

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201705027

引文格式: 程萍, 张卫, 彭秀丽. 牛血清白蛋白与地肤提取物 N-反式阿魏酰酪胺相互作用研究 [J]. 广西植物, 2017, 37(12):1598-1602  
CHENG P, ZHANG W, PENG XL. Interaction between bovine serum albumin and N-trans-feruloyltyramine from *Kochia scoparia* [J]. *Guihaia*, 2017, 37(12):1598-1602

## 牛血清白蛋白与地肤提取物 N-反式阿魏酰酪胺相互作用研究

程萍, 张卫, 彭秀丽\*

(郑州铁路职业技术学院 药学系, 郑州 450052)

**摘要:** 地肤别名扫帚苗、扫帚菜、孔雀松等, 属藜科地肤属一年生草本植物。地肤幼苗是一种高蛋白、低脂肪并且富含钾元素和胡萝卜素的野生蔬菜, 有丰富的营养价值。作为在我国广泛分布的植物, 一直以来地肤主要作为传统野菜被食用, 对其药用价值却鲜有进一步研究与开发。该研究对地肤采用硅胶柱色谱分离提纯得到 N-反式阿魏酰酪胺, 利用紫外光谱法和荧光光谱法研究它和牛血清白蛋白(BSA)相互作用的机制, 求出了猝灭常数、结合常数及结合位点数。结果表明: N-反式阿魏酰酪胺对 BSA 具有荧光猝灭作用, 其猝灭方式为静态猝灭; N-反式阿魏酰酪胺与 BSA 有较强的相互作用, 可以被蛋白质所储存和运输。该研究结果为进一步开发利用地肤资源、提高地肤的药用价值提供一定的理论基础。

**关键词:** N-反式阿魏酰酪胺, 牛血清白蛋白, 猝灭效应, 光谱分析, 地肤

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2017)12-1598-05

## Interaction between bovine serum albumin and N-trans-feruloyltyramine from *Kochia scoparia*

CHENG Ping, ZHANG Wei, PENG Xiu-Li\*

(Department of Pharmacy, Zhengzhou Railway Vocational & Technical College, Zhengzhou 450052, China)

**Abstract:** *Kochia scoparia*, also called broom seedlings, broom dishes and peacock pine, is an annual herb of genus *Kochia* in family chenopodiaceae. The seedlings of *K. scoparia* are wild vegetables with high protein, low fat and rich potassium and carotene. As a widely distributed plant in china, *K. scoparia* is eaten as traditional wild herbs. However, there is little research and development on its medicinal value. The N-trans-feruloyltyramine from *K. scoparia* was isolated and purified by silica gel column chromatography. The interaction mechanism between N-trans-feruloyltyramine and bovine serum albumin(BSA) was investigated by UV and fluorescence spectrometry. The quenching constant, binding constant and binding sites were obtained by analyzing quenching data based on Stern-Volmer equation. The results

收稿日期: 2017-07-28 修回日期: 2017-08-17

基金项目: 河南省科技攻关计划项目(162102310058); 河南省高等学校重点科研项目(16B150016) [Supported by the Key Science and Technology Program of Henan(162102310058); Foundation of Henan Education Committee(16B150016)]。

作者简介: 程萍(1968-), 女, 河南平顶山人, 硕士, 副教授, 研究方向为有机化学, (E-mail) ztjcp@163.com。

\*通信作者: 彭秀丽, 副教授, 主要从事食品药品化学研究, (E-mail) pengxiuli\_2004\_ren@163.com。

showed that the fluorescence of BSA was quenched by N-trans-feruloyltyramine by a static quenching process strong interaction between N-trans-feruloyltyramine and BSA could be stored and transported by protein. The results of this experiment provide some theoretical information for the further development and medicinal value of *Kochia scoparia* resources.

**Key words:** N-trans-feruloyltyramine, bovine serum albumin, quenching effect, spectrometric analysis, *Kochia scoparia*

地肤(*Kochia scoparia*), 别名扫帚苗、扫帚菜、孔雀松等, 为藜科地肤属一年生草本植物, 广泛分布于全国各地。地肤适应力极强, 无论是原野山林还是田间路旁随处可见。地肤幼苗是一种高蛋白、低脂肪并且富含钾元素和胡萝卜素的野生蔬菜, 有丰富的营养价值。地肤的药用价值始载于《名医别录》, 在《本草纲目》《圣惠方》《救荒本草》等书中都有关于其药用的记载。由于地肤性味寒, 传统应用主要用于清热解毒、利尿通淋。对地肤的进一步开发利用有赖于其药效机制的研究。药物进入人体后需要通过血浆的储存和运输才能到达受体部位, 血浆中最丰富最重要的载体是血清白蛋白, 通过考查白蛋白和药物分子间的相互作用, 可以帮助我们了解药物分子在人体内的储运过程, 对于认识和掌握药物的药效机制具有重要意义。

阿魏酸是刺蒺藜、川芎、当归等中药的有效成分, 具有广泛的药理活性, 可抑制血小板聚集(邵荣杰和邵世宏, 2015)、抗氧化清除自由基(王玲等, 2012; 李树立和刘玉衡, 2015; 张扬等, 2016), 还可抑制肿瘤转移、并对人 HepG2 细胞显示出一定的抑制活性(汤浩等, 2014)。在对阿魏酸及其衍生物的应用中, 阿魏酸钠、阿魏酸哌嗪和阿魏酸酯研究较多, 酰胺类衍生物研究较少。目前尚未见阿魏酰酪胺与血清白蛋白作用的相关报道。本研究从地肤全草 95% 乙醇提取物分离并鉴定得到了 N-反式阿魏酰酪胺(N-反式阿魏酰酪胺结构如图 1 所示); 采用紫外光谱法、荧光光谱法, 在生理 pH 条件下, 对地肤中提取的 N-反式阿魏酰酪胺与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用进行了研究, 测定了荧光猝灭常数, 探讨了 N-反式阿魏酰酪胺对牛血清白蛋白荧光猝灭机制。

作为在我国广泛分布的植物, 一直以来地肤

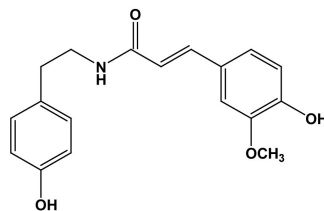


图 1 N-反式阿魏酰酪胺结构图

Fig. 1 Chemical structure of N-trans-feruloyltyramine

主要作为传统野菜被食用, 对其药用价值却鲜有进一步研究与开发。本研究发现并证明了地肤中含有阿魏酸酰胺类衍生物, 并利用光谱等研究手段从分子水平上研究其与蛋白质的作用机理, 对了解阿魏酸衍生物在体内的代谢、吸收及分子水平上与蛋白质的相互作用具有重要意义, 对临床药物研发及应用有重要的参考价值。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

F-4500 型荧光光度计(日本 Hitachi 公司); UV-265 紫外分光光度计(日本岛津公司); PHS-3C 型酸度计。

N-反式阿魏酰酪胺(从地肤中提取, 98%);  $3.31 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  乙醇溶液;  $6.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  牛血清白蛋白溶液(安耐吉公司);  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl 缓冲溶液(pH = 7.4, 含  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl); 其它试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水。

### 1.2 方法

1.2.1 提取与分离 将地肤用 95% 乙醇溶液回流提取 3 次, 将提取液合并、减压浓缩后得浸膏。将

浸膏分散于水中,依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇反复萃取,取乙酸乙酯部位进行硅胶柱分离,先用三氯甲烷-甲醇(100:1~8:1)梯度洗脱,分为4个流分;再对4个流分以三氯甲烷-甲醇(60:1~8:1)进行反复柱分离,可得到化合物N-反式阿魏酰酪胺(张卫等,2013)。

**1.2.2 紫外吸收光谱法** 将2.0 mL 0.05 mol·L<sup>-1</sup> pH=7.4的Tris-HCl缓冲溶液加入一系列10 mL比色管中,再分别加1×10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup>的N-反式阿魏酰酪胺、BSA和N-反式阿魏酰酪胺-BSA两者等摩尔混合溶液,静置30 min,用水作为参比,测定298 K、波长250~360 nm条件下的紫外吸收光谱。

**1.2.3 荧光光谱法** 将5.0 mL BSA标准溶液与一定量的N-反式阿魏酰酪胺标准液依次加入到10 mL的比色管中,以0.05 mol·L<sup>-1</sup> pH=7.4的Tris-HCl缓冲溶液稀释至刻度,恒温静置30 min。然后移取此溶液至荧光池中,激发波长设定为280 nm,扫描300~500 nm的荧光光谱(激发、发射狭缝宽度均为3 nm)。

## 2 结果与分析

### 2.1 紫外光谱

N-反式阿魏酰酪胺和BSA相互作用的紫外吸收光谱如图2所示。由图2可知,pH=7.4时,N-反式阿魏酰酪胺在286 nm处出现一个强吸收峰,BSA在278 nm处有一吸收峰,当二者等体积混合后,强吸收峰出现在317 nm处,吸光度没有呈现加和性,推测N-反式阿魏酰酪胺与BSA发生了相互作用,生成新的复合物(曹福悦等,2012)。

### 2.2 荧光光谱

**2.2.1 荧光光谱研究** 蛋白质分子中含多种氨基酸,其中三种芳香族氨基酸能产生内源性荧光,分别是酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸,当激发波长为280 nm时,发射荧光的主要是色氨酸残基,它对环境非常敏感,其最大荧光发射峰位在疏水环境中约为332 nm,在水相中约为352 nm,部分暴露于水相中则大约为342 nm(聂丽华等,2001)。N-反式阿魏酰酪胺和BSA相互作用的荧光光谱如图3所示。由图3可知,BSA在342 nm处有一强吸收

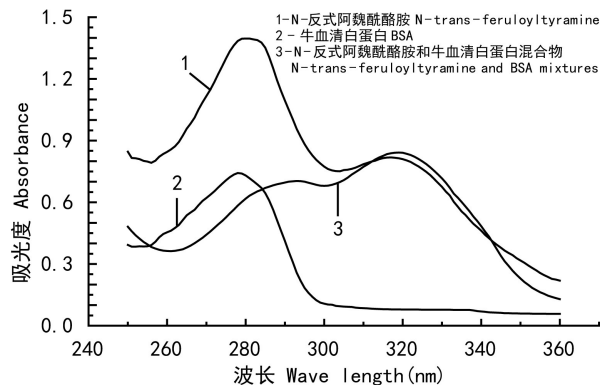


图2 N-反式阿魏酰酪胺和牛血清白蛋白相互作用的紫外吸收光谱

Fig. 2 UV absorption spectrum of the interaction between N-trans-feruloyltyramine and BSA

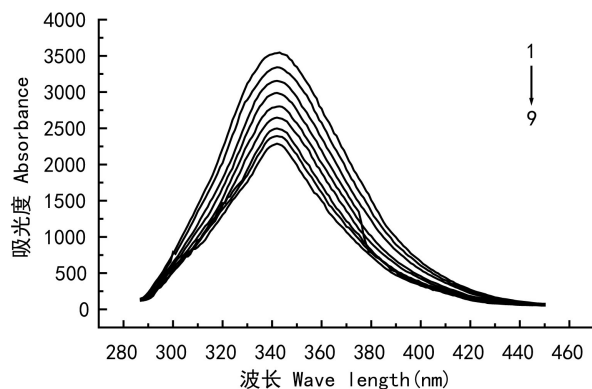


图3 N-反式阿魏酰酪胺和牛血清白蛋白相互作用的荧光光谱  $c_{\text{BSA}} = 2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 1~9  $c_{\text{N-反式阿魏酰酪胺}} = (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0) \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

Fig. 3 Fluorescence spectrum of the interaction between N-trans-feruloyltyramine and BSA

$c_{\text{BSA}} = 2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 1~9  $c_{\text{N-trans-feruloyltyramine}} = (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0) \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

峰,随着N-反式阿魏酰酪胺浓度的不断增加,BSA在342 nm处的内源荧光强度有规律地降低,发射峰位及峰形基本不变,最大吸收峰的位置仅由342 nm红移至345 nm。由此可以推测,BSA与N-反式阿魏酰酪胺结合后,它的空间构象可能发生了变化,螺旋结构逐渐解旋,色氨酸残基由疏水环境逐渐进入水相中。

2.2.2 荧光猝灭光谱研究 荧光猝灭, 广义上指任何可以使给定物质的荧光强度减弱的作用, 狭义上指荧光物质分子与溶剂或其它溶质分子相互作用而导致荧光强度降低的物理或化学过程。一般将荧光猝灭分静态猝灭和动态猝灭两类。两者的区别主要在于前者是猝灭剂和荧光物质的基态分子作用, 而后者是和荧光物质的激发态分子作用。

动态猝灭过程遵循 Stern-Volmer 方程 (Eftink, 1991):

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

式中,  $F_0$  和  $F$  分别表示荧光物质加入猝灭剂前后的荧光强度,  $K_q$  为双分子猝灭速率常数,  $\tau_0$  为生物大分子在不存在猝灭剂条件下的平均寿命 ( $\tau_0 \approx 10^{-8}$  s) (Lakowicz, 1999),  $[Q]$  为猝灭剂浓度,  $K_{sv}$  为 Stern-Volmer 动态猝灭常数。由文献可知, 各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散猝灭速率常数为  $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (冯素玲和袁道琴, 2009; 陈彩莲等, 2014)。

在不同的温度下, 测定不同浓度的 N-反式阿魏酰酪胺对 BSA 的荧光猝灭光谱, 所得数据按式 (1) 处理, 并绘制  $F_0/F \sim [Q]$  的关系曲线, 所得猝灭常数、速率常数和相关系数列于表 1。

表 1 不同温度下 N-反式阿魏酰酪胺和 BSA 作用的猝灭常数、速率常数

Table 1  $K_{sv}$  and  $K_q$  of N-trans-feruloyltyramine-BSA system at different temperatures

温度 (T) Temperature (K)	猝灭常数 ( $K_{sv}$ ) Stern-Volmer constant ( $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ )	猝灭速率常数 ( $K_q$ ) Quenching constant ( $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	相关系数 (r) Correlation coefficient
293	$3.572 \times 10^5$	$3.572 \times 10^{13}$	0.989 4
310	$3.356 \times 10^5$	$3.356 \times 10^{13}$	0.986 3

由表 1 可以看见, 温度为 293 K 和 310 K 时, N-反式阿魏酰酪胺对 BSA 的猝灭速率常数都是  $10^{13} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  数量级, 均远远大于猝灭剂对生物大分子的最大扩散猝灭速率常数  $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , 说明 N-反式阿魏酰酪胺对 BSA 的猝灭

过程不属于动态猝灭。

依据荧光猝灭理论, 动态猝灭的起因是猝灭剂和激发态荧光分子发生碰撞, 该过程与物质的扩散速度有关, 升高温度溶液的粘度下降, 同时双分子运动速率加快, 扩散系数增大, 荧光猝灭常数相应增大; 相反, 静态猝灭常数与温度成负相关, 其原因主要是由于基态荧光分子和猝灭剂作用形成不发光的配合物, 配合物的稳定性随温度升高而降低 (领小等, 2011)。由表 1 中不同温度下的荧光猝灭常数, 能够进一步判断 N-反式阿魏酰酪胺对 BSA 的猝灭是静态猝灭。

2.2.3 结合常数  $K_A$  以及结合位点数  $n$  静态猝灭过程中荧光强度与猝灭剂的关系可由对数方程 (朱庆仁等, 2013) 表示:

$$\lg [(F_0 - F)/F] = \lg K_A + n \lg [Q] \quad (2)$$

公式 (2) 中, 固定 BSA 总浓度不变, 改变猝灭剂 N-反式阿魏酰酪胺的浓度  $[Q]$ , 以  $[\lg(F_0 - F)/F]$  为纵坐标,  $\lg[Q]$  为横坐标作图得到一直线, 由斜率和截距可以求出 N-反式阿魏酰酪胺与 BSA 的表观结合常数  $K_A$  以及结合位点数  $n$ , 见表 2。

表 2 不同温度下 N-反式阿魏酰酪胺和 BSA 作用的结合常数和结合位点数

Table 2  $K_A$  and  $n$  of N-trans-feruloyltyramine-BSA system at different temperatures

温度 (T) Temperature (K)	结合常数 ( $K_A$ ) Binding constant ( $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ )	结合位点数 ( $n$ ) Binding site	相关系数 (r) Correlation coefficient
293	$1.27 \times 10^6$	1.219	0.996 2
310	$4.25 \times 10^5$	0.967	0.990 4

从表 2 可以看出, 结合位点数  $n$  约为 1, 表明 N-反式阿魏酰酪胺与 BSA 结合形成 1:1 的基态复合物; 结合常数较大, 说明 N-反式阿魏酰酪胺与 BSA 之间结合作用较强, 可以被蛋白质储存和运输。

### 3 结论

采用紫外光谱法和荧光光谱研究了 N-反式阿

魏酰酪胺和牛血清白蛋白(BSA)之间的体外相互作用,求出了猝灭常数、结合常数及结合位点数。研究表明:N-反式阿魏酰酪胺对BSA具有荧光猝灭作用,其猝灭方式为静态猝灭;N-反式阿魏酰酪胺与BSA有较强的相互作用,可以被蛋白质所储存和运输。该研究有助于阐明N-反式阿魏酰酪胺在体内的运输过程,对新药的设计和合成研究有一定参考意义。N-反式阿魏酰酪胺的代谢机制尚需进一步进行体内代谢实验进行验证。

## 参考文献:

CAO FY, REN FL, SONG G, et al, 2012. Study on the interaction between colchicine and bovine serum albumin using electrochemical method [J]. *Chin J Anal Lab*, 31(6): 92-95. [曹福悦,任凤莲,宋鸽,等,2012.秋水仙碱与牛血清白蛋白相互作用的电化学研究[J].分析试验室,31(6):92-95.]

CHEN CL, ZHU QR, SUN DM, 2014. Studies on the interaction of taxifolin and bovine serum albumin by spectroscopic and voltammetric methods [J]. *Chin J Appl Chem*, 31(5):617-623. [陈彩莲,朱庆仁,孙登明,2014.花旗松素与牛血清白蛋白相互作用的光谱和电化学[J].应用化学,31(5):617-623.]

EFTINK MR, 1991. In biophysical and biochemical aspects of fluorescence spectroscopy [M]. New York: Plenum Press: 1-41.

FENG SL, YUAN DQ, 2009. Study on interaction between piperazine ferulate and bovine serum albumin [J]. *Chin J Anal Lab*, 28(7):78-82. [冯素玲,袁道琴,2009.阿魏酸哌嗪与牛血清白蛋白相互作用的研究[J].分析试验室,28(7):78-82.]

LAKOWICZ JR, 1999. Principles of fluorescence spectroscopy [M]. 2ed. New York: Plenum Press:237-259.

LI SL, LIU YH, 2015. Chemical constituents with antioxidative activity from the flower buds of *Lonicera serreana* [J]. *Guhaia*, 35(4): 586-589. [李树立,刘玉衡,2015.毛药忍冬花蕾抗氧化活性部位化学成分研究[J].广西植物,35(4):586-589.]

LING X, NA RS, ZHAORI GT, et al, 2011. Studies on interaction between piperlonguminine and bovine serum albumin [J]. *Chem Reag*, 33(3):203-206. [领小,娜日苏,昭日格图,等,2011.荜茇宁与牛血清白蛋白相互作用的研究[J].化学试剂,33(3):203-206.]

NIE LH, ZHAO HC, WANG XB, et al, 2001. Study on the Interaction of bovine serum albumin and fleroxacin by fluorescence method [J]. *J Beijing Norm Univ (Nat Sci Ed)*, 2(1):87-91. [聂丽华,赵慧春,王学斌,等,2001.荧光法研究氟罗沙星与牛血清白蛋白的相互作用[J].北京师范大学学报(自然科学版),2(1):87-91.]

SHAO RJ, SHAO SH, 2015. Progress in study on medicinal value of medicinal parts of *Kochia scoparia* [J]. *Chin Trad Herb Drugs*, 46(23): 3605-3610. [邵荣杰,邵世宏,2015.地肤的各药用部位药用价值研究进展[J].中草药,46(23):3605-3610.]

TANG H, GAO QJ, LU C, et al, 2014. Effects of ferulic acid and isoferulic acid on proliferation of HepG2 cells and its cytochrome P450 enzymes [J]. *Chin Trad Herb Drugs*, 45(12): 1726-1730. [汤浩,高庆剑,陆铖,等,2014.阿魏酸和异阿魏酸对HepG2细胞增殖及其细胞色素P450酶的影响[J].中草药,45(12):1726-1730.]

WANG L, ZHAO DW, ZI LJ, et al, 2012. Investigations of the interaction between ferulic acid and serum albumin [J]. *J Henan Norm Univ (Nat Sci Ed)*, 40(4):87-90. [王玲,赵东旺,訾丽娟,等,2012.阿魏酸与血清蛋白相互作用研究[J].河南师范大学学报(自然科学版),40(4):87-90.]

ZHANG W, ZHANG XX, LIU CF, et al, 2013. Study on chemical constituents of *Kochia scoparia* [J]. *J Chin Med Mat*, 36(6): 921-924. [张卫,张晓霞,刘昌发,等,2013.地肤的化学成分研究[J].中药材,36(6):921-924.]

ZHANG Y, LIU H, ZHANG Y, et al, 2016. In vitro antioxidant activities of polysaccharides from corn bract [J]. *J Henan Univ Technol (Nat Sci Ed)*, 37(6): 85-89. [张扬,刘欢,张艳,等,2016.玉米苞叶多糖的体外抗氧化活性研究[J].河南工业大学学报(自然科学版),37(6):85-89.]

ZHU QR, CHEN CL, SUN DM, 2013. Electrochemical study of interaction between rutin and bovine serum albumin [J]. *J Huabei Norm Univ (Nat Sci Ed)*, 34(3): 23-27. [朱庆仁,陈彩莲,孙登明,2013.芦丁与牛血清白蛋白相互作用的光电化学研究[J].淮北师范大学学报(自然科学版),34(3):23-27.]