

牡荆苷与溶菌酶相互作用的荧光光谱学研究

颜娟¹, 郑茂东¹, 崔玉环², 赵虹琇¹, 赵秀花¹, 班旭霞¹

1. 河北北方学院附属第一医院 药学部, 河北 张家口 075000

2. 河北北方学院附属第一医院 老年科, 河北 张家口 075000

摘要: **目的** 在模拟人体生理条件下, 研究牡荆苷与溶菌酶的相互作用的光谱学特征。**方法** 利用同步荧光光谱法和荧光光谱法研究牡荆苷与溶菌酶的相互作用机制、作用力类型, 考察牡荆苷对溶菌酶构象的影响。**结果** 牡荆苷对溶菌酶的荧光猝灭机制为静态猝灭, 牡荆苷与溶菌酶的结合常数、结合位点数分别为 6.73×10^5 L/mol、1.12, 其作用力以疏水作用为主。同步荧光光谱法测定的结合位点靠近色氨酸, 并使色氨酸的疏水性增强。**结论** 牡荆苷与溶菌酶结合并改变溶菌酶的构象, 共存金属离子对牡荆苷与溶菌酶的相互作用有一定的影响。

关键词: 牡荆苷; 溶菌酶; 荧光光谱法; 同步荧光法; 作用机制; 构象

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2017)02-0175-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.02.003

Fluorescence spectroscopy of interactions between vitexin and lysozyme

YAN Juan¹, ZHENG Mao-dong¹, CUI Yu-huan², ZHAO Hong-xiu¹, ZHAO Xiu-hua¹, BAN Xu-xia¹

1. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China

2. Department of Geriatrics, The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China

Abstract: **Objective** To study the spectroscopic characteristics of interaction between vitexin and lysozyme under the simulative human physiological condition. **Methods** Interaction mechanism and interaction force of vitexin with lysozyme were investigated by fluorescence spectroscopy and synchronous fluorescence spectroscopy. The effects of their interaction on conformation change of lysozyme were investigated. **Results** The fluorescence quenching mechanism of vitexin with lysozyme was static quenching. The binding parameters of vitexin and lysozyme were as following: The binding constant (K) was 6.73×10^5 L/mol, and the number of binding site was 1.12, respectively. And the major driving force was hydrophobic force. The results of synchronous fluorescence demonstrated that the binding site was closer to tryptophan residues and the hydrophobicity of tryptophan residues was increased. **Conclusion** Vitexin with lysozyme can form complex and change the conformation of lysozyme. The common metal ions have effects on interaction between vitexin and lysozyme.

Key words: vitexin; lysozyme; fluorescence spectrometry; synchronous fluorescence spectroscopy; mechanism; conformation

溶菌酶是免疫系统的一种碱性蛋白酶, 能与许多内、外源性物质结合, 发挥抗菌、抗病毒、消炎、消肿等生物功能^[1]。溶菌酶是药物发挥药效的一种重要载体, 常作为模型蛋白用于研究药物小分子与蛋白质相互作用, 为研究药物在体内的分布、代谢、药效的发挥等提供依据。牡荆苷是金莲花的主要药效成分, 属于黄酮碳苷类, 可延缓脑组织萎缩, 提高脑组织中抗氧化酶的活性和降低丙二醛、脂褐素水平, 改善海马区神经细胞结构的功能^[2]。本研究

在模拟人体生理条件下, 采用荧光光谱法和同步荧光光谱法研究牡荆苷与溶菌酶的相互作用, 探索其猝灭机制, 获得两者作用参数(结合常数、结合位点数、结合距离), 并探讨共存金属离子对牡荆苷-溶菌酶体系相互作用的影响, 同时利用同步荧光光谱考察牡荆苷对溶菌酶构象的影响。

1 仪器和试剂

F-7000 荧光光度计(日本日立公司); 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); Biohit 加样

收稿日期: 2016-10-30

基金项目: 河北省医学科学研究重点课题计划项目(20150474)

作者简介: 颜娟(1984—), 女, 山东泰安人, 博士, 主管药师, 从事药物与生物大分子相互作用研究。Tel: 15369318124; E-mail: zhengmd520@126.com

器(芬兰 Biohit 公司); pH-3C 数字酸度计(上海雷磁仪器厂); 电热恒温水槽(上海精宏实验设备有限公司); $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ (PBS) 缓冲溶液(0.02 mol/L, pH 7.40, 内含 0.15 mol/L NaCl); 溶菌酶(美国 Sigma 公司, 货号 12650-88-3, 相对分子质量 14 000, 用 PBS 配成 10.1 $\mu\text{mol/L}$); 牡荆苷(河北北方学院药物研究所提供, 质量分数 >98%, 用 PBS 配制 1.15 mmol/L); ZnCl_2 、 FeCl_3 、 $\text{CuCl}_2\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 实验方法

在系列 10 mL 量瓶中移取 10.1 $\mu\text{mol/L}$ 溶菌酶溶液 1.0 mL 和 0、10、20、30、40、50、60 μL 牡荆苷溶液, 用 PBS 缓冲溶液加至刻度, 摇匀。将量瓶置于 300、305、310 K 恒温水浴中 30 min。移取混合溶液 3 mL 于 1 cm 石英池中, 280 nm 为激发波长, 记录 290~500 nm 波长的发射光谱。在 $\Delta\lambda=15$ 、60 nm 下扫描荧光激发光谱, 分别得到溶菌酶中酪氨酸残基和色氨酸残基的同步荧光光谱。

2.2 牡荆苷与溶菌酶相互作用的荧光光谱及荧光猝灭及机制

溶菌酶分子中含有酪氨酸(Tyr)、色氨酸(Trp)和苯丙氨酸(Phe), 所以其具有较强的内源性荧光。固定溶菌酶溶液的浓度, 以 280 nm 为激发波长, 在 290~500 nm 测定不同浓度牡荆苷与溶菌酶相互作用的荧光光谱, 结果见图 1。可见增加牡荆苷的浓度, 溶菌酶的荧光强度有规律的降低, 同时伴随 345 nm 处最大荧光发射峰峰位的蓝移。由此推测牡荆苷与溶菌酶发生结合作用, 导致溶菌酶荧光猝灭。

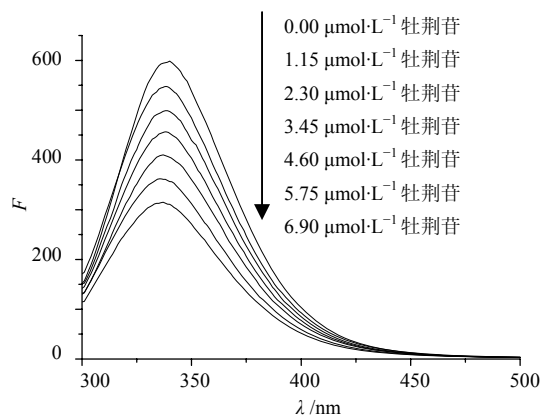


图 1 310 K 时牡荆苷对溶菌酶荧光猝灭图

Fig. 1 Fluorescence spectra of vitexin on lysozyme at 310 K

荧光猝灭分为动态猝灭过程和静态猝灭过程两类^[3]。动态猝灭是猝灭剂分子与荧光物质激发态分子之间的相互作用, 使其荧光猝灭的过程。其过程遵循 Stern-Volmer 方程^[4]:

$$F_0/F = 1 + K_{SV}[Q]$$

静态猝灭过程应符合 Lineweaver-Burk 双倒数方程^[5]:

$$(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + K_{LB}^{-1} F_0^{-1} [Q]$$

F_0 、 F 分别为牡荆苷和溶菌酶作用前和作用后的荧光强度, $[Q]$ 为牡荆苷的浓度, K_{SV} 为 Stern-Volmer 动态猝灭常数, K_{LB} 为静态荧光猝灭的速率常数。

以 $(F_0 - F)^{-1}$ 对 $[Q]^{-1}$ 作图, 可求得 K_{LB} , 结果见表 1。以 F_0/F 对牡荆苷浓度 $[Q]$ 作图, 见图 2, 可得不同温度下的 K_{SV} 。

表 1 牡荆苷与溶菌酶作用的相关参数

Table 1 Correlating parameters of interaction between vitexin and lysozyme

T/K	$K_{SV}/(\times 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1})$	$K_{LB}/(\times 10^5 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1})$	$K/(\times 10^5 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1})$	结合位点数/个
300	9.37	3.28	4.25	1.21
305	8.24	4.16	5.36	1.09
310	7.15	5.79	6.73	1.12

可见 K_{SV} 随着温度的升高而降低, K_{LB} 随温度增大而增大, 初步推测牡荆苷与溶菌酶形成不发光的复合物而导致荧光猝灭, 其猝灭机制为静态猝灭。此外, 牡荆苷的荧光猝灭速率常数远大于各类猝灭剂对生物大分子的最大动态荧光猝灭常数 (200 L/mol), 进一步证实牡荆苷与溶菌酶的猝灭过程是

由于两者形成不发光复合物而引起的静态猝灭。因此, 牡荆苷对溶菌酶的荧光猝灭作用是由于生成牡荆苷-溶菌酶复合物引起的静态猝灭。

2.3 牡荆苷与溶菌酶结合位点数、结合常数的确定

对于静态猝灭过程, 荧光强度与猝灭剂的关系可由静态猝灭公式表示^[6]:

$$\lg(F_0 - F)/F = \lg K + n \lg [Q]$$

以 $\lg(F_0 - F)/F$ 对 $\lg[Q]$ 作图, 见图 3, 可计算牡荆苷与溶菌酶的结合常数 (K) 和结合位点数 (n), 结果见表 1。牡荆苷与溶菌酶 K 的数量级均为 1×10^5 , 表明两者之间具有很强作用力; 牡荆苷与溶菌酶结合位点数接近 1, 表明两者有 1 个结合位点数。

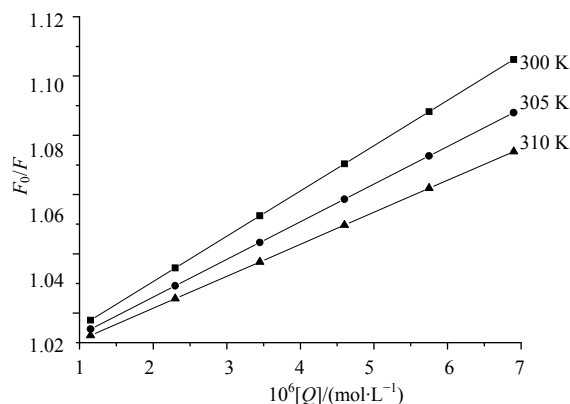


图 2 牡荆苷对溶菌酶荧光猝灭的 Stern-Volmer 图
Fig. 2 Stern-Volmer plots of fluorescence quenching of lysozyme by vitexin

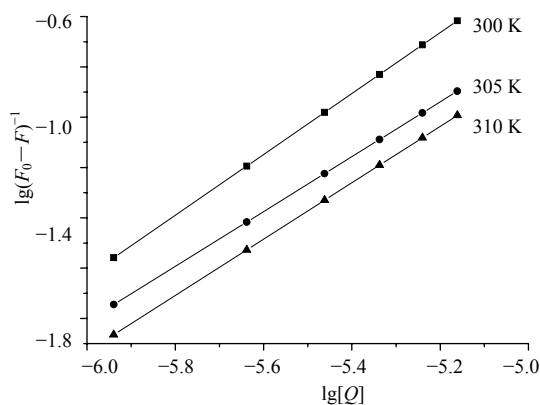


图 3 不同温度下牡荆苷对溶菌酶的双对数图
Fig. 3 Double logarithm plots of fluorescence quenching of lysozyme by vitexin

2.4 牡荆苷与溶菌酶结合的热力学性质

药物小分子与生物大分子之间作用力主要包括疏水作用力、氢键、范德华力、静电引力等^[7]。相同实验条件下分别测定在 300、305、310 K 下牡荆苷与溶菌酶作用的相关热力学参数。根据牡荆苷与溶菌酶作用前后的熵变和焓变的相对大小, 确定两者的作用力类型。

$$\ln(K_2/K_1) = \Delta H(1/T_1 - 1/T_2)/R$$

$$\Delta G = RT \ln K$$

$$\Delta S = (\Delta H - \Delta G)/T$$

由热力学公式可得到 300、305、310 K 下牡荆苷与溶菌酶的热力学参数, 结果见表 2。

表 2 牡荆苷与溶菌酶结合热力学参数

Table 2 Thermodynamics parameters of binding of vitexin and lysozyme

T/K	$\Delta rHm/(kJ \cdot mol^{-1})$	$\Delta rGm/(kJ \cdot mol^{-1})$	$\Delta rSm/(J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1})$
300	35.29	-26.57	206.19
305	35.29	-27.60	209.62
310	35.29	-28.64	213.09

根据热力学参数与作用力的关系^[8], $\Delta rHm > 0$, $\Delta rSm > 0$, 可判定牡荆苷与溶菌酶作用力为典型的疏水作用。

2.5 牡荆苷对溶菌酶构象的影响

溶菌酶的内源性荧光主要来自分子中的色氨酸和酪氨酸, 分别固定 $\Delta\lambda = 15$ 、60 nm, 测定溶菌酶中酪氨酸和色氨酸残基的同步荧光光谱^[9], 可以考察牡荆苷对溶菌酶构象的影响, 结果见图 4。

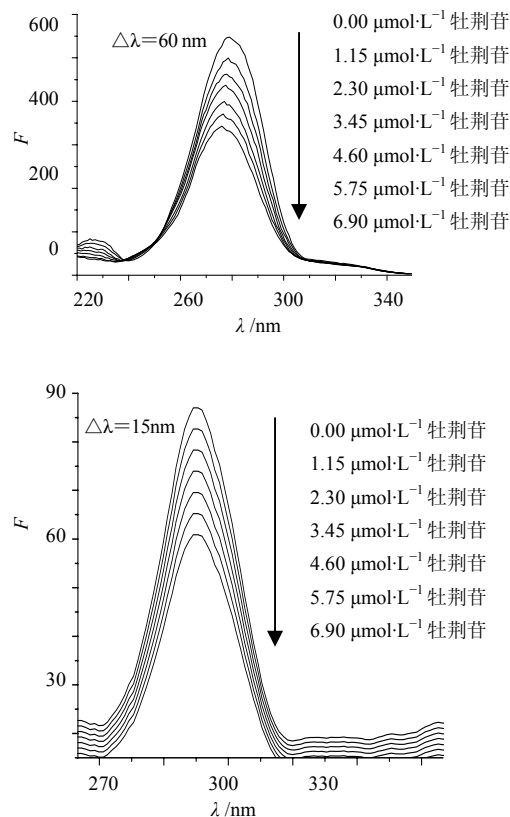


图 4 牡荆苷与溶菌酶作用的同步荧光光谱图
Fig. 4 Synchronous fluorescence spectra of interaction between vitexin and lysozyme

色氨酸残基的荧光强度发生有规律的明显降低,且降低程度比酪氨酸更明显,说明溶菌酶的荧光主要是色氨酸残基贡献,推测牡荆苷与溶菌酶的结合位点接近于色氨酸残基。酪氨酸残基的荧光有规律的降低,但不明显,且最大荧光发射峰未发生红移或蓝移,说明牡荆苷对酪氨酸残基影响很小。此外,色氨酸的最大发射波长发生蓝移,表明牡荆苷加入使色氨酸残基附近的微环境发生了改变。由此说明牡荆苷的加入使溶菌酶的构象发生改变。

2.6 共存金属离子对牡荆苷与溶菌酶相互作用的影响

人体本身具有许多微量金属元素,其中 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 等金属离子与人体的生存、代谢等息息相关。试验考察 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 等金属离子(与牡荆苷的物质的量比为 1:1)对牡荆苷与溶菌酶相互作用的影响,结果见表 3。

表 3 共存金属离子对牡荆苷与溶菌酶结合参数的影响

Table 3 Effect of common metal ions on binding parameters of vitexin and lysozyme at 310 K

体系	结合常数/($\times 10^5 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$)	结合位点数/个
牡荆苷	6.73	1.12
Cu^{2+} -牡荆苷	0.59	0.89
Zn^{2+} -牡荆苷	0.37	0.96
Fe^{3+} -牡荆苷	3.68	1.09

可见在金属离子存在时,牡荆苷与溶菌酶的结合常数和结合位点数均减小,说明金属离子与牡荆苷存在相互竞争作用,缩短牡荆苷在血浆中的储留时间,可以短时间内增加其临床疗效。 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 对牡荆苷与溶菌酶的结合常数的影响大于 Fe^{3+} 的影响,推测这种影响可能与牡荆苷的结构本身有关。此外,有无金属离子存在,结合位点数均接近 1,说明牡荆苷与溶菌酶只有 1 个结合位点。

3 讨论

本实验采用荧光光谱法考察牡荆苷与溶菌酶的相互作用,并探讨金属离子对两者相互作用的影响,结果表明牡荆苷对溶菌酶猝灭机制为静态猝灭。有

无金属离子对牡荆苷与溶菌酶的结合常数和结合位点数均有不同程度的影响,推测金属离子可能在牡荆苷与溶菌酶之间以“离子架桥”方式参与两者的结合过程。此外,金属离子按照结合常数改变程度大小的排序为 $\text{Zn}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Fe}^{3+}$,金属离子使两者结合常数减小,说明金属离子与牡荆苷存在竞争作用,可以缩短其在血浆中的储留时间,增加其疗效。

同步荧光结果表明,牡荆苷使色氨酸残基附近的极性减弱,疏水环境增强,肽链的伸展程度有所减少;牡荆苷使溶菌酶构象发生改变,且牡荆苷与溶菌酶的结合位点在色氨酸附近。

参考文献

- [1] Zhang H M, Xu Y Q, Zhou Q H, *et al.* Investigation of the interaction between chlorophenols and lysozyme in solution [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2011, 104(3): 405-413.
- [2] 蒋伟, 屈海琪, 袁丹华, 等. 金莲花中荜苳苔和牡荆苷对 D-半乳糖致衰老小鼠脑损伤的保护作用 [J]. *中草药*, 2012, 43(7): 1376-1380.
- [3] Ding F, Huang J L, Lin J, *et al.* A study of the binding of C.I. Mordant Red 3 with bovine serum albumin using fluorescence spectroscopy [J]. *Dyes and Pigments*, 2009, 82(1): 65-70.
- [4] 董露, 易忠胜, 伍智蔚, 等. 2'-羟基-2,4-二溴二苯醚与人血清白蛋白作用机制的光谱研究与计算模拟 [J]. *高等学校化学学报*, 2015, 36(3): 516-522.
- [5] Lan Y X, Liu M X, Chen S Z, *et al.* Spectrophotometric studies on the interaction between chlorogenic acid, neochlorogenic acid, cryptochlorogenic acid and lysozyme [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2014, 23(8): 543-547.
- [6] 滕跃, 刘美, 邹路易, 等. 2-巯基苯并咪唑与溶菌酶作用机理的研究 [J]. *分析测试学报*, 2014, 33(12): 1431-1435.
- [7] 刘保生, 韩荣, 李志云, 等. 硝基羟乙唑与溶菌酶反应机制的荧光光谱研究 [J]. *发光学报*, 2015, 36(12): 1458-1463.
- [8] 郑茂东, 颜娟, 庞茜茜, 等. 荧光光谱法研究卡铂与牛血清白蛋白的相互作用 [J]. *现代药物与临床*, 2016, 31(5): 587-590.
- [9] 张海容, 刘晓燕, 李慧卿, 等. 药物青蒿素与溶菌酶相互作用研究 [J]. *分析科学学报*, 2013, 29(4): 539-542.