

研究论文

分子动力学模拟二硫键对胰岛素 构象稳定性的影响

杨 程, 卢滇楠, 张敏莲, 刘 铮
(清华大学化学工程系, 北京 100084)

摘要: 采用分子动力学模拟考察了二硫键对天然态和还原态胰岛素构象稳定性的影响。结果表明: 天然态胰岛素中的二硫键限制了其 A 链和 B 链的相对运动, 有助于稳定胰岛素的主链构象以及胰岛素活性位点的构象。对于还原态胰岛素而言, 失去二硫键使其 A 链和 B 链解离, B 链的中心螺旋趋于失稳, 而导致活性位点构象变化。上述分子模拟结果与文献报道的实验结果相符, 从分子水平上揭示了二硫键对于胰岛素构象稳定性的影响机制, 对胰岛素药物的制剂、储存和应用等具有指导意义。

关键词: 胰岛素; 二硫键; 分子动力学模拟

中图分类号: O 629.73; TQ 936.21

文献标识码: A

文章编号: 0438-1157 (2010) 04-0929-06

Molecular dynamics simulation of impact of disulfide bridge on conformational stability of insulin

YANG Cheng, LU Diannan, ZHANG Minlian, LIU Zheng

(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Molecular dynamics simulation of the impact of disulfide bond on the conformational stability of native and reduced insulin was conducted at all-atom level. It was shown that disulfide bond restricted the relative motion of chain A and chain B in native insulin and thus strengthened the conformational stability for both the domain and active site. For reduced insulin without the native disulfide bonds, the conformation of the activate site altered while chain A and chain B dissociated. Moreover, the simulation suggested that the central helix in chain B would be unstable after disengaging the disulfide bonds, *i. e.*, the deactivation was irreversible. The above described simulation reproduced the experimental observations reported in the literatures, and established a molecular insight into the impact of disulfide bonds on the conformational stability of insulin, and would be of fundamental importance to the processing, formulating and pharmaceutical application of insulin.

Key words: insulin; disulfide bond; molecular dynamics simulation

引 言

胰岛素在调节生物体内血糖水平、维持生物体

正常代谢的过程中发挥着关键作用, 是糖尿病临床治疗的重要药物之一。胰岛素单体由 A、B 两条链组成, A 链含 21 个氨基酸, B 链含 30 个氨基酸。

2009-05-31 收到初稿, 2009-12-10 收到修改稿。

联系人: 刘铮。第一作者: 杨程 (1986—), 男, 博士研究生。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20706032)。

Received date: 2009-05-31.

Corresponding author: Prof. LIU Zheng, liuzheng@mail.tsinghua.edu.cn

Foundation item: supported by the National Natural Science Foundation of China (20706032).

天然胰岛素由动物胰腺中的 β 细胞合成, 在锌离子的辅助下以六聚体的形式稳定储存, 在需要时以单体的形式释放到血液中, 发挥其生物功能^[1]。

天然态单体胰岛素分子内部含有 3 个二硫键, 分别为 CysA6-CysA11、CysA7-CysB7、CysA20-CysB19, 它们在折叠过程中自动识别并成键。已有的研究表明, 天然胰岛素的 A 链和 B 链自身已经包含了足够的折叠信息, 可促使二硫键正确搭配^[2-3]。Katsoyannis 等^[4]将胰岛素的 CysA7 和 CysA20 分别置换成高半胱氨酸 (homocysteine), 从而切断胰岛素两条链间的二硫键, 所得产物不再具备天然胰岛素的生物活性。Tang 等^[5]将胰岛素中的 CysA6 和 CysA11 分别突变为丝氨酸, 得到的产物虽呈现与天然胰岛素相同的免疫原性, 但却基本丧失了与受体结合的能力。Hua 等^[6-7]表达了 DKP-胰岛素, 在保证胰岛素以单体形式存在的情况下得到了 Tang 所述的突变体, 结构检测显示缺失了 CysA6-CysA11 二硫键的胰岛素 A 链 N 端螺旋发生解旋, 由此推测 A1~A8 残基在胰岛素生物功能的实现上起到关键作用^[8-9]。Chang 等^[10]将胰岛素中的每对二硫键分别突变为丝氨酸, 突变体不仅丧失了活性, 同时二级结构的含量也有不同程度的降低。上述结果均显示胰岛素在缺失二硫键之后基本无法维持其生物功能。但由于实验手段的限制, 胰岛素中的二硫键被切断之后, 胰岛素分子构象的变化行为以及其失活的微观原因迄今并未得到满意的阐释。

分子模拟技术的发展提供了一种与实验观察相互补充的重要研究工具。Mark 等^[11]首先采用分子动力学方法和全原子模型研究水溶液中的胰岛素构象的转变; Zoete 等^[12]探讨了胰岛素分子内的柔性结构与其生物活性之间存在的关系; Yip 等^[13-14]采用拉伸分子动力学 (steered molecular dynamics) 不仅可以从数量级上验证原子力显微镜的实验结果, 而且可清晰地展现胰岛素二聚体中单体之间的相互作用和单体内部的相互作用; Jacoby 等^[15]采用靶向分子动力学 (targeted molecular dynamics) 模拟了胰岛素构象转换的可能途径; 而 Swegat 等^[16]和 Vashisth 等^[17]通过算法的改进, 即加速胰岛素六聚体-配体复合物的解离过程, 推断出配体的离去路径, 使得从热力学上描述胰岛素-配体复合物的性质成为可能。而二硫键对胰岛素构象转换行为的影响, 目前尚未见相关报道。

本文拟采用分子动力学方法对二硫键在胰岛素分子中所起的作用开展研究, 重点探讨胰岛素分子的整体构象和胰岛素活性位点在空间分布上的调整, 揭示二硫键在维持胰岛素空间构象及其生物活性中所起到的作用。结果显示分子模拟能够很好地再现文献报道的实验结论, 所揭示的微观细节对于丰富对胰岛素结构变化过程机理的认识, 指导胰岛素药物的制剂、储存和使用等具有重要的基础意义。

1 模型和方法

1.1 胰岛素模型

采用 PDB 数据库中编号为 1ZNI 的胰岛素分子为模型蛋白, 删除六聚体中的其他原子得到经二硫键共价键合的胰岛素单体, 如图 1 所示。天然态胰岛素 A 链和 B 链上的半胱氨酸以二硫键的形式连接, 对应于生理环境; 而还原态胰岛素的 A 链和 B 链, 则在半胱氨酸上引入氢原子以形成自由巯基, 对应于还原剂存在下的溶液环境。水分子选用 SPC 模型, 胰岛素各残基的电荷依据 $\text{pH}=7.0$ 的溶液环境进行设置, 并通过添加两个氯离子作为反离子, 使模拟体系呈电中性。将胰岛素分子居中置于 $4.917 \text{ nm} \times 4.613 \text{ nm} \times 5.321 \text{ nm}$ 的长方体盒子中, 添加 3761 个水分子使体系密度达到 $1.0 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$, 在 x 、 y 、 z 三方向上均采用周期性边界条件。采用 GROMACS 3.3.3 软件^[18-19]进行分子动力学模拟, 力场为 GROMOS96 43a1 (official distribution)^[20]。

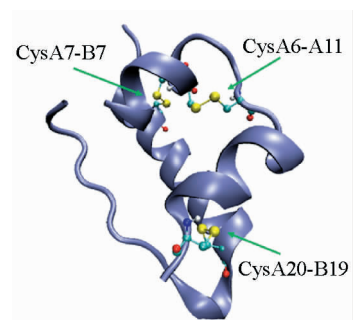


图 1 胰岛素单体中的 3 个二硫键

Fig. 1 Three disulfide bridges in insulin monomer

1.2 模拟方法

首先采用最速下降法进行体系能量最小化, 然后固定胰岛素主链原子的坐标, 在 NVT 系综, 350 K 下进行 1 ns 的限制性分子动力学模拟, 使水分子在胰岛素周围平衡分布。从 0.8~1.0 ns 的模

拟结果中，每隔 50 ps 选取一个构象作为后续分子动力学模拟的初始构象。在 350 K 条件下进行 10 ns 的常规分子动力学模拟，最后采用 5 个平行计算的样品经统计平均得到结果。

分子动力学模拟在 350 K 下进行，选用 NVT 系综，Berendsen 热浴控温，时间常数为 0.1 ps。积分方法为半步蛙跳法，积分时间步长为 0.002 ps。相邻原子列表截断距离为 0.9 nm；LJ 势能截断距离为 1.4 nm；以 PME 算法处理静电相互作用，截断半径为 0.9 nm；以 LINCS 算法约束成键相互作用。

计算机配置为：Lenovo 1800，2×Intel Xeon 3.2GHz CPU。

1.3 分析方法

胰岛素均方根位移 (root mean square deviation, RMSD)：以胰岛素晶体结构为参照，根据式 (1) 计算 t 时刻的构象中各原子坐标与天然构象中对应坐标的根均方差^[21]

$$\text{RMSD}(t,0) = \left[\frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i \| \mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(0) \|^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (1)$$

式中 m_i 为各原子的原子量， M 为各原子的原子量之和，在本文中即为胰岛素的分子量， $\mathbf{r}_i(t)$ 和 $\mathbf{r}_i(0)$ 分别表示原子 i 在 t 时刻和 0 时刻的位置坐标。RMSD 的值反映了特定构象与天然结构的相似程度，其值越低，表明胰岛素越接近天然构象。

二硫键分子间距离分析：形成二硫键的两个硫原子之间的距离，在实际计算中取两个硫原子的几何中心之间的距离。

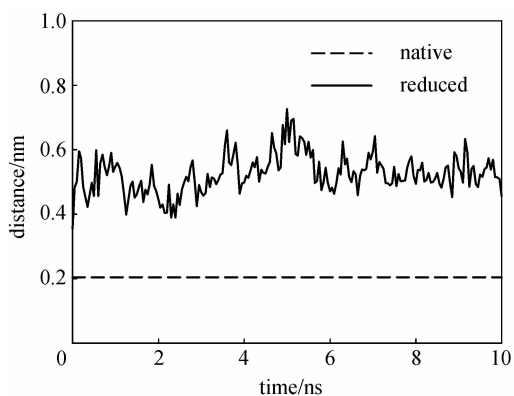
胰岛素分子的微观构象图采用软件 VMD1.8.6 制作^[22]。

2 结果与讨论

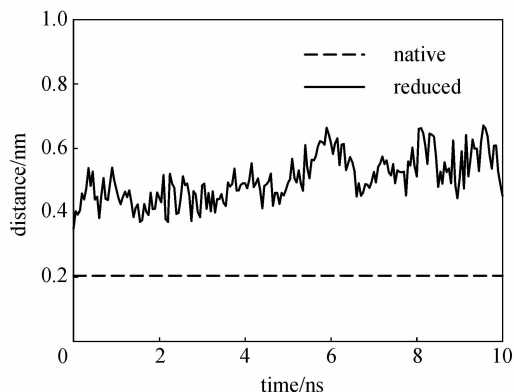
2.1 天然态和还原态胰岛素成键半胱氨酸相对位置分析

天然态胰岛素分子存在 3 对二硫键，分别为 CysA6-CysA11、CysA7-CysB7 和 CysA20-CysB19。首先考察了天然态和还原态胰岛素成键半胱氨酸中的硫原子相对位置，结果如图 2 所示。

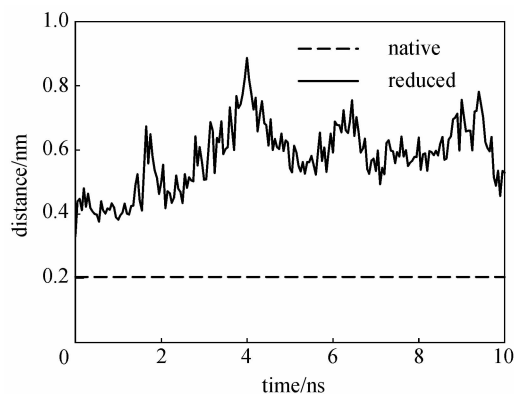
由图 2 可知，硫原子形成二硫键之后，硫原子的运动受到了成键相互作用的限制，只能在很小的范围内做谐振运动。一旦将胰岛素还原，则二硫键发生解离，硫原子之间的相对运动便不再受到二硫键限制，它们之间的距离随时间不断发生变化。



(a) CysA6-CysA11



(b) CysA7-CysB7



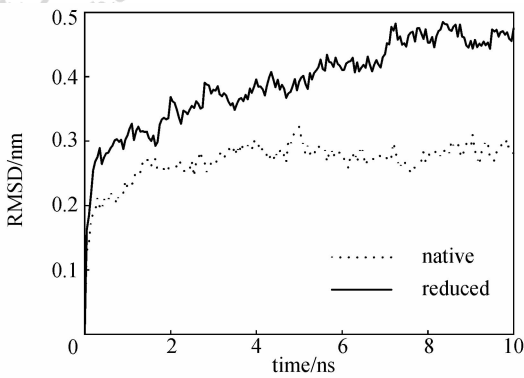
(c) CysA20-CysB19

图 2 天然态和还原态胰岛素中半胱氨酸硫原子之间距离

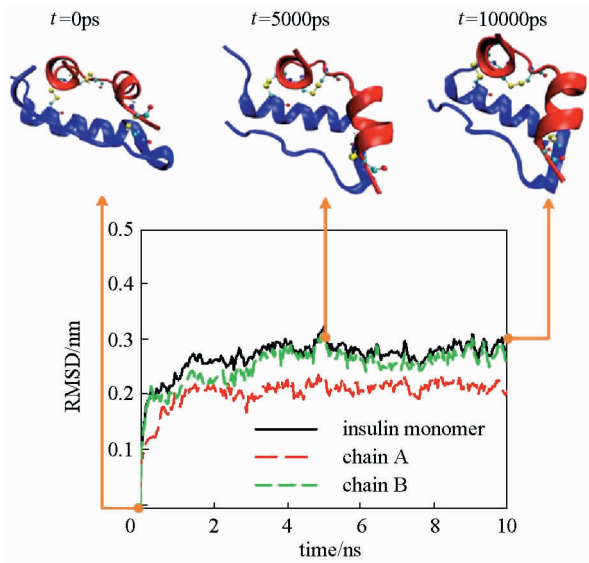
Fig. 2 Distance between sulphur atoms in cysteine residues of native and reduced insulin

2.2 二硫键对胰岛素构象稳定性的影响

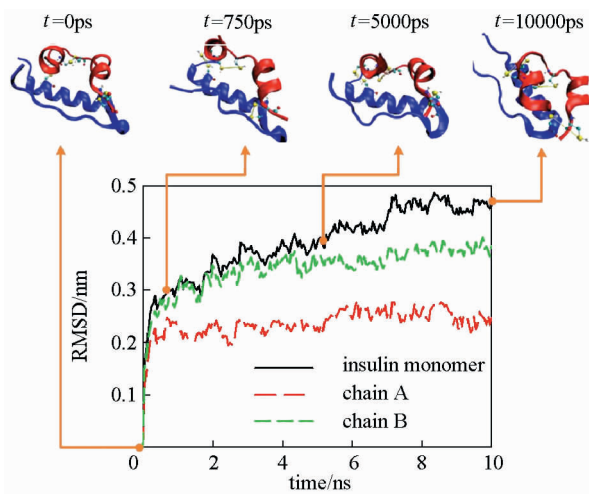
将天然态胰岛素的 6 个半胱氨酸残基从二硫键更换成自由巯基，此时胰岛素以还原态的形式存在，保持溶液及其他条件不变，由此展现还原剂对胰岛素构象稳定性的影响。结果如图 3 所示。这里计算蛋白质主链，即 N、C α 、C 原子的 RMSD 作为胰岛素稳定性的衡量指标。



(a) comparison of native and reduced insulin backbone



(b) comparison of backbones in native insulin, chain A and chain B



(c) comparison of backbones in reduced insulin, chain A and chain B

图 3 天然态和还原态胰岛素主链的 RMSD 变化
Fig. 3 RMSD of native and reduced insulin backbone

图 3 (a) 给出了 350 K 下,天然态和还原态胰岛素整体结构 RMSD 的变化。结果表明,在水溶液环境中,天然态和还原态胰岛素的整体结构均发生失稳,即 RMSD 值增加。这源于高温下,胰岛素分子结构的热涨落和水分子对胰岛素分子的攻击。天然态胰岛素稳定性显著高于其还原态,表明二硫键能够稳定胰岛素,这与文献报道的实验结果^[4-5,8-10]是一致的。

图 3 (b) 给出了 350 K 下,天然态胰岛素整体结构、A 链和 B 链的 RMSD 变化。结果表明,A 链的变化显著低于 B 链的变化,而 B 链的变化接近整体结构的变化。因此,天然态胰岛素结构丧失主要是由于 B 链引起,即 B 链更加不稳定。

图 3 (c) 给出了 350 K 下,还原态胰岛素整体结构、A 链和 B 链的 RMSD 变化。结果表明,A 链的变化显著低于 B 链的变化。在 5000 ps 内,B 链的 RMSD 变化接近整体结构的变化,即结构丧失主要由 B 链引起;进一步总体结构的 RMSD 显著高于 B 链 RMSD 的变化,这源于 A 链和 B 链相对位置变化,即还原态胰岛素发生解离。

图 3 (b)、(c) 给出对应的微观构象证实了上述结构变化。在天然态胰岛素单体中,由于链间二硫键的存在,限制了 A 链和 B 链的相对运动,胰岛素结构变化源于 B 链结构的摆动;而还原态胰岛素,两条链之间的限制被解除,胰岛素结构变化既源于 B 链结构丧失,也源于 A 链和 B 链的解离。

2.3 二硫键对胰岛素活性位点空间构象的影响

胰岛素活性位点包括 A 链的 A1~A3, A5, A19, A21 和 B 链的 B12, B16, B23~B26 共 12 个氨基酸残基,如图 4 所示,它们的空间分布对胰岛素与其受体之间的成功对接有至关重要的意义^[23]。进一步研究了胰岛素中二硫键对活性位点空间构象的影响,结果如图 5 所示。

图 5 给出了天然态和还原态的胰岛素单体中活性位点的 RMSD 变化情况,可以发现,天然态的活性位点 RMSD 变化比较平稳,最终其相对位置会接近平衡,而还原态的胰岛素活性位点 RMSD 却随时间不断上升,这源于二硫键解开,导致 A 链和 B 链之间存在着比较剧烈的相对运动,进而改变了原先活性位点各个氨基酸残基在空间中的相对位置。由此可以判断,胰岛素被还原之后主要的失活原因是 A 链和 B 链之间的相对运动,破坏了整个胰岛素分子活性位点的空间分布状况。

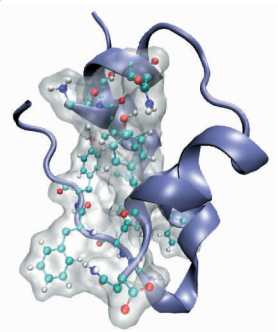


图 4 胰岛素中“经典”活性位点分布
(活性位点以 CPK 颜色和阴影表示)

Fig. 4 “Classical” active site of insulin monomer represented by color of CPK and transparent shadow

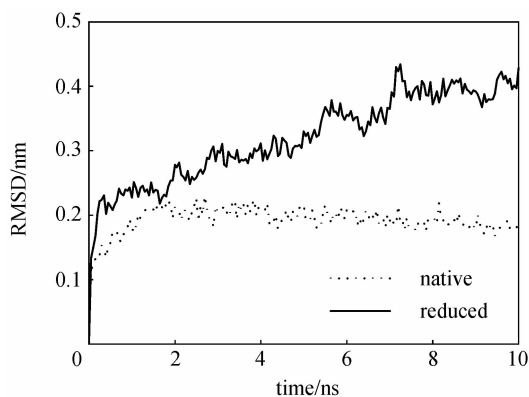


图 5 天然态和还原态胰岛素活性位点的 RMSD 变化

Fig. 5 RMSD of active site in native and reduced insulin

2.4 二硫键对胰岛素 B 链中心螺旋构象稳定性的影响

B 链前 19 个氨基酸残基构成一个 α -螺旋结构, α -螺旋结构中 B1~B8 为胰岛素 T 态和 R 态的构象互变区, B9~B19 为胰岛素 B 链的中心螺旋, 进一步分析了 B 链中心螺旋结构的变化, 结果如图 6 所示。

结果表明, 天然胰岛素的 B 链中心螺旋区结构非常稳定, 其 RMSD 一直在 0.6 nm 上下波动; 而还原态胰岛素中心螺旋的 RMSD 在模拟前期还能与天然态保持相似, 在后期则出现丧失天然结构的趋势。上述结果证明了二硫键破坏后, 胰岛素 B 链中心螺旋的失稳会加剧。

3 结论

本文采用分子模拟对胰岛素中二硫键的作用进行了研究, 并对天然态和还原态胰岛素的构象转行为进行了分析。在模拟过程中通过打开二硫键, 使半胱氨酸残基形成自由巯基来模拟还原态胰岛

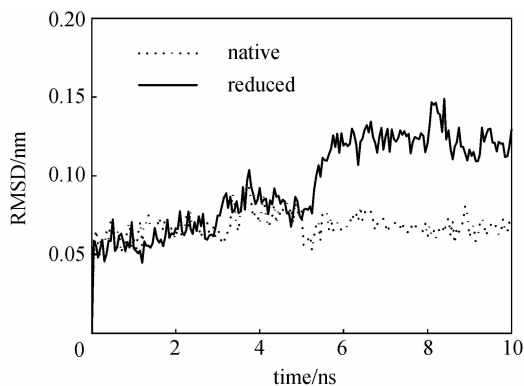


图 6 胰岛素 B 链中心螺旋主链原子的 RMSD 变化

Fig. 6 RMSD of backbone atoms in central helix of chain B in insulin

素。模拟结果显示, 胰岛素被还原之后, 其半胱氨酸中硫原子的运动不再受到二硫键的限制, 由此影响了胰岛素主体和 B 链中心螺旋的稳定性以及胰岛素的生物活性。

天然态胰岛素单体中由于具有二硫键而限制了 A 链和 B 链的相对运动, 维持了活性位点氨基酸残基的相对位置, 使活性位点的空间分布趋于稳定。而在还原态胰岛素中因为连接 A 链和 B 链的二硫键解开, A 链和 B 链之间的相对位置发生了较大变化, 活性位点的空间构象也被破坏。分子模拟还显示天然态胰岛素中 A 链的稳定性要强于 B 链, 解开二硫键会使 B 链的不稳定性表现得更加明显, 同时 B 链中心螺旋的二级结构呈现失稳的趋势。上述分子模拟结果与文献报道相符^[4-5, 8-10], 并给出了二硫键影响胰岛素分子稳定性的微观细节。胰岛素单体的回转半径、二级结构等相关参数变化也将会在后续的研究中予以进一步讨论。由本文结果可知, 在胰岛素药物制剂和使用过程中, 除应注意胰岛素的自聚集之外, 还应注意构建适宜于胰岛素天然构象的化学环境, 即避免引入导致其二硫键发生还原反应的物质。上述结果不仅丰富了对于胰岛素结构变化的微观机制的认识, 对于胰岛素药物制剂的加工、储存和应用等也具有指导意义。

References

- [1] Mayer J P, Zhang F, DiMarchi R D. Insulin structure and function. *Biopolymers*, 2007, **88** (5): 687-713
- [2] Katsoyan Pg, Tometsko A. Insulin synthesis by recombination of A and B chains—a highly efficient method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1966, **55** (6): 1554

- [3] Tang J G, Tsou C L. The insulin A and B chains contain structural information for the formation of the native molecule—studies with protein disulfide-isomerase. *Biochemical Journal*, 1990, **268** (2): 429-435
- [4] Cosmatos A, Katsoyannis P G. Elongation of interchain disulfide bridges of insulin—synthetic analog. *Journal of Biological Chemistry*, 1975, **250** (14): 5315-5321
- [5] Dai Y, Tang J G. Characteristic, activity and conformational studies of [A6-Ser, A11-Ser]-insulin. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1996, **1296** (1): 63-68
- [6] Weiss M A, Hua Q X, Lynch C S, Frank B H, Shoelson S E. Heteronuclear 2D NMR-studies of an engineered insulin monomer—assignment and characterization of the receptor-binding surface by selective H-2 and C-13 labeling with application to protein design. *Biochemistry*, 1991, **30** (30): 7373-7389
- [7] Shoelson S E, Lu Z X, Parlautan L, Lynch C S, Weiss M A. Mutations at the dimer, hexamer, and receptor-binding surfaces of insulin independently affect insulin insulin and insulin-receptor interactions. *Biochemistry*, 1992, **31** (6): 1757-1767
- [8] Hua Q X, Hu S Q, Frank B H, Jia W H, Chu Y C, Wang S H, Burke G T, Katsoyannis P G, Weiss M A. Mapping the functional surface of insulin by design: structure and function of a novel A-chain analogue. *Journal of Molecular Biology*, 1996, **264** (2): 390-403
- [9] Weiss M A, Hua Q X, Jia W H, Chu Y C, Wang R Y, Katsoyannis P G. Hierarchical protein “un-design”: insulin’s intrachain disulfide bridge tethers a recognition alpha-helix. *Biochemistry*, 2000, **39** (50): 15429-15440
- [10] Chang S G, Choi K D, Jang S H, Shin H C. Role of disulfide bonds in the structure and activity of human insulin. *Molecules and Cells*, 2003, **16** (3): 323-330
- [11] Mark A E, Berendsen H J C, Vangunsteren W F. Conformational flexibility of aqueous monomeric and dimeric insulin—a molecular-dynamics study. *Biochemistry*, 1991, **30** (45): 10866-10872
- [12] Zoete V, Meuwly M, Karplus M. A comparison of the dynamic behavior of monomeric and dimeric insulin shows structural rearrangements in the active monomer. *Journal of Molecular Biology*, 2004, **342** (3): 913-929
- [13] Yip C M, Yip C C, Ward M D. Direct force measurements of insulin monomer-monomer interactions. *Biochemistry*, 1998, **37** (16): 5439-5449
- [14] Kim T, Rhee A, Yip C M. Force-induced insulin dimer dissociation: a molecular dynamics study. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, **128** (16): 5330-5331
- [15] Jacoby E, Kruger P, Schlitter J, Roper D, Wollmer A. Simulation of a complex protein structural change: the T \leftrightarrow R transition in the insulin hexamer. *Protein Engineering*, 1996, **9** (2): 113-125
- [16] Swegat W, Schlitter J, Kruger P, Wollmer A. MD simulation of protein-ligand interaction: formation and dissociation of an insulin-phenol complex. *Biophysical Journal*, 2003, **84** (3): 1493-1506
- [17] Vashisth H, Abrams C F. Ligand escape pathways and (un) binding free energy calculations for the hexameric insulin-phenol complex. *Biophysical Journal*, 2008, **95** (9): 4193-4204
- [18] Lindahl E, Hess B, van der Spoel D. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. *Journal of Molecular Modeling*, 2001, **7** (8): 306-317
- [19] van der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark A E, Berendsen H J C. GROMACS: fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry*, 2005, **26** (16): 1701-1718
- [20] Todorova N, Legge F S, Treutlein H, Yarovsky I. Systematic comparison of empirical forcefields for molecular dynamic simulation of insulin. *Journal of Physical Chemistry B*, 2008, **112** (35): 11137-11146
- [21] The GROMACS Development Team. GROMACS user manual [EB/OL]. [2006-04-07]. <http://www.gromacs.org/content/view/27/42/>
- [22] Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 1996, **14** (1): 33
- [23] Pullen R A, Lindsay D G, Wood S P, Tickle I J, Blundell T L, Wollmer A, Krail G, Brandenburg D, Zahn H, Gliemann J, Gammeltoft S. Receptor-binding region of insulin. *Nature*, 1976, **259** (5542): 369-373