

文章编号: 1000-7032(2019)07-0922-08

## 盐酸吡格列酮与胃蛋白酶之间的 相互作用及对药效、胃部消化能力的影响

王春丹, 刘保生\*, 边 刚, 马丽花, 张红彩, 程 旭

(河北省分析科学技术重点实验室, 国家级化学实验教学示范中心(河北大学),

药物化学与分子诊断教育部重点实验室, 河北 保定 071002)

**摘要:** 为了研究药物与胃蛋白酶(PEP)相互作用后对药效及胃部消化能力的影响,在模拟生理条件下,建立了光谱测定。本文通过荧光法、同步荧光法和分子对接模拟技术研究了在 298, 310, 318 K 时盐酸吡格列酮(PGH)和 PEP 之间的相互作用机理。结果表明,PGH 与 PEP 之间通过静电引力及氢键作用以静态猝灭的方式形成了 1:1 的稳定复合物;PEP 的酪氨酸残基(Tyr)和色氨酸残基(Trp)均参与了反应;PGH-PEP 的结合对后继配体存在正协同作用。通过估算得知:当患者服用 PGH 15 ~ 45 mg 时,胃液中的药物结合率为 0.0013% ~ 0.0032%,数值很小,即 PGH 与 PEP 的结合对 PGH 药效几乎没有影响;PEP 的结合率为 69.76% ~ 87.37%,即服用 PGH 使得游离的 PEP 减少 69.76% ~ 87.37%,表明服用 PGH 将使患者的消化功能受到影响。分子对接技术表明 PGH 与 PEP 的最佳结合位点位于 PEP 的催化活性中心处,且两者的结合作用改变了 PEP 催化活性中心处氨基酸残基的微环境。

**关键词:** 盐酸吡格列酮;胃蛋白酶;作用机理;荧光法;分子对接

中图分类号: O657.3 文献标识码: A DOI: 10.3788/fgxb20194007.0922

## Interaction of Pioglitazone Hydrochloride to Pepsin and Its Effect on Drug Efficiency and Digestive Ability of Stomach

WANG Chun-dan, LIU Bao-sheng\*, BIAN Gang, MA Li-hua, ZHANG Hong-cai, CHENG Xu

(Key Laboratory of Analytical Science and Technology of Hebei Province, National Chemistry Experimental Teaching Demonstration Center Hebei University, Key Laboratory of Pharmaceutical Chemistry and Molecular Diagnosis Ministry of Education, Baoding 071002, China)

\* Corresponding Author, E-mail: lbs@hbu.edu.cn

**Abstract:** In order to study the effect of the interaction between drugs and pepsin (PEP) on the pharmacodynamics and digestive ability of stomach, the spectral determination was established under simulated physiological conditions. At 298, 310 and 318 K, the interaction mechanism between pioglitazone hydrochloride (PGH) and PEP was studied by fluorescence, synchronous fluorescence and molecular docking simulation. The results showed that a stable 1:1 complex was formed between PGH and PEP by electrostatic force and hydrogen bonding in a static quenching manner. Tyrosine residues (Tyr) and tryptophan residues (Trp) in PEP were involved in the reaction. The binding of PGH-PEP had positive cooperativity effect on the subsequent ligands. The results showed that when patients took PGH 15 - 45 mg, the drug binding rate in gastric juice was 0.0013% - 0.0032%, which was very small, that is, the combination of PGH and PEP had little effect on PGH. The

收稿日期: 2018-07-09; 修订日期: 2018-10-26

基金项目: 国家自然科学基金(21375032)资助项目

Supported by National Natural Science Foundation of China(21375032)

binding rate of PEP was 69.76%–87.37%, that is, PGH reduced the free PEP by 69.76%–87.37%, indicating that PGH would affect the digestive function of the patients. Molecular docking technique showed that the best binding site between PGH and PEP was located at the catalytic active site of PEP, and the interaction between them changed the microenvironment of amino acid residues in PEP catalytic active center.

**Key words:** pioglitazone hydrochloride; pepsin; interaction mechanism; fluorescence spectroscopy; molecular docking

## 1 引 言

盐酸吡格列酮(PGH)属于治疗 2 型糖尿病的常用药物<sup>[1]</sup>。其主要副作用除了服用剂量过多时发生低血糖造成患者昏迷、甚至死亡<sup>[2-3]</sup>外,还有恶心、呕吐、腹痛、疲劳、厌食、黑尿等副作用。但有关口服药物对人体消化功能影响机理的光谱法研究至今未见报道。

胃蛋白酶(PEP)由 327 个氨基酸残基组成并且含有具有内禀荧光体的 13 个酪氨酸(Tyr)残基、5 个色氨酸(Trp)残基和 13 个苯丙氨酸(Phe)残基<sup>[4]</sup>。胃蛋白酶是脊椎动物胃黏膜中以酶原形式产生的典型的天冬氨酸蛋白酶<sup>[5]</sup>,由 N 端结构域(残基 1~175)和 C 末端结构域(残基 176~327)两个同源结构域组成<sup>[6]</sup>。它作为人体消化系统中一个重要的蛋白酶,食物、药物在进入胃时首先与胃蛋白酶相互作用。同时,胃蛋白酶的活性也可能受到食物、药物的影响。目前,胃蛋白酶常被用作消化蛋白酶的一个重要模型来研究小分子与蛋白质的相互作用,但尚未见采用光谱法研究 PGH 与 PEP 之间的作用机理的文献报道。本文通过传统荧光光谱法、同步荧光光谱法以及分子对接法,研究了 PGH 与 PEP 之间的相互作用机理并定量研究了 PGH 与 PEP 之间的相互作用对药物的药效及胃部消化功能的影响情况。该方法简单、快速,研究结果与药物实际对消化功能的副作用一致。

## 2 实 验

### 2.1 仪器与试剂

试剂:PEP(纯度 $\geq 99\%$ ,Sigma 公司),配成浓度为  $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L 的储备液;PGH 配成  $1.0 \times 10^{-3}$  mol/L 的储备液;HAc-NaAc 缓冲溶液(pH =  $2.00 \pm 0.02$ ,含  $0.10$  mol/L NaCl)。实验用水皆为二次石英蒸馏水,以上储备液于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  下避光

保存。

仪器:岛津 RF-5301PC 荧光分光光度计;SYC-15B 超级恒温水浴;SZ-93 自动双重纯水蒸馏器。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 荧光光谱测定

分别在 298,310,318 K 下,向一系列 10 mL 比色管中,分别加入 HAc-NaAc 缓冲溶液 1.0 mL,PEP( $1.0 \times 10^{-5}$  mol/L)溶液 2.0 mL 和不同体积的 PGH( $1.0 \times 10^{-3}$  mol/L)溶液,定容并水浴恒温静置 30 min。狭缝宽度设为 5 nm, $\lambda_{\text{ex}} = 280, 295$  nm 时,扫描荧光光谱。 $\Delta\lambda = 15, 60$  nm 时,扫描同步荧光光谱。

#### 2.2.2 分子对接

在蛋白数据库(Protein Data Bank)得到 PEP 的晶体结构(PDB ID: 5PEP),利用软件 ChemDraw Pro 14.0 和软件 ChemBio 3D Ultra 14.0 对 PGH 的结构进行处理。在 AutoDock 4.2.6 软件对 PGH 和 PEP 进行分子对接,主要采用遗传算法来计算与蛋白质和药物分子结合的可能构象<sup>[7]</sup>。

## 3 结果与讨论

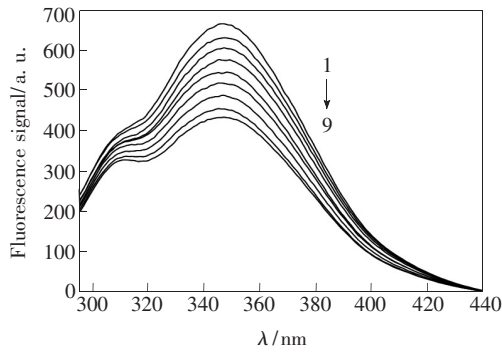
### 3.1 PGH 与 PEP 体系的荧光光谱

PGH-PEP 体系的荧光光谱见图 1。由图 1 可知,在  $\lambda_{\text{ex}} = 280$  nm 时,PEP 最佳荧光发射峰的波长为 347 nm,且随着 PGH 浓度的增加其有规律地下降(激发波长为 295 nm 时,PGH-PEP 体系的荧光光谱与其类似),表明 PGH 与 PEP 反应,使得 PEP 的荧光发生猝灭效应<sup>[8]</sup>。

通过其 Stern-Volmer<sup>[9]</sup>猝灭常数  $K_{\text{sv}}$  和猝灭速率常数  $k_{\text{q}}$  与温度的相关性可以区分其作用机制:

$$F_0/F = 1 + k_{\text{q}}\tau_0[Q] = 1 + K_{\text{sv}}[Q], \quad (1)$$

其中  $F_0$ 、 $F$  分别为无、有猝灭剂时的荧光强度; $\tau_0$



$C_{\text{PEP}} = 2.0 \times 10^{-6}$  mol/L, 1 ~ 9  $C_{\text{PGH}} = (0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0) \times 10^{-5}$  mol/L

图1 PGH-PEP 的荧光发射光谱( $T=298$  K,  $\lambda_{\text{ex}}=280$  nm)

Fig. 1 Fluorescence emission spectra of PGH-PEP system ( $T=298$  K,  $\lambda_{\text{ex}}=280$  nm)

表 1 不同温度下 PGH-PEP 体系的猝灭反应参数

Tab. 1 Quenching reactive parameters of PGH-PEP system at different temperatures

$\lambda_{\text{ex}}/\text{nm}$	$T/\text{K}$	$k_q/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	$K_{\text{SV}}/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$r_1$	$K_a/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$n$	$r_2$
	298	$4.81 \times 10^{11}$	$4.81 \times 10^3$	0.995 5	$4.57 \times 10^3$	0.89	0.994 9
280	310	$4.09 \times 10^{11}$	$4.09 \times 10^3$	0.999 5	$3.63 \times 10^3$	0.98	0.993 5
	318	$3.30 \times 10^{11}$	$3.30 \times 10^3$	0.997 8	$3.02 \times 10^3$	0.94	0.995 3
	298	$3.71 \times 10^{11}$	$3.71 \times 10^3$	0.994 4	$3.39 \times 10^3$	0.94	0.992 5
295	310	$2.94 \times 10^{11}$	$2.94 \times 10^3$	0.998 3	$2.57 \times 10^3$	0.88	0.998 2
	318	$2.37 \times 10^{11}$	$2.37 \times 10^3$	0.994 6	$2.19 \times 10^3$	0.86	0.998 5

$r_1$  为方程  $F_0/F-[Q]$  的线性相关系数;  $r_2$  为方程  $\lg[(F_0-F)/F]-\lg\{[D_1]-n[B_1](F_0-F)/F\}$  的线性相关系数。

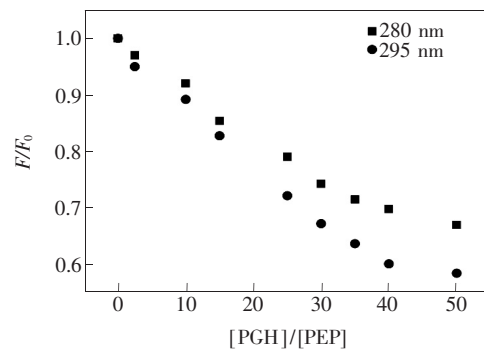
其中,  $[D_1]$  和  $[B_1]$  分别为 PGH 和 PEP 总浓度。以  $\lg\{(F_0-F)/F\}$  对  $\lg\{[D_1]-n[B_1](F_0-F)/F\}$  作图, 根据斜率和截距可得到  $n$  和  $K_a$  值并列表 1。由表 1 可知  $n \approx 1$ , 说明 PGH 与 PEP 结合时只存在一个高亲和力结合位点<sup>[12]</sup>, 即 PGH 与 PEP 结合形成 1:1 的复合物。温度升高  $K_a$  降低可知温度升高使 PGH 与 PEP 的结合能力降低, 表明 PGH-PEP 体系发生了静态猝灭<sup>[13]</sup>。在荧光光谱实验中,  $\lambda_{\text{ex}}=280$  nm 时可以同时激发蛋白的 Tyr 和 Trp 残基的荧光;  $\lambda_{\text{ex}}=295$  nm 时只能激发蛋白的 Trp 残基的荧光。由相同温度下  $K_a(\lambda_{\text{ex}}=280 \text{ nm}) > K_a(\lambda_{\text{ex}}=295 \text{ nm})$  可知, PEP 中的 Tyr 和 Trp 残基均参与了反应。相关系数  $r_1, r_2$  均大于 0.99, 说明了数据的可靠性以及计算结果的准确性。图 2 为 PEP 中的 Tyr 和 Trp 残基参与情况的。由图 2 可见,  $\lambda_{\text{ex}}=280, 295$  nm 时的猝灭曲线没有重叠, 并且  $\lambda_{\text{ex}}=280$  nm 荧光猝灭程度比  $\lambda_{\text{ex}}=295$  nm 时大, 说明在 PGH 与 PEP 结合的过程中, PEP 的 Trp 与 Tyr 残基均参加反应且 PEP

和  $[Q]$  分别为分子荧光平均寿命(约为  $10^{-8}$  s) 和猝灭剂的浓度。不同温度的计算结果列于表 1。由表 1 可知,  $K_{\text{SV}}$  与  $k_q$  值随着温度的升高均呈现降低趋势, 可见该体系的猝灭方式为静态猝灭; 不同温度下的  $k_q$  均大于各类猝灭剂对生物分子的最大碰撞扩散常数( $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )<sup>[10]</sup>, 也印证了该体系的猝灭类型为静态猝灭的正确性。

为了进一步得到结合常数( $K_a$ )、结合位点数( $n$ ) 等信息, 运用公式(2)<sup>[11]</sup> 处理, 结果一并列入表 1:

$$\lg\left(\frac{F_0-F}{F}\right) = n \lg K_a + n \lg\left\{[D_1] - n \frac{F_0-F}{F}[B_1]\right\}, \quad (2)$$

的 Trp 残基参与反应的程度更大。



$C_{\text{PEP}} = 2.0 \times 10^{-6}$  mol/L,  $C_{\text{PGH}} = 5.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-4}$  mol/L

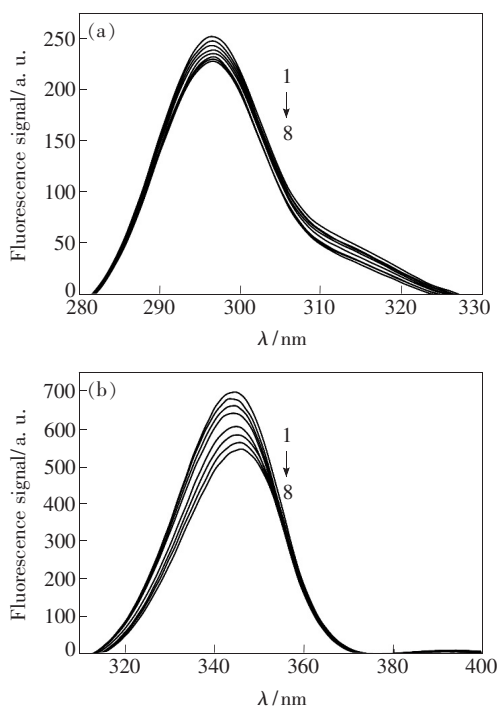
图 2 PGH 与 PEP 作用的相对荧光曲线( $T=298$  K)

Fig. 2 Relative fluorescence curves of the interaction between PGH and PEP( $T=298$  K)

### 3.2 PGH 与 PEP 体系的同步荧光光谱

同步荧光光谱能够给出分子环境信息, 尤其是在荧光基团附近<sup>[14]</sup>。图 3 为 PGH-PEP 体系的同步荧光光谱。  $\Delta\lambda = 15$  nm (Tyr 残基) 的荧光猝

灭程度远小于  $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$  (Trp 残基) 的荧光猝灭程度,表明 PEP 的 Trp 残基参与反应程度比 Tyr 残基大<sup>[15]</sup>。图 3(a) 中的荧光峰并没有随着 PGH 加入而发生位移,说明 PGH 与 PEP 的结合不改变 PEP 中 Tyr 残基周围的微环境;图 3(b) 中 PEP 344 nm 处的荧光峰随着 PGH 加入红移至 346 nm,说明 PGH 与 PEP 的结合改变了 PEP 中 Trp 残基周围的微环境,使 PEP 疏水性降低<sup>[16]</sup>。



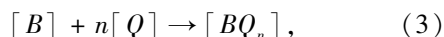
$C_{\text{PEP}} = 2.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ ,  $1 \sim 8 C_{\text{PGH}} = (0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 7.0, 9.0, 10.0) \times 10^{-5} \text{ mol/L}$

图3 PGH-PEP体系的同步荧光光谱( $T = 298 \text{ K}$ )。(a)  $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ ; (b)  $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 。

Fig. 3 Synchronous fluorescence spectra of PGH-PEP system ( $T = 298 \text{ K}$ ). (a)  $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ . (b)  $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ .

### 3.3 PGH-PEP体系结合率

当药物与蛋白结合达到动态平衡时,蛋白一部分为游离型蛋白,另一部分为结合型蛋白。若蛋白有  $n$  个相同且独立的结合位点时,PGH-PEP体系存在如下反应:



如果蛋白 B 与药物 Q 的相互作用符合 Langmuir 单分子吸附模型<sup>[17]</sup>,则平衡常数  $K_a$  为:

$$K_a = \frac{[BQ_n]}{[Q]^n[B]}, \quad (4)$$

当  $n = 1$  时,即 PGH 与 PEP 以 1:1 比例结合时,则:

$$K_a = \frac{[BQ]}{[Q][B]}, \quad (5)$$

假设 PGH 总浓度为  $Q$ , PEP 总浓度为  $B$ , PGH-PEP 复合物浓度为  $x$ ,则  $K_a$  亦表示为:

$$K_a = \frac{x}{(Q-x)(B-x)}, \quad (6)$$

解该一元二次方程,经整理得:

$$x =$$

$$\frac{K_a(Q+B) + 1 - \sqrt{K_a^2(Q-B)^2 + 2K_a(Q+B) + 1}}{2K_a}, \quad (7)$$

则药物结合率可表示为:

$$W(Q) = \frac{x}{Q} \times 100\% =$$

$$\frac{K_a(Q+B) + 1 - \sqrt{K_a^2(Q-B)^2 + 2K_a(Q+B) + 1}}{2K_aQ} \times 100\%, \quad (8)$$

蛋白结合率为:

$$W(B) = \frac{x}{B} \times 100\% =$$

$$\frac{K_a(Q+B) + 1 - \sqrt{K_a^2(Q-B)^2 + 2K_a(Q+B) + 1}}{2K_aB} \times 100\%, \quad (9)$$

以本实验的 PEP 浓度  $2.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 、PGH 浓度  $2.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ ,由表 1 中不同温度下  $K_a$  值结合公式(8)、(9)计算了不同温度下的  $W(Q)$  和  $W(B)$  值。得  $W(Q)$ : 0.83% ~ 0.62% (298 K)、0.67% ~ 0.53% (310 K)、0.57% ~ 0.46% (318 K),表明随着药物浓度的增大  $W(Q)$  值减小,但是变化程度非常小(小于1%),故 PGH 与 PEP 的结合对 PGH 的药效的影响很小,可以忽略不计; $W(B)$  的变化范围为: 8.31% ~ 31.23% (298 K)、6.73% ~ 26.53% (310 K)、5.67% ~ 23.11% (318 K),可见随着 PGH 浓度增大,蛋白结合率增大。以 310 K 数据 6.73% ~ 26.53% 为例,表明 PGH 与 PEP 的结合将使得 PEP 游离浓度减小 6.73% ~ 26.53%,即由于 PGH 与 PEP 的结合使得 PEP 的游离浓度由 100% 减小到 93.27% ~ 73.47%,由此可推断 PGH 与 PEP 的结合作用将会对胃部的消化能力产生一定的影响。设  $R = Q/B$ ,分别以  $W(Q)$  和  $W(B)$  对  $R$  作图,如图 4。从图 4 中可以看出,随着温度的升高, $W(Q)$  值很小,呈下降趋势;而  $W(B)$  值较大且呈升高趋势。对 310 K

时的曲线做非线性拟合可得结合模型:  $W(Q) = 2.088 \times 10^{-5} R^2 - 0.0048R + 0.718$ , 相关系数  $r = 0.9993$ ;  $W(B) = -0.0029R^2 - 0.6689R + 0.3670$ , 相关系数  $r = 0.9997$ 。

PGH 的实际服用剂量为每次 15 ~ 45 mg, 人体胃液量按 50 mL 计算, 则 PGH 在胃液中浓度为  $7.64 \times 10^{-4} \sim 2.29 \times 10^{-3}$  mol/L, PEP 在胃液中浓度为  $2.6 \times 10^{-8} \sim 4.3 \times 10^{-8}$  mol/L<sup>[18]</sup>。由实验所得 310 K 的  $K_a$  值及公式(8)、(9)计算,  $0.0013\% \leq W(Q) \leq 0.0032\%$ , 值非常小, 表明此时 PGH 与 PEP 的结合对 PGH 药效的影响很小, 几乎可以忽略

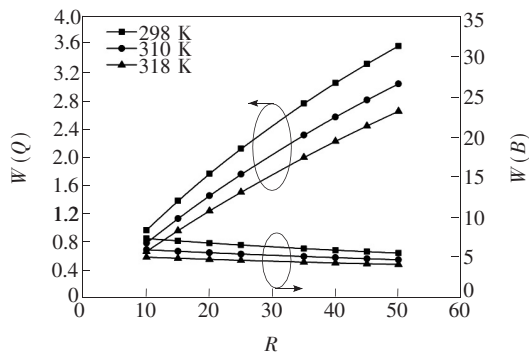


图 4 PGH 的结合率与 PEP 的结合率

Fig. 4 Binding rate of PGH and the binding rate of PEP

表 2 不同温度下 PGH-PEP 体系的热力学参数

Tab. 2 Thermodynamic parameters of PGH-PEP at different temperatures

$\lambda_{ex}/nm$	$T/K$	$K_a/(L \cdot mol^{-1})$	$\Delta H/(kJ \cdot mol^{-1})$	$\Delta S/(J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1})$	$\Delta G/(kJ \cdot mol^{-1})$
280	298	$4.57 \times 10^3$	-16.17	15.80	-20.88
	310	$3.63 \times 10^3$		15.98	-21.13
	318	$3.02 \times 10^3$		15.77	-21.19

### 3.5 PGH 与 PEP 体系的协同性

利用 Hill 方程<sup>[24]</sup>计算 Hill 系数  $n_H$ :

$$\lg\{Y/(1-Y)\} = \lg K_a + n_H \lg[L], \quad (11)$$

$Y$  和  $K_a$  分别表示结合饱和分数、结合常数。其中:

不计;而  $69.76\% \leq W(B) \leq 87.37\%$  数值很大, 表明服用 PGH 后, 用来起消化作用的游离 PEP 仅剩 30.24% ~ 12.63%, 由此推测由于服用 PGH 后 PGH 与 PEP 的结合使得游离 PEP 浓度大幅度降低, 将对胃部的消化能力造成严重影响, 即服用 PGH 之后可能引起恶心、呕吐以及胃部不适等, 这与 PGH 药物说明书服用 PGH 所引起胃部的副作用相符。

### 3.4 PGH 与 PEP 体系的作用力类型

由体系的自由能( $\Delta G$ )、焓( $\Delta H$ )和熵( $\Delta S$ )来推断体系的作用力类型<sup>[19-20]</sup>。可通过公式(10)<sup>[21]</sup>及表 1 中不同温度下的  $K_a$  值进行计算, 结果列于表 2:

$$\Delta G = -RT \ln K = \Delta H - T\Delta S, \quad (10)$$

根据表 2,  $\Delta G < 0$  表明 PGH-PEP 的相互作用可以自发进行<sup>[22]</sup>;  $\Delta S > 0$  表明 PGH-PEP 的相互作用是熵增加过程;  $\Delta H < 0$  表明 PGH-PEP 的结合是放热过程, 温度升高不利于反应进行, 即温度升高使 PGH 与 PEP 结合能力减弱; 该结论与表 1 中  $K_a$  随温度升高而降低结论一致。同时  $\Delta S > 0$ 、 $\Delta H < 0$ , 表明 PGH 与 PEP 的结合作用以静电引力为主<sup>[23]</sup>。

$$Y/(1-Y) = Q/(Q_m - Q), \quad (12)$$

$$Q = 1 - I/I_0, \quad (13)$$

$1/Q$  对  $1/[L]$  作图的截距为  $1/Q_m$ 。PGH-PEP 体系的  $n_H$  计算结果见表 3。 $n_H$  大于 1 时表示第一种

表 3 不同温度下 PGH-PEP 体系的 Hill 系数

Tab. 3 Hill coefficient of PGH-PEP system at different temperatures

$T/K$	$\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$		$\lambda_{ex} = 295 \text{ nm}$		$\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$		$\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$	
	$n_H$	$r_3$	$n_H$	$r_3$	$n_H$	$r_3$	$n_H$	$r_3$
298	1.03	0.9963	1.02	0.9944	1.02	0.9966	1.03	0.9915
310	1.08	0.9917	1.04	0.9929	1.04	0.9932	1.06	0.9957
318	1.15	0.9901	1.09	0.9986	1.12	0.9918	1.05	0.9988

$n_H$  为 PGH-PEP 体系的 Hill 系数;  $r_3$  为方程  $\lg\{Y/(1-Y)\} - \lg[L]$  的线性相关系数。

配体与后继配体之间为正协同作用即 PGH-PEP 的结合有利于后继配体再与 PEP 结合; $n_H < 1$  表示第一种配体与后继配体之间为负协同作用即 PGH-PEP 的结合不利于后继配体再与 PEP 结合; $n_H = 1$  表示第一种配体与后继配体之间为零协同作用即 PGH-PEP 的结合不影响后继配体再与 PEP 结合。由表 3 中的数据可知  $n_H$  在 1.02 ~ 1.15 范围内,数值均大于 1,由此可以说明 PGH 与 PEP 结合后对后继配体与 PEP 结合能够产生一定的促进作用。两种方法所得结果一致。

### 3.6 分子对接

PEP 的二级结构有 4 个能明显区分的区域,

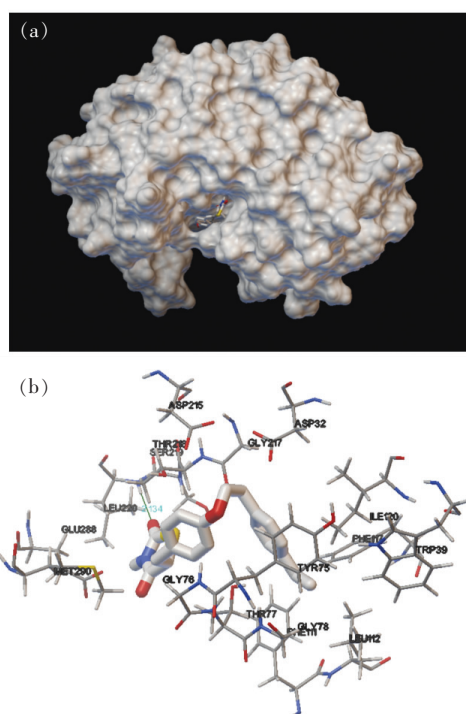


图5 PGH 与 PEP 相互作用的分子对接图。(a) PGH 与 PEP 发生作用区域;(b) PGH 与 PEP 活化中心发生作用的氨基酸残基。

Fig. 5 Computation docking model of the interaction between PGH and PEP. (a) PGH located within the hydrophobic pocket in PEP. (b) Detailed illustration of the amino acid residues lining the binding site in the PGH and PEP cavity.

### 参 考 文 献:

- [1] ZHANG C C, MATZGER A J. A newly discovered racemic compound of pioglitazone hydrochloride is more stable than the commercial conglomerate [J]. *Cryst. Growth Des.*, 2017, 17(2):414-417.
- [2] 王静文, 曹进, 王钢力, 等. 保健食品中非法添加药物检测技术研究进展 [J]. *药物分析杂志*, 2014, 34(1):1-11.  
WANG J W, CAO J, WANG G L, et al.. Research progress on determination technologies for illegally added drugs in

其中第一个区域是由 6 条反向平行链组成的  $\beta$ -折叠结构,从而形成的分子骨架。 $\beta$ -折叠的形成进一步确立了 PEP 的催化活性位点<sup>[25]</sup>,催化活性位点主要由天冬氨酸 ASP32 和 ASP215 组成。图 5(a)为 PGH 与 PEP 的最佳结合位置。分子对接结果显示,PGH-PEP 的结合能  $\Delta G = -21.37 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,与表 2 实验结果  $\Delta G$  较为一致,表明这一结合模式可以较为真实地反映 PGH 与 PEP 的相互作用方式。图 5(b)为 PGH 分子周围氨基酸残基示意图,PGH 被氨基酸残基 ASP215、THR218、SER219、GLU288、LEU220、MET290、GLY217、ASP32、GLY76、THR77、GLY78、PHE111、TYR75、PHE117、ILY120、TRP39 所包围,并与 LEU229 形成氢键,键长为 0.213 4 nm。结合荧光光谱的实验结果,可见 PGH-PEP 体系的结合是由静电引力与氢键作用力共同驱动,PGH 与 PEP 的结合位点在 Trp 和 Tyr 残基附近说明 PGH 能够使 PEP 发生荧光猝灭,由此可以说明分子对接的结果与荧光法结果是一致的。从图 5(b)中可以看出 PGH 周围的氨基酸残基包含 ASP215 和 ASP32,由此可见 PGH 与 PEP 的结合位置位于 PEP 的催化活性位点处。

## 4 结 论

以荧光光谱法和分子模拟技术探讨了 PGH 与 PEP 之间的相互作用,建立了 PGH-PEP 的体外结合模型。结果证明 PGH 能够自发地在静电引力与氢键作用力的驱动下与 PEP 结合,并且仅有一个结合位点,该结合位点位于 PEP 的催化活性中心处。PGH-PEP 复合物的生成使 PEP 中发色基团微环境发生改变,且对于后继药物存在正协同作用。通过结合常数计算了蛋白结合率和药物结合率,定量阐述了 PGH 与 PEP 的相互作用对药物药效及消化功能的影响。PGH 与 PEP 相互作用的光谱法研究对于合理用药与新药的研发均具有指导意义,且方法简单、快速。

- health food [J]. *Chin. J. Pharm. Anal.*, 2014, 34(1):1-11. (in Chinese)
- [ 3 ] 李改霞, 刘保生, 李志云, 等. 盐酸吡格列酮与 BSA 反应机理的荧光猝灭法、同步荧光法比较研究 [J]. *发光学报*, 2015, 36(6):705-710.
- LI G X, LIU B S, LI Z Y, *et al.*. Comparative studies on the reaction mechanism of pioglitazone hydrochloride with bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy and synchronous fluorescence spectroscopy [J]. *Chin. J. Lumin.*, 2015, 36(6):705-710. (in Chinese)
- [ 4 ] WANG J, CHAN C, HUANG F W, *et al.*. Interaction mechanism of pepsin with a natural inhibitor gastrodin studied by spectroscopic methods and molecular docking [J]. *Med. Chem. Res.*, 2017, 26(2):405-413.
- [ 5 ] YING M, HUANG F W, YE H D, *et al.*. Study on interaction between curcumin and pepsin by spectroscopic and docking methods [J]. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2015, 79:201-208.
- [ 6 ] MA X L, HE J W, HUANG Y M, *et al.*. Investigation and comparison of the binding between tolvaptan and pepsin and trypsin: multi-spectroscopic approaches and molecular docking [J]. *J. Mol. Recognit.*, 2017, 30(5):e2598-1-9.
- [ 7 ] GÖKOGLU E, YILMAZ E. Fluorescence interaction and determination of sulfathiazole with trypsin [J]. *J. Fluoresc.*, 2014, 24(5):1439-1445.
- [ 8 ] TAYYAB S, IZZUDIN M M, KABIR M Z, *et al.*. Binding of an anticancer drug, axitinib to human serum albumin: fluorescence quenching and molecular docking study [J]. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2016, 162:386-394.
- [ 9 ] RAZA M, YANG J, YUN W, *et al.*. Insights from spectroscopic and *in-silico* techniques for the exploitation of biomolecular interactions between human serum albumin and paromomycin [J]. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2017, 157:242-253.
- [ 10 ] MOEINPOUR F, MOHSENI-SHAHRI F S, MALAEKEH-NIKOUEI B, *et al.*. Investigation into the interaction of losartan with human serum albumin and glycated human serum albumin by spectroscopic and molecular dynamics simulation techniques: a comparison study [J]. *Chem. Biol. Interact.*, 2016, 257:4-13.
- [ 11 ] FERROZ S R, TEOH Y J, MOHAMAD S B, *et al.*. Interaction of flavokawain B with lysozyme: a photophysical and molecular simulation study [J]. *J. Lumin.*, 2015, 160:101-109.
- [ 12 ] AMROABADI M K, TAHERI-KAFRANI A, SAREMI L H, *et al.*. Spectroscopic studies of the interaction between alprazolam and Apo-human serum transferrin as a drug carrier protein [J]. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2018, 108:263-271.
- [ 13 ] BANI-YASEEN A D. Spectrofluorimetric study on the interaction between antimicrobial drug sulfamethazine and bovine serum albumin [J]. *J. Lumin.*, 2011, 131(5):1042-1047.
- [ 14 ] BUDDANAVAR A T, NANDIBEWOOR S T. Multi-spectroscopic characterization of bovine serum albumin upon interaction with atomoxetine [J]. *J. Pharm. Anal.*, 2017, 7(3):148-155.
- [ 15 ] EHTESHAMI M, RASOULZADEH F, MAHBOOB S, *et al.*. Characterization of 6-mercaptopurine binding to bovine serum albumin and its displacement from the binding sites by quercetin and rutin [J]. *J. Lumin.*, 2013, 135:164-169.
- [ 16 ] XU C B, GU J L, MA X P, *et al.*. Investigation on the interaction of pyrene with bovine serum albumin using spectroscopic methods [J]. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2014, 125:391-395.
- [ 17 ] 赵旭, 王毅力, 郭瑾珑, 等. 颗粒物微界面吸附模型的分形修正——朗格缪尔(Langmuir)、弗伦德利希(Freundlich)和表面络合模型 [J]. *环境科学学报*, 2005, 25(1):52-57.
- ZHAO X, WANG Y L, GUO J L, *et al.*. Modification of the micro-interface adsorption model on particles with fractal theory-Langmuir, Freundlich and surface complexation adsorption model [J]. *Acta Sci. Circumstant.*, 2005, 25(1):52-57. (in Chinese)
- [ 18 ] 冯军鹏, 陈秀, 王瑞玲, 等. 不同胃液中胃蛋白酶含量的测定 [J]. *中国医学工程*, 2012, 20(3):3-5.
- FENG J P, CHEN X, WANG R L, *et al.*. Assay of the pepsin content in the various gastric juice [J]. *China Med. Eng.*, 2012, 20(3):3-5. (in Chinese)
- [ 19 ] HUANG S, QIU H N, LIU Y, *et al.*. Systematical investigation of *in vitro* interaction of InP/ZnS quantum dots with human serum albumin by multispectroscopic approach [J]. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2016, 148:165-172.
- [ 20 ] BOLATTIN M B, NANDIBEWOOR S T, JOSHI S D, *et al.*. Interaction of hydralazine with human serum albumin and effect of  $\beta$ -cyclodextrin on binding: insights from spectroscopic and molecular docking techniques [J]. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2016, 55(19):5454-5464.
- [ 21 ] HU Y J, YANG Y O, DAI C M, *et al.*. Site-selective binding of human serum albumin by palmitate: spectroscopic approach

- [J]. *Biomacromolecules*, 2010,11(1):106-112.
- [22] MARIAM J,DONGRE P M,KOTHARI D C. Study of interaction of silver nanoparticles with bovine serum albumin using fluorescence spectroscopy [J]. *J. Fluoresc.*, 2011,21(6):2193-2199.
- [23] TIAN Z Y,ZANG F L,LUO W,*et al.*. Spectroscopic study on the interaction between mononaphthalimide spermidine (MINS) and bovine serum albumin (BSA) [J]. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2015,142:103-109.
- [24] CUI M M,LIU B S,LI T T,*et al.*. Interaction of transferrin with cefuroxime sodium [J]. *Spectrosc. Lett.*, 2016,49(9):573-581.
- [25] ZHANG H M,CAO J,FEI Z H,*et al.*. Investigation on the interaction behavior between bisphenol a and pepsin by spectral and docking studies [J]. *J. Mol. Struct.*, 2012,1021:34-39.



王春丹(1991-),女,河北衡水人,硕士研究生,2016年于保定学院获得学士学位,主要从事分子发光学理论与应用的研究。

E-mail: 2316879737@qq.com



刘保生(1963-),男,河北保定人,硕士,研究员,1992年于河北大学获得硕士学位,主要从事分子发光学理论与应用的研究。

E-mail: lbs@hbu.edu.cn