

# 光谱法研究头孢尼西钠与牛血清白蛋白的相互作用

刘 里, 李艳芳, 成飞翔

**摘要** 目的 运用荧光和紫外光谱法在不同的温度下去探讨头孢尼西钠(CS)与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用。方法 用 Stern-Volmer、Lineweaver-Burk 和双对数方程计算了速率常数( $K_q$ )、猝灭常数( $K_{sv}$ )、静态荧光猝灭缔合常数( $K_{LB}$ )、结合位点数( $n$ )和有效结合常数( $K_b$ )。结果 CS 能结合 BSA。由于生成 CS-BSA 复合物, 头孢尼西钠对 BSA 的猝灭是静态猝灭机制。热力学参数表明是一个自发过程, 其作用力类型主要为静电作用力。BSA 的亚螺旋域 II A 是主要结合位置, 离酪氨酸残基更近。有药物负协同作用。同步荧光光谱法表明 CS 能改变 BSA 的色氨酸和酪氨酸残基的微环境。结论 CS 与 BSA 发生了静态相互作用, 有一个结合位点, 为 CS 的临床研究提供重要的参考依据。

**关键词** 头孢尼西钠; 荧光; 猝灭; 相互作用; 牛血清白蛋白  
中图分类号 O 657.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)01-0052-05  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.01.011

头孢尼西钠(简称 CS)为第 2 代广谱、长效的头孢类抗生素, 其细菌的选择性好且无毒, 有抗菌作用强、抗菌谱广、耐青霉素酶、过敏反应较青霉素类少见等优点, 被广泛应用于临床<sup>[1]</sup>。虽然 CS 有诸多优点, 但对人体也存在一些不良反应, 如神经系统毒性反应、造血系统毒性反应、肝、肾毒性反应以及胃肠道等反应<sup>[2]</sup>。在人体血浆中, 血清白蛋白是含量最丰富的蛋白质。CS 与血清白蛋白的亲合力可能会影响该种药物和其他药物的有效活性部位。因此, 获得 CS 与血清白蛋白相互作用的机制的详细信息就显得至关重要。牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)被广泛用作研究蛋白质与药物相互作用的模型, 因为具有 76% 的序列与人血清白蛋白相同<sup>[3]</sup>。但至今还未见光谱法研究 CS 与 BSA 的相互作用的报道。该研究用紫外和荧光光谱法研究 CS 与 BSA 的结合作用, 测定各种结合参数, 如  $K_q$ 、 $K_{sv}$ 、

$K_{LB}$ 、 $n$  和  $K_b$  等, 探讨了两者的结合力类型、结合位置等, 对 CS 的临床研究有参考价值, 并为 CS 的安全用药提供了理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 主要仪器与试剂** pH5-3C 型精密酸度计(上海虹益仪器仪表有限公司); HWS12 型超级恒温水浴(上海一恒科技有限公司); F-4600 型荧光光谱仪(日本日立公司); Cary 50 型紫外-可见光谱仪(美国瓦里安技术中国有限公司); 牛血清白蛋白(99%, 生工生物工程股份有限公司); CS(98%, 北京悦康药业集团有限公司); 其它试剂均为分析纯, 实验用水为超纯水。

**1.2 方法** 于 10.0 ml 比色管中依次加入 CS 溶液, 终浓度为(0、0.795、1.59、2.385、3.18、3.975、4.77、5.565、6.36、7.155、7.95、8.745)  $\times 10^{-6}$  mol/L, 编号依次为 1~12;  $1.0 \times 10^{-5}$  mol/L 的 BSA 1.5 ml 0.5 mol/L NaCl 溶液 2.0 ml 和 0.1 mol/L pH 7.4 的缓冲溶液 1.5 ml, 定容至刻度线。分别在 291 K、301 K、311 K 温度下孵育 40 min 后扫描荧光光谱和同步荧光光谱。记录空白的荧光强度  $F_0$  和含有 CS 体系的荧光强度为  $F$ ,  $\Delta F = F_0 - F$ 。按照上述方法扫描 CS-BSA 体系的吸收光谱。

## 2 结果

**2.1 荧光光谱** 当 BSA 与药物小分子相互作用时, 如 CS, 其内源荧光[主要是酪氨酸残基(Tyr)和色氨酸残基(Trp)贡献的荧光]通常随药物浓度增加而降低。BSA 的荧光发射光谱(激发波长  $\lambda_{ex} = 280$  nm)在 291 K 时, 在发射波长( $\lambda_{em}$ )340 nm 处, 表现出很强的荧光发射峰值。然而增加 CS 的浓度导致荧光强度明显减弱, 见图 1。

**2.2 最佳相互作用条件** 对 CS-BSA 体系的缓冲溶液的种类、pH 值、缓冲溶液的浓度、BSA 的浓度、试剂加入顺序和孵育时间进行优化。图 2 表明 CS 对 BSA 的荧光降低程度依赖于 pH 值、缓冲溶液类型和浓度、BSA 的浓度、试剂加入顺序和孵育时间。

**2.3 猝灭机制** 荧光猝灭可以分为荧光动态猝灭、

2016-08-16 接收

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金项目(编号:2015C090Y); 国家自然科学基金(编号:21261019)

作者单位: 曲靖师范学院化学化工学院, 曲靖 655011

作者简介: 刘 里, 女, 博士研究生, 讲师, 责任作者, E-mail: ml8908746298@163.com

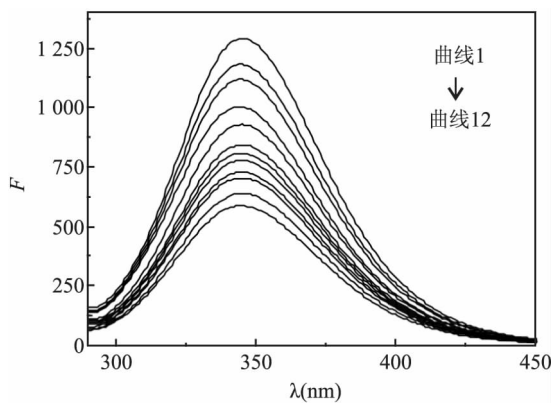


图1 CS对BSA的猝灭光谱

荧光静态猝灭和混合猝灭。静态猝灭是由于指荧光基团和猝灭剂之间形成不发荧光的复合物<sup>[4]</sup>。而动态猝灭指的是它们之间的碰撞猝灭。静态和动态

猝灭过程可以由 Stern-Volmer (即 S-V) 方程描述： $F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [CS] = 1 + K_{sp} [CS]$ ，式中  $K_{sp}$  为 S-V 常数， $[CS]$  为头孢尼西钠浓度， $K_q \tau_0 [CS]$  为荧光寿命 (BSA:  $10^{-8}$  s)<sup>[4]</sup>， $K_q$  为生物分子的猝灭速率常数。各种猝灭机制通常通过改变温度  $K_{sp}$  的变化情况来区分。温度较高，扩散系数越大，更快的分子运动和大量的碰撞猝灭。因此，动态猝灭的  $K_{sp}$  随温度的升高而升高。相比之下，温度升高通常会导导致基态复合物的解离，因此，静态猝灭的  $K_{sp}$  会降低<sup>[5]</sup>。作 CS-BSA 体系的 S-V 曲线 (图 3)，并计算各类常数列于表 1 中。但药物与血清白蛋白符合静态猝灭机理时，遵循 L-B 双倒数方程<sup>[6]</sup>： $(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + (K_{LB} F_0 [CS])^{-1}$ ，式中  $K_{LB}$  为静态猝灭缔合常数。用  $(F_0 - F)^{-1}$  对  $[CS]^{-1}$  作不同温度下的 L-B 曲线，计

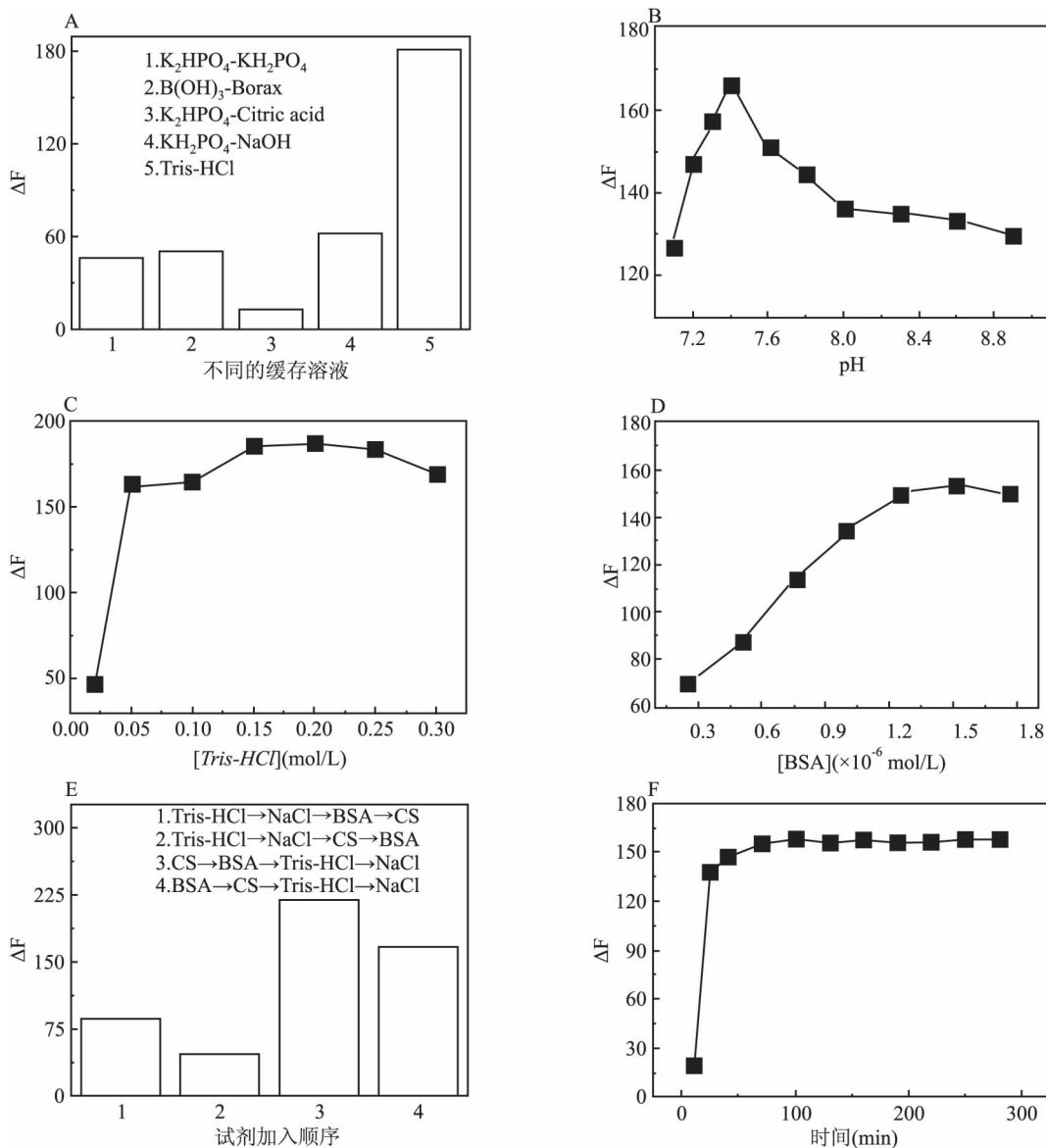


图2 反应体系的优化

表1 S-V 方程

温度 (K)	S-V 方程	$K_{st}$ (L/mol)	$K_q$ [L/(mol · s)]	r 值
291	$F_0/F = 16\ 819 [CS] + 1.024\ 3$	16 819	$1.681\ 9 \times 10^{12}$	0.995 4
301	$F_0/F = 15\ 398 [CS] + 0.924\ 8$	15 398	$1.539\ 8 \times 10^{12}$	0.996 0
311	$F_0/F = 14\ 644 [CS] + 0.892\ 3$	14 644	$1.464\ 4 \times 10^{12}$	0.995 8

表2 L-B 方程

温度 (K)	L-B 方程	$K_{LB}$ (L/mol)	r 值
291	$(F_0 - F)^{-1} = 3.243\ 4 \times 10^{-8} [CS]^{-1} + 0.001\ 2$	$2.379\ 3 \times 10^4$	0.977 5
301	$(F_0 - F)^{-1} = 3.415\ 4 \times 10^{-7} [CS]^{-1} + 0.006\ 0$	$4.245\ 2 \times 10^3$	0.973 0
311	$(F_0 - F)^{-1} = 8.326\ 8 \times 10^{-7} [CS]^{-1} + 0.015\ 2$	$3.059\ 8 \times 10^3$	0.989 0

表3 双对数方程

温度 (K)	双对数方程	$K_b$ (L/mol)	n	r 值
291	$\lg [(F_0 - F) / F] = 0.984\ 4 \lg [CS] + 4.112$	$1.294\ 2 \times 10^4$	0.984	0.992 0
301	$\lg [(F_0 - F) / F] = 0.976\ 8 \lg [CS] + 4.062$	$1.153\ 5 \times 10^4$	0.977	0.991 6
311	$\lg [(F_0 - F) / F] = 0.889\ 1 \lg [CS] + 3.641$	$4.374\ 2 \times 10^3$	0.889	0.992 5

算  $K_{LB}$  值列于表 2 中。图 4 是在不同浓度 CS 的存在下,BSA 的紫外吸收光谱。曲线 1 代表只有 CS 的吸收曲线,曲线 2 ~ 12 是 CS-BSA 的吸收曲线。

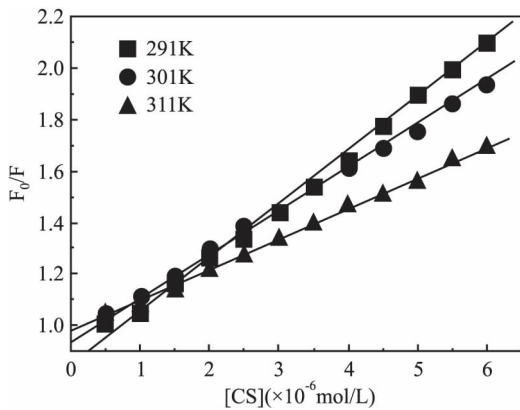


图3 S-V 曲线

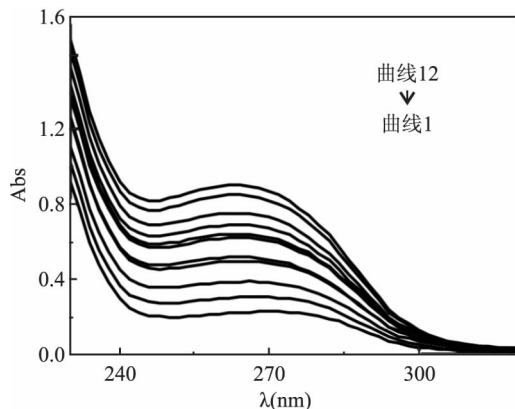


图4 CS-BSA 的紫外-吸收光谱

2.4 结合常数和结合位点数 由于形成了 CS 和 BSA 的复合物,可以通过双对数方程: $\lg [(F_0 - F) /$

$F] = \lg K_b + n \lg [CS]$ <sup>[7]</sup> 确定其结合常数 ( $K_b$ ) 和结合位点数 ( $n$ )。作不同温度下的双对数曲线,由直线截距和斜率分别求得  $K_b$  和  $n$  值,并列于表 3 中。

2.5 CS 对 BSA 构象的影响 同步荧光光谱可以提供很多关于氨基酸残基微环境有价值的信息。在一般情况下,当固定  $\Delta\lambda = 15\ \text{nm}$  时,Tyr 的光谱特性将被观察到,当固定  $\Delta\lambda = 60\ \text{nm}$ ,Trp 光谱特性被观察<sup>[8]</sup> (图 5)。

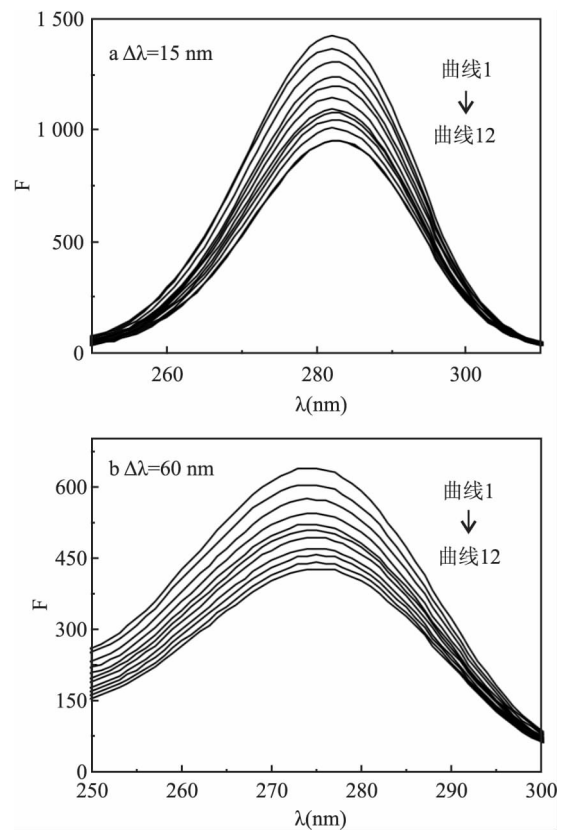


图5 CS 猝灭 BSA 的同步荧光光谱图

**2.6 热力学常数及结合力类型** CS 与 BSA 结合反应的吉布斯自由能变  $\Delta G$ , 焓变  $\Delta H$  及熵变  $\Delta S$  可由热力学公式  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT\ln K$  和  $\ln(K_2/K_1) = (1/T_1 - 1/T_2) \Delta H/R$ <sup>[7-9]</sup> 计算, 结果列于表 2。

表 4 热力学参数和  $n_H$  值

温度 (K)	$\Delta S$ (J/mol·K)	$\Delta H$ (kJ/mol)	$\Delta G$ (kJ/mol)	$n_H$	r 值
291	49.93	-8.38	-22.91	0.827 8	0.993 3
301	49.93	-8.38	-23.41	0.604 8	0.996 5
311	42.76	-8.38	-21.68	0.554 6	0.998 4

**2.7 药物协同作用** Hill 方程:  $\lg Y/(Y_m - Y) = \lg K + n_H \lg [CS]$ <sup>[10-12]</sup> 是分析药物协同作用的常用公式, 式中  $n_H$  为 Hill 系数,  $K$  为结合常数,  $Y$  为饱和分数,  $Y = (F_0 - F)/F_0$ ,  $1/Y_m$  为截距。1/Y 对 1/[CS] 作图,  $n_H$  值列于表 4 中。

**2.8 结合位置的确定** BSA 含有三个线性的结合位点命名为 I-II-III, 而每个结合位点都有两个子域 A 和 B<sup>[10-12]</sup>。可以通过比较激发波长分别为 280、295 nm 时, CS 对 BSA 荧光强度的猝灭程度 ( $F/F_0$ ) (图 6) 来初步确定 CS 与 BSA 的结合位置。

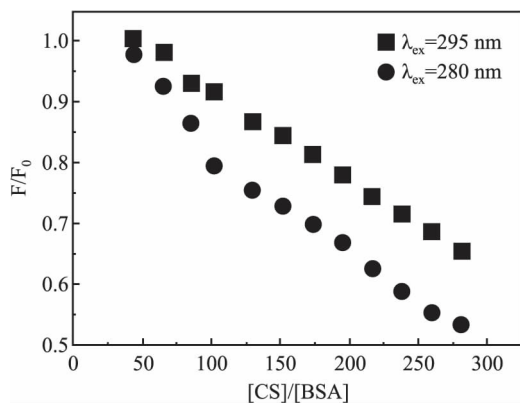


图 6  $\lambda_{ex}$  为 280 nm 和 295 nm 时 CS-BSA 的荧光猝灭曲线

### 3 讨论

随着 CS 浓度的增加, BSA 的荧光强度逐渐降低, 而且  $\lambda_{em}$  略有红移 (从 340 nm 到 345 nm), 这些结果表明 CS 与 BSA 发生了相互作用, 可以猝灭 BSA 的荧光。

CS 与 BSA 相互作用的最佳条件为 0.015 mol/L, pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液作为反应介质, BSA 浓度为  $1.5 \times 10^{-6}$  mol/L, CS  $\rightarrow$  BSA  $\rightarrow$  Tris-HCl  $\rightarrow$  NaCl 的加入顺序, 孵育时间为 40 min。

CS 对 BSA 猝灭的  $K_q$  值比最大散射碰撞猝灭常数  $2.0 \times 10^{10}$  L/(mol·s) 大 2 个数量级, 这表明对 BSA 的荧光猝灭的 CS 是最有可能的静态猝灭。随着温度的升高, 直线斜率即  $K_{sv}$  降低, 表明头孢尼西钠与 BSA 遵循静态猝灭机制。

$K_{LB}$  值在  $10^3$  到  $10^4$  数量之间, 表明形成的 CS-BSA 复合物稳定性好。而且随着温度的升高,  $K_{LB}$  值逐渐下降, 这是由于温度越高, 复合物稳定性越差。正好与静态猝灭机制相符合。

由于 CS 的加入, BSA 的吸收峰从 270 nm 蓝移到 264 nm, 吸收峰的强度也增加了。这表明由于 BSA 的构象改变, 导致 BSA 的紫外可见吸收光谱变化。这一结果在实验范围内, 再次确认 CS 对 BSA 的荧光猝灭机制可能为静态猝灭。

$K_b$  为  $10^3$  数量级, 表明 CS 与 BSA 之间形成了较强的结合作用力。当温度从 291 K 升高到 301 K 时,  $K_b$  变化不大; 但当温度升高到 311 K 时,  $K_b$  值减少了约 2/3, 表明 CS-BSA 复合物对高温变化敏感, 而且进一步阐明了温度超过 301K 会有碍于血清白蛋白在体内运转、贮存和分配 CS。n 值接近于 1, 说明 CS 与 BSA 之间可形成 1 个结合位点。

对 CS-BSA 体系  $\Delta G < 0$ ,  $\Delta H < 0$  且  $\Delta S > 0$ , 表明 BSA 与 CS 的结合是自发进行的放热反应, Ross 和 Subramanian 总结的相互作用规律<sup>[8-10]</sup>, CS 与 BSA 之间的作用力以静电作用力为主。

$n_H$  值小于 1, 说明了 CS 分子结合到 BSA 位点上后, 对后续 CS 与 BSA 的结合起了阻碍作用, 即有药物负协同作用。随着温度升高,  $n_H$  值越来越小, 阐明了温度越高, 后续药物分子对 BSA 的亲水性越弱。

$\lambda_{ex}$  为 280、295 nm 的 CS-BSA 光谱曲线不相交, 表明 Tyr 和 Trp 都参与其中; 当  $\lambda_{ex} = 280$  nm,  $F/F_0$  曲线比  $\lambda_{ex} = 295$  nm 的降低程度更大<sup>[8-10]</sup>, 表明亚螺旋域 II A 是主要结合位置。

随着 CS 浓度的加大,  $\Delta\lambda = 15$  nm 和  $\Delta\lambda = 60$  nm 的 BSA 同步荧光强度逐渐减小, 而且  $\lambda_{em}$  发生微小的红移 ( $\sim 1$  nm)。这说明 CS 的加入改变了 Trp 和 Try 的微环境, 导致 Trp 和 Try 附近的极性增加, 相应的它们的亲水性增强。CS 对 Tyr 的猝灭程度大于 Trp 残基, 表明 CS 与 BSA 相结合的位点偏向于 Tyr。

综上所述, 使用多种光谱方法表明 CS 与 BSA 的相互作用是静态猝灭过程, 两者通过静电作用力结合。因形成了一个结合位点, BSA 可转运和储存

CS,但有药物负协同作用。其结合位置靠近酪氨酸残基,在BSA的亚螺旋域II A中。这些重要结果为CS的临床研究提供了重要的参考数据,并为CS的安全用药提供了理论依据。

### 参考文献

- [1] 付晓丽,郭景文,郑台等.注射用头孢西钠质量评价[J].中国抗生素杂志,2014,39(4):285-8.
- [2] 赵红印,代红梅.头孢西钠不良反应与配伍禁忌分析[J].中国现代药物应用,2013,7(7):65-6.
- [3] 储著朗,崔笑,杨晓明,等. HPO205 与 COX6B1 蛋白之间的相互作用[J]. 安徽医科大学学报,2010,47(11):1278-82.
- [4] 许金钩,王尊本. 荧光分析法[M]. 3版. 北京:科学出版社,2006:42-69.
- [5] Lakowicz J R. Principles of fluorescence spectroscopy [M]. 3rd ed. New York:Springer Press 2006:285.
- [6] 刘里,成飞翔. 光谱法研究头孢地尼与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 中南大学学报(医学版),2015,40(9):979-86.
- [7] 刘保生,闫潇娜,曹世娜,等. 头孢匹胺钠与牛血清白蛋白相互作用机理及共存金属离子的影响[J]. 发光学报,2012,33(9):1018-24.
- [8] Cyril L, Earl J K, Sperry W M. Biochemist's Handbook [M]. London:Epon Led Press,1961.
- [9] Ross D P, Subramantan S. Thermodynamics of protein association reactions:forces contributing to stability [J]. Biochemistry,1981,20(11):3096-102.
- [10] Ni Y, Wang S, Kokot S. Spectrometric study of the interaction between Alpinetin and bovine serum albumin using chemometrics approaches [J]. Anal Chim Acta,2010,663(2):139-46.
- [11] Bojko B, Sułkowska A, Maciążek-Jurczyk M, et al. The influence of dietary habits and pathological conditions on the binding of theophylline to bovine serum albumin [J]. J Pharmaceut Biomed,2009,52(3):384-90.
- [12] Xu H, Gao S L, Lv J B, et al. Spectroscopic investigations on the mechanism of interaction of crystal violet with bovine serum albumin [J]. J Mol Struct,2009,919(1):334-8.

## On the interaction between cefonicid sodium and bovine serum albumin by spectrometry

Liu Li, Li Yanfang, Cheng Feixiang

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Qujing Normal University, Qujing 655011)

**Abstract Objective** To explore the interaction of cefonicid sodium (CS) with bovine serum albumin (BSA) by fluorescence and absorption spectroscopy. **Methods** The rate constant ( $K_q$ ), quenching constant ( $K_{sv}$ ), static fluorescence quenching association constant ( $K_{LB}$ ), binding site number ( $n$ ) and binding constant ( $K_b$ ) were calculated using Stern-Volmer, Lineweaver-Burk and double logarithm equations. **Results** CS was able to bind to BSA. The probable quenching mechanism of BSA by CS was mainly static quenching due to the formation of a CS-BSA complex. The results of thermodynamic parameters indicated that electrostatic force plays the main role in the binding process and the binding process was spontaneous. There was a single class of binding site for the BSA with CS. The primary binding site for CS was located at sub-domain II A of BSA and near by tyrosine residue. There was almost some negative cooperative effect. The results obtained from synchronous fluorescence showed that CS could change the microenvironment of Tyrand Trp residues of BSA. **Conclusion** The interaction between CS and BSA is dynamic. There is a single class of binding site for the BSA with CS. The obtained results provide references for its clinical application.

**Key words** cefonicid sodium; fluorescence; quenching; interaction; bovine serum albumin