

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2016.03.019

光谱法研究聚肌胞与牛血清白蛋白的 相互作用及共存金属离子的影响^①

刘 里, 成飞翔

曲靖师范学院 化学化工学院, 云南 曲靖 655011

摘要: 用紫外-可见吸收光谱法和荧光光谱法研究聚肌胞(PPA)和牛血清白蛋白(BSA)的相互作用及共存金属离子对两者结合作用的影响。结果表明: PPA 对 BSA 的荧光有猝灭作用, 其猝灭过程属于动态猝灭。通过计算得出 PPA 与 BSA 的结合常数 K_b 及结合位点数 n 。根据热力学参数确定了 PPA 和 BSA 之间的作用力类型主要表现为疏水作用力。PPA 在 BSA 中的结合位点主要位于 II A 中。Hill 系数略小于 1, 表明 PPA 对 BSA 的结合为弱的负协同作用。此外还详细探讨了共存金属离子对 PPA 与 BSA 结合作用的影响。

关键词: 聚肌胞; 相互作用; 金属离子

中图分类号: O657.3

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2016)03-0114-05

与人血清白蛋白相似的牛血清白蛋白(BSA), 是生命体中含量最丰富的蛋白质, 能与金属离子、酶、代谢物等许多物质相作用^[1], 具有贮运内源代谢产物和外源药物小分子(离子)等重要生理功能^[2]。聚肌胞(PPA)主要用于治疗病毒性角膜炎、单纯疱疹、慢性病毒肝炎的辅助治疗^[3]。目前, 对 PPA 的研究大多集中在临床应用和疗效方面^[4-8], 目前未见用光谱法研究 PPA 与 BSA 相互作用的报道, 而且以往研究药物与 BSA 相互作用主要集中在猝灭机理上。而本文从不同的角度研究了 PPA 与 BSA 的结合反应, 除了常规的作用机理及结合特征的研究, 还深入探讨了两者的结合位置、药物之间的协同性以及金属离子对 PPA 与 BSA 结合反应的影响, 对于阐明 PPA 在机体内的传输、代谢过程及药理作用具有有益的参考意义。

1 实验

1.1 仪器与试剂

荧光分光光度计(F-4600 型, 日本日立公司, 测定参数: 狭缝宽度 10.0 nm, 光电倍增管负电压为 400 V); 紫外-可见光分光光度计(Cary 50 型, 美国瓦里安技术中国有限公司); 精密酸度计)pHS-3C, 上海虹益仪器仪表有限公司); 超级恒温水浴)HWS12 型, 上海一恒科学仪器有限公司)。BSA: 北京奥博星生物技术有限责任公司, 配制 1.0×10^{-5} mol/L 的溶液; PPA: 江莱化学科技(上海)有限公司, 质量分数为 99%, 批号: 1311252, 配制 8.96×10^{-2} g/L 的溶液; 其他试剂都为分析纯, 实验用水为超纯水。

1.2 实验方法

依次加入 0.50 mol/L NaCl 溶液 2.0 mL; 0.10 mol/L, pH=7.40 的 Tris-HCl 缓冲溶液 1.0 mL, 1.0×10^{-5} mol/L 的 BSA 1.0 mL 和不同体积 8.96×10^{-2} g/L 的 PPA 溶液, 在 10 mL 比色管中, 定容至刻度线。分别在 296.5, 306.5, 316.5 K 温度下, 以最大激发和发射波长($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$)位于 280 nm/345 nm 处, 扫描荧光猝灭光谱记录 F_0 和 F (F 和 F_0 分别指 PPA 存在与不存在时 BSA 的荧光强度)。以相应的

① 收稿日期: 2014-10-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21261019); 云南省教育厅科学研究基金项目(2015C090Y)。

作者简介: 刘 里(1982-), 女, 满族, 吉林吉林人, 讲师, 主要从事药物化学和分子发光学理论与应用研究。

PPA 溶液作为参比,记录 PPA-BSA 体系的吸收光谱.按照上述条件,在 PPA-BSA 体系中加入浓度都为 1×10^{-3} mol/L 金属离子(Mn^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{3+} , Ni^{2+} , Fe^{3+}) 0.1 mL,测其荧光光谱.

2 结果与讨论

2.1 猝灭光谱

在模拟人体生理条件下,PPA 在测定波段没有荧光,PPA 能猝灭 BSA 蛋白质的内源荧光,并在 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=280/345$ nm 处其荧光强度明显有规律地降低(图 1),图 1 表明 PPA 与 BSA 之间存在着相互作用且荧光猝灭程度在一定范围内与 PPA 的质量浓度成正比.

2.2 猝灭机理的探讨

实际上任何一个荧光猝灭过程是一个同时包含动态和静态猝灭的混合过程,但是二者在反应过程中有主次之分^[9],正如通常所说的猝灭机理分为动态猝灭机理和静态猝灭机理.动态猝灭遵从 S-V 方程^[10]:

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 c_{PPA} = 1 + K_{sv} c_{PPA}$$

式中: K_q 为两分子猝灭过程的速率常数; τ_0 为生物大分子荧光寿命,在 10^{-8} s 数量级左右^[10]; K_{sv}

为 S-V 猝灭常数; c_{PPA} 为 PPA 质量浓度.按照实验方法在 296.5,306.5,316.5 K 时,作 $F_0/F-c_{PPA}$ 图,根据 $K_q = K_{sv}/\tau_0$ 可求出不同温度下的 K_q 值,结果列于表 1.表 1 中所有温度下的 K_q 值都小于最大动态猝灭速率常数 2.0×10^{10} L/(mol·s)^[10],推测 PPA 对 BSA 的猝灭属于动态猝灭. S-V 曲线均呈良好的线性关系,且随着温度的升高, K_{sv} 增加,正好与动态猝灭机理相吻合.

表 1 不同温度下 PPA-BSA 的 S-V 方程及相关系数

温度 T/K	Stern-Volmer 方程	相关系数 r	$K_{sv}/(L \cdot g^{-1})$	$K_q/(L \cdot (g \cdot s)^{-1})$
296.5	$F_0/F = 16.088c + 1.0329$	0.9982	16.088	1.6088×10^9
306.5	$F_0/F = 17.543c + 0.9221$	0.9992	17.543	1.7543×10^9
316.5	$F_0/F = 18.875c + 0.9806$	0.9985	18.875	1.8875×10^9

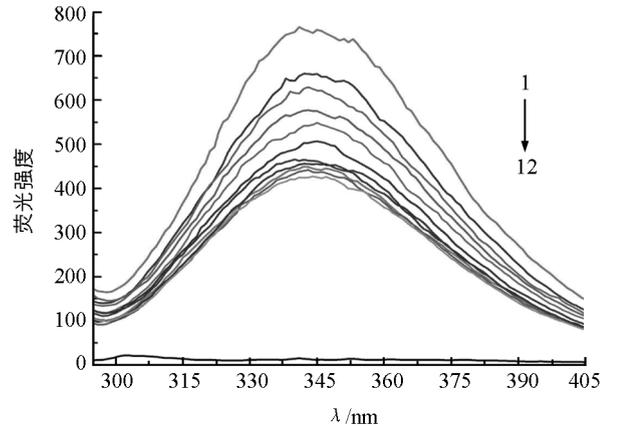
为了确定猝灭机理,测定了 PPA,BSA 和不同浓度 PPA 与 BSA 作用的吸收光谱图(图 2);对比图 2 中曲线 1(PPA)、曲线 2(BSA)和曲线 3-12(PPA-BSA)可以看出,随着 PPA 不断加入到 BSA 溶液中,峰形与峰位几乎没有任何变化,只是吸收强度随着 PPA 质量浓度的增加而增加,这表明 PPA 与 BSA 发生像动态猝灭那样没有改变紫外光谱^[9-13],而不是 PPA 与 BSA 基态分子之间发生作用生成新物质的静态猝灭,而改变吸收光谱的结果,所以最终确定 PPA-BSA 的作用机理为动态猝灭.

2.3 结合位点数 n 以及结合常数 K_b

BSA 大分子与 PPA 小分子结合的表现结合常数 K_b 与结合位点数 n 由 $\lg[(F_0 - F)/F] = \lg K_b + n \lg c_{PPA}$ 公式求出^[10].分别在 296.5,306.5,316.5 K 以 $\lg(F_0 - F)/F$ 对 $\lg c_{PPA}$ 作图,并计算 K_b 和 n 值,列于表 2.由表 2 可知,当温度低于 306.5 K 时, K_b 和 n 随温度的增加而增加;当温度高于 306.5 K 时, K_b 和 n 随温度的增加而减小;在 306.5 K 时 K_b 和 n 达到最大值, n 约等于 1,可形成一个结合位点.表明 K_b 和 n 对温度比较敏感,即蛋白质对药物的运输受温度的影响较大.

表 2 PPA-BSA 的 K_b 和 n

温度/K	双对数方程	$K_b/(L \cdot g^{-1})$	n	r
296.5	$\lg[(F_0 - F)/F] = 0.904 \lg c + 1.0924$	12.371	0.904	0.9970
306.5	$\lg[(F_0 - F)/F] = 1.2131 \lg c + 1.4933$	31.139	1.2131	0.9988
316.5	$\lg[(F_0 - F)/F] = 0.9753 \lg c + 1.2283$	16.916	0.9753	0.9992



1-11. $c_{BSA} = 1 \times 10^{-6}$ mol/L; $c_{PPA} = (0, 1.0752, 1.3440, 1.6128, 1.8816, 2.4192, 3.2256, 3.4944, 3.7632, 4.0320, 4.3008) \times 10^{-2}$ g/L; 12. $c_{PPA} = 1.0752 \times 10^{-2}$ g/L.

图 1 PPA 对 BSA 的猝灭光谱

2.4 作用力类型

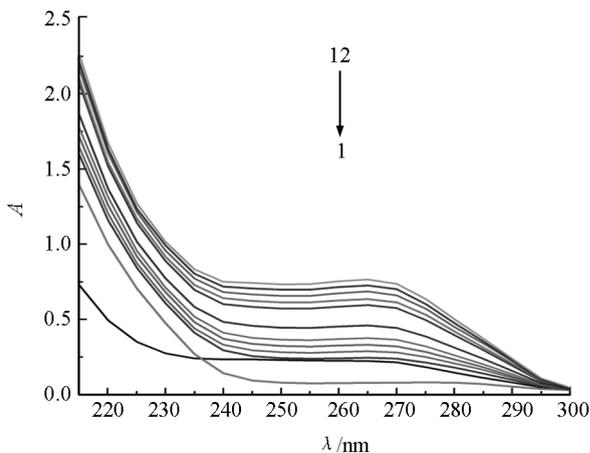
当温度相差不大时,可以把焓变 ΔH 看成是一个常数,由不同温度下的 K_b ,可根据热力学方程^[11-13]算出反应 ΔH 、吉布斯自由能变 ΔG 和熵变 ΔS ,计算结果见表3.由表3可知,PPA与BSA的热力学参数 $\Delta G < 0$, $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$ 表明PPA与BSA为自发的吸热反应.根据Ross等人^[11-14]总结出的判断规律,推断出PPA与BSA的作用力以疏水作用力为主.

表3 不同温度下的热力学参数值和 n_H 值

温度 T / K	自由能 ΔG / ($\text{kJ} \cdot \text{g}^{-1}$)	焓 ΔH / ($\text{kJ} \cdot \text{g}^{-1}$)	熵 ΔS / ($\text{J} \cdot \text{g} \cdot \text{K}^{-1}$)	n_H	相关系数 r
296.5	-6.200 6	10.912 7	57.717 9	0.992 7	0.996 5
306.5	-8.762 0	10.912 7	64.191 8	0.987 3	0.997 8
316.5	-7.442 2	10.912 7	57.993 6	0.998 0	0.999 2

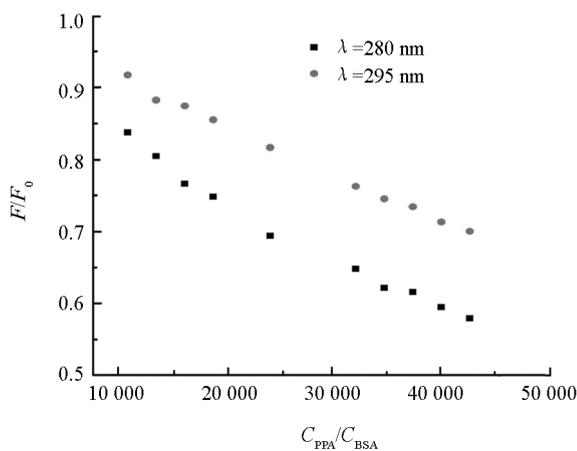
2.5 可能的结合部位

与人血清白蛋白相似,BSA含有3个 α -螺旋域(I-III),每个 α -螺旋域包含2个亚螺旋域A和B.为确定药物小分子与BSA具体结合的位置,考察在两者的作用过程中色氨酸和酪氨酸残基的实际参与情况,应用Sulkowska和刘保生等人^[15-18]提出的方法,即比较波长在280 nm和295 nm激发时PPA-BSA体系荧光程度的降低变化.由图3可知,在波长为280 nm和295 nm激发下,PPA对BSA的猝灭程度曲线是分开独立的,说明色氨酸和酪氨酸残基都参与其中,对比这2种波长下的荧光猝灭程度可知,在280 nm激发时的荧光降低程度中更大些,这一现象说明在PPA与BSA的结合过程中,结合位点主要位于亚螺旋域IIA.



$c_{\text{PPA}} = (0, 1.075 2, 1.344 0, 1.612 8, 1.881 6, 2.419 2, 3.225 6, 3.494 4, 3.763 2, 4.032 0, 4.300 8) \times 10^{-2} \text{ g/L}$.

图2 PPA(1),BSA(2)和PPA-BSA(3-12)混合体系的紫外吸收光谱



$c_{\text{PPA}} = (1.075 2 - 4.300 8) \times 10^{-2} \text{ g/L}$.

图3 λ_{ex} 为280 nm和295 nm时,PPA-BSA的荧光光谱

2.6 药物协同性

刘保生等人^[15-18]认为药物协同性是指药物与具有多重结合部位的BSA结合过程中各结合部位之间可能存在相互影响作用,可用Hill方程^[15-18]进行分析:

$$\lg D / (1 - D) = \lg K + n_H \lg c_{\text{PPA}}$$

式中: D 为结合饱和分数, K 为结合常数, n_H 为Hill系数.在荧光实验中,

$$D / (1 - D) = B / (B_m - B)$$

其中:

$$B = (F_0 - F) / F_0$$

$1/B_m$ 是 $1/B$ 对 $1/c_{\text{PPA}}$ 作图的截距.PPA-BSA的 n_{Hill} 值的计算结果见表2.表2中3个温度下的 n_{Hill} 变化不大,表明药物协同性对温度变化不是很敏感; n_{Hill} 都略小于1,说明在PPA与BSA结合过程中,PPA分子

之间有较弱的负协同作用,即前一个药物分子结合到 BSA 位点上后,对后一个药物分子与 BSA 的结合有阻碍作用.

2.7 金属离子的影响

金属离子的存在会直接影响药物与蛋白质的结合^[18-21],有两种不同的影响:一是对药物与蛋白质结合有增强作用;二是对药物与蛋白质结合有减小作用^[18-21].因此,研究了 Ni^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} 和 Mn^{2+} 对 PPA 与 BSA 的结合作用的影响,实验结果见表 4.由表 4 可知,金属离子不同, K'_b 和 n 也不同,其原因可能是由于金属元素本身的原子结构不同,才导致结合力和结合位点的差异;加入 Ni^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{3+} 后, K_b 和 n 都增加了,即金属离子对药物与蛋白质的作用产生了促进作用,其中 Cu^{2+} 对体系的影响最大.原因可能是在 PPA 与 BSA 结合时,金属离子是通过桥联作用或形成“离子架桥”^[19-22]方式参与其中的,才有助于 PPA 对 BSA 的荧光猝灭.但 Mn^{2+} , Fe^{3+} 的加入与其他 3 种离子所产生的效果相反,减小了原本的 K_b 和 n 值,说明 Mn^{2+} , Fe^{3+} 对 PPA 与 BSA 结合产生了竞争作用,抑制了 BSA 与药物的结合作用,缩短了 PPA 在血液中的停留时间,从而增大了药效.以上这些不同恰好也说明不同人的血液金属离子含量不同,产生的药效也不同.

表 4 金属离子对结合作用的影响

金属离子	$K'_b/(\text{L} \cdot \text{g}^{-1})$	K'_b/K_b	结合位点 n	相关系数 r
*	12.371 0	1.000 0	0.904 0	0.997 0
Mn^{2+}	8.723 7	0.705 2	0.741 5	0.995 2
Cu^{2+}	22.646 4	1.830 6	1.147 6	0.998 4
Cr^{3+}	12.456 6	1.006 9	0.964 2	0.999 1
Fe^{3+}	10.841 8	0.876 4	1.089 7	0.996 7
Ni^{2+}	18.302 1	1.479 4	1.075 9	0.997 2

注:表中的 K_b 和 K'_b 分别表示与 BSA 在金属离子不存在和存在时的结合常数,“*”代表的是不加任何金属离子.

3 结 论

用荧光和紫外光谱法推断出 PPA 对 BSA 荧光产生了动态猝灭,PPA 和 BSA 之间的作用力类型主要为疏水作用力;通过计算求得了 K_b 和 n 值的大小,表明 PPA 可以被 BSA 运输;两者结合位置位于 BSA 的亚螺旋域 II A 中;在 PPA 与 BSA 结合过程中,药物分子之间有弱的负协同性;详细研究了常见 5 种金属离子对 PPA 与 BSA 相互作用的影响.

参考文献:

- [1] 刘 哲,王坤杰,董银龙,等.水杨酸金属配合物与牛血清白蛋白的相互作用[J].无机化学学报,2010,3(1):72-78.
- [2] 孟丽艳,屈凌波,杨 冉,等.紫外吸收光谱和荧光光谱法研究大黄酚与牛血清白蛋白相互作用机制[J].理化检验(化学分册),2009,10(24):1169-1173.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(二部)[M].中国医药科技出版社,2012:178.
- [4] 李 毅,金 一,孙伦泉,等.双链 RNA 的免疫调节作用及聚肌胞抗病毒应用进展[J].中国生化药物杂志,2011,32(4):335-338.
- [5] 陈 斌,汪贤君,胡坤丽.穴位注射聚肌胞配合中药辨证治疗乙肝疗效观察[J].现代中医药,2014,34(1):20-21.
- [6] 杜 峰.局部注射聚肌胞治疗 36 例多发性跖疣临床观察[J].湖北科技学院学报(医学版),2013,27(2):146-147.
- [7] 王华照.阿昔洛韦与聚肌胞治疗带状疱疹的临床效果及安全性[J].河南医学研究,2013,22(1):86-87.
- [8] 张 军.板蓝根注射液联合聚肌胞注射液治疗单疱病毒性角膜炎临床观察[J].吉林医学,2013,34(6):1062.
- [9] LAKOWICZ J R. Principles of Fluorescence Spectroscopy [M]. 3rd ed. New York: Springer Press, 2006: 280-291.
- [10] 许金钩,王尊本.荧光分析法[M].北京:科学出版社,2006,34(7):42-60.
- [11] 刘 里,彭洪生,伏云红.荧光光谱法研究头孢孟多酯与牛血清白蛋白的相互作用[J].中国测试,2014,40(3):64-67.
- [12] 刘 凡,李 琼,邹 琼.1,4,7,10-四氮杂环十二烷合铜与牛血清白蛋白的相互作用[J].西南大学学报(自然科学版),2012,34(9):48-51.

- [13] 蔡向阳, 孔德贤, 郑新宇, 等. 荧光法研究吡啶甲酸铬与牛血清白蛋白的相互作用 [J]. 西南大学(自然科学版), 2012, 34(9): 43-46.
- [14] ROSS D P, SUBMMANTAN S. Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability [J]. *Biochem*, 1981, 20(11): 3096-3102.
- [15] SULKOWSKA A, MACIAZEK-JURCZYK M, BOJKO B, et al. Competitive Binding of Phenylbutazone and Colchicine to Serum Albumin in Multidrug Therapy [J]. *J Mol Struct*, 2008, 881(1-3): 97-106.
- [16] BOJKO B, SULKOWSKA A, MACIAZEK-JURCZYK M, et al. The Influence of Dietary Habits and Pathological Conditions on the Binding of Theophylline to Bovine Serum Albumin [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2009, 52(3): 384-390.
- [17] 刘保生, 杨超, 王晶, 等. 硫酸头孢匹罗与牛血清白蛋白结合反应的发光机理, 发光学报 [J], 2011, 32(3): 295-296.
- [18] 刘保生, 杨超, 王晶, 等. 头孢匹胺钠与牛血清白蛋白相互作用机理及共存金属离子的影响 [J]. 发光学报, 2012, 33(9): 1021.
- [19] 高兴军, 郭明, 李兵, 等. 二价金属离子与牛血清白蛋白的相互作用 [J]. 浙江农林大学学报, 2013, 30(5): 777-783.
- [20] 郭明, 刘咪咪, 李铭慧, 等. 不同形态铬离子与牛血清白蛋白结合的反应机制 [J]. 环境化学, 2013, 32(1): 65-70.
- [21] 李建晴, 张爱花, 蔡雪梅. Cu^{2+} , Pb^{2+} 和 Ni^{2+} 对日落黄与牛血清白蛋白作用的影响研究 [J]. 化学研究与应用, 2013, 25(11): 1550-1553.

A Spectrometric Study on the Interaction of Polyinosinic-Polycytidylic Acid with Bovine Serum Albumin and the Effect of Coexistent Metal Ions on the Reaction

LIU Li, CHENG Fei-xiang

College of Chemistry and Chemical Engineering, Qujing Normal University, Qujing Yunnan 655011, China

Abstract: The interaction between polyinosinic-polycytidylic acid (PPA) and bovine serum albumin (BSA) and the effects of coexistent metal ions on their binding were studied with ultraviolet-visible absorption spectrometry (UV-VIS) and fluorescent spectrometry. The results showed that the fluorescence of BSA was quenched by PPA, which was a dynamic quenching process. The binding constant K_b and the corresponding number of binding sites n were obtained by calculation. The thermodynamic parameters obtained from the measured data showed that the interaction of PPA and BSA was mainly driven by the hydrophobic force. The primary binding site for PPA was located at the sub-domain II A of BSA. The values of Hill's coefficients were less than 1, which indicated that there was a negative cooperative effect. In addition, the effects of coexistent metal ions on the binding constant of PPA with BSA were also studied.

Key words: polyinosinic-polycytidylic acid; interaction; metal ion

责任编辑 潘春燕

