

糖蛋白/胆红素钙水溶性复合物的形成及光谱研究

谢安建^{1,2} 沈玉华^{*,1,2} 董 婷¹ 夏 兵^{1,2} 黄方志^{1,2}(¹ 安徽大学化学化工学院, 合肥 230039)(² 南京大学配位化学国家重点实验室, 南京 210093)

采用傅立叶变换红外光谱 (FT-IR), 结合减法、二阶导、退卷积和曲线拟合等先进光谱技术, 紫外可见光谱, ICP-AES 分析方法, 对不同质量比的 α -酸性糖蛋白 (AGP) 和胆红素钙 (CaBR) 反应后的滤液进行了研究。结果表明, AGP 和 CaBR 之间存在着较强的相互作用, 导致 AGP 二级结构的有序性增加, CaBR 的水溶性增大, 两者形成了可溶性的 AGP/CaBR 复合物。

关键词: 糖蛋白 胆红素钙 复合物 光谱 胆结石
分类号: O614.23*1 O657.31

胆红素钙是色素型胆结石的主要成分, 而单纯的胆色素钙盐的沉积并不能形成胆结石。正是由于有少量糖蛋白、多糖等有机基质的参与, 导致该类胆结石的结构复杂, 至今没有可以有效治疗其的溶石剂和复方剂^[1]。因此, 多年来, 关于色素型胆结石的形成机理、预防和抑制一直是人们研究的焦点^[2-7]。

对于糖蛋白在结石形成中的作用, 多数人认为^[8-10]糖蛋白是成石因子, 诱导和促进结石的形成。但最近的研究表明, 不同相对分子质量、不同结构的糖蛋白对结石的形成所起的作用不同^[11-13], 某些可以起促成核作用, 另一些则具有抑成核作用。因此研究糖蛋白与胆红素钙之间的相互作用, 对于理解色素型胆结石的成因, 预防和治疗该类胆结石具有重要意义。本文将不同质量比的 AGP 与 CaBR 在生理盐水中混合、反应, 并采用多种先进光谱技术, 对反应后的滤液进行了表征。试图从 AGP 与 CaBR 之间的相互作用以及生物矿化的角度讨论 AGP 对 CaBR 成核、生长的影响, 以期探讨色素型胆结石的形成机理。

1 实验部分

1.1 试剂

胆红素、糖蛋白均为 Sigma 公司产品; 无水氯化钙、氯化钠均为分析纯; 硝酸, 优级纯, 上海前进化学试剂厂产品。

1.2 仪器

Nicolet 公司的 Nexus 870 傅立叶变换红外光谱仪, 扫描范围 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$, 扫描 32 次, 分辨率 4 cm^{-1} ; 北京普析通用仪器有限责任公司的 TU-1901 双光束紫外可见分光光度计; 美国 Leemans Lab 电感耦合等离子体原子发射光谱仪。

1.3 实验方法

1.3.1 CaBR 的合成

加入 0.2692g 胆红素于 810.00mL 氯仿中、0.1077g 无水氯化钙于 300.00mL 无水乙醇中, 搅拌使其充分溶解。然后边搅拌边将氯化钙溶液缓慢滴入到胆红素溶液中, 再加入一定量的吡啶, 搅拌 1h 后静置。出现红棕色沉淀, 离心分离, 并依次用无水乙醇、二次水、氯仿洗涤, 真空干燥 12h, 所得产物为红褐色固体, 即胆红素钙。

1.3.2 AGP/CaBR 样品的制备

在 0.9% NaCl 溶液中加入 AGP, 配成 $1 \text{ mg} \cdot$

收稿日期: 2002-10-10。收修改稿日期: 2003-01-10。

国家自然科学基金资助项目 (No. 20031010, 29971001), 国家教育部重点项目 (No. 00180) 以及安徽省自然科学基金项目 (No. 0045115)。

* 通讯联系人。E-mail: s_yuhua@163.com

第一作者: 谢安建, 男, 45 岁, 副研究员; 研究方向: 生物无机化学及分子有序膜。

mL^{-1} 的 AGP 溶液。然后分别按 AGP 和 CaBR 质量比为 1:1, 1:5, 1:15, 1:25 的比例将两者混合, 室温下充分搅拌后, 离心分离, 弃去沉淀。滤液称 AGP/CaBR 溶液, 分成三部分: (1) 用优级纯硝酸消解后, 配成 2% 的硝酸溶液, 测定钙离子含量; (2) 用 0.9% NaCl 溶液稀释 10 倍, 测定紫外可见光谱; (3) 将滤液滴加在 KBr 晶体上, 干燥后压片, 测定红外光谱。

2 结果与讨论

2.1 FT-IR 光谱

图 1 为纯 AGP 溶液 (A) 和不同反应质量比的 AGP/CaBR 溶液干燥后的红外光谱, 其主要数据见表 1a。可以看出, 在 AGP 溶液中加入 CaBR 后, 红外光谱的峰形基本相似, 但还是观察到一些小的变化: (1) 与 COH(CN) 振动有关的 $1030 \sim 1120\text{cm}^{-1}$ 区域谱带的强度逐渐减弱; (2) 纯 AGP 的 COO^- 伸缩振动 $1400 \sim 1450\text{cm}^{-1}$ 谱带为双峰, 其中 1404cm^{-1} 谱带较为尖锐; 与胆红素钙作用后, 此两峰的相对强度发生了变化, 随着参与反应的胆红素钙量的增大, 逐渐转变成了一个峰; (3) 糖蛋白的酰胺 I 带与 II 带的相对强度减弱, II 带由 1544cm^{-1} 至 1557cm^{-1} , 向高频移动了 $\sim 13\text{cm}^{-1}$; (4) 纯 AGP 中, $\sim 3447\text{cm}^{-1}$ NH 伸缩振动谱带与酰胺 I 带强度之比为 1.00, 而在反应质量比为 1:1, 1:5, 1:15, 1:25 的 AGP/CaBR 光谱中, 两谱带的比值依次为 1.18, 1.19, 1.24, 1.27, 呈增大之势。上述谱带频率和强度的变化表明 AGP 酰胺 I 带的 C=O 基团、酰胺 II 带中的 CN、NH 基团以及 COH 等极性基团与胆红素钙之间发生了相互作用, 这些作用包括配位作用 (AGP 与 Ca^{2+} 、胆红素与 Ca^{2+})、氢键及分子间力等 (AGP 与胆红素之间)。

为了得到更为详细的信息, 我们作 AGP/CaBR

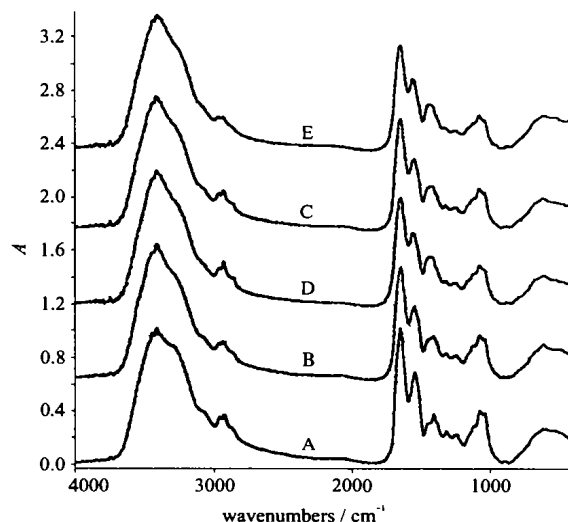


图 1 AGP/CaBR 复合物的红外光谱

Fig. 1 FT-IR spectra of AGP/CaBR complexes

(A) AGP, (B) $\rightarrow$ (E): Initial ratios of AGP to CaBR (w/w) are 1:1, 1:5, 1:15, 1:25, respectively.

与 AGP 的红外光谱差谱, 结果见图 2 和表 1b。在差谱中, 变化比较大的是 N-H 伸缩振动谱带, 与纯 AGP 相应的谱带比较, 向低频移动了 $\sim 34\text{cm}^{-1}$, 一方面可能是 AGP 的 NH 基团与 CaBR 的结合使该谱带发生了位移; 另一方面 CaBR 的吡咯环、内酰胺的 NH 振动峰位在 $\sim 3413\text{cm}^{-1}$ 和 3244cm^{-1} 处, 因此不排除这些谱带的影响。AGP 的酰胺 I 带向低频移动, 而 II 带则由 1544cm^{-1} 向高频移动至 $\sim 1564\text{cm}^{-1}$, 说明酰胺带中的 C=O、CN 以及 NH 基团与胆红素钙的作用较强。由于 II 带与胆红素羧酸根 C=O 不对称伸缩、吡咯环共轭 C=C 伸缩振动叠加峰 (1569cm^{-1}) 比较, 向低频移动了 $\sim 5\text{cm}^{-1}$, 因此该谱带可能是 AGP 与 CaBR 反应后相应基团振动共同

表 1 AGP/CaBR 复合物红外光谱和红外差谱的主要谱带频率

Table 1 Main Frequencies of AGP/CaBR in IR Spectra and IR Difference Spectra (cm^{-1})

assignment		NH	amide I	amide II	COO^-	amide III	C-OH (C-N)
HBG		3447	1645	1544	1442	1404	1315 1242 1111
initial ratio of HBG to CaBR / (w/w)	a	1:1	3447	1644	1545	1435	1406 1316 1244 1114 1070 1037
		1:5	3447	1645	1546	1435	1406 1317 1246 1118 1070 1039
		1:15	3446	1645	1557		1423 1318 1249 1070 1039
		1:25	3446	1645	1557		1423 1319 1245 1071 1040
	b	1:1	3412	1640	1564	1426	1246 1117 1073
		1:5	3413	1641	1563	1435	1249 1113 1071
		1:15	3412	1641	1563	1535	1241 1071
		1:25	3412	1641	1564	1435	1250 1151 1076
CaBR		3413	1665	1569	1456	1414	

Note: a: FT-IR spectrum; b: IR difference spectrum.

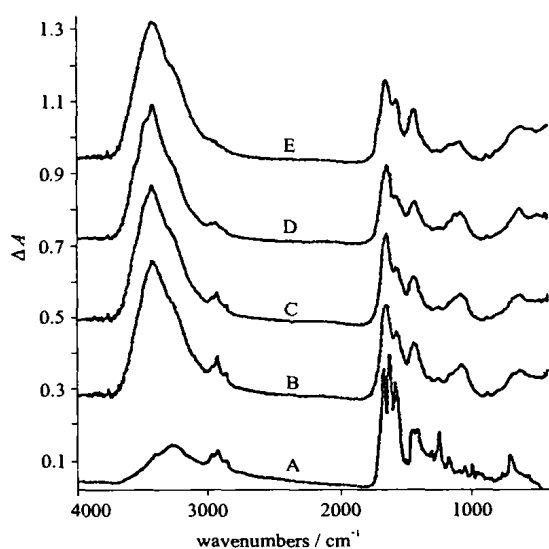


图 2 AGP/CaBR 复合物与 AGP 的红外光谱差谱
Fig. 2 IR difference spectra of AGP/CaBR complexes
(A) CaBR, (B) → (E): Initial ratios of AGP to CaBR (w/w) are 1:1, 1:5, 1:15, 1:25, respectively.

产生的结果。在差谱中, 酰胺 I 带和 II 带强度之比依次为 1.63, 1.57, 1.40, 1.29, 呈逐渐减弱之势。还观察到 $\sim 1404\text{cm}^{-1}$ 谱带消失, $\sim 1435\text{cm}^{-1}$ 谱带的强度总体增大的现象, 这可能与胆红素羧基的振动也有关。可以推测, AGP 与 CaBR 的相互作用使彼此的微观结构均发生了变化, 两者形成了水溶性的 AGP/

CaBR 复合物。

蛋白酰胺 I 带的吸收频率取决于 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动及其与 N-H 振动、 C-N 伸缩振动的耦合, 反映了蛋白质的二级结构, 主要包括蛋白质 α -螺旋、 β -折叠、无规卷曲和转角结构等氢键形式的吸收。为了了解 CaBR 的作用对 AGP 二级结构的影响, 我们对酰胺 I 带进行二阶导和退卷积处理, 确定了若干个子峰, 然后以它们的峰位值为初始参数, 对原始光谱酰胺 I 带进行曲线拟合, 结果见图 3。根据文献^[14-16]对其进行了归属和分析。将 $\sim 1660\text{cm}^{-1}$ 、 $\sim 1652\text{cm}^{-1}$ 指认为 α -螺旋结构; $\sim 1645\text{cm}^{-1}$ 为无规卷曲结构的特征吸收; $\sim 1693\text{cm}^{-1}$ 、 $\sim 1639\text{cm}^{-1}$ 、 $\sim 1631\text{cm}^{-1}$ 、 $\sim 1622\text{cm}^{-1}$ 、 $\sim 1613\text{cm}^{-1}$ 、 $\sim 1605\text{cm}^{-1}$ 归属于 β -折叠的特征谱带; 而 $\sim 1687\text{cm}^{-1}$ 、 $\sim 1678\text{cm}^{-1}$ 和 $\sim 1669\text{cm}^{-1}$ 则被认为是转角结构, 由此计算出 AGP 各二级结构的含量, 如表 2 所示。

可以看到, 纯 AGP 的 α -折叠、 β -螺旋、回转和

表 2 AGP/CaBR 中糖蛋白二级结构的质量分数

Table 2 Mass Percent of the Secondary Structure of AGP in AGP/CaBR ($w\%$)

secondary structure	AGP	initial ratios of AGP to CaBR / (w/w)			
		1:1	1:5	1:15	1:25
β -fold	34.3	38.3	37.5	40.3	45.1
α -helix	38.8	35.6	39.0	38.7	41.6
corner	14.5	14.2	11.7	11.9	13.3
random	12.4	11.9	11.8	9.1	0.0

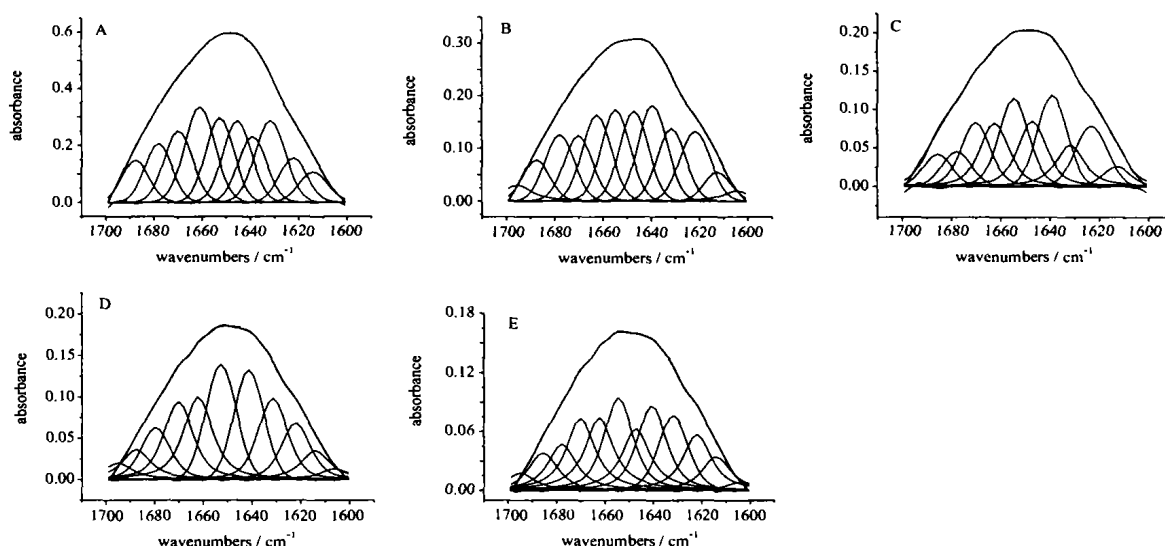


图 3 AGP/CaBR 复合物中酰胺 I 带拟合曲线

Fig. 3 Curve-fitted results of amide I bands of AGP (A) and AGP/CaBR (B ~ E)

B → E: Initial ratios of AGP to CaBR (w/w) are 1:1, 1:5, 1:15, 1:25, respectively.

表 3 AGP/CaBR 水溶液体系 Ca^{2+} 浓度的测定

Table 3 Determination of the Concentration of Calcium Ion in AGP/CaBR Aqueous Solution

samples	saturation solution of CaBR	initial ratios of AGP to CaBR/(w/w)			
		1:1	1:5	1:15	1:25
concentration of $\text{Ca}^{2+}/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	0.080	1.403	2.411	4.518	6.735

无规卷曲结构的百分含量分别为 34.3%、38.8%、14.5% 和 12.4%。与 CaBR 发生作用后, 二级结构发生了较大的变化。随反应质量比由 1:1 $\rightarrow$ 1:25, 蛋白 β -折叠氢键形式的结构含量增加; α -螺旋结构的含量在反应质量比为 1:25 时也呈增大趋势。而转角结构和无规卷曲结构的含量则相应减少, 特别是无规结构, 在 AGP 与 CaBR 反应质量比达 1:25 时消失。可见后两种形式的氢键结构部分转化为高度有序的 β -折叠和 α -螺旋结构。由此我们得出结论: CaBR 与 AGP 间的相互作用使 AGP 的氢键形式发生改变, 结构的有序性增加。在生物体系中, 蛋白质结构的有序性对生物矿物的形成有直接的影响, 涉及到生物矿物的组织形式、结构和性质。因此, CaBR 与 AGP 之间复杂的相互作用可使 CaBR 在蛋白质的表面上成核、有序地生长。

2.2 紫外可见光谱

为了考察 CaBR 在 AGP 水溶液中的溶解情况, 本文测定了 CaBR 饱和溶液和 AGP/CaBR 溶液的 UV-Vis 光谱(见图 4)。

部颁标准胆红素的特征吸收波长位于 ~ 453 nm, 对应于两对吡咯环衍生物和内酰胺共轭体系的 $\pi-\pi^*$ 跃迁的强特征吸收峰。在饱和 CaBR 溶液的光

谱中, 基本观察不到该特征峰, 说明饱和溶液中所溶解的胆红素的浓度非常低。而在 AGP/CaBR 溶液中, 随反应质量比由 1:1 $\rightarrow$ 1:25, 胆红素的特征吸收峰逐渐显现, 并呈增强趋势, 表明糖蛋白的作用使胆红素钙的水溶性逐渐增加, 溶液中胆红素的浓度增大。

2.3 电感耦合等离子体原子发射光谱

我们利用电感耦合等离子体原子发射光谱测定了 AGP/CaBR 复合物溶液中钙的含量, 其结果见表 3。可以看出, 随参与反应的 CaBR 量的增大, 溶液中钙的含量也呈增长趋势, 从另一侧面说明了 CaBR 在 AGP 溶液中的溶解度大大增加。显而易见, 该条件下胆红素钙不可能完全以游离态的 Ca^{2+} 和 BR^{2-} 形式进入水中, 而主要是以 CaBR 中的 Ca^{2+} 与糖蛋白、胆红素的 N, O 等原子配位以及胆红素与糖蛋白极性基团间的氢键结合形成的复杂水溶性复合物的形式存在。因此该复合物的形成, 可以抑制 CaBR 沉积的速度, 使其生长有序化。

参 考 文 献

- [1] Casmeli E., Elewant A. E., Kerre T. et al *Am. J. Gastroenterol.*, **1999**, *94*(2), 474.
- [2] Sama C., Mnselli M., Taronic F., Barbara L. *Semin. Liver Dis.*, **1990**, *10*, 149.
- [3] Taylor D. R., Wu J. G., Soloway R. D. *Hepatology*, **1995**, *22*(2), 488.
- [4] Kajihara T., Tazuma S., Yamashita G., Kajiya G. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **1999**, *14*, 578.
- [5] Caroli Bosh F. X., Pugliese E. P., Demarguay J. F. et al *Digestion*, **1999**, *60*, 344.
- [6] Well J. E., Berr F., Thomas L. A. et al *J. Hepatol.*, **2000**, *32*, 4.
- [7] Nakai K., Tazuma S., Ochi H., Chayama K. *Biochim. Biophys. Acta*, **2001**, *1534*, 78.
- [8] Soloway R. D., Wu J. G., Shen G. R. et al *Gastroenterology*, **1987**, *92*(50), 1780(Part 2).
- [9] Xu Y. Z., Soloway R. D., Wu J. G. et al *Gastroenterology*, **1999**, G0144.

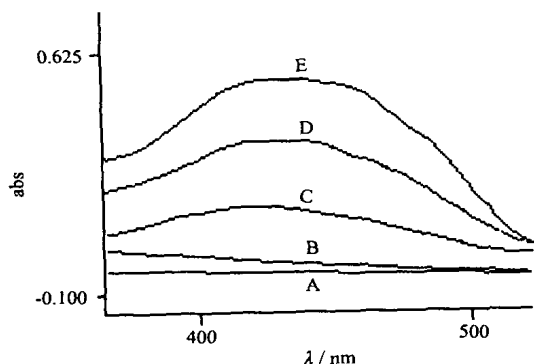


图 4 胆红素钙饱和溶液(A)和 AGP/CaBR 溶液(B~E)的紫外光谱

Fig. 4 UV-vis spectra of CaBR saturation solution (A) and AGP/CaBR filtrates(B~E)
B $\rightarrow$ E: initial ratios of AGP to CaBR (w/w) are 1:1, 1:5, 1:15, 1:25, respectively.

- [10] SHEN Shi-Peng (沈世鹏), XIAO Rong-Biao (萧蓉葆) *Cholelithiasis* (胆石病), Beijing: Public Sanitation Press, 1998, p35.
- [11] Zijlstra A. T., Offner G. D., Afdhal N. H. et al *Gastroenterology*, 1996, 110, 1926.
- [12] Offner G. D., Afdhal N. H. *Hepatology*, 1991, 14, 92.
- [13] Ohya T., Schwarzendrube J., Busch N. et al *Gastroenterology*, 1993, 104, 527.
- [14] Jackson M., Haris P. I., Chapman D. *J. Mol. Struct.*, 1989, 214, 329.
- [15] Hollosi M., Majer Z. S. et al *Biopolymers*, 1994, 34, 177.
- [16] Jackson M., Haris P. I., Chapman D. *Biochem.*, 1991, 30, 9681.

Study on the Formation and Spectra of Soluble Glycoprotein/Calcium Bilirubinate Complexes

XIE An-Jian^{1,2} SHEN Yu-Hua^{*,1,2} DONG Ting¹ XIA Bing^{1,2} HUANG Fang-Zhi^{1,2}

(¹ College of Chemistry and Chemical Engineering, Anhui University, Hefei 230039)

(² State Key Laboratory of Coordination Chemistry, Nanjing University, Nanjing 210093)

Fourier transform infrared spectroscopy and ultraviolet spectrum and inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry were used to study the filtrates produced by reactions of different initial ratios (w/w) of α -acidic glycoprotein (AGP) and calcium bilirubinate (CaBR) in saline solution. The results indicated that there were strong interactions between AGP and CaBR by hydrogen bonds or coordination or electrostatic attraction, which made the microstructure of AGP changed and solubility of CaBR in aqueous solution increased and a series of soluble AGP/CaBR complexes formed.

Keywords: acidic glycoprotein calcium bilirubinate complexes spectrum gallstone