

文章编号:1009-3087(2013)04-0181-05

柳叶水甘草碱与牛血清白蛋白的相互作用

吴笛,晏瑾,白珂珂,王庆,闫树军,李晖*

(四川大学化学工程学院,四川成都610065)

摘要:利用亲和毛细管电泳法(ACE)研究了柳叶水甘草碱(TAB)与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用。结果表明,柳叶水甘草碱与BSA常温下结合常数为 $8.00 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$,热力学参数验证两者相互作用力以氢键和范德华力为主。傅立叶变换红外光谱(FT-IR)进一步考察了柳叶水甘草碱对BSA二级结构的影响,其结果是,柳叶水甘草碱使得蛋白的 α -螺旋、 β -转角含量降低, β -折叠含量上升。在分子水平,利用分子对接技术确定了柳叶水甘草碱和牛血清白蛋白结合的适宜位置。

关键词:柳叶水甘草碱;亲和毛细管电泳;牛血清白蛋白;分子对接;相互作用

中图分类号:O657

文献标志码:A

Analysis of Interaction Between Tabersonine and Bovine Serum Albumin

WU Di, YAN Jin, BAI Ke-ke, WANG Qing, YAN Shu-jun, LI Hui*

(College of Chem. Eng., Sichuan Univ., Chengdu 610065, China)

Abstract: Affinity capillary electrophoresis was employed to study the interaction between tabersonine(TAB) and bovine serum albumin(BSA). The results showed that the binding constant is $8.00 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ under normal temperature. The thermodynamic parameters indicated that the interaction between tabersonine and BSA was driven mainly by hydrophobic interaction and van der Waals forces. The secondary structure of BSA was changed in the presence of TAB according to the FT-IR results. It was shown that TAB reduced α -helix, β -turn and increased β -sheet. At the molecular level, the binding mode of TAB and BSA was determined by molecular modeling method.

Key words: tabersonine; affinity capillary electrophoresis; bovine serum albumin; molecular modeling; interaction

当药物进入体内后会与血清白蛋白产生快速可逆结合,发生相互作用,其结果必将影响药物的总体功效、活性、毒性和代谢等。血清白蛋白在循环系统中起着维持渗透压、pH缓冲,作为载体和营养等作用^[1]。因此,研究血清白蛋白与药物的相互作用,在药代动力学、药效和药理毒性方面具有重要意义^[2]。何梅等^[3]使用紫外光谱法研究了大黄素、大黄酸和大黄酚与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用,进一步探明其药物代谢途径。Tajmir-Riahi等^[4]利用红外光谱、紫外光谱和圆二色谱研究了叶绿素和叶绿酸与人血清白蛋白(HSA)结合模型,结合常数以及对HSA二级结构变化的影响。Naik^[5]等人利用荧光和红外法对地塞米松和HSA的相互作用进行了研究,为地塞米松这种药物在人体中如何更大

的发挥药效提供了有力的指导。毛细管电泳法具有简单、快捷、样品量少的特点也逐步用于研究药物与血清白蛋白相互作用^[6-9]。

作者采用亲和毛细管电泳(ACE)法研究了长春胺生物碱的合成前体化合物柳叶水甘草碱(TAB)^[10]与牛血清白蛋白的相互作用,利用傅立叶红外变换光谱定量表征了相互作用前后BSA二级结构的变化,同时进行了TAB与BSA的分子对接,获得满意结果。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

贝克曼P/ACE™ MDQ毛细管电泳系统, Beckman Coulter Instrument, Fullerton, CA, USA, 配置紫外检测器;未涂层熔融石英毛细管(总长度50.2 cm, 有效长度40 cm, 内径75 μm), 河北永年锐泽色谱器件有限公司; Nicolet-6700傅立叶红外(FT-IR)

收稿日期:2013-01-15

作者简介:吴笛(1988—),女,博士生.研究方向:药物分析.

*通信联系人 E-mail: lihuilab@sina.com

光谱仪(配有液体检测附件);Millipore synergy UV超纯水系统(Milford, MA, USA);V0876X-5型混旋仪,海门市其林贝尔仪器制造有限公司;KQ-250DE型数控超声波仪,昆山市超声仪器有限公司;BS224S电子分析天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司;pHS-3C酸度计(上海雷磁)。

牛血清蛋白(BSA),Sigma-Aldrich(美国)生物技术公司,纯度99%;柳叶水甘草碱,实验室自提,(HPLC98%)^[11];硼砂(AR, Sigma);甲醇、氢氧化钠均为分析纯,水为二次去离子水。

1.2 测定条件

亲和毛细管电泳:

1)电泳条件: 3.45×10^{-3} Ma)气压进样5 s,分离电压20 kV;紫外光谱检测波长214 nm;甲醇作为电渗流标记物。

2)毛细管预处理:每次电泳前均先用 5.0×10^{-1} mol/L NaOH水溶液,去离子水,运行缓冲液分别冲洗毛细管6、5、5 min,所有溶液均经过0.45 μ m醋酸纤维素微孔滤膜过滤。

3)操作步骤:以 1.0×10^{-3} mol/L柳叶水甘草碱甲醇溶液作为样品进样,电泳运行缓冲液为0.01 mol·L pH 7.4的硼砂缓冲液(PBS),其中BSA(硼砂缓冲液溶解)的浓度梯度增加,依次为0、 3.0×10^{-6} 、 6.0×10^{-6} 、 9.0×10^{-6} 、 1.2×10^{-5} 、 1.5×10^{-5} 、 1.8×10^{-5} mol/L,考察在不同BSA浓度下柳叶水甘草碱的迁移情况。改变柱温(25、30和37 $^{\circ}$ C),按上述步骤操作,相同条件下重复操作3次,结果取平均值,考察药物与BSA的结合。

傅立叶红外变换光谱 FT-IR 光谱均采用衰减全反射(ATR)方法记录,将采集样品均匀铺满于液样采集晶片,在分辨率为4 cm^{-1} ,室温环境下敞开状态收集背景,重复扫描64次样品。BSA和柳叶水甘草碱浓度均为 4.0×10^{-4} mol·L。分别采集BSA作用前后的红外光谱图,以及缓冲液和药物的红外光谱图。BSA作用前光谱图与缓冲液光谱图差谱得到相互作用前BSA的红外光谱,BSA作用后光谱图与药物光谱图差谱得到相互作用后BSA红外光谱图。将得到的红外差谱在1600~1700 cm^{-1} 波数段进行傅立叶去卷积处理和线性拟合,获得各子峰的吸收频率和峰宽,并对其进行多次拟合使残差最小,对得到的每一个子峰进行归属,根据其积分面积计算各个二级结构的相对百分含量。

分子对接 BSA 的晶体结构来自于 Brookhaven 蛋白数据库(pdb code: 3v03),TAB的初始3D结构

由 ChemiDraw11.0 分子模拟软件包生成。再用 Gasteiger-Huckel 优化分子的几何结构,修饰结构后在 Linux 操作系统上运用 sybyl8.0 软件包基于探针位置进行分子对接。用遗传算法来计算蛋白分子与药物分子结合的可能构象,选择结合能量最小的结果,最后用 Molsoft ICM Browser 软件编辑查看结合构象。

2 结果与讨论

2.1 结合常数及热力学参数的测定

2.1.1 结合常数测定

蛋白分子在电场作用下通过毛细管发生迁移时,蛋白分子的电泳淌度主要由蛋白质分子的荷/质比和蛋白分子周围存在的化学微环境决定。药物能与蛋白分子发生作用,蛋白-药物复合物的荷/质比与蛋白分子不同,导致电泳淌度发生变化^[12]。固定药物浓度,以不同浓度的蛋白为缓冲溶液,当柳叶水甘草碱与BSA以1:1摩尔比结合形成复合物时^[13],存在快速平衡 $S + L \rightleftharpoons S - L$, 可得二者结合常数 $K = c(S - L) / c(S)c(L)$, 游离的TAB, BSA及其结合物在电泳中的迁移率由游离分子和结合物的浓度共同决定:

$$\mu_i = \frac{c(S)}{c(S) + c(S - L)}\mu_f + \frac{c(S - L)}{c(S) + c(S - L)}\mu_e \quad (1)$$

可得:

$$\mu_i = \frac{\mu_f + \mu_e Kc(L)}{1 + Kc(L)} \quad (2)$$

式中, $c(L)$ 为受体分子即BSA的游离浓度, $c(S)$ 为配体分子即TAB的游离浓度, $c(S - L)$ 为BSA与TAB结合物的浓度, μ_i 为TAB的表观迁移率, μ_f 为TAB的自由迁移率, μ_e 为结合物的迁移率, K 为结合常数。

$$(\mu_i - \mu_f) = \frac{(\mu_i - \mu_f)Kc(L)}{1 + Kc(L)} \quad (3)$$

将式(2.3)整理为

$$\frac{(\mu_i - \mu_f)}{c(L)} = -K(\mu_i - \mu_f) + K(\mu_e - \mu_f) \quad (4)$$

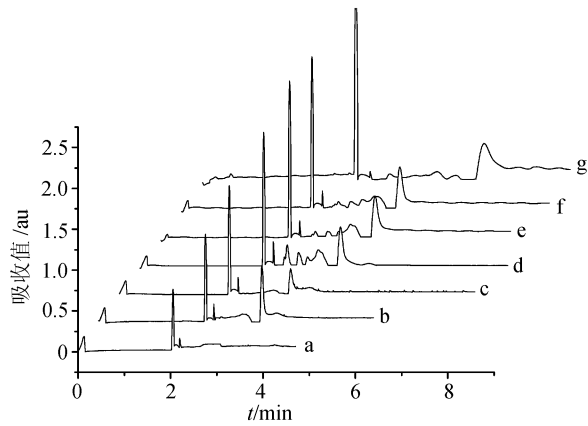
这就是著名的 Scatchard 方程,也可称为 x -倒数法,式(2.4)又可变形为:

$$\frac{c(L)}{(\mu_i - \mu_f)} = \frac{1}{(\mu_i - \mu_f)} c(L) + \frac{1}{(\mu_e - \mu_f)K} \quad (5)$$

式(2.5)称为 y -倒数法^[14-15]。分别测定不同BSA浓度下电泳淌度的变化,以 $c(L) / (\mu_i - \mu_f)$ 对 $c(L)$

线性回归,所得直线的斜率为 $1/(\mu_e - \mu_f)$,截距为 $1/K(\mu_e - \mu_f)$,斜率与截距相比即得 K 。

在 pH 7.4 的 1.0×10^{-2} mol/L 硼砂缓冲体系下电流稳定,约 $35 \mu\text{A}$ 左右,且基线平稳。图 1 为 37 °C 下柳叶水甘草碱在不同 BSA 浓度缓冲溶液中的毛细管电泳图。



a. 0 mol/L; b. 3.0×10^{-6} mol/L; c. 6.0×10^{-6} mol/L;
d. $\times 10^{-6}$ mol/L; e. $\times 10^{-6}$ mol/L; f. 1.5×10^{-6} mol/L;
g. 1.8×10^{-6} mol/L。

图 1 TAB 在不同 BSA 浓度下的电泳谱图

Fig.1 Electropherogram of TAB under different BSA concentrations

表 1 给出了 25、30、37 °C 下实验所得的结合常数 K ,其数量级均在 10^6 L/mol,说明柳叶水甘草碱与血清白蛋白有较强的结合能力,可以在体内被血清白蛋白储存转运。温度对其结合常数影响较大,温度升高 K 值明显降低。

表 1 毛细管电泳所得不同温度下 TAB 与 BSA 结合常数

Tab.1 Binding constant between TAB and BSA under different temperature

$T/^\circ\text{C}$	$K/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	R^2
25	8.00×10^6	0.999 7
30	5.19×10^6	0.999 4
37	2.38×10^6	0.998 1

2.1.2 热力学参数测定

药物与生物分子间的作用力主要有疏水作用、静电作用、范德华力及氢键作用。通常根据蛋白结合过程中热力学参数的值可判断它们二者之间的作用力的种类。结合过程中的焓变 (ΔH),熵变 (ΔS) 以及吉布斯自由能的变化 (ΔG) 等热力学参数可以由如下方程来计算:

$$\ln K = -\Delta H/RT + \Delta S/R \quad (6)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (7)$$

根据实验所得不同温度下结合常数,可求得结合过程中的 ΔH 、 ΔS 及 ΔG 。以对作图, ΔH 与 ΔS 可分别

由直线的斜率和截距求得, ΔH 与 ΔS 在所研究温度范围内被认为是一个常数,进而得出各个温度下的 ΔG 。

表 2 中所列为 ACE 法测定的 TAB 与 BSA 结合的热力学参数, $\Delta G < 0$ 表明结合反应是一个放热过程,它们之间的结合是自发进行的; $\Delta H < 0$ 和 $\Delta S < 0$ 表明氢键和范德华力为二者结合过程的主要作用力^[16]。

表 2 毛细管电泳所得热力学参数

Tab.2 Thermodynamic parameters				
$T/^\circ\text{C}$	ΔG	ΔH	ΔS	作用力类型
25	-39.38	-81.50	-141.01	氢键和范德华力
30	-38.95	-81.50	-141.01	氢键和范德华力
37	-37.84	-81.50	-141.01	氢键和范德华力

2.2 蛋白构象变化的定量表征

为进一步考察 TAB 对 BSA 二级结构的影响,进行了红外光谱实验。白蛋白的红外光谱根据其位置的不同,分别称为酰胺 I、II、III,其中酰胺 I 带和酰胺 II 带是公认的二级结构敏感带,均适合做二级结构分析^[17]。但一般蛋白质的 IR 谱中,酰胺 II 带极弱,因此 90% 的蛋白质结构的研究工作都是借助于酰胺 I ($1\ 600\text{--}1\ 700\ \text{cm}^{-1}$) 带,主要为氨基酸残基的 $\text{C}=\text{O}$ 的伸缩振动。对酰胺 I 带的划分较多为: $1\ 610\sim 1\ 640\ \text{cm}^{-1}$ 为 β -折叠; $1\ 640\sim 1\ 650\ \text{cm}^{-1}$ 为无规则卷曲; $1\ 650\sim 1\ 658\ \text{cm}^{-1}$ 为 α -螺旋; $1\ 660\sim 1\ 700\ \text{cm}^{-1}$ 为 β -转角。

根据红外光谱差谱数据,通过傅立叶去卷积分辨出蛋白质不同二级结构的吸收子带,用曲线拟合法定量计算出各二级结构的百分比^[18]。

图 2 为柳叶水甘草碱与 BSA 相互作用前后的蛋白质酰胺 I 带的曲线拟合图。结果显示加入柳叶水甘草碱后,因为 α -螺旋的解螺旋,白蛋白的 α -螺旋含量减少,由 52.10% 下降到 46.06%; β -折叠含量增加,由 30.32% 上升到 40.59%; β -转角含量减少,由 17.58% 下降到 13.35%。由此说明,柳叶水甘草碱的结合使牛血清白蛋白结构的构象发生了变化,改变了蛋白质的二级结构。

2.3 分子对接

分子对接的目的是寻找底物分子和受体分子间的最佳结合位置^[19-20]。实验所得的最优化结果如图 3 所示。截取药物分子周围的氨基酸残基可见,柳叶水甘草碱分子被天冬氨酸 (Asp450),精氨酸 (Arg194),谷氨酸 (Glu291),赖氨酸 (Lys294),丙氨酸 (Ala314) 等包围。其中分子中羰基上的 O 原子

与 Lys294 上的 H 原子形成氢键,显示了氢键是柳叶水甘草碱与 BSA 作用的一种主要相互作用力,这与热力学参数研究中作用力主要为氢键和范德华力的实验结果相吻合。

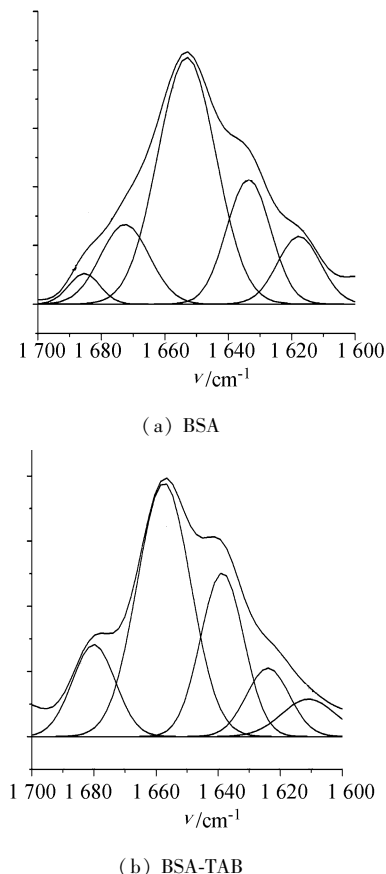


图2 BSA 和 BSA-TAB 体系的酰胺 I 带的曲线拟合图
Fig. 2 Curve fitting of amide I of free BSA and TAB-BSA system

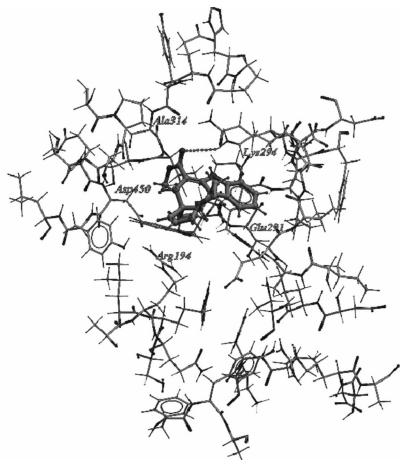


图3 柳叶水甘草碱与牛血清蛋白相互作用的分子模型
Fig. 3 Interaction mode between TAB and BSA

3 结论

在模拟生理条件下,利用亲和毛细管电泳法研

究了柳叶水甘草碱和牛血清白蛋白间的相互作用,由所得的结合常数,热力学参数初步探明二者间的作用机理,分子对接实验进一步证实氢键和范德华力为二者主要作用力。药物与蛋白相互作用的研究,对其药物代谢、转运及临床等具有重要的指导意义。

参考文献:

- [1] Bi Shuyun. Studies on the interaction of drug molecules and biomolecules by spectrometric methods [D]. Changchun: Jilin University, 2006. [毕淑云. 药物与生物分子相互作用的光谱法研究[D]. 长春: 吉林大学, 2006.]
- [2] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2000: 77 - 110.
- [3] Hemei, Xia Zhining, Yin Yongguang, et al. Research on interactions between effective multicomponents of Rhizoma Rhei with bovine serum albumin by ultraviolet - visible spectra analysis [J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2004, 21 (6): 429 - 432. [何梅, 夏之宁, 阴永光, 等. 紫外光谱研究中药大黄有效成分与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 中国现代应用药学, 2004, 21 (6): 429 - 432.]
- [4] Ouameur A A, Marty R, Tajmir-Riahi H A. Human serum albumin complexes with chlorophyll and chlorophyllin [J]. Biopolymers, 2005, 77 (3): 129 - 136.
- [5] Naik P N, Chimatadar S A, Nandibewoor S T. Interaction between a potent corticosteroid drug -dexamethasone with bovine serum albumin and human serum albumin: A fluorescence quenching and fourier transformation infrared spectroscopy study [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2010, 100 (3): 147 - 159.
- [6] Jia Zhongjiang, Tore Ramstad, Zhong Min. Determination of protein-drug binding constants by pressure-assisted capillary electrophoresis (PACE)/frontal analysis (FA) [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2002, 30 (3): 405 - 413.
- [7] 陈义. 毛细管电泳技术及应用 [M]. 北京: 化学工业出版社

- 社,2000:13-14.
- [8] Chu Y H, Avila L Z, Biebuyck H A. Use of affinity capillary electrophoresis to measure binding constants of ligands to proteins[J]. *Medicinal Chemistry*, 1992, 35(1): 285-291.
- [9] Wang Jinglan, Qian Xiaohong. Theory and application of affinity capillary electrophoresis[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 1999, 17(4): 343-347. [王京兰, 钱小红. 亲和毛细管电泳技术及其应用[J]. *色谱*, 1999, 17(4): 343-347.]
- [10] Kikura-Hanajiri R, Maruyama T, Miyashita A, et al. Chemical and DNA analyses for the products of a psychoactive plant *Voacanga Africana* [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2009; 129(8): 975-982.
- [11] Bai Keke, Su Yanhong, Chen Xiaochun, et al. Determination of tabersonine in the seeds of *Voacanga Africana* by HPLC [J]. *West China Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2011, 26(5): 492-493. [白珂珂, 苏艳红, 陈晓春, 等. HPLC测定伏康树籽中的柳叶水甘草碱[J]. *华西药学*, 2011, 26(5): 492-493.]
- [12] Yeung E S, Kuhr W G. Indirect detection methods for capillary separations[J]. *Analysis Chemistry*, 1991, 63(5): 275-282.
- [13] Zhu Xiaofeng, Lin Bingchen. Measurement of binding constant of host-guest interaction by capillary electrophoresis [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 1999, 27(12): 1408-1414. [朱晓峰, 林炳承. 毛细管电泳测定主客分子相互作用的结合常数[J]. *分析化学*, 1999, 27(12): 1408-1414.]
- [14] Khan J, Simon R, Bittner M, et al. Gene expressing profiling of alveolar rhabdomyosarcoma with cDNA microarrays[J]. *Cancer Research*, 1998, 58(22): 2009-5013.
- [15] Xia Zhining, Liu Yong, Qu Pengcheng, et al. Determination of the constants of tricomponent interaction systems by capillary electrophoresis[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2001, 29(10): 1188-1191. [夏之宁, 刘勇, 屈鹏程, 等. 毛细管电泳测定物质三元相互作用体系的结合常数[J]. *分析化学*, 2001, 29(10): 1188-1191.]
- [16] Ross P D, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: Forces contributing to stability[J]. *Biochemistry*, 1981, 20(11): 3096-3102.
- [17] Zhang Yuping, Shi Shuyun, Chen Xiaoqin, et al. Investigation on the interaction between Ilaprazole and bovine Serum albumin without or with different C-ring flavonoids from the viewpoint of food Drug Interference[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(15): 8499-8506.
- [18] Jackson M, Mantsch H H. The use and misuse of FT-IR spectroscopy in the determination of protein structure[J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 1995, 30(2): 95-120.
- [19] Wang Tuo, Zhang Danni, Ren Jun. Application and optimization of docking method for screening ligands in chromatography[J]. *Computers and Applied Chemistry*, 2008, 25(5): 541-544. [王舵, 张丹妮, 任军. 分子对接技术在色谱配基筛选中的应用与优化[J]. *计算机与应用化学*, 2008, 25(5): 541-544.]
- [20] Lemiesz L T, Wiglusz K. Effects of glycation on meloxicam binding to human serum albumin[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2011, 995(1): 35-40.

(编辑 黄小川)