

# 荧光光谱法研究灯盏花素与牛血清白蛋白相互作用

高平章, 吴洪, 郭婧, 许亚妹(泉州师范学院化学与生命科学学院, 福建 泉州 362000)

**摘要:**目的 采用荧光光谱法研究灯盏花素与牛血清白蛋白(BSA)在生理条件下(pH 7.4)的相互作用机制。方法 固定BSA浓度,依次加入不同浓度的灯盏花素溶液,在激发波长为280 nm下,290~500 nm的波长范围内进行荧光猝灭光谱、同步荧光光谱扫描。结果 灯盏花素对BSA的荧光猝灭类型是静态猝灭;在温度288 K和310 K时,二者的结合常数 $K_A$ 分别为 $8.295 \times 10^5$ 和 $3.302 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ;二者的结合位点数 $n$ 分别为1.239 3和1.177 0。由热力学参数焓变( $\Delta H = -31.080 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ )小于零和熵变( $\Delta S = 5.392 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ )大于零,确定灯盏花素与BSA之间的作用力类型为静电作用力;生成自由能变( $\Delta G$ )为负值,表明灯盏花素与BSA的作用过程是一个自发过程。此外,应用同步荧光光谱考察了灯盏花素对BSA构象的影响。结论 经过荧光光谱分析,可以确定灯盏花素与白蛋白的作用机制,为其开发成治疗心血管疾病新药提供理论依据。

**关键词:** 灯盏花素;牛血清白蛋白;荧光光谱法;相互作用

中图分类号: R962.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2012)02-0106-04

## Study on the Interaction between Breviscapinum and Bovine Serum Albumin by Fluorescence Spectrometry

GAO Pingzhang, WU Hong, GUO Jing, XU Yamei(College of Chemistry and Life Science, Quanzhou Normal University, Quanzhou 362000, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To identify the interaction mechanism between breviscapinum and bovine serum albumin(BSA) under the physiological conditions (pH 7.4) by fluorescence spectrometry. **METHODS** Fixing the concentration of BSA, different concentrations of breviscapinum were added. At excitation wavelength 280 nm, the interaction between breviscapinum and BSA was determined with quenching and synchronous spectrum from 290 nm to 500 nm. **RESULTS** The fluorescence quenching mechanism between breviscapinum and BSA was static quenching. The binding constants ( $K_A$ ) under 288 K and 310 K between breviscapinum and BSA were  $8.295 \times 10^5$  and  $3.302 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ , respectively. The number of binding sites under 288 K and 310 K between breviscapinum and BSA were 1.239 3 and 1.177 0, respectively. According to the thermodynamic parameters, enthalpy change ( $\Delta H$ ) and entropy change ( $\Delta S$ ), which were calculated to be  $-31.080 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  and  $5.392 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ , respectively, the interaction between breviscapinum and BSA was driven mainly by electrostatic interaction. The process of binding was spontaneous because that Gibbs free energy change was negative. Further more, synchronous spectrum was used to investigate the conformational changes of BSA. **CONCLUSION** In this paper, the interaction mechanism between breviscapinum and BSA was analyzed by fluorescence spectrometry. The results can be applied for the antioxidant new drugs development of breviscapinum.

**KEY WORDS:** breviscapinum; bovine serum albumin(BSA); fluorescence spectrometry; interaction

血清白蛋白是血浆中含量最丰富的重要蛋白,能够广泛结合多种内源性和外源性物质。药物小分子进入血液后,首先不同程度地与血清白蛋白结合,然后分布到作用部位解离成原药而发挥药效<sup>[1]</sup>。因此,研究药物小分子与白蛋白的相互作用,有利于充分认识药物的转运和代谢过程,对临床安全用药具有重要意义。

灯盏花素(breviscapinum)在治疗脑血栓、脑缺血、脑血管疾病后遗症及对抗血小板凝聚等方面有良好的疗效<sup>[2-3]</sup>。笔者运用荧光技术研究在模拟人体生理(pH 7.4)条件下灯盏花素小分子与蛋白质大分

子间的相互作用,确定了其荧光猝灭机理,测定了结合常数、热力学参数及灯盏花素对BSA构象的影响。研究结果一方面可以更好解释灯盏花素进入人体后与白蛋白的结合情况;另一方面也为筛选优良的自然药物提供理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 仪器与试剂

Cary Eclipse荧光分光光度计(美国瓦里安有限公司);BS224S电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);pHS-3C型酸度计(杭州雷磁仪器分析厂);HH-2数显恒温水浴锅(常州国华电器

基金项目:福建省教育厅科技项目(JK2009044);泉州师范学院重点学科建设项目资助(MDSCh-2009A)

作者简介:高平章,男,博士生,讲师 Tel: 15905053518 E-mail: gaopingzhang@126.com

有限公司)。

牛血清白蛋白(BSA, 武汉贝特生物有限公司, 批号: 2310C053); 灯盏花素(陕西慧科公司, 纯度 >98%, 批号: ZL20101110); Tris-base(美国Amresco公司分装); 其它试剂为国产分析纯。实验用水为二次蒸馏水。

## 1.2 方法

在 1 cm 比色皿中, 依次加入 Tris-HCl 缓冲溶液, 2.0 mL 的 BSA 溶液, 并加入同浓度的不同体积(10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100  $\mu$ L) 的灯盏花素溶液, 混合均匀并分别置于 288 K 和 310 K 的环境下, 在激发波长为 280 nm 下, 用荧光分光光度计在 290~500 nm 左右的波长范围内进行荧光光谱扫描。同时记录  $\Delta\lambda=15$  nm 和  $\Delta\lambda=60$  nm 的同步荧光光谱, 测定时荧光激发和发射狭缝均为 5 nm。

## 2 结果与讨论

### 2.1 灯盏花素对 BSA 的荧光猝灭光谱

在浓度固定的 BSA 溶液中, 分别加入不同浓度的灯盏花素溶液, 扫描其荧光光谱见图 1。在 280 nm 的激发波长下, BSA 的最大荧光发射波长为 345 nm。由于蛋白质中含有色氨酸及酪氨酸, 使其具有内源性荧光, 随着灯盏花素的浓度的增大(从 1 至 11), 345 nm 波长处的 BSA 最大荧光吸收峰也逐渐降低, 且最大发射波长发生红移。这说明灯盏花素与 BSA 之间发生了相互作用。

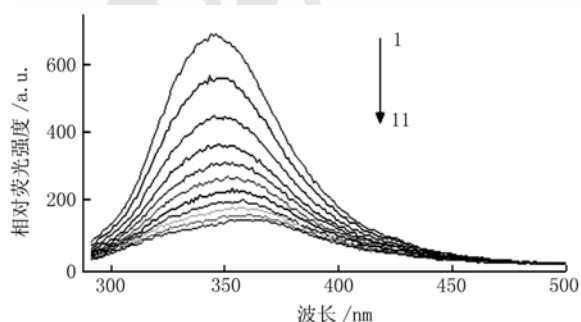


图 1 灯盏花素对 BSA 的荧光猝灭光谱(T=288 K)

$C_{BSA}=5.0\times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $C_{\text{Breviscapinum}}=(0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0)\times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$

Fig 1 Fluorescence quenching spectra of Breviscapinum and BSA at 288 K

$C_{BSA}=5.0\times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $C_{\text{Breviscapinum}}=(0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0)\times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$

### 2.2 灯盏花素对 BSA 内在荧光猝灭的机理

2.2.1 猝灭类型的确定 荧光猝灭过程的不同是由它们的猝灭机理不同造成的, 一般来说荧光猝

灭机理分为动态猝灭和静态猝灭<sup>[4]</sup>。静态猝灭是指猝灭剂分子与荧光物质分子之间形成了新的复合物, 一般来说所生成的新的复合物弱荧光或不发荧光; 而动态猝灭是猝灭剂分子与荧光分子的激发态分子之间的相互碰撞而导致的荧光猝灭, 它遵循 Stern-Volmer 方程<sup>[5]</sup>:  $F_0/F=1+K_q\tau_0[Q]=1+K_{sv}[Q]$ , 式中  $F_0$  和  $F$  分别为未加入猝灭剂灯盏花素和加入猝灭剂灯盏花素的荧光强度;  $[Q]$  为猝灭剂灯盏花素的浓度;  $K_q$  为双分子猝灭过程速率常数;  $\tau_0$  为猝灭剂不存在时荧光分子平均寿命(生物大分子的荧光寿命约为 10 ns<sup>[6]</sup>);  $K_{sv}$  为动态猝灭常数。

假设上述灯盏花素对 BSA 的荧光猝灭属于动态猝灭方式, 则它与 BSA 的作用过程符合上述 Stern-Volmer 方程。以  $(F_0-F)/F$  对  $[Q]$  作图, 不同温度下的 Stern-Volmer 曲线见图 2, 并对实验数据线性拟合得到  $K_{sv}$  和  $K_q$ , 结果见表 1。

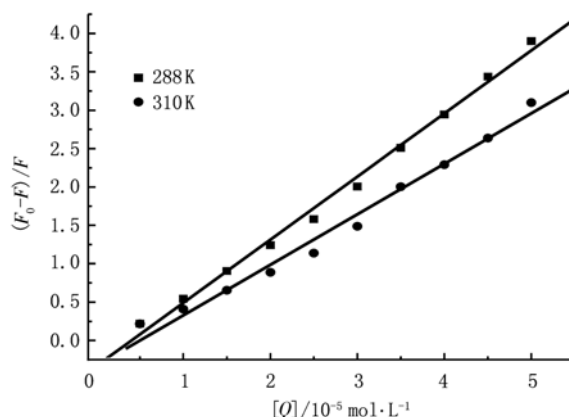


图 2 灯盏花素-BSA 的 Stern-Volmer 方程曲线

$C_{BSA}=5.0\times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$

Fig 2 The Stern-Volmer equations curve of breviscapinum and BSA

$C_{BSA}=5.0\times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$

表 1 不同温度下灯盏花素对 BSA 的猝灭常数

Tab 1 The Stern-Volmer quenching constant and bimolecular quenching constant at different temperatures

| $T/\text{K}$ | $K_q/\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ | $K_{sv}/\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$ | $r$      |
|--------------|------------------------------------------------------|---------------------------------------|----------|
| 288          | $8.225\times 10^{12}$                                | $8.225\times 10^4$                    | 0.996 93 |
| 310          | $6.474\times 10^{12}$                                | $6.474\times 10^4$                    | 0.992 16 |

一般认为, 动态猝灭常数随温度的升高而增大, 而静态猝灭常数随温度的升高而减小, 且各类猝灭剂对生物大分子的最大动态猝灭速率常数为  $2\times 10^{10}\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ <sup>[7]</sup>。由图 2 和表 1 可知  $K_q$  数量级在  $10^{12}$ , 可初步判断灯盏花素对 BSA 荧光猝灭过程是以静态猝灭为主的。王丽等<sup>[8]</sup>研究表明, 在 308 K 时灯盏花素对 BSA 的猝灭常数  $K_q$  和  $K_{sv}$  分别

是 $2.780 \times 10^{13} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 和 $2.780 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ，均大于本文在310 K 时的实验结果。其原因可能是本文的实验温度较之高2 K。但两文中 $K_q$  和 $K_{sv}$ 总的趋势都是随温度的升高而降低，故可由此判断灯盏花素对BSA的荧光猝灭作用不是由于碰撞引起的动态猝灭而是两者之间形成了复合物，其荧光猝灭类型应该是静态猝灭。

**2.2.2 灯盏花素与BSA的表现结合常数及结合位点数** 对于静态猝灭，荧光强度 $F$ ，猝灭剂灯盏花素的浓度 $[Q]$ 与结合常数 $K_A$ 之间的关系式可用Lineweaver-Burk 双倒数方程进行描述<sup>[9]</sup>： $\lg[(F_0-F)/F]=\lg K_A+n\lg[Q]$ 。设灯盏花素与BSA可形成 $n$ 个结合位点的复合物，可得出求算 $K_A$ 和 $n$ 的公式，以此公式来做出两个不同温度下的 $\lg[(F_0-F)/F]-\lg[Q]$ 的双对数拟合曲线，结果见图3和表2。

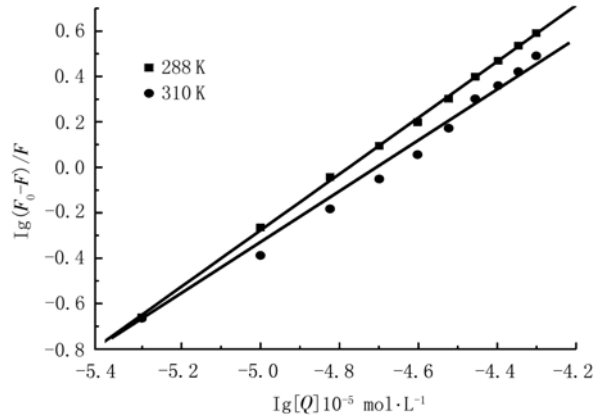


图3 灯盏花素-BSA 的 Lineweaver-Burk 双倒数方程曲线  
 $C_{\text{BSA}}=5.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig 3 The Lineweaver-Burk equations curve of Brevi-scapi-num and BSA  
 $C_{\text{BSA}}=5.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

求得在288 K和310 K下，灯盏花素和BSA结合常数 $K_A$ 和结合位点数 $n$ 如下表2：

表2 不同温度下灯盏花素与 BSA 的表现结合常数  $K_A$  及结合位点数  $n$

Tab 2 The binding constants  $K_A$  and the binding numbers  $n$  of Brevi-scapi-num and BSA at different temperatures.

| $T/\text{K}$ | $K_A/\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ | $n$     | $r$      |
|--------------|--------------------------------------|---------|----------|
| 288          | $8.295 \times 10^5$                  | 1.239 3 | 0.999 66 |
| 310          | $3.302 \times 10^5$                  | 1.177 0 | 0.995 68 |

在接近人体生理条件( $\text{pH}=7.4$ )下，288 K和310 K时灯盏花素与 BSA 结合位点数 $n$ 分别是1.239 3和1.177 0，说明灯盏花素与BSA之间具有较强的结合作用，蛋白质能够用来运输和储存灯

盏花素。随着温度的升高，其结合常数也有所减小，生成新的复合物稳定性也随温度升高而下降，间接地说明了该猝灭过程为静态猝灭。

**2.2.3 灯盏花素与 BSA 的作用力类型的确定** 药物小分子与生物大分子之间的结合力包括氢键、范德华力、静电作用力、疏水作用力等。药物不同，与蛋白质作用力类型也不同。当温度变化不大时，反应的焓变 $\Delta H$ 可以看作一个常数，有公式： $\ln K_2/K_1=\Delta H(1/T_1-1/T_2)/R$ ； $\Delta G=\Delta H-T\Delta S=-RT\ln K$ 。根据两个温度下的热力学常数值可以计算出灯盏花素与 BSA 相互作用的热力学函数值，结果见表3。

表3 灯盏花素与 BSA 在不同温度下的猝灭常数及热力学参数

Tab 3 Stern-Volmer quenching constant and the thermodynamic parameters at different temperatures

| $T/\text{K}$ | $K/\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ | $\Delta H/\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ | $\Delta G/\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ | $\Delta S/\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ |
|--------------|------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| 288          | $8.295 \times 10^5$                | -31.08                                     | -32.633                                    | 5.392                                                         |
| 310          | $3.302 \times 10^5$                |                                            | -32.752                                    |                                                               |

根据反应前后热力学焓变 $\Delta H$ 和熵变 $\Delta S$ 的相对大小，可以判断药物与蛋白质之间的主要作用力的类型<sup>[10]</sup>。Ross 等总结出判断生物大分子与生物小分子的结合性质有一定的热力学规律，即若表现为疏水作用力，则 $\Delta H>0$ ， $\Delta S>0$ ；若表现为静电作用力，则 $\Delta H<0$ ， $\Delta S>0$ ；若表现为氢键和范德华力，则 $\Delta H<0$ ， $\Delta S<0$ 。由结果可知，该体系中灯盏花素与 BSA 之间的主要作用力是静电作用力。然而，在王丽等<sup>[8]</sup>研究中表明，灯盏花素与 BSA 的相互作用是典型的疏水作用，并推测出灯盏花素对 BSA 的荧光猝灭作用主要源于 212 位色氨酸残基。为了进一步确定两者的作用力类型，运用同步荧光法研究了灯盏花素对 BSA 构象的影响。

**2.2.4 灯盏花素对 BSA 构象的影响** 蛋白质的荧光主要来自色氨酸、酪氨酸残基。在 BSA 分子中，在氨基酸残基中数色氨酸与酪氨酸的荧光强度比较大<sup>[11-12]</sup>。因此，酪氨酸和色氨酸通常被用于同步光谱的研究。选择 $\Delta\lambda=15\text{nm}$ 和 $\Delta\lambda=60\text{nm}$ ，此时分别表现出 BSA 中酪氨酸残基和色氨酸残基的同步荧光。

本试验固定了 BSA 的浓度在 $C_{\text{BSA}}=5.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 下，逐步加入不同浓度的灯盏花素，可测定 BSA 中色氨酸残基的同步荧光光谱和酪氨酸残基的同步荧光光谱，结果见图4。

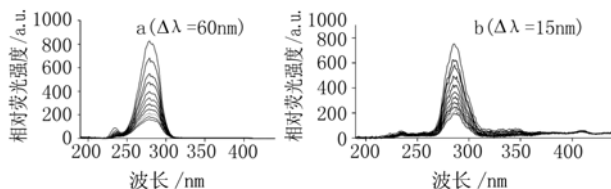


图4 灯盏花素与 BSA 的同步荧光谱图

$C_{\text{BSA}}=5.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $C_{\text{breviscapine}}=(0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0) \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig 4 Synchronous fluorescence spectra of breviscapine and BSA

$C_{\text{BSA}}=5.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $C_{\text{breviscapine}}=(0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0) \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

由结果可知,随着灯盏花素浓度的增加,BSA 中色氨酸残基和酪氨酸残基的同步荧光最大荧光发射波长都没有发生明显的变化,这表明色氨酸残基和酪氨酸残基所处微环境并没发生改变,其所处的微环境疏水性也未降低,肽链伸展程度也没有多大变化。这表明灯盏花素的加入并没有使 BSA 中的色氨酸残基和酪氨酸残基的构象发生变化。这也就进一步确定了灯盏花素与 BSA 之间的主要作用力是静电作用力,而不是疏水作用。

### 3 结论

本研究结果证明,在人体生理环境下(pH 7.40)灯盏花素对 BSA 的荧光猝灭为静态猝灭过程,由热力学参数焓变( $\Delta H$ )<0和熵变( $\Delta S$ )>0,可看出灯盏花素与 BSA 之间主要靠静电作用力相结合,其结合位点有待进一步研究。在 BSA 中逐步加入灯盏花素溶液后,BSA 的色氨酸残基和酪氨酸残基所触动的微环境没有发生改变,这表明其内疏水性并未改变,进而其肽链的伸展程度也没有改变,所以可推断出 BSA 色氨酸残基和酪氨酸残基的构象在一定程度上没有发生变化。

### REFERENCES

- [1] HUANG Y, CUI L J, CHEN C, et al. The comparative studies on the interaction of baicalein and baicalin with bovine serum albumin and influence of glucose [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2010, 26(6): 754-758.
- [2] YANG L M, GU J, LIN M J, et al. Advances in research on breviscapine [J]. Tianjin Pharm(天津药学), 2010, 22(1): 56-60.
- [3] LIU H, TANG X Q, WANG Y, et al. Characterization of Soutellarin Phospholipid Complex [J]. Her Med(医药导报), 2010, 29(11): 1395-1397.
- [4] XU J G, WANG Z B. Fluorescence Analytical Method(荧光分析法) [M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 2006: 5.
- [5] ZHANG X X, HE M, LIU A L, et al. Study on the interaction between curcumin and bovine serum albumin by fluorescence spectrometry [J]. Chin J Spectrosc Lab(光谱实验室), 2010, 27(2): 395-401.
- [6] LAKOWICA J R, WEBER G. Quenching of fluorescence by oxygen. A probe for structural fluctuations in macromolecules [J]. Biochemistry, 1973, 12(21): 4161-4170.
- [7] SHANG YH, LI H, SUN J J. Study on the interaction between luteolin and bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy [J]. J Anal Sci(分析科学学报), 2010, 26(4): 419-422.
- [8] WANG L, ZHANG A P, YANG J Y, et al. Study on the interaction between scutellarin and bovine serum albumin [J]. Chin Rem Clin(中国药物与临床), 2007, 7(9): 667-669.
- [9] CHEN G Z, HUANG X Z, XU J G, et al. Fluorescence analytical method(荧光分析法) [M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 1990: 112.
- [10] ROSS P D, SUBRAMANIAN S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability [J]. Biochemistry, 1981, 20(11): 3096-3102.
- [11] QI C, LI W G, ZHANG Y J. Studies on the interaction of porphyrin with antibody with fluorescent spectrum and UV-Vis differential spectra [J]. Chem J Chin Univ (高等学校化学学报), 2002, 23(8): 1453-1456.
- [12] KANDAGAL P B, ASHOKA S, SEETHARAMAPPA J, et al. Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: spectroscopic approach [J]. J Pharm Biomed Anal, 2006, 41(2): 393-399.