

# 大豆皂苷 I 抑制唾液酸转移酶的分子机理研究

王 隼, 张海玲, 光翠娥\*, 桑尚源, 杨红飞

(食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 从晶体结构出发, 应用分子对接和结合自由能分析, 研究了唾液酸转移酶 (Sialyltransferase, ST) 与其抑制剂大豆皂苷 I 的相互作用机理, 确定了它们的作用位点、作用力类型及大小。结果表明: 范德华力和静电相互作用是复合物形成的主要驱动力, 极性溶剂化能则起相反作用; 8 个氨基酸残基 Gly149、Ser151、Met172、Asn173、Phe292、Trp300、His301、Ser325 与大豆皂苷 I 形成疏水相互作用, 11 个氨基酸残基 Asn150、Tyr194、Ser271、Thr272、Gly273、Ile274、Gly291、Gly293、His302、Glu305、Glu324 与大豆皂苷 I 形成氢键作用; 大豆皂苷 I 占据了 ST 与底物胞苷一磷酸- $\beta$ -N-乙酰神经氨酸相互作用的 12 个氨基酸残基中的 11 个, 可起到竞争性抑制的作用。

**关键词:** 唾液酸转移酶; 大豆皂苷 I; 分子对接; 结合自由能分析

**中图分类号:** R914.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2015)04—0355—06

## Mechanism of Interaction between Sialyltransferase and Its Inhibitory Soyasaponin I

WANG Fei, ZHANG Hailing, GUANG Cuie\*, SANG Shangyuan, YANG Hongfei

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** The molecular mechanism for the binding sites, driving forces and the interaction intensity between sialyltransferase (ST) and soyasaponin I was investigated by molecular docking and free energy calculation based on the crystal structure. The van der Waals force and electrostatic interaction were considered as the main driving forces, while polar solvation energy behaved in an opposite manner. The hydrophobic interaction was formed between soyasaponin I and eight amino acid residues, i.e., Gly149, Ser151, Met172, Asn173, Phe292, Trp300, His301, and Ser325. Hydrogen bonding was found between soyasaponin I and eleven amino acid residues, including Asn150, Tyr194, Ser271, Thr272, Gly273, Ile274, Gly291, Gly293, His302, Glu305, and Glu324. Soyasaponin I was a competitive inhibitor which occupied 11 of the 12 amino acid residues that accommodated the substrate CMP- $\beta$ -N-acetylneuramic acid. These results provide a theoretical basis for the development and utilization of soyasaponin I as a ST inhibitor.

**Keywords:** sialyltransferase, soyasaponin I, molecular docking, free energy calculation

收稿日期: 2014-07-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(31201289); 江南大学大学生创新训练计划项目(012011342)。

\*通讯作者: 光翠娥(1976-), 女, 湖北仙桃人, 工学博士, 副教授, 主要从事食品营养与功能因子研究。E-mail: guang1226@hotmail.com。

唾液酸转移酶(ST)是一类糖基转移酶,它以胞苷一磷酸- $\beta$ -N-乙酰神经氨酸(CMP- $\beta$ -N-acetylneuramic acid, CMP-Neu5Ac)为底物,将唾液酸残基 Neu5Ac 以 $\alpha$ -2,3, $\alpha$ -2,6 或 $\alpha$ -2,8 糖苷键的形式转移至新的糖基受体上形成唾液酸糖苷化合物<sup>[1]</sup>。细胞表面糖蛋白和糖脂的唾液酸化修饰在许多生物过程中发挥着至关重要的作用,如致癌性转化、肿瘤转移和入侵<sup>[2]</sup>。

ST的底物单一,唾液酸供体仅为 CMP-Neu5Ac<sup>[1]</sup>,所以,迄今为止,ST抑制剂的设计主要是基于供体 CMP-Neu5Ac 的化学结构,现在也有研究是基于 CMP-Neu5Ac 过渡态的结构和糖基受体的结构进行设计以及通过随机筛选得到<sup>[3]</sup>。然而,由于低膜通透性这些化合物很难进入细胞或组织<sup>[3]</sup>。Chi-Yue Wu<sup>[2]</sup>等人发现大豆皂苷 I 对 ST 中的 ST3Gal I 有强烈的抑制作用,抑制常数( $K_i$ )为 2.3  $\mu\text{mol/L}$ ,作为竞争性抑制剂(相对底物 CMP-Neu5Ac),大豆皂苷 I 对 ST3Gal I 的亲合性是 CMP-Neu5Ac 和 CMP 的 20 和 25 倍,并且大豆皂苷 I 只对 ST 起作用,对其他的糖基转移酶和糖苷酶几乎不起抑制作用。细胞水平上,大豆皂苷 I 能抑制高转移黑色素瘤细胞表面唾液酸的生成<sup>[4]</sup>,也能抑制 MFC-7 乳腺癌细胞 ST 的活性、ST3Gal IV mRNA 的表达及唾液酸的分泌<sup>[5]</sup>。

ST 是药物设计的重要靶点,作者采用分子对接及结合自由能计算的方法研究大豆皂苷 I 对 ST 的抑制作用,确定他们的作用力类型、结合的关键位点以及复合物的结合自由能,提高了实验效率,减少不必要的消耗,为 ST 抑制剂的合理药物设计提供理论依据,也为大豆皂苷 I 的开发利用提供了新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 受体 ST 与配体大豆皂苷 I 分子的获取

ST 的三维结构取自蛋白质晶体结构数据库 (<http://www.rcsb.org/pdb/>), PDB ID: 2WNB, 分辨率为 0.155 nm, 共有 298 个氨基酸残基, 相对分子质量为 34 748.3, 小分子配体为  $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NO}_6$ 、 $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_8\text{P}$ 、 $\text{C}_6\text{H}_6\text{NO}_3$  和  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ , 利用北京创腾科技有限公司的 Discovery Studio 2.5(DS)软件去掉小分子配体和水分子并加氢后得到 ST 三维结构并作为受体用于后续的对接过程。大豆皂苷 I (图 1)的三维结构取自 chemicalbook 网站库 (<http://www.chemicalbook.com/>),

分子式为  $\text{C}_{48}\text{H}_{78}\text{O}_{18}$ , 相对分子质量为 943.12, 采用 PRODRG 网站 (<http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/cgi-bin/prodrgr>) 对大豆皂苷 I 的分子结构进行加电荷和构象优化等预处理。

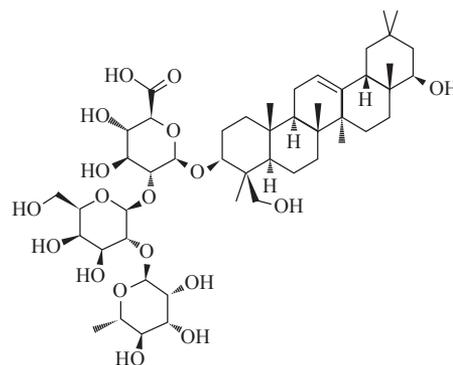


图 1 大豆皂苷 I 的分子结构

Fig.1 Molecular structure of soyasaponin I

### 1.2 ST 与大豆皂苷 I 的分子对接

以 ST 为对接受体, 以大豆皂苷 I 为对接配体, 以 ST 的活性位点 Gln108、Asn150、Met172、Asn173、Tyr194、Clu196、Phe212、Tyr233、Arg269、Thr272、Gly273、Gly293、Trp300、His302、Val318、His319 形成的区域为中心, 通过 DS 软件包中的 Libdock 模块, 在半径为 1.65 nm 内的范围内(图 2)进行受体与配体的分子对接。每产生一个构象就进行一次分子对接, 配体分子在受体口袋中可能的构象模式采用 Libdock 模块进行收集。根据 LibDock 综合得分 LibDockscore 和最终的均方根偏差 RMSD 值, 分析和评估 ST 与大豆皂苷 I 的相互作用。取打分最好以及底物骨架重合性较高的复合物构象, 运用 DS 程序包, 采用 CHARMM 力场, 添加抗衡离子溶剂化(Solvation)后, 对对接复合物的空间结构进行两次能量优化, electrostatic 参数设置为 Particle, Mesn, Ewald。优化分成 2 步完成: 先限制蛋白质和抑制剂的结构, 只优化水分子; 再去除限制, 优化整个体系。每个步骤都先采用最陡下降法(Steepest Descent)优化 500 步, 再采用共轭梯度法(Conjugate Gradient)优化 1 000 步。基于优化后的空间结构用 Ligplot+ 软件统计受体中与配体产生氢键及疏水作用的氨基酸残基, 并分析复合物的空间作用力。

### 1.3 对接复合物的结合自由能计算

基于优化后的结构, 用分子力学泊松-波尔兹曼表面积法(molecular mechanics Poisson-Boltzmann surface area, MM-PBSA)计算对接复合物的结合自

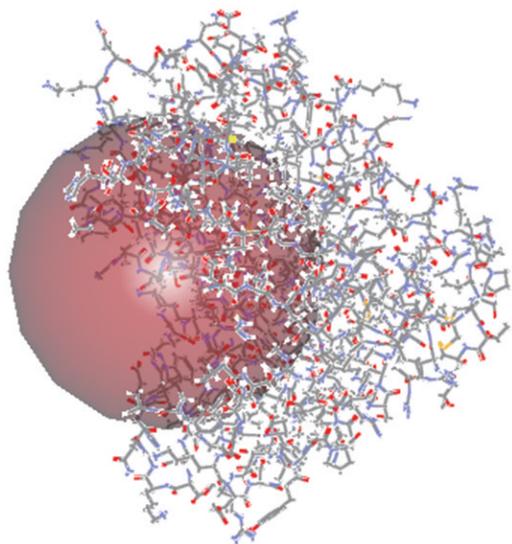


图2 ST与大豆皂苷 I 分子对接的活性区域图

Fig.2 Active zone of ST docking with soyasaponin I

由能(binding free energy,  $\Delta G_{\text{bind}}$ )<sup>[6]</sup>。 $\Delta G_{\text{bind}}$ 值越低说明受体与配体之间的亲和力越高<sup>[7]</sup>。MM-PBSA法将体系自由能分解为真空下分子内能、溶剂化能和由构象变化引起的熵变3部分,能更为直观的分析各种相互作用的贡献。结合自由能( $\Delta G_{\text{bind}}$ )计算过程为:

$$\Delta G_{\text{bind}} = G_{\text{complex}} - G_{\text{receptor}} - G_{\text{ligand}} \quad (1)$$

$$G = G_{\text{solv}} + E_{\text{MM}} - TS_{\text{MM}} \quad (2)$$

$$G_{\text{solv}} = G_{\text{PB}} + G_{\text{SUR}} \quad (3)$$

$$E_{\text{MM}} = E_{\text{elec}} + E_{\text{vdW}} \quad (4)$$

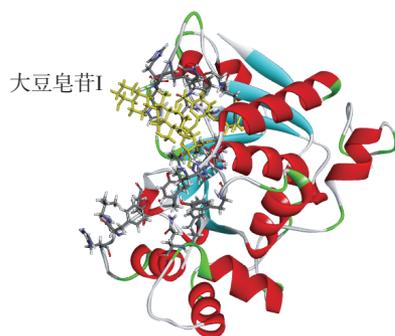
其中  $G_{\text{complex}}$ 、 $G_{\text{receptor}}$  和  $G_{\text{ligand}}$  分别为复合物、受体和配体的自由能。复合物、受体或配体的自由能由液相和气相两部分组成的,液相部分的自由能为溶剂化能  $G_{\text{solv}}$ , 主要包括极性溶剂化能  $G_{\text{PB}}$  和非极性溶剂化能  $G_{\text{SUR}}$ , 用 DS 中的程序包计算, Implicit Solvent Model 参数设置为 Poisson Boltzmann with non-polar

Surface Area, electrostatic 参数设置为 Spherical Cutoff; 气相部分的自由能包含内能  $E_{\text{MM}}$  和熵  $T_{\text{SMM}}$ ,  $E_{\text{MM}}$  为整个分子力学能,  $E_{\text{elec}}$  和  $E_{\text{vdW}}$  分别为气相中分子静电相互作用和范德华能, 用 DS 中的程序包计算, Implicit Solvent Model 参数设置为 None, electrostatic 参数设置为 Spherical Cutoff。因为  $T_{\text{SMM}}$  值的变化对结合自由能的影响非常小, 所以一般情况下可以忽略此数值。

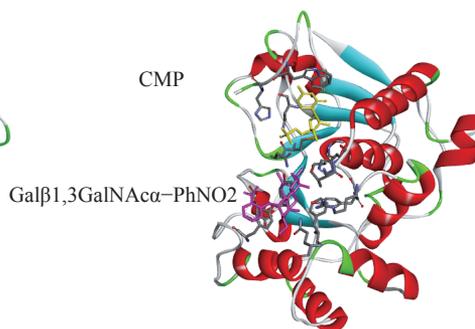
## 2 结果与讨论

### 2.1 分子对接总体结果

从晶体结构看出, ST3Gal-I 按结构折叠方式属于 GTA 类, 有 12 个  $\alpha$  螺旋, 7 个  $\beta$  折叠, 3 个二硫键 (Cys62-Cys67、Cys65-Cys142、Cys145-Cys284)<sup>[8]</sup>。Libdock 模块收集的大豆皂苷 I 与 ST 活性口袋结合的可能构象显示, 配体与受体蛋白的结合方式共有 90 种, 其中得分超过 100 的有 85 种, LibDock 综合得分最高为 186.2 表明, 大豆皂苷 I 和 ST 活性区域匹配性较好 (LibDockscore > 100)。以打分最高的对接结果为研究对象 (图 3, (a)), 将其与结合有糖基受体 Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ -PhNO<sub>2</sub> 和产物 CMP 的 ST3Gal-I (图 3, (b))、结合有糖基受体 Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ -PhNO<sub>2</sub> 和底物 CMP-Neu5Ac 的 ST3Gal-I (图 3, (c))、结合有糖基受体 Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ -PhNO<sub>2</sub> 和大豆皂苷 I 的 ST3Gal-I 进行比较 (图 3, (d)), 结果表明大豆皂苷 I 主要与 ST 中由氨基酸残基 Asn150、Met172、Asn173、Gly273、Gly293、Trp300 和 His302 形成的活性区域产生相互作用, 这类类似于 CMP-Neu5Ac 与 ST 的作用, 并且发现糖基受体的存在几乎不影响大豆皂苷 I 和 ST 活性区域的结合。



(a)大豆皂苷 I +ST;



(b)CMP+ ST +Galβ1,3GalNAcα-PhNO<sub>2</sub>;

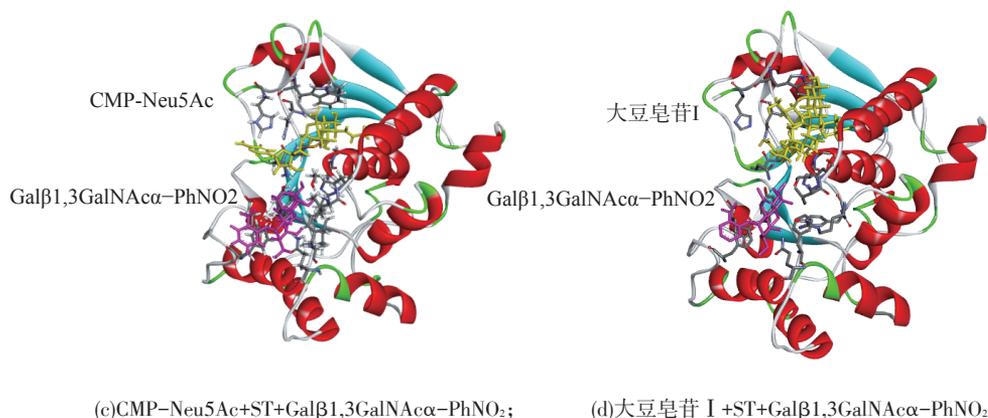


图3 ST与配体分子对接示意

Fig.3 Molecular docking schematic diagram of ST and ligands

注:图中黄色棍棒代表配体;红色棍棒代表糖基受体;灰色棍棒代表活性区域

## 2.2 大豆皂苷 I 与 ST 形成的氢键和疏水作用分析

图4为用Ligplot+软件显示的对接后配体与受体相互作用的二维图。

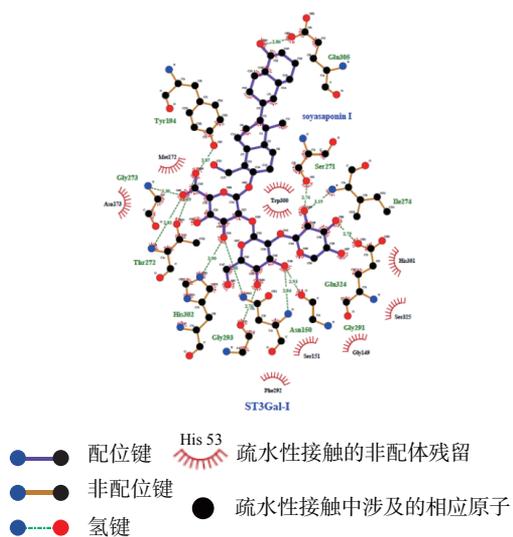


图4 ST和 大豆皂苷 I 分子间氢键和疏水相互作用分析

Fig.4 Hydrogen bond and hydrophobic interactions between ST and soyasaponin I

通过图4分析可得,ST中8个氨基酸残基Gly149、Ser151、Met172、Asn173、Phe292、Trp300、His301、Ser325与大豆皂苷I形成疏水相互作用,11个氨基酸残基参与形成氢键作用(表1)。其中氨基酸Asn150、Gly273、Gly293也是CMP-Neu5Ac及CMP与ST形成氢键的重要残基<sup>[8]</sup>,Ile274、Gly291、Glu305也可影响CMP与ST的作用,Thr194、Ser271、Ser272也可影响Gal与ST的作用。ST与大豆皂苷I的氢键和疏水作用结果表明,大豆皂苷I能有效

阻碍CMP-Neu5Ac与ST的作用。

表1 ST和 大豆皂苷 I 的氢键分析

Table 1 Hydrogen bonds between ST and soyasaponin I

受体	配体	键长/nm
Asn150-N	O46	0.284
Asn150-ND2	O34	0.305
Tyr194-OH	O39	0.287
Ser271-OG	O53	0.274
Thr272-N	O40	0.281
Thr272-OG1	O39	0.269
Gly273-N	O40	0.330
Ile274-N	O53	0.319
Gly291-OE1	O46	0.293
Gly293-O	O50	0.276
His302-NE2	O34	0.290
Glu305-OE2	O26	0.286
Glu324-O	O56	0.279

## 2.3 复合物的比较

通过Ligplot+软件将大豆皂苷I以及CMP-Neu5Ac分别与ST的对接结果进行比较<sup>[9]</sup>(图5),发现CMP-Neu5Ac与ST的12个氨基酸残基存在相互作用,其中11个氨基酸残基Asn150、Ser151、Met172、Asn173、Tyr194、Thr272、Gly273、Phe292、Gly293、Trp300、His301在ST与大豆皂苷I、ST与CMP-Neu5Ac的结合过程中都参与了作用,并且CMP-Neu5Ac与ST分子对接的LibDock综合得分最高为143.5,得分超过100的结合方式有73种,说明大豆皂苷I能有效阻止CMP-Neu5Ac与ST的结合。通过图6看出,大豆皂苷I在空间位置上也能阻碍CMP-Neu5Ac与ST的结合。

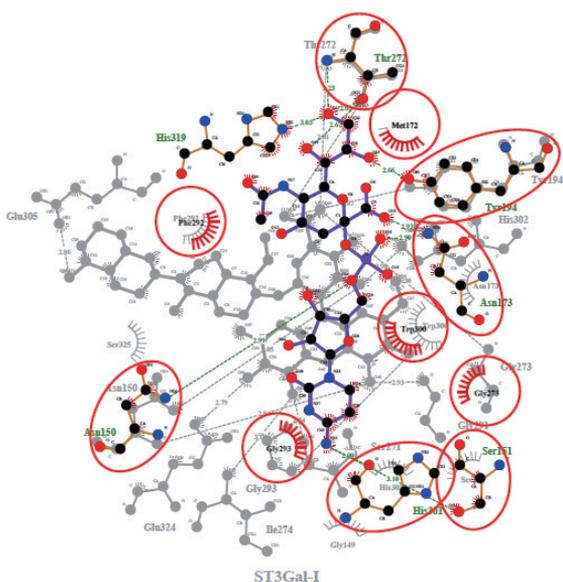


图5 大豆皂苷 I-ST 与 CMP-Neu5Ac-ST 相互作用细节对比

Fig.5 Interaction comparison between soyasaponin I-ST and CMP-Neu5Ac-ST

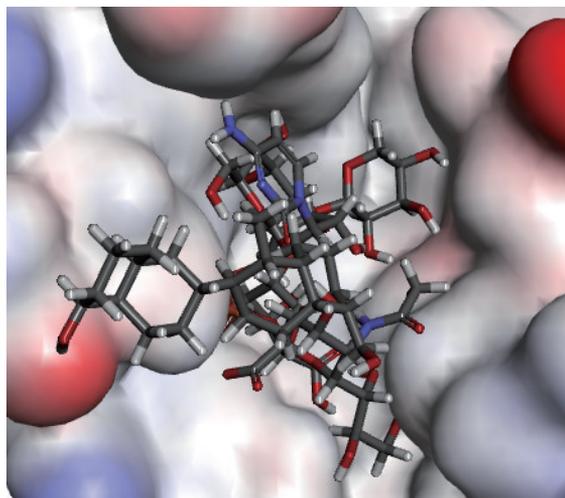


图6 大豆皂苷 I 与 CMP-Neu5Ac 在 ST 活性口袋中的空间位置

Fig.6 Spatial superposition of soyasaponin I and CMP-Neu5Ac in the active site of ST

### 2.4 大豆皂苷 I 与 ST 复合物的结合自由能计算结果

结合自由能反映了受体和配体结合的稳定性<sup>[10]</sup>。对大豆皂苷 I 和 ST 进行分子对接和优化后,按照公式(1)对对接复合物的结合自由能进行计

算。结果发现大豆皂苷 I 和 ST 的结合自由能( $\Delta G_{\text{bind}}$ )为 $-209 \text{ kJ/mol}$ ,表明大豆皂苷 I 和 ST 结合稳定。

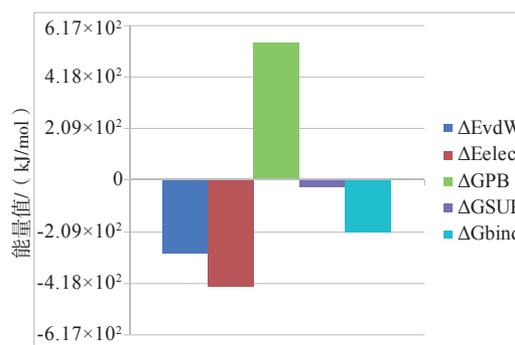


图7 结合自由能各项能量示意图

Fig.7 Each energy contributing value in binding free energy

注: $\Delta E_{\text{vdW}}$ 为气相下大豆皂苷 I 与 ST 残基间的范德华作用; $\Delta E_{\text{elec}}$ 为气相下大豆皂苷 I 与 ST 残基间的静电相互作用; $\Delta G_{\text{PB}}$ 为大豆皂苷 I 与 ST 残基间的极性溶剂化能; $\Delta G_{\text{SUR}}$ 为大豆皂苷 I 与 ST 残基间的非极性溶剂化能

通过对比图7中结合自由能各项能量的贡献值可以看出,在大豆皂苷 I 和 ST 形成的复合物中, $\Delta E_{\text{vdW}}$ , $\Delta E_{\text{elec}}$ 和 $\Delta G_{\text{SUR}}$ 均为负值,表明范德华力、静电相互作用和非极性溶剂化能对结合自由能都起到促进作用,而极性溶剂化能很大程度上表现为阻碍 ST 和大豆皂苷 I 的结合。 $\Delta E_{\text{vdW}}$ 和 $\Delta E_{\text{elec}}$ 在 $\Delta G_{\text{bind}}$ 中占有主导地位,表明范德华力和静电相互作用对于大豆皂苷 I 和 ST 之间的结合能作用贡献比较大( $>90\%$ ),但是较强的极性溶剂化能可抵消部分作用力,阻碍大豆皂苷 I 和 ST 的结合。

## 3 结语

对大豆皂苷 I 与 ST 进行分子对接,预测了 ST 与大豆皂苷 I 相互作用的模式,得到的复合物结果表明:8 个氨基酸残基与大豆皂苷 I 形成疏水相互作用,11 个氨基酸残基与大豆皂苷 I 形成氢键作用;结合自由能为 $-209 \text{ kJ/mol}$ ,范德华力和静电相互作用是复合物形成的主要驱动力,极性溶剂化能不利于复合物的形成;大豆皂苷 I 相对底物是 ST 的竞争性抑制剂。

## 参考文献:

- [1] 王亚娟,邢国文. 唾液酸酶和唾液酸糖基转移酶的结构, 功能与催化反应研究进展[J]. 有机化学, 2011, 31(8): 1157-1168.  
WANG Yajuan, XING Guowen. Progress in structure, function and catalytic reactions of sialidase and sialyltransferase [J]. **Chinese Journal of Organic Chemistry**, 2011, 31(8):1157-1168
- [2] Wu C Y, Hsu C C, Chen S T, et al. Soyasaponin I, a potent and specific sialyltransferase inhibitor[J]. **Biochemical and biophysical research communications**, 2001, 284(2): 466-469.
- [3] Wang X, Zhang L H, Ye X S. Recent development in the design of sialyltransferaseinhibitors[J]. **Medicinal research reviews**, 2003, 23(1): 32-47.
- [4] Chang W W, Yu C Y, Lin T W, et al. Soyasaponin I decreases the expression of  $\alpha$ 2, 3-linked sialic acid on the cell surface and suppresses the metastatic potential of B16F10 melanoma cells[J]. **Biochemical and biophysical research communications**, 2006, 341(2): 614-619.
- [5] Hsu C C, Lin T W, Chang W W, et al. Soyasaponin-I-modified invasive behavior of cancer by changing cell surface sialic acids[J]. **Gynecologic oncology**, 2005, 96(2): 415-422.
- [6] Zhang Y, Pan D, Shen Y, et al. Understanding the molecular mechanism of the broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01 from the perspective of molecular dynamics simulation and binding free energy calculations[J]. **Journal of molecular modeling**, 2012, 18(9): 4517-4527
- [7] Takamatsu Y, Sugiyama A, Purçon A, et al. Binding free energy calculation and structural analysis for antigen-antibody complex [C]//AIP Conference Proceedings. 2006, 832(5): 566-569.
- [8] Rao F V, Rich J R, Rakic B, et al. Structural insight into mammalian sialyltransferases[J]. **Nature Structural and Molecular Biology**, 2009, 16(11): 1186.
- [9] Laskowski RA, Swindells MB. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery[J]. **Journal of chemical information and modeling**, 2011, 51: 2778-2786.
- [10] Guang C, Shang J, Jiang B. Transport of traditional Chinese pimple milk-derived angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides across a Caco-2 cell monolayer and their molecular recognition with ACE[J]. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, 2012, 10(3&4): 40-44.

## 会议信息

会议名称(中文): 2015年(第七届)北京实验动物科学国际论坛

开始日期: 2015-06-14

结束日期: 2015-06-16

所在城市: 北京市 东城区

具体地点: 北京九华山庄

主办单位: 北京市实验动物管理办公室、中国实验动物学会、北京实验动物学学会、首都医科大学

承办单位: 北京实验动物行业协会

会议主席: 赵德明 教授

联系人: 刘新艺 13911628792

联系电话: 010 68722982、68722983

传真: 010 68479601

E-MAIL: baola@baola.org 或 balac@balac.org

会议网站: <http://www.lascn.net/Item/12920.aspx>

会议背景介绍: 由北京市实验动物管理办公室、中国实验动物学会、北京实验动物学学会和首都医科大学主办, 北京实验动物行业协会承办的“2015年(第七届)北京实验动物科学国际论坛”将于2015年6月14日至16日在北京九华山庄召开。

此次大会将以“标准化—实验动物工作永恒的追求”为主题, 深入探讨实验动物管理法规与标准、实验动物环境控制与质量监管、实验动物福利与动物实验伦理审查规范, 以及实验动物资源共享方法等议题。

本届论坛宗旨是借助国内外专家的学术交流, 共同探讨如何促进我国实验动物行业与国际接轨, 突出标准战略, 规范实验动物产业, 更好的管理和引导北京和全国实验动物行业健康发展。