

光谱法研究甲氨喋呤与牛血清白蛋白的相互作用

谢文俊¹, 冯玉萍^{1*}, 曹胜利², 赵玉芬¹

1. 清华大学化学系, 生命有机磷化学及化学生物学教育部重点实验室, 北京 100084

2. 首都师范大学化学系, 北京 100037

摘要 用荧光和紫外吸收光谱法, 研究了抗癌药物甲氨喋呤(MTX)与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用。结果表明: 在生理条件下, 甲氨喋呤对牛血清白蛋白荧光有较强的猝灭作用, 其猝灭方式为静态猝灭。根据猝灭结果, 求出了不同温度下反应的结合常数及反应热力学参数, 并据此确定了它们相互作用的主要形式。

主题词 甲氨喋呤; 牛血清白蛋白; 荧光光谱; 紫外光谱; 相互作用

中图分类号: O657.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-0593(2006)10-1876-04

引言

甲氨喋呤(methotrexate, MTX), 即 N-{4-[(2,4-diamino-6-pteridinyl)methyl]methylaminobenzoyl}-L-glutamic acid(结构式见图1), 是长期应用于临床的一种重要抗癌药。它具有杀菌、抗病毒和抑制癌细胞生长等作用^[1], 对急性白血病、绒毛膜上皮细胞癌、恶性葡萄胎及某些实体肿瘤均有很好的治疗效果, 还可用于治疗肠炎、关节炎与类风湿性关节炎、重度牛皮癣等^[2]。另一方面, MTX毒性较大, 会引起一些不良反应, 对皮肤、肝脏、血液等造成损害^[3]。

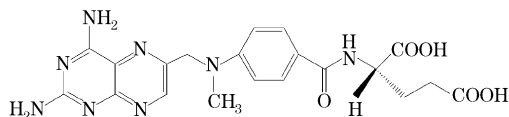


Fig. 1 Molecular structure of Methotrexate

通常, 药物分子进入生物体后, 要通过血浆贮存与运输, 才能达到受体部位, 进而发挥相应的药理作用。血清白蛋白是血浆中重要的运输载体, 因此研究 MTX 与血清白蛋白分子间的相互作用, 对于理解药物在体内的运输机制、代谢过程和药理作用具有重要的意义^[4]。本文利用荧光光谱和紫外吸收光谱法, 研究了生理条件下 MTX 与牛血清白蛋白的结合作用, 测定了不同温度下它们之间的结合位数与结合常数, 并根据求得的热力学参数确定了其相互作用的主要形式。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

F-2500 荧光光度计(日本 Hitachi 公司), 配有 Pharmacia Biotech 循环水恒温系统; Ultrospec 4000 紫外-可见分光光度计(瑞士 Pharmacia Biotech 公司), 配有自动控温系统。

牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA, 北京益利精细化学品有限公司), 配成 $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水溶液, 当日配置; 甲氨喋呤(MTX, Acros Organics 产品), 用 Tris-HCl 缓冲液配成 $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液; pH 7.20 Tris-HCl 缓冲液($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 含 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 以维持一定的离子强度); 实验用水均为二次去离子水。

1.2 实验方法

BSA 用 Tris-HCl 缓冲液稀释成 $3 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液; 向 1 cm 比色皿中加入 3 mL 此溶液, 恒温 2 min 后, 测定荧光或紫外光谱; 再向其中逐次加入一定浓度的 MTX 溶液, 恒温后分别测定其荧光或紫外光谱(实验过程中, 加入 MTX 溶液的体积为 $0 \sim 40.5 \mu\text{L}$, 不超过溶液总体积的 1.5%, 故体积变化的影响可以忽略)。荧光激发波长 284 nm, 记录 $300 \sim 550 \text{ nm}$ 的发射强度, 激发狭缝 5 nm, 发射狭缝 10 nm, 测定温度分别为 25 和 35 °C。紫外光谱测定温度为 25 °C。

2 结果与讨论

2.1 甲氨喋呤对牛血清白蛋白荧光的猝灭作用

蛋白质分子因含有色氨酸、酪氨酸等氨基酸残基, 在紫

收稿日期: 2005-06-28, 修订日期: 2005-11-08

基金项目: 北京市自然科学基金(7042006)资助项目

作者简介: 谢文俊, 女, 1982 年生, 清华大学化学系本科生 * 通讯联系人

外光照射下会产生内源荧光。牛血清白蛋白中含有两个色氨酸残基^[4]。在本文的实验条件下, 荧光谱 340 nm 处有一荧光发射峰, 甲氨喋呤自身在此激发波长下无荧光发射。固定溶液中牛血清白蛋白(BSA)的浓度, 随着甲氨喋呤(MTX)浓度的增加, BSA 的荧光强度逐渐降低, 但发射峰位置和形状不变, 实验结果见图 2, 说明 MTX 对 BSA 的荧光有猝灭作用。

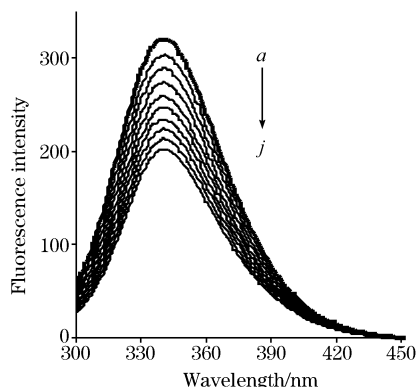


Fig. 2 Fluorescence spectra of BSA with various concentrations of MTX

pH 7.20 Tris-HCl buffer, 25 °C; [BSA] = 3×10^{-6} mol · L⁻¹; [MTX] (10^{-6} mol · L⁻¹), $a \sim j$: 0, 1.5, 3.0, 4.5, 6.0, 7.5, 9.0, 10.5, 12.0, 13.5

2.2 猝灭方式的判定

从荧光猝灭机理看, 药物分子对蛋白质荧光的猝灭可分为动态猝灭和静态猝灭。静态猝灭是药物和蛋白质在基态时生成复合物, 从而导致蛋白质荧光强度降低; 动态猝灭是药物和蛋白质的激发态分子之间的相互作用而导致的荧光猝灭, 遵循 Stern-Volmer 方程^[5]: $F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [Q]$, 式中 F_0 和 F 分别表示猝灭剂不存在和存在时蛋白的荧光强度, $[Q]$ 表示猝灭剂浓度, K_q 为双分子表观猝灭速率常数, τ_0 为蛋白荧光寿命。以 F_0/F 对药物浓度作图(见图 3)。

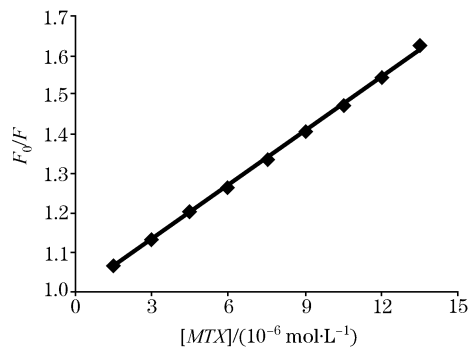


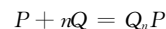
Fig. 3 Stern-Volmer plot of BSA (3×10^{-6} mol · L⁻¹) quenched by MTX at 25 °C ($r=0.9997$)

可得 $K_q \cdot \tau_0 = 4.47 \times 10^4$ mol⁻¹ · L, 这里 BSA 的荧光寿命 τ_0 约 10^{-8} s^[6], 则 $K_q = 4.47 \times 10^{12}$ mol⁻¹ · L · s⁻¹。据报道, 各类猝灭剂对生物大分子的最大碰撞猝灭速率常数

为 2.0×10^{10} mol⁻¹ · L · s⁻¹^[7], 而本实验所求得的 MTX 对 BSA 的猝灭过程速率常数远远大于此扩散控制的 K_q , 说明以上猝灭不是由碰撞引起的动态猝灭^[8]。

2.3 甲氨喋呤与牛血清白蛋白的结合位点数

甲氨喋呤对牛血清白蛋白的荧光猝灭不是动态猝灭, 很可能是由于 MTX 与基态的 BSA 之间形成了复合物, 从而产生静态猝灭。假设一个 BSA 分子有 n 个相同且独立的结合位点可与 MTX 结合, 用 P 表示蛋白, Q 表示猝灭剂, $Q_n P$ 表示生成的复合物, 二者之间的猝灭作用可用下式表示^[9]



用 K_A 表示复合物生成常数, 则有

$$K_A = [Q_n P] / ([P][Q]^n)$$

不难导出

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

以 $\lg(F_0/F - 1)$ 对 $\lg[Q]$ 作图(如图 4), 可求得 25 和 35 °C 时 BSA 对 MTX 的结合位点数分别为 1.04 和 1.03, 从而推测甲氨喋呤与牛血清白蛋白二者以 1:1 结合。

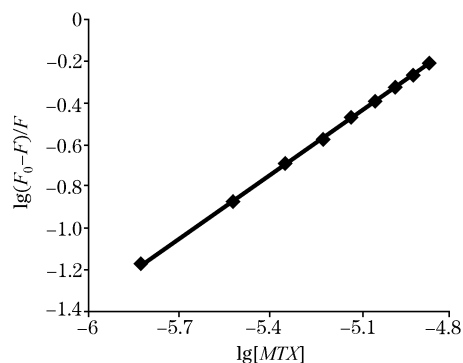
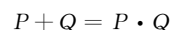


Fig. 4 A plot of $\lg[(F_0 - F)/F]$ vs $\lg[MTX]$ (25 °C, $r=0.9999$)

2.4 甲氨喋呤与牛血清白蛋白结合常数的计算

对于以 1:1 结合的静态猝灭, 甲氨喋呤与牛血清蛋白结合常数可由它们之间缔合公式求得



其生成常数

$$K_A = \frac{[PQ]}{[P][Q]} = \frac{[P]_0 [1 - F/F_0]}{[P]_0 (F/F_0) [Q]} = \frac{[1 - F/F_0]}{(F/F_0)[Q]}$$

进而推出

$$F_0/F = 1 + K_A [Q] \quad (1)$$

而解离常数

$$K_D = 1/K_A = [Q]/(F_0/F - 1)$$

变形为

$$K_D [Q]^{-1} = F_0 (F_0 - F)^{-1} - 1$$

从而得到 Lineweaver-Burk 方程^[10]

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

(1)式与(2)式均为目前国内研究者常用的求取蛋白与药物结合常数的公式^[4, 6, 8, 9, 11, 12]; 由推导过程看, 二者应当是等价的。根据(1)式, 以 F_0/F 对 $[Q]$ 作图(如图 3), 可以求得不同温度下的 K_A ; 而根据(2)式, 以 $(F_0 - F)^{-1}$ 对 $[Q]^{-1}$ 作

Lineweaver-Burk 双倒数图(见图 5), 可以求得不同温度下的 K_D 。

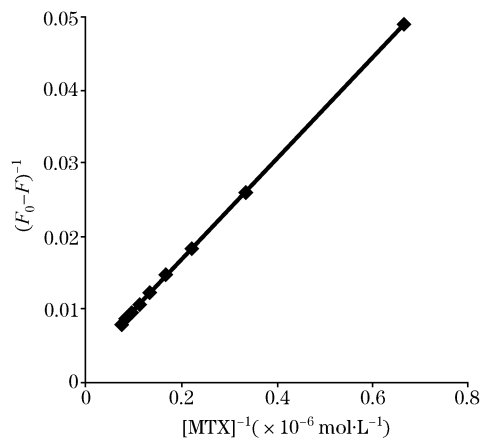


Fig. 5 Lineweaver-Burk plot of BSA quenched by MTX at 25 °C ($r=0.9999$)

表 1 列出了在 25 和 35 °C 时, 甲氨喋呤与牛血清白蛋白的结合常数和解离常数(r 为相关系数)。

Table 1 The binding constants of MTX with BSA at different temperatures

	$K_A/(\text{mol}^{-1} \cdot \text{L})$	r	$K_D/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	r
25 °C	4.47×10^4	0.999 3	2.53×10^{-5}	0.999 9
35 °C	4.42×10^4	0.998 8	2.50×10^{-5}	0.999 7

从表中的数据, 可认为温度对甲氨喋呤与 BSA 之间的结合常数基本没有影响, 说明甲氨喋呤对 BSA 有较强的结合作用^[6]。另外由结合常数也可看出二者结合较为紧密, MTX 可在体内被血清白蛋白转运。

2.5 热力学参数的计算及主要作用力形式的确定

一般, 药物小分子与蛋白大分子间的非共价相互作用属分子间的弱相互作用, 包括氢键、范德瓦耳斯力、静电和疏水等相互作用的多种形式, 而二者结合的热力学参数可以用于确定它们之间作用力的类型, 为此进行了热力学参数的计算。对于化合物与蛋白之间的相互作用, 当温度变化不大时二者结合的焓变 ΔH 可以看作常数^[10]。根据公式

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

$$\Delta G = -RT \ln K, \Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

用表 1 中的 K_A 值计算热力学参数焓变 ΔH , 熵变 ΔS 和自由能变 ΔG , 其结果列于表 2。

对于药物与蛋白分子间的相互作用, 正的 ΔS 值一般被认为是疏水作用力存在的特征, 对水溶液中的离子型复合物来说, 静电作用也会产生正的 ΔS ^[12]。牛血清白蛋白易溶于水, 由 3 个结构域组成, 每个结构域又含有 2 个亚结构域并

Table 2 The thermodynamic constants for the binding of MTX with BSA

	$\Delta H/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S/(\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \text{K}^{-1})$	$\Delta G/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$ 25 °C
MTX-BSA	0	10.71	-26.55

构成疏水腔, 这些空腔可通过疏水作用与特异性的配基互补。当 BSA 带有电荷时, 又能与带电配体发生非特异性静电相互作用; 其等电点在 pH 4.7 左右^[13]。在本实验 pH 7.20 的缓冲液中, 牛血清白蛋白主要带负电荷; 而甲氨喋呤分子含有两个羧酸基团, 在 pH 7.20 的环境中会失去电子也带负电荷。因此, 根据热力学参数 $\Delta H=0$, $\Delta S>0$ 的判断, 以及对实验体系的分析, 可认为, 甲氨喋呤与牛血清白蛋白的相互作用主要是通过疏水作用力进行的。

2.6 牛血清白蛋白与甲氨喋呤相互作用的紫外光谱

除荧光光谱外, 还测定了甲氨喋呤与牛血清白蛋白作用的紫外光谱。甲氨喋呤在紫外-可见光区有 3 个吸收峰, 实验时固定其它影响因素, 使 BSA 浓度为唯一可变因子。从图 6 中可见, 随着加入的牛血清白蛋白浓度不断增加, 其在 258, 303 nm 处的吸收强度不断减小, 而在 371 nm 处的吸收基本不变。减色效应的存在, 说明基态的 BSA 与 MTX 之间存在相互作用^[14]。甲氨喋呤吸收光谱的变化, 也进一步验证了 MTX 对 BSA 的猝灭是静态猝灭。

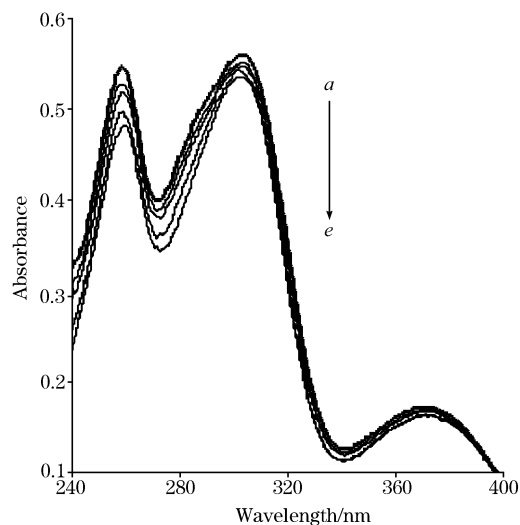


Fig. 6 Absorption spectra of MTX without and with BSA

pH 7.20 Tris-HCl buffer, 25 °C; $[\text{MTX}] = 20 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $[\text{BSA}] (10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$, a to e: 0, 5, 10, 20, 30

本文在医药上有一定的实际意义, 而有关药物分子与牛(人)血清白蛋白相互作用的研究应是当前的热点课题, 可参阅文献^[15, 16]。

参 考 文 献

- [1] Curtin N J, et al. *Lancet Oncol.*, 2001, 2: 298.
- [2] LI Li, et al(李 莉, 等). *Chinese Remedies & Clinics(中国药物与临床)*, 2004, 4(10): 763.
- [3] ZHANG Chuan-cang, et al(张传仓, 等). *Chin. J. Pharmacoepidemiol(药物流行病学)*, 2001, 10(2): 70.
- [4] YANG Man-man, et al(杨曼曼, 等). *Chinese Science Bulletin(科学通报)*, 1994, 39(1): 31.
- [5] ZHANG Bao-lin, et al(张保林, 等). *Acta Chimica Sinica(化学学报)*, 1994, 52: 1213.
- [6] Joseph R. Lakowicz, Gregorio Weber. *Biochemistry*, 1973, 12(21): 4161.
- [7] LIU Bao-sheng, et al(刘保生, 等). *Journal of Analytical Science(分析科学学报)*, 2005, 21(1): 17.
- [8] YANG Pin, GAO Fei, et al(杨 频, 高 飞, 等). *Principle of Bioinorganic Chemistry(生物无机化学原理)*. Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 2002.
- [9] LU Ji-xin, et al(卢继新, 等). *Acta Chimica Sinica(化学学报)*, 1997, 55: 915.
- [10] ZHANG Yong, et al(张 勇, 等). *Journal of Analytical Science(分析科学学报)*, 2000, 16(6): 445.
- [11] ZHANG Li-wei, et al(张立伟, 等). *Journal of Shaanxi University(Nat. Sci. Ed.)(山西大学学报·自然科学版)*, 1995, 18(1): 36.
- [12] LIU Jia-qin, et al. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2004, 35: 671.
- [13] MA Chun-qi, et al(马春琪, 等). *Acta Chimica Sinica(化学学报)*, 1999, 57: 389.
- [14] HE Mei, et al(何 梅, 等). *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy(中国现代应用药学)*, 2004, 21(6): 429.
- [15] CHEN Xiao-bo, KANG Dong-guo, LI Song, et al(陈晓波, 康栋国, 李 崧, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2005, 25(9): 1451.
- [16] YU Ying, ZHOU Zhen-tao(俞 英, 周震涛). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2005, 25(9): 1456.

Study of the Interaction between Methotrexate and Bovine Serum Albumin by Spectrometry

XIE Wen-jun¹, FENG Yu-ping^{1*}, CAO Sheng-li², ZHAO Yu-fen¹

1. Key Laboratory of Bioorganic Phosphorus Chemistry and Chemical Biology(Ministry of Education), Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China
2. Department of Chemistry, Capital Normal University, Beijing 100037, China

Abstract The interaction of methotrexate (MTX) and bovine serum albumin (BSA) was studied by fluorescence and absorption spectra. The results show that methotrexate strongly quenched the fluorescence of bovine serum albumin, and the quenching mechanism is a static quenching procedure. The binding constants and the number of binding sites between MTX and BSA at different temperatures were calculated. Furthermore, the enthalpy and entropy changes in the interaction were also obtained, and the primary binding pattern between MTX and BSA was interpreted as hydrophobic interaction.

Keywords Methotrexate (MTX); Bovine serum albumin (BSA); Fluorescence spectra; Absorption spectra; Interaction

(Received Jun. 28, 2005; accepted Nov. 8, 2005)

* Corresponding author