

# 分子模拟技术与光谱法结合研究硫酸沙丁胺醇 与两种蛋白质的相互作用

唐志华\*

(陕西理工学院, 陕西 汉中 723000)

**[摘要]** 目的:研究了硫酸沙丁胺醇(salbutamol sulfate, SAS)与人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)及人免疫球蛋白 G(human Immunoglobulin G, HIgG)之间的相互作用。方法:在模拟生理条件下,采用分子模拟技术、紫外-可见吸收光谱法及圆二色谱法获得了 HSA 和 HIgG 结构改变的定性和定量依据。结果:根据分子对接技术所得数据可知:SAS 与 HSA 之间的作用力主要是氢键、范德华力和静电作用;SAS 与 HIgG 之间的作用力主要有氢键、 $\pi$ -正电荷相互作用和范德华力。紫外-可见吸收光谱实验结果表明当 SAS 加入到 HSA 和 HIgG 溶液中时,HSA 和 HIgG 的二级结构会发生变化,并且 SAS 与 HSA 和 HIgG 之间的淬灭机制为静态淬灭;由圆二色谱所得到的定量数据可知 SAS 的加入使得 HSA 的  $\alpha$  螺旋结构由 47.92% 减小到 46.53%。与此同时,SAS 的加入使得 HIgG 的二级结构产生变化。结论:分子模拟技术、紫外-可见吸收光谱法及圆二色谱法结合适合于研究 SAS 与 HSA 和 HIgG 之间的相互作用,具有简单快速,灵敏度高等优点。

**[关键词]** 硫酸沙丁胺醇; 人血清白蛋白; 人免疫球蛋白 G; 分子对接技术; 光谱法

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)24-0114-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014240114

## Studies of Interaction Between Salbutamol Sulfate and Two Proteins by Molecular Modeling and Spectroscopic Methods

TANG Zhi-hua\*

(School of Chemistry and Environment Science, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the interaction of salbutamol sulfate (SAS) with human serum albumin (HSA) and human immunoglobulin G (HIgG). **Method:** Qualitative and quantitative structure changes of HSA and HIgG were performed by molecular modeling, UV-visible absorbance and circular dichroism spectroscopy methods. **Result:** The experiment results obtained from molecular modeling indicated that there were hydrogen bonds, Van der Waals force and electrostatic interactions between SAS and HSA; meanwhile, hydrogen bonds,  $\pi$ -cation interaction and Van der Waals force played the major role in the interaction of SAS and HIgG. Experimental results observed from UV-visible absorbance spectroscopy showed that the secondary structures of HSA and HIgG were altered in the presence of salbutamol sulfate, and their quenching mechanisms were both suggested as static quenching. Moreover, the  $\alpha$ -helices of HSA in the presence of SAS were decreased from 47.92% to 46.53%, and the secondary structure of HIgG was also changed because of the addition of salbutamol sulfate, which were obtained from the circular dichroism spectroscopy. **Conclusion:** Molecular modeling, UV-visible absorbance and circular dichroism spectroscopy are good methods for investigating the interaction between SAS, HSA and HIgG. They have the advantages of high speed and high sensitivity.

**[Key words]** salbutamol sulfate; human serum albumin; human immunoglobulin G; molecular modeling; spectroscopy

**[收稿日期]** 20140409(001)

**[通讯作者]** \*唐志华,副教授,从事生物无机化学研究, Tel:0916-2641660, E-mail:tangzhihua@sntu.edu.cn

硫酸沙丁胺醇(salbutamol sulfate, SAS)是一种选择性受体 $\beta_2$ 激动剂,主要用于防治支气管哮喘、支气管炎及肺气肿患者的支气管痉挛等<sup>[1]</sup>。由于SAS可增加动物体内的瘦肉,和提高自身肌肉的力量<sup>[2]</sup>,近年来出现了SAS滥用的情况。德国、意大利、法国及西班牙等欧共体国家已将此类药物列为禁用品。

人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)能与许多内源及外源性化合物结合,起到存储和转运作用<sup>[3]</sup>。人免疫球蛋白G(human immunoglobulin G, HIgG)主要存在于血液、脑脊液和腹腔液中<sup>[4]</sup>,可以和很多物质结合。因此,对HSA及HIgG与药物分子相互作用的研究,不仅有助于了解药物在体内的运输及作用机制,对全面阐明药物与蛋白质的结合规律和机制也具有重要的意义<sup>[4]</sup>。

关于SAS的合成和检测的研究有很多,如王翠欣等制备了SAS口腔崩解片并对它的质量进行了评价<sup>[3]</sup>;刘茜等运用液相-质谱联用法测定了人血浆中SAS的浓度并对其药动学进行了研究<sup>[5]</sup>。然而,关于SAS与蛋白质之间的相互作用,例如它对蛋白质内部结构的影响,并没有被报道过。研究药物与蛋白相互作用的方法有很多种,如分子对接技术、荧光光谱、紫外-可见吸收光谱等等。2012年,Gao等利用毛细管电泳及荧光光谱法研究了磺胺二甲嘧啶(SMZ)与HSA之间的键合作用,并评估了SMZ对人体的潜在毒性<sup>[6-7]</sup>;2013年,全艳等利用分子对接技术研究了柴胡-黄芩药对主要成分与环氧合酶-2之间的相互作用<sup>[8]</sup>。本工作在模拟人体生理pH的条件下,利用分子模拟技术、紫外-可见吸收光谱法和圆二色谱法研究了SAS与HSA和HIgG之间的相互作用,从而评估它对人体生理功能的影响。

## 1 材料

**1.1 试药和仪器** HSA, HIgG和SAS(Sigma-Aldrich,美国生物技术制品公司),三羟甲基氨基甲烷[tris(hydroxymethyl)amino-methane, Tris,上海化学试剂公司],其他试剂均为分析纯。

Tu-1901型紫外-可见吸收光谱仪(北京浦西分析仪器有限公司),Olis DSM 1000圆二色谱仪(美国OLIS公司),XL-39-YYQ型移液枪(北京卓川电子科技有限公司)。

**1.2 溶液的制备** Tris-HCl缓冲溶液(pH 7.40)用0.20 mol·L<sup>-1</sup>的Tris和0.10 mol·L<sup>-1</sup>HCl配制,当温度高于室温时,用0.50 mol·L<sup>-1</sup>NaOH调节pH至7.40;HSA和HIgG溶液均用Tris-HCl缓冲溶液配

制,其储备液的浓度为 $3.0 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup>并在4℃下保存于暗处;SAS储备液的浓度为 $3.0 \times 10^{-3}$  mol·L<sup>-1</sup>;0.1 mol·L<sup>-1</sup>NaCl溶液被用来将溶液离子强度保持在0.1。试验中使用的均为二次蒸馏水。

## 2 方法

**分子模拟试验:**HSA和HIgG的晶体结构with R-warfarin是从Brookhaven蛋白质数据库得到的,它们的编码分别为1h9z和1AJ7。用kollman-all-atom电荷计算出HSA或HIgG的三维结构的势能,所有分子的初始结构都由分子模型软件包Sybyl6.9来生成。用tripos力场和Gasteiger-marsili电荷优化分子的几何结构。FlexX程序用来构建SAS与HSA和HIgG之间的模型结构。所有的计算都在SGI FUEL工作站上进行。

**紫外-可见吸收光谱试验:**在SAS的浓度为 $2.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup>时,记录190~400 nm波长的SAS与HSA和HIgG混合溶液的紫外-可见吸收光谱图;采用的参比溶液为一系列含有不同浓度SAS的Tris-HCl缓冲溶液(每次SAS的浓度与相应的HSA或HIgG溶液中SAS的浓度相同),从而消除由于SAS的加入所造成的影响。

**圆二色谱试验:**圆二色谱(CD)在室温下测量得到的,记录了波长范围为190~270 nm的数据。变化的椭圆率是通过SAS减去SAS和HSA或HIgG混合液的椭圆率而获得的,它用毫度来表示。结果表示为椭圆率残基(MRE),被定义为 $MRE = \theta_{obs} \frac{(mdeg)}{10nlC_p}$ 。其中, $\theta_{obs}$ 用毫度来代表CD, $n$ 是氨基酸残基的数量, $l$ 是池子的长度, $C_p$ 是摩尔片段。在280 nm,HSA的 $\alpha$ 螺旋的含量用MRE的值来计算

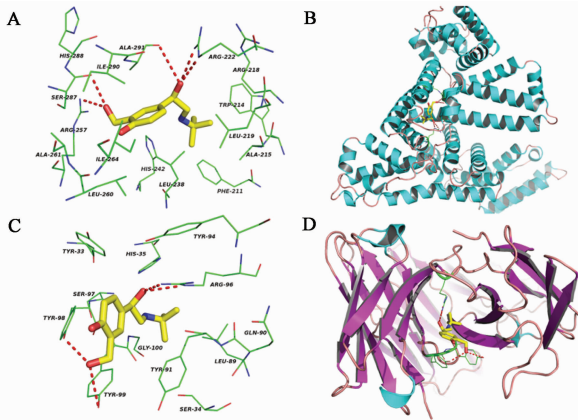
$$\alpha \text{ 螺旋} = [(-MRE_{208} - 4000)/(33000 - 4000)] \times 100\%$$

## 3 结果与讨论

**3.1 SAS与HSA和HIgG的分子模拟试验** 用计算机的方法来进行的分子模拟实验帮助笔者了解了SAS与HSA和HIgG的相互作用。He和Carter证明了在subdomain IIA有很大的疏水区域,很多小分子可以与HSA键合<sup>[9]</sup>。晶体结构的X射线分析表明HIgG结构中含有2个大小为1.5 nm×0.6 nm×0.6 nm的狭缝,抗原可以进入这个狭缝,然后通过氢键、范德华力、静电和疏水作用与氨基酸残基相互作用<sup>[10]</sup>。

SAS与HSA和HIgG体系的键合参数的能量结果如图1所示。从图1A和1B中可以看到,SAS分

子上与苯甲基相连的羟基与 HSA 分子中的 Ser287 和 Arg257 可形成 2 个氢键;另外 1 个烷基链上的羟基与 HSA 分子中的 Arg222 和 Ala291 可形成 3 个氢键;叔丁基与 Trp214 和 Phe211 有范德华力相互作用;二级胺与 His242 有静电相互作用。由图 1C 和 1D 中可以看到,SAS 分子上与苯甲基相连的羟基与 HIgG 分子中的 Tyr98 和 Tyr99 可形成 2 个氢键;另外 1 个烷基链上的羟基与 HIgG 分子中的 Arg96 形成 2 个氢键;苯环与 Arg96 有  $\pi$ -正离子相互作用,叔丁基与 Leu89 有范德华力相互作用。计算得到的 SAS 与 HSA 和 HIgG 体系的吉布斯自由能分别是:  $-25.93, -26.35 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,这一结果表明 SAS 与 HSA 和 HIgG 之间可发生相互作用,并且它们之间的结合是很强的。分子模拟所得到的实验结果为下面的实验提供了一个理想的基础。

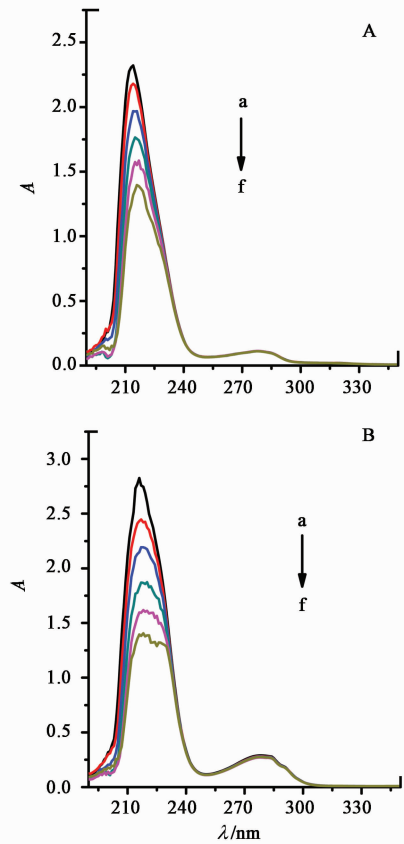


注:HSA 和 HIgG 的氨基酸残基用线表示;配体结构用球棍模型表示;配体和蛋白之间的氢键用虚线表示

图 1 (A,B) SAS 与 HSA 体系的最佳分子对接;  
(C,D) SAS 与 HIgG 体系的最佳分子对接

**3.2 紫外-可见吸收光谱** 紫外-可见吸收光谱不仅是判定药物影响蛋白质二级结构变化的定性依据,还是判定药物与蛋白质相互作用机制的重要依据之一<sup>[11]</sup>,因此,本实验测定了空白和加入 SAS 的 HSA 或 HIgG 的紫外-可见吸收光谱图(如图 2 所示)。从图 2A 中可以看到,在 214 nm 处 HSA 有很强的吸收峰,峰的强度随着 SAS 连续的加入而降低,共降低了 39.88%;HSA 的最大吸收峰的波长也随之产生红移,从 214 nm 变化到 216 nm。由图 2B 中可知,在 216 nm 处 HIgG 有很强的吸收谱图,峰的强度随着 SAS 的连续加入而降低,共降低了 62.88%;HIgG 的最大吸收峰的波长也随着 SAS 的连续加入而产生红移,从 216 nm 变化到 218 nm。以上现象说明了 SAS 与 HSA 和 HIgG 可以产生相互

作用,SAS 的连续加入会改变 HSA 和 HIgG 的二级结构。此外,动态淬灭仅仅影响荧光体的激发态,而不影响荧光体的吸收光谱。因此,SAS 和 HSA 或 HIgG 之间的相互作用均是静态淬灭。



A. SAS-HSA; B. SAS-HIgG;

HSA, HIgG 浓度均为  $3.0 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;

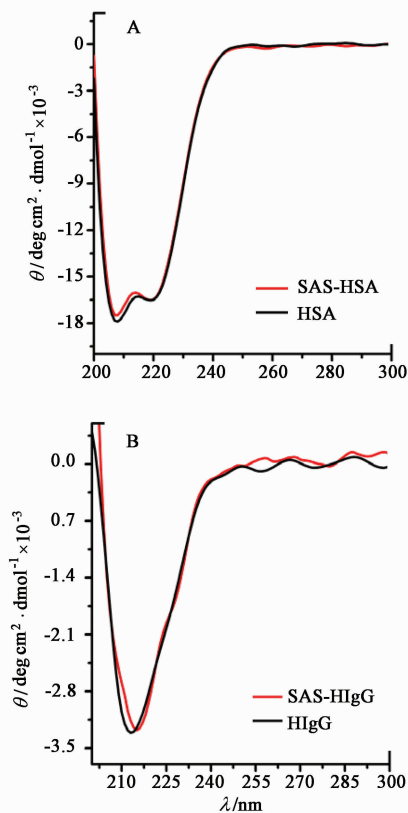
a-f 分别为  $0, 2 \times 10^{-6}, 4 \times 10^{-6}, 6 \times 10^{-6}, 8 \times 10^{-6}, 10 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;

$T = 298 \text{ K}; \text{pH } 7.40$

图 2 SAS 与 HSA 和 HIgG 的紫外-可见吸收光谱

**3.3 圆二色谱法** 为了进一步验证 SAS 与 HSA 或 HIgG 是否发生相互作用以及蛋白质的结构发生变化的程度,本试验测定了空白的 HSA 与 HIgG 及 SAS 与 HSA 或 HIgG 混合物的圆二色谱(结果如图 3 所示)。从图 3A 中可知,HSA 的二级结构主要以  $\alpha$  螺旋为主,SAS 与 HSA 的结合造成了谱带强度的减小但没有明显的峰转移;通过计算可知,当 SAS 与 HSA 之间的摩尔比为 4:1 时,HSA 的  $\alpha$  螺旋结构从 47.92% 减小到 46.53%,这一现象说明 SAS 的加入,会引起 HSA 的  $\alpha$  螺旋结构的含量减小,从而使 HSA 螺旋结构的稳定性减小。根据文献可知蛋白质在约 215 nm 的负峰是  $\beta$ -折叠,为蛋白质圆二色谱图的典型特征<sup>[12]</sup>。由图 3B 可知,SAS 与 HIgG 的结合使 HIgG 在 213 nm 的负峰红移到 215 nm,谱带强

度有稍微的减小,这表明 HIgG 的二级结构主要以  $\beta$ -折叠为主;SAS 可以与 HIgG 发生相互作用,这种作用对 HIgG 的构型发生一定微扰,使 HIgG 构型发生了一定变化。



A. SAS-HSA; B. SAS-HIgG;

HSA, HIgG 浓度均为  $3.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;

SAS 浓度为  $1.2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $T = 293 \text{ K}$ ;  $\text{pH} 7.40$

图3 空白蛋白质与其混合物的 CD 谱

#### 4 结论

在这个工作中,分子对接实验结果说明 SAS 与 HSA 和 HIgG 之间可发生相互作用,作用力主要有氢键、范德华力、静电作用、 $\pi$ -正电荷相互作用,并且通过计算得到的 SAS 与 HSA 和 HIgG 体系的吉布斯自由能;紫外-可见吸收光谱定性的研究了 SAS 与 HSA 和 HIgG 之间的相互作用,实验结果表明 SAS 的加入可以使 HSA 和 HIgG 的二级结构发生变化,它们之间的淬灭机制均为静态淬灭;通过对圆二色谱数据的定量分析更好的了解 SAS 与 HSA 和 HIgG 之间键合作用的定量数据,进一步验证了 SAS 与 HSA 和 HIgG 可以发生相互作用并且使这两种蛋白质的结构发生变化。

#### [参考文献]

- [1] 方卢秋,王周平,付志锋,等. 硫酸沙丁胺醇的流动注射化学发光法测定[J]. 分析测试学报,2003, 22 (3):25.
- [2] 陈昌国,李红,范玉静. 毛细管电泳-非接触电导检测法测定药剂中的硫酸沙丁胺醇[J]. 色谱,2011, 29 (2):137.
- [3] Kakhodayi-Kholghi N, Heenan R K, Gor J, et al. The solution structure of rabbit IgG accounts for its interactions with the Fc receptor and complement C1q and its conformational stability[J]. J Mol Biol, 2013, 425 (3):506.
- [4] 王翠欣,滑千里,刘福利,等. 硫酸沙丁胺醇口腔崩解片的制备及质量评价[J]. 中国当代医药,2010, 17 (8):113.
- [5] 刘茜,杜红文,赵辉,等. LC-MS-MS 法测定人血浆中硫酸沙丁胺醇浓度及其药动学研究[J]. 中国药房, 2009, 20 (26):2031.
- [6] Housaindokht M R, Rouhbakhsh Zaeri Z, Bahrololoom M, et al. Investigation of the behavior of HSA upon binding to amlodipine and propranolol:spectroscopic and molecular modeling approaches[J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2012, 85 (1):79.
- [7] Li Y Q, Jia B X, Wang H, et al. The interaction of 2-mercaptobenzimidazole with human serum albumin as determined by spectroscopy, atomic force microscopy and molecular modeling [J]. Colloids Surf. B Biointerfaces, 2012, 104:311.
- [8] 全艳,李晓飞,王宪龄,等. 柴胡-黄芩药对主要成分与环氧合酶-2 的对接研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013, 19 (11):148.
- [9] He X M, Carter D C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin[J]. Nature, 1992, 358:209.
- [10] Liu Y C, He W Y, Gao W H, et al. Binding of wogonin to human gammaglobulin [J]. Int J Biol Macromol, 2005, 37:1.
- [11] Zhang Y Z, Chen X X, Dai J, et al. Spectroscopic studies on the interaction of lanthanum (III) 2-oxopropionic acid salicyloyl hydrazone complex with bovine serum albumin [J]. Luminescence, 2008, 23 (3):150.
- [12] Provencher S W, Gloeckner J. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism[J]. Biochemistry, 1981, 20:33.

[责任编辑 邹晓翠]