

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00808

环丙沙星和致病菌铁结合蛋白的相互作用

唐文兵¹, 仲维清^{1*}, 赵靖霞², 杨根金²

1. 第二军医大学药学院无机化学教研室, 上海 200433

2. 第二军医大学药学院分析测试中心, 上海 200433

[摘要] **目的:** 研究环丙沙星和致病菌铁结合蛋白之间的作用, 探索致病菌铁结合蛋白(FBP)是否为环丙沙星的靶分子。 **方法:** 以紫外-可见分光光度法和核磁共振法, 观察环丙沙星与从大肠杆菌表达出的淋病奈瑟双球菌的铁结合蛋白相互作用的结果。 **结果:** 在 10 mmol/L、pH 7.40 Tris-HCl 缓冲溶液中, 298 K 时, 环丙沙星与 Fe^{3+} 形成配合物而将 Fe^{3+} 从 holo-FBP 中脱去, 当环丙沙星过量 50 倍时, 可移去 holo-FBP 中一半量的 Fe^{3+} 。 **结论:** 环丙沙星能部分脱去 holo-FBP 中的 Fe^{3+} , 从而可干扰细菌对 Fe^{3+} 的获取, 进而可影响细菌的生长和致病能力。

[关键词] 环丙沙星; 铁结合蛋白; 抗菌机制; 紫外-可见分光光度法; 磁共振波谱学

[中图分类号] R 978.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)07-0808-04

Interaction between ciprofloxacin and ferric-ion binding protein from pathogenic bacteria

TANG Wen-bing¹, ZHONG Wei-qing^{1*}, ZHAO Jing-xia², YANG Gen-jin²

1. Department of Inorganic Chemistry, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Center of Analysis and Measurement, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the interaction between ciprofloxacin (CIP) and ferric-ion binding protein (FBP) from pathogenic bacteria, so as to determine whether FBP is the target of CIP. **Methods:** Reactions between ciprofloxacin and FBP from *N. gonorrhoeae*, which was expressed in *E. coli*, were monitored by UV-visible and NMR spectroscopy. **Results:** Fe^{3+} was removed from holo-FBP by CIP in 10 mmol/L Tris-Cl buffer, pH 7.40, at 298 K, and half of the loaded Fe^{3+} was taken off when 50 molar equivalence of CIP was present. **Conclusion:** CIP can remove Fe^{3+} from holo-FBP, indicating that CIP can interfere with the Fe^{3+} capture of the bacteria and influence the growth and virulence of the bacteria.

[KEY WORDS] ciprofloxacin; ferric-iron binding protein; antibacterial mechanism; UV-visible spectroscopy; magnetic resonance spectroscopy

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(7):808-811]

环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)是第三代喹诺酮类抗菌素,对革兰阴性菌有高度抗菌活性。它的作用机制是抑制细菌脱氧核糖核酸回旋酶^[1]。

铁是生物体必需的微量元素。人体血液中 Fe^{3+} 的浓度严格调控在约 10^{-18} mol/L,对于需铁的细菌来说,维持其生长的 Fe^{3+} 的最低浓度约为 $(10^{-7} \sim 10^{-5})$ mol/L,因此,细菌进化出有效地从宿主体内获取 Fe^{3+} 的机制。铁结合蛋白(ferric-ion binding protein, FBP)主要存在于在奈瑟淋病双球菌(*N. gonorrhoeae*)等革兰阴性菌中,是唯一在细菌细胞周质中负责传递 Fe^{3+} 的蛋白,与细菌从宿主体内获得

铁、细菌的生长、繁殖、致病能力密切相关。由于 FBP 对这些细菌的重要的作用,它或许可以成为某些抗菌药物的作用靶分子^[2]。本文研究了从大肠杆菌表达出奈瑟淋病双球菌中的 FBP 与 CIP 的相互作用,为探索 CIP 抗菌机制提供了新的线索,对用 FBP 作为探针设计和筛选金属配合物抗菌药物具有一定的指导意义。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器 盐酸、氢氧化钠、氯化钠、六水合三氯化铁(上海国药公司,分析纯),二甲亚砜(DM-

[收稿日期] 2008-10-24 **[接受日期]** 2009-02-10

[基金项目] 国家自然科学基金(20371050)和 The Wellcome Trust (UK) International Research Development Award(R36352). Supported by National Natural Science Foundation of China(20371050) and The Wellcome Trust (UK) International Research Development Award(R36352).

[作者简介] 唐文兵,硕士生。

* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-81871120, E-mail:wqzhong2002@sohu.com

SO-d₆)、D₂O (Cambridge Isotope Laboratories, Inc), 三羟甲基氨基甲烷(Tris, Sigma-Aldrich), 环丙沙星原料药(德宝生化公司, 南京), 实验用水为去离子水。

Z323K 型超速冷冻离心机(德国 Hermle 公司), YM-10 型超滤离心管(美国 Amicon 公司), 精密移液器(法国 Gilson 公司), EC-13 型超级恒温仪(Julabo 中国有限公司), 828 型台式 pH 计(美国 Orion 公司), p-4010 电感耦合等离子体发射光谱仪(日本日立公司), FA2104 型电子天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司), AVANCE II 600 核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司), Ultra Pure 凯弗隆纯水机(上海和泰仪器有限公司)。

1.2 铁结合蛋白溶液的制备 将 YM-10 型超滤离心管用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液浸泡 1 h, 用水冲洗干净备用。称取约 0.40 g 铁结合蛋白(holo-FBP)冻干粉(按文献^[3-4]方法从大肠杆菌中表达和纯化), 溶解于 10 mmol/L pH 7.4 Tris-HCl 缓冲溶液, 277 K 温度下用 YM-10 型超滤离心管在 Z323K 型超速冷冻离心机 2 000×g 离心(重复 7 次)以除去蛋白中的小分子杂质, 制成铁结合蛋白储备液。

1.3 紫外-可见光谱的测定 在 298K 温度下向 450 μl 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.40)中移入 50 μl holo-FBP 溶液, 以同体积的 Tris-HCl 缓冲液为参比, 在 Lambda25 型紫外-可见分光光度计上测蛋白 200~600 nm 的光谱, 根据其 280 nm 处的光密度值确定蛋白浓度 $[\epsilon_{280} = 48\ 900\ \text{L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})]$ ^[2]。

向测量池、参比池分别加入与蛋白等物质的量的 20 mmol/L 环丙沙星溶液, 待 30 min 反应平衡后, 测反应混合液的光谱。同法测得加入 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、30、40、50 倍量的 20 mmol/L 环丙沙星溶液后的反应混合液的光谱。

在 298 K 温度下向测量池加入 0.5 ml 10 μmol/L 环丙沙星溶液, 以同体积的去离子水为参比, 在 Lambda25 型紫外-可见分光光度计上测环丙沙星 200~800 nm 的光谱。向测量池、参比池分别加入与环丙沙星等物质的量的 20 mmol/L 氯化铁溶液, 待 10 min 反应平衡后, 测此时的光谱。再加入 1 倍量的 20 mmol/L 氯化铁溶液, 测其混合液的光谱。

1.4 核磁共振波谱的测定 取 2 ml 蛋白储备液, 在 277 K 温度下用 YM-10 型超滤离心管 2 000×g 离心至约 0.2 ml, 加入 1.8 ml 0.1 mol/L NaCl 溶液离心浓缩至 0.2 ml, 重复上述步骤 7 次以除去溶液中的 Tris, 制成 500 μl holo-FBP/NaCl 溶液。以同

体积的 NaCl 溶液为参比, 在 Lambda25 型紫外-可见分光光度计上测定蛋白的浓度 $[\epsilon_{280} = 48\ 900\ \text{L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})]$ 。

将 holo-FBP/NaCl 溶液转移到 NMR 样品管中, 同时加入 50 μl D₂O, 采用 5 mm PABBO 探针、扫场宽度 7 288 Hz、NS 128、AQ 2.25 s、TD 64 k、实验温度为 300 K, 在 Bruker 600 MHz 核磁共振仪上测其¹H NMR 谱。

向 holo-FBP 中加入 1 倍物质的量的环丙沙星, 并调 pH 值到 7.40, 相同方法测¹H NMR 谱。同法测得环丙沙星溶液(90/10 H₂O/D₂O, pH 7.40)的¹H NMR 谱。

将 0.038 64 g (0.1 mmol) 环丙沙星用 1 ml DMSO-d₆溶解并取 0.5 ml 到 NMR 样品管中, 采用 5 mm BBO 探头、扫场宽度 9 014 Hz、NS 16、AQ 2.73 s、TD 64 k、实验温度为 300 K, 在 Bruker 600 MHz 核磁共振仪上测其¹H NMR 谱。采用 5 mm BBO 探头、扫场宽度 45 454 Hz、NS 3 168、AQ 0.72 s、TD 64 k、实验温度为 300 K, 测其¹³C NMR 谱。然后加入 0.001 mmol FeCl₃·6H₂O, 采用相同方法测混合液的¹H NMR、¹³C NMR 谱, 继续加入 0.001 mmol FeCl₃·6H₂O, 测其¹H NMR、¹³C NMR 谱。

1.5 pH 值的测定 溶液的 pH 值在 828 型台式 pH 计测定, 仪器在使用前经 pH 7.00、10.01 标准液(Aldrich)校正, D₂O 对 pH 测定的影响未作校正。

1.6 铁结合蛋白中铁含量的测定 取 1 ml 浓度为 5.04 μmol/L holo-FBP 溶液, 在 p-4010 电感耦合等离子体发射光谱仪(复旦大学测试中心)测铁含量。

2 结果

在 298 K、10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.40)条件下, 向 holo-FBP 溶液中不断加入环丙沙星时, holo-FBP 在 481 nm 处的 LMCT(ligand-to-metal charge-transfer)特征吸收峰^[2,4]强度连续下降, 同时在约 445 nm 产生一个新吸收峰, 且其强度随环丙沙星的加入而上升(图 1)。当环丙沙星的浓度是 holo-FBP 的 50 倍时, 481 nm 处的吸收峰强度下降了约一半。

而在环丙沙星和铁结合蛋白反应的¹H NMR 图谱中[170 μmol/L holo-Fbp, 0.1 mol/L NaCl/D₂O (9/1), pH 7.40, 图 2], 环丙沙星 C5 上和 C8 上的质子峰的化学位移(分别为 8.19、7.84)分别向高场移动了 0.03 和向低场移动了 0.04。

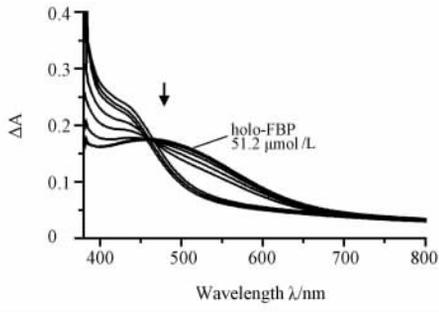


图1 环丙沙星与 holo-FBP 反应的紫外-可见光谱(差谱)

Fig 1 Plot of titration of holo-FBP with ciprofloxacin (difference of spectra)

From top to bottom: 51.2 μmol/L holo-FBP in 10 mmol/L Tris-HCl buffer, pH 7.40, and with the presence of 4, 8, 12, 16, 30, 40 and 50 equivalence of ciprofloxacin. The spectra were recorded after 30 min for equilibrium at 298 K

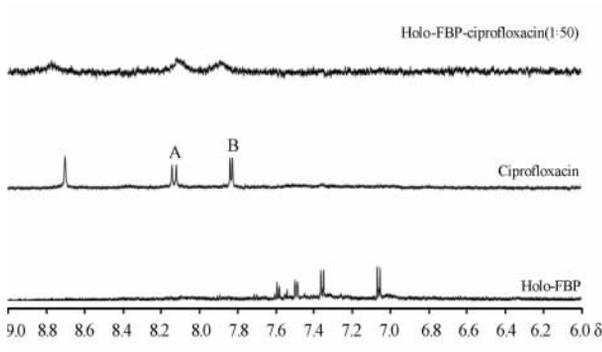


图2 铁结合蛋白和环丙沙星的¹H NMR 谱
Fig 2 ¹H NMR spectra of holo-FBP with and without ciprofloxacin

A and B refer to protons on C5 and C8, respectively. [holo-FBP]=170 μmol/L in 0.1 mol/L NaCl/D₂O(9/1), pH 7.40, 300 K

从环丙沙星和氯化铁的紫外-可见光谱可以看出,环丙沙星在 334 nm、323 nm 出现的双峰随着 FeCl₃ 的加入逐渐下降,而在 271 nm 的吸收峰的强度逐渐增加(图 3)。在环丙沙星和氯化铁的¹H NMR 图谱中(图 4),环丙沙星 C5 和 C8 上的质子峰上的化学位移(分别为 7.95、7.62),在加入 1% FeCl₃ 后,分别向高场移动了 0.10、0.09,继续加入加入 1% FeCl₃ 后,向高场又分别移动了 0.05、0.04。但在环丙沙星和氯化铁的¹³C NMR 谱中(图略),环丙沙星 C5、C8 的化学位移(分别为 111.23、106.86),在加入 1% FeCl₃ 后分别向低场移动了 0.79、0.54,继续加入 1% FeCl₃ 后,分别向高场又移动了 0.10、0.05。

3 讨论

在环丙沙星的结构中存在 1 个羧酸基、1 个羰基

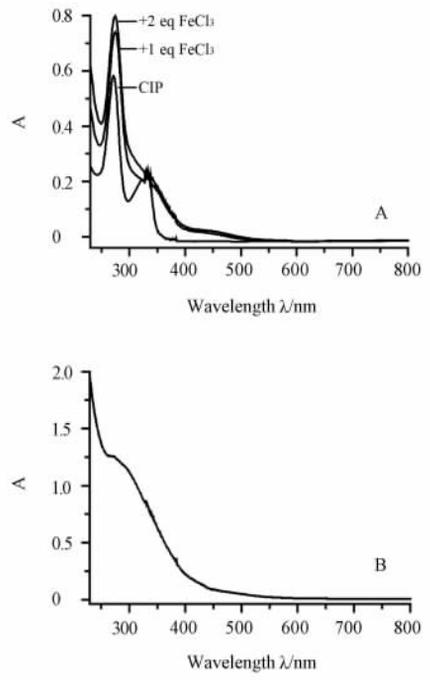


图3 环丙沙星(A)和氯化铁(B)的紫外-可见光谱

Fig 3 UV-visible spectra of ciprofloxacin(A) and ferric chloride(B)

A: UV-visible spectra of ciprofloxacin after addition of ferric chloride (1:1, 2:1) at 298 K. B: UV-spectrum of ferric chloride at 298 K. [CIP]=10 μmol/L in water

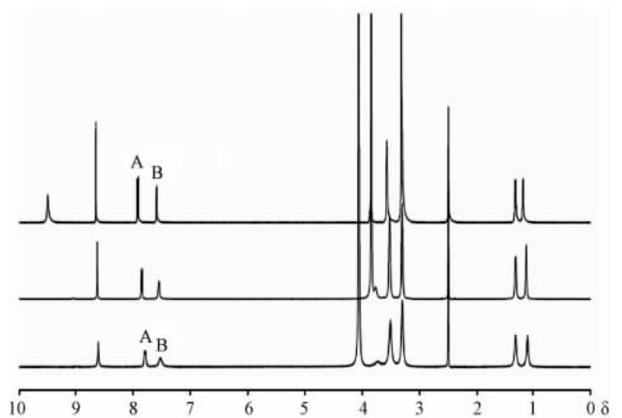


图4 环丙沙星和氯化铁的¹H NMR 谱

Fig 4 ¹H NMR spectra of ciprofloxacin with and without ferric chloride

From the top to bottom: ciprofloxacin, after addition of 0.01 and 0.02 equivalence of ferric chloride. A and B refer to protons on C5 and C8, respectively. [CIP]=100 μmol/L in DMSO-d₆, 300 K

氧和 1 个哌嗪 NH, 它们都可能成为金属配合物的配体。在配合物[Fe(CIP)(NTA)]·3.5H₂O 中, Fe³⁺ 为六配位的变形八面体结构, 其中 NTA 为四齿配体, 而环丙沙星分别用 C3-羧酸根和 C4-羰基氧与 Fe³⁺ 配位^[5]。环丙沙星与不同比例的 Fe(ClO₄)₃ 反应可获得 Fe : CIP = 1 : 1~1 : 4 多种组成比的配合物^[6], 同

样,1:1、2:1的环丙沙星分别与 FeCl_3 反应可获得 $\text{CIP}:\text{Fe}=1:1$ 、 $2:1$ 的配合物^[7]。Urbaniak等^[8]用毛细管区带电泳的方法测得pH 3.25条件下环丙沙星和 Fe^{3+} 的结合常数 $\lg K$ 为 (14.117 ± 0.223) , Eldin等^[9]用顺序注射停留分光光度法测得在 Fe^{3+} 浓度为 0.20 mol/L 时,在 $5.00 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 硫酸溶液中环丙沙星和 Fe^{3+} 的结合比为 $2:1$,结合常数 $\lg K$ 为 (7.756 ± 0.121) 。虽然这些实验结果显示环丙沙星和 Fe^{3+} 的结合情况在不同的条件下差别很大,但是它们都说明环丙沙星和 Fe^{3+} 具有一定的结合能力。在环丙沙星和 FeCl_3 的紫外可见光谱中(图3),由于和 Fe^{3+} 形成配合物,环丙沙星在323 nm和334 nm的吸收峰强度下降,同时270 nm处的吸收峰强度增加。而 FeCl_3 在423 nm的肩峰红移到445 nm。而在环丙沙星和 FeCl_3 反应产物的¹H NMR、¹³C NMR图谱中,环丙沙星上的C5和C8的¹³C的化学位移分别向低场移动,同时与其相连的¹H的化学位移分别向高场移动(图4),也说明环丙沙星可通过C3-羧酸根和C4-羰基和 Fe^{3+} 配位。

铁结合蛋白是致病菌获取 Fe^{3+} 的重要系统,它是一种单链蛋白,其氨基酸序列及结构具有高度同一性。从奈瑟氏淋病双球菌中获得的FBP的相对分子质量约为34 000,每个分子能结合1个 Fe^{3+} 离子,其中2个酪氨酸(Tyr195和Tyr196)、1个组氨酸(His9)和1个谷氨酸(Glu57)与 Fe^{3+} 配位,另有1个配体水分子和1个磷酸根离子作为协同配阴离子^[10]。

当向holo-FBP中加入环丙沙星时,holo-FBP中 Fe^{3+} -蛋白的电荷迁移吸收峰的强度逐渐下降,说明holo-FBP中的 Fe^{3+} 的含量减少(ICP-AES测定结果显示,在holo-FBP中铁和蛋白的摩尔比约为 $0.76:1$),其原因是环丙沙星和 Fe^{3+} 结合形成配合物,从而将 Fe^{3+} 从蛋白中移出。并且当环丙沙星过量50倍时,吸收峰的强度下降了约50%。 Fe^{3+} 与FBP的结合常数约为 $2.4 \times 10^{18} \text{ L/mol}$ (0.35 mmol/L 磷酸根条件下,pH 6.5,298 K)^[11],从实验结果可知, Fe^{3+} 与环丙沙星的结合能力小于 Fe^{3+} 与FBP的结合能力。

环丙沙星和holo-FBP反应产物的¹H NMR谱,与环丙沙星和 FeCl_3 反应产物的¹H NMR谱相似,环丙沙星C5和C8上H的化学位移分别向高场、低场移动,也说明环丙沙星与FBP中 Fe^{3+} 形成配合物,

并将 Fe^{3+} 从蛋白中移出。

由于环丙沙星能部分脱去holo-FBP中的 Fe^{3+} ,从而干扰细菌对 Fe^{3+} 的吸收,进而影响细菌的生长和致病能力,这为探索环丙沙星抗菌机制提供了新的线索,对用铁结合蛋白作为探针设计和筛选金属配合物抗菌药物具有一定的指导意义。

[参考文献]

- [1] 杨宝峰. 药理学[M]. 6版. 北京:人民卫生出版社,2003:430.
- [2] Guo M L, Harvey I, Yang W P, Coghil L, Campopiano D J, Parkinson J A, et al. Synergistic anion and metal binding to the ferric ion-binding protein from *Neisseria gonorrhoeae* [J]. J Biol Chem, 2003, 278: 2490-2502.
- [3] Zhong W, Alexeev D, Harvey I, Guo M, Hunter D J B, Zhu H, et al. Assembly of an oxo-zirconium(IV) cluster in a protein cleft[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2004, 43: 5914-5918.
- [4] Alexeev D, Zhu H, Guo M, Zhong W, Hunter D J B, Yang W, et al. A novel protein mineral interface[J]. Nat Struct Biol, 2003, 10: 297-302.
- [5] Wallis S C, Gahanl R, Charles B G, Hambley T W. Synthesis and X-ray structural characterization of an iron(III) complex of the fluoroquinolone antimicrobial ciprofloxacin, [Fe(CIP)(NTA)] · 3.5 H₂O(NTA = nitrilotriacetato)[J]. Polyhedron, 1995, 14: 2835-2840.
- [6] Al-Mustafa J, Tashtoush B. Iron(II) and iron(III) perchlorate complexes of ciprofloxacin and norfloxacin[J]. J Coord Chem, 2003, 56: 113-124.
- [7] Obaleye J A, Akinremi C A, Balogun E A, Adebayo J O. Toxicological studies and antimicrobial properties of some iron(III) complexes of ciprofloxacin [J]. African J Biotechnol, 2007, 6: 2826-2832.
- [8] Urbaniak B, Mrestani Y, Kokot Z J, Neubert R H H. Investigation of interaction of fluoroquinolones with aluminum, iron and magnesium ions using capillary zone electrophoresis[J]. Chromatographia, 2007, 65: 489-492.
- [9] Suliman F E O, Sultan S M. Sequential injection technique employed for stoichiometric studies, optimization and quantitative determination of some fluoroquinolone antibiotics complexed with iron(III) in sulfuric acid media[J]. Talanta, 1996, 43: 559-568.
- [10] Bruns C M, Nowalk A J, Arvai A S, McTigue M A, Vvughan K G, Mietzner T A, et al. Structure of *Haemophilus influenzae* Fe^{3+} -binding protein reveals convergent evolution within a superfamily[J]. Nat Struct Biol, 1997, 4: 919-924.
- [11] Taboy C H, Vaughan K G, Mietzner T A, Aisen P, Crumbliss A L. Fe^{3+} coordination and redox properties of a bacterial transferrin[J]. J Biol Chem, 2001, 276: 2719-2724.

[本文编辑] 尹 茶