

# 荧光法研究三种黄酮小分子与溶菌酶的相互作用

杨 冉<sup>1</sup>, 陈晓岚<sup>2</sup>, 李 萍<sup>1</sup>, 屈凌波<sup>2</sup>

(1. 中国药科大学现代中药教育部重点实验室, 南京 210038;

2. 郑州大学化学系, 化学生物重点实验室, 郑州 450052)

**摘要** 用荧光光谱法研究了芹菜素(Quercetin)、木犀草素(Luteocin)、槲皮素(Quercetin)与溶菌酶的相互作用, 对比了 C3'-OH 和 C3-OH 取代对黄酮与溶菌酶作用的影响. 结果表明, C3'-OH 可大大增强黄酮与溶菌酶之间的作用, C3-OH 的取代则导致作用力减弱. 根据 3 种黄酮的结构参数, 初步分析了 C3'-OH 和 C3-OH 取代对黄酮与蛋白相互作用的影响.

**关键词** 荧光光谱法; 溶菌酶; 芹菜素; 木犀草素; 槲皮素; 能量转移; 结构参数

**中图分类号** O625; O641

**文献标识码** A

**文章编号** 0251-0790(2006)09-1673-04

许多化合物活性的实质在于其与生物体内靶向大分子之间弱的相互作用, 活性的高低取决于它们与靶向分子之间作用的方式和亲和力的大小<sup>[1]</sup>. 蛋白质是生物体内具有重要生理功能的大分子, 是药物发挥药效的重要载体和靶分子, 探讨具有药理活性的小分子与蛋白的相互作用及作用机理, 对于了解药物发挥药效的作用机制, 揭示药物药效的实质内涵具有重要意义. 溶菌酶是一种广泛分布于生物体内的小分子碱性蛋白, 长期以来一直被作为一种模型体系, 用于研究蛋白的空间构象, 酶动力学以及分子进化与分子免疫间的关系<sup>[2]</sup>. 同时它也是生物体内不可缺的重要的非特异性体液免疫因子, 能够和很多的外源和内源性物质结合, 从而行使其抗菌消炎、抗病毒等诸多的生物功能<sup>[3]</sup>. 关于溶菌酶与外源性小分子相互作用的研究很少有报道. Chen 等<sup>[4,5]</sup>曾通过 ESI/MS 和荧光光谱法对 7-羟基黄酮、5,7-二羟基黄酮及其磷酸化产物与溶菌酶的相互作用进行过研究. 黄酮类化合物母核上羟基的取代位置及羟基的多少对其活性有重要影响<sup>[6]</sup>.

本文对具有不同羟基取代的 3 种黄酮分子 (Scheme 1) 与溶菌酶的相互作用进行研究, 旨在通过它们与溶菌酶作用的对比, 探讨 C3'-OH 和 C3-OH 取代对黄酮类化合物与生物大分子作用的影响.

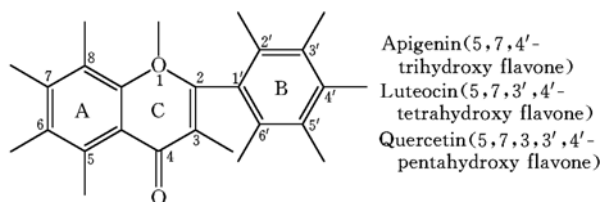
## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

荧光分光光度计 (Hitach F-4500); 紫外分光光度计 (HP, UV-8453); 电子分析天平 (日立 HA-180MF); 恒温水浴 (岛津 TB-85); 酸度计 (pH-3S). 溶菌酶 (Sigma, 纯度 >99%), 木犀草素、芹菜素溶液、槲皮素 (中国药科大学现代中药教育部重点实验室提供, 纯度 ≥99.5%), 三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、盐酸、氯化钠均为分析纯试剂, 实验用水均为二次亚沸蒸馏水.

### 1.2 实验方法

在 10 mL 的具塞试管中, 依次加入 1.0 mL Tris-HCl 缓冲溶液 (用体积分数 50% 甲醇/水配制, pH = 7.2)、0.8 mL 0.5 mol/L NaCl 溶液 (用体积分数 50% 甲醇/水配制) 和 80 μL 5.0 × 10<sup>-5</sup> mol/L 溶



Scheme 1 Structure of assay flavones

收稿日期: 2005-08-03.

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 20472076)、河南省杰出青年科学基金 (批准号: 0512001400) 资助。

联系人简介: 屈凌波 (1963 年出生), 男, 博士, 教授, 主要从事药物分析及药物分子设计研究. E-mail: qulingbo@zzu.edu.cn;

李 萍 (1960 年出生), 女, 博士, 教授, 主要从事中药新药开发研究. E-mail: liping2004@126.com

菌酶水溶液, 然后分别加入一定量的  $1.5 \times 10^{-4}$  mol/L 黄酮小分子溶液(用体积分数 50% 甲醇/水配制), 用体积分数 50% 甲醇/水稀释至 4 mL. 将试管置于恒温仪中, 分别调节水温至 20 和 37  $^{\circ}\text{C}$ , 在 200 ~ 900 nm 范围内, 激发波长为 280 nm, 激发和发射光谱狭缝宽度均为 5.0 nm, 记录荧光光谱.

## 2 结果与讨论

### 2.1 芹菜素、木犀草素、槲皮素对溶菌酶荧光光谱的影响

芹菜素、木犀草素、槲皮素对溶菌酶的荧光猝灭光谱(图 1)表明, 3 种小分子均无荧光发射, 但它们在溶菌酶中的激发波长(280 nm)和发射波长(334 nm)下均有一定程度的吸收, 因此其猝灭行为下包含有“内滤光效应”. Steiner 等<sup>[7]</sup>提出, 当吸收值不超过 0.3 时, 内滤光效应可以用  $F_c = F_a \times e^{-(A_1 + A_2)/2}$  校正, 其中  $F_a$  和  $F_c$  分别代表校正后和观察到的荧光强度,  $A_1$  和  $A_2$  为小分子溶液在激发和发射波长处的吸收值. 本文计算所用的荧光强度均为校正“内滤光效应”后的荧光值.

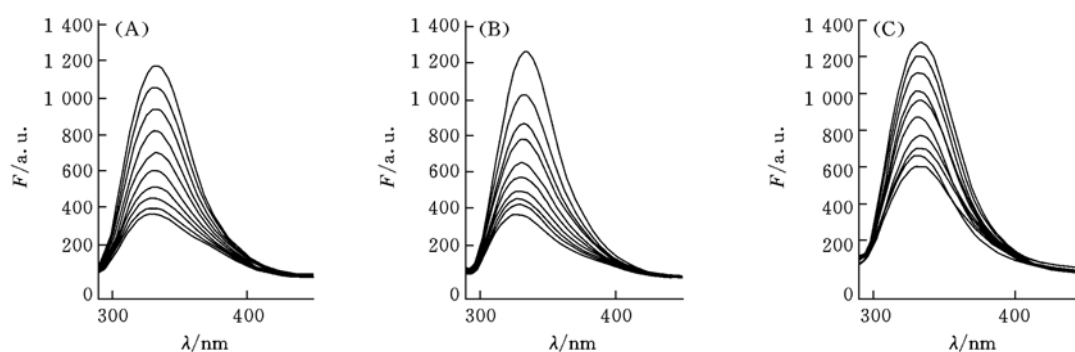


Fig. 1 Effects of Apigenin(A), Luteocin(B) and Quercetin(C) on fluorescence spectra of Lys at 20  $^{\circ}\text{C}$

$c(\text{BSA}) = 1.0 \mu\text{mol/L}$  in all cases; peak from up to down,  $c(\text{Apigenin})/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ : 0, 3.0, 6.0, 9.0, 12.0, 15.0, 18.0, 21.0, 24.0, 27.0;  $c(\text{Luteocin})/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ : 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0, 17.5, 20.0, 22.5;  $c(\text{Quercetin})/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ : 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0, 17.5, 20.0, 22.5.

由图 1 可知, 随着 3 种黄酮小分子的加入, 334 nm 左右溶菌酶的最大荧光发射峰逐渐降低, 并且芹菜素、木犀草素分别使溶菌酶的最大发射蓝移 8 和 13 nm, 表明色氨酸残基所处环境疏水性增加<sup>[8]</sup>, 这是小分子与溶菌酶之间发生相互作用的佐证. 但槲皮素的加入只引起溶菌酶内在荧光有规律地猝灭, 而没有明显的波长蓝移. 仅从溶菌酶的内荧光猝灭还不足以证明它们之间发生了相互作用.

### 2.2 动态猝灭结合常数

在一般情况下, 引起荧光猝灭作用的原因主要有 3 种: 动态猝灭、静态猝灭和发生非辐射能量转移等. 我们利用 Stern-Volmer<sup>[9]</sup>方程:  $F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q]$ , 对上述过程进行处理, 式中  $F_0$  为未加入化合物时蛋白的荧光强度,  $F$  是加入化合物作用后蛋白的荧光强度,  $K_{sv}$  是动态猝灭常数,  $\tau_0$  是猝灭剂不存在时生物大分子的平均寿命,  $[Q]$  为猝灭剂的浓度. 表 1 结果显示, 3 种黄酮对溶菌酶荧光的猝灭速率常数  $K_q$  均远大于  $2.0 \times 10^{10}$  L/(mol  $\cdot$  s)<sup>[9]</sup>, 且  $K_{sv}$  不随温度的升高而加剧. 由此断定, 3 种黄酮分子对溶菌酶体系的荧光猝灭作用主要是由它们与溶菌酶彼此结合的静态猝灭所引起.

### 2.3 静态结合常数和结合位点数

药物分子与蛋白之间的相互作用一般采用位点结合模型来描述. 假设蛋白分子(P)对药物分子(Q)有  $n$  个等同且独立的结合部位, 蛋白质总浓度为  $[P_t]$ , 药物总浓度为  $[Q_t]$ , 经推导并分别取对数得:  $\lg(F_0 - F)/F = n \lg K_A - n \lg(1/\{[Q_t] - (F_0 - F)[P_t]/F_0\})$ , 以  $\lg(F_0 - F)/F$  对  $\lg(1/\{[Q_t] - (F_0 - F)[P_t]/F_0\})$  作图, 得到的结合常数和结合位点数列于表 1. 表 1 表明, 3 种黄酮小分子与溶菌酶均有较强的亲和力, 结合位点数随结合力的增强而增多. 相对芹菜素, 木犀草素与溶菌酶的结合常数明显增大, 说明 C3'-OH 可大大增强黄酮小分子与蛋白之间的亲和力, 这与文献<sup>[6, 10]</sup>的 C3'-OH 的黄酮具有更强的抗氧化活性结果相一致. 但槲皮素与溶菌酶的作用相对芹菜素和木犀草素则大大减弱, 说明 C3-OH 取代不利于黄酮与蛋白之间的相互作用, 这与 Husain<sup>[6]</sup> 和 Hodinick 等<sup>[11]</sup> 报道的 C3-OH 降低黄酮抗氧化活性相一致.

上述分析表明, 黄酮类化合物与蛋白相互作用的强弱与其活性相关.

**Table 1** The dynamic quenching constants and static quenching constants of the interactions between Lys and flavones

Compound	$t/^\circ\text{C}$	Dynamic quenching		Static quenching		
		$K_{\text{sv}}/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$R^2$	$K/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$n$	$R^2$
Apigenin	20	$8.84 \times 10^4$	0.987 8	$6.63 \times 10^4$	1.51	0.998 1
	37	$8.65 \times 10^4$	0.986 5	$6.52 \times 10^4$	1.50	0.995 4
Luteocin	20	$1.23 \times 10^5$	0.977 9	$8.56 \times 10^4$	1.49	0.997 0
	37	$1.13 \times 10^4$	0.980 2	$8.36 \times 10^4$	1.47	0.997 3
Quercetin	20	$5.23 \times 10^4$	0.980 7	$4.73 \times 10^4$	1.28	0.993 9
	37	$5.12 \times 10^4$	0.981 1	$4.62 \times 10^4$	1.24	0.996 5

## 2.4 作用力类型的确定

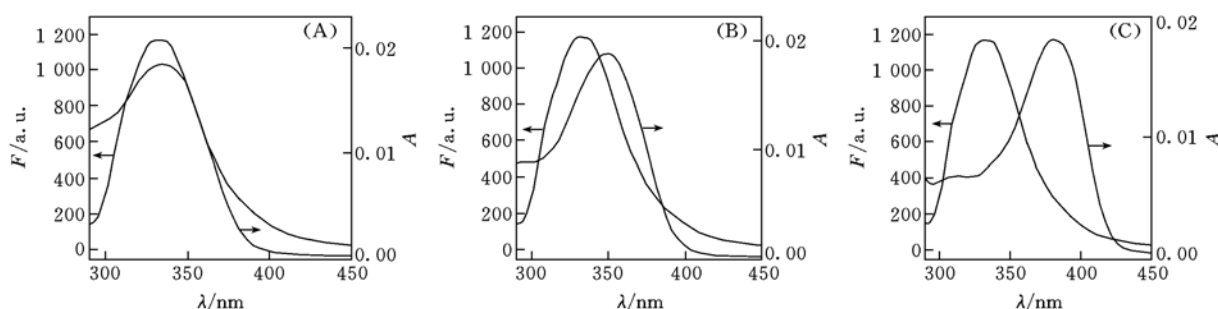
有机小分子和蛋白质等大分子之间的结合力主要有疏水作用力、范德华力、静电引力和氢键等. 当温度变化不大时, 反应的焓变  $\Delta H$  可以看作是一个常数. 根据反应前后热力学参数焓变  $\Delta H$  和熵变  $\Delta S$  的相对大小, 可以判断小分子与蛋白质间的主要作用力类型<sup>[12]</sup>. 热力学参数之间的关系如下:  $\ln(k_2/k_1) = \Delta H/R(1/T_1 - 1/T_2)$ ,  $\Delta G = -RT \ln k$ ,  $\Delta S = -(\Delta G - \Delta H)/T$ . 根据热力学公式以及不同温度下的  $k$  值, 计算 3 种黄酮与溶菌酶作用的热力学参数见表 2.  $\Delta H \geq 0$ ,  $\Delta S > 0$  是小分子与蛋白之间以疏水作用力结合的表现<sup>[12]</sup>. 在许多情况下, 有机小分子与蛋白的反应是多种力协同作用的结果. 对比 3 种黄酮与溶菌酶的结合常数可知, OH 的个数和位置对其与溶菌酶之间的结合力具有重要影响, 表明氢键作用力参与了 3 种小分子与溶菌酶的作用过程. 疏水作用是发生在两个非极性基团之间的一种作用力, 黄酮母核是黄酮分子的主要疏水性基团, 由此推断, 3 种黄酮主要以疏水作用与溶菌酶相结合, 黄酮母核是黄酮与溶菌酶发生疏水作用的主要位点, 而取代的羟基则与溶菌酶发生氢键作用.

**Table 2** The thermodynamic parameters of the interactions between Lys and flavones

Compound	$\Delta H/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S/(\text{J} \cdot \text{K}^{-1})$	$\Delta G/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$
Apigenin	-0.81	89.52	-27.04
Luteocin	-1.05	90.85	-27.67
Quercetin	-1.04	85.93	-26.22

## 2.5 结合距离的计算

由图 2 可知, 溶菌酶的荧光发射光谱与芹菜素、犀草素、槲皮素的 UV 吸收光谱有较多的重叠, 根据 Förster 能量转移原理<sup>[13]</sup>, 计算 3 种黄酮小分子与溶菌酶色氨酸残基之间的距离(表 3)显示 3 种黄酮与溶菌酶中色氨酸之间的距离均小于 7 nm, 表明它们都可以能量转移的方式与溶菌酶发生作用.



**Fig. 2** Overlap of absorption of Apigenin (A), Luteocin (B) and Quercetin (C) with Lys fluorescence spectra

$c(\text{BSA}) = 1.0 \mu\text{mol/L}$ ;  $c(\text{flavones}) = 1.0 \mu\text{mol/L}$ .

**Table 3** The distance of the interaction of Lys with naringenin and naringin

Compound	$J/(\text{cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$R_0/\text{nm}$	$E$	$r/\text{nm}$
Apigenin	$1.88 \times 10^{-14}$	2.72	0.22	3.36
Luteocin	$1.90 \times 10^{-14}$	2.73	0.30	3.14
Quercetin	$1.52 \times 10^{-14}$	2.63	0.10	3.79

**Table 4** Molecular parameters of three flavones

Compound	Dipole	$\angle \text{C}2'\text{C}1'\text{C}2'/(\text{ }^\circ)$	$V/\text{cm}^3$	$\lg P$
Apigenin	6.457 2	17.002 400	671.0	1.90
Luteocin	7.535 5	18.268 200	687.0	1.51
Quercetin	5.182 7	-0.001 378	706.5	0.35

## 2.6 黄酮与溶菌酶结合模式与其结构的关系

为了更进一步探讨三种黄酮化合物与溶菌酶键合选择性的原因, 我们通过 Gaussian 03 和 Cerius<sup>2</sup>

计算软件对上述 3 种化合物的结构参数进行计算, 结果列于表 4. 3 种化合物的偶极矩大小顺序为: 木犀草素 > 芹菜素 > 槲皮素, 偶极矩增大, 表明分子中正负电荷的分布不均匀. 对中性分子而言, 意味着正负电荷的绝对值增大, 小分子和大分子之间电荷作用力增加. 3 种化合物的偶极矩与它们和溶菌酶作用的强弱成正相关, 因此推断偶极矩可能是影响 3 种化合物与溶菌酶作用的重要参数. 然而, 分子之间的作用是非常复杂的, 是各种因素综合作用的结果, OH 的取代使得黄酮分子的极性增大. 由于疏水作用是发生在两个非极性分子间的一种作用力, 相对 C3'—OH 取代来说, C3—OH 取代导致分子疏水性下降的程度大大增加, 不利于槲皮素分子与溶菌酶之间以疏水作用结合. 二面角的计算结果表明, 槲皮素分子的柔韧性相对芹菜素和木犀草素也大大降低, 这可能不利于其进入溶菌酶的疏水腔, 而小分子与蛋白质的作用主要发生在小分子与蛋白质疏水腔中的氨基酸残基之间. 因此, 上述 3 种因素都有可能导致槲皮素与溶菌酶之间的作用减弱, 至于那一种因素为主导尚需进行更多的研究.

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Pyle A. M., Morii T., Barton J. K. J. *J. Am. Chem. Soc.* [J], 1990, **112**: 9432—9434
- [ 2 ] Jeffrey S. N., John J. R., Bruce S. Z. *et al.*. *Cancer Res.* [J], 1981, **4**: 1642—1649
- [ 3 ] WANG Dian-Liang(王佃亮). *J. Chin. Biotech.* (中国生物工程杂志) [J], 2003, **23**(9): 59—62
- [ 4 ] CHEN Xiao-Lan(陈晓岚), YU Fei(于菲), QU Ling-Bo(屈凌波) *et al.*. *Acta Chim. Sinica*(化学学报) [J], 2004, **62**(3): 188—193
- [ 5 ] Chen X. L., Qu L. B., Zhang T. *et al.*. *Super. Mol. Chem.* [J], 2004, **16**(1): 67—75
- [ 6 ] CHEN Qi(陈琪), WANG Bo-Chu(王伯初), TANG Chun-Hong(唐春红) *et al.*. *J. Chongqing University*(重庆大学学报) [J], 2003, **26**(11): 48—51
- [ 7 ] XU Yan(徐岩), HUANG Han-Guo(黄汉国), SHEN Han-Xi(沈含熙). *Chin. J. Anal. Chem.* (分析化学) [J], 1998, **26**(12): 1494—1497
- [ 8 ] LI Na(李娜), WEI Yong-Ju(魏永巨). *J. Hebei Normal University, Natural Science Edition*(河北师范大学学报, 自然科学版) [J], 2003, **27**(2): 176—180
- [ 9 ] ZHANG Xiao-Wei(张晓威), ZHAO Feng-Lin(赵凤林), LI Ke-An(李克安). *Chem. J. Chinese Universities*(高等学校化学学报) [J], 1999, **20**(7): 1063—1067
- [ 10 ] Husain S. R., Cillard J., Cillard P. *Photochem.* [J], 1987, **26**(9): 2487—2491
- [ 11 ] Hodnick W. F., Kung F. S., Roetter W. J. *Biochem. Pharm.* [J], 1986, **35**(17): 2315—2357
- [ 12 ] Ross D. P., Sabramanian S. *Biochemistry* [J], 1981, **20**: 3096—3102
- [ 13 ] ZHANG Bao-Lin(张保林), WANG Wen-Qing(王文清), BAI Feng-Lian(白风莲). *Chem. J. Chinese Universities*(高等学校化学学报) [J], 1994, **15**(3): 373—378

## Interaction Between Lysozyme and Three Flavones by Fluorescence Spectroscopy

YANG Ran<sup>1</sup>, CHEN Xiao-Lan<sup>2</sup>, LI Ping<sup>1\*</sup>, QU Ling-Bo<sup>2\*</sup>

(1. *Key Laboratory of Modern Chinese Medicines, Ministry of Education,  
China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China;*

2. *Key Laboratory of Chemical Biology, Department of Chemistry, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China*)

**Abstract** The interaction between lysozyme and three flavones, including Apigenin, Luteocin and Quercetin, were studied by fluorescence spectroscopy. The influence of C3—OH and C3'—OH on the interaction of flavones-Lys were compared. The results showed that C3'—OH could enhance the binding affinity greatly; while C3—OH weakened the affinity largely. According to the structure parameters of assay flavones, the effect of hydrogen group on the flavones-protein were discussed, and the main reason resulting in the weaker binding affinity of Quercetin-Lys were explored. The results obtained from the work could supply beneficial reference for the further study of Flavone-Protein interactions.

**Keywords** Fluorescence spectroscopy; Lysozyme; Apigenin; Luteocin; Quercetin; Energy transfer; Structure parameter  
(Ed.: H, J, Z)