

应激水平^[8-11]。实验结果显示, LPS 可导致 CAT、GPx 和 SOD 活性明显降低, 而芦丁可增加 CAT、GPx 和 SOD 活性。实验结果显示, 芦丁可通过抗氧化应激减轻 LPS 导致的 ALI, 这为临床预防治疗 ALI 提供了新思路。但在 ALI 中, 芦丁除干预氧化应激外, 是否还有其他途径目前仍然不清楚, 这将是笔者进一步研究解决的问题。

REFERENCES

- [1] SUN T. A study on chemical constituents of the leaves from *Engelhardtia roxburghiana* and *Brassica pekinensis* [D]. Beijing: Chinese Academy of Medical Science Peking Union Medical College, 2012.
- [2] CHEN H, BAI C, WANG X. The value of the lipopolysaccharide-induced acute lung injury model in respiratory medicine [J]. *Expert Rev Respir Med*, 2010, 4(6): 773-783.
- [3] MCDONALD C I, FUNG Y L, SHEKAR K, et al. The impact of acute lung injury, ECMO and transfusion on oxidative stress and plasma selenium levels in an ovine model [J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2015, 30(3): 4-10.
- [4] GAO H C, ZHU K, GAO H M, et al. Role of tissue transglutaminase in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy and the intervention effect of rutin [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 9(4): 1103-1108.
- [5] HUANG R, ZHONG T, WU H. Quercetin protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats through suppression of inflammation and oxidative stress [J]. *Arch Med Sci*, 2015, 11(2): 427-432.
- [6] SRIVASTAVA R. A review on phytochemical, pharmacological, and pharmacognostical profile of *Wrightia tinctoria*: Adulterant of kurchi [J]. *Pharmacogn Rev*, 2014, 8(15): 36-44.
- [7] CHUA L S. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 150(3): 805-817.
- [8] CHEN S, ZHENG S, LIU Z, et al. Endogenous sulfur dioxide protects against oleic acid-induced acute lung injury in association with inhibition of oxidative stress in rats [J]. *Lab Invest*, 2015, 95(2): 142-156.
- [9] SHOHRATI M, KARIMZADEH I, SABURI A, et al. The role of N-acetylcysteine in the management of acute and chronic pulmonary complications of sulfur mustard: a literature review [J]. *Inhal Toxicol*, 2014, 26(9): 507-523.
- [10] MADL A K, PLUMMER L E, CAROSINO C, et al. Nanoparticles, lung injury, and the role of oxidant stress [J]. *Annu Rev Physiol*, 2014, 76(8): 447-465.
- [11] YE H C H, YANG J J, YANG M L, et al. Rutin decreases lipopolysaccharide-induced acute lung injury via inhibition of oxidative stress and the MAPK-NF- κ B pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 69(7): 249-257.

收稿日期: 2015-04-15

荧光光谱法研究安非他酮与人血清白蛋白的相互作用

周彬, 汤从容, 胡卢丰(温州医科大学附属第一医院药学部, 浙江 温州 325000)

摘要: 目的 研究安非他酮与人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)的相互作用。方法 通过荧光光谱法研究安非他酮对 HSA 的荧光猝灭光谱和同步荧光光谱的影响。由 Stern-Volmer 方程确定安非他酮对 HSA 的荧光猝灭机制, 双对数方程确定反应结合位点和结合常数。根据热力学方程讨论两者间主要的作用力类型。结果 荧光猝灭光谱显示, 安非他酮对 HSA 有猝灭作用, 在 17 °C 和 37 °C 时的猝灭速率常数分别为 5.714×10^3 和 $3.126 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 反应前后的焓变和熵变均 < 0 , 结合点数为 1。结论 安非他酮对 HSA 的猝灭过程为静态猝灭, 二者间的结合力主要为氢键和范德华力。

关键词: 安非他酮; 人血清白蛋白; 荧光猝灭; 荧光光谱法

中图分类号: R969.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)09-1062-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.09.008

Study on the Interaction Between Amfebutamone and Human Serum Albumin by Fluorescence Spectrum

ZHOU Bin, TANG Congrong, HU Lufeng(Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the interaction between amfebutamone and human serum albumin(HAS). **METHODS** Fluorescence spectrum was used to measure the effects of amfebutamone on the fluorescence quenching spectra and synchronous

作者简介: 周彬, 男, 药师 Tel: (0577)88069699 E-mail: zb1890@189.cn

fluorescence spectra of HAS. Stern-Volmer equation was used to determine the mechanism of fluorescence quenching of HAS. The binding constants were calculated according to Lineweaver-Burk equation and types of binding force were estimated by the calculation of thermodynamic parameters. **RESULTS** The fluorescence quenching spectra showed that amfebutamone had quenching effect on HAS. The quenching rate constants were 5.714×10^3 , $3.126 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ at 17°C and 37°C . The enthalpy changes and entropy changes were both <0 . The binding site number of amfebutamone and HSA was 1. **CONCLUSION** The fluorescence of HAS quenched by amfebutamone is static and the interaction force between them are mainly hydrogen bond and Van der Waals force.

KEY WORDS: amfebutamone; human serum albumin; fluorescence quenching; fluorescence spectrum

安非他酮主要用于抑郁症治疗, 它的蛋白结合率高达 84%。大部分药物进入循环系统后都与血清白蛋白(human serum albumin, HSA)结合^[1]。荧光光谱法是研究生物大分子与小分子药物相互作用的重要手段^[2-3]。本研究应用荧光猝灭法探讨安非他酮与 HSA 相互作用的热力学特点, 讨论安非他酮对 HSA 的荧光猝灭机制。本研究结果有助于了解安非他酮与高蛋白结合率药物间的相互作用, 为临床合理用药提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

HSA(奥克特玛公司, 批号: 20120104, 纯度: 20%); 安非他酮(浙江新华制药有限公司, 批号: 20111107, 规格: 50 mg); 其他试剂均为分析纯, 实验用水均为二次蒸馏水。

1.2 仪器

RF5301PC 荧光分光光度计(日本岛津公司); TU-C901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司); KQ-500DE 型数据超声清洗器(上海道京仪器有限公司); XW-80A 型漩涡混合器、UPWS-I-20T 型超纯水器、上海方瑞 FA/JA 系列电子天平和 HH-4 数显恒温水浴箱均购于上海江星仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 溶液的配制 以 Tris-HCl 缓冲溶液(pH 7.4, 含 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 维持溶液离子强度)为溶剂, 配制 $3.01 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HSA 溶液, 稀释成 $3.01 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 作为实验用 HSA 溶液。用生理盐水配制 $9.05 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 安非他酮备用, 保存在 4°C 冰箱中。

1.3.2 安非他酮对 HSA 的荧光猝灭 取 5 mL EP 管 10 支, 依次加入 $3.01 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HSA 和适量安非他酮, 以 Tris-HCl 缓冲溶液稀释至 3 mL, 使安非他酮浓度分别为 0 , 5.586×10^{-5} , 1.117×10^{-4} , 1.676×10^{-4} , 2.235×10^{-4} , 2.793×10^{-4} , $3.352 \times$

10^{-4} , 3.910×10^{-4} , 4.469×10^{-4} , $5.028 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。混合后在 17°C 和 37°C 下分别稳定 30 min, 测定 HSA 的荧光光谱。狭缝为 5 nm, 激发波长为 285 nm, 采集 HSA 在 300~500 nm 的荧光光谱。

1.3.3 安非他酮对 HSA 的荧光猝灭光谱测定 按“1.3.2”项下方法分别测定 HSA 的荧光发射光谱, 取最大发射峰的荧光强度参考文献[4]计算。根据 Stern-Volmer 方程描述动态猝灭规律。

$$F_0/F = 1 + K_q \cdot \tau_0 \cdot [Q] = 1 + K_{sv} \cdot [Q] \quad (1)$$

其中, F_0 和 F 分别表示加入猝灭剂前后所测得的荧光强度值; K_q 为猝灭速率常数; τ_0 为没有猝灭剂存在时荧光分子的平均寿命; $[Q]$ 为猝灭剂的浓度; K_{sv} 为 Stern-Volmer 猝灭常数, 且 $K_{sv} = K_q \tau_0$ 。

根据 Lineweaver-Burk 公式描述静态猝灭规律。

$$(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + K_{LB}^{-1} \cdot F_0^{-1} \cdot [Q]^{-1} \quad (2)$$

其中, K_{LB} 为静态荧光猝灭过程中复合物的形成常数。

用静态猝灭双对数公式求有关热力学参数。

$$\lg[(F_0/F - 1)] = \lg K_A + n \lg [Q] \quad (3)$$

其中, n 为结合位点数; K_A 为表观结合常数。

根据如下公式计算吉布斯自由能(ΔG)、焓变(ΔH)和熵变(ΔS)。

$$\Delta G = -RT \ln K_A \quad (4)$$

$$\ln K_2 - \ln K_1 = (1/T_1 - 1/T_2) \cdot \Delta H/R \quad (5)$$

$$\Delta S = (\Delta H - \Delta G)/T \quad (6)$$

1.3.4 安非他酮与 HSA 相互作用的同步荧光光谱 分别在 $\Delta\lambda = 15, 60 \text{ nm}$ 测定 HSA 的 265~330, 310~400 nm 同步荧光光谱, 观察峰位和峰型的变化。

2 结果

2.1 安非他酮对 HSA 的荧光猝灭作用

激发波长 285 nm、HSA 浓度固定不变时, 随安非他酮浓度的增加, HSA 的荧光强度有规律的降低, 而峰位和峰型保持不变, 表明药物对 HSA 有猝灭作用。结果见图 1。

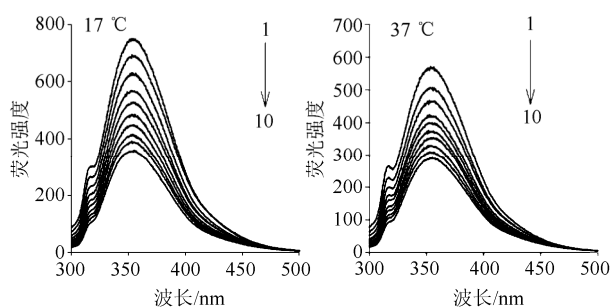


图 1 17 °C 和 37 °C 安非他酮与 HSA 相互作用的荧光光谱 1→10: 安非他酮浓度分别为 0, 5.586×10^{-5} , 1.117×10^{-4} , 1.676×10^{-4} , 2.235×10^{-4} , 2.793×10^{-4} , 3.352×10^{-4} , 3.910×10^{-4} , 4.469×10^{-4} , $5.028 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

Fig. 1 Fluorescence spectrum of the interaction between amfebutamone and HSA at 17 °C and 37 °C 1→10: the concentration of amfebutamone were respectively 0, 5.586×10^{-5} , 1.117×10^{-4} , 1.676×10^{-4} , 2.235×10^{-4} , 2.793×10^{-4} , 3.352×10^{-4} , 3.910×10^{-4} , 4.469×10^{-4} , $5.028 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 安非他酮对 HSA 的荧光猝灭机制

以 F_0/F 对 $[Q]$ 作线性拟合, 可知随温度的增加 K_{sv} 降低, 表明安非他酮对 HSA 猝灭过程不是动态猝灭过程。另外, τ_0 约为 10^{-8} s , 计算得 17 °C 和 37 °C 时的 K_q 分别约为 9.69×10^{12} , $8.19 \times 10^{12} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 该值远大于最大碰撞 $K_q(2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$, 进一步表明安非他酮对 HSA 荧光猝灭过程可能是一个静态猝灭过程。根据实验数据得到 HSA 的 Lineweaver-Burk 公式双倒数曲线, 17 °C 和 37 °C 时 2 条曲线的相关系数分别为 0.998 6 和 0.991 0, 利用线性关系得到 K_{LB} 值, 证明了安非他酮对 HSA 为静态淬灭。结果见图 2~3、表 1~2。

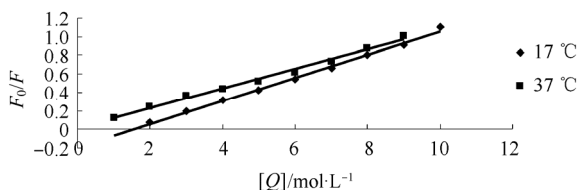


图 2 安非他酮对 HSA 荧光猝灭 Stern-Volmer 方程拟合图 **Fig. 2** The Stern-Volmer equation of amfebutamone and HSA

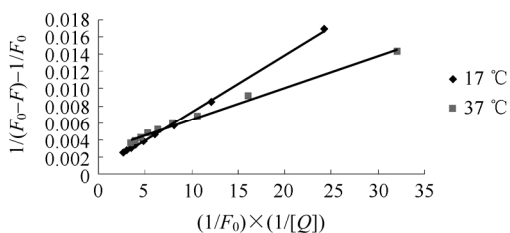


图 3 HSA 的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线拟合图 **Fig. 3** The Lineweaver-Burk equation of HSA

表 1 安非他酮作用下 HSA 的荧光猝灭参数

Tab. 1 The fluorescence quenching parameters of HSA interfered by amfebutamone

温度/°C	$K_{sv}/\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$	$K_q/\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	R^2
17	96 905	9.69×10^{12}	0.995 9
37	81 901	8.19×10^{12}	0.992 5

表 2 Lineweaver-Burk 双倒数方程参数

Tab. 2 Parameters of the Lineweaver-Burk equation

温度/°C	$K_{LB}^{-1}/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$K_{LB}/\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$	R^2
17	1.53×10^{-5}	0.65×10^5	0.998 6
37	0.86×10^{-5}	1.16×10^5	0.991 0

2.3 安非他酮与 HSA 的结合参数和位点数

根据 $\lg[(F_0-F)/F] = \lg K_A + n \lg [Q]$ 作图, 通过斜率和截距求出药物分子与蛋白质分子的结合常数 K_A 和结合位点数 n , 结果提示安非他酮与 HSA 的结合位点为 1。结果见图 4、表 3。

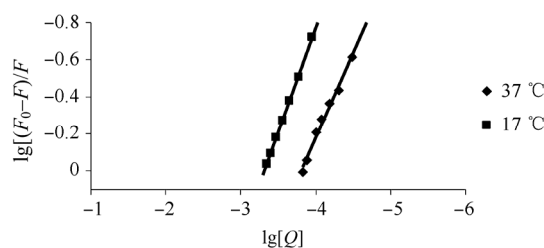


图 4 安非他酮与 HSA 的双对数方程图

Fig. 4 The double logarithm equation of amfebutamone and HSA

表 3 安非他酮与 HAS 的结合参数

Tab. 3 The binding parameters of amfebutamone and HSA

温度/°C	K_A	n	R^2
17	$5.714 8 \times 10^3$	1.131 7	0.999 7
37	$3.126 1 \times 10^3$	0.918 9	0.995 1

2.4 安非他酮与 HSA 之间的作用力类型

药物等有机小分子和蛋白质等生物大分子常常借助于疏水作用力、静电引力、氢键、立体排斥力和范德华力等结合形成超分子复合物。蛋白质和药物不同, 则它们之间的作用力类型也不完全相同。根据反应前后 ΔH 和 ΔS 的相对大小, 可以判断药物与蛋白质之间的主要作用力类型。 $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$ 时, 主要作用力为疏水作用力; $\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$ 时, 主要作用力为氢键和范德华力; $\Delta H < 0$, $\Delta S > 0$ 时, 主要作用力为静电引力^[5]。根据公式 (4)~(6) 计算热力学参数 ΔH 、 ΔG 和 ΔS , 结果 $\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$, 推测其作用力主要为范德华力和氢键。结果见表 4。

表4 安非他酮与HAS相互作用的热力学参数

Tab. 4 Thermodynamic parameters of the interaction between amfebutamone and HSA

T/K	$K_A/L \cdot mol^{-1}$	$\Delta G/kJ \cdot mol^{-1}$	$\Delta S/J \cdot mol^{-1}$	$\Delta H/kJ \cdot mol^{-1}$
290.15	5.7148×10^3	-20.893 6	-5.767 4	-22.567
310.15	3.1261×10^3	-20.751 3	-5.854 3	

2.5 安非他酮对HSA构象的影响

$\Delta\lambda=60$ nm 时 HSA 荧光峰没有发生偏移, 在 $\Delta\lambda=15$ nm 时发生红移, 说明安非他酮不影响色氨酸残基附近的极性, 但可使酪氨酸分子腔内疏水环境的极性增大。结果见图 5。

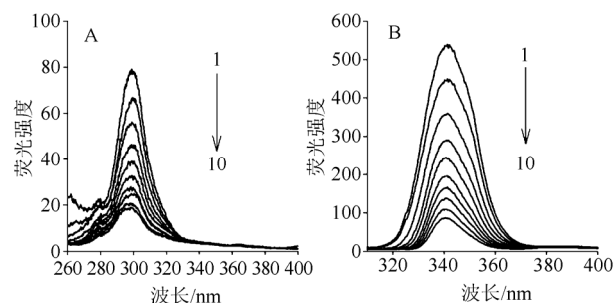


图5 安非他酮作用下HSA的同步荧光光谱

A- $\Delta\lambda=15$ nm; B- $\Delta\lambda=60$ nm; 1→10: 安非他酮浓度分别为 0 , 5.586×10^{-5} , 1.117×10^{-4} , 1.676×10^{-4} , 2.235×10^{-4} , 2.793×10^{-4} , 3.352×10^{-4} , 3.910×10^{-4} , 4.469×10^{-4} , $5.028 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot L^{-1}$ 。

Fig. 5 The synchronous fluorescence spectra of HSA interfered by amfebutamone

A- $\Delta\lambda=15$ nm; B- $\Delta\lambda=60$ nm; 1→10: the concentration of amfebutamone were respectively 0 , 5.586×10^{-5} , 1.117×10^{-4} , 1.676×10^{-4} , 2.235×10^{-4} , 2.793×10^{-4} , 3.352×10^{-4} , 3.910×10^{-4} , 4.469×10^{-4} , $5.028 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot L^{-1}$ 。

3 讨论

安非他酮对HSA荧光的影响呈静态猝灭, 即安非他酮与HSA有牢固结合, 热力学参数表明安非他酮与HSA间为单位点结合, 二者主要作用力为范德华力和氢键, 提示它们间相互作用较强。与其机制相同的还有阿霉素对HSA的荧光淬灭^[6]。

HSA分子的二级结构包括I、II、III 3个 α -螺旋的结构域, 每个结构域又包含2个子域, 这就形成了IA、IB、IIA、IIB、IIIA、IIIB亚结构域^[4]。每个结构中A和B又以槽口相对的方式形成圆桶状结构。药物小分子主要结合于IIA和IIIA。这2个区域都是由疏水性氨基酸残基构成疏水空腔。由于蛋白质中酪氨酸与色氨酸的最大荧光发射波长与其所处环境的疏水性有关, 随其所处环境的疏水性降低而红移, 因此由最大发射波长的改变可以判断蛋白质构象的变化^[7]。同步荧光结果提示安非他酮可使酪氨酸分子腔内疏水环境的极性增大, 这种变化有可能影响一些极性药物与HSA的结合。

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] 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.
- [3] TONG S L, ZHANG X X. Study on the interaction of ofloxacin and levofloxacin with DNA [J]. Spectrosc Spectral Anal(光谱学与光谱分析), 2010, 30(2): 481-485.
- [4] LIN G Y, YE X M, HU L F. Interaction characteristics between epirubicin and human serum albumin [J]. Chin J Clin Pharm(中国临床药理学杂志), 2011, 20(2): 85-88.
- [5] HUANG B, ZOU G L, YANG T M. Studies on the interaction between adriamycin and bovine serum albumin [J]. Acta Chim Sin(化学学报), 2002, 60(10): 1867-1871.
- [6] LIANG J, HU L F, LIN G Y, et al. Spectroscopy study of cisplatin and adriamycin on human serum albumin interactions [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2014, 31(7): 832-835.
- [7] CHEN D W, XIE Q J, JIANG X Q, et al. Interactions of quercetin with casein and bovine serum albumin as well as effects of coexisting carbon nanotubes [J]. Acta Phys Chim Sin(物理化学学报), 2008, 24(3): 379-387.

收稿日期: 2014-12-02

浙江七叶一枝花种质资源的化学评价

周爱存, 闫道良, 黄妍, 徐忆琳, 段承俐* (浙江农林大学, 浙江 临安 311300)

摘要: 目的 测定浙江不同采集地野外七叶一枝花中主要活性成分甾体皂苷的含量, 为筛选优质种质资源和适宜栽培地提供依据。方法 采用高效液相色谱法, 色谱柱为 Waters XBridge C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(A)-水(B), 梯度洗脱, 柱温: 25 °C, 洗脱流速为 1.0 mL·min⁻¹, 测定 12 个不同采集地七叶一枝花中重楼皂苷 I、II、VI、VII

基金项目: 浙江省公益性技术应用研究项目(2012C22078)

作者简介: 周爱存, 男, 硕士, 讲师 Tel: (0571)63741273 E-mail: aczhou@zafu.edu.cn

E-mail: aczhou@zafu.edu.cn

*通信作者: 段承俐, 女, 博士, 副教授

Tel:

(0571)63741273 E-mail: chenglidian@hotmail.com