

纳米金声动力损伤蛋白质的活性研究

李京壑¹, 宁秀^{1*}, 王孟圆¹, 刘镭¹, 金波¹, 王冬晶², 刘彬¹

¹辽宁大学药学院, 辽宁 沈阳

²北京利龄恒泰药业有限公司, 北京

收稿日期: 2023年5月10日; 录用日期: 2023年6月30日; 发布日期: 2023年7月11日

摘要

本研究采用荧光光谱和紫外-可见光谱的方法, 考察了超声照射下球形纳米金(Gold Nanospheres, GNSs)对人血清白蛋白(Human Serum Albumin, HSA)的损伤, 并探究了GNSs浓度和超声功率对HSA分子损伤的影响。研究结果显示, 在一定条件下, HSA的损伤随着GNSs浓度的增加和超声功率的增大而加剧。进一步研究发现, 超声可激活GNSs产生活性氧物质, 且活性氧的含量随着GNSs浓度和超声功率的增大而增加, 这一研究对分子水平上深入研究GNSs合理应用具有重要意义。

关键词

超声, 金纳米颗粒, 人血清白蛋白, 损伤

Study on Sonodynamic Damage Proteins of Gold Nanoparticles

Jinghe Li¹, Xiu Ning^{1*}, Mengyuan Wang¹, Qiang Liu¹, Bo Jin¹, Dongjing Wang², Bin Liu¹

¹School of Pharmaceutical Sciences, Liaoning University, Shenyang Liaoning

²Beijing Liling Hengtai Pharmaceutical Co., Ltd., Beijing

Received: May 10th, 2023; accepted: Jun. 30th, 2023; published: Jul. 11th, 2023

Abstract

This paper investigated the activity of Gold Nanospheres (GNSs) damaging Human Serum Albumin (HSA) under ultrasonic irradiation using fluorescence spectroscopy and UV-visible spectroscopy. The influence of GNSs concentration and ultrasonic power on the destruction of HSA molecular was further explored. The research results revealed that, under certain conditions, the activity of HSA de-

*通讯作者。

creased with increasing GNSs concentration and ultrasonic power. Additionally, the study also revealed that GNSs could be activated to produce reactive oxygen species after ultrasonic irradiation, and its yield was positively correlated with GNSs concentration and ultrasonic power. This study holds significant importance in providing insights into the rational application of GNSs at the molecular level.

Keywords

Ultrasound, Gold Nanoparticles, Human Serum Albumin, Damage

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

2022 年国家肿瘤中心数据显示,我国有 482 万癌症新发病例及 321 万死亡病例[1],每天有超过 1 万人确诊癌症,而且数字至今一直在上升,因此迫切需要寻找新型抗肿瘤治疗手段。近年来,声动力疗法(Sonodynamic Therapy, SDT)被越来越多的科研人员关注,SDT 是先将声敏剂富集在肿瘤处,用低强度的超声波激活肿瘤处的声敏剂,促使激发态的声敏剂与肿瘤组织附近的氧气作用产生多种活性氧物质(Reactive Oxygen Species, ROS)。此外,超声波引起的空化效应也会使系统产生 ROS,进而损伤肿瘤细胞的 DNA、蛋白质、脂质等内源性物质,最终诱导细胞凋亡[2][3]。因而,提高 SDT 的效用、寻找具有良好声动力活性的声敏剂并合理使用对 SDT 的临床应用具有重要意义。

纳米金颗粒(Gold Nanoparticles, GNPs)是近年来研究较多的纳米材料,具有许多在生物医学中应用的特性,如良好的生物相容性、无毒副作用等。目前制得 GNPs 的方法主要是通过还原氯金酸、改变还原剂的种类及浓度即可改变 GNPs 的粒径,因而 GNPs 还具有粒径形状易控性的特点[4]。除此之外,GNPs 因其较好的声敏性和抗肿瘤活性,常被用作声敏剂,在 SDT 中展示出优秀的效果,近年来已被广泛应用于抗肿瘤研究之中。人血清白蛋白(Human Serum Albumin, HSA)是人体血浆中最主要的蛋白质,约占血浆总蛋白的 60%,螺旋结构较高,在维持机体营养与渗透压、运输内源及外源物质以及其他生理功能的调节中起着关键性作用[5][6][7]。当 HSA 因外源性因素而活性降低或数量减少时,机体会出现乏力食欲降低、水肿、贫血、免疫力下降等症状,更有甚者会有恶心、呕吐、体力下降等症状[8]。因此,探究当 GNPs 作为声敏剂杀伤肿瘤细胞过程中产生的副作用对 HSA 的损伤程度显得十分重要。

本论文主要探究 GNPs 在超声照射下对 HSA 分子所造成的损伤情况,并在此基础上考察了 GNPs 浓度、超声功率的影响因素。其次,又探究了上述 GNPs 声动力损伤 HSA 过程的机制。希望本研究能对 GNPs 高效应用于 SDT 治疗肿瘤有所帮助。

2. 实验

2.1. 仪器与试剂

紫外-可见分光光度计(UV-2550 型,日本岛津公司);荧光光谱仪(F-7000 型,日本日立公司);超声装置(苏州工业园区海纳科技有限公司);四水氯金酸(国药集团化学试剂有限公司);柠檬酸三钠(天津市致远学试剂厂);浓硝酸(沈阳经济技术开发区试剂厂);浓盐酸(沈阳经济技术开发区试剂厂);人血清白蛋白(北京博奥拓达科技有限公司);1,3-二苯基异苯并呋喃(上海麦克林生化试剂有限公司);其它试剂

均为市售分析纯，实验用水为双蒸水。

2.2. GNSs 的制备

实验开始前用王水处理实验过程中所用到的所有玻璃仪器，王水处理 1 h，然后用自来水洗一遍，再用蒸馏水洗一遍，放入恒温为 60℃的烘箱烘 1 h。配置质量分数为 0.01%的氯金酸溶液和质量分数为 1%的柠檬酸钠溶液，用量筒称取 200 mL 氯金酸(0.01%)，倒入 250 mL 圆底烧瓶，并放入转子，冷凝回流条件下，用数显智能控温磁力搅拌器油浴加热，磁力搅拌器转速设置为 200 r/min，温度以每 10℃递增，当温度超过 100℃时，以每 5℃递增加热至沸腾。此时，向圆底烧瓶迅速加入 2 mL 柠檬酸钠(1%)，观察颜色从浅黄色至紫黑色，最后变成红色后，再加热 18 min，移走热源后放置室温冷却，放在 4℃冰箱遮光保存[9]。

2.3. GNSs 浓度对其声动力损伤 HSA 的研究

取 5 个 25 mL 容量瓶标记为 a~e，分别向其中加入 10 mL 浓度为 2.5×10^{-5} mol/L 的 HSA 溶液，a 为空白组，向 b~e 中分别加入 1.25 mL、1.50 mL、2.50 mL、5.0 mL 的 GNSs 溶液，用 PBS 缓冲液稀释至刻度，配成浓度分别为 0.00、0.25、0.30、0.50、 1.00×10^{-2} g/L 的 GNSs 溶液。将上述溶液平均分成两份，一份置于单杯培养皿中，在频率为 0.5 MHz、功率为 0.16 W/cm^2 的条件下进行避光超声 2 min，另一份于暗处放置同样时间。超声结束后分别测定荧光光谱，激发波长 280 nm，狭缝均为 5 nm，扫描波段范围 200~800 nm，考察 GNSs 浓度因素对 HSA 损伤的影响[10]。

2.4. 超声功率对 GNSs 声动力损伤 HSA 的研究

取 4 个 25 mL 容量瓶标记为 a~d，分别加入 10 mL 浓度为 2.5×10^{-5} mol/L 的 HSA 溶液，用 PBS 缓冲液稀释至刻度，使 HSA 浓度为 1.0×10^{-2} g/L。b~d 则分别加入 5.0 mL 的 GNSs 溶液，用 PBS 缓冲液稀释至刻度，配成浓度为 1.0×10^{-2} g/L 的 GNSs 溶液。然后从容量瓶中分别取 4 mL 溶液置于单杯培养皿中，分别在频率为 0.5 MHz、功率为 0.08、0.16、 0.24 W/cm^2 的条件下进行避光超声 2 min。超声结束后分别测定荧光光谱，激发波长 280 nm，狭缝均为 5 nm，扫描的波段范围 200~800 nm [10]。

2.5. 超声联合 GNSs 损伤 HSA 机制研究

取 2 个 25 mL 容量瓶标记为 a 和 b，分别加入 10 mL 浓度为 2.5×10^{-5} mol/L 的 HSA 溶液，然后向 b 中加入 5.0 mL 的 GNSs 溶液，最后用 PBS 缓冲液统一稀释至刻度。将上述溶液平均分成两份，一份置于暗处放置 2 min，另一份置于单杯培养皿中，在频率为 0.5 MHz、功率为 0.24 W/cm^2 的条件下进行避光超声 2 min，将处理后的样品进行紫外-可见光谱检测及同步荧光检测。

另取 2 个 25 mL 容量瓶标记为 a 和 b，分别加入 7.2 mL 的单线态氧荧光探针 1,3-二苯基异苯并呋喃(1,3-Diphenylisobenzofuran, DPBF)溶液($700 \mu\text{mol/L}$)，然后向 b 中加入 5.0 mL 的 GNSs 溶液，最后用去离子水统一稀释至刻度。a、b 两瓶中分别取出 7 mL 样品置于单杯培养皿中，经由 0.5 MHz、 0.16 W/cm^2 超声照射。从 a、b 两瓶中另各取 7 mL 样品不超声，作为对照。2 min 后，以无水乙醇作为空白参比测定所有样品溶液在 415 nm 处的吸光度[11]。

3. 结果与讨论

3.1. GNSs 浓度对其声动力损伤 HSA 的研究

当光束照射到溶液中时，溶液中的分子能够吸收一定波长的光，经过能量积累后能发射出较长波长的光，这种发射出来的光即荧光，而这种能够产生荧光的物质被称为荧光物质。当荧光物质中加入另外

一种物质,二者相互作用后,会发生荧光猝灭现象,即荧光物质的荧光强度明显降低,引起荧光猝灭的物质称为猝灭剂。当 HSA 与 GNSs 结合后,蛋白质分子的荧光会被 GNSs 猝灭[12]。

由图 1 可见,在超声照射条件下,随着 GNSs 浓度的增加,HSA 的荧光强度有规律的降低。说明超声不仅可激活 GNSs 对 HSA 造成损伤,并且作用效果随 GNSs 浓度的增加而增强,很可能是因为 GNSs 浓度越大,被超声激活后产生的 ROS 越多,进而对 HSA 中荧光基团产生更大的破坏作用。

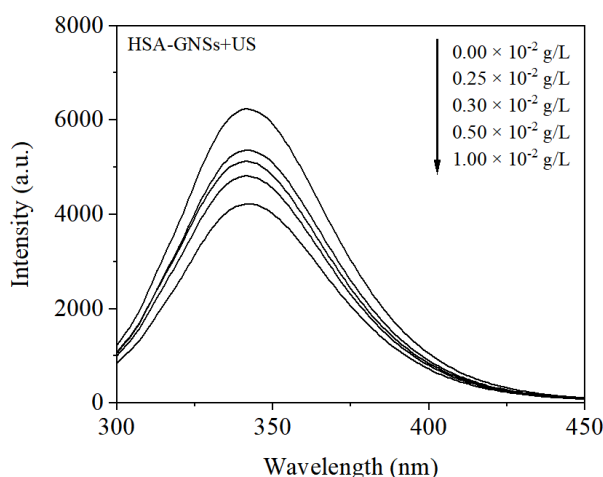


Figure 1. Fluorescence spectra of the effect of HSA by sonodynamic damage with GNSs concentration
图 1. GNSs 浓度对其声动力损伤 HSA 影响的荧光光谱

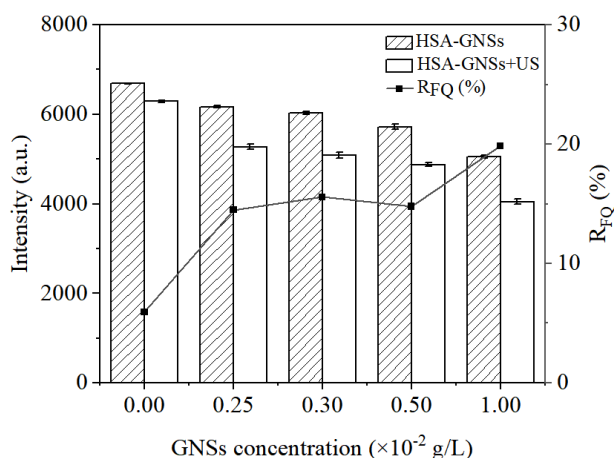


Figure 2. Changes of fluorescence intensity of HSA and HSA-GNSs system with GNSs concentration
图 2. HSA 和 HSA-GNSs 体系的荧光强度随 GNSs 浓度的变化

采用公式(1)计算荧光猝灭率[13]。

$$R_{FQ}(\%) = (F_0 - F_U) / F_0 \times 100 \quad (1)$$

计算不同 GNSs 浓度时超声损伤 HSA 的相对荧光猝灭率(R_{FQ}),式中 F_0 表示未超声条件下 HSA-GNSs 体系的荧光强度, F_U 表示超声照射条件下 HSA-GNSs 体系的荧光强度。由图 2 可见,当 GNSs 浓度从 0 增加到 1×10^{-2} g/L 时, R_{FQ} 随着 GNSs 浓度的增加而增加,说明在超声照射条件下 HSA 的损伤程度随着 GNSs 浓度的增大而增强。同时,从图 2 中可以看出,在超声照射条件下, HSA-GNSs 体系的荧光强度均低于同浓度未超声的条件下 HSA-GNSs 体系的荧光强度,证明超声加剧了 GNSs 对 HSA 分子的损伤。

3.2. 超声功率对 GNSs 声动力损伤 HSA 的研究

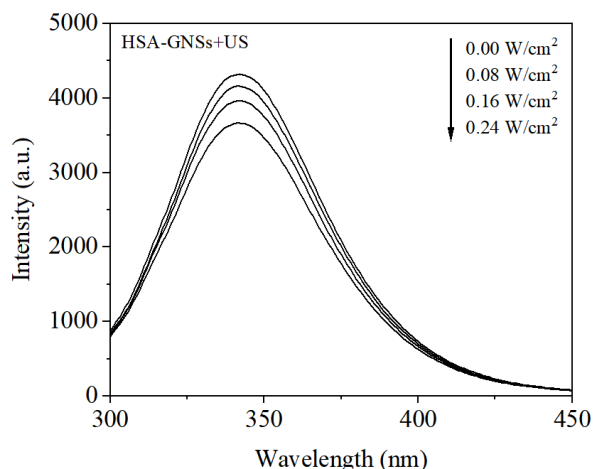


Figure 3. Fluorescence spectra of the effect of HSA by GNSs sonodynamic damage with ultrasonic power
图 3. 超声功率对 GNSs 声动力损伤 HSA 影响的荧光光谱

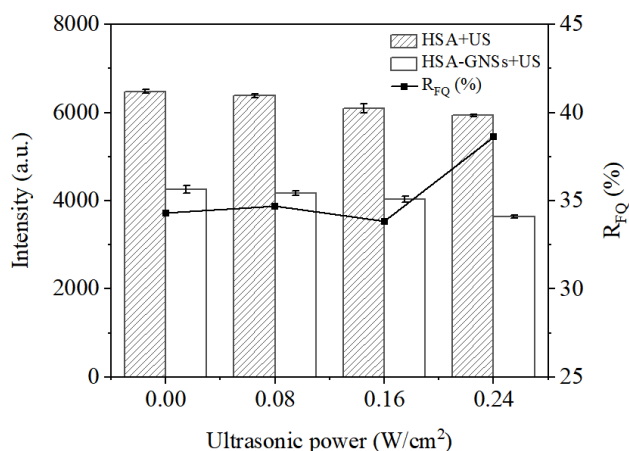


Figure 4. Changes of fluorescence intensity of HSA and HSA-GNSs system with increasing ultrasonic power
图 4. HSA 和 HSA-GNSs 体系随超声功率增强的荧光强度变化

超声功率的改变对 HSA-GNSs 体系荧光强度影响如图 3 所示。由图 3 可见，在超声照射条件下，HSA-GNSs 体系荧光强度随超声功率的增加而不断降低。从图 4 中可以看出，在超声照射条件下，HSA 和 HSA-GNSs 体系的荧光强度都随着超声功率的增加而降低，且相同超声功率下，HSA 体系的荧光强度始终大于 HSA-GNSs 体系的荧光强度。这是因为超声功率的增大不仅会导致体系中空化效应的增强[2]，同时促使更多的 GNSs 被激活，使体系中产生更多的 ROS，进而加剧了对 HSA 分子中可产生荧光的氨基酸残基破坏程度，使其不再具有荧光性，最终导致 HSA 荧光强度随之降低。采用公式(1)计算 HSA 随超声功率改变时 R_{FQ} 的变化，由图 4 可见， R_{FQ} 随着超声照射功率的增加而呈上升趋势，得出结论，超声与 GNSs 的协同作用对 HSA 分子的损伤随着超声功率的增加而加重。

3.3. 超声联合 GNSs 损伤 HSA 机制研究

从体系波长差 $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 时分别扫描的同步荧光光谱图 5 和图 6 来看，HSA 与 GNSs 混合溶液超声后损伤程度最大，其次是混合后不超声，损伤程度相对较小的是 HSA 单独超声。

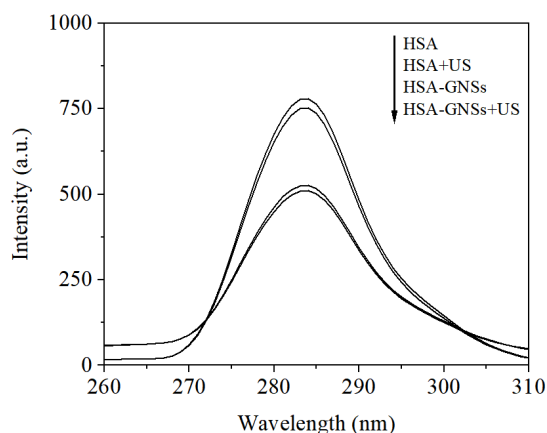


Figure 5. Synchronous fluorescence spectra of HSA under different conditions ($\Delta\lambda = 15$ nm)

图 5. 不同条件下 HSA 的同步荧光光谱图($\Delta\lambda = 15$ nm)

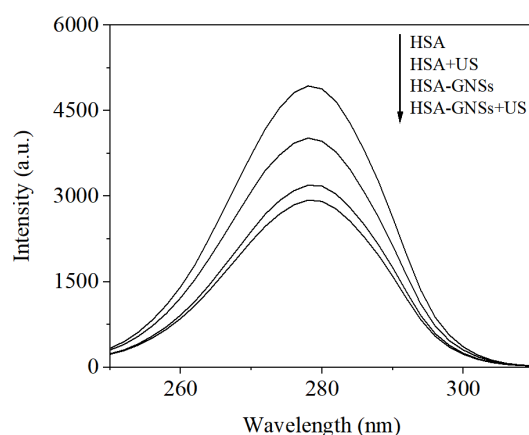


Figure 6. Synchronous fluorescence spectra of HSA under different conditions ($\Delta\lambda = 60$ nm)

图 6. 不同条件下 HSA 的同步荧光光谱图($\Delta\lambda = 60$ nm)

为进一步探讨产生上述现象的原因,检测了体系中产生的 ROS。ROS 是氧分子的不完全还原产物,包括超氧负离子、过氧化氢和羟基自由基等。ROS 的过量蓄积会引起多种人体疾病的发生,如癌症,ROS 具有相对矛盾的功能,正常细胞存活需要合适且稳定的 ROS 浓度,而 ROS 异常积累会导致正常细胞向恶化转变,过多的 ROS 会破坏细胞内物质如 DNA、蛋白质和脂质等,从而使细胞死亡[14]。由于 ROS 活性高,半衰期较短,目前能够直接对 ROS 进行检测的方法非常有限。本研究利用 ROS 高反应活性与单线态氧探针 DPBF 反应,并基于 DPBF 的改变间接对 ROS 做出定量或定性分析[15]。DPBF 是一种常用的 $^1\text{O}_2$ 指示荧光探针,在 415 nm 处具有特征吸收峰。当溶液中有 $^1\text{O}_2$ 存在时,DPBF 将与其反应,导致 ROS 形成过氧化物并且 DPBF 分解成为 1,2-联苯甲酰苯,该过程不可逆转,会使 DPBF 位于 415 nm 处的吸收峰逐渐减弱。因此,使用紫外-可见分光光度计检测 DPBF 在 415 nm 处吸收强度的变化,可以检测溶液中 $^1\text{O}_2$ 含量的变化[16]。

从图 7 看出,当超声功率为 0.16 W/cm^2 ,随着 GNSs 浓度从 0 增加到 $1.0 \times 10^{-2} \text{ g/L}$ 时,DPBF 的吸收强度呈下降趋势,说明超声照射条件下,GNSs 浓度增加将引起 HSA-GNSs 体系中 ROS 含量增加,进而损伤 HSA 活性。这与图 1 得到的结论一致,在超声照射条件下,HSA-GNSs 体系中 HSA 的损伤程度随着 GNSs 浓度的增加而增加。从图 8 可以看出,当 GNSs 浓度为 $1.0 \times 10^{-2} \text{ g/L}$,超声功率由 0 W/cm^2 向 0.24 W/cm^2 递增时,DPBF 的吸收强度呈阶梯式下降,即说明 HSA-GNSs 体系中 ROS 含量增加,表明

超声照射下 GNSs 对 HSA 的损伤程度随着超声功率的增大而增强。

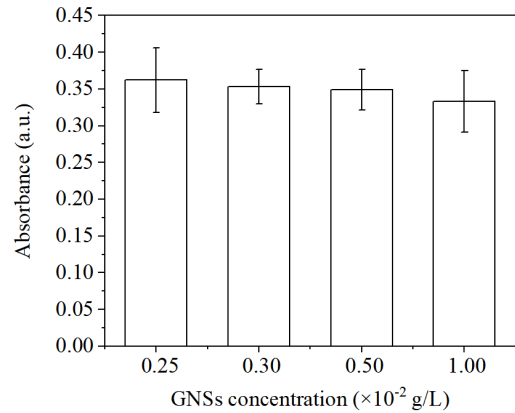


Figure 7. Effect of ROS yield of ultrasound system under GNSs concentration
图 7. GNSs 浓度对超声体系中 ROS 产量的影响

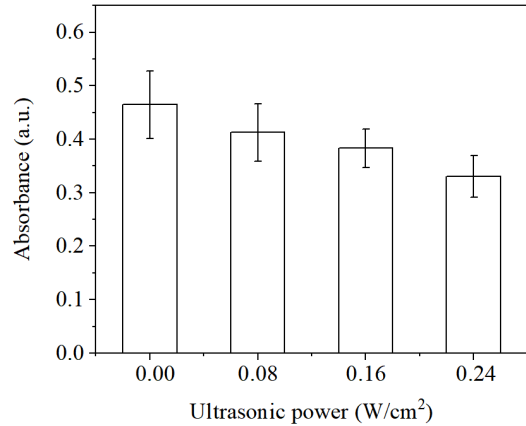


Figure 8. Effect of ROS yield of ultrasound system with ultrasonic power
图 8. 超声功率对超声体系中 ROS 产量的影响

4. 结论

本研究借助紫外-可见光谱法、荧光光谱法等手段,考察了超声照射下 GNSs 对 HSA 分子活性的损伤,探究了 GNSs 浓度和超声功率对 HSA 的影响。结果表明,在频率为 0.5 MHz、超声功率为 0.16 W/cm² 的条件下,随着 GNSs 浓度从 0~1.0 $\times 10^{-2}$ g/L 逐渐增加, HSA 的损伤程度逐渐加重;在 GNSs 浓度为 1.0 $\times 10^{-2}$ g/L 的条件下,随着超声频率从 0~0.24 W/cm² 逐渐增加, HSA 的损伤程度逐渐加重。进一步探究其作用机制,发现 GNSs 浓度增加和超声频率的增大将导致 ROS 含量的过度蓄积,损伤 HSA 内源性物质,从而导致活性降低甚至 HSA 的凋亡,该研究对于从分子水平上研究纳米金合理应用于杀伤肿瘤细胞具有重要意义。

基金项目

本文由辽宁大学“大学生创新创业训练计划项目”(X202310140074)资助。

参考文献

- [1] Xia, C., Dong, X., Li, H., *et al.* (2022) Cancer Statistics in China and United States, 2022: Profiles, Trends and Deter-

- minants. *Chinese Medical Journal*, **135**, 584-590. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000002108>
- [2] 姜琴, 耿鹏, 张雯, 等. 声敏剂在肿瘤声动力治疗中的研究进展[J]. 中国材料进展, 2022, 41(9): 730-741+677.
- [3] Rosenthal, I., Sostaric, J.Z. and Riesz, P. (2004) Sonodynamic Therapy—A Review of the Synergistic Effects of Drugs and Ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, **11**, 349-363. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2004.03.004>
- [4] 张阳德. 纳米生物材料学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005, 60-68.
- [5] 杨峰, 梁宏. 人血清白蛋白及其复合物的结构基础[J]. 化学进展, 2013, 25(4): 530-538.
- [6] Ascenzi, P., di Masi, A., Fanali, G. and Fasano, M. (2015) Heme-Based Catalytic Properties of Human Serum Albumin. *Cell Death Discovery*, **1**, Article No. 15025. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2015.25>
- [7] Rub, M.A., Khan, J.M., Azum, N., et al. (2017) Influence of Antidepressant Clomipramine Hydrochloride Drug on Human Serum Albumin: Spectroscopic Study. *Journal of Molecular Liquids*, **241**, 91-98. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.05.143>
- [8] 涂健铭, 邱熙廉, 许向东, 等. 低白蛋白血症对住院老年患者并发症的影响[J]. 医学综述, 2012, 18(8): 1280+封3.
- [9] 任林娇, 李晨龙, 秦自瑞, 等. 柠檬酸钠还原法制备金纳米颗粒的影响因素分析[J]. 功能材料, 2021, 52(2): 2211-2215.
- [10] 刘彬, 董浩博, 王冬晶, 等. 超声协同吡罗昔康对牛血清白蛋白的损伤研究[J]. 辽宁大学学报(自然科学版), 2020, 47(1): 60-64.
- [11] 郎晨瑜. 超声频率对纳米金促进声动力抗菌作用的影响和机制研究[D]: [硕士学位论文]. 沈阳: 辽宁大学, 2022.
- [12] 侯慧敏. 尺寸和形貌调控的纳米金与蛋白质相互作用的研究[D]: [硕士学位论文]. 新乡: 河南师范大学, 2018.
- [13] Lacerda, S.H.D.P., Park, J.J., Meuse, C., et al. (2010) Interaction of Gold Nanoparticles with Common Human Blood Proteins. *ACS Nano*, **4**, 365-379. <https://doi.org/10.1021/nn9011187>
- [14] Walkey, C.D., Chan, W.C.W. (2012) Understanding and Controlling the Interaction of Nanomaterials with Proteins in a Physiological Environment. *Chemical Society Reviews*, **41**, 2780-2799. <https://doi.org/10.1039/C1CS15233E>
- [15] 王新. 药物竞争结合血浆蛋白及声动力活性的光谱法研究[D]: [博士学位论文]. 沈阳: 东北大学, 2019.
- [16] 胡海涛, 钱婷婷, 杨玲. 基于 H2DCFDA 荧光探针的植物活性氧检测方法[J]. 植物学报, 2022, 57(3): 320-326.