

丹参酚酸与牛血清白蛋白结合反应的特性和结构相关性研究

邹晓丽, 王湘敏, 郭海方, 许 卉*, 刘 珂

(烟台大学药学院, 山东 烟台 264005)

摘要: 目的 研究丹参酚酸与牛血清白蛋白的结合反应特性及其结构相关性。方法 运用荧光和紫外光谱法研究了4种小分子天然丹参酚酸类化合物迷迭香酸、紫草酸、丹参酚酸A、丹参酚酸B(SA I ~ IV)与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用。结果 计算得到各SA-BSA结合体系的静态表现结合常数(K_A)、结合位点数(n)、能量转移效率(E)、空间距离(r)及热力学常数 ΔG 、 ΔH 和 ΔS 。4种丹参酚酸均能与BSA结合形成非共价复合物,通过静态猝灭和非辐射能量转移共同导致BSA内源荧光的猝灭。结论 丹参酚酸A(SA III)主要通过疏水作用力与BSA结合,而其余3种丹参酚酸与BSA的结合则主要由氢键和范德华力驱动。SA-BSA相互作用体系的结合强度可以用综合反应参数 $[Y = \lg(K_A \times E \times n/r)]$ 来表征,其在数值上按SA III $\rightarrow$ SA IV $\rightarrow$ SA II $\rightarrow$ SA I的顺序递减,并与分子中所含游离羟基数目和分子体积等结构特性密切相关,可以利用脂水分分配系数($clogP$)和单位相对分子质量下的拓扑分子极性表面积($tPSA/Mr$)来预测丹参酚酸化合物与蛋白的结合程度。

关键词: 丹参酚酸; 牛血清白蛋白; 相互作用; 结构相关性; 荧光光谱法

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)08-1271-04

Characteristic of salvianolic acid binding to bovine serum albumin and structure-performance relationship

ZOU Xiao-li, WANG Xiang-min, GUO Haifang, XU Hui, LIU Ke

(School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China)

Abstract: **Objective** To study the characteristic of salvianolic acid (SA) binding to bovine serum albumin (BSA) and the structure-performance relationship. **Methods** The interactions between BSA and four natural SA (SA I, rosmarinic acid; SA II, lithospermic acid; SA III, salvianolic acid A; and SA IV, salvianolic acid B) were investigated by fluorescence and ultraviolet spectroscopy. **Results** The intrinsic fluorescence of BSA was quenched by SA via forming SA-BSA complexes and non-radiation energy transfer. The parameters of SA-BSA binding process, such as the static apparent association constant K_A , the number of binding site n , the efficiency of energy transfer E , the spatial distance r were obtained, and the thermodynamic constants ΔG , ΔH , and ΔS were calculated. **Conclusion** The results indicate that SA III binds to BSA mainly through a hydrophobic force and the other three SA-BSA interactions are mainly driven by hydrogen bond and Van der Waals' force. Y , a comprehensive binding parameter constructing from the equation $Y = \lg(K_A \times E \times n/r)$, could be used to reflect the interaction extent of SA-BSA system. The Y value changes with the number of free phenolic hydroxyl and molecule volume and decreases in the order of SA III $\rightarrow$ SA IV $\rightarrow$ SA II $\rightarrow$ SA I. The results from correlation analysis indicate that it could be possible to estimate SA-BSA binding extent from hydrophobic parameter $clogP$ and topological polar surface area per unit of molecular weight $tPSA/Mr$ of SA molecule.

Key words: salvianolic acids (SA); bovine serum albumin (BSA); interaction; structure-performance relationship; fluorescence spectroscopy

分子生物学和分子药理学的发展使人们能够从基因水平理解某些疾病的发病机制,并通过分子设

计来寻找有效的治疗药物。因此药物小分子与蛋白质、DNA 等功能大分子的相互作用成为化学和生命

* 收稿日期: 2009-12-12

基金项目: 山东省高等学校科技计划项目(J09LF08); 山东省高校优秀青年教师国内访问学者项目(2007)

作者简介: 邹晓丽(1984—),女,福建人,硕士研究生,研究方向为天然药物化学。E-mail: pharmlx1@163.com

* 通讯作者 许 卉 Tel: (0535) 6706030-8009 E-mail: xuhui33@sina.com

科学相关交叉领域的研究热点,光谱法则是这类研究的常用方法^[1-5]。作为传统中药丹参活血化瘀作用的主要功能成分,丹参酚酸(salvianolic acids, SA)是一类同时包含新木脂素骨架和咖啡酰缩酚酸结构的化合物,具有抗氧化、治疗心肌缺血等多种重要的生理活性^[6-7]。本实验采用荧光光谱和紫外光谱法研究了迷迭香酸(SA I)、紫草酸(SA II)、丹酚

酸 A(SA III)和丹酚酸 B(SA IV) 4 种重要的丹参酚酸(化学结构见图 1)与牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)的相互作用,并探讨了 SA 与蛋白结合反应特性与化学结构的相关性,所得结果有助于阐述这类化合物的分子作用机制,并为体外筛选和药物设计提供有价值的信息。

1 仪器与材料

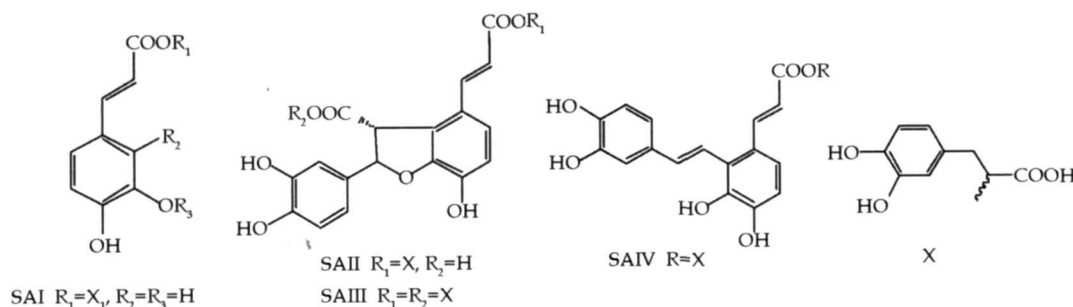


图 1 SA 的化学结构

Fig 1 Chemical structures of SA

CARY—Eclipse 型分子荧光光谱仪(美国 Varian); UV—2550 型双光束紫外-可见分光光度计(日本 Shimadzu);微量注射器;旋涡混合器;pHS—3 酸度计。

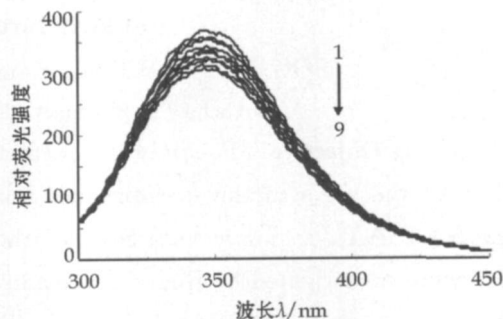
牛血清白蛋白(相对分子质量 68 000, 质量分数> 98%, 北京军区兽医防治中心生物工程研究室);SA I、SA II、SA III和 SA IV均由本实验室分离制备,并经 IR、UV、¹H-NMR、¹³C-NMR 确证结构,反相 HPLC 归一化质量分数均大于 99%。其余试剂均为分析纯,实验用水为 Milli-Q 超纯水。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制:牛血清白蛋白以 pH 7.4 Tris-HCl 缓冲液为溶剂,配成 1.0×10^{-6} mol/L 储备溶液,4℃保存备用;4 种 SA 单体化合物分别用水配成 1.0×10^{-4} mol/L 的溶液,内含 0.1 mol/L NaCl,以维持离子强度。

2.2 光谱的测定:取 BSA 标准溶液 3.0 mL 于 1 cm 石英比色皿中,置循环水控温比色槽中(内置微型磁力搅拌器),用微量注射器逐次加入 SA I 溶液,进行光谱滴定。每次滴定结束,磁力搅拌 10 min,停止搅拌并静置 5 min 后,在 280 nm 激发波长下,扫描 300~500 nm 荧光光谱,结果见图 2。测定 26℃ 时与 BSA 相同浓度(1.0×10^{-6} mol/L)的 SA I 溶液 300~500 nm 紫外吸收光谱。按同样方法进行其他 3 种 SA 溶液的光谱测定。

2.3 SA-BSA 相互作用参数的计算:分别在 26℃ 和 37℃ 下测定了不同浓度 SA I~SA IV 对 BSA 荧



1~9 0.17, 0.33, 0.50, 0.67, 0.83, 1.00, 1.17, 1.33, 1.50 μmol/L SA I

图 2 SA I 与 BSA 结合荧光光谱图

Fig 2 Fluorescence spectrum of SA I binding with BSA

光强度的影响。按文献方法^[3-4]处理实验数据,得到 SA 类化合物-BSA 结合过程的动态荧光猝灭常数(K_{sv})、静态表观结合常数(K_A)和结合位点数(n)、结合过程的热力学参数、化合物的 UV 光谱与 BSA 的荧光光谱的图谱重叠积分(J)、化合物与 BSA 之间的能量转移效率(E)以及化合物与 BSA 荧光性氨基酸残基间的平均空间距离(r)等作用参数,结果见表 1。

2.4 SA-BSA 荧光猝灭机制的探讨:由于分子结构中色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸的存在,使 BSA 具有内源荧光(λ_{ex} 225 nm, λ_{em} 345 nm)。图 2 中,随着 SA I 浓度的增加,BSA 的内源荧光强度有规律地降低,且发射峰的峰位与峰形均不变,表明 SA I 对 BSA 的荧光有猝灭作用。SA II~SA IV 与 SA I 类似,都能引起 BSA 荧光的猝灭。

表 1 SA-BSA 结合过程的相互作用参数

Table 1 Interaction parameters of SA-BSA binding process

参 数	温度/℃	SA I	SA II	SA III	SA IV
$K_{SV}/(10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$	26	1.19 ($R^2 = 0.9994$)	2.64 ($R^2 = 0.9968$)	3.30 ($R^2 = 0.9970$)	2.60 ($R^2 = 0.9973$)
	37	1.05 ($R^2 = 0.9883$)	2.46 ($R^2 = 0.9984$)	2.63 ($R^2 = 0.9943$)	3.04 ($R^2 = 0.9998$)
$K_A/(10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$	26	0.116 ($R^2 = 0.9969$)	55.0 ($R^2 = 0.9979$)	18.5 ($R^2 = 0.9980$)	26.4 ($R^2 = 0.9981$)
	37	0.028 ($R^2 = 0.9958$)	4.72 ($R^2 = 0.9985$)	75.6 ($R^2 = 0.9979$)	16.5 ($R^2 = 0.9998$)
n	26	0.6479	1.0419	0.9583	0.9976
	37	0.5200	0.8754	1.0869	0.9534
$\Delta H/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	26	-100.84	-172.03	98.62	-32.93
	37	-100.84	-172.03	98.62	-32.93
$\Delta G/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	26	-17.54	-32.86	-30.15	-31.03
	37	-14.48	-27.74	-34.89	-30.96
$\Delta S/(\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$	26	-278.41	-465.14	430.38	-6.35
	37	-278.40	-465.15	430.40	-6.35
$J/(10^{-14} \text{ cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	37	1.3544	1.2519	1.6891	1.4565
E	37	0.09	0.12	0.24	0.17
r/nm	37	5.81	5.43	4.96	5.21

不存在猝灭剂时,生物大分子的荧光平均寿命(τ_0)约为 $1 \times 10^{-8} \text{ s}^{[9]}$ 。根据 $K_{SV} = K_q \times \tau_0$, 以及表 1 数据, 计算得各试验反应体系动态猝灭速率常数 K_q 的量级为 10^{13} , 均远大于各种猝灭体对生物大分子动态猝灭速率常数的最大值 $2 \times 10^{10} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})^{[9]}$, 据此可以推断, 4 种 SA 对 BSA 内源性荧光主要不是以分子扩散控制的动态猝灭而是静态猝灭。

根据 Förster 的偶极-偶极非辐射能量转移原理, 可以进一步计算药物分子与 BSA 内源性荧光的主要产生部位第 212 位的色氨酸残基间的距离(r)^[10]。由表 1 数据可以看出, SA I ~ SA IV 与 BSA 中色氨酸残基之间的 r 值均小于 7 nm, 表明试验的 4 种 SA 均能够插入 BSA 分子内部, 形成稳定的非共价复合物, 非辐射能量转移与静态猝灭共同导致 SA 对 BSA 的荧光猝灭。

2.5 SA-BSA 结合反应的作用力类型: 根据结合反应前后热力学参数焓变(ΔH)和熵变(ΔS)的相对大小, 可以进一步判断小分子有机化合物与蛋白质间的主要作用力类型。当 $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$ 时, 主要作用力为疏水作用力; 当 $\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$ 时, 主要作用力为氢键和范德华力; 当 $\Delta H < 0$, $\Delta S > 0$ 时, 主要作用力为静电引力^[11]。表 1 的数据表明, SA I ~ SA IV 与 BSA 的结合均是 Gibbs 自由能降低的自发过程。其中, SA I、SA II、SA IV 与 BSA 间的作用力主要为氢键作用力和范德华力, 而 SA III 与 BSA 结合过程的主要驱动力则为分子间疏水相互作用。

2.6 SA-BSA 结合反应特性与化学结构的相关性: 比较表 1 中的数据可以发现, 37℃ 时 4 种 SA 与 BSA 结合作用的 K_A 、 E 和 n 按 SA III $\rightarrow$ SA IV $\rightarrow$ SA II $\rightarrow$ SA I 的顺序递减, 同时 r 按上述顺序递增, 表

明 SA-BSA 结合作用按以上顺序逐渐减弱。

为了便于进行结构相关性分析, 根据以上测定结果, 构造一个综合反应参数 Y 以反映 SA-BSA 分子结合程度, $Y = \lg(K_A \times E \times n/r)$, 计算结果见表 2。所得 Y 值按 SA III $\rightarrow$ SA IV $\rightarrow$ SA II $\rightarrow$ SA I 顺序依次减小。

表 2 SA I ~ SA IV 的主要理化特性参数

Table 2 Main physicochemical parameters of SA I —SA IV

丹参酚酸	M_r	NH	$\text{clog} P^*$	$tPSA^*/MW$	Y
I	360	4	1.0996	0.4014	0.3532
II	538	5	1.3478	0.3927	2.9605
III	494	6	2.5276	0.3745	4.5994
IV	718	7	1.8405	0.3872	3.7104

针对研究中的 4 种小分子 SA 化合物, 利用 ChemBioDraw 软件(Ultra 11.0)计算了与分子结构密切相关的两个理化特性参数脂水分配系数($\text{clog} P$)和拓扑分子极性表面积($tPSA$), 并以相对分子质量(M_r)为因子校正分子体积大小对分子极性表面积的影响, 得参数($tPSA/M_r$), 结果见表 2。可以看出, $\text{clog} P$ 、 $tPSA/M_r$ 在数值上分别按 SA III $\rightarrow$ SA IV $\rightarrow$ SA II $\rightarrow$ SA I 的顺序递减和递增, 并与参数 Y 随分子结构的变化趋势呈现明显的相关性。进一步以 $\text{clog} P(X_1)$ 和 $tPSA/M_r(X_2)$ 为自变量, 以 Y 为应变量, 分别进行多项式回归分析, 得回归方程:

$$Y = -2.8064 X_1^2 + 12.808 X_1 - 9.9351 (R = 0.9550)$$

$$Y = -6.8149 X_2^2 + 5.1319 X_2 - 9.6151 (R = 0.9982)$$

回归方程拟合度良好, 拟合曲线见图 3。

可以看出, 在相对分子质量不变的情况下, SA 分子结构中游离羟基数目减少, 其 $\text{clog} P$ 值增大, 同

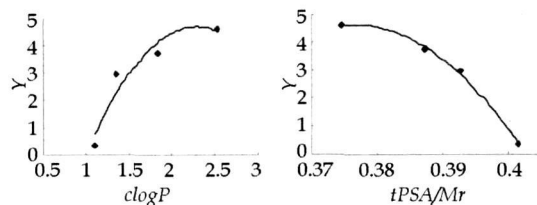


图 3 SA-BSA 结合程度参数和理化特性参数的拟合曲线图

Fig 3 Correlation between SA-BSA binding parameter Y and physicochemical property parameters

时分子的极性表面积减小,与蛋白的结合作用将增强;在游离羟基数目一定的情况下,相对分子质量增大,将使单位相对分子质量下的分子极性表面积减小,其与蛋白的结合作用将增强。因此,分子中结构中羟基数目和分子体积综合影响 SA-BSA 的相互作用,疏水性和氢键结合能力是与丹参酚酸-BSA 结合程度相关的两个理化特性。

3 讨论

本实验研究结果表明,对于天然的小分子 SA 类化合物,在药物设计中,综合考虑脂-水分配系数和单位相对分子质量下的拓扑分子极性表面积这两个理化参数来预测其与蛋白的结合作用程度,将可以获得切实可靠的参考数据。

参考文献:

- [1] 曹 毅, 韩凤梅, 陈 勇. 电喷雾离子阱质谱法研究射干苷与血浆蛋白的非共价结合[J]. 中草药, 2007, 38(10): 1473-1476
- [2] 周 能, 梁逸曾, 王 平, 等. 荷花碱与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 分析化学, 2008, 36(8): 1066-1070.
- [3] 刘雪锋, 夏咏梅, 曹玉华. 香豆素类中药有效成分与牛血清白蛋白结合的构效关系[J]. 高等学校化学学报, 2006, 27(1): 150-152
- [4] 屈凌波, 王 玲, 陈晓岚, 等. 葛根素及其衍生物与牛血清白蛋白相互作用研究[J]. 化学学报, 2007, 65(21): 2417-2422
- [5] 崔 艳, 陈建秋, 严拯宇. 盐酸土霉素与牛血清白蛋白的相互作用研究[J]. 光谱实验室, 2010, 27(3): 1064-1069
- [6] 黎莲娘, 张均田. 丹参及其同属植物的水溶性活性成分[J]. 医学研究通讯, 2001, 30(7): 1-4
- [7] 张白嘉, 刘 榴. 丹参水溶部分药理研究进展[J]. 中草药, 1996, 27(10): 634-636
- [8] 刘 杰, 高秀梅, 王 怡, 等. 丹酚酸 B 对急性心肌梗死大鼠血流动力学的影响及作用分子机制研究[J]. 中草药, 2006, 37(3): 409-412
- [9] 杨宇杰, 程晓亮, 吕英超, 等. 双氢丹酚酸 B 对大鼠急性心肌梗死的治疗作用[J]. 中草药, 2010, 41(3): 447-449
- [10] Owen C S, Shuler R L. Spectral evidence for non calcium interactions of intracellular $\text{Indo} 1$ [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, 163: 328-333
- [11] Förster T. *Modern Quantum Chemistry* [M]. New York: Academic Press, 1996
- [12] Ross P D, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability [J]. *Biochemistry*, 1981, 20(11): 3096-3102

半夏白术天麻汤提取液的血清指纹图谱研究

王淑玲¹, 孙秀梅², 张兆旺², 谢 恬^{1*}

(1 杭州师范大学 生物医药与健康研究中心, 浙江 杭州 310012; 2 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250014)

摘 要: 目的 比较半夏白术天麻汤 4 种方法提取液的血清指纹图谱。方法 取大白兔, ig 半仿生生物酶提取 (SBEE) 液, 采集不同时刻的血样, 分离含药血清, 用 HPLC 法和 UV 法测定, 将 HPLC 色谱峰数目、峰总面积以及紫外吸光度平均值标准化处理, 加权求和后得综合评判 Y 值, 以 Y 值大者为较佳采血时刻; 然后对 4 种方法提取液此时刻的含药血清进行指纹图谱比较。结果 给药后 2 h 的含药血清综合评判 Y 值最大; 4 种方法提取液 2 h 含药血清以 SBEE 液综合评判 Y 值最大。结论 SBEE 液含药血清较水提法、醇提法、SBE 法提取液含药血清中成分量高。

关键词: 半夏白术天麻汤; 4 种提取液; 含药血清指纹图谱

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)08-1274-06

Comparison of serum fingerprint in extract solution from Banxia Baizhu Tianma Decoction

WANG Shu-ling¹, SUN Xiur-mei², ZHANG Zhao-wang², XIE Tian¹

(1 Biomedicine and Health Institute of Hangzhou Normal University, Hangzhou 310012, China; 2 College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China)

Abstract: Objective Comparing the serum fingerprint of four kinds of extract solution from Banxia

* 收稿日期: 2009-10-29

作者简介: 王淑玲 (1972—), 女, 山东东营人, 讲师、博士, 1995 年获山东中医药大学学士学位, 2005 年获江西中医学院中药学硕士学位, 2009 年获山东中医药大学药学院中药学博士学位, 从事中药新药研究与中药炮制原理研究的科研、教学工作。

Tel: (0671) 28868269 E-mail: wsling000@163.com