

硫硒化镉纳米颗粒对胰高血糖素聚集的影响

李春草¹, 徐 鹏¹, 王兰杰¹, 魏余辉¹, 孔丽霞¹, 李 宾², 周星飞^{1*}

(1. 宁波大学 理学院, 浙江 宁波 315211; 2. 中国科学院 上海应用物理研究, 上海 201800)

摘要: 利用原子力显微镜、傅里叶变换红外光谱仪和荧光光度计等研究了硫硒化镉纳米颗粒对胰高血糖素聚集的影响, 包括聚集形成纤维数量的多少、纤维的生长速度等。结果表明: 硫硒化镉纳米颗粒能够抑制胰高血糖素多肽的聚集, 并且随着颗粒浓度的增加, 其抑制胰高血糖素纤维化的程度也明显加剧。另外, 还对纳米颗粒抑制胰高血糖素聚集的机理进行了初步讨论。

关键词: 硫硒化镉纳米颗粒; 胰高血糖素; 原子力显微镜; 纤维化

中图分类号: O629.8

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2016) 01-0069-04

生物体内某些淀粉样蛋白在一定条件下会纤维化, 形成如寡聚体、细丝纤维和成熟纤维等各种结构^[1], 而各种不同结构形态的纤维会产生不同的细胞毒性。研究表明淀粉样蛋白的聚集与老年痴呆症、帕金森症和 II 型糖尿病等神经退行性疾病密切相关^[2-3], 因此, 对淀粉样蛋白聚集的研究引起了生物医学、化学及物理学家极大的兴趣^[4-5]。淀粉样多肽的聚集往往会受到外界因素的影响, 如湿度、pH 值和离子浓度等^[6-7]。许多研究表明生物表面(脂质双分子层和脂质小泡)对蛋白质的聚集也有很大影响^[8-9], Morriss 等^[10]曾指出膜表面比固体表面更容易促进多肽的流动, 并影响多肽最终聚集的结构。另外, 金属离子如 Cu^{2+} 和 Fe^{3+} 也能够调控和改变胰高血糖素多肽的聚集路径, 在一定程度上改变聚集体的形态和二级结构^[11]。

目前纳米颗粒材料在很多领域有广泛的应用, 但 Alvarez 等^[12]发现经常用来作为药物载体材料的胶体金颗粒能够加速多肽的成核过程, 进而促进蛋白纤维的聚集。Wu 等^[13]发现 TiO_2 纳米颗粒能够促进 $\text{A}\beta$ 淀粉样蛋白的聚集。然而 Cabaleiro 等^[14]发现共聚物纳米颗粒(NiPAM:BAM)却能够束缚 $\text{A}\beta$ 单体或寡聚体, 进而抑制 $\text{A}\beta$ 纤维化。由此可见, 不同纳米颗粒对多肽聚集的影响可能差别很大。

硫硒化镉(CdSeS)纳米颗粒经常用于生物荧光

标记, 而胰高血糖素是由 29 个氨基酸残基构成的双亲性激素, 能够与胰岛素一起调节血糖水平。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

胰高血糖素干粉(质量分数>98%)和 Thioflavin T 荧光分子购于上海 Sigma 公司; 硫硒化镉纳米颗粒(CdSeS)购于天津游瑞量子点技术发展有限公司; 实验采用 Milli-Q 水, 室温电阻率为 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 。

原子力显微镜(Nanoscope IIIa), 样品在大气环境下使用轻敲模式观察, 使用探针型号是 NSC11 (三角形悬臂, MikroMash 公司), 探针的力常数大小约为 $40 \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$, 共振频率为 330 kHz , 扫描速率为 $1 \sim 1.5 \text{ Hz}$; Nicolet 6700 傅里叶变换红外光谱仪; Cary Eclipse 荧光光度计。

1.2 样品制备

用去离子水把硫硒化镉冰冻的干粉直接稀释成 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硫硒化镉溶液, 冷冻保存待用; 用去离子水将胰高血糖素冰冻的干粉直接稀释成 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的胰高血糖素溶液, 冷冻保存待用。

实验时, 在储存液中加入不同量的硫硒化镉纳米颗粒, 得到胰高血糖素的最终质量浓度为 $0.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (pH 7.0), 硫硒化镉最终质量浓度分别为 0.0 (不加纳米颗粒作为对照样品), 1.5 , 6.0 , 60.0

收稿日期: 2014-12-17.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家自然科学基金(11474173); 浙江省自然科学基金(Y14A040006); 宁波大学王宽诚教育基金。

第一作者: 李春草(1987-), 女, 安徽亳州人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 颗粒对多肽聚集的影响。E-mail: m15257495315@163.com

*通信作者: 周星飞(1963-), 男, 浙江余姚人, 副研究员, 主要研究方向: 蛋白分子的自组装。E-mail: zhouxingfei@nbu.edu.cn

$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 4 种样品, 将这些样品放置在温度为 37°C 的恒温箱内一定时间.

1.3 样品表征

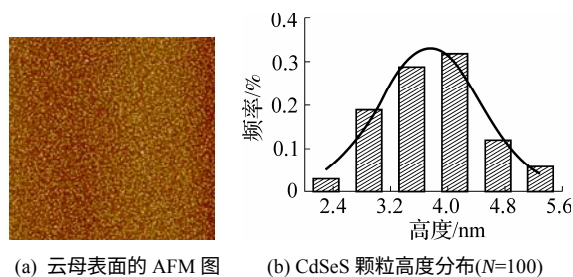
取 $4\sim 5\ \mu\text{L}$ 胰高血糖素和纳米颗粒的混合溶液(培养 40 h), 滴加在云母上, 晾干后即可用原子力显微镜进行检测.

在金刚石上滴 $2\ \mu\text{L}$ 胰高血糖素和纳米颗粒的混合溶液(培养 40 h), 在红外灯下烘干后用 Nicolet Continuum 红外显微系统测量其透射光谱.

将体积为 $10\ \mu\text{L}$ 的 ThT 荧光探针分子(浓度为 $10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)和 $25\ \mu\text{L}$ 不同纳米颗粒培养后的胰高血糖素溶液混合均匀后, 在荧光分析仪上进行荧光分析, 激发和发射波长分别为 440 和 484 nm.

2 结果与讨论

实验采用的硫硒化镉颗粒是商品化样品, 为检验其热稳定性, 将 $0.3\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硫硒化镉颗粒放在 37°C 温度下培养 40 h, 然后取其中 $4\sim 5\ \mu\text{L}$ 样品滴加在新鲜解离的云母上, 待其晾干后作 AFM 测试(扫描范围为 $6\ \mu\text{m}\times 6\ \mu\text{m}$). 发现纳米颗粒形状近乎球形, 平均高度为 $(3.7\pm 0.7)\ \text{nm}$ (图 1). 说明硫硒化镉纳米颗粒在 37°C 的环境下结构并没有被破坏.



(a) 云母表面的 AFM 图 (b) CdSeS 颗粒高度分布($N=100$)

图 1 CdSeS 纳米颗粒检测情况

图 2 为不同质量浓度的硫硒化镉纳米颗粒和胰高血糖素混合溶液在 37°C 环境下经过 40 h 后形成纤维的 AFM 形貌图(扫描范围均为 $10\ \mu\text{m}\times 10\ \mu\text{m}$). 可见引入硫硒化镉纳米颗粒后, 胰高血糖素聚集过程有明显变化. 尽管纤维长度没有明显差异, 但随颗粒浓度的增加, 纤维在云母表面的覆盖度越来越小. 加入不同($0.0, 1.5, 6.0$ 和 $60\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)的硫硒化镉纳米颗粒后, 单位面积的纤维根数逐渐递减分别是 17.4, 11.1, 3.4 和 0.5 根(图 3), 说明硫硒化镉颗粒对胰高血糖素纤维的聚集有明显抑制作用, 而且随着颗粒浓度的逐渐增大, 其抑制作用也

随之增强.

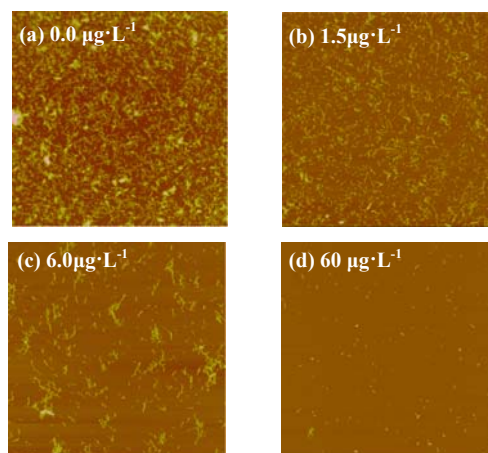


图 2 胰高血糖素与硫硒化镉颗粒混合溶液的 AFM 图像

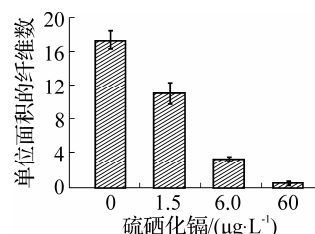


图 3 单位面积上纤维的根数

为进一步探讨硫硒化镉纳米颗粒对胰高血糖素纤维聚集的影响, 又测量了上述 4 种不同纳米颗粒质量浓度的胰高血糖素溶液(相同环境)的傅里叶变换红外光谱(FTIR). 在 FTIR 的蛋白质红外吸收光谱图的酰胺 I 谱带中, α -螺旋结构位于 $1658\sim 1650\ \text{cm}^{-1}$ 区域, β -折叠结构位于 $1640\sim 1610\ \text{cm}^{-1}$ 区域, 无卷曲结构位于 $1650\sim 1640\ \text{cm}^{-1}$ 区域^[15].

从图 4 可见, 加入硫硒化镉纳米颗粒 $0.0, 1.5$ 和 $6.0\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的样品经过 40 h 培养后, 3 条曲线在 $1659.7\ \text{cm}^{-1}$ 附近都有明显吸收峰, 说明溶液中有部分蛋白的结构依然是 α 螺旋. 同时 3 组样品在 $1628.4\ \text{cm}^{-1}$ 附近出现明显的吸收峰, 说明部分可溶的蛋白单体聚集成具有 β 折叠结构的纤维. 值得指出的是这 3 组样品在 $1628.4\ \text{cm}^{-1}$ 的峰强随着颗粒浓度的增加而不断减弱, 说明呈 β 折叠结构的蛋白在溶液中的比例越来越低; 纤维聚集越来越少也说明抑制蛋白纤维化的程度越来越剧烈. 当颗粒进一步增加到 $60.0\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 在 $1628.4\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1659.7\ \text{cm}^{-1}$ 附近都没有观察到明显的吸收峰, 这可能是由于纳米颗粒破坏了多肽中的二级结构(如 α 螺旋和 β 折叠结构), 导致胰高血糖素不能发生聚

集. 这个现象和文中 AFM 观察的结果是一致的.

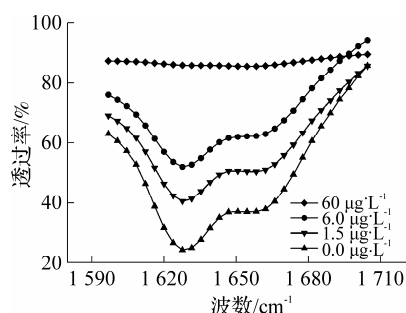


图4 不同质量浓度的硫硒化镉傅里叶变换红外光谱

进一步用 ThT 荧光研究了引入硫硒化镉纳米颗粒后胰高血糖素聚集的动力学过程. ThT 荧光常用于淀粉样多肽结构的检测, ThT 荧光分子能与 β 片层结构结合, 在特定波长发出荧光. 在荧光测试中, 将 4 种不同质量浓度的纳米颗粒(0.0, 1.5, 6.0, 60.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)和胰高血糖素混合溶液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养若干小时, 并将 ThT 荧光探针加入经过不同时间培养的样品, 摇匀后在荧光光度计上测量其荧光强度. 如图 5 所示, 当加入的纳米颗粒质量浓度为 0.0, 1.5, 6.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 初始阶段(小于 50 h), 荧光强度均随着样品培养时间的延长而增大; 但在相同时间下, 加入的颗粒浓度越大, 胰高血糖素聚集的速率越小(曲线的斜率小), 说明硫硒化镉颗粒对胰高血糖素的抑制速率越明显. 随着培养时间的进一步延长(>70 h), 每条线均趋于一个稳定的数值, 说明纤维的聚集达到一个稳定的状态. 值得一提的是, 加入纳米颗粒的浓度为 60.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 经过不同时间培养的样品荧光强度接近于零, 说明纤维的聚集过程几乎被完全抑制, 此结果与之前的 FTIR 和 AFM 结果是一致的.

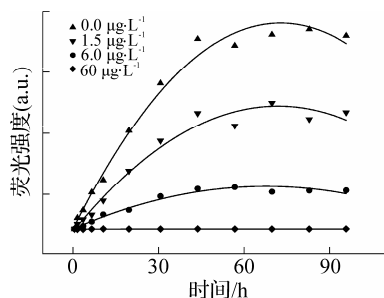


图5 不同硫硒化镉颗粒的胰高血糖素溶液 ThT 荧光强度

目前, 关于纳米颗粒和多肽相互作用机理还不是十分清楚, 纳米颗粒促进和抑制多肽聚集的现象均有报道. Wu 等^[13]发现 TiO_2 纳米颗粒能够促

进多肽的聚集, Linse 等^[16]指出纳米颗粒能够促进 β 微球蛋白纤维化是因为纳米颗粒具有相对较大的表面积, 能显著提高其吸附和束缚蛋白分子的能力, 使得颗粒表面局部蛋白分子的浓度大幅度提高, 由于成核过程与浓度有很大关系, 所以纳米颗粒通过缩短成核的进程来促进蛋白的聚集. 同时, 纳米颗粒表面的蛋白分子构象也会发生改变, 比如聚乙二醇纳米颗粒能够绑定和改变 β -淀粉样多肽的构象^[17], 这种改变使得蛋白更易于聚集. 另外, Colvin 等^[18]还认为纳米颗粒就像常规的催化剂来促进蛋白的纤维化, 它依靠增加原纤维聚集的数量来减少纤维形成的能量障碍.

纳米颗粒也能抑制多肽的聚集, Cabaleiro 等^[14]和 Bellova 等^[19]认为纳米颗粒对蛋白分子或寡聚体的吸收导致溶液中蛋白分子和寡聚体浓度的减少, 并且纳米颗粒通过束缚蛋白分子的活性部位导致被束缚的分子和寡聚体不可能纤维化, 从而抑制蛋白分子的聚集. 另外, Cabaleiro 等^[14]发现共聚物纳米颗粒(NiPAM:BAM)能够抑制 $\text{A}\beta$ 纤维化, 他们认为这与纳米颗粒表面的化学特性也有极大的关系. 譬如, PolyA-FF-ME 纳米颗粒能够抑制 $\text{A}\beta_{40}$ 纤维化是因为纳米颗粒对 FF 残基和 $\text{A}\beta_{40}$ 原纤维相应残基间的相互作用破坏了 $\text{A}\beta_{40}$ 聚集成纤维^[20]. 本文, 硫硒化镉纳米颗粒能够明显抑制胰高血糖素的聚集过程, 这可能是由于硫硒化镉颗粒对胰高血糖素分子或寡聚体的吸附作用导致溶液中分子和寡聚体浓度的减少, 而且硫硒化镉颗粒能够束缚分子的活性部位, 破坏了胰高血糖素分子本身的结构, 导致被束缚的分子和寡聚体不可能纤维化, 进而抑制了胰高血糖素的聚集.

3 结论

利用原子力显微镜、红外分析、荧光分析等手段研究了硫硒化镉颗粒对胰高血糖素纤维聚集的影响, 结果表明硫硒化镉颗粒对胰高血糖素的聚集具有很强抑制作用, 并且硫硒化镉颗粒浓度越大, 抑制作用也越强. 可能是由于硫硒化镉颗粒对胰高血糖素分子或寡聚体的吸收, 导致溶液中分子和寡聚体浓度的减少, 而且硫硒化镉颗粒能够束缚分子的活性部位, 导致被束缚的分子和寡聚体不可能纤维化, 进而抑制了胰高血糖素的聚集.

参考文献:

- [1] KUMAR S, UDGAONKAR J B. Mechanisms of amyloid fibril formation proteins[J]. *Curr Sci*, 2010, 98(5):639-656.
- [2] CHITI F, DOBSON C M. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease[J]. *Annu Rev Biochem*, 2006, 75:333-366.
- [3] DETOMA A S, SALAMEKH S, RAMAMOORTHY A, et al. Misfolded proteins in alzheimer's disease and type II diabetes[J]. *Chem Soc Rev*, 2012, 41(5):608-621.
- [4] 翟彩宁, 贺静, 毛新焕, 等. 金属离子对牛胰岛素淀粉样纤维形成的作用[J]. *四川大学学报*, 2008, 45(6):1499-1503.
- [5] 王志刚, 万立俊, 周纯青, 等. β -淀粉样蛋白在石墨表面吸附及凝聚结构的 STM 和 AFM 研究[J]. *科学通报*, 2002, 47(12):908-911.
- [6] 刘建华, 刘京松, 谭菊花, 等. 高湿度环境下衬底表面对牛胰岛素聚集的影响[J]. *科学通报*, 2011, 56(12):941-946.
- [7] SAHIN E, GRILLO A O, PERKINS M D, et al. Comparative effects of pH and ionic strength on protein-protein interactions, unfolding, and aggregation for IgG1 antibodies[J]. *J Pharm Sci*, 2010, 99(12):4830-4848.
- [8] GORBENKO G P, KINNUNEN P K J. The role of lipid-protein interactions in amyloid-type protein fibril formation[J]. *Chem Phys Lipids*, 2006, 141(1/2):72-82.
- [9] ZHANG L, ZHONG J, HUANG L X, et al. Parallel-oriented fibrogenesis of a β -sheet forming peptide on supported lipid bilayers[J]. *J Phys Chem B*, 2008, 112(30):8950-8954.
- [10] MORRISS A A, BROWN F L H, SHEA J E. A coarse-grained model for peptide aggregation on a membrane surface[J]. *J Phys Chem B*, 2014, 118(28):8420-8432.
- [11] ZHOU X F, TAN J H, ZHENG L F, et al. The opposite effects of Cu(II) and Fe(III) on the assembly of glucagon amyloid fibrils[J]. *RSC Adv*, 2012, 2(12):5418-5423.
- [12] ALVAREZ Y D, FAUERBACH J A, PELLEGGROTTI J V, et al. Influence of gold nanoparticles on the kinetics of α -synuclein[J]. *Nano Lett*, 2013, 13(12):6156-6163.
- [13] WU W H, SUN X, YU Y P, et al. TiO_2 nanoparticles promote β -amyloid fibrillation in vitro[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 373:315-318.
- [14] CABALEIRO L C, QUINLAN P F, LYNCH I, et al. Inhibition of amyloid β protein fibrillation by polymeric nanoparticles[J]. *J Am Chem Soc*, 2008, 130(46):15437-15443.
- [15] HIRAMATSU H, KITAGAWA T. FT-IR approaches on amyloid fibril structure[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 1753(1):100-107.
- [16] LINSE S, CABALEIRO L C, XUE W F, et al. Nucleation of protein fibrillation by nanoparticles[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(21):8691-8696.
- [17] BRAMBILLA D, VERPILLOT R, LEDROUMAGUET B, et al. PEGylated nanoparticles bind to and alter amyloid-beta peptide conformation: Toward engineering of functional nanomedicines for alzheimer's disease[J]. *ACS Nano*, 2012, 6(7):5897-5908.
- [18] COLVIN V L, KULINOWSKI K M. Nanoparticles as catalysts for protein fibrillation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(21):8679-8680.
- [19] BELLOVA A, BYSTRENOVA E, KONERACKA M, et al. Effect of Fe_3O_4 magnetic nanoparticles on lysozyme amyloid aggregation[J]. *Nanotechnology*, 2010, 21(6):65103-65109.
- [20] SKAAT H, CHEN R, GRINBERG I, et al. Engineered polymer nanoparticles containing hydrophobic dipeptide for inhibition of amyloid- β fibrillation[J]. *Biomacromolecules*, 2012, 13(9):2662-2670.

Effect of Cadmium Selenide Sulfide Nanoparticles on Glucagon Aggregation

LI Chun-cao¹, XU Peng¹, WANG Lan-jie¹, WEI Yu-hui¹, KONG Li-xia¹, LI Bin², ZHOU Xing-fei^{1*}

(1.Faculty of Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2.Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China)

Abstract: In this paper, we have investigated the effect of Cadmium Selenide Sulfide nanoparticles (CdSeS NPs) on the fibrillation of glucagon peptides using AFM, FTIR and Fluorophotometer. We have found that CdSeS NPs can inhibit glucagon peptide aggregation progress which is strongly dependent on the concentration of CdSeS NPs. In addition, the mechanism of interaction between glucagon and NPs is also discussed.

Key words: CdSeS NPs; Glucagon; AFM; Fibrillation

(责任编辑 章践立)