

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{NaCl}$ 体系, $\text{pH}=7.4$) 进行基线校正。

2.2 结果与讨论

2.2.1 黄腐酸对转铁蛋白内源荧光的猝灭

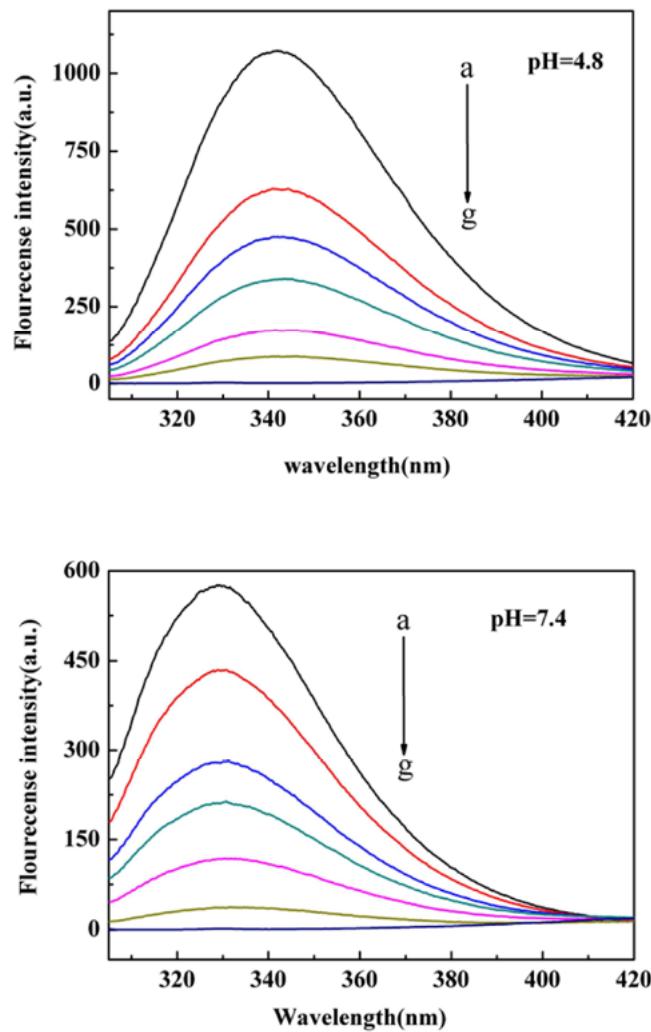


图 5 15°C 下转铁蛋白随黄腐酸浓度变化的荧光光谱 ($\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$).

Fig. 5 Tf fluorescence spectra in the presence of FA at 15°C ($\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$). (a-f) $C_{\text{FA}}/C_{\text{Tf}} = 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3$, $C_{\text{Tf}} = 10 \mu\text{mol/L}$, (g) $C_{\text{FA}} = 30 \mu\text{mol/L}$.

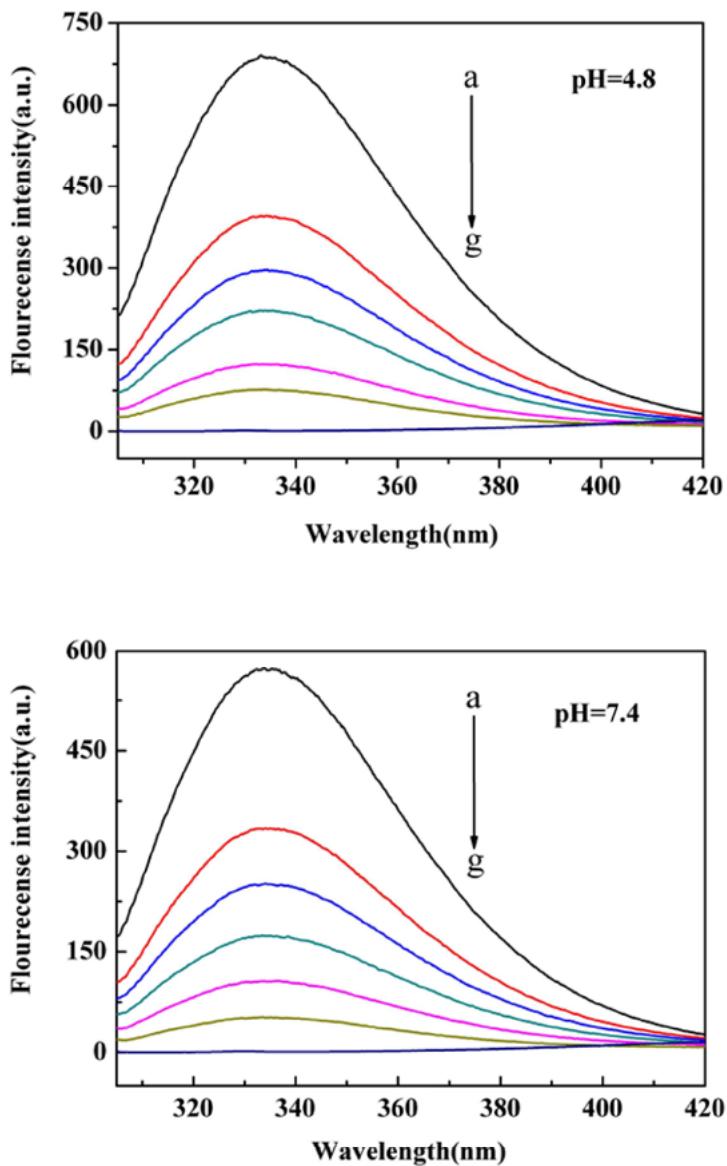


图 6 25℃下转铁蛋白随黄腐酸浓度变化的荧光光谱 ($\lambda_{ex} = 295$ nm).

Fig. 6 Tf fluorescence spectra in the presence of FA at 25°C ($\lambda_{ex} = 295$ nm). (a-f) $C_{FA}/C_{Tf} = 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3$, $C_{Tf} = 10 \mu\text{mol/L}$, (g) $C_{FA} = 30 \mu\text{mol/L}$.

荧光技术是一种用于研究蛋白质分子的重要而有效的手段，利用荧光猝灭的计算可以得到黄腐酸与转铁蛋白相互作用的结合常数及结合位点数。当激发光波长为 280 nm 时，转铁蛋白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，只有色氨酸发射荧光，荧光发射峰位置在 330~340 nm 附近。在 295 nm 激发波长下，分别测量生理环境下（正常细胞生理 pH 为 7.4）和酸性环境下（肿瘤细胞内 pH 为 4.8）转铁蛋白分别在三个温度 15°C、25°C、37°C 下的荧光光谱图，得

到了图5, 图6, 图7。分别从图4, 图5, 图6中可以看出, 生理环境 (pH 7.4) 和酸性环境 (pH 4.8) 中黄腐酸和转铁蛋白在三个温度下相互作用都在338 nm 处有较强荧光, 主要产生于色氨酸残基。随着黄腐酸浓度不断增大, 转铁蛋白的荧光强度全部都有规律地降低, 但是荧光发射峰没有明显的改变, 说明生理环境 (pH 7.4) 和酸性环境 (pH 4.8) 中黄腐酸在不同温度下都能够与转铁蛋白发生相互作用生成复合物, 引起转铁蛋白的荧光猝灭现象, 并改变了蛋白中的氨基酸残基微环境。

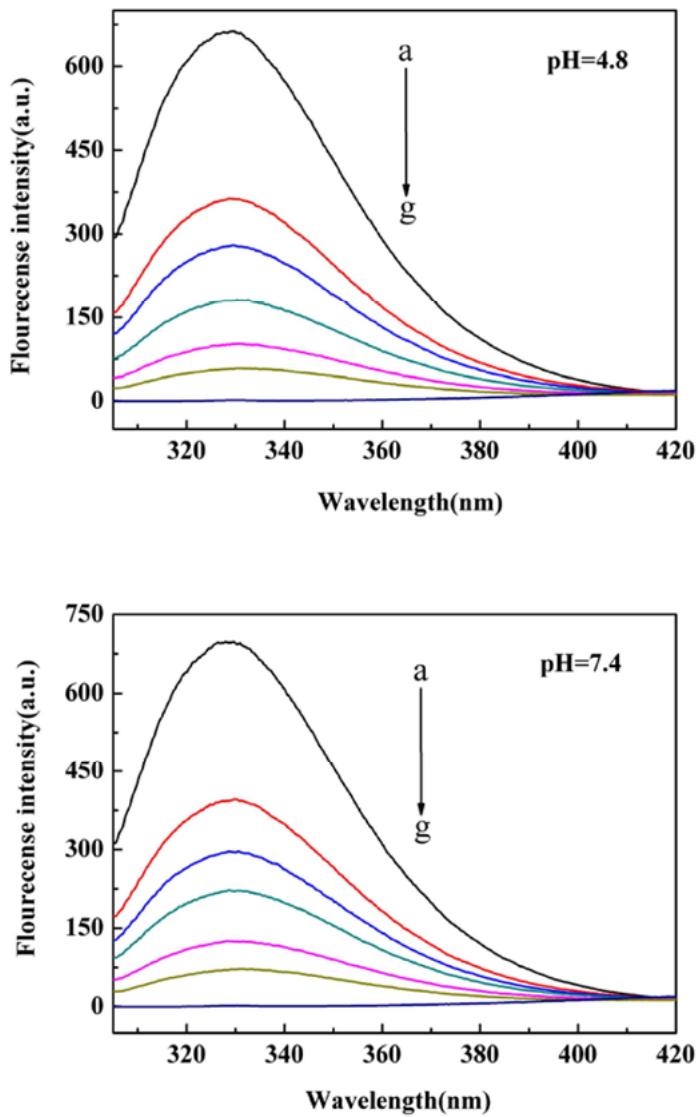


图 7 37℃下转铁蛋白随黄腐酸浓度变化的荧光光谱 ($\lambda_{ex} = 295$ nm).

Fig. 7 Tf fluorescence spectra in the presence of FA at 37°C ($\lambda_{ex} = 295$ nm). (a-f) $C_{FA}/C_{Tf} = 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3$, $C_{Tf} = 10 \mu\text{mol/L}$, (g) $C_{FA} = 30 \mu\text{mol/L}$.

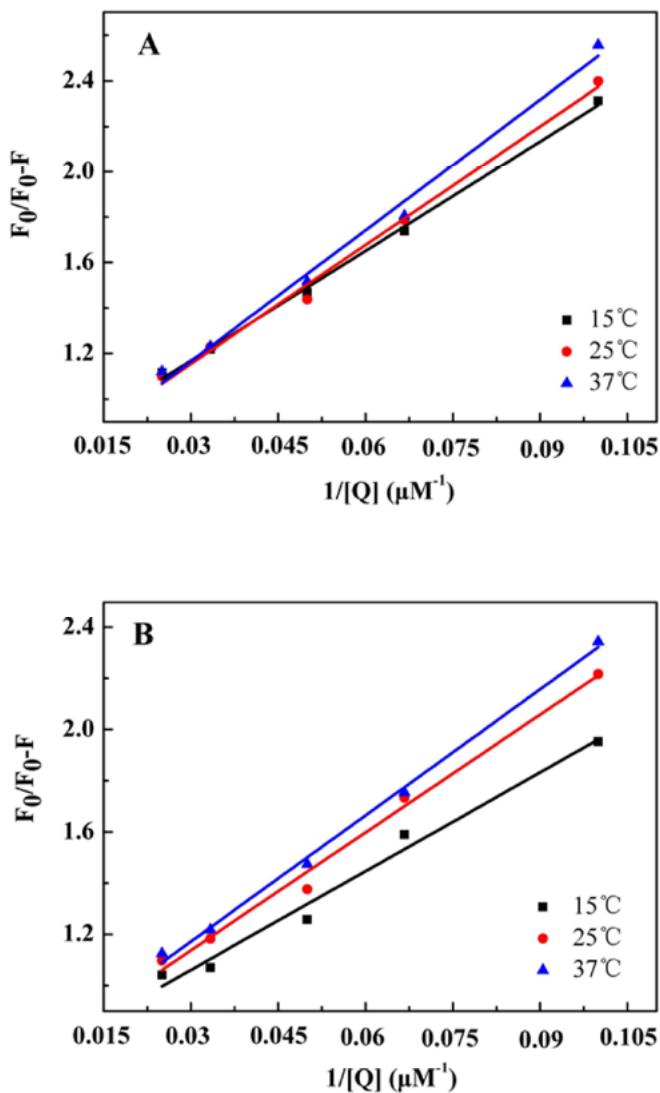


图 8 FA 对 Tf 荧光猝灭的修正 Stern-Volmer 曲线

Fig. 8 The modified Stern-Volmer curve of Tf in FA (A) pH=7.4; (B) pH=4.8

引起荧光猝灭的原因很多，机理也比较复杂，内部因素主要是分子从激发态回到基态以非辐射跃迁形式释放能量，外部因素主要包括两种：一是因荧光物质的分子和猝灭剂分子碰撞而损失能量；二是荧光物质的分子与猝灭剂分子作用生成了本身不发光的配位化合物等。荧光猝灭机制通常有静态猝灭和动态猝灭两种，根据荧光猝灭常数的不同可以判断出猝灭机制类型。因黄腐酸与转铁蛋白发生了荧光猝灭现象而形成了复合物，为了进一步确定黄腐酸与转铁蛋白发生相互作用的荧光猝灭机制，我们假设猝灭剂对蛋白质的猝灭机制是动态猝灭，利用修正的 Stern-

Volmer 方程^[48]可以计算出动态猝灭速率常数，如下：

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{f_a K_{sv}[Q]} + \frac{1}{f_a} \quad (1)$$

式中 F_0 , F 代表转铁蛋白和黄腐酸作用前后的荧光发射峰强度, K_{sv} 为荧光猝灭常数, τ_0 为无猝灭剂时蛋白质的荧光寿命, 本实验中用到的 Tf 荧光寿命 $\tau_0 = 2.5$ ns, $[Q]$ 是黄腐酸的浓度, f_a 为荧光体的荧光猝灭分数。以 $F_0/(F - F_0)$ 对 $1/[Q]$ 作图得到图 8, 可以看到生理环境和酸性环境中三个温度的黄腐酸对转铁蛋白荧光猝灭的修正的 Stern-Volmer 曲线呈较好的线性关系。通过方程 (1) 及 $K_q = K_{sv} / \tau_0$ 计算出荧光猝灭常数 K_{sv} 及猝灭速率常数 K_q 如表 6 及表 7。

由表 6 及表 7 可以看到生理环境 (pH 7.4) 和酸性环境中 (pH 4.8) 中随温度升高黄腐酸与转铁蛋白相互作用的荧光猝灭速率常数 K_q 增大, 表明黄腐酸对转铁蛋白的荧光猝灭强度增强, 其猝灭速率常数 K_q 远远大于各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散速率常数 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$ ^[49], 由此可以判断荧光猝灭的主要原因可能是黄腐酸与转铁蛋白形成复合物引起的静态猝灭为主。

表 6 FA 与 Tf 相互作用的 K_{sv} 和 K_q 值 (pH=7.4)

Table 6 The value of K_{sv} and K_q to Tf in FA (pH=7.4)

T/°C	K_{sv} (L·mol ⁻¹)	K_q (L·mol ⁻¹ ·S ⁻¹)	R
15°C	4.1×10^4	1.6×10^{13}	0.99707
25°C	4.4×10^4	1.8×10^{13}	0.99228
37°C	5.1×10^4	2.0×10^{13}	0.98965

表 7 FA 与 Tf 相互作用的 K_{sv} 和 K_q 值 (pH=4.8)

Table 7 The value of K_{sv} and K_q to Tf in FA (pH=4.8)

T/°C	K_{sv} (L·mol ⁻¹)	K_q (L·mol ⁻¹ ·S ⁻¹)	R
15°C	4.7×10^4	1.4×10^{13}	0.9775
25°C	4.3×10^4	1.7×10^{13}	0.9887
37°C	3.6×10^4	1.9×10^{13}	0.9959

动态猝灭是一种能量转移或电子转移过程, 只影响荧光分子的激发态, 不改变荧光物质的吸收光谱; 静态猝灭则是由于发生了结合作用, 通常是产生了不发荧光的复合物, 对蛋白质的二级结构可产生影响, 影响其生理活性, 荧光分子的吸收光谱会受到影响。图 9 为单独转铁蛋白与加入一定量黄腐酸的吸收光谱图, 从图中可以看到加入黄腐酸后转铁蛋白的吸收光谱发生了明显的变化, 进一步证明黄腐酸与

转铁蛋白的荧光猝灭机制为形成复合物而引起的静态猝灭。

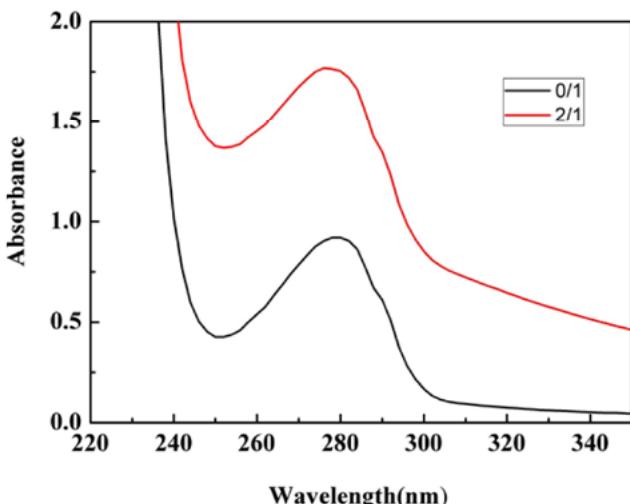


图 9 黄腐酸与转铁蛋白的紫外吸收光谱

Fig. 9 UV-vis absorbance spectra of Tf in FA

2.2.2 结合常数及结合位点数的计算

药物小分子与转铁蛋白在相互作用的结合过程中，不一定只含一个位点，多数情况下含多个位点。所以根据形成的复合物的稳定程度，通常被分成两种类型的结合位点：第一种为高亲和结合位点，其结合常数比较大，亲和力比较强，结合作用力也比较强；第二种为低亲和结合位点，其结合常数比较小，亲和力也比较弱，结合作用力也比较差。若黄腐酸与转铁蛋白的相互作用为静态荧光猝灭，荧光物质与猝灭剂分子间的结合常数和结合位点数可根据荧光强度与猝灭剂浓度的关系求出，其结合常数 K_a 和结合位点数 n 的关系如下^[50]：

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_a + n \lg [Q] \quad (3)$$

式中 F_0 , F 代表转铁蛋白和黄腐酸作用前后的荧光发射峰强度， K_a 代表黄腐酸与转铁蛋白的结合常数， n 代表结合位点数， $[Q]$ 则为黄腐酸的浓度，根据黄腐酸的不同浓度，以 $\lg(F_0 - F)/F$ 对 $\lg[Q]$ 作图得到图 10，其中 pH 7.4 是细胞外的生理 pH，而 pH 4.8 是内涵体内 pH 值，根据直线斜率和截距及公式 (3) 计算得出其结合常数 K_a 及结合位点数 n 如表 8 及表 9，结合常数 K_a 值越大证明其结合作用力越强，越有利于药物小分子与蛋白质的相互结合，进一步根据结合位点数 n 的值来推断可能的结合位点数。

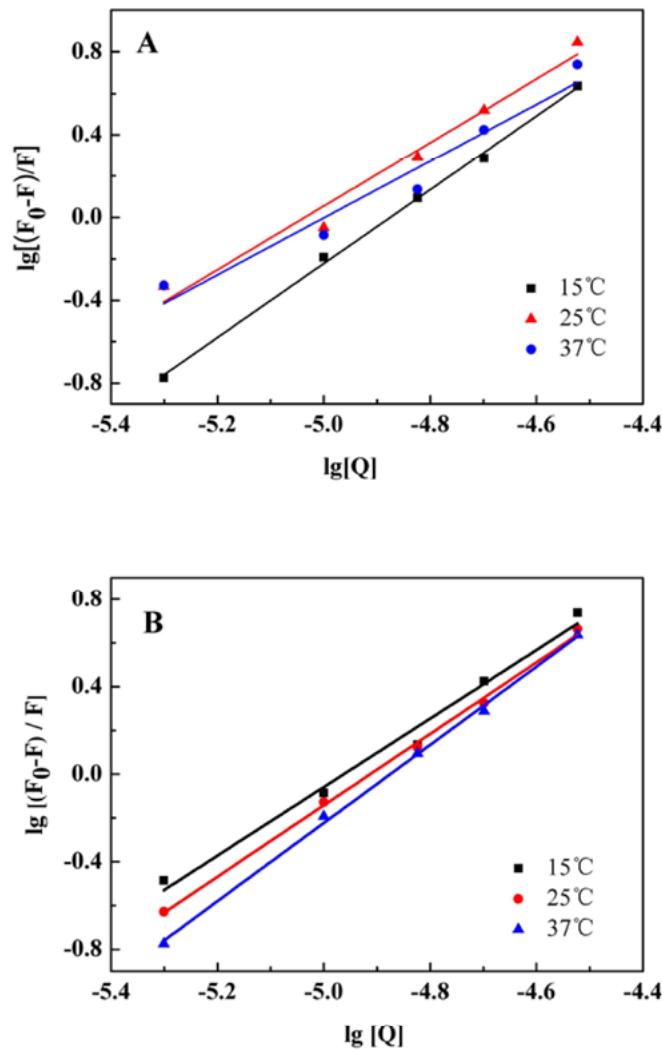


图 10 FA 对 Tf 荧光猝灭的 Logarithmic 曲线

Fig. 10 Plots of $\lg[(F_0 - F)/F]$ versus $\log[Q]$ for the FA-Tf system

(A) pH=7.4; (B) pH=4.8

表 8 FA 与 Tf 相互作用的结合常数及结合位点数 (pH=7.4)

Table 8 The binding constant and binding sites of FA in Tf (pH=7.4)

T/°C	$K_a(M^{-1})$	n	R
15°C	5.04×10^8	1.78	0.99359
25°C	5.48×10^7	1.54	0.97858
37°C	7.38×10^6	1.37	0.93747

表 9 FA 与 Tf 相互作用的结合常数及结合位点数 (pH=4.8)

Table 9 The binding constant and binding sites of FA in Tf (pH=4.8)

T/℃	$K_a(M^{-1})$	n	R
15℃	5.79×10^7	1.56	0.9818
25℃	1.03×10^8	1.73	0.9971
37℃	7.94×10^8	1.81	0.9978

根据表 8 及表 9 可以发现黄腐酸与 Tf 的结合常数较大，具有较强的结合作用，结合位点数接近 2，结合位点可能有两个。结合图 10A 及表 8 发现在生理环境中 (pH 7.4) 黄腐酸与转铁蛋白的结合常数随着温度的升高而降低，说明在正常细胞中低温有利于黄腐酸与转铁蛋白的相互结合，其结合力较强，稳定性较好。然而，根据图 10B 及表 9 在酸性环境下 (pH 4.8) 黄腐酸与转铁蛋白的结合常数随着温度升高有了小幅度的降低，说明在细胞体内高温有利于黄腐酸与转铁蛋白的相互结合，其结合力越强，稳定性越好。在低温 15℃ 条件下，我们发现酸性环境下 (pH 4.8) 黄腐酸与转铁蛋白的结合常数比生理环境 (pH 7.4) 下的低，表明低温可能有利于黄腐酸小分子在细胞内从转铁蛋白上释放下来^[51]，但是细胞内环境比较复杂，实际情况会如何还需要更深入的研究。

2.2.3 结合距离的计算

由黄腐酸吸收光谱和转铁蛋白荧光光谱的谱图 (图 11) 所示，两者之间存在着一定的重叠，因此可能存在着 Förster 非辐射能量转移。根据这种理论可以求出发射荧光基团和药物分子与蛋白质分子结合位置的距离，距离越小，越有利于蛋白质存储与转运药物分子，其药理作用发挥越好^[52]。根据 Förster 非辐射能量转移理论，转移效率 E 与给体-受体间距离 r 及临界距离 R_0 的关系如下^[53, 54]：

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r_0^6} \quad (4)$$

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 \varphi J N^{-4} \quad (5)$$

$$J = \frac{\sum F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta \lambda}{\sum F(\lambda) \Delta \lambda} \quad (6)$$

式中 F 为转铁蛋白和黄腐酸浓度比为 1:1 时转铁蛋白的荧光强度， F_0 为转铁蛋白与黄腐酸作用前的荧光强度， R_0 为 $E=50\%$ 时的临界距离， r_0 为供体和受体间的距离，公式 (5) 中 K^2 取蛋白质-药物各向随机分布的平均值 2/3， N 取水和有机物的平均值 1.336， φ 取 HSA 中色氨酸残基量子产率 0.118^[55]，对转铁蛋白荧光发射

光谱与黄腐酸吸收光谱的重叠部分进行积分得到 J , 公式 (6) 中 F_λ 为转铁蛋白在波长 λ 处的荧光强度, ϵ_λ 则为药物在波长 λ 处的摩尔消光系数。

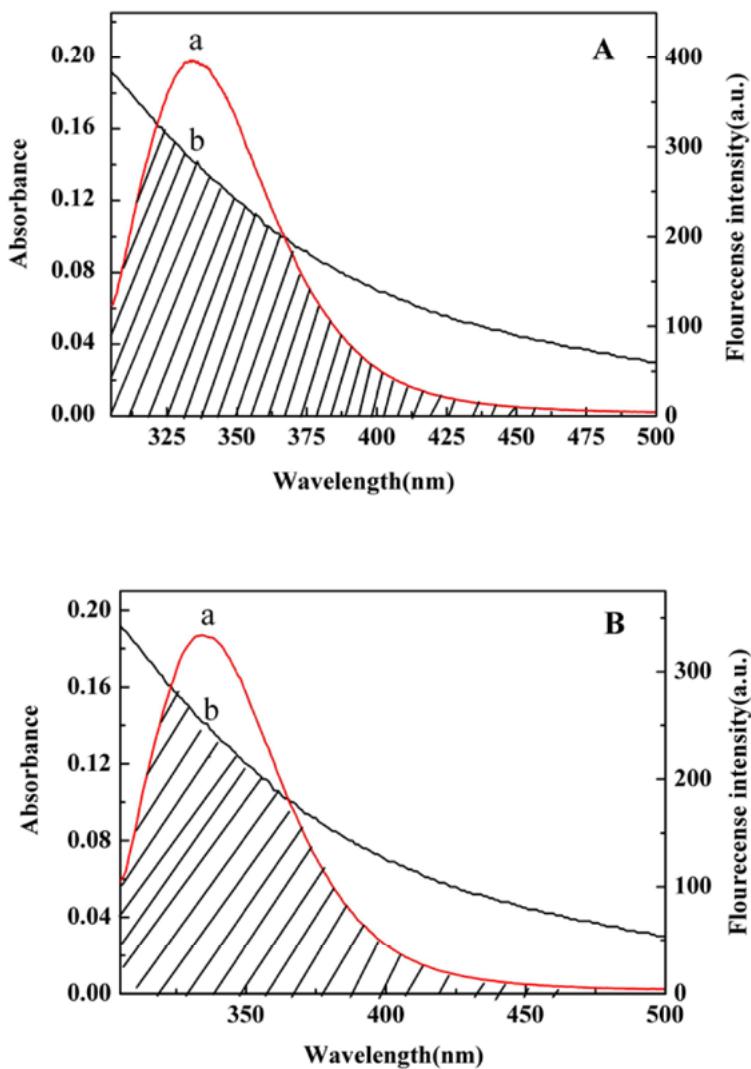


图 11 Tf 荧光发射光谱(a)和 FA 紫外吸收光谱(b)的重叠图

Fig. 11 Overlapping between the fluorescence emission spectra of Tf(a) and the absorption spectra of FA(b). (A) pH=7.4; (B) pH=7.4

将图 11 中的光谱重叠部分分割成极小的矩形, 利用公式 (5) 求得 pH 7.4 和 pH 4.8 的重叠积分分别为 $J=1.20 \times 10^{-14} \text{ cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$, $J=1.18 \times 10^{-14} \text{ cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 临界距离分别为 $R_0=2.89 \text{ nm}$, $R_0=2.86 \text{ nm}$, 结合距离分别为 $r_0=2.92 \text{ nm}$, $r_0=2.89 \text{ nm}$, 由计算结果可以看到, 黄腐酸与转铁蛋白的结合距离在两个 pH 的环境下没有

发生很大的变化，其结合距离很近似，说明黄腐酸与转铁蛋白相互作用后在两种 pH 环境下能够发挥相似强度的药理作用。黄腐酸在转铁蛋白上的结合位点与蛋白质分子中的色氨酸残基的距离 $r < 8 \text{ nm}$ ，具备了能量转移猝灭蛋白质荧光的条件，因此非辐射能量转移也是引起荧光猝灭的原因之一，且满足 $0.5 R_0 < r < 1.5 R_0$ ，推断能量是从转铁蛋白向黄腐酸转移^[56]。

2.2.4 相互作用力类型

药物分子与蛋白质的结合属于分子间的弱相互作用，主要包括氢键、范德华力、静电引力、疏水相互作用力四种类型^[57]。不同的药物，不同的条件都能够影响药物分子与蛋白质的相互作用力类型，重要的热力学参数（如熵变 ΔS ，焓变 ΔH ，吉布斯自由能变 ΔG ）对于判断相互作用力的类型具有关键作用。Ross^[58]等根据大量的试验结果，总结出生物大分子与小分子结合力的热力学规律，一般作用力类型可由如下规则确定： $\Delta H > 0, \Delta S > 0$ 时为典型的疏水作用力； $\Delta H < 0, \Delta S < 0$ 时为氢键和范德华力； $\Delta H < 0, \Delta S > 0$ 时，主要作用力为静电引力。为了进一步确定黄腐酸与转铁蛋白之间的作用力类型，我们利用热力学参数的计算值来推测两者之间的相互作用力类型。根据 Van't Hoff 方程可求出 ΔH 和 ΔS 的数值， ΔH 可由成键常数求出。其相关公式如下^[59]：

$$\ln K = -\Delta H / RT + \Delta S / R \quad (7)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (8)$$

其中 K 值是前面计算得到的不同温度不同 pH 值的黄腐酸与转铁蛋白相互作用的结合常数 K_a 的值， R 是气体常数，以 $\ln K$ 对 T 作图得到图 12，可以看到生理环境（pH 7.4）和酸性环境中黄腐酸对转铁蛋白的 Van't Hoff 曲线呈现良好的拟合，根据拟合所得斜率和截距，以及公式（7）（8）求得黄腐酸与转铁蛋白结合反应的热力学函数变化值如表 10 及表 11。

表 10 FA 与 Tf 的热力学参数值（pH=7.4）

Tab. 10 Thermodynamic parameters of binding of FA to Tf (pH=7.4)

T/K	$\Delta H/\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\Delta S/\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$	$\Delta G/\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$
288	-142.24	-327.94	-47.79
298	-	-	-44.51
310	-	-	-40.58

表 11 FA 与 Tf 的热力学参数值 (pH=4.8)

Tab. 11 Thermodynamic parameters of binding of FA to Tf (pH=4.8)

T/K	$\Delta H/$ kJ · mol ⁻¹	$\Delta S/$ J · mol ⁻¹ · K ⁻¹	$\Delta G/$ kJ · mol ⁻¹
288	86.58	439.04	-39.85
298	-	-	-44.24
310	-	-	-49.59

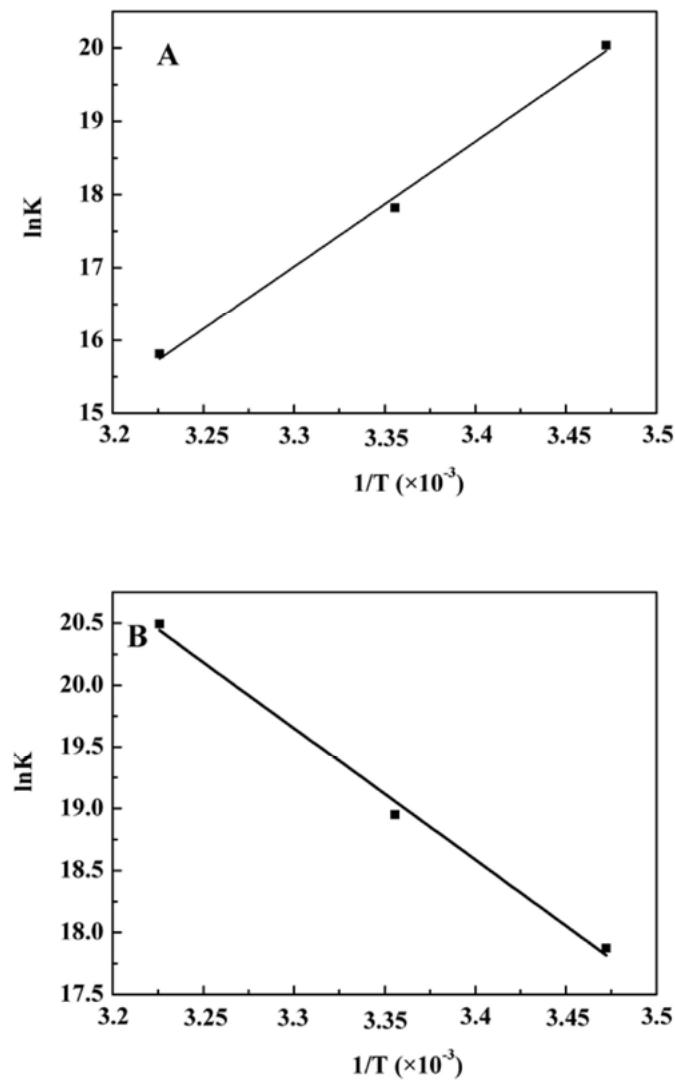


图 12 不同温度 Tf-FA 的 Van't Hoff 曲线图

Fig. 12 Van't Hoff plot for the Tf-FA in the different temperatures. (A) pH=7.4; (B) pH=7.0

根据表 10, 11 的热力学参数可以看到, ΔG 均大于零, 说明黄腐酸与转铁蛋白结合是自发的。

白的反应可以自发进行。根据表 10 可以看到生理环境 (pH 7.4) 的焓变 $\Delta H < 0$ 熵变 $\Delta S < 0$, 说明黄腐酸与转铁蛋白之间的相互作用力主要为氢键和范德华力, 推测产生这种作用力的原因主要是由于黄腐酸的分子结构中含有较多的羟基基团, 进而更容易形成氢键; 由表 11 可以看到酸性环境 (pH 4.8) 的焓变 $\Delta H > 0$ 熵变 $\Delta S > 0$, 说明疏水作用力在反应中发挥主要作用。

2.2.5 黄腐酸对转铁蛋白构象的改变

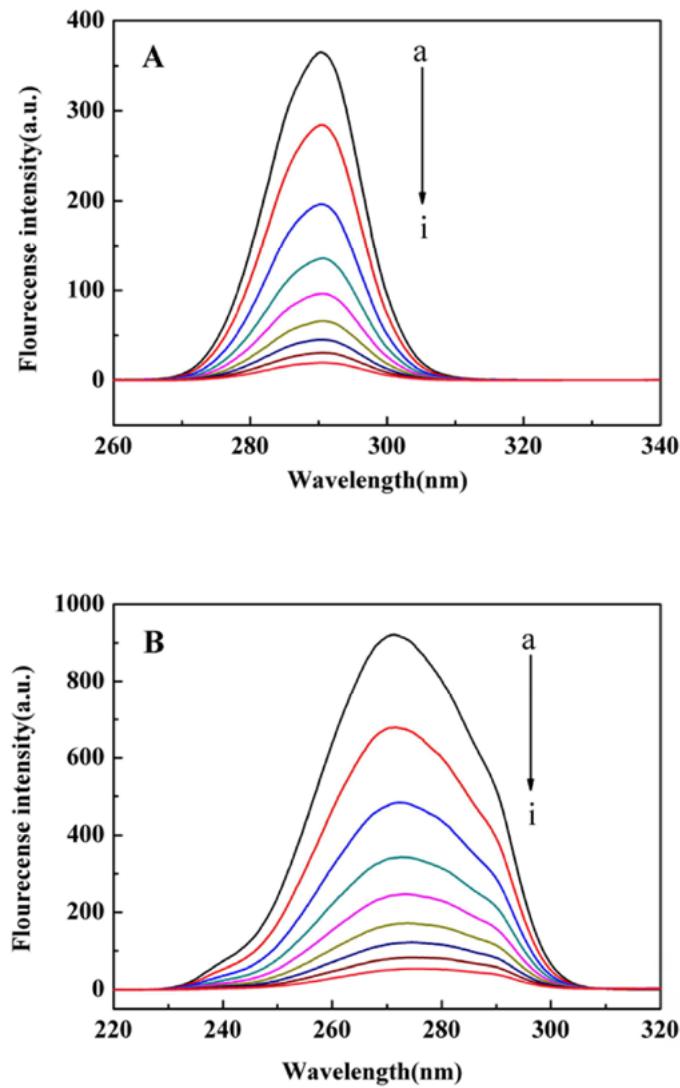


图 13 FA-Tf 体系的同步荧光光谱

Fig. 13 Synchronous fluorescence spectra of FA-Tf (A) $\Delta\lambda=15$ nm, (B) $\Delta\lambda=60$ nm. (a-i) the ratio of $C_{FA}/C_{Tf}=0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4$, $C_{Tf}=10 \mu\text{mol/L}$.

对药物小分子与蛋白质相互作用的研究过程中，蛋白质分子的构象变化得到了普遍关注。蛋白质具有复杂的生理活性功能的重要特征，它可以根据自身所处环境的微小变化而自发地进行分子构象的转变，药物分子和蛋白质结合以后，维持蛋白质二级和三级结构的分子内的作用力会发生一些改变，因此就会导致蛋白的构象发生变化。荧光猝灭光谱的实验结果证明黄腐酸与转铁蛋白具有很强的结合能力，为了进一步研究黄腐酸对转铁蛋白构象的影响，我们利用了同步荧光光谱和圆二色谱来对FA-Tf复合物体系进行研究。

同步荧光光谱技术具有光谱带宽减少，光谱简化，敏感性和避免不同的扰动影响等优点。以此方法为基础，可以观察药物小分子对生物大分子的构象变化情况。转铁蛋白的发射荧光来自于其内部的酪氨酸，色氨酸和苯丙氨酸，由于苯丙氨酸的荧光强度及其微弱，可以忽略不计。当 $\Delta \lambda=15$ nm时显示蛋白质酪氨酸残基的光谱特性，而 $\Delta \lambda=60$ nm时显示了色氨酸残基周围微环境的极性改变。固定 $\Delta \lambda$ 为15 nm和60 nm测定其同步荧光光谱如图13，如图所示，随着黄腐酸浓度的增加，转铁蛋白的同步荧光强度逐渐降低，酪氨酸残基的最大发射峰没有发生明显的位移（如图13A），说明黄腐酸对酪氨酸周围的环境几乎没有影响。但是色氨酸残基的荧光发生了微弱的红移（270~275 nm，如图13B），表明在黄腐酸和转铁蛋白发生相互作用时，转铁蛋白的构象发生了变化，色氨酸残基的极性增强，使转铁蛋白的疏水性变小，容易被水分子接近。

圆二色谱的吸收谱图在紫外区 190~250nm 范围内主要反映了蛋白质中二级结构肽链的变化情况，我们在较低浓度下分别测定 FA-Tf 体系在生理环境下（pH 7.4）和酸性环境下（pH 4.8）在这一范围内的 CD 谱图如图 14。由图 14A 可以看到在 220-250nm 的波长范围内单独黄腐酸没有 CD 信号，因此对该实验没有干扰。在生理环境中（pH 7.4），加入黄腐酸后转铁蛋白的摩尔椭圆率减小，表明黄腐酸与转铁蛋白结合后 α -螺旋结构的百分含量减小了，引起转铁蛋白肽链的舒展，使转铁蛋白的结构变得更加疏松，削弱了小分子与转铁蛋白的相互作用力，增加了黄腐酸与溶剂之间的作用力，这与同步荧光光谱得到的结果一致。由图 14B 可以看到在 220~250nm 的波长范围内单独黄腐酸同样也没有 CD 信号，因此对该实验没有干扰，在酸性环境中（pH 4.8），加入黄腐酸后转铁蛋白的摩尔椭圆率增加了，引起转铁蛋白肽链的收缩，表明黄腐酸与转铁蛋白结合后增加了 α -螺旋结构的百分含量，使转铁蛋白的结构变得更加紧密，增加了黄腐酸小分子与转铁蛋白的相互作用力。由黄腐酸对转铁蛋白构象的影响我们看到，酸性环境（pH 4.8）比生理环境（pH 7.4）加入黄腐酸后转铁蛋白的构象更加的稳定，这一结果可能导致黄腐酸

小分子进入细胞内后很难被释放。

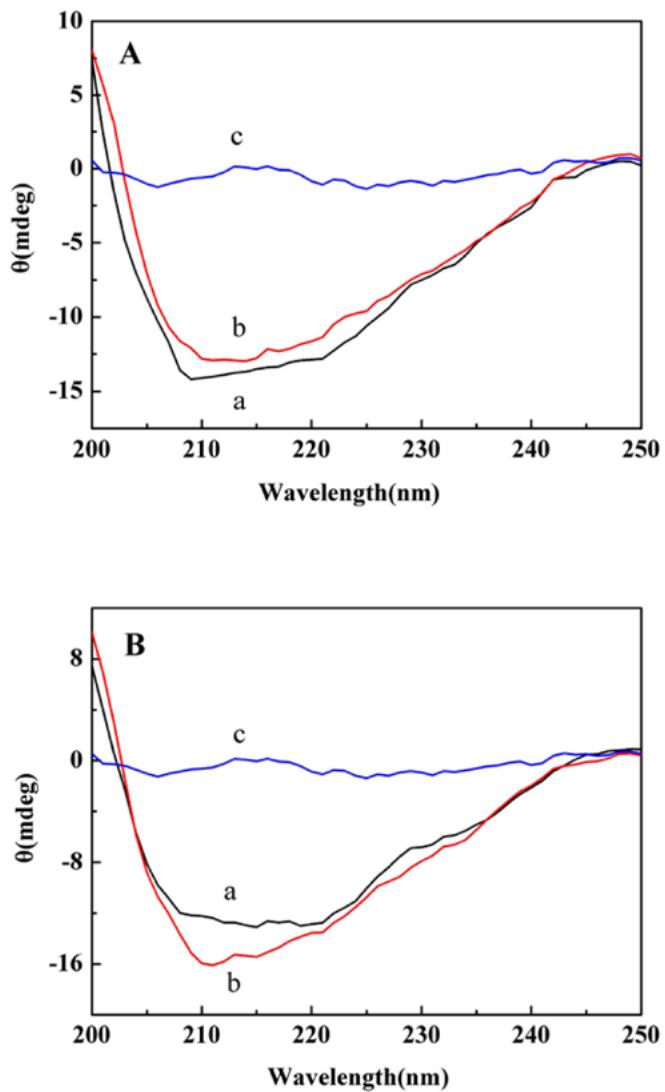


图 14 FA-Tf 体系的 CD 谱图

Fig. 14 CD spectra of the Tf-FA system (A) pH=7.4; (B) pH=4.8. (a) 2.5×10^{-6} mol/L ; (b) 2.5×10^{-6} mol/L Tf + 1.25×10^{-6} mol/L FA; (c) 1.25×10^{-6} mol/L FA

2.3 结论

在本章中我们利用吸收光谱, 荧光光谱, 同步荧光光谱, 热力学参数以及圆二色图研究了生理环境 (pH 7.4) 和酸性环境 (pH 4.8) 中黄腐酸与转铁蛋白在不同温度 (15°C, 25°C, 37°C) 下的相互作用机制。实验结果表明, 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, 进一

步利用荧光猝灭法计算了黄腐酸与转铁蛋白的荧光猝灭常数，结合常数，结合位点数，计算结果表明其为静态猝灭过程，并且存在非辐射能量转移，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（生理环境）时随着温度的升高黄腐酸与转铁蛋白的结合常数降低，说明在正常生理环境中低温有利于两者之间的结合，亲和力更强。黄腐酸与转铁蛋白的作用力类型主要为氢键与范德华力，可能是由于黄腐酸的分子结构中含有多个羟基基团，较容易形成氢键。黄腐酸引起了转铁蛋白中 α -螺旋结构的百分含量减小，改变了转铁蛋白的空间结构，使转铁蛋白的结构变得更加疏松。当 pH=4.8（酸性环境）时随着温度的升高黄腐酸与转铁蛋白的结合常数增大，说明在细胞内酸性环境中高温有利于两者之间的结合，亲和力更强。黄腐酸与转铁蛋白的作用力类型主要为疏水作用力。黄腐酸引起了转铁蛋白中 α -螺旋结构的百分含量增加，改变了转铁蛋白的空间结构，使转铁蛋白的结构变得更加紧密。我们的研究结果首次表明黄腐酸能够与转铁蛋白相互结合实现靶向载运，并且改变了转铁蛋白的空间构象。这为制备转铁蛋白介导黄腐酸的靶向载药体系提供理论依据，并为设计开发新药提供一种新思路，同时对黄腐酸的抗肿瘤疗效研究具有重要意义。

第3章 黄腐酸与人血清白蛋白相互作用的机制研究

人血清白蛋白 (human serum albumin, HSA, 图15) 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，是药物分布的重要载体^[60]。人血清白蛋白由585个氨基酸组成，分子量约为68000，在其分子中有三个相似的结构域，分别称为结构域I、II、III，每个结构域又可分为A和B两个子域，其中结构子域IIA和IIIA是大多数药物特异性的强结合位点^[61]。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^[62]。研究药物小分子与人血清白蛋白相互作用对于从分子水平上了解药物在体内的运输过程、作用机理、毒理和代谢情况具有重要的指导意义。

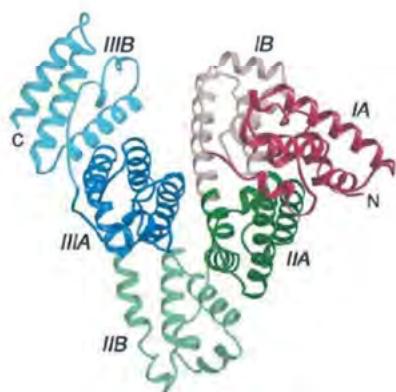


图 15 人血清白蛋白的 X 射线晶体结构

Fig. 15 The X-ray crystal structure of HSA

通过黄腐酸与转铁蛋白相互作用的机制研究，首次发现黄腐酸能够与转铁蛋白结合实现载运过程，为了进一步了解黄腐酸药物分子在体内的储存、运输过程，本章首次应用荧光光谱法研究了黄腐酸与人血清白蛋白的相互作用机理，得出了黄腐酸与人血清白蛋白之间的猝灭类型，结合常数，结合位点数及结合距离，并用圆二色谱及同步荧光光谱研究了黄腐酸对人血清白蛋白构象的影响。这些研究对于阐明黄腐酸在体内的运输过程及其作用机理具有十分重要的意义，同时为构建转铁蛋白介导黄腐酸的靶向载药体系的机制研究提供更为全面的理论信息。

3.1 实验部分

3.1.1 实验试剂

黄腐酸与人血清白蛋白相互作用的机制研究的实验试剂见第 3 章表 1。

3.1.2 实验仪器

黄腐酸与人血清白蛋白相互作用的机制研究的实验仪器见第 3 章表 2。

3.1.3 样品制备

缓冲溶液 PBS 的配制 (pH 4.8)：分别称量 0.38 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 0.14625 g NaCl 于小烧杯中充分溶解后倒入 250 ml 容量瓶，用超纯水稀释定容后用 pH 计测其 pH 值为 4.8。

缓冲溶液 PBS 的配制 (pH 7.4)：分别称量 0.117 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.6265 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.073 g NaCl 于小烧杯中充分溶解后倒入 250 ml 容量瓶，用超纯水稀释定容后使用 pH 计测量其 pH 值为 7.4。

人血清白蛋白母液的配制：称量一定量的人血清白蛋白，用一定量的 PBS 缓冲溶液 (pH 4.8 和 pH 7.4) 稀释到浓度 5×10^{-5} mol/L，得到生理环境下和酸性环境下的血清白蛋白母液储存于 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) 稀释到浓度 2×10^{-4} mol/L，得到生理环境下和酸性环境下的黄腐酸母液避光储存于 4℃ 冰箱内。

表 12 荧光猝灭光谱的实验配比表

Table 12 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

待测样品制备：用移液枪移取相同体积的人血清白蛋白母液于 2mL 离心管，固定人血清白蛋白的最终浓度为实验所需浓度，再按一定的浓度比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。黄腐酸与人血清白蛋白的荧光猝灭光谱实验的待测样品的母液、PBS 溶液加入量是按照表 12 配置；同步荧光光谱实验的待测样品的母液、PBS 溶液的加入量是按照表 13 配置；圆二色谱实验的待测样品的母液、PBS 溶液的加入量是按照表 14 配置。

表 13 同步荧光光谱的实验配比表

Table 13 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

表 14 圆二色谱的实验配比表

Table 14 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
4	1/0	10	0	990

3.1.4 实验方法

荧光光谱：分别配置两组 pH 条件的人血清白蛋白溶液，保持人血清白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°C，25°C，37°C 反应 12 h 后迅速用荧光光谱仪测定，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: 分别配置两组 pH 环境的人血清白蛋白溶液, 并保持人血清白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: 人血清白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: 分别配置两组 pH 环境的人血清白蛋白溶液, 保持人血清白蛋白溶液的最终浓度为 2.5×10^{-6} mol/L, 按照相同 pH 环境、相同浓度比例加入黄腐酸溶液, 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, 狹缝宽度为 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 (Na₂HPO₄·12H₂O+NaH₂PO₄·2H₂O+NaCl 体系, pH=7.4) 缓冲液进行基线校正。

3.2 结果与讨论

3.2.1 黄腐酸对人血清白蛋白内源荧光的猝灭

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, 具有具有灵敏度高, 选择性强, 样品用量少, 污染小等多重优点, 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, 为研究蛋白质分子构象提供了理论依据。根据体系荧光性质的改变可分为两种: 一种是药物小分子无荧光, 当加入到蛋白质溶液中后, 蛋白质分子本身的荧光强度降低, 称为内源荧光猝灭法, 也称荧光猝灭法; 另一种是药物小分子本身具有荧光, 当加入到蛋白质溶液中后, 蛋白质的荧光强度降低, 同时药物小分子的荧光被敏化增强, 称为荧光增强法。根据其猝灭机理可分为动态猝灭和静态猝灭。动态猝灭是由于荧光分子和猝灭剂之间碰撞产生的, 它随着温度的升高, 扩散系数和生物分子的猝灭常数都相应增大; 静态猝灭是荧光分子与猝灭剂之间生成复合物, 且该复合物使荧光产生猝灭的现象。人

血清白蛋白分子中由于含有色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸残基而具有内源荧光，当激发光波长为 280 nm 时，人血清白蛋白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，只有色氨酸发射荧光，荧光发射峰位置在 345 nm 附近。

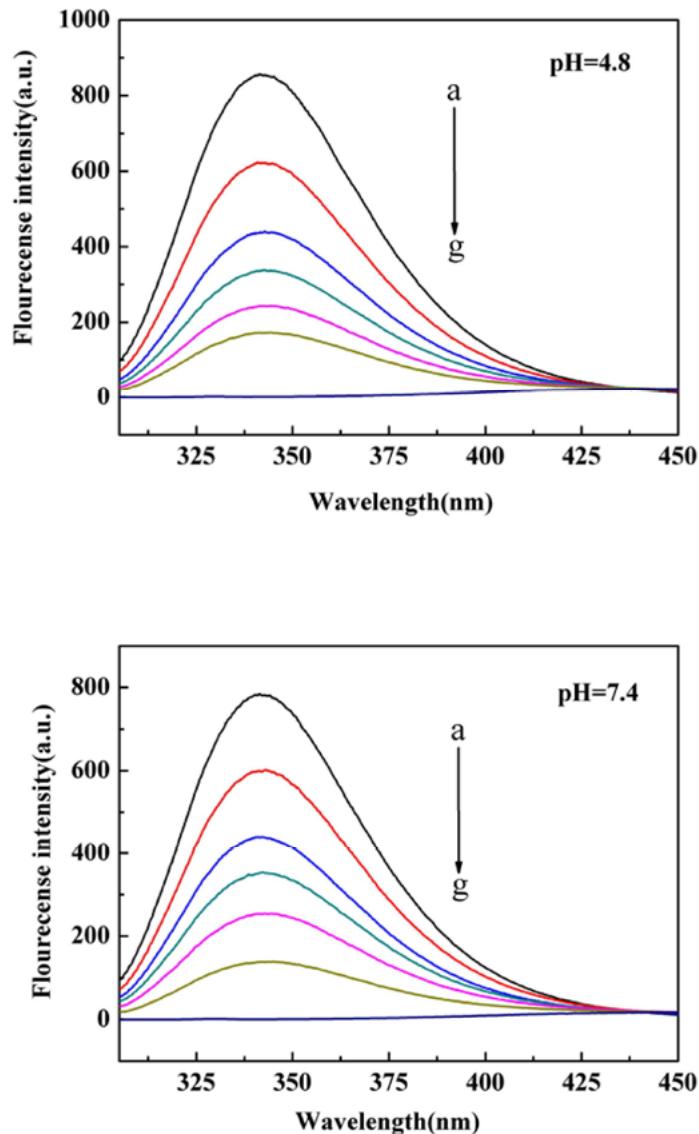


图 16 15℃下人血清白蛋白随黄腐酸浓度变化的荧光光谱 ($\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$).

Fig. 16 HSA fluorescence spectra in the presence of FA at 15°C ($\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$). (a-f) $C_{\text{FA}}/C_{\text{HSA}} = 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3$, $C_{\text{TF}} = 10 \mu\text{mol/L}$, (g) $C_{\text{FA}} = 30 \mu\text{mol/L}$.

在 295nm 激发波长下，分别测量生理环境和酸性环境人血清白蛋白与黄腐酸

在三个温度 15°C, 25°C, 37°C下的荧光光谱图, 得到了图 16, 17, 18。黄腐酸在 305~425 nm 范围内没有荧光发射信号, 对该荧光猝灭没有干扰。从图中看出, 随着黄腐酸浓度的不断增加, 345 nm 附近的荧光强度有规律地降低, 发生了明显的荧光猝灭现象, 其发射峰的位置并没有明显改变。说明黄腐酸与人血清白蛋白在不同温度及不同 pH 环境下都能够发生相互作用而形成无荧光特性的复合物, 并改变了色氨酸周围的微环境, 引起人血清白蛋白分子的空间构象发生了变化。

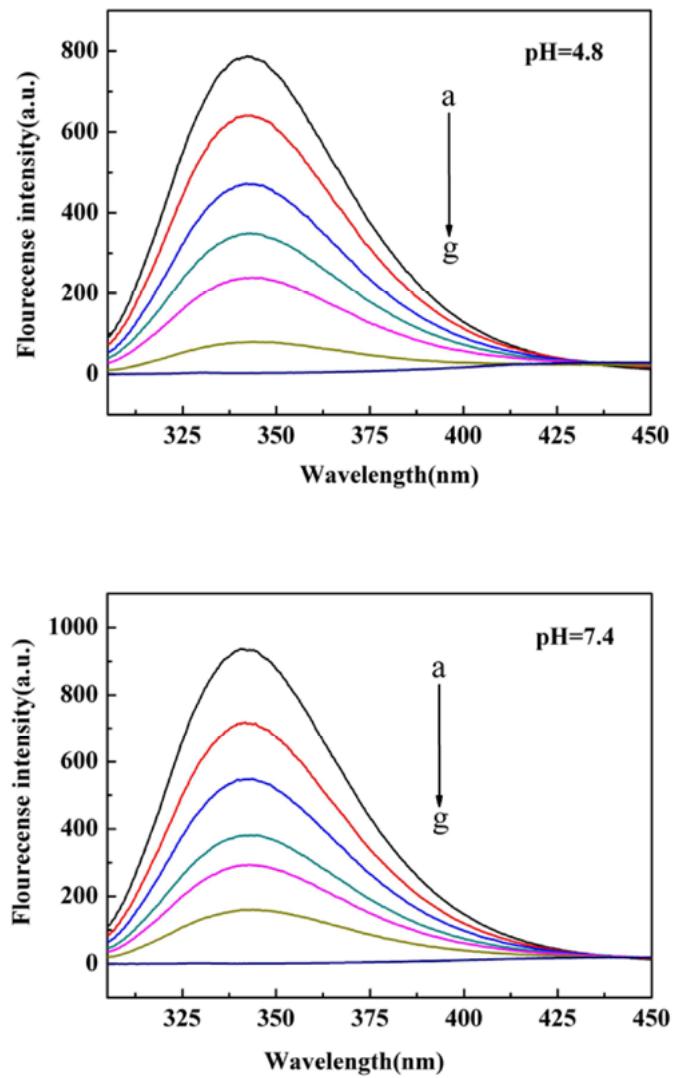


图 17 25°C下人血清白蛋白随黄腐酸浓度变化的荧光光谱 ($\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$)。

Fig. 17 HSA fluorescence spectra in the presence of FA at 25°C ($\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$). (a-f) $C_{\text{FA}}/C_{\text{HSA}} = 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3$, $C_{\text{TF}} = 10 \mu\text{mol/L}$, (g) $C_{\text{FA}} = 30 \mu\text{mol/L}$.