

荧光探针法研究胶原蛋白的水溶液聚集状态*

史向阳 吴世康

(中国科学院感光化学研究所 北京 100101)

孙曹民**

(北京理工大学生物材料实验室 北京 100081)

摘 要 利用一种分子内电荷转移化合物 3-甲氧基-4'-N,N-二甲氨基黄酮(DMMF)作为荧光探针,研究了胶原蛋白在水溶液中的聚集状态. 研究结果发现,当胶原蛋白浓度增大到 0.5mg/mL 以上时, DMMF 在 465nm 处的荧光强度有一突跃;继续增大其浓度,荧光强度越来越大. 证明胶原蛋白在水溶液中随浓度增大有明显的聚集行为. 利用荧光偏振法测量该体系内 DMMF 的荧光偏振特性,发现当胶原蛋白浓度增大到 0.5mg/mL 以上时,体系具有较高的微粘度,进一步证实了胶原蛋白在水溶液中的聚集特性.

关键词 荧光探针, 胶原蛋白, 荧光偏振, 聚集

胶原蛋白是动物组织的一种结构蛋白,约占动物体蛋白总量的 1/3. 天然成熟的胶原蛋白是由三股多肽链作螺旋状缠绕而成的绳索状分子,分子量约为 300KD^[1]. 而从生物体内提取出来的胶原蛋白,由于酶解作用,失去了原有的三股螺旋结构,故也称变性胶原,能够溶于酸性介质. 胶原作为一种重要的生物材料,已经广泛地应用于生物医学和药理学领域. 近期的研究结果证实,胶原和以胶原蛋白为主的复合材料在创伤修复^[2~5],作为贴壁细胞培养的微载体^[6],及药物控制释放系统提高药物的长效性方面^[7~9],均取得满意的效果;尤其在作为药物载体脂质体的包覆基质,减少网状内皮系统对脂质体的吞噬作用方面^[10,11],效果比较明显. 胶原蛋白的许多物化性能,主要与分子链中疏水性的氨基酸之间和肽键之间由于氢键引起的聚集行为有关. 虽然天然成熟胶原蛋白的结构早已研究清楚,但是在生物材料内部,尤其是胶原蛋白在水溶液中的构象状态,仍是一个需要进一步研究的问题.

一个简单而有效的办法是通过荧光探针来探测生物体系的构象状态^[12],而用这一方法来探测胶原蛋白的构象状态,文献中鲜见报道. 本工作用一种分子内电荷转移化合物 3-甲氧基-4'-N,N-二甲氨基黄酮(DMMF)作为荧光探针,来研究胶原蛋白在水溶液中随浓度及环境的 pH 值的变化而形成的聚集状态.

1 实验部分

1.1 胶原蛋白样品制备

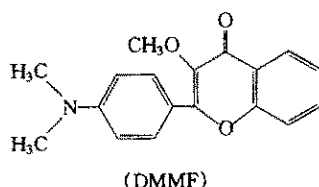
胶原蛋白,自制. 根据文献^[6],取市售新鲜猪皮 500g,去毛,剔除皮下组织及少量脂

* 1997-09-05 收稿,1997-10-28 修稿; ** 通讯联系人

肪,清洗后切成小块,捣碎.分别用 5% 的 NaCl 和 1% 的 NaHCO_3 清洗以除去溶解物质.再溶于 1000mL pH2.5 的盐酸中,加入 0.1g 胃蛋白酶和 0.5g 金霉素,温度保持在 20°C 以下,间隙搅动,共计 5d.所得粘稠胶原溶解物用纱布过滤.pH 用 NaOH 调至 10, 4°C 下放置 5h 以使胃酶失活.再用盐酸调 pH 至 7~8.胶原沉淀物用冷冻离心收集后,再次把沉淀物溶解在 pH2.5 的盐酸中.重复上述步骤,在 pH7.5 左右收集沉淀,经冷冻干燥后保存.用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测得其分子量约为 54KD.其它试剂均为分析纯.所用水溶液均用二次蒸馏水精确配制.胶原蛋白溶解在 0.1mol/L 的醋酸中,配制出一系列浓度从 0.01~3mg/mL 的胶原水溶液.

1.2 荧光探针化合物

DMMF 的分子结构如下:



按文献[14]合成.若以溶剂的 Dimroth $E_T(30)$ 值^[13]作为不同溶剂的极性参数,与 DMMF 荧光光谱峰值处的波长值 $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ 作图^[14],如图 1 所示.可以看出其间存在着良好的线性关系.因此用它作为探针来检测其周围环境的极性,从而推断大分子在溶液中的构象变化是十分有效的.

1.3 荧光发射光谱及稳态偏振的测量

将 DMMF 溶于甲醇中,浓度为 2.8×10^{-3} mol/L.将 DMMF 的甲醇溶液加入胶原蛋白水溶液,使其最终浓度为 2.8×10^{-6} mol/L.紫外光谱在 Hitachi 330 型紫外可见吸收光谱仪上测得;荧光光谱在 Hitachi MPF-4 型荧光光谱仪上测得.激发波长为 380nm,发射光谱在 400~610nm 范围内测定.激发和发射狭缝均为 8nm.

稳态偏振的测量,是在 Hitachi MPF-4 型荧光光谱仪的激发和发射光路中插入偏振滤光片进行.将发射偏振器平行于和垂直于激发偏振器时所求得的强度 $I_{\parallel}$ 和 $I_{\perp}$ 组合起来,按下式求得稳态偏振值 p ^[15]:

$$p = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad (1)$$

发射波长固定于 465nm,样品在 395nm 处激发.

2 结果和讨论

2.1 探针的选择

荧光探针有这样的优点:利用它们可以研究具有微弱的自身荧光或不具有荧光的体系.因此原则上挑选探针时应使探针分子的光谱性质不与体系中任何其它分子的光谱性

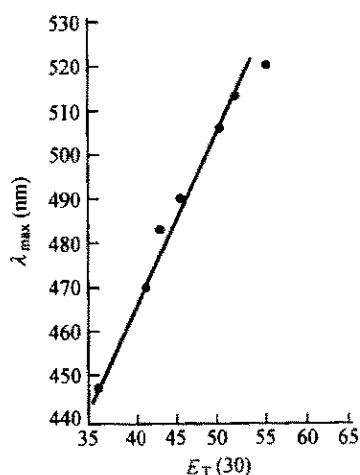


Fig.1 The change of maximum emission wavelength of compound DMMF with the Dimroth $E_T(30)$ values

质相重叠,从而可以避免干扰引起的麻烦. 胶原蛋白由于含有部分苯丙氨酸和酪氨酸残基,自身具有荧光. 为了避免自身荧光的干扰,所用探针必须具备合适的激发波长(此处自身生色团的吸收很少)和合适的发射波长(此处自身生色团不具发射),从而使自身生色团

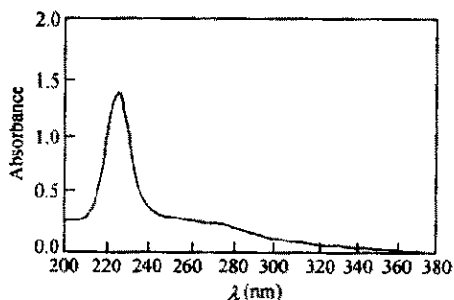


Fig. 2 The absorption spectrum of collagen in 0.1 mol/L acetic acid

产生的干扰降低至最小. 图 2 显示了胶原蛋白(浓度为 1 mg/mL)的紫外吸收光谱. 可见胶原蛋白的最大吸收在 230 nm 左右,而在 380 nm 处的吸收接近于零. 所用探针 DMMF 的激发波长为 380 nm, 所以基本上能够排除胶原蛋白自身发色团的干扰.

2.2 荧光发射光谱研究

图 3 给出了探针化合物 DMMF 在不同浓度的胶原蛋白水溶液中的荧光光谱.

可以看出,随着胶原蛋白浓度的增大, DMMF 在 465 nm 处的荧光发射峰强度不断增大,当浓度增大到 0.5 mg/mL 以上时, DMMF 的荧光峰有一突跃. 这表明在该浓度以上时, DMMF 周围环境的极性变弱,显示其周围疏水微区的存在,从而证明胶原蛋白分子链发生了聚集. 利用相对荧光强度 RI_f 对胶原蛋白的浓度 C (mg/mL) 作图如图 4 所示.

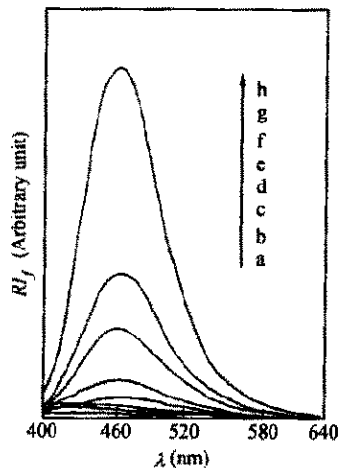


Fig. 3 Fluorescence spectra of DMMF in collagen solution with concentrations of (a) 0.01 mg/mL; (b) 0.05 mg/mL; (c) 0.1 mg/mL; (d) 0.25 mg/mL; (e) 0.5 mg/mL; (f) 1 mg/mL; (g) 1.5 mg/mL; (h) 3 mg/mL in 0.1 mol/L acetic acid. DMMF was dissolved in collagen solution at a final concentration of 2.8×10^{-6} mol/L

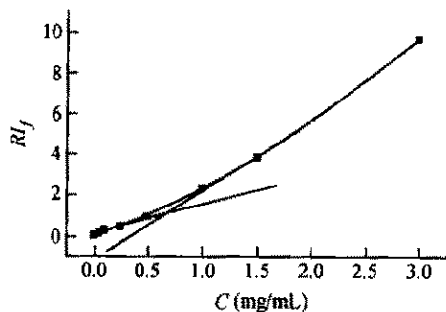
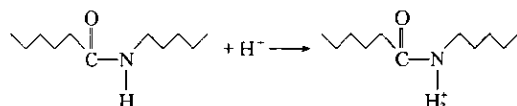


Fig. 4 The change of RI_f of DMMF at 465 nm with the concentration of collagen in 0.1 mol/L acetic acid

可以清楚地看到, DMMF 在 465 nm 处的相对荧光强度随着胶原蛋白浓度的增大而不断增强, 当浓度增大到 0.5 mg/mL 时, RI_f 值也有一突跃, 显示了 DMMF 周围环境极性

急剧减弱,证实了胶原蛋白多肽链之间疏水微区的形成.该浓度相当于钱人元^[16]对高分子溶液浓度分区中,随着高分子浓度增大产生分子链间集聚的分界浓度 C_0 .

对于胶原蛋白多肽链的聚集行为,可以从分子结构的角度加以讨论.利用酶解法提取的胶原蛋白,由于其尾肽非螺旋区的切除,正常的三股螺旋结构破坏^[17].作为一种聚两性电解质(等电点为 7.6)^[18],在酸性介质中,胶原分子内肽键的酰胺基能够和 H^+ 作用成盐,如下式



同时,多肽链上的赖氨酸、精氨酸和组氨酸残基的作用使胶原蛋白成为一个很弱的聚阳离子电解质.在低浓度范围内,多肽链上 $-NH_2^+$ 的相互排斥作用占明显优势,再加上三种带正电荷氨基酸残基的排斥作用,使胶原蛋白成为一线性分子.因而 DMMF 探测的只是水溶液的极性,因此荧光强度很弱.当胶原浓度增大到 0.5mg/mL 以上时,多肽链上 $-NH_2^+$ 的相互排斥作用相对于多肽链上疏水氨基酸残基的疏水作用明显变弱,分子内和分子间氢键的作用加强,形成不规则线团结构(Coil),产生疏水微区,因而 DMMF 周围环境的极性减弱,荧光强度明显变大.当胶原蛋白浓度进一步增大时,多肽链上疏水氨基酸残基的疏水作用占明显优势,同时每个肽链上肽键都参与氢键的形成,因而形成了螺旋结构,发生了 Coil-Helix 转变,DMMF 周围环境极性进一步减弱,荧光强度进一步增大.

既然胶原蛋白在 0.1mol/L 的醋酸溶液中随着浓度的增大产生明显的聚集状态,主要原因是由于胶原多肽链上 $-NH_2^+$ 的排斥作用相对减弱,而分子内和分子间氢键的作用加强.因而有必要对相同胶原蛋白浓度在不同 pH 环境下的聚集状态进行研究.图 5 显示了 DMMF 在相同胶原蛋白浓度下不同 pH 值的胶原溶液中的发射光谱.

由图 5 可见,随着溶液 pH 值的升高,DMMF 的荧光强度不断增大,表明相同浓度的胶原蛋白在水溶液中的聚集状态会随溶液 pH 的变化而改变.对此,我们认为,胶原作为一种酸溶性蛋白,其溶液 pH 值的增高,证明和多肽分子链上酰胺基相互作用的 H^+ 浓度降低,因此在多肽分子链上所形成的一 NH_2^+ 之间的排斥作用相对于 pH 值较低的溶液来说更弱,而分子内和分子间氢键的作用相对较强,导致胶原蛋白在水溶液中的聚集状态加强.

2.3 稳态偏振研究

当用偏振光激发样品时,物质分子发射的荧光也是偏振的,这是由于分子的荧光发色团按它与激发光偏振方向的相对取向进行光选择的结果.由于偏振荧光有所谓的记忆能力,即其发光能够保持与激发光源相同的偏振信息,但前提是发光物质在体系中应保持其

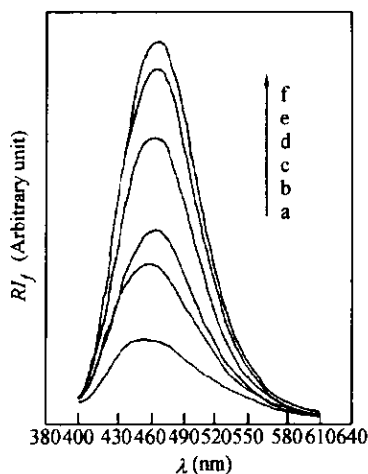


Fig. 5 Fluorescence spectra of DMMF in 1.5mg/mL collagen solution with pH values of (a)2.57; (b)2.81; (c)2.94; (d)3.11; (e)3.30; (f)3.78

被激发时原有的方位. 如果方位改变则会丧失其记忆能力, 表现所谓去偏振结果^[19]. 在低粘滞性或非玻璃态溶液中, 荧光的去偏振作用可用 Perrin 公式来表达^[20]:

$$1/P - 1/3 = (1/P_0 - 1/3)(1 + KT\tau/\eta V) \quad (2)$$

式中 P_0 是当体系中不发生分子旋转及发光分子与相邻分子间无相互作用(如能量转移)条件下的极限偏振值, K 和 T 则分别为 Boltzman 常数和绝对温度, τ 是荧光寿命, V 是分子体积, η 是发光分子的环境粘度. 因此, 如已知 P_0 及 τ 值, 并估计出在溶液中发光分子的体积 V , 可按测得的 P 值算出探针分子所处的环境粘度. 可见荧光偏振法具有较强的理论背景, 用它研究发光物质在介质中的扩散运动, 借以测定介质的微粘度, 用于指明大分子的构象或聚集情况的改变, 是行之有效的. 本文拟从胶原蛋白随浓度变化而探测其偏振度变化, 研究其在水溶液中的聚集情况的变化. 表 1 列出了在不同胶原蛋白浓度下, 由 DMMF 探测的偏振度的变化.

Table 1 The change of DMMF fluorescence polarization with the concentration of collagen

Collagen concentration(mg/mL)	0.01	0.05	0.1	0.5	1.0	1.5
Fluorescence polarization	0.0440	0.135	0.144	0.270	0.284	0.310

由表可看出, 当胶原浓度增大到 0.5mg/mL 时, 偏振度变为 0.270, 表明 DMMF 分子周围环境介质的微粘度增大, 显示胶原蛋白开始形成无规线团(Coil), 当浓度增大到 1.5mg/mL 时, 偏振度增大为 0.310, 此时预示着胶原蛋白螺旋结构的形成, 偏振度的测定结果进一步证实了上述结果的正确性.

REFERENCES

- 1 Lu Ge(卢戈). Progress in Biochemistry and Biophysics(生物化学与生物物理进展), 1991, 18(4): 275~280
- 2 Doillon C J, Silver F H. Biomaterials, 1986, 7: 3~8
- 3 Yannas I V, Burke J F. J Biomed Mater Res, 1980, 14: 65~81
- 4 Barbani N, Cascone M G, Giusti P, et al. Biomater Sci Polymer Edn, 1995, 7(6): 471~484
- 5 Jeyanthi R, Panduranga Rao K. Biomaterials, 1990, 11(5): 238~243
- 6 Chen Yinliang(陈因良), Li Yutian(李雨田). Acta Bioengineering(生物工程学报), 1992, 8(2): 157~163
- 7 O'Brien T P, Sawasch M R, Dick J J, et al. J Cataract Refract Surg, 1988, 14: 505~507
- 8 Minabe M, Takeuchi K, Tamura T, et al. J Periodontol, 1989, 60: 552~556
- 9 Minabe M, Vematsu A, Nishijima K, et al. J Periodontol, 1989, 60: 113~117
- 10 Weiner A L, Carpenter-Green S S, Soehgen E C. J Pharm Sci, 1985, 74: 922~925
- 11 Jose' Fonseca M, Asuncion Alsina M, Francesca Reig. Biochimica et Biophysica Acta, 1996, 1279: 259~265
- 12 Shechter Y. Proc Nat Acad Sci USA, 1978, 25: 2135~2139
- 13 Reichardt C, Dimroth K. Fortschr. Chem Forsch, 1968, 1: 11~17
- 14 Wang Pengfei(汪鹏飞). Thesis for Ph D of Institute of Photographic Chemistry, Academia Sinica(中科院感光化学所博士学位论文), 1993. 147
- 15 Zhu Dachang(祝大昌). Analytics of Molecule Luminescence(分子发光分析法), Shanghai: Fudan University Press, 1985. 24~27
- 16 Qian Renyuan. In: Lee Lieng-Huang, eds. New Trends in Physics and Physical Chemistry of Polymers, New York: Plenum Publishing Corporation, 1989. 239~253
- 17 Tsuruta T. Biomedical Applications of Polymer Materials, New York: CRC Press, Inc, 1993, 126~128

- 18 Wen Shao, Leong K W. *J Biomater Sci Polymer Edn*, 1995, 7(5):389~399
19 Wu Shikang(吴世康). *Progress in Chemistry(化学进展)*, 1996, 8(2):118~128
20 Hamai S, Kokubun H. *Bull Chem Soc Jap*, 1974, 47(1):24~27

A STUDY ON COLLAGEN ASSOCIATION STATE IN AQUEOUS SOLUTION USING FLUORESCENCE PROBE

SHI Xiangyang, WU Shikang

(*Institute of Photographic Chemistry, Academia Sinica, Beijing 100101*)

SUN Caomin

(*Biomaterials Laboratory of Beijing Institute of Technology, Beijing 100081*)

Abstract A kind of intramolecular charge transfer compound——3-methoxy-4'-N, N-dimethylamino flavone derivatives (DMMF) was used to detect collagen association in aqueous solution. Results showed that, when collagen concentration was increased to 0.5mg/mL or above, the fluorescence intensity of DMMF at 465nm increased dramatically. This indicated that collagen can associate in aqueous solution. A fluorescence polarization study on the same collagen solution also showed that the fluorescence polarization of DMMF rose rapidly when collagen concentration was increased to 0.5mg/mL or above, which proved that the system had high micro-viscosity. This results also indicated that the aggregation behavior existed in the aqueous solution of collagen.

Key words Fluorescence probe, Collagen, Fluorescence polarization, Self-association