

有/无金属离子 Cu^{2+} 或 Zn^{2+} 参与时中药有效成分 伞形花内酯与生物大分子 BSA 的相互作用

刘雪峰, 夏咏梅, 方云*, 邹鲁, 刘玲玲

江南大学化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214036

摘要 运用荧光光谱(FS)及紫外光谱(UV)研究了有/无金属离子 Cu^{2+} 或 Zn^{2+} 参与时中药有效成分伞形花内酯与生物大分子牛血清白蛋白(BSA)的相互作用。实验结果表明:有/无金属离子参与时,伞形花内酯均与 BSA 形成基态复合物从而猝灭 BSA 的内源性荧光,猝灭原因主要为静态猝灭和非辐射能量转移;金属离子参与使得 K_A 增大, n 仍维持在 2 左右;伞形花内酯分子能够插入 BSA 分子内部,温度以及金属离子参与对伞形花内酯与 BSA 分子中荧光性氨基酸残基间的空间距离 r 影响不大。有/无金属离子参与时伞形花内酯与 BSA 的作用过程均是一个熵增加和 Gibbs 自由能降低的自发超分子作用过程。伞形花内酯与 BSA 之间以静电相互作用为主,金属离子参与使伞形花内酯与 BSA 分子间静电相互作用增强,故 ΔH 对 ΔG 的贡献增大。

主题词 中药有效成分;伞形花内酯;牛血清白蛋白;金属离子;荧光光谱法

中图分类号: O657 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2005)08-1301-05

各类化合物或合成药物与生物大分子的作用已有较多报道^[1-6],目前比较关注中药小分子与生物大分子的相互作用^[7,8]。此外,传统中药复方汤剂中或生物体内的各种金属离子必然会影响到药物分子与蛋白质的相互作用,因而研究金属离子对药物小分子与生物活性大分子相互作用的影响规律亦很有意义。中药有效成分伞形花内酯(umbelliferone)属于香豆素类天然化合物,是芸香科和伞形科中草药的主要有效成分。有关香豆素类合成化合物与人血清白蛋白(HSA)的相互作用已有报道^[9],但尚未见有金属离子参与香豆素类中药小分子与生物大分子的相互作用研究的报道。本文运用荧光光谱(FS)、紫外光谱(UV)研究了伞形花内酯与牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)相互作用,获得了药物对 BSA 荧光猝灭的主要原因、相互结合的表现结合常数 K_A 及结合位点数 n 、以及药物与 BSA 之间的主要作用力类型等作用参数,进而研究了 Cu^{2+} 或 Zn^{2+} 的参与对伞形花内酯与 BSA 相互作用的影响。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

RF 5301PC 型荧光光度仪(Shimadzu 公司), HP 1901 紫外光度仪(北京通用仪器设备公司), USC-302 型超声波浴槽(上海波龙电子设备公司)。

牛血清白蛋白(99.0%, BSA Fraction V, Sino-American Biotechnology Co.), 伞形花内酯(按照文献^[10]方法制备, m. p. 231.0~231.5 °C, 其 UV 图谱与 Sadtler 标准图谱完全吻合, 归一化纯度 98.8%), 缓冲剂 Tris(上海化学试剂公司), 亚沸蒸馏水(电导率 $7.8 \times 10^{-7} \text{ S} \cdot \text{cm}^{-1}$, 实验室自制), 其他实验试剂均为分析纯。

1.2 光谱实验方法

以 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4, 含 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 以维持溶液离子强度)为溶剂配制 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BSA 标准溶液备用。伞形花内酯用无水甲醇配成 $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准溶液备用。在 50 mL 三角瓶中精确移入一定量的伞形花内酯甲醇标液, 赶去甲醇, 再加入 BSA 标液 10 mL, 超声分散 5 min 后, 恒温 3 h。荧光光谱仪的激发光栅及发射光栅狭缝宽(带通)均为 3 nm, 激发波长 295 nm, 恒温测定上述样品在 300~500 nm 的荧光发射光谱。以 Tris-HCl 缓冲液为溶剂配制 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的伞形花内酯溶液, 恒温测定其在 300~500 nm 的 UV 吸收光谱。

2 结果与讨论

2.1 伞形花内酯对 BSA 内源性荧光猝灭

BSA 分子中的色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸残基均能够发射荧光, 因而 BSA 属内源性荧光物质。当激发光波长为 295

收稿日期: 2003-12-08, 修订日期: 2004-03-28

基金项目: 江苏省科委基金(BJ99036), 江南大学自然科学教研基金(2004LY019)资助项目

作者简介: 刘雪峰, 1973 年生, 江南大学化学与材料工程学院讲师, 博士研究生 * 通讯联系人

nm 时, BSA 荧光发射峰位置在 343 nm 附近。图 1 为 25 °C (a) 和 37 °C (b) 时伞形花内酯对 BSA 内源性荧光猝灭图。由图 1 可见, 伞形花内酯在 BSA 荧光发射出峰位置附近区域均无荧光发射峰, 随着药物浓度增加 BSA 的荧光发射峰强度 I 有规律地降低, 表明伞形花内酯能够猝灭 BSA 的内源

性荧光。伞形花内酯的荧光发射峰位置在 459 nm 附近, 该发射峰群与上述 BSA 的发射峰群在 390 nm 附近相交出现一等发射点, 表明伞形花内酯与 BSA 形成了复合物^[11], 进而证实了伞形花内酯与 BSA 之间存在相互作用。

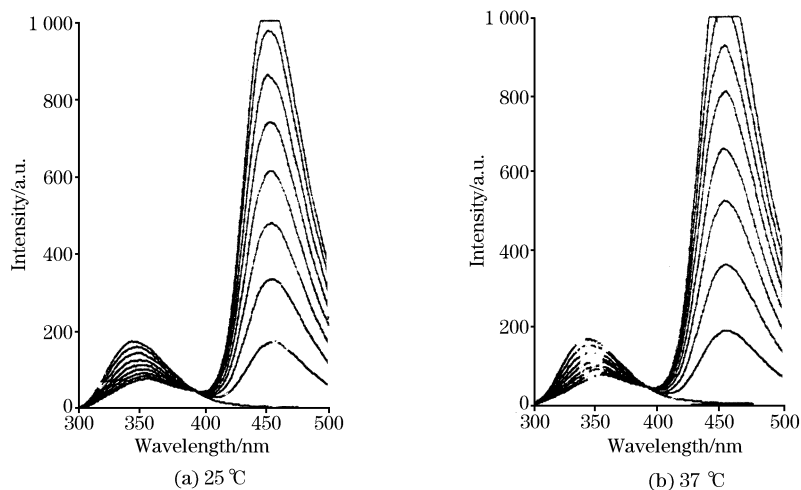


Fig. 1 Effect of umbelliferone on fluorescence spectra of BSA

$c(\text{BSA}): 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c(\text{umbelliferone})$ from up to down in peaks: 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 and $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

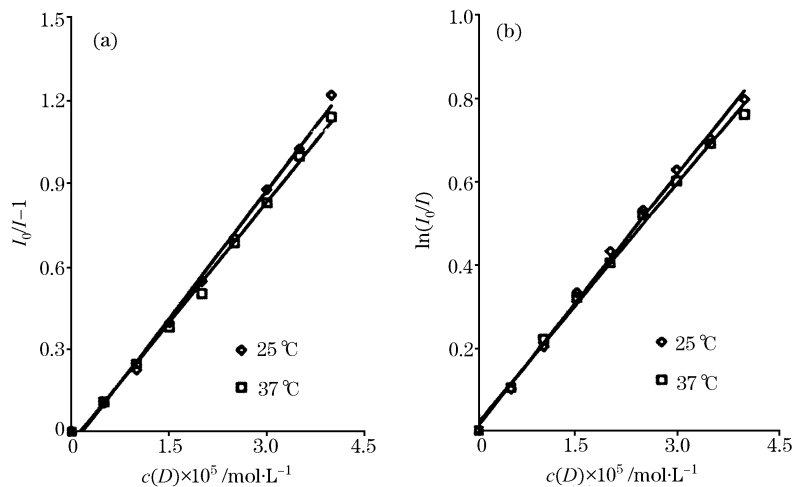


Fig. 2 Stern-Volmer (a) and Perrin (b) matching of umbelliferone-BSA (c : Concentration)

$t/^\circ\text{C}$	$K_{\text{SV}}/\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$	$K_{\text{P}}/\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$
25	$3.062 \times 10^4 (R^2 = 0.9959)$	$2.009 \times 10^4 (R^2 = 0.9965)$
37	$2.882 \times 10^4 (R^2 = 0.9967)$	$1.916 \times 10^4 (R^2 = 0.9964)$

Stern-Volmer 方程和 Perrin 方程分别用于描述动态和静态荧光猝灭过程^[12]。将伞形花内酯对 BSA 的荧光猝灭数据与药物总浓度 $c(D)$ 关系分别作 Stern-Volmer 拟合和 Perrin 拟合(图 2, 图中纵坐标 I 为荧光强度), 由此获得动态猝灭常数 K_{SV} 、静态猝灭常数 K_{P} 以及相关的线性回归系数 R^2 列于图 2 标题下方。实验结果表明, 所得拟合方程线性程度均很高。鉴于 K_{SV} 在低温下比高温下大的事实, 而且从 $K_{\text{SV}} = k_q \times \tau_0$ (式中 k_q 是由扩散过程控制的双分子动态猝灭速率常数; τ_0 是生物大分子内源性荧光平均寿命, 一般取 $6.2 \times$

$10^{-9} \text{ s}^{[14]}$), 得到 k_q 值均为 10^{12} 量级, 远大于各种猝灭体对生物大分子的最大扩散猝灭常数 ($2 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)^[1], 故伞形花内酯(对 BSA 内源性荧光的猝灭过程主要为静态猝灭过程^[1]), 其与 BSA 之间可能形成了基态复合物^[14]。图 3(以 37 °C 为例)中伞形花内酯的 UV 吸收光谱与主要 BSA 的 FS 发射光谱有相当程度的重叠现象, 据 Forster 无辐射能量转移理论^[14], 伞形花内酯与 BSA 之间存在着非辐射能量转移, 因此可以判断非辐射能量转移与静态猝灭一样也是导致伞形花内酯对 BSA 荧光猝灭的成因之一。

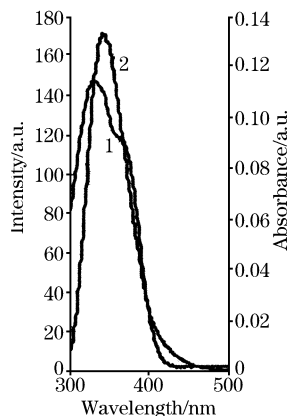


Fig. 3 Overlap of umbelliferone absorption spectra with BSA fluorescence spectra at 37 °C

- 1, Absorption spectra of umbelliferone ($1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$);
2, Fluorescence spectra of BSA ($1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

根据 Förster 无辐射能量转移理论, 计算得到伞形花内酯的 UV 吸收光谱与 BSA 的 FS 发射光谱重叠积分 $J = 5.411 \times 10^{-15} \text{ cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (25 °C) 及 $5.220 \times 10^{-15} \text{ cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (37 °C)。由图 1 结果计算得到药物小分子与 BSA 之间的能量转移效率 E , 在本文实验条件下, 取 $K^2 = 2/3$, N (折射率) = 1.336, $\Phi = 0.15$ ^[13], 进而得到伞形花内酯小分子与 BSA 荧光性氨基酸残基间的空间距离 $r = 2.95 \text{ nm}$ (25 °C) 和 2.89 nm (37 °C), 表明伞形花内酯分子能够扦插入 BSA 分子内部, 同时温度对 r 值几乎无影响。一般认为药物小分子与蛋白质结合时, 疏水性药物小分子扦插入蛋白质分子内部的疏水空腔^[13], 由于伞形花内酯在水中的溶解度极小, 属于疏水性小分子, 因而是扦插到 BSA 分子内部的疏水空腔内。

2.2 伞形花内酯与 BSA 的表观结合常数 K_A 以及结合位点数 n

设药物小分子 D 与生物大分子 P 之间的相互作用满足一般式



并设在一定浓度范围内药物小分子在每个大分子上以 n 个等同且独立的结合位点结合, 且 D 与 P 之间相互作用关系符合 Langmuir 单分子吸附模型^[15], 则当相互作用达到平衡状态时, 有

$$K_A = c(D)_b / c(D)_f (nc(P)_t - c(D)_b) \quad (2)$$

式中, K_A 为 D 与 P 之间的表观结合常数 ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$), $c(D)_b$, $c(D)_f$ 及 $c(P)_t$ 分别为被结合药物、游离药物以及生物大分子总浓度 ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。假定 D-P 复合物不发荧光, 则体系中各物种之间有下列定量关系式

$$c(D)_b / nc(P)_t = (I_0 - I) / I_0 \quad (3)$$

$$c(D) = c(D)_b + c(D)_f \quad (4)$$

式中 I_0 , I 分别是 BSA 溶液中无和有药物时的荧光发射强度, 将式(3)及式(4)代入式(2)可以得到式(5)^[16]

$$I_0 / I = K_A c(D) I_0 / (I_0 - I) - n K_A c(P)_t \quad (5)$$

按照式(5)对实验数据进行处理得到图 4, 线性拟合方程列于图 4 标题下方。从方程斜率和截距就可以得到表观结合常数 K_A 分别为 $4.047 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (25 °C) 和 $3.729 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (37 °C), 伞形花内酯在 BSA 分子上的结合位点数 n 分别为 1.88 (25 °C) 和 1.75 (37 °C), 表明伞形花内酯与 BSA 之间具有较强的相互作用, 伞形花内酯能够被 BSA 贮运。

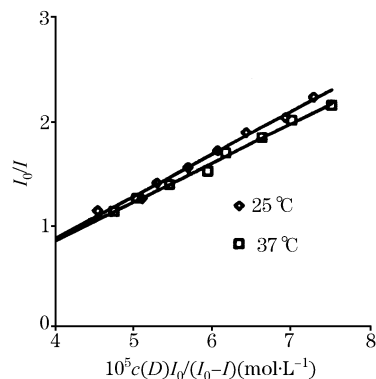


Fig. 4 The $c(D)I_0/(I_0 - I) - I_0/I$ curve of umbelliferone-BSA system (c : Concentration)

$$I_0 / I = 4.047 \times 10^4 c(D) I_0 / (I_0 - I) - 0.7599$$

$$R^2 = 0.9920 (25 \text{ °C})$$

$$I_0 / I = 3.729 \times 10^4 c(D) I_0 / (I_0 - I) - 0.6537$$

$$R^2 = 0.9938 (37 \text{ °C})$$

2.3 伞形花内酯与 BSA 之间相互作用的热力学参数及作用力类型

若将伞形花内酯与 BSA 之间作用过程的焓变 ΔH 随温度改变的变化量近似忽略, 则可以由式(6)~式(8)得到伞形花内酯与 BSA 结合过程的热力学参数 ΔH , ΔG 和 ΔS , 结果列于表 1。

$$\ln(K_A)_2 / (K_A)_1 = \Delta H (1/T_1 - 1/T_2) / R \quad (6)$$

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (7)$$

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (8)$$

Table 1 Thermodynamic parameters of umbelliferone-BSA binding process

$T/\text{°C}$	$\Delta H/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta G/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S/(\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$
25	-5.24	-26.28	70.60
37	-5.24	-27.13	70.61

表 1 中 $\Delta G < 0$, $\Delta S > 0$, 表明伞形花内酯与 BSA 的作用过程是一个熵增加、Gibbs 自由能降低的自发超分子作用过程。根据热力学参数与作用力类型的关系^[17]可以推断, 伞形花内酯与 BSA 之间以静电相互作用为主。伞形花内酯进入 BSA 的疏水空腔内部, 由伞形花内酯引发的 BSA 分子构象自发应激改变, 可使部分结合水分子得以释放, 故 $\Delta S > 0$, 这是自发相互作用的主要驱动力。 ΔH 反映了药物小分子与 BSA 间的分子结合作用, 伞形花内酯分子中存在 7-羟基, 故与 BSA 的结合以静电(偶极-偶极)相互作用为主。

2.4 Cu²⁺ 或 Zn²⁺ 参与时伞形花内酯与 BSA 的相互作用

以分别含有浓度为 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu²⁺ 或 Zn²⁺ 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4, 含 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 以维持溶液离子强度) 为溶剂配制 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA 的标准溶液, 其他实验条件同上。金属离子参与时伞形花内酯对 BSA

荧光猝灭结果见图 5 (37 °C)。实验数据按照 Stern-Volmer 方程、Perrin 方程拟合处理的结果, 由 Förster 无辐射能量转移理论计算得到的 r , 表观结合常数 K_A , 结合位点数 n , 有关作用过程的热力学参数计算值一并列于表 2。

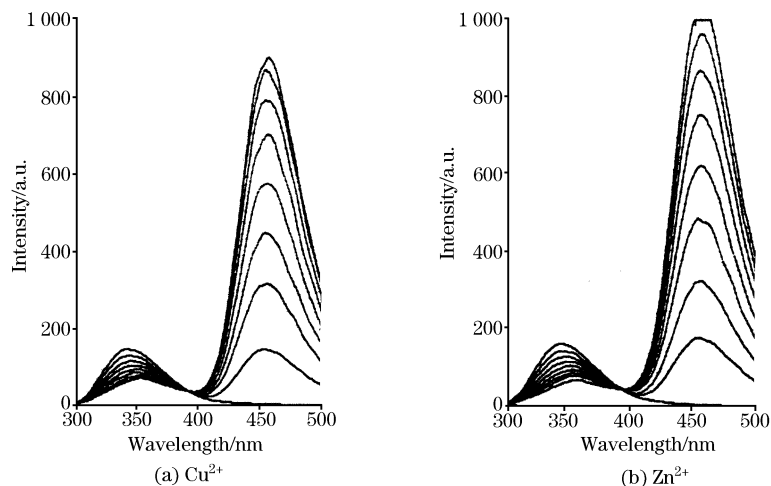


Fig. 5 Effect of umbelliferone on fluorescence spectra of BSA with Cu²⁺ or Zn²⁺ at 37 °C

$c(\text{CSA}): 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

$c(\text{Umbelliferone})$ from up to down in the left peaks: (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 and 4.0) $\times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Table 2 Experimental results of umbelliferone-BSA binding process with Cu²⁺ or Zn²⁺ at 25 °C or 37 °C

metal ion	$T/^\circ\text{C}$	$K_{\text{SV}}/(10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$K_{\text{P}}/(10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$	r/nm	$K_{\text{A}}/(10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$	n	$\Delta H/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta G/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S/(\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$
Cu ²⁺	25	3.283 ($R^2=0.995$)	2.178 ($R^2=0.998$)	3.04	4.219 ($R^2=0.990$)	1.52	-5.71	-26.38	69.36
	37	3.035 ($R^2=0.997$)	2.061 ($R^2=0.996$)	3.08	3.859 ($R^2=0.9931$)	1.48	-5.71	-27.22	69.39
Zn ²⁺	25	3.832 ($R^2=0.993$)	2.323 ($R^2=0.997$)	3.07	5.294 ($R^2=0.992$)	1.89	-7.79	-26.95	64.30
	37	3.263 ($R^2=0.994$)	2.089 ($R^2=0.997$)	3.12	4.687 ($R^2=0.996$)	2.18	-7.79	-27.72	64.29

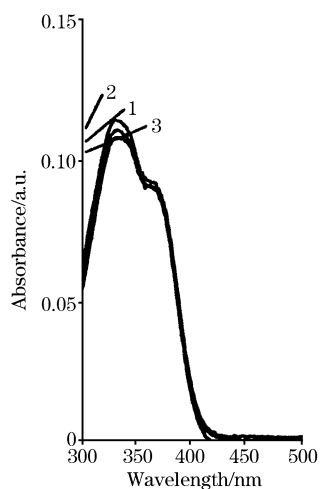


Fig. 6 Effect of metal ions on UV spectra of umbelliferone

1, Cu²⁺; 2, Zn²⁺; 3, without Cu²⁺ and Zn²⁺

从图 5 可见, Cu²⁺ 或 Zn²⁺ 参与时, 伞形花内酯对 BSA 的内源性荧光也具有猝灭作用, 与无金属离子参与相比等发射点位置未变, 表明伞形花内酯与 BSA 之间仍然存在着相

互作用, 伞形花内酯与 BSA 之间形成了基态复合物。综合表 2 中有金属离子参与时的结果可以推断: 静态猝灭和非辐射能量转移仍是导致伞形花内酯对 BSA 荧光猝灭的两大成因; 伞形花内酯与 BSA 的表观结合常数 K_A 增大, 表明金属离子参与降低了中药小分子的游离浓度, 有助于药物持久缓释发挥药效; 伞形花内酯在 BSA 分子上的结合位点数 n 仅稍有改变, Cu²⁺ 共存时 n 为 1.50 ± 0.02 , Zn²⁺ 共存时 n 为 2.04 ± 0.14 ; 金属离子参与对 r 影响不大, 表明伞形花内酯分子仍然能够插入 BSA 分子内部; 从热力学函数计算得知金属离子参与时伞形花内酯与 BSA 的作用过程仍是一个熵增加、Gibbs 自由能降低的自发超分子作用过程, 伞形花内酯与 BSA 之间仍以静电相互作用为主。图 6 结果显示 Cu²⁺ 或 Zn²⁺ 存在时, 伞形花内酯的紫外最大吸收峰位置没有明显变化, 但最大吸光度明显增强, 表明 Cu²⁺ 或 Zn²⁺ 分别与伞形花内酯形成基态复合物^[13], 考虑到 Cu²⁺ 或 Zn²⁺ 也能与 BSA 结合, 因此, 有金属离子参与时, 金属离子可能在伞形花内酯与 BSA 分子间起“离子架桥作用”^[18], 将使伞形花内酯与 BSA 分子间静电相互作用增强, 故 ΔH 对 ΔG 的贡献增大, 这一推论从表 1 和表 2 中 ΔH 及 ΔG 数据得到证实。

参 考 文 献

- [1] LIU Bao-sheng, ZHANG Hong-yi, WANG Fu-li(刘保生, 张红医, 王甫丽). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2003, 23(3): 539.
- [2] ZHANG Hong-yi, LIU Bao-sheng, WANG Fu-li(张红医, 刘保生, 王甫丽). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2003, 23(2): 342.
- [3] FENG Xi-lan, LI Na, ZHAO Feng-ling, et al(冯喜兰, 李娜, 赵凤林, 等). Acta Chimica Sinica(化学学报), 2003, 61: 603.
- [4] Jiang C Q, Gao M X, Meng X Z. Spectrochimica Acta Part A, 2003, 59: 1605.
- [5] Il'ichev Y V; Perry J L, Simon J D. J. Phys. Chem. B, 2002, 106: 452.
- [6] Il'ichev Y V; Perry J L, Simon J D. J. Phys. Chem. B, 2002, 106: 460.
- [7] LIU Yuan, XIE Meng-xia, KANG Juan(刘媛, 谢孟峡, 康娟). Acta Chimica Sinica(化学学报), 2003, 61: 1305.
- [8] ZHANG Li-wei, YANG Pin, WANG Fang(张立伟, 杨频, 王芳). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2001, 21(5): 694.
- [9] Shobini J, Mishra A K, Sandhya K, et al. Spectrochimica Acta Part A, 2001, 57: 1133.
- [10] LI Jia-rong(李嘉蓉). Chinese Traditional Medicines and Herbal Drug(中草药), 1982, 13: 13.
- [11] YU Tian-zhi, TAO Zu-yi(俞天智, 陶祖贻). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 1999, 19(3): 453.
- [12] JIANG Yun-bao, XU Jin-gou, CHEN Guo-zhen(江云宝, 许金钩, 陈国珍). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 1992, 20: 1109.
- [13] Gemlamo E L, Silva C H T P, Imasato H, et al. Biochimica et Biophysica Acta, 2002, 1594: 84.
- [14] YANG Pin, GAO Fei(杨频, 高飞). The Principles of Bioinorganic Chemistry(生物无机化学原理). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 2002.
- [15] GAO Hong-wen, CHEN Yun-sheng(郜洪文, 陈运生). Chem. J. of Chinese Universities(高等学校化学学报), 2002, 23(5): 825.
- [16] YI Ping-gui, LIU Jun-feng, SHANG Zhi-cai, et al(易平贵, 刘俊峰, 商志才, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2001, 21(6): 826.
- [17] Ross D P, Sabramanian S. Biochemistry, 1981, 20: 3096.
- [18] Xia J L, Paul L D, Yesook K. J. Phys. Chem., 1992, 96: 6805.

Interaction between Bovine Serum Albumin and Umbelliferone with/without Metal Ions of Cu^{2+} or Zn^{2+}

LIU Xue-feng, XIA Yong-mei, FANG Yun*, ZOU Lu, LIU Ling-ling

School of Chemical and Material Engineering, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China

Abstract The interaction between bovine serum albumin (BSA) and umbelliferone, an active component of Chinese herbs, with or without metal ions was investigated using fluorescence spectroscopy (FS) and UV. The experimental results showed that the umbelliferone molecules inserted into the hydrophobic pockets of BSA and quenched the intrinsic fluorescence of BSA by forming umbelliferone-BSA complex. The mechanism of fluorescence quenching was confirmed combining by both static quenching and nonradiative energy transferring. It was discovered that the apparent association constant (K_A) increases in the presence of Cu^{2+} and Zn^{2+} , whereas the spatial-distance (r) between umbelliferone molecule and fluorescent amino acid residues of the BSA and the binding sites (n) of umbelliferone molecules on BSA have no obviously change. Binding of umbelliferone molecules to BSA was a spontaneous supramolecular interaction in which entropy increased and Gibbs free energy decreased. The interaction of the umbelliferone-BSA was driven mainly by electrostatic force which was enhanced by Cu^{2+} and Zn^{2+} , thus the contribution of ΔH to ΔG increased in the presence of metal ions.

Keywords Active component of Chinese herbs; Umbelliferone; Bovine serum albumin; Metal ion; Fluorescence spectroscopy

(Received Dec. 8, 2003; accepted Mar. 28, 2004)

* Corresponding author