

分子对接模拟法与多光谱法研究盐酸金霉素与胃蛋白酶的相互作用

王晓霞^{1*}, 于洋洋², 马力通¹, 聂智华³, 王正德¹, 崔金龙¹, 赛华征¹, 赵文渊¹

1. 内蒙古科技大学化学与化工学院, 内蒙古 包头 014010
2. 中国石油大学(华东)化学工程学院, 山东 青岛 266580
3. 清华大学生命科学学院, 北京 100084

摘要 通过荧光光谱法、紫外-可见吸收光谱法、三维荧光光谱法、圆二色谱法(CD)、同步荧光光谱法和分子对接模拟法等方法研究了 CTC(金霉素)和 PEP(胃蛋白酶)之间相互作用的机制。通过在不同温度下进行荧光强度测定, 确定了 CTC 与 PEP 相互作用及相关的猝灭机制。通过实验结果计算出 CTC 与 PEP 的结合常数 K_A (298, 303 和 308 K) 为 4.345×10^7 , 2.836×10^7 和 1.734×10^7 L · mol⁻¹ 以及结合位点数 n 为 1.618, 1.587 和 1.555。 n 值接近于 1, 这意味着在 PEP 与 CTC 之间只有一个结合位点。基于热力学分析, 计算得 298 K 的热力学参数: $\Delta H(-70.13$ kJ · mol⁻¹), $\Delta G(-43.57$ kJ · mol⁻¹) 和 $\Delta S(-89.00$ J · (mol · K)⁻¹)。由 $\Delta H < 0$ 和 $\Delta S < 0$ 可知范德华力和氢键是 CTC 和 PEP 之间的主要作用力, 由 $\Delta G < 0$ 可知该反应自发进行。根据 Förster's 偶极-偶极非辐射能量转移理论, 计算得结合距离 $r = 3.240$ nm, 证明 CTC 与 PEP 之间存在非辐射能量转移。分子对接模拟表明, CTC 与 PEP 的结合位置在 PEP 的活性中心凹槽内, CTC 与 PEP 的氨基酸残基 VAL30, SER35, TYR189, THR74, THR77, GLY78 和 LEU112 之间存在范德华力; CTC 和 GLU13, GLY217, ASP32, ASP215 和 GLY76 等残基之间存在氢键作用力; CTC 还与 PEP 的氨基酸残基 TYR75 存在疏水作用力。各种作用力使 CTC 和 PEP 形成稳定的复合物。通过紫外-可见吸收光谱、同步荧光光谱和三维荧光光谱等技术分析, 可知 CTC 使 PEP 中的色氨酸(Trp)氨基酸残基周围环境极性增强, 疏水性减弱, 亲水性增强, 导致 PEP 二级结构发生改变。圆二色谱图则表明 CTC 改变了 PEP 的部分二级结构, PEP 中的 α -螺旋结构的含量从 11.6% 增加到 21.0%, β -折叠结构的含量从 47.3% 降至 28.2%, β -转角(β -Turn)结构的含量从 19.6% 增加到 24.2%, 无规则结构(Random coil)的含量从 27.6% 增加到 34.2%, 表明 CTC 对 PEP 发生了相互作用, 改变了 PEP 周围的微环境, 导致 PEP 的二级结构发生变化。本研究结果有助于了解 CTC 与 PEP 的结合机理, 为 CTC 的合理使用提供了重要依据。

关键词 盐酸金霉素; 胃蛋白酶; 多光谱法; 分子对接模拟法

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2020)08-2518-07

引言

金霉素(chlortetracycline, CTC)是一种能抑制革兰阳性菌和阴性菌的活性四环素类抗生素。胃蛋白酶(pepsin, PEP)主要存在于胃液中, 是一种多肽水解酶^[1-2]。当 CTC 经口服进入胃中后, 通常会与胃液中的酶结合, 由于 CTC 分子含有多个具有活性的酚羟基, 可能会与胃蛋白酶上的活性基团相互作用, 从而使 PEP 的活性发生改变。近年来, 药物小分子与蛋白酶的相互作用吸引了国内外研究学者的广泛关

注。Fatemeh S. Mohseni-Shahri^[3]使用多光谱法和分子动力学模拟, 探究了食品添加剂日落黄与 PEP 的结合机理; Malika Pathak^[4]运用多光谱法和热力学计算, 研究了二甲双胍与 PEP 的结合反应。

使用多光谱法与分子对接模拟法研究 PEP 与 CTC 之间的相互作用, 通过探讨 CTC 与 PEP 的相互作用机制, 可进一步了解 CTC 对 PEP 活性和功能的影响, 以及了解 CTC 在体内的药效动力学和代谢动力学, 为改良药物和开发新药提供参考依据。

收稿日期: 2019-07-05, 修订日期: 2019-11-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(21766025), 内蒙古自治区科技计划项目(201702027), 内蒙古自治区高等学校科学研究项目(NJZY17166), 内蒙古自然科学基金项目(2019LH02005)资助

作者简介: 王晓霞, 女, 1984年生, 内蒙古科技大学化学与化工学院讲师 e-mail: wx572369@163.com * 通讯联系人

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

荧光分光光度计(LS-55, 美国 PerkinElmer 公司); 紫外可见近红外分光光度计(CARY-5000, 美国安捷伦科技有限公司); 圆二色谱仪(Chirascan plus, 英国应用光物理公司)。

$1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 金霉素(Chlortetracycline Hydrochloride, 质量分数为 95.3%, 中国药品生物制品检定所)溶液; $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 2.00 的三(羟甲基)氨基甲烷(Tris hydroxymethyl aminomethane, Tris, 质量分数 $\geq 99.0\%$) $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 溶液; $5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 胃蛋白酶(porcine stomach mucose, PEP, 纯度 $\geq 98\%$, 上海金穗生物科技有限公司)溶液。

1.2 方法

1.2.1 荧光光谱的测定

取十支比色管, 分别加入 1.0 mL 的 PEP 溶液($5.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 再分别加入适量的 CTC 溶液($1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 定容至 10 mL, 使管内 CTC 浓度分别为(0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 和 4.5) $\times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。充分摇匀后, 置入预先定温好的恒温热水浴中, 放置 20 min, 分别测量各管溶液的荧光光谱, 并记录波长范围内发射峰位置及相应荧光强度。根据上述方法, 分别测定热力学温度为 298, 303 和 308 K 条件下的所需数据。

荧光光度计的条件设置: 激发波长(λ_{ex})为 280 nm, 发射波长(λ_{em})范围为 300~600 nm, 扫描速度为 $1500 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$, 狭缝宽为 9.0 nm。

1.2.2 同步光谱测定

用荧光光谱法配制比例配制同步荧光所需的待测液, 所得待测液中 PEP 浓度均为 $5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, CTC 的浓度分别为(0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5) $\times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。静置与仪器预热完毕, 设置光度计, 调节前后狭缝为 9.0 nm, 扫描速率为 $1500 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$, 分别设置发射波长与激发波长的波长差为 15 和 60 nm, 分别设发射波长为 265 和 310 nm, 激发波长范围为 250~550 nm。用比色皿盛取溶液, 置入测量部位, 扫描待测液, 得同步荧光光谱。

1.2.3 三维荧光光谱测定

取两支比色管, 分别加入 0.5 mL 的 PEP 溶液($5.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 再取其中一支加入 1.0 mL 的 CTC 溶液($1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。放入 298 K 的恒温水浴锅, 静置 20 min, 待测。

荧光光度计预热 20 min, 再调至三维荧光功能区, 设置前后狭缝为 7.0 nm, 激发波长范围为 200~400 nm, 间隔为 5.0 nm, 扫描 200~500 nm 范围内的发射光谱, 扫描速度为 $1500 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ 。待测溶液放入比色皿, 测出光谱后导出数据。

1.2.4 紫外可见吸收光谱的测定

取十支比色管, 分别移取 1.5 mL 的 PEP 溶液($5.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 再分别加入适量的 CTC 溶液($1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 使管内 CTC 最终浓度分别为(0, 0.5, 1.0,

1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5) $\times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。摇匀后静置 20 min, 置入 25 °C 恒温水浴锅中 20 min。设置扫描吸收波长范围为 190~500 nm, 扫描速度为 $300 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ 。记录 CTC 和 PEP 体系的紫外光谱。

1.2.5 结合距离的测定

在三支比色管中, 分别配制 PEP 的浓度 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、CTC 浓度为 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 PEP 和 CTC 浓度均为 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液。放入 298 K 的恒温水浴锅, 静置 20 min。对 CTC 溶液进行紫外测定, 对 PEP 溶液和 CTC-PEP 混合液进行荧光测定。荧光光度计参数: 激发波长为 280 nm, 发射波长扫描范围为 290~550 nm, 狭缝设为 8.0 nm, 扫描速度为 $500 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ 。紫外可见吸收光度计参数: 扫描范围为 190~500 nm, 扫描间隔为 0.5 nm。扫描速度为 $300 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

1.2.6 圆二色光谱的测定

在两支比色管中, 准确移取 1.0 mL 的 PEP 溶液、1.0 mL 的 PEP 溶液加 4.0 mL 的 CTC 溶液, 蒸馏水定容至 10 mL, 得到溶液中 PEP 浓度均为 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, CTC 的浓度分别为 0 和 $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 待测。

仪器狭缝宽度调为 10.0 nm, 设扫描波长范围为 180~260 nm, 扫描时长为 0.5 s。以 Tris-HCl 溶液为参比, 记录 CTC 和 CTC-PEP 体系的圆二色光谱。

1.2.8 分子对接模拟技术

蛋白质数据库 RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)选取 PEP 晶体结构(蛋白质编码: 3utl), 由 Chem office 15.1 软件画出 CTC 的分子结构式, 利用分子对接软件 DS2016Client 作出分子对接模拟图。

2 结果与讨论

2.1 CTC 对 PEP 的荧光猝灭光谱

PEP 是由多种氨基酸脱水缩合而成, 其中三种芳香氨基酸(色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸)使 PEP 具有内源性荧光^[5]。图 1(a, b, c)分别为 298, 303 和 308 K 温度时, 固定浓度的 PEP 随 CTC 浓度增大的荧光强度变化情况。由图 1(a, b, c)可知, 在激发波长 280 nm 下, PEP 的最大发射波长为 344 nm, 随着 CTC 浓度的增加, PEP 的荧光强度呈现出有序的下降, 而发射光谱峰位置移动不明显, 由此可知 CTC 对 PEP 的荧光强度产生了猝灭效应, 两者之间发生了反应。

2.2 CTC 对 PEP 的荧光猝灭类型的判断

动态荧光猝灭中, 猝灭分子与荧光分子发生碰撞或能量转移, 使荧光分子不发射荧光就直接返回基态, 故猝灭效果与激发的单个荧光分子寿命、猝灭剂实际浓度和所处温度有关, 相关运算可使用 Stern-Volmer 方程^[6]

$$F_0/F = 1 + K_{\text{SV}}[Q] = 1 + K_{\text{q}}\tau_0[Q] \quad (1)$$

式(1)中: F_0 是无 CTC 存在时荧光体 PEP 的荧光强度; F 是加入 CTC 溶液后荧光体 PEP 的荧光强度; $[Q]$ 是 CTC 溶液的实际最终浓度; K_{SV} 是动态猝灭常数; K_{LB} 是静态猝灭常数; K_{q} 为动态荧光猝灭速率常数; τ_0 是无猝灭剂时生物体内

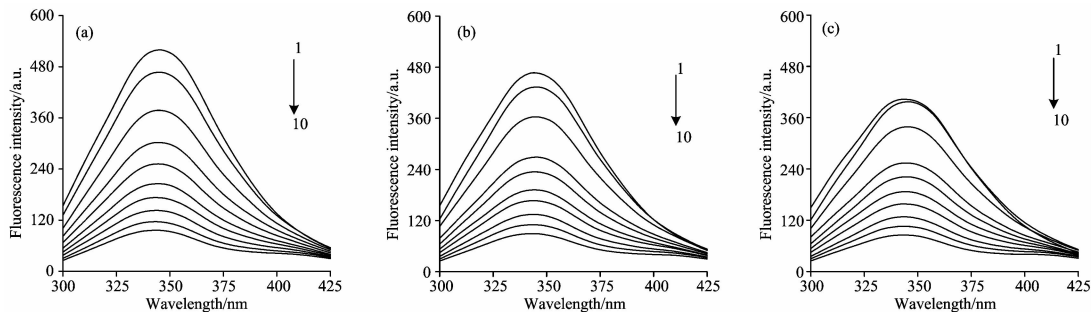


图 1 不同温度下 CTC-PEP 体系的荧光发射光谱图

Fig. 1 Fluorescence emission spectra of CTC-PEP system under different temperature

(a): 298 K; (b): 303 K; (c): 308 K

$c_{(PEP)} = 5.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{(CTC)} (1-10)$: $(0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5) \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH 2.00

大分子的内源性荧光寿命，生物大分子的 τ_0 约为 10^{-8} s ^[6]。假设 CTC 对 PEP 引起的猝灭方式是动态猝灭，则 CTC 对 PEP 的猝灭规律适用于 Stern-Volmer 方程。本实验研究了在 298, 303 和 308 K 三个温度下 CTC 对 PEP 荧光猝灭的影响。以 CTC 浓度 $[Q]$ 为横坐标、 F_0/F 为纵坐标进行作图，得到 Stern-Volmer 曲线见图 2，并求得 K_{SV} 及 K_q 值列入表 1。

根据表 1 中 298, 303 和 308 K 下的 $K_q \approx 10^{13} \text{ L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{s})^{-1}$ ，都远大于动态猝灭最大速率常数 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{s})^{-1}$ ^[7]，表明 CTC 主要通过静态猝灭的途径来减弱 PEP 的荧光强度。静态猝灭中，温度升高会使其猝灭常数 K_{SV} 降低。由表 1 可知，在不同温度下 CTC-PEP 体系的猝灭常数 $K_{SV} (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$: $9.425 \times 10^4 (298 \text{ K}) > 8.795 \times 10^4 (303 \text{ K}) > 7.915 \times 10^4 (308 \text{ K})$ ，由于 K_{SV} 随着温度增加逐渐减小，可进一步说明 CTC 对 PEP 的猝灭类型为静态猝灭。

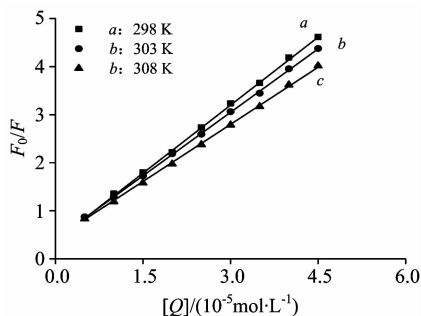


图 2 三个温度 CTC-PEP 体系的荧光猝灭的 Stern-Volmer 曲线

Fig. 2 Fluorescence quenching of Stern-Volmer curve of CTC-PEP system at three temperatures

表 1 Stern-Volmer 线性方程和相关系数

Table 1 Stern-Volmer linear equations and correlation coefficients

T/K	$K_{SV}/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$K_q/[\text{L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{s})^{-1}]$	相关系数 R^2	$K_A/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	结合位点数 n
298	9.425×10^4	9.425×10^{12}	0.9935	4.345×10^7	1.618
303	8.795×10^4	8.795×10^{12}	0.996 8	2.836×10^7	1.587
308	7.915×10^4	7.915×10^{12}	0.993 3	1.734×10^7	1.555

2.3 CTC 与 PEP 的结合常数和结合位点数

利用静态猝灭双对数公式^[8]求两者的结合常数和结合位点数

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

式(2)中: K_A 是 CTC 与 PEP 的结合常数; n 是 CTC 与 PEP 的结合位点数。以 $\lg [Q]$ 为横坐标、 $\lg [(F_0 - F)/F]$ 为纵坐标作双对数图(图 3)，拟合直线的斜率是两者的结合位点数 $\lg K_A$ ，与纵坐标的截距数值为 n ，计算结果见表 1。

由表 1 可知，在 298 K 时，CTC-PEP 体系的结合常数 $K_A = 4.345 \times 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ， $n = 1.618$ ，在 303 K 时，CTC-PEP 体系的结合常数 $K_A = 2.836 \times 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ， $n = 1.587$ ，在 308 K 时，CTC-PEP 体系的结合常数 $K_A = 1.734 \times 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ， $n = 1.555$ 。可见，三个温度时的 CTC 与 PEP 结合常数 K_A 很大，且结合位点数 n 都接近于 1，其证

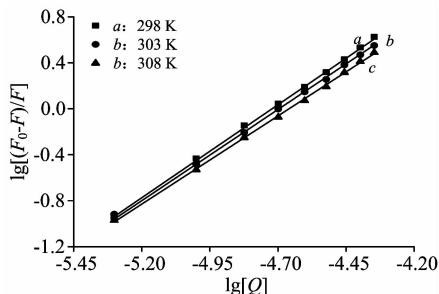


图 3 不同温度下 $\lg[(F_0 - F)/F] - \lg [Q]$ 图
Fig. 3 Polt of $\lg[(F_0 - F)/F]$ against $\lg [Q]$ at different temperature

明 CTC 与 PEP 之间的结合作用较强，所得到的复合物也均为 1:1 型。同时 CTC 与 PEP 的结合常数大小排列为: K_A

(298 K) > $K_A(303\text{ K}) > K_A(308\text{ K})$, 这显示 CTC 与 PEP 的结合常数 K_A 在一定温度范围内与温度呈负相关, 这与猝灭常数 K_{sv} 与温度的关系具有一致性, 进一步表明 CTC 对 PEP 荧光猝灭模式为静态猝灭。

2.4 CTC 和 PEP 相互作用的热力学参数和主要作用力

Ross 理论中的论断可判断出结合反应的实际作用力^[9]: 当 $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$ 时, 作用力为疏水作用力; $\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$ 时, 作用力为氢键和范德华力; $\Delta H < 0$, $\Delta S > 0$ 时, 作用力为静电作用力。

$$\ln(K_2/K_1) = \Delta H(1/T_1 - 1/T_2)/R \quad (3)$$

$$\ln K = -\Delta H/RT + \Delta S/R \quad (4)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K_A \quad (5)$$

运用式(3)一式(5), 根据 Van't Hoff 公式^[10], 计算出 298, 303 和 308 K 下热力学参数焓变 $\Delta H = -70.13\text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 熵变 $\Delta S = -89\text{ J} \cdot (\text{mol} \cdot \text{K})^{-1}$, 吉布斯自由能 $\Delta G = -43.57\text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ (298 K), $-43.23\text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ (303 K), $-42.68\text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ (308 K)。可知, $\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$, 可推测出 CTC 与 PEP 间主要作用力是范德华力和氢键, $\Delta G < 0$ 可说明 CTC 对 PEP 的静态猝灭为自发、放热($\Delta H < 0$)的结合过程。

2.5 CTC-PEP 体系的结合距离

根据 Förster's^[11] 非辐射能量转移理论, 激发体和吸收体之间的能量迁移率 E 与两者结合距离 r 及临界能量迁移距离 R_0 存在以下关系

$$E = 1 - F/F_0 = R_0^6/(R_0^6 + r^6) \quad (6)$$

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} (k^2 \varphi n^{-4} J) \quad (7)$$

$$J = \sum F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda / \sum F_D(\lambda) \Delta\lambda \quad (8)$$

式(6)一式(8)中: r 为 CTC 与 PEP 之间的结合距离; R_0 代表 $E=50\%$ 时的临界能量转移距离; k^2 是偶极空间取向因子, 一般取平均值 $2/3$; n 为介质中的光折射指数, 通常取水和有机物的平均值 1.36 ; φ 为 PEP 的荧光量子产率, 常取色氨酸残基量子产率 $\varphi=0.15$; J 为 PEP 的发射光谱与 CTC 紫外吸收光谱的重叠积分; $F_D(\lambda)$ 为 PEP 在各个波长下的荧光强度; $\epsilon_A(\lambda)$ 为 CTC 在各个波长下的摩尔吸光系数, $F_D(\lambda)$

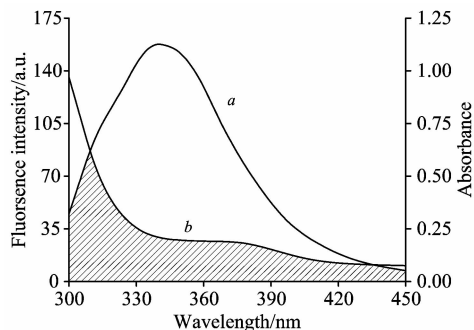


图 4 PEP 的荧光光谱曲线(a)与 CTC 的紫外吸收光谱曲线(b)重叠图

Fig. 4 Overlapping of the fluorescence spectra of PEP (a) with the absorption spectra of CTC (b)

a: $c(\text{PEP}) = 1.0 \times 10^{-5}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; b: $c(\text{CTC}) = 1.0 \times 10^{-5}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $T = 298\text{ K}$; $\text{pH } 2.00$

与 $\epsilon_A(\lambda)$ 计算所用波长一致。

图 4 为 CTC 与 PEP 的浓度比为 1 : 1 时, CTC 的紫外-可见吸收光谱曲线与 PEP 的发射光谱曲线的重叠图, 代入式(6)一式(8)积分求得两光谱重叠积分 $J = 3.409 \times 10^{-14}\text{ cm}^3 \cdot \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $E = 42.96\%$, $R_0 = 3.091\text{ nm}$, $r = 3.240\text{ nm}$, $0.5R_0 < r < 1.5R_0$, 且 $r < 7\text{ nm}$, 证明 CTC 与 PEP 之间存在非辐射能量转移。

2.6 CTC 对 PEP 二级结构的影响

2.6.1 CTC 对 PEP 作用的紫外可见吸收光谱分析

动态猝灭的荧光物质的吸光度一般不受其猝灭剂影响^[12], 图 5 中随着 CTC 浓度增大, PEP 的紫外吸收峰逐渐增大, 证明两者发生了相互作用, 且进一步证明静态猝灭发生在 CTC 与 PEP 之间。发生红移现象显示嵌入的 CTC 药物分子与 PEP 酶的碱基对 π 电子发生相互作用, 使 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁更易进行, 吸收的光波能量降低。上述现象, 说明 CTC 使 PEP 分子二级结构的构象发生了变化。

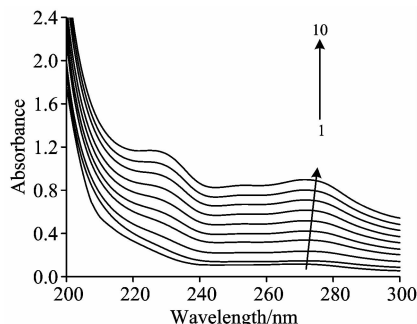


图 5 CTC 与 PEP 的紫外可见吸收光谱图

Fig. 5 UV-Visible absorption spectrum of CTC with PEP

$c(\text{CTC})$ (1—10): (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5) $\times 10^{-5}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c(\text{PEP}) = 5.0 \times 10^{-5}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $T = 298\text{ K}$; $\text{pH } 2.00$

2.6.2 CTC 对 PEP 作用的同步荧光光谱分析

当 $\Delta\lambda$ 为 15 nm 时, 同步荧光光谱可显示 PEP 中酪氨酸 (Tyr) 残基的荧光光谱特性; $\Delta\lambda$ 为 60 nm 时, 可显示 PEP 中色氨酸 (Trp) 残基的荧光光谱特性^[13]。

图 6(a) 为在 $\Delta\lambda = 15\text{ nm}$ 时的 CTC-PEP 同步荧光光谱, 图 6(b) 为在 $\Delta\lambda = 60\text{ nm}$ 时 CTC-PEP 的同步荧光光谱。从图 6 中可知, 在 PEP 存在的环境中, 酪氨酸 (Tyr) 残基的荧光光波峰波长并没有受 CTC 浓度的影响, 且荧光强度变化微弱, 峰型基本不变; 但色氨酸 (Trp) 残基的发射峰随着 CTC 浓度的增大荧光强度显著减小, 而且红移了 2.5 nm, 证明 CTC 使 PEP 的色氨酸残基微环境极性增加、亲水性增加和疏水性减弱, 引起 PEP 二级结构构象改变。

2.6.3 CTC 与 PEP 的三维荧光光谱分析

图 7(a) 和 (b) 为 PEP 和 CTC-PEP 体系的三维荧光光谱图及等高线图。“山脊”状的 PEAK a 和 PEAK b 是瑞利散射峰 ($\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$); “驼峰”形状的 PEAK 1 和 PEAK 2 是典型的荧光峰 ($2\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$), PEAK 1 显示残基 Trp 和残基 Tyr 的荧光光谱特征^[13], PEAK 2 主要与多肽骨架结构有关, 其强度与蛋白二级结构相关。由表 4 可知, 加入 CTC 后, 峰 1

(PEAK 1) 的荧光强度降低且最大发射波长红移了 3.0 nm, 峰 2(PEAK 2) 的荧光强度降低且最大发射波长红移了 0.5 nm。荧光强度的降低显示 CTC 对 PEP 发生了猝灭作用。红移现象则证明 CTC 影响了 PEP 的周围微环境, CTC 使 PEP 周围的微环境的极性增大、亲水性增强和疏水性降低,

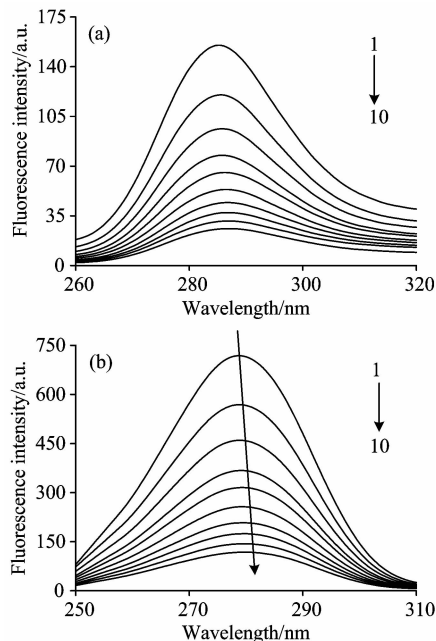


图 6 CTC 与 PEP 的同步荧光光谱图

Fig. 6 Synchronous fluorescence spectra of CTC and PEP

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

$c_{\text{PEP}} = 5.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{CTC}} (1-10)$: (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5) $\times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $T = 298 \text{ K}$; pH 2.00

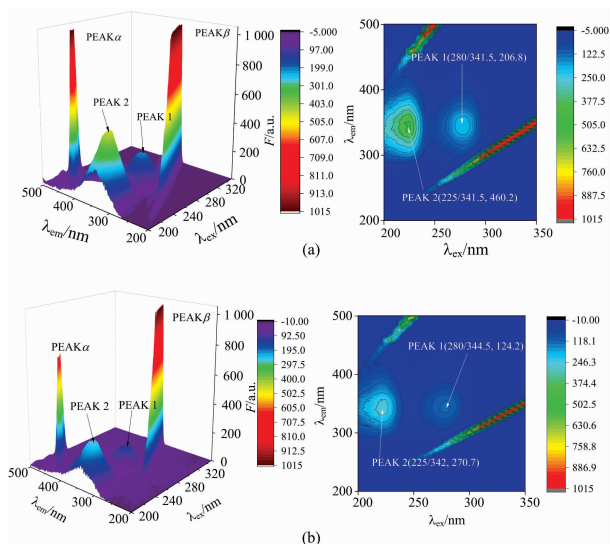


图 7 PEP 与 CTC 相互作用前 (a) 后 (b) 的三维荧光光谱

Fig. 7 The three-dimensional fluorescence spectra of BSA and CTC before (a) and after (b) reaction

(a): $c_{\text{PEP}} = 2.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; (b): $c_{\text{PEP}} = 2.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $c_{\text{CTC}} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $T = 298 \text{ K}$; pH 7.40

低, 且 CTC 使 PEP 的肽链结构发生变化。综合上述, CTC 使 PEP 的二级结构发生了变化。

表 2 PEP 和 CTC-PEP 的三维激发发射荧光光谱特征参数
Table 2 Three-dimensional fluorescence spectra characteristic of PEP and CTC-PEP

体系	组分	PEAK 1 ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}, F$)	PEAK 2 ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}, F$)
A	PEP	280/341.5, 206.8	225/341.5, 460.2
B	CTC-PEP	280/344.5, 124.2	225/342, 270.7

2.6.4 CTC 对 PEP 作用的圆二色谱分析

为进一步研究 CTC 对 PEP 构象的影响, 扫描 PEP 与 CTC-PEP 体系的圆二色谱。由图 8 可知, PEP 在 200 nm 处具有一个负峰, 这个负峰是 PEP 的 β -折叠特征峰, 吸收峰的强度可以反映蛋白酶 β -折叠 (β -sheet) 含量的变化。将圆二色谱值导入 CDNN 软件, 经过计算得出 CTC 和 CTC-PEP 体系的各二级结构占比。当 PEP 与 CTC 的浓度比为 $c_{\text{PEP}} : c_{\text{CTC}} = 1 : 8$ 时, PEP 的 β -折叠 (β -sheet) 占比从 47.3% ($c_{\text{PEP}} : c_{\text{CTC}} = 1 : 0$) 降到 28.2%。同时, PEP 的 α -螺旋 (α -Helix) 占比从 11.6% ($c_{\text{PEP}} : c_{\text{CTC}} = 1 : 0$) 增加到 21.0%, β -转角 (β -Turn) 占比从 19.6% ($c_{\text{PEP}} : c_{\text{CTC}} = 1 : 0$) 增加到 24.2%, 无规则结构 (Random coil) 占比从 27.6% ($c_{\text{PEP}} : c_{\text{CTC}} = 1 : 0$) 增加到 34.2%。上述结果均表明 CTC 对 PEP 发生了相互作用, 改变了 PEP 周围的微环境, 导致 PEP 的二级结构发生变化。

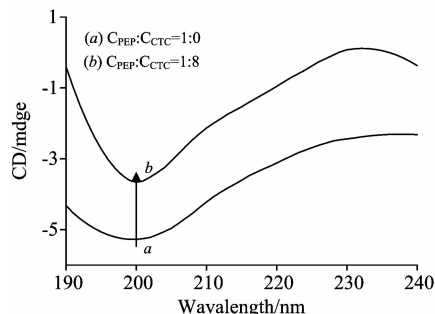


图 8 CTC 与 PEP 相互作用的圆二色谱图

Fig. 8 The circular dichroism spectra of PEP interacting with CTC

a: $c_{\text{PEP}} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; b: $c_{\text{PEP}} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $c_{\text{CTC}} = 8.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $T = 298 \text{ K}$; pH 2.00

2.7 CTC 与 PEP 的分子对接模拟

为了判断 CTC 对 PEP 相互作用形式, 利用分子对接软件进行对接模拟来预测两者作用力形式及特定距离, 利用程序生成 CTC 对 PEP 的对接模拟见图 9。由图 9(a) 和 (b) 可知, CTC 分子进入到 PEP 的表面活性中心凹槽处。为进一步观察 CTC 与 PEP 相互作用的微环境, 作出 CTC 附近的氨基酸残基 2D/3D 示意图 9(c)。

图 9(c) 中, CTC 与 GLU13, GLY217, ASP32, ASP215 和 GLY76 等氨基酸残基形成氢键, 其键长分别为 3.393,

3.127 和 3.456, 2.578, 3.110, 2.283 Å。其中, GLY217 残基与 CTC 形成 2 个碳氢键(Carbon Hydrogen Bond)。CTC 与 PEP 的残基 VAL30, SER35, TYR189, THR74, THR77, GLY78 和 LEU112 通过范德华力相互作用。CTC 还与残基 TYR75 之间存在疏水作用力, 其作用形式为 π -烷基(π -Alkyl), 键长为 4.851 Å。除了上述作用力, CTC 还与残基 ILE120, ASP32, GLY34, TYR75, PHE111, LEU112 和 PHE117 之间存在不利碰撞作用力(unfavorable bump), 键长分别为 3.631, 3.643 与 4.589, 2.091 与 3.451, 3.240,

4.080, 4.391 Å。这一切均能说明 CTC 通过各种作用力与 PEP 稳定结合, CTC 与 PEP 之间的作用力主要是氢键与范德华力, 且说明 CTC 使 PEP 二级结构微环境变化。

3 结 论

探究了 PEP-CTC 在 298, 303 和 308 K 温度下的荧光发射光谱, 证明两者发生相互作用, CTC 使 PEP 荧光猝灭。Stern-Volmer 方程计算得到三个温度下的 $K_q \approx 10^{13} \text{ L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{s})^{-1}$, 显示 CTC 对 PEP 的荧光猝灭形式为静态猝灭。静态猝灭双对数公式计算的三个温度下的两者的结合常数和结合位点数, 证明 CTC 与 PEP 之间的结合较强且复合比为 1:1 型, 也进一步证明 CTC 对 PEP 猝灭反应为静态猝灭。由 Van't Hoff 公式结合 Ross 理论推断出 PEP-CTC 的主要作用力形式为氢键和范德华力, 其结合过程是自发、放热的反应。利用 Förster's 偶极-偶极非辐射能量转移理论, 计算出结合距离 $r=3.240 \text{ nm}$, 证明非辐射能量转移出现在 CTC 与 PEP 之间并导致 PEP 荧光猝灭。经过分子对接, 由模拟结果可知 CTC 对 PEP 残基的作用方式不仅具有氢键和范德华力, 还存在疏水作用力, CTC 通过各种作用力与 PEP 稳定结合。通过 CTC-PEP 的紫外-可见吸收光谱分析, PEP 的吸收峰发生一定的红移, 证明 PEP 的分子构象发生改变, 进一步证明 CTC 与 PEP 之间发生了荧光静态猝灭。利用波长差分别为 15 和 60 nm 的同步荧光法观察 PEP 中特定氨基酸, 可知 CTC 的加入使色氨酸(Trp)残基附近微环境极性变大, 导致 PEP 的构象变化。利用三维荧光光谱法对 CTC-PEP 体系分析可知, CTC 对 PEP 的荧光强度产生猝灭, 同时证明 CTC 降低荧光分子的微环境极性并改变其肽链结构, 进一步证实了 PEP 二级结构的变化。通过圆二色谱法分析 CTC-PEP 体系, 并利用 CDNN 软件计算出各二级结构含量值, 二级结构含量的明显变化充分说明 CTC 使 PEP 的结构发生了改变。这些结果阐明了在分子结构层面上 CTC 在胃中的作用机理, 进一步揭示金霉素(CTC)在人体内的转运过程及吸收特性, 为新药的研发和相关药物的改性提供必要的信息。

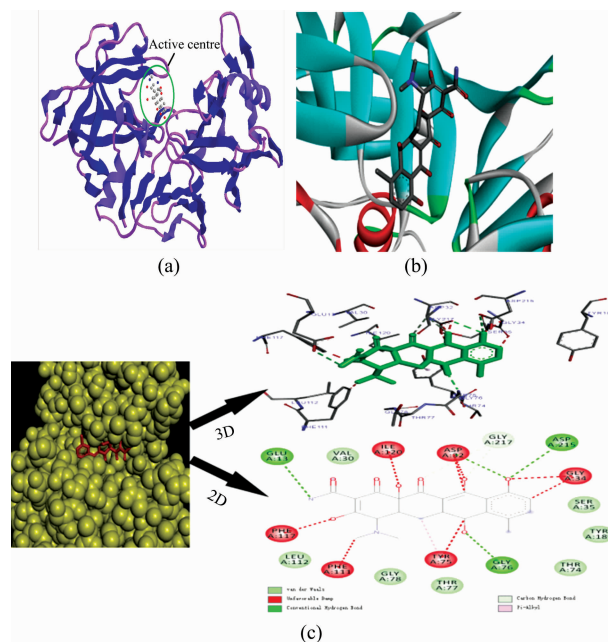


图 9 CTC 与 PEP 结合的分子对接结构模型图

(a): CTC 与 PEP 的分子对接模拟图; (b): CTC 与 PEP 的飘带状分子对接模拟图; (c) CTC 与 PEP 的氨基酸残基 2D, 3D 示意图

Fig. 9 The docking result of CTC with PEP

(a): Molecular docking simulation of CTC and PEP; (b): Streamer shape molecular docking model diagram of CTC and PEP; (c): 2D/3D diagram of amino acid residues of CTC and PEP

References

- [1] REN Guo-yan, SUN He, NIU Xiao-li, et al(任国艳, 孙贺, 牛晓莉, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2019, 39(4): 1103.
- [2] Meti Manjunath D, Xu Yang, Xie Jiangfeng. Molecular Biology Reports, 2018, 45(6): 1637.
- [3] Fatemeh S Mohseni-Shahri, Farid Moeinpour, Masoumeh Nosrati. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 115: 273.
- [4] Mallika Pathak, Deepti Sharma, Navneet Sharma, et al. Journal of Molecular Structure, 2018, 1166: 183.
- [5] Leila Khalili, Gholamreza Dehghan. Journal of Luminescence, 2019, 211: 193.
- [6] Suo Zili, Ma Xiangling, Meng Zhihan, et al. Spectroscopy Letters, 2018, 51(7): 332.
- [7] Suma K Pawar, Seetharamappa J. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2019, 3(7): 1.
- [8] Samima Khatun, Riyazuddeen. J. Chem. Thermodynamics, 2018, 126: 43.
- [9] Cao Xiangyu, He Yonglin, Kong Yuchi, et al. Food Hydrocolloids, 2019, 94: 63.
- [10] Tang Bin, Tang Peixiao, He Jiawei, et al. Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology, 2018, 184: 18.
- [11] Gan Na, Sun Qiamei, Tang Peixiao, et al. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2019, 206: 126.
- [12] Samima K, Riyazuddeen. J. Chem. Thermodynamics, 2018, 11: 43.
- [13] Prateek T, Monika T, Swati A, et al. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2017, 171: 246.

Study on the Interaction Between Chlortetracycline Hydrochloride and Pepsin by Multispectral and Molecular Docking

WANG Xiao-xia^{1*}, YU Yang-yang², MA Li-tong¹, NIE Zhi-hua³, WANG Zheng-de¹, CUI Jin-long¹, SAI Hua-zheng¹, ZHAO Wen-yuan¹

1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014010, China

2. School of Chemical Engineering, China University of Petroleum (East China), Qingdao 266580, China

3. School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract The mechanism of interaction between CTC and PEP was investigated by using fluorescence spectra, UV-Vis absorption spectra, circular dichroism (CD), 3D fluorescence spectra, synchronous fluorescence spectra and molecular docking methods. The quenching mechanism associated with the CTC-PEP interaction was determined by performing fluorescence measurements at different temperatures. The binding constants (K_A) at three temperatures (298, 303, and 308 K) were 4.345×10^7 , 2.836×10^7 and 1.734×10^7 L · mol⁻¹ respectively, and the number of binding sites (n) was 1.618, 1.587, and 1.555, respectively. The n value was close to unity, which meant that there was only one independent class of binding site on pepsin for CTC. Based on the thermodynamic analysis, thermodynamic parameters at 298 K were calculated as follows: ΔH (-70.13 kJ · mol⁻¹), ΔG (-43.57 kJ · mol⁻¹), and ΔS (-89.00 J · (mol · K)⁻¹). It was known from $\Delta H < 0$ and $\Delta S < 0$ that Van der Waals' forces and hydrogen bonds were the main forces between CTC and PEP, the reaction was spontaneous from $\Delta G < 0$. According to Förster's dipole-dipole non-radiative energy transfer theory, the specific binding distance of CTC-PEP system was 3.240 nm, it proved that there was non-radiative energy transfer between CTC and PEP. Molecular docking further suggested that CTC molecule bound within the active pocket of PEP. There were the van der Waals forces between CTC and residues VAL30, SER35, TYR189, THR74, THR77, GLY78 and LEU112 of PEP, and hydrogen bonds between CTC and GLU13, GLY217, ASP32, ASP215 and GLY76. There also was a hydrophobic interaction between CTC and the amino acid residue TYR75 of PEP. Various forces make CTC and PEP form a stable complex. The effects of CTC on the conformation of PEP were analyzed by UV absorption spectroscopy, synchronous fluorescence spectroscopy and 3D fluorescence spectroscopy. It is demonstrated in detail that CTC can increase microenvironment polarity and decrease the hydrophobicity of tryptophan (Trp) residues in PEP. Circular dichroism spectra indicated the secondary structure of PEP was partially changed by CTC with the percentage of α -helix increasing from 11.6% to 21.0% and the percentage of β -sheet decreasing from 47.3% to 28.2%. The content of β -Turn structure increased from 19.6% to 24.2%, and the content of Random coil increased from 27.6% to 34.2%, indicating that CTC interacted with PEP, and CTC changed the microenvironment around PEP, and also changed the secondary structure of PEP. The results of this study are helpful to understand the binding mechanism of CTC and PEP, and provide an important basis for the rational use of CTC.

Keywords Chlortetracycline hydrochloride; Pepsin; Multi-spectroscopy; Molecular docking

(Received Jul. 5, 2019; accepted Nov. 30, 2019)

* Corresponding author