

文章编号: 1000-7032(2012)08-0905-06

丁二酰化壳寡糖铈配合物的合成及与牛血清白蛋白的相互作用

李小芳^{1*}, 冯小强¹, 杨 声², 张玉霞¹

(1. 天水师范学院 生命科学与化学学院, 甘肃 天水 741001;

2. 定西师范高等专科学校, 甘肃 定西 743000)

摘要: 合成并表征了丁二酰化壳寡糖铈配合物, 在模拟人体生理条件下, 运用紫外和荧光光谱研究了配合物与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用。结果表明: 随着配合物浓度的增加, BSA的紫外光谱表现出增色效应并伴有蓝移; 配合物与BSA形成复合物, 从而猝灭BSA内源荧光, 该猝灭机制为静态猝灭。计算得到室温下配合物与BSA的结合常数和结合位点数分别为 $2.0682 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 和 1.09472。

关键词: 丁二酰化壳寡糖铈; 牛血清白蛋白; 相互作用

中图分类号: O614.338 文献标识码: A DOI: 10.3788/fgxb20123308.0905

Synthesis and Interaction of Succinic-oligochitosan-Eu(III) Complex with Bovine Serum Albumin

LI Xiao-fang^{1*}, FENG Xiao-qiang¹, YANG Sheng², ZHANG Yu-xia¹

(1. College of Life Science and Chemistry, Tianshui Normal University, Tianshui 741001, China;

2. Dingxi Teachers College, Dingxi 743000, China)

* Corresponding Author, E-mail: lixiaofang1982@163.com

Abstract: Succinic-oligochitosan-Eu(III) complex was synthesized and characterized. Under simulated physiological conditions, the interaction between complex and bovine serum albumins (BSA) was studied by ultraviolet spectrum and fluorescence spectrum. The results showed that the absorption intensity of BSA increased with the concentration of complex. The complex quenched the fluorescence of BSA and it was static quenching, and then the binding constant and binding sites were calculated. They were $2.0682 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ and 1.09472 at room temperature, respectively.

Key words: succinic-oligochitosan-Eu(III); bovine serum albumin; interaction

1 引 言

由于各种药物进入体内需通过血浆的存储和运输到达受体部位而产生药理作用, 血清白蛋白是血浆中含量最丰富的蛋白质, 是基础科学研究

中最常用的药物靶蛋白之一^[1]。研究药物与血清白蛋白的作用有助于阐明药物在体内的存储和转运过程, 也能为药物的设计与开发及药理研究提供有价值的信息。壳寡糖(简称COS)水溶性好, 易被人体吸收, 具有较强的生物活性、独特的

收稿日期: 2012-05-07; 修订日期: 2012-06-03

基金项目: 天水师范学院物理无机化学重点学科基金(ZD0840); 天水师范学院“青蓝”人才工程和天水师范学院中青年教师科研项目(TSA1003)资助项目

作者简介: 李小芳(1983-), 女, 甘肃甘谷人, 主要从事天然高分子生物活性及其稀土配位的研究。

E-mail: lixiaofang1982@163.com

生理活性如抗菌性、抗肿瘤性、抗氧化性、降血脂性、调节免疫等。酰化壳寡糖的合成早已引起人们的重视,因为它是一个很好的中间体,可溶于普通有机溶剂,而且可以进行选择性定量化学修饰而制备高分子药物和具有生物相容性的人造组织等可设计生物材料。乙酰化壳寡糖在体内和体外都能有效地抑制肿瘤血管生成,且效果优于壳寡糖^[2]。稀土元素由于特殊的外层电子构型,具有独特的物理和化学性质,如发光特性^[3]、抗炎、杀菌、抗癌、抗凝血、镇痛作用^[4]。近年来,关于壳聚糖、壳寡糖或其衍生物稀土配合物的报道不断涌现,如与 Pr^{3+} ^[5]、 Y^{3+} ^[6]、 Dy^{3+} ^[5]、 Ce^{3+} ^[6-7]、 Nd^{3+} ^[7-8] 和 La^{3+} ^[7-10] 等离子的配位,而有关酰化壳寡糖稀土配合物的制备以及与牛血清白蛋白相互作用的研究尚未见报道。本课题组在前期工作基础上制备了丁二酰化壳寡糖与 Eu^{3+} 的配合物,并研究其与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用。该研究为今后进一步扩大稀土及其壳寡糖的应用、开拓药物化学的新领域具有一定的意义。

2 实 验

2.1 材料与仪器

壳寡糖,济南海得贝海洋生物工程有限公司;丁二酸酐(化学纯),国药集团试剂有限公司; Eu_2O_3 甘肃稀土新材料股份有限公司;牛血清白蛋白(BSA),北京奥博星生物有限责任公司, $C_{\text{BSA}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 。傅立叶变换红外光谱仪,美国 PE 公司;UV-2450 型紫外可见光谱仪,日本岛津公司;RF-5301PC 型荧光光谱仪,日本岛津公司。

2.2 丁二酰化壳寡糖的制备

将 3.0 g 壳寡糖溶于 75 mL 1% (质量分数) 的乙酸溶液,向其中加入 60 mL 无水乙醇,搅拌后加 21 mL 吡啶;称取 2.5 g 丁二酸酐,溶于 220 mL 乙醇,搅拌后加入反应器,室温下反应 5 h。用无水乙醇析出沉淀,抽滤,并用无水乙醇洗涤多次,65 °C 干燥得丁二酰化壳寡糖,记作 BCS。

称取 0.5 g BCS 溶于适量蒸馏水中,在搅拌下逐滴加入氯化铕水溶液,室温下搅拌 3 h,调节 pH 至中性,继续反应 3 h。反应结束后加入丙酮析出沉淀,抽滤,并用丙酮洗涤多次直至无 Cl^- (AgNO_3 检验),65 °C 干燥得丁二酰化壳寡糖,记作 BCS-Eu。

2.3 配合物与 BSA 的作用

在 5.0 mL 比色管中依次加入 1.0 mL BSA 溶液及一定体积 5 mg/mL 的 BCS-Eu 溶液,以二次蒸馏水定容,室温作用 12 h。在 240 ~ 320 nm 扫描测定 BSA 及配合物作用后 BSA 的紫外光谱。设定激发和发射狭缝宽度均为 3 nm,激发波长 $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$,在 300 ~ 400 nm 扫描荧光发射光谱。

3 结果与讨论

3.1 紫外光谱

CS、BCS 及 BCS-Eu 溶于 1.0% 的醋酸,配制成浓度为 1.0 mg/mL 的溶液,扫描其紫外光谱(如图 1 所示)。发现 CS 在 223 nm 处有一较强的吸收峰,是由 CH_3CONH —中的 $n \rightarrow \sigma^*$ 跃迁引起的。BCS 在 255.236 nm 处产生强吸收峰,在 275.5 nm 处有一弱吸收峰,这是由丁二酸酐中的 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁引起的,表明丁二酸酐与 CS 分子发生反应。BCS-Eu 在 272.236 nm 处有一吸收峰,说明 BCS 与 Eu^{3+} 发生配位作用。

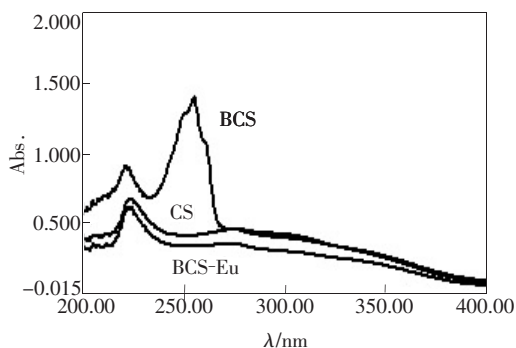


图 1 CS、BCS 及 BCS-Eu 的紫外光谱。

Fig. 1 UV spectra of CS, BCS and BCS-Eu.

3.2 红外光谱

CS 经丁二酸酐改性后,原位于 $3\ 445 \text{ cm}^{-1}$ 处 $-\text{NH}_2$ 和 $-\text{OH}$ 伸缩振动的缔合峰移至 $3\ 412 \text{ cm}^{-1}$ 处且峰变窄;原位于 $1\ 600 \text{ cm}^{-1}$ 处 $-\text{NH}$ 面外弯曲振动强吸收峰移至 $1\ 606 \text{ cm}^{-1}$;原位于 $1\ 028.84 \text{ cm}^{-1}$ 处伯羟基的伸缩振动峰移至 $1\ 023.93 \text{ cm}^{-1}$;BCS 在 $1\ 774.27 \text{ cm}^{-1}$ 处出现了酰胺环上的 $-\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动峰并且 495.66 cm^{-1} 处出现丁二酸酐的特征峰,在 $1\ 251.87 \text{ cm}^{-1}$ 和 899.30 cm^{-1} 处的 CS 特征吸收峰没有消失。表明丁二酸酐与 CS 中 $-\text{NH}_2$ 和仲羟基发生反应,反应过程中没有改变 CS 的结构。BCS-Eu 在

1 364. 59 cm^{-1} 处的吸收峰是 $-\text{CH}_3$ 的对称变形振动峰, 775. 70 cm^{-1} 处的吸收峰是 $-\text{CH}_2$ 的平面摇摆振动峰, 在 3 364. 80 cm^{-1} 处的吸收峰变弱变窄, BCS 配位后在 1 774 cm^{-1} 处的吸收峰消失, 另外在 1 618. 96 cm^{-1} 处产生吸收峰, 并且在 1 023. 93 cm^{-1} 处的吸收峰向低波数移动并且峰强度逐渐变弱。表明 BCS 中的 $-\text{NH}_2$ 和伯羟基参与了 Eu^{3+} 配位。

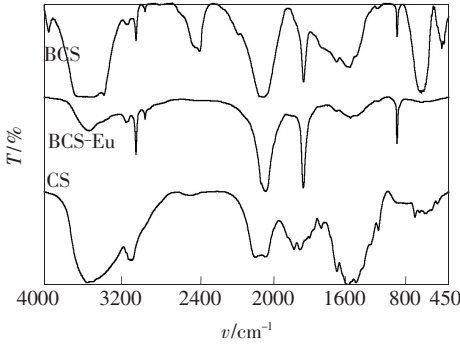


图 2 CS、BCS 及 BCS-Eu 的红外光谱。
Fig. 2 IR spectra of CS, BCS and BCS-Eu.

3.3 配合物与 BSA 的作用

3.3.1 紫外光谱

BCS-Eu 对 BSA 的紫外光谱影响如图 3 所示。BSA 在 280 nm 处有一强的吸收峰, 是其肽链上的酪氨酸和色氨酸的苯杂环 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁引起的。在 BSA 溶液中加入镧配合物后, 吸收强度随着镧配合物浓度的增加而增强, 说明 BCS-Eu 使包围在 BSA 分子内部的酪氨酸和色氨酸残基的芳杂环疏水基团暴露出来, 使吸收峰强度增强, 同时疏水基团之间疏水作用减弱, $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁能量增大, 使吸收峰紫移至 275 nm。紫外光谱表明配合物与 BSA 发生了相互作用。

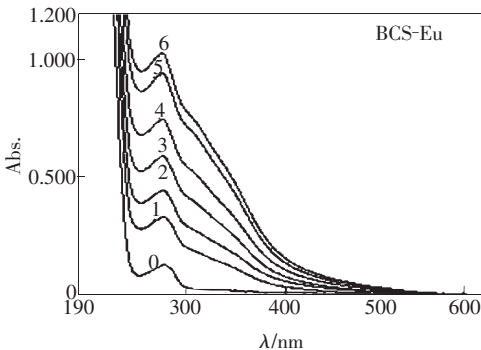


图 3 BCS-Eu 对 BSA 紫外谱图的影响。1 ~ 6 表示 BCS-Eu 浓度 (10^{-4} mol/L) 为: 0, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 1.5。
Fig. 3 Effect of BCS-Eu on the UV spectra of BSA

3.3.2 荧光光谱

以激发波长 280 nm 分别激发 BSA 和 BCS-Eu 溶液, BSA 在 338 nm 附近有很强的荧光发射峰, 是色氨酸残基产生的; 而 BCS-Eu 在 438 nm 附近有荧光发射峰, 在相同浓度下 BCS-Eu 发射峰的强度很低, 可以认为 BCS-Eu 配合物溶液荧光不会干扰 BSA 溶液的荧光。图 4 是 BCS-Eu 存在时 BSA 的荧光光谱图。固定 BSA 的浓度, 依次逐渐加入 BCS-Eu 配合物, 随着 BCS-Eu 配合物浓度的增加, BSA 在 338 nm 附近的荧光强度逐渐减弱, 说明 BCS-Eu 与 BSA 之间通过一定的作用形成了复合物。另外, 随着 BCS-Eu 配合物浓度的增加, 在 438 nm 附近出现一个新的荧光发射峰, 强度随 BCS-Eu 浓度的增大而递增。结果表明配合物对 BSA 的荧光产生猝灭作用。

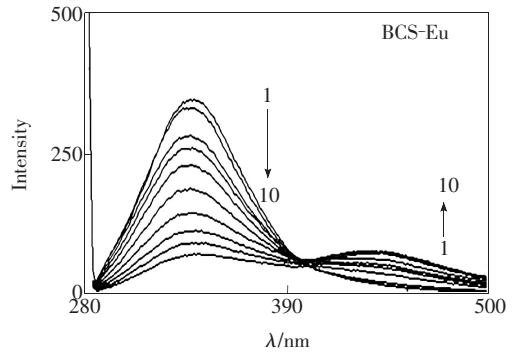


图 4 BCS-Eu 对 BSA 荧光谱图的影响。1 ~ 10 表示 BCS-Eu 浓度 (10^{-4} mol/L) 为: 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0。

Fig. 4 Effect of BCS-Eu on fluorescence spectra of BSA

3.3.3 荧光猝灭行为

荧光猝灭过程分为动态猝灭和静态猝灭。通过 Stern-Volmer 方程来分析 BCS-Eu 对 BSA 的荧光猝灭过程类型。

Stern-Volmer 方程:

$$F_0/F = 1 + K_q \Gamma_0 c_q = 1 + K_{SV} c_q, \quad (1)$$

其中, F_0 为未加入猝灭剂时的荧光强度; F 为加入猝灭剂后的荧光强度; K_q ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) 为双分子猝灭过程的速率常数, $K_q \Gamma_0 = K_{SV}$ ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$) 称为 Stern-Volmer 猝灭常数; c_q 为猝灭剂的浓度; Γ_0 为没有猝灭剂存在时荧光分子的平均寿命, 生物大分子的平均寿命约为 10^{-8} s。根据式(1), 以 $F_0/F - 1$ 对所加入的猝灭剂 BCS-Eu 浓度 c_q 作图, 得 Stern-Volmer 猝灭曲线, 如图 5 所示。由(1)式求得猝灭速率常数 $K_q = 1.0297 \times$

$10^{12} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ($R=0.9961$), 通常各类猝灭剂对生物大分子的最大动态猝灭常数为 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。经分析本实验中双分子猝灭常数 K_q 大于最大动态猝灭常数, 这表明 BCS-Eu 配合物对 BSA 的荧光猝灭效应不是动态猝灭而是二者形成复合物的静态猝灭。

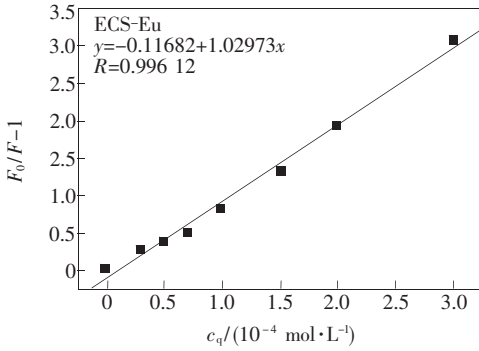


图 5 BCS-Eu 与 BSA 的 Stern-Volmer 曲线

Fig. 5 Stern-Volmer curve of BCS-Eu with BSA

3.3.4 用静态猝灭法分析 BCS-Eu 配合物与 BSA 的相互作用

在静态猝灭作用中, 荧光强度与猝灭剂的关系可由荧光-猝灭分子间的结合常数表达式求出, 采用 Regression equation 方程:

$$\lg(F_0/F - 1) = \lg K + n \lg c_q, \quad (2)$$

其中, F_0 为未加入猝灭剂时的荧光强度; F 为加入猝灭剂后的荧光强度; K 为猝灭剂与 BSA 分子的结合常数; n 为结合位点数。

将相关数据代人(2)式作图, 得 $\lg(F_0/F - 1)$ 与 $n \lg c_q$ 的关系(如图 6)。由图 4 求出 BCS-Eu 配合物与 BSA 分子的结合常数 $K = 2.0682 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ($R=0.9950$), 结合位点数 $n = 1.0947$ 。可以看出在室温下 BCS-Eu 与 BSA 均以 1:1 结合, 这说明 BCS-Eu 与 BSA 之间作用较强。BCS-Eu

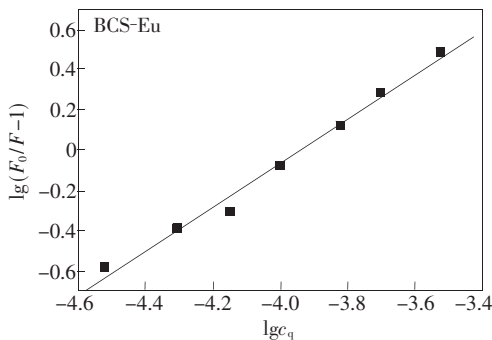


图 6 $\lg(F_0/F - 1)$ 与 $n \lg c_q$ 的关系图

Fig. 6 Plot of $\lg(F_0/F - 1)$ versus $n \lg c_q$

在抗菌、抗氧化、抗肿瘤方面的活性有待进一步研究。

3.3.5 BCS-Eu 与 BSA 的结合距离

根据 Förster 偶极-偶极非辐射能量转移理论^[11], 发生非辐射能量转移必须同时满足三个条件: 一是给体必须发荧光; 二是给体的荧光发射光谱与受体的吸收光谱必须有一定的重叠; 三是给体与受体之间的距离最大不超过 $7 \sim 10 \text{ nm}$ 。给体发生非辐射能量转移导致荧光猝灭, 由此可以求出小分子化合物和蛋白质分子的结合位置相对于发射荧光的基团之间的距离, 距离越小, 越有利于药物分子被蛋白质存储和转运, 越能发挥其药理作用。

当两种化合物发生非辐射能量转移时, 能量转移效率 E 与距离 r 及邻界能量转移距离 R_0 之间的关系式为:

$$E = 1 - F/F_0 = R_0^6 / (R_0^6 + r^6), \quad (3)$$

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

$$J = \int F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda / \int F(\lambda) \Delta\lambda, \quad (5)$$

式中, F_0 与 F 分别为猝灭剂不存在与存在时血清白蛋白的荧光强度; R_0 为能量转移效率为 50% 时的临界距离; K^2 为偶极空间取向因子, 可取供能体-受能体各向随机分布的平均值 $2/3$; n 为介质的折射率, 一般取水和有机物折射率的平均值 1.366; Φ_D 为供能体的荧光量子产率, 通常取 0.15; $F(\lambda)$ 为荧光供体在波长 λ 处的荧光强度; $\varepsilon(\lambda)$ 为受能体在波长 λ 处的摩尔吸光系数; $\Delta\lambda$ 为计算时分割的波长跨度; J 是供能体的荧光发射光谱和受体的吸收光谱之间的光谱重叠积分。

图 7 是 BSA 的荧光光谱与 BCS-Eu 吸收光谱的重叠图, 把光谱重叠部分分割成极小的矩形, 求得 BCS-Eu 的重叠积分 $J = 2.57 \times 10^{-15} \text{ cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

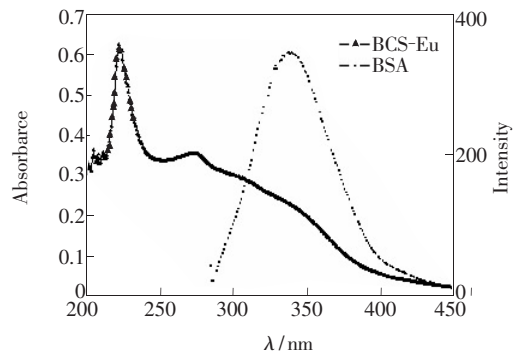


图 7 BCS-Eu 的 UV 光谱与 BSA 荧光光谱的重叠现象

Fig. 7 Overlap of BCS-Eu UV spectrum with BSA fluorescence spectrum

能量转移效率 $E = 0.290$, 算出 $r = 2.33$ nm, 即 BCS-Eu 在 BSA 上的结合位置距色氨酸残基的距离 $r < 7$ nm, 说明 BCS-Eu 与 BSA 之间发生非辐射能量转移。

3.3.6 同步荧光光谱

对于蛋白质的同步荧光光谱, $\Delta\lambda = 15$ nm 时只表现出酪氨酸残基的荧光, $\Delta\lambda = 60$ nm 时仅表现出色氨酸残基的荧光^[12]。因为氨基酸残基的最大发射波长与其所处环境的疏水性有关, 所以由发射波长的改变可判断蛋白质构象的变化。BSA 的空间结构由 3 个结构域组成, 每个结构域

由 2 个亚结构域以槽口相对的方式形成圆筒状结构, 几乎所有疏水性氨基酸残基都包埋在圆筒内部, 构成疏水腔^[13]。固定 BSA 的浓度, 逐渐增大 BCS-Eu 浓度, $\Delta\lambda = 15$ nm 和 $\Delta\lambda = 60$ nm 时的同步荧光光谱如图 8 所示。发现酪氨酸残基的最大发射波长稍有蓝移, 而色氨酸残基的最大发射波长有红移现象, 表明 BCS-Eu 的加入使 BSA 的构象发生变化, 酪氨酸残基所处环境的疏水性增加, 而色氨酸残基所处环境的疏水性降低, 配合物分子的结合部位可能都处于这种疏水腔中, 使 BSA 内部的疏水结构有所瓦解, 肽链的伸展程度增加^[14]。

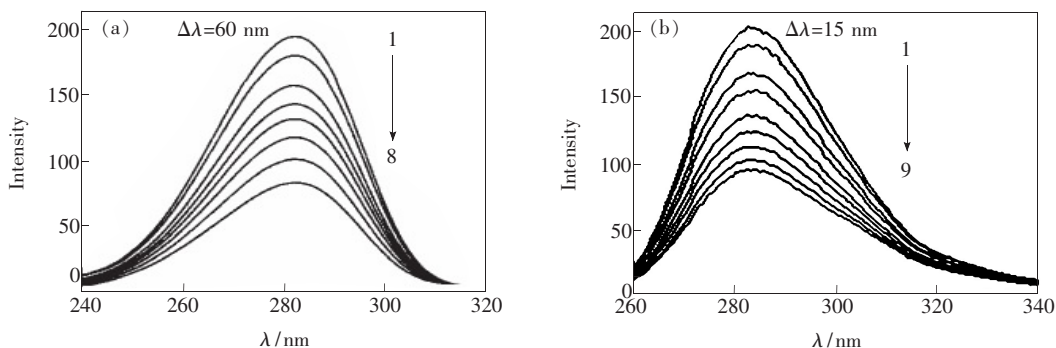


图 8 BCS-Eu 对 BSA 同步荧光光谱的影响。(a) $\Delta\lambda = 60$ nm, 1~8 分别对应 BCS-Eu 浓度 (10^{-4} mol/L): 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 1.5, 2.0; (b) $\Delta\lambda = 15$ nm, 1~9 分别对应 BCS-Eu 浓度 (10^{-4} mol/L): 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5。

Fig. 8 Effect of BCS-Eu on the synchronous fluorescence spectra of BSA

4 结 论

BCS-Eu 能诱导 BSA 分子发生蛋白质肽链伸展现象, 使包围在 BSA 分子内部的色氨酸和酪氨酸残基的芳香环疏水基团裸露出来, 从而使吸收

强度增强。BCS-Eu 对于 BSA 的荧光猝灭效应属于两者之间生成了不发光的复合物而导致的静态猝灭。这些信息对于了解配合物在生物体内的吸收、发布、代谢具有重要的意义。

参 考 文 献:

- [1] Sugio S, Kashima A, Mochizuki S, et al. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 nm resolution [J]. *Protein Eng.*, 1999, 12(6):439-446.
- [2] Wang Z, Zheng L, Yang S, et al. N-acetyl chitooligosaccharide is a potent angiogenic inhibitor both in vivo and in vitro [J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007, 357(1):26-31.
- [3] Liu B S, Xue C L, Wang J, et al. Studies on the interaction between ciprofloxacin and ofloxacin in presence of bovine serum albumin by spectroscopic methods [J]. *Chin. J. Lumin.* (发光学报), 2010, 31(2):285-290 (in Chinese).
- [4] Deng R W, Zhang Z S. Rare earth medicine and pharmacy property [J]. *Chin. Rare Earth* (稀土), 1987, 8(3):36-47 (in Chinese).
- [5] Ren Q X, Zhai Y C, Bai Y H, et al. Synthesis, coordination mechanism and anti-hydroxyl free radical activity of coordination compounds of chitooligosaccharide with PrCl_3 and DyCl_3 [J]. *Chin. Rare Earth* (稀土), 2009, 30(3):57-61 (in Chinese).
- [6] Wang K J, Wen H R, Liu F, et al. Syntheses and spectral characterization of low-molecular-weight chitosan-Ce(III)

- complexes [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis* (光谱学与光谱分析), 2006, 26(7):1277-1280 (in Chinese).
- [7] Yang Z F, He Q Z, Xu D F, *et al.* Preparation, characterization and antibacterial properties of chitosan-RE(Ⅲ) complexes [J]. *Chin. Rare Earth* (稀土), 2009, 30(6):50-54 (in Chinese).
- [8] Li X F, Feng X Q, Yang S, *et al.* Synthesis, antibacterial activity and interaction with bovine serum albumin of chitosan-rare earth complexes [J]. *Journal of Functional Polymers* (功能高分子学报), 2010, 23(2):197-201 (in Chinese).
- [9] Feng X Q, Li X F, Yang S, *et al.* Study on the synthesis of rare earth complexes of o-carboxymethyl chitosan and the IR interaction with bovine serum albumin [J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory* (分析实验室), 2010, 29(11):5-8 (in Chinese).
- [10] Feng X Q, Fu G Q, Li X F, *et al.* Interaction of rare earth with bovine serum albumin [J]. *Chin. J. Lumin.* (发光学报), 2011, 32(2):205-209 (in Chinese).
- [11] Xie M X, Xu X Y, Wang Y D. Spectroscopic investigation of the interaction between 2,3-dihydro-4',5,7-trihydroxyflavone and human serum albumin [J]. *Acta Chimica Sinica* (化学学报), 2005, 63(22):2055-2062 (in Chinese).
- [12] Chen G Z. *Fluorescence Analytical Method* [M]. Beijing: Science Press, 1990:122-189 (in Chinese).
- [13] Zhang B L, Wang W Q, Yuan R Y, *et al.* Spectroscopic studies on binding of anthraquinones and flavonoids to bovine serum albumin [J]. *Acta Chimica Sinica* (化学学报), 1994, 52(12):1213-1217 (in Chinese).
- [14] Zhang X W, Zhao F L, Li K A, *et al.* Studies on the reaction between ciprofloxacin and bovine serum albumin [J]. *Chemical Journal of Chinese Universities* (高等学校化学学报), 1999, 20(7):1063-1067 (in Chinese).