

## 多光谱法和分子对接模拟研究鞣花酸与牛血清蛋白的相互作用

倪丹<sup>1</sup>, 蒋新元<sup>2\*</sup>, 庞亚辉<sup>2</sup>, 曾胜男<sup>2</sup>, 唐玉莲<sup>2</sup>, 何思宜<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>中南林业科技大学理学院 长沙 410004

<sup>2</sup>中南林业科技大学材料科学与工程学院 长沙 410004)

**摘要** 鞣花酸(EA)是一种具有抗氧化、抗癌、抗突变、抗炎等多种生理活性的天然多酚,鞣花酸与蛋白的相互作用直接影响其在人体的转运与代谢。本文运用多种光谱学方法与分子对接模拟法研究 EA 与牛血清蛋白(BSA)互作的反应机理。紫外光谱和荧光光谱研究结果表明:EA 通过静态方式猝灭 BSA 的内源荧光,EA 与 BSA 按 1.5:1 比例通过自发的放热过程结合,形成稳定的复合物,初步确定其主要作用力为范德华力和氢键。红外光谱和圆二色谱研究表明:EA 的加入对 BSA 的二级结构影响显著,导致 BSA 中  $\alpha$ -螺旋结构减少, $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角和无规则卷曲结构增加,且 EA 与 BSA 间可能存在疏水作用力。分子对接模拟进一步验证了上述光谱分析结果,说明主导 EA 和 BSA 结合的作用力除范德华力和氢键外,还有一定的疏水作用力。EA 在 BSA 上的最佳结合位点位于亚结构域 II A 与亚结构域 III A 间的疏水空腔内,距离 site I 更近。EA 与 His145、Pro110、Arg458 等残基间存在疏水相互作用,与 Arg144 残基间存在氢键作用。本研究阐明 EA 与 BSA 相互作用的分子机制,为 EA 在体内转运及代谢研究提供了参考。

**关键词** 鞣花酸;牛血清蛋白;多光谱法;分子对接;相互作用机制

**文章编号** 1009-7848(2023)12-0020-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.12.003

鞣花酸是一种天然多酚<sup>[1]</sup>,具有抗氧化<sup>[2]</sup>、抗炎<sup>[3]</sup>、抗癌<sup>[4]</sup>、降低肝肾毒性<sup>[5-6]</sup>等生理作用。随着人们对健康的日益重视,多酚与蛋白质的相互作用研究逐渐成为食品化学和多酚化学<sup>[7]</sup>的核心内容。研究发现,在食品加工业或人体消化过程,多酚与蛋白质的相互作用会影响两者的结构特征和功能活性<sup>[8]</sup>。牛血清白蛋白(BSA)与人血清白蛋白(HAS)在构象和序列上有很高的相似性和同源性,并且成本低、运输方便、稳定性高,因此被普遍应用于多酚和蛋白的研究中<sup>[9-10]</sup>。本文使用 BSA 为模型蛋白展开试验研究。

近年来,光谱技术被广泛应用于多酚与蛋白质结合的研究<sup>[11]</sup>。分子对接模拟技术能准确有效地预测小分子与蛋白质的最佳结合位点,也已成为研究多酚与蛋白质相互作用的重要手段<sup>[12]</sup>。目前,关于鞣花酸与蛋白质相互作用的机理研究较少。本试验采用紫外光谱、荧光光谱、圆二色谱、红外光谱等多光谱法研究鞣花酸与 BSA 的相互作

用机理,并结合分子对接模拟技术进行分析比较、验证和补充,用试验结合理论的方法从分子水平综合分析两者的作用机理,为鞣花酸在食品或医药领域的广泛应用提供参考。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与试剂

EA(纯度 $\geq 98\%$ ),西安皓源生物技术有限公司;BSA(纯度 $\geq 98\%$ ),合肥博美生物科技有限责任公司;其它试剂均为分析纯;试验用水为超纯水;EA 储备液:称取一定量 EA,溶解于 DMSO,定容配制 1.00 mg/mL 的储备液,4 °C 冰箱保存,避光,根据需要用水稀释;BSA 储备液:称取一定量 BSA,溶解于超纯水,定容配制 3.00 mg/mL 的储备液,4 °C 冰箱保存,避光,根据需要用水稀释。

#### 1.2 仪器与设备

UV2310 II 紫外可见分光光度计,上海天美科学仪器有限公司;SCIENTZ-10N 冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司;F-4500 荧光分光光度计,日本日立公司;Nicolet iS5 傅里叶红外光谱仪,美国 Thermo Fisher 公司;MOS-500 圆二色谱仪,法国 Biologic 公司。

收稿日期:2022-12-23

基金项目:“十三五”国家重点研发计划项目  
(2018YFD0600404)

第一作者:倪丹,女,硕士生

通信作者:蒋新元 E-mail: jxycsfu@126.com

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 EA 与 BSA 络合特性的紫外光谱法测定

1.3.1.1 EA 与 BSA 络合反应合适检测波长  $\lambda$  的选择 用紫外分光光度计分别扫描 0.50 mg/mL 的 EA 溶液和 BSA 溶液在 200~450 nm 的吸收光谱, 确定适合 EA 与 BSA 络合反应的检测波长。

1.3.1.2 BSA 与 EA 的质量比对 EA 和 BSA 络合反应的影响 在 10 mL 离心管里分别添加不同质量浓度的 BSA 稀释液 3.00 mL, 1.00 mg/mL EA 溶液 3.00 mL, 摇匀, 在 37 °C 水浴 30 min, 冷却后置 4 °C 下存放 24 h, 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液测定吸光度, 试验重复 3 次。计算各质量比的相对吸收率  $R_A$ :

$$R_A = (A_0 - A) / A \quad (1)$$

式中:  $A$  代表一定质量浓度 EA 与不同浓度 BSA 反应后离心上清液的吸光度;  $A_0$  代表相同质量浓度 EA 与超纯水混合后离心上清液的吸光度。相对吸收率  $R_A$  的大小可代表 EA 与 BSA 结合能力的强弱<sup>[13]</sup>。

1.3.2 EA 与 BSA 相互作用的荧光光谱测定 由于色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸残基<sup>[14]</sup>的存在, BSA 溶液具有内源性荧光。EA 溶液有很弱的荧光发射信号, 基本不会对 BSA 的荧光信号造成干扰。因此, 本试验可忽略“内部滤波效应”的干扰。

1.3.2.1 荧光光谱的测定 在 10 mL PE 管中分别添加 2.00 mg/mL BSA 溶液 2.00 mL, 不同浓度 EA 稀释液 2.00 mL 和 pH=7.4 PBS 缓冲液 1.00 mL, 摇匀, 将混合液分别在 25, 31, 37 °C 下保温 1 h, 待测。设置激发波长 280 nm, 激发狭缝 2.5 nm, 发射狭缝 5.0 nm, 记录待测液在 285~450 nm 的荧光光谱。

$$\eta = (F_0 - F) / F_0 \quad (2)$$

式中:  $F_0$  和  $F$ ——分别代表添加不同浓度 EA 稀释液前后 BSA 的荧光强度。

1.3.2.2 荧光猝灭类型的确定 荧光猝灭一般有动态猝灭和静态猝灭两种类型<sup>[15]</sup>。为了确定猝灭类型, 根据 Stern-Volmer 方程计算荧光发射光谱数据:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (3)$$

式中:  $K_q$ ——猝灭过程中的速率常数, L/

mol/s;  $[Q]$ ——EA 浓度, mol/L;  $K_{sv}$ ——猝灭常数, L/mol;  $\tau_0$ ——EA 不存在时荧光分子的平均寿命 ( $\tau_0 = 10^{-8}$  s)<sup>[16]</sup>。

1.3.2.3 EA 与 BSA 的结合常数和结合位点的计算 根据双对数方程计算:

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_A + n \lg [Q] \quad (4)$$

式中:  $K_A$ ——结合常数, L/mol;  $n$ ——结合位点数。

1.3.2.4 EA 与 BSA 作用力的探讨 热力学参数可根据下列公式计算:

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

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (6)$$

式中:  $\Delta G$ ——结合自由能的变化, kJ/mol;  $K$ ——结合常数, L/mol;  $\Delta H$ ——结合焓变, kJ/mol;  $T$ ——反应温度, K;  $\Delta S$ ——结合熵变, J/mol/K;  $R$ ——气体常数 (8.314 J/mol/K)。

#### 1.3.3 EA 与 BSA 相互作用的红外光谱测定

1.3.3.1 EA-BSA 复合物的制备 在 10 mL 离心管里添加 0.50 mg/mL BSA 溶液 3.00 mL, 1.00 mg/mL EA 溶液 3.00 mL, 摇匀, 在 37 °C 水浴 30 min, 冷却后置 4 °C 下存放 24 h, 8 000 r/min 离心 10 min, 得到 EA-BSA 复合物。

1.3.3.2 傅里叶红外光谱的测定 将制备的 EA-BSA 复合物冷冻干燥 48 h。在干燥环境下, 研磨适量复合物样品和溴化钾成粉末, 压片。以干燥溴化钾为背景, 分辨率 4  $\text{cm}^{-1}$ , 平均扫描 64 次, 记录样品在 4 000~400  $\text{cm}^{-1}$  的红外光谱。

1.3.4 EA 与 BSA 相互作用的圆二色谱测定 在 10 mL PE 管中添加 0.50 mg/mL BSA 溶液 3.00 mL, 5.00 mg/L EA 溶液 3.00 mL, 摇匀, 在 37 °C 下水浴 1 h, 将样品用超纯水稀释 50 倍, 用圆二色谱仪进行远紫外-圆二色谱检测, 扣除相应质量浓度的 EA 以校正背景。设置分辨率 2.0 nm, 扫描速度 60 nm/min, 响应时间 1 s, 25 °C 下持续氮气环境, 记录样品在 190~260 nm 的圆二色谱。利用 DichroWeb<sup>[17]</sup>的 SELCON3<sup>[18-19]</sup>模式计算 BSA 中各二级结构单元比例的变化。

1.3.5 EA 与 BSA 相互作用的分子对接模拟 BSA 晶体结构来自 RSCB PDB 数据库 (PDB 编号: 4F5S), EA 结构来自 PubChem 数据库 (化合物编

号:5281855)。用 AutoDockTools(Ver 1.5.7)软件将 BSA 进行除水、加氢、加电荷、删去多余对称 b 链结构;将 EA 进行加氢操作。以 A 链作为对接链,设置网格框( $x=126,y=90$  和  $z=112$ ,格点数为 0.772),以覆盖所有位点。其它参数设置均采用 AutoDockTools 默认参数,对接时不考虑受体和配体分子的柔性。以最低能量确定最优对接构型,用 Pymol 软件<sup>[20-21]</sup>呈现分子对接三维图,并用 Ligplot+软件<sup>[22]</sup>分析相互作用力。

## 2 结果与分析

### 2.1 EA 与 BSA 络合特性的紫外光谱分析

2.1.1 EA 与 BSA 络合反应的合适波长  $\lambda$  由图 1 可知,EA 溶液在 370.5 nm 处有明显的吸收,而 BSA 溶液在这个波长下几乎没有吸收。EA 与 BSA

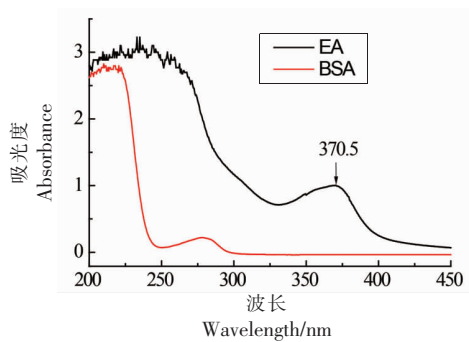
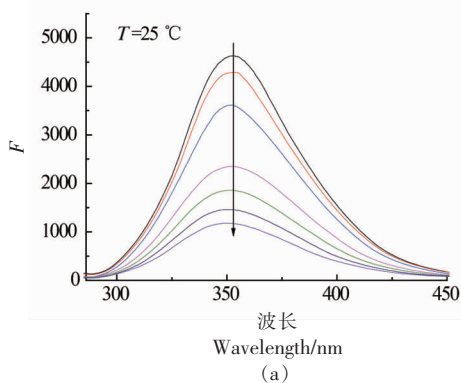


图 1 EA 和 BSA 的紫外吸收光谱图

Fig.1 The UV absorption spectra of EA and BSA

### 2.2 EA 与 BSA 相互作用的荧光光谱分析

2.2.1 EA 与 BSA 相互作用的荧光光谱特征 由图 3 可以看出,BSA 溶液在 351 nm 产生荧光峰,EA 对 BSA 的荧光具有特异性猝灭。在 BSA 质量浓度一定的情况下,荧光强度随 EA 浓度增加呈



络合反应后,其离心上清液在 370.5 nm 处的吸收值可以代表 EA 的含量变化,不受离心液中 BSA 的影响。因此,EA 与 BSA 相互作用后相对吸收率  $R_A$  的检测波长可以确定为 370.5 nm。

2.1.2 BSA 与 EA 的质量比对 EA 和 BSA 络合反应的影响 由图 2 可知,当体系中 EA 含量固定,相对吸收率  $R_A$  随 BSA 含量的变化而变化,说明 BSA 与 EA 质量比对 BSA 与 EA 的结合强度有很大影响。当体系中 BSA 与 EA 质量比小于 0.5 时,  $R_A$  随着 BSA 含量的增加而增加;而当 BSA 与 EA 质量比在 0.5~0.7 之间时,  $R_A$  几乎不变;当两者质量比大于 0.7 时,  $R_A$  反呈下降趋势。当两者质量比在 0.5~0.7 之间时,相对吸收率  $R_A$  达到了 0.6,两者结合能力强。此现象可推断出 BSA 与 EA 以 0.5~0.7,即 EA:BSA=1.43~2.00 的比例结合可能性高。

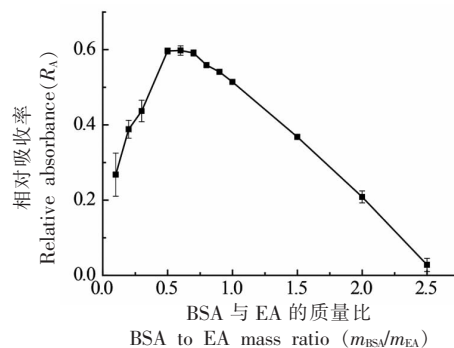
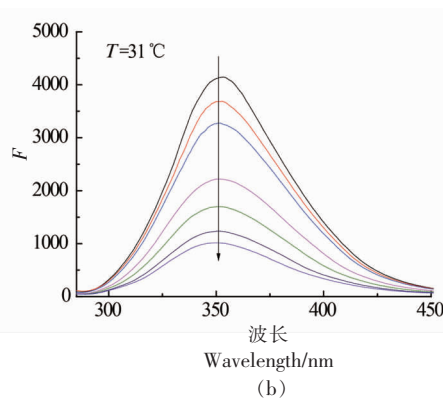
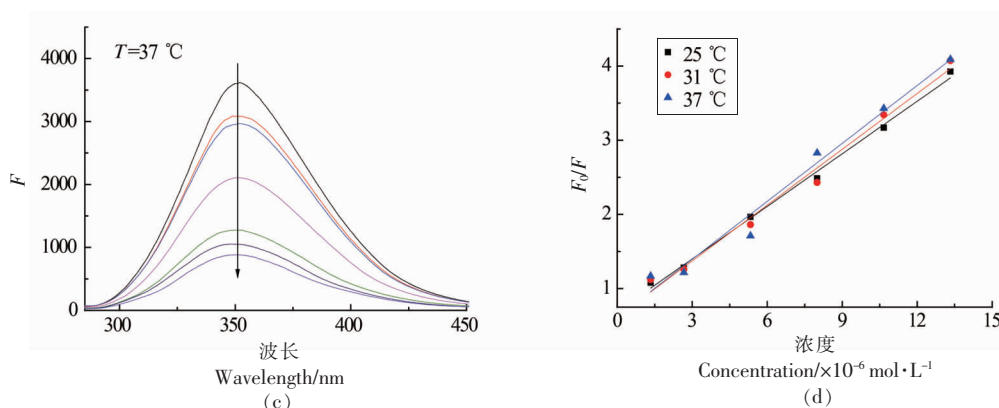


图 2 BSA 与 EA 的质量比对 EA 和 BSA 络合反应的影响

Fig.2 The effect of the mass ratio of BSA to EA on the complexation reaction of EA and BSA

现规律性降低,并且峰形不变,最大吸收峰没有明显的红移或蓝移。生理条件下( $\text{pH}=7.4$ ),当 EA 浓度为  $13.33 \mu\text{mol/L}$  时,其在  $25, 31 \text{ }^\circ\text{C}$  和  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  对 BSA 的荧光猝灭率分别为:74.52%,75.44%,75.54%。





注:  $c(\text{BSA}) = 0.80 \text{ mg/mL}$ ;  $c(\text{EA}) = 0, 1.33, 2.67, 5.33, 8.00, 10.67, 13.33 \text{ } \mu\text{mol/L}$ 。

图 3 不同温度下 EA 对 BSA 的荧光猝灭 (pH=7.4), 以及 Stern-Volmer 图

Fig.3 Fluorescence quenching of BSA by EA at different temperatures (pH=7.4), and Stern-Volmer plots

2.2.2 EA 和 BSA 相互作用的荧光猝灭类型 动态猝灭的  $K_q$  值一般随反应温度升高而增大; 而静态猝灭则相反。目前很多文献表明,  $K_q$  值随温度升高而增大, 但其值远大于最大动态猝灭常  $2.0 \times 10^{10} \text{ L/mol}\cdot\text{s}$ <sup>[23]</sup>时, 也可认定为静态猝灭<sup>[24]</sup>。

由图 3 和表 1 知, 在不同温度下, Stern-

Volmer 图呈线性分布, 线性相关性良好 ( $R^2 > 0.97$ ); 25, 31, 37 °C 时猝灭常数  $K_q$  分别为  $2.36 \times 10^{13}$ ,  $2.51 \times 10^{13}$ ,  $2.60 \times 10^{13} \text{ L/mol}\cdot\text{s}$ ,  $K_q$  值随着温度升高而增大; 但无论哪个反应温度下,  $K_q$  值均远大于  $2.0 \times 10^{10} \text{ L/mol}\cdot\text{s}$ , 说明 EA 对 BSA 猝灭的主要原因是形成了 EA-BSA 复合物, 猝灭机理为静态猝灭。

表 1 不同温度下 EA 与 BSA 相互作用的  $K_{sv}$  和  $K_q$  (pH=7.4)

Table 1  $K_{sv}$  and  $K_q$  of the interaction between EA and BSA at different temperatures (pH=7.4)

$T/^\circ\text{C}$	方程	$K_{sv}/\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$	$K_q/\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	$R^2$
25	$Y=0.2363x+0.6899$	$2.36 \times 10^5$	$2.36 \times 10^{13}$	0.9948
31	$Y=0.2508x+0.6200$	$2.51 \times 10^5$	$2.51 \times 10^{13}$	0.9837
37	$Y=0.2600x+0.6130$	$2.60 \times 10^5$	$2.60 \times 10^{13}$	0.9738

2.2.3 EA 与 BSA 相互作用的结合常数和结合位点 由图 4 和表 2 得, 25, 31, 37 °C 时 EA 与 BSA 结合的  $K_A$  值分别为  $1.24 \times 10^8$ ,  $3.37 \times 10^7$ ,  $1.84 \times 10^7 \text{ L/mol}$ , 结合强度高。3 种温度结合位点数  $n$  均接近 1.5, 推断 EA 与 BSA 以 1.5:1 的比例结合, 此结合比例在络合反应推断的结合范围内, 与紫外结果对应。

2.2.4 EA 与 BSA 的相互作用力 由表 3 知,  $\Delta G < 0$ , 说明生成 EA-BSA 复合物是自发的;  $\Delta H < 0$  且  $\Delta S < 0$ , 说明反应放热, 作用力主要表现为范德华力和氢键<sup>[25]</sup>, 这与王军等<sup>[26]</sup>研究柠檬黄与牛血清蛋白以及王晓霞等<sup>[27]</sup>研究美满霉素与牛血清蛋白的相互作用所得到的结果一致。但是考虑到

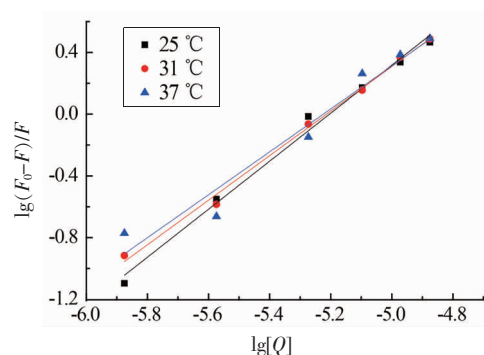


图 4 不同温度下 EA 和 BSA 相互作用的双对数图 (pH=7.4)

Fig.4 Double logarithmic plot of interaction between EA and BSA at different temperatures (pH=7.4)

表2 不同温度下EA与BSA相互作用的 $K_A$ 和 $n$  (pH=7.4)Table 2  $K_A$  and  $n$  of the interaction between EA and BSA at different temperatures (pH=7.4)

$T/^\circ\text{C}$	方程	$K_A/\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$	$n$	$R^2$
25	$Y=1.5554x+8.0942$	$1.24\times 10^8$	1.56	0.9897
31	$Y=1.4430x+7.5270$	$3.37\times 10^7$	1.44	0.9946
37	$Y=1.3905x+7.2646$	$1.84\times 10^7$	1.39	0.9457

表3 EA与BSA相互作用的热力学参数 (pH=7.4)

Table 3 Thermodynamic parameters of the interaction between EA and BSA (pH=7.4)

$T/^\circ\text{C}$	$\Delta H/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta G/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta S/\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$
25		-46.17	
31	-163.38	-43.81	-393.33
37		-43.11	

BSA的复杂结构及EA的多酚羟基,应结合多种分析技术进一步详细分析两者之间的相互作用。

### 2.3 EA与BSA相互作用的红外光谱分析

蛋白质二级结构的变化通常通过酰胺I带拉伸( $1700\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ , C=O的肽键)和酰胺II带移位( $1600\sim 1500\text{ cm}^{-1}$ , N-H弯曲和C-N拉伸)解释<sup>[28]</sup>。因此,这两个条带作为蛋白二级结构的指纹区域,可以通过它们的光谱位移和强度变化来研究蛋白与多酚之间的相互作用<sup>[29]</sup>。BSA与EA结合前后的结构变化如图5所示,BSA的酰胺I带和

酰胺II带的位置分别在 $1651\text{ cm}^{-1}$ 和 $1540\text{ cm}^{-1}$ ,在添加EA后,EA-BSA的酰胺I带和酰胺II带的位置分别移位到 $1622\text{ cm}^{-1}$ 和 $1581\text{ cm}^{-1}$ 。通过酰胺I带和酰胺II带的位移,可以推断EA与BSA相互作用引起了BSA的C=O, C-N和N-H等化学键的变化,从而引起BSA二级结构的变化。同时,BSA的特征峰之一的 $3303\text{ cm}^{-1}$ (酰胺A带,主要是C-N拉伸、N-H的伸缩振动和氢键)<sup>[30-31]</sup>的变化也表明氢键和疏水相互作用参与EA与BSA结合的过程<sup>[32]</sup>。

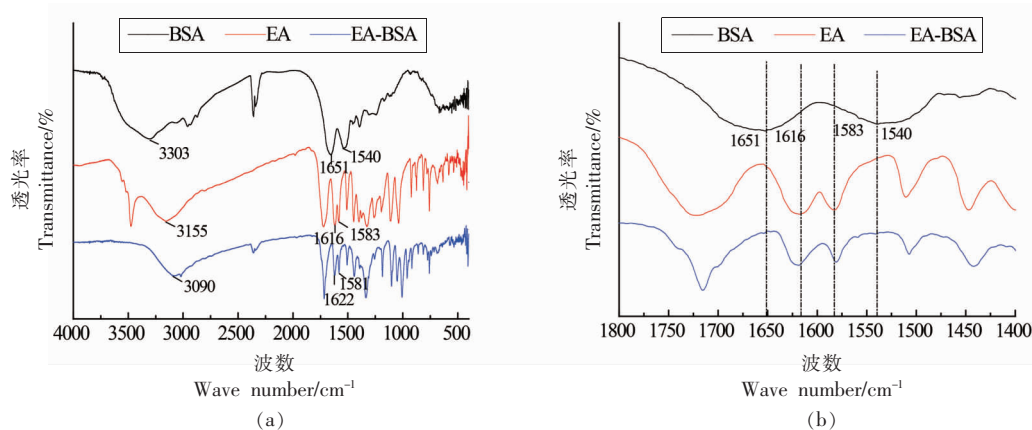


图5 EA与BSA相互作用的傅里叶红外光谱图

Fig.5 The FT-IR spectra of the interaction between EA and BSA

### 2.4 EA与BSA相互作用的圆二色谱分析

圆二色谱可以检测蛋白质空间结构变化,定量分析多酚和蛋白相互作用对蛋白二级结构的变化。BSA与EA结合前后的结构变化如图6所示,

BSA在 $192\text{ nm}$ 处存在明显的正峰,在 $210\text{ nm}$ 处存在较小的负峰,说明BSA存在 $\alpha$ -螺旋结构;当添加EA后,BSA的二级结构发生明显变化。根据CD数据计算,游离BSA含有约70.6%的 $\alpha$ -螺

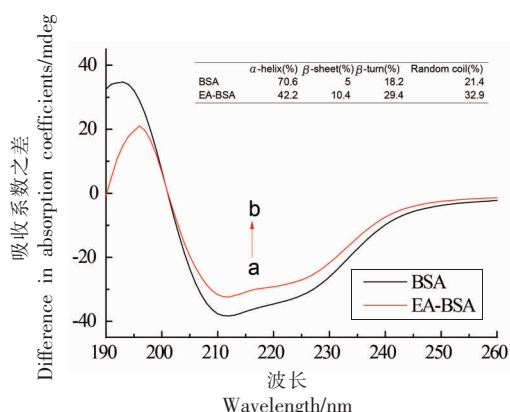


图 6 EA 与 BSA 相互作用的圆二色谱图

Fig.6 The CD spectra of of the interaction between EA and BSA

旋,5%的 $\beta$ -折叠,18.2%的 $\beta$ -转角和21.4%的无规则卷曲。BSA与EA相互作用后, $\alpha$ -螺旋结构减小,其余结构增加,而 $\alpha$ -螺旋 $\beta$ -折叠结构需要氢键稳定<sup>[28]</sup>,猜测是因为EA结合到BSA的疏水区域中,并诱导BSA的多肽链二级结构单元间的氢键发生重排,从而得到更稳定的构象,王晓霞等<sup>[27]</sup>

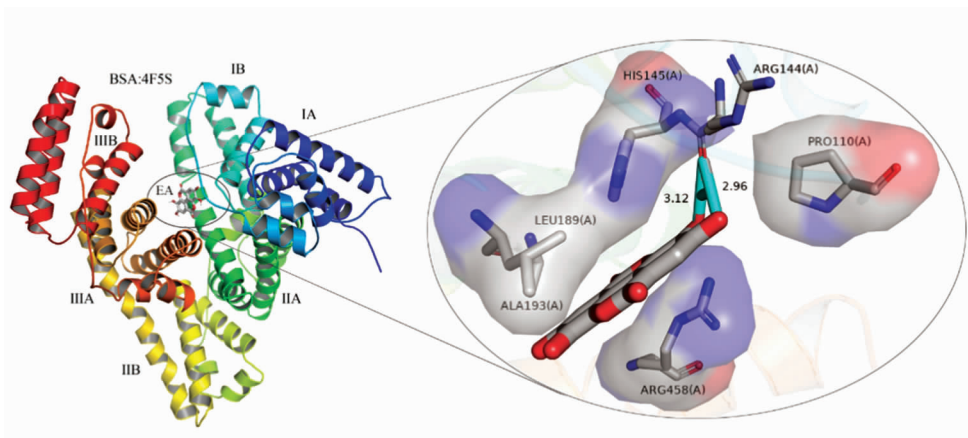


图 7 EA 和 BSA 对接三维图以及 EA 分子周围氨基酸分布图

Fig.7 The 3D diagram of docking between EA and BSA and the distribution of amino acids around the EA

### 3 结论

试验利用多光谱法和分子对接模拟技术深入探究了EA与BSA的相互作用。多种光谱学方法结果表明EA通过静态猝灭与BSA形成复合物,结合比例为1.5:1,反应自发进行,两者主要靠范德华力和氢键形成稳定的复合物;EA的加入对BSA的酰胺峰带有影响,同时影响BSA的二级结

也得出了类似的结论。

### 2.5 EA 与 BSA 相互作用的分子对接模拟

从图7中可以看出,EA在BSA上的最佳结合位点位于亚结构域IIA与亚结构域IIIA之间的疏水空腔内,距离IIA即强结合位点site I更近,BSA蛋白分子能够提供足够的空间来容纳EA分子,与EA距离4 nm之内的BSA蛋白残基共有6个。由图8可进一步观察EA与BSA蛋白残基之间的相互作用,EA和氨基酸残基(His145、Pro110、Arg458、Leu189、Ala193)之间发生疏水相互作用,从而减少了水的介入,有助于EA与BSA形成稳定的复合物。同时,EA和氨基酸残基(Arg144)形成两个氢键,键长分别为3.12,2.96 nm,多条氢键也加强了两者的结合稳固性。对接结果形象地表明主导EA和BSA结合的作用力除范德华力和氢键以外,还有一定的疏水作用力,证实了前面光谱试验的准确性。分子对接从理论上分析了结合的位点及相互作用力类型<sup>[33]</sup>,为试验提供了结构信息。

构,导致BSA中部分 $\alpha$ -螺旋结构转化为 $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角和无规则卷曲结构,疏水作用力也可能是EA与BSA的作用力之一。分子对接模拟结果验证了上述光谱实验的分析结果,EA与BSA主要通过范德华力、氢键和疏水作用力相互作用,并发现EA在BSA的最佳结合位点位于BSA的疏水空腔内,距离site I更近。

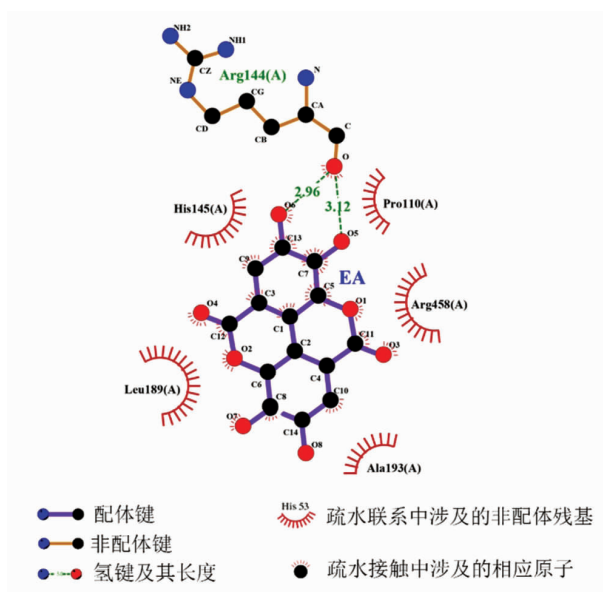


图8 EA分子与BSA氨基酸残基间相互作用平面示意图

Fig.8 The 2D diagram of the interaction between EA and BSA amino acid residues

### 参 考 文 献

- 陆晶晶, 丁轲, 杨大进. 保健品功能因子鞣花酸研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(21): 451-454.  
LU J J, DING K, YANG D J. Research progress on functional factor ellagic acid in health products [J]. Food Science, 2010, 31(21): 451-454.
- 崔珊珊, 毕凯媛, 吴杰, 等. 响应面法优化树莓鞣花酸提取工艺及其体外抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2019, 40(1): 149-155, 161.  
CUI S S, BI K Y, WU J, et al. Optimization of extraction process of ellagic acid from raspberry and its antioxidant activity *in vitro* by response surface methodology[J]. Food Industry Technology, 2019, 40(1): 149-155, 161.
- 张元梅, 张群英. 树莓酚类物质及其生物活性研究进展[J]. 南方农业, 2020, 14(4): 28-31.  
ZHANG Y M, ZHANG Q Y. Research progress on phenolic substances and their biological activities in raspberry [J]. Southern Agriculture, 2020, 14(4): 28-31.
- 杨洪亮, 张翼鸞, 王晓芳, 等. 鞣花酸对肿瘤细胞增殖抑制和诱导凋亡作用的初步研究[J]. 赤峰学院学报(自然科学版), 2010, 26(10): 49-51.  
YANG H L, ZHANG Y Z, WANG X F, et al. Preliminary study on the effects of ellagic acid on tumor cell proliferation inhibition and apoptosis induction [J]. Journal of Chifeng University (Natural Science Edition), 2010, 26(10): 49-51.
- SOHN E H, KOO H J, HANG D T, et al. Protective effects of ellagic acid on ethanol-induced toxicity in hepatic HepG2 cells[J]. Molecular & Cellular Toxicology, 2013, 9(3): 249-256.
- AL-KHARUSI N, BABIKER H A, AL-SALAM S, et al. Ellagic acid protects against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats: a dose-dependent study [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2013, 17(3): 299-310.
- 李庆舒, 程琳, 邓红, 等. 三种多酚与牛血清蛋白相互作用的初步研究[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(3): 180-187.  
LI Q S, CHENG L, DENG H, et al. Preliminary study on the interaction of three polyphenols with bovine serum albumin[J]. Food and Fermentation Industry, 2020, 46(3): 180-187.
- 李春翼, 田勇, 杨雅轩, 等. 植物多酚与蛋白质作用机制表征方法研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(13): 262-268.  
LI C Y, TIAN Y, YANG Y X, et al. Research progress on characterization methods of plant polyphenols and protein interaction mechanism [J]. Food and Fermentation Industry, 2019, 45(13): 262-268.
- GELAMO E L, SILVA C, IMASATO H, et al. Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: spectroscopy and modelling[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 2002, 1594(1): 84-99.
- BASU A, KUMAR G S. Thermodynamics of the interaction of the food additive tartrazine with serum albumins; A microcalorimetric investigation[J]. Food Chemistry, 2015, 175(2): 137-142.
- 刘夫国, 马翠翠, 王迪, 等. 蛋白质与多酚相互作用研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(2): 282-288.  
LIU F G, MA C C, WANG D, et al. Research progress on the interaction between protein and polyphenols [J]. Food and Fermentation Industry, 2016, 42(2): 282-288.

- [12] WANG R, LIU Y Y, HU X, et al. New insights into the binding mechanism between osthole and  $\beta$ -lactoglobulin; Spectroscopic, chemometrics and docking studies[J]. Food Research International, 2019, 120: 226–234.
- [13] 董婉, 黎振球, 张培芳. 利用紫外分光光度法分析几种中药多酚与蛋白质反应[J]. 轻工科技, 2014, 30(4): 106–107.  
DONG W, LI Z Q, ZHANG P F. Analysis of the reaction between several traditional Chinese medicine polyphenols and proteins by UV spectrophotometry[J]. Light Industry Technology, 2014, 30(4): 106–107.
- [14] 王彦卿, 张红梅, 张根成. 荧光光谱法研究黄藤素与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 分析测试学报, 2006, 25(5): 48–51.  
WANG Y Q, ZHANG H M, ZHANG G C. Fluorescence spectrometry to study the interaction between paclitaxel and bovine serum albumin[J]. Journal of Analytical Testing, 2006, 25(5): 48–51.
- [15] WU X, WU H, LIU M, et al. Analysis of binding interaction between (–)-epigallocatechin (EGC) and  $\beta$ -lactoglobulin by multi-spectroscopic method [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2011, 82(1): 164–168.
- [16] WANG Q, ZHANG X, ZHOU X, et al. Interaction of different thiol-capped CdTe quantum dots with bovine serum albumin[J]. Journal of Luminescence, 2012, 132(7): 1695–1700.
- [17] MILES A J, RAMALLI S G, WALLACE B A. DichroWeb, a website for calculating protein secondary structure from circular dichroism spectroscopic data[J]. Protein Science, 2022, 31(1): 37–46.
- [18] SREERAMA N, WOODY R W. A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism[J]. Analytical Biochemistry, 1993, 209(1): 32–44.
- [19] SREERAMA N, VENYAMINOV S Y U, WOODY R W. Estimation of the number of  $\alpha$ -helical and  $\beta$ -strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy[J]. Protein Science, 1999, 8(2): 370–380.
- [20] TROTT O, OLSON A J. Software News and Update Auto Dock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading[J]. Journal of Computational Chemistry, 2010, 31(2): 455–461.
- [21] 范金波, 安佳鑫, 麻奥, 等. 荧光光谱法结合分子对接探究咖啡酸与牛血清白蛋白相互作用机制[J]. 包装与食品机械, 2020, 38(5): 6–12.  
FAN J B, AN J X, MA A, et al. Fluorescence spectroscopy combined with molecular docking to explore the interaction mechanism between caffeic acid and bovine serum albumin[J]. Packaging and Food Machinery, 2020, 38(5): 6.
- [22] LASKOWSKI R A, SWINDELLS M B. LigPlot+ : multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery [J]. Journal of Chemical Information and Modeling, 2011, 51(10): 2778–2286.
- [23] LI T, HU P, DAI T, et al. Comparing the binding interaction between  $\beta$ -lactoglobulin and flavonoids with different structure by multi-spectroscopy analysis and molecular docking [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2018, 201: 197–206.
- [24] DAN Q, XIONG W, LIANG H, et al. Characteristic of interaction mechanism between  $\beta$ -lactoglobulin and nobiletin: A multi-spectroscopic, thermodynamics methods and docking study [J]. Food Research International, 2019, 120: 255–263.
- [25] ROSS P D, SUBRAMANIAN S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability[J]. Biochemistry, 1981, 20(11): 3096–3102.
- [26] 王军, 王周利, 程晶晶. 多光谱法结合分子对接研究柠檬黄与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 光谱学与光谱分析, 2022, 42(3): 904–909.  
WANG J, WANG Z L, CHENG J J. Multispectral method combined with molecular docking to study the interaction between tartrazine and bovine serum albumin[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2022, 42(3): 904–909.
- [27] 王晓霞, 聂智华, 马力通, 等. 多光谱法和分子对接模拟法研究美满霉素与牛血清白蛋白的相互作用 [J]. 光谱学与光谱分析, 2020, 40(5): 1503–1508.  
WANG X X, NIE Z H, MA L T, et al. Multi-spectral method and molecular docking simulation method to study the interaction between minocycline and bovine serum albumin [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2020, 40(5): 1503–1508.
- [28] BOURASSA P, BARIYANGA J, TAJMIR-RIAAHI H A. Binding sites of resveratrol, genistein, and curcumin with milk alpha- and beta-caseins[J]. Journal



- of Physical Chemistry B, 2013, 117(5): 1287–1295.
- [29] CONDUCT L, KAUR J, HUNG A, et al. Combined spectroscopic, molecular docking and quantum mechanics study of  $\beta$ -casein and ferulic acid interactions following UHT-like treatment[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 89: 351–359.
- [30] GÜLER G, VOROB'EV M M, VOGEL V, et al. Proteolytically-induced changes of secondary structural protein conformation of bovine serum albumin monitored by Fourier transform infrared (FT-IR) and UV-circular dichroism spectroscopy[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2016, 161: 8–18.
- [31] 黄国, 陈骐, 池云峰, 等. 矢车菊素-3-葡萄糖苷与大豆蛋白相互作用的多重光谱分析及分子对接[J]. 食品科学, 2022, 43(22): 24–33.
- HUANG G, CHEN Q, CHI Y F, et al. Multiple spectral analysis and molecular docking of the interaction of cornflower-3-glucoside with soy protein[J]. Food Science, 2022, 43(22): 24–33.
- [32] YANG Y X, WANG Q M, LEI L, et al. Molecular interaction of soybean glycinin and  $\beta$ -conglycinin with (-)-epigallocatechin gallate induced by pH changes[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 108: 106010.
- [33] 金丽虹, 王梦欣, 周雅静, 等. 光谱法及分子模拟研究青蒿素与小牛胸腺 DNA 的相互作用[J]. 发光学报, 2018, 39(12): 1765–1771.
- JIN L H, WANG M X, ZHOU Y J, et al. Spectroscopic and molecular simulation studies on the interaction between artemisinin and calf thymus DNA[J]. Luminescence Acta Sinica, 2018, 39(12): 1765–1771.

### Studies on Ellagic Acid with Bovine Serum Albumin Interaction Using Multispectral and Molecular Docking Simulation

Ni Dan<sup>1</sup>, Jiang Xinyuan<sup>2\*</sup>, Pang Yahui<sup>2</sup>, Zeng Shengnan<sup>2</sup>, Tang Yulian<sup>2</sup>, He Siyi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>College of Science, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004

<sup>2</sup>College of Materials Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004

**Abstract** Ellagic acid (EA) is a natural polyphenol with antioxidant, anti-cancer, anti-mutation, anti-inflammatory and other physiological activities. The interaction between ellagic acid and protein will directly affect its transport and metabolism in the human body. In this paper, a variety of spectroscopic methods and molecular docking simulation methods were used to study the reaction mechanism of the interaction between EA and bovine serum albumin (BSA). The results of UV spectroscopy and fluorescence spectroscopy showed that EA quenched the endogenous fluorescence of BSA in a static manner, EA and BSA combined to form a stable complex through BSA, resulting in the decrease of  $\alpha$ -helix structure and the increase of  $\beta$ -sheet,  $\beta$ -turn and random coil structure in BSA. There may be hydrophobic interactions between them. Molecular docking simulation further verifies the results of the above spectral analysis, which shows that in addition to the van der Waals force and hydrogen bond, the dominant force for the binding of EA and BSA also has a certain hydrophobic force. The optimal binding site of EA on BSA is located in the hydrophobic cavity between subdomain IIA and subdomain IIIA, which is closer to site I. There are hydrophobic interactions between EA and residues such as His145, Pro110, and Arg458, and there are hydrogen bonds between residues of EA and Arg144. This study clarified the molecular mechanism of the interaction between EA and BSA, and provided useful information for the study of EA transport and metabolism *in vivo*.

**Keywords** ellagic acid; bovine serum albumin; multispectral method; molecular docking; interaction mechanism