

闫佳兴,张久亮.石金钱龟板来源的寡肽与环氧合酶-2相互作用机制[J].华中农业大学学报,2022,41(5):169-178.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2022.05.021

石金钱龟板来源的寡肽与环氧合酶-2相互作用机制

闫佳兴,张久亮

华中农业大学食品科学技术学院/环境食品学教育部重点实验室,武汉 430070

摘要 为探究石金钱龟板来源的寡肽KNGP能否作为COX-2(环氧合酶-2)的新型抑制剂,通过紫外分光度法测定石金钱龟板肽YPTP、合成肽段KNGP和RG的IC₅₀值,利用内源荧光、同步荧光、三维荧光光谱和ANS(1-苯胺基-8-萘磺酸)荧光探针法分析KNGP对COX-2的疏水性影响,利用分子对接方法分析KNGP与COX-2间的相互作用方式。结果显示,YPTP、KNGP和RG的IC₅₀值分别为0.609、0.046和0.056 mg/mL,KNGP的IC₅₀值低于阳性药布洛芬(IC₅₀=0.217 mg/mL),说明KNGP对COX-2具有显著的抑制潜力。内源荧光结果显示KNGP对COX-2的作用为静态猝灭且有单一作用位点,同时热力学参数计算结果显示,KNGP和COX-2的结合过程中疏水作用是主要驱动力,且KNGP和COX-2结合的是由熵驱动的自发过程。同步荧光、三维荧光光谱和荧光探针结果显示COX-2中的酪氨酸与色氨酸的疏水环境发生变化,且其表面的疏水性减弱。KNGP与COX-2的分子对接显示,KNGP分子主要通过NH基团、C=O结构、吲哚和咪唑结构与COX-2活性中心的氨基酸残基形成氢键和疏水相互作用,并通过形成静电作用增强结合的稳定性。以上结果表明,KNGP能与COX-2的单一位点通过氢键和疏水相互作用结合形成复合物,并改变酶的二级结构来抑制其活性。

关键词 荧光光谱;分子对接;COX-2;抗炎;寡肽;龟板

中图分类号 TS201.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2022)05-0169-10

环氧合酶-1(cyclooxygenase-1, COX-1)和环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)是2种同工酶,COX-1在健康组织中表达维持机体的正常运转,而COX-2几乎只在组织受到伤害刺激后才大量表达,参与炎症和疼痛等过程^[1]。特异性抑制COX-2可有效阻止炎症和疼痛反应,常用的COX-2抑制剂包括布洛芬和对乙酰基苯酚等,但这些药物对胃肠道、心血管、肾脏、肝脏等器官可能造成一定程度的损害,尤其是胃肠道损伤最为常见^[2]。严重的不良反应已经导致了罗非昔布与依托昔布的退市^[3]。因此,目前亟需寻找新型的COX-2抑制剂。

石金钱龟是一种淡水龟,主要分布在日本、越南和中国中南部,是一种高价值的功能性食品^[4]。《本草纲目》和近期研究均表明,一些龟板提取物具有良好抗氧化、抗炎和消肿止痛等作用^[5-6]。其他研究表明有脯氨酸或精氨酸残基的寡肽除具有良好活性外还具有抗酶解特性^[7],可通过胃肠道吸收进入血液循环,进而对相关疾病靶点起作用^[8-9]。因此,人们对天

然产物中寡肽的研究和开发越来越重视。笔者所在研究团队前期已证明石金钱龟板来源的肽为2~9个氨基酸残基的具有良好抗氧化、抗炎等活性的寡肽^[10-11],尤其其中的合成寡肽单体分子KNGP含脯氨酸残基、RG含有精氨酸残基,可能具有优良的抗酶解特性和更高的吸收效率。然而,龟板肽对抗炎靶点之一COX-2的潜在抑制作用及其机制尚不明确。

因此,本研究利用团队前期以石金钱龟来源的龟板肽^[10]和合成寡肽单体分子(KNGP和RG)进行抑制试验,并利用荧光光谱和分子对接探究KNGP对COX-2的抑制机理,分析寡肽KNGP对COX-2的抑制作用和构效机制,旨在为探究寡肽分子的抗炎作用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1)材料。石金钱龟板肽(yellow pond turtle pep-

收稿日期: 2022-05-08

基金项目:国家重点研发计划项目(2021YFE0194000)

闫佳兴,E-mail:1813425989@qq.com

通信作者: 张久亮,E-mail:zjl_ljz@mail.hzau.edu.cn

tides, YPTP)(肽含量 72.16%)由笔者所在研究团队前期制备^[10], 试验中所使用石金钱龟板的肽段 Lys-Asn-Gly-Pro(KNGP)和 Arg-Gly(RG)的结构为团队前期鉴定^[10], 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 纯度大于 98%。

2) 试剂。试验中所使用的试剂均为分析纯, 所使用水为去离子水。COX-2(美国 Sigma-Aldrich 公司), 8-苯胺基萘-1-磺酸(美国 Sigma-Aldrich 公司), 花生四烯酸(AA, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司), N,N,N,N-四甲基对苯二胺盐酸盐(TMPD, 上海源叶生物科技股份有限公司), 正铁血红素(Hematin, 猪, 美国 Sigma-Aldrich 公司), Tris(北京兰杰柯科技有限公司), 氢氧化钾和二甲基亚砜(国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

KNGP 的结构用 ChemDraw 7.0 软件绘制。KNGP 与 COX-2 的分子对接选择 Discovery Studio 2018 软件(华中农业大学农业微生物学国家重点实验室)。紫外可见分光光度计(日本岛津公司), 荧光光谱仪 F-4600(日本 Jasco 公司)。

1.3 IC₅₀值的测定

根据 Shang 等^[12]和曹艳花等^[13]报道的方法进行适当的修改。首先, 用 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.8)将 COX-2 稀释制成 25 U/mL 溶液。设置样品组、样品对照组、空白对照组和空白背景组, 样品对照组是以缓冲溶液代替样品溶液, 空白对照组是以缓冲溶液代替酶, 空白背景组以缓冲溶液代替样品和酶。将 140 μL 的缓冲溶液、20 μL 的 COX-2 溶液、10 μL Hematin(2.5%)分别与不同浓度的样品混合均匀, 在 25 °C 下孵化 5 min。随后, 添加 10 μL 的 21 μmol/L 的 N,N,N,N-四甲基对苯二胺盐酸盐(TMPD)和 100 μmol/L 花生四烯酸(AA)来启动反应。在 25 °C 下反应 20 min 后, 使用紫外可见分光光度计在 590 nm 处记录吸光度值。所有试验重复 3 次。用式(1)计算抑制率:

$$\text{抑制率} = \left(1 - \frac{D_{\text{sample}} - D_{\text{sampleblank}}}{D_{\text{control}} - D_{\text{controlblank}}} \right) \times 100\% \quad (1)$$

式中, D_{control} 是空白对照组的吸光度; $D_{\text{controlblank}}$ 是空白背景组的吸光度; D_{sample} 是样品组的吸光度; $D_{\text{sampleblank}}$ 是样品对照组的吸光度。最后, 利用 SPSS 26.0 对得到的数据进行非线性回归分析得到半数抑制浓度(IC_{50})值。

1.4 内源荧光光谱测定

蛋白质中由于氨基酸残基色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)和苯丙氨酸(Phe)的存在而具有内源荧光^[14], 进行荧光猝灭试验可以获得 KNGP 与 COX-2 之间的结合机制、结合位点、结合力和热力学参数等相互作用的特征^[15-16]。使用 Stern-Volmer 方程分析荧光猝灭数据, 以研究其猝灭类型^[17-18]。

基于 KNGP 对 COX-2 是静态猝灭的结果, 我们假设 KNGP 能与 COX-2 的活性位点结合形成配体-蛋白质的基态配合物, 根据文献[17-18]中的公式计算配合物的结合位点数(n)和表观结合常数(K_a), K_a 值越大, 配合物的紧密程度和稳定性越强^[17-18]。

荧光猝灭分为静态猝灭和动态猝灭 2 种方式^[19-20]。当猝灭类型是静态猝灭时, KNGP 与 COX-2 的结合过程依赖于静电相互作用、氢键、疏水相互作用和范德华力等。根据上述 3 个温度下的 K_a 值, 采用 Van't Hoff 方程求得焓变(ΔH)、熵变(ΔS)和自由能变化(ΔG)^[21]。

当 $\Delta H < 0$ 、 $\Delta S < 0$ 时, 主要驱动作用是氢键; 当 $\Delta H > 0$ 、 $\Delta S > 0$ 时, 主要驱动作用是疏水相互作用; 当 $\Delta H < 0$ 、 $\Delta S > 0$ 时, 主要驱动作用是静电作用^[22-23]。在 200 μL 的反应体系中, 加入 150 μL 溶解于 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.8)的 COX-2(10 U/mL), 之后分别逐次加入 50 μL 的 IC_{50} 值最低的肽段(KNGP)溶液, 分别控制终浓度为 0.00~0.50 mmol/L。然后采用 F-4600 荧光光谱仪测定各样品的内源荧光光谱。其中, 设置激发波长 280 nm, 发射波长 350~500 nm, 狹缝宽度设定为 5 nm, 扫描速度设定为 1 200 nm/min, 电压设定为 700 V。所有测定均重复 3 次。

1.5 同步荧光光谱测定

当同步荧光的波长间隔($\Delta\lambda$)设置为 15 和 60 nm 时, 可以分析 COX-2 中的酪氨酸和色氨酸残基的光谱变化, 从而阐明 COX-2 的构象变化^[24]。按照本文“1.4”的试验方法(溶液的量与浓度相同)在 298 K 下进行同步荧光光谱的测定。分别设定 $\Delta\lambda = 15$ nm 和 $\Delta\lambda = 60$ nm, 狹缝宽度设定为 5 nm, 扫描速度设定为 1 200 nm/min, 电压设定为 700 V, 进行同步荧光光谱扫描。所有测定均重复 3 次。

采用文献[25]中的公式计算 KNGP 对 COX-2 的同步荧光猝灭率(ratio of synchronous fluorescence quenching, RSFQ)。

1.6 三维荧光光谱测定

利用三维荧光光谱可以分析 KNGP 对 COX-2 构

象的影响^[24-25]。按照本文“1.4”的方法制备COX-2溶液与KNGP溶液。在室温条件下,将样品稀释至200倍后,以200 nm为起始激发波长,200~500 nm为连续扫描记录发射波长,狭缝宽度设定为5 nm,扫描速度设定为1 200 nm/min,电压设定为700 V。所有测定均重复3次。

1.7 表面疏水性的测定

8-苯胺基萘-1-磺酸(8-anilino naphthalene-1-sulfonic acid, ANS)是一种疏水性探针,能在与蛋白质的表面疏水基团相互反应时,增强其荧光光度值,可以常用来反映表面疏水性的变化^[26]。表面疏水性的变化通常反映酶的构象变化^[27]。将按照本文“1.4”方法制备的COX-2溶液与KNGP溶液,混合均匀后静置10 min,加入10 μ L的0.10 mmol/L的ANS溶液,在298 K下避光20 min。设定激发波长390 nm,发射波长420~570 nm,激发狭缝5.0 nm和发射狭缝2.5 nm。分别以相对应的KNGP-缓冲溶液体系的荧光发射光谱作为空白背景信号。所有测定均重复3次。

1.8 分子对接

分子模拟对接是研究分子之间特别是生物分子复合物(如药物与受体)之间相互作用的一种有效方法,它能获得配体和受体结合构象、位点和作用力等信息^[28]。本研究分子对接过程和结果分析均采用Discovery Studio 2018软件进行。COX-2(PDB ID:3NT1)的晶体结构取自Protein Data Bank蛋白质数据库,KNGP肽段的结构由ChemDraw 7.0,软件绘制好的结构导入Discovery Studio 2018软件中,利用Small Molecules模块下Prepare Ligands工具处理。分别利用Discovery Studio 2018对COX-2进行去水与加全氢等预处理。分子对接结果的ROC曲线图可以分析分子对接的打分函数,X轴越接近零,准确率越高;Y轴越大代表准确率越好。曲线越接近左上角(X越小,Y越大),即曲线下面积越大,预测准确率越高^[29]。基于与参考文献[30]对比结合酶的配体位置获得对接位点的信息。COX-2的活性位点由Arg120、Glu524和Tyr355三个氨基酸残基组成,活性位点周围还包括有一些氨基酸残基如:Lys83、Tyr115、Ser119、Val89、Pro86、Leu93、Leu123^[31]。随后利用CDOCKER对接方法对接,其他参数采取默认值,根据结合能大小对结果进行排序和可视化分析。

1.9 数据统计与分析

本试验每组数据均做平行重复试验3次,以“平均值士标准差”表示。利用SPSS 17.0软件进行显著性分析, $P<0.05$ 为差异显著。采用Origin 8.0、Discovery Studio 2019等软件绘图与荧光光谱数据分析。

2 结果与分析

2.1 不同样品的IC₅₀值分析

3种寡肽样品(石金钱龟板肽YPTP、合成肽段KNGP和RG样品)对于COX-2的抑制率如图1所示,由非线性回归分析得到3种寡肽样品和阳性药布洛芬的IC₅₀值,分别为0.609、0.046、0.056和0.217 mg/mL。其大小排序为KNGP<RG<阳性药布洛芬<石金钱龟板肽YPTP(72.16%)。这些样品中KNGP的IC₅₀值最小,表明KNGP对COX-2具有极显著的抑制潜力。因此,选用KNGP进行后续的荧光光谱试验,探究肽段KNGP对COX-2的抑制机制。

2.2 内源荧光光谱分析

1)荧光猝灭分析。图2所示为KNGP与COX-2在298 K下的荧光发射光谱。随着KNGP浓度的增加,COX-2的荧光强度减小,表明COX-2发生荧光猝灭现象。从而表明KNGP与COX-2之间发生了相互作用,使得酶的微环境发生了变化。如图3所示,在不同温度(298、304、310 K)下拟合的曲线为线性,表明由KNGP造成COX-2的荧光猝灭类型是单一的。如表1所示,由斜率可计算出 K_q 值,YPTP对于COX-2的不同温度的 K_q 值分别远大于最大扩散碰撞猝灭常数[2.0×10^{10} L/(mol·s)],呈现出静态猝灭的特征;同时,随着温度升高(298、304和310 K)导致KNGP-COX-2复合物的猝灭常数(K_{sv})降低(分别为 2.09×10^4 、 1.51×10^4 和 1.31×10^4 L/mol),即温度越高,配合物的稳定性降低,呈现出静态猝灭的特征,所以YPTP对COX-2的荧光猝灭方式为静态猝灭。

2)结合常数和结合位点。如图4所示, $\lg[(F_0-F)/F]$ 与 $\lg[Q]$ 拟合的298、304和310 K温度下的双对数回归曲线是线性的。不同温度下计算结果见表2。不同温度下COX-2的 n 值接近1,这意味着COX-2上仅存在单一结合位点供KNGP结合。此外,COX-2和KNGP在不同温度下的 K_a 值分别为 4.3×10^4 、 7.5×10^4 和 12.5×10^4 L/mol。随着温度升高,配合物 K_a 值变大,这反映出KNGP和COX-2相互作用的稳定性升高。

3)热力学参数特征。表3列出了KNGP和

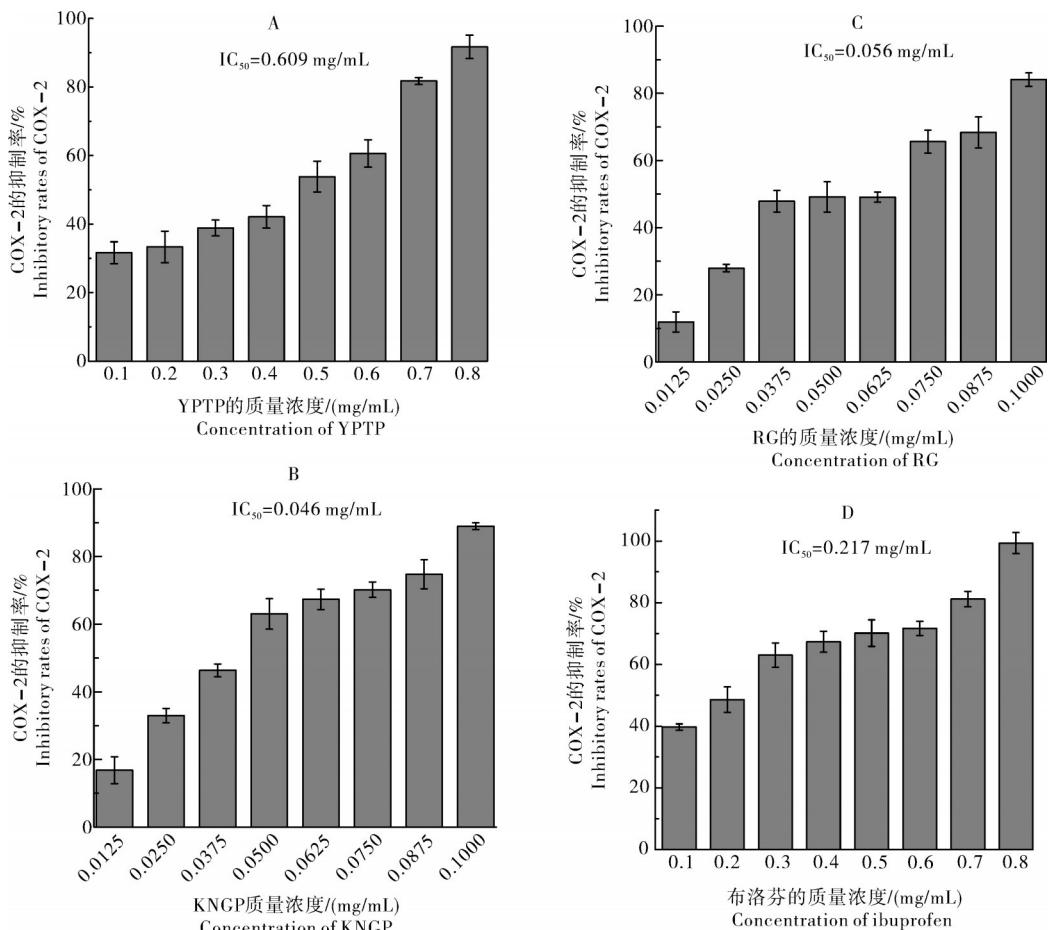


图1 石金钱龟龟板肽 YPTP(A)、合成肽段 KNGP(B)、RG(C)和布洛芬(D)对COX-2的抑制率

Fig.1 Inhibitory rates of YPTP (A), KNGP (B), RG (C) and ibuprofen (D) on COX-2

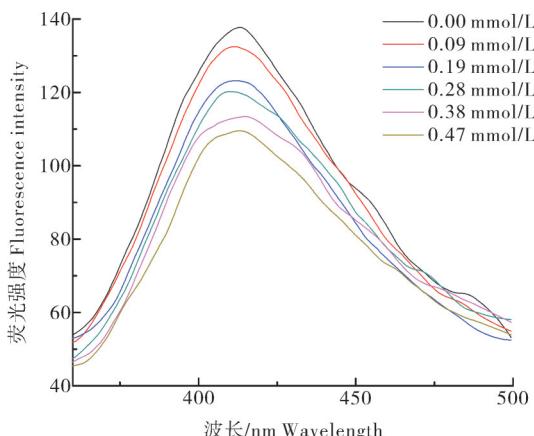


图2 COX-2与不同浓度的KNGP在298 K下的内源荧光光谱

Fig.2 Intrinsic fluorescence spectra of COX-2 with KNGP at 298 K

COX-2的热力学参数。KNGP与COX-2相互作用的 ΔH 和 ΔS 均为正值,表明结合过程中疏水作用是主要驱动作用。 $\Delta S > 0$ 和 $\Delta G < 0$,表明KNGP与COX-2之间的相互作用是熵驱动的自发过程。

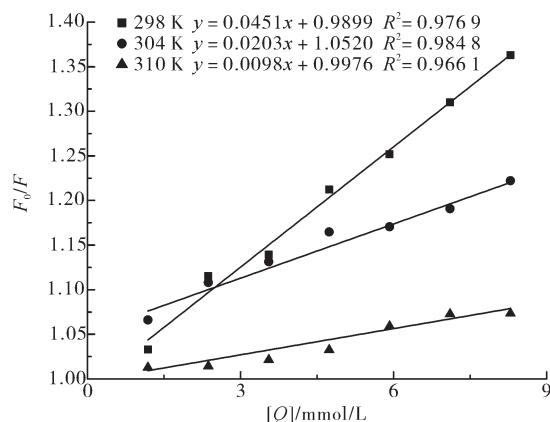


图3 COX-2与KNGP在298、304和310 K下的Stern-Volmer猝灭曲线

Fig.3 Stern-Volmer plots for the quenching of COX-2 with KNGP at 298 K, 304 K and 310 K

2.3 同步荧光光谱分析

在KNGP存在下COX-2的同步荧光光谱如图5所示。在 $\Delta\lambda=15$ nm时(图5A),KNGP浓度的增加导致COX-2中酪氨酸残基的荧光强度降低,证实了

表1 不同温度下KNGP对COX-2的猝灭常数

Table 1 Quenching constants of KNGP on COX-2 at three temperatures

T/K	$K_q/[\times 10^{12} \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{s})]$	$K_{sv}/(\times 10^4 \text{ L}/\text{mol})$	R^2
298	2.03	4.51	0.976 9
304	3.08	2.03	0.984 8
310	0.98	0.98	0.966 1

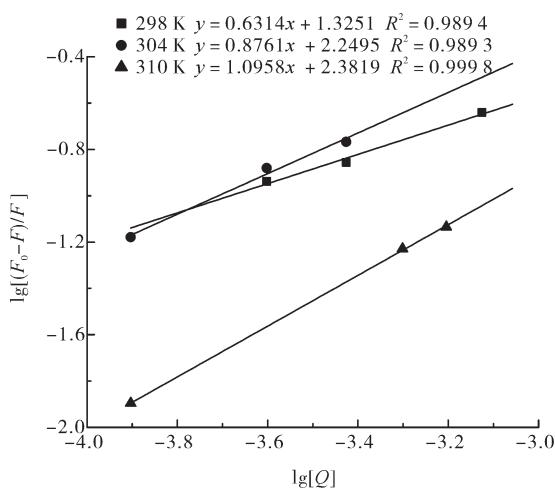


图4 KNGP与COX-2的双对数回归曲线

Fig.4 The plots for calculating the binding constants and the number of binding sites of KNGP to COX-2

表2 不同温度KNGP对COX-2的结合常数和结合位点数

Table 2 Binding constant and binding number of KNGP on COX-2 at three temperatures

T/K	$K_a/(\times 10^4 \text{ L}/\text{mol})$	n	R^2
298	4.3	0.63	0.989 4
304	7.5	0.88	0.989 3
310	12.5	1.10	0.999 8

表3 不同温度KNGP对COX-2的热力学参数

Table 3 Thermodynamic parameters of KNGP on COX-2 at three temperatures

T/K	$\Delta H/(\times 10^4 \text{ kJ}/\text{mol})$	$\Delta S/[\times 10^2 \text{ J}/(\text{mol}\cdot\text{K})]$	$\Delta G/(\times 10^3 \text{ kJ}/\text{mol})$
298	/	/	-3.60
304	6.85	2.42	-5.05
310	/	/	-6.50

荧光猝灭现象,且最大发射波长从285.6 nm蓝移到284.4 nm,表明加入KNGP使得COX-2的酪氨酸残基周围的疏水性增强,极性减弱。如图5B所示,色氨酸残基的荧光强度降低,同样证实了荧光猝灭现象,其最大发射波长从280.6 nm蓝移到279.2 nm,同

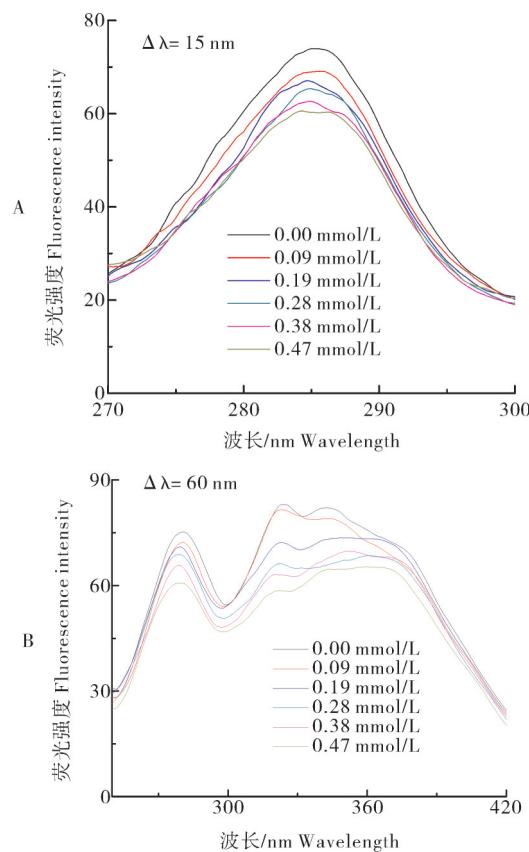


图5 KNGP对COX-2的同步荧光光谱

Fig.5 Synchronous fluorescence spectra of COX-2 with KNGP

样地表明色氨酸残基所处微环境的疏水性增强,极性减弱。酪氨酸残基和色氨酸残基的微环境变化一致,进一步计算2种氨基酸残基的同步荧光猝灭率(RSFQ),比较具体结合位点与2种残基的相对位置。

KNGP对COX-2的RSFQ曲线如图6所示,在0.09、0.19、0.28、0.38 mmol/L4种浓度的情况下酪氨酸的RSFQ值大于色氨酸的RSFQ,说明酪氨酸残基在KNGP引起COX-2的荧光猝灭中贡献较大。因此,在与COX-2的结合过程中,KNGP结合位置可能更接近酪氨酸。

2.4 三维荧光光谱分析

KNGP-COX-2配合物的三维荧光等高线图如图7所示。峰a为瑞利散射峰($\lambda_{em}=\lambda_{ex}$),峰1为酪氨酸和色氨酸残基的特征峰,峰2主要为COX-2中氨基酸 $\pi\rightarrow\pi^*$ 跃迁引起的特征峰。如图7A、7B,对于COX-2,加入KNGP后峰1荧光强度从335.8下降到52.52,峰位置发生了约10 nm的轻微蓝移,表明KNGP与COX-2结合位点靠近酪氨酸残基,KNGP

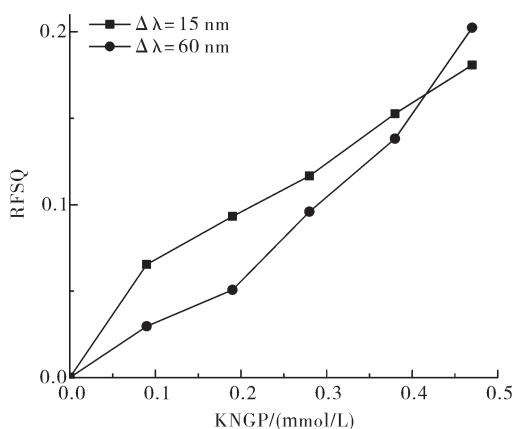


图 6 KNGP 对 COX-2 的 RSFQ 曲线

Fig.6 The corresponding plot of RSFQ of COX-2 with KNGP

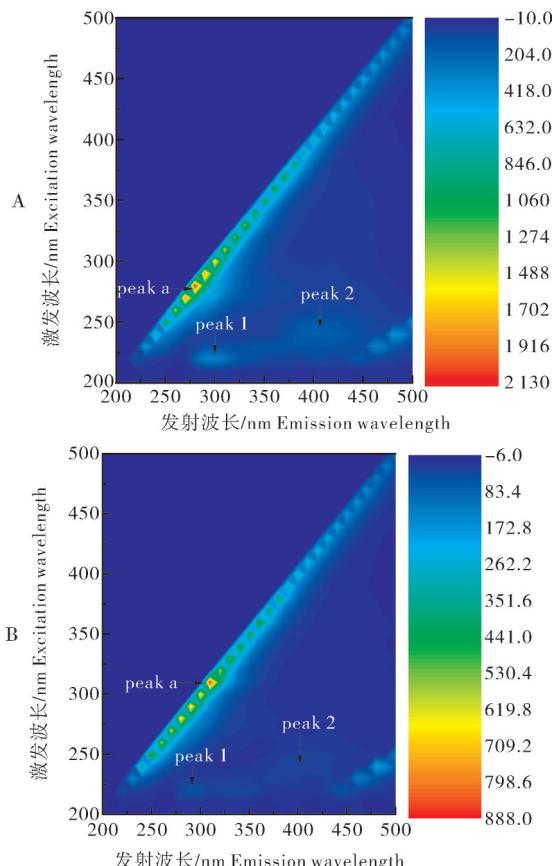


图 7 COX-2(A)三维荧光等高线图和在 KNGP (0.47 mmol/L) 时 COX-2(B) 三维荧光等高线图

Fig.7 Three-dimensional fluorescence spectra of COX-2 in absence (A) and presence of KNGP (0.47 mmol/L, B)

与酶相互作用后蛋白质周围微环境疏水性增强,极性减弱。同时,峰2的荧光强度也有所降低,荧光强度从186.0下降到29.41,表明KNGP-COX-2复合物的形成可能影响蛋白质的二级结构,并导致COX-2构象的松散。

2.5 表面疏水性变化分析

KNGP对COX-2表面疏水性的影响通过COX-2中ANS荧光强度变化来表示。如图8所示,KNGP的加入导致COX-2的表面疏水性降低。KNGP可能与COX-2的活性位点的亲水基团相互作用,导致酶活性位点内的疏水基团暴露,从而引起COX-2表面的亲水基团暴露,使得COX-2的构象发生变化,抑制底物与COX-2的结合。

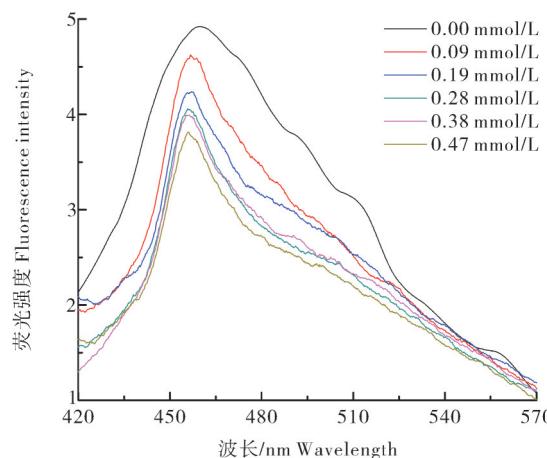


图 8 KNGP 对 COX-2 的 ANS 荧光光谱

Fig.8 ANS-fluorescence spectra of COX-2 with KNGP

2.6 分子对接结果

1)分子对接ROC曲线分析。基于ROC曲线(图9)比较,可以看到-CDOCKER ENERGY (-ECD)曲线下面积最大,证实负的受体-配体间的总能量-ECD和负的受体-配体相互作用能量-CDOCKER INTERACTION ENERGY (-IECD)能够较好地区分活性和非活性分子,可以作为此次分子对接的打分函数,且-ECD更能较好地体现分子的活性。其最终计算结果,对应-ECD值越高,说明受体与配体间的总能量越低,对接体系越稳定。

2)分子对接函数打分结果。本研究采用CDOCKER分子对接模式进行模拟,通过模拟退火得到了KNGP、阳性对照(布洛芬和对乙酰氨基酚)的多个可能的构象,从中选择其中总能量最低的模拟结果进行分析和比较。如表4所示,在模拟对接的KNGP、布洛芬和对乙酰氨基酚的-ECD打分分别为250.44、117.25和61.53 kJ/mol,反映出的相互作用强度由大到小排列为KNGP>布洛芬>对乙酰氨基酚。可以看出,KNGP对COX-2的抑制作用好于阳性药物对照布洛芬和对乙酰氨基酚。表明KNGP可能有很好的COX-2抑制活性。

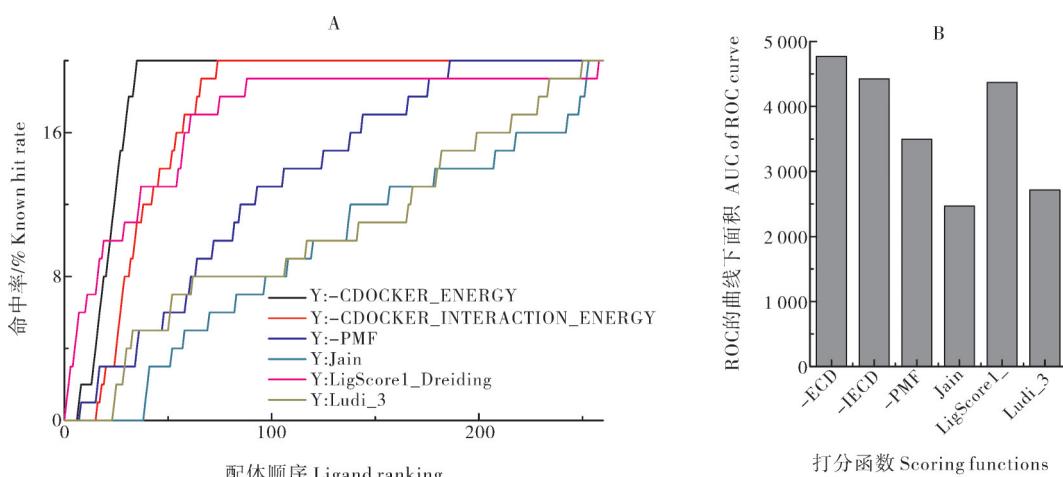


图9 KNGP与COX-2分子对接ROC曲线(A)及ROC的曲线下面积(B)

Fig.9 ROC curves (A) and AUC of ROC curve (B) of docking between KNGP and COX-2

表4 KNGP、阳性对照(布洛芬和对乙酰氨基酚)与COX-2的对接打分结果

Table 4 Results of molecular docking between KNGP, positive controls (ibuprofen and acetaminophen) and COX-2

配体Ligands	负受体-配体间的总能量-ECD/(kJ/mol)		负受体-配体相互作用能量-IECD/(kJ/mol)	
	-CDOCKER energy	-CDOCKER interaction energy	-CDOCKER energy	-CDOCKER interaction energy
KNGP	250.44		201.59	
布洛芬 Ibuprofen	117.25		115.19	
对乙酰氨基酚 Acetaminophen	61.53		71.33	

3)分子对接可视化分析。分子对接的可视化结果如图10A所示, KNGP寡肽能对接到COX-2活性位点内, 其ECD值和IECD值分别为-250.44和-201.59 kJ/mol, 表明KNGP与COX-2活性位点能更好地结合。同时, 2D图(图10B)提供了KNGP与特定氨基酸残基相互作用的详细信息。KNGP与COX-2的氨基酸残基Arg216(2.80、2.37和1.96 Å)、Asp239(2.07、2.50 Å)、Glu140(2.54 Å)、Tyr147(2.12 Å)、Leu238(2.87 Å)和Ser143(1.83 Å)相互作用形成了9个氢键, 其吡咯烷结构与Phe220形成疏

水作用。此外, 分子与蛋白残基Glu140还存在静电相互作用(盐桥和电荷吸引), 与Ser143、Asn144、Thr237、His133形成范德华力, 这些相互作用加强了其结合稳定性, 也证明了KNGP-COX-2配合物结合后的主要作用力是氢键。上述研究结果说明KNGP有望成为COX-2分子的抑制剂。总之, KNGP主要由NH基团、C=O结构、吡咯与酶活性中心的氨基酸残基相互作用形成氢键和疏水作用, 并且能与活性中心附近的氨基酸残基结合形成静电作用增强结合的稳定性。结合荧光光谱试验的热力学参数分析,

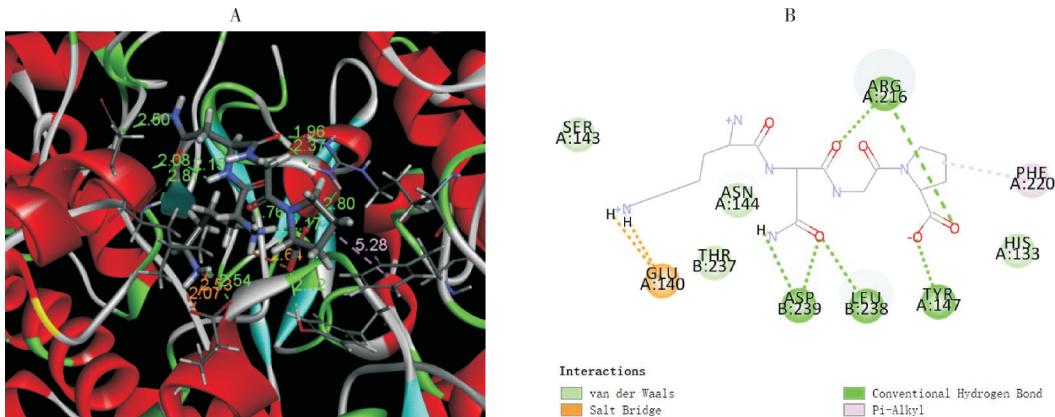


图10 KNGP与COX-2对接的活性位点和特定氨基酸残基的3D(A)和2D(B)对接结果图

Fig.10 3D (A) and 2D (B) docking mode of KNGP to the active site and specific amino acid residues of COX-2

表明KNGP-COX-2配合物形成过程的驱动力为疏水作用,而KNGP-COX-2配合物形成后的主要作用力是氢键。

3 讨 论

根据KNGP对COX-2荧光猝灭数据的分析,KNGP对COX-2的荧光猝灭机制为静态猝灭,即KNGP可能与COX-2的单一位点结合形成配合物,导致荧光猝灭作用。COX-2和KNGP在298 K (4.3×10^4 L/mol)、304 K (7.5×10^4 L/mol)和310 K (12.5×10^4 L/mol)下作用的 K_a 值大于新型芳基异丙酸类化合物 (3.08×10^4 、 3.92×10^4 和 5.40×10^4 L/mol)^[22],同时,COX-2和KNGP的 K_a 值在 $10^4 \sim 10^5$,与保泰松 (1.95×10^4 、 1.25×10^5 、 9.82×10^4 L/mol)和布洛芬 (1.19×10^4 、 2.13×10^5 和 8.09×10^4 L/mol)的 K_a 值相似^[32]。 K_a 值越大,配合物的紧密程度和稳定性越强^[18]。由此可见,KNGP-COX-2的配合物有很强的结合力和稳定性,因此,KNGP对COX-2活性的抑制作用较强。不仅如此,随着温度升高,配合物 K_a 值变大,这反映出KNGP和COX-2相互作用的稳定性升高^[25]。进一步计算得到热力学参数特征,其结果 $\Delta H > 0$ ($\Delta H = 6.85 \times 10^4$ kJ/mol)、 $\Delta S > 0$ ($\Delta S = 2.42 \times 10^2$ J/(mol·K))、 $\Delta G < 0$ ($\Delta G = -3.60 \times 10^3$ kJ/mol (298 K)、 $\Delta G = -5.05 \times 10^3$ kJ/mol (304 K)、 $\Delta G = -6.50 \times 10^3$ kJ/mol (310 K)),表明结合过程中疏水作用是主要驱动作用,且是熵驱动的自发过程^[22-23]。与我们的研究结果略有不同,其他研究报道了疏水相互作用力和静电作用力是形成抗炎药-酶复合物的主要驱动力,且是自发和焓驱动的过程,如新型芳基异丙酸类化合物^[22]、棉酚^[15]等。这意味着相互作用的驱动力可能随抑制剂的结构变化而变化。同步荧光和三维荧光光谱分析表明在与COX-2的结合过程中,KNGP结合位置可能更接近酪氨酸,而在保泰松和布洛芬与酶的结合位置可能更接近色氨酸^[18, 33],这表明结构不同的抑制剂对活性位点氨基酸残基的影响会有差别。与侯利杰等^[18]在保泰松和孙艳涛等^[33]在布洛芬与酶相互作用的报道中一致,KNGP-COX-2配合物的形成会影响酪氨酸和色氨酸残基的微环境,使二者周围的疏水性增强。ANS荧光探针法结果表明KNGP-COX-2配合物的形成导致COX-2的表面疏水性降低,说明KNGP可能引起COX-2的结构变化从而导致活性降低。表面疏水性的变化为KNGP引起COX-2的结构变化从而导致活性降低的机制提供了

更多的证据。综上所述,本研究揭示了KNGP对COX-2的作用机制是与COX-2的单一位点通过氢键和疏水相互作用结合形成复合物,可为寡肽段KNGP作为潜在的COX-2抑制剂提供理论基础,且本研究中肽段KNGP由于含有脯氨酸残基而具有抗酶解吸收的特性,因此,以KNGP作为研究对象是十分有意义的。

参考文献 References

- [1] SINGH P, KAUR S, KUMARI P, et al. Tailoring the substitution pattern on 1,3,5-triazine for targeting cyclooxygenase-2: discovery and structure-activity relationship of triazine-4-amino-phenylmorpholin-3-one hybrids that reverse algesia and inflammation in Swiss albino mice [J]. Journal of medicinal chemistry, 2018, 61(17):7929-7941.
- [2] BINDU S, MAZUMDER S, BANDYOPADHYAY U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: a current perspective [J/OL]. Biochemical pharmacology, 2020, 180: 114147 [2022-05-08]. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114147>.
- [3] 杨鹰,孙茹,曹艳花.选择性环氧化酶-2抑制剂对心血管影响的研究进展 [J].药学研究,2016,35(1):41-45.YANG Y, SUN R, CAO Y H. Research progress on the effect of selective COX-2 inhibitors on cardiovascular diseases [J]. Journal of pharmaceutical research, 2016, 35(1):41-45 (in Chinese with English abstract).
- [4] CHENG Y Y, CHEN T Y, YU P H, et al. Observations on the female reproductive cycles of captive Asian yellow pond turtles (*Mauremys mutica*) with radiography and ultrasonography [J]. Zoo biology, 2010, 29(1):50-58.
- [5] LIU L L. Studies on bioactive peptide from Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*) with functionalities of ACE inhibition and antioxidation [J]. African journal of biotechnology, 2012, 11 (25):6723-6729.
- [6] CHIU L H, HSU G S W, LU Y F. Antihypertensive capacity of defatted soft-shelled turtle powder after hydrolysis by gastrointestinal enzymes [J]. Journal of food biochemistry, 2006, 30 (5) : 589-603.
- [7] 蒋爽. ACE抑制肽的设计与抗酶解,抑制机理的研究 [D]. 无锡:江南大学,2014.JIANG S. Study on the design, enzyme-resistant activity and inhibition mechanism of ACE inhibitory peptides [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2014 (in Chinese with English abstract).
- [8] GARDNER M L. Absorption of intact peptides: studies on transport of protein digests and dipeptides across rat small intestine *in vitro* [J]. Quarterly journal of experimental physiology (Cambridge, England), 1982, 67(4):629-637.
- [9] 郭文博,徐冰,刘一蔓,等.中药:天然生物活性寡肽之库 [J].中草药,2019,50(18):4477-4484.GUO W B, XU B, LIU Y M, et al. Chinese materia medica: a natural bioactive oligopeptides bank [J]. Chinese traditional and herbal drugs, 2019, 50 (18) : 4477-4484 (in Chinese with English abstract).
- [10] LV Y B, ZHOU Q, FAN Y, et al. Intervention on immunodeficiency [J].

- ciency mice and structural identification of enzymatic peptides from *Mauremys mutica* and *Cuora trifasciata* [J/OL]. Journal of ethnopharmacology, 2019, 241: 111920 [2022-05-08]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2019.111920>.
- [11] YIN J J, ZHOU Q, WANG L, et al. Protective effect of extract of *Mauremys mutica* against cyclophosphamide (CY)-induced suppression of immune function in mice [J]. Food and agricultural immunology, 2016, 27(4): 577-588.
- [12] SHANG J H, CAI X H, FENG T, et al. Pharmacological evaluation of *Alstonia scholaris*: anti-inflammatory and analgesic effects [J]. Journal of ethnopharmacology, 2010, 129(2): 174-181.
- [13] 曹艳花,李靖,吕鹏月,等.维他昔布的抗炎镇痛作用研究[J].中国药学杂志,2013,48(20):1736-1739.CAO Y H, LI J, LÜ PY, et al. The anti-inflammatory and the analgesic effects of vita-coxib, a new molecular entity [J]. Chinese pharmaceutical journal, 2013, 48(20): 1736-1739 (in Chinese with English abstract).
- [14] YANG J, JING Z H, JIE J J, et al. Fluorescence spectroscopy study on the interaction between gossypol and bovine serum albumin [J]. Journal of molecular structure, 2009, 920 (1/2/3): 227-230.
- [15] CHENG F Q, WANG Y P, LI Z P, et al. Fluorescence study on the interaction of human serum albumin with bromsulphalein [J]. Spectrochimica acta part A: molecular and biomolecular spectroscopy, 2006, 65(5): 1144-1147.
- [16] GÉRARD V, GALOPIN C, AY E, et al. Photostability of l-tryptophan in aqueous solution: effect of atmosphere and antioxidants addition [J/OL]. Food chemistry, 2021, 359: 129949 [2022-05-08]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129949>.
- [17] 张子程.紫薯花色苷干预尿酸代谢异常的分子机制研究[D].武汉:华中农业大学,2019.ZHANG Z C. Molecular mechanism of anthocyanins from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) in attenuating abnormal uric acid metabolism [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2019 (in Chinese with English abstract).
- [18] 侯利杰,张泽,申炳俊,等.分子对接和荧光光谱法研究保泰松与人血清白蛋白的相互作用及机制[J].长春理工大学学报(自然科学版),2021,44(6):131-137.HOU L J, ZHANG Z, SHEN B J, et al. Molecular docking and fluorescence spectroscopy were used to study the interaction and mechanism between bute and human serum albumin [J]. Journal of Changchun University of Science and Technology (natural science edition), 2021, 44(6): 131-137 (in Chinese with English abstract).
- [19] ZHANG L J, WANG Z C, REN T, et al. Investigation of the interaction between FTO and 3-substituted 2-aminochromones by spectroscopy and molecular modeling [J]. Medicinal chemistry research, 2017, 26(7): 1349-1358.
- [20] ZHENG Y X, TIAN J H, YANG W H, et al. Inhibition mechanism of ferulic acid against α -amylase and α -glucosidase [J/OL]. Food chemistry, 2020, 317: 126346 [2022-05-08]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126346>.
- [21] LI X, ZHANG S, CUI X, et al. Multi-spectroscopic characterization of anaesthetic parecoxib upon interaction with cyclooxygenase-2 *in vitro* biophysical studies [J]. Latin American journal of pharmacy, 2017, 36(4): 686-693.
- [22] 陈彦,尹宗宁.新型芳基异丙酸类化合物与牛血清白蛋白的相互作用[J].华西药学杂志,2015,30(4):436-439.CHEN Y, YIN Z N. Interaction between a novel aryl isopropyl acids and bovine serum albumin [J]. West China journal of pharmaceutical sciences, 2015, 30(4): 436-439 (in Chinese with English abstract).
- [23] PENG X, ZHANG G W, LIAO Y J, et al. Inhibitory kinetics and mechanism of kaempferol on α -glucosidase [J]. Food chemistry, 2016, 190: 207-215.
- [24] 任钰婷,邱智军,张彬,等.活性蓝4与牛血清白蛋白的相互作用研究[J].河南科技大学学报(自然科学版),2020,41(6): 93-99.REN Y T, QIU Z J, ZHANG B, et al. Study of interaction between reactive blue 4 and bovine serum albumin [J]. Journal of Henan University of Science and Technology (natural science), 2020, 41(6): 93-99 (in Chinese with English abstract).
- [25] YANG Y, ZHANG J L, SHEN L H, et al. Inhibition mechanism of diacylated anthocyanins from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) against α -amylase and α -glucosidase [J/OL]. Food chemistry, 2021, 359: 129934 [2022-05-08]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129934>.
- [26] TANG H J, MA F, ZHAO D S, et al. Exploring the effect of salianolic acid C on α -glucosidase: inhibition kinetics, interaction mechanism and molecular modelling methods [J]. Process biochemistry, 2019, 78: 178-188.
- [27] 杨扬.紫薯花色苷干预淀粉消化与改善高果糖高脂诱导代谢综合征的机制研究[D].武汉:华中农业大学,2021.YANG Y. Mechanism of anthocyanins from purple sweet potato in slowing starch digestion and alleviating high-fructose/high-fat induced metabolic syndrome [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2021 (in Chinese with English abstract).
- [28] 张爱芹,王嫚,申刚义,等.多溴联苯醚与人血清白蛋白相互作用的表面等离子体共振及分子对接[J].高等学校化学学报,2020,41(9):2054-2060.ZHANG A Q, WANG M, SHEN G Y, et al. Interactions between polybrominated diphenyl ethers and human serum albumin using SPR and molecular docking [J]. Chemical journal of Chinese universities, 2020, 41(9): 2054-2060 (in Chinese with English abstract).
- [29] 王帅.基于TGF β I型受体抑制剂药效团的构建、虚拟筛选和打分功能的评估[D].重庆:重庆医科大学,2021.WANG S. Construction, virtual screening and evaluation of scoring function of pharmacophore based on TGF β I receptor inhibitor [D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2021 (in Chinese with English abstract).
- [30] 席尧.计算机辅助环氧合酶抑制剂的结构-活性关系研究[D].北京:北京化工大学,2019.XI Y. Computer-aided of structure-activity relationships (SAR) study of cyclooxygenase (COX) inhibitors [D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2019 (in Chinese with English abstract).
- [31] BLOBAUM A L, MARNETT L J. Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition [J/OL]. Journal of medicinal chemistry, 2007, 50 (7): 1425-1441 [2022-05-08]. <https://doi.org/10.1021/jm0613166>.
- [32] SISA M, DVORAKOVA M, TEMML V, et al. Synthesis, inhibitory activity and *in silico* docking of dual COX/5-LOX inhibitors with quinone and resorcinol core [J/OL]. European journal of medicinal chemistry, 2020, 204: 112620 [2022-05-08]. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112620>.
- [33] 孙艳涛,张玉璞,毕淑云,等.牛血清白蛋白与保泰松和布洛芬

相互作用的荧光光谱研究[J].高等学校化学学报,2009,30(6):1095-1100.SUN Y T,ZHANG Y P,BI S Y,et al.Studies on the interaction for bovine serum albumin with phenylbutazone

and ibuprofen by fluorescence spectrometry[J].Chemical journal of Chinese universities, 2009, 30 (6) : 1095-1100 (in Chinese with English abstract).

Interaction mechanism between oligopeptides from yellow pond turtle and cyclooxygenase-2 based on fluorescence spectroscopy and molecular docking

YAN Jiaxing,ZHANG Jiuliang

College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University/
Key Laboratory of Environment Correlative Dietology, Ministry of Education, Wuhan 430070, China

Abstract This study aimed to reveal the mechanism of action of oligopeptides KNGP on cyclooxygenase-2 (COX-2), and to explore the interaction between KNGP from yellow pond turtle peptides (YPTP) and COX-2. The IC_{50} values of YPTP, synthesized KNGP and RG were determined by UV spectrophotometry. The mechanism of interaction between KNGP and COX-2 was investigated by intrinsic fluorescence, synchronous fluorescence, three-dimensional fluorescence spectroscopic techniques and ANS fluorescence probe. The mode of action between KNGP and COX-2 was studied by molecular docking. The results showed that the IC_{50} values of YPTP, KNGP and RG were 0.609, 0.046 and 0.056 mg/mL, respectively. The IC_{50} of KNGP was lower than that of the positive drug ibuprofen ($IC_{50}=0.217$ mg/mL), indicating that KNGP had a significant inhibitory effect on COX-2 enzyme. The intrinsic fluorescence results showed that KNGP had a static quenching effect on COX-2, and the action site was single. Meanwhile, the results of thermodynamic parameter calculations showed that hydrophobic interaction is the main driving force in the process of KNGP binding to COX-2, and KNGP binding to COX-2 is a spontaneous process driven by entropy. The results of synchronous fluorescence, three-dimensional fluorescence spectroscopic and ANS fluorescence probe showed that the hydrophobic environment of tyrosine and tryptophan in COX-2 changed, and the hydrophobicity of COX-2 surface was weakened. The molecular docking between KNGP and COX-2 showed that KNGP molecules formed hydrogen bonds and hydrophobic interactions with the amino acid residues of COX-2 active center mainly through NH, C=O structure, indole and imidazole structure, and enhanced the binding stability by forming electrostatic interaction. Therefore, the results showed that KNGP could form a complex with COX-2 at a single site through hydrogen bonding and hydrophobic interaction, and change the secondary structure of the enzyme to inhibit its activity.

Keywords fluorescence spectrum; molecular docking; COX-2; anti-inflammatory; oligopeptides; tortoiseshell

(责任编辑:边书京)