

槲皮素对胰蛋白酶活性的影响

赵红辉, 韦庆益, 陈磊, 袁尔东, 宁正祥

(华南理工大学轻工与食品学院, 广州 510640)

摘要: 通过测定槲皮素对胰蛋白酶催化活性、催化反应动力学以及内源荧光光谱的影响, 对槲皮素和胰蛋白酶相互作用特性进行研究。结果表明: 槲皮素对胰蛋白酶催化活性有明显的抑制作用, 当槲皮素与胰蛋白酶的摩尔比为 44:1, 在 37 °C 反应 10 min, 抑制率达到 32.5%; 反应时间对两者的作用影响并不明显; 槲皮素对胰蛋白酶催化活性的抑制作用属于可逆的竞争性抑制; 槲皮素可使胰蛋白酶的内源荧光发生猝灭现象, 猝灭常数 K_q 是 $4.7415 \times 10^{12} (\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 猝灭类型为静态猝灭, 结合位点数 N 为 0.9206。

关键词: 胰蛋白酶; 槲皮素; 酶活力; 酶动力学; 荧光光谱

文章编号: 1673-9078(2012)3-260-262

The Influence of Quercetin on the Trypsin Properties

ZHAO Hong-hui, WEI Qing-yi, CHEN Lei, YUAN Er-dong, NING Zheng-xiang

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The interaction between quercetin and trypsin was studied by measuring the catalytic activity, the enzymatic kinetic analysis and fluorescence spectra. Quercetin showed inhibition effect on catalytic activity of trypsin. When trypsin was treated by quercetin with the molar ratio of quercetin to trypsin of 44:1 for 10mins under 37 °C, the inhibition rate reached 32.5%. Reaction time had little effect on the inhibition rate. The type of inhibition effect was reversible competitive inhibition. Quercetin can cause the quenching of intrinsic fluorescence of trypsin in physiological condition. With fluorescence quenching method, the quenching constant K_q was found to be $4.7415 \times 10^{12} (\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ and the number of binding site N was 0.9206.

Key words: trypsin; quercetin; enzymatic activity; fluorescence spectra; enzyme kinetics

槲皮素 (quercetin, 图 1) 是一种重要的植物次生代谢产物, 属类黄酮物质中的黄酮醇, 具有抗氧化及清除活性氧自由基、抗癌、抗菌、抗病毒、镇痛、降血压及免疫作用增强等作用^[1-3]。由于分子内多个酚羟基的存在, 槲皮素经口摄入之后, 在消化道内可能与其中的酶蛋白发生结合作用, 从而影响到其自身生物活性及酶催化活性的有效发挥。胰蛋白酶 (EC3.4.21.4, trypsin) 是一种内肽酶, 主要作用于精氨酸或赖氨酸羧基端的肽键, 可把天然蛋白、变性蛋白、纤维蛋白和粘蛋白等蛋白质水解为多肽或氨基酸, 常将胰蛋白酶在临床上用于抗炎症和消化药物的复配^[4]。本文研究槲皮素对胰蛋白酶特性的影响情况, 探讨槲皮素与胰蛋白酶相互作用的机制。

4500 荧光分光光度计; pH 计; 离心机等。胰蛋白酶, 上海伯奥生物科技有限公司; 槲皮素 (98%), 陕西慧科植物开发有限公司。茚三酮等试剂均为国产分析纯, 所有溶液均用去离子水配制, 并用 0.1 mol/L 的 PBS 缓冲液以保持生理条件。

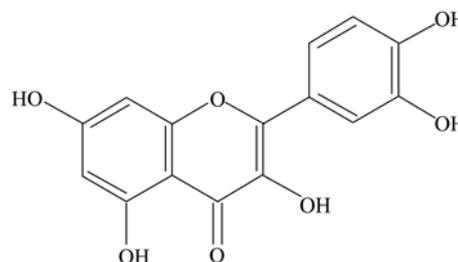


图 1 槲皮素的化学结构

Fig.1 Molecular structures of quercetin

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

TU-1810PC 型紫外可见分光光度计; Hitachi-

收稿日期: 2011-11-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21002034)

作者简介: 赵红辉 (1986-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品化学

通讯作者: 袁尔东

1.2 试验方法

1.2.1 槲皮素对胰蛋白酶活性的影响

取一定量的槲皮素和胰蛋白酶溶液, 在不同的反应条件下混合反应, 测定反应前后胰蛋白酶的催化活性, 探讨反应体系 pH、反应时间和浓度比对槲皮素-胰蛋白酶的相互作用强弱的影响。

胰蛋白酶活性的测定方法: 采用茚三酮比色法测

定胰蛋白酶活力。胰蛋白酶催化水解酪蛋白产生氨基酸,氨基酸与茚三酮作用生成紫红色物质,在 568 nm 波长处有最大吸收,由此即可了解胰蛋白酶催化活力^[5]。

取1 mL酶液加入2 mL 1%酪蛋白溶液,40 °C下酶解反应10 min后,加三氯乙酸终止反应。酶解液3000 r/min离心10 min,取上清液0.8 mL于具塞试管中,加入2 mL 2%茚三酮溶液和2 mL pH 5.0乙酸缓冲液,水浴煮沸20 min,取出,迅速冷却至室温,测定568 nm 波长处吸光度。同样方法,配制L-酪氨酸标准溶液,用茚三酮显色,制作标准曲线。同一样品平行测定三次。胰蛋白酶活力定义为:1 mmol胰蛋白酶在10 min 内水解酪蛋白产生1 mg酪氨酸为1个酶活力单位。抑制率计算公式为:

$$\text{抑制率}\% = \frac{E_{\text{空白}} - E_{\text{样品}}}{E_{\text{空白}}} \times 100\%$$

注: $E_{\text{空白}}$ 为空白组酶活力; $E_{\text{样品}}$ 为样品组酶活力。

1.2.2 胰蛋白酶催化动力学研究

判断抑制类型:反应速率的测量方法见文献^[6,7],固定底物酪蛋白和样品槲皮素浓度,改变酶的浓度,得到一系列反应速率值,以 v 对 $[En]$ 作图,可得到一条直线。保持底物浓度不变,改变样品浓度,以同样方法得到另外几条直线,根据这一组直线可判断抑制剂的抑制类型。

判断可逆抑制类型:采用Lineweaver-Burk作图法判断。反应速率的测量方法同抑制类型判断方法。固定酶和样品浓度,改变底物浓度,得到一系列反应速率值,以 $1/V$ 对 $1/[S]$ 作图,得到一条双倒数曲线。保持酶浓度不变,改变样品浓度,以同样方法得到另外几条双倒数曲线。根据双倒数作图确定可逆抑制类型。

1.2.3 槲皮素对胰蛋白酶荧光光谱的影响

在4 mL 5 $\mu\text{mol/L}$ 胰蛋白酶溶液中加入不同体积1 mmol/L槲皮素溶液,室温下静置10 min,以等量PBS作为空白参比,在荧光光度计上以295 nm为激发波长,扫描225~500 nm的荧光发射光谱变化。

2 结果讨论

2.1 pH 值对槲皮素-胰蛋白酶相互作用的影响

如图2所示,在不同pH条件下,槲皮素对胰蛋白酶催化活力的抑制效果略有差异,pH 6.5条件下槲皮素对胰蛋白酶催化活力的抑制率,较pH 7.4和pH 8.0条件下的稍低。考虑到人体生理环境条件,因此后续试验中采用pH 7.4反应体系。

2.2 反应时间对槲皮素-胰蛋白酶相互作用的影响

如图3所示,随着时间的延长,槲皮素对胰蛋白

酶催化活性的抑制作用并没有发生明显的变化,说明槲皮素和胰蛋白酶能很快完成反应过程。

2.3 槲皮素添加量对槲皮素-胰蛋白酶相互作用的影响

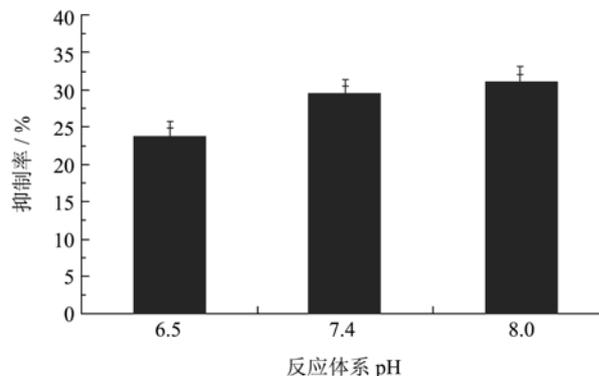


图2 pH 值对槲皮素-胰蛋白酶相互作用的影响

Fig.2 The effect of pH on the interaction between quercetin and trypsin

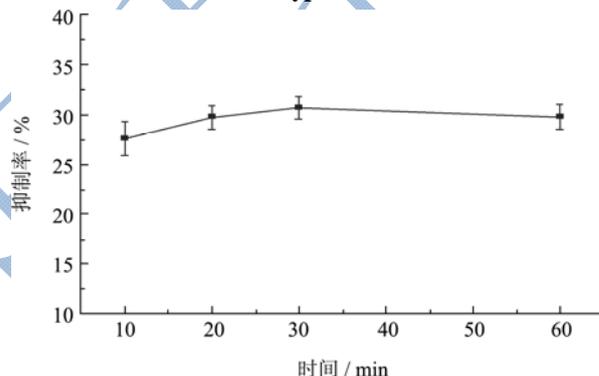


图3 反应时间对槲皮素-胰蛋白酶相互作用的影响

Fig.3 The effect of time on the interaction between quercetin and trypsin

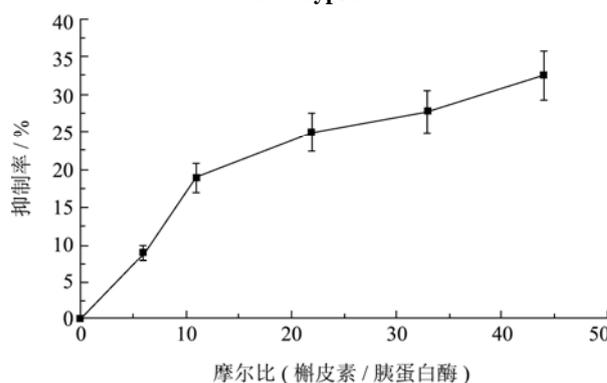


图4 槲皮素添加量对胰蛋白酶活性的影响

Fig.4 The effect of quercetin on the tryptic activity

由图4所示,随着槲皮素比例的增加,其对胰蛋白酶活力的抑制率也明显增加。当槲皮素添加量为胰蛋白酶的44倍(摩尔比)时,其对胰蛋白酶的催化活性抑制率达到32.5%。

2.4 槲皮素抑制胰蛋白酶催化活性的动力学性质研究

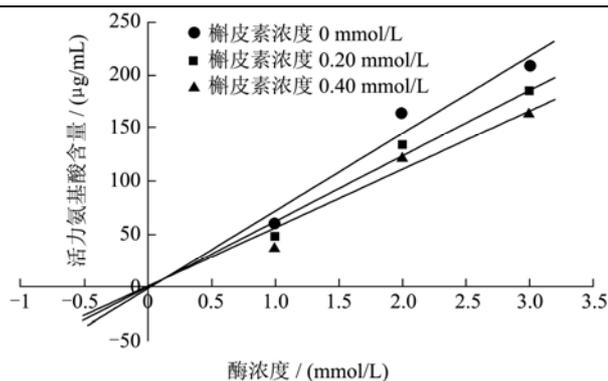


图5 槲皮素对胰蛋白酶的抑制作用机理判断

Fig.5 Determination of the inhibitory mechanism of quercetin on trypsin

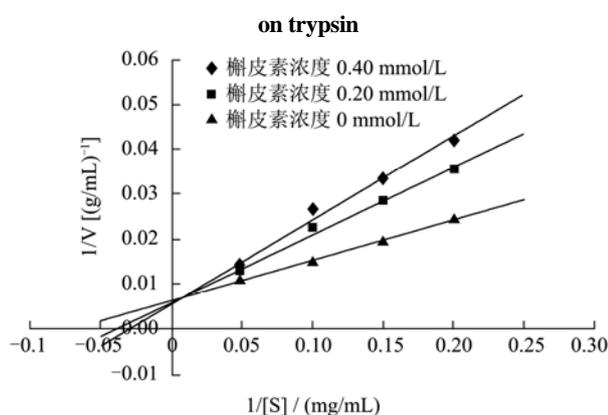


图6 槲皮素对胰蛋白酶抑制作用的Lineweaver-Burk 双倒数曲线

Fig.6 Lineweaver-Burk plots of the inhibitory mechanism of quercetin on trypsin

黄酮类化合物可通过疏水作用和氢键与酶蛋白结合,当结合到酶的活性部位时表现为竞争性抑制,结合到非活性部位时则表现为非竞争性抑制。这种抑制作用与化合物的分子结构和浓度、酶蛋白的氨基酸组成以及构型等密切相关^[8]。这种相互作用,可以影响酶蛋白的理化特性和酶学性质^[9,10]。从图5和图6可以看出,槲皮素对胰蛋白酶的抑制类型是可逆竞争性抑制,槲皮素-胰蛋白酶的作用部位在其活性羟基位置。

2.5 槲皮素对胰蛋白酶荧光光谱的影响

如图7所示,以 $\lambda_{ex}=295\text{ nm}$,胰蛋白酶在340 nm左右具有最大发射波长。试验中,固定胰蛋白酶的量,逐渐增大槲皮素与胰蛋白酶的比例,胰蛋白酶的內源荧光呈现规律性的降低,峰形及峰位置不变,说明槲皮素与胰蛋白酶形成了复合物。

根据槲皮素对胰蛋白酶荧光猝灭的图谱,以荧光强度 F_0/F 对槲皮素 $[Q]$ 作图,得到Stern-Volmer方程: $y=4.7415 \times 10^4 [Q] + 1.0000$ 相关系数是0.9944,猝灭常数 K_q 是 $4.7415 \times 10^{12} (\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$ 。 K_q 值远大于各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散常数 $2.0 \times 10^{10} (\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$,

因此槲皮素对胰蛋白酶的荧光猝灭以静态猝灭为主^[11]。

在室温下做槲皮素与胰蛋白酶的 $\lg[(F_0-F)/F]$ 对 $\lg[Q]$ 的双对数图,得到Lineweaver-Burk线性方程 $\lg[(F_0-F)/F]=4.2827+0.9206\lg[Q]$,相关系数是0.9830,结合位点数是0.9206,推测槲皮素与胰蛋白酶只有一个结合位点。

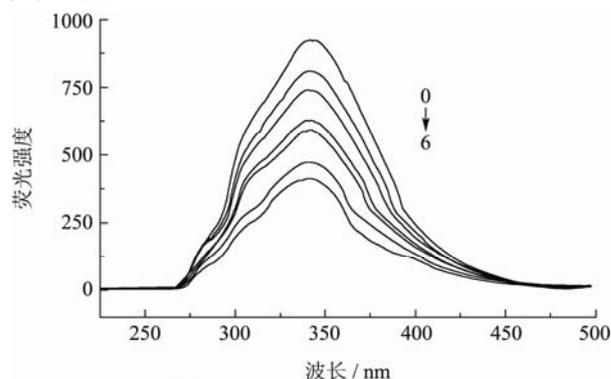


图7 不同浓度的槲皮素对胰蛋白酶的荧光猝灭效应

Fig.7 The quenching of fluorescence spectra of trypsin after treatment with different concentration of quercetin

注:曲线0-6表示不同的槲皮素浓度分别为0、0.0025、0.005、0.010、0.015、0.020、0.025 mmol/L

3 结论

槲皮素对胰蛋白酶催化水解酪蛋白有明显的抑制作用,并且这种随着槲皮素与胰蛋白酶比例增大而增强,反应时间对两者的相互作用影响并不明显。酶活性动力学试验显示,槲皮素对胰蛋白酶催化活性的抑制作用属于可逆的竞争性抑制。槲皮素可以使胰蛋白酶的内源荧光发生猝灭现象,猝灭常数 K_q 是 $4.7415 \times 10^{12} (\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$,猝灭类型为静态猝灭,结合位点数 n 为0.9206。

参考文献

- [1] 苏俊锋,郭长江.食物黄酮槲皮素的抗氧化作用[J].解放军预防医学杂志,2001,19(3):229-231
- [2] 席丹莹,王正平,宁正祥.二氢槲皮素衍生物的制备及其抗氧化性能研究[J].现代食品科技,2007,23(10):29-31
- [3] 宋玉乔,姚凌云,曹蔚,等.槲皮素的药理作用研究近况[J].西北药学杂志,2002,17(1):40-42
- [4] Perkins SJ, Smith KF. Identity of the putative serine proteinase role in proteins of the complement system with nine relevant crystal structures [J]. Biochem J, 1993, 29: 109-114
- [5] 方焕,生吉萍,吴显荣.工业生产中木瓜蛋白酶的活性检测方法比较[J].食品与机械,2000,13(6):27-29

- [6] Rohn S, Rawel HM, Wollenberger U. Enzyme activity of α -chymotrypsin after derivatization with phenolic compounds [J]. Food Science, 2003, 47(5): 325-329
- [7] 陈青西. 酶学及其研究技术[M]. 厦门: 厦门大学出版社, 2010
- [8] Tagliazucchi D, Verzelloni E, Conte A. Effect of some phenolic compounds and beverages on pepsin activity during simulated gastric digestion [J]. Journal of Agricultural and Food Industry, 2005, 53: 8706-8713
- [9] Kroll J, Rawel HM, Rohn S. Reactions of Plant Phenolics with Food Proteins and Enzymes under Special Consideration of Covalent Bonds [J]. Food Science, 2003, 9 (3): 205-218
- [10] Rohn S, Rawel HM, Pietruschinski N et al. In vitro inhibition of α -chymotrytic activity by phenolic compounds [J]. Journal of the science of Food and Agriculture, 2001, 81 (10): 1512 - 1521
- [11] 王玲, 曲凌波, 杨冉等. 槲皮素和芦丁与牛血清白蛋白相互作用研究[J]. 分析科学学报, 2006, 22(6): 719-722

现代食品科技