

荧光光谱法研究头孢孟多酯与牛血清白蛋白的相互作用

刘 里, 彭洪生, 伏云红

(曲靖师范学院化学化工学院, 云南 曲靖 655011)

摘 要:模拟生理条件下,用荧光光谱法和紫外-可见吸收光谱法研究头孢孟多酯和牛血清白蛋白(BSA)结合反应的特征。研究表明:头孢孟多酯与 BSA 形成复合物,从而猝灭 BSA 的内源性荧光,该过程为静态猝灭过程。根据 Stern-Volmer 方程得出不同温度下结合位点数 n 和结合常数 K_a ;结合位点位于 BSA 的亚结构 IIA 中。通过计算相应的热力学参数,确定头孢孟多酯与 BSA 之间的作用力主要为静电作用力。利用同步荧光光谱探讨了头孢孟多酯与 BSA 作用前后白蛋白的构型变化。Hill 系数 $n_H < 1$,表明头孢孟多酯有弱的负协同作用。此研究不仅对于揭示体内药物动力学问题和指导临床合理用药具有一定意义,而且对药物分子设计及新药开发等也具有重要指导意义。

关键词:头孢孟多酯;牛血清白蛋白;荧光光谱法;紫外-可见吸收光谱法

中图分类号:R961;O657.31;R927;R978.1*1

文献标志码:A

文章编号:1674-5124(2014)03-0064-04

Study on interaction between cefamandole and bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy

LIU Li, PENG Hong-sheng, FU Yun-hong

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Qujing Normal University, Qujing 655011, China)

Abstract: The interaction between cefamandole and bovine serum albumin (BSA) was studied with fluorescence spectra and UV-visible absorption spectra in the presence of simulating physiological systems. It showed that the complex formed by BSA and cefamandole led to the static quenching of the intrinsic fluorescence of BSA. The binding site number n and apparent binding constant K_a were measured according to the Stern-Volmer equation. The primary binding site for cefamandole was located at site I in subdomain IIA of BSA. The author also confirmed that the main sorts of binding force between cefamandole and BSA was the electro-static force. Meanwhile, synchronous fluorescence was used to investigate the structure change of BSA before and after the introduction of cefamandole. The values of Hill's coefficients were less than 1, which indicated that there was some negative cooperative effect. It is not only valuable to reveal the pharmacokinetics, clinical therapy, but also guiding significance for drug design and development of new drugs.

Key words: cefamandole; bovine serum albumin; fluorescence spectroscopy; UV-visible absorption spectra

0 引 言

近年来采用荧光光谱法研究药物和蛋白质的相

收稿日期:2013-06-17;收到修改稿日期:2013-08-29

基金项目:云南省科技计划项目(2009CD095)

作者简介:刘 里(1982-),女,吉林省吉林人,讲师,硕士,主要从事纳米材料和分子发光学理论与应用研究。

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。牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)是结构剖析比较成熟的蛋白质^[1-2],是各学科研究蛋白质与小分子相互作用的对象。头孢孟多酯(cefamandole, CEF)为第二代头孢菌素类抗生素,对白喉杆菌和革兰阳性厌氧菌(厌氧球菌和梭状芽孢

杆菌)均有良好作用,对大肠埃希菌、奇异变形杆菌、肺炎克雷伯菌和流感嗜血杆菌的活性较头孢噻吩和头孢唑林为强^[3]。目前,分子光谱法研究药物小分子与生物大分子的相互作用已有报道^[4-5],但未见 CEF 与 BSA 相互作用的研究。本文采用光谱法研究 CEF 与 BSA 的相互作用,提供一些重要的信息。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

F-4600 荧光分光光度计(日本日立公司),测定参数:狭缝宽度 5.0 nm,光电倍增管(PMT)负电压为 700 V; Cary 50 型紫外可见分光光度计(美国瓦里安技术中国有限公司);pHS-3C 精密酸度计(上海虹益仪器仪表有限公司)。超级恒温水浴锅(DHG-9035A 型,上海一恒科技有限公司)。

牛血清白蛋白(BSA,上海楷样生物技术有限公司)配制成浓度为 1.0×10^{-4} mol/L 的水溶液;头孢孟多脂(CEF,87.3%中国药品生物制品检定所)配制成浓度为 8.73×10^{-4} mol/L;并保存于 $0 \sim 4$ °C 的冰箱中。其他试剂均为分析纯,实验用水为超纯水。

1.2 试验方法

于 10.0 mL 比色管中依次加入不同体积的 8.73×10^{-5} mol/L 的 CEF 溶液, 1.0×10^{-6} mol/L 的 BSA 2.5 mL, 0.2 mol/L、pH=7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液 2 mL; 0.5 mol/L NaCl 溶液 2.0 mL 以保持反应体系的离子强度;用水释至刻度并摇匀,放置 50 min。荧光分光光度计记录荧光光谱,其最大激发和发射波长($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$)位于 280 nm/340 nm 处,于 1 cm 石英池中分别测量反应体系的荧光强度 F 及试剂空白的荧光强度 F_0 , $\Delta F = F_0 - F$ 。固定荧光发射与激发的波长差分别为 $\Delta\lambda = 15$ nm 和 $\Delta\lambda = 60$ nm,扫描同步荧光光谱。

2 结果与讨论

2.1 荧光光谱

图 1 是按照实验方法改变 CEF 浓度时的 BSA 荧光发射光谱图,可以看出随着 CEF 浓度的增大,BSA 的荧光强度有规律地猝灭,表明 CEF 与 BSA 之间发生了相互作用。

2.2 适宜的反应条件

分别考察了不同缓冲溶液、pH、缓冲溶液的用量、BSA 的浓度、试剂加入顺序以及反应时间对体系荧光强度的影响。结果表明,实验选用 pH=7.40 的 Tris-HCl 缓冲溶液 2.0 mL 调节酸度, 2.5×10^{-7} mol/L BSA 作为反应浓度, BSA → CEF → Tris-HCl → NaCl 的加入顺序以及溶液放置 50 min 后 ΔF 基本保持稳定达到且最大,因此实验按照优化出来的结果进行荧光测量。

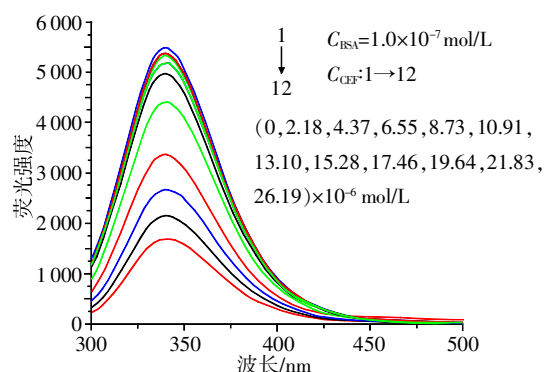


图 1 头孢孟多脂与 BSA 的荧光光谱

2.3 BSA 与 CEF 的结合反应

2.3.1 荧光猝灭机理

荧光猝灭机理有动态、静态和静态动态混合猝灭 3 种^[6]。动态猝灭遵从 Stern-Volmer 方程^[7-8]:

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

式中: K_q ——双分子猝灭过程的速率常数;

K_{sv} ——Stern-Volmer 猝灭常数;

$[Q]$ ——猝灭剂浓度。

猝灭过程若为静态猝灭,荧光强度与猝灭剂浓度之间的关系可适用于改进的 Stern-Volmer 方程^[7-8]:

$$F_0/F = 1 + K [Q] \quad (2)$$

式中: K ——配合物的形成常数。

但在某些情况下静态猝灭与动态猝灭可能同时存在,混合猝灭 Stern-Volmer 曲线向上弯曲^[7-8]。

为了确定荧光猝灭机理的类型,按照实验方法在 286, 296, 306 K 时,测定不同浓度 CEF 下 BSA 的相对荧光强度,并作 $F_0/F - [Q]$ 图,结果见表 1。Stern-Volmer 曲线均呈良好的线性关系,表明 CEF 对 BSA 的荧光猝灭机理不是静态动态混合猝灭。

表 1 Stern-Volmer 线性回归方程的相关参数

温度/K	Stern-Volmer 方程	相关系数	$K_{sv}/(L \cdot mol^{-1})$	$K_q/(L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1})$
286	$F_0/F = 19.622[Q] + 0.9474$	0.9964	19.622	1.9622×10^{12}
296	$F_0/F = 15.779[Q] + 0.9507$	0.9964	15.779	1.5779×10^{12}
306	$F_0/F = 13.342[Q] + 1.0068$	0.9956	13.342	1.3342×10^{12}

通常认为各类猝灭剂对生物大分子的最大动态猝灭常数为 2.0×10^{10} L/(mol·s)^[8]。从表 1 可知, K_q ($K_q = K_{sv}/\tau_0$, 其中 $\tau_0 = 10^{-8}$ s^[8]) 远远大于 2.0×10^{10} L/(mol·s), 可判断该荧光猝灭过程为静态猝灭。且表 1 显示随着温度升高 K_{sv} 减小, 也表明该过程是静态猝灭。

若猝灭过程为静态猝灭,则应符合 Lineweaver-Burk 方程^[8]:

$$(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + (K_{LB} F_0 [Q])^{-1} \quad (3)$$

式中: K_{LB} ——静态荧光猝灭结合常数。

$(F_0-F)^{-1}-[Q]^{-1}$ 作不同温度下的 Lineweaver-Burk 曲线,结果表明 CEF 与 BSA 结合作用较强(见表2)。同时在整个实验浓度范围内该直线具有良好的线性关系,说明 CEF 与 BSA 的作用更符合静态猝灭的特征。

表2 Lineweaver-Burk 线性回归方程的相关参数

温度/K	Lineweaver-Burk 方程	相关系数	$K_{LB}/(L \cdot mol^{-1})$
289	$(F_0-F)^{-1}=4.59233 \times 10^{-8}[Q]^{-1}+0.0009$	0.9973	9.6386×10^4
299	$(F_0-F)^{-1}=2.78926 \times 10^{-8}[Q]^{-1}+0.0014$	0.9982	1.7253×10^4
309	$(F_0-F)^{-1}=2.49293 \times 10^{-8}[Q]^{-1}+0.0019$	0.9982	2.0538×10^4

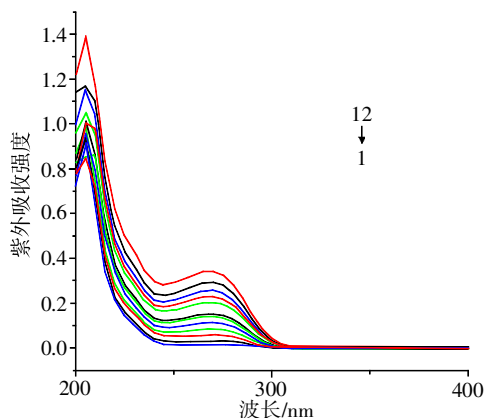


图2 头孢孟多脂与牛血清白蛋白混合溶液的紫外示差吸收光谱

2.3.2 紫外吸收光谱

图2为加入 CEF 前后 BSA 荧光光谱的变化情况。可以看出,随着 CEF 浓度的增加,BSA 的最大吸收的吸光度明显增大,并且最大吸收峰从 280nm 处红移至 285 nm 处,可以推断基态的 BSA 与 CEF 之间一定发生了相互作用。在基态时生成不发光的配合物,从而引起 BSA 紫外吸收光谱的变化。由于动态猝灭只影响荧光分子的激发态,并不改变荧光物质的吸收光谱^[9],进一步证明猝灭过程是由静态猝灭引起的。

2.3.3 结合常数和结合位点

设生物大分子有 n 个相同且独立的结合位置,可以通过公式推导得到方程^[8-10]:

$$\lg[(F_0-F)/F]=\lg K_a+n \lg [Q] \quad (4)$$

以 $\lg[(F_0-F)/F]$ 对 $\lg[Q]$ 作 286,296,306K 的图,可求出药物分子与蛋白质分子作用的结合常数 K_a 和结合位点数 n 。所得结果列于表3。所得数据表明,CEF 与 BSA 有一定的结合能力,可形成一个结合位点,能在体内被蛋白质储存和转运。并且随着温度的升高, K_a 减小,进一步验证了静态猝灭的机理。

2.3.4 热力学参数与结合力类型

Ross 等^[10]总结出小分子与生物大分子反应的热力学参数与主要作用力类型的关系, $\Delta H < 0, \Delta S > 0$ 主

表3 头孢孟多脂与 BSA 的结合常数 K_a 以及结合位点数 n

温度/K	双对数方程	$K_a/(L \cdot mol^{-1})$	n	r
286	$\lg[(F_0-F)/F]=1.3949 \lg[Q]+6.0058$	1.5800×10^4	1.3949	0.9987
296	$\lg[(F_0-F)/F]=1.1331 \lg[Q]+4.6632$	5.2650×10^3	1.1331	0.9974
306	$\lg[(F_0-F)/F]=0.9915 \lg[Q]+4.0434$	3.0898×10^3	0.9915	0.9988

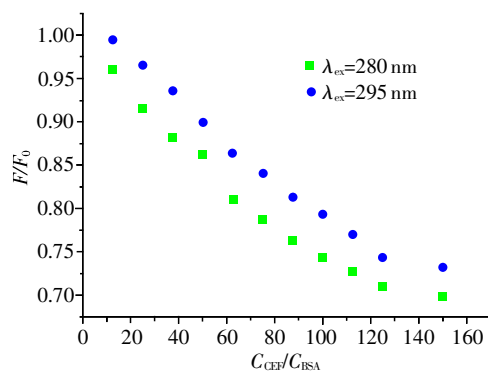
要表现为静电作用力。因此,表4的数据表明,CEF 与 BSA 之间的主要作用力是静电作用力。

表4 不同温度下 CEF 与 BSA 相互作用的热力学参数

温度/K	自由能/ ($J \cdot mol^{-1}$)	焓/ ($kJ \cdot mol^{-1}$)	熵/ ($J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$)
286	-23067.30	-37.79	80.24
296	-21155.57	-37.39	71.10
307	-20510.15	-37.39	66.69

2.4 结合位置的确定

Sulkowska 等^[11-13]认为比较激发波长为 280 nm 和 295 nm 时的 BSA 的荧光猝灭光谱,可以了解酪氨酸残基和色氨酸残基在药物分子与 BSA 的结合反应中的参与情况,并确定其结合的具体位置^[12]。由图3可知,在激发波长为 280nm 和 295nm 时,CEF 对 BSA 的猝灭曲线没有重叠,且在 280nm 时的蛋白荧光猝灭比 295nm 时的猝灭程度大,表明在 CEF 与 BSA 的反应中色氨酸和酪氨酸残基均参加了作用。进而可以确定,CEF 与 BSA 的结合位点主要位于亚结构域 IIA。

图3 λ_{ex} 为 280 nm 和 295 nm 时,CEF 与 BSA 作用的相对荧光猝灭曲线

2.5 药物协同性

按照文献^[13-14]的方法计算 CEF-BSA 的 n_H 值,计算结果见表5。各温度下的 n_H 均小于 1,说明 CEF-BSA 结合过程中,随着配体 CEF 不断结合到结合位点上,导致后继配体对 BSA 的亲合性有所降低,表现为负协同作用。

2.6 头孢孟多脂对 BSA 构象的影响

由于蛋白质中酪氨酸、色氨酸残基的最大荧光发射波长与其所处环境的极性有关,因此,根据最大荧光发射波长的改变可判断蛋白质构象的变化。按

表 5 不同温度时各体系的 Hill 系数 n_H

T/K	n_H	r
289	0.9972	0.9983
299	0.9811	0.9973
309	0.9775	0.9965

实验方法, 固定 BSA 的浓度, 逐渐增加 CEF 的浓度, 分别在 $\Delta\lambda=15\text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda=60\text{ nm}$, 测得头孢孟多脂猝灭 BSA 的同步荧光光谱如图 4 所示。

可以看出, 随 CEF 浓度的增大, $\Delta\lambda=15\text{ nm}$ 酪氨酸和 $\Delta\lambda=60\text{ nm}$ 色氨酸残基的最大发射波长均有红移, 表明 CEF 与 BSA 作用改变了色氨酸、酪氨酸残基所处的微环境。氨基酸微环境的改变使得 BSA 腔内疏水环境的极性增强, 疏水性减弱^[13-15], 从而导致 BSA 的构象发生了变化。高浓度药物使蛋白质分子伸展, 降低了氨基酸残基间的能量传递, 使两者的荧光强度降低。

3 结束语

采用荧光光谱法和紫外-可见吸收光谱法研究头孢孟多酯和牛血清白蛋白结合反应的特征。研究表明: CEF 与 BSA 形成复合物, 从而猝灭 BSA 的内源性荧光, 该过程为静态猝灭过程。根据 Stern-Volmer 方程得出了不同温度下结合位点数和结合常数; 结合位点位于 BSA 的亚结构 IIA 中。通过计算相应的热力学参数, 确定了 CEF 与 BSA 之间的作用力主要为静电作用力。利用同步荧光光谱探讨了 CEF 与

BSA 作用前后白蛋白的构型变化。Hill 系数 $n_H < 1$, 表明 CEF 有弱的负协同作用。研究不仅可以获得蛋白质分子中荧光生色基团的种类、结构和所处微环境及其分布情况等信息, 还有助于从分子水平上揭示药物与蛋白质的结合特性, 这对于了解药物在体内的运输和代谢过程、阐明药物的作用机制及生物大分子与药物小分子相互作用的化学本质, 从而为指导临床用药和药物分子设计均具有较大意义。

参考文献

- [1] 王克夷. 蛋白质导论[M]. 北京: 科学出版社, 2007(1):.
- [2] Ulrich K H. Molecular aspects of ligand binding to serum albumin[J]. *Pharmacol Rev*, 1981(33):17-53.
- [3] 赵玉新, 刘丹, 任吉秋. 气相色谱法测定头孢孟多酯钠的残留溶剂[J]. *中国医药导报*, 2010, 13(7):49.
- [4] Bogdam S. Fluorescence study of sinapic acid interaction with bovine serum albumin and egg albumin[J]. *Fluorescence*, 2003, 13(4):349-356.
- [5] 白海鑫, 杨成, 杨秀荣. 牛血清白蛋白与 Indo-1 相互作用的荧光光谱法研究[J]. *高等学校化学学报*, 2007, 28(2): 227-233.
- [6] Lakowicz J R. Principles of fluorescence spectroscopy[M]. 2nd ed. New York: Plenum Press, 1986:264.
- [7] 许金钧, 王尊本. 荧光分析法[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2006:42-60.
- [8] Lakowicz J R. Principles of fluorescence spectroscopy[M]. 3rd ed., Springer Press, New York, 2006:280.
- [9] Cyril L, Earl J K, Sperry W M. Biochemists handbook[M]. London: EponLed Press, 1961:84.
- [10] Ross D P, Subramantan S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability[J]. *Biochemistry*, 1981, 20(11):3096-3102.
- [11] Sulkowska A, Maciazek-Jurczyk M, Bojko B, et al. Competitive binding of phenylbutazone and colchicine to serum albumin in multidrug therapy[J]. *J Mol Struct*, 2008, 81(1-3):97-106.
- [12] 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, 924-926:378-384.
- [13] 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):295-296.
- [14] 梁宏, 边贺东, 涂楚桥, 等. La(IV)与 HSA 或 BSA 的结合平衡研究[J]. *高等学校化学学报*, 2001, 2(1):21-25.
- [15] Xu H, Gao S L, Lv J B, et al. Spectroscopic investigations on the mechanism of interaction of crystal violet with bovine serum albumin[J]. *Mol Struct*, 2009, 919(1-3): 334-338.

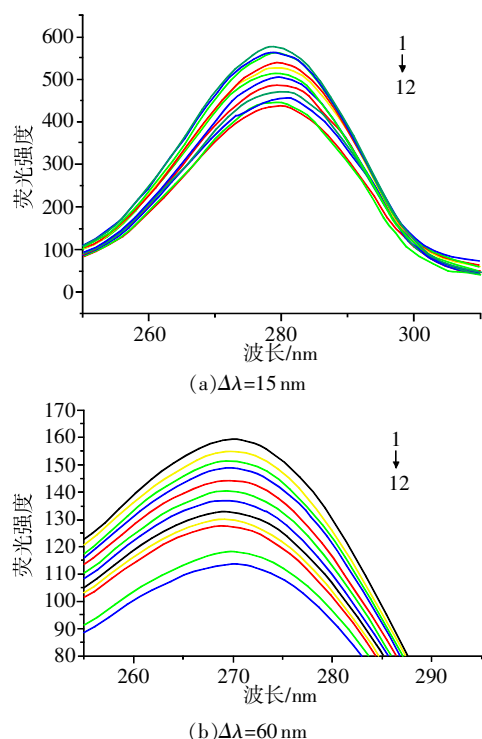


图 4 头孢孟多脂猝灭 BSA 的同步荧光光谱图