

荧光光谱法研究木栓酮与牛血清白蛋白的相互作用*

林之蔚¹ 邵正福² 万忠民^{1,2} 王飞² 雷泞菲^{1**}

(¹成都理工大学材料与化学化工学院 成都 610059)

(²中国科学院成都生物研究所 成都 610041)

摘要 为了解三萜类化合物在体内的结合转运机制,采用荧光光谱法结合紫外吸收光谱研究从中药爵床中分离的有效成分木栓酮(Friedelin, FDL)与牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)的结合反应.通过研究木栓酮对牛血清白蛋白内源性荧光的淬灭作用,发现木栓酮可以与牛血清白蛋白相互结合,且其作用是一个静态淬灭的过程.通过计算木栓酮与牛血清白蛋白的结合常数和结合位点,发现在生理弱碱性溶液中二者具有较强的结合作用,且以1:1结合.根据热力学参数推测木栓酮与牛血清白蛋白的作用力类型为氢键和范德华力.根据Förster非辐射能量转移机理,计算出木栓酮与牛血清白蛋白结合距离为2.86 nm.研究表明木栓酮在体内可以通过血清白蛋白进行结合和转运.图5 表2 参12

关键词 木栓酮;牛血清白蛋白;荧光淬灭;荧光光谱法;爵床;三萜类化合物

CLC R963 : Q946.41

Spectroscopic Studies on Interaction of Friedelin with Bovine Serum Albumin *

LIN Zhiwei¹, TAI Zhengfu², WAN Zhongmin^{1,2}, WANG Fei² & LEI Ningfei^{1**}

(¹College of Materials and Chemistry and Chemical Engineering, Chengdu University of Technology, Chengdu 610059, China)

(²Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

Abstract In order to find the transport mechanism of triterpenoids *in vivo*, the fluorescence and UV-Vis spectroscopic methods were used to study the binding reaction between friedelin, a pentacyclic triterpenoid isolated from *Rostellularia procumbens*, and bovine serum albumin (BSA). The fluorescent emission of BSA was inhibited by friedelin in a dose-dependent manner, indicating that friedelin interacted with BSA by a static process. The binding constant and the number of binding sites were calculated based on the quenching effect of friedelin on BSA, and the results indicated that friedelin interacted with BSA in high affinity with the binding ratio of 1 : 1 under alkaline condition. Thermodynamic parameter study indicated the interaction force between friedelin and BSA was hydrogen bonding and van der Waals force. The distance between friedelin and BSA was calculated to be 2.86 nm according to Förster non-radiative energy transfer theory. These results demonstrate that friedelin could bind with serum albumin. Fig 5, Tab 2, Ref 12

Keywords friedelin; bovine serum albumin; fluorescence quenching; fluorescence spectroscopy; *Rostellularia procumbens*; triterpenoids

CLC R963 : Q946.41

各种药物进入人体一般都要通过血浆的贮存和运输到达受体部位发挥其药理作用.在众多生物大分子中,血清白蛋白合成于肝脏,是脊椎动物血浆中含量最丰富的蛋白质,具有多种生理功能.血清白蛋白在储藏和转运外源性化合物

中发挥着重要作用,能够明显地提高血浆中疏水性化合物的溶解性,并且调节其向细胞的转运,因此化学物质在同血清白蛋白结合后会显著地影响其吸收、分配、代谢和稳定性及毒性^[1].深入研究血清白蛋白与药物的相互作用对进一步了解药物的体内代谢规律,对指导药物的临床研究和临床应用具有重要的意义.在众多研究方法中,荧光光谱法被广泛用于研究生物大分子与小分子、离子的相互作用,是研究血清白蛋白和药物的相互作用的一种重要方法^[2].

收稿日期: 2011-08-15 接受日期: 2011-09-15

*四川省青年基金项目(No. 07ZQ026-039)资助 Supported by the Youth Foundation of Sichuan, China (No. 07ZQ026-039)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: leiningfei@cdut.cn)

三萜类成分(又叫灵芝酸)在自然界分布很广,鲨鱼油、甘草、五味子的有效成分中都有三萜类物质。灵芝三萜类成分有五环三萜和四环三萜两类,一些五环三萜类化合物如熊果酸,乌苏酸等被报道具有抗肿瘤,抗AIDS的活性^[3]。中草药爵床具有清热解毒、利尿消肿的功效,常用于治疗感冒发热、咽喉肿痛、痢疾、肠炎等炎症疾病。在前期的研究中,我们从爵床全草95%乙醇提取物分离并鉴定得到了木栓酮。木栓酮(Friedelin, FDL)结构如图1,是木栓烷型的五环三萜类化合物。对小鼠耳廓致炎的临床前研究表明木栓酮母核具有抗炎活性,并且通过对母核进行化学修饰得到的衍生物也具有不同程度的抗炎活性^[4],目前还没有木栓酮与牛血清白蛋白相互作用的研究的相关报道,通过研究其与血清白蛋白的作用机制,将有助于解释木栓酮的生物转化及其抗炎活性,对其作为新的抗炎药物的研究开发具有重要的意义。

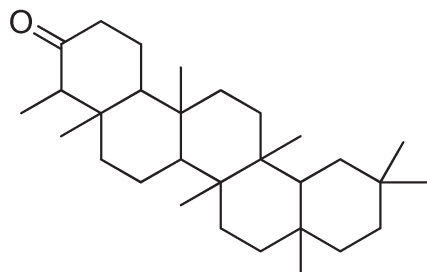


图1 木栓酮(Friedelin)结构式

Fig. 1 The chemical structure of friedelin

本实验拟利用荧光光谱法和紫外可见分子光谱法结合研究模拟生理条件下木栓酮与牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)的相互作用。利用木栓酮对BSA荧光的猝灭,分别求出二者之间结合反应的猝灭常数和结合常数,由Förster非辐射能量转移理论确定木栓酮与BSA的结合距离,并通过计算热力学参数解释它们之间的主要作用力情况。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

牛血清白蛋白(以0.1 mol/L、pH 7.4的Tris-HCl溶液配制),木栓酮(中国科学院成都生物所天然产物中心)从爵床全草中提取并纯化得到,纯度 $\geq 95\%$;实验用水均为二次蒸馏水(电阻率 $\geq 18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$);其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

离心机, Thermo Varioskan Flash 多功能读数仪, 排枪, 摇床, 超声水浴锅, UV检测96孔板。

1.3 方法

荧光光谱测定: 首先用双蒸水配制pH 7.40、0.1 mol/L的Tris-HCl缓冲溶液, 再用该缓冲液配制浓度为 $3 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 的BSA母液, 将其保存在4℃备用。依次移去8.9 mL的Tris-HCl缓冲溶液和1 mL的BSA母液配成含有 $3 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 的混合体

系, 将约10 mL的混合液加到加样槽内在摇床上混匀。将10 mg/mL的木栓酮配用DMSO成 $5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 的母液, 离心, 在依次配制 $1 \times 10^{-3} \sim 5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 的母液; 测定前用排枪将混合液移取99 μL 至96孔测定板上, 再将一个浓度重复3次移取1 μL 至板中混匀, 反应大约5~10 min后以273、330 nm分别为激发波长和发射波长(λ_{ex} 、 λ_{em}), 在多功能读数仪上依次测定不同温度下体系的荧光强度, 所得实验数据用于猝灭常数和结合常数等的计算。

紫外吸收光谱测定: 在96孔全波长紫外扫描板上, 先校正光程为1 cm, 然后依次加入由pH 7.4的Tris-HCl缓冲液配制的木栓酮溶液及终浓度相同的BSA溶液(终浓度均为 $3 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$), 设置3个重复, 并同时加上3个空白作对照, 在多功能读数仪上选择可见光部分, 测定290~500 nm的UV-fVis光谱。

2 结果与分析

2.1 木栓酮与BSA的结合反应

BSA中由于色氨酸、酪氨酸的存在使其具有内源荧光, 在273 nm激发波长下, BSA的最大发射波长是330 nm。在本实验条件下保持BSA浓度不变, 由图2可见, 随着木栓酮浓度的不断增加, 峰形基本保持不变, 但BSA在330 nm处的内源荧光发射峰强度明显减弱, 表明木栓酮与BSA之间存在结合反应。

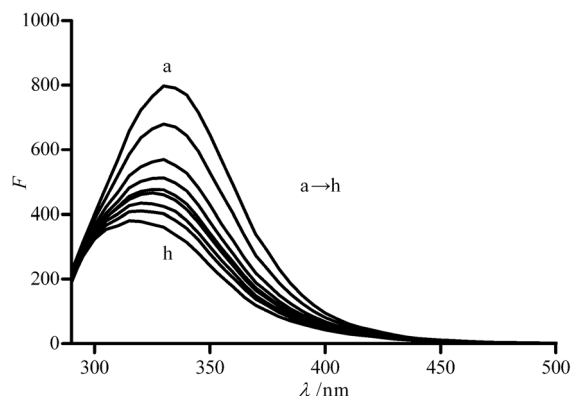


图2 300 K条件下木栓酮对BSA的荧光猝灭效应

Fig. 2 Fluorescence quenching spectra of BSA by various concentrations of friedelin at 300 K

0.1 mol/L Tris-HCl buffer solution (pH 7.40); $c(\text{BSA}) = 3 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$; $c(\text{friedelin})$ (a→h) are $0, 1 \times 10^{-5}, 2 \times 10^{-5}, 2.5 \times 10^{-5}, 3.5 \times 10^{-5}, 4 \times 10^{-5}, 4.5 \times 10^{-5}, 5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$

其荧光猝灭符合Stern-Volmer方程^[5]:

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 c_q = 1 + K_{sv} c_{\text{FDL}} \quad (1)$$

式中: F_0 、 F 分别表示猝灭剂不存在和存在时蛋白质的荧光强度; c_{FDL} 为猝灭试剂(木栓酮)的浓度; K_q 为双分子表观猝灭速率常数; τ_0 为蛋白荧光寿命, 对于生物大分子约为 10^{-8} s ^[6]; K_{sv} 为猝灭常数。

表1 不同温度下木栓酮对BSA的猝灭速率常数、结合常数和结合位点数

Table 1 The quenching constants (K_q), binding constants (K_A), number of binding sites (n) and relative thermodynamic parameters of the BSA-Friedelin system at different temperatures

反应温度 (T/K)	猝灭速率常数 ($K_q/\text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$)	相关系数 (r^2)	结合常数 ($K_A/\text{L mol}^{-1}$)	结合位点个数 (n)	相关系数 (r^2)
300	2.23×10^{12}	0.9866	1.35×10^5	1.18	0.9946
310	2.14×10^{12}	0.9823	3.85×10^4	1.06	0.9884
315	1.84×10^{12}	0.9773	3.30×10^4	1.06	0.9826

根据Stern-Volmer方程, 通过拟合线性曲线(图3)分别求出了不同温度下猝灭速率常数 K_q 的值及结合常数 K_A 和结合位点数 n 的值(表1)。

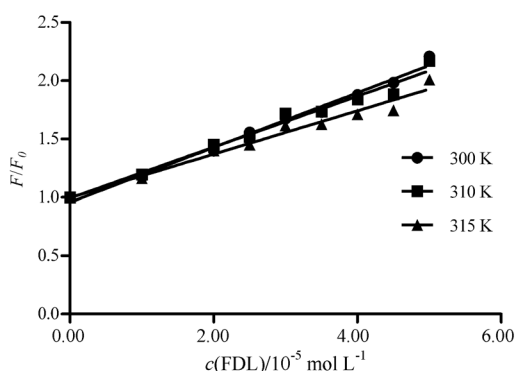


图3 木栓酮和BSA荧光猝灭Stern-Volmer曲线

Fig. 3 The Stern-Volmer curves of fluorescence quenching of BSA by friedelin

由表1可知, 随着温度的升高, 木栓酮对BSA的荧光猝灭速率常数 K_q 呈减小趋势, 且远大于各种猝灭剂对生物大分子的最大扩散猝灭速率常数 $2 \times 10^{10} \text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$ [7]。说明木栓酮对BSA荧光的猝灭过程不是动态猝灭, 应为静态猝灭。

2.2 结合常数及结合位点数的计算

从以上讨论可知木栓酮与BSA的猝灭作用属于静态猝灭, 假设一个BSA分子有 n 个相同且独立的结合位点可与木栓酮结合, 符合下列方程:

$$\lg [(F_0 - F)/F] = \lg K_A + n \lg c_{\text{FDL}} \quad (2)$$

以 $\lg (F_0 - F)/F$ 为纵坐标, $\lg c_{\text{FDL}}$ 为横坐标作直线, 由斜率求出木栓酮与BSA结合的结合位点数 n , 通过截距求出结合常数 K_A , 见图4。从结合常数的数值可以看出二者之间有较强的结合作用, 说明木栓酮在体内能被血清白蛋白转运。平均结合位点数约为1, 可以看出1 mol BSA约与1 mol木栓酮分子结合。

2.3 热力学函数计算

药物与蛋白质间的作用力属于分子间的弱相互作用, 包括氢键、范德华力、静电引力和疏水力。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, 一般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

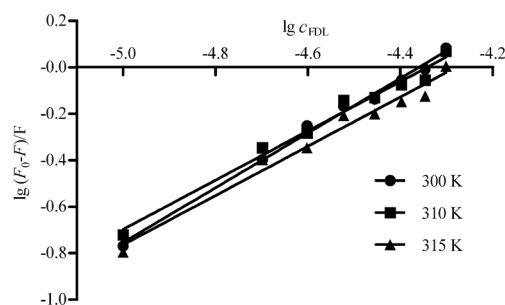


图4 在不同温度(300 K, 310 K, 315 K)时木栓酮对BSA猝灭效应的双对数曲线

Fig. 4 Double-lg plot of friedelin quenching effect on BSA fluorescence at different temperatures

利于反应的自发进行[8]。Ross等的实验结果[9]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: $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$ 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, 根据公式:

$$\ln K = -\Delta H/RT + \Delta S/R \quad (3)$$

$$\Delta G = -RT \ln K_A = \Delta H - T\Delta S \quad (4)$$

以 $\ln K$ 为纵坐标, $1/T$ 横坐标拟合直线, 通过截距和斜率可求得生理条件下, 木栓酮与BSA的热力学参数 ΔS 、 ΔH [10], 进而求得 ΔG , 其结果列于表2中。

从表2中的数据结合Ross的研究结果可知 $\Delta G < 0$ 反应是一个自发进行过程。 $\Delta S < 0$, $\Delta H < 0$ 说明范德华力和氢键同时存在。

2.4 结合距离的计算

根据Förster非辐射能量转移原理: 若供体的荧光发射光谱与受体的吸收光谱有足够的重叠, 且供体与受体之间的距离不超过7 nm时, 将会发生非辐射能量转移现象, 从而使荧光体荧光猝灭[10]。能量转移效率 E 与供体-受体间距离 r_0 以及临界能量转移距离 R_0 之间的关系为:

$$E = 1 - F/F_0 = R_0^6/R_0^6 + r_0^6 \quad (5)$$

式中: F 为BSA和木栓酮浓度比为1时BSA的荧光强度; F_0 为与木栓酮作用前BSA的荧光强度; 这里 R_0 是 $E = 50\%$ 时的临界距离:

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

表2 木栓酮与BSA结合的热力学参数

Table 2 The binding constants K_A and relative thermodynamic parameters of the friedelin-BSA system at different temperatures

温度 (T/K)	结合常数 (K_A /L mol ⁻¹)	自由能变化 (ΔG /kJ mol ⁻¹)	焓变 (ΔH /kJ mol ⁻¹)	熵变 (ΔS /J mol ⁻¹ K ⁻¹)
300	1.35×10^5	-29.46	-77.26	-159.84
310	3.85×10^4	-27.21	-77.26	-159.84
315	3.30×10^4	-27.24	-77.26	-159.84

式中： k^2 为偶极空间取向因子（取蛋白质-药物各向随机分布的平均值 $k^2=2/3$ ）； N 为介质的折射指数（取水和有机的平均值 $N=1.36$ ）； ϕ 为供体（BSA）的荧光量子产率取 $\phi=0.15$ ^[12]； J 为供体（BSA）荧光光谱与受体（木栓酮）吸收光谱的重叠积分，即

$$J = \sum F_{\lambda} \epsilon_{\lambda} \lambda^4 d\lambda / \sum F_{\lambda} d\lambda \quad (7)$$

式中： F_{λ} 为荧光供体（BSA）在波长 λ 处的荧光强度； ϵ_{λ} 为受体（药物分子）在波长 λ 处的摩尔吸光系数。通过拟合曲线法求该定积分得到 $J=6.48 \times 10^{-15} \text{ L cm}^3/\text{mol}$ 。

图5是BSA的荧光光谱与木栓酮的紫外吸收光谱的重叠图谱，通过拟合曲线法由(7)式计算得： $J=6.48 \times 10^{-15} \text{ L cm}^3/\text{mol}$ 将上述数值代入式(5)和(6)，求得： $E=1-F/F_0=1-658.75/862.8=1-0.764=0.236$ ； $R_0=2.35 \text{ nm}$ ， $r_0=1.22R_0=2.86 \text{ nm}$ ，证明BSA与木栓酮之间的能量转移效率较大，由计算结果知木栓酮与BSA荧光性氨基酸残基间的空间距离 r_0 远小于7 nm，因此BSA与木栓酮之间可以发生能量转移，使BSA荧光猝灭，据此推测BSA荧光猝灭的原因包括非辐射能量转移和静态猝灭。

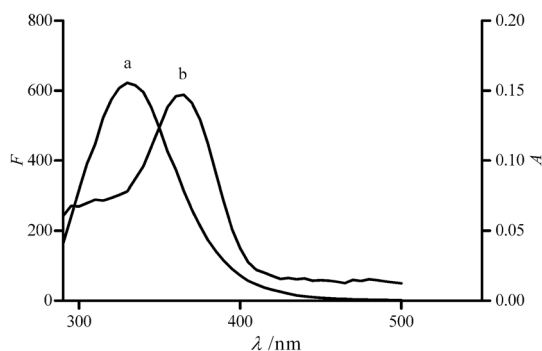


图5 BSA荧光光谱(a)与木栓酮紫外光谱(b)重叠图($T=300 \text{ K}$, $c_{\text{BSA}} = c_{\text{FDL}} = 2.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$)

Fig. 5 Overlap of fluorescence emission spectrum of BSA (a) and absorption spectrum of friedelin (b) ($T=300 \text{ K}$, $c_{\text{BSA}} = c_{\text{FDL}} = 2.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$)

3 结论

本文利用荧光光谱法并结合紫外吸收光谱，详细地研究了木栓酮与BSA的相互作用，发现木栓酮对BSA内源荧光具有猝灭作用，其猝灭原因主要为静态猝灭和非辐射能量转移。计算了木栓酮和血清白蛋白的结合常数和结合位点数，证明了氢键和范德华力为两者间主要作用力，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的非辐射能量转移理论，计算求出了木栓酮与BSA的结合位置和BSA分子中发荧光集团之间的距离为2.86 nm，证明了木栓酮容易被蛋白质存储和转运，并能很好地发挥其药理所用。国内外利用荧光法对药物分子及血清白蛋白的相互作用进行了大量研究并建立起了数据库^[12]，数据库中的数据被广泛应用在药物分子设计、开发新药、揭示药物动力学问题、指导临床合理用药等临床实践之中^[2]。本研究通过建立木栓酮与血清白蛋白的体外模型，不仅完善了药物分子与血清白蛋白结合数据库，而且为深入研究木栓酮及其衍生物的抗炎活性提供了条件，同时为研究三萜类化合物对BSA荧光猝灭机理作了重要补充。

References

- Shahabadi N, Maghsudi M, Kiani Z, Pourfoulad M. Multispectroscopic studies on the interaction of 2-tert-butylhydroquinone (TBHQ), a food additive, with bovine serum albumin. *Food Chem*, 2011, **124** (3): 1063~1069
- Wang F (王芳), Pei MY (裴明砚), Tang Q (唐乾), Zheng XF (郑学仿). Applications of fluorescence technology on the interactions between drugs and serum albumin. *J Dalian Univ* (大连大学学报), 2009, **30** (3): 39~44
- Meng YQ (孟艳秋), Zhao LX (赵临襄), Wang C (王趁), Lü MX (吕明心), LIU D (刘丹). Structure-activity relationship of pentacyclic triterpenes. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2004, **13** (12): 1098~1098
- He L (何兰), Yue XJ (岳祥军), Chen YZ (陈耀祖), Pan X (潘宣), Wu YJ (吴勇杰), Tang FT (唐富天). Chemical modification of friedelin and anti-inflammatory activity. *Chin J Appl Chem* (应用化学), 1996, **13** (5): 67~69
- Cheng ZJ, Zhang YT. Spectroscopic investigation on the interaction of salidroside with bovine serum albumin. *J Mol Struct*, 2008, **889** (1~3): 20~27
- Bi SY, Sun YT, Qiao CY, Zhang HQ, Liu CM. Binding of several anti-tumor drugs to bovine serum albumin: Fluorescence study. *J Lumin*, 2009, **129** (5): 541~547
- Yang YM, Hu QL, Fan YL, Shen HS. Study on the binding of luteolin to

- bovine serum albumin. *Spectrochim Acta Part A*, 2008, **69** (2): 432~436
- 8 Zhang T (张婷), Xu H (徐慧), Li GH (李桂华), Liu CY (柳成荫), Zou N (邹宁), Zhang X (张鑫), Liu QW (柳全文). Spectroscopic study of binding reaction between celastrol and bovine serum albumin. *Food Chem* (食品科学), 2009, **30** (17): 130~133
- 9 Ross PD, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: Forces contributing to stability. *Biochemistry*, 1981, **20** (11): 3096~3101
- 10 Forster T, Sinanoglu O. *Modern Quantum Chemistry*. New York, USA: Academic Press, 1996. 93
- 11 Shaikh SMT, Seetharamappa J, Kandagal PB, Ashoka S. Binding of the bioactive component isothipendyl hydrochloride with bovine serum albumin. *J Mol Struct*, 2006, **786** (1): 46~52
- 12 Li N (李娜), Wei YJ (魏永巨). Developments of fluorescence study on the combination of drugs with serum albumin. *J Hebei Norm Univ* (河北大学学报), 2003, **27** (2): 176~180



功能蛋白质研究——生命科学前沿

何庆瑜 著 出版时间: 2012年3月 书号: 978-7-03-03384-5 装帧: 平装 开本: 16开 定价: ¥88.00

内容简介

蛋白质是生命活动的重要执行者,参与遗传、发育、应急和能量代谢等重要的生命进程。揭示生命内数以万计的蛋白质的具体功能和完成功能的机制,是后基因组时代生命科学最重要也是充满挑战性的研究领域之一。对蛋白质功能的研究目前还不完整,当一种模式生物的基因组序列被测定完毕后,科学家们只是根据序列的保守性来推断某些基因编码蛋白的功能,但是部分蛋白质及其功能是物种特异的。特定的蛋白质分子在生物体内发挥何种功能?发挥特定功能的分子机制是怎样的?蛋白质功能是如何被调节的?是什么样的结构基础使得特定的蛋白质分子能够发挥特定的生物功能?蛋白质分子生命进程中的质量控制是如何实现的?具有形形色色功能的蛋白质分子又是如何进化产生的?这些问题一直困扰着从事蛋白质研究的科研工作者。本书从蛋白质的功能,到如何在生物体内发挥作用及功能的调节机制,以及功能蛋白体外和体内研究的生物化学、生物物理学和生物信息学的方法,首次由浅入深的系统介绍蛋白功能研究这门学科,力求给以上的问题给出清晰的答案。

医学分子细胞生物学——研究策略和技术原理 ——现代生物技术前沿

罗建红 著 出版时间: 2012年3月 书号: 978-7-03-023811-5 装帧: 平装 开本: 16开 定价: ¥58.00

内容简介

《医学分子细胞生物学:研究策略与技术原理》从生物医学相关前沿领域的研究主题切入,着重介绍所涉及的分子生物学和细胞生物学的技术原理与研究策略。全书共分14章,内容涉及基因组学、基因克隆、基因的表达与调控、非编码小RNA、蛋白质组学、蛋白质结构、细胞显微成像、细胞内信号转导及组织细胞电生理学等分子和细胞生物学的核心技术。另外,我们还选择了5个重要的技术专题,包括动物基因修饰、肿瘤生物标志物筛选、分子药物靶点、干细胞及基于网络的生物信息利用,旨在帮助读者尽快掌握生物医学重要前沿领域的研究策略和技术原理,从而采用合适的方法和技术解决相关的科学问题。

《医学分子细胞生物学:研究策略与技术原理》适于作为现代生物医学相关专业研究生的实验课程教材或研究参考书,也可作为生物学、农学、医学及药学等专业高年级本科生,以及生物医药领域科研工作者的科研参考书。

科学出版社 科学销售中心 联系人: 周文宇 电话: 010-64022646 010-64017321

网址: <http://www.lifescience.com.cn/>; <http://shop.sciencepress.cn/>

E-mail: zhouwenyu@mail.sciencepress.com

购书网站:

学士书店: <http://www.xueshi.com.cn/>; 当当网: <http://www.dangdang.com/>; 亚马逊: <http://www.Amazon.cn/>;

京东图书: <http://book.360buy.com/>