

文章编号: 1000-7032(2012)09-1018-07

头孢匹胺钠与牛血清白蛋白的相互作用机理及共存金属离子的影响

刘保生*, 闫潇娜, 曹世娜, 种宝红, 吕运开

(河北大学化学与环境科学学院 药物化学与分子诊断教育部重点实验室, 河北 保定 071002)

摘要: 研究了不同温度下牛血清白蛋白(BSA)与头孢匹胺钠(CPMS)的相互作用及常见金属离子(Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+})对BSA-CPMS体系的影响。结果表明:CPMS能使BSA的荧光发生猝灭,其过程为静态猝灭并伴有非辐射能量转移;CPMS通过静电引力与BSA结合,结合常数为 10^4 数量级,结合位点数约为1;结合主要作用于BSA的亚结构II A中,结合距离 $r \approx 2.60$ nm。同步荧光光谱和圆二色谱(CD)均表明CPMS使BSA构象发生了变化。

关键词: 牛血清白蛋白; 头孢匹胺钠; 金属离子; 相互作用

中图分类号: O657.3 文献标识码: A DOI: 10.3788/fgxb20123309.1018

Interaction of Cefpiramide Sodium with Bovine Serum Albumin and The Effect of Coexistent Metal Ion on The Reaction

LIU Bao-sheng*, YAN Xiao-na, CAO Shi-na, CHONG Bao-hong, LV Yun-kai

(Key Laboratory of Medical Chemistry and Molecular Diagnosis, Ministry of Education, College of Chemistry & Environmental Science, Hebei University, Baoding 071002, China)

* Corresponding Author, E-mail: lbs@hbu.edu.cn

Abstract: The interaction between bovine serum albumin (BSA) and cefpiramide sodium (CPMS) was investigated at different temperatures. The effect of common metal ions (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+}) on the BSA-CPMS system was also researched. The results show that CPMS can quench the intrinsic fluorescence of BSA significantly, and the quenching mechanism is a static quenching process which follows the Förster spectroscopy energy transfer. The electrostatic force played an important role on the conjugation reaction between BSA and CPMS. The binding constants (K_a) was in the order of 10^4 , and the number of binding site (n) in the binary system was approximately equal to 1. The binding distance (r) was about 2.60 nm and the primary binding for CPMS was located at sub-domain II A of BSA. Synchronous spectra and Circular dichroism (CD) spectra revealed that the microenvironment and the conformation of BSA were changed during the conjugation reaction.

Key words: bovine serum albumin; cefpiramide sodium; metal ions; interaction

收稿日期: 2012-03-26; 修订日期: 2012-06-28

基金项目: 国家自然科学基金(20675024); 河北省重点基础研究项目(10967126D)资助项目

作者简介: 刘保生(1963-), 男, 研究员, 河北保定人, 主要从事分子发光学理论与应用的研究。

E-mail: lbs@hbu.edu.cn, Tel: (0312)5079385

1 引言

蛋白质与内源性化合物及许多药物分子之间相互作用的研究一直受到人们的关注,研究其结合机制对于生命科学、化学、药学以及临床医学都具有非常重要的意义。头孢匹胺钠(Cefpiramide sodium, CPMS)为半合成的第三代头孢菌素类广谱抗生素,对革兰氏阳性菌、绿脓杆菌和厌氧菌抗菌活性显著,临床应用广泛^[1]。人体内存在的各种微量元素参与许多重要的生命过程^[2],研究金属离子对药物与蛋白质结合的影响,有助于全面了解药物在体内的输送和作用机制。牛血清白蛋白(BSA)与各种药物、金属离子及其配合物的相互作用已有大量研究^[3],但对于BSA与CPMS间相互作用的研究尚未见报道。本文在模拟人体生理条件下,研究了BSA与CPMS之间的相互作用以及常见金属离子对于BSA与CPMS结合作用的影响,这些研究对于更全面地了解药物在体内与蛋白的结合状况具有重要意义。

2 实验

2.1 试剂与仪器

荧光数据或谱图采用日立公司F-4600荧光分光光度计获得,吸收光谱采用岛津公司UV-265紫外可见分光光度计绘制,圆二色谱数据和谱图采用法国Bio-Logic公司MOS-450/SFM300圆二色谱仪获得,酸度由上海雷磁仪器厂pHS-3C型精密酸度计测定,温度用南通科学仪器厂CS501型超级恒温水浴控制。

CPMS的结构式如图1所示,将其标准品(CAS#: 74849-93-7)配成浓度为1.0 mmol/L的水溶液,用时稀释至所需浓度。牛血清白蛋白(BSA 纯度 $\geq 99\%$, Sigma公司)配成浓度0.1 mmol/L的水溶液,用时稀释10倍;ZnSO₄、CuSO₄、FeCl₃、Co(NO₃)₂、NiCl₂、MgCl₂均配成1.0 mmol/L

的水溶液,用时稀释至所需浓度。pH = 7.40的Tris-HCl缓冲溶液(内含0.15 mol/L NaCl用以维持生理条件下的离子强度)。除注明外所用试剂均为分析纯,实验用水为二次石英蒸馏水,溶液均在4℃下避光保存。

实验所测荧光强度均采用内滤光效应公式校正^[4]:

$$F_{\text{cor}} = F_{\text{obs}} \times e^{(A_{\text{ex}} + A_{\text{em}})/2}, \quad (1)$$

式中 F_{cor} 和 F_{obs} 分别代表校正后和观察到的荧光强度, A_{ex} 和 A_{em} 则是药物在激发和发射波长处的吸光度值。

2.2 实验步骤

分别在293, 303, 310, 313 K温度下,于10 mL比色管中依次加入1.0 mL pH = 7.40的Tris-HCl缓冲溶液,1.0 mL 10 $\mu\text{mol/L}$ 的BSA溶液,不同浓度的CPMS溶液,用水稀至刻度,摇匀,静置25 min。设置发射与激发狭缝均为5 nm,激发波长分别为280 nm和295 nm,扫描发射光谱或测定340 nm处荧光强度 F 。同时固定 $\Delta\lambda = 15$ nm或 $\Delta\lambda = 60$ nm,记录BSA与CPMS作用的同步荧光光谱。以相应的CPMS溶液作为参比,记录BSA-CPMS体系的吸收光谱。使用1 mm的石英吸收池,于293 K下测定200~300 nm波长范围内BSA与CPMS作用前后的CD谱。

3 结果与讨论

3.1 BSA-CPMS的紫外吸收光谱

BSA在225 nm和275 nm处有两个吸收峰,225 nm处的吸收峰主要是由肽键上C=O的 $n-\pi^*$ 跃迁引起的,与BSA的 α -螺旋含量有关;275 nm处的吸收峰是BSA分子中的2个色氨酸和19个酪氨酸的芳杂环的 $\pi-\pi^*$ 和 $n-\pi^*$ 跃迁引起的^[5]。图2为293 K温度下的BSA-CPMS体系的紫外吸收光谱。由图2可知,随着CPMS浓度的增加,225 nm处的吸收峰吸光度降低且红移5 nm,表明CPMS和BSA间发生相互作用并形成了复合物,导致BSA的 α -螺旋含量改变,构象发生变化。而275 nm处的吸收峰强度降低说明CPMS与BSA之间的相互作用是在基态分子中发生的,即CPMS与BSA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。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,因此可初步推断CPMS对BSA的

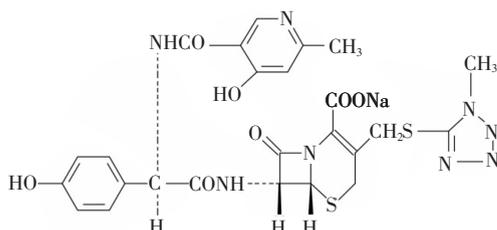


图1 头孢匹胺钠结构式

Fig. 1 Chemical structure of cefpiramide sodium

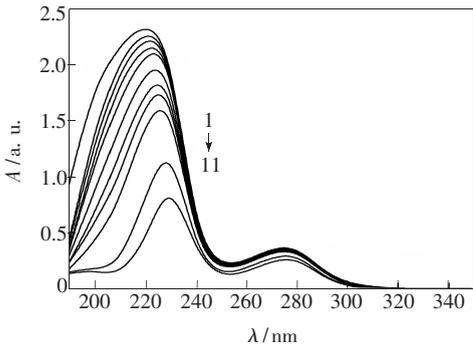


图 2 BSA-CPMS 体系的紫外吸收光谱 ($T = 293 \text{ K}$)。 $c(\text{BSA}) = 1.0 \text{ } \mu\text{mol/L}$, $1 \sim 11$; $c(\text{CPMS}) = 0, 2, 4, 6, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 70 \text{ } \mu\text{mol/L}$ 。

Fig. 2 UV absorption spectra of BSA-CPMS system ($T = 293 \text{ K}$). $c(\text{BSA}) = 1.0 \text{ } \mu\text{mol/L}$, $1 \sim 11$; $c(\text{CPMS}) = 0, 2, 4, 6, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 70 \text{ } \mu\text{mol/L}$ 。

荧光猝灭过程为静态猝灭。

3.2 CPMS 对 BSA 的荧光猝灭机理

BSA 的内源荧光主要来自分子中的色氨酸残基 (Trp) 和酪氨酸残基 (Tyr), 在激发波长为 280 nm 时, 其最大发射峰位于 340 nm , 见图 3 ($\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ 时的谱图与其类似)。由图 3 可以看出, 随着 CPMS 浓度的增加, BSA 的荧光依次猝灭, 表明 CPMS 与 BSA 间存在相互作用。为研究作用机理, 将猝灭数据按 Stern-Volmer 方程^[6]处理:

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [L] = 1 + K_{sv} [L], \quad (2)$$

其中 F_0 、 F 分别为无、有猝灭剂时的荧光强度; τ_0 为分子荧光平均寿命, 约为 10^{-8} s ; K_{sv} 为 Stern-Volmer 猝灭常数; $[L]$ 为猝灭剂的浓度; K_q 为猝灭速率常数。以 F_0/F 对 $[L]$ 作图, 由直线的斜率

和截矩可得不同温度反应的 K_{sv} 和 K_q 值, 结果列于表 1。由表 1 可知, 随温度的升高, K_{sv} 逐渐降低, 即温度升高使 CPMS 对 BSA 猝灭程度降低, 表明荧光猝灭是静态猝灭过程。同时 CPMS 对 BSA 的猝灭过程在不同温度下的 K_q 值均大于各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞猝灭常数 $2 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 进一步证明该猝灭是静态的。这一结论与紫外光谱所得结论一致。

荧光静态猝灭过程常用下式计算生物大分子与小分子的结合常数 K_a 和结合位点数 n ^[7]:

$$\lg \left(\frac{F_0 - F}{F} \right) =$$

$$n \lg K_a + n \lg \left\{ [D_t] - n \frac{F_0 - F}{F_0} [B_t] \right\}, \quad (3)$$

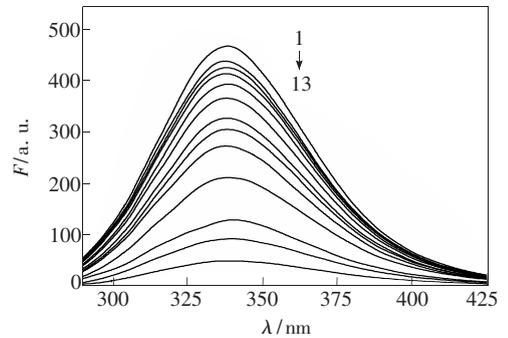


图 3 BSA-CPMS 体系的荧光光谱 ($T = 293 \text{ K}$, $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$)。 $c(\text{BSA}) = 1.0 \text{ } \mu\text{mol/L}$, $1 \sim 13$; $c(\text{CPMS}) = 0, 2, 4, 6, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 70, 100, 150 \text{ } \mu\text{mol/L}$ 。

Fig. 3 Fluorescence spectra of BSA-CPMS system ($T = 293 \text{ K}$, $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$). $c(\text{BSA}) = 1.0 \text{ } \mu\text{mol/L}$, $1 \sim 13$; $c(\text{CPMS}) = 0, 2, 4, 6, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 70, 100, 150 \text{ } \mu\text{mol/L}$ 。

表 1 不同温度下 BSA 与 CPMS 的猝灭反应参数

Table 1 Quenching reactive parameters of BSA and CPMS at different temperatures

$\lambda_{\text{ex}}/\text{nm}$	T/K	$K_q/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	$K_{sv}/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	r_1	$K_a/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	n	r_2
280	293	2.46×10^{12}	2.46×10^4	0.993 3	2.18×10^4	0.96	0.991 3
	303	2.43×10^{12}	2.43×10^4	0.993 1	2.03×10^4	1.04	0.995 0
	310	2.16×10^{12}	2.16×10^4	0.997 2	1.95×10^4	0.92	0.992 9
	313	2.09×10^{12}	2.09×10^4	0.996 9	1.90×10^4	0.91	0.991 7
295	293	8.58×10^{11}	8.58×10^3	0.994 0	9.03×10^3	0.80	0.993 3
	303	8.24×10^{11}	8.24×10^3	0.994 5	8.60×10^3	0.84	0.998 2
	310	8.23×10^{11}	8.23×10^3	0.995 7	8.55×10^3	0.89	0.994 4
	313	8.22×10^{11}	8.22×10^3	0.992 7	8.47×10^3	0.83	0.992 5

K_q is the quenching rate constant; K_a is the binding constant; n is the number of binding site; r_1 is the linear relative coefficient of $F_0/F - [L]$; r_2 is the linear relative coefficient of $\lg(F_0 - F)/F - \lg\{[D_t] - n[B_t](F_0 - F)/F_0\}$.

式中 $[D_1]$ 、 $[B_1]$ 分别为 CPMS 和 BSA 的总浓度。先将 $\lg\{[D_1] - n[B_1](F_0 - F)/F_0\}$ 括弧中的 n 假设为 1, 以 $\lg(F_0 - F)/F$ 对 $\lg\{[D_1] - [B_1](F_0 - F)/F_0\}$ 作图, 由曲线斜率可得到括弧外面的 n 值, 将此 n 值代入括弧内, 以 $\lg(F_0 - F)/F$ 对 $\lg\{[D_1] - n[B_1](F_0 - F)/F_0\}$ 再作图, 循环下去, 直到括弧内外 n 值相同。由曲线截距、斜率, 可得 n, K_a 值, 列于表 1。由表 1 可知: 结合位点数 n 值均约为 1; K_a 随温度升高而减小, 即 BSA-CPMS 体系的稳定性随温度升高而降低, 表明 CPMS 对 BSA 的荧光猝灭为静态猝灭。

激发波长为 280 nm 的光可同时激发 BSA 的 Trp 和 Tyr 的荧光, 激发波长为 295 nm 时只激发 Trp 荧光。在 BSA 的疏水亚结构域中, II A (同时含有 Tyr 和 Trp) 和 III A (只含有 Tyr) 是小分子配体的主要结合部位^[8]。比较 280 nm 及 295 nm 时的 BSA 的荧光猝灭数据, 可以了解 Trp 和 Tyr 在 CPMS 与 BSA 的结合反应中的参与情况, 并确定其结合的具体位置, 见图 4。由图 4 可知, 在激发波长为 280 nm 和 295 nm 时, CPMS 对 BSA 的猝灭曲线没有重叠, 且 280 nm 的猝灭程度大于 295 nm, 表明在 CPMS 与 BSA 的相互作用中 Trp 和 Tyr 均参加了反应。进而可以推断, CPMS 与 BSA 的结合位点主要位于亚结构域 II A。

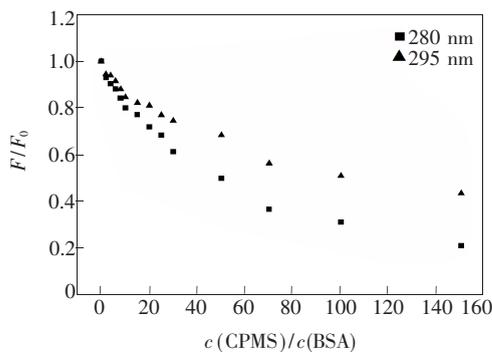


图 4 $\lambda_{ex} = 280, 295$ nm 时, BSA-CPMS 体系的猝灭曲线 ($T = 293$ K)。 $c(\text{BSA}) = 1.0 \mu\text{mol/L}$, $c(\text{CPMS}) = 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 70, 100, 150 \mu\text{mol/L}$ 。

Fig. 4 Quenching curves of BSA-CPMS system at $\lambda_{ex} = 280, 295$ nm ($T = 293$ K). $c(\text{BSA}) = 1.0 \mu\text{mol/L}$, $c(\text{CPMS}) = 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 70, 100, 150 \mu\text{mol/L}$.

3.3 BSA 与 CPMS 的作用力类型

药物与蛋白的作用力类型可以通过药物与蛋

白反应的热力学参数获得。温度变化不大时, 将反应的焓变 ΔH 看作定值, 对于 BSA-CPMS 体系, 依据表 1 不同温度下的 K_a 值, 由下式可以计算热力学参数:

$$R \ln K = \Delta S - \Delta H/T, \quad (4)$$

$$\Delta G = -RT \ln K = \Delta H - T\Delta S, \quad (5)$$

结果见表 2。 $\Delta G < 0$ 表明反应能够自发进行; $\Delta H < 0, \Delta S > 0$, 表明 BSA 与 CPMS 之间的作用力主要是静电引力^[9]。

表 2 热力学参数

Table 2 The thermodynamic parameters

T/K	$K_a/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta H/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S/(\text{J} \cdot \text{K}^{-1})$	$\Delta G/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$
293	2.18×10^4	-5.24	65.15	-24.33
303	2.03×10^4	-5.24	65.18	-24.99
310	1.95×10^4	-5.24	65.22	-25.46
313	1.90×10^4	-5.24	65.17	-25.64

3.4 BSA 与 CPMS 间的结合距离

根据 Förster 能量转移理论, 在能量给体与能量受体间距离为 r 与能量转移效率为 50% 时, 所对应的临界能量转移距离 R_0 及能量转移效率 E 之间有如下关系^[10]:

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

$$R_0^6 = 8.78 \times 10^{-25} K^2 \Phi N^4 J, \quad (7)$$

$$J = \sum F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda / \sum F(\lambda) \Delta\lambda, \quad (8)$$

其中 F_0 为供体的荧光强度; F 为供体和受体浓度为 1:1 的荧光强度; K^2 为取向因子, 取给体与受体各向随机分布的平均值 2/3; N 是溶剂的折射率, 取水和有机物的平均值 1.336; Φ 为无受体存在时能量给体的荧光量子产率, 取 BSA 中 Trp 的量子产率为 0.118; J 为供能体的荧光发射光谱和受能体的吸收光谱间的重叠积分 (图 5 中阴影部分); $F(\lambda)$ 为给体在波长 λ 处的荧光强度; $\varepsilon(\lambda)$ 为受体在波长 λ 处的摩尔吸光系数。处理数据得出 J 值代入式 (7) 得到 R_0 , 由 R_0 和实验测得 E 可以计算 r 。计算结果列于表 3。由表 3 可知: $r < 7$ nm, 说明 BSA 与 CPMS 间存在非辐射能量转移^[11]; 随着温度的升高, E 值减小, r 值增大, 导致体系结合稳定性降低, 结合常数减小; $r > R_0$, 进一步说明 CPMS 对 BSA 的内源荧光的猝灭过程为静态猝灭^[12]。

表 3 不同温度下 BSA 与 CPMS 间的 E, J, r, R_0 参数

Table 3 Parameters of E, J, r, R_0 between BSA and CPMS at different temperatures

T/K	$E/\%$	$J/(\text{cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	R_0/nm	r/nm
293	10.4	1.50×10^{-15}	1.79	2.56
303	8.33	1.23×10^{-15}	1.73	2.58
310	7.46	1.21×10^{-15}	1.72	2.62
313	7.11	1.21×10^{-15}	1.72	2.65

R_0 is the critical distance when E is 50%; r is the distance between acceptor and donor; J is the overlap integral between the fluorescence emission spectrum of donor and the absorption spectrum of the acceptor.

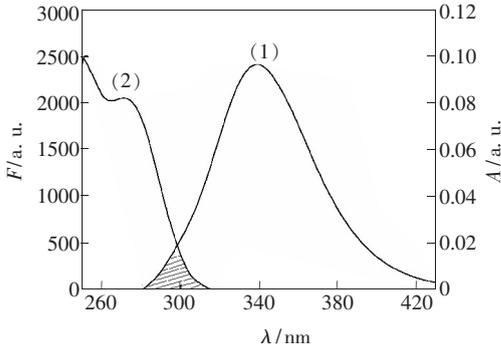


图 5 BSA 的荧光发射光谱(1)和 CPMS 的紫外吸收光谱(2) ($T = 293 \text{ K}$), $c(\text{BSA}) = c(\text{CPMS}) = 6.0 \mu\text{mol/L}$ 。

Fig. 5 Fluorescence emission spectra for BSA (1) and UV absorbance spectra for CPMS (2) ($T = 293 \text{ K}$), $c(\text{BSA}) = c(\text{CPMS}) = 6.0 \mu\text{mol/L}$.

3.5 BSA 与 CPMS 结合率以及对浓度的依赖性

当蛋白与药物结合达到平衡时,溶液中的蛋白一部分以结合型蛋白存在,一部分以游离型蛋白存在。蛋白与药物的结合率 f 为^[13]:

$$f = \frac{[PD_n]}{[P_0]}, \tag{9}$$

其中 $[PD_n]$ 表示蛋白与药物结合达平衡时的蛋白-药物复合物的平衡浓度, $[P_0]$ 为蛋白总浓度, 游离蛋白浓度为 $[P_f]$ 。由于 $n = 1$, 则:

$$[PD_n] = [P_0] - [P_f], \tag{10}$$

在温度为 293 K、激发波长为 280 nm 的条件下,测定不同浓度 BSA 的 F 值,绘制工作曲线,得其线性方程: $F = 7.1349 + 5.58873 \times 10^7 c(\text{mol/L})$, 相关系数 $r = 0.99713$, 线性范围为 0.1 ~ 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 。根据 BSA 与 CPMS 结合后的 F 值即可由工作曲线得出游离蛋白浓度 $[P_f]$ (CPMS 在 340 nm 处无荧光发射), 从而计算出蛋白与药物的结合率 f 。当 BSA 与 CPMS 浓度比例为 1:10、

1:20、1:30、1:50 时, f 分别为 14.0%、27.2%、44.4%、59.1%; 当 BSA 与 CPMS 浓度比例为 0.1:1、0.3:1、1:1 时, f 分别为 14.0%、10.4%、19.5%。比较可知,随着 CPMS 浓度的增加,BSA 与 CPMS 的结合率有所提高,说明当 CPMS 的浓度在 0.1 ~ 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 时,BSA 与 CPMS 的结合对 CPMS 的浓度有一定的依赖性;而随着 BSA 浓度的增加,BSA 与 CPMS 的结合率变化较小,说明 BSA 的浓度在 1.0 ~ 10 $\mu\text{mol/L}$ 范围时,BSA 与 CPMS 的结合对 BSA 浓度无依赖性。

3.6 BSA-CPMS 的同步荧光光谱

对于蛋白质的同步荧光光谱, $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 仅显示蛋白质 Tyr 的光谱特征, $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 仅表现 Trp 的光谱特征。固定 BSA 浓度并逐渐增大 CPMS 的浓度,结果见图 6。由图 6 可知,随着 CPMS 浓度增大, Tyr 和 Trp 荧光均被猝灭,且荧光峰位置均红移 3 nm,表明 CPMS 对 BSA 的作用使 Tyr 和 Trp 所处微环境的极性增加,疏水性降低,肽链

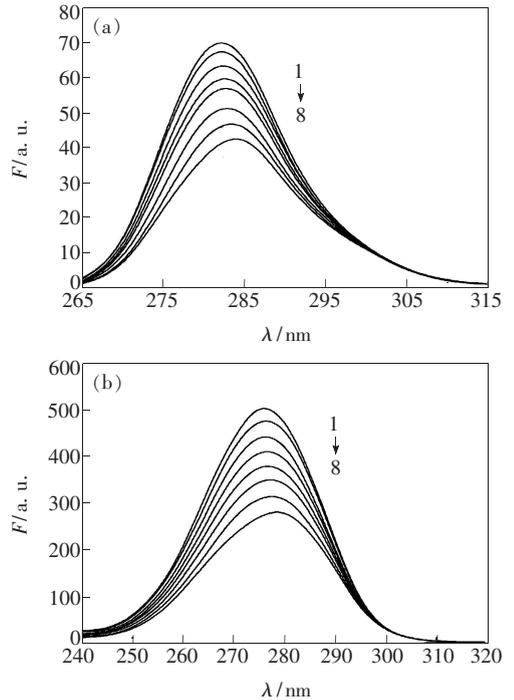


图 6 BSA-CPMS 体系的同步荧光光谱 ($T = 293 \text{ K}$)。 (a) $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$; (b) $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 。 $c(\text{BSA}) = 1.0 \mu\text{mol/L}$, 1 ~ 8: $c(\text{CPMS}) = 0, 2, 6, 10, 15, 20, 25, 30 \mu\text{mol/L}$ 。

Fig. 6 Synchronous fluorescence spectra of BSA-CPMS system ($T = 293 \text{ K}$). (a) $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$; (b) $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$. $c(\text{BSA}) = 1.0 \mu\text{mol/L}$, 1 ~ 8: $c(\text{CPMS}) = 0, 2, 6, 10, 15, 20, 25, 30 \mu\text{mol/L}$.

的伸展程度有所增加,蛋白结构变得松散^[14]。由此可知,在 CPMS 与 BSA 的相互作用中 Trp 和 Tyr 均参加了反应,CPMS 与 BSA 的结合位点应位于亚域 II A。这一结论与 3.2 节中所得结论一致。

3.7 金属离子对 BSA-CPMS 体系的影响

金属离子与 BSA 有一定的结合能力,血清中存在的金属离子与药物竞争结合,直接影响药物与蛋白质的结合。固定 BSA 与金属离子 (Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+}) 的浓度比为 1:1,分别加入不同浓度的 CPMS,在 293 K 以 280 nm 为激发波长记录体系 340 nm 处的荧光值,按公式 (3) 计算 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 存在时 BSA-CPMS 的结合常数,结果分别为 1.88×10^4 、 2.35×10^4 、 1.61×10^4 、 1.64×10^4 、 1.79×10^4 、 1.36×10^4 L/mol。与无金属离子存在时的 BSA-CPMS 体系结合常数 2.18×10^4 L/mol 相比较,可知 Zn^{2+} 使 BSA 与 CPMS 的结合作用加强, Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 则使 BSA 与 CPMS 的结合作用减弱。 Zn^{2+} 先与 CPMS 反应形成了复合物,再与 BSA 作用,从而在 BSA 和 CPMS 分子间形成“离子架桥”,使得 BSA 与 CPMS 的结合作用加强^[15]。而 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 与 BSA 之间的相互作用产生了间接竞争的结果,因它们结合位点的差异,可能是通过改变 BSA 的构象致使 BSA 与 CPMS 结合减弱^[16]。结合常数增大将在一定程度上对血浆中药物的浓度起到调节缓冲作用,对延长药物作用时间、减小药物毒性的临床治疗是有效的;而结合常数减小将导致药物在血浆中的储留时间缩短,短时间内增大药物的血药浓度,增大药物的作用强度,对短期提高药效的临床治疗是有效的^[17]。

3.8 BSA-CPMS 体系的圆二色谱

圆二色谱可以灵敏地检测一些反应引起的蛋白质分子二级结构的变化。图 7(a) 为 BSA-CPMS 相互作用的 CD 谱图。由图可知,在 209 nm 和 222 nm 处出现了两个负的特征肩峰谱带,这是 BSA 中 α -螺旋结构的特征峰。当 BSA 与 CPMS 的浓度比为 1:4 时,负峰峰高强度减弱,证明 BSA 与 CPMS 的相互作用使 BSA 的 α -螺旋结构有所松散二级结构发生改变,导致了 BSA 的荧光猝灭^[18]。虽然 CPMS 的加入导致 BSA 两个负的肩峰带强度减小,但峰形和峰位并未改变,表明 CPMS 虽对 BSA 的二级结构有一定的影响,但 α -

螺旋结构仍占主导地位^[19]。图 7(b) 为在 BSA-CPMS 体系 ($c(\text{BSA}):c(\text{CPMS}) = 1:4$) 中加入与 BSA 相同浓度的金属离子 (Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+}) 后体系的 CD 谱图,与不含金属离子时 BSA-CPMS 体系的 CD 谱图比较可知,金属离子的加入使 BSA 的 α -螺旋结构含量增加,表明金属离子与 BSA-CPMS 体系发生了作用,导致 BSA 结构发生变化,这一结论与 3.7 节中所得结论一致。

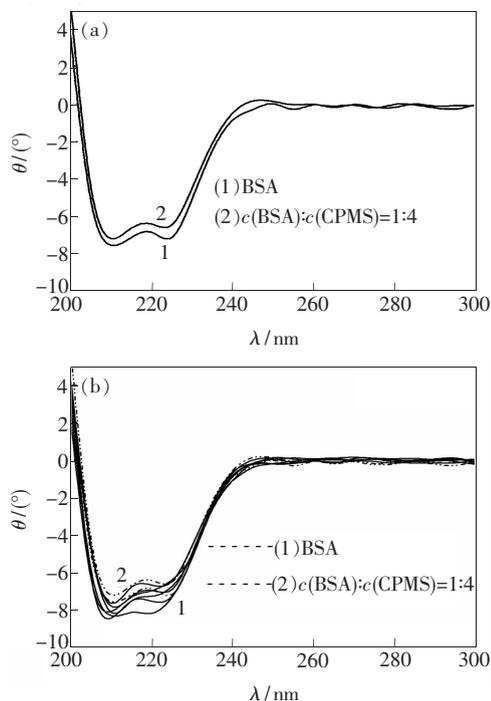


图 7 BSA-CPMS 和 BSA-CPMS- M^+ 体系圆二色谱图 ($T = 293$ K)。(a) $c(\text{BSA}) = 1.0 \mu\text{mol/L}$, $c(\text{CPMS}) = 4.0 \mu\text{mol/L}$; (b) $c(\text{BSA}) = c(M^+) = 1.0 \mu\text{mol/L}$, $c(\text{CPMS}) = 4.0 \mu\text{mol/L}$ 。

Fig. 7 The circular dichroism spectra of BSA-CPMS and BSA-CPMS- M^+ system ($T = 293$ K). (a) $c(\text{BSA}) = 1.0 \mu\text{mol/L}$, $c(\text{CPMS}) = 4.0 \mu\text{mol/L}$; (b) $c(\text{BSA}) = c(M^+) = 1.0 \mu\text{mol/L}$, $c(\text{CPMS}) = 4.0 \mu\text{mol/L}$.

4 结 论

利用吸收光谱、荧光光谱、圆二色谱研究了不同温度下 BSA 与 CPMS 间的相互作用。结果表明,CPMS 分子通过静电引力与 BSA 分子结合,结合距离小于 7 nm,属非辐射能量转移过程,结合主要作用于 BSA 的亚结构 II A 中,该结合对后继配体有弱的负协同作用。CPMS 可以导致 BSA 中 α -螺旋结构含量下降,构象发生变化。 Co^{2+} 、

Fe^{3+} 、 Ni^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 的存在不利于 BSA 与 CPMS 的结合,而 Zn^{2+} 使 BSA 与 CPMS 的结合更加牢固。BSA 与 CPMS 的结合对 CPMS 的浓度有一定的依赖性对 BSA 浓度无依赖性。

参 考 文 献:

- [1] Sun Q, Shi M, Shao W, *et al.* Tissue distribution and pulmonary targeting studies of cefpiramide sodium-loaded liposomes [J]. *J. Drug Target.*, 2011, 19(1):49-55.
- [2] Shaikh S M T, Seetharamappa J, Ashoka S, *et al.* A study of the interaction between bromopyrogallol red and bovine serum albumin by spectroscopic methods [J]. *Dyes and Pigments*, 2007, 73(2):211-216.
- [3] Yu Y M, Feng J C, Liu Y. Spectroscopic Study of the interaction between sulfamethoxazole and bovine serum albumin in the presence of Fe^{3+} [J]. *Acta Chimica Sinica* (化学学报), 2011, 69(2):190-198 (in Chinese).
- [4] Steiner R F, Weinryb L. *Excited States of Protein and Nucleic Acid* [M]. New York: Plenum Press, 1971:40.
- [5] Zhang Z H, Zang S L, Geng B, *et al.* Study on interaction of butyltin compounds with BSA by UV and CD spectra [J]. *J. Anal. Sci.* (分析科学学报), 2005, 21(2):179-181 (in Chinese).
- [6] Liu J Q, Tian J N, Zhang J Y, *et al.* Interaction of magnolol with bovine serum albumin: A fluorescence-quenching study [J]. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, 376(6):864-867.
- [7] Bi S Y, Ding L, Song D Q, *et al.* Studies on the binding mechanism of several antibiotics and human serum albumin [J]. *Acta Chimica Sinica* (化学学报), 2005, 63(23):2169-2173 (in Chinese).
- [8] 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, 881(1-3):97-106.
- [9] Pei M Y, Zheng X F, Cao H Y, *et al.* Spectroscopic studies on interaction between 3-bromopyruvic acid and human serum albumin [J]. *Chin. J. Anal. Chem.* (分析化学), 2010, 38(7):948-952 (in Chinese).
- [10] Liu B S, Yang C, Wang J, *et al.* Luminescence mechanism study of the conjugation reaction between cefpirome sulfate and bovine serum albumin [J]. *Chin. J. Lumin.* (发光学报), 2011, 32(3):293-299 (in Chinese).
- [11] Chen D W, Xie Q J, Su Y H, *et al.* Fluorescent studies on the interactions between Au nanoparticles and quercetin as well as bovine hemoglobin [J]. *J. Anal. Sci.* (分析科学学报), 2008, 24(3):259-264 (in Chinese).
- [12] Mandal P, Bardhan M, Ganguly T. A detailed spectroscopic study on the interaction of rhodamine 6G with human hemoglobin [J]. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2010, 99(2):78-86.
- [13] Zhang Q, Chen X, Bai X H. Simultaneous and fast research of protein binding characteristic of six flavonoids drugs by hollow fiber liquid phase microextraction [J]. *Chin. J. Anal. Chem.* (分析化学), 2011, 39(6):857-862 (in Chinese).
- [14] Aodeng G W, Jin Y C. Spectroscopic studies on the interaction between fenbufen and bovine serum albumin [J]. *Chin. J. Lumin.* (发光学报), 2011, 32(4):404-410 (in Chinese).
- [15] Shao S, Qiu J. Effecting of metal ions on the interaction between zidovudine and bovine serum albumin [J]. *Acta Phys. Chim. Sin.* (物理化学学报), 2009, 25(7):1342-1346 (in Chinese).
- [16] Fei Y, Lu G C, Fan G R, *et al.* Studies on interaction of sinifloxacin with bovine serum albumin and effect of the coexistent metal ions on the reaction [J]. *Spectrosc. Spectral. Anal.* (光谱学与光谱分析), 2008, 28(11):2609-2614 (in Chinese).
- [17] Wu G H, Wang J, Chen J L, *et al.* Bovine serum albumin in the presence of zinc(II) by fluorescence method [J]. *Spectrosc. Spectral. Anal.* (光谱学与光谱分析), 2008, 28(4):913-916 (in Chinese).
- [18] Wang C X, Ye L, Yan F F, *et al.* Spectroscopic studies on the interaction between rifabutin and human serum albumin [J]. *Chem. J. Chinese Universities* (高等学校化学学报), 2007, 28(12):2280-2283 (in Chinese).
- [19] Wang Y, Chen Y P, Zhang Y Z. Investigation on the interaction of 2,4-dichlorophenol with human serum albumin [J]. *Chem. Bioengin.* (化学与生物工程), 2011, 28(5):28-33 (in Chinese).