

# 3-溴丙酮酸与人血清白蛋白相互作用的光谱学研究

裴明砚<sup>1</sup> 郑学仿<sup>\* 1,2</sup> 曹洪玉<sup>1,2</sup> 唐乾<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>(辽宁省生物有机化学重点实验室, 大连 116622) <sup>2</sup>(大连大学生物工程学院, 大连 116622)

**摘要** 运用荧光光谱、紫外可见吸收光谱和圆二色光谱法研究了抗肿瘤药物 3-溴丙酮酸 (3-Bromopyruvic acid, 3-BrPA) 与人血清白蛋白 (Human serum albumin, HSA) 的相互作用。3-BrPA 对 HSA 的猝灭机制属于静态猝灭, 并发生分子间非辐射能量转移。热力学数据显示, 二者之间的作用力主要为静电作用; 同步荧光光谱表明, 3-BrPA 与蛋白质中接近色氨酸残基的区域发生了相互作用; 荧光光谱研究发现,  $Zn^{2+}$  存在时 3-BrPA 对 HSA 的猝灭程度进一步增强; 圆二色光谱法研究蛋白二级结构结果显示, 3-BrPA 对 HSA 的结构影响非常小。

**关键词** 3-溴丙酮酸; 人血清白蛋白; 相互作用; 荧光光谱; 紫外可见光谱; 圆二色光谱

## 1 引言

3-溴丙酮酸 (3-Bromopyruvic acid, 3-BrPA) 是一种近年来被广泛研究的抗癌药物<sup>[1]</sup>, 是较好的能量代谢抑制剂<sup>[2,3]</sup>。3-BrPA 注射入体内后, 除绝大部分能够选择性地吸附到肿瘤组织上, 有少量 3-BrPA 进入到正常组织中, 影响正常组织。3-BrPA 作为一种强烷化剂通过抑制肿瘤细胞糖酵解来抑制肿瘤细胞 ATP 的产生, 导致大量肿瘤细胞死亡。因此, 3-BrPA 的毒副作用的研究十分重要。

血清白蛋白是可以作为内源和外源化合物的存放和转运蛋白, 对生命活动有重要作用<sup>[4]</sup>。人血清白蛋白 (Human serum albumin, HSA) 是血液中主要蛋白之一, 担负着药物的贮存、运输等作用, 常常作为研究药物与蛋白质相互作用的模型蛋白<sup>[5]</sup>。药物进入人体后, 首先与 HSA 结合, 然后通过运输和转运, 才能产生药效或毒副作用。因此, 研究药物与 HSA 相互作用有助于从分子水平上了解药物的作用机理、毒理和代谢情况。HSA 与内源及外源性化合物的结合机制对于生命科学、化学、药学和临床医学具有重要的意义<sup>[6]</sup>。目前, 荧光光谱法是研究药物与生物大分子之间相互作用的重要方法<sup>[7,8]</sup>。近年来, 分子模拟技术<sup>[9,10]</sup>结合光谱学方法用于药物与生物大分子之间相互作用的研究发挥了重要的作用<sup>[11]</sup>。

本研究以 3-BrPA 为药物模型, 以 HSA 作为血液中生物大分子的代表, 采用计算与光谱学实验相结合的方法研究了 3-BrPA 与 HSA 的相互作用机制, 为研究 3-BrPA 对 HSA 性能的影响提供一些基础信息<sup>[12]</sup>。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

V-560 紫外-可见分光光度计, FP-6500 型荧光分光光度计, J-810 圆二色谱仪 (日本 Jasco 公司); Julabo F-12 型制冷和加热循环器 (德国 Julabo 公司); FA-1004 电子天平; 移液枪; 微量进样器。

用磷酸盐缓冲液配制  $5 \times 10^{-5}$  mol/L HSA 储备液; 用超纯水配制 5.0 mmol/L 3-BrPA 储备液; 1.0 mmol/L  $ZnSO_4$  溶液; 0.05 mol/L  $N_2HPO_4 \cdot N_2H_2PO_4$  缓冲液 ( $pH = 7.4$ ); 实验用水为去离子水。

### 2.2 实验方法

**2.2.1 紫外吸收光谱实验** 移取 2 mL 人血清白蛋白溶液于 1 cm 石英比色池中, 以  $N_2HPO_4 \cdot N_2H_2PO_4$  缓冲液为参比, 用微量进样器依次加入适量的 3-BrPA 溶液, 静置 5 min, 测定 250~320 nm 的紫外吸收光谱 (3-BrPA 溶液的加入总体积小于 50  $\mu$ L)。

**2.2.2 荧光光谱实验** 移取 2 mL HSA 溶液于 1 cm 石英比色池中, 用微量进样器依次加入适量 3-BrPA 溶液进行荧光测定, 以 280 nm 为激发波长, 激发和发射狭缝通带宽度均为 5 nm; 扫描波长范围

2009-11-30 收稿; 2010-01-09 接受

本文系国家自然科学基金 (No. 20871024)、辽宁省优秀人才培养计划项目 (No. RC-04-10)、辽宁省高校创新团队项目 (No. 2006T002 2009T003) 和大连市科技计划项目 (No. 2008E11SF170) 资助

\* E-mail: dkzheng@163.com

280~ 460 nm。以  $\Delta\lambda = 20 \text{ nm}$  和  $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$  测定 HSA 和 3-BrPA 作用的同步荧光光谱。移取 2 mL HSA 溶液于 1 cm 石英比色池中, 加入 2  $\mu\text{L}$  1.0 mmol/L  $\text{ZnSO}_4$  溶液, 静置 30 min, 使 HAS 与  $\text{Zn}^{2+}$  形成浓度比为 1:1 的  $(\text{HSA}-\text{Zn}^{2+})$  二元溶液, 再用 3-BrPA 进行荧光测定, 测定方法同上。

**2.2.3 圆二色谱实验** 移取 500  $\mu\text{L}$  HAS 溶液于 0.1 cm 石英比色池中, 用微量进样器依次加入 3-BrPA 溶液进行圆二色的测定。狭缝带宽为 1 nm, 扫描波长范围 200 ~ 260 nm, 扫描速度为 50 nm/min, 响应时间为 2 s。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 3-BrPA 与 HSA 作用的紫外光谱

由图 1A 可见, 随着 3-BrPA 浓度的增加, HSA 的吸光度逐渐增强, 峰位略有蓝移。HSA 在 280 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。HSA 吸光度随 3-BrPA 浓度的增加而增大, 说明 3-BrPA 均可使包围在 HSA 分子内部的色氨酸和酪氨酸残基的芳杂环疏水基团裸露出来, 导致吸收强度增加。同时, 疏水基团之间的疏水作用减弱,  $\pi-\pi^*$  跃迁能量增大, 吸收峰蓝移。

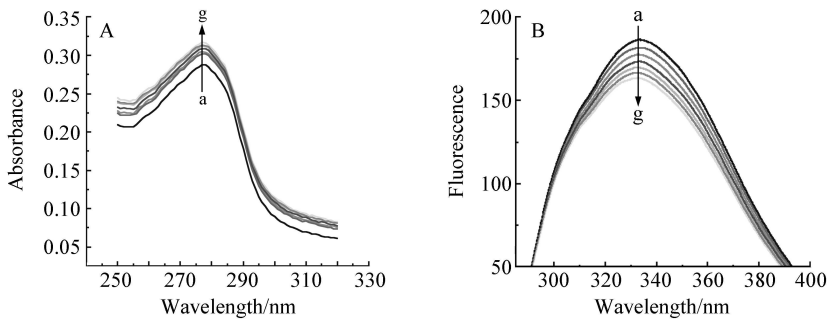


图 1 HSA 与 3-BrPA 相互作用的紫外光谱图 (A) 和荧光光谱图 (B)

Fig 1 HSA and 3-bromopyruvic acid (3-BrPA) interaction ultraviolet (UV) absorption spectra (A) and fluorescence spectra (B)

5.0  $\mu\text{mol/L}$  HSA;  $C_{3\text{-BrPA}}$  (a~g): 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30  $\mu\text{mol/L}$ .

#### 3.2 3-BrPA 与 HSA 作用的荧光光谱

蛋白质的内源荧光主要来源于色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸残基。苯丙氨酸的量子产率很低, 酪氨酸被电离或者接近氨基、羧基时, 其荧光几乎全部猝灭。HSA 在 333 nm 处有最大发射波长, 主要由色氨酸残基贡献。如图 1B 所示, 3-BrPA 对 HSA 的内源荧光产生了变化: 荧光强度下降, 最大吸收峰略有蓝移。说明 HSA 与 3-BrPA 之间存在相互作用, 发生了能量转移。

**3.2.1 荧光猝灭机理** 荧光猝灭可由动态猝灭和静态猝灭引起。先假设 3-BrPA 对 HSA 的荧光猝灭机制为动态猝灭, 则该猝灭服从 Stern-Volmer 方程:

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q]$$

式中,  $F_0$  和  $F$  分别为未加入和加入猝灭剂  $Q$  时荧光物质的荧光强度;  $K_q$  为双分子猝灭常数;  $\tau_0$  为猝灭体不存在时荧光物质的平均寿命;  $K_{sv}$  为动态猝灭常数;  $[Q]$  为猝灭剂浓度。

图 2 为根据不同温度 (293, 303 和 313 K) 绘制的 Stern-Volmer 曲线图。由图 2 可见, 随着温度的升高, HSA 的 Stern-Volmer 曲线的斜率降低。动态猝灭依赖于扩散, 升高温度导致扩散加快, 猝灭常数随着温度的升高而增大; 而静态猝灭随温度的升高, 化合物稳定性降低, 猝灭常数随着温度的升高而降低。据此可初步判断该过程为静态猝灭。293, 303 和 313 K 温度下的  $K_q$  分别为

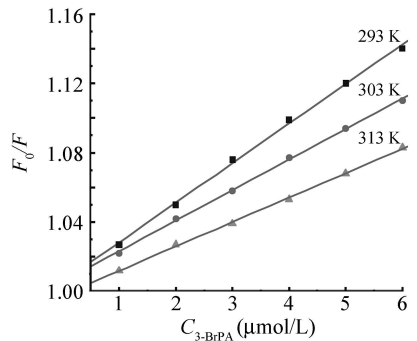


图 2 不同温度下 3-BrPA 对 HSA 荧光猝灭的 Stern-Volmer 曲线

Fig 2 Stern-Volmer plot of HSA quenched by 3-BrPA at different temperatures.

2.23  $\times 10^{12}$ , 1.76  $\times 10^{12}$  和 1.41  $\times 10^{12} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ ;  $K_{sv}$  分别为 2.23  $\times 10^4$ , 1.76  $\times 10^4$  和 1.41  $\times 10^4 \text{ L}/\text{mol}$ 。

各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散猝灭常数为  $2 \times 10^{10} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ , 3-BrPA 对 HSA 荧光猝灭常数  $K_q$  均大于此值, 进一步说明此猝灭过程是分子之间结合形成复合物所引起的静态猝灭。

当荧光分子与猝灭剂之间形成不发光的复合物而发生静态猝灭时, 服从 Lineweaver-Burk 方程:

$$(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + K_a F_0^{-1} [Q]^{-1}$$

式中,  $F_0$  和  $F$  分别为未加入和加入猝灭剂  $Q$  时荧光物质的荧光强度,  $K_a$  为结合常数。以  $(F_0 - F)^{-1}$  对  $[Q]^{-1}$  作图, 得到 Lineweaver-Burk 曲线图 (图 3A)。根据直线斜率可求得 293、303 和 313 K 温度下的  $K_a$  分别为  $2.8 \times 10^4$ ,  $2.4 \times 10^4$  和  $1.2 \times 10^4 \text{ L}/\text{mol}$ 。由图 3A 可见, 线性关系良好, 且结合常数随温度的升高而减小, 这更进一步说明 3-BrPA 对 HSA 荧光猝灭机制是静态猝灭。

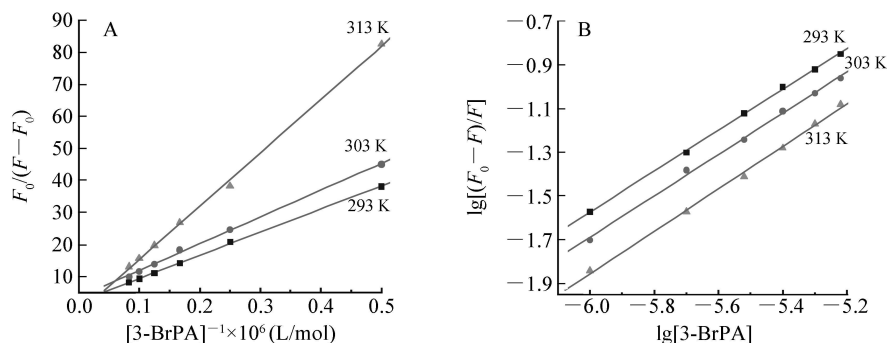


图 3 不同温度下 3-BrPA 对 HSA 荧光猝灭的 Lineweaver-Burk 曲线 (A) 和双对数图 (B)

Fig 3 Lineweaver-Burk plot of HSA quenched by 3-BrPA at different temperatures (A) and Double lg plot at different temperature (B).

**3.2.2 结合常数和结合位点数** 静态猝灭荧光强度与猝灭体的关系可由荧光体分子与猝灭体分子之间的结合常数表达式推导出来。即:  $\lg[(F_0 - F)/F] = \lg K + n \lg [Q]$ , 以  $\lg[(F_0 - F)/F]$  对  $\lg [Q]$  作图 (图 3B), 根据直线截距求出 293、303 和 313 K 下的猝灭体和荧光体分子结合常数  $K$  分别为:  $1.06 \times 10^4$ ,  $0.938 \times 10^4$  和  $0.922 \times 10^4 \text{ L}/\text{mol}$  与 Lineweaver-Burk 方程计算出的结合常数基本相符, 结合能力随着温度的升高而下降。由直线的斜率得出, 293、303 和 313 K 下的结合位点数  $n$  分别为 0.99963、0.99867 和 0.99859,  $n \approx 1$ , 表明 3-BrPA 与 HSA 的结合位点数约为 1。

由不同温度下的结合常数  $K$  和 Van't Hoff 方程可获得 3-BrPA 与 HSA 结合过程的热力学参数  $\Delta H$ ,  $\Delta G$  和  $\Delta S$ , 结果列于表 1。由表 1 可知,  $\Delta H < 0$ ,  $\Delta S > 0$  可推断 3-BrPA 与 HSA 的作用力主要为静电作用。

### 3.3 3-BrPA 与 HSA 作用的同步荧光光谱

由图 4 可见,  $\Delta\lambda = 20 \text{ nm}$  和  $\Delta\lambda = 80 \text{ nm}$  所得

到的同步荧光光谱图分别显示 HSA 中酪氨酸和色氨酸残基的荧光光谱特征。对于两种氨基酸而言, 其峰形和发射波长均没有发生改变, 但它们的荧光强度均随着 3-BrPA 量的逐渐增加而逐渐减弱。对于色氨酸而言, 在峰强度逐渐减弱的同时, 最大发射波长略有蓝移, 说明色氨酸残基的微环境发生了改变, 3-BrPA 的加入, 主要是与蛋白质中接近色氨酸残基的区域发生了相互作用, 使蛋白质的构象发生了改变。

### 3.4 3-BrPA 分别与 HSA 和 HSA-Zn<sup>2+</sup> 形成的二元溶液的荧光光谱

由图 5A 可见, 当向 HSA 溶液中逐渐加入适量 3-BrPA 溶液时, HSA 的内源荧光强度下降。向摩尔比为 1:1 的 HSA-Zn<sup>2+</sup> 复合物中逐渐加入适量 3-BrPA 溶液发现, Zn<sup>2+</sup> 的加入使 3-BrPA 对 HSA 的荧光猝灭程度比未加入时进一步增强 (图 5B), 说明 Zn<sup>2+</sup> 影响了药物与蛋白相互作用过程, 研究 Zn<sup>2+</sup> 对药物与蛋白质结合的影响, 有助于全面了解药物在体内的运输和作用机制<sup>[13]</sup>。

### 3.5 圆二色光谱

圆二色光谱可以灵敏的检测一些反应引起的蛋白质分子二级结构的变化。图 6 为 3-BrPA 与 HSA

表 1 3-BrPA 与 HSA 相互作用的热力学参数

Table 1 The thermodynamic parameters between 3-bromopyruvic acid and human serum albumin

$T/\text{K}$	$\Delta G$ ( $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ )	$\Delta S$ ( $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ )	$\Delta H$ ( $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ )
293	-25.54		
303	-26.13	58.54	-8.39
313	-26.71		

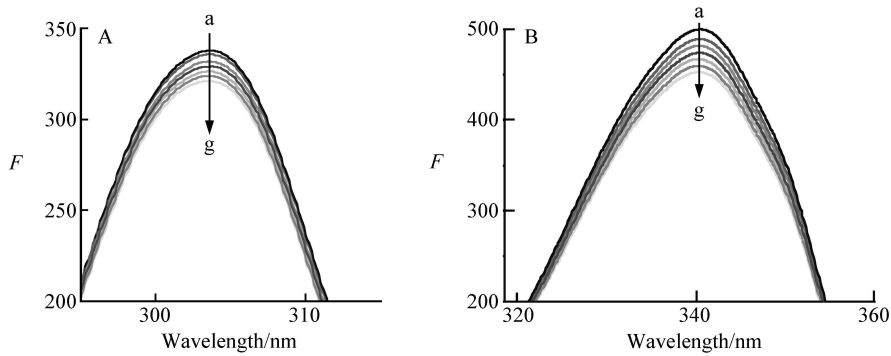


图 4 3-BrPA 与 HSA 相互作用的同步荧光光谱图

Fig 4 HSA and 3-BrPA interaction synchronous fluorescence spectra

A:  $\Delta\lambda = 20 \text{ nm}$ , B:  $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ .  $C_{\text{HSA}} = 5 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ ;  $C_{3\text{-BrPA}}$  (a-g): 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30  $\mu\text{mol/L}$ .

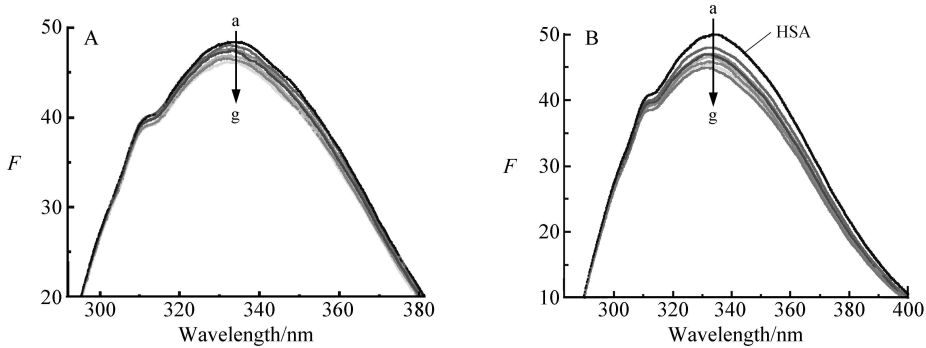


图 5 3-BrPA 分别与 HSA 和 HSA-Zn<sup>2+</sup> 二元溶液相互作用的荧光光谱图

Fig 5 A: HSA and 3-BrPA interaction fluorescence spectra B: HSA-Zn<sup>2+</sup> and 3-BrPA interaction fluorescence spectra

1.0  $\mu\text{mol/L}$  HSA; 1.0  $\mu\text{mol/L}$  HSA-Zn<sup>2+</sup>;  $C_{3\text{-BrPA}}$  (a-g): 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6  $\mu\text{mol/L}$ .

相互作用的 CD 谱图。208 和 222 nm 出现 2 个负槽, 这是典型  $\alpha$  螺旋结构 CD 光谱信号。当 3-BrPA 浓度从 1.0  $\mu\text{mol/L}$  逐渐增加到 10  $\mu\text{mol/L}$  时, 3-BrPA 对 HSA 的二级结构没有改变, 圆二色谱图没有变化 (谱图重叠); 当药物浓度加大到  $1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$  时, 随着 3-BrPA 浓度的增加, HSA 在远紫外区域的 CD 信号振幅减弱, 但形状和肩峰的位置没有改变。以上结果表明, 只有 3-BrPA 浓度从  $1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$  开始逐渐增加时才能诱导 HSA 的二级结构发生微弱的改变, 当加入 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 和 0.5  $\text{mmol/L}$  3-BrPA 时, 可计算出 HAS 的  $\alpha$ -螺旋分别为 31.9%, 31.9%, 31.9%, 32.3%, 32.1% 和 32.1%,  $\beta$ -折叠分别为 16.9%, 16.7%, 16.5%, 16.6%, 17.0% 和 17.0%。结果表明, 3-BrPA 在人体需要的浓度小于 30  $\text{mmol/L}$  时几乎不会改变 HSA 的二级结构。因此, 3-BrPA 通过血液作用于肿瘤细胞的过程中对 HSA 的结构影响很小, 表明 HSA 是一种可以安全携带 3-BrPA 药物到达患处的载体蛋白。

### 3.6 小结

3-BrPA 对 HSA 的荧光猝灭属于静态猝灭机制, 且分子内发生了非辐射能量转移; 二者主要靠静电作用力相结合, 结合位点接近于 HSA 中的 Trp 残基, 且结合后使 Trp 残基所处的微环境极性略有降低, 引起 HSA 的构象发生变化。圆二色谱数据显示, 当 3-BrPA 的浓度增加到  $1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$  时, HSA 的二级结构发生极其微弱的改变, 表明此种抗癌药物在人体内对

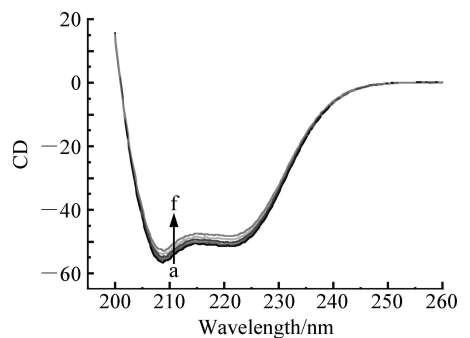


图 6 3-BrPA 与 HSA 相互作用的圆二色谱

Fig 6 HSA and 3-BrPA interaction CD spectra

5.0  $\mu\text{mol/L}$  HSA;  $C_{3\text{-BrPA}}$  (a-f): 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5  $\text{mmol/L}$ .

HSA 二级结构几乎没有改变, 只改变氨基酸所处的微环境。在把药物安全运输到肿瘤细胞的过程中, 3-BiPA 对 HSA 没有毒害作用。血液金属离子的存在促进了药物与蛋白质的结合, 使得药物在血浆中贮留时间延长, 达到缓释的目的, 减小药物的毒性<sup>[14]</sup>。3-BiPA 与血液中其它蛋白的相互作用有待于进一步研究, 从而深入研究它的毒理机制。

## References

- 1 Liu X H, Zheng X F, Wang Y L. *Chinese Medical Journal*, **2009**, 122(14): 1681~ 1685
- 2 Nelson K. *Lancet Oncology*, **2002**, 3: 524~ 524
- 3 Geschwind JF, Ko Y H, Torbenson M S, Magee C, Pedersen P L. *Cancer Research*, **2002**, 62: 3909~ 3913
- 4 ZHOU Neng(周能), LIANG Yi-Zeng(梁逸曾), WANG Ping(王平), LIU Shao(刘韶), WANG Bing(王兵), ZENG Mao-Mao(曾茂茂). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2001**, 29(7): 782
- 5 WU Qi-Hua(吴秋华), WANG Dong-Yue(王东跃), ZHOU Xin(周欣). *Spectroscopy and Spectral Analysis*(光谱学与光谱分析), **2009**, 29(7): 1911~ 1914
- 6 LN Lin(林琳), SUN Si-Yan(孙素颜), MU Xue(穆雪). *Journal of Analytical Science*(分析科学学报), **2007**, 23(6): 681~ 684
- 7 Kandagal P B, Ashoka S, Seetharanappa J. *Spectroscopic approach Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2006**, 41: 393~ 399
- 8 Paz S, Jose M R, Francisco G B. *Biophys Acta*, **2007**, 1774: 1359~ 1369
- 9 Yue Y Y, Zhang Y H, Li Y. *Journal of Luminescence*, **2008**, 128: 513~ 520
- 10 He W Y, Li Y, Si H Z. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **2005**, 174: 53~ 61
- 11 MAO Hu(毛慧), CAI Bing-Feng(蔡炳锋), ZHAO Bo(赵波). *Chemical Research and Application*(化学研究与应用), **2009**, 21(5): 675~ 679
- 12 FENG Yi-Ying(冯玉英), WU Xia-Hong(吴晓红), ZHOU Ji-Hong(周家宏). *Applied Chemistry*(应用化学), **2005**, 22(8): 895~ 898
- 13 SHAO Shuang(邵爽), QIU Jin(邱瑾). *Acta Physico-Chimica Sinica*(物理化学学报), **2009**, 25(7): 1342~ 1346
- 14 WU Ge-Hua(吴根华), WANG Jie(汪婕), CHEN Jin-Long(陈金龙). *Spectroscopy and Spectral Analysis*(光谱学与光谱分析), **2008**, 28(4): 913~ 916

## Spectroscopic Studies on Interaction Between 3-Bromopyruvic Acid and Human Serum Albumin

PEI Ming-Yan<sup>1</sup>, ZHENG Xue-Fang<sup>1,2</sup>, CAO Hong-Yu<sup>1,2</sup>, TANG Qian<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>(Liaoning Key Laboratory of Bioorganic Chemistry, Dalian 116622)

<sup>2</sup>(College of Biotechnology, Dalian University, Dalian 116622)

**Abstract** The interaction between 3-bromopyruvic acid (3-BiPA) and human serum albumin was studied using fluorescence spectroscopy synchronous fluorescence spectra UV-Vis and circular dichroism spectra. Static quenching was predominant between 3-BiPA and HSA, and non-radiation energy transfer between molecules was observed. The results showed that electrostatic force played an important role in the binding reaction. Synchronous fluorescence spectral results revealed that the binding of 3-BiPA induced conformational changes of tyrosine and tryptophan of HSA. 3-BiPA mainly interacted with the residues surrounding to the tyrosine. The further quenching phenomenon of the interaction between 3-BiPA and HSA induced by Zn<sup>2+</sup> was investigated with the application of fluorescence spectroscopy. The secondary structure of HSA was studied with the presence of 3-BiPA using CD spectra and the result proved that 3-BiPA had little influence on HSA.

**Keywords** 3-Bromopyruvic acid; Human serum albumin; Interaction; Fluorescence spectroscopy; Ultraviolet spectroscopy; Circular dichroism spectroscopy

(Received 30 November 2009; accepted 9 January 2010)