

稳态荧光技术及分子对接模拟研究党参炔苷与牛血清蛋白的相互作用

李端¹, 远俊洋¹, 侯嘉¹, 邵士俊², 杨扶德^{1*}

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000;
2. 中国科学院兰州化学物理研究所, 兰州 730000)

[摘要] 目的: 基于稳态荧光技术及分子对接模拟技术对党参炔苷与牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)的相互作用进行研究。方法: 运用稳态荧光分析方法, 通过荧光猝灭、紫外吸收谱、分子对接模拟及药物竞争实验等对党参炔苷-BSA体系的猝灭常数、结合常数、位点数、结合位置、作用力类型和作用距离进行分析, 同时考查金属阳离子对党参炔苷-BSA体系猝灭常数的影响。结果: 党参炔苷-BSA体系的猝灭常数为 $1.25 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (37 °C); 结合常数为 $2.95 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (37 °C), 位点数为1个, 在BSA的II A区位点1结合; 热力学参数 $\Delta H = -19.374 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $\Delta S = 23.1 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$; 相互作用距离为3.2 nm; 金属离子会加速党参炔苷-BSA体系的猝灭。结论: 通过稳态荧光技术、紫外吸收谱、分子对接模拟等方法, 从分子角度说明了党参炔苷与BSA结合的猝灭机制为静态猝灭, 相互作用力为静电作用力, 二者能很好的结合, 为以后筛选优化类似党参炔苷结构的药物提供了相关数据, 并且对于党参炔苷在体内的代谢研究有着重要的参考意义, 同时也说明了分子对接模拟结果与稳态荧光分析法得出的实验结果差异不大。

[关键词] 党参炔苷; 牛血清白蛋白; 稳态荧光; 分子对接模拟; 静态猝灭

[中图分类号] R22; R289; R2-031; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)12-0162-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201313

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20200407.1504.001.html>

[网络出版日期] 2020-4-7 16:30

Interaction Between Lobetyolin and Bovine Serum Albumin by Steady-State Fluorescence and Molecular Docking

LI Duan¹, YUAN Jun-yang¹, HOU Jia¹, SHAO Shi-jun², YANG Fu-de^{1*}

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;
2. Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** The interaction between lobetyolin and bovine serum albumin (bovine serum albumin, BSA). **Method:** By the steady-state fluorescence analysis method, the molecular-docking, ultraviolet absorption spectrum and fluorescence quenching were used to calculate quenching constant and binding constant, the number of sites, the position, the force and the distance of lobetyolin-BSA system. In addition, the effect of metal ion on quenching constant of the lobetyolin-BSA system was studied. **Result:** The quenching constant was $1.25 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (37 °C), the binding constant was $2.95 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (37 °C), and the number of sites was 1 and bound with site 1 in II A of BSA, thermodynamic meters were $\Delta H = -19.374 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $\Delta S = 23.1 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$, the interaction distance was 3.2 nm. Metal ions could accelerate the quenching. **Conclusion:** By the steady-

[收稿日期] 20200324(015)

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2018YFC1706300); 国家自然科学基金项目(81360622); 甘肃省省属普通本科高校基本科研业务费专项(甘财教[2014]63号-5); 兰州市2014年人才创新创业专项(2014-2-15); 甘肃省高等学校科研项目(2014B-055)

[第一作者] 李端, 在读硕士, 从事中药鉴定与品质评价研究, E-mail: liduan0828@163.com

[通信作者] *杨扶德, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药品质及中药材规范化栽培研究, Tel: 0931-8765520, E-mail: gszyfyfd@163.com

state fluorescence technique, molecular-docking and ultraviolet absorption spectrum, the quenching mechanism of Lobetyolin-BSA is quiescent quenching, and the interactive force is electro static force. The Lobetyolin-BSA can be well combined. At the same time, it also shows that the molecular docking results are similar to the experimental results obtained by steady-state fluorescence analysis.

[Key words] lobetyolin; bovine serum albumin; steady-state fluorescence; molecular-docking; static quenching

党参炔苷是桔梗科党参属植物党参的化学成分之一,属于聚炔苷类化合物,常被用作党参质量评价的指标之一,有研究人员发现党参炔苷可以抗胃黏膜急性损伤^[1],除此之外,研究人员还发现党参炔苷可以促进卵巢颗粒细胞分泌雌二醇,且不影响细胞正常的增殖与分化^[2]。现阶段,党参炔苷的药理作用研究较少,通过了解党参炔苷与牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA)的结合机制,对研究党参炔苷的药理药效作用具有重要的意义。党参炔苷结构见图1。

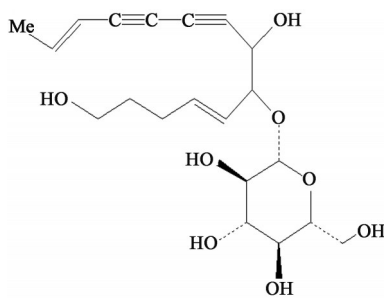


图1 党参炔苷结构
Fig. 1 Structure of lobetyolin

牛血清白蛋白(BSA)是一种经济易得的蛋白,其生理活性与人血清蛋白(HSA)相似,在研究小分子药物和蛋白质相互作用的实验中被广泛应用^[3-4]。药物进入体内,主要先与蛋白结合进行运输,然后释放。BSA主要有3个结构域,每个结构域有2个子域(A,B),每个子域有3个螺旋。BSA主要有3个结合点,分别为位点1,位点2,位点3,其中位点1在II A区,华法林结合在该位点,位点2在III A区,布洛芬结合在该位点^[5]。BSA由于有2个内源性荧光的色氨酸残基 Trp212, Trp134, 分别位于BSA的内部和表面^[5-6],因此可以通过稳态荧光等方法分析小分子与其作用后的荧光强度和波长的变化,从而分析小分子和BSA的作用机制。有研究人员通过稳态荧光方法对玉米赤霉烯酮与BSA相互作用进行表征^[7],发现玉米赤霉烯酮对BSA具有很强的猝灭能力。也有研究人员运用此方法对具有结构差异的没食子酸丙酯和没食子酸甲酯进行研究,发现二

者与BSA相互作用的性质不同,因此可以通过荧光变化来分析二者的性质^[8]。药物与BSA的相互作用研究对于药物开发利用有着重要意义,有研究人员通过该方法研究克唑替尼与BSA的结合,发现其结合点在II A区的位点1,为筛选类似药物提供了数据参考^[9]。

荧光光谱技术分为稳态荧光和瞬态荧光技术,其中稳态荧光技术是指在连续光源的照射下,荧光强度随激发波长分布^[10]。常见的荧光光谱属于稳态荧光光谱,包括了激发光谱、发射光谱、同步荧光光谱、三维荧光光谱等,其应用范围广,已经成为研究小分子与蛋白相互作用的技术手段之一。分子对接模拟技术是通过计算机模拟的方法,操作简单,通过建立化合物结构与蛋白结构,进行对接模拟,可以分析出小分子与蛋白结合的最佳构象及结合位置等信息^[11]。基于上述研究思路与方法,本研究运用稳态荧光分析方法,通过荧光猝灭、紫外吸收谱、分子对接模拟及药物竞争实验等对党参炔苷-BSA体系的猝灭常数、结合常数、位点数、结合位置、作用力类型和作用距离进行分析,同时考查金属阳离子对党参炔苷-BSA体系猝灭常数的影响,为以后筛选优化类似党参炔苷结构的药物提供相关数据,对党参炔苷在体内的代谢研究提供技术支撑。

1 材料

Fluoromax-4P型稳态/FL-3-11型瞬态荧光光谱仪(日本Horiba), Lambda 750S型紫外分光光度计(PerkinElmer)。牛血清白蛋白(Albumin bovine V, 罗氏公司, 相对分子质量66 000, 纯度 $\geq 95\%$), $1 \times 10^{-5} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ BSA溶液(pH 7.4的Tris-HCl-NaCl缓冲盐配制), $2.5 \times 10^{-4} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 党参炔苷溶液(无水甲醇配制), $1.25 \times 10^{-5} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 布洛芬(无水甲醇配制, 纯度 $> 98\%$, 上海旭硕生物科技有限公司, 批号DC19601), $1.25 \times 10^{-5} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 华法林(无水甲醇配制, 江苏艾康生物医药研发有限公司, 批号MAYA-CR-3039, 纯度 $\geq 97\%$), Tris-HCl-NaCl缓冲盐(pH 7.4, $0.1 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ NaCl, Tris购自中国医药集团上海

化学试剂公司,用超纯水配制,批号F20020528),各金属阳离子($1 \times 10^{-5} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$)用超纯水配制、其他试剂为分析纯。分子对接软件 AutoDockTools(Ver 1.5.6),图表软件 Origin 2017, Excel 10, Ligplot⁺ 2.1 和 PyMol(Ver 0.99)。

2 方法

2.1 猝灭试验 分别取党参炔苷溶液 0, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45, 0.50 mL 于 5 mL 离心管中,用甲醇补至 0.5 mL,加 BSA 溶液 1 mL 与 Tris-HCl-NaCl 缓冲液 1.5 mL,终体积 3 mL,摇匀,于 25, 30, 37 °C 水浴 6 min,测定荧光发射强度。用 Origin 作图。荧光参数设定,激发波长 (Ex) 280 nm,狭缝 2 nm,发射波长 (Em) 300~500 nm,狭缝 2 nm,步进 1 nm。

猝灭常数 K_{sv} 根据 Stern-Volmer 方程计算^[12]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (1)$$

结合常数 K 及结合位点数 n 根据双对数方程计算^[13]:

$$\lg \left[\frac{F_0 - F}{F} \right] = \lg K + n \lg [Q] \quad (2)$$

结合作用力由焓变、熵变推断,焓变、熵变则根据 Van'tHoff 方程计算^[12]:

$$\ln K = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} \quad (3)$$

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (4)$$

结合距离由 FRET 方程计算^[11]:

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (5)$$

$$R_0 = \left[(8.8 \times 10^{-25}) K^2 N^{-4} \phi J \right]^{-6} \quad (6)$$

$$J = \frac{\sum F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta \lambda}{\sum F(\lambda) \Delta \lambda} \quad (7)$$

取水-有机物溶剂的折射常数 $N=1.336$,色氨酸量子产率 $\phi=0.118$, $K^2=2/3$ 计算 R_0 。 F 为荧光强度, F_0 为无党参炔苷时的荧光强度。

重叠积分 J 的测定:取党参炔苷溶液 0.04 mL,在室温下测定紫外吸收强度,另取 BSA 1 mL 在室温下测定荧光发射强度,数据归一化后,由公式(7)计算两个曲线的重叠积分。 $\varepsilon(\lambda)$ 为党参炔苷在 λ 摩尔吸光系数, R_0 为 50% 能量转移效率时的距离。

2.2 同步荧光试验 荧光参数设定, $\Delta\lambda=15 \text{ nm}$,激发波长 200~450 nm,发射波长 215~465 nm; $\Delta\lambda=60 \text{ nm}$,激发波长 200~450 nm,发射波长 260~510 nm; $\Delta\lambda=55 \text{ nm}$,激发波长 200~450 nm,发射波长 255~505 nm。激发波长和发射波长的狭缝 2 nm,步进

1 nm。取与猝灭实验相同的党参炔苷-BSA 体系浓度进行测定。

2.3 三维荧光试验 荧光参数设定激发波长 200~400 nm,狭缝 2 nm,发射波长 250~450 nm,狭缝 2 nm,步进 10 nm。取与猝灭实验相同的党参炔苷-BSA 体系浓度进行测定。

2.4 药物竞争试验 取与猝灭实验相同的党参炔苷-BSA 体系浓度,加入布洛芬 10 μL ,另取体系相同浓度,加入华法林 10 μL , λ 280 nm 激发,计算各自的结合常数。

2.5 金属离子干扰试验 取党参炔苷溶液 0, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45, 0.50 mL 于 5 mL 离心管中,用甲醇补至 0.5 mL,加 BSA 溶液 1 mL 与 Tris-HCl-NaCl 缓冲液 1.0 mL,加金属离子溶液 0.5 mL,终体积 3 mL。在 λ 280 nm 波长下激发。

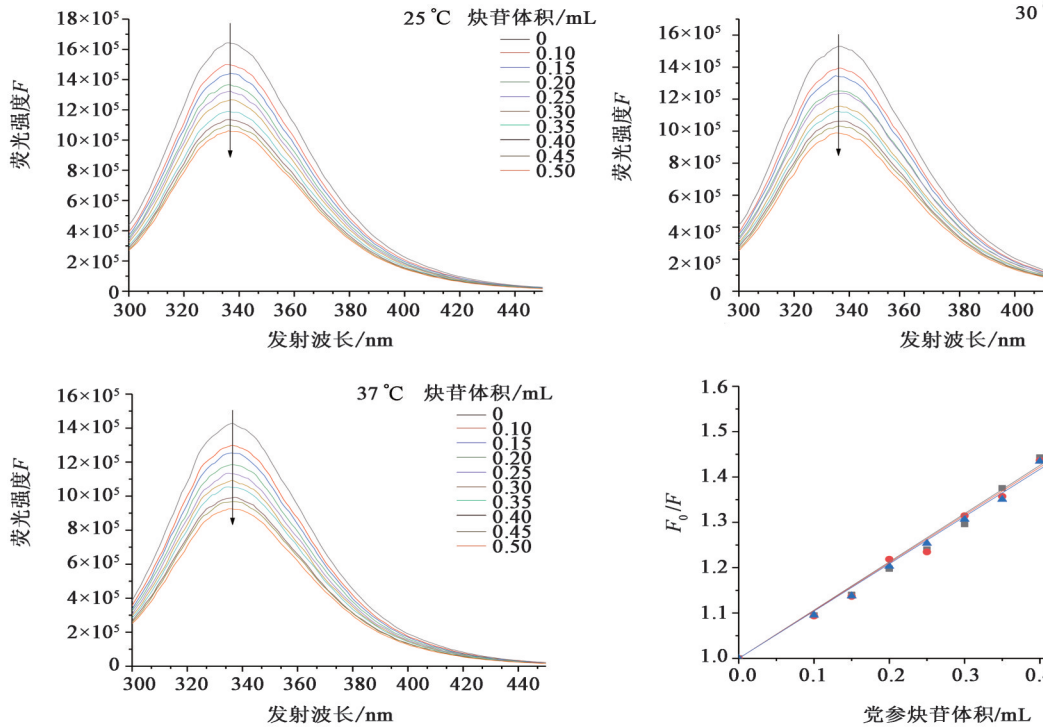
2.6 紫外吸收试验 取与猝灭实验相同的党参炔苷-BSA 体系浓度,以 BSA 为考察对象,设置不同浓度的空白对照,进行紫外吸收扫描。

2.7 分子对接模拟试验 从 www.rcsb.org 网站下载 BSA 结构 4jk4,用 AutoDockTools(Ver 1.5.6) 软件进行除水、加氢、删去配体及多余对称结构,以 A 链作为对接链,以 4 个原有配体(3,5-二碘水杨酸)所在口袋坐标原子 C_1 为对接中心点,设置对接盒子大小为 $60 \times 60 \times 60$,格点数 0.375。设置 BSA 为刚性,小分子为柔性,进行半柔性对接。设置 GeneticAlgorithm 搜索参数为默认值、输出 LamarckianGA 文件,进行对接。

3 结果与讨论

3.1 猝灭试验 25, 30, 37 °C 时猝灭常数 K_{sv} 分别为 1.28×10^4 , 1.27×10^4 , $1.25 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$,拟合程度 R^2 均为 0.99,主要以静态猝灭为主,随着党参炔苷浓度的增大,荧光强度下降。见图 2。

3.2 党参炔苷与 BSA 的结合常数、位点、位点数、作用力、距离的研究 通过 Origin 进行线性拟合,通过方程(1)~(4)计算出结合常数、位点数、判断作用力。结合位点数接近 1,见图 3,表 1。 $\Delta H=-19.37 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $\Delta S=23.12 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$, $\Delta H < 0$, $\Delta S > 0$,判断其相互作用力为静电作用力,以焓为驱动力自发的进行结合,见表 2,图 4。重叠积分 J 为 $9.2 \times 10^{-15} \text{ cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$,结果见图 5。通过方程(5)(6)计算相互作用距离得到 $r=3.2 \text{ nm}$, $0.5R_0 < r < 1.5R_0$,由于电子转移现象常存在于范德华力的环境中,大致作用距离在 pm 的范围,因此,党参炔苷与 BSA 的能量转移主要是通过

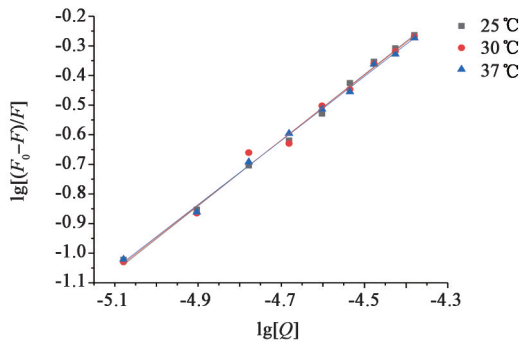


F. 荧光强度; EM. 发射波长; F_0/F 未加党参炔苷时的荧光强度比上加入党参炔苷后的荧光强度

图2 不同温度下党参炔苷与BSA的猝灭曲线及线性拟合

Fig. 2 Quenching curve and linear fit of lobetyolin and BSA at different temperatures

非辐射荧光共振能量转移进行的。通过药物竞争实验,华法林结合在ⅡA区位点1,布洛芬结合在ⅢA区位点2,可以发现,华法林的加入使得体系结合常数显著变化,而布洛芬影响不大,结果见图6,表3,因此,判断出党参炔苷在ⅡA区的位点1结合。



[Q]为党参炔苷的浓度, F_0 为未加党参炔苷的荧光强度, F 为加入党参炔苷的荧光强度

图3 不同温度下的结合常数

Fig. 3 Binding constant at different temperatures

3.3 党参炔苷对BSA构象的影响 在280 nm附近,随着党参炔苷浓度的增加,紫外吸收强度呈下降趋势。结果见图7。说明党参炔苷与BSA相互作用结合成复合物,从而影响了原本的BSA紫外吸收,但在213 nm附近,强度呈现上升趋势,说明党参

表1 不同温度下的结合常数及位点数

Table 1 Binding constants and number of sites at different temperatures

| 温度/°C | 结合常数 $K/L \cdot mol^{-1}$ | 结合位点数 n | R^2 |
|-------|---------------------------|-----------|---------|
| 25 | 3.99×10^4 | 1.110 6 | 0.996 9 |
| 30 | 3.52×10^4 | 1.098 9 | 0.992 7 |
| 37 | 2.95×10^4 | 1.082 9 | 0.997 6 |

表2 熵变、焓变及吉布斯自由能

Table 2 Entropy, enthalpy and Gibbs free energy

| 温度/°C | $\Delta H/kJ \cdot mol^{-1}$ | $\Delta S/J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$ | $\Delta G/J \cdot mol^{-1}$ | R^2 |
|-------|------------------------------|--|-----------------------------|-------|
| 25 | | | -2.626 7 | |
| 30 | -19.374 | 23.1 | -2.638 2 | 0.999 |
| 37 | | | -2.654 4 | |

炔苷的加入对BSA微环境和构象产生了影响,使得 α 螺旋结构更加紧密,不易展开。可以看出在 λ 280 nm附近的最大吸收峰强度有蓝移的趋势,推测可能是由于党参炔苷的加入,抑制了氨基酸的 $n \sim \pi^*$ 电子跃迁,使得跃迁所需吸收的能量增大,因此吸收波长蓝移。

从图8同步荧光图可以看出,随着党参炔苷浓度的增加,在 $\Delta\lambda$ 15 nm时,酪氨酸特征峰有略微的

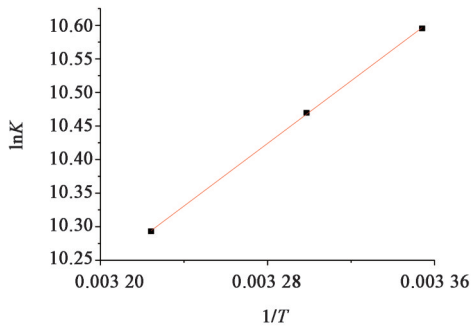
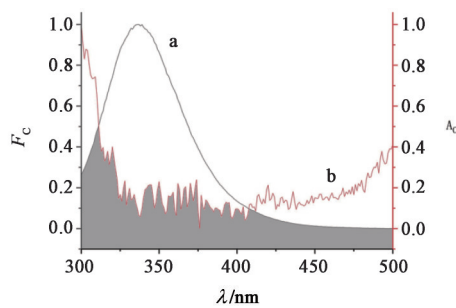


图4 Van'tHoff方程的lnK值与1/T的关系

Fig. 4 Relationship between lnK value and 1/T of Van'tHoff equation



a. BSA; b. 党参炔苷; F_c . 归一化荧光强度; A_c . 归一化吸收强度; λ . 波长

图5 党参炔苷吸收光谱与BSA荧光光谱的重叠

Fig. 5 Overlap of absorption spectrum of lobetyolin with fluorescence spectrum of BSA

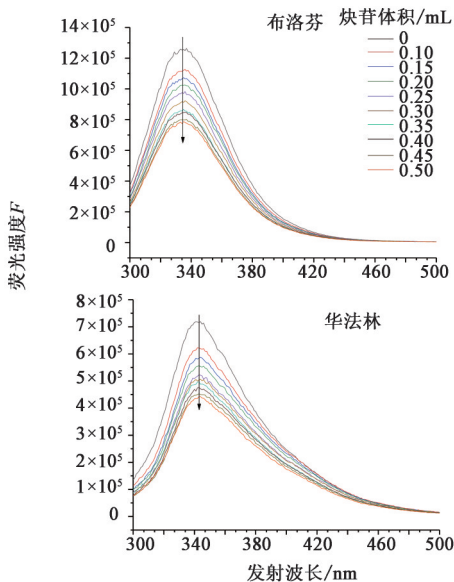


图6 布洛芬、华法林在党参炔苷-BSA体系下的猝灭曲线

Fig. 6 Quenching curve of ibuprofen and warfarin under lobetyolin-BSA system

红移,说明酪氨酸附近的微环境发生了变化;在 $\Delta\lambda$ 60 nm,色氨酸特征峰分裂成两个峰,从图9中可以看出,不同波长的激发,仅在 λ 335 nm处得到发射

表3 布洛芬、华法林加入后结合常数的变化

Table 3 Changes of binding constants with ibuprofen and warfarin were added

| 组别 | $K/L \cdot mol^{-1}$ | $K/K_0/\%$ | R |
|-----|----------------------|------------|------|
| 布洛芬 | 2.20×10^4 | 74.64 | 0.99 |
| 华法林 | 3.75×10^4 | 12.70 | 0.99 |
| 空白 | 2.95×10^4 | 100 | - |

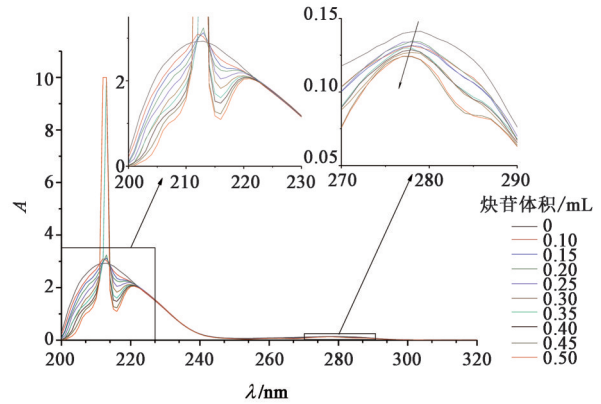


图7 不同猝灭剂体积下的紫外吸收

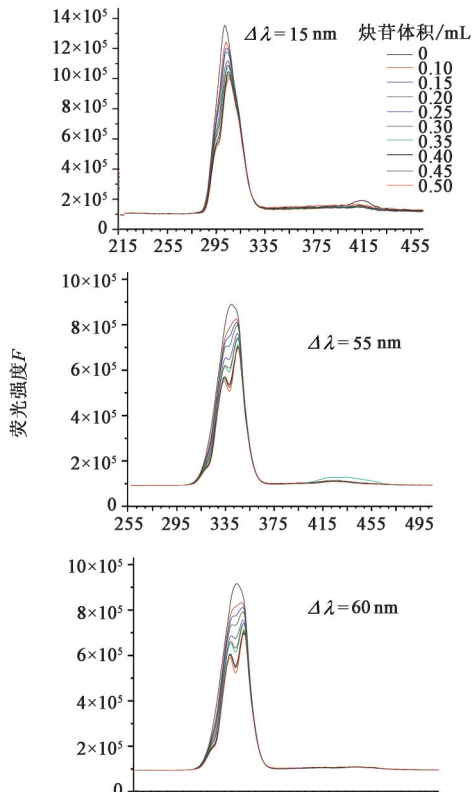
Fig. 7 UV absorption under different quencher volumes

峰,而同步荧光却表现出两个峰,两个峰分别为激发波长 279 nm,发射波长 339 nm 和激发波长 290 nm,发射波长 350 nm,推测可能是因为党参炔苷与BSA相互作用,改变了微环境,使得内源性荧光的色氨酸出现构象变化,产生了外消旋,故同步荧光呈现两个峰,而发射谱由于外消旋作用,整体上只表现出色氨酸 λ 280 nm的信息,故仅有一个峰;在 $\Delta\lambda$ 55 nm时,表现酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸三者的共有特征。

对党参炔苷-BSA体系进行3D荧光测定,结果见图10,从图10中可以直观的看出党参炔苷对BSA有猝灭作用,主要强峰是在 $\lambda_{Ex}=280$ nm, $\lambda_{Em}=340$ nm处。

3.4 金属离子对党参炔苷与BSA体系猝灭常数的影响 从图11中可以看出,伴随着金属离子的加入,猝灭常数呈上升趋势,其中 Fe^{2+} 的猝灭常数最大,从金属离子猝灭常数(K)与空白BSA猝灭常数(K_0)的比值发现,金属离子整体而言,对于党参炔苷-BSA体系的荧光猝灭程度影响并不大,结果见表4,但是金属离子的加入使得BSA结构更加紧凑,色氨酸残基就不易接受到能量,表现出荧光强度减弱,加速体系的猝灭。金属离子的加入会导致BSA微环境的改变。

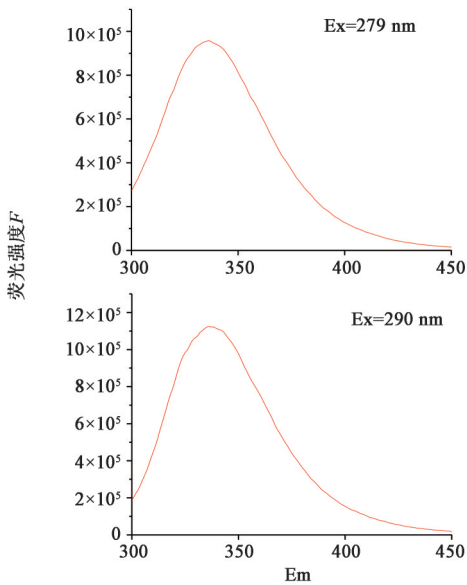
3.5 分子对接模拟 对接位置如图12所示,对接



F. 荧光强度; Em. 发射波长

图8 $\Delta\lambda$ 为 15, 55, 60 nm 的同步荧光谱

Fig. 8 Synchronous fluorescence spectrum of $\Delta\lambda$ 15, 55, 60 nm



F. 荧光强度; Em. 发射波长

图9 不同激发波长 BSA 与 0.5 mL 党参炔苷的荧光发射谱

Fig. 9 Fluorescence emission spectra of BSA and 0.5 mL Lobetyolin with different excitation wavelengths

位置在原配体序号 601, 602, 603, 604 附近, 对接结果见表 5。相互作用图见图 13, 14。

从表中可以看出党参炔苷在 BSA 的 II A 区结合最为紧密, 印证了文献中提到的杂环极性化合物

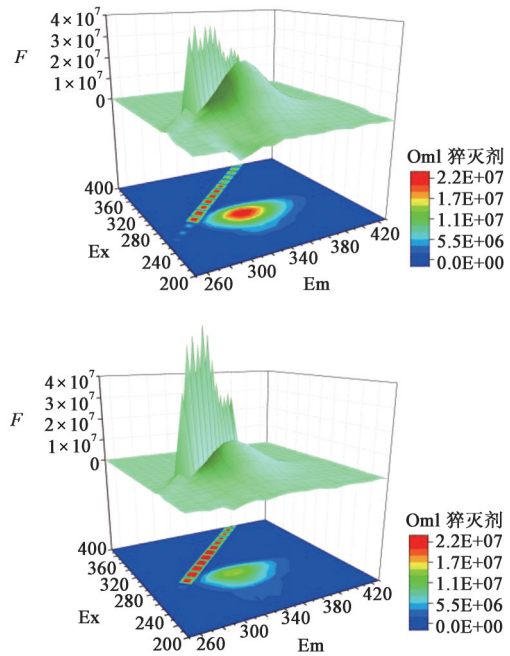
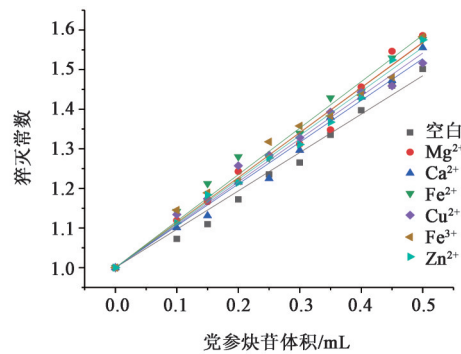


图10 BSA-党参炔苷体系的三维荧光

Fig. 10 Three-dimensional fluorescence of BSA-Lobetyolin system



K_{SV} -猝灭常数

图11 不同金属阳离子加入后的党参炔苷-BSA 猝灭常数

Fig. 11 Quenching constant of lobetyolin-BSA after addition of different metal cations

表4 不同金属阳离子对党参炔苷-BSA 体系猝灭常数的影响

Table 4 Effect of different metal cations on quenching constant of lobetyolin-BSA system

| 金属阳离子盐 | 猝灭常数 | R^2 | $K/K_0/\%$ |
|--------------------------|--------------------|-------|------------|
| $MgSO_4$ | 1.37×10^4 | 0.98 | 117.4 |
| $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ | 1.27×10^4 | 0.98 | 108.9 |
| $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ | 1.41×10^4 | 0.98 | 121.2 |
| $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ | 1.30×10^4 | 0.98 | 111.8 |
| $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ | 1.36×10^4 | 0.98 | 117.1 |
| $Zn(NO_3)_2$ | 1.33×10^4 | 0.99 | 114.8 |
| 空白 | 1.16×10^4 | 0.98 | 100 |

常与 II A 区结合的说法。从图中可以看出党参炔苷与 BSA 结合主要是通过氢键, 以静电作用力为主

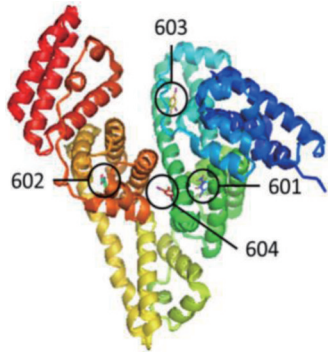


图12 党参炔苷对接位置

Fig. 12 Docking positions of lobetyolin and BSA

表5 不同位置的对接能及内能

Table 5 Docking energy and internal energy at different positions

| 残基位置 | 对接能/kcal·mol ⁻¹ |
|------|----------------------------|
| 601 | -3.60 |
| 602 | -0.63 |
| 603 | -1.63 |
| 604 | -2.56 |

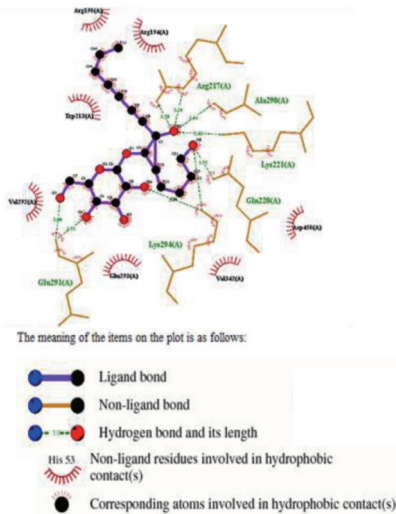


图13 党参炔苷与BSA相互作用

Fig. 13 Interaction of lobetyolin and BSA

的,以焓驱动的过程。同时从图中可以看到党参炔苷与220,221,294,291,290位置处的氨基酸相互作用较强,而这些氨基酸距离213处的色氨酸很近,因此结合同步荧光光谱图更能说明213处的色氨酸残基受到了党参炔苷的影响。通过计算,从图13中可以看出相互作用氨基酸距离在2~3 nm左右,色氨酸残基与党参炔苷相近的2个原子距离分别为3.1 nm和3.4 nm,而实验计算得到的色氨酸残基与党参炔苷的距离为3.2 nm,说明分子对接与实验所得的结果差异不大。

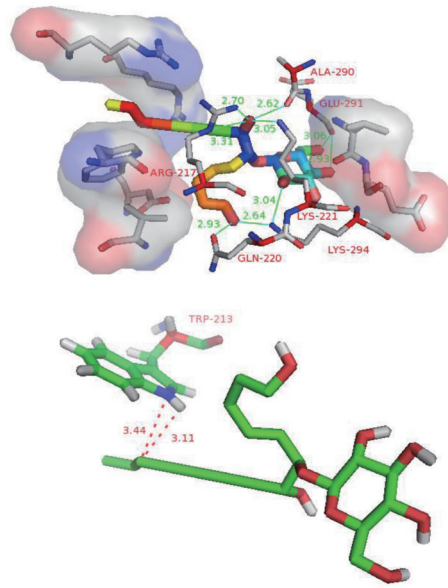


图14 党参炔苷与BSA相互作用氨基酸及作用距离

Fig. 14 Amino acid and its interaction distance between lobetyolin and BSA

4 结论

通过该实验发现,温度升高,荧光强度下降,因此党参炔苷-BSA体系存在动态猝灭,但是党参炔苷主要以静态猝灭为主,并伴随着动态猝灭。同时,党参炔苷以静电作用力为主与BSA的II A区位点1结合,印证了文献中说的杂环极性化合物与BSA结合的位点主要在II A区位点1。通过稳态荧光等方法,能够很好的从分子角度解释党参炔苷与BSA的结合机制,以及BSA微环境和构象的变化,其中发射谱结合同步荧光谱能很好地分析色氨酸的变化。此外,实验还表明,党参炔苷与BSA能很好地结合,为以后筛选优化类似党参炔苷结构的药物提供了相关数据,同时对于党参炔苷在体内的代谢研究有着重要的参考意义。

[参考文献]

- [1] 宋丹,王峥涛,李隆云,等. 党参炔苷对胃溃疡模型大鼠胃黏膜损伤保护作用的研究[J]. 中国中医急症, 2008,17(7):963-964,986.
- [2] 唐晓静,江涛,徐斯凡. 党参炔苷对雌性大鼠卵巢颗粒细胞增殖分化的影响及其作用机制[J]. 生殖与避孕, 2015,35(9):587-592,639.
- [3] 曹团武,黄文兵,时建伟,等. 光谱法和分子对接研究哈巴俄苷与牛血清白蛋白的相互作用机制[J]. 中国中药杂志, 2018,43(5):993-1000.
- [4] 吴干斌,褚延乐. 冬凌草乙素与牛血清白蛋白相互作用及其机制研究[J]. 中国中药杂志, 2017,42(9):1777-1781.

- [5] 朱映瑶. 光谱法和分子模拟技术研究甾类药物与牛血清蛋白的相互作用[D]. 杭州:浙江工业大学, 2013:11-12.
- [6] 寻彩芳. 光谱法研究牛血清白蛋白的变性及其与五种含氮小分子的相互作用[D]. 湘潭:湖南科技大学, 2017:8-9.
- [7] LEE S J, CHO H G, CHEONG B S. Interaction of bovine serum albumin with propyl gallate and methyl gallate investigated by Fluorescence spectroscopy[J]. Bull Korean Chem Soc, 2019, 40(4):344-351.
- [8] MA L, MARAGOS C M, ZHANG Y H. Interaction of zearale none with bovine serum albumins determined by fluorescence quenching[J]. Mycotoxin Res, 2018, 34(1):39-48.
- [9] ABDELHAMEED A S, ALANAZI A M, BAKHEIT A H, et al. Fluorescence spectroscopic and molecular docking studies of the binding interaction between the new anaplastic lymphoma kinase inhibitor crizotini band bovine serum albumin[J]. Spectrochim Acta A, 2017, 171:174-182.
- [10] 李磊. 生物荧光探针的分子动力学研究与应用[D]. 上海:华东师范大学, 2017:2-3.
- [11] 戴国梁, 马世堂, 刘史佳, 等. 异鼠李素-3-O-新橙皮糖苷与牛血清蛋白的结合及分子对接研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(14):109-113.
- [12] 罗志强, 张玉杰, 孙青, 等. 荧光光谱法测定黄芪甲苷及环黄芪醇与牛血清白蛋白相互作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(16):123-127.
- [13] 张晓静, 许多多, 张俊义, 等. 胆酸类化合物与牛血清白蛋白相互作用的光谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(1):56-62.

[责任编辑 顾雪竹]