

光谱法研究尼美舒利与牛血清白蛋白的相互作用

刘 里, 成飞翔

(曲靖师范学院化学化工学院, 云南 曲靖 655011)

[摘要] 利用荧光、同步荧光和紫外可见光谱来研究牛尼美舒利(Nime)与血清白蛋白(BSA)的相互作用. 结果表明: Nime 能猝灭 BSA 的荧光, 遵循静态猝灭过程. 通过分析同步荧光光谱可知, Nime 改变了 BSA 的二级结构, 使 BSA 腔内疏水环境的极性减弱. BSA 的亚螺旋域 II A 是主要结合位置, 离酪氨酸残基更近, 有微弱的药物负协同作用. BSA 能运输 Nime, 是一个自发过程, 其作用力类型主要为静电作用力. 结合位置实验表明 Nime 与 BSA 的结合主要发生在亚螺旋域 II A. 有微弱的药物负协同作用. 对于 Nime, 有一个结合位点. 焓为负值, 熵为正值, 表明在结合过程中静电作用力起了主要作用. 另外, 它是一个自发放热过程. 我们的研究结果可能对尼美舒利的临床研究和疗效具有参考价值.

[关键词] 尼美舒利, 荧光猝灭, 相互作用

[中图分类号] O657.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2016)02-0050-06

Study on the Interaction Between Nimesulide and Bovine Serum Albumin by Spectrometry

Liu Li, Cheng Feixiang

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

Abstract: The interaction of Nimesulide (Nime) with bovine serum albumin (BSA) has been investigated by fluorescence, synchronous fluorescence, and ultraviolet-visible (UV-vis) spectrometry. The results indicated that (Nime) had a strong ability to quench the intrinsic fluorescence of BSA, while the fluorescence quenching was initiated by static quenching procedure. The analysis of synchronous fluorescence spectra showed the change in secondary structure of BSA upon interaction with Nime, leading to the polarity around BSA weakened. Site competitive experiments indicated that their binding to BSA primarily took place in subdomain IIA. There was some negative cooperative effect. For Nime, there was only one binding site on BSA. The values of negative enthalpy change and positive entropy change indicated that electrostatic interactions play an important role in the binding processes. In addition, the binding processes were spontaneous and carried out by exothermic reactions. Our results may have relevant insight into Nime's clinical application and efficacy.

Key words: Nimesulide, fluorescence quenching, interaction

尼美舒利(Nime)是一种非甾体抗炎药,因抗炎、解热镇痛作用比对乙酰氨基酚和布洛芬起效更快,而且几乎全部通过尿液排泄,即使多次服用也不会出现积累现象^[1],所以被一致认为一个具有良好发展前途的药物^[2]. 目前已在 50 多个国家使用,其市场规模超过 10 亿美元. 但该药对中枢神经和肝脏造成损伤的案例时常出现,因此被禁止用于 12 岁以下儿童. 牛血清白蛋白(简称 BSA)因价格低廉,在分子结构和氨基酸序列上与人血清白蛋白极其相似,被广泛地用于与药物相互作用的研究^[3]. 至今还未见光谱法研究 Nime 与 BSA 的结合特征的报道. 本文优化了体系的实验条件,探讨了 Nime 与 BSA 的相互作用机理,测定了 3 个温度下的结合位点数、热力学常数,分析了 Nime 与 BSA 结合对蛋白质构象的影响、体内常见共存物质的影响、药物的协同作用、作用力类型以及结合位置等. 这些研究为临床上尼美舒利的用药安全提供理论依据.

收稿日期: 2014-11-10.

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金项目(2015C090Y)、国家自然科学基金资助项目(21261019).

通讯联系人: 刘里, 讲师, 研究方向: 药物化学和分子发光学理论与应用研究. E-mail: m18908746298@163.com

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

上海虹益仪器仪表有限公司 pHs-3C 型精密酸度计,上海一恒科技有限公司 HWS12 型超级恒温水浴,日本日立公司 F-4600 型荧光光谱仪,美国瓦里安技术中国有限公司 Cary 50 型紫外-可见光谱仪.牛血清白蛋白(98%,上海楷样生物技术有限公司),尼美舒利(99%,百灵威科技有限公司),其它试剂均为分析纯,实验用水为超纯水.

1.2 试验方法

依次加入 Nime 溶液 ($0, 3.243, 4.865, 6.486, 8.108, 9.729, 11.351, 12.972, 14.594, 16.215, 17.837, 19.458, 21.079$) $\times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (编号依次为 1~13), $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BSA 1.5 mL, $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 溶液 2.0 mL 和 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH=7.4 的缓冲溶液 1.5 mL, 于 10.0 mL 比色管中, 定容摇匀, 分别在 291.6 K、301.6 K、311.6 K 温度下, 孵育 40 min 后扫描荧光光谱和同步荧光光谱. 记录不含 Nime 的空白溶液的荧光强度为 F_0 和含有 Nime 溶液的荧光强度为 F . 按照上述方法扫描 Nime-BSA 体系的吸收光谱.

2 结果与讨论

2.1 反应条件的影响

2.1.1 缓冲溶液

缓冲溶液的选择不同, 对 Nime 与 BSA 相互作用的影响不大(图 1). 其中, Tris-HCl 缓冲溶液效果对其相互作用最佳.

2.1.2 pH 值

在 Tris-HCl 缓冲范围内, 体系的 F_0/F 随溶液 pH 值变化而改变(图 2A). pH=7.4 时, 达到最佳. 由图 2B 可知, Tris-HCl 用量为 1.5 ml 时, ΔF 达到最大值. 最终确定 pH=7.4, $0.015 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 作为 Nime 与 BSA 相互作用的缓冲溶液.

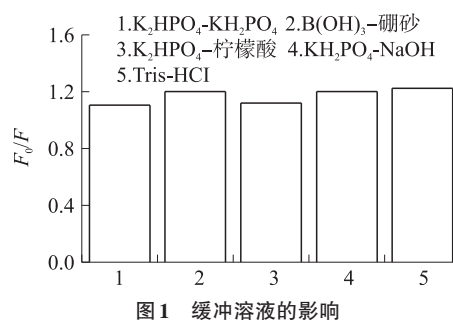


图1 缓冲溶液的影响

Fig.1 Effect of buffer solution ($C_{\text{BSA}}=1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $C_{\text{Nime}}=3.243 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

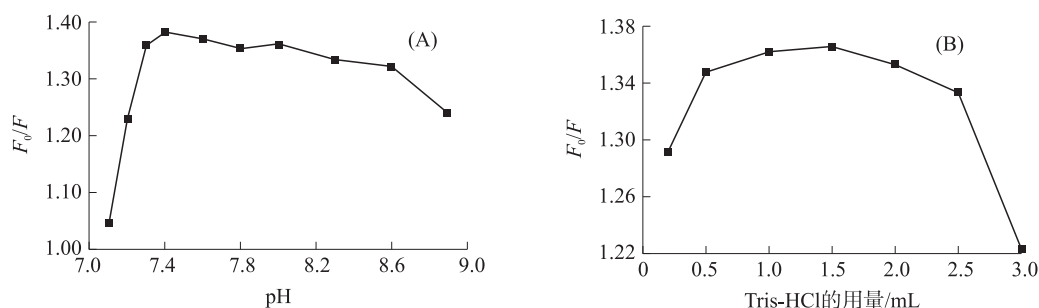


图2 pH及用量的影响

Fig.2 Effects of pH(A) and amount(B) ($C_{\text{BSA}}=1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $C_{\text{Nime}}=3.243 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

2.1.3 BSA 的浓度

固定其它实验条件, 改变 BSA 的浓度, 测定 BSA 溶液分别为: $1.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 至 $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对体系的荧光强度的影响(图 3). $7.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA 作为反应的浓度最佳.

2.1.4 试剂加入顺序

图 4 是不同的加入顺序对 Nime 与 BSA 相互作用的影响. 加入顺序影响 Nime 与 BSA 结合, Nime→BSA→NaCl→Tris-HCl 的加入顺序最佳.

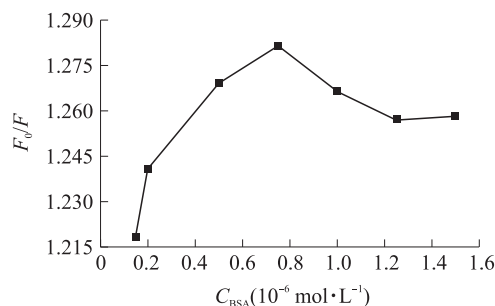


图3 BSA 浓度的影响

Fig.3 Effect of concentrations of BSA ($C_{\text{Nime}}=3.243 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

2.1.5 孵育时间

考察 225 min 内孵育时间对体系的影响(图 5). 实验表明,Nime 与 BSA 的相互作用在 299.6 K 温度下需要 25 min 才能完成并稳定 .

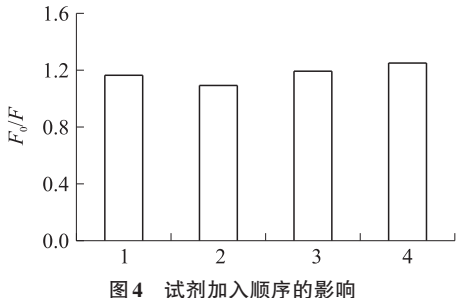


图 4 试剂加入顺序的影响

Fig.4 Effect of Addition sequence of reagents

1.NaCl→Tris-HCl→BSA→Nime; 2.NaCl→Tris-HCl→Nime→BSA ; 3.BSA→Nime→NaCl→Tris-HCl ; 4.Nime→BSA→NaCl→Tris-HCl

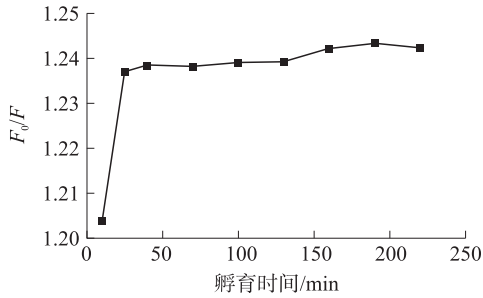


图 5 孵育时间的影响

Fig.5 Effect of incubation time

2.2 荧光光谱

由于 BSA 分子中存在着酪氨酸(Tyr)、色氨酸(Trp)等能够发射荧光的芳香性氨基酸残基,所以它是一种典型的内源荧光物^[3]. 其最大激发和发射波长($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$)位于 280 nm/340 nm 处 . 从图 6 可知,随着 Nime 浓度的增加, λ_{em} (移到 344 nm)处 BSA 的荧光强度逐渐降低,说明 Nime 对 BSA 的荧光有明显的猝灭作用 .

2.3 猝灭机理

荧光猝灭机理通常可分为动态猝灭和静态猝灭^[3-5]. 在静态猝灭中,生成了新物质,起主要作用的是新物质的稳定性,温度越高,稳定性越差, K_{sv} 越小^[3-5]. 在动态猝灭中 K_{sv} 会随着温度的升高而增大,因为分子扩散起主导 . 猝灭过程遵循 Stern-Volmer 方程^[3-5]: $F_0/F=1+K_q\tau_0[Nime]=1+K_{sv}[Nime]$, 式中 $[Nime]$ 为 Nime 浓度, K_q 为速率常数; τ_0 为荧光寿命, 10^{-8} s 数量级左右^[3-5]. 在 291.6 K, 301.6 K, 311.6 K 时作 Stern-Volmer 方程(表 1), 3 个温度下的 K_q 值比最大动态猝灭速率常数 $2.0\times10^{10} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)^[3-5] 大 2 个数量级,与动态猝灭机理相违背 . 由图 7 可知,随着温度的升高,直线斜率即 K_{sv} 降低,与静态猝灭机理吻合 .

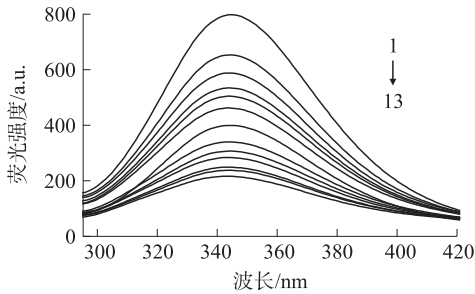


图 6 Nime-BSA 的猝灭光谱

Fig.6 Quenching spectra of Nime-BSA

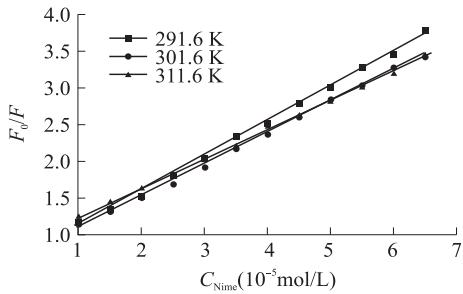


图 7 3 个不同温度下的 Stern-Volmer 图

Fig.7 Stern-Volmer plots at three different temperatures

表 1 回归方程与相关参数

Table 1 Regression equation and correlation coefficient

温度 T/K	Stern-Volmer 方程	$K_{sv}/$ ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$)	$K_q/$ ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	Lineweaver-Burk 方程	$K_{LB}/$ ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$)	双对数 方程	$K_b/$ ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$)	n
291.6	$F_0/F=51\ 895$ [Nime]+0.594 3	51 895	5.189×10^{12}	$(F_0-F)^{-1}=2.492\ 93\times10^{-8}$ [Nime] $^{-1}$ +0.001 0	$3.214\ 2\times10^4$	$\lg[(F_0-F)/F]=1.478$ $\lg[\text{Nime}]+6.700$	5.014×10^6	1.478
301.6	$F_0/F=46\ 520$ [Nime]+0.635	46 520	4.652×10^{12}	$(F_0-F)^{-1}=2.789\ 26\times10^{-8}$ [Nime] $^{-1}$ +0.001 2	$2.823\ 0\times10^4$	$\lg[(F_0-F)/F]=1.485$ $\lg[\text{Nime}]+6.684$	4.829×10^6	1.485
311.6	$F_0/F=42\ 885$ [Nime]+0.823 7	42 885	4.289×10^{12}	$(F_0-F)^{-1}=4.592\ 33\times10^{-8}$ [Nime] $^{-1}$ +0.000 2	$2.783\ 4\times10^4$	$\lg[(F_0-F)/F]=1.209$ $\lg[\text{Nime}]+5.498$	3.149×10^5	1.209

Lineweaver-Burk 双倒数方程^[6-8]: $(F_0-F)^{-1}=F_0^{-1}+(K_{LB}F_0[Nime])^{-1}$, 其中: K_{LB} 常用来分析静态猝灭过程. 用 $(F_0-F)^{-1}$ 对 $[Nime]^{-1}$ 作不同温度下的 L-B 曲线(图 8), 计算 K_{LB} 值列于表 1 中, K_{LB} 值都在 10^4 数量级以上, 表明 Nime 与 BSA 形成的复合物稳定性较好. 随着温度的升高, K_{LB} 略有下降, 这与因静态猝灭方式而形成的复合物随温度升高而越不稳定的作用机理正好相符合.

另一种推断猝灭机理的重要方法是紫外吸收光谱法^[4-6], 由图 9 的紫外吸收光谱可知, Nime-BSA 体系的吸收峰从 280 nm 蓝移到 265 nm, 吸收峰的强度也增加了, 表明推断 Nime 与 BSA 静态猝灭机理是合理的.

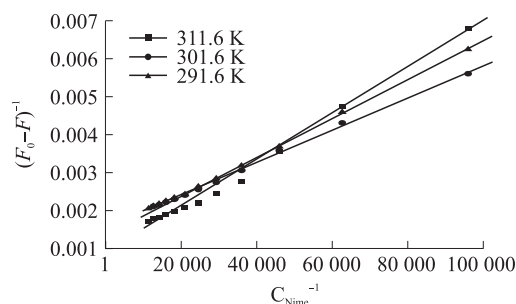


图8 Lineweaver-Burk 曲线

Fig.8 Lineweaver-Burk plots

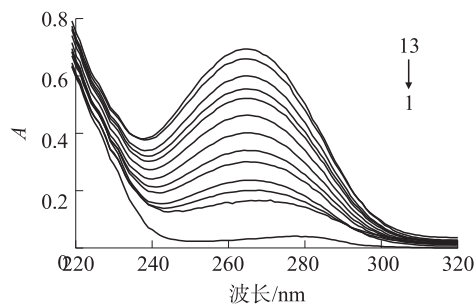


图9 Nime-BSA的紫外-吸收光谱

Fig.9 UV Absorption spectra of Nime-BSA

2.4 结合常数 K_b 和结合位点数 n

尼美舒利与 BSA 的结合常数 K_b 以及结合位点数 n 双对数方程^[6-8] $\lg[(F_0-F)/F]=\lg K_b+n\lg[Nime]$. 由 $\lg[(F_0-F)/F]$ 对 $\lg[Nime]$ 作图, 由直线截距可得结合常数 K_b , 斜率可求 n (表 1). n 值接近于 1, 表明尼美舒利与 BSA 可形成 1 个结合位点. K_b 为 10^6 数量级, 表明 Nime 与 BSA 之间有很强的结合作用. 当温度由 291.6 K 到 301.6 K 时, K_b 变化不大; 但当温度升高到 311.6 K 时, K_b 值减少 1 个数量级, 表明尼美舒利与 BSA 的相互作用对温度变化比较敏感, 高温不利于血清白蛋白在体内运转、贮存和分配尼美舒利.

2.5 作用力类型

根据热力学公式 $\Delta G=\Delta H-T\Delta S=-RT\ln K$ 和 $\ln(K_2/K_1)=(1/T_1-1/T_2)\Delta H/R$ ^[8-10] 计算 291.6 K, 301.6 K, 311.6 K 温度下 Nime 与 BSA 结合反应的吉布斯自由能变 ΔG , 焓变 ΔH 及熵变 ΔS (表 2). 由表 2 可得, $\Delta G<0$, $\Delta H<0$ 且 $\Delta S>0$, 表明 BSA 与 Nime 的结合是自发进行的放热反应, 主要作用力为静电作用力.

表2 热力学参数和 n_H 值Table 2 Thermodynamic parameters and the value of n_H

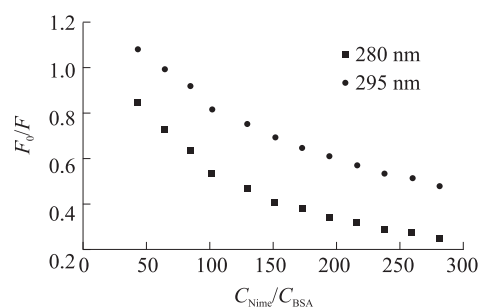
T/K	$\Delta S/(J\cdot K^{-1})$	$\Delta H/(J\cdot mol^{-1})$	$\Delta G/(J\cdot mol^{-1})$	n_H	r
291.6	117.68	-3 097.86	-37 414.20	0.966 6	0.994 1
301.6	117.68	-3 097.86	-39 590.50	0.969 1	0.997 0
311.6	95.31	-3 097.86	-32 797.00	0.967 2	0.996 4
平均值	110.22	-3 097.86	-36 600.57	0.967 6	0.995 8

2.6 结合位置的确定

亚螺旋域 IIA (含有酪氨酸和色氨酸) 或 IIIA (含有酪氨酸) 是大多数药物在 BSA 上结合位置^[11-13]. 比较激发波长为 280 nm、295 nm 时 Nime-BSA 体系荧光程度的变化便可知道. 由图 10 可知, $\lambda_{ex}=280$ nm, 295 nm 的 Nime-BSA 光谱曲线平行, 表明色氨酸和酪氨酸残基都参与其中; $\lambda_{ex}=280$ nm 激发曲线比 $\lambda_{ex}=295$ nm 的降低程度更大, 表明亚螺旋域 II A 是主要结合位置^[8-10].

2.7 药物协同作用

药物的协同作用常用 Hill 方程^[11-13] 进行分析: $E=(F_0-F)/F_0$, $1/E$ 对 $1/[Nime]$ 作图, 截距为 $1/E_m$, $\lg E(E_m-E)=\lg K+n_H\lg[Nime]$, 式中, n_H 为 Hill 系数, K 为结合常数, E 为饱和分数. 由表 2 可知, 各温度下的 n_H 值略小于 1, 表明 Nime 与 BSA 结合时有微弱

图10 λ_{ex} 为 280 nm 和 295 nm 时, Nime-BSA 的荧光猝灭曲线Fig.10 Fluorescence quenching curves of Nime-BSA at $\lambda_{ex}=280$ nm and 295 nm

的药物负协同作用,即 Nime 分子结合到 BSA 位点上后,对后继药物分子与蛋白质的结合有微弱的阻碍作用.这种负协同作用可能是由于药物分子结构决定的,Nime 浓度的加大,导致后续 Nime 对 BSA 的亲水性减弱.随着温度的升高, n_H 值变化很小,表明 Nime 的药物协同作用对温度的改变不敏感.

2.8 Nime 对 BSA 构象的影响

同步荧光光谱法是分析药物小分子对影响蛋白质的构象的常用方法,在 $\Delta\lambda=15\text{ nm}$ (显示酪氨酸特征)和 $\Delta\lambda=60\text{ nm}$ (显示色氨酸特征)^[6-8] 条件下绘制 Nime-BSA 体系的同步荧光光谱(图 11).由图可知,随 Nime 浓度的增大, λ_{em} 发生红移,酪氨酸和色氨酸的荧光强度逐渐降低,表明 BSA 腔内疏水环境的极性增强,疏水性减弱.酪氨酸残基的猝灭程度大于色氨酸残基,表明 Nime 与 BSA 相结合的位点偏向于酪氨酸.

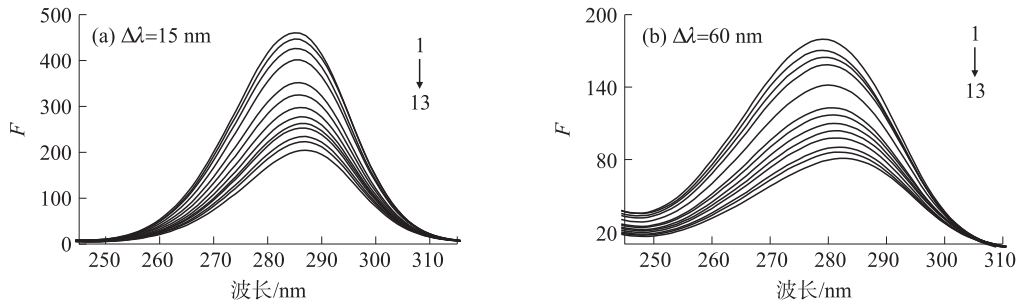


图 11 Nime 猝灭 BSA 的同步荧光光谱
Fig.11 Synchronous fluorescence spectrometry of BSA-Nime

2.9 共存物的影响

实验中对常见金属离子、有机物和糖类等共存物质对 Nime 与 BSA 相互作用的影响,结果列于 3 中.从表 3 中可以看出,当相对误差 $\leq\pm 5.0\%$,Nime 浓度为 $3.243\times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, K^+ 、 NH_4^+ 、 Na^+ 、 Zn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 NO_3^- 、 Cl^- 、 SO_4^{2-} 、糖类和有机物等几乎不影响 Nime 对 BSA 的作用强度,但是 Fe^{3+} 和 Cu^{2+} 等对体系的干扰较大,可通过加入 EDTA 和硫脲将其掩蔽.因此,BSA 可作为荧光探针对 Nime 的含量进行测定,这一方法具有良好的选择性.

表 3 共存物质的影响

Table 3 Effects of coexisting substances

共存物质	倍数	相对标准偏差/%	共存物质	倍数	相对标准偏差/%
$\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$	162	-3.59	葡萄糖	130	1.46
CuSO_4	8	-1.57	丙酮	230	0.61
CrCl_3	190	-2.95	NH_4Cl	138	4.17
甲醇	81	1.95	淀粉(30)	170	2.78
$\text{Al}(\text{NO}_3)_3$	43	1.22	淀粉(25)	116	3.92
KCl	1 459	4.98	ZnSO_4	82	4.28
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	654	0.65	FeCl_3	11	-1.12
$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$	264	3.34	BaCl_2	56	4.74
MnCl_2	46	0.53	乙醇	49	4.08
NaNO_3	53	4.72	KH_2PO_4	2 780	0.59

3 结论

应用紫外和荧光光谱法研究推断出尼美舒利与 BSA 的相互作用是静态猝灭过程,两者通过静电作用力相互作用,因有 1 个结合位点,药物能被蛋白质转运和储存;有微弱的药物负协同作用,结合位置在 BSA 的亚螺旋域 II A 中,靠近酪氨酸残基,Nime 与 BSA 相互作用对 BSA 构象产生影响.探究了常见金属离子、有机物和糖类等共存物质对 Nime 与 BSA 相互作用的影响,其中 Fe^{3+} 和 Cu^{2+} 对其相互作用影响较大.BSA 可作为荧光探针对 Nime 进行含量测定.这些重要信息对尼美舒利的临床研究具有参考价值,并为后续非甾体抗炎药的研发提供了理论依据.

[参考文献]

- [1] 岑彦艳,覃容欣,李小丽,等. 尼美舒利解热镇痛抗炎作用比较研究[J]. 中国现代应用药学,2014,31(8):933-934.
- [2] 陈沫,卢永翎,杭太俊,等. 尼美舒利分散片在健康人体内的药代动力学及生物等效性的 LC-MS/MS 研究尼美舒利分散片制备的处方工艺优选[J]. 药物分析杂志,2013,33(1):30-32.
- [3] BOGDAM S. Fluorescence study of sinapic acid interaction with bovine serum albumin and egg albumin[J]. J fluorescence, 2003,13(4):349-356.
- [4] LAKOWICZ J R. Principles of fluorescence spectroscopy[M]. 3rd ed. New York:Springer Press,2006:285-292.
- [5] 许金钩,王尊本. 荧光分析法[M]. 3 版. 北京:科学出版社,2006:23-49.
- [6] 刘里,成飞翔. 光谱法研究头孢替唑钠与牛血清白蛋白相互作用[J]. 江西师范大学学报(自然科学版),2014,38(6):639-644.
- [7] 刘里,成飞翔. 光谱法研究洛索洛芬钠与牛血清白蛋白的相互作用及共存金属离子的影响[J]. 中国生化药物杂志,2014,35(1):21-24.
- [8] 刘保生,杨超,王晶. 硫酸头孢匹罗与牛血清白蛋白结合反应的发光机理[J]. 发光学报,2011,32(3):293-299.
- [9] CYRIL L,EARL J K,SPERRY W M. Biochemists handbook[M]. London:Epon Led Press,1961:84-96.
- [10] ROSS D P,SUBRAMANTAN S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability[J]. Biochemistry,1981,20(11):3 096-3 102.
- [11] SULKOWSKA A,MACIAZEK-JURCZYK M,BOJKO B,et al. Competitive binding of phenylbutazone and colchicine to serum albumin in multidrug therapy: a spectroscopic study[J]. Journal of molecular structure,2008,881(1):97-106.
- [12] MACIAZEK-JURCZYK M, SULKOWSKA A, BOJKO B, et al. Fluorescence analysis of competition of phenylbutazone and methotrexate in binding to serum albumin in combination treatment in rheumatology[J]. Journal of molecular structure,2009,919(1):334-338.
- [13] XU H,GAO S L,LÜ J B,et al. Spectroscopic investigations on the mechanism of interaction of crystal violet with bovine serum albumin[J]. Journal of molecular structure,2009,919(1):334-338.

[责任编辑:顾晓天]