

香豆素类化合物对胃蛋白酶活性的影响研究

豆妮娜¹, 张平¹, 王帅兵¹, 李磊², 陈魁霞¹, 马海艳¹, 袁欣¹ (1. 河北中石油中心医院药
学部, 廊坊 065000; 2. 合成与生物胶体教育部重点实验室, 江南大学化学与材料工程学院, 无锡 214122)

摘要 目的: 基于香豆素类化合物与胃蛋白酶相互作用的研究, 探讨香豆素类化合物对胃蛋白酶活性的影响, 可能与胃部疾病治疗存在潜在的关系。方法: 采用紫外-可见光谱法及福林酚法, 以牛血红蛋白为底物, 分别用香豆素、4-羟基香豆素、7-羟基香豆素、7-羟基-4-甲基香豆素作为干扰剂与胃蛋白酶混合, 测定胃蛋白酶在540 nm处的吸光度值, 计算胃蛋白酶表观酶活; 在香豆素类化合物-胃蛋白酶体系中添加抗坏血酸, 研究抗坏血酸对各体系中胃蛋白酶活性的影响; 同时采用紫外-可见光谱法对香豆素类化合物与牛血红蛋白的相互作用光谱特征进行测定。结果: 随着香豆素类化合物浓度增加, 胃蛋白酶表观酶活呈降低趋势, 但趋势略有不同。4-羟基香豆素、7-羟基香豆素、7-羟基-4-甲基香豆素、香豆素对胃蛋白酶的抑制率分别为10.15%~35.92%、7.27%~12.14%、10.58%~29.29%、13.88%~47.13%。添加抗坏血酸的4-羟基香豆素、7-羟基香豆素和7-羟基-4-甲基香豆素体系与未添加抗坏血酸的香豆素类化合物-胃蛋白酶体系相比, 胃蛋白酶表观酶活进一步降低, 而添加抗坏血酸的香豆素-胃蛋白酶体系与未添加抗坏血酸的香豆素-胃蛋白酶体系相比, 胃蛋白酶表观酶活增加。结论: 4个香豆素类化合物对胃蛋白酶活性有抑制作用。抗坏血酸在4-羟基香豆素、7-羟基香豆素和7-羟基-4-甲基香豆素与胃蛋白酶体系中起到抑制胃蛋白酶的作用, 而在香豆素-胃蛋白酶体系中起到了促进胃蛋白酶活性的作用。4个香豆素类化合物与牛血红蛋白也存在相互作用, 进而对胃蛋白酶活性产生了间接的影响。

关键词: 香豆素; 胃蛋白酶; 表观酶活; 抗坏血酸; 光谱特征

中图分类号: R96 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2023)11-1310-009

doi:10.16153/j.1002-7777.2023.11.011

Investigation of Effects of Coumarin Compounds on Pepsin Activity

Dou Nina¹, Zhang Ping¹, Wang Shuaibing¹, Li Lei², Chen Kuixia¹, Ma Haiyan¹, Yuan Xin¹ [1. Department of Pharmacy, Hebei Petro China Center Hospital, Langfang 065000, China; 2. The Key Laboratory of Synthetic and Biological Colloids (Ministry of Education), School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China]

Abstract Objective: Based on the study of the interaction between coumarin compounds and pepsin, to investigate the effect of coumarin compounds on pepsin activity, which may have potential relationship with the treatment of stomach diseases. **Methods:** Using UV visible spectroscopy and Folin phenol method, bovine hemoglobin was used as substrate, coumarin, 4-hydroxy-coumarin, 7-hydroxy-coumarin and 7-hydroxy-4-methyl-coumarin were used as interference agents to mix with pepsin. The absorbance values of pepsin at 540 nm were determined, and the apparent enzyme activity of pepsin was calculated. The effects of ascorbic acid on pepsin activity in coumarin compounds-pepsin systems were studied by adding ascorbic acid. The interaction

between coumarin compounds and bovine hemoglobin was determined by UV-VIS spectroscopy. **Results:** With the increase of coumarin compounds concentration, the apparent enzyme activity of pepsin decreased, but the trend was slightly different. The inhibition rates of 4-hydroxy-coumarin, 7-hydroxy-coumarin, 7-hydroxy-4-methyl-coumarin and coumarin on pepsin were 10.15%-35.92%, 7.27%-12.14%, 10.58%-29.29% and 13.88%-47.13%, respectively. Compared with the coumarin compounds-pepsin systems without ascorbic acid, the 4-hydroxy-coumarin, 7-hydroxy-coumarin, 7-hydroxy-4-methyl-coumarin systems added with ascorbic acid further decreased the apparent enzyme activity of pepsin, while the coumarin-pepsin system with ascorbic acid increased the apparent enzyme activity of pepsin compared to the coumarin-pepsin system without ascorbic acid. **Conclusion:** Four kinds of coumarin compounds can inhibit pepsin activity. Ascorbic acid inhibits pepsin in 4-hydroxy-coumarin, 7-hydroxy-coumarin, 7-hydroxy-4-methyl-coumarin and pepsin systems, while promoting pepsin activity in coumarin-pepsin system. Four coumarin compounds also interact with bovine hemoglobin, which indirectly affects pepsin activity.

Keywords: coumarin; pepsin; apparent enzyme activity; ascorbic acid; spectral feature

胃蛋白酶是人体消化道中重要的消化酶,其活性与人体消化功能及多种消化道疾病密切相关^[1-2]。胃蛋白酶是由326个氨基酸残基构成,是一种非特异性的肽链内切酶,可水解多种蛋白质。胃蛋白酶是由胃蛋白酶原在pH 2.0左右条件下,N端约25个氨基酸残基从肽链上水解下来被激活而成,因此,胃蛋白酶只有在酸性条件下才能发挥作用^[3]。胃蛋白酶被认为是胃部疾病的主要攻击因子,胃酸分泌与胃蛋白酶活性在一定范围内呈正相关,一般胃酸分泌高的疾患,胃蛋白酶的活性增高^[4]。影响胃蛋白酶活性的因素主要包括温度、pH值、金属离子,以及一些小分子物质与胃蛋白酶的相互作用。药物与胃蛋白酶的作用及对胃蛋白酶性质的影响,对胃部疾病的药物治疗有一定的指导意义。尽管已有一些研究关注药物小分子与胃蛋白酶相互作用或对胃蛋白酶活性的影响^[5-7],但对于分子结构呈一定变化的药物小分子对胃蛋白酶性质的影响及构效关系研究尚未见报道。

香豆素类化合物广泛分布于高等植物中,是芸香科和伞形科等中草药的主要有效成分,是一类含有C6-C3骨架的化合物,由酪氨酸衍生而来,具有多种药理活性,如抗HIV、抗氧化、抗炎、抗菌等^[8]。选取结构上呈一定变化的香豆素类化合物作为胃蛋白酶活性的干扰剂,研究此类化合物对胃蛋白酶性质影响的构效关系以及与胃部疾病治疗相关的临床应用具有一定的指导意义。本文采用福林酚试剂法^[9],以牛血红蛋白为底物,测定不同浓度香豆素类化合物存在下胃蛋白酶表观酶活的变化,

讨论不同浓度香豆素类化合物对胃蛋白酶活性的影响,研究香豆素类化合物与牛血红蛋白的相互作用,探讨其对胃蛋白酶活性产生的间接影响。

抗坏血酸(维生素C)是具有抗氧化作用的有机酸,具有预防动脉粥样硬化和癌症的作用,是人体重要的微量元素^[10]。在考虑人体环境的复杂性基础上,在香豆素类化合物-胃蛋白酶体系中添加食品中较常见的抗坏血酸,研究其作为联合干扰剂对胃蛋白酶活性的影响。通过对上述体系的研究,探讨几种香豆素类化合物联合抗坏血酸对于胃部疾病治疗存在的潜在关系。

1 仪器与试剂

TU-1901型紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),AE240S电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],KQ2200E型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),25 μ L微量进样器(上海高鸽工贸有限公司)。

香豆素(分析纯,国药集团化学试剂有限公司,批号:20140228)、4-羟基香豆素(纯度98%,国药集团化学试剂有限公司,批号:20140808)、7-羟基香豆素(纯度98%,国药集团化学试剂有限公司,批号:20140227)、7-羟基-4-甲基香豆素(纯度97%,国药集团化学试剂有限公司,批号:20141020);福林酚试剂(生化试剂,国药集团化学试剂有限公司,批号:20141021)、L-酪氨酸(生物试剂,国药集团化学试剂有限公司,批号:2014)、抗坏血酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司,批号:

20140826)、胃蛋白酶(生物试剂, 国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20150120)、牛血红蛋白[生物试剂, Ruibio(美国)公司, 进口分装, 批号: 20150106]; 浓盐酸(分析纯, 天津市耀华化学试剂有限责任公司, 批号: 20141213)、氢氧化钠(分析纯, 天津市天大化工实验厂, 批号: 20140912)、甲醇(分析纯, 沈阳试剂厂, 批号: 20140816)、超纯水(电导率=1.9 $\mu\text{s} \cdot \text{cm}^{-1}$)。

2 试验方法

2.1 胃蛋白酶活力的测定

试剂配制: (1) 盐酸溶液: 准确移取浓盐酸0.8 mL于1 L容量瓶中, 超纯水定容, 得pH 2.0的盐酸溶液, 以pH计测定并确认其pH值; (2) 酪氨酸标准溶液: 精密称取L-酪氨酸50 mg溶于50 mL容量瓶中, 盐酸溶液定容, 得浓度为1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 酪氨酸标准溶液; (3) 胃蛋白酶溶液: 准确称取0.25 g胃蛋白酶于500 mL容量瓶中, 盐酸溶液定容, 得浓度为0.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 胃蛋白酶溶液; (4) 1%血红蛋白溶液: 准确称取1 g牛血红蛋白于100 mL容量瓶中, 超纯水溶解并定容, 配制过程中超声助溶; (5) 5%三氯乙酸溶液: 准确称取10 g三氯乙酸于200 mL容量瓶中, 超纯水溶解并定容; (6) 10%氢氧化钠溶液: 准确称取20 g氢氧化钠于200 mL容量瓶中, 超纯水溶解并定容。

采用福林酚试剂(DAB9)法^[11-12], 以酪氨酸标准溶液为对照。将3 mL酪氨酸标准溶液与5 mL蒸馏水和10%氢氧化钠溶液1 mL混合, 加入1 mL福林酚试剂, 显色15 min后, 于540 nm处以空白(3 mL蒸馏水代替酪氨酸标准溶液)为对照测定吸光度。酶活测定采用1%牛血红蛋白溶液(5 mL)做底物, 与0.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 胃蛋白酶溶液(1 mL)在25 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应10 min, 用5%三氯乙酸溶液6 mL终止反应, 过滤, 取滤液3 mL与20 mL蒸馏水和1 mL氢氧化钠溶液混合, 加入1 mL福林酚试剂, 显色15 min后, 于540 nm处以空白为对照测定生成酪氨酸的量, 以每分钟酶解血红蛋白生成1 μmol 为一个活力单位; 空白对照为先在酶液中加入6 mL三氯乙酸溶液, 再加入5 mL底物溶液, 按上述反应进行。平行测试2组样品, 取平均值。

2.2 香豆素类化合物对胃蛋白酶活性的影响

分别称取一定量的4个香豆素类化合物于10 mL不同容量瓶中, 甲醇溶解并定容, 使其最终浓度均

为 $5.5 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 备用。准确移取不同体积的香豆素类化合物的甲醇溶液($5.5 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)于三角瓶中, 高纯氮气将甲醇快速吹干, 移取一定量pH 2.0 ± 0.1 的盐酸溶液于三角瓶中, 超声2~3 min, 并定容至200 mL, 以此溶液为溶剂分别配制胃蛋白酶溶液作为工作母液($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)备用, 参照表1移取胃蛋白酶母液, 并用盐酸溶液定容至50 mL, 使各体系中香豆素类化合物与胃蛋白酶的最终摩尔浓度比分别为0.2:1、0.4:1、0.8:1、1.0:1和1.5:1。胃蛋白酶活力测定同“2.1”项。

表1 香豆素类化合物-胃蛋白酶体系构成

$C_D : C_P$	$V_{\text{-pepsin}}/\text{mL}$	$V_{\text{-D}}/\mu\text{L}$
0 : 1	5	0
0.2 : 1	5	10
0.4 : 1	5	20
0.8 : 1	5	40
1.0 : 1	5	50
1.5 : 1	5	75

注: $V_{\text{-pepsin}}$ 表示胃蛋白酶溶液体积; $V_{\text{-D}}$ 表示香豆素类化合物溶液体积; C_D 和 C_P 分别表示香豆素类化合物和胃蛋白酶的摩尔浓度。

2.3 抗坏血酸对香豆素类化合物-胃蛋白酶体系中胃蛋白酶活性的影响

分别在4个香豆素类化合物-胃蛋白酶溶液中加入50 μL 的抗坏血酸-盐酸溶液($5.5 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 抗坏血酸与胃蛋白酶摩尔浓度比为1:1。其他步骤同“2.2”项。

2.4 牛血红蛋白与香豆素类化合物作用的紫外可见吸收光谱

分别称取一定量的4个香豆素类化合物于10 mL不同容量瓶中, 甲醇溶解并定容, 使其最终浓度均为 $5.5 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 备用。准确称取3.5475 g牛血红蛋白于200 mL容量瓶中, 盐酸溶液溶解并定容至刻度, 得摩尔浓度为 $2.75 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的牛血红蛋白溶液, 备用。参照表1中香豆素类化合物移取的体积及“2.2”项方法, 分别移取香豆素类化合物甲醇溶液于三角瓶中并吹干甲醇, 分别

向三角瓶中加入10 mL牛血红蛋白溶液，超声分散2~3 min，配制成香豆素类化合物与牛血红蛋白摩尔浓度比分别为0:1、0.2:1、0.4:1、0.8:1、1.0:1、1.5:1的溶液，并以含相同浓度的香豆素类化合物的盐酸溶液为参比溶液，室温下测定其紫外可见吸收光谱^[13-14]。

3 数据处理方法

3.1 胃蛋白酶活性定量计算

本文所涉及各体系中胃蛋白酶活性的定量计算依据如下公式：

胃蛋白酶的表观酶活 = (反应液总体积 × 1000 × E_p) / ($W \times E_s \times$ 滤液体积 × 反应时间)

式中 E_p 为反应后酶液吸光度， E_s 为酪氨酸标准溶液的吸光度， W 为1 mL所用酶液中含有酶的重量(mg)，滤液体积单位为mL，反应时间单位为min，1000为1000 mg。

3.2 香豆素类化合物-牛血红蛋白相互作用

4个香豆素类化合物-牛血红蛋白相互作用表征，通过比较牛血红蛋白于274 nm左右的吸收峰位置及吸光度值变化，判断是否存在相互作用。

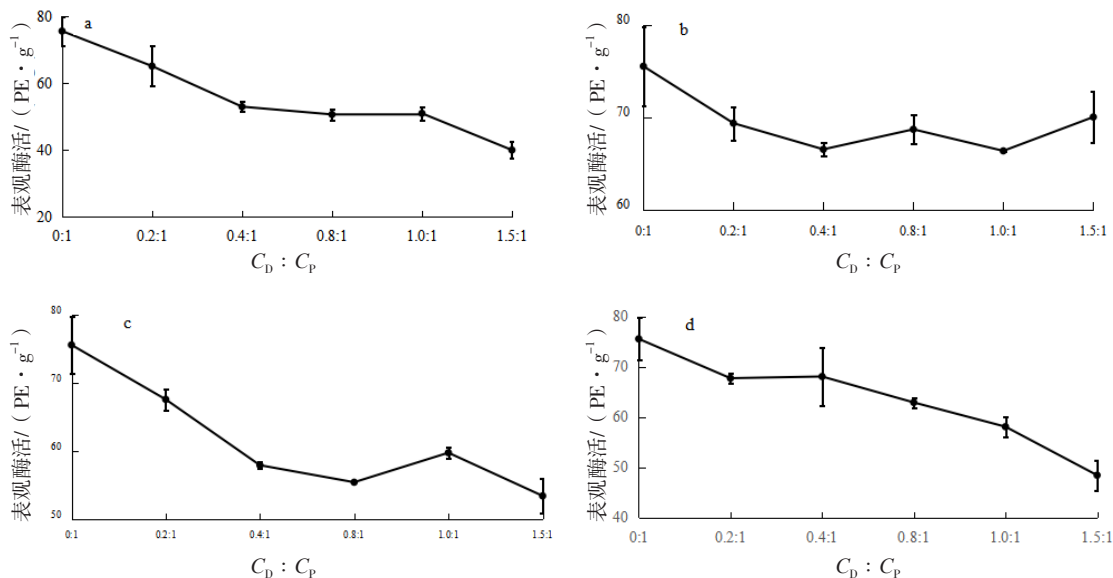
4 结果

4.1 香豆素类化合物对胃蛋白酶活性的影响

4.1.1 不同浓度香豆素类化合物对胃蛋白酶活性的影响

将香豆素、7-羟基香豆素、7-羟基-4-甲基香豆素、4-羟基香豆素分别与胃蛋白酶摩尔浓度比

为0:1、0.2:1、0.4:1、0.8:1、1.0:1、1.5:1的溶液加入牛血红蛋白溶液中，依据福林酚试剂法测定胃蛋白酶表观酶活，表观酶活变化趋势如图1所示。随香豆素浓度的增大，胃蛋白酶表观酶活整体呈降低趋势，而在 $C_D : C_P$ 为0.4:1~1.0:1范围内，胃蛋白酶表观酶活变化较平缓， $C_D : C_P$ 为0:1~0.4:1以及1.0:1~1.5:1范围内表观酶活下降趋势较明显。随着7-羟基香豆素浓度增加，胃蛋白酶表观酶活呈波动性下降趋势。 $C_D : C_P$ 为0.2:1、0.4:1、0.8:1、1.0:1和1.5:1时胃蛋白酶表观酶活均较0:1时降低，而在 $C_D : C_P$ 为0.4:1~1.5:1范围内，胃蛋白酶表观酶活发生波动，在0.4:1~0.8:1及1.0:1~1.5:1区间出现了小幅度上升趋势。与香豆素及7-羟基香豆素-胃蛋白酶体系类似，在7-羟基-4-甲基香豆素-胃蛋白酶体系中 $C_D : C_P$ 为0.2:1、0.4:1、0.8:1、1.0:1、1.5:1时胃蛋白酶表观酶活均较0:1时降低。随7-羟基-4-甲基香豆素浓度的增加，胃蛋白酶表观酶活呈波动性下降趋势。在 $C_D : C_P$ 为0:1~0.8:1以及1.0:1~1.5:1范围内，胃蛋白酶表观酶活均呈下降趋势，而在 $C_D : C_P$ 为0.8:1~1.0:1范围内出现了小幅度上升。随着4-羟基香豆素浓度的增加，胃蛋白酶表观酶活呈总体降低趋势，但在 $C_D : C_P$ 为0.2:1~0.4:1范围内表观酶活变化较平缓。



a. 香豆素；b. 7-羟基香豆素；c. 7-羟基-4-甲基香豆素；d. 4-羟基香豆素。

图1 不同摩尔浓度4个香豆素类化合物对胃蛋白酶表观酶活的影响

4.1.2 不同浓度香豆素类化合物对胃蛋白酶表观酶活的相对抑制率

参照文献^[15],以相同条件下不加香豆素类化合物时的表观酶活力为100%,其余条件下测定的酶活力换算成相对酶活,则抑制率 $I=(T-T')/T=1-T'/T$,其中 T 和 T' 分别代表无抑制剂和有抑制剂时的表观酶活。不同摩尔浓度比例的香豆素、7-羟基-4-甲基香豆素、7-羟基香豆素、4-羟基香豆素抑制率结果见表2。随着香豆素浓度的增大,香豆素对胃蛋白酶表观酶活的抑制率增加,最小为0.2:1时的13.88%,最大为1.5:1时的47.13%。7-羟基-4-甲基香豆素对胃蛋白酶表观酶活的抑制率随浓度增大整体呈增加趋势,最小为0.2:1时的10.58%,最大为1.5:1时的29.29%;

但在 $C_D:C_P$ 为1.0:1时较0.8:1时出现抑制率降低情况。在 $C_D:C_P$ 为0:1~0.4:1、0.8:1~1.0:1范围内,随着7-羟基香豆素浓度升高,对胃蛋白酶表观酶活的抑制率增加;在0.4:1~0.8:1、1.0:1~1.5:1范围内随着7-羟基香豆素浓度升高,7-羟基香豆素对胃蛋白酶表观酶活的抑制率降低。在 $C_D:C_P$ 为0.2:1~0.4:1范围内,随着4-羟基香豆素浓度升高,对胃蛋白酶表观酶活的抑制率降低;而在 $C_D:C_P$ 为0:1~0.2:1、0.4:1~1.5:1范围内,随着4-羟基香豆素浓度升高,对胃蛋白酶表观酶活的抑制率增加。综合表中数据,对胃蛋白酶表观酶活的抑制率相对程度由大到小排序:香豆素>7-羟基-4-甲基香豆素>4-羟基香豆素>7-羟基香豆素。

表2 不同浓度香豆素类化合物对胃蛋白酶的相对酶活及表观酶活抑制率

$C_D:C_P$	香豆素		7-羟基-4-甲基香豆素		7-羟基香豆素		4-羟基香豆素	
	相对酶活/%	抑制率/%	相对酶活/%	抑制率/%	相对酶活/%	抑制率/%	相对酶活/%	抑制率/%
0:1	100	0	100	0	100	0	100	0
0.2:1	86.12	13.88	89.42	10.58	91.85	8.15	89.65	10.35
0.4:1	70.05	29.95	76.65	23.35	88.10	11.90	89.85	10.15
0.8:1	66.96	33.04	73.34	26.66	90.96	9.04	83.24	16.76
1.0:1	67.40	32.60	79.07	20.93	87.86	12.14	76.85	23.15
1.5:1	52.87	47.13	70.71	29.29	92.73	7.27	64.08	35.92

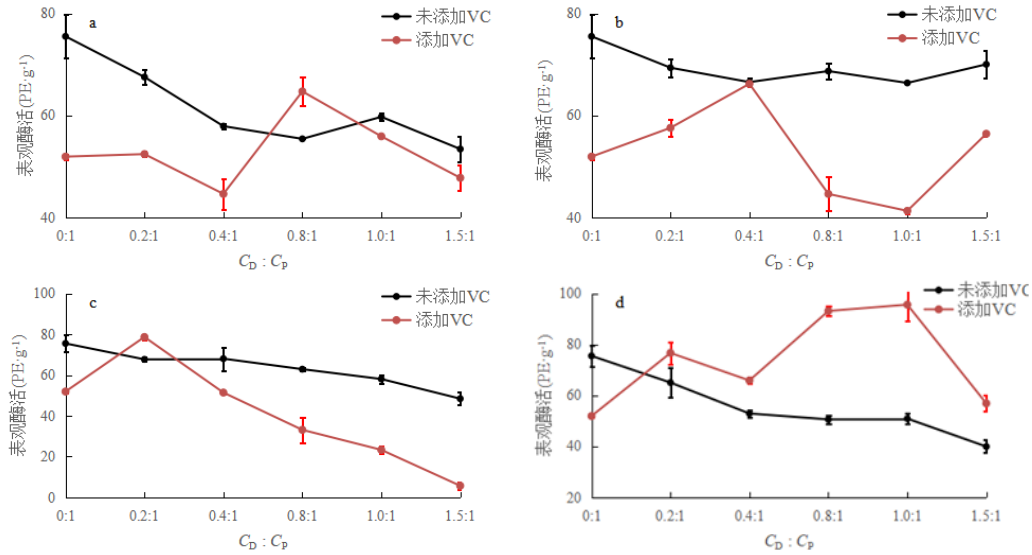
4.2 抗坏血酸对香豆素类化合物-胃蛋白酶体系中胃蛋白酶表观酶活的影响

将抗坏血酸分别加入不同摩尔浓度比例的7-羟基-4-甲基香豆素-胃蛋白酶体系、7-羟基香豆素-胃蛋白酶体系、4-羟基香豆素-胃蛋白酶体系、香豆素-胃蛋白酶体系中,依据福林酚试剂法,有/无抗坏血酸存在时胃蛋白酶表观酶活变化趋势见图2。如图2(a)所示,在抗坏血酸存在时,随着7-羟基-4-甲基香豆素浓度增加,胃蛋白酶表观酶活发生变化,相对于 $C_D:C_P$ 为0:1时,其他浓度比例存在表观酶活升高或降低的波动性变化,胃蛋白酶的表观酶活除在 $C_D:C_P$ 为0.8:1时比无抗坏血酸存在时高,其他浓度比例的胃蛋白酶表观酶活

均低于未添加抗坏血酸时的表观酶活。在有抗坏血酸存在下,胃蛋白酶表观酶活随7-羟基-4-甲基香豆素浓度增加的变化趋势较无抗坏血酸存在下发生较大变化。如图2(b)所示,抗坏血酸存在时,随着7-羟基香豆素浓度增加,表观酶活呈波动性变化,数值先增后降,再增大。7-羟基香豆素-胃蛋白酶体系中胃蛋白酶表观酶活在各 $C_D:C_P$ 比例下均低于未添加抗坏血酸体系。在抗坏血酸存在时,随着7-羟基香豆素浓度增加,胃蛋白酶表观酶活变化趋势较无抗坏血酸时不同,波动更加明显。如图2(c)所示,在抗坏血酸存在时,随着4-羟基香豆素浓度增加,胃蛋白酶表观酶活先增后降,在 $C_D:C_P$ 为0.2:1时,胃蛋白酶表观酶活大于无抗

坏血酸存在的胃蛋白酶表观酶活，其他浓度比例的胃蛋白酶表观酶活较无抗坏血酸存在时低。在抗坏血酸存在， $C_D : C_P$ 为1.5 : 1时，胃蛋白酶表观酶活明显降低。如图2(d)所示，在抗坏血酸存在时，香豆素-胃蛋白酶体系中胃蛋白酶表观酶活变化趋

势与其他3种体系不同，随着香豆素浓度增加，香豆素-胃蛋白酶体系表观酶活呈波动性变化，除 $C_D : C_P$ 为0 : 1时，其余各 $C_D : C_P$ 点的胃蛋白酶表观酶活高于未添加抗坏血酸体系的胃蛋白酶表观酶活，呈促进酶活作用。



a. 7-羟基-4-甲基香豆素; b. 7-羟基香豆素; c. 4-羟基香豆素; d. 香豆素。

图2 有/无抗坏血酸存在时不同浓度4个香豆素类化合物对胃蛋白酶表观酶活的影响

4.3 抗坏血酸对胃蛋白酶表观酶活的影响

为明确香豆素类化合物与抗坏血酸对胃蛋白酶活性的联合作用，单独考察抗坏血酸对胃蛋白酶表

观酶活的影响，其吸光度及表观酶活结果见表3，随着添加抗坏血酸体积的增加，胃蛋白酶的表观酶活逐渐降低。

表3 添加不同体积抗坏血酸的胃蛋白酶表观活性

抗坏血酸添加量 / μL	吸光度值 (A)			\bar{A}	胃蛋白酶表观酶活 / ($\text{PE} \cdot \text{g}^{-1}$)
	A_1	A_2	A_3		
0	0.143	0.151	0.160	0.151	75.550
2.5	0.105	0.103	0.104	0.104	51.911
5.0	0.095	0.090	0.091	0.092	45.920
7.5	0.081	0.082	0.075	0.079	39.430

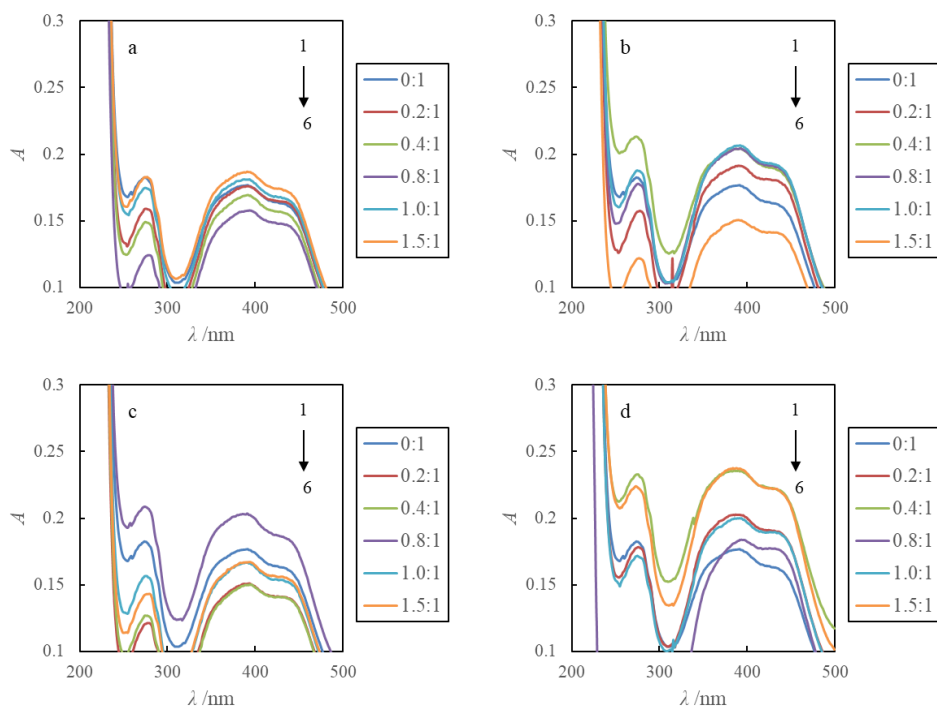
4.4 香豆素类化合物与牛血红蛋白作用的光谱特征

配制4-羟基香豆素-、7-羟基-4-甲基香豆素-、7-羟基香豆素-、香豆素-的牛血红蛋白不同摩尔浓度比的溶液，分别以含对应浓度的香豆素类溶液为参比，用紫外-可见分光光度计进行光谱

扫描，光谱图见图3。随着4-羟基香豆素浓度的增加，牛血红蛋白的特征峰出峰位置较无4-羟基香豆素时由274 nm发生了不同程度的红移（向长波方向移动），且特征峰值也存在一定程度的变化；随着4-羟基香豆素与牛血红蛋白摩尔浓度比例的增

加,牛血红蛋白在274 nm左右的波峰发生了移动,且特征峰强度变化并不与4-羟基香豆素浓度的增加呈对应关系。如图3(b),随着7-羟基-4-甲基香豆素浓度增加,牛血红蛋白特征峰值发生不同程度变化, $C_D : C_P$ 为0.2 : 1、0.8 : 1和1.0 : 1时发生红移,而在1.5 : 1时发生蓝移(向短波方向移动),0.4 : 1时出峰位置未变化;牛血红蛋白在274 nm处的特征峰位置发生变化,与4-羟基香豆素体系类似,特征峰吸光度值不随7-羟基-4-甲基香豆素浓度增加呈对应关系。由图3(c)可看出,7-羟基香

豆素-牛血红蛋白相互作用的牛血红蛋白在274 nm左右处特征峰总体趋势较未加入7-羟基香豆素表现为红移(274 nm变化至279 nm),且特征峰吸光度值不随7-羟基香豆素浓度增加呈对应关系。如图3(d)所示, $C_D : C_P$ 为0.2 : 1、0.4 : 1、0.8 : 1和1.0 : 1时,牛血红蛋白的特征峰均发生红移(274 nm变化至280 nm),而在1.5 : 1时发生少量蓝移。牛血红蛋白在274 nm左右处特征峰随香豆素浓度增加发生不同程度变化,且其吸光度值不随香豆素浓度增加呈规律性变化。



a. 4-羟基香豆素; b. 7-羟基-4-甲基香豆素; c. 7-羟基香豆素; d. 香豆素。

图3 4个香豆素类化合物与牛血红蛋白相互作用呈现的紫外光谱图

5 讨论

本文采用胃蛋白酶、香豆素类化合物、抗坏血酸为研究对象,参考相关文献的试验方法,研究有/无抗坏血酸存在时香豆素类化合物对胃蛋白酶的活性影响,以及体系中可能对胃蛋白酶活性产生间接影响的香豆素类化合物与牛血红蛋白的相互作用。

5.1 香豆素类化合物对胃蛋白酶活性影响

不同浓度的4个香豆素类化合物对胃蛋白酶活性均有抑制作用。图1(a)显示香豆素-胃蛋白酶摩尔浓度比从0 : 1 ~ 0.4 : 1变化为较明显的线性下降

趋势,0.4 : 1 ~ 1.0 : 1范围变化较为平缓,胃蛋白酶活性几乎未发生变化,1.0 : 1 ~ 1.5 : 1范围胃蛋白酶活性又发生明显下降趋势;图1(b)中7-羟基香豆素-胃蛋白酶摩尔浓度比0.4 : 1 ~ 1.5 : 1区间内胃蛋白酶活性发生波动性变化,但总体为下降趋势;图1(c)、图1(d)的趋势与图1(a)相似,胃蛋白酶活性有明显下降趋势,即7-羟基-4-甲基香豆素和4-羟基香豆素对胃蛋白酶活性表现为一定程度的抑制作用。胃蛋白酶表观酶活相对不规律的变化趋势可能是4个香豆素类化合物与胃蛋白酶较为复杂的相互作用所导致^[16]。

由表2可见,当香豆素与胃蛋白酶摩尔浓度比为1.5:1时,胃蛋白酶的表观酶活下降到不加香豆素时的52.87%,香豆素对胃蛋白酶活性的抑制率为47.13%;当7-羟基-4-甲基香豆素与胃蛋白酶摩尔浓度比为1.5:1时,胃蛋白酶的表观酶活下降到不加7-羟基-4-甲基香豆素时的70.71%,7-羟基-4-甲基香豆素对胃蛋白酶活性的抑制率为29.29%;当7-羟基香豆素与胃蛋白酶摩尔浓度比为1.5:1时,胃蛋白酶的表观酶活下降到不加7-羟基香豆素时的92.73%,7-羟基香豆素对胃蛋白酶活性的抑制率为7.27%;当4-羟基香豆素与胃蛋白酶摩尔浓度比为1.5:1时,胃蛋白酶的表观酶活下降到不加4-羟基香豆素时的64.08%,4-羟基香豆素对胃蛋白酶活性的抑制率为35.92%。由此可见,7-位取代基的香豆素类化合物对胃蛋白酶活性抑制率相对较低,4-位取代基以及无取代基香豆素类化合物对胃蛋白酶活性抑制率相对较高;进一步说明,4个香豆素类化合物与胃蛋白酶活性抑制率之间存在一定的构效关系,不同香豆素类化合物对胃蛋白酶表观酶活抑制率的差异可能与取代基的个数、位置和种类相关,这也可能是导致香豆素类化合物与胃蛋白酶作用强度或作用方式不同的原因之一。

5.2 抗坏血酸对香豆素类化合物-胃蛋白酶体系的影响作用

由图2(a)可知,在抗坏血酸存在下,除摩尔浓度比为0.8:1的体系,7-羟基-4-甲基香豆素-胃蛋白酶体系中胃蛋白酶表观活性均低于不含抗坏血酸的相应体系;图2(b)显示,抗坏血酸存在下各摩尔浓度比的7-羟基香豆素-胃蛋白酶体系中胃蛋白酶表观酶活均低于不含抗坏血酸的相应体系;从图2(c)可知,除摩尔浓度比为0.2:1的体系,含有抗坏血酸的4-羟基香豆素-胃蛋白酶体系中胃蛋白酶表观酶活均低于不含抗坏血酸的相应体系;图2(d)显示,除摩尔浓度比为0:1的体系,含有抗坏血酸的香豆素-胃蛋白酶体系中胃蛋白酶表观酶活均高于不含抗坏血酸的相应体系。单独考察抗坏血酸对胃蛋白酶活性影响,结果显示结合抗坏血酸的胃蛋白酶表观活性均低于不含抗坏血酸的胃蛋白酶。表明抗坏血酸对除香豆素-胃蛋白酶体系以外的3个香豆素类化合物-胃蛋白酶体系中的胃蛋白酶活性均有抑制作用,其单独对于胃蛋白酶活性也有抑制

作用;说明抗坏血酸加入后,其自身与4个香豆素类化合物对胃蛋白酶活性产生了交互作用,存在较为复杂的协同抑制以及拮抗或加强作用。抗坏血酸对于香豆素-胃蛋白酶体系中胃蛋白酶活性产生增强作用,其原因可能为香豆素与抗坏血酸之间发生不同于与其他3个香豆素类化合物的分子间相互作用,形成了酶活促进剂作用的复合物^[5-6],总体表现为对胃蛋白酶活性的促进或增强作用。

5.3 香豆素类化合物与血红蛋白结合作用

在本研究体系中,4个香豆素类化合物对胃蛋白酶活性均具有不同程度的抑制作用;此外,含有香豆素类化合物的胃蛋白酶加入牛血红蛋白后构成的多元体系中,可能存在游离未结合的香豆素类化合物,而这些化合物与牛血红蛋白也可能存在相互作用,影响胃蛋白酶对牛血红蛋白的水解过程,使其表观酶活受到一定程度的影响,因此,可通过采用紫外可见光谱手段考察香豆素类化合物与血红蛋白之间是否存在对胃蛋白酶活性产生影响的相互作用。由图3可知,药物与牛血红蛋白摩尔浓度比分别为0.2:1、0.4:1、0.8:1、1.0:1、1.5:1的体系中牛血红蛋白的吸收光谱特征峰在 $\lambda = 274 \text{ nm}$ 附近,且随着香豆素类化合物浓度增加,牛血红蛋白的特征吸收峰发生不同程度的移动,说明牛血红蛋白的微环境(亲/疏水性)发生变化,牛血红蛋白与4个香豆素类化合物之间发生相互作用,生成复合物,致使牛血红蛋白的主链构象发生变化^[10],对牛血红蛋白的生理活性产生影响,具体影响需进一步研究,此影响结果会对胃蛋白酶活性产生间接作用,可能会影响胃蛋白酶对牛血红蛋白的水解程度和方式。

6 结论

综上所述,香豆素、7-羟基香豆素、4-羟基香豆素、7-羟基-4-甲基香豆素对胃蛋白酶活性产生抑制作用,对胃蛋白酶表观酶活的抑制率由大到小排序:香豆素>7-羟基-4-甲基香豆素>4-羟基香豆素>7-羟基香豆素,对胃酸分泌具有抑制作用,对胃黏膜会产生保护作用,可促进胃酸分泌过多类型胃部疾病的治疗;在抗坏血酸存在时,7-羟基香豆素、4-羟基香豆素、7-羟基-4-甲基香豆素加入后大部分浓度范围内对胃蛋白酶活性产生抑制作用。相反,联合抗坏血酸的香豆素对胃蛋白酶活性产生促进作用,不利于胃酸分泌过多类型胃部疾病

的恢复与治疗。基于紫外可见吸收光谱, 香豆素、7-羟基香豆素、7-羟基-4-甲基香豆素、4-羟基香豆素与牛血红蛋白之间存在不同程度的相互作用, 对牛血红蛋白的构像产生了影响, 可能影响了胃蛋白酶对牛血红蛋白的水解程度和方式, 对胃蛋白酶活性产生间接影响。香豆素类化合物应用于疾病治疗的毒理学作用尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] 冷晓莲. 小檗碱对几种重要消化酶部分性质的影响[D]. 成都: 四川大学, 2007.
- [2] 周素芳, 凌江红. 不同胃液胃蛋白酶含量及活性的测定[J]. 广西医科大学学报, 2000, 17(1): 59-60.
- [3] Schlamowitz M, Peterson L U. Studies on the Optimum pH for the Action of Pepsin on "Native" and Denatured Bovine Serum Albumin and Bovine Hemoglobin[J]. Journal of Biological Chemistry, 1959, 234(12): 3137-3145.
- [4] John T A, Onabanjo, A O. Gastroprotective Effects of An Aqueous Extract of Entandrophragma-utile Bark in Experimental Ethanol-induced Peptic-ulceration in Mice and Rats[J]. Journal of Ethnopharmacology, 1990, 29: 87-93.
- [5] Shahlaei M, Zamani P, Farhadian N, et al. Cholesterol-lowering Drugs the Simvastatin and Atorvastatin Change the Protease Activity of Pepsin: An Experimental and Computational Study[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 167: 1414-1423.
- [6] Cheng X, Liu B S, Zhang H C. Spectroscopic and Molecular Docking Studies of the Interaction between Meloxicam and Pepsin[J]. Spectroscopy Letters, 2020, 53(1): 32-43.
- [7] Nai X, Chen Y R, Zhang Q, et al. Interaction between Caffeic Acid Phenethyl Ester and Protease: Monitoring by Spectroscopic and Molecular Docking Approaches[J]. Luminescence, 2022, 37(6): 1025-1036.
- [8] 刘雪峰, 夏咏梅, 方云, 等. 三种香豆素类化合物与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 化学学报, 2004, 62(16): 1484-1490.
- [9] 赵玉莲. "福林酚法"分析蛋白酶活性的探讨[J]. 中国调味品, 1986(6): 3-8.
- [10] Padayatty S J, Katz A, Wang Y, et al. Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention [J]. Journal of the American College of Nutrition, 2003, 22(1): 18-35.
- [11] 张利民, 盛惟, 刘宏, 等. 酪氨酸法测定大鼠胃蛋白酶实验方法的探讨[J]. 中国药品标准, 2003(4): 49-50.
- [12] 魏宜琴, 赵学兰. 胃蛋白酶活力测定法的探讨[J]. 生化药物杂志, 1991(2): 74-76.
- [13] 韦静, 沈星灿, 梁宏, 等. 牛血红蛋白与纳米雄黄相互作用的光谱研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(4): 852-855.
- [14] 张立科, 田水泉, 谢太平, 等. 紫外可见分光光度法测定果蔬中的维生素C [J]. 河北化工, 2009, 32(1): 50-52.
- [15] 梁会丽. 黄酮类化合物与胃蛋白酶的相互作用及其对酶活性影响的研究[D]. 郑州大学药学院, 2014.
- [16] 豆妮娜, 张平, 王声祥, 等. 4种香豆素类化合物对胃蛋白酶结构影响研究[J]. 中国药师, 2022, 25(8): 1334-1340.

(收稿日期 2023年6月25日 编辑 王雅雯)