

芒果苷对黄嘌呤氧化酶的活性抑制及其分子机制

郭淋¹, 袁子恒¹, 叶汪阳^{2*}, 汪鋈植^{1*}, 张宏岐³

(1. 三峡大学天然产物研究与利用湖北省重点实验室, 湖北省生物酵素工程技术研究中心, 湖北宜昌 443002)

(2. 湖北民族大学医学部, 湖北恩施 445000) (3. 三峡大学健康医学院, 湖北宜昌 443002)

摘要: 黄嘌呤氧化酶 (Xanthine Oxidase, XOD) 是尿酸生成关键酶, 其活性增强与高尿酸血症及痛风密切相关。芒果苷具有抑制 XOD 作用, 目前关于芒果苷抑制 XOD 的分子机制尚待系统阐释。为了阐明芒果苷对 XOD 的抑制作用及其分子机制, 该研究采用酶活性测定、抑制动力学、荧光光谱、热力学分析、圆二色谱 (Circular Dichroism, CD) 及分子对接模拟, 对芒果苷与 XOD 的相互作用进行了研究。结果表明, 芒果苷通过可逆性混合抑制方式抑制 XOD, 具有剂量依赖性, 其最大抑制率 (80.05%) 与别嘌呤醇 (81.58%) 相近。荧光光谱及热力学分析表明, 两者形成稳定复合物, 其结合过程为自发进行的吸热反应, 疏水作用力为主要驱动力。同步荧光和 CD 结果表明, 芒果苷能够改变 XOD 色氨酸残基微环境及二级结构, 从而影响其催化活性。分子对接结果显示, 芒果苷通过氢键和疏水作用与多种关键氨基酸残基形成相互作用。该研究为芒果苷在高尿酸血症及痛风功能食品中的开发与应用提供了理论依据, 同时也为开发更加安全有效的 XOD 抑制剂提供了依据。

关键词: 芒果苷; 黄嘌呤氧化酶; 抑制作用; 酶动力学

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2027.8.1050

The Inhibitory Effect of Mangiferin on Xanthine Oxidase Activity and Its Molecular Mechanism

GUO Lin¹, YUAN Ziheng¹, YE Wangyang^{2*}, WANG Junzhi^{1*}, ZHANG Hongqi³

(1.Hubei Provincial Key Laboratory of Natural Products Research and Development, Hubei Province Bio-Enzyme Engineering Technology Research Center, China Three Gorges University, Yichang 443002, China)

(2.Medical School, Hubei Minzu University, Enshi 445000, China)

(3.College of Medicine and Health Sciences, China Three Gorges University, Yichang 443002, China)

Abstract: Xanthine oxidase (XOD) is a key enzyme in uric acid production, and its increased activity is closely associated with hyperuricemia and gout. Mangiferin has been shown to inhibit XOD, but the molecular mechanisms underlying this inhibition remain poorly understood. To elucidate the inhibitory effect of mangiferin on XOD and its underlying molecular mechanisms, this study employed enzyme activity assays, inhibition kinetics, fluorescence spectroscopy, thermodynamic analysis, circular dichroism (CD), and molecular docking simulations to investigate the interaction between mangiferin and XOD. Results indicated that mangiferin inhibits XOD via a reversible mixed-type inhibition mechanism in a dose-dependent manner, achieving a maximum inhibition rate of 80.05%, which was comparable to that of allopurinol (81.58%). Fluorescence and thermodynamic analyses revealed the formation of a stable complex between mangiferin and XOD, with the binding process being an endothermic spontaneous reaction driven primarily by hydrophobic interactions. Synchronous fluorescence and CD results demonstrated that mangiferin alters the microenvironment around tryptophan residues and modifies the secondary structure of XOD, thereby affecting its catalytic activity. Molecular docking further revealed that mangiferin interacted with multiple key amino acid residues through hydrogen bonding and hydrophobic interactions. This study provides a theoretical foundation for the development and application of mangiferin in functional foods targeting hyperuricemia and gout, as well as insights for designing safer and more effective XOD inhibitors.

Key words: mangiferin; xanthine oxidase; enzyme kinetics; inhibition effect

收稿日期: 2026-07-16; 修回日期: 2026-08-27; 接受日期: 2026-08-28

基金项目: 湖北省自然科学基金创新发展联合基金 (2025AFD515)

作者简介: 郭淋 (2002-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 药物安全与有效性评价, E-mail: 2947885792@qq.com

通讯作者: 叶汪阳 (1994-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 血管内皮细胞损伤与保护机制研究, E-mail: 125674721@qq.com; 共同通讯作者: 汪鋈植 (1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 土家族药物活性评价和质量控制研究, E-mail: horsedog@163.com

高尿酸血症与痛风已成为严重影响人类健康的常见代谢性疾病,且其发病率逐年攀升并呈年轻化趋势。高尿酸血症是由嘌呤代谢紊乱或尿酸排泄减少引起的代谢异常综合征。黄嘌呤氧化酶(Xanthine Oxidase, XOD)是嘌呤代谢的关键酶,负责将次黄嘌呤转化为黄嘌呤,并进一步转化为尿酸^[1]。XOD活性越高,尿酸生成越多。作为细胞外环境的抗氧化剂,适度的尿酸可以减少机体活性氧物质引起的氧化损伤^[2,3]。当尿酸生成过多或排泄减少,导致血清尿酸水平持续升高,引发高尿酸血症与痛风发作^[4]。抑制XOD活性是当前临床上控制高尿酸血症和痛风的一线治疗手段^[5]。常见的XOD抑制剂有别嘌呤醇、非布司他等,这些药物能够有效降低血清尿酸,但其临床应用易伴随皮疹、肝肾毒性及严重超敏反应等不良反应^[6,7]。同时,在治疗期初期,还可能因血尿酸水平快速下降,诱发急性痛风发作^[8],临床使用该类药物时通常通过减少用量,同时与抗炎药物联用,从而缓解疼痛^[9,10]。因此,开发安全、高效的新型XOD抑制剂,并具有抗炎效果的药物具有重要意义。

芒果苷是知母、杠果等的主要有效成分^[11],属于黄酮葡萄糖苷^[12]。已有研究表明,芒果苷可有效降低高尿酸血症小鼠的血尿酸水平^[13],并抑制肝脏XOD活性^[14],且对小鼠肝肾无损伤,具有高效、低毒的特点^[15,16]。芒果苷还具有抗炎,抗菌,抗氧化,免疫调节及抗肿瘤等多种生物活性^[17-19]。目前,酶动力学分析、光谱学、分子对接等技术已广泛应用于天然产物与XOD的作用机制研究^[20-22]。研究发现,不同天然活性成分可通过竞争性、非竞争性或混合型方式与XOD结合,并通过改变酶构象、影响活性中心微环境等方式降低酶活性。然而,目前关于芒果苷与XOD结合特征、抑制动力学及其诱导XOD构象变化的分子机制尚缺乏系统研究。因此,本研究采用酶动力学、荧光光谱、同步荧光光谱、圆二色谱及分子对接等方法,从分子层面解析芒果苷与XOD之间的相互作用,对于理解芒果苷降尿酸机制具有重要意义,可为更安全有效防治高尿酸血症及痛风提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

XOD(活性10.8 U mg⁻¹,来源于牛乳),南京建成生物科技有限公司;芒果苷(纯度98.85%)、别嘌呤醇(纯度98%),源叶生物科技有限公司;黄嘌呤(纯度98%),上海阿达玛斯试剂有限公司;磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、氯化钠、氯化钾(分析纯),国药集团化学试剂有限公司;氢氧化钠(分析纯),上海麦克林生化科技有限公司;盐酸(分析纯),成都市科隆化学品有限公司。

1.2 仪器与设备

UV-1900i紫外可见分光光度计,日本岛津公司;SuPerMax 3000FA型多功能酶标仪,上海闪耀生物科技有限公司;日立F-4600荧光光谱仪,日本日立公司;J-1700型圆二色谱仪,日本JASCO公司;CJ-LTL101实验室超纯水机,四川纯洁科技有限公司;PHS-3C型pH计,上海仪电科学仪器股份有限公司;FA1004型电子分析天平,群安科学仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 尿酸特征峰验证

XOD能够催化底物黄嘌呤产生尿酸,尿酸具有紫外特征吸收峰^[23]。依次向96孔板中加入50 μL磷酸缓冲盐溶液(Phosphate buffered saline, PBS)和50 μL XOD(酶活力为0.05 U·mL⁻¹)溶液,37℃下反应10 min后,加入100 μL的黄嘌呤溶液(摩尔浓度为0.1 mmol·L⁻¹),37℃下孵育30 min。测定波长200~800 nm下体系的吸光值。重复三组,观察图谱变化,确定产物吸收峰所在波长。

1.3.2 XOD抑制活性测定

参考Liu、Ironi等^[24,25]的方法并进行适当修改,具体实验步骤如下:在96孔板中使用终体积为200 μL反应体系,取50 μL不同质量浓度的阳性药别嘌呤醇/样品/PBS,再加入50 μL XOD(酶活力为0.05 U·mL⁻¹)/PBS溶液,在37℃烘箱中避光孵育10 min,加入100 μL黄嘌呤溶液(摩尔浓度为0.1 mmol·L⁻¹),再次在37℃烘箱中孵育30 min。用酶标仪测试其在295 nm下的OD值,计算抑制率。

$$D(\%) = \left(1 - \frac{A_0 - A_1}{A_2 - A_3}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中:

D ——黄嘌呤氧化酶抑制率, %;

A_0 ——样品组的吸光值;

A_1 ——样品对照组的吸光值;

A_2 ——空白组的吸光值;

A_3 ——空白对照组的吸光值。

1.3.3 抑制可逆性实验

按照上述 1.3.2 相同条件, 控制底物黄嘌呤摩尔浓度不变 ($0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 配制不同酶活力的黄嘌呤氧化酶溶液 (0 、 0.01 、 0.03 、 0.05 、 $0.1 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和抑制剂芒果苷质量浓度 (0 、 50 、 100 、 200 、 $400 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 以 XOD 浓度为横坐标, 反应速率 ($V = \Delta\text{OD}/\text{min}$) 为纵坐标作图, 通过相关性判断芒果苷对 XOD 的抑制可逆性。

1.3.4 抑制动力学研究

在上述相同条件下, 固定 XOD 的浓度 ($0.05 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$), 测定不同芒果苷质量浓度体系 (0 、 100 、 200 、 300 、 $400 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 中, 不同摩尔浓度底物黄嘌呤 (0.05 、 0.1 、 0.3 、 0.5 、 $0.75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对反应速率的影响, 每种浓度做 3 个平行, 以黄嘌呤浓度的倒数 $1/[S]$ 为横坐标, 反应速率 $1/v$ 为纵坐标, 并以 Lineweaver-Burk 双倒数方程作图^[26], 分析不同芒果苷浓度与不同底物浓度对反应速率的影响, 判断芒果苷对 XOD 抑制作用的可逆性和抑制类型, 并求出抑制常数 (K_i) 和抑制系数 (α)。

抑制类型和动力学常数通过以下公式计算:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(\frac{[I]}{K_i} + 1 \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \left(\frac{[I]}{\alpha K_i} + 1 \right) \quad (2)$$

$$\text{Slope} = \frac{K_m}{V_{\max} K_i} [I] + \frac{K_m}{V_{\max}} \quad (3)$$

$$Y - \text{intercept} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{[I]}{\alpha K_i V_{\max}} \quad (4)$$

式中:

v ——反应速率, $\Delta\text{OD} \cdot \text{min}^{-1}$;

$V_{\max}$ ——最大反应速率, $\Delta\text{OD} \cdot \text{min}^{-1}$;

K_m ——米氏常数, $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$;

α ——表观系数;

K_i ——芒果苷与游离 XOD 的结合常数, $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;

αK_i ——XOD-黄嘌呤复合物的结合参数, $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;

$[S]$ ——底物黄嘌呤的浓度, $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$;

$[I]$ ——抑制剂芒果苷的质量浓度, $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.3.5 荧光猝灭光谱研究

参考 Liu、Yan 等^[25,27]的方法, 并进行适当修改: 在 4 mL 反应体系 (PBS 缓冲液) 中, 固定 XOD 浓度 ($0.1 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$), 依次滴加不同质量浓度的芒果苷溶液 (0 、 100 、 200 、 300 、 400 、 $500 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 并混合均匀, 分别在 298 K 、 304 K 、 310 K 下孵育 5 min , 扫描游离 XOD 和芒果苷-XOD 混合体系的荧光光谱。扫描条件为激发波长 ex : 280 nm ; 发射波长 em : $300 \sim 540 \text{ nm}$ 。激发和发射狭缝宽度均为 10 nm 。

当激发波长为 280 nm 时, 可测定 Trp 和 Tyr 两种氨基酸残基的荧光强度, 由 Stern-Volmer 方程表示为:

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

式中:

F_0 ——加入猝灭剂前的荧光强度;

F ——加入猝灭剂后的荧光强度;

Q ——芒果苷的质量浓度, $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$;

K_q ——猝灭速率常数, $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$;

τ_0 ——未加入猝灭剂时荧光团的平均寿命, 10^{-8} s ;

K_{sv} ——Stern-Volmer 猝灭常数, $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。

当猝灭类型为静态猝灭时, 结合常数和结合位点可由双对数方程得到:

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

式中:

K_a ——结合常数, $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$;

n ——为结合位点数。

1.3.6 热力学参数测定

配体与生物大分子结合的驱动力主要有氢键、范德华力、静电作用力和疏水作用力^[28,29]。反应系统的热力学参数如焓变 (ΔH)、熵变 (ΔS) 和吉布斯自由能 (ΔG), 通常是判断作用力类型的主要依据, 由 Van't Hoff 方程可得:

$$\lg K_a = -\frac{\Delta H}{2.303RT} + \frac{\Delta S}{2.303R} \quad (7)$$

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

式中:

K_a ——对应温度下的结合常数, $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$;

R ——气体常数, $8.314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$;

T ——反应温度 (298、304、310 K)。

1.3.7 同步荧光光谱测定

反应体系配制同 1.3.5 一致, 设置发射波长和激发波长间隔 ($\Delta\lambda$) 分别为 15 nm (酪氨酸, Tyr) 和 60 nm (色氨酸, Trp), 使用荧光分光光度计扫描 200~350 nm 同步荧光光谱, 激发和发射狭缝宽度为 10 nm, 按照下列公式计算同步荧光猝灭比率 (RSFQ)

$$\text{RSFQ} = \left(1 - \frac{F}{F_0}\right) \times 100\% \quad (9)$$

式中:

F_0 ——XOD 的荧光强度;

F ——加芒果苷后 XOD 的荧光强度。

1.3.8 圆二色谱测定

参照 Zhang, Liu 等^[22,30]的方法并稍作修改。芒果苷溶液 ($0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 与 XOD 溶液 ($0.15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 配制 XOD 和芒果苷的摩尔比为 1:0、1:20、1:50 的反应体系, 在持续氦气流和 $100 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$ 扫描速度的条件下, 使用圆二色光谱仪扫描 190~250 nm 远紫外区的圆二色谱。使用 1 mm 石英比色皿测定, 减去 pH 值为 7.4 的 PBS 信号。使用 Origin Pro 2018 对相关图表进行绘制, 横坐标为波长 (nm), 纵坐标为圆二色性 (mdeg), 绘制色谱图谱, 并采用 CDNN 软件计算 XOD 与芒果苷结合前后二级结构含量的变化。

1.3.9 分子对接研究

采用 Auto Dock Tool-1.5.7 软件模拟芒果苷与 XOD 可能的结合方式。从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中获取芒果苷的 3D 结构, 从蛋白质数据库 (<http://www.rcsb.org/pdb>) 中获取 XOD (PDB ID: 1FIQ) 的晶体结构, 该结构由 X 射线晶体学解析, 分辨率为 $2.50 \text{ \AA}$, 来源物种为牛乳, 且无突变。采用 PyMOL 软件进行去水、加氢和加 Gasteiger 电荷处理。设置 XOD 的中心坐标 (X: 28.634, Y: 30.078, Z: 101.350); 设置对接网格框 ($126\text{\AA} \times 126\text{\AA} \times 126\text{\AA}$)。选择 Genetic Algorithm 算法, 其余参数默认, 将处理后的 XOD 与配体分子芒果苷进行对接, 选择结合能最低且对接次数最多的构象用于进一步分析。

1.3.10 数据分析

所有实验均做3次平行,结果以平均值 $\pm$ 标准差($n=3$)表示,使用Excel 2019、Origin Pro 2018软件进行数据分析和绘图。

2 结果与讨论

2.1 尿酸特征峰验证

由图1可知,XOD和黄嘌呤反应生成的尿酸在295 nm波长附近出现特征峰。后续酶促反应选定295 nm作为检测波长,通过监测该波长下反应体系吸光度值的变化,表征尿酸的生成量。

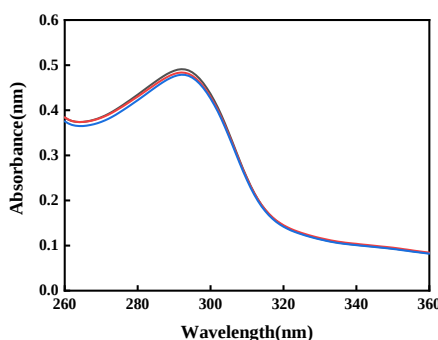


图1 尿酸特征吸收峰

Fig.1 Characteristic absorption peak of uric acid

2.2 体外抑制 XOD 活性

由图2可知,芒果苷呈浓度依赖性抑制XOD活性,测得芒果苷的 IC_{50} 值为 $447.17 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,最大抑制率为80.05%;别嘌呤醇的 IC_{50} 值为 $6.08 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,最大抑制率为81.58%。芒果苷的 IC_{50} 值远大于别嘌呤醇,但其最大抑制率与别嘌呤醇较为接近,表明逐渐增加剂量可达到良好抑制效果。

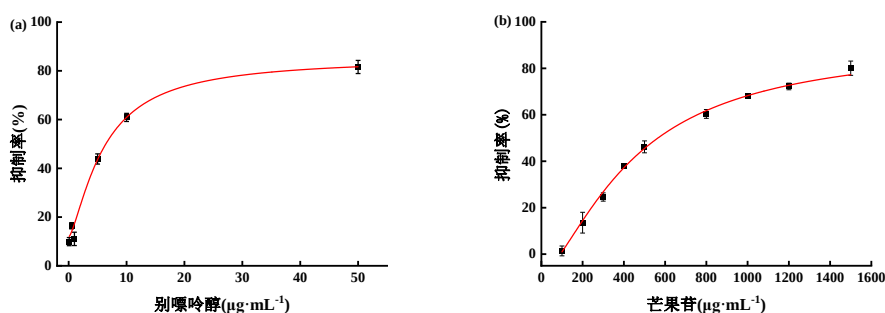


图2 不同抑制剂对XOD活性的影响

Fig.2 Effect of different inhibitors on XOD activity

注:(a) 别嘌呤醇;(b) 芒果苷。

2.3 抑制可逆性实验

由图3可知,芒果苷各质量浓度组曲线均呈现良好线性关系,每条直线都经过原点,直线斜率随着芒果苷质量浓度的增大而减小,结果表明芒果苷对XOD的抑制为可逆抑制,其抑制作用均是经过降低酶活,而不是有效酶数量的减少。

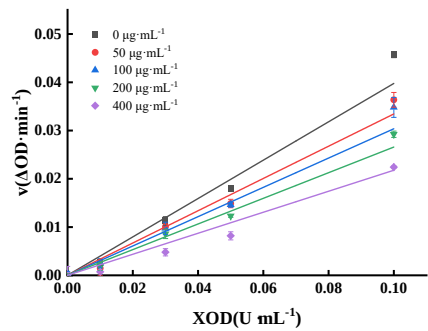


图 3 芒果苷对 XOD 的抑制可逆性

Fig.3 The inhibition of XOD by mangiferin is reversible

2.4 抑制动力学分析

利用 Lineweaver-Burk 方程绘制双倒数曲线, 判断芒果苷对 XOD 的抑制类型。由图 4 可知, 每条直线的斜率和截距都不同, 但都相交于第二象限, 斜率和截距随着芒果苷质量浓度的增大而增大, 表明芒果苷通过混合抑制的方式来抑制 XOD。混合抑制是指芒果苷既能通过与 XOD 结合以减少 XOD 与底物的相互作用, 又能与 XOD-底物复合物结合形成三元复合物, 使得底物与 XOD 无法正常反应得到原本的产物, 进而实现对 XOD 的有效抑制, 减少尿酸的生成。

在 Lineweaver-Burk 双倒数曲线中, 对斜率 Slope 和 Y 轴截距 Y-intercept 与抑制剂芒果苷质量浓度 $[I]$ 进行二次计算并绘图。由图 5、6 可知: $\alpha K_i > K_i$, 表明芒果苷可能与游离 XOD 的结合比 XOD-黄嘌呤复合物的结合更容易且更紧致。斜率 Slope 与芒果苷质量浓度 $[I]$ 线性拟合状态良好, 表明芒果苷对 XOD 只有一个或一类抑制位点, 并且两者之间的结合依赖于疏水相互作用。

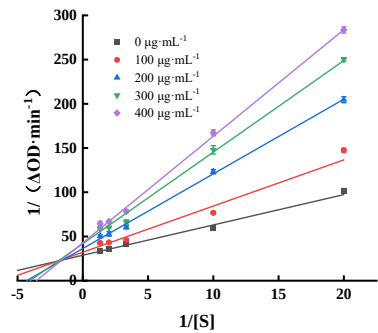


图 4 芒果苷对 XOD 抑制作用的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线

Fig.4 The Lineweaver-Burk double reciprocal curve of the inhibitory effect of mangiferin on XOD

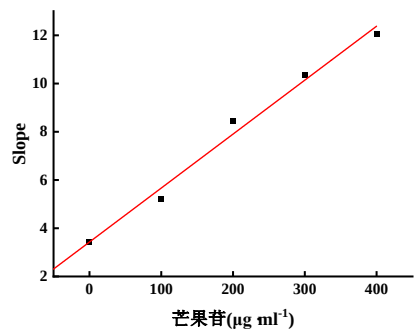


图 5 Lineweaver-Burk 曲线中斜率对芒果苷质量浓度的二级曲线

Fig.5 Secondary plot of Lineweaver-Burk slopes as a function of mangiferin concentration

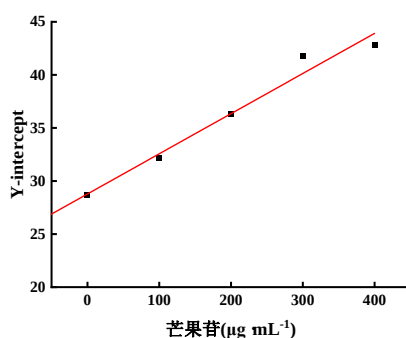


图6 Lineweaver-Burk 曲线中截距对芒果苷质量浓度的二级曲线

Fig.6 Secondary plot of Lineweaver-Burk intercepts as a function of mangiferin concentration

2.5 荧光猝灭光谱分析

基于上述实验中测定的抑制动力学结果,进一步探究芒果苷对 XOD 的抑制及结合机制。研究表明, Tyr、Trp 是 XOD 的固有荧光氨基酸残基^[31]。由图 7 可知, 芒果苷本身不具有内源荧光, 所以对 XOD 的荧光光谱不产生干扰。在不同温度下, XOD 的荧光发射峰强度随着芒果苷质量浓度的增加而降低, 即芒果苷的存在使得 XOD 的内源荧光产生猝灭, 这表明芒果苷可以与酶相互作用并有效抑制其固有荧光, XOD 荧光发色基团周围的微环境在相互作用过程中发生了变化。

在静态猝灭中, K_{sv} 和 K_q 值通常随着温度的升高而降低, 而在动态猝灭中, K_{sv} 和 K_q 值往往会随着温度的升高而增加。由表 1 可知, K_{sv} 和 K_q 值随着温度的升高而降低, 同时, K_q 远大于 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot (\text{mol s})^{-1}$ (最大动态猝灭常数), 说明芒果苷对 XOD 的猝灭属于静态猝灭^[32]。

根据图 8 及式 6, 计算出三种不同温度下的 K_a 和 n 值。由表 1 可知随着温度的升高, K_a 逐渐增大, 说明温度的升高有利于芒果苷和 XOD 的结合; n 值在三种不同温度下均近似等于 1, 说明芒果苷在 XOD 上只有一个或一类结合位点, 该实验结论与上述酶动力学实验结果一致。

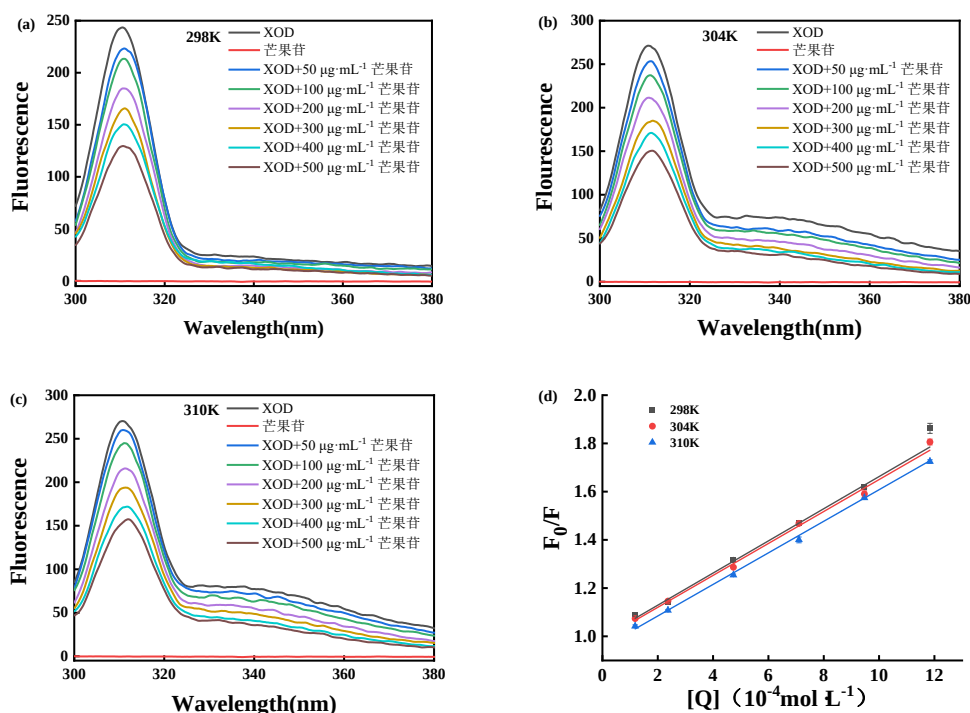


图7 不同温度下芒果苷对 XOD 荧光光谱的影响

Fig.7 The influence of mangiferin at different temperatures on the fluorescence spectrum of XOD

注: (a) 298K; (b) 304K; (c) 310K; (d) 芒果苷对 XOD 荧光猝灭的 Stern-Volmer 图。

表 1 不同温度下芒果苷-XOD 体系的荧光猝灭参数

Table 1 Fluorescence quenching parameters of the mangiferin-XOD system at different temperatures						
温度/K	Stern-Volmer 方程	$K_{sv}/(10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1})$	$K_q/(10^{12} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$	相关系数 R^2	$K_d/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$	n
298	$y=0.0667x+0.9955$	0.0667	0.0667	0.9962	637	0.9918
304	$y=0.0662x+0.9878$	0.0662	0.0662	0.9954	819	1.0473
310	$y=0.0655x+0.9532$	0.0655	0.0655	0.9995	3632	1.2583

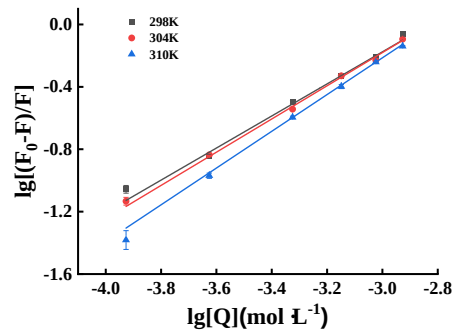


图 8 不同温度下芒果苷对 XOD 荧光猝灭的 Stern-Volmer 双对数图

Fig.8 Stern-Volmer double logarithmic plots of the fluorescence quenching of XOD by mangiferin at different temperatures

2.6 热力学参数分析

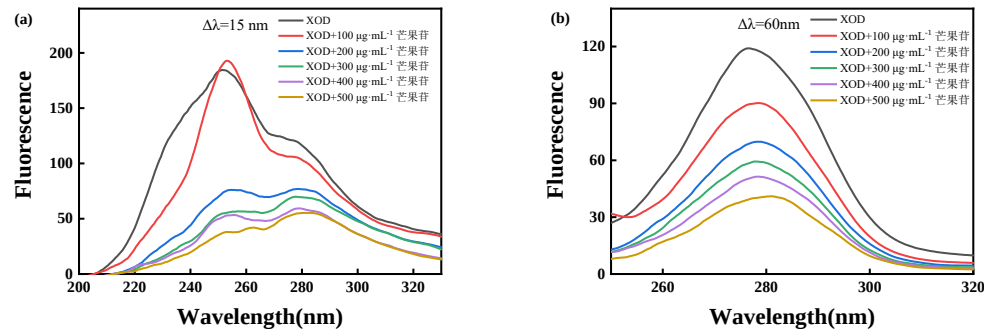
当 $\Delta H < 0$, $\Delta S > 0$ 时, 主要作用力为静电相互作用; 当 $\Delta H > 0$, $\Delta S < 0$ 时, 主要作用力为静电相互作用和疏水相互作用; 当 $\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$ 时, 主要作用力为氢键与范德华力; $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$ 时, 主要作用力为疏水相互作用^[33]。通过式 7、8 计算热力学参数, 由表 2 可知: $\Delta G < 0$, 表明芒果苷与 XOD 的作用过程是一个自由能降低的自发过程; $\Delta H > 0$ 、 $\Delta S > 0$, 表明该过程是熵驱动的吸热反应, 且主要驱动力是疏水作用力。

表 2 不同温度下芒果苷-XOD 体系的热力学参数

Table 2 Thermodynamic parameters of the mangiferin-XOD system at different temperatures			
温度 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	110.9	0.424	-15.452
304			-17.996
310			-20.540

2.7 同步荧光光谱分析

为了进一步探究芒果苷对 XOD 微环境的影响, 通过同步荧光光谱法研究 XOD 发色团 (Tyr 和 Trp) 微环境周围极性变化^[34]。由图 9 可知, XOD 的荧光强度随芒果苷的增加而降低, 说明结合过程中发生了荧光猝灭。芒果苷的加入改变了 XOD 中疏水性氨基酸 Trp 残基附近的微环境, 使得 Trp 残基所处的微环境疏水性略微增强, 从而影响 XOD 的空间构象。此外, 通过式 9 计算 Tyr 和 Trp 残基的 RSFQ 值发现, 在同样的条件下, Trp 的 RSFQ 值高于 Tyr, 说明 Trp 残基对 XOD 的荧光猝灭有较好的促进作用, 芒果苷与 XOD 的结合位点更靠近 Trp。



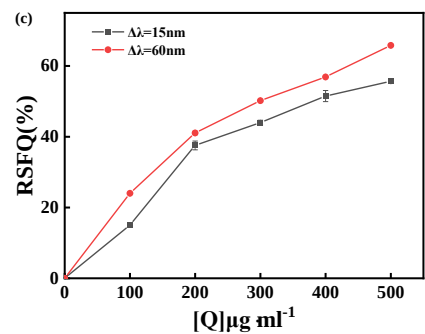


图 9 芒果苷对 XOD 的同步荧光光谱的影响

Fig.9 The effect of mangiferin on the synchronous fluorescence spectra of XOD

注：(a) $\Delta\lambda=15\text{ nm}$ ；(b) $\Delta\lambda=60\text{ nm}$ ；(c) 芒果苷对 XOD 的 RSFQ 图。

2.8 CD 分析

CD 可以有效检测蛋白质与小分子作用前后二级结构构象变化^[35]。如图 10 所示，XOD 的 CD 光谱在紫外区 209 nm 和 221 nm 处出现了两个负双峰，这是蛋白质中由 α 螺旋结构的 $\pi\rightarrow\pi$ 和 $n\rightarrow\pi^*$ 跃迁引起的特征峰^[36,37]。随着 XOD 与芒果苷摩尔比的增加，XOD 的 CD 信号明显增强，两个负峰的椭圆度均增加并表现为向负水平的移动。XOD 的 α -螺旋从 14.42% 增加到 19.18%（表 3），使得 XOD 的二级结构更加紧密，说明芒果苷的加入使得 XOD 活性位点的空间构象可能发生改变，不利于 XOD 形成活性中心并阻断黄嘌呤进入活性中心，从而降低 XOD 的活性。此外，随着芒果苷与 XOD 的摩尔比的增加， β -折叠、 β -转角以及无规卷曲含量都发生改变，进一步说明芒果苷改变了 XOD 的二级结构。

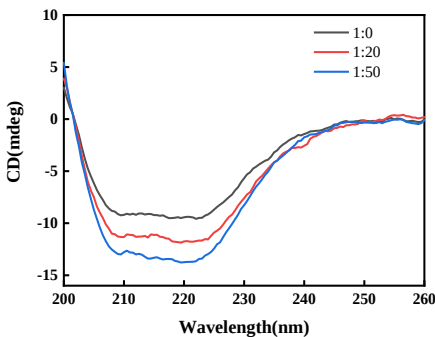


图 10 芒果苷对 XOD 圆二色光谱图的影响

Fig.10 The influence of mangiferin on the circular dichroism spectra of XOD

表 3 XOD 和芒果苷-XOD 体系的二级结构含量 (%)

Table 3 The secondary structure content of the XOD and mangiferin-XOD system (%)

n (XOD) :n (芒果苷)	α -Helix	β -Sheet	β -Turn	Random-coil
1:0	14.42	30.25	20.41	34.92
1:20	17.76	25	20.71	36.63
1:50	19.18	18.77	21.63	40.41

2.9 分子对接分析

由图 11 可知，芒果苷与 XOD 活性口袋能够自发结合，其结合自由能为 $-4.25\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。由图可见芒果苷结合位点位于酶的催化中心附近，芒果苷通过氢键以及疏水相互作用稳定嵌入 XOD 活性口袋。其关键作用氨基酸包括 LYS-256、VAL-259、ASN-261、GLU-263、ILE-353、ARG-394 与 THR-396 等。氢键网络增强了分子的定位与结合强度，而芒果苷的多酚骨架与疏水残基形成良好堆叠，有助于抑制底物进入活性位点，进而影响酶活，阻碍

尿酸生成相关的催化反应。

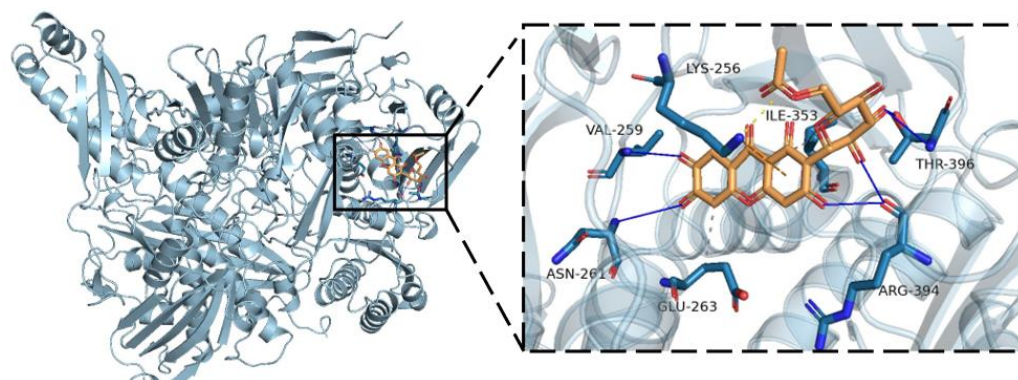


图 11 芒果苷和 XOD 的分子对接

Fig.11 Molecular docking of mangiferin and XOD

3 结论

本研究发现, 芒果苷主要以氢键和疏水作用力与 XOD 的催化活性中心发生相互作用, 并通过可逆性混合抑制的方式抑制 XOD, 抑制率呈剂量依赖性。芒果苷对 XOD 的半数抑制浓度的 IC_{50} 值为 $447.17 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 别嘌呤醇对 XOD 的半数抑制浓度的 IC_{50} 值为 $6.08 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 芒果苷对 XOD 的半数抑制浓度大于别嘌呤醇, 但最大抑制率相近。荧光光谱显示, 随着芒果苷质量浓度的增加, XOD 荧光强度逐渐减弱, K_{sv} 和 K_q 值随着温度的升高而降低, 同时, K_q 远大于 $2.0 \times 10^{10} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (最大动态猝灭常数), 所以芒果苷对 XOD 的猝灭属于静态猝灭; 在热力学分析结果中: $\Delta G < 0$, $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$, 表明芒果苷与 XOD 的作用过程是一个自由能降低、吸热和熵驱动过程; 同步荧光及 CD 分析表明, 芒果苷的加入导致 XOD 二级结构发生改变, α -螺旋含量从 14.42% 增加到 19.18%, 提高了 XOD 结构的紧密性而不利于底物进入活性区域, 进而降低 XOD 的活性。本研究从酶学特性、光谱学行为、蛋白构象变化及分子结合模式等多个层面系统揭示了芒果苷抑制 XOD 的作用机制, 为其在高尿酸血症及痛风防治中的进一步开发与应用奠定基础, 并为开发更加安全有效的新型 XOD 抑制剂提供了依据。已有研究表明芒果苷具有促进尿酸排泄, 并保护肾等相关器官作用^[38-40]。表明芒果苷具有良好的开发应用前景, 后续将开展动物实验进一步验证芒果苷体内降尿酸作用及安全性。

参考文献

- [1] XU L Q, LIN G S, YU Q X, et al. Anti-hyperuricemic and nephroprotective effects of dihydroberberine in potassium oxonate-and hypoxanthine-induced hyperuricemic mice [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 645879.
- [2] YU Z F, BRUCE-KELLER A J, GOODMAN Y, et al. Uric acid protects neurons against excitotoxic and metabolic insults in cell culture, and against focal ischemic brain injury in vivo [J]. *Journal of Neuroscience Research*, 1998, 53(5): 613-625.
- [3] DISSANAYAKE L V, SPIRES D R, PALYGIN O, et al. Effects of uric acid dysregulation on the kidney [J]. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 2020, 318(5): F1252-F1257.
- [4] LIU S, PEREZ-RUIZ F, MINER J N. Patients with gout differ from healthy subjects in renal response to changes in serum uric acid [J]. *Joint Bone Spine*, 2017, 84(2): 183-188.
- [5] ZENG N, ZHANG G, HU X, et al. Mechanism of fisetin suppressing superoxide anion and xanthine oxidase activity [J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 58: 1-10.
- [6] MOHAMMAD C M, CHE ALHADI S, WAN FATIMAH S W M, et al. Delayed hypersensitivity reaction to allopurinol: a case report [J]. *Malaysian Family Physician*, 2023, 18: 11.
- [7] 夏闻远, 李雪晨, 叶菲. 高尿酸血症口服治疗药物的疗效及安全性分析 [J]. *药学报*, 2026, 61(5): 1450-1459.
- [8] CHOI H K, ZHANG Y Q, DALBETH N. When underlying biology threatens the randomization principle-initial gout flares of urate-lowering therapy [J]. *Nature reviews. Rheumatology*, 2022, 18(9): 543-549.
- [9] BORSTAD G C, BRYANT L R, ABEL M P, et al. Colchicine for prophylaxis of acute flares when initiating allopurinol for chronic gouty

- arthritis [J]. *The Journal of Rheumatology*, 2004, 31(12): 2429-2432.
- [10] 雷雨欣,刘萍,张薇,等.小剂量秋水仙碱联合非布司他治疗高尿酸血症痛风的效果及对疼痛程度、炎性因子的影响[J].*解放军医药杂志*,2022,34(9):82-85.
- [11] 孙晨瑜,谢国勇,秦民坚.芒果苷在植物界的分布及药理活性研究进展[J].*中国野生植物资源*,2017,36(4):39-45.
- [12] LI L S, DONG Y J, LIU X F, et al. Mangiferin for the management of liver diseases: a review [J]. *Foods*, 2023, 12(13): 2469.
- [13] 张妍,李瑶,赵亚妮,等.芒果苷、山柰酚和栀子苷对高尿酸血症小鼠的作用[J].*西北药学杂志*,2021,36(2):215-219.
- [14] NIU Y F, LIU J, LIU H Y, et al. Hypouricaemic action of mangiferin results from metabolite norathyriol via inhibiting xanthine oxidase activity [J]. *Pharmaceutical Biology*, 2016, 54(9): 1680-1686.
- [15] 林华,候亮,高丽辉,等.芒果苷与别嘌醇长期毒性比较研究[J].*中国民族民间医药*,2020,29(16):16-22.
- [16] 赵东,孙宇菲,上官静波,等.芒果苷降尿酸的作用机制及其应用研究进展[J].*精细化工中间体*,2024,54(6):1-6.
- [17] 闫文昊,林贺,律广富,等.芒果苷现代药理作用研究[J].*吉林中医药*,2017,37(3):288-290.
- [18] MEI S H, MA H L, CHEN X M. Anticancer and anti-inflammatory properties of mangiferin: a review of its molecular mechanisms [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2021, 149: 111997.
- [19] SHANG Y H, TIAN J F, ZHANG Z, et al. Mangiferin: sources, anti-inflammatory activities, and molecular mechanisms [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2025, 73(43): 27145-27160.
- [20] DU H Y, LI S J. Inhibition of porphyrin polysaccharide on xanthine oxidase activity and its inhibition mechanism [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2022, 266: 120446.
- [21] LI J, GONG Y H, LI J W, et al. In vitro xanthine oxidase inhibitory properties of flos sophorae immaturus and potential mechanisms [J]. *Food Bioscience*, 2022, 47: 101711.
- [22] ZHANG C, WANG R, ZHANG G W, et al. Mechanistic insights into the inhibition of quercetin on xanthine oxidase [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 112: 405-412.
- [23] 李凯丽,唐浩国,郑鹏达,等.三种黄酮对尿酸生成关键酶的酶动力学和抗氧化活性研究[J/OL].*食品与发酵工业*,2026:1-12.
- [24] IRONDI E A, AGBOOLA S O, BOLIGON A A. Inhibitory effects of tropical almond leaf extract on xanthine oxidase, pancreatic lipase, and angiotensin 1-converting enzyme, in vitro [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2018, 42(4): e12481.
- [25] LIU X Z, ZHANG W, CHEN J W, et al. Investigating the inhibition of xanthine oxidase by five catechins: kinetic studies, spectroscopy, molecular docking, and dynamics simulations [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 281: 136231.
- [26] YU D, DU J N, HE P, et al. Identification of natural xanthine oxidase inhibitors: virtual screening, anti-xanthine oxidase activity, and interaction mechanism [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 259: 129286.
- [27] YAN J K, ZHANG G W, HU Y T, et al. Effect of luteolin on xanthine oxidase: inhibition kinetics and interaction mechanism merging with docking simulation [J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(4): 3766-3773.
- [28] RASOULZADEH F, JABARY H N, NASERI A, et al. Fluorescence quenching study of quercetin interaction with bovine milk xanthine oxidase [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2009, 72(1): 190-193.
- [29] LIANG M, LIU R, QI W, et al. Interaction between lysozyme and procyanidin: multilevel structural nature and effect of carbohydrates [J]. *Food Chemistry*, 2013, 138(2-3): 1596-1603.
- [30] LIU Y J, CHEN H, XIANG H L, et al. Inhibition and molecular mechanism of diosmetin against xanthine oxidase by multiple spectroscopies and molecular docking [J]. *New Journal of Chemistry*, 2020, 44(17): 6799-6809.
- [31] YAO Y Y, ZHANG M, CHEN J R, et al. Novel mechanistic insights into luteolin and its analogues as potent inhibitors of xanthine oxidase activity: Inhibition thermodynamics, kinetics and docking simulation [J]. *Food Bioscience*, 2025, 71: 107087.
- [32] 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.
- [33] 周素珍,邢莉,范金波,等.分子对接结合荧光光谱法探究3种类胡萝卜素与HSA的相互作用[J].*中国食品学报*,2023,23(2):61-71.
- [34] 王晓霞,马力通,孙吉盛,等.多光谱法和分子对接模拟法研究茶碱和胃蛋白酶的相互作用[J].*光谱学与光谱分析*,2024,44(3):714-721.
- [35] YU Q, FAN L Q, DING Z Y. The inhibition mechanisms between asparagus polyphenols after hydrothermal treatment and tyrosinase: a circular dichroism spectrum, fluorescence, and molecular docking study [J]. *Food Bioscience*, 2022, 48: 101790.

- [36] SHAHABADI N, MAGHSUDI M, ROUHANI S. Study on the interaction of food colourant quinoline yellow with bovine serum albumin by spectroscopic techniques [J]. Food Chemistry, 2012, 135(3): 1836-1841.
- [37] LI D J, ZHU M, XU C, et al. Characterization of the baicalein–bovine serum albumin complex without or with Cu²⁺ or Fe³⁺ by spectroscopic approaches [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2011, 46(2): 588-599.
- [38] 徐象威, 牛艳芬, 高丽辉, 等. 基于肠道尿酸转运体 ABCG2 的芒果苷降尿酸作用机制分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(17): 145-149.
- [39] LI Q R, LIN H, NIU Y F, et al. Mangiferin promotes intestinal elimination of uric acid by modulating intestinal transporters [J]. European Journal of Pharmacology, 2020, 888: 173490.
- [40] LUM P T, SEKAR M, GAN S H, et al. Therapeutic potential of mangiferin against kidney disorders and its mechanism of action: a review [J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2022, 29(3): 1530-1542.