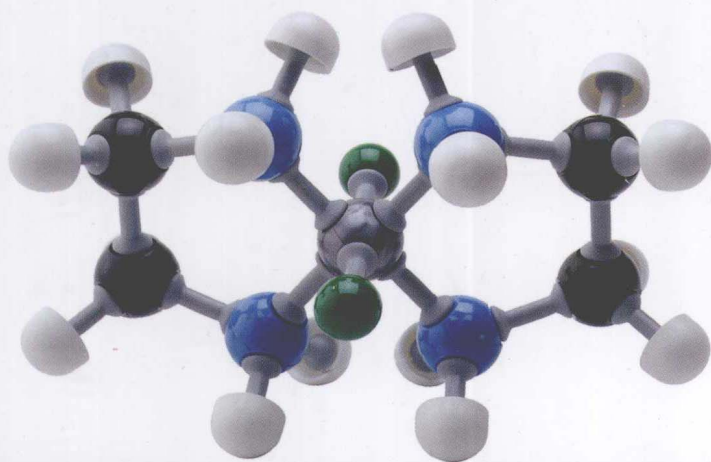


小分子与蛋白质 作用的谱学及应用

何文英 舒火明 胡之德○著



科学出版社

内 容 简 介

本书阐述研究药物小分子与蛋白质相互作用的领域中所应用的多种谱学方法及计算机化学方法,其特点是既系统地介绍这些研究方法及技术的基本原理及应用,又以研究专题的形式从分子水平介绍药物小分子与蛋白质相互作用的研究实例,图文并茂,理论和实验并重。

全书由两部分共十三章组成。第一部分主要介绍几种球状模型蛋白的结构及其性质,论述研究药物小分子与蛋白质相互作用的多种光谱学、核磁共振波谱学及计算机化学方法。第二部分介绍黄酮类化合物、呋喃类化合物、生物碱类化合物、醌类化合物、酚类化合物、咕吨酮类化合物、聚酰亚胺类化合物与几种球状蛋白质相互作用的研究成果。

本书内容全面、新颖,具有科学性、实用性和系统性。不仅对从事药物开发和生命科学领域的科研人员具有重要的指导作用和参考价值,而且还可供高等院校相关专业的师生阅读参考。

图书在版编目(CIP)数据

小分子与蛋白质作用的谱学及应用 / 何文英,舒火明,胡之德著. —北京:科学出版社,2012

ISBN 978-7-03-033926-3

I. ①小… II. ①何… ②舒… ③胡… III. ①药物-研究 IV. TQ463

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 060625 号

责任编辑:张 析 韩 赞 / 责任校对:宋玲玲

责任印制:钱玉芬 / 封面设计:东方人华

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

双 青 印 刷 厂 印 刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2012年4月第 一 版 开本:B5 (720×1000)

2012年4月第一次印刷 印张:20 1/2

字数:397 000

定价:82.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

药物和蛋白质的相互作用是生命科学研究的重要领域,药物小分子与蛋白质作用机理的研究具有很大的发展潜力,是医学、药理学、化学、分子生物学学科中的重要课题。药物小分子与蛋白质相互作用的应用可为探讨人类疾病机理,诊断、预防疾病,制药和新药开发提供重要的信息和依据。

通过研究蛋白质的构象、组成、结构,研究药物小分子与蛋白质的相互作用机理和作用过程,可探索在客体分子作用下蛋白质结构与功能等方面的变化,不仅对研究蛋白质和药物小分子(包括有机小分子、离子、量子点等)相互结合作用的配位本质、促进生命科学的发展有重要的意义,而且对改进和发展检测蛋白质的方法有促进作用,在阐明药物动力学、耐药性和毒副作用的机理及临床药理学方面 also 具有重要意义。

近年来,该领域已成为生命科学、化学、药代动力学和临床医学科研工作者共同关注的课题,国内相关研究现在也日趋活跃。但是基于应用化学分析的研究方法揭示药物小分子与蛋白质相互作用的书籍却鲜有。系统性地把这些研究方法及相关研究实例介绍给相关领域的科学研究工作者,是我们撰写本书的主要目的。

本书分为两部分共十三章。第一部分包括第 1~5 章,介绍多种光谱学、核磁共振波谱学及计算机化学方法的方法特点、基本原理及影响因素等;第二部分包括第 6~12 章,为讨论研究专题,介绍若干药物小分子与几种球状蛋白质相互作用的研究成果。第 13 章对此相关领域的研究前景及展望进行论述。

本书主要由海南师范大学的何文英副教授撰写,海南经贸职业技术学院的舒火明教授参与本书第 4 章的撰写,海南师范大学的陈光英教授参与本书第 8 章的撰写,兰州大学胡之德教授对全书的撰写给予了指导。此外,兰州大学的姚小军教授、盛芬玲教授及金璟教授在有关的数据测定等方面给予了大力支持,海南师范大学的韩长日教授、林强教授在本书撰写过程中给予了热情指导,海南师范大学化学化工学院的领导也提出了许多宝贵的修改意见,在此一并表示感谢。

由于作者学识及水平有限,书中难免有疏漏和不妥之处,敬请读者批评指正。

作 者

2011 年 6 月

目 录

前言

第一部分 基础理论篇

第 1 章 绪论	3
1.1 引言	3
1.2 小分子物质与蛋白质相互作用的研究方法概述	5
1.2.1 蛋白质与药物小分子相互作用研究的常用方法	5
1.2.2 蛋白质与药物小分子相互作用研究的其他方法	6
参考文献	7
第 2 章 几种球状模型蛋白的结构及其性质	12
2.1 蛋白质的结构、功能和性质	12
2.1.1 蛋白质在生命过程中的作用	13
2.1.2 蛋白质的一般结构	14
2.1.3 蛋白质的性质	19
2.1.4 维系和稳定蛋白质高级结构的因素	20
2.1.5 球状蛋白分子结构的一般规律	22
2.2 血清白蛋白的结构、功能和性质	24
2.2.1 血清白蛋白的结构	24
2.2.2 血清白蛋白的生理功能	24
2.2.3 人血清白蛋白的晶体结构与活性部位的确定	26
2.3 人免疫球蛋白的结构、功能和性质	27
2.3.1 人免疫球蛋白的基本结构	27
2.3.2 免疫球蛋白的功能和性质	31
2.3.3 免疫球蛋白的活性部位	32
2.4 酶蛋白——溶菌酶的结构、功能和性质	32
2.4.1 溶菌酶的结构和性质	32
2.4.2 酶蛋白分子的功能	35
2.4.3 溶菌酶的活性与活性部位	37
参考文献	38

第3章 光谱学	41
3.1 光谱分析法概述	41
3.1.1 光谱分析法基本原理	41
3.1.2 光谱分析法的分类	43
3.1.3 光谱分析法的特点和应用	45
3.2 紫外可见吸收光谱法	46
3.2.1 紫外可见吸收光谱法及其特点	46
3.2.2 紫外可见吸收光谱的产生	47
3.2.3 紫外可见吸收光谱测定及其表示方法	48
3.2.4 影响紫外可见吸收光谱的主要因素	50
3.2.5 紫外吸收光谱法在药物-蛋白质相互作用中的应用	50
3.3 分子荧光光谱法	52
3.3.1 荧光光谱法及其特点	52
3.3.2 荧光光谱的产生	53
3.3.3 荧光光谱测定及其表示方法	55
3.3.4 影响荧光光谱的主要因素	57
3.3.5 荧光光谱法在药物-蛋白质相互作用中的应用	58
3.4 瑞利共振光散射技术	65
3.4.1 瑞利共振光散射技术及其特点	65
3.4.2 瑞利共振光散射光谱的产生	67
3.4.3 瑞利共振光散射光谱的测定及其表示方法	68
3.4.4 影响瑞利光散射光谱的主要因素	69
3.4.5 共振光散射在药物-蛋白质相互作用中的应用	72
3.5 红外吸收光谱法	72
3.5.1 红外吸收光谱法及其特点	72
3.5.2 红外吸收光谱的产生	74
3.5.3 红外吸收光谱测定及其表示方法	75
3.5.4 影响红外吸收光谱的主要因素	79
3.5.5 红外光谱法在药物-蛋白质相互作用中的应用	81
3.6 拉曼光谱法	84
3.6.1 拉曼光谱法及其特点	84
3.6.2 拉曼光谱的产生	85
3.6.3 拉曼光谱与红外光谱的关系	86
3.6.4 拉曼光谱的测定及表示方法	87
3.6.5 影响拉曼光谱的主要因素	88

3.6.6 其他拉曼光谱技术	90
3.6.7 拉曼光谱在药物-蛋白质相互作用中的应用	92
3.7 激光散射法	93
3.7.1 激光散射法及其特点	93
3.7.2 激光散射光谱的产生及测定	93
3.7.3 激光散射光谱的分类	94
3.7.4 影响激光光散射光谱的主要因素	96
3.7.5 激光光散射在蛋白质及其与药物相互作用研究中的应用	96
3.8 圆二色谱法	98
3.8.1 圆二色谱法及其特点	98
3.8.2 圆二色谱的产生	100
3.8.3 圆二色谱的测定及其表示方法	102
3.8.4 影响圆二色谱的主要因素	103
3.8.5 圆二色谱在研究多肽和蛋白质二级结构方面的应用	104
参考文献	107
第4章 核磁共振波谱法	114
4.1 核磁共振波谱法及其特点	114
4.2 核磁共振波谱的产生	115
4.2.1 原子核自旋现象	115
4.2.2 核磁共振现象	115
4.2.3 弛豫过程	116
4.2.4 自旋偶合及自旋分裂	117
4.3 核磁共振波谱测定及其表示方法	119
4.3.1 化学位移	119
4.3.2 定性和定量分析	120
4.4 影响核磁共振波谱的主要因素	121
4.4.1 样品制备	121
4.4.2 实验参数设置	121
4.4.3 溶剂选择	121
4.4.4 影响化学位移的主要因素	122
4.5 核磁共振波谱在药物-蛋白质相互作用中的应用	122
4.5.1 表征蛋白质-配体相互作用的几个重要参数	123
4.5.2 研究蛋白质-配体相互作用的核磁共振波谱技术	126
参考文献	131

第 5 章 用于预测药物-蛋白质相互作用的计算机技术	135
5.1 定量结构-性质/活性关系	135
5.1.1 定量结构-性质/活性关系的特点	135
5.1.2 QSPR/QSAR 研究的主要步骤	136
5.1.3 QSPR/QSAR 研究中的主要结构特征	137
5.1.4 QSPR/QSAR 研究中描述符选择方法	140
5.1.5 QSPR/QSAR 研究中的建模方法	142
5.1.6 QSPR/QSAR 在药物-蛋白质相互作用中的应用	143
5.2 分子对接技术	143
5.2.1 分子对接技术的发展与特点	144
5.2.2 分子对接的分类及方法	144
5.2.3 分子对接主要软件	146
5.2.4 分子对接在药物-蛋白质相互作用中的应用	147
参考文献	148

第二部分 研究专题篇

第 6 章 黄酮类化合物(山姜素和豆蔻明)与三种球状蛋白质相互作用的 研究	155
6.1 两种同分异构体的黄酮化合物简介	155
6.2 山姜素和豆蔻明与人血清白蛋白(HSA)的相互作用研究	156
6.2.1 山姜素和豆蔻明与 HSA 相互作用的荧光猝灭机理	156
6.2.2 结合常数及结合位点数的计算	158
6.2.3 结合距离的计算	160
6.2.4 键合模式的确定	162
6.2.5 判定药物影响 HSA 二级结构的定性依据:同步荧光光谱与紫外光谱	164
6.2.6 判定药物影响 HSA 二级结构的定量依据:圆二色谱与红外光谱	165
6.2.7 药物在血清白蛋白上结合位置的确定	170
6.3 山姜素和豆蔻明与人免疫球蛋白(HIgG)的相互作用研究	173
6.3.1 山姜素和豆蔻明对 HIgG 的荧光猝灭作用	173
6.3.2 结合常数、结合位点数及结合距离的计算	176
6.3.3 键合模式的确定	178
6.3.4 判定药物影响 HIgG 二级结构的定性和定量依据	179
6.3.5 分子对接结果	186
6.4 山姜素和豆蔻明与溶菌酶(LYSO)的相互作用研究	188

6.4.1 山姜素和豆蔻明对 LYSO 的荧光猝灭作用	188
6.4.2 结合常数、结合位点数及结合距离的计算	190
6.4.3 键合模式的确定	191
6.4.4 判定药物影响 LYSO 二级结构的定性和定量依据	193
6.4.5 共存离子对药物-蛋白质相互作用的影响	197
参考文献	199
第 7 章 呋喃类化合物(补骨脂素和异补骨脂素)与 HSA 和 HIgG 相互作用的 研究	203
7.1 两种同分异构体的呋喃类化合物简介	203
7.2 补骨脂素和异补骨脂素与 HSA 的相互作用研究	204
7.2.1 补骨脂素和异补骨脂素对 HSA 的荧光猝灭机理	204
7.2.2 结合参数的计算及键合模式的确定	205
7.2.3 判定药物影响 HSA 二级结构的定性依据: 同步荧光光谱与紫外光谱	208
7.2.4 判定药物影响 HSA 二级结构的定量依据: 圆二色谱与红外光谱	210
7.2.5 药物在血清白蛋白上结合位置的确定	216
7.3 补骨脂素和异补骨脂素与人免疫球蛋白(HIgG)的相互作用研究	218
7.3.1 补骨脂素和异补骨脂素对 HIgG 的荧光猝灭作用	218
7.3.2 结合参数及结合模式确定	220
7.3.3 判定药物影响 HIgG 二级结构的定性和定量依据	223
7.3.4 分子对接结果	231
参考文献	232
第 8 章 四种生物碱类化合物与血清白蛋白的相互作用	233
8.1 长春碱类及胡椒碱化合物简介	233
8.2 硫酸长春碱与 SA 相互作用的荧光光谱和紫外光谱	234
8.2.1 硫酸长春碱与 SA 相互作用的荧光光谱和紫外光谱	234
8.2.2 硫酸长春碱对 SA 的荧光猝灭机理的确定	236
8.2.3 结合常数及结合模式	237
8.2.4 共存离子对药物-蛋白质相互作用的影响	239
8.3 基于文多灵碱的荧光增敏法研究与血清白蛋白的键合	240
8.3.1 文多灵碱对 SA 的荧光增敏效应	240
8.3.2 文多灵碱-SA 体系的紫外光谱图	242
8.3.3 文多灵碱与 SA 的结合参数与结合模式	243
8.3.4 确定文多灵碱在 HSA 的结合位置	245

8.3.5 共存离子对文多灵碱-BSA 相互作用的影响	246
8.4 酒石酸长春质碱对 BSA 的键合研究	247
8.4.1 酒石酸长春质碱与 BSA 相互作用的荧光光谱和紫外光谱	247
8.4.2 酒石酸长春质碱对 BSA 的荧光猝灭机理	248
8.4.3 确定结合参数及作用力类型	249
8.4.4 共存离子对酒石酸长春质碱-BSA 相互作用的影响	251
8.5 胡椒碱对血清白蛋白键和作用的研究	252
8.5.1 胡椒碱与 SA 相互作用的荧光光谱和紫外光谱	252
8.5.2 胡椒碱对 SA 的荧光猝灭机理	253
8.5.3 胡椒碱-SA 体系的结合参数及模式的确定	254
8.5.4 胡椒碱键和 HSA 的位点确定	256
参考文献	258
第 9 章 醌类化合物(紫草素)与 HSA 和 LYSO 相互作用的研究	260
9.1 紫草素简介	260
9.2 紫草素与 HSA 和 LYSO 相互作用的荧光光谱及猝灭机理	261
9.3 结合参数及模式确定	262
9.4 判定紫草素影响蛋白质二级结构的定性依据和定量依据	265
9.5 紫草素在血清白蛋白上结合位置的确定	270
9.6 共存离子对紫草素-蛋白质相互作用的影响	272
参考文献	272
第 10 章 酚类化合物(愈创木酚)与 HSA 和 HIgG 相互作用的研究	274
10.1 愈创木酚简介	274
10.2 分子对接结果	275
10.3 愈创木酚与 HSA 和 HIgG 相互作用的荧光光谱和紫外光谱	277
10.4 愈创木酚与 HSA 和 HIgG 相互作用的荧光偏振研究	279
10.5 确定愈创木酚与蛋白质键合的结合常数与结合模式	282
10.6 判定愈创木酚影响蛋白质二级结构的定性依据和定量依据	284
参考文献	291
第 11 章 咕吨酮类化合物与 HSA 的相互作用	293
11.1 两种咕吨酮类化合物简介	293
11.2 DC 及 HM 键合 HSA 的紫外光谱及荧光光谱	293
11.3 DC 及 HM 对 HSA 的荧光猝灭机理	295
11.4 结合常数及键合位点数的计算	296
11.5 键合模式的确定	297
11.6 DC 及 HM 键合 HSA 的位点竞争实验	298

11.7 分子对接结果.....	298
参考文献.....	300
第 12 章 一种新型聚酰亚胺与蛋白质的相互作用	301
12.1 聚酰亚胺化合物 BAFP 简介	301
12.2 BAFP 与 HSA、HIgG 相互作用的荧光光谱和紫外光谱	301
12.3 BAFP 与 HSA、HIgG 相互作用的红外光谱	303
12.4 BAFP 与 HSA、HIgG 相互作用的键合参数及模式	307
12.5 BAFP 在 HSA、HIgG 结合位置的确定	310
参考文献.....	311
第 13 章 药物小分子与蛋白质相互作用研究的前景及展望	313
参考文献.....	315

第一部分 基础理论篇

第 1 章 绪 论

1.1 引 言

生物大分子是一切生命形式的基础。重要的生物大分子有四类,主要包括蛋白质、核酸、多糖和脂类。其中蛋白质、核酸、多糖是聚合物,它们分别由同一类但组成不完全相同的物质聚合而成。生物大分子在机体内行使各种各样的功能,而这些功能往往是由其结构所决定的。随着当代科学技术的发展,对生物大分子的研究已经从一般描述性科学过渡到探讨其具体化学结构的分子水平科学。其中蛋白质与核酸是生物大分子中的两大组成部分,它们直接涉及生命科学的许多核心内容。

此外,药物与生命体生活有着密切的联系,药物的吸收、分布、代谢及排泄等体内过程,直接影响药物在其作用部位的浓度和有效浓度的持续时间,从而决定着药物的作用——药理作用和毒性作用的发生、发展和消除。大多数药物分子均通过与生物体内的大分子结合起作用,这也是决定药物是否具有良好的生物利用度、药理活性、代谢稳定性和低毒性的主要因素。药物主要通过干扰病原体的代谢而抑制其生长繁殖,以达到治疗的目的。例如,青霉素抑制细菌细胞壁的合成,氯霉素抑制细菌核蛋白体的合成,氯喹啉与疟原虫的核蛋白结合[主要是与脱氧核糖核酸(DNA)相结合]抑制 DNA 的复制,使核酸合成减少,从而影响其生长繁殖。

药物自给药部位进入血液,随血液的循环再分布于全身各组织器官中,有的药物以其原形发生作用,有的药物构型发生了变化,药物及其代谢产物可以通过不同的途径排泄于体外。联系药物吸收、分布和排泄的枢纽是血液。药物(无论是口服给药还是注射给药)进入血液后,必然或多或少与血浆蛋白(主要是白蛋白)结合,结合后的药物不易穿透毛细血管壁、血脑屏障及肾小球等多种生物膜,限制其进一步运输,从而对药物在体内的分布与代谢产生重要影响,同时药物与血浆蛋白结合的程度决定了药物储留于血浆中的量,影响药物的最大作用强度,有利于防止作用大幅度波动并对延长药物作用时间起到缓释作用。

药物无论在体内起什么作用,其本质都是药物小分子与机体组织中具有重要功能的生物大分子之间进行物理和化学反应的最终结果。这些能够与药物小分子发生结合并产生相应药理药效作用的生物大分子称为受体。由于生物大分子参与形形色色的反应,它们行使的功能和参与的反应都具有高度的专一性,也是药物小

分子与受体生物大分子相互作用并产生某专一生物效应的物质基础^[1,2]。

在药物小分子与生物大分子相互作用的研究中,蛋白质作为一种重要的生物大分子已被广泛研究。众所周知,蛋白质存在于所有的生物细胞中,是构成生物体最基本的结构物质和功能物质,它参与了几几乎所有的生命活动过程。具有多样性的蛋白质是形形色色的生物和绚丽多彩的生命活动的物质基础。蛋白质分子的功能往往是由其结构所决定的,蛋白质分子结构与功能的研究是生命科学的核心课题。探索蛋白质的构象、组成、结构,研究药物、染料、表面活性剂、离子、量子点等小分子与蛋白质的相互作用机理和作用过程,了解在客体分子作用下蛋白质结构与功能等方面的变化,不仅对研究生物大分子和小分子(包括有机小分子、离子、量子点等)相互结合作用的配位本质、促进生命科学的发展有着重要的意义,而且对改进和发展检测蛋白质的方法也有促进作用,在药代动力学及临床药理学上也具有重要意义。因此,该领域已成为从事生命科学、化学、药代动力学和临床医学学科研究者共同关注的课题^[3,4]。近年来,国内有关研究也日趋活跃^[5-9]。

根据研究目的和任务不同,可选取具有不同功能的蛋白质,如血清白蛋白、 α -酸性糖蛋白^[10]、血红蛋白^[11,12]、免疫球蛋白^[13]、胆汁蛋白^[14]等为模型蛋白。其中,血清白蛋白是血浆中最丰富的蛋白质,是生物体内具有重要生理功能的大分子^[15],它可以同许多内源性和外源性物质结合,起着重要的储存和运输作用。并且,血液中血清白蛋白浓度长期以来一直是检验健康和疾病的指标。与其他蛋白质相比,血清白蛋白具有相对分子质量小、水溶性好、稳定性高、易提纯制备等优点,在临床药物研究中一直作为模型蛋白,也是研究高分子蛋白质物理化学性质、结构与功能、临床应用以及变异方面的理想蛋白质,因此,在药理学、临床医学和分子生物学等方面有重要的应用价值。

人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)可以同许多内源和外源小分子物质发生作用。血液中有许多内源物质可与 HSA 结合,如胆红素、脂肪酸、维生素、激素、电解质等。如果体内的脂肪酸浓度超过一定值则会禁阻许多药物与 HSA 的结合,当低于某值时,则禁阻可以完全忽略,脂肪酸对药物与 HSA 结合的调节作用主要由药物与 HSA 亲和力的大小决定,亲和力越大,脂肪酸的影响就越小;又如, HSA 与胆红素具有较强的结合作用,许多药物可以将结合在 HSA 上的胆红素置换下来而导致细胞毒性增大,如某些磺胺药物抑制胆红素与 HSA 的结合,可以导致新生儿黄疸。蛋白质除了与内源性物质作用外,还可以同许多外源性小分子如药物、染料、表面活性剂、离子、配合物、量子点等结合。这些物质与蛋白质结合生成超分子复合物之后,体系的光谱、电化学等性质发生改变,从而提供蛋白质浓度或结构方面的信息。因此,药物与蛋白质的相互作用在药物动力学及临床药理学上有重要意义。建立药物-蛋白质结合的体外模型,了解结合的紧密程度、结合部位、结合力、结合数等问题,不仅对揭示体内的药物动力学问题、指导合

理用药具有一定意义,同时对进行药物分子设计、新药开发也具有重要的指导意义^[16]。

1.2 小分子物质与蛋白质相互作用的研究方法概述

人们采用多种现代实验手段如紫外可见吸收光谱、荧光光谱法、圆二色谱法、激光拉曼光谱法、傅里叶转换红外光谱、核磁共振法、质谱、电化学分析法、平衡透析法、液相色谱法、微量热、毛细管电泳及黏度等方法从不同角度对小分子与蛋白质之间的相互作用进行了广泛的研究。利用这些光谱可得到许多关于蛋白质与药物分子作用的信息,包括结合常数、结合位点数、结合位置、作用力类型以及蛋白质分子在相互作用中结构的变化等有用的信息。由于蛋白质的特定生理活性在很大程度上由其构象决定,因此,药物与生物大分子是否相互作用的一个重要指标就是蛋白质的构象是否发生了变化^[17,18]。

1.2.1 蛋白质与药物小分子相互作用研究的常用方法

从蛋白质存在的形式来看,研究蛋白质分子构象的方法可以概括为两大类:一类是测定溶液中蛋白质分子的构象,如核磁共振法、圆二色性光谱法、激光拉曼光谱法、红外光谱法、荧光光谱法、紫外光谱法以及氢同位素交换法;另一类是测定晶体蛋白质的分子结构,如X射线衍射分析法和小角中子衍射法(表1-1)。

表 1-1 测定蛋白质构象的方法^[19]

方法	提供的结构信息	主要指标	主要设备	应用
X射线衍射 结构分析	多肽链上所有原子的空间排布,但氢原子除外	衍射点的强度和位置	高分辨率X射线衍射仪	很多
核磁共振	溶液中蛋白质分子构象;构象动力学	化学位移;谱线强度;自旋偶合常数	脉冲傅里叶NMR波谱仪	越来越多
圆二色性光谱	二级结构及其变化	椭圆度	圆二色光谱仪	很多
荧光光谱	色氨酸或酪氨酸微区;构象变化	发射光谱;量子产率	自动扫描荧光分光光度计	很多
紫外光谱	色氨酸或酪氨酸微区;构象变化	不同波长的可见光	紫外分光光度计	很多
激光拉曼光谱	二级结构	拉曼光谱峰	激光拉曼光谱仪	较少应用 较困难
氢同位素交换	氢键数目;规则二级结构变化	与环境水不可交换的肽键氢的个数	红外分光光度计分子筛测定	较少
小角中子衍射	多肽链上所有原子的空间排布	散射强度的角分布		较少

这些实验技术各有其优越性和局限性: X 射线衍射分析法虽然可以较准确地测量晶态蛋白质分子的空间结构, 但许多蛋白质难以培养出单晶, 方法也很复杂, 而且生命体中蛋白质多数以溶液状态存在, 与晶体结构往往有一定的差别, 测定结果不能准确地说明蛋白质在生理状态下结构与功能的关系。中子衍射法由于仪器昂贵等原因, 目前应用于蛋白质分子构象研究刚起步。核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)技术只能测定小分子蛋白质的结构。荧光光谱法(fluorescence spectroscopy)是研究蛋白质分子构象的一种常用的有效方法, 能提供包括激发光谱、发射光谱以及荧光强度、量子产率、荧光寿命、荧光偏振等许多物理参数, 这些参数能从各个角度反映分子的成键和结构情况, 该法不但可以做一般的定量分析, 而且还可以推断蛋白质分子在各种环境下的构象变化, 从而阐明蛋白质结构与功能之间的关系; 同时, 荧光光谱法还具有灵敏度高、选择性强、用样量少、方法简便、仪器价廉等优点, 在药物与蛋白质的相互作用研究中应用越来越广泛。圆二色性(circular dichroism, CD)光谱法也可测定蛋白质在溶液状态的结构, 从 CD 谱的变化可获得一些重要信息。而傅里叶变换红外光谱(Fourier transformation infrared spectroscopy, FT-IR)法有其独特之处, 它适用于不同状态、不同浓度及不同环境中蛋白质和多肽的测定^[20], 将 FT-IR 与去卷积(deconvolution)、二阶导数谱(second derivative spectrum)和曲线拟合(curve-fitting)等数学处理方法结合用于蛋白质二级结构的研究是很有发展前景的新兴研究领域。此外, 基于计算机对接技术的分子模拟也是近年来发展较快的一门新兴学科, 可用于在分子水平上研究药物与蛋白质相互作用的情况。

1.2.2 蛋白质与药物小分子相互作用研究的其他方法

在诸多分析生物大分子与药物小分子相互作用的研究方法中, 除以上所述的几种光谱法与化学信息学以外, 其他仪器分析方法也较为常见。其中, 平衡透析法以及超滤是应用最为广泛的方法, 主要是因为其简单而且易应用于不同体系^[21-27]。虽然色谱方法主要用来分离纯化生物活性化合物, 但固定生物大分子的高效液相色谱固定相的引入使其成为研究小分子试剂与大分子相互作用的强有力手段^[28-30]。毛细管亲和凝胶电泳^[31-33]或利用蛋白质固定相的毛细管电色谱^[34]也已经应用于蛋白质与药物相互作用研究。作为研究生物大分子的溶液状态行为的方法, 激光散射方法在药物与生物大分子相互作用研究中的应用主要集中在两性分子药物与蛋白质的研究方面^[35-43]等。通过检测小分子配体在不同蛋白质浓度时核磁弛豫速率或扩散系数的变化, 可以用核磁共振法进行药物-蛋白质的动力学研究^[44-46]。

近年来, 研究生物大分子相互作用的新技术不断出现, 基于表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)的生物传感器技术或称生物分子相互作用分析

技术(bimolecular interaction analysis, BIA)^[47-50]在生命科学相关领域的研究方面已取得了很大的进展。Rich 等利用 SPR 传感器研究了香豆素、洋地黄毒苷、蔡普生、强的松、利福平等药物^[51]与 HSA 的相互作用; Ahmad 等^[52]则利用基于 SPR 方法的 Biacore 3000 传感器研究了对映体药物与固定蛋白质的相互作用的差异性。虽然 SPR 必须将研究对象之一固定于换能器表面,但其仍将是研究相互作用的一种较好的方法。此外,在药物代谢动力学研究中,高效前沿分析^[53,54]是近几年发展起来的一种能同时测定药物与蛋白质结合平衡中游离药物浓度和总药物浓度的一种新的色谱方法,该方法通过测定平台峰高度和峰面积可得到游离药物浓度和总药物浓度,研究药物-蛋白质结合情况,测得生物利用度等药动学参数。

对药物与蛋白质结合的研究一般分为定量、定性两种。确定复合物的离解常数和结合位点数就是定量研究,确定这些常数有助于了解复合物的稳定性;而对药物-蛋白质复合物的特征参数进行定性描述,则有助于进行药物筛选,并能提供药物空间取向信息等。

近年来,作者致力于植物药中活性小分子与蛋白质相互作用的研究。针对药物小分子与蛋白质相互作用的情况,本书阐述了两方面内容:一是论述相关蛋白质的结构与性质,以及多种光谱学、核磁共振波谱学和计算机化学技术的基础理论;二是介绍应用多种谱学方法(主要包括荧光光谱法、紫外光谱法、傅里叶变换红外光谱法和圆二色性光谱法),并结合计算机化学法对若干植物药中活性小分子与几种球状蛋白质相互作用的研究成果^[55-83]。

参 考 文 献

- [1] 徐文芳. 新药设计原理与方法. 北京:中国医药科技出版社,1997.
- [2] 姜红,安普丽,蒋晔. 药物与蛋白质相互作用研究方法的进展. 第二军医大学学报,2007,28(6): 662.
- [3] Lin Y L, Lin S R, Wu T T, et al. Evidence showing an intermolecular interaction between KChIP proteins and Taiwan cobra cardiotoxins. Biochem Bioph Res Co, 2004, 319(3): 720.
- [4] Chan Warren C W, Shuming N. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. Science, 1998, 281(5385): 2016.
- [5] 曹书霞,赵玉芬. 分子吸收光谱在生物体大分子研究中的应用. 光谱学与光谱分析, 2004, 24(10): 1197.
- [6] 张华新,颜承农,黄星,等. 小分子配体与蛋白质作用的荧光法研究进展. 化学与生物工程, 2005, 9: 4.
- [7] 薛琨,饶美香,李蕾. 药物与蛋白质相互作用的研究新进展. 赣南师范学院学报, 2002, 3: 46.
- [8] 俞英,周震涛. 蛋白质光谱探针的研究进展. 光谱学与光谱分析, 2005, 25(4): 628.
- [9] 刘静,徐桂英. 表面活性剂与蛋白质相互作用的研究进展. 日用化学工业, 2003, 33: 29.
- [10] Brown M B, Miller J N, Seare N J. An investigation of the use of Nile red as a long-wavelength fluorescent probe for the study of alpha 1-acid glycoprotein-drug interactions. J Pharma Biomed Anal, 1995, 13(8): 1011.
- [11] Shen X Can, Liou X Y, Ye L P, et al. Spectroscopic studies on the interaction between human hemoglobin and CdS quantum dots. J Colloid Interface Sci, 2007, 311(2): 400.