

具有抗 HIV 病毒活性的杂多酸 HPA-23 与谷胱甘肽的作用

赵大庆 高新风 吴亦洁 孝延文 裴奉奎 倪嘉缙

(中国科学院长春应用化学研究所, 长春 130022)

刘景福

(东北师范大学化学系, 长春 130022)

刘 娅

(白求恩医科大学预防医学院, 长春 130021)

以谷胱甘肽作为病毒包络蛋白的模拟物, 用 NMR 方法研究了与具有抗艾滋病病毒活性杂多酸 HPA-23 的作用。对不同配比的 HPA-23 和谷胱甘肽混合物的 ^1H 和 ^{183}W NMR 谱研究结果表明, 还原型和氧化型谷胱甘肽均以 C 末端 COO^- 与 HPA-23 骨架的钨原子配位, 还原型谷胱甘肽侧链上的巯基 (SH) 也参加配位。COSY 谱证明了 SH 配位为慢交换反应。

早在七十年代初, 人们就发现杂多酸具有抗病毒活性^[1,2]。最近报道 $[\text{NH}_4]_{18}[\text{NaSb}_9\text{W}_{21}\text{O}_{88}] \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ (结构代号为 HPA-23) 具有很高的抗艾滋病病毒活性, 在法国已进入临床应用^[3]。但从分子水平研究杂多酸化合物抗病毒的机理, 目前尚未见到国内外报道。而作为病毒可以广义地看作由一个蛋白外壳包裹, 内部则为核酸。艾滋病病毒同样由两层蛋白所包裹, 与宿主细胞发生吸附作用主要是通过外层包络蛋白 (GP120)^[4], 该蛋白的活性组份是一个由 8 个氨基酸组成的 T(Ala-Ser-Thr-Thr-Thr-Asn-Tyr-Thn) 肽段^[5]。我们以容易得到的三肽—谷胱甘肽作为病毒包络蛋白的模拟物, 用 NMR 方法研究杂多酸 HPA-23 与它的作用。结果表明还原型和氧化型谷胱甘肽均以 C 末端 COO^- 和 HPA-23 骨架上钨原子配位, 还原型谷胱甘肽侧链上的巯基 (SH) 也参加配位。

关键词: 核磁共振 杂多酸 谷胱甘肽

实 验 部 分

氧化型和还原型谷胱甘肽均为 Sigma 公司产品, D_2O (99.8%) 为北京化工厂产品, 其他试剂均为分析纯, 杂多酸 HPA-23 按文献^[7]制备。

NMR 实验在 Varian Unity-400 型核磁共振仪上进行。还原型和氧化型谷胱甘肽重水溶液浓度均为 $0.01\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, ^1H NMR 谱采用 5mm 开关探头, DSS 为内标物。T₁ 测定采用反转恢复法, 测定前样品进行冷冻除氧。HPA-23 重水溶液浓度为 $2\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, ^{183}W NMR 谱在 10mm 多核探头上获得, $2\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Na_2WO_4 重水溶液为外标物。

结果与讨论

图 1 给出还原型谷胱甘肽(GSH)的结构式和氢原子标号。加入不同量杂多酸 HPA-23 后, GSH 的 ^1H NMR 谱示于图 2; 谱线归属及 HPA-23 毫摩尔浓度也都在图 2 中给出。非常有趣的是引入 HPA-23 后, GSH 的 ^1H NMR 谱在 3.42ppm 处出现一条新的共振线, 其强度随 HPA-23 含量的增加逐渐增强; 而与巯基相连的 $\text{CH}_2(\text{H}5)$ 谱线强度(2.94ppm)则逐渐降低, 最后完全消失; 同时靠近巯基的 $\text{H}4(4.58\text{ppm})$ 也分裂成两条谱线。其余 4 条谱线也有明显加宽。我们认为这是由于 GSH 通过侧链上的巯基与 HPA-23 发生键合作用所致。从 GSH(HPA-23 含量为 $0.7\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) 的 COSY 谱(图 3)可以看到, 表征半胱氨酸 $\text{CH}(\text{H}4)$ 的两个谱峰(4.74 和 4.60ppm)分别与 3.42ppm 和 2.94ppm 两条共振线有相关峰, 说明巯基与杂多酸配位是一个慢交换过程。而 3.42 和 2.94ppm 这两条谱线分别表征键合前后 $\text{H}5$ 的行为。

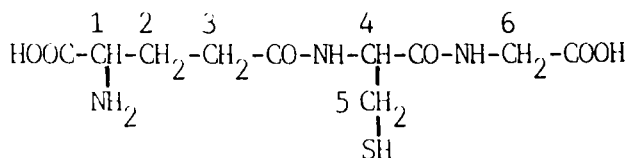


图 1 GSH 的结构式及 H 原子标号

Fig.1 Chemical structure and H atom number of GSH

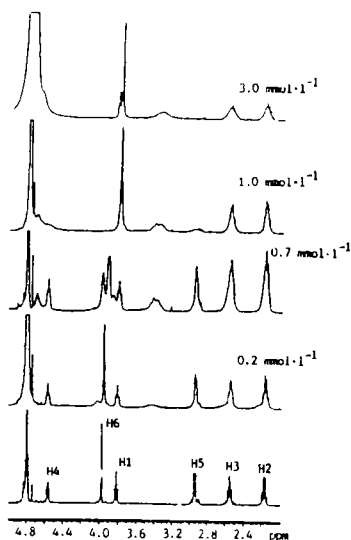


图 2 HPA-23 存在下 GSH 的 ^1H NMR 谱
Fig.2 ^1H NMR spectrum of GSH in the
presence of HPA-23

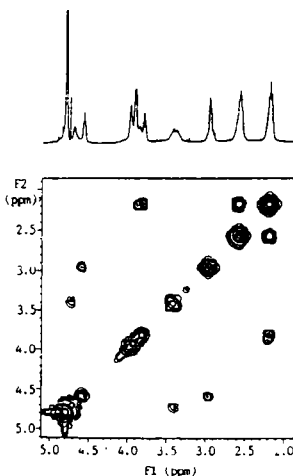


图 3 $0.7\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ HPA-23 存在下
GSH 的 COSY 谱

Fig.3 COSY spectrum of GSH containing
 $0.7\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ HPA-23

从图 2 还可以看到, 表征甘氨酸 $\text{CH}_2(\text{H}6)$ 的共振峰随着 HPA-23 含量的增加向高场移动, 说明除了侧链上的巯基之外, GSH C 末端 COO^- 与 HPA-23 也有配位作用, 该过程为快

交换反应。

表 1 给出了加入 HPA-23 前后 GSH 的 T_1 值。GSH 与杂多酸作用后，所有氢原子的弛豫时间都变短。这是由于键合作用限制了 GSH 分子的运动。而离两个配位点较近的 H5、H4 和 H6 的 T_1 值变化相对较大，而谷氨酸上氢的 T_1 值变化较小，进一步说明 GSH 是通过末端 COO^- 及侧链上 SH 与 HPA-23 配位，而 N 末端的 COO^- 和 NH_3^+ 均不参加配位。

图 4 示出了氧化型谷胱甘肽(GSSG)与 HPA-23 作用的 ^1H NMR 谱。随着 HPA-23 含量的增加，表征甘氨酸 $\text{CH}_2(3.94\text{ppm})$ 的共振线向高场移动，而其他谱线未发现明显的变化。因 GSSG 存在着 S-S 键，故只能通过 C 末端 COO^- 与 HPA-23 作用。与 GSH 相同，N 末端 COO^- 和 NH_3^+ 亦不参加配位。

表 1 加入 HPA-23 前后 GSH 的 T_1 值(sec)

Table 1 T_1 Values of GSH in the Presence and Absence of HPA-23

chemical shift (ppm)	assignment	GSH	GSH+HPA-23 ($0.7\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$)
2.18	H2	0.67	0.56
2.58	H3	0.75	0.59
2.94	H5	0.62	0.50
3.42	H5		0.49
3.81	H1	2.85	2.43
3.97	H6	1.04	0.80
4.56	H4	3.25	1.47
4.69	H4		1.57

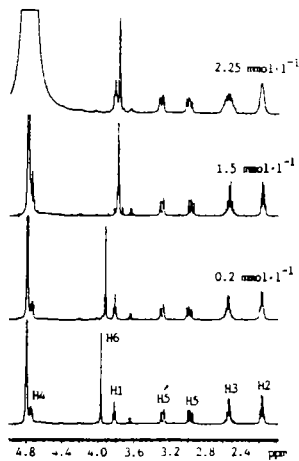


图 4 HPA-23 存在下 GSSG 的 ^1H NMR 谱
Fig.4 ^1H NMR spectrum of GSSG
in the presence of HPA-23

向 HPA-23 溶液中逐渐加入 GSH，谱线按文献[7]归属。当 GSH 量较少时($0.3\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$)，HPA-23 四条谱线化学位移基本没有变化；随着 GSH 含量的增加，表征 W(2)和 W(3)的两条谱线，分别向高场和低场移动，最后分裂成两条谱线；HPA-23 骨架中有 4 种结晶学不等价位置^[7]，GSH 上的 SH 和 COO^- 与 W(2)和 W(3)配位，从而改变 W 原子周围的电场，导致化学位移发生变化。由于 GSH 的配位作用，W(2)和 W(3)都变得不等价，因而谱线发生劈裂。由于 W(1)分别与 W(2)和 W(3)通过氧桥相连，并且也位于 HPA-23 骨架外表面，GSH 与 W(2)及 W(3)作用后，W(1)周围的电场也将发生改变，因而当 GSH 过量时，W(1)的化学位

移也有变化;而位于 HPA-23 内表面的 W(4)和 Sb 与 GSH 不发生键合作用。表 2 列出了不同含量 GSH 存在下 HPA-23 ^{183}W NMR 化学位移变化情况。

表 2 还原型 GSH 存在下 HPA-23 ^{183}W NMR 化学位移值(ppm)

Table 2 Chemical Shift of ^{183}W NMR in Presence of Reductive GSH

GSH(mol · l ⁻¹)	W1	W2	W3	W4
0	-232.1	-135.2	-72.8	-19.2
0.3	-231.8	-134.6	-72.8	-18.6
1.0	-232.8	-134.0	-74.2	-18.0
3.0	-233.2	-130.7	-76.7	-16.9
			-76.9	
6.0	-230.6	-127.5	-77.6	-19.0
		-127.9	-78.1	
1.0	-226.8	-126.0	-77.9	-20.3
		-127.2	-78.8	

从上述结果看,抗病毒药物 HPA-23 的确能够与包络蛋白模拟物发生配位作用。我们进一步合成 HIV 包络蛋白的片段(T 肽),研究其与 HPA-23 的作用,从而更接近真实情况了解 HPA-23 的抗爱滋病病毒的作用机理。

参 考 文 献

- [1] Raynaud, M., Chermann, J. C., Plata, F., Jasmin, C., Mathe, G., *C. R. Acad. Sci. Paris*, **272**, 347-348(1971).
- [2] Bonissol, C., Kona, P., Chermann, J. C., Jasmin, C., Raynaud, M., *C. R. Acad. Sci. Paris*, **274**, 3030-3033 (1972).
- [3] Rozenbaum, D., Dormont, B., Spire, E., Vilmer, M., Gentilini, C., Griseelli, L., Montagnier, F., Barre-Sinoussi, Chermann, J. C., *Lancet* **I**, 450-451(1985).
- [4] Vaishnav, Y. N., Wong-Staal, F., *Annu. Rev. Biochem.*, **60**, 577-630(1991).
- [5] Pert, C. B., Hill, J. M., Ruff, M. R., Berman, R. M., Robey, W. G., Arthur, L. O., Ruscetti, F. W., Farrar, W. L., *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, **83**, 9254-9258(1986).
- [6] Herve, G. B., Teze, A., *Inorg. Synth.*, **27**, 120-122(1990).
- [7] Fisher, J., Ricard, I., Weiss, R., *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 3050-3052(1976).

INTERACTIONS OF HETEROPOLYTUNGSTATE HPA-23 WITH GLUTATHIONE STUDY BY NMR SPECTROSCOPY

Zhao Daqing Gao Xinfeng Wu Yijie

Xiao Yanwen Pei Fengkui Ni Jiazan

(Changchun Institute of Applied Chemistry, Academia Sinica, Changchun 130022)

Liu Jingfu

(Department of Chemistry, Northeastern Normal University, Changchun 130022)

Liu Ya

(Bethune Medical University, Changchun 130021)

The interactions of heteropolytungstate HPA-23 known to exhibit human immunodeficiency virus with glutathione(GSH and GSSG) used as model for envelope protein of the virus have been investigated by ^1H and ^{183}W NMR spectroscopy. Both GSH and GSSG interact with atoms W in the framework of HPA-23 by the COO^- group of C-terminal. The SH group in the side chain of GSH is also bound to HPA-23, and this process is verified to be slowly exchange by COSY.

Keywords: NMR heteropolytungstate glutathione