

高频超声照射下卟啉镓对牛血清白蛋白的损伤

王 君^{*,1} 赵红丹¹ 张朝红² 张向东¹ 马 腾¹ 姜岳峰¹ 张邯玉¹

(¹ 辽宁大学化学系; ² 辽宁大学环境科学系, 沈阳 110036)

摘要: 用紫外-可见(UV-Vis)光谱和荧光(FL)光谱研究了高频超声波激活卟啉镓(HP-Ga)配合物对牛血清白蛋白(BSA)的损伤, 探讨了超声波照射时间, HP-Ga 浓度和酸度等因素对 BSA 损伤的影响。结果表明, 在一定条件下, BSA 的损伤程度随着照射时间的增加和 HP-Ga 浓度的增大而加剧。

关键词: 超声; 卟啉镓(HP-Ga); 牛血清白蛋白(BSA)

中图分类号: O614.37⁺1; O657.3

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2006)09-1605-05

Damage of Bovine Serum Albumin under Irradiation of High Frequency Ultrasound in the Presence of Porphyrin-Ga

WANG Jun^{*,1} ZHAO Hong-Dan¹ ZHANG Zhao-Hong²

ZHANG Xiang-Dong¹ MA Teng¹ JIANG Yue-Feng¹ ZHANG Han-Yu¹

(¹Chemistry Department, ²Environmental Science Department, Liaoning University, Shenyang 110036)

Abstract: The damage of bovine serum albumin (BSA) under the irradiation of high frequency ultrasound in the presence of Porphyrin-Ga (HP-Ga) complex was studied by ultraviolet-visible (UV-Vis) and fluorescence (FL) spectra, and the influence of irradiation time, HP-Ga concentration and acidity were also studied. The results show that, under a certain condition, the damage degree of BSA is increased with the enhancement of irradiation time and HP-Ga concentration.

Key words: ultrasound; porphyrin-Ga (HP-Ga); bovine serum albumin (BSA)

研究表明,某些血卟啉衍生物(Hematoporphyrin derivative, HPD)对肿瘤细胞有较强的亲和力,与光结合用较小的剂量就可以达到诊断和治疗肿瘤的目的^[1,2]。这是因为血卟啉(HP)和 HPD 可以被光激活,通过与氧分子(O₂)之间的能量交换产生具有极强氧化能力的单线态氧(¹O₂),从而杀死肿瘤细胞。1978年, Dougherty 等人把这种方法称为光动力学疗法(Photodynamic treatment, PDT)^[3]。但由于光在生物组织中的穿透能力低, PDT 疗法主要应用于人体表面或浅层肿瘤的治疗。超声波具有极强的穿透能力且聚焦技术已经成熟,因此,采用超声波抑制肿瘤的生

长和破坏肿瘤细胞,尤其是治疗深层组织肿瘤已经引起国内外的普遍关注。1989年,日本学者梅村晋一郎(Umemura S)等人首次在国际会议上报道了用超声波激活 HP 杀伤肿瘤细胞的初步尝试,并把这种方法称为声动力学疗法 (Sonodynamic treatment, SDT)^[4-7]。实验表明,HP 本身无抗肿瘤活性,但被超声波激活后能产生强烈的抗肿瘤效应,而且超声波装置简单,造价低廉,便于临床应用。因此,SDT 疗法在肿瘤治疗方面比 PDT 疗法有更加广阔的应用前景。

近 10 年来,国内外学者对 SDT 疗法进行了大

收稿日期:2006-02-20。收修改稿日期:2006-06-08。

国家自然科学基金资助项目(No.20371023)和辽宁省教育厅自然科学基金资助项目(No.2004C018)。

*通讯联系人。E-mail: wangjun890@126.com

第一作者:王 君,男,46岁,理学博士,教授;研究方向:超声化学与生物化学。

量的研究并取得了初步的成效,但这些工作都是以肿瘤细胞为攻击目标,通过细胞膜的损伤使肿瘤细胞坏死来达到治疗肿瘤的目的^[8-10]。实际上,正常细胞膜和肿瘤细胞膜之间的差别是相当小的,抑制和杀死肿瘤细胞应以攻击具有各种功能的蛋白质和容易使药物具有靶向性的 DNA 为目标。蛋白质是生物细胞中重要的组成物质,是执行各种生命功能的主要大分子,如果通过超声波激活 HP 导致蛋白质分子损伤,就有可能造成自然情况下的细胞凋亡^[11]。本文通过紫外-可见(UV-Vis)光谱和荧光(FL)光谱观察在卟啉镓(HP-Ga)配合物的存在下超声波对牛血清白蛋白(BSA)的损伤,为推动分子水平的 SDT 疗法提供有意义的参考。

1 实验部分

1.1 仪器设备

超声波照射装置(频率 1.65 MHz,功率 25 W,自制);紫外-可见光谱仪(Lambda-17 型,美国 Perkin-Elmer 公司);荧光光谱仪 (LS-45 型,美国 Perkin-Elmer 公司)。

1.2 试剂

牛血清白蛋白(BSA,北京奥博星生物技术责任有限公司产品。使用时未经进一步纯化。在 0~4 ℃下配成 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液,准确浓度由 278 nm 处的吸光度确定);血卟啉 (HP,Sigma 公司产品,在 0~4 ℃下配成 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液);卟啉-镓配合物(HP-Ga,按照文献^[12]合成,在 0~4 ℃下溶于磷酸盐缓冲溶液配成 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液)。实验用水为二次蒸馏水,其余均为市售分析纯试剂。

1.3 实验方法

实验装置如图 1 所示,体系温度控制在 $25.0 \pm 0.2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。取 8 个容量瓶分别标记为 a,b,c,d,e,f,g 和 h。前 6 个分别加入 10.00 mL 浓度为 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BSA 溶液,其中 a 和 d 加入 5.00 mL 浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HP-Ga 溶液,b 和 c 加入 5.00 mL 浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HP 溶液,而 g 和 h 分别只加 HP-Ga 和 HP。所有容量瓶都用磷酸缓冲溶液稀释至 50.00 mL。将 a,b 和 e 放入超声照射装置,2.0 h 后测定 8 个样品的 UV-Vis 光谱和荧光光谱,判断 HP-Ga 和 HP 与 BSA 分子(c 和 d)的相互作用以及结合超声波对 BSA 分子(a 和 b)的损伤。另外,改变超声波照射时间,HP-Ga 的浓度和溶液酸度等,考察这些因素对 BSA 分子损伤的影响。

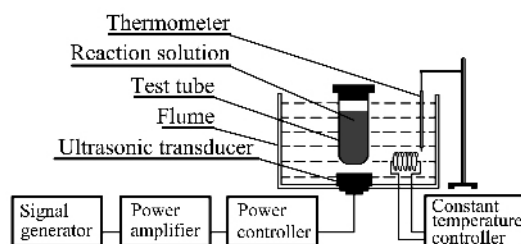


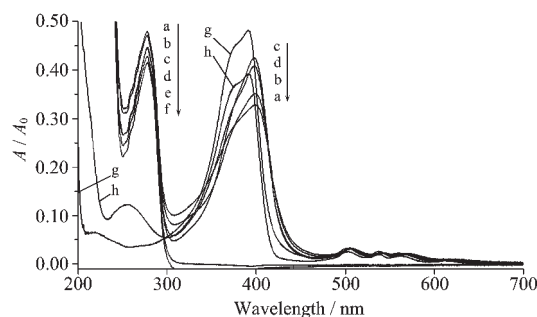
图 1 超声照射装置

Fig.1 Setup for ultrasound irradiation

2 结果与讨论

2.1 超声波照射下 BSA 与 HP-Ga 和 HP 的 UV-Vis 光谱和荧光光谱

从图 2 中可以看出,BSA,HP 和 HP-Ga 分别在 278 nm,389 nm 和 391 nm 处有强的吸收(图中 f,g 和 h)。由于 BSA 与 HP-Ga 和 HP 之间存在相互作用,BSA 的吸收峰呈现出一定程度的增色并伴随着微小的蓝移,但 BSA 与 HP-Ga 相互作用的程度要强于与 HP 的相互作用。而 HP 和 HP-Ga 的吸收峰则发生较大红移,分别由 389 nm 和 391 nm 移到了 397 nm 和 399 nm 处,吸收峰的强度也有所变化(图中 c 和 d)。超声照射 2.0 h 后,BSA (图中 e),BSA + HP-Ga(图中 a)和 BSA + HP(图中 b)溶液在 278 nm 的吸光度都高于超声照射前的吸光度(图中 f),超声波作用后的 BSA + HP-Ga(图中 d)和 BSA + HP(图中 c)进一步显示出增色效应,增色的顺序为 BSA + HP-Ga > BSA + HP > BSA。一般情况下,维持蛋白质空间结构的作用力主要是弱相互作用的非共价键



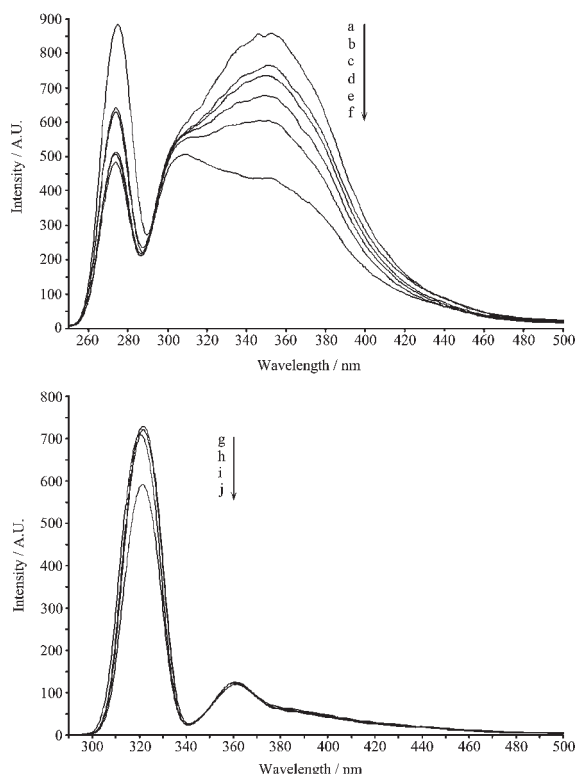
a: BSA + HP-Ga (with irradiation); b: BSA + HP (with irradiation); c: BSA + HP (without irradiation); d: BSA + HP-Ga (without irradiation); e: BSA (with irradiation); f: BSA (without irradiation); g: HP (without irradiation); h: HP-Ga (without irradiation)

图 2 不同条件下 BSA, HP-Ga 和 HP 的紫外-可见吸收光谱

Fig.2 UV-Vis spectra of BSA, HP-Ga and HP at different conditions

或次级键,包括氢键、静电引力、范德华力和疏水作用力等^[13]。除此之外还有共价的双硫(-S-S-)键。小分子可以进入 BSA 分子的疏水腔中,与 BSA 分子形成复合物^[14-17]。相互作用通常会减弱 BSA 分子内的弱相互作用,使其二级结构破坏, α -螺旋减少和肽链伸展等^[18]。超声波的照射导致紫外光谱的进一步增色,这说明在 HP-Ga 和 HP 与 BSA 分子相互作用的基础上对 BSA 分子有所损伤,破坏共价的-S-S-键,使二级结构进一步破坏。

无超声波照射时,BSA + HP-Ga 的增色效应弱于 BSA + HP。超声波照射时,BSA + HP-Ga 的增色效应又强于 BSA + HP,说明两者的作用方式和程度不同。HP 为一平面分子,可以与 BSA 分子很好的结合,但妨碍了 HP 接受能量,因此超声波照射时对 BSA 分子损伤较弱。而含有金属离子 Ga^{3+} 的 HP-Ga 与 BSA 分子结合较弱,或以侧面与 BSA 分子结合,



a: BSA (without irradiation); b: BSA (with irradiation); c: BSA+HP-Ga (without irradiation); d: BSA+HP (without irradiation); e: BSA-HP (with irradiation); f: BSA+HP-Ga (with irradiation); g: HP-Ga (without irradiation); h: HP-Ga (with irradiation); i: HP (without irradiation); j: HP (with irradiation)

图3 不同条件下 BSA, HP-Ga 和 HP 的荧光光谱

Fig.3 Fluorescence spectra of BSA, HP-Ga and HP at different conditions

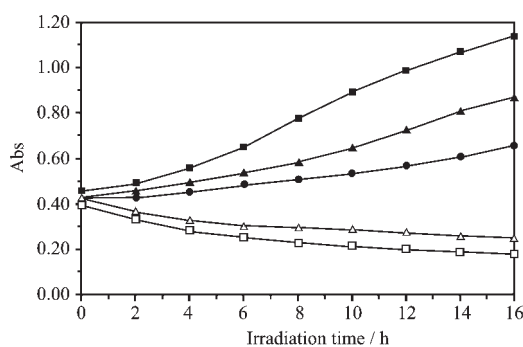
基本不影响能量的吸收,因而对 BSA 分子损伤较强。

荧光光谱也证实了这种变化。图3显示 BSA 分子在 350 nm 处的发射峰的猝灭趋势与 UV-Vis 光谱的增色顺序基本一致。BSA 分子在单纯超声作用下以及没有超声照射只加入 HP 较 HP-Ga 对 BSA 时荧光光谱都显示一定程度的猝灭。但只有 HP-Ga 或 HP 结合超声照射时 BSA 的荧光光谱才显示更明显的猝灭,说明 BSA 的损伤更为严重。另外,HP-Ga 及 HP 在 320 nm 处的荧光光谱也显示出超声存在时荧光的猝灭现象,说明超声照射对 HP-Ga 和 HP 也有一定的破坏作用。

2.2 超声波照射时间对 BSA 损伤的影响

BSA 与 HP-Ga 和 HP 的浓度都为 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,磷酸盐缓冲溶液浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH=7.0,改变超声波照射时间。

从图4可以看出,随着照射时间的增加,在 HP-Ga 和 HP 作用下,BSA 分子在 278 nm 处的吸收峰不断增加,呈现出越来越明显的增色效应,但前者远远强于后者。这说明超声波激活 HP-Ga 和 HP 都可以对 BSA 分子造成损伤,但 HP-Ga 的活性大于 HP。随着 BSA 分子二级结构的破坏和肽链伸展,使包围在 BSA 分子内部的色氨酸和酪氨酸残基的芳香环疏水基团不断地裸露出来,导致 UV-Vis 光谱的吸收峰增强。另外,在超声波照射下,HP-Ga 和 HP 在 399 nm 和 397 nm 处的吸收峰却随照射时间的增加



■: BSA (and HP-Ga with irradiation, at 278 nm);
▲: BSA (and HP with irradiation, at 278 nm);
□: HP-Ga (and BSA with irradiation, at 399 nm);
△: HP (and BSA with irradiation, at 397 nm);
●: BSA (with irradiation, at 278 nm)

图4 BSA+HP-Ga, BSA+HP 和 BSA 溶液的吸光度随照射时间的变化

Fig.4 Changes of absorbance of BSA+HP-Ga, BSA+HP and BSA solutions with irradiation time

而减弱,这说明超声波的照射也能够破坏 HP-Ga 和 HP。

2.3 HP-Ga 浓度对 BSA 损伤的影响

改变 HP-Ga 的浓度,分别为 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 和 25.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,其他条件同 2.2。

从图 5 可以看出,随着 HP-Ga 浓度的增加,在超声波照射的作用下,BSA 在 278 nm 处的吸光度逐渐增加,其增加程度要大于未加超声波照射的 BSA 与 HP-Ga 之间相互作用的吸收峰,与未加 HP-Ga 时的情况比,表现出越来越明显的增色效应。这说明 BSA 分子二级结构所受破坏程度越来越大, α -螺旋结构不断减少,肽链逐渐伸展,有更多的芳香环疏水基团裸露出来,使吸收峰增强。

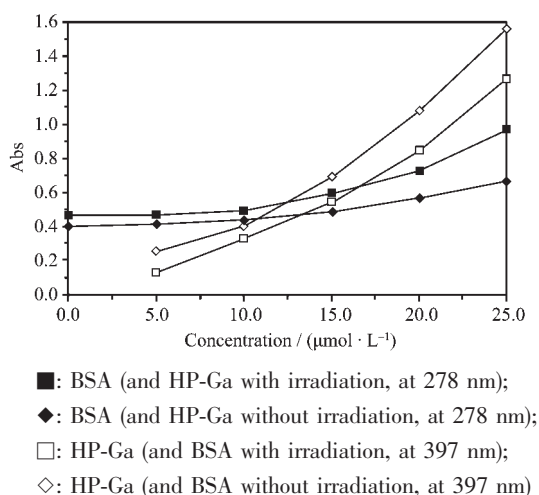


图 5 BSA + HP-Ga 溶液的吸光度随 HP-Ga 浓度的变化
Fig.5 Changes of absorbance of BSA+HP-Ga solutions with HP-Ga concentration

2.4 溶液酸度对 BSA 损伤的影响

人体正常组织液的 pH 值为 7.35~7.45,而在细胞发生癌变时,周围微环境内组织液的 pH 值会发生微小的改变(pH 值约为 6.90),比正常组织液的 pH 值稍低。考虑上述因素,改变 pH 值,考察了在超声波与 HP-Ga 协同作用下溶液酸度对 BSA 分子损伤的影响。用 NaOH 和 HCl 溶液调节体系的 pH,使溶液中的 pH 分别为 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 和 9.0,其他条件同 2.2。

图 6 显示在没有超声波照射时,BSA 与 HP-Ga 体系的吸光度随 pH 值的升高而略有下降。这是因为 pH 值升高,过量的 OH⁻会使 HP-Ga 水解正电荷消失,减弱了 HP-Ga 与 BSA 分子之间的相互作用。但在超声波照射时,BSA 与 HP-Ga 体系的吸光度却随 pH 值的升高而略有上升。这是因为 pH 值过高有

利于·OH 自由基的生成,导致 BSA 分子损伤的加剧。

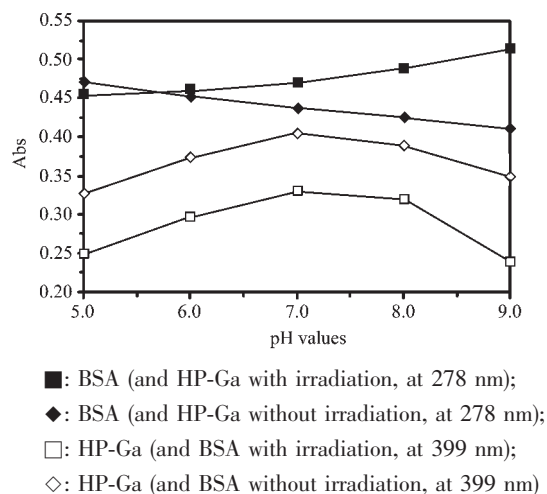


图 6 BSA + HP-Ga 溶液的吸光度随 pH 值的变化
Fig.6 Changes of absorbance of BSA + HP-Ga solutions with pH values

2.5 超声波损伤 BSA 机理的探讨

对于超声波激活 HPD 杀死肿瘤细胞的机理,一些研究者认为超声波对 HPD 有类似激光的激活过程,并产生相似的产物如单线态 $^1\text{O}_2$ 、过氧化物和氢氧自由基等^[19,20]。关于单线态 $^1\text{O}_2$ 的产生过程可借鉴 PDT 疗法的观点进行说明^[21-23]。BSA 分子和 HPD 之间通过弱的相互作用相互靠近,但对于 HPD 利用的是超声空化时产生的热能还是光能还有待进一步的研究。目前普遍认为“声致发光”和“热点激发”可用于解释这种激活的原因^[24]。最近的研究认为产生单线态 $^1\text{O}_2$ 的主要诱因是超声空化后“热点”的高温效应^[25]。另外,超声辐射能够导致较宽波长范围光的产生,这些光会激发作为光敏剂的 HPD 从而产生单线态 $^1\text{O}_2$ 的可能性也是有的。当然,关于超声波激活 HPD 损伤 BSA 分子的详细机理还需更深入的研究。

3 结 论

高频超声波照射时,HP-Ga 能够有效地产生单线态 $^1\text{O}_2$ 及其他一些自由基,导致 BSA 分子的损伤。损伤的程度随着照射时间的延长、HP-Ga 浓度的增加和溶液 pH 值的升高而加深。从实验结果可以获得启示,如果选择对肿瘤细胞具有靶向聚集性且能够穿过细胞膜的 HPD 类化合物结合超声波照射,比较容易地直接破坏肿瘤细胞内的各种蛋白质分子,通过进一步研究或许不失为一种可行的肿瘤治疗方法。

参考文献:

- [1] Lipson R L, Baldes E J, Olsen A M, et al. *J. Natl. Cancer. Inst.*, **1961**,**26**:1~12
- [2] Lipson R L, Gray M J, Baldes E, et al. *J. Cancer.*, **1967**,**20**: 2255~2257
- [3] Dougherty T J, Kaufman J H, Goldfarb A, et al. *Cancer. Res.*, **1978**,**38**(8):2628~2635
- [4] Yumita N, Nishigaki R, Umemura K, et al. *Jpn. J. Cancer. Res.*, **1990**,**81**(3):304~308
- [5] Yumita N, Nishigaki R, Umemura K, et al. *Jpn. J. Cancer. Res.*, **1989**,**80**(2):219~222
- [6] Umemura S, Yumita N, Nishigaki R, et al. *Jpn. J. Cancer. Res.*, **1990**,**81**(9):962~966
- [7] Umemura S, Yumita N, Nishigaki R, et al. *Jpn. J. Cancer. Res.*, **1993**,**84**(5):582~588
- [8] Umemura S, Kawabata K, Sasaki K, et al. *Ultrasonics Sonochemistry*, 1996,**3**(3):S187~S191
- [9] Umemura S, Yumita N, Umemura K, et al. *Cancer. Chemother. Pharmacol.*, **1999**,**43**(5):389~393
- [10] Naoto N, Norio M. *Life Sciences*, **2002**,**72**(3):321~328
- [11] ZHANG Rong-Ying(张蓉颖), PANG Dai-Wen(庞代文), CAI Ru-Xiu(蔡汝秀), et al. *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao (Chemical Journal of Chinese Universities)*, **1999**,**20**(8):1210~1217
- [12] Umemura S, Yumita N, Umemura K, et al. *Inorg. Chim. Acta.*, **1997**,**263**(1~2):161~170
- [13] LI Wei(李 惟), et al. *Biological Chemistry(生物化学)*. Beijing: Chemical Industry Press, **2004**.66~93
- [14] ZHANG Xiao-Wei(张晓威), ZHAO Feng-Lin(赵凤林), LI Ke-An(李克安), et al. *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao (Chemical Journal of Chinese Universities)*, **1999**,**20**(7):1063~1067
- [15] GUO Can-Cheng(郭灿城), LI He-Ping(李和平), ZHANG Xiao-Bing(张晓兵), et al. *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao (Chemical Journal of Chinese Universities)*, **2003**,**24**(2):282~287
- [16] LU Ji-Xin(卢继新), ZHANG Gui-Zhu(张贵珠), ZHAO Peng(赵 鹏), et al. *Huaxue Xuebao(Acta Chimica Sinica)*, **1997**,**55**(9):915~920
- [17] JIA Tao(贾 涛), WANG Kai(王 凯), BAO Xiao-Ping(鲍小平), et al. *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao(Chemical Journal of Chinese Universities)*, **2004**,**25**(9):1604~1607
- [18] Gantchev T G, Lier J E. *J. Photochem. Photobiol.*, **1995**,**62**(1):123~134
- [19] Worthington A E, Thompson J, Rauth A M, et al. *Ultrasound. Med. Biol.*, **1997**,**23**(7):1095~1103
- [20] Miyoshi N, Igarashi T, Riesz P. *Ultrason. Sonochem.*, **2000**, **7**(3):121~124
- [21] TA De-An(他得安), CHEN Qi-Min(陈启敏). *Shanxi Shifan Daxue Xuebao(Journal of Shaanxi Normal University)*, **1999**, **27**(1):54~57
- [22] GUO Xiao-Wu(郭孝武). *Shanxi Shifan Daxue Xuebao(Journal of Shaanxi Normal University)*, **1999**,**27**(3):57~59
- [23] SONG Cun-Niu(宋存牛). *Shanxi Shifan Daxue Xuebao(Journal of Shaanxi Normal University)*, **2002**,**30**(2):38~40
- [24] WANG Jun(王 君), HAN Jian-Tao(韩健涛), ZHANG Yang(张 杨). *Zhongguo Zhongliu(Bulletin of Chinese Cancer)*, **2003**,**12**(6):339~341
- [25] SHANG Zhi-Yuan(尚志远), SHI Huan-Wen(石焕文), LIU Yuan-Sheng(刘渊声), et al. *Huaxue Xuebao(Acta Chimica Sinica)*, **2004**,**62**(14):1277~1280