

## 光谱法研究头孢米诺钠与牛血清白蛋白的相互作用

刘 里<sup>\*</sup>, 李爱丽<sup>1</sup>, 成飞翔<sup>2</sup>

<sup>1</sup>曲靖师范学院化学与环境科学学院, <sup>2</sup>云贵高原化学功能材料与污染治理研究中心, 云南 曲靖 655011

**[摘要]** **目的:**研究在实验选定的最佳条件下头孢米诺钠(cefminox sodium, CMNS)与牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)之间的相互作用。**方法:**用荧光光谱法联合紫外光谱法研究CMNS与BSA的相互作用机制。**结果:**通过Stern-Volmer方程分析荧光猝灭数据,表明静态猝灭机制存在。热力学参数表明静电相互作用力是稳定CMNS-BSA复合物的主要分子间作用力。计算结合位点的数目( $n$ )和有效结合常数( $K_b$ )。CMNS与BSA的结合是自发过程,有1个结合位点。BSA的亚螺旋域II A是主要结合位置,离酪氨酸残基更近。CMNS对BSA构象产生影响,使BSA腔内疏水环境的极性增强。**结论:**CMNS与BSA有药物协同作用,该研究结果为CMNS的临床研究提供一定的参考依据。

**[关键词]** 头孢米诺钠;荧光猝灭;相互作用

**[中图分类号]** R969.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2018)09-1215-05

**doi:**10.7655/NYDXBNS20180909

## Study on the interaction between cefminox sodium and bovine serum albumin by spectrometry

Liu Li<sup>\*</sup>, Li Aili<sup>1</sup>, Cheng Feixiang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>College of Chemistry and Environmental Science, <sup>2</sup>Yunan Guizhou Plateau Chemical Functional Materials and Pollution Governance Research Center, Qujing Normal University, Qujing 655011, China

**[Abstract]** **Objective:** This study was designed to examine the interaction of cefminox sodium (CMNS) with bovine serum albumin (BSA) under the optimum conditions. **Methods:** The mechanism of the interaction between CMNS and BSA was studied by spectroscopic techniques combination with absorption spectroscopy. **Results:** Stern-Volmer analysis of fluorescence quenching data showed the presence of the static quenching mechanism. The thermodynamic parameters indicated that the electrostatic interactions were the predominant intermolecular forces stabilizing the complex. The number of binding sites ( $n$ ) and binding constant ( $K_b$ ) was calculated. The binding process was spontaneous. The obtained data for binding sites of  $n$  approximately equal to 1 indicated that there was a single class of binding site for the BSA with CMNS. The primary binding site for CMNS was located at sub-domain II A of BSA and nearby tyrosine residue. The conjugation reaction would affect the conformation of BSA, leading to the polarity around BSA strengthened. **Conclusion:** There was almost some negative cooperative effect between CMNS and BSA. The obtained results provided references for its clinical application.

**[Key words]** cefminox sodium; fluorescence quenching; interaction

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(09): 1215-1219]

头孢菌素类药物对细菌的选择性好,具有抗菌作用强、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>。虽然头孢菌素类药物有诸多优点,但有一些不良反应,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反应等<sup>[1]</sup>。由于头孢菌素类药物对人体的不良反应,所以对头孢菌素类药物与循环系统中含量非常丰富的血清蛋白的相互作用研究就显得尤其重要。头孢米诺钠(cefminox sodium, CMNS)是一种新型广谱抗生素,用于治疗敏感细菌引起的呼吸系统、泌尿系统、腹腔和盆腔感染<sup>[2]</sup>。但至今还未见光谱法研究CMNS与牛血清白蛋白(bovine serum

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

<sup>\*</sup>通信作者(Corresponding author), E-mail: m18908746298@163.com

albumin, BSA)相互作用的报道。BSA是动物血浆中最主要的高分子物质,占总蛋白质60%以上,浓度可达42 g/mL<sup>[3]</sup>。因为BSA在医学上的重要性,含量丰富,成本低,易于纯化,极好的配体结合性能和稳定性<sup>[4]</sup>,且与人血清白蛋白属同源蛋白质<sup>[5]</sup>,因此BSA常被选作蛋白质模型。由于荧光和紫外可见吸收光谱的灵敏度、重现性和便利性等特点,它们是研究小分子与蛋白质相互作用的有效技术。这些方法可以揭示药物小分子与蛋白的亲和力,有助于理解它们的猝灭机制。本研究使用几种光谱方法来获得CMNS与BSA的猝灭机制、热力学参数、特异结合位点和对BSA二级结构的影响,从而揭示药物与血清白蛋白内部之间结构-活性关系的重要信息。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

pHS-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(日立公司,日本),Cary 50型紫外-可见光谱仪(瓦里安技术中国有限公司,美国)。牛血清白蛋白(98%,上海生工生物工程股份有限公司),CMNS(97%,北京百灵威科技有限公司),其他试剂均为分析纯,实验用水为超纯水。

### 1.2 方法

在10 mL比色管中依次加入BSA(终浓度为 $7.5 \times 10^{-7}$  mol/L),不同体积 $1 \times 10^{-4}$  mol/L的CMNS溶液,NaCl溶液(终浓度为0.1 mol/L),Tris-HCl缓冲溶液(终浓度为0.02 mol/L),定容后分别在291.6 K、301.6 K、311.6 K温度下反应40 min后扫描荧光光谱,记录不含CMNS的空白溶液的荧光强度( $F_0$ )和含有CMNS溶液的荧光强度( $F$ ), $\Delta F = F_0 - F$ 。按照上述方法配制溶液后扫描CMNS-BSA体系的吸收光谱。

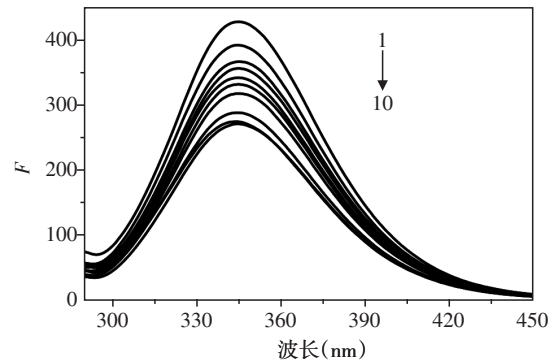
## 2 结果

### 2.1 荧光猝灭光谱

BSA的最大激发波长( $\lambda_{ex}$ )和最大发射波长( $\lambda_{em}$ )位于280 nm/345 nm处,随着CMNS浓度的增大,荧光强度逐渐减小, $\lambda_{em}$ 未见明显位移(图1),表明在实验条件下CMNS对BSA的荧光有猝灭,CMNS与BSA发生了相互作用。

### 2.2 反应条件的优化

CMNS与BSA相互作用的最佳条件如图2所示,缓冲溶液为pH7.4,0.02 mol/L Tris-HCl,BSA的最佳浓度为 $7.5 \times 10^{-7}$  mol/L,反应时间为40 min,最佳



1~10: BSA  $7.5 \times 10^{-6}$  mol/L, CMNS 0、 $1.0 \times 10^{-6}$ 、 $1.5 \times 10^{-6}$ 、 $2.0 \times 10^{-6}$ 、 $2.5 \times 10^{-6}$ 、 $3.0 \times 10^{-6}$ 、 $3.5 \times 10^{-6}$ 、 $4.0 \times 10^{-6}$ 、 $4.5 \times 10^{-6}$ 、 $5.0 \times 10^{-6}$  mol/L。

图1 CMNS对BSA的猝灭光谱

Figure 1 Quenching spectra of BSA by CMNS

加入顺序为BSA→CMNS→Tris-HCl→NaCl。

### 2.3 猝灭类型的判断

CMNS与BSA的猝灭过程用Stern-Volmer方程<sup>[6]</sup>进行分析。 $F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [CMNS] = 1 + K_s [CMNS]$ ,式中 $[CMNS]$ 为CMNS浓度, $K_q$ 为生物分子猝灭速率常数,动态猝灭时,最大值为 $2.0 \times 10^{10}$  L/(mol·s); $\tau_0$ 为BSA平均寿命, $10^{-8}$  s数量级<sup>[7-8]</sup>, $K_s (=K_q \tau_0)$ 为Stern-Volmer猝灭常数。由Stern-Volmer方程计算各类常数于表1中。

Lineweaver-Burk方程<sup>[8-10]</sup>: $(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + (K_{LB} F_0 [CMNS])^{-1}$ ,式中 $K_{LB}$ 为静态猝灭结合常数,常用来表征静态猝灭过程。用 $(F_0 - F)^{-1}$ 和 $[CMNS]^{-1}$ 作不同温度下的Lineweaver-Burk曲线,计算 $K_{LB}$ 值列于表2中。

紫外吸收光谱法是推断猝灭机制的另一种重要方法<sup>[10]</sup>,在不同浓度CMNS存在下,记录BSA的紫外吸收光谱,如图3所示。

### 2.4 结合常数和结合位点数

对于静态猝灭,荧光猝灭强度与猝灭剂的浓度之间遵循双对数方程<sup>[9]</sup>: $\lg[(F_0 - F)/F] = \lg K_b + n \lg [CMNS]$ 。式中, $K_b$ 为结合常数, $n$ 为药物分子与每个BSA分子结合位点的数量。 $\lg[(F_0 - F)/F]$ 对 $\lg [CMNS]$ 作图, $n$ 和 $K_b$ 值,通过由直线的截距和斜率求出(表3)。

### 2.5 热力学分析

CMNS-BSA体系的吉布斯自由能变 $\Delta G$ ,焓变 $\Delta H$ 及熵变 $\Delta S$ 可通过van't Hoff方程: $\ln(K_b/K_{b1}) = (1/T_1 - 1/T_2) \Delta H/R$ 和Gibbs-Helmholtz公式: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K_b$ <sup>[9-12]</sup>来计算求得,结果列于表4。

### 2.6 药物协同性

Hill方程: $\lg Y/(Y_m - Y) = \lg K + n_{H1} \lg [CMNS]$ <sup>[10-12]</sup>是

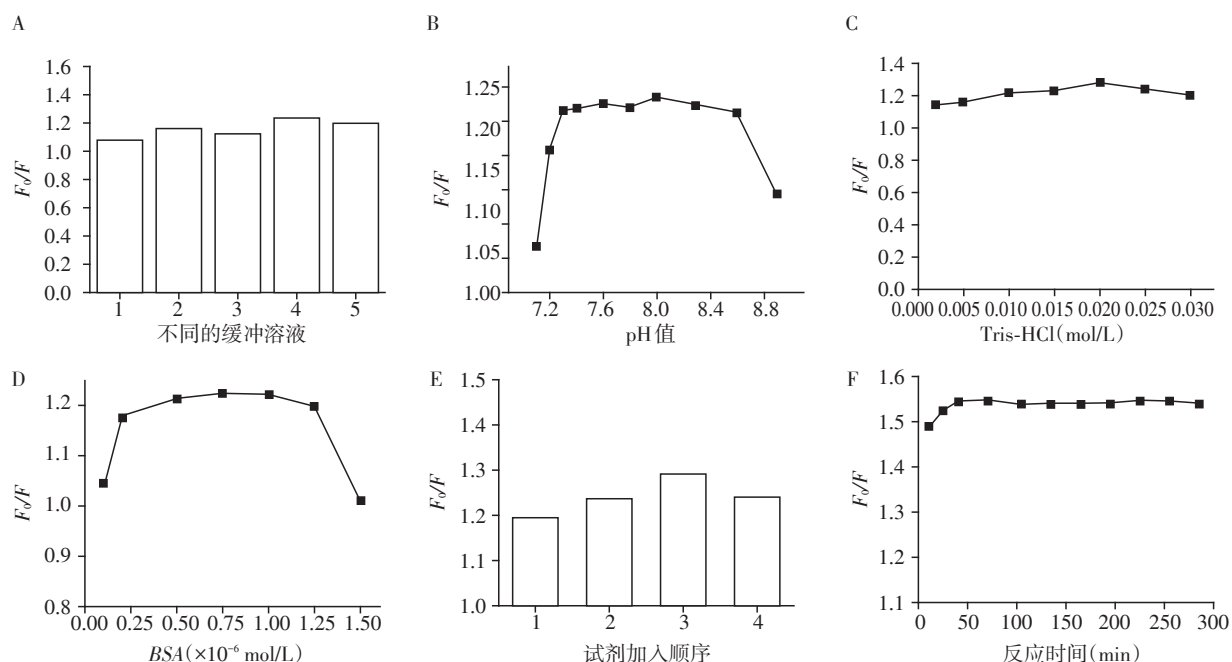


图2 反应条件的优化  
A:缓冲溶液的优化,1:K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;2:B(OH)<sub>3</sub>-Borax;3:K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Citric acid;4:Tris-HCl;5:NaAc-HAc。B:pH值的优化。C:缓冲溶液用量的优化。D:BSA浓度的优化。E:试剂加入顺序的优化,1:Tris-HCl→NaCl→BSA→CMNS;2:Tris-HCl→NaCl→CMNS→BSA;3:BSA→CMNS→Tris-HCl→NaCl;4:CMNS→BSA→Tris-HCl→NaCl。F:反应时间的优化。

图2 反应条件的优化

Figure 2 Optimization of reaction conditions

表1 Stern-Volmer方程与相关参数

Table 1 Stern-Volmer equation and correlation coefficient

温度(K)	Stern-Volmer方程	$K_{sv}$ (L/mol)	$K_q$ [L/(mol·s)]	r值
291.6	$F_0/F=14\ 834[CMNS]+0.899$	14 834	$1.48\times 10^{12}$	0.995 9
301.6	$F_0/F=14\ 290[CMNS]+0.932$	14 290	$1.42\times 10^{12}$	0.990 9
311.6	$F_0/F=13\ 886[CMNS]+0.944$	13 886	$1.39\times 10^{12}$	0.995 9

表2 Lineweaver-Burk方程与相关参数

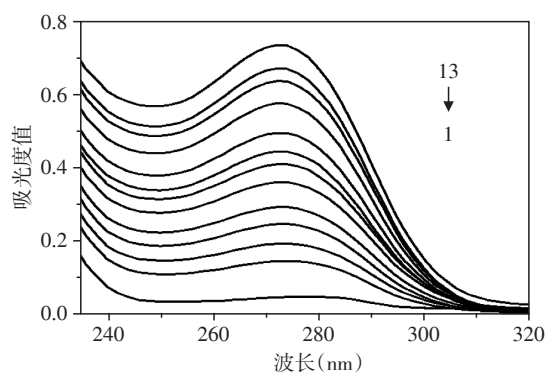
Table 2 Lineweaver-Burk equation and correlation coefficient

温度(K)	Lineweaver-Burk方程	$K_{LB}$ (L/mol)	r值
291.6	$(F_0-F)^{-1}=1\times 10^{-7}[CMNS]^{-1}+0.001$	$2.658\ 1\times 10^4$	0.994 8
301.6	$(F_0-F)^{-1}=2\times 10^{-7}[CMNS]^{-1}+0.001$	$1.604\ 3\times 10^4$	0.994 9
311.6	$(F_0-F)^{-1}=3\times 10^{-7}[CMNS]^{-1}+0.002$	$1.449\ 2\times 10^4$	0.994 9

分析配体协同作用的常用公式,以  $\lg Y(Y_m-Y)$  对  $\lg[CMNS]$  作图,斜率为  $n_H$ (Hill系数); $K$ 为结合常数; $Y$ 为饱和分数, $Y=(F_0-F)/F_0$ ;以  $1/Y$ 对  $1/[CMNS]$  作图,截距为  $1/Y_m$ 。 $n_H$ 值列于表4中。

### 2.7 结合位置的确定

BSA由582个氨基酸残基组成1个单链,其中包括3个相似的结构域I、II和III。每个结构域又含两个亚螺旋域A和B<sup>[8-10]</sup>。药物小分子与BSA的结



1~13:BSA  $7.5\times 10^{-7}$  mol/L, CMNS  $0, 0.5\times 10^{-6}, 1.0\times 10^{-6}, 1.5\times 10^{-6}, 2.0\times 10^{-6}, 2.5\times 10^{-6}, 3.0\times 10^{-6}, 3.5\times 10^{-6}, 4.0\times 10^{-6}, 4.5\times 10^{-6}, 5.0\times 10^{-6}, 5.5\times 10^{-6}, 6.0\times 10^{-6}$  mol/L。

图3 CMNS-BSA的紫外-吸收光谱

Figure 3 UV absorption spectra of CMNS-BSA

合位点主要在亚螺旋域II A和III A<sup>[8-10]</sup>。遵循Sulkowska等<sup>[13-15]</sup>的研究方法,绘制图4。

表3 双对数方程

Table 3 Double logarithm equations

温度(K)	双对数方程	$K_b$ (L/mol)	$n$	$r$ 值
291.6	$\lg[(F_0-F)/F]=1.292[CMNS]+5.359$	$2.290\ 3\times 10^5$	1.292	0.998 4
301.6	$\lg[(F_0-F)/F]=1.244[CMNS]+5.164$	$1.459\ 5\times 10^5$	1.244	0.994 9
311.6	$\lg[(F_0-F)/F]=0.939[CMNS]+3.621$	$4.187\ 0\times 10^3$	0.939	0.994 9

表4 热力学参数和 $n_H$ 值

Table 4 Thermodynamic parameters and the value of  $n_H$

温度(K)	自由能 $\Delta G$ (J/mol)	焓 $\Delta H$ (J/mol)	熵 $\Delta S$ [J/(mol·K)]	$n_H$	$r$ 值
291.6	-29 921.0	-2 494.50	94.05	0.979	0.995 9
301.6	-29 817.0	-2 494.50	90.59	0.974	0.990 5
311.6	-21 605.3	-2 494.50	62.82	0.965	0.996 9

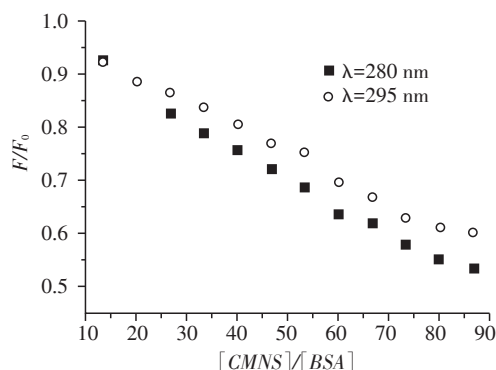


图4  $\lambda_{ex}=280\text{ nm}/295\text{ nm}$  时 CMNS-BSA 的荧光光谱

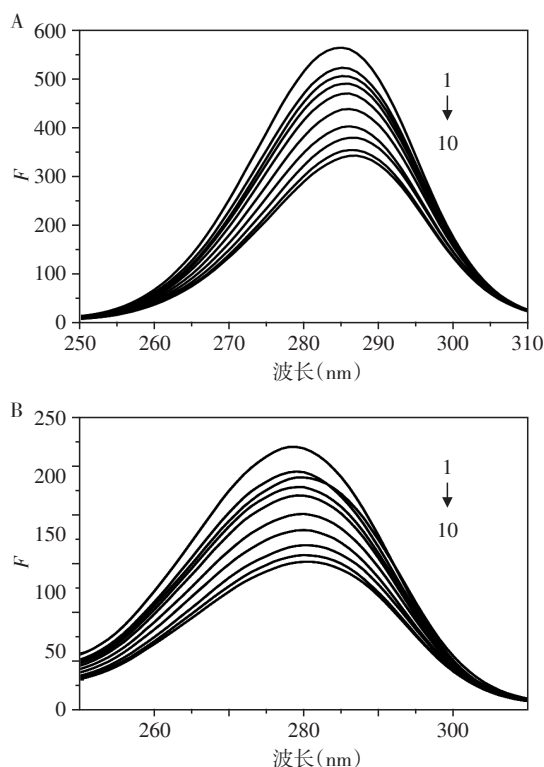
Figure 4 Fluorescence spectra of CMNS-BSA at  $\lambda_{ex}=280/295\text{ nm}$

### 2.8 BSA 构象的研究

固定 BSA 的浓度,改变 CMNS 的浓度,绘制 CMNS-BSA 体系同步荧光光谱(图5)。

### 3 讨论

首先通过对 CMNS-BSA 体系荧光光谱的研究,确定了在实验条件下 CMNS 能猝灭 BSA 的荧光,CMNS 与 BSA 发生了相互作用。其次,通过对 pH 值、缓冲溶液种类和浓度、BSA 浓度、反应时间和试剂加入顺序进行优化,CMNS 与 BSA 相互作用的最佳条件被确定。然后详细探讨了 CMNS 对 BSA 荧光的猝灭机制。动态猝灭主要受分子扩散程度影响。温度升高时,分子运动加速,同时溶液黏度下降,其结果将使分子扩散系数增大,从而增大  $K_{sv}$  值。反之,静态猝灭时,荧光分子与猝灭剂之间形成不发光的基态配合物,温度升高可能引起药物-蛋白质缔合物的稳定度下降,从而减小  $K_{sv}$  [8]。表1中  $K_q$  值比最大猝灭常



A:  $\Delta\lambda=15\text{ nm}$ ; B:  $\Delta\lambda=60\text{ nm}$ 。1~10: BSA  $7.5\times 10^{-7}\text{ mol/L}$ , CMNS  $0, 1.0\times 10^{-6}, 1.5\times 10^{-6}, 2.0\times 10^{-6}, 2.5\times 10^{-6}, 3.0\times 10^{-6}, 3.5\times 10^{-6}, 4.0\times 10^{-6}, 4.5\times 10^{-6}, 5.0\times 10^{-6}\text{ mol/L}$ 。

图5 CMNS-BSA 的同步荧光光谱图

Figure 5 Synchronous fluorescence spectrometry of CMNS-BSA

数大两个数量级,表明 CMNS 与 BSA 之间是非动态猝灭机制。而且随着温度升高,  $K_{sv}$  降低,与静态猝灭机制吻合。  $K_{Lb}$  为  $10^4$  数量级,表明 CMNS-BSA 稳定性较好。  $K_{Lb}$  随温度升高而逐渐下降,表明高温有利于分解 CMNS-BSA 复合物。静态猝灭过程中基态配合物的生成往往将引起荧光物质吸收光谱的改变 [10]。相反,动态猝灭并不改变荧光物质即 BSA 的吸收光谱 [10]。由图3可知,CMNS-BSA 体系的吸收峰从 280 nm 移到 271 nm,吸收峰的强度也增加了,推断 CMNS 与 BSA 静态猝灭机制是合理的。

结合常数和结合位点数的确定。从表3中可以看出,  $K_b$  随温度增加而略有减小,但  $n$  值约等于 1。表明 CMNS 与 BSA 形成 1:1 复合物并且 CMNS-BSA

复合物随温度增加而部分分解。温度从 291.6 K 升高到 301.6 K 时,  $K_b$  和  $n$  值减小的程度很小, 温度从 301.6 K 升高到 311.6 K 时,  $K_b$  值减小了两个数量级, 表明温度低于 301.6 K 时, 温度的变化几乎不影响 CMNS 与 BSA 的相互作用; 当温度高于 301.6 K 时, 温度的改变对 CMNS 与 BSA 的相互作用十分敏感。

在配体与蛋白质之间发挥关键作用的非共价作用力主要有 4 种类型, 即氢键、范德华力、静电和疏水作用力。作用力可根据 Ross 等<sup>[12]</sup> 研究来判断。由表 4 可知,  $\Delta G < 0$  且  $\Delta H < 0$  表明 BSA 与 CMNS 的结合是自发进行的放热反应。  $\Delta H < 0$  且  $\Delta S > 0$ , 表明主要作用力为静电作用力。

由表 4 可知, 各温度下的  $n_H$  值都小于 1, 并随温度增加  $n_H$  值减小, 表明 CMNS 分子之间呈现出负协同作用, 即一个 CMNS 结合到 BSA 结合位点上后, 会阻碍后继药物分子与蛋白质的结合, 温度越高, 药物小分子结合到 BSA 位点上越难, 导致后续 CMNS 对 BSA 的亲水性减弱。

由图 4 可知,  $\lambda_{ex}=280$  nm 曲线和  $\lambda_{ex}=295$  nm 曲线没有重叠, 表明色氨酸和酪氨酸残基都参与其中; 而且  $\lambda_{ex}=295$  nm 的  $F/F_0$  比  $\lambda_{ex}=280$  nm 曲线明显大, 表明亚螺旋域 II A 是主要结合位置。

同步荧光光谱是通过测量发射波长位移, 来获得氨基酸残基在结构和构象变化方面的信息。当  $\Delta\lambda=15$  nm 时, BSA 同步荧光光谱揭示酪氨酸残基的特征信息; 而当  $\Delta\lambda=60$  nm, 提供色氨酸残基的特征信息<sup>[10-12]</sup>。由图 5A 可知, 随 CMNS 浓度的增大, 酪氨酸残基的  $\lambda_{em}$  由 285 nm 移动到 287 nm, 而色氨酸残基的  $\lambda_{em}$  由 279 nm 移动到 281 nm (图 5B), 说明 CMNS 的加入改变了 BSA 构象, 导致 BSA 腔内疏水环境极性增强, 疏水性减弱。酪氨酸残基的荧光猝灭程度大于色氨酸残基的猝灭程度, 表明 CMNS 与 BSA 相结合的位点偏向于酪氨酸。

综上, 通过荧光和紫外光谱法研究 CMNS 与 BSA 的相互作用。由于形成 CMNS-BSA 复合物, CMNS 通过静态猝灭机制对 BSA 的荧光产生猝灭。两者通过静电作用力结合形成一个位点。有药物负协同作用, 结合位置在 BSA 的亚螺旋域 II A 中, 靠近酪氨酸残基。CMNS 能改变 BSA 构象。这些重要信息为头孢类抗生素的研发提供了理论依据。

#### [参考文献]

[1] 杨 焱. 头孢米诺治疗感染的疗效观察[J]. 中国医院用药评价与分析, 2016, 16(1): 14-15  
[2] 肖连光, 毛艺惠, 陈 娟. 头孢米诺钠静脉滴注配合内

服中药治疗 AECOPD[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(13): 213-215

- [3] Bolattin MB, Nandibewoor ST, Chimatadar SA. Biomolecular interaction study of hydralazine with bovine serum albumin and effect of  $\beta$ -cyclodextrin on binding by fluorescence, 3D, synchronous, CD, and Raman spectroscopic methods[J]. J Mol Recognit, 2016, 29(7): 308-317
- [4] Rudra S, Dasmandal S, Patra C, et al. Binding affinities of Schiff base Fe(II) complex with BSA and calf-thymus DNA: Spectroscopic investigations and molecular docking analysis[J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2016, 166: 84-94
- [5] Ma XL, Yan J, Wang Q, et al. Spectroscopy study and co-administration effect on the interaction of mycophenolic acid and human serum albumin[J]. Int J Biol Macromol, 2015, 77: 280-286
- [6] Lakowicz RJ. Principles of fluorescence spectroscopy[M]. 3rd ed. New York: Springer Press, 2006: 273-289
- [7] 许金钩, 王尊本. 荧光分析法[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 64-81
- [8] 刘 里, 成飞翔. 光谱法研究头孢克肟与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(8): 1183-1184
- [9] Zeng HJ, Qi TT, Yang R, et al. Spectroscopy and molecular docking study on the interaction behavior between nobletin and pepsin[J]. J Fluoresc, 2014, 24(4): 1031-1040
- [10] Jiang M, Xie MX, Zheng D, et al. Spectroscopic studies on the interaction of cinnamic acid and its derivatives with human serum albumin[J]. J Mol Struct, 2004, 692(1/3): 71-80
- [11] Cyril L, Earl JK, Sperry WM. Biochemists Handbook[M]. Epon Led Press: London, 1961: 254
- [12] Ross PD, Subramanian S. Thermodynamic of protein association reactions: forces contributing to stability[J]. Biochemistry, 1981, 20(11): 3096-3102
- [13] Sulkowska A, Bojko B, Rownicka J, et al. Paracetamol and cytarabine binding competition in high affinity binding sites of transporting protein[J]. J Mol Struct, 2006, 792(SI): 249-256
- [14] Bojko B, Sulkowska A, Maciazek-Jurczyk M, et al. The influence of dietary habits and pathological conditions on the binding of theophylline to serum albumin[J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 52(3): 384-390
- [15] 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]. J Mol Struct, 2009, 924(SI): 378-384

[收稿日期] 2016-08-29