

光谱法结合计算模拟探究胡桃醌与脯氨酰顺反异构酶 1 的相互作用

蒋晓琦¹, 马超², 余凯², 周安², 朱国飞²

(1. 贵阳职业技术学院生化工程系, 贵州贵阳 550081)

(2. 贵州理工学院食品药品制造工程学院, 贵州贵阳 550003)

摘要: 胡桃醌为胡桃科核桃属植物胡桃楸 (*Jugland mandshurica Maxim*) 和核桃 (*Juglans regia L*) 中存在的重要活性物质, 脯氨酰顺反异构酶 1 (Pin1) 为细胞内主要起信号传导作用的小分子蛋白。为探究胡桃醌对 Pin1 的抑制机理, 通过定点突变、计算模拟以及多种光谱学技术研究了胡桃醌与 Pin1 的相互作用。荧光光谱显示, 胡桃醌可以有效地淬灭 Pin1 内源荧光。293 K 温度时, 其淬灭常数 (K_{sv}) 为 1.36×10^4 L/mol, 结合常数 (K_a) 为 2.32×10^4 L/mol, 结合数(n)为 0.85, 随着温度升高, 其 K_{sv} 和 K_a 逐渐降低, 表明其淬灭机制为静态淬灭, n 值接近 1 则表明两者可形成 1:1 复合物。同步荧光光谱表明, 胡桃醌与 Pin1 结合会促使 Pin1 酪氨酸和色氨酸残基周围微环境疏水性降低, 极性增加。圆二色谱揭示胡桃醌与 Pin1 结合会导致 Pin1 中的 α -螺旋结构减少。热力学参数显示, 在 293 K 条件下, $\Delta H=12.97$ kJ/mol, $\Delta S=127.83$ J/(mol·K), $\Delta G=-24.49$ kJ/mol, 表明胡桃醌与 Pin1 可自发结合, 其主要作用力为疏水作用力。分子对接显示, 氢键和范德华力在两者作用过程中同样扮演着重要角色。分子对接、定点突变以及分子动力学模拟进一步揭示 Pin1 催化残基 Cys113 在胡桃醌结合到 Pin1 过程中发挥着至关重要的作用。

关键字: 胡桃醌; 脯氨酰顺反异构酶 1 (Pin1); 光谱学; 计算模拟; 定点突变

文章编号: 1673-9078(2021)08-135-141

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.8.0044

Interaction between Juglone and Peptidyl-prolyl Cis-trans Isomerase NIMA-interacting 1 by Spectroscopic Combined with Computational Simulation

JIANG Xiao-yu¹, MA Chao², YU Kai², ZHOU An², ZHU Guo-fei²

(1. Department of Biochemical Engineering, Guiyang Vocational and Technical College, Guiyang 550081, China)

(2. Institute of Food and Drug Manufacturing Engineering, Guizhou Institute of Technology, Guiyang 550003, China)

Abstract: Juglone is an important active substance in Juglandaceae walnut plant nuts chinense (*Jugland mandshurica Maxim*) and walnut (*Juglans regia L*), and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1 (Pin1) is a small molecule proteasome that mainly plays a role in signaling transduction. In order to explore the inhibition mechanism of juglone on Pin1, the interaction between Pin1 and juglone was studied by site-directed mutagenesis, computational simulation techniques and multiple spectroscopy. The fluorescence spectra showed that juglone could effectively quench the endogenous fluorescence of Pin1. At 293 K, the quenching constant (K_{sv}) was 1.36×10^4 L/mol, the binding constant was (K_a) 2.32×10^4 L/mol, and the binding number (n) was 0.85. With the increase of temperature, K_{sv} and K_a decreased gradually, which indicated that the quenching mechanism was static quenching, and the binding number n was close to 1, which indicated that they could form 1:1 complex. Synchronous fluorescence spectrum revealed that the combination of juglone with Pin1 could decrease the hydrophobicity and

引文格式:

蒋晓琦, 马超, 余凯, 等. 光谱法结合计算模拟探究胡桃醌与脯氨酰顺反异构酶 1 的相互作用[J]. 现代食品科技, 2021, 37(8): 135-141, +159

JIANG Xiao-yu, MA Chao, YU Kai, et al. Interaction between juglone and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1 by spectroscopic combined with computational simulation [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(8): 135-141, +159

收稿日期: 2021-01-12

基金项目: 贵州省科技计划项目(黔科合字(2017)1068); 贵州理工学院高层次人才项目(XJGC20190656); 国家级大学生创新创业项目(201914440009)

作者简介: 蒋晓琦(1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 应用生物科学与生物技术; 通讯作者: 朱国飞(1985-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 生物制药

increase the polarity of the microenvironment around the tyrosine and tryptophan residues of Pin1. Circular dichroism revealed that the combination of juglone with Pin1 resulted in the reduction of α -helical structure in Pin1. Thermodynamic parameters showed that $\Delta H=12.97$ kJ/mol, $\Delta S=127.83$ J/(mol·K), and $\Delta G=-24.49$ kJ/mol at 293 K, which indicated that juglone and Pin1 could combine spontaneously, and the main action force was hydrophobic action. Molecular docking showed that hydrogen bonds and van der Waals forces also played important roles in the process. Molecular docking, fluorescence titration and molecular dynamics simulation further revealed that catalytic residue Cys113 of Pin1 played a crucial role in the binding of juglone to Pin1.

Key words: juglone; peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1 (Pin1); spectroscopy; computational simulation; site-directed mutagenesis

胡桃楸和核桃在我国资源丰富, 很多部分均可食用, 具有很高的营养价值。大量研究表明, 其含有的有效成分胡桃醌(Juglone, 又名 5-羟基-1,4-萘醌, 属于萘醌类化合物), 不仅具有显著的抗菌、止血功能, 还具有较好的抗肿瘤功效, 能有效地抑制胃癌, 肝癌, 卵巢癌, 宫颈癌, 肺癌, 结肠癌等恶性肿瘤的增殖^[1-3]。然而, 胡桃醌的这种抗肿瘤作用的分子机制任然还不是很清楚。

脯氨酰顺反异构酶 1 (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1, Pin1) 可以特异性调节磷酸化蛋白质中丝氨酸或苏氨酸-脯氨酸模体 (pSer/Thr-Pro) 从顺式构象转为反式构象, 从而调节该蛋白功能, 影响一系列信号通路^[4]。Pin1 的底物蛋白在有丝分裂、转录、分化和 DNA 损伤应答等各种生物功能起着重要的作用。尤其值得注意的是, Pin1 在原癌基因信号通路中也起着关键的作用, 并且在乳腺癌、结肠癌、前列腺癌和甲状腺癌等多种肿瘤细胞中过量表达, 其表达量高低与肿瘤恶性程度成正相关, 而抑制肿瘤细胞中 Pin1 蛋白的活性能够触发细胞凋亡^[5,6]。尽管研究表明, 胡桃醌可作为 Pin1 小分子抑制剂, 能有效抑制其活性, 从而抑制肿瘤增殖, 但是胡桃醌与 Pin1 具体作用机制还知之甚少^[7]。

为了从分子水平上探究胡桃醌对 Pin1 的抑制机制, 本研究采用最常用的光谱法结合计算模拟探究了胡桃醌与 Pin1 的互作机理^[8,9]。在本研究中, 首先使用荧光光谱推断出 Pin1 与胡桃醌的淬灭常数、结合常数、结合位点数以及热力学参数等信息。其次, 使用同步荧光光谱和圆二色谱探究胡桃醌对 Pin1 构象的影响。再次, 利用分子对接预测出潜在的结合位点, 并对潜在的结合位点进行了定点突变, 构建了 H59A, L61A, C113A, S114 和 S154A 等多个突变体, 然后通过突变体荧光滴定对结合位点进行了验证。最后, 采用分子动力学模拟探究 Pin1 与胡桃醌在体外随时间变化的结合信息。申炳俊等探究了胡桃醌与人血清白蛋白的相互作用研究^[3], 为从分子水平上了解胡桃醌在体内可能的运转、代谢、排泄等提供了信息。本

研究将从分子水平上探究胡桃醌与 Pin1 的相互作用, 为阐明胡桃醌的抗肿瘤作用提供参考, 为扩大胡桃醌的应用, 综合开发利用我国胡桃楸和核桃资源, 研发具有防癌、抑癌、治癌功能的保健食品、药品提供相应的科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

试剂: 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 和二甲基亚砜 (DMSO) 购买自 Sigma 公司; 胡桃醌 (Juglone) 购买自源叶公司; 胰蛋白酶和酵母提取物购买自 OXOID 公司; 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 和氨苄青霉素购买自生工公司; 其他化学试剂均为国产分析纯。

仪器: 日立 F-4700 荧光光谱仪, Jasco J-815 圆二色谱仪, 戴尔 T440 塔式服务器。

1.2 实验方法

1.2.1 Pin1 及其突变体原核表达与纯化

Pin1 及其突变体 H59A、L61A、C113A、S114 和 S154A 重组质粒 pET-19b 由实验室保存。首先将重组质粒转化到大肠杆菌 *BL21(DE3)*, 然后接种在含氨苄青霉素 LB 液体培养基中, 待其长到对数期时, 18 °C, 加入 IPTG 诱导 10 h。离心收集菌体, 然后重悬菌体, 超声破碎, 高速离心, 弃沉淀, 收集上清。将上清液倒入 Ni²⁺-NTA-Sepharose 亲和层析柱中, 先用 20 mmol/L 咪唑溶液洗脱杂蛋白, 再用 400 mmol/L 咪唑溶液洗脱目的蛋白, 最后使用超滤管去除咪唑溶液。

1.2.2 荧光光谱

在石英比色皿中, 加入 200 μ L 的 5 μ mol/L Pin1 溶液, 每次滴加适量的 1 mmol/L 胡桃醌溶液, 测量荧光光谱, 控制胡桃醌终浓度为 0、5、10、15、20 和 30 μ mol/L。内源荧光光谱采用 295 nm 作为激发波长, 扫描波长为 310~400 nm。同步荧光光谱测定使用 $\Delta\lambda=15$ nm 和 $\Delta\lambda=60$ nm, 扫描范围分别为 270~310 nm 和 250~310 nm。激发狭缝和发射狭缝分别设置为 5 和

10 nm, 激发电压为 700 V, 扫描速度为 1200 r/min。

1.2.3 圆二色谱

在比色皿中,加入 200 μL 的 10 μmol/L Pin1 溶液,每次滴定适量的 1 mmol/L 胡桃醌溶液,测量圆二色谱,控制胡桃醌终浓度为 0、10 和 30 μmol/L。扫描速度设置为 200 nm/min,响应时间设置为 2 s,扫描波长为 200~260 nm。

1.2.4 分子对接

Pin1 的三维结构 (PDB_ID: 4TNS) 下载自 PDB 蛋白数据库^[10]。胡桃醌的三维结构 (ZINC_ID: ZINC526257) 下载自 ZINC 数据库^[11]。使用 ADT 工具对 Pin1 蛋白进行预处理,包括去除配体,去除结晶水,加氢,加电荷以及确定对接盒子。使用 AutoDock Vina 1.0 软件进行分子对接^[12]。

1.2.5 分子动力学模拟

使用 GROMACS 4.6.5 程序对分子对接之后的结合模型进行分子动力学模拟,使用 pdb2gmx 和 Ambertools 程序分别获取 Pin1 和胡桃醌参数文件^[13]。Pin1 与胡桃醌复合物的分子力场选用 AMBER99SB,并进行 20 ns 分子动力学模拟。使用 GROMACS 4.6.5 自带的工具进行模拟分析。

2 结果与讨论

2.1 荧光发射光谱检测胡桃醌与 Pin1 相互作用

荧光发射光谱能够监测蛋白结构中发色基团微环境的改变。Pin1 蛋白包含三个色氨酸残基和三个酪氨酸残基,具有内源荧光现象。当激发波长为 295 nm,主要呈现色氨酸残基微环境变化。如图 1a 所示,随着胡桃醌浓度的增加,Pin1 的内源荧光强度逐渐下降。表明胡桃醌结合到 Pin1 中,导致 Pin1 荧光淬灭。

荧光淬灭可以分为两种,动态淬灭和静态淬灭,可以根据 Stern-Volmer 方程计算淬灭常数 (K_{sv}) 和动态荧光淬灭速率常数 (K_q) 得出。公式如下所示:

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

式中, F 为有胡桃醌时 Pin1 的荧光强度; F_0 为无胡桃醌时 Pin1 的荧光强度; τ_0 为胡桃醌不存在时荧光体的荧光寿命,约为 10^{-8} s^[14]; $[Q]$ 为胡桃醌浓度。

根据公式 1,以 F_0/F 对 $[Q]$ 进行线性拟合,做出 Stern-Volmer 图,根据拟合直线的斜率可以得出不同温度下的 K_{sv} 和 K_q 值。如图 1b 和表 1 所示,在 293 K,胡桃醌对 Pin1 淬灭常数 (K_{sv}) 为 1.36×10^4 L/mol,随着温度的增加, K_{sv} 值逐渐降低,表明温度升高会导致胡桃醌对 Pin1 的淬灭程度降低,这是一个典型的静态淬灭特征。此外,在 293 K 和 303 K 条件下, K_q 值分

别为 1.36×10^{12} L/(mol·s) 和 0.66×10^{12} L/(mol·s),均远大于最大扩散碰撞淬灭常数 2×10^{10} L/(mol·s)^[14],进一步表明胡桃醌对 Pin1 的荧光淬灭过程是静态淬灭过程。

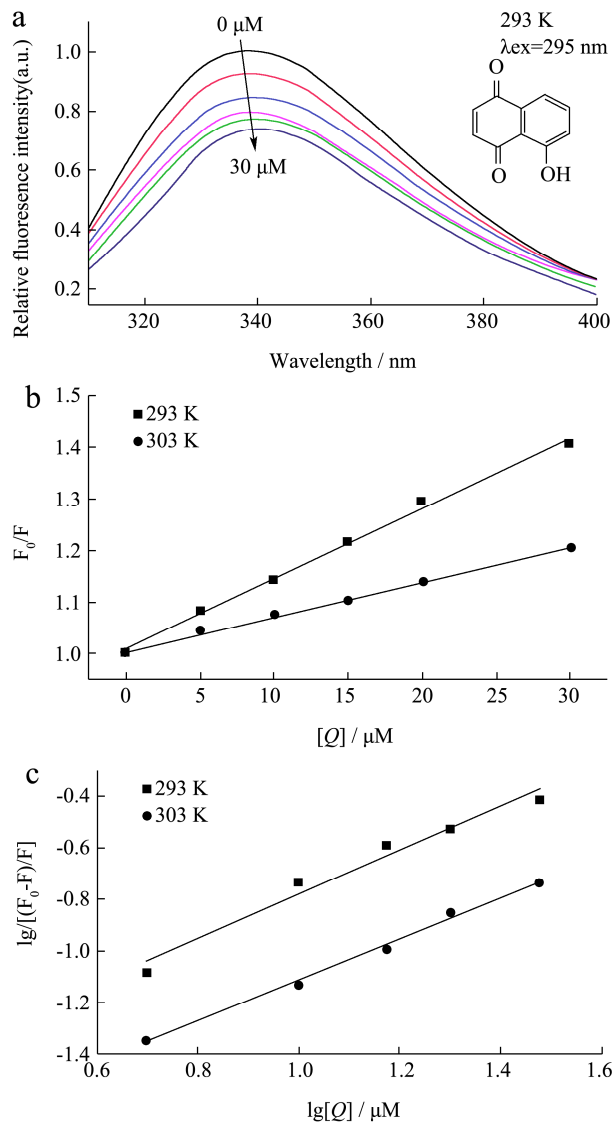


图 1 内源荧光光谱图

Fig.1 Fluorescence spectra

注: (a) 胡桃醌与 Pin1 相互作用荧光光谱图; (b) 不同温度下胡桃醌与 Pin1 相互作用 Stern-Volmer 图; (c) 不同温度下胡桃醌与 Pin1 相互作用 Lineweaver-Burk 双对数图。

对于静态淬灭过程,可以使用 Lineweaver-Burk 双对数方程计算结合常数 (K_a) 和结合位点数 (n),公式如下所示:

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

式中, F 为有胡桃醌时 Pin1 的荧光强度; F_0 为无胡桃醌时 Pin1 的荧光强度; $[Q]$ 为胡桃醌浓度。

根据公式 2,以 $\lg[(F_0 - F)/F]$ 对 $\lg[Q]$ 进行线性拟合,做出 Lineweaver-Burk 双对数图,以拟合直线的斜率和截距可以得出不同温度下的 n 和 K_a 值。如图 1c 和

表 1 所示, 在 293 K 条件下, K_a 值为 2.32×10^4 L/mol, 随着温度的增加, K_a 值逐渐降低, 表明温度升高会导致胡桃醌对 Pin1 的结合程度降低, 这也是静态淬灭的典型特征之一。此外, 在 293 K 和 303 K 条件下, n 值分别为 0.85 和 0.80, 均接近 1, 表明胡桃醌对 Pin1 的结合只有一个结合位点。

药物与蛋白质之间的作用力主要有氢键, 范德华力, 疏水作用力和静电作用力, 它们可以通过 Van't Hoff 方程计算焓变 (ΔH), 熵变 (ΔS) 和吉布斯自由能 (ΔG) 来判断^[15]。公式如下所示:

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

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

$$\Delta S = -(\Delta G - \Delta H) / T \quad (5)$$

式中, K_a 为公式 2 中计算的结合常数; T 为实验温度; R 为气体常数。

表 1 胡桃醌与 Pin1 相互作用热力学参数

Table 1 Thermodynamic parameters between juglone and Pin1

Parameters	293 K	303 K
$K_{st}/(10^4 \text{ L/mol})$	1.36±0.01	0.66±0.01
$K_q/(10^{12} \text{ L/(mol·s)})$	1.36±0.01	0.66±0.01
R_{2a}	0.998	0.998
n	0.85±0.09	0.80±0.03
$K_a/(10^4 \text{ L/mol})$	2.32±0.06	1.20±0.04
R_{2b}	0.986	0.998
$\Delta G/(\text{kJ/mol})$	-24.49±0.06	-22.80±0.08
$\Delta H/(\text{kJ/mol})$	12.97±0.06	12.97±0.06
$\Delta S/(\text{J/(mol·K)})$	127.83±0.44	122.37±0.44

根据公式 3~5, 可以分别计算出 ΔH , ΔS 和 ΔG , 结果如表 1 所示。在 293 K 和 303 K 条件下, ΔG 分别为 -24.49 和 -22.80 kJ/mol, 表明胡桃醌与 Pin1 的结合是自发结合过程。根据 Ross 等归纳出来的热力学规律^[16,17]: 当 $\Delta H > 0$ 和 $\Delta S > 0$ 时, 作用力为疏水作用力; 当 $\Delta H < 0$ 和 $\Delta S > 0$ 时, 作用力为静电作用力; 当 $\Delta H < 0$ 和 $\Delta S < 0$ 时, 作用力为氢键和范德华力。在 293 K 条件下, ΔH 和 ΔS 分别是 12.97 kJ/mol 和 127.83 J/(mol·K)。这个结果表明胡桃醌与 Pin1 的结合过程中, 主要的作用力是疏水作用力。此外, 胡桃醌化学结构表明其有一个疏水性萘醌环组成, 并含有一个羟基。因此, 除了疏水作用力, 氢键作用也不应该排除, 详细的作用力类型将在对接模型和 MM/PBSA 结合自由能中进一步讨论。

2.2 同步荧光光谱检测胡桃醌对 Pin1 构象的影响

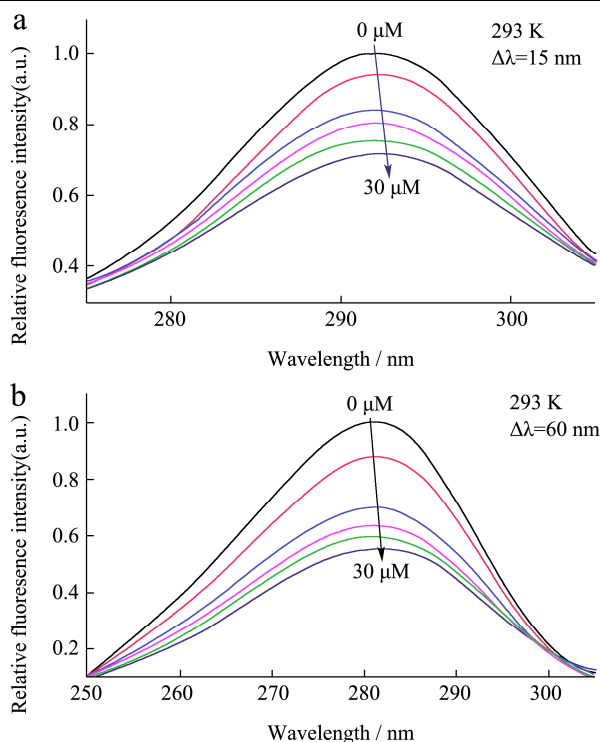


图 2 胡桃醌与 Pin1 相互作用同步荧光光谱。

Fig.2 Synchronous fluorescence spectra between juglone and Pin1

同步荧光光谱可以检测蛋白质中色氨酸或酪氨酸微环境构象的变化。当 $\Delta\lambda$ ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$) 分别等于 15 nm 和 60 nm 时, 分别表示色氨酸和酪氨酸同步荧光光谱。如图 2a 所示, 当 $\Delta\lambda = 15$ nm 时, 随着胡桃醌浓度的增大, 酪氨酸荧光强度逐渐降低, 表明胡桃醌可以淬灭酪氨酸内源荧光。并且, 最大发射波长从 291 nm 轻微红移至 293 nm, 表明酪氨酸残基周围微环境疏水性降低, 极性增加。如图 2b 所示, 当 $\Delta\lambda = 60$ nm 时, 随着胡桃醌浓度的增大, 色氨酸荧光强度逐渐降低, 表明胡桃醌可以淬灭色氨酸内源荧光。与酪氨酸同步荧光类似, 最大发射波长从 281 nm 轻微红移至 283 nm, 表明色氨酸残基周围微环境疏水性降低, 极性增加。

2.3 圆二色谱检测胡桃醌对 Pin1 二级结构的影响

圆二色谱是最常见的检测蛋白质二级结构变化的技术之一^[18,19]。如图 3 所示, Pin1 的圆二色谱在 208 和 222 nm 附近有两个负峰, 是典型的 α -螺旋结构。随着胡桃醌浓度的增加, 谱图中负峰强度减弱, 表明胡桃醌与 Pin1 结合会导致 Pin1 的 α -螺旋结构减少。可能是胡桃醌与 Pin1 中 α -螺旋结构中的氨基酸发生氢键缔合等作用, 引起 Pin1 空间变化, α -螺旋数量下

降^[20,21]。为了进一步定量 α -螺旋含量的变化,使用如下两个公式计算:

$$MRE_{208} = \frac{CD(mdeg)}{C_p n l \times 10} \quad (6)$$

$$\alpha-Helix(\%) = \frac{-MRE_{208} - 4000}{33000 - 4000} \times 100 \quad (7)$$

式中, C_p 表示Pin1摩尔浓度(10 μ M); n 表示Pin1氨基酸残基数(163); l 表示样品池的厚度(0.1 cm); MRE_{208} 表示蛋白质在208 nm处的平均残基椭圆率。

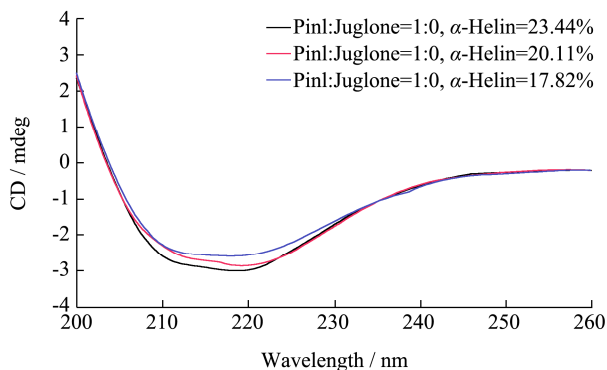


图3 胡桃醌与Pin1相互作用圆二色谱

Fig.3 Circular dichroism between juglone and Pin1

根据公式6和7,计算Pin1中 α -螺旋含量。如图3所示,当加入胡桃醌和Pin1的摩尔比分别为1:0、1:1和1:3时,对应的Pin1的 α -螺旋含量为23.44%、20.11%和17.82%。表明胡桃醌会导致Pin1中的 α -螺旋含量减少。同时谱图形状和峰尖位置没有明显变化,也进一步说明胡桃醌主要影响Pin1中的 α -螺旋结构。

2.4 分子对接预测胡桃醌与Pin1的结合模型

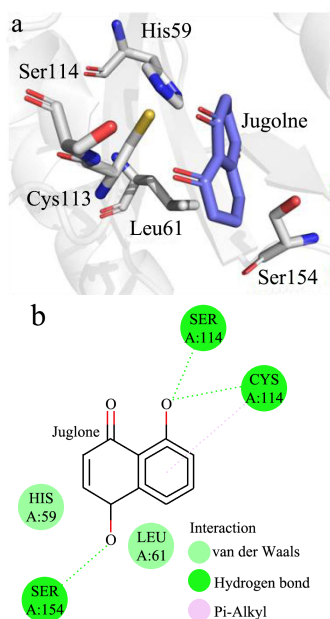


图4 胡桃醌与Pin1相互作用预测结合模型

Fig.4 Predicted binding model between juglone and Pin1

分子对接是最常见预测药物和蛋白结合的方法之一^[22-24]。利用 AutoDock Vina 对胡桃醌和 Pin1 进行分子对接,预测两者结合模型和作用机制。如图 4A 所示,胡桃醌进入 Pin1 疏水空腔中,并且与关键残基 His59、Leu61、Cys113、Ser114 和 Ser154 相互接触。为了进一步分析胡桃醌与 Pin1 中关键残基作用力类型,详细的结果展现在图 4B 中,胡桃醌与 Cys113、Ser114 和 Ser154 形成三个氢键,以及与 Cys113 形成一个 Pi-Alkyl 键(一种疏水作用力),与 His59 和 Leu61 形成范德华力。这个结果与热力学参数结论一致,表明胡桃醌与 Pin1 的作用力类型主要是疏水作用力,氢键和范德华力。

2.5 定点突变检测胡桃醌与Pin1的结合残基

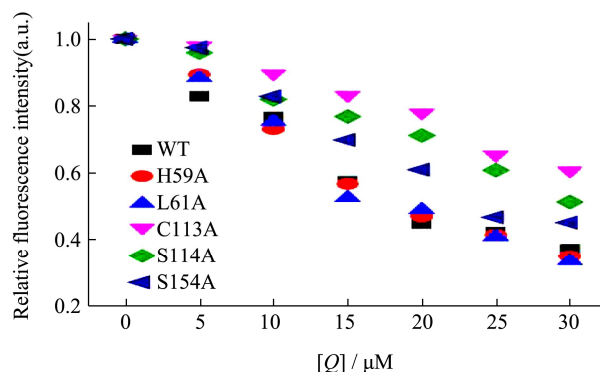


图5 胡桃醌对Pin1及其突变体荧光滴定结果

Fig.5 Fluorescence titration between juglone and Pin1 and mutants

为了进一步验证胡桃醌与 Pin1 相互作用的结合模型,采用定点突变技术将 His59、Leu61、Cys113、Ser114 和 Ser154 突变为丙氨酸残基。然后将胡桃醌滴加到 Pin1 野生型和突变体中,测量内源荧光光谱。如果突变体荧光滴定结果与 Pin1 野生型差异较大,表明该残基是胡桃醌主要作用残基,反之,则表明该残基不是关键残基。如图 5 所示,突变体 C113A 与 Pin1 野生型和其它突变体结果差异较大,表明胡桃醌结合的关键残基为 Cys113。这个结果与之前文献报道是一致的,进一步揭示胡桃醌结合 Cys113 残基,导致 Pin1 酶活降低^[7]。

2.6 分子动力学模拟

分子动力学模拟可以模拟药物与蛋白在生理状态下,随时间变化的结合情况^[25]。均方根偏差(RMSD)可以反映药物与蛋白结合稳定性。如图6a所示,Pin1-胡桃醌(Pin1-Juglone)体系和Pin1体系在20 ns模拟时间中,RMSD值变化幅度不大,表明胡桃醌可以稳定的结合到Pin1中。然而,C113A-胡桃醌(C113A-

Julgone) 体系在模拟时间内, RMSD值变化幅度明显大于Pin1-胡桃醌和Pin1体系, 表明Cys113残基突变会影响胡桃醌对Pin1的结合。这个结果印证了突变体荧光滴定实验, 进一步表明胡桃醌结合的关键残基是Cys113。均方根波动(RMSF)可以反映药物与蛋白结合的柔韧性。如图6c所示, Pin1-胡桃醌体系中的His59、Leu61、Cys113、Ser114和Ser154的RMSF明显低于Pin1体系, 表明胡桃醌可以稳定的结合到这些关键残基。

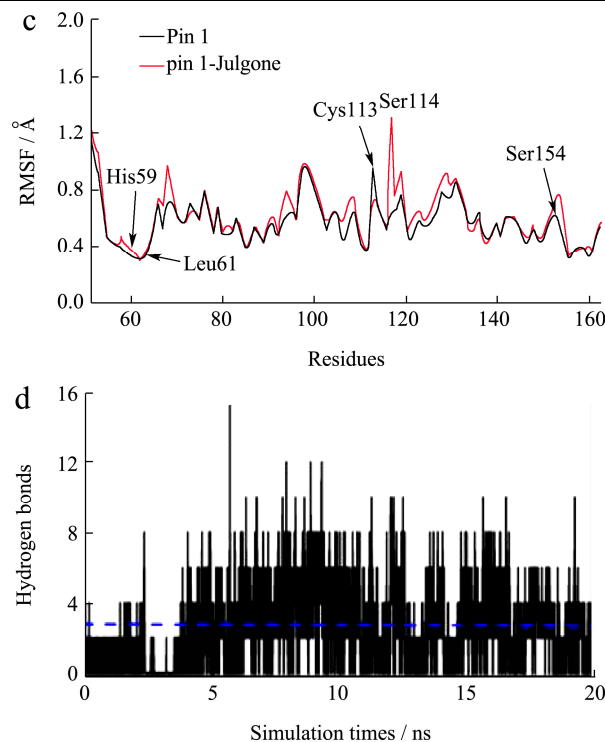
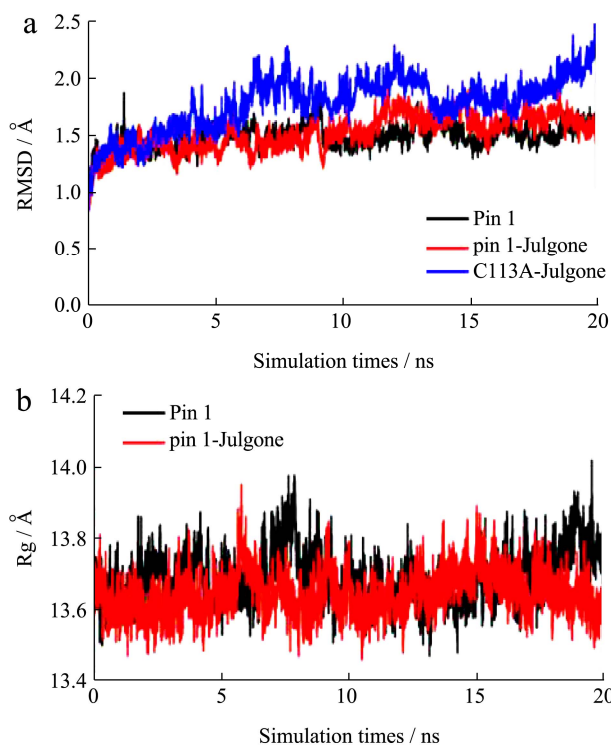


图6 胡桃醌对Pin1的分子动力学模拟

Fig.6 Molecular dynamics simulation between juglone and Pin1

蛋白质回旋半径(Rg)能反映药物与蛋白结合的紧凑程度。如图6b, Pin1-胡桃醌体系的Rg值略微低于Pin1体系, 表明胡桃醌结合到Pin1, 促使其结构变得略紧凑。药物与蛋白结合关键作用力之一是氢键, 分析氢键的变化能揭示结合的稳定性。如图6d, Pin1-胡桃醌体系的氢键在模拟时间内一直存在, 且平均值为2.51, 非常接近对接模型的结果, 表明氢键是胡桃醌与Pin1的作用力之一。

表2 MM/PBSA 结合自由能分析(kJ/mol)

Table 2 Analysis of binding energy using MM/PBSA method

System	ΔE_{vdw}	ΔE_{ele}	ΔG_{polar}	$\Delta G_{nonpolar}$	ΔG_{bind}
Pin1-Julgone	-78.36 ± 4.87	-1.05 ± 0.58	22.69 ± 3.78	-6.38 ± 0.42	-62.93 ± 2.21
C113A-Julgone	-18.23 ± 4.18	-2.07 ± 0.60	7.41 ± 5.02	-1.66 ± 0.39	-14.54 ± 5.14

使用MM/PBSA方法, 预测了Pin1-胡桃醌和C113A-胡桃醌体系结合自由能。如表2所示, Pin1-胡桃醌和C113A-胡桃醌体系的结合自由能(ΔG_{bind})分别为-62.93和-14.54 kJ/mol, 表明Cys113残基突变会显著性减少结合自由能。此外, Pin1-胡桃醌体系中的范德华能(ΔE_{vdw}), 电势能(ΔE_{ele}), 极性溶剂能(ΔG_{polar})和非极性溶剂能($\Delta G_{nonpolar}$)分别为-78.36 kJ/mol, -1.05 kJ/mol, 22.69 kJ/mol和-6.38 kJ/mol。表明胡桃醌结合到Pin1过程中, 范德华力具有十分重要的作用。此外, Pin1-胡桃醌体系中的非极性自由能($\Delta E_{vdw} + \Delta G_{nonpolar}$)和极性自由能($\Delta E_{ele} + \Delta G_{polar}$)分别为-84.74和21.69 kJ/mol。表明胡桃醌结合到Pin1过程中, 非极性自由能利于结合, 而极性自由能不利于结合。

3 结论

本文通过荧光光谱, 圆二色谱, 分子对接和分子动力学模拟等技术, 研究胡桃醌与Pin1的相互作用。荧光光谱结果表明, 胡桃醌对Pin1的荧光淬灭机制是典型的静态淬灭, 两者形成Pin1-胡桃醌复合物。同步荧光光谱表明, 胡桃醌结合到Pin1过程中淬灭了色氨酸和酪氨酸内源荧光, 最大波长轻微红移, 导致其构象改变。此外, 圆二色谱结果表明, 胡桃醌结合到Pin1中, 导致 α -螺旋含量降低。热力学参数, 分子对接和分子动力学模拟结果表明, 胡桃醌结合到Pin1过程中, 疏水作用力, 氢键和范德华力是最要作用力。对接模型, 突变体荧光滴定和分子动力学模拟结果揭示

了胡桃醌主要作用于 Cys113 残基。本研究提供了 Pin1 与胡桃醌相互作用的一些数据, 有助于进一步了解胡桃醌对 Pin1 抑制机理, 为综合利用我国胡桃楸和核桃资源开发功能性食品、药品提供一定的科学依据。

参考文献

- [1] Strugstad M, Despotovski S. A summary of extraction, synthesis, properties, and potential uses of juglone: a literature review [J]. *Journal of Ecosystems and Management*, 2013, 13(3): 1-16
- [2] Ahmad T, Suzuki Y J. Juglone in oxidative stress and cell signaling [J]. *Antioxidants*, 2019, 8(4): 91
- [3] 申炳俊,柳婷婷.光谱法和分子对接技术研究胡桃醌与人血清白蛋白的相互作用[J].*分析化学*,2020,48(10):1383-1391
SHEN Bing-Jun, LIU Ting-Ting. Spectroscopy and molecular docking technique for investigation of interaction between juglone and human serum albumin [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2020, 48(10): 1383-1391
- [4] Cheng-han L, Hao-yi L, Yu-cheng L, et al. Landscape of Pin1 in the cell cycle [J]. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood, NJ), 2015, 240(3): 403-408
- [5] Theuerkorn M, Fischer G, Schiene-fischer C. Prolyl cis/trans isomerase signalling pathways in cancer [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2011, 11(4): 281-28
- [6] Lu Z, Hunter T. Prolyl isomerase Pin1 in cancer [J]. *Cell Res*, 2014, 24(9): 1033-49
- [7] Moore J D, Potter A. Pin1 inhibitors: pitfalls, progress and cellular pharmacology [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2013, 23(15): 4283-4291
- [8] Sengupta P, Sardar P S, Roy P, et al. Investigation on the interaction of Rutin with serum albumins: insights from spectroscopic and molecular docking techniques [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2018, 183: 101-110
- [9] Wu J, Bi S, Sun X, et al. Study on the interaction of fisetholz with BSA/HSA by multi-spectroscopic, cyclic voltammetric, and molecular docking technique [J]. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2019, 37(13): 3496-505
- [10] Bernstein F C, Koetzle T F, Williams G J, et al. The protein data bank: a computer-based archival file for macromolecular structures [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1977, 80(2): 319-324
- [11] Irwin J J, Shoichet B K. Zinc-a free database of commercially available compounds for virtual screening [J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2005, 45(1): 177-182
- [12] Seeliger D, De Groot B L. Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina [J]. *J Comput Aided Mol Des*, 2010, 24(5): 417-22
- [13] Pronk S, Pall S, Schulz R, et al. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit [J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(7): 845-54
- [14] 张静,米佳,禄璐,等.黑果枸杞花色苷提取物对胰脂肪酶活性的影响[J].*食品科学*,2020,41(5):8-14
ZHANG Jing, MI Jia, LU Lu, et al. Effect of Anthocyanins extract from *Lycium ruthenicum* Murr. fruit on pancreatic lipase activity [J]. *Food Science*, 2020, 41(5): 8-14
- [15] 田康永,杨吕清,胡慧慧,等.[C4mim]BF₄、[C4Py]Cl 离子液体与木瓜蛋白酶相互作用的荧光光谱分析和分子对接[J].*食品科学*,2020,41(23):15-20
TIAN Kang-yong, YANG Lü-qing, HU Hui-hui, et al. Fluorescence spectroscopic and molecular docking studies of interaction between [C4mim]BF₄ or [C4Py]Cl ionic liquids and papain [J]. *Food Science*, 2020, 41(23): 15-20
- [16] Ross P D, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability [J]. *Biochemistry*, 1981, 20(11): 3096-3102
- [17] 张洁怡,陈艳豪,王凌琴,等.白背三七中黄酮类药物对牛血清白蛋白结构影响的研究[J].*当代化工研究*,2017,10:141-142
ZHANG Jie-yi, CHEN Yan-hao, WANG Ling-qin, et al. Study on the effect of flavonoids on the structure of bovine serum albumin in white back radix notoginseng [J]. *Modern Chemical Research*, 2017, 10: 141-142
- [18] 李庆舒,程琳,邓红,等.三种多酚与牛血清蛋白相互作用的初步研究[J].*食品与发酵工业*,2020,46(3):180-187
LI Qing-shu, CHENG Lin, DENG Hong, et al. Study of interactions between three polyphenols and bovine serum albumin [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(3): 180-187
- [19] 张莉,刘倩倩,吴长玲,等.多酚与蛋白质相互作用研究方法进展[J].*食品工业科技*,2018,39(24):340-345
ZHANG Li, LIU Qian-qian, WU Chang-ling, et al. Progress in research methods for the interaction between polyphenols and proteins [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(24): 340-345

(下转第 159 页)