

## 荧光法研究木犀草素与人血清白蛋白的相互作用

张志恒<sup>1</sup>, 李彩瑞<sup>2</sup>, 马晶军<sup>1</sup>, 吴秋华<sup>1</sup>, 王春<sup>1</sup>, 仵茜<sup>1</sup>, 王志<sup>1\*</sup>

1. 河北农业大学理学院, 河北保定 071001

2. 河北大学卫生职业技术学院, 河北保定 071002

**摘要** 用荧光光谱、同步荧光光谱和紫外吸收光谱方法,研究了木犀草素与人血清白蛋白(HSA)的相互作用。研究表明木犀草素对HSA有较强的荧光猝灭作用,根据不同温度下木犀草素对HSA的荧光猝灭作用,利用 Stern-Volmer 方程处理实验数据,表明木犀草素对HSA的荧光猝灭作用属于静态猝灭。根据 Förster 非辐射能量转移理论计算了木犀草素与HSA间的结合常数和结合位点数,求得了木犀草素与HSA间的结合距离  $r$ 。热力学数据表明二者主要靠疏水作用力结合。同时用同步荧光光谱探讨了木犀草素对HSA构象的影响。

**关键词** 木犀草素; 人血清白蛋白; 相互作用; 荧光光谱; 紫外吸收光谱

**中图分类号**: O641.3 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2008)05-1135-05

### 引言

黄酮类化合物是一类具有重要药理活性的天然化合物<sup>[1,2]</sup>,广泛存在于中药和植物的根、茎、叶及果实中。木犀草素是 5,7,3,4-四羟基黄酮化合物,又称黄色素或黄示灵等,具有抗菌、抗炎、解痉、祛痰、抗癌、抑酶等作用,是浮萍、石韦、水蔓菁等多种传统中草药的有效成分。

人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)是人血浆中含量最丰富的重要载体蛋白,作为许多内源性和外源性化合物的存储和转运蛋白,可与许多化合物分子发生相互作用。药物分子进入血液后不同程度地与血清白蛋白结合,可以控制药物向受体释放,避免药物迅速代谢。药物与血清白蛋白相互作用的研究是介于化学和生命科学之间的边缘性课题,是化学生物学研究的重要内容<sup>[3,4]</sup>。在分子水平上研究药物分子和生物大分子的相互作用,探索药物与蛋白质、核酸的结合特性,将有助于了解药物在人体内的吸收、分布、排泄、药理活性和毒性,对于阐明药物的作用机理和进行药物设计以开发新药、指导临床用药,以及在基因水平上治疗疾病和探索生命体系的化学过程和生物物理过程具有重要的理论和实践意义,也是现代高通量药物筛选的重要基础。研究表明,蛋白质是具有生理活性的黄酮类化合物的目标靶分子,黄酮类药物能够与蛋白质分子特异性结合,从而发挥其

药理作用<sup>[2]</sup>,有关木犀草素与HSA之间相互作用的研究,目前尚未见报道。

荧光光谱法是研究生物大分子,特别是蛋白质与各种有机小分子、离子和无机化合物相互作用的重要手段。本文应用紫外光谱和荧光光谱,研究了木犀草素与HSA的荧光猝灭机理,测定了木犀草素与HSA的结合常数、结合位点数、热力学参数等,并确定了二者间的结合力类型,这些基础数据对于阐明木犀草素在体内的运输过程及其作用机理具有十分重要的意义。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器与试剂

UV-2501PC型紫外-可见分光光度计(日本岛津); F-4500型荧光分光光度计(日本日立); AE-240双量程电子分析天平(Mettler-Toledo); TB-85恒温水浴装置(日本岛津)。

人血清白蛋白(HSA, Sigma, 纯度 > 95%),用 pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液(含 0.1 mol · L<sup>-1</sup> NaCl)配制,其储备液浓度为 1.0 × 10<sup>-5</sup> mol · L<sup>-1</sup>, 4℃ 保存;木犀草素(Luteolin, 中国药品生物制品检定所),储备液(1.0 × 10<sup>-3</sup> mol · L<sup>-1</sup>)用无水乙醇配制;三羟甲基氨基甲烷(Tris)购于 Serva, 其他试剂均为分析纯,实验用水均为二次去离子水。

#### 1.2 实验方法

收稿日期: 2006-12-06, 修订日期: 2007-03-09

基金项目: 人事部留学人员科技择优资助项目和河北省自然科学基金项目(B2006000413)资助

作者简介: 张志恒, 1971年生, 河北农业大学食品科技学院硕士研究生 e-mail: licairui1962@yahoo.com.cn

\*通讯联系人 e-mail: wangzhi@hebau.edu.cn

### 1.2.1 荧光光谱测定

在 27, 37 和 47 °C 条件下, 准确移取一定量的木犀草素乙醇标准溶液于 10 mL 比色管中, 待乙醇挥发完全后, 再加入血清白蛋白标准溶液 10 mL, 超声分散 5 min 后, 恒温 2 h。在激发和发射光栅狭缝均为 5 nm, 激发波长为 283 nm 下扫描 300 ~ 500 nm 范围内 HSA 与木犀草素作用的荧光光谱。

### 1.2.2 同步荧光光谱的测定

在激发和发射光栅狭缝均为 5 nm, 分别在  $\lambda_{em} - \lambda_{ex} = 15$  nm ( $\lambda_{em} - \lambda_{ex} = 60$  nm) 和  $\lambda_{em} - \lambda_{ex} = 60$  nm 下扫描 HSA 与木犀草素相互作用的同步荧光光谱。

### 1.2.3 紫外吸收光谱的测定

以 Tris-HCl 缓冲溶液为溶剂, 配制  $1.0 \times 10^{-5}$  mol · L<sup>-1</sup> 的木犀草素溶液, 实验温度下恒温测定其 300 ~ 500 nm 的紫外可见吸收光谱。

## 2 结果与讨论

### 2.1 荧光猝灭光谱

血清白蛋白分子中因含有色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸残基而发射一定强度的内源荧光。按照实验方法在 HSA 中加入不同量的木犀草素后进行扫描, 得到的荧光光谱见图 1。由图 1 可知, HSA 的荧光强度随药物浓度增加而不断降低, 而且 HSA 的荧光发射峰的峰值出现了蓝移现象, 说明木犀草素与 HSA 发生了相互作用<sup>[5]</sup>。

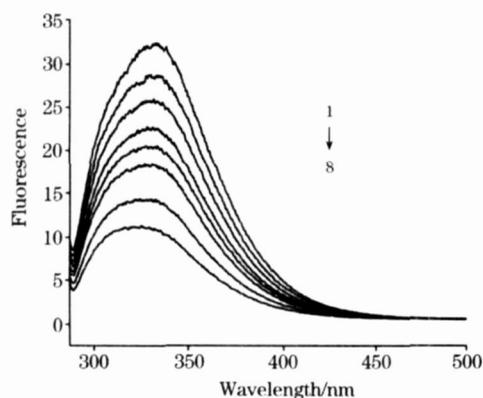


Fig 1 Fluorescence quenching spectra of luteolin-HSA

$c_{HSA} = 1.0 \times 10^{-5}$  mol · L<sup>-1</sup>,  $c_{Luteolin} / 10^{-5}$  mol · L<sup>-1</sup>,  
from 1 to 8: 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0

### 2.2 荧光猝灭机理

荧光猝灭是溶液中猝灭体分子和荧光物质分子之间发生相互作用, 使荧光物质的荧光量子效率降低或激发态寿命缩短, 从而导致荧光强度降低的现象。荧光强度被猝灭的原因有三种: 动态猝灭、静态猝灭和非辐射能量转移。对于动态猝灭, 温度的升高将增加有效碰撞和加剧电子转移过程, 使荧光猝灭常数随温度升高而增大。若是静态猝灭, 则温度的升高使猝灭常数减小<sup>[6]</sup>。

木犀草素对 HSA 荧光猝灭过程若是动态猝灭, 其作用过程应遵循 Stern-Volmer 方程

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

式中,  $F_0$  是 HSA 溶液的荧光发射总量,  $F$  是加入药物后 HSA 溶液的荧光发射总量,  $[Q]$  是药物的总浓度,  $K_{sv}$  是 Stern-Volmer 猝灭常数, 它描述的是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,  $K_q$  是由扩散过程控制的双分子动态猝灭速率常数, 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, 通常各类荧光猝灭剂对生物大分子的最大动态猝灭速率常数为  $2.0 \times 10^{10}$  L · mol<sup>-1</sup> · s<sup>-1</sup><sup>[7]</sup>,  $\tau_0$  为生物大分子内源性荧光寿命, 本文取  $\tau_0 = 10^{-8}$  s<sup>[8]</sup>。

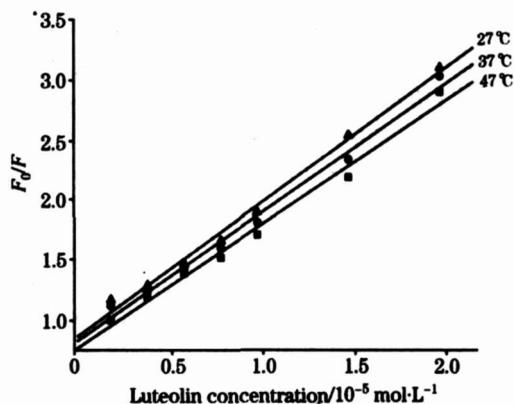


Fig 2 Stern-Volmer curves of fluorescence quenching of HSA by luteolin

本文分别研究了 27, 37 和 47 °C 下 HSA 与木犀草素作用的荧光光谱, 利用不同温度下的实验结果, 以  $F_0/F$  对相应的  $[Q]$  作图 (图 2), 木犀草素对 HSA 荧光猝灭的 Stern-Volmer 曲线呈良好的线性关系 (线性相关系数均大于 0.99), 随着温度的升高, HSA 的猝灭曲线斜率降低, 并且由  $K_{sv}$  得出相应的  $K_q$  值分别为  $1.11 \times 10^{13}$  L · mol<sup>-1</sup> · s<sup>-1</sup> (27 °C),  $1.06 \times 10^{13}$  L · mol<sup>-1</sup> · s<sup>-1</sup> (37 °C) 和  $1.00 \times 10^{13}$  L · mol<sup>-1</sup> · s<sup>-1</sup> (47 °C), 此值远大于各类猝灭剂对生物大分子的最大动态猝灭速率常数 ( $2.0 \times 10^{10}$  L · mol<sup>-1</sup> · s<sup>-1</sup>), 且随着温度的升高猝灭速率常数降低, 表明动态碰撞不是引起 HSA 荧光猝灭的主要原因, 而是由于药物和 HSA 形成了复合物而引起的静态猝灭。

### 2.3 木犀草素与 HSA 的表观结合常数 $K_A$ 以及结合位点数 $n$

用静态猝灭公式<sup>[9]</sup>

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

处理实验数据, 分别作不同温度下 HSA 的  $\lg(F_0 - F)/F \sim \lg [Q]$  的曲线图, 如图 3 所示。

根据截距和斜率求得不同温度的  $K_A$  和  $n$  值。  $K_A$  值分别为  $1.02 \times 10^6$  L · mol<sup>-1</sup> (27 °C),  $3.05 \times 10^6$  L · mol<sup>-1</sup> (37 °C) 和  $5.13 \times 10^6$  L · mol<sup>-1</sup> (47 °C);  $n$  值分别为 1.21 (27 °C), 1.31 (37 °C) 和 1.38 (47 °C)。由这些数据可看出, 木犀草素与 HSA 的结合常数较大, 可形成一个结合位点, 表明木犀草素与 HSA 相互作用时形成 1:1 的复合物, 且温度对结合常数  $K_A$  的影响较小, 说明木犀草素与 HSA 之间有较强的

结合作用，可以被蛋白质运输和储存。

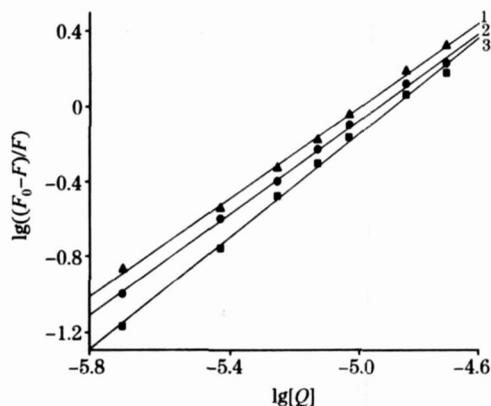


Fig 3 Double-log plot of luteolin quenching effect on HSA fluorescence  
1: 27 ; 2: 37 ; 3: 47

### 2.4 木犀草素与 HSA 之间作用力的类型

药物等有机小分子和蛋白质等生物大分子之间的结合力属于分子间的弱相互作用，主要有疏水作用力、氢键、范德华力和静电引力等。Ros<sup>ss</sup>[7]等根据大量的试验结果，总结出了根据反应前后热力学焓变  $H$  和熵变  $S$  的相对大小判断生物大分子与小分子结合力性质的热力学规律，可以判断药物与蛋白质之间主要存在的作用力的类型： $H > 0, S > 0$  为疏水作用力； $S < 0, H < 0$  为氢键和范德华力； $H < 0, S > 0$  为静电引力。在温度变化不大时，反应的焓变  $H$  可以看作一个常数，由  $K_A$  可以求出反应的自由能变  $G$

$$G = -RT \ln K \quad (3)$$

$$\ln K_2 / K_1 = [1/T_1 - 1/T_2] H/R \quad (4)$$

$$G = H - TS \quad (5)$$

Table 1 Thermodynamic parameters of luteolin-HSA binding process

$T$ /	$H$ / (kJ · mol <sup>-1</sup> )	$G$ / (kJ · mol <sup>-1</sup> )	$S$ / (J · mol <sup>-1</sup> · K <sup>-1</sup> )
27	64.46	-36.81	337.57
37	64.46	-39.72	347.27
47	64.46	-41.11	329.91

由表 1 中数据可以看出： $H > 0, S > 0$ ，说明木犀草素与 HSA 之间的作用力主要为疏水作用力；且  $G < 0$  表明其作用过程是一个自由能降低的自发过程； $H$  对  $G$  的贡献相对较小，所以木犀草素与 HSA 分子之间的自发作用过程主要是熵增加所驱动的。

### 2.5 木犀草素与 HSA 的结合距离

根据 Förster 偶极-偶极非辐射能量转移理论<sup>[6]</sup>，发生能量转移必须满足以下条件：一是给体必须发荧光，二是给体的荧光发射光谱与受体的吸收光谱必须有一定的重叠，三是给体与受体之间的距离最大不超过 7~10 nm。同时符合以上三个条件的给体将会发生非辐射能量转移，导致荧光猝

灭，由此可以求出小分子化合物和蛋白质分子的结合位置相对于发射荧光的基团之间的距离，距离越小，越有利于药物分子被蛋白质存储与转运，越能发挥其药理作用<sup>[10]</sup>。

据此理论，非辐射能量转移效率  $E$ ，供能体与受能体之间的结合距离  $r$  及临界能量转移距离  $R_0$  之间有下列关系<sup>[11]</sup>

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

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} P J \quad (7)$$

$$J = \int I_P(\lambda) D(\lambda)^4 d\lambda / \int I_P(\lambda) d\lambda \quad (8)$$

式中  $K^2$  为偶极空间取向因子，可取受能体和供能体各项随机分布的平均值  $2/3$ <sup>[7]</sup>， $N$  为介质折射常数，一般取水和有机物折射指数的平均值 1.336<sup>[7]</sup>， $P$  为血清白蛋白的荧光量子产率，通常取蛋白质中色氨酸的量子产率 0.15<sup>[12]</sup>， $E$  为授体与受体间能量转移效率， $R_0$  为转移效率为 50% 时的临界距离， $J$  为给体荧光发射光谱与受体吸收光谱的重叠积分， $I_P(\lambda)$  是 HSA 在波长  $\lambda$  处的荧光强度， $D(\lambda)$  是受能体在波长  $\lambda$  处的摩尔吸光系数。

图 4 为木犀草素的紫外吸收光谱和 HSA 的荧光发射光谱的重叠光谱图，将图中的光谱重叠部分分割成极小的矩形，采用矩形分割法由 (8) 式可以求出两光谱重叠区域的积分值  $J$ ，并可由 (7) 式求出  $R_0$  值，由 (6) 式求出  $E$  和  $r$  值。 $r$  值分别为 3.11 nm(27)，3.20 nm(37) 和 3.40 nm(47)。所得  $r$  值远小于 7 nm 说明木犀草素对 HSA 的猝灭过程符合非辐射能量转移理论，而且其能量转移效率达 29% 以上，因此非辐射能量转移也是引起 HSA 荧光猝灭的原因之一。

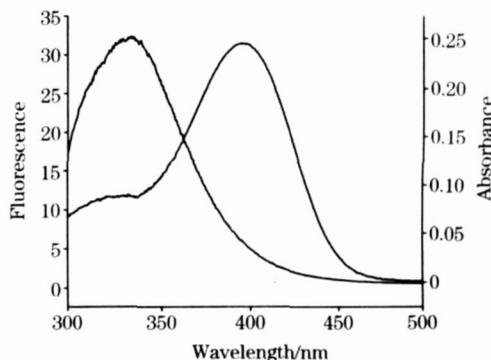


Fig 4 Overlap of the fluorescence emission spectrum of HSA and UV absorption of luteolin

### 2.6 木犀草素与 HSA 结合的同时荧光光谱

蛋白质分子内的三种内源荧光生色团色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸中，常用色氨酸的荧光来考查其构象的变化。固定激发波长与发射波长的间距，同步扫描激发波和发射波即可得同步荧光光谱。由  $\Delta\lambda = 15$  nm 所作同步荧光光谱显示酪氨酸残基的光谱特征，而  $\Delta\lambda = 60$  nm 的同步荧光光谱仅显示色氨酸残基的光谱特征<sup>[13]</sup>。因氨基酸残基的最大发射波长与其所处环境之极性有关，随其所处环境的疏水性逐渐降低，其最大发射波长红移<sup>[14]</sup>。故由发射波长的改变可判断血清白蛋白中氨基酸残基所处微环境的变化。

图 5 中 (a) 和 (b) 分别为 HSA-木犀草素体系在  $\Delta\lambda = 15$

nm 和  $\lambda_{em} = 60$  nm 时的同步荧光光谱图。随木犀草素浓度的增加, HSA 的荧光强度降低, 说明木犀草素分子的存在降低了芳香氨基酸残基间的能量传递<sup>[15]</sup>。图 5(a) 中酪氨酸残基的特征荧光光谱峰位基本不变, 图 5(b) 中色氨酸残基的特征

荧光光谱峰位随木犀草素浓度的增加发生了红移, 说明色氨酸残基所处的微环境疏水性降低, 肽链的伸展程度可能有所增加, 且色氨酸的特征荧光光谱峰形发生了改变, 说明木犀草素主要与 HSA 中的色氨酸残基形成了复合物。

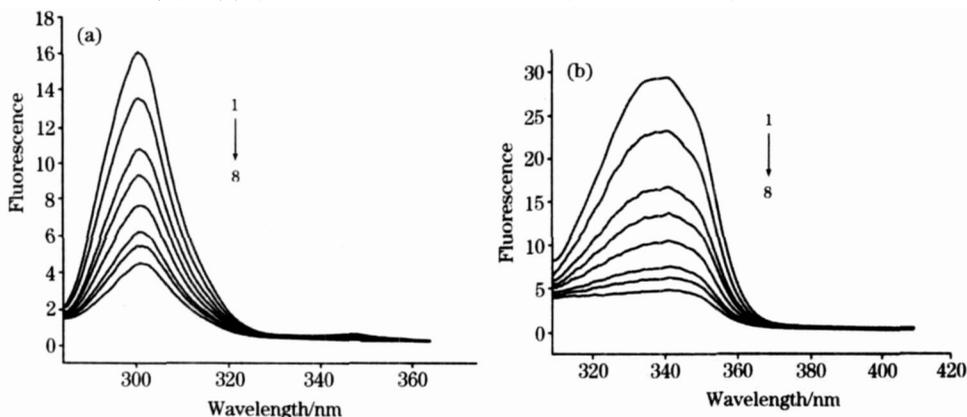


Fig 5 Synchronous fluorescence spectra of HSA

(a):  $\lambda_{ex} = 15$  nm; (b):  $\lambda_{ex} = 60$  nm;  $c_{Luteolin}/10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 1-8: 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0

### 3 结 论

研究表明, 木犀草素对 HSA 的荧光猝灭属于静态荧光猝灭, 且分子内发生了非辐射能量转移; 二者间的结合常数  $K_A$  为  $1.02 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$  (27 °C),  $3.05 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$

(37 °C),  $5.13 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$  (47 °C), 表明二者间有较强的结合作用, 作用力主要靠疏水作用力; 同时用同步荧光光谱探讨了木犀草素对 HSA 构象的影响, 说明木犀草素可能主要与 HSA 中的色氨酸结合, 且结合后使氨基酸残基所处的微环境疏水性降低。

### 参 考 文 献

- [1] LIU Chang-xiao (刘昌孝). Acta Pharm. Sinica (药学学报), 2005, 40: 395.
- [2] Walle T, Vincent T S, Walle U K. Biochem. Pharmacol., 2003, 65: 1603.
- [3] WANG Chun, WU Qiu-hua, WANG Zhi, et al (王 春, 吴秋华, 王 志, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2006, 26(9): 1672.
- [4] WANG Jin-jun, LIU Yong-ming, LI Li (王进军, 刘永明, 李 利). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2005, 25(4): 594.
- [5] Tian J N, Liu J Q, Tian X, et al. J. Mol. Struct., 2004, 691: 197.
- [6] CHEN Guo-zhen, HUANG Xian-zhi, ZHENG Zhu-zi, et al (陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 等). Fluorescence Analysis Method (荧光分析法). Beijing: Science Press (北京: 科学出版社), 1990.
- [7] Ross D P, Sabramanian S. Biochemistry, 1981, 20: 3096.
- [8] YANG Pin, GAO Fei (杨 频, 高 飞). The Principles of Bioinorganic Chemistry (生物无机化学原理). Beijing: Science Press (北京: 科学出版社), 2002.
- [9] XIAO Hou-rong, SHENG Liang-quan, SHI Chun-hua, et al (肖厚荣, 盛良全, 施春华, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2004, 24(1): 78.
- [10] LI Gui-zhi, LIU Yong-ming, GUO Xin-yun, et al (李桂芝, 刘永明, 郭新运, 等). Acta Chim. Sinica (化学学报), 2006, 64(7): 679.
- [11] LIU Luo-sheng, WANG Xing-po, ZHAO Quan-qin, et al (刘洛生, 王兴坡, 赵全芹, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2006, 26(6): 1130.
- [12] GUO Can-cheng, LI He-ping, ZHANG Xiao-bing, et al (郭灿城, 李和平, 张晓兵, 等). Chem. J. Chin. Univ. (高等学校化学学报), 2003, 24(2): 282.
- [13] 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.
- [14] Hu YJ, Liu Y, Wang J B, et al. J. Pharm. Biomed. Anal., 2004, 36: 915.
- [15] YAN Cheng-nong, ZHANG Hua-xin, LIU Yi, et al (颜承农, 张华欣, 刘 义, 等). Acta Chim. Sinica (化学学报), 2005, 63(18): 1727.

## Study on the Interaction of Luteolin with Human Serum Albumin by Fluorescence Quenching Method

ZHANG Zhi-heng<sup>1</sup>, LI Cai-ru<sup>2</sup>, MA Jing-jun<sup>1</sup>, WU Qiu-hua<sup>1</sup>, WANG Chun<sup>1</sup>, WU Qian<sup>1</sup>, WANG Zhi<sup>1\*</sup>

1. College of Science, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China

2. College of Vocational and Technological Sanitation, Hebei University, Baoding 071002, China

**Abstract** The interaction between luteolin and human serum albumin (HSA) was studied by using fluorescence quenching spectra, synchronous fluorescence spectra and ultra-violet spectra. The results showed that luteolin had a strong ability to quench the fluorescence of HAS. The Stern-Volmer curve of the fluorescence quenching of HSA by luteolin indicated that the mechanism behind the quenching between luteolin and HSA was a static quenching. According to the Förster theory of non-radiation energy transfer, the binding distances ( $r$ ) and the binding constants ( $K_A$ ) were calculated. The thermodynamic parameters showed that the interaction between luteolin and HSA was driven mainly by hydrophobic force. Synchronous spectra were used to investigate the conformational changes of HSA.

**Keywords** Luteolin; Human serum albumin; Interaction; Fluorescence spectra; Ultraviolet spectra

(Received Dec. 6, 2006; accepted Mar. 9, 2007)

\* Corresponding author