

叶酸与人血清白蛋白结合作用的光谱研究

刘慧娟, 李鹏, 张亚东, 郭操, 邓峻元, 蔡健炜, 刘伯里*

放射性药物教育部重点实验室, 北京师范大学化学学院, 北京 100875

摘要 在不同温度下的 pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液体系中, 采用荧光光谱、紫外吸收光谱和同步荧光光谱研究了人血清蛋白与叶酸的相互作用。研究表明, 这种相互作用使人血清白蛋白发生内源荧光猝灭, 属于静态猝灭机制。通过计算得到人血清蛋白与叶酸在 17 和 37 °C 下静态猝灭的猝灭速率常数分别为 7.3966×10^4 和 $7.2652 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 、结合常数分别为 7.50×10^4 和 $1.98 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 、结合位点数均为 1。根据 Förster 非辐射能量转移机理, 求出给体(HSA)与受体(叶酸)间的作用距离和能量转移效率分别为 1.77 和 0.05265 nm, 并结合热力学参数说明了叶酸分子与人血清白蛋白的作用以疏水作用为主, 同时也存在静电引力。利用同步荧光光谱研究了人血清蛋白与叶酸的相互作用中 HSA 的构象变化, 发现色氨酸残基所处环境的疏水性降低, 说明叶酸分子进入了人血清白蛋白的疏水腔中。

关键词 叶酸; 人血清蛋白; 荧光光谱; 荧光猝灭

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)07-1915-05

引言

叶酸(FA), 是维持细胞功能、新陈代谢和生长的一类维生素, 对核酸和蛋白质的合成、氨基酸的相互转化、嘌呤合成和 DNA 的合成与代谢都有重要意义^[1,2]。其分子结构由蝶啶、对氨基苯甲酸和左旋谷氨酸三部分组成, 含 α 和 γ 两个羧基。

叶酸通过叶酸受体主动转运进入人体。叶酸受体是一种糖基磷脂酰肌醇, 有 α 和 β 两种受体。研究证实, 此类受体的过度表达是细胞恶性增殖一种显著标志^[2-5]。因而以叶酸受体为肿瘤特异性靶向治疗药物和分子探针的方面的研究日益深入, 已有部分新药前体进入临床研究阶段^[6-10]。

叶酸的衍生物, 特别是分子探针, 在动物体内的生物学分布已有较多的研究^[5-10], 但叶酸分子在血液中的行为却不甚明了。考虑到血清白蛋白是人血浆中含量最丰富的载体蛋白, 人血清白蛋白(HSA)在结合和运输内源性和外源性化合物中扮演重要角色。本文在生理条件下, 利用叶酸分子对人血清白蛋白荧光的猝灭效应, 求出了二者的结合常数和结合位点数。这对于阐明叶酸在人体血液中的分布及与蛋白相互作用的机制有重要的价值, 对进一步研究叶酸探针及其复合物具有指导意义。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

Fluorolog-tau-3 型荧光光谱仪, Cintra-10e UV-Vis 型紫外-可见分光光度计, 雷磁 H-3 型 pH 计。叶酸(99%, 北京化学试剂公司); 人血清白蛋白(HSA, 分子量为 65000D, 99%, 购自 Sigma 公司); 其他化学试剂均为分析纯; 实验用水全部为 Milli-Q 超纯水。

1.2 实验方法

准确称量叶酸并配制浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液。准确称量人血清白蛋白并配制成为 $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液, 置于 4 °C 冰箱中保存。

在 10 mL 比色管中依次加入 1.0 mL pH 7.4 的缓冲溶液、1.0 mL 人血清白蛋白溶液和一定量的 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 叶酸, 加水定容至刻度, 摇匀, 放置半小时后测定荧光光谱。荧光比色皿为 1 cm, 固定激发波长为 280 nm, 入射和出射狭缝为 2.5 nm, 扫描温度为 17 和 37 °C。

2 结果与讨论

2.1 叶酸与 HSA 结合的荧光光谱

固定人血清白蛋白的浓度不变, 改变加入叶酸的浓度,

收稿日期: 2008-05-12, 修订日期: 2008-08-16

基金项目: 国家大学生创新性实验计划项目(102119002)和北京市新医药学科群建设项目(XK100270569)资助

作者简介: 刘慧娟, 1988 年生, 北京师范大学化学学院本科生 * 通讯联系人 e-mail: liuboli@bnu.edu.cn

扫描混合溶液的荧光光谱。人血清白蛋白中的色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)和苯丙氨酸(Phe)残基能够发射内源荧光,实验结果如图 1 所示,叶酸对 HSA 内源荧光有猝灭作用,随着叶酸的逐渐增加,300~400 nm 处的荧光强度不断降低。这说明叶酸与 HSA 发生了相互作用,并引起 HSA 中荧光发色团的微环境及蛋白质分子构象发生变化。在 450 nm 处出现新的荧光峰,为叶酸的荧光峰,且在 413 nm 处有一个等发射点。

2.2 HSA 荧光猝灭机理

引起 HSA 荧光猝灭的原因可能有两种:动态猝灭和(或)静态猝灭。动态猝灭是化合物和蛋白质的激发态分子间的相互碰撞而导致的荧光猝灭,并不影响蛋白质的结构和生理活性,遵循 Stern-Volmer 方程^[11]。静态猝灭则通常是由于发生了配合反应,对蛋白质的二级结构产生影响,并可能影响其生理活性。荧光猝灭符合下式

$$F_0/F = 1 + K_q[Q] \quad (1)$$

式中, F_0 为猝灭剂不存在时的荧光强度, F 为加入猝灭剂后荧光强度, K_q 为猝灭常数, $[Q]$ 为猝灭剂浓度。根据式(1),对于单一的动态猝灭或静态猝灭过程,以荧光分子的荧光强度变化 F_0/F 对猝灭剂浓度 $[Q]$ 作图应为直线关系,直线斜率代表荧光猝灭过程速率常数 K_q 。

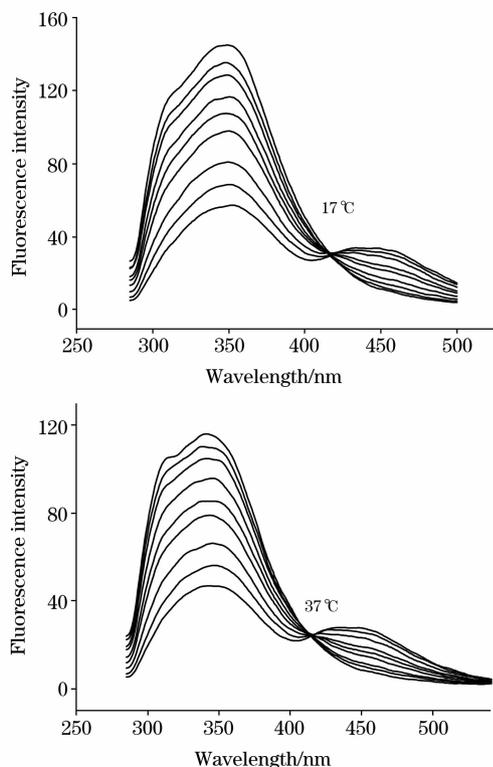


Fig. 1 Fluorescence spectra of human serum albumin (HSA) at different folic acid concentration

$c_{\text{HSA}} = 2.0 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; from up to down, $c_{\text{FA}} = 0, 0.1 \times 10^{-5}, 0.2 \times 10^{-5}, 0.4 \times 10^{-5}, 0.6 \times 10^{-5}, 0.8 \times 10^{-5}, 1.2 \times 10^{-5}, 1.6 \times 10^{-5}, 2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

一般而言,生物大分子的最大动态猝灭过程的速率常数 $K < 100 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ^[12]。因此对于速率常数大于 $100 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$

的荧光猝灭过程不可能是动态猝灭而只能是静态猝灭过程。

将 17 和 37 °C 不同温度下 HSA 的荧光强度 F_0/F 比值与猝灭剂叶酸浓度分别作图,图 2 显示随着叶酸浓度的增加, F_0/F 逐渐增大,且二者呈良好的线性关系。直线斜率为 7.3966×10^4 和 $7.2652 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$,因此可以判断 HSA 的荧光猝灭是由于叶酸与 HSA 形成了配合物引起的静态猝灭。

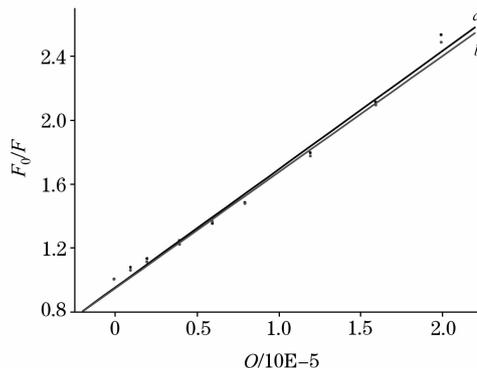


Fig. 2 Stern-Volmer curve of HSA quenched by folic acid

a: 17 °C; b: 37 °C

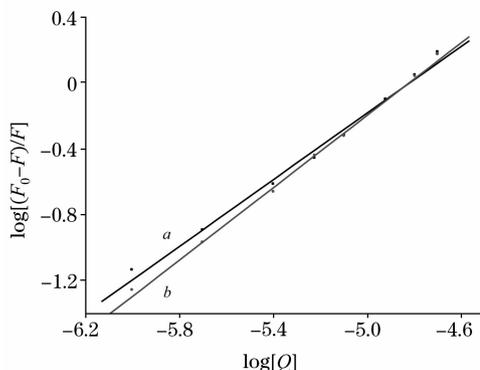


Fig. 3 Lineweaver-Burk curve of HSA quenched by folic acid

a: 17 °C; b: 37 °C

2.3 叶酸与 HSA 的结合常数和结合位点数

对于静态猝灭,荧光强度与猝灭剂的关系可由结合常数表达式^[13,14](2)推导求出。

$$\lg[(F_0 - F)/F] = \lg K_A + n \lg[Q] \quad (2)$$

将 $\lg[(F_0 - F)/F]$ 对 $\lg[Q]$ 作图,直线斜率代表结合位点数 n ,直线截距结合常数 K_A 。

实验所用猝灭剂最小浓度为 HSA 浓度的 0.5 倍,最大为 10 倍。将 17 和 37 °C 下实验体系的测量数据用静态猝灭公式处理,在图 2 统一读取 347 nm 处的荧光强度,分别得到 17 和 37 °C 两个温度下的曲线如图 3 所示,其方程式如下

$$\lg[(F_0 - F)/F] = 4.87535 + 1.01128 \lg[Q]$$

$$\lg[(F_0 - F)/F] = 5.29604 + 1.09813 \lg[Q]$$

线性相关系数分别为 0.99561 和 0.99879。由直线的截距和斜率求得两个温度下叶酸和 HSA 作用的结合常数 K_A 和结合位点数 n 的列于表 1。叶酸和 HSA 相互作用时只有一个结合位点 ($n_{17^\circ\text{C}} = 1.01128, n_{37^\circ\text{C}} = 1.09813$),它们的结合常

数比较大,同时温度对叶酸和 HSA 的结合常数影响比较大, $10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。从 17°C 时的 $7.50 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 变化到 37°C 时的 $1.98 \times$

Table 1 Thermodynamic parameters of the FA-HSA binding procedure

$T/^\circ\text{C}$	$K_A/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	n	$\Delta H/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta G/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S/(\text{J} \cdot (\text{mol} \cdot \text{K})^{-1})$
17	7.50×10^4	1.011 3	36.28	-13.67	172.2
37	1.98×10^5	1.098 1	36.28	-14.78	164.7

2.4 叶酸和 HSA 的主要作用力类型

小分子与生物大分子的作用力类型包括氢键、范德华力、静电引力、疏水作用力^[15,16], 温度变化范围不大时, 可以将作用过程的焓变 ΔH 作为常数, 依据热力学参数方程

$$\ln(K_2/K_1) = (1/T_1 - 1/T_2)\Delta H/R \quad (3)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT\ln K \quad (4)$$

根据 17 和 37°C 两个温度下的结合常数可以计算出叶酸和 HSA 相互作用的热力学函数值, 结果列于表 1。

Ross 等根据大量的实验结果, 总结了生物大分子与小分子作用力类型的热力学规律^[16], $\Delta S > 0$ 可能是疏水和静电作用力; $\Delta H > 0$ 同时 $\Delta S > 0$ 为疏水作用力; $\Delta H < 0$ 时主要为静电相互作用。根据实验结果, 17 和 37°C $\Delta H > 0$, 且 $\Delta S > 0$, 因此可以推测该体系中叶酸和 HSA 之间的作用力以疏水作用为主, 同时也存在静电引力。

2.5 叶酸与 HSA 结合距离的计算

根据 Förster 偶极-偶极非辐射能量转移理论, 可以求出小分子与蛋白质分子中发射荧光的基团之间的距离。距离越小, 药物分子越有利于被蛋白质存储与转运。能量转移效率与给体-受体间的距离 r 的关系为

$$E = 1/[1 + (r/R_0)^6] \quad (5)$$

能量转移的效率 (E) 为 50% 时的距离称为临界距离, 记为 R_0

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

式中, K^2 为供体-受体各项随机分布的取向因子, n 为介质的折射指数, Φ_D 为给体的荧光量子产率, J 表示供体的发射光谱与受体的吸收光谱二者重叠积分。将式子变形整理得到

$$J = \sum F(\lambda)\epsilon(\lambda)\lambda^4 \Delta\lambda / \sum F(\lambda)\Delta\lambda \quad (7)$$

$F(\lambda)$ 为荧光受体在波长 λ 处的荧光强度, $\epsilon(\lambda)$ 为受体在波长 λ 处的摩尔吸光系数。能量转移效率 E 可用下式计算

$$E = 1 - F/F_0 \quad (8)$$

只要得到 E , K^2 和 n 并通过测定光谱求出积分 J , 就可以计算得到 R_0 与 r 。

人血清白蛋白的荧光光谱图和叶酸的吸收光谱如图 4。用矩形分割法对该图中光谱重叠部分的面积求和。求得光谱的重叠积分 $J = 9.78 \times 10^{-15} \text{ cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

在上述实验条件下, 取向因子供体受体各项随机分布的平均值 $K^2 = 2/3$, n 折射指数, 取水和有机物平均值 $n = 1.336$, $\Phi_D = 0.118$ ^[16], 将上述数值代入式(6)求得 $R_0^6 = 1.70 \text{ nm}$ 。再通过叶酸与 HSA 摩尔比为 1:1 时络合物的荧光强度, 通过(8)式计算得到能量转移效率 $E = 0.052 65$ 。

HSA 的荧光主要来自于色氨酸残基 Trp214, 计算得到它们的距离 $r = 1.77 \text{ nm}$, 具备了能量转移猝灭蛋白质荧光的

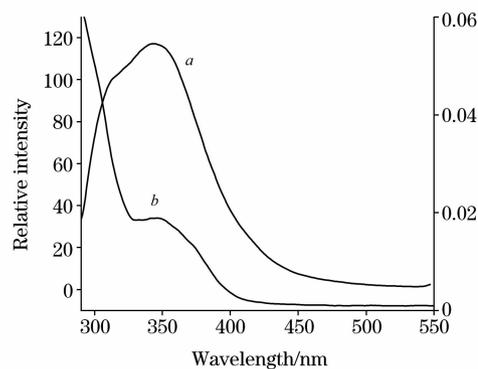


Fig. 4 The fluorescence emission spectra of HSA(a) and the UV absorption spectra of FA(b)

$$c_{\text{HSA}} = c_{\text{FA}} = 2.4 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

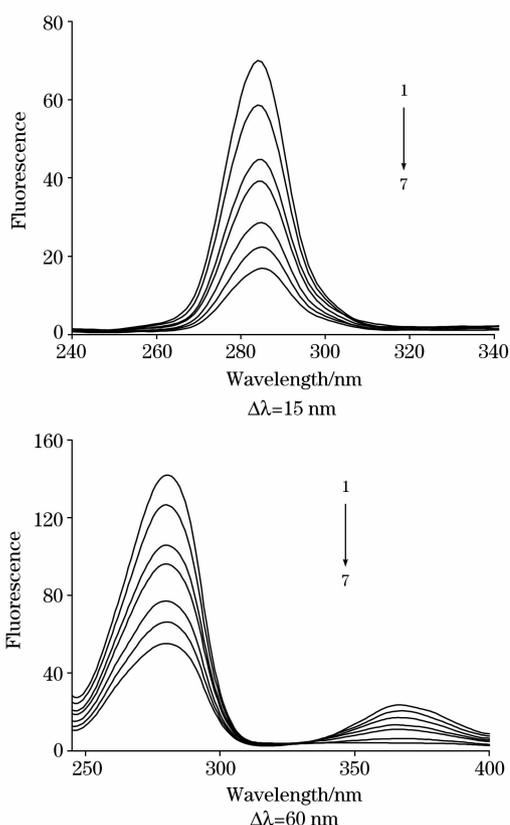


Fig. 5 Synchronous fluorescence spectrum of HSA

$$c_{\text{HSA}} = 2.0 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}; \text{ from up to down, } c_{\text{FA}} = 0, 0.2 \times 10^{-5}, 0.6 \times 10^{-5}, 0.8 \times 10^{-5}, 1.2 \times 10^{-5}, 1.6 \times 10^{-5}, 2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

条件^[17]。由于结合距离 r 大于能量转移效率为 50% 时的临界距离 R_0 , 说明非辐射能量转移引起蛋白质荧光猝灭的几率比静态猝灭的要很多小。

2.6 叶酸对 HSA 构象的影响

固定激发波长和发射波长的间距为 $\Delta\lambda$, 同步扫描激发和发射单色器可得到同步荧光光谱。在蛋白质的同步荧光光谱中, $\Delta\lambda=15$ nm 时表现出酪氨酸残基的荧光光谱, $\Delta\lambda=60$ nm 时则表现出色氨酸残基的荧光光谱^[18]。

固定 HSA 浓度逐渐增大叶酸的浓度时, 记录 $\Delta\lambda=15$ nm 和 $\Delta\lambda=60$ nm 时的同步荧光光谱(图 5)。发现酪氨酸残基的最大发射波长保持不变, 而色氨酸残基的最大发射波长发生红移, 在 360 nm 处出现新的发射峰。这一结果表明, 叶酸的加入使 HSA 的构象发生变化, 色氨酸残基所处环境的疏水性降低, 该结论也与计算机模拟分子对接实验一致。

2.7 叶酸与 HSA 结合模式的分析

人血清白蛋白(HSA)是血浆中含量最丰富的载体蛋白, 其分子量约为 66 500, 含 585 个氨基酸残基。HSA 的肽链中共含有 18 个酪氨酸(Tyr), 30 个苯丙氨酸(Phe)和一个 214

位的色氨酸(Trp)。HSA 由三个功能相似的区域组成, 每个结构域又包含两个子域, 这就形成了 I A, I B, II A, II B, III A, III B 六个亚域, 每个结构中 A 和 B 又以槽口相对的方式形成圆桶状结构。药物小分子主要结合在 II A 和 III A, 分别称做 site I 和 site II。site I 位点又被称为 Warfarin 和 Azapropazone 结合区, 而 Site II 主要结合 Indole 和 Benzodiazepone; 这两个区域都是由疏水性氨基酸残基构成疏水空腔, 带有电荷的氨基酸残基形成了疏水空腔的入口。由于形成空腔的结构和电荷不同, Site I 更有利于结合体积比较大、带负电和具有杂原子环的小分子, 而 Site II 更趋于结合一些芳香酸类小分子^[19,20]。叶酸分子较大, 且拥有含氮杂环和较大的共轭体系, 故叶酸结合在 HSA 的 Site I 处的可能性较大。

叶酸分子与 HSA 发生相互作用时, 叶酸分子通过静电引力靠近疏水空腔, 叶酸的蝶啶和苯环部分的疏水性作用力与空腔内部的氨基酸残基相互作用, 形成比较稳定的结构。这一结果阻止了酪氨酸(Tyr)和色氨酸(Trp)之间发生能量转移导致 HSA 内源荧光猝灭。

参 考 文 献

- [1] CHEN Qing-chuan, MOU Shi-fen(陈青川, 牟世芬). Journal of Chemical Education(化学教育), 1996, (6): 1.
- [2] OU Jing-min, ZHANG Yi-chu(欧敬民, 张一楚). Foreign Medical Sciences Subbranch Surgery(国外医学外科学分册), 2002, 29(2): 57.
- [3] Wiener E C, Konda S, Shadron A, et al. Investigation Radiology, 1997, 32(12): 748.
- [4] Wang S, Low, Philip S. Journal of Controlled Release, 1998, 53: 39.
- [5] XING Shi-an(邢诗安). Foreign Medical Science • Radiomedicine and Nuclear Medicine(国外医学 • 放射医学核医学分册), 2002, 26(6): 257.
- [6] Shinoda T, Takagi Akira, et al. Journal of Pharmaceutical Science, 1998, 87(12): 1521.
- [7] ZHANG Qing-wen(张庆文). Foreign Medical Science World Pharmacy(国外医药 • 合成药 • 生化药 • 制剂分册), 1996, 17(5): 266.
- [8] WANG Xiao-yang(汪啸洋). Foreign Medical Science World Pharmacy(国外医药 • 合成药 • 生化药 • 制剂分册), 1994, 15(1): 8.
- [9] ZHAO Wei-zhang, CUI Zhi-yong, LI Ren-li, et al(赵维璋, 崔智勇, 李仁利, 等). Journal of Beijing Medical University(北京医科大学学报), 1995, 27(3): 233.
- [10] Jansen G, Jackman A L. Antifolate Drugs Cancer Therapy. Totowa, NJ: Humana Press Ino., 1999, 293.
- [11] Braun A M, Maurette M T. Photochemical Technology, Eds., New York: Oliveros, E. Wiley, 1991. 41.
- [12] LIU Yong-ming, LI Gui-zhi(刘永明, 李桂芝). Chinese Journal of Applied Chemistry(应用化学), 2004, 21(6): 621.
- [13] ZHANG Hai-rong, GUO Si-yuan, LI Lin, et al(张海容, 郭祀远, 李琳, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2001, 21(6): 829.
- [14] CHI Xin-ying, CHI Yan-hua(迟欣颖, 迟燕华). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(11): 2097.
- [15] Klotz I M, Urquhart J M. J. Am. Chem. Soc., 1949, 71(3): 847.
- [16] Ross P D, Subramanian S. Biochem, 1981, 20(11): 3096.
- [17] YANG Man-man, YANG Pin, ZHANG Li-wei(杨曼曼, 杨频, 张立伟). Chinese Science Bulletin(科学通报), 1994, 39(1): 31.
- [18] MA Chun-qi, LI Ke-an, et al(马春琪, 李克安, 等). Acta Chimica Sinica(化学学报), 1999, 57(4): 389.
- [19] Ulrich K H. Pharmacological Rev., 1981, 33(1): 17.
- [20] XIE Meng-xia, XU Xiao-yun, WANG Ying-dian, et al(谢孟峡, 徐晓云, 王英典, 等). Acta Chimica Sinica(化学学报), 2005, 63(22): 2055.

Spectroscopic Study on Binding of Folic Acid to Human Serum Albumin

LIU Hui-juan, LI Peng, ZHANG Ya-dong, GUO Cao, DENG Jun-yuan, CAI Jian-wei, LIU Bo-li*

Key Laboratory of Radiopharmaceuticals (Beijing Normal University), Ministry of Education, School of Chemistry, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

Abstract The interaction of human serum albumin and folic acid was studied using fluorescence spectroscopy, UV absorption and synchronous fluorescence spectroscopy in the pH 7.4 Tris-HCl buffer system at different temperatures. The research shows that these interactions result in the endogenous fluorescence quenching of HSA, which belongs to a static quenching mechanism. The quenching rate constants, the binding constants and the binding sites of the static quenching were calculated. The distance between the body (HSA) and receptor (folic acid) and the efficiency of energy transfer were obtained to be 1.77 nm and 0.052 65 respectively, based on the theory of Förster nonradiative energy transfer. And according to the thermodynamic parameters calculated the binding of HSA and folic acid is mainly attributed to the hydrophobic interaction, partly static force. Furthermore the synchronous fluorescence spectrum was utilized to investigate the conformational transformation; The decline result of the hydrophobic nature around Trp demonstrates that the folic acid is in the hydrophobic cavity of HSA.

Keywords Folic acid; Human serum albumin; Fluorescence spectroscopy; Fluorescence quenching

(Received May 12, 2008; accepted Aug. 16, 2008)

* Corresponding author