

分子模拟技术与光谱法结合研究抑菌剂磺胺二甲嘧啶 与人血清白蛋白之间的相互作用

张晟瑞*, 王芹, 季晓辉

(陕西理工学院, 陕西 汉中 723000)

[摘要] **目的:**研究了磺胺二甲嘧啶(SMZ)与人血清白蛋白(HSA)之间的相互作用。**方法:**在模拟生理条件下,采用分子模拟技术、荧光猝灭光谱、三维荧光光谱及紫外-可见吸收光谱法研究 SMZ 与 HSA 之间的猝灭类型,计算二者之间的结合常数、结合位点数等。**结果:**分子模拟技术试验结果说明 SMZ 与 HSA 之间的相互作用主要是氢键和疏水作用;荧光猝灭试验结果表明 SMZ 可以使 HSA 发生荧光猝灭。在 293, 298, 303, 308 K 的温度下,根据 Scatchard 方程计算结果可知 SMZ 与 HSA 之间的结合常数分别为 3.42×10^4 , 3.13×10^4 , 2.63×10^4 , $2.13 \times 10^4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,这说明 SMZ 和 HSA 之间的猝灭机制为静态猝灭,它们之间相应的结合位点数分别为 0.99, 0.96, 0.98, 1.09;在 SMZ 与 HSA 相互作用的体系中,它们之间的热力学常数:焓变和熵变的值分别为 -18.76 , $22.80 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$,这说明结合过程可能同时存在静电作用和疏水作用;此外,通过三维荧光光谱和紫外-可见吸收光谱得到的数据可知:SMZ 的加入会引起 HSA 二级结构的变化。**结论:**分子模拟技术与光谱法结合适合于研究 SMZ 与 HSA 之间的相互作用,具有简单快速,灵敏度高等优点。

[关键词] 磺胺二甲嘧啶; 人血清白蛋白; 分子模拟技术; 光谱法; 相互作用

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)15-0104-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014150104

Molecular Modeling and Multi-spectroscopic Approaches to Study Interaction Between Antimicrobial Drug Sulfamethazine and Human Serum Albumin

ZHANG Sheng-ru^{*}, WANG Qin, JI Xiao-hui

(School of Chemistry and Environment Science, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the interaction of sulfamethazine (SMZ) with human serum albumin (HSA). **Method:** The quenching mechanism, binding constants and binding sites (n) were studied using molecular modeling, fluorescence quenching spectroscopy, three-dimensional fluorescence spectroscopy and UV-vis absorption spectroscopy under simulative physiological conditions. **Result:** The experiment results obtained from molecular modeling indicated that there were hydrogen bonds and hydrophobic interactions between SMX and HSA; the fluorescence quenching spectra data showed that the fluorescence intensity of HSA was quenched by the gradual addition of SMX. The binding constants of SMX with HSA at 293, 298, 303, 308 K were calculated to be 3.42×10^4 , 3.13×10^4 , 2.63×10^4 , $2.13 \times 10^4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively, which means that the quenching mechanism was suggested as a static quenching. Meanwhile, corresponding numbers of binding sites (n) were calculated to be 0.99, 0.96, 0.98, 1.09, respectively. The thermodynamic parameters of the reaction, namely standard enthalpy ΔH^0 and entropy ΔS^0 , had been calculated to be $-18.76 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ and $22.80 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, respectively, which suggested that the electrostatic and hydrophobic interactions were the predominant intermolecular forces in stabilizing the SMZ-HSA complex. Experimental results obtained from the three-dimensional fluorescence spectroscopy and UV-vis absorption spectroscopy confirmed that the secondary structure of HSA was altered in the

[收稿日期] 20130904(017)

[基金项目] 陕西理工学院校级人才启动项目(SLGQD13-3)

[通讯作者] *张晟瑞, 硕士, 助理实验师, 从事药物与蛋白相互作用的光谱学研究, Tel:0916-2642766, E-mail:zhangshr09@lzu.edu.cn

presence of SMZ in aqueous solution. **Conclusion:** Molecular modeling and multi-spectroscopic approaches are good methods for investigating the interaction between SMZ and HSA. They have the advantages of high speed and high sensitivity.

[**Key words**] sulfamethazine; human serum albumin; molecular modeling; spectroscopy; interaction

人血清白蛋白(HSA)是血液蛋白中含量最多的一种蛋白质^[1],在传递内源性和外源性物质,包括药物等起到很重要的作用^[2],是一种最常用的模型蛋白。蛋白质与药物的相互作用不仅影响药物在体内分布,而且还影响药物在体内的代谢与排泄方式^[2];从药物的有效性来看,药物的药代动力学行为很大程度依赖于键合现象^[3],因此研究药物与蛋白质的相互作用已成为生命科学、化学和临床医学研究领域的重要研究课题之一^[4]。

磺胺类药物在食品中的残留对人类健康构成了巨大的潜在威胁^[4]。从2005年起,我国农业部把畜产品中磺胺类抗生素的残留情况作为继瘦肉精之后的又一个重点予以监控^[5]。因此,磺胺类药物与HSA之间作用机制的研究对理解它们对人体的危害方面具有很重要的意义。磺胺二甲嘧啶(SMZ)作为一种磺胺类药物,是一种应用广泛的抗菌药。本文将SMZ作为模型物质来研究磺胺类药物与HSA之间的作用机制。

研究药物与蛋白相互作用的方法有很多种,如分子对接技术、荧光光谱、紫外-可见吸收光谱等,其中利用对接方法可以详细且形象的表示出药物与蛋白质的结合,为下一步的实验提供一个良好的理论基础^[6]。考虑到磺胺类药物的医疗价值和人体的危害,本文在前人研究结果的基础上采用分子模拟技术、荧光光谱、紫外-可见吸收光谱对SMZ与HSA之间的相互作用进行研究。

1 材料

1.1 试药和仪器 HSA,SMZ(美国Sigma-Aldrich生物技术制品公司),三羟甲基氨基甲烷[tris(hydroxymethyl)-amino-methane, Tris,上海化学试剂公司],其他试剂均为分析纯,实验用水为二次蒸馏水。

F97Pro型荧光光谱仪(中国上海棱光技术有限公司,荧光发射光谱从270 nm记录到450 nm,狭缝宽度10 nm/10 nm),NTT-2100型系统温度用电动恒温热水浴(日本东京理化),Tu-1901型紫外-可见光谱仪(北京浦西分析仪器有限公司),XL-39-YYQ型移液枪(北京卓川电子科技有限公司)。

2 方法

Tris-HCl缓冲溶液(pH 7.40)用0.20 mol·L⁻¹的Tris和0.10 mol·L⁻¹盐酸配制;HSA溶液均用Tris-HCl缓冲溶液配制(pH 7.40),其储备液的浓度为3.0 × 10⁻⁵ mol·L⁻¹,并在4 °C下保存于暗处;SMZ溶液用甲醇配制,其储备液浓度为3.0 × 10⁻⁴ mol·L⁻¹,并在4 °C下保存于暗处;1.0 mol·L⁻¹ NaCl将溶液离子强度保持在0.1 mol·L⁻¹。

荧光猝灭(典型荧光滴定)试验:将不同体积的SMZ储备液(浓度从0.0 × 10⁻⁶ ~ 10.0 × 10⁻⁶ mol·L⁻¹)加入3 mL 3.0 × 10⁻⁶ mol·L⁻¹ HSA溶液中。荧光强度:激发波长284 nm,发射波长331 nm。

三维荧光光谱试验:发射波长220 ~ 600 nm,激发波起始波长220 nm,以5 nm/次增加。

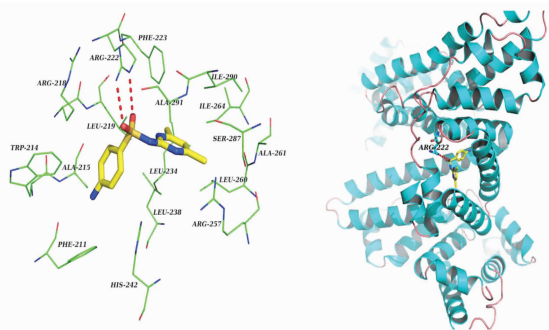
紫外-可见光谱试验:SMZ浓度为0.0 × 10⁻⁶ ~ 10.0 × 10⁻⁶ mol·L⁻¹,记录190 ~ 400 nm处SMZ和HSA混合溶液紫外-可见吸收光谱。

分子模拟试验:HSA的晶体结构with R-warfarin从Brookhaven蛋白质数据库得到^[7],编码为1h9z。首先用kollman-all-atom电荷计算出HSA的三维结构的势能,所有分子的初始结构都由分子模型软件包Sybyl 6.9来生成;然后用tripos力场和Gasteiger-marsili电荷优化分子的几何结构;最后用FlexX程序构建SMZ与HSA间的模型结构。所有计算均在SGI FUEL工作站上进行。

3 结果与讨论

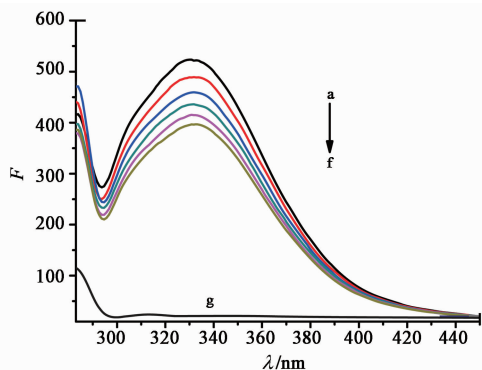
3.1 SMZ与HSA的分子模拟试验 利用SGI FUEL工作站来评估SMZ-HSA体系的键合参数。从图1中可以看到,SMZ位于HSA的疏水区;SMZ结构中的2个磺基氧可以与Arg222形成2个氢键;SMZ结构中的2个甲基与Leu260和Ile264之间存在疏水作用;计算得到的吉布斯自由能为:-32.76 kJ·mol⁻¹。结果表明SMZ与HSA之间的结合很强,作用力主要是氢键和疏水作用。

3.2 SMZ与HSA相互作用的荧光猝灭机制 图2为HSA,SMZ及不同浓度的SMZ与HSA混合液的荧光光谱。HSA的最大发射波长(λ_{em})为331 nm,随着SMZ浓度的增大,HSA的荧光强度出现了明显的降低,并且最大发射波长发生红移,从331 nm红



线-氨基酸残基;球棍模型-配体结构;虚线-配体和蛋白间氢键

图 1 SMZ 和 HSA 体系的最佳分子对接



HSA 浓度为 $3.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 从 a~f 对应的 SMZ 浓度为 $0.0, 2.0 \times 10^{-6}, 4.0 \times 10^{-6}, 6.0 \times 10^{-6}, 8.0 \times 10^{-6}, 10.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; g 为 SMZ 的荧光光谱, 浓度为 $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $T = 293 \text{ K}$

图 2 SMZ-HSA 体系的荧光光谱

移到 334 nm。表明 SMZ 的加入改变了 Try 残基附近的微环境,使其疏水性减小,生成不发荧光的基态配合物,从而猝灭了 HSA 内色氨酸残基的荧光。

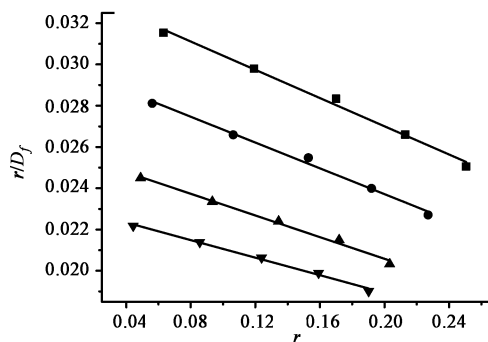
3.3 结合常数及结合位点数的计算 通过分析猝灭数据,使用 Scatchard 方程计算 4 种不同温度下 SMZ 和 HSA 之间的结合常数和结合位点数:

$$r/D_f = nK - rK \quad (1)$$

其中 r 是每摩尔蛋白结合的生物小分子的摩尔数; D_f 是游离生物小分子的摩尔浓度; n 是结合位点数; K 是结合常数。

图 3 显示,在选定浓度范围内,随着温度升高,猝灭曲线的斜率降低,作线性回归计算各个温度下的猝灭常数,同时 SMZ-HSA 体系的 Scatchard 方程图有着良好的线性关系,表明 SMZ 和 HSA 之间只有 1 个结合位,这与所求得结合位点数一致(表 1)。

在 SMZ-HSA 体系中,温度升高猝灭常数呈降低趋势,这表明 SMZ 和 HSA 的荧光猝灭机制为静态猝灭。



HSA 浓度为 $3.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;

■ 293 K; ● 298 K; ▲ 303 K; ▼ 308 K

图 3 SMZ-HSA 体系的 Scatchard 方程

表 1 不同温度下 SMZ-HSA 体系的结合参数和热力学常数

T/K	$K/\times 10^4$ $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$	n	ΔG $/\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	ΔS $/\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$	ΔH $/\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$
293	3.42	0.99	-25.44	22.80	-18.76
298	3.13	0.96	-25.55		
303	2.63	0.98	-25.67		
308	2.13	1.09	-25.78		

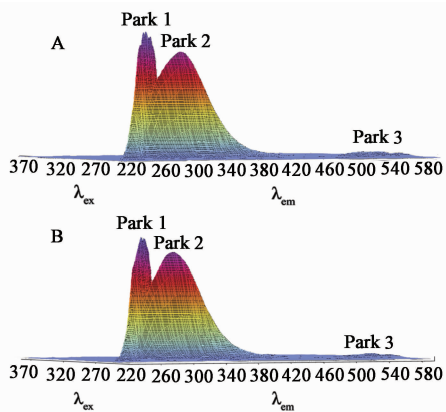
3.4 键合模式的确定 研究了 4 种不同温度下 (293, 298, 303, 308 K), SMZ 与 HSA 之间的结合常数(在这 4 种不同温度下, HSA 并不会发生结构的变化),并根据 Van't Hoff 方程来计算与温度有关的热力学常数:

$$\ln K = -\Delta H/RT + \Delta S/R \quad (2)$$

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (3)$$

其中在相应温度下, K 是猝灭常数; R 是气相常数; T 是温度; ΔH , ΔS 和 ΔG 分别为焓变、熵变和吉布森自由能。根据 4 种温度下的 Scatchard 猝灭常数,测定这些热力学参数。从表 1 可知, SMZ 与 HSA 混合物的焓变为负值,熵变为正值,这说明 SMZ 与 HSA 配合物的形成是一种放热反应,为熵驱动。SMZ 与 HSA 之间的结合过程可能同时存在几种作用力,而非单一作用力,主要是静电作用,但也有疏水作用力和氢键的存在。

3.5 三维荧光光谱图 图 4 为 HSA 和 SMZ-HSA 体系的三维荧光光谱图,如图 4 所示,峰 1 是瑞利散射峰 ($\lambda_{em} = \lambda_{ex}$),峰 3 是二级散射峰 ($\lambda_{em} = 2\lambda_{ex}$)^[7]。峰 2 ($\lambda_{ex} = 284 \text{ nm}, \lambda_{em} = 331 \text{ nm}$) 是色氨酸、酪氨酸残基的谱峰及多肽骨干结构谱峰的重叠峰,为主要的荧光谱峰。由图 4 可知峰 2 的荧光强度随着 SMZ 的加入由 520.43 降低到 417.64,最大发射波长由 331 nm 红移到 334 nm,这 2 个现象说明色氨酸和酪氨酸残基的微环境发生变化。由以上的现象和分析

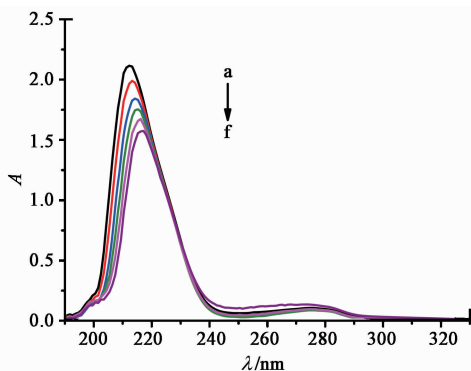


A. HSA; B. SMZ-HSA; HSA 浓度 $3.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; SMZ 浓度分别为 $0, 24 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $T = 293 \text{ K}$

图4 HSA 与 SMZ-HSA 体系的三维荧光光谱

可知, SMZ 可与 HSA 产生相互作用, 并诱导 HSA 的一些微观环境和构象发生变化, 这与荧光猝灭光谱所得结果是一致的。

3.6 紫外-可见吸收光谱 从图 5 中可以看到, 在 214 nm 处 HSA 有很强的吸收谱图, 峰的强度随着 SMZ 的加入而降低, 并且使 HSA 吸收峰的波长产生红移, 从 214 nm 变化到 219 nm。这 2 个现象说明了 SMZ 与 HSA 可以产生相互作用, 使 HSA 的 α 螺旋结构发生改变^[8]。此外, 由于基态配合物的形成会引起荧光体的吸收光谱不断变化, 因此 SMZ 和 HSA 之间的相互作用是静态猝灭。



HSA 浓度 $3.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; a ~ f 对应 SMZ 浓度分别为 $0.0, 2.0 \times 10^{-6}, 4.0 \times 10^{-6}, 6.0 \times 10^{-6}, 8.0 \times 10^{-6}, 10.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $T = 293 \text{ K}$

图5 HSA 与 SMZ-HSA 体系的紫外-可见吸收光谱

4 结论

本文利用分子模拟技术、荧光猝灭光谱、三维荧光光谱和紫外-可见吸收光谱研究了 SMZ 与 HSA 之间的相互作用, 为研究磺胺类药物与蛋白质之间的相互作用, 提供了一个简单易行的方法。在这个工

作中, 分子对接实验结果说明 SMZ 与 HSA 之间的作用力主要是氢键和疏水作用; 荧光猝灭光谱试验结果表明 SMZ 与 HSA 之间可以发生相互作用, 形成不发荧光的基态配合物, 并结合不同温度下的荧光实验数据计算得到了它们之间的结合常数和结合位点数。此外, 三维荧光光谱图和紫外-可见光谱的结果显示 SMZ 的加入会引起 HSA 二级结构的变化。该实验结果不仅对于揭示体内的药物动力学问题、指导合理用药具有一定意义, 同时对于进行药物分子设计, 开发新药, 也具有重要的指导意义。

[参考文献]

- [1] Tabassum S, Al-Asbahy W M, Afzal M, et al. Synthesis, characterization and interaction studies of copper based drug with human serum albumin (HSA): spectroscopic and molecular docking investigations[J]. J Photochem Photobiol B, 2012, 114(8):132.
- [2] Samari F, Shamsipur M, Hemmateenejad B, et al. Investigation of the interaction between amodiaquine and human serum albumin by fluorescence spectroscopy and molecular modeling [J]. Eur J Med Chem, 2012, 54(5):255.
- [3] Wang L L, Wu J, Wang Q, et al. Rapid and sensitive determination of sulfonamide residues in milk and chicken muscle by microfluidic chip electrophoresis[J]. J Agric Food Chem, 2012, 60(7):1613.
- [4] Guo Y C, Ngom B, Le T, et al. Utilizing three monoclonal antibodies in the development of an immunochromatographic assay for simultaneous detection of sulfamethazine, sulfadiazine, and sulfaquinoxaline residues in egg and chicken muscle [J]. Anal Chem, 2010, 82(18):7550.
- [5] 袁中珍, 张雷, 唐柏彬, 等. 分析测试学报[J]. 2013, 32(3):478.
- [6] 全艳, 李晓飞, 王宪龄, 等. 柴胡-黄芩药对主要成分与环氧合酶-2 的对接研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(11):148.
- [7] Zhang Y Z, Chen X X, Dai J, et al. Spectroscopic studies on the interaction of lanthanum (III) 2-oxopropionic acid salicyloyl hydrazone complex with bovine serum albumin[J]. Luminescence, 2008, 23(3):150.
- [8] Jiang H, Chen R R, Pu H L. Study on the interaction between tabersonine and human serum albumin by optical spectroscopy and molecular modeling methods [J]. J Luminescence, 2012, 132(3):592.

[责任编辑 邹晓翠]