

# 基于光谱学结合分子模拟研究咖啡酸和对香豆酸与脲酶的相互作用

郭浩旭<sup>1,2</sup>, 蔡燕雪<sup>2</sup>, 肖珊<sup>2</sup>, 王波<sup>2</sup>, 陈璇<sup>2</sup>, 雷红涛<sup>1\*</sup>, 王际辉<sup>2\*</sup>

(1. 华南农业大学食品学院, 广州 510642; 2. 东莞理工学院生命健康技术学院, 中国轻工业健康食品开发与营养调控重点实验室, 东莞市预制菜创新发展与品质控制重点实验室, 东莞 523808)

**摘要:** **目的** 探究咖啡酸(caffeic acid, CA)和对香豆酸(*p*-coumaric acid, PCA)与脲酶的相互作用。**方法** 以具有细微分子结构差异的 CA 和 PCA 为研究对象, 通过荧光光谱获取其对脲酶的荧光淬灭常数及结合常数, 使用圆二色谱结合变温技术考察不同温度条件下 CA 和 PCA 对脲酶二级结构的影响, 利用分子模拟方法探讨 CA 和 PCA 与脲酶的结合位点与空间构象。**结果** CA 和 PCA 对脲酶均属于静态淬灭, 与脲酶的结合是自发形成的( $\Delta G^\circ < 0$ ), 且结合摩尔比为 1:1。CA 对脲酶二级结构的影响高于 PCA, 且在温度为 300.15 K 时 CA 与脲酶的亲合力远高于 PCA, 而它们与脲酶的结合稳定性随温度的升高而降低。分子对接进一步证明了 CA 与脲酶的结合能力强于 PCA, 并且在结合过程中氢键为主要相互作用力, CA 和 PCA 与脲酶结合在双镍活性位点周边。**结论** CA 和 PCA 可以与脲酶自发结合, 其稳定性随着温度的升高而下降, 研究结果为基于构效关系的天然小分子的功能性应用提供新思路。

**关键词:** 咖啡酸; 对香豆酸; 脲酶; 分子结构; 相互作用; 结合机制

## Studying the interaction of caffeic acid and *p*-coumaric acid with urease based on spectroscopy combined with molecular simulation

GUO Hao-Xu<sup>1,2</sup>, CAI Yan-Xue<sup>2</sup>, XIAO Shan<sup>2</sup>, WANG Bo<sup>2</sup>, CHEN Xuan<sup>2</sup>,  
LEI Hong-Tao<sup>1\*</sup>, WANG Ji-Hui<sup>2\*</sup>

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. School of Life and Health Technology, China National Light Industry Key Laboratory of Healthy Food Development and Nutrition Regulation, Dongguan Key Laboratory of Innovative Development and Quality Control of Prepared Vegetables, Dongguan University of Technology, Dongguan 523808, China)

**ABSTRACT: Objective** To investigate the interaction between caffeic acid (CA) and *p*-coumaric acid (PCA) and urease. **Methods** The quenching constants and binding constants of CA and PCA with subtle molecular structure

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(32001662)、东莞理工学院高层次人才(创新团队)科研启动项目(KCYCXPT2017007)、广东省创新强校创新团队项目(2021KCXTD035)

**Fund:** Supported by the National Natural Science Foundation of China (32001662), the ISTI, Dongguan University of Technology, China (KCYCXPT2017007), and the Foundation for Innovation Team in Higher Education of Guangdong, China (2021KCXTD035)

\*通信作者: 雷红涛, 博士, 教授, 主要研究方向为食品安全与营养。E-mail: hongtao@scau.edu.cn

王际辉, 博士, 教授, 主要研究方向为功能性食品与安全。E-mail: wangjihui@dgut.edu.cn

\*Corresponding author: LEI Hong-Tao, Ph.D, Professor, College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China. E-mail: hongtao@scau.edu.cn

WANG Ji-Hui, Ph.D, Professor, School of Life and Health Technology/China National Light Industry Key Laboratory of Healthy Food Development and Nutrition Regulation, Dongguan University of Technology, Dongguan 523808, China. E-mail: wangjihui@dgut.edu.cn

differences on urease were obtained by fluorescence spectra. The effects of CA and PCA on the secondary structure of urease at different temperatures were investigated by circular dichroism combined with temperature change technology. The binding sites and spatial conformations of CA and PCA with urease were studied by molecular simulation method. **Results** The fluorescence quenching types of urease by CA and PCA were static quenching, and the binding to urease was spontaneous ( $\Delta G^\circ < 0$ ), and the molar ratio of binding was 1:1. The effect of CA on the secondary structure of urease was higher than that of PCA, and the affinity of CA to urease was much higher than that of PCA at 300.15 K, while the binding stability of CA to urease decreased with the increase of temperature. Molecular docking further proved that the binding ability of CA and urease was stronger than that of PCA, and the hydrogen bond was the main interaction force during the binding process, and CA and PCA bound to urease around the active site of double nickel. **Conclusion** CA and PCA can spontaneously bind to urease, and their stability decreases with increasing temperature. The research findings provide new insights into the functional applications of natural small molecules based on structure-activity relationships.

**KEY WORDS:** caffeic acid; *p*-coumaric acid; urease; molecular structure; interaction; binding mechanism

## 0 引言

幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*, HP)是一种螺旋形厌氧菌,为慢性胃炎、消化性溃疡、胃黏膜相关淋巴瘤和胃癌等的主要致病因素,是全球内最常见的传染性致病菌之一<sup>[1]</sup>。世界卫生组织已将 HP 列为第一类致癌因子<sup>[2]</sup>。HP 存活的最适 pH 范围为 6.0~8.0,并且 HP 能分泌高活性脲酶。脲酶(urease)又称尿素酰胺水解酶,是由 567 个氨基酸构成的一类广泛存在于细菌、真菌、动植物和人体中的酶,在催化尿素水解方面具有高度专一性<sup>[3]</sup>。脲酶可以特异性地催化尿素水解释放出氨和二氧化碳,此反应使得尿素浓度降低,氨浓度升高,从而对 HP 起到保护作用,使其能在胃部酸性环境中存活<sup>[4]</sup>并破坏宿主的胃部组织,引发胃炎和胃溃疡等。多酚是一类在自然界中广泛存在的化合物,是许多食用和医用植物的主要生物活性成分,脲酶抑制剂可干扰尿素与催化位点的结合,降低脲酶的催化活性<sup>[5]</sup>。多酚是一类苯环上含有羟基物质的总称,主要包含黄酮类或异黄酮类、酚酸类、花青素类等。据文献报道,改变异黄酮苯环结构上官能团的种类和位置,可以显著影响其对脲酶的抑制作用<sup>[6]</sup>,但是对于其他类型多酚类物质的结构差异与脲酶的相互作用关系仍不明晰。

咖啡酸(caffeic acid, CA)和对香豆酸(*p*-coumaric acid, PCA)是天然酚类化合物,可从果蔬香料中提取,目前已经广泛应用于医药、香料、化妆品等领域。CA 常见于百里香、苹果、咖啡、树莓等原料<sup>[7]</sup>,PCA 常见于真菌、花生、西红柿、梨和罗勒等农副产品<sup>[8]</sup>,研究表明,CA 和 PCA 都表现出优异的抗氧化性、抗菌特性、抗癌特性<sup>[9]</sup>、神经保护<sup>[10]</sup>等生物活性。CA 和 PCA 在分子结构上的差异主要体现在 PCA 仅在对位位置含有 1 个酚羟基,而 CA 在此基础上于邻位多 1 个酚羟基,这种结构差异是造成两种分子基本特性与生物活性差别的主要原因。CA 和 PCA 对酶存在一定的抑制作用,例如,CA

和 PCA 均对  $\alpha$ -淀粉酶都呈现出良好的抑制效果<sup>[11]</sup>,CA 对于脲酶的半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)为(3.04±0.68) mmol/L<sup>[12]</sup>,但与脲酶的结合方式与结合位点等相互作用关系尚不明晰,基于构效关系进一步选择或合理设计小分子结构将是研究脲酶抑制剂的关键。本研究对具有细微分子结构差异的 CA 和 PCA 与脲酶的相互作用关系进行对比,通过荧光光谱分析 CA 和 PCA 与脲酶的荧光淬灭常数及结合常数,基于圆二色谱(circular dichroism, CD)结合变温技术考察不同温度条件下小分子对脲酶二级结构的影响,进一步利用分子模拟方法探讨 CA 和 PCA 与脲酶的结合位点与空间构象,为基于构效关系的天然小分子的功能性应用提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

脲酶(200 U/mg, 上海麦克林生化科技有限公司); 咖啡酸、对香豆酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠(分析纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。

### 1.2 仪器与设备

MR Hei-connect 磁力搅拌器(德国 Heidolph 公司); PHS-3CpH 计(上海雷磁股份有限公司); MX-S 涡旋机(上海精密科学仪器公司); F-7000 荧光光谱仪(日本日立公司); Chirascan V100 圆二色光谱仪(英国应用光物理公司, 上海代表处)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 荧光淬灭

参考文献[13]的方法并有所修改,激发波长为 280 nm、发射波长为 300~500 nm,激发波长和发射波长的狭缝宽度设置为 2.5 nm,光程为 5 mm。在 2 mL 的脲酶(1.09×10<sup>-6</sup> mol/L)中增量加入 10  $\mu$ L 的 CA (1.00×10<sup>-3</sup> mol/L)或 PCA (1.00×10<sup>-3</sup> mol/L)反

应 3 min, 每次增加后测量体系的荧光光谱, 实验分别在 300.15、305.15 和 310.15 K 下操作检测。

通过 Stern-Volmer 方程计算荧光淬灭程度:

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

式中:  $F_0$  和  $F$  分别是不添加和添加抑制剂时的荧光强度;  $[Q]$  为抑制剂浓度(mol/L);  $K_{sv}$  为荧光淬灭常数( $10^5$  L/mol);  $K_q$  为荧光淬灭速率常数( $10^{12}$  L/mol/s);  $\tau_0$  为抑制剂不存在时的平均荧光寿命( $2.0 \times 10^{10}$  L/mol/s)。

以  $F_0/F$  为纵坐标,  $[Q]$  为横坐标作图, 可直接通过直线斜率求出  $K_{sv}$  与  $K_q$ 。通过公式(2)计算结合常数和结合位点数:

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_b + n \log [Q] \quad (2)$$

式中:  $K_b$  为结合常数( $10^8$  L/mol);  $n$  为结合位点数。

通过公式(3)和公式(4)计算热力学参数<sup>[14]</sup>:

$$\log K_b = \frac{\Delta H^\circ}{2.303RT} + \frac{\Delta S^\circ}{2.303R} \quad (3)$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (4)$$

式中:  $K_b$  为对应温度下的结合常数( $10^8$  L/mol);  $R$  为气体常数 [ $8.314$  J/(mol·K)];  $\Delta H^\circ$  为焓变(kJ/mol);  $\Delta S^\circ$  为熵变[L/(mol·s)];  $\Delta G^\circ$  为吉布斯自由能变化(kJ/mol)。

### 1.3.2 圆二色谱

运用圆二色谱仪在远紫外区(180~260 nm)范围内, 分别扫描 CA、PCA 与  $5.45 \times 10^{-5}$  mol/L 的脲酶的混合溶液, 按照 1:1、1:2、1:5 的摩尔比添加 CA、PCA。以不添加抑制剂的脲酶样品作为空白对照, 研究 CA、PCA 浓度对蛋白质二级结构的影响。

在温度效应实验中, 在 25~90°C 范围内以 1°C/min 的速率进行实验。酶与 CA、PCA 的比例保持为 1:1 的摩尔比。扫描速度 100 nm/min, 响应时间 1 s, 狭缝宽度 1 nm。每个光谱是 3 次连续扫描的平均值。

### 1.3.3 分子对接

使用 AutoDock 4.2 和 MGL Tools 1.5.6 进行分子对接

模拟。脲酶(PDB ID: 3LA4)的蛋白三维结构来自蛋白质数据库(<http://www.rcsb.org/pdb>)。CA 和 PCA 的三维结构来源于国家医学实验室(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。使用 AutoDock 4.2 通过对接 100 次, 输出 LamarckianGA 模块的结果, 其他参数默认。使用 PyMol 软件(<http://www.pymol.org/>)将对接过程可视化分析。

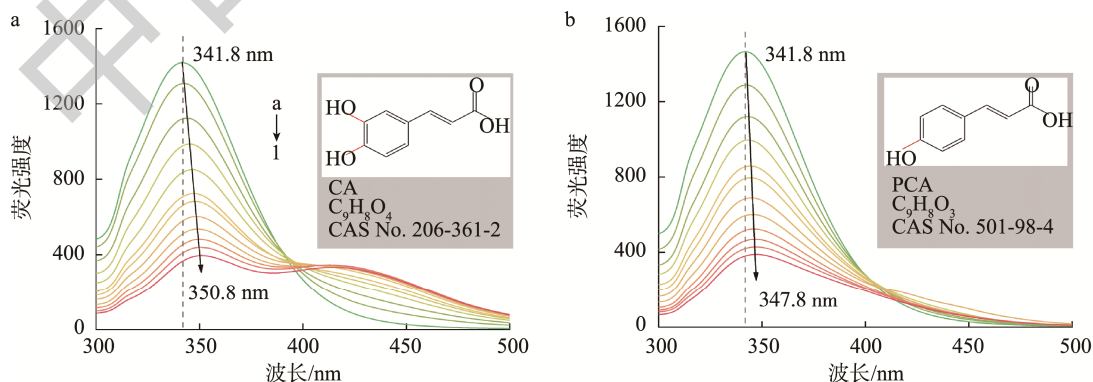
## 1.4 数据处理

所有实验至少重复 3 次, 结果用平均值±标准偏差表示, 使用 Origin Pro 9.8.0 绘制结果, 使用 SPSS 26.0 进行单因素方差分析,  $P < 0.05$  被认为具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 CA 和 PCA 对脲酶的荧光淬灭分析

CA 和 PCA 有着相似的分子结构, 主要差异在于 CA 苯环上邻位多一个酚羟基, 从而表现出对蛋白质的亲和能力差异。本研究对比了不同温度(300.15、305.15 K 和 310.15 K)条件下 CA 和 PCA 对脲酶的荧光淬灭效应。以 310.15 K 温度为例(图 1), 在 280 nm 的激发波长下, 未添加抑制剂情况下最大荧光发射峰均在 341.80 nm 处。在脲酶浓度不变的情况下, 荧光强度随着 CA 和 PCA 浓度的不断增加而逐渐降低, 这表明 CA 和 PCA 可以与脲酶发生结合并产生荧光淬灭现象, 并且属于浓度依赖性的淬灭作用。一般认为, 蛋白质内源荧光的主要由色氨酸等含有共轭结构的氨基酸残基产生<sup>[15]</sup>, 由于抑制剂小分子与蛋白结合后产生能量转移效应, 从而导致蛋白内源荧光的淬灭。同时发现, 随着 CA 和 PCA 浓度的增加, 发射峰位置分别出现了从 341.80 nm 到 350.80 nm 或 347.80 nm 不等的红移现象。荧光发射峰出现蓝移或红移是由于小分子改变了蛋白质中色氨酸的微环境<sup>[16-17]</sup>, CA 产生了更多的红移是因为邻位羟基对于色氨酸的扰动更加剧烈, 结果表明, CA 和 PCA 与脲酶都存在强烈的相互作用, 其中 CA 的作用效应可能更强。



注: a 为 310.15 K 下不同浓度的 CA 引起脲酶荧光淬灭(a→1 表示浓度区间  $0.0 \sim 4.5 \times 10^{-5}$  mol/L); b 为 310.15 K 下不同浓度的 PCA 引起脲酶荧光淬灭(a→1 表示浓度区间  $0.0 \sim 4.5 \times 10^{-5}$  mol/L)。

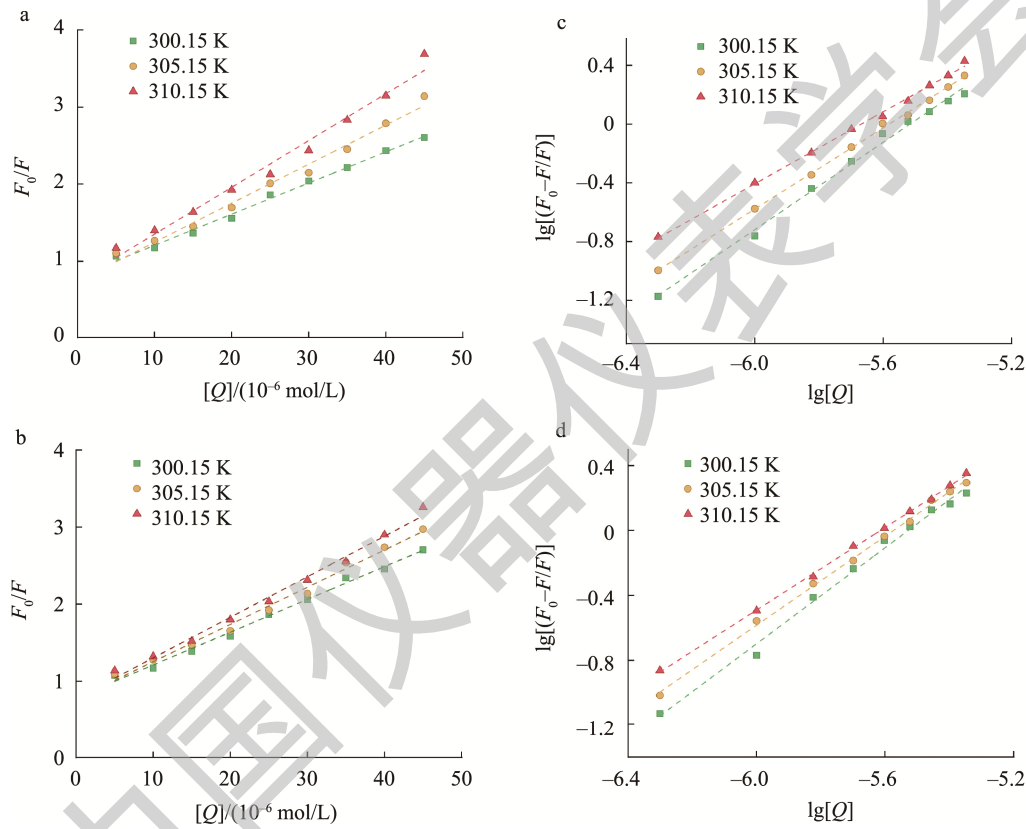
图 1 脲酶荧光淬灭图

Fig.1 Fluorescence quenching diagrams of urease

为进一步了解 CA 和 PCA 对脲酶的荧光淬灭机制, 通过 Stern-Volmer 方程和温度梯度对数图(图 2)计算小分子与脲酶的荧光淬灭常数与结合常数<sup>[18]</sup>。结果如表 1 所示, CA 和 PCA 在不同温度下对于脲酶的荧光淬灭 Stern-Volmer 曲线具有较好的线性关系。随着温度升高, CA 的  $K_{sv}$  值由  $0.43 \times 10^5$  L/mol 显著增加到  $0.61 \times 10^5$  L/mol, PCA 由  $0.42 \times 10^5$  L/mol 逐渐增加到  $0.53 \times 10^5$  L/mol, 同时计算荧光淬灭速率常数  $K_q$  在  $4.2 \times 10^{12} \sim 6.1 \times 10^{12}$  L/mol/s 范围内, 都远大于生物大分子的最大散射碰撞速率常数  $2.0 \times 10^{10}$  L/mol/s, 由此推断 CA 与 PCA 导致脲酶发生荧光淬灭的类型均为静态淬灭<sup>[14,19]</sup>, 并且 CA 相较于 PCA 在温度改变条件下,  $K_q$

值也呈现出更大的波动。

$K_b$  表示蛋白质与淬灭剂的亲和力,  $K_b$  越高表明淬灭剂的亲和力越强<sup>[20]</sup>。表 1 数据显示, CA 和 PCA 的  $K_b$  值都随着温度的升高而降低, 即结合稳定性随温度的升高而降低。同时, 伴随温度的升高结合位点数( $n$ )也随之降低, 说明高温不利于小分子与脲酶蛋白的结合<sup>[21]</sup>。根据  $n$  在 1.23~1.56 范围内的参数, 可以推测 CA 和 PCA 与脲酶结合的摩尔比可能为 1:1 的形式存在<sup>[22]</sup>。同时也发现, 当温度在 300.15 K 时 CA 与脲酶的亲和力远高于 PCA 与脲酶的亲和力, 表明在此温度下 CA 与脲酶具有更强的结合性, 这可能是由于 CA 上更多的酚羟基提供了更多的结合位点。



注: a 和 b 为不同温度下 CA 和 PCA 的 Stern-Volmer 图; c 和 d 为 CA 和 PCA 与脲酶的温度梯度对数图。

图 2 Stern-Volmer 图和脲酶的温度梯度对数图

Fig.2 Stern-Volmer plots and log plots of the temperature gradient for urease

表 1 不同温度下 CA 和 PCA 与脲酶的荧光淬灭常数

Table 1 Fluorescence quenching constants of CA and PCA with urease at different temperatures

抑制剂	T/K	$K_{sv}/(10^5 \text{ L/mol})$	$K_b/(10^8 \text{ L/mol})$	$n$	$\Delta H^\circ/(\text{kJ/mol})$	$\Delta S^\circ/[\text{L}/(\text{mol} \cdot \text{s})]$	$\Delta G^\circ/(\text{kJ/mol})$
CA	300.15	$0.43 \pm 0.02^a$	$3.89 \pm 0.13^a$	$1.56 \pm 0.04^a$			$-49.26 \pm 1.48^a$
	305.15	$0.51 \pm 0.03^b$	$0.51 \pm 0.03^c$	$1.38 \pm 0.01^a$	$-292.13 \pm 5.84^a$	$-809.56 \pm 21.10^a$	$-45.21 \pm 1.81^b$
	310.15	$0.61 \pm 0.03^a$	$0.09 \pm 0.01^d$	$1.23 \pm 0.05^a$			$-41.16 \pm 2.06^c$
PCA	300.15	$0.42 \pm 0.01^c$	$1.51 \pm 0.07^b$	$1.48 \pm 0.06^a$			$-46.95 \pm 1.41^b$
	305.15	$0.48 \pm 0.01^b$	$0.42 \pm 0.01^c$	$1.37 \pm 0.03^a$	$-185.23 \pm 5.56^b$	$-460.95 \pm 23.05^b$	$-44.64 \pm 1.34^b$
	310.15	$0.53 \pm 0.01^b$	$0.14 \pm 0.01^d$	$1.27 \pm 0.04^a$			$-42.34 \pm 1.27^c$

注: 同列不同小写字母表示组间差异显著( $P < 0.05$ ), 下同。

一般认为, 酚类小分子和蛋白质的结合主要包括氢键、静电作用、疏水作用和范德华力等弱分子相互作用<sup>[23]</sup>。通过计算 CA 和 PCA 与脲酶的热力学参数, 可以有效判断出相互作用的作用力类型。由表 1 可知, 两种小分子与脲酶相互作用的热力学参数  $\Delta G^\circ < 0$ , 表明 CA 或 PCA 均能够自发地与脲酶结合<sup>[24]</sup>。此外,  $\Delta G^\circ$  值越低表明这种自发结合的可能性越大, 比较两种小分子的  $\Delta G^\circ$  发现, 在温度为 300.15 K 时两个小分子的  $\Delta G^\circ$  最小, 并且 CA 的  $\Delta G^\circ$  低于 PCA, 表明在此温度下 CA 与脲酶结合自发性强于 PCA。同时发现, 随着温度升高, CA 与 PCA 的  $\Delta G^\circ$  均是逐渐升高, 反应朝着自发性减小的方向进行, 推测是由于温度升高导致整个体系的熵是增加的, 从而导致每个分子的活跃性都有所增加。根据文献报道, 当  $\Delta S^\circ$  和  $\Delta H^\circ$  同时为负值, 说明 CA 和 PCA 与脲酶的结合力主要为氢键和范德华力<sup>[14]</sup>,  $\Delta H^\circ$  的负值表明 CA 和 PCA 与脲酶的结合是一个放热过程。

## 2.2 CA 和 PCA 对脲酶二级结构的影响

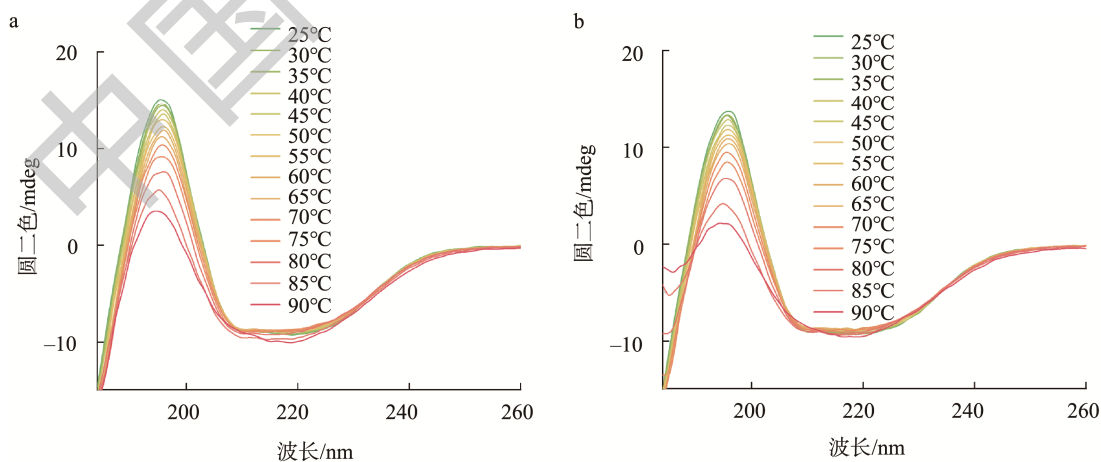
通过 CD 可以有效监测脲酶蛋白二级结构的变化<sup>[25]</sup>。结果如表 2 所示, 随着 CA 浓度的增加,  $\alpha$ -螺旋的含量从 (21.65±0.87)% 显著下降到 (20.68±1.03)%,  $\beta$ -折叠的含量从 (28.97±1.45)% 上升到 (31.01±0.62)%,  $\beta$ -转角的内容趋于持平, 无规卷曲含量从 (31.55±1.26)% 显著下降到 (30.71±0.61)%, 同样随着 PCA 的浓度变化, 脲酶的二级结构也发生了一定的变化, 但其变化幅度相较于 CA 来说较小, 这可能是因为它们分子结构差异导致对脲酶蛋白结构影响的不同。

本研究进一步通过变温技术分析小分子与脲酶结合后二级结构的变化情况。如图 3a~c 所示, 在 195 nm

处, 可以发现随着温度的增加, CD 呈规律性下降趋势, 在 210 nm 和 220 nm 处出现两个负带, 这是典型的  $\alpha$ -螺旋的特征<sup>[26]</sup>。进一步拟合变温条件下蛋白二级结构的含量, 由图 3d 可知, 随着温度的上升, 脲酶的  $\alpha$ -螺旋含量随着温度增加而降低, 而  $\beta$ -折叠的含量随着温度增加而呈先上升后下降的趋势, 相对应的  $\beta$ -转角和无规卷曲的含量则是呈现上升趋势, 由此表明温度导致脲酶二级结构发生明显变化。图 3e 是以 1:1 摩尔比添加 PCA 之后脲酶二级结构随温度变化情况, 可以看出与图 3d 变化趋势相近, 然而当以同样摩尔比添加 CA 之后, 脲酶二级结构随温度变化波动较大, 可以推断出 CA 对于脲酶二级结构的稳定性影响更为强烈, 这与荧光淬灭结果相一致。天然多酚类小分子可以通过改变酶的二级结构从而导致酶的活性受到抑制<sup>[27]</sup>。

表 2 有无 CA 和 PCA 时脲酶二级结构的变化  
Table 2 Changes in urease secondary structures in the presence or absence of CA and PCA

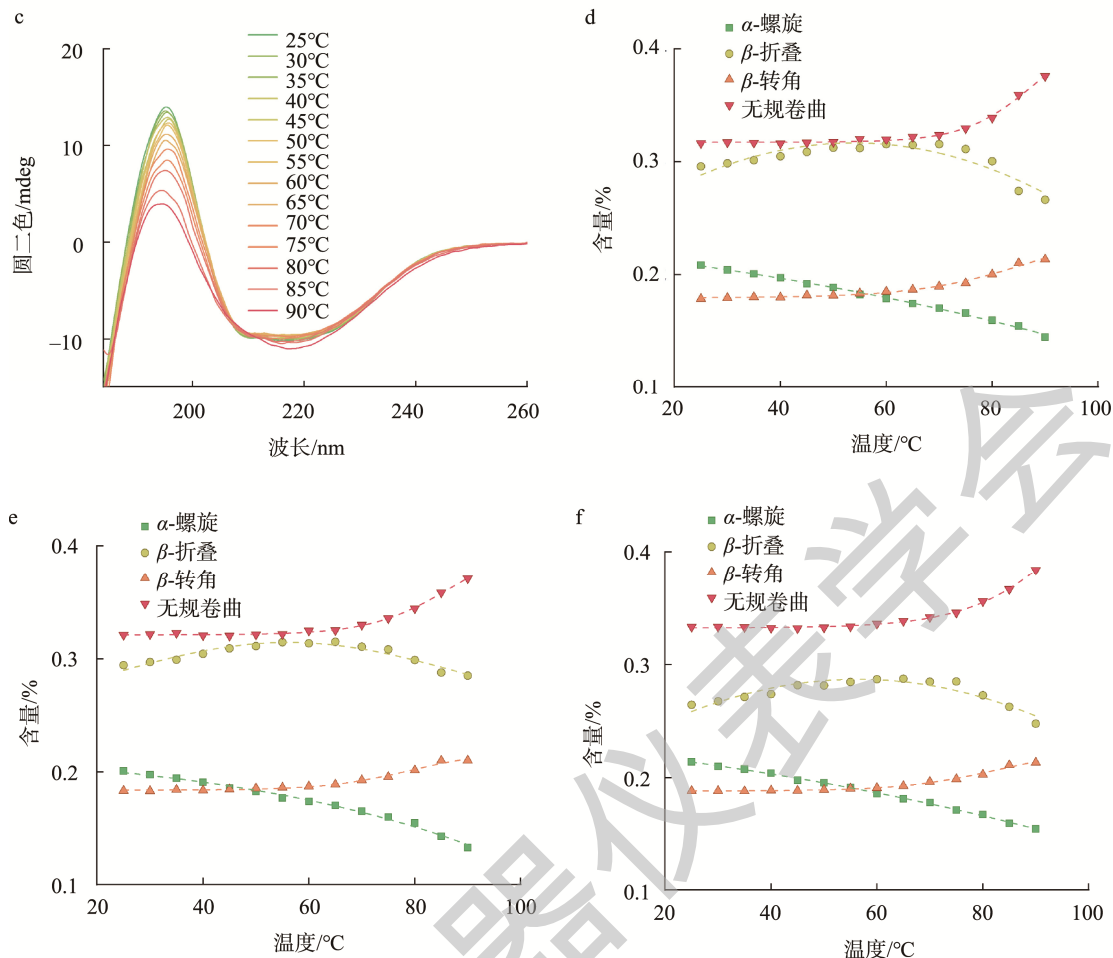
脲酶与多酚的 摩尔比	二级结构/%			
	$\alpha$ -螺旋	$\beta$ -折叠	$\beta$ -转角	无规卷曲
$n_{\text{Urease}}:n$				
1:0	21.65±0.87 <sup>b</sup>	28.97±1.45 <sup>b</sup>	17.84±0.54 <sup>a</sup>	31.55±1.26 <sup>a</sup>
1:1	22.34±1.12 <sup>a</sup>	27.20±0.82 <sup>c</sup>	17.89±0.36 <sup>a</sup>	32.57±1.30 <sup>a</sup>
$n_{\text{Urease}}:n_{\text{CA}}$				
1:2	20.68±0.21 <sup>c</sup>	30.81±0.31 <sup>b</sup>	17.71±0.53 <sup>a</sup>	30.81±0.31 <sup>b</sup>
1:5	20.68±1.03 <sup>c</sup>	31.01±0.62 <sup>a</sup>	17.71±0.18 <sup>a</sup>	30.71±0.61 <sup>b</sup>
1:1	21.42±0.64 <sup>b</sup>	28.84±0.29 <sup>b</sup>	17.92±0.72 <sup>a</sup>	31.93±0.62 <sup>a</sup>
$n_{\text{Urease}}:n_{\text{PCA}}$				
1:2	21.19±0.69 <sup>b</sup>	29.01±0.87 <sup>b</sup>	17.90±0.54 <sup>a</sup>	31.79±0.77 <sup>a</sup>
1:5	20.86±0.42 <sup>c</sup>	29.60±1.18 <sup>b</sup>	17.88±0.89 <sup>a</sup>	31.65±0.95 <sup>a</sup>



注: a 为 25~90°C 内脲酶的 CD 光谱; b 和 c 为相同条件下脲酶与 PCA 和 CA 为 1:1 时脲酶的 CD 光谱变化; d 为在 25~90°C 内脲酶的二级结构变化; e 和 f 为相同条件下脲酶与 PCA 和 CA 为 1:1 时脲酶的 CD 光谱。

图 3 有无 CA 和 PCA 时脲酶的 CD 光谱图与二级结构变化图

Fig.3 CD spectra and secondary structure changes of urease in the presence or absence of CA and PCA



注: a 为 25~90°C 内脲酶的 CD 光谱; b 和 c 为相同条件下脲酶与 PCA 和 CA 为 1:1 时脲酶的 CD 光谱变化; d 为在 25~90°C 内脲酶的二级结构变化; e 和 f 为相同条件下脲酶与 PCA 和 CA 为 1:1 时脲酶的 CD 光谱。

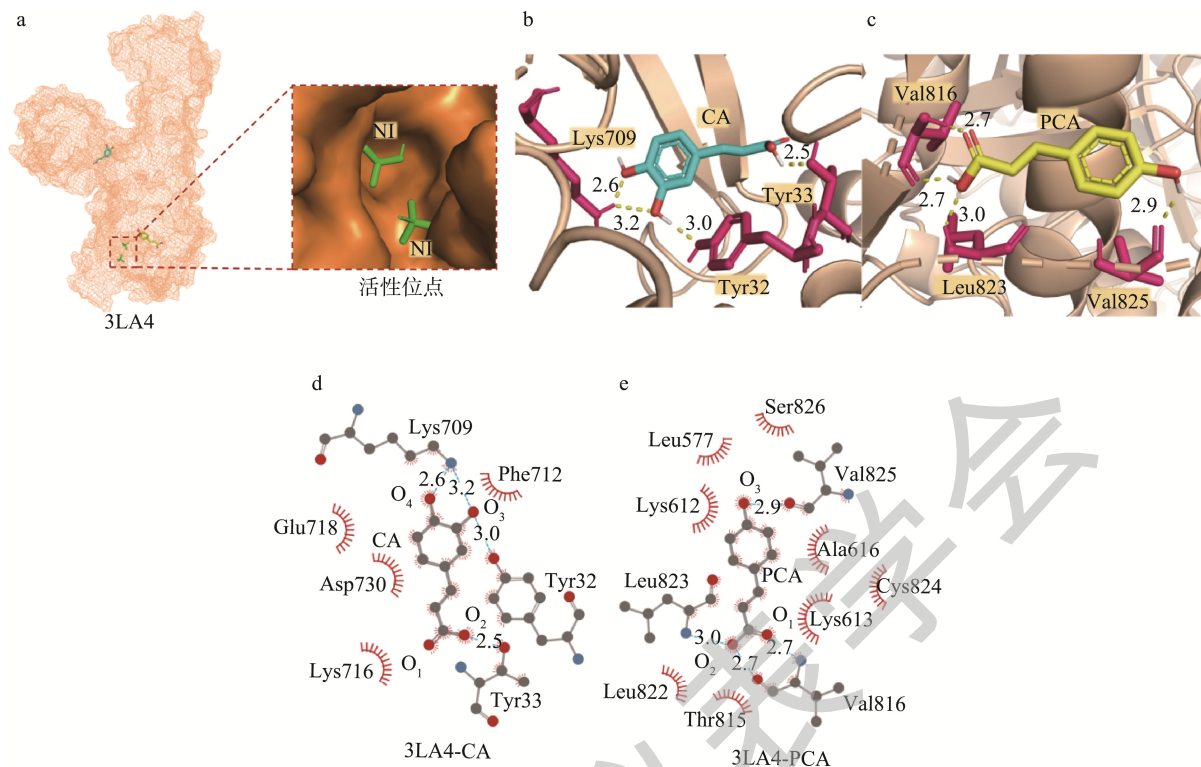
图 3(续) 有无 CA 和 PCA 时脲酶的 CD 光谱图与二级结构变化图

Fig.3 CD spectra and secondary structure changes of urease in the presence or absence of CA and PCA

### 2.3 CA 和 PCA 与脲酶的分子对接

一般认为,脲酶的活性部位存在金属原子,主要为激活底物与水的反应<sup>[28]</sup>,相较于其他双核金属水解酶,脲酶是目前发现的唯一一种在活性部位存在双镍(II)原子的镍依赖性水解酶<sup>[29]</sup>。为进一步直观地观察并探究 CA 和 PCA 与脲酶的结合机制,使用分子对接方法对结合位点进行了预测。通过 100 次对接,根据最小能量原理选择最佳结合位点与结合构象<sup>[30]</sup>,CA 分子间能量计算为 -7.11 kcal/mol,其中氢键和范德华力为 -5.01 kcal/mol,静电力为 -2.10 kcal/mol,表明氢键和范德华力在结合过程中起主要的作用。PCA 分子间能量计算为 -6.58 kcal/mol,其中氢键和范德华力为 -6.04 kcal/mol,静电力为 -0.54 kcal/mol,总分子间结合能高于 CA 分子,表明其与脲酶的结合能力略低于 CA。

脲酶双镍活性位点在图 4a 中所示,可以发现,CA 和 PCA 与脲酶结合的最低构象都不在活性位点中心。在图 4b 和 d 中,清晰展示了 CA 与脲酶结合位点相关的氨基酸残基, Tyr32、Thr33、Lys709 与 CA 形成 3 个氢键相互作用。其中,CA 两个羟基上的 O<sub>3</sub> 和 O<sub>4</sub> 与脲酶的 Lys709 残基的 -NH<sub>2</sub> 的两个氢原子所形成氢键键长分别为 2.6Å 和 3.2Å,此外, O<sub>3</sub> 还与脲酶 Tyr32 残基的 -OH 的氧原子形成了一个键长 3.0Å 的氢键,而 CA 羧基上的 O<sub>1</sub> 与 Thr33 残基的 -OH 的氧原子形成一个氢键,键长为 2.5 Å。此外,由图 4d 发现,脲酶的 Phe712、Lys716、Glu718、Asp730 残基与 CA 形成疏水相互作用也是其形成稳定结构的重要原因之一。从图 4c 和 e 同样展现了 PCA 与脲酶结合的主要残基及其相互作用关系。由二者的分子间结合能可知,CA 与脲酶具有更强的结合能力,这与前面荧光淬灭与圆二色实验结果一致。



注: a 为 CA 和 PCA 与脲酶对接示意图, 蓝色是 CA, 黄色是 PCA, 绿色为镍原子; b 和 c 为脲酶与 CA 和 PCA 的氢键最佳构象; d 和 e 为脲酶与 CA 和 PCA 之间的疏水相互作用。

图 4 CA 和 PCA 与脲酶的分子对接图

Fig.4 Molecular docking plots of CA and PCA with urease

### 3 结论

小分子与脲酶的相互作用是研究其作为潜在脲酶抑制剂的关键。CA 与脲酶的亲和力和结合能力高于 PCA, 在常温或变温情况下, PCA 对脲酶二级结构的影响都明显弱于 CA。分子模拟结果显示, CA 与脲酶的结合过程中, 氢键为主要相互作用, 且 CA 与脲酶的结合要强于 PCA。本研究从光谱学分析结合分子模拟角度研究了 CA 和 PCA 与脲酶的相互作用关系, 对比讨论了由于分子结构不同导致结合差异的原因, 研究表明, CA 和 PCA 可以作为潜在的脲酶抑制剂用于缓解和治疗幽门螺旋杆菌, 为基于构效关系的天然小分子的功能性应用提供新思路。

### 参考文献

- [1] ELBEHIRY A, MARZOUK E, ALDUBAIB M, *et al.* *Helicobacter pylori* infection: Current status and future prospects on diagnostic, therapeutic and control challenges [J]. *Antibiotics*, 2023, 12(2): 191.
- [2] 林颖璐, 韩尧跃, 栗华, 等. 壳寡糖及其相关衍生物对幽门螺旋杆菌的抑菌作用[J/OL]. *中国食品学报*: 1-7. [2023-08-07]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4528.ts.20230606.1555.010.html>  
LIN YJ, HAN YY, LI H, *et al.* Antibacterial effects of chitooligosaccharides and related derivatives on *Helicobacter pylori* [J/OL]. *J Chin Inst Food Sci Technol*: 1-7. [2023-08-07]. <http://kns.cnki.net/>

[kcms/detail/11.4528.ts.20230606.1555.010.html](http://kcms/detail/11.4528.ts.20230606.1555.010.html)

- [3] 陈铁雄, 陈敏, 张宗毅, 等. 醋酸棉酚对土壤脲酶活性的抑制作用[J]. *水土保持学报*, 2012, 26(1): 219-222.  
CHEN YX, CHEN M, ZHANG ZY, *et al.* Inhibitory effect of gossypol acetate on soil urease activity [J]. *J Soil Water Conserv*, 2012, 26(1): 219-222.
- [4] 赵明明, 刘妹玲, 肖竹平. 苯磺酰氨基羟肟酸类脲酶抑制剂的合成及活性研究[J/OL]. *化学试剂*: 1-9. [2023-08-07]. DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0247  
ZHAO MM, LIU ML, XIAO ZP. Study on synthesis and activity of benzene sulfonamide hydroxamic acid urease inhibitors [J/OL]. *Chem Reag*: 1-9. [2023-08-07]. DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0247
- [5] MAMIDALA R, BHIMATHATI SRS, VEMA A. Discovery of novel dihydropyrimidine and hydroxamic acid hybrids as potent *Helicobacter pylori* urease inhibitors [J]. *Bioorg Chem*, 2021, 114: 105010.
- [6] XIAO ZP, SHI DH, LI HQ. Polyphenols based on isoflavones as inhibitors of *Helicobacter pylori* urease [J]. *Bioorgan Med Chem*, 2007, 15(11): 3703-3710.
- [7] 孙权, 范青, 赵志磊, 等. ‘菲尔杜德’和‘托拉蜜’红树莓果实发育过程中 5 种酚类物质含量的研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(7): 2090-2096.  
SUN Q, FAN Q, ZHAO ZL, *et al.* Content of five phenolic substances during fruit development of ‘Fildur’ and ‘Torrami’ red raspberry [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(7): 2090-2096.
- [8] KIOKIAS S, PROESTOS C, OREOPOULOU V. Phenolic acids of plant

- origin-A review on their antioxidant activity *in vitro* (O/W emulsion systems) along with their *in vivo* health biochemical properties [J]. *Foods*, 2020, 9(4): 534.
- [9] MIRZAEI S, GHOLAMI MH, ZABOLIAN A, *et al.* Caffeic acid and its derivatives as potential modulators of oncogenic molecular pathways: New hope in the fight against cancer [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 171: 105759.
- [10] ALAM M, AHMED S, ELASBALI AM, *et al.* Therapeutic implications of caffeic acid in cancer and neurological diseases [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 860508.
- [11] KHAN MS, ALOKAIL MS, ALENAD AMH, *et al.* Binding studies of caffeic and *p*-coumaric acid with  $\alpha$ -amylase: Multispectroscopic and computational approaches deciphering the effect on advanced glycation end products (AGEs) [J]. *Molecules*, 2022, 27(13): 3992.
- [12] 吴萍, 李燕妮, 邹辉, 等. 蒲公英水提多酚的脲酶抑制作用及机理[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(20): 122–129.
- WU P, LI YN, ZOU H, *et al.* Inhibitory effect and mechanism of urease by water-extracted polyphenols in dandelion [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2022, 43(20): 122–129.
- [13] YAN J, ZHANG G, PAN J, *et al.*  $\alpha$ -Glucosidase inhibition by luteolin: Kinetics, interaction and molecular docking [J]. *Int J Biol Macromol*, 2014, 64: 213–223.
- [14] ROSS PD, SUBRAMANIAN S. Thermodynamics of protein association reactions: Forces contributing to stability [J]. *Biochemistry*, 1981, 20(11): 3096–3102.
- [15] XIE L, XIE J, XU Y, *et al.* Discovery of anthocyanins from cranberry extract as pancreatic lipase inhibitors using a combined approach of ultrafiltration, molecular simulation and spectroscopy [J]. *Food Funct*, 2020, 11(10): 8527–8536.
- [16] ZHAO G, ZHU L, YIN P, *et al.* Mechanism of interactions between soyasaponins and soybean 7S/11S proteins [J]. *Food Chem*, 2022, 368: 130857.
- [17] WU Z, XU J, RUAN J, *et al.* Probing the mechanism of interaction between capsaicin and myofibrillar proteins through multispectral, molecular docking, and molecular dynamics simulation methods [J]. *Food Chem: X*, 2023. DOI: 10.1016/j.fochx.2023.100734
- [18] JIANG C, CHEN Y, YE X, *et al.* Three flavanols delay starch digestion by inhibiting  $\alpha$ -amylase and binding with starch [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 172: 503–514.
- [19] DAI Y, LIU M, ZHONG J, *et al.* Interaction, bioaccessibility and stability of bovine serum albumin-gamma-oryzanol complex: Spectroscopic and computational approaches [J]. *Food Chem*, 2023, 402: 134493.
- [20] ZHENG Y, TIAN J, YANG W, *et al.* Inhibition mechanism of ferulic acid against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase [J]. *Food Chem*, 2020, 317: 126346.
- [21] HOSSEINI-KOUPAEI M, SHAREGHI B, SABOURY AA, *et al.* Molecular investigation on the interaction of spermine with proteinase K by multispectroscopic techniques and molecular simulation studies [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 94: 406–414.
- [22] JIA Y, GAO X, XUE Z, *et al.* Characterization, antioxidant activities, and inhibition on  $\alpha$ -glucosidase activity of corn silk polysaccharides obtained by different extraction methods [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 163: 1640–1648.
- [23] HE XM, CARTER DC. Atomic structure and chemistry of human serum albumin [J]. *Nature*, 1992, 358(6383): 209–215.
- [24] HE Z, XU M, ZENG M, *et al.* Interactions of milk  $\alpha$ - and  $\beta$ -casein with malvidin-3-O-glucoside and their effects on the stability of grape skin anthocyanin extracts [J]. *Food Chem*, 2016, 199: 314–322.
- [25] SARMAH S, DAS S, ROY AS. Protective actions of bioactive flavonoids chrysin and luteolin on the glyoxal induced formation of advanced glycation end products and aggregation of human serum albumin: *In vitro* and molecular docking analysis [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 165: 2275–2285.
- [26] LIU Y, ZHU J, YU J, *et al.* A new functionality study of vanillin as the inhibitor for  $\alpha$ -glucosidase and its inhibition kinetic mechanism [J]. *Food Chem*, 2021, 353: 129448
- [27] WU M, LIU M, WANG F, *et al.* The inhibition mechanism of polyphenols from *Phyllanthus emblica* Linn. fruit on acetylcholinesterase: A interaction, kinetic, spectroscopic, and molecular simulation study [J]. *Food Res Int*, 2022, 158: 111497.
- [28] KRAJEWSKA B. Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review [J]. *J Mol Catal B-Enzym*, 2009, 59(1–3): 9–21.
- [29] DIXON NE, GAZZOLA C, BLAKELEY RL, *et al.* Jack bean urease (EC 3.5.1.5). Metalloenzyme. Simple biological role for nickel [J]. *J Am Chem Soc*, 1975, 97(14): 4131–4133.
- [30] LAKSHMANA SS, CHANDRASEKARAN R, ARJUN HA, *et al.* *In vitro* and *in silico* inhibition properties of fucoidan against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -D-glucosidase with relevance to type 2 diabetes mellitus [J]. *Carbohydr Polym*, 2019, 209: 350–355.

(责任编辑: 郑丽于梦娇)

## 作者简介



郭浩旭, 硕士研究生, 主要研究方向为食品多酚提取与功能化。

E-mail: Echo\_hxxx@163.com

雷红涛, 博士, 教授, 主要研究方向为食品安全与营养。

E-mail: hongtao@scau.edu.cn

王际辉, 博士, 教授, 主要研究方向为功能性食品与安全。

E-mail: wangjihui@dgut.edu.cn