

荧光光谱法研究硅钨酸及硅钨钴杂多酸与牛血清白蛋白的相互作用

沈卫阳*, 钟绍鹏, 陈建秋

(中国药科大学分析化学教研室, 药物质量与安全预警教育部重点实验室, 南京 210009)

摘要 采用荧光光谱和紫外吸收光谱法研究了硅钨酸(SiW)及硅钨钴酸(SiWCo)与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用,发现SiW和SiWCo与BSA的荧光猝灭为静态猝灭;其结合常数 K_{LB} 分别为 4.94×10^4 、 6.06×10^4 (298 K)与 4.33×10^4 、 5.86×10^4 (310 K),结合位点数 n 均为1,它们与BSA相互作用方式为静电引力。采用同步荧光法考察了SiW和SiWCo对BSA构象的影响,发现SiW和SiWCo与BSA均发生了相互作用,但都没有改变BSA的构象,通过比较发现SiWCo与BSA作用活性比SiW强。

关键词 硅钨酸;硅钨钴酸;牛血清白蛋白;荧光光谱;紫外吸收光谱;同步荧光

中图分类号 0657.3 文献标识码 A 文章编号 1000-5048(2011)02-0131-05

Interaction between silicotungstic acid, silicon tungsten-cobalt heteropoly acid and bovine serum albumin by fluorescence spectrometry

SHEN Wei-yang*, ZHONG Shao-peng, CHEN Jian-qiu

Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance of Ministry of Education, Department of Analytical Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract The interactions of bovine serum albumin(BSA) with silicotungstic acid(SiW) and silicon tungsten-cobalt heteropoly acid (SiWCo) were studied by fluorescence and ultraviolet absorption spectroscopy. The fluorescence quenching of BSA with SiW and SiWCo was static quenching, and the binding constants at 298 K and 310 K were 4.94×10^4 , 6.06×10^4 (298 K), 4.33×10^4 , 5.86×10^4 (310 K), respectively. The number of binding site (n) was 1. The interaction of BSA with SiW and SiWCo was electrostatic force based on the thermodynamic parameters calculated at 298 K and 310 K. The conformation of BSA impacted by SiW and SiWCo was also discussed by synchronous fluorescence. The results showed that both SiW and SiWCo interacted with BSA, without changing its conformation, and the interaction between SiWCo and BSA was more active than that of SiW.

Key words silicotungstic acid; silicon-tungsten-cobalt heteropoly acid; bovine serum albumin; fluorescence spectra; UV absorption spectra; synchronous fluorescence

This study was supported by the Foundation for Basic Scientific Research of Postgraduates in China Pharmaceutical University (No. ZJ10118)

杂多酸化合物是由具有 d^0 、 d^1 构型的金属阳离子,以氧阴离子为桥,通过自由组装形成的一类低聚化合物^[1]。研究发现多酸作为药物在抗病毒、抗肿瘤、抗菌等方面具有一定的优势^[2-4],而血清蛋白是体内储运内源和外源性化合物的大分子,研究

它与药物小分子的结合是近年来较为活跃的研究领域^[5-6]。目前研究杂多酸与蛋白相互作用的较少,黄瑾等^[7]使用紫外、荧光光谱研究了磷钨酸与血清蛋白的结合平衡。胡艳军等^[8]探讨了稀土杂多酸盐($\text{EuHSiMo}_{10}\text{W}_2\text{O}_{40} \cdot 25\text{H}_2\text{O}$)与牛血清白蛋白(BSA)

* 收稿日期 2010-11-01 * 通讯作者 Tel:15251869798 E-mail:wyshe@hotmail.com

基金项目 中国药科大学研究生基本科研业务费专项资金资助项目(No. ZJ10118)

的相互作用。王彦卿等^[9]研究了硅钨杂多酸与 BSA 的相互作用。梁彦秋等^[10]考察了杂多酸盐 ($K_7[Pt_{12}W_{10}O_{40}] \cdot 6H_2O$) 与 BSA 在不同温度下的相互作用。本文研究硅钨酸及硅钨钴杂多酸与 BSA 相互作用, 比较不同温度下硅钨酸及硅钨钴酸与 BSA 的相互作用, 并讨论了其作用机制, 这为进一步研究多酸类药物的作用机制提供理论依据。

1 材料

1.1 试剂

牛血清白蛋白 (BSA, 相对分子质量 66.43 kD, 南京瑞创生物技术有限公司), 用三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 缓冲溶液 (0.1 mol/L, pH = 7.4, 内含 0.1 mol/L NaCl 维持离子强度) 配成 2.0×10^{-5} mol/L 储备液并于冰箱中 (温度低于 5 °C) 保存。

硅钨酸 $H_4[SiW_{12}O_{40}]$, 国药集团化学试剂有限公司配成 1.15×10^{-6} mol/L 储备液待用, 钴取代硅钨酸 (SiWCo) 为自行合成, 配成 1.2×10^{-6} mol/L 的溶液, 除 Tris 为生化试剂外, 其他试剂均为分析纯, 实验用水为二次重蒸水。

1.2 仪器

F-5301PC 型荧光分光光度计 (日本岛津公司); pH 计 (赛多利斯有限公司); 恒温水浴 (国华电器有限公司); UV-2100 紫外分光光度计 (日本岛津公司)。

2 方法

精密量取 2.0×10^{-5} mol/L BSA 3 mL 于一系列 5 mL 离心管中, 用注射器分别加入一定量的 1.2×10^{-6} mol/L SiWCo 溶液, 混匀, 静置 30 min, 分别测定其荧光光谱。固定激发波长 280 nm, 测定 300 ~ 500 nm 的发射光谱, 同时扫描同步荧光 (固定发射与激发的波长差分别为 $\Delta\lambda = 60$ nm 和 $\Delta\lambda = 15$ nm, 其他条件相同)。激发和发射狭缝均为 3 nm, 测定温度分别为 298 K 和 310 K。紫外光谱的测定温度为 298 K。SiW 对 BSA 的作用采用相同的方法测定。

3 结果和讨论

3.1 猝灭类型的确定

3.1.1 SiW、SiWCo 对 BSA 的荧光光谱的影响

BSA 中由于存在色氨酸、酪氨酸, 而使其具有内源

性荧光。在 BSA 溶液中分别加入不同量的 SiW 与 SiWCo 酸溶液。随着浓度的增加, BSA 的荧光强度有规律地降低, 结果见图 1。由此可知, SiW 和 SiWCo 对 BSA 均有荧光猝灭作用。

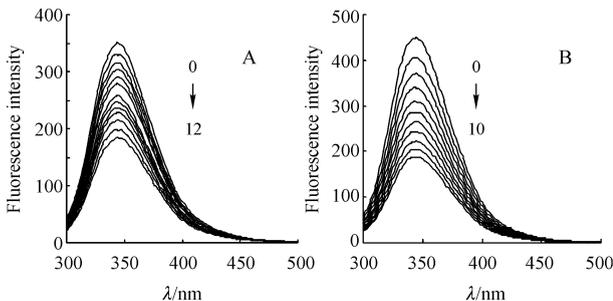


Figure 1 Fluorescence emission spectra of SiW (A) and SiWCo (B) interacted with bovine serum albumin (BSA)

A: 0→12 the volume of SiW; 0, 2.5, 5, 0, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5, 25, 27.5, 30 μL; B: 0→10 the volume of SiWCo; 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 μL

3.1.2 温度对猝灭的影响 假设 SiW 和 SiWCo 对 BSA 的猝灭过程是动态猝灭, 则作用过程应遵循 Stern-Volmer 方程:

$$F_0/F = 1 + K_A [Q] = 1 + K_q \tau_0 [Q] \quad (1)$$

式(1)中: F_0 和 F 分别表示不存在和存在猝灭剂时体系的荧光强度; $K_A = 1 + K_q \tau_0$, 是 Stern-Volmer 猝灭常数; K_q 为生物大分子的猝灭速率常数; τ_0 为不存在猝灭剂时荧光物质的平均寿命; τ_0 一般为 1×10^{-8} s; $[Q]$ 为猝灭剂的浓度。分别测定了 298 K 和 310 K 时, SiW 和 SiWCo 与 BSA 相互作用的荧光光谱, 将 $(F_0/F - 1)$ 对 $[Q]$ 作图, 结果见图 2。由图可知 SiW、SiWCo 分别在 310 K、298 K 与 BSA 相互作用的 $K_A = 7.20 \times 10^4$ 、 9.03×10^4 (310 K), $K_A = 8.03 \times 10^4$ 、 9.43×10^4 (298 K), 从而可以求得在 310 K、298 K 时 $K_q = 7.20 \times 10^{12}$ 、 9.03×10^{12} (310 K), $K_q = 8.03 \times 10^{12}$ 、 9.43×10^{12} (298 K)。随着温度的升高, BSA 的猝灭曲线斜率降低, 同时根据文献[11], 可以推断 SiW 和 SiWCo 对 BSA 的猝灭均为静态猝灭。

3.1.3 紫外吸收光谱的变化 在 pH 为 7.4 的条件下, 测定了 2.0×10^{-5} mol/L BSA 的紫外吸收曲线及 SiW、SiWCo 与 BSA 等摩尔混合物与 SiW、SiWCo 的差谱。由图 3 可知, 二者均未完全重合, 进一步证明了 SiW 和 SiWCo 对 BSA 的猝灭机制为静态猝灭。

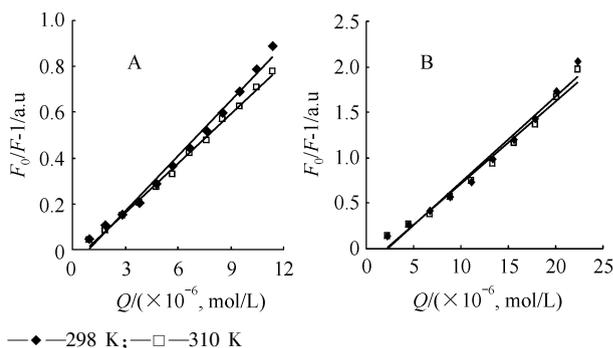


Figure 2 $(F_0/F-1)-[Q]$ curves of SiW (A) and SiWCo (B) interacted with BSA

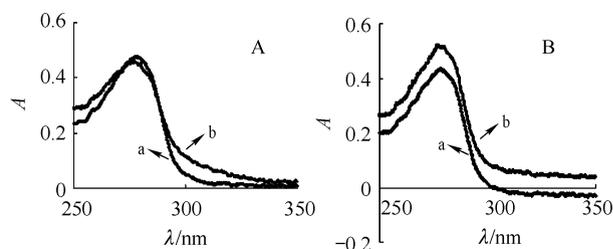


Figure 3 UV absorption spectra of BSA (a) and the differential spectra (b) SiW, SiWCo and BSA (molar ratio 1:1) with SiW (A) and SiWCo (B)

3.2 SiW 和 SiWCo 与 BSA 结合位点数的计算

假设一个 BSA 分子有 n 个相互独立的结合位点可与 SiW、SiWCo 结合, 则根据 $\lg K_A + n \lg [Q] = \lg (F_0/F-1)$, 其中 $\lg (F_0/F-1)$ 对 $\lg [Q]$ 如图 4 所示。分别求得 298 K 和 310 K 时 BSA 对 SiW 的结合位点数分别为 1.176 和 1.192, 对 SiWCo 的结合位点数分别为 1.172 和 1.171, 从而推测 SiW 和 SiWCo 与 BSA 均为 1:1 结合^[12]。

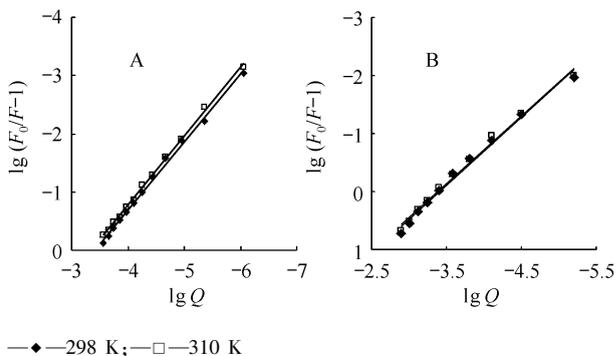


Figure 4 $\lg(F_0/F-1)-\lg[Q]$ curves of SiW (A) and SiWCo (B) interacted with BSA

3.3 与 BSA 结合常数的计算

对于物质的量 1:1 结合的静态猝灭, SiW 和 SiWCo 与 BSA 结合常数可由公式:

$$F_0/F = 1 + K_A [Q] \quad (2)$$

求得 Lineweaver-Burk 方程:

$$(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + (K_{LB} F_0)^{-1} [Q]^{-1} \quad (3)$$

式中, K_{LB} 为静态荧光猝灭结合常数, 用来描述静态猝灭过程中生物大分子与荧光剂的结合反应达到平衡时的量效关系, 根据式 (2), 以 $(F_0/F-1)$ 对 $[Q]$ 作图 (图 2), 可以求得不同温度下的 K_A , 而根据式 (3), 以 $(F_0 - F)^{-1}$ 对 $[Q]^{-1}$ 作图 (图 5) 可以求得不同温度下的 K_{LB} (表 1)。

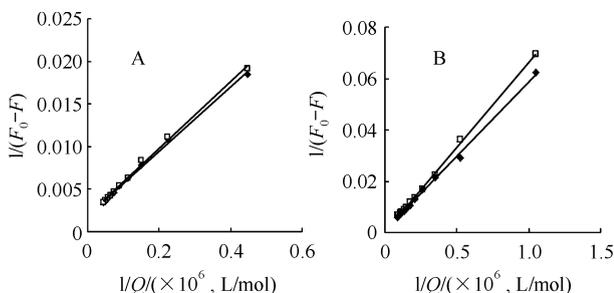


Figure 5 $(F_0 - F)^{-1}-[Q]^{-1}$ curves of SiW (A) and SiWCo (B) interacted with BSA

Table 1 Binding constants of SiW and SiWCo combined with BSA at different temperatures

	T/K	Formula(1)		Formula(3)	
		K_A	r	K_{LB}	r
SiW	298	8.03×10^4	0.991	4.94×10^4	0.998
	310	7.20×10^4	0.996	4.33×10^4	0.999
SiWCo	298	9.43×10^4	0.979	6.06×10^4	0.997
	310	9.03×10^4	0.983	5.86×10^4	0.996

从表 1 的数据可以认为温度对 SiW、SiWCo 与 BSA 的结合均有一定的影响, 结合常数均随温度的升高有降低的趋势, 进一步证明了 SiW、SiWCo 对 BSA 的猝灭为静态猝灭。

3.4 热力学参数的计算及作用类型的确定

根据反应前后的热力学参数焓变 ΔH 和熵变 ΔS 的相对大小, 可以用来确定 SiW、SiWCo 与 BSA 之间的相互作用类型: $\Delta H > 0, \Delta S > 0$ 为疏水作用力; $\Delta H < 0, \Delta S < 0$ 为氢键和范德华力; $\Delta H < 0, \Delta S > 0$ 为静电引力^[13]。

根据公式

$$\ln(K_2/K_1) = \Delta H/R(1/T_1 - 1/T_2) \quad (4)$$

$$\Delta G = -RT/\ln K \quad (5)$$

$$\Delta S = (\Delta H - \Delta G)/T \quad (6)$$

用表 1 中的 K_A 计算热力学焓变 ΔH 、熵变 ΔS 和自由能变 ΔG , 其结果见表 2。

Table 2 Thermodynamic parameters of SiW and SiWCo combined with BSA at different temperatures

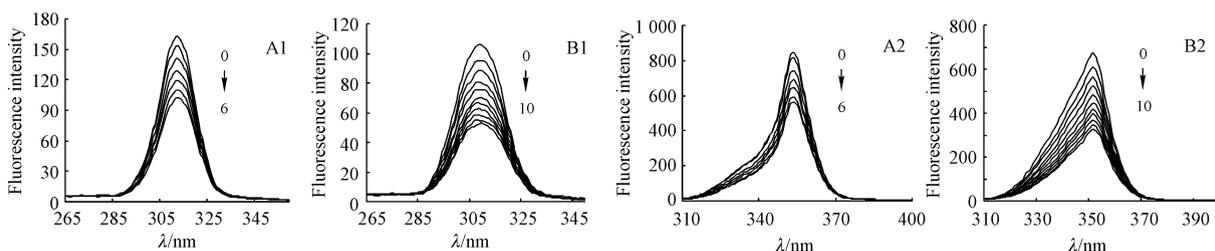
	<i>T</i> /K	ΔG /(kJ/mol)	ΔH /(kJ/mol)	ΔS /(J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)
SiW	298	-27.967	-6.980	70.426
	310	-28.812	-6.979	70.429
SiWCo	298	-28.365	-2.773	85.880
	310	-29.395	-2.773	85.878

从热力学角度来看, $\Delta G < 0$, 说明 SiW 和 SiWCo 与 BSA 的反应均可以自发进行, $\Delta H < 0$, $\Delta S > 0$ 表明两者与 BSA 的主要作用力为静电引力。

3.5 硅钨酸及硅钨钴酸对 BSA 构象的影响

在蛋白质的同步荧光光谱中, $\Delta\lambda = 15$ nm 只显示酪氨酸残基的光谱特性, 而 $\Delta\lambda = 60$ nm 仅表

现出色氨酸残基的光谱特性。由于蛋白质中芳香氨基酸残基的最大发射波长 λ_{\max} 与所处的环境极性有关, 若 λ_{\max} 发生变化, 则说明残基所处微环境发生变化, 由此可判断蛋白质的构象发生了变化。图 6 为 BSA 中酪氨酸和色氨酸的同步荧光光谱图。从图中可以看出随着 SiW 和 SiWCo 加入量的增加, 二者的荧光强度均下降, 其中色氨酸的下降幅度较大, 说明 SiW 和 SiWCo 与 BSA 的结合位点更接近于色氨酸残基。酪氨酸和色氨酸的最大发射波长均没有明显变化, 说明 SiW 及 SiWCo 与 BSA 虽然发生了相互作用, 但是并没有进入蛋白质肽链疏水部分的空穴, 所以蛋白质的构象并没有发生变化^[10]。

**Figure 6** Synchronous fluorescence spectra of BSA interacted with SiW (A1, A2) and SiWCo (B1, B2)

A1, B1: $\Delta\lambda = 15$ nm; A2, B2: $\Delta\lambda = 60$ nm. 0→6 the volume of SiW: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 μL ; 0→10 the volume of SiWCo: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 μL .

3.6 SiW 和 SiWCo 与 BSA 相互作用的比较

分别研究了 SiW 和 SiWCo 与 BSA 的相互作用, 发现在浓度相近的条件下, SiWCo 与 BSA 相互作用的荧光猝灭常数大于 SiW 与 BSA 相互作用的猝灭常数。在同步荧光光谱 ($\Delta\lambda = 60$ nm) 中, SiWCo 与 BSA 作用的荧光强度下降幅度比 SiW 更大, 这些表明硅钨钴酸比硅钨酸与 BSA 相互作用的活性大, 这为进一步研究比较其活性提供了理论基础^[14]。

参考文献

- [1] 刘术侠(Liu SX), 翟红菊(Zhai HJ), 王恩波(Wang EB). 多金属氧酸盐的抗艾滋病病毒活性和机理的探讨[J]. 东北师大学报自然科学版[J *Northeast Normal Univ (Nat Sci)*], 2004, **36**(1): 55-61.
- [2] Shiget S, Mori S, Yamase T, et al. Anti-RNA virus activity of polyoxometalates [J]. *Biomed Pharmacol*, 2006, **60**(5): 211-219.
- [3] 刘霞(Liu X), 赵军(Zhao J), 熊宇迪(Xiong YD). 磺胺多金属氧酸盐对人宫颈癌 HeLa 细胞的抑制作用[J]. 化学研究(*Chem Res*), 2008, **19**(2): 94-96.
- [4] Seko A, Yamase T, Yamashita K. Polyoxometalates as effective inhibitors for sialyl- and sulfotransferases [J]. *J Inorg Biochem*, 2009, **103**(7): 1061-1066.
- [5] 陈建秋(Chen JQ), 梁佳然(Liang JR), 钟文英(Zhong WY), 等. 橙皮苷及其 4 种金属配合物与牛血清白蛋白结合作用的研究[J]. 分析试验室(*Anal Lab*), 2010, **29**(1): 14-17.
- [6] 汪双双(Wang SS), 倪永年(Ni YN). 光谱法研究 11-羟基喜树碱与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 分析试验室(*Chin J Anal Lab*), 2010, **29**(1): 10-13.
- [7] 黄瑾(Huang J), 袁余洲(Yuan YZ), 梁宏(Liang H). 紫外光谱、荧光光谱及平衡透析研究磷钨杂多酸与 HSA 或 BSA 的结合平衡[J]. 中国科学 B 辑(*Sci Chin: Ser B*), 2001, **31**(6): 530-535.
- [8] 胡艳军(Hu YJ), 刘义(Liu Y), 侯安新(Hou AX). 稀土杂多酸盐 $\text{EuHSiMo}_{10}\text{-W}_2\text{O}_{40}\cdot 25\text{H}_2\text{O}$ 与 BSA 相互作用的研究[J]. 化学学报(*Acta Chem Sin*), 2004, **62**(16): 1519-1523.
- [9] 王彦卿(Wang YQ), 张红梅(Zhang HM), 张根成(Zhang GC). 硅钨杂多酸与牛血红蛋白相互作用的研究[J]. 无机化学学报(*Chin J Inorg Chem*), 2006, **22**(6): 895-899.
- [10] 梁彦秋(Liang YQ), 邓斌(Deng B), 刘婷婷(Liu TT), 等. 杂多酸盐 $\text{K}_7[\text{PTi}_2\text{W}_{10}\text{O}_{40}]\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 与牛血清白蛋白(BSA)的作用研究[J]. 无机化学学报(*Chin J Inorg Chem*), 2007, **23**

(4):688-692.

- [11] 曾芳(Zeng F),杨昌英(Yang CY),潘家荣(Pan JR). 稀土杂多配合物 $K_{15}[Ce(BW_{11}O_{39})_2] \cdot 17H_2O$ 与 BSA 的相互作用[J]. 稀土(*Chin Rare Earths*), 2006, **27**(4):5-9.
- [12] Zhang HM, Wang YQ, Fei ZH, et al. Characterization of the interaction between Fe(III)-2,9,16,23-tetracar-boxyphthalocyanine and blood proteins [J]. *Dyes Pigmen*, 2008, **78**(3):239

-247.

- [13] 彭博(Peng B). 荧光光谱法研究若干种药物与 BSA 的相互作用[D]. 南京:中国药科大学,2006.
- [14] 刘亚楠(Liu YN),杨芳(Yang F),梅文杰(Mei WJ),等. 手性钆配合物的合成、抗肿瘤活性及其与血清蛋白的相互作用[J]. 高等学校化学学报(*Chem J Chin Univ*), 2010, **31**(3):435-441.

· 新信息 ·

我国应重视新药研究临床试验

2011年3月1日,“重大新药创制”科技重大专项“十二五”计划报告会在京举行。全国人大常委会副委员长、“重大新药创制”科技重大专项技术总师桑国卫出席会议并作重要报告。

会议指出,我国重大新药创制在“十一五”期间获得了显著的成果。重大新药创制的目标在数量上超额完成,部分新药质量有所提升,甚至有的新药已经接近国际先进水平。现有40个品种获得新药证书或提交注册申请,有23个药物完成全部临床试验,还有近800个品种项目处在不同的研发阶段。同时,我国初步建立了药物创新体系,并突破了一批重要的关键技术,在新药发现、药物合成、药物质量控制等方面均有明显进展。

桑国卫指出,国际创新药物研发领域出现了几个影响比较深远的创新原则,应当引起国内研究者的注意:

- 新药创制必须重视成药性评估。
- 遵循早期评价早期淘汰原则。
- 固定剂量配比的复方型“创新”药物产品成为国际新药研发的一个最新趋势。
- 利用计算机进行虚拟筛选成为减少研发成本,加快研发速度的方向之一。

国内临床研究应重视两端:

当前,我国本土医药产业跟国际领先水平有一个很大的不同点,即国内企业在药品上市后的IV期临床还相对是一个短板。而一些跨国企业则不断进行上市后的临床研究,通过IV期临床观察新药在实际应用情况下的效果,进一步确认了药物的安全性和有效性,而这些数据同时也为其打开市场提供了有利的学术支持。

对此,桑国卫表示:“现在的新药研究往前开始重视0期实验,往后则比较强调IV期临床试验。”

与已经进行多年的传统三个阶段的临床试验相比,强调前期探索性的0期临床和大规模、广泛性的IV期临床试验,无疑对研究单位和临床试验医生都提出更高要求。

(医药经济报,本刊有删改)