

研究简报

杂多酸盐 $K_7[PTi_2W_{10}O_{40}] \cdot 6H_2O$ 与牛血清白蛋白相互作用的研究

梁彦秋^{1,2} 邓斌³ 刘婷婷³ 孙鹏³ 臧树良^{*,1}

(¹华东师范大学化学系, 上海 200062)

(²沈阳化工学院环境与生物系, 沈阳 110142)

(³辽宁大学化学学院, 沈阳 110036)

关键词: 杂多酸盐; 牛血清白蛋白; 荧光光谱; 紫外光谱; 热力学参数; 同步荧光光谱

中图分类号: O657.39

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2007)04-0688-05

Interaction between Heteropoly Salt $K_7[PTi_2W_{10}O_{40}] \cdot 6H_2O$ and Bovine Serum Albumin

LIANG Yan-Qiu^{1,2} DENG Bin³ LIU Ting-Ting³ SUN Peng³ ZANG Shu-Liang^{*,1}

(¹Department of Chemistry, East China Normal University, Shanghai 200062)

(²Department of Environment and Biology, Shenyang Institute of Chemical Technology, Shenyang 110142)

(³Department of Chemistry, Liaoning University, Shenyang 110036)

Abstract: Under the imitated physiological condition of animal body, the interactions of heteropoly salt (PM-19) with bovine serum albumin (BSA) were investigated by fluorescence and absorption spectroscopy. It was shown that this compound had a quite strong ability to quench the fluorescence launching from BSA. After analyzing the fluorescence quenching data according to Stern-Volmer equation and Lineweaver-Burk double-reciprocal equation, we found that BSA had reacted with PM-19 and formed a certain new compound. The quenching belonged to static fluorescence quenching. According to Lineweaver-Burk equation, the forming constants of the compound (298 K: $2.68 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$; 304 K: $2.19 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$; 310 K: $1.82 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$) and the thermodynamic parameters ($\Delta H = -24.72 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$; $\Delta S = 20.97 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ / $20.92 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ / $20.97 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$; $\Delta G = -30.97 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ / $-31.08 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ / $-31.22 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) at the corresponding temperatures were obtained. The latter shows that binding power between them is mainly electrostatic interaction. Based on Förster's non-radiation energy transfer mechanism, the binding locality ($r = 4.14 \text{ nm}$) was calculated between donor and acceptor. The effect of PM-19 on the conformation of BSA was also analyzed by synchronous fluorescence spectroscopy.

Key words: heteropoly salt; BSA; fluorescence spectroscopy; absorption spectroscopy; thermodynamic parameter; synchronous fluorescence spectroscopy

20世纪70年代初期, 法国科学家报道了杂多阴离子 $[SiW_{12}O_{40}]^{4-}$ 的抗病毒活性, 以后相继发现了

$[BW_{12}O_{40}]^{5-}$ 、 $[P_2W_{12}O_{40}]^{6-}$ 等在体外也表现出抗病毒活性^[1]。80年代后期, 具有抑制艾滋病病毒作用的

收稿日期: 2006-10-08。收修改稿日期: 2006-12-11。

国家自然科学基金资助项目(No.20271024)。

*通讯联系人。E-mail: dalin0417@163.com; Tel: 024-62207819

第一作者: 梁彦秋, 女, 35岁, 副教授; 研究方向: 生物无机化学和分子光谱。

$(NH_4)_{17}Na[NaSb_9W_{21}O_{86}] \cdot 14H_2O$ (HPA-23) 被应用于临床试验^[2]。虽然其治疗效果不够理想,但却激发了人们对多金属氧酸盐的研究兴趣。90年代以来,Yamase等^[3]研究了十几种多金属氧酸盐的抗肿瘤、抗爱滋病毒活性,发现 $K_7[PTi_2W_{10}O_{40}] \cdot 6H_2O$ (PM-19) 具有较强的抗 HIV 病毒能力和较低的毒性。此后多金属氧酸盐的药物化学迅速发展起来^[4]。

血清白蛋白是血浆中最丰富的蛋白质,具有储运内源代谢产物和外源药物小分子的重要生理功能^[5]。各种药物进入人体一般需要通过血浆的存储和运输到达受体部位,产生药理作用。研究药物与血清白蛋白的相互作用,对了解药物的作用机制具有重要的意义。从不同角度研究以血清白蛋白为代表的蛋白质与有机药物小分子间的相互作用,已成为非常活跃的研究课题^[6-12]。而目前研究杂多酸盐与蛋白相互作用的报道不多见。黄瑾等^[13]利用紫外、荧光及平衡透析研究了磷钨杂多酸与牛血清白蛋白(BSA)的结合平衡。胡艳军等^[14]研究了稀土杂多酸盐 $EuHSiMo_{10}W_2O_{40} \cdot 25H_2O$ 与 BSA 的相互作用。王彦卿等^[15]研究了硅钨杂多酸与牛血红蛋白的相互作用。本文研究了不同温度条件下杂多酸盐 PM-19 与 BSA 的相互作用,考察了 PM-19 对 BSA 构象的影响,分析了 PM-19 与 BSA 的作用机理,为今后进一步开发、利用杂多酸盐从事药物化学领域的研究提供了一些具有理论和应用价值的信息。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Cary Eclipse 荧光分光光度计(美国瓦里安公司);Cary 5000 紫外可见分光光度计(美国瓦里安公司);温度控制器(美国瓦里安公司);AY-120 电子分析天平(日本,岛津);pHs-3C 型酸度计(上海精密仪器有限公司,精度 ± 0.01)。

牛血清白蛋白(北京奥博星生物技术责任有限公司); $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液,临用时稀释至 $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$;PM-19 浓度为 $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$;PM-19 和 BSA 均用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl、pH=7.40 (内含 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 维持离子强度)缓冲溶液配制及稀释;所用试剂均为分析纯,实验用水为二次石英蒸馏水,经检测均无荧光杂质。

杂多酸盐 PM-19 的合成与表征按文献^[16]方法进行。白色晶体,分子式为 $K_7[PTi_2W_{10}O_{40}] \cdot 6H_2O$,分子量为 2986.84。

1.2 实验方法

1.2.1 PM-19 与牛血清白蛋白作用的荧光光谱测定

在 $1 \times 1 \text{ cm}$ 石英比色皿中准确加入 3.0 mL $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA 溶液、测定其发射光谱,然后用微量进样器逐次加入浓度为 $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PM-19 溶液 $4 \mu\text{L}$ 进行荧光滴定(滴定剂累加体积小于 0.1 mL),混匀,利用温度控制器控温(298 K ; 304 K ; 310 K),分别测定其发射光谱,激发波长为 280 nm ,绘制 $310 \sim 440 \text{ nm}$ 的荧光光谱。

1.2.2 紫外吸收光谱

分别测定浓度为 $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PM-19、BSA 及二者的物质质量的比为 1:1 混合液的紫外吸收光谱。

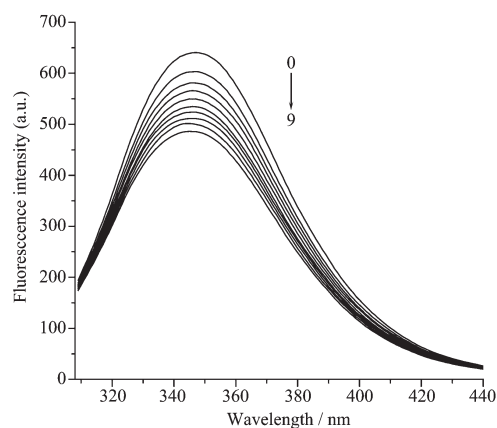
1.2.3 PM-19 与牛血清白蛋白作用的同步荧光测定

用 1.2.1 所配的温度为 310 K 的溶液,固定激发和发射波长间隔 $\Delta\lambda$ 分别为 20 nm 和 60 nm ,同时扫描激发和发射波长并记录同步荧光光谱。

2 结果与讨论

2.1 荧光光谱

BSA 分子中色氨酸和酪氨酸残基具有荧光发射性质,以 $\lambda_{\text{ex}}=280 \text{ nm}$ 激发 BSA,在 346 nm 附近有很强的荧光峰;而以同样激发波长激发 PM-19 溶液,在 346 nm 附近则没有荧光峰,证明 PM-19 不会产生与 BSA 相互干扰的荧光。固定 BSA 的量,随着体系中 PM-19 浓度的增加,BSA 的内源荧光产生有规律的猝灭,其最大发射波长没有发生明显的变化(见图 1)。



$c_{\text{BSA}}=1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{PM-19}}$ from 0 to 9: 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 2.8, 3.2, $3.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

图1 PM-19 对 BSA 荧光光谱的影响($T=310 \text{ K}$)

Fig.1 Effect of PM-19 on fluorescence spectra of BSA

2.2 紫外吸收光谱

图 2 为 $T=310\text{ K}$, $\text{pH}=7.40$ 浓度分别为 $1.0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BSA 溶液(b)、PM-19(a)溶液的紫外吸收曲线及 PM-19 与 BSA 的物质的量之比为 1:1 的混合物与 PM-19 的紫外吸收差谱(c)。从图 2 可以看出在该浓度下 PM-19(曲线 a)紫外吸收强度较低,与同浓度的牛血清白蛋白的吸收相比(b)可忽略。单纯的牛血清白蛋白一般在紫外有 2 个吸收峰,在 210 nm 附近的吸收峰主要是由肽键上羰基($\text{C}=\text{O}$) $n-\pi^*$ 电子跃迁引起的,在 278 nm 处的吸收峰则 BSA 分子中色氨酸和酪氨酸残基的芳杂环 $\pi-\pi^*$ 引起的。加入 PM-19 后,BSA 的这 2 个吸收峰均表现了明显的增色效应,这说明 BSA 与 PM-19 发生了作用,而这种作用有力于 BSA 分子中这两种跃迁的发生。

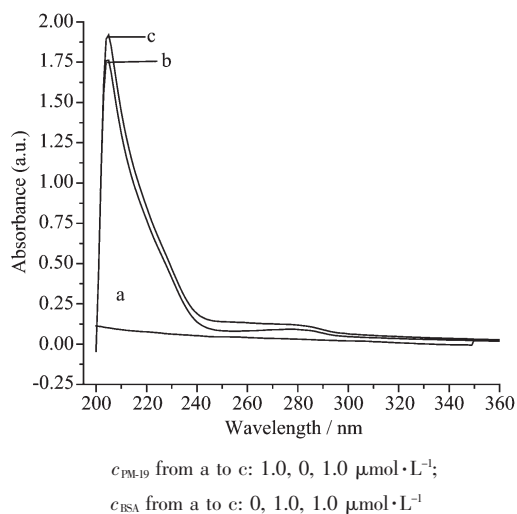


图 2 PM-19 对 BSA 吸收光谱的影响($T=310\text{ K}$)

Fig.2 Effect of PM-19 on the absorption spectra of BSA

2.3 荧光猝灭常数及猝灭机理的确定

有关猝灭机理及猝灭方式的判断参见文献^[15,17]。采用 Stern-Volmer 和 Lineweaver-Burk 方程分别处理试验数据,结果见图 3 和表 1。由图 3 和表 1 可见,这两种图形均为直线,且从低到高整个浓度范围内呈良好的线性关系。随着温度的升高,Stern-

Volmer 猝灭曲线的斜率逐渐降低,这表明 PM-19 对 BSA 荧光猝灭效应应归因于静态猝灭机制。由于各类猝灭剂对生物大分子的最大动态猝灭常数为 $2.0 \times 10^{10}\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ^[17],而表 1 中的双分子猝灭常数 K_q 远大于最大动态猝灭常数,这进一步表明 PM-19 对 BSA 的荧光猝灭效应不是动态猝灭而是静态猝灭。当猝灭体分子和荧光物质分子之间形成新的复合物而发生静态猝灭时,服从 Lineweaver-Burk 方程。从所得的结合常数看 PM-19 与 BSA 之间的结合作用较强,这说明 PM-19 可以在血清蛋白中存储和运输,这也是 PM-19 具有药理活性的佐证。

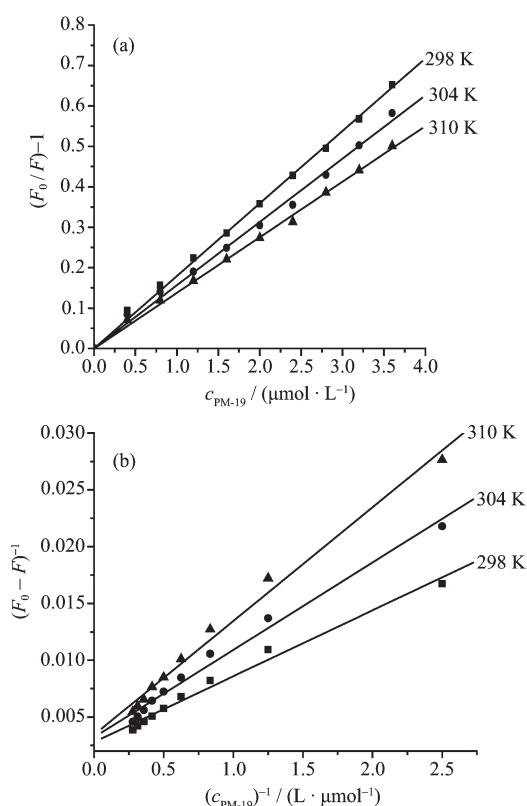


图 3 不同温度下的 Stern-Volmer 图(a)和 Lineweaver-Burk 图(b)

Fig.3 Stern-Volmer plot (a) and Lineweaver-Burk plot (b) at different temperatures

表 1 方程的相关系数、猝灭常数、结合常数和热力学常数

Table 1 Correlation coefficients R , the dynamic quenching constants K_q , the binding constants K_A , and the thermodynamic parameters

T / K	Stern-Volmer		Lineweaver-Burk		$\Delta H / (\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$\Delta S / (\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1})$	$\Delta G / (\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$
	R	$K_q / (\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$	R	$K_A / (\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$			
298	0.999	1.79×10^{13}	0.992	2.68×10^5	-24.72	20.97	-30.97
304	0.998	1.57×10^{13}	0.993	2.19×10^5		20.92	-31.08
310	0.999	1.38×10^{13}	0.995	1.82×10^5		20.97	-31.22

2.4 作用力类型的判定

猝灭体和生物大分子相互作用主要是通过范德华力、静电作用力和氢键作用力等进行的。因为温度效应对反应的结合常数影响比较小,所以当温度相差不是很大时,可以把反应焓变看作一个常数。因此,由 Lineweaver-Burk 方程中不同温度下的结合常数 K_A , 可根据热力学公式计算出反应焓变、自由能和熵变。结果见表 1。由 $\Delta G < 0$ 可以判断 PM-19 与 BSA 结合是一个自发过程;由 $\Delta H < 0$ 和 $\Delta S > 0$ 可以认为 PM-19 与 BSA 之间的主要作用力为静电作用力^[18]。

2.5 荧光给体-受体间距离的求取

荧光给体-受体间距离求取的理论基础及计算公式参见文献^[19-21]。图 4 为紫外吸收光谱和同浓度的荧光光谱的重叠图。利用矩形分割法及相关公式求得两光谱的重叠积分值 J 为 $3.74 \times 10^{-14} \text{ cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 非辐射转移效率 E 为 0.114。由相关常数的取值进而求得供能体 BSA 和受能体 PM-19 之间的距离 $r = 4.14 \text{ nm}$ 。根据 Förster 能量转移理论,当供能体和受能体之间的距离不超过 7 nm 时,将会发生非辐射能量转移,由图 1 荧光光谱没有发生畸变及 BSA 与 PM-19 之间的距离 (4.14 nm) $< 7 \text{ nm}$, 说明 BSA 与 PM-19 之间的能量转移属于分子内的非辐射能量转移^[20,21]。

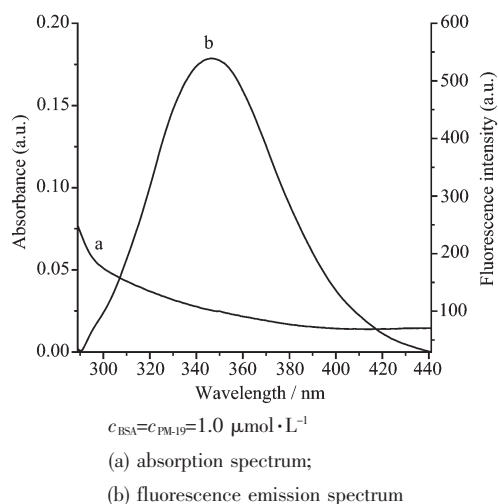


图 4 PM-19 与 BSA 物质质量比为 1:1 的紫外吸收光谱 (a) 和荧光发射光谱 (b) 图 ($T = 310 \text{ K}$)

Fig.4 Spectral overlap of absorption with fluorescence when the molar ratio of PM-19 to BSA is 1:1

2.6 PM-19 对蛋白质构象的影响

对于蛋白质的同步荧光, $\Delta\lambda_{\text{ex}} = 20 \text{ nm}$ 时仅表现出酪氨酸残基的荧光, $\Delta\lambda_{\text{ex}} = 60 \text{ nm}$ 时仅表现出色氨酸残基的荧光,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以判断蛋白质构象的变化^[22]。一般说来红移表明蛋白质所处环境的疏水性降低,蓝移表明蛋白质所处环境疏水性增强。按照实验方法,得到 PM-19 与 BSA 的同步荧光光谱图,见图 5。图 5 中的 (A) 和 (B) 分别为加入不同量的 PM-19 后牛血清白蛋白中的酪氨酸和色氨酸残基的同步荧光光谱图。可以看出在此实验条件下,酪氨酸和色氨酸残基荧光同时被猝灭,使其荧光强度下降,相比之下色氨酸残基的荧光降低比酪氨酸残基更显著,说明 PM-19 与 BSA 的结合位点更接近于色氨酸残基。二者的最大发射波长均无改变。这说明 PM-19 虽然与 BSA 发生了作用,但并没有进入蛋白质的疏水腔,所以没有改变蛋白质的构象。

酪氨酸和色氨酸残基荧光同时被猝灭,使其荧光强度下降,相比之下色氨酸残基的荧光降低比酪氨酸残基更显著,说明 PM-19 与 BSA 的结合位点更接近于色氨酸残基。二者的最大发射波长均无改变。这说明 PM-19 虽然与 BSA 发生了作用,但并没有进入蛋白质的疏水腔,所以没有改变蛋白质的构象。

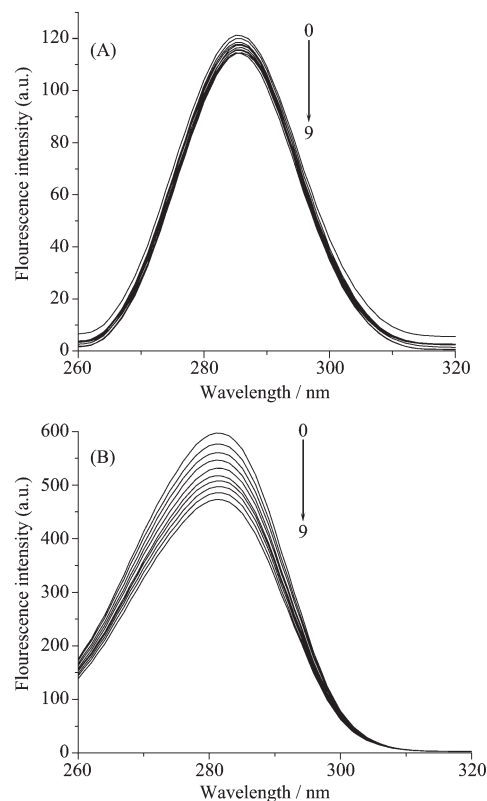


图 5 PM-19 对牛血清白蛋白同步荧光光谱的影响 ($T = 310 \text{ K}$)

Fig.5 Effect of PM-19 on synchronous fluorescence spectra of BSA

参考文献:

[1] Haapala D, Jasmin C, Sinoussi F. *Biomedicine*, **1973**:19~24

- [2] Moskovitz B L. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **1988**,**32**(9): 1300~1303
- [3] Yamase T, Ozeki T. *Bull. Chem. Soc.*, **1992**,**65**:1543~1553
- [4] WANG En-Bo(王恩波), HU Chang-Wen(胡长文), XU Lin(许林). *An Introduction to Heteropoly Acid*(杂多酸导论). Beijing: Press of Chemical Industry, **1998**.146~147
- [5] Ulrich K H. *Pharmacol. Rev.*, **1981**,**33**(1):17~23
- [6] Kandagal P B, Ashoka S, Seetharamappa J, et al. *J. Photochem. Photobiol. A*, **2006**,**179**:161~166
- [7] LIU Hai-Ping(刘海萍), WANG Xing-Ming(王兴明), DAI Ya-Tang(戴亚堂), et al. *Wuji Huaxue Xuebao*(*Chin. J. Inorg. Chem.*), **2005**,**21**(9):1422~1427
- [8] YANG Mei-Ling(杨美玲), YANG Pei-Ju(杨培菊), SONG Yu-Min(宋玉民). *Wuji Huaxue Xuebao*(*Chin. J. Inorg. Chem.*), **2005**,**21**(4):483~489
- [9] Hu Y J, Liu Y, Jiang W, et al. *J. Photochem. Photobiol. B*, **2005**, **80**:235~242
- [10] Hu Y J, Liu Y, Zhao R M, et al. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2005**, **37**:122~126
- [11] XIE Men-Xia(谢孟峡), XU Xiao-Yun(徐晓云), WANG Ying-Dian(王英典), et al. *Huaxue Xuebao*(*Acta Chim. Sinica*), **2005**,**63**(22):2055~2062
- [12] LI Gui-Zhi(李桂芝), LIU Yong-Ming(刘永明), GUO Xin-Yun(郭新运), et al. *Huaxue Xuebao*(*Acta Chim. Sinica*), **2006**,**64**(7): 679~685
- [13] HUANG Jin(黄瑾), YUAN Yu-Zhou(袁余洲), LIANG Hong(梁宏). *Zhongguo Kexue*(*Science in China*), **2001**,**31**(6):530~535
- [14] 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
- [15] WANG Yan-Qing(王彦卿), ZHANG Hong-Mei(张红梅), ZHANG Gen-Cheng(张根成). *Wuji Huaxue Xuebao*(*Chin. J. Inorg. Chem.*), **2006**,**22**(5):895~899
- [16] Domaille P J, Knoth W H. *Inorg. Chem.*, **1983**,**22**:812~818
- [17] CHEN Guo-Zhen(陈国珍), HUANG Xian-Zhi(黄贤智), ZHENG Zhu-Zhi(郑朱梓), et al. *Fluorescence Analysis Method*(*Second Edition*)(荧光分析法,第二版). Beijing: Science Press, **1990**.502~505
- [18] Ross P D, Subramanian S. *Biochemistry*, **1981**,**20**:3096~3102
- [19] WEI Xiao-Fang(魏晓芳), LIU Hui-Zhou(刘会洲). *Fenxi Huaxue*(*Chinese J. Anal. Chem.*), **2000**,**28**(6):699~701
- [20] YANG Man-Man(杨曼曼), YANG Pin(杨频). *Kexue Tongbao*(*Chin. Sci. Bull.*), **1994**,**39**(1):31~35
- [21] ZHU Keng(朱铿), TONG Shen-Yang(童沈阳). *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao*(*Chem. J. Chin. Univ.*), **1996**,**17**(4): 539~542
- [22] CHANG Xi-jun(常希俊), HUANG Yan(黄艳), HE Qun(贺群). *Huaxue Xuebao*(*Acta Chim. Sinica*), **2005**,**63**(3):223~228