

基于头孢曲松钠 - 牛血清白蛋白相互作用机制的药物协同性研究

刘正宏, 李松, 徐科*, 雷治友, 敖正松, 郭电云, 黎顺, 甄承

贵州师范学院化学与材料学院, 贵州 贵阳

收稿日期: 2024年4月20日; 录用日期: 2024年5月17日; 发布日期: 2024年5月27日

摘要

本文采用荧光和同步荧光光谱法, 基于头孢曲松钠(CRO) - 牛血清白蛋白(BSA)相互作用机制研究药物协同性和CRO蛋白结合率及BSA中酪氨酸(Tyr)和色氨酸(Trp)残基的药物结合率。结果表明: CRO与BSA结合使BSA中Tyr和Trp残基的荧光发生静态荧光猝灭, 且均参与体系结合反应。 $N_{SFQ(Tyr)} > N_{SFQ(Trp)}$, 结合位置更靠近Tyr残基, 结合位点数 $n \approx 1$, $\Delta G < 0$, $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$, 体系环境以疏水作用为主; 模拟生理条件下, Hill系数 $n_H \approx 1$, 当 $4.08 \text{ mg/L} < c_{CRO} < 8.16 \text{ mg/L}$ 时, CRO-BSA中Tyr残基的药物结合率 $W(Q)$ 为6.5%~12.6%, Trp残基的药物结合率 $W(Q)$ 为6.35%~12.07%, Tyr和Trp残基的药物结合对CRO的药效基本没有影响, CRO的蛋白结合率可达95%以上。

关键词

作用机制, 静态猝灭, 药物协同性, 蛋白结合率

Study on Drug Synergy Based on the Interaction Mechanism between Ceftriaxone Sodium and Bovine Serum Albumin

Zhenghong Liu, Song Li, Ke Xu*, Zhiyou Lei, Zhengsong Ao, Dianyun Guo, Shun Li, Cheng Zhen

School of Chemistry and Materials Science, Guizhou Education University, Guiyang Guizhou

Received: Apr. 20th, 2024; accepted: May 17th, 2024; published: May 27th, 2024

Abstract

In this paper, we used fluorescence and synchronous fluorescence spectroscopy to study drug synergy and protein binding rate of CRO-BSA system. The results show that the fluorescence of Tyr and Trp residues in BSA is quenched by CRO, and both participate in the binding reaction. $N_{SFQ(Tyr)} > N_{SFQ(Trp)}$, the binding site is closer to Tyr residue, the binding site number $n \approx 1$, $\Delta G < 0$, $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$, the system environment is dominated by hydrophobic interaction; under simulated physiological conditions, Hill coefficient $n_H \approx 1$, when $4.08 \text{ mg/L} < c_{CRO} < 8.16 \text{ mg/L}$, the drug binding rate $W(Q)$ of Tyr residue in CRO-BSA is 6.5%~12.6%, the drug binding rate $W(Q)$ of Trp residue is 6.35%~12.07%, the drug binding of Tyr and Trp residues has little effect on the efficacy of CRO, the protein binding rate of CRO can reach 95% or more.

*通讯作者。

文章引用: 刘正宏, 李松, 徐科, 雷治友, 敖正松, 郭电云, 黎顺, 甄承. 基于头孢曲松钠-牛血清白蛋白相互作用机制的药物协同性研究[J]. 药物资讯, 2024, 13(3): 232-241. DOI: 10.12677/pi.2024.133028

synergism and CRO protein binding and drug binding of tyrosine (Tyr) and tryptophan (Trp) residues in BSA based on the mechanism of ceftriaxone sodium (CRO)-bovine serum albumin (BSA) interaction. The results showed that CRO binding to BSA caused static fluorescence burst of Tyr and Trp residues in BSA, and both were involved in the system binding reaction. $N_{SFQ(Tyr)} > N_{SFQ(Trp)}$, the binding position was closer to the Tyr residue, the number of binding sites $n \approx 1$, $\Delta G < 0$, $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$, and the system environment was predominantly hydrophobic; under simulated physiological conditions, the Hill coefficient $n_H \approx 1$, when $4.08 \text{ mg/L} < C_{CRO} < 8.16 \text{ mg/L}$, the drug binding rate $W(Q)$ of Tyr residues in CRO-BSA was 6.5%~12.6%, and that of Trp residues was 6.35%~12.07%, and the drug binding of Tyr and Trp residues was basically unaffected by the drug efficacy of CRO. The protein binding rate of CRO could reach more than 95%.

Keywords

Mechanism of Action, Static Fluorescence Burst, Drug Synergism, Protein Binding Ratio

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

近年来, 药物小分子与生物大分子相互作用机理的研究方法主要有紫外可见[1]、电化学、圆二色谱[2]及荧光光谱法[3]等, 其中以荧光和同步光谱法作为重要的研究手段, 因其具有选择性好, 灵敏度高等特点, 受到研究者的青睐, 同时相关研究结果已持续报道。

头孢曲松钠作为临床常用的第三代头孢菌素, 属于 β -内酰胺类抗生素, 主要用于预防和治疗呼吸道感染、泌尿感染等[4]。近年来, 采用光谱法对头孢曲松钠与生物大分子的相互作用鲜有报道[5], 但是对头孢曲松钠与蛋白结合位置、蛋白中酪氨酸, 色氨酸残基结合情况及药物协同性等方面的研究未见报道, 因此本实验采用荧光和同步荧光光谱, 在不同激发波长下, 基于头孢曲松钠(CRO) - 牛血清白蛋白(BSA)相互作用机制研究体系的药物协同性和 CRO 的蛋白结合率及 BSA 中酪氨酸(Tyr)残基和色氨酸(Trp)残基的药物结合率, 对深入分析药物动力学和为临床用药提供参考具有一定意义和应用价值。

2. 实验部分

2.1. 仪器与试剂

仪器: 荧光分光光度计(Agilent Cary eclipse, Germany), pH 计(PHS-25, 上海)。

试剂: 牛血清白蛋白(BSA, Sigma 公司), 头孢曲松钠(CRO, Sigma 公司, 纯度 $\geq 98\%$), 其余试剂均为分析纯; 实验用水为二次蒸馏水。

2.2. 实验方法

头孢曲松钠储备液的配制: 准确称量 10.2 mg, 定容为 100 mL, 浓度为 0.102 g/L; 牛血清白蛋白储备液的配制: 用 pH = 7.38 的 Tris-HCl 缓冲溶液定容, 使其浓度为 0.682 mg/mL, 置于冰箱冷藏保存。

在 25 mL 比色管中依次加入 2.00 mL BSA、5.00 mL 0.5mol/LNaCl 溶液, 依次加入 0.00、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00、1.20、1.40、1.60、1.80、2.00 mL 的头孢曲松钠溶液, 用 pH = 7.38 的 Tris-HCl 缓冲溶液定容。荧光比色皿为 1 cm, 入射和出射狭缝均为 5 nm, 在 310 K, 298 K, 290 K 下扫描体系的荧光光

谱和同步荧光光谱。

3. 结果与讨论

3.1. CRO-BSA 的荧光猝灭机制

蛋白质呈现出荧光效应是因色氨酸(Trp), 酪氨酸(Tyr)和苯丙氨酸(Phe)残基发色团共同作用[3]。Phe 激发的荧光强度与前两者相比很小, 因此, $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ 时可激发 Trp 和 Tyr 的荧光, $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ 只有 Trp 荧光被激发。

设置 $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ 和 $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ 时, 对 CRO-BSA 体系进行荧光光谱测定, 见图 1。

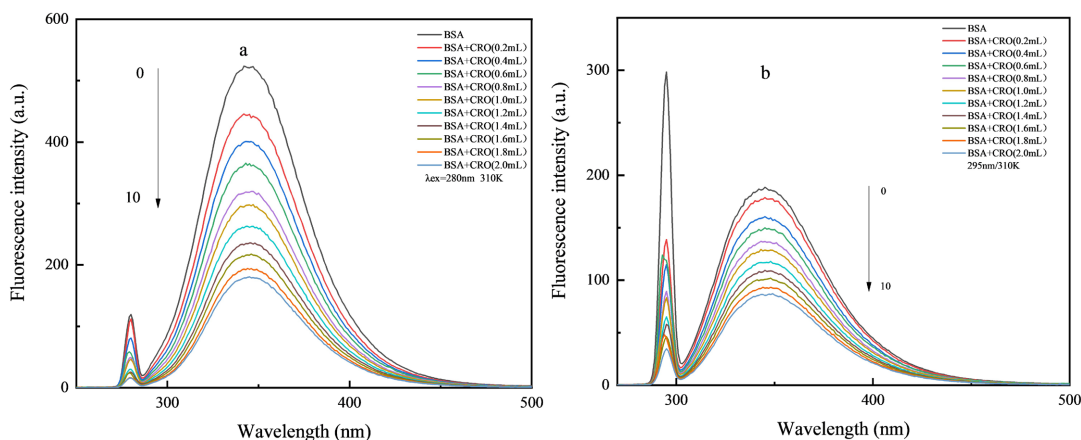


Figure 1. Fluorescence spectra of CRO-BSA ($T = 310 \text{ K}$, a: $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$; b: $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$, $c_{\text{BSA}} = 8.21 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$; 0~10 $c_{\text{CRO}} = (0, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, 1.00, 1.20, 1.40, 1.60, 1.80, 2.00) \times 6.16 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$)

图 1. CRO-BSA 体系的荧光光谱($T = 310 \text{ K}$, a: $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$; b: $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$, $c_{\text{BSA}} = 8.21 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$; 0~10 $c_{\text{CRO}} = (0, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, 1.00, 1.20, 1.40, 1.60, 1.80, 2.00) \times 6.16 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$)

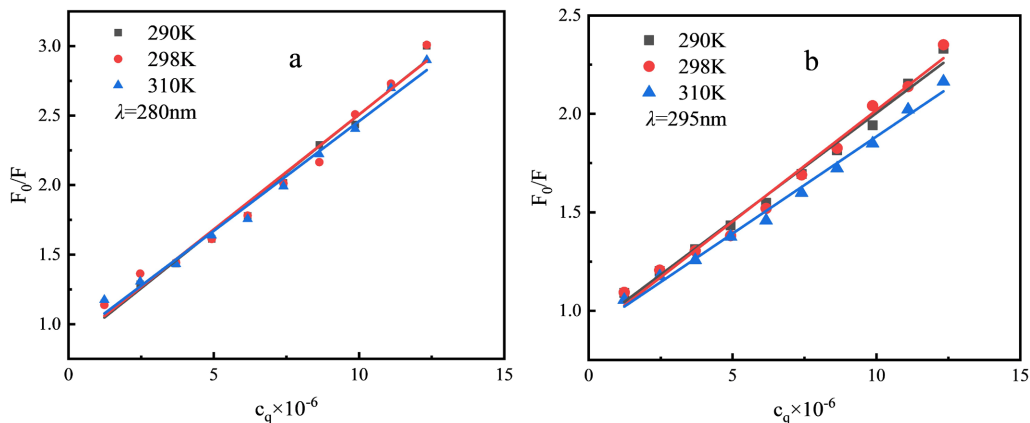


Figure 2. Stern-Volmer plots for the quenching of CRO-BSA at different temperatures (a: $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$; b: $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$)

图 2. 不同温度下 CRO-BSA 体系的 Stern-Volmer 曲线(a: $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$; b: $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$)

从图 1 可以看出, CRO 的浓度从 0~10 浓度逐渐增大, BSA 的荧光强度不断减低, 表明 CRO 的加入, 使 BSA 荧光猝灭, 和 BSA 发生相互作用。

为进一步研究体系的相互作用机制, 根据 Stern-Volmer 方程[6]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}c_q = 1 + K_q\tau c_q \quad (1)$$

式中 F 、 F_0 分别为有、无猝灭剂时的荧光强度； K_{sv} 为动态猝灭常数(即 Stern-Volmer 猝灭常数)； c_q 为猝灭剂的浓度； K_q 为荧光猝灭速率常数，各类猝灭剂对生物大分子 K_q 一般为 $2.0 \times 10^{10} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ； τ_0 ：生物分子荧光平均寿命，一般为 10^{-8} s [7]。

以 F_0/F 对 c_q 作图，得到不同温度下的 K_{sv} 和 K_q ，见图 2。

根据不同温度下 CRO-BSA 体系 Stern-Volmer 方程，得到 $\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$ ， $\lambda_{ex} = 295 \text{ nm}$ 时 K_q 和 K_{sv} ，见表 1。

Table 1. Quenching reactive parameters of CRO-BSA at different temperatures

表 1. CRO-BSA 体系的荧光猝灭反应参数

$\lambda_{ex}(\text{nm})$	$T(\text{K})$	$K_q/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$	$K_{sv}/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$	r_1	$K_a/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$	n	r_2
280	290	1.6650×10^{13}	1.665×10^5	0.9943	7.1499×10^5	1.1380	0.9970
	298	1.6527×10^{13}	1.6527×10^5	0.9910	6.006×10^5	1.1225	0.9945
	310	1.5780×10^{13}	1.578×10^5	0.9942	2.7868×10^5	1.0596	0.9943
295	290	1.1319×10^{13}	1.1319×10^5	0.9952	6.4815×10^5	1.2749	0.9994
	298	1.0943×10^{13}	1.0943×10^5	0.9928	5.7996×10^5	1.1538	0.9967
	310	9.8590×10^{12}	9.859×10^4	0.9959	2.1100×10^5	1.1487	0.9972

n 是 CRO-BSA 的结合位点数； r_1 是方程 $F_0/F \sim c_q$ 的线性相关系数； r_2 是方程 $\log(F_0 - F)/F \sim \lg c_q$ 的线性相关系数。

表 1 数据表明，不同温度下， $\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$ 和 $\lambda_{ex} = 295 \text{ nm}$ 的 $K_q > 2.0 \times 10^{10} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ，表明 CRO 的加入使 BSA 发生了静态猝灭，同时，随着温度升高， K_{sv} 略有减小，不同激发波长下的变化趋势一致，表明 CRO-BSA 形成基态复合物，发生静态猝灭[8]，两者结论一致。

根据 CRO-BSA 的荧光猝灭反应过程为静态猝灭，同时运用下述公式(2)计算求出结合位点数 n 以及结合常数 K_a 。

$$\lg(F_0 - F)/F = \lg K_a + n \lg c_q \quad (2)$$

不同温度下， $\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$ 和 $\lambda_{ex} = 295 \text{ nm}$ 时，以 $\log(F_0 - F)/F \sim \lg c_q$ 作图，得到图 3。

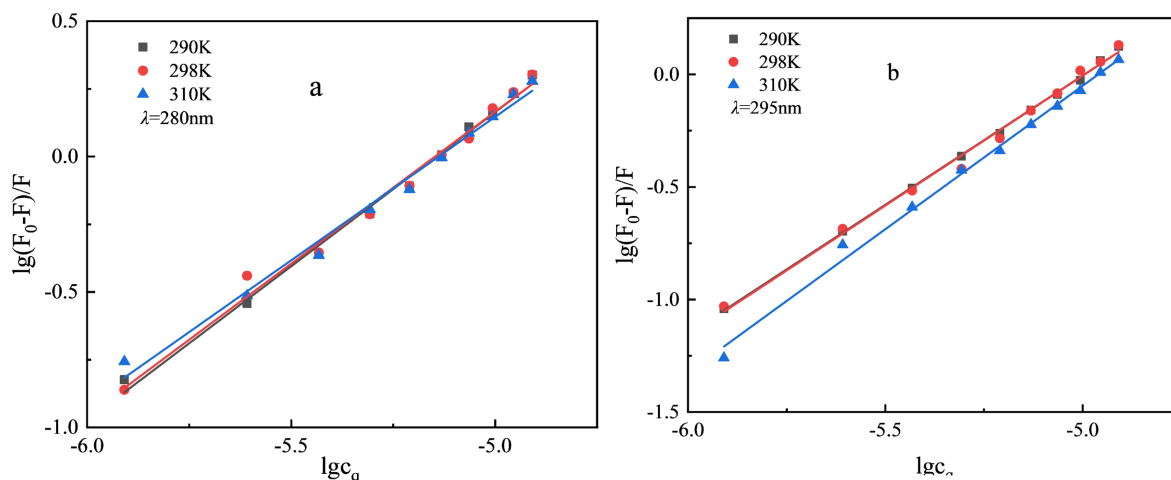


Figure 3. $\log(F_0 - F)/F \sim \lg c_q$ plots for the quenching of CRO-BSA at different temperatures (a: $\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$ b: $\lambda_{ex} = 295 \text{ nm}$)

图 3. 不同温度下 CRO-BSA 体系 $\log(F_0 - F)/F \sim \lg c_q$ 曲线(a: $\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$ b: $\lambda_{ex} = 295 \text{ nm}$)

从图3拟合曲线方程得到结合位点数 $n \approx 1$, 说明 CRO 与 BSA 只有一个结合位点; 表1中的数据表明, 相同温度下 $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ 和 $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ 的 K_a 不同, 且有一定的差异, $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ 的 K_a 大于 $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ 的 K_a , 但是 K_a 随温度的变化趋势一致, 随着温度增加, K_a 略有降低, 表示 CRO-BSA 配合物稳定性略有下降, 同时诠释了体系的荧光猝灭为静态猝灭[9]。

3.2. CRO-BSA 结合位置的确定

图4为不同温度下, $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ 和 $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ 时, 随着 CRO 浓度逐渐增大, BSA 的荧光猝灭曲线。

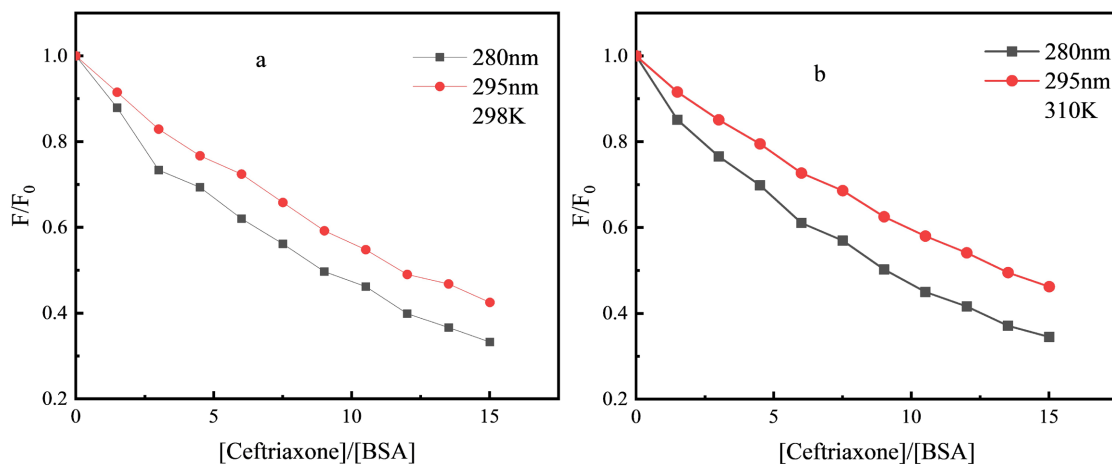


Figure 4. Quenching curves of CRO-BSA system at $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ and 295 nm (a = 298 K; b = 310 K)

图4. λ_{ex} 为 280 nm、295 nm 时 CRO-BSA 体系的荧光猝灭曲线(a = 298 K; b = 310 K)

从图4中可以看出, 在不同温度下, 当 $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ 或 $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ 时, 体系的荧光猝灭曲线并未重合, 说明在 CRO-BSA 的反应中, Tyr 和 Trp 都有参与, 因小分子在 BSA 中主要结合位置是 IIA 和 IIIA 的疏水腔中[10], 对于 CRO-BSA 体系而言, CRO 主要在 BSA 的亚结构 IIA 位置结合。

3.3. CRO-BSA 体系的同步荧光光谱

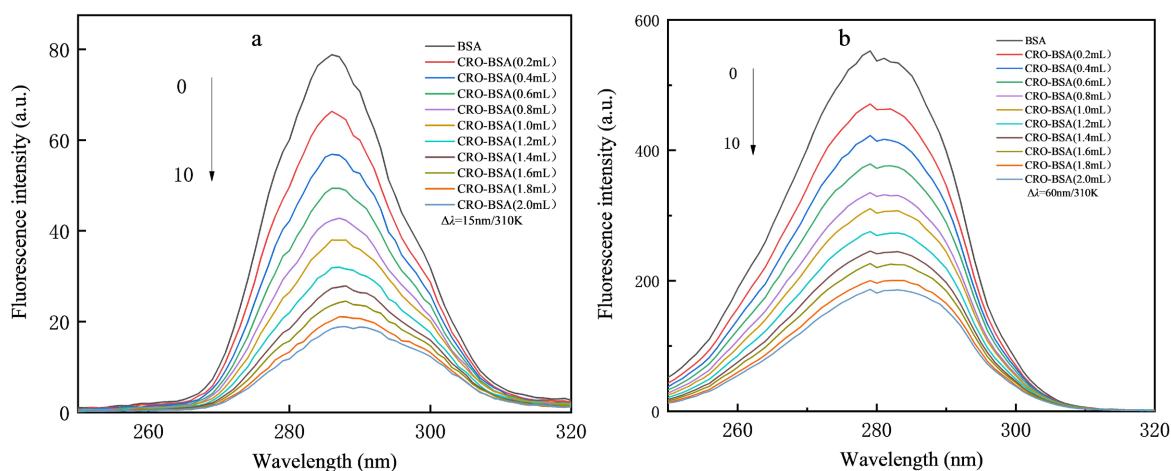


Figure 5. Synchronous fluorescence spectra of CRO-BSA system ($T = 310 \text{ K}$, a: $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$; b: $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$, $C_{\text{BSA}} = 8.21 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$; $0 \sim 10 C_{\text{CRO}} = (0, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, 1.00, 1.20, 1.40, 1.60, 1.80, 2.00) \times 6.16 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$)

图5. CRO-BSA 体系的同步荧光光谱($T = 310 \text{ K}$, a: $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$; b: $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$, $C_{\text{BSA}} = 8.21 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$; $0 \sim 10 C_{\text{CRO}} = (0, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, 1.00, 1.20, 1.40, 1.60, 1.80, 2.00) \times 6.16 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$)

$\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 分别表示 BSA 中 Tyr 残基和 Trp 残基的光谱特征[11], 若同步荧光的 λ_{max} 发生位移, 表明基团分子极性发生变化[12]。图 5 为 310 K 时 $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 时 CRO-BSA 体系的同步荧光光谱。

从图 5 看出, CRO-BSA 体系的同步荧光光谱随着 CRO 浓度逐渐增大, BSA 中的 Tyr 和 Trp 残基均出现明显的同步荧光猝灭, 表明 BSA 中的 Tyr 和 Trp 残基参与了 CRO 与 BSA 的结合作用, 但是最大吸收波长几乎没有发生位移, 说明 Tyr 和 Trp 残基周围的微环境没有发生改变。

根据公式(1)和(2), 计算得到 CRO-BSA 体系的同步荧光猝灭反应参数, 见表 2。

Table 2. Synchronous fluorescence quenching parameters of CRO and BSA at different temperatures
表 2. CRO-BSA 体系的同步荧光猝灭反应参数

$\Delta\lambda(\text{nm})$	$T(\text{K})$	$K_q/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$	$K_{sv}/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$	r_1	$K_a/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$	n	r_2
15	290	2.4908×10^{13}	2.4908×10^5	0.9929	5.4263×10^6	1.2669	0.9965
	298	2.3703×10^{13}	2.3703×10^5	0.9931	5.1428×10^6	1.2687	0.9967
	310	2.2624×10^{13}	2.2624×10^5	0.9923	3.2576×10^6	1.2687	0.9958
60	290	1.7206×10^{13}	1.7206×10^5	0.9939	9.7521×10^5	1.1623	0.9979
	298	1.6748×10^{13}	1.6748×10^5	0.9918	7.5266×10^5	1.1416	0.9956
	310	1.5396×10^{13}	1.5396×10^5	0.9939	1.8005×10^5	1.1011	0.9988

表 2 中数据表明, 不同温度下, $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 的 $K_q > 2.0 \times 10^{10} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, 表明 CRO 与 BSA 相互作用发生了静态猝灭; 同时, 温度升高, K_{sv} 略有减小, 这一结论与 CRO-BSA 体系荧光猝灭反应参数呈现的结论一致, 表明 CRO-BSA 形成基态复合物, 发生静态猝灭, 同时结合位点数 ≈ 1 , 荧光和同步荧光结论一致。

荧光猝灭比率 R_{SFQ} [13] ($R_{\text{SFQ}} = (F_0 - F)/F_0$) 和荧光猝灭比例分数 N_{SFQ} [14] ($N_{\text{SFQ}(\text{Tyr})} = R_{\text{SFQ}(\text{Tyr})}/(R_{\text{SFQ}(\text{Tyr})} + R_{\text{SFQ}(\text{Trp})}, N_{\text{SFQ}(\text{Trp})} = 1 - N_{\text{SFQ}(\text{Tyr})}$) 可进一步表示 BSA 中 Tyr 和 Trp 残基参与体系结合情况。当 $T = 310 \text{ K}$, $C_{\text{BSA}} = 8.21 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$, $C_{\text{CRO}} = (0.20, 0.40, 0.60, 0.80, 1.00, 1.20, 1.40, 1.60, 1.80, 2.00) \times 6.16 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 时, $N_{\text{SFQ}(\text{Tyr})}$ 分别为 61.79%、59.33%、58.17%、55.82%、56.21%、55.61%、55.28%、54.95%、54.11%、54.28%, 平均值为 56.55%; $N_{\text{SFQ}(\text{Trp})}$ 分别为 38.21%、40.67%、41.83%、44.18%、43.79%、44.39%、44.72%、45.05%、45.89%、45.72%, 平均值为 43.45%, 结果表明 BSA 中 Tyr 和 Trp 残基均参与体系结合反应, 与上述 CRO-BSA 结合位置的结论一致, 且 $N_{\text{SFQ}(\text{Tyr})} > N_{\text{SFQ}(\text{Trp})}$, 说明体系结合反应更靠近 Tyr 残基, 与表 2 中结合常数 K_a 数据结论一致。

3.4. CRO-BSA 体系的作用力类型

当 T 变化不大时, 根据 Vant's Hoff 方程(公式 3)和热力学方程(公式 4), 可计算 CRO-BSA 体系的热力学参数, 结果见表 3。

$$R \ln K = \Delta S - \Delta H / T \quad (3)$$

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

温度变化不大时, ΔH 基本不变化, 以 $R \ln K$ 与 $1/T$ 作图, ΔH 即可由不同温度下 CRO-BSA 体系的 Vant's-Hoff 线性关系图得到, 见图 6。从图中可以看出 $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$, $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 及 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 时, $R \ln K$ 与 $1/T$ 呈现良好的线性关系, r 分别为 0.9837, 0.9998, 0.9909 和 0.9994。

Table 3. Thermodynamic parameters of CRO-BSA system at different temperatures
表 3. 不同温度下 CRO-BSA 体系的热力学参数

	$T/(K)$	$K_D \times 10^4/(L \cdot mol^{-1})$	$\Delta H/(KJ \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1})$	$\Delta S/(J \cdot mol^{-1})$	$\Delta G/(KJ \cdot mol^{-1})$
$\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$	290	10.22	12.95	140.56	-27.81
	298	12.28		140.90	-29.03
	310	14.50		140.59	-30.63
$\lambda_{ex} = 295 \text{ nm}$	290	4.00	16.07	143.53	-25.55
	298	4.80		143.57	-26.71
	310	6.14		143.53	-28.42
$\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$	290	10.09	8.21	124.11	-27.78
	298	11.26		124.27	-28.82
	310	12.59		124.13	-30.27
$\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$	290	8.60	10.51	130.70	-27.40
	298	9.72		130.74	-28.45
	310	11.40		130.70	-30.01

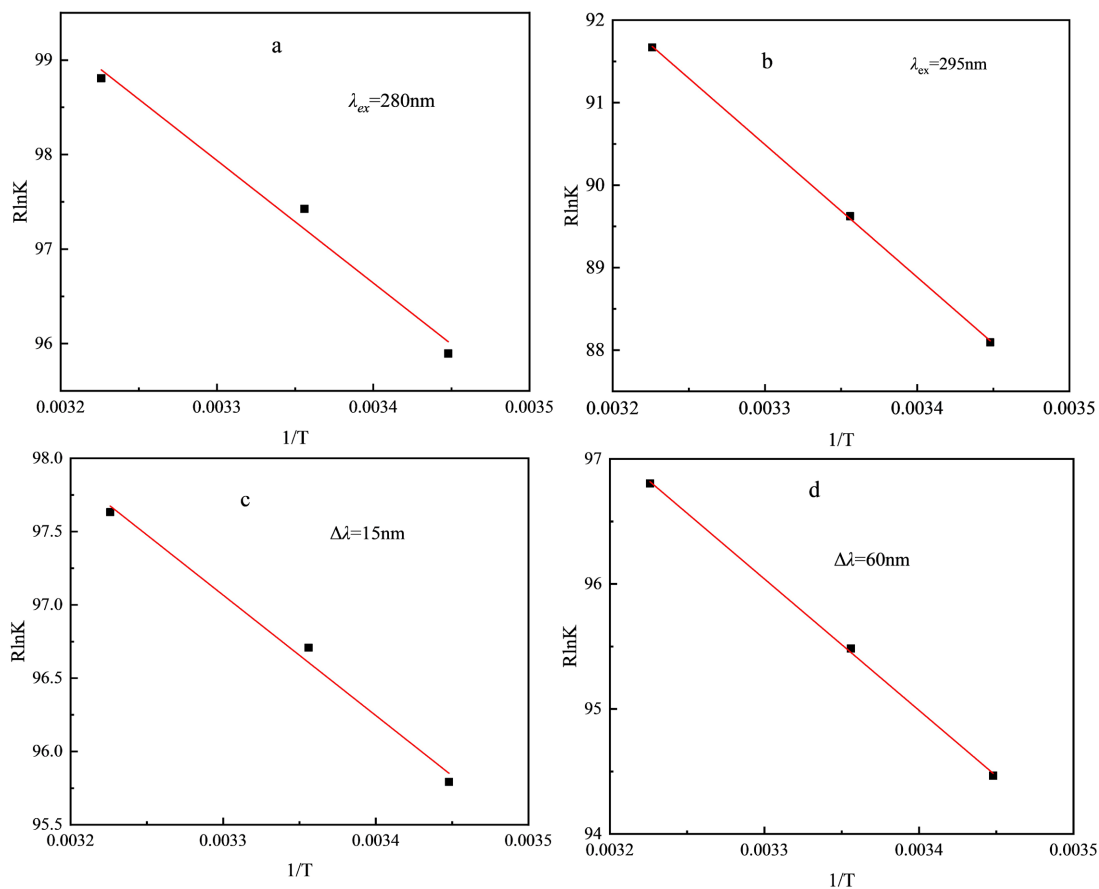


Figure 6. Vant's-Hoff plot for the interaction of BSA and CRO at different temperatures (a: $\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$; b: $\lambda_{ex} = 295 \text{ nm}$; c: $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$; d: $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$)

图 6. 不同温度下 CRO-BSA 体系的 Vant's-Hoff 曲线(a: $\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$; b: $\lambda_{ex} = 295 \text{ nm}$; c: $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$; d: $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$)

从表 3 可以看出, $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$, $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 及 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 时, 计算所得热力学参数略有差异, 相同温度下, $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ 的 ΔG 小于 $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$, $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 的 ΔG 小于 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$, 进一步表明 CRO 与 BSA 中 Tyr 残基结合趋势更强, 且反应自发进行; $\Delta H > 0$ 表明 CRO 与 BSA 结合为吸热过程; $\Delta S > 0$ 表明体系环境中水分子以有序的方式围绕体系, 因 $\Delta G < 0$, $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$, 由此可判断 CRO 与 BSA 结合的作用力是以疏水作用为主, 静电引力为辅[15]。

3.5. 药物协同性及体系的结合率

药物协同性可以用 Hill 方程的系数 n_H 进行定量分析, Hill 方程[16] (5):

$$\lg\left(\frac{Y}{1-Y}\right) = \lg K_a + n_H \lg[L] \quad (5)$$

Y 为结合饱和分数; n_H 为 Hill 系数; 同时根据实验中公式(6), (7)

$$Y/(1-Y) = Q/(Q_m - Q) \quad (6)$$

$$Q = 1 - F/F_0 \quad (7)$$

$1/Q$ 对 $1/[L]$ 作图得到 $1/Q_m$, n_H 由 $\lg[Y/(1-Y)]$ 对 $\lg[L]$ 作图得到, 结果见表 4。

Table 4. Hill coefficient of CRO-BSA at different temperatures

表 4. 不同温度下 CRO-BSA 的 Hill 系数

T/K	$\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$		$\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$		$\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$		$\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$	
	n_H	r_1	n_H	r_2	n_H	r_3	n_H	r_4
290	1.0455	0.9986	0.9676	0.9992	0.9808	0.9951	1.008	0.9996
298	0.9615	0.9954	1.0009	0.9987	0.9822	0.9994	0.9643	0.9965
310	1.1176	0.9924	1.0526	0.9982	1.0173	0.9995	0.9728	0.9990

从表 4 中数据表明, 在不同温度下, $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$, $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 及 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 时的 $n_H \approx 1$, 因 $n_H > 1$ 表现为正协同作用, $n_H < 1$ 为负协同作用, $n_H = 1$ 没有协同作用[17], 所以, 在 CRO 与 BSA 结合过程中没有协同作用, 不影响后继配体与 BSA 的结合。

CRO-BSA 的结合率可以根据同步荧光所得 K_a 值, 结合位数 $n = 1$, 根据公式(8)、(9)分别计算 CRO 与 BSA 中 Tyr 和 Trp 残基的药物结合率和 CRO 蛋白结合率[18]。

$$\text{药物结合率: } W(Q) = \frac{K_a(Q+B)+1 - \sqrt{K_a^2(Q-B)^2 + 2K_a(Q+B)+1}}{2K_aQ} \times 100\% \quad (8)$$

$$\text{蛋白结合率: } W(B) = \frac{K_a(Q+B)+1 - \sqrt{K_a^2(Q-B)^2 + 2K_a(Q+B)+1}}{2K_aB} \times 100\% \quad (9)$$

式中 Q 和 B 分别代表 CRO 和 BSA 的总浓度。

CRO 为常见的临床注射用头孢类抗生素, 本实验以头孢曲松钠注射用无菌粉末为例, 模拟人体体温 310 K 时, 当 $4 \text{ mg/L} < c_{\text{CRO}} < 8 \text{ mg/L}$ 时, 计算得到 CRO-BSA 中 Tyr 残基的药物结合率 $W(Q)$ 为 6.5%~12.6%, 药物游离率为 93.5%~87.4%, Trp 残基的药物结合率 $W(Q)$ 为 6.35%~12.07%, 药物游离率为 93.65%~87.93%, 由此可见, Tyr 和 Trp 残基的药物结合率 $W(Q)$ 与游离的药物浓度变化不大, 说明体系中 Tyr 和 Trp 残基的结合对 CRO 的药效基本没有影响。

随着 CRO 浓度增大, $4.08 \text{ mg/L} < c_{\text{CRO}} < 8.16 \text{ mg/L}$ 时, CRO 在 Tyr 残基的蛋白结合率 $W(B)$ 为 94.6%~97.4%, 蛋白游离率为 5.4%~2.6%, 在 Trp 残基的蛋白结合率 $W(B)$ 为 90.71%~95.41%, 蛋白游离率为 9.29%~4.59%。结果表明: CRO 与 BSA 结合后, 游离的 Tyr 和 Trp 残基蛋白数量明显减少, CRO 蛋白结合率可达 95% 以上, 这与静脉滴注 CRO ($c_{\text{CRO}} < 25 \text{ mg/L}$) 的蛋白结合率 95% [19] 基本一致, 数据表明, 当 CRO 进入人体后, 立即与血液中蛋白结合, 会使血浆蛋白中游离的 Tyr 残基和 Trp 残基数量大大减少, CRO 在血液中可以充分的转运, 能持续释放, 药物浓度较稳定, 因此 CRO 在人体内不会被代谢, 主要以原形自消化系统和泌尿系统排出。

4. 结论

本实验在模拟生物条件下, 采用荧光光谱和同步荧光光谱, $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$, $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 及 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 时, 研究了不同温度下 CRO-BSA 体系相互作用机理, 基于体系的作用机理, 进一步探索了 CRO-BSA 体系的药物协同性和 CRO 的蛋白结合率及 BSA 中 Tyr 和 Trp 残基的药物结合率, 通过蛋白质中游离 Tyr 和 Trp 残基含量的变化, 分析药物分子在人体代谢方式, 本方法对研究药物与蛋白质残基结合的作用机理具有一定的意义, 为进一步研究药物在临床应用提供参考。

基金项目

贵州师范学院大学生科研项目(No: 2023DXS018), 大学生创新训练项目(No: 2023142234029, S2023142234094)。

参考文献

- [1] 李改霞. 光谱法研究头孢西丁钠、盐酸吡格列酮等药物与蛋白质的反应机理[D]: [硕士学位论文]. 保定: 河北大学, 2016.
- [2] 薛春霞. 药物分子与牛血清白蛋白相互作用的研究[D]: [硕士学位论文]. 西安: 西安建筑科技大学, 2006.
- [3] 倪永年, 张方圆, 张秋兰. 光谱法研究刺芒柄花素与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 南昌大学学报(理科版), 2011, 35(2): 146-150.
- [4] 张春桃, 王静康, 王永莉. 头孢曲松钠结晶工艺研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2006, 31(7): 388-392.
- [5] 宋林. 共振光散射技术在蛋白质分析检测中的应用研究[D]: [硕士学位论文]. 青海: 青海师范大学, 2013.
- [6] Braun, A.M. and Maurette, M.T. (1991) Photochem Technology. Oliveros, New York, 41.
- [7] Lakowicz, J.R. and Weber, G. (1973) Quenching of Fluorescence by Oxygen: A Probe for Structural Fluctuations in Macro-Molecules. *Biochemistry*, **12**, 4161-4170. <https://doi.org/10.1021/bi00745a020>
- [8] Markarian, S.A. and Aznauryan, M.G. (2012) Study on the Interaction between Isoniazid and Bovine Serum Albumin by Fluorescence Spectroscopy: The Effect of Dimethylsulfoxide. *Molecular Biology Reports*, **39**, 7559-7567. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1590-3>
- [9] Topark, M. and Arik, M. (2014) The Investigation of the Interaction between Orientin and Bovine Serum Albumin by Spectroscopy Analysis. *Luminescence*, **29**, 805-809.
- [10] Sułkowska, A., Maciążek-Jurczyk, M., Bojko, B., et al. (2008) Competitive Binding of Phenylbutazone and Colchicine to Serum Albumin in Multidrug Therapy: A Spectroscopic Study. *Journal of Molecular Structure*, **881**, 97-106. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2007.09.001>
- [11] Ehteshami, M., Rasoulzadeh, F., Mahboob, S., et al. (2013) Characterization of 6-Mercaptopurine Binding to Bovine Serum Albumin and Its Displacement from the Binding Sites by Quercetin and Rutin. *Journal of Luminescence*, **135**, 164-169. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2012.10.044>
- [12] Bi, S.Y., Yan, L.L., Pang, B., et al. (2012) Investigation of Three Flavonoids Binding to Bovine Serum Albumin Using Molecular Fluorescence Technique. *Journal of Luminescence*, **132**, 132-140. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2011.08.014>
- [13] Makarska-Bialokoz, M. (2018) Interactions of Hemin with Bovine Serum Albumin and Human Hemoglobin: A Fluorescence Quenching Study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **193**, 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.11.063>

-
- [14] Zhang, Y.Q. and Liu, B.S. (2018) The Comparison between Commercial Spectral Method and Synchronous Fluorescencespectrometry on Interaction of Cefoperazone Sodium with Bovine Transferrin. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, **37**, 503-508. (In Chinese)
- [15] Wang, Y.Q., Zhang, H.M., Zhang, G.C., *et al.* (2007) Studies of the Interaction between Paraquat and Bovine Hemoglobin. *International Journal of Biological Macromolecules*, **41**, 243-250.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.02.011>
- [16] Bojko, B., Sułkowska, A., Maciążek-Jurczyk, M., *et al.* (2010) The Influence of Dietary Habits and Pathological Conditions on the Binding of Theophylline to Serum Albumin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **52**, 384-390. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.09.004>
- [17] Liu, B.S., Wang, J., Xue, C.L., *et al.* (2011) Spectroscopic Studies on the Interaction of Synthetic Food Colorants with Bovine Serum Albumin. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, **225**, 455-468.
<https://doi.org/10.1524/zpch.2011.0070>
- [18] Ma, L.H., Liu, B.S., Wang, C.D., *et al.* (2018) The Interaction Mechanism of Nifedipine and Pepsin. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, **149**, 2123-2130.
<https://doi.org/10.1007/s00706-018-2269-9>
- [19] 科普中国·科学百科. 头孢曲松钠-药代动力学[Z]. <http://www.kepuchina.cn/>