

[Note]

www.whxb.pku.edu.cn

## 5-氟尿嘧啶与牛血清白蛋白的相互作用

王冬冬 孙德志 李林尉\* 魏新庭 张爱梅

(聊城大学化学化工学院, 山东 聊城 252059)

**摘要:** 根据合理的假设和 Langmuir 结合理论, 在 298.15 K 下, 以等温滴定微量热(ITC)实验数据为依据, 应用非线性最小方差拟合方法确定了抗肿瘤药物 5-氟尿嘧啶(5-FU)与牛血清白蛋白(BSA)相互作用的热力学性质的改变. 研究表明, 牛血清白蛋白(BSA)与 5-氟尿嘧啶相互作用存在两类结合位点. 第一类结合,  $N=(54.0\pm 0.3)$ ,  $\Delta H^0=(30.0\pm 0.4)$  kJ·mol<sup>-1</sup> (吸热),  $\Delta S^0=(196.0\pm 2.6)$  J·mol<sup>-1</sup>·K<sup>-1</sup> (熵增),  $\Delta G^0=(-28.4\pm 0.3)$  kJ·mol<sup>-1</sup>; 第二类结合,  $N=(77.0\pm 0.4)$ ,  $\Delta H^0=(-20.0\pm 0.4)$  kJ·mol<sup>-1</sup> (放热),  $\Delta S^0=(28.6\pm 0.3)$  J·mol<sup>-1</sup>·K<sup>-1</sup> (熵增),  $\Delta G^0=(-28.5\pm 0.2)$  kJ·mol<sup>-1</sup>. 结合体系的圆二色谱(CD)分析结果说明, 抗肿瘤药物 5-氟尿嘧啶与 BSA 的相互作用诱导蛋白质(BSA)二级结构单元的相对含量发生了一定程度的变化.

**关键词:** 5-氟尿嘧啶; 牛血清白蛋白; 等温滴定微量热法; 圆二色谱

**中图分类号:** O642

## Interactions between 5-fluorouracil and Bovine Serum Albumin

WANG Dong-Dong SUN De-Zhi LI Lin-Wei\* WEI Xin-Ting ZHANG Ai-Mei

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Liaocheng University, Liaocheng 252059, Shandong Province, P. R. China)

**Abstract:** From reasonable suppositions on binding process and Langmuir's binding theory, the interactions between 5-fluorouracil (5-FU) and bovine serum albumin (BSA) were investigated by the isothermal titration calorimetry (ITC) and the circular dichroism (CD) spectrometry at 298.15 K. The results showed that there were two classes of binding sites on a protein (BSA) molecule for the 5-fluorouracil. For the first class of binding,  $N=(54.0\pm 0.3)$ ,  $\Delta H^0=(30.0\pm 0.4)$  kJ·mol<sup>-1</sup> (endothermal),  $\Delta S^0=(196.0\pm 2.6)$  J·mol<sup>-1</sup>·K<sup>-1</sup> (entropy increasing),  $\Delta G^0=(-28.4\pm 0.3)$  kJ·mol<sup>-1</sup>; for the second class of binding,  $N=(77.0\pm 0.4)$ ,  $\Delta H^0=(-20.0\pm 0.4)$  kJ·mol<sup>-1</sup> (exothermal),  $\Delta S^0=(28.6\pm 0.3)$  J·mol<sup>-1</sup>·K<sup>-1</sup> (entropy increasing),  $\Delta G^0=(-28.5\pm 0.2)$  kJ·mol<sup>-1</sup>. The interactions between 5-fluorouracil and BSA induced the relative contents of secondary structure units of protein (BSA) to change in two classes of binding processes.

**Key Words:** 5-fluorouracil; Bovine serum albumin; Isothermal titration calorimetry; Circular dichroism spectra

细胞凋亡(apoptosis)是生命科学研究的重要综合课题<sup>[1,2]</sup>. 肿瘤细胞增殖与凋亡的非平衡匹配及其恶性转移和扩散的调控是发展中的疾病治疗手段—细胞凋亡干预研究的重要内容<sup>[3-5]</sup>. 抗肿瘤药物与细胞化学物质组成蛋白质分子之间相互作用的热力学效应及其微观作用模式的研究是其诱导肿瘤细胞凋亡作用机制研究的重要途径.

5-氟尿嘧啶(5-FU)在水环境中具有抗肿瘤活性的双酮式结构和易引起基因突变的烯醇式结构<sup>[6]</sup>, 在体内能干扰、阻断 DNA、RNA 和蛋白质合成而发挥抗肿瘤作用, 是目前临床广泛使用并对多种肿瘤具有较好疗效的抗肿瘤药物<sup>[7]</sup>. 作为哺乳动物血浆中含量最丰富的蛋白质, 血清白蛋白能够储存和转运许多内源性和外源性物质, 对于体内药物分子的储

Received: April 25, 2007; Revised: June 25, 2007; Published on Web: August 6, 2007.

\*Corresponding author. Email: lcdxlkxb@163.com; Tel: +86635-8238337.

国家自然科学基金(20543004, 20773059)、山东省自然科学基金(2004ZX15)及聊城大学科学基金(31801)资助项目

存、运输、受体部位药理作用的发挥等具有多方面的功能作用<sup>[8,9]</sup>. 由于血清白蛋白重要的生理功能和易于分离、提纯的特性, 因而常被用来作为模型物质来研究生物大分子与药物小分子之间的相互作用<sup>[10]</sup>.

药物与血清白蛋白的结合很大程度上影响到药物在动物体内的吸收和代谢, 因而对药物与BSA结合模式的研究, 能够获取许多生命体系演变过程中的结构和能量的转化信息, 在药物代谢动力学和药物有效治疗浓度的确定等方面亦具有一定的理论和应用价值<sup>[11,12]</sup>.

微量热法的非特异性有助于药物与生物大分子特异性相互作用的研究. 圆二色谱分析法对溶液中蛋白质构象变化的研究方便、有效、较为准确. 本文根据合理的假设和Langmuir结合理论, 通过等温滴定微量热和圆二色谱实验数据的测定, 运用非线性最小方差拟合方法和杨氏方法, 确定了药物配体(5-FU)与蛋白质(BSA)的结合类型、结合位点数、结合常数、结合体系的焓变、熵变和吉布斯自由能变以及药物5-FU诱导蛋白质BSA二级结构单元相对含量的改变, 并根据热力学原理对5-FU与蛋白质(BSA)的相互作用进行了初步的讨论.

## 1 实验

### 1.1 仪器与试剂

滴定式微量热计(TAM 2277, 瑞典Thermometric AB公司, 热功率测定灵敏度为 $\pm 10$  nW), 用随机所带Digitam 4.1软件控制实验过程并进行数据采集和处理. 通过测定蔗糖稀释焓验证<sup>[13]</sup>, 该量热计的电标定精密度高于 $\pm 1\%$ . Jasco J-810圆二色谱仪(Japan).

牛血清白蛋白(BSA), (数均)摩尔质量为 $66.0 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ <sup>[14]</sup>, 购自Sigma公司, 其溶液浓度用称重法配制. 5-氟尿嘧啶(结构见图1)购自北京百灵威化学技术有限公司. 三(羟甲基)胺基甲烷(Tris)、盐酸、氯化钠等均为分析纯试剂. 实验用水是碱性高锰酸钾存在下制备的二次蒸馏水. 5-氟尿嘧啶和BSA的溶液均以浓度为 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH=7.4的Tris-HCl缓冲液为溶剂配制而成.

### 1.2 药物与BSA作用的等温滴定热实验

量热数据测定方法同文献[15]: 将5-氟尿嘧啶溶液( $1.43\times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )装入500  $\mu\text{L}$  Hamilton注射器, 用612 Lund Syringe Pump注射泵, 每次滴12.00  $\mu\text{L}$ 于0.50 mL BSA溶液( $4.02\times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )中. 滴定时间间隔足够长(40 min), 以使信号返回基线. 安

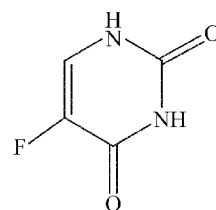


图1 5-氟尿嘧啶(5-FU)的结构式

Fig.1 Molecular structure of 5-fluorouracil (5-FU)

甬中搅拌机转速固定在 $30 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 待搅拌下基线稳定后启动实验, 以使搅拌产生的热量被自动扣除. 实验温度为 $(298.15\pm 0.01) \text{ K}$ . 为扣除药物和BSA的稀释热, 分别进行药物溶液向缓冲溶液中滴定和缓冲溶液向BSA溶液中滴定的实验.

### 1.3 药物与BSA作用的圆二色谱实验

圆二色谱(CD)用日本产Jasco J-810型圆二色谱仪测定. 实验时光源系统用氮气保护(流量为 $5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ), 样品池的光径为0.1 cm. 测量参数, 扫描速率为 $100 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$ , 分辨率为0.1 nm, 响应时间1 s, 累积次数3次, 扫描波段为200–250 nm. 固定BSA原始浓度为 $2.0\times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 控制5-氟尿嘧啶与BSA的物质的量之比分别为0、54和77, 得到CD谱, 并用该仪器附带的杨氏法软件<sup>[16]</sup>计算出对应BSA二级结构单元的相对含量.

## 2 结果与讨论

### 2.1 药物配体与蛋白质结合的滴定量热数据处理

对于药物配体(5-氟尿嘧啶)与蛋白质(BSA)的结合过程, 其基本假设为<sup>[17]</sup>, (1) 一个蛋白质分子可有*i*类结合位点, 它们可结合相同的配体, 同类中的所有位点在热力学意义上是相同的; (2) *i*类结合位点相互独立, 即蛋白质分子的每一类受体位点与药物配体的结合率彼此互不依赖. 基于上述假设和Langmuir结合理论<sup>[18,19]</sup>有:

$$\theta_i = K_i^0 c_L / (1 + K_i^0 c_L) \quad (1)$$

$$c_{L,0} = c_L + c_{P,0} \sum_{i=1}^m N_i \theta_i \quad (2)$$

式中 $\theta_i$ 、 $K_i^0$ 和 $N_i$ 分别是第*i*类结合位点的结合率、结合常数和结合位点数(*i*类结合位点一个蛋白质分子可能结合的药物小分子数,  $N_i = n_{5\text{-FU}}/n_{\text{BSA}}$ ),  $c_{L,0}$ 和 $c_{P,0}$ 分别为配体和蛋白质的初始浓度,  $c_L$ 是游离配体的浓度. 将(1)式代入(2)式有

$$c_{L,0} = c_L + c_{P,0} \sum_{i=1}^m \frac{N_i K_i^0 c_L}{1 + K_i^0 c_L} \quad (3)$$

ITC实验中第*j*次注射所得到的热量( $Q_j$ )可表示为

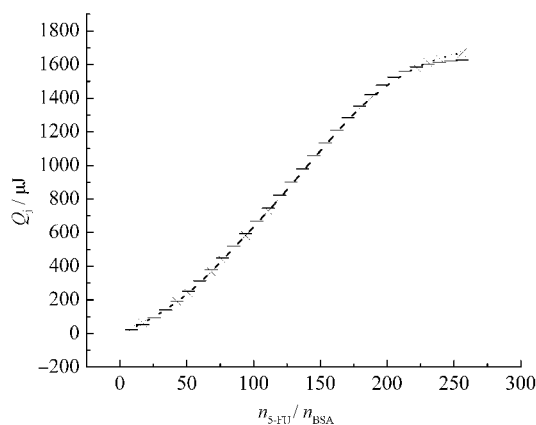


图2 结合反应热( $\times$ )对5-氟尿嘧啶与牛血清白蛋白(BSA)摩尔比的非线性拟合曲线

Fig.2 Plot of the binding heat ( $\times$ ) versus the molar ratio of 5-FU to bovine serum albumin (BSA)

$$Q_j = c_{P,0} V_{\text{cell}} \sum_{i=1}^m N_i \Delta\theta_i \Delta H_i^0 \quad (4)$$

式中  $V_{\text{cell}}$  是微量热计中安瓿(反应器)中被滴定剂的体积,  $\Delta\theta_i$  是从第( $j-1$ )次注射到第  $j$  次注射第  $i$  类结合位点结合率的增量,  $\Delta H_i^0$  是第  $i$  类位点的结合焓, 由(3)式可知, 在  $c_{L,0}$  和  $c_{P,0}$  已知的情况下,  $c_L$  是关于  $N_i$  和  $K_i^0$  的函数. 所以(4)式含有  $K_i^0$ 、 $\Delta H_i^0$ 、 $N_i$  共  $3m$  个未知量, 根据等温滴定量热数据( $Q_j$ ), 利用MATLAB 7.01 软件以  $Q_j$  对  $c_{L,0}$  进行非线性最小方差拟合, 可得到  $3m$  个热力学参数. 通过拟合曲线与实验点的拟合度的回归分析, 当药物配体与 BSA 结合时, 蛋白质 BSA 分子有两类结合位点( $m=2$ , 方差最小, 见图 2). 由此, 可以确定本结合体系两类结合的  $K_1^0$ 、 $K_2^0$ 、 $\Delta H_1^0$ 、 $\Delta H_2^0$ 、 $N_1$  和  $N_2$  六个热力学参数值. 根据热力学关系式,

$$\Delta G^0 = -RT \ln K^0, \Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (5)$$

又可求出该结合过程体系的吉布斯自由能变和熵变(上述数据处理结果见表 1).

## 2.2 结合过程及结合体系的热力学性质的改变

本结合体系中药物与蛋白质的结合可设想涉及以下过程: (1)药物和蛋白质的溶解稀释; (2)蛋白质与单个药物分子的作用; (3)蛋白质在两类作用位点与药物配体的稳定结合作用; (4)药物诱导蛋白质发生的构象变化. 在 ITC 实验中我们已经设法扣除了药物与蛋白质的溶解稀释热效应. 又因为形成稳定两类作用位点时自由药物分子的浓度远低于量热滴定实验过程中样品池内药物分子的浓度, 所以(1)、(2)过程的热效应可忽略不计. 因此可以认为微量热法测定的本结合体系的热效应主要是

表 1 298.15 K 5-氟尿嘧啶与 BSA 相互作用的热力学参数  
Table 1 Thermodynamic parameters for the binding of 5-FU to BSA at 298.15 K

Site	N	$10^{-4}K^0$	$\Delta H^0$	$\Delta G^0$	$\Delta S^0$
		(L·mol <sup>-1</sup> )	(kJ·mol <sup>-1</sup> )	(kJ·mol <sup>-1</sup> )	(J·mol <sup>-1</sup> ·K <sup>-1</sup> )
first binding	54.0±0.3	9.51±0.02	30.0±0.4	-28.4±0.3	196.0±2.6
second binding	77.0±0.4	9.94±0.03	-20.0±0.4	-28.5±0.2	28.6±0.3

Data are expressed as (mean±S.D.)

(3)、(4)过程, 即药物配体与蛋白质分子的稳定结合及其诱导产生的蛋白质分子的构象变化而产生的.

结合体系的焓、熵改变特征是分析结合过程特征和作用力类型的热力学依据. 根据 Ross 和 Subramanian 的观点<sup>[20]</sup>和本体系热力学性质的改变特征(见表 1), 可认为, 第一类结合,  $\Delta H^0 > 0$ (吸热),  $\Delta S^0 > 0$ (熵增),  $T\Delta S^0 > \Delta H^0$  熵增效应较大并决定该过程的  $\Delta G^0 < 0$ , 故表现为熵驱动过程, 疏水相互作用是熵驱动的主要推动力; 第二类结合,  $\Delta H^0 < 0$ (放热),  $\Delta S^0 > 0$ (熵增),  $|\Delta H^0| > |T\Delta S^0|$ , 放热和熵增效应均导致该过程的  $\Delta G^0 < 0$ , 故表现为以焓驱动为主的焓-熵协同驱动过程, 氢键、静电相互作用是焓-熵协同驱动的主要推动力. 两类结合位点的结合常数( $K^0$  值) 相对较大, 说明 5-氟尿嘧啶与 BSA 发生了较为稳定的结合. 两类结合位点的  $\Delta G^0$  值均为绝对值较大的负值, 说明两类结合过程在本实验条件下可能且平稳发生, 形成了较为稳定的“小分子-大分子”结合体.

众所周知, 广泛存在于蛋白质多肽链各基团之间的氢键相互作用是稳定蛋白质二级结构的主要作用力, 疏水核心几乎全部是由  $\alpha$  螺旋和  $\beta$  折叠片构成, 疏水作用在稳定蛋白质的结构方面具有突出的地位和作用<sup>[21]</sup>. 本结合体系热力学性质的改变是结合过程中体系作用物质诸种相互作用效应竞争综合平衡的结果. 蛋白质分子构象是其生物功能的基础, 药物分子可通过调节蛋白质的构象变化发挥其药理药效作用<sup>[22]</sup>. 根据圆二色谱分析和等温滴定量热的研究结果(见图 3、表 2 和表 1)可以看出, (1)在两类结合位点不同结合浓度的药物诱导蛋白质(BSA)各二级结构单元的相对含量均发生了一定程度的变化. (2)与无药物作用下相比, 低结合浓度( $n_{5-FU}/n_{BSA}=54$ )药物对于  $\alpha$  螺旋和  $\beta$  折叠片结构单元含量的变化的影响较大, 由此可认为在第一类结合位点疏水相互作用较大; 高结合浓度( $n_{5-FU}/n_{BSA}=77$ )药物对  $\alpha$  螺旋和  $\beta$  折叠片结构单元含量的变化影响较

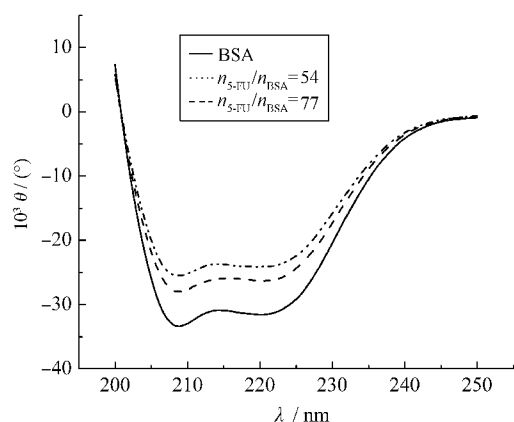


图3 不同浓度的5-氟尿嘧啶对BSA圆二色谱的影响  
Fig.3 CD spectra of BSA in the presence of 5-FU

表2 结合过程中BSA二级结构的变化

Table 2 Conformational changes of BSA in the binding system at 298.15 K

$n_{5-FU}/n_{BSA}$	$\alpha$ -helix(%)	$\beta$ -sheet(%)	$\beta$ -turn(%)	Random coil(%)
0	33.8 $\pm$ 0.4	32.0 $\pm$ 0.2	6.3 $\pm$ 0.1	27.9 $\pm$ 0.3
first	54	32.5 $\pm$ 0.4	7.3 $\pm$ 0.2	27.6 $\pm$ 0.3
second	77	32.8 $\pm$ 0.3	31.9 $\pm$ 0.3	27.4 $\pm$ 0.4

Data are expressed as (mean $\pm$ S.D).

小,但对以氢键结合而成、大多处于分子表面的 $\beta$ -turn的含量增加影响较大,由此可认为第二类结合位点疏水相互作用效应可能已打折扣,氢键和静电相互作用(或称盐键)相对较强.药物诱导BSA构象变化形成稳定空间结构所产生的构象热力学效应变化与对应结合体系的热力学效应是相关的,并归属于本结合体系的热力学性质的改变之中.

### 3 结论

298.15 K下,药物配体5-氟尿嘧啶与牛血清白蛋白相互作用存在两类结合位点.第一类结合,表现为熵驱动过程,疏水相互作用为熵驱动的主要推动力;第二类结合,表现为焓-熵协同驱动过程,氢键、静电相互作用为焓-熵协同驱动的主要推动力.BSA与5-FU可形成较为稳定的“小分子-大分子”结合体.在本结合体系的溶液环境中5-FU诱导BSA分子构象发生了一定程度的变化.

### References

- Golstein, P. *Science*, **1998**, **281**: 1283
- Peter, M. E.; Heuffelder, A. E.; Hengartner, M. O. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, **94**: 12736
- Thornberry, N. A.; Lazebnik, Y. *Science*, **1998**, **281**: 1312
- Kidd, V. J. *Annu. Rev. Physiol.*, **1998**, **60**: 533
- Rudin, C. M.; Thompson, C. B. *Annu. Rev. Med.*, **1997**, **48**: 267
- Hu, X. B.; Li, H. R.; Liang, W. C.; Han, S. J. *Acta Phys. -Chim. Sin.*, **2005**, **21**(9): 952 [胡兴邦, 李浩然, 梁婉春, 韩世钧. 物理化学学报, **2005**, **21**(9): 952]
- Olson, R. E.; Christ, D. D. *Ann. Rep. Med. Chem.*, **1996**, **31**: 327
- Wang, R. M.; Song, J. F.; He, Y. F.; Mao, J. J.; Li, Y. *Chin. Chem. Lett.*, **2006**, **17**(11): 1495
- Jiang, C. Q.; Gao, M. X.; Meng, X. Z. *Spectrochim. Acta A*, **2003**, **59**: 1605
- Wang, Y.; Li, L. X.; Zhao, D. B.; Zhang, W.; Liu, X. H. *Acta Chim. Sin.*, **2006**, **46**(13): 1361 [王勇, 李林玺, 赵东保, 张卫, 刘绣华. 化学学报, **2006**, **64**(13): 1361]
- Sulkowska, A.; Rownicka, J.; Bojko, B.; Sulkowski, W. *J. Mol. Struct.*, **2003**, **651**: 133
- Trynda-Lemiesz, L.; Karaczyn, A.; Keppler, B. K. *J. Inorg. Biochem.*, **2000**, **78**: 341
- Bai, G.; Wang, Y.; Yan, H. K. *J. Phys. Chem. B*, **2002**, **106**: 2153
- Moosavi-Movahedi, A. A.; Bordbar, A. K.; Taleshi, A. A.; Naderimanesh, H. M.; Ghadam, P. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **1996**, **28**: 991
- Qu, X. K.; Sun, D. Z.; Zheng, W. Q.; Liu, M.; Wei, X. L. *Acta Phys. -Chim. Sin.*, **2007**, **23**(1): 116 [曲秀葵, 孙德志, 郑文清, 刘敏, 魏西莲. 物理化学学报, **2007**, **23**(1): 116]
- Chen, Y. H.; Yang, J. T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1971**, **44**: 1285
- Nielsen, A. D.; Borch, K.; Westh, P. *Biochim. Biophys. Acta*, **2000**, **1479**: 321
- Lin, L. N.; Mason, A. B.; Woodworth, R. C.; Brandts, J. F. *Biochemistry*, **1991**, **30**: 11660
- Wiseman, T.; Wiliston, S.; Brandts, J. F.; Lin, L. N. *Anal. Biochem.*, **1989**, **179**: 131
- Ross, P. D.; Subramanian, S. *Biochemistry*, **1981**, **20**: 3096
- Wang, J. Y.; Zhu, S. G.; Xu, C. F. *Biochemistry*. Beijing: Higher Education Press, 2002: 202-237 [王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学. 北京: 高等教育出版社, 2002: 202-237]
- Su, Z.; Qin, C.; Xie, M. X.; Li, J. D.; Wang, Y. D. *Acta Chim. Sin.*, **2007**, **65**(4): 329 [苏忠, 秦川, 谢孟峡, 李建东, 王英典. 化学学报, **2007**, **65**(4): 329]