

虾青素立体异构体与牛血清白蛋白的相互作用

郑钦生, 周乐松, 张俊林, 邹晓君, 曹庸, 刘晓娟*

(华南农业大学食品学院, 广东省功能食品活性物重点实验室, 广东广州 510642)

摘要: 该论文采用多光谱、表面等离子共振和分子对接, 研究虾青素 (Astaxanthin, AST) 立体异构体与牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA) 的相互作用机制。研究发现, AST 异构体均结合于 BSA 亚结构域 II A 和 III A 的交界处, 并且对蛋白质的构象没有明显影响。AST 异构体对 BSA 具有相似的结合亲和力 (左旋 AST 4.17×10^{-7} mol/L, 右旋 AST 3.91×10^{-7} mol/L) 和结合动力学 (慢结合、慢解离), 然而在较高浓度下 (0.35~1.78 μ mol/L) 左旋 AST 的最高结合响应值均高于右旋 AST。此外, 左旋和右旋 AST 与 BSA 相互作用的焓变 ΔH 分别为 -175.09 和 -149.42 kJ/mol, 熵变 ΔS 分别为 -502.72 和 -417.65 J/(mol·K), 负值的 ΔH 和 ΔS 表明 AST-BSA 发生结合的主要相互作用力是氢键和范德华力。分子对接显示左旋 AST 与 Lys504、Thr190 残基形成键长为 2.0 Å、2.7 Å 的氢键, 而右旋 AST 与 Arg435 残基形成键长为 2.9 Å 的氢键。这项研究有助于阐明 AST 立体异构体与 BSA 的结合机制, 并为 AST 异构体在血液循环中潜在的药代动力学提供重要的理论指导信息。

关键词: 虾青素; 立体异构体; 牛血清白蛋白; 相互作用

文章编号: 1673-9078(2024)04-84-94

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.4.0426

Interactions of Astaxanthin Optical Isomers with Bovine Serum Albumin

ZHENG Qinsheng, ZHOU Lesong, ZHANG Junlin, ZOU Xiaojun, CAO Yong, LIU Xiaojuan*

(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Nutraceuticals and Functional Foods, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The mechanisms underlying the interaction between the two optical isomers of astaxanthin (AST) and bovine serum albumin (BSA) were investigated based on multiple spectroscopic, surface plasmon resonance, and molecular docking analyses. Both AST isomers were found to bind to BSA at the junction of subdomains IIA and IIIA, in the absence of any significant effects on protein conformation. The two isomers had similar binding affinities [4.17×10^{-7} mol/L for (3*S*,3'*S*)-AST and 3.91×10^{-7} mol/L for (3*R*,3'*R*)-AST for] and kinetic binding processes (slow binding, slow dissociation) for BSA. However, at higher concentrations (0.35~1.78 μ mol/L), the highest binding response values obtained for (3*S*,3'*S*)-AST were higher than those for (3*R*,3'*R*)-AST. In addition, the change in enthalpy (ΔH) for the interactions between (3*S*,3'*S*)-AST and (3*R*,3'*R*)-AST and BSA were -175.09 and -149.42 kJ/mol, respectively, and the corresponding changes in entropy (ΔS) were -502.72 and -417.65 J/(mol·K). The negative values obtained for ΔH and ΔS indicate that hydrogen bonds and van der Waals forces were the main forces underlying the AST-BSA interactions. Molecular docking analysis revealed that (3*S*,3'*S*)-AST formed 2.0 Å and 2.7 Å hydrogen bonds with the Lys504 and Thr190 residues in BSA, respectively, whereas (3*R*,3'*R*)-AST

引文格式:

郑钦生,周乐松,张俊林,等.虾青素立体异构体与牛血清白蛋白的相互作用[J].现代食品科技,2024,40(4):84-94.

ZHENG Qinsheng, ZHOU Lesong, ZHANG Junlin, et al. Interactions of astaxanthin optical isomers with bovine serum albumin [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(4): 84-94.

收稿日期: 2023-04-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32172195); 广东省自然科学基金项目 (2021A1515012158)

作者简介: 郑钦生 (1998-), 男, 在读研究生, 研究方向: 食品化学及功能性食品, E-mail: 844175689@qq.com

通讯作者: 刘晓娟 (1980-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品化学及功能性食品, E-mail: liuxj@scau.edu.cn

formed a 2.9 Å hydrogen bond with the Arg435 residue. Our findings in this study contribute to elucidating the mechanisms associated with the binding of AST optical isomers to BSA, and will provide important theoretical guidance for the potential pharmacokinetics of AST isomers in blood circulation.

Key words: astaxanthin; optical isomer; bovine serum albumin; interaction

虾青素 (Astaxanthin, AST) 是一种含氧类胡萝卜素, 其分子结构是一条两端连接 β -紫罗兰酮环的共轭双键长链, 并且环上各含有一个羟基和酮基 (图 1)。基于这些结构特性, 虾青素被赋予超强的抗氧化特性^[1]。在自然界中, AST 主要以全反式的形式存在。由于具有手性碳原子, AST 产生了左旋 (3*S*,3'*S*)、右旋 (3*R*,3'*R*) 和内消旋 (3*S*,3'*R*) 三种立体异构体, 并分别存在于不同的生物体中, 如雨生红球藻中主要存在左旋 AST, 而红法夫酵母中主要存在右旋 AST。此外, 也发现了部分生物体 (南极磷虾、红蟹、尼瓦利亚衣藻等) 同时存在三种 AST 立体异构体。值得注意的是, 这些 AST 异构体在抗氧化、抗衰老和免疫调节活性等方面表现出不同的健康效应^[2]。众所周知, 生物体内的各种生理活动都离不开蛋白质的参与, 活性物生理活性的发挥也需要通过与蛋白质的相互作用来实现。一般来说, AST 进入血液后会与血清白蛋白发生结合, 进而被转运到各个组织中并作用于靶蛋白来发挥功能活性^[3]。若 AST 异构体与血清白蛋白之间的结合机制存在差异, 则可能会触发“结合-转运-功效”的链式影响。且当 AST 异构体在蛋白中具有相同的结合位点时, 还会表现出潜在的竞争关系, 这也会影响到最终功效的发挥^[4,5]。因此研究 AST 异构体与血清白蛋白的相互作用机制具有重要意义。

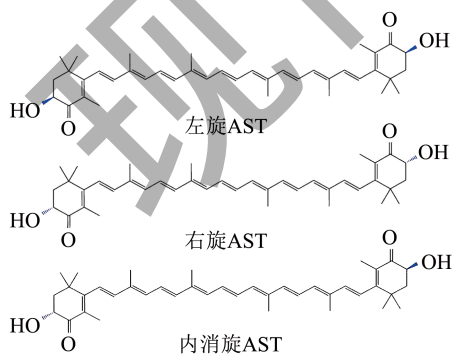


图 1 AST 立体异构体的分子结构

Fig.1 Molecular structure of AST optical isomers

牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA) 是研究最为广泛的血清白蛋白之一, 不仅因为其具有构象清晰、成本低、易获取等优点, 而且还与人

血清白蛋白 (Human Serum Albumin, HSA) 有较高的结构同源性 (76%)^[6]。BSA 的空间结构由三个同源结构域 (I、II 和 III) 组成, 每个结构域各包含两个亚结构域 (A 和 B), 其中亚结构域 II A 和 III A 的疏水口袋是小分子配体的主要特异性结合位点^[7]。作为一种模式结合和转运蛋白, BSA 可以与许多内源性和外源性物质发生相互作用, 进而起到储存和运输作用。并且它自身的手性识别功能可以将活性物立体异构体的微小结构差异通过结合亲和力、互作氨基酸残基、相互作用力等指标呈现出来。如在人参皂苷 Rh2 与 BSA 的相互作用中, 左旋和右旋人参皂苷 Rh2 在结合位点以及互作氨基酸残基上表现出明显的立体选择性, 并且左旋人参皂苷 Rh2 具有更高的结合常数^[8]。另一项基于多光谱和分子对接的研究发现, 相比于左旋地克珠利, 右旋地克珠利与血清白蛋白具有更强的结合亲和力, 并且它们的结合均会导致蛋白质构象发生轻微变化^[9]。由此可见, 研究手性分子与 BSA 的相互作用有助于阐明其立体选择性结合机制。然而, 目前对于 AST 立体异构体与 BSA 的结合机制仍未有报道。

本研究系统地探究了 AST 立体异构体与 BSA 的相互作用。通过多光谱、表面等离子共振、分子对接等方法获得 AST-BSA 复合物的结合信息, 包括荧光猝灭机制、结合常数、热力学参数、相互作用力、蛋白构象变化和结合位点等。这些相互作用信息有助于阐明 AST 立体异构体与 BSA 的结合机制, 并且对揭示 AST 异构体在血液循环中潜在的转运、分布和代谢情况具有重要的理论指导意义。

1 材料与方法

1.1 原料

左旋虾青素 (纯度 >94%)、右旋虾青素 (纯度 >96%) 由实验室制备 (图 2), 分别从雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 和红法夫酵母 (*Phaffia rhodozyma*) 中提取; 牛血清白蛋白 (纯度 98%)、吡啶美辛 (纯度 >99%)、布洛芬 (纯度 >98%)、0.1 mol/L 磷酸缓冲盐溶液 (Phosphate Buffer Solution,

PBS), 上海源叶生物科技有限公司; 氨基偶联试剂盒、10×PBS-P+ 溶液、CM5 芯片, 美国 GE Healthcare 公司; 二甲基亚砜 (Dimethyl Sulfoxide, DMSO), 天津天茂化工试剂厂; 无水乙酸钠, 上海易恩化学技术有限公司; 其它化学品为试剂级; 上述 PBS 和 10×PBS-P+ 的 pH 值均为 7.4。

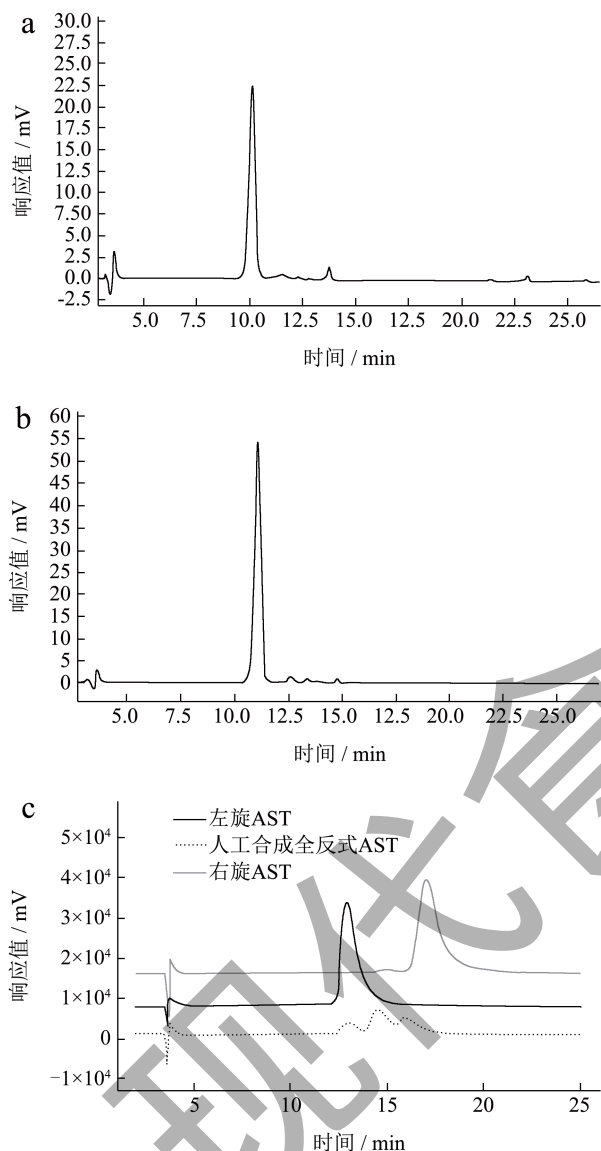


图2 左旋AST (a)、右旋AST (b) 及其手性鉴定 (c) 的高效液相色谱图

Fig.2 High performance liquid chromatogram of (3S,3'S)-AST (a), (3R,3'R)-AST (b) and their chiral identification (c)

1.2 仪器与设备

荧光分光光度计 RF-6000, 日本岛津公司; 表面等离子共振仪 Biacore T200, 美国 GE Healthcare 公司; 圆二色谱仪 Chirascan, 英国应用光物理公司; 恒温磁力搅拌水浴锅, 常州澳华仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 内源荧光光谱

取 BSA 溶解于 0.01 mol/L PBS 中得到 10 μmol/L BSA 溶液; 用 DMSO 配制 200 μmol/L 的左旋和右旋 AST 溶液并用 0.45 μm 针孔滤膜过滤。取干净离心管, 依次加入 600 μL BSA 溶液、2 250 μL PBS、30 μL 乙醇和 0~120 μL 虾青素溶液, 充分涡旋混匀后, 在 303 K 和 310 K 下孵育 20 min, 结束后立即采用荧光分光光度计测定荧光强度。BSA 终浓度为 2 μmol/L, 虾青素终浓度为 0~8 μmol/L, 溶液总体积为 3 mL, 所含有有机溶剂的体积分数小于 5%。仪器设置的激发波长为 280 nm, 发射波长为 300~400 nm, 狭缝宽度为 5 nm, 以 200 nm/min 的扫描速率进行测定。

由于小分子配体的存在会影响蛋白质对激发光的吸收和发射光的传播, 这种现象称为内滤效应。因此需要利用方程 (1) 来校正荧光强度^[10]。然后通过方程 (2~5) 对校正后的荧光强度进行进一步计算得到相互作用信息。

$$F_{cor} = F_{obs} e^{\frac{A_{ex} + A_{em}}{2}} \quad (1)$$

式中:

F_{cor} ——校正后的荧光强度;

F_{obs} ——实际测得的荧光强度;

A_{ex} ——蛋白质配体复合物在激发波长处的吸光度;

A_{em} ——蛋白质配体复合物在发射波长处的吸光度。

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (2)$$

$$\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = \log K_A + n \log [Q] \quad (3)$$

$$\ln K_A = \frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (4)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (5)$$

式中:

F_0 ——蛋白质的原始荧光强度;

F ——存在猝灭剂时蛋白质的荧光强度;

K_q ——双分子猝灭速率常数, L/(mol·s);

τ_0 ——BSA 的荧光寿命, 3×10^{-9} s^[11];

K_{sv} ——Stern-Volmer 猝灭常数, L/mol;

$[Q]$ ——猝灭剂的浓度, μmol/L;

K_A ——结合常数, L/mol;

n ——结合位点数;

R ——气体常数, 8.314 J/(mol·K);

T —温度, K;

ΔH —焓变, kJ/mol;

ΔS —熵变, J/(mol·K);

ΔG —吉布斯自由能, kJ/mol.

1.3.2 同步荧光光谱

按照 1.3.1 节方法配制样品, 反应温度为 303 K。仪器设置激发波长和发射波长的间隔 $\Delta\lambda$ 分别为 15 nm (发射波长 280~330 nm) 和 60 nm (发射波长 310~380 nm), 其他参数不变。

1.3.3 位点竞争实验

按照 1.3.1 节方法配制 BSA、AST 溶液和设置荧光分光光度计参数。布洛芬和吲哚美辛溶于无水乙醇中得到 500 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液, 采用 0.45 μm 针孔滤膜过滤溶液。取干净离心管, 先加入 600 μL BSA 溶液、2 250 μL PBS 和 30 μL 布洛芬或吲哚美辛溶液, 混匀后在 303 K 下反应 20 min。之后加入 0~120 μL AST 溶液, 混匀后再次在 303 K 下反应 20 min, 孵育结束后立即检测。布洛芬和吲哚美辛终浓度为 3 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.3.4 表面等离子共振

通过氨基偶联法将 BSA 固定在 CM5 传感器芯片的通道 Fc2 上, 获得 7 058.3 RU 的密度。然后活化并封闭通道 Fc1, 以其作为不偶联蛋白的参比通道。在 DMSO 中配制左旋和右旋 AST 母液, 然后用 1.5×PBS-P+ 溶液进行首次稀释, 再用含体积分数 5% DMSO 的 1.5×PBS-P+ 溶液进行梯度稀释, 最终浓度范围为 0~2.67 $\mu\text{mol/L}$, 样品溶液中 DMSO 体积分数为 5%。按照仪器操作说明书将 1.5×PBS-P+ 溶液和 DMSO 混合配制校正溶液。以含体积分数 5% DMSO 的 1.5×PBS-P+ 溶液为运行缓冲液, 在室温、30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 流速下进行检测。利用仪器自带软件对所得曲线进行拟合分析, 得到结合速率常数 k_a 、解离速率常数 k_d 和解离平衡常数 K_D 。

1.3.5 圆二色谱

按照 1.3.1 节方法配制样品, 其中 AST 终浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$, 反应温度为 298 K。仪器扫描范围 190~260 nm, 扫描速度 100 nm/min。相同溶剂组成的 PBS 作为空白对照组。利用 Pro-Data 和 CDNN 软件对数据结果进行拟合曲线和解析二级结构含量。

1.3.6 分子对接模拟

采用 AutoDock Vina 软件进行分子对接模拟。

BSA 的原始晶体结构文件在 RCSB 蛋白数据库 (PDB ID: 4F5S^[12]) 中下载, 左旋 AST (PubChem CID: 5281224) 和右旋 AST (PubChem CID: 12358421) 在 PubChem 数据库中下载。在对接开始前, 将 BSA 的水分子和配体分子全部去除, 并补充电荷和原子。为确定所有可能的结合位点, 首先对 AST 进行盲对接。在 AutoDock Tool 界面, 将对接范围扩大至覆盖 BSA 的所有氨基酸残基, 对接得到 10 个最优的结合位点, 它们可作为下一次对接的预测结合位点。然后进行第二次对接, 将对接范围覆盖上一步盲对接所得到的 10 个最优位点, 通过缩小范围来获得更准确的结果。最后, 从第二次对接的结果中选择最优结合模式的结果, 通过 Open Babel GUI、PyMOL 和 Discovery Studio 软件进行处理, 得到三维空间图和二维相互作用力图。

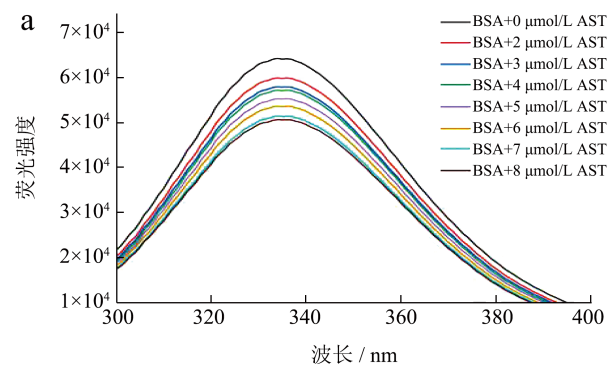
1.4 数据统计分析

以上实验均平行测定 3 次。实验数据用 IBM SPSS Statistics 25.0 和 OriginPro 2022b 软件进行统计分析和绘图。采用方差分析 (ANOVA) 确定统计学差异, $P < 0.05$ 为显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 荧光猝灭机制

由于 BSA 内部的色氨酸 (Tryptophan, Trp)、酪氨酸 (Tyrosine, Tyr) 和苯丙氨酸 (Phenylalanine, Phe) 荧光团对周围环境的极性很敏感, 因此可通过内源荧光光谱 (Intrinsic Fluorescence Emission Spectroscopy, IFES) 得到关于分子间相互作用的可靠信息。如图 3 所示, 在加入 AST 异构体后, 334 nm 处的荧光发射峰明显下降, 并且表现出浓度依赖的猝灭效果, 这表明 AST 与 BSA 发生相互作用导致 BSA 的荧光猝灭。



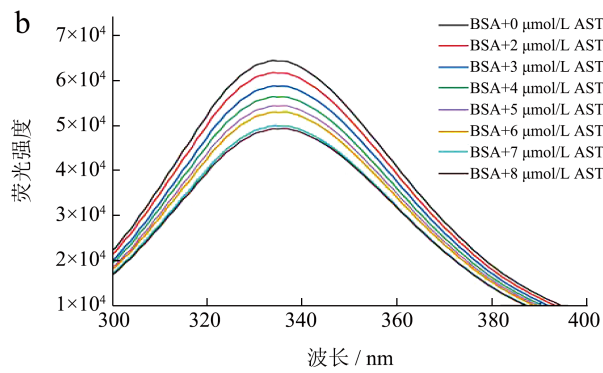


图3 左旋AST (a) 和右旋AST (b) 与BSA相互作用的内源荧光光谱

Fig.3 Intrinsic fluorescence emission spectroscopy of BSA interacting with (3S,3'S)-AST (a) and (3R,3'R)-AST (b)

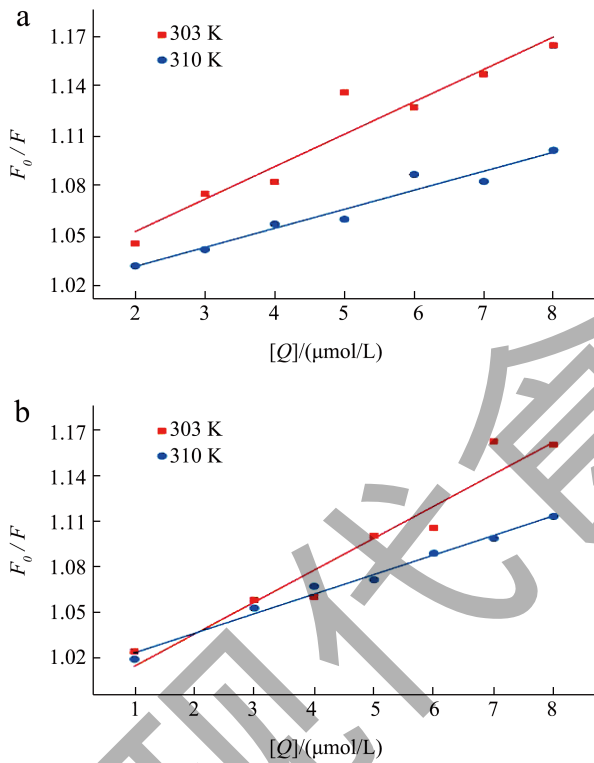


图4 左旋AST (a) 和右旋AST (b) 与BSA相互作用的Stern-Volmer方程拟合图

Fig.4 Stern-Volmer plot of BSA interacting with (3S,3'S)-AST (a) and (3R,3'R)-AST (b)

为了进一步阐明 AST 异构体和 BSA 之间的荧光猝灭机制, 采用 Stern-Volmer 方程 (2) 进行计算分析, 结果如图 4 和表 1 所示。随着温度从 303 K 升高到 310 K, 左旋和右旋 AST 的 Stern-Volmer 猝灭常数 K_{sv} 分别从 1.95×10^4 和 2.11×10^4 L/mol 下降到 1.14×10^4 和 1.29×10^4 L/mol ($P < 0.05$)。一般来说, 荧光猝灭机制可分为静态猝灭和动态猝灭两种

机制。若蛋白质受体与小分子配体之间结合形成复合物, 其 K_{sv} 会表现出随温度升高而降低的趋势, 称为静态猝灭机制。而动态猝灭是由于受体与配体之间发生运动碰撞引起的, 表现为 K_{sv} 随温度升高而增加^[13]。研究结果显示, 左旋和右旋 AST 的 K_{sv} 都随着温度升高而下降, 表明 AST 异构体与 BSA 发生结合, 静态猝灭是主要的荧光猝灭机制。此外, 异构体的双分子猝灭速率常数 K_q 均达到 10^{12} L/(mol·s), 远高于生物分子的最大散射碰撞猝灭常数 [2.00×10^{10} L/(mol·s)], 再一次支持静态猝灭机制的结果^[14]。

表 1 AST 异构体与 BSA 相互作用的双分子猝灭速率常数和 Stern-Volmer 猝灭常数

Table 1 Bimolecular quenching constant and Stern-Volmer quenching constant of interaction between AST isomers and BSA

AST	温度 /K	$K_q / [\times 10^{12} \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{s})]$	$K_{sv} / (\times 10^4 \text{ L}/\text{mol})$	R^2
左旋 AST	303	6.49 ± 0.71	1.95 ± 0.21^A	0.91
	310	3.81 ± 0.59	1.14 ± 0.18^B	0.95
右旋 AST	303	7.04 ± 0.02	2.11 ± 0.01^A	0.92
	310	4.31 ± 0.57	1.29 ± 0.17^B	0.98

注: 不同大写字母 (A、B) 表示相同构型 AST (不同温度) 之间存在显著性差异, $P < 0.05$ 。

2.2 结合常数、结合位点数和结合动力学参数

表 2 AST 异构体与 BSA 相互作用的结合常数和结合位点数

Table 2 Number of binding sites and binding constants of interaction between AST isomers and BSA

AST	温度 /K	$K_A / (\times 10^3 \text{ L}/\text{mol})$	n	R^2
左旋 AST	303	8.14 ± 0.07^{Aa}	0.92 ± 0.18	0.94
	310	1.70 ± 1.27^{Ba}	0.83 ± 0.45	0.96
右旋 AST	303	8.53 ± 0.65^{Aa}	0.93 ± 0.01	0.94
	310	2.24 ± 0.89^{Ba}	0.84 ± 0.02	0.99

注: 不同大写字母 (A、B) 表示相同构型 AST (不同温度) 之间存在显著性差异, $P < 0.05$; 不同小写字母 (a、b) 表示不同构型 AST (相同温度) 之间存在显著性差异, $P < 0.05$ 。

为进一步探究 AST 异构体和 BSA 结合常数 K_A 和结合位点数 n , 使用双对数方程 (3) 对上述所得荧光强度进行分析, 结果如表 2 和图 5 所示。一般情况下, 当小分子配体-蛋白受体复合物的结合常数 K_A 在 $10^7 \sim 10^9$ L/mol 之间时代表较强

的结合亲和力, 而低于 10^6 L/mol 时则代表较弱的结合亲和力^[15]。如表 2 所示, AST-BSA 的 K_A 均为 10^3 L/mol, 可以推测 BSA 对 AST 异构体具有较弱的结合亲和力。其中左旋与右旋 AST 在 303 K 时的 K_A 分别为 8.14×10^3 和 8.53×10^3 L/mol。虽然右旋 AST 比左旋 AST 具有更高的 K_A , 但结果没有显著性差异 ($P > 0.05$), 表明二者对 BSA 具有相似的结合亲和力。此外, 左旋和右旋 AST 在 303 K 时的 n 值分别为 0.92 和 0.93, 它们均小于 1, 表明 AST 异构体在 BSA 中均只有一个结合位点。

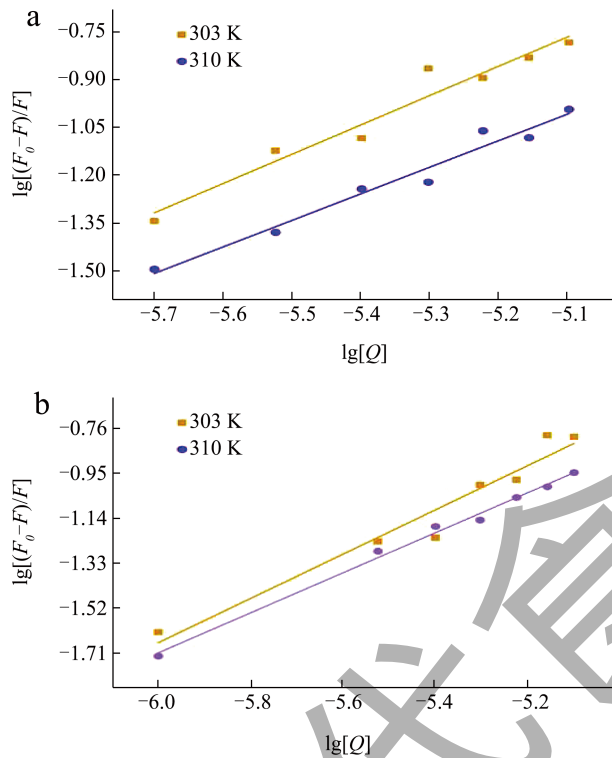


图 5 左旋AST (a) 和右旋AST (b) 与BSA相互作用的双对数方程拟合图

Fig.5 Double logarithmic plots of BSA interacting with (3S,3'S)-AST (a) and (3R,3'R)-AST (b)

虽然内源荧光光谱具有研究结合常数的潜力, 但该技术依赖于周围环境对生色氨基酸的影响程度来计算结合常数, 排除了其他氨基酸对结合的贡献。因此, 为进一步确定 AST 异构体与 BSA 的结合参数, 我们选择表面等离子共振技术 (Surface Plasma Resonance, SPR) 来测定 AST-BSA 的结合亲和力和结合动力学。如图 6 所示, 注入 AST 溶液后, 仪器的响应值随时间变化而逐渐增加, 说明 AST 与偶联在芯片上的 BSA 发生结合。表 3 显示 AST 异构体与 BSA 的解离平衡常数 K_D 均达到 10^{-7} mol/L ($K_A = 1/K_D$, 相当于 10^6 L/mol 的 K_A), 说明 AST 与

BSA 具有中等强度的结合亲和力。其中右旋 AST (3.91×10^{-7} mol/L) 与左旋 AST (4.17×10^{-7} mol/L) 表现出相近的 K_D ($P > 0.05$), 与前面 IFES 的结果一致表明 AST 立体异构体与 BSA 的结合没有表现出明显的立体选择性^[16]。此前已有学者^[17]研究了血清白蛋白对人工合成全反式 AST (左旋: 内消旋: 右旋 = 1:2:1) 的结合亲和力 (1.47×10^{-6} mol/L), 与我们的 SPR 结果 (10^{-7} mol/L) 较为接近, 进一步证明了 SPR 数据的准确性。此外, 从整体的动力学曲线来看, AST 异构体的结合和解离曲线较为相似, 都呈现慢结合与慢解离状态, 但是左旋和右旋 AST 的结合速率常数 [4.76×10^3 和 3.27×10^3 L/(mol·s)] 和解离速率常数 (2.00×10^{-3} 和 1.28×10^{-3} 1/s) 存在较大差异 ($P < 0.05$)。并且当 AST 浓度为 0.35、0.53、0.79、1.19 和 1.78 $\mu\text{mol/L}$ 时, 左旋和右旋 AST 的最高结合响应值分别为 13.84、20.60、25.93、40.58、57.22 RU 和 13.20、17.14、19.22、24.81、33.19 RU。可以看到在相同 AST 浓度下左旋 AST 的响应值均高于右旋 AST, 这种由于手性结构表现出的差异在其它研究中也发现^[18], 表明左旋和右旋 AST 与 BSA 的结合存在差异。

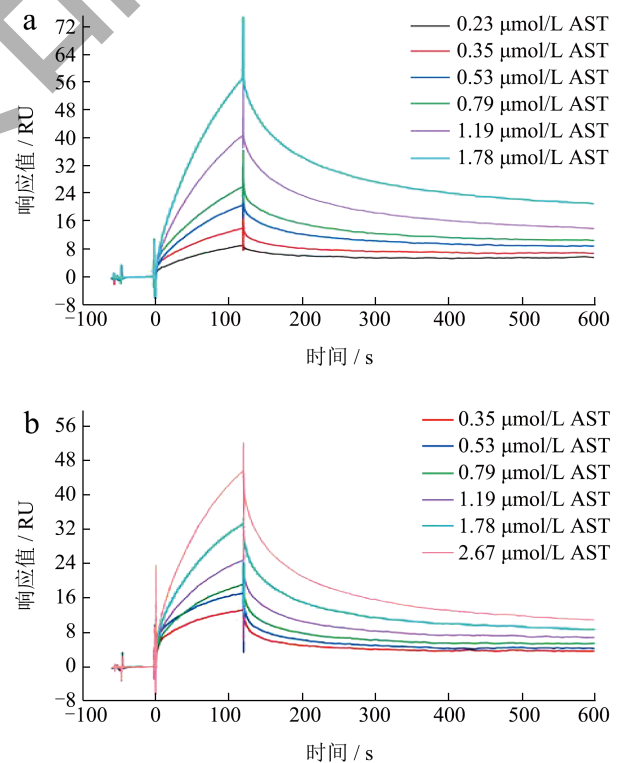


图 6 左旋AST (a) 和右旋AST (b) 与固定化BSA相互作用的传感图

Fig.6 Sensing diagram of immobilized BSA interacting with (3S,3'S)-AST (a) and (3R,3'R)-AST (b)

表 3 AST异构体与BSA相互作用的结合速率常数、解离速率常数及解离平衡常数

Table 3 Association rate constant, dissociation rate constant and equilibrium constants values of AST isomers interacting with BSA

AST	$k_a/$ [$\times 10^3$ L/(mol·s)]	$k_d/$ ($\times 10^{-3}$ 1/s)	$K_D/$ ($\times 10^{-7}$ mol/L)
左旋 AST	4.76 ± 0.53^a	2.00 ± 0.32^a	4.17 ± 0.21^a
右旋 AST	3.27 ± 0.10^b	1.28 ± 0.05^b	3.91 ± 0.02^a

注：不同小写字母 (a、b) 表示不同构型 AST 之间存在显著性差异， $P < 0.05$ 。

对比以上两种方法所得到的结果，发现采用 SPR (10^6 L/mol) 得到的结合亲和力约为 IFES (10^3 L/mol) 的 10^3 倍。这是由于除生色氨基酸之外，SPR 还可以同时检测到 BSA 其它氨基酸的相互作用信息^[19]。由此可见，SPR 获得的结合亲和力更加真实，在 Afkham 等^[20]和 Maleki 等^[21]研究中也得到一致的看法。虽然 IFES 受限于检测原理，但这个方法可作为 SPR 的辅助验证手段，并且它还可以获得其它方面的相互作用信息，如蛋白质构象变化、相互作用力等，这些结果将在以下实验得到验证。

2.3 热力学参数和主要相互作用力

AST 具有多种官能团，如芳香环、酮基和羟基，因此 AST 异构体可能会以不同的结合模式与 BSA 发生相互作用，并在热力学参数上表现出差异。此外，热力学参数是判断相互作用力的重要依据。为了确定 AST 异构体与 BSA 结合的结合亲和力，我们使用了方程 (4) 和 (5) 分析了第 2.2 节中 IFES 的结合亲和力。

左旋和右旋 AST 与 BSA 相互作用的焓变 ΔH 分别为 -175.09 和 -149.42 kJ/mol，熵变 ΔS 分别

为 -502.72 和 -417.65 J/(mol·K) (表 4)。AST 立体异构体均呈现负值的 ΔH 和 ΔS ，表明驱使它们与 BSA 发生结合的主要相互作用力是氢键和范德华力^[22]，这与之前关于类胡萝卜素-BSA 相互作用的报道一致^[23]。产生这种现象的原因主要是因为 AST 异构体具有相同的官能团，而手性结构的差异并不会改变主要相互作用力类型，这在其它异构体的研究中也具有相同的结果^[24]。尽管如此，左旋 AST 比右旋 AST 具有更小的 ΔH 和 ΔS 表明二者存在结合差异。

2.4 虾青素异构体结合位点的确定

现有研究表明，BSA 与小分子配体结合的主要位点位于亚结构域 II A (位点 I) 和 III A (位点 II) 的疏水腔内，而吲哚美辛和布洛芬分别是位点 I 或 II 的典型配体^[23]。因此选择这两种典型配体进行位点竞争实验 (Site Marker Experiments, SME)，并通过方程 (3) 来计算存在位点竞争物质时 AST-BSA 的结合常数，以此来确定 AST 异构体在 BSA 上的结合位点。

结果如表 5 所示，左旋和右旋 AST 与 BSA 的结合常数分别为 8.14×10^3 和 8.53×10^3 L/mol。当加入吲哚美辛后，左旋和右旋 AST 的结合常数分别降低至 0.55×10^3 和 0.14×10^3 L/mol。在加入布洛芬后，左旋和右旋 AST 的结合常数分别为 0.54×10^3 和 0.57×10^3 L/mol。可以看到吲哚美辛或布洛芬的存在会使 AST 异构体的结合常数显著降低 ($P < 0.05$)，这个现象表明两个竞争物质都会影响 BSA 与 AST 异构体的结合。与此同时，发现布洛芬和吲哚美辛在两种 AST 异构体中的结合常数都没有表现出显著差异。由此可推断左旋和右旋 AST 的结合位点均位于亚结构域 II A 和 III A 之间的交界处，在 Li 等^[25]课题组的研究中也发现相似的结果，原因可能是受到 AST 长链结构的影响。

表 4 AST异构体与BSA相互作用的热力学参数

Table 4 Thermodynamic parameters of AST isomers interacting with BSA

AST	温度/K	$\Delta H/$ (kJ/mol)	$\Delta S/$ [J/(mol·K)]	$\Delta G/$ (kJ/mol)
左旋 AST	303	-175.09 ± 77.80^a	-502.72 ± 256.68^a	-22.72 ± 0.02^{Aa}
	310			-19.37 ± 1.81^{Ba}
右旋 AST	303	-149.42 ± 52.40^a	-417.65 ± 172.23^a	-22.88 ± 0.19^{Aa}
	310			-19.95 ± 1.02^{Ba}

注：不同大写字母 (A、B) 表示相同构型 AST (不同温度) 之间存在显著性差异， $P < 0.05$ ；不同小写字母 (a、b) 表示不同构型 AST (相同温度) 之间存在显著性差异， $P < 0.05$ 。

表 5 竞争性实验中AST异构体与BSA相互作用的结合常数

Table 5 Binding constants for the interaction of BSA with AST isomers in competitive experiments

AST	竞争物质	$K_A / (\times 10^3 \text{ L/mol})$	R^2
	(空白)	8.14 ± 0.07^A	0.94
左旋 AST	布洛芬	0.54 ± 0.17^B	0.97
	吲哚美辛	0.55 ± 0.40^B	0.94
	(空白)	8.53 ± 0.65^A	0.94
右旋 AST	布洛芬	0.57 ± 0.09^B	0.94
	吲哚美辛	0.14 ± 0.06^B	0.97

注：不同大写字母 (A、B) 表示相同构型 AST (不同竞争物质) 之间存在显著性差异, $P < 0.05$ 。

2.5 虾青素异构体对牛血清白蛋白构象的影响

蛋白质 (特别是血清白蛋白) 是动态柔性物体, 它能够根据自身所处环境的微小变化, 自发地进行分子构象转变。因此, 小分子与蛋白质的相互作用不仅会影响蛋白质在结合口袋处的结构, 而且对其整体二级结构也可能造成较大影响^[26]。为了探究 AST 异构体对 BSA 结构的影响, 采用了圆二色谱 (Circular Dichroism, CD) 和同步荧光光谱 (Synchronous Fluorescence Emission Spectra, SFES) 进行测定。CD 可以在 190~260 nm 波长下直接分

析 BSA 的二级结构含量, 结果如图 7 和表 6 所示。天然 BSA 的 CD 光谱分别在 209 nm 和 221 nm 附近出现 α -螺旋的波谷, 解析得到其二级结构组成为 56.83% α -螺旋、8.63% β -折叠、13.70% β -转角和 22.27% 无规则卷曲, 表明 BSA 的二级结构主要是 α -螺旋^[27]。当加入左旋和右旋 AST 后, BSA 的 CD 波谷仅轻微下降, α -螺旋分别变为 56.80% 和 57.23%。然而二级结构含量并没有明显变化 ($P > 0.05$), 表明 AST 异构体与 BSA 的结合不会明显改变蛋白二级结构。这一结果有助于 BSA 维持其原有的生理功能。

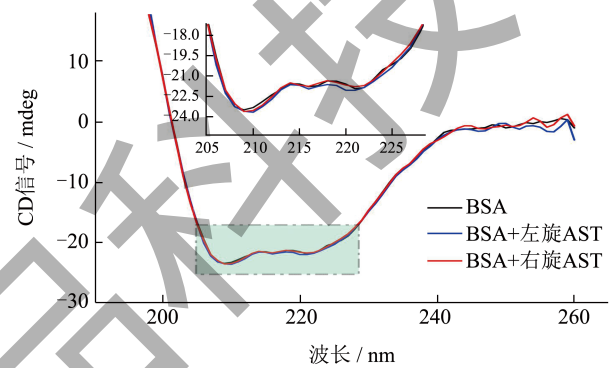


图 7 存在和不存在AST异构体时BSA的CD光谱
Fig.7 CD spectra of BSA in the absence and presence of AST isomers

表 6 存在和不存在AST异构体时BSA的二级结构含量

Table 6 Secondary structure content of BSA in the presence and absence of AST isomers

系统	α -螺旋/%	β -折叠/%	β -转角/%	无规则卷曲/%
BSA	56.83 ± 0.75^A	8.63 ± 0.12^A	13.70 ± 0.20^A	22.27 ± 0.25^A
BSA+左旋 AST	56.80 ± 0.00^A	8.65 ± 0.05^A	13.70 ± 0.00^A	22.30 ± 0.00^A
BSA+右旋 AST	57.23 ± 0.57^A	8.57 ± 0.12^A	13.60 ± 0.10^A	22.03 ± 0.15^A

注：不同大写字母 (A、B) 表示不同系统之间存在显著性差异, $P < 0.05$ 。

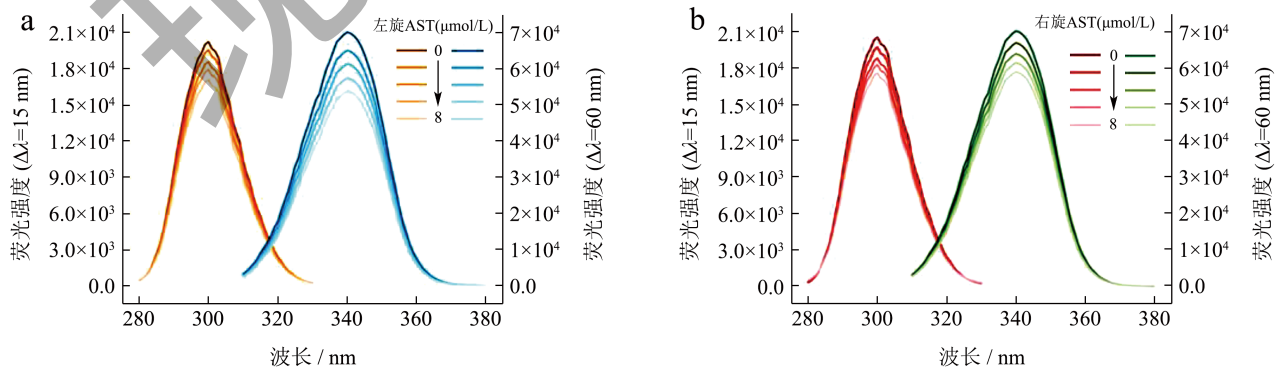


图 8 左旋AST (a) 和右旋AST (b) 与BSA相互作用的同步荧光光谱

Fig.8 Synchronous fluorescence emission spectroscopy of BSA interacting with (3S,3'S)-AST (a) and (3R,3'R)-AST (b)

表 7 AST异构体与BSA的分子对接结合参数

Table 7 Binding parameters of BSA with AST isomers obtained by molecular docking

AST	结合自由能 / (kcal/mol)	相互作用氨基酸残基			氢键键长 /Å	-CDOCKER / (kcal/mol)	
		范德华力	疏水作用力	氢键作用力		能量	相互作用能
左旋AST	-8.9	Lys114, Arg185, Val423, Glu424, Ser428, Arg435, Tyr451, Leu454, Ile455, Arg458, Lys523, Thr526	Leu189, Ala193, Pro420, Lys431, Leu505, Ile522	Lys504, Thr190	2.0, 2.7	-57.99	63.43
右旋AST	-8.9	Lys114, Arg185, Thr190, Thr419, Val423, Glu424, Ser428, Tyr451, Leu454, Ile455, Lys504, Lys523, Thr526	Leu189, Ala193, Pro420, Lys431, Arg458, Leu505, Ile522	Arg435	2.9	-58.58	60.23

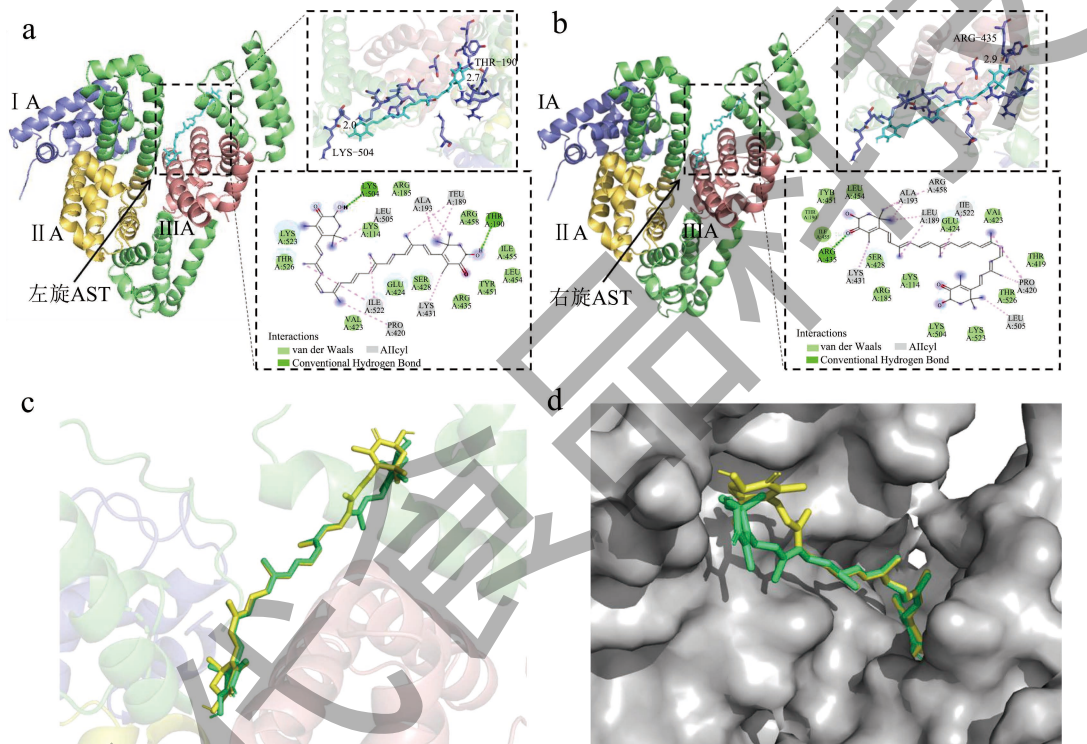


图 9 左旋AST (a) 和右旋AST (b) 与BSA相互作用的分子对接结果及对比分析 (c、d)

Fig.9 Molecular docking results of BSA interacting with (3S,3'S)-AST (a) as well as (3R,3'R)-AST (b) and comparative analysis (c, d)

注：图 a 和 b 中左边显示为对接结果的结合位点，右边分别显示其三维互作氨基酸残基和二维相互作用力。对比分析图 c 和 d 中左旋 AST 和右旋 AST 对应的颜色分别为黄色和绿色。

对于 SFES，光谱中最大发射波长位置的变化可以反映生色氨基酸周围环境极性的变化，以此来观察 AST 异构体对 BSA 微环境的影响。当激发和发射波长的间隔 $\Delta\lambda$ 固定为 15 或 60 nm 时，可以分别获得 Tyr 或 Trp 残基的微环境信息^[28]。对于天然 BSA，Tyr 和 Trp 的最大发射波长分别在 300 和 340 nm (图 8)。随着左旋和右旋 AST 的加入，Tyr 和 Trp 的最大发射波长均没有发生位移变化，说明 AST-BSA 相互作用不会改变 BSA 的微环境。由此可见，CD 和 SFES 一致表明 AST 与 BSA 的相互作用

不会明显改变蛋白构象。从第 2.4 节中可以得到一个合理的解释，即 AST 没有结合到 BSA 内部的疏水口袋，因此对蛋白质构象的影响较小。

2.6 虾青素异构体与牛血清白蛋白的模拟结合

分子对接 (Molecular Docking, MD) 可以预测小分子与蛋白质的相互作用信息并呈现出可视化的结果，有助于进一步了解 AST 异构体与 BSA 之间的结合机制。表 7 显示左旋 AST、右旋 AST 与 BSA 的结合自由能均为 -8.9 kcal/mol，表明二者具有相等的结

合亲和力。如图 9 所示, 最优的对接模式表明 AST 异构体具有相似的结合模式, 二者均结合在 BSA 三个结构域的交界处, 并且与 BSA 结合的相互作用力类型为氢键、范德华力和疏水相互作用力。这与第 2.2~2.4 节的研究结果较为一致, 在理论层面提供了进一步的支持。虽然左旋和右旋 AST 在上述方面具有相似的结果, 但在形成氢键的数目和键长方面表现结合差异。其中左旋 AST 与 Lys504、Thr190 残基形成键长为 2.0 Å、2.7 Å 的氢键, 而右旋 AST 与 Arg435 残基形成键长为 2.9 Å 的氢键。此外, 还发现 AST 立体异构体都是通过酮基或羟基与氨基酸形成氢键, 可见这两个官能团对 AST 的结合起到重要作用。

左旋和右旋 AST 与 BSA 相似的结合自由能再一次反映出它们之间的结合没有明显的立体选择性, 这种情况可以从 AST 的分子结构和结合位点两方面来解释。AST 立体异构体的结构差异在于两端环上的羟基, 由于 AST 的长链结构限制了它们可选择的结合位点, 导致无法像其他小分子异构体那样自由调整分子朝向来选择最合适的结合口袋^[8,29]。此外, 结合位点处芳香族氨基酸残基 (Trp、Tyr 和 Phe) 的存在对手性分子的立体选择性具有较大影响^[30], 然而分子对接结果显示 AST-BSA 的互作氨基酸残基中仅出现一个 Tyr 残基, 这不利于展现 AST 立体异构体的立体选择性作用。

3 结论

本研究通过 IFES、SFES、SME、CD、SPR 和 MD 方法研究了 AST 立体异构体与 BSA 的相互作用。SME 表明 AST 异构体的结合位点均位于 BSA 亚结构域 II A 和 III A 的交界处, 相同的结合位点导致 AST 异构体具有相似的相互作用力 (氢键和范德华力) 和结合亲和力, 这在 IFES 和 SPR 中得到了证明。SPR 还表明 AST-BSA 的结合动力学都表现为慢结合、慢解离状态, 左旋 AST 的最高结合响应值高于右旋 AST。IFES 的结果还显示左旋 AST 具有更低的 ΔH 和 ΔS 。MD 模拟结果与上述实验结果具有较高符合度, 同时还发现 AST 立体异构体在氢键数目和键长上表现结合差异。此外, CD 和 SFES 一致证明 AST 与 BSA 的相互作用不会对蛋白构象造成较大影响。总之, 左旋和右旋 AST 对 BSA 的结合没有明显的立体选择性, 但在最高结合响应值、热力学参数和氢键数表现出结合差异。这些相互作用参数有助于阐明 AST 立体异构体与 BSA 的结合机制, 并为 AST 异构体在血液循环中潜在的药代动

力学提供重要的理论指导信息。

参考文献

- [1] STACHOWIAK B, SZULC P. Astaxanthin for the food industry [J]. *Molecules*, 2021, 26(9): 2666.
- [2] LIU X, XIE J, ZHOU L, et al. Recent advances in health benefits and bioavailability of dietary astaxanthin and its isomers [J]. *Food Chemistry*, 2023, 404: 134605.
- [3] HOWARD M L, HILL J J, GALLUPPI G R, et al. Plasma protein binding in drug discovery and development [J]. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 2010, 13(2): 170.
- [4] GALTIER P, CAMGUILHEM R, BODIN G. Evidence for *in vitro* and *in vivo* interaction between ochratoxin A and three acidic drugs [J]. *Food Cosmet Toxicol*, 1980, 18(5): 493-496.
- [5] VERONICH K, WHITE G, KAPOOR A. Effects of phenylbutazone, tolbutamide, and clofibrilic acid on binding of racemic warfarin and its enantiomers to human serum albumin [J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1979, 68(12): 1515-1518.
- [6] MAHMOUDPOUR M, JAVAHERI-GHEZELDIZAJ F, YEKTA R, et al. Thermodynamic analysis of albumin interaction with monosodium glutamate food additive: insights from multi-spectroscopic and molecular docking approaches [J]. *Journal of Molecular Structure*, 2020, 1221: 128785.
- [7] WANI T A, BAKHEIT A H, ZARGAR S, et al. Mechanistic competitive binding interaction study between olmutinib and colchicine with model transport protein using spectroscopic and computer simulation approaches [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2022, 426: 113794.
- [8] 李红, 许茜, 郑晓丽, 等. 人参皂苷 Rh2 与血清白蛋白相互作用立体选择性的光谱及分子对接研究 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2018, 38(12): 3839-3845.
- [9] CHEN R, HE R, GUO D, et al. Interactions of diclazuril enantiomers with serum albumins: multi-spectroscopic and molecular docking approaches [J]. *Journal of Molecular Recognition*, 2022, 35(4): e2948.
- [10] LI X, ZHAO R, SHAO D, et al. Multispectral and molecular modeling investigations on the binding behaviors of two anticoccidials with serum albumins [J]. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 2022, 40(14): 6522-6533.
- [11] DE PAULA H M C, COELHO Y L, AGUDELO A J P, et al. Kinetics and thermodynamics of bovine serum albumin interactions with congo red dye [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2017, 159: 737-742.
- [12] EL GAMMAL R N, ELMANSI H, EL-EMAM A A, et al.

- Exploring the molecular interaction of mebendazole with bovine serum albumin using multi-spectroscopic approaches and molecular docking [J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 11582.
- [13] ALLAHDAD Z, KHAMMARI A, KARAMI L, et al. Binding studies of crocin to β -Lactoglobulin and its impacts on both components [J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 108: 106003.
- [14] 裘兰兰, 李金贵, 李芳. 分子对接技术与光谱法分析薯蓣皂苷和人血清白蛋白的相互作用[J]. *现代食品科技*, 2020, 36(10): 93-99.
- [15] ABBOUD R, CHARCOSSET C, GREIGE-GERGES H. Interaction of triterpenoids with human serum albumin: a review [J]. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2017, 207: 260-270.
- [16] MU H, XU Z, LIU Y, et al. Probing the stereoselective interaction of ofloxacin enantiomers with corresponding monoclonal antibodies by multiple spectrometry [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2018, 194: 83-91.
- [17] VACHALI P, LI B, NELSON K, et al. Surface plasmon resonance (SPR) studies on the interactions of carotenoids and their binding proteins [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2012, 519(1): 32-37.
- [18] SHEN G, GAO Y, DAI D, et al. Kinetics study of chiral recognition between protein and amino acid enantiomers by surface plasmon resonance [J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2011, 32(8): 1709-1713.
- [19] HUDSON E A, DE PAULA H, FERREIRA G, et al. Thermodynamic and kinetic analyses of curcumin and bovine serum albumin binding [J]. *Food Chemistry*, 2018, 242: 505-512.
- [20] AFKHAM S, HANAEE J, ZAKARIAZADEH M, et al. Molecular mechanism and thermodynamic study of rosuvastatin interaction with human serum albumin using a surface plasmon resonance method combined with a multi-spectroscopic, and molecular modeling approach [J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2022, 168: 106005.
- [21] MALEKI S, ARABZADEH A, NEJATI K, et al. Exploring the interactions of a natural gamma-oryzanol with human serum albumin: surface plasmon resonance, fluorescence, and molecular modeling studies [J]. *Drug Research*, 2021, 71(9): 520-527.
- [22] ROSS P D, SUBRAMANIAN S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability [J]. *Biochemistry*, 1981, 20(11): 3096-3102.
- [23] LIU Y, HUANG L, LI D, et al. Re-assembled oleic acid-protein complexes as nano-vehicles for astaxanthin: multispectral analysis and molecular docking [J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 103: 105689.
- [24] MU H, CHEN S, LIU F, et al. Stereoselective interactions of lactic acid enantiomers with HSA: spectroscopy and docking application [J]. *Food Chemistry*, 2019, 270: 429-435.
- [25] LI D, LIU Y, LIU Y, et al. Effects of different fatty acid ligands on the host-guest interaction of astaxanthin-bovine serum albumin: thermodynamical analysis, binding site identification, and *in vivo* antioxidant evaluation [J]. *Food Hydrocolloids*, 2023, 134: 108112.
- [26] 刘雪锋. 几种中药小分子与牛血清白蛋白相互作用[D]. 无锡: 江南大学, 2005.
- [27] BOURASSA P, KANAKIS C D, TARANTILIS P, et al. Resveratrol, genistein, and curcumin bind bovine serum albumin [J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2010, 114(9): 3348-3354.
- [28] 蒋晓琦, 马超, 余凯, 等. 光谱法结合计算模拟探究胡桃醌与脯氨酰顺反异构酶1的相互作用[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(8): 135-141.
- [29] LIU Y, CHEN M, JIANG L, et al. Stereoselective interaction of cinchona alkaloid isomers with bovine serum albumin [J]. *Food Chemistry*, 2015, 181: 170-178.
- [30] AYUDHYA C C N, GRAIDIST P, TIPMANEE V. Potential stereoselective binding of trans-(\pm)-kusunokinin and cis-(\pm)-kusunokinin isomers to CSF1R [J]. *Molecules*, 2022, 27(13): 4194.