

表儿茶素没食子酸酯影响 5-氟尿嘧啶与 人血清白蛋白结合的热力学研究^①

苑立霞¹ 刘敏^{1,2}

(1.聊城大学 化学化工学院,山东 聊城 252059;2.聊城大学 生物制药研究院,山东 聊城 252059)

摘要 目的:联合用药有利于增强抗癌药物的疗效,降低毒副作用. 茶成分影响 5-氟尿嘧啶(FU)与人血清白蛋白(HSA)结合的热力学值得研究. 方法:本文利用等温滴定量热结合荧光光谱、动态光散射、圆二色光谱研究了不同温度和 pH 下 FU 与 HSA 的结合情况以及表儿茶素没食子酸酯(ECG)对二者结合情况的影响. 结果:拟合数据后得到结合位点数 n 、结合常数 K_a 、焓变 ΔH° 、熵变 ΔS° 和吉布斯自由能变 ΔG° 等热力学参数,结果表明 FU 与 HSA 之间的作用力为疏水、氢键和范德华力,ECG 能够抑制 FU 与 HSA 的结合增加 FU 的游离浓度从而提高疗效. 圆二色光谱数据表明 HSA 的二级结构发生轻微改变. 结论:本研究能够为探明茶成分增强 FU 治疗癌症临床疗效的机制提供帮助,同时也为 ECG 和 FU 的联合用药提供指导.

关键词 联合用药;5-氟尿嘧啶;人血清白蛋白;表儿茶素没食子酸酯;等温滴定量热;光谱

中图分类号 R73-34

文献标识码 A

目前癌症已成为威胁人类健康的头号杀手,而癌症治疗多采用综合手段. 除了手术、放射治疗、免疫治疗及中药治疗以外,化学治疗因强调全身治疗,对已扩散、转移的晚期癌症亦具有治疗作用而日益受到重视. 然而,抗肿瘤药物的毒副作用及耐药性是肿瘤化疗的严重问题,很多药物因其毒副作用太强而在用药剂量上受到限制. 5-氟尿嘧啶(FU,图 1A)是化学法治疗癌症过程中广泛使用的一种嘧啶类抗代谢药物^[1],其在治疗癌症过程中同样存在毒副作用大及耐药性的问题. 为达到增加疗效、降低毒副作用、延缓耐药性发生的目的,联合用药已成为临床上癌症治疗的首要策略^[2].

茶是目前世界上 2/3 的人群选择消费的一种饮料,其可被分为三种:绿茶、红茶和乌龙茶^[3]. 已有研究表明绿茶提取物儿茶素与多种抗癌药物可协同增强细胞凋亡、基因表达和抗癌疗效^[4]. 表儿茶素没食子酸酯(ECG,图 1B)是绿茶中的一种主要成分,能够预防和治

疗癌症、心血管疾病、神经性疾病和糖尿病等疾病^[5]. 众所周知,只有游离药物才能够通过被动扩散到达靶标发挥生物活性^[6],而药物的游离浓度则取决于与蛋白质的结合程度. 人血清白蛋白(HSA)是血浆中最丰富的蛋白质,占总蛋白的近 60%^[7]. 晶体结构表明 HSA 由 585 个氨基酸组成,包括三个结构上相似的域(I-III),每个域又可分成两个亚域(A 和 B)^[8]. 因此,研究药物与 HSA 的相互作用有利于了解药物在体内发挥疗效的机理,为提高药物的抗癌活

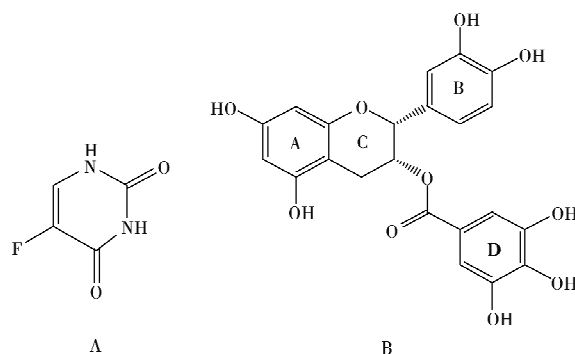


图 1 FU(A)和 ECG(B)的结构式

① 收稿日期:2018-02-02

基金项目:国家自然科学基金项目(21473085);山东省重点研发计划项目(2015GSF118160)资助

通讯作者:刘敏,女,汉族,博士,教授,研究方向:小分子与生物大分子相互作用、药物包合技术与缓控释等,E-mail:liumin2@lcu.edu.cn.

性、降低毒副作用提供理论依据。

目前已有诸多联合药物与蛋白质相互作用的报导. Kameníková^[9]等运用光谱学方法结合分子模拟研究槲皮素对治疗糖尿病药物格列齐特与 HSA 相互作用的影响,得出槲皮素的存在导致格列齐特的游离浓度明显增大,药效随之明显增强. Jing^[10]等利用光谱学方法得出槲皮素以及芦丁的存在使得抗精神病药物氟非那嗪与 HSA 的结合减弱,游离浓度增加进而提高疗效. 然而,关于 ECG 影响 FU 与 HSA 结合情况的研究至今未见报道. 本文主要利用等温滴定量热结合荧光光谱法、动态光散射和圆二色光谱研究在不同温度和 pH(6.0,7.4,9.0)下 ECG 对 FU 与 HSA 结合情况的影响. 所得结论将阐明儿茶素-抗癌药物协同体系与蛋白质之间的相互作用关系,为癌症的联合用药提供理论依据.

1 实验部分

1.1 实验仪器

荧光分光光度计 (F-4600 型,日立,日本);恒温槽 (XT5205-R10-D31, XutempTempTech 有限公司,杭州,中国,精密度 $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$);等温滴定量热仪 (ITC₂₀₀, Microcal, GE Healthcare);动态光散射仪 (Zetasizer Nano ZS, 马尔文,英国);圆二色光谱仪 (J-810, 东京,日本).

1.2 实验试剂

人血清白蛋白(HSA,第五组份,不含脂肪酸,分子量为 66 500 Da)购自美国 Sigma 公司. FU(质量分数 $\geq 98\%$), ECG(质量分数 $\geq 99\%$), NaH_2PO_4 (质量分数 $\geq 99\%$)和 Na_2HPO_4 (质量分数 $\geq 99\%$)均购自中国北京的百灵威公司. 整个实验中均使用 Milli-Q 水净化系统中获得的去离子水制备溶液. 母液使用不同 pH(6.0, 7.4 和 9.0)的磷酸盐缓冲溶液(50 mM)来制备,所有溶液避光储存在 4°C 的冰箱中.

1.3 实验步骤

1.3.1 荧光光谱法. ECG 存在下的 FU+(ECG+HSA)三元体系中, HSA 固定浓度为 $4\ \mu\text{M}$, ECG 与 HSA 的摩尔比为 1:1, FU 的浓度为 $0\text{--}720\ \mu\text{M}$. 激发波长为 295 nm, 激发与发射狭缝宽度均为 5 nm, 电压 700 V, 记录波长范围为 305-400 nm.

1.3.2 等温滴定量热法. 样品池中放置的是浓度为 $100\ \mu\text{M}$ 的 HSA 溶液, 参比池中放置的去离子水. 注射器中放置的是 15 mM 的 FU 溶液. 达到热平衡后, 每次将 $2\ \mu\text{L}$ 的 FU(初始体积为 $0.4\ \mu\text{L}$)滴加到样品池中, 总共 20 次, 间隔 150 秒. 系统补偿功率设定为 $5\ \mu\text{cal}\cdot\text{s}^{-1}$, 搅拌速度为 750 rpm. 测量 298.2 K(pH 6.0, 7.4 和 9.0)以及 310.2 K(pH 7.4)下 FU 与 HSA 的结合热量. 通过缓冲溶液滴蛋白和 FU 溶液滴缓冲扣除 HSA 和药物稀释热带来的影响. 相对二元体系,三元体系测量时样品池中放置的为 HSA 和 ECG($100\ \mu\text{M}$)的混合溶液,其它则与二元体系一致. 所有数据都通过自带的 MicroCal Origin 软件进行分析和绘制.

1.3.3 动态光散射法. HSA 溶液的浓度固定为 $15\ \mu\text{M}$, FU 与 HSA 的摩尔比为 50:1. ECG 存在下的 FU+(ECG+HSA)三元体系中, ECG 与 HSA 的摩尔比为 2:1, 相同摩尔比的 FU 加入到含有 HSA 与 ECG 的混合溶液中测量粒径. 测量前所有溶液皆通过 $0.22\ \mu\text{m}$ 的水系过滤头(Millipore 公司, 美国)进行过滤, 测量条件为不同温度(298.2 和 310.2 K)和 pH(6.0, 7.4, 9.0).

1.3.4 圆二色光谱法. 实验过程中, HSA 溶液的浓度为 $2\ \mu\text{M}$, 在 FU+HSA 二元体系以及 FU+(ECG+HSA)三元体系中 FU 与 HSA 的摩尔比都为 50:1, 三元体系中 ECG 与 HSA 的摩尔比为 2:1. 扫描过程中光源受氮气保护, 光谱记录范围 195-250 nm, 扫速 $200\ \text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$, 两次扫描求平均值.

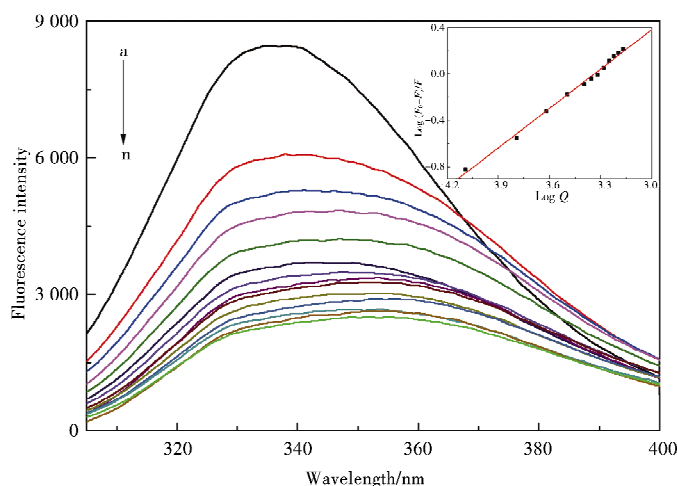


图2 pH 7.4, 298.2 K 下 FU 与 HSA 在 ECG 存在下的荧光光谱图, 插图为对应的线性拟合曲线

(a: HSA; b: HSA+ECG; c→n: FU+(HSA+ECG), FU 与 HSA 的摩尔比分别为 20, 40, 60, 80, 100, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180)

三元体系中 ECG 与 HSA 的摩尔比为 2:1. 扫描过程中光源受氮气保护, 光谱记录范围 195-250 nm, 扫速 $200\ \text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$, 两次扫描求平均值.

2 结果与讨论

2.1 荧光光谱法

图 2 为 ECG 存在下 FU 与 HSA 在 298.2 K 下相互作用的荧光光谱图. 由图可以看出, HSA 在 335 nm 处有一强峰, 该峰为色氨酸的特征峰, 加入 ECG 后 HSA 的荧光强度降低, FU 的继续加入导致 HSA 的荧光强度进一步降低, 这表明 FU 继续与 HSA 结合.

在 FU+(ECG+HSA)三元体系中, 假定荧光强度正比于 HSA 的游离浓度, 则结合常数 K_a 与结合位点数 n 可利用非线性最小二乘回归使 $\sum (F_{\text{exp}} - F_{\text{calc}})^2$ 最小得到, 其中 F_{exp} 与 F_{calc} 分别为测量和计算所得荧光强度, 详细的计算过程见文献^[11]. 所得到的结合常数与结合位点数列于表 1 中. 由表 1 可见, FU 在 ECG 存在下与 HSA 的结合常数和结合位点数都减小, 这说明 ECG 的存在抑制了 FU 与 HSA 的结合, 可以增加 FU 在血浆中的游离浓度进而提高疗效.

表 1 ECG 存在下 FU 与 HSA 结合的结合常数和结合位点数

T (K)	K_a (10^4M^{-1})		n		R^2	
	298.2	310.2	298.2	310.2	298.2	310.2
FU+HSA ^a	2.99 ± 0.05	5.19 ± 0.08	1.37 ± 0.03	1.44 ± 0.03	0.996 6	0.983 3
FU+(ECG+HSA)	0.47 ± 0.01	2.82 ± 0.05	1.10 ± 0.02	1.33 ± 0.02	0.993 7	0.996 9

注: a 来自文献^[11].

2.2 等温滴定量热法

等温滴定量热是一种非常灵敏的检测方法, 可以从单个的实验中直接获得结合过程中的热力学参数^[12]. FU+HSA 二元体系与 FU+(ECG+HSA)三元体系在 pH 6.0、298.2 K 下的滴定示意图见图 3, 图的上部分代表 FU 每次滴加到 HSA 或 ECG+HSA 溶液中产生的热量, 下部分表示滴定过程中产生的热量对摩尔比作图得到的拟合曲线. 拟合过程中选用两类位点模型, 拟合曲线与实验数据的高度吻合表明模型选用合适.

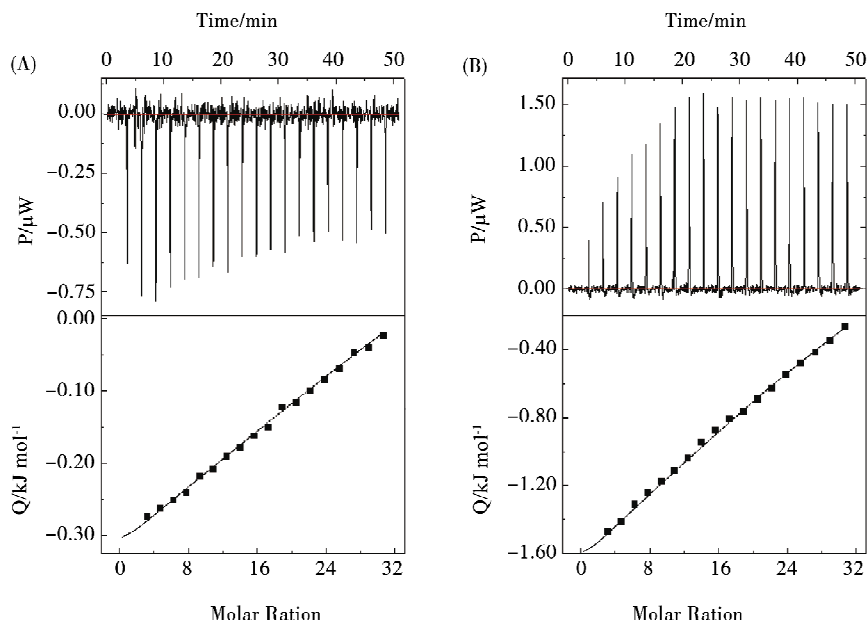


图 3 (A) pH 6.0、298.2 K 下 FU 与 HSA 作用的滴定图, (B) ECG 存在下 FU 与 HSA 作用的滴定图

所得到的结合位点数、结合常数、焓变及熵变等热力学参数列于表 2 中. 从表中可以得到以下结论:

(1) 等温滴定量热实验拟合得到 FU 在 HSA 上有两类结合位点, 与荧光光谱法所得一类位点不同. 这主要是由于荧光只测量色氨酸附近的荧光变化, 等温滴定量热则测量结合过程中所有热量变化.

(2) $\Delta G^\circ < 0$, 表明 FU 与 HSA 之间的结合是自发的. 第一类位点上焓变和熵变均为正值, 表明该位点上的结合是熵驱动疏水作用力为主的过程. 而在第二类位点上, 负的焓变和熵变则表明该位点是焓驱动氢键和范德华力为主的结合过程.

(3) K_{a1} 和 K_{a2} 随 pH 的变化均为 $\text{pH } 7.4 > \text{pH } 6.0 > \text{pH } 9.0$, 这说明在 $\text{pH } 7.4$ 下 FU 与 HSA 之间的结合最强, 而在 $\text{pH } 9.0$ 则最弱, 这应该与 FU 的 $\text{p}K_a$ 最接近 7.4 有关^[13]. FU 与蛋白的结合程度不同会导致 FU 的游离浓度变化, FU+HSA 二元体系与 FU+(ECG+HSA) 三元体系中 FU 在不同 pH 下的游离浓度示于图 4 中. 由图 4 可见, FU 的游离浓度随 pH 的变化为 $\text{pH } 9.0 > \text{pH } 6.0 > \text{pH } 7.4$, 表明 $\text{pH } 7.4$ 下的较强结合会导致药物的游离浓度减小. 同时升温后 K_{a1} 和 K_{a2} 的值都增大, 这表明结合作用力随温度的升高而增强, 升温对 FU 与 HSA 之间的结合是有利的.

(4) ECG 的存在导致 FU 与 HSA 结合过程中的 n 和 K_a 值都减小, 且三元体系的游离浓度较二元体系增大, 这是由于 ECG 的存在抑制了 FU 与 HSA 的结合, 进而增加游离浓度. 同时, 三元体系的游离浓度随 pH 的变化为 $\text{pH } 9.0 > \text{pH } 6.0 > \text{pH } 7.4$, 与二元体系一致.

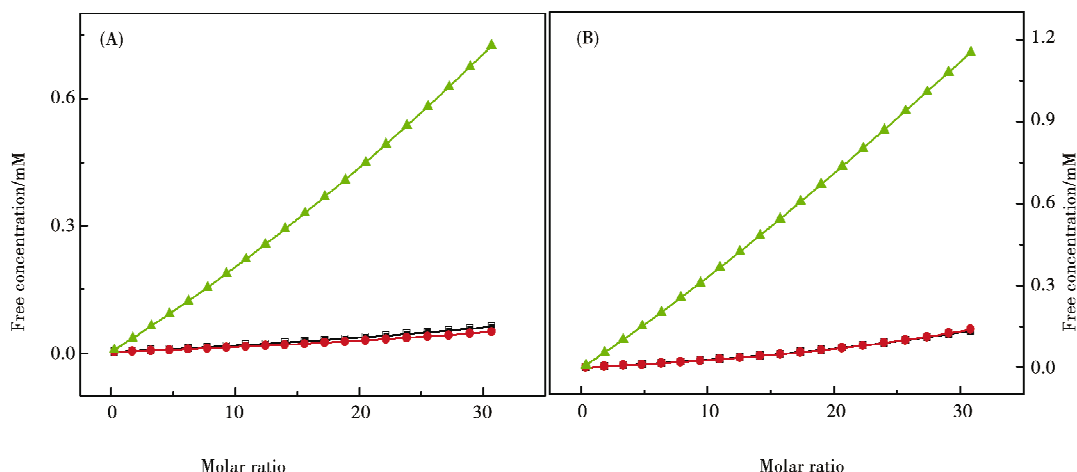


图 4 298.2 K 不同 pH 下 FU 在 (A) 二元体系和 (B) 三元体系的游离浓度(▲pH 9.0, ■pH 6.0, ●pH 7.4)

表 2 不同温度和 pH 下 FU+HSA 与 FU+(ECG+HSA) 体系的热力学常数

T(K)	FU+HSA				FU+(ECG+HSA)			
	298.2	298.2	310.2	310.2	298.2	298.2	310.2	310.2
pH	6.0	7.4 ^a	9.0	7.4 ^a	6.0	7.4	9.0	7.4
n_1	67.2±1.4	65.9±1.1	61.2±1.1	85.4±1.4	45.6±0.4	40.2±0.5	51.4±0.6	50.1±1.2
n_2	29.2±0.5	23.0±0.4	17.6±0.1	22.1±0.4	19.3±0.3	18.0±0.2	12.3±0.2	16.2±0.3
K_{a1} (10^3 M^{-1})	7.42±0.15	10.50±0.16	0.42±0.02	23.40±0.36	5.65±0.10	6.64±0.18	0.22±0.01	9.25±0.21
K_{a2} (10^3 M^{-1})	7.92±0.17	11.50±0.18	1.08±0.03	29.00±0.44	6.82±0.15	8.25±0.12	0.92±0.02	11.50±0.22
ΔH_1^\ddagger ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	10.32±0.17	10.47±0.17	5.25±0.08	8.57±0.13	10.71±0.25	11.53±0.11	5.36±0.19	8.94±0.16
ΔH_2^\ddagger ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	-23.22±0.12	-31.18±0.48	-21.92±0.34	-34.95±0.54	-25.80±0.30	-25.35±0.29	-22.23±0.24	-27.89±0.22
$T \Delta S_1^\ddagger$ ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	32.41±0.22	33.42±0.21	20.24±0.20	34.51±0.17	32.13±0.29	31.35±0.18	18.74±0.30	31.57±0.22
$T \Delta S_2^\ddagger$ ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	-0.97±0.17	-8.00±0.52	-4.61±0.41	-8.45±0.58	-3.92±0.35	-3.00±0.33	-5.31±0.29	-4.71±0.27
ΔG_1^\ddagger ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	-22.09±0.05	-22.95±0.04	-14.99±0.12	-25.94±0.04	-21.42±0.04	-21.82±0.07	-13.38±0.11	-22.63±0.06
ΔG_2^\ddagger ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	-22.25±0.05	-23.18±0.04	-17.31±0.07	-26.50±0.04	-21.88±0.05	-22.35±0.04	-16.92±0.05	-23.18±0.05

注: a 引用文献[14].

2.3 ECG 存在下 FU 与 HSA 结合的粒径变化

动态光散射可以得到颗粒物的粒径大小、分布等信息^[15]. HSA 的水力学直径分布见图 5, 由图中可以看出, HSA 的尺寸受 pH 和温度的影响, 但二者的影响都较小. 所得到的水力学直径数值列于表 3 中, 由表可见, HSA 的粒径随 pH 的变化趋势为 $\text{pH } 9.0 > \text{pH } 6.0 > \text{pH } 7.4$, 这是由于 HSA 在 $\text{pH } 7.4$ 时最紧凑, 呈现心形结构, 而在 $\text{pH } 9.0$ 时构型由 N 转换为 B, 变为椭圆形结构, 尺寸明显增大. 升温后尺寸也随之减小. 同时, 与 FU 作用后 HSA 的尺寸增大, 这是由于 FU 进入蛋白空腔, 使蛋白趋于展开. 而 ECG 的存在导致尺寸进一步增大, 这说明 ECG 抑制了 FU 与 HSA 之间的相互作用, 使得 FU 以弱结合的形式结合到蛋白表面, 尺寸增大.

表 3 不同温度和 pH 下 FU+HSA 与 FU+ (ECG+HSA) 体系的水力学直径

T(K)	298.2			310.2		
pH	6.0	7.4	9.0	6.0	7.4	9.0
HSA	8.394±0.017	8.360±0.014	9.116±0.138	8.224±0.024	8.173±0.013	8.336±0.056
FU (50)+HSA	8.423±0.022			8.385±0.012		
FU (50) [ECG(2) IISA]	10.98±0.17			9.88±0.15		

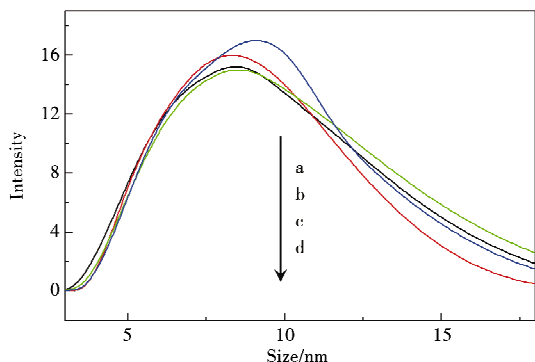


图 5 HSA 在不同温度和 pH 下的水力学直径 (黑线 c, pH 7.4, 298.2 K, 红线 b, pH 7.4, 310.2 K, 绿线 d, pH 6.0, 298.2 K, 蓝线 a, pH 9.0, 298.2 K)

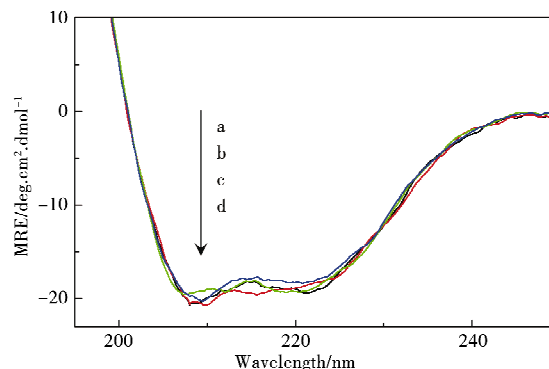


图 6 HSA 的圆二色光谱 (黑线 d, FU+HSA (摩尔比 50:1, 红线 c, 15:1, 绿线 a), FU+(ECG+HSA) (摩尔比 150:2:1, 蓝线 b))

2.4 ECG 存在下 FU 与 HSA 结合的构型变化

圆二色光谱是生物化学和结构生物学中测量二级结构的重要手段。HSA 的圆二色光谱图见图 6, 由图可见, HSA 在 208 和 222 nm 处有两个负峰, 这是 α -螺旋的特征峰, 分别由 $\pi \rightarrow \pi^*$ 和 $n \rightarrow \pi^*$ 引起。药物的加入导致峰的强度降低, 但形状不变, 这表明 α -螺旋仍然是 HSA 的主要结构。 α -螺旋含量可通过以下公式获得^[16]

$$\text{MRE} = \frac{\text{observed CD}}{C_p \times n \times l \times 10}, \alpha \text{ helix}(\%) = \frac{(-\text{MRE}_{208} - 4\ 000)}{33\ 000 - 4\ 000} \times 100,$$

式中 MRE, C_p , n 和 l 分别代表平均残基椭圆率, 蛋白浓度, 氨基酸残基数 (585), 路径长度 (0.1 cm)。计算得到的数值列于表 4 中, 由表可得, HSA 的 α -螺旋含量在 pH 7.4 条件下最大, 这表明 HSA 在 pH 7.4 时最紧凑, 与动态光散射一致。加入 FU 后, α -螺旋数降低, 蛋白趋于展开。而 ECG 的存在则导致 α -螺旋数较单个 FU 存在时的大, 这进一步证明 ECG 的存在抑制了 FU 与 HSA 的结合。

表 4 不同 pH 下 HSA, FU+HSA 及 FU+(ECG+HSA) 体系中 HSA 的 α -螺旋含量

pH	摩尔比 (药物:HSA)		α -螺旋/%		
			6.0	7.4	9.0
HSA	0		46.2±0.2	48.1±0.3	47.6±0.1
FU IISA	50		45.8±0.1	47.4±0.2	46.0±0.2
	150		43.9±0.2	43.3±0.5	44.1±0.3
FU [ECG (2) IISA]	150		44.6±0.3	44.7±0.4	44.9±0.2

3 结论

本文通过等温滴定量热结合荧光光谱、动态光散射和圆二色光谱研究了 ECG 对 FU 与 HSA 在不同温度和 pH 下结合情况的影响, 通过分析结合常数、结合位点数、焓变和熵变等一系列热力学参数得出 ECG 能够抑制 FU 与 HSA 的结合, 降低亲和力进而增加 FU 游离浓度、提高疗效。同时, HSA 的二级结构在与 FU 结合后发生了轻微的改变, 但整体结构保持不变。研究结果能够为探明茶成分增强 FU 癌症治疗临床疗效的机制提供帮助, 为 ECG 和 FU 的联合用药提供有用的信息。

参 考 文 献

- [1] Bertucci C, Ascoli G, Barretta G U, et al. The binding of 5-fluorouracil to native and modified human serum albumin; UV, CD, and ^1H and ^{19}F NMR investigation[J]. *J Pharmaceut Biomed*, 1995, 13: 1087-1093.
- [2] Liu C M J, Zhang L F. Nanoparticle-based combination therapy toward overcoming drug resistance in cancer[J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 83: 1104-1111.
- [3] Bose A. Interaction of tea polyphenols with serum albumins; A fluorescence spectroscopic analysis[J]. *J Lumin*, 2016, 169: 220-226.
- [4] Suganuma M, Saha A, Fujiki II. New cancer treatment strategy using combination of green tea catechins and anticancer drugs[J]. *Cancer Science*, 2011, 102: 317-323.
- [5] Trnková L, Boušová I, Stanková V, et al. Study on the interaction of catechins with human serum albumin using spectroscopic and electrophoretic techniques[J]. *J Mol Struct*, 2011, 985: 243-250.
- [6] Wang C M, Liu M, Yuan L X, et al. Calorimetric and spectroscopic studies on temperature- and pH-dependent interactions of stimulative responsive poly (N-isopropylacrylamide) with piceatannol[J]. *J Chem Thermodyn*, 2016, 98: 186-192.
- [7] Yaseen Z J, Hammad J H, ALTalla H A. Thermodynamic analysis of thymoquinone binding to human serum albumin[J]. *Spectrochim Acta A*, 2014, 124: 677-681.
- [8] Tabassum S, Asbahy W M A, 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 Photoch Photobio B*, 2012, 114: 132-139.
- [9] Kameníková M, Georg F P, Klacsová M, et al. Influence of quercetin on the interaction of gliclazide with human serum albumin-spectroscopic and docking approaches[J]. *Luminescence*, 2017, 32: 1203-1211.
- [10] Jing J J, Liu B, Wang X, et al. Binding of fluphenazine with human serum albumin in the presence of rutin and quercetin; An evaluation of food-drug interaction by spectroscopic techniques[J]. *Luminescence*, 2017, 32: 1056-1065.
- [11] Yuan L X, Liu M, Liu G Q, et al. Competitive binding of (-)-epigallocatechin-3-gallate and 5-fluorouracil to human serum albumin; A fluorescence and circular dichroism study[J]. *Spectrochim Acta A*, 2017, 173: 584-592.
- [12] Liu M, Zheng Y, Sun D Z, et al. Improved stability of (+)-catechin and (-)-epicatechin by complexing with hydroxypropyl- β -cyclodextrin; Effect of pH, temperature and configuration[J]. *Food Chem*, 2016, 196: 148-154.
- [13] Jang Y H, Sowers L C, Cagin T, et al. First principles calculation of pKa values for 5-substituted uracils[J]. *J Phys Chem A*, 2001, 105: 274-280.
- [14] Yuan L X, Liu M, Sun B, et al. Calorimetric and spectroscopic studies on the competitive behavior between (-)-epigallocatechin-3-gallate and 5-fluorouracil with human serum albumin[J]. *J Mol Liq*, 2017, 248: 330-339.
- [15] 蔡畅, 赵燕娜, 刘敏. 不同药载比的紫杉醇白蛋白纳米粒的制备及释药性能研究[J]. *聊城大学学报(自然科学版)*, 2017, 30 (2): 50-55.
- [16] Katrahalli U, Kalalbandi V K A, Jaldappagari S. The effect of anti-tubercular drug, ethionamide on the secondary structure of serum albumins; a biophysical study[J]. *J Pharm Biomed*, 2012, 59: 102-108.

Thermodynamic Study on the Effect of Epicatechin Gallate on the Binding of 5-Fluorouracil to Human Serum Albumin

YUAN Li-xia¹ LIU Min^{1, 2}

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China;

2. Institute of BioPharmaceutical Research, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

Abstract Objective Combination therapy is beneficial to enhance the efficacy of anti-cancer drugs and reduce toxic and side effects. The thermodynamics of tea composition affecting 5-fluorouracil (FU) binding to human serum albumin (HSA) is worth studying. **Method** Isothermal titration calorimetry combined with fluorescence spectroscopy, dynamic light scattering, and circular dichroism spectrum were used to study the interaction of FU with HSA in the presence and absence of epicatechin gallate (ECG) under different temperatures and pH levels. **Result** The thermodynamic constants, including the number of binding site n , binding constant K_a , enthalpy change ΔH° , entropy change ΔS° , and Gibbs free energy change ΔG° , were obtained after fitting the data. The results indicated that the major forces for the binding of FU to HSA are hydrophobic, hydrogen bond and Vander Waals force, and the inhibition of FU by ECG can increase the free concentration of FU and improve the efficiency. Circular dichroism spectrum data showed that the secondary structure of HSA was changed slightly. **Conclusion** This study can help to identify the mechanism of tea composition to enhance the clinical efficacy of FU in the treatment of cancer, and also provide guidance for the combined therapy of ECG and FU.

Key words combination therapy; 5-fluorouracil; human serum albumin; epicatechin gallate; isothermal titration calorimetry; spectrum