

牛血红蛋白与纳米雄黄相互作用的光谱研究

韦 静, 沈星灿, 梁 宏*, 梁宇宁

广西师范大学化学化工学院, 药用资源化学与药物分子工程省部共建重点实验室, 广西 桂林 541004

摘 要 采用紫外-可见吸收光谱、荧光光谱研究牛血红蛋白(bovine hemoglobin, 简称BHb)与纳米雄黄的相互作用。从紫外-可见吸收光谱可观察到,随着纳米雄黄浓度的增加,牛血红蛋白406 nm附近的特征Soret吸收带红移至413 nm,且强度逐渐降低。强度的降低表明纳米雄黄可能使部分血红素辅基逐渐从它们的键腔中脱离出来。特征峰位的红移推测为纳米雄黄中的砷结合了血红蛋白中的氧,诱导血红蛋白脱氧,变成脱氧血红蛋白,其构象由R态转变成T态。由荧光光谱研究可以得出随着纳米雄黄浓度的增加,牛血红蛋白338 nm处的荧光强度逐渐减弱,Sterr-Volmer方程分析表明,纳米雄黄静态猝灭牛血红蛋白的内源荧光。紫外-可见吸收光谱与荧光光谱的计算结果均表明,牛血红蛋白与纳米雄黄的结合常数 k 的数量级达到 10^9 。

关键词 血红蛋白; 纳米雄黄; 紫外-可见吸收光谱; 荧光光谱

中图分类号: O613.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-0593(2008)04-0852-04

引 言

雄黄是我国传统的矿物中药,用于解毒,消肿,杀虫,在我国第一部药物专著《神农本草经》中已有记载。近年研究发现,雄黄可用于临床治疗白血病^[1],诱导癌细胞凋亡^[2]。粒径在纳米尺寸的雄黄颗粒,对肿瘤细胞S180、上皮细胞EG-304等的细胞毒性及诱导是一个关键问题。胞凋亡作用有明显的尺寸效应^[3]。雄黄纳米化后,其药物活性及生物利用度可能得到大幅度提高。纳米雄黄的潜在药效引发人们对含砷药物生理、毒理作用的高度关注。研究纳米雄黄与生物大分子间的相互作用,了解纳米雄黄对生物大分子的结构、功能的影响是其中血红蛋白(hemoglobin, Hb)以血红素作为辅基,是红细胞中的呼吸蛋白。血红蛋白结合氧时采取高亲氧态(R态)构象,脱氧时采取低亲氧态(T态)构象,该结构效应有利于其载氧功能的发挥。对血红蛋白的结构与功能、电化学行为、血红蛋白与小分子及金属离子的相互作用等方面已有大量的研究^[4-10]。而血红蛋白与纳米粒子相互作用研究鲜见报道^[11]。我们曾研究了血红蛋白与银纳米粒子的相互作用,发现银纳米粒子表面与血红蛋白有高亲和性和生物相容性^[11]。本工作运用紫外-可见吸收光谱、荧光光谱研究了牛血红蛋白与纳米雄黄的相互作用,分析了纳米雄黄猝灭

牛血红蛋白内源荧光的机理,报道了两者的结合常数达到 10^9 ,并发现纳米雄黄能诱导牛血红蛋白脱氧,使牛血红蛋白构象由R态转变成T态。该工作有助于了解纳米雄黄与生物大分子的作用机理,及其生理和毒理效应。

1 实验部分

1.2 试剂

牛血红蛋白(Sigma公司,进口分装),用时未经进一步纯化,溶于pH 7.43的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲溶液($0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)中,浓度由 $\lambda_{406\text{nm}}$ 处的摩尔吸光系数($\epsilon=41\,000\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)来确定^[12]。药用矿物雄黄,购置于桂林市医药公司,其他试剂均为国产分析纯,所有溶液均用二次去离子水配制。

1.3 样品制备与测试

矿物雄黄,经预处理^[13],采用化学法制备纳米雄黄溶胶^[14]。Nova200场发射扫描电子显微镜(荷兰FEI公司)观测其粒径与形貌。在10 mL比色管中,依次加入1 mL浓度为 $1.0\times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的牛血红蛋白溶液、不同量的新鲜配制的纳米雄黄胶体,用缓冲溶液稀释至刻度,室温反应16 h。以同浓度的纳米雄黄溶胶作为参比,用1 cm石英池,在Cary 100紫外-可见分光光度计记录紫外吸收光谱(美国,

收稿日期: 2007-01-28, 修订日期: 2007-05-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(20261001, 2070101), 广西青年科学基金项目(0339022, 0728094), 高校青年骨干教师奖励计划项目和广西壮族自治区研究生教育创新计划项目资助

作者简介: 韦 静,女,1979年生,广西师范大学化学化工学院教师 * 通讯联系人 e-mail: xcshen@mailbox.gxnu.edu.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Varian 公司)。280 nm 波长激发, 在 RF-5310PC 型荧光分光光度计(日本, Shimadzu 公司), 测定体系的荧光发射光谱。

2 结果与讨论

2.1 雄黄的性质和表征

扫描电镜测试结果显示, 纳米雄黄接近球形, 平均粒径为 27.7 nm, 分布较均匀(图 1)。雄黄为单斜晶系, 晶胞体积 $V = 0.799 \text{ nm}^3$, 且每个晶胞中含有的雄黄分子个数 Z 为 4 个^[15]。对粒径为 $d \text{ nm}$ 的球形雄黄纳米粒, 其中含雄黄分子数可按式计算

$$n = Z \cdot \left(\frac{\pi}{6} \right) \cdot \frac{d^3}{V} \quad (1)$$

雄黄胶体中雄黄纳米粒的浓度 $[Q]$ 可通过下式计算

$$[Q] = \frac{[As]}{n} \quad (2)$$

当 As 浓度为 $0.01122 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 根据上面两式可计算雄黄纳米粒的浓度 $[Q]$ 为 $1.98 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

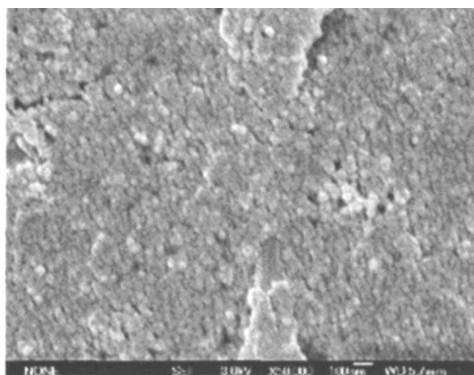


Fig 1 SEM image of realgar nanoparticle

2.2 紫外吸收光谱

等量的 BHb 溶液与不同量的纳米雄黄作用, 用相同条件下的纳米雄黄溶胶作参比, 分别测体系吸收光谱的变化, 结果见图 2。在 406 nm 附近出现的强吸收峰为 Soret 带, 是氧合血红蛋白中血红素辅基与氨基酸残基间的 $\pi-\pi^*$ 跃迁带^[4], 文献报道^[16] 血红蛋白在该处出现吸收峰属于 R 态, 即高亲氧态; 而在 417 nm 附近^[4] 出现吸收峰归属为 T 态, 即低亲氧态。由图 2 可见, 随着纳米雄黄浓度逐渐增大, Soret 带吸收强度逐渐降低, 且位置由 406 nm 逐步红移至 413 nm。Soret 带的红移说明纳米雄黄可能诱导氧合血红蛋白发生脱氧, 推测为纳米雄黄中的砷结合了血红蛋白中的氧, 使血红蛋白释放氧, 其构象从 R 态转变为 T 态。406 nm 吸收强度降低, 是由于 BHb 吸附于纳米雄黄表面, 可能使部分血红素辅基逐渐从它们的键腔中脱离出来。由 Soret 带的吸收强度估计血红蛋白中血红素辅基与纳米雄黄的结合常数, 可根据方程式(3)进行数据处理^[8]

$$A_0/\Delta A = A_0/\Delta A_{\max} + A_0/\Delta A_{\max} \cdot 1/K \cdot 1/[Q] \quad (3)$$

其中, $\Delta A = A_0 - A$; A_0 为 BHb 本身的吸收强度, A 是 BHb 与纳米雄黄作用后的吸收强度; $\Delta A_{\max}$ 为吸收值的最大变化; $[Q]$ 为纳米雄黄的浓度; K 为结合常数。由 $A_0/\Delta A$ 对 $1/[Q]$

作图(图 3), 由直线斜率与截距 $A_0/\Delta A_{\max}$ 之比求得 BHb 与纳米雄黄的结合常数 $K = 5.97 \times 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

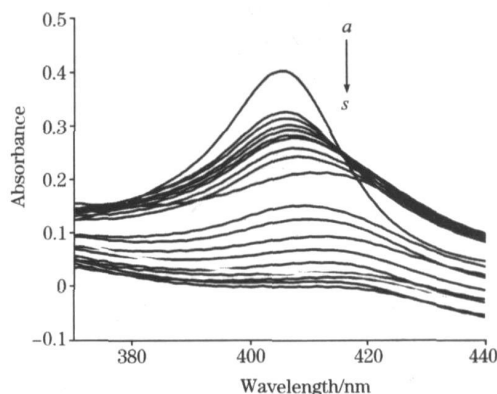


Fig. 2 Effect of concentrations of realgar nanoparticles on UV-Vis spectra of BHb

The concentration of BHb is $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; The concentrations of realgar nanoparticles $a \rightarrow s$ are: 0.64, 1.28, 1.92, 2.56, 3.20, 3.84, 5.12, 6.40, 12.81, 15.37, 17.93, 20.5, 23.06, 25.62 $\times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively

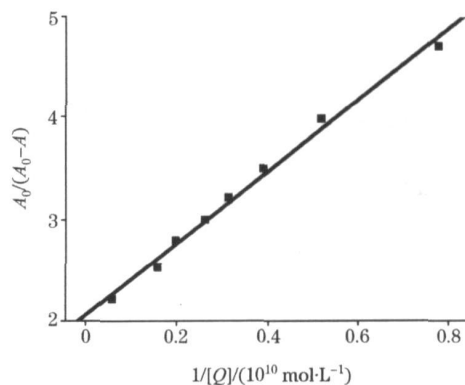


Fig. 3 Plot of $A_0/\Delta A$ versus $1/[Q]$

2.3 荧光猝灭与结合常数

在 280 nm 光激发下, 血红蛋白其发射光谱有 3 个谱带^[17]: 338 nm 谱带主要为色氨酸、酪氨酸芳香氨基酸残基的荧光信号; 430~470 nm 荧光发射, 其归属目前尚不清楚; 650 nm 谱带是血红素辅基的宽带发射。如图 4 所示, BHb 与纳米雄黄作用, 随纳米雄黄浓度增大, BHb 在 338 nm 处发生明显的荧光猝灭, 其强度持续降低。用 Stern Volmer 方程^[18], 对荧光猝灭机理进行分析

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (4)$$

式中 F_0 和 F 分别是加入猝灭剂 Q 前后的荧光强度; K_q 为双分子碰撞猝灭常数; τ_0 为生物分子的荧光寿命; $[Q]$ 为猝灭剂纳米雄黄的浓度; K_{sv} 为 Stern Volmer 猝灭常数, 并有

$$K_{sv} = K_q \tau_0 \quad (5)$$

由(4)式, 对 338 nm 处的荧光数据进行处理, 以 F_0/F 对纳米雄黄浓度 $[Q]$ 作图, 有良好的线性关系(图 5), 根据直线的斜率求得猝灭常数 K_{sv} 为 $1.77 \times 10^8 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。由于生物

大分子的荧光寿命约为 10^{-8} s^[18], 由 (5) 式求得表观猝灭常数 K_q 为 1.77×10^{16} L · mol⁻¹ · s⁻¹, 该值远远大于猝灭剂对生物大分子的最大扩散猝灭常数 2.0×10^{10} L · mol⁻¹ · s⁻¹^[18], 由此说明该荧光猝灭机理为静态猝灭。BHb 与纳米雄黄作用后形成了复合物。

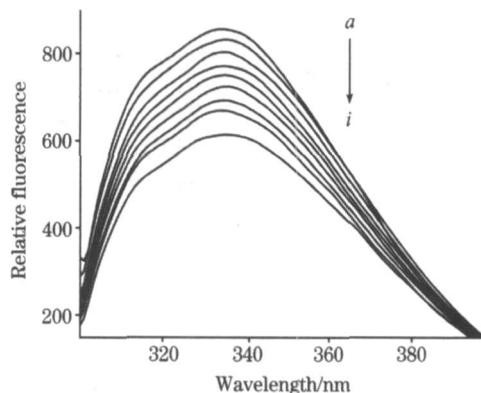


Fig. 4 Effect of realgar nanoparticles concentrations on the fluorescence spectra of BHb

The concentration of BHb is 1.0×10^{-6} mol · L⁻¹; The concentrations of realgar nanoparticles a→i are: 0, 0.64, 1.28, 1.92, 2.56, 6.40, 12.81, 20.5, 39.56×10^{-10} mol · L⁻¹, respectively

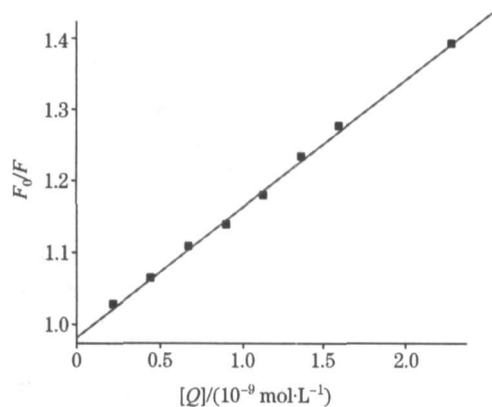


Fig. 5 Stern-Volmer plot of the fluorescence quenching

当荧光物质与猝灭剂之间形成复合物发生静态猝灭时, 服从 Lineweaver Burk 方程^[18]

$$(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + K^{-1}F_0^{-1}[Q]^{-1} \quad (5)$$

F_0 和 F 分别是加入猝灭剂 Q 前后的荧光强度, K 为结合常数, $[Q]$ 为猝灭剂纳米雄黄的浓度。根据所得荧光数据, 由 (4) 式作 BHb 荧光强度与纳米雄黄浓度的双倒数图, 即以 $(F_0 - F)^{-1}$ 对 $[Q]^{-1}$ 作图, 得图 6。由直线斜率和 F_0 , 可求得 BHb 与纳米雄黄的结合常数 K 为 4.64×10^9 L · mol⁻¹, 与紫外-可见吸收光谱数据计算的结果接近。研究报道, 金属离子、药物及小分子与蛋白质的结合常数的数量级通常为 $10^3 \sim 10^6$ ^[18], 而 BHb 与纳米雄黄结合常数的数量级达到 10^9 。可见 BHb 与纳米雄黄的作用比一般小分子与生物大分子间的作用强。

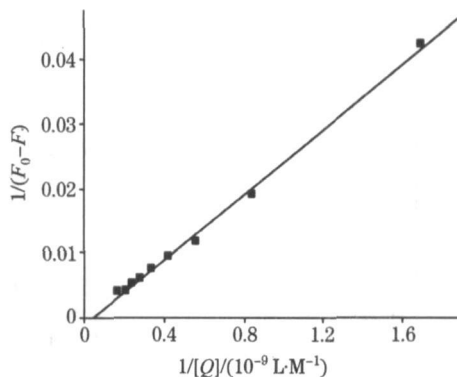


Fig. 6 Lineweaver Burk plot of the fluorescence quenching

3 结 论

通过紫外-可见吸收光谱和荧光光谱的研究, 结果表明: 纳米雄黄与 BHb 作用的结合常数的数量级达到 10^9 , 比普通的小分子与蛋白质的结合常数大。纳米雄黄使 BHb 由 R 态转变成 T 态; 静态猝灭 BHb 的内源荧光, 并扰动 BHb 芳香氨基酸所处的微环境。两者作用后可能形成了复合物。该研究为纳米雄黄应用于生物领域提供了一定的理论基础, 但有关纳米雄黄对 BHb 的载氧功能还有待进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Lu D P, Wang Q. International Journal of Hematology, 2002, 76: 316.
- [2] Ye H Q, Gan L, Yang X L, et al. Journal of Ethnopharmacology, 2006, 103: 366.
- [3] Deng Y, Xu H, Huang K, et al. Pharmacological Research, 2001, 44: 513.
- [4] Zhu, Y C, Cheng G J, Dong S J. Biophys. Chem., 2002, 97: 129.
- [5] Cheng Y, Lin H K, Xue D P, et al. Biochim. Biophys. Acta 2001, 1535: 200.
- [6] Chen H Y, Long Y T. Anal. Chim. Acta, 1999, 382: 171.
- [7] Cheng Y, Li Y, Li R C, et al. Chemico-Biological Interactions, 2000, 125: 191.
- [8] Sil S, Kar M, Chakraborti A S. J. Photochem. Photobiol. B: Biology, 1997, 41: 67.
- [9] CEN Shan, ZHANG Ren, YAO Wenhua, et al(岑 剡, 张 人, 姚文华, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(3): 405.
- [10] RUAN Ping, HUANG Ya-xiong, LI Dan(阮 萍, 黄耀熊, 李 丹). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(7): 1121.
- [11] SHEN Xing-can, LIU Xiryan, LIANG Hong, et al(沈星灿, 刘新艳, 梁 宏, 等). Acta Chimica Sinica(化学学报), 2006, 64(6): 469.
- [12] LIU H H, TIAN Z Q, LU Z X, et al. Biosen. Bioelectr., 2004, 20: 295.
- [13] NIU Qir-ya, CHEN Weiping, TIAN Yizhuang, et al(牛秋雅, 陈维平, 田一庄, 等). Environmental Protection of Chemical Industry(化工环保), 2002, 22(3): 169.
- [14] SHEN Xing-can, LIANG Hong, CHEN Yun, et al(沈星灿, 梁 宏, 陈 韵, 等). China Patent, 200510020488.5, 2005.
- [15] Karen T, Leon S. Anal. Chem., 1996, 68: 1755.
- [16] Faulkner K M, Bonaventura C, Crumbliss A L. Inorg. Chim. Acta, 1994, 226: 187.
- [17] ZUO Zhi-Ying, BO Yurong, YANG Xiaoda, et al(左智颖, 薄云红, 杨晓达, 等). Journal of Rare Earths(中国稀土学报), 1996, 14(4): 336.
- [18] CHANG Xijun, HUANG Yan, HE Qun(常希俊, 黄 艳, 贺 群). Acta Chimica Sinica(化学学报), 2005, 63(3): 222.

Spectroscopic Studies on Interaction of Bovine Hemoglobin and Realgar Nanoparticles

WEI Jing, SHEN Xing-can, LIANG Hong^{*}, LIANG Yurong

College of Chemistry and Chemical Engineering, Key Laboratory of Medicinal Chemical Resources and Molecular Engineering, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China

Abstract In the present paper, the interaction of bovine hemoglobin (BHb) and realgar nanoparticles has been investigated by ultraviolet visible (UV-Vis) and fluorescence spectroscopy. The Soret band of oxygen BHb at 406 nm shifted to 413 nm, and its absorption intensity decreased gradually after adding realgar nanoparticles. The Soret band decreases gradually with the increasing the amount of realgar NPs, suggesting the detachment of some heme chromophores from their matrixes in BHb. The red-shift of characteristic peak leads to be conjecture that the arsenic of realgar combined with the oxygen of BHb. The oxygen BHb was deoxidated by realgar nanoparticles, and the surface binding induces conformation change of BHb from the high affinity R state to the low affinity T state. The fluorescence intensity of BHb is quenched by realgar nanoparticles when its concentration gradually increased. The analysis of Stern-Volmer equation revealed that the mechanism was a static quenching procedure. The order of the magnitude of binding constant k was 10^9 , obtained from the calculation of UV-Vis and fluorescence spectra.

Keywords Hemoglobin; Realgar nanoparticles; Ultraviolet-visible absorption spectrum; Fluorescence spectrum

(Received Jan. 28, 2007; accepted May 6, 2007)

* Corresponding author