

光谱法研究纳米二氧化硅 (SiO₂) 催化超声波照射对牛血清白蛋白 (BSA) 的损伤

王君^{1,3}, 丁娜¹, 张朝红², 郭颖³, 王诗猷¹, 徐锐¹, 张向东¹

1. 辽宁大学化学学院, 辽宁 沈阳 110036

2. 辽宁大学环境学院, 辽宁 沈阳 110036

3. 辽宁大学药学院, 辽宁 沈阳 110036

摘要 利用紫外-可见 (UV-Vis) 光谱和荧光光谱研究了超声波照射激活纳米二氧化硅 (SiO₂) 粒子对牛血清白蛋白 (BSA) 分子的损伤, 并考查了超声波照射时间、纳米 SiO₂ 粉末加入量、溶液酸度和超声波照射功率等因素对 BSA 分子损伤程度的影响。结果表明, 对于体系温度为 (37.0 ± 0.2) 和浓度为 1.0 × 10⁻⁵ mol · L⁻¹ 的 BSA 溶液, UV-Vis 光谱显示, 随着超声波照射时间, 纳米 SiO₂ 粉末加入量, 溶液 pH 值和照射功率的增大呈现出越来越明显的增色效应。然而, BSA 溶液的荧光光谱却随着上述因素的增大呈现出越来越明显的猝灭现象。此外, 还初步探讨了超声波照射激活纳米 SiO₂ 粒子对 BSA 分子损伤的机理, 认为是声致发光或高热激发使纳米 SiO₂ 粒子产生 ·OH 自由基, 进而损伤溶液中的 BSA 分子。这一研究结果对声催化方法应用于临床治疗肿瘤以及纳米药物的开发具有一定的指导意义。

关键词 光谱法; 超声波照射; 纳米二氧化硅 (SiO₂); 牛血清白蛋白 (BSA); 损伤

中图分类号: O614.37, O657.3 **文献标识码**: A **DOI**: 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)04-1069-05

引言

近年来, 半导体光催化抗肿瘤的方法引起了人们的注意。但此方法也有一定的缺陷, 即紫外光对组织的烧伤以及穿透能力有限, 对于人体内深层肿瘤的治疗往往无能为力。而超声波具有极强的穿透能力, 对于人体组织一般可达 15 ~ 20 cm, 且聚焦技术成熟。采用超声波抑制和破坏肿瘤细胞, 尤其是治疗人体深层组织肿瘤已经引起了国内外学者的关注^[1]。由于血清白蛋白的重要性和易于分离、提纯而常被用作模型球蛋白^[2-5]。另外, 由于它含有色氨酸和酪氨酸等芳香氨基酸残基, 在紫外光激发下, 血清白蛋白分子具有较强的内源荧光发射, 研究某些物质对蛋白质的荧光猝灭, 对于获取蛋白质分子的信息很有意义^[6]。

纳米 SiO₂ 是一种无毒、无味、无污染的非金属纳米材料。此前我们曾研究了关于超声波照射下微米 TiO₂ 对牛血清白蛋白 (BSA) 损伤的研究^[7, 8], 由于 SiO₂ 比 TiO₂ 具有更高的安全性, 本次实验采用纳米 SiO₂ 代替微米 TiO₂, 探讨了在超声波照射下对 BSA 的损伤作用, 为进一步探索杀灭肿瘤细胞的新方法和推动纳米药物的研发提供有价值的参

考。

1 实验部分

1.1 仪器设备与试剂

超声波照射仪 (KQ-100 型, 频率 40 kHz, 功率 (可调) 10 ~ 50 W, 昆山市超声仪器有限公司)。实验过程中用温度计监测体系温度 (37.0 ± 0.2)。紫外-可见 (UV-Vis) 光谱仪 (Cary 50 型, 美国 VARIAN 公司); 荧光光谱仪 (Cary 300 型, 美国 VARIAN 公司); 台式高速离心机 (80-2B 型, 上海医用分析仪器厂)。

牛血清白蛋白 (BSA, 北京奥博星生物技术责任有限公司), 使用时未经进一步纯化, 在 0 ~ 4 ℃ 下溶于 NaCl-Tris-HCl 缓冲溶液配成浓度为 1.0 × 10⁻⁵ mol · L⁻¹ 的储备液, 准确浓度由 278 nm 处的吸光度确定; 纳米二氧化硅 (SiO₂) 粉末 (粒径 5 ~ 30 nm, 比表面积 (400 ± 30) m² · g⁻¹, 杭州万景新材料有限公司); NaCl-Tris-HCl 缓冲溶液 (pH 7.4, Tris-HCl 浓度为 50 mmol · L⁻¹, NaCl 浓度为 50 mmol · L⁻¹); 实验用水为二次蒸馏水。其余试剂为市售分析纯。

1.2 实验方法

收稿日期: 2007-10-08, 修订日期: 2008-01-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20371023) 和辽宁省教育厅自然科学基金项目 (20040018) 资助

作者简介: 王君, 1960 年生, 辽宁大学化学学院教授 e-mail: wangjun890@126.com

准确量取 4 份浓度为 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BSA 溶液 25 mL, 分别放入 4 个容量瓶中, 其中两个容量瓶中另外加入 0.025 g ($1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 高温活化后的纳米 SiO_2 粉末, 然后分别选择加入和未加入纳米 SiO_2 粉末的两个容量瓶放入超声波照射装置中, 另外两个则避光放置。照射或放置 3.0 h 后取样, 二次离心测定溶液的 UV-Vis 光谱和荧光光谱, 以此判断纳米 SiO_2 粒子与 BSA 分子的相互作用以及超声波照射下对 BSA 分子的损伤作用, 结果如图 1。另外, 改变超声波照射时间, 纳米 SiO_2 加入量, 溶液酸度, 超声波照射功率等影响因素, 考察对 BSA 分子损伤的影响, 结果分别如图 2 ~ 图 5。

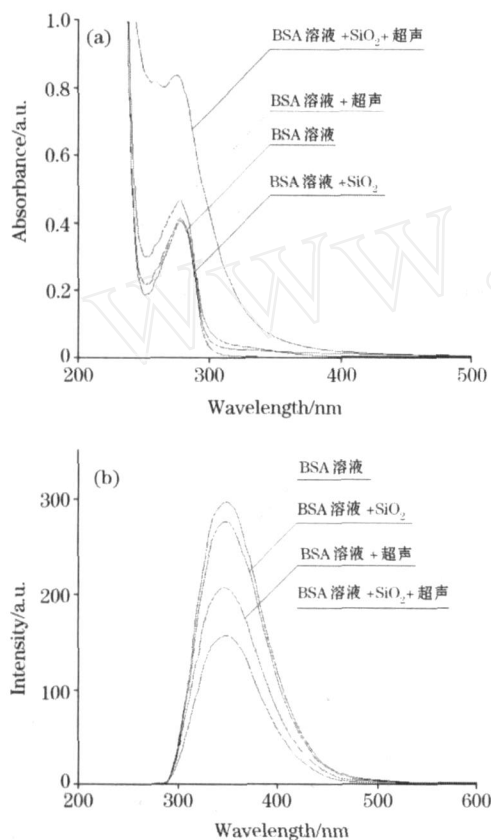


Fig 1 UV-Vis (a) and fluorescence (b) ($\lambda_{\text{ex}} = 282 \text{ nm}$) spectra of BSA solutions

2 结果与讨论

2.1 BSA 溶液的 UV-Vis 光谱和荧光光谱

从图 1(a) 看出, 与原液相比, 单纯超声波照射的 BSA 溶液的 UV-Vis 光谱表现出一定程度的增色效应。而在超声波照射下, 加入纳米 SiO_2 粉末的 BSA 溶液的 UV-Vis 光谱则表现出明显的增色效应。产生增色效应的原因主要是超声波照射激发纳米 SiO_2 粒子产生空穴和自由电子。这些空穴和自由电子与水分子反应生成高氧化活性的 $\cdot\text{OH}$ 自由基^[9], 进攻 BSA 分子中的二硫键, 氧化硫原子使其断裂^[8], 导致 BSA 分子二级结构的破坏, α -螺旋结构的减少, 芳香环暴露,

吸光度增强^[10]。没有超声波照射时, 单纯纳米 SiO_2 的加入使 BSA 溶液的吸光度微弱减色, 说明纳米 SiO_2 对 BSA 分子只有极小的吸附。

图 1(b) 表明同样的原因使 BSA 溶液的荧光强度从上到下依次为: 原液, 纳米 SiO_2 , 单纯超声波和超声波 + 纳米 SiO_2 , 超声波照射和纳米 SiO_2 的联合作用一方面使 BSA 分子中的荧光化合物 (如色氨酸和酪氨酸等残基) 破坏, 导致 BSA 溶液的荧光强度下降。另一方面使 BSA 分子结构变化, 破坏了 BSA 分子的荧光体系, 也使其荧光发生猝灭。

2.2 超声波照射时间对 BSA 分子损伤作用的影响

BSA 浓度 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 纳米 SiO_2 加入量 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 溶液 pH 值 7.4, 改变超声波照射时间 (0.0 ~ 5.0 h), 照射一定时间后取样测定 UV-Vis 光谱和荧光光谱, 结果如图 2。

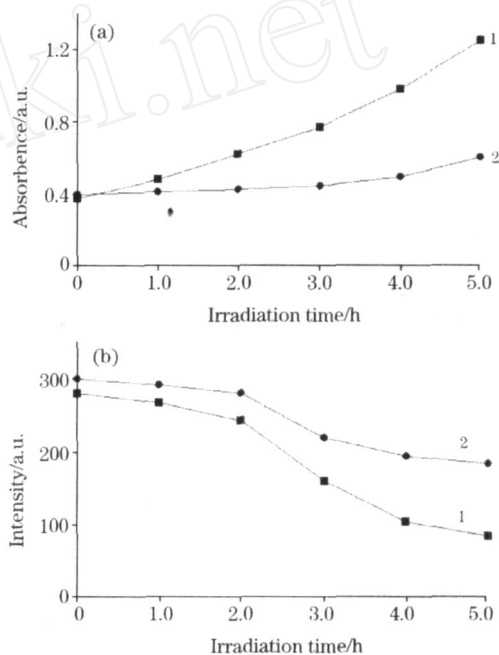


Fig 2 Influence of irradiation time on absorbance (a) ($\lambda_{\text{max}} = 278 \text{ nm}$) and intensity (b) ($\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$) of BSA solutions

1: BSA solution + nano-sized SiO_2 ;

2: BSA solution + ultrasound + nano-sized SiO_2

从图 2(a) 可以看出, 随着照射时间的延长, 加入纳米 SiO_2 的 BSA 溶液的增色效应呈现出不断增加的趋势, 而在单纯超声波照射下的 BSA 溶液的吸光度只是略有增加。这说明在纳米 SiO_2 粒子存在下, 随着照射时间的增加, BSA 分子结构的破坏越来越严重, 导致肽链伸展, 包围在 BSA 分子内部的色氨酸和酪氨酸残基的芳香环疏水基团不断地裸露出来^[11], 从而使吸收峰增强。而且照射时间越长, BSA 分子的损伤程度也越大。在单纯超声波照射下, BSA 溶液的吸光度仅有轻微增加, 说明单纯超声波照射不会对 BSA 分子造成明显的损伤。图 2(b) 表明, 在单纯超声波照射下, BSA 溶液荧光光谱表现出轻微的荧光猝灭。加入纳米 SiO_2 后荧光强度明显降低, 荧光猝灭现象更加明显。这说明随着 BSA 分

子的损伤, 这些具有内源性荧光的氨基酸残基也逐渐被破坏, 不再具有荧光性, 荧光强度也随之快速降低。

2.3 纳米 SiO₂ 粉末加入量对 BSA 分子损伤作用的影响

改变纳米 SiO₂ 加入量 (0.0 ~ 2.5 g · L⁻¹), 超声波照射 3.0 h, 其他条件同上。测定 BSA 溶液的 UV-Vis 光谱和荧光光谱。结果见图 3。

图 3(a) 显示在没有超声波的照射下, 即使纳米 SiO₂ 加入量增加, BSA 溶液的吸光度几乎没有变化。而在超声波照射下, 吸光度则明显增加。这说明由于 BSA 分子受损伤程度越来越严重。纳米 SiO₂ 粒子的增加, 会产生更多的 ·OH 自由基, 因而被破坏的 BSA 分子也就越多。从图 3(b) 也观察到, 没有超声波照射时, BSA 溶液的荧光强度随着纳米 SiO₂ 的增加而略微降低, 而在超声波照射下, BSA 溶液的荧光强度明显降低。但当加入量超过 1.5 g · L⁻¹ 时, BSA 溶液的荧光强度又略有升高。这是因为纳米 SiO₂ 加入量的不断增多, 导致 BSA 分子二级结构的彻底破坏, 荧光性的氨基酸残基完全暴露的结果。

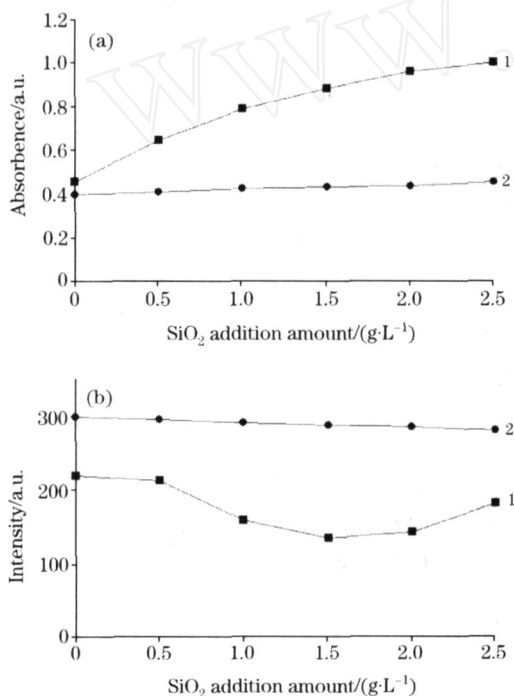


Fig 3 Influence of addition amount on absorbance (a) ($\lambda_{\max} = 278 \text{ nm}$) and intensity (b) ($\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$) of BSA solutions

1: BSA solution + ultrasound + nano-sized SiO₂ ;
2: BSA solution + ultrasound

2.4 溶液酸度对 BSA 损伤作用的影响

人体正常组织液的 pH 为 7.35 ~ 7.45, 但在细胞发生癌变时, 周围微环境中组织液的 pH 会发生微小的改变。考虑上述因素, 调节 BSA 溶液的 pH 值, 其他条件同上。测定 BSA 溶液的 UV-Vis 光谱和荧光光谱。结果见图 4。

从图 4(a) 可以看出, pH 值对单纯 BSA 溶液的吸光度影响不大, 只是略微升高。单独超声波照射下, 随着 pH 值的

升高 BSA 溶液的吸光度先降低后升高。但在超声波照射和纳米 SiO₂ 联合作用下, BSA 溶液的吸光度表现出先大幅度升高后小幅度降低的趋势。一般情况下, 单独超声波照射时, 由于酸性溶液中的 O₂ 和碱性溶液中的 OH⁻ 都容易形成 ·OH 自由基, 因此, 都容易导致 BSA 分子的损伤^[12]。纳米 SiO₂ 粒子存在时, 碱性溶液中也更容易产生 ·OH 自由基, 导致 BSA 分子的损伤, UV-Vis 光谱显示出明显的增色效应。与吸光度变化相对应, 图 4(b) 的荧光光谱显示出随着溶液 pH 值的升高, BSA 溶液荧光强度呈现出先降低后升高的趋势。这或许是 BSA 分子二级结构进一步破坏的表现。

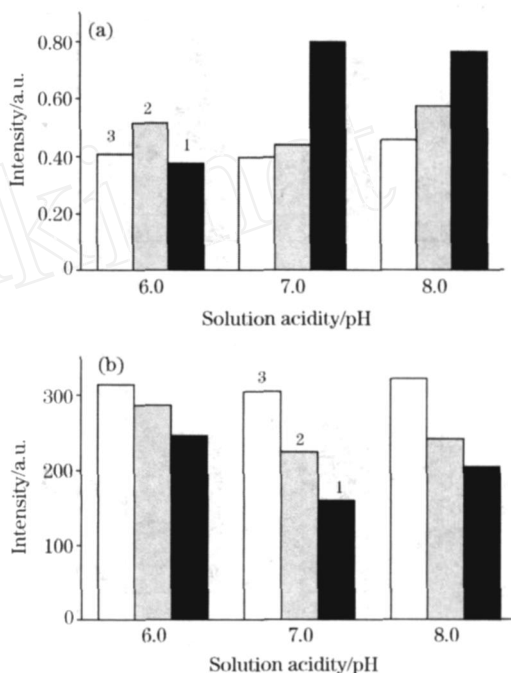


Fig 4 Influence of solution acidity on absorbance (a) ($\lambda_{\max} = 278 \text{ nm}$) and intensity (b) ($\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$) of BSA solutions

1: BSA solution + ultrasound + nano-sized SiO₂ ;
2: BSA solution + ultrasound; 3: BSA solution

2.5 超声功率对 BSA 损伤作用的影响

改变超声波照射功率 (10 ~ 50 W), 照射 3.0 h, 其他条件同上。测定 BSA 溶液的 UV-Vis 光谱和荧光光谱, 结果见图 5。

图 5(a) 表明单纯超声波照射时, 照射功率的增加能使 BSA 溶液的吸光度有一定程度的增加。而加入纳米 SiO₂ 时吸光度的增加更加明显。这是因为超声波照射强度增加到一定程度, 即达到或超过空化阈声压时, 就很容易产生空化气泡, 而且空化泡的溃陷也更为猛烈。因此, 随着功率增加, 空化效应增强, 产生 ·OH 自由基的能力加强, 对 BSA 分子的损伤也更严重。图 5(b) 则显示出随着照射功率的增加, 没有纳米 SiO₂ 粒子存在时, 荧光强度呈现上升趋势, 有纳米 SiO₂ 存在时, 荧光强度则呈现下降趋势。由此可见, 单纯超声波照射以破坏 BSA 分子的二级结构为主, 荧光性氨基酸残基裸露出来, 超声波照射和纳米 SiO₂ 粒子的协同作用则

以破坏 BSA 分子中的荧光性氨基酸残基为主。

2.6 超声波照射激活纳米 SiO₂ 粒子损伤 BSA 机理的探讨

蛋白质分子因为有特定的三维结构而表现出各种各样的生物活性。维持蛋白质空间构象的作用力主要有氢键、二硫键、疏水键、盐键和范德华力等。其中二硫键为共价键, 结合比较牢固, 对于稳定蛋白质构象和保持蛋白质活性具有重要作用。BSA 为球状蛋白, 结构的变化对疏水性氨基酸残基在 BSA 分子内外的分配产生影响, 从而改变蛋白质分子的表面疏水性^[13]。超声波照射激活纳米 SiO₂ 产生 ·OH 自由

基会进攻蛋白质分子中的二硫键, 氧化硫原子使二硫键断裂, 导致空间结构的破坏, 同时又改变蛋白质分子周围微环境的酸碱碱性, 进而削弱分子中的氢键。随着维系 α -螺旋的氢键作用的削弱, α -螺旋含量减少, 同时肽链身展, 包裹在分子内部的疏水性氨基酸(如色氨酸, 酪氨酸和苯丙氨酸等)残基暴露出来, UV-Vis 光谱表现为增色效应。另外, 随着荧光性物质(如色氨酸和酪氨酸等残基)的破坏, 荧光光谱则表现为猝灭现象。任何一种蛋白质分子在其自然状态或活性形式下, 都具有特征而稳定的三维结构, 一旦这种专一的空间结构遭到破坏, 其功能也会立即消失^[14]。

超声波照射的空化效应可以导致声致发光和高温。声致发光可以使纳米 SiO₂ 粒子发挥光催化剂的作用, 激发价带上的电子(e⁻)跃迁到导带, 从而在价带产生空穴(h⁺)。导带上的 e⁻ 和价带上的 h⁺ 分别与吸附在纳米 SiO₂ 粒子表面的 O₂ 和 H₂O 反应生成氧化性极强的 ·O₂⁻ 和 ·OH 自由基。另外, 超声波由于空化效应在水中产生的“热点”高达几千 K, 本身就可以产生 ·OH 自由基, 但效率较低^[15]。纳米 SiO₂ 粒子获得这部分能量后导致氧原子逃离晶格而产生空穴, 同样可以生成 ·OH 自由基^[16], 结果都会使 BSA 分子受到损伤。

4 结 论

利用 UV-Vis 光谱和荧光光谱研究了超声波照射激活纳米 SiO₂ 粒子对 BSA 分子的损伤。在超声波照射下, 纳米 SiO₂ 粒子可以产生空穴和自由电子, 进而与水分子反应生成高氧化活性的 ·OH 自由基, 导致 BSA 分子的损伤, UV-Vis 光谱呈现出增色效应, 荧光光谱呈现出荧光猝灭现象。BSA 分子的损伤程度随着超声波照射时间, 纳米 SiO₂ 加入量, 溶液 pH 值和照射功率等的增加而增大。由于纳米 SiO₂ 粒子被超声波照射激活后对蛋白质分子有明显的损伤作用有可能导致自然情况下细胞的凋亡, 在此基础上进行深入研究或许可以成为一种可行的肿瘤治疗方法。

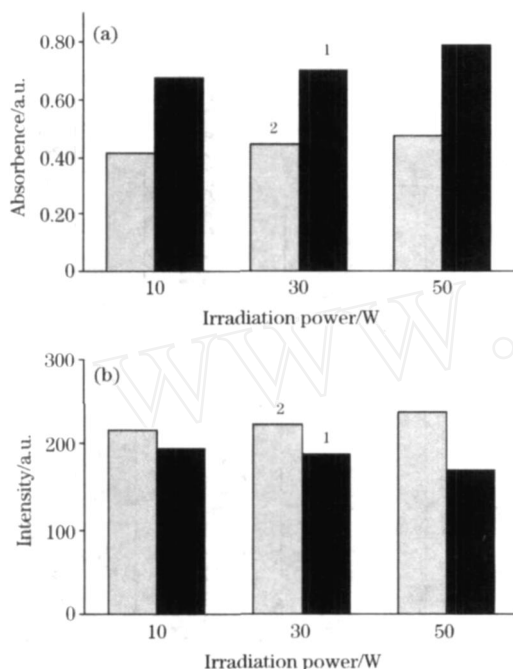


Fig 5 Influence of irradiation power on absorbance (a) ($\lambda_{\text{max}} = 278 \text{ nm}$) and intensity (b) ($\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$) of BSA solutions

1: BSA solution + ultrasound + nano-sized SiO₂ ;
2: BSA solution + ultrasound

参 考 文 献

- [1] Chen L, Rivens I, Terhaar H G, et al. *Ultrasound. Med. Biol.*, 1993, 19(1): 67.
- [2] Deep S, Ahluwalia J C. *Physical Chemistry and Chemical Physics*, 2001, 3(20): 4583.
- [3] Vasilescu M, Angelescu D, Almgren M, et al. *Langmuir*, 1999, 15(8): 2635.
- [4] Giancola C, DeSena C, Fessas D, et al. *Int. J. Biol. Macromol.*, 1997, 20(3): 193.
- [5] Saboury A A. *J. Chem. Thermodyn.*, 2003, 35(12): 1975.
- [6] Eftink M R, Ghivon C A. *Anal. Biochem.*, 1981, 114(2): 199.
- [7] WANG Jun, ZHAO Hong-dan, ZHANG Zhao-hong, et al (王君, 赵红丹, 张朝红, 等). *Chinese Journal of Inorganic Chemistry (无机化学学报)*, 2007, 23(3): 439.
- [8] WANG Jun, XU Liang, ZHANG Zhao-hong, et al (王君, 徐亮, 张朝红, 等). *Acta Chimica Sinica (化学学报)*, 2005, 63(20): 1921.
- [9] WANG Jun, WEN Fu-yu, ZHANG Zhao-hong, et al (王君, 温福宇, 张朝红, 等). *Environmental Science (环境科学)*, 2006, 27(6): 1134.
- [10] Hidaka H, Horikoshi S, Ajisaka K, et al. *J. Photochemistry and Photobiology A: Chem.*, 1997, 108(2-3): 197.
- [11] ZHANG Zhao-hong, DONG Dian-bo, ZHAO Zhe, et al (张朝红, 董殿波, 赵哲, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析)*, 2007, 27(2): 309.

- [12] YUE Lin-hai, ZHOU Yong-qiu(岳林海, 周永秋). Environmental Pollution & Control (环境污染与防治), 1998, 20(3): 5.
- [13] WEI Xiao-fang, DING Xi-ming, LIU Hui-zhou(魏晓芳, 丁西明, 刘会洲). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2000, 20(4): 556.
- [14] Al-Ekabi H, Serpone N. J. Phys. Chem., 1988, 92(20): 5726.
- [15] Kruus P, Burk R, Entezari M, et al. Ultrason. Sonochem., 1997, 4(3): 229.
- [16] Augugliaro V, Palmisano L, Sclafani A, et al. Toxicological Environ. Chem., 1988, 16(2): 89.

Investigation on Damage of Bovine Serum Albumin (BSA) Catalyzed by Nano-Sized Silicon Dioxide (SiO₂) under Ultrasonic Irradiation Using Spectral Methods

WANG Jun^{1,3}, DING Na¹, ZHANG Zhao-hong², GUO Ying³, WANG Shi-xian¹, XU Rui¹, ZHANG Xiang-dong¹

1. Department of Chemistry, Liaoning University, Shenyang 110036, China
2. Department of Environment, Liaoning University, Shenyang 110036, China
3. Department of Pharmacy, Liaoning University, Shenyang 110036, China

Abstract The damage of bovine serum albumin (BSA) molecules under ultrasonic irradiation in the presence of nano-sized silicon dioxide (SiO₂) particles was studied by UV-Vis and fluorescence spectra. In addition, the influences of ultrasonic irradiation time, nano-sized SiO₂ addition amount, solution acidity (pH) and ultrasonic irradiation power on the damage of BSA molecules in aqueous solution were also detected. For BSA solution of $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ at $(37.0 \pm 0.2)^\circ\text{C}$, the UV-Vis spectra of BSA solutions showed that the absorption peaks of BSA displayed obvious hyperchromic effect with the increase in some influence factors such as ultrasonic irradiation time, nano-sized SiO₂ addition amount, pH value and ultrasonic irradiation power. However, the fluorescence spectra of BSA solutions showed the phenomenon of fluorescence quenching with the increase in ultrasonic irradiation time, nano-sized SiO₂ addition amount, pH value and ultrasonic irradiation power. Moreover, the possible mechanism behind the damage of BSA molecule in the presence of nano-sized SiO₂ powders under ultrasonic irradiation was discussed. It was considered that the damage of BSA molecules was attributed to the formation of $\cdot\text{OH}$ radicals resulting from the sonoluminescence and high-heat excitation of ultrasonic cavitation. The research results could be of great significance to using sonocatalytic method to treat tumour in clinic application and for developing nano-sized drug in the future.

Keywords Spectral methods; Ultrasonic irradiation; Nano-sized silicon dioxide(SiO₂); Bovine serum albumin (BSA); Damage

(Received Oct. 8, 2007; accepted Jan. 12, 2008)