

doi: 103969/j.issn.0490-6756.2017.03.022

光谱法研究穿琥宁与牛血清白蛋白的相互作用

刘 里¹, 成飞翔²

- (1. 曲靖师范学院化学与环境科学学院, 曲靖 655011;
2. 曲靖师范学院云贵高原化学功能材料与污染治理研究中心, 曲靖 655011)

摘要: 穿琥宁(PDS)是一种药物,被广泛用于治疗病毒性肺炎,病毒性上呼吸道感染等的消炎药,被誉为“中药抗生素”。在优化的实验条件下,运用荧光和紫外光谱法,在不同的温度下研究穿琥宁与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用及共存金属离子的影响,用 Stern-Volmer, Lineweaver-Burk 和 双对数方程计算了速率常数(K_q),表观猝灭常数(K_{sv}),结合常数(K_A),静态荧光猝灭缔合常数(K_{LB})和结合位点数(n)。结果表明:穿琥宁能结合 BSA。由于生成 PDS-BSA 复合物,穿琥宁对 BSA 的猝灭是静态猝灭机理。热力学参数表明是一个自发过程,其作用力类型主要为静电作用力。至少一个结合位点。BSA 的亚螺旋域IIA 和 IIIA 是主要结合位置,离酪氨酸残基更近,无药物协同作用。穿琥宁对 BSA 构象产生影响。 Pb^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Cu^{2+} 对 PDS 与 BSA 结合产生竞争作用,增强药效。 Cr^{3+} 对穿琥宁与 BSA 结合产生促进作用,延长药效时间。该研究结果对揭示药物动力学问题及新的抗病毒类中草药的研发提供了理论依据。

关键词: 穿琥宁; 相互作用; 金属离子

中图分类号: R961; R285.5; O657.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2017)02-0351-06

Study on the interaction between potassium dehydroandrographolide succinate and bovine serum albumin by spectroscopic methods

LIU Li¹, CHENG Fei-Xiang²

- (1. College of Chemistry and Environmental Engineering, Qujing Normal University, Qujing 655011, China;
2. Yunnan Guizhou Plateau Chemical Functional Materials and Pollution Governance Research Center, Qujing 655011, China)

Abstract: Dehydroandrographolide Succinate (PDS) is a drug, widely used to treat viral pneumonia, viral upper respiratory tract infection such as anti-inflammatory drugs, known as the “Chinese medicine antibiotics”. Herein, under the optimal conditions, fluorescence and absorption spectroscopies were used to study the interaction of PDS with bovine serum albumin (BSA) and the effects of metal ions at different temperatures. The rate constant (K_q), apparent quenching constant (K_{sv}), binding constant (K_A) and static fluorescence quenching association constant (K_{LB}) and binding site number(n) were calculated using Stern-Volmer, Lineweaver-Burk and Double logarithm equations. The results show that PDS is able to bind to BSA. The probable quenching mechanism of BSA by PDS was mainly static due to the formation of a PDS-BSA complex. The results of thermodynamic parameters indicate that electrostatic force plays the main role in the binding process and the binding process is spontaneous. The obtained data for binding sites of n approximately equal to 1 indicates that there is a single class of binding site for the BSA with PDS. The primary binding site for PDS is located at sub-domain IIA and IIIA of BSA and near by tyrosine residue. There is almost no cooperative effect. The results obtain from synchro-

收稿日期: 2016-01-06

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金(2015C090Y); 国家自然科学基金(21261019)

作者简介: 刘里(1982-),女,满族,讲师,主要从事药物化学和分子发光学理论与应用研究。E-mail: m18908746298@163.com.

nous fluorescence showed that the interaction between BSA and PDS causes the conformational changes of BSA. Pb^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} and Cu^{2+} compete with the interaction of PDS with BSA, increasing medical effectiveness. Cr^{3+} promoted on interaction and prolonged drug effect time. The obtained results provided a theoretical basis for revealing the pharmacokinetics and further research on development of new anti virus herbs drugs.

Keywords: Potassium Dehydroandrograpolid Succinate; Interaction; Metal Ions

1 引言

随着药代动力学和临床药理学的蓬勃发展,人们对药物与蛋白质结合对药代动力学的影响,有了更好的认识.由于对药物与血清白蛋白的相互作用不仅能表明药物在体内运输和新陈代谢过程,而且也能揭示机理、药物毒性以及药代动力学.因此,研究药物与血清白蛋白的相互作用显得尤其重要^[1-3].研究穿琥宁(简称 PDS),是爵床科植物穿心莲提取物—穿心莲内酯经酯化、脱水、成盐而制成的精制脱水穿心莲内酯琥珀酸半脂单钾盐,是用于治疗病毒性肺炎,病毒性上呼吸道感染等的消炎药,被誉为“中药抗生素”^[2].国内外的研究都是对其进行疗效的分析^[1],至今还没有用光谱法研究 PDS 与 BSA 的结合特征.本文优化了体系的实验条件,探讨了 PDS 与 BSA 的相互作用机理,测定了三个温度下的结合位点数,热力学常数,分析了 PDS 与 BSA 结合对蛋白质构象的影响,金属离子的影响,药物的协同作用,结合力类型以及结合位置等.这些研究对于阐明 PDS 在机体内的传输、代谢过程及药理作用具有有益的参考意义.

2 实验部分

2.1 实验仪器与试剂

上海虹益仪器仪表有限公司 pH5-3C 型精密酸度计;上海一恒科技有限公司 HWS12 型超级恒温水浴;日本日立公司 F-4600 型荧光光谱仪;美国瓦里安技术中国有限公司 Cary 50 型紫外-可见光谱仪.穿琥宁:江莱化学科技(上海)有限公司,含量:99%;牛血清白蛋白:上海楷样生物技术有限公司,含量:99%.其它试剂都为分析纯,实验用水为超纯水.

2.2 实验方法

依次加入不同浓度的 PDS 溶液(0、0.52575、1.0515、1.5773、2.1030、2.6288、3.1545、3.6803、4.2060、4.7318、5.2575、5.7833) $\times 10^{-4}$ mol \cdot L⁻¹ (编号依次为 1~12),BSA(1×10^{-7} mol/L),NaCl 溶液(0.1 mol/L),pH=7.4 的三羟甲基氨基甲烷

盐酸盐(Tris-HCl)溶液(0.015 mol/L)于 10 mL 比色管中,定容.在 296 K、311 K、326 K 温度下孵育 180 min 后,以 280 nm 为激发波长,扫描发射光谱.记录空白溶液的荧光强度为 F_0 .和样品溶液的荧光强度为 F , $\Delta F = F_0 - F$.测定浓度比为 1:1 的 BSA 与 PDS 溶液的紫外吸收光谱.在 PDS-BSA 体系中加入金属离子(1×10^{-4} mol/L⁻¹),测其荧光光谱.

3 结果与讨论

3.1 猝灭光谱

由于 BSA 分子中存在着酪氨酸(Tyr)、色氨酸(Trp)等能够发射荧光的芳香性氨基酸残基,所以它是一种典型的内源荧光物^[3].其最大激发和发射波长($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$)位于 280 nm/340 nm 处.从图 1 可知,当 280 nm 激发时,有 2 个发射峰在 340 nm 和 439 nm.随着 PDS 浓度的增加,340 nm 处峰高逐渐降低, $\lambda_{em}=439$ nm 处,荧光强度增加,说明 PDS 对 BSA 的荧光有明显的猝灭作用.

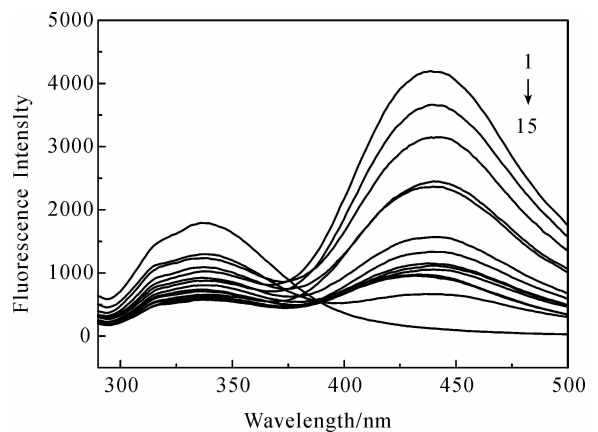


图 1 PDS 对 BSA 猝灭光谱

Fig. 1 Quenching spectra of PDS with BSA

3.2 最佳的相互作用条件

3.2.1 缓冲溶液 缓冲溶液的选择不同,对 PDS 与 BSA 相互作用的影响较大(图 2).其中,Tris-HCl 缓冲溶液效果对其相互作用最佳.

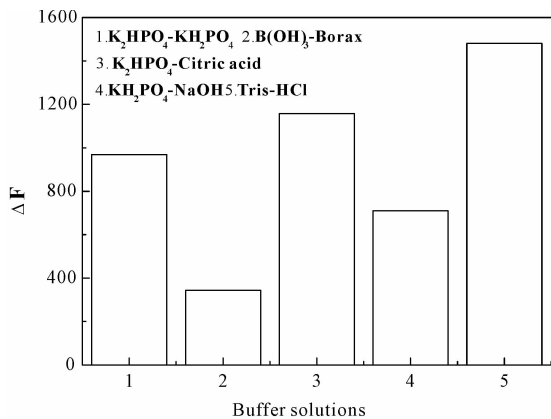
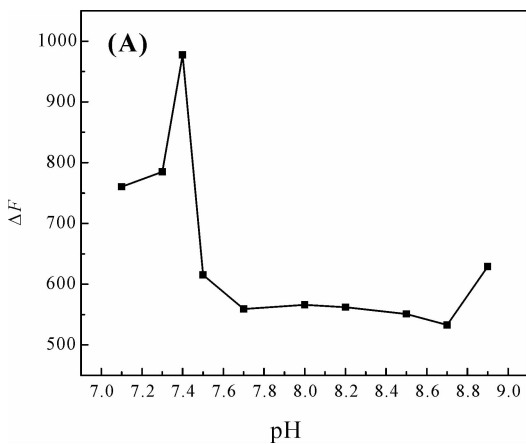


图 2 缓冲溶液的影响

Fig. 2 Different buffer solutions



3.2.2 pH 值 在 Tris-HCl 缓冲范围内, 体系的 ΔF 随溶液 pH 值变化而改变(图 3(A)). pH = 7.4 时, 达到最佳. 由图 3(B) 可知, Tris-HCl 用量为 1.5 mL 时, ΔF 达到最大值. 最终确定 pH = 7.4, 0.015 mol/L Tris-HCl 作为 PDS 与 BSA 相互作用的缓冲溶液.

3.2.3 BSA 的浓度 固定其它实验条件, 改变 BSA 的浓度, 测定 BSA 溶液分别为: 1.25×10^{-7} 至 2.75×10^{-7} mol \cdot L $^{-1}$ 时对体系的荧光强度的影响(图 4). 2.0×10^{-7} mol \cdot L $^{-1}$ BSA 作为反应的浓度最佳.

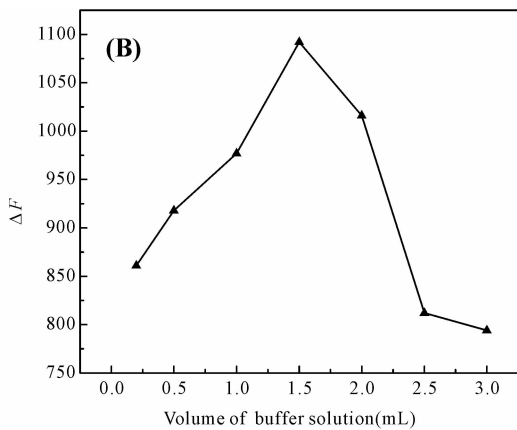


图 3 缓冲溶液的 pH 及用量对荧光强度的影响

Fig. 3 Effect of acidity intensity

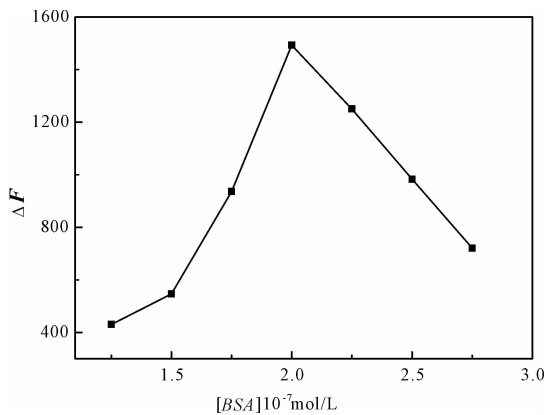


图 4 BSA 浓度的影响

Fig. 4 Effect of concentrations of BSA

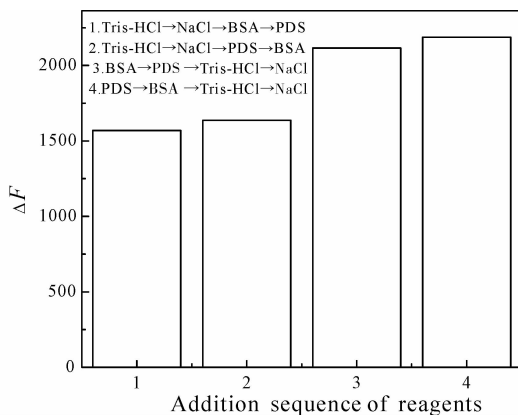


图 5 试剂加入顺序的影响

Fig. 5 Effect of Addition sequence of reagents

3.2.4 试剂加入顺序 图 5 是不同的加入顺序对 PDS 与 BSA 相互作用的影响. 加入顺序影响 PDS 与 BSA 结合, PDS \rightarrow BSA \rightarrow NaCl \rightarrow Tris-HCl 的加入顺序最佳.

3.2.5 孵育时间 考察 300 min 内孵育时间对体系的影响(图 6). 实验表明, PDS 与 BSA 的相互作用在 296 K 温度下需要 180 min 才能完成并稳定.

3.3 猝灭机理

荧光猝灭机理通常可分为动态猝灭和静态猝

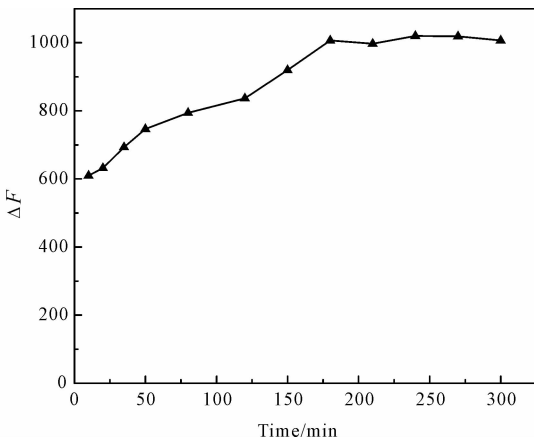


图 6 反应时间的影响
Fig. 6 Effect of reaction time

表 1 Stern-Volmer 方程与相关参数

Tab. 1 Stern-Volmer equations and correlation coefficients

温度 T/K	Stern-Volmer 方程	K _{sv} /(L · mol ⁻¹)	K _q /(L · mol ⁻¹ · s ⁻¹)	相关系数 r
296	$F_0/F = 4116[\text{PDS}] + 0.5943$	4116	4.12×10^{11}	0.9990
311	$F_0/F = 3402[\text{PDS}] + 0.6350$	3402	3.40×10^{11}	0.9991
326	$F_0/F = 2461[\text{PDS}] + 0.8237$	2462	2.46×10^{11}	0.9995

静态猝灭过程, 遵循 Lineweaver-Burk 双倒数方程^[7]: $(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + (K_{LB}F_0[\text{PDS}])^{-1}$, 其中: K_{LB} 为静态荧光猝灭缔合常数. 用 $(F_0 - F)^{-1}$ 对 $[\text{PDS}]^{-1}$ 作不同温度下的 Lineweaver-Burk 曲线

计算 K_{LB} 值列于表 2 中. K_{LB} 在 10^3 数量级左右, 表明 PDS 与 BSA 形成的复合物稳定性较好. 随着温度的升高, K_{LB} 降低, 表明高温时复合物稳定性变差.

表 2 Lineweaver-Burk 方程与相关参数

Tab. 2 Lineweaver-Burk equations and correlation coefficients

温度 T/K	Lineweaver-Burk 方程	$K_{LB}/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	相关系数 r
296	$(F_0 - F)^{-1} = 1.29 \times 10^{-7}[\text{PDS}]^{-1} + 4.47 \times 10^{-4}$	3.59×10^3	0.9989
311	$(F_0 - F)^{-1} = 5.06 \times 10^{-7}[\text{PDS}]^{-1} - 1.06 \times 10^{-4}$	8.96×10^2	0.9970
326	$(F_0 - F)^{-1} = 2.20 \times 10^{-7}[\text{PDS}]^{-1} + 5.40 \times 10^{-4}$	2.39×10^3	0.9965

另一种推断猝灭机理的重要方法是紫外吸收光谱法^[8]. 在实验条件下, 测定了 PDS 溶液和 PDS 与 BSA 等摩尔混合物的吸收光谱图(图 7). 曲线 1 表明 PDS 在 255 nm 处有一吸收峰, 曲线 2(BSA) 和曲线 3(PDS 和 BSA 混合液)在 278 nm 处有一吸收峰, 对比曲线 4(曲线 1 与曲线 2 相加)和曲线 3 可发现两曲线明显不重合, 表明推断 PDS 与 BSA 静态猝灭机理是合理的.

3.4 结合常数 K_A 和结合位点数 n

PDS 与 BSA 的结合常数 K_A 以及结合位点数 n 双对数方程^[7] $\lg[(F_0 - F)/F] = \lg K_A + n \lg [\text{PDS}]$ ^[8]. 由 $\lg[(F_0 - F)/F]$ 对 $\lg[\text{PDS}]$ 作图, 由直线截距可得结合常数 K_A , 斜率可求 n , 计算结果见表 3.

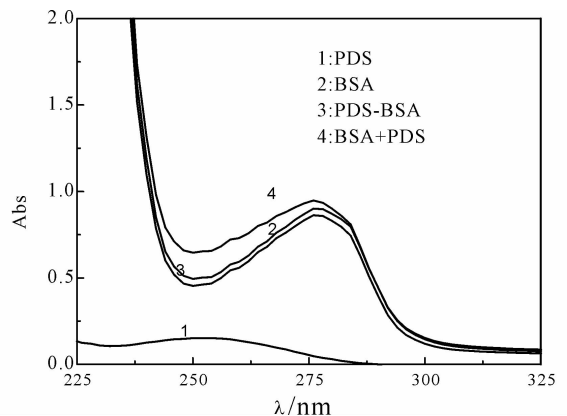


图 7 PDS、BSA 和 PDS-BSA 的紫外光谱图
Fig. 7 The UV spectra of PDS, BSA and PDS-BSA

由表 3 可看出, n 对于温度变化比较敏感, 296 K 和 326 K 时, n 接近 1, 表明 PDS 与 BSA 可形成 1 个结合

位点; 当 311 K 时, $n \approx 2$, 可形成 2 个结合位点. K_A 为 10^6 数量级, 表明 PDS 与 BSA 之间有很强的结合作用.

表 3 PDS-BSA 的 K_A 和 n
Tab. 3 K_A and n of PDS-BSA

温度 T/K	双对数方程	$K_A/L \cdot \text{mol}^{-1}$	n	相关系数 r
296	$\lg[(F_0 - F)/F] = 1.068 \lg[\text{PDS}] + 6.764$	5.810×10^6	1.068	0.9966
311	$\lg[(F_0 - F)/F] = 1.682 \lg[\text{PDS}] + 6.684$	4.831×10^6	1.682	0.9963
326	$\lg[(F_0 - F)/F] = 1.051 \lg[\text{PDS}] + 5.498$	3.148×10^6	1.051	0.9983

3.5 作用力类型

根据热力学公式 $\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K$ 和 $\ln(K_2/K_1) = (1/T_1 - 1/T_2) \Delta H/R$ ^[8-10] 计算 296 K、311 K、329 K 温度下 PDS 与 BSA 结合反应的吉布斯自由能变 ΔG , 焓变 ΔH 及熵变 ΔS (表 4). 由表 4 可得, $\Delta G < 0$, $\Delta H < 0$ 且 $\Delta S > 0$, 表明 BSA 与 PDS 的结合是自发进行的放热反应, 主要作用力为静电作用力.

表 4 热力学参数和 n_H 值

Tab. 4 Thermodynamic parameters and the values of n_H					
T/K	$\Delta S/(\text{J} \cdot \text{K}^{-1})$	$\Delta H/(\text{J} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta G/(\text{J} \cdot \text{mol}^{-1})$	n_H	r
296	101.45	-3568.48	-27262	1.067	0.9941
311	92.66	-3568.48	-32386	1.180	0.9970
326	67.65	-3568.48	-22051	1.029	0.9964

3.6 药物协同性

药物的协同作用常用 Hill 方程^[8] 进行分析: E

$= (F_0 - F)/F_0$, $1/E$ 对 $1/[\text{PDS}]$ 作图, 截距为 $1/Em$, $\lg E(Em - E) = \lg K + n_H \lg[\text{PDS}]$, 式中, n_H 为 Hill 系数; K 为结合常数; E 为饱和分数. 由表 2 可知, 各温度下的 n_H 值约等于 1, 表明 PDS 与 BSA 结合时无药物协同作用, 即 PDS 结合到 BSA 位点上后, 对后继药物分子与蛋白质的结合无影响.

3.7 PDS 对 BSA 构象的影响

同步荧光光谱法是分析药物小分子对影响蛋白质的构象的常用方法, 在 $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ (显示 Tyr 特征) 和 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ (显示 Trp 特征)^[8] 条件下绘制 PDS-BSA 体系的同步荧光光谱 (图 8). 由图可知, 随 PDS 浓度的增大, λ_{em} 发生移动, Tyr 和 Trp 的荧光强度逐渐降低. 酪氨酸残基的猝灭程度大于色氨酸残基, 表明 PDS 与 BSA 相结合的部位偏向于酪氨酸.

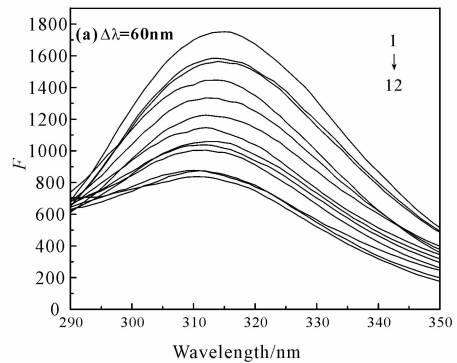
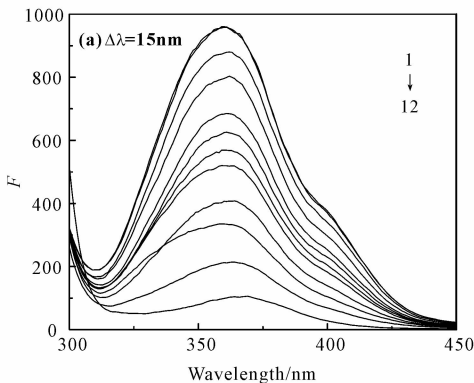


图 8 PDS 猝灭 BSA 的同步荧光光谱图

Fig. 8 Synchronous fluorescence spectrometris of BSA as PDS

3.8 结合位置的确定

亚螺旋域 IIA (含有 Tyr 和 Trp) 或 IIIA (含有 Tyr) 是大多数药物在 BSA 上结合位置^[11-13]. 比较激发波长为 280、295 nm 时 PDS-BSA 体系荧光程度的变化便可知道. 由图 9 可知, $\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$ 和 $\lambda_{ex} = 295 \text{ nm}$ 的 PDS-BSA 光谱曲线交叉, 表明色氨酸和酪氨酸残基都参与其中, 结合位置在 BSA 的亚螺旋域 II A 和 III A 中.

3.9 金属离子的影响

人体血液内往往同时存在几种甚至十几种金属元素, 这些金属离子必然会影响到药物分子与蛋白质的相互作用^[7], 因而研究金属离子对药物分子与生物体的相互作用的影响有着十分重要意义. 本文研究了 Pb^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Ni^{2+} 和 Cu^{2+} 五种金属离子存在下, 对 PDS 与 BSA 的结合作用的影响, 结果见表 3, 从表中可以看出 Pb^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+}

和 Cu^{2+} 的结合常数 K_A' 和结合位点数 n , 比原先 PDS-BSA 体系的 K_A 和 n 减小很多. 其中 Mn^{2+} 加入后 K_A' 和 n 降低程度最大, 说明这四种金属离子对 PDS 与 BSA 结合产生了竞争作用. 可能是金属离子与 BSA 先结合, 占据了 BSA 的结合位点, 从而抑制了 BSA 与药物的结合作用^[8], 缩短了 PDS 在血液中的停留时间, 增强了药效. Cr^{3+} 的加入与其它四种离子所产生的效果相反, 增加了原本的 K_A 和 n 值. 表明 Cr^{3+} 的加入增大了药物的作用强度, 有效地提高了短期药效.

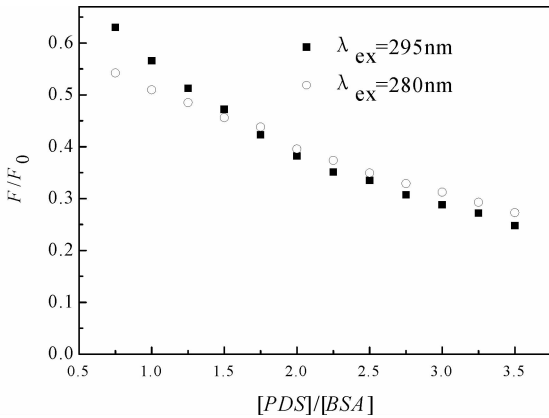


图 9 λ 为 280 nm 和 295 nm 时, PDS-BSA 的荧光猝灭曲线

Fig. 9 Fluorescence quenching curves of PDS-BSA at $\lambda=280$ and 295 nm

表 5 不同金属离子对结合常数的影响

Tab. 5 Effects of metal ions on binding constants

金属离子	$K_A'(10^6)$	K_A'/K_A	n	r
*	5.8104	1	1.068	0.999
Pb^{2+}	5.2569	0.9047	0.933	0.982
Mn^{2+}	3.6549	0.6290	0.605	0.992
Cr^{3+}	6.4532	1.1106	1.314	0.996
Ni^{2+}	5.4456	0.9372	0.895	0.994
Cu^{2+}	5.4083	0.9308	0.918	0.994

注: K_A' 表示加金属离子的结合常数数值, * 为不加金属离子.

4 结 论

应用紫外和荧光光谱法研究推断出 PDS 与 BSA 的相互作用是静态猝灭过程, 两者通过静电作用力相互作用, 因有 1-2 个结合位点, 药物能被蛋白质转运和储存; 几乎没有的药物协同作用, 结合位置在 BSA 的亚螺旋域 II A 和 III A 中, 靠近酪氨酸残基, PDS 与 BSA 相互作用对 BSA 构象产生影响. Pb^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Cu^{2+} 参与 PDS 与 BSA 相互作用, 增强药效. Cr^{3+} 的参与, 会延长药效时间, 这些重要信息为抗病毒中草药的研发提供了理论依据.

参考文献:

- [1] Molina-Bolívar J A, Galisteo-González F, Carnero Ruiz C, *et al.* Interaction between the anti-cancer drug diacetyl maslinic acid and bovine serum albumin: A biophysical study [J]. *J Mol Liq*, 2015, 208: 304.
- [2] 邢文敏, 许志连, 陆红. 穿琥宁注射液对小鼠肾脏毒性作用及机制初探 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19: 263.
- [3] Dai C, Ji C, Lan H, *et al.* Study of the interaction between mercury (II) and bovine serum albumin by spectroscopic methods [J]. *Environ Toxicol Phar*, 2014, 37: 870.
- [4] Bogdam S. Fluorescence study of sinapic acid interaction with bovine serum albumin and egg albumin [J]. *J Fluorescence*, 2003, 13: 349.
- [5] Lakowicz, J R. Principles of fluorescence spectroscopy [M]. 3rd ed. New York: Springer Press, 2006.
- [6] 许金钩, 王尊本. 荧光分析法 [M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2006.
- [7] 刘里, 成飞翔. 光谱法研究头孢克肟与牛血清白蛋白的相互作用 [J]. *中国药理学通报*, 2015, 40: 979.
- [8] 赵小辉, 朱乾华, 贺薇, 等. HSA 荧光猝灭法同时测定 6-苄基腺嘌呤和激动素 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2013, 50: 823.
- [9] Cyril L, Earl J K, Sperry W M. *Biochemists Handbook* [M]. London: Epon Led Press, 1961.
- [10] Ross D P, Subramantan S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability [J]. *Biochem*, 1981, 20: 3096.
- [11] Shahabadi N, Hadidi S. Molecular modeling and spectroscopic studies on the interaction of the chiral drug venlafaxine hydrochloride with bovine serum albumin. [J]. *Spectrosc Acta Part A: Mol Biomol Spectroscopy*, 2014, 122: 100.
- [12] Dandan Chen, Qiong Wu, Jun Wang, *et al.* Spectroscopic analyses and studies on respective interaction of cyanuric acid and uric acid with bovine serum albumin and melamine [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Mol Biomol Spectrosc*, 2015, 135: 511.
- [13] Rajendiran N, Thulasidhasan J. Interaction of sulfanilamide and sulfamethoxazole with bovine serum albumin and adenine: Spectroscopic and molecular docking investigations [J]. *Spectrochim Acta Part A: Mol Biomol Spectrosc*, 2015, 144: 183.