

牛血清白蛋白与四氯合铂(II)酸根、顺铂及顺式二水二氨合铂(II)相互作用的研究

李荣昌 左琦 朱林松 王夔

(北京医科大学无机化学教研室, 北京 100083)

用平衡透析、凝胶色谱等方法研究了牛血清白蛋白 (BSA) 与 PtCl_4^{2-} 、顺铂及 $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ 的相互作用。结果表明, 顺铂与 BSA 在 25℃ 作用 4 小时, 未发现 BSA 结合铂, 而在 37℃ 作用 20 小时后 BSA 与铂 (II) 有一定的结合。BSA 对 PtCl_4^{2-} 有一个强结合部位, 3 个弱结合部位, 结合常数分别为 4.0×10^4 及 1.1×10^3 。BSA 对 $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ 有 2 个专一性结合部位, 结合常数 $K_1 = 9.0 \times 10^4$, 有 2~3 个非专一性结合部位, $K_2 = 2.4 \times 10^2$ 。BSA 与 $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ 的反应对 BSA 是一级反应, 速度常数 $k = 0.012 \text{ min}^{-1}$ 。

关键词: 顺铂 牛血清白蛋白

抗癌药物顺铂的主要靶分子是 DNA, 但许多研究表明, 它也能与体内的其他生物配体作用。自 1973 年以来, 许多作者报道了顺铂在血浆内与血浆蛋白质结合及与细胞各种组分的作用^[1-5]。显然, 顺铂与体内的生物大分子配体的相互作用的研究对于认识顺铂在体内的代谢机制及抗癌机理是极为重要的。为此, 我们用凝胶色谱法、平衡透析法对顺铂及其水解产物与牛血清白蛋白 (BSA) 的相互作用进行了研究。为了进行比较, 同时研究了四氯合铂 (II) 酸根离子 PtCl_4^{2-} 与 BSA 的作用。

实验及其结果

一. 试剂及仪器

试剂: 牛血清白蛋白 (BSA), 电泳纯, 中国科学院生物物理所生化厂制品。顺铂 (cisDDP) 由北京医科大学实验药厂研究室提供。三 (羟甲基) 氨基甲烷 (tris), 纯度大于 99.8%, 北京朝阳门药品分装厂。葡聚糖凝胶 (Sephadex) G-25, Fina, Pharmacia。

仪器: UV-260 可见紫外分光光度计 (岛津), Spectr AA-40 原子吸收分光光度计 (Varian), 自制的聚四氟乙烯透析池。

二. 实验步骤及其结果

(1) BSA 与二价铂离子的结合部位数和结合常数的测定。在透析池中间夹一透析膜 (截留分子量 10000), 压紧。精密称取计算量的 BSA, 加入一定量的 tris-HCl 缓冲液, 用 NaCl 维持离子强度, 调整溶液的 pH 为 7.4。取此溶液 4.00ml 注入左半部透析池中, 右半部透析池中的溶液除了用一定量的 K_2PtCl_4 代替 BSA 外, 其余均与左半部相同。把透析池置于恒温 (37℃) 振荡器中振荡。间隔一定时间从右半部透析池中用微量注射器吸取 0.10ml 溶液, 用原

子吸收分光光度法(石墨炉法)测定铂浓度,直至浓度不变为止,即得到 K_2PtCl_4 的平衡浓度,其结果见表 1。

为了确定 BSA 结合 $Pt(II)$ 的部位数和结合常数,我们用 Scatchard 作图法⁽⁶⁾,其数学关系为:

$$\frac{r}{C} = \frac{n}{K_d} - \frac{r}{K_d} \quad (1)$$

式中, r 为每摩尔 BSA 结合铂(II)的平均摩尔数; C 为 K_2PtCl_4 的平衡浓度; n 为 BSA 结合铂(II)的部位数; K_d 为 $BSAPt(II)$ 配合物的解离常数。求得的 r 和 r/C 值见表 1。用 r/C 对 r 作图(图 1)。从图可求得结合部位数和结合常数,其结果见表 3。

表 1 K_2PtCl_4 与 BSA 结合的实验数据

Table 1 Experimental Data of Bond of K_2PtCl_4 and BSA, tris-HCl Buffer pH 7.4, μ_{NaCl} 0.1, 37°C

[BSA](mol · l ⁻¹)	$C_{K_2PtCl_4}$ (mol · l ⁻¹)	r	r/C
2.39×10^{-4}	0.460×10^{-5}	0.0960	2.09×10^4
2.39×10^{-4}	2.34×10^{-5}	0.280	1.20×10^4
2.61×10^{-4}	1.22×10^{-4}	0.436	0.358×10^4
1.28×10^{-4}	0.530×10^{-4}	0.344	0.649×10^4
1.26×10^{-4}	4.02×10^{-4}	0.762	1.90×10^4
2.61×10^{-4}	4.21×10^{-4}	0.949	0.226×10^4
1.26×10^{-4}	8.66×10^{-4}	1.492	0.172×10^4

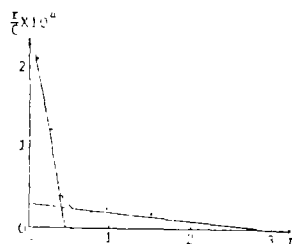


图 1 BSA 与 K_2PtCl_4 相互作用的 Scatchard 图

Fig.1 Scatchard diagram of interaction of BSA and K_2PtCl_4

(2) 顺铂水解产物 $cis-[Pt(NH_3)_2(H_2O)_2]^{2+}$ (简记为 DDAP) 与 BSA 结合部位数和结合常数的确定。 $cis-[Pt(NH_3)_2(H_2O)_2]^{2+}$ 的制备: 将顺铂与 $AgNO_3$ 严格按摩尔比 1:2 混合, 溶于 pH7.4 的 tris-HNO₃ 缓冲溶液中, 在 37°C 下避光振荡 15 小时, 滤去沉淀, 滤液即为 $cis-[Pt(NH_3)_2(H_2O)_2]^{2+}$ 溶液。

BSA 与 DDAP 相互作用的平衡透析及铂的测定方法同(1), 但用 tris-HNO₃ 缓冲体系以免引入 Cl^- 而重新形成顺式二氯二氨合铂(II), 用 KNO_3 维持离子强度 0.1, 所得结果见表 2。

表 2 $cis-[Pt(NH_3)_2(H_2O)_2]^{2+}$ 与 BSA 结合的实验数据

Table 2 Experimental Data of Bond of BSA and $cis-[Pt(NH_3)_2(H_2O)_2]^{2+}$, tris-HNO₃ Buffer pH 7.4, μ_{KNO_3} 0.1, 37°C

[BSA](mol · l ⁻¹)	$C_{Pt(NH_3)_2(H_2O)_2^{2+}}$ (mol · l ⁻¹)	r	r/C
2.49×10^{-4}	1.61×10^{-4}	0.325	0.202×10^4
2.49×10^{-4}	2.92×10^{-4}	0.562	0.192×10^4
2.48×10^{-4}	0.390×10^{-5}	0.015	0.385×10^4
2.48×10^{-4}	0.720×10^{-5}	0.023	0.319×10^4
2.48×10^{-4}	1.14×10^{-5}	0.030	0.263×10^4
2.48×10^{-4}	2.04×10^{-5}	0.047	0.230×10^4
2.59×10^{-4}	4.15×10^{-5}	0.092	0.222×10^4
2.59×10^{-4}	6.55×10^{-5}	0.131	0.200×10^4
2.47×10^{-4}	0.180×10^{-5}	0.0097	0.539×10^4
2.47×10^{-4}	0.220×10^{-5}	0.0117	0.532×10^4
2.47×10^{-4}	0.320×10^{-5}	0.0129	0.403×10^4

如用 γ/C_{DDAP} 对 r 作图, 随着 r 的增加, 曲线先下降后趋于和 r 轴平行, 因此用 Scatchard 作图法不能得到结合部位数和结合常数. 这说明 BSA 与 DDAP 有专一性结合部位, 也有非专一性结合部位, 对于这种情况, 可以用 Rosenthal 分析以求得结合部位数和结合常数⁽⁷⁾. 可以假设 BSA 对 $cis-[Pt(NH_3)_2(H_2O)_2]^{2+}$ 有两类结合部位, 则有:

$$r = \frac{n_1 K_1 [L]}{1 + K_1 [L]} + \frac{n_2 K_2 [L]}{1 + K_2 [L]} \quad (2)$$

式中, r 的意义同前, n_1 为专一性结合部位数, n_2 为非专一性结合部位数, K_1 和 K_2 分别为这两类结合部位结合 $cis-[Pt(NH_3)_2(H_2O)_2]^{2+}$ 的结合常数, $[L]$ 为平衡时游离的 $cis-[Pt(NH_3)_2(H_2O)_2]^{2+}$ 即 C_{DDAP} . 令

$$\begin{aligned} a &= K_1 K_2 & b &= K_1 + K_2 & N &= r/[L] = r/C \\ d &= -K_1 K_2 (n_1 + n_2) & e &= -(K_1 n_1 + K_2 n_2) \end{aligned}$$

把(2)式展开整理得:

$$ar^2 + brN + dr + eN = -N^2 \quad (3)$$

利用表 2 中的实验数据, 算出 N^2 , r^2 及 rN 值, 并对(3)式利用电子计算机进行多元线性回归, 得方程:

$$-N^2 = 4.27 \times 10^7 r^2 + 9.042 \times 10^4 rN - 2.008 \times 10^8 - 8422N + 1.424 \times 10^7 \quad (4)$$

相关系数 $R = 0.997$. 由(4)式可得系数 a 、 b 、 d 、 e 值, 并进一步求出 n_1 、 n_2 和 K_1 、 K_2 , 其结果见表 3.

表 3 BSA 对 Pt(II) 及 $cis-[Pt(NH_3)_2(H_2O)_2]^{2+}$ 的结合部位数和结合常数

Table 3 Numbers of Bonding Sites and Bonding Constants of BSA and Pt(II),

$cis-[Pt(NH_3)_2(H_2O)_2]^{2+}$, 37°C, $\mu = 0.1$					
ions	n_1	K_1	n_2	K_2	μ
$PtCl_4^{2-}$	0.5	4.0×10^4	3	1.1×10^3	0.1(NaCl)
$cis-[Pt(NH_3)_2(H_2O)_2]^{2+}$	2.2	9.0×10^4	2.5	2.4×10^2	0.1(KNO ₃)

(3) 顺铂与 BSA 相互作用的凝胶色谱法研究. 称取 16.27mg BSA, 加入 $3.400 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 的顺铂溶液 2.00ml, 在 pH 7.4, $\mu_{NaCl} = 0.1$ 及 25°C 下反应 4 小时, 取 2.00ml 反应液上 Sephadex G-25 柱(1×25cm)层析分离, 按 1.0ml 一份收集淋出液, 用 280nm 作测定波长, 用紫外分光光度法测定每份淋出液中的 BSA 含量. 用原子吸收分光光度法(石墨炉法)测定铂含量. 分别用 BSA 和 Pt 浓度对淋出体积作图, 可得顺铂与 BSA 相互作用的凝胶色谱图. 从图可以看出, 在 BSA 的流出峰位无 Pt 的色谱峰, 说明在此实验条件下 BSA 与顺铂未发生可以察觉的反应.

用同样方法可得到 37°C 下 BSA 与顺铂反应

20 小时的凝胶色谱图(2). 从图可见, 此时顺铂与 BSA 有一定作用. 根据峰面积可以求得 BSA 结合铂量为 $0.0606 \text{ mol} / \text{mol BSA}$.

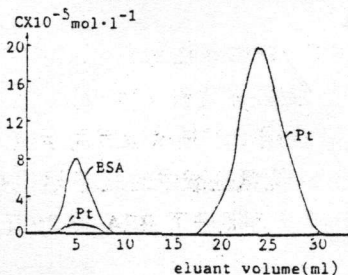


图 2 BSA 与顺铂作图 20 小时的凝胶色谱图

Fig.2 Gel chromatography of interaction between BSA and cisplatin after 20 hrs of reaction

(4)顺铂水解产物 $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ 与 BSA 相互作用的动力学研究. 称取 23mg BSA, 加入 $3.333 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 的 $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ 6.00ml, 取 1.00ml 上凝胶柱, 按与步骤 (3) 相同的方法, 可得到 BSA 与 DDAP 在 37℃、pH7.4、tris-HNO₃ 缓冲体系、 $\mu=0.1$ (KNO₃) 的条件下不同作用时间的凝胶色谱图. 为简便起见这些图不再列出. 从色谱图可求出 BSA 结合铂的总浓度. 前面我们已经求出 BSA 对 DDAP 的第一类结合部位数为 2.2; 而凝胶色谱的测定表明, 在本实验条件下, BSA 与 DDAP 反应 4 小时 40 分, BSA 平均结合 $1.89 \text{ mol Pt} / \text{mol BSA}$. 因此可以推断, 在反应的初始阶段, DDAP 优先与 BSA 的第一类结合部位结合, 反应的化学计量关系为 1 摩尔 BSA 结合 2 摩尔的 DDAP. 由于 DDAP 的浓度 ($3.333 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) 远大于 BSA 的浓度 ($5.64 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), 按假一级反应

$$\ln \frac{[\text{BSA}]_0}{[\text{BSA}]} = kt \quad (5)$$

式中 k 为速度常数, $[\text{BSA}]_0$ 为 BSA 的初始浓度, $[\text{BSA}]$ 为任意时刻的游离浓度. 按化学计量关系有 $[\text{BSA}] = [\text{BSA}]_0 - 1/2[\text{DDAP}]_{\text{结合}}$. BSA 结合 DDAP 的浓度 (即 $[\text{DDAP}]_{\text{结合}}$) 可由色谱图求出, 则 $[\text{BSA}]$ 也可求得. 动力学测定结果见表 4. $\ln[\text{BSA}]_0 / [\text{BSA}]$ 与时间 t 间确有直线关系 (相关系数为 0.99), 求得速度常数 $k = 1.20 \times 10^{-2} \text{ 分}^{-1}$, 反应半衰期为 58 分.

表 4 BSA 与 $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ 反应的动力学数据

Table 4 Kinetic Data of Interaction between BSA $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$.

tris-HNO₃ Buffer, pH7.4, 37℃, μ_{KNO_3} 0.1, $[\text{BSA}]_0$ $5.64 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$,

$[\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ $3.33 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$

time(min)	3.25	30.0	70.0	140.0	210
$[\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}_{\text{总}} (\text{mol} \cdot \text{l}^{-1})$	3.86×10^{-6}	2.13×10^{-5}	5.65×10^{-5}	8.63×10^{-5}	10.4×10^{-5}
$[\text{BSA}] (\text{mol} \cdot \text{l}^{-1})$	5.32×10^{-5}	4.45×10^{-5}	2.81×10^{-5}	1.32×10^{-5}	0.423×10^{-5}
$\ln([\text{BSA}]_0 / [\text{BSA}])$	0.0359*	0.215*	0.695	1.45	2.59

* The values were obtained at $[\text{BSA}]_0 = 5.52 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$

讨 论

(1)用 Scatchard 法研究 BSA 与 PtCl_4^{2-} 的相互作用表明, BSA 有两类铂 (II) 结合部位. BSA 有个独立的巯基 (34 位). 但是在未脱脂蛋白的溶液中, 大约只有 60% 的巯基有反应活性^[8], 根据 Pt^{2+} 是软酸因而亲硫的性质, 可以推断 Pt^{2+} 对 BSA 的第一类结合部位可能为蛋白链中第 34 位氨基酸中的巯基, 这也是 n_1 为 0.5 的原因. 值得注意的是, NH_3 对铂 (II) 的配位不但不阻碍反而促进了 BSA 与 $\text{Pt}(\text{II})$ 的结合, 这从第一类结合部位数及结合常数都增大得到了证实.

(2)凝胶色谱的研究表明, 顺铂与 BSA 在 25℃、pH7.4、 $\mu=0.1$ (NaCl) 的条件下反应 4 小时未发生可以察觉的反应. 但在同样介质条件下, 升高温度到 37℃, 反应 20 小时, 可以看到 BSA 与顺铂有明显的结合. 这可能是顺铂发生水解, 水解产物再与 BSA 结合. 顺铂水解产物 $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ 与 BSA 的结合是比较慢的, 在反应的初始阶段为一级反应, 半衰期为 58 分. 因此, 我们认为 Leroy 等提出的各种小分子铂物种与蛋白质铂 (II) 配合物间存在快速平衡的看法是有疑问的^[3]. 顺铂从血浆中清除按双时相方式 (Biphasic manner) 进

行, 第一阶段的 $t_{1/2}$ 约为 1 小时, 第二阶段的 $t_{1/2}$ 约为 58~73 小时⁽¹⁾, 这些实验结果可以从顺铂及其水解产物与血浆蛋白质的慢反应动力学得到合理的解释。

参考文献

- [1] Deconti, R.C. et al., *Cancer Res.*, 33, 1310 (1973).
- [2] Manaka, R.C. et al., *Chem. Biol. Interact.*, 22, 253 (1978).
- [3] Leroy, F. et al., *Cancer Treat. Rep.*, 63, 59 (1979).
- [4] Repta, A.J. et al., in Prestayko, A.W. et al., *Cisplatin Current Status and New Developments*, Academic Press, 258, (1980).
- [5] Choie, D.D. et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 55, 245 (1980).
- [6] W. 费迪南德, 酶分子, 科学出版社, 113 (1980).
- [7] 周廷冲, 受体生化药理学, 人民卫生出版社, 84 (1985).
- [8] Hansen, U.K., *Pharmacologica Reviews*, 33(1), 17 (1981).

INTERACTIONS BETWEEN BOVINE SERUM ALBUMIN (BSA) WITH TETRACHLOROPLATINATE(II), CISPLATIN AND CIS-DIAQUODIAMMINEPLATIN(II)

Li Rongchang Zuo Qi Zhu Linsong Wang Kui

(Department of Inorganic Chemistry, Beijing Medical University, Beijing 100083)

The interactions between BSA and PtCl_4^{2-} , cisplatin and cis-diaquodiammineplatin(II) have been studied by gel chromatography and equilibrium dialysis. The experimental results show that no platinization of BSA has been observed up to 4 hrs. at 25°C. However, after 20 hrs of reaction a small fraction of BSA has been platinized at 37°C. It is found that BSA has two groups of binding sites to PtCl_4^{2-} , which has been characterized with number of binding sites 1 and 3, the binding constant are 4.0×10^4 and 1.1×10^3 , respectively. For binding of cis-[Pt(NH₃)₂(H₂O)₂]²⁺, the number of sites in the first specific group equals to 2, the binding constant, 9.0×10^4 and the second, nonspecific, consists of 2-3 binding sites, binding constant is 2.4×10^2 . The reaction between BSA and diaquo complex has been characterized as a first order reaction with $k = 0.012 \text{ min}^{-1}$ at 37°C.

Keywords: cisplatin bovine serum albumin