

DOI:10.3969/j.issn.1003-0972.2017.02.006

荧光法研究阿托伐他汀钙与牛血清白蛋白的相互作用

吕艳阳*, 张亚茹

(信阳师范学院 化学化工学院, 河南 信阳 464000)

摘 要:在不同温度下测定了阿托伐他汀钙(AC)对牛血清白蛋白(BSA)的荧光光谱的影响,结果表明,AC 会使 BSA 发生荧光猝灭,随着 AC 浓度的增大,猝灭程度增强.AC 对 BSA 的猝灭作用主要是动态猝灭,并计算得到 AC 与 BSA 的结合位点数为 1.2.根据热力学方程式得出 AC 与 BSA 相互作用的参数,说明 AC 与 BSA 之间的相互作用力主要是疏水作用力.

关键词:阿托伐他汀钙;荧光猝灭;动态猝灭;结合位点数;疏水作用力

中图分类号:TS201.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1003-0972(2017)02-0201-04

Interaction of Atorvastatin Calcium with Bovine Serum Albumin by Fluorescence

LYU Yanyang*, ZHANG Yaru

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Xinyang Normal University, Xinyang 464000, China)

Abstract:The interaction between atorvastatin calcium(AC) and bovine serum albumin (BSA) was studied by fluorecence spectrum at different temperatures.The results showed that the fluorecence quenching of BSA was caused by AC. The degree of quenching was enhanced with the increase of the concentration of AC. The quenching belonged to dynamic quenching mostly. The binding sites of the AC and BSA was 1.2.The parameters of the interaction between AC and BSA were obtained according to the thermodynamic equation. The results indicated that the interaction between AC and BSA was mainly hydrophobic force.

Key words:atorvastatin calcium; fluorecence quenching; dynamic quenching; the binding site; hydrophobic force

0 引言

阿托伐他汀钙(AC)是新合成的一种 HMG-CoA 还原酶抑制剂,可通过选择性地抑制肝脏内 HMG-CoA 还原酶的合成来降低血浆中胆固醇和脂蛋白的水平,所以在临床上常用于治疗与胆固醇过高或血脂异常相关的疾病.牛血清白蛋白(BSA)由 581 个氨基酸残基组成,其中包括能够发出内源性荧光的色氨酸残基、酪氨酸残基、苯丙氨酸残基等,其作用主要是维持血液的渗透压,以及具有载体和营养作用^[1].BSA 可与多种小分子物质作用^[2,3],BSA 与人血清白蛋白(HSA)的氨基酸序列极其相似,又具有溶解度较大、性质稳定、廉价易得等诸多优点^[4],因此通过研究 AC 与 BSA 的相互

作用对于阐明 AC 在人体内与 HSA 发生相互作用的机制有很大意义.

目前关于 AC 与 BSA 间相互作用的研究报道较少^[4],文献[4]采用电化学的方法研究了 AC 与 BSA 间的相互作用.本文用荧光光谱法研究了在模拟人体 pH 条件下 AC 与 BSA 的荧光猝灭光谱,并进一步探讨了其猝灭方式、结合位点数及相互作用力,对进一步探索药物的作用机理等有关生命问题有着重要意义.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Cary Eclipse 型荧光分光光度计,美国 VARIAN 公司;HH-2 数显恒温水浴锅,金坛市杰瑞儿

收稿日期:2016-11-02;修订日期:2017-01-12; * .通信联系人,E-mail: yanyang632@126.com
基金项目:国家自然科学基金项目(21305119);河南省教育厅自然科学基金项目(2011B150032)
作者简介:吕艳阳(1963—),女,河南信阳人,教授,主要从事分析化学研究.

电器有限公司;pHSJ-3F 型酸度计,上海雷磁仪器厂.BSA,分子量为 66 000,生化试剂;阿托伐他汀钙片,优力平,浙江新东港药业股份有限公司,10 mg/片;无水乙醇,分析纯;三(羟甲基)氨基甲烷(Tris),分析纯;实验用水均为二次蒸馏水.

1.0×10⁻⁵ mol/L BSA 标准溶液的配制:准确称取 0.165 g BSA,用蒸馏水溶解并定容至 250 mL 容量瓶中;0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲溶液的配制:准确称取 3.028 5 g Tris,用蒸馏水溶解并定容至 250 mL 容量瓶中,然后用 pH 计将其调成 pH 7.4 的缓冲溶液.0.2 g/L AC 标准溶液的配制:取两片阿托伐他汀钙片粉碎后用适量无水乙醇溶解,然后滤去沉淀,再用无水乙醇定容至 100 mL 容量瓶中.

1.2 实验方法

在编号为 0~10 的 10 mL 比色管中分别加入 4.0 mL 新配制的 BSA 标准溶液,依次加入 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 mL 的 AC 标准溶液,用 pH7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液定容,分别在 25 ℃和 45 ℃条件下恒温静置反应 10 min 扫描其荧光发射光谱(激发波长为 280 nm,扫描波长范围为 282~500 nm,激发和发射狭缝均为 5 nm).

2 结果与讨论

2.1 AC 对 BSA 荧光猝灭光谱的研究

BSA 中的色氨酸残基、酪氨酸残基、苯丙氨酸残基等能够发出荧光,当向其溶液中加入 AC 后,会观察到荧光猝灭现象.图 1 研究的分别是 25 ℃和 45 ℃时,随 AC 浓度的增大 BSA 荧光猝灭光谱的变化情况.由图 1 可知,在其他条件一定时,只改变加入 AC 的量,BSA 的荧光强度逐渐降低,即荧光猝灭程度逐渐增强,这说明 AC 与 BSA 发生了某种作用,使得 BSA 发生荧光猝灭.

2.2 AC 对 BSA 荧光猝灭方式的研究

荧光猝灭是指荧光物质分子的荧光强度减弱的现象.荧光猝灭方式有动态猝灭和静态猝灭两种.动态猝灭是指荧光物质分子被激发后与猝灭剂发生碰撞,导致其丧失激发能而返回到基态.静态猝灭是指荧光分子和猝灭剂之间形成不发光的基态配合物,或者与激发态的荧光分子形成有效的猝灭球状模型^[5].溶剂、体系的酸碱度和温度等都会对荧光物质的荧光强度产生影响.猝灭剂与 BSA 发生的动态猝灭并不影响蛋白质的结构和生理活

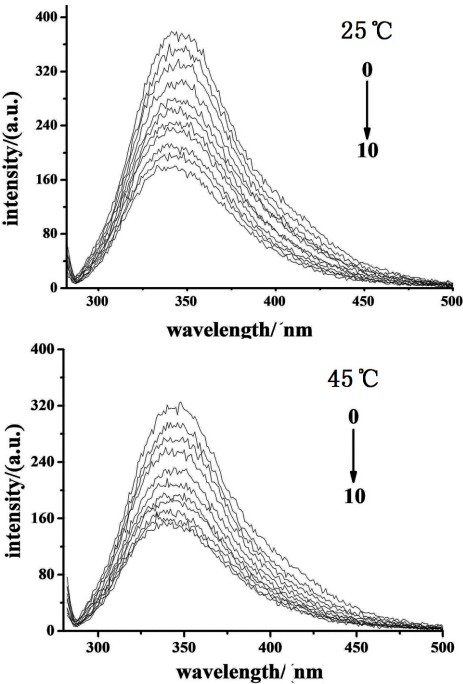


图 1 25 ℃和 45 ℃时 AC 对 BSA 的荧光猝灭光谱
Fig. 1 Fluorescence emission spectra of AC and BSA
其中:从 0 到 10 AC 的浓度(×10⁻³ g/L)依次为

0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20.

性,而猝灭剂与 BSA 发生的静态猝灭通常是发生了配合反应,会对蛋白质的结构产生一定的影响^[6].

由于分子的热运动等发生碰撞所引起的动态猝灭通常符合 Stern-Volmer 方程^[3]:

$$F_0/F=1+K_q\tau_0C(Q)=1+K_{sv}C(Q).$$

荧光体与猝灭剂之间结合生成不发光的复合物或者无辐射能量转移所引起的静态猝灭通常符合 Lineweaver-Burk 方程^[7]:

$$F_0/(F_0-F)=1+K_{LB}[1/C(Q)].$$

其中: F_0 是无猝灭剂时荧光体的荧光强度; F 是加入猝灭剂后荧光体的荧光强度; $C(Q)$ 是猝灭剂的浓度; τ_0 是无猝灭剂时荧光体的荧光寿命; K_{sv} 是动态猝灭常数; K_{LB} 是静态猝灭常数.

假设 AC 引起 BSA 的荧光猝灭为动态猝灭,则由 Stern-Volmer 方程可用 F_0/F 对 $C(Q)$ 作图,如图 2 所示.在图 2 中,25 ℃时的线性方程为

$$F_0/F=0.921+0.104C(Q),$$

$$R=0.995.$$

并且已知生物分子的荧光寿命约为 10 ns 数量级.由线性方程的斜率可求得 $K_{sv}=0.117$ L/mol, $K_q=1.165\times10^7$ L/(mol·s);45 ℃时的线性方程为

$$F_0/F=0.956+0.113C(Q),$$

$R=0.995$.

由线性方程的斜率可求得 $K_{sv} = 0.126 \text{ L/mol}$, $K_q = 1.256 \times 10^7 \text{ L/(mol} \cdot \text{s)}$. 已知猝灭剂对生物大分子的最大 K_q 值为 $2.0 \times 10^{10} \text{ L/(mol} \cdot \text{s)}$ ^[3]. 本实验中求得的 K_q 值均小于 $2.0 \times 10^{10} \text{ L/(mol} \cdot \text{s)}$, 符合动态猝灭的特征. 并且, 25 °C 时的 K_q 值要比 45 °C 时的 K_q 值小, 即随着温度的升高 K_q 值增大, 这表明温度越高, 扩散速率越快, 符合动态猝灭的特征. 因此可推知 AC 与 BSA 之间的荧光猝灭方式是动态猝灭.

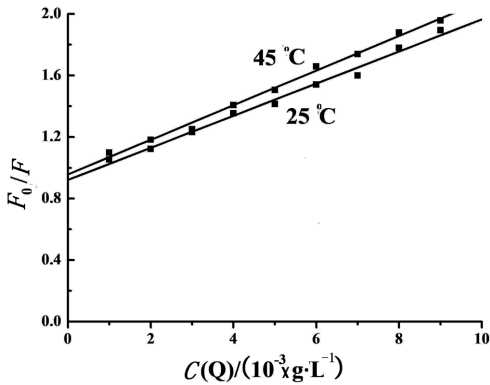


图 2 不同温度 AC 与 BSA 相互作用的 Stern-Volmer 曲线

Fig. 2 The Stern-Volmer graph of the AC and BSA

2.3 AC 与 BSA 结合位点数的判定

荧光体与猝灭剂之间发生相互作用的结合位点数可由公式

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

求出^[3]. 其中, F_0 是无猝灭剂时荧光体的荧光强度; F 是加入猝灭剂后荧光体的荧光强度; $C(Q)$ 是猝灭剂的浓度; n 是荧光体与猝灭剂的结合位点数; K_A 是该猝灭反应的平衡常数. 以 $\lg [(F_0 - F)/F]$ 为纵坐标, $\lg C(Q)$ 为横坐标作图, 如图 4 所示.

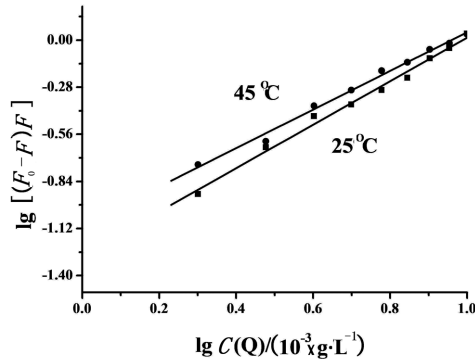


图 3 不同温度下 $\lg [(F_0 - F)/F]$ 与 $\lg C(Q)$ 的关系

Fig. 3 A graph of the $\lg [(F_0 - F)/F]$ and $\lg C(Q)$

从图 4 中可得知, 25 °C 时的线性方程为 $\lg [(F_0 - F)/F] = 1.279 + 1.293 \lg C(Q)$, $R = 0.996$,

所以可求得

$$\begin{aligned} n_{25} &= 1.293, K_{A25} = 18.999; \\ 45 \text{ °C 时的线性方程为} \\ \lg [(F_0 - F)/F] &= 1.101 + 1.147 \lg C(Q), \\ R &= 0.996, \end{aligned}$$

所以可求得

$$n_{45} = 1.147, K_{A45} = 12.618.$$

综上, $n = (1.293 + 1.147)/2 = 1.220$, AC 与 BSA 的结合位点数约为 1.2.

2.4 AC 与 BSA 之间相互作用力的确定

药物等有机小分子与蛋白质等生物大分子间的结合力有范德华力、氢键、静电引力、疏水作用力等^[8]. 由不同温度下 AC 与 BSA 作用的动态猝灭常数 K_{sv} (即结合常数) 可求出猝灭反应的熵变、焓变和吉布斯自由能变. 假设该反应的焓变不随温度改变, 则由热力学公式

$$\begin{aligned} \Delta G &= -RT \ln K (K \text{ 即 } K_{sv}), \\ \ln (K_2/K_1) &= \Delta H (1/T_1 - 1/T_2)/R \\ (R &= 8.314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}), \\ \Delta S &= (\Delta H - \Delta G)/T. \end{aligned}$$

可得: 在 25 °C 时, $\Delta G = -17.493 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $\Delta H = 2.963 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $\Delta S = 68.643 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$; 在 45 °C 时, $\Delta G = -18.866 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $\Delta H = 2.963 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $\Delta S = 68.643 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$.

从以上计算可以看出, AC 与 BSA 猝灭反应的热力学参数 $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$. 根据 Ross 等总结的判断生物大分子与小分子结合力性质的热力学规律可推断, AC 与 BSA 之间的相互作用力主要是疏水作用力, 即 AC 通过疏水作用力进入 BSA 的疏水空腔内部形成稳定的配合物^[9]. 又因为该反应的 $\Delta G < 0$, 所以该猝灭反应是正向自发进行的, $\Delta H > 0$, 提高反应的温度对反应的正向进行有利.

3 结论

模拟人体的 pH 值, 分别在 25 °C 和 45 °C 条件下测得了不同浓度的 AC 对 BSA 的荧光猝灭光谱, 并进一步探讨了其猝灭方式、结合位点数以及相互作用力. 结果表明, AC 对 BSA 的荧光猝灭方式为动态猝灭, 通过扩散和碰撞达到平衡. 通过进一步计算得出了 25 °C 时的速率常数 K_q 为 $1.165 \times 10^7 \text{ L/(mol} \cdot \text{s)}$, 45 °C 时的速率常数 K_q 为 $1.256 \times 10^7 \text{ L/(mol} \cdot \text{s)}$, AC 与 BSA 的结合位点

数大约是 1.2,并由热力学数据得出二者之间是通过疏水作用力相结合的.

参考文献:

[1] 晋可,张家兴,尹宗宁,等.用荧光参数表征牛血清白蛋白溶液的构象变化过程[J].中国药学杂志,2013,48(7):531-533.
JIN Ke, ZHANG Jiaying, YIN Zongning, et al.Characterizing the conformational change process of bovine serum albumin solution by fluorescence parameters [J]. Chin Pharm J, 2013, 48(7): 531-533.

[2] 吕艳阳,陈芳芳,查纯婷.蒲公英提取物与牛血清白蛋白相互作用研究[J].信阳师范学院学报(自然科学版),2016,29(1):40-42.
LYU Yanyang, CHEN Fangfang, ZHA Chunting. Study on the interaction of dandelion extract and bovine serum albumin[J]. Journal of Xinyang Normal University(Natural Science Edition), 2016, 29(1): 40-42.

[3] 郁有祝,王艳飞,郭玉华. Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 对香豆素-3-羧酸与牛血清白蛋白相互作用的影响[J]. 信阳师范学院学报(自然科学版), 2016,29(4):524-527 .
YU Youzhu, WANG Yanfei, GUO Yuhua. Effect of $\text{Cu}(\text{II})$, $\text{Fe}(\text{III})$, $\text{Zn}(\text{II})$ on the interaction between bovine serum albumin and coumarin-3-carboxylic acid[J]. Journal of Xinyang Normal University (Natural Science Edition), 2016, 29(4): 524-527.

[4] 董社英,薛春霞,黄廷林.阿托伐他汀钙与牛血清白蛋白的相互作用[J].物理化学学报,2007,23(10):1520-1524.
DONG Sheying, XUE Chunxia, HUANG Tinglin. Interaction between atorvastatin calcium and bovine serum albumin[J]. Acta Physico-Chimica Sinica, 2007, 23(10): 1520-1524.

[5] 徐科,黄亚励,刘红,等.荧光光谱法研究氢化可的松与牛血清白蛋白的结合作用[J].化学与生物工程,2012,29(11):32-35.
XU Ke, HUANG Yali, LIU Hong, et al. Study on binding of hydrocortisone with bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy [J]. Chemistry & Bioengineering, 2012, 29(11): 32-35.

[6] 李玲,徐祖顺,宋功武.荧光光谱法研究辛烷磺酸钠与 BSA 的相互作用[J].湖北大学学报(自然科学版),2009,31(4):384-387, 402.
LI Ling, XU Zushun, SONG Gongwu. Study on the interaction between sodium octanesulfonate and bovine serum albumin by spectroscopic analysis[J]. Journal of Hubei University(Natural Science Edition), 2009, 31(4): 384-387, 402.

[7] 原华平,关洪亮,顾青,等.硫唑嘌呤与牛血清白蛋白相互作用的热力学研究[J].分析试验室,2006,25(3):81-85.
YUAN Huaping, GUAN Hongliang, GU Qing, et al. Spectrometric study on the interaction between Azathioprine and bovine serum albumin[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2006, 25(3): 81-85.

[8] 杨朝霞,文艳清,张友玉,等.川陈皮素与牛血清白蛋白的相互作用的光谱研究[J].分析科学学报,2009,25(5):527-532.
YANG Chaoxia, WEN Yanqing, ZHANG Youyu, et al.Studies on the interaction of nobiletin and bovine serum albumin by spectral methods[J]. Journal of Analytical Science, 2009, 25(5): 527-532.

[9] 李志良,李俊忠,毕琼斯,等.新型靶抗癌配合物初步筛选与作用机制的荧光法研究[J].化学学报,1997,55(8):766-772.
LI Zhiliang, LI Junzhong, BI Qionsi, et al.Fluorimetry used for preliminary screening of eleven novel palladium complexes as potential antitumor agents [J]. Acta Chimica Sinica, 1997, 55(8): 766-772.

责任编辑:张 建 合