

光谱法研究痲囊腔菌素 A 与血红蛋白的相互作用

马 菲¹, 周 林¹, 王 薇¹, 冯玉英¹, 周家宏¹, 王兴和², 沈 健¹

(1 江苏省生物功能材料重点实验室, 分析测试中心, 南京师范大学, 江苏 南京 210046)

(2 南京师范大学物理科学与技术学院, 江苏 南京 210046)

[摘要] 利用紫外-可见吸收光谱和荧光光谱系统地研究了痲囊腔菌素 A (EA) 与血红蛋白 (Hb) 之间的相互作用. 实验结果表明, EA 与 Hb 之间的相互作用影响 Hb 分子的构象, 且该影响在避光与光照等两种情况下存在明显差异, 避光时 EA 仅与 Hb 的氨基酸残基发生作用, 而光照时 EA 与 Hb 的氨基酸残基和血红素辅基均发生作用. 避光实验条件下的荧光猝灭常数、热力学参数等计算结果表明 Hb 荧光被猝灭方式为动态猝灭, EA 对 Hb 之间的作用力为疏水作用力. 同步荧光进一步研究了 EA 对 Hb 微环境的影响.

[关键词] 痲囊腔菌素 A, 血红蛋白, 紫外-可见吸收光谱, 荧光光谱, 同步荧光光谱

[中图分类号] O657.3 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2010)02-0046-04

Spectroscopic Studies on Interaction of Elsinochrome A With Hemoglobin

Ma Fei¹, Zhou Lin¹, Wang Wei¹, Feng Yuying¹, Zhou Jiahong¹, Wang Xinh², Shen Jian¹

(1 Key Lab of Bifunction Materials of Jiangsu Province Analysis and Testing Center Nanjing Normal University, Nanjing 210046 China)

(2 School of Physics and Technology, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract The interaction between Elsinochrome A (EA) and hemoglobin (Hb) was investigated using UV-vis spectroscopy and fluorescence spectroscopy. The results suggested that the interaction modes were obviously different in the dark and the illuminated condition. In the dark, EA interacted with the surface amino acid of Hb only, but with the illumination, both amino acid and the interior heme chromophore of Hb interacted with EA. According to the values of the quenching constant and the thermodynamics parameters, the quenching mechanism was dynamic quenching procedure and the interaction between EA and Hb was mainly hydrophobic in nature. The changes in the microcircumstance of amino acid of Hb were analyzed by synchronous fluorescence spectroscopy.

Key words Elsinochrome A, hemoglobin, UV-vis spectroscopy, fluorescence spectroscopy, synchronous fluorescence spectroscopy

痲囊腔菌素 A (图 1) 是一种花醌类的有机化合物, 拥有优良的光敏性能, 被认为是一种极有应用前景的天然光敏剂及光疗药物. 与传统的光疗药物相比, 痲囊腔菌素 A 因其极高的单线态氧产率而引起人们的关注^[1-3]. 作为一种潜在的临床光疗药物, 系统地研究其与血液中大量存在的蛋白之间的相互作用, 对了解药物在体内的运输、吸收具有重要意义, 而该类研究迄今尚未见相关报道.

血红蛋白是人体血液中一种重要的蛋白质, 主要是为人体各个组织器官输送氧, 而痲囊腔菌素 A 类光敏剂在临床治疗过程中是通过静脉注射的方式进入人体, 因此本文采用紫外-可见光谱、荧光光谱和同步荧光光谱等技术

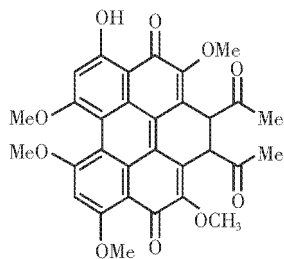


图 1 痲囊腔菌素 A 的分子结构

Fig.1 Molecular structure of EA

收稿日期: 2009-10-19

基金项目: 国家自然科学基金 (20603018)、江苏省教育厅自然科学基金 (04KJD150110)、江苏省光电技术重点实验室开放基金 (KJC09).

通讯联系人: 王兴和, 副教授, 研究方向: 物理电子学. E-mail: wangxinghe@njnu.edu.cn

系统地研究了痼囊腔菌素 A 与血液中血红蛋白的相互作用, 通过猝灭常数、热力学常数等计算确定了其猝灭形式和主要作用力类型, 在分析两者之间的相互作用机理的基础上, 探讨了痼囊腔菌素 A 人体血液中的传输机理.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

痼囊腔菌素 A (EA) 从子囊菌 (*E. annonae Bitanc*) 中分离提取; 血红蛋白 (Hb) 购自 Sigma 公司, 使用前没有作进一步处理; 其它试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水. 实验均在 25℃ 下进行.

紫外-可见吸收光谱采用 Varian Cary 5000 紫外可见分光光度计, 荧光光谱和同步荧光光谱采用 Perkin Element LS-50B 荧光光谱仪. 光照实验采用 500 W 高压汞灯.

1.2 实验方法

Hb 用磷酸缓冲液 ($\text{pH} = 7.4$) 配制成 $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 的溶液, $1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 的 EA 溶液由二甲亚砷溶解后再加蒸馏水稀释制得, 避光储存.

实验过程中用微量进样器每次取 20 μL EA (二甲亚砷浓度为 $1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$, 在该浓度下对实验无影响^[4]) 水溶液至 3 mL Hb 中, 用 1 cm 石英比色皿测定, 分别测定其紫外-可见吸收光谱、荧光光谱和同步荧光光谱. 荧光光谱激发波长为 280 nm, 同步荧光光谱采用的波长差分别为 $\lambda = 20 \text{ nm}$ 和 $\lambda = 60 \text{ nm}$.

2 结果与讨论

2.1 紫外-可见光谱

由文献可知, 血红蛋白在紫外-可见光谱有 2 个特征吸收峰, 分别是 278 nm 处的氨基酸残基的吸收峰和 405 nm 处的血红素辅基的吸收峰^[5]. 图 2 为 Hb 与 EA 在避光 (图 2a) 和光照 (图 2b) 2 种不同实验条件下发生相互作用的紫外-可见光谱图. 在避光的实验条件下, 随着溶液中 EA 浓度的增大, Hb 在 278 nm 处的吸收强度明显增强, 405 nm 处的吸收峰基本没有发生变化 (图 2a), 表明 EA 只能与 Hb 分子外部的氨基酸残基发生相互作用^[6]. 这是由于 EA 中的含氧基团与血红蛋白肽链的氨基酸残基中含氧或含氮基团之间发生作用, 使氨基酸残基中含氧或含氮基团所处的微环境发生改变, 使 278 nm 处的吸光度发生升高^[4], 血红素辅基被包裹在 Hb 内部的疏水空穴中, 空间位阻使 EA 和血红素辅基之间不能发生直接作用, 因而 405 nm 处的吸光度没有发生变化.

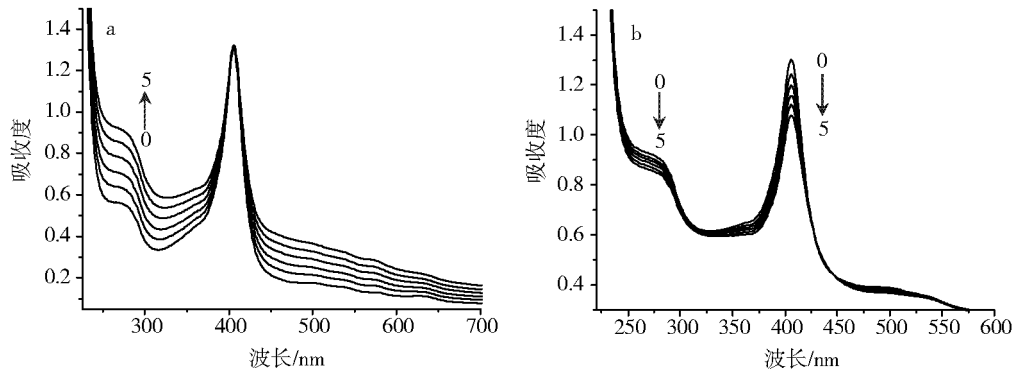


图 2 Hb 溶液中加入 EA 的紫外-可见光谱图 (a: 避光; b: 光照)

Fig.2 The UV-vis absorption spectra of Hb with addition of EA (a. in the dark; b. illuminated)

在光照的实验条件下 (图 2b), 随着溶液中 EA 浓度的增大, Hb 位于 278 nm 处的氨基酸残基的吸收峰和位于 405 nm 处的血红素辅基的吸收峰均发生下降. 这是由于 EA 具有光敏性能, 光照导致其产生各种活性氧物质, 如单线态氧、超氧阴离子自由基和羟基自由基等^[1], 这些活性氧物质一方面与蛋白质的氨基酸残基发生作用, 一方面进入 Hb 空腔内部损伤血红素辅基^[7], 使得吸光强度下降. 通过避光和光照的 2 种实验条件下的反应, 说明 EA 影响 Hb 分子构象的程度存在明显差异.

2.2 荧光光谱

Hb 与 EA 在避光实验条件下相互作用的荧光光谱如图 3 所示. 激发波长 280 nm 时, 在 355 nm 处可观察到强的宽荧光发射峰, 是由 Hb 中色氨酸残基和酪氨酸残基共同产生的^[8]. 随着溶液中 EA 浓度的不断增加, Hb 的氨基酸的荧光强度逐渐升高, 这是因为 EA 与 Hb 发生作用后, 使 Hb 分子的微环境更加极性化, 从而引起荧光强度发生有规律的升高^[9].

2.3 EA 与 Hb 作用机理探讨

2.3.1 荧光猝灭机制及猝灭常数

为了研究 EA 与 Hb 的荧光猝灭机理, 可利用 Stern-Volmer 方程^[10], 绘制不同温度下 F_0/F 与 $[Q]$ 曲线.

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q],$$

F_0 为未加猝灭剂时的荧光强度; F 为加入猝灭剂后的荧光强度; K_q 为分子扩散碰撞猝灭速率常数; τ_0 为荧光分子的平均寿命, 约为 $10^{-8} s^{[11]}$; K_{SV} 称为 Stern-Volmer 猝灭常数, 是双分子猝灭速率常数与单分子衰变速率常数的比率; $[Q]$ 为猝灭剂浓度.

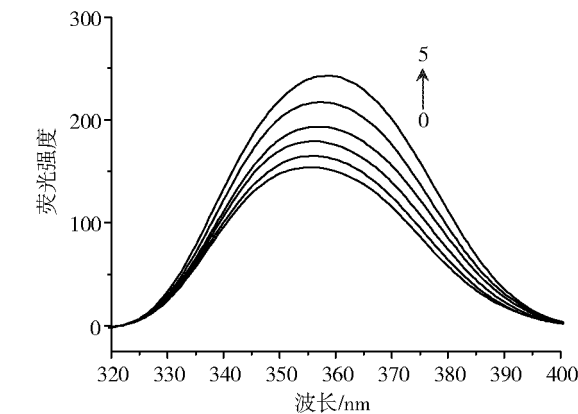


图 3 Hb 中加入 EA 的荧光光谱图 (25℃, $\lambda_{ex}=280\text{ nm}$ (0, 2×10^{-6} , 4×10^{-6} , 6×10^{-6} , 8×10^{-6} , $10\times10^{-6}\text{ mol/L}$ respectively))

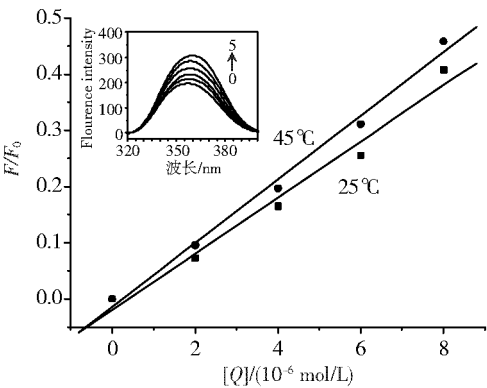


图 4 EA 对 Hb 在不同温度下荧光猝灭的 Stern-Volmer 曲线
Fig.4 The Stern-Volmer curves of fluorescence quenching of Hb by addition of EA at different temperatures

由图 4 可见, F_0/F 与 $[Q]$ 具有较好的线性关系, 随着温度升高, 直线斜率增大, 表明该猝灭过程为动态猝灭^[12]. 一般认为, 各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞猝灭常数为 $2\times10^{10}\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, 而表 1 中 EA 对 Hb 荧光猝灭的猝灭常数 K_q 比它大 2 个数量级, 由于实验体系为离子溶液, 测得的动态猝灭常数 K_q 偏大很可能是离子强度的影响结果^[10].

表 1 EA 与 Hb 相互作用线性方程和相关系数

Table 1 Regression quench equations and correlation coefficients			
$t/^\circ\text{C}$	Linear regression equation	$K_q/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$	R
25	$F_0/F - 1 = 4.991 \times 10^4 [Q] - 1.019$	4.991×10^{12}	0.989 8
45	$F_0/F - 1 = 5.661 \times 10^4 [Q] - 1.014$	5.661×10^{12}	0.996 1

2.3.2 热力学参数及相互作用力

EA 与 Hb 相互作用的各种热力学参数可以根据以下热力学公式算出^[13], 根据反应前后热力学参数焓变 ΔH 和熵变 ΔS 的相对大小, 可以判断 EA 与 Hb 之间的主要作用力类型, 相关数据见表 2

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

表 2 EA 与 Hb 相互作用的热力学常数

Table 2 The thermodynamic parameters of EA to Hb at different temperatures

$t/^\circ\text{C}$	$\Delta H (\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$\Delta G (\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$\Delta S (\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1})$
25	26.18	-26.34	176.24
45		-26.35	165.19

根据文献 [14] 可以得知: 当 $\Delta H < 0$ 或 $\Delta H \approx 0$ $\Delta S > 0$ 两者之间的作用力主要为电荷作用力; $\Delta H < 0$ $\Delta S < 0$ 作用力主要为范德华力或氢键作用力; $\Delta H > 0$ $\Delta S > 0$ 作用力主要为疏水作用力. 因此表 2 中的数据可以判断出, EA 与 Hb 在避光条件下相互作用过程的 $\Delta G < 0$ $\Delta H > 0$ $\Delta S > 0$ 说明该作用过程是自发的, 且作用力主要是疏水作用力.

2.4 同步荧光

图 5 为避光时 EA 与 Hb 相互作用的同步荧光光谱. 当 $\Delta\lambda = 20\text{ nm}$ 时 (图 5a) 在 355 nm 处为 Hb 分子结构中酪氨酸残基的荧光发射峰; $\Delta\lambda = 60\text{ nm}$ 时 (图 5b) 在 339 nm 处为 Hb 分子结构中色氨酸残基的荧光发射峰.

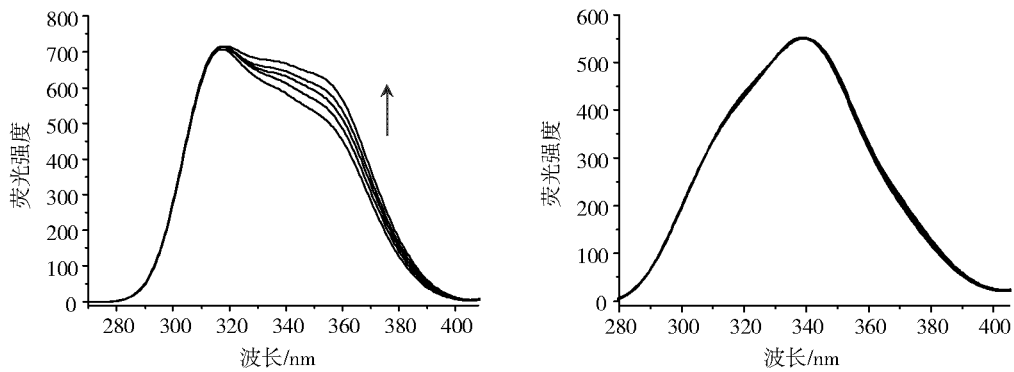


图 5 Hb 与 EA 作用的同步荧光光谱:(a) $\Delta\lambda=20\text{ nm}$; (b) $\Delta\lambda=60\text{ nm}$
Fig.5 Synchronous fluorescence spectra of Hb with EA: (a) $\Delta\lambda=20\text{ nm}$; (b) $\Delta\lambda=60\text{ nm}$

随着 EA 浓度的增加, Hb 的酪氨酸残基荧光发射峰强度随之发生变化, 色氨酸残基的荧光发射峰基本没有变化. 比较二者可知 EA 对 Hb 酪氨酸残基所处的微环境影响程度较大, 对色氨酸残基所处的微环境基本没有影响. 这些表明在避光的实验条件下, EA 与 Hb 的酪氨酸残基发生作用, 使其微环境发生改变, 最终导致 Hb 的分子构象发生变化^[15]. 该结论也说明 EA 主要与 Hb 外部的氨基酸残基作用, 从而改变 Hb 的构象, 对内部血红素辅基的影响不大. 这同 EA 与 Hb 避光时的紫外-可见吸收光谱的实验结果一致.

3 结论

本文采用紫外可见吸收光谱和荧光光谱等技术研究了 EA 与 Hb 的相互作用. 结果发现, 避光时 EA 仅与 Hb 的氨基酸残基发生作用, 而光照时 EA 同时与 Hb 的氨基酸残基和血红素辅基发生作用. 通过荧光猝灭常数、结合常数和结合位点数的计算, 证明避光时 EA 对 Hb 荧光的猝灭方式为静态猝灭, 两者之间存在较强的结合作用, 根据热力学参数确定 EA 与 Hb 之间主要以疏水作用力相结合. 同步荧光光谱法进一步确定了 EA 对 Hb 构象存在一定的影响.

[参考文献]

[1] Li C, He Y P, Ou L C, et al Photophysical and photosensitive properties of Elninochrome A[J]. Chinese Science Bulletin 2006, 51(9): 1 050-1 054
[2] Zhou L, Dong C, Wei S H, et al Water-soluble soft nanocolloid for drug delivery[J]. Materials Letters, 2009, 63(20): 1 683-1 685
[3] A mone A, Merlini L, Mondelli R, et al Structure, conformational analysis and absolute configuration of the Perylenequinone Pigments Elninochromes B1, B2, C1 and C2[J]. Gazzetta Chimica Italiana 1993, 123(3): 131-136
[4] 冯玉英, 吴晓红, 周家宏, 等. 竹红菌甲素与血红蛋白相互作用光谱[J]. 应用化学, 2005, 22(8): 895-898
[5] White A, Handler P, Smith E L. Principle of Biochemistry[M]. Beijing Science Press, 1978: 110
[6] Zhou J H, Wu X H. Spectroscopic studies on the interaction of hypocrellin A with myoglobin[J]. Spectroscopy-an International Journal 2007, 21(4): 235-243

(下转第 53 页)

- [2] 徐竟成,朱清漪,李光明,等. 印染废水微滤-反渗透工艺深度处理研究[J]. 印染, 2008(5): 24-27.
- [3] Zhang R J. Membrane technology and water treatment in environmental protection[J]. Membrane Science and Technology, 2001, 1(21): 25-29.
- [4] 李健秀,王建刚,邱俊,等. 超滤-反渗透集成工艺处理玉米酒糟废水[J]. 化学工程, 2007, 35(8): 42-44.
- [5] Zhong Changning Xu Zhenliang Fang X hui Treatment of acid mine drainage by ultra low-pressure reverse osmosis and nanofiltration [J]. Environmental Engineering Science 2007, 24 (9): 1297-1306
- [6] 李福勤,杨久坡,谷宏旺,等. 深度处理污染河水的反渗透膜污染特性与防治[J]. 中国给水排水, 2006, 22(20): 90-92
- [7] 钟常明,秦晓海,许振良. 超低压反渗透膜处理矿山酸性废水膜污染及清洗的研究[J]. 水处理技术, 2009, 35(5): 107-110
- [8] 刘昌胜,邬行彦,潘德维,等. 膜的污染及其清洗[J]. 膜科学与技术, 1996 16(2): 25-30
- [9] 吉卫. 膜污染与清洗[J]. 清洗世界, 2006, 22(11): 37-41
- [10] Chen K, Song L F, Ong L F, et al The development of membrane fouling in full scale RO processes[J]. Journal of Membrane Science, 2004, 232 63-72
- [11] 马丽萍. 反渗透膜的污染与清洗[J]. 石油化工应用, 2006 26(4): 46-49.
- [12] 王晓琳. 膜的污染和劣化及其防治对策[J]. 工业水处理, 2001 21(9): 1-5.
- [13] 海德能公司. 反渗透和纳滤系统的清洗[EB/OL]. [2009-08-11]. <http://www.hydranautics.cn/news/manage/upbad/upfiles/20076199135.pdf>
- [14] 国家环保局水和废水监测分析方法编委会. 水和废水监测分析方法[M]. 4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2004

[责任编辑: 顾晓天]

(上接第 49页)

- [7] 唐乾,郑学仿,王静云,等. 可见光谱法研究肌红蛋白血红素铁与金属离子相互作用(I) [J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29(7): 1958-1961.
- [8] Lakowicz J R. Principles of Fluorescence Spectroscopy[M]. New York: Plenum Press, 1983: 341.
- [9] 何文英,姚小军,刘鹏军,等. 分子模拟与光谱法研究愈创木酚和人免疫球蛋白的键合[J]. 中国科学 B辑: 化学, 2007, 37(1): 54-63.
- [10] 袁道琴,冯素玲,崔凤灵. 甘草酸二铵与牛血清白蛋白相互作用的光谱[J]. 应用化学, 2009, 26(8): 918-922
- [11] Lakowicz J R, Weber G. Quenching of fluorescence by oxygen: probe for structural fluctuations in macromolecules[J]. Biochemistry, 1973 12(21): 4161-4170.
- [12] Zhou JH, Wu XH, Gu XT, et al Spectroscopic studies on the interaction of hypocrellin A and hemoglobin[J]. Spectrochimica Acta Part A, 2009 72(1): 151-155
- [13] Klotz IM, Jean M. The binding of organic ions by proteins: effect of temperature[J]. J Am Chem Soc, 1949, 71(3): 847-851.
- [14] Nemethy G, Scheraga H A. The structure of water and hydrophobic bonding in proteins[J]. J Phys Chem, 1962, 66(10): 1773-1789.
- [15] 吴晓红,周家宏,顾晓天,等. 竹红菌甲素与肌红蛋白和血红蛋白相互作用的同步荧光光谱研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2006, 26(12): 2287-2290

[责任编辑: 顾晓天]