

对磺酸基杯[4]芳烃与血红蛋白相互作用的光谱研究

林琳¹, 孙素颜¹, 穆雪², 刘睿¹, 冶保献^{*1}

(1. 郑州大学化学系, 郑州 450052; 2. 厦门大学化学化工学院, 福建厦门 361005)

摘要:用荧光光谱法和紫外可见分光光度法研究了表面活性剂存在下对磺酸基杯[4]芳烃与牛血红蛋白的相互作用机理。由 Stern-Volmer 方程及紫外可见吸收光谱图确定对磺酸基杯[4]芳烃对血红蛋白的荧光猝灭过程为动态猝灭, 求出了猝灭常数。由热力学参数判断二者之间的作用力主要是疏水作用。依据能量转移理论得出荧光给体受体间的距离 r 。在同步荧光光谱中, 对磺酸基杯[4]芳烃的加入对血红蛋白构象的改变不大。

关键词:对磺酸基杯[4]芳烃; 血红蛋白; 荧光猝灭

中图分类号: O657.39 **文献标识码:** A

血红蛋白(hemoglobin, Hb)是脊椎动物红细胞内的呼吸蛋白,起着运输 O_2 、 CO_2 、分解 H_2O_2 等与氧和能量代谢有关的重要作用。有关血红蛋白与内源及外源性化合物的结合机制对于生命科学、化学、药学和临床医学具有重要的意义。而杯芳烃(Calixarene)被认为是继环糊精、冠醚之后的第三大类充满魅力的新型化合物。水溶性杯芳烃在生物学及制药方面的应用始于 1955 年 Cornforth 发现磺酸基杯芳烃具有抗结核的性质^[1]。由此,水溶性杯芳烃引起了科学工作者的广泛兴趣。研究发现其具有抗血栓^[2]、抗菌、抗癌和抗艾滋病病毒^[3]、抑制酶及赖氨酰氧化酶^[4]等的活性。

本文在模拟人体生理条件下(pH 为 7.4, 离子强度为 0.1),用荧光光谱法和紫外可见分光光度法研究了磺酸基杯[4]芳烃(4-Sulfonic calix[4]arene, SCX4)与血红蛋白的相互作用,计算了猝灭常数和热力学参数,同时考察了 SCX4 对血红蛋白构象的影响。其结果为水溶性杯芳烃在制药及生命科学研究方面提供了有益的实验数据。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

日立 F-3010 型荧光光度计(日本,日立公司);UNICO UV-2102 PC 型紫外-可见分光光度计;HANA pH 213 型酸度计。

牛血红蛋白(天津市中山研究所)配制成 $1.56 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液并于冰箱 4°C 保存; $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对磺酸基杯[4]芳烃溶液(Acros Organics 公司,纯度为 95%); $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 十二烷基硫酸钠溶液(SDS, 上海化学试剂公司);pH=7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液(内含 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 溶液);所用试剂均为分析纯以上,实验用水为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

在一系列 10 mL 比色管中依次加入 1 mL 血红蛋白储备液,2 mL SDS 溶液,一定量的 SCX4 溶液及 2 mL 缓冲溶液,定容后放置 15 min。在最大激发波长 281 nm 处测定体系的荧光强度,并扫描 $\Delta\lambda = 80 \text{ nm}$ 时的同步荧光光谱。

收稿日期: 2007-03-20 修回日期: 2007-05-23

基金项目: 国家自然科学基金(No. 20475050); 河南省基础与前沿技术研究项目(No. 072300420080)

通讯联系人: 冶保献,男,博士,教授,研究方向:生物分析化学。

2 结果与讨论

2.1 荧光光谱

血红蛋白分子中含有色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸残基, 能够发射荧光, 但血红蛋白的内源荧光微弱(图 1a), 加入表面活性剂后可以极大地增强其荧光强度(图 1b), 且最大发射波长由 338 nm 蓝移至 331 nm。在此二元体系中再加入 SCX4 溶液后, 体系的荧光强度明显降低(图 1c)。荧光峰的位置无变化。图 2 为 SCX4 浓度的改变对血红蛋白荧光强度的影响。如图所示, 随着 SCX4 浓度的增加, 血红蛋白的荧光强度逐渐降低, 表明二者间存在相互作用。

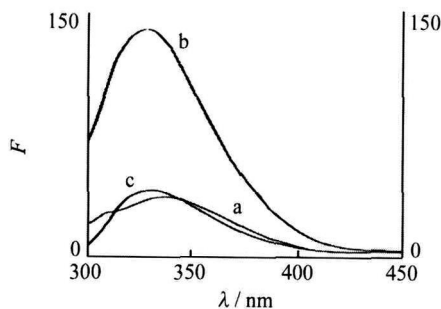


Fig. 1 The fluorescence spectra of Hb (a), Hb-SDS (b) and Hb-SDS-SCX4 (c)

$c_{\text{SCX4}}: 3.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;
 $c_{\text{Hb}}: 1.56 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;
 $c_{\text{SDS}}: 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

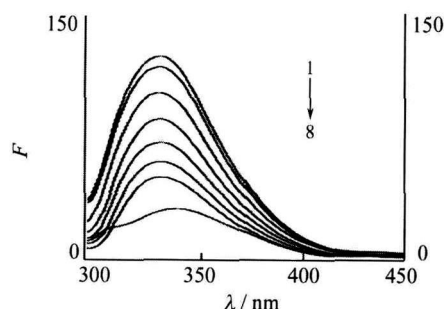


Fig. 2 The fluorescence quenching spectra of hemoglobin upon addition of SCX4

$c_{\text{Hb}}: 1.56 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{SDS}}: 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;
 c_{SCX4} from 1 to 7 is 0, 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2 and $2.5 (\times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$. The lowest curve is the spectra of hemoglobin without SDS.

2.2 表面活性剂的选择

表面活性剂对荧光测定具有增溶、增敏、增稳的独特作用^[5]。血红蛋白与 SCX4 的混合体系易混浊, 加入表面活性剂 SDS 后, 体系澄清且稳定。另外血红蛋白内源荧光微弱, 加入表面活性剂增敏其荧光后, 可以更灵敏的研究 SCX4 对其荧光猝灭机理, 因此表面活性剂 SDS 的存在对整个测定有益。

分别考察了十种表面活性剂对测定体系的影响。发现六种阳离子表面活性剂如十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、氯化十六烷基吡啶(CPC)等分别加入测定体系后, 均出现混浊现象。原因应是 SCX4 在水溶液中以阴离子形式存在, 能与阳离子表面活性剂作用形成不溶于水的胶束而产生混浊现象。而阴离子表面活性剂十二烷基硫酸钠(SDS)、十二烷基苯磺酸钠(SDBS)和非离子表面活性剂乳化剂 OP 分别加入体系后, 测定体系澄清且增敏效果显著。综合考虑各种因素, 选用十二烷基硫酸钠(SDS)做增敏剂。它对血红蛋白的增敏机理与血红蛋白的结构有关。血红蛋白由四条多肽链组成, 每一条折叠成一个组, 由于缺少足够的暴露, 因此其自身的天然荧光较弱。而 SDS 的加入, 使血红蛋白的肽链发生去折叠或某种程度的伸展, 内部的疏水基团或疏水结合点裸露, 原来深埋于分子内部的血红素更加暴露^[6], 从而增强血红蛋白的荧光强度。

2.3 猝灭机理及猝灭常数的测定

为了确定 SCX4 对血红蛋白的猝灭类型, 根据 Stern-Volmer 方程: $F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q]$, 以 F_0/F 对 $[Q]$ 作图, 得到不同温度下的 Stern-Volmer 图。如图 3 所示, 随着温度的升高, 血红蛋白猝灭曲线的斜率升高, 表明猝灭过程为动态猝灭。由图中各直线斜率可以求出 Stern-Volmer 猝灭常数 K_{sv} , 生物大分子的荧光寿命 τ_0 一般约为 10^{-8} s ^[7], 则可以进一步求出双分子猝灭常数 K_q , 结果列于表 1。

Table 1 Quenching constants and thermodynamic parameters for the interaction of hemoglobin with SCX4

t (°C)	$K_{sv} (10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$K_q (10^{11} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	R	$\Delta_r G$ (kJ·mol ⁻¹)	$\Delta_r H_m$ (kJ·mol ⁻¹)	$\Delta_r S_m$ (kJ·K ⁻¹ ·mol ⁻¹)
20	6.94	6.94	0.9963	-21.5	10.4	0.109
35	8.54	8.54	0.9955	-23.2		

动态猝灭的最大扩散碰撞猝灭常数为 $2 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ^[8], 但从表 1 看来, K_q 值大于最大扩散碰

撞猝灭常数, 似乎猝灭机理不应是动态猝灭, 但考虑到实验体系为离子溶液, 离子强度是影响猝灭常数的重要因素^[5]。故认为 K_q 的增大很可能是离子强度影响的结果。为进一步验证 SCX4 对血红蛋白荧光的猝灭机理, 测定了紫外-可见吸收光谱图(图4)。图中两条曲线分别是血红蛋白的紫外-可见吸收光谱图,

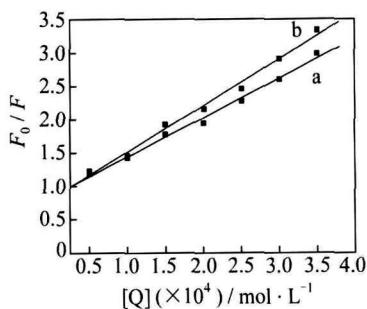


Fig. 3 Stern-Volmer curves for the quenching of hemoglobin by SCX4 at 20 °C (a) and 35 °C (b)

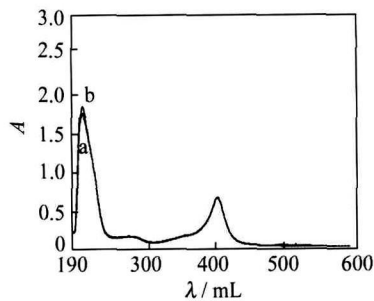


Fig. 4 The absorption spectrum of Hb (a) and Hb + SCX4(1: 1) (b)
 $c_{Hb} = c_{SCX4} = 1.56 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{SDS} = 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

及以 SCX4 溶液作参比, 所测的 SCX4 与血红蛋白等摩尔混合物的光谱图。两图谱几乎完全重合, 表明 SCX4 的加入并未使血红蛋白的紫外吸收光谱发生变化。SCX4 对血红蛋白的荧光猝灭是其与血红蛋白激发态分子间所发生的相互作用的结果, 即猝灭机理为动态猝灭。

2.4 SCX4 与血红蛋白结合反应的热力学性质及作用力

分子间的作用力包括氢键, 范德华力, 静电引力, 疏水作用力等。当温度变化不大时, 反应的焓变可认为是常数。由热力学公式 $\ln(K_2/K_1) = \Delta_r H_m (1/T_1 - 1/T_2)/R$, $\Delta_r G_m = -RT \ln K$, $\Delta_r S_m = (\Delta_r H_m - \Delta_r G_m)/T$, 可以计算出 SCX4 与血红蛋白作用的自由能变 $\Delta_r G_m$ 、焓变 $\Delta_r H_m$ 和熵变 $\Delta_r S_m$, 见表 1。 $\Delta_r H_m > 0$ 和 $\Delta_r S_m > 0$, 由此推断 SCX4 与血红蛋白之间的作用力主要是疏水作用^[9]。

2.5 荧光给体-受体间距离的求取

图 5 为 SCX4 的吸收光谱与血红蛋白的荧光光谱的重叠图, 根据 Förster 偶极-偶极无辐射能量转移机理^[10], 积分图中光谱重叠部分(阴影部分), 求得重叠积分 $J = 3.78 \times 10^{-16} \text{ cm}^3 / \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。又求得 $R_0 = 1.45 \text{ nm}$, $E = 0.299$ 。进而求出 SCX4 与血红蛋白分子间的距离 $r = 1.68 \text{ nm}$, $r < 7 \text{ nm}$, 表明 SCX4 与血红蛋白之间存在能量转移。

2.6 同步荧光光谱

选择 $\Delta \lambda = 80 \text{ nm}$, 扫描血红蛋白的同步荧光光谱, 可以得到将色氨酸和酪氨酸残基分离很好的光谱图^[11](图 6)。235 nm 处的峰为酪氨酸残基, 272 nm 处的峰为色氨酸残基。从图中可以看出, SCX4 有导致蛋白质中的氨基酸残基荧光猝灭的作用, 但是其对酪氨酸及色氨酸荧光峰的位置影响不大, 表明 SCX4

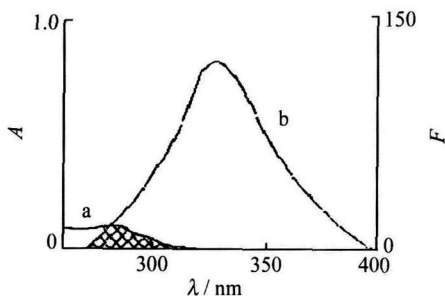


Fig. 5 The overlap of the absorption spectrum of SCX4 (a) and the fluorescence spectrum of hemoglobin (b)
 $c_{Hb} = c_{SCX4} = 1.56 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{SDS} = 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

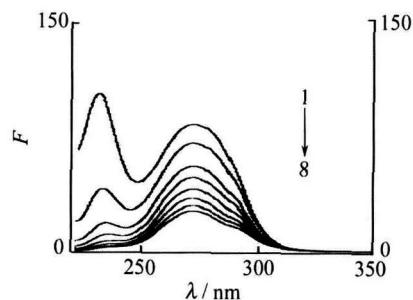


Fig. 6 Synchronous fluorescence spectra of hemoglobin in different SCX4 concentrations
 $c_{Hb} = 1.56 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $c_{SDS} = 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, c_{SCX4} from 1 to 8 is 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 and $3.5 (\times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$.

对血红蛋白构象的改变不大^[12]。

参考文献:

- [1] Cornforth J W, D Arcy Hart P, Nicholls G A, Ress R J W, Stock J A. Br. J. Pharm. Chem. [J], 1955, **10**: 73.
- [2] Hwang K M, Qi Y M, Liu S Y, Lee T C, Choy W, Chen J. Antithrombotic Treatment with Calix(n) arene Compounds [P]. USA: US 5409959, 1995.
- [3] Harris S J. Preparation of Calixarene-based Compounds Having Antibacterial, Antifungal, Anticancer, and Anti-HIV Activity [P]. Ire.: WO 9519974, 1995.
- [4] Hulmes D, Coleman A, Aubert-Foucher E. Use of Calix(n) arenes for Treating Fibrotic Diseases [P]. Fr.: WO 200007585, 2000.
- [5] CHEN Guo-zhen (陈国珍), HUNG Xian-zhi (黄贤智), ZHENG Zhu-zi (郑朱梓), XU Jin-gou (许金钩), WANG Zun-ben (王尊本). Methods of Fluorescence Analysis (荧光分析法) [M]. Beijing (北京): Science Press (科学出版社), 1990: 95, 118.
- [6] WANG Quan-lin (王全林), LIU Zhi-hong (刘志洪), YUAN Hong (原 弘), CAI Ru-xiu (蔡汝秀). Chinese J. Anal. Chem. (分析化学) [J], 2001, **29**(4): 421.
- [7] Lakowicz J R, Weber G. Biochemistry [J], 1973, **12**: 4161.
- [8] Ware W R. J. Phys. Chem. [J], 1962, **66**: 455.
- [9] Ross D P, Subramanian S. Biochemistry [J], 1981, **20**: 3096.
- [10] Förster T. Ann. Phys. [J], 1948, **2**: 55.
- [11] CHEN Xiao-xiang (陈晓翔), YANG Pei-hui (杨培慧), CAI Ji-ye (蔡继业). J. Environ. Health. (环境与健康杂志) [J], 2005, **22**(1): 25.
- [12] DU Xi-tian (杜秀莲), LI Rong-chang (李荣昌), WANG Kui (王 夔). J. Chinese Science Bulletin (科学通报) [J], 2001, **46**(5): 394.

Spectroscopic Study on the Interaction of 4-Sulfonic Calix[4]arene with Hemoglobin

LIN Lin¹, SUN Su-yan¹, MU Xue², LIU Rui¹, YE Bao-xian^{* 1}

(1. Department of Chemistry, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052;

2. Coll. Chemistry & chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005)

Abstract: The interaction of 4-sulfonic calix[4]arene with bovine hemoglobin was investigated in the presence of surfactant by means of fluorescence spectroscopy and UV-Vis absorption spectroscopy. Stern-Volmer equation and UV-Vis spectra indicated that the fluorescence intensity of bovine hemoglobin was quenched by 4-sulfonic calix[4]arene *via* a dynamic quenching mechanism. And the associating constant was calculated. The thermodynamic parameters showed that the interaction of 4-sulfonic calix[4]arene with hemoglobin was mainly the hydrophobic interaction. The distance r between the acceptor and the donor was determined according to Förster non-radiative energy transfer theory. The results of synchronous fluorescence spectra implied that the conformation of hemoglobin was not changed upon addition of 4-sulfonic calix[4]arene.

Keywords: 4-Sulfonic calix[4]arene; Hemoglobin; Fluorescence quenching