

◇ 药学研究 ◇

荧光猝灭法研究二氢槲皮素和二氢杨梅素与牛血清白蛋白的相互作用

樊超, 钟艺青, 栗芸, 李会娟, 吴方评, 金苹

(湖南医药学院, 湖南 怀化 418000)

摘要:目的 研究二氢槲皮素和二氢杨梅素与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用。方法 运用荧光光谱法结合 Stern-Volmer 方程和 Line Weaver-Burk 双倒数函数计算出 BSA 与二氢槲皮素和二氢杨梅素相互作用的猝灭常数和结合常数,通过反应前后热力学参数如焓变 ΔH 和熵变 ΔS 的大小对作用力类别进行判断。结果 测得二氢槲皮素与 BSA 在不同温度下的结合常数 293 K 为 $2.27 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 298 K 为 $2.06 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 303 K 为 $1.89 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 二氢杨梅素与 BSA 在不同温度下的结合常数 293 K 为 $2.43 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 298 K 为 $2.39 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 303 K 为 $2.13 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。确定其使牛血清白蛋白荧光猝灭的过程为静态猝灭过程,通过热力学参数确定其结合力主要为疏水作用。结论 应用荧光猝灭法了解二氢槲皮素和二氢杨梅素与牛血清白蛋白之间有较强的结合反应,结合力以疏水作用力为主。

关键词:二氢槲皮素;二氢杨梅素;牛血清白蛋白

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2018.11.007

An interaction study of bovine serum albumin with dihydroquercetin and dihydromyricetin by fluorescence quenching method

FAN Chao, ZHONG Yiqing, SU Yun, LI Huijuan, WU Fangping, JIN Ping

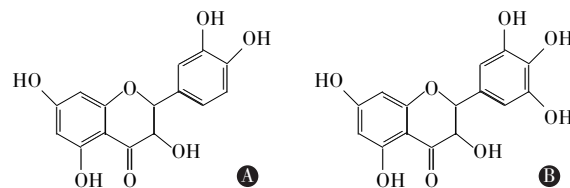
(Hunan University of Medicine, Huaihua, Hunan 418000, China)

Abstract: **Objective** To study the interaction of bovine serum albumin (BSA) with dihydroquercetin and dihydromyricetin. **Methods** The quenching constants and binding constants of the interaction of BSA with dihydroquercetin and dihydromyricetin were calculated by fluorescent spectrometry together with Stern-Volmer equation and Lineweaver-Burk double reciprocal plot. Applied forces were judged by the values of thermodynamics parameters such as enthalpy change (ΔH) and entropy change (ΔS) before and after the bonding. **Results** The binding constants of BSA with dihydroquercetin at different temperatures were $2.27 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ at 293 K, $2.06 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ at 298 K, and $1.89 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ at 303 K, respectively. The binding constants of BSA with dihydromyricetin at different temperatures were $2.43 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ at 293 K, $2.39 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ at 298 K, and $2.13 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ at 303 K, respectively. The quenching mechanism of them was showed as static quenching and the binding force was mainly hydrophobic force. **Conclusion** The binding reactions of BSA with dihydroquercetin and dihydromyricetin were fairly strong, and the binding force was mainly hydrophobic.

Key words: Dihydroquercetin; Dihydromyricetin; Bovine serum albumin

二氢槲皮素别名花旗松素、紫杉叶素、黄杉素、双氢栎精,是药用植物中存在的一种重要的二氢黄酮醇类化合物,属于维生素 PP 族。研究表明,二氢槲皮素具有抗肿瘤^[1-3]、抗氧化^[4-5]、抗病毒^[6-7]和抗心血管系统疾病等生物活性作用,在药品、保健品、食品、烟草等行业中有广泛的应用。二氢杨梅素也是一种重要的二氢黄酮醇类化合物,研究表明,其具有抗肿瘤^[8-10]、抗氧化^[11]、抗炎^[12]、解酒护

肝^[13]、抗病原微生物^[14]、降血糖^[15]、抗疲劳和调血脂等方面的作用。两种二氢黄酮醇的结构非常相似(图 1),本实验拟用光谱法研究二氢槲皮素和二氢杨梅素与血清白蛋白(BSA)作用机制,以了解它们在人体内的储存、转运、代谢等情况,同时对两种



注: A 为二氢槲皮素; B 为二氢杨梅素

图 1 两种成分的化学结构图

基金项目:湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目(2014-617)

通信作者:吴方评,男,副教授,研究方向为药物制剂质量控制研究,

E-mail:wfp1013@163.com

二氢黄酮醇的深入开发也具有重要意义。

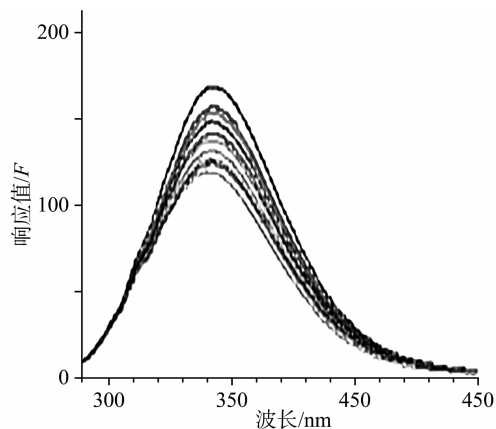
1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 荧光分光光度计 F-7000 (日本日立公司); UV-4802 型紫外分光光度计 (UNIC 公司); 牛血清白蛋白 (BSA) (Amresco, 相对分子量 65 000) $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (即称取约 0.032 5 g BSA 晶体溶于二次蒸馏水并定容至 10 mL), 使用前配成 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 二氢槲皮素 (贵州迪大生物有限公司, 纯度 $\geq 98\%$, 批号: GZDD-0121) 使用前用无水甲醇配成 1×10^{-6} 、 2×10^{-6} 、 3×10^{-6} 、 4×10^{-6} 、 5×10^{-6} 、 6×10^{-6} 、 7×10^{-6} 、 8×10^{-6} 、 9×10^{-6} 、 $10 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 10 种不同浓度的溶液; 二氢杨梅素 (贵州迪大生物有限公司, 纯度 $\geq 98\%$, 批号: 480-18-2) 使用前用无水甲醇配成 0.9×10^{-6} 、 1.8×10^{-6} 、 2.7×10^{-6} 、 3.6×10^{-6} 、 4.5×10^{-6} 、 5.4×10^{-6} 、 6.3×10^{-6} 、 7.2×10^{-6} 、 8.1×10^{-6} 、 $9.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 10 种不同浓度的溶液; $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7.3$) Tris-HCl 缓冲溶液; $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 水溶液; 实验所用试剂均为分析纯, 水为二次蒸馏水 (电导率 $1.7 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$)。

1.2 实验条件的优选 (1) BSA 的浓度范围: 实验表明 BSA 浓度在 $1.20 \times 10^{-7} \sim 2.00 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内, 荧光强度与其浓度成正比, 故实验中 BSA 浓度选择 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; (2) 缓冲介质的选择: 测试了 BSA 在 Tris-HCl、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-H}_3\text{BO}_3$ 和 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 三种缓冲溶液中的荧光稳定情况, 发现 BSA 在 Tris-HCl 缓冲溶液中稳定性较好, 因而选定 Tris-HCl 作为实验的缓冲作用溶液; (3) pH 的影响: 在 Tris-HCl 缓冲溶液中, pH 于 4.0 ~ 9.0 范围内测定 BSA 的荧光光谱, 发现 pH 在 6.0 ~ 7.5 范围内 BSA 荧光强度相对稳定, 所以选择与人体体液相近的 $\text{pH} = 7.3$; (4) 离子强度的影响: NaCl 浓度在 $0.10 \sim 0.35 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内对 BSA 荧光强度影响不太明显, 因而实验选定 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 溶液作为测定 BSA 荧光时的离子强度。

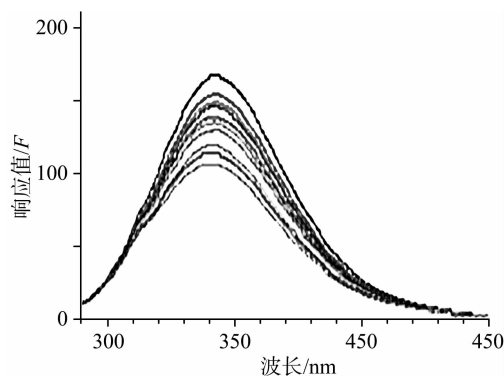
1.3 荧光光谱的测定 在选定条件下, 10 支 10 mL 比色管中分别加入 1 mL Tris-HCl 缓冲液、1 mL $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 溶液、1 mL 二次蒸馏水、 $0.1 \text{ mL } 5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA 溶液和不同浓度的二氢黄酮醇溶液, 用甲醇定容至 5 mL, 将比色管分别置于 18、25、30 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中反应 5 min, 设定激发狭缝宽度为 2.5 nm、发射狭缝宽度为 5 nm, 扫描速度为 $1200 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$, 在激发波长为 280 nm 的激发下, 于 290 ~ 450 nm 范围内扫描, 分别得到二氢槲皮素

和二氢杨梅素的荧光猝灭光谱 (见图 2 和图 3)。



注: 当 BSA 浓度为 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 二氢槲皮素从上至下浓度依次为 1×10^{-6} 、 2×10^{-6} 、 3×10^{-6} 、 4×10^{-6} 、 5×10^{-6} 、 6×10^{-6} 、 7×10^{-6} 、 8×10^{-6} 、 9×10^{-6} 、 $10 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

图2 二氢槲皮素的荧光光谱图



注: 当 BSA 浓度为 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 二氢杨梅素从上至下浓度依次为 0.9×10^{-6} 、 1.8×10^{-6} 、 2.7×10^{-6} 、 3.6×10^{-6} 、 4.5×10^{-6} 、 5.4×10^{-6} 、 6.3×10^{-6} 、 7.2×10^{-6} 、 8.1×10^{-6} 、 $9.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

图3 二氢杨梅素的荧光光谱图

2 结果

2.1 荧光光谱的研究 在 BSA 中, 由于色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸三种芳香族氨基酸的存在, 故使 BSA 存在内源荧光, 而色氨酸的荧光强度大于其他两种, 所以 BSA 荧光强度的变化可直接反映色氨酸残基及其周围环境的变化。以不同浓度的二氢槲皮素和二氢杨梅素与 BSA 的作用体系来看, 随着两种二氢黄酮浓度的增加, 在 341 nm 左右两种体系的荧光发射强度均出现有规律的被猝灭现象, 且最大发射波长均有一定程度的蓝移情况。说明两种小分子二氢黄酮醇引入后与 BSA 发生了结合反应, 并生成了荧光较弱或不发荧光的物质。

2.2 荧光猝灭类型的判断 荧光的猝灭类型分为动态猝灭和静态猝灭两种。动态猝灭可用动态猝灭常数 K_{sv} 来描述猝灭剂与荧光物质之间的相互作用的程度及性质; 静态猝灭可用静态结合常数 K 来

描述猝灭剂与荧光物质之间相互作用的程度和性质。

激发态时猝灭剂与荧光物质分子之间的相互作用过程可通过动态猝灭得到反映,其作用规律遵循 Stern-Volmer 方程:

$$F_0/F = 1 + K_Q\tau_0 C_Q = 1 + K_{sv} C_Q$$

式中: F_0 为未加入猝灭剂时荧光物质的荧光强度; F 为猝灭剂浓度等于 C_Q 时荧光物质的荧光强度; K_Q 为双分子猝灭过程的速率常数; τ_0 为没有猝灭剂存在下荧光分子的平均寿命; K_{sv} 为 Stern-Volmer 双分子猝灭速率常数,看作是双分子猝灭速率常数与单分子衰变速率常数的比率。

静态猝灭则可认为是基态时猝灭剂与荧光物质生成荧光较弱或不发荧光的复合物,可用下列方程来描述:

$$F_0/F = 1 + KC_Q$$

式中: K 为基态复合物的形成常数。

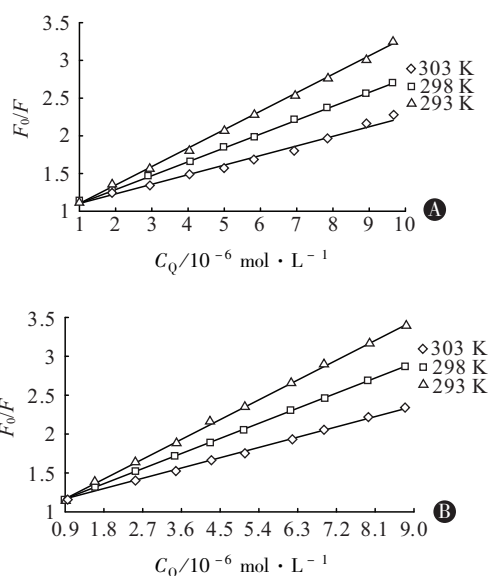
从温度影响、荧光寿命和吸收光谱等三方面判断猝灭类型:(1)温度影响:静态猝灭时,分子复合物的稳定性随温度的升高而下降,因而猝灭常数随温度的升高而减小;动态猝灭时,温度升高,扩散系数增大,双分子的猝灭常数增大,因而动态猝灭与温度有关。(2)荧光寿命:静态猝灭不因为猝灭剂的存在而影响荧光分子激发态的寿命,因而 $\tau_0/\tau = 1$;动态猝灭因为猝灭剂的存在而使荧光寿命缩短,此时 $\tau_0/\tau = F_0/F$ 。(3)吸收光谱:静态猝灭因形成分子复合物而使吸收光谱发生变化;动态猝灭不改变荧光物质的吸收光谱,只影响荧光物质的激发态。

本实验采用 Stern-Volmer 方程进行处理,以方便判断猝灭类型, $F_0/F = 1 + K_Q\tau_0 C_Q = 1 + K_{sv} C_Q$ 以 F_0/F 对 C_Q 作曲线图(图4),数据结果见表1。

表1 BSA 与二氢槲皮素和二氢杨梅素相互作用的猝灭常数

化合物	温度/K	$K_{sv}/L \cdot mol^{-1}$	$K_Q/L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$	相关系数
二氢槲皮素	293	2.39×10^4	2.39×10^{12}	0.998
	298	1.89×10^4	1.89×10^{12}	0.999
	303	1.27×10^4	1.27×10^{12}	0.991
二氢杨梅素	293	2.51×10^4	2.51×10^{12}	0.999
	298	1.92×10^4	1.92×10^{12}	0.999
	303	1.32×10^4	1.32×10^{12}	0.997

从图4可以看出, F_0/F 对 C_Q 呈现良好的线性关系,且曲线的斜率随着温度的升高而逐渐降低,可判断两种小分子二氢黄酮醇与BSA结合形成了复合物,应为静态猝灭过程。



注:A为二氢槲皮素;B为二氢杨梅素

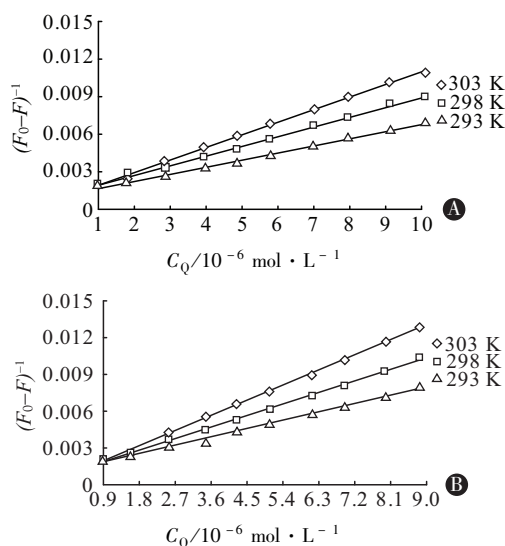
图4 BSA 被分别猝灭时的 Stern-Volmer 曲线

文献[16]报道,各类猝灭剂对生物大分子的碰撞猝灭常数约为 $2 \times 10^{10} L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$,荧光寿命约为 $1 \times 10^{-8} s$ 。从实验结果看,两种小分子二氢黄酮醇对BSA的猝灭常数都远远大于各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞猝灭常数,进一步表明两种二氢黄酮醇对BSA的猝灭属于静态猝灭。

2.3 结合常数的计算 静态猝灭过程中荧光强度 F 、猝灭剂浓度 C_Q 和结合常数 K 之间的关系可用 Line Weaver-Burk 双倒数函数表示:

$$(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + K^{-1} F_0^{-1} C_Q^{-1}$$

通过 $(F_0 - F)^{-1}$ 对 C_Q^{-1} 作曲线图(图5),可求得二氢槲皮素和二氢杨梅素与BSA作用的结合常数,具体数据见表2。



注:A为二氢槲皮素;B为二氢杨梅素

图5 $(F_0 - F)^{-1}$ 对 C_Q^{-1} 的曲线图

表2 BSA与二氢槲皮素和二氢杨梅素的结合常数

化合物	温度/K	$K/L \cdot mol^{-1}$	相关系数
二氢槲皮素	293	2.27×10^4	0.997
	298	2.06×10^4	0.996
	303	1.89×10^4	0.992
二氢杨梅素	293	2.43×10^4	0.998
	298	2.39×10^4	0.995
	303	2.13×10^4	0.993

从表2可以看出,温度对二氢槲皮素及二氢杨梅素与BSA的结合常数 K 的影响不大, K 的数值均大于 10^4 ,说明BSA与两种二氢黄酮结合较强,而相同的温度下二氢杨梅素的结合常数 K 较大,可能与二氢杨梅素的结构B环上多一个羟基有关,进而说明黄酮中的羟基参与了结合反应。

2.4 作用力类型的确定 不同药物小分子与大分子蛋白质的作用力类型主要有氢键、范德华力、疏水作用力和静电引力等。如温度变化不大,反应焓变 ΔH 可看成常数,作用力类型可以通过反应前后热力学参数焓变 ΔH 和熵变 ΔS 的大小进行判断。药物小分子与大分子BSA之间作用的热力学参数可表示为:

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

$$\Delta S = -(\Delta G - \Delta H)/T$$

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

通过选定 $T_1 = 293\text{ K}$, $T_2 = 303\text{ K}$ 计算其热力学参数,具体数据见表3。

表3 BSA与二氢槲皮素和二氢杨梅素结合的热力学参数

化合物	$\Delta G/kJ \cdot mol^{-1}$	$\Delta H/kJ \cdot mol^{-1}$	$\Delta S/J \cdot mol^{-1}$
二氢槲皮素	-24.61	-0.204 6	81.90
二氢杨梅素	-24.98	-0.147 2	83.33

从表3的热力学数据来看,二氢槲皮素和二氢杨梅素的吉布斯自由能 $\Delta G < 0$,说明两种二氢黄酮与蛋白质BSA的结合反应是自发进行的; $\Delta S > 0$, $\Delta H < 0$,说明两者的结合力主要为疏水作用;二氢槲皮素和二氢杨梅素为多羟基类化合物,羟基将参与成键,因此除了疏水作用外,应该还有氢键作用,两种小分子物质极有可能扦插到BSA中形成疏水空腔而使BSA的荧光发生猝灭。

3 结论

本实验的研究表明,二氢槲皮素和二氢杨梅素与BSA之间存在相互作用并形成分子复合物,两种小分子对BSA的荧光猝灭作用过程为静态猝灭;根据热力学参数判断,二氢槲皮素和二氢杨梅素与

BSA作用主要是因为两种小分子物质扦插到BSA中后形成疏水空腔使其结构发生变化而出现荧光猝灭的静态猝灭。

通过对二氢槲皮素和二氢杨梅素与BSA之间相互作用的研究,对于了解两种小分子与BSA作用的机制,开发两种小分子药物及对其结构进行改造有重要意义。

参考文献

- [1] 王佳奇,宋明铭,陈凯,等.二氢槲皮素与二氢杨梅素的抗肿瘤活性对比[J].中国免疫学杂志,2016,32(11):1614-1620.
- [2] 翟延君,程飞王,添敏,等.花旗松素对人宫颈癌Hela细胞的体外抗肿瘤活性及其机理研究[J].中成药,2011,33(12):2052-2055.
- [3] 李雪,赵明智,郭瑞霞.花旗松素对人肺癌细胞A549增殖的抑制作用及其机制研究[J].现代药物与临床,2015,30(3):249-252.
- [4] 刘妍,王遂.二氢槲皮素的提取及抗氧化性研究[J].化学研究与应用,2011,23(1):107-111.
- [5] 卢怡雯,李晓芬,高云涛,等.花旗松素清除DPPH自由基的微量光度滴定研究[J].食品科技,2015,40(7):286-289.
- [6] CHU SC, HSIEH YS, LIN JY. Inhibitory effects of flavonoids on Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase activity[J]. J Nat Prod, 1992, 55(2):179-183.
- [7] BIZIAGOS E, CRANCE JM, PASSAGOT J, et al. Effect of antiviral substances on hepatitis a virus replication *in vitro*[J]. J Med Virol, 1987, 22(1):57-66.
- [8] ZHANG Q, LIU J, LIU B, et al. Dihydromyricetin promotes hepatocellular carcinoma regression *via* a p53 activation-dependent mechanism[J]. Sci Rep, 2014, 4:4628.
- [9] 张琼,刘德育.蛇葡萄素改变Bel-2/Bax表达和激活caspase-3诱导人肝癌细胞Bel-7402凋亡[J].中国药理学通报,2009,25(11):1502-1506.
- [10] REDDY BS, SHARMA SK, LOWN JW. Recent developments in sequence selective minor groove DNA effectors[J]. Curr Med Chem, 2001, 8(5):475-508.
- [11] 张友胜,宁正祥,杨书珍,等.显齿蛇葡萄中二氢杨梅树皮素的抗氧化作用及其机制[J].药学学报,2003,38(4):241-244.
- [12] 陈立峰,董倩倩,张琼.二氢杨梅素对兔复发性口腔黏膜溃疡的作用[J].中国中药杂志,2008,33(2):176-180.
- [13] 潘人琦,郁建平.二氢杨梅素解酒作用的研究[J].山地农业生物学报,2012,31(3):247-249.
- [14] 萧力争,银霞,刘素纯,等.二氢杨梅素抗菌活性研究[J].食品科技,2008,33(4):140-143.
- [15] 郑成,陈静,郭丽娜,等.二氢杨梅素的降血糖及保护肾脏损伤效果研究[J].精细化工,2008,25(10):966-969.
- [16] 何华,于俊生,徐珊萍,等.环丙沙星与牛血清白蛋白的相互作用[J].药学学报,2001,36(7):549-551.

(收稿日期:2017-03-30,修回日期:2017-05-15)