

# 阿魏酸钠与牛血清白蛋白结合作用的研究

张爱平 王丽 杨锦艳 杨斌盛<sup>a</sup>

(山西医科大学药学院 太原市新建南路 56 号 030001)

<sup>a</sup>(山西大学分子科学研究所 太原市 030006)

**摘 要** 用荧光、紫外光谱法研究了在模拟人体生理条件下阿魏酸钠与牛血清白蛋白(BSA)之间的相互作用,求得阿魏酸钠与BSA的结合常数  $K = (5.30 \pm 0.18) \times 10^5$ ,根据热力学参数确定了阿魏酸钠与BSA之间的作用力类型,根据Foster偶极-偶极非辐射能量转移原理,计算了阿魏酸钠与BSA相互结合时其授体-受体间的距离  $r = 1.01\text{nm}$ 。

**关键词** 阿魏酸钠,牛血清白蛋白,荧光猝灭。

中图分类号:O657.32

文献标识码:A

文章编号:1004-8138(2007)06-1161-05

## 1 前言

魏酸钠(sodium ferulate)<sup>[1]</sup>为非肽类内皮素受体拮抗剂,可增加NO的合成,松弛血管平滑肌,抑制血小板聚集,改善血液流变学特征,抑制胆固醇的合成,清除自由基,增强机体免疫功能。阿魏酸钠到达靶部位,进而发生药理作用,需要通过血清白蛋白在体内进行运输和储存。研究血清白蛋白与阿魏酸钠的结合作用<sup>[2]</sup>,有助于了解阿魏酸钠在体内的运输和分布情况,对于阐明阿魏酸钠的作用机理、药代动力学和药物的毒性具有重要的意义。

本文应用荧光、紫外-可见吸收光谱法研究在模拟人体生理条件下阿魏酸钠与牛血清白蛋白(BSA)之间的结合作用,测定了阿魏酸钠与牛血清白蛋白结合反应的结合常数、结合位点数等参数,为探讨阿魏酸钠作用机理提供可参考的实验数据和理论依据。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器和试剂

BSA(美国sigma公司);阿魏酸钠(中国药品生物制品检定所); $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 和 $\text{NaCl}$ 均为分析纯;双蒸水;HITACHI 850型荧光分光光度计(日本日立公司),TU-1901紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),pH计(上海雷磁仪器厂),Finnpipette加样器(芬兰雷勃公司)等。

配制  $0.05\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的磷酸缓冲液(内含  $0.15\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaCl}$ , pH 7.4),然后分别用磷酸缓冲液配制  $6.14 \times 10^{-5}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  BSA 溶液和  $5.23 \times 10^{-4}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的阿魏酸钠溶液。

所用试剂均为分析纯。实验用水为二次蒸馏水。

基金项目:国家自然科学基金(20371031)资助项目

联系人,电话:(0351)4690071;手机:(0)13834679353;E-mail:zhangap1@sxu.edu.cn

作者简介:张爱平(1965—),女,山西省原平市人,博士,硕士生导师,主要从事药物与生物分子相互作用方面的研究工作。

收稿日期:2007-08-29;接受日期:2007-09-26

## 2.2 实验方法

荧光光谱的测定: 移取 2.0 mL BSA 于 1 cm 石英池中, 用可调式移液器逐次加入阿魏酸钠溶液进行荧光滴定, 每次加入溶液后混合均匀, 以 280 nm 为激发波长, 在 HITACHI 850 型荧光分光光度计上记录 300—500 nm 波长范围内的发射光谱。本文所用荧光强度均为考虑稀释效应后的值。

吸收光谱的测定: 在 TU-1901 紫外分光光度计上使用 1 cm 吸收池测定。

## 3 结果与讨论

### 3.1 阿魏酸钠对 BSA 荧光猝灭的机理

BSA 在 343 nm 处出现最大荧光峰, 用阿魏酸钠溶液滴定 BSA, 其 343 nm 处的荧光峰被逐渐猝灭, 见图 1 (从 a 到 g)。相同实验条件下, 用缓冲溶液滴定 BSA 溶液, BSA 343 nm 处的荧光峰被微弱猝灭, 即阿魏酸钠的加入使 BSA 的荧光被有规律地猝灭<sup>[3]</sup>。

荧光猝灭作用因猝灭机理不同分为动态猝灭和静态猝灭<sup>[4]</sup>。

假设阿魏酸钠溶液对 BSA 荧光的猝灭是由分子碰撞引起的动态猝灭, 则按照 Stern-Volmer 方程有:

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (1)$$

其中  $F_0$ —— $[Q] = 0$  时的荧光强度,  $F$ ——猝灭剂存在时的荧光强度,  $K_q$ ——双分子猝灭速率常数,  $\tau_0$ ——猝灭剂不存在时物质的荧光寿命,  $K_{sv}$ ——动态猝灭常数,  $[Q]$ ——猝灭剂的浓度, 则有  $K_{sv} = K_q \tau_0$ 。由图 1 可见, 阿魏酸钠作为

猝灭剂可使 BSA 在 343 nm 处的荧光猝灭, 将  $F_0/F$  对  $[D]$  作图, 进一步可看出, 随着温度升高, BSA 的猝灭曲线斜率降低; 另一方面, 由猝灭曲线求得不同温度下的表观猝灭速率常数见表 1。由于生物大分子荧光平均寿命大约为  $10^{-8}$  s<sup>[5]</sup>, 而各

类猝灭剂对生物大分子最大扩散控制的碰撞猝灭常数为  $2.0 \times 10^{10} \text{ s}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}^{[6]}$ , 由表 1 可看出, 阿魏酸钠对 BSA 的荧光猝灭速率常数  $K_q$  大于此值, 所以阿魏酸钠对 BSA 的荧光猝灭不是动态猝灭, 而是静态猝灭过程。

### 3.2 阿魏酸钠与 BSA 的结合位点数 $n$ 、结合稳定常数 $K$

对于静态猝灭, 荧光强度与猝灭剂的关系可由荧光分子与猝灭剂的结合常数表达式推导出, 设 BSA 有  $n$  个相同且独立的结合位点<sup>[7]</sup>, 则有:



结合稳定常数  $K$  为:

$$K = \frac{[Q_n \text{BSA}]}{[Q]^n [\text{BSA}]} \quad (3)$$

式 (3) 中  $[\text{BSA}]$ ——游离 BSA 浓度,  $[Q]$ ——阿魏酸钠平衡浓度,  $[Q_n \text{BSA}]$ ——配合物浓度, 若 BSA 总浓度为  $[\text{BSA}]_0$ , 则  $[\text{BSA}]_0 = [Q_n \text{BSA}] + [\text{BSA}]$ 。当  $[Q] > [\text{BSA}]_0$  时, 以猝灭剂的起始浓度  $[Q]$  代替其平衡浓度,

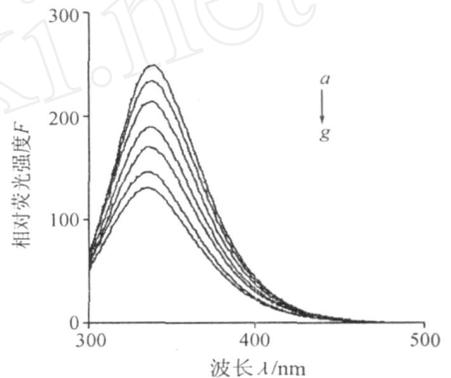


图 1 阿魏酸钠对 BSA 的荧光猝灭图

$[\text{BSA}] = 6.14 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,

$[D] = 5.23 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,

从 a 到 g——加入阿魏酸钠的量依次为 0, 20, 50, 90, 140, 200, 270  $\mu\text{L}$  D-阿魏酸钠。

表 1 不同温度下阿魏酸钠对 BSA 的猝灭常数

$T$ (K)	$K_{sv} (\text{mol}^{-1} \cdot \text{L})$	$K_q (\text{s}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L})$
298	$6.66 \times 10^4$	$6.66 \times 10^{12}$
303	$5.20 \times 10^4$	$5.20 \times 10^{12}$
308	$3.98 \times 10^4$	$3.98 \times 10^{12}$

$$K \frac{[\text{BSA}]_0 - [\text{BSA}]}{[Q]^n [\text{BSA}]} \tag{4}$$

在静态猝灭中, 荧光体系的荧光强度与其游离浓度呈正比(所生成的配合物是非荧光性的)。

$$[\text{BSA}] / [\text{BSA}]_0 = F / F_0 \tag{5}$$

由(4)和(5)可得:

$$\lg[(F_0 - F) / F] = \lg K + n \lg [Q] \tag{6}$$

以  $\lg[(F_0 - F) / F]$  对  $\lg [Q]$  作图, 应为一条直线, 直线斜率为结合位点数  $n$ , 由直线截距可以求得结合稳定常数  $K$ 。

阿魏酸钠在 343nm 没有荧光, 阿魏酸钠与 BSA 结合物也没有荧光, 可以通过上述推导的方法, 计算结合稳定常数及结合位点数。按(6)式进行数据回归处理, 得线性方程  $\lg[(F_0 - F) / F] = 1.25 \lg [Q] + 5.72$ , 线性相关系数为 0.999, 由直线斜率得 BSA 与阿魏酸钠的结合位点数  $n = 1.25$ , 由所得直线的截距求得条件稳定常数  $K = (5.30 \pm 0.18) \times 10^5$ 。

### 3.3 阿魏酸钠和 BSA 色氨酸残基间距离

根据 Foster 型偶极-偶极无辐射能量转移机理<sup>[8]</sup>, 能量转移效率与给体-受体间的距离及临界能量转移距离  $R_0$  的关系为:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \tag{7}$$

其中  $R_0$  是能量转移效率  $E$  为 50% 时的临界距离:

$$R_0^6 = 8.79 \times 10^{-25} k^2 Q_{\text{TP}} n^{-4} J(\lambda) \quad \text{单位}(\text{nm})^6 \tag{8}$$

其中  $K^2$  为取向因子,  $K^2 = 2/3$ ;  $Q_{\text{TP}}$  为没有能量受体时色氨酸残基的量子产率,  $Q_{\text{TP}} = 0.118$ ,  $n$  是介质的折射指数, 通常取水和有机物的平均值 1.336,  $J$  为光谱重叠积分, 由下式计算:

$$J(\lambda) = \frac{F(\lambda) \epsilon(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{F(\lambda) d\lambda} \tag{9}$$

其中  $F(\lambda)$  是能量供体在波长  $\lambda$  的荧光强度,  $\epsilon(\lambda)$  是能量受体在波长  $\lambda$  的摩尔吸光系数, 能量转移效率  $E$  可用下式计算:

$$\text{由 } E = 1 - F / F_0 \tag{10}$$

只要得到  $E$ 、 $K^2$  和  $n$ , 结合 BSA 的荧光光谱和阿魏酸钠的吸收光谱的重叠图(见图 2), 即可求出光谱重叠积分  $J$ , 进而计算得到  $R_0$  与  $r_0$ 。

通过式(9), 求得光谱的重叠积分  $J = 6.71 \times 10^{-18} \text{ cm}^3 \cdot \text{L} / \text{mol}$ 。在上述实验条件下, 以色氨酸为标准物 ( $Q = 0.140$ ), 测得牛血清白蛋白中色氨酸量子效率  $Q_{\text{TP}}$  为 0.118, 取向因子取给体-受体各向随机分布的平均值  $K^2 = 2/3$ , 折射指数  $n$  取水和有机物平均值 1.336, 将上述数值代入式(8), 求得  $R_0$  为 2.72 nm, 再通过阿魏酸钠与 BSA 摩尔比为 1:1 时配合物的荧光强度, 由(10)式计算得到能量转移效率  $E = 0.120$ , 根据公式(7)求得阿魏酸钠与 BSA 结合位置距色氨酸残基间距离  $r = 1.01 \text{ nm}$ 。

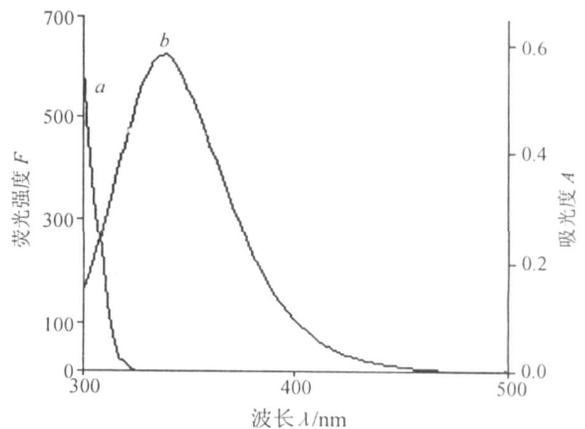


图 2 阿魏酸钠的吸收光谱(a)与 BSA 的荧光光谱(b)间的重叠图

### 3.4 阿魏酸钠与 BSA 结合的热力学性质

一般情况下, 药物与蛋白的作用力很复杂, 主要包括氢键、范德华力、静电引力、疏水作用力等。当温度变化不大时, 结合反应的焓变  $\Delta H$  可看作一个常量, 根据热力学公式(11)、(12)、(13)式

$$\ln(K_2/K_1) = \Delta H_m(1/T_1 - 1/T_2)/R \quad (11)$$

$$\Delta_r G_m = -RT \ln K \quad (12)$$

$$\Delta_n S_m = (\Delta_r H_m - \Delta_r G_m)/T \quad (13)$$

可求得不同温度下的  $\Delta_r H_m$ ,  $\Delta_r G_m$ ,  $\Delta_n S_m$ , 结果见表 2。

根据热力学参数与作用力的相互关系<sup>[9]</sup>, 由表 2 可知,  $\Delta_r H_m > 0$ ,  $\Delta_n S_m > 0$ , 表明阿魏酸钠和 BSA 的相互作用主要为典型的疏水作用。

表 2 阿魏酸钠与 BSA 的热力学参数

T (K)	$\Delta_r H_m$ (kJ/mol)	$\Delta_r G_m$ (kJ/mol)	$\Delta_n S_m$ (J/mol)
298	43.92	-29.28	245.628
303	43.92	-32.49	252.185
308	43.92	-33.75	252.185

### 3.5 结合机理探讨

BSA 的空间结构由 3 个结构域组成, 每个结构域由 2 个亚结构域以槽口相对的方式形成圆筒状结构, 几乎所有的疏水性氨基酸残基都包埋在圆筒内部, 构成疏水腔<sup>[9]</sup>, 由于阿魏酸钠分子中含有脂溶性基团, 因此其主要通过疏水作用进入 BSA 的疏水腔中。BSA 的序列分析表明 BSA 分子在 134 和 212 位处有两个色氨酸残基, 它们分别处于不同的结构域中。已知结合在人血清蛋白(只有一个 214 位色氨酸残基)疏水腔结构域 III 中的脂肪酸与 214 位色氨酸残基之间的距离为 2.3nm<sup>[10]</sup>, 而 BSA 与阿魏酸钠分子之间的结合距离为 1.01nm, 推测阿魏酸钠对 BSA 的荧光猝灭作用主要源于 212 位色氨酸残基。

## 参考文献

- [1] 刘会荣. 阿魏酸钠的药理作用与临床应用[J]. 中国药业, 2005, 14(3): 78—79.
- [2] 李惠卿, 赵亚琴, 杨斌盛. TNS 与牛血清白蛋白相互作用的荧光光谱研究[J]. 光谱实验室, 2007, 24(1): 1—5.
- [3] 张根成, 王彦卿, 张红梅等. 桔皮苷与牛血清白蛋白相互作用的研究[J]. 化学研究与应用, 2006, 18(7): 800—803.
- [4] 陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓等. 荧光分析法[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1990. 112—114.
- [5] Lakowicz J R, Weber G. Quenching of Fluorescence by Oxygen: Probe for Structural in Acromolecules[J]. *Biochemistry*, 1973, 12: 4161—4170.
- [6] 卢继新, 张贵珠, 赵鹏等. 阿霉素与血清白蛋白的作用及共存离子对反应影响的研究[J]. 化学学报, 1997, 55(9): 915—920.
- [7] 刘家琴, 田建襄, 谢建平. 马兜铃酸与牛血清白蛋白相互作用的荧光光谱研究[J]. 光谱实验室, 2006, 23(1): 123—126.
- [8] 黄波, 邹国林, 杨天鸣. 阿霉素与牛血清白蛋白结合作用的研究[J]. 化学学报, 2002, 60(10): 1867—1871.
- [9] Ross D P, Subramanian S. Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability[J]. *Biochemistry*, 1981, 20: 3096—3099.
- [10] Ulrich KH. Molecular Aspects of Ligand Binding to Serum Albumin[J]. *Pharmacol Rev*, 1981, 33(1): 17—53.

## Study on the Interaction between Sodium Ferulate and Bovine Serum Albumin

ZHANG Ai-Ping WANG Li YANG Jin-Yan YANG Bin-Sheng<sup>a</sup>

(School of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, P. R. China)

<sup>a</sup>(Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, P. R. China)

**Abstract** The interaction between sodium ferulate and bovine serum albumin was studied by fluorescence spectroscopy and ultraviolet spectroscopy under the simulated physiological conditions the combining constant was obtained as  $K = (5.30 \pm 0.18) \times 10^5$  by fluorescence quenching method. The type of interaction force between sodium ferulate and bovine serum albumin was determined by the thermodynamic parameters according to the theory of Foster's dipole-dipole non-radiation energy transfer mechanism, the binding distance ( $r = 1.01 \text{ nm}$ ) between sodium ferulate and bovine serum albumin was obtained.

**Key words** Sodium Ferulate, Bovine Serum Albumin, Fluorescence Quenching

## 《北京天科邮票展览馆》(《邮票上科学家展览馆》) 创办始末

周开亿

(北京市学院南路 76 号 35 楼 204 室 100081)

北京有梅兰芳纪念馆、老舍纪念馆、徐悲鸿纪念馆等等,记载着舞台大师、文学大师、美术大师等在其相关领域所创造的辉煌业绩,他们的成就,毫无疑问,值得后人去纪念、继承和发扬光大。然而自然科学家的纪念馆却较少(有詹天佑纪念馆),这也许是因为真正的自然科学家生前不崇拜偶像,死后也不希望后人把他当偶像来朝拜。中国要崛起,就必须鼓励创造发明,过去的科学家搞创造发明的成功经验和失败的教训,对今天的科学家具有重要的现实意义,正如唐太宗李世民所说:“以铜为镜可以正衣冠,以古为镜可以知兴替,以人为镜可以明得失”。今天,我们享受着现代发达的科学技术带来的文明和幸福,带来的快捷和便利,也不能不缅怀为人类作出杰出贡献的科学家,他们从事科学事业的献身精神永远值得我们纪念、学习和继承。

国家“尊重知识、尊重人才”的方针得到强调之后,“尊重”的社会风气有很大好转,但我认为,距发达国家还有较大的差距。1727年,正在英国访问的伏尔泰(法国杰出的启蒙科学家),观看了牛顿的葬礼和纪念活动时,就非常感慨和羡慕地说:英国纪念一位数学家就像其他国家纪念国王一样隆重。这种对知识和人才的尊重,难道与英国19世纪成为“日不落”的世界一流强国没有关系吗?

所以,创办一个自然科学家纪念馆,很有必要。

下一个问题就是科学家的选择,我认为,被选者是否有纪念邮票和是否有传略(容易找到),是一个比较客观(但不绝对)的标准。据此标准,我收集了古今世界各国发行的、涉及530位有传略科学家的529枚纪念邮票(复印件),并把它放大为A4纸的大小(以利观赏);每位科学家再配以100—300字的简要说明(牛顿和爱因斯坦有1000余字),这就构成了展品的主要内容。我认为,展品应以业绩为主,科学家用过的日常生活用品和用过的工具不是“神器”,没有收集和展出的必要。

再一个问题就是纪念馆的馆址。北京城区的房价高得惊人,靠工薪阶层的我的毕生积蓄和退休金是买不起的。常言道:后退一步天地宽。我在北京郊区延庆县刘斌堡乡购得一废弃的乡镇企业(占地4600平方米,房屋830平方米),房屋略加修缮,除去荒草,种植花木,解决了一个简陋的展览馆的馆址问题。

最后一个是注册登记问题。最先,我找到了北京市海淀区科学技术委员会,答复是:纪念馆不归科委管,而归文委(文化委员会)管;再找文委,答复是:文委不管纪念馆,可找工商局。工商局答复是:可以注册登记,但不能叫纪念馆,可以叫展览馆,我同意了。至于“字号”,经同工商局协商,定为“天科”——天才科学家之意。这就是“天科邮票展览馆”的来历。实际上,称为《邮票上科学家展览馆》也许更为明确。