

# 二氢吡啶类药物与牛血清白蛋白相互作用的研究

姜虹<sup>1</sup>, 安普丽<sup>2</sup>, 蒋晔<sup>2\*</sup> (1. 白求恩医学院, 石家庄 050081; 2. 河北医科大学药学院, 石家庄 050017)

**摘要:**目的 研究二氢吡啶类药物(DHP)(包括硝苯地平、尼群地平、尼卡地平、尼莫地平、非洛地平)与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用机制。方法 采用荧光法和紫外光谱法。结果 分别求出DHP与BSA间的结合距离、能量转移效率等相互作用参数。结论 DHP在体内与蛋白结合后,白蛋白仅起运载工具的作用将之运输到受体作用部位。

**关键词:**二氢吡啶类药物;牛血清白蛋白;荧光光谱;紫外光谱

中图分类号:R972;R917.1 文献标识码:B 文章编号:1007-7693(2009)01-0018-05

## Study on the Interaction between Dihydropyridine Derivates and Bovine Serum Albumin

JIANG Hong<sup>1</sup>, AN Puli<sup>2</sup>, JIANG Ye<sup>2\*</sup> (1. Bethune Military Medical University, Shijiazhuang 050081, China; 2. School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To study the reaction mechanism between BSA and DHP, such as nifedipine, nitrendipine, nicardipine, nimodipine and felodipine. **METHODS** Spectrofluorimetry and UV spectrophotometry were used. **RESULTS** Interaction parameters of DHP with BSA were obtained, such as the efficiency of energy transfer and the binding distances. **CONCLUSION** After DHP binding with albumin *in vivo*, DHP are transported to the acceptor sites by albumin which is only a carrier.

**KEY WORDS:** dihydropyridine derivates; bovine serum albumin; fluorescence; UV

二氢吡啶类药物(DHP)是钙通道阻滞药,临床上主要用于治疗高血压、心绞痛、心律失常、充血性心脏病及缺血性心脏病等疾病。这类药物多为脂溶性,且与蛋白的结合率较高,一般在90%以上,而血清白蛋白是血浆中含量最丰富的蛋白质,它具有贮

运内源代谢产物和外源药物小分子等重要生理功能,因此研究药物与血清白蛋白间的相互作用在药物动力学及药效学的研究中占有重要地位。近年已有不少关于药物小分子与血清白蛋白相互作用的文献<sup>[1-3]</sup>,但尚未见同时采用荧光光谱和紫外光谱法研

究 DHP 与牛血清白蛋白(BSA)相互作用的报道。本试验采用了荧光法和紫外光谱法研究了 DHP 与 BSA 之间的结合反应,讨论了 DHP 对 BSA 的荧光猝灭机制,并得到了它们之间的相互作用参数,从不同角度研究了 DHP 与 BSA 的相互作用,不但对阐明该类药物在体内的运输与代谢过程具有一定意义,而且也研究蛋白质的结构与功能的关系提供了一些信息。

## 1 仪器与试剂

LS50B 型荧光分光光度计(美国 PerkinElmer 公司);UV-2201 型紫外分光光度计(日本岛津仪器株式会社);pHS-2C 型精密酸度计(上海雷磁仪器厂);牛血清白蛋白(北京化学试剂公司,批号 20050912);硝苯地平、尼群地平、尼卡地平、尼莫地平、非洛地平对照品(中国药品生物制品检定所);其他试剂均为分析纯;试验用水均为去离子水。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的配制

用  $\text{pH} = 7.2$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$  ( $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 缓冲溶液(其中含 0.9% 的氯化钠)溶解适量的 BSA 并配制成  $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  溶液备用;硝苯地平、

尼群地平、尼卡地平、尼莫地平、非洛地平样品溶液先用少量无水乙醇将其溶解,再用上述磷酸盐缓冲溶液定容,配制成  $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的储备液。

### 2.2 实验方法

配制一系列含有不同浓度药物,BSA 的浓度为  $5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的待测溶液,设定激发波长为 285 nm,扫描范围为 300 ~ 500 nm,激发与发射狭缝均为 5 nm,扫描速度为  $100 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ ,扫描不同温度下不同浓度的 DHP 存在时 BSA 的荧光光谱和同步荧光光谱(发射波长与激发波长差分别为 15 nm,60 nm),并以所用缓冲盐溶液做荧光空白校正。以缓冲盐做参比,测定与白蛋白物质的量之比为 1:1 的各药物溶液的紫外吸收光谱。

### 2.3 药物与 BSA 的荧光光谱

不同浓度的硝苯地平、尼群地平、尼卡地平、尼莫地平、非洛地平与 BSA 混合前后体系的荧光发射谱随药物浓度的变化见图 1。实验结果显示,随着药物浓度的增加,BSA 的荧光强度有规律地降低,而它的峰位及峰形基本不变,表明它们与 BSA 发生了相互作用。

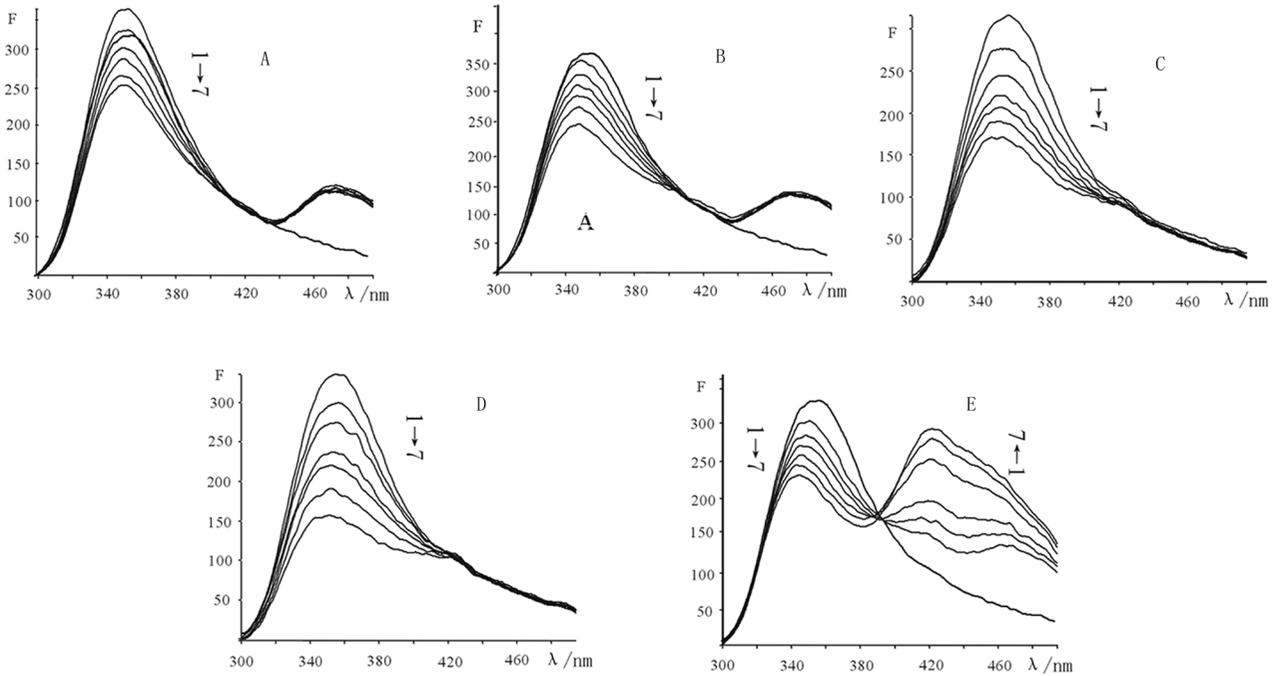


图 1 DHP 对 BSA 的荧光光谱的影响

A - 硝苯地平;B - 尼群地平;C - 尼卡地平;D - 尼莫地平;E - 非洛地平;1 至 7 为 DHP 的浓度分别为  $0, 0.4 \times 10^{-5}, 0.8 \times 10^{-5}, 1.2 \times 10^{-5}, 1.6 \times 10^{-5}, 2.0 \times 10^{-5}, 2.4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig 1 Effect of DHP on fluorescence spectra of BSA

A - nifedipine; B - nitrendipine; C - nicardipine; D - nimodipine; E - felodipine;  $c(\text{BSA}) = 5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; the concentration of DHP from 1 to 7 was: 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0,  $2.4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

## 2.4 猝灭机制

药物小分子引起 BSA 荧光猝灭的原因可能有两种情况,一种是能量转移或电子转移,是激发态分子间的相互作用,不影响蛋白质的结构和生理活性,另一种是药物小分子与蛋白质在基态时发生配合作用,通常生成不发荧光的配合物,使蛋白质的构象发生变化,从而影响蛋白质的生理活性。荧光猝灭通常符合 Stern-Volmer 方程:

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q]^{[4]}$$

式中,  $F_0$ ,  $F$  分别为加入猝灭剂前后荧光体的荧光强度,  $K_q$  为双分子猝灭过程速率常数,它描述了分子间的彼此扩散和相互碰撞对生物大分子荧光寿命衰减速率的影响。  $\tau_0$  为无猝灭剂时生物大分子的平均寿命,其平均寿命一般为  $10^{-8}$  s。  $K_{sv}$  称之为 Stern-Volmer 猝灭常数是双分子猝灭过程速率常数与单分子衰变速率常数的比率,它反映生物大分子与荧光猝灭剂分子在猝灭过程中彼此扩散和碰撞达到平衡时的量效关系<sup>[5]</sup>。

**2.4.1 温度的影响** 分别将 20 °C 和 37 °C 下不同浓度 ( $0, 0.4 \times 10^{-5}, 0.8 \times 10^{-5}, 1.2 \times 10^{-5}, 1.6 \times 10^{-5}, 2.0 \times 10^{-5}, 2.4 \times 10^{-5}$  mol · L<sup>-1</sup>) 的硝苯地平、尼群地平、尼卡地平、尼莫地平、非洛地平与 BSA 作用的最大荧光强度代入 Stern-Volmer 方程,得到

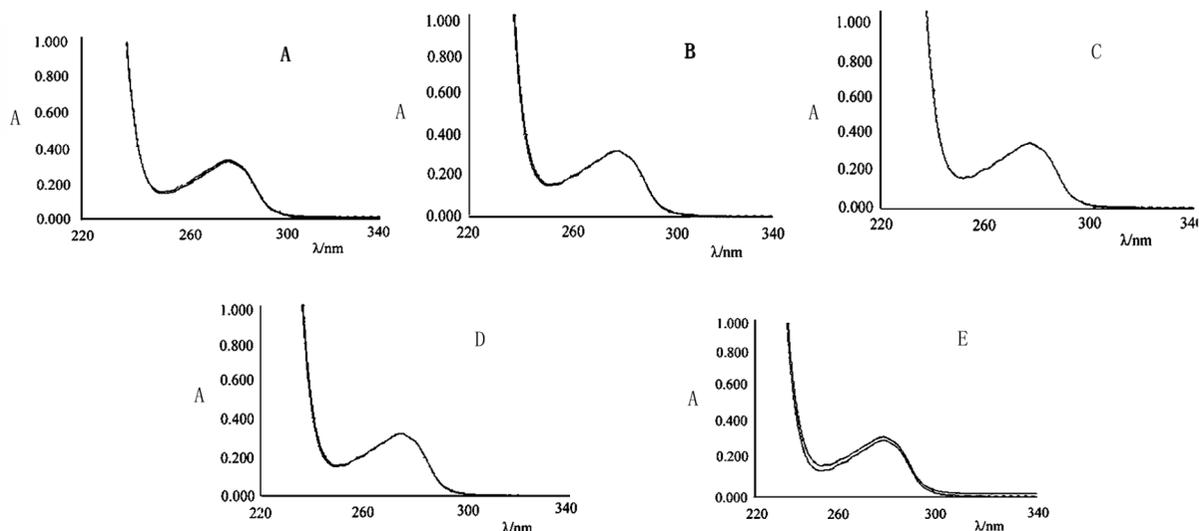
不同温度下 DHP 与 Stern-Volmer 方程及 Stern-Volmer 猝灭常数等,结果见表 1。

**表 1** 不同温度下的 DHP 与 BSA 的线性方程和相关参数

**Tab 1** Stern-volmer equation and correlation parameters of DHP with BSA at different temperature

样品	T/°C	Stern-volmer 方程	$K_{sv}/$	$K_q/$	$r$
			L · mol <sup>-1</sup>	L · mol <sup>-1</sup> · s <sup>-1</sup>	
硝苯地平	20	$Y = 1.49 \times 10^4 X + 1.03$	$1.49 \times 10^4$	$1.49 \times 10^{12}$	0.992
	37	$Y = 1.80 \times 10^4 X + 1.01$	$1.80 \times 10^4$	$1.80 \times 10^{12}$	0.990
尼群地平	20	$Y = 2.30 \times 10^4 X + 1.06$	$2.30 \times 10^4$	$2.30 \times 10^{12}$	0.999
	37	$Y = 3.00 \times 10^4 X + 0.93$	$3.00 \times 10^4$	$3.00 \times 10^{12}$	0.970
尼卡地平	20	$Y = 2.08 \times 10^4 X + 0.96$	$2.08 \times 10^4$	$2.08 \times 10^{12}$	0.992
	37	$Y = 2.19 \times 10^4 X + 0.98$	$2.19 \times 10^4$	$2.19 \times 10^{12}$	0.988
尼莫地平	20	$Y = 3.09 \times 10^4 X + 0.93$	$3.09 \times 10^4$	$3.09 \times 10^{12}$	0.994
	37	$Y = 4.36 \times 10^4 X + 1.01$	$4.36 \times 10^4$	$4.36 \times 10^{12}$	0.987
非洛地平	20	$Y = 2.01 \times 10^4 X + 1.01$	$2.01 \times 10^4$	$2.01 \times 10^{12}$	0.993
	37	$Y = 2.63 \times 10^4 X + 0.97$	$2.63 \times 10^4$	$2.63 \times 10^{12}$	0.989

**2.4.2 吸收光谱的变化** 分别测定了 BSA ( $1 \times 10^{-6}$  mol · L<sup>-1</sup>) 的紫外吸收曲线, DHP 与 BSA 等摩尔 ( $1 \times 10^{-6}$  mol · L<sup>-1</sup>) 混合物与 DHP ( $1 \times 10^{-6}$  mol · L<sup>-1</sup>) 的差谱。结果见图 2。在该研究条件下两图谱几乎完全重合,表明 DHP 的加入并没有使 BSA 的紫外吸收发生明显的变化<sup>[6]</sup>。



**图 2** BSA 及 DHP 与 BSA 等摩尔混合物与 DHP 的差谱的紫外吸收图谱

A - 硝苯地平; B - 尼群地平; C - 尼卡地平; D - 尼莫地平; E - 非洛地平

**Fig 2** UV spectrum of BSA and differential spectrum between DHP and BSA (molar ratio 1:1) with DHP

A - nifedipine; B - nitrendipine; C - nicardipine; D - nimodipine; E - felodipine

## 2.5 对蛋白质构象的影响

蛋白质在水溶液中随着溶液环境的变化会表现出不同的构象,蛋白质中氨基酸残基的最大荧光发射波长与其所处环境的疏水性有关,所以由发射波

长的改变可以判断蛋白质构象的变化,因此利用同步荧光可以了解药物分子对蛋白质构象的影响。当  $\Delta\lambda = 15$  nm 时,同步荧光光谱只显示酪氨酸残基的光谱特性;当  $\Delta\lambda = 60$  nm 时,同步荧光光谱仅表现

色氨酸残基的荧光<sup>[7-8]</sup>。固定 BSA 的浓度为  $5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,扫描不同浓度的 DHP 对 BSA 的同步荧光光谱图,试验结果为随着 DHP 浓度的增加,  $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$  和  $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$  时 BSA 的同步荧光的强度逐渐降低,但峰位和峰形均基本没有变化,结果表明 DHP 的加入并没有影响蛋白质的构象。

## 2.6 Förster 偶极-偶极无辐射能量转移估测药物分子在 BSA 的结合位置<sup>[9]</sup>

按照 Förster 能量转移理论,转移效率  $E$  与授体-受体间的距离  $r$  及临界能量转移距离  $R_0$  相关:

$$E = R_{06} \cdot (R_{06} + r^6)^{-1} \quad (1)$$

$$R_{06} = 8.8 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} \Phi J \quad (2)$$

式中,  $R_0$  是  $E = 50\%$  时的临界距离,  $K^2$  为偶极空间取向因子,  $N^{-4}$  为介质的折射指数,  $\Phi$  为授体的光量子效率,  $J$  为授体 (BSA) 荧光光谱与受体 (盐酸哌啶啉) 吸收光谱间的光谱重叠积分:

$$J = \int_0^\infty F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 d\lambda / \int_0^\infty F(\lambda) d\lambda \quad (3)$$

其中  $F(\lambda)$  荧光授体在波长  $\lambda$  处的荧光强度,  $\varepsilon(\lambda)$  则为受体在波长在  $\lambda$  处的摩尔吸收系数, 能量转移效率可按式确定:  $E = 1 - F \cdot F_0^{-1}$  (4)

式中  $E$  为药物与 BSA 摩尔浓度比为 1:1 时的能量转移效率。分别扫描 BSA 的荧光光谱与 DHP (摩尔浓度与 BSA 相等) 的紫外吸收光谱之重叠光谱图, 用 Origin 6.0 软件中进行处理, 采用矩形分割法可求得图中光谱重叠部分的面积, 见表 2, 将图中光谱重叠部分的面积代入式 (1) ~ (4), 计算出 DHP 与 BSA 中色氨酸残基间的结合距离见表 2。

表 2 硝苯地平、尼群地平、尼卡地平、尼莫地平、非洛地平与牛血清白蛋白 ( $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 相互作用参数

Tab 2 Parameters of terazosin nifedipine, nitrendipine, nicardipine, nimodipine, felodipine with BSA ( $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )

样品	$J \times 10^{-15} / \text{cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$	$E$	$r / \text{nm}$
硝苯地平	2.99	0.143	3.70
尼群地平	2.95	0.203	3.44
尼卡地平	2.48	0.107	3.79
尼莫地平	1.92	0.159	3.37
非洛地平	2.65	0.156	3.57

## 3 讨论

药物等有机小分子和蛋白质生物大分子常常通过能量转移、形成配合物、碰撞等相互作用形成, 引起药物自身荧光光谱和蛋白质自身荧光 (内源荧光) 光谱以及同步荧光光谱的变化, 这些均可以提

供药物与蛋白质相结合的信息。如氧氟沙星和左氧氟沙星都能与血清白蛋白之间通过疏水作用形成亲和力较强的配合物, 它们不仅可以和血清白蛋白结合, 通过血液循环达到作用部位, 而且对蛋白分子的构象都有一定的影响<sup>[10-11]</sup>。环丙沙星和头孢呋辛酯与 BSA 的激发态分子相互作用, 使白蛋白的荧光强度降低, 但它们并没有与蛋白质分子在基态时形成配合物, 没有使蛋白的构象发生变化, 白蛋白仅是环丙沙星和头孢呋辛酯在体内的运载工具<sup>[6,12]</sup>。

蛋白质分子上有主要由酪氨酸、亮氨酸等氨基酸非极性的侧链密集在一起形成的疏水区, 并常暴露于分子表面, 脂溶性药物更易进入疏水区, 因此这类药物与蛋白质的结合率一般都较大。本试验中的 DHP 多为脂溶性药物, 易于蛋白质结合, 如尼卡地平、尼莫地平等与蛋白的结合率一般在 90% 以上。

3.1 二氢吡啶类药物对蛋白质构象影响试验的结果: 随着 DHP 浓度的增加,  $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$  和  $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$  时同步荧光的峰位和峰形均没有变化, 结果表明 DHP 并没有与蛋白质的色氨酸和酪氨酸基团直接结合, 但求得它们与色氨酸间的结合距离较小, 推测它们可能通过疏水力嵌入色氨酸或酪氨酸附近的疏水腔, 从而使蛋白质的荧光强度降低, 这种疏水作用力受温度的影响较大, 随着温度的增加作用力变小, 猝灭常数增大。从该类药物的结构上来看, 它们具有相同的母核, 随着侧链极性的增加猝灭常数降低, 且它们与蛋白质间的结合率较高, 进一步推测 DHP 物嵌入蛋白质的三维疏水腔内。该类药物并没有通过改变蛋白质的构象发挥药理作用, 仅通过血清蛋白运输到作用部位, 作用到相应的靶点, 发挥药理作用。

3.2 从表 2 可以看出, 在 285 nm 的波长激发下药物与 BSA 中色氨酸残基的距离很接近, 推测 DHP 与可能嵌在同一色氨酸附近的疏水腔内, 其  $r$  微小的差别可能与它们侧链的不同有关。这一研究结果有助于了解药物在体内的运输和分布情况, 对阐明药物的作用机制, 药动学以及药物的不良反应具有重要的意义。

3.3 在药物对 BSA 紫外光谱影响实验中发现, 生理条件下,  $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 BSA 的紫外吸收光谱及药物和 BSA 等摩尔混合物与药物的紫外吸收差示光谱几乎都完全重合, 结果显示药物的加入并未使 BSA 的基态发生变化, 这可能也是由于 DHP 的疏水基团嵌入蛋白质的疏水腔内, 并没有与白蛋白形成一复合物的原因所在。

(下转第 35 页)

(上接第 21 页)

综上所述,从试验结果可见,DHP 与白蛋白间的结合率较高,很可能是由于 DHP 的疏水基团嵌入血清白蛋白的疏水腔结构中,而蛋白质的构象没有发生变化,表明白蛋白仅是 DHP 在体内的运载工具,为 DHP 作用机理的研究奠定了一定的理论依据。

## REFERENCES

- [1] LIU L X, FANG G R, SONG G W. Study on interaction between enoxacin and bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy[J]. Anal Instrum (分析仪器), 2005, (1): 18-21.
- [2] CHEN X B, KANG D G, LI S. Fluorescence Spectroscopy Study of Humen Serum Albumin Quenched by Levofloxacin[J]. Spectros Spectral Anal(光谱学与光谱分析), 2005, 25(9):1451-1454.
- [3] YAN C N, TONG J Q, PAN Z T. Studies on the Thermochemical Characteristics of Binding Reaction between Carbamazepine and Bovine Serum Albumin[J]. J Anal Sci(分析科学学报), 2006, 22(1):25-27.
- [4] SONG X K, JIANG H L. Studies on the Interaction between BSA and Fluoroquinolones[J]. J Anal Sci(分析科学学报), 1997, 13(2):108-112.
- [5] YAN C N, SHANG G Y F, LIN L M. Study on the characteristics of the binding reaction of chloramphenicol to bovine serum albumin[J]. J Huazhong Normal Univ(Nat Sci)(华中师范大学

学报:自然科学版), 2006, 40(1):66-69.

- [6] ZHANG X W, ZHAO F L, LI K A. Studies on Reaction Between Ciprofloxacin and Bovine Serum Albumin[J]. Chem J Chin Univ(高等学校化学学报), 1999, 20(7):1063-1067.
- [7] BIAN W, WEI Y L, WANG Y P, et al. Study on Interaction of Caffeine and Theophylline with Bovine Serum Albumins[J]. Spectros Spectral Anal(光谱学与光谱分析), 2006, 26(3):505-508.
- [8] LIU Y C, HU Z D. On the interaction between drugs and proteins by fluorescence spectroscopy[J]. J Baoji Univ Arts and Sci(宝鸡文理学院:自然科学版), 2005, 25(1):42-49.
- [9] LIU Y M, LI G Z, SUN X F. Studies on Reaction Between Colchicine and Bovine Serum Albumin by fluorescence [J]. Chin J Anal Chem(分析化学), 2004, 32(5):615-618.
- [10] YI S, WU J, GUO M, et al. Interaction of human serum albumine with ofloxacin and levofloxacin[J]. J Zhejiang Univ(Sci)(浙江大学学报:理学版), 2004, 31(3):314-318.
- [11] YAN L, YAN C Y, SHAO X F, et al. Studies on the Reaction Between levofloxacin and Bovine Serum Albumin[J]. J China Pharm Univ(中国药科大学学报), 2004, 35(5):456-459.
- [12] PENG B, YAN C Y, SHAO X F, et al. Interaction between Cefuroxime and Bovine Serum Albumin by fluorescence spectroscopy[J]. Chin J Spectros Lab(光谱实验室), 2005, 22(5):913-916.

收稿日期:2007-09-13