

## 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

卢继新

(天津医科大学药理学系 天津 300203)

张贵珠\* 赵 鹏 何锡文 史慧明

(南开大学化学系 天津 300071)

**摘要** 本文用荧光光度法,分光光度法研究了抗癌药物阿霉素(Adriamycin)与微量金属离子、牛血清白蛋白(BSA)、人血清白蛋白(HSA)的相互作用,求得药物与白蛋白的形成常数、与金属离子的结合比和形成常数,讨论了某些金属离子对药物与白蛋白形成常数的影响。

**关键词** 阿霉素,牛血清白蛋白,人血清白蛋白,荧光猝灭,分光光度法

血清白蛋白是血浆中含量最丰富的重要载体蛋白,它能和许多内源性和外源性物质广泛结合<sup>[1]</sup>生物体内还存在着多种微量元素和宏量元素,它们也参与许多重要的生命过程.因此研究药物与血清白蛋白、金属离子的相互作用具有重要意义<sup>[2]</sup>.阿霉素(ADM)是临床广泛使用的具有高效抗癌活性的蒽环抗菌素,本品直接与DNA结合,使双螺旋链分开,改变DNA模板性质,阻止形成DNA嘌呤与DNA依赖型RNA聚合酶,同时阻止了DNA和RNA合成,使癌细胞不能分裂增生<sup>[3]</sup>.它们与白蛋白及金属离子间的相互作用尚未见报道.

本文在生理条件下详细研究了阿霉素与牛血清白蛋白(BSA)、人血清白蛋白(HSA)与金属离子的作用,并用荧光猝灭法求得药物与蛋白配合物的形成常数,并根据热力学参数确定了它们之间的主要作用力类型.进一步用分光光度法测定了药物与多种金属离子的结合比和形成常数,对于金属离子对阿霉素药效的影响获得了一些有价值的信息,为以后药物合成、临床应用药提供了有益参考.

## 1 实验

### 1.1 试剂和仪器

1.1.1 试剂  $1.00 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  BSA溶液;  $5.80 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  HSA溶液;  $3.45 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  阿霉素溶液;  $5.00 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  金属离子标准溶液;用  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  的 Tris(三羟甲基氨基甲烷)溶液与HCl溶液配置  $\text{pH} = 7.4$  的缓冲溶液;实验中NaCl浓度均保持在  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,用以维持离子强度.其他试剂均为分析纯,试验用水为去离子双蒸水.

1.1.2 仪器 日本岛津 UV-240 型分光光度计,日本岛津 RF-510 型荧光光度计,德国

MY-870 型 pH 计.

## 1.2 实验方法

两只 10mL 具塞试管中分别依次加入一定体积的 Tris-HCl 缓冲溶液,  $0.5\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}\text{NaCl}$  溶液, BSA(HSA 溶液)溶液, 用水稀释至 10mL 摇匀, 固定激发波长为  $284\text{nm}^{[4]}$ , 发射波长为  $280\sim 520\text{nm}$  扫描 BSA 和 HSA 的荧光光谱.

在 10mL 比色管中加入一定量的金属离子溶液, Tris-HCl 缓冲溶液, 阿霉素溶液, 用生理盐水稀释至 5.00mL, 以试剂为空白, 用 1cm 吸收池于  $700\sim 400\text{nm}$  波长范围测定阿霉素金属离子相互作用的吸收光谱.

## 2 结果与讨论

### 2.1 阿霉素与金属离子的相互作用

阿霉素是具有蒽环的抗癌药物, 其结构为:

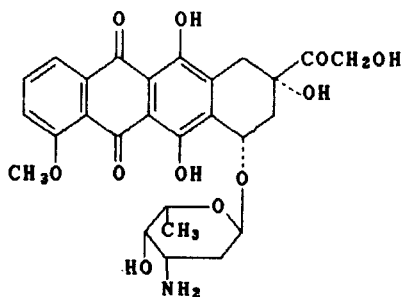


图 1 阿霉素结构式

它具有能与金属离子作用的结合基, 推测可以和金属离子形成配合物. 我们研究了八种金属离子  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Eu}^{2+}$ ,  $\text{Yb}^{3+}$ ,  $\text{Nd}^{3+}$  与阿霉素的作用, 实验表明, 在  $\text{pH}=7.25$  条件下, 阿霉素与上述离子均能形成配合物, 其光谱如图 2 所示, 光谱性质见表 1.

表 1 阿霉素与金属离子配合物吸收光谱的特征及有关参数

配合物	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	$\Delta\lambda/\text{nm}$	$10^{-4}\epsilon$	形成常数	结合比 (ADR:Me)
ADR-Mg	495	15	0.808	$6.20\times 10^{11}$	2:1
ADR-Zn	495	15	0.728	$5.41\times 10^{11}$	2:1
ADR-Fe	603	123	1.32	—	3:1
ADR-Cu	567	87	0.624	$5.57\times 10^9$	2:1
ADR-Ni	568	88	1.66	$5.26\times 10^{13}$	3:1
ADR-Eu	554	74	1.70	$1.41\times 10^{13}$	3:1
ADR-Nd	550	70	2.07	—	3:1
ADR-Yb	582	102	2.71	$2.10\times 10^{13}$	3:1

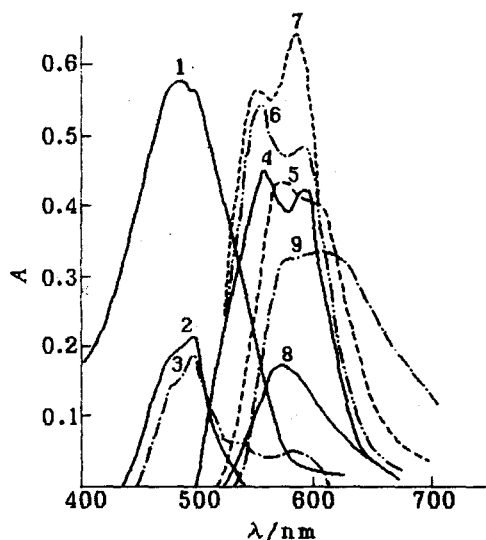


图2 阿霉素与金属离子配合物的吸收光谱

1—ADR; 2—ADR—Mg; 3—ADR—Zn; 4—ADR—Eu; 5—ADR—Ni;  
6—ADR—Nd; 7—ADR—Yb; 8—ADR—Cu; 9—ADR—Fe

$c_{Me} = 2.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $c_{ADR} = 1.1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7.25$ ,  $1 \text{ cm}$  吸收池

## 2.2 阿霉素与金属离子反应的化学计量

采用摩尔比法和连续变化法作为对照,测定了阿霉素与几种金属离子反应的化学计量,发现金属离子不同可分别形成 2:1 和 3:1 的配合物,其具体数据见表 1.

## 2.3 阿霉素与 BSA, HSA 结合常数的求取

蛋白质中色氨酸、酪氨酸的存在,使其具有内源荧光. 固定 BSA(HSA) 的量,在其中不断滴加阿霉素,随着阿霉素浓度的增加,BSA(HSA) 的内源荧光强度有规律地降低(发射峰峰位及峰形不变),如图 3 所示,说明阿霉素对 BSA, HSA 的荧光有猝灭现象.

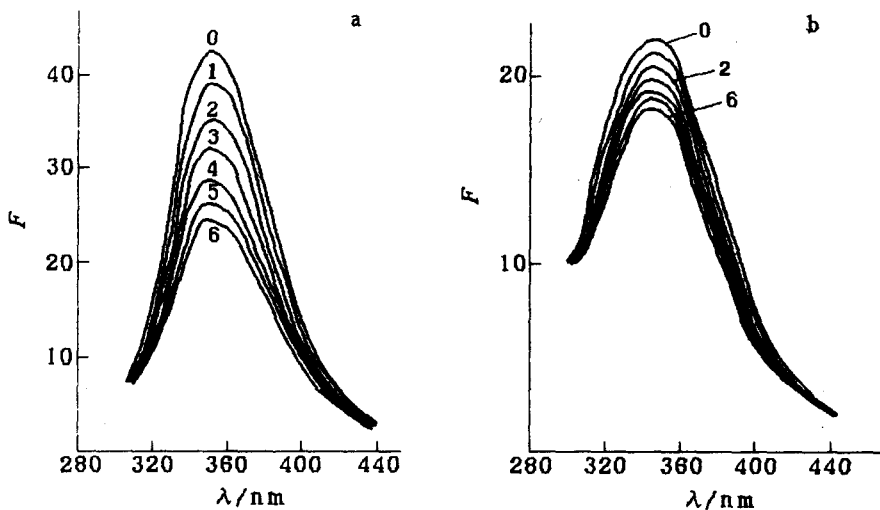


图3 阿霉素对 BSA(a)和 HSA(b)的荧光光谱的影响

a, b:  $\lambda = 284 \text{ nm}$ ,  $c_{BSA} = c_{HSA} = 2.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $c_{ADM} (\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3})$ : 0—未加 ADM; 1— $4.0 \times 10^{-7}$ ;  
2— $1.0 \times 10^{-6}$ , 3— $2.0 \times 10^{-6}$ ; 4— $4.0 \times 10^{-6}$ ; 5— $6.0 \times 10^{-6}$ ; 6— $8.0 \times 10^{-6}$

在不同温度下作出蛋白质猝灭的 Stern-Volmer 和 Lineweaver-Burk 图<sup>[5]</sup>(图 4, 图 5)。

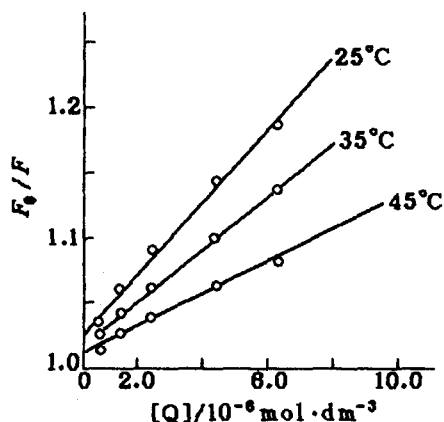


图 4 阿霉素对 HSA 猝灭的 Stern-Volmer 图

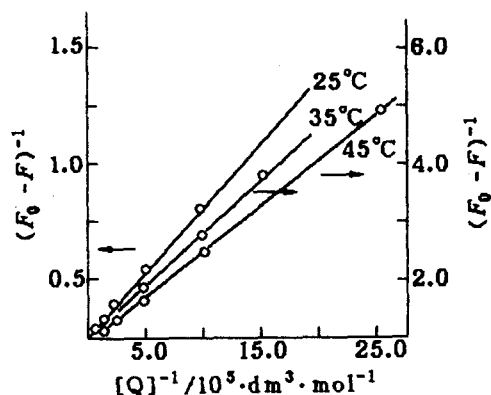


图 5 阿霉素对 HSA 猝灭的 Lineweaver-Burk 图

可以看出,曲线有良好的线性关系,其相关系数在 25℃, 35℃, 45℃ 时 BAS 为 0.9989, 0.9980, 0.9920; HSA 为 0.9824, 0.9920, 0.9906. 还可以看出,随温度升高,BSA 及 HSA 的猝灭曲线斜率均降低,在 25℃, 35℃, 45℃ 时 BSA 的斜率为 84998, 82965, 81045; HSA 的斜率为 20433, 18342, 14670, 故初步证明,此过程为静态猝灭. 为进一步证实其猝灭过程,把此过程按动态过程处理,猝灭过程为;

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q]$$

$K_q$  为双分子猝灭过程速率常数,  $K_{sv}$  为动态猝灭常数,  $\tau_0$  为猝灭体不存在时荧光分子平均寿命,  $[Q]$  为猝灭剂浓度. 而  $K_{SV} = K_q \tau_0$ ,  $K_q = K_{SV} / \tau_0$ , 由于生物大分子荧光寿命约为  $10^{-8}$ <sup>[6]</sup>, 故可由猝灭曲线斜率求得猝灭常数, 见表 2.

表 2 猝灭速率常数 ( $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )

温度	BSA		HSA	
	$K_q$	$r$	$K_q$	$r$
25℃	$8.499 \times 10^{11}$	0.9989	$2.043 \times 10^{11}$	0.9824
35℃	$8.125 \times 10^{11}$	0.9980	$1.670 \times 10^{11}$	0.9920
45℃	$8.105 \times 10^{11}$	0.9920	$1.467 \times 10^{11}$	0.9906

而各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞猝灭常数为  $2.0 \times 10^{10} \text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ <sup>[7]</sup>, 显然阿霉素对蛋白质荧光猝灭过程速率常数远远大于扩散控制的  $K_q$ , 所以进一步证实以上猝灭不是由于动态碰撞引起的, 而是形成了化合物而引起了静态猝灭. 故用静态猝灭公式<sup>[5]</sup>

$$(F_0 - F) - 1 = F_0 - 1 + K_D F - 1 [Q] - 1$$

作双倒数图(图 5), 由直线斜率求得阿霉素与 BSA, HSA 的形成常数  $K_A$  ( $K_A = 1/K_D$ ) 见表 3.

表 3 阿霉素与 BSA, HSA 的形成常数 ( $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ )

温度	BSA		HSA	
	$K_A$	$r$	$K_A$	$r$
25℃	$2.331 \times 10^5$	0.9992	$8.078 \times 10^4$	0.9920
35℃	$2.340 \times 10^5$	0.9940	$5.920 \times 10^4$	0.9990
45℃	$2.355 \times 10^5$	0.9973	$3.599 \times 10^4$	0.9976

可以看出,温度对阿霉素与 HSA 的结合常数略有影响,而对 HSA 无影响,说明阿霉素对 BSA 与 HSA 都有较强的结合力,可以在体内被蛋白所储存、转运.

## 2.4 共存金属离子对药物与蛋白形成常数的影响

如前所述,金属离子与阿霉素药物有强的结合力,金属离子与蛋白质也有一定的结合力<sup>[8]</sup>,金属离子的存在会直接影响药物与蛋白质的结合,为进一步探讨金属离子存在时,对药物与蛋白结合力的影响,测定了多种金属离子存在下,药物与 HSA 的形成常数,结果见表 4.

表 4 金属离子存在条件下的形成常数( $K_A'$ )  
( $25^\circ\text{C}$ ,  $c_{\text{Me}} = 2.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ )

$\text{Me}^{n+}$	$k_A'$	$r$	$k_A'/k_A$
$\text{Zn}^{2+}$	$3.779 \times 10^4$	0.9966	0.4678
$\text{Mg}^{2+}$	$4.296 \times 10^4$	0.9980	0.5318
$\text{Cu}^{2+}$	$1.063 \times 10^5$	0.9978	1.3160
$\text{Fe}^{3+}$	$4.826 \times 10^4$	0.9969	0.5975
$\text{Ni}^{2+}$	$7.692 \times 10^4$	0.9940	0.9523

金属离子与药物竞争的结果,减小了 HSA 与药物的结合常数,一般减小 46~60%. 这样便减小了药物与蛋白的结合力,缩短了药物在血浆中的储留时间,增加了药物的最大作用强度. 这对希望短期提高药效的临床治疗是有效的. 仅铜离子有些例外,它使 HSA 与药物的形成常数增强,这可能因为  $\text{Cu}^{2+}$  与药物的形成常数小(见表 4)有关.

## 2.5 药物与 HSA, BSA 作用力的确定

药物与生物大分子的作用力包括氢键、范德华力、静电引力、疏水作用力等. 药物不同,与蛋白质作用力类型也不同. 当温度变化不大时,反应的焓变  $\Delta H$  可以看作一个常数,由式

$$\ln(k_2/k_1) = (1/T_1 - 1/T_2)\Delta H/R$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \Delta G = -RT\ln K$$

可以求得  $\Delta H$ ,  $\Delta G$ ,  $\Delta S$  ( $\Delta G$  为自由能,  $\Delta S$  为熵变). 结果表明阿霉素与 BSA, HSA 结合反应的  $\Delta H(\text{kJ})$  为  $-3.054 \times 10^4$  和  $3.87 \times 10^2$ ; 其  $\Delta S(\text{J})$  为  $-1.32 \times 10^2$  和  $1.04 \times 10^2$ . 可以看出,对于 BSA,  $\Delta H > 0$ ,  $\Delta S > 0$ ; 对于 HSA,  $\Delta H < 0$ ,  $\Delta S < 0$ . 故认为阿霉素与 BSA 之间的作用力主要为疏水作用力,阿霉素与 HSA 之间的作用力为范德华力<sup>[9]</sup>.

## 参考文献

- 1 杨频,“生物无机化学导论”,西安交通大学出版社,西安,1991.
- 2 韩国柱,刘云海,生理科学进展,1987,18,241.
- 3 原正平,王汝龙,“化工产品手册(药物)”,化学工业出版社,北京,1987,第 207 页.
- 4 宓怀风,“生物化学”,南开大学出版社,天津,1990,57.
- 5 杨曼曼,杨频,张立伟,科学通报,1994,39,31.
- 6 J. R. Lakowicz, G. Weber, Biochemistry, 1973, 12, 4161.
- 7 W. R. Ware, J. Phys. Chem., 1962, 66, 455.
- 8 B. Sarkar, “Metal Ions In Biological Systems” Marcel Dekker, New York, 1981, 233.
- 9 D. Philip. Ross, S. Sabramanian, Biochemistry, 1981, 20, 3096.

## Studies on Interaction between Adriamycin and Serum Albumin as well as Effect of Ions on the Reaction

LU Jin - Xin

(*Department of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin, 300203*)

ZHANG Gui - Zhu\*      ZHAO Peng      HE Xi - Wen      SHI Hui - Ming

(*Department of Chemistry, Nankai University, Tianjin, 300071*)

**Abstract** The interactions between adriamycin, various trace metal ions and HSA or BSA have been studied using spectrophotometry and fluorescence spectrophotometry. The formation constant of adriamycin to BSA or HSA, the binding ratio and formation constant of adriamycin to ions were obtained. Effect of various ions on the formation constant of adriamycin to HSA was also studied.