

用荧光猝灭和荧光加强两种理论研究喹诺酮类 新药与白蛋白的作用

杨曼曼, 席小莉, 杨 频

(山西大学化学化工学院分子科学研究所, 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 太原 030006)

摘要 应用荧光加强和荧光猝灭两种理论公式, 对四种喹诺酮类药物与人血清和牛血清白蛋白的作用进行了对比研究, 对药物与白蛋白的结合特点和通常的表征量(解离常数、猝灭常数、猝灭效率、能量转移效率、给体-受体作用距离等)进行了深入地分析; 在白蛋白与药物结合类型上, 四种药物对 HSA 和 BSA 的猝灭实验结果表明, 这种由给体-受体结合引起的猝灭作用类型不是由生物大分子血清白蛋白单方面决定的, 而是由血清白蛋白与药物、即给体与受体两者的分子结构和相互匹配共同决定的。

关键词 荧光猝灭和加强; 人血清白蛋白(HSA); 牛血清白蛋白(BSA); 喹诺酮类药物

中图分类号 O644; O657

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2006)04-0687-05

左克(盐酸左氧氟沙星)、筠菲(氟罗沙星)、加迈欣(加替沙星)和君立欣(沃氟沙星)是当前广泛应用于临床的新一代含哌嗪基的喹诺酮类药物, 具有抗菌谱广、作用强和毒性较小的特点。这类药物通过抑制细菌的 DNA 旋转酶和拓扑异构酶, 抑制细菌 DNA 复制、转录和修复过程^[1], 但其具体的作用机制仍存在争议^[2,3], 其中有人认为其作用靶分子不是 DNA^[4]。抛开这些分歧, 药物进入人体首先遭遇的受体是血清白蛋白。白蛋白是血浆中最丰富的蛋白, 具有存储、输运许多药物的功能并与药物发生作用, 控制药物的释放和代谢, 因而药物与蛋白的作用研究十分活跃^[5~13], 随着这类新药的不断产生, 其相互作用机理值得进行更深入的研究。迄今对这一问题的研究主要采用光谱法。但不同作者的研究结果存在很多分歧, 特别是关于白蛋白与药物的作用机理、结合类型和结合位置数的研究^[5,10,11]。

本文试图应用荧光加强^[6]和荧光猝灭^[7]两种理论公式, 同时研究^[13]四种含哌嗪基的喹诺酮类新药与人血清和牛血清白蛋白的作用规律, 相互印证, 以期获得关于结合类型、结合位置数更确切的结果, 为阐明药物的作用机制及蛋白质的结构与功能关系提供基础信息。

1 实验部分

1.1 试剂

人血清白蛋白(HSA)和牛血清白蛋白(BSA)购于上海化学试剂采购供应站, 电泳纯; 左克(盐酸左氧氟沙星)购于丽珠集团丽宝生物化学有限公司; 筠菲(氟罗沙星)购于沈阳新马药业有限公司; 加迈欣(加替沙星)和浙江亚太药业公司和君立欣(沃氟沙星)购于河南省华鑫制药厂。以上四种药物均为注射用粉剂。其它试剂均为国产, 分析纯。

1.2 实验过程

HSA、BSA 和四种药物用 0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH = 7.4) 配制, 浓度分别为 1×10^{-4} 和 1×10^{-2} mol/L。在日本岛津 RF-540 型荧光光谱仪上测定药物对白蛋白的荧光猝灭, 用 Tris-HCl 缓冲液作对照, 1 cm 荧光池, 固定激发波长在 280 nm, 发射光谱的扫描范围是 290 ~ 500 nm, 测定白蛋白

收稿日期: 2005-05-24

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 30470408)和山西省青年科学基金(批准号: 20041032)资助。

联系人简介: 杨 频(1933年出生), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事结构无机和生物无机化学研究。

E-mail: yangpin@sxu.edu.cn

的荧光发射光谱. 在日本岛津 UV-265型紫外可见分光光度计上测定 $n(\text{药物})/n(\text{白蛋白}) = 1/1$ (摩尔比) 在 290 ~ 500 nm 的吸收光谱.

2 理论部分

2.1 荧光猝灭效应理论公式

有些发荧光的生物大分子与一些药物作用会引起荧光猝灭. 对荧光体分子与 n 个猝灭剂分子结合的规律可表示为^[6]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_A c(Q) \quad (1)$$

$$\frac{1}{F_0 - F} = \frac{1}{F_0} + \frac{K_D}{F_0 c(Q)} \quad (2)$$

式中, $c(Q)$ 是猝灭剂的浓度, F_0 和 F 是自由生物大分子和加入猝灭剂后的荧光强度. 由式 (2) 的 $(F_0 - F)^{-1}$ 对 $c(Q)^{-1}$ 作双倒数图, 即可求得解离常数 K_D .

2.2 荧光加强效应理论公式

当生物大分子同某些配体共存时, 可以明显观察到荧光的敏化增强. 这一规律可用下式表示^[7]:

$$\frac{M_t}{M_b} = \frac{1}{K_A (nP_t - M_b)} + 1 \quad (3)$$

$$\frac{1}{(F - F_A)} = \frac{1}{(F_b - F_A)} \left[1 + \frac{1}{K_A (nP_t - M_b)} \right] \quad (4)$$

式中, M 是配体总浓度, M_b 是结合在生物大分子上的配体浓度, P_t 为生物大分子的总浓度, 生成物 $M_n H$ 的浓度可表为 M_b/n , 以及 $M = M_t - M_b$, $P = P_t - (M_b/n)$. $F = F - F_D$ [F 是在生物大分子溶液中加入配体后体系的荧光强度, F_b 是自由生物大分子 (给体) 的荧光强度, F_A 是自由配体 (受体) 的荧光强度, F_b 是结合到生物大分子上的配体对荧光的贡献]. 根据式 (4), 有与变数 $(nP_t - M_b)^{-1}$ 对应的线性函数 $(F - F_A)^{-1}$, 据此作图, 由斜率可得生成常数 K_A 和结合位置数 n .

2.3 荧光给体-受体间的距离

根据 Förster 型偶极-偶极无辐射能量转移机理, 转移效率 E 与给体-受体间距离 r 、临界能量转移距离 R_0 以及给体荧光光谱和受体吸收光谱间的重叠积分 J 值有关, 可由文献 [9] 的公式 (22-18) - (22-21) 求得.

3 结果与讨论

3.1 用荧光猝灭理论公式研究四种喹诺酮类新药与白蛋白的解离常数和猝灭常数

测知药物的荧光近似为零, 自由 HSA 在 330 nm 处有较强的荧光. 随着药物的滴定, HSA 荧光在逐渐猝灭. 为显示四种药物对 HSA 的猝灭过程, 以 F_0/F 为纵坐标, 以药物对 HSA 的浓度比 $c(Q)/c(P_t)$ 为横坐标作图, 均得到良好的直线, 其中盐酸左氧氟沙星对 HSA 的猝灭过程见图 1.

我们还测定了药物与 BSA 的作用, 与 HSA 类似, 自由 BSA 在 330 nm 处有较强的荧光. 随着药物的滴定, BSA 荧光在逐渐猝灭, 四种药物对 BSA 的猝灭过程见图 2.

从图 1 四种药物对 HSA 的猝灭曲线可见, 其均呈现良好的线性关系, 据此可判断这些药物与 HSA 只存在一类结合部位, 即随着药物的加入, 可使其荧光均匀地猝灭.

上述四种药物对 BSA 的猝灭曲线 (图 2) 则有所不同: 盐酸左氧氟沙星和加替沙星对 BSA 荧光的

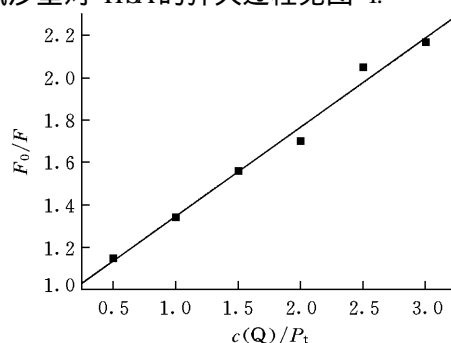


Fig 1 The quenching curve of Levofloxacin Hydrochloride to HSA

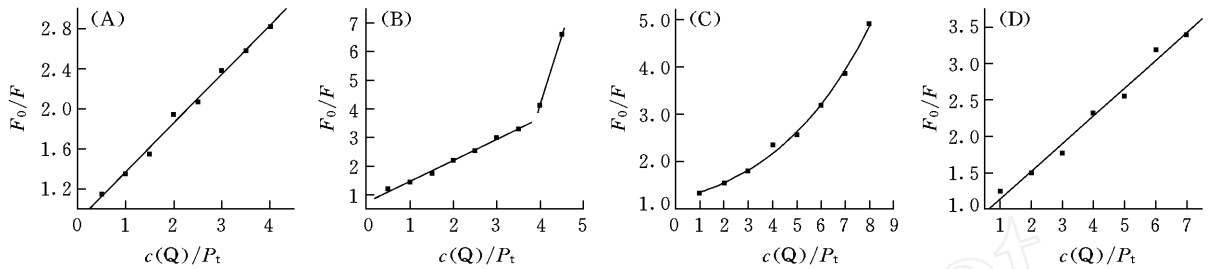


Fig 2 The quenching curves of four kinds of medicine to BSA

(A) Levofloxacin hydrochloride; (B) Worfloxacin; (C) Fleroxacin; (D) Gatifloxacin

猝灭也呈良好的直线关系, 而沃氟沙星对 BSA 在结合数为 4 时出现明显的拐点, 表明给体-受体之间存在两种结合类型^[13], 且第二类结合猝灭效应更强; 氟罗沙星对 BSA 的猝灭曲线呈向上弯曲形, 即拐点不很明确, 表明在结合数为 3, 4 或 5 时, 猝灭效应增强, 即给体-受体间作用由第一类结合转为第二类结合^[13].

进一步应用荧光猝灭理论公式 (2) 对四种药物与 HSA 和 BSA 作用的实验数据作双倒数图, 均得到良好的直线, 其中盐酸左氧氟沙星对 HSA 和 BSA 的猝灭作双倒数图分别见图 3(A) 和 (B).

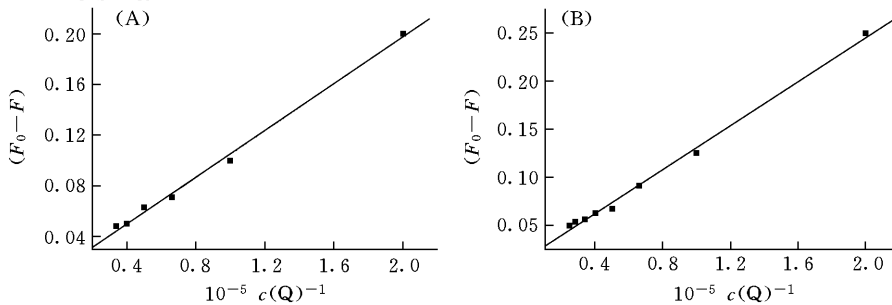


Fig 3 The double reciprocal curve of the action of Levofloxacin Hydrochloride with HSA (A) and Levofloxacin Hydrochloride with BSA (B) based on fluorescence quenching formula (2)

由图 3 各直线的斜率可以分别计算得到它们的解离常数和线性相关系数 (表 1). 表 1 中量值 M_t/P_t 给出了猝灭终止时猝灭剂 (药物) 的最大浓度与荧光体 (白蛋白) 的浓度之比, 它是猝灭剂分子对一个荧光体分子的最大结合数, 向荧光体溶液中再添加超过这个量值的猝灭剂将不再具有猝灭功能.

在表 1 中还给出了两种白蛋白与四种药物的积分 J , 临界能量转移距离 R_0 , 能量转移效率 E , 给体-受体间距离 r 值和 M_t/P_t 值.

Table 1 Dissociation constant of the four kinds of medicines with HSA (upper) and BSA (nether) K_D , linear interrelation coefficient C , quenching constant K_q , energy transfer efficiency E , action distance R_0 and r (based on fluorescence quenching formula (2) and formula of distance of donor-acceptor from [9])

No	Drug	$K_D / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	$K_q / (\text{mol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	C	$10^{-14} J$	R_0 / nm	E	r / nm	M_t / P_t
1	Levofloxacin	3.59×10^{-5}	2.79×10^{12}	0.997 9	3.27	2.99	0.194	3.79	3
		3.56×10^{-5}	2.81×10^{12}	0.997 7	2.96	2.94	0.242	3.72	4
2	Worfloxacin	2.70×10^{-5}	3.70×10^{12}	0.998 3	2.71	2.89	0.305	3.32	3
		3.02×10^{-5}	3.32×10^{12}	0.997 7	3.21	2.97	0.286	3.47	4
3	Fleroxacin	3.51×10^{-5}	2.85×10^{12}	0.999 5	3.29	2.99	0.243	3.61	5
		3.67×10^{-5}	2.72×10^{12}	0.995 4	3.11	2.96	0.241	3.59	8
4	Galifloxacin	3.16×10^{-5}	3.16×10^{12}	0.998 5	3.73	3.05	0.243	3.69	5
		4.36×10^{-5}	2.30×10^{12}	0.998 5	3.59	3.03	0.196	3.98	7

将静态猝灭方程 (1)^[6] 与 Stern-Volmer 碰撞猝灭方程^[8] $F_0/F = 1 + K_q \tau_0 c(Q)$ 建立联系, 可得 $K_A = 1/K_D = K_q \times \tau_0$, 其中, 生物分子的荧光寿命 τ_0 约为 10 ns ^[8], 由表 1 中的 K_D 值即可算得四种药物与 HSA 和 BSA 的表观猝灭常数 K_q 值见表 1. 已知各种猝灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞猝灭常数^[8] 为 $2.0 \times 10^{10} [(\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$. 由表 1 中可以看出, 这些药物对白蛋白的表观猝灭常数 K_q 远大于扩散控制的猝灭常数, 表明这些药物对白蛋白的猝灭不是由于动态碰撞引起的.

3.2 用荧光加强理论公式研究药物与白蛋白的解离常数和猝灭常数

对 HSA 和 BSA 与四种药物, 采用上面的实验数据, 应用荧光加强理论公式 (4) 作双倒数图, 均得到良好的直线, 其中盐酸左氧氟沙星对 HSA 和 BSA 的猝灭作双倒数图见图 4 (A) 和 (B)。

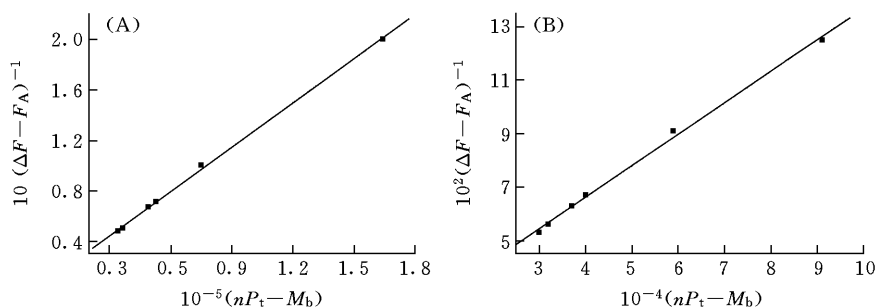


Fig 4 The double reciprocal curve of the action of Levofloxacin Hydrochloride and HSA (A) Levofloxacin Hydrochloride and BSA (B) based on fluorescence enhancement formula (4)

基于荧光加强公式 (4), 由图 4 (A) 和 (B) 算得四种药物与 HSA 和 BSA 的解离常数、线性相关系数见表 2

Table 2 Dissociation constant of the four kinds of medicine with HSA (upper) and BSA (nether) K_D , linear interrelation coefficient C , quenching constant K_q , energy transfer efficiency E , action distance R_0 and r^*

No	Drug	$K_D / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	$K_q / (\text{mol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	C	$10^{-14} J$	R_0 / nm	E	r / nm	M_t / P_t
1	Levofloxacin	1.69×10^{-5}	5.92×10^{12}	0.998 2	3.27	2.99	0.194	3.79	3
		1.30×10^{-5}	7.69×10^{12}	0.998 6	2.96	2.94	0.242	3.72	4
2	Worloxacin	1.46×10^{-5}	6.85×10^{12}	0.999 7	2.71	2.89	0.305	3.32	3
		4.86×10^{-5}	2.06×10^{12}	0.998 3	3.21	2.97	0.286	3.47	4
3	Fleroxacin	1.75×10^{-5}	5.71×10^{12}	0.999 0	3.29	2.99	0.243	3.61	5
		1.54×10^{-5}	6.50×10^{12}	0.998 7	3.11	2.96	0.241	3.59	8
4	Gatifloxacin	1.78×10^{-5}	5.62×10^{12}	0.998 4	3.73	3.05	0.243	3.69	5
		2.01×10^{-5}	4.98×10^{12}	0.998 4	3.59	3.03	0.196	3.98	7

* Based on fluorescence enhancement formula (4) and formula of distance of donor-acceptor from [9].

3.3 讨 论

比较用荧光猝灭和荧光加强两种公式得到的四种药物对两种白蛋白的 K_D 值, 发现其均在相同的数量级的范围内。可见, 尽管两个理论公式的表观形式不同, 但所得结果却很接近。这表明两个理论方程 (2) 和 (4) 的等效性和合理性以及所得结果的可信度。由计算得到的 K_D 常数看到, 四种含哌嗪基的喹诺酮类新药物与白蛋白的结合都较强, 这说明它们不仅可以为白蛋白所贮存和运载, 而且它对白蛋白的构象和分子能级都有明显的作用, 这很可能就是它们具有明显的抗菌活性的原因之一。

从四种药物对 BSA 的猝灭曲线 (图 2) 可以看到, BSA 大分子与不同药物表现出不同的性质, 即盐酸左氧氟沙星和加替沙星对 BSA 荧光的猝灭呈良好的直线关系, 而沃氟沙星对 BSA, 在结合数为 4 时出现明显的拐点; 氟罗沙星对 BSA 的猝灭曲线拐点不很明确, 呈向上弯曲形, 在结合数为 3 到 5 区间发生了向上弯曲, 猝灭效应增强, 即给体-受体间的作用由第一类结合转为第二类结合^[12]。因此可以认为, 这种由给体-受体结合引起的猝灭作用类型不是由生物大分子 BSA 单方面决定的, 而是由它与药物、即给体与受体两者的分子结构和相互匹配共同决定的。这种现象未在与 HSA 作用中出现, 很可能是由于 BSA 分子有两个色氨酸残基生色团, 而表现出不同的作用方式, 且 HSA 分子只有一个色氨酸残基所致。

从表 1 的 M_t/P_t 值可知, 四种含哌嗪基的喹诺酮类新药物对两种白蛋白的猝灭效应都是很强的, 即最多有 8 个药物 (氟罗沙星对 BSA) 分子、最少有 3 个药物 (左氧氟沙星和沃氟沙星对 HSA) 分子就可使白蛋白的荧光猝灭, 这很可能与它们都含有的哌嗪基与白蛋白的生色团色氨酸残基发生无辐射能量跃迁有关。

需要指出的是, 由于荧光加强和荧光猝灭两种理论推导的基础公式^[9]是假定给体与受体之间生成

了结合物,即在药物低浓度时基本属于静态猝灭或加强,但是,这并不排除 Förster型偶极-偶极无辐射能量转移效应的存在. 因为无论 HSA 还是 BSA, 其荧光光谱与白蛋白同药物摩尔比为 1:1 时的吸收谱都有重叠,而且其能量转移效率如 HSA 和 BSA 与沃氟沙星分别高达 30%和 29%,其它三种药物也达到 20%以上. 说明在四种含哌嗪基的喹诺酮类新药物与白蛋白的猝灭作用中都明显存在着能量转移效应.

参 考 文 献

- [1] Skauge T., Turel I., Sletten Einar. *Inorganica Chimica Acta*[J], 2002, **339**: 239—247
- [2] Kampranis S. C., Maxwell A. J. *Biol. Chem.* [J], 1998, **273**: 22606—22614
- [3] Igor D. Vilfan, Petra Drevenšek, Ljotk Turel *et al.*. *Biochimica et Biophysica Acta*[J], 2003, **1628**: 111—122
- [4] Son G. S., Yeo J. A., Kim M. S. *et al.*. *J. Am. Chem. Soc.* [J], 1998, **120**: 6451—6457
- [5] ZHU Keng(朱 铿), TONG Shen-Yang(童沈阳). *Chem. J. Chinese Universities* (高等学校化学学报) [J], 1996, **17** (4): 539—542
- [6] YANG Man-Man(杨曼曼), YANG Pin(杨 频), ZHANG Li-Wei(张立伟). *Chinese Science Bulletin* (科学通报) [J], 1994, **39** (9): 734—739
- [7] Yang P., Yang M. M., Yang B. S. *Chinese Journal of Chemistry*[J], 1996, **14** (2): 109—113
- [8] YANG Pin(杨 频). *Introduction of Bioinorganic Chemistry* (生物无机化学导论) [M], Xian: Xian Jiaotong University Press, 1991
- [9] YANG Pin(杨 频), GAO Fei(高 飞). *Principle of Bioinorganic Chemistry* (生物无机化学原理) [M], Beijing: Science Press, 2002
- [10] ZHU Keng(朱 铿), TONG Shen-Yang(童沈阳). *Acta Chimica Sinica* (化学学报) [J], 1997, **55** (4): 405—411
- [11] ZHU Keng(朱 铿), TONG Shen-Yang(童沈阳). *Chinese Journal of Analytical Chemistry* (分析化学) [J], 1996, **24** (11): 1263—1268
- [12] YANG Bin-Sheng(杨斌盛), YANG Pin(杨 频). *Progress in Biochemistry and Biophysics* (生物化学与生物物理进展) [J], 1992, **19** (2): 110—114
- [13] YANG Man-Man(杨曼曼), XI Xiao-Li(席小莉), YANG Pin(杨 频). *Chinese Science Bulletin* (科学通报) [J], 2005, **50** (22): 2571—2574

Studies on Interaction of New Medicine of Quinolone-Class with HSA and BSA by Using Fluorescence Enhancement and Fluorescence Quenching Theory

YANG Man-Man, XI Xiao-Li, YANG Pin*

(Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Institute of Molecular Science, College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract By using the two theories——fluorescence enhancement and fluorescence quenching, we studied and compared the interaction of four kinds of Quinolone-class medicines with HSA and BSA, then analysed deeply the binding speciality of medicine and albumin and usual characterization constants: dissociation constant, quenching constant, quenching efficiency, energy-transfer efficiency, the distance between donor and acceptor. About binding type of albumin with medicine, through the quenching experiment result of the four kinds of medicines with HSA and BSA, we found that this quenching action type caused by the binding of donor between acceptor was not determined by the one-self-biomacromolecule BSA, but together determined by the molecular structure of BSA and medicine, donor and acceptor, and their match with each other.

Keywords Fluorescence enhancement and quenching; HSA; BSA; Quinolone-class medicine

(Ed : D, I)