

• 药理与临床 •

松果菊苷的血清蛋白质结合机制研究

郭 明*, 许建婷, 范文翔

浙江农林大学理学院, 浙江 临安 311300

摘要: 目的 研究血清白蛋白 (serum albumin, SA) 结合松果菊苷 (echinacoside, ECH) 的分子作用机制。方法 生理条件下, 光谱法测定药物与蛋白质的结合参数, 分子模拟构建 ECH 与牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 的结合模型, 考察药物与 SA 结合机制。结果 构建的药物与 BSA 结合模型表明, 药物与蛋白质的相互作用力主要是氢键和范德华力, 兼有疏水作用力。光谱实验表明 ECH 与 BSA 的相互作用为静态结合过程, 结合强度较强, ECH 与 BSA 分子的结合距离 (r) 值较小, 说明发生了能量转移现象。ECH 对 BSA 的结构域微区构象产生影响, 使结合位域的疏水性发生改变。分析荧光相图得出 ECH 与 BSA 反应构象型态的变迁为“二态”模型。BSA 与 ECH 相互作用的热力学参数表明 ECH 与 BSA 之间是以氢键和范德华力为主的分子间作用。荧光偏振定量证明了 BSA 与 ECH 相互作用过程中生成了非共价复合物。结论 光谱实验与计算机模拟结果一致, 可为研究 ECH 与 BSA 相互作用机制提供一定的参考。

关键词: 松果菊苷; 血清白蛋白; 光谱实验; 分子模拟; 荧光偏振定量

中图分类号: R96 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)09-1270-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.09.014

Binding mechanism between bovine serum albumin and echinacoside

GUO Ming, XU Jian-ting, FAN Wen-xiang

School of Science, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an 311300, China

Abstract: **Objective** To explore the binding mechanism between echinacoside (ECH) and serum albumin (SA). **Methods** The binding parameters were detected by spectrum experiment under physiological conditions, and the molecular modeling techniques had been used to investigate the binding mechanism between ECH and bovine serum albumin (BSA). **Results** Molecular docking revealed that ECH binded to BSA mainly by hydrogen bonds and van der Waals forces, and there was a hydrophobic interaction. The results from spectroscopy indicated that the drug could bind with BSA to form static complex with significantly strong bond. The value of binding distances (r) was low, which indicated the occurrence of energy transfer. ECH affected the conformation of micro-domain and changed the hydrophobicity of the binding domain. The fluorescence phase diagram revealed that the changes on the conformational pattern of proteins had been affected by drug conformed to the “all-or-none” pattern. According to the obtained thermodynamic parameters, it also showed that the main interactional force of ECH binding with BSA was hydrogen bonds and van der Waals forces. The fluorescence polarization proved quantitatively that ECH-BSA generated a non-covalent complex. **Conclusion** The experimental results agree with computer molecular modeling, which provides helpful reference for the interaction mechanism of ECH binding with BSA.

Key words: echinacoside; serum albumin; spectrum experiment; molecular simulation; fluorescence polarization quantitation

松果菊苷 (echinacoside, ECH), 又称海胆苷 (误名)、紫锥花苷, 为苯乙醇苷类化合物, 是管花肉苁蓉的有效成分之一。研究表明, ECH 具有明显的神经保护作用, 主要表现为抗活性氧自由基损伤。

同时, 其具有抗神经细胞凋亡、保护肝脏、抗炎、抗肿瘤、延缓衰老、促血管舒张活性、促进组织愈合、改善免疫调节等功能^[1-2], 其分子式为 $C_{35}H_{46}O_{20}$ 。目前, ECH 与血清白蛋白 (serum albumin, SA)

收稿日期: 2013-11-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20877072); 浙江省自然科学基金资助项目 (Y2100458)

*通信作者 郭 明, 男, 教师, 主要从事药物分析与分子作用机制研究。Tel: (0571)63740852 E-mail: guoming@zafu.edu.cn

的相互作用研究尚未见文献报道。

SA 是血浆中量最丰富的蛋白质,具有贮运内源代谢产物和外源药物分子等重要生理功能^[3]。SA 相对分子质量较小,溶解性较大、稳定性较好、与配体具有较好的亲和性,比较易于分离、提纯,可大量制备,且其三级结构已被人类所探知,常作为药物与蛋白质分子相互作用研究中的模型大分子。不同动物种类 SA 的分子结构、功能有差别,人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)与牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)的氨基酸序列高度相似,BSA 及 HSA 与药物的相互作用具有共性特征,而 BSA 价廉易得,因此,BSA 是理想的模型蛋白质分子。BSA^[4-6]是由 582 个氨基酸残基组成的单肽链蛋白质,其空间结构由 3 个结构域组成,每个结构域由 2 个亚结构域以槽口相对的方式形成圆筒结构,几乎所有的疏水性氨基酸残基都分布于圆筒的内部构成 3 个疏水腔。HSA 是由 585 个氨基酸组成的单肽链蛋白质,由 3 个相似结构域组成(I~III):结构域 I(残基 1~195),结构域 II(残基 196~383),结构域 III(残基 384~585),每个结构域又包含 2 个相似螺旋结构的亚域(A 和 B),6 个亚域聚集在一起,形成不对称的心型分子,HSA 分子内含有 18 个酪氨酸残基,唯一的色氨酸残基(Trp214)位于亚结构域 II-A。与 HSA 不同的是,BSA 缺失 HSA 氨基酸序列的 116 位和 585 位残基,以及 BSA 在 134 位及 213 位各含 1 个色氨酸残基。BSA 与 HSA 均具有广泛的应用价值,分析生理条件下药物与 BSA 的相互作用,可以获得药物的药效学信息,深入阐明药物结合机制,也有助于为 HSA-药物结合机制的深入分析提供理论参考。

本实验基于光谱法结合分子模拟技术研究了中药活性成分 ECH 与 BSA 的相互作用,从获得的光谱数据确定了它们的结合反应常数、热力学常数及药物对蛋白质构象的影响,从分子水平上阐释 ECH 和 BSA 相互作用的机制,进而为分析 ECH 的药效作用机制提供参考。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

BSA(质量分数≥98%)、三羟甲基氨基甲烷(Tris, GR),上海华美生物工程公司;ECH(质量分数≥98%),上海浩然生物技术有限公司;其他试剂均为分析纯,实验用水为亚沸蒸馏去离子水。配制浓度为 0.1 mol/L pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液(内含 0.10 mol/L

NaCl 维持离子强度),用此缓冲溶液配制浓度为 10.0 μmol/L BSA 和浓度为 1.0 mmol/L ECH 贮备溶液。

ZD—2 型精密酸度计,上海雷磁仪器厂;F—4500 型荧光光度计,日本 Hitachi 公司;UV—2450 型紫外-可见分光光度计,日本 Shimadzu 公司;SGI O2 计算机图形工作站,DOCK 软件(4.02 版本)。

1.2 分子模拟

利用 SGI O2 工作站的 DOCK 4.02 程序包建立药物与蛋白质相互作用模型,进行分子模拟计算。受体蛋白 BSA 的晶体结构来源于 PDB 蛋白质晶体数据库,编码 4F5S。ChemDraw 构建 ECH 的分子结构,基于分子力学 MM2 力场优化后利用 Gaussian 量化计算优化生成实验分子模型,分子对接预处理时使用 AutoDock Toolkit (ADT) 进行受体与配体的优化处理。分子对接技术对配体的不同取向进行定位,以经验势能函数作为评价函数,找到配体与受体的最佳结合方式,进而确认 BSA 活性部位^[7]。

1.3 实验方法

1.3.1 BSA 与 ECH 溶液的荧光光谱及 ECH 溶液的吸收光谱测定 移取 2.5 mL BSA 溶液于 1 cm 的石英比色皿中,微量进样器逐次加入 1.0 mmol/L ECH 溶液进行荧光滴定(滴定剂累加体积≤100 μL),缓冲溶液进行荧光空白校正,测定时荧光发射与激发狭缝宽度均为 2.5 nm,波长扫速 1 200 nm/min,固定激发波长 282 nm,室温下绘制 250~900 nm 的发射光谱;荧光光谱仪扫描激发波长和发射波长之间的波长差(Δλ)分别为 15、60 nm 的上述溶液体系的同步荧光光谱。发射与激发狭缝宽度同上,扫速 240 nm/min,Tris-HCl 缓冲溶液进行荧光空白校正。

1.3.2 荧光偏振光谱测定 固定激发波长为 282 nm,先以垂直偏振光激发样品,分别检测荧光的垂直偏振分量(I_{VV})和水平偏振分量(I_{VH});再以水平偏振光激发样品,检测荧光的垂直偏振分量(I_{HV})和水平偏振分量(I_{HH});室温下绘制 250~900 nm 的荧光偏振光谱。移取 2.5 mL Tris-HCl 缓冲溶液于 1 cm 石英比色皿中,微量进样器加入 1.0 mmol/L ECH 溶液,使其浓度为 10.0 μmol/L,测定 500~190 nm 紫外吸收光谱,扫速 60 nm/min 扫描,狭缝宽度 2.5 nm,缓冲溶液定基线。

2 结果与讨论

2.1 分子模拟研究

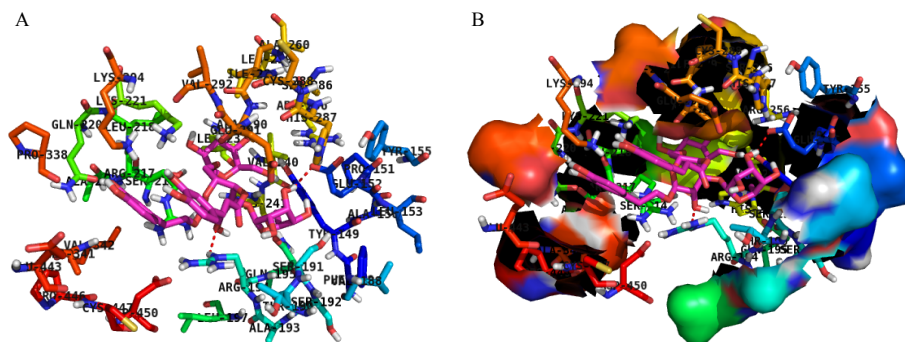
分子模拟构建 ECH 与 BSA 相互作用的结合反应模型时,分别考虑 BSA 的 Sudlow's sites I、sites

II^[8]、6 个脂肪酸结合位点及 triethylene glycol 药物结合位点进行 ECH 分子对接的模拟计算工作。分子对接 ECH 与 BSA 的结合模型见图 1。

由图 1 可见, ECH 分子结合在 BSA 的表面活性口袋处。ECH 分子距 BSA 酪氨酸残基 (Tyr149 和 Tyr155) 和苯丙氨酸 (Phe148) 很近, 这解释了 ECH 猝灭 BSA 内源荧光现象。同时, ECH 分子与 BSA 结合过程中, ECH 分子中 B 环上与 C 环对位的羟基氧原子与 Glu152 发生氢键相互作用, C 环上的羟基氧原子与 Arg194 发生氢键相互作用; 另一方面, ECH 非共价结合在 BSA 活性位点域, 其结

合口袋周围主要由 Leu153、Leu197、Leu218、Leu237、Leu259、Ala150、Ala193、Ala216、Ala260、Ala290、Ala341、Phe148、Val188、Val240、Val292、Val342、Ile289、Pro151、Pro338、Pro446 氨基酸残基形成疏水区域, 由分子模拟结果可知氢键及范德华力起主要作用, 是该药物与蛋白质分子结合的主要驱动力, 同时也兼有疏水作用的存在。

由分子模拟结果可知, ECH 与 BSA 的主要作用力为氢键和范德华力, 兼有疏水作用力的存在, 为验证 ECH 与 BSA 的键合机制和键合方式, 通过光谱实验来进一步证实分子模拟的合理性。



只显示配体周围 1.00 nm 的残基, BSA 与配体结构用棍棒模型表示, 其中红色的代表氧, 红色虚线代表配体和蛋白质之间的氢键 only residues around 1.00 nm of the ligand are displayed. The residues of BSA and the ligand structure are represented using stick model, there into red sticks represented oxygen. The hydrogen bond between the ligand and the protein is represented using red dashed line

图 1 ECH 与 BSA 相互作用的分子对接图 (A) 及疏水表面图 (B)

Fig. 1 Molecular docking mode (A) and hydrophobic surface map (B) of interaction between ECH and BSA

2.2 BSA 与 ECH 相互作用荧光光谱及结合反应机制

图 2 为 BSA、ECH 及二者以等物质的量混合体系的荧光光谱。在 282 nm 激发波长下, BSA 最大发射波长为 342 nm, 而由 ECH-BSA 体系荧光光谱可以看出, 药物的加入使 BSA 的荧光强度 (F) 降低, 表明药物与 BSA 间存在着相互作用, 发生了能量转移。

图 3 为 ECH-BSA 的紫外吸收差谱, 可以发现 BSA 的紫外吸收曲线及 BSA-ECH 等摩尔混合物与 ECH 的差谱几乎完全重合, 表明 ECH 的加入并未使 BSA 的紫外吸收发生变化。同时由图 2 可见, ECH 在 282 nm 激发波长及 342 nm 发射波长下没有吸收, 因此, 可不考虑内滤光效应。

图 4 为 BSA 荧光发射谱随 ECH 浓度的变化图。分析图 4 可知, a 峰为 BSA 的一级荧光峰, 从图中可以看出随着药物的加入, a 峰逐渐降低; b 峰为激发峰的二级倍频荧光峰; c 峰为 BSA 的二级倍频荧光峰。在固定 BSA 浓度的条件下, 随着反应体系中药物浓度增大, BSA 的荧光强度呈规律性的降低, 这表明药物对 BSA 有猝灭作用。荧光最大发射峰值

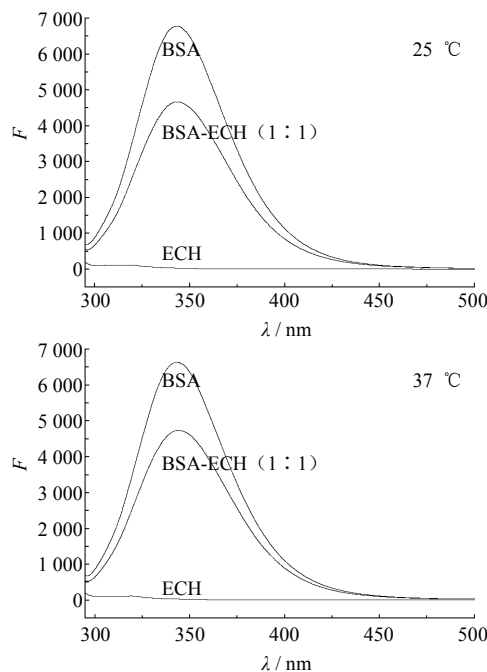


图 2 BSA-ECH 体系中各试样的荧光图谱

Fig. 2 Fluorescence emission spectra of BSA-ECH solution system

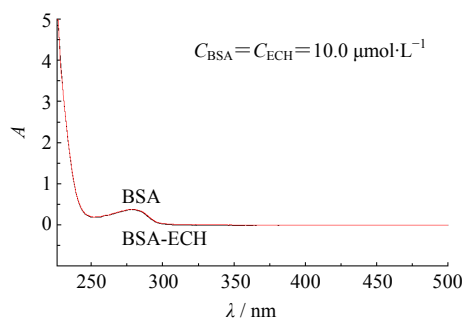


图3 ECH-BSA 的紫外吸收差谱

Fig. 3 UV absorption difference spectrum of ECH-BSA

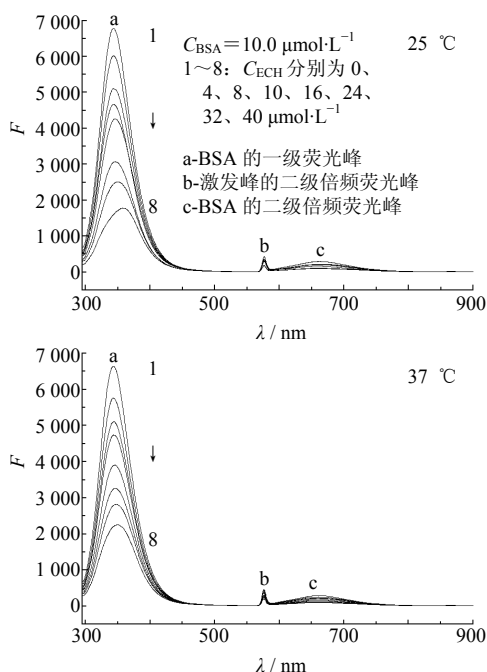


图4 BSA 与 ECH 相互作用的荧光图谱

Fig. 4 Fluorescence quenching spectra of BSA interacting with ECH

置出现了红移, 25 °C 时红移为 15 nm, 37 °C 时为 8 nm, 说明 ECH 和 BSA 确实存在相互作用, ECH 猝灭了 BSA 氨基酸残基的内源荧光, 造成 BSA 分子中与 ECH 相互作用的氨基酸残基的微区环境发生一定变化。

蛋白质与药物分子相互作用的荧光猝灭过程通常分为静态猝灭与动态猝灭, 动态猝灭过程遵循 Stern-Volmer 方程。静态猝灭是猝灭剂与荧光体分子在基态时生成不发光的复合物, 由静态猝灭的实验数据可以求取结合参数。首先按 Stern-Volmer^[9] 方程 $[F_0/F = 1 + K_q\tau_0[D] = 1 + K_{SV}[D]]$, 式中 K_q 为双分子猝灭过程速率常数; τ_0 为猝灭剂不存在时生物大分子的平均荧光寿命; $[D]$ 为猝灭剂 ECH 的浓度;

K_{SV} 为 Stern-Volmer 猝灭常数, 即双分子猝灭过程速率常数 (双分子猝灭过程速率常数 $K_q = K_{SV}/\tau_0$) 与单分子衰变速率常数的比率] 处理上述体系。由实验测得 ECH 与 BSA 相互作用的荧光光谱数据, 按 Stern-Volmer 方程处理可得图 5。

由于无猝灭剂时生物大分子的 τ_0 为 10^{-8} s 数量级^[10], 则由实验数据可以通过 Stern-Volmer 方程计算不同温度下 ECH-BSA 相互作用的猝灭常数 K_{SV} 、 K_q , 计算结果列于表 1。

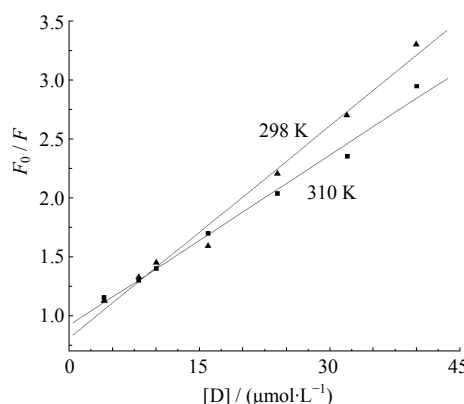


图5 ECH 对 BSA 荧光猝灭的 Stern-Volmer 图

Fig. 5 Stern-Volmer curves of BSA fluorescence quenching by ECH

表1 BSA 与 ECH 相互作用的猝灭参数

Table 1 Quenching constants of ECH binding with BSA

T / K	$K_{SV} / (L \cdot mol^{-1})$	$K_q / (L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1})$	R
298	5.9965×10^4	5.9965×10^{12}	0.993 3
310	4.8120×10^4	4.8120×10^{12}	0.995 0

目前, 生物大分子与活性小分子相互作用的荧光猝灭机制研究中, 常用 2 种方法判定荧光猝灭机制, 一种方法是比较双分子猝灭过程速率常数与猝灭剂对生物大分子最大扩散碰撞猝灭速率常数 ($2.0 \times 10^{10} L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$) 来间接判断荧光猝灭机制^[11]; 另一种方法是通过变温实验直接推断荧光猝灭机制^[12]。由表 1 结果可知, ECH 对 BSA 荧光猝灭的 Stern-Volmer 曲线有良好的线性关系, K_q 值远大于 $2.0 \times 10^{10} L / (mol \cdot s)$, 说明 ECH 对 BSA 的猝灭是由于形成了复合物而引起的静态猝灭。另外, 在不同温度下作 ECH 对 BSA 荧光猝灭的 Stern-Volmer 图 (图 5)。由图 5 可见, 在选定的浓度范围内, 随着温度升高, 猝灭常数呈降低趋势, 进一步确定了 ECH 对 BSA 的猝灭机制为静态猝灭。由此 2

个结果可以确定 ECH 与 BSA 的荧光猝灭机制为静态猝灭。

2.3 ECH 与 BSA 相互作用的结合常数 (K) 及结合位点数 (n)

由实验数据分析得到 ECH 与 BSA 相互作用的动态荧光猝灭机制, 则由荧光分子荧光强度-猝灭剂浓度关系得出结合参数的理论计算公式^[13]: $\lg[(F_0-F)/F] = \lg K + n \lg [D]$, 式中 F_0 与 F 分别为猝灭剂加入前后荧光分子的相对强度, K 是结合常数, n 是结合位点数。因为加入的 ECH 溶液体积远小于比色皿中溶液体积, 可以合理采用猝灭剂的总浓度 $[D]$ 代替 $[D]$ 。以 $\lg[D]$ 对 $\lg[(F_0-F)/F]$ 作双对数图 (图 6), 求得 K 和 n 值, 结果列于表 2。

表 2 BSA 与 ECH 的结合参数

Table 2 Binding parameters of ECH and BSA binding

T/K	$K/(L \cdot mol^{-1})$	n	拟合方程	R	SD	显著性
298	9.9545×10^5	1.28	$Y = 5.9980 + 1.2775X$	0.9928	0.0602	$P < 0.0001$
310	1.2030×10^5	1.10	$Y = 5.0803 + 1.0951X$	0.9988	0.0214	$P < 0.0001$

由图 6 结合表 2 可见, ECH 与 BSA 之间存在结合强度较强的相互作用, ECH 与 BSA 存在 1 个结合位点, 说明 ECH 分子与 BSA 形成了较稳定的复合物。

2.4 ECH 与 BSA 相互作用力的测定

药物分子与生物大分子的相互作用力类型包括氢键、范德华力、静电引力、疏水相互作用, 在一定温度范围内, 相互作用过程的 ΔH 可视为常数, 则可以计算相互作用的热力学参数。根据热力学公式^[14]及前文求出的 K , 求得 ECH 与 BSA 结合反应的热力学参数。

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

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

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

求得的 ΔG 、 ΔH 及 ΔS 值列于表 3。药物与蛋白质的分子作用机制可根据药物-生物大分子的相互作用模式判定, 药物与蛋白质相互作用的类型可由如下规则确定^[15]: $\Delta S > 0$ 时为疏水和静电作用力; $\Delta S < 0$ 时为氢键和范德华力; $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$ 时为典型的疏水作用力; $\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$ 时为氢键和范德华力。由表 3 的结果可知, ECH 与 BSA 的相互作用主要为氢键和范德华力。

2.5 ECH 对 BSA 体系的能量转移参数测定

按照 Förster 非辐射能量转移机制^[16]可以求出猝灭剂分子-蛋白质分子间的能量转移效率 (E) 及

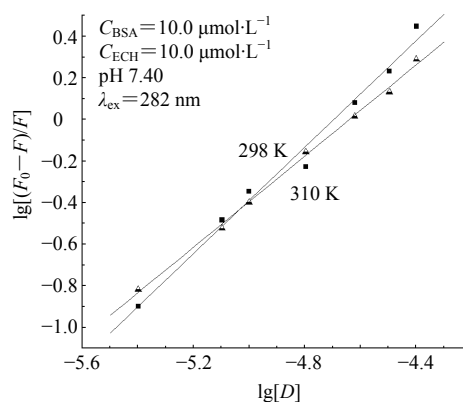


图 6 ECH-BSA 体系荧光变化线性拟合图

Fig. 6 Fluorescence change linear fitting results of ECH-BSA system

表 3 ECH 与 BSA 的热力学参数

Table 3 Thermodynamic parameters of ECH binding with BSA

T/K	$\Delta H / (kJ \cdot mol^{-1})$	$\Delta S / (J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1})$	$\Delta G / (kJ \cdot mol^{-1})$
298	-162.13	-404.77	-36.65
310			-41.50

猝灭剂与蛋白质分子中荧光发射残基的结合距离 (r)。据此理论, 荧光发射体和荧光猝灭体之间的 E 和两者之间的 r 及临界能量转移距离 (R_0 , $E=50\%$ 时的临界能量距离) 相关。

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6)$$

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

K^2 为偶极空间取向因子, N 为介质的折射指数, Φ 为蛋白质分子的光量子效率, J 为蛋白质分子荧光发射光谱与药物吸收光谱间的光谱重叠积分

$$J = \int_0^\infty F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 d\lambda / \int_0^\infty F(\lambda) d\lambda$$

$F(\lambda)$ 为蛋白质分子在波长 λ 处的荧光强度; $\varepsilon(\lambda)$ 为药物在波长 λ 处的摩尔吸收系数

E 则可以根据公式 $E = 1 - F/F_0$ 测得。

由获得的 UV 谱及荧光光谱作重叠光谱图, 见图 7。从图 7 可见, BSA 的荧光发射谱与 ECH 的紫外吸收谱确有部分重叠。根据 Förster 的偶极-偶极

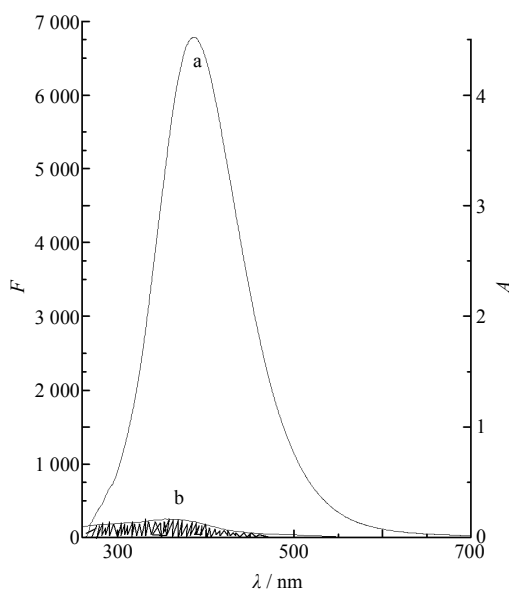


图7 BSA的荧光发射谱(a)与ECH的紫外吸收谱(b)的重叠图

Fig. 7 Overlap between fluorescence emission spectra of BSA (a) and UV absorption spectra of ECH (b)

非辐射能量转移理论^[18]指出:当供能体与受能体足够靠近,距离在7 nm范围内时,被激发的供能体分子将会与近邻受能体分子发生非辐射能量转移现象。如果供能体发射荧光,供能体的荧光发射光谱将与受能体的吸收谱有足够的重叠,导致供能体荧光猝灭,并由此可以求出受能体分子和供能体分子的结合距离。

本实验根据上述公式计算出BSA-ECH结合反应的光谱重叠积分 $J=1.43 \times 10^{-14} \text{ cm}^3 \cdot \text{L/mol}$,求得 $E=0.31$ 。在本实验条件下,取偶极空间取向因子为两结合物各向随机分布的平均值,即 $K^2=2/3$,光量子效率取色氨酸标准值 $\Phi=0.118$,折射指数 $N=1.336$,将以上各量代入公式,可得到BSA的 $R_0=2.62 \text{ nm}$, r 为 2.99 nm 。 $r < 7 \text{ nm}$,即BSA的氨基酸残基与ECH的距离小于7 nm,符合非辐射能量转移理论,氨基酸残基可将能量以非辐射方式转移至ECH,引起BSA的荧光猝灭。

2.6 ECH对BSA构象的影响

蛋白质的同步荧光光谱中, $\Delta\lambda=15 \text{ nm}$ 显示酪氨酸残基的荧光光谱特性, $\Delta\lambda=60 \text{ nm}$ 显示色氨酸残基的荧光光谱特性。蛋白质中氨基酸残基的最大发射波长与其所处环境的极性有关,故由最大发射波长的变化可判断蛋白质构象的变化。固定BSA浓度,逐渐增加ECH浓度,可得到BSA-ECH体系的同步荧光光谱(图8)。

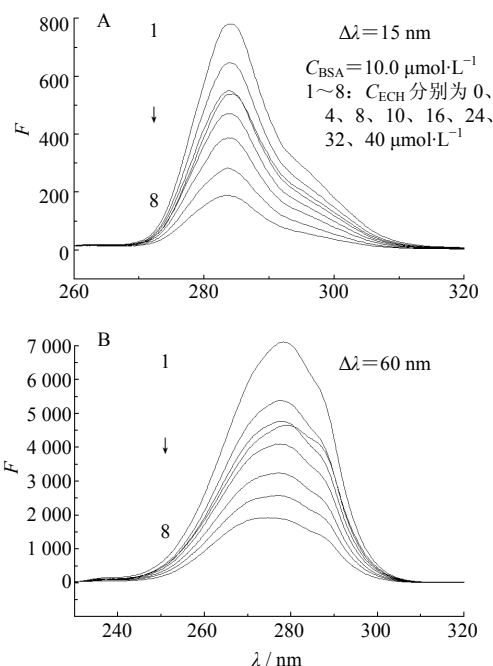


图8 BSA-ECH体系的同步荧光光谱

Fig. 8 Synchronous fluorescence spectra of BSA-ECH system

从图8可见,BSA的荧光主要由色氨酸所贡献。随着药物浓度的增大,酪氨酸残基的最大发射波长基本保持不变(图8-A);图8-B显示, $\Delta\lambda=60 \text{ nm}$ 时,色氨酸残基的最大发射波长出现了轻微蓝移现象,说明ECH与BSA的相互结合,导致BSA的构象发生变化,影响到BSA分子中色氨酸残基所处的微区环境,使其色氨酸残基所处的环境极性减小,组成疏水腔的肽链处于部分紧缩状态,疏水性有所增加。

2.7 BSA-ECH结合反应对BSA构象型态变迁的影响

为了进一步了解ECH与BSA结合反应对BSA构象型态变迁的动力学机制,采用荧光相图法作进一步分析。荧光相图法是在发射波长 λ_1 和 λ_2 下测定蛋白质在不同实验条件下荧光强度 $I(\lambda_1)$ 和 $I(\lambda_2)$ 的变化来描述蛋白质的结构变化结果。荧光强度是一种广度性质,因此存在以下关系: $I(\lambda_1)=a+bI(\lambda_2)$, $a=I_1(\lambda_1)I_1(\lambda_2)[I_2(\lambda_1)-I_1(\lambda_1)]/[I_2(\lambda_2)-I_1(\lambda_2)]$, $b=[I_2(\lambda_1)-I_1(\lambda_1)]/[I_2(\lambda_2)-I_1(\lambda_2)]$ 。

若关系式 $I(\lambda_1)=a+bI(\lambda_2)$ 表现为线性,则表示相应的蛋白质构象型态变迁过程符合“二态模型”;反之若为非线性,表明蛋白质的构象型态转变过程是一个序变过程;若该关系式表现为两条或多条直线,其中每一条直线都描述一个“全或无”

的蛋白质结构变化过程, 则符合“多态模型”。

本实验以 I_{320} — I_{365} 的相图反应结果最准确, 图 9 为根据实验数据作出的相应荧光相图。从图 9 可以看出, ECH 与 BSA 结合反应的荧光相图呈线性, 说明 ECH 与 BSA 发生非共价结合作用时, BSA 中构象型态变迁过程不是序变过程, 是一个“二态”模型。

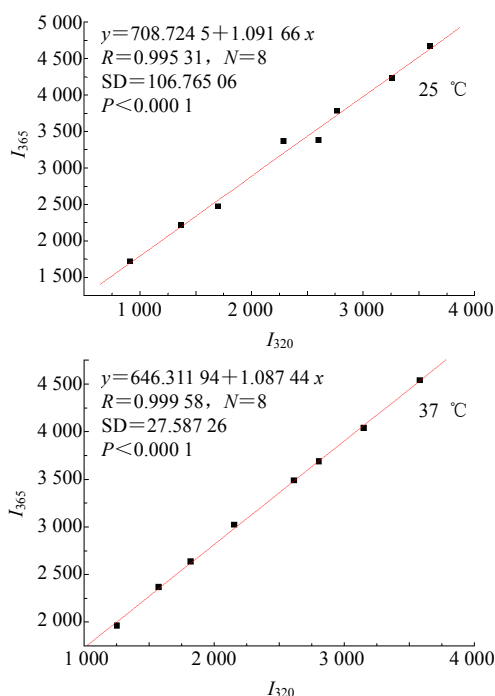


图 9 ECH-BSA 体系的荧光相图

Fig. 9 Fluorescence phase diagram of ECH-BSA system

2.8 偏振荧光光谱定量分析 ECH 与 BSA 的相互作用

偏振荧光光谱反映的是荧光体分子在激发波长下发射波长变化的偏振光谱。偏振荧光光谱可用偏振度 (P) 与各向异性 (r) 来度量, 其中 P 可根据下式计算^[10]: $P = (I_{VV} - GI_{VH}) / (I_{VV} + GI_{VH})$, 其中 G 为校正因子 ($G = I_{HV} / I_{HH}$), 而 r 计算如下: $r = (I_{VV} - GI_{VH}) / (I_{VV} + 2GI_{VH})$, 其中 G 、 I_{HV} 、 I_{HH} 、 I_{VV} 、 I_{VH} 的含义与 P 计算公式中相同。固定 BSA 浓度, 加入不同浓度的 ECH 后, 读取偏振荧光数据并按公式计算各溶液体系的 P 及 r 值, 结果见表 4。

表 4 ECH-BSA 体系荧光偏振参数

Table 4 Fluorescence polarization parameters of ECH-BSA systems

体系	I_{VV}	I_{VH}	I_{HV}	I_{HH}	G	P	r
BSA	447.9	337.4	278.0	256.1	1.0855	0.1003	0.0692
ECH-BSA	302.0	232.6	198.9	191.2	1.0403	0.1104	0.0764

荧光体的 P 及 r 与荧光体的转动速度成反比。

荧光体越小, 转动速度越快, 其 P 及 r 就越小。由表 4 数据可见, 在水溶液中荧光体分子 BSA 转动速度较快, 消偏现象严重, P 及 r 较小。而 BSA 与 ECH 发生相互作用后, BSA 的 P 及 r 均有提高, 说明药物与蛋白质分子之间存在分子间作用力, 形成复合物后荧光体体积变大, 分子转动受阻, 旋转速度变慢, 体系的黏度变大, 因而荧光偏振度随之变大。实验数据定量证明了 BSA 与 ECH 发生相互作用, 生成了非共价复合物。

2.9 分子模拟与实验结果的符合度分析

根据光谱实验结果, ECH 中色氨酸残基及酪氨酸残基所在微区域与 BSA 之间具有明显的相互作用。但对接结果显示, 在配体分子周围 1.00 nm 的范围内存在着 2 个酪氨酸残基, 并未存在色氨酸残基。分子对接结果与实验结果存在一定差异。根据光谱实验测得 ECH 与 BSA 的结合距离为 2.99 nm, 将 ECH-BSA 周围 2.90 nm 的氨基酸残基分子对接后发现该范围内存在 2 个色氨酸残基 Trp134 和 Trp213, 能很好地解释 ECH 猝灭 BSA 内源荧光的现象。将 ECH-BSA 周围 2.90 nm 的氨基酸残基通过分子对接图显示出来 (没有改变 ECH-BSA 内核结构及相互作用力), 结果见图 10。

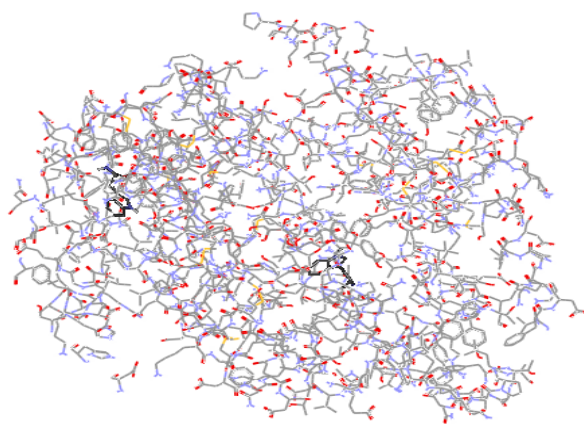


图 10 ECH 与 BSA 相互作用的分子对接图

Fig. 10 Interaction mode between ECH and BSA

由图 10 可见, ECH 插入 BSA 所在结构位域过程中, 药物的进入在造成对接位点结构位域微区构象改变的同时, 由于 BSA 分子倾向于保持整体能量最低的溶液“紧缩”型态, 药物分子嵌入对接位点结构位域中势必会压缩邻近微区区域使其肽链受到挤压, 相应的色氨酸邻近结构位域的肽链型态变化 (即产生别构效应), 使色氨酸残基所处的环境极性

减小, 组成疏水腔的肽链处于部分紧缩状态, 疏水性有所增加, 引起色氨酸残基的荧光光谱发生了蓝移。由图8同步荧光光谱中, $\Delta\lambda=60\text{ nm}$ 的荧光谱最大发射波长轻微蓝移的结果可知, 分子模拟与实验结果相一致。

3 结论

本实验利用光谱法结合分子模拟技术研究了中药活性成分 ECH 与 BSA 的相互作用。分子模拟揭示了药物在 BSA 上的结合部位, 综合实验得到热力学函数, 确定了两者间的作用力, 主要是氢键和范德华力作用兼有疏水作用。光谱法的结果显示药物分子与 BSA 之间的反应机制为动态猝灭。根据能量转移理论, 说明发生了非辐射能量转移现象。ECH 的加入可以引起 BSA 构象型态的转变, 且转变符合“二态模型”。根据荧光偏振分析证明了 BSA 与药物确实发生了相互作用, 生成了非共价复合物。实验结果与计算机模拟相一致。本研究不仅可为中药活性成分 ECH 与 BSA 分子相互作用的深入研究提供有益结果, 而且对于中药其他有效成分与蛋白质分子的相互作用研究也具有一定的参考意义。

参考文献

- [1] Li H, Song A Q, Xue J H, *et al.* Protective effect of echinacoside on vascular endothelial cells [J]. *J Xi'an Jiaotong Univ: Med Sci*, 2013, 34(3): 387-392.
- [2] Zhong M, Chen H, Jiang Y, *et al.* Effects of echinacoside on striatal extracellular levels of amino acid neurotransmitter in cerebral ischemia rats [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2012, 28(3): 361-365.
- [3] 刘敏, 朱兰英, 曲秀葵, 等. 丹皮酚及其两种同分异构体与牛血清白蛋白相互作用的热力学研究 [J]. *化学学报*, 2007, 65(16): 1555-1560.
- [4] Wu A, Lin C, Zhai Y, *et al.* Investigation of the interaction between two phenylethanoid glycosides and bovine serum albumin by spectroscopic methods [J]. *J Pharm Anal*, 2012, 3(1): 61-65.
- [5] Bourassa P, Kanakis C D, Tarantilis P, *et al.* Resveratrol, genistein, and curcumin bind bovine serum albumin [J]. *J Phys Chem B*, 2010, 114(9): 3348-3354.
- [6] Lu H, Shan X, Chen J, *et al.* Preparation of carbon quantum dots in wood charcoal and their interaction with bovine serum albumin [J]. *Carbon*, 2013, 28(4): 307-312.
- [7] 赵琦. 基于分子对接技术的小分子-蛋白质相互作用研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2009.
- [8] Hu Y J, Yue H L, Li X L, *et al.* Molecular spectroscopic studies on the interaction of morin with bovine serum albumin [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2012, 112 (2): 16-22.
- [9] Lakowicz J R. 荧光光谱法原理 [M]. 第3版. 北京: 科学出版社, 2008.
- [10] Jiang C Q, Gao M X, He J X. Study of the interaction between terazosin and serum albumin synchronous fluorescence determination of terazosin [J]. *Anal Chim Acta*, 2002, 452(2): 185-189.
- [11] He W Y, Li Y, Si H Z, *et al.* Molecular modeling and spectroscopic studies on the binding of guaiacol to human serum albumin [J]. *J Photochem Photobiol A: Chemistry*, 2006, 182(2): 158-167.
- [12] 王宁, 刘忠英, 胡秀丽, 等. 黄芩类药物与人血清白蛋白相互作用的研究 [J]. *高等学校化学学报*, 2011, 32(2): 241-245.
- [13] 卞伟, 卫艳丽, 王亚萍, 等. 荧光法研究咖啡因和茶碱与牛血清白蛋白相互作用 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2006, 26(3): 505-508.
- [14] 颜承农, 上官云凤, 童金强, 等. 双噻达莫与牛血清白蛋白结合热力学特征的荧光光谱法研究 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2003, 23(3): 543-546.
- [15] Ross P D, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability [J]. *Biochemistry*, 1981, 20(11): 3096-3012.
- [16] Zhang G W, Que Q M, Pan J H, *et al.* Study of the interaction between icariin and human serum albumin by fluorescence spectroscopy [J]. *J Mol Struct*, 2008, 881(1/3): 132-138.
- [17] Lin H, Lan J F, Guan M, *et al.* Spectroscopic investigation of interaction between mangiferin and bovine serum albumin [J]. *Spectrochim Acta Part A*, 2009, 73(5): 936-941.