

迷迭香酸对大肠杆菌 L-天冬酰胺酶的激活及 亚铁离子对迷迭香酸的抗菌增效作用

李明喆¹ 刘晓倩¹ 邵楠² 李荣贵^{1*}

(1. 青岛大学生物系 山东 青岛 266071)

(2. 浙江大学竺可桢学院 浙江 杭州 310058)

摘要: 研究了迷迭香酸对大肠杆菌 L-天冬酰胺酶促反应动力学的影响, 结果表明, 迷迭香酸能降低天冬酰胺酶的表现米氏常数, 是该酶的激活剂; 亚铁离子能显著促进迷迭香酸的抗菌活性, 吸收光谱分析显示, 迷迭香酸与亚铁离子存在直接的相互作用, 二者的结合比为 1:1。

关键词: 迷迭香酸, L-天冬酰胺酶, 亚铁离子, 抗菌活性, 结合比

Activation of L-Asparaginase in *Escherichia coli* by Rosmarinic Acid and Effect of Ferrous Ions on the Increasing Antibacterial Activity of Rosmarinic Acid

LI Ming-Zhe¹ LIU Xiao-Qian¹ SHAO Nan² LI Rong-Gui^{1*}

(1. Department of Biology, Qingdao University, Qingdao, Shandong 266071, China)

(2. Chu Kochen Honors College, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China)

Abstract: Effect of rosmarinic acid on the kinetics of L-asparaginase catalyzed reaction was studied. The result showed that rosmarinic acid could reduce the apparent kinetic parameters (apparent Michaelis-Menten constant, K_{mapp}) of the enzyme, which indicated that rosmarinic acid was an activator of L-asparaginase. Ferrous ions could increase the antibacterial activity of rosmarinic acid. Absorption spectra analysis indicated that there existed a direct interaction between rosmarinic acid and ferrous ions, with a mole ratio of 1:1.

Keywords: Rosmarinic Acid, L-Asparaginase, Ferrous ions, Antibacterial activity, Binding ratio

迷迭香酸(Rosmarinic acid, 简称 RosA)是一种天然的酚酸化合物, 最早于1958年由Ellis在迷迭香中分离提取, 因而得名。RosA广泛存在于唇形花科和紫草科植物中^[1]。RosA的药理功能丰富, 有抗炎、抗氧化、抗菌、抗病毒、抗凋亡、抗凝集、抗过敏、

抗抑郁、抗辐射的作用^[2-6], RosA对黄嘌呤氧化酶的抑制作用使其有可能成为治疗高尿酸血症和痛风的药物^[7], RosA还在抗肾炎、肺炎、肝炎、关节炎; 抗癌; 抗血栓, 抗抑郁治疗过敏性疾病(如过敏性哮喘)等领域有良好的应用前景。由于其抗氧化活性、抗

紫外线能力, 抑制弹性蛋白的降解和增加细胞膜的稳定性等特性, 可使其成为优质的化妆品添加剂^[8]。

迷迭香酸是一种广谱性的抗菌化合物, 已知对属于革兰氏阴性细菌的大肠杆菌、属于革兰氏阳性细菌的金黄色葡萄球菌以及多种植物病原真菌均有不同程度的抑制作用^[3,4]。孙岫等研究证实迷迭香酸能增加细菌细胞膜的通透性, 导致蛋白质、氨基酸等物质外泄, 抑制 *Taq* DNA 聚合酶的活性, 改变胞内蛋白质的代谢, 从而导致代谢紊乱而发挥其对细菌的抑制作用^[9]。共聚焦扫描成像结果显示, 迷迭香酸处理黑曲霉(*Aspergillus niger*)菌丝可导致其细胞骨架受损、细胞间隔解体、细胞表面扭曲和多细胞核过渡期的出现^[10]。这些结果暗示微生物细胞中可能存在多个迷迭香酸作用的靶点。

L-天冬酰胺酶(L-Asparaginase; EC3.5.1.1)是生物体中普遍存在的一种酶, 催化天冬酰胺水解产生天冬氨酸和氨, 在大肠杆菌中为胞内酶^[11], 该酶在维持细胞内氨水平的平衡方面发挥着重要作用, 而 Fe^{2+} 是维持大肠杆菌正常生长代谢所必需的金属离子。本文研究了迷迭香酸对大肠杆菌 L-天冬酰胺酶促反应的动力学以及 Fe^{2+} 对迷迭香酸的抗菌活性的影响, 以期揭示迷迭香酸的抗菌机理与应用研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

迷迭香酸购自 Aldrich 公司, 纯度大于 97%; 大肠杆菌[E. coli BL21(DE3)]购自 Novagen 公司, 由本实验室保存, AB-8 大孔吸附树脂购自南开大学化工厂, 其它试剂均为国产分析纯。

1.2 L-天冬酰胺酶的提取

参照文献^[12]进行。大肠杆菌单菌落接种入 50 mL LB 培养液中于 37°C 振荡培养过夜, 培养物于 4°C 条件下 10000 r/min 离心 2 min, 收集菌体; 10 mL TE 缓冲液(50 mmol/L Tris-Cl, 1 mmol/L EDTA, pH 7.4)重悬浮菌体, 10000 r/min 离心 2 min, 去上清, 洗去培养基; 加入 5 mL 冰冷的 TE 缓冲液悬浮细胞, 超声波破碎细胞, 细胞裂解液于 4°C, 10000×g 离心 15 min, 上清液即为酶的粗提取液。

1.3 迷迭香酸对 L-天冬酰胺酶活性的影响

天冬酰胺酶活性测定参考史雅珍等的方法^[13], 并作了修改。样品组反应体系中含 TE 缓冲液 0.7 mL、

一定浓度的天冬酰胺溶液 0.1 mL、粗酶 0.1 mL、一定浓度迷迭香酸溶液 0.1 mL, 45°C 水浴加热 10 min, 加入 0.1 mL 20%三氯乙酸终止反应。相应的对照组依次加入 TE 缓冲液 0.7 mL、天冬酰胺溶液 0.1 mL、迷迭香酸溶液 0.1 mL、20%三氯乙酸 0.1 mL、粗酶 0.1 mL。反应体系 10000 r/min 离心 5 min 后加 0.3 mL AB-8 大孔树脂悬浮液, 充分振荡 20 min 后 10000 r/min 离心 5 min 以去除溶液中的迷迭香酸, 避免对随后检测的影响, 分别取样品组、对照组上清 110 μL 于 4.89 mL 蒸馏水中, 加 0.1 mL Nessler 试剂, 振荡使之充分混匀后于 395 nm 处测定吸光度, 以 NH_4Cl 为标准, 计算氨离子浓度, 酶促反应速度(V)以每分钟产生的游离氨的微摩尔数($\mu\text{mol}/\text{min}$)表示。

1.4 Fe^{2+} 对迷迭香酸抑菌效果的影响

用乙酸-乙酸钠缓冲液(50 mmol/L, pH 4.4)分别配制浓度为 18 mmol/L、9.0 mmol/L、2.3 mmol/L、0.58 mmol/L、0.13 mmol/L 迷迭香酸溶液及等摩尔浓度的 FeSO_4 溶液。取过夜培养的大肠杆菌菌悬液 200 μL 加至无菌平皿($\Phi 9$ cm)中, 立即倒入 15 mL 融化后冷却至 45°C 左右的 LB 培养基, 混匀后待凝; 在凝固的平板上打直径 5 mm 的孔穴, 再分别加入 20 μL 不同浓度的迷迭香酸溶液、 FeSO_4 溶液以及等体积迷迭香酸与 FeSO_4 的混合溶液, 每一处理重复 3 次。于 37°C 恒温培养箱内培养 24 h 后测定抑菌圈直径大小表示其抗菌活性, 每个抑菌圈十字交叉测量 2 次直径, 以其均数代表测得的抑菌圈大小, 实际抑菌圈直径=测得抑菌圈直径-孔径。

1.5 迷迭香酸与 Fe^{2+} 的结合比的测定

取浓度为 1.0 mmol/L 迷迭香酸溶液 200 μL , 分别与 pH 为 3.6、4.5、5.6、6.5 的不同浓度的 Fe_2SO_4 溶液(0.1 mol/L 乙酸-乙酸钠缓冲液配制)混匀, 使迷迭香酸与 FeSO_4 的摩尔比从 8:1 至 1:5, 蒸馏水定容至 4 mL, 于 260 nm~380 nm 范围内测定溶液的吸收光谱, 求结合比^[14,15]。

2 结果

2.1 迷迭香酸对 L-天冬酰胺酶的抑制动力学

实验发现, 随着反应体系中的迷迭香酸浓度的增加, 单位时间内产生的氨量逐渐增加, 说明迷迭香酸对大肠杆菌 L-天冬酰胺酶具有明显的激活作用, 以反应速度($\mu\text{mol}/\text{min}$)的倒数对底物浓度(mol/L)的倒数进行作图, 结果如图 1 所示, 反应体系没有迷

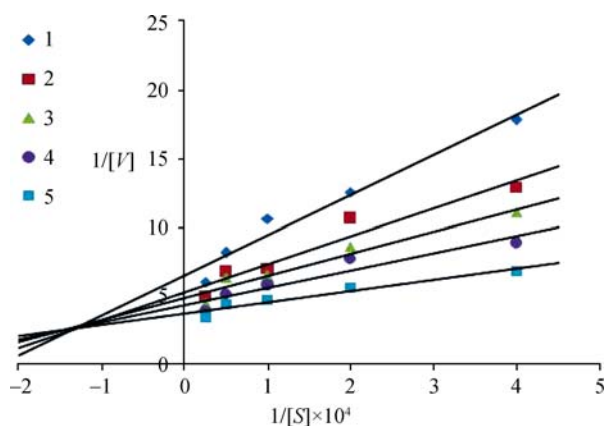


图1 迷迭香酸对L-天冬酰胺酶促反应动力学的影响
Fig. 1 Effect of rosmarinic acid on the kinetics of reaction catalyzed by L-asparaginase

注: 1-5: 迷迭香酸的浓度分别为 $0, 0.375 \times 10^{-4}$ g/mL, 0.75×10^{-4} g/mL, 1.5×10^{-4} g/mL, 3×10^{-4} g/mL.

Note: 1-5: The concentrations of rosmarinic acid were $0, 0.375 \times 10^{-4}$ g/mL, 0.75×10^{-4} g/mL, 1.5×10^{-4} g/mL, 3×10^{-4} g/mL, respectively.

迭香酸时, L-天冬酰胺酶的表观米氏常数为 0.44642

$\times 10^{-4}$, 与已报道大肠杆菌的L-天冬酰胺酶的 K_m 类似^[16], 当体系中迷迭香酸浓度分别为 0.375×10^{-4} g/mL、 0.75×10^{-4} g/mL、 1.5×10^{-4} g/mL、 3.0×10^{-4} g/mL 时, L-天冬酰胺酶的表现米氏常数分别为 0.38297×10^{-4} 、 0.32515×10^{-4} 、 0.28539×10^{-4} 和 0.21888×10^{-4} , 随着迷迭香酸浓度的提高, L-天冬酰胺酶的表现米氏常数逐渐降低, 说明迷迭香酸在其较低浓度时就具有显著的促进作用。

2.2 Fe^{2+} 对迷迭香酸抑菌效果的影响

抗菌活性分析表明, 当浓度达到 2.3 mmol/L 时, 迷迭香酸溶液对大肠杆菌有较明显的抑制作用, 当 $FeSO_4$ 浓度达到 9.0 mmol/L 时, 也表现出一定的抗菌活性, 而低于此浓度, 二者分别测定的抗菌活性不明显, 当等摩尔浓度的 $FeSO_4$ 溶液和迷迭香酸溶液按 1:1(V/V)混合, 二者浓度分别为 0.29 mmol/L 时, 即有明显的抗菌活性(图 2, 表 1), 说明亚铁离子对迷迭香酸具有抗菌增效作用。

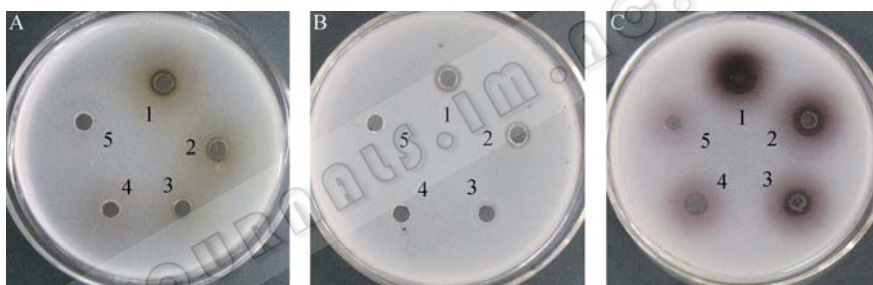


图2 Fe^{2+} 离子对迷迭香酸的抗菌增效作用

Fig. 2 The increasing antibacterial effect of ferrous ions on rosmarinic acid

注: A: 迷迭香酸; B: 硫酸亚铁; C: 迷迭香酸和硫酸亚铁. A 和 B 1-5: 浓度分别为 18 mmol/L、 9.0 mmol/L、 2.3 mmol/L、 0.58 mmol/L、 0.13 mmol/L; C 1-5: 浓度分别为 9 mmol/L、 4.5 mmol/L、 1.1 mmol/L、 0.29 mmol/L、 0.065 mmol/L.

Note: A: Rosmarinic acid; B: $FeSO_4$; C: Rosmarinic acid and $FeSO_4$. 1-5 for Panel A and B: 18 mmol/L, 9.0 mmol/L, 2.3 mmol/L, 0.58 mmol/L, 0.13 mmol/L, respectively; 1-5 for Panel C: 9 mmol/L, 4.5 mmol/L, 1.1 mmol/L, 0.29 mmol/L, 0.065 mmol/L, respectively.

2.3 Fe^{2+} 与迷迭香酸的摩尔比对溶液吸收光谱的影响

当体系 pH 为 5.4 时, Fe^{2+} 、迷迭香酸及 Fe^{2+} 与迷迭香酸等摩尔比的紫外扫描结果如图 3 所示. 随着 Fe^{2+} 和迷迭香酸的摩尔比的变化, 反应体系的紫外吸收光谱也有明显地改变, 其特征吸收峰发生红移, 从而证明迷迭香酸与 Fe^{2+} 发生了反应。

2.4 Fe^{2+} 与迷迭香酸结合比的测定

各 pH 乙酸-乙酸钠缓冲液 260 nm~ 380 nm 的紫外波长范围无明显吸收, 故选择 260 nm~ 380 nm 为结合比测定的扫描范围. 扫描得 RosA 最大吸收峰

在 325 nm 附近, 因此选择在 325 nm 处测定 RosA 与 Fe^{2+} 的结合比. 在各 pH 条件下, 以 RosA 在 325 nm 处的吸光度值为纵坐标, 以 Fe^{2+} 与 RosA 的摩尔比 ($C_{Fe^{2+}}/C_{RosA}$)为横坐标作图, 曲线拐点处两者的摩尔比即为 RosA 与 Fe^{2+} 的结合比率. 不同浓度 Fe^{2+} 与 RosA 溶液的吸光度如图 4 所示, 在 pH 3.6 时, 改变 Fe^{2+} 与迷迭香酸的摩尔比, 反应体系在 325 nm 处吸光度没有明显变化, 说明在此 pH 条件下, Fe^{2+} 与迷迭香酸没有发生结合反应. 当体系 pH 为 4.5 、 5.6 、 6.5 、 7.6 且 $C_{Fe^{2+}}/C_{RosA}$ 为 1 时, 曲线出现拐点, 说明 RosA 与 Fe^{2+} 是以 $1:1$ 结合的. 随着 pH 升高, 反应体

表 1 不同浓度迷迭香酸与铁离子的抑菌圈直径(mm)
Table 1 The diameters of inhibition zones with different concentrations of rosmarinic acid and ferrous ion (mm)

编号 Item No	图 2 A A	图 2 B B	图 2 C C
1	1.97	2.67	4.73
2	1.10	1.43	3.33
3	0.33	0.13	1.93
4	0	0	0.13
5	0	0	0

注: A: 迷迭香酸; B: 硫酸亚铁; C: 迷迭香酸和硫酸亚铁。图 2 A 和图 2 B 1-5: 浓度分别为 18 mmol/L、9.0 mmol/L、2.3 mmol/L、0.58 mmol/L、0.13 mmol/L; 图 2 C 1-5: 浓度分别为 9 mmol/L、4.5 mmol/L、1.1 mmol/L、0.29 mmol/L、0.065 mmol/L。

Note: A: Rosmarinic acid; B: FeSO₄; C: Rosmarinic acid and FeSO₄. 1-5 for Panel A and B: 18 mmol/L, 9.0 mmol/L, 2.3 mmol/L, 0.58 mmol/L, 0.13 mmol/L, respectively; 1-5 for Panel C: 9 mmol/L, 4.5 mmol/L, 1.1 mmol/L, 0.29 mmol/L, 0.065 mmol/L, respectively.

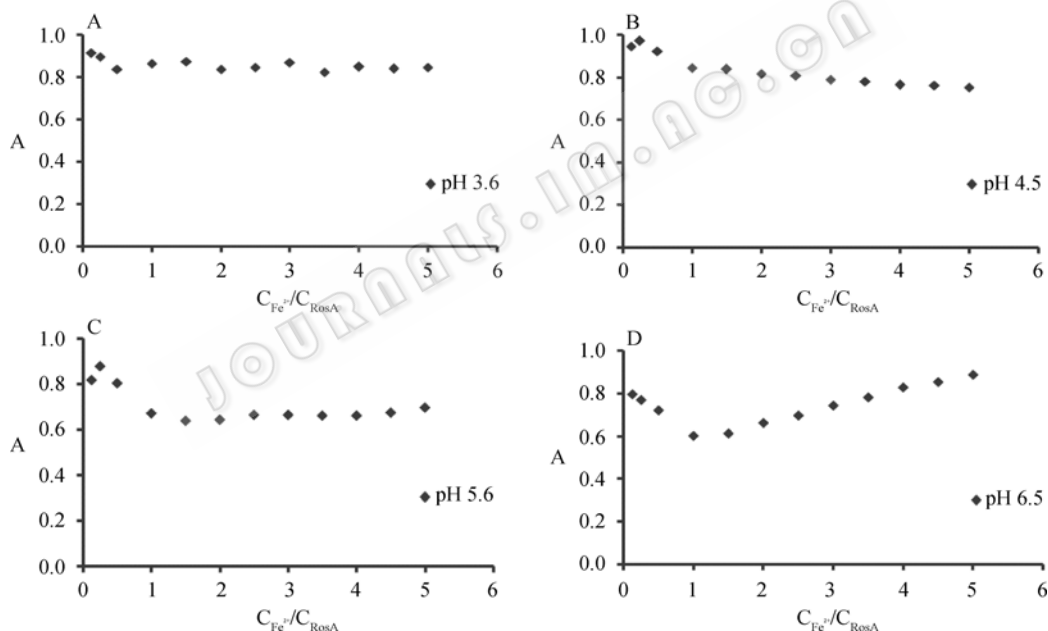


图 4 Fe²⁺与迷迭香酸摩尔比对体系吸光度的影响

Fig. 4 Effect of ratio of Fe²⁺/RosA on the absorbance of rosmarinic acid-Fe²⁺ system

Note: A: pH 3.6; B: pH 4.5; C: pH 5.6; D: pH 6.5.

3 讨论

已有的研究表明, 迷迭香酸是一种广谱的抗菌成分, 该成分能增加细菌细胞膜的通透性, 本研究发现迷迭香酸进入大肠杆菌细胞内, 可能直接提高了胞内酶 L-天冬酰胺酶的活性, 加速天冬酰胺分解, 一方面减少了大肠杆菌合成蛋白质所必需的原料, 另一方面又提高了胞内的氮含量, 进而引起胞内代

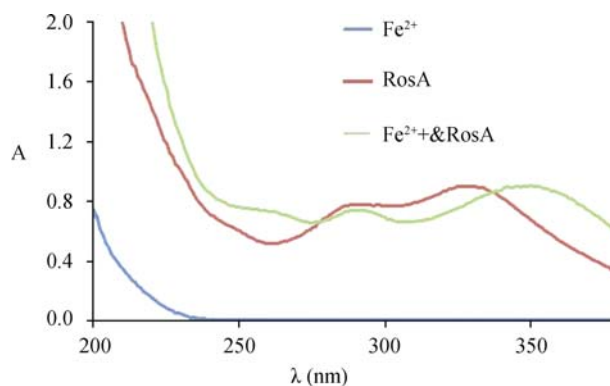


图 3 Fe²⁺离子与迷迭香酸摩尔比对反应体系吸收光谱的影响

Fig. 3 Effect of ferrous ions on the absorption spectra of rosmarinic acid-Fe²⁺ system

系的吸光度变化更加明显, 说明随着 pH 升高这种结合反应也更趋于完全。

谢紊乱并导致大肠杆菌的死亡。我们实验中还发现, 迷迭香酸与亚铁离子结合后能显著提高其抗菌活性, 但迷迭香酸亚铁是否也能作用于 L-天冬酰胺酶这个靶点上, 尚需作进一步研究。

另外, 在临床使用 L-天冬酰胺酶治疗癌症的过程中, 常常引起一些副作用, 从轻度的过敏反应到危险的过敏性休克和血栓栓塞、胰腺炎等^[17], 这与细菌蛋白引起的免疫反应有关, 这种不良反应限制

了L-天冬酰胺酶在治疗方面的应用。减弱免疫反应则有利于L-天冬酰胺酶作为治疗癌症药物的应用。微量迷迭香酸能显著激活L-天冬酰胺酶,理论上可以通过降低外源L-天冬酰胺酶的用量,从而减弱人体的免疫反应。

参 考 文 献

- [1] Petersen M, Monique SJS. Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 2003, **62**(2): 121–125.
- [2] Nakazawa T, Ohsawa K. Metabolism of rosmarinic acid in rats. *Journal of Natural Products*, 1998, **61**(8): 993–996.
- [3] 李荣贵, 滕大为, 杜桂彩, 等. 紫苏愈伤组织迷迭香酸的纯化以抗菌活性研究. *微生物学通报*, 2000, **27**(5): 324–327.
- [4] 郭道森, 杜桂彩, 李 丽, 等. 迷迭香酸对几种植物病原真菌的抗菌活性. *微生物学通报*, 2004, **31**(4): 71–76.
- [5] Mazumder A, Neamati N, Sunder S, *et al.* Curcumin analogs with altered potencies against HIV-1 integrase as probes for biochemical mechanisms of drug action. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1997, **40**(19): 3057–3063.
- [6] 李伟光, 梁敬钰. 迷迭香酸的研究进展. *海峡药学*, 2004, **16**(1):1–4.
- [7] 尚雁君, 黄才国, 蒋三好, 等. 迷迭香酸对黄嘌呤氧化酶的抑制作用. *第二军医大学学报*, 2006, **27**(2): 189–191.
- [8] 齐继成. 植物多酚的开发应用前景. *中国医药技术与市场*, 2007, **7**(4): 31–34.
- [9] 孙 岫, 汪靖超, 李洪涛, 等. 迷迭香酸的抗菌机理研究. *青岛大学学报(自然科学版)*, 2005, **12**(18): 41–46.
- [10] Bais HP, Walker TS, Schweizer HP, *et al.* Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2002, **40**(11): 983–995.
- [11] 韩照中, 王 恒, 冯尔玲, 等. L-天门冬酰胺酶 II 的表达与纯化. *药物生物技术*, 2001, **8**(1): 22–25.
- [12] 胡彦民, 王春祥, 张秀阁. R 质粒对大肠杆菌 L-天冬酰胺酶活力的影响. *微生物学报*, 1992, **19**(5): 277–300.
- [13] 史雅珍, 熊新向, 谯翔希. 奈氏试剂与铵离子的显色反应及光度法定氮. *武汉冶金科技大学学报*, 1998, **21**(1): 40–43.
- [14] 李长华, 陈玉绶. 用于测定络合物组成的摩尔比法原理的论证. *分析实验室*, 1996, **12**(6): 31–33.
- [15] 李红利, 李红军, 帅行明. 分光光度法测定配合物组成方法探索. *漯河职业技术学院学报(综合版)*, 2004, **3**(2): 16–18.
- [16] 程玉华, 赵秋宇, 曹淑桂, 等. 天冬酰胺酶及 PEG2-天冬酰胺酶对天冬酰胺、谷氨酰胺亲和性的研究. *生物化学杂志*, 1989, **5**(2): 102–106.
- [17] 于亚平. 门冬酰胺酶在急性淋巴细胞白血病治疗中的副作用及其对策. *现代肿瘤医学*, 2007, **15**(1): 119–123.

编辑部公告

关于《微生物学通报》专题刊申请的通知

当前,随着生物技术的飞速发展,微生物学涵盖的领域越来越广,交叉学科的研究也越来越受到关注。除了已有的微生物学、病毒学、基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程之外,基因组学、代谢工程、纳米科学、生物炼制、生物质能等也逐步成为微生物学研究的热门领域。为了更加系统、集中地反映各个领域的研究成果,以及该领域学科的热点难点问题,充分发挥《微生物学通报》的学科引领和导向作用,促进学科发展,为某个领域的科研人员提供一个交流的平台,《微生物学通报》编委会决定自2008年起,每年出版一定数量的专题刊。专题刊将系统地反映微生物学相关领域或新学科生长点的最新进展,及时介绍国内外微生物相关前沿领域的突破性成果,以及面向国家和社会发展需要并具有重大应用前景的研究成果。真诚欢迎本领域各学科的学术带头人,申请并组织专题刊。申请得到编委会批准后,申请人将被邀请担任本专题刊的特邀编辑,负责组织稿件、确定审稿专家,并撰写专题刊序言。

根据专刊工作计划,现将有关事项通知如下:

1. 专刊申请的有关规定附在通知的下面,请申请者仔细阅读;
2. 提交形式:请到我刊主页(<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>)的“下载专区”下载专题刊申请表;填写好之后,以E-mail附件的形式发送到编辑部信箱:tongbao@im.ac.cn, 并在邮件主题中注明:“专题刊申请”字样;
3. 申请者如有疑问,请咨询编辑部,联系方式:邮件tongbao@im.ac.cn 或电话010-64807511