

棉酚及其氧化物与牛血清蛋白相互作用的研究

柴秀航, 毕艳兰, 彭丹, 王亚

(河南工业大学粮油食品学院, 河南郑州 450001)

摘要: 利用紫外-可见吸收光谱和荧光光谱法研究棉酚及其氧化物与牛血清蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 的结合作用。实验结果表明, 棉酚及其氧化物与牛血清蛋白相互作用而引起的荧光猝灭机制均属于动态和静态的联合猝灭, BSA 发射峰蓝移。通过计算各个结合参数得出: 棉酚及其氧化物与 BSA 的结合常数在 10^5 数量级, 说明棉酚及其氧化物与 BSA 有很强的结合, 结合位点均为 1; 热力学参数 $\Delta H < 0$ 、 $\Delta S > 0$ 和 $\Delta G < 0$, 表明棉酚及其氧化物与 BSA 结合的主要作用力为疏水作用力和氢键。根据 Forster 的非辐射能量转移理论, 计算供体(BSA)与受体(棉酚及其氧化物)间的结合距离 r 分别为 2.94 nm 和 3.12 nm, 它们都能以能量转移的方式与 BSA 发生作用。紫外-可见光谱、同步荧光光谱和三维荧光光谱的研究结果表明, 棉酚及其氧化物与 BSA 的结合引起了 BSA 的构象变化。

关键词: 棉酚; 棉酚氧化物; 牛血清蛋白; 荧光光谱; 同步荧光光谱

文章编号: 1673-9078(2015)6-36-43

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.6.007

Interaction of Gossypol and Its Oxide with Bovine Serum Albumin

CHAI Xiu-hang, BI Yan-lan, PENG Dan, WANG Ya

(School of Food Science and Technology, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: The interaction of gossypol and its oxide with bovine serum albumin (BSA) was investigated by fluorescence spectroscopy and ultraviolet-visible spectroscopy (UV-vis). The experimental results indicated that the quenching mechanism of BSA by gossypol and its oxide was a combined dynamic and static quenching, with a blue-shift of the emission maximum of BSA. The calculation of various binding parameters showed that the binding constants for gossypol-BSA and gossypol oxide-BSA were in the order of 10^5 , indicating a strong interaction between gossypol/gossypol oxide and BSA. There was one binding site involved in the interaction between gossypol/gossypol oxide and BSA. The negative value of ΔH , positive value of ΔS , and negative value of ΔG indicated that hydrophobic and hydrogen-bonding interactions played major roles in the binding of gossypol or its oxide with BSA. Based on Forster-type nonradiative energy transfer, the binding distances (r) between the donor (BSA) and acceptor (gossypol or its oxide) were 2.94 nm and 3.12 nm, respectively, and they could interact with BSA by energy transfer. The UV-vis absorption spectra, synchronous fluorescence spectra, and three-dimensional fluorescence spectra showed that the binding of gossypol/gossypol oxide to BSA induced conformational changes in BSA.

Key words: gossypol; gossypol oxide; bovine serum albumin; fluorescence spectrum; synchronous fluorescence spectrum

棉酚是一种多酚类天然化合物, 主要存在于棉籽中, 其化学名称为 2, 2'-双-8-甲基酸-1, 6, 7-三羟基-5-异丙基-3-甲基萘, 性质非常活泼, 具有很强的生物和化学活性, 如抗病毒, 抗肿瘤等作用^[1], 目前已经应用到医药和临床实验上。另外, 棉酚本身有一定的毒性, 国家标准中对于饲用棉粕中的棉酚含量的规定是不能超过 100 mg/kg (GB 13078-2001), 因此, 基于棉酚的安全性及作用效果等方面的考虑, 研究棉酚与生物大分子的相互作用是很重要的。

收稿日期: 2014-09-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31271883)

作者简介: 柴秀航 (1988-), 男, 硕士研究生, 研究方向为油脂化学与油脂检测

通讯作者: 毕艳兰 (1969-), 女, 教授, 研究方向为油脂化学与油脂检测

对于棉酚与蛋白的相互作用已有一些学者做了相关的研究, Cater and Lyman^[2]研究了棉酚的醛基可以和氨基酸的氨基形成席夫碱化合物; Maliwa 等人^[3]采用圆二色性光谱 (Circular Dichroism, CD) 和差光谱研究了棉酚与牛血清蛋白的相互作用, 指出棉酚和 BSA 形成 1:1 的复合物。随后, Yang 等人^[4]利用荧光光谱法进一步研究了棉酚与 BSA 的作用机制, 并得出 $c(\text{棉酚})/c(\text{BSA}) < 1$ 时的结合位点, 结合作用力等信息, 但是 $c(\text{棉酚})/c(\text{BSA}) > 1$ 时的结合机制并没有探究; 然而, 棉酚很不稳定, 在提取或储存的过程中, 极易受到光照、温度以及氧气的作用而氧化变质^[5], 因此, 医用棉酚药片和饲用棉粕在加工和储存过程中会有部分棉酚氧化, 棉酚氧化物对人体是否有影响也需要进一步的探索。

本文中,利用荧光光谱、紫外-可见吸收光谱研究了模拟生理条件下棉酚、棉酚氧化物和 BSA 的相互作用。考察它们之间的作用机理,其中包括猝灭机理,结合位点,结合作用力的类型以及棉酚、棉酚氧化物对于 BSA 分子微观环境的变化和构象变化的影响。期望能够对正确地理解棉酚、棉酚氧化物的毒理学提供有用的信息,还能够从分子水平说明棉酚、棉酚氧化物的作用机理。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

棉酚标准品 (Gossypol, 纯度 $\geq 95\%$): 美国 Sigma-Aldrich 公司; 棉酚氧化物: 将棉酚标准品放入烘箱中 $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热氧化 4 h。牛血清蛋白 (Bovine serum albumin, BSA, 纯度 $>98\%$), 北京索莱宝科技有限公司; 用 0.1 mol/L 的 $\text{pH}7.4$ Tris-HCl 缓冲溶液 (内含 0.1 mol/L NaCl 维持离子强度) 配制浓度为 $1.20\times 10^{-5}\text{ mol/L}$ 的 BSA 标准溶液, 于 $1\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中储存。棉酚标准溶液: 采用无水乙醇 (色谱纯) 配制成 $3\times 10^{-3}\text{ mol/L}$ 的工作溶液。棉酚氧化物标准溶液: 采用无水乙醇 (色谱纯) 配制成 $3\times 10^{-3}\text{ mol/L}$ 的工作溶液。Tris 试剂, 氯化钠, 盐酸均为分析纯, 水为二次去离子水。

1.2 仪器与设备

pHS-25 数显 PH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司; TU-1901 型紫外-可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; 日立 F-4500 荧光分光光度计, 日立高新技术公司; HH-2 数显恒温水浴锅, 常州国华电器有限公司; DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器, 河南省予华仪器有限公司。Waters 2695 高效液相色谱分析仪, 美国 Waters 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 棉酚及棉酚氧化物的定性测定

精确称取棉酚标准品和棉酚氧化物 10 mg 于 10 mL 容量瓶中, 加入无水乙醇溶液定容至 10 mL , 分别过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 膜, 采用高压液相色谱仪 (high pressure liquid chromatograph, HPLC) 测定。

用反相 HPLC 法测定棉酚和棉酚氧化物^[6], 其色谱条件为: 色谱柱: Sunfire C18 柱 ($250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$); 流动相: 甲醇/0.1% 磷酸水等度洗脱 (83/17, V/V); 流速: 0.80 mL/min ; 检测波长: 254 nm ; 进样体积: $10\text{ }\mu\text{L}$, 柱温: $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

1.3.2 紫外光谱测定

移取 10 mL $1.20\times 10^{-5}\text{ mol/L}$ 的 BSA 标准溶液于 9 个 10 mL 棕色容量瓶中, 用微量注射器 (范围: $1\sim 100\text{ }\mu\text{L}$) 分别加入 0、10、20、30、40、50、60、70、80 μL 的棉酚/棉酚氧化物标准溶液进行荧光滴定, 每次加入溶液后, 分别在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的恒温水浴锅中磁力搅拌 6 min , 以 BSA 标准作为参比, 在紫外可见分光光度计上记录 $200\sim 500\text{ nm}$ 波长范围内的吸收光谱。

1.3.3 荧光光谱测定

采用 1.3.2 中相同方法制备混匀的待测溶液, 以 280 nm 为激发波长, 在荧光分光光度计上记录 $300\sim 500\text{ nm}$ 波长范围内的发射光谱。分别以 $\Delta\lambda=60\text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda=15\text{ nm}$ 测定其同步荧光光谱 (激发光栅和发射光栅分别为 10 nm , 5 nm)。

1.3.4 三维荧光光谱测定

移取 $1.20\times 10^{-5}\text{ mol/L}$ 的 BSA 标准溶液于 1 cm 石英比色皿中, 利用荧光光度计测得每次改变激发波长对应的牛血清白蛋白的荧光发射光谱数据, 利用 Origin Pro 8 软件绘出未加入棉酚/棉酚氧化物时牛血清白蛋白的三维荧光光谱, 之后用微量注射器分别加入一定量的棉酚/棉酚氧化物溶液, 摇匀, 分别放置一定时间使其充分反应后测定棉酚/棉酚氧化物-BSA 体系的三维荧光光谱。

1.3.5 数据处理

本研究均进行 2 次重复实验, 实验误差采用标准偏差。

2 结果与讨论

2.1 棉酚和棉酚氧化物定性测定

图 1 中的 1、2 两张 HPLC 色谱峰分别是棉酚和棉酚氧化物, 其保留时间分别为 12.21 min 和 9.75 min 。棉酚不稳定, 在空气中, $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下加热 4 h, 棉酚几乎全部转化为其氧化物, 主要是棉酚的醌类化合物^[7]。

2.2 棉酚及其氧化物对 BSA 荧光光谱的影响

图 2、3 表示棉酚、棉酚氧化物对 BSA 荧光光谱的影响, 当激发波长为 280 nm 时, BSA 荧光发射峰在 342 nm 附近, 棉酚和棉酚氧化物在发生峰附近区域均无荧光发射峰; BSA 的浓度一定时, 随着棉酚、棉酚氧化物添加量的增加, BSA 的荧光强度逐渐减弱, 且最大发射波长逐渐蓝移, 但 BSA 的峰形没有发生变化, 说明 BSA 与棉酚、棉酚氧化物之间发生了相

相互作用^[6]。

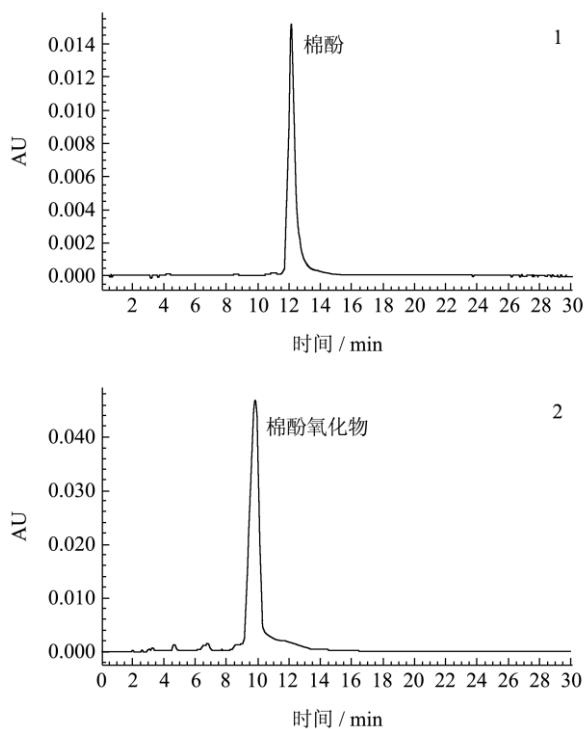


图1 棉酚及其氧化物的HPLC图

Fig.1 HPLC chromatograms of gossypol and gossypol oxide

Note: 1, gossypol; 2, gossypol oxide.

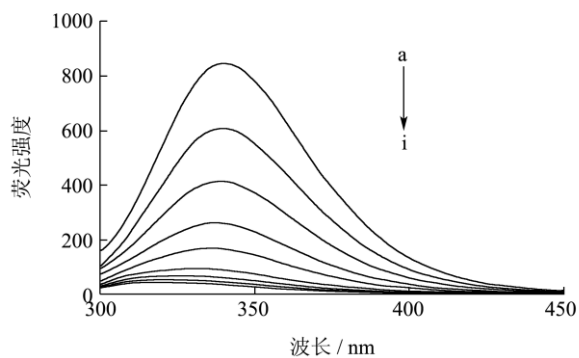


图2 BSA与不同浓度棉酚作用的荧光光谱

Fig.2 Fluorescence spectra of BSA in the various concentrations of gossypol

Note: $c(\text{BSA}) = 1.20 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, $c(\text{gossypol})/c(\text{BSA}) = 0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.5, 1.75, \text{ and } 2.00$, respectively.

荧光猝灭是指由荧光物质分子与溶剂分子或其他分子间的相互作用而引起荧光基团荧光强度减弱的过程。通常被分为动态猝灭和静态猝灭；为了研究猝灭机制，假设此荧光猝灭为动态猝灭，在动态猝灭过程中，蛋白质等荧光体与荧光猝灭剂分子间的相互作用可用 Stern-Volmer 方程进行描述^[8]：

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

其中，F为有猝灭剂时BSA的荧光强度， F_0 为无

猝灭剂时BSA的荧光强度，[Q]为猝灭剂浓度， K_{sv} 为动态猝灭常数，单位是L/mol，它反映了生物大分子与荧光猝灭剂分子彼此扩散和相互碰撞到达动态平衡时的量效关系； K_q 为动态荧光猝灭速率常数，单位是L/(mol s)，它反映了体系中分子的彼此扩散和相互碰撞对生物大分子荧光寿命衰减速率的影响，各类荧光猝灭剂对生物大分子的最大动态荧光猝灭速率常数约为 $2.0 \times 10^{10} \text{ L/(mol s)}$ ， τ_0 为无猝灭剂时荧光分子的平均寿命，生物大分子的荧光平均寿命约为 10^{-8} s 。

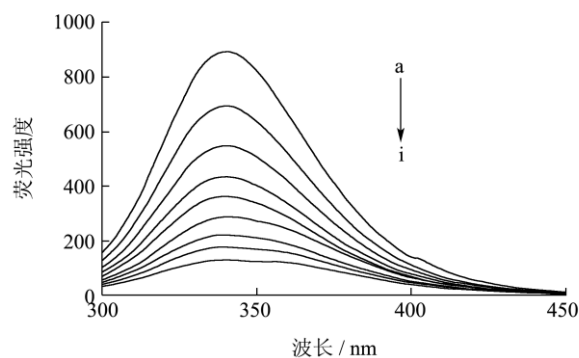


图3 BSA与不同浓度棉酚氧化物作用的荧光光谱

Fig.3 Fluorescence spectra of BSA in the various concentrations of gossypol oxide

Note: $c(\text{BSA}) = 1.20 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, $c(\text{gossypol oxide})/c(\text{BSA}) = 0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.5, 1.75 \text{ and } 2.00$, respectively.

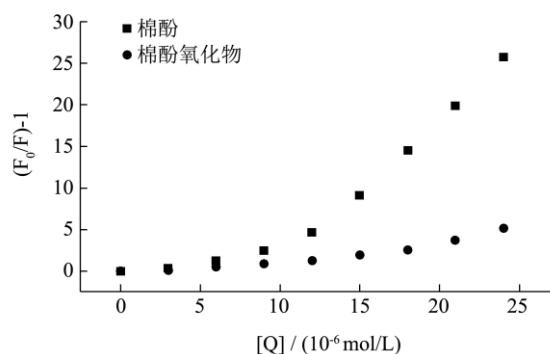


图4 棉酚、棉酚氧化物与牛血清蛋白作用的Stern-Volmer图(25 °C)

Fig.4 Stern-Volmer plots for the interaction of gossypol/gossypol oxide with BSA (25 °C)

如图4所示，在棉酚、棉酚氧化物滴定的整个浓度范围内， F_0/F 并不是一条直线，随着棉酚、棉酚氧化物浓度的增加，曲线逐渐向上Y轴弯曲，表明棉酚、棉酚氧化物高浓度时对内源荧光的猝灭过程为静态猝灭和动态猝灭同时存在^[9]。在棉酚、棉酚氧化物浓度较低时，可用 Stern-Volmer 方程计算不同温度的猝灭常数。对于棉酚而言， $c(\text{棉酚})/c(\text{BSA}) < 0.8$ 时，Stern-Volmer 曲线仍为一直线，此时根据直线的斜率得 25 °C时 K_{sv} 为 $(2.68 \pm 0.03) \times 10^5 \text{ L/mol}$ ， K_q 为

(2.68±0.03)×10¹³ L/(mol s), 远大于生物大分子的最大动态荧光猝灭速率常数约为 2.0×10¹⁰ L/(mol s), 因此初步判断静态猝灭在此过程中其主导作用, 这一结果和 Yang 等人^[4]报道是一致的。对于棉酚氧化物而言, 当 c(棉酚氧化物)/c(BSA)<1 时, Stern-Volmer 曲线为一直线, 此时根据直线的斜率得 25 °C 时 K_{SV} 为 (1.05±0.02)×10⁵ L/mol, K_q 为 (1.05±0.02)×10¹³ L/(mol s), 远大于生物大分子的最大动态荧光猝灭速率常数, 因此同样初步判定静态猝灭为其主导作用。

2.3 棉酚及其氧化物和 BSA 结合位点数及结合常数的求取

对于静态猝灭机制, 假设生物分子中存在相同且独立的结合位点, 则结合常数(K_b)和结合位点数(n)可根据下面的公式求得:

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = n \lg K_b - n \lg \frac{1}{[Q] - (F_0 - F)[P] / F_0} \quad (2)$$

注: F 为有猝灭剂时的荧光强度, F₀ 为无猝灭剂时的荧光强度, [Q] 为猝灭剂浓度, [P] 为牛血清蛋白的总浓度, K_b 为结合常数, n 为结合位点数。根据公式(2)作图, 依直线斜率和截距即可求出棉酚、棉酚氧化物与 BSA 的结合位点数及结合常数, 结果如表 1 所示。

表 1 不同温度下, 棉酚、棉酚氧化物与 BSA 的结合位点及结合常数

Table 1 Quenching constants (K_b) and number of binding sites of the BSA-gossypol/gossypol oxide system at different temperatures

T/°C	棉酚			棉酚氧化物		
	K _b /(L/mol)	n	R	K _b /(L/mol)	n	R
25	5.81×10 ⁶	0.74	0.9810	2.53×10 ⁵	1.10	0.9952
37	5.44×10 ⁶	0.73	0.9783	5.02×10 ⁵	0.76	0.9763

表 1 结果显示, 棉酚、棉酚氧化物的结合常数数量级均在 10⁵ L/mol 以上, 说明棉酚、棉酚氧化物和 BSA 形成了稳定的复合物, 其猝灭机制为静态猝灭。在实验温度下 n 的值约为 1, 表明 BSA 与棉酚、棉酚氧化物的结合位点数仅有 1 个。BSA 晶体结构显示 BSA 是一个由 I、II、III 三个同源结构域构成的心形螺旋单体, 每个结构域包括两个子域 A 和 B, 形成一个圆筒。蛋白质的配位结合位点的主区域位于具有相同化学性质的疏水空腔 II A 和 III A^[10]。因此, 棉酚和棉酚氧化物最可能在区域 II A 处与疏水性空腔结合, 也就是第 212 位的色氨酸结合位点附近或者结合位点上。

2.4 棉酚及其氧化物和 BSA 结合作用力

猝灭剂与生物大分子之间的相互作用力有疏水作用力, 静电作用力, 范德华作用力和氢键作用^[9]。为了研究棉酚、棉酚氧化物与 BSA 之间的相互作用, 需要计算热力学参数。由于温度效应对反应结合常数影响比较小, 所以温度变化不明显, 焓变 (ΔH) 可视为常数。根据不同温度下的结合常数 (K_b), 参照方程(3)、(4)、(5)可计算出焓变 (ΔH)、熵变 (ΔS) 和自由能变 (ΔG), 结果见表 2。

$$\Delta H = \frac{RT_1 T_2 \ln \frac{K_2}{K_1}}{T_1 - T_2} \quad (3)$$

$$\Delta H = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (4)$$

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (5)$$

表 2 棉酚、棉酚氧化物和牛血清蛋白结合的热力学参数

Table 2 Thermodynamic parameters of the gossypol/gossypol oxide-BSA binding process

T /°C	棉酚			棉酚氧化物		
	ΔH / (kJ/mol)	ΔG / (kJ/mol)	ΔS / (J/mol)	ΔH / (kJ/mol)	ΔG / (kJ/mol)	ΔS / (J/mol)
25	-4.85	-38.58	113.21	-4.70	-30.79	261.16
37	-4.85	-38.99	128.88	-4.70	-33.82	109.10

由表 3 可知, ΔH<0、ΔG<0、ΔS>0; 根据焓变值和熵变值, 可得出猝灭剂与生物分子之间相互作用的结合方式^[7]: (1) 熵变的正值表明了疏水作用力的存在, 这是因为水分子在药物周围排列有序, 蛋白质获得了一个随机结构。(2) 焓变的负值表明主要作用力不可能是静电作用力, 因为 ΔH 非常小, 几乎为零, 才能说明是静电作用力。当有氢键结合时, ΔH 就会是负值^[11]。因此, 棉酚、棉酚氧化物与 BSA 相互作用的主要作用力是疏水作用力与氢键。ΔG 的负值表明此反应过程是自发进行的。

2.5 棉酚及其氧化物与 BSA 之间的能量转移

在能量转化过程中, 能量转移现象非常明显。根据 Foster 非辐射能量转换理论可以计算棉酚及其氧化物和 BSA 之间的结合距。

能量转移的影响不仅与供体与受体之间的距离有关, 而且和临界能量转移距离有关, 可由下列方程计算:

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 - r_0^6} \quad (6)$$

注: r₀ 是供体与受体之间的距离, R₀ 是转换效率等于 50% 时的临界距离

R₀ 的值可由下面的方程求得:

$$R_0^6 = 8.79 \times 10^{-25} K^2 n^{-4} \Phi J \quad (7)$$

注: K^2 是依赖于供体与受体偶极子排列的取向因子, n 是介质的折射率, Φ 是没有能量转移时的荧光量子产率, J 表示供体的荧光光谱和受体的吸收光谱的重叠。

J 可由下列公式得到:

$$J = \frac{\int_0^\infty F(\lambda)\epsilon(\lambda)\lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty F(\lambda)d\lambda} \quad (8)$$

注: $F(\lambda)$ 是在波长从 λ 到 $\lambda \pm \Delta\lambda$ 范围内经过校正的供体的荧光强度, ϵ 是波长为 λ 时受体的吸光系数。

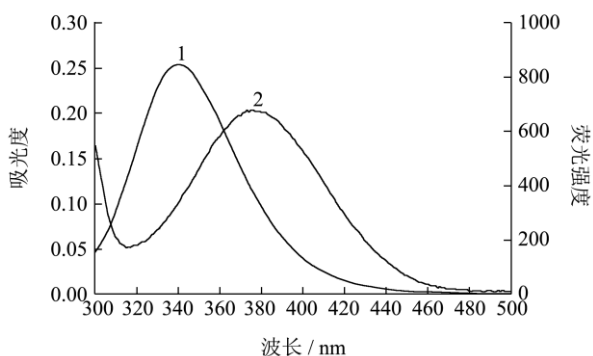


图5 棉酚的紫外吸收光谱和BSA的荧光光谱重叠图

Fig.5 Overlapping UV-vis absorption spectrum of gossypol and fluorescence emission spectrum of BSA

Note: 1, fluorescence emission spectra of BSA; 2, UV-vis absorption of gossypol.

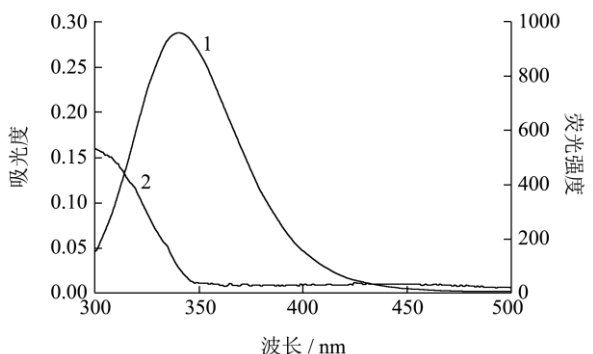


图6 棉酚氧化物的紫外吸收光谱和BSA的荧光光谱重叠图

Fig.6 Overlapping UV-vis absorption spectrum of gossypol oxide and fluorescence emission spectrum of BSA

Note: 1. Fluorescence emission spectrum of BSA; 2, UV-vis absorption spectrum of gossypol oxide.

图5、6显示了棉酚、棉酚氧化物的紫外吸收光谱和BSA的荧光发射光谱的重叠情况。根据重叠光谱,通过对波长为300到500的光谱进行积分可得出 J 值,对于棉酚, $J=2.38 \times 10^{-14} \text{ cm}^3 \text{ L/mol}$ 。根据这些实验的计算结果,由方程(6)根据 $K=2/3$ 可得到 $E=0.61$, $R_0=3.32 \text{ nm}$, BSA的 $n=1.336$, $\Phi=0.15$, 可得 $r_0=2.94 \text{ nm}$; 对于棉酚氧化物, $J=2.04 \times 10^{-14} \text{ cm}^3 \text{ L/mol}$ 。根据这些实验的计算结果,由方程(6)根据 $K=2/3$ 可得到 $E=0.56$, $R_0=3.32 \text{ nm}$,

BSA的 $n=1.336$, $\Phi=0.15$, 可得 $r_0=3.12 \text{ nm}$ 。显然,供体与受体的距离 $r < 8 \text{ nm}$,表明很有可能发生BSA到棉酚、棉酚氧化物之间的能量转移。同时也表明了棉酚、棉酚氧化物与BSA之间的相互作用是静态猝灭。

2.6 构象研究

2.6.1 紫外可见光谱

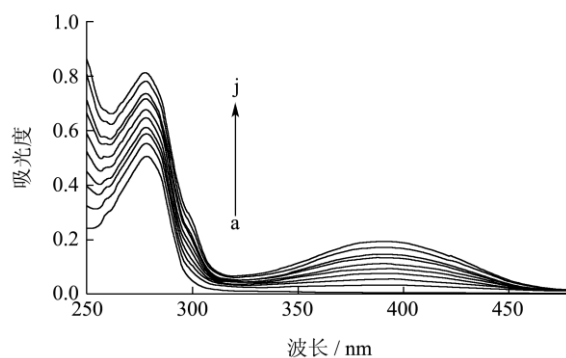


图7 BSA与不同浓度棉酚作用的紫外-可见吸收光谱

Fig.7 UV-vis absorption spectra of BSA in the various concentrations of gossypol

Note: $c(\text{BSA})=1.20 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, $c(\text{gossypol})/c(\text{BSA})=0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.5, 1.75$ and 2.00 , respectively.

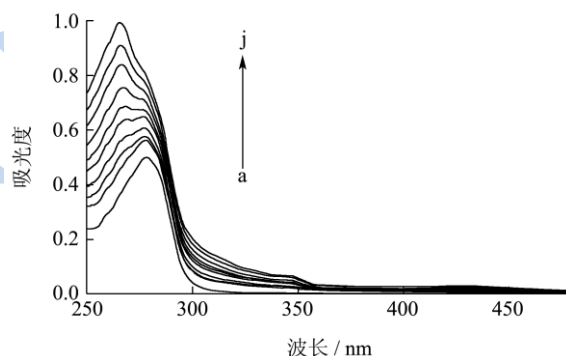


图8 BSA与不同浓度棉酚氧化物作用的紫外-可见吸收光谱

Fig.8 UV-vis absorption spectra of BSA in the various concentrations of gossypol oxide

Note: $c(\text{BSA})=1.20 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, $c(\text{gossypol oxide})/c(\text{BSA})=0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75$ and 2.00 , respectively.

紫外可见吸收光谱是一种简单而有效的方法,可以判断检测络合物是否形成以及蛋白结构是否改变。由图7、8可知,随着棉酚或棉酚氧化物的不断加入,BSA在280 nm处的吸收特征峰的强度均逐渐增强,体系的吸收光谱呈现明显的增色效应;表明棉酚和棉酚氧化产物诱导BSA分子使之发生了蛋白肽链伸展现象^[12],棉酚和棉酚氧化产物诱导BSA分子使包围在其分子内部的色氨酸和酪氨酸等残基的芳香环疏水基团裸露出来,同时由于BSA分子内部疏水基团之间的疏水作用减弱, $\pi-\pi^*$ 和 $n-\pi^*$ 跃迁能量增大;因而使吸收峰的

峰位向短波长蓝移发生位移, 对于棉酚氧化而言, 蓝移比较明显, 这也说明了BSA分子结构发生了改变。同时, 吸收光谱会因基态分子的变化而发生变化^[8], 进一步说明低浓度条件下, 静态猝灭在整个过程中起主导作用。

2.6.2 同步荧光光谱

同步荧光光谱可以表现出蛋白质分子的变化, 对于蛋白质的同步荧光, $\Delta\lambda_{ex}=15\text{ nm}$ 时仅表现出酪氨酸残基的荧光, $\Delta\lambda_{ex}=60\text{ nm}$ 时仅表现出色氨酸残基的荧光, 因为不同氨基酸残基的最大发射波长与其所处环境的极性有关, 所以可以根据发射波长的改变判断蛋白质构象的变化。

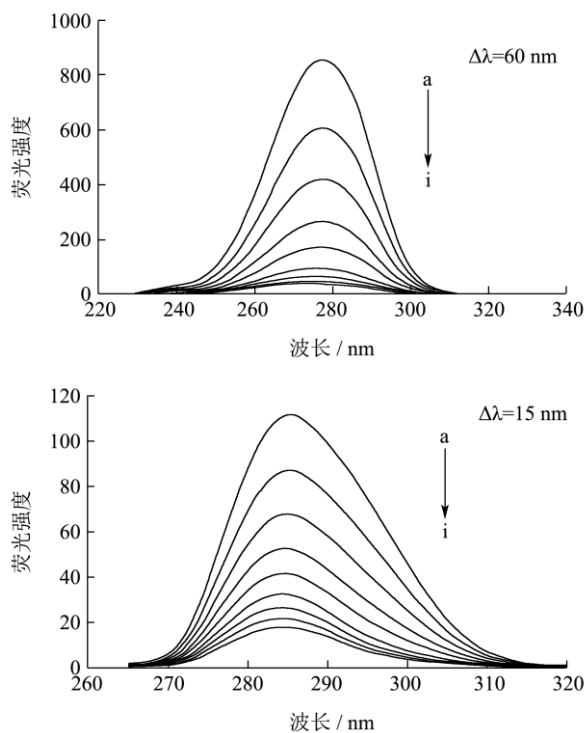


图9 BSA与不同浓度棉酚作用的同步荧光光谱

Fig.9 Synchronous fluorescence spectra of BSA in various concentrations of gossypol

Note: $c(\text{BSA})=1.20\times 10^{-5}\text{ mol/L}$, $c(\text{gossypol})/c(\text{BSA})=0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75$ and 2.00 , respectively.

如图9、10所示, 随着棉酚、棉酚氧化物的添加, 酪氨酸和色氨酸残基荧光同时被猝灭, 相比之下, 色氨酸残基的荧光降低比酪氨酸的明显, 说明棉酚、棉酚氧化物与BSA的结合位点更接近色氨酸^[10], 同时, 棉酚对色氨酸残基的荧光猝灭比棉酚氧化物要明显, 表明棉酚更容易跟牛血清蛋白结合。对于棉酚, 色氨酸和酪氨酸的最大发射波长均发生了蓝移, 表明棉酚的加入使BSA中这两种荧光发射基团附近的极性降低, 疏水环境增强, 说明构象发生了变化^[13]; 跟棉酚

不同的是, 棉酚氧化物色氨酸最大波长处发生红移, 表明棉酚氧化物的添加, 改变了色氨酸残基附近的构象, 棉酚氧化物和BSA作用, 使色氨酸残基基团附近的极性增强, 疏水环境减弱^[14]。

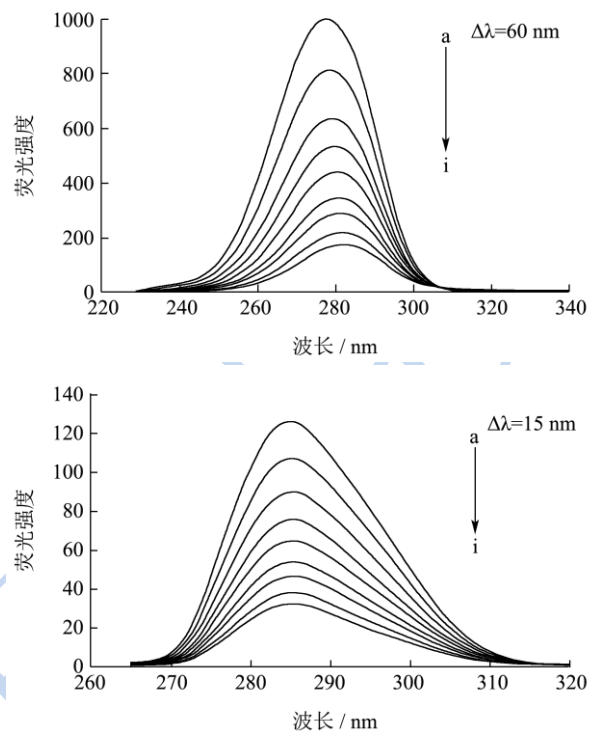


图10 BSA与不同浓度棉酚氧化物作用的同步荧光光谱

Fig.10 Synchronous fluorescence spectra of BSA in the various concentrations of gossypol oxide

Note: $c(\text{BSA})=1.20\times 10^{-5}\text{ mol/L}$, $c(\text{gossypol oxide})/c(\text{BSA})=0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.5, 1.75, 2.00$, respectively.

2.6.3 三维荧光光谱

由于三维荧光光谱能够提供更为详细的蛋白质构型改变信息, 因此三维荧光光谱分析被广泛应用。本实验采用最常用的激发-发射矩阵荧光光谱(excitation emission matrix, EEM) 它是以激发波长、发射波长和荧光强度为坐标的三维空间图谱。

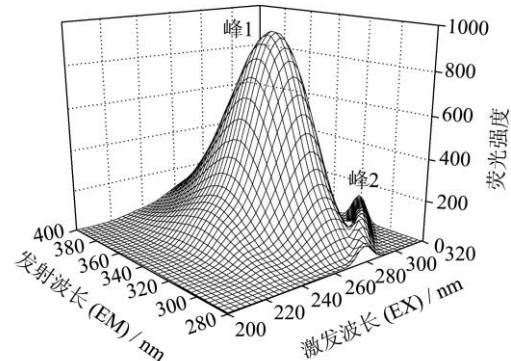


图11 BSA的三维荧光光谱

Fig.11 Three-dimensional fluorescence spectra of BSA

图11~13是BSA以及BSA与棉酚、棉酚氧化物

作用体系的三维荧光光谱,并将部分荧光信息列于表3。图11~13可比较BSA与棉酚、棉酚氧化物作用前后三维荧光的变化,探讨棉酚、棉酚氧化物对BSA构象和微环境的影响。图中出现“山脊”形状的峰2是瑞利散射线,其特征是 $\lambda_{em}=\lambda_{ex}(\Delta\lambda=0)$,同时还出现了“驼峰”形状的峰1,这些都是三维荧光光谱中的荧光峰的典型特征。

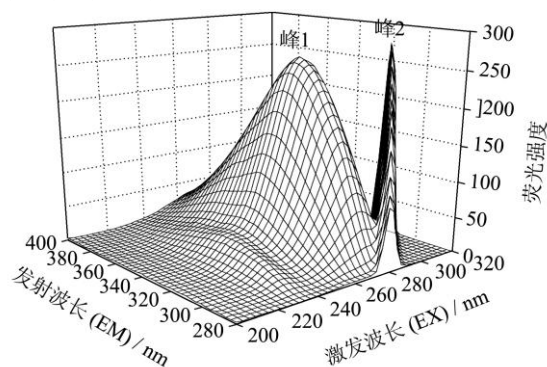


图12 BSA-gossypol 的三维荧光光谱

Fig.12 Three-dimensional fluorescence spectra of the BSA-gossypol system

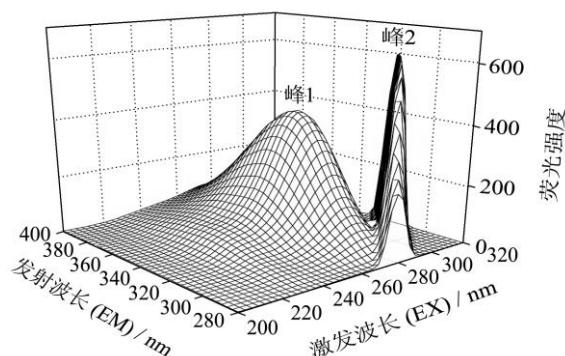


图13 BSA-棉酚氧化物的三维荧光光谱

Fig.13 Three-dimensional fluorescence spectra of the BSA-gossypol oxide system

表3 BSA及棉酚/棉酚氧化物-BSA体系三维荧光光谱的特征参数

Table 3 Characteristic parameters for the three-dimensional fluorescence spectra of BSA and the BSA-gossypol/gossypol oxide system

体系	峰1 ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$)	斯托克斯位移 $\Delta\lambda/nm$	荧光强度	峰2 ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$)	荧光强度
BSA	280/340	60	920.3	300/300	139.5
棉酚-BSA	280/334	54	156.8	300/300	88.97
棉酚氧化物-BSA	280/340	60	421.2	300/300	528.2

对比图11、12、13,结合表3可知,牛血清白蛋白与棉酚、棉酚氧化物作用后,牛血清白蛋白的荧光峰值位置和瑞利散射峰起始位置均没有发射明显变化,而荧光峰的斯托克位移发生了稍微的改变。此外,

荧光峰的强度都发生了不同程度的降低,这表明棉酚、棉酚氧化物对BSA的内源荧光产生了猝灭作用。随着棉酚氧化物的加入,峰2的荧光强度增大,可能是因为棉酚氧化物与BSA形成复合物,使BSA体积增加,导致了散射效果加强。而棉酚确是对瑞利散射峰起到了猝灭作用,可能是棉酚、棉酚氧化物对BSA微环境的作用不同,这一现象跟同步荧光研究棉酚、棉酚氧化物对BSA构象及微环境变化的结论是一致的。

上述这些现象说明了棉酚、棉酚氧化物与BSA之间相互作用后形成了复合物,并且BSA中荧光发色团的微环境及蛋白质分子构象发生了变化。正是棉酚、棉酚氧化物分子的加入导致了这种疏水微环境极性的改变,进而导致了BSA构象的变化。

3 结论

本文采用不同的方法研究了棉酚及其氧化物与BSA的作用机制,对比棉酚和棉酚氧化物可知,它们对BSA的荧光猝灭机制相同,都为动态和静态联合猝灭,都可以和BSA形成1:1的复合物;同时,棉酚、棉酚氧化物与BSA的相互作用力以静电作用力和疏水作用力为主。紫外-可见吸收光谱、同步荧光光谱和三位荧光光谱表明棉酚及其氧化物的加入,改变了BSA疏水微环境的极性,导致了BSA构象的变化。可见棉酚氧化物与棉酚同样对蛋白质有一定的影响,其毒性如何,具体的毒理作用还需要进一步的研究。

参考文献

- [1] Yang J, Zhang F, Li J, et al. Synthesis and antiviral activities of novel gossypol derivatives [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2012, 22(3): 1415-1420
- [2] Cater C M, Lyman C M. Reaction of gossypol with amino acids and other amino compounds [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1969, 46(12): 649-653
- [3] Maliwal B P, Rao A G A, Rao M S N. Spectroscopic study of the interaction of gossypol with bovine serum albumin [J]. International Journal of Peptide and Protein Research, 1985, 25(4): 382-388
- [4] Yang J, Jing Z H, Jie J J, et al. Fluorescence spectroscopy study on the interaction between Gossypol and bovine serum albumin [J]. Journal of Molecular Structure, 2009, 920(1): 227-230
- [5] 黄洪勇,唐辉,关丽,等.棉酚原料药的理化性质及稳定性研究[J].时珍国医国药,2010,21(2):309-310
HUANG Hong-yong, TANG Hui, GUAN Li, et al. Study on physico-chemical property and stability of gossypol [J].

- Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2010, 21(2): 309-310
- [6] Lin H, Gounder M K, Bertino J R, et al. A validated HPLC assay for the determination of R-(-)-gossypol in human plasma and its application in clinical pharmacokinetic studies [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2012, 66: 371-375
- [7] Kenar J A. Reaction chemistry of gossypol and its derivatives [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2006, 83(4): 269-302
- [8] Shahabadi N, Mohammadpour M. Study on the interaction of sodium morin-5-sulfonate with bovine serum albumin by spectroscopic techniques [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2012, 86: 191-195
- [9] Silva D, Cortez C M, Cunha-Bastos J, et al. Methyl parathion interaction with human and bovine serum albumin [J]. Toxicology Letters, 2004, 147(1): 53-61
- [10] Shahabadi N, Maghsudi M, Kiani Z, et al. Multispectroscopic studies on the interaction of 2-tert-butylhydroquinone (TBHQ), a food additive, with bovine serum albumin [J]. Food Chemistry, 2011, 124(3): 1063-1068
- [11] Ross P D, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability [J]. Biochemistry, 1981, 20(11): 3096-3102
- [12] 刘媛,谢孟峡,康娟.三七总皂甙对牛血清白蛋白溶液构象的影响[J].化学学报,2003,61(8):1305-1310
LIU Yuan, XIE Meng-xia, KANG Juan. Influence of total saponins of panax notoginseng on the conformation of BSA [J]. Acta Chimica Sinica, 2003, 61(8): 1305-1310
- [13] Zhang G, Wang L, Fu P, et al. Mechanism and conformational studies of farrerol binding to bovine serum albumin by spectroscopic methods [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2011, 82(1): 424-431
- [14] Gowda J I, Nandibewoor S T. Binding and conformational changes of human serum albumin upon interaction with 4-aminoantipyrine studied by spectroscopic methods and cyclic voltammetry [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2014, 124: 397-403