

# 荧光光谱法研究紫草素与牛血清白蛋白的相互作用

葛锋<sup>1</sup>, 王剑平<sup>1</sup>, 刘迪秋<sup>1</sup>, 陈朝银<sup>1</sup>, 韩本勇<sup>1</sup>, 王玉春<sup>2</sup>

(1. 昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南 昆明 650224; 2. 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100190)

**摘要:** 采用荧光光谱法研究了紫草素和牛血清白蛋白的相互作用. 实验结果表明, 紫草素对牛血清白蛋白的荧光有明显的猝灭作用, 其方式为静态猝灭, 紫草素与牛血清白蛋白之间发生了分子内非辐射能量转移; 紫草素和牛血清白蛋白的结合位点数为1, 结合位置距离212位色氨酸残基1.92 nm; 温度为22和36℃时, 紫草素对牛血清白蛋白荧光的猝灭常数分别为 $6.96 \times 10^4$ 和 $5.91 \times 10^4$  mol/L. 热力学分析表明, 紫草素与蛋白之间的结合以静电作用力为主. 同时, 紫草素分子含有多个羟基, 它们之间还存在氢键作用力.

**关键词:** 紫草素; 牛血清白蛋白; 荧光光谱; 相互作用

**中图分类号:** Q657.3      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1009-606X(2009)01-0118-05

## 1 前言

紫草素(Shikonin)是从新疆紫草[*Arnebia euchroma* (Royle) Johnst.]干燥根中提取分离出的萘醌类化合物<sup>[1]</sup>. 紫草素多用于急、慢性肝炎的治疗, 效果显著, 副作用小, 目前用于临床的紫草素注射剂已经上市<sup>[2]</sup>. 同时, 紫草素对多种肿瘤, 如小鼠腹水型肉瘤S<sub>180</sub>、自发性乳腺肿瘤、恶性葡萄胎等的抑制作用明显, 并能诱导多种癌细胞的凋亡<sup>[3,4]</sup>. 尽管对紫草素多方面的药理作用已经有所认识, 但紫草素进入人体后的转运过程仍不清楚. 药物进入人体循环系统后, 首先遇到的是血清白蛋白. 白蛋白是血浆中最丰富的蛋白质, 能与药物结合, 控制药物的释放和代谢, 因此研究紫草素与血清白蛋白分子间的相互作用, 对于了解和认识药物在体内的转运过程具有重要意义. 紫草素的分子结构见图1.

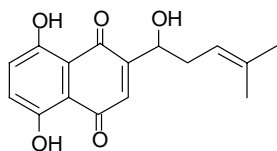


图1 紫草素的分子结构<sup>[4]</sup>  
Fig.1 Molecular structure of shikonin<sup>[4]</sup>

应用光谱法研究药物与生物大分子的相互作用已成为近几年研究的热点, 相关报道不少, 但研究工作多缺乏全面性和系统性<sup>[5,6]</sup>. 本研究综合了国内外相关研究的最新理论和方法, 采用荧光光谱法研究生理条件下紫草素与牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)的结合情况, 测定了不同温度下的猝灭常数、结合位点数, 并根据求得的热力学参数确定了其相互作用的作用力

类型, 计算出紫草素与牛血清白蛋白中主要发荧光氨基酸残基的作用距离.

## 2 实验

### 2.1 材料和仪器

牛血清白蛋白(BSA): 美国 Sigma 公司, 分子量67000, 纯度 $\geq 95\%$ , 用pH 7.39的Tris-HCl缓冲液配成浓度为 $1 \times 10^{-5}$  mol/L的溶液待用.

紫草素(Shikonin): 中国药品生物制品检定所, 分子式C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>, 分子量288.29, 纯度 $\geq 97\%$ , 用甲醇配成 $5 \times 10^{-4}$  mol/L溶液. Tris-HCl缓冲液: pH 7.39, 内含0.9%的NaCl. 所用试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水, 经检测无荧光杂质.

LS-50B 荧光分光光度计(美国 Perkin-Elmer 公司), U-2000 型分光光度计(瑞典 Pharmacia 公司), FA2104 型电子天平(上海天平仪器厂).

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 不同浓度紫草素与 BSA 相互作用的荧光猝灭

以不同浓度紫草素分别与 BSA 相互作用, 按表1所示配比加样后, 在22℃恒温水浴锅中保温2 h. 先以对照组A和B进行荧光光谱预扫描, 考察 Shikonin 和 BSA 的最大激发波长和最大发射波长, 观察 Shikonin 和 BSA 的发射峰是否有重叠. 再对相互作用样品进行常规荧光光谱扫描、60 nm 恒波长同步荧光扫描, 激发波长280 nm, 狭缝宽度5 nm, 扫描速度300 nm/min.

#### 2.2.2 紫草素与 BSA 结合位点数及相互作用力形式

按表1配比加样后, 分别在22和36℃下保温2 h, 测定不同浓度 Shikonin 与 BSA 的相互作用. 通过计算

得到紫草素与 BSA 结合位点数及相互作用力形式。

表 1 Shikonin 与 BSA 实验配比

Sample	0.01 mmol/L BSA	0.5 mmol/L Shikonin	Tris-HCl
Control A	1	0	9
Control B	0	0.10	9.90
1 <sup>#</sup>	1	0.04	8.96
2 <sup>#</sup>	1	0.10	8.90
3 <sup>#</sup>	1	0.14	8.86
4 <sup>#</sup>	1	0.20	8.80
5 <sup>#</sup>	1	0.26	8.74
6 <sup>#</sup>	1	0.32	8.68

### 2.2.3 紫草素与 BSA 相互作用的能量转移

取浓度为 0.01 mmol/L 的 BSA 溶液 1 mL, 加 Tris-HCl 缓冲溶液至 10 mL, 得到 1  $\mu$ mol/L 的 BSA 溶液; 另取浓度为 0.5 mmol/L 的 Shikonin 溶液 0.02 mL, 加 Tris-HCl 缓冲溶液定容至 10 mL, 得到 1  $\mu$ mol/L 的

Shikonin 溶液. BSA 溶液以 280 nm 为激发波长, 测定荧光光谱; Shikonin 溶液进行紫外-可见全波长扫描, 计算重叠积分, 求出能量转移方式、能量转移效率和相互作用距离。

## 3 结果与讨论

### 3.1 紫草素对 BSA 荧光的猝灭作用

牛血清白蛋白含有色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸残基, 在紫外光照射下会产生内源荧光<sup>[7]</sup>. 在本实验条件下, 荧光谱 340 nm 处有一荧光发射峰, 紫草素自身在此波长下无荧光发射. 固定溶液中牛血清白蛋白浓度, 随着紫草素用量增加, BSA 的荧光强度逐渐降低, 但发射峰位置和形状不变. 不同温度下的实验结果见图 2, 表明紫草素对 BSA 的荧光有明显猝灭作用。

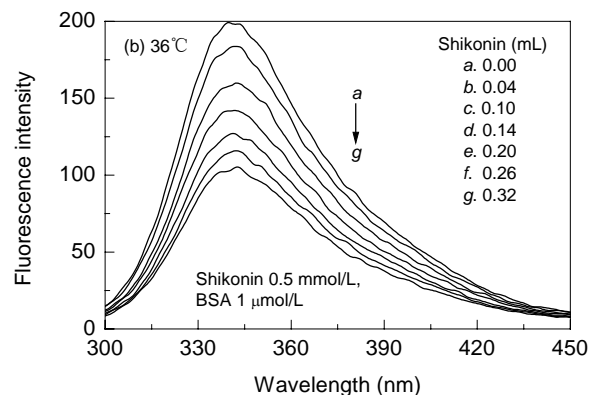
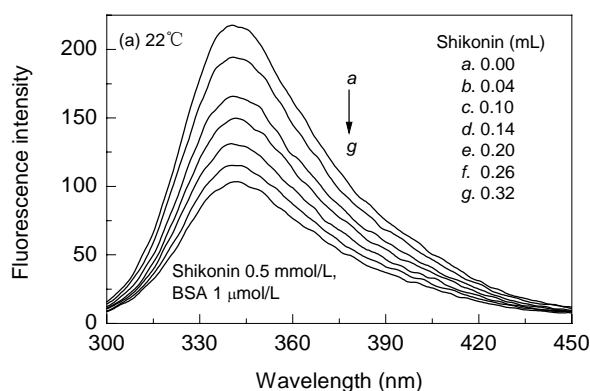


图 2 不同温度下紫草素对牛血清白蛋白荧光的猝灭作用

Fig.2 Fluorescence spectra of BSA-shikonin system at different temperatures

### 3.2 紫草素对牛血清白蛋白荧光猝灭方式的确定

从荧光猝灭机理看, 药物分子对蛋白质荧光的猝灭可分为动态猝灭和静态猝灭<sup>[8]</sup>. 静态猝灭是药物和蛋白质在基态时生成复合物, 从而导致蛋白质荧光强度降低; 动态猝灭是药物和蛋白质的激发态分子之间的相互作用导致的荧光猝灭。

动态猝灭遵循 Stern-Volmer 方程<sup>[8,9]</sup>:  $F_0/F=1+K_q\tau_0[Q]=1+K_m[Q]$ , 式中  $F_0$  和  $F$  为猝灭剂不存在和存在时的蛋白荧光强度,  $[Q]$  为猝灭剂浓度,  $K_q$  为双分子表观动态猝灭速率常数,  $\tau_0$  为蛋白荧光寿命,  $K_m$  为动态猝灭常数. 以  $F_0/F$  对药物浓度作图(见图 3), 可以求出  $K_m$  和  $K_q$ .

动态猝灭是由于药物和蛋白质受激发后, 分子的扩散作用引起药物和蛋白质发生碰撞, 使蛋白质的荧光发生猝灭, 因此, 随着温度的升高, 其扩散作用加强, 碰撞更加剧烈, 荧光猝灭增强, 即  $K_m$  应随温度升高而增大. 从图 3 可以看出, 温度与  $K_m$  呈负相关, 说明紫草素与 BSA 的猝灭过程不是动态猝灭。

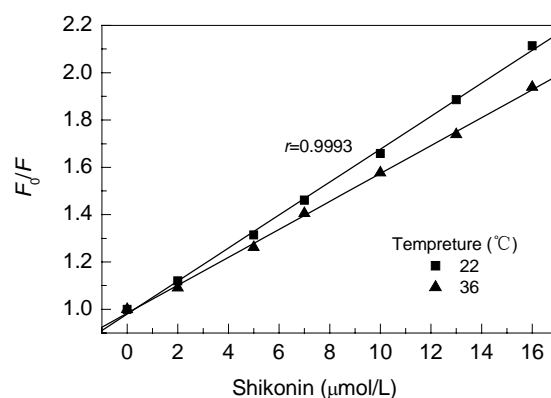
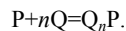


图 3 不同温度下 BSA 与紫草素的 Stern-Volmer 方程线性回归  
Fig.3 Stern-Volmer plot of BSA quenched by shikonin at different temperatures

另外, 由图 3 可求得 22  $^{\circ}$ C 时  $K_q\tau_0=6.965\times 10^4$  mol/L, 一般情况下 BSA 的荧光寿命  $\tau_0$  约为  $10^{-8}$  s<sup>[10]</sup>, 则  $K_q=6.965\times 10^{12}$  mol/(L·s). 根据报道<sup>[9]</sup>, 各类猝灭剂对生物大分子的最大碰撞猝灭速率常数为  $2.0\times 10^{10}$  mol/(L·s). 本实验所得紫草素对 BSA 的猝灭过程速率常数远大于扩

散碰撞控制的  $K_q$ , 再次说明以上猝灭过程不是由于碰撞引起的动态猝灭.

紫草素对牛血清白蛋白的荧光猝灭不是动态猝灭, 很可能是由于紫草素与基态的 BSA 之间形成了复合物, 从而产生静态猝灭. 假设 1 个 BSA 分子有  $n$  个相同且独立的结合位点可与紫草素结合, 用 P 表示蛋白, Q 表示猝灭剂,  $Q_nP$  表示生成的复合物, 二者之间的猝灭作用可用下式<sup>[11]</sup>表示:



用  $K_A$  表示复合物生成常数(猝灭常数), 则有  $K_A=[Q_nP]/([P][Q]^n)$ , 不难导出  $\lg K_A+n\lg[Q]=\lg(F_0/F-1)$ .

以  $\lg(F_0/F-1)$  对  $\lg[Q]$  作图(如图 4), 可以求得 22 和 36 °C 时 BSA 与紫草素的结合位点数  $n$  分别为 1.07 和 1.12, 从而推测紫草素与牛血清白蛋白二者以 1:1 结合.

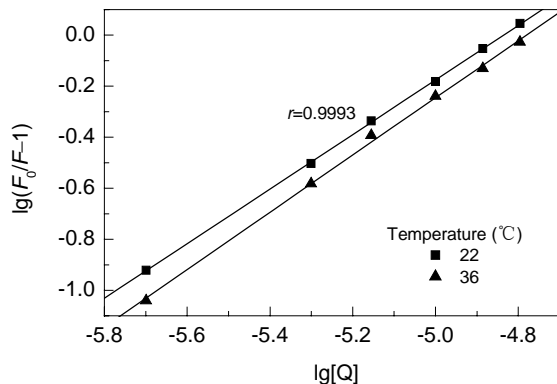


图 4 22 和 36 °C 时  $\lg(F_0/F-1)$  与  $\lg[Q]$  的关系  
Fig.4 A plot of  $\lg(F_0/F-1)$  vs.  $\lg[Q]$  at 22 and 36 °C

对于以 1:1 结合的静态猝灭过程

$$K_A=[QP]/([P][Q])= \frac{\{[P]_0(1-F/F_0)\}}{\{[P]_0(F/F_0)[Q]\}}=(1-F/F_0)/([Q]F/F_0),$$

进而推导出  $F_0/F=1+K_A[Q]$ . (1)

上式与动态猝灭遵循的 Stern-Volmer 方程在形式上相似,  $K_A$  在数值上与  $K_m$  相同, 以  $F_0/F$  对  $[Q]$  作图(见图 3), 可求出不同温度下的  $K_A$ (见表 2).

表 2 不同温度下 BSA 和 Shikonin 的猝灭常数

Table 2 The quenching and dissociation constant,  $K_A$ , of BSA with shikonin at different temperatures

Temperature (°C)	$K_A (\times 10^4 \text{ mol/L})$	$r$
22	6.96	0.9993
36	5.91	0.9993

对于静态猝灭, 药物和蛋白质在基态时产生复合物, 导致蛋白质荧光强度降低, 随温度升高, 蛋白质和药物的结合紧密度有所减弱, 导致猝灭常数变小<sup>[12-14]</sup>. 从表 2 可以看出, 随着温度的上升, 紫草素与 BSA 的

猝灭常数减小, 由此证明了紫草素与 BSA 的猝灭方式为静态猝灭.

图 5 是紫草素和 BSA 相互作用的紫外吸收光谱图, 由图可知随着紫草素用量增加, 体系的吸光度呈规律性降低, 说明基态的 BSA 与紫草素存在相互作用, 形成复合物. BSA 吸收光谱的变化进一步验证了紫草素对 BSA 的猝灭作用为静态猝灭.

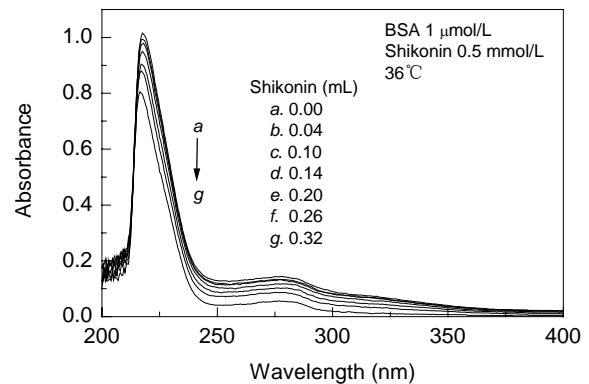


图 5 紫草素与 BSA 相互作用的紫外吸收光谱  
Fig.5 Ultraviolet absorption spectra of shikonin-BSA system

### 3.3 紫草素与牛血清白蛋白作用力形式的确定

一般情况下, 药物小分子与蛋白大分子间的非共价相互作用属分子间的弱相互作用, 包括氢键、范德华力、静电和疏水等多种相互作用形式, 而二者结合的热力学参数可用于确定它们之间作用力的类型, 为此计算了热力学参数. 对化合物与蛋白之间的相互作用, 当温度变化不大时, 二者结合的焓变  $\Delta H^0$  可以看作常数. 根据反应前后热力学参数焓变和熵变的相对大小, 可以判断小分子与蛋白质间的主要作用力类型. 等压条件下, 反应过程的平衡常数与温度的关系可用 Van't-Hoff 方程表示, 如反应焓变  $\Delta H^0$  看作常数时, Van't-Hoff 方程<sup>[15,16]</sup>可表示为

$$\ln(K_{A2}/K_{A1})=\Delta H^0/[R(T_1-T_2)],$$

$$\Delta G^0=-RT\ln K, \quad \Delta G^0=\Delta H^0-T\Delta S^0.$$

用表 2 中的  $K_A$  值计算热力学参数焓变  $\Delta H^0$ 、熵变  $\Delta S^0$  和自由能变  $\Delta G^0$ , 结果列于表 3.

表 3 紫草素-BSA 结合过程的热力学参数

Table 3 Thermodynamic parameters of shikonin-BSA binding process

T (°C)	$\Delta H^0$ (kJ/mol)	$\Delta G^0$ (kJ/mol)	$\Delta S^0$ [J/(K·mol)]
22	-12.97	-27.35	48.72
36	-12.97	-28.24	49.39

一般认为  $\Delta H^0 < 0$ ,  $\Delta S^0 > 0$  时小分子与蛋白之间以静电作用力结合;  $\Delta H^0 \approx 0$ ,  $\Delta S^0 > 0$  时小分子与蛋白质间以疏水作用力结合. 因此推断紫草素与 BSA 之间的作用力

主要是静电作用力. 但多数情况下, 有机小分子与蛋白质的反应是多种作用力协同作用的结果, 紫草素分子中含 3 个羟基, 表明氢键作用力也参与了紫草素与 BSA 的作用过程.

### 3.4 紫草素与 BSA 作用过程中 BSA 构象的变化

加入紫草素使 BSA 的内源荧光发生猝灭, 说明 BSA 的构象有可能发生改变. 同步荧光光谱具有简化光谱、窄化谱带和减少光谱重叠等优点而常被用于探讨蛋白质构象的变化. BSA 分子中的色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸残基均有荧光产生, 而色氨酸残基是 BSA 中的主要荧光源. 目前已知 $\Delta\lambda=60$  nm 时获得的同步荧光光谱图反映了 BSA 中色氨酸残基所处的微环境<sup>[8,17]</sup>, 通过同步荧光光谱图的变化情况可大致推测 BSA 构象的某些改变. 如图 6 所示, 随着紫草素浓度的增加, 色氨酸残基的发射波长基本不变, 表明紫草素对 BSA 的构象影响不大.

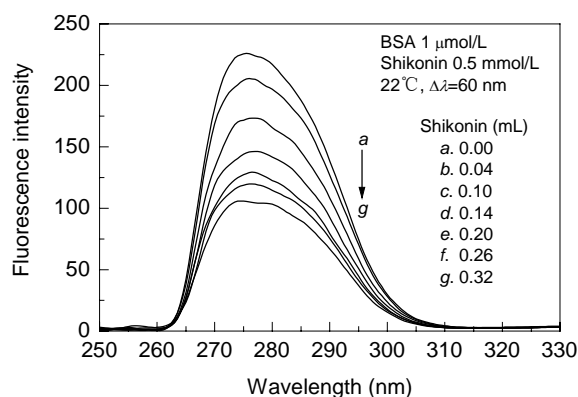


图 6 同步荧光光谱  
Fig.6 Synchronous fluorescence spectra

### 3.5 紫草素与 BSA 结合位置和能量转移效率的计算

根据 Förster 偶极-偶极非辐射能量转移理论<sup>[13]</sup>, 当化合物满足以下条件时, 将发生非辐射能量转移: (1) 供能体发射荧光; (2) 供能体的荧光发射与受能体的吸收光谱有足够重叠; (3) 供能体与受能体足够接近, 最大距离不超过 7 nm. 利用该理论可求出小分子化合物与蛋白质分子的结合位置与发射荧光基团间的距离. 在非辐射能量转移效率  $E$ 、供能体和受能体之间距离  $r$  与临界能量转移( $E=50\%$ )距离  $R_0$  有如下关系式<sup>[11,13,14,16]</sup>:

$$E=R_0^6/(R_0^6+r^6)=1-F/F_0, \quad (2)$$

$$R_0^6=8.8 \times 10^{-25}(K^2 n^{-4} J \Phi), \quad (3)$$

$$J=\sum F_D(\nu) \varepsilon_A(\nu) \nu^4 \Delta \nu / \sum F_D(\nu) \Delta \nu, \quad (4)$$

式中,  $K^2$  为偶极空间取向因子, 取受能体和供能体各向随机分布的平均值 2/3;  $n$  为介质折射指数, 一般取水和

有机物折射指数的平均值 1.336;  $J$  是供体(BSA)荧光发射光谱与受体(紫草素)吸收光谱的重叠积分,  $\Phi$  为供能体荧光量子产率, 对于 BSA, 通常取分子中色氨酸的量子产率 0.118;  $F_D(\nu)$  为荧光供能体在波数为  $\nu$  时的荧光强度,  $\varepsilon_A(\nu)$  为受能体在波数为  $\nu$  时的摩尔吸光系数. 将图 7 光谱重叠部分采用矩形分割法求出积分值  $J=2.776 \times 10^{-22} \text{ cm}^3 \cdot \text{L/mol}$ , 通过式(3)可求出  $R_0=1.35$  nm; 利用紫草素和 BSA 等摩尔相互作用后的荧光强度, 根据式(2)可求出能量转移效率  $E=10.7\%$ , 进而求出  $r=1.92$  nm. BSA 分子中第 134 和 212 位处有 2 个色氨酸残基, 它们分别处于不同的结构域中, BSA 的荧光光谱主要由 212 位的色氨酸残基产生, 由此可知紫草素与 BSA 的结合位置距离 212 位色氨酸残基 1.92 nm.

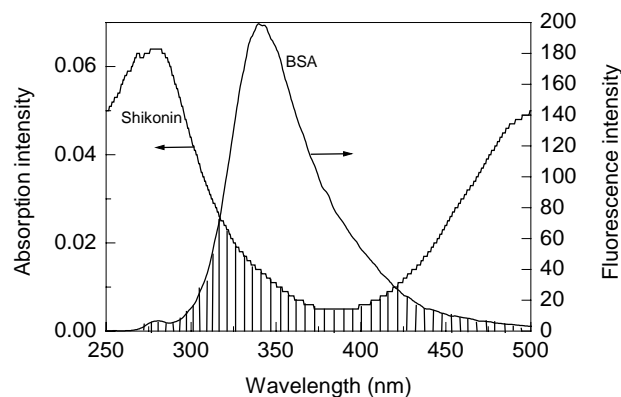


图 7 BSA 的荧光光谱和紫草素的 UV 光谱的重叠现象  
Fig.7 Overlapping of BSA fluorescence spectra with shikonin UV spectra

## 4 结论

紫草素对牛血清白蛋白的荧光有明显的猝灭作用, 猝灭方式为静态猝灭, 紫草素与牛血清白蛋白之间发生了分子内非辐射能量转移; 紫草素和牛血清白蛋白的结合位点数为 1, 结合位置距离 212 位色氨酸残基 1.92 nm; 22 和 36 °C 时紫草素对牛血清白蛋白荧光的猝灭常数分别为  $6.96 \times 10^4$  和  $5.91 \times 10^4$  mol/L. 热力学分析表明, 紫草素与蛋白之间以静电作用力结合为主, 同时, 紫草素分子含多个羟基, 它们之间还存在氢键作用力.

### 参考文献:

- [1] 葛锋, 王晓东, 王玉春. 药用紫草的研究进展 [J]. 中草药, 2003, 34(9): 5-8.
- [2] 黄志舒, 张敏, 马林, 等. 紫草的化学成分及其药理活性研究概况 [J]. 天然产物研究与开发, 2000, 12(1): 73-82.
- [3] 蒋英丽, 宋今丹. 新疆紫草素诱导人大肠癌细胞的凋亡 [J]. 癌症, 2001, 20(12): 1355-1358.
- [4] Papageorgiou V P, Assimopoulou A N, Samanidou V F, et al. Recent Advances in Chemistry, Biology and Biotechnology of Alkannins and Shikonins [J]. Curr. Org. Chem., 2006, 10: 2123-2142.
- [5] 廖卫平, 刘永明, 刘淑燕. 荧光光谱法研究葛根素与牛血清白蛋

- 白的相互作用 [J]. 药物分析杂志, 2007, 27(2): 245-247.
- [6] 张红梅, 王彦卿, 张根成. 荧光光谱法研究茶碱与牛血清白蛋白的相互作用 [J]. 应用化学, 2006, 23(8): 866-870.
- [7] Hu Y J, Liu Y, Wang J B, et al. Study of the Interaction between Monoammonium Glycyrrhizinate and Bovine Serum Albumin [J]. J. Pharm. Biomed. Anal., 2004, 36: 915-919.
- [8] 陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 等. 荧光分析法, 第2版 [M]. 北京: 科学出版社. 1990. 64-86.
- [9] 杨曼曼, 席小莉, 杨频. 变温下荧光猝灭和加强理论公式合理性的比较 [J]. 化学学报, 2006, 64(14): 1437-1445.
- [10] Lakowicz J R, Weber J G. Quenching of Fluorescence By Oxygen-probe for Structural Fluctuations in Macromolecules [J]. Biochemistry, 1973, 12: 4161-4170.
- [11] 谢文俊, 冯玉萍, 曹胜利, 等. 光谱法研究甲胺喋呤与牛血清白蛋白的相互作用 [J]. 光谱学与光谱分析, 2006, 26(10): 1876-1879.
- [12] 闻晓东, 李萍, 钱正明, 等. 三种抗氧化物质与牛血清白蛋白的相互作用 [J]. 化学学报, 2007, 65(5): 421-429.
- [13] Zhang G W, Que Q M, Pan J H, et al. Study of the Interaction between Icariin and Human Serum Albumin by Fluorescence Spectroscopy [J]. J. Mol. Struct., 2008, 881: 132-138.
- [14] Leckband D A. Measuring the Forces that Control Protein Interactions [J]. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 2000, 29: 1-26.
- [15] Cui F L, Zhang Q Z, Yan Y H, et al. Study of Characterization and Application on the Binding between 5-Iodouridine with HSA by Spectroscopic and Modeling [J]. Carbohydr. Polym., 2008, 73: 464-472.
- [16] Orwora J, Bochs B. In Silico Prediction of Drug-binding Strengths to Human Serum Albumin [J]. J. Chromatogr. B, 1996, 677: 1-28.
- [17] 杨曼曼, 席小莉, 杨频. 用荧光猝灭和荧光加强两种理论研究喹诺酮类新药与蛋白质的作用 [J]. 高等学校化学学报, 2006, 27(4): 687-691.

## Study on Interaction between Shikonin and Bovine Serum Albumin by Fluorescence Spectra

GE Feng<sup>1</sup>, WANG Jian-ping<sup>1</sup>, LIU Di-qiu<sup>1</sup>, CHEN Chao-yin<sup>1</sup>, HANG Ben-yong<sup>1</sup>, WANG Yu-chun<sup>2</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650224, China;  
2. State Key Lab. Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

**Abstract:** The interaction between shikonin and bovine serum albumin (BSA) was studied by fluorescence spectra. The results showed that shikonin strongly quenched the fluorescence of bovine serum albumin. The quenching mechanism was a static quenching procedure, and non-radiation energy transfer happened among molecules. The number of binding site was 1, and the binding locality was a distance of 1.92 nm away from tryptophan residue-212 in BSA. At 22 and 36°C, the quenching constant of BSA and shikonin system was  $6.96 \times 10^4$  and  $5.91 \times 10^4$  mol/L. Thermodynamic analysis showed that binding power between shikonin and BSA was electrostatic interaction mainly. In addition, several hydroxyl groups were in the molecular structure of shikonin, therefore, there was also hydrogenolysis interaction between shikonin and BSA.

**Key words:** shikonin; bovine serum albumin; fluorescence spectra; interaction