

荧光光谱法研究锆离子存在下槲皮素及人血清白蛋白的相互作用

贾宝秀, 李 莉, 葛海燕, 王仁亮

泰山医学院药学院, 山东 泰安 271016

摘要: **目的** 采用荧光光谱法研究有无锆离子(Zr^{4+})共存时槲皮素与人血清白蛋白(HSA)的相互作用。**方法** 于10 mL的比色管中,依次加入0.20 mol/L Tris-HCl缓冲溶液(pH 7.40) 2.50 mL, 0.10 mol/L NaCl溶液 1.0 mL,一定量的HSA溶液, Zr^{4+} 溶液,槲皮素溶液,用二次蒸馏水定容至10 mL。HSA荧光激发/发射波长为281/352 nm,激发和发射光狭缝宽度为3 nm,在波长300~500 nm内记录荧光光谱。**结果** 测得了有无锆离子存在时槲皮素-HSA结合反应的平衡常数和结合摩尔位点数分别为 1.032×10^6 L/mol、 2.964×10^5 L/mol, 1.13、1.07;确定槲皮素-HSA的作用类型为静态猝灭过程。**结论** 锆离子、槲皮素对HSA荧光均有猝灭作用,而且二者共存时对HSA荧光有协同猝灭作用,其猝灭机制为槲皮素与锆离子形成配合物后再对HSA的荧光有猝灭作用,而不是槲皮素和锆离子各自猝灭的简单累加。

关键词: 锆离子; 槲皮素; 人血清白蛋白(HSA); 荧光光谱法; 协同猝灭

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)12-2386-04

Interactions between quercetin and human serum albumin in presence of zirconium ion by fluorescence spectrometry

JIA Bao-xiu, LI Li, GE Hai-yan, WANG Ren-liang

College of Pharmacy, Taishan Medical University, Tai'an 271016, China

Abstract: Objective To study the interactions between quercetin (Qct) and human serum albumin (HSA) with or without zirconium ion (Zr^{4+}) coexisting by fluorescence spectrometry. **Methods** A series of solutions, 0.20 mol/L Tris-HCl buffer solution (pH 7.40) 2.50 mL, 0.10 mol/L NaCl solution 1.0 mL, a certain amount of HSA stock solution, Zr^{4+} solution, Qct solution, and ddH₂O were successively added into a 10 mL colorimetric tubes. The fluorescence excitation/emission wavelengths of HSA was 281/352 nm, the slit width of excitation/emission was 3 nm, and the fluorescence spectrometry of the solution was scanned from 300 to 500 nm. **Results** For Qct- Zr^{4+} -HSA and Qct-HSA, the effective quenching constants (K_a) and binding molar site number were 1.032×10^6 L/mol and 2.964×10^5 L/mol, 1.13 and 1.07, respectively. The interaction between Qct and HSA was static quenching process. **Conclusion** The results show that both Zr^{4+} and Qct have quenching effects on HSA, and coexisting of the both has the synergic quenching effects on HSA. The study on the quenching mechanism reveals that the quenching effects of Qct- Zr^{4+} on HSA is due to the complex of Qct and Zr^{4+} rather than the simple accumulation of respective quenching of Qct and Zr^{4+} .

Key words: zirconium ion (Zr^{4+}); quercetin (Qct); human serum albumin (HSA); fluorescence spectrometry; synergic quenching

活性小分子(如药物)与生物大分子(如蛋白质)作用并调控生命功能是化学生物学的核心研究内容。荧光光谱法具有检测灵敏度高、操作简便等优点,在小分子-生物大分子相互作用等化学生物学研究中应用广泛^[1-2]。人血清白蛋白(HSA)是血浆中最为丰富的蛋白质,它能与许多内源及外源性化合物结合,起到存储与转运的作用。槲皮素(quercetin, Qct)是一种植物中广泛存在的生理及药理活性显著

的多羟基黄酮类化合物,具有防治心血管疾病、增强免疫、抗癌、抗菌、抗炎、抗病毒等功能^[3-5],受到广泛关注^[6]。其中槲皮素与生物大分子的相互作用成为研究的焦点^[7-9]。然而,上述研究均只针对理想状况下槲皮素与生物大分子的相互作用。在生命体内存在大量金属离子,这些离子势必对槲皮素与生物大分子的相互作用产生影响。HSA的氨基酸残基能够提供配位原子氧和氮,当体系中存在金属离

收稿日期: 2012-04-20

基金项目: 泰安市科技发展计划项目(20120254)

作者简介: 贾宝秀(1979—),女,硕士,主要从事药物分析的研究。E-mail: jiabaoxiu@163.com

网络出版时间: 2012-10-15 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20121015.1348.001.html>

子时, HSA 可通过氧和氮的配位作用与金属离子相结合。另一方面, 在槲皮素分子中, A 环和 C 环的酚羟基也可与金属离子配位, 在一定条件下, B 环上的羰基也可能参与对金属离子的配位。可见, 金属离子的存在可能影响药物分子(槲皮素)与 HSA 的相互作用。本课题组曾考察了铝、锌、铜、锆等几种离子与槲皮素的作用, 发现锆离子作用比较明显, 因此选择了锆离子存在下槲皮素和 HSA 的相互作用作为研究对象。迄今为止, 在锆离子(Zr^{4+})存在下研究槲皮素与蛋白质作用尚未见报道。

本实验通过荧光光谱法研究了锆离子存在下槲皮素和 HSA 的相互作用, 揭示在锆离子存在下槲皮素与 HSA 之间的作用规律, 为探索其在体内的转运过程及其药物机制提供有价值的信息。

1 仪器和材料

RF—5301 型荧光分光光度计、紫外可见分光光度计(日本, 岛津公司); pH—3C 酸度计(上海雷磁仪器厂)。

HSA(美国 Sigma 公司); 槲皮素(批号 100081-200907, 中国药品食品检定研究所); Tris-HCl 缓冲溶液: 0.20 mol/L, pH 7.40; 0.10 mol/L NaCl 溶液。水为二次蒸馏水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

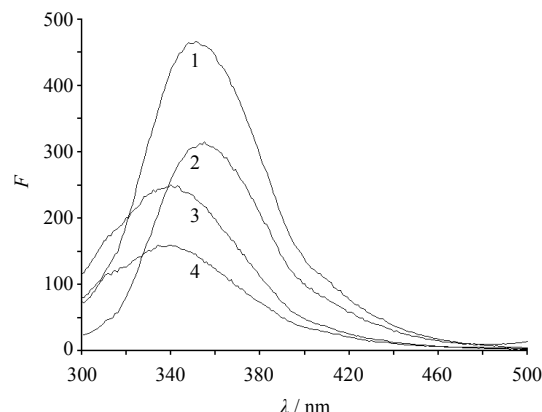
称取适量固体 HSA, 用 Tris-HCl 溶液定容到 10 mL 量瓶中, 得到 0.1 mmol/L HSA 溶液, 在 4 °C 条件下保存。

取适量槲皮素, 用 95%乙醇溶解, 定容到 250 mL 量瓶中, 得到 1 mmol/L 储备液。

称取 ZrO_2 适量, 加浓盐酸数滴加热溶解, 待水分蒸发近干, 用 10%盐酸定容至 250 mL 量瓶中, 得到 0.01 mmol/L $ZrCl_4$ 溶液。

2.2 槲皮素、锆离子、槲皮素-锆离子对 HSA 荧光光谱的影响

取 4 只 10 mL 比色管, 依次加入 Tris-HCl 2.5 mL, NaCl 1.0 mL, 分别加入一定量的 HSA 溶液、HSA- $ZrCl_4$ 溶液、HSA-槲皮素溶液、HSA- $ZrCl_4$ -槲皮素溶液, 用二次蒸馏水定容至 10 mL。HSA 荧光激发/发射波长为 281/352 nm, 激发和发射光狭缝宽度为 3 nm。在波长 300~500 nm 内记录荧光光谱, 得到的荧光曲线, 见图 1。可以看出, 槲皮素、锆离子对 HSA 均有猝灭作用; 而且两者可协同猝灭 HSA 的荧光; 锆离子可以引起 HSA 荧光发射波长



1-HSA 2-HSA-槲皮素 3-HSA-锆离子 4-HSA-槲皮素-锆离子
1-HSA 2-HSA-Qct 3-HSA- Zr^{4+} 4-HSA-Qct- Zr^{4+}

图 1 槲皮素、锆离子、槲皮素-锆离子对 HSA 的荧光猝灭作用 ($C_{HSA}=1.0 \mu\text{mol/L}$, $C_{Qct}=10 \mu\text{mol/L}$, $C_{Zr^{4+}}=10 \mu\text{mol/L}$, pH 7.40)

Fig. 1 Fluorescence quenching effects of Qct, Zr^{4+} , and Qct- Zr^{4+} on HSA ($C_{HSA}=1.0 \mu\text{mol/L}$, $C_{Qct}=10 \mu\text{mol/L}$, $C_{Zr^{4+}}=10 \mu\text{mol/L}$, pH 7.40)

紫移。说明锆离子与 HSA 之间可能发生了结合作用, 两者的产物与槲皮素作用引起 HSA 荧光的猝灭。HSA 的内源性荧光主要来自于色氨酸和酪氨酸残基, 槲皮素与 HSA 的作用只影响酪氨酸微区的构象, 不影响色氨酸微区的构象, 随着锆离子的加入, 色氨酸荧光猝灭, 色氨酸、酪氨酸两残基间的能量传递受阻, 逐渐出现原来被掩盖的酪氨酸短波长的荧光, 故观察到荧光峰发生比较大的紫移现象。

2.3 槲皮素与 HSA 的相互作用

在选定的实验条件 ($\lambda_{em}=352 \text{ nm}$, $T=293 \text{ K}$, pH 7.40) 下, 对 HSA 溶液 ($1.0 \mu\text{mol/L}$) 进行荧光光谱扫描, 发现在约 352 nm 处有一发射峰。在保持 HSA 浓度固定不变的情况下, 随着槲皮素浓度 (0、2.0、5.0、10、20、40、60、80、100、120 $\mu\text{mol/L}$) 的增加, HSA 荧光有规律地降低, 且峰位置及峰形基本保持不变(图 2)。这说明槲皮素和 HSA 之间形成了非荧光性的复合物, 使得 HSA 的荧光强度降低。

2.4 锆离子存在下槲皮素对 HSA 荧光光谱的影响

在“2.3”同样的实验条件下, 随着槲皮素-锆离子浓度 (0、2.0、5.0、10、20、40、60、80、100 $\mu\text{mol/L}$) 的增加, HSA 的荧光强度较单用槲皮素降低更明显, 且激发峰与发射峰的峰形基本不变, 但发生了较大的紫移现象(图 3), 说明槲皮素-锆离子对 HSA 荧光有猝灭作用。

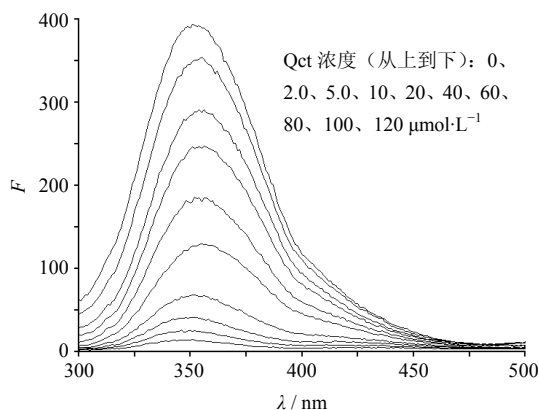


图2 不同浓度槲皮素对HSA的荧光猝灭

Fig. 2 Fluorescence quenching effects of Qct at different concentration on HSA

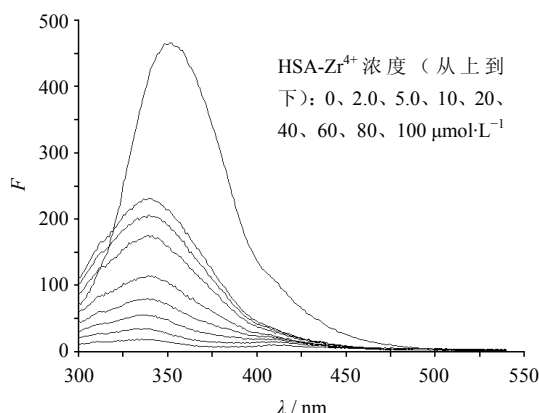


图3 不同浓度槲皮素-锆离子对HSA的荧光猝灭

Fig. 3 Fluorescence quenching effects of Qct-Zr⁴⁺ at different concentration on HSA

2.5 槲皮素对HSA荧光猝灭的机制研究

荧光强度被猝灭的原因有3种：动态猝灭、静态猝灭和非辐射能量转移。一般情况下，动态和静态猝灭可依据不同温度条件下的结果得以区别；对动态猝灭，温度的升高将增加分子间的有效碰撞和加剧电子转移过程，使荧光猝灭常数随温度的升高而增大；若是静态猝灭，则温度的升高将降低配合物的稳定性，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以用动态猝灭常数 K_{SV} (Stern-Volmer 常数)^[10]来描述： $F_0/F = 1 + K_q\tau_0[Q] = 1 + K_{SV}[Q]$ ，其中 F_0 是加入药物前 HSA 溶液的荧光发射总量， F 是加入药物后 HSA 溶液的荧光发射总量， $[Q]$ 是药物的总浓度， K_{SV} 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到达动态平衡时的量效关系； K_q 为双分子表观猝灭常数，其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 $2.0 \times 10^{10} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ ； τ_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 $1 \times 10^{-8} \text{ s}$ 。

按照实验方法测出加入不同浓度的槲皮素后 HSA 荧光强度的变化，绘制 HSA 荧光猝灭的 Stern-Volmer 曲线 (图 4)，由该直线斜率求出该体系的猝灭常数 K_q 为 $4.327 \times 10^{12} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ ，远大于 $2.0 \times 10^{10} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ ，由此可推断，槲皮素对 HSA 荧光的猝灭不是动态碰撞引起的，而是由于药物和蛋白形成了配合物而导致的静态猝灭。这一结论，与文献报道一致^[11]。

由静态猝灭公式 $\lg[(F_0 - F)/F] = \lg K + n \lg [Q]$ ，以 $\lg[(F_0 - F)/F]$ 对 $\lg [Q]$ 作图可得槲皮素对 HSA 荧光猝灭的 Lineweaver-Burk 图 (图 5)。由直线斜率和截距求出槲皮素和 HSA 的结合常数 K 为 $2.964 \times 10^5 \text{ L}/\text{mol}$ 、结合位点数为 1.07。由所得的结合常数可以看出，槲皮素与 HSA 之间有较强的

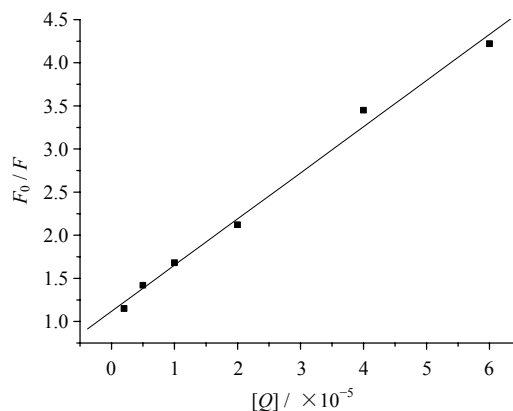


图4 槲皮素对HSA荧光猝灭的Stern-Volmer曲线

Fig. 4 Stern-Volmer curve of fluorescence quenching effect of Qct on HSA

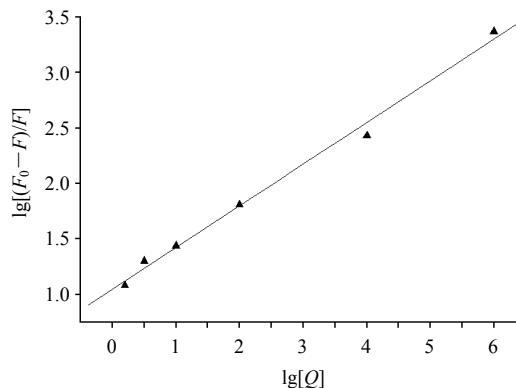


图5 槲皮素对HSA荧光猝灭的Lineweaver-Burk图

Fig. 5 Lineweaver-Burk curve of fluorescence quenching effect of Qct on HSA

结合作用。

2.6 槲皮素-锆离子对 HSA 荧光猝灭的机制研究

按同样方法绘制 HSA 荧光猝灭的 Stern-Volmer 曲线, 由该直线斜率得到槲皮素-锆离子猝灭 HSA 的猝灭常数 K_q 为 $7.854 \times 10^{12} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$, 也远大于 $2.0 \times 10^{10} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$, 结果表明, 同槲皮素一样, 槲皮素-锆离子以形成配合物的方式静态猝灭 HSA 的内源性荧光, 锆离子在一定范围内对槲皮素与人血清白蛋白的结合起着重要的作用。

以 $\lg[(F_0 - F)/F]$ 对 $\lg C_{\text{Qct-Zr}^{4+}}$ 作图, 得一直线, 由直线斜率和截距求出槲皮素-锆离子和 HSA 的结合常数为 $1.032 \times 10^6 \text{ L}/\text{mol}$ 、结合位点数为 1.13。由所得的结合常数可以看出, 槲皮素-锆离子和 HSA 之间有较强的结合作用, 较槲皮素与 HSA 之间的更强。

2.7 两个体系对 HSA 荧光猝灭的机制比较研究

将槲皮素-HSA、槲皮素-锆离子-HSA 体系的结合参数进行比较 (表 1): (1) 槲皮素-锆离子对 HSA 的猝灭程度和猝灭常数强于单独槲皮素; (2) 槲皮素-锆离子-HSA 的结合常数大于槲皮素-HSA 的结合常数; (3) 槲皮素-锆离子-HSA 的结合位点数略多于槲皮素-HSA 的结合位点数。

表 1 2 个体系结合参数的比较

Table 1 Comparison on binding parameters of Qct-HSA and Qct-Zr⁴⁺-HSA

体 系	猝灭常数 / ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	结合常数 / ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$)	结合位 点数
槲皮素-HSA	4.327×10^{12}	2.964×10^5	1.07
槲皮素-锆离子-HSA	7.854×10^{12}	1.032×10^6	1.13

3 讨论

2 个体系的参数存在明显的差异, 这可能是因为: (1) 槲皮素和锆离子协同猝灭 HSA 的荧光, 即 HSA 荧光的猝灭是两者各自猝灭的累加; (2) 槲皮素与锆离子形成配合物后再对 HSA 的荧光有猝灭作用。针对可能的这两种机制, 设置实验予以探讨。一方面, 配制系列槲皮素、锆离子和槲皮素-锆离子的溶液, 加入到相同浓度的 HSA 溶液中, 再按照实验方法测定 HSA 的荧光强度。结果表明, 在相同浓度的情况下, 3 个体系对 HSA 荧光的猝灭程度大不相同, 以槲皮素-锆离子最强、锆离子次之、槲皮素最弱, 并且槲皮素-锆离子体系对 HSA 荧光的减弱值明显大于相同浓度下槲皮素和锆离子对

HSA 荧光减弱值的加和。这说明, 槲皮素-锆离子猝灭 HSA 的荧光不是槲皮素和锆离子各自猝灭的简单累加。另一方面, 实验中考察了样品加入方式对 HSA 荧光猝灭的影响, 分别采用槲皮素和锆离子混合后加入 HSA 溶液、锆离子加入 HSA 溶液混合后再加槲皮素溶液、槲皮素加入 HSA 溶液混合后再加锆离子溶液等 3 种方式。结果表明, 槲皮素与锆离子混合对 HSA 荧光的减弱值最大, 其他两种方式的减弱值基本相仿但与前者有较大的差别。

基于上述分析, 在所研究的三元体系中, 槲皮素与锆离子形成配合物, 锆离子的存在促进了槲皮素与 HSA 的相互作用, 这可能就是药物在生理条件和金属离子的存在下更易被蛋白质储存和运输的原因, 本研究为探索其在体内的转运过程及其药物机制提供有价值的信息。

参考文献

- [1] 李玉琴, 贾宝秀, 冀海伟, 等. 左旋紫草素与溶菌酶相互作用的研究 [J]. 分析测试学报, 2009, 28(5): 544-549.
- [2] 李玉琴, 贾宝秀, 姚晓军, 等. 光谱法与分子模拟对左旋紫草素和人血白蛋白键合作用的研究 [J]. 分析测试学报, 2009, 28(12): 1396-1400.
- [3] 吕 蔡, 张 杰. 槲皮素的药理作用 [J]. 国外医药: 植物药分册, 2005, 20(3): 108-112.
- [4] 赵雪英, 顾振纶. 槲皮素对培养内皮细胞产生和释放内皮素和环磷酸鸟苷的影响 [J]. 中国药理学报, 1996, 17(5): 442-447.
- [5] 龚 珊, 张玉英, 俞光第, 等. 槲皮素镇痛作用的观察 [J]. 中草药, 1996, 27(10): 612-613.
- [6] Rice-Evans C. Flavonoid antioxidants [J]. *Curr Med Chem*, 2001, 8(7): 797-807.
- [7] 廖卫平, 司芝坤. 荧光光谱法研究槲皮素与牛血清白蛋白的相互作用 [J]. 烟台大学学报: 自然科学与工程版, 2006, 19(1): 20-24.
- [8] 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.
- [9] 王 春, 吴秋华, 王 志, 等. 槲皮素与牛血清白蛋白相互作用的研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2006, 26(9): 1672-1675.
- [10] 陈国珍, 黄贤智, 许金钧, 等. 荧光分析法 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1990.
- [11] 王 玲, 屈凌波, 杨 冉, 等. 槲皮素和芦丁与牛血清白蛋白相互作用研究 [J]. 分析科学学报, 2006, 22(6): 719-722.