

光谱法与计算机模拟法研究六溴环十二烷与牛血清白蛋白的相互作用

庾 浔¹, 宋继敏¹, 付 豪², 吕小兰^{1*}

1. 南昌大学化学学院, 江西 南昌 330000

2. 南昌大学药学院, 江西 南昌 330000

摘要 六溴环十二烷(HBCD)是一种被人类广泛使用的溴系阻燃剂。近年来的研究表明 HBCD 已经广泛存在于环境中且对人类的健康具有较大威胁。目前还没有关于 HBCD 与牛血清白蛋白(BSA)之间相互作用机制的报道。该研究在模拟生理条件下, 整合光谱学和计算机模拟研究等技术手段探究 HBCD 与 BSA 之间的相互作用, 为揭示 HBCD 对人类的毒性作用机制提供新的视角和一些基础数据。荧光光谱法和紫外光谱法证明 HBCD 能够使 BSA 的内源荧光猝灭, 猝灭机制为静态猝灭和非辐射能量转移。HBCD 与 BSA 有 1 个结合位点, 结合常数为 $2.7966 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (288 K), $2.1941 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (293 K), $1.1744 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (298 K)。荧光光谱、紫外光谱、分子对接结果表明 HBCD 与 BSA 在结合位点 I 处结合, 结合距离为 3.45 nm 左右。根据热力学常数与结合常数之间的关系, 计算得到 $\Delta H = -61.749 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $\Delta S = -128.742 \text{ J} \cdot (\text{mol} \cdot \text{K})^{-1}$, 两者之间的结合作用力为范德华力或氢键。三维荧光光谱实验、分子动力学模拟结果表明, HBCD 不会对 BSA 的二级结构产生影响。

关键词 六溴环十二烷; 多光谱法; 计算机模拟; 牛血清白蛋白

中图分类号: TQ460.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2021)05-1487-06

引言

六溴环十二烷(Hexabromocyclododecane, HBCD)是一类添加型的含溴阻燃剂, 是继多溴联苯醚、四溴双酚 A 后被广泛使用的第三大溴系阻燃剂。2001 年至 2011 年全球 HBCD 产量由 16 700 t 增至 31 000 t, 我国年生产量从 500 t 增至 18 000 t, 已成为 HBCD 的主要生产国^[1]。2013 年 5 月经缔约方大会第六次会议审议, 联合国环境规划署理事会将 HBCD 纳入持久性有机污染物目录, 引发国际社会广泛关注。

近年来的研究表明 HBCD 能够进入大气、土壤、水体等自然环境并且能够在生物体内蓄积^[1]。据文献报道, 中国各大城市的空气中均检出 HBCD, 土壤中 HBCD 含量检出量高达 $11\,700 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, 远远超过世界标准^[2]。特别值得注意的是, 在人迹罕至的北极地区的空气及生物体内都检测到 HBCD 的存在^[3]。毒理学相关研究表明, HBCD 对生物体具有

生殖毒性、发育毒性、神经毒性等多种毒性^[4]且具有生物放大效应, 能够通过食物链的传递最终严重威胁人类健康。例如: 经 HBCD 染毒 7 天后, 雌性大鼠肝脏中大量蛋白的表达发生改变^[5], 食物链高端的鱼类体内 HBCD 含量高于食物链低端鱼类^[6], 体外研究表明 HBCD 对人肝细胞和人肝癌细胞具有细胞毒性^[7]。因此, 研究 HBCD 对哺乳动物毒性作用机制, 可为降低 HBCD 对人类健康的威胁提供理论支持。

血清白蛋白作为一种重要的生物分子, 在过去的几百年里一直为人们所关注。血清白蛋白是血液中重要的蛋白质成分, 负责维持血液的渗透压以及 pH 值。血清白蛋白在许多内源性物质(氨基酸、脂肪酸等)和外源化合物(药物、环境污染物等)的转运过程中发挥着关键作用^[8]。持久性有机污染物同样能够与白蛋白结合^[9], 继而被转运至各个器官, 由此可以推测血清白蛋白在 HBCD 的致毒机制中发挥着关键作用。目前, 尚未见 HBCD 与血清白蛋白结合机制的研究。本文通过实验研究和理论计算相结合的方式, 探究 HBCD 与 BSA 的作用机制, 以期从分子水平揭示 HBCD 对人类毒

收稿日期: 2018-12-13, 修订日期: 2019-04-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31860153), 江西省自然科学基金项目(20181BAB204003)资助

作者简介: 庾 浔, 1981 年生, 南昌大学化学学院教师 e-mail: tuoxun@ncu.edu.cn

* 通讯作者 e-mail: lxl@ncu.edu.cn

性作用机制提供重要基础信息。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

带温控系统的 F-4500 荧光分光光度计(日本日立公司); 紫外-分光光度计(UV-5500PC 上海元析仪器有限公司); Cary eclipse 荧光光谱仪(美国安捷伦公司); PHS-3C 精密 PH 计(上海雷磁仪器厂); 溶液: 牛血清白蛋白(进口分装)溶于超纯水中配制成 $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液, 六溴环十二烷(上海源叶生物, 97%)溶于二甲基亚砜(国药集团化学试剂有限公司, A. R.)中配成 $1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HBCD 储备液; Tris-HCl 缓冲液: 2.42 g 三羟甲基氨基甲烷(Tris, 上海源叶生物科技有限公司, 纯度为 99.9%)和 3.51 g NaCl 溶于 400 mL 超纯水中配制成 pH 7.40 的缓冲液; 实验用水均为超纯水。

1.2 方法

1.2.1 荧光光谱、同步荧光的测定

固定研究体系中 BSA 浓度为 $3.33 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 改变 HBCD 的浓度 (0, 3.33, 6.66, 9.99, 13.33, 16.67, 19.98) $\times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 以 280 nm 为激发波长, 测定 300~450 nm 下的荧光发射光谱。

改变 BSA-HBCD 体系的温度 (288, 293 和 298 K), 以 280 nm 为激发波长, 测定 300~450 nm 的荧光发射光谱。

固定 $\lambda_{\text{em}} - \lambda_{\text{ex}} = 15 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} - \lambda_{\text{ex}} = 60 \text{ nm}$, 分别测定 260~320 nm 下的同步荧光发射光谱。

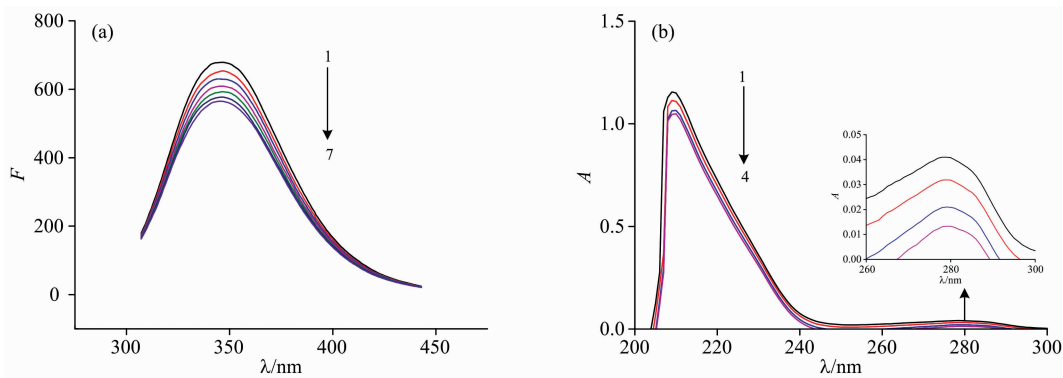


图 1 HBCD 对 BSA 荧光光谱(a)和紫外光谱(b)的影响

Fig. 1 Effect of HBCD on the fluorescence (a) and UV absorption spectra (b) of BSA

(a): $[\text{BSA}] = 3.33 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $[\text{HBCD}] = (0, 3.33, 6.66, 9.99, 13.33, 16.67, 19.98) \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;

(b): $[\text{BSA}] = 3.33 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $[\text{HBCD}] = (0, 3.33, 6.66, 9.99) \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

紫外-可见吸收光谱法是一种简单有效的检测化合物与蛋白质是否形成复合物的方法。BSA 在 215 及 280 nm 处有两个吸收峰[图 1(b)], 其中 215 nm 处的吸收峰是肽键上 C=O 的 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁所产生的, 280 nm 处的吸收峰主要是由 BSA 中氨基酸残基中芳杂环 $\pi \rightarrow \pi^*$ 和 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁所引起的。由图 1(b)可以看出, 215 nm 处的吸收峰的吸光度随着 HBCD 浓度的增加而降低, 并且有微弱的红移现象, 说明 HBCD 与 BSA 形成了复合物; 280 nm 处吸收峰强度也随着

改变体系中 BSA 和 HBCD 的比例, 分别以 280 和 295 nm 为激发波长, 测定发射波长 345 nm 下的荧光强度。

1.2.2 紫外光谱

固定研究体系中 BSA 的浓度为 $3.33 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 改变 HBCD 的浓度 (0, 3.33, 6.66, 9.99) $\times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 以相应的 HBCD 溶液作为参比, 测定 200~300 nm 下 BSA-HBCD 体系的紫外光谱。

1.2.3 分子对接

通过 ChemBio3D Ultra 14.0 得到 HBCD 的结构, 并通过 MMFF94 分子力场优化得到最佳的结构。从 RSCB 数据库(<http://www.rcsb.org/>)中得到编号为 1H9Z 的白蛋白构象。通过 Autodock4.2 程序进行分子对接并使用 Ligplus+ 软件对 ΔG 最低的构象进行分析。

1.2.4 分子动力学

利用分子动力学软件 GROMACS 2016.1 程序模拟游离态和结合态的 BSA 结构的稳定性以及 HBCD 对 BSA 二级结构的影响, 每个体系重复模拟 3 次。

2 结果与讨论

2.1 HBCD 与 BSA 体系荧光光谱、紫外光谱分析

BSA 中含有酪氨酸(Tyr)、色氨酸(Trp)和苯丙氨酸(Phe)三种能够产生荧光的氨基酸残基, 使得 BSA 具有一定的内源性荧光。由图 1(a)所示, 随着 HBCD 浓度的增加, BSA 的荧光强度依次降低, 表明 HBCD 与 BSA 间存在着相互作用且结合能力较强, 易在体内被蛋白质储存和转运。

HBCD 浓度的增加而降低。动态猝灭只会改变荧光分子的激发态, 而不改变物质的吸收光谱。紫外光谱的结果说明 HBCD 与 BSA 在基态的环境中发生相互作用并形成复合物, 即 HBCD 对 BSA 荧光的猝灭机制为静态猝灭。

2.2 HBCD 与 BSA 的结合位置

BSA 具有两个与外源性物质结合的结合位点, 分别是结合位点 I 和结合位点 II。运用 Autodock4.2 程序分别对 HBCD 与 BSA 在结合位点 I 和 II 处结合进行理论模拟研究。结

果表明,当 HBCD 进入 BSA 结合位点 I 处与其结合时吉布斯自由能(ΔG)为 $-6.5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$,而进入结合位点 II 处的 ΔG 为 $+4.3 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。可见 HBCD 与 BSA 会更倾向于在结合位点 I 进行自发结合。最佳模拟结果如图 2(a)和 (b)所示。

由于 BSA 的结合位点 I 中有能够产生荧光的氨基酸残基有 Tyr 和 Trp,而结合位点 II 中仅有 Tyr。因此,利用结合位点 I 和结合位点 II 结构的差异以及 Tyr/Trp 性质的差异,通过同步荧光和改变激发波长实验可进一步确认 HBCD 与

BSA 的结合位点。

2.2.1 同步荧光实验

固定 $\lambda_{em} - \lambda_{ex} = 15 \text{ nm}$ 时,测得蛋白质中 Tyr 的光谱;固定 $\lambda_{em} - \lambda_{ex} = 60 \text{ nm}$ 时,测得 Trp 的光谱。由图 3 可见,随着 HBCD 浓度的增加, Tyr 的荧光强度下降幅度很小,几乎不变[图 3(a)],而 Trp 的荧光强度呈现规律性下降[图 3(b)]。该结果表明 HBCD 与 BSA 的结合位点在 Trp 附近,即两者在结合位点 I 结合。

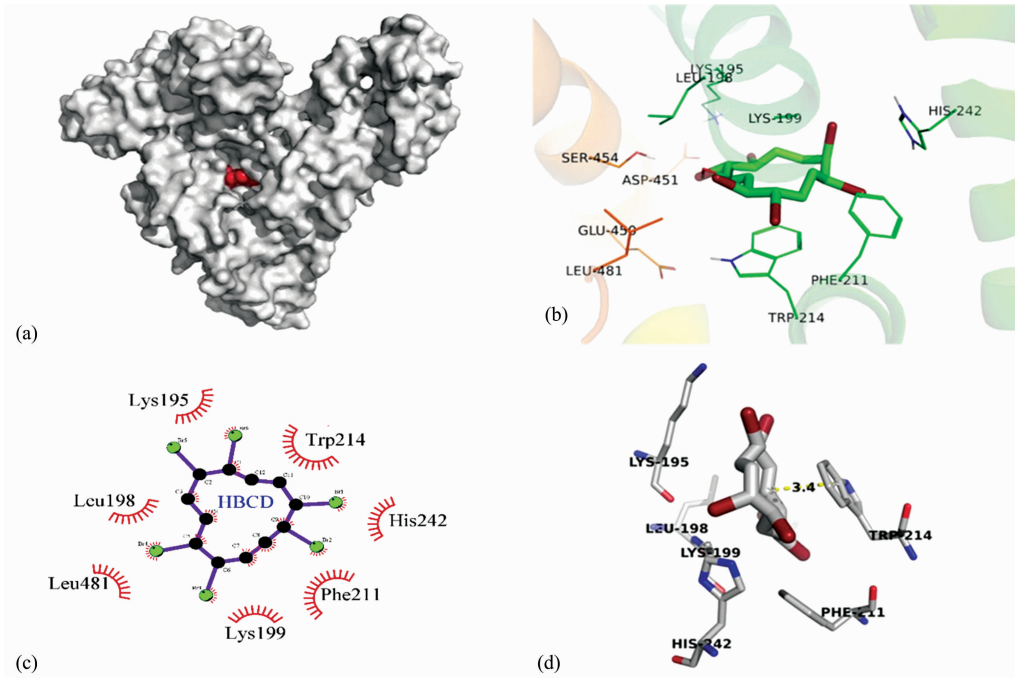


图 2 HBCD 与 BSA 在结合位点 I 的相互作用图

(a): BSA 与六溴环十二烷结合图; (b): 结合位点 I 放大图; (c): Ligplus+ 软件分析 2D 图; (d): Ligplus+ 软件分析 3D 图

Fig. 2 The interaction between HBCD and BSA at site I

(a): BSA and HBCD interaction model; (b): Enlarged view of binding site I;
(c): Analysis of figure using Ligplus+; (d): Analysis of 3D figure using Ligplus+

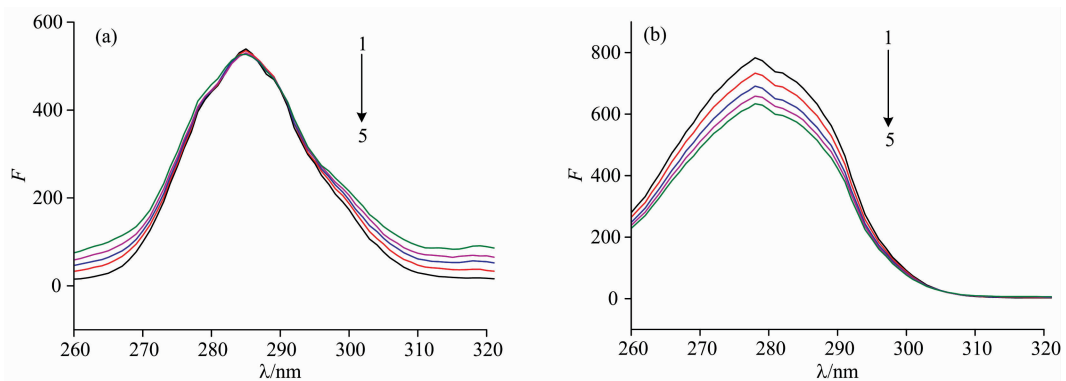


图 3 HBCD 对 BSA 同步荧光光谱的影响

Fig. 3 Effect of HBCD on the synchronous fluorescence spectra of BSA

$[BSA] = 3.33 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $[HBCD] = (0, 3.33, 6.66, 9.99, 13.33) \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

(a): $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$; (b): $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$

2.2.2 不同激发波长下的荧光光谱实验

当激发波长为 280 nm 时, Trp 和 Tyr 的荧光同时被激发; 激发波长为 295 nm 时, 只有 Trp 的荧光被激发。因此, 比较两个不同激发波长处, 荧光强度下降的程度, 可以判断出 HBCD 与 BSA 的结合位点。荧光实验表明在 HBCD 浓度由 $3.33 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 增至 $3.33 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的过程中, 280 nm 处荧光强度下降程度始终大于 295 nm。当 HBCD 浓度达到 $3.33 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 280 nm 处荧光强度下降了 64%, 明显大于 295 nm 处荧光下降强度 47%, 表明 Trp 和 Tyr 的荧光强度在 HBCD 与 BSA 作用过程中均被抑制, 此实验再次证明 HBCD 与 BSA 在结合位点 I 进行结合。这一结果与分子对接结果、同步荧光光谱实验结果一致。

表 1 六溴环十二烷与牛血清白蛋白结合作用的结合常数与热力学参数

Table 1 The binding constant and the thermodynamic parameters of BSA-HBCD at different temperatures

T/K	$Ka/(\times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$	n	r	$\Delta H/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S/[\text{J} \cdot (\text{mol} \cdot \text{K})^{-1}]$	$\Delta G/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$
288	2.796 6	1.105	0.997 58			-24.516
293	2.194 1	1.055	0.996 24	-61.749	-128.742	-24.351
298	1.174 4	1.008	0.998 93			-23.218

2.4 HBCD 与 BSA 的热力学参数及作用力类型

从本质上分析, 有四种主要类型的非共价相互作用力存在于配体与蛋白质的结合过程中, 分别是: 静电作用力, 氢键, 范德华力以及疏水作用力^[11]。通过分子对接得到 HBCD 与 BSA 结合的最佳构象后, 利用 LigPlus+ 软件分析 HBCD 与 BSA 之间的相互作用。如图 2(c) 所示, HBCD 与 5 种氨基酸之间具有疏水作用力, 其中 3 种是疏水性氨基酸 (Trp, Phe, Leu), 2 种是亲水性氨基酸 (Lys, His), 由此可以初步推测 HBCD 与 BSA 结合的主要作用力是范德华力。

热力学参数是确定分子间作用力的主要依据, 为进一步确认 HBCD 与 BSA 的作用力类型, 可通过不同温度条件下的荧光光谱实验得到三个不同温度下的结合常数, 结合式 (2) 和式 (3), 计算得到三个热力学参数大小, 进而判断作用力类型。若 $\Delta H > 0$ 和 $\Delta S > 0$, 表明两物质间的作用力类型为疏水作用; 若 $\Delta H < 0$ 和 $\Delta S > 0$, 表明两物质间的作用力类型为静电作用力; 若 $\Delta H < 0$ 和 $\Delta S < 0$, 表明两物质间的作用力类型为氢键或范德华作用力^[12]。当温度变化不大时, 系统的焓变与熵变可视为常数。焓变与熵变通过式 (2) 计算得到, 系统的吉布斯自由能变化通过式 (3) 计算得到。

$$\ln Ka = -\Delta H/RT + \Delta S/R \quad (2)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln Ka \quad (3)$$

式 (2) 和式 (3) 中, Ka 为 HBCD 与 BSA 结合的结合常数, R 是气体常数, 以 $\ln Ka$ 对 $-1/T$ 作图, 由直线的斜率和截距分别得到 ΔH 和 ΔS , 计算结果见表 1。由表 1 可知, $\Delta G < 0$, 说明 HBCD 与 BSA 的结合反应是自发进行的, $\Delta H < 0$ 和 $\Delta S < 0$, 说明 HBCD 与 BSA 之间主要作用力类型为范德华力或氢键。

2.5 HBCD 与 BSA 间能量转移

根据 Forster 能量转移理论, 两种化合物分子间满足供能体发出荧光, 供能体的荧光发射光谱和受体的吸收光谱有

2.3 HBCD 与 BSA 体系结合位点数与结合常数的确定

小分子与蛋白大分子相互作用的结合位点数 n 与结合常数 Ka 可以由式 (1)^[10] 得到

$$\log[(F_0 - F)/F] = \log Ka + n \log [Q] \quad (1)$$

式 (1) 中, F_0 及 F 分别为 BSA 单独存在以及加入 HBCD 形成复合体系后的荧光强度, Ka 为结合常数, n 为结合位点数, $[Q]$ 为 HBCD 的浓度。以 $\log[(F_0 - F)/F]$ 对 $\log [Q]$ 作图, 通过直线的斜率与截距得到 n 值与 Ka 值, 结果列于表 1 中。不同温度条件下, HBCD 与 BSA 的结合位点数 n 均约为 1, 说明两者发生结合作用时只有 1 个结合位点; 随着体系温度的上升, 结合常数 Ka 逐渐下降, 表明 HBCD 对 BSA 的荧光的猝灭机制为静态猝灭。

重叠或者供能体和受体足够的接近, 且最大距离在 7 nm 范围内时, 将会有非辐射能量转移。按照相关方程处理 HBCD 的紫外吸收光谱与 BSA 荧光光谱的重叠谱图 (图 4)。得到 $J = 3.413 \times 10^{-15} \text{ cm}^3 \cdot \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $R = 2.04 \text{ nm}$, $r = 3.45 \text{ nm}$ 。计算机模拟的结果表明 BSA 与 HBCD 间的结合距离为 3.40 nm [图 2(d)], 该值与实验结果接近, 进一步说明实验的可靠性。 $r < 7 \text{ nm}$ 表明 HBCD 与 BSA 间存在非辐射能量转移, 从而导致 BSA 荧光猝灭。

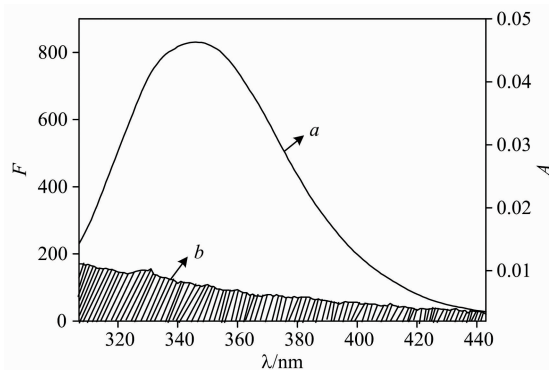


图 4 BSA 的荧光发射光谱 (a) 和 HBCD 的紫外吸收光谱 (b)

Fig. 4 Fluorescence emission spectra of BSA (a) and UV absorption spectra of HBCD (b)

$$[BSA] = [HBCD] = 3.33 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

2.6 HBCD 对 BSA 二级结构的影响

2.6.1 分子动力学模拟

通过分子动力学模拟 (MD) 可以研究 HBCD 与 BSA 复合物在水溶液中的动力学情况。根据均方根偏差 (RMSD) 及蛋白质二级结构变化可以判断 HBCD 对 BSA 二级结构的影响。BSA 与 HBCD 形成的复合体系的均方根偏差如图 5(a)。

研究体系的 RMSD 值在 2 ns 以后变化幅度很小, 说明 HB-CD 能够与 BSA 形成稳定的复合物, 并且复合物体系稳定。进一步分析 BSA 处于游离态与稳定态时的二级结构, 如图 5 (b) 所示, 其中无规则卷曲 (coil)、弯曲 (Bend)、 β -折叠

(Turn)、 α -螺旋 (α -Helix)、5-螺旋 (5-Helix)、3-螺旋 (3-Helix) 的含量都不发生变化, 且具有统计学意义。说明 HB-CD 不会改变 BSA 的二级结构。

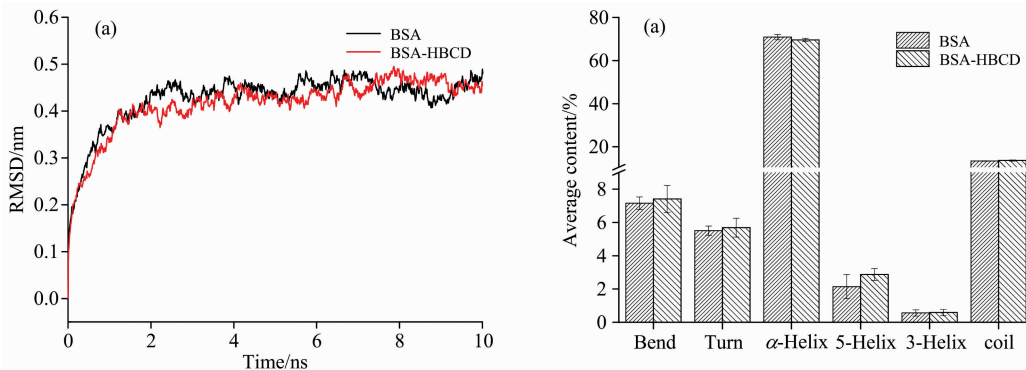


图 5 HB-CD 对 BSA 的 RMSD(a) 和二级结构含量 (b) 的影响
Fig. 5 RMSD (a) and the average contents of Secondary structure (b) of BSA

2.6.2 HB-CD 与 BSA 的三维荧光光谱分析

三维荧光光谱可以提供蛋白质更多更全面的二级结构信息, 图 6(a) 为 BSA 单独存在时的三维立体荧光光谱图; 图 6 (b) 为加入与 BSA 相同质量的 HB-CD 之后的三维立体荧光光谱图。三维荧光光谱图中的 peak1 是肽键上 C=O 的 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁所产生的荧光峰, peak 2 主要是由 BSA 中氨基酸

残基中芳杂环 $\pi \rightarrow \pi^*$ 和 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁所引起的荧光峰, peak3 为瑞利散射峰。体系中 HB-CD 的存在仅改变了 peak1 和 peak2 的强度, 而对 peak1 和 peak2 的峰型和最大激发/发射波长没有影响, 该结果表明 HB-CD 的加入对 BSA 的二级结构并无影响^[13]。实验结果与分子动力学模拟得到的结果相符, 即 HB-CD 与 BSA 结合后, 并未改变 BSA 的二级结构。

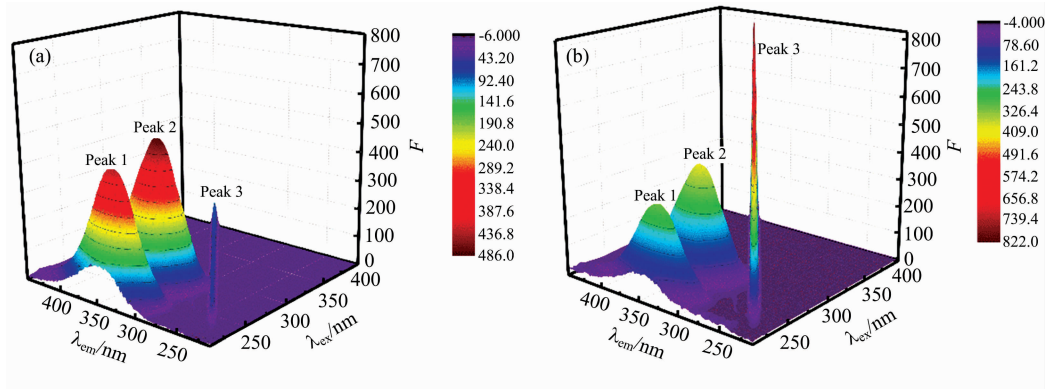


图 6 BSA 和 BSA-HBCD 的三维荧光光谱图
Fig. 6 Three-dimensional fluorescence spectra of BSA and BSA-HBCD

$$[BSA] = [HBCD] = 3.33 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

3 结 论

通过整合多种光谱学技术以及计算机模拟技术, 本文探究了 HB-CD 与 BSA 之间相互作用的化学本质。HB-CD 通过静态猝灭和非辐射能量转移导致 BSA 内源荧光猝灭; 根据计算结果可知 HB-CD 与 BSA 的结合位点数为 1, 结合常数为 $2.7966 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (288 K), $2.1941 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$

(293 K), $1.1744 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (298 K); HB-CD 会自发地与 BSA 在结合位点 I 进行结合, 两者的结合距离为 3.45 nm。 $\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$, $\Delta G < 0$, 表明 HB-CD 与 BSA 之间自发结合过程是熵增加、吉布斯自由能减小的过程, 结合作用力主要为范德华力或氢键; HB-CD 与 BSA 结合不会使 BSA 的构象发生改变。本实验的研究结果能够帮助人们在一定程度上理解溴系阻燃剂在生物体内的运输机制, 为研究 HB-CD 的毒理机制提供重要的理论基础。

References

- [1] Cao X H, Lu Y L, Zhang Y Q, et al. Environ. Pollut. , 2018, 236: 283.
- [2] Zhang Y Q, Lu Y L, Wang P, et al. Sci. Total Environ. , 2018, 610: 94.
- [3] Koch C, Schmidt-Koetters T, Rupp R, et al. Environ. Pollut. , 2015, 199: 26.
- [4] Wang X, Yang J, Li H, et al. Chemosphere, 2018, 208: 31.
- [5] Miller I, Serchi T, Cambier S, et al. Toxicol. Lett. , 2016, 245: 40.
- [6] Meng X Z, Xiang N, Duan Y P, et al. Environ. Toxicol. Chem. , 2012, 31(7): 1424.
- [7] Huang X, Chen C, Shang Y, et al. Chemosphere, 2016, 161: 251.
- [8] Paolo G Gobbi, Adele Gendarini, Annamaria Crema, et al. Cancer, 2015, 55(2): 389.
- [9] Chen H, He P, Rao H, et al. Chemosphere, 2015, 129: 217.
- [10] Naseri A, Hosseini S, Rasoulzadeh F, et al. J. Lumin. , 2015, 157: 104.
- [11] Poureshghi F, Ghandforoushan P, Safarnejad A, et al. J. Photoch. Photobio. B, 2017, 166: 187.
- [12] Manouchehri F, Izadmanesh Y, Aghae E, et al. Bioorg. Chem. , 2016, 68: 124.
- [13] TANG Qian, SU Jin-hong, CAO Hong-yu, et al(唐 乾, 苏晋红, 曹洪玉, 等), Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2017, 37(11): 3485.

Study on Interaction Between Hexabromocyclododecane and Bovine Serum Albumin by Spectroscopy and Computer Simulation Methods

TUO Xun¹, SONG Ji-min¹, FU Hao², LÜ Xiao-lan^{1*}

1. College of Chemistry, Nanchang University, Nanchang 330000, China

2. School of Pharmacy, Nanchang University, Nanchang 330000, China

Abstract Hexabromocyclododecane (HBCD) is widely used in industry as a kind of brominated flame retardant. However, more and more people pay close attention to the problem of HBCD contamination in the environment due to its potential risk to human health. There are no reports focuses on the transport mechanism of HBCD in the human body. Hence, multi-spectroscopy and computer simulation methods investigated the interaction mechanisms of HBCD and bovine serum albumin (BSA)-. The solution experiments confirmed that HBCD quenched BSA's intrinsic fluorescence through the static quench mechanism and non-radiation energy transfer. The binding constants (K_a) between them were $2.7966 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (288 K), $2.1941 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (293 K), and $1.1744 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (298 K), respectively. The number of the binding site in the BSA-HBCD complex was approximately equal to 1. The thermodynamic constants were calculated to be $\Delta H = -61.749 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ and $\Delta S = -128.742 \text{ J} \cdot (\text{mol} \cdot \text{K})^{-1}$, indicating that van der Waals or hydrogen bond play a key role in this binding process. The result of molecular docking and fluorescence spectrum indicated that the primary binding site for HBCD was located in the hydrophobic pocket of sub-domain II A of BSA, and the binding distance was about 3.45 nm. The secondary conformation of BSA did not affect by HBCD was observed in three-dimensional fluorescence spectra and MD simulations. This research provides a theoretical basis for further understanding of toxic effects of HBCD on human toxicity.

Keywords Hexabromocyclododecane; Multi-spectroscopy; Computer Simulation; Bovine serum albumin

(Received Dec. 13, 2018; accepted Apr. 12, 2019)

* Corresponding author