甘氨酸-水杨醛席夫碱和邻菲咯啉混合铜(II)配合物与牛血清白蛋白相互作用热力学行为

代春美^①, 何欢^②, 胡相卡^①, 陈香^①, 郭清莲^{③*}

① 锦州医科大学药学院, 锦州 121001;

② 武汉大学化学与分子科学学院, 武汉 430072;

③ 武汉大学中南医院检验科, 武汉 430071

* 联系人, E-mail: yunjiang716@hotmail.com

2016-05-10 收稿, 2016-06-01 修回, 2016-06-03 接受, 2016-07-07 网络版发表

辽宁省教育厅科学研究项目(L2014322)和湖北省卫生计生委重点项目(WJ2015MB097)资助

摘要 在模拟人体生理条件下, 采用荧光光谱、紫外光谱、圆二色谱和分子模拟等多种技术和方法, 研究了甘氨酸-水杨醛席夫碱和邻菲咯啉混合铜(II)配合物(CuGP)与牛血清白蛋白(BSA)相互作用的热力学行为. 荧光光谱和紫外光谱分析表明, CuGP与BSA之间的猝灭机制为复杂的混合猝灭机制. 通过所获取的相互作用热力学参数, 可以发现CuGP与BSA的相互作用是一个吉布斯自由能降低的自发过程, 猝灭过程的活化能为8.61 kJ/mol, 二者之间的主要作用力为静电相互作用力. 圆二色谱的分析发现CuGP与BSA的结合会导致蛋白结构发生破坏, 其 α -螺旋含量减少, 无规卷曲含量升高. 分子模拟研究发现CuGP结合在BSA的Site I位点, 与BSA发光残基TRP213, TYR156, TYR340和TYR451之间距离小于5 Å.

关键词 铜(II)配合物, 牛血清白蛋白, 热力学参数, 荧光光谱, 圆二色谱, 分子对接

金属配合物在抗菌、抗氧化、抗肿瘤等方面具有良好的生物活性, 越来越受到人们的重视. 研究发现, 金属抗癌药物, 如铂(Pt(II)和Pt(IV))、钌(Ru(II)和Ru(III))、金(Au(I)和Au(III))配合物等, 具有良好的抑制肿瘤活性, 但是传统金属配合物的应用受到其耐药性以及毒副作用的限制^[1]. 已有研究表明包含铜、钛、锡和铈等金属的新型金属配合物具有良好的化疗潜力, 并有与基于铂的金属抗癌药物不同的作用机制^[2].

含铜金属配合物具有优异的抗癌细胞增殖活性, 可以用作潜在的抗癌药物, 但目前其药理学和药代动力学的相关报道比较稀少^[3]. 含铜金属配合物与血浆蛋白的结合能力决定了其在体内吸收、运输和代谢

过程, 是了解其药代动力学的重要参数. 血清白蛋白是血浆中含量最为丰富的载体蛋白, 具有维持人体生理环境相对稳定、贮运内源性代谢物和外源性药物小分子等重要生理功能^[4]. 此外, 有报道表明血清白蛋白会在肿瘤部位聚集, 与正常细胞相比, 癌细胞对血清白蛋白有更高的摄取量, 因此血清白蛋白被广泛应用为抗癌药物分子的载体^[5].

甘氨酸-水杨醛席夫碱和邻菲咯啉混合配体的铜(II)配合物(Cu(glycine salicylidene schiff base)(phenanthroline)·H₂O, CuGP, 图1)是新合成的一种含铜金属配合物, 实验表明它具有良好的抗癌活性, 在10⁻⁵ mol/L浓度条件下对癌细胞生长有明显的抑制效果. 由于牛血清白蛋白(BSA)与人血清白蛋白(HSA)具有

引用格式: 代春美, 何欢, 胡相卡, 等. 甘氨酸-水杨醛席夫碱和邻菲咯啉混合铜(II)配合物与牛血清白蛋白相互作用热力学行为. 科学通报, 2016, 61: 2380–2386
Dai C M, He H, Hu X K, et al. Thermodynamics of the interaction of copper(II) glycine-salicylic aldehyde schiff base-phenanthroline mixed complex with bovine serum albumin (in Chinese). Chin Sci Bull, 2016, 61: 2380–2386, doi: 10.1360/N972016-00443

图1 CuGP的分子结构
Figure 1 Molecular structure of CuGP

高度的同源性, 本文选择BSA作为模型蛋白, 利用多种光谱手段和分子模拟的方法, 研究了含铜金属配合物CuGP与血清白蛋白相互作用的热力学特征及其机理, 为了解铜配合物在体内的分布和代谢情况提供有意义的信息.

1 实验

(i) 试剂与仪器. BSA购自Sigma公司, HCl, NaCl, NaH_2PO_4 , K_2HPO_4 等为分析纯; 实验用水为超纯水; BSA等溶液浓度均为0.05 mol/L, 由pH 7.4的磷酸缓冲盐溶液(PBS)配成. 配合物CuGP由聊城大学化学与化工学院李林蔚教授赠予^[6].

所用仪器如下: 荧光光度计(美国Perkin Elmer公司, LS-55型), 紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司, TU-1901型), CD圆二色光谱仪(英国应用光物理公司), 电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司, BS110S型), Milli-Q Advantage A10超纯水系统(美国Millipore公司).

采用Sybyl 8.1中Surflex-Dock模块^[7]进行计算模拟. 软件购自Tripos公司, 运行环境为Cent OS系统.

(ii) 荧光光谱. 荧光激发波长为 $\lambda_{\text{ex}}=280$ nm, 激发和发射狭缝宽度分别为2.5和5.0 nm. 在pH 7.4条件下, 测定BSA与一系列不同浓度的CuGP在290~500 nm波长范围内的荧光发射光谱.

(iii) 圆二色谱. 持续氮气流条件下, 使用圆二色谱仪测定室温时波长范围为200~260 nm内样品的CD光谱, 比色皿的光路长为0.1 cm, 扫描速度200 nm/min, 在相同实验条件下测定空白缓冲溶液的CD光谱信号并从样品光谱图中扣除. 蛋白质 α -螺旋结构的相对含量根据208 nm处的平均摩尔椭圆率

($\text{MRE}(\text{deg cm}^2/\text{mol})$)值依下式计算^[8]:

$$\alpha\text{-螺旋结构的含量} = \frac{-\text{MRE}_{208} - 4000}{33000 - 4000} \times 100\%, \quad (1)$$

式中 MRE_{208} 为208 nm处MRE值; 4000为 β -折叠、无规卷曲构象在208 nm处的MRE值; 33000为单纯的 α -螺旋结构在208 nm处的MRE值^[9].

(iv) 分子对接. BSA的晶体结构来自于数据库Protein Data Bank(PDB), 本实验选择了蛋白编号为3v03的晶体结构数据^[10], 原始晶体结构数据经去水、加氢、加电荷等处理. 小分子三维结构由Sybyl 8.1软件构建, 并用最小能量法进行结构优化.

2 结果与讨论

2.1 荧光猝灭机制及猝灭常数

荧光光谱法是一种广泛用于生物大分子研究领域的技术^[11]. 荧光猝灭是指分子间相互作用如能量转移、激发态反应、形成基态复合物、分子重排及碰撞猝灭等会导致荧光物质荧光猝灭^[12]. 荧光猝灭的研究可以提供分子间相互作用的信息, 如猝灭常数、结合常数、猝灭机制、结合驱动力等^[13]. 本文通过荧光猝灭法研究了金属抗癌药物CuGP与牛血清白蛋白之间的相互作用. 图2(a)给出了pH 7.4时不同浓度CuGP与BSA相互作用的荧光猝灭光谱, 其中 $c(\text{BSA})=2.0 \times 10^{-6}$ mol/L; A~K代表CuGP浓度($\times 10^{-6}$ mol/L): 0, 0.5, 1.5, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0. 可以看出, 当激发波长为280 nm时, BSA在350 nm附近有1个强的荧光发射峰, 而CuGP在350 nm附近几乎没有荧光发射(线L), 表明CuGP不会对BSA的内源荧光产生干扰. 随着药物的不断加入, BSA的荧光强度逐渐降低, 其内源荧光产生了不同程度的猝灭, 表明CuGP能有效地与BSA相互作用. 此外, 随着铜配合物的加入及浓度增大, 其荧光强度降低, 但并未伴随最大发射波长的红移或蓝移, 表明BSA与CuGP的作用未使其发色团所处环境的极性发生变化^[14].

荧光猝灭过程通常可以分为动态猝灭、静态猝灭以及混合猝灭过程, 其过程均遵循Stern-Volmer方程^[15]:

$$F_0/F = (1 + K_D[Q])(1 + K_S[Q]), \quad (2)$$

式中, F_0 和 F 分别表示不存在和存在猝灭剂时荧光物质的荧光强度; $[Q]$ 为猝灭剂的浓度; K_D 与 K_S 分别是动态与静态猝灭常数.

一般情况下, 猝灭过程为单一猝灭过程, 即猝灭

图2 (a) CuGP对BSA的猝灭图谱对牛血清白蛋白荧光光谱的影响; (b) CuGP与BSA相互作用的Stern-Volmer关系图. 线L为CuGP的荧光光谱
Figure 2 (a) Effect of CuGP on fluorescence spectrum of BSA; (b) Stern-Volmer plot for the interaction of CuGP with BSA. Curve L shows the emission spectrum of CuGP only

过程的某一部分是可以忽略的, F_0/F 与 $[Q]$ 之间存在线性关系, 式(2)可以改写为典型的Stern-Volmer方程^[16]:

$$F_0/F = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q], \quad (3)$$

式中, K_{SV} 是Stern-Volmer猝灭常数, 在一定程度上可以反映荧光物质与猝灭剂之间相互作用的程度和猝灭作用的性质; k_q 表示生物大分子的猝灭速率常数; τ_0 表示不存在猝灭剂时生物大分子的平均荧光寿命, 生物大分子的荧光平均寿命为 10^{-8} s^[17].

采用式(3)对298 K温度条件下的荧光猝灭实验结果进行处理, 结果如图2(b)所示, 可以看到随着铜配物浓度的升高, 其Stern-Volmer图不是一条直线, 而是一条明显弯向Y轴的上升曲线, 说明该体系的猝灭过程很有可能是一种混合猝灭机制. 同时, 由于在低浓度条件下 F_0/F 与 $[Q]$ 线性较好, 按照式(3)对在CuGP浓度较低时不同温度条件下的荧光数据进行拟合, 计算不同温度下 K_{SV} , 如表1所示. K_{SV} 随着温度的升高而增大, 表明CuGP对BSA的荧光猝灭机理可能以动态猝灭为主; 然而, 生物大分子的碰撞猝灭常数一般不超过 2.0×10^{10} L/(mol s), CuGP/BSA猝灭体系

表1 不同温度下CuGP对BSA作用的Stern-Volmer猝灭常数及反应活化能(E_a)

Table 1 Stern-Volmer quenching constant of CuGP/BSA system and relative activation energy

$T(K)$	K_{SV} ($\times 10^5$ L/mol)	$k_q(\times 10^{12}$ L/(mol S))	R^a	SD ^b	$E_a(kJ/mol)$
298	3.33	3.33	0.992	0.04	
304	3.57	3.57	0.991	0.05	8.61
310	3.81	3.81	0.992	0.05	

a) R 为Stern-Volmer图的线性相关系数; b) SD为 K_{SV} 的标准偏差

的猝灭速率常数远大于这个数值, 这表明CuGP与BSA之间还很可能形成了复合物. Stern-Volmer方程拟合结果也表明CuGP对BSA直接的猝灭过程并非单一的猝灭机制.

为进一步证实CuGP与BSA相互作用的猝灭机制, 测定了室温条件下BSA, CuGP和BSA-CuGP的紫外-可见吸收光谱. 对于动态猝灭, 只涉及荧光分子的激发态, 因而猝灭剂对荧光物质的吸收光谱一般不产生影响; 而静态猝灭, 由于基态复合物的形成, 该过程一般会改变荧光物质的吸收光谱^[18]. 如图3所示, BSA的吸收光谱在加入CuGP前后发生了改变, 表明CuGP与BSA基态分子发生相互作用, 即形成了一定的复合物. 综合以上的荧光光谱、紫外差谱实验, 可以推断铜(II)配合物CuGP与BSA之间的相互作用为复杂的混合猝灭机制.

图3 CuGP对BSA相互作用的紫外吸收光谱. pH 7.4, $T=298$ K, 在PBS缓冲溶液中测得

Figure 3 UV absorption spectra of the BSA/CuGP system. pH 7.4, $T=298$ K, obtained in PBS buffer

对于CuGP与BSA之间的混合猝灭过程, 根据Stern-Volmer猝灭常数与温度的关系, 按照Arrhenius公式可以计算反应的 E_a :

$$\ln K_{SV} = -\frac{E_a}{RT} + \ln A, \quad (4)$$

式中, R 为摩尔气体常数, A 为频率因子. 以 $\ln K_{SV}$ 对 $1/T$ 作图(图4), 即可求出猝灭过程的 E_a (表1). CuGP与BSA作用的Arrhenius关系图具有良好的线性关系, 表明在实验温度范围内 E_a 几乎保持常数. 较小的 E_a 表明该猝灭过程易于进行.

2.2 相互作用的热力学参数和主要作用力

根据小分子与大分子配位方程, 荧光强度与猝灭剂的关系存在结合表达式^[19]:

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_b + n \lg [Q], \quad (5)$$

式中, K_b 与 n 分别是表观结合常数与结合位点数.

根据式(5), 以 $\lg[(F_0 - F)/F]$ 对 $\lg[Q]$ 作图, 依直线斜率和截距即可求出铜配物与BSA的 K_b 及 n , 结果列于表2. 结果显示, CuGP-BSA体系表观结合常数达到了 10^7 数量级, 进一步证实了CuGP与BSA之间稳定结合物的形成.

根据式(5)计算出CuGP-BSA体系表观结合常数, 再利用van't Hoff方程^[20], 可以计算反应的焓变 ΔH^θ 和熵变 ΔS^θ :

$$\ln K_b = -\Delta H^\theta / RT + \Delta S^\theta / R. \quad (6)$$

吉布斯自由能变(ΔG^θ)由下式计算:

$$\Delta G^\theta = \Delta H^\theta - T\Delta S^\theta = -RT \ln K_b. \quad (7)$$

如图4所示, 以 $\ln K_b$ 对 $1/T$ 作图, 由斜率和截距可以分别计算出 ΔH^θ 和 ΔS^θ , 进而可以得到不同温度下的 ΔG^θ , 计算结果列于表2. 从图5可以看出, $\ln K_b$ 与 $1/T$ 之间线性关系不好($R^2=0.905$), 表明在实验温度范围内, 反应的焓变发生了一定的变化, 这可能与二者之间混合猝灭类型的本质有关; 负的 ΔG^θ 值, 表明结合过程是自发的. 此外, ΔH^θ 小于0并且 ΔS^θ 大于0, 根

图4 CuGP与BSA作用的Arrhenius关系图. $c(\text{BSA}) = 2.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$
Figure 4 Arrhenius plot of CuGP-BSA system. $c(\text{BSA}) = 2.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$

据Ross理论^[21], 可以推测静电作用是CuGP与BSA的结合过程主要驱动力, 范德华作用对结合过程也起到一定的影响.

2.3 CuGP对BSA二级结构的影响

药物分子与蛋白质的相互作用可能会引起蛋白质构象发生变化, 而圆二色谱是分析蛋白质构象改变的常用方法之一^[22]. 为了考察铜配物对BSA二级结构的影响, 设计并测试了不同浓度铜配物与BSA作用的圆二色谱, 结果如图6所示, 其中 $c(\text{BSA}) = 2.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$, a~f: $c(\text{CuGP}) = 0, 1.0, 2.0, 4.0, 10.0, 20.0 \text{ mol/L}$. 随着铜配物的加入, BSA在208和222 nm处典型的二级结构负椭圆峰逐渐降低, 说明分子结构在加入铜配物后发生了变化. 利用SELCON 3.0程序对BSA二级结构进行定量计算, 结果表明随着CuGP的加入, 蛋白质 α -螺旋含量有所减少, 无归卷曲含量升高, 而且这种影响具有明显的浓度依赖关系; 在CuGP浓度为 $20 \mu\text{mol/L}$ 时, α -螺旋含量由58.3%下降到51.8%, 说明此时BSA的结构受到严重的破坏. CuGP对BSA结构的破坏作用可能与二者之间强的静电作用有关.

表2 CuGP与BSA作用的表现结合常数、结合位点数及热力学常数

Table 2 The apparent binding constant K_b , binding sites n and thermodynamic parameters of CuGP/BSA system at different temperatures

$T(\text{K})$	$K_b(\times 10^7 \text{ L/mol})$	n	R^a	SD^b	$\Delta H(\text{kJ/mol})$	$\Delta G(\text{kJ/mol})$	$\Delta S(\text{J/(mol K)})$
298	1.70	1.30	0.999	0.01		-41.25	
304	2.63	1.33	0.999	0.01	-39.89	-43.18	272.53
310	3.16	1.34	0.999	0.01		-44.51	

a) R , $\lg[(F_0 - F)/F] - \lg[Q]$ 图的线性相关系数; b) SD , K_b 的标准偏差

图5 CuGP与BSA相互作用的范特霍夫曲线

Figure 5 Van't Hoff plot for the interaction of CuGP and BSA

图6 CuGP与BSA作用的圆二色谱. BSA:CuBP为二者摩尔浓度比

Figure 6 CD spectra of the BSA/CuGP system. BSA:CuBP represents the ratio of molar concentration of BSA and CuBP

2.4 分子对接

采用Sybyl 8.1软件进行分子模拟实验, 研究

表3 BSA二级结构在不同浓度CuGP作用下的变化结果

Table 3 Change of secondary structures of BSA under the action of different concentration of CuGP

体系	α -螺旋	β -折叠	β -转角	无规卷曲
BSA	0.583	0.064	0.138	0.222
drug:BSA=0.5:1	0.580	0.064	0.140	0.222
drug:BSA=1:1	0.573	0.064	0.140	0.223
drug:BSA=2:1	0.559	0.069	0.146	0.230
drug:BSA=5:1	0.536	0.069	0.153	0.245
drug:BSA=10:1	0.518	0.083	0.167	0.251

CuGP与BSA的结合位点和作用模式. 分子对接结果显示, CuGP更倾向于结合在BSA的Site I位点, 即华法林位点, 在6 Å范围CuGP结合位点周围的氨基酸残基主要有15个, 分别为TYR156, LYS187, ARG194, ARG198, TRP213, LEU218, LYS284, HIS287, GLU291, PRO338, TYR340, MET445, PRO446, GLU449和TYR451, 其中带电荷的氨基酸残基(LYS, ARG, HIS, GLU)共有7个, 考虑到与CuGP较近的氨基酸对其结合贡献较大, 可以认为CuGP与周围的氨基酸残基存在较强的静电作用^[23], 这之前热力学参数的推断结果相符. 此外, CuGP配体上的芳香环与BSA主要荧光残基TRP213吲哚环之间距离为3.85 Å, 与TYR156, TYR340 和TYR451的距离也均小于5 Å, 表明CuGP与BSA结合会有效地引起TRP, TYR附近微环境的改变, 可能是发生荧光猝灭的机理.

3 结论

含铜金属配合物具有优异的抗肿瘤活性, 可以用作潜在的抗癌药物, 但目前其药理学和药代动力

图7 (a) CuGP与BSA的分子对接模拟; (b) CuGP周围0.6 nm范围内的氨基酸残基

Figure 7 (a) Molecular docking model of CuGP and BSA; (b) amino acid residues around CuGP within 0.6 nm

学的研究比较稀少. 本文采用光谱及分子模拟的方法研究了甘氨酸-水杨醛席夫碱和邻菲咯啉混合铜(II)配合物(CuGP)与BSA相互作用的热力学行为, 研究发现CuGP能有效猝灭BSA的内源荧光, 猝灭机制属于混合猝灭机制, 即猝灭过程中同时涉及复合物的形成和激发态分子之间的相互作用. CuGP与BSA的相互作用是一个吉布斯自由能降低的自发过程,

且二者之间的主要作用力为静电作用力. CuGP在BSA上的结合会使BSA的构象发生一定程度的破坏, 其有序的 α -螺旋结构含量降低, 无规卷曲含量上升. 分子模拟的结果表明CuGP在BSA上的结合位点为Site 1, 而且CuGP与BSA主要荧光基团TRP213较近. 研究结果为了了解铜配合物在体内的分布和代谢情况提供有意义的信息.

参考文献

- Muhammad N, Guo Z. Metal-based anticancer chemotherapeutic agents. *Curr Opin Chem Biol*, 2014, 19: 144–153
- Devereux M, Shea D O, Kellett A, et al. Synthesis, X-ray crystal structures and biomimetic and anticancer activities of novel copper(II) benzoate complexes incorporating 2-(4'-thiazolyl)benzimidazole (thiabenzazole), 2-(2-pyridyl)benzimidazole and 1,10-phenanthroline as chelating nitrogen donor ligands. *J Inorg Biochem*, 2007, 101: 881–892
- Santini C, Pellei M, Gandin V, et al. Advances in copper complexes as anticancer agents. *Chem Rev*, 2014, 114: 815–862
- Hu Y J, Liu Y, Pi Z B, et al. Interaction of cromolyn sodium with human serum albumin: A fluorescence quenching study. *Bioorg Med Chem*, 2005, 13: 6609–6614
- Ang W H, Daldini E, Juillerat-Jeanneret L, et al. Strategy to tether organometallic ruthenium-arene anticancer compounds to recombinant human serum albumin. *Inorg Chem*, 2007, 46: 9048–9050
- Dong J, Li L, Li L, et al. Synthesis, characterization, DNA-binding properties and DNA cleavage of a new ternary copper(II) complex with mixed-ligands of tridentate schiff base and 1,10-phenanthroline. *Chin J Chem*, 2011, 29: 259–266
- Spitzer R, Jain A N. Surflex-dock: Docking benchmarks and real-world application. *J Comput Aid Mol Des*, 2012, 26: 687–699
- Gao H, Lei L, Liu J, et al. The study on the interaction between human serum albumin and a new reagent with antitumour activity by spectrophotometric methods. *J Photochem Photobiol A*, 2004, 167: 213–221
- Uttam A, Chandrima J, Ravi K B, et al. Exploring the mechanism of fluorescence quenching in proteins induced by tetracycline. *J Phys Chem B*, 2011, 115: 6312–6320
- Majorek K A, Porebski P J, Dayal A, et al. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Mol Immunol*, 2012, 52: 174–182
- Tong J Q, Tian F F, Liu Y, et al. Comprehensive study of the adsorption of an acylhydrazone derivative by serum albumin: Unclassical static quenching. *RSC Adv*, 2014, 4: 59686–59696
- Du J, Hu M, Fan J, et al. Fluorescent chemodosimeters using “mild” chemical events for the detection of small anions and cations in biological and environmental media. *Chem Soc Rev*, 2012, 41: 4511–4535
- Bhogale A, Patel N, Sarpotdar P, et al. Systematic investigation on the interaction of bovine serum albumin with ZnO nanoparticles using fluorescence spectroscopy. *Colloid Surface B*, 2013, 102: 257–264
- Li J, Li J, Jiao Y, et al. Spectroscopic analysis and molecular modeling on the interaction of jatrorrhizine with human serum albumin (HSA). *Spectrochim Acta A*, 2014, 118: 48–54
- Ladinig M, Ramseier M, Wirz J. Photo-wolff rearrangement of 2-diazo-1,2-naphthoquinone: Stern-volmer analysis of the stepwise reaction pathway. *Photochem Photobiol*, 2015, 91: 678–683
- Xiao Q, Huang S, Qi Z D, et al. Conformation, thermodynamics and stoichiometry of hsa adsorbed to colloidal CdSe/ZnS quantum dots. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1784: 1020–1027
- Nishijima M, Pace T C S, Bohne C, et al. Highly enantiodifferentiating site of human serum albumin for mediating photocyclodimerization of 2-anthracenecarboxylate elucidated by site-specific inhibition/quenching with xenon. *J Photochem Photobiol A*, 2015, doi:10.1016/j.jphotochem.2015.12.019
- He W, Li Y, Xue C, et al. Effect of chinese medicine alpinetin on the structure of human serum albumin. *Bioorg Med Chem*, 2005, 13: 1837–1845
- Fan X Y, Zhang Y, Wang J, et al. Exploring the interaction between rotenone and human serum albumin. *J Chem Thermodyn*, 2014, 69: 186–192
- Li D W, He H, Lin B B, et al. Studies on the isolated mitochondrial damage induced by α -tocopheryl succinate and its interactions with human serum albumin. *RSC Adv*, 2014, 4: 3913–3919
- Ross P D, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: Forces contributing to stability. *Biochemistry*, 1981, 20: 3096–3102
- Sreerama N, Woody R W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of contin, selcon, and cddsrt methods with an expanded reference set. *Anal Biochem*, 2000, 287: 252–260
- Chi Z, Liu R. Phenotypic characterization of the binding of tetracycline to human serum albumin. *Biomacromolecules*, 2011, 12: 203–209

Thermodynamics of the interaction of copper(II) glycine-salicylic aldehyde schiff base-phenanthroline mixed complex with bovine serum albumin

DAI ChunMei¹, HE Huan², HU XiangKa¹, CHEN Xiang¹ & GUO QingLian³

¹ College of Pharmacy, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, China;

² College of Chemistry and Molecular Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China;

³ Department of Clinical Laboratory, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, China

Metal complexes are widely used in anti-tumor therapy research due to their excellent biological activities. Binding affinities of metal complexes and plasma protein determine the absorption, transport and metabolic processes and other pharmacokinetic parameters of metal complexes in the body. Copper metal complexes have been found to be a potential anti-cancer drug, but research about its pharmacology and pharmacokinetics is rare. Herein, the thermodynamics of the interaction of copper(II) glycine-salicylic aldehyde schiff base-phenanthroline complex (CuGP) with bovine serum albumin (BSA) was investigated using fluorescence, UV absorbance and circular dichroism (CD) spectroscopy, in addition to molecular modeling under physiological conditions. Fluorescence and UV absorbance spectrum analysis show that the quenching between the CuGP and BSA is a kind of mixed quenching mechanism, that is, the quenching is derived from both excited-state reactions and ground-state complex formation. Thermodynamic parameters of the interaction were calculated by analysis of fluorescence data. Binding of CuGP with BSA is a spontaneous process and the activation energy of quenching process is 8.61 kJ/mol. Electrostatic force played a predominant role in the binding process. The circular dichroism spectroscopy demonstrated that the secondary structure of BSA changed after its interaction with CuGP, causing the α -helix content to decrease with an increase in an unordered structure. Site marker competitive experiments and molecule modeling demonstrated that the binding of CuGP to BSA primarily took place in site I. The distances of CuGP with TRP213, TYR156, TYR340 and TYR451 are less than 5 Å and the microenvironment surrounding the fluorophore of BSA might be affected. This work will provide meaningful information to understand the distribution and metabolic situation of copper complexes in the body.

copper(II) complexes, bovine serum albumin, thermodynamic parameters, fluorescence spectroscopy, circular dichroism spectroscopy, molecular modeling

doi: 10.1360/N972016-00443