

# 竹红菌甲素与细胞色素 C 相互作用的 同步荧光光谱研究

顾晓天<sup>1</sup>, 吴晓红<sup>1</sup>, 周家宏<sup>1</sup>, 魏少华<sup>2</sup>, 刘颖<sup>2</sup>, 冯玉英<sup>1</sup>

( 1. 南京师范大学分析测试中心, 210097, 江苏, 南京 )

( 2. 南京师范大学化学与环境科学学院, 210097, 江苏, 南京 )

[ 摘要 ] 利用同步荧光光谱方法研究了在生理 pH 值条件下竹红菌甲素( HA )对细胞色素 C 分子构象的影响, 同时探讨其作用机理. 同步荧光光谱实验结果说明 HA 与细胞色素 C 之间的相互作用主要发生在 HA 和细胞色素 C 分子表面的氨基酸残基之间, 最终这种作用使细胞色素 C 的构象发生变化.

[ 关键词 ] 竹红菌甲素, 细胞色素 C, 同步荧光光谱

[ 中图分类号 ] O657, [ 文献标识码 ] A, [ 文章编号 ] 1001-4616( 2005 )04-0070-03

## Study on the Interaction Between Hypocrellin A and Cytochrome C Using Synchronous Fluorescence Spectra

Gu Xiaotian<sup>1</sup>, Wu Xiaohong<sup>1</sup>, Zhou Jiahong<sup>1</sup>, Wei Shaohua<sup>2</sup>, Liu Ying<sup>2</sup>, Feng Yuying<sup>1</sup>

( 1. Analysis and Testing Center, Nanjing Normal University, 210097, Nanjing, China )

( 2. School of Chemistry and Environmental Science, Nanjing Normal University, 210097, Nanjing, China )

**Abstract** The effect of hypocrellin A ( HA ) on the conformational changes of cytochrome C has been studied with synchronous fluorescence spectra. The results indicate that HA can change the conformation of cytochrome C. The mechanism has been discussed. It is shown that the interaction between HA and Cytochrome C is mainly between HA and the amino acid residues on the Cytochrome C surface.

**Key words** hypocrellin A, cytochrome C, synchronous fluorescence spectra

## 0 引言

竹红菌甲素( HA )是一种天然的光敏剂, 该化合物具有优良的光动力性质, 被公认为是一种极有应用前景的光疗药物<sup>[1-3]</sup>. 由于该光敏剂主要是通过光敏损伤肿瘤细胞的细胞膜来杀死肿瘤细胞<sup>[4-6]</sup>, 而细胞膜中主要成分各种蛋白质, 因此 HA 与蛋白质之间相互作用方面的研究开始受到关注<sup>[7,8]</sup>.

同步荧光光谱指同时扫描激发和发射光的波长, 并使二者保持一个固定的波长差的条件下检测相应的荧光发射信号所得的光谱. 由于同步荧光光谱具有对环境和分子构象的敏感性和信息丰富的特点, 已经成为研究蛋白质微环境和构象变化的有力工具<sup>[9]</sup>. 目前, 同步荧光技术已经被广泛地应用到研究药物分子与蛋白质作用的领域中, 主要是考察药物分子对蛋白质构象的影响, 以及检测蛋白质中发内源荧光的氨基酸残基所处微环境的变化. 但是到目前为止

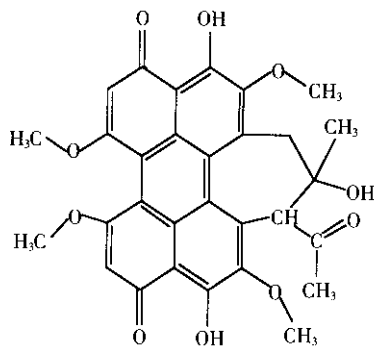


图 1 HA 的结构图

收稿日期: 2005-05-28.

基金项目: 江苏省教育厅自然科学基金资助项目( 2004191TSJB141 和 2004KJD150110 ), 南京师范大学优秀高层次人才启动基金资助项目( 2004191XGQ2B43 ).

作者简介: 顾晓天, 女, 1967—, 讲师, 主要从事光谱分析和功能材料等领域研究. E-mail: guxiaotian@njnu.edu.cn

通讯联系人: 冯玉英, 女, 1953—, 教授, 主要从事光谱分析和功能材料等领域的研究. E-mail: yyfeng@njnu.edu.cn

止,尚未见有关 HA 与蛋白质相互作用同步荧光光谱的研究报道。

本文利用同步荧光光谱技术研究了 HA 与细胞色素 C 之间发生的相互作用,分析了 HA 对细胞色素 C 分子中的色氨酸和酪氨酸残基发光的影响,并对其作用机理进行了初步探讨,为进一步探讨 HA 对细胞膜中的蛋白质光敏损伤提供理论基础。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂

HA 为中国科学院理化技术研究所提供,马心细胞色素 C 为美国 Sigma 公司产品,使用前未经进一步的提纯,其它试剂均为分析纯试剂。HA 由于不溶于水,因此用二甲基亚砜(DMSO)配制成浓溶液待用,实验中直接加入此浓溶液。其余溶液均用二次去离子水配制 0.04 mol/L 混合磷酸盐溶液(pH = 7.4)作缓冲液。实验于室温下进行。

### 1.2 仪器

荧光光谱实验采用 Perkin Elmer 公司的 LS 50B 型荧光光谱仪。

## 2 结果与讨论

细胞色素 C 分子的形状近似于球形,其表面电荷分布很不均匀,带正电荷的氨基酸残基(如赖氨酸残基)分布于细胞色素 C 分子中,处于血红素与外部溶液相接触的通道(活性区域)附近,而带负电荷的氨基酸残基则处于另一侧。根据文献[9]报道,蛋白质中色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸是仅有的发荧光的氨基酸残基,其中苯丙氨酸通常以共振能的形式把自己的激发能转移到色氨酸残基上,所以在蛋白质中通常观察不到苯丙氨酸的荧光发射峰,只能观察到色氨酸和酪氨酸残基的荧光光谱。细胞色素 C 分子中有一个色氨酸残基和四个酪氨酸残基,其中色氨酸残基和一个酪氨酸残基均与细胞色素 C 分子中血红素直接相连,余下的三个酪氨酸残基全部或部分埋在疏水环境中。当选择  $\Delta\lambda = 20$  nm 时,细胞色素 C 的荧光光谱表现为酪氨酸残基的荧光发射峰,而当  $\Delta\lambda = 80$  nm 时,表现为色氨酸残基的荧光发射峰<sup>[10]</sup>。

图 2 是细胞色素 C 在加入 HA 前后的同步荧光光谱,图中的小插图是在同样实验条件下,分析 DMSO 的加入对细胞色素 C 荧光光谱的影响,结果表明,相对于 HA 对细胞色素 C 荧光光谱的影响而言,DMSO 的影响完全可以忽略不计。从图 2 可知,细胞色素 C 分子中色氨酸和酪氨酸残基的发射峰峰位分别位于 354 nm 和 306 nm 间,当向溶液中加入 HA 之后,色氨酸残基的发射峰峰强随着 HA 加入量的不断增加而逐渐增高,但是峰位基本不变,而酪氨酸残基的发射峰不但峰强不断增强,峰位也出现明显的红移,该现象与 HA 和血红蛋白相互作用的同步荧光研究结果相反。比较两者峰位红移和峰强增强的程度,可以发现 HA 对细胞色素 C 分子中酪氨酸残基所处的微环境影响程度要远大于色氨酸残基,该结果表明 HA 对细

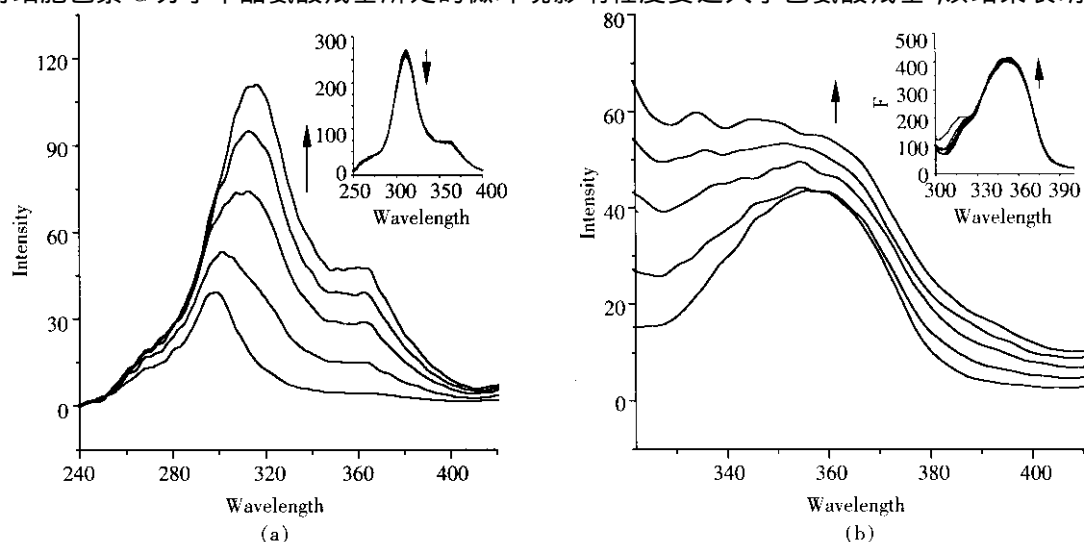


图 1 细胞色素 C 与 HA 相互作用前后的同步荧光光谱,溶液中 HA 的浓度分别为: 0、3.3、6.7、10、13  $\mu\text{mol/L}$

(a:  $\Delta\lambda = 20$  nm, b:  $\Delta\lambda = 80$  nm)

胞色素 C 分子内部微环境影响不大,主要是与胞色素 C 外部的氨基酸残基作用,从而改变胞色素 C 的构象.该结论与紫外可见吸收光谱的实验结果一致,在两者相互作用的紫外光谱中,胞色素 C 分子中血红素的特征吸收峰不受 HA 的加入量的影响,而位于 280 nm 处的胞色素 C 分子中氨基酸残基的吸收峰却随着 HA 加入量的增加,峰强不断增强,位于 210 ~ 250 nm 之间的强吸收(芳香族及其它残基、某些类型的氢键以及其他与构象和螺旋含量有关的相互作用所产生的吸收)峰位不断红移,峰强逐渐下降,因此也说明 HA 是主要与胞色素 C 表面的氨基酸残基发生作用,与血红素没有直接作用.另外,色氨酸和酪氨酸残基的荧光强度得到不同程度增强的原因是由于 HA 和胞色素 C 分子中赖氨酸残基之间形成的氢键降低了质子化氨基对氨基酸残基的荧光猝灭作用.

### 3 结论

同步荧光光谱实验结果说明 HA 与胞色素 C 之间的相互作用主要发生在 HA 和胞色素 C 分子表面的氨基酸残基之间,对其内部血红素所处的微环境基本没有影响,这种相互作用最终使得胞色素 C 的构象发生变化.

### [参考文献]

- [1] 蒋丽金. 竹红菌素的结构、性质、光化学反应及反应机制( I )——竹红菌素的结构和性质[ J ]. 科学通报, 1990, 35( 21 ): 1608.
- [2] Lown J W. Photochemistry and photobiology of perylenequinones[ J ]. J Chem, 1997, 75( 2 ): 99.
- [3] Diwu Z J. Novel therapeutic and diagnostic applications of hypocrellins and hypericins[ J ]. Photochem Photobiol, 1995, 61( 6 ): 529.
- [4] 程龙生,王家珍. 竹红菌甲素对红细胞膜的光损伤[ J ]. 实验生物学报, 1985, 18( 1 ): 80—97.
- [5] 杜健,秦静芬,张秀珍. 竹红菌甲素对红细胞膜和几种磷脂脂质体膜的流动性的光敏损伤[ J ]. 实验生物学报, 1991, 24( 4 ): 369—376.
- [6] 傅乃武,全兰萍,燕利学. 竹红菌甲素对小鼠红细胞的光敏作用[ J ]. 中国药理学与毒理学杂志, 1990, 2: 75—80.
- [7] Kaustuv Das, Alexandre V, Smirnov Jin Wen. Photophysics of hypericin and hypocrellin A in complex with subcellar components: interaction with human serum albumin[ J ]. Photochem Photobiol, 1999, 69( 6 ): 633—645.
- [8] 施焱,叶士宏,贾弘禔,等. 竹红菌甲素敏化 E. coli 菌体蛋白光氧化反应及机制[ J ]. 海南医学院学报, 1995, 1( 2 ): 52—54.
- [9] Rao Ch. Mohan, Synchronous scan fluorescence spectroscopy on proteins and human eye lenses[ J ]. Biophys Res Comm, 1991, 176: 1351.
- [10] Ju Chou, Xiaogang Qu, Tianhong Lu, *et al.* The effect of solution pH on synchronous fluorescence spectra of Cytochrome C solutions[ J ]. Microchemical J, 1995, 52: 159—165.

[责任编辑:孙德泉]