

光谱法研究头孢丙烯与牛血清白蛋白的相互作用^Δ

刘 里*,成飞翔(曲靖师范学院化学化工学院,云南 曲靖 655011)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)31-4360-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.31.14

摘要 目的:研究头孢丙烯(CE)与牛血清白蛋白(BSA)之间的相互作用。方法:采用荧光猝灭光谱法、紫外光谱法和同步荧光光谱法,研究289、299、309 K温度下作用50 min时CE与BSA的相互作用。根据Stern-Volmer方程计算动态猝灭常数(K_{sv})和动态猝灭速率常数(K_q),Lineweaver-Burk方程计算静态猝灭结合常数(K_{LB})和紫外吸收光谱图判断猝灭类型;根据双对数方程计算结合常数(K_b)和结合位点数(n);根据热力学公式计算焓变(ΔH)熵变(ΔS)和吉布斯自由能变(ΔG);根据Hill方程计算Hill系数(n_H)。结果:3个温度下的BSA荧光强度随着CE浓度升高而有规律地降低; K_{sv} 、 K_q 、 K_{LB} 、 K_b 、 n 和 n_H 均随着温度升高而降低; $\Delta G < 0$, $\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$; n 约等于1; n_H 小于1。结论:CE对BSA荧光产生静态猝灭,二者间具有一定的结合作用;其反应是一个自发的放热过程,主要结合力为氢键和范德华力,结合位点主要位于亚螺旋域II A;CE对结合反应产生负协同作用,对BSA构象不产生影响;结合位点更接近于酪氨酸。

关键词 头孢丙烯;牛血清白蛋白;荧光猝灭光谱法;紫外光谱法;同步荧光光谱

Study on the Interaction between Cefprozil and Bovine Serum Albumin by Spectrometry

LIU Li, CHENG Fei-xiang (College of Chemistry and Chemical Engineering, Qujing Normal University, Yunnan Qujing 655011, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the interaction of cefprozil (CE) with bovine serum albumine (BSA). METHODS: Under the temperatures of 289, 299 and 309 K, the interaction of CE with BSA for 50 min had been studied by fluorescence quenching, UV spectrometry and synchronous fluorescence spectroscopy. Quenching constant (K_{sv}) and speed constant (K_q) were calculated by Stern-Volmer equation. Static quenching constant (K_{LB}) was obtained by Lineweaver-Burk equation, and UV spectrogram was used to determine the type of quenching. Double logarithmic equation was used to calculate the binding constants (K_b) and the number of binding site (n). Thermodynamic equation was used to obtain ΔH , ΔS , ΔG . Hill's coefficients (n_H) was obtained by Hill equation. RESULTS: At three different temperatures, with CE concentration increasing, fluorescence intensity of BSA decreased regularly. The value of K_{sv} , K_q , K_{LB} , K_b and n and n_H decreased with the temperature increasing. ΔH , ΔS and ΔG were lower than 0. The numbers of binding sites were approximately equal to 1 and $n_H < 1$. CONCLUSIONS: CE statically quench the fluorescence of BSA, and the binding of them have been found to certain extent. The process of binding is spontaneous exothermic process. The main binding forces include Hydrogen bonds and Van der Waals forces, and primary binding site for CE is located at sub-domain II A of BSA. There was some negative cooperative effect. CE would not affect the conformation of BSA. The binding site of CE and BSA is near by tyrosine residue.

KEYWORDS Cefprozil; Bovine serum albumin; Fluorescence quenching spectroscopy; UV spectrometry; Synchronous fluorescence spectroscopy

血清白蛋白是一类重要的运输性蛋白,在生物体内的循环系统中含量非常丰富,几乎占血清蛋白的60%。近年来采用光谱研究药物与血清白蛋白的相互作用已成为生命科学、化学、药学和临床医学领域的研究热点,这对于了解生命过程、药物作用机制及药物分子设计等都具有重要作用^[1-4]。因结构上和血清白蛋白的相似性,牛血清白蛋白(BSA)被广泛运用于与药物结合作用的研究。头孢丙烯(Cefprozil, CE)属第二代高效、低毒、耐酶头孢菌素类抗生素,常用于治疗敏感

菌所致的轻、中度感染,包括上、下呼吸道感染,以及皮肤和皮肤软组织感染等^[5]。因此,研究CE与BSA的相互作用对理解药物的作用机制具有重要意义。以往研究药物与BSA相互作用主要集中在猝灭机制探讨上,而本文在优化试验条件的情况下研究了CE与BSA的结合反应,除了常规的作用机制研究外,还深入探讨了不同温度下两者的结合位点、结合力类型、结合部位、药物之间的协同性以及药物对蛋白质构象的影响等,现报道如下。

1 材料

1.1 仪器

pHS-3C型精密酸度计(上海虹益仪器仪表有限公司);

^Δ 基金项目:云南省教育厅科学研究基金立项项目(No.2015C-090Y)

* 讲师,硕士。研究方向:药物化学、分子发光理论与应用。电话:0874-8998658。E-mail:m18983703680@163.com

Cary50型紫外-可见分光光谱仪(美国瓦里安技术中国有限公司);F-4600型荧光光谱仪(日本日立公司,测定参数:狭缝宽度5 nm,光电倍增管负高压400 V)。

1.2 药品与试剂

CE(中国食品药品检定研究院,批号:130567-201203,纯度:94.9%);牛血清白蛋白(上海楷洋生物技术有限公司,纯度:98%);其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 猝灭试验

取10.0 ml比色管,加入BSA (1.0×10^{-5} mol/L)2.0 ml,再分别加入 9.490×10^{-5} mol/L的CE溶液0.25、0.5、0.75、1、1.25、1.5、1.75、2、2.25、2.5、3 ml,然后加入三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)溶液(0.2 mol/L、pH 7.4)2.0 ml、NaCl溶液(0.5 mol/L)2.0 ml(以维持正常生理离子强度),最后用水稀释至刻度并摇匀,分别在289、299、309 K温度下作用50 min。此时体系中BSA的浓度为 2.0×10^{-6} mol/L,CE的浓度分别为 0 、 $0.237 3 \times 10^{-6}$ 、 $0.474 5 \times 10^{-6}$ 、 $0.711 8 \times 10^{-6}$ 、 $0.949 0 \times 10^{-6}$ 、 $1.186 3 \times 10^{-6}$ 、 $1.423 5 \times 10^{-6}$ 、 $1.660 8 \times 10^{-6}$ 、 $1.898 0 \times 10^{-6}$ 、 $2.135 3 \times 10^{-6}$ 、 $2.372 5 \times 10^{-6}$ 、 $2.847 0 \times 10^{-6}$ mol/L(编号依次为1~12)。作用完毕后立即以最大激发波长(λ_{ex})280 nm、最大发射波长(λ_{em})342 nm在荧光光谱仪上记录荧光猝灭光谱,并分别以 $\Delta\lambda=15$ 、60 nm绘制289 K温度下CE-BSA体系的同步荧光光谱,记录 F_0 和 F (F 和 F_0 分别指CE存在与不存在时BSA的荧光强度)。

2.2 荧光猝灭光谱

289 K温度下CE-BSA体系的荧光猝灭光谱见图1。

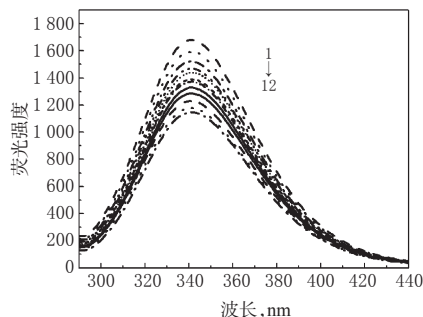


图1 289 K温度下CE-BSA体系的荧光猝灭光谱图

Fig 1 Fluorescence quenching spectrogram of CE-BSA system at 289 K

由图1可见,CE在测量波段没有荧光,而BSA的荧光较强。在 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=280/342$ nm处,当CE加入到BSA之后,虽然 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 几乎未发生变化,但是其荧光强度明显随着CE浓度的增加而逐渐减弱,表明CE能猝灭BSA的荧光,两者之间存在相互作用。

2.3 猝灭类型的判断

引起荧光猝灭的原因很多,但通常分为动态猝灭和静态猝灭。常用温度的改变而引起体系的变化来确定猝灭类型:在动态猝灭中分子扩散起主导,猝灭常数会随着温度的升高而增大;对于静态猝灭,因有新物质生成,稳定性起主导作用,温度越高,猝灭常数反而越小^[6]。

2.3.1 Stern-Volmer方程 动态猝灭过程应遵循Stern-Volmer方程: $F_0/F=1+K_{sv}[c]=1+K_q\tau_0[c]$,式中, K_{sv} 为动态猝灭常数, K_q 为

动态猝灭速率常数[动态猝灭时最大值约为 2×10^{10} L/(mol·s)]^[6], τ_0 为荧光体平均寿命(一般为 10^{-8} s数量级)^[6], $[c]$ 为CE浓度。以289、299、309 K时的 F_0/F 对 $[c]$ 作图,根据 $K_q=K_{sv}/\tau_0$ 可求出不同温度下的 K_q 。不同温度下CE对BSA荧光猝灭的Stern-Volmer曲线见图2,Stern-Volmer方程及相关参数见表1。

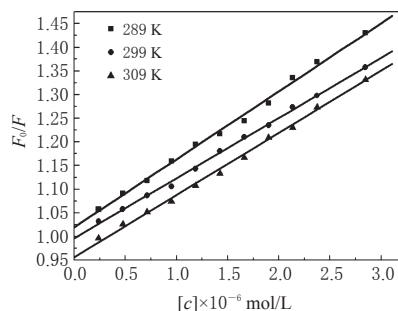


图2 不同温度下CE-BSA体系的Stern-Volmer曲线

Fig 2 Stern-Volmer curves of CE-BSA system at different temperatures

表1 不同温度下CE-BSA体系的Stern-Volmer方程及相关参数

Tab 1 Stern-Volmer equations and correlative parameters of CE-BSA system at different temperatures

温度, K	Stern-Volmer方程	r	K_{sv} , L/mol	K_q , L/(mol·s)
289	$F_0/F=14\ 375[c]+1.019\ 6$	0.997\ 9	14\ 375	$1.437\ 5 \times 10^{12}$
299	$F_0/F=13\ 151[c]+0.956\ 5$	0.997\ 5	13\ 151	$1.315\ 1 \times 10^{12}$
309	$F_0/F=12\ 649[c]+0.998\ 3$	0.996\ 2	12\ 649	$1.264\ 9 \times 10^{12}$

由表1可见,3个温度下的 K_q 比动态猝灭最大速率常数(2×10^{10} L/(mol·s))大2个数量级,说明CE对BSA的猝灭不属于动态猝灭。由图2可知,3个温度下的Stern-Volmer曲线均呈良好的线性关系,且随着温度的升高,直线斜率即 K_{sv} 减小,正好与静态猝灭机制一致。

2.3.2 Lineweaver-Burk方程 若CE对BSA为静态猝灭,应符合Lineweaver-Burk方程^[7-9]: $(F_0-F)^{-1}=F_0^{-1}+(K_{LB}F_0[c])^{-1}$,式中, K_{LB} 为静态猝灭结合常数。以 $(F_0-F)^{-1}$ 对 $[c]^{-1}$ 作不同温度下的Lineweaver-Burk曲线。不同温度下CE对BSA荧光猝灭的Lineweaver-Burk曲线见图3, Lineweaver-Burk方程及相关参数见表2。

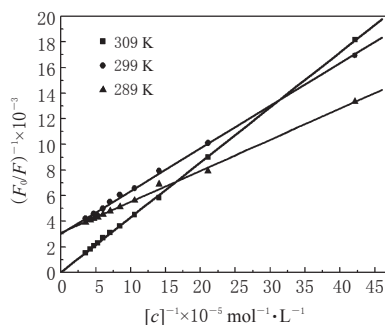


图3 不同温度下CE-BSA体系的Lineweaver-Burk曲线

Fig 3 Lineweaver-Burk curves of CE-BSA system at different temperatures

由图3可知,随着温度的升高,直线斜率逐渐增大,则 K_{LB} 逐渐下降,这与因静态猝灭方式而形成的复合物随温度升高

表2 不同温度下CE-BSA体系的Lineweaver-Burk方程及相关参数

Tab 2 Lineweaver-Burk equations and correlative parameters of CE-BSA system at different temperatures

温度, K	Lineweaver-Burk方程	r	$K_{LB}, L/mol$
289	$(F_0 - F)^{-1} = 2.36182 \times 10^{-8} [c]^{-1} + 0.0019$	0.9984	3.9494×10^4
299	$(F_0 - F)^{-1} = 3.67956 \times 10^{-8} [c]^{-1} + 0.0014$	0.9989	2.1701×10^4
309	$(F_0 - F)^{-1} = 4.69113 \times 10^{-8} [c]^{-1} + 0.0009$	0.9998	1.3874×10^4

越不稳定的作用机制一致。由表2可知,3个温度下的 K_{LB} 都在 10^4 数量级以上,表明CE与BSA由于发生静态猝灭而结合力较强。

2.3.3 紫外吸收光谱^[7-9] 按“2.1”项下方法制备289 K下作用50 min的CE-BSA体系1~12,以相应浓度的CE为参比,在紫外-可见光谱仪上对体系进行紫外光谱扫描,得到CE与BSA结合后的紫外吸收光谱图。紫外吸收光谱见图4。

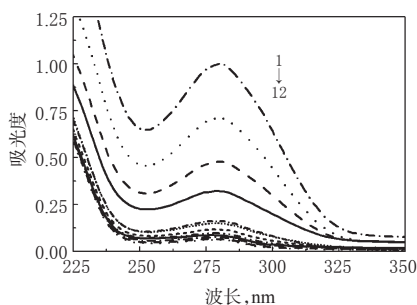


图4 紫外吸收光谱图

Fig 4 UV absorption spectrum

由图4可见,CE的加入使BSA中苯环上的 $\pi-\pi^*$ 跃迁引起的特征吸收峰从280 nm移到274 nm,吸收强度也随CE浓度的增加而增加。CE的加入引起BSA紫外吸收光谱的变化这一现象,说明CE与BSA间发生反应,有新物质生成,更进一步证明两者之间的相互作用机制属于静态猝灭机制。

2.4 结合常数和结合位点数的计算

如CE与BSA存在 n 个等同且独立的结合位点,其相互作用的关系应符合双对数方程: $\lg[(F_0 - F)/F] = \lg K_b + n \lg [c]$ 。分别在289、299、309 K温度下,以 $\lg[(F_0 - F)/F]$ 对 $\lg [c]$ 作图,以直线的斜率和截距求出CE与BSA不同温度下的结合常数(K_b)和结合位点数(n)。不同温度下 $\lg[(F_0 - F)/F] - \lg [c]$ 曲线见图5,不同温度下CE对BSA荧光猝灭的双对数方程及相关参数见表3。

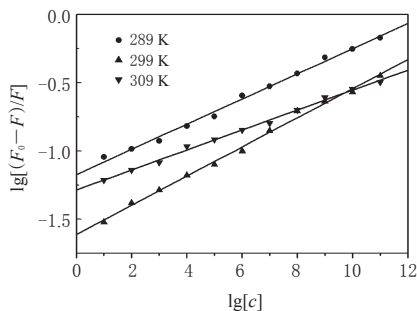


图5 不同温度下CE-BSA体系的 $\lg[(F_0 - F)/F] - \lg [c]$ 曲线

Fig 5 $\lg[(F_0 - F)/F] - \lg [c]$ curves of CE-BSA system at different temperatures

表3 不同温度下CE-BSA体系的双对数方程及相关参数

Tab 3 Double logarithmic equations and correlative parameters of CE-BSA system at different temperatures

温度, K	双对数方程	$K_b, L/mol$	n	r
289	$\lg[(F_0 - F)/F] = 1.0043 \lg [c] + 4.1985$	1.5800×10^4	1.004	0.9981
299	$\lg[(F_0 - F)/F] = 0.9594 \lg [c] + 3.7207$	5.2650×10^3	0.959	0.9947
309	$\lg[(F_0 - F)/F] = 0.8782 \lg [c] + 3.4898$	3.0898×10^3	0.878	0.9989

由表3可见,3个温度下的 n 都约等于1,表明CE与BSA结合后可形成一个结合位点。随着温度增加, K_b 和 n 值减少的程度不大,表明CE与BSA的相互作用对温度变化不是很敏感。这说明温度的提升不利于血清白蛋白携带着CE在体内进行运转、贮存和分配。

2.5 热力学常数和作用力类型判断

根据热力学公式^[10]计算289、299、309 K温度下CE与BSA结合反应的焓变(ΔH)、熵变(ΔS)及吉布斯自由能变(ΔG),结果见表4。

表4 不同温度下CE与BSA相互作用的热力学参数

Tab 4 Thermodynamic parameters of the interaction between CE and BSA at different temperatures

温度, K	$\Delta G, J/mol$	$\Delta H, J/mol$	$\Delta S, J/(mol \cdot K)$
289	-230.6730	-778.7856	-191.37
299	-211.5557	-778.7856	-190.41
309	-205.1015	-778.7856	-186.87

由表4可见, $\Delta G < 0$,表明BSA与CE的反应能自发进行; $\Delta H < 0$,表明反应为放热反应; $\Delta H < 0$ 且 $\Delta S < 0$,表明氢键和范德华力是CE与BSA的主要结合作用力。

2.6 结合位置的确定

应用Maciazek-Jurczyk M、刘保生、梁宏等^[11-13]提出的方法,比较激发波长为280、295 nm时CE-BSA体系荧光程度的变化情况。CE-BSA体系的荧光猝灭曲线见图6。

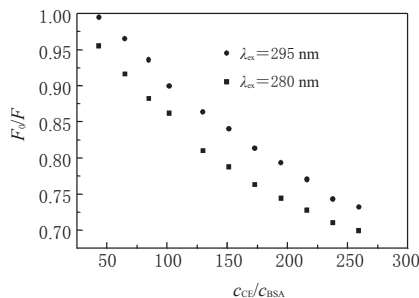


图6 CE-BSA体系的荧光猝灭曲线

Fig 6 Fluorescence quenching curves of CE-BSA system

由图6可知,280、295 nm激发波长下,CE对BSA的猝灭程度曲线没有重叠,说明色氨酸和酪氨酸残基都参与其中。对比这两种波长下的荧光猝灭程度可知,在280 nm激发时降低程度更大些,这说明在CE与BSA的结合过程中,结合位点主要位于亚螺旋域II A。

2.7 药物协同性考察

Maciazek-Jurczyk M、刘保生、梁宏等^[11-13]认为药物协同性是指药物与具有多重结合部位的BSA结合过程中各结合部位之间可能存在相互影响作用,可用Hill方程进行分析: $\lg[H/(1-H)] = \lg K_n + n \lg [c]$,式中, H 为结合饱和分数, K_n 为结

合常数, n_H 为 Hill 系数。在荧光试验中: $H/(1-H)=B/(B_m-B)$, 其中, B 为 $(F_0-F)/F_0$; $1/B_m$ 为 $1/B$ 对 $1/[c]$ 作图的截距。不同温度下 CE-BSA 体系的 n_H 值结果见表 5。

表 5 不同温度下 CE-BSA 体系的 n_H 值

Tab 5 The value of n_H of CE-BSA system at different temperatures

温度, K	n_H	r
289	0.998 4	0.998 8
299	0.979 4	0.995 9
309	0.960 8	0.995 4

由表 5 可知, 3 个温度下的 n_H 都略小于 1, 表现为弱的负协同作用, 说明 CE 与 BSA 结合过程中, 随着配体 CE 不断地结合到结合位点, 使得后继配体对 BSA 的亲性和性减弱, 即前一个药物分子结合到 BSA 位点上后, 对后一个药物分子与 BSA 的结合起到了阻碍作用。随着温度的变化, 虽然 n_H 变化不大, 但也随温度升高而降低, 说明温度的提升对 CE 药物小分子之间的协同作用不利。

2.8 CE 对 BSA 构象的影响

在 $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 的条件下, 测得 CE-BSA 体系的同步荧光光谱见图 7。

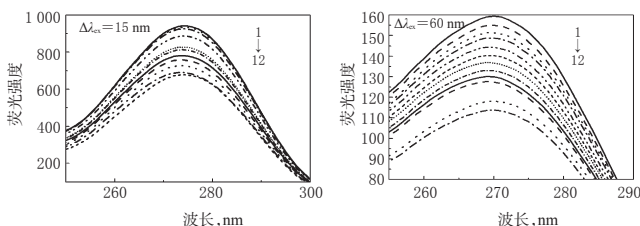


图 7 CE 猝灭 BSA 的同步荧光光谱图

Fig 7 Synchronous fluorescence spectrogram of CE quenching BSA

由图 7 可知, 随 CE 浓度的增大, 这两种氨基酸残基的 λ_{\max} 几乎没有发生移动, 说明 CE 的加入几乎不对 BSA 构象产生影响^[11-13]。酪氨酸的猝灭程度大于色氨酸, 表明 CE 与 BSA 相结合的位点偏向于酪氨酸。

3 讨论

用荧光光谱和紫外吸收光谱法推断出 CE 对 BSA 荧光产生静态猝灭, CE 和 BSA 之间的作用力类型主要为静电作用力; CE 与 BSA 可形成 1 个结合位点, 表明 CE 可被 BSA 运输; $n_H < 1$, 表明 CE 对结合反应产生负协同作用, 即 CE 加入使 BSA 的亲性和性增强, 有利于后续 CE 与 BSA 的结合, 结合部位在 BSA 的亚螺旋域 II A 中。同步荧光光谱表明 CE 几乎不对

BSA 构象产生影响, 结合位点靠近酪氨酸残基。该研究结果为了了解 CE 在体内的运输和代谢过程、毒性机制提供了重要信息。

参考文献

- [1] 谢宝平, 邢惟青, 丘玉昌, 等. 荧光法研究 3 种甲基黄嘌呤类生物碱与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 中国药房, 2011, 22(37): 3 497.
- [2] 汤从容, 曹高忠, 胡卢丰, 等. 咪达唑仑与人血清白蛋白结合的荧光光谱研究[J]. 中国药房, 2012, 23(41): 3 885.
- [3] 张轶, 杨丽娟, 王倩倩, 等. 5-羟甲基糠醛与牛血清白蛋白相互作用的光谱特性研究[J]. 中国药房, 2011, 22(33): 3 095.
- [4] 薛春霞, 董社英. 药物分子与血清白蛋白相互作用的研究进展[J]. 广东化工, 2013, 40(20): 148.
- [5] 龙敏, 曹文霞, 詹倩. 头孢丙烯治疗儿童化脓性扁桃体炎的疗效观察[J]. 中国药房, 2013, 24(8): 707.
- [6] 许金钩, 王尊本. 荧光分析法[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2006: 64.
- [7] 刘里, 彭洪生, 伏云红. 荧光光谱法研究头孢孟多酯与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 中国测试, 2014, 40(3): 64.
- [8] 麻能轩, 慕丽晓, 李瑞金, 等. 头孢哌酮和乳酸环丙沙星与人血清白蛋白相互作用的荧光光谱研究[J]. 中国药房, 2013, 24(33): 3 084.
- [9] 刘里. 光谱法研究马来酸氯苯那敏与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 西北师范大学学报: 自然科学版, 2014, 55(5): 44.
- [10] Ross PD, Subramanian S. Thermodynamic of protein association reactions: forces contributing to stability[J]. *Biochemistry*, 1981, 20(11): 3 096.
- [11] Maciazek-Jurczyk M, Sulkowska A, Bojko B, et al. Fluorescence analysis of competition of phenylbutazone and methotrexate in binding to serum albumin in combination treatment in rheumatology[J]. *J Mol Struct*, 2009, doi: 10.1016/j.molstruc.2008.12.023.
- [12] 刘保生, 杨超, 王晶, 等. 硫酸头孢匹罗与牛血清白蛋白结合反应的发光机理[J]. 发光学报, 2011, 32(3): 295.
- [13] 梁宏, 边贺东, 涂楚桥, 等. La(III) 与 HSA 或 BSA 的结合平衡研究[J]. 高等学校化学学报, 2001, 22(1): 21.

(收稿日期: 2014-12-13 修回日期: 2015-01-21)

(编辑: 邹丽娟)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊, 欢迎投稿、订阅