

荧光法研究 PTB 与白蛋白的结合

陈艳华¹, 卜凤泉¹, 胡秀丽¹, 刘志强², 刘忠英^{1*}, 刘景英¹, 周秋丽¹

1. 吉林大学药学院, 吉林 长春 130021

2. 中国科学院长春应用化学研究所新药研发室, 吉林 长春 130022

摘要 利用药物对蛋白的荧光猝灭作用, 用荧光法研究了 N-苯酰甲噻唑溴(PTB)与牛血清白蛋白(BSA)及人血清白蛋白(HSA)的相互作用。测定发现 BSA 溶液的最大激发波长为 280 nm, HSA 溶液的最大激发波长为 290 nm。分别向溶液中加入 PTB 后, 原有的最大发射波长处的强度明显减弱。说明 PTB 对 BSA 和 HSA 有荧光猝灭作用。PTB 与 BSA, HSA 有中等强度的结合。测得 15 °C 时 PTB 与 BSA, HSA 的结合常数分别为 3.66×10^3 和 3.83×10^3 , 结合位点数 n 分别为 1.02 和 1.16; 37 °C 时 PTB 与 BSA, HSA 的结合常数分别为 3.58×10^3 和 3.35×10^3 , 结合位点数分别为 0.95 和 0.87。根据热力学常数确定了 PTB 与 BSA, HSA 之间的主要作用力类型均为静电作用力。通过 Förster 偶级-偶级非辐射能量转移原理, 得到 BSA, HSA 与 PTB 结合的位置距色氨酸残基的距离分别为 7.5 和 7.9 nm。根据白蛋白的结构, 可以推测 BSA, HSA 与 PTB 结合的位点在 II A 亚结构域, 靠近 Trp214 的区域。

关键词 N-苯酰甲噻唑溴; 牛血清白蛋白; 人血清白蛋白; 荧光光度法

中图分类号: O657.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-0593(2007)10-2079-04

引言

N-苯酰甲噻唑溴(phenacyl thiazolium bromide, 简称 PTB)是一种新型的治疗糖尿病的化合物。在高糖状态下葡萄糖的醛基或酮基与蛋白质的氨基结合生成 schiff 碱, 碱发生化学重排后, 形成 Amadori 产物, 后者经脱水、氧化和缩合等反应形成糖基化终产物(advanced glycation end product, 简称 AGE)^[1]。研究表明, AGE 在糖尿病慢性并发症中起重要作用。国内外的一些学者在研究抑制糖基化反应的药物方面, 取得了一些进展, 但对已形成的 AGE 没有明显的裂解作用。PTB 对 AGE 具有裂解作用, 可清除体内已生成的 AGE, 从而成为糖尿病药物的新的靶点, 继而产生了一系列结构类似的 AGE 裂解剂^[2]。当药物进入人体后, 通过血浆的储存和运输才能达到受体部位, 进而发挥药理作用。血清蛋白可与许多内源和外源化合物结合。研究 PTB 与蛋白的相互作用, 有助于了解这类药物在体内的运输和分布情况, 对于阐明药物的作用机制、药代动力学以及药物的毒性都有非常重要的意义。

1 实验部分

1.1 主要仪器和试剂

Shimadzu RF-540 荧光分光光度计, 紫外分光光度计, PHS 型酸度计, 恒温仪。BSA(第 V 组分, 上海生物制品研究所), HSA(上海生物制品研究所, 纯度 > 98%), 均用缓冲溶液配成 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液。PTB 用双蒸水配成浓度为 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液备用。 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲溶液: 用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris 溶液和 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl 配成 pH 7.4 的缓冲溶液。实验过程中保持 NaCl 浓度为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。实验所用试剂均为分析纯, 水为双蒸水。

1.2 实验方法

取 $1 \text{ mL } 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BSA(或 HSA)储备液, 用缓冲溶液稀释至 100 mL 。分别取 5.0 mL 加入每个试管中, 将 PTB 储备液稀释至不同浓度, 分别取 $20 \mu\text{L}$ 加入各试管中。振荡混匀, 放入恒温水浴箱中, 5 min 后测荧光值。实验设 3 个平行对照管。固定 λ_{ex} 为 340 nm , λ_{em} 从 200 到 300 nm 扫描, 选择最大激发波长为最终激发波长, 即确定 BSA 溶液的 λ_{em} 为 280 nm , HSA 溶液的 λ_{em} 为 290 nm 。分别固定在各自的 λ_{em} , 发射光从 300 到 500 nm 扫描。

收稿日期: 2006-06-02, 修订日期: 2006-09-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(30371757)资助

作者简介: 陈艳华, 女, 1980 年生, 吉林大学药学院硕士研究生 * 通讯联系人 e-mail: liuzy@jlu.edu.cn

2 结果与讨论

2.1 荧光光谱、猝灭机理及形成常数的确定

2.1.1 PTB 对血清白蛋白荧光光谱的影响

固定 BSA(或 HSA) 的浓度, 在其中滴入 PTB 溶液, 随着 PTB 溶液浓度的增加, BSA(HSA) 的内源荧光强度有规律地降低, 但发射峰位及峰型不变。说明 PTB 与白蛋白结合, 因此对 BSA 和 HSA 的荧光有猝灭作用(见图 1)。

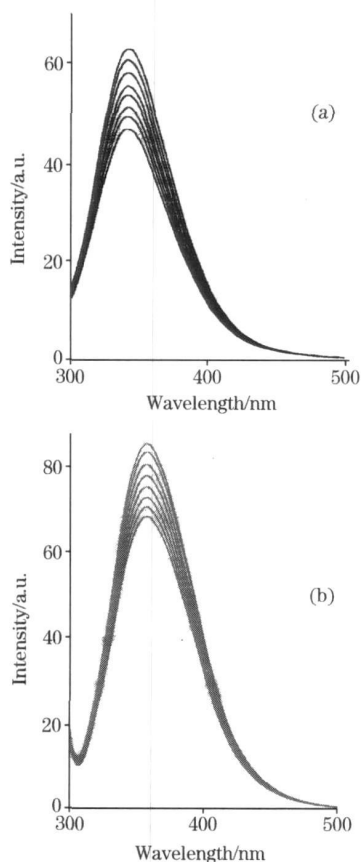


Fig 1 Fluorescence spectra with BSA (a) and HSA (b) of PTB at 15 °C

$$c_{\text{HSA}} = c_{\text{BSA}} = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

(a): c_{PTB} from top to bottom are $0, 12.5 \times 10^{-6}, 25.0 \times 10^{-6}, 37.5 \times 10^{-6}, 50.0 \times 10^{-6}, 62.5 \times 10^{-6}, 75.0 \times 10^{-6}, 87.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;

(b): c_{PTB} from top to bottom are $0, 8.3 \times 10^{-6}, 16.6 \times 10^{-6}, 24.9 \times 10^{-6}, 33.2 \times 10^{-6}, 41.5 \times 10^{-6}, 49.8 \times 10^{-6}, 58.1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

2.1.2 结合常数的计算

药物与蛋白结合反应常用 Stern Volmer 公式^[3]计算:

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

F_0 : 不加药物时的荧光强度。 F : 药物浓度为 $[D]$ 时的荧光强度值。 K_q : 猝灭速率常数。 τ_0 : 无猝灭剂时的分子平均寿命, 其值为 10^{-8} s 。 K_{SV} : Stern Volmer 动态猝灭常数。由上式求得的猝灭常数 $K_q (1 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$ 列于表 1。

Table 1 Quenching constants and Quenching sites of PTB and BSA or HSA at various temperature

serum albumin	15 °C		37 °C	
	$K_q / (1 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	r	$K_q / (1 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	r
BSA	3.66×10^{11}	0.996 3	3.94×10^{11}	0.995 4
HSA	2.99×10^{11}	0.997 9	4.16×10^{11}	0.995 6

由于最大碰撞猝灭速率常数的值为 $2.0 \times 10^{10} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ^[4]。而测得的均大于此值。因此, PTB 与白蛋白的荧光猝灭是静态猝灭, 而非动态猝灭。对于静态猝灭, 设蛋白上有 n 个相同且独立的连接位点, 则



P 是白蛋白, D 是药物分子, D_nP 是新生成的复合物分子。 K_A 是结合常数。

在上式的基础上, 有几种不同的方法计算结合常数和蛋白与药物的结合位点数 n , 见表 2。

方法 1:

$$K_A = [D_nP] / [D_f]^n [P_f] \quad (3)$$

此处, $[D_nP]$ 是新生成复合物的浓度, $[D_f]$ 是游离药物的浓度, $[P_f]$ 是游离白蛋白的浓度, $[P_b]$ 是已与药物连接的蛋白的浓度, 设总蛋白浓度为 $[P_t]$, 则 $[P_t] = [P_b] + [P_f]$, 得到

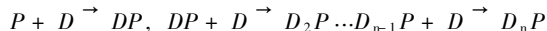
$$K_A = ([P_t] - [P_f]) / [D_f]^n [P_f] \quad (4)$$

在静态猝灭过程中, $[P_f] / [P_t] = F / F_0$ 。带入变形后得

$$\log(F_0 - F) / F = \log K_A + n \log [D_f] \quad (5)$$

由于 $[D_f]$ 在实验中不可知, 则设结合的蛋白浓度足够小, 使 $[D_t] \approx [D_f]$, 则可求出结合常数 K_A 和结合位点数 n 。

方法 2: 对于反应 $P + nD \rightleftharpoons D_nP$, 假设有以下反应:



设结合常数为 $K_{A1}, K_{A2}, \dots, K_{An}$, 则 $K_{A1} K_{A2} \dots K_{An} = [D_nP] / [D_f]^n [P_f]$ 。

假设连接的 n 个位点均相同且独立, 则

$$K_A^n = [D_nP] / [D_f]^n [P_f]$$

将 $[D_t] = [D_f] + [D_nP]$, $[P_t] = [P_f] + [D_nP]$, $[P_f] / [P_t] = F / F_0$ 带入, 可得到

$$K_A^n = [(F_0 - F) / F] [1 / ([D_t] - (F_0 - F)[P_t] / F_0)]^n \quad (6)$$

最终推出:

$$\log(F_0 - F) / F = n \log K_A -$$

$$n \log (1 / ([D_t] - (F_0 - F)[P_t] / F_0))$$

以 $\log(F_0 - F) / F$ 对 $\log(1 / ([D_t] - (F_0 - F)[P_t] / F_0))$ 做函数图, 可得 n 及 K_A 的值。

荧光测定实验中, 保持白蛋白浓度为 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 变换药物 PTB 的总浓度, 记录下数据。图 2 中, (a) 是利用方法 1 得到的以 $\log(F_0 - F) / F$ 对 $\log [D_f]$ 的函数作图; (b) 是利用方法 2 得到的以 $\log(F_0 - F) / F$ 对 $\log(1 / ([D_t] - (F_0 - F)[P_t] / F_0))$ 的函数作图。结合常数 K_A 及结合位点数 n 列在表 2 中进行比较。方法 1 与方法 2 给出的结果相近, 但由于方法 1 有结合的蛋白浓度足够小的设定, 而方法 2 中没有任何假设条件。所以, 由方法 2 推算出的连接常数更加

准确一些^[5,6]。

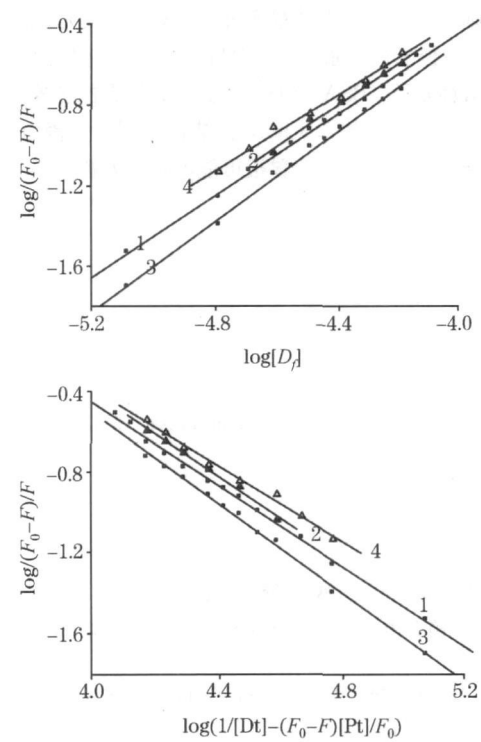


Fig 2 (a) Plot of $\log((F_0 - F)/F)$ vs. $\log[D_f]$; (b) Plot of $\log((F_0 - F)/F)$ vs. $\log(1/([D_t] - (F_0 - F)[P_t]/F_0))$

- 1: Reaction of BSA and PTB at 15 °C;
- 2: Reaction of BSA and PTB at 37 °C;
- 3: Reaction of HSA and PTB at 15 °C
- 4: Reaction of HSA and PTB at 37 °C

Table 2 Binding constants and Binding sites of PTB and BSA or HSA at various temperature

serum albumin	15 °C			37 °C		
	$K_A/(1\text{ mol}^{-1})$	n	r	$K_A/(1\text{ mol}^{-1})$	n	r
BSA	3.66×10^3	1.02	0.997 5	3.58×10^3	0.95	0.998 4
HSA	3.83×10^3	1.16	0.996 9	3.35×10^3	0.87	0.995 5

由表 2 可以看出，由两种方法算出的 37 °C 的结合常数，均小于 15 °C 下的，且温度对 HSA 与药物结合的影响比 BSA 与药物结合的影响更大些。

2.2 作用力类型的确定

热力学参数和药物与蛋白之间有以下关系：

$$\ln K_{A2}/K_{A1} = (1/T_1 - 1/T_2) \Delta H/R,$$
$$\Delta G = -RT \ln K_A = \Delta H - T \Delta S$$

由 BSA 与 PTB 在不同温度下的 K_A 可以算出：

$$\Delta H = -747.11, \Delta G = -1.97 \times 10^4, \Delta S = 65.81$$

由 HSA 与 PTB 在不同温度下的 K_A 算出：

$$\Delta H = -4.53 \times 10^3, \Delta G = -1.97 \times 10^4, \Delta S = 52.67$$

由 $\Delta H < 0, \Delta S > 0$ 可以得出：PTB 与 BSA, HSA 是以电荷作用力结合的^[7]。

2.3 白蛋白与 PTB 作用的结合距离

根据 Förster 偶级偶级非辐射能量转移原理，BSA, HSA 都有较大的荧光，且与 PTB 的吸收光谱有一定重叠。由于 BSA, HSA 中发荧光的主要是色氨酸残基，当 PTB 与色氨酸之间距离足够接近时，色氨酸残基就会将能量传递给 PTB，从而使 BSA, HSA 的荧光值减小。距离越小，能量转移效率越高，BSA、HSA 的荧光被猝灭的越严重^[8]。根据 Förster 原理^[9,10]

$$E = R_0^6 / (R_0^6 \times r_0^6) \tag{8}$$

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} \Phi J \tag{9}$$

$$J = \sum F(\lambda) \epsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta \lambda \sum F(\lambda) \Delta \lambda \tag{10}$$

$$E = 1 - F/F_0 \tag{11}$$

R_0 ：能量转移效率为 50% 时的临界距离， K^2 ：偶级空间取向因子，取 2/3； N ：介质折射指数，取 0.145； Φ ：供能体的荧光量子产率，取 0.118^[9]； J ：供能体的荧光光谱与受能体的吸收光谱间的重叠积分。（图 3）由上式计算出 BSA 与 PTB 的重叠积分 $J = 4.6 \times 10^{-15} \text{ cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ， $E = 0.04$ ， $R_0 = 2.99 \text{ nm}$ ， $r_0 = 7.5 \text{ nm}$ ；HSA 与 PTB 的重叠积分 $J = 4.82 \times 10^{-15} \text{ cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ， $E = 0.03$ ， $R_0 = 3.02 \text{ nm}$ ， $r_0 = 7.9 \text{ nm}$ 。

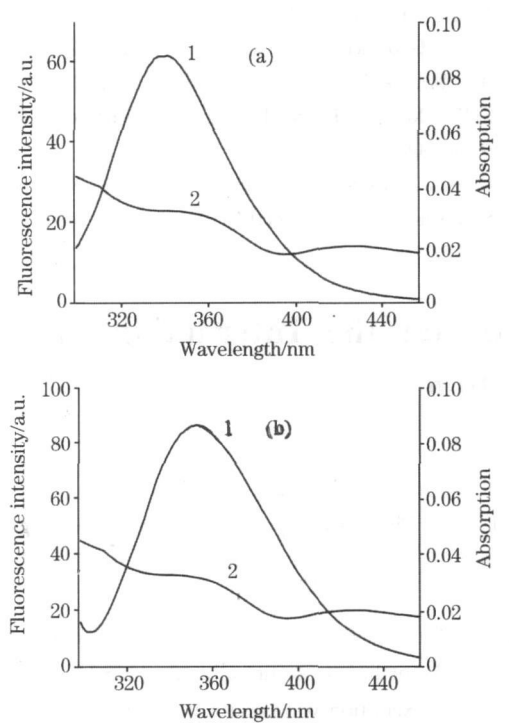


Fig 3 (a) Overlap of the fluorescence spectrum 1 of BSA and the absorption 2 of PTB; (b) Overlap of the fluorescence spectrum 1 of HSA and the absorption 2 of PTB

$$c_{\text{BSA}} = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}; c_{\text{HSA}} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1};$$
$$c_{\text{PTB}} = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

理论上， R_0 在 5 到 10 nm 之间， r_0 在 7 到 10 nm 之间^[10,11]。 R_0 和 r_0 均在理论范围内，且接近理论最大值，这可以证明 PTB 与 BSA, HSA 之间发生了非辐射能量转移，但能量转移效率较低。

3 讨 论

BSA 有两个色氨酸残基, 位于第 135 位和第 214 位, 分别在 I A 和 II A 亚结构域上。HSA 只有一个色氨酸残基在第 214 位, 根据 HSA 和 BSA 与 PTB 作用的光谱相似, 可推断 PTB 与白蛋白结合的位点是 II A 亚结构域, 靠近 Trp214 的区域^[12,13]。Burststein 等认为 BSA 最大荧光发射峰位对环境

很敏感, 在疏水环境中其最大峰位约为 332 nm, 完全暴露在水相中则为 352 nm。从本实验的 BSA 最大荧光发射峰位来说, 色氨酸位于疏水腔中^[8]。PTB 的分子结构既有亲水性, 又有脂溶性基团。BSA 和 HSA 与 PTB 结合的位置距色氨酸的距离分别为 7.5 和 7.9 nm, 且结合作用力为静电作用力。因此判断, PTB 结合的位置很可能不在疏水腔的内部, 而在附近。

参 考 文 献

- [1] Vlassara H, et al. *Clinical Chem.*, 1986, 32: B37.
- [2] Sara Vasan, et al. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2003, 419: 89.
- [3] Dewey T G(ED). *Biophysical and Biochemical Aspects of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Plenum Press, 1991. 1.
- [4] Ware W R. J. *Phys. Chem.*, 1962, 66: 455.
- [5] Bi S Y, et al. *Spectrochimica Acta, Part A*, 2005, 61(4): 629.
- [6] Bi S Y, et al. *Journal of Molecular Structure*, 2004, 703(1-3): 37.
- [7] Ross D P, Sabramanian S. *Biochemistry*, 1981, 20: 3096.
- [8] NIE Li hua, et al(聂丽华, 等). *J. Beijing Nor. Univ. (Nat. Sci.)* (北京师范大学学报·自然科学版), 2001, 37(1): 87.
- [9] XIAO Hou rong, SHENG Liang quan, SHI Chun hua, et al(肖厚荣, 盛良全, 施春华, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis*(光谱学与光谱分析), 2004, 24(1): 78.
- [10] CHEN Guo zhen, HUANG Xian zi, ZHENG Zhu zi, et al(陈国珍, 黄贤梓, 郑朱梓, 等). *Fluorescent Analysis*, 2nd ed. (荧光分析法·第2版). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1990. 123.
- [11] CHEN Xiao bo, KANG Dong guo, LI Song, et al(陈小波, 康栋国, 李 崧, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis*(光谱学与光谱分析), 2006, 26(4): 674.
- [12] Bi S Y, et al. *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2005, 61: 203.
- [13] SHI Yan, YE Fan di, ZHENG Wei wan(石 燕, 叶反帝, 郑为完). *Spectroscopy and Spectral Analysis*(光谱学与光谱分析), 2006, 26(7): 1314.

Study on the Interaction of PTB and Serum Albumin by Fluorescence Method

CHEN Yarr hua¹, BU Feng quan¹, HU Xir li¹, LIU Zhè qiang², LIU Zhong ying^{1*}, LIU Jing ying¹, ZHOU Qir li¹

1. College of Pharmacology, Jilin University, Changchun 130021, China

2. New Drug R&D Division, Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China

Abstract A molecular spectroscopic investigation of the interaction of phenacyl thiazolium bromide (PTB) and bovine serum albumin (BSA) or human serum albumin (HSA) is reported employing fluorescence quenching techniques. It is determined that the maximal excitation wavelength is 280 nm for BSA solution, and 290 nm for HAS solution. When PTB was added into these solutions gradually, the emission peaks were decreased obviously, which are typical quenching phenomena. The results obtained reveal that there is a medium intensity binding affinity for PTB with HSA and BSA. At 15 °C, the binding constants of PTB and BSA(HSA) are 3.66×10^3 and 3.83×10^3 , and the numbers of binding sites are 1.02 and 1.06 respectively. At 37 °C, the binding constants of PTB and BSA(HSA) are 3.58×10^3 and 3.35×10^3 , and the numbers of binding sites are 0.95 and 0.87 respectively. According to the thermodynamic parameters, the main sort of the binding force between the drug and BSA or HSA was electrostatic force. Based on the Förster non-radiation energy transfer theory, it could be acquired that the distance between BSA or HSA and PTB is 7.5 or 7.9 nm. According to the crystal structure of serum albumin, it can be speculated that subdomain II A was the binding sites for the interaction of PTB and serum albumin, which is the region near Try214.

Keywords Phenacyl thiazolium bromide; Serum albumin; Spectrofluorimetry

* Corresponding author

(Received Jun. 2, 2006; accepted Sep. 28, 2006)