

光谱法结合分子模拟法分析毛蕊花糖苷与血清白蛋白的分子作用机制

郭明, 王晓萌, 詹敏忠, 范文翔

浙江农林大学理学院, 浙江 临安 311300

摘要: **目的** 研究毛蕊花糖苷(verbascoside, VER)与牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)的分子作用机制。**方法** 生理条件下, 光谱法测定 VER 与 BSA 的相互作用参数, 分子模拟建立 VER-BSA 结合模型, 分析其结合反应机制。**结果** 构建的 VER-BSA 模型表明, 维持 VER 与 BSA 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 VER 与 BSA 的相互作用为静态结合过程, 结合强度较强, VER 与 BSA 的结合距离(r)值较小, 说明发生了能量转移现象。VER 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。解析荧光相图得出 VER 与 BSA 反应构象型态的变迁为“二态”模型。热力学参数表明 VER 与 BSA 的相互作用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 BSA 与 VER 相互作用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 VER 与 BSA 分子作用机制提供一定参考。

关键词: 毛蕊花糖苷; 牛血清白蛋白; 光谱实验; 分子模拟; 结合反应

中图分类号: R961.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)04-0541-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.04.015

Analysis on molecular interaction mechanism of verbascoside binding with serum albumin by spectroscopy and molecular modeling method

GUO Ming, WANG Xiao-meng, ZHAN Min-zhong, FAN Wen-xiang

School of Science, Zhejiang Agricultural & Forestry University, Lin'an 311300, China

Abstract: **Objective** To study the molecular mechanism of the binding reaction between verbascoside (VER) and bovine serum albumin (BSA). **Methods** Under physiological conditions, the interaction parameter of drug binding with protein was determined by spectroscopy, VER-BSA interactional model was built and the binding reaction mechanism was analyzed. **Results** The established VER-BSA binding model suggested that VER can strongly bind to BSA mainly by hydrogen bonds interaction and Van der Waals force, there were hydrophobic interactions, too. The results from spectroscopy indicated that static quenching existed between VER and BSA with significant strong bond. The value of binding distances (r) was low, which indicated the occurrence of energy transfer. Through fluorescent phase diagram technical analysis, the reaction conformational pattern of VER-BSA showed “two-state” model. According to the obtained thermodynamic parameters, the main interactional force between VER and BSA was hydrogen bonds interaction and Van der Waals force. The fluorescence polarization proved that VER and BSA generated a non-covalent complex. **Conclusion** The experiment results are agreed with the molecular modeling, which provides the helpful reference for the study on molecular reaction mechanism of VER binding with BSA.

Key words: verbascoside; bovine serum albumin; spectrum experiment; molecular modeling; binding reaction

毛蕊花糖苷(verbascoside, VER)又名麦角甾苷、毛蕊花苷、阿克苷、类叶升麻苷, 是苯丙素苷类化合物。目前, 关于 VER 在不同植物中的量分布的报道较多, 主要存在于地黄叶、肉苁蓉等植物中。VER 对骨质疏松症、神经系统及免疫系统等具有明显的防治及治疗作用^[1-2]。VER 通过体液输送到达

靶位才发挥药效功能, 其中血液输送是重要途径。

血清白蛋白(serum albumin, 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]。与其他的蛋白质相比, 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,

收稿日期: 2014-06-14

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)

作者简介: 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

可大量制备,且其三级结构已被人类所探知,是理想的模型蛋白质分子,常作为药物与蛋白质分子相互作用研究中的模型大分子。牛血清白蛋白^[4-6](bovine serum albumin, BSA)是由582个氨基酸残基组成的单肽链蛋白质,BSA的空间结构由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,且在134及213位各含有一个色氨酸残基。分析生理条件下药物与BSA的相互作用不仅可以获得药物的药效学信息,深入阐明药物的输送机制,也可以为药物分析提供理论参考,VER与BSA的相互作用研究尚未见文献报道。

本研究利用光谱法结合分子模拟技术研究了VER结合BSA的相互作用机制^[7],由获得的光谱数据得出了它们的结合反应参数、热力学参数及药物对蛋白质构象的影响,并从分子水平上阐释VER与BSA相互作用的机制,为分析VER的药效作用机制提供一定参考。

1 材料

1.1 药品与试剂

BSA(质量分数≥98%,上海华美生物工程公司);VER(质量分数为96%,百灵威科技有限公司,批号ASB-00022390-010);三羟甲基氨基甲烷(Tris, GR, 百灵威科技有限公司);其他试剂均为分析纯试剂,实验用水为亚沸蒸馏去离子水。配制0.1 mol/L, pH 7.4的Tris-HCl缓冲溶液,用此缓冲液配制 1.0×10^{-5} mol/L的BSA溶液,乙醇配制 1.0×10^{-3} mol/L VER溶液。

1.2 仪器

F-7000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);ZD-2型精密酸度计(上海雷磁仪器厂);SGI O2计算机图形工作站,DOCK软件(4.02版本)。

2 方法

2.1 分子模拟

利用SGI O2工作站上的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的晶体结构从PDB蛋白质晶体数据库获得,编码4F5S。ChemDraw工具构建VER的分子结构,然后基于分子力学MM2力场优化后生成实验分子模型,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。确定活性部位步骤:(1)确定VER结合活性位点;(2)在配体结合位点填充球簇以映射受体结合腔穴的性质;(3)尝试匹配不同小球中心的距离和配体中不同原子的距离,进行配体在受体活性位点处的构象搜索;(4)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^[8]。

2.2 荧光光谱与紫外光谱测定

2.2.1 BSA与VER溶液的荧光光谱测定 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 1.0×10^{-3} mol/L VER溶液进行荧光滴定,每次加入的量分别为10、10、5、15、20、20、20 μ L, Tris-HCl缓冲溶液做荧光空白校正,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($\Delta\lambda$)分别为15和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缓冲溶液做荧光空白校正。

2.2.2 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的发射光谱。

2.2.3 VER溶液的紫外光谱测定 移取2.5 mL Tris-HCl缓冲溶液于1 cm石英比色皿中,用微量进样器加入 1.0×10^{-3} mol/L VER溶液25 μ L,使其终浓度为 1.0×10^{-5} mol/L,测定500~190 nm紫外吸收光谱,中速扫描,狭缝宽度2.5 nm,缓冲溶液定基线。

3 结果与讨论

3.1 分子模拟研究

分子模拟建立VER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^[9]、6个脂肪酸结合位点及triethylene glycol药物结合位点进行VER分子对接的模拟计算工作。分子对接VER与BSA的结合模型见图1。

由图1可见,VER分子结合在BSA的表面活性口袋处,整个分子处于被包围状态。VER分子距BSA色氨酸残基(Trp213)、酪氨酸残基(Tyr149、

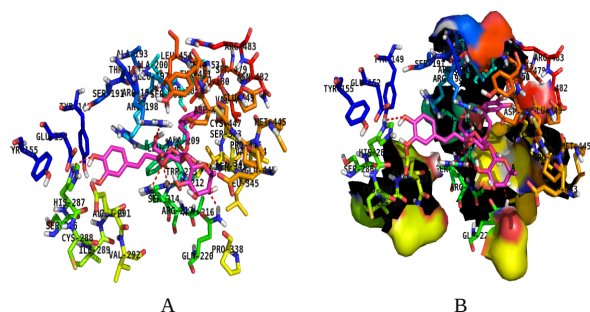


图1 VER-BSA相互作用的分子对接图(A)及疏水表面图(B)

Fig. 1 Molecular docking (A) and hydrophobic surface map (B) of VER-BSA

Tyr155 和 Tyr451) 及苯丙氨酸残基 (Phe205) 很近, 这在一定程度上解释了 VER 能够猝灭 BSA 内源荧光的现象。同时, VER 分子与 BSA 结合过程中, VER 的 A 环上的羟基氧与 His287 发生氢键相互作用; VER 的 B 环上-CH₃ 的邻位羟基氧与 Gln220 发生氢键相互作用, 对位羟基氧与 Arg217 发生氢键相互作用; C 环上氧原子的间位氧 (C 环与 B 环连

接位的邻位) 与 Arg217 发生氢键相互作用, 间位羟基氧与 Arg194 发生氢键相互作用。另一方面, VER 非共价结合在 BSA 活性位点域, 其结合口袋周围主要由 Ala193、Ala200、Ala209、Ala212、Ala216、Ala290、Ala341、Leu197、Leu210、Leu345、Leu346、Leu454、Leu480、Phe205、Trp213、Ile289、Val292、Val342、Val344、Val481、Pro338、Pro446 氨基酸残基形成一个疏水区域。分子模拟结果可知 VER 与蛋白质分子结合的主要驱动力是氢键及范德华力, 同时也有疏水作用的存在, 为验证 VER 与 BSA 的键合机制和键合方式, 通过设计不同的光谱实验来进一步证实分子模拟的合理性。

3.2 BSA-VER 的荧光光谱及结合反应机制

图 2 为 BSA、VER 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, VER 的最大发射波长为 315 nm, BSA 最大发射波长为 342 nm, 而由 VER-BSA 体系的荧光光谱可以看出, VER 的加入使 BSA 的荧光强度降低, 表明 VER 与 BSA 之间存在着相互作用, 发生了能量转移。

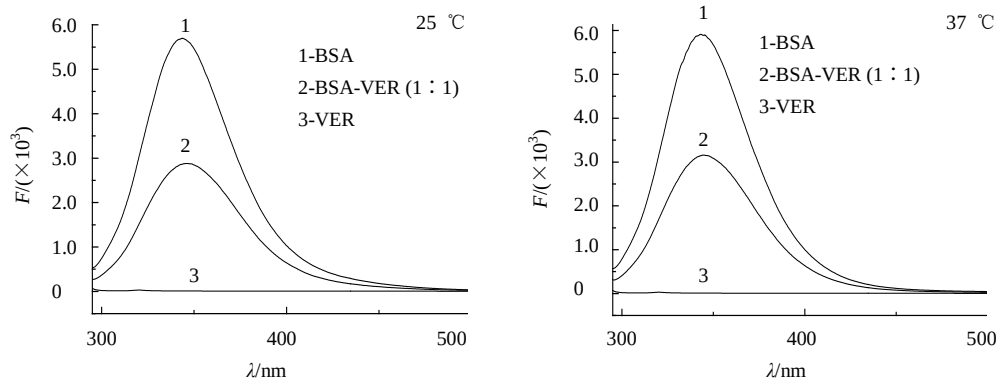


图2 BSA-VER 体系中各试样的荧光图谱

Fig. 2 Fluorescence emission spectra of each sample in BSA-VER solution system

图 3 为 VER-BSA 的紫外吸收差谱, 可知 VER-BSA 等物质的量混合物与 VER 的差谱与 BSA 的紫外吸收曲线几乎完全重合, 表明 VER 的加入并未使 BSA 的紫外吸收发生变化。可以初步确定 VER 与 BSA 分子的荧光猝灭机制为静态猝灭, 且可见, VER 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 VER 浓度的变化图。由图 4 可知, a 峰为 BSA 的一级荧光峰, 从图中可以看出随着 VER 的加入, a 峰逐渐降低; b 峰为 VER 的一级荧光发射峰; c 峰为 Tris-HCl 的二级倍频荧光

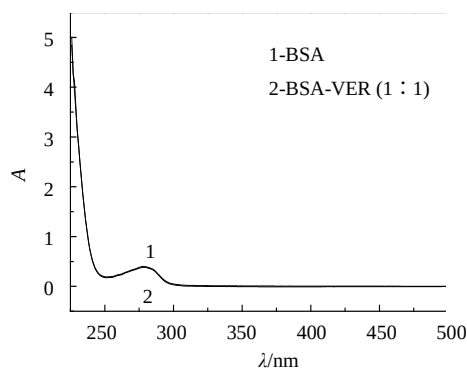


图3 VER-BSA 的紫外吸收差谱

Fig. 3 UV Absorption difference spectrum of VER-BSA

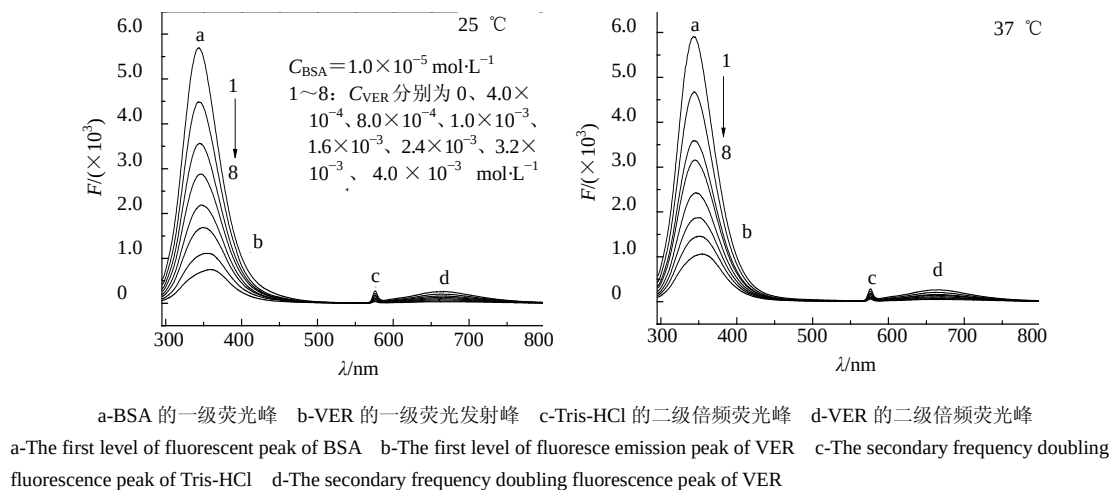


图4 BSA-VER 相互作用的荧光图谱

Fig. 4 Fluorescence spectra in interaction of BSA-VER

峰; d 峰为 VER 的二级倍频荧光峰。在固定 BSA 浓度的条件下, 随着体系中 VER 浓度增大, BSA 的荧光强度呈规律性降低, 这表明 VER 对 BSA 有猝灭作用。

蛋白质与药物分子相互作用的荧光猝灭过程通常包括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。为确定 VER 对血清蛋白荧光的机制, 首先按 Stern-Volmer^[10] 方程处理上述体系。

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

F_0 与 F 分别为猝灭剂加入前后荧光分子的相对强度; K_q [$L/(mol \cdot s)$] 为双分子猝灭过程速率常数; τ_0 (s) 为猝灭剂不存在时生物大分子的平均寿命; $[D]$ (mol/L) 为猝灭剂 (VER) 的浓度; K_{SV} (L/mol) 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

由实验测得 VER 与 BSA 相互作用的荧光光谱数据, 按 Stern-Volmer 方程处理可得图 5。

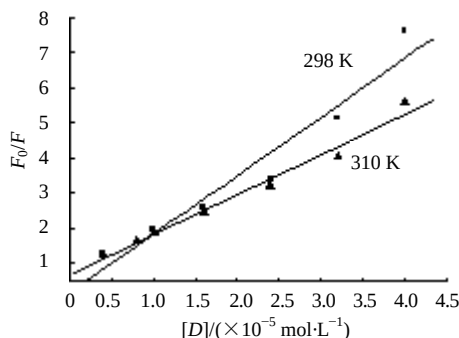


图5 VER 对 BSA 荧光猝灭的 Stern-Volmer 图

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

由于无猝灭剂时 τ_0 为 $1 \times 10^{-8} s^{[11]}$, 则由实验数据可以通过 Stern-Volmer 方程计算不同温度下 VER-BSA 相互作用的猝灭常数 K_{SV} 、 K_q , 计算结果见表 1。

表1 BSA-VER 相互作用的猝灭参数

Table 1 Quenching parameters of VER-BSA interaction

T/K	$K_{SV}/(L \cdot mol^{-1})$	$K_q/(L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1})$	相关系数
298	4.549×10^4	4.549×10^{12}	0.970 9
310	7.892×10^4	7.892×10^{12}	0.989 7

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来间接判断荧光猝灭机制^[12]; 另一种方法是通过变温实验直接推断荧光猝灭机制。本实验中, K_q 值远大于 $2.0 \times 10^{10} L/(mol \cdot s)$, 说明 VER 对 BSA 的猝灭是由于形成了复合物而引起的静态猝灭。另外, 为确定 VER 对 BSA 的猝灭机制, 在不同温度下作 VER 对 BSA 荧光猝灭的 Stern-Volmer 图。从图 5 可见, VER 对 BSA 荧光猝灭的 Stern-Volmer 曲线有良好的线性关系, 在选定浓度范围内, 随着温度升高, 猝灭常数呈减小趋势, 进一步表明 VER 对 BSA 的猝灭机制为静态猝灭。由此 2 个结果可以确定 VER 与 BSA 的荧光猝灭机制为静态猝灭。另外, 也有文献报道离子强度是影响猝灭机制的重要因素^[13], 需要考虑实验体系为离子溶液时, K_q 增大很可能是离子强度影响的结果, 这需要在后续研究中展开进一步验证。

3.3 VER 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 VER 与 BSA 相互作用的静态荧光猝灭机制, 由荧光分子荧光强度-猝灭剂浓度关系可以得出结合参数的理论计算公式^[14]。

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

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, $[D_f]$ 为 VER 的游离浓度

因为加入的 VER 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 $[D_f]$ 。以 $\lg[D]$ 对 $\lg[(F_0-F)/F]$ 作双对数图 (图 6), 求得 K 和 n , 结果见表 2。

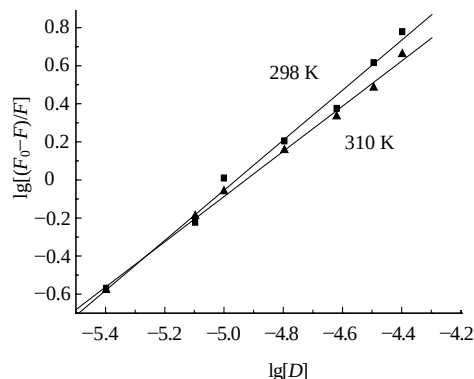


图 6 VER-BSA 体系荧光变化线性拟合图

Fig. 6 Fluorescence change linear fitting of VER-BSA system

表 2 BSA-VER 的结合参数

Table 2 Binding parameters of VER-BSA

T/K	K/(L·mol ⁻¹)	n	拟合方程	r	SD	P
298	3.319 1×10 ⁶	1.32	Y=6.521 0+1.315 1 X	0.995 3	0.050 2	<0.000 1
310	7.118 2×10 ⁵	1.19	Y=5.852 4+1.188 0 X	0.998 1	0.028 5	<0.000 1

图 6 结合表 2 可见, VER 与 BSA 之间存在结合强度较强的相互作用, VER 与 BSA 存在一个结合位点, 说明 VER 分子与 BSA 形成了较稳定的复合物。需要说明的是, 表 2 中结合常数的倒数为 BSA-VER 结合复合物的解离参数, 该解离参数的值很小, 仅说明理论上 BSA-VER 结合较为稳固, 但若在体内实际运输过程中, BSA 与 VER 的结合或解离过程是在动态环境中进行的, 会受到许多因素的影响, BSA-VER 结合物的实际稳定情况需要根据具体影响因素进一步由综合实验获得, 该内容有待进一步深入研究。

3.4 VER 与 BSA 相互作用力分析

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, 在一定温度变化范围内, 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 (3)、(4)、(5) 热力学公式^[15]及式 (2) 求出结合常数 K , 求得 VER 与 BSA 结合反应的热力学函数变化值。

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (3)$$

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (4)$$

$$\ln(K_2/K_1) = (\Delta H/R) \cdot (1/T_1 - 1/T_2) \quad (5)$$

求得的 ΔG (吉布斯自由能变)、 ΔH (焓变) 及 ΔS (熵变) 值见表 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

表 3 VER-BSA 的热力学参数

Table 3 Thermodynamic parameters of VER-BSA

T/K	$\Delta H/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S/(\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$	$\Delta G/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$
298	-98 541.98	-205.84	-37 201.25
310			-34 731.15

物与蛋白质相互作用的类型可由如下规则确定^[16]: $\Delta S > 0$ 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, VER 与 BSA 的相互作用主要为氢键和范德华力。

3.5 VER 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可以求出猝灭剂分子-蛋白质分子间的能量转移效率及猝灭剂与蛋白质分子中荧光发射残基的结合距离。据此理论, 荧光发射体和荧光猝灭体之间的能量转移效率 (E) 和两者之间的距离 (r) 及临界能量转移距离 (R_0) 相关。

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

E 为能量转移效率, R_0 为 $E=50\%$ 时的临界能量距离

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} \Phi J \quad (7)$$

K^2 为偶极空间取向因子, N 为介质的折射指数, Φ 为授体的光量子效率, J ($\text{cm}^3 \cdot \text{L} / \text{mol}$) 为授体 (蛋白) 荧光发射光谱与受体 (药物) 吸收光谱间的光谱重叠积分

$$J = \int_0^{\infty} F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 d\lambda / \int_0^{\infty} F(\lambda) d\lambda \quad (8)$$

$F(\lambda)$ 为荧光授体在波长 λ 处的荧光强度, $\varepsilon(\lambda)$ 为受体在波长 λ 处的摩尔吸收系数 [$L/(mol \cdot cm)$]

E 则可以根据式 (9) 测得, 由获得的 UV 谱及荧光光谱作重叠光谱图, 见图 7。

$$E = 1 - F/F_0 \quad (9)$$

从图 7 可见, BSA 的荧光发射谱与 VER 的紫外吸收谱确有部分重叠。Förster 的偶极-偶极非辐射

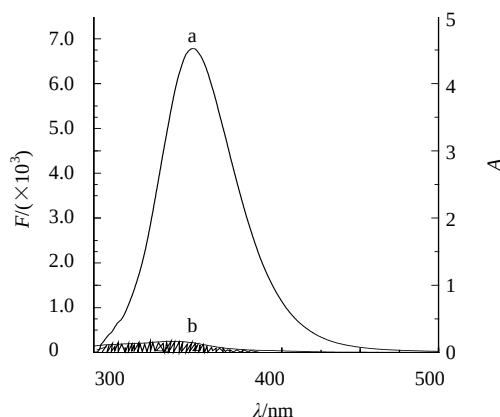
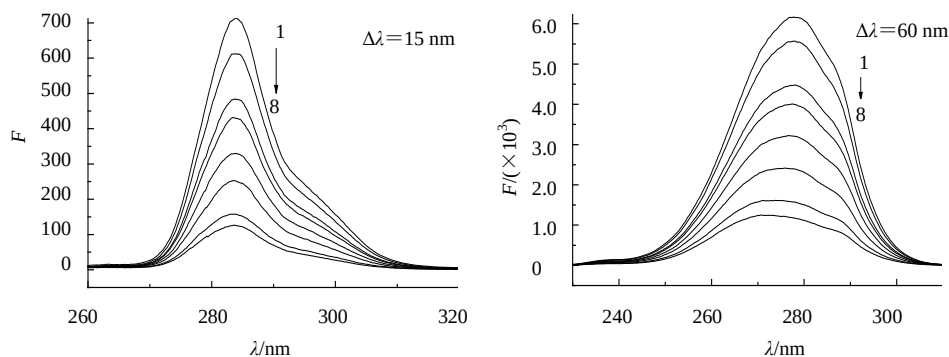


图 7 BSA 的荧光发射谱 (a) 与 VER 的紫外吸收谱 (b) 的重叠图

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



$C_{BSA} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 1~8- C_{VER} 分别为 $0, 4.0 \times 10^{-6}, 8.0 \times 10^{-6}, 1.0 \times 10^{-5}, 1.6 \times 10^{-5}, 2.4 \times 10^{-5}, 3.2 \times 10^{-5}, 4.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$
 $C_{BSA} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 1~8- C_{VER} is equivalent to $0, 4.0 \times 10^{-6}, 8.0 \times 10^{-6}, 1.0 \times 10^{-5}, 1.6 \times 10^{-5}, 2.4 \times 10^{-5}, 3.2 \times 10^{-5}, 4.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively

图 8 BSA-VER 体系的同步荧光光谱

Fig. 8 Synchronous fluorescence spectra of VER-BSA systems

从图 8 可见, BSA 的荧光主要由酪氨酸残基、色氨酸残基、苯丙氨酸残基所贡献。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 在 290 nm 处形成了一个峰, 这个峰并非 BSA 蛋白质峰, 而是 VER 峰, $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 时, 色氨酸残

基的最大发射波长出现了轻微蓝移现象。药物分子嵌入 BSA 亚结构域 IIA 中导致肽链的伸展势必会压缩邻近微区域, 使其肽链受到挤压, 分析 BSA 结构, 推测由于蛋白质分子的别构效应, 亚结构域 IIA 微区肽链的伸展会影响其相邻亚结构域 IIB 微区的

3.6 VER 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 VER 的浓度, 可得到 BSA-VER 体系的同步荧光光谱 (图 8)。

构象,致使亚结构域 IIB 的肽链趋于折叠,处于亚结构域 IIB 内的色氨酸残基会受到影响,疏水性增加,组成疏水腔的肽链处于部分紧缩状态,进而引起 BSA 构象发生了一定程度的变化。

3.7 BSA-VER 结合反应对 BSA 构象型态变迁的影响

为了进一步了解 VER 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:

$$I(\lambda_1)=a+b I(\lambda_2) \quad (10)$$

$$a=I_1(\lambda_1) I_1(\lambda_2)[I_2(\lambda_1)-I_1(\lambda_1)]/[I_2(\lambda_2)-I_1(\lambda_2)]$$

$$b=[I_2(\lambda_1)-I_1(\lambda_1)]/[I_2(\lambda_2)-I_1(\lambda_2)]$$

$I(\lambda_1)$ 和 $I(\lambda_2)$ 为不同实验条件下,测定发射波长 λ_1 和 λ_2 的荧光强度。若式 (10) 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;若式 (10) 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。

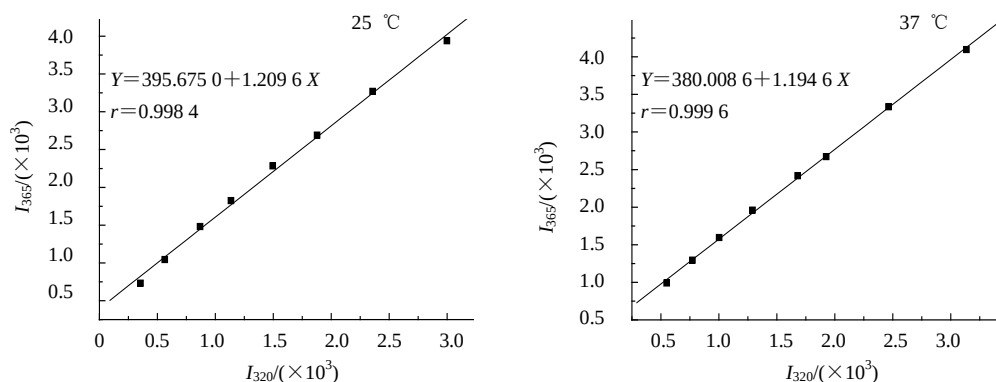


图 9 VER-BSA 体系的荧光相图

Fig. 9 Fluorescence phase diagrams of VER-BSA systems

从图 9 可以看出,VER 与 BSA 结合反应的荧光相图呈线性,说明 VER 与 BSA 发生非共价结合作用时,BSA 中构象型态变迁过程不是一个序变过程,而是一个“二态”模型。

3.8 VER 对 BSA 色氨酸微区的影响

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]:

$$P=(I_{VV}-GI_{VH})/(I_{VV}+GI_{VH}) \quad (11)$$

其中 G 为校正因子 ($G=I_{HV}/I_{HH}$), I_{VV} 和 I_{VH} 分别为垂直偏振光激发下的垂直偏振的发射光强度

和水平偏振的发射光强度, I_{HV} 和 I_{HH} 分别为水平偏振光激发下的垂直偏振发射光强度和水平偏振发射光强度。 r 计算公式如下:

$$r=(I_{VV}-I_{VH}G)/(I_{VV}+2I_{VH}G) \quad (12)$$

固定 BSA 浓度,加入不同浓度的 VER 后,读取偏振荧光数据并按公式 (11)、(12) 计算各溶液体系的 P 及 r ,结果见表 4。

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,偏振度及各向异性较小。

而 BSA 与 VER 发生相互作用后,BSA 的 P 及 r 均

表 4 VER-BSA 体系荧光偏振参数

Table 4 Fluorescence polarization parameters of VER-BSA systems

体系	I_{VV}	I_{VH}	I_{HV}	I_{HH}	G	P	r
HSA	381.500 0	296.700 0	232.900 0	216.800 0	1.074 3	0.089 6	0.061 6
MG-HSA	137.500 0	109.400 0	86.400 0	82.600 0	1.046 0	0.091 6	0.063 0

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VER发生相互作用,生成了非共价复合物。

4 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VER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参数的结果,确定了两者间的作用力主要是氢键和范德华力。光谱法的结果显示VER与BSA之间的反应机制为静态猝灭。根据能量转移理论,求得VER与BSA的距离小于7 nm,说明发生了非辐射能量转移现象。VER的加入可以引起BSA构象型态的转变,且BSA的构象型态变迁符合“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。实验结果与理论计算机模拟相一致。本研究不仅可为中药活性成分VER与BSA相互作用的深入研究提供有益结果,而且对于以后药物与蛋白质组,中药中多种有效成分与蛋白质分子的研究也具有一定的参考意义。同时,需要进一步说明的是人血清白蛋白与动物的血清白蛋白分子有差异,但不同种类的动物血清白蛋白与药物的实验不可或缺,本实验选择BSA为靶标蛋白质分子因其成本较低,且其与人血清白蛋白高度同源,而对于VER与人血清白蛋白的分子作用机制的研究将在后续的工作中深入开展。

参考文献

- [1] 陈微娜,李飞,朱盼盼,等.毛蕊花糖苷对新生大鼠体外培养成骨细胞增殖与分化作用研究[J].海峡药学,2012,24(4):23-24.
- [2] 高莉,彭晓明,霍仕霞,等.毛蕊花糖苷改善D-半乳糖致亚急性衰老小鼠脑损伤的作用[J].中草药,2014,45(1):81-85.
- [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*, 2013, 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] 吕华,单晓辉,陈娇,等.碳量子点的制备及与牛血清蛋白的相互作用[J].新型炭材料,2013,28(4):307-312.
- [7] 郭明,许建婷,范文翔.松果菊苷的血清蛋白质结合机制研究[J].中草药,2014,45(9):1270-1277.
- [8] 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.
- [9] 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: Biology*, 2012, 2(112): 16-22.
- [10] Lakowicz J R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy* [M]. 3rd. Beijing: Science Press, 2008.
- [11] 闫晓东,李萍,钱正明,等.三种抗氧化物质与牛血清白蛋白的相互作用[J].化学学报,2007,65(5):421-429.
- [12] 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.
- [13] 张晓威,赵凤林,李克安.环丙沙星与牛血清白蛋白相互作用的研究[J].高等学校化学学报,1999,20(7):1063-1067.
- [14] 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.
- [15] 颜承农,张华新,刘义,等.百草枯与牛血清白蛋白结合作用的荧光光谱[J].化学学报,2005,63(18):1727-1732.
- [16] Ross P D, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability [J]. *Biochemistry*, 1981, 20(11): 3096-3112.
- [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.