

Reductase Inhibitor-Diabetes Complications Trial[J]. Diabetes Care, 2006, 29(7): 1538-1544.

[27] Ohmura C, Watade H, Azuma K, et al. Aldose reductase inhibitor, epalrestat, reduces lipid hydroperoxides in type 2 diabetes[J]. Endocr J, 2009, 56(1): 149.

[28] 张美彪, 黄云湘, 匡旬亚, 等. 依帕司他与甲钴胺改善糖尿病周围神经传导速度的比较[J]. 实用临床医药杂志, 2006, 10(5): 79-84.

(收稿日期: 2012-10-08)

• 综 述 •

金属离子和化合物对血清清蛋白影响的研究进展

陈墨龙¹, 夏 敏¹, 陈仁政¹, 刘毅敏²综述, 赵先英²审校
(第三军医大学: 1. 学员旅 2 队; 2. 药学院化学教研室, 重庆 400038)

关键词: 血清清蛋白; 离子; 化合物; 荧光猝灭
DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.01.033 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4130(2013)01-0073-03

血清清蛋白(SA)是脊椎动物血浆中含量最为丰富并且极易纯化的蛋白质, 由于它这一特有的地位, 在过去 30 年间, 使他成为了物理学家、化学家、生物学家研究的一种典型理想蛋白质。它是血浆中研究最早也是最为清楚的蛋白质, 1982 年得到人血清清蛋白(HSA)的 cDNA 全序列, 随后对其他脊椎动物 SA 的研究也相继展开。到目前为止, 已经对它所表现出的理化特性, 如光谱性质、吸附平衡、电化学性质、热化学性质等一些方面进行了研究, 对其特性、功能有了一定的认识。同时, 由于牛血清清蛋白(BSA)具有非专一性结合的特点, 现已用于免疫诊断治疗法的过程研究、临床化学试剂、细胞培养基等。笔者就近些年关于多种离子及化合物对 HSA 的研究做一简要综述。

1 HSA

HSA 是由约 18 种共 585 个氨基酸残基组成的单链无糖基蛋白质, 整个蛋白质分子共含有 17 个二硫键, Cys34 上有惟一游离的巯基, 在蛋白质修饰中有重要应用。HSA 具有独特的分子结构, 能与代谢产物、调节物、金属离子等物质相结合, 在血液循环过程中作为内源物质与外源物质的存储和运输分子, 对于物质在靶点的运输与释放有重要意义; 同时, HSA 还能可逆地结合许多药物, 影响药物的运转、代谢和清除, 甚至改变药物在血液中的溶解性, 降低毒副作用。另一方面, HAS 相对分子质量较小, 但数目多, 约占总蛋白质分子数的 3/4, 因而可以维持 4/5 左右的血浆胶体渗透压, 而血浆胶体渗透压的改变也影响 HSA 的合成, 因而构成相互影响关系。在自由基清除方面, HSA 氨基序列 34 位上存在半胱氨酸残基, 可转化成巯基, 即硫醇, 作为活性氧和活性氮的清除剂, 硫醇起到自由基清除的作用。由于其特殊的结构与基团, HSA 还具有抗凝、酶活性、酶抑制剂活性等生理活性。

HSA 在血浆中最为丰富, 临床主要作为血浆容量扩充剂, 可用于治疗出血性休克、脑缺血、烧伤等疾病, 通常每次使用剂量都超过 10 g。由于 HSA 主要通过从血浆中提取而获得, 具有来源有限、价格昂贵等缺点, 因此, 很多学者积极探索基因工程、细胞工程等制备方法。关于 HSA 的非治疗作用, 如用作药剂、辅料、诊断试剂、手性物质分离剂、培养基添加剂等的报道也越来越多, 又由于 BSA 与 HSA 的结构相似^[1], 分子量相近, 二者的氨基酸序列高度相似, 而 BSA 又价廉易得, 因此人们常常通过研究离子、化合物与 BSA 的结合, 作为药物对

HSA 结合情况的参考。

2 金属离子与化合物对 HSA 的影响

2.1 金属离子对 HSA 的影响

2.1.1 Pb^{2+} 铅是一种具有神经毒性的重金属元素, 对人体无任何生理功能, 理想血铅浓度为零。铅一旦进入人体, 90% 存在于骨骼, 10% 随血液分布到全身各器官和组织。铅对人体的影响是剂量效应, 并具有持续累积的过程, 随血铅水平的提高, 可对全身血液、神经、肾脏、内分泌和免疫等各系统产生毒性作用, 临床表现复杂, 缺乏特异性。传统认为, 铅侵入人体后, 主要以 Pb^{2+} 形式与红细胞内血红蛋白结合^[2], 关于 Pb^{2+} 与 HSA 相互作用的文献报道较少, 并且文献结果差别较大。因此研究 Pb^{2+} 与 HSA 的相互作用十分必要。有学者采用荧光法研究了 Pb^{2+} 与 BSA 的相互作用^[3], 测定了不同条件下 Pb^{2+} 与 BSA 作用的荧光光谱, 并通过热力学计算探讨了二者的作用方式、BSA 荧光的猝灭机制^[4]、 Pb^{2+} 与 BSA 之间的结合常数及结合位点。结果表明, Pb^{2+} 对 BSA 的荧光猝灭属于静态猝灭, Pb^{2+} 通过疏水作用进入 BSA 的疏水腔与之发生相互作用, 反应的 $A_G = 4.15 \times 10^4$ J/mol, $A_S = 136$ J/(mol · K), 结合数 $n = 1.366$, 结合常数 $K_A = 2.07 \times 10^7$ J/mol。以此模拟了 Pb^{2+} 对人体的影响机制。通过以上一系列实验得出结论, Pb^{2+} 可与 BSA 中的氨基酸残基结合。因此, Pb^{2+} 对于蛋白质的二级结构具有较强的破坏作用, 说明 Pb^{2+} 具有较大的急性毒性。

2.1.2 Cr^{6+} 铬是环境中常见的重金属污染物, 主要来源于电镀、制革、采矿、铬盐化工等工业废水, 是一种毒性较大的致畸、致突变剂, 被国际癌症研究机构归为人类职业致癌物。 Cr^{6+} 对生物机体具有重要的毒性作用, 可导致细胞凋亡及肿瘤发生, 引起 DNA 氧化损伤及蛋白交联的机制还不十分清楚, 近几年研究人员多采用分析光谱的方法, 如荧光光谱、EPR 光谱、散射光谱等方法分析二者的作用机制。有学者采用荧光光谱法、紫外光谱法研究 $K_2Cr_2O_7$ 与 BSA 的相互作用^[5]。实验结果表明, Cr^{6+} 使 BSA 的紫外吸收降低, 峰位红移, 表明 Cr^{6+} 与 BSA 发生较强的相互作用, $Cr_2O_7^{2-}$ 与 BSA 形成基态复合物导致 BSA 内源荧光猝灭, 猝灭机制主要为静态猝灭。实验结果表明, 上述过程是一个熵增加、自由能降低的自发分子间作用过程^[5]。由此可见, Cr^{6+} 在血清蛋白中能够相对稳定地存在, 并且 Cr^{6+} 与 BSA 相互良好结合, 二者发生较强的相互作用

用,使 BSA 的紫外吸收降低,。用同步荧光法和旋光光谱研究表明, Cr^{6+} 与 BSA 的相互作用使得 BSA 二级构象发生变化, α -螺旋含量降低,使色氨酸残基所处的微环境疏水性增加,HAS 的溶解性减小,进而易于出现沉淀现象。另外,高旭等^[6]采用荧光猝灭光谱法,通过 Stern-Volmer 方程,Lineweaver-Burk 方程和双倒数曲线处理实验数据,并计算分析 $\text{Cr}(\text{VI})$ 与 BSA 的热力学参数也得出了同样的结论。

2.1.3 Sm^{3+} 钐属于轻稀土元素,除被广泛用于永磁材料等外,还常用于生物和医疗领域研究^[7]。用光谱法研究了稀土金属离子 Sm^{3+} 与 HSA 的相互作用^[8],发现 Sm^{3+} 对 HSA 有荧光猝灭作用,属于静态猝灭, Sm^{3+} 与 HSA 反应生成了新的复合物,荧光猝灭发生了分子内的非辐射能量转移。 Sm^{3+} 与 HSA 的结合常数 K_b 分别为 $4.12 \times 10^5 \text{ L/mol}$ (298 K) 和 $2.26 \times 10^5 \text{ L/mol}$ (318 K),结合位点数 n 为 1.24 (298 K) 和 1.20 (318 K)。说明 Sm^{3+} 和 HSA 之间有很强的结合作用,这为 Sm^{3+} 在体内被蛋白质储存和转运提供了条件。另外同步荧光法和 CD 光谱研究表明,稀土离子钐与蛋白质相结合,二者发生相互作用,进而影响蛋白质分子固有结构和功能。

2.1.4 Zn^{2+} 锌是人类应用比较广泛的金属元素,是人体内一种必需的微量元素,是机体内蛋白质和酶的重要组成部分,在人体的新陈代谢过程中起着重要的作用。有学者用荧光光谱法研究了 Zn^{2+} 与 BSA 的作用机制。实验发现, Zn^{2+} 对 BSA 具有荧光猝灭作用,其猝灭方式为静态猝灭实验表明 BSA 的最大发射荧光峰是 351 nm,分别加入不同浓度 Zn^{2+} 后,BSA 的最大发射峰位置不变,但是荧光强度均降低。这说明 Zn^{2+} 和 BSA 之间存在相互作用,相互作用的结果使得 BSA 的荧光发生猝灭。在与配合物络合所得产物时同样具有相应的生物效应,赵芳等^[9]通过研究大黄酸锌配合物与 BSA 相互作用得到其圆二色光谱分析,Rhein-Zn 对 BSA 内源荧光具有较强猝灭作用,此猝灭过程是由于形成复合物而引起的静态猝灭和非辐射能量转移,并且随着 Rhein-Zn 浓度的增加,引起 CD 谱强度和位置明显改变,表明此配合物可明显改变 BSA 的二级结构^[10]。通过实验结果可见,锌离子及其配合物与 BSA 相互作用可导致其结构和理化性质发生改变,对于研究锌在人体内的代谢过程有指导意义。

2.2 部分化合物对 SA 的影响

2.2.1 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG) EGCG 是茶叶中主要活性成分,属儿茶素类茶多酚,呈现很好的抗氧化活性^[11]。研究结果表明:EGCG 不仅具有抗肿瘤、抗病毒、抗突变、抗白血病的作用^[12],还具有降压、降脂、降血糖等作用,对肝脏、肾脏及许多身体重要器官的自由基损伤有一定的保护作用;新的研究还发现,EGCG 具有预防中风以及老年痴呆的作用和治疗各种神经系统疾病的潜力。HSA 作为人血浆中含量最丰富的载体蛋白,同样也是大多数药物的传输和分布的载体,研究 EGCG 在人体与 SA 相互作用的方式对阐明 EGCG 的生物活性作用机制具有重要的意义。

由于 HSA 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,通过荧光光谱和紫外可见光谱研究 EGCG 对 HSA 的荧光猝灭机制,从而得到 EGCG 与 HSA 的表现结合常数 K_A 、结合位点常数 n 及结合距离 r ,根据热力学常数得到结合作用力类型,并通过分子对接计算出结合位点。在不同温度下,用荧光猝灭光谱、紫外-可见吸收光谱及分子对接的方法研究 EGCG 与 HSA 的相互作用^[13]。研究结果表明,EGCG 可与 HSA 相互作用并使 HSA 发生内源

性的静态荧光猝灭。利用 Stern-Volmer 方程处理实验数据,计算得到 17、37 °C 下的静态猝灭常数(K_q)分别为 7.153×10^5 和 $7.886 \times 10^5 \text{ L/mol}$,结合常数(K_A)分别为 9.541×10^5 、 $9.586 \times 10^5 \text{ L/mol}$,结合位点数 $n=1$,并利用 Autodock3 程序进行 HSA 和 EGCG 对接计算,对接结果支持了光谱学的结论。另外一些学者研究发现,在存在儿茶素的条件下,HSA 中蛋白质羰基的形成与儿茶素的化学结构有一定关系。为了评估蛋白质羰基在 HSA 的形成,其采用的 HSA 是在儿茶素生理情况下生成 biotin-LC-hydrazide carbonyls 标记蛋白,与使用蛋白免疫印迹儿茶素的比较显示 pyrogallol-type 儿茶素条件下 HSA 形成蛋白质羰基比相应的 catechol-type 儿茶素条件下生成的更多。此外,发现儿茶素拥有 1 个 galloyl 基团下形成的蛋白质羰基比相应的缺乏 1 个 galloyl 基团者更高。使用甲基化儿茶素和酚酸证明了 B-ring 结构和 galloyl 基团的重要性。这些结果表明,在儿茶素条件下形成蛋白质羰基最重要的结构性因素是在 HSA 中的 B-ring,紧随其后的是 galloyl 基团。儿茶素的氧化稳定性和亲和力保证了蛋白质羰基的形成,因此不同儿茶些属性的差异可能导致生物学活性的大小不同^[14]。

2.2.2 头孢美唑钠 头孢美唑为头孢菌素半合成抗菌药物,属头霉素类,对各种 β -内酰胺酶有很强耐受性,并能杀灭对头孢菌素耐药的菌株,抗菌谱广,抗菌活性强。临床常用于敏感细菌所致肺炎等呼吸系统感染、尿路感染、菌血症、胆道感染、腹腔感染及宫腔等妇科感染^[15]。各种药物进入人体一般都要通过血浆的贮存和运输,到达受体,发生药理作用。由于头孢美唑的水溶性较差,所以常使用其钠盐以增加其水溶性,以提高其使其生物利用度。

张洪芹等^[16]通过荧光光谱法研究头孢美唑钠与 BSA 的荧光猝灭机制,发现头孢美唑钠对 BSA 的光谱具有猝灭作用,其猝灭方式为静态猝灭,静态猝灭在整个猝灭过程中起主导作用。猝灭剂和荧光物质在基态时形成不发光的配合物,从而导致荧光分子荧光强度降低。并得到了头孢美唑钠与清蛋白的结合常数 $K_A=2.5 \times 10^5$,结合位点数 $n=0.97$ 。实验表明头孢美唑钠对 BSA 的色氨酸等氨基酸残基有较大影响,随后的研究发现 Zn^{2+} 的加入使得头孢美唑钠与 BSA 的结合常数与结合位点数减小,但是随着 Zn^{2+} 浓度的增大,结合常数及结合位点略有升高,这一结果与栾尼娜等^[17]研究发现 Zn^{2+} 存在下,芦丁与 BSA 的结合常数与结合位点均升高而得出过渡金属离子参与药物结合的观点不一致。张怀斌等^[18]在模拟动物体生理条件下,利用纳米银作标记物^[19-20],通过对头孢美唑钠与纳米银—BSA 体系相互作用的研究,发现附加体系没有改变 BSA 与头孢美唑钠之间的作用机制,但猝灭常数、结合常数减小,结合常数随温度的升高增大;头孢美唑钠与 BSA 之间的作用力变为疏水作用,但短时间内在头孢美唑钠对 BSA 构象的改变上纳米银没有产生影响。这为研究头孢美唑钠的药理、毒理作用和银纳米粒子生物学效应提供了重要信息。

3 小 结

HSA 作为血浆容量扩充剂,在临床上用途广泛,目前已用于失血性休克、脑水肿、流产引起的清蛋白缺乏、肾病等的治疗,由于其治疗用途的重要性,当前成为医学研究的热点之一。通过对多种离子和化合物对 SA 的影响和作用机制的研究,有助于找到能发挥出 SA 最大活性的物质,对一些可能破坏其结构、影响其理化性质的物质有更深入的了解,有助于在临床工作中合理的应用和避免。相信随着社会的不断发展,科学技术

尤其是医疗科技的不断提升,SA 在临床应用将更为广泛,达到更加理想的治疗效果。

参考文献

- [1] 孙艳涛,张玉璞,毕淑云,等.牛血清白蛋白与保泰松和布洛芬相互作用的荧光光谱研究[J]. 高等学校化学学报, 2009, 30(6): 1095-1100.
- [2] 贾宇,刘利杰,胡功成. 铅接触者职业健康监护血铀原卟啉筛选指标值的探讨[J]. 职业与健康, 2008, 24(14): 1370-1371.
- [3] 吴根华,汪春华. 荧光法研究了 Pb^{2+} 与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 光谱学与光谱分析, 2005, 25(2): 246-248.
- [4] 陶慧林,朱仕毅,梁吴东. 铈-铬天青 s 与牛血清白蛋白结合反应及其应用[J]. 分析试验室, 2009, 28(10): 53-55.
- [5] 张根成,许洁艳. Cr(VI) 与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 应用化学, 2010, 27(2): 191-196.
- [6] 高旭,李树伟,马玉洁,等. 牛血清白蛋白与铬(VI)相互作用的荧光光谱法研究[J]. 西部皮革, 2011, 33(22): 30-33.
- [7] 杨乡珍. 钐的光度分析进展[J]. 湿法冶金, 2007, 26(2): 109-112.
- [8] 邓凡政,陈琳琳,汤秀琴. 稀土钐离子与人血清白蛋白的相互作用[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(1): 85-86.
- [9] 赵芳,黄超峰,梁慧,等. 大黄酸锌配合物与牛血清白蛋白相互作用的研究[J]. 分析化学, 2011, 39(3): 401-404.
- [10] 周能,梁逸曾,王平,等. 荷花碱与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 分析化学, 2008, 36(8): 1066-1070.
- [11] Perron NR, Brumaghim JL. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to ironbinding[J]. Cell Biochem Biophys, 2009, 53(2): 75-100.
- [12] Lamoral-Theys D, Pottier L, Dufrasne F, et al. Natural polyphenols that display anticancer properties through inhibition of kinase activity[J]. Curr Med Chem, 2010, 17(9): 812-825.

- [13] 朱美霖,陆洁,韩梅. 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)与人血清白蛋白相互作用的研究[J]. 北京师范大学学报:自然科学版, 2011, 47(3): 277-280.
- [14] Lucie Trnková, Iva Boušová, Veronika Staňková. Study on the interaction of catechins with human serum albumin using spectroscopic and electrophoretic techniques[J]. J. Molecul Struct, 2011, 985(2): 243-250.
- [15] 宫淑艳,石春生. 头孢美唑钠致不良反应 7 例[J]. 医药导报, 2009, 28(5): 672-673.
- [16] 张洪芹,张怀斌. 注射用头孢美唑钠与牛血清白蛋白相互作用的研究[J]. 光谱实验室, 2011, 28(1): 136-139.
- [17] 栾尼娜,吴锦绣,宋玉民,等. 芦丁与血清白蛋白结合作用的热力学研究(I)[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(4): 856-859.
- [18] 张怀斌,张洪芹,董秀丽,等. 头孢美唑钠与 BSA 及纳米银-BSA 体系相互作用的研究[J]. 化学研究与应用, 2011, 23(11): 1428-1434.
- [19] Liu CH, Li ZP, Du BA, et al. Silver nanoparticle-based ultrasensitive chemiluminescent detection of DNA hybridization and single-nucleotide polymorphisms[J]. Anal Chem, 2006, 78(11): 3738-3744.
- [20] Rijiravanich P, Somasundrum M, Surareungchai W. Femtomolar electrochemical detection of DNA hybridization using hollow polyelectrolyte shells bearing silver nanoparticles[J]. Anal Chem, 2008, 80(10): 3904-3909.

(收稿日期:2012-12-12)

• 综 述 •

生物传感器在肠道致病菌临床快速检测中的新进展

庄稚佳 综述,丁世家[△]审校

(重庆医科大学检验医学院/临床检验诊断学教育部重点实验室,重庆 400016)

关键词:生物传感器; 肠杆菌属; 纳米粒子

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.01.034

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)01-0075-03

肠道致病菌是引起感染性腹泻的主要原因之一,主要包括大肠埃希菌、沙门菌属、金黄色葡萄球菌等。传统的细菌培养技术耗时繁琐、检测灵敏度低,无法满足临床上所需的精准快速鉴定。因此,如何快速、灵敏地检测肠道致病菌在疾病预防与控制以及临床诊断中具有重要的意义。生物传感器是对生物物质敏感并将其浓度转换为电信号进行检测的设备,具有方便、快捷、特异性强、灵敏度高、检测时间短等优点。主要由生物识别元件和信号转换器件两部分组成,根据其转换原理的不同,可将生物传感器分为三大类:电化学型、光学型、质量型^[1]。近几年来,研究人员利用各种方法提高生物传感检测的灵敏度,并用于各个领域肠道致病菌的快速检测,取得了一些进展。本文就近几年,生物传感器在肠道致病菌临床快速检测中的新进展作一评述,并对其发展前景作出展望。

1 电化学生物传感器

1.1 DNA 生物传感器 DNA 生物传感器通过将单链 DNA 固定在电极表面形成捕获探针,利用碱基配对原则对样品溶液

中的靶序列进行识别,根据加入信号探针后检测电话性指示剂的电流变化或形成双螺旋结构时产生的电化学界面性质的变化检测肠道致病菌含量。2011 年 Pandey 等^[2]在十八硫醇化的金膜表面进行分子自组装,通过与 4-叠氮基-1-氟-2-硝基苯结合后固定单链 DNA,用甲基蓝作为氧化还原指示剂,可测得大肠埃希菌 DNA 的线性范围为 $0.5 \times 10^{-18} \sim 1 \times 10^{-6}$ mol/L,检测限可低至 0.5×10^{18} mol/L,实现了对大肠埃希菌的快速、超灵敏检测。2012 年 Li 等^[3]用单链 DNA 作为探针,采用快捷简便的“三明治”DNA 杂交方法实现了沙门氏菌较为灵敏的快速检测,检测限可低至 0.5×10^{-12} mol/L。

根据纳米粒子具有比表面积大、容易修饰和磁性纳米粒子对肠道致病菌进行浓缩和富集等特点,可提高其检测灵敏度。2011 年 Geng 等^[4]用海藻酸这个天然含有羧基多糖的物质修饰的钴磁珠与含有氨基端大肠埃希菌特定序列的 DNA 探针相结合,采用道诺霉素(DNR)作为杂交指示剂,得到 50 CFU/mL 的检测限。2011 年 Li 等^[5]将金离子沉积到预先处理好的