

文章编号: 1674-9057(2019)02-0474-08

doi:10.3969/j.issn.1674-9057.2019.02.030

基于光谱法和计算模拟研究 PFBSK 与 HSA 的相互作用

魏雨晨, 易忠胜, 徐 婕, 赵 赛, 王海洋

(桂林理工大学 化学与生物工程学院, 广西 桂林 541006)

摘要: 采用分子对接、动力学模拟和荧光光谱法研究全氟丁基磺酸钾(PFBSK)和人血清白蛋白(HSA)的相互作用机制。分子对接分析表明, PFBSK 在 HSA 的位点 II 处以氢键作用力稳定结合。动力学模拟的结果表明, PFBSK 与 HSA 相互作用产生的复合物具有良好的稳定性, 并使 HSA 的构象发生改变。结合自由能贡献分析表明, ARG348、ARG484、ARG485、ALA449 为 PFBSK 与 HSA 结合的关键氨基酸残基。荧光光谱试验显示 PFBSK 和 HSA 的结合淬灭了 HSA 的内源性荧光, 淬灭机制为静态淬灭。根据热力学参数吉布斯自由能 ($\Delta G < 0$)、焓变 ($\Delta H < 0$) 和熵变 ($\Delta S < 0$), 可推断 PFBSK 和 HSA 的相互作用力主要是氢键和范德华力, 这与分子对接和结合自由能分析结论一致。

关键词: 全氟丁基磺酸钾; 人血清白蛋白; 分子对接; 分子动力学模拟; 荧光光谱法

中图分类号: X502; O657.3

文献标志码: A

0 引言

人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)是人体血液含量最为丰富的载体蛋白质, 约占人血浆总蛋白含量的 60%^[1-2]。由于 HSA 具有多个结合位点, 使得 HSA 能够结合许多的内源性、外源性物质及不同大小分子的化合物, 也能与难溶于水 and 易溶于水的物质相结合, 具有十分重要的生理意义^[3]。HSA 在人体血浆中起着重要的储存和运输作用, 配体小分子进入人体内, 经蛋白质转运到达靶器官, 发挥其生物学效应^[4]。与人体其他的蛋白质分子相比, HSA 稳定性好, 溶解性也较好, 与配体小分子具有良好的亲和性^[5-6]。由于 HSA 大分子具有无毒性、再生性、良好的生物相容性和生物可降解性等特点^[7], 人血清白蛋白作为一种广泛使用的模型蛋白被应用于各种生物化学、生命物理和药理学等生命科学的研究

中^[8-10]。

全氟化合物(perfluorinated compounds, PFCs)是进入 20 世纪以来一类含有高能量 C—F 键的新型的环境污染物, 逐渐引起科研工作者的关注^[11]。由于 PFCs 的 C—F 键的键能比 C—H 键的键能大, 从而使 PFCs 分子在环境中具有持久性, 在经受强热、光照、化学作用、微生物作用以及高等脊椎动物的代谢作用时依然很难被降解^[12]。这类污染物在一定的剂量下会使生物体出现体重降低、线粒体受损、肝组织增重、基因诱导等不良生物学效应^[13], 且具有全球普遍存在的特点, 甚至存在于人体的血液之中^[14]。因此, 开展 PFCs 小分子与 HSA 生物大分子的相互作用研究, 阐明污染物小分子在人体内的运输、吸收、代谢以及毒性机理有着重大的意义, 也能为环境科学、化学、毒理学以及生命科学等领域提出可靠的理论依据和分析手法。

收稿日期: 2017-09-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(21267008; 21467006; 21565012); 广西自然科学基金项目(2014GXNSFAA118034); 广西高等学校高水平创新团队及卓越学者计划项目(桂教人[2014]49)

作者简介: 魏雨晨(1990—), 男, 硕士, 研究方向: 环境毒理学与化学计量学, xd_chen@163.com。

通讯作者: 易忠胜, 博士, 教授, yzs@glut.edu.cn。

引文格式: 魏雨晨, 易忠胜, 徐婕, 等. 基于光谱法和计算模拟 PFBSK 与 HSA 的相互作用 [J]. 桂林理工大学学报, 2019, 39(2): 474-481.

全氟化合物主要分为全氟羧酸类(perfluoroalkyl sulfonates, PFAS)和全氟磺酸类(perfluorooctanoate, PFCA)^[15]。全氟羧酸类化合物具有不易分解性和高沉积性,容易随着食物链进行传递,并在生物体内富集和放大,其所造成的环境污染遍及全球的生态系统^[16-18]。也有研究表明,在许多的动物组织和人体中发现了 PFCA^[19-20], PFCA 已经成为了一类备受关注的环境污染物。本文以全氟磺酸类化合物中的全氟丁基磺酸钾(PFBSK, 结构式如图1)为例,从计算模拟和实验分析两方面探究 PFBSK 与 HSA 相互作用的机制。

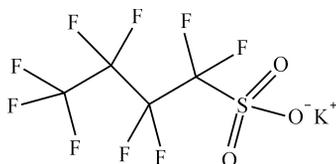


图1 PFBSK 的结构式

Fig.1 Structure of PFBSK

1 实验部分

1.1 实验仪器及试剂

仪器: RF-5301PC 荧光光度计(日本岛津公司); PHS-3CS 精密 pH 计(上海雷磁仪器厂); EL204 电子分析天平(上海梅特勒托利多仪器有限公司)。

试剂: 三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲溶液(Tris-HCl, pH = 7.4); HSA (purity >97%, 美国 Sigma 公司)用 Tris-HCl 缓冲溶液配制成浓度为 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液; 全氟丁基磺酸钾(购于瑞士 AD 公司)用 Tris-HCl 缓冲溶液配制成浓度为 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液, 摇匀, 放置于 4°C 的冰箱中, 备用。除非有其他说明, 否则所用试剂均为分析纯, 实验用水均为二次蒸馏水。

本文所有的计算工作均通过 DELL 服务器上 RedHat Linux 6.4 系统完成。通过 Sybyl X1.1 软件和 GROMACS 4.6.5 软件分别进行分子对接与分子动力学模拟, 用 LigPlus 软件进行分子图形展示和结果分析。HSA 晶体结构从 Brookhaven 蛋白质数据库 (<http://www.rcsb.org/pdb>) 获得(代码为 1n5u, 结构相对完整)。

1.2 实验方法

分子对接: PFBSK 分子用 ChemBioDraw 软件作出结构, 采用密度泛函方法在 B3LYP/6-31G*

理论水平上, 建立初步结构优化和热力学性质的文件, 然后结合 Gaussian 09 进行运算; 对接前对 HSA 分子进行预处理: 除水、加氢、加电荷, 并选择 AMBER7FF99 力场的最陡下降法共轭梯度法能量最小化。目前的分子对接方式主要分为三类: 刚性对接、半柔性对接以及柔性对接^[21]。刚性对接主要用于大分子与大分子之间的对接, 如蛋白质与蛋白质之间以及蛋白质与核酸之间的对接。半柔性对接主要用于研究配体的构象在一定范围内的变化情况, 常用于大分子与小分子之间的对接。柔性对接一般用于精确考虑分子间的识别情况^[22]。本文采用目前较为主流的 CH_4 , $\text{C}=\text{O}$, $\text{N}-\text{H}$ 作为分子探针进行半柔性对接。

分子动力学模拟(MD): 运用 GROMOS96 43a1 力场和周期性边界条件, 采用三点型的水模型 SPC 并对 HSA 体系和 PFBSK-HSA 体系建立水盒子, 添加离子和溶剂使体系平衡。通过最陡下降法进行最大步数 10 000 步的能量最小化, 随后采用正则系统(NVT)和等温等压系统(NPT)平衡体系进行 50 ns 的 MD 模拟。

光谱法: 将 $1 \text{ mL } 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HSA 溶液加入 10 mL 的比色管中, 然后用 pH = 7.4 Tris-HCl 缓冲溶液定容至刻度线, 摇匀。之后依次加入一定量浓度为 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PFBSK 溶液。在恒温下反应 8 min 后, 于 $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ 处进行扫描, 激发光栅和发射光栅的狭缝宽度分别为 3.0/5.0 nm, 测定体系荧光光谱。同时, 检测 $\Delta\lambda = 15$ 及 60 nm 时的同步荧光光谱。

2 结果讨论

2.1 分子对接分析

分子对接可以直观明显地观察出小分子与 HSA 的结合情况和作用力类型。HSA 由 585 个氨基酸残基组成, 主要有 2 个结合药物的位点, 位点 I 和位点 II (也被称为华法林位点与布洛芬位点)^[3], 大部分药物小分子都是结合在这两个位点上。通过运用 Sybyl X1.1 软件中的 Surflex Dock 模块对 PFBSK 与 HSA 进行分子对接分析。对接的方式采用盲接, 探针可自动探测结合位点。Total-Score 为 Surflex Dock 得分, 表达为亲和力 $-\log K_d$, 该函数包含对极性作用、疏水作用、静电作用和氢键作用等综合因素的考虑, 数值越大, 表示形

成的复合物越稳定^[23]。

模拟结果显示位点 II 的 Total-Score 函数得分较高(Site I :3.564 1, Site II :4.492 2), 说明在位点 II 对接形成的复合物更加稳定。图 2a 表示 PFBSK 在 1n5u 位点 II 处的分子对接图。图 2b 显示 PFBSK 与 HSA 结合后 PFBSK 周围 5Å(0.5 nm) 范围内的氨基酸残基, PFBSK 与 ARG485、SER342 和 ARG348 之间形成了 6 个氢键, 从而大大提高了复合物的稳定性。图 2c 为活性位点在 3Å(0.3 nm) 范围内疏水作用的氨基酸二维图, 参与疏水作用的氨基酸有 VAL344、ALA449 和 ILE388 等, 且分布在氟原子周围, 说明 PFBSK 中氟原子有很强的极性。由于 PFBSK 的分子体积不大, 能够较容易进入到 HSA 的疏水腔中。图 2d 为 PFBSK 在 HSA 空腔内的静电引力作用图, 可见 PFBSK 进入 HSA 位点 II 的疏水空腔中并与 HSA 残基间形成了较强的静电力。 $-\log K_d$ 反映的是受体与配体之间的亲和力, 分子对接的结果显示该值较大, 表明 PFBSK 与 HSA 之间形成的复合物具有良好的稳定性。

2.2 分子动力学模拟

分子动力学模拟可以研究复合物在水溶液中的稳定性和动力学特征。本文对游离的 HSA 与 HSA-PFBSK 形成的复合物进行 50 ns 动力学模拟。均方根偏差(RMSD)常用于表述构象偏差的统计值, 是衡量系统稳定性的重要参数^[24]。图 3a 为模拟时间为 50 ns 的 PFBSK-HSA 复合物与游离 HSA 的均方根偏差变化情况, 可以看出在约 13 ns 后复合物体系和 HSA 体系趋于稳定。对比游离 HSA, PFBSK 与 HSA 形成的复合物在整个模拟过程 RMSD 平均值较小, 因此可以说明 PFBSK 与 HSA

形成的复合物更加稳定。均方根波动(RMSF)可用于描述两个体系氨基酸残基柔性的变化情况。图 3b 为 PFBSK-HSA 复合体系与游离 HSA 体系的均方根波动的变化趋势, 可以看出 360~500 号位置残基发生异常波动, 这表明 PFBSK 的结合位置位于 HSA 这些位置的残基处, 所得结果与分子对接相吻合。回转半径(R_g)用来衡量蛋白质结构的紧凑程度。从 50 ns 的回转半径的变化情况(图 3c)中可以看出每个系统的 R_g 值在 10 ns 后达到相对稳定, 表示动力学模拟在 10 ns 后很快达到平衡。而 PFBSK-HSA 复合体系的 R_g 值低于 HSA 体系, 这表明 PFBSK 的加入使 HSA 结构缩小, 导致其空腔变小, 进而引起其二级结构发生变化^[25]。

2.3 结合自由能分析

结合自由能分析可以有效地预测生物大分子的结构和功能, 利用 MM-PBSA 程序计算 PFBSK-HAS

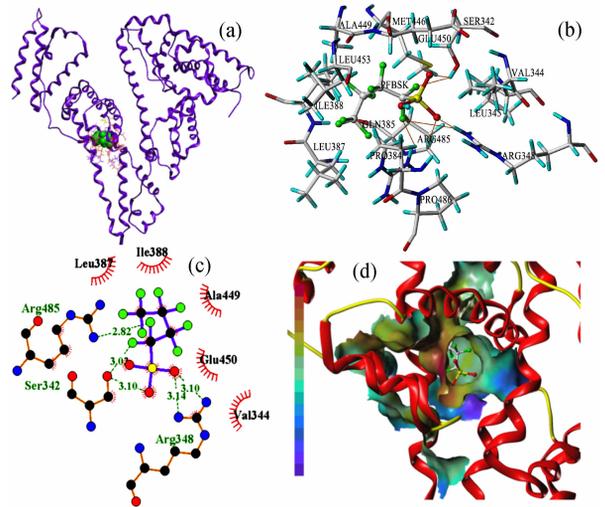


图 2 PFBSK 在 HSA 位点 II 的分子对接图

Fig. 2 Molecular docking and detailed view of the interactions of PFBSK and HSA

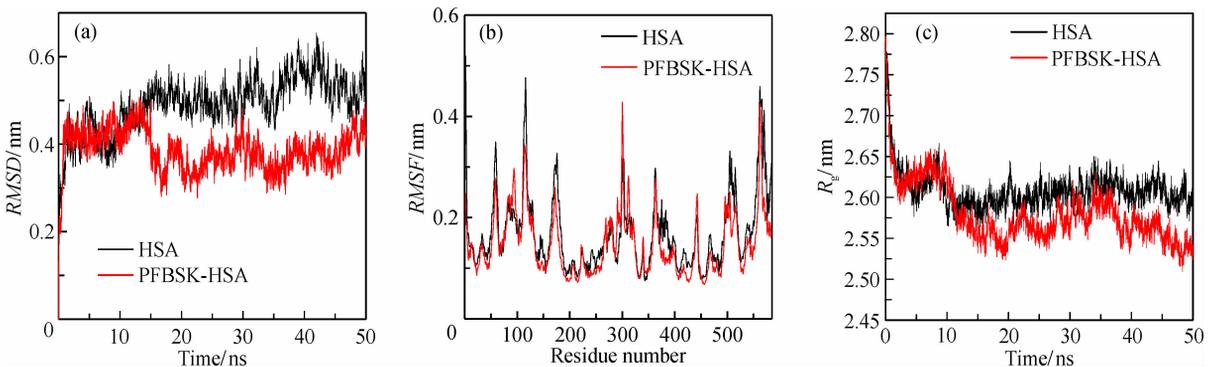


图 3 PFBSK 与 HSA 的分子动力学模拟

Fig. 3 Molecular dynamics of PFBSK and HSA

体系在生理条件下的结合自由能(ΔG_{bind})。本文忽略熵变对 ΔG_{bind} 的影响,通过提取 PFBSK-HSA 复合物在 MD 模拟平衡(45 ~ 50 ns)的构象轨迹求平均值并计算得到各个能量,结果如图 4a 所示,总体的结合自由能 ΔG_{bind} 为负值,且范德华作用力 E_{vdw} 、静电能 E_{elec} 、非极性溶剂化能 ΔG_{np} 也均为负值,充分表明真空中的静电能、范德华作用能、非极性溶剂化能都有利于 PFBSK 和 HSA 的结合。由于静电溶剂化能 ΔG_{pb} 对静电作用能 E_{elec} 的抑制作用使得总体的静电作用不利于小分子和蛋白质的结合。范德华作用能在 PFBSK 和 HSA 的结合过程中贡献很大,此时范德华作用力是结合的主要动力。

对每个氨基酸残基在结合过程中对结合自由能的贡献进行分析如图 4b 所示。其中 ARG348、ARG484、ARG485、ALA449 等对两者的结合有显著的贡献。结合分子对接分析,残基 ALA449 表现的疏水作用使其对结合自由能的贡献较大;而残基 ARG348 和 ARG485 形成的氢键也是对结合自由能的贡献较大的原因之一。

2.4 PFBSK-HSA 的同步荧光光谱

同步荧光具有灵敏度高和选择性好的优点,由于氨基酸残基的最大荧光波长与其所处周围环境的极性和疏水性有关,所以可以用其来探讨蛋白质的二级结构变化及部分氨基酸的光谱特征。荧光光谱的激发和发射波长差值 $\Delta\lambda = 15$ 和 60 nm 分别为酪氨酸和色氨酸残基的光谱特征。

图 5 为 PFBSK 和 HSA 相互作用的同步荧光光谱图,随着 PFBSK 浓度的逐渐增加,蛋白质的酪氨酸残基和色氨酸残基的荧光强度不断下降,说明 PFBSK 对 HSA 的荧光发生了一定程度的淬灭作用。色氨酸残基($\Delta\lambda = 60$ nm)荧光峰的最大发射波

长位置随 PFBSK 浓度的增加发生了微弱的蓝移(图 5b, 蓝移 1 nm),而酪氨酸残基($\Delta\lambda = 15$ nm)荧光峰的最大发射波长始终保持在 309 nm 处(图 5a),说明虽然 PFBSK 结合在 HSA 位点 II 的空腔,但是并没有对酪氨酸产生太大影响,而是对色氨酸附近的微环境产生了较大的影响,它破坏了色氨酸残基附近的微环境,增加了疏水性,进而影响了 HSA 的构象,所得结果与动力学模拟结果相吻合。

2.5 PFBSK-HSA 的荧光淬灭机理

荧光光谱是一种检测蛋白质结构变化和推断其与小分子结合的有效手段。当小分子与蛋白质结合的时候,色氨酸的荧光强度会发生明显的变化,

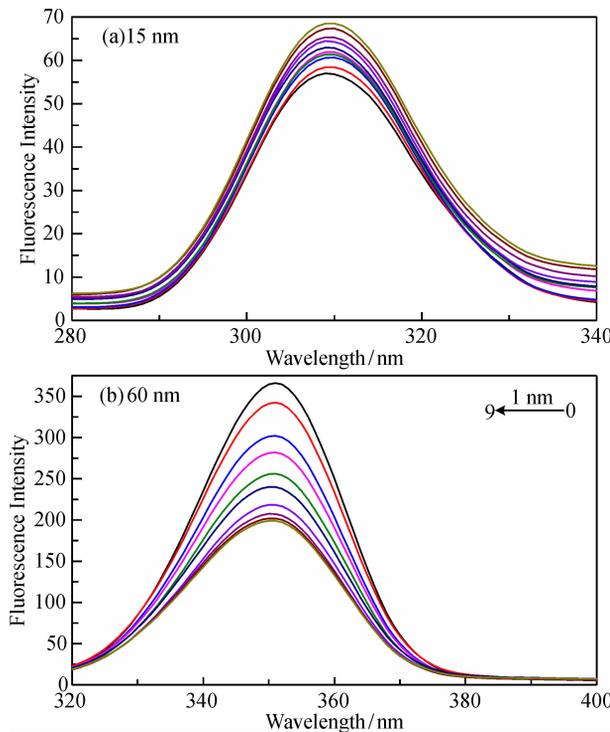


图 5 PFBSK-HSA 的同步荧光光谱

Fig. 5 Synchronous fluorescence spectra of PFBSK-HSA

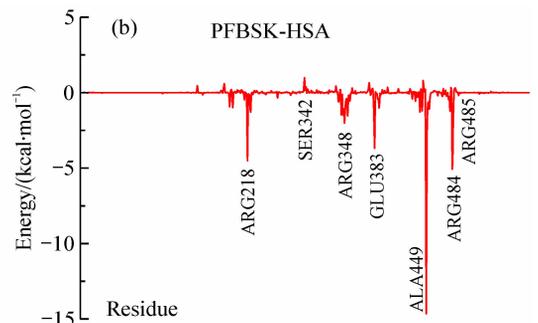
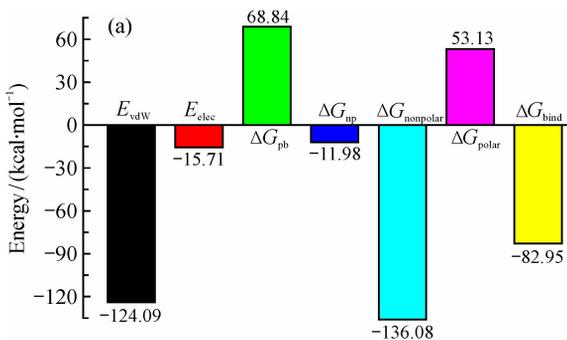


图 4 PFBSK-HSA 之间的结合自由能 (a) 与单个氨基酸残基对结合自由能贡献值 (b)

Fig. 4 Binding free energies of PFBSK-HSA complex (a) and binding free energy contribution of each residue in the complex (b)

HSA 的位点 I 中只存在一个色氨酸, 是 HSA 内源性荧光的主要来源。

图 6 是 298 K 下 PFBSK 和 HSA 的荧光淬灭图。HSA 的荧光强度出现了明显的蓝移现象, 说明 PFBSK 在进入 HSA 的疏水腔时, 引起构象变化导致 HSA 的荧光发生淬灭。

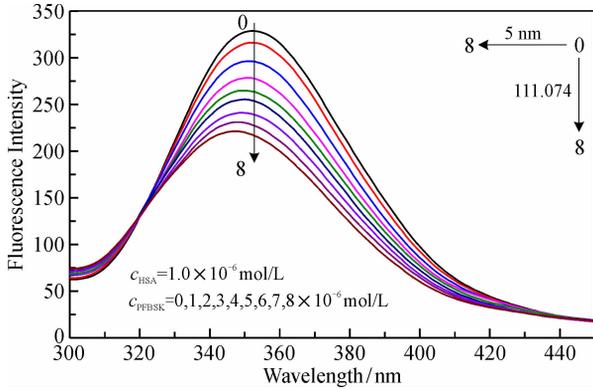


图 6 PFBSK-HSA 的荧光淬灭图

Fig. 6 Fluorescence quench titration of HSA with increasing PFBSK concentrations

PFBSK 和 HSA 的淬灭遵循 Stern-Volmer 方程^[26-27]:

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

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

其中, F_0 和 F 分别为 PFBSK 加入前、后的荧光强度; Q 是 PFBSK 的浓度; K_q 是 HSA 的淬灭速率常数; 而 K_{sv} 是 Stern-Volmer 的淬灭常数; τ 表示没有淬灭剂存在下荧光分子平均寿命, 生物大分子的荧光的荧光寿命约为 10^{-8} s; K_a 是蛋白质和淬灭剂的结合常数。

蛋白质的荧光淬灭机制主要分为动态淬灭(分子间的碰撞)、静态淬灭(淬灭剂和蛋白质形成复合物)和非辐射能量转移等几种机制, 分别在温度为 291、298 和 310 K 时加入 PFBSK, HSA-PFBSK 体系的荧光强度的变化如图 7a 所示。可见, 随着温度升高, K_{sv} 减小, K_q 大于各类淬灭剂对蛋白质大分子的最大分散碰撞常数($2 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), 淬灭剂与具有荧光物质的 HSA 在基态时发生了配

合反应, PFBSK 进入了 HSA 的空腔, 蛋白质原有的微环境和二级结构产生了变化, 从而导致的静态淬灭。

用修正的 Stern-Volmer 方程(式(2))可以得到不同温度下 PFBSK 浓度对 HSA-PFBSK 体系荧光强度的双对数曲线, 由该直线的斜率和截距可求出 PFBSK 与 HSA 结合位点数 n 及表观结合常数 K_a (图 7b)。

由表 1 可知, PFBSK 浓度对 HSA-PFBSK 体系荧光强度的双对数曲线在不同温度下都具有良好的线性关系。它们相互作用的结合常数在 $10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 数量级以上, 结合较稳定。结合位点数 n 约等于 1, 说明在 PFBSK 与 HSA 作用时只存在 1 个结合位点。这与分子对接和动力学模拟结果都存在高度的一致性。

2.6 PFBSK 与 HSA 能量转移的研究

Förster 偶极-偶极非辐射能量转移理论常被用于研究大分子体系中两个发光基团间的距离。理论

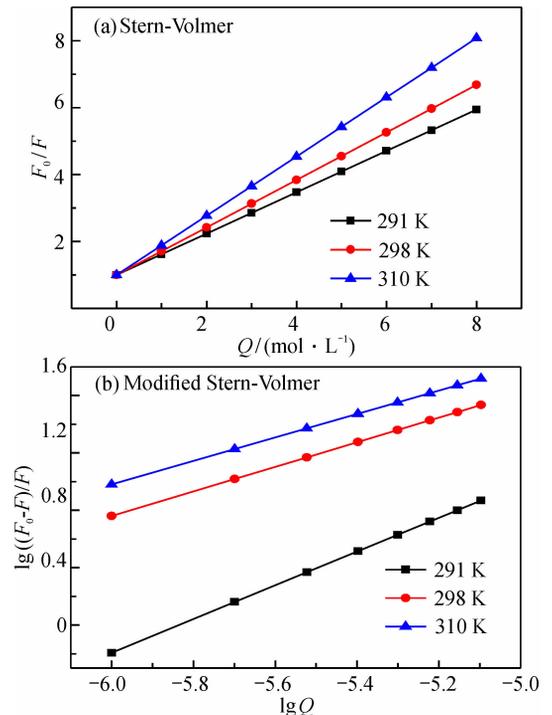


图 7 PFBSK 浓度与 F_0/F 及 $\lg((F_0 - F)/F)$ 的关系

Fig. 7 $Q - F_0/F$ and $\lg Q - \lg((F_0 - F)/F)$ diagrams

表 1 PFBSK 与 HSA 体系在不同温度下的表观结合常数 K_a 、荧光淬灭常数 K_{sv} 及结合位点 n

Table 1 Binding constants (K_a), quenching constant (K_{sv}) and number of binding sites (n) of PFBSK-HSA system at different temperatures

| T/K | $K_a/(10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$ | $K_{sv}/(10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$ | $K_q/(10^{13} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$ | n | R |
|-------|--|---|---|---------|---------|
| 291 | 72.7 | 8.85 | 7.47 | 1.175 7 | 0.996 7 |
| 298 | 8.03 | 7.10 | 6.91 | 0.857 4 | 0.976 3 |
| 310 | 7.63 | 6.18 | 4.16 | 0.816 8 | 0.996 0 |

方程^[28-29]可计算能量供给体和受体间的结合信息

$$E = 1 - F/F_0 = R_0^6/(R_0^6 + r^6); \quad (3)$$

$$R_0^6 = 8.79 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} \Phi J; \quad (4)$$

$$J = (\sum F(\lambda)\varepsilon(\lambda)\lambda^4\Delta\lambda)/(\sum F(\lambda)\Delta\lambda), \quad (5)$$

式中: E 为 PFBSK 与 HSA 二者间的能量转移效率; R_0 为能量转移距离; $K^2 = 2/3$; N 为介质的折射常数(取水和有机物的平均值 1.336); Φ 为荧光量子产率(0.15); J 为荧光发射光谱与受体吸收光谱的重叠积分。

图 8 是 PFBSK 的紫外吸收光谱和 HSA 的荧光发射光谱的重叠图, 根据 Förster 偶极-偶极非辐射能量转移机理通过式(3)~(5)计算得出给体与受体间能量转移的效率 E 、重叠积分 J 和结合距离 r 。由表 2 依据式(3)~(5)求出的给体与受体之间的距离 r 值等于 3.71 nm(小于 7 nm), 且 $0.5R < r < 1.5R$, 说明符合非辐射能量转移的条件, 并且能量转移效率较高, 因此 PFBSK 与 HSA 的荧光淬灭机制为静态淬灭和非辐射能量转移两种机制。

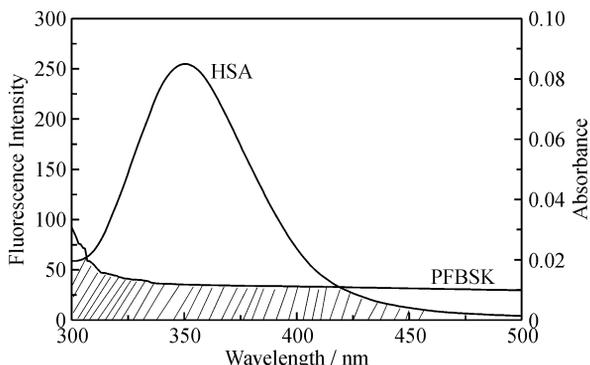


图 8 PFBSK 紫外吸收光谱与 HSA 荧光光谱的重叠图

Fig. 8 Overlap of fluorescence spectrum of HSA and absorbance spectrum of PFBSK

表 2 给体 PFBSK 与受体 HSA 间的结合距离

Table 2 Inding distance between PFBSK and amino acid residue of HSA

| $J/(\text{cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$ | E | R/nm | r/nm |
|--|---------|---------------|---------------|
| 2.11×10^{-14} | 0.018 2 | 2.88 | 3.71 |

2.7 PFBSK 与 HSA 作用力类型的确定

小分子与生物大分子之间结合的相互作用力包括静电引力、氢键、范德华力和疏水作用力等。通过热力学方程^[30]

$$\ln K_2/K_1 = \Delta H(1/T_1 - 1/T_2)/R; \quad (6)$$

$$\Delta G = -RT \ln K; \quad (7)$$

$$\Delta S = -(\Delta G - \Delta H)/T, \quad (8)$$

可计算反应的焓变(ΔH)、熵变(ΔS)和吉布斯自由能变化(ΔG), 并由此判断小分子和生物大分子之间的主要作用力类型。其中, K 为结合常数, $R = 8.314 51 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ 。

根据热力学参数可以判断作用力的类型, 当 $\Delta G < 0$ 时表示反应可以自发进行, 若 $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$ 时, 主要表现为疏水作用力; 若 $\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$ 时, 则是氢键和范德华力起主要作用; 若 $\Delta H < 0$, $\Delta S > 0$ 时, 则静电作用处于主导地位。计算不同温度下($T = 291$ 、 298 、 310 K), PFBSK 与 HSA 相互作用时的体系热力学参数, 如表 3 所示。

表 3 不同温度下 PFBSK 与 HSA 相互作用的热力学常数
Table 3 Thermodynamic parameters of PFBSK and HSA interaction at different temperatures

| T/K | $\Delta H/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$ | $\Delta G/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$ | $\Delta S/(\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$ |
|--------------|--|--|---|
| 291 | | -36.02 | |
| 298 | -173.77 | -32.22 | -475.57 |
| 310 | | -26.52 | |

当温度变化不大时, 可认为焓变 ΔH 是一个常数。该体系 $\Delta G < 0$, $\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$, 说明 PFBSK 与 HSA 的相互作用的主要类型为氢键和范德华作用力, 这与分子对接和结合自由能分析所得的结论相一致。

3 结 论

本文通过分子对接和动力学模拟从分子水平上对 PFBSK 与 HSA 的相互作用进行计算模拟和理论推测。分子对接结果和关键氨基酸残基分析表明 PFBSK 与 HSA 主要结合在位点 II 处, 其相互作用力主要体现为氢键和范德华作用力并伴有疏水作用力与静电引力。分子动力学模拟各种参数的结果显示: PFBSK 与 HSA 之间形成的复合物比游离的 HSA 具有更好的稳定性, 同时 PFBSK 与 HSA 的结合使得 HSA 原本的微环境发生变化, 从而导致 HSA 的二级结构发生变化, 所得的结果与分子对接相吻合。结合自由能分析中贡献较大的是范德华作用力和疏水作用力。实验和模拟结果表明 HSA 与 PFBSK 结合是由疏水作用力、静电引力并伴随着氢键和范德华力共同作用的结果。荧光光谱法得出 PFBSK 导致 HSA 的荧光淬灭机制为静态

淬灭并发生非辐射能量转移;通过对热力学参数的计算,焓变和熵变均为负值,说明 PFBSK 与 HSA 之间的主要作用力为氢键和范德华作用力;同步荧光和能量转移实验表明 PFBSK 与 HSA 的相互作用使 HSA 的构象发生改变,实验结果与分子对接和动力学模拟所得的结论高度一致,为今后探究全氟磺酸类化合物与 HSA 的研究提供了可靠的参考信息与分析手法。

参考文献:

- [1] Carter D C, Chang B, Ho J X, et al. Preliminary crystallographic studies of four crystal forms of serum albumin [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1994, 226(3): 1049–1052.
- [2] 曾溢滔. 蛋白质和核酸遗传病 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1981.
- [3] Kragh-Hansen U. Molecular aspects of ligand binding to serum albumin [J]. *Pharmacological Reviews*, 1981, 33 (1): 17–53.
- [4] Peters T, Sj Holm I. Albumin: structure, biosynthesis, function [M]. Pergamon Press, 1978.
- [5] 乔春玉. 药物与生物大分子相互作用的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2009.
- [6] Purcell M, Neault J F, Tajmir-Riahi H A. Interaction of taxol with human serum albumin [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1478 (1): 61–68.
- [7] Neumann E, Frei E, Funk D, et al. Native albumin for targeted drug delivery [J]. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2010, 7 (8): 915–925.
- [8] Klajnert B, Bryszewska M. Fluorescence studies on PAMAM dendrimers interactions with bovine serum albumin [J]. *Bioelectrochemistry*, 2002, 55 (1–2): 33–35.
- [9] Ashoka S, Seetharamappa J, Kandagal P B, et al. Investigation of the interaction between trazodone hydrochloride and bovine serum albumin [J]. *Journal of Luminescence*, 2006, 19 (1): 179–186.
- [10] Barik A, Mishra B, Kunwar A, et al. Interaction of curcumin with human serum albumin: thermodynamic properties, fluorescence energy transfer and denaturation effects [J]. *Chemical Physics Letters*, 2007, 436 (1–3): 239–243.
- [11] 余忆玄. 铜、铬对 PFOS 在沉积物上吸附行为的影响规律研究 [D]. 大连: 大连海事大学, 2013.
- [12] 祝凌燕, 林加华. 全氟辛酸的污染状况及环境行为研究进展 [J]. *应用生态学报*, 2008, 19 (5): 1149–1157.
- [13] Lau C. *Perfluorinated Compounds* [M]. Springer Basel, 2012.
- [14] Kissa E. Fluorinated surfactants and repellents [J]. *Textile Research Journal*, 2001, 71 (8): 750
- [15] 宋乃宁, 李蕾, 李海山, 等. 全氟辛酸与全氟辛基磺酸钾 28d 重复暴露毒理学效应比较研究 [J]. *毒理学杂志*, 2013, 27 (4): 302–306.
- [16] 冉小蓉, 张政祥, 张之旭. 环境水中全氟羧酸及全氟磺酸类化合物 (PFCs) 的分析 [J]. *环境化学*, 2009, 28 (3): 459–461.
- [17] Calafat A M, Needham L L, Kuklennyik Z, et al. Perfluorinated chemicals in selected residents of the American continent [J]. *Chemosphere*, 2006, 63 (3): 490–496.
- [18] Smithwick M, Muir D C G, Mabury S A, et al. Perfluoroalkyl contaminants in liver tissue from East Greenland polar bears (*Ursus maritimus*) [J]. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 2005, 24 (4): 981–986.
- [19] Martin J W, Kannan K, Berger U, et al. Analytical challenges hamper perfluoroalkyl research [J]. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38 (13): 248A–255A.
- [20] 张超杰, 周琪. 氟代有机物的环境影响及其降解 [J]. *重庆环境科学*, 2003, 25 (6): 41–42.
- [21] 段爱霞, 陈晶, 刘宏德, 等. 分子对接方法的应用与发展 [J]. *分析科学学报*, 2009, 25 (4): 473–477.
- [22] 赵丽琴, 肖军海, 李松. 分子对接在基于结构药物设计中的应用 [J]. *生物物理学报*, 2002, 18 (3): 263–270.
- [23] Tian Y, Du D, Rai D P, et al. Fused heterocyclic compounds bearing bridgehead nitrogen as potent HIV-1 NNRTIs. Part 1: Design, synthesis and biological evaluation of novel 5, 7-disubstituted pyrazolo [1, 5-a] pyrimidine derivatives [J]. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2014, 22 (7): 2052–2059.
- [24] Yamada H, Fukuda M, Miyakawa T, et al. Conformation Analysis of Peptides Derived from Laminin Alpha 1–2 Chain Using Molecular Dynamics Simulation [M]. *Proceedings of the 12th Asia Pacific physics conference (APPC12)*, 2014: 016016.
- [25] Kamaraj B, Purohit R. Computational screening of disease-associated mutations in OCA2 gene [J]. *Cell biochemistry and biophysics*, 2014, 68 (1): 97–109.
- [26] Ghalandari B, Divsalar A, Saboury A A, et al. Spectroscopic and theoretical investigation of oxali-palladium interactions with β -lactoglobulin [J]. *Spectrochimica Acta Part A Molecular & Biomolecular Spectroscopy*, 2014, 118: 1038–1046.
- [27] Sinisi V, Forzato C, Cefarin N, et al. Interaction of chlorogenic acids and quinides from coffee with human serum albumin [J]. *Food Chemistry*, 2015, 168: 332–340.
- [28] Fani N, Bordbar A K, Ghayeb Y. Spectroscopic, docking and molecular dynamics simulation studies on the interaction of two Schiff base complexes with human serum albumin [J]. *Journal of Luminescence*, 2013, 141 (6): 166–172.
- [29] Farooqi M J, Penick M A, Negrete G R, et al. Interaction of human serum albumin with novel 3, 9-disubstituted perylenes

[J]. The Protein Journal, 2013, 32 (6): 493 – 504.

alpinetin on the structure of human serum albumin [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2005, 13(5): 1837 – 1845.

[30] He W Y, Li Y, Xue C X, et al. Effect of Chinese medicine

Interaction between PFBSK and HSA based on spectral and computational simulation

WEI Yu-chen, YI Zhong-sheng, XU Jie, ZHAO Sai, WANG Hai-yang

(College of Chemistry and Bioengineering, Guilin University of Technology, Guilin 541006, China)

Abstract: The interaction mechanism of Potassium Perfluorobutane Sulfonate (PFBSK) and Human Serum Albumin (HSA) was studied by molecular docking, dynamics simulation and fluorescence spectroscopy. Molecular docking indicated that the PFBSK is binded to HSA at site II by the hydrogen bond. The results of dynamics simulation showed that the PFBSK binded to HSA could form a stable complexes, and the conformation of HSA has a little change. The binding free energy suggested that the ARG348, ARG484, ARG485 and ALA449 are the key residues in the interaction between PFBSK and HSA. Fluorescence spectroscopy showed that the binding of PFBSK to HSA could quench the endogenous fluorescence of HSA, and the quenching mechanism was static quenching. The thermodynamic parameters, $\Delta G < 0$, $\Delta H < 0$ and $\Delta S < 0$, indicating the interaction between PFBSK and HSA was driven mainly by hydrophobic forces and van de Waals forces, and that is consistent with molecular docking and dynamics simulation.

Key words: potassium perfluorobutane sulfonate; human serum albumin; molecular docking; molecular dynamics simulation; fluorescence spectroscopy