

# 荧光光谱法和分子对接模拟技术研究白藜芦醇与胃蛋白酶的相互作用

任国艳<sup>1, 2, 3</sup>, 孙贺<sup>1</sup>, 樊金玲<sup>1</sup>, 牛晓莉<sup>3</sup>, 郭金英<sup>1</sup>, 吴影<sup>1</sup>, 崔国庭<sup>1</sup>

1. 河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471023
2. 河南省食品原料工程技术研究中心, 河南 洛阳 471023
3. 国家级食品安全试验教学示范中心, 河南 洛阳 471023

**摘要** 白藜芦醇(Resveratrol, RES)属于非黄酮类多酚化合物,存在于葡萄科、百合科等多种植物体内,是一种具有多种生物活性和药理作用的天然活性物质,被广泛应用于食品和药品领域。研究表明多酚在生物体消化吸收过程中,会与消化酶(如胃蛋白酶、胰蛋白酶等)相互作用,使多酚类物质和消化酶的生物活性发生改变,进而影响多酚物质和其他营养物质的消化吸收,而RES与胃蛋白酶(Pepsin, PEP)的分子间相互作用机制未见报道。采用荧光光谱、紫外-可见吸收光谱、红外光谱和分子对接模拟等技术研究不同温度下RES与PEP相互作用的结合特性,为阐明RES和PEP的作用机制提供重要信息,同时为RES在食品和药品领域的应用提供理论参考。荧光光谱实验结果表明,PEP的荧光强度随着RES浓度的增加呈现出有规律的降低,表明RES对PEP有荧光猝灭作用。加入RES前后,PEP的紫外吸收光谱发生明显变化,初步判断RES与PEP的相互作用属于静态荧光猝灭类型;根据Stern-Volmer方程计算得到不同温度下最小猝灭速率常数 $K_q$ 值远大于猝灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞常数 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ,且猝灭常数( $K_{sv}$ )与温度呈负相关关系,进一步验证了RES与PEP静态荧光猝灭类型结论。化学计量结合的值数目大约等于1,表明一个RES分子只能结合一个PEP分子。根据Van't Hoff方程以及热力学方程计算得到结果显示, $\Delta G < 0$ ,说明RES与PEP的结合过程可以自发进行; $\Delta H < 0$ 和 $\Delta S < 0$ ,表明RES与PEP之间结合作用力类型主要是氢键和范德华力。RES与PEP相互作用的同步荧光光谱和三维荧光光谱图表明,在RES的作用下,PEP的构象和微环境发生变化,色氨酸或酪氨酸残基所处微环境极性增强,疏水性减弱,蛋白构象变得疏松。红外光谱显示RES能使PEP的二级结构中 $\alpha$ 螺旋含量降低, $\beta$ 折叠含量增加, $\beta$ 转角和无规则卷曲变化不明显,这可能会影响PEP的活性。分子对接模拟实验结果显示RES与PEP中的残基Asp-32, Gly-34, Ser-35, Asn-37, Tyr-75, Gly-76, Thr-77, Ile-128, Ala-130及Gly-217有范德华力作用,与残基Ile-128及Asp-215产生超共轭效应,与残基Ser-36, Asn-37, Ile-128及Thr-218形成氢键,各种作用力使RES与PEP形成较稳定的复合物。

**关键词** 光谱法; 分子对接; 白藜芦醇; 胃蛋白酶; 相互作用

**中图分类号:** TS201.4 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2019)04-1103-06

## 引言

白藜芦醇(resveratrol, RES)属于非黄酮类多酚化合物,广泛存在于葡萄科、百合科等多种植物体内,具有多种生物活性和药理作用,是一种对人类健康有显著作用的天然活性物质。RES分子有顺式和反式两种结构,天然的RES多数以反式结构存在(如图1)。研究表明RES具有潜在的防治心血管疾病、防癌、抗衰老及提高机体免疫力等作用<sup>[1]</sup>。RES被

机体摄入后,经胃肠道消化、吸收及代谢而发挥其功效。大量研究表明,多酚在生物体消化吸收过程中,会与消化酶(如胃蛋白酶、胰蛋白酶等)相互作用,使多酚类物质和消化酶的生物活性发生变化,影响多酚物质活性和其他营养成分的消化吸收。而多酚对消化酶的抑制作用强弱与多酚含量和种类以及消化酶的种类密切相关<sup>[2]</sup>,目前,关于RES与PEP的相互作用机制研究未见报道。

本文采用分子荧光光谱、紫外光谱、红外光谱(Fourier infrared spectrum, FTIR)及分子对接等多种方法和技术,检

收稿日期: 2018-02-08, 修订日期: 2018-07-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(31571800)资助

作者简介: 任国艳,女,1976年生,河南科技大学食品与生物工程学院副教授 e-mail: renguoyan@163.com

测 RES 与 PEP 之间的猝灭常数和结合常数, 确定它们之间主要作用力类型, 考察 PEP 所处微环境和二级结构的变化, 探究分子间的相互作用形式及作用位点, 从分子结构层面分析 RES 对 PEP 空间结构及氨基酸残基微环境的影响, 旨在为阐明 RES 与 PEP 之间的作用机理提供重要信息。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Cary eclipse 荧光光度计(安捷伦公司, USA); UV-2600 紫外-可见分光光度计(岛津公司, Japan); VERTEX70 红外光谱仪(布鲁克公司, Germany)。

PEP, 反式 RES(上海生工生物工程股份有限公司, 中国); 溴化钾(天津科密欧化学试剂有限公司, 中国)为光谱纯; 其他试剂均为分析纯。配制  $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PEP 溶液和  $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  RES 溶液, 作为母液, 贮存在  $0 \sim 4 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下备用。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 荧光光谱分析

精确配制 RES 和 PEP 溶液, 使 RES 与 PEP 的终摩尔比为 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2 和 2.25。分别在 298, 304 和 310 K 的温度下反应 10 min, 进行荧光光谱测定。测定条件为: 激发和发射狭缝宽度均为 10 nm, 扫描速度为  $600 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ , 波长扫描范围为  $300 \sim 500 \text{ nm}$ (同步荧光与三维荧光光谱扫描范围为  $200 \sim 500 \text{ nm}$ )。测定项目为:  $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$  处的荧光发射光谱; 分别固定激发波长和发射波长间距  $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$  和  $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ , 记录其同步荧光光谱; 测定 RES 溶液与 PEP 体系的三维荧光光谱。实验所得的荧光强度均采用“内滤光效应”式(1)进行校正<sup>[3]</sup>。

$$F_{\text{corr}} = F_{\text{obs}} \times 10^{(OD_{\text{ex}} + OD_{\text{em}})/2} \quad (1)$$

式中,  $F_{\text{obs}}$  为校正前的荧光强度,  $F_{\text{corr}}$  为校正后的荧光强度;  $OD_{\text{ex}}$  为激发波长下的紫外可见吸收值,  $OD_{\text{em}}$  为发射波长下的紫外可见吸收值。

#### 1.2.2 荧光猝灭机理

设置不同温度, 检测加入 RES 后 PEP 的荧光光谱变化, 结合根据 Stern-Volmer 方程式(2)计算出的热力学参数<sup>[4]</sup>, 揭示 RES 与 PEP 之间的荧光猝灭机制。

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{\text{SV}} [Q] \quad (2)$$

式(2)中,  $F_0$  为没有加入 RES 时, PEP 的荧光强度值;  $F$  为加入 RES 后 PEP 的荧光强度值;  $K_q$  为荧光猝灭速率常数;  $\tau_0$  数值为  $10^{-8} \text{ s}$ , 表示荧光分子平均寿命;  $[Q]$  为猝灭剂 (RES) 浓度;  $K_{\text{SV}}$  为 Stern-Volmer 方程的猝灭常数。

#### 1.2.3 紫外-可见分光光度法分析

不同浓度的 RES 溶液被分别加入到一定浓度的 PEP 溶液中, 进行全波长扫描, 扫描波长范围设置在  $185 \sim 700 \text{ nm}$  内。

#### 1.2.4 傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 分析

将 PEP, RES 和 RES+PEP 溶液冷冻干燥, 按样品粉末与溴化钾粉末 1:100 ( $m/m$ ) 的比例混合, 压片。在  $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$  波数范围内对样品进行红外光谱扫描。

### 1.2.5 分子对接模拟技术

利用分子对接软件 (Autodock 4.2.6) 分析 PEP (PDB ID: 5PEP) 的活性区域, 建立尺寸为  $90 \text{ \AA} \times 100 \text{ \AA} \times 90 \text{ \AA}$  的网格盒子, 盒子中心为  $(-17.802 \text{ \AA}, 40.376 \text{ \AA}, 86.848 \text{ \AA})$ 。分子对接运行 100 次, 分析 PEP 与 RES 作用前后的作用力类型和结合位点, 软件使用的所有参数均为默认值(除文中特殊说明)。

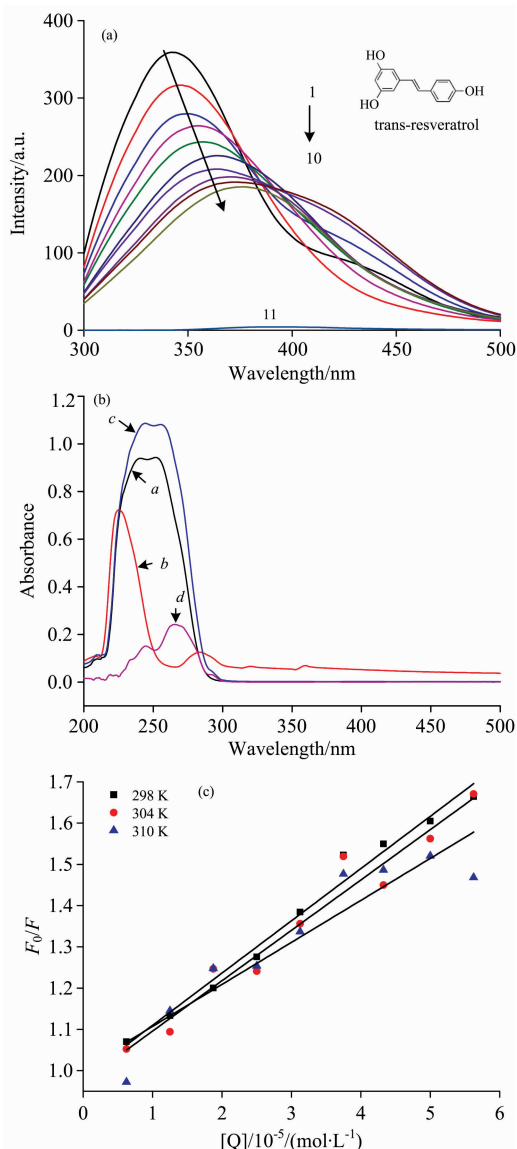


图 1 RES 与 PEP 相互作用相关图

(a): RES 与 PEP 相互作用荧光光谱图; (b): RES 与 PEP 相互作用紫外吸收光谱图, 其中  $a$  是 RES,  $b$  是 PEP,  $c$  是 RES+PEP,  $d$  是  $c-a$ ; (c): RES 与 PEP 相互作用的 Stern-Volmer 曲线

### Fig. 1 The diagram of RES and PEP interaction

(a): Fluorescence emission spectra of RES and PEP interaction; (b): UV-Vis absorption spectra of RES and PEP interaction,  $a$  is RES,  $b$  is PEP,  $c$  is RES+PEP,  $d$  is  $c-a$ ; (c): Stern-Volmer plots for the quenching of PEP caused by resveratrol at different temperatures

## 2 结果与讨论

### 2.1 RES 与 PEP 相互作用的机制

色氨酸和酪氨酸一直被用作蛋白质的内源荧光基团。蛋白质的荧光光谱可以为蛋白质结构和动力学提供重要的信息。PEP 中含有五个色氨酸残基和十六个酪氨酸残基, 这些残基可以被用作内在的荧光团, 提供 PEP 与小分子物质相互作用构象变化的相关信息<sup>[5]</sup>。RES 对 PEP 荧光强度的影响如图 1(a)所示, 当激发波长为 280 nm 时, RES 在此处的荧光(曲线 11)特别微弱, 可忽略不计, 而 PEP 在 344 nm 处有较强的荧光(曲线 1), 因此 PEP 的荧光信息可通过光谱图直接反映。

从图 1(a)中可以看出, 随着 RES 浓度的不断增加, PEP 的荧光强度逐渐降低, 但降低的程度越来越小, 这表明 RES 与 PEP 发生了相互作用从而导致 PEP 内源荧光的猝灭。在加入不同浓度的 RES 后, PEP 的最大发射峰发生了红移, 表明 RES 的存在使 PEP 中的酪氨酸或色氨酸残基所处微环境发生变化<sup>[6]</sup>。图 1(b)展示了 RES 与 PEP 相互作用的紫外可见吸收光谱, 对比曲线 *b* 和 *d* 可以发现, 随着 RES 的加入, PEP 的紫外吸收峰有明显的改变, 表明在 RES 作用下, PEP 的构象发生改变, 可以初步判断出 RES 对 PEP 的猝灭机制为静态猝灭<sup>[7]</sup>。为了进一步确定 RES 对 PEP 的荧光猝灭类型及机理, 将荧光猝灭数据代入 Stern-Volmer 方程进行分析, 可得到相关的猝灭参数(表 1 所示)及不同温度下的 Stern-Volmer 曲线[图 1(c)]。从图 1(c)中可以看出,  $F_0/F$  与  $[Q]$  之间线性关系良好, 表明 RES 对 PEP 的猝灭类型是属于单一的静态猝灭或动态猝灭<sup>[8]</sup>。由方程的斜率可计算得

到猝灭常数  $K_{sv}$  和  $K_q$ , 从表 1 中数据可以看出, 最小的猝灭速率常数  $K_q$  值远大于  $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (猝灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞常数), 且猝灭常数随着温度升高而降低, 再次验证了 RES 与 PEP 两者间相互作用表现为静态猝灭。

表 1 RES 与 PEP 体系荧光猝灭常数及线性相关系数

Table 1 Quenching rate constants and correlation coefficients of RES+PEP

温度 T/K	猝灭常数 $K_{sv}/$ ( $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$ )	猝灭速率常数 $K_q/$ ( $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$ )	相关系数 $R^2$
298	$1.2664 \times 10^5$	$1.2664 \times 10^{13}$	0.979 6
304	$1.2208 \times 10^5$	$1.2208 \times 10^{13}$	0.951 6
310	$1.0180 \times 10^5$	$1.0180 \times 10^{13}$	0.858 7

结合常数和结合位点数是研究小分子与蛋白质相互作用中重要的定量数据。荧光光谱和紫外光谱实验结果表明 RES 与 PEP 作用类型为静态猝灭, 参考静态猝灭式(3)可以求出两者的结合常数<sup>[9]</sup>。

$$\lg[(F_0 - F)/F] = \lg K + n \lg [Q] \quad (3)$$

式(3)中,  $F_0$  为 PEP 的荧光强度,  $F$  为加入 RES 后 PEP 的荧光强度;  $K$  为 PEP 与 RES 的结合常数;  $n$  为结合位点数;  $[Q]$  为 RES 的浓度。

以  $\lg[(F_0 - F)/F]$  为纵坐标,  $\lg [Q]$  为横坐标作双对数图, 两者间呈线性相关(表 2 中  $r$  值), 根据线性方程的斜率和截距计算不同温度下 RES 与 PEP 的结合常数  $K$  和两种反应物之间的结合位点数  $n$ , 结果见表 2。

表 2 RES 与 PEP 反应过程热力学参数

Table 2 Thermodynamic parameters of RES+PEP reaction process

温度 T/K	结合常数 $K/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	结合位点 $n$	相关系数 $r$	自由能 $\Delta G/$ ( $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ )	焓变 $\Delta H/$ ( $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ )	熵变 $\Delta S/$ ( $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ )
298	$2.6001 \times 10^4$	1.075 0	0.995 2	-25.187		
304	$7.3419 \times 10^4$	1.182 8	0.982 0	-28.224	-168.980	-475.972
310	$2.2720 \times 10^3$	0.848 5	0.957 4	-19.919		

从结合常数  $K$  可以看出两者具有较强的相互作用, 形成一个结合位点。RES 与 PEP 之间的作用力类型可根据反应的热力学参数(焓变  $\Delta H$ , 熵变  $\Delta S$ , 吉布斯自由能变  $\Delta G$ )进行判断<sup>[10]</sup>。当温度变化不大时, 反应的焓变( $\Delta H$ )、熵变( $\Delta S$ )和吉布斯自由能变( $\Delta G$ )可由 Van't Hoff 方程(4)以及热力学方程(5)求出<sup>[11]</sup>。

$$\ln K = -\Delta H/RT + \Delta S/R \quad (4)$$

$$\Delta G = -RT \ln K = \Delta H - T\Delta S \quad (5)$$

式中,  $K$  为某温度下的结合常数;  $R$  为气体常数( $8.314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ )。

由表 2 可知,  $\Delta G < 0$ , 说明 RES 与 PEP 的结合可以自发进行。该体系的  $\Delta H < 0$  和  $\Delta S < 0$ , 可说明 RES 与 PEP 之间的作用力主要是氢键和范德华力, 但不能排除其他作用力

的存在。

### 2.2 RES 对 PEP 构象的影响

#### 2.2.1 RES 与 PEP 的同步荧光光谱

同步荧光光谱可提供荧光团附近微环境变化的相关信息。在同步荧光光谱中, 当激发和发射的波长差  $\Delta\lambda$  设为 15 和 60 nm 时, 可以分别呈现出蛋白质中酪氨酸和色氨酸残基附近的分子结构特点。RES 与 PEP 相互作用的同步荧光光谱如图 2 所示, 从图中可以看出, 在两种波长差下, 随着 RES 的不断加入, PEP 酪氨酸和色氨酸的发射峰强度均有所降低, 但下降的程度不同。 $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$  条件下, 随着 RES 浓度的提高, PEP 特征荧光吸收峰不断猝灭, 且由 286 nm 红移至 291 nm。 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$  的特征荧光吸收峰亦猝灭, 由 279 nm 红移至 281 nm。这表明 RES 使 PEP 中色氨酸和酪氨酸

残基附近的微环境发生改变,极性略有增加,疏水性减小, PEP 结构变得疏松<sup>[12]</sup>。这与荧光光谱所测结果一致。

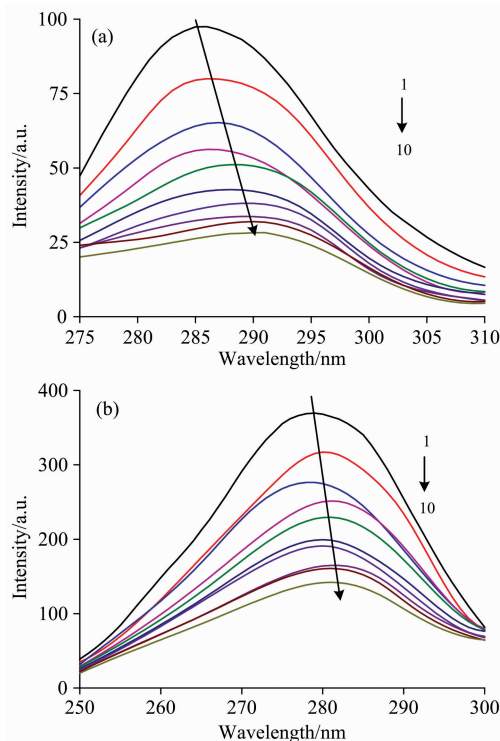


图 2 RES 与 PEP 体系的同步荧光光谱

(a): 波长差为 15 nm; (b): 波长差为 60 nm

$T=298\text{ K}$ ,  $c(\text{PEP})=2.5\times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $c(\text{RES})(1\sim 10)=(0, 0.625, 1.250, 1.875, 2.500, 3.125, 3.750, 4.325, 5.000, 5.625)\times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$

Fig. 2 Synchronous fluorescence spectra of RES and PEP system

(a):  $\Delta\lambda=15\text{ nm}$ ; (b):  $\Delta\lambda=60\text{ nm}$

$T=298\text{ K}$ ,  $c(\text{PEP})=2.5\times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $c(\text{RES})(1\sim 10)=(0, 0.625, 1.250, 1.875, 2.500, 3.125, 3.750, 4.325, 5.000, 5.625)\times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$

### 2.2.2 RES 与 PEP 的三维荧光光谱

三维荧光光谱技术可以完整地呈现出样品的荧光信息,是描述荧光强度同时随激发、发射波长都变化的荧光光谱,比二维荧光光谱包含更丰富的信息。图 3 显示 PEP 单独存在时[图 3(a)]以及与 RES 相互作用的三维荧光光谱图[图 3(b)]。峰 a( $\lambda_{\text{ex}}=\lambda_{\text{em}}$ )是瑞利散射峰,峰 1 主要展现 PEP 中色氨酸或酪氨酸残基的荧光光谱特征。图 3(a)中显示 PEP 溶液峰 1 的相对荧光强度为 368.7,当加入 RES 后,其相对荧光强度下降至 267.0,并出现了新的峰 2[图 3(b)],表明 RES 与 PEP 形成复合物,并引起 PEP 构象的变化<sup>[13]</sup>。加入 RES 前后,PEP 溶液中峰 1 的发射波长由 340 nm 红移到 361 nm,PEP 中色氨酸或酪氨酸所处环境疏水性减弱。这进一步验证了荧光光谱和同步荧光光谱的结果。

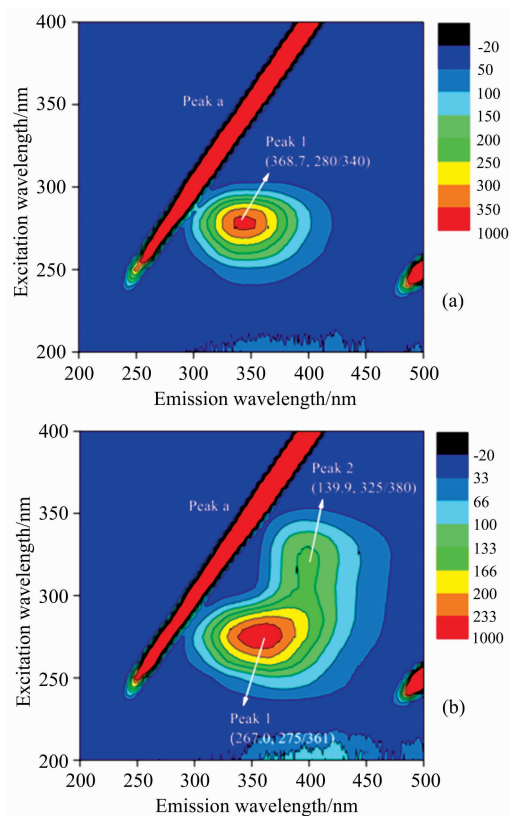


图 3 PEP 及 RES+PEP 的三维荧光光谱

Fig. 3 The three-dimensional fluorescence contour spectra of PEP (a) and RES+PEP (b)

### 2.2.3 傅里叶变换红外光谱

蛋白质的红外光谱可以反映蛋白质构象的变化,酰胺 I 带( $1700\sim 1600\text{ cm}^{-1}$  范围内,主要是 C=O 伸缩振动)和酰胺 II 带( $1600\sim 1500\text{ cm}^{-1}$  范围内,主要是 C-N 伸缩振动和 N-H 弯曲振动)红外吸收峰是蛋白质特征吸收峰,通过对它们进行去卷积处理,可以获得蛋白质二级结构的相关信息<sup>[14]</sup>。对 PEP 加入 RES 前后红外图谱的  $1700\sim 1500\text{ cm}^{-1}$  部分分别进行去卷积处理(表 3),结果显示加入 RES 前后,PEP 二级结构中, $\alpha$  螺旋含量由 21.19% 变为 17.23%, $\beta$  折叠含量由 45.34% 变为 49.76%, $\beta$  转角含量由 28.61% 变为 28.08%,无规则卷曲含量由 4.86% 变为 4.93%,这一实验结果表明,RES 对 PEP 的二级结构产生影响,使其  $\alpha$  螺旋含量降低, $\beta$  折叠含量增高, $\beta$  转角和无规则卷曲变化不明

表 3 RES 对 PEP 二级结构的影响

Table 3 The effect of RES on the secondary structure of pepsin

系列	$\alpha$ 螺旋 /%	$\beta$ 折叠 /%	$\beta$ 转角 /%	无规则卷曲 /%
PEP	21.19	45.34	28.61	4.86
(PEP+RES)-RES	17.23	49.76	28.08	4.93

显,这可能由于 RES 与 PEP 之间主要通过氢键和范德华力产生相互作用,这种作用会影响 PEP 的二级结构,进而影响其活性。

### 2.3 分子对接模拟实验

为了更加直观的反映 RES 与 PEP 的结合状态,利用分子对接技术对它们之间的相互作用进行模拟研究<sup>[15]</sup>。从若干对接结果中选取结合位点出现最多的簇,再从中选取结合能最低的构象进行分析,所得结果如图 4 所示。RES 与 PEP 的结合位点位于 PEP 的凹槽,即活性中心,结合能为  $-29.59 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。RES 与 PEP 中的残基 Asp-32, Gly-34, Ser-35, Asn-37, Tyr-75, Gly-76, Thr-77, Ile-128, Ala-130 及 Gly-217 有范德华力作用,与残基 Ile-128 及 Asp-215 产生超共轭效应。残基 Ser-36, Asn-37, Ile-128 及 Thr-218 与 RES 形成氢键,各种作用力使 RES 与 PEP 形成较稳定的复合物。

## 3 结 论

利用荧光光谱法等多种光谱技术和分子对接技术研究 RES 与 PEP 的作用机制。结果表明 RES 与 PEP 之间以 1 : 1

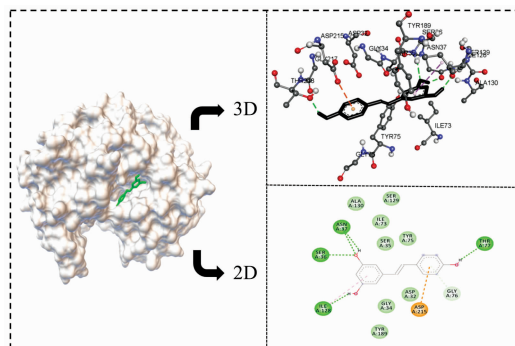


图 4 RES 与 PEP 的分子对接

Fig. 4 Molecular docking of Resveratrol and PEP

结合并相互作用发生静态荧光猝灭,该过程可自发发生。PEP 与 RES 结合有一个结合位点,二者之间的作用力主要是氢键和范德华力。在 RES 的作用下,PEP 中色氨酸和酪氨酸所处的微环境发生变化,极性增强,疏水性减弱,空间结构变得疏松;PEP 的二级结构也发生变化,其中  $\alpha$  螺旋含量明显降低,  $\beta$  折叠含量明显增加;分子对接结果进一步验证以上结果,并直观反映了 RES 与 PEP 之间的相互作用。

## References

- [1] Thiel G, Rössler O G. *Pharmacol. Res.*, 2017, 117: 166.
- [2] Izlia J A, José C T, Andrés H A, et al. *Food Chem.*, 2016, 213: 431.
- [3] Wu H, Dou H, Zhang L, et al. *Spectrochim. Acta A*, 2014, 118(2): 510.
- [4] Zhang L J, Ren T, Wang Z C, et al. *J Mol. Recognit.*, 2017, 30: e2606.
- [5] Ma X L, Guo L Q, Wang Q, et al. *J Fluoresc.*, 2016, 26: 599.
- [6] Jahanban-Esfahlan A, Panahi-Azar V, Sajedi S. *Biopolymers.*, 2015, 103: 638.
- [7] Zeng H J, You J, Liang H L, et al. *Int. J Bio. Macromol.*, 2014, 67: 105.
- [8] Nasruddin A N, Feroz S R, Mukarram A K, et al. *J Lumin.*, 2016, 174: 77.
- [9] Fu L, Sun Y, Ding L, et al. *Food Chem.*, 2016, 203(8): 150.
- [10] Chaves O A, Da S V A, Sant'Anna C M R, et al. *J Mol. Struct.*, 2017, 1128: 606.
- [11] Jahanban-Esfahlan A, Panahi-Azar V. *Food Chem.*, 2016, 202: 426.
- [12] Zeng H J, Yang D, Hu G Z, et al. *J. Mol. Recognit.*, 2016, 29: 476.
- [13] Paul B K, Guchhait N A. *Photoch. Photobiol. Sci.*, 2011, 10: 980.
- [14] WANG Yi-run, FANG Qing, GUO Chen-hui, et al. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2016, 36(10): 3414.
- [15] Wu Z B, Shen L L, Han Q G, et al. *Food Biophys.*, 2017, 12: 78.

# Study on Interaction between Resveratrol and Pepsin by Fluorescence Spectroscopy and Molecular Modeling

REN Guo-yan<sup>1, 2, 3</sup>, SUN He<sup>1</sup>, FAN Jin-ling<sup>1</sup>, NIU Xiao-li<sup>3</sup>, GUO Jin-ying<sup>1</sup>, WU Ying<sup>1</sup>, CUI Guo-ting<sup>1</sup>

1. College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China

2. Henan Engineering Research Center of Food Material, Luoyang 471023, China

3. National Demonstration Center for Experimental Food Processing and Safety Education, Luoyang 471023, China

**Abstract** Resveratrol (RES) is a non-flavonoid polyphenols found in many plants, such as Vitaceae and Liliaceae. It is a natural active substance with variety biological and pharmacological functions and widely used in food and pharmaceutical field. Studies have shown that polyphenols had an interaction with digestive enzymes (such as pepsin, trypsin, etc.) in the process of digestion and absorption of organisms, resulting in changes in the biological activity of polyphenols and digestive enzymes and affecting the digestion and absorption of polyphenols and other nutrients. However, the mechanism of interaction between RES and pepsin (PEP) has rarely been reported. The attempt of this paper was to investigate the binding characteristics between RES and PEP at different temperatures by fluorescence spectroscopy, UV-Vis absorption spectroscopy, infrared spectroscopy (FT-IR) and molecular modeling technique. The experimental results provided important information for elucidating the action mechanism of RES and PEP. Fluorescence data revealed that the fluorescence intensity of PEP decreased regularly with the increase of RES concentration, indicating that RES had a fluorescence quenching effect on PEP. After RES was added, the UV-vis spectra of PEP changed significantly. The  $K_q$  value (the minimum quenching rate constant) at different temperatures were all much larger than  $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (the maximum diffusion collision constant of the quenching agent on biological macromolecules). Moreover, Stern-Volmer quenching constant ( $K_{SV}$ ) gradually decreased with the increase in temperature. These results verified quenching mode between PEP and RES to be static. The value of the stoichiometric binding number approximately equals 1, suggesting that one molecule of RES combined with one molecule of PEP. The thermodynamic parameters indicated that RES could spontaneously bind with pepsin mainly through the hydrogen bonds and Van der Waals forces. Synchronous fluorescence and three-dimensional fluorescence results provided data concerning conformational and some micro-environmental changes of pepsin. According to the results from FTIR analyses of PEP, the content of  $\beta$ -sheet increased accompanying with significantly decrease of  $\alpha$ -helix, and no obvious change of  $\beta$ -turn and random coil upon binding with RES. The presence of RES loosened the skeleton of pepsin. These secondary structure changes might lead to changes of the physiological function of pepsin, such as the enzyme activity. Finally, molecular docking further suggested that RES molecule binded within the active pocket of PEP mainly via the van der Waals forces and hydrogen bonds. There were the van der Waals forces between RES and residues Asp-32, Gly-34, Ser-35, Asn-37, Tyr-75, Gly-76, Thr-77, Ile-128, Ala-130 and Gly-217 of PEP, super conjugation between RES and residues Ile-128 and Asp-215 of PEP, and hydrogen bonds between RES and Ser-36, Asn-37, Ile-128 and Thr-218 of PEP. Various forces make RES and PEP form a more stable complex.

**Keywords** Spectroscopy; Molecular modeling; Resveratrol; Pepsin; Interaction

(Received Feb. 8, 2018; accepted Jul. 10, 2018)