

N-磷酸化多巴胺与牛胰岛素弱相互作用的 ESI-MS 研究*

韩国胜, 冯 聪, 王 珍, 廖新成, 武现丽

(郑州大学化学系//河南省化学生物学与有机化学重点实验室, 河南 郑州 450001)

摘要: 用 ESI-MS 研究了一系列结构具有可比性的 *N*-磷酸化多巴胺与牛胰岛素的非共价相互作用, 比较了磷上不同烷氧取代基对相互作用影响。结果表明烷氧取代基上烷基碳原子个数和其排列顺序对二者相互作用有较大影响。取代基上碳链越长溶液中胰岛素的构象越趋于收缩, 易于形成高计量比复合物; 而支链或直链取代对胰岛素构象的影响程度差别不大。磷酸化多巴胺与胰岛素形成复合物的稳定性随着取代基的增长而增强; 直链取代的磷酸化多巴胺与胰岛素形成的复合物比支链取代的磷酸化多巴胺与其形成的复合物稳定。这一结论对设计合成新型多巴胺类化合物有一定的指导意义。

关键词: ESI-MS; *N*-磷酸化多巴胺; 胰岛素; 非共价相互作用

中图分类号: O657.61; O625.51 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2012) 06-0073-05

Study on the Weak Interaction between *N*-Phosphoryl Dopamines and Insulin by ESI-MS

HAN Guosheng, FENG Cong, WANG Zhen, LIAO Xincheng, WU Xianli

(Henan Province Key Laboratory of Chemical Biology and Organic Chemistry//

Department of Chemistry, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: ESI-MS is an effective way to study intermolecular interaction. In this paper, the non-covalent interaction between a series of synthesized *N*-phosphoryl dopamine and insulin was studied by using ESI-MS. The effects of different groups of P on *N*-phosphoryl dopamine were compared. The results showed that length and sequence of alkyl group of alkoxyl group on P were very important for the interaction under ESI-MS conditions. *N*-phosphoryl dopamines with longer carbon chains could contract the protein configuration more greatly and form complex with higher stoichiometric proportion in solution, while the sequence of carbon chain with a same number carbon atom have no obvious difference on contraction of protein. The result also showed that the length of carbon chain also had an obvious effect on the stability of complexes. Straight chain was more beneficial for the stability than branched chain when the number of carbon was equal. This conclusion was valuable for design of new active dopamine molecules.

Key words: ESI-MS; *N*-phosphoryl dopamine; insulin; non-covalent interaction

神经传质物质多巴胺 (DA) 是由酪氨酸衍生而来, 是继肾上腺素和去甲肾上腺素后第 3 种内源性儿茶酚胺, 在体内为合成去甲肾上腺素的前体。不同剂量的多巴胺具有不同的药理特性, 至今仍是治疗心力衰竭和休克的重要药物, 被广泛应用于临

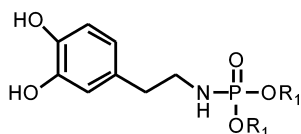
床^[1]。但多巴胺半衰期短、作用时间短, 只能静注, 应用范围受到一定的限制。近年来, 对多巴胺副作用的报道逐渐增多: 如最新的临床研究表明^[2], 小剂量多巴胺 (LDD) 不仅对肾脏功能没有保护作用, 而且对重症患者的内分泌、消化和呼

* 收稿日期: 2012-05-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21004055, 20672104)

作者简介: 韩国胜 (1976 年生), 男, 实验师; 通讯作者: 武现丽; E-mail: wuxianli@zzu.edu.cn

吸系统都有不同程度的不良影响。因此,寻找体内半衰期长、生物利用度高、活性强和毒副性小的多巴胺类新型药物是一个重要的研究方向。对原有药物分子进行结构修饰是提高其各种性能的一种有效途径。磷酸酯常被用作前药来增加药物的水溶性进而提高它的生物利用率,因此对多巴胺进行磷酸化是改善其生物活性的一种方式,因为磷酸基团的引入可以改变其母体分子的某些物理和化学性质,增加或减弱分子间相互作用。在前期工作中合成了 6 种磷酸化多巴胺类化合物^[3],其结构见图 1。



$R_1 = -CH_3(a), -CH_2CH_3(b), -CH_2CH_2CH_3(c), -CH(CH_3)_2(d),$
 $-CH_2CH_2CH_2CH_3(e), -CH_2CH(CH_3)_2(f)$

图 1 6 种 *N*-磷酸化多巴胺的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of *N*-phosphoryl dopamine

药物小分子与蛋白质结合是药物在机体内的一种特殊的分布与储备形式,这种结合对于药物的作用强度与作用时间以及体内代谢与排泄过程都有重要影响^[4]。目前,电喷雾离子阱-质谱 (Electrospray Ionization-Mass Spectrometry, ESI-MS) 以其在研究生理条件下蛋白与药物非共价结合所具有的分析速度快、灵敏度高及样品消耗量少等特点,已被成功地用于测定溶液中分子物质与蛋白质间非共价结合的化学计量和解离常数^[5-7]。

本文通过 ESI-MS 方式对所合成的 6 种 *N*-磷酸化多巴胺分子与牛胰岛素的弱相互作用进行研究,比较了 *N*-磷酸化多巴胺的不同结构对他们与蛋白相互作用的影响,初步探讨了其构效关系。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

Bruker-Esquire-3000 电喷雾-离子阱多级质谱仪 (Bruker Daltonics GmbH, Germany), 检测范围 m/z 915 ~ 2 500; 进样泵: Cole-Parmer 74900 syringe pump Cole Parmer 仪器公司。

1.2 主要材料与试剂

胰岛素购于 Sigma 化学试剂公司,未经进一步纯化直接使用;甲醇为色谱纯;醋酸为分析纯;水为纯水机 (美国 LABCONCO 公司) 生产的超纯水。

1.3 质谱条件

采用正离子检测模式,喷雾气 (N_2) 压力

82.76 kPa, 干燥气 (N_2) 流速 7.5 L/min, 毛细管电压 4 000 V, 毛细管温度 200 °C, 样品导入离子源速率 4 μ L/min; 混合溶液配制后, 孵育一周进行质谱分析。

2 结果与讨论

2.1 磷酸化多巴胺与牛胰岛素的弱相互作用

牛胰岛素 (Insulin from bovine pancreas, $C_{254}H_{377}N_{65}O_{75}S_6$, 相对分子质量为 5 733.50) 是机体内唯一降低血糖的激素,也是唯一同时促进糖原、脂肪、蛋白质合成的激素。它是一条由 21 个氨基酸组成的 A 链和另一条由 30 个氨基酸组成的 B 链,通过两对二硫链连结而成的一个双链两性蛋白质分子,而且 A 链本身还有一对二硫键组成,可以作为一种模型用于研究蛋白的空间构象、酶动力学以及分子进化、分子免疫间的关系^[8]。近年来,关于溶菌酶与外源性分子相互作用的研究有些报道,陈晓岚等^[9-10]曾通过 ESI-MS 和荧光光谱法对 7-羟基黄酮、5,7-二羟基黄酮及其磷酸化产物与溶菌酶的相互作用进行过研究;其课题组还研究了柚皮素、柚皮苷、芹菜素、木犀草素、大豆苷元磷酸化衍生物、槲皮素、*N*-磷酸化肽酯及小肽、磷酸化多巴胺等与溶菌酶的相互作用^[11-15]。而以双螺旋结构的牛胰岛素与外源性分子相互作用的研究却鲜见报道,本文通过研究 *N*-磷酸化多巴胺与其相互作用来初步考察所合成小分子的生理活性。

因为机体 pH 值近中性,本实验选择近中性的溶液环境来研究 *N*-磷酸化多巴胺与牛胰岛素的弱相互作用。作为对照,首先用 ESI 检测了流动注射的牛胰岛素溶液,此溶液由等体积的甲醇和 0.04 mol/L 胰岛素的 $\varphi = 0.5\%$ 醋酸水溶液混合而成,图 2 显示了牛胰岛素从 $[M+3H]^{3+}$ 到 $[M+6H]^{6+}$

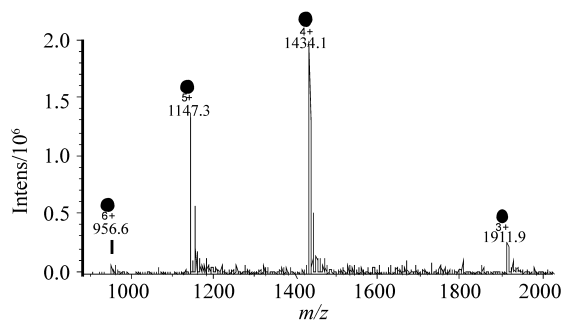


图 2 牛胰岛素 ESI-MS 图

Fig. 2 ESI-MS spectrum of insulin

●—胰岛素的多电荷峰

的多电荷分布状态, 并且以 $(M + 4H)^{4+}$ 峰值最高。图 2 中所计算的平均相对分子质量为 5 733, 与事实相符。

蛋白质分子能够根据自身所处环境的微小变化, 自发的进行分子构象转变是体现蛋白质生理活性的重要特征。蛋白质多电荷的特性为质核比大小、绝对电荷的多少、多电荷分布的相对丰度, 都跟溶液中蛋白质的结构和构象有关。如果蛋白质的多电荷分布朝着低质核比和高电荷方向移动, 这就和蛋白质更为“敞开”、“伸展”的构象相对应^[16-17]。比较图 2 和图 3 中胰岛素的多电荷峰, 可以看出各环境中胰岛素均以 $[M + 4H]^{4+}$ 峰值为最高, 但图 3 中没有检测到 $[M + 6H]^{6+}$ 峰, $[M + 5H]^{5+}$ 峰相对丰度也明显下降, $[M + 4H]^{4+}$ 峰强度占绝对优势, 这表明蛋白质的多电荷分布朝着高核质比和低电荷方向移动了, 说明加入化合物 a, b, c, d, e, f 后, 胰岛素在溶液中的构象均趋于收缩。

比较图 3 的各个小图, 可以看到随着磷上烷氧取代基链增长低电荷和高核质比的峰丰度增强, 而高电荷低核质比的峰丰度减弱。化合物 a、b、c 和 e 相比磷上烷氧基的烷基取代基分别是碳原子数为 1、2、3 和 4 的直链烷基, 比较它们的质谱图可以看到 $[M + 5H]^{5+}$ 峰的相对强度逐渐减弱, 而带 4 个电核的 $[M + 4H]^{4+}$ 峰及其与底物形成的复合物峰的总强度是逐渐增加的, 由此可以推断磷上的烷氧取代基上脂肪链越长胰岛素在溶液中的构象越趋于收缩。这可能是因为取代基增长分子的空间结构较为伸展, 分子柔顺性和疏水性增加, 使胰岛素分子在溶液中的构象更加收缩。化合物 c 和 d 相比, 磷酰基上的烷氧取代基上脂肪链均是 3 个碳原子, c 是丙基取代而 d 是异丙基取代, 对比图 3c 和 3d 二者相差不多。再比较化合物 e 和 f 也可以得到同样的结论, 说明当取代基的碳原子数相同时, 支链或直链结构对胰岛素的空间构象影响程度差别不大。

从图 3 可以看到图中除了胰岛素的多电荷峰以外, 出现了一些新的离子峰, 它们分别对应于带不同电荷的胰岛素结合不同个数的 *N*-磷酰化多巴胺所形成复合物。由图 3a 可知, 所带电荷数为 4 和 5 的胰岛素分子容易和化合物 a 结合形成复合物, 能够检测到化学计量数均为 1:1 的复合物, 说明胰岛素和化合物 a 能够发生弱相互作用。由图 3b 可以看到只有所带电荷为 4 的胰岛素分子能够与化合物 b 形成化学计量数为 1:1 和 1:2 的复合物。为了

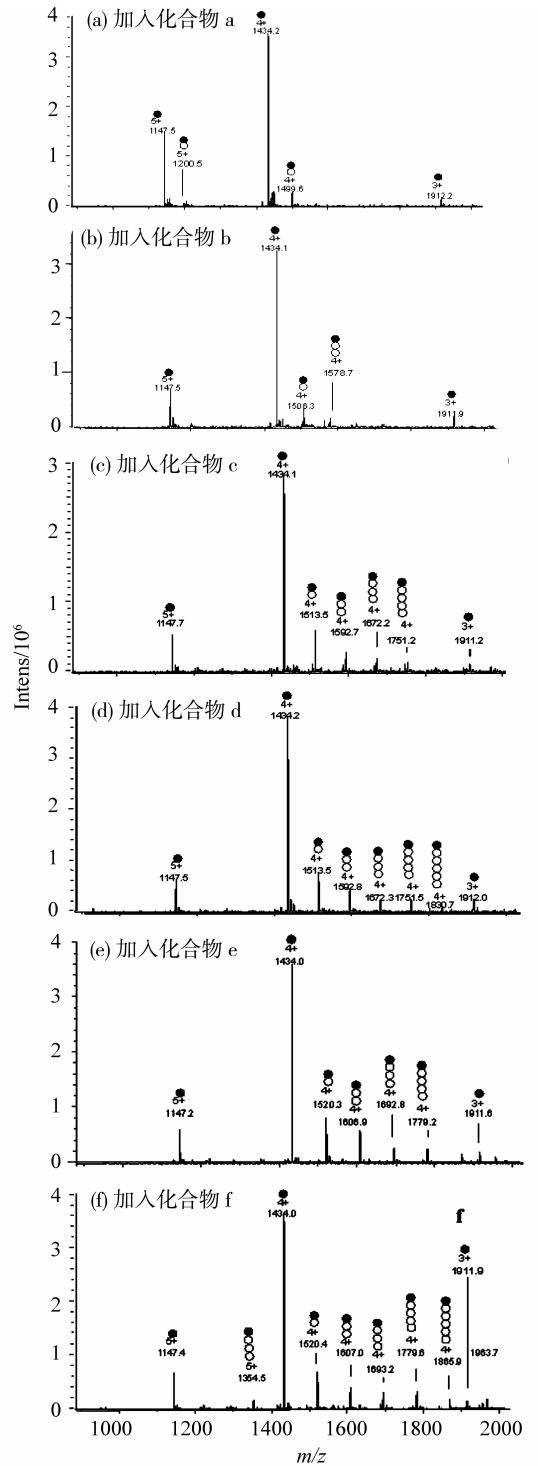


图 3 牛胰胰岛素与 6 种化合物的混合溶液的 ESI-MS 图
Fig. 3 ESI-MS spectra of mixed solution of insulin and compounds

●—胰岛素的多电荷峰; ○—复合物中所加入的化合物, 并且○的个数代表化合物的种数

比较 6 种不同的底物与胰岛素所形成的复合物所带电荷数和计量比, 将上述 6 种化合物与牛胰胰岛素形成的带不同电荷的复合物的不同化学计量比汇总于表 1 中。表 1 数据表明胰岛素和 6 种化合物最容易

形成带 4 个正电荷的复合物, 均没有出现带 3 和 6 个电荷的复合物, 也只有化合物 a 和 f 出现带 5 个电荷的复合物。这是因为这 6 种化合物也对胰岛素在溶液中构象有一定影响, 当胰岛素溶液中加入这类化合物时胰岛素的 $[M + 6H]^{6+}$ 峰消失, $[M + 5H]^{5+}$ 峰的强度大大减弱, 其减弱程度与底物小分子结构有关。对比化合物 c 和 d 及 e 和 f 的结构, 可以看到当取代基碳原子数相同时支链结构更容易与胰岛素形成高计量比的复合物; 比较化合物 a、b、c、e 与胰岛素形成的复合物计量比可以看到当烷基取代基碳链越长时越容易形成高计量比的复合物。这可能因为碳链的长短及碳原子的排列顺序与分子的柔顺性和疏水性及空间位阻有关。从表 1 中可以看到复合物中底物与胰岛素的最高化学计量比为 5:1。

表 1 *N*-磷酸化多巴胺与胰岛素形成复合物的计量比及电荷数

Table 1 Maximal stoichiometric proportion of the complexes of *N*-phosphoryl dopamines and insulin

化合物	P 上烷氧基类型	复合物的电荷数			
		3+	4+	5+	6+
a	CH ₃ O	0	1:1	1:1	0
b	CH ₃ CH ₂ O	0	1:1 ~ 2:1	0	0
c	CH ₃ CH ₂ CH ₂ O	0	1:1 ~ 4:1	0	0
d	(CH ₃) ₂ CHO	0	1:1 ~ 5:1	0	0
e	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ O	0	1:1 ~ 4:1	0	0
f	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ O	0	1:1 ~ 5:1	3:1	0

2.2 *N*-磷酸化多巴胺与牛胰岛素复合物的稳定性研究

这些复合物是靠磷酸化多巴胺和牛胰岛素的弱相互作用形成的, 在电喷雾离子阱质谱中它们具有一定的耐碰撞能力。当升高仪器的锥空电压 (毛细管输出电压) 时, 带电粒子之间以及与溶剂分子、惰性气体分子之间的碰撞几率增大, 因此有些复合物会发生解离, 导致复合物的丰度降低。当锥空电压升高到一定值时, 这些复合物就会消失, 不同磷酸化多巴胺和胰岛素形成的复合物具有不同的耐碰撞能力, 即复合物消失时 (其信号强度在仪器信噪比 3 倍以下), 它们的最高锥空电压是不同的, 据此可以比较不同复合物的相对稳定性^[13,16,18]。测定各种磷酸化多巴胺与复合物的最高锥空电压如表 2 所示。

表 2 *N*-磷酸化多巴胺与胰岛素形成复合物的最高耐受电压

Table 2 Maximal cone voltage of the complexes of *N*-phosphoryl dopamines and insulin

化合物	a	b	c	d	e	f
R ₁	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₃ H ₇	<i>i</i> -C ₃ H ₇	C ₄ H ₉	<i>i</i> -C ₄ H ₉
最高锥空电压/V ¹⁾	127.3	134.1	152.9	141.5	156.0	148.6

1) 经过 5 次重复实验, 结果重现性很好

从表 2 数据可以看出, 磷酸化多巴胺上磷上烷氧基的烷基碳链越长, 最高锥空电压越高; 比较化合物 a、b、c 和 e 与胰岛素形成的复合物的分解电压, 可以看到磷原子上烷氧取代基的直链烷基每增加一个碳原子最高锥空电压增加 3 ~ 9 V 左右, 说明直链取代基的增长有利于增强底物与胰岛素之间的相互作用力, 这可能是因为取代基越长分子的柔性越强, 分子越容易变形, 越有利于二者的相互作用。比较化合物 c 和 d、e 和 f 与胰岛素形成的复合物的最高分解电压可以看到, 当取代基上碳原子数相等时, 支链取代产物与直链取代产物与胰岛素形成的复合物相比, 其最高锥空电压要低 10 V 多, 这可能是因为支链取代时分子的空间位阻大, 不利于二者的有效结合, 减弱了其结合力。

3 结论

上述系列 *N*-磷酸化多巴胺均可与牛胰岛素在质谱条件下形成复合物, 不同结构的磷酸化多巴胺与胰岛素形成复合物的个数、电荷分布和稳定性不同, 而且对蛋白质在溶液中的构象有不同影响。磷上烷氧基中脂肪链的长短和碳原子排列顺序是主要影响因素。碳链越长越容易形成高计量比的复合物, 胰岛素在溶液中的收缩程度越高; 碳链越长小分子与胰岛素形成的复合物越稳定; 但当碳原子数相同时因支链取代基的位阻增大而消弱了底物与蛋白质之间的相互作用。本结论为新型多巴胺类药物分子的设计和开发具有一定的理论指导意义。

参考文献:

- [1] 高达敏, 陈国梁, 杨福秋, 等. 多巴胺肽类衍生物的合成及其对心功能的影响[J]. 药学学报, 1989, 24(6): 422 - 430.
- [2] 赵新生, 王鑫. 正确评价多巴胺在重症患者中的使用[J]. 中国医刊, 2004, 39(8): 18 - 21.
- [3] 王珍, 韩超, 廖新成. 多巴胺含磷衍生物的合成及表征[J]. 郑州大学学报: 理学版, 2009, 41(1), 112 - 115.

- [4] 贺吉香, 江崇球, 王洪鉴, 等. 酮咯酸、非普拉宗与血清蛋白相互作用的研究[J]. 高等学校化学学报, 1999, 20(10): 1548 - 1550.
- [5] SHARON J S, OLAYINKA O I J. Mass spectrometry and non-covalent protein-ligand complexes; confirmation of binding sites and changes in tertiary structure[J]. Am Soc Mass Spectrom, 2003, 14(5): 460 - 470.
- [6] 张华蓉, 张寒琦, 王玉堂, 等. 电喷雾质谱法研究人参皂苷 Rb1、Rd 与细胞色素 C 的非共价复合物[J]. 高等学校化学学报, 2006, 27(11): 2061 - 2065.
- [7] 吕林, 邓慧敏, 林中祥. ESI-MS 法研究 *N*-苯甲酰基-脱氢枞胺衍生物与血管紧张肽 III 的相互作用[J]. 高等学校化学学报, 2011, 32(4): 863 - 867.
- [8] NILSSON C L, KARLSSON G, BERGQUIST J, et al. Mass spectrometry of peptides in neuroscience [J]. Peptides, 1998, 19: 781 - 789.
- [9] 陈晓岚, 于斐, 屈凌波, 等. 荧光及 ESI 质谱法研究溶菌酶与磷酸化黄酮的相互作用[J]. 化学学报, 2004, 62: 188 - 193.
- [10] CHEN X L, QU L B, ZHANG T, et al. Study on the nature of phosphorylated chrysin-protein interactions involved in noncovalent complex formation by electrospray ionization mass spectroscopy [J]. Anal Chem, 2004, 76: 211 - 217.
- [11] 杨冉, 曾华金, 于岚岚, 等. 黄酮类化合物与牛血清白蛋白的相互作用及构效关系研究[J]. 化学学报, 2010, 68(19): 1995 - 1999.
- [12] CHEN X L, SHI X N, QU L B, et al. Synthesis of novel phosphorylated daidzein derivatives and ESI investigation on their non-covalent complexes with lysozyme [J]. Chin J Chem, 2007, 25(7): 1008 - 1013.
- [13] 杨冉, 陈晓岚, 李萍, 等. 荧光法研究三种黄酮小分子与溶菌酶的相互作用[J]. 高等学校化学学报, 2006, 27(9): 1673 - 1676.
- [14] 强黎明, 董雪茹, 吕名秀, 等. *N*-磷酸化肽酯及小肽与溶菌酶相互作用的 ESI-MS 研究[J]. 化学学报, 2009, 67(22): 2607 - 2612.
- [15] 武现丽, 韩国胜, 王珍, 等. *N*-磷酸化多巴胺与溶菌酶相互作用的 ESI-MS 研究[J]. 高等学校化学学报, 2012, 33: 516 - 520.
- [16] LOO J A, LOO R R, UDSETH H R, et al. Solvent-induced conformational changes of polypeptides probed by electrospray-ionization mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 1991, 5(3): 101 - 105.
- [17] PRAMANIK B N, BARTNER P L, MIRZA U A, et al. Electrospray ionization mass spectrometry for the study of non-covalent complexes; an emerging technology[J]. J Mass Spectrom, 1998, 33(10): 911 - 920.
- [18] 吴建丽, 陈晓岚, 屈凌波, 等. α -乳白蛋白与磷酸化黄酮弱相互作用 ESI 质谱研究[J]. 分析测试学报, 2006, 25(3): 22 - 26.