

## 表没食子儿茶素没食子酸酯对柔红霉素与人血清白蛋白 相互作用影响的光谱学及细胞毒性研究

郭庆英<sup>1</sup>, 刘敏<sup>1,2\*</sup>, 赵燕娜<sup>2</sup>, 吴玉姝<sup>2</sup>, 孙彬<sup>2</sup>, 刘杰<sup>1</sup>, 韩军<sup>2</sup>

1. 聊城大学化学化工学院, 山东 聊城 252059

2. 聊城大学生物制药研究院, 山东 聊城 252059

**摘要** 茶多酚与抗肿瘤药物联用具有增效、减毒以及逆转耐药性的作用,可作为生化调节剂应用于临床。通过荧光光谱、紫外-可见吸收光谱、圆二色光谱和动态光散射研究了柔红霉素(DNR)与人血清白蛋白(HSA)在模拟生理条件下的相互作用以及表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对DNR与HSA结合过程的影响。通过MTT法测定了DNR单一药物、EGCG+DNR组合药物及其与HSA的复合物对人宫颈癌He-La细胞系的细胞毒性。荧光猝灭结果与紫外-可见吸收差谱表明DNR与HSA之间形成静态复合物。由荧光数据拟合得到猝灭常数、结合常数、结合位点数、焓变和熵变。正的焓变和熵变表明DNR与HSA的结合过程主要为熵驱动,且疏水作用为结合过程的主要驱动力。位点标记竞争实验结合同步荧光光谱表明,DNR主要结合在HSA的IIA结构域,并且更接近色氨酸残基。在HSA+EGCG+DNR三元体系中,建立了三元体系的荧光数据处理模型,并用Matlab拟合得到EGCG存在下DNR与HSA相互作用的结合位点数与结合常数均明显减小,表明EGCG的存在降低了DNR与HSA的亲和力。此外,在EGCG存在下,DNR与HSA作用的结合常数随着温度升高而增加,表明结合过程的主要作用力仍为疏水作用。圆二色光谱和动态光散射研究表明药物与蛋白结合会影响蛋白的构象和粒径,导致HSA的 $\alpha$ -螺旋含量减小且粒径增加。EGCG存在的(HSA+EGCG)+DNR三元体系中的 $\alpha$ -螺旋含量大于相应的HSA+DNR二元体系中的 $\alpha$ -螺旋含量,而三元体系的水合粒径相对于二元体系的有所减小。这均表明EGCG与DNR存在竞争结合,EGCG的存在使DNR与HSA的结合减弱,与三元体系的荧光实验结果一致。此外,讨论了EGCG对DNR和HSA+DNR复合物的细胞毒性的影响,结果表明DNR与EGCG具有协同作用且HSA可以增强DNR的细胞毒性。所得结果可为EGCG与DNR在临床中的联合应用提供有益信息。研究表明光谱方法可为联合药物与蛋白的相互作用研究提供有力支撑。

**关键词** 人血清白蛋白;柔红霉素;表没食子儿茶素没食子酸酯;光谱技术;细胞毒性

**中图分类号:** O642 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2020)06-1821-07

### 引言

柔红霉素[Daunomycin, DNR, 图1(a)]为第一个临床应用的抗肿瘤抗生素<sup>[1]</sup>。但其在临床化疗中的不良反应,尤其是心脏毒性,使其应用受到了限制<sup>[2]</sup>。微生物药物学和肿瘤药学家甄永苏院士指出:茶多酚与抗肿瘤药物联用具有增效、减毒以及逆转耐药性的作用,可作为生化调节剂应用于临床<sup>[3]</sup>。儿茶素类化合物为茶多酚的主要成分,其中表没食

子儿茶素没食子酸酯[epigallocatechin-3-gallate, EGCG, 图1(b)]含量最高(约占儿茶素的50%)且具有最大活性<sup>[3]</sup>。

人血清白蛋白(HSA)是血浆中含量最丰富的蛋白质,因其独特的分子结构及良好的生物相容性而成为药物传输领域的研究热点。晶体结构表明HSA由585个氨基酸组成,包括三个结构相似的域(I-III)。药物与蛋白的结合直接影响药物的吸收、分布和代谢方式,进而影响药效的发挥。EGCG和DNR单一药物与人血清白蛋白之间的相互作用已有报导<sup>[4-5]</sup>。但遗憾的是EGCG对DNR与人血清白蛋白的相

收稿日期:2019-05-15, 修订日期:2019-10-09

基金项目:国家自然科学基金项目(21473085)资助

作者简介:郭庆英,女,1992年生,聊城大学化学化工学院硕士研究生 e-mail:17863528713@163.com

\* 通讯联系人 e-mail:panpanliumin@163.com

互作用及细胞毒性的影响尚未见文献报导。本工作利用荧光光谱法、紫外-可见吸收光谱法、圆二色谱法、动态光散射研究了 EGCG 存在下 DNR 与人血清白蛋白的相互作用,测定了其结合常数、结合位点数、焓变、熵变等热力学参数,并从微观结构出发加以讨论。同时考察了单一药物、联合药物及药物与蛋白复合物对人宫颈癌 HeLa 细胞的细胞毒性作用。所得结果将为 EGCG 与 DNR 的联合用药提供理论基础。

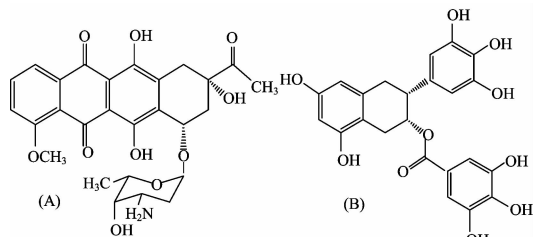


图 1 DNR (a) 和 EGCG (b) 的分子结构图

Fig. 1 Molecular structures of DNR (a) and EGCG (b)

## 1 实验部分

### 1.1 试剂和细胞

人血清白蛋白(HSA, 纯度 $\geq 98\%$ , 分子量为 66.5 kDa), 盐酸柔红霉素(DNR, 纯度 $\geq 98\%$ ), 血晶素(纯度 $\geq 99\%$ )和四丁基溴化铵(TBAB, 纯度 $\geq 99\%$ )购自上海源叶生物科技有限公司; 华法林(纯度 $\geq 99\%$ )和布洛芬(纯度 $\geq 99\%$ )购自北京百灵威科技有限公司; 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四氮唑溴化物(MTT)购自美国 Sigma 公司; DMEM 培养基购自美国 Thermo Fisher 公司; 人宫颈癌 HeLa 细胞株购自武汉普赛诺生命科技有限公司。实验所用其他试剂均为分析纯且使用前无需再次纯化。实验中使用 Milli-Q 水净化系统中获得的去离子水制备溶液。实验所用缓冲溶液为在不同温度下配制的 pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液( $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。人血清白蛋白的储备液在  $4^\circ\text{C}$  下储存过夜。

### 1.2 仪器

荧光分光光度计(F-4600 型, 日立, 日本); 紫外分光光度计(T9CS, 北京, 中国); 动态光散射仪(Zetasizer Nano ZS, 马尔文, 英国); 圆二色谱仪(J-810, Jasco, 日本); 细胞培养箱(HERAcCell150i, Thermo, 美国); 酶标仪(Elx 808, Bio tek, 美国)。

### 1.3 荧光光谱

#### 1.3.1 二元体系荧光光谱

在 DNR+HSA 二元体系中, HSA 的浓度为  $4 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , DNR 的浓度为  $(0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 2.8, 3.2, 3.6, 4.0, 4.8) \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。激发波长为 295 nm, 激发与发射狭缝宽度均为 5.0 nm, 测量温度为 298.2, 302.2, 306.2 和 310.2 K, 配制好的样品恒温 30 min 后测定 305~420 nm 范围的荧光光谱。固定激发和发射的波长差分别为 60 和 15 nm, 其他与上述条件相同, 扫描 DNR 存在下 HSA 的同步荧光光谱。

#### 1.3.2 位点标记

为了确定 DNR 在蛋白上的结合位置, 用血晶素、华法林和布洛芬为标记探针, 分别标记 HSA 的 I B, II A 和 III A 结构域<sup>[6]</sup>。首先制备标记物与 HSA 的混合溶液, 其中标记物与 HSA 的浓度均为  $4 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 平衡 30 min 后向上述溶液中加入不同量的 DNR 溶液, DNR 的浓度与二元体系荧光光谱实验中相同, 利用 1.3.1 中的实验参数记录 DNR+(标记物+HSA)的荧光数据。

#### 1.3.3 三元体系荧光光谱

EGCG 存在下的 DNR+(EGCG+HSA)三元体系中, EGCG 与 HSA 的摩尔比为 1:1, 其他条件均与二元体系荧光光谱实验一致。

### 1.4 紫外吸收光谱

HSA 的浓度为  $5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , DNR 的浓度分别为  $(0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 \text{ 和 } 6.0) \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 以 pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液为参比, 测定 DNR 存在下 HSA 在 245~305 nm 波长范围内的紫外吸收光谱。

### 1.5 圆二色谱

所测溶液为 HSA ( $2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、HSA+DNR (HSA:DNR=1:5 或 1:15)、HSA+EGCG (HSA:EGCG=1:2) 与 (HSA+EGCG)+DNR (HSA:EGCG:DNR=1:2:15)。扫描波长为 200~250 nm, 扫描速率为  $200 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ , 分辨率为 0.1 nm, 响应时间为 1 s, 累积次数 3 次。

### 1.6 动态光散射

HSA 的浓度保持为  $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。HSA+DNR 二元体系中, HSA 与 DNR 的摩尔比为 1:5 或 1:15。(HSA+EGCG)+DNR 三元体系中, HSA:EGCG:DNR 为 1:2:15。测量粒径前所有溶液皆通过  $0.22 \mu\text{m}$  的水系过滤头(Millipore 公司, 美国)进行过滤, 测量温度为  $25^\circ\text{C}$ 。

### 1.7 体外细胞毒性

所用 HeLa 细胞株利用 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清和  $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  的青霉素、链霉素), 于  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中培养, 每 2 天更换一次培养液, 用胰酶消化并传代, 留取对数期细胞用于 MTT 实验, 以测定 DNR, HSA+DNR, EGCG+DNR 以及 HSA+EGCG+DNR 复合物对 HeLa 细胞的体外细胞毒性。将 HeLa 细胞以  $3 \times 10^3 \text{ 个} \cdot \text{孔}^{-1}$  的密度接种在 96 孔板上, 0.1 mL 含有血清的培养基中培养 24 h, 然后用 0.1 mL 含有药物或药物复合物且不含有血清的培养基替换原先培养基, 其中 HSA:DNR=1:1, HSA:EGCG:DNR=1:1:1, 继续培养 48 h, 加入  $20 \mu\text{L}$  MTT (PBS 配制浓度为  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 培养 4 h 后除去孔中溶液, 每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO 使用酶标仪在 570 nm 波长下测定吸光度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 荧光光谱法

#### 2.1.1 DNR 对 HSA 猝灭机制的研究

如图 2 所示, 在激发波长为 295 nm 时, HSA 在 338 nm

处产生内源荧光。随着 DNR 浓度的增大, HSA 的荧光强度出现有规律的降低, 峰形和峰位保持不变, 表明 DNR 对 HSA 存在荧光猝灭现象, 二者存在相互作用。

荧光猝灭机制分为动态猝灭和静态猝灭, 可以通过猝灭常数与温度的关系来进行判断。荧光猝灭常数可利用 Stern-Volmer 方程求得<sup>[7]</sup>

$$F_0/F = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q] \quad (1)$$

式(1)中,  $F_0$  和  $F$  分别为加入猝灭剂前后 HSA 的荧光强度,  $K_{SV}$  为猝灭常数,  $k_q$  为猝灭速率常数,  $\tau_0$  为 HSA 的荧光寿命, 约为  $10^{-8}$  s<sup>[8]</sup>,  $[Q]$  为猝灭剂的浓度。

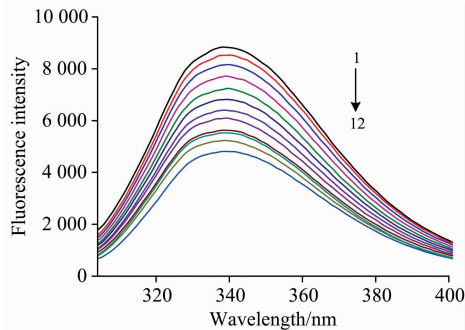


图 2 pH 7.4, 298.2 K 下 DNR 对 HSA 的荧光猝灭光谱 (DNR : HSA=1~12)

Fig. 2 Fluorescence emission spectra of HSA in the presence of DNR (DNR : HSA=1~12) at 298.2 K, pH 7.4

不同温度下的  $F_0/F$  对 DNR 浓度作图均呈良好线性关系, 所得猝灭速率常数列于表 1 中。由表 1 可见, 猝灭速率常数  $k_q$  数量级均为  $10^{12}$ , 远远大于各类猝灭剂对生物大分子

表 1 不同温度下 DNR 与 HSA 相互作用的猝灭速率常数、结合常数、结合位点数和吉布斯自由能变

Table 1 Quenching rate constants, binding constants, the number of binding sites and Gibbs free energy changes for the interaction of DNR with HSA at different temperatures

$T/K$	$k_q/$ ( $\times 10^{12}$ L · mol <sup>-1</sup> · s <sup>-1</sup> )	$K_a/$ ( $\times 10^4$ L · mol <sup>-1</sup> )	$n$	$\Delta G^0/$ (kJ · mol <sup>-1</sup> )
298.2	1.76 ± 0.02	2.60 ± 0.06	1.04 ± 0.02	-25.19 ± 0.06
302.2	1.72 ± 0.01	3.21 ± 0.33	1.06 ± 0.01	-26.05 ± 0.26
306.2	1.64 ± 0.02	3.97 ± 0.30	1.07 ± 0.01	-26.94 ± 0.19
310.2	1.61 ± 0.01	4.93 ± 0.50	1.10 ± 0.01	-27.85 ± 0.26

### 2.1.2 DNR 与 HSA 结合的热力学参数

对于静态猝灭, 相互作用过程中的结合常数( $K_a$ )和结合位点数( $n$ )可以通过下列方程得到<sup>[10]</sup>

$$\log[(F_0 - F)/F] = \log K_a + n \log\left(\frac{[Q]_0}{[Q]_0 - n(F_0 - F)[P]_0/F_0}\right) \quad (2)$$

其中  $[Q]_0$  和  $[P]_0$  分别为药物与蛋白的总浓度。如本课题组前期工作<sup>[8]</sup>中所述, 在 Microsoft Excel 中赋予  $n$  的初值为 1,  $\log[(F_0 - F)/F]$  对  $\log\left(\frac{[Q]_0}{[Q]_0 - n(F_0 - F)[P]_0/F_0}\right)$  作图并线性拟合得到一个  $n$  值, 多次拟合直到  $n$  值为定值不再变化。由  $\log[(F_0 - F)/F]$  对  $\log\left(\frac{[Q]_0}{[Q]_0 - n(F_0 - F)[P]_0/F_0}\right)$  的最终线性作图(图 4), 所得结合常数  $K_a$  与结合位点数  $n$  列于表 1

的最大动态猝灭速率常数  $2.0 \times 10^{10}$  L · mol<sup>-1</sup> · s<sup>-1</sup>, 并且可以看出在 298.2, 302.2, 306.2 和 310.2 K 下, 随着温度的升高 HSA 的猝灭常数减小, 由此可以推测出 DNR 与 HSA 形成复合物, 此过程为静态猝灭过程。

紫外吸收光谱法用于 DNR 与 HSA 结合机制的验证。不同浓度 DNR 对 HSA 紫外吸收光谱的影响如图 3 所示, 随着 DNR 浓度的增加, HSA 吸光度增大, 表明 DNR 与 HSA 之间形成复合物。另外对于静态猝灭来说, 蛋白的吸收强度由于生成复合物而改变, 动态猝灭则不会变化。图 3 中插图所示为紫外差谱图, 图中 (HSA + DNR) - DNR 吸收谱线与 HSA 的吸收谱线存在差异, 该结果进一步表明 DNR 与 HSA 相互作用为静态猝灭过程<sup>[9]</sup>。

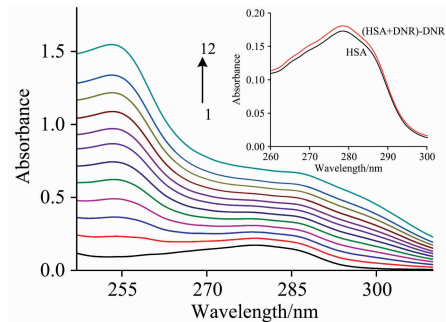


图 3 298.2 K 时 DNR 存在下 HSA 的紫外吸收光谱图, 插图 为差谱图,  $c_{(HSA)} = c_{(DNR)} = 5 \times 10^{-6}$  mol · L<sup>-1</sup>

Fig. 3 Absorption spectra of HSA in the presence of DNR at 298.2 K. The inset corresponds to the absorption spectra of HSA only and the difference absorption spectra between HSA + DNR and DNR at the same concentration,  $c_{(HSA)} = c_{(DNR)} = 5 \times 10^{-6}$  mol · L<sup>-1</sup>

中。由表 1 数据可见, 所测温度下的结合位点数  $n$  均约为 1, 表明利用荧光方法所得 DNR 在 HSA 上有一个结合位点。四个温度下结合常数数量级均为  $10^4$ , 且随着温度升高而增加, 表明 DNR 与 HSA 的结合为中等强度的结合, 高温有利于 DNR 的结合。

当温度变化不太大时, 焓变可看作一个常数, 则焓变和熵变可由 298.2, 302.2, 306.2 和 310.2 K 四个温度下 DNR 与 HSA 相互作用的结合常数利用 Van't Hoff 方程式(3)求得<sup>[11]</sup>

$$\ln K_a = -\Delta H^0/RT + \Delta S^0/R \quad (3)$$

吉布斯自由能变  $\Delta G^0$  由式(4)求得<sup>[11]</sup>

$$\Delta G^{\circ} = \Delta H^{\circ} - T\Delta S^{\circ} = -RT \ln K_a \quad (4)$$

$\ln K_a$  对  $1/T$  作图得 DNR 与 HSA 相互作用的焓变和熵变分别为  $40.92 \pm 0.52 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  和  $221.83 \pm 1.70 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ , 表明结合过程主要为熵驱动, 且疏水作用为结合过程的主要驱动力<sup>[12]</sup>。

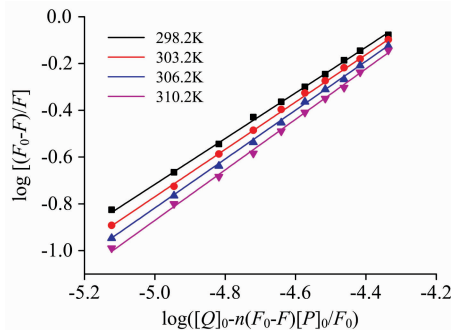


图 4 不同温度下, DNR+HSA 作用的 Stern-Volmer 曲线

Fig. 4 Modified Stern-Volmer plots for DNR+HSA interaction at different temperatures

### 2.1.3 DNR 在 HSA 上的结合位点

为了确定 DNR 在 HSA 上的结合位置, 在 298.2 K 下分别用血晶素、华法林和布洛芬作为位点 I B, II A 和 III A 的特异性探针进行了竞争标记实验。标记物存在下, DNR 与 HSA 相互作用的结合常数与结合位点数列于表 2。与不存在标记物相比, 存在华法林时 DNR 与 HSA 的结合明显减弱; 布洛芬和血晶素存在下, 结合常数略有减小, 表明 DNR 与华法林存在竞争作用, 即主要结合在 HSA 的位点 II A 上。

表 2 298.2 K, 标记物存在下 DNR 与 HSA 的结合常数 ( $K_a$ ) 与结合位点数 ( $n$ )

Table 2 Binding constants ( $K_a$ ) and the number of binding sites ( $n$ ) for the binding of DNR to HSA in the presence of site markers at 298.2 K

	$K_a / (\times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$n$
(HSA+华法林)+DNR	$0.96 \pm 0.02$	$0.87 \pm 0.01$
(HSA+布洛芬)+DNR	$2.46 \pm 0.11$	$1.03 \pm 0.01$
(HSA+血晶素)+DNR	$2.06 \pm 0.01$	$0.98 \pm 0.01$

### 2.1.4 DNR 存在下 HSA 的同步荧光光谱

当  $\Delta\lambda$  为 15 和 60 nm 时, 同步荧光分别为酪氨酸和色氨酸残基的荧光特性。图 5 所示为 DNR 与 HSA 结合的同步荧光光谱图。当  $\Delta\lambda=15 \text{ nm}$  和  $\Delta\lambda=60 \text{ nm}$  时, 同步荧光的最大发射波长均没有明显变化, 表明 DNR 的加入不会使色氨酸和酪氨酸周围的微环境发生明显变化。DNR 对 HSA 同步荧光的猝灭结果表明  $\Delta\lambda=60 \text{ nm}$  时的荧光猝灭程度明显高于  $\Delta\lambda=15 \text{ nm}$  时, 这表明  $\Delta\lambda=60 \text{ nm}$  时 DNR 对 HSA 的猝灭更明显, 即 DNR 在 HSA 上的结合位置更接近色氨酸残基。

### 2.1.5 EGCG 存在下对 DNR 与 HSA 亲和力的影响

由标记实验得出 DNR 结合于 HSA 的 II A 位点, 文献表

明 EGCG 同样结合于 II A 位点<sup>[8]</sup>。为说明一种药物的存在对 HSA 与另一种药物亲和力的影响, 进行了三元体系竞争实验。图 6 为 EGCG 存在下 DNR 与 HSA 在 298.2 K 下相互作用的荧光光谱图。由图可看见, DNR 的加入导致 HSA 的荧光强度进一步降低, 表明 EGCG 存在下 DNR 继续与 HSA 结合。

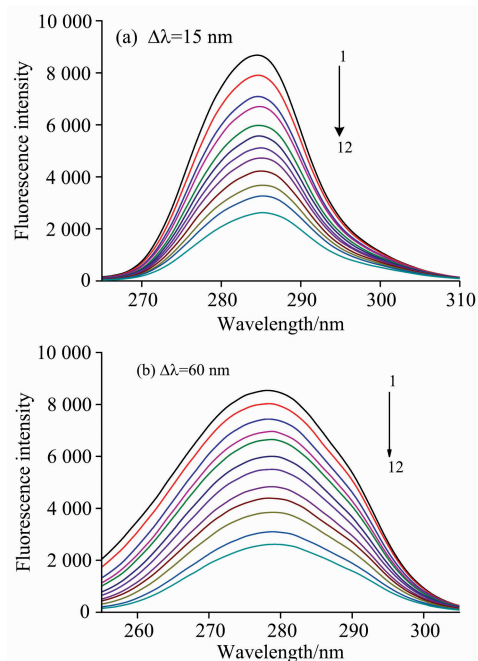


图 5 HSA ( $4 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 与 DNR ( $0 \sim 4.8 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 相互作用的同步荧光光谱图

Fig. 5 Synchronous fluorescence spectra for the interaction of HSA ( $4 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) with DNR ( $0 \sim 4.8 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )

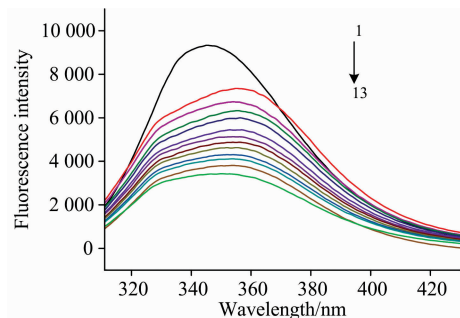


图 6 DNR 与 HSA 在 EGCG 存在下的荧光光谱图

1: HSA; 2: HSA+EGCG; 3~13: (HSA+EGCG)+DNR

Fig. 6 Fluorescence spectra of DNR+HSA in the presence of EGCG

1: HSA; 2: HSA+EGCG; 3~13: (HSA+EGCG)+DNR

由于 EGCG 和 DNR 结合在蛋白的相同位点上, 则可如前期工作<sup>[8]</sup>所述建立三元体系模型。利用 EGCG 存在下不同浓度的 DNR 对应的 HSA 荧光强度, 通过 Matlab 进行非线性最小二乘回归使实验测量的荧光强度  $F_{\text{exp}}$  与计算所求荧光强度  $F_{\text{calc}}$  之差的平方和  $\sum (F_{\text{exp}} - F_{\text{calc}})^2$  最小, 则可拟合得

到 EGCG 存在下 DNR 与 HSA 相互作用的  $K_{\alpha_2}$  和  $n$  (表 3)。由表 3 可知, DNR 在 EGCG 存在下与 HSA 作用的结合常数和结合位点数均明显减小, 这主要是由于 EGCG 和 DNR 结合在 HSA 的相同位点上, EGCG 的存在降低了 DNR 与 HSA 的亲和力, 从而导致 DNR 的游离浓度增加。此外, 当

温度由 298.2 K 升高至 310.2 K 时, 三元体系的结合常数增大, 表明 EGCG 存在下, DNR 与 HSA 的结合仍为吸热过程, 即 EGCG 存在下, DNR 与 HSA 的主要作用力仍为疏水作用。

表 3 存在和不存在 EGCG 下, DNR 与 HSA 结合的结合常数( $K_a$ )和结合位点数( $n$ )

Table 3 Binding constants ( $K_a$ ) and the number of binding sites ( $n$ ) for the binding of DNR to HSA in the absence and presence of EGCG

	298.2 K		310.2 K	
	$K_a/(\times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$n$	$K_a/(\times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$n$
EGCG+HSA	$9.01 \pm 0.93$	$1.02 \pm 0.01$	$5.97 \pm 0.82$	$0.98 \pm 0.01$
DNR+HSA	$2.60 \pm 0.06$	$1.04 \pm 0.01$	$4.93 \pm 0.50$	$1.10 \pm 0.01$
DNR+(EGCG+HSA)	$0.37 \pm 0.04$	$0.79 \pm 0.01$	$0.57 \pm 0.06$	$0.83 \pm 0.01$

## 2.2 EGCG 存在下 DNR 与 HSA 结合的二级结构变化

HSA, HSA+DNR 及 (HSA+EGCG)+DNR 的圆二色光谱图在 208 和 220 nm 处出现两个负峰, 表明体系中主要的二级结构组成为  $\alpha$ -螺旋<sup>[13-14]</sup>。 $\alpha$ -螺旋含量可用式(5)和式(6)计算<sup>[8]</sup>

$$\text{MRE} = \text{observed CD}/(c_p \times n \times l \times 10) \quad (5)$$

$$\alpha\text{-helix}(\%) = [(-\text{MRE}_{208} - 4000)/(33000 - 4000)] \times 100 \quad (6)$$

其中, MRE 表示残基椭圆率,  $c_p$  表示蛋白的浓度,  $n$  和  $l$  分别为氨基酸残基数 (585) 和光路长度 (0.1 cm)。表 4 中数据表明 DNR 的加入使 HSA 的  $\alpha$ -螺旋含量减少, 且随着 DNR 浓度增加进一步减少, 表明 DNA 的结合使得 HSA 的二级结构发生轻微变化。EGCG 的存在使 HSA 的  $\alpha$ -螺旋含量减少, 但是在 EGCG 存在的三元体系中  $\alpha$ -螺旋含量大于相应的二元体系的  $\alpha$ -螺旋含量, 表明两种药物存在竞争结合, 即 EGCG 的存在阻碍了 DNR 与 HSA 的结合。

表 4 存在或不存在 EGCG 时, HSA 和 DNR+HSA 的  $\alpha$ -螺旋含量与水合粒径 ( $D_h$ )

Table 4 The  $\alpha$ -helical contents and hydrodynamic diameters of HSA and HSA+DNR in the absence and presence of EGCG

	摩尔比 (drug : HSA)	$\alpha$ -螺旋 /%	$D_h$ /nm
HSA	0	$52.24 \pm 0.26$	$8.114 \pm 0.021$
HSA+DNR	5	$49.40 \pm 0.16$	$8.131 \pm 0.024$
HSA+DNR	15	$44.88 \pm 0.13$	$8.834 \pm 0.012$
HSA+EGCG	2	$47.91 \pm 0.12$	$8.366 \pm 0.030$
(HSA+EGCG(2))+DNR	15	$45.37 \pm 0.13$	$8.454 \pm 0.014$

## 2.3 EGCG 存在下 DNR 与 HSA 结合的粒径变化

HSA, HSA+DNR 及 (HSA+EGCG)+DNR 体系的水合粒径 ( $D_h$ ) 值列于表 4 中。所测体系的多分散性指数在 0.1~0.2 之间, 表明即使药物存在下的二元与三元复合物的尺寸也呈均匀分布。在 DNR 与 HSA 相互作用后, 颗粒直径略微增加, 表明由于药物分子与 HSA 的结合导致复合物结构

松散。但是 HSA : DNR=1 : 15 时, EGCG 的存在使  $D_h$  的值相较于二元体系减小, 表明 EGCG 与 DNR 存在竞争结合, EGCG 使 DNR 与 HSA 的结合减弱, 与 CD 结果一致。

## 2.4 体外细胞毒性实验

通过 MTT 法测量 DNR, HSA+DNR, EGCG+DNR 和 HSA+EGCG+DNR 对人宫颈癌 HeLa 细胞的细胞毒性。细胞毒性的计算方法如式(7)<sup>[15]</sup>

$$\text{Cytotoxicity} = (A - B)/A \times 100\% \quad (7)$$

其中,  $A$  和  $B$  分别为正常培养基培养及加有药物或药物-蛋白复合物的培养基培养的细胞的吸光度。

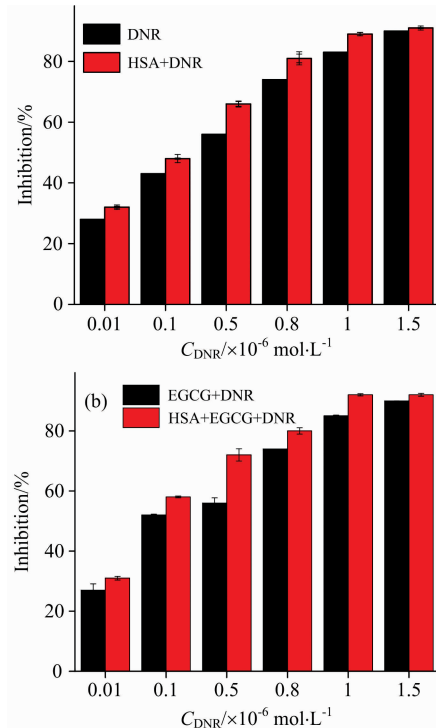


图 7 DNR, HSA+DNR (a), EGCG+DNR 以及 HSA+EGCG+DNR (b) 对 HeLa 细胞的体外细胞毒性

Fig. 7 In vitro cytotoxicity of DNR, HSA+DNR (a), EGCG+DNR and HSA+EGCG+DNR (b) in HeLa Cells

两种药物对同一细胞的协同作用可通过式(8)计算<sup>[16]</sup>

$$CI = (D)_1 / (D_x)_1 + (D)_2 / (D_x)_2 \quad (8)$$

其中,  $CI$  表示组合指数,  $(D_x)_1$  和  $(D_x)_2$  为单一药物作用达到  $x\%$  时药物的浓度,  $D_1$  和  $D_2$  为两种药物共同作用达到  $x\%$  时药物的浓度。本文中,  $x\%$  指  $50\%$  抑制。

图 7(a,b) 为 DNR, HSA+DNR, EGCG+DNR 及 HSA+EGCG+DNR 对人宫颈癌 HeLa 细胞的细胞毒性。由图可见, DNR 对 HeLa 细胞的细胞毒性具有剂量依赖性[图 7(a)]。计算得到上述四个体系的  $IC_{50}$  值分别为  $(0.09, 0.04, 0.07$  和  $0.01) \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。  $IC_{50}$  值表明 HSA 的加入使 DNR 的细胞毒性增大, 其原因可能为 DNR+HSA 大分子复合物更容易使药物通过内吞的形式进入细胞, 从而更好地发挥作用。

$CI > 1$ ,  $CI = 1$  和  $CI < 1$  时分别表示两种药物的加和、拮抗和协同作用。EGCG+DNR 和 HSA+EGCG+DNR 复合物的  $CI_{50}$  值分别为 0.82 和 0.78, 均小于 1, 表明 EGCG 与 DNR 存在协同作用, 并且 HSA 存在下协同作用进一步增强。这主要是由于 EGCG 与 DNR 结合在 HSA 的相同位点上, EGCG 的存在导致 DNR 的游离浓度增加。并且药物与 HSA 结合形成的大分子复合物更容易内吞进入细胞, 从而更好地发挥作用。此结果表明 EGCG 能够增强 DNR 对 HeLa 细胞的细胞毒性。此结果将为 EGCG 和 DNR 用于癌症联合

治疗提供理论依据。

### 3 结 论

通过多种光谱方法研究了模拟生理条件下 DNR 与 HSA 的相互作用以及 EGCG 对 DNR 与 HSA 结合的影响。并且通过 MTT 法考察了单一药物、组合药物及其与 HSA 的复合物对 HeLa 细胞的体外细胞毒性。实验结果表明, DNR 与 HSA 的结合为静态猝灭过程, 其结合过程的主要驱动力为疏水作用力。标记实验表明 DNR 主要结合在 HSA 的位点 II A 上。同步荧光光谱表明 DNR 在 HSA 上的结合更接近色氨酸残基。在 (HSA+EGCG)+DNR 三元体系中, EGCG 的存在阻碍了 DNR 与 HSA 的结合, 这是由于两种药物结合于 HSA 的同一位点, 而存在竞争结合。CD 光谱和 DLS 结果表明与 DNR 结合后蛋白的构象发生了变化,  $\alpha$ -螺旋含量减少, 蛋白粒径增大。EGCG 存在下  $\alpha$ -螺旋含量大于相应的二元体系, 而粒径相对于二元体系的有所减小。体外细胞毒性实验结果表明 EGCG 与 DNR 的组合对 HeLa 细胞产生协同抗肿瘤作用。此外, DNR 单一药物和 EGCG+DNR 组合药物的细胞毒性可通过它们与 HSA 的结合在一定程度上得到增强。本研究可为 EGCG 和 DNR 联合用于癌症临床治疗提供理论依据。

### References

- [1] Kanter P M, Schwartz S S. *Cancer Res.*, 1979, 39: 3661.
- [2] LI Li, TANG Yan-xia, OU Bing-ning, et al(李 丽, 唐燕霞, 欧冰凝, 等). *Chinese Pharmacological Bulletin(中国药理学通报)*, 2014, 30(3): 345.
- [3] CHEN Shu-zhen, ZHEN Yong-su(陈淑珍, 甄永苏). *Acta Pharmaceutica Sinica(药学学报)*, 2013, 48(1): 1.
- [4] Maiti T K, Ghosh K S, Dasgupta S. *Proteins*, 2006, 64: 355.
- [5] Jiang Chongqiu, Gao Mingxia, Meng Xianzhe. *Spectrochim. Acta A*, 2003, 59: 1605.
- [6] Yuan Lixia, Liu Min, Sun Bin, et al. *J. Mol. Liq.*, 2017, 248: 330.
- [7] LI Hong, XU Qian, ZHENG Xiao-li, et al(李 红, 许 茜, 郑晓丽, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)* 2018, 38(12): 3839.
- [8] Yuan Lixia, Liu Min, Liu Guiqin, et al. *Spectrochim. Acta A*, 2017, 173: 584.
- [9] XIE Huan, HE Huan, DONG Jia-xin, et al(谢 欢, 何 欢, 董家新, 等). *Acta Phys.-Chim. Sin.(物理化学学报)*, 2019, 35(7): 725.
- [10] Shi Yabo, Liu Min, Yan Hui, et al. *Spectrochim. Acta A*, 2019, 206: 384.
- [11] Liu Min, Zheng Yan, Wang Chunmei, et al. *Food Chem.*, 2016, 196: 148.
- [12] YAN Cheng-nong, ZHANG Hua-xin, LIU Yi, et al(颜承农, 张华新, 刘 义, 等). *Acta Phys.-Chim. Sin.(物理化学学报)*, 2005, 63(18): 1727.
- [13] Wang Qingpeng, Chen Yan, Li Guoshuai, et al. *Bioorgan. Med. Chem.*, 2019, 27: 2112.
- [14] Li Guoshuai, Zhang Junfeng, Liu Zhifang, et al. *J. Inorg. Biochem.*, 2019, 194: 34.
- [15] Qi Wenwen, Yu haiyan, Guo Hui, et al. *Mol. Pharmaceut.*, 2015, 12: 675.
- [16] Tong Nannan, Zhang Jie, Chen Youran, et al. *Oncol. Lett.*, 2012, 3: 1263.

# Spectroscopic and Cytotoxicity Study on the Influence of (-)-Epigallocatechin-3-Gallate on the Interaction of Daunorubicin with Human Serum Albumin

GUO Qing-ying<sup>1</sup>, LIU Min<sup>1,2\*</sup>, ZHAO Yan-na<sup>2</sup>, WU Yu-shu<sup>2</sup>, SUN Bin<sup>2</sup>, LIU Jie<sup>1</sup>, HAN Jun<sup>2</sup>

1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China

2. Institute of BioPharmaceutical Research, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China

**Abstract** Tea polyphenols play roles in the augmentation of antitumor effects, the reversal of multidrug resistance, and the reduction of side effects of antitumor drugs. Tea polyphenols could be used as biochemical modulators in cancer therapy. In this study, the interaction of daunorubicin (DNR) with human serum albumin (HSA) and the effect of epigallocatechin gallate (EGCG) on the binding process under physiological condition were studied by fluorescence spectroscopy, UV-Vis absorption spectroscopy, circular dichroism (CD) spectroscopy, and dynamic light scattering (DLS). The cytotoxicity of DNR single drug, EGCG+DNR combined drug, and their complexes with HSA against human cervical cancer HeLa cell line was determined by MTT assay. Fluorescence quenching result and difference spectra of UV-Vis absorption revealed the formation of a static complex between DNR and HSA. Quenching constants, binding constants, the numbers of binding sites, enthalpy and entropy changes were obtained from fluorescence data. Positive enthalpy and entropy changes indicated that the binding of DNR to HSA was mainly driven by entropy. The hydrophobic interaction was the main driving force. Site marker competitive experiments combined with synchronous fluorescence spectra showed that DNR mainly bound to subdomain IIA of HSA and was closer to tryptophan residues. In HSA+EGCG+DNR ternary system, the fluorescence data processing model of the ternary system was established. The number of binding sites and binding constants for DNR-HSA interaction in the presence of EGCG obtained by Matlab fitting were obviously decreased in the presence of EGCG. This indicated that the presence of EGCG might decrease the binding affinities of DNR to HSA. In addition, in the presence of EGCG, the binding constant of DNR to HSA increased with the elevation of temperature. This implied that the main driving force for the binding process was still the hydrophobic interactions. CD spectroscopy and DLS studies showed that drug-protein binding could affect the conformation and particle size of the protein, resulting in a decrease in the  $\alpha$ -helical content of HSA and an increase in particle size. The  $\alpha$ -helical content in (HSA+EGCG)+DNR ternary system was greater than that in the corresponding HSA+DNR binary system, while the hydraulic diameter of the ternary system was smaller than that of the binary system. This indicated the presence of EGCG weakened the binding of DNR to HSA due to the competitive binding between EGCG and DNR. This conclusion was consistent with the fluorescence experiment result of the ternary system. Furthermore, the cytotoxicity of DNR and HSA+DNR complex in the presence or absence of EGCG was discussed, and the results indicated that the combination of DNR with EGCG had the synergistic effect and HSA can enhance the cytotoxicity of DNR. Obtained results would provide beneficial information on the combination of EGCG and DNR in the clinic. This study showed that the spectroscopic method could provide strong support for the study of the interaction between combined drugs and proteins.

**Keywords** Human serum albumin; Daunorubicin; (-)-Epigallocatechin-3-gallate; Spectroscopic technique; Cytotoxicity

(Received May 15, 2019; accepted Oct. 9, 2019)

\* Corresponding author