

图 18 37℃下人血清白蛋白随黄腐酸浓度变化的荧光光谱 ($\lambda_{ex} = 295 \text{ nm}$).

Fig. 18 HSA fluorescence spectra in the presence of FA at 25℃ ($\lambda_{ex} = 295 \text{ nm}$). (a-f) $C_{FA}/C_{HSA} = 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3$, $C_{Tr} = 10 \mu\text{mol/L}$, (g) $C_{FA} = 30 \mu\text{mol/L}$.

荧光猝灭机制主要有动态猝灭和静态猝灭两种。根据荧光猝灭常数的不同可以判断出猝灭机制类型。假设黄腐酸对人血清白蛋白的猝灭机制是动态猝灭，可以用 Stern-Volmer 方程^[63]：

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (9)$$

计算动态猝灭速率常数。其中， F_0, F 分别为人血清白蛋白和黄腐酸作用前后

的荧光发射峰强度， K_q 为双分子猝灭过程速率常数， τ_0 为无猝灭剂时蛋白质的荧光寿命，本实验中用到的人血清白蛋白荧光寿命 $\tau_0 = 5.85$ ns， K_{SV} 为动态猝灭常数， $[Q]$ 为黄腐酸的浓度，以 F_0/F 对 $[Q]$ 作图得到图 19。

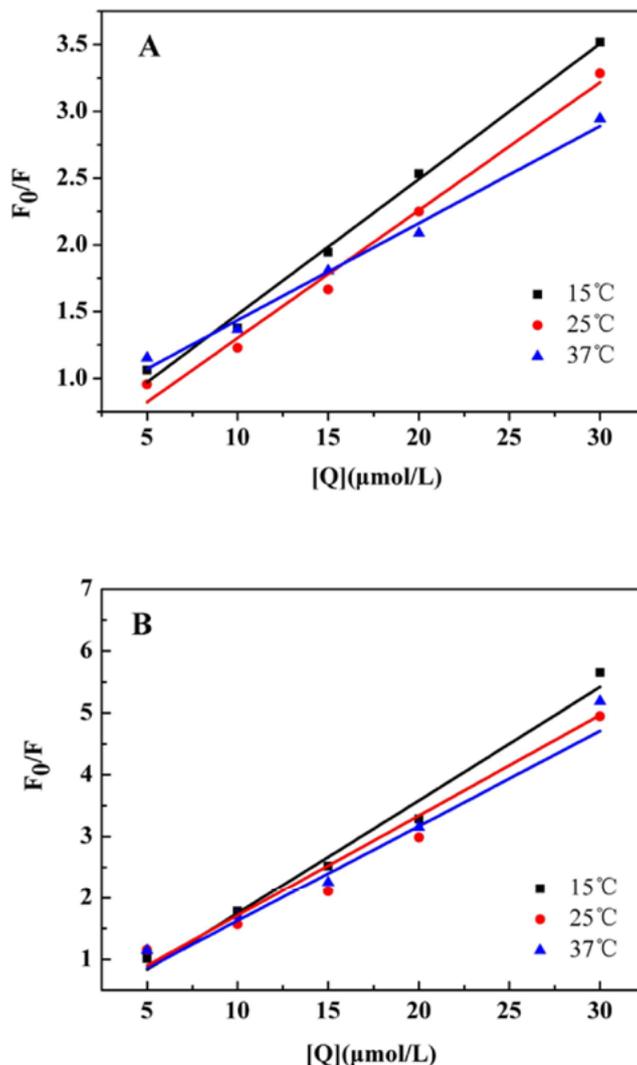


图 19 黄腐酸对人血清白蛋白荧光猝灭的 Stern-Volmer 曲线

Fig. 19 The Stern-Volmer curve of HSA in FA (A) pH=7.4; (B) pH=4.8

由图 19 可以看到，黄腐酸对人血清白蛋白荧光猝灭的 Stern-Volmer 曲线呈较好的线性关系，并用公式 (1) 求出黄腐酸与人血清白蛋白的荧光猝灭常数 K_{SV} 及猝灭速率常数 K_q 如表 15 及 16。根据表可以看到，在生理环境 (pH 7.4) 和酸性环境 (pH 4.8) 中黄腐酸与人血清白蛋白的猝灭速率常数 K_q 的值远远大于各类猝灭

剂对生物大分子的最大扩散速率常数 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$ ，因此可以确定荧光猝灭的主要原因不是动态猝灭，而是黄腐酸和人血清白蛋白相互作用形成复合物而引起的静态猝灭为主的荧光猝灭过程。

表 15 黄腐酸与人血清白蛋白相互作用的 K_{sv} 和 K_q 值 (pH=7.4)

Table 15 The value of K_{sv} and K_q to HSA in FA (pH=7.4)

T/°C	K_{sv} ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$)	K_q ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$)	R
15°C	1.0×10^5	1.7×10^{13}	0.99237
25°C	9.6×10^4	1.6×10^{13}	0.98408
37°C	7.3×10^4	1.2×10^{13}	0.98623

表 16 黄腐酸与人血清白蛋白相互作用的 K_{sv} 和 K_q 值 (pH=4.8)

Table 15 The value of K_{sv} and K_q to HSA in FA (pH=4.8)

T/°C	K_{sv} ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$)	K_q ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$)	R
15°C	1.8×10^4	3.1×10^{12}	0.9787
25°C	1.5×10^4	2.6×10^{12}	0.9608
37°C	1.6×10^4	2.7×10^{12}	0.9710

3.2.2 结合常数及结合位点数的计算

因黄腐酸与人血清白蛋白分子相互作用发生了静态荧光猝灭，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，结合常数越大，说明两者之间的相互结合力越强，亲和力越高，黄腐酸与人血清白蛋白的结合常数 K_a 和结合位点数 n 的关系如下：

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_a + n \lg [Q] \quad (10)$$

式中 F_0 , F 代表人血清白蛋白和黄腐酸作用前后的荧光发射峰强度， K_a 代表黄腐酸与人血清白蛋白的结合常数， n 代表结合位点数， $[Q]$ 则为黄腐酸的浓度，以 $\lg(F_0 - F)/F$ 对 $\lg[Q]$ 作图得到图 20，对数曲线呈现良好的线性关系，根据直线斜率和截距计算得出中性条件及酸性条件下黄腐酸与人血清白蛋白的结合常数 K_a 及结合位点数 n 列于表 17 及表 18 中。根据表中数据可以发现黄腐酸与人血清白蛋白的结合常数较大，具有较强的结合作用。由表 17 可以发现生理环境 (pH 7.4) 下黄腐酸与人血清白蛋白的结合常数随着温度的升高而降低，说明低温条件更有利于两者的结合，亲和力较强。结合位点数 n 接近于 1，推断两者之间可能有 1 个结合

位点。由表 18 可以发现酸性环境 (pH 4.8) 下黄腐酸与人血清白蛋白的结合常数随着温度的升高而增加, 说明高温条件有利于两者的结合, 得到的复合物稳定性越好。结合为点数 n 接近于 2, 推断其可能有两个结合位点。对比表 17 和表 18 可以看到, 生理环境 (pH 7.4) 中黄腐酸与人血清白蛋白的结合常数 K_a 都大于两者在酸性环境 (pH 4.8) 中的结合常数 K_a , 这可能导致黄腐酸小分子很难从人血清白蛋白中释放出来。但是细胞内环境比较复杂, 实际情况会如何可能还需要更深入的研究。

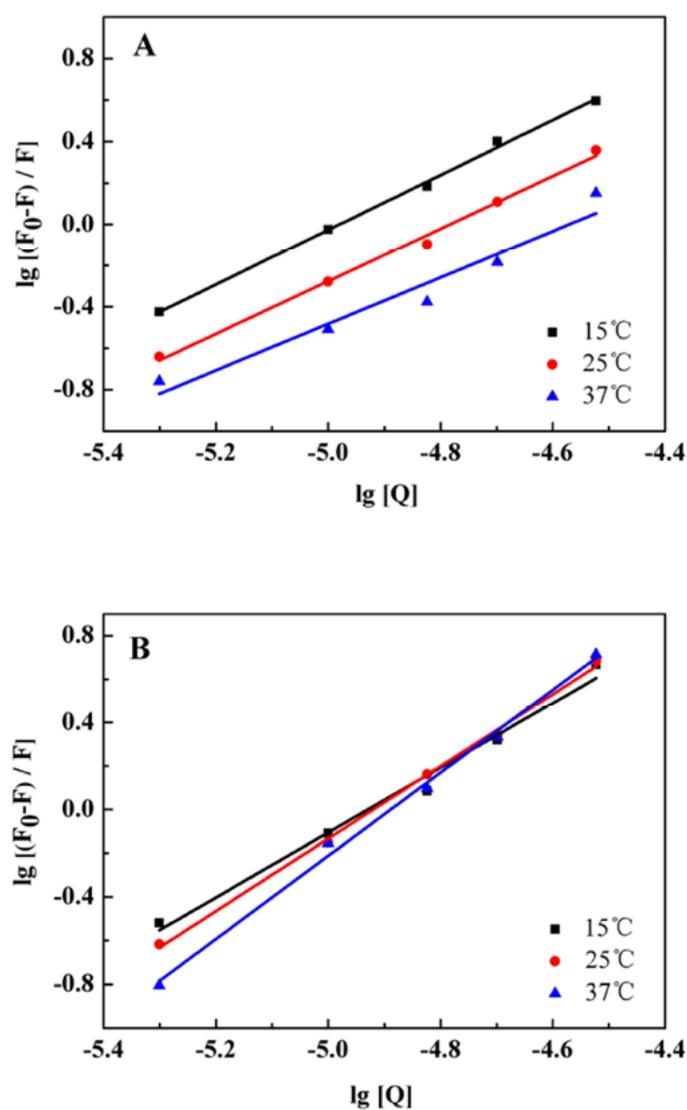


图 20 黄腐酸对人血清白蛋白荧光猝灭的对数曲线

Fig. 20 The Logarithmic curve of HSA in FA. (A) pH=7.4; (B) pH=4.8

表 17 FA 与 HSA 相互作用的结合常数及结合位点数 (pH=7.4)

Table 17 The binding constant and binding sites of FA in HAS (pH=7.4)

T/°C	$K_a(M^{-1})$	n	R
15°C	6.31×10^6	1.35	0.99706
25°C	1.23×10^6	1.27	0.99291
37°C	5.36×10^5	1.19	0.93201

表 18 FA 与 HSA 相互作用的结合常数及结合位点数 (pH=4.8)

Table 18 The binding constant and binding sites of FA in HSA (pH=4.8)

T/°C	$K_a(M^{-1})$	n	R
15°C	5.79×10^7	1.49	0.9820
25°C	1.03×10^8	1.66	0.9973
37°C	7.94×10^8	1.87	0.9943

3.2.3 结合距离的计算

由黄腐酸吸收光谱和人血清白蛋白荧光光谱的谱图 (图 21) 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。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:

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r_0^6} \quad (11)$$

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 \phi J N^{-4} \quad (12)$$

$$J = \frac{\sum F(\lambda) \epsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta \lambda}{\sum F(\lambda) \Delta \lambda} \quad (13)$$

式中 F 为人血清白蛋白和黄腐酸浓度比为 1:1 时人血清白蛋白的荧光强度, F_0 为人血清白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 (12) 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 取人血清白蛋白中色氨酸残基量子产率 0.118, 对蛋白质荧光发射光谱与药物吸收光谱的重叠部分进行积分得到 J , 公式 (13) 中 F_λ 为人血清白蛋白在波长 λ 处的荧光强度, ϵ_λ 则为黄腐酸在波长 λ 处的摩尔消光系数。

如图 21 所示, 将图中的光谱重叠部分分割成极小的矩形, 求得两个 pH 值的重叠积分分别为 $J=1.20 \times 10^{-14} \text{ cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$, $J=1.25 \times 10^{-14} \text{ cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 临界距离分别为 $R_0=2.89 \text{ nm}$, $R_0=2.91 \text{ nm}$, 结合距离分别为 $r_0=2.92 \text{ nm}$, $r_0=2.95 \text{ nm}$ 。从两个 pH 值

的结合距离可以看到，在生理环境（pH 7.4）和酸性环境（pH 4.8）中黄腐酸与人血清白蛋白的结合距离没有很大的变化，说明pH值环境的改变对结合距离的影响不大。黄腐酸在人血清白蛋白上的结合位点与蛋白质分子中的色氨酸残基的距离 $r < 8$ 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 $0.5 R_0 < r_0 < 1.5 R_0$ ，推断能量是从人血清白蛋白向黄腐酸转移。通过公式计算得到的 r_0 值和文献报道的结合在人血清白蛋白IIA区域的化合物之间的距离相近^[64]，我们推断黄腐酸小分子可能结合到人血清白蛋白的IIA区域。

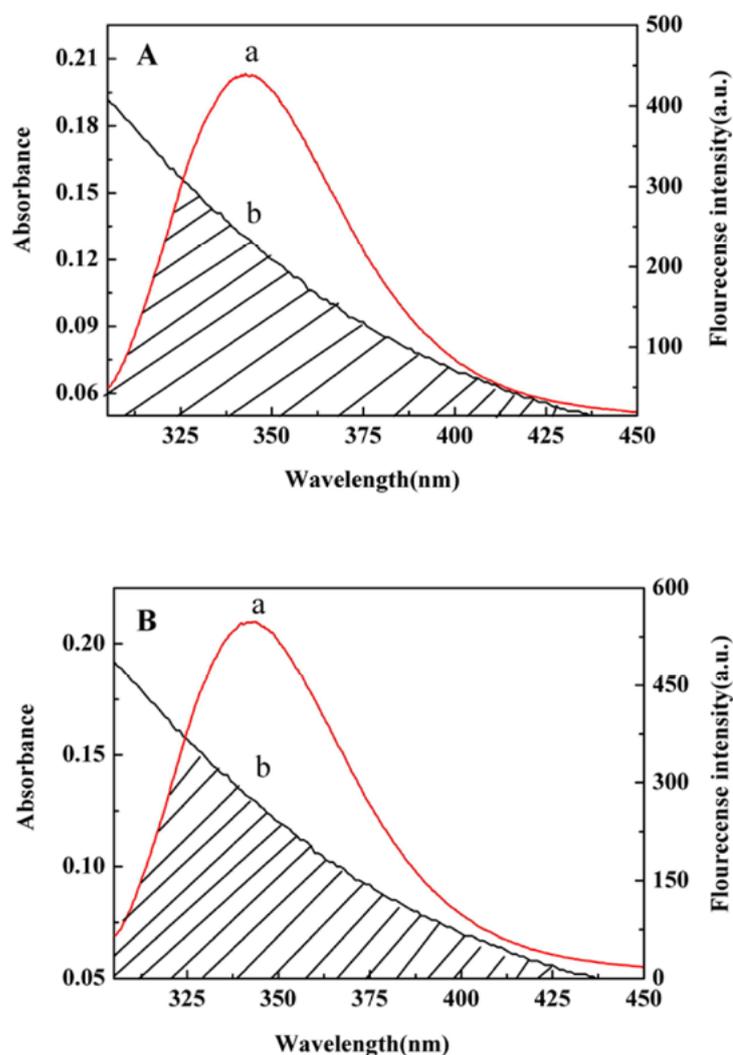


图 21 HSA 荧光发射光谱(a)和 FA 紫外吸收光谱(b)的重叠图

Fig. 21 Overlapping between the fluorescence emission spectra of HSA (a) and the absorption spectra of FA (b). (A) pH=7.4; (B) pH=7.4

3.2.4 相互作用力类型

药物分子与蛋白质的相互作用力类型主要包括氢键、范德华力、静电引力、疏水相互作用力四种。判断作用力类型的重要指标是反应的热力学参数，如熵变 ΔS ，焓变 ΔH ，吉布斯自由能变 ΔG 。为了确定黄腐酸与人血清白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：

$$\ln K = -\Delta H / RT + \Delta S / R \quad (14)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (15)$$

其中 K 值是前面计算得到的不同温度不同 pH 值的黄腐酸与人血清白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 22，可以看到生理环境（pH 7.4）和酸性环境中黄腐酸对人血清白蛋白的 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（14）（15）求得黄腐酸与人血清白蛋白结合反应的热力学函数变化值如表 19 及表 20。

表 19 FA 与 HSA 的热力学参数值（pH 7.4）

Tab. 19 Thermodynamic parameters of binding of FA to HSA (pH 7.4)

T/K	$\Delta H/$ kJ · mol ⁻¹	$\Delta S/$ J · mol ⁻¹ · K ⁻¹	$\Delta G/$ kJ · mol ⁻¹
288	-79.85	-146.34	-37.80
298	-	-	-36.34
310	-	-	-34.59

表 20 FA 与 HSA 的热力学参数值（pH 4.8）

Tab. 20 Thermodynamic parameters of binding of FA to HSA (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	443.84	-41.25
298	-	-	-45.43
310	-	-	-51.01

根据表 19 及表 20 的热力学参数可以看到， ΔG 均大于零，说明黄腐酸与人血清白蛋白的反应可以自发进行。根据表 19 可以看到生理条件（pH 7.4）的焓变 $\Delta H < 0$ 熵变 $\Delta S < 0$ ，说明黄腐酸与人血清白蛋白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分子结构中含有较多的羟基基团，进而更容易形成氢键，该过程为放热反应。根据表 20 可以看到酸性条件（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，推测在酸性环境下黄腐酸分子可能更容易进入蛋白质的疏水空腔，该过程为吸热反应。

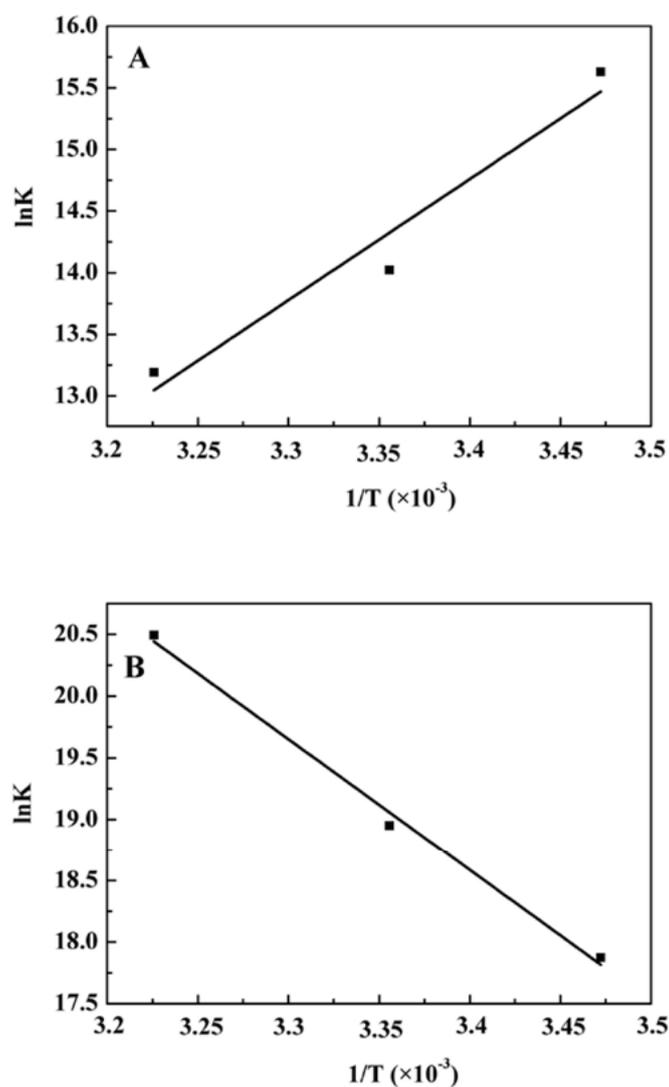


图 22 不同温度 HSA-FA 的 Van't Hoff 曲线图

Fig. 22 The Van't Hoff plot for the HSA-FA in the different temperatures.

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

3.2.5 黄腐酸对人血清白蛋白结构的改变

以上结果证明黄腐酸与HSA具有一定的结合能力，进一步研究黄腐酸对HSA构

象的影响对于其相互作用机制具有非常重要的意义。药物和蛋白质结合以后，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。黄腐酸与蛋白质的结合导致蛋白质荧光发射峰强度出现荧光猝灭淬灭现象，说明色氨酸所处微环境发生了改变，引起蛋白质二级结构发生变化。为了更好的理解黄腐酸对蛋白质构象的影响，我们利用了同步荧光光谱及圆二色谱对FA-HSA复合物体系进行研究。

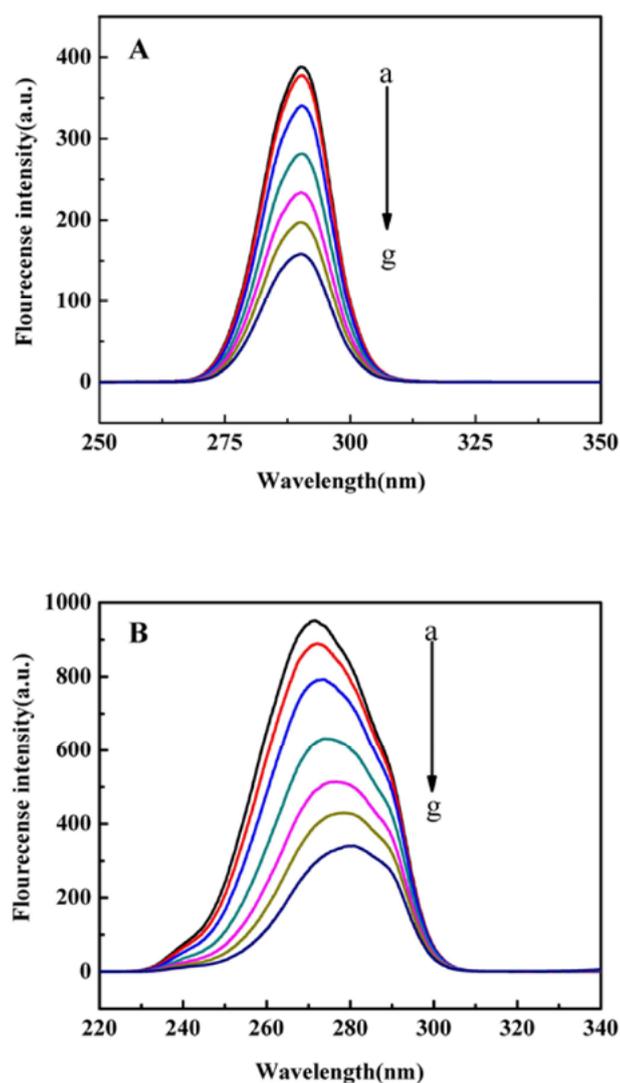


图 23 FA-HSA 体系的同步荧光光谱

Fig. 23 Synchronous fluorescence spectra of daidzein-Tf

(A) $\Delta\lambda=15$ nm, (B) $\Delta\lambda=60$ nm. (a-g) the ratio of $C_{FA}/C_{HSA} = 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4,$

$C_{HSA} = 10 \mu\text{mol/L}.$

同步荧光光谱因具有简化光谱、窄化谱带和减小光谱重叠等优点而常用来探讨蛋白质构象的变化。同步荧光光谱是固定激发波长与发射波长的间距 $\Delta\lambda$ ，同步扫描激发和发射单色器所得的荧光光谱。当 $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 表现的分别是蛋白质中酪氨酸残基和色氨酸残基的光谱特征。固定 $\Delta\lambda$ 为 15 nm 和 60 nm 测定其同步荧光光谱如图23，如图所示，随着大豆素浓度的增加，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23A），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明显的红移（ $270 \text{ nm} \sim 280 \text{ nm}$ ，如图23B），表明黄腐酸改变了色氨酸周围的微环境，使色氨酸残基的极性增强，疏水性减弱，引起转铁蛋白的肽链更加紧密，更容易被水分子接近，改变了人血清白蛋白的二级结构，引起蛋白的空间结构发生变化。

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。图24给出了较低浓度FA-HSA溶液的CD光谱，从图中可以看出两个pH环境中人血清白蛋白均在远紫外区 208 nm 和 222 nm 处有两个负峰，此为典型的 α -螺旋结构。图24（A）显示生理环境（pH 7.4）下，当加入黄腐酸以后人血清白蛋白在 208 nm 和 222 nm 处负峰的摩尔椭圆率升高，但峰位却未发生任何变化。根据 222 nm 处摩尔椭圆率的值，利用公式（16）、（17）计算得出加入黄腐酸之后，生理环境（pH 7.4）中人血清白蛋白的 α -螺旋结构含量从 39% 升高到 47% ，表明黄腐酸与人血清白蛋白结合后增加了 α -螺旋结构的百分含量，引起人血清白蛋白肽链的收缩，使人血清白蛋白的结构变得更加紧密，增强了人血清白蛋白的稳定性，因此导致人血清白蛋白的二级结构发生变化，改变了其微构像，引起人血清白蛋白的荧光猝灭。黄腐酸与人血清白蛋白的相互作用不仅减弱了人血清白蛋白与溶剂水分子之间的相互作用，使得人血清白蛋白的结构变得更加紧凑，同时也削弱了黄腐酸与溶剂之间的作用力。图24（B）显示酸性条件（pH 4.8）表，当加入黄腐酸后人血清白蛋白在 208 nm 和 222 nm 处负峰的摩尔椭圆率下降，但峰位却未发生任何变化，根据 222 nm 处摩尔椭圆率的值，利用公式（16）、（17）计算得出加入黄腐酸之后，酸性环境（pH 4.8）中人血清白蛋白的 α -螺旋结构含量从 45% 降低到 32% ，表明黄腐酸与人血清白蛋白结合后减少了 α -螺旋结构的百分含量，引起HSA肽链的舒展，使人血清白蛋白的结构变得更加疏松，降低了人血清白蛋白的稳定性，因此导致人血清白蛋白的二级结构发生变化，改变了其微构像，引起人血清白蛋白的荧光猝灭^[65]。黄腐酸与人血清白蛋白的相互作用不仅增加了人血清白蛋白与溶剂水分子之间的相互作用，使得人血清

白蛋白的结构变得更加紧凑，同时也增强了黄腐酸与溶剂之间的作用力。

$$MER = \theta_{abs} / (10nIC_p) \quad (16)$$

$$\alpha_{helix} = [(MER_{222nm} - 2340) / 30300] \times 100\% \quad (17)$$

其中公式(16)中 MRE 为平均摩尔椭圆率， θ_{abs} 为CD谱测得的摩尔椭圆率， n 代表HSA中氨基酸的个数为585， l 代表所用样品池的光程为1 mm， C_p 代表蛋白质的摩尔浓度，公式(17)中 α_{helix} 代表蛋白质的 α -螺旋结构百分含量。

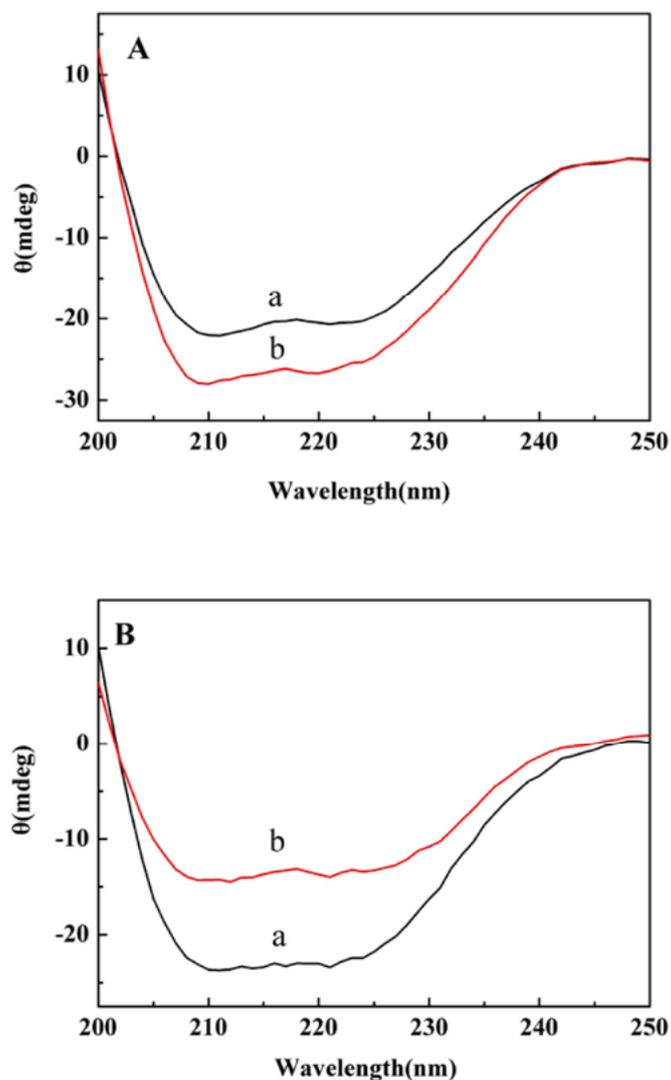


图 24 HSA-FA 体系的 CD 谱图

Fig.24 CD spectra of the FA-HSA system (A) pH=7.4; (B) pH=7.4

(a) 2.5×10^{-6} mol/L HSA; (b) 2.5×10^{-6} mol/L HSA + 1.25×10^{-6} mol/L FA

3.3 结论

在本章中，我们利用吸收光谱、荧光光谱，热力学参数，同步荧光光谱以及圆二色谱图研究了生理环境（pH 7.4）和酸性环境（pH 4.8）中黄腐酸与人血清白蛋白在不同 pH 环境、不同温度下的相互作用机制。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，能够使人血清白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人血清白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，并且发生了非辐射能量转移，根据黄腐酸与人血清白蛋白的结合距离推断黄腐酸结合到人血清白蛋白的黄腐酸分子可能结合到人血清白蛋白的 IIA 区域。当 pH=7.4（生理环境）时随着温度的升高黄腐酸与人血清白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。两者之间的作用力类型主要为氢键与范德华力，约有 1 个结合位点。通过 CD 光谱计算了人血清白蛋白的 α -螺旋结构含量，结果显示黄腐酸引起人血清白蛋白的 α -螺旋结构的百分含量升高，使人血清白蛋白的结构变得更加紧密。当 pH=4.8（酸性环境）时随着温度的升高黄腐酸与人血清白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。两者之间的作用力类型主要为疏水作用力，约有 2 个结合位点。通过 CD 光谱计算了人血清白蛋白的 α -螺旋结构含量，结果显示黄腐酸引起人血清白蛋白中 α -螺旋结构的百分含量减少，使转铁蛋白的结构变得更加疏松。我们的研究结果首次证明黄腐酸能够与人血清白蛋白相互作用形成新的复合物，并且改变了人血清白蛋白的空间构象。这对于阐明黄腐酸在体内的载运过程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。

结 论

论文采用荧光光谱, 热力学参数, 非辐射能量转移理论, 紫外光谱, 同步荧光光谱, 圆二色谱研究了黄腐酸与蛋白质相互作用的机制, 得出了黄腐酸与转铁蛋白及人血清白蛋白在不同温度不同 pH 值的猝灭机制, 结合常数, 结合位点数, 结合距离, 利用热力学参数的计算分别得出了生理环境 (pH 7.4) 和酸性环境下黄腐酸与转铁蛋白及人血清白蛋白的作用力类型, 并利用同步荧光光谱和 CD 谱图研究了黄腐酸对转铁蛋白及人血清白蛋白构象的调控, 为构建转铁蛋白介导黄腐酸靶向载药体系提供了理论研究, 得出以下结论:

1) 利用荧光光谱, 热力学参数, 非辐射能量转移理论, 同步荧光光谱以及 CD 谱图研究了生理环境 (pH 7.4) 和酸性环境 (pH 4.8) 中黄腐酸与转铁蛋白在 15°C, 25°C, 37°C 三个温度下的相互作用机制。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, 荧光猝灭类型为静态猝灭过程, 且发生了非辐射能量转移。在低温环境下黄腐酸与转铁蛋白复合物到达肿瘤细胞内能够释放出来。当 pH=7.4 (生理环境) 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, 能够引起转铁蛋白中 α -螺旋结构的百分含量减小, 使转铁蛋白的结构变得更加疏松; 当 pH=4.8 (酸性环境) 时, 两者之间的作用力类型主要为疏水作用力, 能够引起转铁蛋白中 α -螺旋结构的百分含量增加, 使转铁蛋白的结构变得更加紧密。研究首次证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。

2) 为了进一步了解黄腐酸在体内的储存、运输过程, 利用荧光光谱, 热力学参数, 非辐射能量转移理论, 同步荧光光谱以及 CD 谱图研究了 pH 7.4 和 pH 4.8 条件下黄腐酸与人血清白蛋白的相互作用机制。实验结果表明, 在不同 pH、不同温度下黄腐酸都具有较强的亲和力, 能够使人血清白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, 根据两者之间的结合距离推断黄腐酸分子可能结合到人血清白蛋白的 IIA 区域。当 pH=7.4 (生理环境) 时黄腐酸与人血清白蛋白的作用力类型主要为氢键与范德华力, 使转铁蛋白的结构变得更加紧密; 当 pH=4.8 (酸性环境) 时, 黄腐酸与人血清白蛋白的作用力类型主要为疏水作用力, 使人血清白蛋白的结构变得更加疏松。研究首次证明黄腐酸能够与人血清白蛋白相互结合形成新的复合物, 并且改变了人血清白蛋白的空间构象。这对于阐明黄腐酸在体内的载运过程具有十分重要的意义。

参考文献

- [1] DANIELS T R, BERNABEU E. The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2012, 1820(3): 291-317
- [2] 徐谦, 蓝天, 王晓稼, 等. EGFR 表达与三阴性乳腺癌靶向治疗的相关性[J]. *中国肿瘤*, 2012, 2(4) : 281-284.
- [3] EUGENIO P. Breast cancer in developing countries[J]. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics Gynaecology* , 2012, 26(2): 283-290.
- [4] 张常书, 彭红梅, 张海玲, 等. 2009 中国腐植酸行业低碳经济交流大会暨第八届全国绿色环保肥料(农药)新技术、新产品交流会论文集[C]. 北京: 中国腐植酸工业协会, 2009.
- [5] XIE Wei Ling, YANG Pei Hui. Visual characterization of targeted effect of holo-transferrin-tagged dihydroartemisinin on human breast cancer cells[J]. *Chinese science bulletin*, 2012, 55(22): 2390-2395.
- [6] LAI H, NAKASE I. Artemisinin-transferrin conjugate retards growth of breast tumors in the rat[J]. *Anticancer research*, 2009, 29(10): 3807-3810.
- [7] PRUTKI M, BLAZI M P, JAKOPOVIC M, et al. Altered iron metabolism, transferrin receptor1 and ferritin in patients with colon cancer[J]. *Cancer letters*, 2006, 238(2): 188-196.
- [8] 张洪明. 转铁蛋白受体的结构、表达及功能 [J]. *实用临床医药杂志*, 2008, 12(3): 114-117.
- [9] WALLY J, HALBROOKS P J, VONRHEIN C, et al. The crystal structure of iron-free human serum transferrin provides insight into inter-lobe communication and receptor binding[J]. *Biological chemistry*, 2006, 281: 24934-24944.
- [10] GOBBI M, DARAIO F, OBERKANINS C, et al. Analysis of HFE and TFR2 mutations in selected blood donors with biochemical parameters of iron overload [J]. *Haematologica*, 2003(88): 396-401.
- [11] WELLS B J. The combined effect of transferrin saturation and low density lipoprotein on mortality [J]. *Annals of family medicine*, 2004(36): 324 -329.
- [12] INOUE S, PATIL R. Nanobiopolymer for direct targeting and inhibition of EGFR expression in triple negative breast cancer [J]. *PLOS ONE*, 2012, 7(2): 31-38.
- [13] TANAKA T, SHIRAMOTO S, MIYASHITA M, et al. Tumor targeting based on the effect of

- enhanced permeability and retention (EPR) and the mechanism of receptor-mediated endocytosis (RME)[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2004, 277: 39-61.
- [14] 胡锦涛. 白蛋白和转铁蛋白自组装纳米凝胶的研究以及在药物包埋的初步探索[N]. 复旦大学, 2007.
- [15] REN Wei Hua, CHANG Jiang, HU Yan Cheng, et al. Development of transferrin functionalized poly (ethyleneglycol)/poly (lactic acid) amphiphilic block copolymeric micelles as a potential delivery system targeting brain glioma[J]. *Journal of materials science. Materials in medicine*, 2010(21): 2673-2681.
- [16] 张莉, 徐维平, 苏育德, 等. 转铁蛋白—转铁蛋白受体在肿瘤主动靶向治疗中的应用[J]. *中国药业*, 2012(21): 1-3.
- [17] CITORES L, FERRERAS J M, MUNOZ R, et al. Targeting cancer cells with transferrin conjugates containing the non-toxic type 2 ribosome-inactivating proteins nigrin b or ebulin[J]. *Cancer Letters*, 2002, 184: 29-35.
- [18] HALBROOKS P J, HE Q Y, Briggs S K, et al. Investigation of the Mechanism of Iron Release from the C-Lobe of Human Serum Transferrin: Mutational Analysis of the Role of a pH Sensitive Triad[J]. *Bioanalysis*, 2003(42): 3701-3707.
- [19] YANAGIHARA K, CHENG H, CHENG P W. Effects of epidermal growth factor, transferrin, and insulin on lipofection efficiency in human lung carcinoma cells[J]. *Cancer gene therapy*, 2010(7): 59-65.
- [20] KIRCHEIS R, WIGHTMAN L, SCHREIBER A, et al. Polyethylenimine/DNA complexes shielded by transferrin target gene expression to tumors after systemic application[J]. *Gene therapy*, 2010(8): 28-40.
- [21] FONSECA C, MOREIRA J N, CIUDAD C J, et al. Targeting of sterically stabilised pH-sensitive liposomes to human T-leukaemia cells [J]. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 2005, 59(2): 359-366.
- [22] ABBT B G, LANKES U, FRIMMEL F H. Structural characterization of aquatic humic substances-The need for a multiple method approach[J]. *Aquatic Sciences*, 2004, 2(66): 151-170.
- [23] 郑平. 腐殖酸物质结构[J]. *腐殖酸*. 2002(1): 38-43.
- [24] CRONAN C S, LAKSHMAN S, PATTERFSON H H. Effects of disturbance and soil amendments on dissolved organic carbon and organic acidity in red pine forest floors[J]. *Journal of Environmental Quality*, 1992, 3(21): 457-463.

- [25] 曹可心, 郝瑞霞, 关砚冰. 废水的紫外吸光值积分与常规有机污染物指标的关联性分析[J]. 江苏环境科技, 2006, 19(2): 43-45.
- [26] NELSON A, SHAKIRR S J. In vitro anti-influenza virus activity of synthetic human analogues derived from protocatechuic acid[J]. Carbohydrate Research. 2004, 339(12): 2069-2075.
- [27] ALVAREZ P, VALENZUELA C C, GARRIDO J J. Theoretical Study on Fulvic Acid Structure, Conformation and Aggregatio a Molecular Modelling Approach[J]. Science of the Total Environment, 2006, 358: 243-254.
- [28] TING Hung Chih, YEN Cheng Chieh, CHEN Wen Kang, et al. Humic acid enhances the cytotoxic effects of arsenic trioxide on human cervical cancer cells[J]. Environmental Toxicology and Pharma-cology, 2010, 29(2): 117-125.
- [29] YANG Hsin Ling, HSEU You Cheng, HSEU Yi Ting, et al. Humic acid induces apoptosis in human premyelocytic leukemia HL-60 cells[J]. Life Sciences, 2004, 75(15): 1817-1831.
- [30] 王晶晶, 李宝才, 李鹏, 等. 腐植酸诱导人早幼粒白血病HL-60细胞凋亡[J]. 腐植酸, 2011(3): 33-40.
- [31] 洪宇明, 袁申元, 毛羽, 等. 黄腐酸钠对大白鼠肝缺血/再灌注微循环作用的实验研究[J]. 肝胆外科杂志, 2001, 9(4): 311-313.
- [32] 高金岗, 周连宁, 张英才, 等. 生化黄腐酸对小鼠非特异性免疫功能的影响[J]. 腐殖酸, 2010(2): 11-15.
- [33] 李宝才, 毕艳艳, 李月梅, 等. 黄腐酸及黄腐酸钠对糖尿病小鼠的降糖作用[J]. 昆明理工大学学报, 2011, 36(5): 164-167.
- [34] 杨光燃, 袁申元, 袁明霞, 等. 实验性糖尿病神经和微血管形态研究及黄腐酸钠早期干预[J]. 微循环学杂志, 2000, 10(2): 3-5.
- [35] 高金岗, 石习霞, 周连宁, 等. 口服生化黄腐酸抗炎镇痛作用初步研究[J]. 动物医学进展, 2012, 33(11): 62-65.
- [36] 张莹蕾, 张梅枝, 郭菊. 生化黄腐酸在奶牛饲养中防病试验[J]. 河南畜牧兽医, 2001, 22(1): 10-16.
- [37] 祝亚勤, 李燕敏. 草炭腐植酸钠抗炎镇痛作用的实验研究[J]. 腐植酸, 2000(2): 25-27.
- [38] 黄普, 郭遂成. 中西医结合治疗溃疡性结肠炎33例[J]. 四川中医, 2004, 22(3): 49-50.
- [39] 王而川. 黄腐酸钠口服液对顽固性复发性口腔溃疡的疗效观察[J]. 腐植酸, 2010(4): 41-43.
- [40] SCHEPETKIN I A, KHLEBNIKOV A I, WOO S B, et al. Characterization and Biological Activities of Humic Substances from Mumie[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,

- 2003, 51(18): 5245-5254.
- [41] 张常书, 于秀芳, 朱玲, 等. 2010 中国腐植酸行业低碳经济交流大会暨第九届全国绿色环保肥料(农药)新技术、新产品交流会论文集[C]. 北京: 中国腐植酸工业协会, 2010.
- [42] 李宝才, 张惠芬, 戴伟锋, 等. 腐植酸与普洱茶茶色素[J]. 腐殖酸, 2007(1): 19-26.
- [43] EFTINK M R, GHIRON C A. Exposure of tryptophanyl residues in proteins. Quantitative determination by fluorescence quenching studies[J]. *Biochemistry*, 1976, 15: 672-680.
- [44] SARZEHI S, CHAMANI J. Investigation on the interaction between tamoxifen and human holo-transferrin: Determination of the binding mechanism by fluorescence quenching, resonance light scattering and circular dichroism methods[J]. *Int J Biol Macromol*, 2010, 4(47): 558-569.
- [45] 刘峥, 夏之宁. 光谱法在分子间相互作用中的应用[J]. *激光杂志*, 2001, 22(6): 9-11.
- [46] WANG Y Q, ZHANG H M, ZHANG G C, et al. Binding of brucine to human serum albumin[J]. *J Mol Struct*, 2007, 830: 40.
- [47] GREENFIELD N J. Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data[J]. *Anal Biochem*, 1996, 235: 1-10.
- [48] PASTUKHOV A V, LEVCHENKO L A, SADKOV A P. Spectroscopic study on binding of rutin to human serum albumin[J]. *J Mol Struct*, 2007, 842(1-3): 60-66.
- [49] MATEI I, HILLEBRAND M. Interaction of kaempferol with human serum albumin: A fluorescence and circular dichroism study. *J Pharmaceut Biomed*, 2010, 51(3): 768-773.
- [50] JIANG Min, XIE Meng Xia, ZHENG Dong, et al. Spectroscopic studies on the interaction of cinnamic acid and its hydroxyl derivatives with human serum albumin[J]. *J Mol Struct*, 2004, 692(1-3): 71-80.
- [51] 张艳霞, 以转铁蛋白为载体的抗肿瘤药物靶向作用研究[N]. 北京: 中国科学院化学研究所, 2010.
- [52] 李桂芝, 刘永明, 魏新运, 等. 荧光法研究盐酸拓扑替康、盐酸依利替康喜树碱类药物和牛血清白蛋白的相互作用[J]. *化学学报*, 2006, 64(7): 679-685.
- [53] HU Yan Jun, LIU Yi, JIANG Wei, et al. Fluorometric investigation of the interaction of bovine serum albumin with surfactants and 6-mercaptopurine[J]. *J Photochem Photobiol B*, 2005, 80(3): 235-242.
- [54] CAO Shu Hong, WANG Dan Dan, TAN Xiao Yan, et al. Interactions between trans-resveratrol and serum albumin in aqueous solution[J]. *J Solution Chem*, 2009, 38(9): 1193-

- [55] BYLER D M, BROUILLETTE J N, SUSI H S. Resolution-Enhanced FT-IR Spectra of Soil Constituents: Humic Acid[J]. Spectroscopy, 1986, 1(3): 39-52.
- [56] HU Yan Jun, LIU Yi, ZHANG Li Xia, et al. Studies of interaction between colchicine and bovine serum albumin by fluorescence quenching method[J]. J Mol Struct, 2005, 750: 174-178.
- [57] TIAN Jian Niao, LIU Jia Qin, HU Zhi De, et al. Interaction of wogonin with bovine serum albumin[J]. Bioorg Med Chem, 2005, 13: 4124-4129.
- [58] ROSS D P, SUBRAMANIAN S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability [J]. Biochemistry, 1981, 20: 3096-3102.
- [59] HE Wen Jing, LI Ying, XUE Chun Xia, et al. Effect of chinese medicine alpinetin on the structure of human serum albumin[J]. Bioorg Med Chem, 2005, 13: 1837-1845.
- [60] 王迎进, 张艳青, 李亚雄, 等. 光谱法研究根皮苷与人血清白蛋白相互作用[J]. 分析测试学报, 2013, 32(2): 239-243.
- [61] 岳园园, 董巧, 刘任, 等. 光谱法及分子模拟研究三唑类化合物与人血清白蛋白的相互作用[J]. 分析实验室, 2013, 32(11): 21-24.
- [62] 刘璐莎, 樊君, 胡春梅, 等. 荧光素钠与牛血清蛋白相互作用的荧光光谱研究及其分析应用[J]. 化学学报, 2011, 69(21): 2598-2596.
- [63] LEHRER S S. Solute perturbation of protein fluorescence. Quenching of the tryptophyl fluorescence of model compounds and of lysozyme by iodide ion[J]. Biochem, 1971(10): 3254-3263.
- [64] ANALYTICAL M C. Recommendations for the definition, estimation and use of the detection limit[J]. Analyst, 1987, 112: 199-204.
- [65] ZHANG Xiu Feng, XIE Ling, LIU Yang, et al. Binding of the bioactive component Aloe dihydroisocoumarin with human serum albumin[J]. J Mol Struct, 2008, 891(1-3): 87-92.

(来源: 华北理工大学, 2015, 3: 67)