

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00106

· 短篇论著 ·

荧光光谱分析 5 种黄连生物碱与蛋白和 DNA 的作用

杨 勇^{1*}, 贺 凯¹, 张保顺², 吴方评¹, 黄 军¹, 李学刚²

1. 怀化医学高等专科学校药学院天然药物化学教研室, 怀化 418000

2. 西南大学药学院药用资源化学研究所, 重庆 400716

[摘要] **目的** 了解 5 种黄连生物碱(巴马亭、黄连碱、表小檗碱、药根碱和小檗碱)与生物大分子蛋白质和 DNA 的作用关系及其差异。**方法** 将黄连生物碱巴马亭、黄连碱、表小檗碱、药根碱和小檗碱均配成浓度分别为 0、 1.95×10^{-6} 、 3.9×10^{-6} 、 7.8×10^{-6} 、 1.56×10^{-5} 和 3.12×10^{-5} mol/L 的 PBS 稀释液后,分别量取 1.5 mL 与 0.5 mL 牛血清白蛋白(BSA, 1.10×10^{-5} mol/L)溶液作用,采用 F-4500 型荧光分光光度计,在 280 nm 激发波长条件下扫描 300~500 nm 范围的荧光发射光谱。将浓度均为 0、 1.95×10^{-6} 、 3.9×10^{-6} 、 7.8×10^{-6} 和 1.56×10^{-5} mol/L 的 5 种黄连生物碱 PBS 稀释液各量取 1.5 mL 与 0.5 mL 百分浓度为 0.1% 的质粒 DNA 作用后,在 368 nm 激发波长条件下扫描 480~650 nm 范围的荧光发射光谱。**结果** 5 种黄连生物碱对 BSA 荧光均有很强的淬灭作用,各生物碱之间的荧光淬灭作用差异不大。5 种黄连生物碱与质粒 DNA 作用后,均能增强发射荧光,且各生物碱之间的荧光增强作用差异很大,荧光增强作用由大到小依次为表小檗碱、黄连碱、巴马亭、小檗碱和药根碱,其中,表小檗碱和黄连碱增强作用远大于其余 3 种黄连生物碱;5 种黄连生物碱的最强荧光作用浓度均为 7.8×10^{-6} mol/L。**结论** 5 种黄连生物碱与蛋白和 DNA 均存在很强的相互作用。5 种黄连生物碱与蛋白之间的作用差异较小,与 DNA 之间的作用差异较大,提示黄连生物碱与 DNA 的作用强度与其分子结构有关,该类分子中 9,10-亚甲二氧基和 2,3-二甲氧基结构有利于与 DNA 作用后的荧光增强作用。

[关键词] 黄连生物碱;牛血清白蛋白;质粒 DNA;荧光光谱法;相互作用**[中图分类号]** R 961**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2014)01-0106-04

Fluorescence analysis of interaction between 5 alkaloids from *Rhizoma Coptidis* with protein and DNA

YANG Yong^{1*}, HE Kai¹, ZHANG Bao-shun², WU Fang-ping¹, HUANG Jun¹, LI Xue-gang²

1. Department of Natural Medicine Chemistry, School of Pharmaceutical Science, Huaihua Medical College, Huaihua 418000, Hu'nan, China

2. Chemistry Institute of Pharmaceutical Resources, School of Pharmaceutical Science, Southwest University, Chongqing 400716, China

[Abstract] **Objective** To study the interaction between biomacromolecules (protein and DNA) and different *Rhizoma Coptidis* alkaloids (palmatine, coptisine, epiberberine, jatrorrhizine and berberine) and the difference among 5 *Rhizoma Coptidis* alkaloids. **Methods** Bovine serum albumin (0.5 mL of 1.10×10^{-5} mol/L) was added to 1.5 mL of each alkaloid of different concentrations (concentrations of palmatine, coptisine, epiberberine, jatrorrhizine and berberine being 0, 1.95×10^{-6} , 3.9×10^{-6} , 7.8×10^{-6} , 1.56×10^{-5} and 3.12×10^{-5} mol/L, respectively). The reaction system was shaken and incubated at 37°C for 1 h, and then the emission spectra of mixed solution were recorded within 300 to 500 nm at 280 nm excitation. Plasmid DNA (0.5 mL of 0.1%) was added to 1.5 mL of each alkaloid with different concentrations (concentrations of palmatine, coptisine, epiberberine, jatrorrhizine and berberine being 0, 1.95×10^{-6} , 3.9×10^{-6} , 7.8×10^{-6} and 1.56×10^{-5} mol/L, respectively). The reaction mixture was well shaken, and then the fluorescent emission spectrum was recorded from 480 to 650 nm at 368 nm excitation by an F-4500 fluorescence spectrophotometer. **Results** All the *Rhizoma*

[收稿日期] 2013-07-03**[接受日期]** 2013-08-20**[基金项目]** 科技部“十二五”科技支撑计划项目(2011BAI13B02-1),湖南省科技计划项目(2011FJ3038). Supported by the “12th Five-Year” National Science and Technology Pillar Program of China (2011BAI13B02-1) and Science and Technology Plan Project of Hu'nan Province (2011FJ3038).**[作者简介]** 杨 勇,博士,副教授.

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0745-2384439, E-mail: hnyong@163.com

Coptidis alkaloids in test exhibited similar quenching effect on fluorescence of bovine serum albumin, and they all showed fluorescence enhancing effect on plasmid DNA, and the enhancing effects varied greatly among the five alkaloids, with epiberberine showing the strongest activity, followed by coptisine, palmatine, berberine, and jatrorrhizine in order. The strongest interaction between DNA and five alkaloids were found at the concentration of 7.8×10^{-6} mol/L. **Conclusion** Strong interaction can be found between *Rhizoma Coptidis* alkaloids and biomacromolecules including protein and DNA. The interaction of *Rhizoma Coptidis* alkaloids with plasmid DNA varies greatly among different alkaloids and is similar with bovine serum albumin. 9,10-methylene-dioxy groups and 2,3-dimethoxy groups might have promoted the interaction between alkaloids and DNA.

[Key words] alkaloid from *Rhizoma Coptidis*; bovine serum albumin; plasmid DNA; fluorescence spectrometry; interactions
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(1):106-109]

黄连 (*Coptis chinensis* Franch) 为传统名贵药材,《中华人民共和国药典》(2010 版)记载黄连具有清热燥湿,泻火解毒作用。用于湿热痞满,呕吐吞酸,泻痢,黄疸,高热神昏,心火亢盛,心烦不寐,心悸不宁,血热吐衄,目赤,牙痛,消渴,痈肿疮疖;外治湿疹,湿疮,耳道流脓^[1]。现代药理研究证实,黄连具有抑菌抗痢、降糖调脂、抗肿瘤、抗炎等多方面药理作用^[2],其有效成分被认为是以小檗碱为代表的生物碱类成分。小檗碱的抗菌活性、降糖调脂活性、抗肿瘤活性、抗炎活性均已被现代医学实验所证实。研究发现,黄连粗提物或黄连总碱的药理活性强于小檗碱单体^[3-4],黄连中有除小檗碱以外的成分在发挥协同药理作用^[5],因此关注黄连“非重视成分”的生理生化作用对于了解中药的有效药物分子群作用机制和推进中药现代化研究具有重要意义。研究发现,小檗碱与各种蛋白质、核酸等生物大分子具有较强的相互作用^[6-8],提示这些生物大分子可能是该类药物分子疗效或毒性作用的靶点。本研究通过荧光光谱分析技术对巴马亭、黄连碱、表小檗碱、药根碱、小檗碱等5种黄连生物碱与生物大分子蛋白和DNA作用关系进行研究与探讨,为深入了解黄连中多种生物碱在中药治疗中的作用和地位,以及新药研发提供理论依据。

1 材料和方法

巴马亭、黄连碱、表小檗碱、药根碱和小檗碱由西南大学药学院药用资源化学研究所提取制备,纯度均在98%以上(HPLC归一化法);细菌质粒DNA($D_{260}/D_{280}=1.87$)由西南大学药学院生物制药教研室提供,牛血清白蛋白(BSA)购自上海川翔生

物科技有限公司。

将5种黄连生物碱均配成浓度分别为0、 1.95×10^{-6} 、 3.9×10^{-6} 、 7.8×10^{-6} 、 1.56×10^{-5} 和 3.12×10^{-5} mol/L的PBS稀释液,分别量取5种黄连生物碱PBS稀释液1.5 mL置于标号离心管(5 mL规格)中,然后每管加0.5 mL的 1.10×10^{-5} mol/L BSA溶液,振摇后在37℃水浴中加热1 h。采用F-4500型荧光分光光度计测定小檗碱与BSA作用后的荧光,条件设定为:激发光栅及发射光栅狭缝宽均为5 nm,检测温度为25℃,激发波长280 nm,检测波长为300~500 nm。

分别量取浓度均为0、 1.95×10^{-6} 、 3.9×10^{-6} 、 7.8×10^{-6} 和 1.56×10^{-5} mol/L的5种黄连生物碱PBS稀释液1.5 mL置于标号离心管(5 mL规格)中,随后每管加0.5 mL百分浓度为0.1%的质粒DNA溶液,振摇后直接测定。采用F-4500型荧光分光光度计测定小檗碱与细菌质粒DNA作用后的荧光,条件设定为:激发光栅及发射光栅狭缝宽均为5 nm,检测温度为25℃,激发波长368 nm,检测波长为480~650 nm。

2 结果

2.1 黄连生物碱与BSA的作用 荧光扫描分别得到不同浓度的5种黄连生物碱与BSA作用后的荧光光谱图。巴马亭、黄连碱、表小檗碱、药根碱对蛋白荧光的淬灭作用与已报道的小檗碱作用^[8]相似,即表现出对蛋白荧光的强烈淬灭作用,随着浓度的增加所有黄连生物碱的荧光淬灭作用逐步增强。取不同浓度下各黄连生物碱与BSA作用后荧光强度为纵坐标,黄连生物碱浓度为横坐标,绘图得到不同

生物碱对 BSA 荧光的淬灭曲线。由图 1 可知,不同生物碱对 BSA 荧光的淬灭能力差异较小,5 种生物碱中,表小檗碱的淬灭能力略小于其他 4 种黄连生物碱。

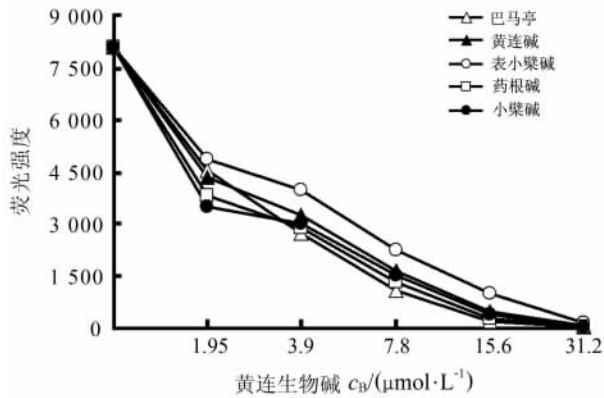


图 1 5 种黄连生物碱对牛血清白蛋白荧光的淬灭作用

2.2 黄连生物碱与细菌质粒 DNA 的作用 图 2 为 5 种黄连生物碱与细菌质粒 DNA 作用后的荧光光谱图。5 种黄连生物碱与细菌质粒 DNA 作用后,作用体系的荧光强度均出现增强作用,不同生物碱之间的荧光增强作用差异非常大。

5 种黄连生物碱与细菌质粒 DNA 作用后的荧光强度关系见图 3。由图 3 可以看出,不同黄连生物碱与 DNA 作用后荧光增强作用差异明显,表小檗碱表现出最大的荧光增强作用,其次是黄连碱、巴马亭、小檗碱,药根碱最弱。从图 3 还可以看出,5 种黄连生物碱的荧光增强作用均有一个相同的最佳作用浓度 $7.8 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$,即当黄连生物碱浓度小于 $7.8 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 时,荧光强度随浓度增加而增加,当黄连生物碱浓度大于 $7.8 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 时,荧光强度随浓度增加而下降。

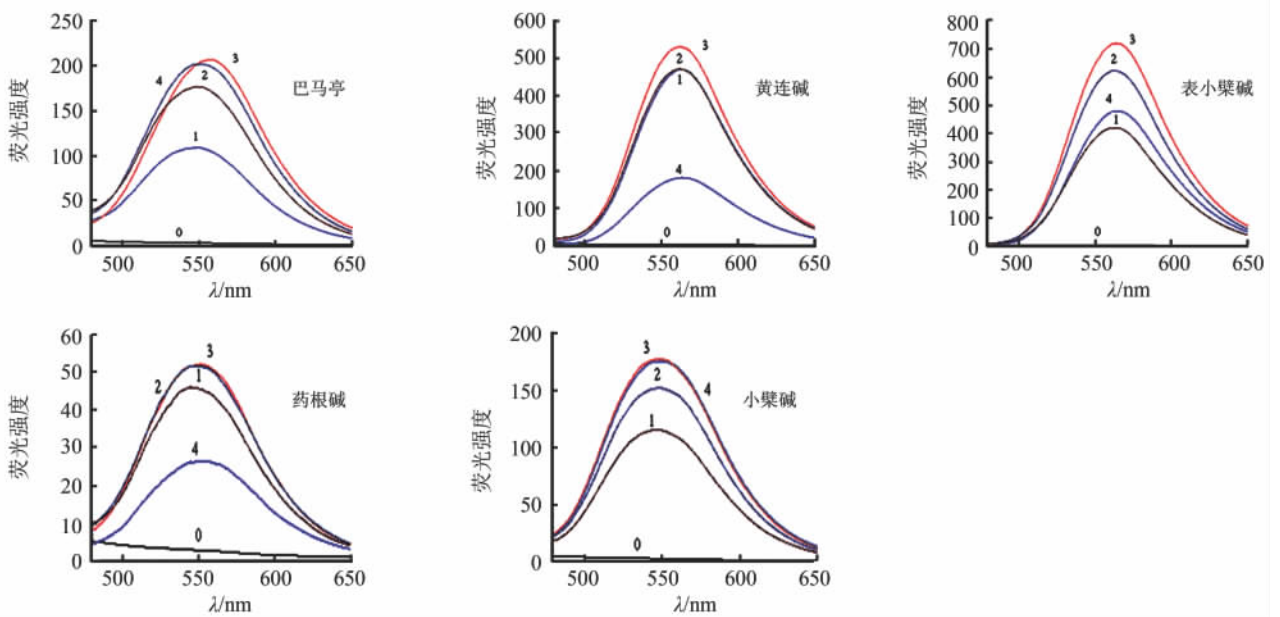


图 2 5 种黄连生物碱与细菌质粒 DNA 作用后的荧光光谱

0: $0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 1: $1.95 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 2: $3.9 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 3: $7.8 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 4: $1.56 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

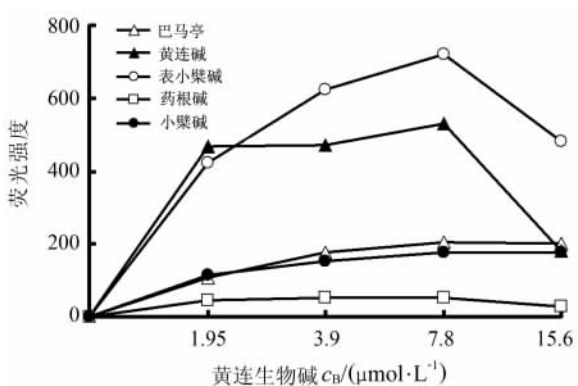


图 3 黄连生物碱对细菌质粒 DNA 荧光的增强作用

3 讨论

5 种黄连生物碱对生物蛋白荧光表现了很强的淬灭作用,但相互间的荧光淬灭作用差异不大,提示分子结构上的基团差异对蛋白作用的强度影响较小。5 种黄连生物碱与质粒 DNA 作用后的荧光强度均大大增强,且相互间该种作用有很大差异,提示黄连生物碱与 DNA 的作用强度与其分子结构有很大关系。从分子结构上进行具体分析可以发现,具有 9,10-亚甲二氧基团的表小檗碱和黄连碱与 DNA

作用后荧光强度大大强于其余3种黄连生物碱,推测9,10-亚甲二氧基团对该类生物碱与DNA的结合作用是有利的。同时对2,3-基团有差异的2对化合物进行分析,具有2,3-亚甲二氧基的黄连碱荧光增强作用弱于2,3-二甲氧基表小檗碱,小檗碱与巴马亭比较同此规律,推测2,3-二甲氧基是荧光增强作用的有利基团。3位羟基的药根碱对DNA荧光的增强作用弱于巴马亭,可能与其分子疏水性降低有关^[5]。5种黄连生物碱与DNA的最大作用浓度均为 7.8×10^{-6} mol/L,说明该类生物碱分子结构上的差异只是增强了与DNA的作用强度,并没有改变它们与DNA的作用位点数。

巴马亭、黄连碱、表小檗碱、药根碱和小檗碱都是中药黄连含有的生物碱成分,其中小檗碱是其重要生物碱成分,含量较其他生物碱要大得多,因此小檗碱的药物化学和药理作用被广泛关注,大多数情况下将小檗碱作为黄连的代表性药效成分进行研究。本研究结果表明5种黄连生物碱均与生物大分子蛋白质和DNA之间有很强的相互作用,且不同成分间的作用存在较大差异,但这些作用是否与其体内药理作用有关尚需进一步研究。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 28.
- [2] 郑洪艳, 徐为人. 小檗碱药理作用研究进展[J]. 中草药, 2004, 35: 708-711.
- [3] 朱家颖, 岑晓凤, 陈 星, 李学刚, 陈 竹, 何凤玲. 黄连生物碱降糖活性协同作用研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21: 2280-2283.
- [4] 吴 静, 王克霞, 李朝品, 王 健, 朱玉霞, 胡友莹, 等. 黄连与盐酸小檗碱对幽门螺杆菌的体外抗菌活性[J]. 中药药理与临床, 2006, 22: 37-38.
- [5] 李佳川, 孟宪丽, 范昕建, 赖先荣, 张 艺, 曾 勇, 等. 中药黄连改善胰岛素抵抗药效物质基础研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35: 1855-1858.
- [6] 刘雪峰, 夏咏梅, 方 云, 刘玲玲, 邹 鲁. 中药黄连有效成分盐酸小檗碱与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 高等学校化学学报, 2004, 25: 2099-2103.
- [7] 贺吉香, 江崇球, 高明霞. 盐酸小檗碱与脱氧核糖核酸相互作用的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2003, 23: 755-758.
- [8] 杨 勇, 叶小利, 李学刚. 小檗碱对兔红细胞膜流动性及膜蛋白荧光的影响[J]. 第四军医大学学报, 2009, 30: 1627-1629.

[本文编辑] 尹 茶

· 消 息 ·

《药学服务与研究》杂志 2014 年征订启事

《药学服务与研究》杂志是第二军医大学主管、主办的,我国第一本有关药学服务方面的专业性学术期刊。本刊宗旨:普及药学服务,提供用药咨询,推广合理用药,提高药物治疗水平,报道药物治疗经验和研究进展,反映药学研究现状,提供临床药理学和临床药理新进展、新信息。本刊为中国科技论文统计源期刊、中国科技核心期刊,收录于美国《化学文摘》(CA)等国内外大型数据库和文摘类期刊。本刊辟有:院士论坛、专家论坛、论著、医院药学、文献综述、临床药师等栏目。本刊为双月刊,双月月末出版,大16开,正文80页。国际标准连续出版物号ISSN 1671-2838,国内统一连续出版物号CN 31-1877/R,邮发代号4-706,国外发行代号BM 3731。定价每册15元,全年90元。您可到当地邮局或直接汇款至本刊编辑部进行订阅,免邮寄费。欢迎广大读者踊跃投稿和订阅!

联系地址:上海市长海路168号《药学服务与研究》杂志社,邮编:200433

联系人:秦丽华(汇款时勿写收款人具体姓名)

电 话:021-65519829(兼传真),021-31162330

<http://www.pcarjournal.net.cn>

E-mail:pharmcr@163.com