

寡肽吸附剂的制备及吸附机理

李纪红^{1,2}, 张原玮¹, 杨眉¹, 张静¹, 马翼¹, 袁直¹

(1. 功能高分子材料教育部重点实验室, 南开大学高分子化学研究所, 天津 300071;
2. 天津医科大学基础医学院, 天津 300070)

摘要 为清除尿毒症患者血清中分离出的八肽 VVRGCTWW (V8), 制备了不同间隔臂长含苯环的吸附剂 Phenc. 吸附实验结果显示, 吸附剂 Phc3c 具有非常好的吸附能力. 采用 NMR 和分子模拟技术对吸附剂的模型体系的吸附机理进行了研究. 结果显示, 配体中的苯环可与八肽形成 π - π 堆积, 而且间隔臂的增长可以克服空间位阻效应, 有效增加配体与 V8 的作用几率, 进而增强吸附剂与八肽的相互作用. 研究表明, 采用合理的分子模型及分子对接方法, 不仅可以合理解释吸附剂的吸附机理, 而且可用于吸附剂的虚拟筛选.

关键词 寡肽; 吸附剂; 配体; 吸附机理; 虚拟筛选

中图分类号 O629.7; O631

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2008)06-1159-04

尿毒症患者由于肾脏受损, 导致某些代谢物质无法通过肾脏排出, 在体内造成蓄积引起中毒, 最终导致死亡. 目前的研究结果表明, 尿毒症中分子蓄积物的主要成分为蛋白质和多肽^[1]. 我们从尿毒症患者血清中分离出来的中分子多肽 V8, 其一级结构为 VVRGCTWW, 可加速肾衰兔的死亡^[2]. 为清除该物质, 合成了不同结构的吸附剂, 研究显示, 含正丁基疏水配体的吸附剂对 V8 具有较好的吸附效果^[3]. 计算机模拟方法是研究分子识别机制及其动态过程的重要途径, 包括底物及受体分子模型的构建、底物及受体相互作用位点的确定、相互作用力的计算、底物和受体分子的对接及其动态过程的研究、体系热力学及动力学性质的计算等方面内容. 近年来, 应用分子模拟方法对有机分子, 尤其是药物分子的设计及虚拟筛选得到了很大的发展. 20 世纪 90 年代, 英国剑桥大学的 Lowe 等^[4] 首先将分子模拟方法用于仿生亲和配体的分子设计. 但是, 至今利用分子模拟方法筛选寡肽吸附剂配体及其作用机理的研究还鲜有报道.

为了清除中分子多肽 V8, 进一步研究吸附剂与多肽的作用模式, 开发新的多肽吸附剂, 本文制备了 3 种含有不同臂长苯环配体的吸附剂, 并进行了吸附实验, 建立了模型体系, 用 NMR 方法及分子模拟技术研究了吸附剂与 V8 的相互作用.

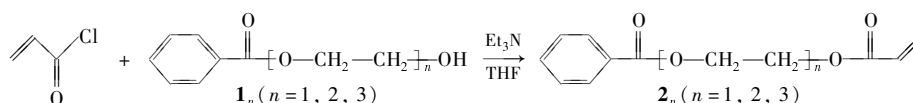
1 实验部分

1.1 试剂与仪器

V8 委托上海吉尔生物有限公司合成; 其它试剂均为分析纯. 400 MHz 核磁共振仪, VARIAN UNITY-plus-400 红外光谱仪 (Varian, 美国).

1.2 含苯环配体吸附剂的制备

1.2.1 含苯环功能单体的制备 含苯环功能单体的反应方程式如 Scheme 1 所示.



Scheme 1 Preparation route of the monomer with benzyl group

收稿日期: 2007-09-11.

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 50573034) 和国家自然科学基金重点项目基金 (批准号: 20634030) 资助.

联系人简介: 袁直, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事生物医用高分子材料研究. E-mail: zhiy@nankai.edu.cn

在 300 mmol 二醇类化合物(分别为乙二醇、二甘醇和三甘醇)和 60 mmol 三乙胺的四氢呋喃溶液中,在 0 °C 下搅拌滴加 60 mmol 苯甲酰氯的四氢呋喃溶液.滴加完毕后,于室温继续反应 12 h.用 100 mL 蒸馏水终止反应,用 30 mL 乙酸乙酯萃取反应混合液 3 次.合并萃取相,分别用饱和 NaHCO_3 溶液和蒸馏水洗涤 2 次,无水硫酸镁干燥.减压蒸去溶剂得粗产物.粗产物过硅胶柱纯化,流动相为乙酸乙酯/石油醚(体积比 1:2),收集最后一个点.减压除去溶剂得无色油状物 $\mathbf{1}_n$.

在 15 mmol 化合物 $\mathbf{1}_n$ 和 15 mmol 三乙胺的四氢呋喃溶液中,于 0 °C 和搅拌下滴加 15 mmol 丙烯酰氯的四氢呋喃溶液.滴加完毕后,于室温下继续反应 12 h.用 50 mL 蒸馏水终止反应,用 15 mL 乙酸乙酯萃取 3 次.合并萃取相,分别用饱和 NaHCO_3 溶液和蒸馏水洗涤 2 次,无水硫酸镁干燥.减压蒸去溶剂得产物 $\mathbf{2}_n$.

1.2.2 含苯环单体与丙烯酰胺线性共聚物的制备 将 19 mmol 的丙烯酰胺和 1 mmol 含苯环单体充分溶解于 20 mL 丁酮中,通 N_2 气 20 min 后,加入 1 mmol 引发剂偶氮二异丁腈(AIBN),升温至 60 °C 反应 24 h.产物分别用丁酮和无水乙醇洗涤 3 次,溶于 15 mL 蒸馏水中透析 3 d,经冷冻干燥得到白色固体.产率分别为 85.7%,82.8% 和 83.6%.根据间隔臂长记为 Phen.

1.2.3 含苯环配体吸附剂的制备 将 10 mmol 丙烯酰胺、10 mmol 含苯环单体和 1 mmol N,N' -亚甲基双丙烯酰胺充分溶解于 10 mL 四氢呋喃和 10 mL 蒸馏水的混合溶剂中,通 N_2 气 20 min 后,加入 4 mmol AIBN,升温至 60 °C 反应 24 h.产物分别用无水乙醇及蒸馏水抽提 24 h,用红外灯干燥.将所得凝胶固体研磨粉碎过 20~40 目筛待用.根据间隔臂长记为 Phenc.

1.3 核磁共振实验

具体实验方法见文献[5].

1.4 分子模拟方法

1.4.1 吸附剂分子模型的构建 利用 Sybyl 6.9 搭建吸附剂片段模型,用分子力学方法优化其结构,优化时选用 Tripos 力场,Gasteiger-Hückel 电荷,优化至能量梯度 RMS 小于 0.21 kJ/(A·mol).经过优化的吸附剂片段分子模型通过模拟退火进行低能构象搜索,初始温度设为 1000 K,降温至 300 K;升温时间 1000 fs,平衡时间 1000 fs;进行 10 个循环.所得优势构象再进行二次分子力学优化,优化时选用 Kollman all atom 力场,其它参数同上,取其中能量最低的构象作为最优构象.

1.4.2 八肽 V8 分子模型的构建 利用 Sybyl 6.9 中 Biopolymer 模块搭建了八肽 V8 的 α 螺旋构型,用分子力学方法优化其结构,优化时选用 Kollman all atom 力场,其它参数同上.

1.4.3 八肽 V8 与吸附剂片段结合能的计算 用 Sybyl 6.9 中的 Docking 模块进行八肽 V8 与吸附剂片段的分子对接,将配体以不同的取向位置与八肽的活性部分对接,选取结合能最大的构象加以保留.然后对结合构象进行分子力学优化,按下式计算复合物的结合能: $E_{\text{binding}} = E_{12} - E_1 - E_2$,其中, E_{binding} 为吸附剂片段与 V8 的结合能, E_{12} 为吸附剂片段与 V8 复合物的能量, E_1 为吸附剂片段的能量, E_2 为 V8 分子的能量.

2 结果与讨论

2.1 聚合物的制备和表征

前期实验结果表明,色氨酸残基是 V8 的重要结合位点,而且疏水作用是重要的作用方式^[3],因此考虑在配体结构中引入芳香结构以增强吸附剂对 V8 的作用.同时,为了考察配体臂长对吸附的影响,分别制备了以苯环为配体,乙二醇、二甘醇、三甘醇为间隔臂的功能单体,并通过共聚反应合成了相应的线性聚合物和交联吸附剂.单体的核磁共振表征结果见表 1.

交联吸附剂的红外光谱显示,在 710~720 cm^{-1} 处出现苯环的特征吸收峰,说明得到了含苯环配体的吸附剂.当共聚物中疏水单体的含量大于 5% 时,所得共聚物在水中的溶解度很小.为了获得水溶性共聚物以进行相关的核磁共振研究,在合成共聚物时需将苯环单体的比例控制在 5% 以内.通过 ^1H NMR 确定了共聚物的结构和功能单体比例.共聚物的 ^1H NMR 谱显示,在 δ 7.1~8.6 处出现一组苯环上氢的质子峰,含量在 3%~5% 之间.

Table 1 Assignment of the protons on monomer containing the phenyl group

Monomer	Phenyl group, δ	Methylene, δ	Acryloyl group, δ
2_1	7.42—8.05, m, 5H		5.82, m, 1H
			6.13, m, 1H
			6.43, m, 1H
2_2	7.42—8.04, m, 5H	4.33—4.48, m, 4H 3.79—3.86, m, 4H	5.82, m, 1H
			6.13, m, 1H
			6.43, m, 1H
2_3	7.41—8.07, m, 5H	4.16—4.48, m, 6H 3.65—3.85, m, 6H	5.83, m, 1H
			6.17, m, 1H
			6.44, m, 1H

2.2 含苯环配体聚丙烯酰胺共聚物与八肽的相互作用

利用化学位移微扰法考察吸附剂与 V8 的作用位点^[5]. 限于吸附剂的不溶性, 合成了线性共聚物作为吸附剂的模型. 核磁共振谱显示, 共聚物的加入对八肽各氨基酸残基的化学位移没有明显干扰. 以 Phe3c 为例, 图 1 为线性 Phe3 与 V8 相互作用的 COSY 谱, 加入 Phe3 后 V8 的谱峰没有发生明显的变化, 说明共聚物与 V8 没有明显的作用位点. 这可能是由于共聚物中疏水单体的含量较低, 位点受到邻近基团屏蔽造成的.

2.3 分子模拟

2.3.1 分子模型的建立

前期研究结果证实 V8 是一条具有 α 螺旋的寡肽^[6], 因此在构建八肽模型

时, 直接将其定义为 α 螺旋结构. 经分子力学优化得八肽优势构象的能量为 -155.38 kJ/mol. 以吸附剂片段结构作为吸附剂的模型. 为了确定合适的链段长度, 构建了含不同单体单元数的吸附剂片段, 利用 Docking 模块考察了它们与 V8 的结合能, 结果见表 2.

Table 2 Binding energy (kJ · mol⁻¹) of octapeptide and the model of adsorbents with different ligands

Amount of monomer unit (amount of functional monomer)	PAM	PVM	Diethylamino PAM	Butyl PAM
1(1)	-41.79	-788.84	-48.33	-57.89
3(1)	-76.56	-47.51	-78.61	-82.88
5(2)	-74.16	-85.26	-88.90	-147.75
7(3)	-72.44	-91.19	-107.43	-128.65
10(5)	-126.80	-142.58	-128.21	-126.19
13(6)	-83.43	-93.14	-88.49	-82.81

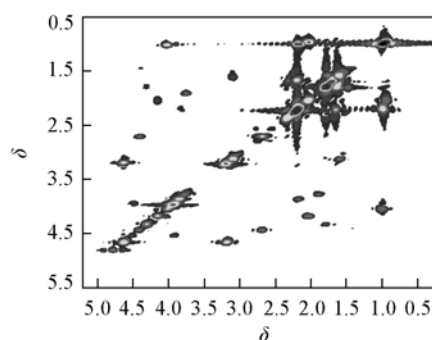
前期静态吸附实验结果显示, 聚丙烯酰胺 (PAM)、聚乙烯胺 (PVM)、二乙胺修饰聚丙烯酰胺 (Diethylamino PAM) 及丁基修饰聚乙烯胺 (Butyl PVM) 吸附剂对 V8 的吸附能力逐渐增强^[3]. 由表 2 结果可以看出, 当单体单元总数在 5~7 之间时, V8 与吸附剂模型的结合能与静态吸附实验的趋势完全吻合. 因此, 在建立吸附剂模型时, 单体单元的数量应控制在 5~7 个之间.

2.3.2 相互作用机理

建立了含 3 个苯环的配体单元和 3 个丙烯酰胺单元的吸附剂模型, 与 V8 进行分子对接. 表 3 显示, 随着苯环配体间隔臂的增长, 吸附剂模型对 V8 的结合能逐渐增加, 该结果与静态吸附结果的趋势完全一致.

Table 3 Interaction of V8 and adsorbents with benzyl group

Adsorbent	Adsorption capacity/(mg · g ⁻¹)	Binding energy of model/(kJ · mol ⁻¹)
PAM	0.14	—
Phe1	0.09	-92.45
Phe2	0.29	-123.25
Phe3	0.91	-148.14

**Fig. 1** COSY spectrum of mixed sample of V8 and polymer Phe3

吸附剂模型与 V8 的相互作用模式(如图 2 所示)揭示了吸附剂与 V8 的作用模式,配体上的苯环可与 V8 上的色氨酸残基形成 π - π 堆积^[7]. 当间隔臂过短时,由于空间位阻的影响,配体上的苯环难以与 V8 上的吲哚环达到空间上的契合. 当适当增加间隔臂的长度时,由于间隔臂的伸展及柔顺性,苯环与吲哚环之间形成 π - π 堆积的几率上升,因此吸附剂 V8 的吸附量也增高. 用分子对接的结果合理地解释了以乙二醇为间隔臂的吸附剂对八肽的吸附能力与聚丙烯酰胺吸附剂接近,以及长链间隔臂苯环配体吸附剂具有较高吸附量的实验事实. 上述结果显示,分子对接的方法既可用于对配体进行初步筛选,如比较结合能的大小,也可以对吸附剂的作用机理进行分析和判断.

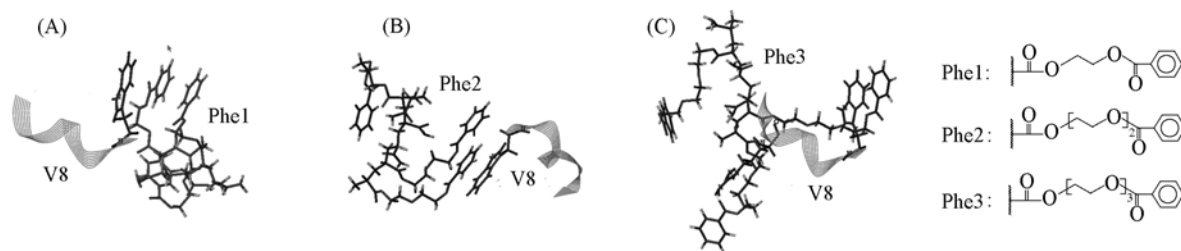


Fig. 2 Schematic diagram of the interaction of the octapeptide and the adsorbents with different ligands

The helix line represents the octapeptide, and the main structures of the different ligands are shown in the figure.

参 考 文 献

- [1] Kaplan B. , Cojocaru M. , Unsworth E. , *et al.* . J. Chromatogr. B[J], 2003, **796**: 141—153
- [2] Li G. H. , Chu J. G. Liu X. H. , *et al.* . Clin. Chim. Acta[J], 2004, **350**: 89—98
- [3] Li G. H. , Li J. H. , Wang W. , *et al.* . Biomacromolecules[J], 2006, **7**: 1811—1818
- [4] Burton N. P. , Lowe C. R. . J. Mol. Recognit. [J], 1992, **5**(2): 55—68
- [5] Wishart D. S. , Sykes B. D. . Methods Enzymol. [J], 1994, **239**: 363—392
- [6] LI Guo-Hua(李国华), LI Ji-Hong(李纪红), YANG Mei(杨眉), *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2005, **26**(10): 1855—1857
- [7] Meyer E. A. , Castellano R. K. , Diederich F. . Angew. Chem. Int. Ed. [J], 2003, **42**(11): 1210—1250

Preparation of Adsorbents for Oligopeptide and Adsorption Mechanism

LI Ji-Hong^{1,2}, ZHANG Yuan-Wei¹, YANG Mei¹, ZHANG Jing¹, MA Yi¹, YUAN Zhi^{1*}

(1. Key Laboratory of Functional Polymer Materials of the Ministry of Education,
Institute of Polymer Chemistry Nankai University, Tianjin 300071;

2. College of Basic Medical Science, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Octapeptide VVRGCTWW(V8) is an oligopeptide separated from the blood serum of uremic patients. To remove it, some adsorbents containing phenyl group with different length spacers were prepared. The result of adsorption experiments shows the adsorbent Phe3c had the highest adsorption capacity to V8. Molecular simulation technology and NMR were used to study the adsorption mechanism. The results demonstrate that the phenyl group in ligands could form π - π stack with Trp residue in octapeptide. Moreover, the strength of the interaction between the octapeptide and adsorbents could increase with the growth of the spacer, because the increasing length of spacer could overcome the space hinder. In a conclusion, under the condition of adoption of reasonable molecular models, the molecular docking could be used to virtually screen the adsorbents for oligopeptide, and to study the adsorption mechanism.

Keywords Oligopeptide; Adsorbent; Ligand; Adsorption mechanism; Virtual screening

(Ed. : H, J, Z)