

分子对接结合荧光光谱法探究 3 种类胡萝卜素与 HSA 的相互作用

周素珍¹, 邢 莉¹, 范金波^{1*}, 王长霞², 吕长鑫¹

(¹渤海大学食品科学与工程学院 辽宁省食品安全重点实验室

生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心 辽宁锦州 121013

²锦州益多乐乳业有限公司 辽宁锦州 121018)

摘要 为探究类胡萝卜素与 HSA 相互作用的影响,采用荧光光谱法,同步和三维荧光光谱法研究叶黄素(LUT)、 β -胡萝卜素(β -CA)、番茄红素(LYC)对 HSA 的荧光猝灭作用,计算相关信息。采用位点 Marker 试验和分子对接分析结合位点。结果表明,LUT、 β -CA、LYC 对 HSA 荧光全都产生猝灭作用,其中 β -CA 对 HSA 的猝灭率最高;LUT、 β -CA、LYC 与 HSA 的结合常数在 10^4 ~ 10^6 L/mol 数量级, β -CA 与 HSA 的结合能力最强;热力学参数表明 LUT、 β -CA、LYC 与 HSA 均主要通过疏水相互作用力结合;同步和三维荧光表明 LUT、 β -CA、LYC 与 HSA 的相互作用能够影响 HSA 的空间构象;位点 Marker 试验和分子对接发现,LUT、 β -CA、LYC 与 HSA 的结合位点均位于 Sudlow's site I 附近。研究表明,3 种类胡萝卜素均能与 HSA 结合,这对类胡萝卜素活性的开发利用、靶向递送具有重要意义。

关键词 人血清白蛋白;类胡萝卜素;荧光猝灭;分子对接

文章编号 1009-7848(2023)02-0061-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.02.006

类胡萝卜素与人类的健康有紧密的联系。人和动物均不可以实现其在身体内部合成,只能经由食物的途径摄取^[1]。有研究证明类胡萝卜素在抗氧化^[2]、抗肿瘤^[3]、降脂^[4]、抗糖尿病^[5]、增强免疫力^[6]和预防心脑血管疾病^[7]等方面展示了巨大潜力。

在研究蛋白质与小分子互作机制时,人血清白蛋白(Human serum albumin, HSA)是最普遍使用的模型蛋白^[8]。HSA 是单肽链的蛋白,其结构中有 3 个同源结构域(I、II、III),每个结构域又可细分为 A 和 B 两个亚结构域,独特的结构能实现和内源及外源性的小分子化合物结合,并跟随血液循环对小分子实现靶向递送^[9-10]。在体外模拟的生理条件下,对天然活性成分和 HSA 的结合进行研究,有利于在分子水平上探索天然活性成分在体内的作用机制。

在人体血浆中含量最高的类胡萝卜素包括 β -胡萝卜素(β -CA)、番茄红素(LYC)、叶黄素(LUT)^[11]。它们具有抗氧化、抗肿瘤、抗糖尿病等多

种生理活性。又因类胡萝卜素种类繁多,各自的功能也会有所不同。 β -CA 是合成维生素 A 的前体^[12],LUT 是构成人体视网膜黄斑区域的重要物质^[13],LYC 对心血管疾病具有一定的预防功能^[14]。然而,水溶性差,受光、热、氧的影响易异构化,限制了类胡萝卜素应用^[15]。

目前,关于酚类化合物、药物等与 HSA 相互作用的研究较为多,而有关比较不同类胡萝卜素与 HSA 结合的报道较少。本文以 HSA 为载体蛋白,选取 3 种类胡萝卜素为配体分子,通过荧光光谱技术探究 3 种类胡萝卜素与 HSA 相互作用的机制,为类胡萝卜素的活性开发、靶向递送提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

HSA(纯度 $\geq 98\%$),购自上海伊卡生物科技有限公司;LUT(纯度 $\geq 98\%$)、 β -CA(纯度 $\geq 98\%$)、LYC(纯度 $\geq 98\%$),购自上海萌芽生物科技有限公司;保泰松(PHE,纯度 $\geq 99\%$)和布洛芬(IBU,纯度 $\geq 99\%$),购自北京百灵威科技有限公司;试验用水为超纯水,磷酸氢二钠、无水乙醇、二甲基亚砜(DMSO)、柠檬酸等均为分析纯级,购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

收稿日期: 2022-02-13

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31972107);辽宁省教育厅项目(LJ2020004)

第一作者: 周素珍,女,硕士生,实验师

通信作者: 范金波 E-mail: jinbo_fan@hotmail.com

1.2 仪器与设备

F-7000 荧光分光光度计, 日本日立高新技术公司; FE20PH 计, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; Milli-Q Reference 型超纯水机, 德国默克密理博有限公司。

1.3 方法

1.3.1 溶液的配制 磷酸缓冲液(PBS, pH 7.4)用柠檬酸、磷酸氢二钠配制, 浓度为 0.2 mol/L, HSA 溶液用 PBS 缓冲液配制成 1.2×10^{-4} mol/L 的储备液。LUT、PHE 用无水乙醇配制, 浓度为 7.2×10^{-4} mol/L。IBU 用 PBS 缓冲液配制, 浓度为 7.2×10^{-4} mol/L。 β -CA、LYC 用 DMSO 配制, 浓度为 7.2×10^{-4} mol/L。以上试剂均存放于 4 °C 的冰箱中备用。

1.3.2 LUT/ β -CA/LYC 与 HSA 相互作用的荧光光谱测定

1.3.2.1 荧光发射光谱 先将一定体积 PBS 缓冲溶液加入离心管, 然后加入 30 μ L 的 HSA, 最后加入一定体积的 LUT、 β -CA、LYC, 得到混合溶液 3 mL, 静置 30 min, 使之充分反应, 最后使 HSA 浓度为 1.2×10^{-6} mol/L, LUT、 β -CA、LYC 的浓度为 0, 6×10^{-6} , 12×10^{-6} , 18×10^{-6} , 24×10^{-6} , 30×10^{-6} , 36×10^{-6} , 42×10^{-6} mol/L。设定反应温度为 298 K、310 K, 激发和发射光栅分别设置为 2.5 nm 和 5 nm, 激发波长为 280 nm, 290~450 nm 范围内记录荧光光谱。

1.3.2.2 同步荧光光谱 设 $\Delta\lambda$ 分别为 60 nm 和 15 nm, 在 310 K、激发光栅 2.5 nm、发射光栅 5 nm 条件下, 在波长 250~350 nm 范围测定同步荧光光谱。

1.3.2.3 三维荧光光谱 固定 HSA 的浓度为 1.2×10^{-6} mol/L, LUT、 β -CA、LYC 的浓度为 6×10^{-6} mol/L, 在 310 K、200~350 nm 的激发波长和 250~500

nm 发射波长下测量 HSA 以及加入 LUT、 β -CA、LYC 后的三维荧光。

1.3.3 LUT/ β -CA/LYC 与人血清白蛋白的结合位点分析 参照 1.3.2 节的方法, 先加入 PHE/IBU, 使其浓度为 6.0×10^{-6} mol/L, 然后加入 LUT/ β -CA/LYC 后续操作与 1.3.2 节相同。

1.3.4 分子对接 采用 AutoDock vina 4.0 软件研究 LUT、 β -CA、LYC 与 HSA 对接。HSA (ID: 1HA2) 来源于 RCSB PDB 数据库, LUT (CID: 5281243)、 β -CA (CID: 5280489)、LYC (CID: 446925) 结构来源于 PubChem。通过 Pymol 软件去除 HSA 结构中存在的水, 并添加 H 原子。网格大小保持在 $82 \times 104 \times 80$, 间距为 1 Å, 以覆盖整个受体分子。HSA 设为刚性对接, 配体设为柔性对接。其它对接参数保持默认, 选择结合能最低的对接构象进行评估。对接后相互作用力的分析是用 Discovery Studio v17.2.0 进行。

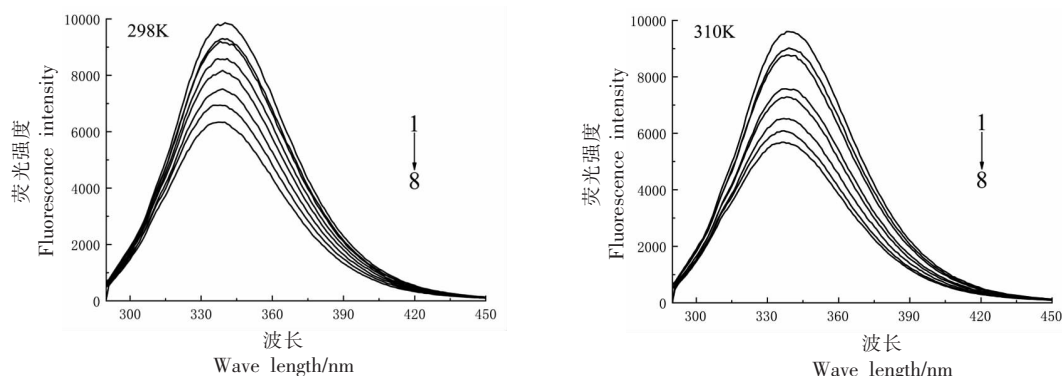
1.4 统计分析

试验均重复设 3 组, 结果表示为 $\bar{x} \pm s$, 采用 Origin V9.0 软件进行绘图。

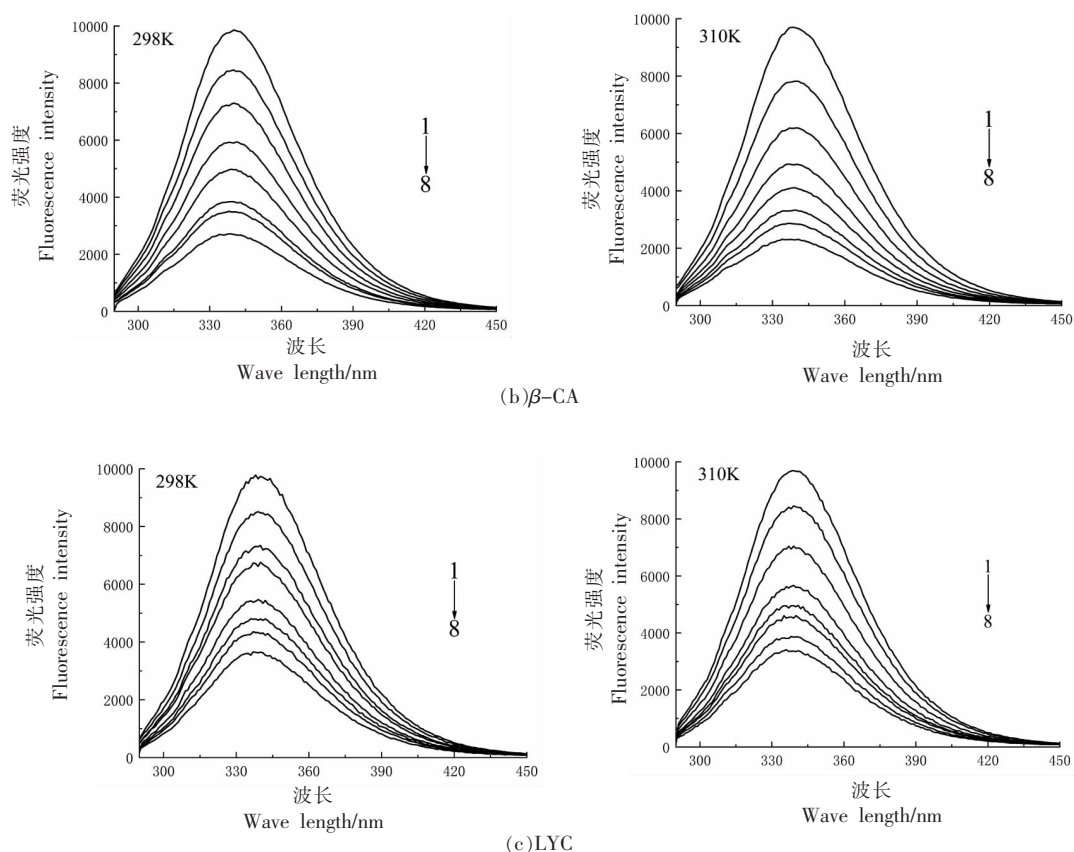
2 结果与讨论

2.1 类胡萝卜素对 HSA 的荧光猝灭作用

图 1 为在 298 K 和 310 K 时, 加入 LUT (图 1a)、 β -CA (图 1b) 和 LYC (图 1c) 前、后的 HSA 荧光发射光谱图。当激发波长为 280 nm 时, HSA 的最大发射波长 (λ_{\max}) 在 340 nm 处。随着 LUT、 β -CA 和 LYC 浓度的递增, HSA 的荧光强度逐渐减弱, 且峰形无显著变化, 峰值分别下降了 35.4%, 72.7% 和 62.8%。这些结果表明 LUT、 β -CA 和 LYC 可以与 HSA 发生相互作用, 并且对 HSA 内源荧



(a) LUT



注: 1~8 配体浓度依次为 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 $\mu\text{mol/L}$ 。

图 1 LUT(a)、 β -CA(b)、LYC(c)对 HSA 荧光猝灭作用

Fig.1 Fluorescence quenching of HSA by LUT(a), β -CA(a) and LYC(c)

光强度的猝灭能力为 β -CA>LYC>LUT。在加入 LUT、 β -CA 后, HSA 的 λ_{max} 均发生了 2 nm 的微弱蓝移, 而加入 LYC 后最大吸收峰未发生移动, 这说明 LUT、 β -CA 的存在, 改变了荧光发色团附近的微环境, 疏水性增强。

2.2 荧光猝灭机理和结合常数

通常用荧光猝灭机理来研究 HSA 和小分子之间的相互作用。荧光猝灭类型主要分为静态和动态^[16-17]。通过 Stern-Volmer 方程(1)和 Acharya 方程(2)分析荧光猝灭机理。

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

$$\lg\left(\frac{F_0}{F} - 1\right) = \lg K_a + n \lg [Q] \quad (2)$$

式中, F_0 ——未加入 LUT/ β -CA/LYC 时 HSA 的荧光强度; F ——加入 LUT/ β -CA/LYC 时 HSA 的荧光强度; $[Q]$ ——LUT/ β -CA/LYC 的浓度, mol/L;

L ; K_q ——双分子猝灭速率常数, L/(mol·s); τ_0 为荧光团的平均寿命, 其值为 10^{-8} s; K_{sv} 为猝灭常数, L/mol; K_a ——结合常数, L/mol; n ——结合位点数, 个。

由表 1 可知, R^2 的值越接近于 1, 数据越精确。根据方程(1), 可计算不同条件下 LUT/ β -CA/LYC 与 HSA 结合的猝灭常数 K_{sv} 。如表 1 所示, 在 HSA 中分别加入 LUT、 β -CA、LYC 后, K_{sv} 的值与温度呈正相关, 而 K_q 均远大于 2×10^{10} L/(mol·s) (生物分子的最大散射碰撞猝灭常数), 说明 LUT、 β -CA、LYC 均对 HSA 产生静态猝灭, 即 LUT、 β -CA、LYC 与 HSA 结合形成了复合物^[18]。根据方程(2), 分别计算出 LUT、 β -CA、LYC 与 HSA 结合常数都在 $10^4 \sim 10^6$ 数量级, 证明 LUT、 β -CA、LYC 与 HSA 的结合能力均较强^[19], 结合能力 β -CA>LYC>LUT。如表 1 所示, HSA 与 LUT、 β -CA、LYC 的结合位点数(n)均在 1 附近, 因此可以推断 LUT、 β -

表1 LUT、 β -CA、LYC与HSA相互作用的常数Table 1 Interaction constants of LUT, β -CA, LYC with HSA

样品	T/K	$K_s/L \cdot mol^{-1}$	$K_q/L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$	R^2	$K_d/L \cdot mol^{-1}$	R^2	n
HSA-LUT	298	1.143×10^4	1.143×10^{12}	0.9983	1.227×10^5	0.9364	1.240
	310	1.562×10^4	1.562×10^{12}	0.9986	3.863×10^5	0.9561	1.312
HSA- β -CA	298	5.267×10^4	5.267×10^{12}	0.9866	4.115×10^6	0.9882	1.425
	310	6.693×10^4	6.693×10^{12}	0.9920	1.534×10^6	0.9974	1.304
HSA-LYC	298	3.569×10^4	3.569×10^{12}	0.9960	3.442×10^5	0.9865	1.222
	310	4.146×10^4	4.146×10^{12}	0.9977	8.514×10^5	0.9944	1.291

CA、LYC均与HSA均有单个结合位点。

2.3 热力学性质和作用力类型

热力学参数采用Van't Hoff方程(3)和热力学方程(4)计算。

$$\ln\left(\frac{K_2}{K_1}\right) = \frac{\Delta H\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}{R} \quad (3)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -R\ln K_a \quad (4)$$

式中, K_1 —— T_1 时蛋白与小分子的结合常数, K_2 —— T_2 时蛋白与小分子的结合常数, L/mol ; ΔH ——焓变, kJ/mol ; ΔG ——吉布斯自由能变, kJ/mol ; ΔS ——熵变, $J/(mol \cdot K)$; R ——气体摩尔常数, $8.314 J/(mol \cdot K)$ 。

表2 LUT、 β -CA、LYC与HSA相互作用的热力学常数Table 2 Thermodynamic constants for the interaction between LUT, β -CA, LYC with HSA

样品	T/K	$\Delta G/kJ \cdot mol^{-1}$	$\Delta H/kJ \cdot mol^{-1}$	$\Delta S/J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$
HSA-LUT	298	-29.03	73.37	343.63
	310	-33.16		
HSA- β -CA	298	-37.73	63.12	330.24
	310	-39.25		
HSA-LYC	298	-31.58	57.96	300.49
	310	-35.19		

从理论上讲,当 $\Delta H < 0$ 且 $\Delta S > 0$,主要作用力为静电相互作用;当 $\Delta H > 0$, $\Delta S < 0$ 时,主要作用力为静电相互作用和疏水相互作用;当 $\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$ 时,主要作用力为氢键与范德华力; $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$ 时,主要作用力为疏水相互作用^[20]。由表2,LUT、 β -CA、LYC分别与HSA结合时, $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$, ΔG 增加($\Delta G < 0$),熵变化的正值表明水分子以有序的方式排列在HSA附近,LUT、 β -CA、LYC的相互作用使其随机化排列^[21]。 ΔH 为正值证实了HSA-类胡萝卜素复合物的形成本质上是吸热的。 ΔG 的值由热力学方程计算,其值为负表明LUT、 β -CA、LYC与HSA的相互作用是自发的^[22]。 ΔS 和 ΔH 均为正值,表明LUT、 β -CA、LYC主要通过疏水相互作用与HSA结合,进一步说明了LUT、 β -CA、LYC可以与HSA发生反应形成复合物。

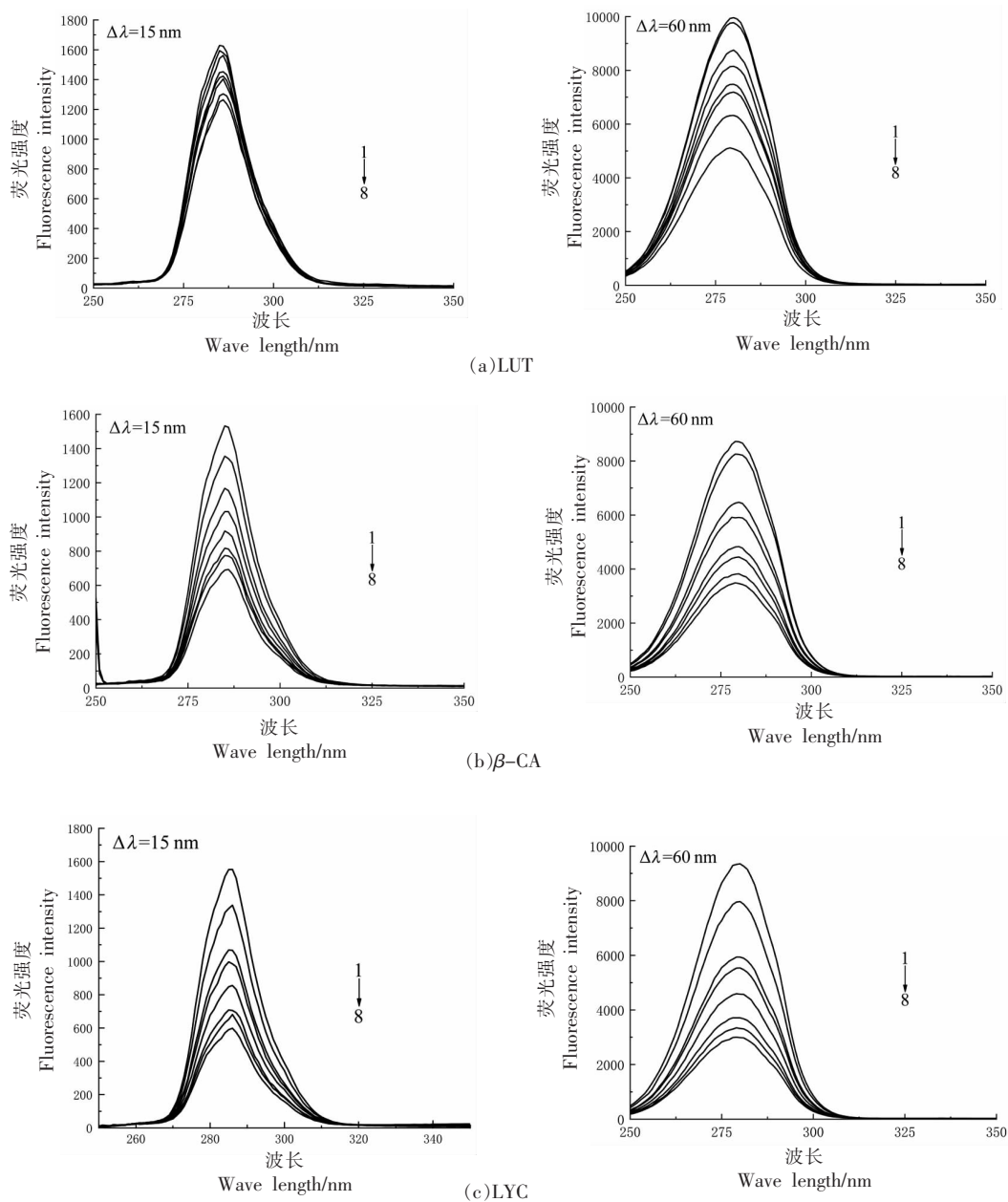
2.4 LUT、 β -CA、LYC与HSA相互作用的同步荧光光谱

采用同步荧光光谱技术对荧光团氨基酸残基Trp和Tyr的微环境变化进行分析。Tyr的微环境信息在 $\Delta\lambda = 15$ nm处获得,而Trp的微环境信息在 $\Delta\lambda = 60$ nm处获得^[23]。HSA中氨基酸残基的 λ_{max} 与环境的疏水性有关。若 λ_{max} 蓝移,则HSA暴露于疏水环境,其极性降低,反之亦然^[24]。因此,可以通过观察 λ_{max} 的偏移判断HSA构象的变化。

图2所示的同步荧光光谱,伴随LUT浓度的升高,荧光发射光谱中记录的Tyr和Trp的荧光强度逐渐降低,Trp的荧光强度降低更显著。Tyr残基的 λ_{max} 向长波长(约1 nm)方向移动,这反映出Trp残基处附近的环境极性更强,更容易在溶剂里暴露;相反,Trp残基 λ_{max} 的轻微蓝移(约1

nm)表明其附近暴露的环境疏水性增强。伴随 β -CA 的加入, Trp 残基的 λ_{max} 未出现明显移动, Tyr 残基的 λ_{max} 红移了 1 nm。LYC 逐渐加入后, $\Delta\lambda =$

60 nm 时, λ_{max} 略微蓝移 1 nm。以上结果可以推测出 LUT、 β -CA、LYC 均与 HSA 发生相互作用, 并且使 HSA 的构象发生了变化。



注: 1~8 配体浓度依次为 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 $\mu\text{mol/L}$ 。

图 2 LUT(a)、 β -CA(b)、LYC(c)与 HSA 相互作用的同步荧光光谱

Fig.2 Synchronous fluorescence spectra of HSA without and with LUT(a), β -CA(b) and LYC(c)

2.5 LUT、 β -CA、LYC 与 HSA 相互作用的三维荧光光谱

三维荧光光谱可同时获取激发和发射的两个

不同维度的荧光强度信息, 从而更全面、更直观地观察 HSA 的结构变化^[25]。对于荧光光谱, 峰 a 主要反映色氨酸由于 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁引起的光谱变化, 峰 b

反映 $\pi \rightarrow \pi^*$ 引起的 HSA 多肽骨架的光谱变化^[26]。

图 3 为 HSA 以及 LUT、 β -CA、LYC 分别与 HSA 结合后的三维荧光光谱图。HSA 的荧光团 Trp 和 Tyr 残基在波长 280 nm 处激发, 由峰 a 表示 ($\lambda_{ex}=278$ nm, $\lambda_{em}=340$ nm)。多肽骨架的特征峰由峰 b 表示 ($\lambda_{ex}=228$ nm, $\lambda_{em}=340$ nm), 荧光强度分别为 8 331 和 4 510。峰 b 的 λ_{max} 蓝移了 2 nm。峰 b 强度降低及蓝移, 表明 HSA 中荧光基团周围的微环境非极性增强。随着 LUT 的加入, HSA 的峰 a 和峰 b 的荧光强度分别降低了 3.2% 和 2.8%,

峰 a 强度降低, 表明 LUT 的加入使 HSA 多肽链发生变化, 进而改变了 HSA 的构象; 峰 b 的 λ_{max} 蓝移 2 nm, 反映出 HSA 荧光团残基的微环境被改变, 非极性增强。随着 β -CA 的加入, HSA 的峰 a 和峰 b 的荧光强度分别降低了 19.52% 和 65.81%, 峰 b 的 λ_{max} 蓝移 4 nm, 这表明 β -CA 的加入改变了 HSA 荧光团残基的微环境。随着 LYC 的加入, HSA 的峰 a 和峰 b 的荧光强度分别降低了 13.42% 和 64.66%。以上结果均表明 LUT 或 β -CA 或 LYC 的加入, 使得 HSA 的构象发生了变化。

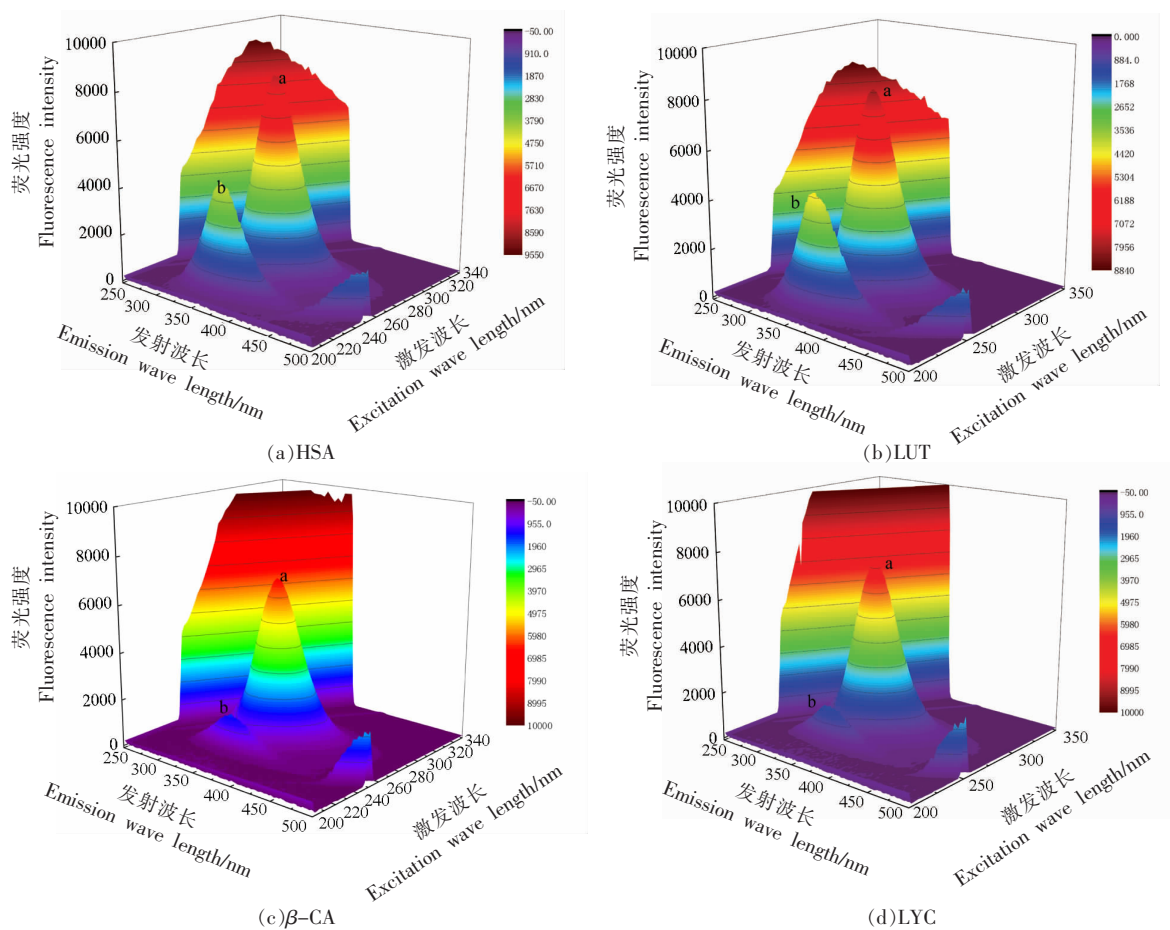


图 3 HSA 及 LUT、 β -CA(c)、LYC 与 HSA 相互作用的三维荧光光谱图

Fig.3 Three-dimensional fluorescence spectra of HSA(a), and the interaction of LUT, β -CA, LYC with HSA

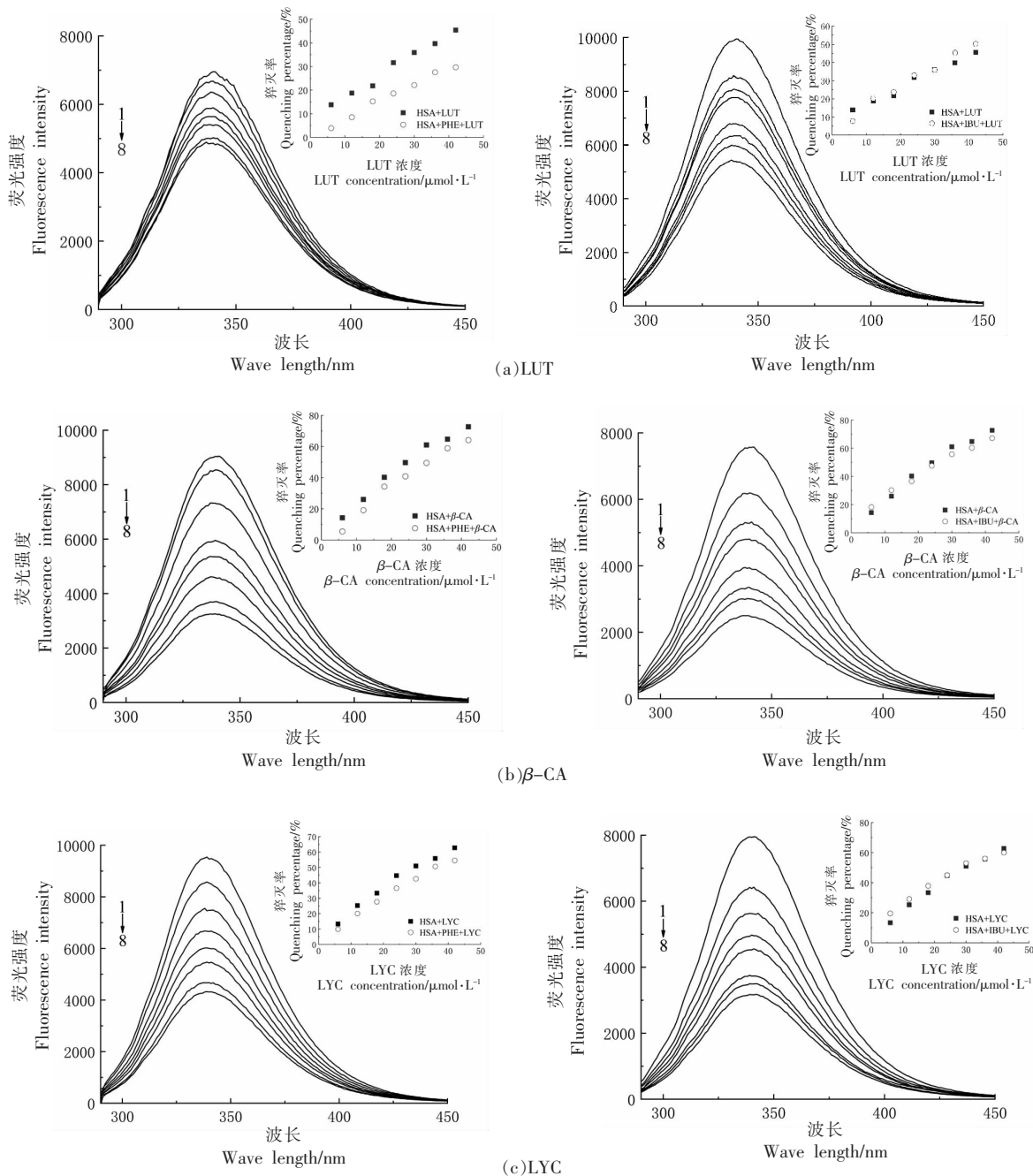
2.6 LUT、 β -CA、LYC 与 HSA 结合位点的分析

位点 1 和位点 2 是 HSA 的主要药物结合位点。已建立的特异性位点标记通常用于了解分子与 HSA 的确切结合位点^[27]。保泰松 (PHE) 作为 IIA

子域 (Sudlow's site I) 的既定位点标记, 布洛芬 (IBU) 作为 IIIA 子域 (Sudlow's site II) 位点的荧光探针^[28]。进行位点竞争试验更加深入了解 LUT、 β -CA、LYC 与 HSA 上这些位点的结合。

图 4 表示两个荧光探针对于 LUT/ β -CA/LYC 与 HSA 结合荧光光谱的影响。如图 4 所示,IBU 的存在,对 LUT/ β -CA/LYC 与 HSA 的结合没有产生影响,从内插图可以看出 IBU 的存在对 HSA 猝灭率影响不大,表明 LUT/ β -CA/LYC 与 HSA 的结

合位点与 IBU 的不同,说明 LUT/ β -CA/LYC 与 HSA 的结合不在亚结构域 IIIA 附近。而 PHE 的存在,降低了 LUT/ β -CA/LYC 与 HSA 的结合,表明 LUT/ β -CA/LYC 与 HSA 的结合位点与 PHE 的相同,在亚结构域 IIA 附近(Sudlow's site I)。



注: 1~8 配体浓度依次为 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 $\mu\text{mol/L}$ 。

图 4 PHE 或 IBU 存在下, LUT、 β -CA、LYC 对 HSA 荧光光谱的影响

Fig.4 Fluorescence quenching of HSA by LUT, β -CA and LYC at the present of PHE or IBU

2.7 分子模拟

分子对接技术能在短时间内提供小分子与生物大分子的结合的详细信息, 在新治疗药物的开发中发挥积极作用^[29]。利用 Autodock vina 软件分析 LUT、 β -CA、LYC 在 HSA 上可能存在的结合位

点。对于每种配体, Autodock vina 分析出 10 种对接结果, 根据结合能最小的部位选取最佳构象。LUT、 β -CA、LYC 与 HSA 结合得出的 ΔG 分别为 -38.11 kJ/mol, -43.07 kJ/mol, -45.62 kJ/mol, 由图 5 可知, LUT 结合在 site 1 位点, 位于主荧光 Trp214

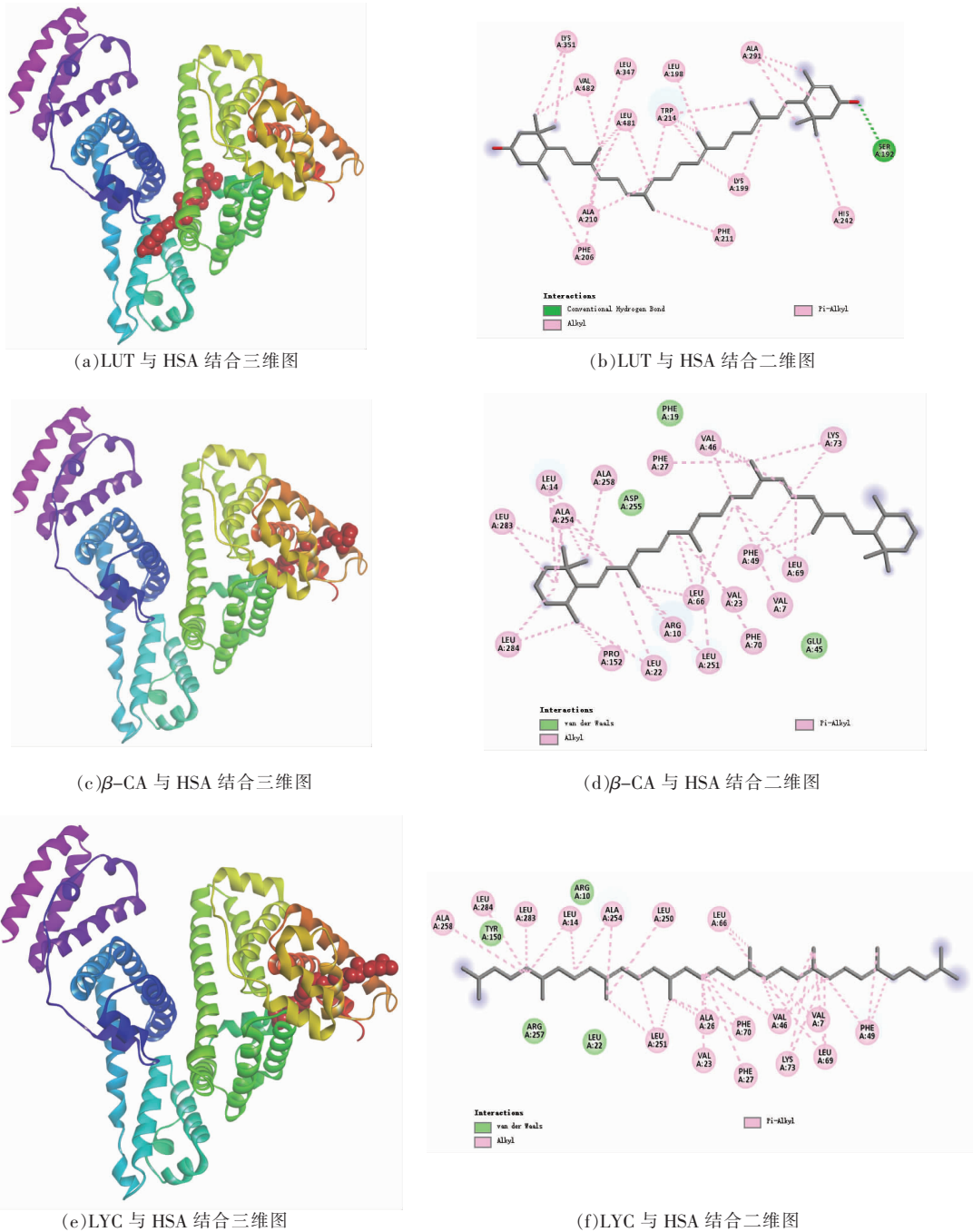


图 5 LUT、 β -CA、LYC 与 HSA 的预测结合位点、结合位点氨基酸及作用力

Fig.5 Predicted binding sites, the binding sites amino acids and interaction forces of between LUT, β -CA, LYC with HSA

附近, 主要作用力为疏水相互作用与 Lys195、Ala291、Trp214、Leu198、Lys199、Phe211、Ala210 等残基形成。 β -CA 位于 IA 与 IIA 之间, 主要作用力为疏水相互作用, 与 Leu251、Ala258、Leu284、Pro152、Leu22、Phe27、Val23 等残基形成。LYC 位于 IA 与 IIA 之间, 与 Ala258、Pro152、Leu283、Phe27、Leu251、Val46、Phe49 等残基形成疏水相互作用, 并且为主要表现力。以上分析与位点竞争试验和计算的热力学常数的结果一致。

3 结论

采用荧光光谱法研究了 3 种类胡萝卜素 LUT、 β -CA、LYC 与 HSA 的结合作用, 经过分析计算出相关信息, 采用同步荧光结合三维荧光研究 3 种类胡萝卜素对 HSA 构象的影响, 采用位点 Marker 试验结合分子对接分析结合位点。结果表明, LUT、 β -CA、LYC 对 HSA 均产生猝灭作用, 表现为静态猝灭, 其中 β -胡萝卜素对 HSA 有最强的猝灭作用, 最大的结合常数, 说明 β -胡萝卜素与 HSA 更容易结合; 热力学参数分析表明 LUT、 β -CA、LYC 与 HSA 主要通过疏水相互作用结合; 同步荧光结合三维荧光结果说明 3 种类胡萝卜素影响了 HSA 的构象; 位点研究表明, LUT、 β -CA、LYC 与 HSA 的结合位点位于亚结构域 II A 附近。研究证明, LUT、 β -CA、LYC 均可以与 HSA 结合, 这将为探究类胡萝卜素体内转运机制, 活性保护载体开发提供思路。

参 考 文 献

- [1] DESMARCHELIER C, BOREL P. Overview of carotenoid bioavailability determinants: From dietary factors to host genetic variations[J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 69(Part B): 270-280.
- [2] TORALES L I E, GARCÍA-ALONSO J, PERIAGO M J. Nutritional importance of carotenoids and their effect on liver health: A review[J]. Antioxidants, 2019, 8(7): 229.
- [3] PAUR I, LILLEBY W, BHN S K, et al. Tomato-based randomized controlled trial in prostate cancer patients: Effect on PSA[J]. Clinical Nutrition, 2017, 36(3): 672-679.
- [4] YIN Y M, ZHENG Z C, JIANG Z Q. Effects of lycopene on metabolism of glycolipid in type 2 diabetic rats [J]. Biomedecine & Pharmacotherapie, 2018, 109: 2070-2077.
- [5] QI S S, SHAO M LI, SUN Z, et al. Lycopene ameliorates diabetic osteoporosis via anti-inflammatory, anti-oxidation, and increasing osteoprotegerin/RANKL expression ratio [J]. Journal of Functional Foods, 2021, 83: 104539.
- [6] 万丽葵, 潘洪志, 陈文华, 等. 番茄红素对四氯化碳急性损伤的保护作用[J]. 中国食品卫生杂志, 2006, 18(1): 44-46.
- [7] WANG L K, PAN H Z, CHEN W H, et al. Protective effect of lycopene against acute injury induced by carbon tetrachloride in rats [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2006, 18(1): 44-46.
- [8] HUANG Y, CHEN H, SU Y H, et al. Increased blood alpha-carotene, all-trans-beta-carotene and lycopene levels are associated with beneficial changes in heart rate variability: A CVD-stratified analysis in an adult population-based study[J]. Nutrition Journal, 2021, 20(1): 43.
- [9] ALAM M M, QAIS F A, AHMAD I, et al. Multi-spectroscopic and molecular modelling approach to investigate the interaction of riboflavin with human serum albumin[J]. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, 2018, 36(3): 795-809.
- [10] BOSE A. Interaction of tea polyphenols with serum albumins: A fluorescence spectroscopic analysis [J]. Journal of Luminescence, 2016, 169(PtA): 220-226.
- [11] CARUSO I P, BARBOSA-FILHO J M, DE-ARAUJO A S, et al. An integrated approach with experimental and computational tools outlining the cooperative binding between 2-phenylchromone and human serum albumin [J]. Food Chemistry, 2016, 196: 935-942.
- [12] MARHUENDA -MUÑOZ M, HURTADO S, TRESSERRA-RIMBAU A, et al. A review of factors that affect carotenoid concentrations in human plasma: Differences between Mediterranean and Northern diets [J]. European Journal of Clinical Nutrition, 2019, 72(2): 18-25.
- [13] LI S Y, LO A C Y. Lutein protects RGC-5 cells against hypoxia and oxidative stress [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2010, 11(5): 2109-2117.

- [13] 袁旭鹏, 王文欢, 张文晔, 等. β -胡萝卜素的主要生理功能及其在畜禽中的应用研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2021, 57(4): 27-33.
YUAN X P, WANG W H, ZHANG W Y, et al. Advances in the physiological functions of β -carotene and its application in livestock production [J]. Chinese Journal of Animal Science, 2021, 57(4): 27-33.
- [14] HE Y, XIA P, JIN H, et al. Lycopene ameliorates transplant arteriosclerosis in vascular allograft transplantation by regulating the NO/cGMP pathways and Rho-associated kinases expression [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016, 2016: 3128280.
- [15] 吴婉仪, 李璐, 李达鸿, 等. 番茄红素纳米乳液体系的稳定性研究[J]. 中国食品学报, 2019, 19(12): 96-103.
WU W Y, LI L, LI D H, et al. Stability studies for lycopene-load nanoemulsions system[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(12): 96-103.
- [16] BAGHERI M, FATEMI M H. Fluorescence spectroscopy, molecular docking and molecular dynamic simulation studies of HSA-Aflatoxin B₁ and G₁ interactions[J]. Journal of Luminescence, 2018, 202: 345-353.
- [17] GOKARA M, SUDHAMALLA B, AMOORU D G, et al. Molecular interaction studies of trimethoxy flavone with human serum albumin[J]. PLoS One, 2010, 5(1): 8834.
- [18] ZHANG H, YU D D, SUN J, et al. Interaction of milk whey protein with common phenolic acids[J]. Journal of Molecular Structure, 2014, 1058: 228-233.
- [19] 付珊琳, 钟俊楨, 姚文俊, 等. 去折叠态 β -乳球蛋白与表没食子儿茶素没食子酸酯的相互作用[J]. 食品科学, 2019, 40(4): 7-13.
FU S L, ZHONG J Z, YAO W J, et al. Interaction between unfolded bovine β -lactoglobulin and epigallocatechin gallate[J]. Food Science, 2019, 40(4): 7-13.
- [20] 顾佳丽, 李东玲, 赵刚, 等. 辣条中糖精钠含量测定及其与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 中国食品学报, 2018, 18(5): 257-263.
GU J L, LI D L, ZHAO G, et al. Determination of saccharin sodium content in spicy gluten and spectroscopic analysis on the interaction of saccharin sodium with bovine serum albumin [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(5): 257-263.
- [21] ZHANG H M, WU P R, WANG Y Q, et al. Affinity of miriplatin to human serum albumin and its effect on protein structure and stability[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 92: 593-599.
- [22] 吴春, 马琳, 孙天一. 改性柑橘皮渣对牛血清白蛋白吸附行为的研究[J]. 包装工程, 2021, 42(1): 25-31.
WU C, MA L, SUN T Y. Adsorption behavior of bovine serum albumin by modified citrus peel residue[J]. Packaging Engineering, 2021, 42(1): 25-31.
- [23] AL-MEHIZIA A A, BAKHEIT A H, ZARGAR S, et al. Evaluation of biophysical interaction between newly synthesized pyrazoline pyridazine derivative and bovine serum albumin by spectroscopic and molecular docking studies[J]. Journal of Spectroscopy, 2019, 2019: 3848670.
- [24] HUANG S, LI H M, LIU Y, et al. Comparable investigation of *in vitro* interactions between three ruthenium (II) arene complexes with curcumin analogs and ctDNA[J]. Polyhedron, 2019, 167: 51-61.
- [25] 汤小玉, 罗云敬, 魏安琪, 等. 同步与三维荧光光谱法研究日落黄和牛血清白蛋白的相互作用[J]. 光谱学与光谱分析, 2018, 38(10): 3129-3135.
TANG X Y, LUO Y J, WEI A Q, et al. Application of synchronous and three-dimensional fluorescent spectrometry in studies on interaction between sunset yellow and human serum albumin[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2018, 38(10): 3129-3135.
- [26] ZHANG Q L, ZHU Z, NI Y N. Interaction between aspirin and vitamin C with human serum albumin as binary and ternary systems[J]. Spectrochimica Acta Part A Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2020, 236: 118356.
- [27] WANI T A, BAKHEIT A H, ZARGAR S, et al. Molecular docking and experimental investigation of new indole derivative cyclooxygenase inhibitor to probe its binding mechanism with bovine serum albumin[J]. Bioorganic Chemistry, 2019, 89: 103010.

- [28] BENVIDI A, REZAEINASAB M, GHARAGHANI S, et al. Experimental and theoretical investigation of interaction between bovine serum albumin and the mixture of caffeic acid and salicylic acid as the antioxidants[J]. *Electrochimica Acta*, 2017, 255(11): 428–441.
- [29] REMO R, ITAI B, HEINZ S, et al. Molecular flexibility in ab initio drug docking to DNA: Binding-site and binding-mode transitions in all-atom Monte Carlo simulations[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(22): 7048–7057.

Exploring the Interaction between Three Carotenes and HSA by Molecular Docking and Fluorescence Spectroscopy

Zhou Suzhen¹, Xing Li¹, Fan Jinbo^{1*}, Wang Changxia², Lü Changxin¹

¹College of Food Science and Technology, Bohai University, Food Safety Key Lab of Liaoning Province, National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, Jinzhou 121013, Liaoning

²Jinzhou Yiduole Dairy Co. Ltd., Jinzhou 121018, Liaoning

Abstract To elucidate the interaction between carotenoids and human serum albumin (HSA) will provide theoretical basis for the development and utilization of active ingredients and the design and delivery of new drugs. In order to explore the interaction between carotenoids and HSA, fluorescence quenching effects of lutein (LUT), β -carotene (β -CA), lycopene (LYC) on HSA were analyzed by fluorescence spectroscopy, synchronous fluorescence spectroscopy and three-dimensional fluorescence spectroscopy. Finally, the binding site was determined by site Marker experiment and molecular docking. The results showed that LUT, β -CA, LYC could quench the endogenous fluorescence of HSA, and β -CA had the highest fluorescence quenching rate for HSA. The binding constant of LUT, β -CA, LYC to HSA was in the order of 10^4 – 10^6 L/mol, and the binding ability of β -CA to HSA was the strongest. Thermodynamic parameters showed that LUT, β -CA, LYC and HSA bind mainly through hydrophobic interaction. Synchronization and three-dimensional fluorescence showed that the interaction between LUT, β -CA, LYC and HSA could change the spatial conformation of HSA. Marker assay and molecular docking technique showed that LUT, β -CA, LYC was bound near Sudlow's site I of HSA. The experimental results showed that all three carotenoids could bind to HSA, which would be of great significance for the development, utilization and targeted delivery of carotenoid activity.

Keywords human serum albumin; carotenoids; fluorescence quenching; molecular docking