

光谱及电化学方法研究大黄酸与牛血清白蛋白的相互作用

梁 慧, 赵 芳*, 李炳奇

石河子大学化学化工学院, 新疆 石河子 832000

摘 要 采用荧光光谱、紫外光谱和圆二色谱法并结合电化学方法, 研究了大黄酸与牛血清白蛋白之间的相互作用。结果表明: 大黄酸对牛血清白蛋白有较强的荧光猝灭作用且为静态猝灭, 并计算出不同温度下其结合常数(K_A)与结合位点数(n)分别为: 3.67×10^5 , 0.95(298 K); 2.60×10^4 , 0.83(309 K)。由热力学参数确定它们间的作用力主要是静电引力, 并依据 Förster 能量转移理论求得其结合距离为 3.28 nm, 同步荧光光谱及圆二色谱表明大黄酸对牛血清白蛋白的构象产生影响。

关键词 大黄酸; 牛血清白蛋白; 荧光光谱; 圆二色谱; 电化学

中图分类号: O657.3 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2011)09-2446-04

引 言

血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)与药物分子发生相互作用形成超分子化合物的研究是介于生命科学与化学之间的边缘性课题, 也是化学、生命科学、药学和临床医学共同关注和感兴趣的研究领域。BSA 是血液中一种重要的载体蛋白, 能与多种内源性和外源性物质结合, 是药物发挥药效的重要载体和靶分子。探讨具有药理活性的小分子与蛋白质的相互作用, 对于了解药物发挥药效的作用机制有重要意义^[1]。大黄酸(rhein)是中药大黄、何首乌、虎杖等多种中药的主要活性成分之一, 具有抗氧化、抑菌、降糖调脂、保肝抗纤维化、抗炎、抗肿瘤等多种生物活性及药理作用, 并且在治疗骨关节炎、糖尿病、肾病等疾病及协同抗肿瘤方面表现突出而成为研究的热点^[2, 3]。其与 BSA 相互作用研究的报道鲜见。

运用紫外可见光谱(UV-Visible), 荧光光谱(fluorescence spectroscopy), 圆二色谱(circular dichroism, CD)并结合电化学(Electrochemical)方法, 详细研究了大黄酸与 BSA 的相互作用, 深入探讨大黄酸与血清白蛋白的结合机理, 结果有助于阐明大黄酸在生物体内的存储和转运过程及其药理效应。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

F-2500 型荧光光度计(日本 Hitachi 公司), MOS 450 型圆二色谱仪(法国华洋科仪公司), UV-2401PC 紫外可见分光光度计(日本岛津公司), PAR 283 电化学系统(美国普林斯顿应用研究公司), pHs-3C 型酸度计(上海雷磁仪器厂)。牛血清白蛋白(Amresco, 分子量 65 000)配成 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液, 4 °C 冰箱保存备用; 大黄酸(陕西慧科植物开发有限公司)用无水甲醇配成 $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液; $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.38 的 Tris-HCl 缓冲液(内含 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 以维持溶液离子强度); 其他试剂均为国产分析纯, 所用水为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

1.2.1 紫外光谱测定

系列 10 mL 容量瓶中, 加入一定量大黄酸溶液, 再加入不同量的 BSA 溶液, 用 pH 7.38 缓冲溶液定容, 混匀后室温放置 3 h。以相应 BSA 溶液为参比, 扫描紫外吸收光谱。

1.2.2 荧光光谱测定

将一定量的 BSA 与大黄酸溶液依次加入到 10 mL 容量瓶中, 用 pH 7.38 的缓冲液稀释至刻度, 混匀后实验温度下水浴恒温 3 h。在激发波长为 283 nm, 激发和发射狭缝均为 5 nm 的条件下, 测定上述样品在 290~450 nm 的荧光光谱; 室温下, 固定 $\Delta\lambda$ 值, 考察随着大黄酸浓度增加, BSA 同步

收稿日期: 2010-11-30, 修订日期: 2011-04-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(20961009)资助

作者简介: 梁 慧, 女, 1987 年生, 石河子大学化学化工学院硕士研究生 e-mail: lianghui861021@163.com

* 通讯联系人 e-mail: nllzff@163.com

荧光光谱的变化情况。

1.2.3 圆二色谱测定

室温下以缓冲液为参比, 氮气吹扫 190~270 nm 波长范围内 BSA 与大黄酸作用前后的圆二色谱。每个 CD 光谱都是三次扫描的平均值。

1.2.4 电化学法测定

在系列容量瓶中加入不同体积的大黄酸溶液和一定量的 BSA 溶液, 以 pH 7.38 Tris-HCl 缓冲溶液定容, 转移部分溶液于电解池中, 通氮 10 min, 用 PAR 283 电化学综合分析仪记录大黄酸溶液和大黄酸与 BSA 混合溶液中大黄酸的线性扫描伏安图, 扫描速率 200 mV · s⁻¹。

2 结果与讨论

2.1 紫外可见吸收光谱

图 1 为模拟生理条件下, 大黄酸紫外吸收光谱及大黄酸-BSA 体系的紫外吸收差谱。由图可见, 大黄酸 220 nm 处吸收峰强度有规律地降低并且峰位发生红移。说明大黄酸与 BSA 之间有显著的相互作用, 同时也说明它们的相互作用使该共轭体系的能级发生了明显的变化^[4,5]。

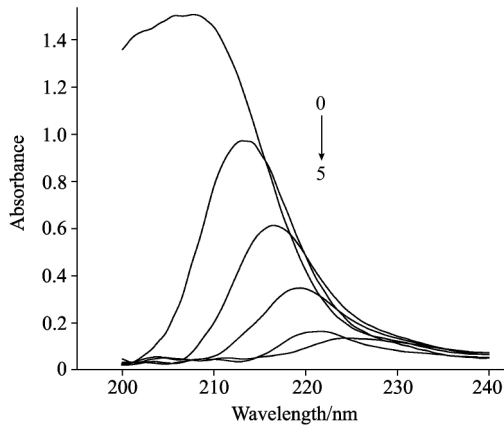


Fig 1 The UV-Vis differential spectra of the rhein-BSA system $c(\text{rhein}) = 2.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c(\text{BSA}) (0 \sim 5)$: 0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 $\times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH 7.38

2.2 大黄酸与牛血清白蛋白相互作用的荧光

2.2.1 荧光猝灭光谱

随着大黄酸浓度增加, BSA 内源荧光的强度有规律降低, BSA 的荧光发射峰形不变, 峰位略微蓝移(见图 2)。说明 BSA 与大黄酸之间发生相互作用^[6]。

2.2.2 荧光猝灭机理与结合常数确定

荧光猝灭的原因主要有动态猝灭、静态猝灭和非辐射能量转移。动态猝灭是猝灭剂和荧光物质的激发态分子之间的相互作用过程; 静态猝灭是猝灭剂和荧光物质分子在基态时生成不发光的配合物, 从而导致荧光物质荧光强度降低的过程。为探讨大黄酸对 BSA 的荧光猝灭机制, 先采用 Stern-Volmer 方程^[7]处理

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

式中 F_0 和 F 分别为猝灭剂加入前后体系的荧光强度; $[Q]$

是猝灭剂的浓度; K_{sv} 表示生物大分子与荧光猝灭剂分子彼此扩散和相互碰撞达到动态平衡时的量效关系; K_q 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, τ_0 为没有猝灭剂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 ^[8]。

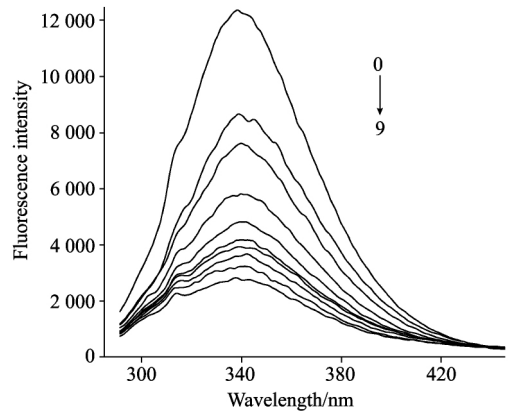


Fig 2 Effects of rhein on fluorescence intensities of BSA $c(\text{BSA}) = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c(\text{rhein}) (0 \sim 9)$: 0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 10.0 $\times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH 7.38

将大黄酸对 BSA 的荧光猝灭数据按式(1)处理见图 3(a), 计算 298 和 309 K 大黄酸-BSA 相互作用的结合常数, 猝灭速率常数 K_q 分别为 6.6×10^{13} , $1.6 \times 10^{13} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 远大于最大扩散碰撞猝灭常数 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ^[9]。由图 3(a)所示, 随温度的升高, 结合常数减小。说明大黄酸与 BSA 形成了基态复合物, 并且遵循静态猝灭机理。

对于静态猝灭其结合常数 K_A 、结合位点数 n ^[10]可由下述公式确定

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

见图 3(b), 求得各自 K_A 分别为: 3.67×10^5 , 2.60×10^4 ; 结合位点数分别为: 0.95, 0.83。

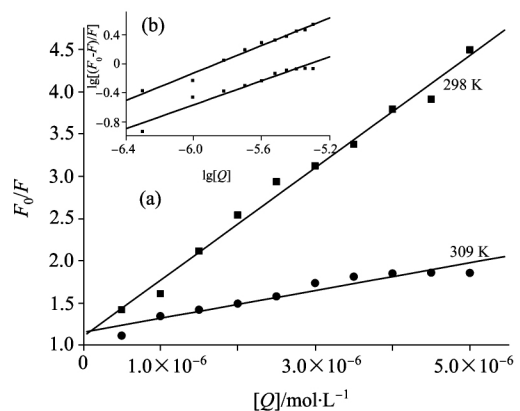


Fig 3 The Stern-Volmer plot (a) and $\lg[(F_0 - F)/F]$ vs $\lg [Q]$ plot (b) of the rhein-BSA system

2.2.3 大黄酸对 BSA 构象的影响

$\Delta\lambda = 15$ 和 60 nm 所得同步荧光光谱分别表示蛋白质中

酪氨酸和色氨酸残基的光谱特征,因此,根据氨基酸残基的最大荧光波长与其所处环境极性的改变可判断蛋白质构象的变化。图 4 显示,随大黄酸浓度的增加,色氨酸残基的最大发射波长基本不变,酪氨酸残基所处环境的疏水性增强,导致 BSA 构象发生变化。

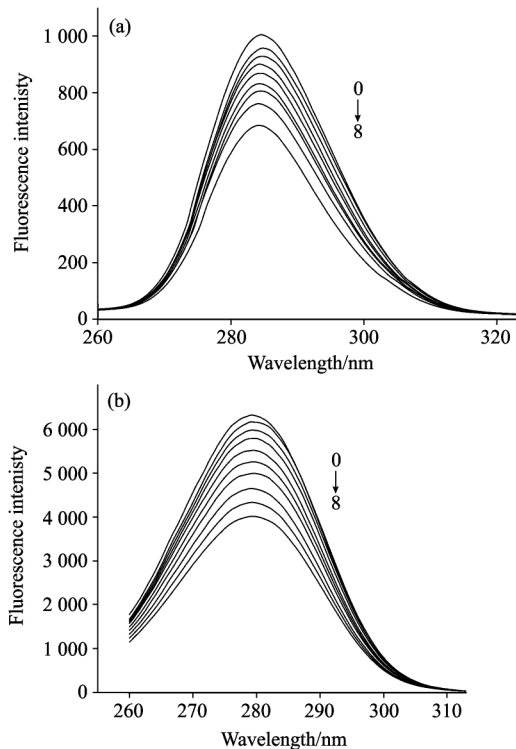


Fig 4 The synchronous fluorescence spectra of rhein-BSA system where $\Delta\lambda$ is 15 nm (a) and 60 nm (b)

$c(\text{BSA}) = 3.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c(\text{rhein})$ (0~8): 0.0, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, $10.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH 7.38

2.2.4 大黄酸与 BSA 作用力的确定

在温度变化不大时,可以近似认为反应的 ΔH 为一常数。根据热力学参数之间的关系式 $\ln K_2/K_1 = \Delta H(1/T_1 - 1/T_2)/R$, $\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K$, 可分别求得焓变 ΔH 、熵变 ΔS 和吉布斯自由能 ΔG (见表 1)。根据 Ross^[11] 等总结出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,以小分子与生物大分子反应的热力学参数的变化判断药物与蛋白质之间的主要作用力类型的规律。大黄酸与 BSA 的结合是一个熵增加、自由能降低的自发过程($\Delta G < 0$),大黄酸与 BSA 结合反应的 $\Delta H \approx 0$, $\Delta S > 0$ 可以认为大黄酸与 BSA 分子间主要表现为静电引力。

Table 1 The thermodynamic parameters of rhein-BSA system under different temperatures

T/K	ΔH /(kJ · mol ⁻¹)	ΔG /(kJ · mol ⁻¹)	ΔS /(J · mol ⁻¹ · K ⁻¹)
298	-2.68	-31.73	97.48
309	-2.68	-26.15	75.95

2.2.5 大黄酸与 BSA 结合距离的确定

据偶极-偶极非辐射能量转移理论,即 Förster 能量转移理论^[12]。结合位置与 BSA 中发光基团之间的距离关系式如下

$$E = 1 - F/F_0 = R_0^6 / (R_0^6 + r_0^6) \quad (3)$$

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} \Phi J$$

$$J = \sum F(\lambda) \epsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda / \sum F(\lambda) \Delta\lambda$$

据此公式可以求得大黄酸与 BSA 的重叠积分 $J = 2.06 \times 10^{-14} \text{ cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$, $R_0 = 2.84 \text{ nm}$, $E = 0.30$, $r = 3.28 \text{ nm}$ 。大黄酸与 BSA 残基之间的距离小于 7 nm,说明 BSA 与大黄酸之间可能发生了非辐射能量转移。

2.3 圆二色谱法

为研究大黄酸与 BSA 作用过程中 BSA 二级构象的变化,对比测试了 BSA 及大黄酸-BSA 体系的圆二色谱,如图 5 所示。由图可看出 b 和 c 的 CD 波谱相对于 a 有明显的红移现象,表明大黄酸与 BSA 结合改变了 BSA 空间构象^[13],与同步荧光光谱的结论一致。

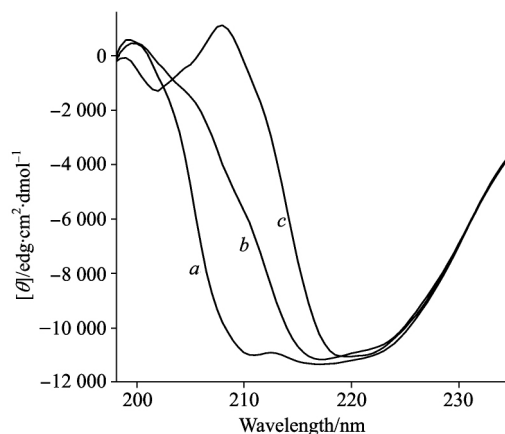


Fig 5 The circular dichroism spectra of the rhein-BSA system

a: $c(\text{BSA}) = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; b: $c(\text{BSA}) = c(\text{rhein}) = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; c: $c(\text{BSA}) = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} + c(\text{rhein}) = 2.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

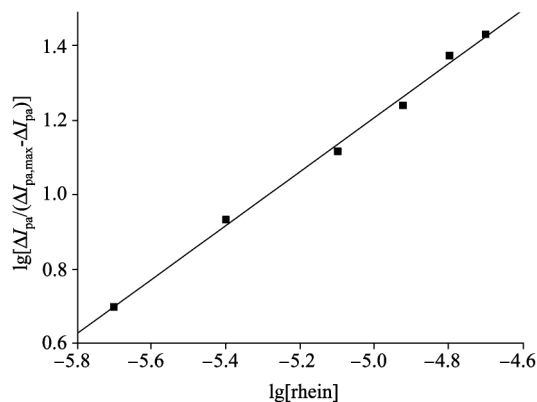


Fig 6 The relationship between $\lg[\Delta I_{pa} / (\Delta I_{pa, \max} - \Delta I_{pa})]$ and $\lg[\text{rhein}]$

$c(\text{BSA}) = 5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH 7.38

2.4 电化学法

电化学方法是一种简单快速的测定物质相互作用的分析方法之一^[14]。大黄酸与BSA结合反应体系的线性扫描伏安结果表明,大黄酸与BSA结合反应体系的电极过程主要受吸附控制,用电化学法可测定大黄酸与BSA的结合数和结合位点数。假定大黄酸与BSA结合生成 $\text{BSA}-(\text{rhein})_m$,应有 $\text{BSA}+\text{RH}\leftrightarrow\text{BSA}-(\text{rhein})_m$,则 $K_a=[\text{BSA}-(\text{rhein})_m]/[\text{BSA}][\text{rhein}]_m$, m 与 K_a 可由下述公式得到,

$$\lg[\Delta I_{pa}/(\Delta I_{pa, \max}-\Delta I_{pa})] = \lg K_a + m \lg[\text{rhein}] \quad (4)$$

以 $\lg[\Delta I_{pa}/(\Delta I_{pa, \max}-\Delta I_{pa})]$ 对 $\lg[\text{rhein}]$ 作图可得一直线(图6)。当 $400 > R > 40$ ($R=[\text{rhein}]/[\text{BSA}]$)时,由直线斜率和截距求得结合常数和结合位点数分别为 6.3×10^4 , 0.92,与荧光光谱法得到的数据基本相符。

3 结论

利用荧光光谱、紫外光谱、圆二色谱和电化学多种方法对大黄酸与牛血清白蛋白的相互作用进行了综合性研究。结果表明,大黄酸与BSA之间有较强的结合作用,通过静态猝灭导致BSA内源荧光减弱;计算了其结合常数、结合位点数和热力学参数,得出了静电作用力为其结合的主要驱动力,表明大黄酸可以被蛋白质所储存和运输;同步荧光光谱和圆二色光谱探讨了大黄酸对BSA构象的影响,大黄酸与BSA的相互作用改变了BSA的空间构象。该研究对于从分子水平上阐明大黄酸在体内的运输过程和药用机理及设计合新药具有一定的指导意义。

References

- [1] SUN Yan-tao, ZHANG Yu-pu, BI Shu-yun, et al(孙艳涛, 张玉璞, 毕淑云, 等). Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报), 2009, 30(6): 1095.
- [2] YU Jia, WU Xiao-qing, SUN Hai-feng, et al(余佳, 吴晓晴, 孙海峰, 等). Pharmaceutical and Clinical Research(药学与临床研究), 2008, 16(2): 125.
- [3] DU Hong, SHAO Jia-qing, GU Ping, et al(杜宏, 邵加庆, 顾萍, 等). China Journal of Chinese Materia Medica(中国中药杂志), 2010, 35(20): 2764.
- [4] Ding F, Liu W, Liu F, et al. Journal of Fluorescence, 2009, 19: 783.
- [5] Wang Y Q, Chen T T, Zhang H M. Spectrochimica Acta Part A, 2010, 75: 1130.
- [6] XIE Xian-chuan, WANG Xiao-rong, ZHANG You-kuan, et al(谢显传, 王晓蓉, 张幼宽, 等). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2010, 38(10): 1479.
- [7] Lakowica J R. Principles of Fluorescence Spectroscopy(Seconded). New York: Plenum Press, 1999. 237.
- [8] Umeha K, Seetharamappa J, Shankara S K. Spectrochimica Acta Part A, 2010, 75: 314.
- [9] Ding F, Zhao G Y, Huang J L, et al. European Journal of Medicinal Chemistry, 2009, 44: 4083.
- [10] Wu F Y, Zhang L N, Ji Z J, et al. Journal of Luminescence, 2010, 130: 1280.
- [11] Ross P D, Subramanian S. Biochemistry, 1981, 20(11): 3096.
- [12] Kalyan S G, Bijaya K S, Swagata D. Chemical Physics Letters, 2008, 452: 193.
- [13] LIU Zhe, WANG Kun-jie, DONG Yin-long, et al(刘哲, 王坤杰, 董银龙, 等). Chinese Journal of Inorganic Chemistry(无机化学学报), 2010, 26(1): 72.
- [14] ZHANG Ya-feng, WU Ping, LIN Xin-hua(张亚峰, 吴萍, 林新华). Chemical Research(化学研究), 2009, 20(1): 37.

Studies on the Interaction of Rhein with Bovine Serum Albumin by Spectroscopic and Voltammetric Methods

LIANG Hui, ZHAO Fang*, LI Bing-qi

College of Chemistry and Chemical Engineering, Shihezi University, Shihezi 832000, China

Abstract The interaction between rhein and bovine serum albumin(BSA) was studied by UV-Visible, fluorescence spectroscopy and circular dichroism in conjunction with electrochemical method. The results indicated that rhein has a powerful ability to quench the albumin's fluorescence in a static mode. The binding constants(K_A) and binding site numbers (n) obtained at different temperatures were 3.67×10^5 , 0.99 (298 K) and 2.60×10^4 , 0.83 (309 K) respectively. According to the thermodynamic parameters the main sorts of binding force of rhein-BSA was fixed as electrostatic. The distance between donor and acceptor in rhein-BSA was 3.28 nm based on the Förster energy transfer theory. Results of the circular dichroism and synchronous fluorescence show that the binding can cause conformation change of BSA.

Keywords Rhein; Bovine serum albumin; Fluorescence spectroscopy; Circular dichroism; Electrochemical

* Corresponding author

(Received Nov. 30, 2010; accepted Apr. 1, 2011)