

荧光光谱法研究 G3.0 PAMAM 树状大分子与牛血清白蛋白的相互作用

何 华^{1,4}, 李彬彬¹, 芦金荣², 顾 艳¹, Chuong Pham-Huy³

1. 中国药科大学分析化学教研室, 江苏 南京 210009
2. 中国药科大学有机化学教研室, 江苏 南京 210009
3. Faculty of Pharmacy, University of Paris V, 4 Avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France
4. 中国药科大学药物质量与安全预警教育部重点实验室, 江苏 南京 210009

摘 要 聚酰胺-胺型(PAMAM)树状大分子是一类新型的纳米级、球型、高度分支、单分散性的聚合物,并具有安全、低毒、无免疫原性等许多独特的生物学性质。正是由于这些优势使其有望成为一种新型有效的生物材料,用于作为寡核苷酸的转运因子和药物转运载体。因此,深入了解树状大分子的生物学性质对进一步研究其在治疗方面的应用是至关重要的。文章应用荧光光谱法在生理条件下研究了具有表面氨基的 3.0 代聚酰胺-胺型(G3.0 PAMAM)树状大分子与牛血清白蛋白(BSA)间的相互作用。结果表明,加入 G3.0 PAMAM 树状大分子后,BSA 内源性荧光发生猝灭,其猝灭机制属于静态猝灭,符合 Stern-Volmer 方程。通过计算得到该树状大分子与 BSA 间的结合常数为 $(1.067 \pm 0.025) \text{L} \cdot \text{mmol}^{-1}$ 。通过同步荧光、红边激发荧光位移(REES)等方法的研究发现,树状大分子的存在会改变 BSA 的构象。此外还考查了体系的 pH 值和离子强度对该树状大分子与 BSA 相互作用的影响,由实验结果可推断静电作用是二者结合的主要作用机制。

关键词 G3.0 PAMAM 树状大分子;牛血清白蛋白;内源性荧光;荧光猝灭;红边激发荧光位移
中图分类号: O631 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)10-2782-05

引 言

聚酰胺-胺型(PAMAM)树状大分子是由 Tomalia 等^[1]首次合成的一类新型功能高分子,近年来引起了诸多领域专家的广泛关注。在生物医学领域中,由于其具有较大的内部空腔和大量的端基官能团,可与多种有机小分子或聚合物结合,并且细胞毒性较低,非常适宜作为药物和基因的转运载体^[2-4]。随着树状大分子与药物结合研究的迅速发展,研究其与生物大分子的相互作用对其在体内的进一步应用尤为重要。众所周知,多数药物进入人体后,必须通过血浆的储存和运输才能到达靶部位,进而发生药理作用。血清白蛋白是血液中的一类重要的蛋白质,对许多内源性和外源性的药物都具有较高的亲和力^[5]。因此,研究 PAMAM 树状大分子与白蛋白的相互作用,对阐明该药物载体在体内的转运、分布和

代谢等具有重要意义。

本文利用荧光法研究了具有末端氨基的 G3.0 PAMAM 树状大分子在生理条件下与牛血清白蛋白的相互作用,并探讨了相互作用机理,以及对蛋白构象的影响,为树状大分子作为药物和基因载体在体内应用提供了理论依据。

1 仪器和试剂

3.0 代(G3.0,具有末端氨基)以乙二醇为核的 PAMAM 树状大分子,实验室自制;牛血清白蛋白 BSA(组分 V,生化试剂,南京大冶生物科技有限公司);实验用水为重蒸水,其他试剂均为分析纯。

RF5301 型荧光分光光度计(日本岛津公司);pHS-25 型酸度计(上海伟业仪器厂);BS 124S 型电子天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司)。

收稿日期:2008-09-26,修订日期:2008-12-26

基金项目:江苏省自然科学基金项目(BK2003080)资助

作者简介:何 华,1963 年生,中国药科大学分析化学教研室教授

e-mail:dochehua@163.com

2 实验方法

2.1 G3.0 PAMAM 树状大分子对牛血清白蛋白荧光的猝灭作用

将 BSA 溶解于含 NaCl(浓度 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲盐溶液中, 配制成浓度为 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液。室温下测定上述 BSA 溶液的荧光光谱。然后向 BSA 溶液中加入不同浓度的 G3.0 PAMAM 树状大分子溶液, 在同样条件下测定其荧光光谱, 以空白树状大分子溶液作对照。

2.2 同步荧光考查树状大分子对 BSA 色氨酸残基微环境疏水性影响

当激发波长和发射波长的差值分别为 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 时, 分别测定上述 BSA 溶液同步荧光光谱。然后向 BSA 溶液中加入不同浓度的 G3.0 PAMAM 树状大分子溶液, 在同样条件下测定其同步荧光光谱。

2.3 红边激发荧光位移 (REES) 法考查树状大分子对 BSA 色氨酸残基微环境疏水性影响

室温下测定上述 BSA 溶液在不同激发波长(激发波长从 285 nm 逐渐增加至 300 nm)下的荧光光谱。然后向 BSA 溶液中加入不同浓度的 G3.0 PAMAM 树状大分子溶液, 在同样条件下测定荧光光谱。

2.4 pH 值和离子强度对 G3.0 PAMAM 树状大分子与 BSA 相互作用的影响

将 BSA 分别溶于 pH 6.2, 6.8, 7.4, 8.0, 8.6 的 Tris-HCl 缓冲溶液中, 配成浓度为 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液, 按照 2.1 节中的方法测定其荧光光谱。

将 BSA 分别溶于含有 100, 200, 400, 600, 800 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的 pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液中, 按照 3.1 中的方法测定其荧光光谱。

3 结果和讨论

3.1 G3.0 PAMAM 树状大分子对牛血清白蛋白荧光的猝灭作用

当激发波长为 295 nm 时, BSA 分子的荧光主要来自于色氨酸(Trp)残基, 其峰值在 345 nm 附近, 而在该激发波长下, 树状大分子本身并不发射荧光, 因此对实验结果不产生干扰。

图 1 是 295 nm 激发波长下不同浓度 G3.0 PAMAM 树状大分子对 BSA 荧光光谱的影响。由图 1 可见, BSA 的荧光强度随树状大分子浓度的增加而减少, 通过稳定性考察发现这种猝灭作用瞬间即可达到稳定状态, 在 120 min 内保持稳定。上述现象说明 G3.0 PAMAM 树状大分子同 BSA 之间存在相互作用。

图 2 为 G3.0 PAMAM 树状大分子对 BSA 荧光猝灭的 Stern-Volmer 曲线图。

Stern-Volmer 方程式^[6,7]如下

$$F_0/F = 1 + K_{SV}[Q] \quad (1)$$

式中 F_0 和 F 分别代表不存在和存在树状大分子情况下的荧

光强度, K_{SV} 代表 Stern-Volmer 的动态消光常数; $[Q]$ 代表树状大分子的浓度。

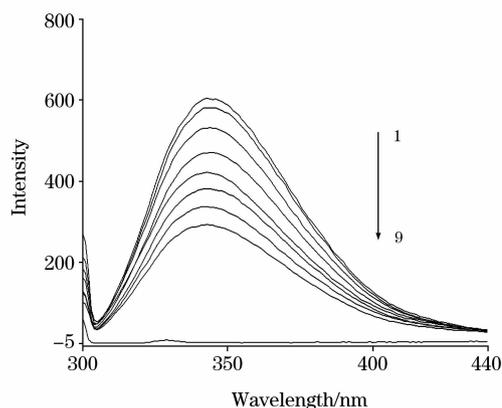


Fig. 1 G3.0 PAMAM dendrimers' influence on BSA fluorescence spectra with $\lambda_{ex} = 295 \text{ nm}$, $c(\text{BSA}) = 0.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c(\text{G3.0 PAMAM})/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ —1: 0; 2: 80.41; 3: 201.0; 4: 321.6; 5: 442.2; 6: 562.9; 7: 683.5; 8: 804.1; $c(\text{BSA}) = 5.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 9: $c(\text{G3.0 PAMAM}) = 402.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

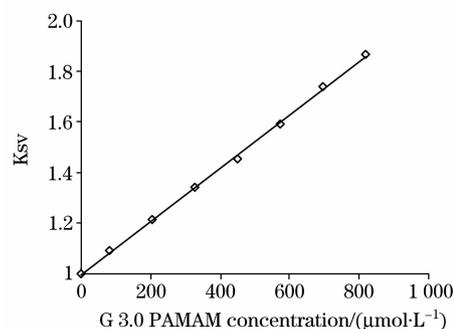


Fig. 2 Stern-Volmer plots for BSA fluorescence quenching by G3.0 PAMAM dendrimers $c(\text{BSA}) = 5.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

由图 2 计算可得到 G3.0 PAMAM 树状大分子与 BSA 作用的动态消光常数 K_{SV} 值为 $(1.067 \pm 0.025) \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1}$ 。据文献报道, 各种猝灭剂对生物大分子最大动态猝灭过程的猝灭常数都不大于 $0.2 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1}$ ^[8], 而 G3.0 PAMAM 树状大分子与 BSA 相互作用的 K_{SV} 值大于此值, 可由此推断该猝灭过程非是树状大分子扩散时所引起的动态猝灭。

同时, 发现加入树状大分子以后, BSA 最大发射波长略有蓝移, 现象不是十分明显(如图 1)。为此, 我们采用双波长法进一步考查树状大分子的存在对 BSA 中色氨酸残基周围微环境的影响。图 3 是双波长法原理的示意图, 在蛋白质分子最大发射波长前后等距选取两个波长 λ_1 和 λ_2 , 加入猝灭剂前, 蛋白谱线上与其相对应的荧光强度分别为 F_L 和 F_R , 加入猝灭剂后, 与其对应的荧光强度变为 F'_L 和 F'_R , 当 $F'_L/F'_R > F_L/F_R$ 时, 说明最大发射波长蓝移, 而当 $F'_L/F'_R < F_L/F_R$ 时说明最大发射波长红移^[9]。

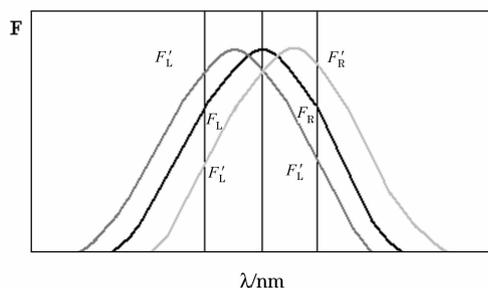


Fig. 3 Scheme of double-wavelength method to evaluate the position of emission maximum

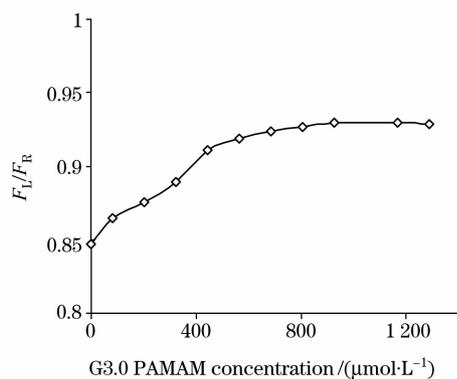


Fig. 4 Effect of G3.0 PAMAM dendrimers on the position of emission maximum
 $c(\text{BSA}) = 5.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

在 295 nm 激发波长下 BSA 的最大发射波长为 345 nm, 我们选取 325 和 365 nm 这两个等波长点, 考查加入树状大分子后 BSA 荧光谱线位移的变化情况。由图 4 可见, 随着树状大分子浓度的增加, F_L/F_R 值由 0.85 增加至 0.93。由此可知, 加入 G3.0 PAMAM 树状大分子后, BSA 荧光谱线最大发射波长确有蓝移现象, 说明 BSA 中色氨酸残基周围微环境变得疏水, 其结构变得更加紧密^[10]。

3.2 同步荧光考察树状大分子对 BSA 色氨酸残基微环境疏水性的影响

同步荧光光谱可用于蛋白质构象变化的分析。 $\Delta\lambda = 15$ nm 时的同步荧光光谱可显示蛋白质中酪氨酸残基的光谱特性, 而 $\Delta\lambda = 60$ nm 时的同步荧光光谱则表现出蛋白质中色氨酸残基的荧光特性。因残基的最大发射波长与其所处环境的疏水性有关, 故由发射波长的改变可判断蛋白质构象的变化^[11]。图 5(a)和图 5(b)分别为 $\Delta\lambda = 15$ nm 和 $\Delta\lambda = 60$ nm 条件下 G3.0 PAMAM 树状大分子与 BSA 相互作用的同步荧光光谱图, 从图中发现: 随着树状大分子浓度的增加, $\Delta\lambda = 15$ nm 时的同步荧光光谱最大发射波长基本没有变化, 而 $\Delta\lambda = 60$ nm 时的同步荧光光谱最大发射波长从 351 nm 移动到 349 nm, 蓝移 2 nm。这表明树状大分子的加入使 BSA 色氨酸残基所处环境的疏水性增加, 导致 BSA 的构象发生了改变。

3.3 红边激发荧光位移法考察树状大分子对 BSA 中色氨酸残基微环境流动性的影响

红边激发荧光位移 (REES) 是一种由于激发波长向吸收谱带红边移动而引发的发射波长向高波长方向移动的现象, 是监测发色团运动的一项良好的方法, 尤其在对蛋白质的研究中, 它是获得有关色氨酸周围环境以及结构组成方面信息的一项有力工具。红边激发效应是色氨酸电子跃迁能分配的结果, 当溶剂介质存在缓慢舒张作用时, 色氨酸的吡咯环与邻近偶极子的电子结合作用引起了 REES。如果色氨酸残基的周围环境是流动的, 舒张作用出现在色氨酸发射前, 并且由舒张状态产生的最大发射不发生变化。如果色氨酸被置于一个运动受限的环境内, 在色氨酸吡咯环激发态将会产生缓慢的溶剂舒张作用, 并且由非舒张态产生的发射波长决定于激发波长^[12, 13]。

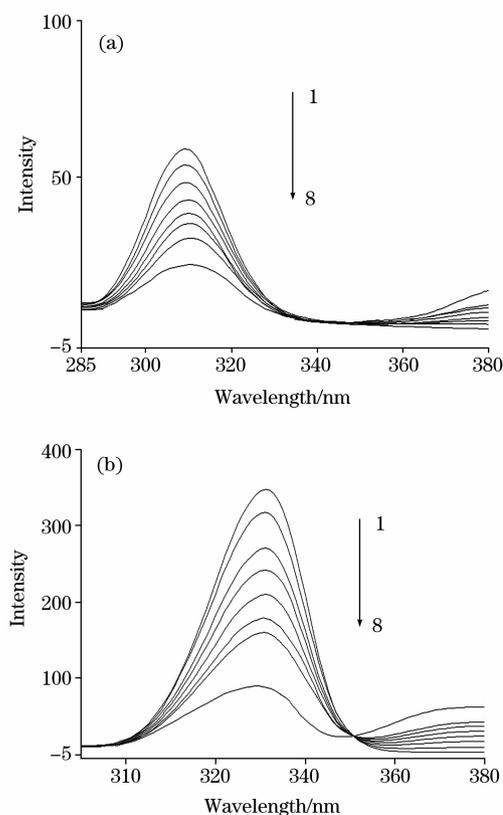


Fig. 5 Effect of G3.0 PAMAM dendrimers on the synchronous fluorescence spectra of BSA $\Delta\lambda = 15$ nm (a) and $\Delta\lambda = 60$ nm (b)

在 REES 实验中, 存在树状大分子的情况下, 随着激发波长的增加 BSA 最大发射波长会发生红移的现象, 仍可用双波长法对实验数据进行处理。实验中, 在 285 nm 激发波长下 BSA 的最大发射波长在 344 nm, 所以选取 324 和 364 nm 这两个等波长点, 考查加入树状大分子后 BSA 荧光谱线的 REES 变化情况。图 6(a)和图 6(b)是通过双波长法处理后的结果。由图 6(a)可见, 随着激发波长的不断增加, BSA 的 F_L/F_R 值不断降低, 说明荧光谱线发生红移现象。并且随

着体系中加入 G3.0 PAMAM 树状大分子浓度的增加, F_L/F_R 值降低程度增加, 说明红移程度增加。为了方便比较, 我们以 $\Delta F_L/F_R$ (F_L/F_R 与 F'_L/F'_R 的差值) 为纵坐标作图得到图 6(b), 从图 6(b) 更加明显地观察到了 F_L/F_R 值的降低。

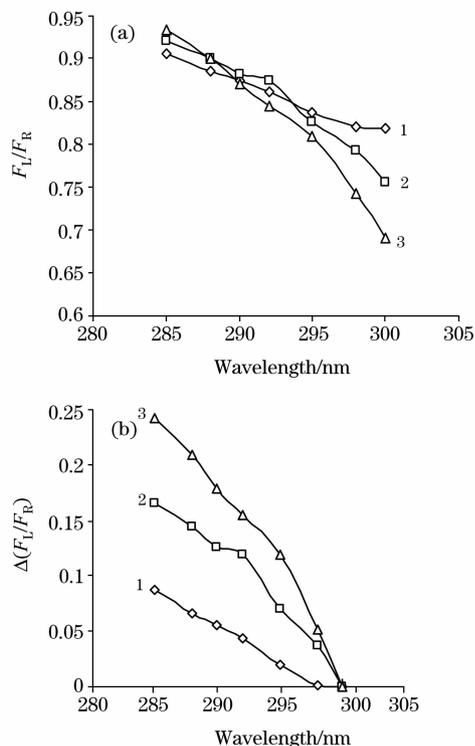


Fig. 6 Effect of G3.0 PAMAM dendrimers on the red edge excitation shift of BSA

(a): Plots of F_L/F_R - λ_{ex} ; (b): Plots of $\Delta F_L/F_R$ - λ_{ex}

1: $c(\text{G3.0 PAMAM})=0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$;

2: $c(\text{G3.0 PAMAM})=409.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$;

3: $c(\text{G3.0 PAMAM})=818.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$;

$c(\text{BSA})=5.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

3.4 pH值和离子强度对 G3.0 PAMAM 树状大分子与 BSA 相互作用的影响

研究了在不同 pH 值和不同离子强度条件下, G3.0 PAMAM 树状大分子对色氨酸残基内源荧光的猝灭作用。从图 7 发现, 在 pH 值 6.2~8.6 范围内, 树状大分子对 BSA 的内源荧光都具有猝灭作用, 但猝灭程度变化趋势没有明显规律。由于 G3.0 树状大分子在 pH 值 6.2~8.6 范围内, 几乎所有的氨基带正电荷, 而 BSA 是一种酸性蛋白质, 在这一 pH 值范围内所有羧基均带负电, 由此可推断树状大分子的氨基会与 BSA 间产生较强的静电作用, 从而导致内源荧光猝灭。

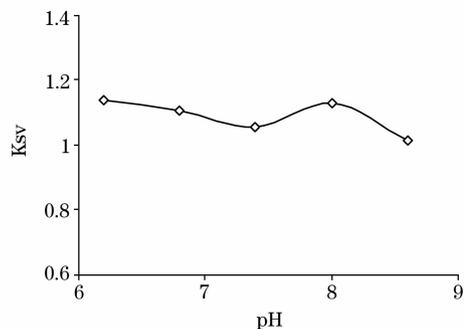


Fig. 7 Effect of pH on the interactions between G3.0 PAMAM dendrimers and BSA

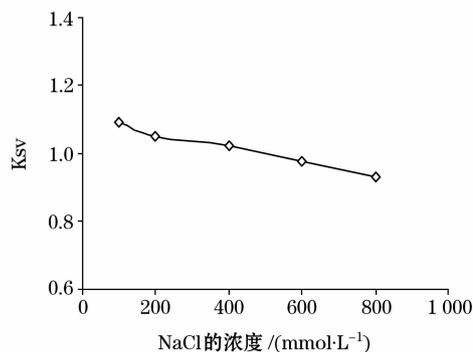


Fig. 8 Effect of ionic strength on the interactions between G3.0 PAMAM dendrimers and BSA

通过观察图 8 发现, NaCl 的浓度在 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, G3.0 树状大分子与 BSA 相互作用的 K_{sv} 值最大, 但随着离子强度的增大 K_{sv} 值逐渐减小。由此推断树状大分子与 BSA 是以静电作用相结合的, 随着离子强度的增加 Na^+ 可竞争结合 BSA, 并且 NaCl 在 BSA 和 PAMAM-NH₂ 之间也起到了静电屏蔽的作用^[14], 从而减弱了两者间的相互作用。

4 结论

本文主要运用荧光法研究了具有末端氨基的 G3.0 PAMAM 树状大分子与 BSA 之间的相互作用。研究表明, G3.0 PAMAM 树状大分子主要通过静电作用方式与 BSA 结合, 使其内源荧光发生猝灭。此外发射荧光、同步荧光和 REES 实验中荧光谱线的峰位峰形变化也说明树状大分子的加入使 BSA 的构象发生改变, 使色氨酸残基周围环境变得更加疏水, 并处于运动受限的环境中。本实验探讨了 PAMAM 树状大分子与 BSA 的结合机制, 为 PAMAM 树状大分子作为药物载体在生物体内应用提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] Tomalia D A, Baker H, Dewald J R, et al. *Polymer Journal*, 1985, 17(1): 117.
- [2] Jonathan D Eichman, Anna U Bielinska, Jolanta F Kukowska-Latallo, et al. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 2000, 3(7): 232.
- [3] Cheng Yiyun, Xu Tongwen. *Medicinal Chemistry*, 2005, 40(11): 1188.
- [4] Man Na, Cheng Yiyun, Xu Tongwen, et al. *Medicinal Chemistry*, 2006, 41(5): 670.
- [5] Cheng Zhengjun, Zhang Yuntao. *Molecular Structure*, 2008, 879(1-3): 81.
- [6] Hu Yanjun, Liu Yi, Sun Tingquan, et al. *Biological Macromolecules*, 2006, 39(4-5): 280.
- [7] ZHANG Zhi-heng, LI Cai-rui, MA Jing-jun, et al (张志恒, 李彩瑞, 马晶军, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析)*, 2008, 28(5): 1135.
- [8] Ware W R. *Process J. Phys. Chem.*, 1962, 66(3): 455.
- [9] Sun Shaofa, Zhou Bo, Hou Hanna. *Biological Macromolecules*, 2006, 39(4-5): 197.
- [10] Callis P R. *Methods Enzymology*, 1997, 278: 113.
- [11] Yang Yumin, Hua Qiuluan, Fan Yanli, et al. *Spectrochimica Acta Part A*, 2008, 69(2): 432.
- [12] Demchenko A P. *Trends in Biochemical Sci.*, 1988, 13(10): 374.
- [13] Patra S K, Pal M K. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.*, 1997, 53A (10): 1609.
- [14] Wang Feng, Huang Wei, Dai Zhongxiang. *Molecular Structure*, 2008, 875(1-3): 509.

Fluorescence Study on the Interactions between G3.0 PAMAM Dendrimers and Bovine Serum Albumin

HE Hua^{1,4}, LI Shan-shan¹, LU Jin-rong², GU Yan¹, Chuong Pham-Huy³

1. Division of Analytical Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

2. Division of Organic Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

3. Faculty of Pharmacy, University of Paris V, 4 Avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

4. Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance, Ministry of Education, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract The interaction between amine terminated G3.0 PAMAM dendrimers and bovine serum albumin (BSA) under physiological condition was studied by fluorescence spectroscopy. Our experiments demonstrated that the fluorescence intensity of BSA decreased after the addition of G3.0 PAMAM dendrimers and the quenching mechanism was suggested as static quenching according to the Stern-Volmer equation. The binding constant of G3.0 PAMAM dendrimers with BSA was calculated to be $1.067 \pm 0.025 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1}$. At the same time, synchronous fluorescence and red edge excitation shift (REES) were adopted to review the conformational changes of BSA influenced by G3.0 PAMAM dendrimers, which provides important significance for clinical medication. And the results indicated that G3.0 PAMAM dendrimers can change the conformation of BSA. Furthermore, this article also examined the influence of pH and ionic strength on the interactions, from which we can conclude that electrostatic interaction played major roles in the binding process. In conclusion, the fluorescence method is a highly sensitive and convenient way to study intermolecular interaction. Further investigation in this field will provide more important information for understanding the pharmacological effects and toxicities of drugs in human body.

Keywords PAMAM dendrimer; Bovine serum albumin; Intrinsic fluorescence; Fluorescence quenching; Red edge excitation shift

(Received Sep. 26, 2008; accepted Dec. 26, 2008)