

3种黄酮类小分子与牛血清白蛋白间相互作用及其构效关系的研究*

Study of Interaction and Structure-Activity Relationships between Three Flavonoids and BSA

陶慧林, 寿红娟, 朱仕毅

TAO Hui-lin, SHOU Hong-juan, ZHU Shi-yi

(桂林理工大学化学与生物工程学院, 广西桂林 541004)

(Department of Chemistry and Biological Engineering, Guilin University of Technology, Guilin, Guangxi, 541004, China)

摘要:解析3种黄酮类小分子桑色素(MOR)、槲皮素(QUE)、芦丁(RUT)与牛血清白蛋白(BSA)相互作用后的紫外-可见光谱和荧光猝灭光谱,研究在同一实验条件下黄酮类小分子与BSA的相互作用及其构效关系。结果显示,黄酮母核B环上的羟基处于相邻位置时,比处于其他位置时表现出的BSA猝灭作用和结合作用更强,而有较大取代基存在时,由于位阻较大,黄酮类小分子与BSA间的猝灭作用及结合作用则明显变弱。

关键词:黄酮 牛血清蛋白 相互作用 构效关系

中图分类号:R965.1 文献标识码:A 文章编号:1002-7378(2010)03-0338-05

Abstract: The structure-activity relationship and interaction between three flavonoids including Morin (MOR), Quercetin (QUE) and Rutin (RUT) and BSA were observed by UV-visible spectra and fluorescence quenching spectra. The results showed that the quenching and binding effect between flavonoids and BSA were strong when the hydroxyl group was in the adjacent position of B benzene ring of nucleus. However, the quenching and binding effect between flavonoids and BSA decreased when a large group existed, which is due to the steric hindrances.

Key words: flavonoids, bovine serum albumin, interaction, structure-activity relationships

研究中药小分子与血清白蛋白之间的相互作用,除了可以对指导合理用药和讨论相互作用机理有实际意义之外,还可以根据其相关参数的不同来判断中药小分子在与白蛋白结合时哪些基团有利于结合作用的发生,哪些基团是关键基团,即可以研究两者所表现出的构(中药小分子的分子结构)效(中药小分子与白蛋白相互作用的效应及相关参数的改变)关系。这方面的研究可以从分子结构水平理解药物与蛋白质间的相互机制,及生物大分子对小分子的识别作用,对中药中主要药效小分子的筛选及药物分子设计和药物分子改造方面具有借鉴意义。

本文选择黄酮类小分子桑色素(MOR)、槲皮素(QUE)和芦丁(RUT)作为研究药物小分子与牛血

清蛋白(BSA)相互作用及构效关系的分子。黄酮类小分子的结构如图1所示,黄酮分子A环部分的取代基全部是A环5位和7位的羟基取代;不同之处在于B环与中环,其中MOR在B环中羟基取代的位置在2'和4'位,为邻、对位取代,而QUE在B环中羟基取代的位置在3'和4'位,为间对位取代;QUE与RUT的A、B环取代基团完全相同,与QUE不同的是RUT的中环3位被体积较大的糖苷基所取代。尽管这3种黄酮类小分子与血清白蛋白的相互作用已有较多研究^[1~4],但是并没有对引起结构差异而对其构效关系进行具体的研究,而本实验旨在体现黄酮结构不同而反映出其与血清白蛋白相互作用方面的差异,重点研究的是在同一实验条件下黄酮类小分子与BSA的相互作用,并且通过计算相关参数来讨论其中所体现出的构效关系。

收稿日期:2010-06-20

作者简介:陶慧林(1961-),女,副教授,主要从事光谱分析研究。

*广西教育厅科研项目(No. 200708LX339)资助。

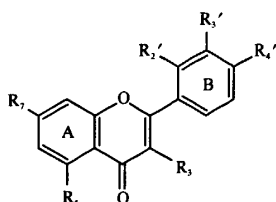


图1 黄酮类小分子的母核结构

$R_2 = \text{OH}; R_3 = \text{H}; R_4 = \text{OH}; R_5 = \text{OH}; R_6 = \text{OH}; R_7 = \text{OH}$: 桑色素(Morin)。

$R_2 = \text{H}; R_3 = \text{OH}; R_4 = \text{OH}; R_5 = \text{H}; R_6 = \text{OH}; R_7 = \text{OH}$: 槲皮素(Quercetin)。

$R_2 = \text{H}; R_3 = \text{OH}; R_4 = \text{OH}; R_5 = \text{glu-rha}; R_6 = \text{OH}; R_7 = \text{OH}$: 芦丁(Rutin)。

1 实验部分

1.1 主要仪器和试剂

RF-5301PC 荧光光度计(日本岛津公司生产), TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析公司生产)。

桑色素(MOR): $1.01 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 水溶液; 槲皮素(QUE): $1.02 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 水溶液; 芦丁(RUT): $1.00 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 水溶液。以上试剂均为生化试剂, 购于中国医药集团上海化学试剂公司。

Tris-HCl 缓冲溶液: 0.1 mol/L , pH 值 7.4; 牛血清白蛋白(BSA, 国药集团化学试剂有限公司生产): $1.53 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 水溶液(含 NaCl 0.15 mol/L), 于 4°C 以下保存备用。实验用水均为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

在 10 ml 的比色管中移入 1.35 ml 的 BSA 溶液, 再加入一定量的 MOR 或 QUE 或 RUT 溶液, 用 Tris-HCl 缓冲溶液定容至刻度, 在设定温度(25°C 或 37°C) 下静置于恒温水浴装置中 $8 \sim 10 \text{ min}$ 。在 RF-5301PC 型荧光光度计上, 设定激发光栅和发射光栅的狭缝宽度均为 5.0 nm , 激发波长为 280 nm , 恒温扫描 BSA 在 $300 \sim 450 \text{ nm}$ 的荧光发射光谱。

在 10 ml 的比色管中准确加入 0.20 ml 的 MOR 或 QUE 或 RUT 溶液, 再加入一定量的 BSA 溶液, 用 Tris-HCl 缓冲溶液定容至刻度。在 UV-1901 型紫外-可见分光光度计上, 以蒸馏水作参比, 扫描 MOR 或 QUE 或 RUT 溶液在 $200 \sim 300 \text{ nm}$ 的紫外吸收光谱。

2 结果与分析

2.1 3种黄酮类小分子与 BSA 相互作用的紫外可见吸收光谱

由于黄酮类小分子结构上的差异, 导致其紫外

可见吸收光谱也有所不同(图2)。

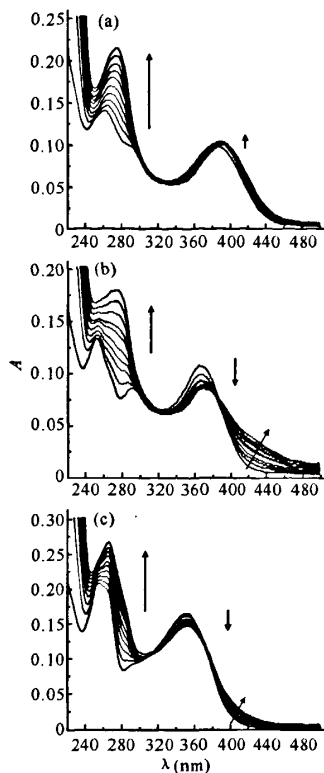


图2 MOR(a)、QUE(b)、RUT(c)与 BSA 相互作用的紫外可见吸收光谱

$c_{\text{MOR}} = 2.02 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$, $c_{\text{QUE}} = 2.14 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$, $c_{\text{RUT}} = 2.08 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$, $c_{\text{BSA}} = (0.00 \sim 1.85) \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 。

在紫外可见吸收光谱中, $240 \sim 280 \text{ nm}$ 处所显示的是由黄酮类分子的 A 环部分的吸收, $300 \sim 450 \text{ nm}$ 反映了其 B 环部分的结构特征。由于 B 环和中环上取代基对 A 环外区有不同的影响, 故 3 者的峰位和形状稍有不同。由于邻、对位的共轭效应, MOR 最大吸收波长偏向红外区一端(385 nm), QUE 出现在 368 nm , 因 RUT 的糖苷基取代了 3 位上的羟基, 光谱发生紫移, 故在 350 nm 处产生吸收。

固定黄酮的浓度, 在其中加入不同量的 BSA, 随着 BSA 浓度的增加, 黄酮小分子的紫外可见吸收光谱发生了明显的变化(见图 2): 在紫外区($250 \sim 260 \text{ nm}$) 所有光谱的吸收强度都与 BSA 浓度呈正比例增加, 且最高峰位置发生了显著的红移, 出现等吸收点, 说明游离分子与 BSA 和黄酮形成基态复合物; 当改变黄酮分子的微环境时, QUE 和 RUT 的极性增加光谱红移, 在 $400 \sim 460 \text{ nm}$ 处原来凹陷下去的光谱曲线逐渐变平, 表明新复合物的峰在此范围内。

2.2 3种黄酮类小分子与BSA相互作用的荧光光谱

由于BSA能够发射出内源性荧光,故更适合利用荧光光谱法对其与黄酮类小分子进行考察。图3为固定BSA的浓度,改变黄酮浓度时的荧光光谱。在BSA的激发波长(280nm)下,黄酮没有荧光发射。图3中只显示BSA的内源性荧光的猝灭变化。

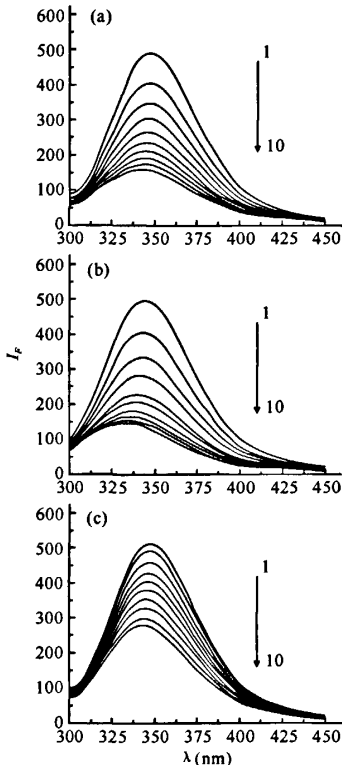


图3 MOR(a)、QUE(b)、RUT(c)与BSA相互作用的荧光光谱

$c_{\text{BSA}} = 2.06 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$, $c_{\text{MOR}} = (1.01 \sim 9.08) \times 10^{-6} \text{ mol/L}$, $c_{\text{QUE}} = (1.07 \sim 9.61) \times 10^{-6} \text{ mol/L}$, $c_{\text{RUT}} = (1.04 \sim 9.34) \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 。

从图3中可见,随着MOR浓度的不断增加,BSA的荧光呈现出有规律的下降,并且伴随着荧光光谱峰紫移5nm,并且在MOR较高浓度时,320~340nm之间的光谱峰明显变平,有荧光峰紫移转换的趋势,说明此时BSA荧光基团周围构象有所改变,这是由于MOR与BSA作用后导致色氨酸片段附近极性增加而引起的。QUE与BSA作用时,BSA的荧光也表现出很强的猝灭效应,由图(3)b中可以发现,QUE猝灭BSA的程度强于MOR,这可能是由于QUE的B环上取代羟基处于相邻的关系,使其与BSA更加容易结合,并且由于羟基相邻,使得

QUE的局部(主要指B环)位阻变小,进入BSA色氨酸疏水腔的部分更多。因此,表现出的BSA荧光紫移了11nm。而RUT由于苷取代,与BSA结合的程度明显小于前两种黄酮,而且光谱仅仅紫移2nm,说明糖苷基的存在确实阻碍了RUT与BSA的结合,但结合部位与糖苷基所在位置相距较远,并没有完全抑制其与BSA的作用。

由图3可以初步得出黄酮类小分子由于结构不同对BSA荧光光谱及构象影响的顺序:QUE>MOR>RUT。其中:QUE分子的邻位取代,有利于其与BSA的相互作用,尽管MOR中对位的分子共轭程度很高,但因两基团相距较远,同时,两基团产生阻碍作用,最终导致荧光猝灭现象不明显;RUT中的3-OH被糖苷取代,使得整个分子的位阻增大,相互作用时其作用程度降低。

2.3 3种黄酮类小分子与BSA的猝灭类型

分别在25℃和37℃作3种小分子物质与BSA的Stern-Volmer方程^[5]和Perrin修正方程^[6]结果。由表1结果可见,随温度的升高,每种小分子的两种曲线斜率减小,再加上小分子物质浓度与BSA荧光的猝灭程度较Stern-Volmer关系式更符合Perrin关系式,故3种黄酮小分子与BSA之间是一种静态猝灭过程^[7]。

表1 不同温度下,ANDRO-BSA相互作用体系的荧光猝灭常数

化合物	温度(℃)	K_{SV} ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$)	R^2	K_{P} ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$)	R^2
MOR	25	2.43×10^5	0.9937	6.56×10^4	0.9968
	37	2.30×10^5	0.9946	6.33×10^4	0.9973
QUE	25	2.84×10^5	0.9906	7.26×10^4	0.9959
	37	2.75×10^5	0.9921	7.14×10^4	0.9952
RUT	25	1.29×10^5	0.9952	4.23×10^4	0.9941
	37	1.21×10^5	0.9982	4.01×10^4	0.9985

根据表1,可以对3种黄酮类小分子与BSA的猝灭作用的强弱进行排序,按猝灭程度从强到弱为:QUE>MOR>RUT。3种黄酮对BSA的荧光猝灭常数的结构效应关系与前面相似,QUE分子中相邻羟基可以同时与BSA发生相互作用,而MOR中3'-OH和RUT中苷基却不利于与BSA相互作用。

2.4 3种黄酮类小分子与BSA的结合特性

根据荧光猝灭双对数方程^[8]作图可知,QUE的双对数曲线对温度的变化依然不敏感,MOR呈现类似平行的变化趋势,RUT随温度的升高产生了交叉。通过求取曲线的斜率和截距得到相应的黄酮小分子与BSA结合的特征信息如表2所示。

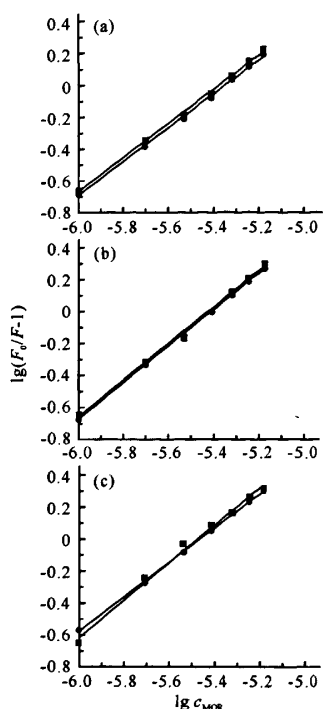


图4 不同温度下MOR(a)、QUE(b)及RUT(c)对BSA荧光猝灭的双对数曲线

■: 25°C; ●: 37°C。

由表2可知,MOR-BSA在各温度下的结合常数小于QUE-BSA的结合常数,且两种分子与BSA的结合常数随温度升高而降低。MOR和QUE与BSA的结合位点数不随温度变化而变化,说明在室温到生理温度间二者大约以1:1的比例相互结合。RUT与BSA的结合常数随温度发生了较为显著的变化,低温下的结合常数约为高温下的5倍,这主要是由于低温下分子运动速度较慢的缘故。随温度的升高,由于空间位阻效应,RUT不能牢固的与BSA结合,最终导致其结合常数变小;因中环3'-OH始终存在,故MOR与BSA的结合常数变化不大;QUE分子中不存在与BSA结合的位阻基团,二者的结合常数几乎不变。根据黄酮小分子与BSA的结合常数可以计算出这一结合过程的热力学参数,如表2所示, ΔH 都小于零,说明所有的结合都是放热

表2 不同温度下,MOR-BSA、QUE-BSA、RUT-BSA体系的表现结合常数(K_A)、结合位点数(n)及热力学参数(ΔG 、 ΔH 、 ΔS)

化合物	T (°C)	K_A (L · mol ⁻¹)	n	R^2	ΔG (kJ · mol ⁻¹)	ΔH (kJ · mol ⁻¹)	ΔS (J · mol ⁻¹ · K ⁻¹)
MOR	25	5.05×10^5	1.06	0.9989	-32.53	-2.79	99.81
	37	4.83×10^5	1.06	0.9978	-33.73		
QUE	25	1.49×10^6	1.14	0.9996	-35.21	-3.22	107.34
	37	1.41×10^6	1.14	0.9966	-36.50		
RUT	25	1.22×10^6	1.18	0.9996	-34.73	-92.25	-193.03
	37	2.89×10^5	1.07	0.9964	-32.41		

过程,温度的增加不利于这种结合的进行;RUT-BSA结合的焓变较其它两分子与BSA结合的焓变最大超过30倍,这主要是因为位阻基团的存在,使其结合常数发生很大变化的缘故。RUT-BSA的焓变 $\Delta S < 0$,说明两者之间的相互作用力为氢键或范德华力。而MOR-BSA和QUE-BSA的焓变 $\Delta S > 0$,说明此时黄酮分子与BSA间的作用力为静电引力。所有黄酮分子在给定温度下的 ΔG 都小于零,说明黄酮小分子与BSA的结合是一个自发过程。

2.5 3种黄酮类小分子与BSA的结合距离

发生能量转移时,非辐射能量转移效率 E ,供能与受体之间的结合距离 r 及临界能量转移距离 R_0 之间有如下关系^[9]:

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6), \quad (1)$$

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

$$E = 1 - F/F_0, \quad (3)$$

式中 $K^2 = 2/3$,为偶极空间取向因子; N 为介质折射常数,取水和有机物折射指数的平均值1.336; Φ 为BSA的荧光量子产率(0.118); J 为给体荧光发射光谱与受体吸收光谱的重叠部分面积积分。

根据以上(1)~(3)式,分别计算出MOR、QUE、RUT与BSA间荧光共振能量转移参数(见表3)。

由表3可知,黄酮类小分子与BSA发生相互作用时的距离的顺序为RUT>MOR>QUE。此顺序与三者同BSA间静态荧光猝灭常数和结合常数的大小顺序刚好相反,这是由于分子间距离增大,两分子间的作用力减小,最终两者之间的荧光猝灭程度以及结合常数都会减小的缘故。QUE B环上处于相邻位置的3'-OH和4'-OH与BSA发生结合时表现

表3 37°C时MOR-BSA、QUE-BSA、RUT-BSA相互作用体系能量转移参数

化合物	J (cm ³ · L/mol)	r (nm)	E
MOR	1.17×10^{-14}	3.01	0.675
QUE	1.33×10^{-14}	2.97	0.721
RUT	1.36×10^{-14}	3.47	0.508

出正向协同作用,两基团极易同时与BSA相结合,对BSA荧光的猝灭程度最高;MOR尽管存在有利于整个分子的共轭效应的2'-OH和4'-OH,当其于BSA有特定位点($n=1.06$)的一个基团发生静电作用时,另一个基团则会表现出空间位阻效应,不利于BSA结合部位的接近,故其与BSA的结合距离较QUE的大。RUT虽然也存在B环上的相邻羟基,但是其中环上的糖苷基空间位阻很大,故拉大了RUT与BSA的结合距离。

3 结束语

本文研究3种黄酮类小分子桑色素(MOR)、槲皮素(QUE)、芦丁(RUT)与牛血清白蛋白(BSA)相互作用后的紫外-可见光谱和荧光猝灭光谱的不同变化,并分析3种黄酮类小分子与BSA的猝灭类型、结合特性和结合距离,研究在同一实验条件下黄酮类小分子与BSA的相互作用及其构效关系。结果显示,黄酮母核B环上的羟基处于相邻位置时,比处于其他位置时表现出的BSA猝灭作用和结合作用更强,而有较大取代基团存在时,由于位阻较大,黄酮类小分子与BSA间的猝灭作用及结合作用则明显变弱。

参考文献:

[1] 王玲,屈凌波,杨冉,等.槲皮素和芦丁与牛血清白蛋白相互作用研究[J].分析科学学报,2006,22(6):719-722.

(上接第337页)

3 结束语

本文采用多元线性拟合法求出了22种氨基酸酯与酰胺类农药分子中16种基团的个数与其高效液相色谱相对响应值关系的回归方程,得到方程的计算值与实验测定值一致的结果。但用参数步减少到9个时,有部分农药的预测值与实验值已有较大偏差。如何选择更合理的参数,我们下一步将进行深入探讨。

参考文献:

[1] 刘尔嘉,胡跃新,孙健用回归分析研究火焰原子化检测器相对响应值[J].色谱,1994,12(6):144.
[2] 苏红伟,吴宁生,史文娟.摩尔响应值与拓扑指数的关

[2] 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.
[3] 栾尼娜,吴锦绣,宋玉民,等.芦丁与血清白蛋白结合作用的热力学研究(I)[J].光谱学与光谱分析,2008,28(4):856-859.
[4] 张国文,陈秀霞,潘军辉,等.桑色素与牛血清白蛋白结合反应的热力学分析[J].南昌大学学报:工科版,2008,30(3):229-233.
[5] Singh R B, Mahanta S, Guchhait N, et al. Study of interaction of proton transfer probe 1-hydroxy-2-naphthaldehyde with serum albumins: A spectroscopic study[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2008, 91(1): 1-8.
[6] 江云宝,许金钩,陈国珍,等.一类新的表面活性剂——长链烷基三苯基磷VI:稳态荧光猝灭法测定十二烷基三苯基溴化磷胶束的平均簇集数[J].分析化学,1992,20(10):1109-1112.
[7] Wang N, Ye L, Yan F, et al. Spectroscopic studies on the interaction of azelnidipine with bovine serum albumin [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2008, 351(1-2): 55-60.
[8] Liu X H, Xi P X, Chen F J, et al. Spectroscopic studies on binding of 1-phenyl-3-(coumarin-6-yl)sulfonylurea to bovine serum albumin [J]. J Photochem Photobiol B, 2008, 92(2): 98-102.
[9] Yue Y, Zhang Y, Li Y, et al. Interaction of nobiletin with human serum albumin studied using optical spectroscopy and molecular modeling methods [J]. Journal of Luminescence, 2008, 128(3): 513-520.

(责任编辑:韦廷宗)

系[J].色谱,1996,14(5):377.
[3] 周丽平,夏之宁,刘树深,等.利用分子路径指数矢量对烷烃摩尔响应值的估计与预测[J].色谱,2000,18(6):480.
[4] 侯镜德,周瑛.用反相高效液相色谱研究含氟酰胺类新农药的定量构效关系[J].分析化学,1994,22(8):805.
[5] 林润国,李志良.氨基酸酯类农药分子中各种原子的个数与其气相色谱相对响应值的相关关系研究[J].化工技术与开发,2002,31(1):1.
[6] 林润国.酰胺类农药分子中各种原子的个数与其气相色谱相对响应值的相关关系研究[J].化工技术与开发,2003(6):7.
[7] 许禄,胡昌玉.应用化学图论[M].北京:科学出版社,2000:18.

(责任编辑:邓大玉)