

巴洛沙星与牛血清白蛋白相互作用的研究

严拯宇, 邵秀芬, 姜新民, 胡育筑

中国药科大学分析化学教研室, 江苏 南京 210009

摘要 应用荧光法研究了在不同酸度条件下, 巴洛沙星(balofloxacin, BLFX)与牛血清白蛋白(BSA)的荧光猝灭现象, 利用荧光猝灭双倒数图计算了巴洛沙星与牛血清白蛋白之间的结合常数, 根据 Förster 非辐射能量转移机制计算出巴洛沙星在牛血清白蛋白上的结合距离, 并根据热力学参数确定了巴洛沙星与牛血清白蛋白之间的作用力类型, 同时采用同步荧光技术考察了巴洛沙星对 BSA 构象的影响。

主题词 荧光猝灭; 牛血清白蛋白; 巴洛沙星

中图分类号: O644.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2006)08-1494-05

引言

巴洛沙星(balofloxacin, BLFX)是第三代喹诺酮类抗菌素, 由于在巴洛沙星母核的7位具有3-甲基氨基哌啶环(结构式见图1), 不仅扩大了抗菌谱、增强了抗菌活性、尤其对革兰氏阳性菌包括 MRSA、肺炎链球菌及肺炎支原体包括耐红霉素的菌株、沙眼衣原体及 *L. interrogans* 等均有较强活性, 而且降低了对动物细胞增殖的抑制活性; 巴洛沙星的另一个值得注意的特点是由于在8位引入甲氧基, 因此可避免或减少光过敏性和光毒性。

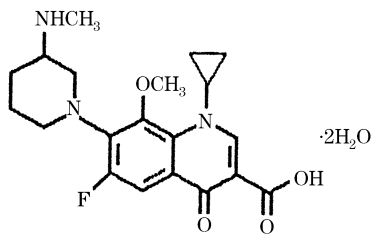


Fig. 1 Structure of balofloxacin

白蛋白是主要的血清蛋白, 可与许多内源及外源性化合物结合, 有关蛋白质的结构和功能研究, 是目前生命科学、化学和医学界共同关注和感兴趣的课题^[1, 2]。本实验用荧光法研究了巴洛沙星与血清白蛋白之间的结合反应, 计算了其结合常数, 根据能量转移机制计算了巴洛沙星与 BSA 结合时的距离, 并计算了巴洛沙星与 BSA 之间的作用力类型, 采用同步荧光技术考察了巴洛沙星对 BSA 构象的影响。对于

巴洛沙星的药物作用机理提供了可资参考的实验数据与理论根据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

RF-5301 型荧光光度计(日本岛津公司), UV2100 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司), TB-85 型恒温仪(日本), pH-25 型酸度计(上海雷磁仪器厂)。

巴洛沙星贮备液浓度为 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 使用前用二次水稀释到刻度; 牛血清白蛋白(BSA, 南京瑞创生物技术有限公司)贮备液于 4°C 冰箱中保存; pH 分别为 7.4, 8.4 的 Tris-HCl 缓冲液(Tris 由南京瑞创生物技术有限公司提供), pH 5.0 的磷酸盐缓冲液, 实验所用溶液均以 0.9% 的 NaCl 水溶液配制, 以维持生理条件下的离子强度, 所用试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

在 10 mL 容量瓶中依次加入 5.0 mL 缓冲液和 1.0 mL $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA 溶液及不同量的 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的巴洛沙星溶液, 最后都用 0.9% 的 NaCl 水溶液稀释至刻度。将各 pH 下的溶液配制三组分别置于 16, 25 和 37°C 恒温水浴中恒温 4 h 作为待测溶液; 固定激发波长 280 nm, 所用发射与激发狭缝宽度均为 3 nm, 室温下扫描 300~500 nm 的发射光谱, 记录 343 nm 处的荧光强度, 并测定与蛋白质等摩尔数的巴洛沙星溶液的紫外吸收光谱。

BSA 与药物的同步荧光光谱测定条件也同 BSA 与药物溶液的荧光光谱, 固定荧光发射与激发的波长差分别为 $\Delta\lambda =$

收稿日期: 2004-11-08, 修订日期: 2005-03-06

基金项目: 国家自然科学基金(20375046)资助项目

作者简介: 严拯宇, 女, 1955 年生, 中国药科大学分析化学教研室教授

60 nm 和 $\Delta\lambda=15$ nm 时进行同步荧光光谱扫描室温下的同步荧光光谱。

2 结果与讨论

2.1 猝灭类型的确定

2.1.1 巴洛沙星对 BSA 的荧光光谱的影响

蛋白质中色氨酸、酪氨酸的存在,使其具有内源荧光。固定 BSA 的量,在其中加入巴洛沙星溶液。随着巴洛沙星浓度的增加,BSA 的内源荧光强度有规律地降低,但发射峰位及峰形不变。说明巴洛沙星对 BSA 的荧光有猝灭作用。按试

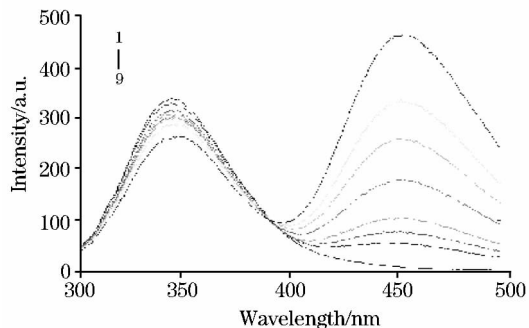


Fig. 2 The effect of BLFX on fluorescence spectra of BSA $c_{\text{BSA}} : 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4, $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$; $c_{\text{BLFX}} : 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, form 1 to 9: 0, 0.5, 0.7, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0

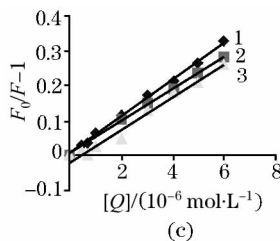
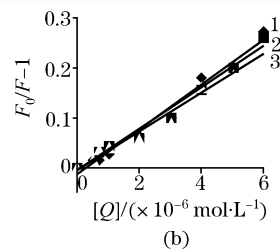
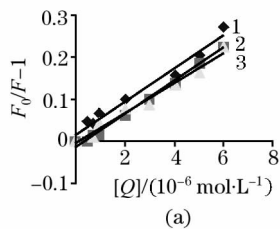


Fig. 3 Stern-Volmer plot of BLFX vs BSA at different pH (a) pH 5.0; (b) pH 8.4; (c) pH 7.4
1: 16 °C; 2: 25 °C; 3: 37 °C

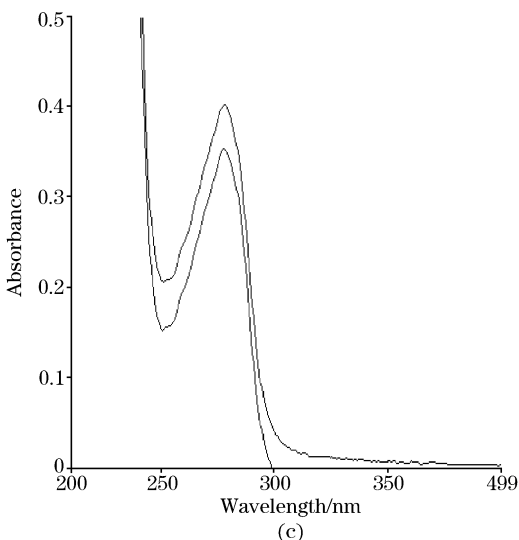
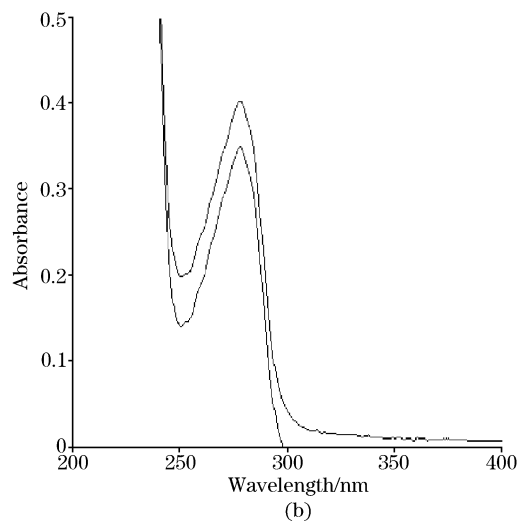
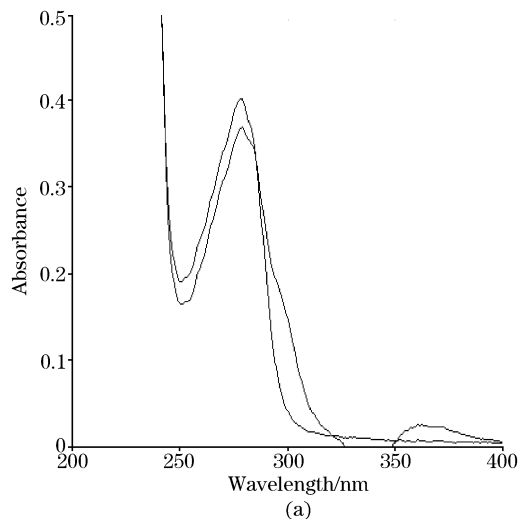


Fig. 4 The UV absorption spectra between BSA and differential spectrum of BLFX and BSA (molar ratio 1 : 1) with BLFX

a: pH 5.0; b: pH 7.4; c: 8.4

验方法得到 BSA 的荧光猝灭光谱见图 2。图 2 为 16 °C, pH 7.4 的荧光猝灭图。

2.1.2 温度的影响

一般情况下, 荧光猝灭作用的机制主要有动态猝灭、静态猝灭和发生非辐射能量转移等。是动态猝灭还是静态猝灭作用, 可根据结合常数 K_{sv} 随温度的变化关系加以判断。对于动态猝灭作用, 温度升高将有利于荧光体和荧光猝灭剂分子之间的有效碰撞, 并可以促进电子的转移过程, K_{sv} 随温度的升高而增大; 若是静态猝灭, 温度升高, 产物的稳定性降低, 静态猝灭常数 K_s 减小^[3]。我们分别测定了弱酸性、中性及弱碱性条件下在 16, 25 和 37 °C 时巴洛沙星对 BSA 的荧光猝灭情况。根据 Stern-Volmer 方程, 从各种条件下的 $(F_0/F - 1) \sim [Q]$ 图(见图 3(a), (b), (c)), $[Q]$ 为猝灭剂的浓度。可以看出: 在弱酸性, 中性及弱碱性条件下, 随温度升高直线斜率减小, 表明猝灭为静态机理。其中 K_{sv} 为动态猝灭常数, K_s 为静态猝灭常数(可参考文献[4]), 而图 3 中直线的斜率为 K_{sv} , 用以判段猝灭的性质。

2.1.3 吸收光谱的变化

由于静态猝灭, 形成了基态复合物, 一般应引起紫外吸收光谱的改变^[3]。分别测定了弱酸性、中性及弱碱性条件下, $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BSA 的紫外吸收曲线及巴洛沙星与 BSA 等摩尔混合物与巴洛沙星的差谱。发现在各种条件下, 两图谱均没有重合, 表明药物的加入使 BSA 的紫外吸收发生变化, 故猝灭机理为静态猝灭。紫外吸收的差谱图见图 4(a), (b), (c)。

2.2 结合常数的计算^[5]

马贵斌等^[6]推导出利用有机物分子对蛋白质荧光的静态

猝灭来求结合常数的方法, 指出 F_0 、猝灭剂浓度 $[Q]$ 、结合常数 K_D 之间的关系式

$$(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + K_D^{-1} F_0^{-1} [Q]^{-1} \quad (1)$$

由此方程以 $(F_0 - F)^{-1}$ 对 $[Q]^{-1}$ 作图, 由直线斜率求得不同温度下巴洛沙星与 BSA 的结合常数。表 1 为不同温度和 pH 条件下 BSA 和 BLFX 的结合常数 K_D 。

Table 1 The binding constant of BSA with BLFX at different temperature and pH

pH	T/°C	K_D	r
5.0	16	9.1867×10^4	0.9861
	25	6.3430×10^4	0.9920
	37	4.5564×10^4	0.9862
7.4	16	6.3541×10^4	0.9982
	25	5.7587×10^4	0.9979
	37	4.1228×10^4	0.9988
8.4	16	3.0635×10^4	0.9891
	25	2.9576×10^4	0.9973
	37	2.2395×10^4	0.9927

2.3 作用力类型的确定

一般地, 药物分子与生物大分子的相互作用力较为复杂, 包括疏水作用, 静电作用, 范德华力等。通过测定药物与蛋白质之间的作用力的焓变 ΔH 和熵变 ΔS , 可以判断二者作用时的作用力类型。根据文献[6, 7], 当温度变化不大时, 结合反应的焓变 ΔH 可看成常数。利用不同 pH 条件下键合常数与温度的关系求得 ΔH 均为负值, ΔS 均为正值(见表 2)。此时相互作用力为电荷作用力。

Table 2 Thermodynamic parameters and interaction force at different temperature and pH

pH	T/°C	$\Delta H/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta G/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S/(\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$	作用力类型
5.0	16	-24.749	-27.473	9.4207	电荷作用力
	25	-24.749	-27.410	8.9251	
	37	-24.749	-27.660	9.3864	
7.4	16	-15.688	-26.587	6.3556	电荷作用力
	25	-15.688	-27.170	8.1216	
	37	-15.688	-27.396	8.5347	
8.4	16	-11.391	-24.833	0.2905	电荷作用力
	25	-11.391	-25.519	2.5817	
	37	-11.391	-25.829	3.4811	

2.4 结合位置的计算

对于药物小分子与血清白蛋白结合形成络合物, 根据偶极-偶极非辐射能量转移理论即 Förster 理论^[1, 8], 可以求出结合位置与蛋白质分子中发荧光基团之间的距离, 距离越小, 药物分子越有利于被蛋白质存储与转运, 越能发挥其药理作用。

能量转移效率与给体-受体间的距离 r 的关系为

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) \quad (2)$$

R_0 是能量转移效率 E 为 50% 时的临界距离, R_0 为

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 \cdot n^{-4} \cdot \Phi \cdot J \quad (3)$$

式中 K 为偶极空间取向因子, n 为介质的折射指数, Φ 为给

体的光量子效率, J 为给体(蛋白)荧光发射光谱与受体(药物)吸收光谱间的光谱重叠部分

$$J = \sum(F(\lambda) \cdot \epsilon(\lambda) \cdot \lambda^4 \cdot \Delta\lambda) / \sum(F(\lambda) \cdot \Delta\lambda) \quad (4)$$

式中 $F(\lambda)$ 为荧光给体在波长 λ 处的荧光强度, $\epsilon(\lambda)$ 则为受体在波长 λ 处的摩尔吸收系数, 能量转移效率 E 可由下式求出

$$E = 1 - F/F_0 \quad (5)$$

只要得到 E , K^2 和 n 并通过测定光谱求出积分 J , 就可以计算得到 R_0 与 r 。

分别将一定浓度 BSA 的荧光光谱数据和与 BSA 等质量的巴洛沙星的紫外吸收光谱数据输入 Matlab 5.3 软件得图 5。图 5 为生理条件(pH 7.4, 37 °C)下, BSA 与巴洛沙星

物质的量为 1 : 1 时 BSA 的荧光光谱和巴洛沙星吸收光谱的重叠图。在此软件中进行处理而求得图中光谱重叠部分的面积, 即积分面积 $J = 5.211 \times 10^{-14} \text{ cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

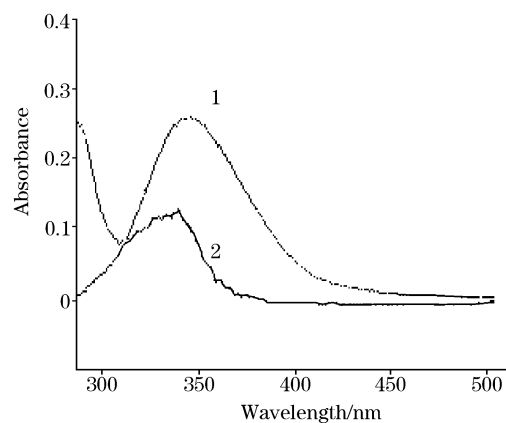


Fig. 5 BSA's fluorescence spectrum and BLFX's absorption spectrum

1: BSA's fluorescence spectrum, $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$;
2: BLFX's absorption spectrum

在上述实验条件下, 取向因子取两结合物各项随机分布的平均值 $K^2 = 2/3$ ^[9], BSA 中色氨酸残基量子效率 $\phi = 0.118$ ^[10] (BSA 的内源荧光主要有色氨酸残基所产生^[11]), 折射指数取水和有机物的平均值 $n = 1.336$ ^[10], 将以上各量带入(3)式, 求得临界距离 $R_0 = 3.23 \text{ nm}$, 根据式(10)求得能量转移效率 $E = 0.06133$, 进而由 R_0 和 E 按式(7)求出 BSA 中色氨酸残基与巴洛沙星分子间的距离 $r = 5.09 \text{ nm}$ 。

2.5 巴洛沙星对牛血清白蛋白构象的影响

对于蛋白质的同步荧光光谱, $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 只显示酪氨酸的光谱特性, $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 仅表现出色氨酸残基的荧光。蛋白质中氨基酸残基的最大荧光发射波长 λ_{max} 与其所处环境的极性有关, 故由 λ_{max} 的变化可判断蛋白质构象变化^[11]。

固定蛋白质浓度, 逐渐增加巴洛沙星的浓度, 测量 BSA 的同步荧光光谱。图 6(a)和图 6(b)分别为 BSA 中色氨酸和酪氨酸残基的荧光光谱图。可以看出 BSA 的荧光主要由色氨酸残基所贡献。且随巴洛沙星浓度的增大, 酪氨酸残基的最大发射波长不变, 而色氨酸残基所处环境的疏水性改变,

BSA 的构象发生了变化。

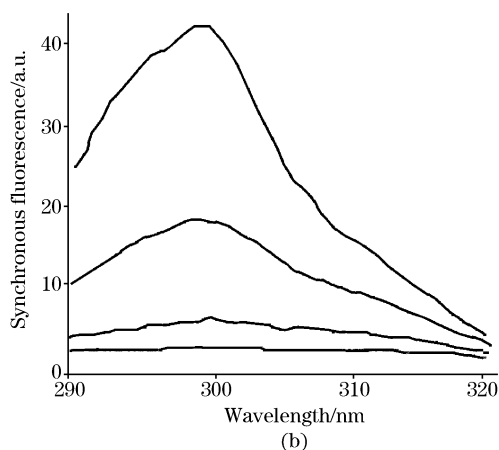
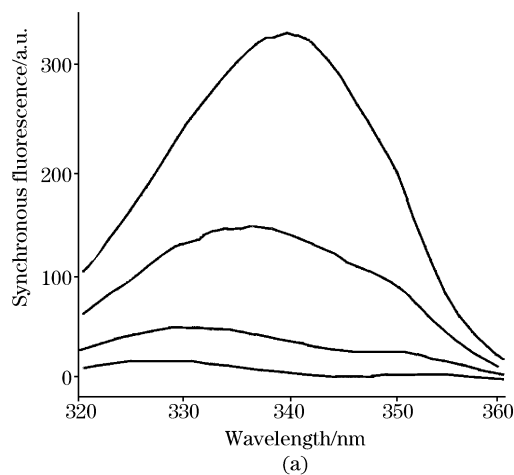


Fig. 6 Synchronous fluorescence spectral of bovine serum albumin (a) $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ (b) $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$

$c_{\text{BSA}}: 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{BLFX}}: 1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, from top to bottom: 0, 2.0, 5.0, 8.0

2.6 讨论

实验发现巴洛沙星对牛血清白蛋白的荧光有猝灭作用, 在弱酸性、中性及弱碱性条件下均表现为静态猝灭。在生理条件下巴洛沙星与牛血清白蛋白之间可通过电荷作用形成亲和力较强的复合物, 因此可以被白蛋白所贮存、运载, 通过血液循环达到作用部位。

参 考 文 献

- [1] FENG Xi-zeng, JIN Rui-xiang, QU Yun, et al(冯喜增, 金瑞祥, 曲 芸, 等). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报), 1996, 17(6): 866.
- [2] TANG Bo, HE Xi-wen, SHEN Han-xi(唐 波, 何锡文, 沈含熙). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 1998, 18(1): 21.
- [3] CHEN Guo-zhen, HUANG Xian-zhi, ZHENG Zhu-zi, et al(陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 等). Fluorescence Analytical Method(荧光分析方法). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1990. 122.
- [4] WANG Jian-lin, FU Lian-chun, ZHOU Shi-wu, et al(王建林, 付连春, 周实武, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(6): 912.
- [5] Mauricio S B, Guilherme L I. J. Phys. Chem., 1998, 102(23): 4678.
- [6] MA Gui-bin, YANG Pin(马贵斌, 杨 频). Chinese Biochemical Journal(生物化学杂志), 1992, 8(5): 624.
- [7] ZHU Keng, TONG Shen-yang(朱 铿, 童沈阳). Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报), 1996, 17(4): 539.
- [8] YAN Cheng-nong, SHANGGUAN Yun-feng, TONG Jin-qiang, et al(颜承农, 上官云凤, 童金强, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2003, 23(3): 543.
- [9] GUO Can-cheng, LI He-ping, ZHANG Xiao-bing, et al(郭灿城, 李和平, 张晓兵, 等). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报), 2003, 24(2): 282.
- [10] YANG Man-man, YANG Pin, ZHANG Li-wei(杨曼曼, 杨 频, 张立伟). Chinese Science Bulletin(科学通报), 1994, 39(1): 31.
- [11] MA Chun-qi, LI Ke-an, ZHAO Feng-lin, et al(马春琪, 李克安, 张凤林, 等). Acta Chim. Sin. (化学学报), 1999, 57(4): 389.

Studies on the Reaction of Balofloxacin with Bovine Serum Albumin

YAN Zheng-yu, SHAO Xiu-fen, JIANG Xin-min, HU Yu-zhu
China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract In the present paper, a fluorescence method was used to study at different pH the fluorescence quenching of bovine serum albumin (BSA) by its interaction with balofloxacin (BLFX). The interaction association constants of BSA and BLFX were determined from a double reciprocal line Weaver-Burk plot. According to the Förster dipole-dipole energy transfer, the distance to be measured between the BLFX and tryptophane is 5.09 nm. From thermodynamical coordination it can be judged that the binding power between BLFX and BSA is electrostatic effect. The effect of BLFX on the conformation of BSA was also analyzed by using synchronous fluorescence spectroscopy.

Keywords Fluorescence quenching; Bovine serum albumin; Balofloxacin

(Received Nov. 8, 2004; accepted Mar. 6, 2005)