

顺铂对阿霉素与人血清白蛋白结合的相互作用光谱研究

梁晶, 胡卢丰, 林观样, 金辉(温州医科大学附属第一医院药学部, 浙江 温州 325000)

摘要: 目的 研究顺铂对阿霉素与人血清白蛋白结合的相互作用。方法 采用荧光光谱法研究不同浓度顺铂对阿霉素与人血清白蛋白结合的相互作用。结果 顺铂与阿霉素对人血清白蛋白都有猝灭作用。顺铂对白蛋白的猝灭方式为动态猝灭, 而阿霉素对白蛋白的猝灭方式为静态猝灭。结论 温度为 17 °C 和 37 °C 时, 阿霉素与白蛋白的结合常数分别为 2.13×10^4 , $2.76 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 2 者的结合位点数为 1。当加入不同浓度的顺铂后, 阿霉素与白蛋白的结合常数有所变化, 而结合位点数仍然为 1。

关键词: 顺铂; 阿霉素; 人血清白蛋白; 相互作用; 光谱研究

中图分类号: R969.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2014)07-0832-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.07.015

Spectroscopy Study of Cisplatin and Adriamycin on Human Serum Albumin Interactions

LIANG Jing, HU Lufeng, LIN Guanyang, JIN Hui(Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study cisplatin and adriamycin on human serum albumin(HSA) interactions. **METHODS** The interaction of cisplatin and adriamycin on HSA was studied by fluorescence spectra. **RESULTS** The results showed that cisplatin and adriamycin strongly quenched the fluorescence of human serum albumin. The quenching mechanism of cisplatin was a dynamic quenching procedure, and the quenching mechanism of adriamycin was a static quenching procedure. **CONCLUSION** At 17 °C and 37 °C, the binding constant of adriamycin and HSA system are 2.13×10^4 and $2.76 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, furthermore, the binding is 1. When different concentrations of cisplatin is added to the adriamycin and HSA system, the binding constant changed, and the binding site is still 1.

KEY WORDS: cisplatin; adriamycin; human serum albumin; interaction; spectroscopy study

血清白蛋白(human serum albumin, HSA)是血浆中最丰富的蛋白质,能与药物结合,控制药物的释放和代谢^[1-2]。大部分药物进入人体循环系统后,都与 HSA 结合。近年,药物与血浆蛋白结合规律的研究引起人们广泛的兴趣,一些学者采用光谱法研究药物与牛血清白蛋白或者 DNA 的相互作用^[3-6]。但是,这些研究多针对单一药物与蛋白大分子的相互作用,而就临床而言,联合用药时常发生,研究药物与药物间与蛋白结合的相互作用更有意义。顺铂与阿霉素为化疗药物,不良反应大,临床经常采取联合用药的方式。本研究采用荧光光谱法(fluorescence spectrometry, FS)研究顺铂和阿霉素与人血清之间的相互作用,讨论顺铂影响阿霉素对 HSA 的荧光猝灭机制,并得到它们之间相互作用的一些参数。

1 仪器与试剂

RF-5301PC 荧光分光光度计(日本岛津);

Millipore 超纯水系统(Millipore); 恒温水浴箱。顺铂(齐鲁制药有限公司,批号:WA2A1210074,规格:20 mg); 阿霉素(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号:120903 规格:10 mg); HAS(奥克特珐玛 20%人血清白蛋白,批号:A224C6661,规格:10 g×50 mL); 其他试剂均为分析纯,实验用水均为二次蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 溶液配制

以超纯水为溶剂配制 $3.0 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 HSA 标准溶液备用,阿霉素配成 $3.7 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 标准溶液,均在 0~4 °C 冰箱中保存。

2.2 顺铂荧光光谱测定

取顺铂 0, 4, 10, 14, 17, 21, 25, 33, 39 mg, 分别加入 Tris-HCl 缓冲溶液 3 mL, $3.0 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 HSA 标准溶液 80 μL , 配制得浓度分别为 0, 4.4×10^{-6} , 11.1×10^{-6} , 15.6×10^{-6} , 18.9×10^{-6} , 23.3×10^{-6} , $27.8 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 7

基金项目:温州市科技计划项目(S20100050)

作者简介:梁晶,女,主管药师 Tel: (0577)888069551 E-mail: 734302823@qq.com

种顺铂溶液, 设定激发波长 $\lambda=285\text{ nm}$, 测定 300~500 nm 的荧光光谱, 分别测定 17 和 37 °C 温度下顺铂的荧光光谱。结果见图 1。

由于顺铂在 HSA 的激发波长(285 nm)与发射波长(354 nm)处均有吸收, 且浓度高, 因此其猝灭行为中包含有“内滤光效应”。如果吸收值不超过 0.3, “内滤光效应”可用 $F_c = F_0 \times e^{-(A_1+A_2)/2}$ 公式^[5]予以校正。其中 F_c 和 F_0 分别为校正后和测量到的荧光强度, A_1 和 A_2 是溶液在激发和发射波长处的吸收值, 以下所用荧光强度均为校正后的荧光值。

2.3 阿霉素荧光光谱测定

取 $3.7 \times 10^{-7}\text{ mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 阿霉素标准液 0, 19, 39, 58, 113, 166, 217 μL , 分别加入 Tris-HCl 缓冲溶液 2.5 mL, $3.0 \times 10^{-9}\text{ mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 HSA 标准溶液 500 μL , 配制得浓度分别为 0, 2.4×10^{-9} , 4.8×10^{-9} , 7.1×10^{-9} , 13.9×10^{-9} , 20.5×10^{-9} , $26.8 \times 10^{-9}\text{ mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 7 种阿霉素溶液, 以 $\lambda=285\text{ nm}$, 测定 300~500 nm 的荧光光谱, 分别测定 17 °C 和 37 °C 下阿霉素的荧光光谱。以 $\Delta\lambda=60\text{ nm}$ 测定其同步荧光光谱。结果见图 1。

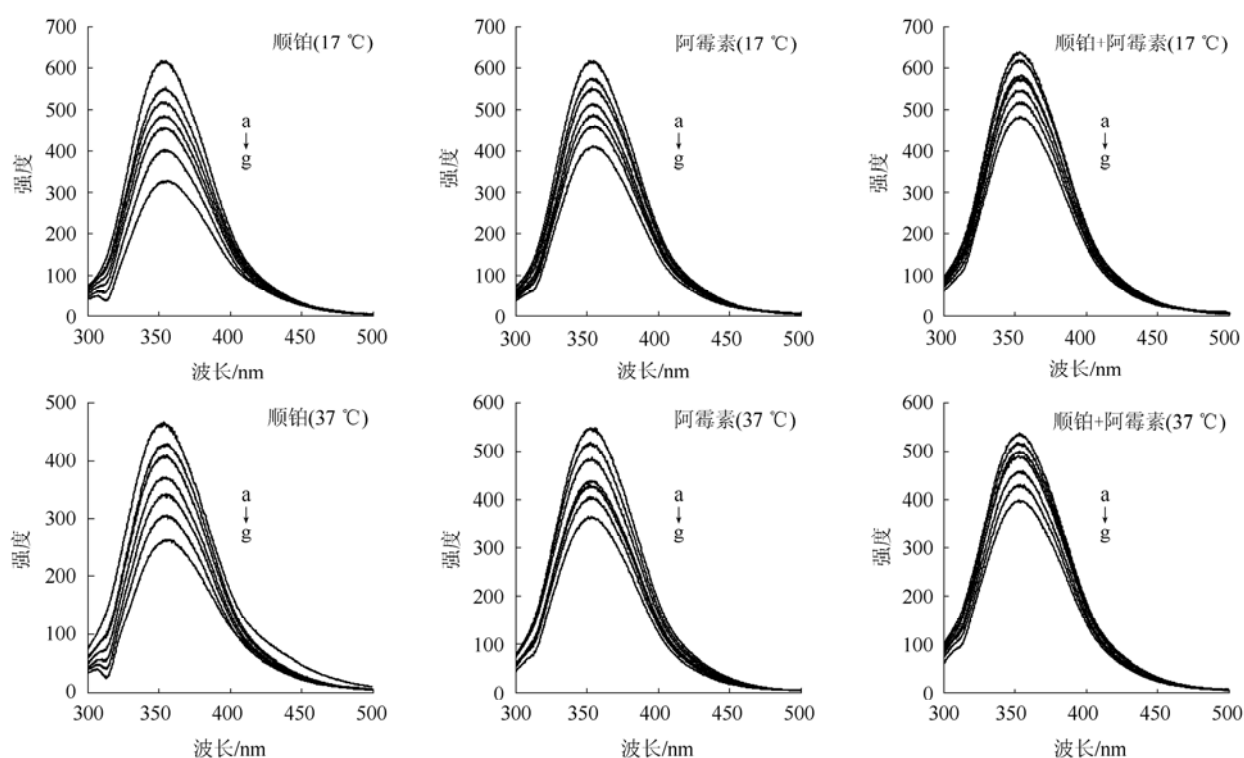


图 1 17 °C 和 37 °C 下药物对 HSA 荧光光谱的影响

a→g: 阿霉素溶液浓度分别为 0, 2.4×10^{-9} , 4.8×10^{-9} , 7.1×10^{-9} , 13.9×10^{-9} , 20.5×10^{-9} , $26.8 \times 10^{-9}\text{ mol}\cdot\text{mL}^{-1}$

Fig. 1 Effect of drugs on the fluorescence spectrum of HSA respectively at 17 °C and 37 °C

a→g: concentrations of adriamycin solution: 0, 2.4×10^{-9} , 4.8×10^{-9} , 7.1×10^{-9} , 13.9×10^{-9} , 20.5×10^{-9} , $26.8 \times 10^{-9}\text{ mol}\cdot\text{mL}^{-1}$

2.4 顺铂对阿霉素荧光光谱的影响

精密称取顺铂 0.126 mg 和 1.26 mg 各 7 份, 分别加入阿霉素标准液 19, 39, 58, 113, 166, 217, 268 μL , HSA($3.0 \times 10^{-8}\text{ mol}\cdot\text{mL}^{-1}$)的 Tris-HCl 溶液 3 mL, 得阿霉素浓度分别 2.4×10^{-9} , 4.8×10^{-9} , 7.1×10^{-9} , 13.9×10^{-9} , 20.5×10^{-9} , 26.8×10^{-9} , $33.0 \times 10^{-9}\text{ mol}\cdot\text{mL}^{-1}$, 顺铂浓度分别为 1.4×10^{-7} 和 $1.4 \times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 各 7 份溶液, 分别测定不同浓度下顺铂对阿霉素荧光光谱的变化。结果见图 2。

3 讨论

3.1 顺铂对 HSA 荧光光谱的影响

固定人血清白蛋白的浓度不变, 在本实验条件下, 当激发光波长为 285 nm 时, HSA 荧光发射峰位置在 354 nm 附近。顺铂在 HSA 荧光发射峰位置附近区域无荧光发射峰。随着顺铂浓度的增加, HSA 的内源荧光强度有规律地降低, 而它的发射峰的峰位及峰形基本保持不变, 这说明顺铂对 HSA 的荧光有猝灭作用。结果见图 1。

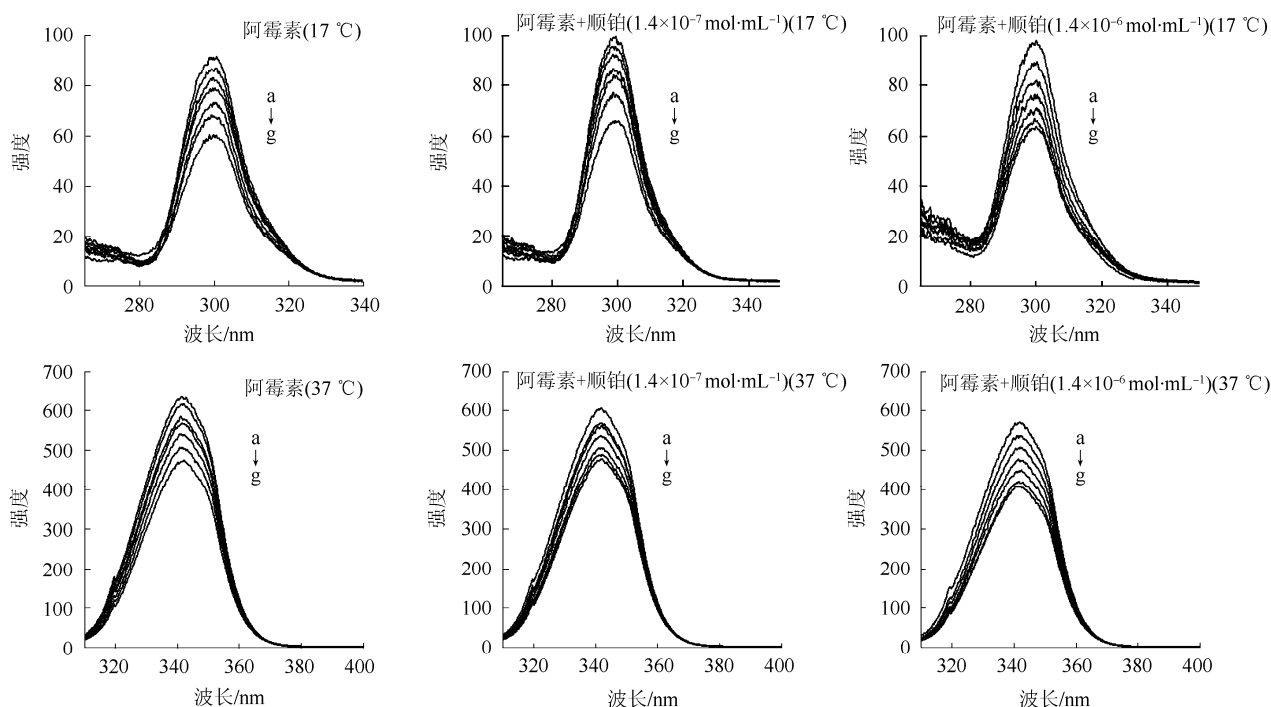


图 2 17 °C 和 37 °C 下不同浓度顺铂对 HSA 同步荧光光谱的影响

a→g: 阿霉素溶液浓度分别为 2.4×10^{-9} , 4.8×10^{-9} , 7.1×10^{-9} , 13.9×10^{-9} , 20.5×10^{-9} , 26.8×10^{-9} , 33.0×10^{-9} mol·mL⁻¹

Fig. 2 Effect of different concentrations of cisplatin on the fluorescence spectrum of HSA respectively at 17 °C and 37 °C

a→g: concentrations of adriamycin solution: 2.4×10^{-9} , 4.8×10^{-9} , 7.1×10^{-9} , 13.9×10^{-9} , 20.5×10^{-9} , 26.8×10^{-9} , 33.0×10^{-9} mol·mL⁻¹

荧光猝灭作用因猝灭机制不同可分为动态猝灭和静态猝灭。在动态猝灭过程中,蛋白质等荧光体与荧光猝灭剂分子间的相互作用可用 Stern-Volmer 方程进行描述,即 $F_0/F = 1 + K_{sv}\tau_0[Q] = 1 + K_q[Q]$ 。其中, F 为有猝灭剂时 BSA 的荧光强度, F_0 为无猝灭剂时 HSA 的荧光强度, $[Q]$ 为猝灭剂浓度, K_{sv} 为动态猝灭常数,单位是 mol·L⁻¹,它反映生物大分子与荧光猝灭剂分子彼此扩散和相互碰撞到达动态平衡时的量效关系; K_q 为动态荧光猝灭速率常数,单位是 L·mol⁻¹·s⁻¹,它反映体系中分子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,各类荧光猝灭剂对生物大分子的最大动态荧光猝灭速率常数约为 2.0×10^{10} L·mol⁻¹·s⁻¹, τ_0 为无猝灭剂时荧光分子的平均寿命,生物大分子的荧光平均寿命约为 10^{-8} s。

动态猝灭和静态猝灭还可依据不同温度条件下的结果加以区别。对于动态猝灭,温度的升高将增加有效碰撞和加剧电子转移过程,使猝灭常数随温度的升高而增大^[2]。

在顺铂对人血白蛋白荧光光谱影响的研究中,利用 Stern-Volmer 方程以 F_0/F 对 $[Q]$ 作图,得

到 17 °C 和 37 °C 的 2 条相关系数为 0.997 6 和 0.995 7 的曲线,并利用线性关系得到 K_q 值分别为 2.01×10^9 , 2.25×10^9 L·mol⁻¹·s⁻¹,都小于最大动态荧光猝灭速率常数 2.0×10^{10} L·mol⁻¹·s⁻¹,且 37 °C 下的猝灭常数比 17 °C 下的猝灭常数大。由此显示顺铂对人血白蛋白的猝灭为动态猝灭。结果见表 1。

表 1 顺铂和阿霉素的猝灭常数

Tab. 1 The quenching constants of cisplatin and doxorubicin

药物	T/°C	$K_{sv}/L \cdot mol^{-1}$	$K_q/L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$	R^2
顺铂	17	20.138	2.01×10^9	0.997 6
	37	22.523	2.25×10^9	0.995 7
阿霉素	17	2.77×10^5	2.77×10^{13}	0.997 4
	37	2.41×10^5	2.41×10^{13}	0.993 0

3.2 阿霉素对 HSA 荧光光谱的影响

同样的,固定 HSA 的浓度不变,当激发光波长为 285 nm 时,HSA 荧光发射峰位置在 354 nm 附近。阿霉素在 HSA 荧光发射峰位置附近区域无荧光发射峰。随着阿霉素浓度的增加,HSA 的内源荧光强度有规律地降低,而它的发射峰的峰位及峰形基本保持不变,这说明阿霉素对 HSA 的荧光有猝灭作用。结果见图 1。

在阿霉素对 HSA 荧光光谱影响的研究中, 也利用 Stern-Volmer 方程以 F_0/F 对 $[Q]$ 作图, 得到 17 °C 和 37 °C 的 2 条相关系数分别为 0.997 4 和 0.993 0 的曲线, 并利用线性关系得到 K_q 值分别为 2.77×10^{13} , $2.41 \times 10^{13} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 都大于最大动态荧光猝灭速率常数 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 且 37 °C 下的猝灭常数比 17 °C 下的猝灭常数小, 由此显示阿霉素对 HSA 的猝灭过程不是由于碰撞引起的动态猝灭。结果见表 1。

阿霉素对 HSA 的荧光猝灭不是动态猝灭, 很可能是由于阿霉素与基态的 HSA 之间形成复合物, 从而产生静态猝灭。

静态荧光猝灭作用是指荧光体分子与荧光猝灭剂分子之间借助分子间力, 彼此结合形成了具有一定结构的超分子复合物, 而导致荧光体荧光强度减弱的现象, 并用 Lineweaver-Burk 双倒数方程进行描述, 即 $(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} K_{LB}^{-1} \cdot F_0^{-1} \cdot [Q]^{-1}$ 。其中, K_{LB} 为静态荧光猝灭过程中复合物的形成常数, 单位是 $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 它反映在静态猝灭过程中生物大分子与荧光猝灭剂分子的结合反应达到平衡时的量效关系。由实验数据作出 HSA 的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线, 17 °C 和 37 °C 时 2 条曲线的相关系数分别为 0.994 2 和 0.995 3, 利用线性关系得到 K_{LB} 。由此获得, 阿霉素对 HSA 的猝灭过程为静态猝灭。结果见表 2。

表 2 阿霉素与白蛋白的结合常数及结合位点数

Tab. 2 The binding constant of adriamycin and albumin and the number of binding sites

药 物	$T/^\circ\text{C}$	$K_{LB}/\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$	n	R^2
阿霉素	17	2.13×10^4	0.970 0	0.994 2
	37	2.76×10^4	1.078 2	0.995 3
阿霉素+0.13 mg 顺铂	17	2.34×10^4	0.893 2	0.991 7
阿霉素+1.3 mg 顺铂	17	2.47×10^4	1.057 8	0.992 4

3.3 顺铂对阿霉素-HSA 体系的影响

3.3.1 对结合常数的影响 17 °C 时分别测定无顺铂干扰, 以及在不同浓度的顺铂(1.4×10^{-7} , $1.4 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$)存在下, 阿霉素荧光光谱的变化, 并按 Lineweaver-Burk 方程拟合得曲线。结果获得对应的 K_{LB} 值为: 2.13×10^4 , 2.34×10^4 , $2.47 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。由此显示随着顺铂浓度的增加, 阿霉素与 HSA 的结合常数有所减小。结果见表 2。

3.3.2 对结合位点数的影响 结合位点数的计算采用 $\lg(F_0/F-1) = \lg K_A + n \lg [Q]$, 以 $\lg(F_0/F-1)$ 对 $\lg [Q]$

作图, 可以由该直线的斜率求出阿霉素与 HSA 之间的结合位点数 n 。表 2 结果显示: 在 17 °C 时, 随着顺铂浓度的增加, 阿霉素与 HSA 的结合位点数基本不变, $n=1$; 另外, 在无顺铂存在时, 阿霉素与 HSA 的结合位点数也不受温度影响, $n=1$ 。

3.3.3 对同步荧光的影响 同步荧光光谱具有简化光谱, 窄化谱带和减少光谱重叠等优点而常被用于探讨蛋白质构象的变化。HSA 分子的色氨酸残基是主要荧光源。目前已知 $\Delta\lambda=60 \text{ nm}$ 时获得的同步荧光光谱图反映 HSA 中色氨酸残基所处的微环境, 通过同步荧光光谱图的变化情况可大致推测 HSA 构象的某些改变。图 2 显示, 把不同浓度顺铂加入到阿霉素-HSA 体系后, 色氨酸残基的发射波长基本不变, 表明顺铂对 HSA 的构象影响不大。

3.4 顺铂和阿霉素对荧光猝灭方式的确定

阿霉素对 HSA 的荧光有明显的猝灭作用, 猝灭方式为静态猝灭, 2 者的结合位点数为 1, 17 °C 和 37 °C 时的猝灭常数 K_{LB} 分别为 2.13×10^4 , 2.76×10^4 。顺铂对人血白蛋白的荧光也有明显的猝灭作用, 猝灭方式为动态猝灭, 17 °C 和 37 °C 时猝灭速率常数 K_q 分别为 2.01×10^9 , $2.25 \times 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。在顺铂对阿霉素与人血白蛋白结合的相互作用中, 发现随着顺铂浓度的增加, 对阿霉素与 HSA 的结合位点数无影响, 对同步荧光无影响, 但会导致阿霉素与 HSA 的结合常数呈现下降趋势。

REFERENCES

- [1] CARTER D C, CHANG B, HO J X, et al. Preliminary crystallographic studies of four crystal forms of serum albumin [J]. Eur J Biochem, 1994, 226(3): 1049-1052.
- [2] GAO P Z, WU H, GUO J, et al. Study on the interaction between breviscapin and bovine serum albumin by fluorescence spectrometry [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(2): 106-109.
- [3] ZHAO J, WANG Z, WU Q H, et al. Interaction between strychnine and bovine serum albumin [J] Acta Pharm Sin(药理学报), 2006, 41(7): 666-670.
- [4] HU M, YANG X, JIN W J, et al. Studies on the style of interaction of pirarubicin with DNA by fluorescence spectra [J]. Acta Pharm Sin(药理学报), 1999, 34(8): 608-612.
- [5] YAN Y, PEI R H, YAN H T. Interaction between warfarin and bovine serum albumin detected by spectrometry [J]. Acta Pharm Sin(药理学报), 2008, 43(12): 1224-1227.
- [6] WEN X D, LI P S, QIAN, Z M, et al. Interaction between three antioxygenic micromolecules and bovine serum albumin [J]. Acta Chim Sin(化学学报), 2007, 65(5): 421-429.

收稿日期: 2013-10-09