

## • 药剂与工艺 •

## 荧光法研究姜黄素与牛血清白蛋白的结合作用

兰瑞家

廊坊师范学院化学与材料科学学院, 河北 廊坊 065000

**摘要:** 目的 研究姜黄素(CU)与牛血清白蛋白(BSA)之间的作用机制。方法 采用变温试验研究二者之间的猝灭类型, 求算结合数( $n$ )和结合常数。结果 静态猝灭是导致BSA荧光猝灭的主要原因, CU与BSA结合反应的平衡常数( $K_0$ )为 $5.26 \times 10^6$  (21 °C)和 $4.60 \times 10^6$  (31 °C),  $n$ 为1.35。通过计算结合反应的热力学参数, 推断CU与BSA之间的作用力以疏水力为主。结论 荧光法适合于研究CU与蛋白质的结合反应, 具有简便快速、灵敏度高等优点。

**关键词:** 姜黄素; 牛血清白蛋白; 荧光猝灭; 结合反应; 疏水力

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)09-1715-04

## Interaction between curcumin and bovine serum albumin by fluorescence

LAN Rui-jia

Faculty of Chemistry and Material Science, Langfang Teachers' College, Langfang 065000, China

**Abstract: Objective** To study the mechanism of interaction between curcumin (CU) and bovine serum albumin (BSA). **Methods** The style of quenching was investigated by changing the reaction temperature. The number and constant of binding sites of CU to BSA were calculated. **Results** Static quenching was the main reason that caused the quenching of BSA fluorescence. The apparent combining constants ( $K_0$ ) were  $5.26 \times 10^6$  at 21 °C and  $4.60 \times 10^6$  at 31 °C, and the number of binding sites ( $n$ ) was 1.35. By calculating the thermodynamic parameters, it can be deduced that hydrophobic force is the main binding force between CU and BSA. **Conclusion** Fluorometric analysis is a good method for the study on CU-BSA binding reaction. It has the advantages of high speed and high sensitivity.

**Key words:** curcumin (CU); bovine serum albumins (BSA); fluorescence quenching; binding reaction; hydrophobic force

姜黄素(curcumin, CU)是一种天然酚类色素, 广泛存在于姜科姜黄属植物姜黄、莪术、郁金等的根茎中<sup>[1]</sup>。CU在抗炎<sup>[2-3]</sup>、抗氧化<sup>[4]</sup>、抗肿瘤<sup>[5]</sup>、抗HIV病毒<sup>[6]</sup>、抗血吸虫病肝纤维化<sup>[7]</sup>、高脂性脂肪肝<sup>[8]</sup>以及抗动脉硬化等方面有很好的药理活性<sup>[9-10]</sup>, 是有效的抗致突变剂和抗促癌剂<sup>[11]</sup>。血清白蛋白是血浆中含量最丰富的重要载体蛋白, 具有储运内源性代谢产物和外源性药物小分子(离子)等重要生理功能, 可与许多内、外源性化合物结合, 是人体中不可或缺的重要蛋白质。近年来, 对药物与血清白蛋白相互作用的研究较多<sup>[12-14]</sup>, 但尚无用荧光法研究CU与牛血清白蛋白(bovine serum albumins, BSA)之间相互作用的报道, 本课题组对其进行实

验研究, 为探讨CU在药学上的应用提供理论参考。

## 1 仪器与材料

WGY-10型荧光分光光度计(天津市港东科技发展有限公司); AE240电子分析天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司)。BSA(相对分子量68 000, 北京元亨金马生物技术开发有限公司); CU(分析纯, 河北邢台化学试剂厂); 三羟甲基胺基甲烷(Tris, 相对分子量121.14, 上海蓝季科技发展有限公司); NaCl、HCl、NaOH等试剂均为分析纯。实验用水均为原子级水, 无荧光杂质干扰。

## 2 方法与结果

### 2.1 方法

在25 mL量瓶中依次加入一定量的0.1 mmol/L

收稿日期: 2010-12-25

作者简介: 兰瑞家(1979—), 女, 河北唐山人, 讲师, 硕士, 研究方向为发光分析和食品、药品分析。

Tel: (0316)2188377 13171738972 E-mail: lanruijia56@126.com

CU、10.0 μmol/L BSA、pH 7.4 Tris-HCl 缓冲溶液、0.1 mol/L NaCl 溶液，配制系列溶液，扫描其荧光光谱。荧光仪的激发和发射狭缝均为 6 nm，激发波长 ( $\lambda_{ex}$ ) 285 nm，发射波长 ( $\lambda_{em}$ ) 340 nm。

### 2.2 CU 和 BSA 的荧光光谱图

图 1 给出了 CU 和 BSA 水溶液的荧光光谱，其

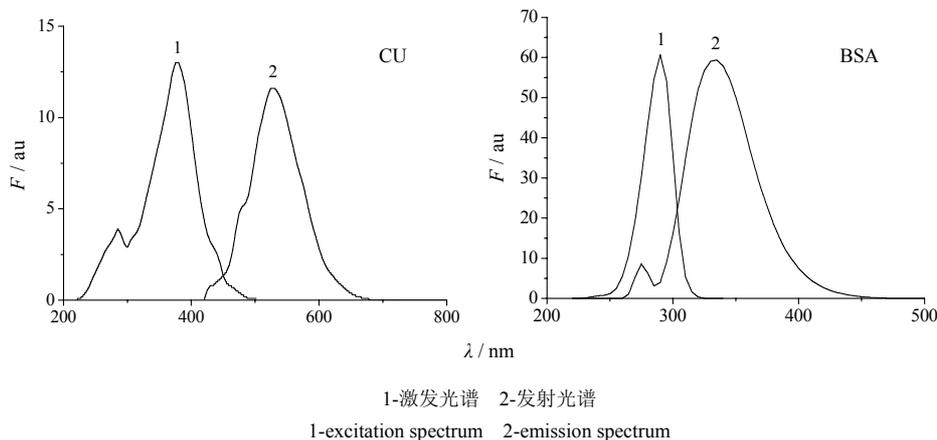
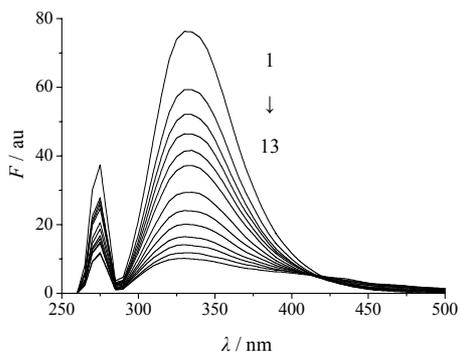


图 1 CU (10.0 μmol/L) 和 BSA (0.80 μmol/L) 的荧光光谱  
Fig. 1 Fluorescence spectra of CU (10.0 μmol/L) and BSA (0.80 μmol/L)

情况下，逐步增加 CU 浓度，以 285 nm 为激发波长，扫描 CU-BSA 体系的荧光光谱 (图 2)。随着 CU 浓度的升高，BSA 的内源性荧光强度在 340 nm 处有规律地降低，峰位置及峰形基本保持不变，且在 418 nm 附近出现一个等荧光发射点，表明两者之间存在相互作用，产生了能量转移。

荧光能量转移可分为辐射能量转移和非辐射能量转移<sup>[15]</sup>。若发生辐射能量转移，会导致荧光光谱畸形。图 2 中 BSA 的荧光光谱没有畸变，因此 CU



1~13-CU 浓度分别为 0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0、16.0、20.0、24.0、28.0、32.0、36.0、40.0 μmol·L<sup>-1</sup>  
1-13-CU concentrations were 0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 16.0, 20.0, 24.0, 28.0, 32.0, 36.0, 40.0 μmol·L<sup>-1</sup>, respectively

图 2 BSA 为 0.80 μmol/L 时 CU-BSA 体系的荧光光谱  
Fig. 2 Fluorescence spectra of CU-BSA at BSA 0.80 μmol/L

中 CU 的激发峰位于 390 nm，发射峰位于 536 nm，且荧光较弱；BSA 的激发峰位于 285 nm，发射峰位于 340 nm，两者的荧光光谱区别较大。当以 BSA 的荧光光谱作为研究对象时，CU 产生的干扰很小。

### 2.3 CU 对 BSA 的荧光猝灭作用及结合反应

#### 2.3.1 猝灭类型的判断 在保持 BSA 浓度不变的

与 BSA 之间的能量转移不属于辐射能量转移。非辐射能量转移包括分子内能量转移和分子间能量转移。若 CU 与 BSA 结合生成复合物，则两者之间的能量转移为分子内能量转移，否则为分子间能量转移。

从 BSA 荧光猝灭的角度看，若 CU 与 BSA 结合生成复合物，则图 2 中的荧光猝灭为静态猝灭；若两者之间是由于碰撞而引起的猝灭则为动态猝灭。一般情况下，动态和静态猝灭可依据不同温度条件下的猝灭常数进行区别：若是动态猝灭，温度升高将增加分子间的有效碰撞和加剧能量转移过程，使荧光猝灭常数随温度升高而增大；若是静态猝灭，则温度升高将降低药物与蛋白所形成复合物的稳定性，使猝灭常数减小。

在动态猝灭过程中，蛋白质等荧光体与荧光猝灭剂分子间的相互作用可用 Stern-Volmer 方程<sup>[16]</sup>描述。

$$F_0/F = 1 + K_q t_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (1)$$

$F_0$  为未加入药物时 BSA 溶液的荧光强度， $F$  为加入药物后 BSA 溶液的荧光强度， $[Q]$  为药物的总浓度， $K_{sv}$  为 Stern-Volmer 常数 (L/mol)，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， $K_q$  ( $K_q = K_{sv}/t_0$ ) 为双分子表观猝灭常数，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，各类荧光猝灭剂对生物大分子的最大动态荧光猝灭速率常

数约为  $2.0 \times 10^{10} \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{s})$ ,  $t_0$  为猝灭剂不存在时荧光分子的平均寿命, 生物大分子的平均寿命约为  $1 \times 10^{-8} \text{ s}$

当温度分别为  $21 \text{ }^\circ\text{C}$  和  $31 \text{ }^\circ\text{C}$  时, Stern-Volmer 曲线见图 3。随着温度升高, BSA 猝灭曲线斜率降低。初步表明猝灭过程为生成 CU-BSA 复合物的静态猝灭。

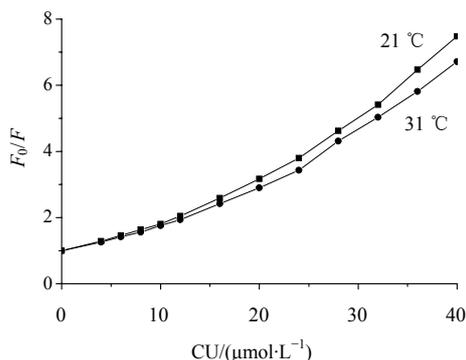
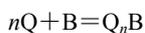


图 3 BSA 荧光猝灭的 Stern-Volmer 曲线

Fig. 3 Stern-Volmer curves of BSA fluorescence quenching

当 CU 浓度大于  $20 \text{ } \mu\text{mol/L}$  时, 曲线对 Stern-Volmer 方程偏离较严重, 所以利用 CU 浓度小于  $20 \text{ } \mu\text{mol/L}$  的数据进行计算, 得 Stern-Volmer 方程:  $21 \text{ }^\circ\text{C}$  时,  $F_0/F=0.965+0.865 [Q] (r=0.996 34)$ ;  $31 \text{ }^\circ\text{C}$  时,  $F_0/F=0.967 14+0.784 29 [Q] (r=0.996 45)$ 。  $21 \text{ }^\circ\text{C}$  和  $31 \text{ }^\circ\text{C}$  时猝灭曲线的斜率分别为  $8.65 \times 10^5$ 、 $7.84 \times 10^5 \text{ L/mol}$ , 可得  $K_q$  分别为  $8.65 \times 10^{13}$ 、 $7.84 \times 10^{13} \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{s})$ , 远大于各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散猝灭常数  $2.0 \times 10^{10} \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{s})$ , 由此可以进一步证明此过程为静态猝灭。

**2.3.2 CU 与 BSA 的结合数 ( $n$ ) 和平衡常数 ( $K_0$ )** 对于静态猝灭, 荧光强度与猝灭剂浓度的关系可作如下推导: 设生物大分子 B 有  $n$  个相同且独立的结合位点, 则与 CU 间的结合反应可表示为:



$$K_0=[Q_nB]/[Q]^n[B] \quad (2)$$

[B]为游离生物大分子的浓度, [Q]为游离猝灭剂浓度,  $[Q_nB]$  为复合物浓度

若生物大分子总浓度为  $C_B$ , 猝灭剂总浓度为  $C_Q$ , 则  $C_B=[Q_nB]+[B]$ 。当  $C_Q \gg C_B$  时, 以猝灭剂的起始浓度代替其平衡浓度:

$$K_0 = ([B_0]-[B]) / C_Q^n [B] \quad (3)$$

假设生成的复合物是非荧光性的, 则:

$$[B]/C_B = F/F_0 \quad (4)$$

由 (3) 和 (4) 式可得静态猝灭方程:

$$\lg[(F_0-F)/F] = \lg K_0 + n \lg C_Q \quad (5)$$

实验中所用猝灭剂 CU 浓度最小为 BSA 浓度的 5 倍, 最大为 50 倍, 所以用猝灭剂的起始浓度代替其平衡浓度进行计算是合理的。对荧光数据按式 (5) 进行处理, 得静态猝灭方程:  $21 \text{ }^\circ\text{C}$  时,  $\lg[(F_0-F)/F]=6.721 38+1.353 86 \lg C_Q (r=0.997 79)$ ,  $31 \text{ }^\circ\text{C}$  时,  $\lg[(F_0-F)/F]=6.662 4+1.351 47 \lg C_Q (r=0.997 11)$ 。由所得直线的截距计算得  $21 \text{ }^\circ\text{C}$  和  $31 \text{ }^\circ\text{C}$  时的  $K_0$  分别为  $5.26 \times 10^6$  和  $4.60 \times 10^6$ , 由斜率求得 CU 与 BSA 的结合数  $n=1.35$ 。

**2.3.3 同步荧光法研究 BSA 构象的变化** 对于蛋白质的同步荧光光谱,  $\Delta\lambda$  为  $15 \text{ nm}$  时只显示酪氨酸残基的光谱特性, 而  $\Delta\lambda$  为  $60 \text{ nm}$  时仅表现色氨酸残基的光谱特性, 因残基的最大发射波长与其所处环境的极性有关, 因而由发射波长的改变可判断蛋白质构象的变化。若最大发射波长红移, 表明残基所处环境的极性增加, 蓝移则疏水性增加。本实验研究了 BSA 与 CU-BSA 在不同  $\Delta\lambda$  下的同步荧光光谱 (图 4)。色氨酸残基及酪氨酸残基的发射波长没有改变, 说明 CU 的加入对 BSA 的构象几乎无影响。

**2.3.4 荧光猝灭过程中热力学函数的变化与作用力的判断** Ross 等<sup>[17]</sup>总结出判断生物大分子与小分子结合力性质和生物大分子自身结合力性质的热力学规律, 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类型:  $\Delta H > 0, \Delta S > 0$  为疏水作用力;  $\Delta H < 0, \Delta S < 0$  为氢键和范德华力;  $\Delta H < 0, \Delta S > 0$  为静电引力。在温度变化不大时, 反应的  $\Delta H$  可以看作一个常数, 由稳定常数可以求出反应的自由能变化量 ( $\Delta G$ ):

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

根据下式分别求出  $\Delta H$  和  $\Delta S$ :

$$\ln K_2/K_1 = [1/T_1 - 1/T_2] \Delta H/R$$

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S$$

由前面所求得的  $K_0$  值计算 CU 与 BSA 结合反应的热力学函数, 结果见表 1。

根据判别规则, 两者之间的作用力应为静电引力; 但是在 pH 7.4 条件下, CU 和 BSA 都带负电荷, 两者之间存在静电斥力。Ross 等<sup>[17]</sup>认为, 在很多情况下, 即使  $\Delta H < 0$ , 蛋白质和一些小分子之间, 主要作用力仍为疏水作用力, 因此, CU 与 BSA 两者之间主要还是以疏水作用力结合。

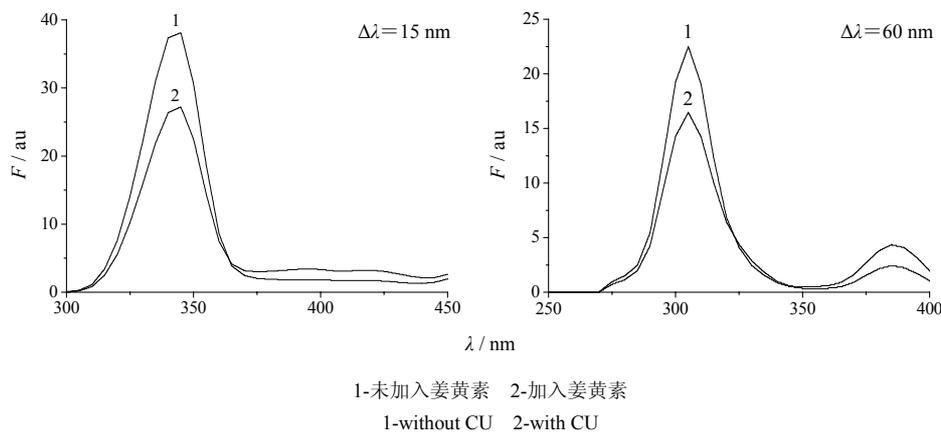


图 4 CU 2.0 μmol/L、BSA 0.40 μmol/L 时 BSA 和 CU-BSA 的同步荧光光谱

Fig. 4 Synchronous fluorescence spectra of BSA and CU-BSA at CU 2.0 μmol/L and BSA 0.40 μmol/L

表 1 结合反应过程的热力学参数

Table 1 Thermodynamic parameters of binding reaction

温度/℃	$K_0$	$\Delta H/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$\Delta G/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$\Delta S/(\text{J}\cdot\text{mol}^{-1})$
21	$5.26 \times 10^6$	-9.97	-37.85	94.78
31	$4.60 \times 10^6$	-9.97	-38.79	94.76

### 3 结论

本实验采用荧光法研究了模拟生理条件下 CU 与 BSA 的相互作用。结果表明，在 CU 和 BSA 的相互结合作用过程中，静态猝灭是导致 CU 对 BSA 荧光猝灭的主要原因，CU 与 BSA 的  $K_0$  分别为  $5.26 \times 10^6$  (21 °C) 和  $4.60 \times 10^6$  (31 °C)， $n$  为 1.35。同步荧光试验结果表明，CU 对 BSA 的构象几乎没有影响。通过热力学函数，推断 CU 与 BSA 之间的作用力以疏水力为主。

### 参考文献

[1] 余美荣, 蒋福升, 丁志山. 姜黄素的研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(5): 828-831.

[2] Lubbad A, Oriowo M A, Khan I. Curcumin attenuates inflammation through inhibition of TLR-4 receptor in experimental colitis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2009, 322(1/2): 127-135.

[3] 赵承光, 梁广, 邵丽丽, 等. 姜黄素类化合物抗炎和细胞保护作用的构效关系研究进展 [J]. 中草药, 2008, 39(4): 619-622.

[4] Jang H D, Chang K S, Huang Y S, et al. Principal phenolic phytochemicals and antioxidant activities of three Chinese medicinal plants [J]. *Food Chem*, 2007, 103(3): 749-756.

[5] Jiao Y, Wilkinson J IV, Di X, et al. Curcumin, a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent, is a biologically active iron chelator [J]. *Blood*, 2009, 113(2):

462-469.

[6] Chai H, Yan S, Lin P, et al. Curcumin blocks HIV protease inhibitor ritonavir-induced vascular dysfunction in porcine coronary arteries [J]. *J Am Coll Surg*, 2005, 200(6): 820-830.

[7] 谌辉, 张景辉, 刘文琪. 姜黄素抗血吸虫病肝纤维化及其机制的实验研究 [J]. 中草药, 2009, 40(8): 1274-1277.

[8] 狄建彬, 顾振纶, 赵笑东, 等. 姜黄素防治大鼠高脂性脂肪肝的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(8): 1322-1326.

[9] 狄建彬, 顾振纶, 赵笑东, 等. 姜黄素的抗氧化和抗炎作用研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(5): 附 18-附 21.

[10] Bengmark S, 刘青. 植物源保护剂姜黄素的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(1): 22-31.

[11] 琚辉, 郝存江, 尹飞, 等. 姜黄素固体脂质纳米粒的制备及表征 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(6): 420-426.

[12] 何文英, 陈光英, 杜娟, 等. 光谱法与分子模拟研究胡椒碱对牛血清白蛋白的键合作用 [J]. 化学学报, 2008, 66(21): 2365-2370.

[13] 邹晓丽, 王湘敏, 郭海方, 等. 丹酚酸与牛血清白蛋白结合反应的特性和结构相关性研究 [J]. 中草药, 2010, 41(8): 1271-1274.

[14] 黄芸, 崔力剑, 王建明, 等. 光谱法研究槲皮苷与人血清白蛋白的相互作用 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 676-679.

[15] 陈国珍, 黄贤智, 许金钧. 荧光分析法 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1990.

[16] 吴根华, 汪春华. 荧光法研究  $\text{Pb}^{2+}$  与牛血清白蛋白的相互作用 [J]. 光谱学与光谱分析, 2005, 25(2): 246-248.

[17] Ross P D, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability [J]. *Biochemistry*, 1981, 20(11): 3096-3102.