

维生素 C 与维生素 B₂ 对中药有效成分牡荆素与人血清白蛋白结合的扰动作用

张国文*, 赵楠, 王琳

(南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西南昌 330047)

摘 要:采用荧光光谱、紫外光谱、红外光谱及圆二色谱(CD)等方法,研究了维生素 C(VC)、维生素 B₂(VB₂)对中药有效成分牡荆素(VTX)与人血清白蛋白(HSA)结合的扰动,求得 VC 或 VB₂ 存在下 HSA-VTX 结合的猝灭常数 K_{SV} 、结合常数 K_a 和结合位点数 n 等参数,归纳了 VC、VB₂ 可能的扰动方式。结果表明,25℃ 时,在 VC 存在下, HSA-VTX 体系的 K_{SV} 减小 45.8%, K_a 减小 9.5%, n 减少 11.8%, 而且作用力类型由氢键和范德华力转变为疏水作用力; VB₂ 存在下, K_{SV} 增加 17.9%, K_a 减小 14.2%, n 由 0.949 略增至 1.067。VC、VB₂ 与 HSA 结合导致 HSA 分子构象变化是维生素扰动 HSA-VTX 结合的共通方式和主要方式,而 VTX-VB₂ 复合物与 HSA 作用是 VB₂ 对 HSA-VTX 结合扰动的又一方式。

关键词:牡荆素;人血清白蛋白;荧光光谱;维生素

中图分类号:O657.39

文献标识码:A

牡荆素(Vitexin, VTX)属于黄酮碳甙类天然产物,对缺血性心肌损伤具有良好的保护作用^[1-2]。因此,研究牡荆素分子与人血清白蛋白(HSA)的相互作用有利于从分子水平了解牡荆素在体内的转运、代谢过程。然而,对于复杂的生命体系而言,生命过程中物质分子间的相互作用远不仅限于两者之间,维生素 C(VC)、维生素 B₂(VB₂)是生物体必需的营养物质,人血清白蛋白是贮存和转运 VC 和 VB₂ 的主要天然载体蛋白。因此,研究蛋白质-药物之间及其在营养物质 VC、VB₂ 存在下的结合作用,有助于阐明 VC、VB₂ 对药物与蛋白质作用扰动的分子机制,为探索多元复杂体系内药物-蛋白质相互作用规律,及中药科学用药规律提供有益信息。

目前,营养物质对药物活性成分与蛋白质相互作用的扰动机制的研究鲜有报道。李磊等^[3]采用荧光光谱、圆二色光谱(CD)和紫外光谱研究了葡萄糖、VC 分别对中药有效成分七叶内酯-牛血清白蛋白(BSA)结合的扰动方式。本课题组前期研究^[4]表明,共存物亚硝酸钠可能以“离子架桥”的方式参与白杨素与 BSA 的结合,而葡萄糖、VC 与 BSA 作用改变 BSA 的分子构象,从而扰动白杨素与 BSA 的结合。本文采用了荧光光谱、紫外光谱、红外光谱及圆二色谱(CD)等方法,研究了在水溶液中 VC、VB₂ 加入前后对 VTX-HSA 体系荧光猝灭常数、结合常数、热力学参数的影响以及对体系光谱影响,探讨了 VC、VB₂ 对牡荆素与 HSA 结合的扰动作用。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

F-4500 型荧光光度计(日本,日立公司);UV-2450 紫外-可见分光光度计(日本,岛津公司);Nexus

收稿日期:2010-11-08

修回日期:2011-01-06

基金项目:国家自然科学基金(No. 31060210ZH0069);食品科学与技术国家重点实验室基金(No. SKLF-TS-200917, SKLF-MB-201002, SKLF-MB-200807)

* 通讯作者:张国文,男,博士,教授,主要研究方向为光谱分析及应用。

380 傅立叶红外光谱仪,配置 ATR 附件(美国,Nicolet 公司);MOS 450 圆二色谱仪(法国,Bio-Logic 公司);pHS-3C 型酸度计(上海雷磁仪器厂)。

牡荆素标准品(中国药品生物制品检定所)储备液浓度为 $2.08 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,无水甲醇配制;人血清白蛋白(HSA,美国 Sigma 公司)配制成 $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液,4℃保存于冰箱中备用;pH=7.4 的磷酸盐缓冲溶液; $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 溶液;其他试剂均为分析纯,实验用水为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

1.2.1 荧光光谱测定 在 10 mL 的比色管中,依次加入 2.0 mL pH=7.4 的磷酸盐缓冲溶液,2.0 mL $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 溶液,667 μL $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HSA 溶液,以二次蒸馏水定容至 10 mL。准确移取 3.0 mL 该溶液于石英荧光池中,用可调式移液器逐次加入一定体积的牡荆素(5 $\mu\text{L}/\text{times}$)溶液,混合均匀并静置 5 min。记录荧光发射光谱。

1.2.2 红外光谱测定 分别取一定体积的 VC、VB₂ 溶液加入到牡荆素与 HSA 的混合溶液中,用磷酸盐缓冲溶液定容至 10 mL,混合均匀。移取适量上述溶液至红外光谱仪 ATR 附件的样品池中,以相同浓度的磷酸盐缓冲溶液为空白,扫描溶液的红外光谱。

1.2.3 圆二色谱测定 分别取一定体积的 VC、VB₂ 溶液加入到牡荆素与 HSA 的混合溶液中,用磷酸盐缓冲溶液定容至 10 mL,混合均匀。移取适量上述溶液至圆二光谱仪的样品池中,以相同浓度的磷酸盐缓冲溶液为空白,扫描溶液的圆二色谱。

2 结果与讨论

2.1 VC 或 VB₂ 存在下牡荆素与 HSA 作用的红外光谱

红外光谱法能够提供蛋白质在水溶液中构型变化的重要信息,因此红外光谱法是一种分析蛋白质结构变化的重要手段。图 1 分别为 HSA、VTX 及 HSA+VTX 水溶液的傅里叶变换衰减全反射红外光谱(ATR-FTIR)。当向 HSA 溶液中加入 4 μL 浓度为 $2.08 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 VTX 溶液时(混合溶液中 VTX 的最终浓度为 $1.02 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$),HSA 的 amide I 波段 C=O 峰几乎消失;amide II 波段 1553 cm^{-1} 的吸收峰移动到 1545 cm^{-1} 。相应地,VTX 1652 和 1558 cm^{-1} 的吸收峰也几乎消失。表明在水溶液中 VTX 与 HSA 发生了相互作用。向 VTX 与 HSA 的混合体系中加入一定量的 VC 后,HSA 的上述 2 个特征峰完全消失,同时,VTX 的 C=O 特征吸收峰 1652 cm^{-1} 几乎消失。在 VTX 与 HSA 的混合体系中加入一定量的 VB₂ 时,HSA 的 amide I 波段 C=O 峰从 1653 cm^{-1} 移动到 1644 cm^{-1} ;amide II 波段的吸收峰几乎消失。VTX 的 C=O 特征吸收峰 1652 cm^{-1} 移动到 1644 cm^{-1} 。上述结果表明,水溶液中 VC 或 VB₂ 能够影响药物与 HSA 的相互作用^[5]。

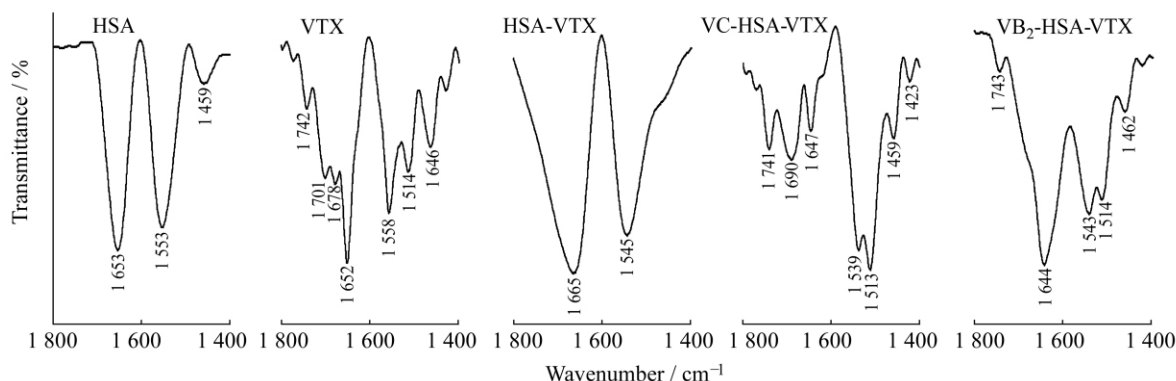


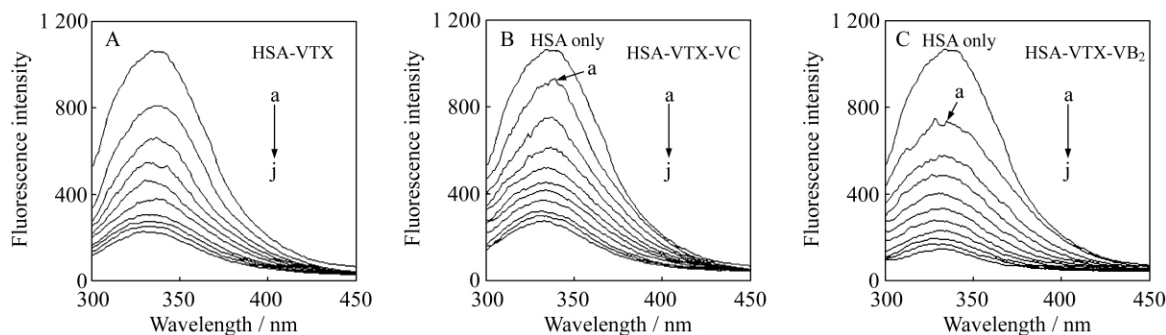
图 1 牡荆素及 VC 或 VB₂ 存在下 HSA-VTX 体系的傅里叶变换衰减全反射红外光谱(ATR-FTIR)

Fig. 1 ATR-FTIR spectra of VTX and the HSA-VTX system in the presence of VC or VB₂

$c_{\text{HSA}} = c_{\text{VTX}} = 1.02 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{VC}} = c_{\text{VB}_2} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

2.2 VC 或 VB₂ 存在下 VTX 与 HSA 作用的荧光光谱

HSA 分子中因含有色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸等残基而发射较强的内源荧光^[6]。VTX 与 HSA 作用能显著地猝灭 HSA 的荧光。图 2 显示了在 VC 或 VB₂ 存在下,VTX 对 HSA 荧光的影响。在 VC 或 VB₂

图2 VC或VB₂存在下VTX与HSA作用的荧光光谱Fig. 2 Fluorescence spectra of HSA-VTX in the presence of VC or VB₂

(A) $c_{\text{HSA}} = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; (B) $c_{\text{HSA}} = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $c_{\text{VC}} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; (C) $c_{\text{HSA}} = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $c_{\text{VB}_2} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; curve a→j: $c_{\text{vitexin}} / (10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$: 0, 0.35, 0.70, 1.05, 1.40, 1.75, 2.10, 2.45, 2.80, 3.15, respectively; pH=7.4, $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 339 \text{ nm}$, $T = 298 \text{ K}$.

存在下, HSA 的荧光被 VTX 有规律地猝灭, 荧光的最大发射峰位置没有明显移动, 且未出现新的荧光发射信号。为了进一步阐明荧光猝灭机理, 用 Stern-Volmer 方程对荧光滴定实验数据进行分析:

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

作出 $F_0/F - [Q]$ 关系图并计算出不同温度下维生素存在与否的动态猝灭常数(表1)。牡荆素对 HSA 的猝灭速率常数远大于生物大分子最大扩散碰撞猝灭常数 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 并且 HSA 的猝灭常数 K_{SV} 随着温度的升高而减小, 推断此荧光猝灭机理为静态猝灭过程^[7]。维生素 VC 或 VB₂ 的参与不改变 HSA 内源荧光的猝灭类型; 但与 HSA-VTX 二元体系相比, VC 参与下, K_{SV} 减小; 而 VB₂ 存在时, K_{SV} 增大, 预示不同的维生素扰动 HSA-VTX 相互作用过程的方式可能不尽一致。

静态猝灭的结合常数 K_a 和结合位点数 n 分别由下列方程^[8-9] 计算:

$$F_0/\Delta F = (1/f_a K_a [Q]) + 1/f_a \quad (2)$$

$$\lg(F_0 - F)/F = \lg K + n \lg [Q] \quad (3)$$

结果列于表1。结果表明, VC、VB₂ 对 VTX 与 HSA 结合的影响效果是不同的。25℃时, VC 的存在使 K_a 和 n 减小; 相应地, VB₂ 存在时, K_a 减小而 n 增大。由热力学公式:

$$\lg K_a = -\Delta H/2.303RT + \Delta S/2.303R \quad (4)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (5)$$

可分别求得焓变(ΔH)、熵变(ΔS)和生成自由能变(ΔG) (表1)。由表1可以发现, 加入 VC 或 VB₂ 前, VTX 与 HSA 间的作用力主要是氢键和范德华力^[10], 而 VC 加入后, 作用力改为疏水作用为主; VB₂ 参与下, 虽然 VTX 与 HSA 之间作用力类型没有发生变化, 但 VB₂ 改变了 VTX 与 HSA 之间作用力的强弱程度, 这进一步表明 VC 和 VB₂ 都参与了 VTX 与 HSA 的作用过程。

2.3 VC、VB₂ 对 VTX 与 HSA 结合的可能扰动方式

VC、VB₂ 参与下, HSA-VTX-VC 和 HSA-VTX-VB₂ 三元体系与二元体系相比, HSA 分子的 α -螺旋的含量均有不同程度的改变(图3), VC 和 VB₂ 分别使 α -螺旋的含量由原来的 39% 分别增加到 40% 和 45%, 表明这是 VC 和 VB₂ 对 HSA-VTX 结合过程扰动的共通方式。

由表1可得出, 25℃时, VC 使 K_{SV} 减小 45.8%, K_a 减小 9.5%, n 减少 11.8%; 而 VB₂ 使 K_{SV} 增加 17.9%, K_a 减小 14.2%, n 由 (0.949 ± 0.020) 略增为 (1.067 ± 0.042) 。VC 和 VB₂ 均属于水溶性有机物, 而牡荆素是疏水性有机物, 在 HSA 分子上没有共同结合区域竞争, 而且分子尺寸较大, 所以难以从同位取代和架桥的角度解释上述参数的变化。HSA-VTX 复合物的稳定性下降(K_a 减小)、药物对 HSA 内源荧光猝灭效应的变化可以归因于 VC 或 VB₂ 与 HSA 之间的自然结合使 HSA 分子构象改变所致, 这是 VC、VB₂ 扰动 HSA-VTX 结合的主要方式^[3,11-12]。

紫外吸收光谱(图略)显示, 在水溶液中, VC 不与 VTX 发生结合, 而 VB₂ 能与牡荆素结合形成复合物, 这主要是由于 VB₂ 分子结构中的芳香环与牡荆素的芳香环共轭电子体系之间可以通过 $\pi \cdots \pi$ 电子堆积方式相互结合^[3]。由此推断, VTX-VB₂ 复合物与 HSA 作用是 VB₂ 对 HSA-VTX 结合扰动的又一方式。

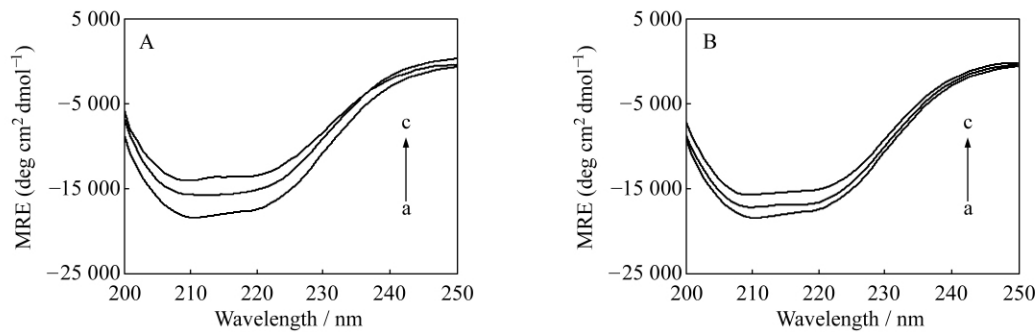


图 3 HSA-VTX-VC(A)及 HSA-VTX-VB₂(B)的 CD 谱图
Fig. 3 CD spectra of HSA-VTX-VC (A) and HSA-VTX-VB₂ (B)
A: a. HSA, b. HSA-VTX-VC, c. HSA-VC; B: a. HSA, b. HSA-VTX-VB₂, c. HSA-VB₂;
 $c_{\text{HSA}} = c_{\text{VIT}} = 1.02 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{VC}} = c_{\text{VB}_2} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

表 1 HSA-VTX 以及 HSA-VTX-维生素体系的结合参数

Table 1 Quenching constant(K_{sv}), apparent association constant(K_{a}), binding sites(n), and thermodynamic parameters of HSA-VTX and HSA-VTX-vitamin systems

System	$T/(\text{K})$	$K_{\text{sv}}/$ ($10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$)	$K_{\text{a}}/$ ($10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$)	n	$\Delta H/$ ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	$\Delta S/$ ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)	$\Delta G/$ ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)
HSA-VTX	298	5.80	7.40	0.949	-57.36	-99.26	-27.78
	304	4.72	4.68	1.050	-57.36	-99.26	-27.19
	310	4.34	3.02	1.109	-57.36	-99.26	-26.59
VC	298	3.15	6.70	0.837	7.04	115.90	-27.49
	304	3.10	6.72	0.799	7.04	115.90	-28.19
	310	2.20	7.49	0.762	7.04	115.90	-28.89
VB ₂	298	6.83	6.35	1.067	-75.83	-161.66	-27.65
	304	5.99	4.73	1.103	-75.83	-161.66	-26.68
	310	4.90	1.93	1.178	-75.83	-161.66	-25.71

3 结论

研究表明,VC、VB₂的参与使 HSA-VTX 体系的猝灭常数、表观结合常数及结合位点数发生改变,且 VC 改变了 HSA-VTX 体系的结合力类型,VB₂改变了 VTX 与 HSA 之间作用力的强弱程度。VC、VB₂与 HSA 结合导致 HSA 分子构象变化是维生素扰动 HSA-VTX 结合的共通方式和主要方式,而 VTX-VB₂复合物与 HSA 作用是 VB₂对 HSA-VTX 结合扰动的又一方式。

参考文献:

[1] DONG Cheng-liang(董成亮),LIU Xiao-dong(刘晓东). Journal of China Pharmaceutical University(中国药科大学学报)[J],2007,**38**(1):65.
[2] ZHU Ren-fa(朱仁发),LI Qian-rong(李前荣),YIN Hao(尹浩). Journal of Instrumental Analysis(分析测试学报)[J],2005,**24**:78.
[3] LI Lei(李磊),LIU Xue-feng(刘雪锋),FANG Yun(方云),ZOU Zhu-yan(邹珠燕). Chinese Journal of Applied Chemistry(应用化学)[J],2008,**25**(1):106.
[4] CHEN Xiu-xia(陈秀霞),ZHANG Guo-wen(张国文). Journal of Analytical Science(分析科学学报)[J],2009,**25**(6):661.
[5] JIANG Xin-yu(蒋新宇),LI Wen-xiu(李文秀),CHEN Jing-wen(陈景文). Chinese Journal of Inorganic Chemistry(无机化学学报)[J],2008,**24**(10):1588.
[6] Zhang G W,Que Q M,Pan J H,Guo J B. Journal of Molecular Structure[J],2008,**881**:132.
[7] ZHOU Xiang-chun(周享春),YAN Chang-qi(颜昌琪),YAN Cheng-nong(颜承农). Chemical Research and Application(化学研究与应用)[J],2010,**22**(1):18.

- [8] Zhang Z Y, Zhou B, Zhang X P, Huang P, Li C H, Liu Y. Journal of Hazardous Materials[J], 2009, **163**:1345.
- [9] SHANG Yong-hui(尚永辉), LI Hua(李 华), SUN Jia-juan(孙家娟). Journal of Analytical Science(分析科学学报)[J], 2010, **26**(4):419.
- [10] Ross P D, Subramanian S. Biochemistry[J], 1981, **20**:3096.
- [11] Xu H, Liu Q W, Zuo Y, Bi Y, Gao S L. Journal of Solution Chemistry[J], 2009, **38**:15.
- [12] Guo X J, Sun X D, Xu S K. Journal of Molecular Structure[J], 2009, **931**:55.

Interference of Vitamin C and Vitamin B₂ on Vitexin-Human Serum Albumin in Binding Process

ZHANG Guo-wen*, ZHAO Nan, WANG Lin

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047)

Abstract: The effect of vitamin C (VC) and vitamin B₂ (VB₂) on the interaction between vitexin (VTX) and human serum albumin (HSA) was investigated by using different spectroscopic techniques *viz.*, fluorescence, UV-vis absorption, Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and circular dichroism (CD). The parameters such as dynamic quenching constant K_{SV} , binding constants K_a and the number of binding sites n were obtained. The detailed interferential quomodo of VC, VB₂ were concluded. The values of K_{SV} , K_a and n of the HSA-VTX system decreased about 45.8%, 9.5% and 11.8% respectively in the presence of VC at 298 K. Moreover, the main driving force in HSA-VTX binding process changed from hydrogen bond and van der Waals forces to hydrophobic interaction. VB₂ increased K_{SV} for about 17.9% and decreased K_a for about 14.2%, and n minor increased from 0.949 to 1.067. CD results indicated that HSA molecular conformational change caused by the vitamins-HSA binding was a common interferential and main quomodo of the VC and VB₂. The results of UV absorption spectra showed that the interaction of VTX-VB₂ complex with HSA was another interferential quomodo of VB₂.

Keywords: Vitexin; Human serum albumin; Fluorescence spectroscopy; Vitamin