• 研究论文 •

光谱法与分子模拟技术研究杨梅素与牛血清白蛋白的相互作用

李悦^a 谷雨^a 何佳^a 何华^{*,a,b}
周祎^a Chuong, Pham-Huy^c

(^a中国药科大学分析化学教研室 南京 210009)

(^b中国药科大学天然药物国家重点实验室 南京 210009)

(^c Faculty of Pharmacy, University of Paris V, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France)

摘要 利用紫外光谱、荧光光谱、红边激发荧光位移(REES)法、圆二色谱(CD)结合分子模拟技术共同研究了模拟生理条件下杨梅素与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用, 阐述了相互作用机制。分子模拟结果表明, 杨梅素与蛋白在亚结构域II A 的疏水腔内结合, 主要作用力为疏水作用力和氢键。依据荧光猝灭法判断猝灭机制为静态猝灭, 并得到不同温度下药物与蛋白相互作用的结合常数(K_a)及结合位点数(n), 根据热力学参数判断出作用力类型, 并且计算出杨梅素与蛋白的结合距离, 与分子模拟得到的判定结果基本一致。通过紫外光谱、同步荧光光谱以及 REES 法获得的信息讨论了相互作用时 BSA 中色氨酸(Trp)微环境的变化; 并利用 CD 谱的测定结果定量计算了 BSA 二级结构中 α -螺旋含量的变化。
关键词 分子模拟; 光谱法; 杨梅素; 牛血清白蛋白; 相互作用

Study on Interaction between Myricetin and Bovine Serum Albumin by Spectroscopy and Molecular Modeling

Li, Yue^a Gu, Yu^a He, Jia^a He, Hua^{*,a,b}
Zhou, Yi^a Chuong Pham-Huy^c

(^a Division of Analytical Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009)

(^b State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009)

(^c Faculty of Pharmacy, University of Paris V, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France)

Abstract The interaction between myricetin and bovine serum albumin (BSA) was investigated by UV absorption spectroscopy, fluorescence spectroscopy, red edge excitation shift (REES) method, circular dichroism (CD) and molecular modeling together to explore the mechanism of interaction under simulated physiological condition. The result of molecular modeling indicated that myricetin can bind with BSA in the hydrophobic pocket of sub-domain IIA with hydrophobic force and hydrogen bonding as the main acting force. The fluorescence quenching of BSA by myricetin was employed to observe the quenching mechanism that proved to be a static one. Binding constant (K_a) and binding sites (n) at different temperatures were all calculated, respectively. The results of corresponding thermodynamic parameters as well as binding distance between BSA and myricetin were obtained and proved to agree with that from the molecular modeling. The transformation of micro-environment of Trp in BSA was observed by the spectra of UV absorption, synchronous fluorescence and REES method, while the spectrum of CD was employed to research the change of the secondary structure of BSA quantitatively through the assay of α -helix.

* E-mail: dochehua@163.com

Received September 21, 2011; accepted November 30, 2011.

Project was supported by the Major Scientific and Technological Specialized Project for "Significant Formulation of New Drugs" (No. 2009ZX09301-006) and the National Basic Science Personnel Training Fund (No. J0630858).

“重大新药创制”科技重大专项(No. 2009ZX09301-006)及国家基础科学人才培养基金(No. J0630858)资助项目。

Keywords molecular modeling; spectroscopy; myricetin; BSA; interaction

杨梅素(3,3',4',5,5',7-六羟基黄酮, myricetin, MYR), 是天然黄酮醇类活性成分, 主要以游离形式存在于壳斗科、豆科、报春花科、葡萄科、菊科等植物的根、茎、叶和果实, 结构式见图 1. 现代研究认为, 杨梅素具有显著的生物和药理活性, 如抗氧化、抗肿瘤、降低神经毒性、降低血糖、血脂、保护肝功能^[1,2]等, 尤其是清除自由基的能力比其他黄酮类活性成分都强^[3]. 因此, 杨梅素被广泛应用于医药、食品、保健和美容等行业, 具有一定的经济价值. 虽然国内外已有文献对黄酮类小分子与生物大分子的相互作用进行报道^[4-8], 但关于杨梅素与血清白蛋白相互作用方面的研究则较为少见, 考虑到杨梅素的多种药理活性和医疗及经济价值, 研究其与蛋白质的相互作用具有一定意义.

图 1 杨梅素的分子结构式

Figure 1 Chemical structure of myricetin

1 实验部分

我们以前也报道了一些药物载体与 BSA 相互作用的研究^[9-12], 重点关注意载体的作用机理及治疗靶点的选择. 本工作在以往工作的基础上采用多种光谱分析技术结合分子模拟研究杨梅素与 BSA 的相互作用, 对进一步了解药物在生物体内的分布、代谢具有非常重要的意义. 血清白蛋白是血浆中最为丰富的蛋白质, 能与多种内源及外源化合物结合, 并能键合生物体内存在的多种微量元素. 药物进入人体后要通过血浆蛋白的贮存与运输达到受体部位, 进而发生药理作用. 因此进行药物小分子与血浆白蛋白之间相互作用的研究不仅有助于从分子水平上阐明药物的作用机理, 而且对抗肿瘤药物的体外筛选具有一定意义, 同时也为药物设计提供了理论指导和有价值的信息.

1.1 仪器与试剂

RF-5301 PC 荧光分光光度计(日本岛津公司); UV 2100 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司); Jasco J-810 圆二色谱仪(日本岛津公司).

三羟甲基氨基甲烷(Tris, 上海精细化工试剂有限公司); 离子液体 1-丁基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐(购于兰州

物理化学研究所); 牛血清白蛋白(BSA, Amresco 公司)用 pH7.4 的 Tris-HCl 缓冲液(含 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl)配成 $5.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 备用, 4°C 保存; 杨梅素(南京泽朗生物科技有限公司)配成 $4.6 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液备用; 实验所用试剂均为分析纯, 水为二次蒸馏水.

1.2 实验方法

1.2.1 分子模拟技术

BSA 的高级结构尚未被收录在蛋白质数据库(PDB)中, 但由于它与人血清白蛋白(HSA)的高序列同源性达到 76.52%, 三级结构也较为相似, 因此以 HSA 与血红素(heme)复合物(1n5u)为模板, 使用同源建模的方法来获得 BSA 的晶体结构. 在 Accelrys Discoverys Studios2.1 软件平台下建立杨梅素的模型, 选用 CHARMM 力场将建模好的牛血清白蛋白和杨梅素的结构模型分别进行最陡下降法(steepest descent method)和共轭梯度法(conjugate gradient method)各 2000 步优化. 用 Gold 3.0.1 程序对杨梅素与 BSA 分子对接, 主要采用遗传算法来探索配体全范围的柔性构象和受体的局部柔性, 充分搜索构象空间, 找到相互作用的最优模式. 所有的计算都在 Accelrys Discoverys Studios2.1 软件平台下完成.

1.2.2 紫外吸收光谱

向 $5.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA 中加入不同量的杨梅素, 以 Tris-HCl 缓冲液为参比, 测定其 200~400 nm 的紫外可见吸收光谱.

1.2.3 荧光光谱

取 3 mL $5.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BSA 溶液于石英吸收池中, 用微量注射器逐次加入浓度为 $4.6 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的杨梅素溶液进行滴定, 加样体积由实验点浓度计算确定(滴定剂累加体积小于 100 μL). 分别在 25, 37 和 45°C 下, 以 280 nm 为激发波长, 绘制 290~500 nm 波长范围的荧光光谱; 同步荧光光谱实验中同时扫描激发和发射单色器, 固定激发和发射波长差分别为 60 和 15 nm, 其他条件参数同荧光光谱测量.

1.2.4 REES 法

室温下测定上述 BSA 溶液在不同激发波长(激发波长从 280 nm 逐渐增加至 300 nm)下的荧光光谱. 然后向 BSA 溶液中分别加入不同浓度的杨梅素溶液, 在同样条件下测定荧光光谱.

1.2.5 CD 谱

移取一定量的 BSA 溶液和杨梅素溶液于 10 mL 比色管中, 以 Tris-HCl 缓冲液定容. 使用 1 mm 石英池, 于

室温下测定 200~280 nm 范围内 BSA 与杨梅素发生相互作用前后的 CD 谱。

2 结果与讨论

2.1 分子模拟研究结合位点和作用力类型

利用分子对接方法,可以预测杨梅素与 BSA 的结合位点以及作用力类型。图 2 是杨梅素与 BSA 的分子对接图,仅显示了杨梅素分子周围 1.0 nm 范围内的部分氨基酸残基。从图 2a 中可以看到杨梅素分子的 B 环插入 HIA 亚结构域的疏水腔中,说明两者间的主要作用力为疏水作用力;从图中还可以看出,杨梅素与 BSA 之间存在分子间氢键,杨梅素 A 环 7-O(O-H)与 Tyr155 形成氢键;B 环 3'-O(O-H)与 Ala192 形成氢键;C 环 3-O(O-H)与 Asp449 形成氢键,氢键的存在也增加了体系的疏水性。而图 2b 则显示杨梅素分子位于 Trp212 残基附近,软件计算杨梅素 B 环 3'-OH 与 Trp212 的结合距离为 1.30 nm。总之,分子对接方法生动形象地给出了药物与蛋白的结合情况,有助于从理论上确定结合位点和作用力类型,并为能否进行下一步实验提供了准确可靠的信息。

图 2 杨梅素与 BSA 相互作用的分子对接图
Figure 2 Molecular docking of myricetin to BSA

2.2 杨梅素与 BSA 相互作用的荧光光谱

2.2.1 杨梅素对 BSA 的荧光猝灭光谱

BSA 分子中由于含有 3 种具有苯基结构的氨基酸残基——色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸,因此能够发射一定强度的内源荧光,其中又以色氨酸残基的内源荧光为主。图 3 显示的是在 BSA 中加入不同量的杨梅素后进行扫描得到的荧光图谱(空白实验证明等量背景物质对体系荧光无影响)以及杨梅素自身的荧光光谱图。实验结果表明,BSA 的荧光强度随着杨梅素浓度的增加而发生猝灭,最大发射波长出现了明显蓝移(349→348→345→344 nm);杨梅素能够发射较低强度的荧光,最大发射波长位于 535 nm,对于 BSA 位于 342 nm 的发射波长不产生影响。这说明杨梅素与 BSA 的确发生了相互作用,且氨基酸微环境的极性也随之降低。

图 3 杨梅素对 BSA 的荧光猝灭图谱

Figure 3 Fluorescence spectra of BSA in the presence of varying concentrations of myricetin

$c(\text{BSA})=5.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\lambda_{\text{ex}}=280 \text{ nm}$, $\text{pH}=7.40$, $T=298 \text{ K}$, the concentration of myricetin (1→7): 0, 1.5, 3.0, 4.5, 6.0, 8.5 and $11.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. (8) fluorescence spectrum of myricetin, $c(\text{myricetin})=5\times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

2.2.2 荧光猝灭机理

荧光猝灭通常可分为动态猝灭和静态猝灭。对于动态猝灭,随着温度的升高,将增加离子有效碰撞的数目,加剧电子转移,使荧光物质的猝灭常数随温度的升高而增大;对于静态猝灭,温度升高将降低复合物的稳定性,使猝灭常数减小。

为了进一步确定荧光猝灭机制,还要测定不同温度下 BSA 猝灭的荧光光谱,根据动态猝灭方程 Stern-Volmer 方程:

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

式中 F_0 和 F 分别为加入猝灭物质前后所测得的荧光强度值, τ_0 为没有猝灭物质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 ; K_q 为双分子碰撞猝

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. $[Q]$ 为猝灭物质浓度, K_{SV} 为 Stern-Volmer 猝灭常数, 它描述了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且有 $K_{SV} = K_q \tau_0^{[13]}$.

本工作分别研究了 25, 37 和 45 °C 下的 BSA 与杨梅素相互作用的荧光光谱, 利用不同温度下的实验结果, 以 BSA 的 F_0/F 对相应的杨梅素浓度作图, 结果见图 4.

图 4 不同温度下杨梅素-BSA 荧光猝灭的 Stern-Volmer 曲线
Figure 4 Stern-Volmer plot for the quenching of BSA by myricetin at different temperatures

不同温度下的 Stern-Volmer 曲线均呈良好线性关系, 且随温度的升高, 曲线斜率降低, 计算所得的 K_q 值见表 1, 数量级均为 10^{13} , 远远大于各类猝灭剂对生物大分子的最大动态猝灭常数 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$, 且猝灭速率常数随温度的升高而降低, 这几条判别标准都说明杨梅素与 BSA 发生相互作用, 形成了复合物是引起静态猝灭的原因.

表 1 不同温度下杨梅素-BSA 体系的猝灭常数(pH=7.40)

Table 1 Stern-Volmer quenching constant of the systems of myricetin-BSA at different temperatures (pH=7.40)

T/K	$K_q \times 10^{13}/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	r
298	2.135	0.9981
310	1.355	0.9991
318	1.002	0.9988

2.2.3 结合常数 K_a 与结合位点数 n

根据静态猝灭公式^[14,15]

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

处理实验数据, 以 $\lg[(F_0 - F)/F]$ 对 $\lg[Q]$ 作图可得到一条直线, 结果如图 5 所示.

图 5 不同温度下杨梅素-BSA 体系的 $\lg[(F_0 - F)/F]$ 对 $\lg[Q]$ 图
Figure 5 The plots of $\lg[(F_0 - F)/F]$ vs. $\lg[Q]$ at different temperatures

由直线斜率和截距所求出的杨梅素与 BSA 的结合常数 K_a 及结合位点数 n 见表 2. 由表中实验数据可知, 杨梅素与 BSA 的结合常数较大, 可达 10^5 , 并能形成一个结合位点, 说明两者具有较强的相互作用. 从表中还可以看出随着温度的上升, 结合常数亦有不断上升的趋势, 表明药物与蛋白的结合能力受温度影响较大.

表 2 杨梅素与 BSA 的结合常数 K_a 及结合位点数 n (pH=7.40)

Table 2 The binding constant, K_a , and the number of binding sites, n (pH=7.40)

T/K	$K_a/(10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$	n	r
298	3.568	1.1615	0.9987
310	7.344	1.1456	0.9997
318	13.662	1.1132	0.9994

2.2.4 作用力类型

药物等有机小分子与蛋白质等生物大分子之间的结合力包括氢键作用力、范德华力、静电引力、疏水作用力等. 不同药物与蛋白质结合力的类型也不相同. 从热力学角度看, 在一定的温度和压力下, 药物与蛋白质的结合反应能否自发进行取决于体系的吉布斯自由能变 ΔG , $\Delta G < 0$ 有利于反应的自发进行, 同时根据反应前后热力学焓变 ΔH 和熵变 ΔS 的相对大小, 可以判断药物与蛋白质之间的主要作用力类型: $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$, 为疏水作用力; $\Delta H < 0$, $\Delta S > 0$, 为静电作用力; $\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$, 为范德华力^[16].

当温度变化不太大时, 反应的焓变 ΔH 可看作一个常数, 由式

$$\ln K_a = -\Delta H/RT + \Delta S/R \quad (3)$$

可知, 以 $\ln K_a$ 对 $1/T$ 作图, 由斜率和截距分别可以计算出焓变 ΔH 和熵变 ΔS , 其中 K_a 为对应温度下的结合常数, R 为气体常数. 再由式

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (4)$$

计算出不同温度下反应的自由能变 ΔG . 所得结果均列于表 3 中.

表 3 杨梅素与 BSA 相互作用的热力学参数(pH=7.40)

Table 3 Thermodynamic parameters for the association of myricetin with BSA (pH=7.40)

T/K	$\Delta H/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$\Delta G/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$\Delta S/(\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1})$
298	52.268	-31.610	281.470
310		-34.987	
318		-37.239	

由表 3 中数据可见: $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$, 说明药物与 BSA 之间的相互作用力以疏水作用为主, 且 $\Delta G < 0$, 表明杨梅素与 BSA 的结合反应是由焓、熵驱动的自发过程, 与分子模拟的预测结果一致. 应当指出, 血清白蛋白结构很复杂, 它和药物之间往往同时存在几种作用力, 分子模拟的研究结果显示氢键作用也存在于药物与蛋白的结合过程中, 是对热力学实验结果的有效补充.

2.2.5 结合距离

根据偶极-偶极非辐射能量转移原理, 当两种化合物分子同时满足以下 3 个条件时, 能够发生非辐射能量转移: (1) 供能体(BSA)发射荧光; (2) 供能体发射的荧光光谱与受能体(杨梅素)的吸收光谱要有足够的重叠; (3) 供能体与受能体的距离要足够接近, 一般不超过 7 nm. 药物与蛋白之间发生非辐射能量转移, 可以导致蛋白荧光猝灭, 由 Föster 能量转移理论, 就可以求出药物在蛋白上的结合位点与蛋白质分子中产生荧光的基团之间的距离^[17].

据此理论可知能量的转移效率 E 与供能体-受能体间距离 r 及临界能量距离 R_0 有如下关系:

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) = 1 - F / F_0 \quad (5)$$

其中 R_0 为能量转移效率 $E=50\%$ 的临界距离.

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

K^2 为偶极空间取向因子, N 为介质折射常数, ϕ 为 BSA 的荧光量子产率, J 为给体荧光发射光谱与受体吸收光谱的重叠积分, 即

$$J = \sum F(\lambda) \epsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda / \sum F(\lambda) \Delta\lambda \quad (7)$$

式中 $F(\lambda)$ 是荧光给体在波长 λ 处的荧光强度, $\epsilon(\lambda)$ 是受体在波长 λ 处的摩尔吸光系数.

图 6 为杨梅素与 BSA 的重叠光谱图, 取向因子取给体与受体各向随机分布的平均值 $K^2=2/3$, 折射常数取水和有机物的平均值 $n=1.336$, 蛋白质的荧光量子产率通常取色氨酸的量子产率 $\phi=0.15$, 将以上数值代入 Eq. 6 中, 计算出临界能量距离 R_0 , 再由 Eq. 5 求出蛋白中的色氨酸残基与已结合的杨梅素分子间的距离 r , 计算结果见表 4.

图 6 杨梅素的吸收光谱与 BSA 的荧光光谱重叠图

Figure 6 Overlapped spectra of BSA's fluorescence spectrum and myricetin's absorption spectrum

$c(\text{myricetin})=c(\text{BSA})=5.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $T=298 \text{ K}$, $\text{pH}=7.40$

表 4 依据 Föster 非辐射能量转移理论计算杨梅素与 BSA 的结合距离

Table 4 Distance from myricetin to tryptophan residue measured by Föster's non-radiation energy transfer with myricetin bound to BSA

Protein	$J/(\text{cm}^3\cdot\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$	E	R_0/nm	r/nm
BSA	6.15×10^{-16}	0.3494	1.60	1.78

由表可知, 结合距离 $r=1.78 \text{ nm} < 7 \text{ nm}$, 与分子模拟计算得到的 $r=1.30 \text{ nm}$ 较为接近, 这说明杨梅素分子与 BSA 中的 Trp212 结合, 通过非辐射能量转移与静态猝灭的共同作用对 BSA 的内源荧光进行猝灭.

2.3 杨梅素对 BSA 二级结构的影响

通过紫外光谱、同步荧光光谱和 REES 法定性研究杨梅素的加入对 BSA 的色氨酸微环境产生的影响, 判断药物是否会使 BSA 的构象发生改变. 在此基础上, 利用圆二色谱法定量计算 BSA 中 α -螺旋结构的含量, 对比相互作用前后 α -螺旋的含量变化, 进一步研究药物结合蛋白后对蛋白质二级结构造成的影响.

2.3.1 紫外吸收光谱法

图 3 为室温环境下, pH 7.40, 在 BSA 中依次加入不

同量的杨梅素的紫外吸收图谱. 结果显示, 随着杨梅素浓度的增加, 出现明显增色效应, 说明 BSA 与杨梅素之间发生了相互作用. 但由于最大吸收波长基本上没有改变, 所以尚且不能判断杨梅素的加入是否改变了蛋白质的微环境, 需要借助荧光光谱和 REES 法等手段进一步研究.

图 7 杨梅素与 BSA 相互作用的紫外光谱

Figure 7 UV-vis absorption spectra of BSA in the absence and presence of myricetin

pH=7.4, $T=298\text{ K}$, $c(\text{BSA})=5.0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $c(\text{myricetin})$ (1 $\rightarrow$ 7): 0, 1.5, 3.5, 6.0, 8.5, 10.0 and $12.0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

2.3.2 同步荧光光谱法

同步荧光光谱因具有简化光谱、窄化谱带和减小光谱重叠等优点而常用来探讨蛋白质构象的变化. $\Delta\lambda=15$ 和 60 nm 时所得同步荧光光谱分别表示蛋白质酪氨酸残基和色氨酸残基的光谱特征, 这两种氨基酸的最大发射波长与其所处的微环境的极性有关, 若其所处环境的疏水性逐渐增加, 则最大发射波长会发生蓝移, 反之, 则发生红移^[18]. 因此, 根据最大发射波长的改变可以判断蛋白质构象的变化.

图 8a 和图 8b 分别为 $\Delta\lambda=15\text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda=60\text{ nm}$ 条件下杨梅素与 BSA 相互作用的同步荧光光谱图. 由图可以看出, 随着杨梅素浓度的增加, $\Delta\lambda=15\text{ nm}$ 时, 同步荧光光谱的最大发射波长基本没有发生位移, 而当 $\Delta\lambda=60\text{ nm}$ 时, 同步荧光光谱的最大发射波长由 352 nm 蓝移至 350 nm , 表明杨梅素的加入使 BSA 色氨酸残基所处环境的疏水性略有增加.

2.3.3 红边激发荧光位移法

从同步荧光实验的结果中发现, $\Delta\lambda=60\text{ nm}$ 时, 加入不同浓度的杨梅素, BSA 的最大发射波长略有蓝移, 现象不是很明显. 因此采用红边激发荧光位移(REES)法进一步考察杨梅素对 BSA 中色氨酸残基微环境流动性的影响. REES 法是指由激发波长红移而引起的发射波长也随之向高波数段位移的现象. 在蛋白质的研究

图 8 BSA-杨梅素体系的同步荧光光谱图

Figure 8 Synchronous fluorescence spectra of BSA in the absence and presence of myricetin

(a) $\Delta\lambda=15\text{ nm}$; (b) $\Delta\lambda=60\text{ nm}$. pH=7.40, $T=298\text{ K}$, $c(\text{BSA})=5.0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $c(\text{myricetin})$ (1 $\rightarrow$ 7): 0, 1.5, 3.0, 4.5, 6.0, 8.5 and $11.5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

中, REES 法是获得色氨酸微环境及结构组成方面信息的重要手段. 如果色氨酸残基周围的微环境是流动的, 那么最大发射波长不会随激发波长的红移而变化; 反之, 如果色氨酸处于运动受限的环境中, 红移现象就会发生^[19].

图 9 为 REES 法测定数据后经双波长法处理后的结果, 在实验中, 280 nm 激发波长下 BSA 的最大发射波长位于 349 nm , 所以选取 329 和 369 nm 这两个等距点, 考察随着激发波长的不断增加, 加入不同浓度的杨梅素后, BSA 荧光光谱的 REES 变化. 由图可见, 随着激发波长的不断红移, BSA 在 329 和 369 nm 处的荧光强度 F_L 和 F_R 的比值不断降低, 说明 REES 现象发生, 色氨酸处于运动受限的环境中. 同时, 从图中还可以发现, 随着体系中杨梅素浓度的增加, F_L/F_R 值降低的程度基本保持不变, 也即红移程度并未明显增加, 这说明杨梅素浓度的增加并未显著改变 BSA 中色氨酸残基微环境的流动.

2.3.4 圆二色谱法

为进一步通过定量的手段验证杨梅素与 BSA 的相

图9 杨梅素对BSA的红边激发荧光位移的影响

Figure 9 Effect of myricetin on the red edge excitation shift of BSA

1: $c(\text{myricetin})=0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 2: $c(\text{myricetin})=125 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 3: $c(\text{myricetin})=300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $c(\text{BSA})=5.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

互作用, 利用CD谱法测定了加入杨梅素前后, BSA中 α -螺旋结构含量的变化, 计算公式为:

$$\alpha = [(-[\theta]_{208} - 4000)/(33000 - 4000)] \times 100\% \quad (8)$$

图10为杨梅素-BSA体系的圆二色谱图, 由图可知, BSA在212, 223 nm两处有负cotton效应, 是BSA分子中典型的 α -螺旋结构^[20]. 加入杨梅素后, 使BSA在212, 223 nm两处的负cotton效应都有所减弱, 但CD谱的形状没有明显改变, 峰位也没有明显移动. 根据Eq. 8计算得到BSA的 α -螺旋含量从11.91%降至3.01%, 说明杨梅素与BSA结合后对BSA的二级结构产生一定影响. 原因可能是杨梅素通过疏水作用力及氢键与组成 α -螺旋的氨基酸残基相互作用, 破坏了 α -螺旋的结构, 从而导致BSA中 α -螺旋含量降低.

图10 BSA (a)与杨梅素-BSA (b)体系的圆二色谱图

Figure 10 CD spectra of BSA-myricetin system

(a) $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BSA; (b) $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BSA + $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ myricetin, $T=298 \text{ K}$, $\text{pH}=7.40$

3 结论

利用荧光光谱法、REES法、圆二色谱法结合分子模拟技术研究了模拟生理条件下黄酮类活性成分杨梅素与BSA的相互作用. 分子模拟研究揭示了杨梅素与BSA通过疏水作用力和氢键在Trp212位点结合. 根据荧光光谱法判定猝灭机制为静态猝灭, 并计算了结合常数和结合位点数, 310 K时结合常数为 7.34×10^5 , 表明杨梅素与BSA之间的自发结合能力较强, 但会受到温度的影响而发生变化; 作用力类型与结合距离的计算都与分子模拟的预测结果一致. 此外, 通过紫外吸收光谱、同步荧光光谱和REES法的定性研究, 发现杨梅素与BSA能够发生相互作用, 两者结合的过程中, BSA的色氨酸残基处于运动受限的微环境中, 而增加杨梅素的浓度并不能改变色氨酸微环境的流动性, 所以不会显著影响BSA的构象; 同时, 圆二色谱的定量计算结果表明, 杨梅素与BSA的相互作用引起了 α -螺旋含量的降低, 说明杨梅素与BSA发生相互作用会对BSA的二级结构产生一定影响.

References

- Prochazkova, D.; Bousova, I.; Wilhelmova, N. *Fitoterapia* **2011**, 82, 513.
- Li, D. J.; Cao, X. X.; Ji, B. M. *J. Lumin.* **2010**, 130, 1893.
- Huang, J. H.; Huang, C. C.; Fang, J. Y.; Yang, C.; Chan, C. M.; Wu, N. L.; Kang, S. W.; Hung, C. F. *Toxicol. in Vitro* **2010**, 24, 21.
- Yang, X. Z.; Wu, D. C.; Du, Z. L. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 3431.
- Lu, Y.; Wang, Y. L.; Gao, S. H.; Wang, G. K.; Yan, C. L.; Chen, D. J. *J. Lumin.* **2009**, 129, 1048.
- Zhang, M.; Lv, Q. L.; Yue, N. N.; Wang, H. Y. *Spectrochim. Acta A* **2009**, 72, 572.
- Yang, R.; Zeng, H.-J.; Yu, L.-L.; Chen, X.-L.; Qu, L.-B.; Li, P. *Acta Chim. Sinica* **2010**, 68, 1995 (in Chinese). (杨冉, 曾华金, 于岚岚, 陈晓岚, 屈凌波, 李萍, 化学学报, **2010**, 68, 1995.)
- Shi, X.-L.; Li, X.-W.; Gui, M.-Y.; Zhou, H.-Y.; Yang, R.-J.; Zhang, H.-Q.; Jin, Y.-R. *J. Lumin.* **2010**, 130, 637.
- Zha, J.; He, H.; Liu, T.-B.; Li, S.-S.; Jiao, Q.-C. *Spectrosc. Spectral Anal.* **2011**, 31, 149 (in Chinese). (查隽, 何华, 刘铁兵, 李杉杉, 焦德才, 光谱学与光谱分析, **2011**, 31, 149.)
- Zhang, H.-J.; He, H.; Li, S.-S.; Lu, J.-R.; Chuong, P.-H. *Acta Chim. Sinica* **2010**, 68, 1741 (in Chinese). (张怀敬, 何华, 李杉杉, 芦金荣, Chuong, Pham-Huy, 化学学报, **2010**, 68, 1741.)
- Li, S.-S.; He, H.; Chen, Z.; Zha, J.; Chuong, P.-H. *Spectrosc. Spectral Anal.* **2010**, 30, 2689 (in Chinese).

- (李杉杉, 何华, 陈哲, 查隼, Chuong, Pham-Huy, 光谱学与光谱分析, **2010**, 30, 2689.)
- 12 He, H.; Li, S.-S.; Lu, J.-R.; Gu, Y.; Chuong, P.-H. *Spectrosc. Spectral Anal.* **2009**, 29, 2782 (in Chinese).
(何华, 李杉杉, 芦金荣, 顾艳, Chuong, Pham-Huy, 光谱学与光谱分析, **2009**, 29, 2782.)
- 13 Ware, W. R. *J. Phys. Chem.* **1962**, 66, 455.
- 14 Lakowicz, J. R.; Weber, G. *Biochemistry* **1973**, 12, 4161.
- 15 Yamamoto, T.; Moriwaki, Y.; Suda, M.; Nasako, Y.; Taka-
hashi, S.; Hiroishi, K.; Nakano, T.; Hada, T.; Higashino, K. *Biochem. Pharmacol.* **1993**, 46, 2277.
- 16 Krenitsky, T. A.; Hall, W. W.; De Miranda, P.; Beauchamp, L. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1984**, 81, 3209.
- 17 Ross, P. D.; Subramanian, S. *Biochemistry* **1981**, 20, 3096.
- 18 Lloyd, J. B. F. *Nat. Phys. Sci.* **1971**, 231, 64.
- 19 Miller, J. N. *Proc. Anal. Div. Chem. Soc.* **1979**, 16, 203.
- 20 Demchenko, A. P. *Trends Biochem. Sci.* **1988**, 13, 374.

(A1109211 Zhao, C.)