

GSH 对两种谷胱甘肽过氧化物酶模拟物活性影响的研究

郑清川¹, 吕绍武², 赵勇山¹, 牟颖², 罗贵民², 孙家锺¹

(1. 吉林大学理论化学研究所, 理论化学计算国家重点实验室,
2. 分子酶学工程教育部重点实验室, 长春 130023)

摘要 设计并合成了谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)模拟物 6A,6A'-二苯胺-6B,6B'-二硒桥联- β -环糊精(6-AnSeCD). 采用双酶偶联法测定 GPX 的活力结果显示, 6A,6A'-二苯胺-6B,6B'-二硒桥联- β -环糊精(6-CySeCD)催化谷胱甘肽还原 H_2O_2 和 枯烯 H_2O_2 的活力均比 6-AnSeCD 的高. 为了进一步考察 6-CySeCD 和 6-AnSeCD 与 GSH 之间的相互作用, 进行了分子动力学(MD)模拟和分子对接研究. 结果表明, 与 GSH 的结合使 GPX 模拟物的构象发生变化, 这种改变可能是影响桥连 GPX 模拟物催化活性的关键因素.

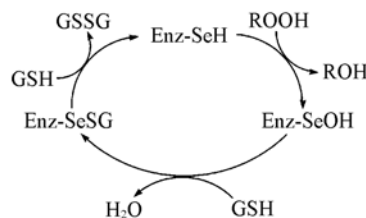
关键词 谷胱甘肽过氧化物酶; 模拟物; 分子动力学模拟; 分子对接

中图分类号 O641

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2008)12-2337-04

谷胱甘肽过氧化物酶(Gluathione peroxidase, GPX, EC. 1. 11. 1. 9)是生物体内重要的含硒酶, 能够有效地清除新陈代谢产生的活性氧(Reactive oxygen species, ROS)(见 Scheme 1), 保护脂膜和其它细胞组分的结构和功能, 维持组织内的氧化代谢平衡^[1-3], 是生物体内最重要的抗氧化酶之一. 近年来, 为了阐明其催化机制及其潜在的药用价值, 对 GPX 模拟物的研究已引起了科学家们的广泛关注^[4]. 基于对 GPX 结构及其分子识别和催化模型的相关研究^[5], 构建具有对硫基底物特异结合能力的结合部位, 并将功能硒基团合理装配到结合部位, 是产生高效 GPX 模拟物的关键, 可通过单克隆抗体技术、生物印记技术和天然酶化学修饰^[5]等实现. 我们已合成了多种以 β -环糊精(β -CD)的疏水空腔为底物结合部位的 GPX 模拟物^[6-8], 最近又合成了 6A,6A'-二苯胺-6B,6B'-二硒桥联- β -环糊精(6-Cy-SeCD)^[9], 即将环己胺基团引入到其分子中的硒原子附近, 并且 β -CD 的疏水空腔发挥底物结合部位的作用. 6-CySeCD 催化谷胱甘肽(GSH)还原 H_2O_2 , 叔丁基过氧化氢(*t*-BuOOH)和枯烯过氧化氢(CumOOH)的 GPX 活性均高于 6-SeCD^[6], 表明亚胺基引入到硒原子附近可以增加硒负离子过渡态的稳定性, 从而增强含硒 GPX 模拟物的活性. 基于此, 本文设计合成了新的 GPX 模拟物 6-AnSeCD, 并通过分子动力学模拟的方法^[10]研究了两种 GPX 模拟物(6-CySeCD, 6-AnSeCD)与 GSH 的相互作用.



Scheme 1 Catalytic cycle of native GPX

1 实验与理论计算方法

1.1 仪器与试剂

Bruker IFS 66 真空型傅里叶变换红外光谱仪(德国 Bruker 公司); Unity-400 核磁共振仪(美国 Vacuum Generator 公司); 240-DS 元素分析仪(美国 Perkin-Elmer 公司); ESCALAB MK II X 射线光电子能谱仪(英国 VG 公司); Shimadzu UV-2550 分光光度计(日本岛津公司). 硼氢化钠、硒粉、1,3 苯二磺酰氯、GSH、CumOOH 和 NADPH 均购自 Sigma 公司; Sephadex G-25 购自 Pharmacia 公司. β -CD(上海三

收稿日期: 2008-09-19.

基金项目: 高等学校博士点学科专项基金(批准号: 20070183046)资助.

联系人简介: 孙家锺, 男, 教授, 博士生导师, 中国科学院院士, 主要从事量子化学研究. E-mail: zhengqch@jlu.edu.cn

普化学试剂公司)用水重结晶3次,于120 °C真空干燥12 h. 其余试剂均为分析纯,北京化学试剂厂.

1.2 6-AnSeCD的合成

将2 g 6A,6B-二碘代-6A,6B-双脱氧- β -环糊精^[11]和150 μ L苯胺溶解于30 mL干燥的二甲基甲酰胺(DMF)中,于45 °C下搅拌4 h. 将DMF减压蒸干后,将剩余物溶解在45 mL磷酸钾缓冲液(50 mmol/L, pH = 7.0)和30 mL DMF的混合溶剂中. 通入高纯N₂气除氧30 min后,加入1 mol/L的NaHSe溶液^[12]15 mL,于60 °C反应40 h. 反应体系充分暴露在空气中氧化后,以8000 r/min离心10 min,取上清液. 用超纯水作洗脱液,经Sephadex G-25柱层析(ϕ 2 cm, 60 cm)纯化(λ = 254 nm),收集第一峰的溶液并进行冻干. 干粉用无水乙醚洗涤3次,真空干燥得到黄色粉末,产率为19%. 用元素分析仪、IR和¹³C NMR进行分析6-AnSeCD的结构. 硒的价态和含量通过X射线光电子能谱鉴定,激发X射线的能量1253.6 eV(Mg, K α), C_{1s} = 285.0 eV作为标准,共扫描10次.

1.3 GPX的活力测定

GPX活力(GPX活力单位定义为在37 °C时每分钟消耗1 μ mol/L NADPH所需要模拟物的量)测定采用Wilson等^[13]的双酶偶联测定法. 反应体系中含有1 mmol/L GSH, 0.25 mmol/L NADPH, 1U的谷胱甘肽还原酶, 0.5 mmol/L 氢过氧化物(H₂O₂或者CumOOH), 5 μ mol/L GPX模拟物, 0.1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L NaN₃和50 mmol/L pH = 7.0的磷酸缓冲溶液(PBS). 在37 °C下保温,先向反应池中依次加入350 μ L PBS, 70 μ L GSH溶液, 70 μ L 谷胱甘肽还原酶和70 μ L GPX模拟物,混合物在37 °C下保温7 min. 然后加入70 μ L NADPH溶液,最后加入70 μ L 氢过氧化物启动反应. 用含有0.2% Triton X-100的PBS溶解有机氢过氧化物(CumOOH),用Triton X-100助溶,它并不影响GPX的活力. 模拟物的活力由在340 nm($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6220 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)处NADPH光吸收值的降低决定. 以缓冲液代替人工酶作为空白以消除非酶促反应.

1.4 分子动力学模拟和分子对接

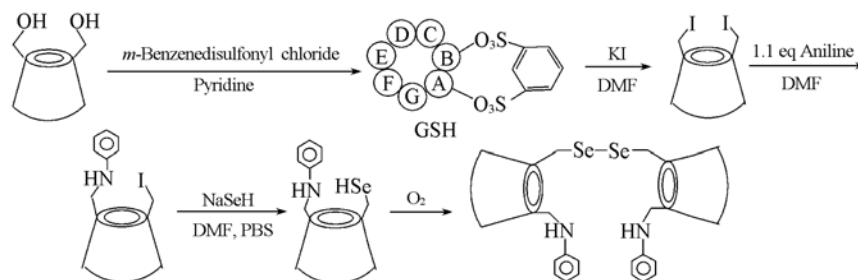
理论计算均在SGI O38600工作站上使用Insight II软件包^[14]完成. 用硫原子代替硒原子, β -CD的初始三维(3D)结构模型来源于三维晶体结构^[15],并经过200步能量最小化和100 ps的分子动力学模拟. 分子力学优化和分子动力学模拟采用CVFF力场(Consistent-valence forcefield). 用TIP3P水模型^[16]作为溶剂化模型. 在 β -CD的结构基础上经化学修饰得到6-CySeCD和6-AnSeCD的结构模型,进行200步能量最小化和500 ps的分子动力学模拟后,借助Affinity程序^[17]进行分子对接研究.

2 结果与讨论

2.1 6-AnSeCD的合成与表征

6-AnSeCD的合成路线见Scheme 2. 6-AnSeCD的元素分析理论值(计算值, %): C 43.61(43.31), H 5.36(5.18), N 1.06(1.14). IR(KBr), $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3382(—OH), 2925(CH, CH₂), 1641, 1566, 1509(Ar), 1437(—NH—), 1158, 1079, 1031(—O—), 948, 840, 755, 709, 579. ¹³C NMR(400 MHz, D₂O), δ : 148.9(C-7), 129.5(C-9), 117.9(C-10), 114.2(C-8), 102.6(C-1), 82.2(C-4), 73.5(C-3), 72.9(C-5), 72.4(C-2), 60.4(C-6), 59.3(C-6').

6-AnSeCD中硒的价态和含量通过X射线光电子能谱法测定. 结果显示,6-CySeCD中的Se_{3d}电子



Scheme 2 Synthetic route of 6-AnSeCD

结合能量为 54.9 eV, 接近硒代半胱氨酸(SeCys)中 Se_{3d} 的电子结合能 55.1 eV, 这个结果表明, 模拟物中硒元素以双硒桥(—Se—Se—)形式存在. 实验测得 C/Se 原子比为 47.7:1 (计算值 48:1), 这表明 1 mol 模拟物中含有 2 mol 的硒. 6-AnSeCD 的结构如 Scheme 3 所示.

2.2 6-CySeCD 的 GPX 活力

合成了 3 种以环糊精为底物结合部位的 GPX 模拟物(6-AnSeCD, 6-SeCD^[6] 和 6-CySeCD^[9]), 在谷胱甘肽还原酶和 NADPH 存在下, 测定了它们的 GPX 活力. 该反应初始速率可以通过跟踪 NADPH 在 340 nm 的吸收变化[式(1)和(2)]来获得. 6-AnSeCD 和其它模拟物的 GPX 活性列于表 1 中.

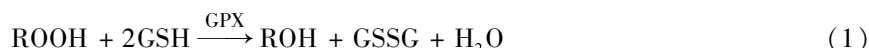


Table 1 Comparison between GPX activities of the 6-AnSeCD-catalyzed reduction of hydroperoxides by GSH and other species

Mimic	Hydroperoxide	Activity/min ⁻¹	Mimic	Hydroperoxide	Activity/min ⁻¹
6-SeCD	H ₂ O ₂	4.20 ± 0.15 ^[9]	6-CySeCD	CumOOH	18.3 ± 0.5 ^[9]
	CumOOH	10.7 ± 0.4 ^[9]		6-AnSeCD	H ₂ O ₂
6-CySeCD	H ₂ O ₂	7.9 ± 0.4 ^[9]			CumOOH

6-AnSeCD 催化 GSH 还原 H₂O₂ 和 CumOOH 的 GPX 活力分别是 6.1 和 13.2 min⁻¹, 均明显比 6-SeCD 催化还原相应过氧化物的低. 对 6-CySeCD^[9] 的研究结果表明, 由于将分子中环己胺基团引入到硒原子附近增加了硒负离子(为亲核性过渡态)的稳定性, 因此 6-CySeCD 的 GPX 活力明显比 6-SeCD 的高. 实验中将苯胺基团引入到 6-AnSeCD 的活性硒原子附近, 6-AnSeCD 催化 GSH 还原 H₂O₂ 和 CumOOH 的 GPX 活力也比 6-SeCD 催化还原相应过氧化物的低, 获得了与 6-CySeCD 相似的结果.

从表 1 可以看到, 6-CySeCD 的 GPX 活力比 6-AnSeCD 的高, 其催化 GSH 还原 H₂O₂ 和 CumOOH 的 GPX 活力分别为 7.9 和 18.3 min⁻¹. 这可能是由于 6-CySeCD 中引入的环己胺是柔性基团, 底物分子可以很容易地接近环糊精的空腔, 进行分子识别并结合, 从而保证催化反应顺利进行. 而 6-AnSeCD 分子中的苯胺则是刚性基团, 在空间上阻碍了底物分子的接近, 从而影响了催化反应的进行.

为了进一步阐明 6-CySeCD 和 6-AnSeCD 活力不同的原因, 进行了分子动力学模拟和分子对接研究. 采用双酶偶联法^[13]测定 GPX 活力时, 首先将硫基底物和模拟物在 37 °C 下保温 7 min (实验中硫基底物是 GSH, 模拟物是 6-CySeCD 或 6-AnSeCD). 在这段时间里未加入启动反应的氢过氧化物, 模拟物分子中的环糊精发挥底物结合部位的作用, 其空腔能够和硫基底物互相识别, 模拟物-硫基底物复合物(酶-底物复合物)不断形成, 即 6-CySeCD 或 6-AnSeCD 与 GSH 的复合物不断形成. 因此, 可通过理论计算考察模拟物 6-CySeCD 和 6-AnSeCD 分别与 GSH 作用的情况.

2.3 分子动力学模拟和分子对接

6-CySeCD 和 6-AnSeCD 的动力学模拟结果见图 1(A) 和 (B), 它们分别与 GSH 形成的复合物列于图 2(A) (复合物 6-CySeCD-GSH, C—G) 和 (B) (复合物 6-AnSeCD-GSH, A—G). 比较模拟物与 GSH

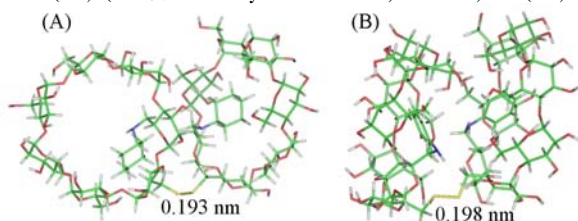
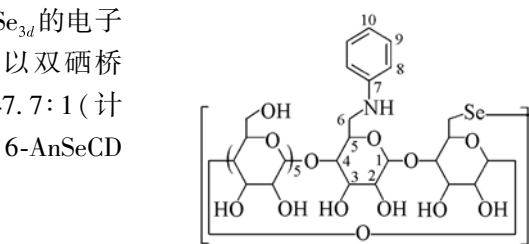


Fig. 1 Final 3D-structure of the 6-CySeCD (A) and 6-AnSeCD (B)



Scheme 3 Structure of 6-AnSeCD

其它模拟物的 GPX 活性列于表 1 中.



Table 1 Comparison between GPX activities of the 6-AnSeCD-catalyzed reduction of hydroperoxides by GSH and other species

Mimic	Hydroperoxide	Activity/min ⁻¹	Mimic	Hydroperoxide	Activity/min ⁻¹
6-SeCD	H ₂ O ₂	4.20 ± 0.15 ^[9]	6-CySeCD	CumOOH	18.3 ± 0.5 ^[9]
	CumOOH	10.7 ± 0.4 ^[9]		6-AnSeCD	H ₂ O ₂
6-CySeCD	H ₂ O ₂	7.9 ± 0.4 ^[9]			CumOOH

6-AnSeCD 催化 GSH 还原 H₂O₂ 和 CumOOH 的 GPX 活力分别是 6.1 和 13.2 min⁻¹, 均明显比 6-SeCD 催化还原相应过氧化物的低. 对 6-CySeCD^[9] 的研究结果表明, 由于将分子中环己胺基团引入到硒原子附近增加了硒负离子(为亲核性过渡态)的稳定性, 因此 6-CySeCD 的 GPX 活力明显比 6-SeCD 的高. 实验中将苯胺基团引入到 6-AnSeCD 的活性硒原子附近, 6-AnSeCD 催化 GSH 还原 H₂O₂ 和 CumOOH 的 GPX 活力也比 6-SeCD 催化还原相应过氧化物的低, 获得了与 6-CySeCD 相似的结果.

从表 1 可以看到, 6-CySeCD 的 GPX 活力比 6-AnSeCD 的高, 其催化 GSH 还原 H₂O₂ 和 CumOOH 的 GPX 活力分别为 7.9 和 18.3 min⁻¹. 这可能是由于 6-CySeCD 中引入的环己胺是柔性基团, 底物分子可以很容易地接近环糊精的空腔, 进行分子识别并结合, 从而保证催化反应顺利进行. 而 6-AnSeCD 分子中的苯胺则是刚性基团, 在空间上阻碍了底物分子的接近, 从而影响了催化反应的进行.

为了进一步阐明 6-CySeCD 和 6-AnSeCD 活力不同的原因, 进行了分子动力学模拟和分子对接研究. 采用双酶偶联法^[13]测定 GPX 活力时, 首先将硫基底物和模拟物在 37 °C 下保温 7 min (实验中硫基底物是 GSH, 模拟物是 6-CySeCD 或 6-AnSeCD). 在这段时间里未加入启动反应的氢过氧化物, 模拟物分子中的环糊精发挥底物结合部位的作用, 其空腔能够和硫基底物互相识别, 模拟物-硫基底物复合物(酶-底物复合物)不断形成, 即 6-CySeCD 或 6-AnSeCD 与 GSH 的复合物不断形成. 因此, 可通过理论计算考察模拟物 6-CySeCD 和 6-AnSeCD 分别与 GSH 作用的情况.

2.3 分子动力学模拟和分子对接

6-CySeCD 和 6-AnSeCD 的动力学模拟结果见图 1(A) 和 (B), 它们分别与 GSH 形成的复合物列于图 2(A) (复合物 6-CySeCD-GSH, C—G) 和 (B) (复合物 6-AnSeCD-GSH, A—G). 比较模拟物与 GSH

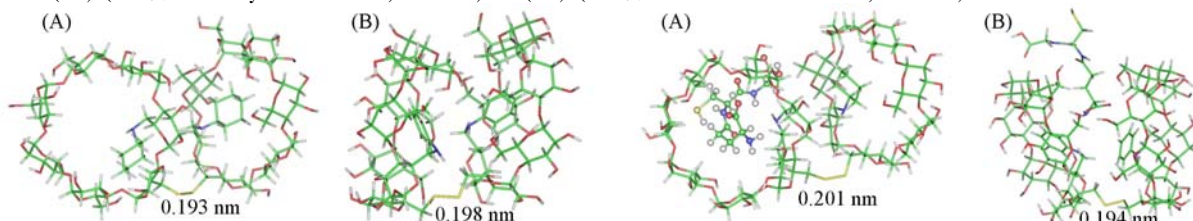


Fig. 2 Stereos picture of the 3D-structure of 6-CySeCD-GSH (A) and 6-AnSeCD-GSH (B)

结合前后的构象可以看出,在复合物 C—G 中底物 GSH 和环糊精分子很好地识别并进入其空腔中,而复合物 A—G 中 6-AnSeCD 分子上的苯胺占据了环糊精空腔的部分空间,阻碍了底物 GSH 进入环糊精的空腔进行分子识别与结合.另一方面,S—S 键长在 6-CySeCD 中为 0.193 nm,而在复合物 C—G 中为 0.201 nm,S—S 键长变长了,由此可以推测,由于 GSH 的作用而使得 S—S 键有断裂的趋势;而对于 6-AnSeCD,由于 GSH 的作用,使 S—S 键从 0.198 nm 缩短到了 0.194 nm,由此可见引入 GSH 不会造成 S—S 键断裂.由以上分析可以看出,底物 GSH 有利于 6-CySeCD 分子中敏感键(—Se—Se—)的断裂而进入催化循环,从而表现出比 6-AnSeCD 高的 GPX 活性.这一理论结果可以解释两种模拟物的活力测定结果.分别对比图 1 和图 2 可看到,当 GPX 与 GSH 相互作用时,GPX 模拟物的构象发生了较大的变化.在模拟物中这种结合-诱导的拉伸/扭曲可能是改进小分子 GPX 模拟物催化效率的关键因素.

参 考 文 献

- [1] Flohé L. . *Curr. Top. Cell. Regul.* [J], 1985, **27**: 473—478
- [2] Reich H. J. , Jasperse C. P. . *J. Am. Chem. Soc.* [J], 1987, **109**: 5549—5555
- [3] Ganther H. E. , Kraus R. J. . *Methods. Enzymol.* [J], 1984, **107**: 593—602
- [4] Muges G. , du Mont W. W. , Sies H. . *Chem. Rev.* [J], 2001, **101**: 2125—2180
- [5] Luo G. , Ren X. , Liu J. , *et al.* . *Curr. Med. Chem.* [J], 2003, **10**: 1151—1183
- [6] Liu J. , Gao S. , Luo G. , *et al.* . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* [J], 1998, **247**: 397—400
- [7] Ren X. , Xue Y. , Zhang K. , *et al.* . *FEBS. Lett.* [J], 2001, **507**: 377—380
- [8] Dong Z. , Huang X. , Mao S. , *et al.* . *Chemistry*[J], 2006, **12**: 3575—3579
- [9] Lv S. , Wang X. , Mu Y. , *et al.* . *FEBS. J.* [J], 2007, **274**: 3846—3854
- [10] ZHENG Xi-Liang(郑喜亮), ZHANG Hong-Xing(张红星), SUN Chia-Chung(孙家钟), *et al.* . *Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)*[J], 2006, **27**(7): 1298—1302
- [11] Iwao T. , Yasuhisa K. , Tadashi M. . *J. Am. Chem. Soc.* [J], 1986, **108**: 4514—4518
- [12] Klayman D. L. , Griffin T. S. . *J. Am. Chem. Soc.* [J], 1973, **95**: 197—199
- [13] Wilson S. R. , Zucker P. A. , Huang R. R. C. , *et al.* . *J. Am. Chem. Soc.* [J], 1989, **111**: 5936—5939
- [14] *Insight II User Guide*[CP], San Diego: Molecular Simulation Inc. , 2000
- [15] Betzel C. , Saenger C. , Hingerty B. E. , *et al.* . *J. Am. Chem. Soc.* [J], 1984, **106**: 7545—7557
- [16] Jorgensen W. L. , Chandrasekhar J. , Madura J. D. , *et al.* . *J. Chem. Phys.* [J], 1983, **79**: 926—935
- [17] *Affinity User Guide*[CP], San Diego: MSI, 1999

Effects of GSH on the Activity of Two Glutathione Peroxidase Mimics

ZHENG Qing-Chuan¹, LÜ Shao-Wu², ZHAO Yong-Shan¹, MU Ying²,
LUO Gui-Min², SUN Chia-Chung^{1*}

(1. *State Key Laboratory of Theoretical and Computational Chemistry, Institute of Theoretical Chemistry, Changchun 130023, China*; 2. *Key Laboratory for Molecular Enzymology and Engineering of the Ministry of Education, Jilin University, Changchun 130021, China*)

Abstract 6A,6A'-dianilino-6B,6B'-diselenide-bis- β -cyclodextrin(6-AnSeCD) was designed and synthesized to imitate the antioxidant enzyme glutathione peroxidase (GPX). The GPX activities of 6-AnSeCD and 6A,6A'-dicyclohexylamine-6B,6B'-diselenide-bis- β -cyclodextrin(6-CySeCD) were assessed in classical coupled reductase assay. 6-CySeCD exhibits better GPX activity than 6-AnSeCD in the reduction of H₂O₂ and cumenyl hydroperoxide by glutathione, respectively. And then, with the molecular dynamics(MD) simulations, the interaction between GPX mimics(6-CySeCD and 6-AnSeCD) and GSH were investigated. The MD results show great differences in the conformation and bond lengths between the each GPX mimics and the its substrate-enzyme complex, which demonstrate the possibility that such change might be the key factor for the bridge GPX mimics' catalysis.

Keywords Glutathione peroxidase; Mimic; Molecular dynamics simulation; Docking (Ed.: S, I)