

太湖蓝藻素抑制作用机理研究

教宗华、陶文沂、孙徽、许正宏

(江南大学 生物工程学院 生物制药研究室, 江苏 无锡 214036)

摘 要:太湖蓝藻素是一种竞争性胰蛋白酶抑制剂。太湖蓝藻素可能是先通过分子中所含有的精氨酸类似基团 Agmatin 与胰蛋白酶活性中心相识别和结合。然后通过脯氨酸相似基团 Choi sulfate 抑制胰蛋白酶的水解功能。

关键词:太湖蓝藻素;胰蛋白酶抑制剂;竞争性

中图分类号:R931.711 文献标识码:A 文章编号:1002-3461(2002)01-0008-03

Studies on the inhibitory mechanism of Taihunoshin

AO Zong-hua, TAO Wen-yi, SUN Wei, *et al.*

(Laboratory of Biopharmacy, School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Taihunotin is a competitive inhibitor of trypsin. By agmatin (arginine like group), Taihunotin recognize and bond to the active center of trypsin. Then, by Choi sulfate (proline like group), Taihunotin inhibite hydrolysis activity of trypsin.

Key words: Taihunisin; trypsin inhibitor; competitive

太湖蓝藻水华是微囊藻属(*Microcystis*)蓝藻爆发形成的。近 10 年来,已有多种结构新颖,活性较强的各类酶抑制剂从该属蓝藻中发现,如从自然来源的第一个三环缩肽^[1],被看作是新药先导化合物的一个独特来源^[2]。太湖蓝藻素是本课题组进行江苏省社会发展项目《太湖蓝藻水华胰蛋白酶抑制剂的开发研究》中发现的,其结构与 *Aeruginosin 98-A* 同质^[2],如图 1 所示。体外活性测定显示,该化合物具有很强的胰蛋白酶抑制活性。

由于微囊藻属蓝藻多肽类酶抑制剂的发现时间较晚,因而对其结构与功能关系的探讨报道较少。Ishida, K. 等^[1]通过对铜绿微囊藻中同时发现的多个胰凝乳蛋白酶抑制剂 Micropeptins 88-A 到 88-F 的比较认为它们的胰凝乳蛋白酶抑制活性强弱与化合物中位于 Thr(苏氨酸)和 Ahp(3-amino-6-hydroxy-

2-piperidone,3-氨基-6-羟基-2-哌啉酮)之间的氨基酸残基有关。

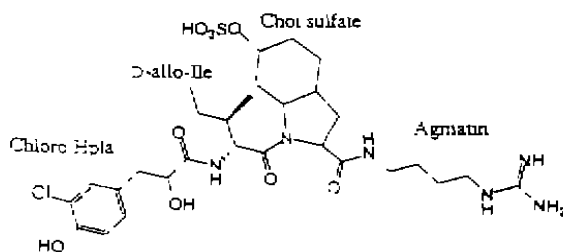


图 1 太湖蓝藻毒素的结构

本文就太湖蓝藻素对胰蛋白酶的抑制曲线作了测定,同时对其作用机理、结构与功能的关系作了初步探讨,希望能对以后新药的研究与开发以及药效更好的化合物的合成提供依据。

1 材料与方法



太湖蓝藻素样品从无锡太湖梅梁湖水域蓝藻中获得,分离方法参照文献[2]。用甲醇分别配成 $0.3\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液。

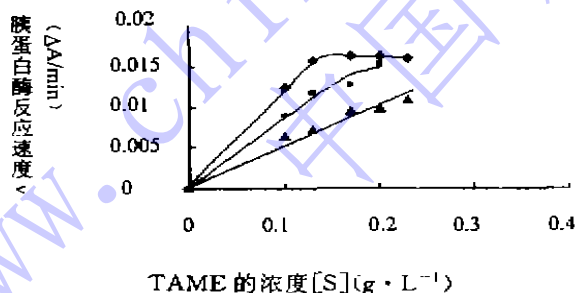
胰蛋白酶(1:250,上海华美生物工程公司);TAME(Na-对甲苯磺酰-L-精氨酸甲酯盐酸盐, Na-Toluene-P-Sulphonyl-L-arginine methyl ester hydrochloride,上海丽珠东风生物技术有限公司)。其余试剂为分析纯。

胰蛋白酶活性的测定方法参照 Worthington 法^[4]。酶反应速度单位为在 247nm 处每分钟吸光度的变化值。共测定了 3 组曲线,每组曲线测定了 4~5 个 TAME 浓度,这 3 组曲线的不同之处是不加抑制剂(A),每毫升反应液中含抑制剂 $0.0033\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (B), $0.01\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (C)。

紫外测定所用仪器为 751G 型紫外-可见分光光度计(上海分析仪器厂)。

2 结果与分析

胰蛋白酶反应速度 v 与底物浓度 $[S]$ 关系表示于图 2。



◆无抑制剂(A),■太湖蓝藻素在反应液中的浓度为 $0.0033\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (B),▲为 $0.01\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (C)。

图 2 胰蛋白酶反应速度与底物浓度的关系

从图 2 中可以看出,随着底物浓度的加大,酶反应速度逐渐增大并接近不加抑制剂时的最大速度。同时,随着抑制剂浓度的加大,其 K_m 值逐渐加大。这说明了此抑制剂与底物之间的竞争关系。将所得数据以 $1/v-1/$

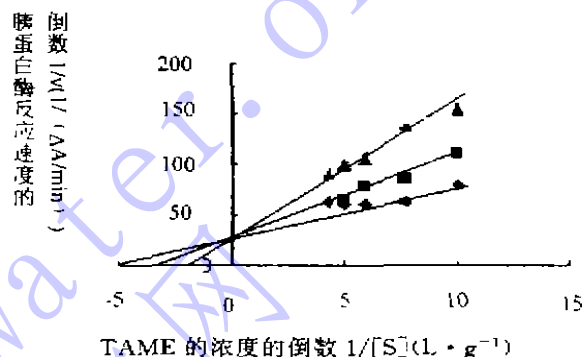
$[S]$ 作图,如图 3 所示。

将以上 3 组数据作趋势线,其回归方程和回归系数分别表示如下:

$$A. y = 4.7593x + 30.56, R^2 = 0.8776$$

$$B. y = 6.9048x + 33.19, R^2 = 0.8748$$

$$C. y = 13.618x + 29.749, R^2 = 0.9650$$



◆无抑制剂(A),■太湖蓝藻素在反应液中的浓度为 $0.0033\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (C)和▲为 $0.01\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (B)。

图 3 胰蛋白酶反应速度倒数与底物浓度倒数的关系

从以上回归方程中可以看出,它们在 y 轴上的截距基本相同,分别为 30.56、33.19、29.75。按照米氏学说, y 轴上的截距代表 $1/V_{\max}$,即酶最大反应速度的倒数,因此可以看出 3 者的反应最大速度基本相同,因而说明此抑制剂是竞争性抑制剂。

3 讨论

胰蛋白酶活性中心由 His(Histidine,组氨酸)57, Asp(Aspartic acid,天冬氨酸)102 和 Ser(Serine,丝氨酸)195 三个基团组成。胰蛋白酶的专一性袋穴比较深,在其底部为 Asp189 而带有一个负电荷。这个袋穴可用来接受长而带正电荷的碱性侧链,例如精氨酸或赖氨酸^[5]。现在已知,胰蛋白酶水解的肽段氨基端应含有精氨酸或赖氨酸残基,羧基端如含有脯氨酸则水解受到抑制^[6]。

太湖蓝藻素分子中所含有的 Agmatin



(1-amino-4-guanidinobutane, 1-氨基-4-胍基丁烷, 即精胺) 含有胍基, 胍基后是 4 个亚甲基, 分子长度与粗氨酸侧链长度相近。Choi sulfate (2-carboxy-6-hydroxyoctahydroindole sulfate, 2-羟基-6-羟基八氢吡咯硫酸盐) 与脯氨酸具有相似的结构, 都含有叔胺基。图 4 比较了 Agmatin 与精氨酸, 脯氨酸与 Choi sulfate 的结构。因此, 太湖蓝藻素具有抑制胰蛋白酶水解活性的基本结构。

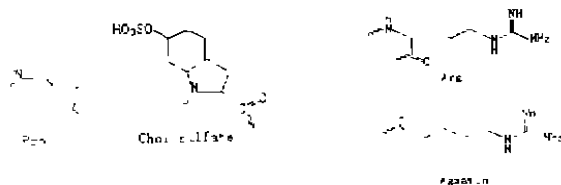


图 4 精氨酸与 Agmatin、脯氨酸与 Choi 的残基结构

现将含脯氨酸残基的肽与太湖蓝藻素对胰蛋白酶活性中心电子中继系统的影响表示如图 5。

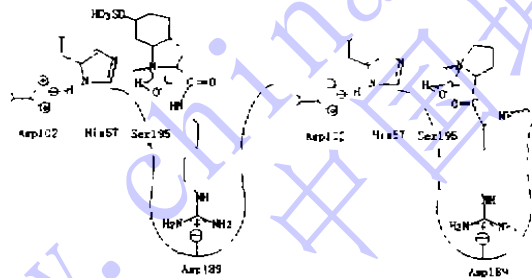


图 5 含脯氨酸的肽和太湖蓝藻素对胰蛋白酶活性中心电子中继系统的影响

从图 5 中可以较直观地看出: Agmatin 的长度与胰蛋白酶中心袋穴的长度吻合, 正好使其中的胍基伸入袋穴与 Asp189 相互吸引; Choi sulfate 上的叔氨基氮原子与 His57 竞争性吸引 Ser195 上的质子。因此, 推导该化合物对胰蛋白酶的抑制机理可能为:

1、太湖蓝藻素利用与精氨酸残基相似的基团——Agmatin 与胰蛋白酶活性中心的袋

穴结合:

2、Chol sulfate 带孤对电子的氮原子, 对胰蛋白酶活性中心 Ser195 上质子产生吸引;

3、由于 Chol sulfate 与脯氨酸有相似结构, 肽键不能断裂与解离, 占据了胰蛋白酶的活性中心, 因而达到了对酶水解功能的抑制。

· 现有的治疗胰腺炎的合成药物相对分子质量在 400~500 左右 (其中, FOY 417, FUT 540, Foipam 494)^[7], aeruginosin 98-A 相对分子质量为 689, 因此其将来在临床上的疗效可能不会弱于现有的化学合成药物。从太湖蓝藻素结构与功能的初步分析可以看出, 该化合物是一潜在的、优秀的新药先导化合物。

参考文献

- [1] Ishitsuka M, Kusumi T, Kakisawa H. Microviridin, A Novel Tricyclic Dipeptide from the toxic Cyanobacterium *Microcystis viridis*. [J] *J Am Chem Soc*, 1990, 112: 8150.
- [2] 数宗华, 陶文沂, 许正宏, 等. 微囊藻属多肽类酶抑制剂研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2000, 12(4): 79.
- [3] Murakami M, Ishida K, Okino T, et al. Aeruginosins 98-A and B, Trypsin Inhibitors from the Blue-Green Alga *Microcystis aeruginosa* (NIES-98) [J]. *Tetrahedron Letters*, 1995, 36(16): 2785.
- [4] Ishida K, Matsuda H, Murakami M. Micropeptins 88-A to 88-F, Chymotrypsin Inhibitors from the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (NIES-88) [J]. *Tetrahedron*, 1998, 54: 5545.
- [5] B. 施特马赫著, 钱嘉渊译. 酶的测定方法[M]. 北京: 轻工业出版社, 1992.
- [6] 杰弗里·佐贝主编, 曹凯明等译. 生物化学(上册)[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1989, 124.
- [7] 沈同, 王镜岩. 生物化学(上册)[M]. 北京: 高等教育出版社(第二版), 1990, 268.
- [8] 张泰昌. 蛋白分解酶抑制剂在急性胰腺炎治疗中的应用[J]. 国外医学消化系统疾病分册, 1994, 14(1): 39.

(收稿日期: 2001-05-29)