

# 长春碱与中心蛋白的结合及其对蛋白聚集性质的影响

张文龙<sup>1,2\*</sup> 胡颖媛<sup>1,2</sup> 裴科<sup>1,2</sup> 任蕾<sup>1</sup> 杨斌盛<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>山西中医药大学中药与食品工程学院; <sup>2</sup>山西中医药大学中药炮制山西省重点实验室 晋中 030619;

<sup>3</sup>山西大学分子科学研究所 化学生物学与分子工程教育部重点实验室 太原 030006)

**摘要** 通过光谱、等温滴定量热(ITC)以及分子对接等方法研究了八肋游仆虫中心蛋白 N-端半分子(N-EoCen)与长春碱(Vin)之间的相互作用以及 Vin 对 N-EoCen 聚集性质的影响。结果表明, Vin 可以与 N-EoCen 以摩尔比 1:1 结合于 N-EoCen 的第一个 EF-hand 的 F 螺旋与第二个 EF-hand 的 E、F 螺旋之间, 条件结合常数约为  $10^4$  L/mol。复合物的形成是放热的过程, 主要依靠静电作用与疏水作用。N-EoCen 与 Vin 结合后, 构象发生变化,  $\alpha$  螺旋含量减少, N-EoCen 与  $Tb^{3+}$  结合能力减弱。最终使得 N-EoCen 的自聚集以及  $Tb^{3+}$  诱导的聚集减弱。研究结果为蛋白聚集抑制剂的筛选以及相关药物的研发提供了参考和依据。

**关键词** 中心蛋白 长春碱 复合物 聚集 抑制

## Binding of Vinblastine to Centrin and Effect on Its Aggregation Properties

Zhang Wenlong<sup>1,2\*</sup>, Hu Yingyuan<sup>1,2</sup>, Pei Ke<sup>1,2</sup>, Ren Lei<sup>1</sup>, Yang Binsheng<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> College of Chinese Medicine and Food Engineering; <sup>2</sup> Key Laboratory of Chinese Medicine Processing

in Shanxi Province, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong, 030619; <sup>3</sup> Key Laboratory

of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Institute of

Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan, 030006)

**Abstract** The interaction between vinblastine (Vin) and N-terminal domain of Euplotes octocarinatus centrin (N-EoCen) was described by spectroscopy, isothermal titration calorimetry (ITC) and molecular docking. Results showed that Vin could bind between the F helix of the first EF-hand and the E, F helix of the second EF-hand of N-EoCen with a molar ratio of 1:1 stoichiometry in 10 mmol/L pH=7.4 Hepes buffer solution at room temperature. The conditional binding constant is about  $10^4$  L/mol. The binding of Vin to N-EoCen is an exothermic process, mainly relying on electrostatic and hydrophobic interactions. The formation of N-EoCen-Vin complex leads to change of protein conformation and the decrease of  $\alpha$ -helix content as demonstrated by circular dichroism (CD) spectra and 3D fluorescence spectra. The binding ability of  $Tb^{3+}$  to N-EoCen is weakened upon complex formation. Finally, the binding of Vin to N-EoCen inhibits the self-aggregation and  $Tb^{3+}$ -induced aggregation of protein. The results provide a reference and basis for the screening of protein aggregation inhibitors and the development of related drugs.

**Keywords** Centrin, Vinblastine, Complex, Aggregation, Inhibit

聚集是蛋白质中常见的现象。有些蛋白质的聚集可导致其在生物体中发生纤维化, 从而引发各类疾病的产生, 例如淀粉样蛋白的异常聚集通常被认为是阿尔茨海默症等淀粉样变性病的主要致病原因之一<sup>[1]</sup>; 而另外一些蛋白质的聚集则可

能具有正向生物学功能, 可以控制蛋白的活性, 以应对生理和环境的变化, 例如 RNA 结合蛋白在生理和体外状态的聚集对于维持肠道稳态、个体健康及延缓衰老具有重要意义<sup>[2]</sup>。又例如高度寡聚的 S100 蛋白使其在生物体内具有更高的功能

\* 联系人, 张文龙 女, 博士, 讲师, 主要从事生物无机化学研究。E-mail: zhangwl@sxtcm.edu.cn

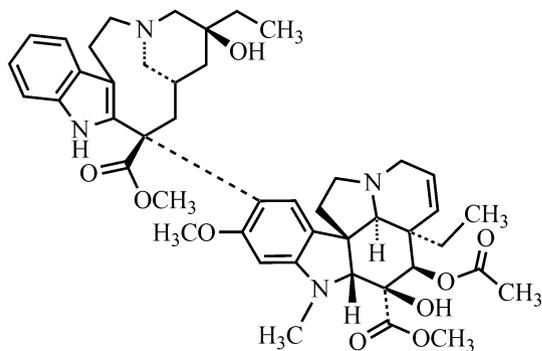
山西省自然科学基金项目(201901D211532)、国家自然科学基金项目(81703704)、山西省教育厅基金项目(2020L0416)和山西中医药大学科研基金项目(2020BK09)资助

2022-08-12 收稿, 2022-09-13 接受

效率<sup>[3]</sup>。小分子药物可以通过与蛋白质结合来改变蛋白的聚集状态,从而调控蛋白的性质与功能。基于此发掘改变蛋白聚集状态的药物分子是一种独特的药物开发策略。

Centrin,与钙调蛋白同属于 EF-hand 钙结合蛋白亚族,是重要的  $\text{Ca}^{2+}$  信号通路蛋白。尽管二者属于同一亚族,但由于 Centrin 比钙调蛋白 N 端多含二十几个氨基酸残基,使其具有聚集性质<sup>[4]</sup>。Centrin 包含 2 个独立的 EF-hand 结构域,分别为 N 端域和 C 端域,每个域包含一对 EF-hand motif。Centrin 可以通过 EF-hand motif 中 loop 环来结合  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Tb}^{3+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  等金属离子<sup>[5,6]</sup>,结合金属离子后,构象发生变化,由“closed”变成“open”状态。Centrin 在高浓度时会发生聚集,金属离子(尤其是  $\text{Tb}^{3+}$ )的结合会进一步诱导蛋白形成聚集体,N 端域在蛋白的聚集过程中发挥着主要作用<sup>[7]</sup>。而 C-端域能够依赖  $\text{Ca}^{2+}$  结合靶肽<sup>[8]</sup>,与蛋白在细胞内的定位有关。Centrin 普遍存在于各类真核生物中<sup>[9]</sup>,与中心体的复制与分离<sup>[10]</sup>、mRNA 输出<sup>[11]</sup>、核苷酸切除修复识别<sup>[12]</sup>、光的转导级联<sup>[13]</sup>等密切相关。

长春碱(Vin)是从长春花植物中提取的成分,其结构如图式 1 所示。作为一种生物碱,Vin 不仅可用于治疗淋巴瘤、乳腺癌和睾丸癌等癌症,还可被应用于阿尔茨海默症、卒中、记忆障碍等情况下的认知障碍的改善以及脑血管疾病的治疗,并且在呼吸系统疾病治疗中也具有潜力<sup>[14]</sup>。其优势在于可以通过多靶点调控不同的信号通路,起到抗炎、抗氧化、血管舒张和神经保护等作用。例如,Vin 可以通过阻止微管蛋白聚集或诱导已经形成的微管解聚,影响蛋白质的合成<sup>[15]</sup>。



图式 1 Vin 的结构

Scheme 1 Chemical structure of vinblastine

八肋游仆虫中心蛋白(EoCen),从单细胞八肋游仆虫中克隆得到<sup>[16]</sup>,可以作为一种研究钙结合蛋白性质与功能的模型蛋白。其 N-端域(N-EoCen)共包含 101 个氨基酸残基。前期研究表明,生理条件下,N-EoCen 浓度达到  $10\mu\text{mol/L}$  会发生聚集,形成聚集体。N-EoCen 可以结合 2 个  $\text{Tb}^{3+}$ , $\text{Tb}^{3+}$  的结合会加剧蛋白的聚集<sup>[7]</sup>,目前 N-EoCen 的 NMR 单体结构(2JOJ.PDB)和三聚体结构(5Z1Q.PDB)<sup>[17]</sup>已被解析。鉴于 Vin 的生物学意义,其是否能影响 N-EoCen 的聚集?考虑到这一点,应用多种光谱、量热法、分子对接等技术研究了 Vin 与 N-EoCen 之间的相互作用以及 Vin 对 N-EoCen 聚集性质的影响。这一研究提供了 Vin 与 centrin 结合的相关信息,对于阐明药物作用机制以及药物的研发具有参考价值。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂

Vin (Solarbio 公司);N-2-羟乙基哌嗪-N'-乙磺酸(Hepes, Sigma-Aldrich 公司)。其他试剂均为市售分析纯级。

### 1.2 溶液的配制

Vin 溶液:取少量 Vin 固体,溶解于  $10\text{mmol/L}$  pH 7.4 Hepes 缓冲液,定容至  $10\text{mL}$ ,确定其浓度。

$\text{Tb}^{3+}$  储备液的制备以及 N-EoCen 表达与纯化参考文献[18]完成。

### 1.3 荧光光谱

荧光光谱使用 F4700 型荧光光谱仪(日本 Hitachi 公司)测定,扫描速度为  $1200\text{nm}/\text{min}$ ,狭缝均为  $10\text{nm}$ 。稳态荧光光谱的扫描范围为  $290\sim 550\text{nm}$ ,激发波长为  $280\text{nm}$ ;三维荧光光谱的激发与发射波长均设置为  $200\sim 500\text{nm}$ ;  $\text{Tb}^{3+}$  探针实验:扫描范围为  $470\sim 650\text{nm}$ ,激发波长为  $290\text{nm}$ ,使用  $360\text{nm}$  的滤光片;共振光散射光谱(RLS)测定:扫描范围为  $250\sim 600\text{nm}$ ,激发与发射波长相同( $\Delta\lambda = 0\text{nm}$ )。

### 1.4 等温微量热法(ITC)

$25^\circ\text{C}$ ,利用 MicroCal ITC200(英国 Malvern 公司)进行 ITC 测试。 $3.0\text{mmol/L}$  Vin、 $0.07\text{mmol/L}$  N-EoCen 分别置于注射池与样品池中,进行滴定,第一滴滴加  $0.4\mu\text{L}$ ,以后每次滴加  $1\mu\text{L}$  Vin 到样品池中,反应时间为  $5\text{min}$ ,共滴加 24 次,搅拌速率为  $750\text{r}/\text{min}$ 。实验结果使用仪器自带软件 Origin<sup>TM</sup> 采用“one set of sites”来

拟合,数据处理过程中,扣除稀释、混合以及第一次滴定所产生的热量,得到结合常数( $K_a$ )、 $\Delta H$ 与 $\Delta S$ 。

## 1.5 圆二色光谱(CD)

25℃下,使用法国 Bio-logic Mos 500 型圆二色谱仪收集,扫描波长范围为 200~260 nm,使用光程 1mm 吸收池进行测定,扫描速度为 50nm/min,步长 0.2nm,带宽 1nm。实验测得的数据使用 Dicroprot 软件来分析,选择 K2D (neural network) 分析方法进行拟合得到蛋白质的二级结构含量。

所有测试均在 10mmol/L pH 7.4 HEPES 缓冲溶液中进行,光谱数据均为 3 次扫描的平均值,数据处理过程中均扣除了稀释效应。

## 1.6 分子对接

Vin 与 N-EoCen 的结合位点和结合模式通过 AutoDock Vina 1. 1. 2 进行分子对接研究<sup>[19]</sup>,选择 N-EoCen 结构(PDB:2JOJ)为模版,在整个蛋白质区域内通过全局搜索找出打分最高的结果,即为最适合位点。

## 2 结果与讨论

### 2.1 N-EoCen 与 Vin 的结合

#### 2.1.1 荧光光谱

由于 N-EoCen 不含色氨酸,仅含有酪氨酸 Tyr 残基(Tyr46, Tyr72, Tyr79),故可使用 Tyr 残基作为其内在荧光来研究蛋白质构象变化和分子间相互作用。

图 1(A) 是 25℃ 时 10mmol/L pH 7.4 HEPES 缓冲溶液中 Vin 滴定 N-EoCen 的荧光光谱图。由图可见,N-EoCen 与 Vin 二者单独存在时,其荧光最大发射峰分别出现在 305、360 nm(图 1(A)插图)。向 N-EoCen 溶液中逐渐滴加 Vin,随着 Vin 浓度的增加,N-EoCen 在 305nm 处的荧光逐渐被猝灭,最大发射峰略微红移,从 305nm 移至 308nm,并在 360nm 处出现 Vin 的荧光发射峰,346nm 处出现等荧光点,这表明在 25℃、10mmol/L pH 7.4 HEPES 缓冲溶液中,Vin 与 N-EoCen 形成复合物。复合物的形成导致 N-EoCen 中 Tyr 残基微环境发生了变化<sup>[20]</sup>。

将 N-EoCen 在 305nm 处的荧光强度扣除稀释效应后对 Vin 与 N-EoCen 浓度比作图,得到图 1(B) 所示的滴定曲线。由图可见,N-EoCen 在

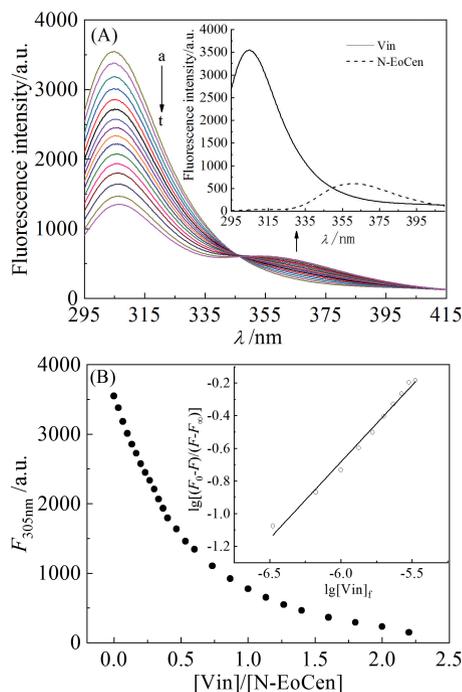


图 1 (A) Vin 滴定 N-EoCen (10 μmol/L) 的荧光光谱; (B) N-EoCen 在 305nm 处的荧光随 [Vin]/[N-EoCen] 的变化曲线

Fig.1 (A) Fluorescence spectra produced by addition of Vin to N-EoCen, (B) titration curve of fluorescent intensity at 305nm against concentration ratio of Vin to N-EoCen

(A) a~t 分别加入 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 18, 22, 26, 30, 34 μL Vin ( $1 \times 10^{-4}$  mol/L);

插图: N-EoCen 和 Vin 的 HEPES 溶液的荧光光谱;

(B) 插图:  $\lg[(F_0 - F_i)/(F_i - F_\infty)]$  vs  $\lg[Vin]_f$  曲线

305nm 处的荧光强度随着二者浓度比的增大而逐渐减小,直到二者的浓度比接近 1, 荧光强度变化不再明显,这意味着 Vin 与 N-EoCen 以 1:1 形成复合物。Vin 与 N-EoCen 的结合常数可由式 (1)<sup>[21]</sup> 得到。

$$\lg[(F_0 - F_i)/(F_i - F_\infty)] = \lg K_a + n \lg [Vin]_f \quad (1)$$

其中,  $F_0$  为蛋白的初始荧光强度;  $F_i$  为任一滴定点的荧光强度;  $F_\infty$  为滴定剂 (Vin) 与 N-EoCen 完全结合后的荧光强度;  $K_a$  为滴定剂 (Vin) 与 N-EoCen 结合的条件结合常数;  $n$  为结合位点数;  $[Vin]_f$  为任一滴定点时滴定剂 (Vin) 的游离浓度。根据文献 [21], 使用 Vin 的总浓度代替 Vin 的游离浓度, 用  $\lg[(F_0 - F_i)/(F_i - F_\infty)]$  对  $\lg [Vin]_f$  作图(图 1(B)插图), 可得  $K_a$  和  $n$ , 结果列于表 1 中。从表中可以看到, Vin 与 N-EoCen 的结合常数为  $(8.91 \pm 0.04) \times 10^4$  L/mol, 化学计量比约为 1。

表1 25℃时 N-EoCen-Vin 复合物的热力学参数

方法	$K_a/(10^4 \text{ L/mol})$	$n$	$\Delta G/(kJ/mol)$	$\Delta H/(kJ/mol)$	$\Delta S/(kJ \cdot mol^{-1} \cdot K)$
荧光	$8.91 \pm 0.04$	1.10	-	-	-
ITC	$2.04 \pm 0.12$	1.08	-36.38	-12.54	0.08

### 2.1.2 ITC 分析

为了进一步探究 Vin 与 N-EoCen 之间的相互作用以及二者之间的作用力,选用 ITC 进行分析。图 2 为 Vin 滴定 N-EoCen 所得到的等温滴定热曲线。由图可知, Vin 与 N-EoCen 之间的反应是放热反应。采用“one set of sites”模型进行拟合,得到  $K_a$  为  $(2.04 \pm 0.12) \times 10^4 \text{ L/mol}$ , 与荧光光谱得到的结合常数接近, 将拟合得到的热力学参数列于表 1。可以看到, Vin 与 N-EoCen 的相互作用是焓熵共同驱动的, 表明静电作用在复合物形成的过程中起主要作用<sup>[18]</sup>。

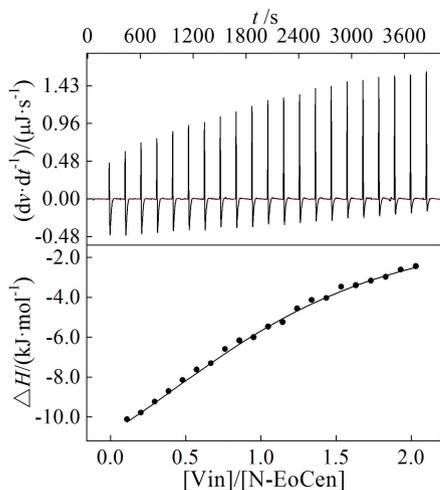


图2 Vin 滴定 N-EoCen 等温滴定热曲线

Fig. 2 Calorimetric titration curve of Vin to N-EoCen (The solid lines represent the best fit for one set of sites)

### 2.1.3 N-EoCen 与 Vin 能量传递与结合距离

根据 Förster 非辐射能量转移理论 (FRET), 只有当能量受体分子 (Vin) 的远紫外吸收光谱和供体分子 (N-EoCen) 的荧光发射光谱具有足够大的重叠且受体与供体之间的距离不超过 7nm 时才有发生能量转移的可能性。室温下, 10mmol/L HEPES 缓冲溶液 (pH = 7.4) 中, Vin 的紫外吸收光谱与 N-EoCen 的荧光发射光谱的重叠如图 3 所示, 重叠部分说明 N-EoCen 与 Vin 之间存在非辐射能量转移, 计算得到重叠积分  $J = 3.29 \times 10^{-16} \text{ cm}^3 \cdot \text{L/mol}$ ,  $E = 0.74$ ,  $R_0 = 1.42 \text{ nm}$ , N-EoCen 中 Tyr 残基到结合的 Vin 的距离为  $r = 1.20 \text{ nm}$ ,

Vin 与 N-EoCen 相互作用的结合距离  $r < 7 \text{ nm}$ , 同时  $0.5R_0 < r < 1.5R_0$ , 证明 Vin 加入 N-EoCen 所引起的 305nm 处的荧光猝灭是由于形成了 N-EoCen-Vin 复合物, 发生了 Tyr 残基向结合 Vin 的无辐射能量转移所致。

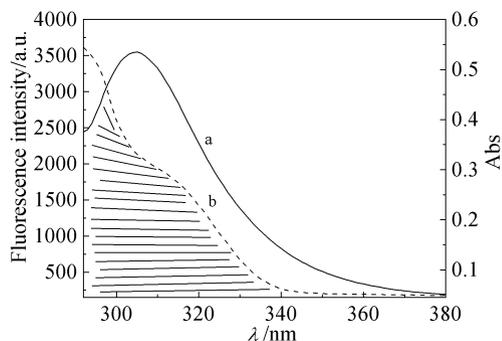


图3 Vin 的吸收光谱与 N-EoCen 的荧光光谱的重叠光谱  
Fig. 3 The overlap of Vin absorption spectrum and fluorescence spectrum of N-EoCen (The concentration of N-EoCen and Vin was  $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ )

### 2.1.4 分子对接模拟

选用 AutoDock Vina 1.1.2 软件进行分子对接研究, 图 4 显示了 Vin 与 N-EoCen 结合的最佳位点。根据 N-EoCen 的晶体结构, 结合分子对接结果, 发现 N-EoCen 中 Tyr46 与 Tyr79 位于 loop 区底部, Tyr72 处于容易接近且暴露的螺旋表面。考虑到这种位置特点, 在非辐射能量转移中, Tyr72 是 Vin 的主要能量供体, Vin 的吡啶环与 N-EoCen 中 Tyr72 苯环间的距离为 1.21nm, 与实验得到的数据相近。

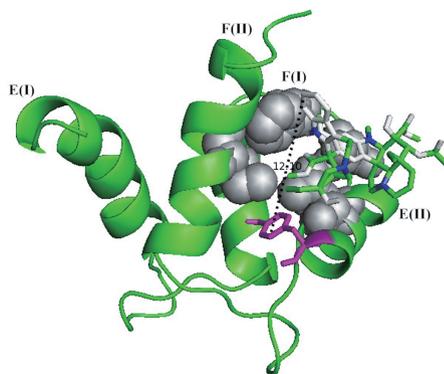


图4 N-EoCen 与 Vin 的分子模拟

Fig. 4 Molecular docking studies between N-EoCen and Vin The distance was shown as dark dash line (1.21nm) between Tyr72 (pink stick) and Vin (rainbow stick), Phe58, Val60, Ile65, Leu68 in gray sphere. E(I), F(I), E(II) and F(II) represent the E, F helix of EF-hand I and EF-hand II, respectively.

根据分子对接结果结合实验数据,推测 Vin 结合到 N-EoCen 第一个 EF-hand 的 F 螺旋与第二个 EF-hand 的 E, F 螺旋之间, Vin 杂环上的 N 以质子化形式存在,谷氨酸(Glu64, Glu67, Glu71)的羧基以去质子化形式存在,它们之间存在静电作用。另外, Vin 与 N-EoCen 中苯丙氨酸(Phe58)、缬氨酸(Val60)、异亮氨酸(Ile65)、亮氨酸(Leu68)之间还存在疏水作用。

## 2.2 构象变化

### 2.2.1 CD 光谱

图 5 为室温下 10mmol/L pH 7.4 HEPES 缓冲溶液中 Vin 与 N-EoCen 反应前后的 CD 光谱。由图可见, N-EoCen 在 208、222 nm 处出现 2 个较强的负峰,这是典型  $\alpha$ -螺旋的特征光谱,与文献<sup>[21]</sup>报道一致, N-EoCen 富含  $\alpha$ -螺旋。在 N-EoCen 溶液中加入 Vin 后, 208 与 222 nm 处负峰信号减弱,经 Dicroprot 软件分析发现,  $\alpha$ -螺旋的含量减少约 10%。表明 Vin 与 N-EoCen 结合后会导致蛋白质构象发生改变。

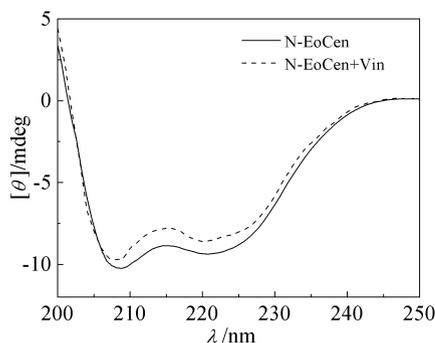


图 5 N-EoCen 与 Vin 作用的 CD 光谱

Fig. 5 CD spectra of N-EoCen and N-EoCen-Vin complex (The concentration of N-EoCen and Vin was  $5.0 \times 10^{-6}$  mol/L)

### 2.2.2 三维荧光光谱

为了进一步了解 Vin 对 N-EoCen 构象以及 Tyr 残基的微环境的影响,测定了 N-EoCen 与 Vin 反应体系的三维荧光光谱。图 6 为不同条件下, N-EoCen 的等量线图。图中存在两个峰,分别为 peak1 和 peak2,其中 peak1 ( $\lambda_{ex} = 280$ nm,  $\lambda_{em} = 305$ nm) 主要显示了 Tyr 残基的光谱特性<sup>[22]</sup>, peak2 ( $\lambda_{ex} = 280$ nm,  $\lambda_{em} = 360$ nm) 反映了 Vin 的荧光特性。由图可见,当 N-EoCen 中未加入 Vin 时(图 6(A)), peak1 的特征参数 ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ , F) 为 peak1(280/305, 862.1)。当 N-EoCen 中加入 Vin 后(图 6(B)), 出现 peak2, 两峰的特征参数分别为 peak1 (280/308, 489.8), peak2 (280/360,

412.6), 与未加入 Vin 相比, peak1 荧光强度下降了 43%, 并且 peak1 红移 3nm, 表明 Vin 与 N-EoCen 形成复合物后,使得蛋白的构象发生变化。这与二维荧光光谱以及 CD 光谱得到的结果一致。

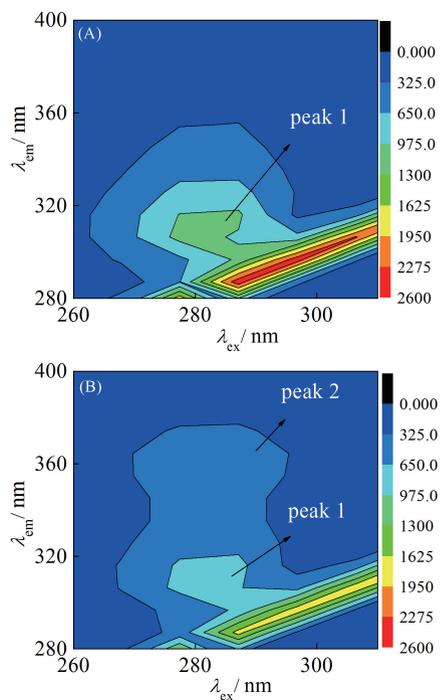


图 6 Vin 与 N-Eocen 作用的三维荧光光谱

Fig. 6 Three-dimensional fluorescence spectra of N-EoCen alone (A) and in the presence of Vin (B) (The concentration of N-EoCen and Vin was  $4.0 \times 10^{-6}$  mol/L)

### 2.2.3 Tb<sup>3+</sup> 探针

Tb<sup>3+</sup> 探针常被用于研究 centrin 的构象变化<sup>[18]</sup>。为了进一步了解 Vin 的结合对于 N-EoCen 构象的影响,检测了 N-EoCen 与 Vin 结合前后与 Tb<sup>3+</sup> 的能量转移情况,如图 7 所示。

由图可见,在 N-EoCen 中加入 Tb<sup>3+</sup> 后,在 495、545、595 及 620 nm 出现了 Tb<sup>3+</sup> 的特征发射峰。随着 Tb<sup>3+</sup> 的逐渐加入,特征峰强度逐渐增大, Tb<sup>3+</sup> 与 N-EoCen 结合并使得 Tb<sup>3+</sup> 荧光得到敏化。将 545nm 处的荧光强度对 Tb<sup>3+</sup> 与 N-EoCen 的浓度比作图(图 7 插图),可以看到 545nm 处荧光强度随着 Tb<sup>3+</sup> 与 N-EoCen 浓度比的增加而线性增强,直到二者的浓度比接近 2, 信号不再变化,表明 N-EoCen 与 Tb<sup>3+</sup> 以摩尔比 1:2 结合,这与文献中报道的结果一致<sup>[21]</sup>。而当 Vin 与 N-EoCen 结合后,由 Tb<sup>3+</sup> 滴定 N-EoCen-Vin 的光谱可得其滴定曲线,如图 8 插图所示,由于 Vin 不与 Tb<sup>3+</sup> 结合, N-EoCen 与 Vin 结合后, N-EoCen 与 Tb<sup>3+</sup> 仍以

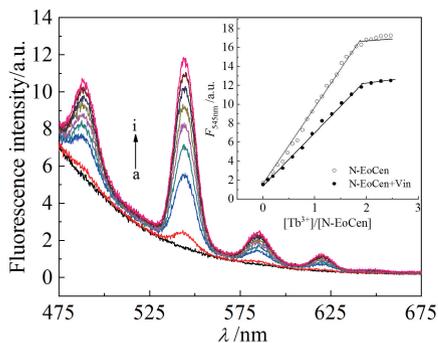
图 7  $Tb^{3+}$  敏化的荧光光谱

Fig. 7  $Tb^{3+}$  sensitized fluorescence spectra. From a to i, the concentration ratio of  $Tb^{3+}$  to N-EoCen ( $1 \times 10^{-5}$  mol/L) is 0, 0.19, 0.76, 0.95, 1.14, 1.33, 1.52, 1.71, 1.9, respectively. Inset: fluorescence intensity of  $Tb^{3+}$  at 545 nm as a function of  $Tb^{3+}$ /N-EoCen ratio in the absence or presence of Vin

1:2 结合,但 N-EoCen-Vin 对  $Tb^{3+}$  的敏化强度比 N-EoCen 减弱 28%。

根据式 (1) 拟合图 7 中得到的滴定曲线可得,在 10 mmol/L pH=7.4 HEPES 缓冲溶液中, $Tb^{3+}$  与 N-EoCen 的结合位点数  $n$  为 2.08,  $K_a$  为  $4.04 \times 10^{10}$  L<sup>2</sup>/mol<sup>2</sup>,与文献中报道的  $2.00 \times 10^{11}$  L<sup>2</sup>/mol<sup>2</sup> 接近<sup>[21]</sup>;而  $Tb^{3+}$  与 N-EoCen-Vin 的结合位点数  $n$  为 1.71,  $K_a$  为  $3.80 \times 10^8$  L<sup>2</sup>/mol<sup>2</sup>。

$Tb^{3+}$  探针实验表明, Vin 与 N-EoCen 结合后, N-EoCen 仍可结合 2 个  $Tb^{3+}$ ,但  $Tb^{3+}$  敏化强度减弱。 $Tb^{3+}$  结合能力减弱,由于 N-EoCen 中 Tyr 残基位于与  $Tb^{3+}$  结合的 loop 区周围,当  $Tb^{3+}$  与 loop 区结合时,配位点附近的 Tyr 残基与  $Tb^{3+}$  之间会发生非辐射能量转移;而当 N-EoCen 与 Vin 结合后, N-EoCen 构象发生变化,尤其是 Tyr 残基的微环境的变化,会使得 Tyr 残基与  $Tb^{3+}$  之间的非辐射能量转移改变。另外, Tyr 残基与结合 Vin 之间的非辐射能量转移也可能削弱 Tyr 残基与结合  $Tb^{3+}$  之间的非辐射能量转移。

### 2.3 Vin 对 N-EoCen 聚集性质的影响

由于发色团的自组装或聚集产生大的不规则碎片会引起强的共振光散射信号,因此 RLS 光谱常用于蛋白聚集的研究<sup>[18]</sup>。为了探究 Vin 对 N-EoCen 的自聚集以及  $Tb^{3+}$  诱导的聚集的影响,应用 RLS 光谱进行了分析。

图 8(A) 为室温下 10 mmol/L pH=7.4 HEPES 缓冲溶液中, N-EoCen 在 Vin 存在或不存在时的 RLS 光谱图。由图可见,缓冲溶液中 Vin 的信号

很弱, N-EoCen 的信号较强,此时蛋白的浓度为  $2 \times 10^{-5}$  mol/L,蛋白应为聚集状态。当向 N-EoCen 中加入 Vin 后, RLS 信号减弱,表明 Vin 与 N-EoCen 的结合对 N-EoCen 的自聚集有抑制作用。

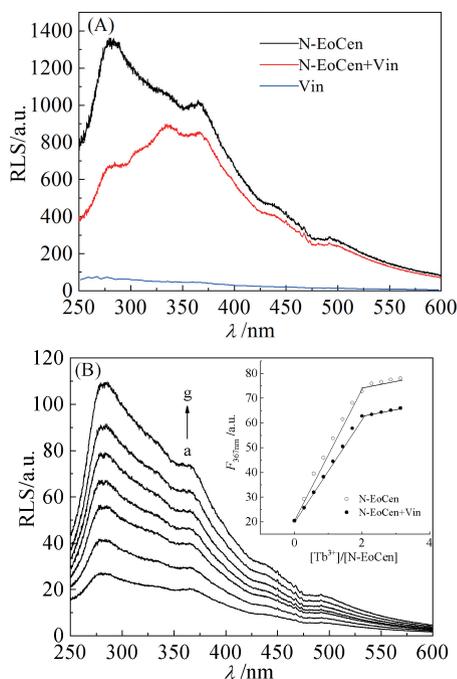
图 8 (A) N-EoCen 的 RLS 光谱; (B)  $Tb^{3+}$  滴定 N-EoCen 或 N-EoCen-Vin 的 RLS 光谱

Fig. 8 (A) RLS spectra of N-EoCen, (B) RLS spectra of N-EoCen or N-EoCen-Vin with addition of  $Tb^{3+}$  in 10 mmol/L HEPES buffer solution (pH=7.4)

(A) the concentration of Vin and N-EoCen was  $2 \times 10^{-5}$  mol/L.  
(B) From a to g, the concentration ratio of  $Tb^{3+}$  to N-EoCen is 0, 0.28, 0.57, 0.85, 1.14, 1.42, 1.71, respectively. Inset: titration curve of intensity at 367 nm against the concentration ratio of  $Tb^{3+}$  to N-EoCen, the concentration of Vin and N-EoCen was  $5 \times 10^{-6}$  mol/L

图 8(B) 为 Vin 不存在或存在时,  $Tb^{3+}$  滴定 N-EoCen 的 RLS 光谱图。由图可见,当 Vin 不存在时,向 N-EoCen 中逐渐加入  $Tb^{3+}$  后, RLS 信号逐渐增强,这与文献报道吻合,  $Tb^{3+}$  的结合会促进 N-EoCen 聚集体的形成<sup>[22]</sup>。将 367 nm 处 RLS 信号强度对  $[Tb^{3+}]/[N-EoCen]$  作图,得到图 8(B) 插图,可见 367 nm 处 RLS 信号随着  $[Tb^{3+}]/[N-EoCen]$  增大而逐渐增强,直到二者的浓度比接近 2,信号强度不再变化,表明 N-EoCen 与  $Tb^{3+}$  以摩尔比 1:2 结合。当 Vin 存在时,由  $Tb^{3+}$  滴定 N-EoCen-Vin 的 RLS 光谱可得其滴定曲线,如图 8(B) 插图所示,滴定曲线类似于 Vin 不存在时的情况,  $Tb^{3+}$  与 N-EoCen 仍以 2:1 结合,这与  $Tb^{3+}$

敏化实验得到的结果一致,但  $Tb^{3+}$  诱导的 N-EoCen 的聚集减弱 15%。表明 Vin 与 N-EoCen 的结合不仅会抑制 N-EoCen 的自聚集,并且对于  $Tb^{3+}$  诱导的聚集也有影响。先前的研究已经证实 Tyr79 在蛋白的聚集过程中起到关键作用,聚集主要依赖疏水作用<sup>[22]</sup>。对于这里得到的结果,可能归因于 N-EoCen 与 Vin 复合物的形成使得蛋白的构象发生变化,蛋白间的反应受到抑制,故而聚集减弱。

综上所述,Vin 可以通过静电、疏水作用结合到 N-EoCen 第一个 EF-hand 的 F 螺旋及第二个 EF-hand 的 E, F 螺旋之间。这是除三氟拉嗪 (TFP) 外<sup>[11]</sup>,另一种可以与 EoCen 的 N-端结合的生物碱类药物分子。这种结合模型与 N-EoCen 和 TFP 的结合类似<sup>[11]</sup>,表明 N-EoCen 表面的口袋能以不同构象容纳多种药物分子,N-EoCen 可能作为潜在的药物靶点。聚集性质是收缩性 centrin 纤维结构的基础,这些收缩结构在不同细胞过程中形貌和功能是高度不同的<sup>[9]</sup>,Vin 可通过与 N-EoCen 作用,使得 N-EoCen 的自聚集以及  $Tb^{3+}$  诱导的聚集减弱,其可能作为 N-EoCen 的潜在抑制剂,通过影响蛋白的聚集,在生物体内发挥作用。该研究不仅有助于理解 Vin 的生物活性,而且有助于更深入地了解 centrin 分子识别多样性的结构基础,可以为聚集抑制剂的开发提供参考,并且可能会提高我们对 centrin 如何介导相关药物分子信号转导过程以及如何阻断相关通路的认识。

### 3 结论

综上所述,在 10mmol/L pH 7.4 Hepes 溶液中,Vin 可以与 N-EoCen 以摩尔比 1:1 形成复合物,条件结合常数约为  $10^4$  L/mol,疏水作用、静电作用在复合物的形成中起到作用。复合物的形成使得 N-EoCen 的构象发生变化, $\alpha$ -螺旋含量减少, $Tb^{3+}$  结合能力减弱,Vin 具有抑制 N-EoCen 聚集的活性。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Giovannini J, Smeralda W, Jouanne M, et al. *Drug Discov. Today*, 2022, 27(5):1284~1297.
- [ 2 ] Ji S M, Luo Y W, Cai Q S, et al. *Mol. Cell*, 2019, 74(2): 363~377.
- [ 3 ] Sturchler E, Cox J A, Durussel I, et al. *J. Biol. Chem.*, 2006, 281(50): 38905~38917.
- [ 4 ] Tourbez M, Firanesco C, Yang A, et al. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279(46): 47672~47680.
- [ 5 ] Zhao Y Q, Yan J, Feng Y N, et al. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2011, 105(1):60~68.
- [ 6 ] Shi E X, Zhang W L, Zhao Y Q, et al. *Metalloomics*, 2017, 9: 1796~1808.
- [ 7 ] Zhao Y Q, Guo X J, Yang B S. *RSC Adv.*, 2017, 7: 10206~10214.
- [ 8 ] Shi E X, Zhang W L, Zhao Y Q, et al. *RSC Adv.*, 2017, 7: 27139~27149.
- [ 9 ] Phanindranath R, Sudhakar D V S, Thangaraj K, et al. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 2021, 570: 67~73.
- [ 10 ] Koblenz B, Schoppmeier J, Grunow A, et al. *J. Cell Sci.*, 2003, 116(13): 2635~2646.
- [ 11 ] Fischer T, Rodríguez-Navarro S, Pereira G, et al. *Nat. Cell Biol.*, 2004, 6: 840~848.
- [ 12 ] Zhang W L, Shi E X, Feng Y N, et al. *RSC Adv.*, 2017, 7(82): 51773~51788.
- [ 13 ] Ying G X, Frederick J M, Baehr W. *J. Biol. Chem.*, 2019, 294(11): 3957~3973.
- [ 14 ] Ritibi K, Grami D, Selmi S, et al. *Toxicol. Rep.*, 2017, 4: 221~225.
- [ 15 ] Watanabe K, Williams E F, Law J S, et al. *Experientia*, 1979, 35: 1487~1489.
- [ 16 ] 贺晓静,丰九英,王伟,等. *动物学报*, 2004, 50(3): 447~451.
- [ 17 ] Wang W M, Zhao Y Q, Wang H F, et al. *Protein Sci.*, 2018, 27(6): 1102~1108.
- [ 18 ] Li M, Zhang W L, Yang B S. *J. Inorg. Biochem.*, 2019, 193: 15~24.
- [ 19 ] 宋珍,韩玲军,王亚洁,等. *化学通报*, 2021, 84(4): 388~393.
- [ 20 ] Voicescu M, Heinrich M, Hellwig P, et al. *J. Fluoresc.*, 2008, 19: 257~266.
- [ 21 ] 叶旭文,张文龙,王志军,等. *高等学校化学学报*, 2019, 40(11): 2257~2264.
- [ 22 ] Duan L, Zhao Y Q, Wang Z J, et al. *J. Inorg. Biochem.*, 2008, 102(2): 268~277.