

文章编号:1000-5404(2013)07-0595-03

论著

金属离子对牛蒡子苷与牛血清白蛋白结合的影响

李沉纹, 于彩平, 李卓恒, 管海燕, 罗明和, 卢来春 (400042 重庆, 第三军医大学大坪医院野战外科研究所药剂科)

[摘要] 目的 研究金属离子对牛蒡子苷与牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)结合的影响。方法 采用同步荧光光谱法,在拟生理 pH 条件下考察不同的金属离子(Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+})对牛蒡子苷与 BSA 结合作用的影响。结果 在金属离子(Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+})存在下,随着体系中牛蒡子苷浓度增大,BSA 荧光增强,两者间的结合力仍以静电作用力为主。金属离子存在时,牛蒡子苷与 BSA 的结合常数在 25 °C 时,分别为 7.899×10^4 (无金属离子)、 8.557×10^4 (Cu^{2+})、 6.724×10^4 (Zn^{2+})、 7.062×10^4 (Mg^{2+});在 37 °C 时,结合常数分别为 5.962×10^4 (无金属离子)、 6.096×10^4 (Cu^{2+})、 5.915×10^4 (Zn^{2+})、 5.612×10^4 (Mg^{2+})。结论 金属离子的存在会影响牛蒡子苷与牛血清白蛋白的结合。 Cu^{2+} 存在下,牛蒡子苷与 BSA 之间的结合常数增大;锌离子和镁离子存在下,两者的结合常数减小。

[关键词] 牛血清白蛋白;牛蒡子苷;金属离子;荧光增强

[中图分类号] R282.71; R341.21; R962

[文献标志码] A

Effect of metal ions on binding between arctiin and bovine serum albumin

Li Chenwen, Yu Caiping, Li Zhuoheng, Guan Haiyan, Luo Minghe, Lu Laichun (Department of Pharmacy, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[Abstract] **Objective** To determine the effect of metal ions on the binding between arctiin and bovine serum albumin (BSA). **Methods** Fluorescence spectroscopy was used to determine the effect of Cu^{2+} , Mg^{2+} , or Zn^{2+} on the interaction between arctiin and BSA under simulated physiological pH value. **Results** At the presence of metal ions (Cu^{2+} , Mg^{2+} , or Zn^{2+}), BSA fluorescence was enhanced with the increase of the concentration of arctiin, with electro-static forces still playing a major role between them. The binding constant was 7.899×10^4 (without metal ion), 8.557×10^4 (Cu^{2+}), 6.724×10^4 (Zn^{2+}), and 7.062×10^4 (Mg^{2+}), respectively, at 25 °C. And it was 5.962×10^4 (without metal ion), 6.096×10^4 (Cu^{2+}), 5.915×10^4 (Zn^{2+}), and 5.612×10^4 (Mg^{2+}), respectively, at 37 °C. **Conclusion** Metal ions affect the binding between arctiin and BSA. Among the metal ions, Cu^{2+} increases their binding constant, while, Mg^{2+} and Zn^{2+} decreases the binding constant.

[Key words] bovine serum albumin; arctiin; metal ion; fluorescence enhancing

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30973908), the Tackling Project of Science and Technology Research of Chongqing (2009AC5025) and the Innovation Fund for Small and Medium Enterprises(HC 26215113529). Corresponding author: Lu Laichun, Tel: 86-23-68757091, E-mail: lulaicq@163.com

血清白蛋白是血浆中含量最丰富的载体蛋白,它能和许多内源性物质广泛结合。人体内存在的各种微量金属元素参与了许多重要的生命过程,其与血清白蛋白间也存在一定结合。药物从给药部位进入血液后,其中一部分与血浆蛋白发生可逆结合,而只有游离型药物可透过血管壁分布到作用部位发挥作用。因此研究药物与血浆蛋白的结合及金属离子对药物与蛋白质结合的影响,有助于全面了解药物在体内的状态和作用机制^[1]。牛蒡子苷(arctiin)是从牛蒡子中提取的有效成分,具有降血糖、防治糖尿病肾病、抗肿瘤、抗病

毒等活性^[2-4],临床尚无以牛蒡子苷单体作为药物的制剂上市。本课题组前期研究了在模拟人体生理条件下牛蒡子苷与牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)的结合^[5]。本实验拟用同步荧光光谱法进一步考察金属离子对牛蒡子苷与 BSA 结合的影响,为深入阐明药物与蛋白质相互作用的化学本质以及牛蒡子苷的制剂研究提供一定依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

F-2500 荧光分光光度计(日本 HITACHI),UV-8500 紫外-可见分光光度计(上海天美科学仪器有限公司),BS110S 型电子分析天平(Satorius 公司),PHB-5 型酸度计(中国杭州雷磁分析仪器厂),HH 恒温水浴锅(江苏金坛市中大仪器厂)。牛蒡子苷(本实验室自制,纯度 >99.8%),牛血清白蛋白(国药集团

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30973908);重庆市攻关项目(2009AC5025);中小企业创新基金(HC 26215113529)

[通信作者] 卢来春,电话:(023)68757091, E-mail: lulaicq@163.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130121.0927.006.html> (2013-01-21)

化学试剂有限公司,批号:20111125), CuCl₂ (上海强顺化学试剂有限公司,批号:20090825), ZnSO₄ (成都市科龙化工试剂厂,批号:20110427), MgCl₂ (重庆博艺化学试剂有限公司,批号:091120), 三羟甲基氨基甲烷(Tris)、HCl、NaCl 等均为分析纯,实验用水为二次蒸馏水,经检测无荧光杂质。

1.2 实验方法

配制 pH = 7.40 的 Tris-HCl 缓冲溶液(内含 0.50 mol/L NaCl 溶液以维持离子强度),用上述 Tris-HCl 缓冲液配制如下溶液:1.0 × 10⁻⁴ mol/L 牛蒡子苷溶液、1.0 × 10⁻⁵ mol/L BSA 溶液、1.0 × 10⁻⁴ mol/L CuCl₂ 溶液、1.0 × 10⁻⁴ mol/L ZnSO₄ 溶液、1.0 × 10⁻⁴ mol/L MgCl₂ 溶液。在 10 mL 容量瓶中依次加入 2.0 mL 0.50 mol/L NaCl 溶液、2.0 mL pH 7.40 的 Tris-HCl 缓冲溶液、1.0 mL BSA 溶液、1.0 mL 金属离子溶液(分别为 Cu²⁺、Zn²⁺、Mg²⁺ 溶液)及一定量的牛蒡子苷溶液,以蒸馏水定容为 10.0 mL,摇匀,分别在 25 °C 和 37 °C 条件下恒温静置一定时间。在荧光分光光度计上分别在 Δλ = 15 nm 条件下对样品进行同步荧光光谱扫描。

1.3 牛蒡子苷与 BSA 结合常数和热力学参数的计算

假设蛋白质与牛蒡子苷相互作用存在单一结合位点的情况,根据荧光效应增强方程^[6]:

$$\frac{1}{I_F - I_F^0} = \frac{1}{\Delta I_{F_{\max}}} + \frac{1}{K[Cq]} \times \frac{1}{\Delta I_{F_{\max}}} \quad (1)$$

其中, I_F⁰ 为 BSA 的初始荧光强度, Cq 为牛蒡子苷浓度, I_F 为体系的荧光强度。ΔI_{F_{max}} = I_{F∞} - I_F⁰, I_{F∞} 为牛蒡子苷与 BSA 作用达到饱和时候的体系荧光强度。K 为牛蒡子苷与 BSA 的结合常数,单位是 L/mol,它反映牛蒡子苷与 BSA 形成生物大分子的结合反应达到平衡时的量效关系。在共存离子分别为 Cu²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺ 时,根据式(1)对实验数据进行处理,以 (I_F - I_F⁰)⁻¹ 对 Cq⁻¹ 作图,由线性拟合方程得到的斜率和截距即可求得结合常数 K。

药物小分子与生物大分子的作用力类型包括氢键、范德华力、静电作用、疏水作用力等。当温度变化不大时,反应的焓变 ΔH、ΔS 可视为常数,根据热力学公式可计算出药物小分子与生物大分子结合过程的有关热力学参数:

$$\lg K = -\Delta H / (2.303RT) + \Delta S / (2.303R) \quad (2)$$

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (3)$$

K 为温度 T 下药物与大分子的结合常数, R 为理想气体常数, R = 8.314 J / (mol · K)。根据 25 °C 和 37 °C 条件下,根据式(3)直接计算得到不同温度下的生成自由能变 ΔG,而根据式(2)代入牛蒡子苷与 BSA 的结合常数 K,将 ΔH、ΔS 视为常数,可求得反应体系的焓变 ΔH、熵变 ΔS。焓变 ΔH 是指物质之间发生化学变化前后的能量变化量,熵变 ΔS 是指发生化学或物理变化前后物质混乱度的变化量,根据焓变和熵变可判断反应方向。Ross 等^[7]根据大量的实验结果,总结出判断蛋白质与小分子等结合力性质与结合作用热力学函数之间的关系,即 ΔS > 0, ΔH > 0 为典型的疏水作用力; ΔH < 0, ΔS < 0 时为氢键和范德华力; ΔH < 0, ΔS > 0 时,主要存在静电相互作用。

2 结果

2.1 牛蒡子苷与 BSA 作用的同步荧光光谱

BSA 分子中的色氨酸 Trp、酪氨酸 Tyr 和苯丙氨酸 Phe 残基能够发射荧光。固定激发波长和发射波长的间距 Δλ, 可得到同步荧光光谱。其中由 Δλ = 15 nm 所得到的同步荧光光谱图仅反映 BSA 酪氨酸残基的光谱特征。分别测定在 25、37 °C 时, Cu²⁺、Zn²⁺、Mg²⁺ 对牛蒡子苷与 BSA 结合的影响,结果见图 1、2。在 25、37 °C 时,随着牛蒡子苷浓度的增加,BSA 的同步荧光强度均呈规律性增大,且最大发射波长发生了部分蓝移,但移动波长在 2 nm 以内,表明金属离子的存在和牛蒡子苷浓度增加并未改变酪氨酸残基微环境的极性,适于进行牛蒡子苷-BSA 结合参数的计算。

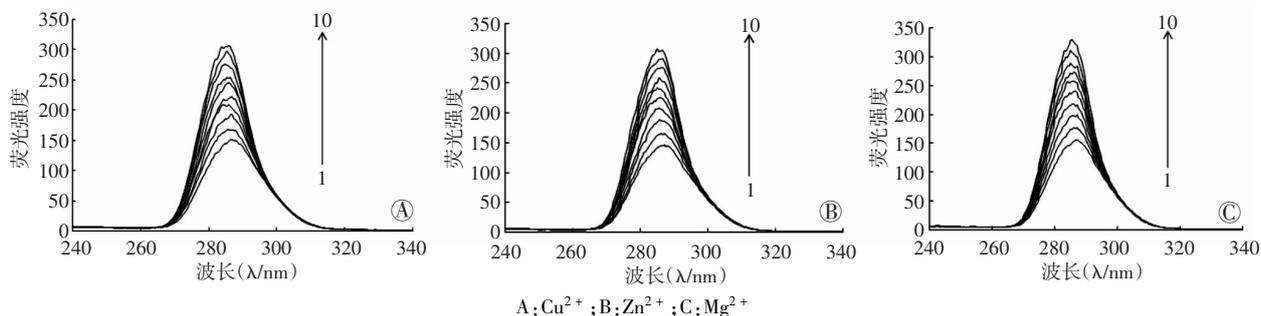


图1 温度为 25 °C, Δλ = 15 nm 的同步荧光光谱图

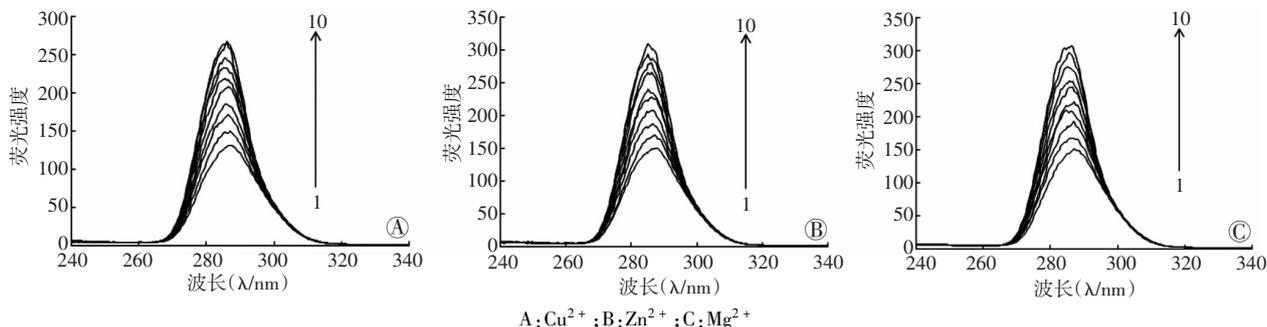


图2 温度为 37 °C, Δλ = 15 nm 的同步荧光光谱图

2.2 不同温度下牛蒡子苷与 BSA 作用的结合常数和热力学参数

在 $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 时,随着药物浓度增大,体系荧光强度规律性增大,以此来进行金属离子对牛蒡子苷-BSA 结合参数的影响。在共存离子分别为 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 时,根据式(1)对实验数据进行处理,以 $(I_F - I_F^0)^{-1}$ 对 Cq^{-1} 作图(图3),由线性拟合方程得到的斜率和截距即可求得结合常数 K 。

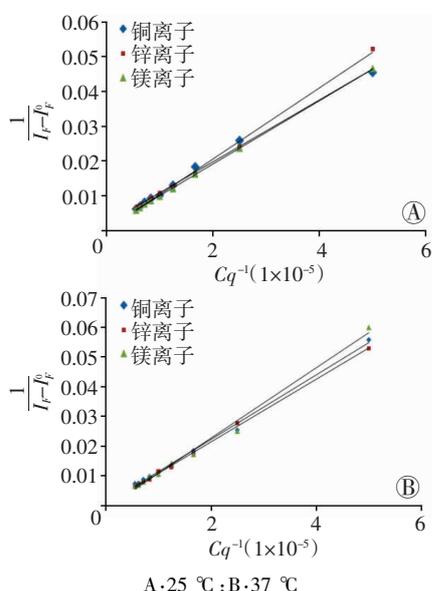


图3 金属离子对牛蒡子苷与 BSA 荧光增强作用影响的双倒数图
 I_F^0 : BSA 的初始荧光强度; Cq : 牛蒡子苷浓度; I_F : 体系的荧光强度

根据式(2)、(3)计算得到热力学参数见表1,可知 $\Delta S > 0$, $\Delta H < 0$,表明牛蒡子苷与 BSA 的作用力主要为静电作用力,而本课题组前期研究发现牛蒡子苷与 BSA 的结合,在没有金属离子存在下也为静电作用力,表明金属离子的存在并未改变牛蒡子苷与 BSA 的结合力类型。

表1 不同温度下牛蒡子苷与 BSA 作用的结合常数和热力学参数

温度	结合作用	K ($\times 10^4, \text{L/mol}$)	ΔH (kJ/mol)	ΔS ($\text{J}/(\text{mol} \cdot \text{K})$)	ΔG (kJ/mol)
25 °C	牛蒡子苷-BSA	7.899	-18.01	33.330	-27.94
	牛蒡子苷-BSA- Cu^{2+}	8.557	-21.71	21.573	-28.14
	牛蒡子苷-BSA- Zn^{2+}	6.724	-8.21	64.868	-27.54
	牛蒡子苷-BSA- Mg^{2+}	7.062	-14.71	43.467	-27.66
37 °C	牛蒡子苷-BSA	5.962	-18.01	33.330	-28.34
	牛蒡子苷-BSA- Cu^{2+}	6.096	-21.71	21.573	-28.40
	牛蒡子苷-BSA- Zn^{2+}	5.915	-8.21	64.868	-28.32
	牛蒡子苷-BSA- Mg^{2+}	5.612	-14.71	43.467	-28.18

3 讨论

本课题组前期研究了在不同温度下牛蒡子苷与 BSA 的结合,表明牛蒡子苷对 BSA 的荧光具有增强效应^[5],本实验结果与之一致: Cu^{2+} 的存在增大了牛蒡子苷与 BSA 的结合(结合常数增大)。文献[8]也报道

相同现象。产生这种现象主要是由于体系中同时存在 Cu^{2+} 、牛蒡子苷、血清白蛋白时, Cu^{2+} 首先能与牛蒡子苷生成络合物,然后 BSA 与此络合物相互作用形成新的复合物体系,即结合常数的增大是由于 Cu^{2+} 同时与牛蒡子苷和 BSA 结合,在药物和蛋白质分子间形成“离子架桥(metal ion bridge)”,从而起到增强作用^[1]。 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 均减小了牛蒡子苷与 BSA 的结合(结合常数减小),主要是由于 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 与蛋白质的作用,生成了金属离子-血清白蛋白复合物,导致蛋白质与药物结合的紧邻区域构型发生改变,从而削弱了药物与蛋白质的结合^[9]。同时本实验结果表明,随着温度升高,牛蒡子苷与 BSA 复合物稳定性降低,牛蒡子苷与 BSA 的结合常数均减小,与文献[1]报道结果一致。

Cu^{2+} 的存在增大了牛蒡子苷与 BSA 的结合,使得牛蒡子苷在血浆中储存时间延长,有利于增加牛蒡子苷在体内的作用时间。而 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 的存在减弱了牛蒡子苷与 BSA 的结合,使得牛蒡子苷在血液内更快释放,增加了牛蒡子苷的最大作用强度,对提高牛蒡子苷的药效具有理论价值^[10]。

参考文献:

- [1] 邵爽,邱瑾. 金属离子对齐多夫定与牛血清白蛋白结合作用的影响[J]. 物理化学学报, 2009, 25(7): 1342-1346.
- [2] 徐传芬,孙隆儒. 牛蒡的研究现状[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(6): 818-821.
- [3] Alghadyan A A. Diabetic retinopathy-An update [J]. Saudi J Ophthalmol, 2011, 25(2): 99-111.
- [4] 王璐,赵烽,刘珂. 牛蒡子苷及牛蒡子苷元的药理作用研究进展[J]. 中草药, 2008, 39(3): 467-470.
- [5] 罗明和,李沉纹,于彩平,等. 同步荧光光谱法研究牛蒡子苷-牛血清白蛋白体系的荧光增强效应[J]. 儿科药理学杂志, 2012, 18(8): 1-3.
- [6] 张曦,寇自农,石羽佳,等. 同步荧光光谱法研究丹参素-牛血清白蛋白体系的荧光增强效应[J]. 分析测试学报, 2011, 30(4): 444-447.
- [7] Ross D P, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability [J]. Biochemistry, 1981, 20(11): 3096-3102.
- [8] 乔春玉. 药物与生物大分子相互作用的研究[D]. 长春:吉林大学, 2009.
- [9] Wang N, Ye L, Yan F, et al. Spectroscopic studies on the interaction of azelnidipine with bovine serum albumin [J]. Int J Pharm, 2008, 351(1/2): 55-60.
- [10] 张国文,阙青民,潘军辉. 葛根素与牛血清白蛋白相互作用的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2007, 27(9): 1784-1787.

(收稿:2012-09-21;修回:2012-10-30)

(编辑 张 维)