

荧光法研究维生素 B₆ 和芦丁与白蛋白的相互作用

马贵斌 杨 频

(山西大学化学系分子科学研究所,太原)

提 要

芦丁是一些中药的有效成份。研究药物与白蛋白的作用能说明蛋白质的结构与功能的关系和药物的作用机制。本文应用荧光偏振和能量转移技术研究了药物 Vit B₆ 和芦丁与白蛋白的作用。给出了这些药物分子与白蛋白的缔合离解常数, Vit B₆ 和芦丁在人血清白蛋白中的结合位置与第 214 位色氨酸残基的距离分别为 23.4 Å 和 24.02 Å。

关键词 荧光,白蛋白,药物,维生素 B₆, 芦丁

白蛋白是血浆中最丰富的蛋白质,它作为许多内源性和外源性化合物的存放和转运蛋白。白蛋白有高亲合性的内生质、有长链脂肪酸和胆红素。两种化合物在血浆中的作用增加了血浆的可溶性。到目前为止,对白蛋白研究表明分子内至少存在六类配体结合区域^[1],结合区域详细的实验证据列于表 1。芦丁是一些中草药的有效成份,属于黄酮类化合物。羟乙基芦丁(hydroxyethyl rutin)商品名“维脑路通”是芦丁的水溶性衍生物。芦丁及其衍生物等对血管、血液方面的疾病有显著的疗效^[2-4]。并且具有一定的抗炎活性。药物分子在生物体中的作用机制虽然是很复杂的,但从不同角度研究配体与蛋白质的作用,对于阐明药物的作用机制及蛋白质的结构与功能的关系有一定的重要性。本文应用荧光偏振和能量转移的方法研究了药物分子芦丁等与白蛋白的作用及其在白蛋白中的结合位置。

一、理论基础

1. 荧光偏振测量缔合反应

当一些分子与蛋白质作用后,必然改变其荧光偏振特性,弛豫时间变长,荧光偏振度增

表 1 白蛋白中键合区域

Table 1 Bonding region in albumin

| 键合区域 Binding region | 高亲合力的结合位置 High affinity fatty acids |
|---------------------------|--|
| 1 | 长链脂肪酸 Long-chain fatty acids |
| 2 | 甲状腺素 L-Thyroxine D-和 L-色氨酸 D- and L- tryptophan 邻碘苯甲酸盐 P-Iodobenzoate 氯离子 Chloride ion 辛酸盐 Octanoate |
| 3 | 胆红素 Bilirubin 染料(如酚红) Several dyes (e. g. phenolsulfonphthalein dyes) |
| 4 | Cu, Ni |
| 5 | 氯高铁血红素 Haemin |
| 6 | 水杨酸盐 Salicylate 磺胺噻唑 Sulfathiazole 磺胺乙噻二唑 Sulfaethidole |

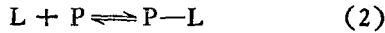
大。荧光体在溶液中如果只存在游离的(F)和键合于蛋白质上(B)的两种形式,则观测的荧光退偏振由下式给出:

$$\gamma = f_F \cdot \gamma_F + f_B \cdot \gamma_B \quad (1)$$

这里 γ 为溶液中存在两种游离的和键合的荧光体的退偏振度, γ_F 和 γ_B 分别为完全游离的和键合的荧光体的退偏振度。 f_F 和 f_B 分别代表游离的和键合的荧光体的摩尔分数,即 $f_F +$

$f_B = 1$ 。

考虑下列荧光配体与蛋白质的平衡：



假设一个 P 结合一个 L，上式反应的离解常数可表示为：

$$K_D = \frac{[P][L]}{[P-L]} \quad (3)$$

处于键合形式的荧光体摩尔分数由下式给出：

$$f_B = \frac{[P-L]}{[L]_0} = \frac{[P]}{[P] + K_D} \quad (4)$$

这里 $[L]_0 = [L] + [P-L]$ 是荧光体的总浓度。

考虑到 $f_B + f_F = 1$ ，将(1)式重排给出：

$$f_B = \frac{\gamma - \gamma_F}{\gamma_B - \gamma_F} \quad (5)$$

如果在测量过程中，使用相同浓度的 P 和 L，形成 P-L 型缔合物，很显然 $[P-L] = [P]_T \cdot f_B$ ， $[L] = [P] = [P]_T \cdot (1 - f_B)$ 。 $[P]_T$ 是蛋白质的总浓度，则离解常数为：

$$K_D = \frac{[L][P]}{[P-L]} = \frac{[P]_T \cdot (1 - f_B)^2}{f_B} \quad (6)$$

由上面公式可知，通过观测荧光体在游离态(不存在蛋白质)和键合态(蛋白质浓度很大)可得到 γ_F 和 γ_B ，再通过观测平衡态的溶液的退偏振 γ ，可由(5)式计算 f_B 和 f_F ，由(6)式可得到解离常数 K_D 。

2. Förster 偶极-偶极能量转移测定能量给予体和接受体之间的距离

根据 Förster 理论，无辐射能量转移的量子效率 E 可表示成下列关系式：

$$E = \frac{R_0^6}{(R^6 + R_0^6)} \quad (7)$$

其中 R_0 为转移效率为 50% 时的临界距离，表示为：

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 n^{-4} \phi_D \cdot J \quad (8)$$

其中 K^2 为偶极空间取向因子， n 为介质的折射指数， ϕ_D 为给体的荧光量子产率， J 为给体的荧光发射光谱与接受体的吸收光谱之间的光谱重迭积分，表示如下：

$$J(\lambda) = \int_0^\infty F_D(\lambda) \epsilon(\lambda) \lambda^4 d\lambda / \int_0^\infty F(\lambda) d\lambda \quad (9)$$

其中 $F_D(\lambda)$ 为荧光给体在波长 λ 的荧光强度， $\epsilon_A(\lambda)$ 为接受体在波长 λ 的摩尔消光系数。

能量转移效率 E 可由下式测定：

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} \quad (10)$$

式中 F 和 F_0 分别为存在和不存在能量接受体时能量给予体的荧光发射强度。

二、材料与试剂

荧光光谱仪 Hitach-M 850 荧光光谱仪。

微量进样器 上海医用激光仪器厂。

人血清白蛋白 卫生部上海生物制品研究所。

牛血清白蛋白 中科院上海生物化学研究所。

维生素 B₆ (盐酸吡哆辛)含量 >99%，上海化学试剂采购供应站经销(国产分装)。

芦丁 太原制药厂。

维脑路通 太原制药厂。

三、结果与讨论

1. 白蛋白与药物分子离解常数的确定

首先观察了药物分子对人血清白蛋白的荧光淬灭情况，随着芦丁和维生素 B₆ 的加入，人血清白蛋白的荧光显著降低，并且有红移的趋势。当加入的药物浓度与白蛋白的浓度接近 1:1 (摩尔比)后，其荧光降低程度明显减小，但还是有淬灭。表明药物能进入白蛋白内，并且发生了相互作用。这种淬灭效应与加入药物的时间间隔无关，说明与扩散无关，是静态淬灭，而不是动态淬灭。静态淬灭就是形成了缔合物而导致的淬灭。

接着，观测了药物在游离态、与白蛋白 1:1 (摩尔比)和白蛋白浓度较药物浓度略大三种情况的荧光偏振度和退偏振度。结果表明白蛋白存在改变了药物分子的退偏振度，说明了白蛋白对药物有作用。测定的退偏振度列于表 2。由荧光淬灭可知浓度在未接近 1:1 时，加进的药物几乎都与白蛋白结合，因此在药物浓度比白蛋白浓度小的情况下测定的 γ 就可近似认为是

表 2 药物分子的退偏振度 (20°C)

Table 2. Depolarization of medicament molecule (20°C)

| 测定条件 Determination condition | γ | 测定条件 Determination condition | γ_F | 测定条件 Determination condition | γ_B |
|---|----------|--|------------|---|------------|
| HSA = 4.0×10^{-5} mol/L 芦丁 (rutin) = 4.0×10^{-5} mol/L | 0.110 | 芦丁 (rutin) = 2.46×10^{-4} mol/L | 0.020 | HSA = 4.0×10^{-4} mol/L 芦丁 (rutin) = 3.0×10^{-4} mol/L | 0.243 |
| HSA = 4.0×10^{-5} mol/L 维脑路通 (H. rutin) = 4.0×10^{-5} mol/L | 0.028 | 维脑路通 (H. rutin) = 1.0×10^{-4} mol/L | 0.025 | HSA = 4.0×10^{-4} mol/L 维脑路通 (H. rutin) = 1.0×10^{-4} mol/L | 0.170 |
| HSA = 4.0×10^{-5} mol/L Vit B ₆ = 4.0×10^{-5} mol/L | 0.051 | Vit B ₆ = 1.0×10^{-4} mol/L | 0.048 | HSA = 4.0×10^{-4} mol/L Vit B ₆ = 1.0×10^{-4} mol/L | 0.053 |
| BSA = 3.36×10^{-5} mol/L 维脑路通 (H. rutin) = 4.4×10^{-5} mol/L | 0.050 | 维脑路通 (H. rutin) = 2.12×10^{-5} mol/L | 0.020 | BSA = 3.36×10^{-4} mol/L 维脑路通 (H. rutin) = 2.2×10^{-4} mol/L | 0.250 |
| BSA = 3.36×10^{-5} mol/L Vit B ₆ = 3.93×10^{-5} mol/L | 0.055 | Vit B ₆ = 7.56×10^{-4} mol/L | 0.045 | BSA = 3.36×10^{-4} mol/L Vit B ₆ = 3.93×10^{-5} mol/L | 0.078 |

1) 维脑路通 Hydroxyethyl rutin (H. rutin)

γ_B 。由表 2 中的数据,则通过 (5)、(6) 式可计算得 [P-L] 型缔合物的离解常数 K_D , 结果列于表 3。

2. Förster 偶极-偶极无辐射能量转移确定药物分子在人血清白蛋白中的结合位置或结合区域

基于 Förster 偶极-偶极无辐射能量转移机理,估测了人血清白蛋白中维生素 B₆ 和芦丁结合位置与第 214 位色氨酸残基之间的距离。

固定发射波长于 355 nm, 分别测定了人血清白蛋白和白蛋白与芦丁浓度为 1:1 (摩尔比) 时的缔合物激发光谱 (图 1)。由图 1 可见, 最大激发峰在 296 nm, 次峰在 265 nm 处。根据游离的色氨酸激发光谱, 可认为 296 nm 为人血清白蛋白中单一色氨酸残基的最大激发峰。当加入芦丁 (摩尔比为 1:1) 后, 并不移动其最大激发波长。

在存在和不存在白蛋白的溶液中, 观察了维生素 B₆ 发射荧光强度, 结果存在白蛋白的维生素 B₆ 的荧光强度比不存在白蛋白时较强, 而存在维生素 B₆ 的白蛋白内源色氨酸残基的荧光强度降低, 结果见图 2。表明白蛋白中色氨酸残基与维生素 B₆ 之间存在能量转移。

我们测定了人血清白蛋白的荧光发射光谱和维生素 B₆、芦丁的吸收光谱 (使用日本鸟津 UV-365 光度仪), 如图 3 所示。由该图的光谱重迭, 使用 (9) 式, 把重迭部分分割成很小的面积求和及按公式 (9) 积分, 计算了光谱的重迭积分。与 Vit B₆ 为 $J = 2.19 \times 10^{-15} \text{ cm}^3 \cdot (\text{mol/L})^{-1}$, 与芦丁为 $J = 1.43 \times 10^{-14} \text{ cm}^3 \cdot (\text{mol/L})^{-1}$ 。

以色氨酸为标准物 ($\phi = 0.14^{[5]}$), 在室温下用相同的激发波长和仪器参数用相对法测定了人血清白蛋白中色氨酸的量子产率, $\phi =$

表 3 荧光偏振测定的药物与白蛋白的离解常数 (20°C)

Table 3 The determinate dissociation constant of medicament with albumin by the method of fluorescence polarization (20°C)

| 离解常数 Dissociation constant 药物 Medicament | 蛋白质 Protein | |
|--|-----------------------------|-----------------------------|
| | HSA | BSA |
| 维生素 B ₆ Vitamin B ₆ | 1.07×10^{-5} mol/L | 5.39×10^{-5} mol/L |
| 芦丁 Rutin | 3.25×10^{-5} mol/L | — |
| 维脑路通 Hydroxyethyl rutin | 1.86×10^{-3} mol/L | 1.95×10^{-4} mol/L |

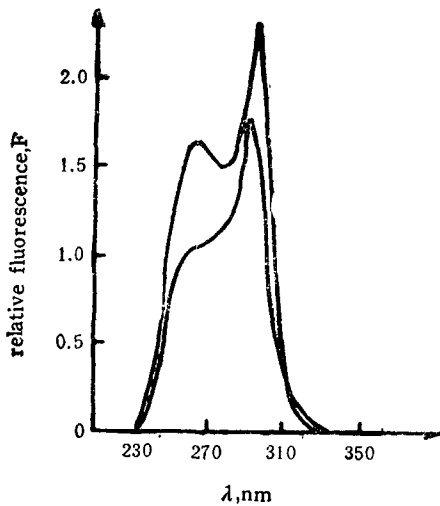


图 1 人血清白蛋白的激发谱
Fig. 1 Excited spectra of human serum albumin (HSA)

pure HSA (upper),
 mol/mol = 1:1 HSA and rutin (below)
 $\lambda_{ex} = 355\text{nm}$, pH = 7.0

0.1188, 同 Longworth^[6] 给出 77 K 的人血清白蛋白中色氨酸的量子产率 $\phi = 0.11$ 基本吻合。

折射指数 n 取水和有机物折射指数的平均值 1.36。取向因子我们取能量给体和受体随机分布的平均值 $K^2 = 2/3$ 。将上面参数代入(8)式,可得出能量转移效率为 50% 时给体和受体距离的临界值 R_0 。色氨酸残基与 Vit B₆ 的 R_0 为 18.83 Å, 与芦丁为 25.75 Å。

能量转移效率的确定, 分别测定了存在药物分子(摩尔比为 1:1) 和不存在药物分子时人血清白蛋白 ($\lambda_{ex} = 296\text{nm}$) 的荧光强度, 按照(10)式分别计算得色氨酸与药物分子间的能量转移效率为 $\text{Trp} \rightarrow \text{Vit B}_6$ $E = 0.2147$, $\text{Trp} \rightarrow$ 芦丁 $E = 0.6028$ 。由 R_0 和 E 值, 按照(7)式计算出 R 值, 即第 214 位色氨酸距离维生素 B₆ 结合位置为 23.4 Å, 距离芦丁为 24.02 Å。

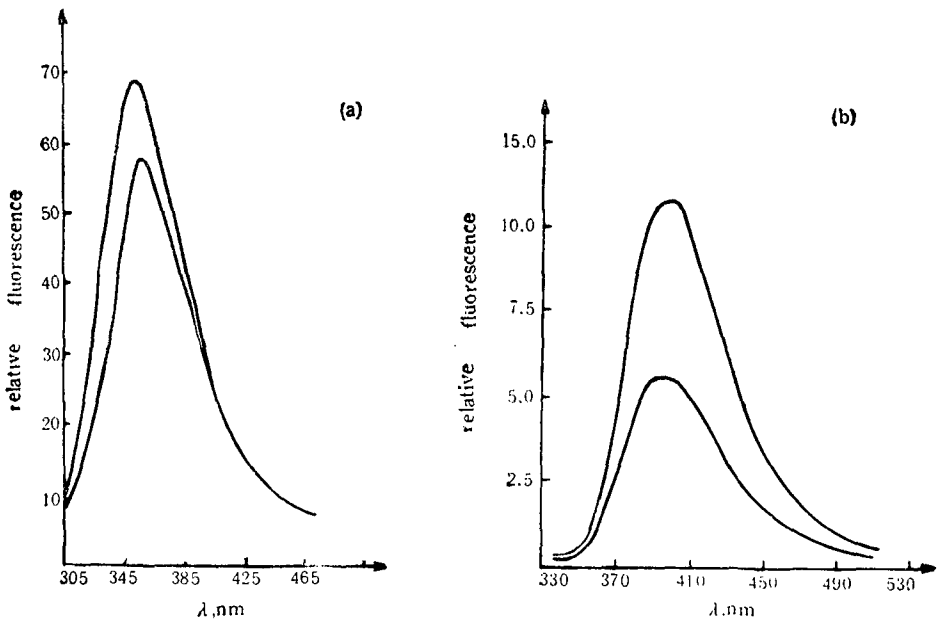


图 2 人血清白蛋白和维生素 B₆ 之间的能量转移

Fig. 2 Energy translation between human serum albumin and vitamin B₆

(a) HSA = 4.0×10^{-5} mol/L (upper)
 HSA = 4.0×10^{-5} mol/L, Vit B₆ = 4.0×10^{-5} mol/L (below)
 $\lambda_{ex} = 296\text{nm}$
 (b) HSA = 4.0×10^{-5} mol/L, Vit B₆ = 4.0×10^{-5} mol/L (upper)
 Vit B₆ = 4.0×10^{-5} mol/L (below)
 $\lambda_{ex} = 324.5\text{nm}$

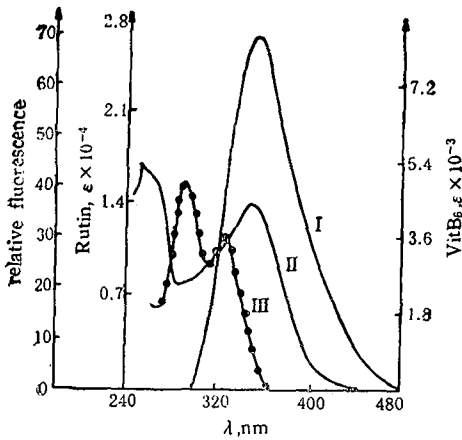


图3 人血清白蛋白的荧光光谱 ($\lambda_{ex} = 296\text{nm}$) 与维生素 B_6 和芦丁的吸收光谱

Fig. 3 Spectral overlap of the absorption spectrum of vitamin B_6 and rutin and the fluorescence emission of human serum albumin

I. 荧光发射光谱 (HSA), II. 芦丁吸收光谱, III. 维生素 B_6 的吸收光谱, 纵轴为摩尔消光系数, 横轴为波长

I. fluorescence emission spectrum of HSA
II. absorption spectrum of rutin
III. absorption spectrum of vitamin B_6 ,
ordinate: molar absorptivity, abscissa: wave length

3. 讨论

通过观察药物对白蛋白的荧光淬灭, 发现当药物浓度较低时符合静态淬灭, 由此通过荧光强度与淬灭剂浓度的双倒数 Lineweaver-Burk 图确定离解常数, 结果给出的离解常数与偏振测定的基本吻合。根据文献报道, 氨基水杨酸 (asprin) 共价结合在赖氨酸残基上^[7], 位置可能是 199 位的赖氨酸^[8]。Bundgaard^[9] 报道了几种青霉素 (benzyl penicillin, phenoxymethyl penicillin, ampicillin, carbenicillin,

and cloxacillin) 的 β -内酰胺环和白蛋白的赖氨酸乙酰化的 ϵ -氨基、组氨酸的咪唑基反应。有些长链的分子可以插入白蛋白的某些 α -螺旋内。可以认为药物分子与白蛋白的作用, 根据分子极性、特定基团的类型和电荷、可遵循相似相溶和酸碱、电荷中和的原则进入白蛋白内相匹配的区域。从确定的离解常数可知, 结合较紧, 相互作用强。由芦丁转变为羟乙基芦丁其水溶性增大, 脂溶性降低, 离解常数却增大, 由此可见芦丁进入白蛋白内某一疏水区域内。

估测的维生素 B_6 和芦丁与 214 位色氨酸的距离位于 Perlman^[10] 等人估算的色氨酸残基与甲状腺素 (22 Å) 的距离和 Charles^[11] 等人估算的与胆红素 (27 Å) 的距离之间。可以认为芦丁和维生素 B_6 进入区域 2 和 3 的可能性都存在, 但进入区域 2 的可能性更大。由此可见在生物体中, 白蛋白可以作为很多分子的载体和转运蛋白, 同样也可作为药物的载体。

参 考 文 献

- 1 Ulrich K H. *Pharmacol Rev*, 1981; 33(1): 17
- 2 李文铎等, 华北地区第二次心血管会议论文汇编, 1979
- 3 Eastham R D *et al. Brit Med J*, 1972; 4: 491
- 4 Sorensen A H *et al. Brit Med J*, 1969; 3: 532
- 5 Chen R F, *Anal Lett*, 1967; 1: 35
- 6 Longworth J W. *Excited States of Proteins and Nucleic Acid*, New York: Plenum press, 1971
- 7 Hawkings D *et al. J Clin Invest*, 1969; 48: 536
- 8 Walker J E. *FEBS Lett*, 1976; 66: 173
- 9 Bundgaard H. *Acta Pharm Suec*, 1977; 14: 391
- 10 Perlman R L *et al. J Amer Chem Soc*. 1968; 90: 2168
- 11 Charles B *et al. J Biol Chem*, 1979; 254(2): 391

〔本文于 1989 年 6 月 27 日收到〕

FLUORESCENCE STUDY ON THE INTERACTION OF VITAMIN B₆ AND RUTIN WITH ALBUMIN

Ma Guibin Yang Pin

(Chemical department, Institute of molecular science, Shanxi University, Taiyuan)

ABSTRACT

Rutin is an effective constituent of some chinese medicinal herb. Interaction study of the medicament with albumin not only can expound the relation of structure and function of the protein and also the action mechanism of the medicament. By using fluorescence polarization and energy transfer technique, We studied on the interaction of human serum albumin (HSA) with medicaments vitamin B₆ and rutin. The dissociation constants of medicaments with albumin were obtained. The distances between the number 214 tryptophane and binding sites of vitamin B₆ and rutin on the protein are 23.4 Å and 24.02 Å respectively.

Key words fluorescence, albumin, medicament, vitamin B₆, rutin

农业部有关单位与北京市星火技术研究所联合举办特种 养殖培训班 包销路、包种源、包技术

动物饲养,投资少,见效快,是农村致富的有效途径。本培训班由养殖专家授课辅导,理论与实践相结合。通过学习,学员可掌握所学动物的饲养、繁殖、加工、疾病防治等一整套养殖技术,达到独立饲养水平。

一、白玉蜗牛养殖技术: 蜗牛肉是高蛋白低脂肪的美味佳肴,不仅可出口创汇,而且内脏可提取蜗牛酶,壳可做饲料添加剂,投资 600 元,年获利万元以上。每只蜗牛年繁殖 600—1000 只,半年即可出售,包销价每公斤 40 元,引种处签订 1—3 年包销合同。面授 80 元,函授 40 元。

二、人工养殖哈士蟆: 哈士蟆又称为中国林蛙,人工养殖哈士蟆已列为国家星火项目,它是珍贵的药用动物,可治体虚气弱、气血不足、产后出血、神经性头痛等疾病。400 只左右哈士蟆可提取一公斤哈士蟆油,市场售价 800—1000 元,投资 500 元,年利万元以上,提供种源,引进种签订产品回收合同,面授 80 元,函授 45 元。

以上培训班常年举办,随到随学,面授 3—5 天,函授时间为三个月。如函授不会,可申请面授,面授时减去函授费,考试合格发给(钢印)结业证书。

[北京市星火技术研究所,北京 867 信箱 20816 组,邮政编码: 100024,李群]