

臭氧对胎牛血清氧化损伤的表面增强拉曼光谱

邹祖全^{1,2}, 刘燕楠^{2,3}, 吴 瑛⁵, 李奇楠^{2,3}, 陈梅宗^{1,3}, 孙海英^{1,3}, 李任植^{1,3,4}

- 1 南开大学物理科学学院生物物理系, 天津 300071
- 2 南开大学物理科学学院光子学中心, 天津 300071
- 3 天津市南开大学弱光非线性光子学材料先进技术及制备教育部重点实验室, 天津 300457
- 4 南开大学生物活性材料教育部重点实验室, 天津 300071
- 5 国家纳米技术与工程研究院, 天津 300457

摘 要 对实验室细胞培养用的国产胎牛血清在臭氧作用前后进行了表面增强拉曼光谱测试, 范围 $200\sim 1800\text{ cm}^{-1}$ 。发现臭氧作用 1 h 后拉曼谱线强度大大减弱, 作用 3 h 后谱线强度进一步减弱, 但减弱的程度明显减慢, 说明臭氧氧化作用具有快速的特点。臭氧作用下蛋白质主链的有序构象(α 螺旋, β 折叠) 明显减少, 对 β 折叠的损伤更为严重, β 回折几乎消失。芳香族氨基酸和半胱氨酸侧链在臭氧作用下氧化损伤非常明显。这些特征谱线的变化, 反映了臭氧的氧化作用使蛋白质变性, 构象变化以及降解。

关键词 表面增强拉曼光谱; 胎牛血清; 臭氧

中图分类号: O657.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-0593(2007)06-1140-03

引 言

臭氧是氧气的同素异形体, 又称活性氧, 由于它的分子内比氧气多了一个氧原子, 所以极易放出一个氧原子变成氧气分子, 这个刚被释放出来的氧原子具有很强的氧化能力, 在水中臭氧分解产生羟基自由基($\cdot\text{OH}$), 羟基自由基是已知的最强的氧化剂。而且臭氧作用后没有任何残留物和二次污染, 除了广泛用于杀菌外, 臭氧也用于医疗。现在时兴的臭氧浴^[1], 口腔手术和镶牙用臭氧水保持口腔无菌, 采用臭氧与放射治疗合用治疗癌症, 和臭氧水治疗妇科病, 注射臭氧气体治疗静脉曲张。最近有的科学家认为现存的数以百计的疾病, 包括癌症, 风湿和血管硬化等疾病, 都是由于人体细胞内氧气不足而导致, 所以定期接受液化氧注射, 提高血液的含氧量以分解体内毒素, 达到治病和预防疾病的效果。但是斯科里普斯研究所的 Paul Wentworth 等认为作为人体防御疾病发生的策略之一, 就是由人体免疫系统产生臭氧, 但由于臭氧的强氧化性, 在体内产生了极端相反的副作用。臭氧和胆固醇, 蛋白质等作用后的产物成为动脉硬化症的致病因素。所以臭氧作为药物, 究竟产生什么副作用, 是否会导致癌症等疾病的产生, 则有待进一步研究。用表面增强拉

曼光谱从分子水平上研究臭氧对胎牛血清氧化损伤机理, 为臭氧应用在杀菌医疗等都具有积极的指导意义。

1 材料和方法

国产胎牛血清(其中主要成分是血清白蛋白)购自天津联星生物有限公司, 用功率为 15 W 的紫外灯产生臭氧, 臭氧浓度 $20\text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ 。胎牛血清在臭氧作用 1 和 3 h 后做拉曼光谱测试, 银溶胶用柠檬酸钠还原硝酸银制取, 银溶胶与胎牛血清混合比例为 3:1。实验在 Renishaw 公司生产的 2000 型共焦显微拉曼仪上进行, 用 514 nm、功率为 5 mW 的氩离子激光器为激发光源, 仪器分辨率为 2 cm^{-1} 。将盛有样品的小池放置在 50 倍物镜下进行拉曼光谱测量。表面增强拉曼散射效应是指在特殊制备的一些金属良导体表面或溶胶中, 吸附分子的拉曼散射信号比普通拉曼信号大大增强的现象。其增强机理可能是物理增强, 也可能是化学增强或者是两者共同作用的结果^[2]。

2 实验结果和讨论

无臭氧作用以及臭氧作用 1 和 3 h 后的胎牛血清的表面

收稿日期: 2005-12-18, 修订日期: 2006-03-10

基金项目: 南开大学杰出学者基金项目(PO2003)资助

作者简介: 邹祖全, 1975 年生, 南开大学物理科学学院硕士研究生

增强拉曼光谱如图1所示,胎牛血清的表面增强效果特别明显,其中芳香族氨基酸最为显著。从图中可以看出,臭氧作用1 h后的拉曼谱线强度大大减弱,其中谱线1 588, 1 387.8, 1 276.3, 1 004.3和851 cm^{-1} 减弱特别明显。臭氧作用3 h后谱线强度进一步减弱,但减弱程度明显减缓,只有1 588和1 387.8 cm^{-1} 有明显的减弱。为了分析臭氧作用前后谱图的具体变化,我们把图1的a和c谱线分段进行对比分析,其中把c光谱曲线的强度乘以2作成光谱曲线c1。光谱曲线分段如图2和图3所示。

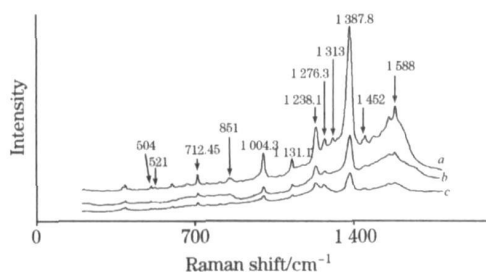


Fig 1 Raman spectra of fetal bovine serum

a: Free from ozone; b: Treated by ozone for 1 h
c: Treated by ozone for 3 h

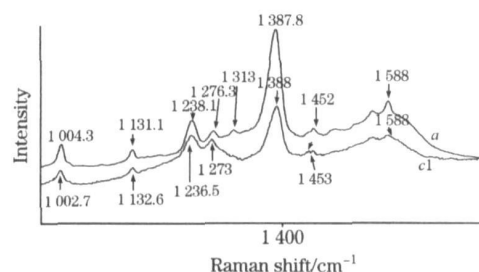


Fig 2 Raman spectra from 900 to 1 800 cm^{-1} of fetal bovine serum

a: Free from ozone; b: On ozone for 3 h ($I_{c1} = 2I_c$)

如图2所示,谱线1 588和1 387.8 cm^{-1} 属于色氨酸的特征峰。色氨酸的吲哚环在1 387.8 cm^{-1} 处的谱线对于环境和聚集状态是敏感的,当色氨酸是“埋藏”时,该谱线成尖锐的峰形,由图可知色氨酸残基是埋藏的。臭氧作用3 h后1 588和1 387.8 cm^{-1} 谱线明显减弱,其原因主要有以下几个:首先,臭氧在水中产生了羟基自由基($\cdot\text{OH}$)和超氧阴离子自由基,超氧阴离子自由基可以和水中的氢离子反应生成 H_2O_2 和单线态氧($^1\text{O}_2$),也可以和臭氧反应生成 $\cdot\text{OH}$ ^[3]。这些自由基具有较强的氧化性,使蛋白质主链构象发生变化,侧链基团受到损伤,色氨酸等疏水芳香族残基暴露在蛋白质表面的数量也会因此增加^[4]。其次,色氨酸有苯环,其环上有 π 键体系,环上电子发生较大离域,与银溶胶作用后表面增强效果最为显著,但羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 的强氧化性使色氨酸的苯环开环,破坏了苯环上若干 π 键体系,环上电子不能发生离域,影响表面增强效果。再次,单线态氧($^1\text{O}_2$)可能同色氨酸的吲哚环2,3位双键产生[2+2]加成反应,也可能攻击吲哚环的烯胺结构单元,发生“ene”反

应^[5],使吲哚环开环,改变了银离子与它的吸附方式,进一步影响了表面增强效果,所以色氨酸谱线强度减弱得最为明显。谱线1 004.3 cm^{-1} 属于苯丙氨酸的特征峰,臭氧作用3 h后其强度也明显减弱,并有16 cm^{-1} 的红移。苯丙氨酸谱带对物理和化学环境是不敏感的,其强度减弱可能在 $\cdot\text{OH}$ 的作用下生成邻位,间位和对位酪氨酸,从而自身的量减少;另一方面也可能是苯环在 $\cdot\text{OH}$ 的作用下开环^[3],电子离域程度减弱,影响了银溶胶的表面增强效果。

如图1,表征 β 回折的1 313 cm^{-1} 谱线在臭氧作用1 h后几乎消失,一方面可能是形成 β 回折的结构只需要2个氢键而且 β 回折主要在蛋白质的表面形成, $\cdot\text{OH}$ 可以很容易破坏这两个氢键,使 β 回折遭到破坏;另一方面脯氨酸在大多数 β 回折存在,而 $\cdot\text{OH}$ 与脯氨酸作用后首先使脯氨酸残基 γ 碳上失去一个氢原子,再经氧化成吡咯酮,自动水解开环, β 回折被破坏。如图2,表征 β 折叠的1 238 cm^{-1} 和表征 α 螺旋的1 276.3 cm^{-1} 谱线,其强度也有明显的减弱,并分别有16到33 cm^{-1} 的红移。由于 $\cdot\text{OH}$ 的强氧化性,破坏了形成 α 螺旋和 β 折叠的链内和链间氢键体系,使 α 螺旋和 β 折叠的有序结构遭到破坏,从而使两者谱线强度大大降低。从图中还可以看出 β 折叠比 α 螺旋减弱得更为明显,可以从两个方面来解释:一方面,血清白蛋白的等电点为4.7,说明其中含较多的酸性氨基酸,而胎牛血清的pH值约为7.4,说明血清白蛋白的酸性氨基酸大部分带负电荷,由于彼此间的静电排斥作用,影响了链内氢键的形成,从而影响了 α 螺旋的形成。在臭氧作用下,胎牛血清的pH值降低,血清白蛋白所带负电荷减少,有利于形成 α 螺旋。另一方面, β 回折大部分在 β 折叠片转角的地方形成,一旦 β 回折遭到破坏,会影响与与之相连的 β 折叠片氢键体系的稳定性。谱线1 452 cm^{-1} 表征亚甲基的非对称弯曲振动,在臭氧作用3 h后谱线发生分裂,反映了脂肪族或烃基侧链的疏水环境变化^[4, 6-10]。

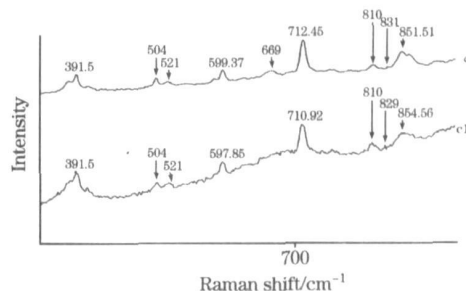


Fig 3 Raman spectra from 200 to 900 cm^{-1} of fetal bovine serum

a: Free from ozone; c1: On ozone for 3 h ($I_{c1} = 2I_c$)

如图3所示,851.51和831 cm^{-1} 为表征酪氨酸的谱线。臭氧作用前后酪氨酸的峰减弱较为明显,可能是酚环在 $\cdot\text{OH}$ 作用下被破坏,影响了表面增强效果。另外谱线851.51和831 cm^{-1} 的强度发生了相对变化,臭氧作用前, $I_{851}/I_{831} > 1$,说明酪氨酸残基绝大部分是暴露的,但臭氧作用后,其比值变小,说明暴露在蛋白质表面的酪氨酸残基数减少,而“埋藏”的酪氨酸残基数相对增加,可能是 $\cdot\text{OH}$

抽去了酪氨酸的酚羟基上的氢,使酪氨酸形成酪氨酰基,在酪氨酰基之间及酪氨酰基与酪氨酸之间可发生反应形成二酞化合物。这种双酪氨酸键可以在蛋白质内部(分子内成键),也可以在蛋白质间(分子间成键)形成,分子间双酪氨酸键的形成使蛋白质聚合的因素,从而使“埋藏”的酪氨酸残基数相对增加^[4, 7-10]。表征二硫键的谱线在 504 和 521 cm^{-1} 位置, 504 cm^{-1} 谱线属于扭曲-扭曲-扭曲构象, 521 cm^{-1} 属于扭曲-扭曲-反式构象,臭氧作用后,两者的强度都减弱,但 521 cm^{-1} 谱线减弱的慢,相对强度增加。谱线 669 cm^{-1} 表征半胱氨酸的 C—S 键,属于扭曲构象,在图 1b 中反映了在臭氧作用 1 h 后谱线消失,反映了半胱氨酸的碳-硫键与 $\cdot\text{OH}$ 产生加成反应,形成一种硫氧化合物,引起碳-硫键的断裂。同样表征蛋氨酸 C—S 键的 712 cm^{-1} 谱线在臭氧作用 1 h 后谱线强度减弱的比较明显,但没有半胱氨酸的 C—S 键损伤明显,可能是蛋氨酸的甲硫基提供的疏水作用,使蛋氨酸的暴露在蛋白质表面的残基较少,减少了臭氧对它的损伤。

3 结 论

臭氧作用下血清中的蛋白质分子的主链的有序结构(α 螺旋, β 回折和 β 折叠)明显减少,无规卷曲增加。氨基酸侧链的损伤也很明显,其中色氨酸,苯丙氨酸最为明显,胱氨酸的二硫键和半胱氨酸的碳-硫键等。主要是臭氧在水中分解产生的 $\cdot\text{OH}$ 的强氧化性使形成蛋白质空间结构的氢键,二硫键,碳-硫键受到损伤甚至断裂,部分氢键体系发生变化,从而导致主链构象发生变化。另一方面臭氧氧化分解芳香族氨基酸,导致了对血清中蛋白质的严重损伤。臭氧在水中的半衰期约为 20 min,其氧化又有快速的特点,臭氧在水中分解产生一系列强氧化性的自由基,氧化分解包括蛋白质,脂质等,是很多疾病的治疗因素。特别是注射臭氧水以补充血液氧气,可能会给病人带来严重后果,所以臭氧用于医疗应该还要一段长时间的临床实验。

参 考 文 献

- [1] GENG Ke ting, WU Chi peng(耿可亭,吴赤蓬). Chinese Journal of Misdiagnosis(中国误诊学杂志), 2005, 5(9): 1615.
- [2] YE Yong, HU Ji ming(叶用,胡继明). University Chemistry(大学化学), 1998, 13(1): 6.
- [3] MA Jun, ZHANG Tao, et al(马军,张涛,等). Environmental Science(环境科学), 2005, 26(2): 78.
- [4] Sekai Ngarize, Alf Adams, et al. Food Hydrocolloids, 2004, 18: 49.
- [5] XU Yi ming, YANG Yong zheng, ZHANG Zhi yi(许以明,杨勇正,张志义). Acta Biophysica Sinica(生物物理学报), 1996, 12(4): 724.
- [6] YAN Xun ling, DONG Rui xin, WANG Qiu guo, et al(闫循领,董瑞新,王秋国,等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(1): 58.
- [7] Lynne S Taylor, Peter York, et al. Biochimica et Biophysica Acta, 1995, 1253: 39.
- [8] Stewart S, Fredericks P M. Spectrochimica Acta Part A, 1999, 55: 1615.
- [9] Rene J Beattie, Steven J Bell, et al. Meat Science., 2004, 66: 903.
- [10] Tsuyoshi Egawa, Syurru Yeh. Journal of Inorganic Biochemistry, 2005, 99: 72.

Surface Enhanced Raman Spectra of Oxidation Damnification of Fetal Bovine Serum by Ozone

ZOU Zhi quan^{1, 3}, LIU Yan nan^{2, 3}, WU Ying⁵, LI Qi nan^{2, 3}, CHEN Mei zong^{1, 3}, SUN Hai ying^{1, 3}, Lee Imshik^{1, 3, 4}

1. Department of Biophysics, School of Physics, Nankai University, Tianjin 300071, China
2. Photonics Center of School of Physics, Nankai University, Tianjin 300071, China
3. The Key Laboratory of Advanced Technique and Fabrication for Weak Light Nonlinear Photonics Materials, Ministry of Education, Nankai University, Tianjin 300457, China
4. The Key Laboratory of Bioactive Material, Ministry of Education, Nankai University, Tianjin 300071, China
5. China National Academy of Nanotechnology and Engineering, Tianjin 300457, China

Abstract Fetal bovine serum was treated by ozone for 1 hour and 3 hours before getting its surface enhanced Raman spectra from 200 to 1 800 cm^{-1} . Treated with ozone for 1 hour, it shows a significant decrease in band intensity. Treated with ozone for 3 hours, the band intensity has a further decrease but not so obviously, which means that oxidation of ozone is short lived. Treated with ozone, the orderly conformations of main chains in protein such as α helix, β sheet and β corner are damaged seriously. Aromatic side chains and C—S of Cys and Met also are damnified greatly. All this means that strong oxidation of ozone results in denaturation, conformational changes and even degradation in protein.

Keywords Surface enhanced Raman spectra; Fetal bovine serum; Ozone

(Received Dec. 18, 2005; accepted Mar. 10, 2006)