

LSPcZn与马心肌红蛋白相互作用的研究

王越,王傲,周林,魏少华

(南京师范大学化学与材料科学学院,江苏南京 210023)

[摘要] 本文研究了在人体生理条件下 β -四(5-磺酸萘氧基)锌酞菁(LSPcZn)与马心肌红蛋白分子(FePP-Mb)的相互作用,LSPcZn能够显著地猝灭FePP-Mb分子的荧光,说明两者之间有着很强的相互作用.变温荧光光谱实验的结果验证该作用可以导致LSPcZn分子和FePP-Mb分子之间形成复合物,使得LSPcZn可以通过静态猝灭有效地猝灭FePP-Mb的荧光.通过对荧光光谱的数据进行处理,得到LSPcZn分子和马心肌红蛋白(FePP-Mb)在不同温度下形成复合物的结合常数和结合位点.另外,LSPcZn与FePP-Mb分子之间相互作用可以改变FePP-Mb的构象.

[关键词] 酞菁,马心肌红蛋白,相互作用,荧光光谱

[中图分类号] O657.39 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2016)02-0028-05

Interaction of LSPcZn and Myoglobin

Wang Yue, Wang Ao, Zhou Lin, Wei Shaohua

(School of Chemistry and Materials Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

Abstract: The interaction of LSPcZn and myoglobin was studied under the physiological condition. The LSPcZn can quench the fluorescence of those three kinds of proteins' myoglobin effectively, and it is indicated that there is a strong interaction occurring between LSPcZn and myoglobin. The results of the fluorescence spectra with changing temperature proved that the interaction can lead to the formation of complex of LSPcZn with myoglobin, and quench the fluorescence of myoglobin through the static quenching mechanism. Dealing with the values of fluorescence spectra, we obtained the binding constant and binding site of complexes between LSPcZn and myoglobin under different temperature. In addition, the interaction can change the conformation of myoglobin markedly also.

Key words: Phthalocyanine, FePP-Mb, interaction, fluorescence spectroscopy

大多数能在光动力疗法领域应用的药物,在应用于临床治疗时都是以静脉注射的方式进入人体的.光疗药物在进入血液后,首先与血液中各种蛋白质(如血清蛋白、脂蛋白等)结合,然后被运送到人体的肿瘤组织部位^[1].因此,我们研究新型酞菁类化合物与人体中多种蛋白质的作用就是为了探究其在人体内的运输机理.另外,有关酞菁类化合物与蛋白质相互作用的研究还使酞菁类化合物的应用领域得到进一步拓展,如作为蛋白质染色剂,制备荧光抗体,用于微量蛋白的快速简便分析,以及增强作为抗癌光敏剂的靶向受体功能等^[2].通过分析新型酞菁类化合物与各种蛋白质之间的相互作用,探讨其应用潜力的基础研究已引起科研工作者的广泛关注和重视,并且日趋活跃^[3-5].前期研究表明,本课题组合成的 β -四(5-磺酸萘氧基)锌酞菁(LSPcZn)(图1)具有良好的光敏性能^[6].马心肌红蛋白是由153个氨基酸残基组成的多肽链和一个血红素(铁卟啉)组成,在人体肌肉组织中有储存氧和促进氧在细胞中扩散的作

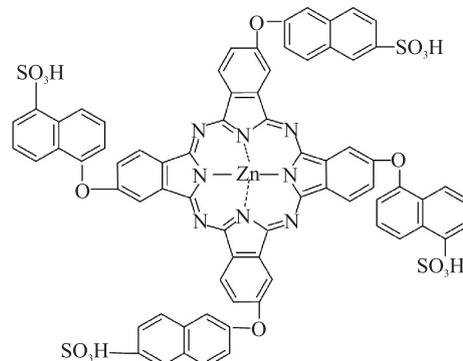


图1 酞菁的结构

Fig.1 Structure of LSPcZn

收稿日期:2015-06-18.

基金项目:国家自然科学基金(21201102)、江苏省自然科学基金(13KJA15003)、江苏省高校优势学科(PAPD)、江苏省生物功能材料协同创新中心项目、2014博士优秀选题计划(181200002131).

通讯联系人:魏少华,博士,教授,研究方向:精细化学品合成. E-mail:shwei@njnu.edu.cn

用^[7].分析两者之间的作用机理及该作用对肌红蛋白功能的影响,对于了解 LSPcZn 发挥光敏抗肿瘤活性机制的了解有很大帮助.本文在模拟人体生理条件下,利用荧光光谱和同步荧光光谱技术研究了 LSPcZn 与肌红蛋白的相互作用,分析了 LSPcZn 猝灭肌红蛋白荧光的机理,求出了两者的结合常数和结合位点,以及对肌红蛋白构象的变化的影响,为探讨 LSPcZn 在体内的储存、传输等提供了理论支撑.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

荧光光谱在 Varian 公司的 Gary Eclipse 荧光光谱仪上测定.

LSPcZn 由本实验室制备,利用 DMSO 配制成 $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液;马心肌红蛋白(FePP-Mb)为 Sigma 公司产品,使用前没有进一步处理;其他所用的试剂都是分析纯,使用前经实验室常规处理;实验用水为二次亚沸蒸馏水,经检测它们均无荧光杂质.

所有的实验未加指明均在温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下进行.

1.2 实验方法

测定荧光光谱前,移取 3 mL 蛋白质溶液于 1 cm 的石英比色皿中,用微量进样器逐次加入 $10 \mu\text{L}$ 的 LSPcZn 溶液(累加体积 $< 150 \mu\text{L}$),作用完全后测定荧光光谱.测定时荧光发射与激发狭缝宽度均为 5 nm,波长扫描速度 $500 \text{ nm}/\text{min}$.固定激发波长 280 nm,绘制 280 nm~450 nm 的发射光谱.同步荧光光谱实验分别测量了酪氨酸残基和色氨酸残基荧光随 LSPcZn 加入量的改变的变化情况,所采用的波长差分别为 $\Delta\lambda=20 \text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda=80 \text{ nm}$.

1.3 LSPcZn 的合成

将 3 mmol 的 4-(5-磺酸萘氧基)-1,2-苯二甲腈与 1 mL 的强有机碱 DBU(1,8-二氮杂环十一碳-7-烯)和 25 mL 的干燥正戊醇混合于反应瓶中,插入温度计,回流冷凝管,通入氮气保护,开动搅拌器,进行加热搅拌.加热至 70°C ,加入 0.8 mmol 的无水氯化锌,反应过程中,溶液颜色逐渐变绿,并加深.反应 40 h 后,将反应液冷至 60°C ,加入 50 mL 的甲醇,混合液搅拌 10 min 后,将其过滤.用 200 mL 的 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸热浸洗,并趁热过滤,丙酮洗涤.分别用二氯乙烷和丙酮抽提 24 h,真空 100°C 干燥,得到蓝绿色粉末水溶性酞菁 LSPcZn 0.57 g,收率 51.8%(以 4-(5-磺酸萘氧基)-1,2-苯二甲腈计).经核磁、红外、紫外及元素分析验证结构正确^[6].

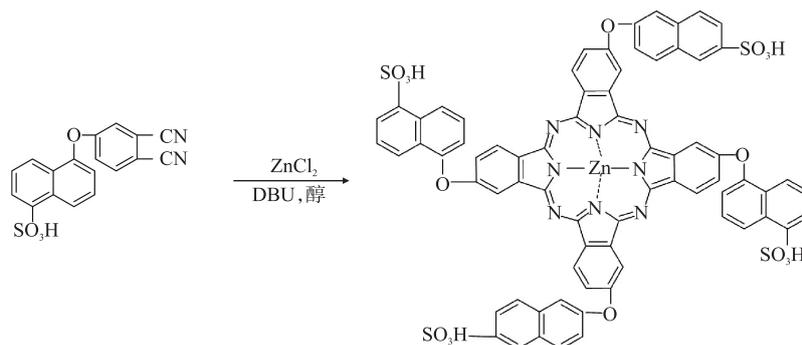


图2 LSPcZn 合成方法

Fig.2 The reaction equation of LSPcZn

2 结果与讨论

2.1 LSPcZn 对蛋白质的荧光猝灭

我们进行了 LSPcZn 与 FePP-Mb 相互作用的荧光光谱实验(见图 3),当激发波长为 280 nm 时,可以在 285 nm~420 nm 之间观察到 1 个很强的荧光发射峰,峰位为 328 nm,它是由肌红蛋白分子中的色氨酸残基和酪氨酸残基共同产生的.在同样的实验条件下,LSPcZn 在该范围内的荧光发射强度很弱,与肌红蛋白荧光发射峰的强度相比,完全可以忽略不计.当向肌红蛋白溶液中逐渐加入 LSPcZn 后,肌红蛋白位于 328 nm 处的荧光发射峰的强度也不断降低,同时峰位略微向短波长移动.由图可见,随着 LSPcZn 浓度

升高, FePP-Mb 的荧光发射峰的强度出现有规律的降低现象. 当在溶液中的 LSPcZn 浓度均为 $1.8176 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, FePP-Mb 的荧光强度降幅达 75.3%, 峰位也从 328 nm 红移到 334 nm 处.

根据文献^[8], 我们对图 3 中的数据进行处理和分析, 并作出相应的 Stern-Volmer 曲线(见图 4), 从其拟合曲线的线性关系来对 LSPcZn 猝灭 FePP-Mb 分子荧光的机理进行初步的判断. 结果发现, LSPcZn 对 FePP-Mb 分子荧光猝灭的 Stern-Volmer 图中的拟合曲线是 1 根直线(图 4 中的曲线 a), 相关系数为 0.999 8, 斜率为 0.974×10^5 . 根据文献^[9]可以判断 LSPcZn 猝灭 FePP-Mb 分子荧光的过程符合静态猝灭机理, 可能是静态猝灭作用的结果. 由于生物大分子荧光寿命在水溶液中约为 10^{-8} s ^[9], 因此, 可以根据图 4 中曲线 a 的斜率求出 LSPcZn 猝灭 FePP-Mb 荧光的 $k_q = K_D/\tau_0$. 计算可得 $k_q = 0.947 \times 10^{13} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 这一数值远远大于各类荧光猝灭剂对生物大分子的最大动态荧光猝灭速率常数(约为 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ^[10]). 因此可以进一步判断该猝灭过程不是动态猝灭而是静态猝灭.

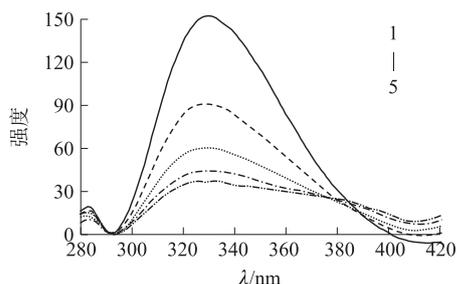


图3 LSPcZn对FePP-Mb的荧光猝灭光谱

Fig.3 Fluorescence quenching of FePP-Mb by LSPcZn

Curves 1-5: $C_{\text{LSPcZn}}/(10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$: 0, 0.454 4, 0.908 8, 1.363 2, 1.817 6
 $C_{\text{FePP-Mb}} = 1.056 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

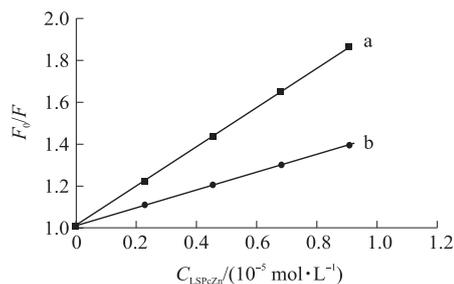


图4 FePP-Mb与LSPcZn相互作用的Stern-Volmer

曲线:(a)25 °C;(b)35 °C

Fig.4 The Stern-Volmer curves of FePP-Mb and LSPcZn at different temperature: (a)25 °C; (b)35 °C

为了进一步验证 LSPcZn 猝灭 FePP-Mb 分子荧光的过程是静态猝灭, 我们做了变温荧光光谱实验. 图 4 中曲线 a 和曲线 b 分别是 LSPcZn 在 25 °C 和 35 °C 条件下猝灭 FePP-Mb 分子荧光的 Stern-Volmer 曲线. 由图 4 可以看出, 在两种温度的情况下, LSPcZn 猝灭 FePP-Mb 分子荧光的过程均符合静态猝灭机理; 另外随着温度的升高, 拟合的直线斜率减小, 表明该猝灭过程不是动态猝灭, 因此证明猝灭过程的确是形成复合物的静态猝灭.

2.2 结合常数与结合位点数

根据 Lineweaver-Burk 双倒数方程^[11],

$$\frac{1}{F_0 - F} = \frac{1}{F_0} + \frac{K_D}{K[Q]}$$

式中, F_0 是猝灭剂不存在时荧光强度, F 为加入猝灭剂后的荧光强度, K_D 为结合常数, $[Q]$ 为猝灭剂浓度. 将其进一步推导, 即得方程:

$$\frac{1}{\frac{F_0}{F} - 1} = \frac{1}{\frac{F_0}{F}} + \frac{K_D}{\frac{F_0}{F}[Q]}$$

以 $1/((F_0/F)-1)$ 对 $1/(F_0[Q]/F)$ 作图(如图 5), 从线性拟合直线斜率求得离解常数 K_D , 从而进一步求得形成常数 $K_A = 1/K_D$.

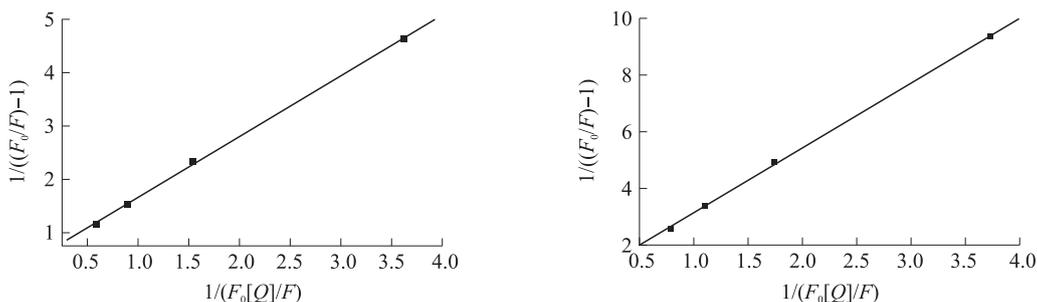


图5 LSPcZn猝灭FePP-Mb荧光的 $1/((F_0/F)-1)$ 对 $1/(F_0[Q]/F)$ 的线性拟合曲线(左:25 °C, 右:35 °C)

Fig.5 The relation between $1/((F_0/F)-1)$ and $1/(F_0[Q]/F)$ (Left:25 °C, Right:35 °C)

假设生物大分子中有 n 个相同且独立的结合位点,则可推出下式:

$$\lg[(F_0-F)/F]=\lg K_0+n\lg[Q].$$

以 $\lg[(F_0-F)/F]$ 对 $\lg[Q]$ 作线性拟合即可求得结合位点数(如图 6).

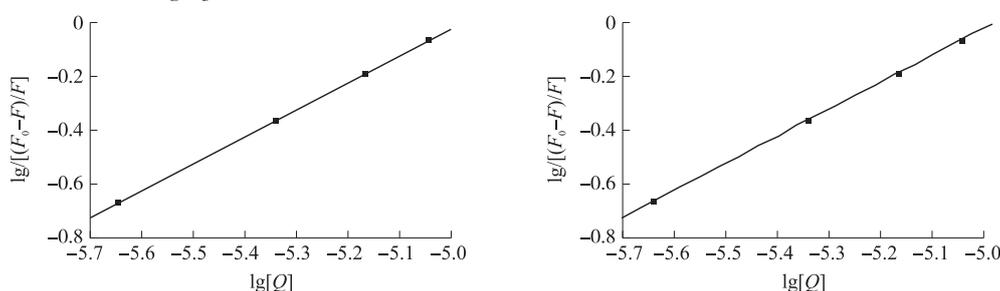


图 6 LSPcZn 猝灭 FePP-Mb 荧光的 $\lg[(F_0-F)/F]$ 对 $\lg[Q]$ 的线性拟合曲线(左:25 °C,右:35 °C)

Fig.6 The Lineweaver-Burk curve(Left:25 °C,Right:35 °C)

所求得的结合常数和结合位点数列于表 1. 从表 1 的数据可以发现,LSPcZn 和 FePP-Mb 之间的结合常数较大,说明两者之间存在较强的结合力.

表 1 LSPcZn 与 FePP-Mb 的结合常数、结合位点数和相应线性关系

Table 1 Estimated values of binding constant (K_A) and possible number of binding sites (n) for binding of LSPcZn and FePP-Mb

| 温度/°C | $K_A/(L \cdot mol^{-1})$ | R | n | R |
|-------|--------------------------|---------|---------|---------|
| 25 | 8.75×10^4 | 0.999 8 | 0.999 9 | 1.000 0 |
| 35 | 4.59×10^4 | 0.999 7 | 0.950 4 | 0.999 9 |

2.3 结合作用力类型

光疗药物与蛋白质之间发生相互作用的作用力类型包括氢键、范德华力、静电引力和疏水力. 不同药物与蛋白子的作用力不相同. 根据反应前后热力学参数焓变 ΔH 和熵变 ΔS 的相对大小,可以对药物与蛋白质之间的主要作用力类型进行判断. Nemethy^[12]总结了热力学参数与生物大分子配体缔合时的主要作用力的相互关系为:当 $\Delta H \approx 0, \Delta S = 0$, 主要为疏水作用力; $\Delta H < 0, \Delta S > 0$, 主要为电荷作用力; 当 $\Delta H < 0, \Delta S < 0$, 主要为范德华力. 在温度变化不大时,反应的焓变 ΔH 可以看作一个常数. 由以下方程式:

$$\ln \frac{K_2}{K_1} = \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \frac{\Delta H}{R}, \quad \Delta G = -RT \ln K, \quad \Delta G = \Delta H - T\Delta S.$$

可以求出反应的自由能变 ΔG 、焓变 ΔH 和熵变 ΔS . 应当指出,蛋白质结果很复杂,它和药物之间的作用力往往不是单纯的一种,而是同时存在几种作用力. 依据上述公式可求得:

$$\Delta G = -28.2 \text{ kJ/mol}; \Delta H = -49.2 \text{ kJ/mol}; \Delta S = -70.5 \text{ J/(mol} \cdot \text{s)}.$$

由此可见, $\Delta H < 0, \Delta S < 0$, 两者之间的作用力应为范德华力. Ross 等^[13]认为,很多情况下,即使 $\Delta H < 0$, 蛋白质和一些小分子之间,仍会有疏水作用力的存在. 因此,可以认为 LSPcZn 与 FePP-Mb 之间作用力为疏水力和范德华力.

2.4 蛋白质构象的变化

为了考察 LSPcZn 的加入对蛋白质分子构象的影响,我们固定 FePP-Mb 的浓度,逐渐增加 LSPcZn 浓度,分别测量了 LSPcZn 加入前后,FePP-Mb 分子中色氨酸残基和酪氨酸残基的同步荧光光谱(如图 7). 从 FePP-Mb 分子中的色氨酸残基和酪氨酸残基在加入 LSPcZn 前后同步荧光光谱可以发现:LSPcZn 的加入均能使蛋白质分子中的色氨酸残基和酪氨酸残基荧光发射峰峰位的红移程度增大,酪氨酸残基的荧光发射峰峰位由 309 nm 红移到 313 nm,色氨酸残基的荧光发射峰峰位由 351 nm 红移到 356 nm. 表明 LSPcZn 的加入是 FePP-Mb 分子中的色氨酸残基和酪氨酸残基所处微环境的极性增强,从而导致 FePP-Mb 分子的构象发生了一定程度的改变. 文献[14]报道游离态色氨酸在溶液中的荧光发射峰在 355 nm 附近,说明 LSPcZn 的加入使 FePP-Mb 分子色氨酸残基完全暴露到溶剂中,证明 FePP-Mb 的构象发生了变化. 另外,根据同步荧光光谱中各种蛋白质分子色氨酸残基和酪氨酸残基荧光发射峰峰位的红移程度的结果,可以得知 FePP-Mb 蛋白质的构象改变很大,该结论与荧光光谱实验的结论一致.

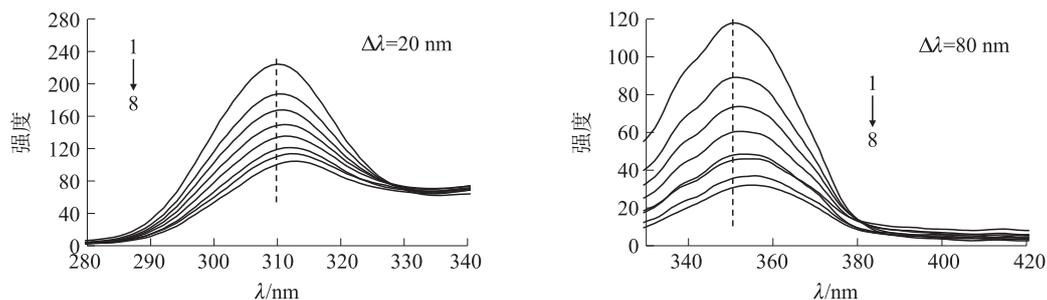


图7 FePP-Mb与LSPcZn相互作用的同步荧光光谱

Fig.7 Synchronous fluorescence spectra of FePP-Mb

$C_{\text{LSPcZn}}/(10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$: 0, 0.227 2, 0.454 4, 0.681 6, 0.908 8, 1.363 2, 1.590 4, 1.817 6; $C_{\text{FePP-Mb}}=1.056 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

3 结论

本文,利用荧光光谱和同步荧光光谱技术研究了在模拟人体生理条件下 β -四(5-磺酸萘氧基)锌酞菁(LSPcZn)与肌红蛋白的相互作用。LSPcZn能够显著地猝灭肌红蛋白的荧光,说明两者之间存在着很强的相互作用。变温荧光光谱实验的结果确证该作用可以导致LSPcZn分子和肌红蛋白分子之间形成复合物,使得LSPcZn可以通过静态猝灭有效地猝灭了肌红蛋白的荧光。通过对荧光光谱的数据进行处理得知,LSPcZn分子和肌红蛋白分子形成复合物的结合常数为 8.75×10^4 ,结合位点 n 为0.999 9。另外,LSPcZn和肌红蛋白之间发生的相互作用还使肌红蛋白分子的构象发生改变。

[参考文献]

- [1] 王树军,彭玉苓,刘光仙.卟啉类化合物与人血清白蛋白相互作用的研究进展[J].化学通报,2013,76(6):491-498.
- [2] 李永新,赵丹华,卓淑娟.鲁米诺-四磺基锰酞菁-过氧化氢化学发光体系在蛋白质测定中的应用[J].分析化学,2003,31(5):638-642.
- [3] 张红梅,王彦卿,于黎明.锌酞菁与牛血红蛋白相互作用的光谱研究[J].化学试剂,2008,30(2):85-88.
- [4] 钟平,刘海东.酞菁铁II与牛血清白蛋白相互作用的光谱研究[J].赣南师范学院学报,2014(6):35-37.
- [5] 魏群,王中华,李洋.铁酞菁与氨基酸的相互作用对酞菁性质的影响[J].西华师范大学学报(自然科学版),2013,34(2):168-174.
- [6] WEI S H, ZHOU J H, HUANG D Y. Synthesis and Type I/Type II photosensitizing properties of a novel amphiphilic zinc phthalocyanine[J]. Dyes and pigments, 2006, 71: 61-67.
- [7] 魏少华,卢珊,季春. p-HPcZn与肌红蛋白结合性能的研究[J].光谱学与光谱分析,2008,28(9):2 148-2 151.
- [8] 付银环,付彩霞.荧光光谱法研究苏丹IV与鲑鱼精DNA的相互作用[J].化学与生物工程,2015(4):44-47.
- [9] 陈小睿,徐沉思,王平.荧光猝灭法研究大黄酚与牛血清蛋白的相互作用[J].世界科学技术(中医药现代化),2011(6):999-1 004.
- [10] WARE W R. Oxygen quenching of fluorescence in solution: an experimental study of the diffusion process[J]. J Phys Chem, 1962, 66: 455-458.
- [11] 郭莹,刘保生,李志云.不同方程计算药物小分子与蛋白结合常数的比较研究[J].发光学报,2014(9):1 114-1 119.
- [12] Nemethy G, Scheraga H A. The structure of water and hydrophobic bonding in proteins[J]. J Phys Chem, 1962, 66: 1 773-1 789.
- [13] Ross P D, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reaction: forces contribution to stability[J]. Biochemistry, 1981, 20: 3 096-3 102.
- [14] SARA B, MARCO van de W, LORENZO S. A reassessment of synchronous fluorescence in the separation of Trp and Tyr contributions in protein emission and in the determination of conformational changes [J]. Journal of molecular structure, 2014, 1 077: 68-76.

[责任编辑:顾晓天]