

阿霉素与牛血清白蛋白结合作用的研究

黄 波^a 邹国林^{* , a} 杨天鸣^b

(^a 武汉大学生命科学院 武汉 430072)

(^b 中南民族大学化学系 武汉 430074)

摘要 结合荧光光谱和吸收光谱研究了阿霉素与牛血清白蛋白间的结合作用,确定了阿霉素对牛血清白蛋白的荧光猝灭过程的猝灭机理.测定了不同酸度条件下该结合反应的结合常数、结合位点数.依据能量转移理论确定了药物和蛋白间的结合距离.通过比较阿霉素和去糖基阿霉素与牛血清白蛋白的相互作用,结合阿霉素对蛋白构象的影响,讨论了药物与蛋白的结合模式.

关键词 阿霉素,去糖基阿霉素,牛血清白蛋白,荧光法,分光光度法

Studies on the Interaction between Adriamycin and Bovine Serum Albumin

HUANG, Bo^a ZOU, Guo-Lin^{* , a} YANG, Tian-Ming^b

(^a College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072)

(^b Department of Chemistry, South Central University of Nationalities, Wuhan 430074)

Abstract The binding reaction between adriamycin (ADR) and bovine serum albumin (BSA) was investigated by absorption spectrometry and fluorescence measurement. It is proved that the fluorescence quenching of BSA by ADR is a result of the formation of ADR-BSA complex. The equilibrium constant K and the number of binding sites n were measured at different pH by fluorescence quenching method. The binding distance r and transfer efficiency E between ADR and BSA were also obtained according to Förster theory of non-radiation energy transfer. The effect of ADR on the conformation of BSA was also analyzed using synchronous fluorescence spectroscopy. By studying the binding of 7-deoxyadriamycinone to BSA, the binding mode between ADR and BSA was discussed.

Key words adriamycin, 7-deoxyadriamycinone, bovine serum albumin, fluorescence, spectrophotometry

阿霉素(Adriamycin, 简称 ADR)是临床广泛使用的蒽环类抗癌抗生素,对白血病、乳腺癌及多种固体肉瘤都有显著疗效^[1].该药物可直接与 DNA 结合,阻碍 DNA 的复制,使癌细胞的生长受到抑制^[2];也可通过介导活性氧自由基的生成来损伤 DNA 等生物大分子,从而杀伤癌细胞^[3, 4].血清白蛋白是血浆中最为丰富的蛋白质,它能与许多内源及外源化合物结合.对血清白蛋白与抗癌药物分子相互作用

的研究,有助于阐明药物在体内的存储和转运过程,是目前一个十分活跃的研究课题^[5, 6].

有人用荧光猝灭法求得 ADR 与血清白蛋白的结合常数及共存金属离子对该常数的影响^[7].本文在此基础上,结合荧光光谱和吸收光谱,研究了不同酸度条件下,ADR 与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用,确定了反应的结合位点数及受体-受体间的结合距离,考察了 ADR 对 BSA 构象的影响,并分析了

* E-mail: zougulin@whu.edu.cn

Received March 7, 2002; revised May 20, 2002; accepted June 29, 2002.

国家自然科学基金(No. 39770200)资助项目.

ADR 与 BSA 的结合模式,从而由分子水平的角度认识了该反应的作用机理,为以后高效低毒 ADR 衍生物的合成,临床上药物的配伍使用等提供了有益的信息.

1 实验

1.1 试剂与仪器

ADR (浙江海门制药厂,纯品原料药),BSA (Sigma 公司),二硫苏糖醇 (DTT) (Serva 公司),三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、盐酸、氯化钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、硅胶、甲醇、丙酮均为分析纯试剂,实验用水为二次去离子水.

TU-1800PC 型分光光度计 (北京普析通用仪器有限公司),LS-55 型荧光分光光度计 (美国 Perkin-Elmer 公司),420A 型 pH 计 (美国 Orion 公司).

1.2 实验方法

1.2.1 去糖基阿霉素的制备与纯化

ADR 在无氧环境下与还原剂作用易脱去其糖环部分. pH = 7.4, 0.1 mol L⁻¹ 的 Tris-HCl 缓冲体系,含 ADR 5 × 10⁻⁴ mol L⁻¹,DTT 8 × 10⁻³ mol L⁻¹,向其中通氮气 15 min 后,37 °C 保温 2 h. 以丙酮-甲醇 (体积比为 2:3) 为展开剂进行薄层层析,用甲醇洗脱各组分,经吸收光谱测定,确定去糖基 ADR 组分,真空干燥后用于以下实验.

1.2.2 ADR 与 BSA 结合作用的测定

以 0.15 mol L⁻¹ 的 NaCl 水溶液配制 pH 5.1 的磷酸缓冲液和 pH 分别为 7.4, 8.4 的 Tris-HCl 缓冲液. 维持缓冲体系 pH 值和离子强度不变,用缓冲溶液配制 BSA 溶液、ADR 溶液和去糖基 ADR 溶液.

吸收光谱测定:测定各溶液的吸收光谱及与 BSA 物质的量之比为 1:1 的 ADR 和去糖基 ADR 溶液的吸收光谱.

荧光光谱测定:取 3 mL 1.0 × 10⁻⁶ mol L⁻¹ BSA 溶液于 1 cm 的石英比色皿中,用微量注射器逐次加入浓度为 2.0 × 10⁻⁴ mol L⁻¹ 的 ADR 溶液或去糖基 ADR 溶液进行滴定,加样体积由实验点浓度计算确定 (滴定剂累加体积小于 100 μL). 以 $\lambda_{\text{ex}} = 277$ nm, 绘制 300 ~ 500 nm 的荧光光谱;以 $\lambda_{\text{ex}} = 277$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 15$ nm 或 $\lambda_{\text{em}} = 60$ nm 记录 ADR 作用于 BSA 的同步荧光光谱. 所有测定都在 25 °C 下进行.

2 结果和讨论

2.1 BSA 与 ADR 结合反应的结合常数、结合位点数及荧光猝灭机理的确定

当激发波长为 277 nm 时,ADR 在 300 ~ 500 nm 范围内无荧光,BSA 由于其自身的色氨酸残基和酪氨酸残基而产生内源荧光. 固定 BSA 的量,在其中滴加 ADR,随 ADR 浓度的增加,BSA 的内源荧光产生有规律的猝灭 (见图 1).

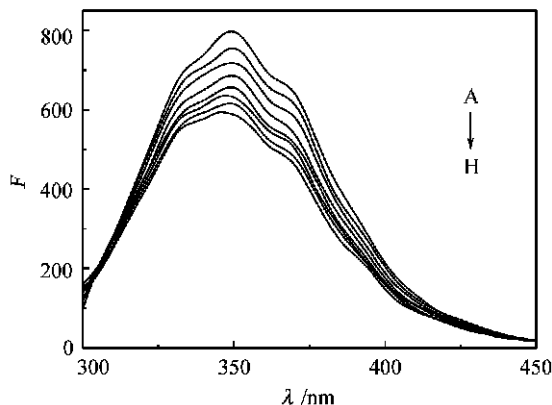


图 1 ADR 对 BSA 荧光光谱的影响

Figure 1 Effect of ADR on fluorescence spectrum of BSA
 $c(\text{BSA}) = 10^{-6}$ mol L⁻¹, $\lambda_{\text{ex}} = 277$ nm, pH = 7.4; $c(\text{ADR}) / (10^{-6}$ mol L⁻¹), A ~ H: 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 2.8

荧光猝灭通常可分为动态猝灭和静态猝灭^[8]. 动态猝灭是猝灭剂和荧光物质的激发态分子之间的相互作用过程,其作用过程遵循 Stern-Volmer 方程:

$$F_0/F = 1 + K_{\text{q}} \tau_0 [Q] = 1 + K_{\text{SV}} [Q] \quad (1)$$

当猝灭剂与荧光物质分子在基态时生成不发光的配合物时,荧光物质荧光强度降低的过程称为静态猝灭.

药物分子和蛋白质分子间的相互作用一般采用位点结合模型来描述,设蛋白质分子 (P) 上对药物分子 (Q) 有 n 个等同且独立的结合部位,蛋白质总浓度为 $[P_t]$, 药物总浓度为 $[Q_t]$, 蛋白质和药物的游离浓度分别为 $[P]$ 和 $[Q]$, 生成物为 Q_nP , 其浓度为 $[Q_nP]$, 则与蛋白质结合的药物当量数为 $n[Q_nP]$, 设结合常数为 K , 依据 Scatchard 方程^[9]:

$$n[Q_nP]/[Q] = K \cdot n[P_t] - K \cdot n[Q_nP] \quad (2)$$

因为 $[P] = [P_t] - [Q_nP]$; $[Q] = [Q_t] - n[Q_nP]$, 由式 (2) 可将结合常数 K 表示为^[10]:

$$K = \frac{n[Q_nP]}{[Q]n[P]} = \frac{[Q_nP]}{[Q][P]} \quad (3)$$

对于选定的发射波长,若体系中的荧光仅为蛋白质分子所产生,则 $F_0/F = [P_t]/[P]$. 根据以上这些关系导出:

$$[Q_nP]/[P] = \{[P_t] - [P]\}/[P] = (F_0 - F)/F \quad (4)$$

$$\begin{aligned} [Q] &= [Q_t] - n[Q_nP] = [Q_t] - n\{[P_t] - [P]\} \\ &= [Q_t] - n[P_t](1 - F/F_0) \end{aligned} \quad (5)$$

合并式(3),式(4)和式(5)可得:

$$F_0/F = K[Q_t]F_0/(F_0 - F) - nK[P_t] \quad (6)$$

当 $[P_t]$ 固定不变, $[Q_t]$ 变化时,依此式可求得结合反应的结合常数和结合位点数.

分别测定弱酸性、中性及弱碱性条件下, $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ 的 BSA 溶液的吸收曲线及 BSA 与 ADR 等摩尔混合物与 ADR 的差谱,发现 ADR 的加入使得 BSA 在 220 nm 处的吸收峰强度降低(图 2). 这说明 ADR 与 BSA 的基态分子发生了相互作用,形成基态配合物,从而引起 BSA 紫外吸收光谱的变化. 动态猝灭只影响荧光分子的激发态,并不改变荧光物质的吸收光谱^[11]. 因此可确定 ADR 对 BSA 的荧光猝灭机理为静态猝灭.

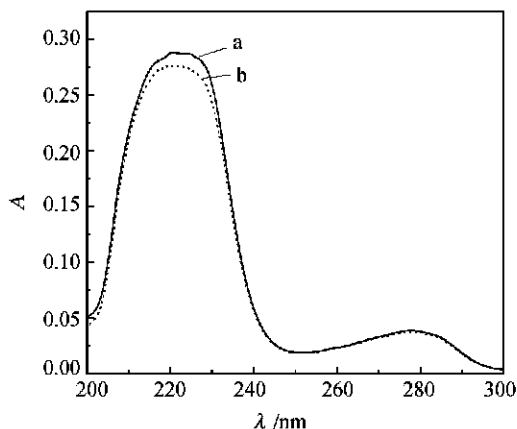


图 2 ADR 对 BSA 紫外吸收光谱的影响

Figure 2 Effect of ADR on ultraviolet absorption spectrum of BSA $c(\text{BSA}) = 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $c(\text{ADR}) = 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; a absorption spectrum of BSA; b difference between absorption spectrum of BSA-ADR complex and ADR

确定猝灭机理后,再将所测得的各荧光光谱,按 349 nm 处的相对荧光强度以 F_0/F 对 $c(\text{ADR})F_0/(F_0 - F)$ 作线性拟合,得到弱酸性、中性及弱碱性条件下,ADR 与 BSA 形成复合物的结合常数、结合位点数和相应的直线相关系数(表 1). 结果表明,ADR 与 BSA 作用时只有一个结合位点,并且随 pH 值的升高,结合常数增大.

表 1 ADR 与 BSA 的结合常数、结合位点数和相应的直线相关系数

Table 1 The equilibrium constant K and the number of binding sites n of the interaction between ADR and BSA

pH	$K/(\text{L mol}^{-1})$	n	R
5.1	5.758×10^4	0.997	0.9977
7.4	8.251×10^4	0.963	0.9906
8.4	2.220×10^5	1.002	0.9962

2.2 ADR 与 BSA 间的结合距离

按照 Förster 能量转移理论,可以求得药物与蛋白质结合时结合位置与蛋白质分子中荧光发射基团之间的距离 $r^{[12]}$:

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) \quad (7)$$

式中 E 是授体与受体间能量转移效率, R_0 是转移效率为 50 % 时的临界距离^[12]:

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 n^{-4} J \quad (8)$$

式中 K^2 为偶极空间取向因子, n 为介质的折射指数, ϕ 为授体的荧光量子产率, J 为授体的荧光发射光谱与受体的吸收光谱间的光谱重叠积分,可表示为^[12]:

$$J = \int F(\lambda) \epsilon(\lambda) d\lambda / \int F(\lambda) d\lambda \quad (9)$$

其中 $F(\lambda)$ 为荧光授体在波长 λ 处的荧光强度, $\epsilon(\lambda)$ 为受体在波长 λ 处的摩尔消光系数,能量转移效率 E 则可由下式求出^[12]:

$$E = 1 - F/F_0 \quad (10)$$

图 3 为 ADR 的吸收光谱和 BSA 的荧光发射光谱的重叠图,将图中的光谱重叠部分(阴影部分)分

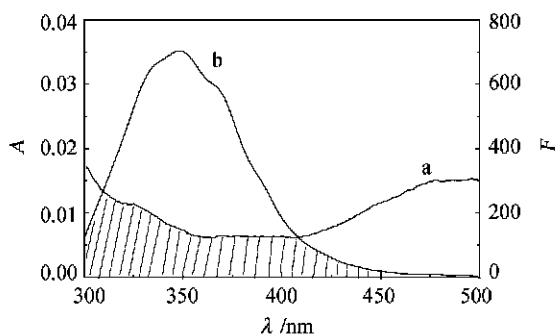


图3 ADR的吸收光谱(a)和BSA的荧光发射光谱(b)的重叠图

Figure 3 Overlap of the absorption spectrum of ADR (a) with the fluorescence emission spectrum of BSA (b)

$$c(\text{ADR}) = 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}; c(\text{BSA}) = 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}; \lambda_{\text{ex}} = 277 \text{ nm}$$

割成极小的矩形,按式(9)积分,得到 $J = 1.99 \times 10^{-24} \text{ cm}^3 \text{ L mol}^{-1}$. 在实验条件下,取向因子取受体-受体各向随机分布的平均值 $K^2 = 2/3$ ^[13], 折射指数取水和有机物的平均值 $n = 1.3360$ ^[13], BSA 中色氨酸残基量子效率 $\phi = 0.118$ ^[13]. 将上述各量代入式(8),求得 $R_0 = 2.75 \text{ nm}$, 结合荧光结果及式(10)算得能量转移效率 $E = 0.12$. 进而由 R_0 经式(7)算出 $r = 3.83 \text{ nm}$.

在实验条件下 ($\lambda_{\text{ex}} = 277 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 349 \text{ nm}$, 25 °C), BSA 的荧光主要来自第 212 位的色氨酸残基^[14], 该残基位于 BSA 的疏水腔内, 所求得的 r 值为结合部位与该残基之间的距离. ADR 脂溶性较差, 比较难以进入疏水腔, 结合位置距该色氨酸残基较远, 因此其 r 值较疏水性药物盐酸川穹嗪 ($r = 1.8 \text{ nm}$)^[14] 要大.

2.3 ADR 与 BSA 结合模式的分析

对于蛋白质的同步荧光光谱, $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 时只表现出酪氨酸残基的荧光, $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 时仅表现出色氨酸残基的荧光^[15]. 因为氨基酸残基的最大发射波长与其所处环境的疏水性有关, 所以由发射波长的改变可判断蛋白质构象的变化.

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, 几乎所有疏水性氨基酸残基都包埋在圆筒内部, 构成疏水腔^[16]. 固定 BSA 浓度, 逐渐增大 ADR 的浓度, 记录 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 时的同步荧光光谱(图 4). 发现酪氨酸残基的最大发射波长保持不变, 而色氨酸残基的最大发射波长红移. 表明 ADR 的加入使 BSA 的构象发生变化, 色氨酸残基所处环境的疏水性降低, BSA 内部的疏水结构有所瓦解, 肽链的伸展程度增加^[11].

ADR 分子主要由两部分结构域组成: 扁平的萘醌衍生的四环结构及一个胺糖环结构(图 5). 由于萘环的共振体系, 使其分子在可见光区域有较大光吸收, λ_{max} 为 480 nm, 该分子亦能受激发产生荧光 ($\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 555 \text{ nm}$)^[17]. ADR 与铁形成配合物时, 三个 ADR 分子以 11-C, 12-C 位的氧原子形成六元环与一个 Fe^{3+} 配位结合, ADR 萘环部分的共振体系受到了影响, 因而在 ADR- Fe^{3+} 配合物的吸收光谱上可观察到 480 nm 处吸收峰的降低^[18]. 当 ADR 与 DNA 形成非共价结合时, 由于其萘环部分嵌入 DNA 分子的碱基对之间, 并与 DNA 碱基及磷酸骨架形成多对氢键, 故可观察到 ADR 分子在 480 nm 处的吸收峰降低并发生红移, 同时其荧光发射强度明

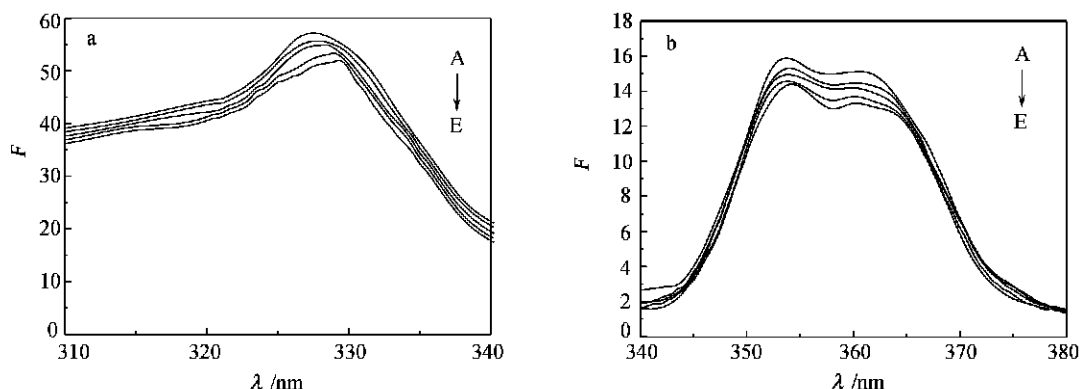


图4 BSA 的同步荧光光谱

Figure 4 Synchronous fluorescence spectrum of BSA

$$c(\text{BSA}) = 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}; \text{pH} = 7.4; c(\text{ADR}) / (10^{-6} \text{ mol L}^{-1}); A \sim E: 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6; a - \Delta\lambda = 60 \text{ nm}; b - \Delta\lambda = 15 \text{ nm}$$

显减弱^[18]. 然而当我们采用吸收光谱研究 ADR 与 BSA 的结合作用时,发现 ADR 在 480 nm 处的吸收峰并不因为它与 BSA 的结合而降低. ADR 自身的荧光强度($\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 555 \text{ nm}$)也不受它与 BSA 结合作用的影响. 这些结果说明,ADR 与 BSA 结合后,其蒽环的共振体系未受影响.

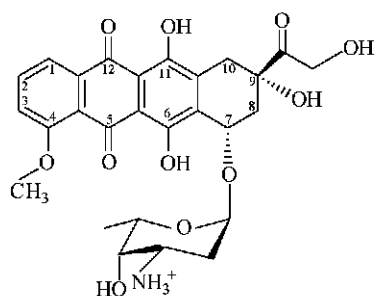


图 5 ADR 的分子结构

Figure 5 Molecular structure of ADR

以去糖基 ADR 替代结合反应体系中的 ADR 进行实验,吸收光谱结果表明,去糖基 ADR 仅能使 BSA 在 220 nm 处的吸收峰强度产生微弱降低. 依据 $\text{pH} = 7.4$ 时,去糖基 ADR 与 BSA 相互作用的荧光光谱,按 349 nm 处的相对荧光强度以 F_0/F 对 $c(\text{ADR})$ $F_0/(F_0 - F)$ 作线性拟合,得到去糖基 ADR 与 BSA 结合反应的结合常数为 $7.822 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$,该值远低于 ADR 与 BSA 的结合常数. 去糖基 ADR 与 BSA 的结合作用要远弱于 ADR 与 BSA 的结合,这表明在 ADR 与 BSA 的结合中,胺糖基起着重要的作用. 卢继新等^[7]提出,ADR 与 BSA 间的作用力主要为疏水作用力. 而胺糖基为亲水基团,更倾向于以氢键或静电引力等方式与 BSA 分子相结合,推测这种结合可能有助于 ADR 的疏水部分与 BSA 分子间发生疏水作用.

References

- 1 Young, R. C.; Ozols, R. F.; Myers, C. E. *N. Engl. J. Med.* **1981**, 305, 139.
- 2 Cutts, S. M.; Phillips, D. R. *Nucleic Acids Res.* **1995**, 23, 2450.
- 3 Liang, Y.; Wang, C.-X.; Zou, G.-L.; Wang, Z.-Y.; Liu, Y.-W.; Qu, S.-S. *Thermochim. Acta* **2000**, 351, 21.
- 4 Powis, G. *Free Radical Biol. Med.* **1989**, 6, 63.
- 5 Demant, E. J.; Friche, E. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, 55, 27.
- 6 Sparreboom, A.; Nooter, K.; Loos, W. J.; Verweij, J. *Neth. J. Med.* **2001**, 59, 196.
- 7 Lu, J.-X.; Zhang, G.-Z.; Zhao, P.; He, X.-W.; Shi, H.-M. *Acta Chim. Sinica* **1997**, 55, 915 (in Chinese). (卢继新, 张贵珠, 赵鹏, 何锡文, 史慧明, 化学学报, **1997**, 55, 915.)
- 8 Chen, G.-Z. *Fluorescence Analytical Method*, Science Press, Beijing, **1990**, p. 122 (in Chinese). (陈国珍, 荧光分析法, 科学出版社, 北京, **1990**, p. 122.)
- 9 Scatchard, G.; Scheinberg, I. H.; Armstrong, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72, 535.
- 10 Yang, P.; Yang, M.-M.; Yang, B.-S. *Chin. J. Chem.* **1996**, 14, 109.
- 11 Zhang, X.-W.; Zhao, F.-L.; Li, K.-A. *Chem. J. Chin. Univ.* **1999**, 20, 1063 (in Chinese). (张晓威, 赵凤林, 李克安, 高等学校化学学报, **1999**, 20, 1063.)
- 12 Yang, P.; Gao, F.; Ma, G.-B. *An Introduction of Bioinorganic Chemistry*, Xi'an Communications University Press, Xi'an, **1991**, p. 152 (in Chinese). (杨频, 高飞, 马贵斌, 生物无机化学导论, 西安交通大学出版社, 西安, **1991**, p. 152.)
- 13 Feng, X.-Z.; Bai, C.-L.; Lin, Z. *Chin. J. Anal. Chem.* **1998**, 26, 154 (in Chinese). (冯喜增, 白春礼, 林璋, 分析化学, **1998**, 26, 154.)
- 14 Ma, G.-B.; Gao, F.; Ren, B.-Z. *Acta Chim. Sinica* **1995**, 53, 1193 (in Chinese). (马贵斌, 高飞, 任斌知, 化学学报, **1995**, 53, 1193.)
- 15 Ma, C.-Q.; Li, K.-A.; Zhao, F.-L. *Acta Chim. Sinica* **1999**, 57, 389 (in Chinese). (马春骐, 李克安, 赵凤林, 化学学报, **1999**, 57, 389.)
- 16 Ulrich, K. H. *Pharmacol. Rev.* **1981**, 33, 17.
- 17 Chaires, J. B.; Dattagupta, N.; Crothers, D. M. *Biochemistry* **1982**, 21, 3933.
- 18 Zhang, J.-J.; Zou, G.-L.; Lü, L.-H.; Xiao, Y.-F. *Acta Biophys. Sinica* **1999**, 15, 19 (in Chinese). (章俊军, 邹国林, 吕利红, 肖元发, 生物物理学报, **1999**, 15, 19.)

Virtual Screening and Rational Design of Phenylpropanoid Glycosides Analogues Based on Molecular Docking

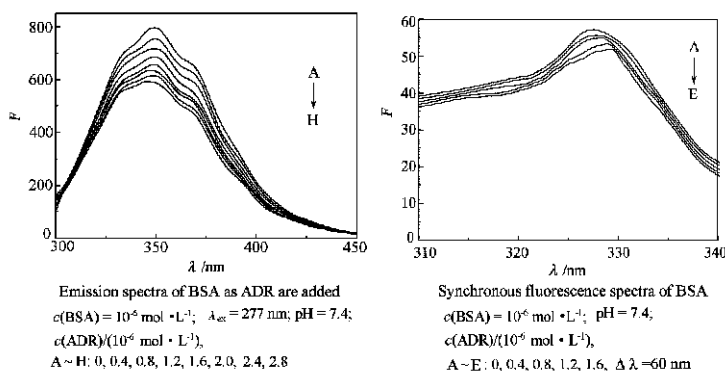
CHEN, Hai-Feng; GAO, Kun; FAN, Bo-Tao;
YUAN, Sheng-Gang; JIA, Zhong-Jian; ZHENG,
Rong-Liang; PANAYE, A.; DOUCET, J. P.
Acta Chimica Sinica **2002**, 60(10), 1860



A set of new phenylpropanoid glycosides analogues was designed by virtual bioactive compound generation and molecular docking calculation. These compounds have high docking energy with telomere DNA and low energy with their complexes.

Studies on the Interaction between Adriamycin and Bovine Serum Albumin

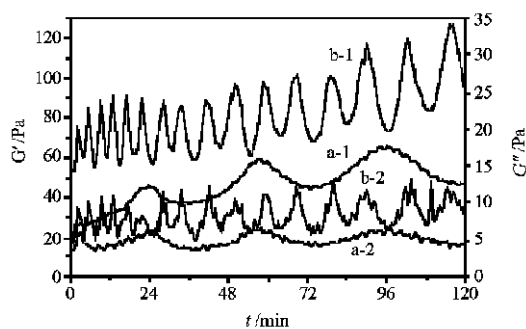
HUANG, Bo; ZOU, Guo-Lin; YANG, Tian-Ming
Acta Chimica Sinica **2002**, 60(10), 1867



The binding reaction between adriamycin (ADR) and bovine serum albumin (BSA) was investigated by absorption spectrometry and fluorescence measurement. The equilibrium constant K and the number of binding sites n at different pH, the binding distance r between ADR and BSA were measured. The effect of ADR on the conformation of BSA was also analyzed using synchronous fluorescence spectroscopy. The binding mode between ADR and BSA was discussed.

Influence of Surfactant on the Rheological Fluctuation Behavior of Manganese Oxide Suspensions

HONG, Xin-Lin; ZHANG, Gao-Yong; ZHANG,
Yue; ZHU, Yin-Yan; YANG, Heng-Quan
Acta Chimica Sinica **2002**, 60(10), 1872



For manganese oxide suspensions which contain surfactant (polyoxyethylene fatty alcohol, AEO₉) or not, apparent viscosity fluctuates with time at shear rate $\dot{\gamma} = 0.2 \text{ s}^{-1}$ with different pre-shear. Fur-

thermore, the oscillation behavior of storage modulus G' and loss modulus G'' was also found in these suspensions. The influence of surfactant molecules on the rheological behavior of the suspensions was discussed.