

顺二氨二水合铂(II)与膜磷脂及膜蛋白 相互作用的荧光光谱研究

王 蒙 刘 冬

(天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京医科大学无机化学教研室, 北京 100083)

用 Tb^{3+} 分别对用和未用顺二氨二水合铂(II)(AAP)处理的红细胞膜和磷脂胆碱(PC)脂质体进行荧光滴定, 测 Tb^{3+} 荧光。用 AAP 滴定红细胞膜, 测蛋白质自身荧光变化。用间接 Scatchard 法求结合参数。表明蛋白质及磷脂均与 AAP 结合, 蛋白质结合能力较强。

关键词: 顺二氨二水合铂(II) 膜磷脂 膜蛋白

一直认为顺二氯二氨合铂(II)(DDP)的靶分子是 DNA。我们提出细胞为一多靶分子系统⁽¹⁾, 有其他 DDP 靶分子存在。苏雅娴等报告 DDP 对癌细胞膜结构及微丝网络的影响⁽²⁾。Fumarulo 认为 DDP 可与微管结构作用⁽³⁾。陈宝卫等证明 DDP 作用于红细胞膜骨架蛋白⁽⁴⁾。在 DDP 与细胞相互作用时, 膜磷脂和膜蛋白都位于前沿。本工作比较地研究了 DDP 水解产物 AAP 与它们的作用, 以确定优先作用的靶分子。

实 验 部 分

一.试剂及仪器: AAP 用 DDP(锦州制药厂)与硝酸银反应制备, 即用。PC 由卵磷脂经柱层析纯制后按常规制备脂质体。依 Dodge 法⁽⁵⁾ 分离人红细胞膜, 测蛋白质含量以定量。由 Tb_6O_4 (中国科技大学刘清亮教授赠)溶于高氯酸配制成 $\text{pH}2\sim3$, $0.0498\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}\text{Tb}(\text{ClO}_4)_3$ 溶液做荧光探针。荧光谱用 RF540 (岛津) 荧光分光光度计测定。

二.方法: 用 Tb^{3+} 同时做蛋白质和磷脂的探针。用 Tb^{3+} 做磷脂探针未见报道, 另文报告。另外还监测蛋白质自身荧光。

1.用 Tb^{3+} 为探针研究 AAP 与红细胞膜的作用 在 5ml 红细胞膜悬浮液(相当 $48\mu\text{g}$ 蛋白质 $\cdot\text{ml}^{-1}$)中, 加不同量 $8.89\times10^{-3}\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ AAP 溶液。37℃ 避光反应 12h 后, 用 $\text{Tb}(\text{ClO}_4)_3$ 滴定。加 $\text{Tb}(\text{ClO}_4)_3$ 后 5min(此时荧光强度恒定)测荧光发射强度($E_x=295\text{nm}$, $E_m=545\text{nm}$)。同法滴定红细胞膜做对照。同时测蛋白质自身荧光($E_x=286\text{nm}$, $E_m=340\text{nm}$)。

2.用蛋白质自身荧光研究 AAP 与红细胞膜蛋白的作用 在 37℃, 使红细胞膜与不同量 AAP 反应 10min 及 17h 后, 测蛋白质荧光。以细胞膜悬浮液为对照。

3.用 Tb^{3+} 为探针研究 AAP 与 PC 脂质体的作用 方法同一。用 5ml 脂质体(含 PC $2.66\times10^{-4}\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) 代细胞膜悬浮液。脂质体为单层, 直径 $\sim 25\text{nm}$, $E_x=375\text{nm}$,

本文于1990年8月4日收到。

国家自然科学基金及国家教委博士点基金资助项目。

本工作为刘冬的硕士学位论文的一部分。

$E_m = 545\text{nm}$.

结果和数据处理

一. AAP 与红细胞膜的作用

为用 Tb^{3+} 做探针, 先用 Tb^{3+} 滴定红细胞膜以确定 Tb^{3+} 与膜磷脂和膜蛋白的结合相对强度. 图 1 给出按 Tb^{3+} 荧光增强及蛋白质荧光熄灭绘制的滴定曲线. Tb^{3+} 荧光增强反映它与蛋白质和磷脂的结合; 蛋白质荧光熄灭只反映与蛋白质的结合. 二者同步进行, 拐点接近, 前段线性好, 提示 Tb^{3+} 主要结合在膜蛋白上; 极少量与磷脂结合.

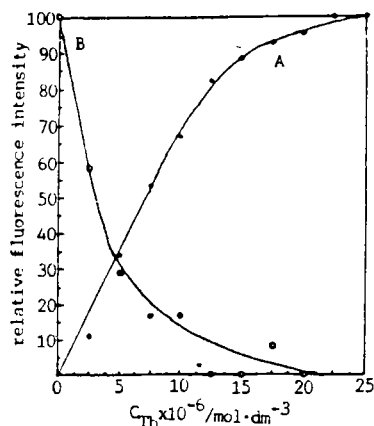


图 1 用 Tb^{3+} 滴定红细胞膜

Fig.1 Titration curves of RBC membrane with Tb^{3+} A. Tb^{3+} fluorescence; B. protein fluorescence

为测定 AAP 与细胞膜的结合参数, 先用 Scatchard 法处理图 1 中曲线 1 数据得膜上 Tb^{3+} 结合部位数 n 和表观结合常数 K . 定义 $\bar{Y} = [\text{TbL}] / C_m$, 其中 $[\text{TbL}]$ 指与膜结合的铽浓度, C_m 为膜浓度(用膜蛋白含量表示). 在滴定前段, $[\text{TbL}]$ 约等于铽分析浓度 C_{Tb} . 此时荧光强度 F 与 $[\text{TbL}]$ 关系可回归为:

$$F = -1.77 + 0.53[\text{TbL}]$$

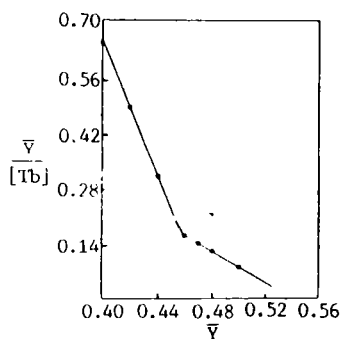


图 2 Tb^{3+} -红细胞膜相互作用的 Scatchard 图

Fig.2 Scatchard diagram of Tb^{3+} -RBC membrane interaction

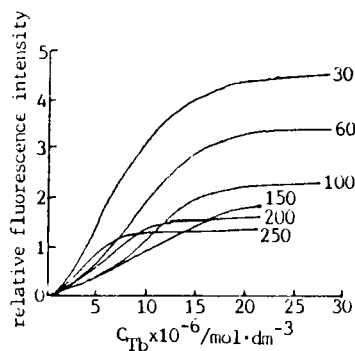


图 3 用 Tb^{3+} 滴定结合 AAP 的红细胞膜

Fig.3 Titration of AAP treated RBC membrane with Tb^{3+} , numbers on the curves refer to number of μl of AAP solution added

在后段, $[\text{TbL}]$ 不等于 C_{Tb} . 由前段 F 值计算 $[\text{TbL}]$, 求各点 $[\text{Tb}^{3+}]$, 算出 $\bar{Y}$, 得图

2 Scatchard 图。该曲线可按两类部位模型解析, 得 n_1 , n_2 和 K_1 , K_2 如下:

$$n_1 = 4.79 \times 10^{-4} \text{ mol Tb} / \text{g 膜蛋白}; \quad K_1 = 8.05 \times 10^6 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$n_2 = 6.10 \times 10^{-5} \text{ mol Tb} / \text{g 膜蛋白}; \quad K_2 = 2.00 \times 10^6 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$$

并得最大结合量 $[\text{TbL}]_{\text{max}}^0$ 为 $2.49 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 。

由图 3 数据先求出结合不同量 AAP 时的 $[\text{TbL}]_{\text{max}}$ 。设结合一个铂可阻止一个铽的结合, 则可按下式计算结合在膜上的铂浓度 $[\text{PtL}]$:

$$[\text{PtL}] = [\text{TbL}]_{\text{max}}^0 - [\text{TbL}]_{\text{max}}$$

由此计算未结合的 AAP 浓度 $[\text{Pt}]$ 及 $\bar{Y}$ 。图 4 为 $30 \sim 200 \mu\text{L}$ 间 11 组数据的 Scatchard 图。并求得:

$$n_1 = 4.00 \times 10^{-3} \text{ mol Pt} / \text{g 膜蛋白}; \quad K_1 = 6.30 \times 10^4 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$n_2 = 9.11 \times 10^{-5} \text{ mol Pt} / \text{g 膜蛋白}; \quad K_2 = 3.17 \times 10^4 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$$

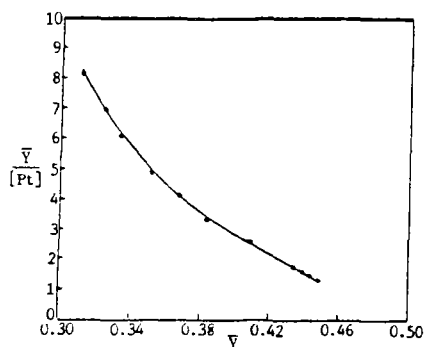


图 4 AAP-红细胞膜相互作用

Fig.4 Interaction of AAP and RBC membrane

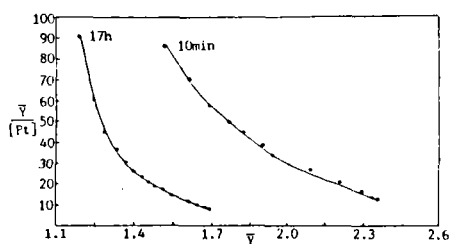


图 5 AAP-红细胞膜蛋白相互作用

Fig.5 Interaction of AAP and RBC membrane protein

结果表明铂与膜蛋白结合影响铽的结合, 而且结合能力大于铽。

二. AAP 与红细胞膜蛋白的相互作用

用 Scatchard 法处理不同量 AAP 与红细胞膜悬浮液反应 10min 及 17h 后的蛋白质自身荧光强度数据, 得图 5 曲线, 并得 n 及 K 值:

	n_1^+	K_1^+	n_2^+	K_2^+
10min*	2.03×10^{-3}	1.10×10^5	5.53×10^{-4}	5.48×10^4
17h	1.38×10^{-3}	2.56×10^5	4.91×10^{-4}	4.52×10^4

* 10min 的实验结果及 n 和 K 值仅供与 17h 结果比较, 未必已达到平衡。

+单位同前。

10min 与 17h 结果很接近, 表示 AAP 与膜蛋白反应较快, 与 Manaka 意见一致^[6]。所得 n 及 K 值与用 Tb^{3+} 荧光测得的与红细胞膜结合的 n 及 K 接近, 可认为 AAP 主要结合在膜蛋白上。

三. AAP 与磷脂脂质体的作用

用 Tb^{3+} 滴定与不同量 AAP 作用的 PC 脂质体, 按测得的 Tb^{3+} 荧光强度绘制滴定曲线, 曲

线前段为直线, 直线斜率 k 与 AAP 对 PC 摩尔比($C_{\text{Pt}}/C_{\text{PC}}$)关系如图 6 所示。结果表明 AAP 与 PC 结合。

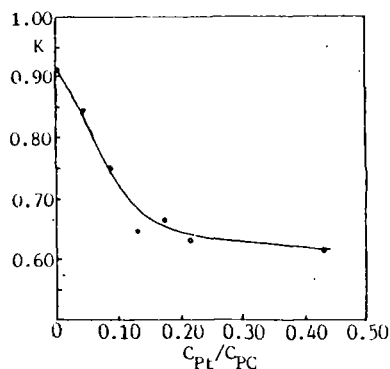


图 6 Tb^{3+} 滴定 PC 脂质体滴定

曲线 k 与 $C_{\text{Pt}}/C_{\text{PC}}$ 关系

Fig.6 Titration of AAP-PC liposome with Tb^{3+} , relationship of k and $C_{\text{Pt}}/C_{\text{PC}}$

可认为 $C_{\text{Pt}}/C_{\text{PC}}$ 很小时, AAP 完全与 PC 结合, 则 $C_{\text{Pt}}/C_{\text{PC}} = \bar{Y}$ 。实验结果 k 与 $\bar{Y}$ (即 $C_{\text{Pt}}/C_{\text{PC}}$) 符合 $k = 0.917 - 1.895\bar{Y}$ 线性方程 ($r = 0.99$)。 $C_{\text{Pt}}/C_{\text{PC}}$ 增大时, 偏离直线, 表示未结合的 AAP 较多。对曲线上任一点都先按回归方程算出 $\bar{Y}$, 再计算 $[\text{Pt}]$:

$$[\text{Pt}] = (C_{\text{Pt}}/C_{\text{PC}} - \bar{Y})C_{\text{PC}}$$

由此得到了 Scatchard 图, 由它算出的 n 及 K 为

$$n_1 = 0.138 \text{ mol/mol PC}; \quad K_1 = 6.35 \times 10^2 \text{ dm}^{-3} \text{ mol}^{-1}$$

$$n_2 = 0.0296 \text{ mol/mol PC}; \quad K_2 = 1.37 \times 10^2 \text{ dm}^{-3} \text{ mol}^{-1}$$

结果表明 AAP 能与脂质体中的 PC 结合, 但结合能力很弱。

结 果 与 讨 论

结果表明 AAP 与膜结合的蛋白和膜磷脂都能结合, 但与蛋白质的结合较强。自然, 用 Scatchard 法处理象 Tb^{3+} 或 AAP 这样的离子与细胞膜或其碎片的结合数据时, 所得的 K 值只能理解为表观结合常数, 它与膜的制备方法和条件有关。

Tb^{3+} 与膜蛋白优先结合早有报道。 Tb^{3+} 与周围酪氨酸和色氨酸残基的能量转移使 Tb^{3+} 荧光增强。Simpkins 等对胸腺细胞的研究结果提示 Tb^{3+} 主要结合在钙通道内口部位 1 上, 而且 DDP 可能占据这一部位⁽⁷⁾。本工作也显示铂可能占据钽结合部位。由于 DDP 对 Tb^{3+} 荧光强度和对 Tb^{3+} 磷光衰减的影响依赖于离子强度, Simpkins 认为 DDP 与膜蛋白间发生电荷-电荷相互作用, 但从测得的 K 值看未必如此。Sinha⁽⁸⁾ 及 Simpkins⁽⁷⁾ 都报告 DDP 的结合对磷脂分子的流动性影响很小, 与我们测得 AAP 与磷脂的 K 值较低一致。本工作提示 AAP 与膜蛋白的作用较快, 这一现象早即为 Manaka 指出。DDP 则因配位 Cl^- 交换慢, 所以作用很慢。

由于细胞膜上结合有多种蛋白质和磷脂, 所谓结合部位不是指配位的原子或残基, 只指与铂结合的是某种或某类分子。

参 考 文 献

- [1] Wang, K., *Pure and Appl. Chem.*, **60**, 1279(1988).
[2] Su, Y.X. et al., *J. Mol. Sci. (China)*, **6**, 110(1990); Xiao, J.J. et al., *ibid.*, **6**, 105(1990).
[3] Fumarulo, R. et al., *Inorg. Chim. Acta*, **137**, 99(1987).
[4] Dodge, J.T., *Arch. Biochem. Biophys.*, **100**, 119(1963).
[5] 陈宝卫等, 高等学校化学学报, **12**, 857(1991).
[6] Manaka, R.C. et al., *Chem. Biol. Interactions*, **22**, 353(1978).
[7] Simpkins, H. et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **972**, 25(1988).
[8] Sinha, B.K. et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **86**, 1051(1979).

**FLUORESCENCE SPECTROSCOPIC STUDIES ON THE
INTERACTIONS BETWEEN *cis*-DIAQUODIAMMINEPLATINUM(II)
AND THE MEMBRANE PROTEINS AND PHOSPHOLIPIDS**

Wang Kui Liu Dong

(Research Laboratories of Natural and Biomimetic Drugs; Department of Inorganic Chemistry,
Beijing Medical University, Beijing 100083)

The interactions between *cis*-diaquodiammineplatinum(II), AAP and membrane proteins and phospholipids of erythrocytes were studied by titration of the erythrocyte membrane, intact and AAP treated, and phosphatidylcholine liposome with Tb^{3+} by monitoring Tb^{3+} fluorescence. The membrane was also titrated with AAP by measuring the intrinsic fluorescence of protein. The binding parameters are obtained by Scatchard method. The results show that AAP binds to both proteins and phospholipids, but stronger with proteins.

Keywords: *cis*-diaquodiammineplatinum(II) membrane phospholipids membrane protein