

华法灵过渡金属配合物与人血清白蛋白相互作用研究

张 琼¹ 宋玉民^{*1} 刘家成¹ 王坤杰²

(¹ 西北师范大学化学化工学院, 兰州 730070)

(² 兰州理工大学石油化工学院, 兰州 730050)

摘要: 为了解过渡金属华法灵配合物的抗凝血机理, 本文采用荧光光谱、紫外吸收光谱和圆二色谱法(CD)研究了具有抗凝血作用的华法灵过渡金属配合物与人血清白蛋白(HSA)的相互作用。观察到配合物能使人血清白蛋白荧光产生猝灭现象, 猝灭方式为静态猝灭, 并计算了配合物与人血清白蛋白的结合常数 K (约 10^6) 和结合位点数 n (>1)。根据不同温度下的热力学函数, 确定了配合物与人血清白蛋白之间的作用力为氢键和范德华力。发现华法灵过渡金属配合物的存在改变人血清白蛋白的构象, 并讨论了配合物使人血清白蛋白构象发生变化的可能原因。配合物的抗凝血作用与其通过改变 HSA 的构象, 进而影响血清白蛋白在血液中的溶解性之间有一定的关系。

关键词: 华法灵配合物; 人血清白蛋白; 荧光光谱; 紫外吸收光谱; 圆二色谱

中图分类号: O614.121; O614.81 文献标识码: A 文章编号: 1001-4861(2011)09-1772-09

Interaction between Complexes of Transition Metal with Warfarin and Human Serum Albumin

ZHANG Qiong¹ SONG Yu-Min^{*1} LIU Jia-Cheng¹ WANG Kun-Jie²

(¹ College of Chemistry and Chemical Engineering, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China)

(² College of Petrochemical Technology, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China)

Abstract: For investigation the mechanism of the anticoagulant of the complexes of transition metal with warfarin, fluorescence, CD and UV spectra were used to study the interaction between human serum albumin (HSA) and the binary complexes of transition metals with warfarin. It was observed that complexes could reduce the fluorescence intensity of human serum albumin. The way of fluorescence quenching was static quenching, and then calculated the binding constant K (about 10^6) and binding sites n (>1). According to the thermodynamic functions at different temperatures, the binding type of complexes to HSA is hydrogen bond and van der Waals. And found that complexes have obviously changed the conformation of HSA. The possible reason for which the complex made HSA conformation changes was discussed. The interaction between HAS and the complexes warfarin caused the conformation changes of HSA and influenced the solubility of HSA in blood, which may be the some reasons for anticoagulant function of the complexes.

Key words: complexes of warfarin; human serum albumin; fluorescence; UV spectra; CD

目前脑血管病已成为我国城市和农村人口的第一位致残和死亡原因, 且发病率有逐年增多的趋势。流行病学研究表明, 中国每年有 150 万~200 万

新发脑卒中的病例。随着人口老龄化和经济水平的快速发展, 缺血性脑卒中发病率明显上升, 其中以动脉粥样硬化为基础的缺血性脑血管病发病率正

收稿日期: 2011-03-16。收修改稿日期: 2011-04-29。

国家自然科学基金(No.20871099), 甘肃省高分子材料重点实验室和兰州理工大学博士科研启动资助项目。

*通讯联系人。E-mail: songym@nwnu.edu.cn; 会员登记号: S06N8225M1006。

在增长^[1-2],故对具有抗凝血药物的研究早已是药学家研究的重点^[3]。华法灵钠是常用的抗凝血药物,但其毒性较大,长期服用容易导致出血。为了降低华法灵钠的毒副作用和提高疗效,本课题组合成并研究了一些过渡金属华法灵二元配合物(结构式见图1)、过渡金属华法灵水杨酸三元配合物、稀土华法灵二元配合物、稀土华法灵水杨酸三元配合物的抗凝血功效^[4-5],这些配合物性质稳定,抗凝血性能均比配体华法灵优越,毒性比华法灵小。而存在于血浆中的人血清白蛋白(HSA),化学性质非常活跃,可以和很多物质如金属离子、脂肪酸、氨基酸、代谢物、胆红素、酶、激素等相结合进行存储和运输,是生物体中非常重要的载体蛋白,也是形成血栓的成分之一^[6]。为了解配合物的抗凝血机理,本课题组对过渡金属水杨酸配合物与人血清白蛋白(HSA)的作用进行了研究^[7],结果表明该类配合物能使HSA的荧光产生猝灭,并引起其构象改变。为了进一步了解过渡金属华法灵配合物的抗凝血机理,本课题组首先对华法灵钠与人血清白蛋白之间的相互作用进行了研究^[8],因为华法灵配合物的抗凝血性质都与华法灵的性质有关。进而对过渡金属华法灵配合物与人血清白蛋白之间的相互作用又进行了研究,该研究结果表明配合物对人血清白蛋白荧光产生猝灭现象,猝灭方式为静态猝灭,发现过渡金属华法灵配合物与人血清白蛋白的结合力类型为氢键和范德华力。在相同条件下,配合物与人血清白蛋白的结合常数大于华法灵钠与人血清白蛋白之间的结合常数,这可能是配合物抗凝血性能均比配体

华法灵性能好的原因之一。华法灵钠和过渡金属华法灵配合物都能引起HSA的构象发生变化,而不同构象的HSA经过多肽链盘绕卷曲形成的纤维蛋白和球蛋白在血液中的溶解、沉降性能是不同的,推测配合物的抗凝血作用可能通过改变HSA的构象来实现。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LS-55 荧光分光光度计(美国 PE 公司);Agilent-8453 紫外分光光度计(美国 Agilent 公司);TB-85 型恒温器(日本岛津公司);pHS-25 型酸度计(上海第二分析仪器厂)。

人血清白蛋白为国药集团化学试剂有限公司产品(20%, 25mL, 5 克/瓶, 分子量 67 000, 3.0 mmol·L⁻¹); 过渡金属华法灵二元配合物 FeL₃·2H₂O、NaCuL₃·2H₂O、NaCoL₃·2H₂O(自制, L=华法灵离子)^[4]实验用水为去离子三次蒸馏水; 配制 10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲溶液, pH=7.34(内含 50 mmol·L⁻¹ NaCl 的溶液维持离子强度);其余试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 二元配合物与 HSA 作用的荧光光谱

实验时,取 83.3 μL 的 HSA 溶液加入 1.1 中的 Tris-HCl 缓冲溶液 25 mL 配制成 10 μmol·L⁻¹ 的 HSA 溶液,华法灵过渡金属铁、铜、钴配合物用三次蒸馏水溶解(内加 0.025 mL 1% 的吐温-80 水溶液乳化) 分别配制成 25 mL C_{FeL₃·2H₂O} = 1.0 mmol·L⁻¹、C_{NaCuL₃·2H₂O} = 4.5 mmol·L⁻¹、C_{NaCoL₃·2H₂O} = 4 mmol·L⁻¹ 溶液, 移取 3 mL 10 μmol·L⁻¹ 的 HSA 溶液于 1 cm 石英比色池中,用微量进样器分别加入不同体积的配合物,在 25 °C、30 °C、43 °C 下反应 5 min 后,以 λ_{ex} = 282 nm 为激发波长,记录 300~500 nm 波长范围的荧光光谱。并且测定 Δλ=15 nm 和 Δλ=60 nm 时的同步荧光光谱。

1.2.2 二元配合物与 HSA 作用的紫外吸收光谱

向加有 3 mL 的 10 μmol·L⁻¹ HSA 溶液的 1 cm 石英吸收池中滴加不同体积的相应二元配合物(浓度与 1.2.1 相同),以 Tris-HCl 缓冲溶液为参比,扫描紫外吸收光谱。

2 结果与讨论

2.1 荧光光谱

图 2A、2B、2C 分别为华法灵铁 (FeL₃·2H₂O)、华

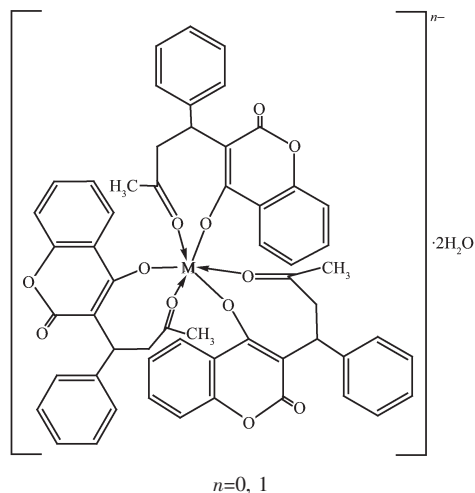


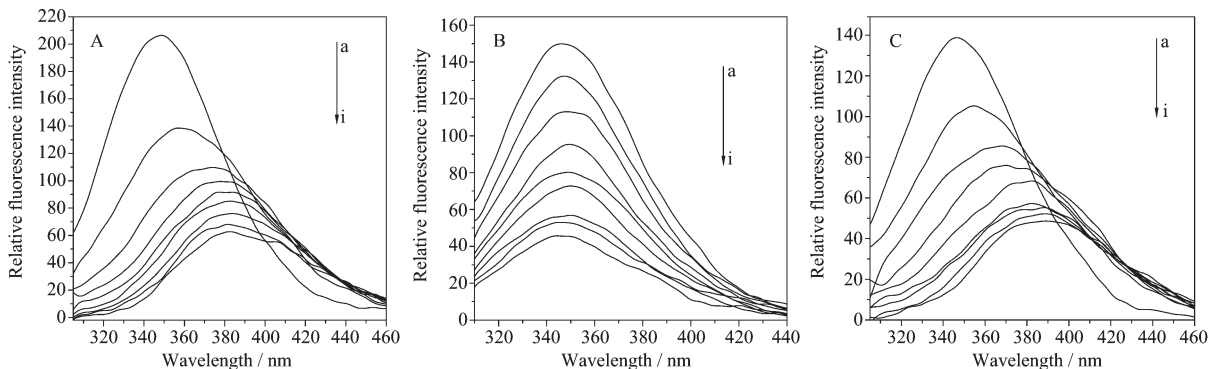
图1 过渡金属华法灵配合物结构

Fig.1 Structure of transition metal complexes with warfarin

法灵铜($\text{NaCuL}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)和华法灵钴($\text{NaCoL}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)对 HSA 溶液荧光影响光谱图。以激发波长 $\lambda_{\text{ex}}=282 \text{ nm}$ 分别激发 HSA 溶液和二元配合物溶液, HSA 在 $\lambda_{\text{em}}=346 \text{ nm}$ 附近有很强的荧光发射峰, 而华法灵铁、华法灵铜、华法灵钴 3 种配合物在该波长附近没有荧光发射峰。

固定 HSA 的浓度, 依次加入相应的配合物溶液, 随着配合物浓度的增加, HSA 在 $\lambda_{\text{em}}=348 \text{ nm}$ 附近的荧光发射峰强度有规律地减弱, 说明配合物与人血清白蛋白之间存在一定的作用(滴定过程中, 最后加入的配合物溶液的累加体积($\leq 80 \mu\text{L}$)远小于 HSA 溶液的体积 3.0 mL , 故忽略稀释效应对 HSA 荧光强度的影响)。并且可以看到图 2A, 2C 中发射

峰位置有明显的红移(约 $40 \sim 50 \text{ nm}$), HSA 在 348 nm 附近的发射峰是色氨酸残基所产生的, 而色氨酸残基的最大发射波长与它所处的环境有关, 发射波长红移表明配合物的加入使得 HSA 中的色氨酸残基周围的疏水性有所降低^[9-11]。图 2B 中的发射峰位置有略微蓝移, 说明华法灵铜与人血清白蛋白之间通过一定的作用形成了复合物, 使得色氨酸残基周围的疏水性有所增加^[9-11]。发射波长的改变, 表明 HSA 的构象发生了变化。在相同的条件下, 3 种配合物对 HSA 荧光猝灭强度的影响不同, 可能与 3 种配合物与 HSA 结合强度不同有关, 同时 3 种配合物对 HSA 荧光发射峰位移的不同影响, 可能与配合物中心离子的电荷和电子构型不同有关。



$\lambda_{\text{ex}}=282 \text{ nm}$; $C_{\text{HSA}}=10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; A: $\text{FeL}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; from a to i curves $C_{\text{FeL}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}} / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$: 0, 2.7, 5.3, 8.0, 10.7, 13.3, 16.7, 20.7, 25.3, respectively; B: $\text{NaCuL}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; from a to i curves $C_{\text{NaCuL}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}} / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$: 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, respectively; C: $\text{NaCoL}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; from a to i curves $C_{\text{NaCoL}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}} / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$: 0, 11, 21, 32, 43, 53, 64, 75, 96, respectively

图 2 二元配合物在 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 时对 HSA 溶液荧光光谱的影响

Fig.2 Effect of binary complexes on fluorescence spectra of HSA at $25 \text{ }^\circ\text{C}$

2.2 荧光猝灭方式

荧光猝灭过程通常分为动态猝灭和静态猝灭两类^[12-13]。动态猝灭主要是依赖于分子的扩散, 温度越高, 扩散系数越大, 猝灭常数的改变与温度成正比。而静态猝灭, 温度升高, 基态配合物的稳定性越差, 形成常数越小^[14]。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过程。其作用过程遵循 Stern-Volmer 方程:

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

其中 F_0 为未加入猝灭剂时的荧光强度; F 为加入猝灭剂后的荧光强度; $K_q (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$ 为双分子猝灭过程的速率常数; $K_q \tau_0 = K_{sv} (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$ 称为 Stern-Volmer 猝灭常数, C_Q 为猝灭剂的浓度; τ_0 为没有猝灭剂存在时荧光分子的平均寿命, 生物大分子的平均寿命约为 10^{-8} s ^[15]; 静态猝灭是猝灭剂和荧光物质分子相互作用生成不发光的基态化合物, 从而导致荧光物

质荧光强度降低的过程。其荧光强度与猝灭剂浓度之间的关系与公式(1)是相同的, 但其常数的物理意义是基态的形成常数^[16]。

根据(1)式, 以 F_0/F 对所加入的二元配合物浓度 C_Q 作图, 得到人血清白蛋白荧光的 Stern-Volmer 猝灭曲线, 如图 3 所示。

由图 3 可以看出, 二元配合物-HSA 体系在不同温度下的 Stern-Volmer 曲线都为直线, 说明配合物对 HSA 的荧光猝灭主要存在一种方式, 动态猝灭或静态猝灭^[17]。由(1)式求得猝灭速率常数见表 1 (R 为相关系数), 各类猝灭剂对生物大分子的最大动态猝灭常数为 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ^[18], 然而反应中双分子猝灭常数 K_q 远大于最大动态猝灭常数, 且随着温度的升高, 华法灵铁、华法灵铜、华法灵钴的 K_q 值明显变小, 说明铁、铜、钴二元配合物对 HSA 的荧光猝灭过程不是动态猝灭而是和 HSA 之间生

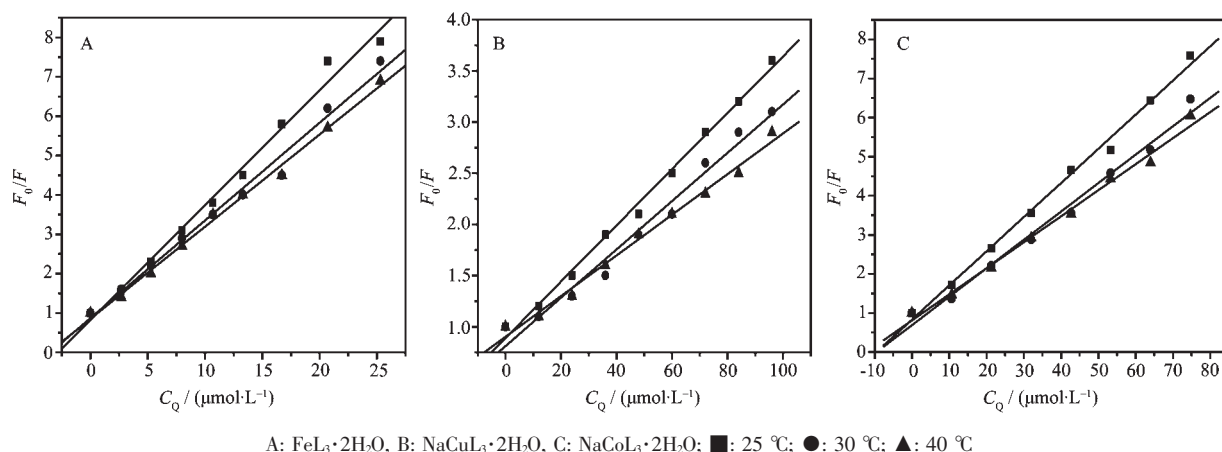
A: $\text{FeL}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, B: $\text{NaCuL}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, C: $\text{NaCoL}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; ■: 25 °C; ●: 30 °C; ▲: 40 °C

图3 二元配合物-HSA 在不同温度下的 Stern-Volmer 曲线

Fig.3 Stern-Volmer curves of binary complexes-HSA at different temperature

表1 二元配合物-HSA 在不同温度的 Stern-Volmer 常数

Table 1 Stern-Volmer quenching constant of K_{sv} at different temperature

Complex	T / K	$K_{sv} / (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$K_q / (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	R
$\text{FeL}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	298	2.92×10^5	2.92×10^{13}	0.994 9
	303	2.48×10^5	2.48×10^{13}	0.994 1
	313	2.34×10^5	2.34×10^{13}	0.997 7
$\text{NaCuL}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	298	2.75×10^4	2.75×10^{12}	0.997 3
	303	2.36×10^4	2.36×10^{12}	0.989 2
	313	1.99×10^4	1.99×10^{12}	0.995 1
$\text{NaCoL}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	298	8.74×10^4	8.74×10^{12}	0.997 2
	303	7.27×10^4	7.27×10^{12}	0.993 5
	313	6.66×10^4	6.66×10^{12}	0.995 5

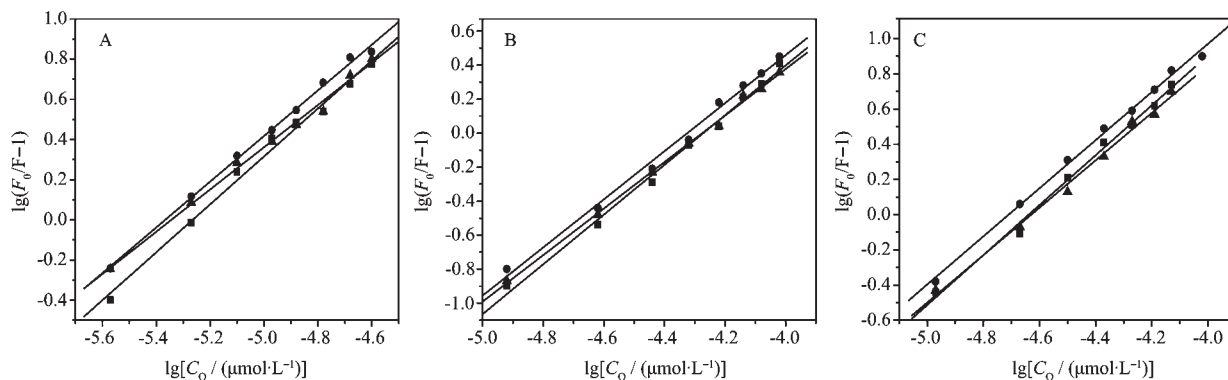
成了不发荧光的复合物而导致的静态猝灭^[9]。

2.3 用静态猝灭法分析配合物与 HSA 的相互作用

在静态猝灭过程中, 荧光物质与猝灭剂分子间的结合常数可根据荧光强度与猝灭剂浓度的关系求出。设蛋白质大分子有 n 个相同并且相互独立的结合位置。则有:

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K + n \lg C_Q \quad (2)$$

其中 F_0 为未加入猝灭剂时的荧光强度; F 为加入猝灭剂后的荧光强度; K 为静态猝灭常数, C_Q 为配合物的浓度。相关数据代入式(2), 得到 $\lg(F_0/F-1)$ 与 $\lg C_Q$ 的关系图(图4)。

A: $\text{FeL}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, B: $\text{NaCuL}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, C: $\text{NaCoL}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; ■: 25 °C; ●: 30 °C; ▲: 40 °C图4 $\lg(F_0/F-1)$ 与 $\lg C_Q$ 的关系图Fig.4 Plot of $\lg(F_0/F-1)$ versus $\lg C_Q$

由图 4 求出在不同温度下的 $\text{FeL}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NaCuL}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{NaCoL}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 与 HSA 的结合常数 K 以及结合位点数 n (见表 2)。从表 2 中可以看出: $\text{FeL}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NaCuL}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{NaCoL}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的结合常数 K 均比较大, 数量级达到了 10^5 、 $10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 并且结合常数随温度的升高而减小, 进一步说明了配合物对 HSA 的荧光猝灭为静态猝灭过程。HSA 的药物主要结合位点是由蛋白质分子中的疏水性氨基酸残基之间通过疏水作用聚集在一起构成的疏水

腔^[20]。药物分子中苯环的疏水性使其与疏水腔中的氨基酸残基发生相互作用, 若疏水性氨基酸残基(如色氨酸)位于 HSA 的疏水腔内且参与了二级和三级界面的二次疏水性折叠作用, 则脂溶性药物比水溶性药物更易进入疏水腔形成复合物^[21]。而过渡金属华法灵配合物分子结构中的共轭平面比华法灵铜配合物的共轭平面大, 脂溶性更好, 更易进入疏水腔与 HSA 形成复合物, 因而其与 HSA 有较强结合作用。

表 2 线性回归方程、相关系数和结合位点数

Table 2 Regression equations and correlation coefficient R and the number of binding site n

Complex	T / K	Regression equation	$K / (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	R	n
$\text{FeL}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	298	$\lg(F_0/F-1)=6.282 \ 8+1.19\lg C_0$	1.918×10^6	0.995 79	1.19
	303	$\lg(F_0/F-1)=6.104 \ 8+1.14\lg C_0$	1.273×10^6	0.998 56	1.14
	313	$\lg(F_0/F-1)=5.622 \ 8+1.05\lg C_0$	4.196×10^5	0.997 15	1.05
$\text{NaCuL}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	298	$\lg(F_0/F-1)=6.249 \ 7+1.46\lg C_0$	1.777×10^6	0.996 79	1.46
	303	$\lg(F_0/F-1)=6.1191+1.41\lg C_0$	1.315×10^6	0.998 81	1.41
	313	$\lg(F_0/F-1)=5.850 \ 4+1.37\lg C_0$	7.087×10^5	0.993 97	1.37
$\text{NaCoL}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	298	$\lg(F_0/F-1)=6.577 \ 7+1.42\lg C_0$	3.782×10^6	0.996 74	1.42
	303	$\lg(F_0/F-1)=6.440 \ 3+1.37\lg C_0$	2.756×10^6	0.998 24	1.37
	313	$\lg(F_0/F-1)=6.239 \ 02+1.35\lg C_0$	1.734×10^6	0.996 52	1.35

2.4 二元配合物与 HSA 之间的作用力类型

有机小分子和蛋白质等生物大分子之间的结合力主要有氢键、范德华力、静电引力、疏水作用力等。由反应前后热力学参数焓变 ΔH 和熵变 ΔS 的相对变化, 可以判断小分子与蛋白质分子链之间的主要作用力类型^[22-25]。假设在测定的温度范围内焓变的变化可以忽略, 则焓变 ΔH 和熵变 ΔS 以及 ΔG 可以通过以下的热力学方程式求得(见表 3):

$$\ln(K_2/K_1)=\Delta H(1/T_1-1/T_2)/R$$

$$\Delta G=\Delta H-T\Delta S$$

$$\Delta G=-RT\ln K$$

Mohammed 等^[26]根据大量的实验结果总结出判断生物大分子与小分子结合力性质的热力学规律, 即: $\Delta S > 0$ 可能是疏水和静电作用力; $\Delta S < 0$ 可能为氢键和范德华力; $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$ 为典型的疏水作用力; $\Delta H \approx 0$ 或较小, $\Delta S > 0$ 为静电作用力; $\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$ 为氢键和范德华力。从表 3 数据中可以看出三种二元配合物与 HSA 体系中 $\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$, 说明该二元配合物与 HSA 之间主要作用力是氢键和范德华力。二元配合物与 HSA 反应的 $\Delta H < 0$, 为放热反应,

表 3 热力学参数

Table 3 Thermodynamic parameters

Complex	T / K	$K / (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta H / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S / (\text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta G / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$
$\text{FeL}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	298	1.918×10^6	-61.544	-98.00	-35.843
	303	1.273×10^6	-61.544	-86.24	-35.411
	313	4.196×10^5	-61.544	-61.54	-30.87
$\text{NaCuL}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	298	1.777×10^6	-45.206	-32.06	-35.653
	303	1.315×10^6	-45.206	-32.06	-35.493
	313	7.087×10^5	-45.206	-32.43	-35.056
$\text{NaCoL}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	298	3.782×10^6	-47.515	-33.54	-37.52
	303	2.756×10^6	-47.515	-33.51	-37.36
	313	1.734×10^6	-47.515	-32.38	-37.38

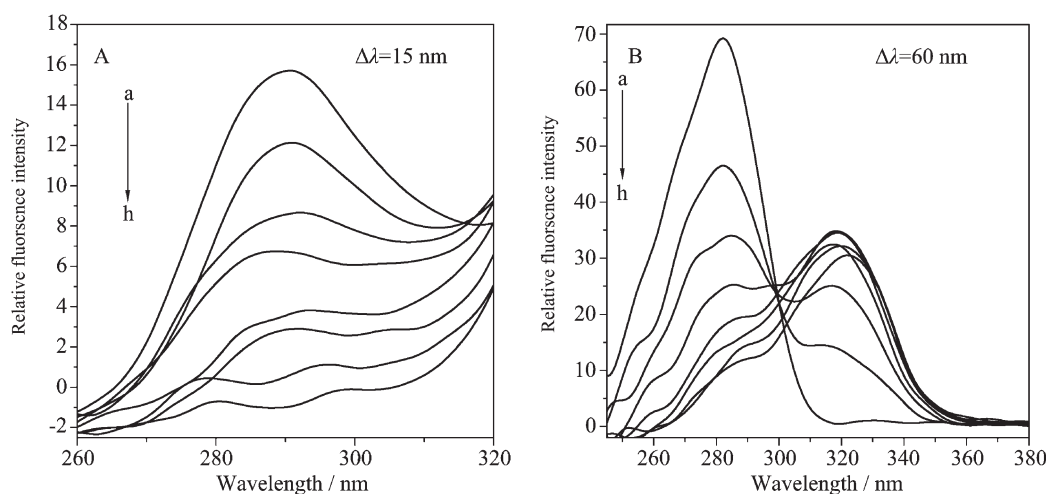
升高温度不利于反应正向进行,这与静态猝灭常数随温度的升高而减小相一致。

2.5 同步荧光光谱

固定激发波长和发射波长的间距 $\Delta\lambda$, 同步扫描激发和发射单色器可以得到同步荧光光谱,因其具有简化光谱、窄化谱带和减少光谱重叠等优点,而常被用于研究小分子对蛋白质构象的影响,进而探讨蛋白质构象的变化^[27]。蛋白质的荧光主要来自于色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸所产生的荧光,它们的荧光强度之比一般为 100:9:0.5。由于苯丙氨酸的荧光强度太弱,所以一般重点考察构象发生变化的是色氨酸和酪氨酸。在 $\Delta\lambda=15\text{ nm}$ 与 $\Delta\lambda=60\text{ nm}$ 时, HSA 的同步荧光分别显示酪氨酸残基和色氨酸残

基的特征信息^[28]。

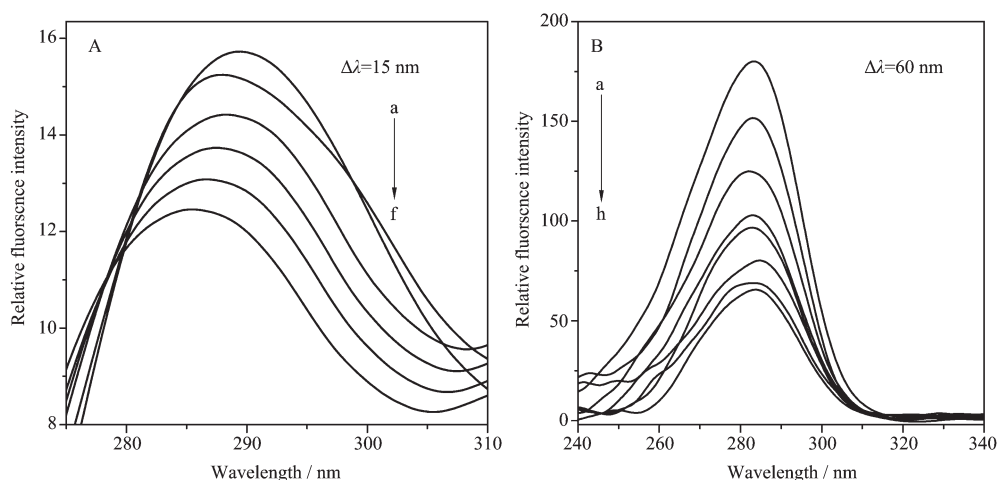
图 5、图 6 和图 7 分别是 $\text{FeL}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NaCuL}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{NaCoL}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 与 HSA 相互作用的同步荧光光谱。室温 25 °C 下,固定 HSA 的浓度,逐渐增加配合物的浓度,记录 $\Delta\lambda=15\text{ nm}$ 与 $\Delta\lambda=60\text{ nm}$ 时的同步荧光光谱。发现图 5 和图 7 中,酪氨酸残基的最大发射波长基本不变,色氨酸残基的最大发射波长红移,在 320 nm 处出现了游离的 $\text{FeL}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{NaCoL}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 配合物的发射峰,发射强度随配合物浓度的增加而加大。图 6 中酪氨酸残基和色氨酸残基的最大发射波长略有蓝移。表明配合物的加入使 HSA 的构象发生变化。随着华法灵铁和华法灵钴的加入, HSA 中酪氨酸残基所处环境基本不变,色氨



$T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7.34$. $C_{\text{HSA}}=10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{FeL}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}$; from a to h curves $C_{\text{FeL}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$: 0, 1.3, 4.0, 6.7, 10, 14, 19.3, 25.3

图 5 华法灵铁和 HSA 相互作用的同步荧光光谱

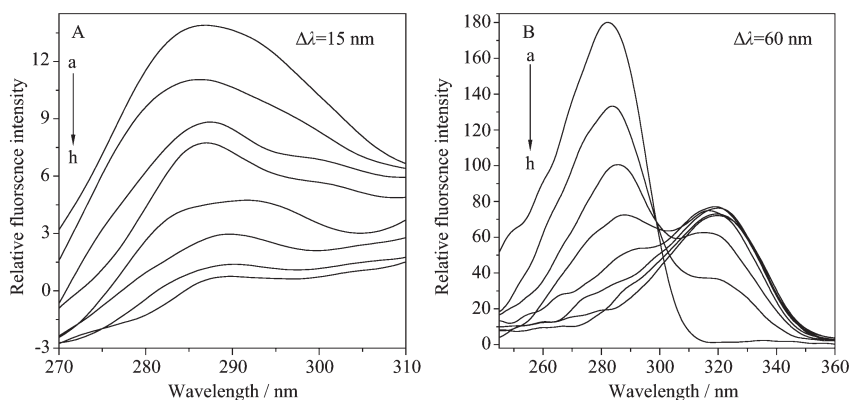
Fig.5 Synchronous fluorescence spectra with $\text{FeL}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -HSA



$T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7.34$. $C_{\text{HSA}}=10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{NaCuL}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}$; from a to h curves $C_{\text{NaCuL}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$: 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96

图 6 华法灵铜和 HSA 相互作用的同步荧光光谱

Fig.6 Synchronous fluorescence spectra with $\text{NaCuL}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ HSA



$T=25^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7.34$, $C_{\text{HSA}}=1.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{NaCoL}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}$; from a to h curves $C_{\text{NaCoL}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}} / (\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$: 0, 11, 21, 32, 43, 53, 64, 75, 96

图 7 华法灵钴和 HSA 相互作用的同步荧光光谱

Fig.7 Synchronous fluorescence spectra with $\text{NaCoL}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ HSA

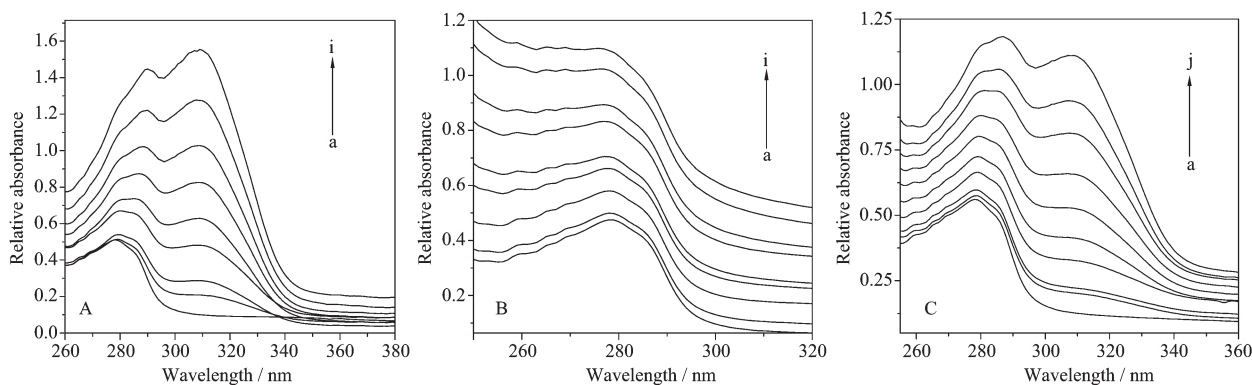
酸残基所处环境的疏水性降低。随着华法灵铜的加入, HSA 中酪氨酸残基和色氨酸残基所处环境的疏水性增加。说明配合物分子的结合部位可能处于 HSA 亚结构域中圆筒状的疏水腔内, 导致 HSA 内部的疏水结构有一定程度的瓦解^[28]。这也说明了 3 种配合物抗凝血作用可能是通过改变 HSA 的构象来实现的。

2.6 紫外光谱

华法灵铁($\text{FeL}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、华法灵铜($\text{NaCuL}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 和华法灵钴 ($\text{NaCoL}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 在 260~300 nm 范围内无吸收。从图 8 可知, 随着 3 种配合物的加入, HSA 在 278 nm 处的吸收强度逐渐增强, 并且峰位略微的红移。随着 3 种配合物的浓度的增加, 在 310 nm

附近出现了游离的华法灵铁和华法灵钴的吸收峰。

HSA 在 278 nm 处的吸收峰是其肽链上的色氨酸和酪氨酸的苯杂环 $\pi-\pi^*$ 跃迁引起的, 吸收强度随着配合物浓度的增加而加强, 说明以上两种配合物与 HSA 发生了作用, 诱导 HSA 分子链发生了类似降低 pH 值所出现的蛋白质肽链伸展现象^[29]以致本来被包含在 HSA 内部的色氨酸和酪氨酸残基的芳杂环疏水基团裸露出来, 使吸收强度增加, 同时疏水基团之间的疏水作用减弱, 由于 HSA 与加入的二元配合物生成了新的共轭体系, 增加了新的 $\pi-\pi^*$ 跃迁, 使得吸收峰发生了红移, 导致 HSA 构象发生了变化。



$\text{pH}=7.37$, $C_{\text{HSA}}=50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; A: $\text{FeL}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}$; from a to i curves $C_{\text{FeL}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}} / (\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$: 0, 3.3, 6.7, 10.7, 15.3, 20.7, 26.7, 33.3, 40.7, respectively; B: $\text{NaCuL}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}$; from a to i curves $C_{\text{NaCuL}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}} / (\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$: 0, 12, 27, 48, 72, 99, 129, 162, 320, respectively; C: $\text{NaCoL}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}$; from a to j curves $C_{\text{NaCoL}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}} / (\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$: 0, 8.0, 17.6, 28.8, 43.2, 60.8, 80, 100.8, respectively

图 8 三种配合物对 HSA 的紫外紫外吸收光谱的影响

Fig.8 Effect of the complexes on the absorption spectra on HSA

2.7 圆二色谱(CD)

HSA 是光学活性物质, 因此可测量它的 CD 谱,

从而了解其构象(结构), 当加入配合物后, 观察其 CD 谱的变化, 进而了解其构象的结构变化。一般 CD 谱

用椭圆值 $[\theta]^{[30]}$ 表示,若使用单位浓度与单位光程长度,则 $[\theta]$ 可表示为:

$$[\theta]=3\,300(A_L-A_n)$$

单位为“ $^{\circ}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ ”, A_L 和 A_n 分别为物质对入射的左旋和右旋偏振光的吸收率。

由图9看出,随着 $\text{FeL}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 配合物浓度的增加,HSA分子典型的二级结构的208 nm和222 nm处的负峰略微向低波数方向移动,并且相应的振幅也显著地减弱。表明配合物与HSA之间产生了一定的作用,形成了复合物,从而使得HSA分子链得到了伸展,改变了HSA的二级结构,导致了HSA的构象发生了变化。配合物 $\text{NaCuL}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和配合物 $\text{NaCoL}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 与HSA作用的CD图谱与 $\text{FeL}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 配合物与HSA的CD图谱较为相似。这3种配合物和华法灵钠与HSA作用的CD图谱也较为相似^[8],说明华法灵配合物的抗凝血性质主要来自配体华法灵的性质。

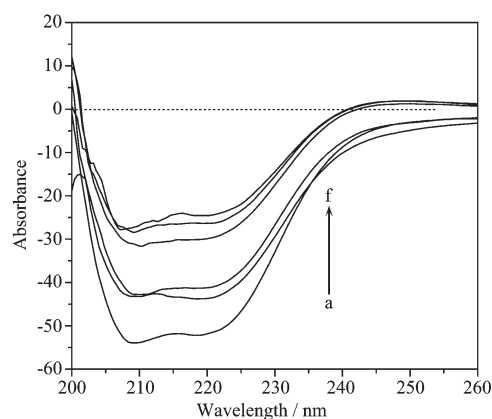


图9 $\text{FeL}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 对HSA溶液的CD光谱的影响

Fig.9 Effect of $\text{FeL}_3\cdot \text{H}_2\text{O}$ on the CD spectra of HSA solution from a to f curves $C_{\text{FeL}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}} / (\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$: 0, 3.3, 6.7, 10.7, 15.3, 20.7, respectively

通过荧光光谱、紫外吸收光谱、圆二色谱分析可知,抗凝血过渡金属华法灵二元配合物对于HSA的猝灭效应属于两者之间生成了不发荧光的复合物而导致静态猝灭,并计算了它们与HSA相互作用的结合常数 K 值数量级约为 10^6 左右,结合位点数 $n>1$,说明过渡金属华法灵配合物与人血清白蛋白结合作用较强的原因可能是疏水性氨基酸残基(如色氨酸)位于HSA的疏水腔内且参与了二级和三级界面的二次疏水性折叠作用,使过渡金属华法灵配合物更易进入疏水腔与HSA形成复合物。并通过计算确定了它们的结合力类型为氢键和范德

华力。得出过渡金属配合物的加入是通过影响HSA的二级结构,改变HSA的构象来实现其抗凝血的,这对于开发新的抗凝血药物提供了一定的理论参考价值。

参考文献:

- [1] WANG Yi-Long(王伊龙), WANG Chun-Xue(王春学), WANG Yong-Jun(王拥军). *Cerebrovas. Diseases Foreign Med. Sci. (Guowai Yixue Naoxueguan Fence)*, **2005**,**13**(6):418-421
- [2] WANG Gui-Hong(王桂红), WANG Yong-Jun(王拥军), JIANG Wei-Jian(姜卫剑). *Chin. J. Geriatric Cardiovas. Cerebrovas. Disease (Zhonghua Laonian Xinnaoxueguan Jibing)*, **2003**,**5**: 315-373
- [3] Jiao T Q, Wu J G, Zeng F L, et al. *Synth. React. Inorg. Met. -Org. Chem.*, **1999**,**29**:725-735
- [4] DONG Yin-long(董银龙), LUAN Ni-Na(栾尼娜), SONG Yu-Min(宋玉民), et al. *Acta Chim. Sin. (Huaxue Xuebao)*, **2008**,**66**(12):1497-1500
- [5] SONG Yu-Min(宋玉民), DONG Yin-Long(董银龙), FU Yun-Long(付云龙), et al. *Acta Chim. Sin. (Huaxue Xuebao)*, **2007**,**65**(8):678-682
- [6] Ulrich K H. *J. Pharm. Rev.*, **1981**,**33**(1):17-23
- [7] LIU Zhe(刘哲), WANG Kun-Jie(王坤杰), SONG Yu-Min(宋玉民), et al. *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **2010**,**26**(1):72-78
- [8] SONG Yu-Min(宋玉民), ZHANG Qiong(张琼), LI Qing-Ping(李清萍), et al. *J. Northwest Normal Univ. (Xibei Shifan Daxue Xuebao)*, **2011**,**47**(1):48-52
- [9] ZHAO Yan(赵妍), CAO Yi(曹焱), HAN Fen-Mei(韩凤梅), et al. *Spectrosc. Spectr. Anal. (Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi)*, **2008**,**28**(4):904-907
- [10] YANG Mei-Ling(杨美玲), YANG Pei-Ju(杨培菊), SONG Yu-Min(宋玉民). *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **2005**,**21**(4):483-489
- [11] CHEN Ke-Hai(陈克海), ZHEN Xue-Fang(郑学仿), GUO Ming(郭明). *Acta Chim. Sin. (Huaxue Xuebao)*, **2007**,**65**(7): 1887-1891
- [12] YANG Pin(杨频), GAO Fei(高飞). *Principles of Bioinorganic Chemistry (生物无机化学原理)*. Beijing: Science Press, **2002**:329-331
- [13] ZHONG Wei-Qing(仲维清), ZHANG Qi(张琦), YUE Chen(岳晟), et al. *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **1997**,**13**(3):241-250
- [14] Lakowicz J R. *Principles of Fluorometric Spectroscopy*. New York: Plenum Press, **1983**:187-214
- [15] ZHA Dan-Ming(查丹明), LI Shu-Tin(李舒婷), YANG Yong-

- Fei (杨勇飞), et al. *Spectrosc. Spectr. Anal. (Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi)*, **1999**,**19**(6):788-791
- [16] LU Yan(卢雁), GAO Sheng-Hua(高胜华), WANG Yun-Lai(王运来), et al. *Chin. Sci. Bull (Kexue Tongbao)*, **2009**,**54**(14):2071-2075
- [17] CHEN Guo-Zhen(陈国珍), HUANG Xian-Zhi(黄贤智), XU Jin-Gou(许金钩), et al. *Fluorescence Analysis. 2nd Ed.*(荧光分析.2 版). Beijing: Science Press, **1990**:201-212
- [18] XIE Meng-Xia(谢孟峡), XU Xiao-Yun(徐晓云), WANG Ying-Dian(王英典), et al. *Acta Chim. Sin. (Huaxue Xuebao)*, **2005**,**63**(22):2055-2062
- [19] Ross P D, Submmanian S. *Biochem.*, **1981**,**20**:3096-3102
- [20] DING Fei(丁飞), SONG Wei-Tang(宋卫堂), LIN Juan(林娟), et al. *Chin. J. Spectrosc. Lab. (Guangpu Shiyanshi)*, **2008**,**25**(6):1099-1103
- [21] NI Yong-Nian(倪永年), LAI Yan-Hua(赖燕华). *J. Nanchang Univ.: Nat. Sci. (Nanchang Daxue Xuebao)*, **2008**,**32**(4):377-381
- [22] SONG Yu-Min(宋玉民), LIU Zhe(刘哲), WANG Kun-Jie(王坤杰), et al. *Acta Chim. Sin. (Huaxue Xuebao)*, **2010**,**68**(21): 2191-2198
- [23] LI Lin-Wei(李林尉), WANG Dong-Dong(王冬冬), SUN De-Zhi(孙德志). *Acta Chim. Sin. (Huaxue Xuebao)*, **2007**,**65**(24):2853-2857
- [24] LIU Jia-Qin(刘家琴), TIAN Jian-Niao(田建袅), XIE Jian-Ping(谢建平). *Chin. J. Anal. Chem. (Fenxi Huaxue)*, **2006**, **34**(4):557-560
- [25] LUAN Ni-Na(栾尼娜), WU Jin-Xiu(吴锦绣), SONG Yu-Min(宋玉民). *Spectrosc. Spectr. Anal. (Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi)*, **2008**,**28**(4):856-859
- [26] Mohammed H R, Toru M, Tomoko O et al. *Biochem. Pham.*, **1993**,**46**(10):1721-1731
- [27] Miller J N. *Proc. Anal. Div. Chem. Soc.*, **1979**,**16**:203-208
- [28] ZHANG Xiao-Wei(张晓威), ZHAO Fen-Lin(赵凤林), LI Ke-An(李克安). *Chem. J. Chinese Universities (Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao)*, **1999**,**20**(7):1063-1067
- [29] LI Xiao-Jin(李晓晶), WANG Zhi-Qiang(王志强), CHEN Ji(陈继). *Chin. J. Appl. Chem. (Yingyong Huaxue)*, **1998**,**15**(1): 5-8
- [30] YANG Pin(杨频), GAO Fei(高飞). *Principles of Bioinorganic Chemistry (生物无机化学原理)*. Beijing: Science Press, **2002**:45-59