

### 【基础研究】

通信作者:孙祥德(1963-),男,河南民权人,学士,教授,主要从事药物分析学研究;E-mail:sunxd@xxmu.edu.cn。

benzamide, lz} 是以尼洛替尼为先导物设计的针对 BCR-ABL 的酪氨酸激酶的高度选择性的酪氨酸激酶小分子抑制剂<sup>[6]</sup>, 如果其进入人体后, 与蛋白质发生相互作用, 会改变蛋白质的结构与功能。因此, 研究 lz 与蛋白的相互作用对于了解 lz 在体内的代谢和生物效应有着重要意义<sup>[7-9]</sup>。由于牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 与人血清白蛋白 (human serum albumin, HSA) 的结构及氨基酸序列高度相似, 分子量相近, 而 BSA 较 HSA 价廉易得, 因此通过研究 lz 与 BSA 的结合, 可以作为 lz 对 HSA 结合情况的参考。本研究在生理 pH 7.4 下采用荧光光谱和紫外吸收光谱技术研究了 lz 与 BSA 的相互作用, 并对其结合机制和结合模式进行了探讨, 对进一步了解 lz 在生物体内的分布、代谢具有非常重要的意义, 且对尼洛替尼衍生物的体外筛选具有一定意义, 同时也为新药设计和开发提供了科学依据和指导。

## 1 材料与方法

**1.1 仪器与试剂** FL1107 型荧光分光光度计 (美国 Agilent 公司); 微量进样器 (德国 Eppendorf Research); UV-2550 型紫外-可见分光光度计 (日本岛津公司)。PHS-3C 精密数显酸度计 (上海雷磁仪器厂); 电子天平 (赛多利斯科学仪器有限公司)。

三羟甲基氨基甲烷 (Tris, 上海精细化工试剂有限公司), BSA (美国 Sigma 公司) 用 pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液配成  $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  备用, 4 °C 冰箱避光保存; lz 参考文献<sup>[6]</sup>合成 (纯度 > 99.0%), 甲醇溶解制备成  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  溶液备用, 使用时用 Tris-HCl 缓冲溶液制备至所需浓度; 试验用水为二次蒸馏水; 所用试剂均为分析纯。

**1.2 荧光光谱** 准确移取  $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  BSA 溶液 2.0 mL 于 1 cm 石英荧光池中, 用微量注射器逐次加入 lz 溶液进行滴定, 加样体积由实验点浓度计算确定, 每次加入后混合均匀, 静置反应 10 min。分别在 25、37 °C 下, 激发波长 279 nm, 激发和发射光谱狭缝宽度分别为 2.5 nm 和 5.0 nm, 在 300 ~ 450 nm 波长范围内扫描溶液的荧光光谱, 绘制 BSA 的荧光猝灭图及 lz 对蛋白的荧光猝灭光谱。

同步荧光光谱实验中, 固定激发和发射波长差  $\Delta\lambda$  分别为 60、15 nm, 其他条件参数同荧光光谱测量, 扫描酪氨酸和色氨酸的同步荧光光谱。

**1.3 紫外吸收光谱** 以 Tris-HCl 缓冲液为参比, 向浓度为  $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  BSA 中加入不同量的 lz

溶液, 在 280 ~ 450 nm 波长范围内扫描, 测定其 200 ~ 400 nm 的紫外光谱。

**1.4 lz 与 BSA 荧光猝灭机制检测** 动态猝灭与扩散有关, 静态猝灭与配合物的稳定度有关。温度升高, 溶液的黏度下降, 分子运动速度加快, 扩散系数增大, 动态双分子猝灭常数增大。而温度降低配合物的稳定度升高, 静态双分子猝灭常数增大。根据 Stern-Volmer 方程作图, 见式 (1)。如果高温的斜率大于低温的斜率, 则为动态猝灭; 反之, 则为静态猝灭。

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

式 (1) 中  $F_0$  和  $F$  分别为加入 lz 前后 BSA 的荧光强度,  $K_q$  为双分子猝灭速率常数 ( $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $\tau_0$  为猝灭剂 lz 不存在时 BSA 的荧光寿命, 约为  $10^{-8} \text{ s}$ ,  $[Q]$  为 lz 的浓度 ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),  $K_{sv}$  为动态猝灭常数 ( $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ )。以  $F_0/F$  对  $[Q]$  作 Stern-Volmer 曲线, 进行线性分析, 然后根据  $K_{sv} = K_q \tau_0$ , 可求得  $K_q$ 。

**1.5 结合常数与结合位点数的求取** 小分子猝灭剂与蛋白质生物大分子发生作用时, 体系中小分子猝灭剂的结合状态处于一种平衡关系, 这种平衡关系可由荧光分子与猝灭剂分子之间的结合常数表达式描述, 见式 (2)。

$$\lg \left( \frac{F_0 - F}{F} \right) = \lg K + n \lg [Q] \quad (2)$$

式中  $K$  和  $n$  分别为结合常数和结合位点数,  $F_0$  和  $F$  分别表示加入 lz 前后体系的荧光强度, 以  $\lg (F_0 - F)/F$  对  $\lg [Q]$  作图得直线, 由该直线的斜率和截距即可确定结合位点数  $n$  和结合常数  $K$ 。

**1.6 lz 与 BSA 的主要作用力类型测定** 氢键、疏水作用力、范德华力、静电引力等是构成有机小分子与生物大分子的主要结合力, 从热力学角度看, 药物与蛋白质相互作用过程中的焓变  $\Delta H$ 、熵变  $\Delta S$  是判断作用类型主要依据。

根据以下热力学参数方程 (3) (4) (5) 可求得  $\Delta H$ 、 $\Delta G$ 、 $\Delta S$ 。

$$\ln \left( \frac{K_2}{K_1} \right) = \frac{\Delta H}{R} \left( \frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \quad (3)$$

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

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (5)$$

式中,  $R$  为气体常数,  $T$  为绝对温度,  $K$  为结合常数。

**1.7 lz 与 BSA 能量转移的测定** 由于 BSA 的内源荧光主要由色氨酸产生, 对于 lz 与 BSA 结合形成的配合物, 常用 Förster 的偶极-偶极非辐射能量转移理论求出和蛋白质作用的药物的结合位置与色氨酸残基的距离, 来判断 lz 与 BSA 的能量转移情况。由

Förster 理论可知能量转移效率( $E$ )与供能体(BSA)和受能体(lz)之间的结合距离( $r$ )和能量转移效率为 50% 的临界能量转移距离( $R_0$ )的关系式:

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} = 1 - \frac{F}{F_0} \tag{6}$$

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{25} K^2 n^{-4} \Phi_D J \tag{7}$$

$$J = \frac{\sum F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda}{\sum F(\lambda) \Delta\lambda} \tag{8}$$

式(7)中  $K^2$  为偶极空间取向因子( $K^2 = 2/3$ );  $\Phi$  为色氨酸的荧光量子产率( $\Phi = 0.118$ );  $n$  为介质折射指数取水和有机物的平均值( $n = 1.336$ ),  $J$  为 BSA 的荧光发射光谱与 lz 的吸收光谱间的重叠积分。式(8)中,  $F(\lambda)$  为 BSA 波长  $\lambda$  处的荧光强度,  $\varepsilon(\lambda)$  为 lz 在波长  $\lambda$  处的摩尔吸收系数,  $\Delta\lambda$  为计算重叠积分时分割的波长跨度。根据公式(7)可求出  $r$ , 即药物和蛋白结合的位点与色氨酸残基之间的距离。

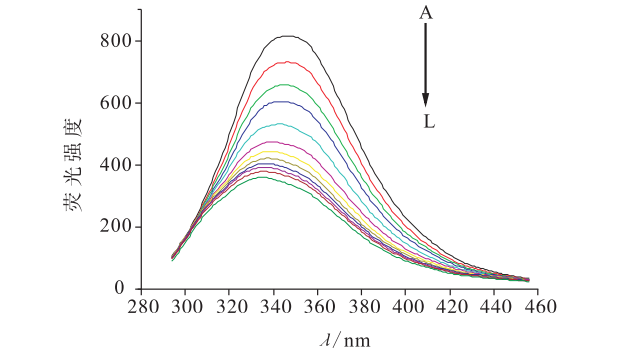
**1.8 lz 对 BSA 构象影响的检测** 由  $\Delta\lambda = 15\text{ nm}$  和  $\Delta\lambda = 60\text{ nm}$  所作出的同步荧光光谱分别表示蛋白质酪氨酸残基和色氨酸残基的荧光特性。因残基的最大发射波长与其所处环境的极性有关, 故由  $\lambda_{\text{max}}$  的变化可判断蛋白质构象的变化。固定 BSA 浓度, 逐渐增加药物的浓度, 绘制 BSA 的同步荧光光谱, 若其所处环境的亲水性逐渐增加, 则最大发射波长会发生红移, 反之, 则发生蓝移。

2 结果

**2.1 BSA 的荧光猝灭光谱** 结果见图 1。在  $\text{pH} = 7.4$  的生理条件下,  $\lambda_{\text{ex}} = 279\text{ nm}$ , 固定 BSA 的浓度, 滴加 lz, 随着 lz 浓度的增大, 体系中的 BSA 荧光发射强度均被有规律地明显减弱, 出现典型的荧光猝灭现象, 且其最大发射波长从  $347\text{ nm}$  减小到  $335\text{ nm}$ , 发生了  $12\text{ nm}$  的蓝移, 说明二者发生了相互作用, lz 的加入使得 BSA 分子中的色氨酸残基的微环境发生了改变, 2 个吡啶环中至少有 1 个其介质环境发生了变化, 荧光生色团所处介质的疏水性增加。

**2.2 lz 与 BSA 荧光猝灭机制** 结果见图 2 和表 1。结果均显示猝灭曲线有良好的线性关系, 并且动态猝灭常数  $K_{\text{sv}}$  随温度升高而增大, 可以初步判断 lz 对 BSA 的荧光猝灭类型为分子间碰撞而引起的动态猝灭。为验证 lz 对 BSA 荧光的猝灭机制, 测定了  $1.0 \times 10^{-6}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 BSA 溶液(以 Tris-HCl 缓冲液

为参比)和 lz 与 BSA 等摩尔混合物的吸收光谱图(以 lz 溶液作参比), 二者几乎完全重合, 表明 lz 的加入并未引起 BSA 的紫外吸收光谱改变。进一步证实 lz 对 BSA 荧光猝灭机制是其与 BSA 激发态分子之间未生成基态复合物, 或生成的为瞬时复合物, 是动态猝灭过程。



$C_{\text{BSA}} = 1 \times 10^{-6}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $C_{\text{lz}} (10^{-6}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}) (A \sim L) 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5$ ;  $\text{pH} = 7.4$ 。

图 1 lz 的荧光猝灭光谱

Fig. 1 Fluorescence emission spectra of lz ( $T = 298\text{ K}$ )

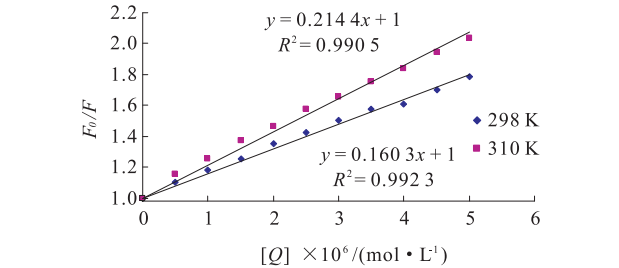


图 2 不同温度下 lz 与 BSA 荧光猝灭的 Stern-Volmer 曲线  
Fig. 2 Stern-Volmer curves of BSA quenched by lz under different temperature

表 1 lz 与 BSA 的猝灭常数

Tab. 1 Queching contants between lz and BSA				
化合物	T/K	$K_{\text{sv}}/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	$K_{\text{q}}/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	相关系数
lz	298	$1.60 \times 10^5$	$1.60 \times 10^{13}$	0.992
	310	$2.14 \times 10^5$	$2.14 \times 10^{13}$	0.991

**2.3 结合常数与结合位点数** 结果见表 2。可以看出结合位点数约为 1, 说明 1 分子 BSA 结合 1 分子的 lz; 常温下结合常数比较大, 说明 lz 与 BSA 结合力较强, 温度对结合常数有一定的影响, 温度升高, 加剧了 BSA 分子和 lz 的有效碰撞, 增大了扩散系数, 复合物的稳定性下降。

**2.4 lz 与 BSA 的主要作用力类型** 结果见表 2。lz 与 BSA 的结合是一个自发过程,  $\Delta G < 0$ ; 药物与 BSA 结合的  $\Delta H < 0, \Delta S < 0$ , 可以认为药物与 BSA 分子间主要表现为氢键和范德华力。此外,  $\Delta H < 0$  表示 lz 和 BSA 的相互作用为一放热过程, 即温度升高会不利于二者的相互作用。

表 2 结合常数和热力学参数

Tab.2 Binding constants and thermodynamic parameters

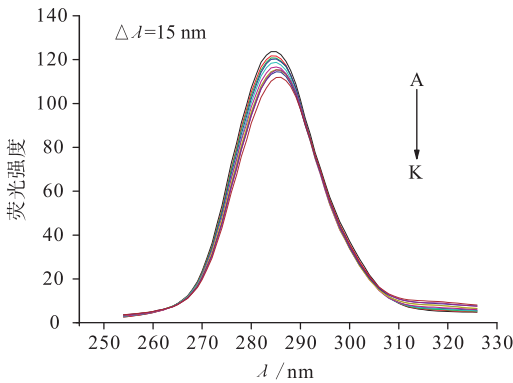
化合物	T/K	K/ (L·mol <sup>-1</sup> )	n	ΔG/ (kJ·mol <sup>-1</sup> )	ΔH/ (kJ·mol <sup>-1</sup> )	ΔS/ (J·mol <sup>-1</sup> ·K <sup>-1</sup> )
lz	298	4.14×10 <sup>4</sup>	0.892	-26.3	-22.1	-14.1
	310	2.94×10 <sup>4</sup>	0.841	-26.5		

**2.5 lz 与 BSA 的能量转移** 结果见表 3 和图 3。由于 BSA 能够发射荧光,图 3 所示 BSA 与 lz 的吸收光谱有足够的重叠,以及表 3 结合距离  $r = 3.20\text{ nm} < 7\text{ nm}$ ,可知 lz 与 BSA 能够发生非辐射能量转移,这说明 lz 分子与 BSA 中的色氨酸结合,通过非辐射能量转移与动态猝灭的共同作用对 BSA 的内源荧光进行猝灭。

表 3 依据 Förster 非辐射能量转移理论计算 lz 与 BSA 的结合距离

Tab.3 Binding distance between BSA and lz was calculated by the Förster theory of non-radiation energy

蛋白	$J/(\text{cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$E$	$R_0/\text{nm}$	$r/\text{nm}$
BSA	$8.84 \times 10^{-15}$	0.175 3	2.47	3.20



pH=7.40,  $T=298\text{ K}$ ,  $C_{\text{BSA}} = 1 \times 10^{-6}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $C_{\text{Iz}}$  ( $10^{-6}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), ( $A \sim K$ )0.0,0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0,3.5,4.0,4.5,5.0,5.5,6.0,6.5。

图 4 lz 的同步荧光光谱

Fig.4 Synchronous fluorescence spectra of lz

3 讨论

由于蛋白质中存在芳香族氨基酸——色氨酸、酪氨酸及苯丙氨酸等的残基,而使蛋白质发射较强的内源荧光<sup>[10]</sup>。药物与蛋白质发生相互作用,可以使荧光发生猝灭,改变蛋白固有功能,进而影响药物在体内的分布与代谢。本研究结果表明,lz 与 BSA 间存在相互作用,lz 能猝灭 BSA 的内源性荧光,且荧光猝灭过程是由于分子间碰撞而引起的动态猝灭,热力学参数  $\Delta H < 0$ ,  $\Delta S < 0$  表明氢键和范德华力<sup>[11]</sup>是驱动 lz 与 BSA 作用的主要作用力,能量转移原理计算出  $r < 7\text{ nm}$  说明 lz 与 BSA 间可以发生能量转移,且高浓度的 lz 能引起 BSA 构象的明显变化。这为进一步改造设计尼洛替尼,寻找新的治疗 CML 的药物小分子提供了一定的实验依据。

**2.6 lz 对 BSA 构象的影响** 结果见图 4。lz 存在时 BSA 的色氨酸残基的最大发射峰略有蓝移,表明 lz 使 BSA 的色氨酸残基所处环境的疏水性增加,BSA 的构象发生了变化。从荧光猝灭的程度看, $\Delta\lambda = 60\text{ nm}$  的同步荧光降幅很大,而  $\Delta\lambda = 15\text{ nm}$  的基本不变,说明 lz 和 BSA 的色氨酸残基的相互作用较强。

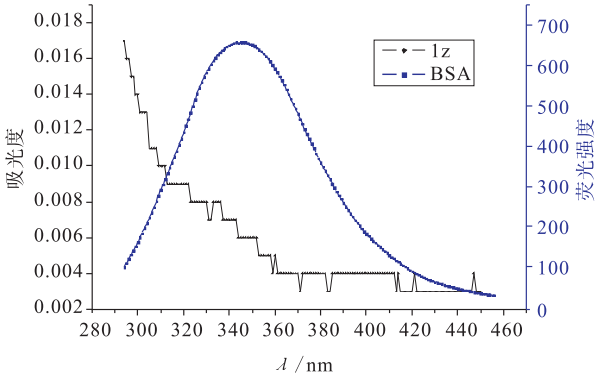
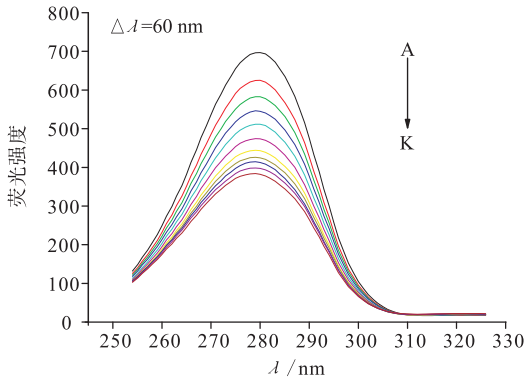


图 3 lz 的吸收光谱与 BSA 的荧光光谱的重叠光谱

Fig.3 Spectral overlap of lz absorption spectrum with BSA fluorescence spectrum



参考文献:

[1] Jin X L,Wei X,Qi F M,*et al.* Characterization of hydroxycinnamic acid derivatives binding to bovine serum albumin[J]. *Org Biomol Chem*,2012,10:3424-3431.

[2] Fasano M,Curry S,Terreño E,*et al.* The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin[J]. *IUBMB Life*,2005,57(12):787-796.

[3] Bertucci C,Domenici E. Reversible and covalent binding of drugs to human serum albumin; methodological approaches and physiological relevance[J]. *Curr Med Chem*,2002,9(15):1463-1481.

[4] Ellen W,Paul W M,Werner B,*et al.* Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl[J]. *Cancer Cell*, 2005,2(7):129-141.

[5] Davies S L,Serradell N,Bayes M. Nilotinib[J]. *Drugs Fut*,2007,32(1):17-25.

养、细胞融合、流式细胞分析、核酸与蛋白的分离和提取等。Nakazama 等<sup>[11]</sup>曾用红细胞裂解液裂解脾组织中的红细胞,然后进行脾细胞与骨髓瘤细胞的融合。Shekhar 等<sup>[9]</sup>用红细胞裂解液裂解脾组织中的红细胞后,从脾组织中分离纯化 T 细胞。因此,本实验在提取脾组织中蛋白前,先用红细胞裂解液对脾组织中的红细胞进行裂解是比较合理的。在本实验中发现,单用红细胞裂解液预处理脾组织后,可观测到较清楚的 SP 蛋白条带,但其条带显色较浅,且含非特异性条带,未达到满意的实验效果。

Hank's 液是常见的平衡盐溶液之一,常用于配制培养基或洗涤细胞等<sup>[12]</sup>。用 Hank's 液洗涤可以有效去除裂解后的残余成分,进一步降低红细胞的影响,从而提高所提取总蛋白的纯度。本实验中,脾组织先用红细胞裂解液裂解,再用 Hank's 液进行洗涤处理后提取总蛋白,蛋白印迹技术结果显示,SP 蛋白条带表达明显,无非特异性条带,结果较为理想。

有些研究者在对脾组织中的蛋白进行蛋白印迹技术检测时,并未对脾组织进行特殊处理,如郭勇等<sup>[13]</sup>研究 MFG-E8 蛋白在梗阻性黄疸小鼠脾脏中的表达水平时,柯琴梅等<sup>[14]</sup>在研究溃疡性结肠炎大鼠脾脏组织中的 13-arrestin1 表达时,也能得到预期的结果。但是,用蛋白印迹技术检测 SP 蛋白在脾组织中的表达必须经过处理才能实现,这种实验方法的非一致性可能与不同目的蛋白在脾组织中的表达量不同有关。总之,本实验对用蛋白印迹技术检测脾组织 SP 蛋白的方法进行了改良,虽然其总蛋白提取方法也较为繁琐,但对于特殊组织中用蛋白印迹技术难以检测到的蛋白表达不失为一种参照和借鉴。

参考文献:

[1] 张佳俐,梁瑜帧,夏宁. Western blot 蛋白分析中血清蛋白上样量的研究[J]. 广西医科大学学报,2013,30(3):348-349.

[2] Heidebrecht F,Heidebrecht A,Schulz I,*et al.* Improved semiquantitative Western blot technique with increased quantification range [J]. *J Immunol Methods*,2009,345(1/2):40-48.

[3] 王丽,张永亮,何涛,等. 不同细胞裂解液提取总蛋白在免疫印迹中的效果分析[J]. 泸州医学院学报,2010,33(4):367-369.

[4] 董冰,马子芳,余爽,等. 云芝糖肽对 EAC 荷瘤小鼠脾脏 TLR4 信号通路调控机制的研究[J]. 中国免疫学杂志,2014,30(3):333-337.

[5] Panjwani N,Mulvihill E E,Longuet C,*et al.* GLP-1 receptor activation indirectly reduces hepatic lipid accumulation but does not attenuate development of atherosclerosis in diabetic male ApoE<sup>-/-</sup> mice[J]. *Endocrinology*,2012,154(1):127-139.

[6] 许守平,姜洪池. 脾脏外科进展[J]. 中国中西医结合外科杂志,2010,16(2):134-137.

[7] 马征,庞久玲,刘丹,等. 烧伤后康复期老年患者抑郁评分与血清 P 物质和神经肽 Y 表达的关系研究[J]. 中国全科医学,2013,16(29):3447-3449.

[8] 李洋,韩莹瑛,范双喜,等. 叶用莴苣幼苗总蛋白 SDS-PAGE 和 Western-blot 方法的优化[J]. 中国农学通报,2012,28(31):153-156.

[9] Shekhar S,Milling S,Jenkins C,*et al.* Identification and phenotypic characterization of  $\gamma\delta$  T cells in rat lymph[J]. *Res Vet Sci*,2012,93(1):168-171.

[10] Keats J J,Chesi M,Egan J B,*et al.* Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma[J]. *Blood*,2012,120(5):1067-1076.

[11] Nakazama M,Mukumoto M,Miyatake K. Immunoelectron microscopy methods and protocols[M]. USA:Humana Press,2010:75-91.

[12] Shioyama T,Haraguchi Y,Muragaki Y,*et al.* New isolation system for collecting living cells from tissue[J]. *J Biosci Bioeng*,2013,115(1):100-103.

[13] 郭勇,熊琦,唐永梁,等. MFG-E8 基因在梗阻性黄疸小鼠免疫组织中的表达及临床意义[J]. 重庆医学,2014,43(16):2019-2021,2025.

[14] 柯琴梅,吴霁,范恒. 乌梅丸对 TNBS 诱导的溃疡性结肠炎大鼠脾脏组织  $\beta$ -arrestin1 表达的影响[J]. 山东医药,2013,53(27):23-25.

( 本文编辑:李胜利 英文编辑:王 燕)

( 上接第 902 页)

[6] Pan X Y,Wang F,Zhang Y M,*et al.* Design,synthesis and biological activities of Nilotinib derivatives as antitumor agents[J]. *Bioorg Med Chem*,2013,21(9):2527-2534.

[7] Jayabharathi J,Thanikachalam V,Jayamoorthy K,*et al.* Binding interaction of 1-(4-methylbenzyl)-2-p-tolyl-1H-benzodimidazole with bovine serum albumin[J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*,2012,93:180-184.

[8] Sun Y,Wei S,Zhao Y Y,*et al.* Characterization of the interaction between 4-(tetrahydro-2-furanmethoxy)-N-octadecyl-1,8-naphthalimide and human serum albumin by molecular spectroscopy and its analytical application[J]. *Applied Spectroscopy*,2012,4(66):

464-469.

[9] Sharma R,Choudhary S,Kishore N. Insights into the binding of the drugs diclofenac sodium and cefotaxime sodium to serum albumin: calorimetry and spectroscopy[J]. *Eur J Pharm Sci*,2012,46(5):435-445.

[10] 庆伟霞,李明静,王勇,等. 木犀草素及其苷与牛血清白蛋白的相互作用研究[J]. 分析试验室,2008,27(5):50-53.

[11] 郁彩虹,张耀东,高裙裙,等. 分子对接和荧光光谱法研究鞣皮素与  $\beta$ -葡萄糖苷酶的相互作用[J]. 光谱学与光谱分析,2011,8(31):2151-2155.

( 本文编辑:杨 博 英文编辑:杨 博)