

转铁蛋白介导黄腐酸靶向载药体系的机制研究

摘要

转铁蛋白是一种广泛存在于生物体液及细胞中的转运蛋白。它可以通过转铁蛋白受体介导的内吞作用运载抗肿瘤药物小分子进入靶细胞，因此将转铁蛋白应用于抗肿瘤药的靶向载药体系的构建成为目前的研究热点。黄腐酸是一种含有芳香结构的天然有机化合物，研究表明它具有一定的生物及药理活性，对于宫颈癌、艾氏腹水癌、白血病、艾滋病毒、流感病毒等多种病毒具有较明显的抑制作用。近年来很多研究报道了药物分子与蛋白质的结合机制并开发出了以转铁蛋白介导的药物小分子载药体系，因此研究黄腐酸与蛋白质的作用机制可以为开发与设计转铁蛋白介导的药物分子载药体系提供一种新思路。

利用吸收光谱、荧光光谱、同步荧光光谱、热力学计算、圆二色谱等一系列方法研究了 pH 7.4 和 pH 4.8 中转铁蛋白与黄腐酸在 15°C, 25°C, 37°C 三个温度下的相互作用机制。实验结果显示，在不同 pH 环境和不同温度下黄腐酸都具有较强的亲和力，能够使转铁蛋白发生荧光猝灭现象，其为静态猝灭过程，并且发生了非辐射能量转移，低温条件下黄腐酸小分子到达肿瘤细胞内后可能会被释放。当 pH=7.4 时黄腐酸与转铁蛋白的作用力类型主要为氢键与范德华力，并且能够引起转铁蛋白中 α -螺旋结构的百分含量减小，改变转铁蛋白的二级结构，使其结构变得更加疏松；当 pH= 4.8 时黄腐酸与转铁蛋白的作用力类型主要为疏水作用力，引起了转铁蛋白中 α -螺旋结构的百分含量升高，使转铁蛋白的结构变得更加紧密。

通过黄腐酸与转铁蛋白的机制研究，证明黄腐酸能够与转铁蛋白结合实现靶向载运过程。为了进一步了解黄腐酸药物分子在体内的储存、运输过程，利用荧光光谱、同步荧光光谱、热力学计算、圆二色谱等一系列方法研究了黄腐酸与人血清白蛋白的相互作用机制。实验结果显示，在不同 pH 环境、温度下黄腐酸能够使人血清白蛋白发生荧光猝灭，主要为静态猝灭并且发生了非辐射能量转移，黄腐酸与人血清白蛋白结合后很难被释放。当 pH=7.4 时黄腐酸与人血清白蛋白主要为氢键与范德华力，并且能够引起转铁蛋白中 α -螺旋结构的百分含量升高，使其结构变得更加紧密；当 pH= 4.8 时两者之间主要为疏水作用力，引起转铁蛋白中 α -螺旋结构的百分含量降低，使转铁蛋白的结构变得更加疏松。

图 24 幅；表 20 个；参 65 篇。

关键词：转铁蛋白；人血清白蛋白；黄腐酸；荧光猝灭法；圆二色谱

分类号：O657.3

Abstract

Transferrin (Tf) is a transport protein existed in biological fluids and cells widely. Tf could deliver anticancer drugs into target cells through swallowing function of receptor, and it is widely used to build the targeting delivery of anticancer drugs. Fulvic acid (FA) has wide activities of biology and pharmacology with strong inhibitory effect on the HIV, cervical cancer, ehrlich ascites carcinoma and leukemia. The studies design delivery system of drug molecules by transferrin-mediated, so the mechanism between FA and protein provides a new thought to design delivery system of drug molecule for Tf.

The paper investigates the interaction of FA with Tf by using fluorescence quenching, thermodynamics, synchronous fluorescence and circular dichroism (CD) under the pH 7.4 and 4.8 at 15°C, 25°C, 37°C. The results show that FA has a strong affinity under different pH and temperatures as a static quenching process, it releases FA in tumor cell at low temperature. It is mainly hydrogen bonding and van der Waals force under pH 7.4. FA reduces the Tf of α -helix structure, and make the structure of protein become more loose at pH 7.4. It is mainly hydrophobic forces at pH 4.8. FA increases α -helix structure of Tf, and make the structure of protein become more closely at pH 4.8.

The results of study on mechanism of FA with Tf show that the binding of FA with Tf achieves targeted transport process. To further understand the storage and transportation process FA in the body, it investigates the interaction of FA with HSA by using fluorescence quenching, thermodynamics, synchronous fluorescence and CD. The results show that FA had fluorescence quenching as static quenching process for HSA under different pH and temperature, it is difficult to release FA. It is mainly hydrogen bonding and van der Waals force under pH 7.4. FA increases the HSA of α -helix structure, and make the structure of protein become more closely at pH 7.4. It is mainly hydrophobic forces at pH 4.8. FA reduces α -helix structure of Tf, and make the structure of protein become more loose at pH 4.8.

Figure 24; Table 20; Reference 65

Keywords: Transferrin, Human serum albumin, Fulvic acid, Fluorescence quenching, Circular dichroism

Chinese books catalog: O657. 3

目 次

引 言	1
第 1 章 文献综述	2
1.1 转铁蛋白及转铁蛋白受体	2
1.1.1 转铁蛋白结构及生物功能	2
1.1.2 转铁蛋白受体	3
1.2 转铁蛋白作为载药体系的研究现状	5
1.2.1 转铁蛋白作为抗肿瘤药物的载体	5
1.2.2 转铁蛋白作为生物活性物质的载体	5
1.2.3 转铁蛋白作为基因治疗的载体	6
1.2.4 转铁蛋白作为药物载体的应用前景	6
1.3 人血清白蛋白	6
1.4 黄腐酸的生物活性研究	7
1.4.1 黄腐酸结构研究概况	7
1.4.2 黄腐酸的药理活性	8
1.4.3 黄腐酸生物活性的作用机理	10
1.4.4 黄腐酸的应用前景	10
1.5 药物小分子与蛋白质分子相互作用的研究方法	11
1.5.1 荧光猝灭光谱	11
1.5.2 同步荧光光谱	11
1.5.3 圆二色谱	11
1.6 立题背景及研究内容	12
第 2 章 黄腐酸与转铁蛋白相互作用的机制研究	13
2.1 实验部分	13
2.1.1 实验试剂及仪器	13
2.1.2 样品制备	14
2.1.3 实验方法	16
2.2 结果与讨论	17
2.2.1 黄腐酸对转铁蛋白内源荧光的猝灭	17

2.2.2 结合常数及结合位点数的计算	22
2.2.3 结合距离的计算	24
2.2.4 相互作用力类型	26
2.2.5 黄腐酸对转铁蛋白构象的改变	28
2.3 结论	30
第 3 章 黄腐酸与人血清白蛋白相互作用的机制研究	32
3.1 实验部分	33
3.1.1 实验试剂	33
3.1.2 实验仪器	33
3.1.3 样品制备	33
3.1.4 实验方法	34
3.2 结果与讨论	35
3.2.1 黄腐酸对人血清白蛋白内源荧光的猝灭	35
3.2.2 结合常数及结合位点数的计算	40
3.2.3 结合距离的计算	42
3.2.4 相互作用力类型	44
3.2.5 黄腐酸对人血清白蛋白结构的改变	45
3.3 结论	49
结 论	50
参考文献	51
致 谢	56
导师简介	57
作者简介	59
学位论文数据集	60

引　　言

转铁蛋白是一种广泛存在于生物体液及细胞中的单链糖基化 β -球蛋白，是脊椎动物体内铁的运输者，在抗菌杀菌、防治肿瘤和癌症等方面具有突出作用，并且具有稳定性、可生物降解性、无毒性、可控性等优点，转铁蛋白在医药界已越来越受到人们的重视并开展了其作为药物载体的大量研究。转铁蛋白和转铁蛋白受体之间的配体—受体具有特异性识别作用，由于快速增长的肿瘤细胞表面转铁蛋白受体过度表达，转铁蛋白可以运载药物小分子通过受体调控的细胞内吞物作用进入靶细胞，这为转铁蛋白作为药物小分子的载体提供了可能，同时为开发和研究抗癌药物通过细胞靶向吸收提供了一个新的契机。

人血清白蛋白是人血浆中含量最多的蛋白质，担负着药物的储存、转运等重要功能，对药物的代谢动力学和效率起到关键作用，是药物分布的重要载体，并且具有维持血液的正常渗透压和运送水分子的作用。目前，大量研究报道了药物小分子在血液中与人血清白蛋白的结合机理，人血清白蛋白常常作为研究药物与蛋白质相互作用的模型蛋白，因此研究药物小分子与人血清白蛋白相互作用机制对于从分子水平上了解药物在体内的运输、作用机理和代谢情况具有重要的指导意义。

黄腐酸是一种存在于煤炭中的天然有机化合物，对艾滋病毒、流感病毒、宫颈癌、艾氏腹水癌、白血病等多种恶性肿瘤及病毒具有一定的抑制作用，在医药领域具有广阔的发展前景。然而关于黄腐酸产生药理活性的物质基础以及所起药效的机制基本处于空白，从而限制了黄腐酸在医药领域的应用与发展。药物分子一般是通过调节蛋白质的结构而发挥药理药效，因此研究黄腐酸与蛋白质的结合机制有利于深入了解黄腐酸的药理药效并为开发黄腐酸药物提供一种新思路。

近年来，已有大量的文献专注于探讨转铁蛋白介导的药物小分子的靶向载药体系。学者们用吸收光谱、荧光光谱、圆二色谱等一系列方法研究了以转铁蛋白—转铁蛋白受体介导的药物小分子的靶向载药体系，发现其可以较好地提高药物的溶解度，药物的疗效及延长药物的半衰期等，取得了一系列显著的成果。因此本课题提出转铁蛋白介导的黄腐酸靶向载药体系的机制研究，利用吸收光谱、荧光光谱、热力学计算、同步荧光光谱、圆二色谱等一系列手段探讨了基于转铁蛋白介导黄腐酸靶向载药体系的机制研究，从而揭示黄腐酸药物小分子和转铁蛋白相互作用机制，同时研究了黄腐酸与人血清白蛋白相互作用机制，为构建黄腐酸—转铁蛋白靶向载药体系提供更为全面的理论依据。

第1章 文献综述

随着生物技术的快速发展，对于各类药物的研究认识已经逐步深入到从细胞分子探究其作用机制。为了提高药物疗效减小其毒副作用，将药物定向转运、定点释放和特异性靶细胞治疗已经成为现代药剂学的研究热点之一^[1]。目前大量研究探索了药物定向和靶向传递系统的能力^[2]，其中配体-受体介导药物主动靶向传递系统备受关注，利用转铁蛋白作为靶向配体传递药物到转铁蛋白受体高度表达的恶性肿瘤部位的研究取得了大量研究成果^[3]。

转铁蛋白是血浆中主要的含铁蛋白质，负责运载被红细胞降解释放的铁和被消化管吸收的铁，并以复合物的形式进入骨髓中生成成熟的红细胞，它是体液中不可缺少的成分，参与铁的运输与代谢，调节铁离子的平衡和能量平衡，阻止铁离子的沉积，并且参与呼吸、细胞增殖和免疫系统的调节，具有抗菌杀菌的保护功能，因此转铁蛋白具有较全面的蛋白质生理功能。天然黄腐酸具有分子量较小、氧化程度高、活性官能团多、易被人体吸收利用等生物活性特点^[4]，在抗肿瘤、调节免疫系统、降糖、消炎镇痛、醒酒、抗病毒等方面具有较好的医疗效果。然而从分子细胞探究黄腐酸作用机制的文章鲜有报道，本论文以转铁蛋白介导黄腐酸的载药体系探讨了转铁蛋白与黄腐酸的作用机制及其构效关系。

1.1 转铁蛋白及转铁蛋白受体

转铁蛋白最基本的生理功能是结合和运载铁离子至红细胞用于合成血红蛋白，或其他需要铁离子的部位，因此转铁蛋白可作为药物的载体，具有稳定性、可生物降解性、无毒性、可控性等优点，在抗菌、杀菌、防治肿瘤和癌症等方面的具有突出作用。转铁蛋白和转铁蛋白受体之间的配体—受体具有特异性识别作用，这为开发和研究抗癌药物通过细胞靶向吸收提供了一个新的契机。目前，大量研究报道了关于转铁蛋白和转铁蛋白受体的结构、功能和性质以及它们在医学治疗中的存在的潜能^[5, 6]。

1.1.1 转铁蛋白结构及生物功能

转铁蛋白(transferrin, Tf)是一种存在于脊椎动物体液及其细胞中的单链糖基化β-球蛋白，由 670~700 个氨基酸组成，分子量在 80000 左右，主要有四种形式：血

清转铁蛋白、卵转铁蛋白、乳转铁蛋白、黑色素转铁蛋白。转铁蛋白具有 N-端和 C-端两个结构非常相似的结构域，二者之间通过短肽相连(图 1)，这两个结构域有 42 % 的同源性，且相交处有一个铁离子结合位点。 Fe^{3+} 与氨基酸中的氧原子通过配位键形成了一个八面体的立体几何形状，配体分别是域 1 (Asp 63)，域 2 (Tyr 188) 以及跨过铁离子结合位点背部两个域的多肽链。目前，已经有报道通过研究转铁蛋白的构象转变和动力学结果，详细描述转铁蛋白 N-端 Fe^{3+} 释放的详细过程^[7]。

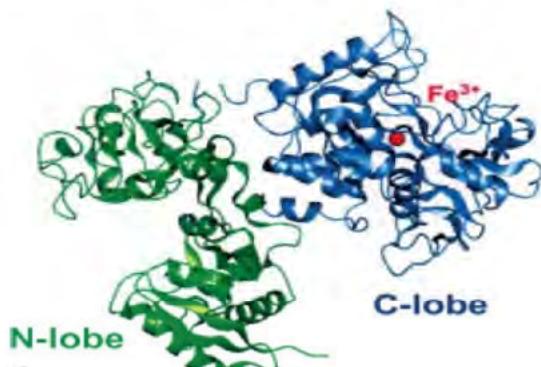


图 1 转铁蛋白的 X 射线晶体结构

Fig. 1 The X-ray crystal structure of Tf

转铁蛋白最基本的生理功能是结合和运载铁离子至红细胞用于合成血红蛋白或其他需要铁离子的部位，控制体液中自有铁离子的平衡和能量平衡，阻止了铁离子在体内沉积，图 2 显示了转铁蛋白通过内吞作用与转铁蛋白受体相互作用介导铁离子的吸收。转铁蛋白还能够调节免疫系统，参与呼吸、细胞增殖以及铁的运输与代谢，具有抗菌杀菌的保护功能，是体液中不可缺少的成分。

1.1.2 转铁蛋白受体

转铁蛋白受体的主要生物功能是通过与转铁蛋白的相互作用介导铁的吸收。正常细胞中受体的表达水平较低，而快速生长的肿瘤细胞对铁的需求量增加，导致肿瘤细胞中转铁蛋白受体的表达显著增加^[8]，并且转铁蛋白和转铁蛋白受体之间的配体—受体具有特异性识别作用，图 2 显示了转铁蛋白通过内吞作用与转铁蛋白受体相互作用介导铁离子的吸收，因此转铁蛋白受体在靶向治疗方面是一类很好的靶向分子。这为转铁蛋白作为药物载体提供了希望，也为开发和研究抗癌药物通过细胞靶向吸收提供了一个新的契机。

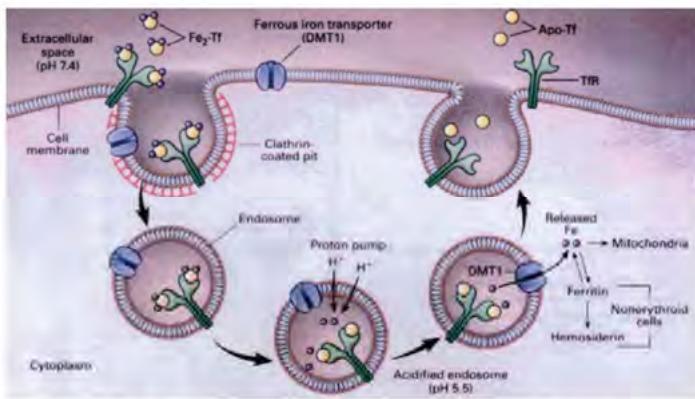


图2 转铁蛋白-转铁蛋白受体特异性识别的吸收路径

Fig. 2 The absorption path of Tf and TfR specificity recognition

转铁蛋白受体 (TfR1) 是一种跨膜糖蛋白，分子量约为 200000 Da 左右，一个转铁蛋白受体由两个同源二聚体的亚基通过两条二硫键交联而成（如图 3）。每分子包括胞内和胞外亲水部分及跨膜部分，胞内区由转铁蛋白单体 N 端的第 1~67 残基构成，跨膜区由第 68~88 残基构成，胞外区由第 87~760 残基构成。通过对 Tf/TfR 晶体结构的研究表明，转铁蛋白受体的胞外区四周高中间低形成碗状，转铁蛋白只能结合在碗状边缘区，转铁蛋白的 C-端和 N-端两个结构域在结合过程中都发挥重要作用^[9]。近年研究表明，转铁蛋白还可以和另外一种转铁蛋白受体 2 (TfR2) 结合，TfR2 是一种二型膜糖蛋白，同 TfR1 有 45 % 的相同序列，胞外域同 TfR1 有 66 % 的相似性，但 TfR2 与转铁蛋白的亲和性较低，比 TfR1 低 25 倍。尽管存在许多差异，TfR2 与转铁蛋白的反应方式类似于 TfR，还可以调控一种铁离子摄取的调节器的表达^[10, 11]。

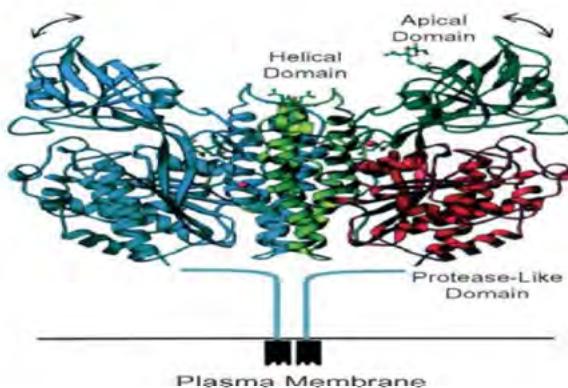


图3 转铁蛋白受体的X射线晶体结构

Fig. 3 The X-ray crystal structure of transferrin receptor

1.2 转铁蛋白作为载药体系的研究现状

药物小分子与转铁蛋白结合在一起，提高了其在组织中的分配性，延长了药物在胞浆中的半衰期，同时还达到控制作用。近年来，许多学者对药物小分子与转铁蛋白的作用机制进行了研究并开发出了转铁蛋白介导的药物小分子的新型载药体系，取得了一系列显著的研究成果。

1.2.1 转铁蛋白作为抗肿瘤药物的载体

转铁蛋白与药物偶联结合主要是通过药物与配体共价偶联，利用受体介导的内吞作用，将药物有效的运送到靶细胞。Satoshi Inoue等^[12]研制了无毒、无免疫反应、具有生物降解性的聚β-L苹果酸并偶联抗转铁蛋白受体的单克隆抗体。由于对单克隆抗体的摄取，乳腺癌的生长、血管生成、入侵和转移可以得到很好的控制。Tanaka等^[13]用戊二酸酐与丝裂霉素(MMC)合成戊二酸丝裂霉素(GMMC)，再与转铁蛋白反应生成Tf-GMMC，研究发现通过受体介导的细胞内吞作用，增强了丝裂霉素的Hep G2 肝癌细胞摄取率，在与MMC 共价连接后，转铁蛋白的细胞内吞作用并没有受到影响^[14]。Ren等^[15]采用纳米沉淀技术将生物素基团载于聚乙二醇-聚乳酸[poly(ethylene glycol)-polylactide, PEG-PLA]纳米粒的表面，然后将转铁蛋白偶联于生物素化的PEG-PLA纳米粒的表面，研究表明该纳米粒能靶向体内的肿瘤细胞，转铁蛋白功能化的PEG-PLA纳米粒能够渗透到体内的肿瘤组织^[16]。

1.2.2 转铁蛋白作为生物活性物质的载体

将具有一定生物活性的蛋白质药物与转铁蛋白偶联结合，可以克服其易降解、通透性差、半衰期短等缺点。Cidores等^[17]将转铁蛋白和II型非病毒性核糖蛋白Nigrin b与Ebulin 1各自分别活化后再反应生成结合物，制得Nigrin b与Ebulin 1靶向药物，其本身的分子活性不会降低。体外HeLa 细胞实验显示，其蛋白质的半抑制浓度明显降低，提示转铁蛋白-核糖体可作为新的抗肿瘤药靶向肿瘤细胞。Stuart等^[18]利用杆状病毒表达系统，把HIV-1蛋白酶底物(VSQNYPIVL)基因与转铁蛋白基因在Tf289位氨基酸残基处融合。融合蛋白既保持转铁蛋白的天然活性，又能够被HIV-1蛋白酶识别切割。与对照HIV-1蛋白酶底物、HIV-1蛋白酶底物-Tf相比，该转铁蛋白类似物表现极低的免疫原性。这说明，转铁蛋白可能可以用于改善肽类药物的运输^[19]。

1.2.3 转铁蛋白作为基因治疗的载体

基因治疗是将特异性的基因运输到特定的靶细胞中。目前应用比较广泛的是各种病毒载体，这些病毒载体可引起宿主免疫反应、细胞病变和基因重组等问题，为了克服这些缺点学者们将转铁蛋白和病毒载体联用取得了比较好的效果。Citro等^[20]研究证实，转铁蛋白-多聚赖氨酸偶联物系统将myb反义核酸转染HL-60细胞后，相较于单用myb反义核酸，可迅速而强烈的抑制细胞增殖。除此之外，转铁蛋白-聚乙烯亚胺(PEI)-DNA复合物同样可以作为基因治疗的载体转染细胞^[21]。

1.2.4 转铁蛋白作为药物载体的应用前景

转铁蛋白作为药物载药体系在药学领域及肿瘤靶向治疗中具有很重要的价值，其应用将会越来越广泛。通过转铁蛋白及其受体介导的内吞作用将抗肿瘤药物特异性运载到靶部位，已经受到国际上的广泛关注并进行了大量的研究。但作为一种新的药剂，若要使它们达到理想的要求，还有很多问题尚待解决，比如存在制备技术不成熟，生产工艺、质量控制以及制剂的稳定性等问题。因此，构建一种新型的转铁蛋白载体是目前的研究热点之一。转铁蛋白通过非共价键相互作用在体内运转药物分子的同时，相对较弱的共价键作用可以提高药物分子到达细胞的释放程度，研究生物大分子通过共价键相互作用与药物小分子复合使药物分子进入人体有助于了解药物分子在人体中发挥作用的机制，改进和优化小分子的结构，更好更高的提高疗效。

1.3 人血清白蛋白

人血清白蛋白（HSA）在人血浆中含量丰富（在血浆中其浓度为 42 g/L，约占血浆总蛋白的 60%），是由 585 个氨基酸组成的单链蛋白质，分子量约为 67000Da。人血清白蛋白的分子呈心形结构，它由 3 个结构相似的 α -螺旋结构域组成。HSA 含有 18 个酪氨酸残基（Tyr），一个色氨酸残基（Trp，位于第 214 号位置上），C 端为亮氨酸残基（Leu），N 端为天门冬氨酸残基（Asp）。其晶体结构研究表明 HSA 由三个相似的结构域组成，即 Domain I (1~195)，Domain II (196~382) 和 Domain III (384~585)，每个结构域又可分为 A, B 两个亚结构域（Subdomain），且每个亚结构域由三个螺旋（X、Y、Z）以槽口相对的方式形成圆筒状结构。几乎所有的疏水性氨基酸都被包埋在圆筒腔内部，构成疏水性空腔。每个结构域本身都装配紧密，但结构域之间的关系相当松懈，形成裂缝。它作

为血浆容量扩充剂，具有维持血液的正常渗透压和运送水分子的作用，是一种具有多功能、多用途的蛋白质，也是当前生物化学里研究热点之一。大量研究报道了药物小分子在血液中与人血清白蛋白的结合机理，HSA 常常作为研究药物小分子与蛋白质相互作用的模型蛋白^[13]。研究药物小分子与 HSA 相互作用对于从分子水平上了解药物的作用机理、毒理和代谢情况具有重要的指导意义。

1.4 黄腐酸的生物活性研究

黄腐酸是由一系列具有芳香结构的复杂大分子化合物组成的复合物，其主要元素组成为碳、氧、氢，还有少量氮、硫等其他元素^[22, 23]。黄腐酸具有分子量较小、氧化程度高、活性官能团多，能够被人体吸收利用等生物活性特点，在抗肿瘤、调节免疫系统、降糖、消炎镇痛、醒酒、抗病毒等方面具有一定的疗效，还被开发为药物形式应用于临幊上并取得了一定的效果。天然黄腐酸在医药领域的开发研究中具有得天独厚的资源优势，已成为新药研发的关注点。

1.4.1 黄腐酸结构研究概况

黄腐酸的化学结构比较复杂，没有完整的化学结构与稳定的形式，对于它的成分迄今为止还不完全清楚。大量研究表明，黄腐酸是由蛋白质、多糖、酚和金属元素化合而成的复合物，还能和多种金属发生络合作用。由于黄腐酸的化学成分比较复杂，许多研究者用不同的分析方法对黄腐酸的结构进行了研究。

Stevenson 等^[24]人用化学降解法研究了黄腐酸的结构，分析了其质谱和红外光谱谱图，认为黄腐酸降解产物中存在苯甲酸、n-脂肪酸、含氯化合物和酚衍生物。有研究者^[25]用紫外光谱方法研究了黄腐酸的结构，结果显示其紫外光吸收随芳香环的缩合度、总碳的含量、分子量、芳环碳与脂肪族碳比值的增加而增大，并发现黄腐酸的E4/E6一般大于5。Martin 等^[26]人用热降解技术研究了黄腐酸的结构，酸性水解黄腐酸的热解产物为一系列的烷烃、烯烃、酚、苯并呋喃、烷基苯和烷基多环芳香烃，表明黄腐酸大分子中存在芳香族物质。

黄腐酸结构复杂，奥格纳和斯尼茨尔根据黄腐酸的降解过程提出其可能含有酚酸和苯羧酸等物质成分，它们是通过氢键连接而形成具有一定稳定性的多聚结构的黄腐酸，这种结构具有很强的吸附能力。Alvarez P 等人通过国际腐殖酸协会建议的流程对黄腐酸进一步分离提纯后，利用分子模拟提出了一个黄腐酸的结构式，此结构式与实验室研究结果比较吻合^[27]，见图4。

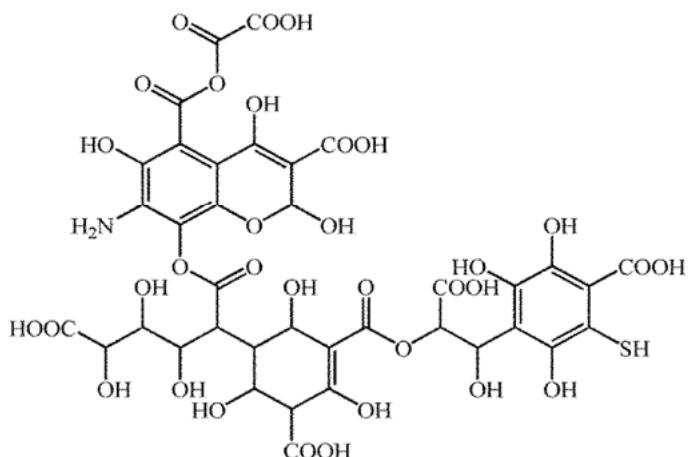


图4 Alvarez P提出的黄腐酸结构

Fig. 4 The structure of fulvic acid proposed by Alvarez P

1.4.2 黄腐酸的药理活性

黄腐酸的氧化程度高，活性官能团多，含有羧基、羰基、酚基、醌基等多种活性基团，具有很强的络合和螯合能力，易溶于水，并且能够被人体吸收利用，在医药领域的研究中具有得天独厚的优势，已成为新药研发的关注点。目前研究发现黄腐酸及其盐类具有一些生理及药理活性，在抗肿瘤、调节机体免疫系统、醒酒、降糖、抗炎镇痛、抗溃疡，治疗或改善由糖尿病所引起的各种并发症等方面具有一定治疗效果。

1) 抗肿瘤

近年来，有学者发现腐殖酸具有一定的诱导细胞凋亡的效应^[28]，而黄腐酸是腐殖酸中的主要活性物质，具有一定的医疗效果，这意味着黄腐酸可能具有抗癌活性，对新药品的开发有潜在帮助。Hsin-Ling Yang 等^[29, 30]人采用人早幼粒白血病 HL-60 细胞研究了腐殖酸诱导细胞凋亡的效应，结果表明腐殖酸通过诱导细胞凋亡，抑制了 HL-60 细胞的增殖及生长，这些作用可能具有抗癌性质，为抗癌药物的研发提供了一个新的契机。研究发现黄腐酸并不是直接作用于癌细胞的，很可能是通过提高宿主免疫功能而发挥其抗肿瘤作用，很多免疫型抗肿瘤药物的抗肿瘤作用与用药方法有关。

2) 免疫调节

黄腐酸通过对免疫功能的调节和增强来治疗各种疾病并增强机体的抗病能力，能够减轻心、脑、胃、肝、胰腺的微循环障碍，治疗高血压，肝硬化等。通过探索

发现黄腐酸钠可提高正常肝脏微循环，并可明显改善肝缺血/再灌注后微循环障碍，对肝功能有一定保护作用，是预防肝缺血/再灌注损伤的较好药物^[31]。在饲料中添加生化黄腐酸，通过较长期喂养小鼠的方法，研究了生化黄腐酸对小鼠非特异性免疫功能的影响，结果表明生化黄腐酸可提高小鼠巨噬细胞的吞噬能力，对机体非特异性免疫具有一定的促进作用^[32]。

3) 降糖

黄腐酸具有降低血糖，抑制糖尿病患者视网膜病变和肾脏病变的作用。李宝才等^[33]研究了黄腐酸对正常小鼠血糖和糖尿病小鼠血糖、甘油三醋、总胆固醇以及口服葡萄糖耐量的影响，结果表明黄腐酸具有降血糖的作用。黄腐酸不仅具有降低血糖的作用，而且能够在一定程度上治疗或抑制由糖尿病所引起的一些并发症，如视网膜病变、肾脏病变、末梢神经炎等。从形态学和功能学两方面研究^[34]黄腐酸钠应用于糖尿病大鼠视网膜病的疗效及其作用机制，结果发现给予黄腐酸钠治疗的糖尿病鼠，其视网膜组织有明显改善，黄腐酸钠虽然不能从根本上预防糖尿病视网膜病变的发生，但对糖尿病视网膜病变的进展有一定抑制作用。

4) 抗炎镇痛

黄腐酸钠对溃疡性结肠炎有一定的治疗效果^[35]，黄腐酸钠的吸附和络合作用可以促进清除肠道细菌、毒素从而保护胃黏膜，抑制溃疡形成。利用生化黄腐酸添加剂治疗奶牛乳房炎，治愈率达80 %以上。研究生化黄腐酸对奶牛乳房炎的抗病力表明：饲喂生化黄腐酸具有提高奶牛泌乳性能，减少奶牛体细胞计数，增强机体抗病力的效果^[36]。对黄腐酸进行分离、提取、筛选出6个有效活性部位，以生理盐水作空白，以阿司匹林作阳性对照药，然后通过适当的抗炎、镇痛动物模型，对各有效部位进行药理实验。实验结果显示，其中有2个部位药物的抑制率高于阿司匹林，对大鼠足肿具有明显的抗炎作用，有1个部位药物的镇痛作用与阿司匹林相当^[37]。

5) 临床应用

药用黄腐酸在临床上的应用也取得了一定的成果。利用中西医结合治疗溃疡性结肠炎^[38]，用黄腐酸钠口服液高位保留灌肠，治疗结果显示总有效率高达97 %。对15例顽固性复发性口腔溃疡进行临床试验发现^[39]，患者周边溃疡周边炎症减轻或消失，溃疡变浅，局部淋巴结反应减轻或消失，黄腐酸钠口服液对口腔溃疡有良好的治疗作用，能缩短病程，减少复发，缓解病痛。

1.4.3 黄腐酸生物活性的作用机理

目前一般将黄腐酸的作用机理分为以下几种：消炎作用主要归因于黄腐酸的杀菌活性；激素作用主要归因于黄腐酸的生理活性；抗癌作用主要归因于黄腐酸的提高机体免疫机能的生物活性；镇痛止血作用主要归因于黄腐酸的改善微循环的生物活性。根据临床实验报告显示分子量小于600的黄腐酸对小鼠、鸡、虾的机体免疫具有增强作用，对病毒性感冒有一定的疗效，对药物造成的血象改变有明显的拮抗作用，相比之下高剂量黄腐酸的疗效反而略差^[40]。有研究指出黄腐酸的激素作用机理，主要是刺激多糖酶和氧化酶的活化，促进根的生长及根细胞的分裂，增强根部呼吸，提高发芽率；而生化黄腐酸中的多酚类物质在植物细胞内起到呼吸催化剂的作用，能够提高作物光合强度和呼吸强度，提高植物生理代谢能力和酶的活性，促进微量元素的吸收，增加叶绿素含量，提高渗透压、增强ATP酶的活性^[41]。

李宝才等^[42]人提出了茶褐素和黄腐酸在化学性质方面（结构和官能团）存在一定的相似性。茶褐素与黄腐酸都含有一定的酚性基团和羧基、醌基，其基本母核均为芳基。连接的方式虽有所不同，但茶色素和黄腐酸在药理上同样都应该是羧基基团、酚基基团、醌基基团等起作用。因此，黄腐酸在生理活性及治疗功能方面可能与茶色素具有一定的相似性。

1.4.4 黄腐酸的应用前景

黄腐酸是一种有前途的天然资源，具有明显的生理及药理活性，在抗肿瘤、调节机体免疫系统、抗溃疡、降糖，治疗或改善由糖尿病所引起的各种并发症等方面都具有一定的治疗效果，因此黄腐酸在医药领域的研究开发具有广阔的前景，同时也能够为新药的研发带来契机。由于黄腐酸是一种结构未定的不饱和高分子有机混合物，所以其药理活性可能是通过调节机体功能而起作用，也可能是其不同成分协同作用的结果，还可能是局部的对症治疗等各种疗效方式。目前，关于黄腐酸产生药理活性的物质基础以及所起药效的机制基本处于空白，从而限制了黄腐酸的药理活性基础研究。研究发现药物分子一般是通过调节蛋白质的结构而发挥药理药效的。近年来一些研究报道了药物分子与蛋白质的结合机制，并开发出了以转铁蛋白介导的药物小分子的载药体系，因此研究黄腐酸与蛋白质的作用机制，有利于初步了解黄腐酸在体内的运输，代谢以及对肿瘤细胞的靶向运输与释放，并为开发与设计转铁蛋白介导药物小分子的载药体系提供一种新思路。

1.5 药物小分子与蛋白质分子相互作用的研究方法

1.5.1 荧光猝灭光谱

荧光光谱法是研究药物小分子与蛋白质分子相互作用的重要方法，通过荧光猝灭法可以计算得到药物小分子与蛋白质分子的结合位点及结合常数^[43]，为研究蛋白质分子构象提供了理论依据。该法不但可以做一般的定量分析，而且还可以推断蛋白质分子在各种环境下的构象变化，从而阐明蛋白质结构与功能之间的关系。蛋白中含有的色氨酸（Trp）、酪氨酸（Tyr）、苯丙氨酸（Phe）残基受激发后能够发射内源荧光，当这些氨基酸残基本身或周围环境发生变化时，蛋白的荧光会发生相应变化。当激发光波长为 280 nm 时，蛋白质分子中的色氨酸和酪氨酸残基能够发射荧光，当激发光波长为 295 nm 时，只有色氨酸残基能够发射一定强度的荧光^[44]，因此，通常利用色氨酸残基的荧光来研究蛋白质分子构象以及与药物分子的作用情况。向蛋白质溶液中逐渐加入一系列浓度比例的药物小分子溶液后能够引起蛋白质内源性荧光强度的下降，从而可以判断药物小分子与蛋白质相互作用是否发生了荧光猝灭现象。引起荧光猝灭的机制比较复杂，通常主要将荧光猝灭类型分为静态猝灭和动态猝灭两种，静态猝灭是由于猝灭剂与荧光物质分子相互作用生成不发荧光的复合物；动态猝灭是溶液分子与荧光分子发生有效碰撞而产生电子转移的过程^[45]，根据荧光猝灭常数的不同可以判断出猝灭机制类型。

1.5.2 同步荧光光谱

同步荧光光谱能够检测出药物小分子与蛋白质结合后对蛋白质的构象产生的影响。当固定 $\Delta\lambda$ 为 60 nm 时，可得到色氨酸残基的同步荧光光谱；而当固定 $\Delta\lambda$ 为 15 nm 时，可得到酪氨酸残基的同步荧光光谱^[46]。其中色氨酸残基受其所处环境的影响较大：当处于亲水性环境时，其最大荧光发射波长产生红移；当处于疏水性环境时，其最大荧光发射波长则蓝移。通过检测色氨酸残基最大发射波长的变化即可判断蛋白质的构象是否发生了改变。

1.5.3 圆二色谱

圆二色谱（CD）可检测到药物与蛋白相互作用后蛋白质立体化学结构的微小变化，如蛋白质的 α -螺旋结构、 β -折叠结构，这些特定的构象是蛋白质表达生物功能的结构基础，测定这些结构对了解蛋白质如何表达功能具有重要作用^[47]。圆二色谱

可用来获取生物分子在溶液状态下的构象，是一种比较成熟的测定溶液中生物大分子构象的方法。圆二色光谱紫外区段(190~240 nm)，主要生色团是肽链，这一波长范围的圆二色谱包含着生物大分子主链构象的信息。在近紫外区(240~300 nm)，占支配地位的生色团是芳香胺基侧链，这一区域可以给出“局域”侧链间相互作用的信息。在波长大于300 nm的区域，包括可见区域，主要反映有机化合物的生色基团的手性结构。圆二色光谱具有六个基本特征：(1)测量光谱范围广(紫外-红外波长范围)；(2)自动化获得数据；(3)重复性好数据稳定；(4)样品需要量小；(5)非损害测量，样品可回收；(6)对生物大分子的空间构象变化灵敏。

1.6 立题背景及研究内容

由于转铁蛋白和转铁蛋白受体之间的配体—受体可以特异性识别，快速生长的肿瘤细胞表面过度表达转铁蛋白受体，抗肿瘤药物可以通过非共价键连接转铁蛋白/转铁蛋白受体介导的转运系统运输到细胞内，从而达到提高抗肿瘤疗效。相关文献报道了黄腐酸对于肿瘤细胞具有一定的抑制作用，但是其药物作用机制并不明确，限制了黄腐酸的开发利用。由于肿瘤细胞表面转铁蛋白受体的过度表达，利用转铁蛋白和转铁蛋白受体之间的特异性识别这一生物功能，研究黄腐酸与蛋白质的相互作用机制，对于开发设计转铁蛋白介导黄腐酸靶向载药体系具有一定的指导作用，同时也为黄腐酸在医疗领域的研究提供了新思路。

本课题利用吸收光谱、荧光猝灭法、热力学计算和 CD 光谱等方法，研究了黄腐酸与转铁蛋白在细胞内外不同 pH 环境及温度下的相互作用机制，同时研究了黄腐酸与人血清白蛋白的相互作用机制，初步了解黄腐酸在体内的运输，代谢以及对肿瘤细胞的靶向运输与释放，为构建转铁蛋白介导黄腐酸靶向载药体系提供全面的理论依据。

第2章 黄腐酸与转铁蛋白相互作用的机制研究

黄腐酸是从低阶煤中提取纯化出的一种天然有机物，具有分子量较小、氧化程度高、活性官能团多，能够被人体吸收利用等生物活性特点，在抗肿瘤、调节免疫系统、降糖、消炎镇痛、醒酒、抗病毒等方面具有多种药理活性，还被开发成药物形式应用于临幊上并取得了一定的效果。尤其在抗肿瘤方面的疗效引起了学者们的广泛兴趣和关注，最新的研究显示黄腐酸对于宫颈癌，艾式腹水癌，白血病有一定的抑制作用，这为研究转铁蛋白介导黄腐酸的靶向载药体系提供了理论可能性。由于黄腐酸的结构复杂，来源不同其结构也有所不同，因此黄腐酸产生药理活性的物质基础以及所起药效的机制基本处于空白，从而限制了黄腐酸的药理活性基础研究。研究发现药物分子一般是通过调节蛋白质的结构而发挥药理药效的，因此研究黄腐酸与蛋白质的相互作用机制对于黄腐酸药理活性的开发具有重要意义。

转铁蛋白最基本的生理功能是结合和运载铁离子至红细胞用于合成血红蛋白，或其他需要铁离子的部位，因此转铁蛋白可作为药物的载体，具有稳定性、可生物降解性、无毒性、可控性等优点，在抗菌、杀菌、防治肿瘤和癌症等方面的具有突出作用。靶向药物传递系统中受体-配体介导的靶向治疗是以细胞表面特异性或过度表达的受体为靶点，以配体或配体结合物为载体将药物特异性地运送到体内特定部位发挥药效。恶性肿瘤表面的转铁蛋白受体过度表达，而转铁蛋白与转铁蛋白受体能够特异性识别，这为利用转铁蛋白作为药物载体实现靶向治疗提供了理论依据。近年来很多研究报道了药物分子与转铁蛋白的结合机制并开发出了以转铁蛋白介导药物小分子的靶向载药体系，因此研究黄腐酸与转铁蛋白的相互作用机制，有利于深入了解黄腐酸的药理药效并为开发与设计转铁蛋白靶向载药体系提供一种新思路。本章利用吸收光谱、荧光光谱、热力学计算、同步荧光光谱、圆二色谱等一系列手段对黄腐酸与转铁蛋白相互结合的机制进行了研究，从而揭示黄腐酸药物小分子和转铁蛋白的相互作用机制。

2.1 实验部分

2.1.1 实验试剂及仪器

转铁蛋白与黄腐酸的相互作用机制研究所需要的实验药品详见表 1。转铁蛋白

与黄腐酸的相互作用机制研究所需要的实验仪器详见表 2。

表 1 实验药品

Table 1 The chemical reagents

药品	纯度	生产厂家
转铁蛋白 (Tf)	96-99%	Sigma
人血清白蛋白 (HSA)	96-99%	Sigma
黄腐酸 (FA)	≥99%	上海通微生物技术有限公司
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	分析纯	天津市天力化学试剂有限公司
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	分析纯	天津市天力化学试剂有限公司
NaCl	分析纯	天津市光复科技发展有限公司
无水乙醇	分析纯	天津市永大化学试剂有限公司
超纯水		上海莱津设备有限公司
PBS		自制

表 2 实验仪器

Table 2 The experimental equipments

仪器名称	规格	生产厂家
荧光光谱仪	F-7000	日本日立公司
圆二色谱仪	Jasco 815	日本分光公司
双光束紫外-可见	TU-1901	北京普析公司
分光光度计		
超声清洗器	1860QTP	昆山市超声仪器有限公司
电子天平	BSA124S	塞多利斯科学仪器北京有限公司
移液枪	100-1000 μl; 20-200 μl; 2-20 μl	上海康敏检验设备有限公司
恒温水浴锅	HH-2	江苏金坛市中大仪器厂
一次性枪头	1000 μl; 200 μl; 20 μl	上海康敏检验设备有限公司
石英比色皿	1 cm	江苏兴宜试剂有限公司
超纯水仪	ZP15UVF	上海莱津设备有限公司

2.1.2 样品制备

缓冲溶液 PBS 的配制 (pH 4.8) : 准确称量 0.38 g NaH₂PO₄·2H₂O 和 0.14625 g NaCl 充分溶解后倒入 250 ml 容量瓶, 用超纯水稀释定容后用 pH 酸度计测量其值为 4.8。

缓冲溶液 PBS 的配制 (pH 7.4) : 准确称量 0.117 g NaH₂PO₄·2H₂O, 0.6265 g Na₂HPO₄·12H₂O, 0.073 g NaCl 充分溶解后倒入 250 ml 容量瓶, 用超纯水稀释定容后测量其 pH 值为 7.4。

转铁蛋白母液的配制：称取一定量的转铁蛋白，用一定量的 PBS 缓冲溶液（pH 4.8 和 pH 7.4）稀释后配置浓度为 5×10^{-5} mol/L 的转铁蛋白母液，得到生理环境下和酸性环境下的转铁蛋白母液储存于 4℃ 冰箱内。

黄腐酸母液的配制：称量一定量的黄腐酸，用一定量的 PBS 缓冲溶液（pH 4.8 和 pH 7.4）稀释后配置浓度为 2×10^{-4} mol/L 的黄腐酸母液，得到生理环境和酸性环境下的黄腐酸母液避光储存于 4℃ 冰箱内。

表 3 荧光猝灭光谱的实验配比表

Table 3 Chart of fluorescence quenching spectral ratio

序号	FA/TRF (浓度比)	FA 2×10^{-4} mol/L (μl)	TRF 5×10^{-5} mol/L (μl)	PBS (μl)
1	0/1	0	400	1600
2	0.5/1	40	400	1560
3	1/1	80	400	1520
4	1.5/1	120	400	1480
5	2/1	160	400	1440
7	3/1	240	400	1360
8	3/0	240	0	1760

表 4 同步荧光光谱的实验配比表

Table 4 Chart of synchronous fluorescence spectral ratio

序号	FA/TRF (浓度比例)	FA 2×10^{-4} mol/L (μl)	TRF 5×10^{-5} mol/L (μl)	PBS (μl)
1	0/1	0	400	1600
2	0.5/1	40	400	1560
3	1/1	80	400	1520
4	1.5/1	120	400	1480
5	2/1	160	400	1440
6	2.5/1	200	400	1400
7	3/1	240	400	1360
8	3.5/1	280	400	1320
9	4/1	320	400	1280
10	4/0	320	0	1780

待测样品制备：用移液枪移取相同体积的转铁蛋白母液于 2mL 离心管，固定转铁蛋白的最终浓度为实验所需浓度，再按一定的浓度比分分别加入不同量的黄腐酸母液，最后加入缓冲溶液 PBS 稀释到 2mL，避光静置 12 小时后进行试验。荧光猝

灭光谱的待测样品的母液、PBS 溶液加入量按照表 3 配置；同步荧光光谱的待测样品的母液、PBS 溶液的加入量按照表 4 配置；圆二色谱的待测样品的母液、PBS 溶液的加入量按照表 5 配置。

表 5 圆二色谱的实验配比表

Table 5 Chart of CD spectral ratio

编号	FA/TRF (浓度比例)	FA 2×10^{-4} mol/L (μL)	TRF 1×10^{-5} mol/L (μL)	PBS (μL)
1	0/1	0	25	975
2	0.5/1	5	25	970
3	1/0	10	0	990

2.1.3 实验方法

荧光光谱：分别配置两种 pH 环境的转铁蛋白溶液，保持转铁蛋白溶液的最终浓度为 1.0×10^{-5} mol/L，按照相同 pH 环境、相同浓度比例依次加入黄腐酸溶液，充分混合后放入恒温水浴锅，分别设置温度 15℃，25℃，37℃反应 12 h 后迅速用荧光光谱仪测定，样品的温度通过循环水保持，激发与发射狭缝为 5.0 nm，扫描速度为 12000 nm/min，激发电压为 400 V，响应时间为 Auto，激发波长为 295 nm，采集波长为 305~700 nm。

同步荧光光谱：分别配置两种 pH 环境的转铁蛋白溶液，保持转铁蛋白的最终浓度为 1.0×10^{-5} mol/L，按照相同 pH 环境、相同浓度比例依次加入黄腐酸溶液，充分混合后在室温反应 12 h 后用荧光光谱仪测量，激发波长间隔分别为 $\Delta\lambda=15$ nm，60 nm，采集波长分别为 260~340 nm 和 220~340 nm，激发与发射狭缝为 5.0 nm，扫描速度为 1200 nm/min，激发电压为 400 V，响应时间为 Auto。

紫外吸收光谱：转铁蛋白溶液的最终浓度为 1.0×10^{-5} mol/L，按照 1:1 浓度比例加入黄腐酸溶液充分混合后于室温反应 12 h 后测量紫外-可见吸收光谱，波长范围为 220~350 nm。

圆二色谱：分别配置两种 pH 环境的转铁蛋白溶液，保持转铁蛋白溶液的最终浓度为 2.5×10^{-6} mol/L，按相同 pH 环境、相同浓度比例依次加入黄腐酸溶液，室温下避光静置 12 h 后，用圆二色谱仪测定，扫描速度为 500 nm/min，响应时间为 0.5 s，狭缝宽度为 5 nm，取 5 次扫描结果的平均值。在进行圆二色谱实验前用高纯 N₂除氧 5 min，并在实验中一直用高纯 N₂作保护气，以保证没有臭氧产生。圆二色谱实验数据采集前，用相应的磷酸缓冲液（Na₂HPO₄·12H₂O+