

## 光谱法研究染料木素与人血清白蛋白的相互作用

吴秋华, 王 春, 张志恒, 张美月, 宋双居, 王 志\*

河北农业大学理学院生物无机化学重点实验室, 河北 保定 071001

**摘要** 用荧光猝灭光谱、同步荧光光谱和紫外-可见吸收光谱研究了染料木素与人血清白蛋白(HSA)的相互作用。结果表明染料木素对 HSA 的荧光猝灭作用属于二者形成复合物所引起的静态猝灭; 利用 Stern-Volmer 方程处理实验数据, 得到染料木素与 HSA 之间的结合常数  $K_A$  为  $1.00 \times 10^6$  (27 °C),  $1.66 \times 10^6$  (37 °C) 和  $5.25 \times 10^6$  (47 °C)。根据 Förster 非辐射能量转移理论, 求出了染料木素与 HSA 之间的结合距离为 2.59 nm(27 °C), 2.65 nm(37 °C) 和 2.90 nm(47 °C)。通过计算热力学参数, 可知该药物与人血清白蛋白的相互作用是一个吉布斯自由能降低的自发过程, 且二者之间的主要作用力类型为静电引力, 同时用同步荧光光谱探讨了染料木素对 HSA 构象的影响。

**关键词** 染料木素; 人血清白蛋白; 相互作用; 荧光光谱; 同步荧光光谱; 紫外-可见吸收光谱

**中图分类号**: O641.3 **文献标识码**: A **DOI**: 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)04-1060-04

### 引言

目前人们比较关注药物与血清白蛋白之间的相互作用[1-4], 这一研究将有助于了解药物在人体内的运输及药理活性的表达。国家一类新药染料木素(Genistein)是一种具有较高药理活性的异黄酮类化合物, 是治疗骨质疏松症的新型有效药物, 此外它也可用于治疗妇女更年期综合症、前列腺癌、乳腺癌及肿瘤等疾病<sup>[5, 6]</sup>。

当前对异黄酮类物质的研究大多集中于活性方面, 很少有关于其与生物大分子相互作用方面的研究报道。本文运用荧光光谱和紫外光谱研究了染料木素与人血清白蛋白(HSA)的相互作用, 由荧光猝灭现象和 Förster 非辐射能量转移理论求得了染料木素与 HSA 的结合常数和结合距离, 从热力学参数推出二者之间的作用力类型, 并探讨了染料木素对 HSA 构象的影响。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器与试剂

UV-2501PC 紫外-可见分光光度计(日本岛津); F-4500 型荧光分光光度计(日本日立); AE-240 双量程电子分析天平(Mettler-Toledo); TB-85 恒温水浴装置(日本岛津)。

染料木素(中国药品生物制品检定所); 人血清白蛋白

(Sigma), Tris(Serva), 其他试剂均为分析纯, 实验用水均为二次去离子水。

以 Tris-HCl 缓冲溶液(pH 7.4, 含  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 以维持溶液的离子强度)为溶剂配制  $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 HSA 标准溶液, 染料木素用乙醇配成  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的标准溶液, 两种标准溶液放在  $0 \sim 4 \text{ }^\circ\text{C}$  的冰箱中保存。

#### 1.2 实验方法

准确移取一定量的染料木素乙醇标准溶液于 10 mL 具塞比色管中, 待乙醇挥发完全后, 再加入 HSA 标准溶液 5.0 mL, 超声分散 5 min, 实验温度下恒温 2 h。在激发和发射光栅狭缝均为 5 nm, 激发波长为 283 nm 下, 扫描一定波长范围内 HSA 和 HSA-染料木素的荧光猝灭光谱、同步荧光光谱。以 pH 7.4 Tris-HCl 缓冲溶液为溶剂, 配制  $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的染料木素溶液, 实验温度下恒温测定其 300~500 nm 的 UV 吸收光谱。

### 2 结果与讨论

#### 2.1 荧光猝灭光谱

图 1 是按照实验方法在 HSA 中加入不同量的染料木素后的荧光光谱。在实验范围内, 随着染料木素浓度的增加, HSA 的荧光光谱最大发射波长维持在 343 nm 左右无明显变化, 而荧光强度随药物浓度增加而不断降低, 这说明染料木素与 HSA 发生了相互作用。

收稿日期: 2007-11-06, 修订日期: 2008-02-12

基金项目: 人事部留学人员科技择优资助项目和河北省自然科学基金项目(B2006000413)资助

作者简介: 吴秋华, 1969 年生, 河北农业大学理学院副教授 \* 通讯联系人 e-mail: wangzhi@hebau.edu.cn

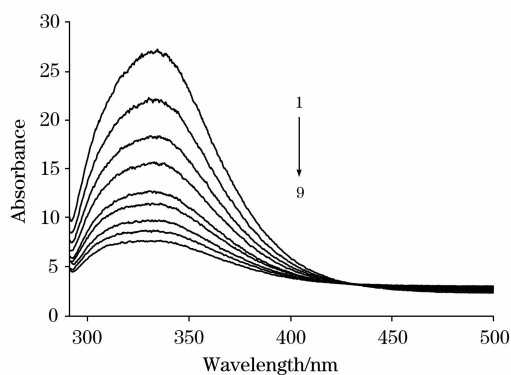


Fig. 1 Fluorescence quenching spectra of genistein-HSA

$c_{\text{HSA}} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $c_{\text{Genistein}}/10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  
from 1 to 9: 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0

## 2.2 荧光猝灭机理

荧光猝灭作用分为三种：动态猝灭、静态猝灭和非辐射能量转移。一般情况下，动态猝灭和静态猝灭可依据不同温度条件下的结果得以区别。对于动态猝灭，其作用过程应遵循 Stern-Volmer 方程<sup>[7]</sup>

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

式中， $F_0$  是 HSA 溶液的荧光发射总量， $F$  是加入药物后 HSA 溶液的荧光发射总量， $[Q]$  是药物的总浓度， $K_{sv}$  是 Stern-Volmer 猝灭常数， $K_q$  是由扩散过程控制的双分子动态猝灭速率常数， $\tau_0$  为生物大分子内源性荧光寿命，本文取  $\tau_0 = 10^{-8} \text{ s}$ <sup>[8]</sup>。

本实验分别研究了 27, 37, 47 °C 下 HSA 与染料木素作用的荧光光谱，利用不同温度下的实验结果，以  $F_0/F$  对相应的  $[Q]$  作图，得到染料木素对 HSA 猝灭的 Stern-Volmer 曲线(图 2)，在整个实验浓度范围内呈良好的线性关系，求得 27, 37 和 47 °C 时  $K_{sv}$  分别为  $9.05 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ， $8.18 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$  和  $7.52 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。结果表明随着温度的升高，HSA 的猝灭曲线斜率降低，故可初步证明药物与 HSA 的结合过程为静态猝灭过程<sup>[7]</sup>，并且由  $K_{sv}$  得出相应的  $K_q$  分别为  $9.05 \times 10^{12} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ， $8.18 \times 10^{12} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  和  $7.52 \times 10^{12} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ，此值远大于各类

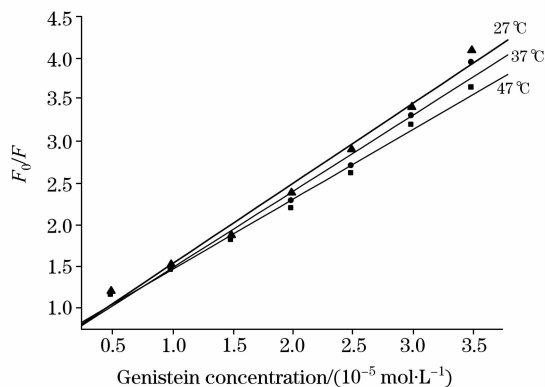


Fig. 2 Stern-Volmer curves of fluorescence quenching of HSA by genistein

猝灭剂对生物大分子的最大动态猝灭速率常数  $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ <sup>[9]</sup>，进一步证明动态碰撞不是引起 HSA 荧光猝灭的主要原因，而是由于药物和蛋白形成了复合物，从而引起了静态猝灭。

## 2.3 染料木素与 HSA 的表现结合常数 $K_A$ 以及结合位点数 $n$

因为静态猝灭是导致染料木素对 HSA 荧光猝灭的主要原因，所以用静态猝灭公式<sup>[10]</sup>

$$\lg(F_0 - F)/F = \lg K + n \lg [Q] \quad (2)$$

处理实验数据，分别作不同温度下  $\lg(F_0 - F)/F \sim \lg [Q]$  的双对数图，根据截距和斜率求得不同温度下的  $K_A$  和  $n$ ，结果见表 1。染料木素与 HSA 的结合常数较大，且温度对结合常数  $K_A$  略有影响。较大的  $K_A$  数值说明染料木素与 HSA 之间有较强的结合作用，可以被蛋白质运输和储存。

Table 1 Binding constants ( $K_A$ ), binding numbers ( $n$ ), correlation coefficients ( $R$ ) and binding distances ( $r$ ) between genistein and HSA

$T/^\circ\text{C}$	$K_A$	$n$	$R$	$r/\text{nm}$
27	$1.00 \times 10^6$	1.2	0.993 5	2.59
37	$1.66 \times 10^6$	1.3	0.999 8	2.65
47	$5.25 \times 10^6$	1.4	0.997 2	2.90

## 2.4 染料木素与 HSA 的结合距离

根据 Förster 非辐射能量转移理论<sup>[11, 12]</sup>，当供能体荧光发射光谱与受能体的吸收光谱有足够程度的重叠，且供能体与受能体之间的最大距离不超过 7 nm 时，将会发生非辐射能量转移，导致荧光猝灭，由此可求出小分子化合物和蛋白质分子的结合位置相对于发射荧光的基团之间的距离。据此理论，非辐射能量转移效率  $E$ ，供能体与受能体之间的结合距离  $r$  及临界能量转移距离  $R_0$  之间有下列关系

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) \quad (3)$$

$$E = 1 - F/F_0 \quad (4)$$

$$R = 8.8 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} \Phi_P J \quad (5)$$

式中， $F$  和  $F_0$  分别为存在和不存在受能体时供能体的荧光发射强度， $K^2$  为偶极空间取向因子，可取受能体和供能体各项随机分布的平均值 2/3， $N$  为介质折射常数，一般取水和有机物折射指数的平均值 1.336， $\Phi_P$  为 HSA 的荧光量子产率，通常取蛋白质中色氨酸的量子产率 0.15， $J$  为给体荧光发射光谱与受体吸收光谱的重叠积分，可表示为

$$J = \left( \sum I_p(\lambda) \epsilon_D(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda \right) / \left( \sum I_p(\lambda) \Delta\lambda \right) \quad (6)$$

式中  $I_p(\lambda)$  是 HSA 在波长  $\lambda$  处的荧光强度， $\epsilon_D(\lambda)$  是受能体在波长  $\lambda$  处的摩尔吸光系数。由(6)式可以求出两光谱重叠区域的积分值  $J$ ，并由(5)式求出  $R_0$  值，由(4)和(3)式求出  $E$  和  $r$  值。

由染料木素的紫外-可见吸收光谱和 HSA 的荧光光谱的重叠光谱图，根据 Förster 非辐射能量转移理论，可以求出 27 °C 时染料木素与 HSA 摩尔浓度比为 1 : 1 时的重叠积分  $J = 6.70 \times 10^{-15} \text{ cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ，相应温度下的  $r$  值见表 1。

计算的  $r$  值均小于 7 nm, 说明染料木素对 HSA 的猝灭过程符合非辐射能量转移理论, 从而说明非辐射能量转移是导致 HSA 荧光猝灭的原因之一。

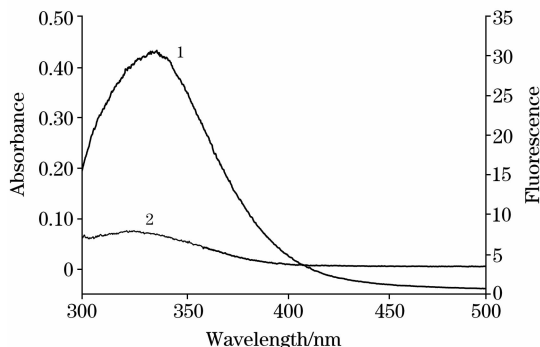


Fig. 3 Overlap spectra of HSA's fluorescence spectrum (1) and genistein's absorption spectra (2)

### 2.5 染料木素与 HSA 之间的作用力类型

药物等有机小分子和蛋白质之间的作用力主要有疏水作用力、氢键、范德华力和静电引力等。不同药物与蛋白质结合力的类型是不同的, Ross<sup>[13]</sup> 等根据大量的实验结果, 总结出了根据反应前后热力学焓变  $\Delta H$  和熵变  $\Delta S$  的相对大小, 判断药物与蛋白质之间的主要作用力类型的规律。在温度变化不大时, 反应的焓变  $\Delta H$  可以看作一个常数, 由  $K_A$  可以求出反应的自由能变  $\Delta G$

$$\Delta G = -RT \ln K_A \quad (7)$$

然后根据下式分别求出  $\Delta H$  和  $\Delta S$ , 并将计算所得的数据列于表 2。

$$\ln K_2/K_1 = [1/T_1 - 1/T_2] \Delta H/R \quad (8)$$

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (9)$$

Table 2 Thermodynamic parameters of genistein-HSA binding procedure

$T/^\circ\text{C}$	$\Delta H$ /(kJ·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G$ /(kJ·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S$ /(J·mol <sup>-1</sup> ·K <sup>-1</sup> )
27 °C	-16.30	-27.63	37.76
37 °C	-16.30	-28.01	37.76
47 °C	-16.30	-27.98	36.94

由表中数据可以看出:  $\Delta H < 0$ ,  $\Delta S > 0$ , 说明染料木素与 HSA 之间的主要作用力为静电引力, 且  $\Delta G < 0$ , 所以染料木素与 HSA 之间的结合反应是自发进行的。

### 2.6 同步荧光光谱

同步荧光光谱可以反映药物分子对蛋白质构象变化的影响<sup>[14]</sup>。由  $\Delta\lambda = 15$  nm 所作同步荧光光谱只显示酪氨酸残基的光谱特征, 而  $\Delta\lambda = 60$  nm 的同步荧光光谱仅显示色氨酸残基的光谱特征。因芳香氨基酸残基的最大发射波长与其所处

环境之极性有关, 故由发射波长的改变可判断 HSA 中芳香氨基酸残基所处微环境的变化<sup>[15, 16]</sup>。

图 4 中(a)和(b)分别为  $\Delta\lambda = 15$  nm 和  $\Delta\lambda = 60$  nm 的同步荧光光谱图, 在 HSA 浓度固定为  $1.0 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup> 时, 随染料木素浓度的增加, 最大发射波长的强度逐渐降低。酪氨酸残基的特征荧光光谱峰位未发生明显变化, 说明酪氨酸残基所处的微环境疏水性及亲水性无明显变化<sup>[17]</sup>。色氨酸的特征荧光光谱峰形发生了改变, 且最大发射波长红移, 说明染料木素主要与 HSA 中的色氨酸残基形成了复合物, 使色氨酸残基所处的微环境疏水性降低, 亲水性增加, 从而导致 HSA 构象发生变化<sup>[17]</sup>。

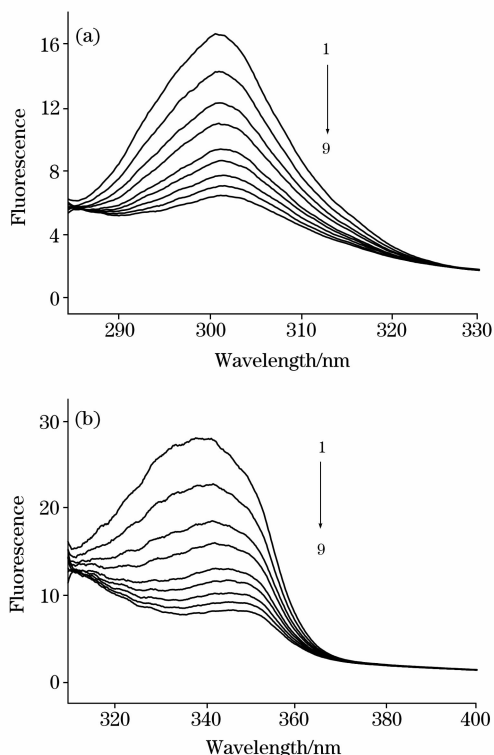


Fig. 4 Synchronous fluorescence spectra of HSA-genistein (a):  $\Delta\lambda = 15$  nm, (b):  $\Delta\lambda = 60$  nm;  $c_{\text{HSA}} = 1.0 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup>;  $c_{\text{Genistein}}/10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup>, from 1 to 9; 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 and 4.0

## 3 结 论

研究表明, 染料木素对 HSA 的荧光猝灭属于静态荧光猝灭, 且分子内发生了非辐射能量转移; 求得了染料木素与 HSA 的结合常数、结合位点、结合距离和热力学参数, 热力学数据表明二者主要靠静电引力相结合; 同时用同步荧光光谱探讨了染料木素对 HSA 构象的影响, 结果表明染料木素主要与 HSA 中的色氨酸残基结合, 且结合后使色氨酸残基所处的微环境极性略有增加。

## 参 考 文 献

- [1] WANG Chun, WU Qiu-hua, WANG Zhi, et al(王 春, 吴秋华, 王 志, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(4): 754.
- [2] WU Qiu-hua, WANG Chun, WANG Zhi, et al(吴秋华, 王 春, 王 志, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(11): 2317.
- [3] WANG Chun, WU Qiu-hua, WANG Zhi, et al. Anal. Sci. 2006, 22(3): 435.
- [4] SHAO Shuang, MA Bo-ying, WANG Xue-jie, et al(邵 爽, 马博英, 王学杰, 等). Acta Phys.-Chim. Sin. (物理化学学报), 2005, 21(7): 792.
- [5] Jiangsu New College of Medicine(江苏新医院编). Dictionary of Chinese Materia Medica(中药大辞典). Shanghai: Shanghai Scientific and Technological Publishers(上海: 上海科学技术出版社), 1985.
- [6] Dixon R A, Ferreira D. Phytochemistry, 2002, 60(3):205.
- [7] CHEN Guo-zhen, HUANG Xian-zhi, ZHENG Zhu-zi, et al(陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 等). Fluorescence Analysis Method(荧光分析法). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1990.
- [8] Lakowicz J R, Weber G. Biochemistry, 1973, 12: 4161.
- [9] WANG Chun, WU Qiu-hua, LI Cairui. Anal. Sci., 2007, 23(4): 429.
- [10] YANG Man-man, YANG Pin, ZHANG Li-wei(杨曼曼, 杨 频, 张立伟). Chin. Sci. Bull. (科学通报), 1994, 39(1): 374.
- [11] Förster T, Sinanoglu O. Modern Quantum Chemistry. New York: Academic Press, 1996.
- [12] YANG Pin, GAO Fei(杨 频, 高 飞). The Principles of Bioinorganic Chemistry(生物无机化学原理). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 2002.
- [13] Ross P D, Subramanian S. Biochemistry, 1981, 20: 3096.
- [14] Gonzalez-Jzmenoz J, Jacquotte H, Cayre I. Chem-Biological Interactions, 1992, 84: 221.
- [15] TAN Fei, GUO Ming, YU Qin-sen. Spectrochim. Acta Part A, 2005, 61: 3006.
- [16] WU Qiu-hua, WANG Chun, WANG Zhi, et al(吴秋华, 王 春, 王 志, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(12): 2498.
- [17] HU Yan-jun, LI Wei, LIU Yi, et al. Pharm. Biomed. Anal., 2005, 39: 740.

## Study on the Interaction of Genistein and Human Serum Albumin by Spectroscopic Method

WU Qiu-hua, WANG Chun, ZHANG Zhi-heng, ZHANG Mei-yue, SONG Shuang-ju, WANG Zhi\*

Key Laboratory of Bioinorganic Chemistry, College of Science, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China

**Abstract** The interaction of genistein and human serum albumin (HSA) was investigated by fluorescence quenching spectra, synchronous fluorescence spectra and ultra-violet absorption spectra. The results showed that the quenching mechanism of the intrinsic fluorescence of HSA by genistein is due to the formation of genistein-HSA complex, resulting in a static quenching procedure. The binding constants ( $K_A$ ) were  $1.00 \times 10^6$  (27 °C),  $1.66 \times 10^6$  (37 °C) and  $5.25 \times 10^6$  (47 °C), respectively. According to the Förster theory of non-radiation energy transfer, the binding distances ( $r$ ) were 2.59 nm (27 °C), 2.65 nm (37 °C) and 2.90 nm (47 °C), respectively. The thermodynamic parameters showed that the binding power between genistein and HSA is mainly the electrostatic interaction. Synchronous spectrum was used to investigate the conformational change of HSA.

**Keywords** Genistein; Human serum albumin; Interaction; Fluorescence spectra; Synchronous fluorescence spectra; Ultra-violet absorption spectra

(Received Nov. 6, 2007; accepted Feb. 12, 2008)

\* Corresponding author