

槲皮素与牛血清白蛋白相互作用的研究

王春, 吴秋华, 王志*, 陈大刚

河北农业大学理学院, 河北保定 071001

摘要 利用荧光光谱(FS)和紫外光谱(UV)法研究了槲皮素与牛血清白蛋白之间的相互作用。结果表明, 静态猝灭和非辐射能量转移是导致槲皮素对 BSA 荧光猝灭的两大原因, 槲皮素与 BSA 的结合常数 K_A 为 2.8×10^8 (26 °C) 和 3.1×10^8 (36 °C), 结合位点数为 1.76 ± 0.01 , 根据 Förster 非辐射能量转移理论得到槲皮素与 BSA 之间的结合距离为 3.25 nm (26 °C) 和 3.30 nm (36 °C), 表明槲皮素的部分片段可以插入 BSA 分子内部。通过计算热力学参数, 可知该药物与蛋白的相互作用是一个熵增加和吉布斯自由能降低的自发过程, 并由此推断槲皮素与 BSA 之间的作用力是以疏水相互作用为主。

主题词 荧光光谱法; 槲皮素; 牛血清白蛋白; 相互作用

中图分类号: O648 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2006)09-1672-04

引言

药物与血清白蛋白相互作用的研究是介于化学与生命科学之间的边缘性课题, 目前人们比较关注中药小分子与生物大分子的相互作用。血清白蛋白是血浆中含量最丰富的重要载体蛋白, 具有储运内源性代谢产物和外源性药物小分子(离子)等重要生理功能^[1-4]。槲皮素是许多中草药的有效成分, 具有非常广泛的生理和药理活性, 近年来槲皮素对肿瘤的化学预防和治疗作用正日益受到人们的关注^[5, 6], 有关槲皮素与 BSA 相互作用的研究, 对于阐明槲皮素在体内的运输过程及揭示其抗癌机理具有十分重要的意义, 而目前在国内未见有相关报道。

本文用荧光光谱和紫外可见吸收光谱研究了槲皮素与牛血清白蛋白相互作用的光谱特征, 用 Stern-Volmer 和 Lineweaver-Burk 方程处理光谱数据, 确定了静态猝灭和非辐射能量转移是导致槲皮素对 BSA 荧光猝灭的两大原因, 求得了槲皮素与 BSA 的表观结合常数 K_A 、结合位点数 n 及二者间的结合距离 r , 且从热力学参数的计算结果可知: 槲皮素与 BSA 之间的作用力以疏水相互作用为主。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

UV-2501PC 紫外-可见分光光度计(日本岛津公司); F-

4500 型荧光分光光度计(日本日立公司); Millipore 超纯水系统(Millipore); AE240 双量程电子分析天平(Mettler-toledo); 槲皮素(Quercetin, 上海); 牛血清白蛋白(BSA, Fraction V, Roche); Tris(Serva), 其他试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

以 Tris-HCl 缓冲溶液(pH 7.4, 含 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 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 BSA 标准溶液备用。槲皮素用乙醇配成 $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准溶液备用。准确移取一定量的槲皮素乙醇标准溶液于 50 mL 三角瓶中, 待乙醇挥发完全后, 加入 BSA 标准溶液 10 mL, 超声分散 5 min 后, 恒温(26 或 36 °C)3 h。荧光仪的激发和发射光栅狭缝均为 5 nm, 激发波长 285 nm, 恒温(26 或 36 °C)测定上述样品在 300~500 nm 的荧光发射光谱。以 Tris-HCl 缓冲溶液为溶剂配制 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的槲皮素溶液, 恒温(26 或 36 °C)测定其 300~500 nm 的 UV 吸收光谱。

2 结果与讨论

2.1 槲皮素对 BSA 荧光的猝灭

BSA 分子中因含有色氨酸、酪氨酸等氨基酸残基而能发射较强的内源荧光, 所以 BSA 是荧光体, 图 1 表明, 在保持 BSA 浓度固定不变的情况下, 随着槲皮素浓度的增加, BSA 的内源性荧光强度有规律的降低, 峰位置及峰形基本保持不变, 表明槲皮素能猝灭 BSA 的荧光, 二者之间存在相互作用

收稿日期: 2005-12-10, 修订日期: 2006-03-20

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金和人事部留学人员科技择优资助项目

作者简介: 王春, 1969年生, 河北农业大学生命科学学院博士研究生 * 通讯联系人

用。在 285 nm 激发波长下, 槲皮素无荧光发射, 因此, 研究中不用考虑内滤光效应的干扰。

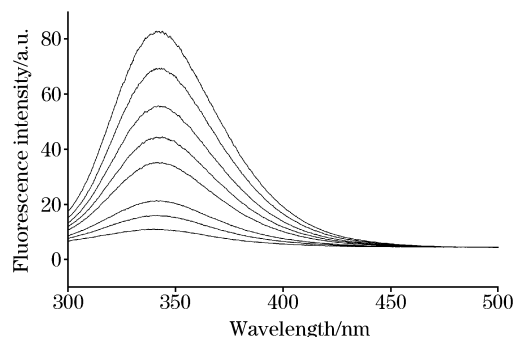


Fig. 1 The fluorescence quenching spectra of quercetin-BSA

$n(\text{quercetin})/n(\text{BSA})$ increases from top to bottom

荧光强度被猝灭的原因有三种可能: 动态猝灭、静态猝灭和非辐射能量转移^[7, 8]。一般情况下, 动态和静态猝灭可依据不同温度条件下的结果得以区别, 对动态猝灭, 温度的升高将增加分子间的有效碰撞和加剧电子转移过程, 使荧光猝灭常数随温度的升高而增大。若是静态猝灭, 则温度的升高将降低配合物的稳定性, 使猝灭常数减小。在动态猝灭过程中, 蛋白质等荧光体与荧光猝灭剂分子间的相互作用可以用动态猝灭常数 K_{SV} (Stern-Volmer 常数) 来描述。

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

其中 F_0 是加入药物前 BSA 溶液的荧光发射总量, F 是加入药物后 BSA 溶液的荧光发射总量, $[Q]$ 是药物的总浓度, K_{SV} ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$) 描述了生物大分子与荧光猝灭剂分子彼此扩散和相互碰撞到达动态平衡时的量效关系; K_q ($K_q = K_{SV} \times \tau_0^{-1} \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) 为双分子表观猝灭常数, 它反映了体系中分子的彼此扩散和相互碰撞对生物大分子荧光寿命衰减速率的影响, 各类荧光猝灭剂对生物大分子的最大动态荧光猝灭速率常数约为 $2.0 \times 10^{10} \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。 τ_0 为猝灭剂不存在时荧光分子的平均寿命, 生物大分子的平均寿命约为 10^{-8}s ^[9]。

当温度分别为 26 和 36 °C 时, 按照实验方法测出加入不同浓度的槲皮素后 BSA 荧光强度的变化由(1)式作出 BSA 荧光猝灭的 Stern-Volmer 曲线(见图 2), 由图 2 猝灭曲线可以看出, 在槲皮素浓度小于 $2.0 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 温度对 BSA 的猝灭曲线影响不大。当浓度大于 $2.0 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 随着温度升高, BSA 的猝灭曲线斜率降低。26 和 36 °C 时猝灭曲线起始部分的斜率分别为 7.4×10^4 , 6.7×10^4 , 可得 K_q 分别为 $7.4 \times 10^{12} \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (26 °C), $6.7 \times 10^{12} \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (36 °C), 远大于各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散猝灭常数 $2.0 \times 10^{10} \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。由此可以初步证明此过程为静态猝灭, 因为动态猝灭与扩散有关, 温度升高将增大扩散系数, 从而增大双分子的猝灭常数; 反之, 若是静态猝灭, 则温度升高可引起配合物的稳定性下降, 从而使猝灭常数减小, 实验结果表明动态碰撞不是引起 BSA 荧光猝灭的主要原因, 而是由于药物和蛋白形成了复合物, 从而引起的静态猝灭。

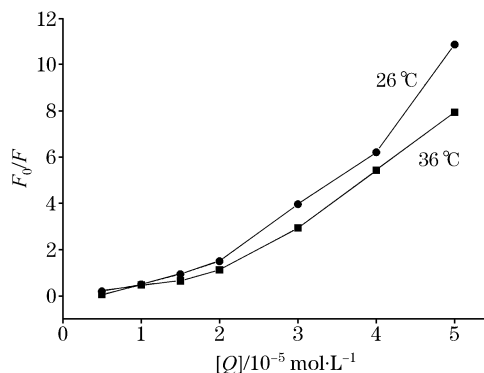


Fig. 2 The Stern-volmer curves of fluorescence quenching of BSA by quercetin

2.2 槲皮素与 BSA 的表观结合常数 K_A 以及结合位点数 n

静态荧光猝灭作用是指荧光体分子与荧光猝灭剂分子之间借助分子间力, 彼此结合形成具有一定结构的超分子化合物, 而导致荧光体荧光强度减弱现象, 用静态猝灭公式

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

处理实验数据, 以 $\lg(F_0 - F)/F$ 对 $\lg [Q]$ 作图可得一直线(见图 3), 由直线斜率和截距求出槲皮素与蛋白质分子的结合常数 K_A 及结合位点数 n (如表 1 所示)。

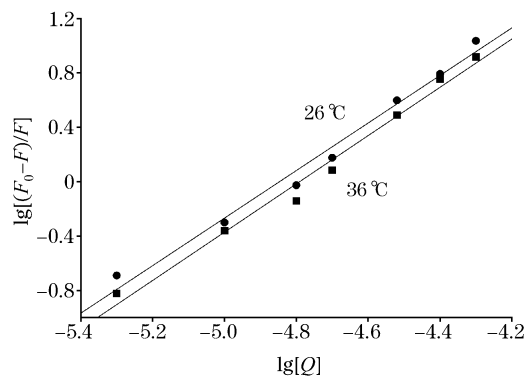


Fig. 3 Double-lg plot of quercetin quenching effect on BSA fluorescence at different temperatures

由所得的结合常数及结合位点数可以看出, 槲皮素与 BSA 的结合常数较大, 可形成两个结合位点, 且温度对槲皮素与 BSA 的结合常数 K_A 影响较小, 说明槲皮素与 BSA 之间有较强的结合作用, 可以被蛋白质所储存和运输。

2.3 槲皮素在 BSA 上结合位置的求取

依据 Förster 的偶极-偶极非辐射能量转移理论, 当给体能发射荧光, 其荧光发射光谱与受体的吸收光谱有足够的重叠, 且给体与受体之间最大距离不超过 7 nm 时, 将会发生非辐射能量转移现象, 导致荧光猝灭, 由此可以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因之间的距离^[10]。据此理论, 转移效率与给体-受体间距离 r 及临界能量距离 R_0 有关, 且给体与受体间能量转移效率为

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) = 1 - F/F_0 \quad (3)$$

其中 R_0 为能量转移效率 $E = 50\%$ 的临界距离

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 N^4 \Phi_p J \quad (4)$$

K^2 为偶极空间取向因子, N 为介质折射常数, Φ_p 为 BSA 的荧光量子产率, J 为给体荧光发射光谱与受体吸收光谱的重叠积分, 即

$$J = \left(\sum F_p(\lambda) \epsilon_D(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda \right) / \left(\sum F_p(\lambda) \Delta\lambda \right) \quad (5)$$

式中 $F_p(\lambda)$ 是荧光给体在波长 λ 处的荧光强度, $\epsilon_D(\lambda)$ 是受体在波长 λ 处的摩尔吸光系数, 图 4 为 36 °C 时槲皮素与 BSA 摩尔浓度比为 1 : 1 时的吸收光谱及 BSA 荧光光谱的重叠光谱的实验结果, 将图中的光谱重叠部分分割成极小的矩形, 并结合式(5)求得重叠积分 $J = 2.15 \times 10^{-14} (\text{cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$ 。

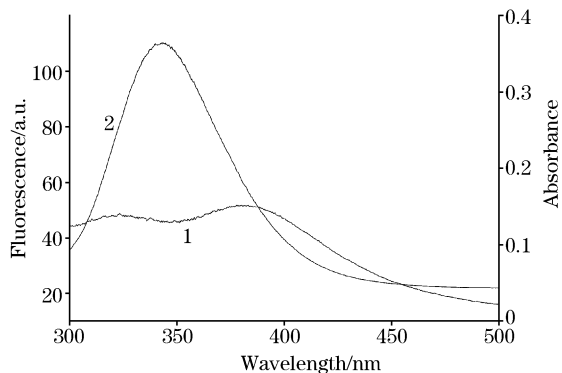


Fig. 4 Overlapped spectra of quercetin's absorption spectrum(1) and BSA's fluorescence spectrum(2)

在本文实验条件下, 取 $K^2 = 2/3$, $N = 1.336$, $\Phi_p = 0.15^{[11]}$, 按式(4)计算得 $R_0 = 2.899 \text{ nm}$ 。按式(3)计算得 $E = 0.170(26 \text{ °C})$ 及 $0.131(36 \text{ °C})$, 进而得到 $r = 3.25 \text{ nm}(26 \text{ °C})$ 及 $3.30 \text{ nm}(36 \text{ °C})$, 表明槲皮素的部分片段能够插入 BSA 分子内部。

2.4 荧光猝灭过程中热力学函数的变化与作用力的判断

药物等有机小分子和蛋白质等生物大分子之间的结合力主要有疏水作用力、氢键作用力、范德华瓦耳斯力和静电引力等。不同药物与蛋白质结合力的类型是不同的, 从热力学观点看, 在一定的温度和压力下, 药物与蛋白质的结合反应能否自发进行取决于体系的 ΔG , $\Delta G < 0$ 有利于反应的自发进行。Ross 等根据大量的实验结果, 总结出了判断生物大分子与小分子结合力性质和生物大分子自身结合力性质的热力学规律, 根据反应前后热力学焓变 ΔH 和熵变 ΔS 的相对大小, 可以判断药物与蛋白质之间的主要作用力类型^[12]: $\Delta H > 0, \Delta S > 0$ 为疏水作用力; $\Delta S < 0, \Delta H < 0$ 为氢键和范德华力; $\Delta H < 0, \Delta S > 0$ 为静电引力。在温度变化不大时, 反应的焓变 ΔH 可以看作一个常数, 由稳定常数可以求出反应的自由能变 ΔG

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

然后根据下式分别求出 ΔH 和 ΔS

$$\ln K_2 / K_1 = [1/T_1 - 1/T_2] \Delta H / R \quad (6)$$

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (7)$$

应当指出, 血清白蛋白结构很复杂, 它和药物之间往往同时存在几种作用力^[13]。由前面所求得 K_A 值求得槲皮素与 BSA 的热力学函数, 结果见表 1。

Table 1 The binding and thermodynamic parameters of the quercetin-BSA complex

T/°C	K_A	n	r/nm	$\Delta H/(\text{kJ} \cdot \text{mol})$	$\Delta G/(\text{kJ} \cdot \text{mol})$	$\Delta S/(\text{J} \cdot \text{mol})$
26	2.8×10^8	1.75	3.25	3.4	-48.4	173.1
36	3.1×10^8	1.77	3.30	3.4	-50.2	173.5

由表中数据可以看出 $\Delta H > 0, \Delta S > 0$, 所以槲皮素与 BSA 之间的作用力主要为疏水作用力。

3 结 论

利用荧光光谱法并结合紫外吸收光谱, 比较详尽地研究了槲皮素与 BSA 的相互作用, 发现槲皮素对 BSA 内源荧光具有较强猝灭作用, 探讨了这种猝灭主要为静态猝灭和非辐

射能量转移机制, 计算了其结合常数和结合位点数, 得出了疏水作用力为其主要作用力, 且二者之间具有较强的作用力, 可以被蛋白质所储存和运输; 依据 Förster 的偶极-偶极非辐射能量转移理论, 求出了槲皮素在 BSA 上结合位置, 表明槲皮素的部分片段能够插入 BSA 分子内部。该研究对于阐明槲皮素在体内的运输过程及对肿瘤的化学预防作用和治疗作用具有一定的意义, 为药物合成、临挡用药提供基础数据。

参 考 文 献

- [1] CAO Shu-xia, ZHAO Yu-fen(曹书霞, 赵玉芬). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(10): 1197.
- [2] XU Wen-xiang, PANG Yue-hong, SHUANG Shao-min(徐文祥, 庞月红, 双少敏). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2004, 32(12): 1571.
- [3] Rost B. Structure, 1998, 6: 256.
- [4] WU Gen-hua, WANG Chun-hua(吴根华, 汪春华). Spectroscopy and Spectral Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(2): 246.
- [5] ZHAO Xue-ying, GU Zhen-lun(赵雪英, 顾振纶). Acta Pharmacologica Sinica(中国药理学报), 1996, 17(5): 442.
- [6] GONG Shan, ZHANG Yu-ying, YU Guang-di, et al(龚 珊, 张玉英, 俞光第, 等). Chinese Traditional and Herbal Drugs(中草药), 1996, 27(10): 612.
- [7] YANG Man-man, YANG Pin, XI Xiao-li, et al(杨曼曼, 杨 频, 席小莉, 等). Chinese Science Bull(科学通报), 1997, 42(12): 1276.
- [8] GUO Yao-jun(郭尧君). Fluorescence Experiment Technology and Its Application in Molecular Biology(荧光实验技术及其在分子生物学中的应用). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1983.
- [9] CHA Dan-ming, LI Shu-ting, YANG Yong-fei, et al(查丹明, 李舒婷, 杨勇飞, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 1999, 19(6): 788.
- [10] 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.
- [11] Cyril L, Earl J K, Sperry W M. Biochemists Handbook, London: Epon Led. Press, 1961: 83.
- [12] Ross P D, Subramanian S. Biochemistry, 1981, 20: 3096.
- [13] Gonzalez-Jzmenoz J, Jacquotte H, Cayre I. Chem-Biol. Interactions, 1992, 84: 221.

Interaction of Quercetin and Bovine Serum Albumin

WANG Chun, WU Qiu-hua, WANG Zhi*, CHEN Da-gang

College of Sciences, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China

Abstract The interaction of quercetin and bovine serum albumin (BSA) was investigated using fluorescence spectroscopy (FS) and ultraviolet spectroscopy (UV). The apparent binding constants (K_A) between quercetin and BSA were 2.8×10^8 (26 °C) and 3.1×10^8 (36 °C), and the binding sites (n) were 1.7 ± 0.02 . According to the Förster theory of non-radiation energy transfer, the binding distances (r) were also obtained. The experimental results showed that the quercetin could be inserted into the BSA, quenching the inner fluorescence by forming the quercetin-BSA complex. It was found that both static quenching and non-radiation energy transfer were the main reasons for the fluorescence quenching. The process of binding was a spontaneous molecular interaction in which entropy increased while Gibbs free energy decreased, indicating that the interaction of quercetin and BSA was driven mainly by hydrophobic force.

Keywords Fluorescence spectroscopy; Quercetin; Bovine serum albumin; Interaction

(Received Dec. 10, 2005; accepted Mar. 20, 2006)

* Corresponding author