

光谱法研究 FCLA 与人血清白蛋白的相互作用

周 静, 魏言春*

华南师范大学激光生命科学研究所, 激光生命科学教育部重点实验室, 广东 广州 510631

摘 要 在生物学和医学中活性氧的检测非常重要。海萤荧光素类似物 FCLA 是检测单态氧($^1\text{O}_2$)和超氧阴离子(O_2^-)的一种高灵敏的化学发光探针。文章用光谱法研究了 FCLA 与人血清白蛋白(HSA)的结合反应,发现 FCLA 对 HSA 的荧光有很强的猝灭作用。从荧光猝灭结果求得了 FCLA 与 HSA 的结合位点数。根据 Förster 非辐射能量转移机理探讨了二者相互结合时其给体-受体间的距离和能量转移效率,从而证实了它们的结合作用为静态猝灭过程。阐明了由于能量转移所导致的 HSA 荧光的猝灭及 FCLA 荧光的产生机理。通过光谱法对 FCLA 与 HSA 的相互作用的研究,阐明 FCLA 的运输过程及其在体内的作用机制,对实现利用探针在体检测活性氧具有一定的意义,同时也为药物动力分析、体内药物转运的研究提供了基础。

关键词 FCLA; 人血清白蛋白; 荧光猝灭; 结合反应

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2007)11-2287-04

引 言

在生物学和医学中活性氧的检测非常重要。已经发现这些活性氧参与了生物细胞的信号转导,扩张血管,杀灭入侵的微生物,攻击病变的肿瘤细胞等生理功能;同时这些活性氧也与动脉粥样硬化,神经退行性病变,肿瘤等疾病的发生发展及衰老过程密切相关^[1]。海萤荧光素类似物(Cypridina luciferin analog)类化学发光探针(CLA, MCLA, FCLA)是检测单态氧($^1\text{O}_2$)和超氧阴离子(O_2^-)的优秀的化学发光探针^[2-5]。该类化学发光探针可以高灵敏度、高选择性地检测 $^1\text{O}_2$ 与 O_2^- ,这对于高效而方便的检测生物体系中的活性氧自由基是非常有利的。而光动力学疗法(photodynamic therapy, PDT)是一种正在研究发展中的治疗恶性肿瘤的新技术^[6]。这种疗法主要通过产生单态氧($^1\text{O}_2$)来引起蛋白质、脂类、核酸和其它细胞组分的损伤,破坏大量细胞,最终导致肿瘤细胞的坏死^[7],利用 FCLA 与 PDT 过程中生成的单态氧反应产生的化学发光可以进行肿瘤的光动力诊断及实时监控 PDT 的疗效^[8,9]。声致发光、声动力学治疗研究是 90 年代以来声学界和物理学界的热门课题之一。利用声敏剂对肿瘤进行定位并结合 FCLA 对活体瘤裸鼠可以进行声致化学发光成像,达到声动力学诊断肿瘤的目的^[10,11]。对于人体中的药物输送蛋白人血清白蛋白(HSA),它能和许多外源

性、内源性的物质广泛结合^[12-14]。HSA 也是一种有效的单态氧猝灭剂^[15],在 FCLA 溶液中加入 HSA, FCLA 的化学发光有很大程度的增强^[16]。因此研究 FCLA 与 HSA 的相互作用具有十分重要的意义。本文应用光谱法研究了在 pH 7.4 的条件下 FCLA 与 HSA 的结合反应,这对阐明 FCLA 的运输过程及其在体内的作用机制具有一定的意义,可为药物动力分析、体内用药提供参考基础。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

FCLA (sodium salt, Tokyo Kasei Kogyo Co., Tokyo, Japan) 用双蒸水稀释到 $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度储存在 -80 的温度下备用。HSA (purity > 96%, Sigma, St. Louis, MO) 用双蒸水配置成 $5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度储存在 4 下备用。

荧光光谱利用 LS-55 型荧光分光光度计 (Perkin Elmer, Shelton, USA) 进行测量。吸收光谱用 Lambda 35 UV/Vis 型分光光度计测量 (Perkin Elmer, Shelton, USA)。

1.2 实验方法

将一定浓度的 HSA ($2.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和不同浓度的 FCLA ($0 \sim 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 混合成 0.6 mL 的溶液置于石英比色皿中,溶液的 pH 值调为 7.4。然后用 279 nm 的光激

收稿日期: 2006-08-28, 修订日期: 2006-11-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (60378043; 30470494), 广东省自然科学基金项目 (015012; 04010394) 及广东省科技计划项目 (2004B10401011) 资助

作者简介: 周 静, 女, 1975 年生, 华南师范大学激光生命科学研究所硕士研究生 *通讯联系人 e-mail: weiyanchun@sncu.edu.cn

发, 测量 288 ~ 550 nm 的荧光发射光谱。入射和出射狭缝均为 6 nm。同时测量 $2.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FCLA 的吸收光谱。所有的实验都在室温下进行。

2 结果与讨论

2.1 FCLA 与 HSA 结合反应的荧光猝灭机理

为了分析 FCLA-HSA 的相互作用和缔合的情况, 研究了 FCLA 对 HSA 荧光猝灭的化学计算。图 1 表明, 在加入不同浓度的 FCLA 以后, 通过 279 nm 的光激发, HSA 在 337 nm 的荧光成比例的下降。在 279 nm 的激发下, FCLA 无荧光发射。因此, 该研究中不用考虑“内滤光效应”的干扰问题。

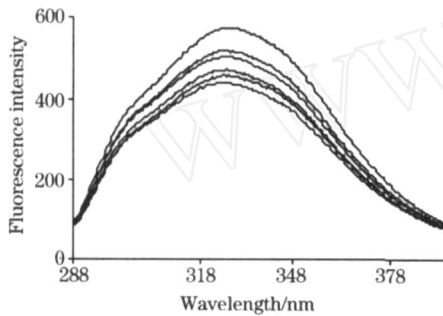


Fig 1 Fluorescence quenching spectra of HSA as FCLA is added $\lambda_{\text{ex}} = 279 \text{ nm}$

HSA 的荧光能够被猝灭的原因有很多, 不考虑 HSA 荧光的自我猝灭的机制, HSA 的荧光还有可能由于其他的原因猝灭, 比如动态猝灭、静态猝灭和非辐射能量转移。考虑到加入 HSA 溶液中的 FCLA 的体积很小, 其对溶液的稀释作用可以忽略。动态猝灭是由分子间的物理碰撞引起的, 可以由 Stern-Volmer 等式来描述

$$\frac{F_0}{F} - 1 = k_q \cdot \tau_0 [Q] = K_D [Q]^{[17]}$$

式中 F_0 和 F 是 HSA 在不加和加猝灭剂 (FCLA) 的情况下的相对荧光值, k_q 是猝灭常数。 τ_0 是没有猝灭剂的情况下 HSA 的激发态寿命, 对于大分子而言一般为 $10^{-8} \text{ s}^{[18]}$ 。 K_D 为 Stern-Volmer 常数。利用图 2 可以计算得到猝灭常数 k_q 为 $1.31 \times 10^{13} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 这个值远大于生物分子的极限猝灭常数 $2 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 因此动态猝灭不是荧光猝灭的主要原因^[19,20]。静态猝灭主要是由于分子间形成了不发荧光或弱荧光的缔合物所引起。根据蒋敏等的文献, 如果生物分子 Q 有 n 个缔合位点在蛋白上, 那么 HSA 的相对荧光强度 F_0 和 F (分别为不加 Q 或加 Q 的相对荧光值) 以及 Q 的浓度满足下面等式^[21]:

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_A + n \lg [Q]$$

式中 $[Q]$ 在本实验中为 FCLA 浓度。当探针蛋白的浓度比小于或等于 1 的时候, $\lg \frac{F_0 - F}{F}$ 与 $\lg [Q]$ 成线性关系 ($r = 0.99$, $P = 0.001$) (见图 3), 直线的斜率 (即缔合位点数) 为 0.98,

意味着 FCLA 在 HSA 上有一个结合位点。

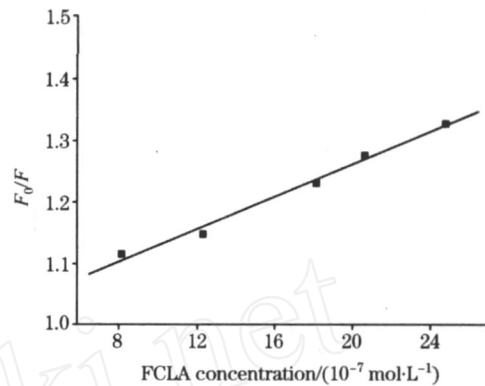


Fig 2 Relationship curve between $F - F_0 / F$ and c_{FCLA} with $\lambda_{\text{ex}} = 279 \text{ nm}$, when the fluorescence of HSA was quenched by FCLA

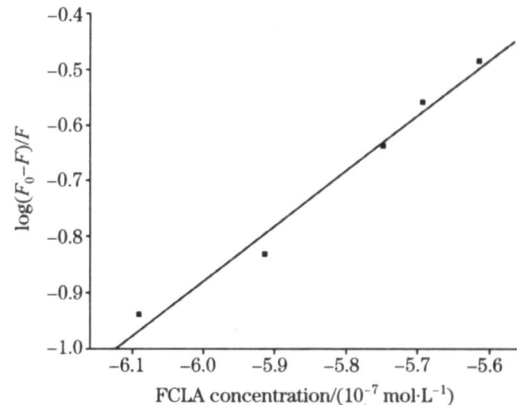


Fig 3 Logarithmic plot of fluorescence quenching of HSA treated with different FCLA concentrations, $\lambda_{\text{ex}} = 279 \text{ nm}$

2.2 FCLA 在 HSA 分子上结合位置的求取

按照 Förster 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 相关^[22,23]:

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

式中 F 为能量给体和受体为 1:1 时能量给体的荧光强度, F_0 为未加入受体时给体的荧光强度, 这里 R_0 是 $E = 50\%$ 时的临界距离:

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

式中 K^2 为偶极空间取向因子, N 为介质的折射指数, 为猝灭体不存在时荧光体的量子产率, J 为蛋白质荧光发射光谱与受体吸收光谱间的光谱重叠积分, 可表示为:

$$J = \int \frac{F(\lambda)^4}{F(\lambda)} d\lambda \quad (3)$$

式中 F 为荧光给体在波长 λ 处的荧光强度, ϵ 为猝灭体在波长 λ 处的摩尔消光系数。只要得知 E , K^2 , 和 N , 并通过实测光谱求出重叠积分 J , 即可算出 R_0 和 r 。

图 4 为 FCLA 的吸收光谱和 HSA 的荧光发射光谱的重叠图, 将图中的光谱重叠部分分割成极小的矩形, 按照积分公式 (3) 求出重叠积分 J 。在实验条件下, 取向因子取供体-

受体各向随机分布的平均值 $K^2 = 2/3$, 折射指数取 $N = 1.33$, HSA 中色氨酸残基量子效率 $\phi = 0.118^{[24]}$, 将上述各量代入式 (2), 求得 R^0 约 1.2 nm, 结合荧光结果计算出能量转移效率 $E = 23.7\%$, 用式 (1) 计算得 r 约 1.4 nm.

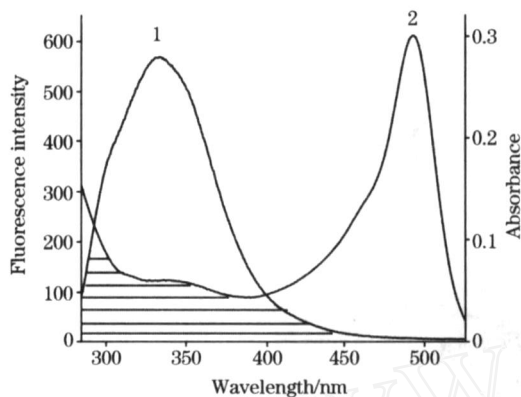


Fig 4 Fluorescence spectrum of HSA (1) and absorbance spectrum of FCLA (2) at 1:1 FCLA/HSA concentration ratio

2.3 FCLA 与 HSA 之间的非辐射能量转移光谱

FCLA 在 HSA 上的结合位点与 HSA 分子中唯一的色氨酸残基 Trp214 的距离 $r < 7$ 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。图 5 为 FCLA 与 HSA 之间的非辐射能量转移荧光光谱, 随着 HSA 荧光的下降, 能量转移给 FCLA, 导致 FCLA 的荧光上升。同时由于 FCLA 与 HSA 分子的缔合,

FCLA 的荧光峰值发生了一定的红移。

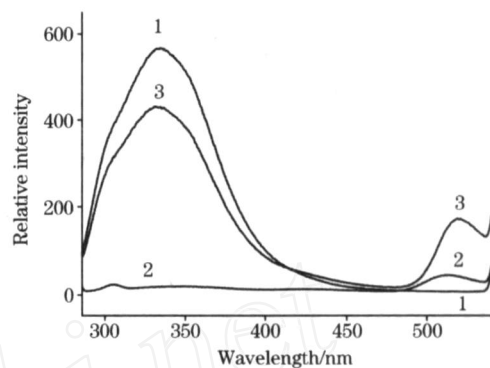


Fig 5 Fluorescence spectra of HSA at $\lambda_{ex} = 279$ nm
1: Absence of FCLA; 2: Fluorescence of FCLA alone;
3: Presence of FCLA

3 结论

荧光技术在蛋白研究中有着广泛的应用, 发射峰的位置、荧光偏振、能量转移、荧光寿命等指标可以对蛋白质中荧光生色团的结构及其所处的微环境提供有用的数据信息。白蛋白与许多药物分子的相互作用已被进行了较为广泛的研究。通过研究 FCLA 与 HSA 的结合反应, 分析它们的荧光猝灭结果求得了 FCLA 与 HSA 的结合位点数。根据 Förster 非辐射能量转移机理探讨了 FCLA 与 HSA 相互结合时其给体-受体间的距离和能量转移效率, 证实了 FCLA 与 HSA 结合作用为静态猝灭过程, 其猝灭同时也通过能量转移而产生荧光。这对阐明 FCLA 的运输过程及其在体内的作用机制具有一定的意义, 可以作为药物动力分析、体内用药的参考。

参 考 文 献

- [1] Harman D, Miquel J. Free Radical Theory of Aging. New York: Alan R Liss Inc, 1986. 3.
- [2] Akutsu K, Nakajima H, Katoh T, Kino S, et al. J. Chem. Soc. Perkin Trans., 1995, 2: 1699.
- [3] WANG Juan, XING Da (王涓, 邢达). Acta Biochem. Biophys. Sinica (生物化学与生物物理学报), 2002, 34(1): 11.
- [4] Zhu D B, Xing D, Wei Y D, et al. Luminescence, 2004, 19(5): 278.
- [5] He Y, Xing D, Yan G, et al. Cancer Lett., 2002, 182: 141.
- [6] Sibata C, Colussi V, Oleinick N, et al. J. Med. Biol. Res., 2000, 33(8): 869.
- [7] Salet C, Moreno G, Ricchelli F, et al. J. Biol. Chem., 1997, 272(35): 21938.
- [8] Qin Y F, Xing D, Luo S M, et al. Photochem. Photobiol., 2005, 81: 1534.
- [9] Wang J, Xing D, He Y, et al. The Federation of European Biochemical Societies Lett., 2002, 523: 128.
- [10] HE Yong-hong, XING Da, WANG Juan (何永红, 邢达, 王涓). Chinese Sci. Bull. (科学通报), 2003, 48(8): 777.
- [11] He Y H, Xing D, Tang Y H, et al. Phys. Med. Biol., 2002, 47(9): 1535.
- [12] LIAN Shao-hui, YANG Shi-zhen, JIANG Shou-ping (连少辉, 杨士珍, 江寿平). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 1994, 14(1): 33.
- [13] WU Yun-xia, XING Da (吴云霞, 邢达). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2005, 25(10): 1630.
- [14] ZHANG Yong, YAN Xin-liang, LEI Ya-chun, et al (张勇, 燕新梁, 雷亚春, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2005, 25(8): 1274.
- [15] Takemura T, Ohta N, Nakajima S, et al. Photochem. Photobiol., 1992, 55: 137.
- [16] HAO Min, XING Da, CHEN Qun, et al (郝敏, 邢达, 陈群, 等). Chinese Chem. Lett. (中国化学快报), 2004, 15: 679.
- [17] Lakowicz J R. Principles of Fluorescence Spectroscopy (2nd Edition). New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers, 1999.
- [18] Valensin G, Kushnir T, Navon G. J. Magn. Reson., 1982, 46: 23.

- [19] Eftink M R. Biophysical and Biochemical Aspects of Fluorescence Spectroscopy. New York: Plenum Publishers, 1991.
- [20] Ware W R. J. Phys. Chem., 1962, 66: 455.
- [21] Jiang M, Xie M X, Zheng D, et al. J. Mol. Struct., 2004, 692: 71.
- [22] Kenworthy A K. Methods, 2001, 24: 289.
- [23] Saha D C, Ray K, Misra T N. Spectrochim. Acta, Part A, 2000, 56: 797.
- [24] ZHANG Xiao-wei, ZHAO Feng-lin, LI Ke-an(张小威, 赵凤林, 李克安). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报), 1999, 201(7): 1063.

The Study on the Interaction of FCLA with Human Serum Albumin with Spectroscopy Techniques

ZHOU Jing, WEI Yan-chun*

MOE Key Laboratory of Laser Life Science and Institute of Laser Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

Abstract It is very important to detect reactive oxygen species (ROS) in biologic and medicinal research. FCLA, the Fluoresceinyl Cypridina Luciferin Analog, is a high sensitivity probe of detecting singlet oxygen and superoxide anions. The FCLA molecule can react with ROS and, after a series of reactions that result in the release of additional chemical energy, releases photons. Depending on the probe used, the photons are typically in visible wavelength range and easily measurable with conventional optical detectors. The binding reaction of FCLA with human serum albumin (HSA) was studied with spectroscopy techniques. It was found that HSA fluorescence was partially quenched by FCLA. The binding constants were obtained with quenching results. According to the Förster energy transfer mechanism, the energy efficiency and the distance between FCLA and HSA were calculated. Then it was found that static quenching was the main binding reaction between FCLA and HSA, and the energy transfer caused the HSA fluorescence quenching and the FCLA fluorescence producing. By studying the binding reaction of FCLA with HSA by spectroscopy techniques, this research proved the transfer style of FCLA and the interaction mechanism in the body. The results will offer some good advises about the ROS detection with the chemiluminescence probe *in vivo*. Meanwhile, it will also provide a new means to study pharmacokinetics and some basic theories about the medicine transfer in the body.

Keywords FCLA; Human serum albumin; Fluorescence quenching; Binding reaction

(Received Aug. 28, 2006; accepted Nov. 6, 2006)

* Corresponding author