

硅钨杂多酸与牛血红蛋白相互作用的研究

王彦卿 张红梅 张根成*

(江苏省滩涂生物资源与环境保护重点建设实验室,
盐城师范学院应用化学与环境工程研究所,盐城 224002)

关键词: 硅钨杂多酸; 牛血红蛋白; 紫外光谱; 荧光光谱; 热力学参数

中图分类号: O614.61⁺3; O613.72; O657.61

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2006)05-0895-05

Interaction between Silicotungstic Heteropolyacid and Bovine Hemoglobin (BHb)

WANG Yan-Qing ZHANG Hong-Mei ZHANG Gen-Cheng*

(Jiangsu Provincial Key Laboratory of Coastal Wetland Bioresources and Environmental Protection,
Institute of Applied Chemistry and Environmental Engineering, Yancheng Teachers College, Yancheng, Jiangsu 224002)

Abstract: The interaction between silicotungstic heteropolyacid and bovine hemoglobin (BHb) was investigated using fluorescence and UV-Vis. The experimental results show that the fluorescence quenching of BHb by silicotungstic heteropolyacid is a result of the formation of SiW-BHb complex; and the quenching mechanism is mainly static quenching. The binding site number n , apparent binding constant K_A and corresponding thermodynamic parameters were measured at different temperatures. The process of binding SiW molecule on BHb was a spontaneous molecular interaction procedure in which entropy increased and Gibbs free energy decreased. Electrostatic interaction plays a major role in stabilizing the complex. The effect of silicotungstic heteropolyacid on the conformation of BHb was analyzed using synchronous fluorescence spectroscopy.

Key words: silicotungstic heteropolyacid; BHb; UV-Vis spectroscopy; fluorescence spectroscopy; thermodynamic parameters

多金属氧酸盐作为抗艾滋病病毒、抗流感病毒和抗肿瘤的药物,引起了人们对多金属氧酸与蛋白质之间相互作用的极大关注。蛋白质空间结构的任何变化引起的构象变化都意味着蛋白质分子的活性改变,因此,蛋白质与内源性化合物及许多药物分子之间相互作用的研究一直受到人们关注^[1-3]。血红蛋白是动物及人体内执行输氧任务的蛋白质,是生命机体进行各种生理活动的主要承担者。血红蛋白分子中每条 α 链和 β 链含有的色氨酸(Trp)残基分别为 α -14Trp、 β -15Trp、 β -37Trp。Alpert^[4]等认为位于疏水

腔内的 β -37Trp是血红蛋白内源荧光的主要来源,同时 β -37Trp荧光的变化与血红蛋白R-T构象的转变及血红蛋白的载氧功能有着密切的联系。近年来,人们将杂多酸化合物用于多肽链、蛋白质、酶催化作用和光合作用的生物研究中^[5-8]。杂多酸作为一种药物,在注入人体后,除绝大部分能够吸附到发病组织上,不可避免地会有少量的杂多酸分子进入到正常组织中,因此了解该药物可能的毒副作用是十分重要的。本文以相关研究报道较少的血红蛋白作为血液中生物大分子的代表,在模拟动物体生理

收稿日期:2005-10-31。收修改稿日期:2005-12-28。

江苏省滩涂生物资源与环境保护重点建设实验室资助项目(No.JLCBE05032)。

*通讯联系人。E-mail:hxzhgc@126.com;wyqing76@126.com

第一作者:王彦卿,男,30岁,硕士研究生;研究方向:生物无机化学。

条件下,以硅钨杂多酸作为药物模型,用 UV-Vis 吸收光谱和荧光光谱研究了硅钨杂多酸与牛血红蛋白(BHb)的相互作用,讨论了硅钨杂多酸对 BHb 的荧光猝灭作用,得到了杂多酸与 BHb 的表观结合常数、结合作用力类型和热力学参数等,并用同步荧光技术考察了 BHb 构象的变化,为研究杂多酸对血红蛋白性能的影响提供了一些基础信息。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

带恒温系统的 LS-50B 型荧光光度计(美国 Perkin-Elmer 公司);GBC UV-Vis916 紫外-可见光谱仪(澳大利亚);PHS-3C 型精密 pH 计(上海雷磁仪器厂);ZC-18Q 智能型超级恒温水槽(宁波天恒仪器厂);高纯水制备仪(日本 Millipore 公司)。

把硅钨杂多酸($\text{SiO}_2 \cdot 12\text{WO}_3 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$, 国药集团化学试剂有限公司)配制成 $1.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液待用;牛血红蛋白(购于 Sigma 公司)用 $\text{pH}=7.4$ 的三羟甲基氨基甲烷(Tris)缓冲溶液(内含 $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 维持离子强度)配制成 $5.0 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备溶液并于冰箱中(温度低于 $5 \text{ } ^\circ\text{C}$)保存。除 Tris 为生化试剂外,其余试剂均为分析纯试剂,实验用水为高纯水(电阻率为 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$)。

1.2 实验方法

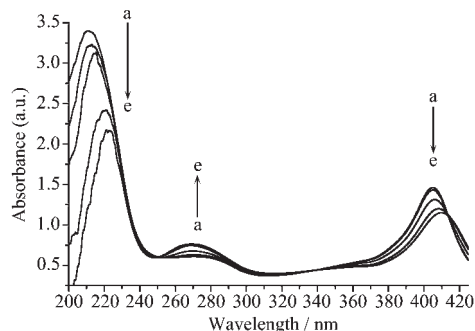
移取 $2.5 \text{ mL } 5.0 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BHb 于 1 cm 的石英比色皿中,用微量注射器逐次加入 $1.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硅钨杂多酸溶液进行荧光滴定(滴定剂累加体积小于 0.1 mL),每次加入溶液后混合均匀,在一定温度下作用 10 min 后,于 280 nm 激发波长下进行荧光扫描。光源为脉冲式氙灯,发射与激发狭缝宽度均为 5 nm ,扫描速度 $500 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$,在 LS-50B 型荧光分光光度计上记录 $285 \sim 500 \text{ nm}$ 波长范围内的发射光谱;固定 $\Delta\lambda=15 \text{ nm}$ 或 $\Delta\lambda=60 \text{ nm}$,记录硅钨酸与 BHb 作用的同步荧光光谱。在室温, $190 \sim 500 \text{ nm}$ 范围内,以相应的硅钨酸溶液作为参比,用 GBC UV-Vis916 紫外-可见光谱仪记录纯 BHb 溶液和硅钨酸-BHb 混合溶液的紫外吸收光谱。

2 结果与讨论

2.1 UV-Vis 光谱

图 1 为硅钨杂多酸与 BHb 的紫外示差吸收光谱。当溶液中不含硅钨酸时,在 $200 \sim 420 \text{ nm}$ 范围内可观察到 215 、 270 和 405 nm 处的 3 个吸收峰,它

们分别是血红蛋白肽链中氨基酸残基的吸收峰、色氨酸和酪氨酸残基的芳香杂环的吸收峰和血红素的特征峰^[9]。随着溶液中硅钨酸与血红蛋白物质的量比的增加, 215 nm 和 405 nm 峰的吸光度降低,峰位发生了红移, 270 nm 峰的吸光度增加,同时在 250 、 340 和 410 nm 附近形成 3 个等吸收点。随着硅钨酸与 BHb 物质的量比值的增大, BHb 的构象发生了变化,而这种构象的变化有利于 BHb 分子中色氨酸和酪氨酸残基芳香杂环的 $\pi-\pi^*$ 跃迁,从而导致 270 nm 的吸收峰强度增加^[7,10]。 215 nm 峰的吸光度降低,峰位红移,这可能是硅钨酸与氨基酸中含氧或含氮基团发生作用,导致其原有键强减弱而引起其吸收峰吸光度的降低和峰位的红移。BHb 分子中血红素基团被包埋在蛋白链中,蛋白链上很多氨基酸的疏水性基团位于链的内侧,在血红素周围创造了一个疏水性环境,避免了极性分子或氧化剂进入,从而保护在 BHb 分子中 Fe(II) 血红素的稳定。 405 nm 处的吸收峰就是血红素的 Soret 谱带特征峰,它的吸收峰吸光度的降低和峰位的红移,表明硅钨酸分子能够进入 BHb 中血红素辅基围绕肽链所形成的疏水空穴,使得硅钨酸与血红素辅基发生了直接作用。



$n_{\text{BHb}}:n_{\text{SiW}}$: a, 1:0; b, 1:1; c, 1:3; d, 1:6; e, 1:9

图 1 不同物质的量比的硅钨酸和血红蛋白混合溶液的紫外示差吸收光谱

Fig.1 Differential absorption spectra of BHb and SiW mixture of difference molar ratio

2.2 硅钨酸对 BHb 的荧光猝灭机理

BHb 在 280 nm 光激发下,其发射光谱(见图 2)在 $300 \sim 500 \text{ nm}$ 范围内有 2 个发射峰, 346 nm 为 BHb 中色氨酸和酪氨酸残基的荧光发射峰, 437 nm 的荧光发射可能类似原卟啉和 BSA 的 422 nm 荧光发射,反映了卟啉和结合蛋白质分子的某些独特的相互作用^[11,12]。图 2 为固定 BHb 浓度下体系的荧光发射光谱随硅钨酸浓度的变化谱图。可以看出,随着

硅钨酸浓度的增加,2 个荧光发射波长分别保持在 346 nm 和 437 nm 左右,但蛋白质的内源荧光强度有规律地降低,说明两者之间存在着相互作用,发生了能量转移。曾测定了硅钨酸在 280~500 nm 范围内的紫外吸收光谱(图略),并与 BHb 的荧光发射光谱比较,发现在 280~360 nm 之间两者有不同程度的重叠,由于 BHb 的荧光光谱没有发生畸变,表明两者之间的能量转移属于非辐射能量转移^[13]。346 nm 的荧光峰主要为 BHb 中 β -37Trp 的荧光发射,由于 β -37Trp 荧光的变化能够体现血红蛋白四级空间构象的改变^[4],因此杂多酸分子对 β -37Trp 的荧光猝灭表明其影响了 BHb 的载氧功能。BHb 在 405 nm 处紫外吸收峰吸光度的降低和峰位的红移,以及 437 nm 的荧光发射峰强度的降低,表明硅钨酸与血红素辅基发生了直接作用,干扰了血红素辅基与珠蛋白部分的相互作用,由此可能影响血红蛋白的正

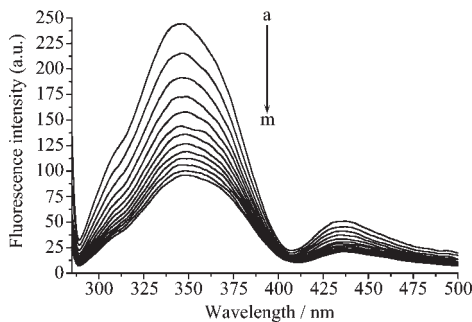


图 2 硅钨酸对 BHb 荧光光谱的影响

Fig.2 Effects of SiW on fluorescence the spectra of BHb at 299 K, pH=7.40; λ_{ex} =280 nm; c_{BHb} : 5.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ in all cases; c_{SW} $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ from a to m: 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0, 17.5, 20.0, 22.5, 25.0, 27.5, 30.0

表 1 硅钨酸与 BHb 结合的 Stern-Volmer 常数和相应的直线关系

Table 1 Stern-Volmer quenching constant of the system of SiW-BHb at different temperatures

T / K	Linear regression equation	R	$10^{-4} K_{sv} / (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$10^{-12} K_q / (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$
299	$F_0 / F = 1.0219 + 5.168 \times 10^4 C_q$	0.999 6	5.168	5.168
304	$F_0 / F = 1.0267 + 4.715 \times 10^4 C_q$	0.998 7	4.715	4.715
309	$F_0 / F = 1.0389 + 4.307 \times 10^4 C_q$	0.998 6	4.307	4.307

从表 1 可以看出, K_q 的数值在 10^{12} 数量级,远大于动态猝灭的 K_q 值 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$,随着温度的升高 K_{sv} 有所降低。从这种意义上考虑,硅钨酸对 BHb 的荧光猝灭作用不是由扩散和碰撞引起的动态猝灭,而是硅钨酸与 BHb 形成了基态复合物,对 BHb 内源性荧光的猝灭过程应为静态猝灭。这与

常生理功能^[11]。

荧光猝灭过程通常可以分为动态猝灭和静态猝灭。动态猝灭是猝灭剂和荧光物质的激发态分子之间的相互作用引起的,其过程遵循 Stern-Volmer 方程^[14]:

$$F_0 / F = 1 + K_{sv} C_q = 1 + K_q \tau_0 C_q \quad (1)$$

式中 F_0 和 F 分别表示不加入和加入猝灭剂时体系的相对荧光强度; K_{sv} 为动态猝灭常数 (即 Stern-Volmer 猝灭常数); C_q 为猝灭剂的浓度; K_q 为荧光猝灭速率常数,各类猝灭剂对生物大分子的最大 K_q 值一般为 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; τ_0 为不存在猝灭剂时荧光物质的平均寿命,生物大分子的荧光平均寿命一般约为 10^{-8} s ^[14]。根据图 2,假设硅钨酸对 BHb 的荧光猝灭过程为动态猝灭,则由式(1)作出荧光发射峰在 346 nm 处 BHb 荧光猝灭的 Stern-Volmer 曲线,如图 3 所示。由图中直线的斜率及截矩可求出 K_{sv} 和 K_q ,计算结果见表 1。

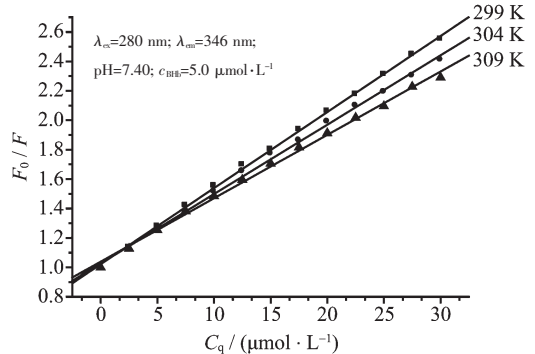


图 3 不同温度下硅钨酸对 BHb 荧光猝灭的 Stern-Volmer 图

Fig.3 Stern-Volmer plot for the SiW-BHb at different temperature

硅钨杂多酸与 BHb 的紫外示差吸收光谱表明的结果相吻合。

2.3 硅钨酸与 BHb 的结合热力学参数和结合力类型

药物小分子与蛋白质等生物大分子之间的结合力主要有疏水作用力、氢键、Vander Waals 力和静电

作用力等^[3]。在温度变化范围不大时,可以近似的认为反应的 $\Delta H^\ominus$ 为一常数,可由 Vant-Hoff 方程求得结合反应的标准吉布斯自由能变 $\Delta G^\ominus$ 、焓变 $\Delta H^\ominus$ 、熵变 $\Delta S^\ominus$ ^[3,15]。

$$\ln K^\ominus = -\Delta H^\ominus / RT + \Delta S^\ominus / R \quad (2)$$

$$\Delta G^\ominus = \Delta H^\ominus - T\Delta S^\ominus \quad (3)$$

式(2)中 $K^\ominus$ 为 Stern-Volmer 猝灭常数, R 为摩尔气体常数,以不同温度下 $\ln K^\ominus$ 对 $1/T$ 作图,得直线 $y = 5.2234 + 1.6833 \times 10^3 x$, $R = 0.9999$, 根据直线的斜率

表 2 硅钨酸与 BHB 相互作用的热力学函数

Table 2 Thermodynamic parameters of SiW-BHB interaction at pH 7.4 (tris buffer)

T / K	$\Delta H^\ominus / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S^\ominus / (\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K})$	$\Delta G^\ominus / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$
299	-13.992	43.427	-26.977
304	-13.992	43.427	-27.194
309	-13.992	43.427	-27.411

及截矩可求出 $\Delta H^\ominus$ 和 $\Delta S^\ominus$, 根据公式(3)计算出不同温度的 $\Delta G^\ominus$, 相应数据见表 2。从热力学角度来看,反应的 $\Delta G^\ominus < 0$, 说明硅钨酸与 BHB 的结合反应能够自发进行, 而由 $\Delta H^\ominus < 0$, $\Delta S^\ominus > 0$ 等实验事实表明硅钨酸与 BHB 之间的作用力主要为静电作用力^[5,16]。

2.4 硅钨酸与 BHB 结合位点数及表观结合常数

硅钨酸对 BHB 的猝灭机理为静态猝灭, 二者的结合符合荧光物质-猝灭剂间的结合表达式^[17,18]。设生物大分子含有 n 个相同且独立的结合位置, 则有:

$$F_0 / F = 1 + K_A C_q^n \quad (4)$$

$$\text{即} \quad \lg[(F_0 - F) / F] = \lg K_A + n \lg C_q \quad (5)$$

表 3 硅钨酸与 BHB 结合位点数及表观结合常数

Table 3 Binding constants K_A and binding sites n at different temperature

T / K	Linear regression equation	R	$10^{-4} K_A / (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	n
299	$\lg[(F_0 - F) / F] = 4.6113 + 0.9756 \times \lg C_q$	0.9996	4.0860	0.9756
304	$\lg[(F_0 - F) / F] = 4.5834 + 0.9773 \times \lg C_q$	0.9992	3.8318	0.9773
309	$\lg[(F_0 - F) / F] = 4.3197 + 0.9278 \times \lg C_q$	0.9997	2.0878	0.9278

2.5 硅钨酸对 BHB 构象的影响

对于蛋白质的同步荧光光谱, $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 时仅表现为酪氨酸残基的荧光, $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 时则显示色氨酸残基的荧光^[20]。因残基的最大发射波长与其所处环境的极性有关, 故由发射波长的改变可判断蛋白质构象的变化。若最大发射波长红移, 表明残基所处环境的极性增加, 蓝移则疏水性增加。

固定 BHB 浓度, 逐渐增大硅钨酸的浓度, 绘制 BHB 的同步荧光光谱。经实验获得, 分别选择波长

由式(5)作 $\lg[(F_0 - F) / F] \sim \lg C_q$ 图, 见图 4。由图中直线的斜率及截矩计算硅钨酸与 BHB 表观结合常数 K_A 及结合位点数 n (表 3)。表 3 数据表明, 硅钨酸与 BHB 分子之间具有较强的相互作用, 且每 1 个硅钨酸分子与 1 个蛋白质分子结合形成配合物, 而表观结合常数随反应温度的升高而减少, 进一步说明推断该反应过程为静态猝灭机理的合理性。同时, 从式(4)可以看出, 在理论结合位点数 $n = 1$ 时, 静态猝灭 F_0 / F 与 C_q 的关系式与动态猝灭所获得的关系式相似, 只是在静态猝灭的情况下用药物与生物大分子形成基态复合物的表观结合常数 K_A 代替了动态猝灭常数 K_{SV} ^[19]。不难理解, 单独通过讨论两者之间的大小关系是难以判断所发生的猝灭现象究竟是动态猝灭还是静态猝灭。

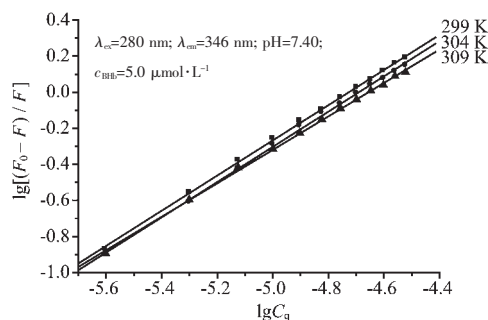


图 4 不同温度下硅钨酸对 BHB 荧光猝灭的 $\lg[(F_0 - F) / F]$ 与 $\lg C_q$ 图

Fig.4 $\lg[(F_0 - F) / F]$ with $\lg C_q$ plot for the SiW-BHB at different temperature

差 $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 考察硅钨酸对酪氨酸和色氨酸残基的影响(图 5A、B)。从图 5A 中可以看出, 随着硅钨酸浓度增大, 酪氨酸残基荧光被猝灭, 但酪氨酸特征荧光光谱峰位置没有发生移动, 表明硅钨酸对酪氨酸残基所处微环境的影响较小。图 5B 中 280 nm 处的荧光峰是由血红蛋白的四聚体中色氨酸残基贡献的, 320 nm 处的荧光峰是由二聚体贡献的^[21], 这 2 个色氨酸残基荧光均被猝灭, 其特征荧光光谱峰位置分别红移 6 nm 和 3 nm。表明硅钨酸与

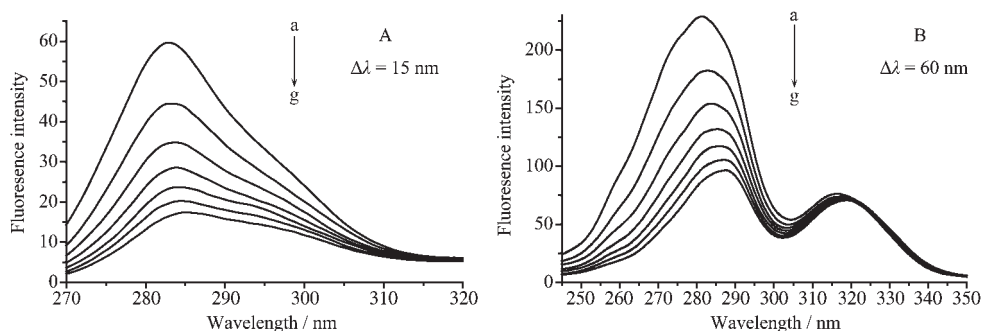


图5 BHB 的同步荧光光谱

Fig.5 Synchronous fluorescence spectra of BHB: pH=7.40; $T=299\text{ K}$; $c_{\text{BHB}}=5.0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $c_{\text{SW}}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$: a~g: 0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0

BHB的作用使蛋白质的构象发生改变,色氨酸残基所处微环境的极性增加,疏水性减小,硅钨酸分子插入BHB分子内部的疏水空穴,使其疏水结构有所瓦解,肽链的伸展程度有所增加。

参考文献:

- [1] YANG Mei-Ling(杨美玲), YANG Pei-Ju(杨培菊), SONG Yu-Min(宋玉民). *Wuji Huaxue Xuebao(Chinese J. Inorg. Chem.)*, **2004**,**21**(4):483~489
- [2] YAN Cheng-Nong(颜成农), ZHANG Hua-Xin(张华新), MEI Ping(梅平), et al. *Zhongguo Huaxue(Chinese Journal of Chemistry)*, **2005**,**23**(9):1151~1156
- [3] He W J, Li Y, Tian H X, et al. *J. Photochem. Photobiol. A.*, **2005**,**174**:53~61
- [4] Alpert B, Jahnson D M, Weber F C G. *J. Photochem. Photobiol. A.*, **1980**,**30**:1~8
- [5] HU Yan-Jun(胡艳军), LIU Yi(刘义), HOU An-Xin(侯安新), et al. *Huaxue Xuebao(Acta Chim. Sinica)*, **2004**,**62**(16): 1519~1523
- [6] LUO Yang-He(罗杨合), JIANG Zhi-Liang(蒋治良), YUAN Wei-En(袁伟恩), et al. *Yingyong Huaxue(Chinese J. Application Chemistry)*, **2003**,**20**(9):833~836
- [7] HUANG Jin(黄瑾), YUAN Yu-Zhou(袁余洲), LIANG Hong(梁宏). *Zhongguo Kexue(Science in China)*, **2001**,**31**(6):530~535
- [8] Long X F, Zhang H, Bi S P. *Spectrochimica Acta Part A*, **2004**,**60**:1631~1636
- [9] White A, Handler P, Smith E L. *Principle of Biochemistry*. Beijing: Science Press, **1978**.110
- [10] LI Xiao-Jing(李晓静), WANG Zhi-Qiang(王志强), CHEN Ji (陈继), et al. *Yingyong Huaxue(Chinese J. Application Chemistry)*, **1998**,**15**(1):5~8
- [11] ZUO Zhi-Ying(左智颖), BO Yun-Hong(薄云红), YANG Xiao-Da(杨晓达), et al. *Zhongguo Xitu Xuebao(Journal of the Chinese Rare Earth Society)*, **1996**,**14**(4):336~340
- [12] CHENG Yi(程驿), LIN Hua-Kuan(林华宽), WANG Kui (王夔). *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao(Chemical Journal of Chinese Universities)*, **1998**,**19**(6):876~878
- [13] YAN Cheng-Nong(颜成农), ZHANG Hua-Xin(张华新), LIU Yi(刘义), et al. *Huaxue Xuebao(Acta Chim. Sinica)*, **2005**,**63**(18):1727~1732
- [14] MA Gui-Bin(马贵斌), GAO Fei(高飞), REN Bin-Zhi(任斌知), et al. *Huaxue Xuebao(Acta Chim. Sinica)*, **1995**,**53**: 1193~1197
- [15] Hu Y J, Liu Y, Wang J B, et al. *J. Pharm. Biom. Anal.*, **2004**, **36**:915~919
- [16] Ross D P, Subramanian S. *Biochemistry*, **1981**,**20**:3096~3102
- [17] Jiang M, Xie M X, Zheng Y, et al. *J. Molec. Struct.*, **2004**, **692**:71~80
- [18] XIE Meng-Xia(谢孟峡), JIANG Min(蒋敏), LIU Yuan(刘媛), et al. *Huaxue Xuebao(Acta Chim. Sinica)*, **2004**,**62**(16): 1460~1466
- [19] CHEN Guo-Zheng(陈国珍), HUANG Xian-Zhi(黄贤智), ZHENG Zhu-Zi(郑朱梓), et al. *Fluorescence Analysis(Second Edition)(荧光分析法,第二版)*, Beijing: Science Press, **1990**.115~119
- [20] SHANG Zhi-Cai(商志才), YI Ping-Gui(易平贵), YU Qing-Sen(俞庆森), et al. *Wuli Huaxue Xuebao(Acta Phys. Chim. Sin.)*, **2001**,**17**(10):873~878
- [21] YANG Xiu-Juan(杨秀娟), LU Tian-Hong(陆天虹). *Fenxi Huaxue(Chinese Journal of Analytical Chemistry)*, **1997**,**25**(9):1021~1023