

荧光猝灭法对肉桂酸与人血清白蛋白间的相互作用的研究

赵妍, 曹 焱, 韩凤梅, 陈 勇*

湖北大学中药生物技术省重点实验室, 湖北 武汉 430062

摘 要 白蛋白是血液循环系统中最丰富的一种蛋白质,能与许多物质结合,并起着运输蛋白的作用。文章利用荧光光谱法研究了中药有效成分肉桂酸与人血清白蛋白间的非共价结合特性。研究表明,在 pH 7.4 作用液、286 nm 激发波长条件下,肉桂酸对人血清白蛋白的荧光发射有较强猝灭作用。当作用温度为 37 和 47 时,肉桂酸与人血清白蛋白间的结合常数 K 分别为 1.2767×10^3 和 $3.4041 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$,结合位点数 n 分别为 0.7586 和 0.8356,表明温度升高有利于两者的结合;同时,根据不同作用温度时非共价结合复合物的热力学参数变化,证明肉桂酸与人血清白蛋白分子间的结合力主要是疏水作用。研究结果为进一步研究肉桂酸的药理作用,尤其是对血浆蛋白构像的影响提供了重要信息。

关键词 肉桂酸;人血清白蛋白;荧光猝灭

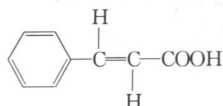
中图分类号: R33-33

文献标识码: A

文章编号: 1000-0593(2008)04-0904-04

引 言

药物与血浆蛋白的非共价结合是药物体内储存与分布的特殊形式,对药物的体内过程与药效有重要影响。人血清白蛋白是人血浆中最重要的载体蛋白,可与许多内源、外源性化合物结合。探讨药物与人血清白蛋白间的非共价结合特性,对探讨药物的体内过程及临床合理用药具有重要的指导作用^[1-3]。肉桂酸(Cinnamic acid)是中药肉桂的有效成分之一,具有抗炎与抗真菌作用^[4],同时是一种重要的有机合成中间体,广泛应用于医药、香料、塑料、感光材料、缓蚀剂和交联剂等产品的生产中。肉桂酸结构见 Scheme 1。



Scheme 1 Structure of cinnamic acid

蛋白质的荧光是来源于芳香氨基酸的芳香环的发光,这种大分子的发光可以看成是相应的内在的发光。它代表氨基酸发色团的总贡献也就是色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸及其衍生物发光的总贡献^[5]。因此我们应用荧光光谱法研究了药物肉桂酸与血浆中最丰富的人血清白蛋白间的非共价相互作用特性,如结合常数、结合位点数和结合力类型。

1 实验部分

1.1 实验仪器和材料

日本岛津公司 RF-450 型荧光光度计(带恒温装置);肉桂酸(Sigma 公司),人血清白蛋白(以下简称 HSA, Sigma 公司),pH 7.4 Tris-HCL 缓冲液,实验用水为 2 次重蒸水,其他试剂为国产分析纯; $3 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 肉桂酸水溶液储备液, $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HSA 水溶液储备液。

1.2 实验方法

于 10 mL 比色管中依次加入 2 mL $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 溶液,2 mL Tris-HCL 缓冲溶液,2 mL HSA 储备液,用水稀释至 10 mL,摇匀并于恒温水浴中预热 10 min,取该溶液 3 mL 放于 4.5 mL 荧光池中,以 286 nm 为激发波长、狭缝与发射狭缝宽度为 10 nm,在 300~400 nm 范围内扫描荧光发射光谱。用移液枪分次加入肉桂酸溶液 10 μL ,摇匀并作用 6 min,在上述条件下扫描荧光发射光谱。

2 实验结果

2.1 HSA 的荧光猝灭光谱

实验选用了 37 和 47 两个蛋白药物作用温度,在本实验条件下,肉桂酸溶液荧光强度很弱,对 HSA 的荧光发射光谱无影响。图 1 是作用温度为 37 时,蛋白与不同量肉桂

收稿日期: 2006-11-02, 修订日期: 2007-02-06

基金项目: 湖北省杰出青年基金项目(2002AC004)和中药生物技术省重点实验室开放基金项目(2004CTM001)资助

作者简介: 赵 妍,女,1984 年生,湖北大学生命科学学院在读研究生 *通讯联系人 e-mail: cy101610@npc.gov.cn

酸相互作用时的荧光发射光谱图,其发光特征是由于人血清白蛋白的 214 位的色氨酸残基的发光所致^[5]。由图可知:固定作用蛋白摩尔量,随着作用的肉桂酸摩尔量不断增加,虽然 HSA 的荧光发射光谱的峰位和峰形不变,但 HSA 的内源荧光强度均呈现有规律的降低,说明肉桂酸与蛋白之间形成了复合物。

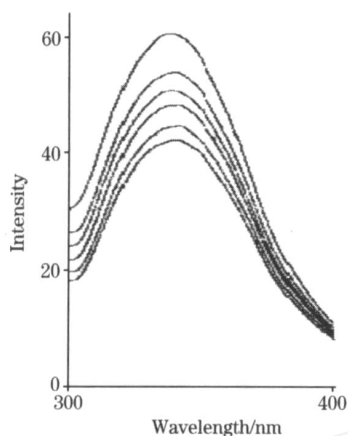


Fig. 1 Effect of cinnamic acid on the fluorescence emission spectra of HSA. $[Q]_{\text{HSA}} = 0.2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $[Q]$ (Cinnamic acid) = 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\lambda_{\text{ex}} = 286 \text{ nm}$, $T = 37^\circ \text{C}$

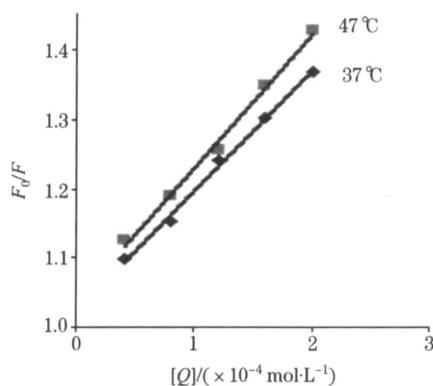


Fig. 2 Stern-volmer curves of HSA fluorescence quenched by cinnamic acid

2.2 肉桂酸对 HSA 的猝灭机理

引起蛋白荧光猝灭的原因有动态和(或)静态猝灭,动态猝灭是一种电子或能量转移过程,不会影响蛋白质的二级结构和生理活性。而静态猝灭是因为生成了配合作用,通常是产生了不发荧光的配合物,对蛋白质的二级结构和生理活性产生影响。荧光动态猝灭符合 Stern-Volmer 曲线方程^[6]

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

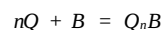
式中, F_0 是猝灭剂不存在时的荧光强度, F 为加入猝灭剂后的荧光强度, K_{SV} ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$) 表示生物大分子与荧光猝灭剂分子彼此扩散和相互碰撞到达动态平衡时的量效关系; K_q ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) 为双分子表观猝灭常数,它反映了体系中分子的彼此扩散和相互碰撞对生物大分子荧光寿命衰减速率

的影响。 $[Q]$ 为猝灭剂浓度。 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 ^[7]。

根据(1)式,把 F_0/F 对所加入的肉桂酸的总浓度 $[Q]$ 作图,得到对人血清白蛋白荧光的 Stern-Volmer 猝灭曲线,结果如图 3 所示。由图 2 可以看出, F_0/F 随着肉桂酸浓度的增加逐渐增大, F_0/F 与 $[Q]$ 线性关系良好。通过计算可知,作用温度为 37 和 47 时的荧光猝灭过程速率常数 K_{SV} 分别为 1 500 和 1 915 $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。由于生物大分子的最大动态猝灭过程的速率常数 $K_{SV} < 100 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$,而通过 Stern-Volmer 曲线方程求得的 HSA 与肉桂酸非共价结合的猝灭过程速率常数比最大动态猝灭过程的速率常数大几个数量级,表明肉桂酸对 HSA 内源性荧光的猝灭过程不是由扩散控制的动态猝灭过程,而可能是静态猝灭过程。

2.3 荧光给体-受体间平衡常数和结合位点常数

对于静态猝灭过程,荧光强度与猝灭剂的关系可由荧光分子与猝灭剂分子间的结合常数表达式推导求出。设生物大分子有 n 个相同且独立的结合位点,则其与小分子间的猝灭反应可表示为^[8]



其结合常数为 K_A

$$K_A = [Q_nB] / [Q]^n [B] \quad (2)$$

式中: $[B]$ 是游离荧光体浓度, $[Q]$ 是猝灭剂浓度, $[Q_nB]$ 是配合物浓度。若荧光体总浓度为 $[B_0]$, 则 $[B_0] = [Q_nB] + [B]$, 当 $[Q] \gg [B_0]$ 时,以猝灭剂的起始浓度代替其平衡浓度

$$K_A = ([B_0] - [B]) / [Q]^n [B] \quad (3)$$

在静态猝灭中,体系的荧光强度 F 与其游离浓度成正比(所生成的配合物是非荧光性的)

$$[B] / [B_0] = F / F_0 \quad (4)$$

由(3)和(4)式得

$$\lg[(F_0 - F) / F] = \lg K_A + n \lg [Q] \quad (5)$$

根据(5)式处理图 2 数据作图 3,得到如下线性回归方程。

作用温度为 37 时

$$\lg[(F_0 - F) / F] = 0.7586 \lg [Q] + 3.106, r^2 = 0.9991 \quad (6)$$

作用温度为 47 时

$$\lg[(F_0 - F) / F] = 0.8356 \lg [Q] + 3.532, r^2 = 0.996 \quad (7)$$

根据(6)和(7)式可计算出作用温度为 37 和 47 时的结合常数 K 和结合位点数 n 分别为 $1.2767 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 0.7586 和 $3.4041 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 0.8356。

2.4 荧光给体-受体间作用力的确定

有机小分子与蛋白质相互结合的主要部位是蛋白质上的碱性氨基酸残基,它们是精氨酸、赖氨酸、组氨酸残基和 N 端氨基等。相互作用力有氢键作用力、静电作用力、疏水作用和范德瓦耳斯力^[9]等。Masaki otogiri 总结出判断生物大分子与小分子结合性质的热力学规律,即: $\Delta S > 0$ 为疏水和静电作用力; $\Delta S < 0$ 为氢键和范德瓦耳斯力; $\Delta H > 0$ 和 $\Delta S > 0$ 为典型的疏水作用力; $\Delta H < 0$ 和 $\Delta S < 0$ 为氢键和范德瓦耳斯力; $\Delta H < 0$ 和 $\Delta S > 0$ 为静电作用力。通过改变反应作用

温度, 经 (8) 和 (9) 式

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

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

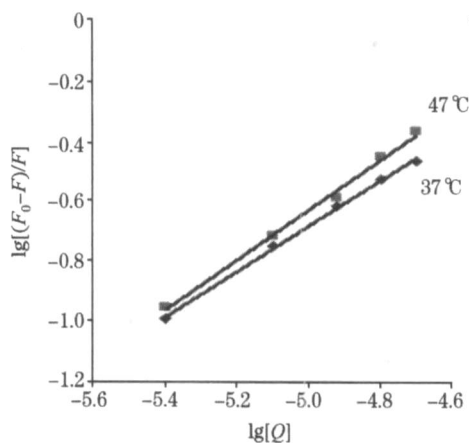


Fig 3 Plots of $\lg[(F_0 - F)/F]$ vs $\lg[Q]$

可计算温度变化时药物蛋白结合的 ΔH 和 ΔS 。式中, T_1 和 T_2 分别为 37 和 47 的绝对温度, K_1 和 K_2 为与之对应的结合常数。结果为: $\Delta H = 8.105 \times 10^4 \text{ J}$, $\Delta S = 320.8 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ 。可见肉桂酸与人血清白蛋白之间的作用力主要为疏水作用力, 且作用较稳定。

3 讨 论

HSA 中由于色氨酸、酪氨酸等氨基酸残基的存在而具有内源荧光, 肉桂酸本身在扫描范围内无荧光强度, 但在与 HSA 相互作用的过程中能不同程度地猝灭 HSA 的荧光强度。通过上述荧光猝灭研究发现, 肉桂酸对人血清蛋白的猝灭机制属于静态猝灭, 即肉桂酸与 HSA 之间形成不发荧光的复合物, 出现无辐射能量转移时, 产生了荧光体的静态猝灭, 表明肉桂酸的加入使 HSA 的结构发生改变。肉桂酸与 HSA 之间以疏水作用方式相互作用, 温度的升高有利于两者的结合, 作用较为显著。

参 考 文 献

- [1] LIU Yong-ming, LI Gui-zhi, SUN Xi-fen(刘永明, 李桂芝, 孙希芬). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2004, 32(5): 615.
- [2] YAN Zheng-yu, SHAO Xi-fen, JIANG Xin-min, et al(严拯宇, 邵秀芬, 姜新民, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(8): 1494.
- [3] Michael Peschke, et al. J. Am. Soc. Mass Spectrom., 2004, 15: 1424.
- [4] ZHU Wei-feng, ZHANG Ya-hong, LIU Hong-ning(朱卫丰, 张亚红, 刘红宁). Chinese Traditional Patent Medicine(中成药), 2003, 25(6): 443.
- [5] CHEN Xiao-bo, KANG Dong-guo, LI Song, et al(陈晓波, 康栋国, 李 崧, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(4): 674.
- [6] LI Bing-yang, TONG Lu, ZOU Ben-tian(李炳阳, 童 路, 邹本田). Acta Pharmaceutica Sinica(药学报), 1985, 20(5): 398.
- [7] 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.
- [8] Alain M, Michel B, Michel A. J. Chem. Edu., 1986, 63(4): 365.
- [9] YAN Cheng-nong, TONG Jin-qiang, XIONG Dan, et al(颜承农, 童金强, 熊 丹, 等). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2006, 34(6): 796.

Study on the Interaction between Cinnamic Acid and Human Serum Albumin by Fluorescence Quenching Method

ZHAO Yan, CAO Yi, HAN Feng-mei, CHEN Yong*

Hubei Provincial Key Lab of Bio-Technology of TCM, Hubei University, Wuhan 430062, China

Abstract The albumin is the richest protein in blood circulatory system, which can combine with many drugs and play an important role in transporing protein. In the present work, the non-covalent interaction between human serum albumin and cinnamic acid was studied by using fluorescence quenching method. The results showed that cinnamic acid had a powerful ability to quench the fluorescence of human serum albumin at excitation and emission wavelengths of $\lambda_{\text{ex}} = 286 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 340 \text{ nm}$, respectively, in the reaction solution of pH 7.4. The binding constants (K) at 37 and 47 °C were found to be 1.2767×10^3 and $3.4041 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, with the number of binding site (n) of 0.7586 and 0.8356, respectively, suggesting that the reaction temperature is advantageous for the binding reaction in a way. The changes in the thermodynamic parameters of binding interaction at 37 and 47 °C indicated that the main binding force between cinnamic acid and human serum albumin was hydrophobic force. These provide important information for studying the pharmacological effects of cinnamic acid and the influence of cinnamic acid on the configuration change of HSA.

Keywords Cinnamic acid; Human serum albumin; Fluorescence quenching

(Received Nov. 2, 2006; accepted Feb. 6, 2007)

* Corresponding author