

# 荧光猝灭法研究 8-烷基黄连碱衍生物对溶菌酶的作用机制

蒋小飞<sup>1,2</sup>, 张宝顺<sup>1</sup>, 刘勇<sup>1</sup>, 李学刚<sup>1\*</sup>

(1.西南大学 药学院, 重庆 400716; 2.重庆三峡学院 化学与环境工程学院, 重庆 404000)

**摘要:** 通过测定不同温度(12、24、36 °C)下 8-烷基黄连碱衍生物(Cop-C8-n, n=4、6、8)对溶菌酶的荧光猝灭常数,并计算热力学参数,研究 8-烷基黄连碱衍生物对溶菌酶的作用机制。结果表明:8-烷基黄连碱衍生物对溶菌酶的内源性荧光可产生极强的猝灭作用,猝灭作用过程既有静态猝灭又有动态猝灭;热力学参数证明,黄连碱衍生物与溶菌酶的结合作用力主要为疏水作用力,随着烷基链的增长,溶菌酶的紫外吸收逐渐下降;在荧光分析中,24 °C下溶菌酶与 Cop-C8-8 的结合位点为 2,结合常数为  $2.063 \times 10^7$ ,都显著高于 Cop-C8-6 和 Cop-C8-4。

**关键词:** 8-烷基黄连碱衍生物;溶菌酶;荧光猝灭法

中图分类号:O657.3;O629.3 文献标志码:A 文章编号:1007-1032(2011)03-0346-05

## Study on the binding interaction of 8-alkyl coptisine derivatives with lysozyme by fluorescence quenching method

JIANG Xiao-fei<sup>1,2</sup>, ZHANG Bao-shun<sup>1</sup>, LIU Yong<sup>1</sup>, LI Xue-gang<sup>1\*</sup>

(1. School of Pharmaceutical Science, Southwest University, Chongqing 400716, China; 2. College of Chemical and Environmental Engineering, Chongqing Three Gorges University, Chongqing 404000, China)

**Abstract:** Interaction between 8-alkyl coptisine derivatives and lysozyme were investigated by measuring the quenching constants under different temperatures and analyzing the thermodynamic parameter. The result revealed that there was a strong fluorescence quenching effect of coptisine analogues on lysozyme. The data indicated both dynamic and static quenchings were involved in the quenching process. The thermodynamic parameters indicated that the interactions of coptisine analogues with lysozyme were driven mainly by hydrophobic force. UV absorption of lysozyme was more negatively affected by a longer alkyl chain. Compared to Cop-C8-6 and Cop-C8-4, Cop-C8-8 had the highest binding constant which is  $2.063 \times 10^7$ .

**Key words:** 8-alkyl coptisine derivatives; lysozyme; fluorescence quenching

黄连碱是中药黄连的重要活性成分之一,具有抑菌、降糖等多种生理活性<sup>[1-2]</sup>。西南大学药用资源化学研究所黄连碱为先导化合物,通过在黄连碱第8位的亲脂性修饰合成了一系列的8-烷基黄连碱同系物(Cop-C8-n, n=4、6、8),发现这些黄连碱同系物的某些生理活性有所提高。为进一步了解黄连碱同系物的药理活性,笔者应用荧光猝灭法<sup>[3-4]</sup>,在灭菌的溶菌酶<sup>[5-6]</sup>Tris-HCl缓

冲液中,测定了8-烷基黄连碱同系物与溶菌酶作用的荧光强度的变化,探讨8-烷基黄连碱同系物与溶菌酶作用的机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

黄连碱Cop和8-烷基黄连碱衍生物(Cop-C8-n, n=4、6、8),由西南大学药用资源化学研究所提供。

收稿日期:2010-08-27

基金项目:西南大学优秀博士生项目(kb2009017)

作者简介:蒋小飞(1973—),男,壮族,云南蒙自人,博士研究生,讲师,主要从事天然产物提取分离及结构修饰研究;\*通信作者, xuegangli2000@yahoo.com.cn

用双蒸水将 Cop 以及 Cop-C8-*n* 分别配制成  $1 \times 10^{-4}$  mol/L 的溶液。溶菌酶(北京华美生物工程有限公司产品)用 0.05 mol/L 的 NaCl 溶液(已灭菌)配制成  $1 \times 10^{-4}$  mol/L 的贮备液。三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)缓冲溶液 (pH 7.4)。

主要仪器有: F24500 型荧光光度计(日本日立公司); UV-1800 分光光度计(日本 Hitachi 仪器公司); pH S-3C 型酸度计(上海雷磁仪器厂)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 溶菌酶与 8-烷基黄连碱衍生物的紫外测定

取上述配制的溶菌酶溶液、Cop、Cop-C8-*n*(*n*=4, 6, 8) 稀释 10 倍, 按照溶菌酶溶液+Tris-HCl 缓冲液、Cop+Tris-HCl 缓冲液、Cop+溶菌酶溶液+Tris-HCl 缓冲液、Cop-C8-*n*(*n*=4, 6, 8)+溶菌酶溶液+Tris-HCl 缓冲液, 配制成 6 组混合液(等体积配比), 分别在室温下测定混合液的紫外光谱, 观察溶菌酶和 Cop 的最大吸收峰以及溶菌酶在加入 Cop、Cop-C8-*n* 后的紫外吸收变化。

### 1.2.2 8-烷基黄连碱衍生物对溶菌酶荧光猝灭测定

将 Cop 以及 Cop-C8-*n* 分别配制成以下浓度: Cop,  $2.06 \times 10^{-5}$ 、 $2.575 \times 10^{-5}$ 、 $3.05 \times 10^{-5}$ 、 $4.12 \times 10^{-5}$ 、

$4.635 \times 10^{-5}$ 、 $5.15 \times 10^{-5}$  mol/L; Cop-C8-4,  $1.753 \times 10^{-5}$ 、 $2.1915 \times 10^{-5}$ 、 $2.596 \times 10^{-5}$ 、 $3.068 \times 10^{-5}$ 、 $3.954 \times 10^{-5}$ 、 $4.383 \times 10^{-5}$  mol/L; Cop-C8-6,  $1.632 \times 10^{-5}$ 、 $2.04 \times 10^{-5}$ 、 $2.416 \times 10^{-5}$ 、 $2.855 \times 10^{-5}$ 、 $3.264 \times 10^{-5}$  mol/L; Cop-C8-8,  $1.526 \times 10^{-5}$ 、 $1.9074 \times 10^{-5}$ 、 $2.2593 \times 10^{-5}$ 、 $2.6704 \times 10^{-5}$ 、 $3.4333 \times 10^{-5}$  mol/L, 在 0.165 mL Cop 和 Cop-C8-*n* 溶液中依次加入 2.0 mL Tris-HCl 缓冲液、1 mL 0.1 mol/L NaCl 溶液、1.51 mL  $10^{-4}$  mol/L 溶菌酶(Lys) 溶液以及 0.49 mL 蒸馏水, 混合均匀后, 分别于 12、24、36 °C 的水浴锅中静置 10 min 后(对照液是等体积的蒸馏水), 在 F-4500 型荧光光度计上测定荧光强度。测定条件: 激发波长为 280 nm, 扫描范围为 290~500 nm, 狭缝均为 5.0 nm, 每个样品 3 个重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 溶菌酶和 8-烷基黄连碱衍生物的紫外扫描结果

紫外扫描发现, 溶菌酶在约 280、343 nm 处有较强的吸收, 而 8-烷基黄连碱衍生物在约 356、454 nm 处有较强的紫外吸收。溶菌酶与 8-烷基黄连碱衍生物作用后, 溶菌酶在 343 nm 处的吸收峰明显降低。

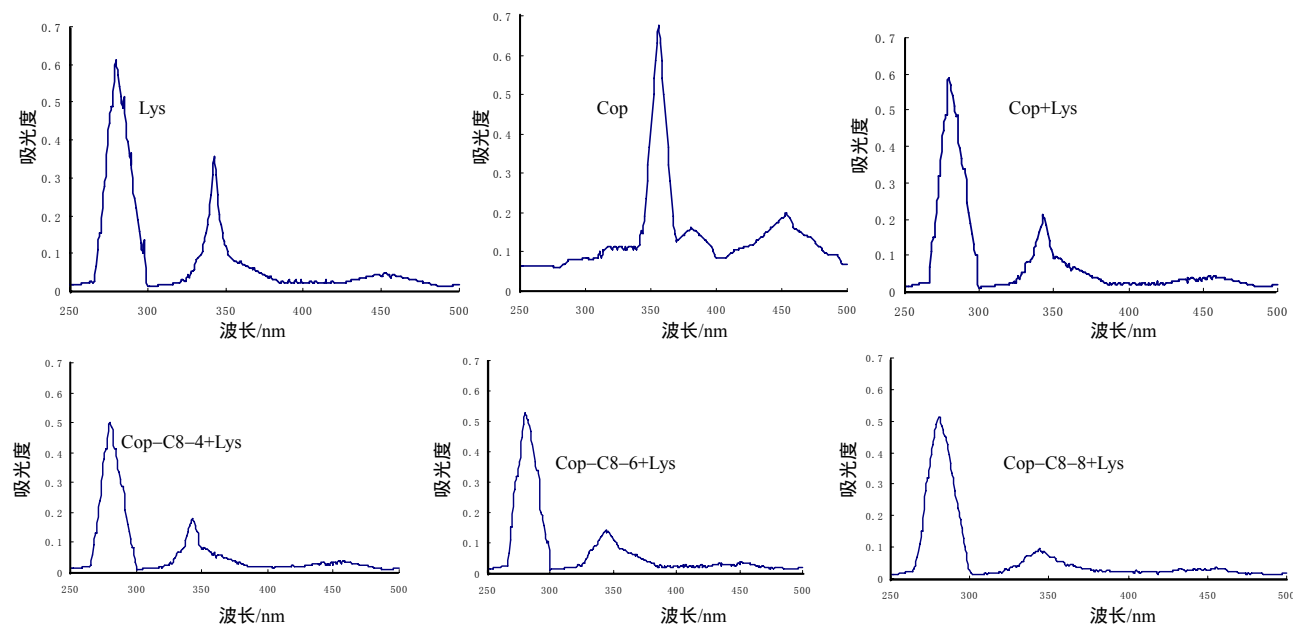


图 1 溶菌酶与 8-烷基黄连碱衍生物及其作用后的紫外吸收光谱

Fig.1 UV-absorption spectra of Lys-Cop complexes at room temperature

## 2.2 8-烷基黄连碱衍生物对溶菌酶的荧光猝灭作用

溶菌酶与药物作用的主要氨基酸有谷氨酸、色氨酸、天冬氨酸与甘氨酸,能够发射荧光的只有色氨酸。在相同条件下,缓冲液与药物都不能发出荧光。图2是不同浓度的 Cop、Cop-C8-n 和  $3.02 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$  溶菌酶混合液的荧光发射光谱。从图2中可以看出,在激发波长为 280 nm 时,溶菌酶的最大发射波长为 343 nm 左右,主要表现为色氨酸

残基的荧光特征。同时随着 Cop、Cop-C8-n 浓度的增加,溶菌酶在 343 nm 左右的荧光发射高度峰逐渐降低,发生了一定强度的荧光猝灭。黄连碱衍生物都使得溶菌酶的荧光发射峰发生了蓝移以及出现了一定程度的裂分,说明色氨酸残基所处的微环境发生了改变,提示溶菌酶的构象发生了变化<sup>[7]</sup>,同时也在一定程度上佐证了黄连碱衍生物对溶菌酶的猝灭机理较为复杂。

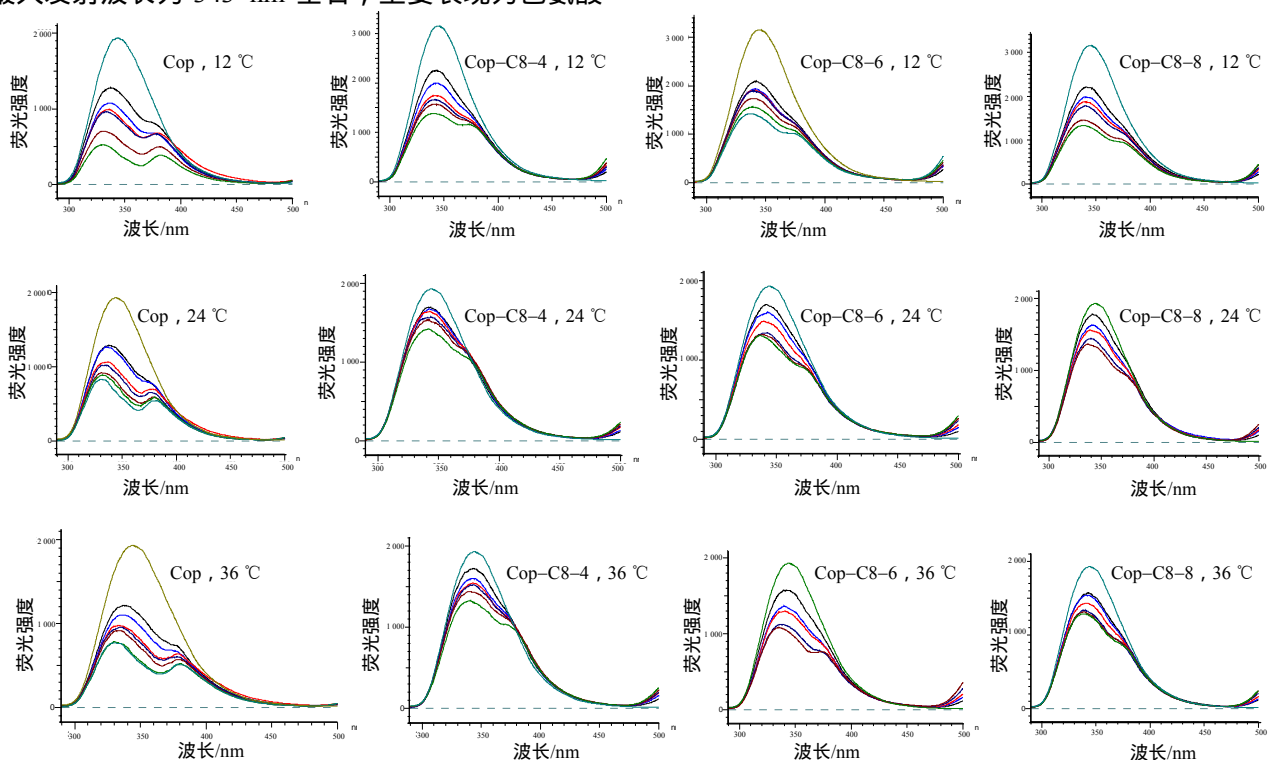


图2 不同温度下8-烷基黄连碱衍生物对溶菌酶荧光猝灭作用曲线

Fig.2 Fluorescence spectra of Lys in the presence of coptisine analogues under various temperature

## 2.3 结合常数与猝灭机理

在12、24、36 °C下,测定加入黄连碱衍生物前后的溶菌酶荧光强度的变化,并通过Stern-Volmer方程<sup>[8]</sup>求得猝灭常数,如表1所示。大部分 $K_q$ 大于最大扩散碰撞猝灭常数 $2 \times 10^{10} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ <sup>[9]</sup>,所以黄连碱及其衍生物对溶菌酶内源荧光的猝灭主要是静态猝灭<sup>[10]</sup>。从Stern-Volmer方程线性相关系数的平方可以看出,并没有良好的线性关系,同时从各个不

同温度下的Stern-Volmer猝灭常数可以看出,猝灭常数随温度升高先减小后又增大,这表明黄连碱及其衍生物对溶菌酶的荧光猝灭机理是静态和动态的联合猝灭。随着温度的升高,在24 °C时,溶液的黏度下降,有利于动态猝灭,猝灭常数增大,温度继续升高至36 °C时,猝灭常数增大不明显,可见温度并不是主要影响因素,表明是以静态猝灭为主的猝灭机理<sup>[11]</sup>。

表 1 Stern-Volmer 猝灭常数  $K_{sv}$  与双分子猝灭过程速率常数  $K_q$ Table 1 Stern-Volmer quench constant  $K_{sv}$  and apparent quench constant  $K_q$ 

8-烷基黄连碱衍生物	$t/^\circ\text{C}$	Stern-Volmer 方程	$R^2$	$K_{sv}/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$K_q/(\times 10^{10} \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$
Cop	12	$y = 0.0079x + 1$	0.9047	790	7.9
	24	$y = 0.0027x + 1$	0.9836	270	2.7
	36	$y = 0.0031x + 1$	0.9751	310	3.1
Cop-C8-4	12	$y = 0.0024x + 1$	0.9815	240	2.4
	24	$y = 0.0007x + 1$	0.9909	70	0.7
	36	$y = 0.0008x + 1$	0.9739	80	0.8
Cop-C8-6	12	$y = 0.0022x + 1$	0.9726	220	2.2
	24	$y = 0.0010x + 1$	0.9618	100	1.0
	36	$y = 0.0051x + 1$	0.9788	510	5.1
Cop-C8-8	12	$y = 0.0026x + 1$	0.9476	260	2.6
	24	$y = 0.0008x + 1$	0.9053	80	0.8
	36	$y = 0.0011x + 1$	0.9815	110	1.1

#### 2.4 8-烷基黄连碱衍生物与溶菌酶的作用力类型及结合位点数

8-烷基黄连碱衍生物与溶菌酶结合常数  $K$  以及结合位点数  $n$ <sup>[12]</sup> 如表 2 所示。

药物分子与蛋白质间的相互作用力主要有范德华力、静电引力、疏水作用力和氢键等几种类型。在温度变化不大的情况下, 根据热力学参数与作用力间的关系<sup>[13]</sup>: 当焓变  $H < 0$ 、熵变  $S > 0$  时, 为静电作用力; 当  $H < 0$ 、 $S < 0$  时为范德华力; 当  $H > 0$ 、 $S > 0$  时, 为疏水作用力。选用 12  $^\circ\text{C}$  和 24  $^\circ\text{C}$  时 8-烷基黄连碱衍生物计算吉布斯自由能

$G$ 、 $H$  和  $S$ , 结果如表 3 所示。吉布斯自由能  $G$  都小于 0, 说明反应都是自发地进行着。结合表 2,  $n \approx 1$ , 说明黄连碱衍生物与溶菌酶的作用位点只有 1 个色氨酸残基与药物相结合, 因静态猝灭形成的配合物比例为 1:1, 这也在一定程度上佐证了该反应的机理以静态猝灭为主。但 Cop-C8-8 在 24  $^\circ\text{C}$  时的结合常数为其余常数的 20 倍以上, 结合位点为 2 个, 说明在该条件下, Cop-C8-8 与蛋白质分子结合能力强于其他衍生物, 这与抑菌试验结果较为一致。

表 2 结合常数  $K$ 、结合位点数  $n$ Table 2 Calculated binding constant ( $K$ ), binding sites ( $n$ )

8-烷基黄连碱衍生物	$t/^\circ\text{C}$	线性方程	$R^2$	$K/\times 10^5$	$n$
Cop	12	$y = 0.8356x + 4.0808$	0.8335	0.120	0.8356
	24	$y = 1.1583x + 5.1011$	0.9666	1.262	1.1583
	36	$y = 0.9278x + 4.1489$	0.9582	0.140	0.9278
Cop-C8-4	12	$y = 1.0269x + 4.5416$	0.9443	0.348	1.0269
	24	$y = 1.2236x + 4.8877$	0.9490	0.772	1.2236
	36	$y = 1.4902x + 6.1951$	0.9460	15.671	1.4902
Cop-C8-6	12	$y = 0.8840x + 3.9146$	0.9437	0.082	0.8840
	24	$y = 1.4286x + 6.0112$	0.9680	10.261	1.4286
	36	$y = 1.2374x + 5.3325$	0.9058	2.150	1.2374
Cop-C8-8	12	$y = 1.2902x + 5.8345$	0.9729	6.831	1.2902
	24	$y = 1.7338x + 7.3184$	0.9669	206.300	1.7338
	36	$y = 0.9068x + 3.7395$	0.9260	0.054	0.9068

表 3 显示, 从 12  $^\circ\text{C}$  到 24  $^\circ\text{C}$ ,  $H$  大于 0, 这表明在温度变化过程中反应吸热, 升温有利于反应的进行, 同时  $S > 0$ , 证明了该反应是一个熵增加

的过程。由  $H > 0$ 、 $S > 0$ , 判断黄连碱衍生物与溶菌酶相互间的作用力为疏水作用力。

表3 12、24 °C下的吉布斯自由能  $\Delta G$ 、焓变  $\Delta H$ 与熵变  $\Delta S$

Table 3 Gibbs free energy ( $\Delta G$ ), enthalpy ( $\Delta H$ ) and entropy ( $\Delta S$ ) at 12 and 24 °C

8-烷基黄连碱 衍生物	$\Delta G/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$\Delta H/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$\Delta S/(\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1})$
Cop	- 22.280 4		
	- 29.023 0	137.94	561.88
Cop-C8-4	- 24.796 3		
	- 27.808 9	46.79	251.05
Cop-C8-6	- 21.373 0		
	- 34.201 0	283.46	1 069.02
Cop-C8-8	- 31.855 0		
	- 41.616 0	200.10	813.43

#### 4 结 论

黄连碱衍生物对溶菌酶的荧光猝灭作用既有动态猝灭又有静态猝灭,在温度较低时动态猝灭为主,而在温度较高时静态猝灭作用更明显。但从 Stern-Volmer 方程来看,几个小烷基黄连碱溶菌酶的荧光猝灭作用并没有一定的规律性,只是在 24、36 °C 时有 Cop-C8-6 的猝灭作用大于 Cop-C8-8, Cop-C8-4 的猝灭作用最弱,在 12 °C 时并无此规律;相反在紫外吸收图谱中,发现随着烷基链的增长,溶菌酶的紫外吸收逐渐降低,说明荧光猝灭还受到分子基团直径大小的影响。Cop-C8-8 在 24 °C 时结合常数得到大幅增加,结合位点也上升为 2 个,这说明 Cop-C8-8 在 24 °C 时能够显著改变溶菌酶的结构,使二者的结合更为容易,通过疏水作用力将黄连碱衍生物与溶菌酶结合起来,使得黄连碱衍生物在体内的分布以及生物利用度得到提高。

#### 参考文献:

[1] Yung H A ,Yoon N Y ,Bae H J ,et al .Inhibitory activities of the alkaloids from *Coptidis rhizoma* against aldose reductase[J] .Arch Pharm Res ,2008 ,31(11) :1405-1412 .  
[2] 杨勇,叶小利,李学刚.四种黄连生物碱的抑菌作用

[J].时珍国医国药,2007,18(12):3013-3014.

- [3] 崔凤灵,闫迎华,张强斋,等.同步荧光法测定生物样品中蛋白含量的研究[J].光谱学与光谱分析,2009(9):2531-2534.
- [4] 韩英强,罗登柏,詹国庆.血清蛋白与4,5-二溴荧光素相互作用及其分析应用的研究[J].氨基酸与生物资源,2003(1):35-36.
- [5] 张国文,陈秀霞,郭金报.荧光法研究橙皮苷、淫羊藿苷与溶菌酶的作用[J].光谱学与光谱分析,2009,29(1):184-187.
- [6] Jeffrey S N, John J R, Bruce S Z. Carboxyl terminal tyrosine, etabolism of alpha tubulin and changes in cell shape: Chinese Hamster Ovary cells[J]. Biochem Bioph Res Co, 1981, 100: 1642-1650.
- [7] 黄鹤勇,顾晓天,丁艳,等.荧光光谱法研究咖啡因与肌红蛋白的相互作用[J].光谱学与光谱分析,2009,29(10):1798-1802.
- [8] Chen Guozhen, Huang Xianzhi, Zheng Zhuzi, et al. The Methods of Fluorescence Analysis[M]. Second ed. Beijing: Science Press, 1990: 112-113.
- [9] Carter D C, Chang B, Ho J X, et al. Krishnassmi, preliminary crystallographic studies of four crystal forms of serum albumin[J]. Eur J Biochem, 1994, 226: 1049-1052.
- [10] 谭平,张友玉,文艳清,等.荧光猝灭法研究溶菌酶与白藜芦醇苷的相互作用[J].湖南师范大学自然科学学报,2009,32(1):92-96.
- [11] Lakowicz J R. Principles of Fluorescence Spectroscopy [M]. Second ed. New York: Plenum Press, 1999: 237-241.
- [12] Kang J, Liu Y, Xie M X, et al. Interactions of human serum albumin with chlorogenic acid and ferulic acid[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2004, 1674: 205-214.
- [13] Ross P D, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability[J]. Biochemistry, 1981, 20: 3096-3102.

责任编辑: 罗慧敏