

## 吡哌酸、氟哌酸与 HSA, IgG 相互作用的研究

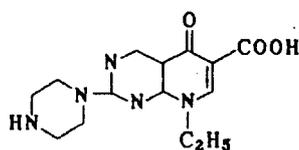
朱 铿 童沈阳\*

(北京大学化学与分子工程学院 北京 100871)

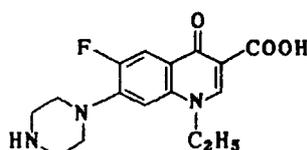
**摘要** 本文研究了在人体生理 pH 值条件下,吡哌酸、氟哌酸与人血清白蛋白(HSA)和人体  $\gamma$  球蛋白(IgG)间的相互作用,求出了吡哌酸、氟哌酸与蛋白质的结合常数及结合位置,并根据热力学参数确定了它们之间的主要作用力类型.

**关键词** 吡哌酸,氟哌酸,人血清白蛋白,人体  $\gamma$  球蛋白,相互作用

吡哌酸、氟哌酸都是抗菌类药物,适用于敏感细菌所引起的感染,如肾盂肾炎、膀胱炎、前列腺炎等,治愈率可达 100%. 人血清白蛋白(HSA)是人体中的药物输送蛋白,药物进入血液后,首先要和血清白蛋白结合,然后再被运输到身体的各部位. 人体  $\gamma$  球蛋白(IgG)是一种免疫蛋白,它能吞噬进入体内的外源物,从而消除有害物质对人体的危害. 有关吡哌酸、氟哌酸与蛋白质相互作用的文献目前尚未见报道. 本文研究了在人体生理 pH 值条件下,吡哌酸、氟哌酸与人血清白蛋白(HSA)和人体  $\gamma$  球蛋白(IgG)间的相互作用,利用吡哌酸、氟哌酸对蛋白质荧光的猝灭求出了吡哌酸、氟哌酸与蛋白质的结合常数和结合位置,并根据热力学参数确定了它们之间的主要作用力类型. 这对于阐明不同种蛋白对药物的不同作用方式和药物在人体内的作用机制有一定的意义.



吡哌酸



氟哌酸

## 1 实验

### 1.1 仪器和试剂

UV-265 型紫外-可见分光光度计(岛津); RF-540 型荧光分光光度计(岛津); Model-821 型酸度计(中山大学制造).

吡哌酸溶液:称取吡哌酸(湖北制药厂)0.0357g 于 100mL 烧杯中,加 0.1mol/L HCl 溶解. 转移至 100mL 容量瓶,加水定容,浓度为  $1.0 \times 10^{-3}$  mol/L. 使用时逐级稀释;氟哌酸溶液:

称取氟哌酸(湖北制药厂)0.0319g于100mL烧杯中,加0.1mol/LHCl溶解.转移至100mL容量瓶,加水定容,浓度为 $1.0 \times 10^{-3}$ mol/L.使用时逐级稀释;人血清白蛋白(HSA)溶液:称取适量HSA(Sigma公司),加0.5%NaCl溶液溶解; $\gamma$ 球蛋白(IgG)溶液:称取适量IgG(Serva公司),加0.5%NaCl溶液溶解;缓冲溶液:用0.1mol/L的Tris溶液与0.1mol/L的HCl溶液配制pH=7.4的缓冲溶液;所有试剂均为分析纯,实验用水为二次去离子水.

## 1.2 方法

在比色管中依次加入缓冲溶液、药物及蛋白质溶液和NaCl溶液,加水至刻度后混匀.在RF-540型荧光分光光度计上测定荧光强度( $\lambda_{\text{ex}}=280\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=335\text{nm}$ ).在实验中溶液均保持pH值为7.4,NaCl浓度为0.1mol/L(用以维持离子强度).

## 2 结果与讨论

### 2.1 吡哌酸、氟哌酸与蛋白质的结合常数

当温度不同时,在浓度一定的蛋白质溶液中,分别加入不同浓度的吡哌酸和氟哌酸,作出蛋白质淬灭的Stern-Volmer图(见图1~4).由图中可以看出,曲线有着良好的线性关系(所有曲线的线性相关系数都大于0.998).由图中还可以看出,随着温度的升高,HSA淬灭曲线的斜率降低.证明此过程为静态淬灭.IgG淬灭曲线其曲线斜率不随温度变化而变化.若认为此过程是动态淬灭,则应符合Stern-Volmer方程<sup>[1]</sup>.

$$F_0/F = 1 + K_q \Gamma_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (1)$$

$F_0$ 为淬灭剂不存在时的荧光强度, $F$ 为加入淬灭剂后的荧光强度. $K_q$ 为双分子淬灭过程速率常数, $K_{sv}$ 为Stern-Volmer淬灭常数, $\Gamma_0$ 为淬灭体不存在时荧光分子平均寿命, $[Q]$ 为淬灭剂浓度.

$$K_{sv} = K_q \Gamma_0 \quad (2)$$

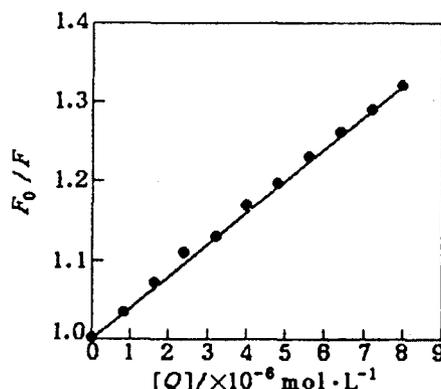
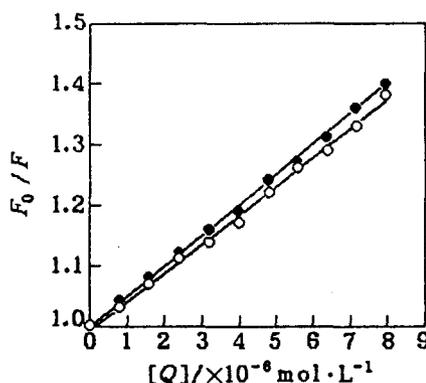


图1 吡哌酸对HSA淬灭的Stern-Volmer图 图2 15°C时吡哌酸对IgG淬灭的Stern-Volmer图

●—15°C; ○—45°C

由淬灭曲线得到吡哌酸、氟哌酸 $K_{sv}$ 值分别为 $4.89 \times 10^4 \text{L/mol}$ ,  $5.14 \times 10^4 \text{L/mol}$ .由于生物大分子荧光寿命约为 $10^{-8} \text{s}$ <sup>[2]</sup>,由方程式(2)得 $K_q$ (吡哌酸) $= 4.89 \times 10^{12} \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ;  $K_q$ (氟哌酸) $= 5.14 \times 10^{12} \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ .各类淬灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞淬灭常数为

$2.0 \times 10^{10} \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [3]. 显然吡哌酸、氟哌酸对蛋白质荧光的淬灭过程速率常数远大于扩散控制的  $K_q$ , 所以淬灭不是由于动态碰撞引起的, 淬灭过程是由于形成化合物而引起的静态淬灭.

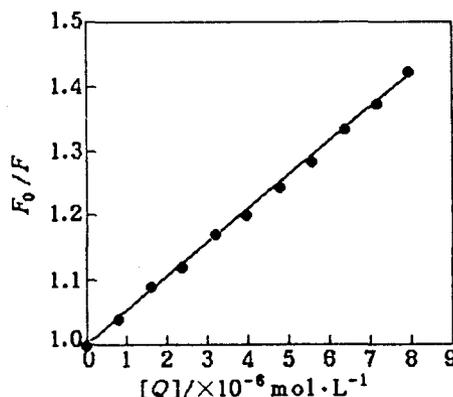
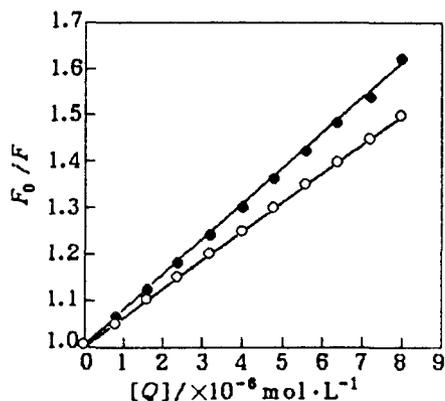


图3 氟哌酸对HSA淬灭的Stern-Volmer图

图4 15°C时氟哌酸对IgG淬灭的Stern-Volmer图

●—15°C; ○—45°C

杨频等[4]曾提出了利用有机分子对蛋白质荧光的静态淬灭来求结合常数的方法. 他推导出了荧光强度、淬灭剂浓度、结合常数之间的关系式.

$$(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + K^{-1}F_0^{-1}[Q]^{-1} \quad (3)$$

$F_0$  为淬灭剂不存在时的荧光强度,  $F$  为加入淬灭剂后的荧光强度,  $K$  为结合常数,  $[Q]$  为淬灭剂浓度.

根据式(3)作出蛋白质荧光强度与吡哌酸、氟哌酸浓度的双倒数图, 即以  $(F_0 - F)^{-1}$  对  $[Q]^{-1}$  作图(见图5~8), 并分别求得不同温度下的结合常数  $K$ , 结果见表1和表2.

表1 蛋白质与吡哌酸在不同温度下的结合常数

$T(^{\circ}\text{C})$	$K_{\text{HSA}}(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$K_{\text{IgG}}(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$
15	$8.02 \times 10^4$	$6.10 \times 10^4$
45	$5.44 \times 10^4$	$5.81 \times 10^4$

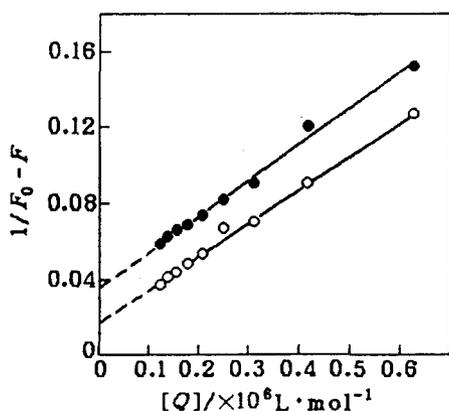


图5 HSA的荧光强度与吡哌酸浓度的双倒数图

●—15°C; ○—45°C

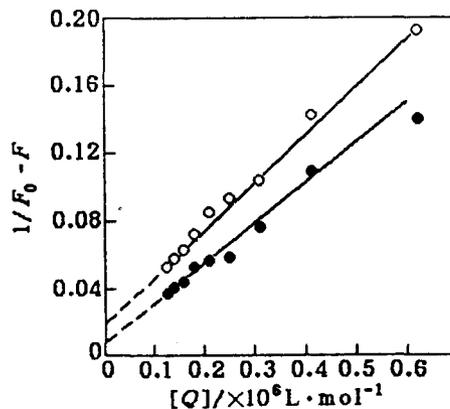


图6 IgG的荧光强度与吡哌酸浓度的双倒数图

●—15°C; ○—45°C

表 2 蛋白质与氟哌酸在不同温度下的结合常数

T(°C)	$K_{\text{HSA}}(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$	$K_{\text{IgG}}(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$
15	$1.78 \times 10^5$	$5.31 \times 10^4$
45	$6.67 \times 10^4$	$5.26 \times 10^4$

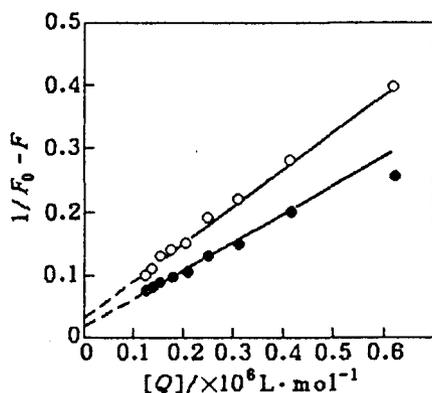


图 7 HSA 的荧光强度与氟哌酸浓度的双倒数图

●—15°C; ○—45°C

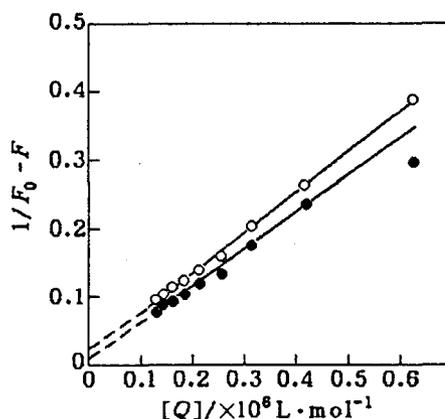


图 8 IgG 的荧光强度与氟哌酸浓度的双倒数图

●—15°C; ○—45°C

## 2.2 蛋白质与吡哌酸、氟哌酸主要相互作用力的确定

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(4),(5)和(6)可以求得  $\Delta H$ ,  $\Delta G$  和  $\Delta S$ .  $\Delta G$  为自由能变,  $\Delta S$  为熵变.

$$\ln(K_2/K_1) = \Delta H/R(1/T_1 - 1/T_2) \quad (4)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (5)$$

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (6)$$

15°C时,吡哌酸与 HSA, IgG 反应的热力学参数  $\Delta H$  分别为 -29.3kJ 和 0kJ;  $\Delta S$  分别为 59.3J 和 91.6J. 15°C时,氟哌酸与 HSA, IgG 反应的热力学参数  $\Delta H$  分别为 -29.2kJ 和 0kJ;  $\Delta S$  分别为 57.9J 和 90.4J. 根据热力学参数与作用力间的关系可知<sup>[5~7]</sup>,吡哌酸、氟哌酸主要是依靠“疏水作用力”与 IgG 相结合,而与 HSA 的作用力则主要是静电引力.

## 2.3 吡哌酸、氟哌酸在 HSA 上结合位置的求取

根据 Foster<sup>[8]</sup>提出的偶极-偶极非辐射能量转移理论,当两种化合物分子满足以下条件时,将会发生非辐射能量转移现象.即(1)供能体(Doner)能发荧光;(2)供能体的荧光发射光谱与受能者(Acceptor)的吸收光谱有足够重叠;(3)供能体与受能者足够接近,最大距离不超过 7nm. HSA 有很强的荧光,作出吡哌酸、氟哌酸的紫外-可见吸收光谱(图 9, 10),发现其与 HSA 的荧光光谱有着较大程度的重叠.根据 Foster<sup>[8]</sup>提出的偶极-偶极非辐射能量转移机理,转移效率与给体-受体间距离  $r$  及临界能量转移距离  $R_0$  有关,且给体与受体间能量转移效率为:

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

其中  $R_0$  是转移效率为 50%时的临界距离.

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

其中  $K^2$  为偶极空间取向因子,  $n$  为介质折射指数,  $\phi$  为给体的荧光量子产率,  $J$  为给体的荧光发射光谱与受体的吸收光谱间的重叠积分.

$$J = \int F_D(V) \epsilon_A(V) V^{-4} \Delta V / \int F_D(V) \Delta V \quad (9)$$

其中  $F_D(V)$  为荧光给体在波数为  $V$  的荧光强度,  $\epsilon_A$  为受体在波数为  $V$  的摩尔吸光系数. 能量转移效率  $E$  又可由下式测定.

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

只要得到  $E, K^2$  和  $n$ , 并通过实测光谱求出积分  $J$ , 就可算出  $R_0$  和  $r$ .

HSA 中有一个色氨酸残基, 位于第 214 位. 色氨酸量子产率 = 0.118<sup>[4]</sup>. 折射指数  $n$  取水和有机物的平均值 1.336, 取向因子取给体和受体各向随机分布的平均值  $K^2 = 2/3$ . 利用前面测定的人血清白蛋白的荧光发射光谱和吡哌酸、氟哌酸的吸收光谱, 把光谱重叠部分分割成极小的矩形面积求重叠积分  $J$ , 将以上值分别代入式(8), 求得临界距离  $R_0$ . 求能量转移效率时, 利用前面测定的 HSA 与吡哌酸、氟哌酸摩尔比为 1:1 时复合物的荧光强度, 按式(10)算出  $E$ , 于是由式(7)可得吡哌酸、氟哌酸距 HSA 上第 214 位色氨酸残基距离  $r$ . 结果见表 3.

表 3 吡哌酸、氟哌酸在 HSA 上的结合位置

药物	$J$ ( $\text{cm}^3\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	$E$	$R_0(\text{nm})$	$r$ (nm)
吡哌酸	$9.33 \times 10^{-16}$	0.032	1.651	2.92
氟哌酸	$3.16 \times 10^{-15}$	0.016	2.023	4.02

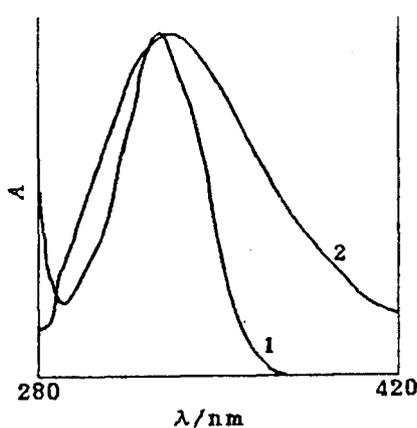


图 9 HSA 的荧光光谱(2)与吡哌酸(1)的吸收光谱

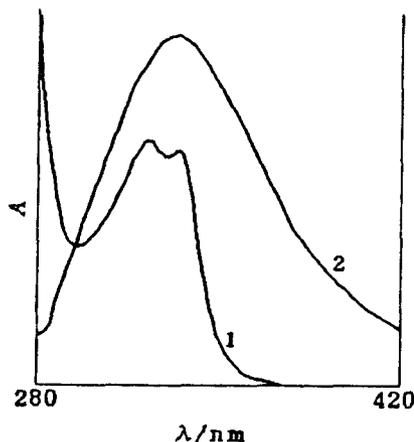


图 10 HSA 的荧光光谱(2)与氟哌酸(1)的吸收光谱

### 2.4 药物对蛋白质构象的影响

保持  $\Delta\lambda = 60\text{nm}$ , 作出 HSA 和 IgG 的同步荧光光谱<sup>[1]</sup>. 此时, 同步荧光光谱仅表现出色氨酸的荧光<sup>[9]</sup>. Bursten<sup>[10]</sup>认为色氨酸的最大发射波长与其所处环境有关, 当它位于疏水介质中时,  $\lambda_{\text{max}} = 331\text{nm}$ ; 部分暴露于水相时,  $\lambda_{\text{max}} = 341\text{nm}$ ; 完全暴露于水相时,  $\lambda_{\text{max}} = 351\text{nm}$ . 若色氨酸的最大发射波长改变, 说明蛋白质的构象也发生了改变. 我们固定蛋白质的量, 逐渐增加吡哌酸、氟哌酸的量, 光谱的最大发射波长由 341nm 移向了 351nm, 这说明药物的加入使蛋白质的构象发生了变化. 吡哌酸与 HSA, IgG 的同步荧光光谱示于图 11 和 12, 氟哌酸与 HSA, IgG 的同步荧光光谱与此相似.

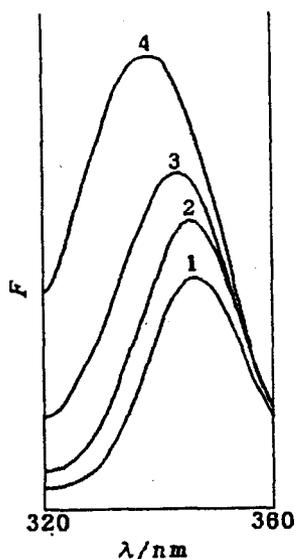


图 11 HSA 的同步荧光光谱

HSA: 0.034mg/mL

吡啶酸( $\times 10^{-5}$ mol/L):

1—3.0; 2—2.0; 3—1.0; 4—0

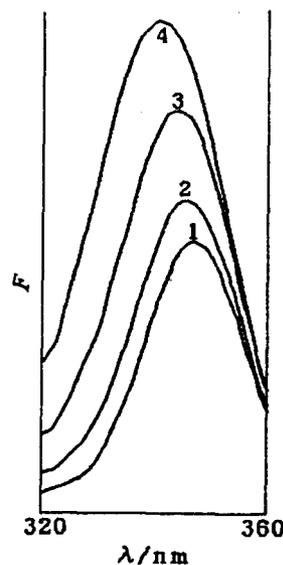


图 12 IgG 的同步荧光光谱

IgG: 0.075mg/mL

吡啶酸( $\times 10^{-5}$ mol/L):

1—3.0; 2—2.0; 3—1.0; 4—0

## 参考文献

- 1 陈国珍,黄贤智,郑朱梓,许金钩,王尊本,“荧光分析法”,科学出版社,北京,1990.
- 2 J. R. Lakowicz, G. Weber, *Biochem.*, **1973**, *12*, 4161.
- 3 W. R. Ware, *J. Phys. Chem.*, **1962**, *66*, 455.
- 4 杨曼曼,杨 频,张立伟,科学通报,1994, 39, 31.
- 5 I. M. Klotz, J. M. Urquhart, *J. Am. Chem. Soc.*, **1949**, *71*, 847.
- 6 C. Tanford, “*Physical Chemistry of Macromolecules*”, John Wiley and Sons. New York, **1971**, p. 526.
- 7 C. Tanford, “*The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*”, John Wiley and Sons. New York, **1973**, p. 12.
- 8 杨 频,“生物无机化学导论”,西安交通大学出版社,西安,1991.
- 9 J. M. Miller, *Anal. Proc.*, **1979**, *16*, 203.
- 10 E. A. Brustein, N. S. Vedenkina, M. N. Irkova, *Photochem. Photobiol.*, **1973**, *18*, 263.

## A Study on the Reaction Between Protein and Acidum Pipemidicum/Norfloxacinum

ZHU Ken    TONG Shen - Yang\*

(Department of Chemistry, Peking University, Beijing, 100871)

**Abstract** In this paper, the study of the reaction between protein and acidum pipemidicum/norfloxacinum were reported. The binding sites and binding constant were obtained. According to the thermodynamic parameters, the main sort of binding force can be known.