2016年	第 11 卷
第1期,	159-166

生态毒 理学报

Asian Journal of Ecotoxicology

Vol. 11, 2016 No.1, 159-166

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20150513001

伍智蔚, 易忠胜, 董露, 等. 模拟和光谱相互验证 2'-OH-BDE-28 对 HSA 构象的影响[J]. 生态毒理学报,2016, 11(1): 159-166 Wu Z W, Yi Z S, Dong L, et al. Combined simulation and multispectral investigation on the effect of 2'-OH-BDE-28 on the structure of HSA [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2016, 11(1): 159-166 (in Chinese)

模拟和光谱相互验证 2′-OH-BDE-28 对 HSA 构象的影响

伍智蔚1,易忠胜1,*、董露1,杨露露1,杨雾1,张爱茜2

 广西高校食品安全与检测重点实验室,岩溶地区水污染控制与用水安全保障协同创新中心,桂林理工大学化学与生物工程 学院,桂林 541004

2. 中国科学院生态环境研究中心 环境化学与生态毒理学国家重点实验室,北京 100085

收稿日期:2015-05-13 录用日期:2015-07-27

摘要:利用分子对接、分子动力学模拟(molecular dynamics simulation, MD)和光谱法研究 2'-羟基-2,4,4'-三溴二苯醚(2'-OH-BDE-28)与人血清白蛋白(HSA)的作用机制。MD 模拟研究表明 2'-OH-BDE-28 诱导 HSA 的内部疏水性增强,结构松散膨胀, 致使其二级结构发生改变;圆二色光谱实验与 MD 模拟结果相吻合,验证 2'-OH-BDE-28 可诱导 HSA 的构象变化。荧光光谱 实验表明,2'-OH-BDE-28 能通过静态猝灭和非辐射能量转移机制引起 HSA 荧光猝灭。分子对接推断 2'-OH-BDE-28 以氢键和疏水作用力键合在 HSA 的位点 I 处;热力学分析和竞争实验结果一致验证分子对接结果。本文将计算模拟和光谱实验相 结合,从模拟和实验 2 个角度共同探讨 2'-OH-BDE-28 与 HSA 的作用机制,结果高度吻合。

关键词: 2'-羟基-2,4,4'-三溴二苯醚;人血清白蛋白;分子动力学模拟;光谱法

文章编号: 1673-5897(2016)1-159-08 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Combined Simulation and Multispectral Investigation on the Effect of 2'-OH-BDE-28 on the Structure of HSA

Wu Zhiwei¹, Yi Zhongsheng^{1,*}, Dong Lu¹, Yang Lulu¹, Yang Wu¹, Zhang Aiqian²

1. Guangxi Colleges and Universities Key Laboratory of Food Safety and Detection, Collaborative Innovation Center for Water Pollution Control and Water Safety in Karst Area, College of Chemistry and Bioengineering, Guilin University of Technology, Guilin 541004, China

2. State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Research Center for Eco-environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

Received 13 May 2015 accepted 27 July 2015

Abstract: In this paper, the interaction mechanism between 2'-hydroxy-2,4,4'-tribromodiphenyl ethers (2'-OH-BDE-28) and human serum albumin (HSA) was investigated by combining molecular docking, molecular dynamics simulation (MD) and multispectral techniques. The results of MD simulations indicate that the 2'-OH-BDE-28 induced increase in the interior hydrophobicity of HAS occurred and the molecular structure became loose and expansive, and finally the secondary structure of HSA changed. The results of circular dichroismspectra (CD) are

基金项目:国家自然科学基金(21267008,21167006);广西自然科学基金(2013GXNSFAA019034);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号)

作者简介:伍智蔚(1990-),男,硕士,研究方向为化学计量学和环境毒理学,E-mail:wuzwgx@163.com

^{*} 通讯作者(Corresponding author), E-mail: yzs@glut.edu.cn

highly consistent with the results of MD simulations. Moreover, the results of fluorescence spectroscopy experiment also show that the intrinsic fluorescence of HSA was quenched by 2'-OH-BDE-28 through static quenching and non-radiation energy transfer. Molecular docking results indicate that 2'-OH-BDE-28 coordinated with the site I of HAS through hydrophobic forces and hydrogen bonds. Hence, a similar conclusion was obtained from the thermo-dynamics parameters and competitive experiment to verify the results from molecular docking. Excellent agreement was obtained between computer simulations and multispectral experiments to study the mechanism on the interaction between 2'-hydroxy-2,4,4' - tribromodiphenyl ethers and human serum albumin.

Keywords: 2'-hydroxy-2,4,4'-tribromodiphenyl ethers; human serum albumin; molecular modeling; multispectral analysis

环境污染物多溴二苯醚(polybrominated diphenyl ethers, PBDEs)作为溴代阻燃剂因其难降解,生物 毒性大且蓄积性等特点^[1-2],已经引起人们的广泛关 注。自 20 世纪 60 年代以来,由于长期大量使用 PBDEs 使得环境介质中 PBDEs 存在含量逐年递增, 覆盖范围扩散得较广^[3-5]。近年来,研究工作者在水 体、大气、农副产品甚至人体内不但陆续检测出多溴 二苯醚还检测出其典型的衍生物-羟基化多溴二苯 醚(OH-PBDEs)^[6-8],其化学结构与母体多溴二苯醚相 似,除了具备母体 PBDEs 的一些毒性特征外,OH-PBDEs 还具有一些特殊的毒理特征^[7,9-10]。同时, OH-PBDEs 生物毒性在某些方面要大于其母体^[11], 它对环境和人类的危害更是不可忽视。目前,国内 外研究者们对于 OH-PBDEs 的研究还处于起步阶 段,其转化行为、毒理效应、作用机制仍不甚清晰。

人血清白蛋白(HSA)是人血液最为丰富的蛋白 质,承载着物质运输与转载,同时还维持血液胶体的 渗透压。HSA 也是具有显要生理功能的蛋白质,它 可以与进入体内的外源性物质进行快速、可逆的结 合^[12],进而发挥外源性物质的生物学作用,因此研 究具有药理活性的小分子与 HSA 相互作用,对于 了解药物小分子的药理、毒理机制具有十分重要 的意义。

本文以 2'-羟基-2,4,4'-三溴二苯醚(2'-OH-BDE-28)为例,利用计算模拟和光谱法相结合研究 2'-OH-BDE-28 与 HSA 的作用机制,探讨其结合情况:包括2'-OH-BDE-28 与 HSA 结合的分子机制(结合构象和结合位点)、荧光猝灭机制以及 2'-OH-BDE-28 对 HSA 稳定性和二级结构的影响。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 仪器与试剂

RF-5301PC 型荧光分光光度计(日本岛津);TU-1901 型双光束紫外可见分光光度计(北京普析);J- 810 型圆二色光谱仪(日本分光株式会社); PHS-3C 型酸度计(上海雷磁)。

2'-OH-BDE-28(purity ≥ 99%,购于德国 DR 公司):用 pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液(含 NaCl 0.15 mol·L⁻¹)配制 1.0×10^{-6} mol·L⁻¹储备液。HSA(purity ≥ 97%,购于美国 sigma 公司):配制 1.0×10^{-5} mol·L⁻¹储备液,用 Tris-HCl 缓冲溶液定容,4 ℃以下避光储存备用;其他试剂均为分析纯,实验用水均为二次蒸馏水。

本文所有的计算工作均在 DELL 服务器的 RedHat Linux 6.4 系统上完成。使用 Sybyl x 1.1 软 件进行分子对接和 GROMACS 5.0 软件进行分子动 力学模拟。所用的 HSA 晶体结构(代码为 109X, 109X 由去掉波动区域较大 C、N-末端氨基酸残基 的 579 个氨基酸构成,残基区域为 4~582,结构相对 完整,在位点 I 和位点 II 处均含有对应配体,便于计 算模拟)从 Brookhaven 蛋白质数据库(http://www. rcsb.org/pdb)获得。

1.2 实验方法

分子对接:运用 ChemBioDraw Ultra 12.0 软件 构建 2'-OH-BDE-28 结构,选择 MMFF94 力场进行 能量最小化优化结构;HSA 选择 AMBER7 FF99 力 场的最陡下降法-共轭梯度法能量最小化;采用 CH₄,C=O,N-H 为分子探针进行柔性对接。

分子动力学模拟(MD):利用 GROMACS 5.0 程 序分别进行 10 ns 的未配位 HSA 和 2'-OH-BDE-28-HSA 复合物的 MD 模拟。采用 GROMOS96 43A1 力场,通过最陡下降法进行初始结构的能量最小化, 并采用正则系统(NVT)和等温等压系统(NPT)平衡 体系进行 10 ns 分子动力学模拟,最后用 VMD 软件 和 LigPlus 软件进行分子图形展示和结果分析。

光谱法:在 10 mL 的比色管中准确移入 1 mL 1.0×10⁻⁵ mol·L⁻¹ HSA 溶液,依次加入一定量的 1.0×

10⁻⁶ mol·L⁻¹ 2'-OH-BDE-28 溶液,用 pH 7.4 Tris-HCl 缓冲溶液定容至刻度线,摇匀,在设定温度 291 K、298 K、310 K 下恒温反应 5 min,扫描激发波长为285 nm 下的发射光谱,仪器的激发和发射荧光狭缝均为 5 nm。以 Tris-HCl 缓冲液为参比,测定其相应的圆二色光谱和紫外光谱。

2 结果(Results)

2.1 HSA 与 2⁻-OH-BDE-28 复合物的结构特征

首先要指明的是本文中 HSA 体系代表没有添加 2'-OH-BDE-28 的空白体系,2'-OH-BDE-28-HSA

体系代表 HSA 与 2'-OH-BDE-28 结合复合物的体系。

均方根偏差(RMSD)是用来衡量体系波动性的 重要参数,而基于残基分析的均方根波动(RMSF)则 可以用来观察蛋白质残基柔性的变化情况^[13]。图 1 a 为模拟 10 ns HSA 体系和 2'-OH-BDE-28-HSA 体 系基于骨架的 RMSD 值的变化图。2'-OH-BDE-28-HSA 体系整个模拟过程中 RMSD 值波动幅度小于 HSA 体系骨架的波动值,这表明了 2'-OH-BDE-28 与 HSA 形成稳定的复合物使体系趋于稳定。该结 果与前人报道HSA 与其他小分子的RMSD分析结



图 1 HSA 体系和 2'-OH -BDE-28-HSA 体系的动力学模拟结果

注:(a)蛋白质骨架的均方根偏差值(RMSD)与时间的关系;(b)蛋白质的均方根波动值(RMSF)与残基的关系; (c)蛋白质的回旋半径;(d)两个体系中亲水和疏水的溶剂可及表面积平均值。

Fig. 1 The results of HSA (black) and 2'-OH-BDE-28-HSA complex (red) during 10 ns MD simulation

Note: (a) Time dependence of RMSD values for protein backbone; (b) The RMSF values of protein were against residue numbers;

(c) Time evolution of the protein of Gyration; (d) The average of solvent accessible surface areas for hydrophobic and hydrophilic in two systems.

果类似,例如席夫碱(Schiff base)^[14]。图 1 b 为 10 ns HSA 体系和 2'-OH-BDE-28-HSA 体系氨基酸残基

相对于平衡位置的波动情况。2'-OH-BDE-28-HSA 与 HSA 体系的 RMSF 变化相似,波动较小,这反映

了在 MD 模拟过程中 HSA 残基没有较大的位置变动,整个 HSA 的氨基酸柔性发生微弱的改变。但在 氨基酸残基 196~297(位点 I)处(见图 1 b 放大图),2 '-OH-BDE-28-HSA 体系 RMSF 值略高于 HSA 体 系,这说明 2'-OH-BDE-28 与 HSA 的相互作用对此 氨基酸残基柔性影响较大,致使其周围环境发生改 变,进而影响其二级结构(见表 1 的分析结果)。

回旋半径(*R*_g)值是可以用来衡量 HSA 结构的 紧密程度^[15]。图1c为10ns的HSA体系和2'-OH-BDE-28-HSA体系的*R*_g值变化图。2'-OH-BDE-28-HSA体系的*R*_g值大于 HSA体系,这表明2'-OH-BDE-28与HSA结合后,使氨基酸残基间微环境改 变,残基间相互作用(例如HSA与2'-OH-BDE-28之 间产生了氢键作用和疏水相互作用,见对接模型结 果)使HSA体系变得膨胀,导致其构象发生改变,这 个变化结果与圆二色光谱实验结果相吻合。同时,其 他研究工作者的研究成果^[16-17]也与本文的实验结果 相似:在 MD 模拟的过程中 HSA 的构象发生了改变。

2'-OH-BDE-28 使 HSA 体系氨基酸残基的可及 表面积(solvent accessible surface areas, SASA)发生 改变,进而影响其体系的疏水性(见图 1 d)。2'-OH-BDE-28 能使 HSA 体系的疏水性残基的 SASA 由 251.44 nm²变化为 321.40 nm²,增加了 27.82%,而亲 水性残基的 SASA 则由 700.34 nm²变化为 614.46 nm²,减少了 12.26%。因此得出,2'-OH-BDE-28 与 HSA 结合使 HSA 体系的疏水性增强,疏水作用力 驱使 HSA 体系变得膨胀、松散与 2'-OH-BDE-28 结 合得更稳定。这也表明 2'-OH-BDE-28 与 HSA 的 结合过程是一种柔性的结合过程。

2.2 HSA 二级结构的影响

根据文献^[18],蛋白质的紫外区(190~240 nm)圆 二色性光谱可用来预估其二级结构中 α-螺旋含量 的变化情况。图 2 a 为 2' -OH-BDE-28 与 HSA 相互 作用的 CD 光谱。208 nm 和 222 nm 处出现 2 个负 槽,这是典型的 α-螺旋结构 CD 光谱信号。2' -OH-BDE-28 加入后 HSA 在 208 nm 和 222 nm 处的负光

谱信号有所减少,但谱线形状没有发生明显的改变。 利用 CD Pro 软件对数据分析(见表 1)得出:2'-OH-BDE-28 使 HSA 的 α-螺旋含量从 42.4% 降至 41.2%, 这说明 2'-OH-BDE-28 进入 HSA 后, 与氨基 酸残基的存在力的相互作用, 使 α -螺旋含量降低, β-折叠含量增加,驱使内部结构松散、膨胀,进而对 HSA 的二级结构产生一定影响^[19]。同时数据转角、 无规则卷曲等含量也发生一定的变化,但α-螺旋向 β-折叠转变起主导地位。此外,使用 do_dssp 程序 分析动力学模拟数据发现:当 2'-OH-BDE-28 与 HSA 形成复合物时,α-螺旋的含量下降(73.0%~ 72.0%),并化为转角结构(6.0%~7.0%,见表1)。该 结果与 CD 光谱的分析结果相似,说明 2'-OH-BDE-28 与 HSA 结合时是以一种柔性的方式进行结合。 通过改变 HSA 的二级结构使生成的 2'-OH-BDE-28-HSA 复合物更稳定。

2.3 2'-OH-BDE-28 对 HSA 的荧光猝灭机制

蛋白质的荧光猝灭因机理不同主要分为动态猝 灭、静态猝灭和非辐射能量转移等。为了进一步判 断 2'-OH-BDE-28 与 HSA 相互作用的荧光猝灭机 制,通常选定 Stern-Volmer 方程进行数据分析,其方 程如下:

 $F_0/F = 1 + K_{\rm SV}[Q] = 1 + K_{\rm g}\tau_0[Q] \qquad (1)$

选定 291 K、298 K、310 K 三个温度进行荧光实 验,2'-OH-BDE-28 加入后,HSA 的荧光强度呈现出 有规律的猝灭,并发生了微弱的蓝移,这与 MD 模 拟中疏水性增强相一致。而 3 个温度下的猝灭速率 常数 K_{sv}的结果分析(见图 2 b),K_{sv}随着温度升高而 降低,且 2'-OH-BDE-28 对 HSA 的 K_q值也远大于各 类猝灭剂对生物大分子最大动态的猝灭常数 2.0× 10¹⁰ L·mol⁻¹·S⁻¹。因此,2'-OH-BDE-28 猝灭 HSA 荧光强度的猝灭机制是静态猝灭。这是由于 2'-OH-BDE-28 进入 HSA 的空腔后,与基态的 HSA 发 生了配合反应,两者之间相结合形成复合物,使 HSA 内部的疏水性增强,引起了 HSA 构象的变化, 最终导致 HSA 的荧光强度发生猝灭。

表 1 HSA 二级结构的估计结果

Table 1 Fractions of secondary structures of HSA by CDPro and do_dssp program

			•			_ 1		
	CDPro software/%			_do_dssp program/%				
-	螺旋	折叠	转角	无规则	卷曲	弯管	转角	螺旋
	Helix	Stand	Turns	Unordered	Coil	Bend	Turns	Helix
HSA	42.4	23.6	12.3	21.4	14.0	7.0	6.0	73.0
2' -OH-BDE-28-HSA	41.2	25.2	13.3	20.1	14.0	7.0	7.0	72.0



图 2 HSA 与 2'-OH-BDE-28 的光谱实验结果

注:(a)HSA 和 2'-OH-BDE-28-HSA 体系的圆二色光谱(a-b, c_{HSA}:c_{2'-OH-BDE-28}=1.0, 5:1);(b)Stern-Vomer 曲线(T=291 K、298 K、310 K 时);(c)HSA 的荧光光谱 和 2'-OH-BDE-28 的紫外吸收光谱重叠图(T=298 K, c_{HSA} = c_{2'-OH-BDE-28}=1.0×10⁻⁷ mol·L⁻¹);(d)华法林竞争实验荧光图(c_{HSA} = 1.0×10⁻⁶ mol·L⁻¹)。

Fig. 2 The details of multispectral investigation between HSA and 2' -OH-BDE-28

Note: (a) CD spectra of HSA and 2'-OH-BDE-28-HSA system. a-b, $c_{\text{HSA}}:c_{2'-\text{OH-BDE-28}}=1:0, 5:1;$ (b) Stern-Vomer curves at three different temperatures; (c) spectral overlap between the fluorescence emission spectrum of HSA and absorption spectra of 2'-OH-BDE-28 at 298 K,

 $c_{\text{HSA}} = c_{2'-\text{OH-BDE-}28} = 1.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; (d) fluoresence competitive test by warfarin, $c_{\text{HSA}} = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

根据 Förster 偶极-偶极非辐射能量转移理论可 得到 2'-OH-BDE-28 与 HSA 能量转移信息。选定 浓度 1:1 的 2'-OH-BDE-28 和 HSA,获得 2'-OH-BDE-28 紫外吸收光谱和 HSA 荧光光谱的重叠图谱 (见图 2 c)。经数据分析得出重叠积分 $J = 4.90 \times 10^{-14}$ cm³·L·mol⁻¹,临界距离 $R_0 = 3.33$ nm,能量转移 效率 E = 0.40 和 2'-OH-BDE-28 与 HSA 中的色氨 酸残基的距离 r = 3.57 nm < 7 nm 且满足 0.5R < r< 1.5R,符合 Förster 偶极-偶极非辐射能量转移的条 件^[20]。与之前 OH-PBDEs 与 HSA 的研究类似^[27], 说明 2'-OH-BDE-28 与 HSA 结合发生能量转移机 制并引起其荧光猝灭,且能量转移的效率较高。故 2'-OH-BDE-28 是通过静态猝灭和能量转移 2 种机 制导致 HSA 的荧光猝灭。

2.4 2'-OH-BDE-28 与 HSA 作用力类型

研究表明^[20],分子对接可以探讨药物小分子与 HSA 结合情况。而 HSA 的 IIA 和 IIIA 是大部分药 物分子的活性位点,也称为位点 I(华法林位点)和位 点 II(布洛芬位点)。运用 Sybyl x 1.1 软件,将 2'-OH-BDE-28 分别与 HSA 的位点 I、位点 II 进行分子 对接,并选取较高得分位点 I 进行分析。图 3 为 2'-OH-BDE-28 与 HSA 对接作用图。2'-OH-BDE-28 结合在 HSA 位点 I 处,其 5 Å 范围内氨基酸残基(见 图 3 a)。其中 HSA 中 ALA291、LEU238、HIS242、 ARG257 在 2'-OH-BDE-28 周围形成"半包裹"的疏 水性界面,同时 LYS199 通过 2 个氢键与其稳定键 合(见图 3 b),氢键和疏水作用力对 2'-OH-BDE-28-HSA 的稳定性起着重要作用。对接结果还得出,





图 3 2'-OH-BDE-28-HSA 模型分子对接结果

Fig. 3 The results of molecular docking Note: (a) residues around 6 Å of the 2'-OH-BDE-28 in the active pocket of HSA; (b) two-dimensional plot of hydrophobic effect for the 2'-OH-BDE-28-HSA complex.

298 K下 2'-OH-BDE-28 与 HSA 的结合自由能为-15.27 kJ·mol⁻¹。此外,测量出 2'-OH-BDE-28 与 TRP214 的距离为 4.13 Å < 7 nm(见图 3a),完全符合 能量转移条件。

根据文献^[21],分析荧光猝灭实验数据可知 2'-OH-BDE-28 与 HSA 相互作用时的表观结合常数 K_a 、结合位点数 n 和热力学参数(见表 2)。3 个温度 下其结合位点数 n 均约为 1,表明在 2'-OH-BDE-28 与 HSA 作用时只有一个结合位点。2'-OH-BDE-28 与 HSA 的表观结合常数 K_a 较大,在 10⁶数量级以 上,说明两者的结合较牢固,在其与蛋白质发生相互 作用结合后可被蛋白质储存和转运。而热力学参数 $\Delta G < 0$ 、 $\Delta H < 0$ 、 $\Delta S < 0$,可以推断,2'-OH-BDE-28 和 HSA 之间的相互作用是一种自发的放热过程,且 其主要驱动力为氢键和疏水作用力^[21],这也与分子 对接结果完全吻合。

竞争试验可有效、快捷地判断 2'-OH-BDE-28 与 HSA 的结合区域和结合位点。通常采用布洛芬 (ibuprofen)、华法林(warfarin)等荧光探针对蛋白质不

同区域进行特异性结合,然后根据小分子在 HSA 结 合位置上的置换作用确定其结合位点,结果见图 2 d。同时,竞争试验的结合常数可以通过修正的 Stern-Volmer 方程得出

 $F_0/(F_0 - F) = 1/f + 1/(f \cdot K_a \cdot [Q])$ (2)

加入 Ibuprofen 探针后 2'-OH-BDE-28 与 HSA 的结合常数 K_a 为 9.23×10⁶ L·mol⁻¹与未加探针之前 的结合常数 9.90×10⁶ L·mol⁻¹很接近, 而加入 Warfarin 探针后 2'-OH-BDE-28 与 HSA 的结合常数 K_a 为 3.67×10⁶ L·mol⁻¹明显比未加探针之前的 9.90×10⁶ L ·mol⁻¹小很多。这表明 2'-OH-BDE-28 与 HSA 的结 合位点是 Warfarin 位点。

3 讨论(Discussion)

目前,用于研究小分子与生物大分子相互作用的技术有许多。包括光谱法^[22]、电化学方法^[23]、核磁 共振分析法^[24]、质谱法^[25]等。近年来,计算模拟技术 在研究相互作用领域有了很大的发展^[26-27]。Rehman 等^[28]通过分子对接技术直观的展示了 HSA 在 HSA

表 2 2'-OH-BDE-28-HSA 体系的结合常数、位点数和热力学参数

Table 2 Binding constants (K_a) , number of binding sites (n) and thermodynamic parameters of

2'-OH-BDE-28-HSA	system a	t different	temperatures
------------------	----------	-------------	--------------

温度/K	结合常数/(L·mol ⁻¹)	位点数	焓/(kJ·mol ⁻¹)	自由能/(kJ·mol ⁻¹)	熵/(J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)
<i>T</i> /K	$K_a/(L \cdot \text{mol}^{-1})$	п	$\Delta H/(kJ \cdot mol^{-1})$	$\Delta G/(kJ \cdot mol^{-1})$	$\Delta S/(J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1})$
291	6.08×10 ⁷	1.11		-37.13	
298	4.94×10^{6}	1.11	-23.12	-37.44	48.06
310	1.39×10^{6}	1.07		-38.02	

的 IIIA 子域稳定的与 Leu387、Ile388、Asn391、Cys-392、Phe-403、Leu-407、Arg-410、Lys-414、Leu-430 等 氨基发生相互作用,并且分子对接的结果与热力学 分析结果高度吻合。然而,每种方法各有其独特之 处,也有其局限性。例如光谱法虽然可以测定小分 子与生物大分子形成复合物前后结构变化的信息, 但各种光谱学方法应用范围有限,需多种光谱学方 法并用[29]。电化学方法难以测定一些难电离的小分 子例如本文中的 OH-PBDEs。而核磁共振分析法所 用样品量较大对于研究超大型生物大分子具有局限 性。因此要打破这些局限,一方面需要多种分析检 测方法的综合应用和不同学科之间的协作。Gao 等^[30]结合质子核磁共振(H NMR)、紫外可见光谱、荧 光光谱、圆二色光谱法研究改性环糊精与牛血清白 蛋白的作用机制。这项研究结合了多种手段的优点 多方面解读其作用机制:包括作用前后质子的转移、 荧光猝灭机制、α-螺旋的变化以及亲和力的强弱等。 另一方面,也依赖于实验方法合理安排以及各种分 析测试技术的不断发展完善。Ma 等^[25]通过合理的 优化设置利用电喷雾电离质谱(ESI/MS)研究了牛血 清白蛋白(BSA)与 24 种不同溴和羟基取代位置的 OH-PBDEs 同系物的共价络合相互作用。不仅能测 定 OH-PBDEs 同系物对各个 BSA 的结合力大小还 能推断 BSA 的构象变化。但目前对于 OH-PBDEs 与 HSA 相互作用的报道甚少^[31]。

本研究也是采用了多种手段结合研究的方法研究 2'-OH-BDE-28 与 HSA 的毒理作用。结果表明 2'-OH-BDE-28 通过静态猝灭和能量转移机制猝灭 HSA 的荧光强度,并且诱导 HSA 的二级结构发生 变化,其中 α-螺旋改变起主导地位。此外,热力学 分析表明,氢键和疏水作用力是维持 2'-OH-BDE-28 与 HSA 稳定结合的作用力,这与分子对接的结果完 全吻合。最后,竞争实验和分子对接结果又一致表明 2'-OH-BDE-28 主要是结合在 HSA 的位点 I。实验和计算机模拟相互佐证,结果高度吻合,提高实验的准确性,同时为羟基化多溴二苯醚的毒性机理的 研究提供更可靠的参考信息。

通讯作者简介:易忠胜(1970-),男,博士,教授,研究方向为化 学计量学和环境毒理学。

参考文献(References):

[1] 熊勤犁, 史雅娟, 吕永龙, 等. 2,2',4,4'-四溴二苯醚 (BDE-47)对大型溞(*Daphnia magna*)的毒性效应[J]. 生 态毒理学报, 2013, 8(1): 97 - 104

Xiong Q L, Shi Y J, Lv Y L, et al. Toxic effects of 2,2',4, 4' -tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) to *Daphnia magna* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2013, 8(1): 97 - 104 (in Chinese)

- [2] 吉贵祥, 石利利, 刘济宁, 等. BDE-47 对斑马鱼胚胎-幼鱼的急性毒性及氧化应激作用[J]. 生态毒理学报, 2013, 8(5): 731 736
 Ji G X, Shi L L, Liu J N, et al. Acute toxicity and oxidative stress effects of BDE-47 on zebrafish embryos and larvae [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2013, 8(5): 731 736 (in Chinese)
- [3] Birnbaum L S, Staskal D F. Brominated flame retardants: Cause for concern? [J] Environmental Health Perspectives, 2004, 112(1): 9 - 17
- [4] Darnerud P O, Eriksen G S, Jóhannesson T, et al. Polybrominated diphenyl ethers: Occurrence, dietary exposure, and toxicology [J]. Environmental Health Perspectives, 2001, 109(Z1): 49 68
- [5] Roberts S C, Noyes P D, Gallagher E P, et al. Species-specific differences and structure-activity relationships in the debromination of PBDE congeners in three fish species [J]. Environmental Science & Technology, 2011, 45 (5): 1999 2005
- [6] Chen A, Park J S, Linderholm L, et al. Hydroxylated polybrominated diphenyl ethers in paired maternal and cord sera [J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47 (8): 3902 3908
- [7] Qiu X H, Bigsby R M, Hites R A. Hydroxylated metabolites of polybrominated diphenyl ethers in human blood samples from the United States [J]. Environmental Health Perspectives, 2009, 117(1): 93 98
- [8] Sun J, Liu J, Liu Q, et al. Hydroxylated polybrominated diphenyl ethers (OH-PBDEs) in biosolids from municipal wastewater treatment plants in China [J]. Chemosphere, 2013, 90(9): 2388 - 2395
- [9] He Y, Murphy M B, Yu R M K, et al. Effects of 20 PBDE metabolites on steroidogenesis in the H295R cell line [J]. Toxicology Letters, 2008, 176(3): 230 - 238
- [10] Boxtel A L V, Kamstra J H, Cenijn P H, et al. Microarray analysis reveals a mechanism of phenolic polybrominated diphenylether toxicity in zebrafish [J]. Environmental Science & Technology, 2008, 42(5): 1773-1779
- [11] Xu X H, Huang H L, Wen B, et al. Phytotoxicity of brominated diphenyl ether-47 (BDE-47) and its hydroxylated and methoxylated analogues (6-OH-BDE-47 and 6-MeO-BDE-47) to maize (*Zea mays* L.) [J]. Chemical Research in Toxicology, 2015, 28(3): 510-517

- [12] Farooqi M J, Penick M A, Negrete G R, et al. Interaction of human serum albumin with novel 3, 9-disubstituted perylenes [J]. Protein Journal, 2013, 32(6): 493 - 504
- [13] Deeb O, Rosales-Hernández M C, Gómez-Castro C, et al. Exploration of human serum albumin binding sites by docking and molecular dynamics flexible ligand-protein interactions [J]. Biopolymers, 2010, 93(2): 161 – 170
- [14] 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: 166 - 172
- [15] Eriksson J, Green N, Marsh G, et al. Photochemical decomposition of 15 polybrominated diphenyl ether congeners in methanol/water [J]. Environmental Science & Technology, 2004, 38(11): 3119 - 3125
- [16] Yeggoni D P, Gokara M, Manidha D M, et al. Binding and molecular dynamics studies of 7-hydroxycoumarin derivatives with human serum albumin and its pharmacological importance [J]. Molecular Pharmaceutics, 2014, 11 (4): 1117 - 1131
- [17] Shahlaei M, Rahimi B, Ashrafi-Kooshk M R, et al. Probing of possible olanzapine binding site on human serum albumin: Combination of spectroscopic methods and molecular dynamics simulation [J]. Journal of Luminescence, 2015, 158: 91-98
- [18] Khan S N, Islam B, Yennamalli R, et al. Interaction of mitoxantrone with human serum albumin: Spectroscopic and molecular modeling studies [J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008, 35(5): 371 - 382
- [19] Sudhamalla B, Gokara M, Ahalawat N, et al. Molecular dynamics simulation and binding studies of beta-sitosterol with human serum albumin and its biological relevance
 [J]. Journal of Physical Chemistry B, 2010, 114 (27): 9054-9062
- [20] Faridbod F, Ganjali M R, Larijani B, et al. Interaction study of pioglitazone with albumin by fluorescence spectroscopy and molecular docking [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2011, 78 (1): 96 - 101
- [21] Gong Q L, Hu X G, Fang G Y, et al. Study of the interaction between 8-azaguanine and bovine serum albumin using optical spectroscopy and molecular modeling methods [J]. Journal of Molecular Modeling, 2012, 18(2): 493 500
- [22] 俞英,程晓伟. 牛血清白蛋白与酸性品红的结合反应
 [J]. 分析化学, 2000, 28(5): 583 586
 Yu Y, Cheng X W. Interaction of bovine serum albumin with acid magenta in acidic solution [J]. Chinese Journal of

Analytical Chemistry, 2000, 28(5): 583 - 586 (in Chinese)

[23] 陈彩莲,朱庆仁,孙登明.花旗松素与牛血清白蛋白相 互作用的光谱和电化学[J].应用化学,2014,31(5):617 - 623
Chen C L, Zhu Q R, Sun D M.Studies on the interaction

of taxifolin and bovine serum albumin by spectroscopic and voltammetric methods [J]. Chinese Journal of Applied Chemistry, 2014, 31(5): 617 - 623 (in Chinese)

- [24] Meyer B, Peters T. NMR Spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors [J]. Angewandte Chemie-International Edition, 2003, 42(8): 864 - 890
- [25] Ma Q, Bai H, Wang C, et al. Investigation of noncovalent interactions between hydroxylated polybrominated diphenyl ethers and bovine serum albumin using electrospray ionization-ion mobility-mass spectrometry [J]. International Journal of Mass Spectrometry, 2014, 357: 34 – 44
- [26] Wang X X, Yang H Y, Hu X X, et al. Effects of HO-/ MeO-PBDEs on androgen receptor: In vitro investigation and helix 12-involved MD simulation [J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(20): 11802 - 11809
- [27] Brogan A P S, Sessions R B, Perriman A W, et al. Molecular dynamics simulations reveal a dielectric-responsive coronal structure in protein – polymer surfactant hybrid nanoconstructs [J]. Journal of the American Chemical Society, 2014, 136(48): 16824–16831
- [28] Rehman M T, Shamsi H, Khan A U. Insight into the binding mechanism of imipenem to human serum albumin by spectroscopic and computational approaches [J]. Molecular Pharmaceutics, 2014, 11(6): 1785 - 1797
- [29] Varlan A, Hillebrand M. Bovine and human serum albumin interactions with 3-carboxyphenoxathiin studied by fluorescence and circular dichroism spectroscopy [J]. Molecules, 2010, 15(6): 3905 - 3919
- [30] Gao H, Wang Y N, Fan Y G, et al. Interactions of some modified mono- and bis-beta-cyclodextrins with bovine serum albumin [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2006, 14(1): 131-137
- [31] 董露, 易忠胜, 伍智蔚, 等. 2'-羟基-2,4-二溴二苯醚与人血清白蛋白作用机制的光谱研究与计算模拟[J]. 高等学校化学学报, 2015, 36(3): 516 522
 Dong L, Yi Z S, Wu Z W, et al. Mechanism Study on theinteraction between 2'-hydroxy-2,4-dibromo diphenyl ethers and human serum albumin based on spectroscopic methods and computional simulations [J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2015, 36(3): 516 522 (in Chinese)