

生物科学

荧光光谱法研究盐酸阿霉素与溶菌酶的相互作用

倪志华^{1,2} 张玉明^{1*}

(河北大学生命科学院¹,河北省生物工程技术研究中心²,保定 071002)

摘要 盐酸阿霉素(doxorubicin hydrochloride, DOX)是临幊上广泛应用的一种抗幊药物,溶菌酶(lysozyme, LYS)是生物体內普遍存在的一种具有杀菌、抗病毒、抗肿瘤作用的蛋白质,研究DOX与LYS之间的相互作用十分必要。研究利用荧光光谱法研究了不同温度下(298 K、308 K 和 318 K)DOX 与 LYS 的相互作用,阐述了DOX 对 LYS 荧光猝灭的机理;并计算了二者之间的结合位点和结合常数。结果表明,DOX 能使 LYS 的内源荧光发生猝灭,荧光猝灭机理属于二者形成复合物所引起的静态猝灭。Stern-Volmer 方程分析显示,DOX 与 LYS 具有 1 个结合位点,不同温度下 DOX 与 LYS 的结合常数(K_A): 4.79×10^6 (298 K)、 2.82×10^6 (308 K)和 2.14×10^6 (318 K)。通过计算热力学参数,可知 DOX 与 LYS 的相互作用主要是由分子之间的静电作用引发的;并且二者之间相互作用是伴随吉布斯自由能降低的自发反应。三维荧光光谱实验显示,DOX 的加入引起 LYS 构象的变化,表现为蛋白质内部色氨酸残基所处微环境的疏水性降低。

关键词 盐酸阿霉素 溶菌酶 相互作用 荧光光谱

中图法分类号 Q55 TN249; **文献标志码** A

盐酸阿霉素(doxorubicin hydrochloride, DOX)是一种蒽环类抗癌抗生素,具有抗瘤谱广、抗瘤活性强的特点,临幊上广泛应用于治疗多种恶性肿瘤^[1]。DOX 可直接与 DNA 结合,阻碍 DNA 的复制,使癌细胞的生长受到抑制;也可通过介导活性氧自由基的生成来损伤 DNA 等生物大分子,从而杀伤癌细胞。也有报道 DOX 可诱导肿瘤细胞发生细胞自噬从而达到抗幊效果^[2],然而该药物的心脏毒性等副作用^[3]限制了其在化疗中的深入应用。研究蛋白质等生物大分子与 DOX 的相互作用,将 DOX 与生物大分子联用,可增强其靶向性及抗幊疗效,并有助于抗幊药物的毒副反应^[4]。溶菌酶(Lysozyme, LYS)是一种小分子碱性蛋白质,普遍存在于生物体體液和组织细胞中。作为生物体内重要的非特异性體液免疫因子,LYS 具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、增强免疫力等多种药理作用,并能够和许多外源和内源性物质结合充当药物运输载体^[5]。探讨药物分子与 LYS 之间的相互作用可以阐明外源药物在生物

体内的转运过程和作用机理,有助于药代动力学研究和药物联用开发^[6]。目前,DOX 与人血清白蛋白^[7, 8]、牛血清白蛋白^[9]、过氧化氢酶^[10]之间的相互作用已经得到深入研究,然而 DOX 与 LYS 相互作用机制尚无报道。

光谱法是研究小分子化合物与生物大分子相互作用的重要手段^[11, 12]。本文应用荧光光谱法研究 LYS 与 DOX 的作用,重点考察二者相互作用的结合常数、结合位点数以及结合热力学参数,并利用三维荧光光谱研究 DOX 对 LYS 结构的影响。本研究可为阐明 DOX 在体内的输送和代谢过程提供理论依据,并期望为 DOX 蛋白载体的选择提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

F97pro 型荧光分光光度计(上海棱光技术有限公司);BS110S 型精密电子分析天平(德国 Sartorius 公司);HH 系列数控恒温水浴锅(金坛市科析仪器有限公司);明澈—D 超纯水机(millipore)。DOX(上海士峰生物科技有限公司);溶菌酶(sigma),其他试剂均为分析纯。以 0.1 mol/L PBS 磷酸缓冲液(pH 7.4)为溶剂配置 1.0×10^{-4} mol/L 的 LYS 标准溶液备用,DOX 使用超纯水配成 2.5×10^{-3} mol/L 的标准溶液备用。

1.2 方法

取 DOX 标准溶液 10 mL 置于具盖离心管中,再

2015 年 10 月 14 日收到 保定市科学技术研究与发展指导计划
(15ZN001)、河北省科技计划项目(15222912)、河北大学
中西部提升综合实力专项、河北省生物学强势特色

学科建设项目资助
第一作者简介:倪志华(1979—),女,讲师,硕士。研究方向:应用生
物化学。E-mail:nizhihua@hbu.edu.cn。

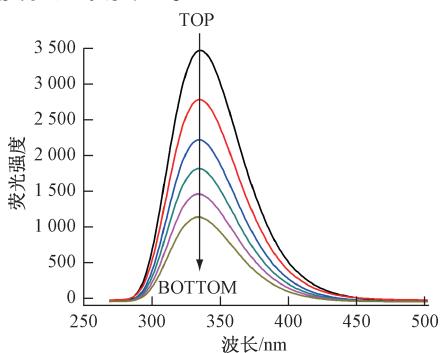
*通信作者简介:张玉明(1979—),男,讲师,博士。研究方向:生物
化工。E-mail:zhangyuming@hbu.edu.cn。

加入 LYS 标准溶液 0.3 mL, 以 10 mmol/L PBS 磷酸缓冲液(pH 7.4)定容到 3 mL, 恒温水浴 10 min。将离心管中 LYS-DOX 混合溶液置于石英比色皿中进行荧光分析(扫描波长范围 250~500 nm), 激发波长设定为 280 nm, 荧光分光光度计光栅狭缝设定为 5 nm。并且, 在激发波长 250~400 nm 和发射波长 250~400 nm 范围内进行三维荧光扫描, 比较 LYS 与 LYS-DOX 体系的三维荧光等高线图。

2 结果与分析

2.1 荧光猝灭光谱

LYS 是由 129 个氨基酸残基组成的蛋白质, 含有 6 个色氨酸(tryptophan, Trp)。其中, Trp62 和 Trp108 处在 LYS 分子表层的结合位置, 是 LYS 分子主要的荧光发光基团^[13], 这也为荧光法研究 LYS 与配体结合作用提供了理论依据。图 1 是不同浓度 DOX 存在时 1.0×10^{-4} mol/L LYS 的荧光发射光谱。由图 1 可知, 激发波长为 280 nm 时, LYS 的最大发射波长位于 335 nm。并且, 随着 DOX 浓度的增加, LYS 的内源性荧光强度有规律的降低, 峰位也产生了不同程度的蓝移。当体系中 DOX 为 12.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时, LYS 的最大发射波长蓝移至 354 nm。这表明, 加入 DOX 后 LYS 分子内色氨酸残基所处微环境疏水性增加, 这是小分子化合物与 LYS 发生相互作用形成复合物的佐证。二者相互作用后, DOX 分子与 LYS 芳香氨基酸残基之间可能发生 $\text{p}-\pi$ 或其他超共轭效应, 使芳香氨基酸残基荧光位置及强度发生改变^[6]。



LYS 的浓度为 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$; 图中从上到下的 DOX 浓度分别为 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$

图 1 DOX 对 LYS 的猝灭光谱

Fig. 1 The fluorescence quenching spectra of DOX by LYS

2.2 DOX 对 LYS 的荧光猝灭机理

小分子化合物与蛋白质等生物大分子发生分子间相互作用, 从而引发蛋白质荧光猝灭现象广泛存在, 对分子之间猝灭机理的研究十分重要, 动态猝灭和静态猝灭是最为常见的 2 种荧光猝灭形式。通

常, 动态猝灭和静态猝灭可依据小分子猝灭剂与蛋白质大分子在不同温度条件下相互作用得到的荧光猝灭参数变化而进行区分^[14]。如果小分子猝灭剂对蛋白质大分子的荧光猝灭作用是由动态猝灭引起的, 从微观角度分析: 猛灭效果是由于猝灭剂与蛋白质之间不断发生的分子间相互碰撞而引发的。因此, 动态猝灭发生时, 较高的反应温度可提高二者之间分子相互碰撞的几率, 从而增大猝灭剂对蛋白质内源荧光的猝灭效率。反而言之, 当小分子猝灭剂与蛋白质大分子之间通过非共价键形成复合物时, 一般认为蛋白质的内源荧光是被静态猝灭的。通常, 引发静态猝灭的猝灭剂-蛋白质复合物是对温度敏感的, 温度升高不利于复合物的结合稳定性, 进而降低蛋白质内源荧光的猝灭程度。研究分析时, 可首先假定小分子对于蛋白质内源荧光的猝灭属于动态猝灭, 则小分子-蛋白质之间的相互作用应该遵循 Stern-Volmer 方程^[15]。

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K[Q] \quad (1)$$

式(1)中, F_0 和 F 分别表示不加入和加入猝灭剂时体系的荧光强度, $[Q]$ 为猝灭剂的摩尔浓度。本研究中, DOX 为猝灭剂, F_0 为 LYS 溶液的荧光强度, F 为 LYS 溶液加入 DOX 后的荧光强度。如果 DOX 对 LYS 的荧光猝灭作用为静态猝灭, K 为二者结合形成复合物的形成常数; 如果 DOX 对 LYS 的猝灭作用为动态猝灭, 则 K 为动态猝灭常数 K_{sv} 。

$$K_{sv} = K_q T_0 \quad (2)$$

式(2)中, K_q 为荧光猝灭速率常数; T_0 的含义为不存在猝灭剂时荧光物质的平均寿命, 对于 LYS 等蛋白质大分子物质, T_0 为一常数(10^{-8} mol/s)。由式(1)作图, 得到 Stern-Volmer 猛灭曲线(图 2), 线性回归后根据斜率计算得到 K_q 值。如果 DOX 对 LYS 的猝灭机制为动态猝灭, 由式(2)可求出二者之间相互作用的 K_{sv} , 结果见表 1。

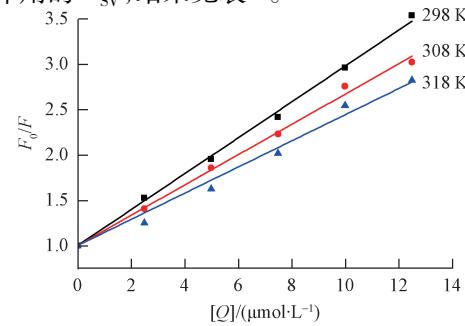


图 2 不同温度下 DOX 对 LYS 的荧光猝灭 Stern-Volmer 曲线

Fig. 2 The Stern-Volmer curves of fluorescence quenching of LYS by DOX at different temperatures

表 1 DOX 对 LYS 的荧光猝灭常数

Table 1 The quenching constants of the interaction of DOX and LYS

T/K	$K_{SV}/(L \cdot mol^{-1})$	$K_q/[L \cdot (mol \cdot s^{-1})^{-1}]$	r
298	1.97×10^5	1.97×10^{13}	0.9961
308	1.66×10^5	1.66×10^{13}	0.9946
318	1.44×10^5	1.44×10^{13}	0.9915

由图 2 可知, F_0/F 对 $[Q]$ 线性良好, 相关系数 r 值都大于 0.99, 表明 DOX 与 LYS 之间相互作用时只存在一种猝灭机制。由图 2 中直线的斜率可求出 K_{SV} 值, 动态和静态猝灭可根据猝灭常数 K_{SV} 随温度变化关系来判断。图 2 显示: 随着温度的升高, DOX 对 LYS 的猝灭曲线斜率下降, 说明 DOX 对 LYS 荧光的猝灭作用随温度升高而降低, 符合静态猝灭规律。表 1 中参数也说明温度升高不利于 DOX 与 LYS 的结合, 这符合静态猝灭规律。文献显示^[10], 如果小分子物质对蛋白质分子的猝灭为动态猝灭, 则猝灭剂对生物大分子最大扩散控制的碰撞猝灭速率常数为 $2.0 \times 10^{10} L/mol$ 。本研究中, DOX 对 LYS 的猝灭参数经式(2)计算, 得到 DOX 对 LYS 的 K_q 值在 10^{13} 数量级(远大于动态猝灭的 10^{10} 数量级), 这也说明 LYS 的荧光猝灭属于二者形成的复合物而导致的静态猝灭。分析认为, DOX 是一种具有扁平结构的分子, 易于插入 DNA 和蛋白质等生物大分子中^[16], 更易引起生物大分子的静态猝灭。本研究结果与已有文献报道的 DOX 与牛血清白蛋白^[9]、人血清白蛋白^[7]、过氧化氢酶^[10]的相互作用研究结果是一致的, 说明 DOX 易于与生物大分子形成复合物。

2.3 DOX 与 LYS 的结合常数 K_A 及结合位点数 n

当小分子猝灭剂与蛋白质生物大分子相互作用时, 二者之间的结合常数 K_A 及结合位点数 n 可由式^[17](3)得到。

$$\lg \frac{(F_0 - F)}{F} = \lg K_A + n \lg [Q] \quad (3)$$

将不同温度(298 K、308 K、318 K)条件下, 不同浓度 DOX 对 LYS 的荧光猝灭参数(F_0/F)代入式(3), 可以得到图 3 的 DOX 对 LYS 荧光猝灭的双对数图。将各温度的数据进行线性回归分析, 得到标准方程的斜率和截距即可求出 DOX 与 LYS 作用的结合位点数 n 和结合常数 K_A (具体数据见表 2)。如图 3 和表 2 所示, 温度分别为 298 K、308 K 和 318 K 时, $\lg [(F_0 - F)/F]$ 对 $\lg [Q]$ 的线性关系良好, 相关系数 r 值都达到 0.99 以上。DOX 与 LYS 的结合位点数均接近于 1, 表明二者近似的以 1:1 形式结合而生成复合物, 温度对二者之间结合比例影响不大。本研究

中, DOX 与 LYS 在各温度的结合常数 K_A 值均超过 10^6 数量级, 表明二者之间的结合作用较强。

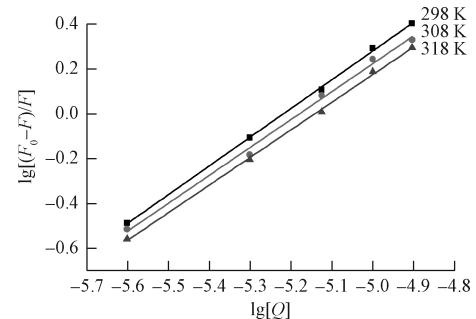


图 3 不同温度下 DOX 对 LYS 荧光猝灭的双对数图

Fig. 3 The double logarithmic curves for the quenching of LYS fluorescence by DOX

表 2 DOX 与 LYS 的结合常数

Table 2 The binding constants of the interaction of DOX and LYS

T/K	$K_A/(L \cdot mol^{-1})$	n	r
298	4.79×10^6	1.28	0.9985
308	2.82×10^6	1.25	0.9954
318	2.14×10^6	1.23	0.9981

2.4 DOX 与 LYS 相互作用的结合力类型

当小分子猝灭剂与蛋白质等生物大分子相互作用时, 主要存在以下几种非共价作用力: 疏水作用力、氢键作用力、范德华力和静电引力等^[18]。Ross 等^[19]从焓变(ΔH)、熵变(ΔS)、吉布斯自由能变(ΔG)等热力学参数角度阐述了猝灭剂与蛋白质等生物大分子结合时的作用力类型: ①当反应体系的 $\Delta H > 0, \Delta S > 0$ 时, 小分子猝灭剂-蛋白质复合物的结合主要为疏水作用力引起; ②当反应体系的 $\Delta H < 0, \Delta S < 0$ 时, 氢键或范德华力是引起小分子猝灭剂-蛋白质复合物形成的主要促进力; ③当反应体系的 $\Delta H < 0, \Delta S > 0$ 时, 一般认为静电作用力是促使小分子猝灭剂-蛋白质复合物形成的主要作用力。并且, 在小分子猝灭剂与蛋白质混合体系的温度变化范围不大时, 可以近似的认为二者相互作用过程的焓变(ΔH)是一个常数。因此, 根据经典的热力学公式(4)~式(6)及不同温度下的 DOX 和 LYS 的结合常数, 可求的不同温度条件下(298 K、308 K、318 K)相应的热力学参数(结果见表 3)。

$$\Delta G = -RT \ln K_a \quad (4)$$

$$\ln \left(\frac{K_{A2}}{K_{A1}} \right) = \Delta H \frac{\left(\frac{1}{r_1} - \frac{1}{r_2} \right)}{R} \quad (5)$$

$$\Delta S = \frac{(\Delta H - \Delta G)}{T} \quad (6)$$

表3 DOX与LYS相互作用的热力学参数

Table 3 Thermodynamic parameters of DOX-LYS interaction

T/K	$\Delta H/(kJ \cdot mol^{-1})$	$\Delta G/(kJ \cdot mol^{-1})$	$\Delta S/[J \cdot (mol \cdot K^{-1})^{-1}]$
298		-39.89	16.56
308	-34.96	-39.82	15.80
318		-40.69	18.03

如表3所示,DOX与LYS相互作用时热力学参数 $\Delta H < 0$ 、 $\Delta S > 0$,可以认为二者之间的作用力主要为静电相互作用。李玉琴等^[13]报道左旋紫草素与LYS相互作用也是以静电相互作用为主,说明静电相互作用LYS分子与小分子化合物相互作用的一种方式。DOX与LYS结合后,反应的焓变小于零,这说明二者之间的结合反应为放热过程。因此,高温不利于DOX-LYS复合物的形成,这与本研究2.2节所得到的DOX对LYS的猝灭机制为静态猝灭的结论是一致的。表3显示,3个温度下的反应的自由能变 $\Delta G < 0$,说明DOX与LYS的相互作用是一个吉布斯自由能降低的自发过程。该结果表明,LYS易于和DOX结合,是一种DOX在生物体内运输良好的药物载体。

2.5 DOX与LYS的三维荧光光谱

三维荧光光谱是以激发波长、发射波长和荧光强度三个参数分别为坐标的荧光矩阵光谱。同时,三维图谱可用强度等高线代替以更为直观的描述被测组分的荧光信息,是一种有价值的光谱指纹技术^[20]。研究溶液状态下蛋白质-药物小分子相互作用中蛋白质的构象变化时,三维荧光光谱能提供比常规荧光光谱更完整的光谱信息。本实验在激发波长250~400 nm和发射波长250~400 nm范围内进行三维荧光扫描,得到LYS和DOX-LYS复合物的三维荧光图和荧光等高线图(图4)。

从峰的类别看,图4(a)和图4(b)中都存在两

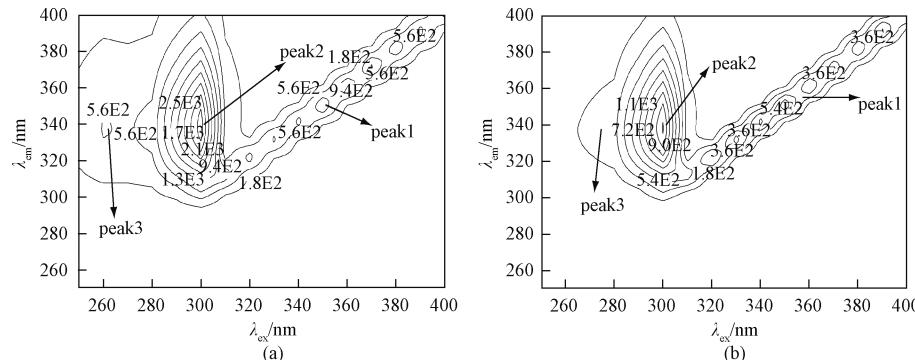


图4 LYS(a)及DOX-LYS体系(b)的三维荧光光谱等高线图

Fig. 4 Contour spectra of LYS (a) and DOX-LYS (b) system

条“铅笔”形纹线,它们的共同特征是激发波长(λ_{ex})等同于发射波长(λ_{em}),是典型的瑞利散射峰^[21](peak1)。加入DOX后,LYS的peak1较加入前略微降低,说明LYS分子体积减小,光散射程度有所降低。图4(a)和图4(b)中瑞利散射线左上方 $\lambda_{ex} = 300$ nm左右都存在“指纹”形纹线,并且上述“指纹”形纹线符合 $\lambda_{ex} < \lambda_{em}$ 的规律,是荧光峰(peak2, peak3)的典型特征。加入DOX后,使荧光峰peak2的位置蓝移2 nm,荧光峰peak3的位置蓝移1 nm,荧光峰中的“指纹”形纹线变得稀疏,中心位置也有明显差异,色氨酸的荧光峰发生猝灭和位移程度要比酪氨酸残基荧光峰明显,说明DOX对LYS中的色氨酸残基影响较大。

LYS是椭圆形的分子,在其表面有一个深陷而狭长的凹槽^[5]。推断DOX可能在LYS的非极性凹槽内与之发生结合作用,诱导了LYS构象的变化。分析认为,DOX的加入使水溶液中LYS疏水腔体内微环境的极性和疏水效应发生改变,导致LYS构象的变化^[22],而且随着温度的升高这种构象变化更为明显。

3 结论

利用荧光光谱法研究了DOX与LYS的相互作用。DOX对LYS的内源荧光具有较强的猝灭作用,原因是DOX与LYS分子发生结合形成复合物。测定了不同温度下DOX与LYS的结合常数、结合位点和热力学参数,结果表明DOX对于LYS的荧光猝灭机制为静态猝灭,二者的结合主要是基于静电相互作用,大约形成1个结合位点。三维荧光光谱研究表明,DOX和LYS之间结合导致了蛋白质分子内部疏水微环境极性的改变,进而导致了LYS构象的变化。上述结果均说明LYS可以作为DOX的有效载体。

参 考 文 献

- 1 Yu M, Kong H, Zhao Y, et al. Enhancement of adriamycin cytotoxicity by sodium butyrate involves hTERT downmodulation-mediated apoptosis in human uterine cancer cells. *Molecular Carcinogenesis*, 2014; 53(7):505—513
- 2 余芳, 陈协群, 陈娟娟, 等. 骨髓瘤细胞中阿霉素诱导的ATP变化与自噬的关系. *现代生物医学进展*, 2011; 11(6):1030—1032
- 3 Yu F, Chen X Q, Chen J J, et al. Relationship between ATP and autophagy in myeloma cell lines NCI-H929 induced by doxorubicin. *Progress in Modern Biomedicine*, 2011; 11(6):1030—1032
- 4 王睿, 徐长庆. 阿霉素心脏毒性作用机制研究进展. *齐齐哈尔医学院学报*, 2006; 27(10):1221—1222
- 5 Wang R, Xu C Q. Advances in the mechanism of cardiac toxicity induced by adriamycin. *Journal of Qiqihar Medical College*, 2006; 27(10):1221—1222
- 6 李榕, 何玉凤, 马琼, 等. 蛋白质高分子药物载体研究进展. *化学通报*, 2014; 77(6):484—488
- 7 Li R, He Y F, Ma Q, et al. Advances in protein-based polymer drug carriers. *Chemistry*, 2014; 77(6):484—488
- 8 张鹏, 江明锋, 王永. 动物源溶菌酶研究进展. *中国生物工程杂志*, 2012; 32(8):87—93
- 9 Zhang P, Jiang M F, Wang Y. Advance in studies of animal-borne lysozyme. *China Biotechnology*, 2012; 32(8):87—93
- 10 崔力剑, 渠玲玲, 杨文月, 等. 卢丁与溶菌酶相互作用的光谱研究. *现代食品科技*, 2014; 30(6):30—35
- 11 Cui L J, Qu L L, Yang W Y, et al. Spectroscopic studies on the interaction of rutin and lysozyme. *Modern Food Science and Technology*, 2014; 30(6):30—35
- 12 林爱华, 冯艾荣, 汤凯, 等. pH对阿霉素与人血清白蛋白相互作用的影响. *武汉大学学报(理工版)*, 2005; 51(6):749—752
- 13 Lin A H, Feng A R, Tang K, et al. Effect of pH on the interaction of adriamycin and human serum albumin. *Wuhan University Journal (Natural Science Edition)*, 2005; 51(6):749—752
- 14 陈丽芳. 阿霉素与人血清白蛋白相互作用分析. *海峡药学*, 2014; 26(2):117—118
- 15 Chen L F. Analysis of the interaction between adriamycin and human serum albumin. *Strait Pharmaceutical Journal*, 2014; 26(2):117—118
- 16 黄波, 邹国林, 杨天鸣. 阿霉素与牛血清白蛋白结合作用的研究. *化学学报*, 2002; 60(10):1867—1871
- 17 Huang B, Zou G L, Yang T M. Studies on the interaction between adriamycin and bovine serum albumin. *Acta Chimica Sinica*, 2002; 60(10):1867—1871
- 18 易平贵, 商志才. 丝裂霉素C、阿霉素与过氧化氢酶的相互作用. *化学通报*, 2003; (7):496—499
- 19 Yi P G, Shang Z C. Study on interaction of anticancer-drug MMC and ADM with catalase by fluorescence spectroscopy. *Chemistry*, 2003; (7):496—499
- 20 倪志华, 张玉明, 赵晓辉, 等. XeCl准分子激光辐照能量变化对溶菌酶结构与活力的影响. *科学技术与工程*, 2014; 14(26):26—31
- 21 Ni Z H, Zhang Y M, Zhao X H, et al. Effect of different energy XeCl laser radiation on lysozyme structure. *Science Technology and Engineering*, 2014; 14(26):26—31
- 22 刘冰, 江致勤, 祁景玉, 等. 荧光探针10-甲基吖啶鎓碘盐与核酸的相互作用. *科学技术与工程*, 2003; 3(3):297—298
- 23 Liu B, Jiang Z Q, Qi J Y, et al. Binding interaction of fluorescent probe 10-methylacridinium iodide to nucleic acids. *Science Technology and Engineering*, 2003; 3(3):297—298
- 24 李玉琴, 贾宝秀, 冀海伟, 等. 左旋紫草素与溶菌酶相互作用的研究. *分析测试学报*, 2009; 28(5):544—549
- 25 Li Y Q, Jia B X, Ji H W, et al. Interaction between shikonin and lysozyme. *Journal of Instrumental Analysis*, 2009; 28(5):544—549
- 26 Hu X X, Deng Z W, Wang Y, et al. Study on the interaction between bovine serum albumin and terbium complex containing polymer. *Soft Materials*, 2014; 12(3):277—283
- 27 Bi S Y, Pang B, Wang T J, et al. Investigation on the interactions of clenbuterol to bovine serum albumin and lysozyme by molecular fluorescence technique. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014; 120:456—461
- 28 杜芳静, 冯荣荣, 胡晓琴, 等. 盐酸阿霉素与人端粒DNA相互作用的电化学研究. *分析测试学报*, 2015; 34(8):966—969
- 29 Du F J, Feng R R, Hu X Q, et al. Investigation on interaction of doxorubicin hydrochloride with human telomere DNA by electrochemical methods. *Journal of Instrumental Analysis*, 2015; 34(8):966—969
- 30 范志飞, 曾维才, 戴吉领, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯与猪胰脂肪酶的相互作用. *食品科学*, 2013; 34(7):20—23
- 31 Fan Z F, Zeng W C, Dai J L, et al. Interaction of epigallocatechin-3-gallate with porcine pancreas pipase. *Food Science*, 2013; 34(7):20—23
- 32 周瑞, 董学艳, 景浩. 不同溶液中牛血清白蛋白与花青素相互作用特性及抗氧化性. *食品科学*, 2013; 34(15):11—16
- 33 Zhou R, Dong X Y, Jing H. Characterization of bovine serum albumin/anthocyanin interaction and antioxidant activity in different solutions. *Food Science*, 2013; 34(15):11—16
- 34 Ross P D, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry*, 1981; 20:3096—3102
- 35 姜新佩, 姚杰, 张欢. 三维荧光区域积分法评估不同植物对溶解性有机物去除效果. *科学技术与工程*, 2015; 15(7):276—279
- 36 Jiang X P, Yao J, Zhang H, et al. Evaluation of dissolved organic matter removal efficiency by different plants based on fluorescence regional integration. *Science Technology and Engineering*, 2015; 15(7):276—279
- 37 陈晨, 张洪峰, 王乐, 等. 光谱法研究顺铂与溶菌酶的相互作用. *中国药房*, 2012; 23(30):2847—2849
- 38 Chen C, Zhang H F, Wang L, et al. Spectroscopic study on the interaction of cisplatin with lysozyme. *China Pharmacy*, 2012; 23(30):2847—2849
- 39 Han R, Liu B, Li G, et al. Investigation on the interaction of cefpirome sulfate with lysozyme by fluorescence quenching spectroscopy and synchronous fluorescence spectroscopy. *Luminescence*, 2015. doi:10.1002/6i.2998

(下转第 44 页)

- from gasification fly ash. Journal of Hazardous Materials, 2007;139 (3):413—423
- 15 王克勤,李生虎,朱国海,等. 盐酸浸出氧化铝赤泥回收镓. 有色金属(冶炼部分),2012;(8):34—36
- Wang K Q, Li S H, Zhu G H, et al. Gallium recovery from alumina red mud with hydrochloric acid leaching. Nonferrous Metals (Extractive Metallurgy),2012;(8):34—36

Research on the New Process for Collecting and Extracting Gallium from Alumina Red Mud with Sulfuric Acid Leaching

KE Sheng-nan, WANG Hai-fang*, LONG Zhe-qing, TIAN Ying-xiao, CHENG Qiong

(Institute of Chemical Industry and Environment, North University of China, Taiyuan 030003, P. R. China)

[Abstract] The sulfuric acid leaching process of gallium from Bayer red mud was studied. In this process the precipitating could be formed by reaction of the solution of sulfuric acid leaching with NaOH, and then the precipitation was dissolved in hydrochloric acid. The effects of leaching temperature, time, ratio of liquid to solid (*L/S*) and concentration of sulfuric acid on the leaching rate of gallium were investigated with orthogonal test, and the best conditions. The results show that gallium is the basis of high leaching rates with high recovery.

[Key words] red mud gallium sulfuric acid leaching recover

(上接第 36 页)

Studies on the Interaction of Lysozyme with Doxorubicin Hydrochloride by Fluorescence Spectroscopy

NI Zhi-hua^{1,2}, ZHANG Yu-ming^{1*}

(College of Life Sciences, Hebei University¹, Research Center of Bioengineering, Hebei Province², Baoding 071002, P. R. China)

[Abstract] Doxorubicin hydrochloride (DOX) is a kind of medicine with widely application of anti-cancer. Lysozyme (LYS), a protein existing in organism, has effect of anti-bacteria, anti-virus, and antineoplastic. Thus, studies on the Interaction of LYS with DOX is necessary. The interactions between DOX and LYS at different temperature were studied by fluorescence spectroscopy. The quenching mechanism between DOX and LYS was demonstrated, and the binding parameters were determined. The results showed that the intrinsic fluorescence of LYS could be quenched by DOX. The quenching mechanism between is due to static manner by forming DOX-LYS complex. The binding parameters were determined according to Stern-Volmer equation, and the thermodynamic parameters were calculated. The results showed, there is one binding site between DOX and LYS. The binding constants (K_A) between DOX and LYS at different temperature were 4.79×10^6 (298 K), 2.82×10^6 (308 K), and 2.14×10^6 (318 K), respectively. Thermodynamic analysis indicated that the interaction process was spontaneous, and electrostatic force might be primarily responsible for the interaction. In addition, the effect of DOX on the conformation of LYS was analyzed by three-dimensional fluorescence spectra. The result indicates that the polarity micro-environment around Trp residues decreased.

[Key words] doxorubicin hydrochloride lysozyme interaction fluorescence spectroscopy