

# 胆酸类化合物与牛血清白蛋白相互作用的光谱研究

张晓静, 许多多, 张俊义, 孙毅坤\*  
(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

**[摘要]** **目的:**运用荧光光谱(FS)结合衰减全反射傅里叶变换红外光谱研究了6种胆酸类(CAs)小分子与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用。**方法:**在pH 7.40和离子强度 $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的模拟生理条件下,根据Stern-Volmer方程、Lineweaver-Burk双倒数方程、双对数方程、热力学公式、同步荧光及衰减全反射傅里叶变换红外光谱求出CAs与BSA相互作用的猝灭常数、结合常数 $K_{LB}$ 、结合位点数 $n$ 、结合力类型及BSA构象变化情况。**结果:**6种胆酸类小分子对BSA的猝灭属于静态猝灭,结合位点约为0.5:1,结合力主要为氢键或Vander Walls力,对牛血清白蛋白构象影响较小。**结论:**胆酸类小分子与牛血清白蛋白之间具有一定的结合作用,这为胆酸类小分子在体内被蛋白质储存和转运提供了条件;同时阐明了胆酸类小分子与牛血清白蛋白相互作用的机制,为进一步探讨胆酸类小分子在生物体内与蛋白质的作用机制和生物学效应提供了理论依据。

**[关键词]** 荧光光谱法; 衰减全反射傅里叶变换红外光谱; 胆酸类小分子; 牛血清白蛋白  
**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)01-0056-07  
**[doi]** 10.11653/syfy2014010056  
**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20131017.1134.003.html>  
**[网络出版时间]** 2013-10-17 11:34

## Spectroscopic Investigation of Binding of Active Compounds of Cholic Acids to Bovine Serum Albumin

ZHANG Xiao-jing, XU Duo-duo, ZHANG Jun-yi, SUN Yi-kun\*

(Beijing University of Chinese Medicine, Department of Chinese Pharmacy, Beijing 100102, China)

**[Abstract]** **Objective:** The interaction between six micromolecules of cholic acids (CAs) and bovine serum albumin (BSA) was investigated by fluorescence spectroscopy (FS) combined with FT-ATR-IR and the six CAs were cholic acid (CA), deoxycholic acid (DCA), hyodeoxycholic acid (HDCA), chenodeoxycholic acid (CDCA), taurochenodeoxycholic acid (TCDCa), ursodesoxycholic acid (UDCA) respectively. **Method:** According to the dynamic quenching rate constants  $K_q$  of Stern-Volmer equation, we could infer the fluorescence quenching mechanism of BSA under the simulated physiological conditions (at pH 7.40 and ionic strength =  $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ). The binding constants  $K_{LB}$ , binding site numbers  $n$ , every type of conjugation effort according to the Stern-Volmer equation, Lineweaver-Burk equation, Langmuir equation; thermodynamic parameters. Synchronous fluorescence technique and FT-ATR-IR. **Result:** CAs could insert into the BSA molecule initiatively with the ratio of 0.5:1, namely two protein molecules binding with one of cholic acid compounds molecular to become ground-state complex substances which resulted into intrinsic fluorescence quenching. And with the increasing concentration of CAs, their combination tended to saturation. But the combination of CAs and BSA were relatively weaker as the binding constant  $K_{LB}$  is lower than that of inter-actions of other drugs with protein. The interaction force was mainly hydrogen bonds or Vander Walls force between CAs and BSA, with the possible force of electrostatic interaction. The influence on the framework of BSA was not obvious. **Conclusion:** There is certain binding interaction between CAs and BSA which provides the conditions for storage and transport of protein in the body. At the same time, the interactional mechanism was

**[收稿日期]** 20130708(006)  
**[基金项目]** 国家重大科技专项(2010zx09102)  
**[第一作者]** 张晓静,在读硕士,从事中药体内代谢及质量控制研究,E-mail:zhxiji2012@163.com  
**[通讯作者]** \*孙毅坤,博士,教授,从事中药体内代谢及质量控制研究,Tel:010-84738619,E-mail:sunyik@163.com

clarified, and the theoretical basis was provided for the further study of the inner mechanism and biological effect in organism of CAs and the proteins.

**[Key words]** fluorescence spectrometry; FT-ATR-IR; cholic acids; bovine serum albumin

胆汁酸(CAs)是一类在C-17侧链带有羧基的类固醇类化合物,是人类和动物胆汁的特征成分代表。他们在脂质吸收和胆固醇代谢方面发挥着重要作用,并且是增加维生素肠吸收及治疗胆固醇结石与胆汁淤积性肝病的有效成分<sup>[1-2]</sup>。在中国传统中药中,动物胆被广泛应用,包括熊胆、牛胆、猪胆、蛇胆、牛黄等。为更好的控制中药质量,动物胆之间的鉴别和含量测定方法备受关注<sup>[3-6]</sup>,但是关于胆酸类成分与蛋白之间的相互作用却还没有相关研究。

人血清白蛋白是人体血浆中含量最丰富的载体蛋白,具有储运内源性代谢产物和外源性药物小分子(离子)的生理功能,是药物发挥药效的重要靶点,参与了许多重要的生命过程。白蛋白是生物体循环系统中最丰富的蛋白质,能与许多内源和外源性药物分子以及生物活性小分子可逆地结合。牛血清白蛋白与人血清白蛋白在氨基酸序列及结构方面非常相似,作为一种重要的模型蛋白,在药物研究中被广泛应用,有关牛血清白蛋白(BSA)与各类物质的相互作用已有较多报道<sup>[7-9]</sup>。红外光谱是研究药物与蛋白质相互作用的另一种有效方法,其与荧光光谱和紫外光谱等比较而言可以阐明蛋白质二级结构的变化。蛋白质二级结构特征与氢键的形成方式相关,无论 $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角或其他构象,都有其特定的氢键结构,而这种氢键结构的差异能够在对于氢键敏感的红外光谱中得到反映,主要表现为谱带峰位、半峰宽的变化。这些基础数据对于阐明胆酸类成分在体内的运输过程及揭示其作用机理,方便临床合理用药,具有十分重要的意义。为此,本文采用荧光光谱法研究了胆酸(CA)、猪去氧胆酸(HDCA)、去氧胆酸(DCA)、鹅去氧胆酸(CDCA)、牛磺鹅去氧胆酸(TCDCA)、熊去氧胆酸(UDCA)与牛血清白蛋白(BSA)间的相互作用,探讨了胆酸类小分子和牛血清白蛋白的作用机制。

## 1 仪器和试剂

Perkin Eimer LS45 型荧光分光光度计; NICOLET is10 型傅立叶变换红外光谱仪(Thermo Scientific),衰减全反射附件(ATR, ZnSe 晶体), OMNIC 32 数据处理软件;510 型超级恒温器(上海实验仪器厂);pHS-W 型精密 pH 计(上海般特仪器有限

公司);BSA 标准品(Beijing Biodee Biotechnology Co., Ltd;纯度 98%);胆酸、去氧胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸、熊去氧胆酸(均由中国药品生物制品检定所提供,批号分别为 100078-200414, 0724-200207, 100087-200610, 110806-200704, 110846-200506, 110755-9003)。

## 2 方法

**2.1 溶液配制** 配制 pH 为 7.4 的  $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的磷酸盐缓冲液(PBS,含  $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 以维持溶液离子强度)。分别精密称取 CA, DCA, HDCA, CDCA, TCDCA, UDCA 适量,用乙醇溶解并用磷酸盐缓冲液稀释至刻度,制得浓度均约为  $4.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的工作液。

牛血清白蛋白(BSA)溶液:称取 BSA 标准品  $0.0706 \text{ g}$  于量瓶中,以磷酸盐缓冲溶液溶解并稀释至刻度,制成  $1.04 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的储备溶液,并稀释制成  $2.05 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  BSA 的工作液,置于冰箱中  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。所用试剂均为分析纯,实验用水为二次蒸馏水。

**2.2 荧光光谱测定** 移取  $2.5 \text{ mL}$   $2.05 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  BSA 稀释液于  $1 \text{ cm}$  的石英比色皿中,用微量注射器分别逐次加入  $2 \text{ } \mu\text{L}$  上述胆酸类化合物(CAs)溶液,溶液混合均匀后,在  $290 \text{ K}$  下作用  $5 \text{ min}$  使体系达到平衡。固定激发波长为  $280 \text{ nm}$ , 激发狭缝宽度和发射狭缝宽度均为  $10 \text{ nm}$ , 在  $300 \sim 500 \text{ nm}$  扫描 BSA 在胆酸类化合物作用下的荧光光谱<sup>[20]</sup>。

分别以  $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$  和  $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$  扫描胆酸类化合物与牛血清白蛋白相互作用的同步荧光光谱,入射狭缝均为  $10 \text{ nm}$ , 出射狭缝均为  $5 \text{ nm}$ 。

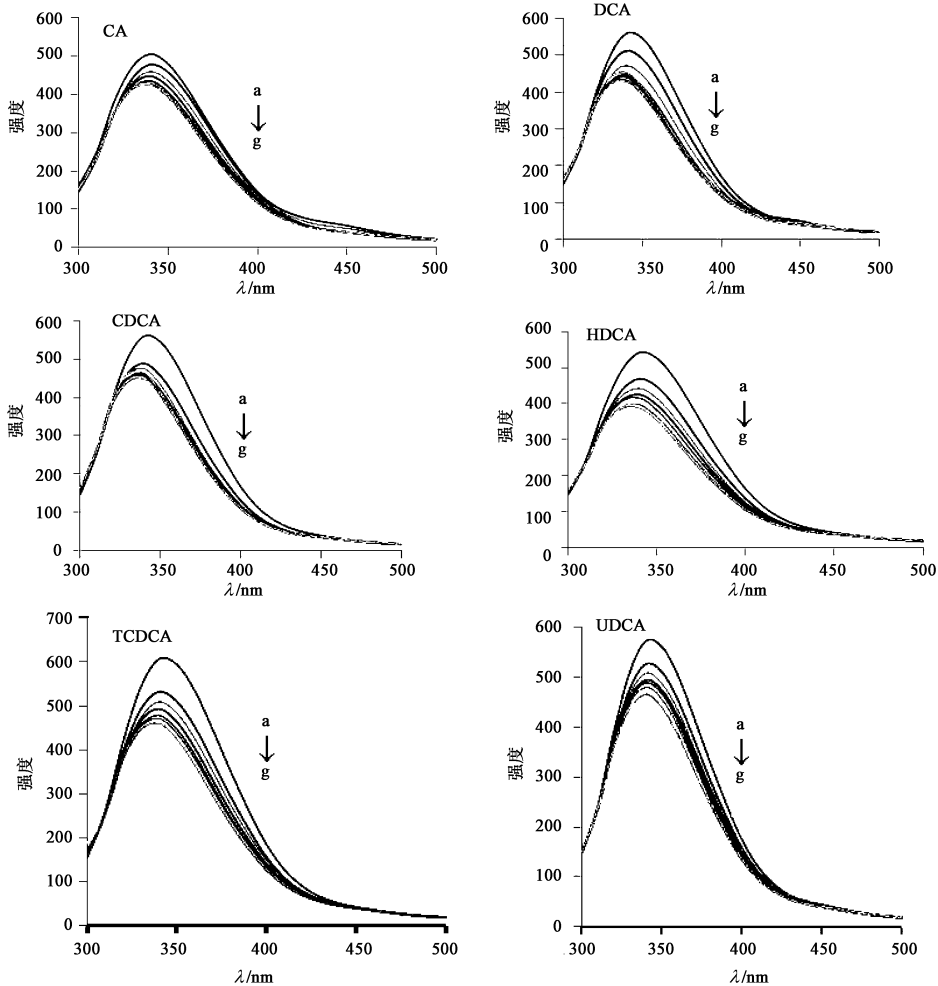
**2.3 红外光谱的采集及谱图处理** 用 PBS 缓冲液配  $5.04 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 BSA 溶液,分别加入  $10 \text{ } \mu\text{L}$  上述 CAs 溶液,作为样品溶液。将样品均匀地铺满 ATR 的 ZeSe 晶片,自动扣除水汽及二氧化碳影响,在  $4 \text{ cm}^{-1}$  分辨率下,扫描 32 次收集样品光谱;分别以 PBS 缓冲液及加  $10 \text{ } \mu\text{L}$  上述 CAs 溶液后的缓冲液作为对应背景,然后在与样品测定相同条件下扫描背景。

## 3 结果与讨论

**3.1 胆酸类化合物(CAs)对 BSA 的荧光猝灭光谱** BSA 分子在一定波长的紫外光激发下发射较强的内源荧光,它的荧光信号主要来自色氨酸和酪氨

酸残基。图 1 为 CAs 对 BSA 的荧光猝灭光谱,从图中可以看出随着 CAs 浓度的增大,BSA 的荧光强度逐渐降低,但降低的幅度越来越小,这表明 CAs 小

分子能够插入 BSA 分子内部与 BSA 形成复合物导致 BSA 内源荧光猝灭,且随着 CAs 浓度增加二者的结合趋向饱和。



pH 7.4;  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 280 \text{ nm}/344 \text{ nm}$ ;  $c(\text{BSA}) = 2.08 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  in all cases;  
 $4.0 \times 10^{-3} \text{ C}(\text{CAs}) / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ , from a to g: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14

图 1 CAs 对 BSA 的荧光猝灭作用

**3.2 荧光猝灭机制及结合常数** 引起 BSA 荧光猝灭作用因猝灭机制不同通常可分为动态猝灭和静态猝灭作用。动态猝灭是猝灭剂和荧光物质的激发态分子之间的相互作用过程,符合 Stern-Volmer 方程:

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (1)$$

静态猝灭是猝灭剂和荧光物质在基态生成复合物而导致荧光猝灭的过程,其符合 Lineweaver-Burk 双倒数方程:

$$(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + K_{LB}^{-1} F_0^{-1} [Q]^{-1} \quad (2)$$

式中,  $F_0$  和  $F$  分别表示不存在和存在猝灭剂物质的荧光强度;  $[Q]$  为猝灭剂的浓度,  $K_{SV}$  为动态猝灭常数,  $K_q$  是由扩散过程控制的双分子动态猝灭速率常数。  $\tau_0$  为没有猝灭剂存在下荧光分子平均寿

命,生物大分子荧光寿命约为  $10^{-8} \text{ s}$ , KLB 为静态猝灭过程中复合物的形成常数,单位是  $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,它反映了在静态猝灭过程中生物大分子与小分子的结合反应达到平衡的量效常数。分别测定 17, 26, 37 °C 下 CAs 与 BSA 的荧光猝灭光谱,以  $F_0/F \sim [Q]$  作 Stern-Volmer 曲线和以  $(F_0 - F)^{-1} \sim [Q]^{-1}$  做 Lineweaver-Burk 曲线,其相关参数如表 1 所示,药物-BSA 体系的 Stern-Volmer 方程拟见图 2。

结果表明,CAs 对 BSA 的荧光猝灭过程的速率常数远大于扩散控制的  $K_q (2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$  可以初步判断该过程主要为静态猝灭;同时随着温度升高 DCA, HDCA, CDCA, TCDCA, UDCA 与 BSA 作用的猝灭曲线斜率降低,也可以进一步说明

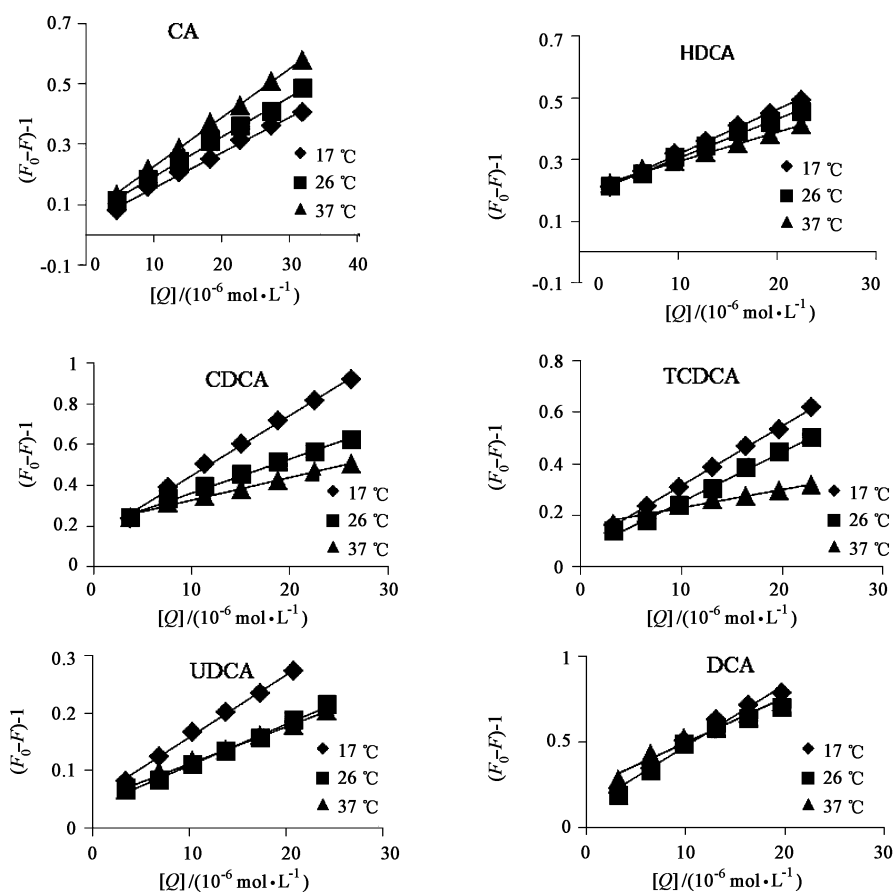


图2 药物-BSA体系的Stern-Volmer方程拟合

该过程主要为静态猝灭。但是,随着温度升高 CA 与 BSA 作用的猝灭曲线斜率升高,可能与 CA 分子相对于其他胆酸类分子多一个羟基有关,具体因素有待进一步研究。结合常数  $K_{LB}$  和一些特征的药物与蛋白质的结合常数相比低约一个数量级,说明 CAs 与 BSA 的结合相对比较弱。同时,表 1 显示 CA 的荧光猝灭速率常数和荧光猝灭常数均大于其他胆酸类分子,这可能与胆酸分子相对于其他胆酸类分子多一个羟基水溶性相对较好,存在部分动态猝灭的缘故,可推测出胆酸类分子中的羟基可能是与 BSA 的结合基团。

**3.3 CAs 与 BSA 作用的结合常数  $K_A$ 、结合位点数  $n$**  对于静态猝灭,假设药物小分子 Q 与生物大分子 B 存在  $n$  个等同且独立的结合位点, Q 与 B 之间相互作用关系符合 Langmuir 单分子吸附模型:  $\log((F_0 - F)/F) = \log K_A + n \log[Q]$ , 由  $\log((F_0 - F)/F)$  对  $\log[Q]$  作图,由直线截距可得表观结合常数  $K_A$ ,由斜率可求  $n$ ,不同温度下的结果见表 2。

由表 2 可得出 CAs 与 BSA 约以 0.5:1 的比例结合,即二个蛋白分子和一个胆酸类化合物分子结合,且 CA 较其他 CAs 分子与 BSA 结合能力较强,这与

其多一个羟基的缘故有关。通过比较不同温度时各胆酸类小分子与 BSA 的表观结合常数  $K_A$  的变化可以发现,随着温度升高平衡常数也逐渐减小,这可以理解当温度升高,更有利于胆酸类小分子与 BSA 的结合产物的解离,使结合常数  $K_A$  减小。说明血清白蛋白可以携带着胆酸类化合物在体内进行运转、贮存和分配。

**3.4 CAs 与 BSA 作用方式的热力学研究** 蛋白质与小分子之间主要通过氢键、疏水作用力、范德华力、静电力等相互作用。由热力学方程  $\ln K = -\Delta H/RT + \Delta S/R$  及  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$  可对其热力学参数进行推断。实验条件下的  $K_A$  值见表 2,以  $\ln K$  对  $1/T$  作图,由直线的斜率和截距可计算出 CAs 与 BSA 作用的热力学函数,结果见表 3。

Ross 等根据反应前后热力学常数焓变和熵变的相对大小,总结出了判断生物大分子与小分子结合力性质的热力学规律,即疏水作用力对体系的  $\Delta H$  和  $\Delta S$  产生正的贡献,氢键或 Vander Walls 力使  $\Delta H$  和  $\Delta S$  变负,静电作用力使  $\Delta H \approx 0, \Delta S > 0$ 。从表 3 可得,  $\Delta S \theta < 0$  表明 CAs 与 BSA 相互作用主要为氢键或 Vander Walls 力。但是  $\Delta H \theta < 0$  通常又表明药

表 1 由曲线拟合得到的  $K_{SV}$  和  $K_{LB}$

成分	$T/^\circ\text{C}$	$K_{SV}/\mu\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$	$R^2$	$K_q/\mu\text{L}\cdot(\text{mol}\cdot\text{s})^{-1}$	$K_{LB}/\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$	$R^2$
CA	290	$1.16 \times 10^5$	0.994 3	$1.16 \times 10^{13}$	$1.21 \times 10^4$	0.993
	299	$1.31 \times 10^5$	0.996 7	$1.31 \times 10^{13}$	$0.37 \times 10^4$	0.997 3
	310	$1.61 \times 10^5$	0.998 2	$1.61 \times 10^{13}$	$3.14 \times 10^4$	0.990
DCA	290	$3.64 \times 10^4$	0.991 0	$3.64 \times 10^{12}$	$6.72 \times 10^4$	0.997 1
	299	$3.12 \times 10^4$	0.991 3	$3.12 \times 10^{12}$	$6.39 \times 10^4$	0.998 4
	310	$2.67 \times 10^4$	0.992 2	$2.67 \times 10^{12}$	$11.54 \times 10^4$	0.997 3
HDCA	290	$1.45 \times 10^4$	0.995 9	$1.45 \times 10^{12}$	$31.69 \times 10^4$	0.996 8
	299	$1.31 \times 10^4$	0.992 9	$1.31 \times 10^{12}$	$35.88 \times 10^4$	0.990 5
	310	$0.94 \times 10^4$	0.995 7	$0.94 \times 10^{12}$	$43.31 \times 10^4$	0.990 1
CDCA	290	$2.95 \times 10^4$	0.995 5	$2.95 \times 10^{12}$	$7.49 \times 10^4$	0.993 5
	299	$1.65 \times 10^4$	0.992	$1.65 \times 10^{12}$	$9.88 \times 10^4$	0.990 2
	310	$1.11 \times 10^4$	0.996 3	$1.11 \times 10^{12}$	$11.25 \times 10^4$	0.990 5
TCDCa	290	$2.32 \times 10^4$	0.999 5	$2.32 \times 10^{12}$	$4.14 \times 10^4$	0.992 5
	299	$1.93 \times 10^4$	0.994 9	$1.93 \times 10^{12}$	$2.62 \times 10^4$	0.998 6
	310	$0.469 \times 10^4$	0.993 3	$0.469 \times 10^{12}$	$4.38 \times 10^4$	0.992 6
UDCA	290	$1.04 \times 10^4$	0.995 5	$1.04 \times 10^{12}$	$2.83 \times 10^4$	0.990 5
	299	$0.72 \times 10^4$	0.992	$0.72 \times 10^{12}$	$1.39 \times 10^4$	0.990 2
	310	$0.64 \times 10^4$	0.996 3	$0.64 \times 10^{12}$	$1.50 \times 10^4$	0.991 0

表 2 不同温度下 CAS 与 BSA 的结合位点数与结合常数

成分	$T/\text{K}$	回归方程	$n$	$K_A/\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$
CA	290	$\log[(F_0 - F)/F] = 4.123 7 + 0.821 4 \log C_{CA}$	0.82	$1.33 \times 10^4$
	299	$\log[(F_0 - F)/F] = 3.710 6 + 0.735 8 \log C_{CA}$	0.74	$0.51 \times 10^4$
	310	$\log[(F_0 - F)/F] = 3.94 + 0.762 3 \log C_{CA}$	0.76	$0.87 \times 10^4$
DCA	290	$\log[(F_0 - F)/F] = 3.613 5 + 0.785 1 \log C_{DCA}$	0.79	4 106.8
	299	$\log[(F_0 - F)/F] = 3.397 3 + 0.748 6 \log C_{DCA}$	0.75	2 496.3
	310	$\log[(F_0 - F)/F] = 2.383 6 + 0.534 1 \log C_{DCA}$	0.53	241
HDCA	290	$\log[(F_0 - F)/F] = 2.096 7 + 0.527 4 \log C_{HDCA}$	0.53	124.9
	299	$\log[(F_0 - F)/F] = 1.558 6 + 0.410 6 \log C_{HDCA}$	0.41	36.2
	310	$\log[(F_0 - F)/F] = 1.011 5 + 0.305 5 \log C_{HDCA}$	0.31	10.3
CDCA	290	$\log[(F_0 - F)/F] = 3.089 8 + 0.684 1 \log C_{CDCA}$	0.68	1230.3
	299	$\log[(F_0 - F)/F] = 2.004 3 + 0.484 8 \log C_{CDCA}$	0.48	100.0
	310	$\log[(F_0 - F)/F] = 1.362 8 + 0.366 2 \log C_{CDCA}$	0.37	22.9
TCDCa	290	$\log[(F_0 - F)/F] = 2.995 3 + 0.695 4 \log C_{TCDCa}$	0.70	1 000.0
	299	$\log[(F_0 - F)/F] = 3.610 1 + 0.842 6 \log C_{TCDCa}$	0.84	3 981.1
	310	$\log[(F_0 - F)/F] = 1.306 7 + 0.397 1 \log C_{TCDCa}$	0.40	20.0
UDCA	290	$\log[(F_0 - F)/F] = 2.769 6 + 0.747 8 \log C_{UDCA}$	0.75	588.3
	299	$\log[(F_0 - F)/F] = 1.924 + 0.570 7 \log C_{UDCA}$	0.57	83.9
	310	$\log[(F_0 - F)/F] = 1.500 9 + 0.453 2 \log C_{UDCA}$	0.45	31.7

物与蛋白质之间也存在静电作用。通常,蛋白质与小分子之间的作用力也不止一种。Ross 等认为,在很多情况下,即使  $\Delta H^\theta < 0$ ,蛋白质和一些小分子之间的主要作用力仍为氢键或 Vander Walls 力。同

时,  $\Delta G < 0$ ,说明该反应能自发进行。且从图 1 中可知各种胆酸类化合物的分子结构中含有的羰基和羟基,即可与蛋白中的氨基酸残基形成氢键。综上可知胆酸类化合物与 BSA 之间主要是以氢键或

表 3 热力学参数

成分	T/K	$\Delta H$ /kJ·mol <sup>-1</sup>	$\Delta S$ /J·(mol·K) <sup>-1</sup>	$\Delta G$ /kJ·mol <sup>-1</sup>
CA	290	-15.8	-24.5	-22.9
	299			-23.1
	310			-23.4
DCA	290	-107.3	-298.24	-20.8
	299			-18.1
	310			-14.8
HDCA	290	-93.2	-281.39	-11.6
	299			-9.05
	310			-5.95
CDCA	290	-148.5	-453.6	-16.9
	299			-12.8
	310			-7.8
TCDCA	290	-146.4	-447.1	-16.6
	299			-12.6
	310			-7.7
UDCA	290	-108.9	-323.0	-15.2
	299			-12.3
	310			-8.7

Vander Walls 力结合,也不排除存在静电作用的可能性。

**3.5 同步荧光** 血清白蛋白分子中的色氨酸 Trp,酪氨酸 Tyr 和苯丙氨酸 Phe 残基能吸收紫外光,并且能发射荧光,所以血清白蛋白具有内源荧光。由于色氨酸 Trp、酪氨酸 Tyr 和苯丙氨酸 Phe 的侧链 R

基团不同,三者的荧光光谱也不同。

在相同的实验条件下,固定 BSA 的浓度为  $1.04 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,逐渐增加 CAs 的浓度,分别固定  $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$  和  $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ ,可分别得到 Tyr 和 Trp 的荧光光谱<sup>[10]</sup>。残基的最大发射波长与其所处环境极性有关,若红移表明残基所处环境极性增加,疏水性降低,因而由发射波长的移动可以判断蛋白质构象的改变。结果表明, $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$  时,随着 CAs 的增加,BSA 的同步荧光强度变化不明显;但  $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$  时,荧光强度明显逐渐下降,说明 BSA 的荧光主要由色氨酸残基所贡献,但峰位和峰形均基本没有变化,说明结合位点附近的色氨酸和酪氨酸的极性环境变化不大;总体而言 CAs 的加入对蛋白质的构象影响较小。

**3.6 红外光谱** 蛋白质红外光谱中酰胺 I 带 ( $1650 \sim 1658 \text{ cm}^{-1}$  为  $\alpha$  螺旋) 主要是其氨基酸残基的 C=O 伸缩振动吸收,羰基和氨基之间形成的氢键与其二级结构密切相关,因此酰胺 I 带对蛋白质二级结构的变化非常敏感,酰胺 II 带 ( $1500 \sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ ) 包含了 C-N 的伸缩振动和 N-H 的变形振动,它也是反映蛋白质结构的一个重要谱带,但对蛋白质二级结构变化的敏感程度次于酰胺 I 带。分别收集样品溶液和对应背景溶液的红外光谱,差减得到 BSA 光谱图及 CAs 与 BSA 作用后 BSA 的光谱图,见图 4。

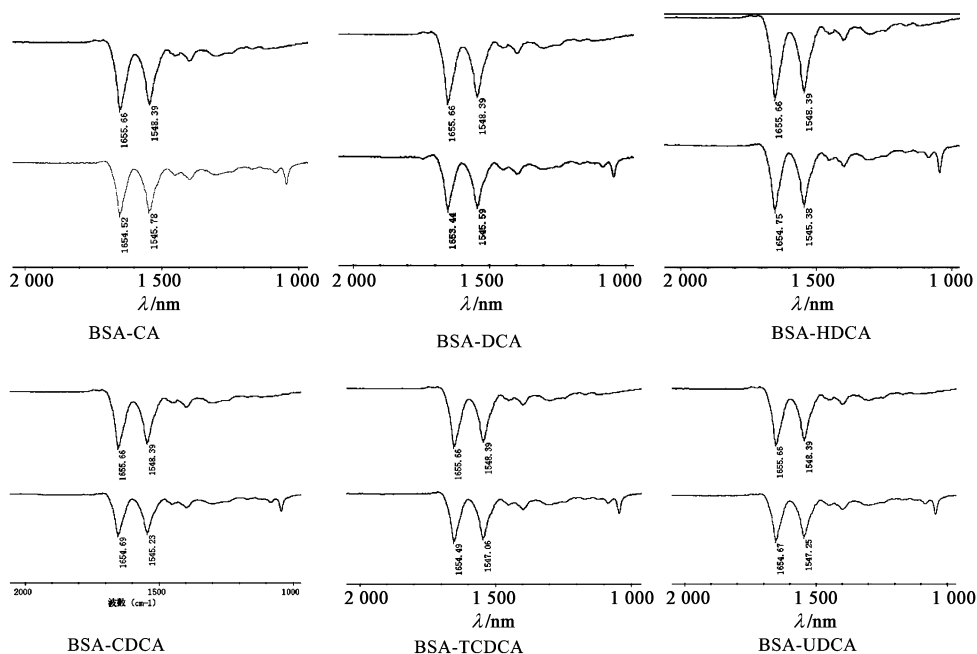


图 4 BSA 的红外谱图(上层)及其与药物作用后的 BSA 红外谱图对比

从上图可看出,胆酸类小分子与 BSA 作用后 BSA 中峰位及半峰宽没有发生明显变化,但酰胺 I 带(主要为  $\alpha$  螺旋)与酰胺 II 带的相对强度发生变化,说明,胆酸类小分子的加入影响了蛋白中氢键而导致其二级结构有稍微的变化,与同步荧光结论相一致。

#### 4 结论

通过利用荧光光谱及衰减全反射傅里叶变换红外光谱法,本文研究了在生理 pH 条件下胆酸类化合物与牛血清白蛋白的相互作用。结果表明胆酸类小分子对 BSA 有一定的猝灭作用,其猝灭主要为静态猝灭,计算了其结合常数及结合位点数,得出其主要为氢键或 Vander Walls 力,为胆酸类小分子在体内被蛋白质储存和转运提供了条件;同时通过同步荧光及衰减全反射傅里叶变换红外光谱发现胆酸类化合物对蛋白质的构象影响较小。本研究对于了解蛋白质的相关信息及进一步探索胆酸类化合物在人体内的作用具有重要的参考价值。

#### [参考文献]

[1] 尤承忠, 汤文浩. 胆汁酸合成及转运载体研究进展[J]. 国外医学: 消化系统分册, 2004, 24(1): 52.  
[2] 张久聪, 聂青和. 胆汁酸代谢及相关进展[J]. 胃肠

病学和肝病杂志, 2008, 17(11): 953.  
[3] 李水军, 刘罡一, 印其友, 等. 液相色谱-串联质谱法测定血清中 15 种胆汁酸[J]. 分析测试学报, 2007, 26(3): 31.  
[4] 鄢海燕, 邹纯才. 熊胆粉、猪胆粉、牛胆粉及鸡胆粉中总胆酸的含量测定及其抑菌作用[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(3): 175.  
[5] 韩杰. HPLC 测定清开灵颗粒中黄芩苷、栀子苷及胆酸、猪去氧胆酸的含量[J]. 中成药, 2012, 32(2): 227.  
[6] 刘萍, 古今, 冯建涌. 熊胆与猴胆、鸡胆汁的高效毛细管电泳法鉴别[J]. 中国药物应用与监测, 2005, 17(4): 17.  
[7] 闻晓东, 李萍, 钱正明, 等. 三种抗氧化物与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 化学学报, 2007, 65(5): 421.  
[8] 刘媛, 谢孟峡, 康娟, 等. 三七总皂苷对牛血清白蛋白溶液构象的影响[J]. 化学学报, 2003, 61(8): 1305.  
[9] 刘媛, 秦川, 侯菲儿, 等. 贝加因黄酮与不同异构体人血清白蛋白相互作用机制研究[J]. 化学学报, 2009, 67(7): 629.  
[10] 章汝平, 何立芳, 导数恒能量同步荧光法快速同时分析茚、咪唑、苯并[ $\alpha$ ] 茚和茚[J]. 光谱学和光谱分析, 2007, 27(2): 350.

[责任编辑 顾雪竹]

## 天津中医药大学期刊编辑部 2014 年征订启事

《天津中医药》月刊, 每期 8 元, 年定价 96 元, 联系电话: 022-59596310, 联系人: 张震之。邮局订阅: 邮发代号 6-83 电子邮件: zhongyiyao@vip.126.com, xuebaobj@126.com, 网址: http://www.tjzhongyiyao.com, 地址: 天津市南开区鞍山道 312 号, 邮政编码: 300193。

《天津中医药大学学报》双月刊, 每期 6 元, 年定价 36 元, 联系电话: 022-59596310, 联系人: 张震之。邮局订阅: 邮发代号 6-153, 电子邮件: xuebaobj@vip.126.com, xuebaotxd@126.com, 网址: http://www.tjzhongyiyao.com, 地址: 天津市南开区鞍山道 312 号, 邮政编码: 300193。