

荧光法研究咖啡因和茶碱与牛血清白蛋白相互作用

卞伟¹, 卫艳丽², 王亚萍², 董川²

1. 山西医科大学, 山西 太原 030001
2. 山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006

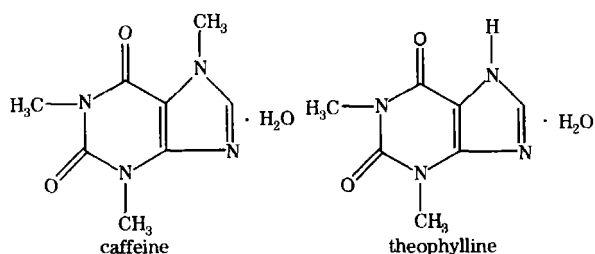
摘要 用荧光光谱法研究了咖啡因和茶碱两种生物碱药物与牛血清白蛋白(BSA)分子间的相互结合反应。测定了咖啡因和茶碱与BSA反应的结合平衡常数分别为: $1.673 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, $6.802 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。证实了两种生物碱药物与牛血清白蛋白的相互结合作用为单一的静态猝灭过程。

主题词 咖啡因; 茶碱; 牛血清白蛋白; 荧光光谱

中图分类号: O657.3 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2006)03-0505-04

引言

药物进入人体要通过血浆的储存与运输达到身体部位产生药效。血清白蛋白是血浆中含量最丰富的载体蛋白,它可以作为许多内源性和外源性化合物存储与转运的蛋白。因此研究药物分子与血清白蛋白的相互作用具有重要意义^[1-3]。咖啡因(Caffeine)和茶碱(Theophylline)是重要的天然甲基黄嘌呤类生物碱,在化学结构上咖啡因比茶碱多一个甲基,它们具有兴奋中枢神经系统和心脏、舒张血管、松弛平滑肌和利尿等重要的药理功能^[4](结构见 Scheme 1)。



Scheme 1 Structure of caffeine and theophylline

本文利用光谱法初步探讨了咖啡因和茶碱这两种药物分子对BSA的荧光猝灭机理以及它们与BSA的结合方式。对探讨甲基黄嘌呤类药物作用机理提供了可参考的实验数据和理论依据。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

日立F-4500型荧光分光光度计。pH 7.26的 $\text{H}_3\text{BO}_3\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-HAC}$ 三酸缓冲液;实验试剂均为分析纯;实验用水为石英亚沸蒸馏水。

1.2 实验方法

咖啡因、茶碱(SIGMA公司)于100℃下烘烤1h,用亚沸蒸馏水配制成 $1.00 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液;牛血清白蛋白(生化试剂,上海丽珠东风生物技术有限公司出品),纯度>98%,分子量68000,用亚沸蒸馏水配制 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液,置于1~4℃冰箱中保存。

移取0.4 mL BSA储备液,依次加入系列间隔为1.5 mL的浓度为 $1.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的咖啡因(茶碱)溶液,用缓冲溶液定容至刻度,混合均匀后,在室温下作用10 min。以288 nm为激发波长,在F-4500型荧光分光光度计上记录300~430 nm波长范围内的发射光谱。

在10 mL比色管中依次加入一定量的BSA溶液和咖啡因溶液(茶碱溶液),以缓冲溶液稀释至刻度,混合均匀后,在室温下作用10 min。分别以 $\lambda = 15 \text{ nm}$ (激发和发射狭缝为5.0/2.5 nm)和 $\lambda = 60 \text{ nm}$ (激发和发射狭缝为2.5/2.5 nm),绘制BSA的同步荧光光谱。

收稿日期: 2005-04-21, 修订日期: 2005-11-08

基金项目: 国家自然科学基金(20275022)资助项目

作者简介: 卞伟,女,1972年生,山西医科大学基础医学院讲师,理学硕士

2 结果与讨论

2.1 咖啡因和茶碱与牛血清白蛋白的相互作用

牛血清白蛋白中的色氨酸、酪氨酸残基使其具有内源荧光 ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 228/345 \text{ nm}$)。由图 1 和图 2 的结果可以看出, 随着两种生物碱药物浓度增加, BSA 内源荧光强度有规律地降低, 且峰位及峰型基本不变, 说明咖啡因和茶碱与白蛋白有结合作用。

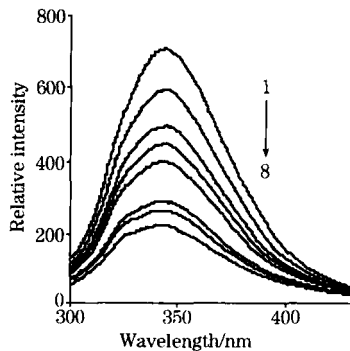


Fig 1 The effect of caffeine on fluorescence of BSA

$\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 228 \text{ nm}/347 \text{ nm}$; $c(\text{BSA}) = 6.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;
 $c_c / (10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$: 1, 0; 2, 1.5; 3, 3.0; 4, 4.5; 5, 6.0; 6, 7.5; 7, 9.0; 8, 10.5 (c_c 代表咖啡因的浓度)

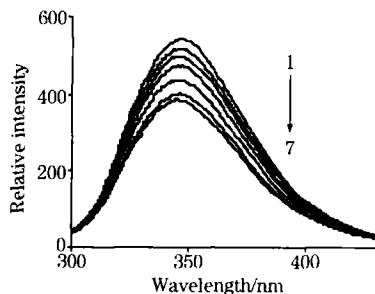


Fig 2 The effect of theophylline on fluorescence of BSA

$\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 228 \text{ nm}/347 \text{ nm}$; $c(\text{BSA}) = 6.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;
 $c_t / (10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$: 1, 0; 2, 1.5; 3, 3.0; 4, 4.5; 5, 6.0; 6, 7.5; 7, 9.0 (c_t 代表茶碱的浓度)

引起 BSA 荧光猝灭的原因有动态和(或)静态猝灭, 动态猝灭是一种电子或能量转移过程, 不会影响蛋白质的二级结构和生理活性。而静态猝灭是因为生成了配合作用, 通常是产生了不发荧光的配合物, 对蛋白质的二级结构和生理活性产生影响。荧光猝灭符合下式^[4]:

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

式中, F_0 是猝灭剂不存在时的荧光强度, F 为加入猝灭剂后的荧光强度, K 为猝灭过程速率常数, $[Q]$ 为猝灭剂浓度。

据图 1 和图 2 的实验数据, 以荧光分子的荧光强度变化 F_0/F 对药物猝灭剂浓度 $[Q]$ 作图为直线关系, 直线的斜率代表荧光猝灭过程速率常数 K 。BSA 的荧光强度 F_0/F 随猝灭剂药物浓度变化的 Stern-Volmer 曲线方程分别为: $F_0/F = 2.58 \times 10^4 [Q_c] + 1.0053$, $r = 0.997$ (咖啡因); $F_0/F = 1.56$

$\times 10^4 [Q_t] + 1.038$, $r = 0.999$ (茶碱)。随着它们浓度的增加, F_0/F 逐渐增大, 且二者呈良好线性关系, 荧光猝灭速率常数分别为: $K_c = 2.58 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, $K_t = 1.56 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。生物大分子的最大动态猝灭过程的速率常数 $K < 100 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。而实验所得猝灭过程的速率常数较动态猝灭过程的速率常数大两个数量级, 所以猝灭不是由于两种物质对 BSA 碰撞引起的动态猝灭, 而是由于咖啡因和茶碱与 BSA 形成了配合物引起的静态猝灭。

2.2 求算两种生物碱药物与 BSA 的平衡常数和结合位点

对于因猝灭剂与荧光分子之间的结合引起的静态猝灭, 荧光强度与猝灭剂浓度的关系可由荧光分子与猝灭剂的结合常数表达式推导出^[5]。

设生物大分子 B 有 n 个相同且独立的结合位点, 则与两种生物碱间的配合反应表示为



平衡常数 K_0 为

$$K_0 = [Q_nB] / [Q]^n [B] \quad (3)$$

式中 $[B]$ 是游离荧光体浓度, $[Q]$ 是猝灭剂浓度, $[Q_nB]$ 是配合物浓度。若荧光体总浓度为 $[B_0]$, 则 $[B_0] = [B] + [Q_nB]$, 当 $[Q] \gg [B_0]$ 时, 以猝灭剂的起始浓度代替其平衡浓度,

$$K_0 = ([B_0] - [B]) / [Q]^n [B] \quad (4)$$

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

$$[B] / [B_0] = F / F_0 \quad (5)$$

由(4)和(5)式, 可得

$$\lg((F_0 - F) / F) = \lg K_0 + n \lg [Q] \quad (6)$$

实验中测得未加蛋白质时咖啡因和茶碱空白溶液的荧光强度很小, 对牛血清白蛋白在其最大发射波长处的荧光强度

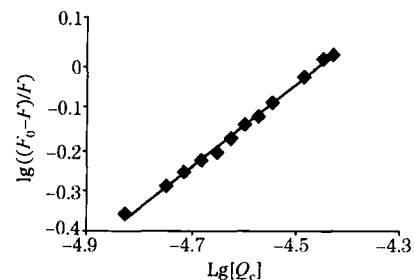


Fig 3 Plots of $\lg((F_0 - F) / F)$ vs $\lg[Q_c]$

$c_{\text{BSA}} = 6.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

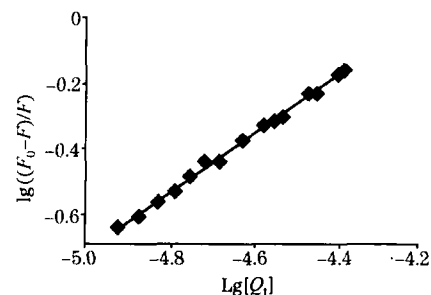


Fig 4 Plots of $\lg((F_0 - F) / F)$ vs $\lg[Q_t]$

$c_{\text{BSA}} = 6.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

影响可忽略不计。方程实验所用猝灭剂浓度最小的为 BSA 浓度的 2.5 倍, 而最大的为 71.7 倍。以猝灭剂的起始浓度代替其平衡浓度进行计算是合理的。按(6)式处理图 1 和图 2 数据并作图 3 和图 4, 得到线性方程: $\lg((F_0 - F)/F) = 0.9519 \lg[Q_c] + 4.2236$, $r = 0.9988$ (咖啡因); $\lg((F_0 - F)/F) = 0.9519 \lg[Q_t] + 3.8327$, $r = 0.9990$ (茶碱)。由直线的截距计算得平衡常数 $K_c = 1.673 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 及 $K_t = 6.802 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。咖啡因与 BSA 的结合数 $n = 1$, 茶碱与 BSA 的结合数 $n = 1$, 说明每一个咖啡因分子(或茶碱分子)与一个蛋白质分子结合形成配合物。

示蛋白质色氨酸残基的荧光。因残基的最大激发波长与其所处的环境有关, 随其所处环境疏水性逐渐降低, 其最大发射波长发生改变。所以由发射波长改变可以判断蛋白质构象发生了变化^[6]。固定 BSA 的浓度, 逐渐增加两种生物碱药物的浓度, 分别以 $\lambda_{ex} = 15 \text{ nm}$ 和 $\lambda_{ex} = 60 \text{ nm}$ 绘制 BSA 的同步荧光光谱。图 5(a)、图 6(a)和图 5(b)、图 6(b)分别为酪氨酸和色氨酸残基的荧光光谱, 可以看出在此实验条件下随着两种药物浓度的增加, 色氨酸和酪氨酸的最大发射峰波长蓝移, 表明 BSA 所处环境的疏水性增加, 两种生物碱药物的加入引起了 BSA 构象的变化。

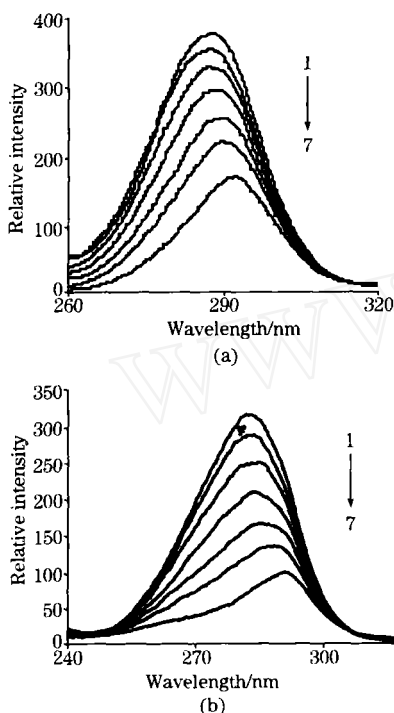


Fig 5 Effect of caffeine concentration on the configuration of BSA

$c_c / (10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$: 1, 0; 2, 1.5; 3, 3.0; 4, 4.5; 5, 6.0; 6, 7.5; 7, 9.0
 $c_{BSA} = 6.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$
 (a), $\lambda_{ex} = 15 \text{ nm}$, slit(ex) and slit(em) were 5.0/2.5 nm;
 (b), $\lambda_{ex} = 60 \text{ nm}$, slit(ex) and slit(em) were 2.5/2.5 nm

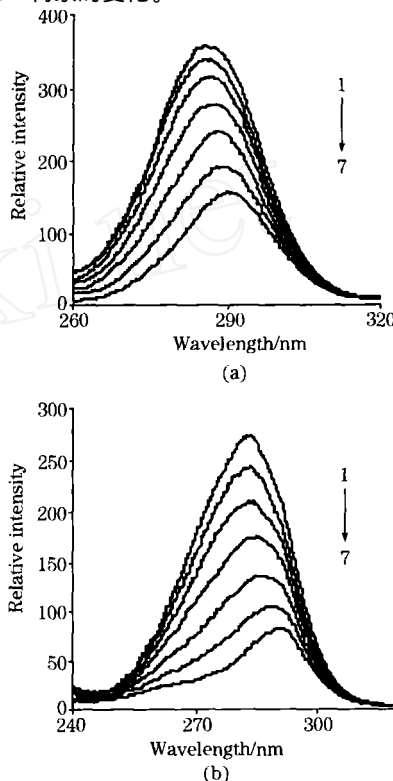


Fig 6 Effect of theophylline concentration on the configuration of BSA

$c_t / (10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$: 1, 0; 2, 1.5; 3, 3.0; 4, 4.5; 5, 6.0; 6, 7.5; 7, 9.0
 $c_{BSA} = 6.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$
 (a), $\lambda_{ex} = 15 \text{ nm}$, slit(ex) and slit(em) were 5.0/2.5 nm;
 (b), $\lambda_{ex} = 60 \text{ nm}$, slit(ex) and slit(em) were 2.5/2.5 nm

2.3 两种生物碱对 BSA 构象的影响

固定激发波长与发射波长间的间距, 同步扫描激发和发射单色仪就得同步荧光光谱。这种光谱法已用于蛋白质构象变化的分析, 由 $\lambda_{ex} = 15 \text{ nm}$ 所得的同步荧光只显示蛋白质酪氨酸残基的光谱特征, $\lambda_{ex} = 60 \text{ nm}$ 所得的同步荧光只显

综上所述, 咖啡因和茶碱与 BSA 均发生了结合反应, 形成了弱的荧光发光体使 BSA 荧光猝灭。咖啡因在结构上比茶碱多一个甲基, 由于这种结构上的差异使得咖啡因与 BSA 的结合作用比茶碱与 BSA 的结合作用大。

参 考 文 献

- [1] YI Ping-gui, YU Qing-sen, SHANG Zhi-cai, et al(易平贵, 俞庆森, 商志才, 等). Acta Pharmaceutica Sinica(药学学报), 2000, 35: 774.
- [2] YI Ping-gui, LIU Jun-feng, SHANG Zhi-cai, YU Qing-sen(易平贵, 刘俊峰, 商志才, 俞庆森). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2001, 21(6): 826.
- [3] LIU Yong-ming, LI Gui-zhi(刘永明, 李桂芝). Chinese Journal of Applied Chemistry(应用化学), 2004, 21(6): 621.
- [4] LI Bing-yang, TONG Lu, ZOU Ben-tian(李炳阳, 童路, 邹本田). Acta Pharmaceutica Sinica(药学学报), 1985, 20(5): 398.
- [5] FENG Xi-zeng, JIN Rui-xiang, QU Yun, HE Xi-wen(冯喜增, 金瑞祥, 曲芸, 何锡文). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报), 1996, 17(6): 866.
- [6] Brustein E A, Vedenkina N S, Irkova M N. Photochem. Photobiol., 1973, 18: 263.

Study on Interaction of Caffeine and Theophylline with Bovine Serum Albumins

BIAN Wei¹, WEI Yan-li², WANG Ya-ping², DONG Chuan²

1. Medical University of Shanxi, Taiyuan 030001, China

2. Chemistry and Chemical Engineering College, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract The interaction of caffeine and theophylline with bovine serum albumins has been studied by fluorescence spectroscopy. The results indicated that enoxacin could bind with BSA strongly at molar ratio 1:1 and the equilibrium constants were $K_c = 1.673 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ and $K_i = 6.802 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, respectively. Good linear Stern-Volmer lines were observed on the fluorescence of BSA quenched by enoxacin of different concentration, indicating that the combination reaction of enoxacin with BSA is a single static quenching process.

Keywords Caffeine; Theophylline; Bovine serum albumin; Fluorescence spectroscopy

(Received Apr. 26, 2005; accepted Nov. 8, 2005)