

光谱法研究槲皮苷与人血清白蛋白的相互作用

黄芸¹, 崔力剑², 王建明¹, 陈晨¹, 窦玉红², 韩冬¹

1. 河北医科大学药学院 天然药物学教研室, 河北 石家庄 050017

2. 河北医科大学中医学学院 中药药理教研室, 河北 石家庄 050091

摘要: **目的** 研究槲皮苷与人血清白蛋白(HSA)的相互作用, 并探讨葡萄糖对二者结合的影响。**方法** 应用光谱法研究槲皮苷与 HSA 的作用机制, 以双对数方程和能量转移原理计算槲皮苷与 HSA 的结合常数、结合位点数和结合距离; 根据热力学参数判断二者的作用力类型; 用同步荧光光谱考察槲皮苷对 HSA 构象的影响; 观察葡萄糖浓度对反应结合常数和结合位点数的影响。**结果** 槲皮苷对 HSA 的荧光猝灭过程为生成复合物的静态猝灭; 结合常数和结合位点数随温度的升高而降低; 结合距离小于 7 nm; 二者主要以疏水作用力相结合; 槲皮苷与 HSA 的相互作用改变了色氨酸残基所处的微环境; 葡萄糖的加入使结合常数和结合位点数均增加。**结论** 槲皮苷能与 HSA 结合并改变 HSA 的构象, 生理浓度的葡萄糖可增加槲皮苷与 HSA 的结合常数和结合位点数。

关键词: 槲皮苷; 人血清白蛋白(HSA); 荧光猝灭; 同步荧光光谱; 葡萄糖

中图分类号: R283.6; R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2011)04-0676-04

Spectroscopic study on interaction of quercitrin with human serum albumin

HUANG Yun¹, CUI Li-jian², WANG Jian-ming¹, CHEN Chen¹, DOU Yu-hong², HAN Dong¹

1. Department of Natural Medicine, School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China

2. Department of Chinese Medicine Pharmacology, School of Traditional Chinese Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050091, China

Abstract: Objective To study the interaction of quercitrin with human serum albumin (HSA) and the influence of glucose. **Methods** To investigate the interaction mechanism between quercitrin and HSA by spectroscopic method; to calculate the binding constants, binding sites, and binding distance according to double logarithmic plot and Förster's energy transfer theory, respectively; to explain the type of interaction force between quercitrin with HSA by thermodynamic parameters; to discuss the conformation change of HSA via synchronous fluorescence spectra. **Results** The fluorescence quenching mechanism of quercitrin to HSA was static quenching; The binding constants and the number of binding sites decreased with the increasing of temperature and glucose; The distance between the donor and acceptor was less than 7 nm; The hydrophobic forces played a major role in stabilizing quercitrin and HSA complex; The binding reaction had changed the micro-environment of tryptophan residues. **Conclusion** Quercitrin could bind with HSA and change the conformation of HSA; The physiological concentration of glucose increases the binding constants and the number of binding sites of quercitrin with HSA.

Key words: quercitrin; human serum albumin (HSA); fluorescence quenching; synchronous fluorescence spectra; glucose

药物在生物体内的分布、代谢速度受到它们与血清白蛋白(SA)的结合方式、结合程度以及血糖浓度的影响^[1-3]。探讨药物与 SA 的作用机制, 对于深入了解药物活性实质具有指导作用。槲皮苷广泛分布于多种食物和药用植物中, 具有抑制乙酰胆碱酯酶和苏氨酸激酶等作用^[4], 其药效学方面已日益受到关注^[5-6]。槲皮苷与人血清白蛋白(HSA)的相

互作用, 对于阐明槲皮苷在体内的分布、代谢过程均具有重要意义。本实验采用光谱法研究了生理 pH 值条件下槲皮苷与 HSA 的相互作用, 并讨论了葡萄糖对槲皮苷与 HSA 的结合常数和结合位点数的影响, 以期对槲皮苷临床合理应用提供实验依据。

1 仪器与材料

LS—50B 荧光光度计(美国 PE 公司), UV—

收稿日期: 2010-07-02

基金项目: 中国博士后科学基金面上项目(20070410868); 河北省自然科学基金项目(08B033)

作者简介: 黄芸(1974—), 女, 江西上饶市人, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事天然药物活性成分及质量标准研究。

Tel: (0311)86265628 E-mail: hy9317536@126.com

2450 紫外-可见分光光度计 (日本岛津), BS223S 电子天平 (德国赛多利斯公司), CU600 电热恒温水箱 (上海一恒科技有限公司), PWUV 超纯水系统 (香港力康生物医疗科技控股集团), pHs—3C 型酸度计 (上海雷磁仪器厂)。

Tris (Sigma)-HCl 缓冲液 (0.05 mol/L, pH 7.4, 含 NaCl 0.1 mol/L); HSA (Sigma), 取适量用上述缓冲液配制成 0.1 mmol/L 的溶液; 槲皮苷 (批号 111538-200403, 中国药品生物制品检定所) 溶于甲醇-水 (1:1) 中, 配制成 2.50 mmol/L 的溶液; 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 槲皮苷对 HSA 荧光光谱的影响

HSA 的荧光光谱能反映 HSA 分子中氨基酸残基所处微环境及其分布情况、蛋白质高级结构^[7]。由 HSA 发射光谱的特征可知其内源荧光主要表现为分子内色氨酸 (Trp) 残基的发射。在 11 支 5 mL 具塞试管中, 各加入 2.0 mL HSA 溶液, 分别加入 0.0、8.0、16.0、24.0、32.0、40.0、48.0、56.0、64.0、72.0、80.0 μL 槲皮苷溶液, 用微量注射器加 Tris-HCl 缓冲液至 2.08 mL, 将温度分别调至 25、37 $^{\circ}\text{C}$, 激发和发射光谱狭缝宽度均为 5.0 nm, 进行荧光光谱扫描, 记录槲皮苷对 HSA 的荧光猝灭光谱图, 同时记录 $\Delta\lambda=60$ nm 的同步荧光光谱; 紫外-可见分光光度计测定与 HAS 相同浓度的槲皮苷的吸光度值。从图 1 看出, 随着槲皮苷的加入, 342 nm HSA 的最大荧光发射峰逐渐降低。

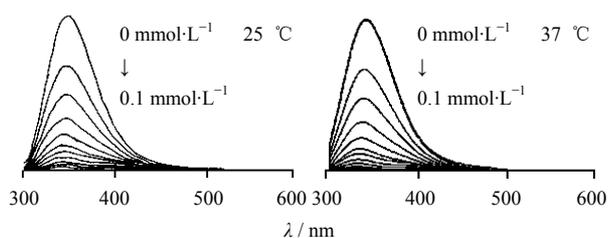


图 1 槲皮苷对 HSA (0.1 mmol/L) 荧光光谱的影响
Fig. 1 Effect of quercitrin on fluorescence spectra of HSA (0.1 mmol/L)

2.2 猝灭机制确定及结合常数、结合位点数的计算

荧光猝灭发生机制可分为动态猝灭和静态猝灭, 动态猝灭是猝灭剂分子和荧光物质激发态分子之间的相互作用。静态猝灭是指猝灭剂分子与荧光分子之间借助分子间力, 彼此结合形成了超分子复合物, 而导致荧光体荧光强度减弱。动态猝灭过程遵循 Stern-Volmer 方程:

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

F_0 、 F 分别为未加入和加入槲皮苷时 HSA 的荧光强度, $[Q]$ 为猝灭剂浓度, K_{SV} 是动态猝灭常数; K_q 为双分子猝灭过程的速率常数; τ_0 为不存在猝灭剂时荧光分子的平均寿命 (约为 10^{-8} s)。

以 F_0/F 对 $[Q]$ 作图 (图 2), 得到不同温度下的 K_{SV} 和 K_q (表 1)。根据 K_{SV} 随温度的变化可以对猝灭机制进行判断。对于动态猝灭, 温度升高有利于猝灭过程进行, K_{SV} 随温度的升高而增大; 而静态猝灭, 温度升高形成的复合物稳定性降低, K_{SV} 减小。由表 1 中的数据可看出, K_{SV} 随温度升高而降低, 可初步判断槲皮苷对 HSA 的荧光猝灭为静态猝灭。同时猝灭剂对生物大分子的 K_q 最大不超过 $2.0 \times 10^{10} \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{s})$ ^[8], 而槲皮苷对 HSA 的 K_q 远大于此值, 进一步表明槲皮苷对 HSA 的荧光猝灭作用主要是其分子与 HSA 的 Trp 残基结合形成了某种特定结构的超分子复合物所引起的静态猝灭。

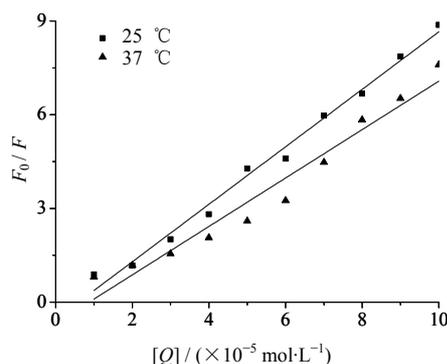


图 2 槲皮苷与 HSA 作用的 Stern-Volmer 曲线
Fig. 2 Stern-Volmer curve of interaction between quercitrin and HAS

根据双对数方程:

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

以 $\lg[(F_0 - F)/F]$ 对 $\lg [Q]$ 作图 (图 3), 得出 HSA 与槲皮苷的结合常数 (K_a) 和结合位点数 (n), 由表 1 可看出, K_a 和 n 均随温度升高而降低, 说明温度升高可能使生成的复合物稳定性降低, 而不利于二者的结合, 与静态猝灭机制相吻合。

2.3 结合距离

根据 Förster 能量转移原理, 当两种化合物满足以下条件时会发生非辐射能量转移: 供能体发射荧光; 供能体荧光发射光谱与受能体吸收光谱有足够的重叠; 供能体与受能体之间的结合距离不超过 7 nm^[9]。

能量转移效率 E 与结合距离 r 之间的关系:

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) = 1 - F/F_0 \quad (3)$$

表 1 不同温度下槲皮苷与 HSA 作用的结合参数

Table 1 Fitting parameters of interaction between quercitrin and HSA at different temperatures

温度/°C	Stern-Volmer 方程			双对数方程		
	$K_{SV}/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$	R	$K_q/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$	$K_a/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$	R	n
25	1.99×10^5	0.970 7	1.99×10^{13}	4.07×10^4	0.999 7	1.72
37	1.46×10^5	0.965 0	1.46×10^{13}	2.55×10^4	0.999 1	1.66

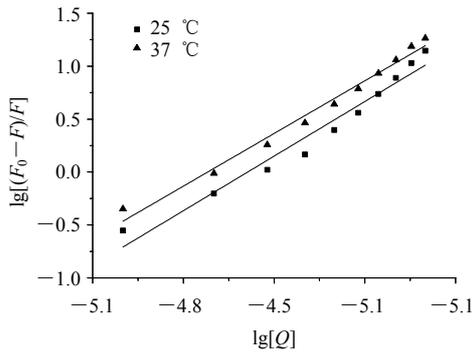


图 3 槲皮苷与 HSA 作用的双对数曲线

Fig. 3 Double logarithmic curve of interaction between quercitrin and HAS

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

E 为能量转移效率, R_0 为能量转移效率为 50% 时的临界距离, r 为供能体与受能体之间的距离, F 为 C_{HSA} 与 $C_{\text{槲皮素}}$ 为 1:1 时 HSA 的荧光强度, K^2 为供能体-受能体偶极空间取向因子, N 为介质的折射指数, Φ 为 HSA 的荧光量子产率, J 为供能体的发射光谱与受能体的吸收光谱的重叠积分。

$$J = (\sum F_{\lambda} \epsilon_{\lambda} \lambda^4 \Delta\lambda) / \sum F_{\lambda} \Delta\lambda \quad (5)$$

其中, F_{λ} 是供能体在波长 λ 处的荧光强度, ϵ_{λ} 是受能体在波长 λ 处的摩尔吸光系数, $\Delta\lambda$ 为计算时分割的波长跨度。

根据 HSA 荧光发射光谱与槲皮苷吸收光谱的叠加图(图 4), 把光谱重叠部分分割成很小的矩形, 依据式 (5) 求得槲皮苷与 HSA 的重叠积分, 将 J 值及 K^2 、 n 、 Φ 值代入式 (4), 即可求出临界距离 $R_0 = 2.77 \text{ nm}$, 计算中 K^2 、 n 、 Φ 分别取 2/3、1.336、0.118。能量转移效率 E 可由 $E = 1 - F/F_0$ 求出, 最后得出 HSA 与槲皮苷之间的结合距离 $r = 1.78 \text{ nm} < 7 \text{ nm}$, 说明 HSA (供能体) 与槲皮苷 (受能体) 之间发生了非辐射能量转移。

2.4 作用力类型的确定

有机小分子和 HSA 之间的结合力主要包括氢键、范德华力、静电引力、疏水作用力等^[10]。根据反应前后热力学参数焓变 (ΔH) 和熵变 (ΔS) 的相对大小, 可以判断小分子与蛋白质间的主要作用

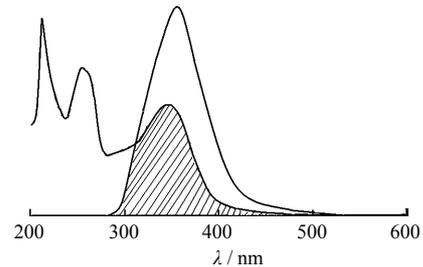


图 4 HSA 的荧光光谱与槲皮苷的吸收光谱的叠加图

Fig. 4 Overlap of HSA fluorescence spectrum with quercitrin absorption spectrum

力类型, $\Delta H > 0$ 、 $\Delta S > 0$ 为典型的疏水作用力; $\Delta H < 0$ 、 $\Delta S < 0$ 为氢键和范德华力; $\Delta H < 0$ 、 $\Delta S > 0$ 为静电作用力。根据热力学关系式, 计算槲皮苷与 HSA 相互作用的热力学参数, 见表 2。 K_1 、 K_2 分别为在 T_1 、 T_2 温度下槲皮苷与 HSA 的结合常数。

$$\ln K_2 / K_1 = \Delta H / R (1/T_1 - 1/T_2) \quad (6)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (7)$$

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (8)$$

表 2 槲皮苷与 HSA 作用的热力学参数

Table 2 Thermodynamic parameters of interaction between quercitrin and HAS

温度/°C	$\Delta H/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$\Delta S/(\text{J}\cdot\text{K}^{-1})$	$\Delta G/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$
25	8.60	0.18	-44.97
37		0.15	-44.64

由结果可知, $\Delta G < 0$ 、 $\Delta H > 0$ 、 $\Delta S > 0$, 表明槲皮苷与 HSA 的相互作用是以疏水作用力结合为主的自发过程。

2.5 槲皮苷对 HSA 构象的影响

在 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 条件下, 扫描 HSA 的同步荧光光谱, 此时主要表现出 Trp 残基的荧光特征^[11]。Trp 残基的最大发射波长与其所处微环境密切相关, 最大发射波长红移, 表明 Trp 残基所处微环境的疏水性降低, 极性增强; 蓝移则表明微环境的极性增强, 疏水性降低。

固定 HSA 的浓度, 随着槲皮苷浓度的增加, 354 nm 处的荧光峰强度逐渐减弱, 436 nm 处荧光

峰发生 22 nm 的红移, 表明槲皮苷与 HSA 发生了相互作用, Trp 残基所处微环境的疏水性降低, HSA 的构象发生了改变 (图 5)。

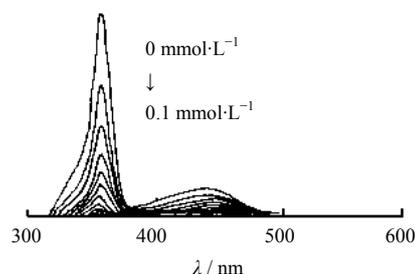


图 5 槲皮苷与 HSA (0.1 mmol/L) 作用的同步荧光光谱图
Fig. 5 Synchronous fluorescence spectra of interaction between quercitrin and HAS (0.1 mmol/L)

2.6 葡萄糖的影响

为考察葡萄糖对槲皮苷与 HSA 相互作用的影响, 本实验测定了 37 °C 下, 葡萄糖浓度为 6.0 mmol/L (正常人体血糖浓度约 3.9~6.1 mmol/L) 时, 槲皮苷与 HSA 作用的 K_a 和 n , 结果分别为 3.61×10^4 L/mol、1.82。与不存在葡萄糖时的测定结果比较, 发现葡萄糖能增加二者的 K_a 和 n 。

3 讨论

在 200~900 nm 扫描 0.1 mmol/L HSA 溶液荧光光谱, 得到 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=280/335$ nm。在此条件下, 考察不同缓冲介质、pH 值及离子强度对 HSA 荧光性质的影响, 结果表明在 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲介质 (pH 7.40) 和 0.1 mol/L NaCl 离子强度下, HSA 的荧光相对比较灵敏且稳定。HSA 溶液在试验浓度下具有适宜的荧光强度, 且荧光强度稳定。同时槲皮苷在系列浓度范围内, 能使 HSA 荧光发生有规律的荧光猝灭, 且线性较好。试验在室温 25 °C 及模拟人体正常体温 37 °C 两个温度进行, 反应的结合参数具有较大的差别。

HSA 分子的构象可受小分子药物诱导而发生改变, 槲皮苷的加入使 HSA 内部的疏水腔结构有所瓦解, 肽链的伸展程度增加。疏水腔“打开”, 有利于槲皮苷进入 HSA 疏水腔内部并与之发生有效结合。同时得出二者结合力为典型的疏水作用力, 说明在槲皮苷分子中, 苷元是与色氨酸发生结合的主要部位, 并且槲皮苷分子正负电荷中心相对较集中, 对外不会表现出较强的偶极距, 否则二者之间会以静电力发生结合。

槲皮苷与 HSA 的相互作用是自发过程, 同时

二者结合的 K_a 值较小, 二者在血液中较容易分离, 使槲皮苷较容易分布到靶组织和代谢, 这与文献报道^[12]的槲皮苷半衰期较短相吻合。

在生理浓度范围内的葡萄糖可改变槲皮苷与 HSA 的结合常数, 这提示在不同个体给药时应充分考虑到血糖浓度对药效的影响。槲皮苷与 HSA 之间的相互作用及葡萄糖影响的研究, 对于揭示槲皮苷活性的实质内涵具有重要意义, 所获结果可为槲皮苷的合理应用提供有益的参考和依据。

参考文献

- [1] Paál K, Müller J, Hegedűs L. High affinity binding of paclitaxel to human serum albumin [J]. *Eur J Biochem*, 2001, 268(7): 2187-2191.
- [2] 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.
- [3] 童俊, 韩凤梅, 陈勇. 荧光猝灭法研究马钱子碱、土的宁与人血清白蛋白的相互作用 [J]. *中草药*, 2010, 41(9): 1453-1456.
- [4] Jiang R W, Wang Y, Gao H, *et al.* Molecular structures and π - π interactions of quercitrin and morusin hydroperoxide [J]. *J Mol Struct*, 2009, 920(1/3): 383-386.
- [5] 李玉兰, 李军, 王乃利, 等. RP-HPLC 法测定小花鬼针草中原儿茶酸、芦丁、金丝桃苷和槲皮苷的含量 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2009, 26(8): 639-643.
- [6] 李钦, 郑晓亮, 陈爱君, 等. 槲皮苷防治溃疡性结肠炎的药效学研究 [J]. *中国现代应用药学*, 2009, 26(3): 180-184.
- [7] 黄芸, 崔力剑, 陈晨, 等. 黄芩素及黄芩苷与牛血清白蛋白结合作用比较研究及葡萄糖的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2010, 26(6): 754-758.
- [8] Ge F, Chen C Y, Liu D Q, *et al.* Study on the interaction between theasinesin and human serum albumin by fluorescence spectroscopy [J]. *J Luminesc*, 2010, 130(1): 168-173.
- [9] Wang T H, Zhao Z M, Wei B Z, *et al.* Spectroscopic investigations on the binding of dibazol to bovine serum albumin [J]. *J Mol Struct*, 2010, 970(1/3): 128-133.
- [10] 黄芸, 崔力剑, 窦玉红, 等. 阿司匹林与人血清白蛋白的相互作用研究 [J]. *中国药理学通报*, 2008, 24(9): 1192-1195.
- [11] Yang J, Jing Z H, Jie J J, *et al.* Fluorescence spectroscopy study on the interaction between Gossypol and bovine serum albumin [J]. *J Mol Struct*, 2009, 920(1/3): 227-230.
- [12] 杨秀岭, 袁志芳, 张兰桐, 等. 照山白总黄酮中杨梅苷、金丝桃苷和槲皮苷在大鼠体内的药动学 [J]. *中国医院药学杂志*, 2009, 29(19): 1610-1614.