生相互作用。说明苦荞黄酮是非竞争性抑制和竞争型抑制的混合型抑制，印证了在黄嘌呤氧化酶抑制试验中，苦荞黄酮能够表现出一定的抑制性。

与黄芩素、黄芩苷等多酚类化合物作用方式不

同^[26-28]，芦丁、槲皮素芦丁能够与黄嘌呤氧化酶的多活性位点结合，这显示了芦丁与黄嘌呤氧化酶之间的特异性相互作用。芦丁、槲皮素与活性位点的结合，可能通过氢键、疏水相互作用或其他非共价键来实现。这种结合可能影响了黄嘌呤氧化酶的构象或活性，从而调节其催化功能。 $\pi-\pi$ 键通常发生在芳香环之间，它们能够增强分子间的相互作用，并影响分子的稳定性和活性。这些相互作用共同表明芦丁、槲皮素与黄嘌呤氧化酶之间存在较强的结合能力，这解释了芦丁、槲皮素对黄嘌呤氧化酶的抑制作用。通过结合酶的活性位点和关键残基，芦丁、槲皮素干扰了黄嘌呤氧化酶的催化机制，从而减少了尿酸的生成。这种抑制作用对于治疗与尿酸水平异常相关的疾病具有重要意义^[29,30]。

综合分析 XP 对接与 MM-GBSA 结果如表 1 所示，芦丁与黄嘌呤氧化酶对接得分为 -7.064，MM-GBSA 结果为 -26.42 kcal·mol⁻¹，对接得分低，结合自由能较低，表明芦丁与黄嘌呤氧化酶结合较稳定。其次，槲皮素与黄嘌呤氧化酶对接得分为 -6.995，MM-GBSA 结果为 -27.70 kcal·mol⁻¹，对接得分低，结合自由能较低，表明槲皮素与芦丁结合较稳定^[31]。芦丁和槲皮素与黄嘌呤氧化酶结合时形成的氢键数量相同，但二者与酶催化活性位点的作用模式存在差异。这种差异致使槲皮素与黄嘌呤氧化酶的结合能更低，分子间相互作用更为稳定。因此，两种化合物对黄嘌呤氧化酶的抑制活性呈现差异，即槲皮素凭借更强的结合能力，展现出更高效的酶抑制效果。芦丁和槲皮素与黄嘌呤氧化酶结合能显示出不同的负值，说明苦荞黄酮提取物对黄嘌呤氧化酶的抑制在热力学上是有利的。

2.4 芦丁、槲皮素与黄嘌呤氧化酶蛋白-RMSD、RMSF 分析

如图 5 为芦丁、槲皮素与 XO 蛋白的均方根偏差（Root Mean Square Deviation, RMSD）分析结果，其中蓝色为 XO 蛋白，红色为芦丁、槲皮素。随着模拟时间的增加波动逐渐减小，表明所有的配合物的构象都趋于稳定，芦丁与 XO 蛋白在 20 ns 之后相对稳定，此时系统处于平衡状态；槲皮素与 XO 蛋白在 30 ns 之后相对稳定，系统处于平衡状态^[32]。

如图 6 为蛋白 RMSF 的均方根波动（Root Mean Square Fluctuation, RMSF）变化情况。芦丁与 XO 蛋白结合后在 80-85 AA、560-570 AA 等残基区域出现较高峰值，蛋白质表现出较高的结构灵活性。槲皮素与 XO 蛋白结合后，蛋白在 10-20 AA、530-550 AA 等残基区域表现出较高的结构灵活性。

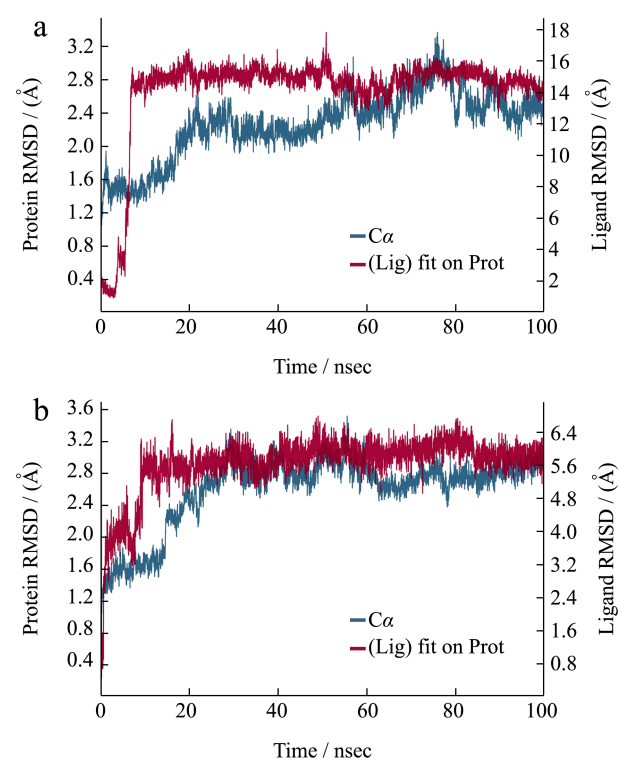


图 5 芦丁、槲皮素与 XO 蛋白-RMSD 分析结果图

Fig.5 Analysis results of Rutin, Quercetin and XO Protein-

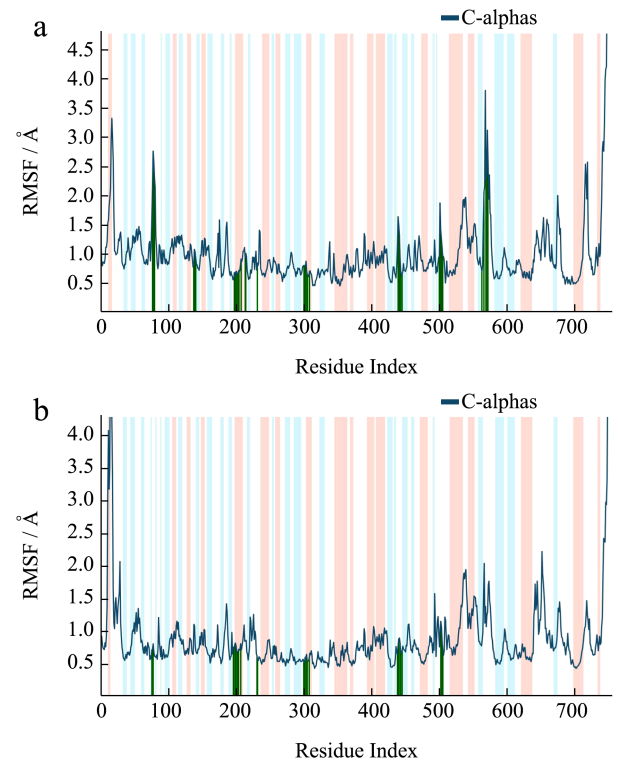


图 6 芦丁、槲皮素与 XO 蛋白-RMSF 分析结果图

Fig.6 Analysis results of Rutin, Quercetin and XO Protein-

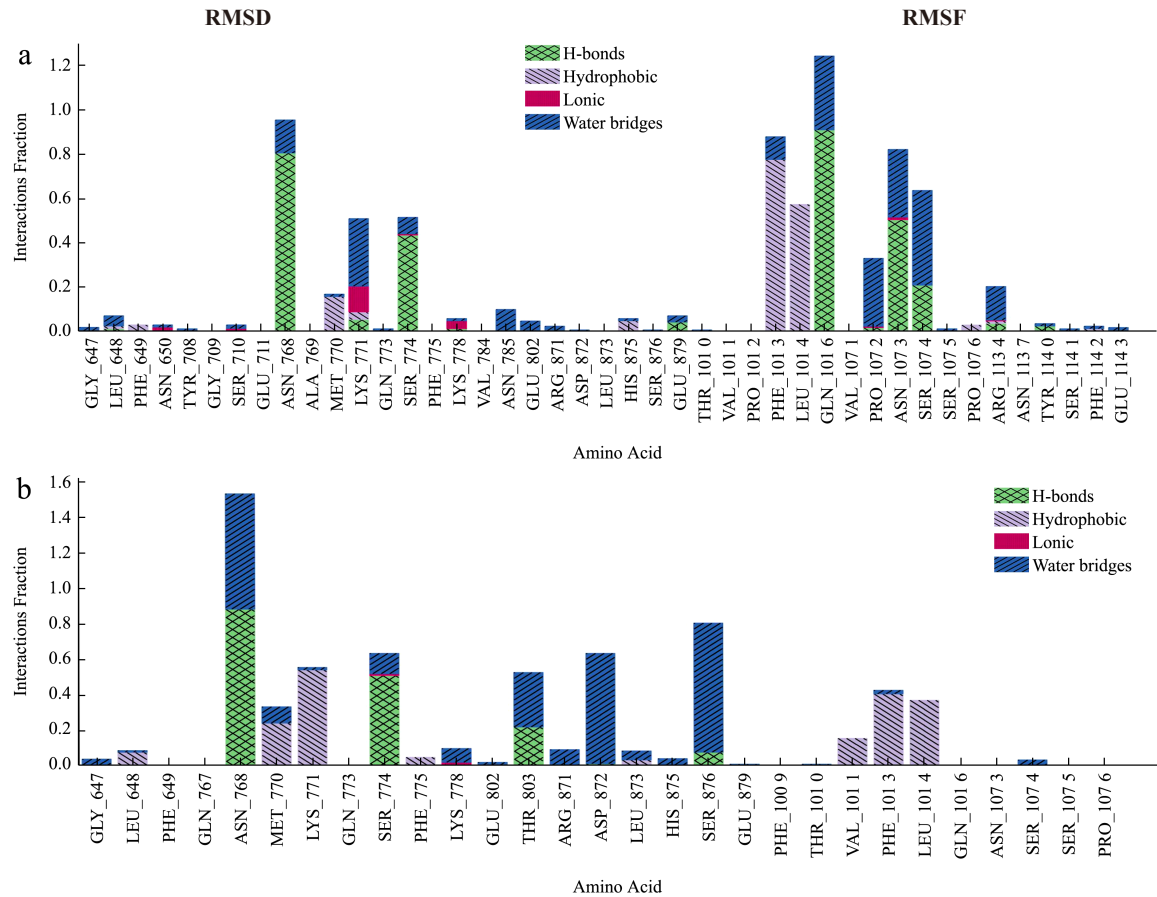


图 7 结合位点的氨基酸对蛋白结合的贡献分析

Fig.7 Analysis of the contribution of amino acids at binding sites to protein binding

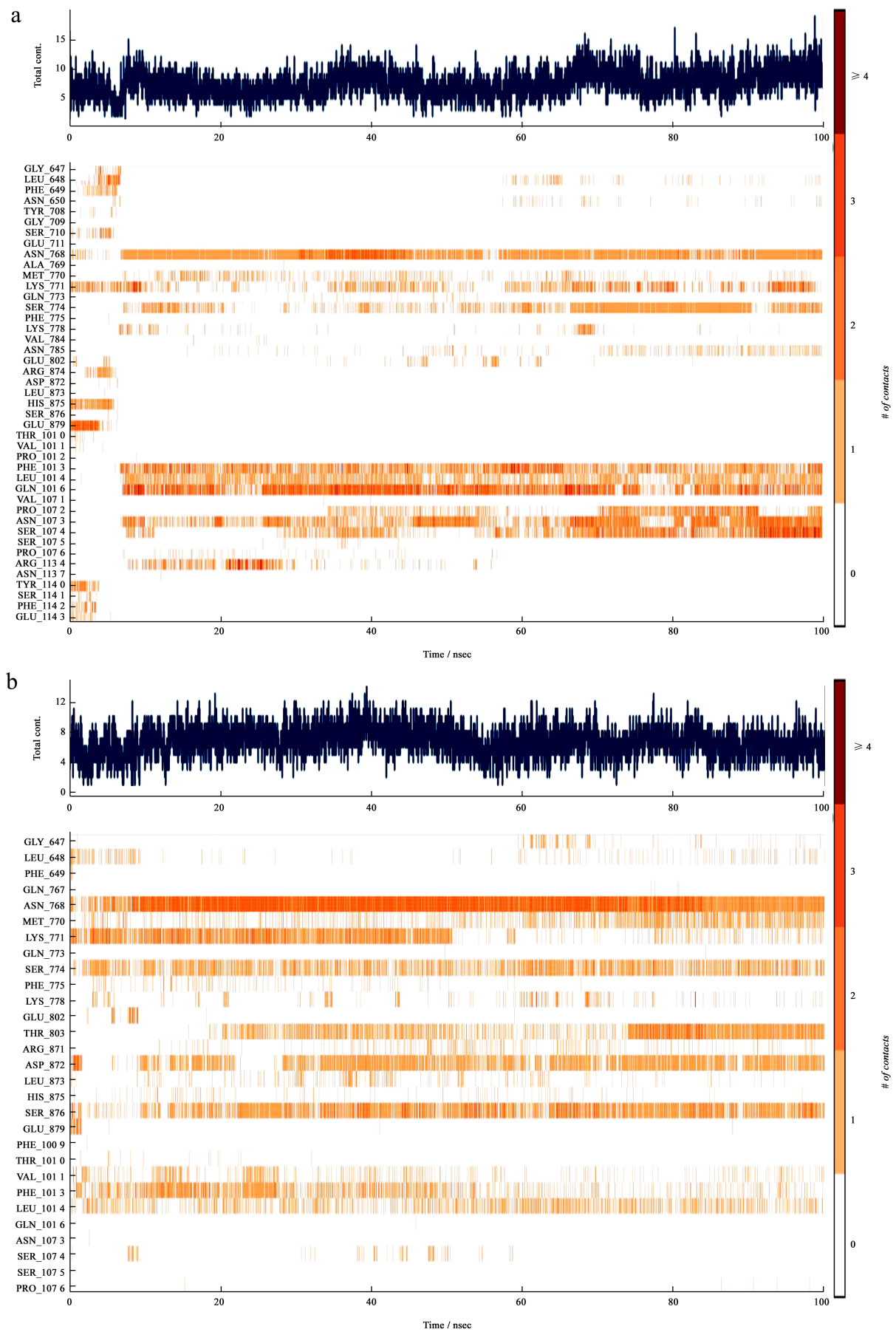


图 8 芦丁、槲皮素与特定氨基酸相互作用随时间变化图

Fig.8 Plot of the interaction of rutin and quercetin with specific amino acids over time

2.5 芦丁、槲皮素与黄嘌呤氧化酶蛋白相互作用分析

芦丁、槲皮素与黄嘌呤氧化酶蛋白的相互作用可以在整个模拟过程中进行监测。如图7所示,对芦丁与XO蛋白的结合起到重要作用的氨基酸主要有ASN768、PHE1013和GLN1016,对槲皮素与XO蛋白的结合起到重要作用的氨基酸主要有ASN768、SER774和SER876,其相互作用主要为氢键、水桥和疏水作用。说明苦荞黄酮类化合物主要通过非离子化的相互作用与黄嘌呤氧化酶结合,苦荞黄酮类化合物能够通过利用氢键与黄嘌呤氧化酶蛋白的活性位点紧密结合进而占据其活性位点、利用水桥改变酶的构象或调整抑制剂的位置从而抑制酶的活性,还能够通过疏水作用促进抑制剂与酶的非极性区域结合,从而稳定结合状态,进一步增强抑制效果。Yu等^[33]通过分子对接探讨了槲皮素、芦丁和金丝桃苷对黄嘌呤氧化酶的抑制机制,结果显示三种黄酮类化合物均通过氢键、疏水相互作用和范德华力维持复合物的稳定性。本研究进一步验证了这三种互作模式可以通过调整化合物的结构和官能团进而提高抑制剂的抑制效果,可以为设计新型抑制剂、开发新型治疗策略提供思路。

芦丁、槲皮素与特定氨基酸相互作用的整个轨迹如图8所示,氨基酸残基ASN768、SER774、LYS770、PHE1013、LEU1014、GLN1016、ASN1073、SER1074与芦丁有多次接触(以较深的橙色表示)。氨基酸残基ASN768、LYS771、SER774、THR803、ASP872、SER876与槲皮素有多次接触(以较深的橙色表示)。

2.6 芦丁、槲皮素与黄嘌呤氧化酶蛋白-结合模式分析

图9为芦丁、槲皮素化合物与蛋白质残基相互作用的详细示意图。如图9a所示,芦丁与XO蛋白的氨基酸残基SER1074(98%)、GLN1016(49%)、ASN768(33%)、SER774(24%)、ASN1073(17%)直接形成氢键,与残基SER1074(13%)、LYS771(12%)通过水桥间接形成氢键,与残基PHE1013(27%)直接形成 $\pi-\pi$ 键。如图9b所示,槲皮素与XO蛋白的氨基酸残基ASN768(88%)、SER774(32%)、THR803(21%)直接形成氢键,与残基ASP872(61%)、SER876(58%)、ASN768(51%)、THR803(30%)通过水桥间接形成氢键,与残基PHE1013(28%)直接形成 $\pi-\pi$ 键,与残基LYS771(36%)直接形成 π 阳离子键。

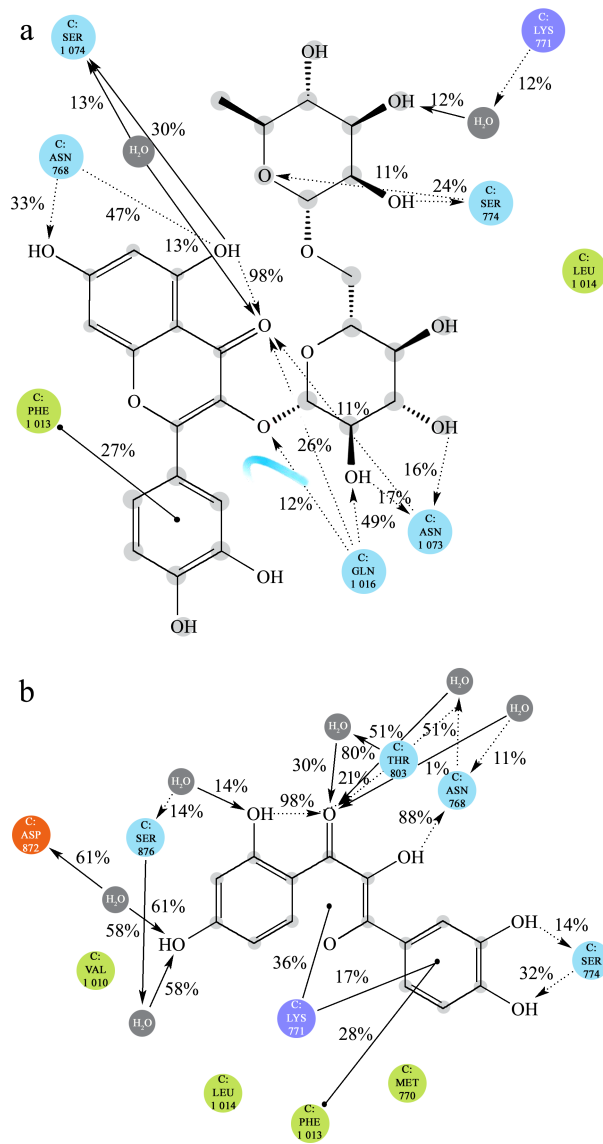


图9 芦丁、槲皮素与XO蛋白结合图

Fig.9 The results of protein-binding pattern display of rutin, quercetin and XO

3 结论

本研究利用酶促动力学模型与Lineweaver-Burk曲线深入分析了苦荞黄酮对黄嘌呤氧化酶的抑制效果及抑制类型,苦荞黄酮对黄嘌呤氧化酶活性半抑制浓度的 IC_{50} 值为 $0.83\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,当质量浓度为 $1.4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,荞黄酮的抑制率为60.43%低于别嘌呤醇的抑制率92.88%,其抑制类型为可逆混合型抑制,即苦荞黄酮能够混合型地抑制尿酸的生成。表明苦荞黄酮对黄嘌呤氧化酶活性具有较好的抑制作用,黄酮类化合物是有效的黄嘌呤氧化酶抑制剂。

利用分子对接和分子动力学模拟方法探讨了苦荞黄酮主要成分芦丁、槲皮素对黄嘌呤氧化酶的抑制的分子机制。芦丁和槲皮素主要通过氢键、 $\pi-\pi$ 键、水

桥和疏水键分别与黄嘌呤氧化酶 SER1074、GLN1016 等 8 个氨基酸残基和 ASN768、ASP872 等 9 个氨基酸残基相互作用,结合自由能为 -26.42 、 -27.70 kcal·mol⁻¹,结合自由能较低,结合相对稳定,可有效抑制黄嘌呤氧化酶活性。从分子水平上解释了苦荞黄酮对黄嘌呤氧化酶活性的抑制机制,为新型黄嘌呤氧化酶抑制剂的设计、优化和开发提供了有力的参考。

综上所述,苦荞黄酮作为一种天然的黄嘌呤氧化酶抑制剂,可通过抑制黄嘌呤氧化酶活性,进而调控嘌呤代谢为尿酸的转化过程,因此在预防高尿酸血症和痛风的功能性食品开发领域具有潜在应用价值。

参考文献

- [1] 柴多,王美婷,姜雨萌,等.苦荞麦不同部位代谢轮廓及活性成分分布[J].食品科学,2021,42(2):212-217.
- [2] WANG P, LI Q, WEI J, et al. Germplasm resources and metabolite marker screening of high-flavonoid tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(50): 20131-20145.
- [3] BETTS Z, DEVECI O A, YUKSEL B, et al. Investigation of the combined cytotoxicity induced by sodium butyrate and a flavonoid quercetin treatment on MCF-7 breast cancer cells [J]. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 2023, 86(22): 833-845.
- [4] SHEN W, LIU Q, LI C, et al. Exploration of the effect and potential mechanism of quercetin in repairing spinal cord injury based on network pharmacology and *in vivo* experimental verification [J]. Heliyon, 2023, 9(9): 12.
- [5] BOROVAYA A S, KLYKOV G A. Some aspects of flavonoid biosynthesis and accumulation in buckwheat plants [J]. Plant Biotechnology Reports, 2020, 14(2): 1-13.
- [6] LIU Y J, SUI X Y, ZHAO X H, et al. Antioxidative activity evaluation of high purity and micronized tartary buckwheat flavonoids prepared by antisolvent recrystallization [J]. Foods, 2022, 11(9): 1346.
- [7] 李河,李正涛,张宿义,等.苦荞黄酒的工艺研究[J].食品研究与开发,2016,37(21):68-71.
- [8] 姚佳,靳航,贾健斌.苦荞黄酮及其生理功能的研究进展[J].食品科技,2014,39(10):194-197.
- [9] 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.
- [10] ZHANG M, ZHU X X, WU J, et al. Prevalence of hyperuricemia among Chinese adults: findings from two nationally representative cross-sectional surveys in 2015-16 and 2018-19 [J]. Frontiers in Immunology, 2022, 12: 791983.
- [11] 金丹莉,段文慧,朱郑裕,等.玉米须水提物的抗氧化及降尿酸活性[J].现代食品科技,2023,39(7):16-23.
- [12] 李桐,梁宝月,刘晗,等.葛根异黄酮抑制XOD和GLUT9分别发挥减少尿酸生成、促进尿酸排泄双重途径的机制[J].海南医学院学报,2024,30(2):94-99.
- [13] 董渭雪.樱桃黄酮组分及降尿酸作用研究[D].汉中:陕西理工大学,2020.
- [14] 王佰灵,陈雅烯,谢家星,等.超声波辅助纤维素酶提取金荞麦总黄酮工艺优化及其抗氧化活性研究[J].粮食与油脂,2021,34(4): 123-128.
- [15] 李灵娜.超声波复合酶法提取蒲公英根总黄酮工艺研究[J].粮食与油脂,2019,32(11):93-96.
- [16] 王振吉,杨申明,段德珊,等.金环胡蜂蜂房总黄酮提取工艺及抗氧化活性分析[J].中国蜂业,2023,74(1):64-68.
- [17] 徐浪,张继斌,石卫标,等.不同产地苦荞和种植土壤资源考察分析[J].作物杂志,2024,6:78-83.
- [18] 徐浪,王玉,王祥儒,等.苦荞贮存及加工过程中黄酮类成分含量变化和利用研究[J].作物杂志,2025,3:85-91.
- [19] ABDIZADEH R, HEIDARIAN E, HADIZADEH F, et al. Investigation of pyrimidine analogues as xanthine oxidase inhibitors to treat of hyperuricemia and gout through combined QSAR techniques, molecular docking and molecular dynamics simulations [J]. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2020, 113: 72-100.
- [20] SONG J L, CHEN M H, MENG F L, et al. Studies on the interaction mechanism between xanthine oxidase and osmundacetone: Molecular docking, multi-spectroscopy and dynamical simulation [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2023, 299: 122861.
- [21] 王亚楠,张志军,李会珍.紫苏叶提取物对黄嘌呤氧化酶的抑制作用[J].中成药,2020,42(2):462-465.
- [22] 张德成,王虹,邵文卓,等.枳椇子不同溶剂提取物对黄嘌呤氧化酶的作用及动力学研究[J].山东中医药大学学报,2024,48(2): 217-226.
- [23] 孙梦月.桑黄黄酮降尿酸作用评价及降尿酸代用茶的研制[D].武汉:华中农业大学,2023.
- [24] 佟思漫.刺玫果黄酮对黄嘌呤氧化酶抑制及槲皮素微胶囊制备表征[D].长春:吉林大学,2023.
- [25] BATHULA S, SANKARA M, MALGIJA B, et al. 2-Amino thiazole derivatives as prospective aurora kinase inhibitors against breast cancer: QSAR, ADMET prediction, molecular docking, and molecular dynamic simulation studies [J]. American Chemical Society, 2023, 8(46): 44287-44311.
- [26] 曾霓.四种黄酮类化合物对黄嘌呤氧化酶的抑制作用及机制研究[D].南昌:南昌大学,2020.
- [27] WANG Y, HU T, WEI J J, et al. Inhibitory activities of flavonoids from *Scutellaria baicalensis* Georgi on amyloid aggregation related to type 2 diabetes and the possible structural requirements for polyphenol in inhibiting the nucleation phase of hIAPP aggregation [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 215: 531-540.
- [28] WEI W, ZHOU L J, WANG S, et al. Katsuwonus pelamis peptide and its complexes protect zebrafish and mice from hyperuricemia through promoting kidney excretion of uric acid and inhibiting liver xanthine oxidase activity [J]. Frontiers in Chemistry, 2022, 10: 924371.
- [29] FUJISHIMA Y, NISHIZAWA H, KAWACHI Y, et al. The effects

- of topiroxostat, a selective xanthine oxidoreductase inhibitor, on arterial stiffness in hyperuricemic patients with liver dysfunction: A sub-analysis of the BEYOND-UA study [J]. *Biomedicines*, 2023, 11(3): 674.
- [30] JIANG S Y, SONG D N, ZHAO H H, et al. Bioactivity and component analysis of water extract of sophora japonica against hyperuricemia by inhibiting xanthine oxidase activity [J]. *Foods*, 2022, 11(23): 3772.
- [31] DAS S, BORA N, ROHMAN M A, et al. Molecular recognition of bio-active flavonoids quercetin and rutin by bovine hemoglobin: an overview of the binding mechanism, thermodynamics and structural aspects through multi-spectroscopic and molecular dynamics simulation studies [J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2018, 20(33): 21668-21684.
- [32] ZIKRI A T, PRANOWO H D, HARYADI W. Stability, hydrogen bond occupancy analysis and binding free energy calculation from flavonol docked in DAPK1 active site using molecular dynamic simulation approaches [J]. *Indonesian Journal of Chemistry*, 2020, 21(2): 383-390.
- [33] YU Y L, XIONG Y Z, TONG S M, et al. Inhibitory activity of quercetin, rutin, and hyperoside against xanthine oxidase: kinetics, fluorescence, and molecular docking [J]. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2025, 26(4): 513-524.