

远红外陶瓷粉对精油与BSA相互作用的影响

黄芳¹, 刘明学^{1,2*}, 熊杰¹, 陈律奇¹, 高竹欣¹, 陈慧明¹, 王丹妮¹

1. 西南科技大学生命科学与工程学院, 四川 绵阳 621010

2. 核废物与环境安全省部共建协同创新中心, 四川 绵阳 621010

摘要 精油和远红外陶瓷粉(cFIR)经常用于理疗或相关的保健产品,但其与生物分子间的相互作用及其机制较少被关注。在模拟生理条件下,采用光谱法与红外热成像技术,研究了cFIR对玫瑰精油(REO)与牛血清蛋白(BSA)之间相互作用的影响及其机制。荧光光谱表明,REO与cFIR均能猝灭BSA的内源性荧光;无论cFIR是否存在,REO对BSA的猝灭方式均为静态猝灭;Stern-Volmer方程拟合计算结果表明加入cFIR,使BSA与REO之间的结合位点数由0.55提高到0.96,结合常数也显著提高,说明cFIR的存在能提高REO对BSA的亲合力,且二者与BSA之间存在强有效的作用力;利用同步荧光光谱、三维荧光光谱和红外光谱探究了cFIR与REO对BSA二级结构的影响,结果表明两者会引起蛋白质周围疏水性的增加,对BSA的构象有一定的影响;另外两者主要通过形成缔合物的方式对蛋白质的内源性荧光产生影响并具有协同作用;利用Förster非辐射能量转移理论计算临界能量转移距离 R_0 和结合距离 r ,cFIR加入前后BSA与REO之间的结合距离 r 由1.445 nm变为1.453 nm, R_0 基本不变,且 $R_0 < r$,表明无论cFIR是否存在,REO对BSA荧光静态猝灭的同时也伴随着非辐射能量转移;另外,cFIR与REO在BSA的不同部位存在非竞争性结合位点,cFIR主要是通过改变BSA的构象提高精油对BSA的亲合力。采用红外热成像技术方法分析了REO和cFIR与大分子的相互作用。通过对红外热成像图的分析,表明REO可使生物分子的温度降低,而cFIR可使生物分子温度升高;另外,cFIR的加入会提高BSA-REO体系响应的温度,即热效应会增加($p < 0.05$)。以上结果表明具有纳米尺寸效应和远红外射线辐射的纳米红外线陶瓷粉,在与精油共同作用于生物分子时,可通过形成缔合物影响体系的微环境,从而影响荧光特征与能量传递。研究结果可为精油结合远红外材料在理疗上的进一步应用及机理研究提供参考。

关键词 牛血清白蛋白;远红外陶瓷粉;精油;荧光光谱;红外热成像;理疗

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2020)08-2358-08

引言

远红外是一种电磁辐射,因人体的红外吸收能量处于远红外波长范围之内,远红外材料能够对人体细胞产生较强的共振作用。远红外材料,作为广泛可用的功能材料,在医疗保健上受到关注。研究表明远红外辐射能增加生物活性,利用此性能可以进行理疗(如热桑拿)或制作各种保健产品(如远红外热灯、红外保健织物、热敷袋等),可增强相关功效^[1-2]。

精油因具有抗炎和抗氧化等多种生物活性而被越来越多

地用于医疗保健、美容等领域,被誉为“液体黄金”。利用精油的挥发性,通过嗅吸和皮肤渗透^[3]而产生明显的心理、生理反应,从而达到医疗保健、美容的目的。

远红外材料结合精油的医疗保健方式受到广泛的关注。在李云平等^[4]的研究中,利用远红外线照射结合精油按摩的方式可提高疗效。另外,市面上也有将精油添加到远红外材料制品中制成的各种理疗贴如远红外磁疗贴、远红外艾灸贴等。但未见远红外材料对精油与牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)相互作用影响的报道。研究远红外材料对具有生物活性的精油小分子与生物大分子的相互作用,阐述两者相互作用在医疗保健上的作用机制,具有一定的理论与应

收稿日期: 2019-12-09, 修订日期: 2020-04-17

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973)项目(2014CB846003), 国家自然科学基金项目(41272371), 西南科技大学龙山人才计划项目(18LZX507)资助

作者简介: 黄芳,女,1999年生,西南科技大学生命科学与工程学院本科生 e-mail: huangfang299615@163.com

* 通讯联系人 e-mail: liumingxue@swust.edu.cn

用价值。

小分子与大分子相互作用的研究除了光谱法,有些还会结合各种色谱、电化学以及分子对接等方法探究其机理,但用红外热成像技术研究小分子与 BSA 大分子作用的文章还鲜有报道。利用此技术,可以全面、整体、动态地采集和分析物体的温度信息,评价能量辐射的状况^[5]。如文建等^[6]利用红外热成像观察光子贴的疗效,发现红外热成像对光子理疗贴联合合法治疗慢性膝痛的疗效评价具有很好的临床应用价值。

目前,国内外对于精油小分子或纳米材料作用于 BSA 的研究有相关报道^[7-8],但两者结合以及使用具有远红外射线辐射效应的纳米材料的研究未见报道。鉴于此,选用常见的远红外辐射材料——远红外陶瓷粉(far-infrared ceramic powder, cFIR),利用光谱法及红外热成像技术研究 cFIR 对玫瑰精油(rose essential oil, REO)与 BSA 相互作用的影响及其作用机制,为远红外材料结合精油的理疗研究及应用提供相关的科学基础。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

荧光分光光度计(F-7000,日本日立公司);钠灯(上海亚明照明有限公司);红外成像仪(TiS20,福禄克公司);傅里叶变换红外吸收光谱仪(Nicolet5700,美国热电仪器公司);紫外分光光度计(U-3900H,天美科学仪器有限公司)。

玫瑰护理精油(广州美颂生物科技有限公司);普通陶瓷粉(common ceramic powder, CCP)、远红外陶瓷粉(茂川矿业);BSA(阿拉丁试剂股份有限公司),纯度>98%;其余所用试剂均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司;实验用水为去离子水。

1.2 溶液的配制

准确称取 10.0 mg 远红外陶瓷粉,溶解在 10.0 mL 无水乙醇中,使用封口膜密封后超声 1 h 后,用 0.5 mol·L⁻¹ pH 为 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液配制成 0.1 mg·mL⁻¹ 的 cFIR 悬浊液;CCP 悬浊液的配制方法同 cFIR;准确称取 0.5 g 玫瑰精油,用丙二醇定容至 10.0 mL,配制成 0.05 g·mL⁻¹ 的精油悬浊液;准确称取 165.4 mg BSA,用 Tris-HCl 定容至 50.0 mL,配制成 5.0×10⁻⁵ mol·L⁻¹ 的 BSA 储备液,保存备用。

1.3 方法

1.3.1 荧光光谱、同步光谱的测定

准确移取浓度为 5.0×10⁻⁶ mol·L⁻¹ 的 BSA 溶液 3.0 mL 于比色管中,逐次加入 5.0 μL 的 REO 悬浊液,即为 BSA-REO 二元体系,依次测定荧光光谱。在另一组实验中,先逐次加入 5.0 μL 的 cFIR 悬浊液,依次测定;之后,向二元体系中逐次加入 5.0 μL 的 Oil 悬浊液,即为(BSA-cFIR)-REO 三元体系,依次测定。在测试 CCP 对 REO 与 BSA 相互作用影响的荧光光谱时,只需将 cFIR 换成 CCP 即可,其余相同。

在荧光分光光谱的扫描中,参数设置为:激发波长 λ_{ex} 为 280 nm,扫描范围为 200~550 nm,扫描速度为 240 nm·

min⁻¹,狭缝宽度为 5 nm。

同步荧光光谱的扫描中,Δλ=15 nm 与 Δλ=60 nm 对应的起始发射波长分别为 255 和 300 nm,激发波长范围均为 240~340 nm。

1.3.2 三维荧光光谱的测定

在荧光分光光度计中测试常温条件下 cFIR 和 REO 与 BSA 相互作用时的三维光谱;参数设置为:激发波长 λ_{ex} 为 200~450 nm,发射波长 200~500 nm,扫描速度 1 200 nm·min⁻¹,扫描间距为 5 nm,狭缝宽度为 5 nm。在 BSA 体系中逐次加入 5.0 μL REO 和 5.0 μL cFIR,共 5 次。

1.3.3 红外光谱的测定

室温下测定不同体系的傅里叶变换红外光谱(FTIR),分辨率为 4 cm⁻¹,扫描范围为 4 000~400 cm⁻¹;将样品均匀地铺满 KBr 晶片,扫描样品光谱;用 Omnic 和 Peakfit 软件进行处理。

1.3.4 红外成像的测定

用面膜模拟人的皮肤来测试红外响应温度变化。将面膜剪成大小近似的小块,晾干;然后将面膜放在不同的体系的离心管中,一段时间后取出来,晾干。在 10 cm 附近设钠灯照射,用红外成像仪测定在钠灯照射下不同面膜的响应温度。将红外成像仪设为自动模式,每 5 s 捕捉一张,一次设置捕捉 30 张,在不同时间段重复实验,得到 180 组数据,用单因素方差分析的方法对数据进行分析。

2 结果与讨论

2.1 不同体系的荧光光谱分析

图 1 给出了陶瓷粉和精油对 BSA 猝灭曲线。荧光猝灭是由于猝灭剂与生色基团的相互接触而引起的荧光量子产率下降^[9]。猝灭剂对蛋白质的荧光猝灭分为静态猝灭、动态猝灭。动态猝灭主要是由分子扩散引起,静态猝灭主要是由于分子间相互作用形成复合物引起。由图 1 可知,在激发波长为 280 nm 的条件下,BSA 最大荧光峰出现在 340 nm 左右。REO 和 cFIR 与 BSA 作用的体系中,随着猝灭剂的不断加入,荧光强度逐渐下降,峰形也出现了略微的蓝移;表明陶瓷粉和精油与 BSA 间发生了相互作用与能量转移,使 BSA 的内源性荧光发生了猝灭。而 CCP-REO 与 BSA 作用的体系,荧光强度也下降,说明与 BSA 也发生了相互作用,但并不规律。因此,在后续的研究中主要对 cFIR-REO 进行探讨。

假设远红外陶瓷粉和/或精油与 BSA 作用的机制为动态猝灭,利用 Stern-Volmer 方程(1)对不同体系的猝灭情况进行计算,将结果列于表 1 中。

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

在式(1)中, F₀ 和 F 分别代表未加入猝灭剂和加入猝灭剂时蛋白质的荧光强度, K_{sv} 为 Stern-Volmer 荧光猝灭常数; K_q 为动态猝灭速率常数; [Q] 为所加猝灭剂的浓度; τ₀ 为不存在猝灭剂的情况下大分子物质生物体内的内源荧光寿命(τ₀≈10⁻⁸ s)。

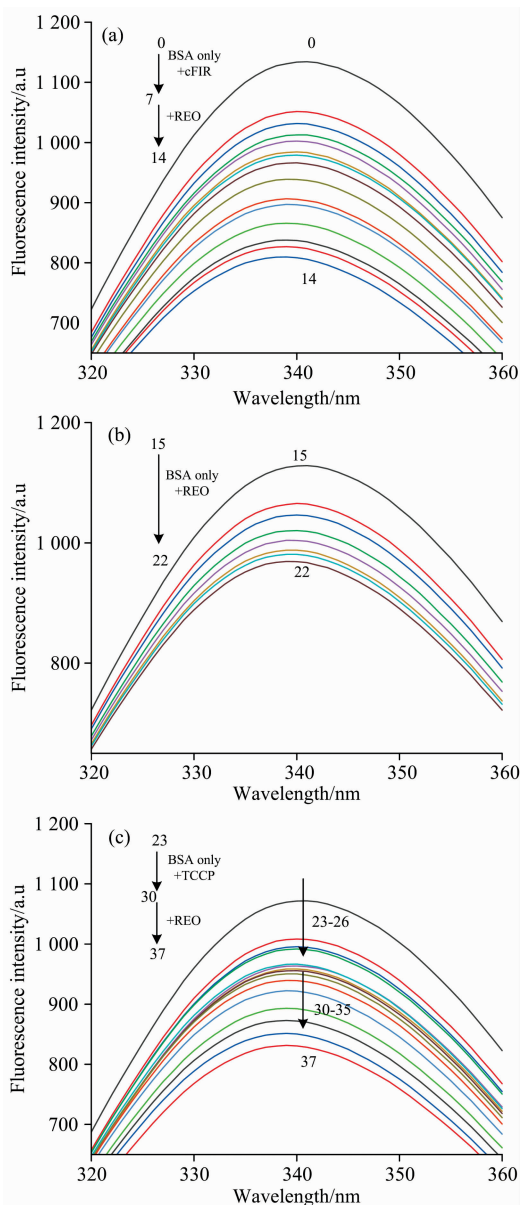


图 1 不同体系与 BSA 作用的荧光淬灭曲线

Fig. 1 Fluorescent quenching curves of BSA in different systems

(a); (BSA-cFIR)-REO; (b); BSA-REO; (c); (BSA-CCP)-REO;
 (0—14): $c_{(\text{BSA})} = 5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{(\text{cFIR/CCP})}$ (0—7): (0, 0.19, 0.38, 0.57, 0.76, 0.95, 1.14, 1.33) $\times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$
 (8—14): $c_{(\text{REO})} = (0.19, 0.38, 0.57, 0.76, 0.95, 1.14, 1.33) \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$
 (15—22): $c_{(\text{BSA})} = 5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{(\text{REO})}$ (15—22): (0, 0.19, 0.38, 0.57, 0.76, 0.95, 1.14, 1.33) $\times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

表 1 二元/三元体系的 Stern-Volmer 常数

Table 1 Stern-Volmer constants in binary/ternary systems

体系	$10^4 K_{\text{SV}} / (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$10^{12} K_q / (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	相关系数 R^2
BSA-Oil	0.140 98	0.140 98	0.999 57
(BSA-cFIR)-Oil	0.152 63	0.152 63	0.999 97

据报道, 各类荧光猝灭剂对生物大分子的最大动态猝灭速率常数为 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [7]; 由表 1 可知, 两个体系的动态猝灭常数均大于最大值, 故判断 cFIR-REO 与 REO 对 BSA 的猝灭机制均为静态猝灭。其中 REO 的猝灭机制与 Leila 等[8]研究的百里香酚相似; 另外, Sekar 等[10]证明挥发油纳米乳共轭物、Riaz 等[11]证明蓖麻油聚氨酯纳米复合材料对蛋白质的猝灭机制为静态猝灭。

2.2 结合位点数 n 与表观结合常数 K_a

对于静态猝灭方式, 不同体系的结合位点数 n 与结合常数都可由静态猝灭双对数式(2)计算。将结果列于表 2 中。

$$\lg[(F_0 - F)]/F = n \lg[Q] + \lg K_a \quad (2)$$

表 2 不同体系下的结合位点数 n 、结合常数 K_a

Table 2 The binding site number n and the binding constant K_a of different system

体系	n	$K_a / (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	相关系数 R^2
BSA-REO	0.550 28	22.438	0.992 41
(BSA-cFIR)-REO	0.966 93	1 096.478	0.986 7

由表 2 可知, 在 cFIR 的参与下, REO 与 BSA 相互作用的结合位点数 n 与结合常数 K_a 明显提高。两个体系的结合位点数分别与百里香酚[8]、挥发油纳米乳[10]类似。在三元体系中, n 的值近似为 1, 说明 BSA 在 cFIR 和 REO 上存在一个有效结合位点; 另外, 结合常数达到了 $10^3 (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$ 以上, 进一步说明二者与 BSA 之间存在强有效的作用力, cFIR 的存在可促进 REO 与 BSA 的结合, 其可能是 REO 与 cFIR 之间存在协同作用, 使得与 BSA 作用时结合常数增大。

2.3 cFIR-REO 对 BSA 构象的影响

2.3.1 同步荧光光谱分析

因同步荧光光谱具有简单、避免扰动等优点常用来研究蛋白质的构象变化。荧光峰的位置与蛋白质的构象相关, 极性的变化常常引起最大吸收波长的变化, 若发生红移, 则说明氨基酸周围极性增大, 反之减小。当激发波长和发射波长之间的 $\Delta\lambda$ 设置为 15 和 60 nm 时, 同步荧光光谱给出了 Tyr 和 Trp 残基的特征信息[10]。(BSA-cFIR)-REO 体系的同步荧光光谱如图 2 所示。

由图 2 可以看出, 在 (BSA-cFIR)-REO 体系中, Trp 和 Tyr 的荧光强度都降低, Trp 荧光峰规律性的下降, 而 Tyr 在只加 cFIR 时逐渐减低, 继续加入 REO 后则无梯度规律性; 另外, Trp 的最大吸收峰出现了轻微的蓝移, 而 Tyr 的荧光峰几乎没有移动, 且 Trp 猝灭程度大于 Tyr, 说明 REO 和 cFIR 与 BSA 的结合更偏向色氨酸残基, 使 Trp 周围的极性降低, 疏水性增加, 导致 BSA 构象发生略微的变化。同步荧光光谱的说明 cFIR 的加入会使 BSA 的 Trp 暴露在一个相对疏水的环境。Trp 的行为与 Mahanthappa 等[7]研究的纳米硫化铜、Riaz 等[11]研究的两亲性材料类似。

2.3.2 三维荧光光谱分析

三维荧光光谱常用来揭示小分子对蛋白质构象的影响。为了进一步探究 cFIR 和 REO 与 BSA 作用的影响, 测定了

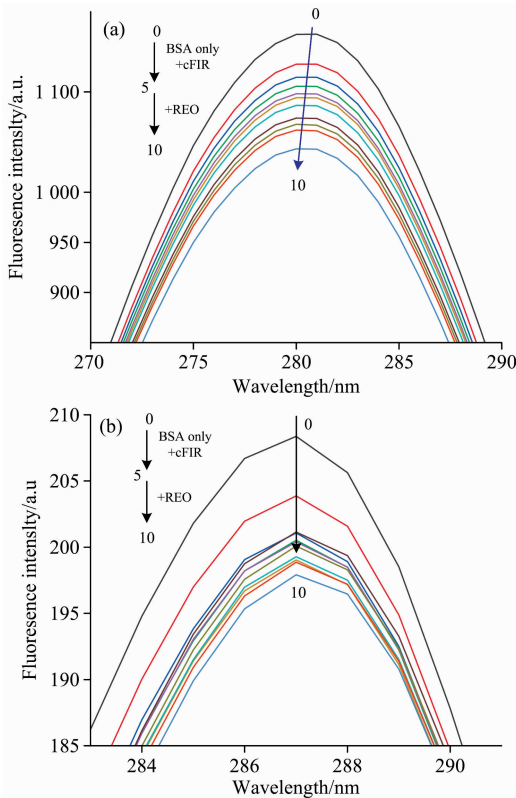


图 2 (BSA-cFIR)-REO 同步荧光光谱

Fig. 2 (BSA-cFIR)-REO synchronous fluorescence spectrum

(a): $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$; (b): $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$

$c_{\text{BSA}} = 5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{cFIR}} (0-5)$: (0, 0.19, 0.38, 0.57, 0.76, 0.95) $\times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{REO}} (6-10)$: (0, 0.19, 0.38, 0.57, 0.76, 0.95) $\times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

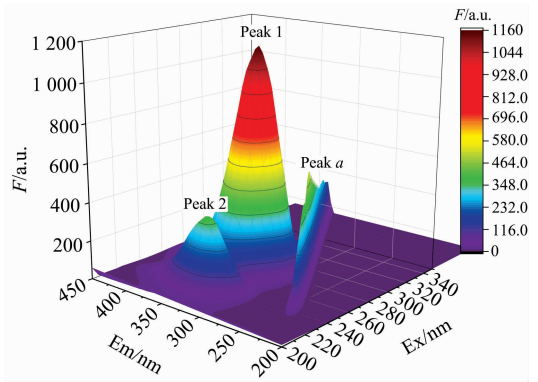


图 3 BSA 的三维荧光光谱图

Fig. 3 Three-dimensional fluorescence spectrum of BSA

BSA-REO-cFIR 体系的三维荧光光谱图。BSA 的三维荧光图见图 3。将所有体系的三维荧光光谱特征参数列于表 3 中。

Peak a 主要代表瑞利散射峰，常用来表示大分子直径的变化。由表 3 可知随着 REO 和 cFIR 的不断加入 Peak a 的强度不断增强，说明两者与 BSA 相互作用形成了缔合物，缔合物使体系的摩尔质量增大，导致瑞利光散射增强而内源性荧光降低^[7]。

Peak 1 代表 Tyr 和 Trp 的荧光特征峰，其变化主要与氨基酸周围极性的改变有关；Peak 2 是 BSA 多肽骨架结构的荧光光谱特征峰，该峰是由多肽骨架发生 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁引起的，其变化与 BSA 二级结构的改变有关^[7]；由表 3 可知，Peak 1 和 Peak 2 的荧光强度随着猝灭剂的加入在一定程度上都在不断降低，且 Peak 2 伴随轻微蓝移，说明了 BSA 与 cFIR 和 REO 结合后多肽骨架受到影响，疏水性增强，以至 BSA 二级结构发生略微的变化。该结论与同步荧光光谱一致。

表 3 不同体系中的三维荧光光谱特征参数

Table 3 Characteristic parameters of three-dimensional fluorescence spectra of different systems

体系	Peak 1			Peak 2			Peak a		
	λ_{ex}	λ_{em}	F/a. u	λ_{ex}	λ_{em}	F/a. u	λ_{ex}	λ_{em}	F/a. u
BSA	280	340	1 156	235	342	374.1	295	295	521.1
BSA-5 μL REO-5 μL cFIR	280	340	1 074.7	235	340	358.5	300	300	713.5
BSA-10 μL REO-10 μL cFIR	280	340	1 029.2	235	340	344.7	300	300	947.1
BSA-15 μL REO-15 μL cFIR	280	340	1 010.9	235	340	345.9	300	300	1 135.3
BSA-20 μL REO-20 μL cFIR	280	340	993.6	235	340	341.3	300	300	1 326.7
BSA-25 μL REO-25 μL cFIR	280	340	983.9	235	340	338.1	300	300	1 530.3

Campana 等^[12]利用中子反射的研究观察到 BSA 在油水界面有更高的吸附作用，提出在疏水性较强的界面处，蛋白质的吸附性更高的结论。这一结论为该结果提供一定的论据，说明加入 cFIR 后，使蛋白质处在相对疏水的环境，该环境更利于 REO 与 BSA 的结合。

2.3.3 傅里叶变换红外光谱分析

傅里叶变换红外光谱是定量研究蛋白质二级结构的有力工具，通过谱图可以考察 BSA 的构象变化，其中酰胺 I 带 (1 700~1 600 cm^{-1}) 的研究最有价值。酰胺 I 带主要是

C=O 键的伸缩振动，由于羰基和氨基形成的氢键与蛋白质二级结构密切相关，因此酰胺 I 带的变化常表征蛋白质二级结构的改变^[13]。

为定量分析 BSA 蛋白质二级结构的变化，利用 Gaussian 去卷积和二阶导数拟合对酰胺 I 带进行处理，如图 4 所示。根据拟合的结果，计算 BSA 的二级结构比例。由表 4 可知，随着 cFIR, REO 和 cFIR-REO 的加入， α -helix 的比例均略微降低，其他结构含量升高，说明两者的加入会使蛋白质分子变得更加松散，BSA 的二级结构发生略微变化。另

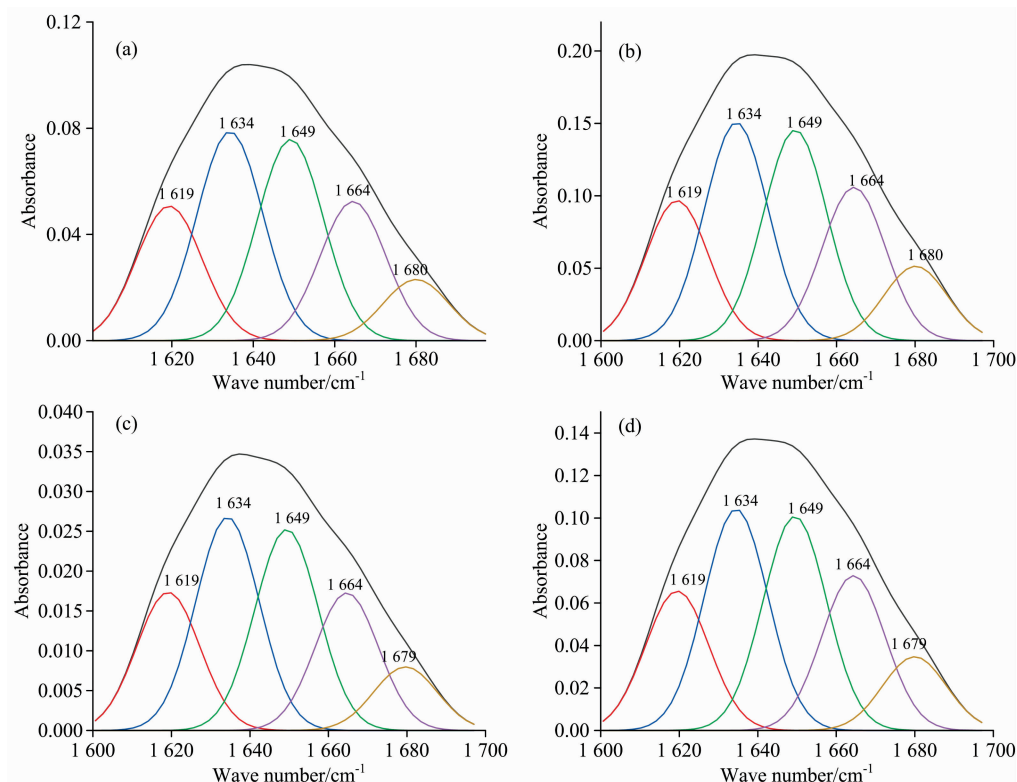


图 4 不同体系的酰胺 I 带拟合图

Fig. 4 Amide I band fitting maps for different systems

(a): BSA; (b): BSA-cFIR; (c): BSA-REO; (d): BSA-cFIR-REO

表 4 不同体系的二级结构拟合结果

Table 4 Fitting results of secondary structures for different systems

二级结构	BSA		BSA+cFIR		BSA+REO		BSA+REO+cFIR	
	Wavenumbers /cm ⁻¹	Content /%	Wavenumbers /cm ⁻¹	Content /%	Wavenumbers /cm ⁻¹	Content /%	Wavenumbers /cm ⁻¹	Content /%
β -sheets	1 619.39	18.09	1 619.39	17.59	1 619.20	18.34	1 619.50	17.37
Random coil	1 634.31	28.09	1 634.48	27.43	1 634.31	28.37	1 634.51	27.61
α -helix	1 649.20	27.04	1 649.50	26.46	1 649.40	26.73	1 649.49	26.66
β -turns	1 664.57	18.66	1 664.43	19.22	1 664.76	18.20	1 664.41	19.23
Antiparalled β -sheets	1 680.05	8.12	1 680.15	9.30	1 679.64	8.35	1 679.95	9.13

外, REO 和 cFIR 共同作用时 α -helix 含量为 26.66%, 该值介于 cFIR 与 REO 单独作用的值之间, 说明二者存在协同作用。

2.4 从 BSA 到 REO-cFIR 的能量转移

2.4.1 结合距离计算

根据 Förster 非辐射能量转移理论^[14], 若供体与受体之间满足以下三个条件, 将会发生非辐射能量转移, 导致荧光猝灭: ①供体能够给出荧光; ②供体的荧光光谱与受体的紫外光谱有充分的重叠; ③供体与受体的结合距离小于 7 nm。根据此理论, 非辐射能量转移效率 E 、供体与受体之间的结合距离 r 、临界能量转移距离 R_0 及光谱的重叠积分 J 可由式(3)~式(5)计算

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) = 1 - F/F_0 \quad (3)$$

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

$$J = \sum F(\lambda) \epsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda / \sum F(\lambda) \Delta\lambda \quad (5)$$

式中, K^2 为偶极空间取向因子, 一般取平均值 2/3; φ 为量子产率, 对于 BSA, 取 0.118^[14]; n 为介质的折射率, 取水和有机物的平均值 1.336; J 为供体的荧光光谱与受体的紫外光谱的重叠积分; F 与 F_0 分别为受体存在与不存在时 BSA 的荧光强度; ϵ 为受体在相应波长下的摩尔吸收系数^[14]。图 5 给出了 cFIR 存在或不存在时, BSA 的荧光光谱与 REO 的紫外光谱重叠图。

利用 Origin 计算出当 cFIR 存在与不存在时各个物理量的值, 将结果列于表 5 中。

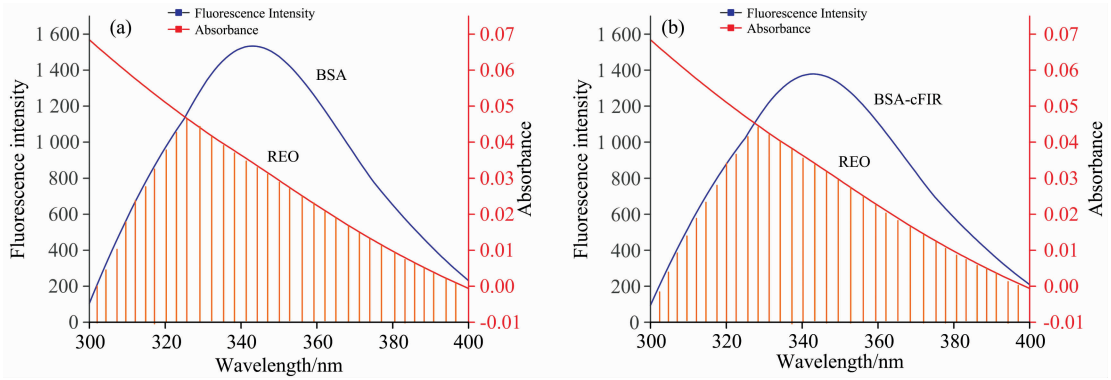


图 5 有(a)无(b)cFIR时BSA发射光谱与REO紫外光谱重叠图

Fig. 5 The overlap of the emission spectrum of BSA and UV spectrum of REO with (a) or without (b) cFIR in the systems

表 5 有无 cFIR 时 Förster 非辐射能量转移特征参数

Table 5 Characteristic parameters of nonradiative energy transfer of Förster with or without cFIR

	$J/$ ($\text{cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$)	$E/$ %	$R_0/$ nm	$r/$ nm
BSA-REO	3.67667×10^{-17}	8.05	0.96	1.445
BSA-cFIR-REO	3.68107×10^{-17}	7.82	0.96	1.453

由表 5 的结果可知，两个体系的结合距离都小于 7 nm，说明在 cFIR 存在或不存在的条件下，REO 对 BSA 荧光静态猝灭的同时也伴随着非辐射能量转移； $R_0 < r$ 说明了 REO 对 BSA 与 (BSA-cFIR) 的荧光猝灭方式主要为静态猝

灭^[7, 13]。此外，由表 5 得出 cFIR 加入前后 BSA 与 REO 之间的结合距离 r 由 1.445 nm 变为 1.453 nm，可以合理假设 cFIR 与 REO 在不同的白蛋白部位具有非竞争性结合位点，从而导致三元非荧光配合物 cFIR-BSA-REO 的形成；另外，cFIR 的加入使其与 BSA 之间形成络合物 BSA-cFIR，该络合物改变了 BSA 的构象，使 REO 与 BSA 结合变得更容易^[15]。
2.4.2 不同体系对热辐射的响应分析

红外热成像是利用物体不同的辐射能力和对红外线的反射强弱，将不可见的红外辐射变成可见的热图像。红外热成像图其实就是物体温度分布的图像。图 6 展现了在钠灯的照射下拍摄不同体系的特征红外热成像图。

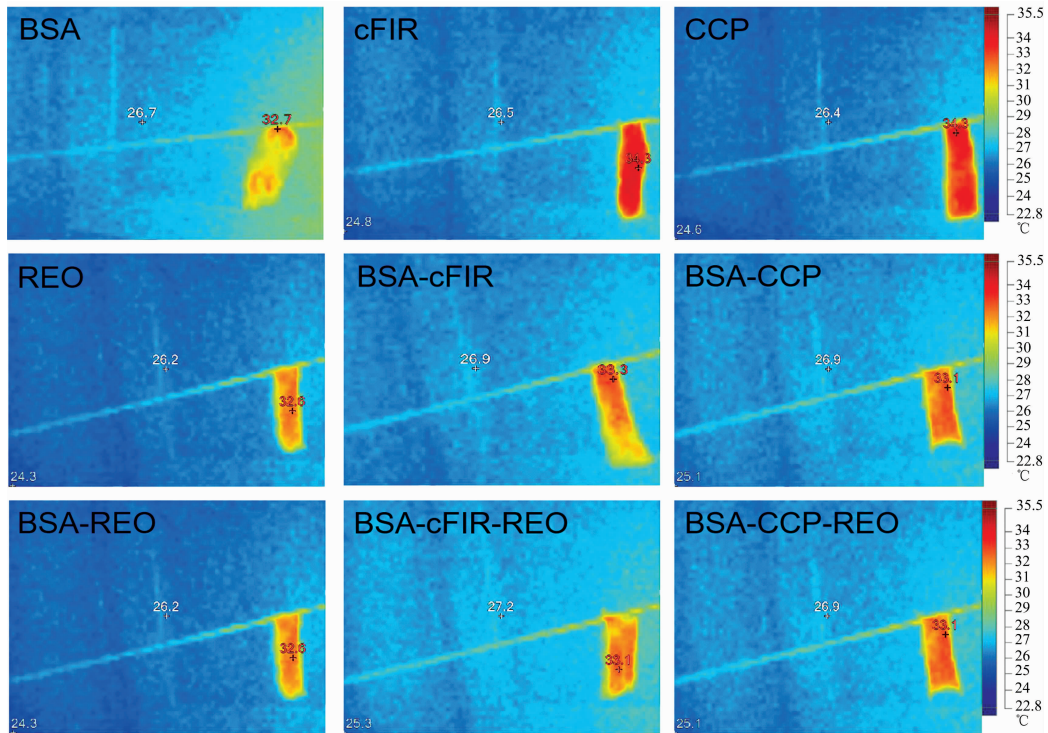


图 6 钠灯照射下不同体系面膜的红外热成像图(红色区域代表面膜)

Fig. 6 Thermograph of the mask in different systems irradiated by sodium lamp (red area represents mask)

从图 6 可以得出,在钠灯照射下面膜的响应温度高于周围的温度。重复 6 次实验,将 180 组数据取平均值作图,利用 SPSS 软件,利用 LSD 法进行方差分析,结果如图 7 所示。

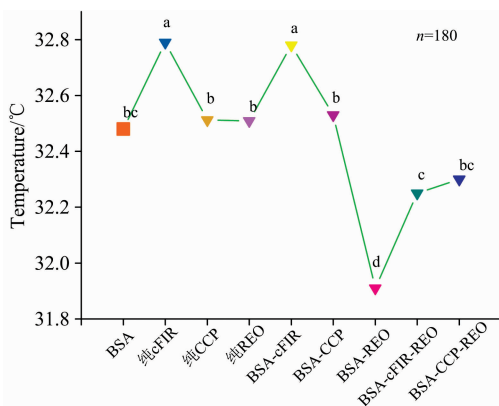


图 7 不同体系的红外响应温度情况

注:用 LSD 法进行多重比较,标有不同字母表示组间差异显著($p < 0.05$),标有相同字母表示组间差异不显著

Fig. 7 Infrared response temperature of different systems

Note: Multiple comparisons are performed using the LSD method. Different letters of an alphabet are used to indicate significant differences between groups ($p < 0.05$), and the same letters are used to indicate no significant differences between groups

图 6、图 7 结果显示,纯 cFIR 和 BSA-cFIR 体系在钠灯照射后呈现最高的温度响应(两者无显著差异),其次是纯 BSA、纯 CCP、纯 REO 及 BSA-CCP 体系(四组间无显著差异,与纯 cFIR 和 BSA-cFIR 体系差异显著, $p < 0.05$);温度响应最低的是 BSA-REO 体系($p < 0.05$),而在该体系中加入陶瓷粉后(BSA-cFIR-REO 体系和 BSA-CCP-REO 体系)温度会升高,但仍然低于其他组($p < 0.05$)。这些现象说明单一体系、二元体系、三元体系呈现迥异的温度响应特征;与单一体系相比,精油可使生物分子的温度降低,而 cFIR

可使生物分子温度升高;共同作用时,cFIR 的加入会使 BSA-REO 体系响应的温度增加,即热效应会增加($p < 0.05$)。按照李云平^[4]等的说法,这个热效应可起扩张血管、加速新陈代谢等作用。与普通陶瓷粉相比,远红外陶瓷粉的热效应更显著。另一方面,用红外成像技术用于研究小分子/纳米颗粒与 BSA 之间相互作用受客观因素的影响大,还需更广泛的研究进一步阐明其作用。

3 结论

利用荧光光谱法得出 REO 和 cFIR 与 BSA 的作用机制与结合情况,以此基础再继续用各种分析方法研究 REO 和 cFIR 对 BSA 构象的影响,最后用红外热成像技术表征二者对 BSA 能量辐射的影响。基于以上的分析,可得出如下几点结论:(1)荧光光谱法表明无论远红外陶瓷粉是否存在,BSA 与精油之间都存在相互作用和荧光猝灭,且主要作用机制主要为静态猝灭;通过计算结合常数 K_s 与结合位点数 n 表明远红外陶瓷粉的加入会使精油与 BSA 的结合更加牢靠;(2)同步荧光光谱、三维荧光光谱和 FTIR 的结果表明远红外陶瓷粉和精油对 BSA 的二级结构产生略微的变化,两者使氨基酸周围的极性降低,疏水性增加,同时通过形成缔合物的方式对 BSA 的内源性荧光产生影响;Förster 非辐射能量转移距离的计算进一步表明无论远红外陶瓷粉是否存在,精油与 BSA 之间都发生非辐射能量转移,同时络合物 BSA-cFIR 的形成改变了 BSA 的构象,使其与精油的结合更加容易;(3)红外热成像结果表明远红外材料的加入能提高 BSA-REO 体系响应的温度,具有热效应。

因此,具有纳米尺寸效应和远红外射线辐射的纳米红外线陶瓷粉,在与精油共同作用于生物分子时,可通过形成缔合物影响体系的微环境,从而影响荧光特征与能量传递。本研究结果可为精油结合远红外材料在医疗保健上的进一步应用及机理研究提供参考。

References

- [1] Vatanserver F, Hamblin M R. *Photonics Lasers Med.*, 2012, 4: 255.
- [2] Tsai S R, Hamblin M R. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*, 2017, 170: 197.
- [3] Jiang Q D, Wu Y M, Zhang H, et al. *Pharmaceutical Biology*, 2017, 55(1): 1592.
- [4] LI Yun-ping, HE Yun(李云平, 何云). *Laser Journal(激光杂志)*, 2015, 36(8): 146.
- [5] WANG Yu-ting, DENG Pin, LI Hong-juan(王雨婷, 邓品, 李洪娟). *Infrared Technology(红外技术)*, 2017, 39(1): 14.
- [6] WEN Jian, WU Shi-ming(文建, 吴士明). *Laser Magazine(激光杂志)*, 2019, 40(9): 191.
- [7] Mahanthappa M, Savanur M A, Puthusseri B, et al. *Biomaterials*, 2018, 53: 202.
- [8] Roufegarinejad L, Jahanban-Esfahlan A, Sajed-Amin S, et al. *Journal of Molecular Recognition*, 2018, 31(7): e2704.
- [9] Shiri F, Rahimi-Nasrabadi M, Ahmadi F, Ehrlich H. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2018, 203: 520.
- [10] Sekar G, Sugumar S, Mukherjee A, et al. *Journal of Luminescence*, 2015, 161: 187.
- [11] Riaz U, Ashraf S M, Jadoun S, et al. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 2018, 67: 925.
- [12] Campana M, Hosking S L, Petkov J T, et al. *Langmuir: the ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 2015, 31(20): 5614.
- [13] Jiang M, Huang C R, Wang Q, et al. *Luminescence*, 2016, 31(2): 468.
- [14] WANG Xiao-xia, NIE Zhi-hua, LI Song-bo, et al(王晓霞, 聂智华, 李松波, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2018, 38(8): 2468.

[15] Zhang Y P, Shi S Y, Liu Y N, et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2011, 56(5): 1064.

Effect of Far-Infrared Ceramic Powder on the Interaction Between Essential Oil and BSA

HUANG Fang¹, LIU Ming-xue^{1,2*}, XIONG Jie¹, CHEN Lü-qi¹, GAO Zhu-xin¹, CHEN Hui-ming¹, WANG Dan-ni¹

1. School of Life Sciences and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China

2. The Center for Co-Operation and Innovation of Nuclear Waste and Environmental Safety and Provincial Department, Mianyang 621010, China

Abstract Essential oil and far-infrared ceramic powder(cFIR) are often used in physiotherapy or related health-care products, but the interaction and mechanism between them and biomolecules are less concerned. In this research, the influence and mechanism of cFIR on the interaction between rose essential oil(REO) and bovine serum albumin (BSA) were studied through different spectroscopy methods and infrared thermography under simulated physiological conditions. The results of the fluorescence spectrum show that both the REO and the cFIR can quench the intrinsic fluorescence of BSA. Whether the cFIR exists or not, the quenching mode of the REO to BSA is static quenching. The fitting calculation of Stern-Volmer equation shows that the binding sites n between BSA and REO is increased from 0.55 to 0.96 by adding cFIR, and the binding constant is also significantly increased, which shows that the affinity of REO to BSA can be improved with the existence of cFIR. The effects of cFIR and REO on the secondary structure of BSA were studied through synchronous fluorescence spectrum, three-dimensional fluorescence spectrum and Fourier transform infrared spectrum. The results show that they can cause the increase of hydrophobicity around the protein and have little effect on the conformation of BSA; in addition, cFIR and REO show the synergistic effect on the quenching of BSA intrinsic fluorescence through the formation of association compounds with BSA. Critical distance (R_0) and binding distance (r) were calculated based on Förster's non-radiative energy transfer theory. The binding distance (r) between BSA and REO changes from 1.445 nm to 1.453 nm after the addition of cFIR, R_0 is basically unchanged and R_0 is less than r . These results suggest that whether the cFIR exists, the static quenching of BSA fluorescence by REO is accompanied by non-radiative energy transfer. The cFIR mainly improves the affinity of REO to BSA by changing the conformation of BSA due to different non-competitive binding sites between the cFIR and REO on BSA molecular surface. Infrared thermal imaging techniques was used to explore the interaction of REO and cFIR with macromolecules. Infrared thermal imaging results show that REO can reduce the temperature of biomolecules, while cFIR can increase the temperature of biomolecules. The addition of the cFIR can increase a response temperature of BSA-REO system, which indicates the thermal effect will increase ($p < 0.05$). The above results show that the cFIR with nano-size effect and far-infrared radiation can affect the microenvironment of the system by forming association compounds when it interacts with REO, thus affect the fluorescence characteristics and energy transfer of biomolecules. The results of this study can provide a reference for further application of essential oil combined with cFIR in physiotherapy and mechanism research.

Keywords Bovine serum albumin; Far-Infrared ceramic powder; Essential oil; Fluorescence spectrum; Infrared thermography; Physiotherapy

(Received Dec. 9, 2019; accepted Apr. 17, 2020)

* Corresponding author