光谱法研究吡嗪酰胺与人血清白蛋白的作用机制

卢雁, 高胜华, 王运来, 王公轲, 闫长岭, 陈得军

河南师范大学化学与环境科学学院, 新乡 453007

E-mail: yanlu2001@sohu.com

2008-12-31 收稿, 2009-06-04 接受

国家自然科学基金(批准号: 20673034)和教育部高等学校博士学科点专项科研基金(编号: 20060476001)资助项目

摘要 用荧光光谱法研究了抗结核药物吡嗪酰胺(PZA)与人血清白蛋白(HSA)在不同温度下的相互作用. 初步确定 PZA 对 HSA 的荧光猝灭机理主要为静态猝灭, 并测定了二者之间形成基态化合物的结合常数 K 和作用位点数 n . 根据不同温度条件下的热力学函数, 确定了 PZA 与 HSA 之间的主要作用力是氢键和范德华力. 根据 Forster 非辐射能量转移原理, 确定了 PZA 与 HSA 的结合距离, 并用同步荧光和紫外光谱法研究了 PZA 对 HSA 构象的影响

关键词
荧光猝灭
吡嗪酰胺
人血清白蛋白
作用机制

血清白蛋白是血浆中最为丰富的蛋白质, 它能与许多内源及外源性化合物结合, 起到存储和运输的作用^[1]. 许多生物活性化合物在人体内的运输和代谢, 都和它们与蛋白质间的亲和力有关^[2]. 同时蛋白质在药物的药效和药物的传输速率上也发挥了重要的作用. 吡嗪酰胺(pyrazinamide, PZA, 其结构式如图 1)是治疗结核病最有效的一线药物之一, 临床药效较好, 不良反应较少. 建立药物-蛋白质结合的体外模型, 了解结合的紧密程度、结合部位、结合力、结合数等问题已经成为研究热点^[3,4], 这不仅对研究药物在体内的运输和作用机制具有一定的意义, 而且对于进行药物分子设计也有重要的指导意义. 本文报道利用荧光光谱和紫外光谱技术研究吡嗪酰胺与人血清白蛋白之间的相互作用情况.

图 1 吡嗪酰胺分子的结构

1 实验

() 仪器与试剂. 所用的仪器有 TU-1810 紫外-可见分光光度计(北京普析公司), CARY Eclipse 型荧光光度计(美国 VARIAN 公司), 智能型低温恒温槽 DC-0515(上海恒平科学仪器有限公司), pH S-2C 型酸度计(上海大普仪器有限公司), JA5003 型电子天平(上海恒平科学仪器有限公司)等. 所用的试剂有吡嗪酰胺(PZA, 中国药品生物制品检定所)和人血清白蛋白(HSA, Sigma)等.

() 储备液的配制. 配制 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲溶液(0.1 mol/L NaCl, pH 7.4); 分别用该缓冲溶液配制 5×10^{-3} mol/L 的 PZA 母液和 1×10^{-4} mol/L 的 HSA 母液, 实验时按一定浓度稀释. 所用试剂均为分析纯, 实验用水为二次去离子水.

() 荧光、同步荧光及紫外光谱的测定. 在上述选定条件下, 于 9 支 10 mL 容量瓶中分别加入所配制的 Tris-HCl 缓冲溶液 2 mL, HSA 母液 0.1 mL, 并加入适量的 PZA 母液 (使容量瓶 1~9 中的 PZA 的浓度分别为 0 , 3×10^{-6} , 6×10^{-6} , 9×10^{-6} , 12×10^{-6} , 15×10^{-6} , 18×10^{-6} , 21×10^{-6} , 24×10^{-6} mol/L), 最后用缓冲溶液定容至 10 mL. 混合均匀的溶液在恒温槽中恒温 40 min (温度分别为 16, 21, 26, 31 和 36)后进行光谱测定.

引用格式: 卢雁, 高胜华, 王运来, 等. 光谱法研究吡嗪酰胺与人血清白蛋白的作用机制. 科学通报, 2009, 54: 2071~2075

Lu Y, Gao S H, Wang Y L, et al. Study on interaction mechanism between pyrazinamide and human serum albumin by spectroscopic methods (in Chinese). Chinese Sci Bull (Chinese Ver), 2009, 54: 2071 ~ 2075, doi: 10.1360/972008-2733

在激发波长为 285 nm 的条件下测定溶液的相对荧光强度 F . 同步荧光光谱的实验是在保持波长差 $\Delta\lambda$ 分别为 15 和 60 nm 的条件下测定 PZA 与 HAS 相互作用的同步荧光光谱, 并测定了 PZA 与 HSA 在不同浓度条件下的紫外吸收光谱.

2 结果与讨论

2.1 荧光光谱

作为代表, 图 2 给出了温度为 36 °C, pH 为 7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液中, HSA 在不同 PZA 浓度时的荧光发射光谱图. 从图中可以看出, 随着 PZA 浓度的增加, HSA 的荧光强度逐渐减小, 表明二者之间发生了相互作用. 其他温度下的谱图与此类似.

图 2 吡嗪酰胺与人血清白蛋白相互作用的荧光光谱图

1~9: [HSA] = 1.0×10^{-6} mol/L, [PZA] = 0, 3×10^{-6} , 6×10^{-6} , 9×10^{-6} , 12×10^{-6} , 15×10^{-6} , 18×10^{-6} , 21×10^{-6} , 24×10^{-6} mol/L, $\lambda_{\text{ex}} = 285$ nm

2.2 猝灭机理及猝灭常数的确定

荧光猝灭过程可分为动态猝灭和静态猝灭^[5], 动态猝灭是猝灭剂和荧光物质的激发态分子间发生碰撞, 产生扩散控制型的相互作用过程, 其荧光强度与猝灭剂浓度之间遵从 Stern-Volmer^[6] 方程:

$$F_0/F = 1 + k_q\tau_0[Q] = 1 + K_{SV}[Q], \quad (1)$$

式中 F_0 为未加入猝灭剂时蛋白的荧光强度, F 是加入猝灭剂进行作用后的蛋白荧光强度, k_q 为双分子猝灭过程速率常数, τ_0 是猝灭剂不存在时生物大分子的平均荧光寿命, K_{SV} 是 Stern-Volmer 猝灭常数, $[Q]$ 是猝灭剂的浓度. 静态猝灭是猝灭剂和荧光物质分子相互作用生成不发光的基态配合物, 从而导致荧光物质荧光强度降低的过程. 其荧光强度与猝灭剂浓度之间的关系与公式(1)是相同的, 但其常数的物理意义是基态配合物的形成常数.

虽然我们不能根据公式(1)去判断造成荧光猝灭

的原因, 但是由公式(1)得出的猝灭常数的大小与温度的变化关系能够给我们提供判断荧光猝灭机理的信息. 动态猝灭主要依赖于分子的扩散, 温度越高, 扩散系数越大, 猝灭常数的改变与温度成正比. 而静态猝灭, 温度升高, 基态配合物的稳定性越差, 形成常数越小^[7]. 为了探明 PZA 与 HSA 的猝灭机理, 我们分别做了在 16, 21, 26, 31 和 36 °C 下的荧光光谱, 得出 5 个温度下 PZA 与 HSA 相互作用的 Stern-Volmer 图(图 3).

图 3 吡嗪酰胺与人血清白蛋白在不同温度下的 Stern-Volmer 图

■, 16 ; ●, 21 ; ▲, 26 ; ▼, 31 ; ◆, 36

从图 3 中可以看出, 数据有良好的线性关系, 根据此线性关系求出的各温度的 K_{SV} 及 k_q 值列于表 1. 从表 1 可知, K_{SV} 的值在 8×10^4 L/mol 左右, 随温度的升高其值略有增大, 其中 31 和 36 °C 下的 K_{SV} 值变化很小, 似乎预示着是动态猝灭过程. 但随着温度的升高, K_{SV} 值的变化并不十分显著, 尚不足以确定荧光猝灭的原因. 一般猝灭剂对生物大分子的最大扩散控制的碰撞猝灭常数 k_q 值为 2.0×10^{10} L/(mol·s), 而生物大分子的荧光寿命 τ_0 约为 10^{-8} s^[8]. 由表 1 可以看出, k_q 值的数量级是 10^{12} , 远大于最大扩散控制的碰撞猝灭常数. 从这点考虑, 猝灭机理不应该为动态猝灭^[4]. 此外, 区分动态猝灭和静态猝灭的另一个方法是观察吸收光谱, 动态猝灭仅仅影响荧光分子的激发态, 不改变荧光物质的吸收光谱. 而静

表 1 吡嗪酰胺与人血清白蛋白在不同温度的 Stern-Volmer 曲线

T/K	$K_{SV}/L \cdot mol^{-1}$	$k_q/L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$	R^a
289	7.46×10^4	7.46×10^{12}	0.9964
294	7.75×10^4	7.75×10^{12}	0.9955
299	8.06×10^4	8.06×10^{12}	0.9972
304	8.31×10^4	8.31×10^{12}	0.9972
309	8.34×10^4	8.34×10^{12}	0.9954

a) 相关系数

态猝灭中, 基态配合物的形成往往会使荧光物质吸收光谱改变. 为了进一步确定荧光猝灭的原因, 实验测定了PZA与HSA在不同浓度条件下的紫外吸收光谱(图4). 实验结果表明, HSA在208 nm处的吸收峰向长波方向移动, 而且吸收峰强度随着药物浓度的增加而增强, 这表明蛋白质分子的 α -螺旋结构增加^[9]. 另外, 紫外吸收光谱显示PZA, HSA的吸收光谱以及它们作用后的PZA-HSA体系的吸收光谱明显不同, 并且同步荧光光谱中280 nm处发射峰出现了明显的红移现象, 这两方面都是PZA与HSA发生反应生成复合物的明显标志. 此外, 我们又考察了 1×10^{-6} mol/LHSA的紫外吸收光谱及PZA与HSA等摩尔混合物与PZA的紫外差谱(图5), 结果发现210 nm处紫外差谱特征吸收峰的强度明显减弱, 同时发生红移, 这进一步证实PZA与HSA之间的作用是形成复合物的静态猝灭. 综合以上分析, 可以判断PZA与HSA的相互作用主要是形成基态的复合物, 静态猝灭是形成荧光猝灭的主要原因.

图4 吡嗪酰胺与人血清白蛋白在不同浓度下的紫外吸收光谱图

a ~ d: $C_{\text{HSA}} = 1.0 \times 10^{-6}, 0, 3.0 \times 10^{-6}, 9.0 \times 10^{-6}$ mol/L, $C_{\text{HSA}} = 0, 1.0 \times 10^{-6}, 1.0 \times 10^{-6}, 1.0 \times 10^{-6}$ mol/L

图5 吡嗪酰胺与人血清白蛋白的紫外差谱

a, 人血清白蛋白的紫外吸收光谱, $C_{\text{HSA}} = 10^{-6}$ mol/L; b, 吡嗪酰胺与人血清白蛋白等摩尔浓度的紫外差谱, $C_{\text{HSA}} = C_{\text{PZA}} = 10^{-6}$ mol/L

2.3 结合常数与结合位点数的确定

对于静态猝灭过程, 假设蛋白质上存在 n 个等同的独立结合位点, 可以用以下方程来计算结合常数 K 和结合位点数 n ^[10].

$$\log[(F_0 - F)/F] = \log K + n \log [Q], \quad (2)$$

以 $\log[(F_0 - F)/F]$ 对 $\log[Q]$ 作图, 得到不同温度下的结合常数 K 和结合位点数 n , 结果列于表2.

2.4 PZA与HSA之间作用力类型的确定

小分子与蛋白质的作用力主要有氢键、范德华力、静电力和疏水作用力等. 由反应前后热力学参数焓变 ΔH 和熵变 ΔS 的相对大小, 可以判断小分子与蛋白质间的主要作用力类型^[11]. 假定在测定温度范围内焓变的变化可以忽略, 则它的值和熵变 ΔS 可以从 Vant-Hoff 方程求得:

$$\ln K = -\Delta H/RT + \Delta S/R, \quad (3)$$

而自由能变 ΔG 由下式求得:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S. \quad (4)$$

计算得到不同温度下的热力学函数, 结果也列于表2. Mohammed等^[12]根据大量的实验结果总结出判断生物大分子与小分子结合力性质的热力学规律, 即: $\Delta S > 0$ 可能是疏水和静电作用力; $\Delta S < 0$ 可能为氢键和范德华力; $\Delta H > 0, \Delta S > 0$ 为典型的疏水作用力; $\Delta H < 0, \Delta S < 0$ 为氢键和范德华力; $\Delta H \approx 0$ 或较小, $\Delta S > 0$ 为静电作用力; $\Delta H < 0$ 时主要是静电作用力. 从以上数据中可以看出 $\Delta H < 0, \Delta S < 0$, 说明PZA与HSA之间主要作用力是氢键和范德华力.

2.5 PZA与HSA之间的结合距离

根据Forster的偶极-偶极非辐射能量转移理论^[7, 13], 供能体(HSA)的荧光发射光谱与受能体(PZA)的紫外吸收光谱有足够的重叠; 供能体和受能体之间的距离不超过7 nm时, 将会发生非辐射能量转移现象, 从而使荧光体荧光猝灭. 在非辐射能量转移效率 E 、供能体和受能体之间的距离 r 及临界能量转移距离 R_0 有如下的关系式:

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6), \quad (5)$$

式中 R_0 是能量转移效率为50%时的临界距离:

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

式中 K^2 为偶极空间取向因子, 可取供能体和受能体各向随机分布的平均值 $K^2 = 2/3$ ^[14], n 为介质的折射指数, 可取水 and 有机物的平均值 $n = 1.336$ ^[14], Φ 为供能体荧光量子产率, 对HSA取色氨酸的量子产率为0.118^[15].

$$J = \sum F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta \lambda / \sum F(\lambda) \Delta \lambda, \quad (7)$$

表 2 吡嗪酰胺与人血清白蛋白在不同温度下的结合常数结合位点数和热力学常数

T/K	n	$K/L \cdot \text{mol}^{-1}$	$R^a)$	$\Delta G/\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\Delta H/\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\Delta S/\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$
289	1.23	8.64×10^5	0.9964	-32.6	-50.8	-62.9
294	1.20	5.76×10^5	0.9998	-32.2	-50.8	-62.9
299	1.13	2.98×10^5	0.9996	-32.0	-50.8	-62.9
304	1.11	2.32×10^5	0.9986	-31.4	-50.8	-62.9
309	1.10	2.30×10^5	0.9992	-31.3	-50.8	-62.9

a) 相关系数

式中 $F(\lambda)$ 为供能体在波长 λ 时的荧光强度, $\epsilon(\lambda)$ 为受能体在 λ 时的摩尔吸收系数, 能量转移效率由下式求出:

$$E = 1 - F/F_0 \quad (8)$$

式中 F 为 $[\text{PZA}]:[\text{HSA}] = 1:1$ 时的 HSA 的荧光强度. 将图 6 中光谱的重叠部分分割成极小的矩形由(7)式积分求出 $J = 8.775 \times 10^{-14} \text{ cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$. 再由(6)式求得 $R_0 = 1.76 \text{ nm}$, 由(8)式得到能量转移效率 $E = 0.1004$, 由 R_0 带入(5)式得到 $r = 2.53 \text{ nm}$. 表明了 PZA 与 HSA 之间能发生非辐射能量转移.

2.6 同步荧光光谱研究

同步荧光光谱常被用于研究药物分子对蛋白质构象的影响, 同步荧光因具有简化光谱、窄化谱带和减少光谱重叠等优点而常用来探讨蛋白质构象的变化, 通过选择合适的波长差可将普通荧光光谱上相互重叠的荧光峰分开. 因为蛋白质的荧光主要来自于色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸所产生的荧光, 它们的荧光强度之比一般为 100:9:0.5. 由于苯丙氨酸的荧光强度太弱, 我们重点考察构象发生变化的是色氨酸还是酪氨酸, 为此进行了同步荧光光谱的实验. 首先设定 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$, 此时同步荧光光谱仅表现出色氨酸残基的荧光^[16], 实验结果见图 7(a).

图 6 人血清白蛋白的荧光发射光谱(a)和吡嗪酰胺的吸收光谱(b)

$$C_{\text{HSA}} = C_{\text{PZA}} = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$$

图 7 吡嗪酰胺和人血清白蛋白相互作用的同步荧光光谱

$T = 36^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7.4$. $1 \sim 9: C_{\text{HSA}} = 1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}; C_{\text{PZA}} = 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$. (a) $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$, (b) $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$

色氨酸的最大发射波长与其所处环境有关, 从图 7(a)可以看出, 随着 PZA 浓度的增大色氨酸残基的最大发射波长发生了红移, 证明 HSA 腔内疏水环境的极性增大, 肽链的伸展程度有所增加^[17,18], 蛋白质的构象发生了改变. 然后我们设定 $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$, 此时同步荧光光谱仅表现出酪氨酸残基的荧光^[19], 实验结果见图 7(b). 在图 7(b)中最大发射波长没有随 PZA 浓度的增大发生明显的改变. 这表明 PZA 对酪氨酸残基所处微环境的影响较小. 由此可以判定 PZA 与 HSA 的结合位点应该是在 HSA 的色氨酸残基附近.

3 结论

应用荧光光谱法和紫外光谱法研究 PZA 与 HSA 的相互作用. 结果表明, PZA 对 HSA 的荧光有静态猝

灭效应, 热力学参数的变化表明它们之间的相互作用主要是氢键和范德华力。根据偶极-偶极非辐射能量转移理论的计算, 得出 PZA 与 HSA 之间的结合距

离为 2.53 nm。同步荧光光谱的研究表明, PZA 与 HSA 的结合位点应该在 HSA 的色氨酸残基附近, PZA 的结合使 HSA 分子的构象发生了变化。

参考文献

- 1 Ulrich K H. Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. *Pharmacol Rev*, 1981, 33: 17—53
- 2 Zsila F, Bikadi Z, Simonyi M. Probing the binding of the flavonoid, quercetin to human serum albumin by circular dichroism, electronic absorption spectroscopy and molecular modeling methods. *Biochem Pharmacol*, 2003, 65: 447—456[[doi](#)]
- 3 杜金凤, 李颖, 张崎, 等. 芦荟大黄素与人血清白蛋白的相互作用. *科学通报*, 2006, 51: 2847—2850
- 4 Sun S F, Zhou B, Hou H N, et al. Studies on the interaction between international oxaprozin-E and bovine serum albumin by spectroscopic methods. *Int J Biol Macromol*, 2006, 39: 197—200[[doi](#)]
- 5 朱铿, 童沈阳. 吡哌酸, 氟哌酸与 HSA, IgG 相互作用的研究. *化学学报*, 1997, 55: 405—410
- 6 Yan Z Y, Shao X F, Yan L, et al. Interaction between gatifloxacin and bovine serum albumin. *J Chin Pharm Sci*, 2005, 40: 33—37
- 7 Lakowicz J R. *Principles of Fluorometric Spectroscopy*. New York: Plenum Press, 1983. 187—214
- 8 Lakowicz J R, Weber G. Quenching of fluorescence by oxygen. Probe for structural fluctuations in macromolecules. *Biochemistry*, 1973, 12: 4161—4170[[doi](#)]
- 9 Wang Y L, Wang H F. Interaction of bovine serum albumin with benzoate. *北京大学学报: 自然科学版*, 2002, 38: 159—163
- 10 张跟成, 王彦卿, 张红梅, 等. 桔皮苷与牛血清白蛋白相互作用的研究. *化学研究与应用*, 2006, 18: 800—804
- 11 Ross P D, Subramanian S. Thermodynamics of protein association relation: forces contribution to stability. *Biochemistry*, 1981, 20: 3096—3102[[doi](#)]
- 12 Mohammed H R, Toru M, Tomoko O, et al. Study of interaction of carprofen and its enantiomers with human serum albumin-I mechanism of binding studied by dialysis and spectroscopic methods. *Biochem Pharm*, 1993, 46: 1721—1731[[doi](#)]
- 13 Sklar L A, Hudson B S, Simoni R D. Conjugated polyene fatty acids as fluorescent probes: Binding to bovine serum albumin. *Biochemistry*, 1997, 16: 5100—5108[[doi](#)]
- 14 杨曼曼, 杨频, 席小莉. 荧光染料探针与蛋白质结合的研究. *科学通报*, 1997, 42: 1276—1279
- 15 Yang P, Gao F. *Bio-inorganic Chemistry Principium*. Beijing: Science Press, 2002. 322—342
- 16 Miller J N. Recent advances in molecular luminescence analysis. *Proc Anal Div Chem Soc*, 1979, 16: 203—208
- 17 Hu Y J, Liu Y, Pi Z B. Interaction of cromolyn sodium with human serum albumin: A fluorescence quenching study. *Bioorg Med Chem*, 2005, 13: 6609—6614[[doi](#)]
- 18 张保林, 王文清, 白凤莲. 蒽醌及黄酮类化合物与人血清白蛋白的结合反应研究. *高等学校化学学报*, 1994, 15: 373—378
- 19 Lakowicz J R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Plenum Press, 1999. 237—265

Study on interaction mechanism between pyrazinamide and human serum albumin by spectroscopic methods

Lu Yan, Gao ShengHua, Wang YunLai, Wang GongKe, Yan ChangLing & Chen DeJun

College of Chemistry and Environmental Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China

The binding of pyrazinamide (PZA), generally used as an antitubercular drug, to human serum albumin(HSA) has been investigated by spectroscopy at different temperatures. The quenching mechanism of fluorescence of HSA by PZA was found to be in static quenching procedure. The apparent binding constant K and binding sites number n were measured by fluorescence quenching method. The thermodynamic parameters obtained from measured data at different temperatures showed that the binding of PZA to HSA involves hydrogen bond and van der Waals interaction. The binding distance between PZA and HSA was determined according to the theory of energy transfer. The effect of PZA on the conformation of HSA was also analyzed by synchronous fluorescence spectrometry and UV absorption spectrometry.

fluorescence, quenching, pyrazinamide, HSA, interaction mechanism

doi: 10.1360/972008-2733