

张牧焱, 张 森, 孙 冲, 等. 磷脂与 Hsp90 相互作用的荧光和红外光谱[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(4): 922-926.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.04.033

磷脂与 Hsp90 相互作用的荧光和红外光谱

张牧焱¹, 张 森^{1,2}, 孙 冲¹, 王道营¹, 卞 欢¹, 吴海虹¹, 诸永志¹, 耿志明¹, 徐为民¹

(1. 江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏 南京 210014; 2. 南京财经大学, 食品科学与工程学院, 江苏 南京 210046)

摘要: 为研究磷脂酰胆碱(PC)与热休克蛋白 90(Hsp90)的相互作用机制, 分别采用荧光光谱和红外光谱法研究 Hsp90 内源荧光的变化和磷脂主要基团的变化。结果显示: PC 对 Hsp90 内源荧光有较强的猝灭作用, PC 对 Hsp90 的猝灭属于形成复合物产生的静态猝灭, 结合位点数为 0.92, 结合的主要作用力为氢键和范德华力; Hsp90 与 PC 的相互作用发生在磷脂极性头端和非极性侧链上, 并使磷脂的结构发生改变。磷脂可以稳定地与 Hsp90 结合。

关键词: 热休克蛋白 90(Hsp90); 磷脂酰胆碱; 荧光光谱; 红外光谱

中图分类号: TS251.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)04-0922-05

Interaction between phosphatidylcholine and heat shock protein 90 (Hsp90) by fluorescence and infrared spectroscopy

ZHANG Mu-han¹, ZHANG Miao^{1,2}, SUN Chong¹, WANG Dao-ying¹, BIAN Huan¹, WU Hai-hong¹, ZHU Yong-zhi¹, GENG Zhi-ming¹, XU Wei-min¹

(1. Institute of Agricultural Products Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. College of Food Science and Engineering, Nanjing University of Finance and Economics, Nanjing, 210046, China)

Abstract: To investigate the mechanism underlying the interaction between phosphatidylcholine (PC) and heat shock protein 90 (Hsp90), the fluorescence spectroscopy and infrared spectroscopy were applied to study the changes of intrinsic fluorescence of Hsp90 and major groups of phosphatidylcholine respectively. The results showed PC was found to have a strong ability to quench the intrinsic fluorescence of Hsp90. It was a static quenching as the result of the formation of PC-Hsp90 complex. The number of binding sites was 0.92, and based on Van't Hoff equation, the binding of PC to Hsp90 was driven mainly by hydrogen bond and Van der Waals forces. The infrared spectroscopy indicated the binding of Hsp90 and PC took place in the polar headgroup and nonpolar fatty acid side chains of PC, and the structure of PC molecules changed. In conclusion, PC could stably bind with Hsp90.

Key words: heat shock protein 90 (Hsp90); phosphatidylcholine; fluorescence spectroscopy; infrared spectroscopy

收稿日期: 2015-12-31

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31271891); 国家自然科学基金青年基金项目(31401560); 江苏省农业科技创新基金项目[CX(14)5058]; 江苏省农业科学院基本科研业务专项项目[ZX(15)4046]

作者简介: 张牧焱(1985-), 女, 江苏南京人, 硕士, 助理研究员, 研究方向为肉品科学。(E-mail) zhangmh06@sina.com

通讯作者: 王道营, (E-mail) wdy0373@aliyun.com

磷脂主要包括磷脂酰胆碱(PC)和磷脂酰乙醇胺(PE)等, 是组成动物肌内脂质的主要物质, 也是构成细胞膜的重要成分^[1]。磷脂易发生水解和氧化, 与肉制品风味和品质的形成密切相关^[2]。因此研究肌内磷脂的生化特性对阐明肉制品品质形成有

重要的意义。

热休克蛋白(Hsp)是动物和微生物中广泛存在的一类高度保守蛋白质,也是膜结合蛋白之一。其中 Hsp90 是热休克蛋白家族的重要成员,在非应激细胞中占胞质蛋白的 1%~2%,在应激后表达量更高^[3]。据报道小分子热休克蛋白和热休克蛋白 70 可以与磷脂紧密结合,并对细胞膜的流动性、渗透性、完整性具有调控作用^[4-7]。Wang 等的研究也初步证实了 Hsp90 可以与磷脂结合并抑制磷脂酶 A2 对磷脂的水解^[8],但目前 Hsp90 与磷脂相互作用的机制还不明确。在肉品科学领域,热休克蛋白已被证实与肌肉脂肪含量、汁液损失、嫩度等相关^[9-11],深入研究热休克蛋白与肌肉磷脂的关系可以了解肉制品品质的形成机理提供理论基础。本试验拟采用荧光光谱和红外光谱研究 Hsp90 与磷脂酰胆碱之间的相互作用,初步揭示 Hsp90 与磷脂酰胆碱相互作用的机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

磷脂酰胆碱来源于 Avanti Polar Lipids 公司;Hsp90 从鸭肉中分离提纯^[8]。

1.2 仪器与设备

970CRT 荧光分光光度计(上海棱光技术有限公司产品),600IR 傅里叶红外光谱仪(美国 Varian 公司产品)。

1.3 方法

1.3.1 磷脂酰胆碱脂质体的制备 称取卵磷脂 10 mg,用 2 ml 乙醚溶解,加 0.5 ml 50 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8)缓冲液,旋转蒸发器中旋转蒸发除乙醚,再加缓冲液 2 ml,置于超声波发生器中在超声频率 28 kHz、功率 100 W 条件下冰浴乳化 30 min,用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8)缓冲液定容至 10 ml。

1.3.2 Hsp90-磷脂脂质体的荧光光谱测定 向浓度为 1×10^{-5} mol/L 的 Hsp90 溶液中依次加入磷脂脂质体,使其终浓度为 4.2×10^{-6} mol/L、 8.3×10^{-6} mol/L、 12.5×10^{-6} mol/L、 16.7×10^{-6} mol/L,在温度为 288 K、298 K、308 K 下检测 Hsp90 的荧光发射波长。测定时发射与激发狭缝为 10 nm,激发波长 285 nm,样品池光径为 1 cm。每次测定重复 3 次。

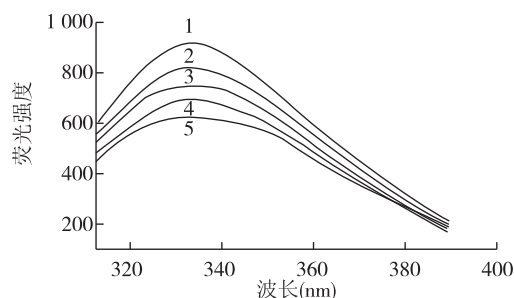
1.3.3 Hsp90-磷脂脂质体的红外光谱测定 在 Hsp90 溶液中加入磷脂脂质体溶液,蛋白质与磷脂

脂质体的摩尔比为 1:12。分别取 50 μ l 脂质体溶液和 Hsp90/磷脂复合物滴于玻璃片上,保持脂质体的浓度一致,室温下晾干。以傅里叶变换红外光谱仪在 $800 \sim 4\,000\text{ cm}^{-1}$ 进行扫描,分辨率 4 cm^{-1} ,扫描次数 32 次,每次测定重复 3 次。谱图由 Origin 8.0 软件获得。

2 结果与分析

2.1 磷脂对 Hsp90 的荧光猝灭方式

Hsp90 因含有色氨酸和酪氨酸等氨基酸残基而具有内源荧光。荧光猝灭是指溶液中猝灭体分子和荧光物质之间发生相互作用使荧光物质的荧光量子效率降低或激发态寿命缩短,从而导致荧光强度降低的现象^[12]。本试验固定 Hsp90 的浓度不变,增加脂质体浓度,观察该反应的荧光变化。图 1 为磷脂对 Hsp90 的荧光光谱图。由图 1 可以看出,在 $300 \sim 400\text{ nm}$,随着磷脂浓度的增加,Hsp90 的荧光强度逐渐减小,说明磷脂在与 Hsp90 的作用过程中,对 Hsp90 的荧光有猝灭作用。



1~5: 1×10^{-5} mol/L Hsp90 分别与 0 mol/L、 4.2×10^{-6} mol/L、 8.3×10^{-6} mol/L、 12.5×10^{-6} mol/L、 16.7×10^{-6} mol/L 磷脂酰胆碱相互作用。

图1 磷脂酰胆碱对 Hsp90 荧光强度的影响

Fig.1 Effect of phosphatidylcholine on the fluorescence intensity of Hsp90

荧光猝灭过程可分为动态猝灭和静态猝灭。而无论是动态猝灭还是静态猝灭,都与温度的变化关系密切。小分子与蛋白质的激发态分子间相互碰撞导致荧光强度猝灭的过程称为动态猝灭。在这个过程中若升高温度,会使分子间有效碰撞程度加剧,猝灭常数增高^[12]。而小分子与蛋白质分子间借助分子间作用力,生成不发光的复合物,导致蛋白质荧光强度降低的过程,称为静态猝灭过程。在这个过程中,升高温度会使复合物的稳定性降低,猝灭常数减

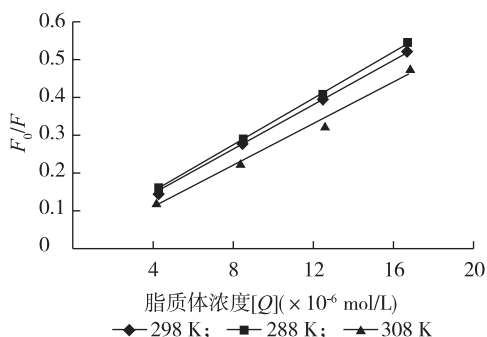
小^[12]。所以,一般情况下,可以通过改变温度,观察猝灭常数的变化,确认荧光猝灭的类型。

本试验测定了不同温度(288 K、298 K、308 K)下磷脂对 Hsp90 的荧光猝灭情况。首先用 Stern-Volmer 方程进行描述^[13]:

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

式中 K_q 是双分子猝灭过程的速率常数, K_{sv} 为动态猝灭常数, τ_0 为猝灭剂不存在时荧光分子的平均寿命($\tau_0 = 10^{-8}$ s), $[Q]$ 为脂质体的浓度, F_0 和 F 分别为未加入和加入脂质体时 Hsp90 的荧光强度。

根据 Stern-Volmer 方程,以脂质体浓度为横坐标, F_0/F 为纵坐标,作 Hsp90 的荧光猝灭 Stern-Volmer 曲线(图 2)。



F_0 和 F 分别为未加入和加入脂质体时 Hsp90 的荧光强度。

图 2 磷脂酰胆碱对 Hsp90 荧光猝灭的 Stern-volmer 曲线

Fig. 2 Stern-Volmer curves describing Hsp90 fluorescence quenching by phosphatidylcholine

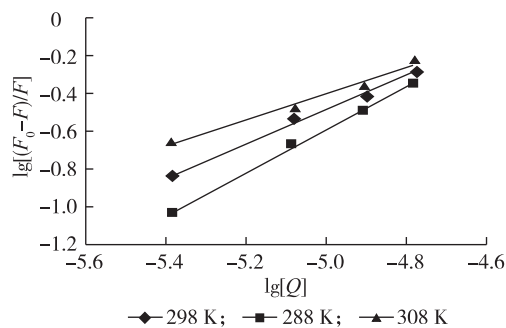
由图 2 可见,在 288 K、298 K、308 K 时曲线均呈较好的线性关系,不同温度下的 K_{sv} 分别为 $3.07 \times 10^5 (\text{mol/L})^{-1}$ 、 $2.97 \times 10^5 (\text{mol/L})^{-1}$ 、 $2.75 \times 10^5 (\text{mol/L})^{-1}$,可见,随着温度的升高,动态猝灭常数呈减小的趋势。荧光猝灭过程 K_q 分别为 $3.07 \times 10^{13} (\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 、 $2.97 \times 10^{13} (\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 、 $2.75 \times 10^{13} (\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$,皆远大于各类猝灭剂对生物大分子最大扩散碰撞猝灭的速率常数 $2.0 \times 10^{10} (\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ^[14]。所以可以推测,脂质体对 Hsp90 的猝灭不是由于分子间碰撞引起的动态猝灭,而是形成了复合物而引起的静态猝灭。

2.2 磷脂与 Hsp90 的结合常数和结合位点数

在静态猝灭中,用 Lineweaver-Burk 双倒数方程进行处理,可以进一步确定结合反应的相关参数^[15]。Lineweaver-Burk 双倒数方程为:

$$\lg[(F_0 - F)/F] = \lg K_a + n \lg [Q] \quad (2)$$

式中 K_a 为 Hsp90 与脂质体的结合常数, n 为结合位点数。以 $\lg[(F_0 - F)/F]$ 对 $\lg[Q]$ 作图,作脂质体 Hsp90 的双倒数曲线(图 3)。由图 3 可以看出,在 308 K、298 K、288 K 温度下,结合常数 K_a 分别为 1.2×10^3 、 1.2×10^4 、 1.4×10^5 。可以推断脂质体和 Hsp90 之间存在较好的结合力。结合位点数为 0.92 ± 0.22 。



F_0 和 F 分别为未加入和加入脂质体时 Hsp90 的荧光强度, $[Q]$ 为脂质体的浓度。

图 3 磷脂酰胆碱对 Hsp90 荧光猝灭的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线

Fig. 3 Lineweaver-Burk curves describing Hsp90 fluorescence quenching by phosphatidylcholine

2.3 磷脂与 Hsp90 结合作用力类型

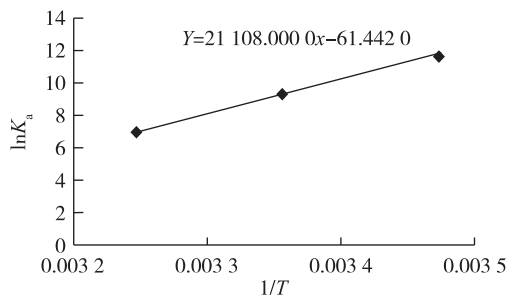
在热力学中,不同类型反应之间的相互结合作用力不同。一般来说,作用力类型主要有疏水作用力、氢键作用力和范德华力。为判断磷脂和 Hsp90 之间的作用力类型,可以根据反应前后的热力学焓变(ΔH)和熵变(ΔS)的大小进行计算。若反应 $\Delta H > 0$ 、 $\Delta S > 0$,可以推断相互作用力为疏水作用力;若 $\Delta H < 0$ 、 $\Delta S < 0$,主要作用力为氢键和范德华力;若 $\Delta H < 0$ 、 $\Delta S > 0$,主要作用力为氢键和静电引力^[16]。 ΔH 和 ΔS 可以根据范特霍夫方程求出:

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

式中 R 是热力学气体常数 $8.314 \text{ J}/(\text{mol} \cdot \text{K})$,以 $\ln K_a$ 对 $1/T$ 作线性图(图 4),由直线的斜率和截距计算出 ΔH 和 ΔS ,再根据方程 $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ 计算自由能变 ΔG ,相关参数列于表 1 中。从表 1 中可以看出 $\Delta G < 0$,说明磷脂对 Hsp90 的反应是自发进行的。其中 $\Delta H < 0$ 、 $\Delta S < 0$,推测 Hsp90 与磷脂结合的主要作用力为氢键和范德华力。

2.4 磷脂与 Hsp90 相互作用的红外光谱分析

磷脂酰胆碱(PC)与 Hsp90 相互作用的红外光



K_a 为 Hsp90 与脂质体的结合常数。
图 4 磷脂酰胆碱与 Hsp90 相互作用的范特霍夫图
Fig.4 Vant' Hoff plot describing the interaction between phosphatidylcholine and Hsp90

谱如图 5 所示。波数 $2\,850\text{ cm}^{-1}$ 、 $2\,920\text{ cm}^{-1}$ 、 $2\,945\text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收峰表示 CH_2 的对称振动以及 CH_2 和 CH_3 的反对称振动,它们反映了碳氢键的排列情况和磷脂相态变化^[17]。如果峰向低波数位移说明 CH 链的排列有序度升高^[17]。PC 的浓度固定,在加入 Hsp90 后,这些吸收峰发生了位移或消失,推测 Hsp90 可能影响磷脂脂肪酸链的有序程度。

表 1 磷脂酰胆碱与 Hsp90 相互作用的热力学函数
Table 1 Thermodynamic parameters describing the interaction of phosphatidylcholine and Hsp90

温度(K)	ΔG (KJ/mol)	ΔH (KJ/mol)	ΔS [J/(mol·K)]
288	-27.88	-175.00	-510.83
298	-22.77		
308	-17.67		

$1\,730\text{ cm}^{-1}$ 的峰代表磷脂的 $\text{C}=\text{O}$ 键^[18],从谱图上可以看出,加入 Hsp90 后, $1\,730\text{ cm}^{-1}$ 处的峰消失了。磷脂中的羰基通常与其所处环境的极性、氢键和一些配基的相互作用有关^[19]。羰基基团的改变可反映磷脂结构和水化程度的改变^[19]。 $\text{C}=\text{O}$ 基团具有亲水特性,但由于它紧邻疏水长链,处于 PC 疏水区域与亲水区域的交界处^[20]。Hsp90 加入后,通过氢键或范德华力影响水分子与 $\text{C}=\text{O}$ 基团形成的氢键网络,削弱氢键或使氢键断裂。
在 PC/Hsp90 混合体系中, 970 cm^{-1} 附近的胆碱反对称振动 $\text{N}^+-(\text{CH}_3)_3$ 产生的吸收峰消失^[21],说明 Hsp90 可能对磷脂酰胆碱的极性头部和脂肪酸链都产生了影响。Tsvetkova 等^[22]用傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 研究小分子热休克蛋白与磷脂的相互作

用时也发现了小分子热休克蛋白可以引起磷脂亚甲基的对称振动峰和磷酸不对称伸缩峰的变化,提出小分子热休克蛋白与磷脂的结合受磷脂极性头部的调控并影响磷脂内部的疏水区域。通常氢键可稳定蛋白质与磷脂极性头部的结合,而非极性的范德华力可使疏水的磷脂脂肪酸链紧密插入蛋白质的疏水表面沟槽^[23]。本试验红外光谱测定结果表明 Hsp90 可能通过氢键和范德华力与磷脂结合,这与荧光光谱测定结果一致。Hsp90 与磷脂的结合对细胞膜的状态与功能有着重要影响,其相互作用机制还有待进一步深入研究。

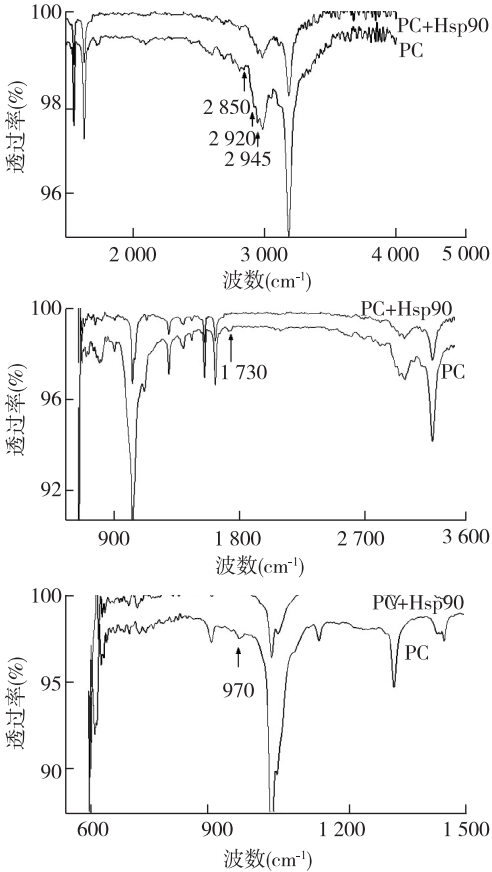


图 5 磷脂酰胆碱与 Hsp90 相互作用的红外光谱图
Fig.5 Infrared spectrum describing the interaction between phosphatidylcholine and Hsp90

3 结论

本研究利用荧光光谱和红外光谱技术研究了磷脂对 Hsp90 的相互作用。研究结果表明磷脂对 Hsp90 产生静态猝灭,磷脂对 Hsp90 的结合位点数为 0.92,结合作用力主要是氢键和范德华力。通过

红外光谱测定,进一步确定 Hsp90 与磷脂的极性头部和脂肪酸链都可产生稳定的结合,且 Hsp90 对磷脂的结构产生影响。

参考文献:

- [1] 徐为民,王道营,诸永志,等. 肌内磷脂在腌腊肉制品风味形成中的作用机制研究进展[J]. 江苏农业学报, 2010, 26(1): 204-207.
- [2] PEREZ-PALACIOS T, RUIZ J, DEWETINCK K. Muscle individual phospholipid classes throughout the processing of dry-cured ham; influence of pre-cure freezing [J]. Meat Science, 2010, 84(3): 431-436.
- [3] BUCHNER J. Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones [J]. The FASEB Journal, 2011, 25: 10-19.
- [4] ARISPE N, MAIO D M. Lipid interaction differentiates the constitutive and stress-induced heat shock proteins Hsc70 and Hsp70 [J]. Cell Stress Chaperones, 2002, 7: 330-338.
- [5] TSVETKOVA N M, HORVATH I, TOROK Z, et al. Small heat-shock proteins regulate membrane lipid polymorphism [J]. Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(21): 13504-13509.
- [6] HARADA Y, SATO C, KITAJIMA K. Complex formation of 70-kDa heat shock protein with acidic glycolipids and phospholipids [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, 353: 655-660.
- [7] CHOWDARY T K, RAMAN B, RAMAKRISHNA T, et al. Interaction of mammalian Hsp22 with lipid membranes [J]. Biochemical Journal, 2007, 401(Pt 2): 437-445.
- [8] WANG D, ZHANG M, LIU F, et al. Purification and characterisation of a phosphatidylcholine-binding protein from duck Biceps femoris muscle [J]. Animal Production Science, 2014, 54(2): 194-199.
- [9] KIM N K, CHO S, LEE S H, et al. Proteins in longmimm muscle of Korean native cattle and their relationship to meat quality [J]. Meat Science, 2008, 80(4): 1068-1073.
- [10] LOMIWES D, HURST S M, DOBBIE P, et al. The protection of bovine skeletal myofibrils from proteolytic damage post mortem by small heat shock proteins [J]. Meat Science, 2014, 97: 548-557.
- [11] ZHANG M, WANG D, GENG Z, et al. The level of heat shock protein 90 in pig longissimus dorsi muscle and its relationship with meat pH and quality [J]. Food Chemistry, 2014, 165: 337-341.
- [12] 许金钧,王尊本. 荧光分析法[M]. 3版. 北京:科学出版社, 2006.
- [13] DING F, ZHAO G, CHEN S, et al. Chloramphenicol binding to human serum albumin: determination of binding constants and binding sites by steady-state fluorescence [J]. Journal of Molecular Structure, 2009, 929: 159-166.
- [14] 张璐颖,郭明,陈建议,等. 熊果酸与血清白蛋白的结合反应机制研究[J]. 林产化学与工业, 2010, 30(3): 41-48.
- [15] 丁兰,彭舒,柳志军,等. 荧光、圆二色及共振光散射光谱研究熊果酸与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 西北师范大学学报, 2013, 49(1): 78-95.
- [16] PHILIP D R, SUBRAMANIAN S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability [J]. Biochemistry, 1981, 20: 3096-3102.
- [17] CAGNASSO M, BOERO V, FRANCHINI M A, et al. ATR-FTIR studies of phospholipid vesicle interactions with α -FeOOH and α -Fe₂O₃ surfaces [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010, 76: 456-467.
- [18] SHAI Y. ATR-FTIR studies in pore forming and membrane induced fusion peptides [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2013, 1828: 2306-2313.
- [19] MELANDRI S. Union is strength: how weak hydrogen bonds become stronger [J]. Physical Chemistry Chemical Physics, 2011, 13: 13901-13911.
- [20] DISALVO E A, BOUCHET A M, FRIAS M A. Connected and isolated CH₂ populations in acyl chains and its relation to pockets of confined water in lipids membranes as observed by FTIR spectroscopy [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2013, 1828: 1683-1689.
- [21] TAMM L K, TATULIAN S. Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers [J]. Quarterly Reviews of Biophysics, 1997, 30: 365-429.
- [22] TSVETKOVA N M, HORVATH L, TOROK Z, et al. Small heat-shock proteins regulate membrane lipid polymorphism [J]. Proceedings of the National Academy of Science, 2002, 99: 13504-13509.
- [23] PALSDOTTIR H, HUNTE C. Lipids in membrane protein structures [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2004, 1666: 2-18.

(责任编辑:张震林)