

荧光光谱法结合分子对接研究人血清白蛋白 对齐墩果酸与熊果酸的异构体识别作用

韩忠保¹, 吴雨杭¹, 米媛媛¹, 刘丽艳^{1,2}, 苏桂田¹, 于湛^{1,2*}

1. 沈阳师范大学化学化工学院, 辽宁 沈阳 110034

2. 沈阳师范大学复杂体系分离与分析辽宁省高校重点实验室, 辽宁 沈阳 110034

摘要 五环三萜化合物齐墩果酸(OA)与熊果酸(UA)为同分异构体, 具有相似的理化性质和稍有差异的药理活性。目前人们主要采用各种色谱、质谱类方法实现对 OA 与 UA 的异构体识别, 未见使用荧光光谱法的报道。提出了一种使用荧光猝灭法实现对 OA 与 UA 异构体识别的方法。首先考察了两种常见的血清蛋白—牛血清白蛋白(BSA)与人血清白蛋白(HSA)同 OA 与 UA 的作用情况, 结果表明 OA 与 UA 均可有效地猝灭 BSA 与 HSA 的荧光发射。对所得荧光猝灭数据计算可知 OA, UA 与 BSA, HSA 作用的双分子猝灭速率常数(K_q)均远大于生物大分子荧光猝灭所观察到的最大散射碰撞速率常数 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{s})^{-1}$, 说明猝灭类型均为静态猝灭, 即 OA 与 UA 均是通过与 BSA 及 HSA 形成稳定复合物方式实现荧光猝灭的。应用双对数方程对所得荧光猝灭数据计算可知 OA, UA 与 BSA, HSA 所形成的复合物中结合位点数在 0.90~1.26 之间, 说明所形成的复合物为 1:1 型。BSA 与 OA, UA 所形成复合物的表观结合常数(K_A)为同一数量级, 相差不大, 但是 HSA 与 OA, UA 所形成复合物的 K_A 差别很大, HSA-UA 复合物的 K_A 比 HSA-OA 复合物高 124.91 倍, 表明 HSA-UA 复合物的稳定性更强。同步荧光实验结果显示, OA 与 UA 的加入对于 HSA 波长差($\Delta\lambda$)为 60 nm 同步荧光光谱的影响大于 $\Delta\lambda$ 为 15 nm 的同步荧光光谱, 由此可以说明 OA 与 UA 在 HSA 上的结合位点可能位于 Trp 残基附近。分子对接模拟计算结果表明 OA 与 UA 均对接在 HSA 结构中一个疏水性空腔中, 主客体之间存在强烈的氢键与疏水作用。OA 同 Arg218, His242, Pro447 等残基间存在氢键作用, 键长分别为 2.95, 2.97 与 3.17 Å, 此外还与 Lys195, Lys199, Trp214, Arg222, Leu238, Asp451 和 Tyr452 等七个氨基酸残基间存在疏水作用。UA 同 Trp214, Arg218 和 Lys444 等残基存在氢键作用, 键长分别为 3.01, 2.88 与 2.65 Å, 此外还与 Leu198, Gln221, Arg222, Asn295, Val343, Pro447, Cys448, Asp451 和 Val455 等 9 个氨基酸残基间存在疏水作用。由于 UA 同 HSA 作用位点数目多于 OA, 说明 UA 与 HSA 疏水性空腔的空间匹配程度更高。因此, 认为 HSA-UA 与 HSA-OA 复合物间稳定性差异是 HSA 实现对 OA 与 UA 异构体识别的原因。

关键词 人血清白蛋白; 齐墩果酸; 熊果酸; 异构体识别; 分子对接

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2019)07-2190-06

引言

齐墩果酸(oleanolic acid, OA)与熊果酸(ursolic acid, UA)同为五环三萜类化合物, 二者为同分异构体, 共同存在于多种植物中, 具有相似的理化性质和药理活性。已有研究

表明 OA 与 UA 对于不同类型肝损伤具有一定程度的修复作用^[1], 可抑制 NS5B 聚合酶剂具有抗丙肝病毒活性^[2]。但在面对某些病症时 OA 与 UA 表现出一定的活性差异, 例如在抑制革兰氏阳性菌活性时, UA 反馈的效果更为明显^[3]。因此, 对于 OA 与 UA 的识别在医学上具有积极意义。

人们大都采用各种色谱分离方法识别 OA 与 UA。Liu

收稿日期: 2018-04-19, 修订日期: 2018-09-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(21205080), 辽宁省高等学校优秀人才支持计划(LJQ2015105), 沈阳师范大学大学生创新创业项目(201710166210)资助

作者简介: 韩忠保, 1994 年生, 沈阳师范大学化学化工学院硕士研究生 e-mail: 781720336@qq.com

* 通讯联系人 e-mail: yuzhan@synu.edu.cn

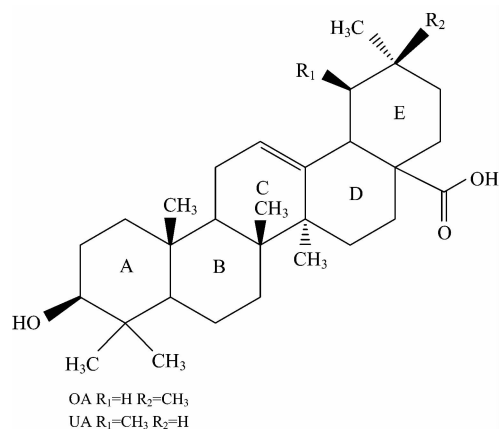


图 1 OA 与 UA 分子结构示意图

Fig. 1 Molecular structures of OA and UA

等^[4]采用胶束电动毛细管色谱法实现了 OA 与 UA 的区分, Gao 等^[5]采用毛细管区带电泳法实现了 OA 与 UA 的识别。此外 Janicsak 等^[6]采用了气相色谱法区分 OA 与 UA。但气相色谱法的测定条件较为苛刻, 因此人们大多转而采用高效液相色谱法(HPLC), 如 Kamatou 等^[7]通过 HPLC 法证明了 OA 和 UA 富含于鼠尾草中, Xu 等^[8]通过 RP-HPLC 法实现了枇杷叶片中 OA 与 UA 的定量检测。此外, 各种色谱-质谱联用技术^[9-11]也常用来进行 OA 与 UA 的区分或识别, 如于湛等^[12]通过质谱技术也实现了对 OA 与 UA 的识别。

本文使用荧光光谱法, 选用常见的两种血清蛋白—牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)与人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)作为识别试剂, 研究其对 OA 与 UA 的异构体识别。本文发现 OA 与 UA 对 HSA 的荧光猝灭程度不同, 所形成的复合物的稳定常数存在较大差异, 并通过分子对接技术推测了 HSA 与 OA 及 UA 所形成复合物的结构。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Cary Eclipse 型荧光光谱仪(美国 Varian 公司), LAMBDA 25 型紫外-可见光谱仪(美国 PE 公司), FE20K 型 pH 计(上海梅特勒托利多公司)。

BSA 购自美国 Sigma 公司, HSA 与三羟甲基氨基甲烷(Tris)购自美国 Amersco 公司, OA 与 UA 购于上海如吉生物技术有限公司, 其余试剂均购自国药集团化学试剂有限公司, 实验用水为二次去离子水。上述试剂均为分析纯或更高, 且在实验中未经预处理而直接使用。

1.2 样品准备

配制浓度均为 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 OA 与 UA 的乙醇溶液备用。使用 Tris, NaOH, HCl 与 NaCl 配制 pH 分别为 5.4, 6.4, 7.4, 8.4 与 9.4 的缓冲溶液并保证其中 Tris 与 NaCl 浓度均为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。BSA 与 HSA 使用上述缓冲溶液配置为 $5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液备用。

依次将 $20 \mu\text{L}$ BSA(或 HSA)储备液、 $1000 \mu\text{L}$ 缓冲溶液以

及适量的 OA(或 UA)储备液加入离心管中并使用去离子水定容至 $4000 \mu\text{L}$, 恒温水浴一定时间后, 立即测其荧光发射强度。

1.3 测试方法

荧光光谱仪设置如下, 激发波长 λ_{ex} 为 280 nm , 扫描范围为 $280 \sim 450 \text{ nm}$, 激发与发射狭缝宽度均为 5 nm 。同步荧光实验光谱仪设置如下: 扫描范围为 $200 \sim 350 \text{ nm}$, 激发与发射狭缝宽度均为 5 nm , $\Delta\lambda$ 分别为 15 与 60 nm 。

BSA 与 HSA 结构来自 RSCB 蛋白质数据库, 编号分别为 4F5S 与 1A06。OA 与 UA 的三维结构取自 PubChem 网站, 并通过 Avogadro 程序的 MMFF94^[13] 分子力场优化。本文使用 Autodock 4.2 程序^[14] 进行分子对接模拟。分子对接所需格子(Grid)采用边长为 12.6 nm 的立方体, 格子间隔为 0.0375 nm 。OA 与 UA 分子中可旋转的单键数量按照 AutoDock 默认值选取。采用 LGA 算法优化对接结果, 几个重要的参数设置如下: ga_pop_size 为 150 , ga_num_evals 为 2.5×10^7 , ga_run 为 300 , 其余参数均使用默认值。使用 Lig-Plot+ 程序分析主客体间的相互作用。

2 结果与讨论

2.1 溶液条件对荧光猝灭的影响

由于物质的荧光发射受溶液条件影响较大, 因此在荧光猝灭实验之前需要考察各种溶液条件对实验结果的影响。本文配制含有一定量的血清蛋白与猝灭剂(OA 或 UA)的混合溶液后, 分别置于生理温度($37 \text{ }^\circ\text{C}$)下水浴 $0, 10, 30, 60, 90$ 和 120 min , 随后立即测试其荧光强度, 结果显示随着水浴时间的延长, 血清蛋白的荧光发射均呈现下降随后稳定不变的趋势, 转折点均发生在 $10 \sim 30 \text{ min}$ 。考虑到水浴时间过短会导致血清蛋白与猝灭剂结合不充分, 而过长会增加蛋白质暴露在空气中被氧化的可能, 因此本文中水浴时间设置为 30 min 。

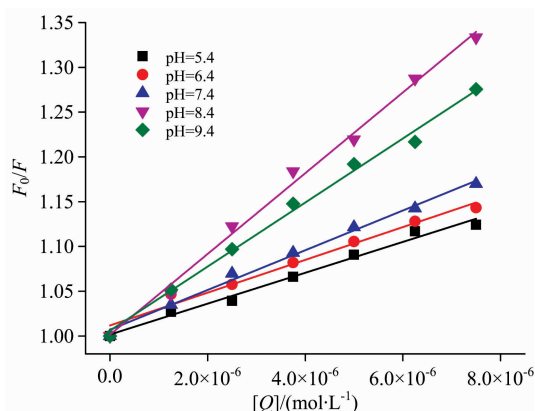


图 2 pH 对 UA 猝灭 BSA 的影响

Fig. 2 The effect of pH to the fluorescence quenching of BSA by the addition of UA

本文以 UA 猝灭 BSA 为例, 考察了 pH 对荧光猝灭的影响。图 2 为不同 pH 下, 不同浓度 UA 猝灭 $2.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot$

L^{-1} BSA 的 F_0/F (无猝灭剂与有猝灭存在时荧光物质发光强度之比) 对 $[Q]$ (猝灭剂浓度) 关系图。由图 2 可见, 在 pH 8.4 时 UA 对于 BSA 的猝灭效果最好, 这与类似报道的结论不同^[15-16]。一般认为, pH 7.4 时血清蛋白的结构最接近真实结构, 所形成的疏水性口袋具有最强的结合能力, 但本文实验结果显示高于 7.4 的 pH 更有利于 UA 猝灭 BSA, 我们推测这可能是由于 UA 体积较大, 当 BSA 在 $pH > 7.4$ 条件下发生部分变性, 松散的疏水空腔可以与 UA 的结合更强的缘故。当使用 HSA 与 OA 时, 所得实验结果相同, 因此后续实验中选择 pH 8.4。

2.2 荧光猝灭机理分析

猝灭剂对荧光物质激发波长或发射波长的吸收而产生的内滤效应会对实验结果产生一定影响, 可通过下述式(1)对荧光强度进行修正

$$F_{\text{corr}} = F_{\text{obs}} \times e^{(A_{\text{ex}} + A_{\text{em}})/2} \quad (1)$$

其中 F_{corr} 与 F_{obs} 为校正后与实验观察到的荧光强度, A_{ex} 与

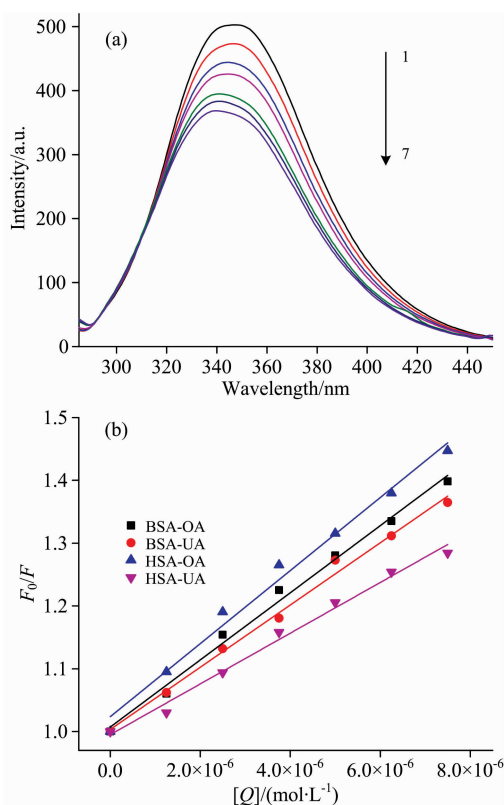


图 3 (a) 不同浓度 UA 存在时 BSA 的荧光猝灭情况; (b) OA, UA 与 BSA 或 HSA 结合的 Stern-Volmer 图

温度为 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$; pH 为 8.4; BSA 浓度为 $2.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 从 1→7, UA 浓度分别为 $0, 1.25 \times 10^{-6}, 2.50 \times 10^{-6}, 3.75 \times 10^{-6}, 5.00 \times 10^{-6}, 6.25 \times 10^{-6}$ 以及 $7.50 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig. 3 (a) The fluorescence quenching of BSA by different concentration of UA; (b) Stern-Volmer plots for the binding of BSA or HSA by OA or UA

Temperature is $37\text{ }^{\circ}\text{C}$; pH is 8.4; BSA concentration is $2.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; From 1 to 7, the concentration of UA is $0, 1.25 \times 10^{-6}, 2.50 \times 10^{-6}, 3.75 \times 10^{-6}, 5.00 \times 10^{-6}, 6.25 \times 10^{-6}$ and $7.50 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively

A_{em} 为溶液在发射波长与激发波长下的吸光度。

图 3(a) 给出了在温度为 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、pH 8.4 时, 校正内滤效应后 UA 对 BSA 的猝灭曲线。由图可见, 随着 UA 浓度的增加, BSA 的荧光发射明显减弱, 这表明了 BSA 与 UA 之间存在相互作用。当使用 UA 猝灭 HSA 或使用 OA 猝灭 BSA, HSA 时, 所得结果与上述类似。

为了探究猝灭剂对血清蛋白的猝灭机理, 本文采用 Stern-Volmer 方程(2)分析了 OA (或 UA) 猝灭 BSA (或 HSA) 的猝灭曲线, 所得结果见图 3(b) 与表 1。

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

式中: K_q 为双分子猝灭速率常数, τ_0 为生物大分子独立存在时的平均荧光寿命, $[Q]$ 为猝灭剂浓度。

表 1 OA, UA 与 BSA, HSA 的相互作用常数

Table 1 Binding constants of the interaction between OA or UA and BSA or HSA

荧光剂	猝灭剂	$K_q / [L \cdot (\text{mol} \cdot \text{s})^{-1}]$	$K_A / (L \cdot \text{mol}^{-1})$	n
BSA	OA	5.17×10^{12}	1.62×10^4	0.899 22
BSA	UA	4.94×10^{12}	4.79×10^4	0.995 23
HSA	OA	5.56×10^{12}	7.41×10^3	0.823 58
HSA	UA	4.04×10^{12}	9.33×10^5	1.260 68

由图 3 可见无论 OA 还是 UA, 其 F_0/F 对 $[Q]$ 均呈现良好的线性关系, 即猝灭剂的加入可促使血清蛋白荧光均匀地猝灭, 据此可初步判断猝灭剂与血清蛋白只存在一种结合类型。由于 K_q 值均在 $10^{12} \text{ L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{s})^{-1}$ 数量级, 远大于各类剂对生物大分子最大扩散控制的碰撞猝灭速率常数 $2.0 \times$

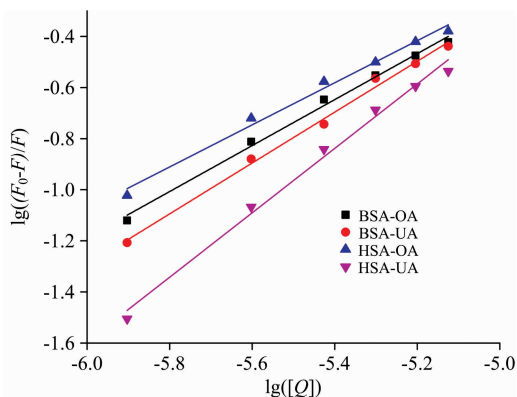


图 4 OA, UA 对 BSA 或 HSA 猝灭的 $\lg(F_0 - F)/F$ 和 $\lg[Q]$ 的关系图

温度为 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$; pH 为 8.4; BSA 浓度为 $2.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 从 1→7, UA 浓度分别为 $0, 1.25 \times 10^{-6}, 2.50 \times 10^{-6}, 3.75 \times 10^{-6}, 5.00 \times 10^{-6}, 6.25 \times 10^{-6}$ 以及 $7.50 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig. 4 Plot of $\lg(F_0 - F)/F$ versus $\lg[Q]$ of BSA or HSA quenched by OA or UA

Temperature is $37\text{ }^{\circ}\text{C}$; pH is 8.4; BSA concentration is $2.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; From 1 to 7, the concentration of UA is $0, 1.25 \times 10^{-6}, 2.50 \times 10^{-6}, 3.75 \times 10^{-6}, 5.00 \times 10^{-6}, 6.25 \times 10^{-6}$ and $7.50 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively

$10^{10} \text{ L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{s})^{-1}$, 因此说明 OA 或 UA 对 BSA 或 HSA 的荧光猝灭作用是静态猝灭, 即猝灭剂与荧光剂之间形成了稳定的复合物。

随后本文利用双对数方程^[17](3)分析了静态猝灭发生时猝灭剂与荧光剂的表现结合常数 K_A 及结合位点数 n , 所得结果见图 4 与表 1。

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

由表 1 中数据可以看出 OA 与 UA 都可与 BSA 或 HSA 形成 1:1 型复合物, 但是 K_A 值之间相差十分明显。BSA-OA 与 BSA-UA 复合物的 K_A 均处在相同的数量级, 但是

HSA-OA 与 HSA-UA 之间的 K_A 相差两个数量级, 由此可见 OA, UA 与 HSA 形成的复合物稳定性上存在明显差异, 即 HSA 可识别 OA 与 UA。

荧光猝灭法显示的 HSA 中所有的芳香性氨基酸荧光发射叠加结果, 可通过同步荧光光谱法检测 HSA 中 Trp 与 Tyr 残基受客体的影响情况, 考察客体对 HSA 构象的影响。当 $\Delta\lambda=60 \text{ nm}$ 时所得为 HSA 中 Trp 残基的同步荧光光谱; $\Delta\lambda=15 \text{ nm}$ 时所得为 HSA 中 Tyr 残基的同步荧光光谱, 见图 5。

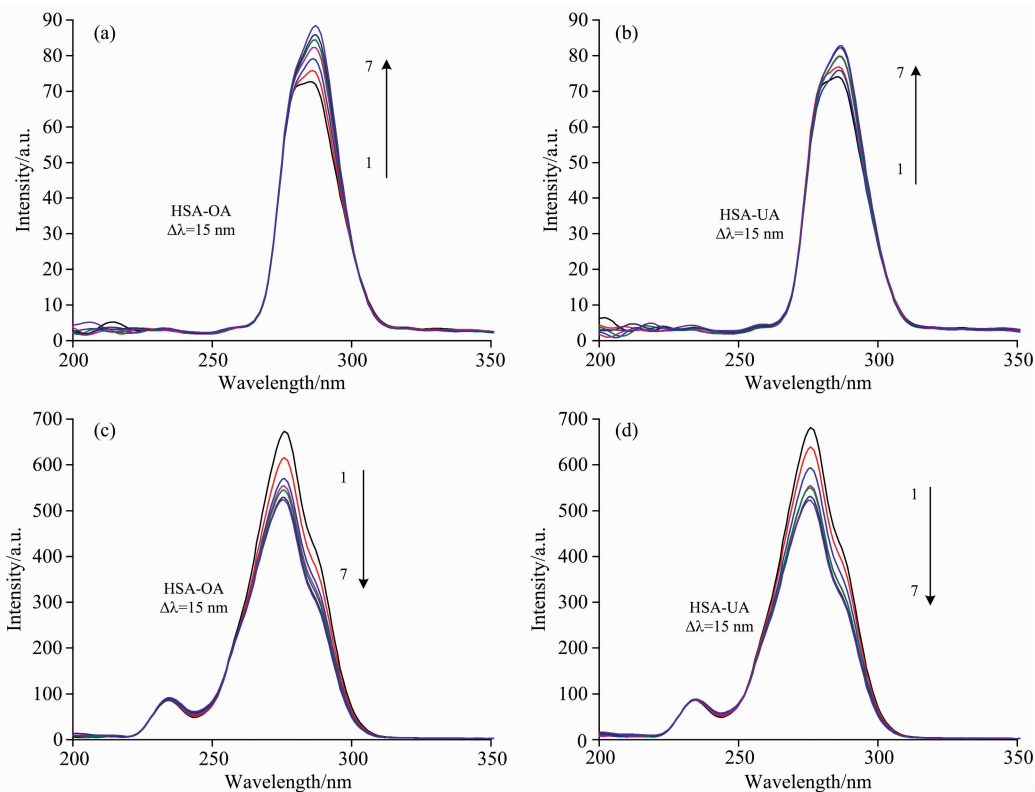


图 5 不同客体与 HSA 相互作用的同步荧光光谱图

(a) 客体为 OA, $\Delta\lambda=15 \text{ nm}$; (b) 客体为 UA, $\Delta\lambda=15 \text{ nm}$; (c) 客体为 OA, $\Delta\lambda=60 \text{ nm}$; (d) 客体为 UA, $\Delta\lambda=60 \text{ nm}$; 温度为 $37 \text{ }^\circ\text{C}$; pH 为 8.4; HSA 浓度为 $2.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 从 1→7, UA 浓度分别为 0, 1.25×10^{-6} , 2.50×10^{-6} , 3.75×10^{-6} , 5.00×10^{-6} , 6.25×10^{-6} 以及 $7.50 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig. 5 Synchronous fluorescence spectra for the interaction between HSA and different guests

(a) guset: OA, $\Delta\lambda=15 \text{ nm}$; (b) guset: UA, $\Delta\lambda=15 \text{ nm}$; (c) guset: OA, $\Delta\lambda=60 \text{ nm}$; (d) guset: UA, $\Delta\lambda=60 \text{ nm}$; Temperature is $37 \text{ }^\circ\text{C}$; pH is 8.4; BSA concentration is $2.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; From 1 to 7, the concentration of UA is 0, 1.25×10^{-6} , 2.50×10^{-6} , 3.75×10^{-6} , 5.00×10^{-6} , 6.25×10^{-6} and $7.50 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively

当 $\Delta\lambda=15 \text{ nm}$ 时, 可以观察到 HSA 的荧光发射强度随着 OA 与 UA 浓度的增加而增强, 这由于 OA 与 UA 自身所产生的荧光与 HSA 荧光发射叠加的结果。当 $\Delta\lambda=60 \text{ nm}$ 时, HSA 的荧光发射强度随着 OA 与 UA 浓度增加而呈现明显的下降, 显示 OA, UA 与 HSA 的结合对于其 Trp 残基的微环境存在明显的影响, 其结合位点可能位于 Trp 残基附近。

2.3 分子对接分析

利用 AutoDock 软件对 OA, UA 与 HSA 所形成复合物

的结构进行了模拟研究, 考察 HSA 对 OA 与 UA 的识别机理。图 6 给出了 HSA-OA 与 HSA-UA 能量最低分子对接结果中主客体间相互作用情况。由图可见, OA 与 UA 均对接在 HSA 结构中一个疏水性空腔中, 主客体之间存在氢键与疏水作用。OA 同 Arg218, His242, Pro447 等残基间存在氢键作用, 键长依次为 2.95, 2.97 与 3.17 Å, 此外还与 7 个氨基酸残基间存在疏水作用; UA 同 Trp214, Arg218, Lys444 残基间存在氢键作用, 键长依次为 3.01, 2.88 与 2.65 Å, 此

外还与 9 个氨基酸残基间存在疏水作用。由于 UA 同 HSA 作用位点数多于 OA, 说明 UA 与 HSA 疏水性空腔的空间

匹配度更高, 从而印证了 HSA-UA 复合物的稳定常数大于 HSA-OA。

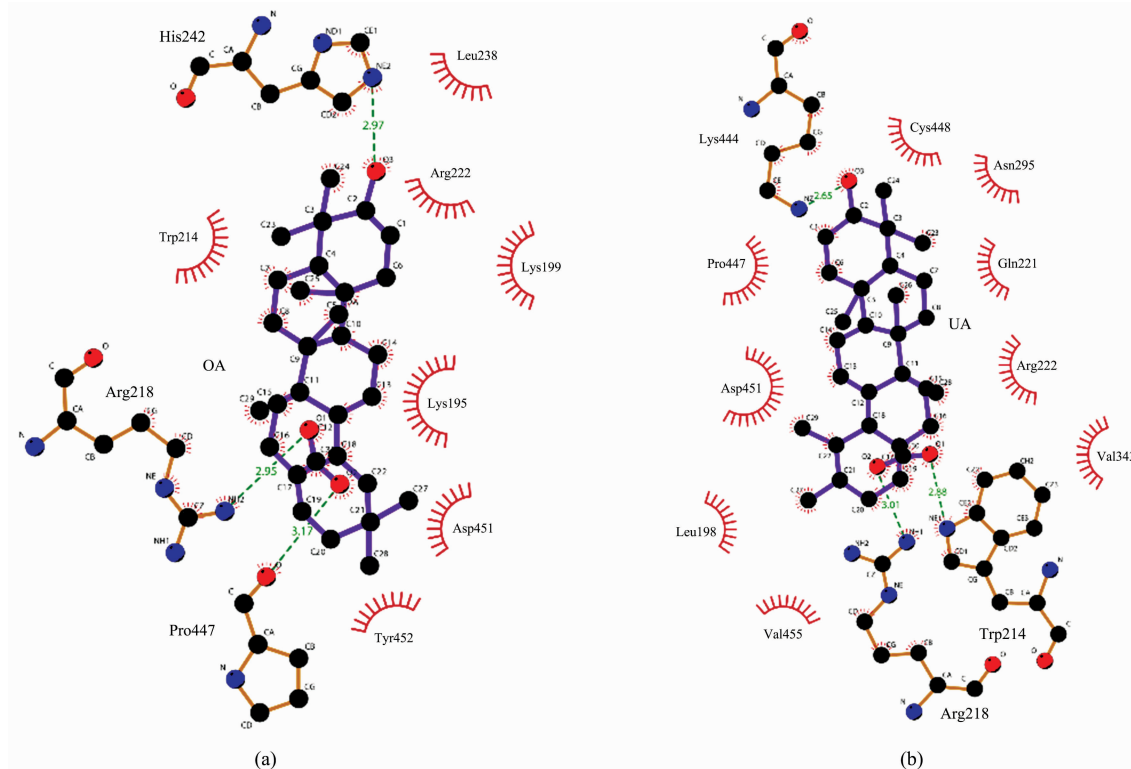


图 6 HSA 中氨基酸残基与 OA(a) 及 UA(b) 相互作用情况

虚线为氢键, 线上数字为原子间距离(单位 Å); 放射状圆弧表示疏水作用

Fig. 6 Molecular contacts between the amino acid residues of HSA with OA (a) or UA (b)

Hydrogen bonds are dashed lines with indicated distances (in Å); Residues in hydrophobic contact with Cy are represented by semicircles with radiating spokes

3 结论

通过荧光猝灭法结合分子对接研究了 BSA 与 HSA 对 OA 与 UA 的异构体识别作用。实验表明在水浴温度为 37 °C、水浴时间为 30 min, pH 为 8.4 的条件下, OA 与 UA 对 BSA 及 HSA 都具有明显的猝灭作用。进一步研究表明 OA 与 UA 猝灭 BSA 与 HSA 均为静态猝灭, 是通过形成 1 : 1

型复合物实现荧光猝灭。实验结果表明 BSA-OA 与 BSA-UA 复合物的稳定常数在同一数量级, 而 HSA-OA 与 HSA-UA 的稳定常数之间相差两个数量级, 显示 HSA 对于 OA 与 UA 具有一定的识别能力。同步荧光光谱数据显示 OA 与 UA 均结合在 HSA 的 Trp214 残基附近。分子对接研究结果表明, 促使形成 HSA-OA 与 HSA-UA 复合物形成的驱动力是氢键与疏水作用, 而且 UA 与 HSA 的结合要强于 OA, 这可能是 UA 与 HSA 所形成复合物具有更大稳定常数的原因。

References

- [1] Liu J. Journal of Ethnopharmacology, 1995, 49(2): 57.
- [2] Kong L, Li S, Liao Q, et al. Antiviral Research, 2013, 98(1): 44.
- [3] Fontanay S, Grare M, Mayer J, et al. Journal of Ethnopharmacology, 2008, 120(2): 272.
- [4] Liu H, Shi Y, Wang D, et al. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2003, 32(3): 479.
- [5] Gao R, Wang L, Yang Y, et al. Biomedical Chromatography, 2015, 29(3): 402.
- [6] Janicsák G, Veres K, Kállai M, et al. Chromatographia, 2003, 58(5-6): 295.
- [7] Kamatou G P P, Viljoen A M, Sleenkamp P. Food Chemistry, 2010, 119(2): 684.
- [8] Xu X H, Su Q, Zang Z H. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2012, 2(3): 238.
- [9] Chen Q, Zhang Y, Zhang W, et al. Biomedical Chromatography: BMC, 2011, 25(12): 1381.
- [10] Huang L, Chen T, Ye Z, et al. Journal of Mass Spectrometry, 2007, 42(7): 910.

- [11] Caligiani A, Malavasi G, Palla G, et al. *Food Chemistry*, 2013, 136(2): 735.
- [12] Yu Z, Cui M, Yan C, et al. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2007, 21(5): 683.
- [13] Hanwell M D, Curtis D E, Lonie D C, et al. *Journal of Cheminformatics*, 2012, 4(1): 17.
- [14] Morris G M, Huey R, Lindstrom W, et al. *Journal of Computational Chemistry*, 2009, 30(16): 2785.
- [15] WU Yu-hang, HAN Zhong-bao, MA Jia-ze, et al(吴雨杭, 韩忠保, 马嘉泽, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2016, 36(3): 765.
- [16] MA Jia-ze, HE Yan, LIU Li-yan, et al(马嘉泽, 何妍, 刘丽艳, 等). *Chinese Journal of Analysis Laboratory(分析实验室)*, 2016, 35(12): 1365.
- [17] Kandagal P B, Shaikh S M T, Manjunatha D H, et al. *Journal of Photochemistry & Photobiology A Chemistry*, 2007, 189(1): 121.

Isomeric Discrimination of Oleanolic and Ursolic Acids by Human Serum Albumin: a Joint Study of Fluorescence Spectroscopy and Molecular Docking

HAN Zhong-bao¹, WU Yu-hang¹, MI Yuan-yuan¹, LIU Li-yan^{1,2}, SU Gui-tian¹, YU Zhan^{1,2*}

1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Shenyang Normal University, Shenyang 110034, China

2. Provincial Key Laboratory for Separation and Analysis of Complex Systems in Liaoning Universities, Shenyang Normal University, Shenyang 110034, China

Abstract Oleanolic acid (OA) and ursolic acid(UA) are isomeric pentacyclic triterpenoid compounds, which share the similar physical and chemical properties but a little bit different pharmacological activity. At present, various chromatography and mass spectrometry methods have been used to discriminate OA and UA isomerically, but there seems no fluorescence spectroscopy-based method reported. This paper presents a method for the identification of OA and UA isomers using fluorescence quenching. Firstly, two common serum albumins, bovine serum albumin (BSA) and human serum albumin (HSA), interacting with OA and UA are examined, respectively. Experimental result shows that OA and UA can effectively quench fluorescence emission of BSA and HSA. The result of obtained fluorescence quenching data shows the bi-molecular quenching constants of BSA (or HSA) and OA (or UA) are much higher than the maximum scatter collision-quenching rate constant generally observed for any quencher against biopolymer ($2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{s})^{-1}$), indicating the type of quenching is static quenching, namely, OA and UA can form stable complexes with BSA and HSA. Double logarithm equation was also applied to the fluorescence quenching data and binding site numbers of the complexes formed by OA or UA and BSA or HSA are obtained between 0.90 and 1.26, indicating all complexes are 1 : 1 type. The apparent binding constants (K_A) of BSA-OA and BSA-UA complexes are at the same order of magnitude, but those of HSA-OA and HSA-UA are very different. The K_A of HSA-UA is 124.91 times higher than that of HSA-OA, indicating HSA-UA has much higher stability. Synchronous fluorescence experimental result shows that the spectrum at 60 nm wavelength difference ($\Delta\lambda$) can be quenched more effectively than that of 15 nm $\Delta\lambda$ alongwith the addition of OA and UA, showing the binding sites of OA and UA at HSA may be close to Trp residues. The results of molecular docking simulation show that both OA and UA are docked at a hydrophobic cavity in HSA, and there is strong hydrogen bonding and hydrophobic effect between the host and the guest. In addition, three hydrogen bonding interaction are found between OA and Arg218, His242 and Pro447 residues of HSA with bond lengths of 2.95, 2.97 and 3.17 Å, respectively. There are seven amino acid residues of HSA that has hydrophobic effect with OA including Lys195, Lys199, Trp214, Arg222, Leu238, Asp451 and Tyr452. Whereas UA forms three hydrogen bonds with Trp214, Arg218 and Lys444 residues of HSA with bond length of 3.01, 2.88 and 2.65 Å, respectively. Nine amino acid residues including Leu198, Gln221, Arg222, Asn295, Val343, Pro447, Cys448, Asp451 and Val455 have hydrophobic effect with UA. Since UA has stronger hydrogen bonding and more hydrophobic effect with HSA, it is more spatially fitted to the HSA's hydrophobic cavity. Thus, according to the fluorescence spectral data and molecular docking results, the stability difference of HSA-OA and HSA-UA may be responsible for discrimination of OA and UA isomers.

Keywords Human serum albumin; Oleanolic acid; Ursolic acid; Isomeric discrimination; Molecular docking

* Corresponding author

(Received Apr. 19, 2018; accepted Sep. 11, 2018)