

文章编号: 1000-7032(2013)01-00104-07

4-硫胸苷的合成及其与人血清白蛋白的相互作用

银鸿雁¹, 郑学仿², 曹洪玉², 张晓辉^{1*}

(1. 大连大学 环境与化学工程学院, 辽宁 大连 116622;

2. 大连大学 辽宁省生物有机化学重点实验室, 辽宁 大连 116622)

摘要: 基于含硫核苷类化合物的光敏性和核苷类化合物对肿瘤细胞有特殊的亲和力以及核苷类化合物的抗肿瘤活性,设计合成了4-硫胸苷,并通过 NMR、UV、MS 对其结构进行了表征。利用荧光光谱考察了4-硫胸苷与人血清白蛋白(HSA)的相互作用。实验结果表明:4-硫胸苷对人血清白蛋白(HSA)体系的猝灭是由于他们相互作用形成复合物而导致的静态猝灭。通过计算得出其结合常数分别为 3.46×10^4 , 3.91×10^4 , 4.31×10^4 L · mol⁻¹,并测定了不同温度下的热力学参数。结果表明,4-硫胸苷与人血清白蛋白之间的主要作用力类型为疏水作用力。另外,通过圆二色光谱考察了4-硫胸苷对人血清白蛋白二级结构的影响,结果表明,4-硫胸苷对人血清白蛋白的二级结构基本没有影响。

关键词: 4-硫胸苷; 人血清白蛋白; 核苷; 荧光光谱; 圆二色光谱

中图分类号: O657.3

文献标识码: A

DOI: 10.3788/fgxb20133401.0104

Synthesis of 4-Thiothymidine and Its Interaction with Human Serum Albumin

YIN Hong-yan¹, ZHENG Xue-fang², CAO Hong-yu², ZHANG Xiao-hui^{1*}

(1. College of Environment and Chemical Engineering, Dalian University, Dalian 116622, China;

2. Liaoning Key Laboratory of Bioorganic Chemistry, Dalian University, Dalian 116622, China)

* Corresponding Author, E-mail: xiaohui99@hotmail.co.uk

Abstract: Based on photosensitivity and a special affinity on tumor cells and anti-tumor activity for thionucleoside compounds, 4-thiothymidine was designed and synthesized. The structure was characterized by NMR, UV, MS. The interactions between 4-thiothymidine and human serum albumin (HSA) were also investigated by the fluorescence spectroscopy. The results show that 4-thiothymidine on HSA has a static fluorescence quenching, the binding constants of 4-thiothymidine and HSA are 3.46×10^4 , 3.91×10^4 , 4.31×10^4 L · mol⁻¹, respectively. The determination of thermodynamic parameters at different temperatures for 4-thiothymidine and HSA was investigated, the results show that the main forces of both interactions have typical hydrophobic interaction from thermodynamic data to determination. In addition, the effect of 4-thiothymidine on the secondary structure of HSA was investigated by circular dichroism, the results show that 4-thiothymidine has no effect on the secondary structure of HSA.

Key words: 4-thiothymidine; human serum albumin (HSA); nucleoside; fluorescence spectroscopy; circular dichroism spectroscopy (CD)

收稿日期: 2012-07-02; 修订日期: 2012-10-16

基金项目: 国家自然科学基金(21271036); 教育部留学回国人员科研启动基金资助项目

作者简介: 银鸿雁(1985-), 女, 山西忻州人, 主要从事核苷化学的研究。

E-mail: hongyan155@126.com, Tel: (0411)87402378

1 引言

4-硫胸苷是一种含硫嘧啶核苷类化合物,虽然它的结构与胸苷很类似,但是它们的紫外吸收谱却有着很大的差别,胸苷的最大紫外吸收波长为 270 nm,而硫胸苷的最大紫外吸收波长为 340 nm^[1]。这充分说明 4-硫胸苷结合成为 DNA 可增强对 UVA 光的敏感性。4-硫胸苷导致的这种光谱的改变能够使形成 DNA 链之间的光交联反应和 DNA-蛋白质之间的交联反应,这些性质可以用于结构的研究以及用含有 4-硫胸苷的寡核苷酸来合成蛋白质^[1]。最近报道 4-硫胸苷是一种潜在的抗癌药物,尤其是在紫外光辅助下可以治疗膀胱癌和皮肤癌^[1-2]。因此徐耀忠和 Peter Kann 博士提出一种新颖的、对癌症患者有帮助的治疗方法——近紫外光/4-硫胸苷 (UVA/Thiothymidine) 疗法^[3],即利用 UVA 光与 4-硫胸腺嘧啶核苷 (4-thiothymidine) 的协同作用来损伤增生细胞中的 DNA。

人血清白蛋白 (HSA) 是血浆中含量最丰富的载体蛋白,是目前研究最多的一种蛋白质^[4],担负着药物的贮存、运输等作用,常常作为研究药物与蛋白质相互作用的模型蛋白^[5]。因此,研究药物分子与 HSA 之间的相互作用,有助于理解药物在人体内的运输、分布和代谢情况,对于阐明药物的药理作用和药物代谢动力学也具有非常重要的意义^[6]。HSA 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^[7]。荧光光谱法是研究药物与生物大分子之间相互作用的重要方法^[8,9]。本文以 4-硫胸苷为药物模型,以 HSA 作为血液中生物大分子的代表,采用计算与光谱学实验相结合的方法研究了 4-硫胸苷与 HSA 的相互作用机制,为研究 4-硫胸苷对 HSA 性能的影响提供了一些基础信息。

2 实验

2.1 仪器与试剂

JASCO-UV560 型紫外-可见分光光度计(日本); JASCO-FP6500 型荧光分光光度计(日本); JULABO-F12 型制冷和加热循环器(德国, ±0.01 °C); JASCO-J810 型圆二色分光光度计(日本,带蛋白质二级结构分析软件, Jasco Secondary Structure Estimation Version 1.00.00); PHB-4 酸度计(上海雷磁仪器厂);

FA1004 电子天平(上海精科天平厂)。

HSA: 去除脂肪酸和球蛋白, Sigma 公司出产, 纯度为 99%, 配制 1 μmol/L 的储备液放在冰箱待用。磷酸盐缓冲溶液: 浓度为 50 mmol/L。胸苷: Sigma 公司出产, 纯度为 97%。所用的其它试剂均为分析纯。实验用水为二次去离子蒸馏水。

2.2 4-硫胸苷的合成

4-硫胸苷的合成路线如图 1 所示。

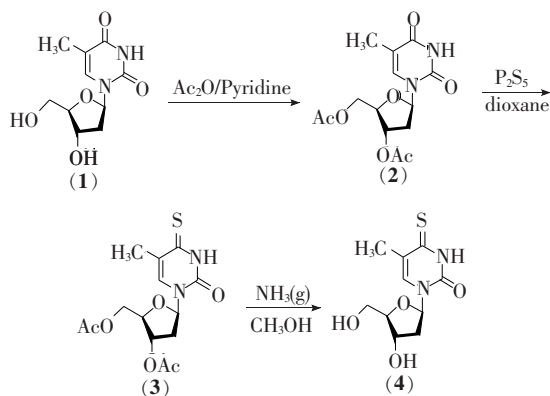


图 1 4-硫胸苷的合成路线

Fig. 1 The synthesis route of 4-thiothymidine

2.2.1 3',5'-O-二乙酰基胸苷(2)的合成

在 100 mL 的三颈烧瓶中,加入胸苷(1) (1.89 g, 7.74 mmol),用无水吡啶 (40.4 mL, 502 mmol)溶解,待其充分溶解后加入纯化过的乙酸酐 (8.3 mL, 87.8 mmol),在冰浴条件下过夜反应,用 TLC 检测。待原料点完全消失后,在减压条件下除去溶剂,加入 CH₂Cl₂ 和苯各 10 mL,在减压条件下再次除去溶剂。粗产品溶于 CH₂Cl₂ (250 mL) 中,再加入饱和 NaHCO₃ (80 mL),用 CH₂Cl₂ 萃取 3 次。合并有机相,用无水 Na₂SO₄ 干燥,过滤,浓缩滤液。用甲醇重结晶,得到白色块状晶体 3',5'-O-二乙酰基胸腺嘧啶核苷(2) (2.41 g, 9.33 mmol),收率为 95%,熔点 (m. p.) 为 129 ~ 131 °C (文献值 126 ~ 128 °C)^[10]。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 11.39 (br s, 1H, NH), 7.50 (s, 1H, 6-H), 6.18 (t, J = 8.0 Hz, 1H, 1'-H), 5.18 (t, J = 4.0 Hz, 1H, 3'-H), 4.25 (d, J = 4.0 Hz, 2H, 5'-H), 4.14 (d, J = 4 Hz, 1H, 4'-H), 2.25 ~ 2.48 (m, 2H, 2'-H), 2.07 (s, 6H, 2 × -OC = OCH₃), 1.80 (s, 3H, -CH₃)。

2.2.2 3',5'-O-二乙酰基-4-硫胸腺嘧啶核苷(3)的合成

Ar 气氛下,3',5'-O-二乙酰基胸腺嘧啶核苷

(2) (1.0 g, 3.06 mmol)溶于(55 mL, 643 mmol)无水二氧六环中,再加入 P_2S_5 (1.02 g, 4.59 mmol)混匀,回流约 40 min,用 TLC [V(石油醚):V(乙酸乙酯) = 1:1]检测,直到显示反应物完全消失。反应停止后用硅藻土过滤,收集滤液,减压除去溶剂,粗产品通过硅胶层析分离,洗脱剂为 V(石油醚):V(乙酸乙酯) = 2:1。得到黄色油状液体 3',5'-O-二氧乙酰基 4-硫胸苷 (3) 0.76 g,收率为 50.7%, m. p. 93 ~ 95 °C (文献值 97 °C)^[11]。¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.79 (br s, 1H, NH), 7.36 (s, 1H, 6-H), 6.13 (t, J = 4.0 Hz, 8.0 Hz, 1H, 1'-H), 5.21 (t, J = 4.0 Hz, 1H, 3'-H), 4.26 (dd, J = 4.0 Hz, 2H, 5'-H), 4.20 ~ 4.21 (m, 1H, 4'-H), 2.32 ~ 2.48 (m, 2H, 2'-H), 2.06 (s, 3H, —OC = OCH₃), 2.07 (s, 3H, —OC = OCH₃), 1.99 (s, 3H, —CH₃)。

2.2.3 4-硫-胸腺嘧啶核苷(4)的合成

3',5'-O-二氧乙酰-4-硫胸苷 (3) (0.6 g, 1.74 mmol)溶于饱和的氨气甲醇溶液(114 mL, 3 mmol)中,在室温下密闭搅拌 4.5 h。待反应完全后减压除去溶剂,粗产品用硅胶层析提纯,洗脱剂为 V(二氯甲烷):V(甲醇) = 9:1,得到黄色固体产物 4-硫胸苷 (4) 0.32 g,收率为 71%, m. p. 116 ~ 118 °C^[12]。¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.70 (br s, 1H, NH), 7.89 (s, 1H, 6-H), 6.11 (t, J = 4.0 Hz, 8.0 Hz, 1H, 1'-H), 5.09 (s, 1H, 5'-OH), 5.26 (s, 1H, 3'-OH), 3.80 (d, J = 4.0 Hz, 1H, 4'-H), 4.25 (s, 1H, 3'-H), 3.59 (dd, J = 12 Hz, 24 Hz, 2H, 5'-H), 2.14 (t, J = 4 Hz, 12 Hz, 2H, 2'-H), 1.97 (s, 3H, —CH₃); ¹³C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 190.07, 147.26, 132.80, 117.07, 87.05, 84.08, 69.46, 60.42, 39.50, 16.35; UV-Vis (CH₃OH), λ_{max} /nm: 337, 249.0; IR (film)/cm⁻¹: 1693 (C = O), 1090 (C = S), 1153 (C = S), 1628 (C = C); Exac mass (ESI-MS) for C₁₀H₁₅N₂O₄S [M + H]⁺ found, 259.0753; calcd 259.0747。

2.3 4-硫胸苷与人血清白蛋白的(HSA)的相互作用

2.3.1 紫外吸收光谱实验

用 50 mmol/L 的磷酸盐缓冲溶液配制成浓

度为 1 μ mol/L 的人血清白蛋白(HSA)溶液,将 4-硫胸苷用磷酸盐缓冲溶液配制成浓度为 10 mmol/L 的溶液,用移液枪移取 2 mL 浓度为 1 μ mol/L 的人血清白蛋白溶液于 1 cm 石英比色皿中,以 pH = 7.4 的磷酸盐缓冲溶液为参比,用微量进样器依次加入适量的 4-硫胸苷溶液,静置 3 min,测定 220 ~ 450 nm 的紫外吸收光谱(4-硫胸苷溶液的加入总体积小于 50 μ L)。

2.3.2 荧光光谱实验

用浓度为 50 mmol/L, pH = 7.4 的磷酸盐缓冲溶液配制成浓度为 1 μ mol/L 的人血清白蛋白溶液,将 4-硫胸苷用磷酸盐缓冲溶液配制成浓度为 1 mmol/L 的溶液。288 K 时,用移液枪移取 2.5 mL 浓度为 1 mmol/L 的 HSA 储备液,加入到光径为 1 cm 的石英比色皿中,用微量进样器依次加入适量的浓度为 1.0 mmol/L 的 4-硫胸苷溶液进行荧光滴定(累计总体积在 50 μ L 以内),摇匀,静置作用 3 min。以 280 nm 为激发波长,激发与发射的狭缝宽度为 5 nm/5 nm,扫描速度为 500 nm/min,以 0.05 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液作为空白校正,在荧光分光光度计上记录 290 ~ 450 nm 范围内的 HSA 的荧光光谱以及 HSA 在 4-硫胸苷作用下的荧光猝灭光谱,按同样的方法测定 298 K 和 308 K 下的 290 ~ 450 nm 范围内的 HSA 的荧光光谱以及 HSA 在 4-硫胸苷作用下的荧光猝灭光谱。

2.3.3 圆二色光谱的实验

298 K 时,用移液枪移取 500 μ L HSA 储备液,加入到光径为 1 mm 的圆形比色皿中,用微量进样器依次加入适量的 1.0 mmol/L 的 4-硫胸苷溶液,静置作用 3 min。在 CD 上测定 190 ~ 250 nm 范围内的圆二色谱,扫描速度为 50 nm/min,响应时间为 2 s。

3 结果与讨论

3.1 4-硫胸苷与 HSA 相互作用的紫外吸收光谱

对于研究小分子与蛋白质的相互作用,紫外吸收光谱法是一种简单有效的方法。蛋白质之所以能产生紫外吸收光谱,其主要原因是氨基酸残基和肽键对光的吸收^[13]。

从图 2 可知,依次加入 4-硫胸苷后,HSA 的紫外吸收峰强度逐渐升高。因此可以初步判定,4-硫胸苷与 HSA 之间发生了相互作用^[14]。

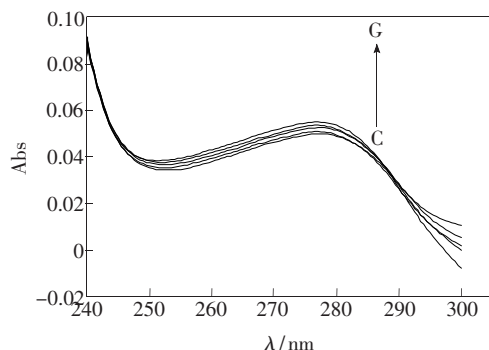


图 2 4-硫胸苷与 HSA 的紫外吸收光谱图。图中曲线 C ~ G 代表 $n(\text{HSA}) : n(4\text{-硫胸苷}) = 1:0, 1:20, 1:40, 1:60, 1:80$ 。

Fig. 2 UV-vis absorption spectra of HSA in the presence of various concentrations of 4-SdT. Curves C ~ G: $n(\text{HSA}) : n(4\text{-SdT}) = 1:0, 1:20, 1:40, 1:60, 1:80$.

3.2 4-硫胸苷与 HSA 相互作用的荧光光谱

图 3 为 25 °C 时 HSA-4-SdT 体系的荧光光谱, 图中曲线 a 代表 25 °C 时 2 μmol/L 的 4-SdT 溶液, 曲线 b ~ g 代表 $n(\text{HSA}) : n(4\text{-SdT}) = 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10, 1:12$ 的 HSA-4-SdT 体系。从图 3 可以看出, 在以 280 nm 为激发波长时, 4-硫胸苷在扫描的范围内基本无荧光; 随着 4-硫胸苷的加入, HSA 的荧光强度逐渐降低, 表明 4-硫胸苷能使 HSA 的荧光猝灭, 两者之间存在相互作用。

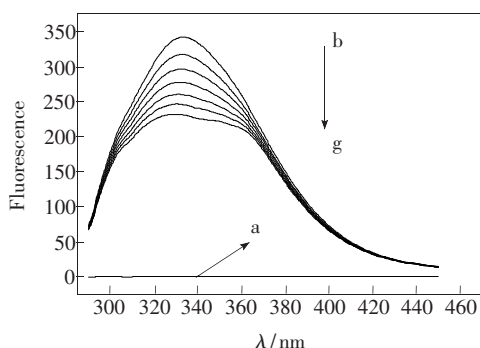


图 3 HSA-4-硫胸苷体系的荧光光谱

Fig. 3 Emission spectra of HSA in the presence of various concentrations of 4-SdT

3.3 荧光猝灭机理

3.3.1 4-硫胸苷与 HSA 的猝灭常数

荧光分子与猝灭剂之间相互作用引起荧光强度降低的现象称为荧光猝灭。荧光猝灭过程通常分为动态猝灭和静态猝灭。动态猝灭是因为猝灭剂和荧光分子之间碰撞导致荧光物质荧光强度减弱, 温度升高会引起扩散系数增大, 因此动态猝灭常数随温度的升高而增大, 动态猝

灭不影响荧光分子的结构。静态猝灭是由于猝灭剂和荧光分子之间在基态发生了配合作用, 生成了不发荧光的复合物, 进而导致荧光物质的荧光强度减弱。对于静态猝灭, 温度升高可以使基态配合物稳定性下降, 因此静态猝灭常数随温度的升高而下降。动态猝灭是猝灭剂分子与荧光物质激发态分子之间的相互作用导致的, 遵循 Stern-Volmer 方程^[15]

$$F_0/F = 1 + K_q\tau_0[Q] = 1 + K_{sv}[Q], \quad (1)$$

F 表示加入药物后 HSA 溶液的荧光强度, F_0 表示未加入药物 HSA 溶液的荧光强度; K_q 表示双分子猝灭过程速率常数; τ_0 表示猝灭剂不存在时荧光体分子的平均寿命 (生物大分子 τ_0 约为 10^{-8} s), 在猝灭剂不存在的情况下, HSA 的荧光寿命 $\tau_0 = 1.77 \times 10^{-9}$ s; $[Q]$ 为猝灭剂 (即 4-SdT) 的浓度; K_{sv} 称为 Stern-Volmer 猝灭常数, 定义为双分子猝灭速率常数与单分子衰变速率常数的比率 (L/mol), 它意味着这两种衰变途径之间的相互竞争。Stern-Volmer 方程式说明, 以 F/F_0 对 $[Q]$ 作图, 所得直线的斜率即为 K_{sv} 。如图 4 所示, 以 332 nm 处 HSA 的相对荧光强度按公式 (1) 做动态处理, 通过斜率可求得 4-硫胸苷对 HSA 猝灭的 K_{sv} 。

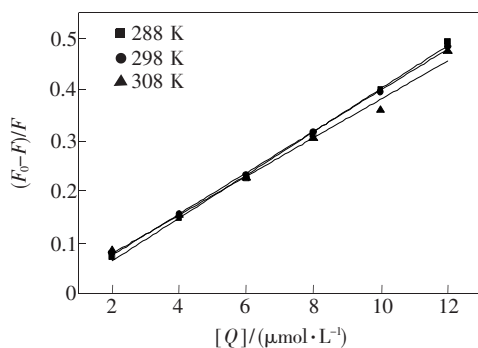


图 4 不同温度下 4-SdT-HSA 的 Stern-Volmer 曲线

Fig. 4 Stern-Volmer plots for the quenching of HSA fluorescence by 4-SdT-HSA at different temperatures

通常动态猝灭常数 K_{sv} 随着温度的升高而增大, 但图 4 和表 1 结果表明, 随着温度的升高, 4-SdT-HSA 体系的 K_{sv} 反而减小, 且实验结果得出的动态猝灭速率常数 K_q 远大于各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散猝灭常数 $K_q = 2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ^[16]。因此, 可以推断 4-硫胸苷与人血清白蛋白这体系的猝灭过程不是扩散和碰撞引起的动态猝灭。

表 1 4-SdT 与 HSA 相互作用的双分子猝灭常数

Table 1 Stern-Volmer quenchin constants of the 4-SdT-HSA system at different temperatures

温度/K	Stern-Volmer 方程	L_q	K_{sv}	R
288	$(F_0 - F)/F = 4.214 \times 10^4 [Q] - 0.02123$	4.214×10^{12}	4.214×10^4	0.997 79
298	$(F_0 - F)/F = 4.034 \times 10^4 [Q] - 0.00619$	4.034×10^{12}	4.034×10^4	0.999 25
308	$(F_0 - F)/F = 3.773 \times 10^4 [Q] + 0.00227$	3.773×10^{12}	3.773×10^4	0.989 96

3.3.2 HSA 与 4-硫胸苷的相互作用结合常数

根据 Lineweaver-Burk 方程^[17]

$$(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + K^{-1} F_0^{-1} [Q]^{-1}, \quad (2)$$

由 $(F_0 - F)^{-1}$ 对 $[Q]^{-1}$ 做 Lineweaver-Burk 双倒数图。从图 5 可以看出曲线的线性关系良好, 曲线的斜率随着温度的升高有所降低。通过直线斜率的倒数可分别求出不同温度下的 4-SdT 与 HSA 的结合常数及相关系数(表 2), 由结合常数可知 4-SdT-HSA 之间有较强的键合作用。

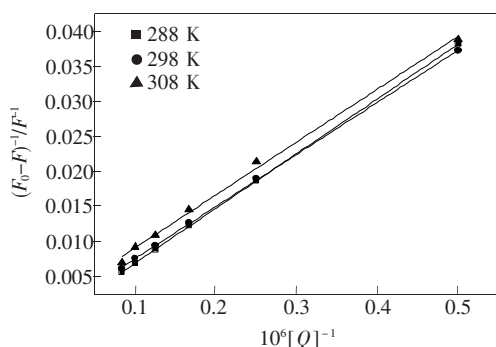


图 5 不同温度下 4-SdT-HSA 的 Lineweaver-Burk 曲线图

Fig. 5 Lineweaver-Burk line for the interaction HSA and 4-SdT

表 2 4-SdT 与血清蛋白的结合常数及相关系数

Table 2 The binding constant K of the 4-SdT-HSA system at different temperatures

温度/K	Lineweaver-Burk 方程	$K/(L \cdot mol^{-1})$	R
288	$(F_0 - F)^{-1} - F_0^{-1} = 28.90412 F_0^{-1} [Q]^{-1} - 0.00103$	3.46×10^4	0.999 98
298	$(F_0 - F)^{-1} - F_0^{-1} = 25.57338 F_0^{-1} [Q]^{-1} - 8.7001 \cdot 10^{-6}$	3.91×10^4	0.999 74
308	$(F_0 - F)^{-1} - F_0^{-1} = 23.19900 F_0^{-1} [Q]^{-1} + 0.00144$	4.31×10^4	0.996 5

3.3.3 4-硫胸苷与 HSA 之间的作用力

小分子和蛋白质等生物大分子之间的相互作用力主要是氢键、范德华力、静电引力和疏水作用力。反应的热力学参数是衡量作用力类型的重要指标, 如焓变 (ΔH) 和熵变 (ΔS)。为此研究了不同温度条件下的结合常数, 选择的温度范围在 15 ~ 45 °C 之间, 此时 HSA 不经受任何结构的降解, 当温度变化不大时反应的 ΔH 可以看作常数。根据 Van't Hoff 定律^[18]

$$\ln K = -\Delta H/RT + \Delta S/R, \quad (3)$$

式中 R 为气体常数, K 为对应温度下的结合常数。将 $\ln K$ 对 $1/T$ 作图(图 6), 由直线斜率和截距可以计算出 ΔH 和 ΔS 的值, 进而根据方程

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

可以计算出反应的自由能变 (ΔG)。根据以上公式以及不同温度下的结合常数计算了 4-SdT 与 HSA 体系的热力学参数, 如表 3 所示。

由表 3 可以看出 4-硫胸苷与人血清白蛋白相

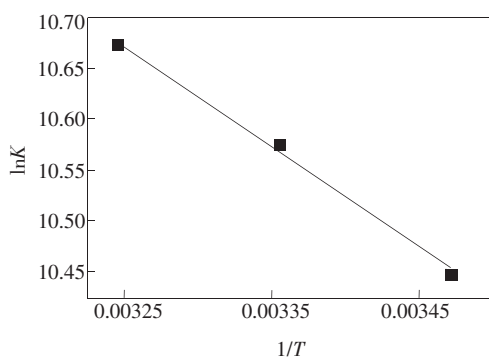


图 6 不同温度 4-SdT-HSA 的 Van't Hoff 曲线图

Fig. 6 Van't Hoff plot for the interaction of HSA and 4-SdT-HSA

互作用过程中的 ΔG 为负值, 从热力学角度来看, $\Delta G < 0$ 说明 4-硫胸苷与人血清白蛋白之间的结合反应能够自发进行。焓变 (ΔH) 值为正值, 熵值 (ΔS) 为正值, 这表明 4-硫胸苷与人血清白蛋白之间的作用力为典型的疏水作用力。

表3 4-SdT 与血清白蛋白体系的热力学参数

Table 3 The related thermodynamic parameters of the 4-SdT-HSA system at different temperatures

温度/ K	$\Delta G/$ ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	$\Delta H/$ ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	$\Delta S/$ ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)
288	-33.132		
298	-34.283	8.11	115.07
308	-35.433		

3.4 圆二色光谱

圆二色光谱可以灵敏的检测一些反应引起的蛋白质分子二级结构的变化。HSA 的二级结构发生极其微弱的改变,表明此种抗癌药物在人体内对 HSA 二级结构几乎没有改变,只改变了氨基酸所处的微环境。

圆二色光谱可以灵敏的检测一些反应引起的

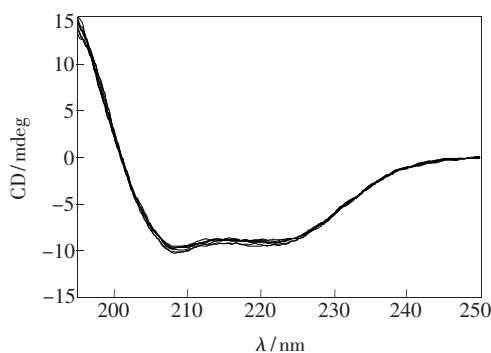


图7 4-SdT 与 HSA 相互作用的 CD 光谱图。 $c(\text{HSA}) = 1 \mu\text{mol/L}$, $c(4\text{-SdT}) = 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 \mu\text{mol/L}$ 。

Fig. 7 Circular dichroism spectra of 4-SdT-HSA. $c(\text{HSA}) = 1 \mu\text{mol/L}$, $c(4\text{-SdT}) = 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 \mu\text{mol/L}$.

表4 4-SdT 与 HSA 相互作用后 HSA 二级结构数据

Table 4 Secondary structural compositions of HSA determined by 4-SdT spectra

$c(4\text{-SdT})/$ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	α -螺旋/ %	β -折叠/ %	β -转角/ %	无规卷曲/ %
0	24.7	34.7	17.8	22.8
0.2	26.7	34.8	14.4	24.0
0.4	24.0	37.0	16.0	23.1
0.6	20.1	42.6	17.9	19.4
0.8	29.5	31.7	15.0	23.9
1.2	25.1	33.9	17.9	23.1
1.4	31.2	30.6	12.8	25.4

蛋白质分子二级结构的变化。图7为4-硫胸苷与HSA相互作用的CD谱图。从图中可以看出,当4-硫胸苷的浓度从 $2.0 \mu\text{mol/L}$ 逐渐增加至 $14 \mu\text{mol/L}$ 时,圆二色谱图基本没有发生变化(具体结果见表4),4-硫胸苷对人血清白蛋白的二级结构基本没有改变。结果表明,4-硫胸苷通过血液作用于肿瘤细胞的过程中对人血清白蛋白的结构影响很小,HSA是一种可以安全携带4-硫胸苷药物达到患处的载体蛋白^[19]。

4 结 论

4-硫胸苷与人血清白蛋白的荧光猝灭属于静态猝灭机制,二者主要靠疏水作用力结合。圆二色数据 displays,4-硫胸苷对HSA的二级结构只产生极其微弱的改变,表明此种抗癌药物在人体内只改变氨基酸所处的微环境,在把药物安全输送到肿瘤细胞的过程中,4-硫胸苷对HSA没有毒害作用。

参 考 文 献:

- [1] Pridgeon S W, Heer R, Taylor G A, *et al.* Thiothymidine combined with UVA as a potential novel therapy for bladder cancer [J]. *Br. J. Cancer*, 2011, 104(12):1869-1876.
- [2] Gemenetzidis E, Shavorskaya O, Xu Y Z, *et al.* Topical 4-thiothymidine is a viable photosensitizer for the photodynamic therapy of skin malignancies [J/OL]. *J. Dermatol. Treatment*. [2011-11-10]. <http://informahealthcare.com/toc/jdt/0/0>.
- [3] Massey A, Xu Y Z, Karran P. Photoactivation of DNA thiobases as a potential novel therapeutic option [J]. *Curr. Biol.* 2001, 11(14):1142-1146.
- [4] Yan Y, Xu J G, Chen G Z. Studies on protein conformation in solution by three-dimensional fluorescence spectrometry [J]. *Science in China Series B: Chemistry (中国科学·B)*, 1997, 27(1):16-22 (in Chinese).
- [5] Wu Q H, Wang D Y, Zhou X, *et al.* Study on the interaction between daidzein and human serum albumin [J]. *Spectrosc. Spect. Anal.* (光谱学与光谱分析), 2009, 19(7):1911-1914 (in Chinese).

- [6] Liang J, Fen S L. Interaction between ambroxol hydrochloride and human serum albumin studied by spectroscopic and molecular modeling methods [J]. *Spectrosc. Spect. Anal.* (光谱学与光谱分析), 2011, 31(4):1020-1024 (in Chinese).
- [7] Lin L, Song S Y, Mu X, *et al.* Spectroscopic study on the interaction of 4-sulfonic calix[4]arene with hemoglobin [J]. *J. Anal. Sci.* (分析科学学报), 2007, 23(6):681-684 (in Chinese).
- [8] Kandagal P B, Ashoka S, Seetharamappa J, *et al.* Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: Spectroscopic approach [J]. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 2006, 41:393-399.
- [9] Sevilla P, Rivas J M, García-Blanco F, *et al.* Identification of the antitumor drug emodin binding sites in bovine serum albumin by spectroscopic methods [J]. *Biochim. Biophys. Acta*, 2007, 1774(11):1359-1369.
- [10] Raffaele S, Claudia C, Occhionero F, *et al.* A new chemical transformation of 4-thiouracil and 6-thioguanine nucleosides to cytosine and adenosine counterparts [J]. *Tetrahedron.*, 1995, 51(12):3607-3616.
- [11] Scheit K H. Die synthese von 4-thiouridin-5'-diphosphat, 4-thiouridin-5'-triphosphat [J]. *Chemische Berichte*, 1968, 101(4):1141-1147.
- [12] Sara V P, Helene M L, Olivier H, *et al.* Synthesis and inhibitory activity of thymidine analogues targeting mycobacterium tuberculosis thymidine monophosphate kinase [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2011, (19):7603-7611.
- [13] Zheng Y, Chen D J, Wang G K, *et al.* Studies on the interaction between *N*-Octyl- β -*D*-glucopyranoside and bovine serum albumin [J]. *Acta Chim. Sinica* (化学学报), 2011, 69(6):633-639 (in Chinese).
- [14] Stryer L. Fluorescence energy transfers as a spectroscopic ruler [J]. *Annu. Rev. Biochem.*, 1978, 47(3):819-846.
- [15] Brustein E A, Vedenkina N S, Irkova M N. Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules [J]. *Photochem. Photobiol.*, 1973, 18(4):263-267.
- [16] Hu Y J, Liu Y, Zhang L X, *et al.* Studies of interaction between colchicine and bovine serum albumin by fluorescence quenching method [J]. *J. Mol. Struct.*, 2005, 750(1/2/3):174-178.
- [17] Xie B, Wan B J, Qin Z H. Interaction between congo red and human serum albumin by fluorescence quenching method [J]. *Chin. J. Spectrosc. Lab.* (光谱实验室), 2011, 28(2):764-769 (in Chinese).
- [18] Zhang Q Z. Study of interaction between the nucleobase-modified nucleoside and serum albumin [D]. Xinxiang: Henan Normal University, 2008 (in Chinese).
- [19] Pei M Y, Zheng X F, Cao H Y. Spectroscopic studies on interaction between 3-bromopyruvic acid and human serum albumin [J]. *Chin. J. Anal. Chem.* (分析化学), 2010, 7(38):948-952 (in Chinese).