

马兜铃酸 A 与牛血清白蛋白相互作用的研究

俞英, 周秋云

(华南师范大学化学与环境学院, 广东广州 510006)

摘要: 应用光谱法和电化学方法研究了水溶液中马兜铃酸 A 与牛血清白蛋白分子间的结合反应, 测定了反应的形成常数 K_A 及热力学函数 ΔG , ΔH 和 ΔS 并确定了分子间作用力性质; 还讨论了温度和微量金属离子对药物与牛血清白蛋白形成常数的影响; 采用同步荧光技术考察了马兜铃酸 A 对牛血清白蛋白构象的影响; 依据 Forster 非辐射能量转移机制, 确定了给体-受体间的结合距离和能量转移效率.

关键词: 马兜铃酸 A; 牛血清白蛋白; 光谱法

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A

STUDY ON THE INTERACTION BETWEEN ARISTOLOCHIC ACID A AND SERUM ALBUMIN

YU Ying ZHOU Qi-yun

(School of Chemistry and Environment, South China Normal University Guangzhou 510006 China)

Abstract The binding characteristics of aristolochic acid A with bovine serum albumin (BSA) have been studied by spectroscopy method and electrochemical method in aqueous solution. The formation constant K_A and the thermodynamic functions (such as ΔG , ΔH and ΔS) for the reaction have all been measured. The effect of various metal ions and temperatures on the formation constant of aristolochic acid A with BSA was also studied. Furthermore, the effect of aristolochic acid A on the conformation of BSA has been analyzed using synchronous fluorescence spectroscopy. The binding distance between aristolochic acid A and BSA, and the transfer efficiency have been obtained based on the mechanism of Forster energy transfer.

Key words aristolochic acid A; bovine serum albumin; spectroscopy method

血清白蛋白是药物输送蛋白, 药物进入血液后, 首先与它结合, 然后被运输到身体的各部位. 药物与血清白蛋白的结合方式和结合牢固的程度影响到药物在作用部位所释放的浓度, 即影响药物的药效和药效持续的时间, 因此对药物与血清白蛋白间的相互作用进行研究具有重要的理论意义^[1], 国内多位学者对许多药物分子与蛋白质相互作用进行了研究^[2-5].

收稿日期: 2006-06-01

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (04010369)

作者简介: 俞英 (1964-), 女, 江西婺源人, 博士, 华南师范大学教授, Email: yuyh@163.com.

马兜铃酸 A (简称为 Q) 是关木通、朱砂莲等多种常用中药的主要成分, 具有抗癌、抗感染、抗早孕及增强吞噬细胞活性等方面的药理作用, 最近有报导含马兜铃酸的中草药对肾有损害。本文用光谱法和电化学方法对马兜铃酸 A 与牛血清白蛋白 (BSA) 的相互作用进行了研究, 确定了其荧光猝灭是静态猝灭, 求出了形成常数 K_A 及热力学函数 ΔG , ΔH 和 ΔS , 并确定了分子间作用力性质, 还研究了温度、金属离子对形成常数的影响, 并根据 Forster 非辐射能量转移机理确定了结合位置。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

F-2500 型荧光分光光度计 (日本日立); RF-540 型荧光分光光度计 (日本岛津); UV-VIS 8500 分光光度计 (上海天美科学仪器有限公司); pHs-3C 型酸度计 (上海雷磁仪器厂); 超级恒温槽 (上海实验仪器厂); Autolab PGSTAT-30 型电化学系统 (ECO Chemie B.V.), 三电极系统: 工作电极为铂盘电极, 饱和甘汞电极 (SCE) 为参比电极, 大面积的铂片为对电极。

牛血清白蛋白 (简称 BSA): 生化试剂, 分子量按 67 000 计, 上海伯奥生物科技有限公司; 马兜铃酸 A (简称 Q): 化学对照品, 中国药品生物制品检定所; 氯化钠: 分析纯, 广州化学试剂厂; Britton-Robinson 系列缓冲液。

牛血清白蛋白溶液的配制: 准确称取牛血清白蛋白, 用 0.05 mol/L 的 NaCl 溶液溶解后, 定量转移到容量瓶中, 准确加入 0.05 mol/L 的 NaCl 溶液至容量瓶的刻线, 置于 1-4℃ 冰箱中保存。

其它试剂均为分析纯, 实验用水均为二次去离子水。

1.2 实验方法

在一系列的 10 mL 比色管中, 依次加入 BSA、马兜铃酸 A、pH 为 4.56 的 Britton-Robinson 缓冲溶液 2.5 mL, 用二次蒸馏水定容, 摇匀。设置 F-2500 型荧光分光光度计的激发狭缝和发射狭缝为 5 mm, 扫描样品的激发光谱或荧光发射光谱, 或在激发波长 280 nm, 荧光波长 335 nm 处测定 BSA 的荧光强度 F_0 , BSA 中加入马兜铃酸 A 后的荧光强度 F , 并按 $\Delta F = F_0 - F$ 计算 ΔF 值。同步荧光光谱扫描实验是在 RF-540 型荧光光度计上设置激发狭缝和发射狭缝为 5 mm, 将溶液于 $\lambda_{em} - \lambda_{ex} = 15$ nm 或 60 nm 处进行同步扫描, 可得同步荧光光谱。

2 结果与讨论

2.1 荧光光谱

马兜铃酸 A 由于没有大的共轭双键体系荧光很弱。蛋白质的内源荧光主要来自于色氨酸和酪氨酸残基, 色氨酸和酪氨酸是两个芳香族氨基酸, 其中酪氨酸的最大激发和发射波长分别为 275/303 (nm), 色氨酸的最大激发和发射波长分别为 287/348 (nm)^[6]。扫描 BSA 的荧光光谱, 可以看出 BSA 的最大激发波长 λ_{ex} 为 280 nm, 最大荧光波长为 335 nm, 说明 BSA 的荧光光谱是色氨酸、酪氨酸荧光光谱的叠加。固定 BSA 的量, 在其中加入不同浓度的马兜铃酸 A, 随着马兜铃酸 A 浓度的增加, BSA 的内源荧光强度有规律性地降低, 说明马兜铃酸 A 对 BSA 的

荧光有猝灭现象,如图 1所示.

试验了 Britton-Robinson(简称 B-R), NaAc-HCl 和 NaAc-HAc 3个缓冲体系,实验表明以 B-R 为缓冲体系, ΔF 最大,因而选 B-R 作为缓冲体系. 试验了酸度对结合反应的影响,发现 pH 在 4.10~6.09 范围内 ΔF 最大且平稳,取 4.56 为反应酸度. 试验了缓冲液用量对结合反应的影响,实验表明,缓冲液用量大于 1.0 mL 时 ΔF 值平稳,取 2.5 mL 为缓冲液用量.

2.2 猝灭机理及猝灭常数的确定

荧光猝灭通常分为静态猝灭和动态猝灭. 所谓静态猝灭被认为是猝灭剂与

发荧光的分子在基态时生成不发光的配合物,从而使荧光物质的荧光强度降低. 所谓动态猝灭则是指猝灭剂和荧光物质的激发态分子之间所发生的相互作用过程,如能量转移过程、电子转移过程或生成激发态复合物,这种激发态复合物可能不发射荧光,或荧光的发射特性与原来荧光物质的不同,引起荧光猝灭^[7].

动态猝灭和静态猝灭的方程为:

$$F_0/F = 1 + K_{sv}c_q$$

式中 F 和 F_0 分别是加入和未加入猝灭剂时,浓度一定的 BSA 溶液的荧光强度, c_q 为猝灭剂的浓度. 对动态猝灭而言, K_{sv} 为猝灭常数;对静态猝灭而言, K_{sv} 是复合物的形成常数. 由于动态猝灭与扩散有关,温度升高时将增大扩散系数,从而增大双分子猝灭常数. 反之,对静态猝灭而言,温度升高可能引起复合物的稳定性下降,从而减小静态猝灭的程度,复合物的形成常数 K_{sv} 随温度上升而下降^[7].

为了研究马兜铃酸 A 对 BSA 荧光猝灭是静态猝灭还是动态猝灭,按实验方法在不同温度下作出蛋白质荧光猝灭的 Stern-Volmer^[2],如图 2 所示. 可以看出图 2 曲线具有良好的线性关系,随着温度升高 BSA 的猝灭曲线的斜率几乎不变,初步证明不是动态猝灭. 为进一步证实马兜铃酸 A 对 BSA 的猝灭过程,假设过程是动态猝灭,猝灭方程为^[2]:

$$F_0/F = 1 + K_q\tau_0c_q = 1 + K_{sv}c_q$$

K_q 为双分子猝灭过程的速率常数, τ_0 为猝

灭剂不存在时分子的平均寿命, K_{sv} 为动态猝灭常数. 由于 $K_{sv} = K_q\tau_0$, $K_q = K_{sv}/\tau_0$, 生物大分子的荧光寿命约为 $10^{-8} \text{ s}^{[2]}$, 故可由 F_0/F 对 c_q 的猝灭曲线的斜率求得猝灭常数 K_q (单位 $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

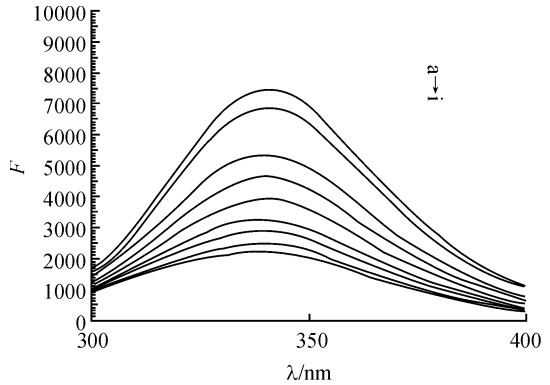


图 1 马兜铃酸 A 对 BSA 的荧光光谱的影响

$c_{\text{BSA}} = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$, 曲线 a~j $c_{\text{马兜铃酸 A}} (\times 10^{-7} \text{ mol/L})$ 分别为 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 0

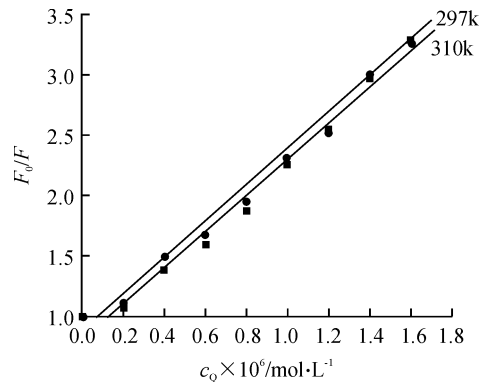


图 2 不同温度下马兜铃酸 A 对 BSA 的 Stern-Volmer 图

在 298K 和 310K 时 K_q 都为 $1.5 \times 10^{14} (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$.

而各类猝灭剂对生物大分子最大扩散控制的碰撞猝灭常数为 $2.0 \times 10^{10} (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})^{[1]}$, 显然马兜铃酸 A 对蛋白质猝灭过程的速率常数远远大于扩散控制的 K_q 所以前面的动态猝灭的假设不成立, 以上猝灭过程不是由于动态碰撞引起的, 而是形成了复合物而引起的静态猝灭.

2.3 复合物的形成常数

用静态猝灭公式^[3]:

$$1/(F_0 - F) = F_0^{-1} + KF_0^{-1}c_Q^{-1},$$

以 c_Q^{-1} 对 $1/(F_0 - F)$ 作图得 Lineweaver-Burk 图 3 由图 3 曲线的斜率得马兜铃酸 A 与 BSA 形成复合物的形成常数 K_A ($K_A = 1/K$). $T = 297 \text{ K}$ 时, 形成常数 $K_A = 5.9 \times 10^5 (\text{L}/\text{mol})$ (相关系数 $r = 0.9994$); $T = 310 \text{ K}$ 时, 形成常数 $K_A = 1.0 \times 10^6 (\text{L}/\text{mol})$ (相关系数 $r = 0.9941$). 可以看出, 马兜铃酸 A 与 BSA 的形成常数较大且温度对马兜铃酸 A 与 BSA 的形成常数影响明显.

2.4 BSA 与马兜铃酸 A 结合反应的热力学性质

药物与生物大分子的作用力类型^[3]主要有氢键、范德华力、疏水作用力和静电引力等. 当温度变化不大时, 反应的焓变 ΔH 可以看作一个常数, 根据热力学参数方程:

$$\ln(K_2/K_1) = (\Delta H/R) \cdot (1/T_1 - 1/T_2), \Delta G = -RT \ln K, \Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

以不同温度下的形成常数 K_1 和 K_2 可以求得 ΔH 、 ΔG 和 ΔS . 马兜铃酸 A 与 BSA 的 ΔG 、 ΔH 、 ΔS 分别为 $-32.8 \text{ kJ}/\text{mol}$ 、 $31.1 \text{ kJ}/\text{mol}$ 、 $215 \text{ J}/\text{mol}\cdot\text{K}$. 马兜铃酸 A 与蛋白质的焓变 $\Delta H > 0$ 熵变 $\Delta S > 0$ 根据热力学参数与作用力的关系, 可知马兜铃酸 A 与 BSA 结合的作用力类型主要是疏水作用力^[1].

为了进一步确定马兜铃酸 A 与 BSA 的相互作用力类型, 测定了未加 NaCl 和加入 0.5% NaCl 时马兜铃酸 A 对 BSA 荧光猝灭的 Lineweaver-Burk 图. 由 $1/(F_0 - F)$ 对 c_Q^{-1} 曲线斜率和截距求得加入 0.5% NaCl 时形成常数 $K_A = 6.2 \times 10^5 \text{ L}/\text{mol}$ 未加 NaCl 时形成常数 $K_A = 5.9 \times 10^5 \text{ L}/\text{mol}$. 由上述两组实验结果可见, 加入 NaCl 0.5% 时的 K_A 值与未加 NaCl 时的 K_A 值相比无明显变化, 说明两者的作用力不是静电作用力, NaCl 对马兜铃酸 A 与 BSA 的结合影响不大, 这可能是由于马兜铃酸 A 进入 BSA 的疏水空腔而使其免受 NaCl 的影响, 这一结果支持了疏水作用机理.

2.5 马兜铃酸 A 与 BSA 体系的循环伏安特性

为了进一步证实马兜铃酸 A 与 BSA 的相互作用力类型, 测定了马兜铃酸 A 及马兜铃酸 A 中加入 BSA 后的循环伏安图, 见图 4 结果表明, 曲线 1 表明马兜铃酸 A 有一个较灵敏的还原峰, 峰电位为 -0.36 V (vs SCE), 曲线 2 表明当在马兜铃酸 A 溶液中加入少量的 BSA 后还原峰电位稍向低电位移动, 峰电流降低. 这可能是由于 BSA 分子中的疏水性氨基酸残基会形成疏水性空腔, 进而使马兜铃酸 A 可以进入 BSA 中的空腔结构中而形成一种复合物. 由于 BSA 的包埋, 使马兜铃酸 A 中的电化学活性基团隐藏于 BSA 内部而难于在电极上发生还原反应, 从而导致了所测定的峰电流的下降, 这一结果也支持了疏水作用机理.

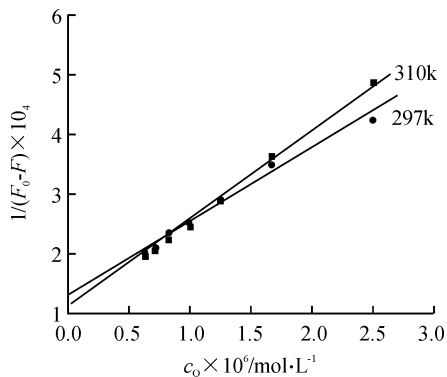


图 3 不同温度下马兜铃酸 A 对 BSA 的 Lineweaver-Burk 图

2.6 共存金属离子对药物与蛋白质结合常数的影响

实验发现,金属离子的存在对马兜铃酸 A 的紫外吸收光谱几乎没有影响,但金属离子与蛋白质有一定的结合力,金属离子的存在直接影响着药物与蛋白质的结合,为进一步探讨金属离子存在时,对药物与蛋白质的结合力的影响,测定了多种金属离子存在下,药物对 BSA 的荧光猝灭,计算了药物与 BSA 的形成常数 K_A , 结果见表 1.

金属离子与药物竞争的结果,减小了蛋白质与药物的形成常数,约减小 10~15%. 这样便减小了药物与蛋白质的结合力,缩短了药物在血浆中的滞留时间,有利于药物的释放,增强了药物的药效.

2.7 马兜铃酸 A 在 BSA 上的结合位置

BSA 中色氨酸和酪氨酸残基的内源荧光很强,测出马兜铃酸 A 的紫外-可见吸收光谱,发现其与 BSA 的荧光光谱有部分重叠,见图 5 根据偶极-偶极非辐射能量转移机理^[4], 给体与受体间能量转移效率 E 为:

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6), E = 1 - F / F_0$$

转移效率为 50% 时的临界距离 R_0 :

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

给体的荧光发射光谱与受体的吸收光谱间的重叠积分:

$$J = \sum F(\lambda) \epsilon_a(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda / \sum F(\lambda) \Delta\lambda$$

求能量转移效率 E 时, F 为药物与蛋白质的物质的量比为 1:1 时复合物的荧光强度. 只要得到 E, K^2 和 n , 并通过实测光谱求积分得 J , 就可算出 R_0, r . 对于 BSA: 取向因子取给体受体各向随机分布的平均值 $K^2 = 2/3$, 量子产率 $\Phi = 0.15$, 折射指数取水和有机物的平均值 $n =$

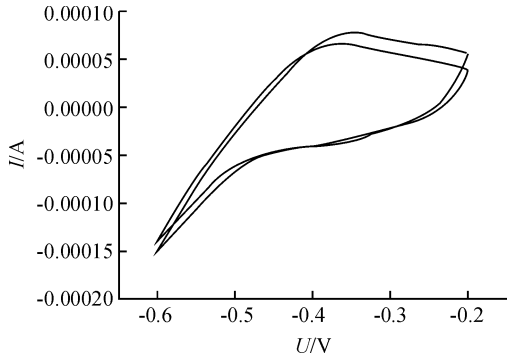


图 4 马兜铃酸 A-BSA 体系的循环伏安图

表 1 金属离子存在条件下马兜铃酸 A 与 BSA 的形成常数

M^{n+}	$K_A / L \cdot mol \Gamma^{-1}$	r	K'_A / K_A
Ca^{2+}	5.0×10^5	0.998 5	0.85
Mg^{2+}	5.3×10^5	0.999 1	0.90
Fe^{3+}	5.4×10^5	0.999 1	0.92
Zn^{2+}	8.8×10^5	0.999 6	1.49

$$K_A = 5.9 \times 10^5 L / mol, c_M = 1.0 \times 10^{-6} mol/L$$

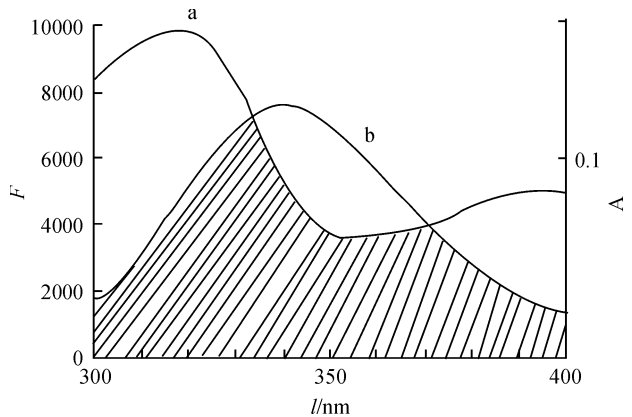


图 5 马兜铃酸 A 吸收光谱 (a) 与 BSA 荧光发射光谱 (b) 的重叠光谱

1.336 通过计算得 $E = 0.56$ $R_0 = 2.38$ nm, $r = 2.15$ nm. 由 r 值可知, 马兜铃酸 A 与 BSA 结合后, 与第 212 位色氨酸之间的距离小于 7 nm, 符合非辐射能量转移条件, 说明马兜铃酸 A 与 BSA 的猝灭机理为静态猝灭.

2.8 马兜铃酸 A 对 BSA 构象的影响

同步荧光光谱可用于蛋白质构象变化的分析^[5]. 由 $\Delta\lambda = 15$ nm 所得到的同步荧光光谱仅显示蛋白质酪氨酸残基的光谱特征, 而 $\Delta\lambda = 60$ nm 的同步荧光光谱仅表现出色氨酸残基的荧光. 因残基的最大发射波长与其所处环境的极性有关, 故由发射波长的改变可判断蛋白质的构象变化. 固定蛋白质的量, 逐渐增加马兜铃酸 A 的浓度, 绘制 BSA 的同步荧光光谱. 图 6 (a) 和 (b) 分别为 BSA 中酪氨酸和色氨酸残基的荧光光谱图, 可以看出, 随马兜铃酸 A 浓度增大, 酪氨酸残基的发射波长紫移, 而色氨酸残基的发射波长基本不变, 这说明马兜铃酸 A 与 BSA 的结合, 不影响 BSA 上色氨酸微区的构象, 只影响酪氨酸微区的构象.

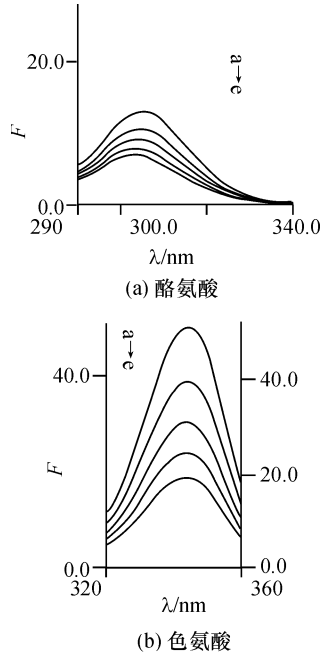


图 6 BSA 的同步荧光光谱图 (pH 4.56)

$$c_{BSA} = 7.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$$

曲线 a \rightarrow e c_0 ($\times 10^{-6}$ mol/L) 分别为 0.0 2.0 4.0 6.0 8.0

参考文献:

[1] DEMANT E J, FRICHE E. Equilibrium binding of anthracycline cytostatics to serum albumin and small unilamellar phospholipids[J]. *Biochem Pharmacol* 1998; 55: 27-32

[2] 江崇球, 王敬政, 王洪鉴, 等. 多沙唑嗪与血清白蛋白的作用及血清中多沙唑嗪含量的荧光测定法研究[J]. *分析化学*, 1999, 27(8): 894-898

[3] 卢继新, 张贵珠, 赵鹏, 等. 阿霉素与血清白蛋白的作用及共存离子对反应影响的研究[J]. *化学学报*, 1997; 55: 915-920

[4] 朱 铿, 童沈阳. 吡派酸、氟派酸与 HAS、IgG 相互作用的研究[J]. *化学学报*, 1997; 55: 405-410

[5] BURSTEIN E A, VEDENKINA N S, IVKOVA M N. Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules[J]. *Photochem Photobiol* 1973; 18(4): 263-279

[6] 陈国珍, 黄贤智, 许金钩. *荧光分析法* [M]. 2版. 北京: 科学出版社, 1990: 495-497.

[7] LAKOWICZ J R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy* [M]. New York: Plenum Press, 1983: 257-295

【责任编辑 黄玉萍】