

土大黄苷与牛血清白蛋白结合反应机制及金属离子的介导作用

徐兴涛^{1,2}, 郭明^{1,2}, 吴志武², 李铭慧², 高兴军², 钱慈^{1,2}

(1. 塔里木大学 生命科学学院, 新疆 阿拉尔 843300; 2. 浙江农林大学 理学院, 浙江 临安 311300)

摘要: 应用荧光光谱法结合紫外-可见分光光度法研究了中药分子土大黄苷(rhaponticin, RT)与牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)的结合反应机制,并考察了金属离子的介导作用。依据不同理论模型测定了反应体系的结合常数 K 、结合位点数 n ,并进行了分析比较,探讨了荧光猝灭机制。根据Förster非辐射能量转移机制确定了授体-受体间结合距离和能量转移效率。采用同步荧光技术考察了RT对BSA分子构象的影响。结果表明:不同理论模型计算的结合参数基本相符并显示出RT与BSA结合反应形成了稳定的静态复合物,RT对BSA分子的结构域微区构象产生了影响,导致BSA相应结构微区疏水环境改变。金属离子钴(II),镍(II)竞争RT与BSA的结合反应,使BSA-RT的结合距离发生改变。同时,提出了一个新变量-伸展度 E_D 的计算公式,以此定量表征药物分子对蛋白质分子微区构象的影响。图8表3参31

关键词: 土大黄苷;牛血清白蛋白;荧光光谱;紫外光谱;金属离子

中图分类号: S852.5

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2011)03-0349-10

Binding interactions between rhaponticin and bovine serum albumin with mediation of metal ions

XU Xing-tao^{1,2}, GUO Ming^{1,2}, WU Zhi-wu², LI Ming-hui², GAO Xing-jun², QIAN Ci^{1,2}

(1. Department of Life Science, Tarim University, Alaer 843300, Xinjiang, China; 2. School of Sciences, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: The interaction between rhaponticin (RT) and bovine serum albumin (BSA) was studied using fluorescence spectroscopy and absorbance spectra. Based on different theoretical models of fluorescence quenching, the binding constant (K) and binding sites (n) of the interactions were determined with the effects of metal ions on the interactions considered. The binding distance (r) and energy-transfer efficiency (E) between RT/RT-Co(II)/RT-Ni(II) and BSA were also obtained using the Förster theory of non-radiation energy transfer. Results showed that RT bound BSA by forming a stable complex and the micro-conformation of BSA changed greatly due to a hydrophobic change in the chemical environment of the fluorescence chromophores within the relevant subdomains of BSA. Therefore, metal ions Co(II) and Ni(II) could compete with RT-BSA interactions, thereby shortening the binding distance between RT and BSA; however, to precisely quantify the hydrophobic effect and micro-conformational changes of drugs on proteins, we suggest a new formula defining the entention degree E_D . [Ch, 8 fig. 3 tab. 31 ref.]

Key words: rhaponticin; bovine serum albumin; fluorescence spectroscopy; ultraviolet absorption spectroscopy; metal ions

收稿日期: 2010-07-31; 修回日期: 2010-10-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20877072)

作者简介: 徐兴涛, 从事小分子与蛋白质相互作用研究。E-mail: swenson.xuxingtao@yahoo.com.cn。通信作者: 郭明, 教授, 博士, 从事天然活性物质与蛋白质(组)的相互作用及药用植物活性成分的药理及分子作用机制研究。E-mail: guoming@zafu.edu.cn

蛋白质是具有重要生理功能的生物大分子。血清白蛋白(bovine serum albumin, SA)是人和动物血浆中含量最丰富的蛋白质,它具有血液缓冲剂、维持血浆渗透压、小分子载体等作用。血清白蛋白可与许多金属离子结合,也是药物、脂肪酸、酶、代谢产物、激素等的运送载体^[1]。血清白蛋白与其他蛋白质分子相比,具有分子量较小,溶解性较大,稳定性较好,与各种配基具有亲和性的特点,且易提纯制备。因此,血清白蛋白是研究高分子蛋白质理化性质、生物学功能、体内代谢、临床应用和遗传变异等方面的理想模型蛋白质,在生理学和临床上具有重要意义^[2-3]。土大黄苷(rhaponticin, RT)分子式为 $C_{21}H_{24}O_9$,化学名为3-羟-5-[(1''E)-2''-(3'-羟基-4'-甲氧基苯基)乙烯基]苯基- β -D-葡萄糖苷,为二苯乙烯衍生物,属于芪苷,是一种广泛存在于蓼科 Polygonaceae 植物叶中的中药活性成分,具有抗菌,改善微循环,降血脂,降血糖,抗肿瘤,抑制过敏反应,调节机体免疫防御系统,抗血栓和抗氧化等作用^[4]。金属离子在许多生命过程中发挥关键作用。研究发现:钴是血液中血红蛋白的重要组成部分,也是维生素 B_{12} 组成部分,机体缺乏钴会导致贫血;镍可以通过血清中血清白蛋白运送到身体其他部位,并可与血清中的L-组氨酸和 α -巨球蛋白相结合。生物体内所含的金属离子必然会影响到RT与BSA的相互作用,因此,研究金属离子在RT-BSA结合过程中所起的介导作用机制亦有重要的实际意义^[5-8]。目前,金属离子钴(II)和镍(II)存在下,土大黄苷与牛血清白蛋白(BSA)之间的相互作用研究尚未见文献报道。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

F-4500型荧光光度计(Hitachi,日本);UV-2450型紫外-可见分光光度计(Shimadzu,日本);ZD-2型精密酸度计(上海雷磁仪器厂,中国)。

土大黄苷(RT, $\geq 99\%$,南京泽郎医药科技有限公司);牛血清白蛋白(BSA, $\geq 98\%$),三羟甲基氨基甲烷(Tris, GR)均购自上海华美生物工程公司;盐酸、硝酸钴、硝酸镍和氯化钠均为分析纯。实验用水为亚沸蒸馏去离子水。配制 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.43三羟甲基氨基甲烷-氯化氢(Tris-HCl)缓冲溶液(含 $0.10\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠维持离子强度),用此缓冲液配制 $1.0\times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BSA及 $1.0\times 10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ RT, RT-钴(II)(摩尔比=1:1), RT-镍(II)(摩尔比=1:1)储备液。

1.2 实验方法

BSA-RT溶液体系, BSA-金属离子($M^{2+} = \text{Co}^{2+}, \text{Ni}^{2+}$)-RT溶液体系的荧光光谱测定:移取2.5 mL BSA溶液于1 cm石英比色皿中,逐次加入 $1.0\times 10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ RT/RT-钴(II)/RT-镍(II)溶液进行荧光滴定(滴定剂累加体积 $\leq 200\ \mu\text{L}$),以缓冲溶液做荧光空白校正。测定时发射与激发狭缝宽度均为2.5 nm,扫描速度为 $1\ 200\text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$,激发波长为282 nm,室温下绘制250~500 nm发射光谱,记录最大吸收波长处的荧光强度。

RT溶液体系, RT- M^{2+} 溶液体系的紫外吸收光谱测定:测定与蛋白质物质的量之比为1:1 RT溶液、RT-钴(II)溶液及RT-镍(II)溶液的吸收光谱。

同步荧光光谱测定:分别固定荧光发射与激发的波长差为 $\Delta\lambda = 60\text{ nm}$ 及 $\Delta\lambda = 15\text{ nm}$,测定BSA-RT溶液体系, BSA-钴(II)-RT溶液体系及BSA-镍(II)-RT溶液体系的同步荧光光谱。

2 结果与讨论

2.1 RT, RT-钴(II)和RT-镍(II)对BSA的荧光猝灭效应

图1为固定蛋白浓度为 $1.0\times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,体系的荧光发射光谱随RT/RT- M^{2+} 浓度的变化图。

从图1可见:随着反应体系中RT/RT- M^{2+} 浓度的增加,BSA的荧光被有规律地猝灭,且RT与BSA相互作用的荧光最大发射峰位置发生了明显红移(21 nm)。最大发射峰红移说明RT, RT-钴(II)和RT-镍(II)均使BSA部分微区所处的化学环境发生较大变化,结合位点附近的疏水性总体降低,原本包裹在BSA大分子内部的主要荧光生色团总体更加暴露于极性溶剂中^[9-10]。从图1右上角BSA与 M^{2+} 相互作用的荧光光谱可以看出:金属离子钴(II)和镍(II)对BSA分子均有荧光猝灭作用,相比之下钴(II)的猝灭作用大于镍(II);但与RT分子和BSA的猝灭效应相比,RT- M^{2+} 对BSA分子的荧光猝灭仍以RT分子作用为主。同时,金属离子钴(II)和镍(II)对BSA分子作用的荧光最大发射峰位置没有发生改变,

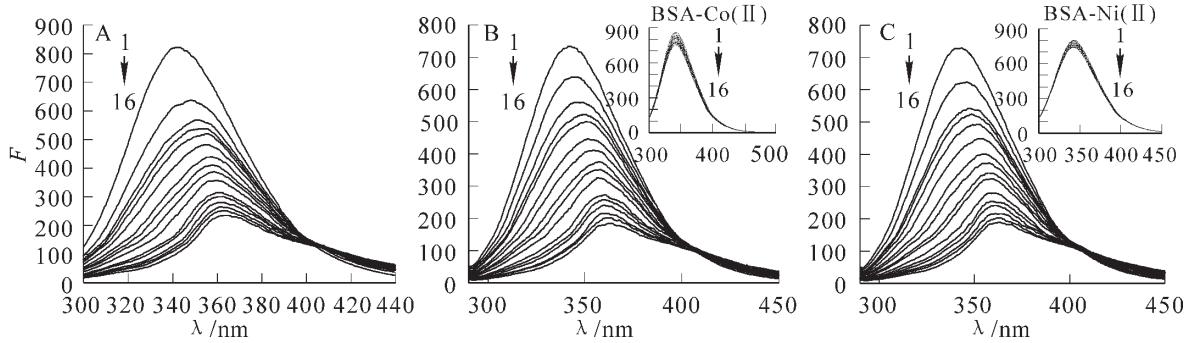


图 1 RT(A), RT-钴(II)(B)和 RT-镍(II)(C)与 BSA 结合反应的荧光图谱

Figure 1 Fluorescence quenching of BSA in the presence of various concentrations of RT(A), RT-Co(II)(B) and RT-Ni(II)(C) pH = 7.40, $\lambda_{ex} = 282 \text{ nm}$, $c_{BSA} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $c_{RT/RT-Co(II)/RT-Ni(II)} (\times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$, 1 to 16:0, 0.40, 0.80, 1.00, 1.20, 1.60, 2.04, 2.48, 2.88, 3.32, 4.20, 4.60, 5.04, 5.48, 5.92, 6.36; the up-right diagram is the fluorescence quenching of BSA in the presence of Co(II) and Ni(II).

这说明钴(II)和镍(II)不会改变 BSA 大分子在溶液中的构象。从图 1 也可以看出, RT-钴(II), RT-镍(II)和 RT 对 BSA 分子的荧光猝灭作用各不相同, 说明金属离子钴(II)/镍(II)对 RT 分子与 BSA 分子的结合可能存在竞争或者协同作用。同时, 本研究进一步考察了金属离子钴(II)/镍(II)对 RT 分子的相互作用。图 2 为 RT/RT- M^{2+} 体系的荧光光谱图。

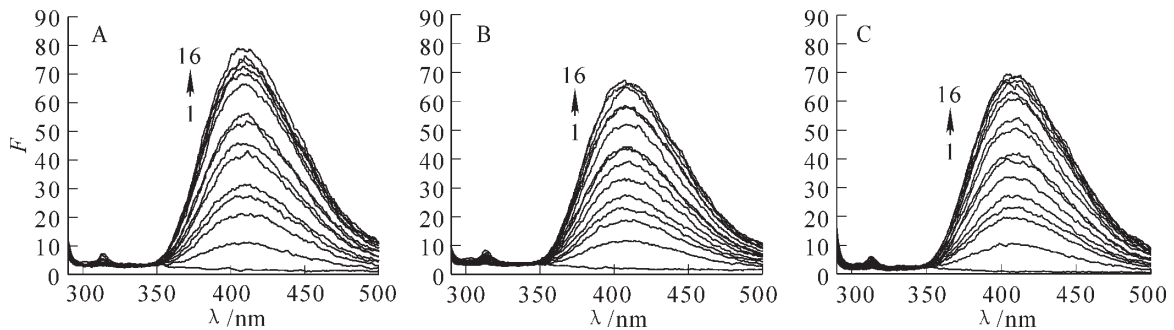


图 2 不同浓度 RT(A), RT-钴(II)(B)和 RT-镍(II)(C)的荧光图谱

Figure 2 Fluorescence quenching of various concentrations of RT(A), RT-Co(II)(B) and RT-Ni(II)(C) pH = 7.40, $\lambda_{ex} = 282 \text{ nm}$, $c_{BSA} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $c_{RT/RT-Co(II)/RT-Ni(II)} (\times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$, 1 to 16:0, 0.40, 0.80, 1.00, 1.20, 1.60, 2.04, 2.48, 2.88, 3.32, 4.20, 4.60, 5.04, 5.48, 5.92, 6.36.

由图 2 可见: RT 分子在 282 nm 激发波长下, 在 408 nm 处出现荧光最大发射峰, 并且随着 RT 分子浓度的增加而升高; RT-钴(II)和 RT-镍(II)的荧光最大发射峰也表现为同样的趋势, 但是钴(II)和镍(II)的存在使同浓度下 RT 的最大荧光发射峰比 RT 分子单独存在时的最大荧光发射峰略有下降, 说明钴(II)/镍(II)对 RT 的分子荧光有较小的猝灭作用。由于 RT/RT- M^{2+} -BSA 体系的荧光主要是由 BSA 贡献并且最大发射峰在 342 nm 附近, 与 RT 的分子荧光最大发射峰几乎没有重叠。所以, 可以认为金属离子钴(II)/镍(II)及 RT 的分子荧光对 RT/RT- M^{2+} -BSA 体系的荧光分析没有干扰。

荧光猝灭过程通常包括动态猝灭和静态猝灭。其中, 动态猝灭过程符合 Stern-Volmer 方程^[11]。为确定 RT, RT-钴(II)和 RT-镍(II)对 BSA 的荧光猝灭机制, 首先按 Stern-Volmer 方程处理上述体系:

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

式(1)中: K_q 为双分子猝灭过程速率常数, $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; τ_0 为猝灭剂不存在时生物大分子的平均寿命, s; $[D]$ 为猝灭剂(药物分子)的浓度, $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; K_{SV} 为 Stern-Volmer 猝灭常数, $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 即双分子猝灭过程速率常数(双分子猝灭过程速率常数 $K_q = K_{SV}/\tau_0$)与单分子衰变速率常数的比率。

由实验测得 RT, RT-钴(II)和 RT-镍(II)与 BSA 相互作用的荧光光谱数据按 Stern-Volmer 方程处理可得图 3, 由于无猝灭剂时生物大分子的平均荧光寿命 $\tau_0 = 10^{-8} \text{ s}$ ^[12], 则由实验数据可以通过 Stern-Volmer 方程计算 BSA-RT, BSA-钴(II)-RT 和 BSA-镍(II)-RT 体系的猝灭常数 K_{SV} , K_q 。计算结果列于表 1。

表1 RT, RT-Co(II)和RT-Ni(II)与BSA相互作用的猝灭参数

Table 1 Quenching constants of RT, RT-Co(II) and RT-Ni(II) to BSA

| 溶液 | $K_{sv}/(10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1})$ | $K_q/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$ | R |
|--------------|---|--|---------|
| BSA-RT | 10.60 | 1.06×10^{13} | 0.982 1 |
| BSA-钴(II)-RT | 9.90 | 9.90×10^{12} | 0.978 7 |
| BSA-镍(II)-RT | 9.75 | 9.75×10^{12} | 0.983 2 |

目前,生物大分子与活性小分子相互作用的荧光猝灭机制研究中,常用2种方法判定荧光猝灭机制,一种方法是通过比较双分子猝灭过程速率常数与猝灭剂对生物大分子最大扩散碰撞猝灭速率常数来间接推断荧光猝灭机制^[13];另一种方法是通过变温实验来直接推断荧光猝灭机理^[14-15]。根据实验室的具体实验条件,本研究采用间接比较法判断RT/RT-钴(II)/RT-镍(II)与BSA相互作用的荧光猝灭机制。

由图3结合表1结果可知:在较大浓度范围内,RT,RT-钴(II)和RT-镍(II)对BSA荧光猝灭的Stern-Volmer曲线都有良好的线性关系,这是静态猝灭的迹象之一。本实验体系的双分子猝灭过程速率常数远大于各类猝灭剂对生物大分子最大扩散碰撞猝灭的速率常数 $2.0 \times 10^{10} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$,这说明RT,RT-钴(II)和RT-镍(II)对BSA的猝灭不是由于碰撞引起的动态猝灭,而是主要由于形成了复合物而引起的静态猝灭。

2.2 结合常数及结合位点数测定

药物与蛋白质之间的相互作用一般采用位点结合模型描述^[12,16-17],即:

$$V = nK[D]/(1 + K[D]) \quad (2)$$

式(2)中: v 为平均结合数,即平均每摩尔蛋白质分子结合药物分子的物质的量, mol; K 为结合常数, $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$; n 为结合位点数,即一个蛋白质分子能结合药物分子的数目; $[D]$ 为溶液中药物的游离浓度, $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

对于选定的发射波长,若体系的荧光仅为蛋白质所产生,则有:

$$F_0/F = [P_t]/[P] \quad (3)$$

根据 v 的定义,可得:

$$v = ([D_t] - [D])/[P_t] = n([P_t] - [P])/[P_t] - n(F_0 - F)/F_0 = n\Delta F/F_0 \quad (4)$$

式(3)和(4)中, $[D_t]$ 和 $[P_t]$ 分别为体系中药物与蛋白质的总浓度, F 和 F_0 分别表示加入和未加入小分子药物时蛋白质的荧光强度。根据式(3)和式(4)理论推导可得到:

$$2\Delta F/F_0 = 1 + 1/K_n[P_t] + [D_t]/n[P_t] - \sqrt{(1 + 1/K_n[P_t] + [D_t]/n[P_t])^2 - 4[D_t]/n[P_t]} \quad (5)$$

则通过公式(5)非线性拟合可求取结合反应体系的结合参数。由所得实验数据,按式(5)将 $2\Delta F/F_0$ 对 $[D_t]/[P_t]$ 进行拟合得到拟合曲线(图4),进而计算求得RT,RT-钴(II)和RT-镍(II)与BSA的结合常数 K ,结合位点数 n 。结果列于表2。

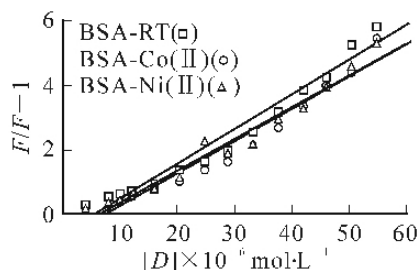


图3 RT, RT-Co(II)和RT-Ni(II)对BSA荧光猝灭的Stern-Volmer图

Figure 3 Stern-Volmer plot for the fluorescence quenching of BSA by RT, RT-Co(II) and RT-Ni(II)

pH = 7.40, λ_{ex} = 282 nm, c_{BSA} = $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

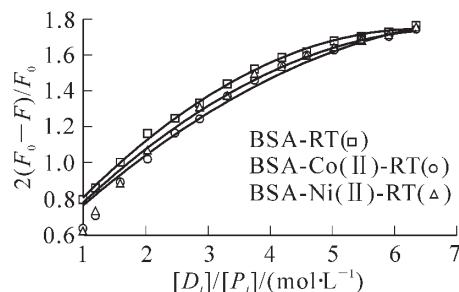


图4 RT, RT-钴(II)和RT-镍(II)对BSA荧光变化拟合图

Figure 4 Non-linear fitting curve for the fluorescence quenching of BSA by RT, RT-Co(II) and RT-Ni(II)

此外，为比较不同理论模型对结合反应参数计算结果的异同，本文对结合常数的求算方法还采用了 Lineweaver-Burk 双倒数方程进行拟合^[18-19]：

$$(F_0 - F) - 1 = F_0 + K^{-1}F_0^{-1}[D]^{-1} \quad (6)$$

式(6)中， F_0 为未加药物小分子时的荧光强度， F 为加入药物小分子时的荧光强度， $[D]$ 为加入药物小分子浓度， K 为结合常数。根据(6)式作 $(F_0 - F)^{-1} - [D]^{-1}$ 拟合图(图5)，进而求得 BSA-RT，BSA-钴(II)-RT 和 BSA-Ni(II)-RT 体系的结合反应参数，相应结果一并列于表2。

表 2 RT, RT-钴(II)和 RT-镍(II)与 BSA 反应的结合参数

Table 2 Binding parameters of RT, RT-Co(II) and RT-Ni(II) to BSA

| 溶液 | $K^{\text{①}}/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$ | $K^{\text{②}}/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$ | $n^{\text{①}}$ | $R^{\text{①}}$ | $R^{\text{②}}$ |
|--------------|---|---|----------------|----------------|----------------|
| BSA-RT | 6.66×10^4 | 7.97×10^4 | 3.98 | 0.998 2 | 0.987 5 |
| BSA-钴(II)-RT | 5.96×10^4 | 2.41×10^4 | 4.84 | 0.979 8 | 0.999 0 |
| BSA-镍(II)-RT | 6.12×10^4 | 3.02×10^4 | 4.33 | 0.979 9 | 0.998 6 |

说明：①根据式(5)计算；②根据式(6)计算。

图4和图5结合表2可见：式(5)和式(6)所求结果都有良好的相关系数且结合常数数量级均较高，说明RT分子、RT-钴(II)分子和RT-镍(II)分子均与BSA形成了较稳定的复合物，也侧面证实了BSA内源荧光猝灭的机制为静态猝灭。同时，分析实验所得结果，得出如下规律：①金属离子介导作用下，BSA-RT- M^{2+} 体系的结合常数小于BSA-RT的结合常数。说明金属离子与RT分子可能竞争与BSA分子的结合反应，该竞争反应可能为金属离子结合BSA过程中引起BSA分子的别构效应所致^[20-21]；②不同金属离子介导对RT-BSA结合反应的影响程度不同，其结合常数大小顺序为

$K_{\text{BSA-RT}} > K_{\text{BSA-Ni(II)-RT}} > K_{\text{BSA-钴(II)-RT}}$ 。此外，BSA-钴(II)-RT体系的结合位点数及BSA-镍(II)-RT体系的结合位点数分别比BSA-RT体系的结合位点数多0.86和0.35，也说明金属离子钴(II)，镍(II)与RT分子可能竞争与BSA分子的结合反应，使结合位点数增多。结合金属离子钴(II)，镍(II)对BSA分子均有较弱的荧光猝灭作用，我们分析推断，钴(II)，镍(II)同RT竞争与BSA的结合反应，钴(II)，镍(II)的加入会导致RT与BSA的相互作用程度减小，故结合常数变小；但由于钴(II)，镍(II)对BSA分子的荧光猝灭作用远小于RT对BSA分子的荧光猝灭作用，可能竞争结合BSA分子的钴(II)，镍(II)离子数多于减少的BSA结合RT的分子数，故在结合常数减小的同时，结合位点数增多。本研究分别利用位点结合模型和Lineweaver-Burk双倒数方程处理结合反应的光谱数据，得到基本一致的结果，说明了结果分析的可信度，进一步验证了金属离子介导可能在RT与BSA的结合反应中起竞争作用的推论。

2.3 RT, RT-钴(II)和 RT-镍(II)与 BSA 的结合距离

按照Foster非辐射能量转移机制^[11,22]可以求出猝灭剂分子-蛋白质分子间的能量转移效率及猝灭剂分子与蛋白质分子中荧光发射残基的结合距离。据此理论，荧光发射体和荧光猝灭体之间的能量转移效率 E 和两者之间的距离 r 及临界能量转移距离 R_0 相关：

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) \quad (7)$$

式(7)中， E 为能量转移效率， R_0 为能量转移效率 $E = 50\%$ 时的临界能量距离。

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} \Phi J \quad (8)$$

式(8)中： K 为偶极空间取向因子， N 为介质的折射指数， Φ 为授体的光量子效率， J 为授体(蛋白)荧光发射光谱与受体(药物)吸收光谱间的光谱重叠积分， $\text{cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

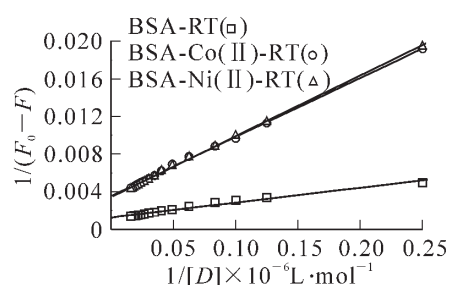


图 5 RT, 钴(II)-RT 和 镍(II)-RT 与 BSA 相互作用的 Lineweaver-Burk 双倒数方程图

Figure 5 Lineweaver-Burk plot for the fluorescence quenching of BSA by RT, RT-Co(II) and RT-Ni(II)

$$J = \int_0^{\infty} F(\lambda)\varepsilon(\lambda)\lambda^4 d\lambda / \int_0^{\infty} F(\lambda) d\lambda \quad (9)$$

式(9)中: $F(\lambda)$ 为荧光授体在波长 λ 处的荧光强度, $\varepsilon(\lambda)$ 为受体在波长 λ 处的摩尔吸收系数, $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ 。

能量转移效率 E 可按式(10)确定:

$$E = 1 - F/F_0 \quad (10)$$

按式(9)计算光谱重叠积分 J_{BSA} (表3)。在本实验条件下, 取偶极空间取向因子为两结合物各向随机分布的平均值, 即 $K^2 = 2/3$ ^[22], 光量子效率取色氨酸标准值 $\Phi = 0.118$ ^[17,23], 折射指数取水(1.33)和有机物(1.39)的平均值 $N = 1.36$ ^[22], 将以上各量代入式(8), 可得 BSA 的临界能量距离 R_0 。由式(10)求得能量转移效率 E , 进而由 R_0 和 E 按式(7)求出 BSA 分子与 RT, RT-钴(II)和 RT-镍(II)分子之间的距离(r), 相应能量转移参数也列于表3。

表3 RT, RT-钴(II)和 RT-镍(II)与 BSA 能量转移参数

Table 3 Energy transfer parameters between quenchers and BSA

| 溶液 | $J/(\text{cm}^3\cdot\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$ | R_0/nm | E | r/nm |
|--------------|--|-----------------|---------|---------------|
| BSA-RT | 1.46×10^{-14} | 2.61 | 0.394 9 | 2.81 |
| BSA-钴(II)-RT | 1.15×10^{-14} | 2.51 | 0.317 4 | 2.85 |
| BSA-镍(II)-RT | 1.19×10^{-14} | 2.53 | 0.307 1 | 2.89 |

说明: $N = 1.36$, $\Phi = 0.118$, $K^2 = 2/3$ 。

由表3可见: RT/RT-钴(II)/RT-镍(II)与 BSA 分子的结合距离均小于 7 nm, 表明 RT/RT-钴(II)/RT-镍(II)与 BSA 分子之间可以发生非辐射能量转移。钴(II)和镍(II)的加入使 BSA-RT 的结合距离分别增大了 0.04 nm 和 0.08 nm, 说明金属离子介导作用使得 RT 分子与 BSA 分子的结合距离发生了变化。

2.4 RT, RT-钴(II)和 RT-镍(II)对 BSA 构象的影响

2.4.1 同步荧光光谱 蛋白质的同步荧光光谱中, $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 显示酪氨酸残基的荧光光谱特性, $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 显示色氨酸残基的荧光光谱特性。蛋白质中氨基酸残基的最大发射波长与其所处环境的极性有关, 故由最大发射波长的变化可判断蛋白质构象的变化^[24-25]。固定蛋白质浓度, 并逐渐增大 RT/RT-钴(II)/RT-镍(II)的浓度, 可得到 BSA 的同步荧光光谱(图6)。从图6可见: BSA 的荧光主要由色氨酸所贡献, 随着猝灭剂浓度的增大, $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 的同步荧光光谱最大发射波长均发生红移(约为 4 nm), $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 的同步荧光光谱最大发射波长基本没有变化, 说明本实验条件下, RT, RT-钴(II)和 RT-镍(II)的加入对 BSA 色氨酸残基周围的微区构象产生影响, 使 RT 分子嵌入色氨酸残基所在 BSA 大分子的微区结构中并改变了色氨酸残基周围的微区构象, 使得肽链的伸展程度增加, 微区疏水腔相对展开, 使部分色氨酸残基更大程度暴露于极性溶剂环境中, 造成色氨酸残基周围的疏水性降低^[9-10]。由图6 BSA 与 M^{2+} 相互作用的同步荧光光谱可以看出(右上角图): 金属离子钴(II)和镍(II)对 BSA 分子的色氨酸和酪氨酸残基同步荧光均有微弱猝灭作用, 但与 BSA-RT 体系中的猝灭效应相比, BSA-RT- M^{2+} 体系中 BSA 分子的荧光猝灭仍以 RT 分子作用为主, 同时, 金属离子(M^{2+})对 BSA 色氨酸和酪氨酸残基同步荧光猝灭的最大发射峰没有发生位移, 说明 RT/ M^{2+} 对 BSA 微区构象的影响是以 RT 分子的影响为主。已知 BSA 分子由 585 个氨基酸组成, 其心形高级结构可以分成 3 个结构域(从 N-端开始依次为 domain I, domain II 和 domain III), 这些结构域主要由 α -螺旋反向平行形成, 每个域又以槽口相对的 2 个疏水性空腔亚域(subdomain A 和 subdomain B)形成。分子中有 2 个色氨酸残基 Trp134 和 Trp212 位, Trp134 处于 IB 亚域, 此区域靠近 BSA 分子表面, 处于亲水环境中; Trp212 处于 IIA 亚域, 此区域位于 BSA 分子内部, 包埋在疏水腔中。Trp212 参加了 IIA 和 IIIA 疏水腔的界面形成, 该处疏水腔在结合药物过程中起了主要作用^[26-27]。进一步分析 RT/RT- M^{2+} 分子结合 BSA 作用部位的情况, 得出如下推论: RT 分子很可能由于疏水作用嵌入 BSA 大分子中 Trp212 残基所在的疏水腔亚结构域 IIA 中并改变了色氨酸残基周围的微区构象, 使得肽链的伸展程度增加, 造成周围的疏水性降低。

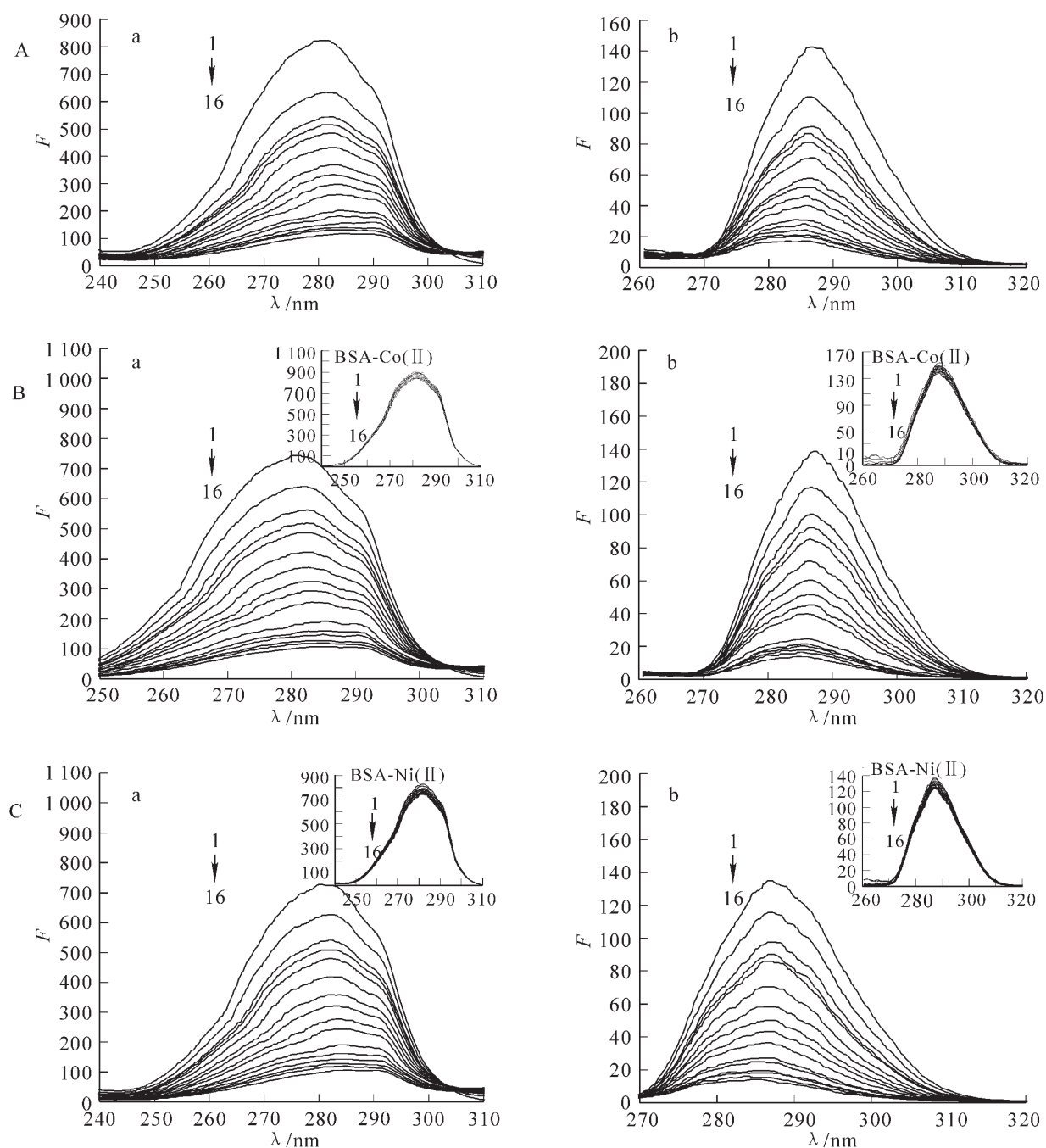


图 6 RT-BSA(A), RT-钴(II)-BSA(B)和 RT-镍(II)-BSA(C)体系的同步荧光光谱

Figure 6 Effect of RT-BSA(A), RT-Co(II)-BSA(B) and RT-Ni(II)-BSA(C) on the synchronous fluorescence spectra of BSA
 a: $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$, b: $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$; $c_{\text{BSA}} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $c_{\text{RT}} (\times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1})$, 1 to 16: 0, 0.40, 0.80, 1.00, 1.20, 1.60, 2.04, 2.48, 2.88, 3.32, 4.20, 4.60, 5.04, 5.48, 5.92, 6.36.

2.4.2 RT, RT-钴(II)和 RT-镍(II)对 BSA 微区构象的影响 蛋白质大分子与药物小分子的相互作用对蛋白质分子的稳定性、构象和功能均产生影响。关于药物分子对蛋白质分子疏水性和微区构象变化影响的研究时有报道。然而,目前还没有精确的方法或者理论公式来说明药物分子对蛋白质分子构象影响的程度。从我们的实验结果并提取文献报道的信息进行综合分析^[28-29],可以得出,蛋白质分子荧光值下降说明蛋白质的疏水性发生了改变,因此荧光值的变化程度可以作为衡量药物分子对蛋白质分子构象影响大小的因子。把蛋白质分子内源荧光生色团最大荧光发射峰红(蓝)移范围作为衡量药物小分子对蛋白质大分子构象影响大小的因子也是合理的^[9-10,30-31]。相对于血清白蛋白分子,如果包埋在 BSA 分子内部的主要荧光生色团-色氨酸残基更加暴露于极性溶剂环境中,则色氨酸残基附近的疏水性降低,也就是

说原本“包裹”色氨酸残基的肽链变得更加“伸展(extended)”，微区构象发生了相应变化。因此，为了更加精确地说明药物小分子对蛋白质大分子微区疏水性和构象的变化，我们建议给出一个新的计算变量 E_D ，并建议其理论计算公式如下：

$$E_D = (1 - F/F_0)\Delta\lambda \quad (11)$$

式(11)中 E_D 表示药物分子作用在蛋白质大分子相应微区肽链的伸展度(extension degree)， F_0 为未加药物小分子时蛋白质分子的荧光强度， F 为加入药物小分子时相互作用体系的荧光强度， $\Delta\lambda$ 为 $\Delta\lambda = 60$ nm 时同步荧光光谱最大发射峰变化值(同步荧光最大发射峰值红移为正值，蓝移为负值)。则由伸展度 E 可以定量表征药物分子对蛋白质分子微区构象变化及疏水性变化的影响，RT，RT-钴(II)和RT-镍(II)对 BSA 微区构象影响的变化趋势见图 7。从图 7 可以看出：随着 RT，RT-钴(II)和 RT-镍(II)浓度的增加，其对 BSA 微区构象影响的变化趋势几乎一致，即随着 RT/RT-钴(II)/RT-镍(II)浓度的增加，BSA 色氨酸残基附近微区肽链的“伸展度”表现为有规律地增加。则由所得结果可知，伸展度 E_D 可以定量衡量药物分子作用在蛋白质大分子相应微区引起的肽链变化程度，也更加直观地反映出药物分子对蛋白质分子微区构象的影响。

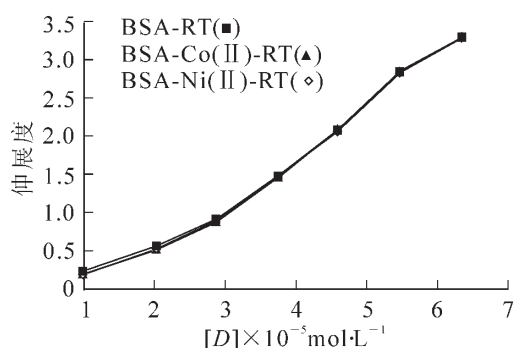


图 7 伸展度与 RT/RT- M^{2+} 浓度关系图

Figure 7 Relationship between extension degree and the concentration of RT/RT- M^{2+}

2.4.3 RT，RT-Co(II)和RT-镍(II)分子对 BSA 结合部位的影响 为直观比较 RT/RT-钴(II)/RT-镍(II)对 BSA 的同步荧光猝灭程度并推断出 RT/RT- M^{2+} 与 BSA 分子中色氨酸残基/酪氨酸残基的相互作用程度，由同步荧光光谱实验数据做 $F/F_0 - [D]/[P]$ 曲线图($[D]/[P]$ 为 RT/RT- M^{2+} 分子与 BSA 分子的浓度比)得到图 8。由图 8 可见：在 $[D]/[P]$ 较小时即 $[D]$ 浓度较小时，RT 对 BSA 色氨酸残基和酪氨酸残基荧光的猝灭程度均强于钴(II)-RT 和镍(II)-RT 对 BSA 色氨酸残基和酪氨酸残基荧光的猝灭程度，且大小顺序正好与上文所求出的 $K_{BSA-RT} > K_{BSA-镍(II)-RT} > K_{BSA-钴(II)-RT}$ 结果相吻合。值得注意的是，对于 BSA，在 $[D]/[P]$ 大于 3 时，RT，钴(II)-RT 和镍(II)-RT 对 BSA 色氨酸残基及酪氨酸残基猝灭效应趋势图的走势几乎是一样的，说明在较大浓度情况下，钴(II)和镍(II)对 RT 分子和 BSA 分子结合反应不再起协同作用，这可能是由于小分子猝灭剂已经把 BSA 的强结合位点占满，而且这些强位点恰好是钴(II)和镍(II)所发挥介导作用的位点，以至于随着小分子猝灭剂浓度的增加，虽然会继续使 BSA 的荧光发生猝灭，但是 RT，钴(II)-RT 和镍(II)-RT 对 BSA 的相互作用都是 RT 分子与 BSA 分子的结合反应。

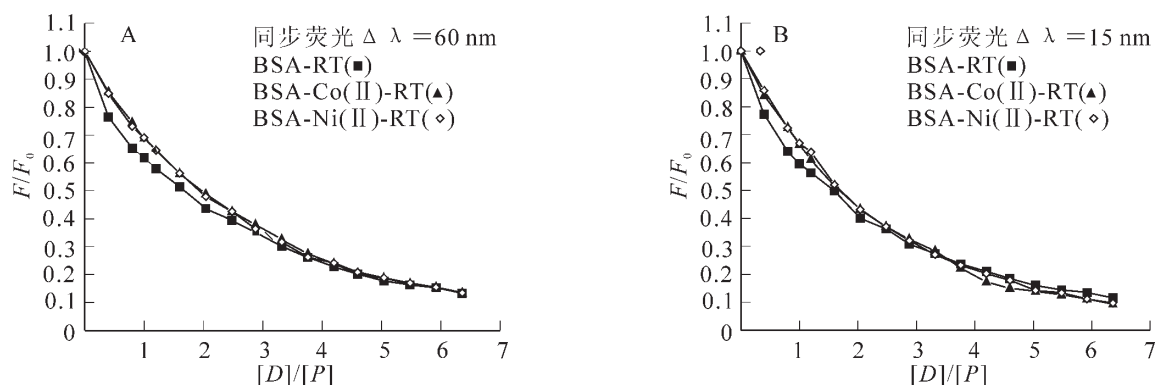


图 8 RT，RT-钴(II)和 RT-镍(II)对 BSA 结合部位影响趋势图

Figure 8 Binding trend curve of BSA in the presence of various concentration of RT, RT-Co(II) and RT-Ni(II)

$$C_{BSA} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

3 结论

土大黄苷(RT)，RT-钴(II)和 RT-镍(II)与牛血清白蛋白(BSA)的结合反应为形成稳定的复合物，

说明中药成分土大黄苷能够被 BSA 载运。RT, RT-钴(II)和 RT-镍(II)与 BSA 相互作用的荧光光谱说明 RT, RT-钴(II)和 RT-镍(II)在 BSA 结合反应过程中均造成其部分微区构象发生变化, 使结合位点微区环境的疏水性总体降低。金属离子的介导改变了药物小分子与 BSA 的相互作用程度, 但不会进一步影响 BSA 整体构象的变化。

依据位点结合模型和 Lineweaver-Burk 双倒数方程计算了 RT, 钴(II)-RT 和镍(II)-RT 与 BSA 的结合参数并得到了基本一致的结果, 数据显示 RT/RT-M²⁺与 BSA 均具有较强的相互作用。同时, 由实验结果分析推测, 钴(II)和镍(II)对土大黄苷与 BSA 分子作用部位的影响可能是金属离子-药物竞争作用的结果, 该竞争反应可能为金属离子结合 BSA 过程中引起 BSA 分子的别构效应所致。而根据 Förster 非辐射能量转移理论确定的授体-受体间结合距离(r)和能量转移率(E)说明了 RT, RT-钴(II)和 RT-镍(II)与 BSA 的结合距离较短, 发生了能量转移但能量转移效率有限。

由同步荧光光谱实验结果可以推测: RT/RT-M²⁺与 BSA 结合反应的作用部位主要发生在 BSA 大分子中 Trp212 残基所在疏水腔亚结构域 IIA 中, 结合反应过程中 RT/RT-M²⁺导致了 BSA 相应结构微区疏水环境降低。为了直观地反映出药物分子对蛋白质分子微区构象的影响, 笔者提出了伸展度 E_D 的定义并建议了理论计算公式, 由相应结果得出: 随着 RT/RT-钴(II)/RT-镍(II)浓度的增加, BSA 色氨酸残基附近微区肽链的伸展度 E_D 有规律地增加。

参考文献:

- [1] WEI Yanli, LI Jianqing, DONG Chuan, *et al.* Investigation of the association behaviors between biliverdin and bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy [J]. *Talanta*, 2006, **70** (2): 377 - 382.
- [2] PAN Y, SHIELL B, WAN J, *et al.* The molecular characterisation and antimicrobial activity of amidated bovine lactoferrin [J]. *Intern Dairy J*, 2007, **17** (6): 606 - 616.
- [3] ELLISON R T, GIECHL T J, LAFORCE F M. Damage of the outer membrane of enteric gram negative bacteria by lactoferrin and transferrin [J]. *Infect Immun*, 1998, **56**: 2774 - 2781.
- [4] 陈志强, 张文懿, 张学良, 等. HPLC 制备河套大黄中多羟基芪类化合物 Rhapontin[J]. 中成药, 2004, **26** (11): 932 - 933.
CHEN Zhiqiang, ZHANG Wenyi, ZHANG Xueliang, *et al.* Preparative separation of polyhydrostilbenes rhapontin from *Rhaponticum hotaoense* C.Y. Cheng et C. T. Kao. by HPLC [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2004, **26** (11): 932 - 933.
- [5] GUIYANG H, TOSHIMITSU F, RYUJI N, *et al.* Cation exchange separation of ⁶⁴Cu²⁺ from natCo targets and preparation of ⁶⁴Cu-DOTA-HSA as a blood pool agent [J]. *Appl Rad Isot*, 2009, **67** (4): 511 - 515.
- [6] ZHOU Yongqia, HU Xuying, DOU Chao, *et al.* Structural studies on metal-serum albumin(IV). The interaction of Zn(II), Cd(II) and Hg(II) with HSA and BSA [J]. *Biophys Chem*, 1992, **42** (2): 201 - 211.
- [7] GUO Ming, ZOU Hanfa, WANG Hailin, *et al.* Binding of metal ions with protein studied by a combined technique of microdialysis with liquid chromatography [J]. *Anal Chim Acta*, 2001, **443** (1): 91 - 99.
- [8] WU Shanshan, YUAN Wenbing, WANG Haiyang, *et al.* Synthesis, crystal structure and interaction with DNA and HSA of (N, N'-dibenzylethane-1, 2-diamine) transition metal complexes [J]. *J Inorg Biochem*, 2008, **102** (11): 2026 - 2034.
- [9] CUI Fengling, KONG Xiaoduo, QIN Lixia, *et al.* Specific interaction of 4'-O-(α -l-Cladinosyl) daunorubicin with human serum albumin: The binding site II on HSA molecular using spectroscopy and modeling [J]. *J Photochem Photobiol B Biol*, 2009, **95** (3): 162 - 169.
- [10] LAKOWICZ J R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*[M]. 2nd Ed. New York: Plenum Press, 1996.
- [11] 杨频, 高飞. 生物无机化学原理[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [12] 许金钧, 王尊本. 荧光分析法[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2006.
- [13] 张立伟, 杨频, 王芳. 二价铜、锌离子对盐酸巴马亭与牛血清白蛋白结合反应光谱的影响研究[J]. 无机化学学报, 1999, **15** (4): 26 - 30.
ZHANG Liwei, YANG Pin, WANG Fang. Spectroscopic studies on binding of palmatine hydrochloride to bovine serum albumin influenced by zinc and copper [J]. *Chin J Inorg Chem*, 1999, **15** (4): 26 - 30.
- [14] ROSS P D, SUBRAMANIAN S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability

- [J]. *Biochemistry*, 1981, **20**: 3096 – 3102.
- [15] HU Yanjun, LIU Yi, ZHOU Ruming, *et al.* Spectroscopic studies on the interaction between methylene blue and bovine serum albumin [J]. *J Photochem Photob A Chem*, 2006, **179** (3): 324 – 329.
- [16] LEE S U, PARK S J, KWAK H B, *et al.* Anabolic activity of ursolic acid in bone: Stimulating osteoblast differentiation in vitro and inducing new bone formation in vivo [J]. *Pharm Res*, 2008, **58** (5/6): 290 – 296.
- [17] KHAN S N, ISLAM B, YENNAMALLI R, *et al.* Bovine and human serum albumin interactions with 3-carboxyphenoxathiin studied by fluorescence and circular dichroism spectroscopy [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2008, **35** (5): 371 – 382.
- [18] 杨曼曼, 杨频, 张立伟. 荧光猝灭和荧光加强理论公式的等效性论证[J]. 科学通报, 1994, **39** (1): 31 – 35.
YANG Manman, YANG Pin, ZHANG Liwei. Equivalent study on fluorescence quenching and fluorescence increase [J]. *Chin Sci Bull*, 1994, **39** (1): 31 – 35.
- [19] BARBERO N, BARNI E, BAROLO C, *et al.* A study of the interaction between fluorescein sodium salt and bovine serum albumin by steady-state fluorescence [J]. *Dyes Pigm*, 2009, **80** (3): 307 – 313.
- [20] LIANG Hong, HUANG Jin, TU Chuqiao, *et al.* The subsequent effect of interaction between Co^{2+} and human serum albumin or bovine serum albumin [J]. *J Inorg Biochem*, 2001, **85**: 167 – 171.
- [21] ZHOU Yongqia, HU Xuying, OUYANG Di, *et al.* The novel behaviour of interaction between Ni^{2+} ion and human or bovine serum albumin [J]. *Biochem J*, 1994, **304**: 23 – 26.
- [22] LIU Bin, GUO Ying, WANG Jun, *et al.* Spectroscopic studies on the interaction and sonodynamic damage of neutral red (NR) to bovine serum albumin (BSA)[J]. *J Lum*, 2010, **130** (6): 1036 – 1043.
- [23] ZHANG Yaheng, DONG Lijun, LI Jiazhong, *et al.* Studies on the interaction of gallic acid with human serum albumin in membrane mimetic environments [J]. *Talanta*, 2008, **76** (2): 246 – 253.
- [24] KAMAT B P, SCETHARAMAPPA J. In vitro study on the interaction of mechanism of tricyclic compounds with bovine serum albumin [J]. *J Pharm Biom Anal*, 2004, **35** (3): 655 – 664.
- [25] GUO Ming, LÜ Weijun, LI Minghua, *et al.* Study on the binding interaction between carnitine optical isomer and bovine serum albumin [J]. *Europ J Med Chem*, 2008, **43** (10): 2140 – 2148.
- [26] SULKOWSKA A. Interaction of drugs with bovine and human serum albumin [J]. *J Mol Struct*, 2002, **614** (1/3): 227 – 232.
- [27] PETER T. Serum albumin [J]. *Adv Prot Chem*, 1985, **37**: 161 – 245.
- [28] KATO A, NAKAI S. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1980, **624**: 13 – 20.
- [29] LIU Xiaoming, POWERS J R, SWANSON B G, *et al.* Modification of whey protein concentrate hydrostatic pressure [J]. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 2005, **6**: 310 – 317.
- [30] GONZÁLEZ-CHÁVEZ S A, ARÉVALO-GALLEGOS S, RASCÓN-CRUZ Q. Lactoferrin: structure, function and applications [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2009, **33** (4): 301 – 308.
- [31] ALIZADEH-PASDAR N, LI-CHAN E C Y. Application of PRODAN fluorescence probe to measure surface hydrophobicity of proteins interacting with κ -carrageenan [J]. *Food Hydrocoll*, 2001, **15**: 285 – 294.