

文章编号: 1000-7032(2012)05-0553-05

甲钴胺与牛血清白蛋白相互作用的光谱特性

辛建伟, 马红燕*, 杨 猛

(延安大学化学与化工学院 分析化学研究所, 陕西 延安 716000)

摘要: 应用荧光光谱法、紫外吸收光谱法及共振光散射法,研究了甲钴胺(Mecobalamin)与牛血清白蛋白(BSA)之间的相互作用。在pH=7.40的三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)缓冲溶液中,随着甲钴胺浓度的增加,BSA的荧光强度、共振散射光强度逐渐减弱。通过计算不同温度(293,303,310 K)下的猝灭常数($K_{sv} = 5.40 \times 10^4, 6.90 \times 10^4, 8.00 \times 10^4$ L/mol)及扫描紫外吸收光谱,确定了甲钴胺对牛血清白蛋白的猝灭机理为动态猝灭。测定了该反应的表现结合常数($K_A = 1.68 \times 10^4, 4.34 \times 10^4, 7.90 \times 10^4$ L/mol)和结合位点数($n \approx 1$)。利用热力学参数($\Delta H > 0, \Delta G < 0$ 和 $\Delta S > 0$)确定了分子间的作用力性质,作用力主要是疏水作用力,作用过程是自发的。同时应用同步荧光技术研究了甲钴胺对BSA构象的影响。结果表明,甲钴胺没有引起BSA构象的变化。

关键词: 甲钴胺; 牛血清白蛋白; 荧光光谱; 紫外吸收光谱; 共振光散射

中图分类号: O657.3

文献标识码: A

DOI: 10.3788/fgxb20123305.0553

Spectroscopic Studies on The Interaction Between Mecobalamin and Bovine Serum Albumin

XIN Jian-wei, MA Hong-yan*, YANG Meng

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Institute of Analytical Chemistry, Yan'an University, Yan'an 716000, China)

* Corresponding Author, E-mail: mahy6614@hotmail.com

Abstract: The interaction of mecobalamin and bovine serum albumin (BSA) was studied by fluorescence spectroscopy, ultraviolet absorption spectroscopy and resonance light scattering spectroscopy. The results showed that in pH 7.40 Tris-HCl buffer solution, both the fluorescence and resonance light scattering intensity were quenched when increasing the mecobalamin concentration. According to Stern-Volmer curve, the fluorescence quenching constant was calculated ($K_{sv} = 5.40 \times 10^4, 6.90 \times 10^4, 8.00 \times 10^4$ L/mol) with the interaction of mecobalamin and BSA at different temperatures (293, 303, 310 K). At the same time, ultraviolet absorption spectra were characterized. The experimental results indicated that the fluorescence quenching mechanism of mecobalamin with BSA was a dynamic quenching procedure. The binding constants ($K_A = 1.68 \times 10^4, 4.34 \times 10^4, 7.90 \times 10^4$ L/mol), binding sites ($n \approx 1$) and the corresponding thermodynamic parameters, namely enthalpy change (ΔH), free energy change (ΔG) and entropy change (ΔS) at different temperatures were calculated ($\Delta H > 0, \Delta G < 0, \text{ and } \Delta S > 0$). According to the thermodynamic parameters, during the binding process, spontaneous molecular interaction occurs in which entropy increased and free energy decreased. These indicate the hydrophobic interaction was the main sort of binding force between

收稿日期: 2011-12-16; 修订日期: 2012-02-13

基金项目: 国家自然科学基金(21103146); 陕西省教育厅科研基金(12JK0616)资助项目

作者简介: 辛建伟(1985-), 男, 陕西榆林人, 主要从事发光分析的研究。

E-mail: xinjianwei1986@126.com

the reaction of mecobalamin and BSA. In addition, the effect of mecobalamin on the conformation of BSA was analyzed using synchronous fluorescence spectroscopy. The results revealed that mecobalamin did not change the conformation of BSA during the reaction.

Key words: mecobalamin; bovine serum albumin (BSA); fluorescence spectroscopy; ultraviolet absorption spectroscopy; resonance light scattering

1 引 言

甲钴胺是一种内源性辅酶 B₁₂, 又称甲基维生素 B₁₂, 是维生素 B₁₂ 系列品种中的一种有机钴胺素, 主要存在于生物体血液、髓液中, 可直接转运入神经细胞, 刺激轴浆蛋白质合成, 使轴突受损区域再生^[1], 是氰钴胺的一种深加工产品, 比氰钴胺易于进入神经元参与脑细胞和脊髓神经元胸腺嘧啶核苷的合成, 能够促进叶酸的利用和核酸的代谢^[2]。甲钴胺主要功能是修复损伤的神经, 缓解麻木、疼痛和感觉异常, 是一种有效而安全的神经修复剂。该药不良反应少, 使用方便, 在临床上的应用日益广泛^[3]。

血清白蛋白是血浆中含量最丰富的重要载体蛋白^[4-5], 能与多种内源及外源性化合物结合^[6], 具有储运外源性药物小分子和内源性代谢产物等重要生理功能, 参与许多重要的生命过程。因此, 研究药物小分子与蛋白质间相互作用不仅有助于从分子水平上了解蛋白质与小分子的作用机理与规律, 而且有助于认识药物的转运和代谢过程, 为新的高活性的药物小分子的设计与开发研究提供有价值的信息及理论指导^[7]。许多药物分子具有光学活性, 或与血清白蛋白结合后产生光学活性, 因此, 通过光谱法研究血清白蛋白结合药物分子后结构上的变化来探讨其结合机理非常有效且应用广泛。其中, 荧光光谱法其灵敏度高、选择性强、用量少、方法简便, 不仅可以提供激发光谱、发射光谱、荧光强度、量子产率及荧光寿命等物理指标, 而且可对蛋白质分子中荧光生色基团的结构及其所处的微环境提供有用的信息, 在血清白蛋白与药物小分子之间相互作用的研究中发挥了重要的作用^[8-12]。甲钴胺在中国药典、地方标准均未见收载, 关于甲钴胺与牛血清白蛋白之间相互作用的研究也未见报道。

本文应用荧光光谱法、紫外吸收光谱法及共

振光散射法研究了甲钴胺与牛血清白蛋白之间的相互作用, 运用 Stern-Volmer 方程确定了其猝灭机理、猝灭常数。同时在一定条件下测定了两者的结合常数、结合位点数和它们之间的作用力类型, 并且应用同步荧光光谱法研究了甲钴胺对牛血清白蛋白构象的影响。本研究为了解甲钴胺在体内的输送和代谢过程、阐明药物分子在生物体中的作用机理以及为安全用药提供了实验依据。

2 实 验

2.1 仪器与试剂

F-4500 型荧光分光光度计 (Fluorescence Spectrophotometer; 日本日立公司), 8453 型紫外分光光度计 (美国 Agilent 公司), 电热恒温水浴锅 (北京化玻联医疗器械有限公司)。

牛血清白蛋白 (BSA, 国药集团化学试剂有限公司): 以 50 mmol/L 的 NaCl 溶液配制成 25 μmol/L 的溶液, 保存于 4 °C 以下^[10]。甲钴胺 (Mecobalamin, 由沈阳卫材制药有限公司提供): 以水配成 25 μmol/L 的溶液。缓冲溶液为 Tris-HCl, 所用试剂均为分析纯, 实验用水均为 UP 超纯水。

2.2 实验方法

在 25 mL 比色管中依次加入 5.00 mL pH = 7.40 的 Tris-HCl 缓冲溶液, 1.00 mL 25 μmol/L BSA 溶液, 不同体积的 25 μmol/L 的甲钴胺溶液, 用水稀释至刻度, 摇匀, 将比色管置于室温 (20 °C) 下或恒温 (30, 37 °C) 水浴锅中, 恒温 2 h。选择激发和发射狭缝宽度均为 5 nm, 固定激发波长为 280 nm, 扫描 290 ~ 550 nm 荧光光谱; 固定激发和发射波长间隔 ($\Delta\lambda_1 = 15$ nm, $\Delta\lambda_2 = 60$ nm) 记录同步荧光光谱; 固定激发和发射波长间隔为 $\Delta\lambda = 0$ nm, 记录 280 ~ 650 nm 范围内体系共振光散射光谱^[11]。在紫外分光光度计上以 UP 超纯水为参比溶液, 扫描 190 ~ 390 nm 范围内的 BSA 以及 BSA 与甲钴胺等摩尔混合物的紫外吸收光谱。

3 结果与讨论

3.1 甲钴胺对 BSA 荧光光谱的影响

图1为激发波长为280 nm、温度为293 K时,甲钴胺对BSA的荧光猝灭光谱。从图1可以看出,随着甲钴胺浓度的增加,BSA的荧光发射峰强度逐渐降低,峰形基本保持不变,而峰位置有蓝移,说明甲钴胺对BSA的内源荧光具有猝灭作用。

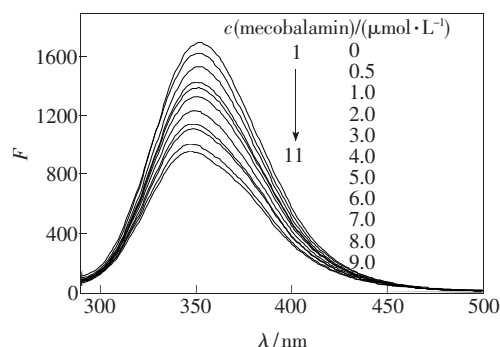


图1 甲钴胺对BSA荧光光谱的影响

Fig.1 fluorescence quenching spectra of mecobalamin-BSA

3.2 猝灭机理的确定

荧光猝灭过程可分为静态猝灭和动态猝灭。静态猝灭往往会引起发光分子的吸收光谱发生变化;动态猝灭并不改变发光分子的吸收光谱。动态猝灭时,温度升高猝灭常数增大;静态猝灭时温度升高,猝灭常数减小。其猝灭过程遵循 Stern-Volmer 方程^[12]:

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

$$K_q = K_{sv}/\tau_0,$$

式中: F_0 和 F 是猝灭剂加入前后所测得的荧光强度; K_q 为双分子猝灭过程的速率常数; τ_0 为没有猝灭剂存在下测得的荧光寿命,生物大分子的荧光寿命一般为 10^{-8} s; $[Q]$ 为猝灭剂的平衡浓度; K_{sv} 称为 Stern-Volmer 猝灭常数。

3.2.1 温度对猝灭常数的影响

根据 Stern-Volmer 方程,绘制 $F_0/F-[Q]$ 关系图,由直线的斜率求出 K_{sv} ,结果见表1。由表1可知,随温度升高 K_{sv} 增大,表明猝灭机理为动态猝灭。一般认为,各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞猝灭常数为 2×10^{10} L/(mol·s)^[13],而从表1结果来看, K_q 数量级在 10^{12} ,由此考虑,猝灭机理似乎不应为动态猝灭;但考虑到实验体系为离子溶液,离子强度是影响猝灭系数的重要因素,所以认为 K_q 的增大很可能是离子强度影响

的结果^[14]。

3.2.2 紫外吸收光谱的变化

图2为BSA溶液的紫外吸收光谱及BSA与甲钴胺等摩尔混合物的紫外吸收光谱。由图2得BSA的紫外吸收光谱图与BSA和甲钴胺等摩尔混合物的紫外吸收光谱图重叠,即紫外吸收光谱没有发生变化,进一步证明甲钴胺对BSA的荧光猝灭机理为动态猝灭。

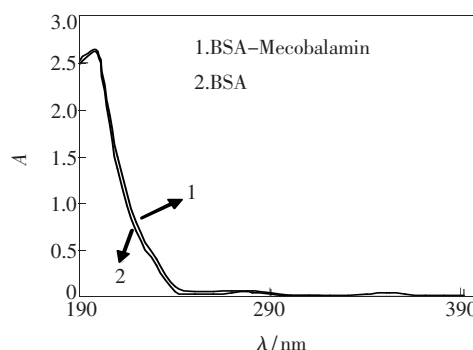


图2 甲钴胺与BSA作用的吸收光谱图

Fig.2 Effect of BSA on absorption spectra of mecobalamin

3.3 结合常数及结合位点数的计算

对于动态猝灭,荧光强度与猝灭剂的浓度可用下式描述^[15]:

$$\lg[(F_0 - F)/F] = \lg K_A + n \lg[Q], \quad (2)$$

式中: F_0 和 F 是猝灭剂加入前后所测得的荧光强度; K_A 为药物分子与蛋白质生物大分子相互作用的表现结合常数, n 表示结合位点数, $[Q]$ 为猝灭剂的平衡浓度。

固定BSA浓度,改变甲钴胺的浓度,绘制 $\lg[(F_0 - F)/F]-\lg[Q]$ 关系图,直线的斜率为结合位点数 n ,截距为 $\lg K_A$,结果见表1。由表1可知,甲钴胺与BSA结合位点数 n 接近于1,结合常数 K_A 值均为 10^4 数量级,表明甲钴胺与BSA可形成一个结合位点数且具有较强的结合作用,可以被蛋白质运输和储存。

3.4 甲钴胺与BSA之间作用力类型的确定

药物和生物分子之间的作用力包括范德华力、氢键作用力、疏水作用力和静电引力^[16]。当 $\Delta H < 0, \Delta S < 0$ 时,两者之间主要为氢键作用力和范德华力;当 $\Delta H > 0, \Delta S > 0$ 时,两者之间主要为疏水作用力;当 $\Delta H < 0, \Delta S > 0$ 时,两者之间主要为静电引力。根据热力学公式^[17]: $\Delta G = -RT \ln K$; $\Delta H = RT_1 T_2 \ln(K_1/K_2)/(T_2 - T_1)$; $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$,分别计算出对应温度下甲钴胺与BSA作用的自

表 1 甲钴胺与 BSA 作用的猝灭常数 K_{sv} 、结合常数 K_A 、结合位点数 n 和热力学参数

Table 1 Quenching constants, binding constants, binding sites and thermodynamic parameters of mecobalamin-BSA system

T/K	$K_{sv}/$ ($10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$) (R)	$K_q/$ ($10^{12} \text{ L} \cdot$ $\text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	$K_A/$ ($10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$) (R)	n	$\Delta H/$ ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	$\Delta G/$ ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	$\Delta S/$ ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot$ K^{-1})
293	5.40(0.985 9)	5.40	1.68(0.982 5)	0.871 7	69.83	-23.76	319.4
303	6.90(0.994 5)	6.90	4.34(0.987 1)	0.963 0	69.83	-26.90	319.2
310	8.00(0.990 7)	6.90	7.90(0.991 5)	0.990 8	68.61	-29.06	315.1

由能变 ΔG 、焓变 ΔH 和熵变 ΔS , 结果如表 1 所示。由表 1 可知, $\Delta H > 0$, $\Delta G < 0$, $\Delta S > 0$, 表明甲钴胺与 BSA 之间的作用力主要为疏水作用力。

3.5 共振光散射光谱

常温(20 °C)下, 在荧光分光光度计上, 设定 $\Delta\lambda = 0 \text{ nm}$, 记录 280 ~ 650 nm 范围内体系的共振光散射光谱, 结果如图 3 所示。由图可知, BSA 在 469 nm 处有最大共振光散射峰, 甲钴胺的加入使 BSA 最大散射峰处的散射强度依次降低, 因此可应用共振光散射光谱数据来解释 BSA 与甲钴胺之间的相互作用机理。设 I_0 和 I 为猝灭剂加入前后时 BSA 的散射光强度, 按方程: $I_0/I = 1 + K_q\tau_0[Q] = 1 + K_{sv}[Q]$ 与 $\lg[(I_0 - I)/I] = \lg K_A + n\lg[Q]$, 作图求得 $K_q = 8.17 \times 10^{12} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$, $K_A = 9.96 \times 10^4 \text{ L}/\text{mol}$, 与荧光猝灭所得 K_q 和 K_A 值在相同的数量级范围内。因此, 荧光猝灭理论同样适用于药物对蛋白质共振光散射强度猝灭的研究。

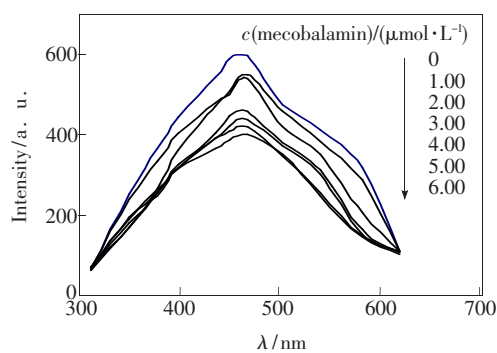


图 3 甲钴胺对 BSA 共振光散射光谱的影响

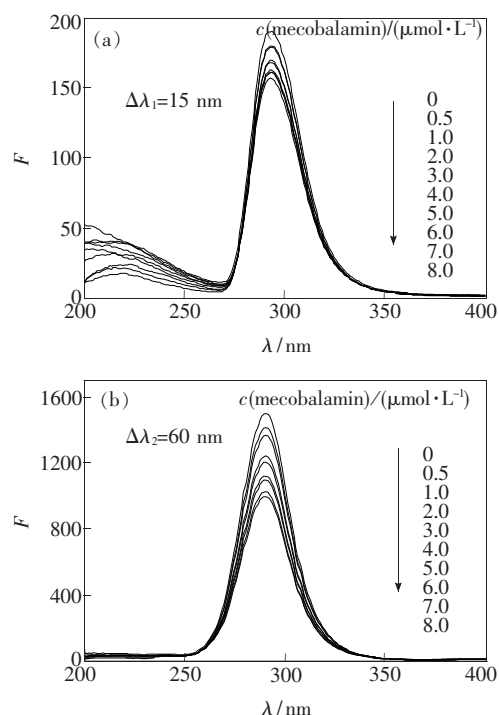
Fig. 3 Effect of mecobalamin concentration on the resonance light scattering intensity of BSA

3.6 甲钴胺对 BSA 构象的影响

文献报道, 蛋白质的同步荧光在 $\Delta\lambda_1 = 15 \text{ nm}$ 时只显示酪氨酸残基的荧光光谱, $\Delta\lambda_2 = 60 \text{ nm}$ 时只显示色氨酸残基的荧光光谱^[18]。因为氨基酸残基的最大发射波长与其所处环境的极性有关,

若最大发射波长发生改变, 则说明残基所处的微环境发生了变化, 故可由最大发射波长的改变来判断 BSA 构象的变化^[19]。

图 4(a)、(b) 分别表示体系在 $\Delta\lambda_1 = 15 \text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda_2 = 60 \text{ nm}$ 的同步荧光光谱。由图 4 可知: 随着甲钴胺浓度的增大, $\Delta\lambda_1 = 15 \text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda_2 = 60 \text{ nm}$ 时酪氨酸残基和色氨酸残基的特征荧光强度均发生了明显的猝灭, 但酪氨酸残基和色氨酸残基的最大发射峰位置基本没有移动, 这说明甲钴胺的加入没有引起 BSA 构象的变化。

图 4 (a) $\Delta\lambda_1 = 15 \text{ nm}$ 和 (b) $\Delta\lambda_2 = 60 \text{ nm}$ 的同步荧光光谱图 (pH = 7.40)Fig. 4 Synchronization fluorescence spectra at $\Delta\lambda_1 = 15 \text{ nm}$ (a) and $\Delta\lambda_2 = 60 \text{ nm}$ (b) (pH = 7.40)

4 结论

采用荧光光谱、紫外吸收光谱及共振光散射法研究了甲钴胺与牛血清白蛋白之间的相互作用

用,甲钴胺对 BSA 的荧光猝灭属于动态猝灭。求得了甲钴胺与 BSA 的结合常数、结合位点数和热力学参数,热力学数据表明二者主要靠疏水作用力相结合。同步荧光光谱表明,甲钴胺的加入没

有引起 BSA 构象的变化。这些研究结果将有助于了解甲钴胺在体内的运输和分布情况,对于了解生命过程、研究药物作用机制及药物分子设计等方面也具有一定的指导意义。

参 考 文 献:

- [1] Li Ying, Yu Zhiguo, Liu Xinrong, *et al.* Bioequivalence of mecobalamin soft capsules in human plasma [J]. *J. Shenyang Pharm Univ.* (沈阳药科大学学报), 2011, 28(3):237-240 (in Chinese).
- [2] Xie Lihua, Chen Qiao, Chen Xiaoyan. Determination of related substance of mecobalamin by HPLC [J]. *Hebei Chemical Engineering and Industry* (河北化工), 2011, 34(3):52-52 (in Chinese).
- [3] Guo Hui, Chen Yonghua. Effect of mecobalamin on diabetic peripheral neuropathy [J]. *Chinese Journal of Practical Nervous Diseases* (中国实用神经疾病杂志), 2011, 14(13):30-31 (in Chinese).
- [4] Feng Xiaoqiang, Fu Guoqing, Li Xiaofang, *et al.* Interaction of rare earth with bovine serum albumin [J]. *Chin. J. Lumin.* (发光学报), 2011, 32(2):205-209 (in Chinese).
- [5] Liu Baosheng, Xue Chunli, Wang Jing, *et al.* Luminescence spectroscopy of conjugation reaction between bovine serum albumin and spectroscopic probe ponceau S [J]. *Chin. J. Lumin.* (发光学报), 2011, 32(1):100-108 (in English).
- [6] Liang Yanqiu, Xu Hongbo. Interaction of 4-nitoraniline with bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy [J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory* (分析试验室), 2011, 30(5):54-57 (in Chinese).
- [7] Wang Ling, Zhang Zhan, Liang Ruiling. Study on interaction of small molecules with protein [J]. *Journal of Henan University of Urban Construction* (河南城建学院学报), 2010, 19(5):39-42 (in Chinese).
- [8] Croney J C, Jameson D M, Learmonth R P. Fluorescence spectroscopy in biochemistry: Teaching basic principles with visual demonstrations [J]. *Biochem. Mol. Bio. Edu.*, 2001, 29(2):60-65.
- [9] Aodeng Gaowa, Jin Yingchun. Spectroscopic studies on the interaction between fenbufen and bovine serum albumin [J]. *Chin. J. Lumin.* (发光学报), 2011, 32(4):405-410 (in Chinese).
- [10] Zhang Qiulan, Ni Yongnian. Spectroscopic studies on the interaction between salbutamol and terbutaline with bovine serum albumin [J]. *Chemical Research and Application* (化学研究与应用), 2011, 23(6):673-378 (in Chinese).
- [11] Liu Baosheng, Yang Chao, Wang Jing, *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).
- [12] Yang J, Zheng H J, Jin J J, *et al.* Fluorescence spectroscopy study on the interaction between gossypol and bovine serum albumin [J]. *J. Mol. Struct.*, 2009, 920(1-3):227-230.
- [13] Li Fangfang. Interaction of micromolecule medicines and serum albumin by spectroscopic methodology [J]. *Chemical Engineer* (化学工程师), 2009, (7):74-78 (in Chinese).
- [14] Shang Yonghui, Sun Jiajuan, Liu Jing, *et al.* Study on the interaction between hesperidin and bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy [J]. *Chemical Analysis and Meterage* (化学分析计量), 2011, 20(1):32-34 (in Chinese).
- [15] Yu X Y, Liu R H, Yi R Q, *et al.* Study of the interaction between N-confused porphyrin and bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy [J]. *Spectrochim Acta Part A*, 2011, 4(78):1329-1335.
- [16] Mote U S, Bhattar S L, Patil S R, *et al.* Interaction between felodipine and bovine serum albumin: Fluorescence quenching study [J]. *Luminescence*, 2010, 25(1):1-8.
- [17] Zhang W M, Han B Y, Zhao S L, *et al.* Study on the interaction between theasinesin and bovine serum albumin by fluorescence method [J]. *Anal. Lett.*, 2010, 43(2):289-299.
- [18] Liu Baosheng, Xue Chunli, Wang Jing, *et al.* Studies on the interaction between ciprofloxacin and ofloxacin in presence of bovine serum albumin by spectroscopic methods [J]. *Chin. J. Lumin.* (发光学报), 2010, 31(2):285-290 (in Chinese).
- [19] Guo Xingjia, Li Xiaozhou, Xu Shukun, *et al.* A study on interaction of bilirubin with bovine serum albumin by fluorescence quenching spectroscopy [J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory* (分析试验室), 2007, 26(4):11-15 (in Chinese).