

注,以减轻局部肿胀。③增加抗血栓形成药物的应用,如加用低分子右旋糖酐 500 mL,24 h 静脉滴注溶栓。如以上措施仍不能改善静脉危象症状,要果断实行每个手指末梢尺侧小切口放血。一般在术后 3~4 d 症状暂时可以缓解;但小切口放血往往只能维持 1~2 d,此时可以拔除手指指甲放血或在桡侧再次切开对侧小切口放血。李志杰等^[5]认为:在小切口外敷湿肝素钠棉球,既可防止切口血栓快速形成,又能保持切口湿润,促进血液循环。该组运用此方法效果较好,可使切口放血再维持 1~2 d,即至术后第 6 至 7 天。此时由于前臂小静脉已有部分长入脱套皮肤,静脉危象症状开始减轻,1 周后逐渐消失,病情开始稳定,渡过危险期的手指成活。个别手指由于挫伤严重,虽然实施以上各种措施仍出现坏死,但患者保留住了部分全指,避免了全部手指部分

截指的厄运。

参考文献

- [1] 刘会仁,曹磊,王立新,等.组织移植修复肢体严重损伤发生血管危象的原因分析[J].中华显微外科杂志,2010,33(2):161
- [2] 熊胜,巨积辉,金光哲,等.吻合血管术后 55 例血管危象探查体会[J].中华外科杂志,2011,27(5):284
- [3] 刘宇舟,寺奎永,许亚军,等.套状撕脱性断指再植 19 例临床分析[J].中华外科杂志,2011,27(3):187
- [4] 梁启善,张咸中,卢冉翔,等.脱套性拇指离断的再植体会[J].中华显微外科杂志,2011,34(5):417
- [5] 李志杰,蒋良福,高伟阳,等.小儿末节压砸断指的临床特点及其血管处理[J].中华外科杂志,2011,27(5):271

(2013-05-19 收稿 责任编辑徐春燕)

doi:10.13705/j.issn.1671-6825.2014.03.046

奥司他韦、扎那米韦和帕拉米韦对人 H7N9 流感病毒神经氨酸酶的抑制作用

蔚晓晖,刘伟[#]

郑州大学生物工程系生命科学院 郑州 450001

[#]通讯作者,男,1967 年 7 月生,博士,教授,研究方向:生物信息学与药物设计,E-mail: weiliu@zzu.edu.cn

关键词 H7N9 流感病毒;神经氨酸酶;分子动力学;分子对接

H7N9 流感病毒属于甲型流感病毒,是一种新亚型流感病毒,2013 年 3 月首次在人类中检测出^[1-2]。目前尚未有明显证据表明该病毒可以在人与人之间传播^[3],但 H7N9 病毒之间的遗传变化表明其病毒较易传播给人类,并且和 SARS 一样可导致严重的呼吸道症状及死亡^[4]。目前较常用的抗流感病毒药物主要有奥司他韦、扎那米韦和帕拉米韦,它们可以通过抑制神经氨酸酶(neuraminidase, NA)来抑制流感病毒的繁殖。NA 是一种流感病毒糖蛋白,能催化水解唾液酸末端的 N-乙酰基神经氨酸与邻近寡糖 D-半乳糖或是 D-氨基半乳糖之间的 $\alpha(2,6)$ 或 $\alpha(2,3)$ 糖苷键,使成熟的病毒颗粒最终脱离宿主细胞,感染新的上皮细胞,造成流感病毒在患者体内的扩散。虽然甲型流感病毒 NA 活性中心的结构在流感病毒中是较为保守的,但流感病毒基因易重组突变,NA 活性位点上氨基酸残基的改变

有可能使病毒对 NA 抑制剂产生明显抗药性^[5-6]。因此,对 NA 药物抑制特性的研究有助于对人感染 H7N9 流感病毒的防控工作。作者利用同源建模和分子对接方法,通过对药物分子与 H7N9 NA 结合能的比较,分析药物分子对 NA 的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 序列比对与同源建模 从 NCBI 数据库中获得所有 H7N9 流感病毒 NA 的完整序列,包括 6 条人感染 H7N9 流感病毒 NA 序列,利用 clustalx 进行序列比对。选取人感染 H7N9 流感病毒 A/Hangzhou/1/2013 的 NA 序列(NCBI 序列号:AGI60300.1, AGI)和其他来源 H7N9 流感病毒株 A/wild bird/Korea/A3/2011 的 NA 序列(NCBI 序列号:AEK84752.2, AEK)进行同源建模。同源建模采用 CPHmodels-3.2 网络服务器^[7],可获得对应序列的

三维空间结构。

1.2 分子动力学平衡 分子动力学模拟采用 Amber11, 蛋白质力场采用 ff99 力场^[8]。NA 模型在进行动力学模拟之前还需要利用 Xleap 程序进行处理, 包括增加氢原子、增加抗衡离子以使体系中中性化以及增加 8.5 μm 厚的基于 TIP3P 模型的八面体水环境。分子动力学过程优化分为两个阶段: 首先约束溶质, 对溶剂分子进行优化; 再无约束优化整个系统。每个阶段均采用最陡下降法优化 2 500 步, 再采用共轭梯度法优化 2 500 步。优化之后用 60 ps 时间使系统缓慢升温到 298 K, 在 298 K 下进行 500 ps 的体系平衡过程, 平衡之后再继续进行 1.5 ns 分子动力学模拟, 最后选取体系能量最低的构像状态作为 NA 的稳定结构。按上述方法处理, 分别获得 AGI 和 AEK 的稳定结构。

1.3 分子对接模拟 从 PDB 数据库里获得野生型流感 H5N1 病毒 NA 与奥司他韦复合物 (WT-OTV, PDB Code: 2HU4) 的结构作为模板, 然后将 WT-OTV 分别与平衡后的 AGI 和 AEK 的稳定结构进行叠加, 删除 WT-OTV 的 NA, 分别得到了 AGI/AEK 与奥司他韦复合物 (AGI-OTV/AEK-OTV) 的结构。同法获得 AGI/AEK 分别与扎那米韦和帕拉米韦复合物 (AGI-ZNV/AEK-ZNV 和 AGI-PRV/AEK-PRV) 的结构。对获得的 6 种复合结构, 分别采用 Autodock 4.0 程序^[9]进行分子对接。对接选用的格点盒子大小为 40 点 \times 40 点 \times 40 点, 格点间距 0.375 埃。运用 Lamarckian 遗传算法, 对小分子进行 100 次的独立对接实验, 能量极大值设为 2.5×10^6 , 最大变异代数设为 27 000, 最后得到这些复合物与药物小分子的结合能。

2 结果与讨论

6 条人感染 H7N9 病毒 NA 均出自长三角地区, 序列比对的结果表明, 序列相似度很高, 而且在活性位点均未发生变异, 由此初步判断这次人感染 H7N9 病毒 NA 结构比较保守。除人感染 H7N9 流感病毒 NA 序列外, 只有 AEK 序列在第 118 位活性位点发生了 R 到 T 的突变。

在分子动力学模拟过程中, 为了判断体系是否平衡, 分别计算了动能、势能、总能和 NA 的主链 C α 原子的 RMSD 值。RMSD 是指体系在模拟过程中产生的结构相对于晶体结构随时间变化的均方根偏差, 也是衡量体系是否稳定的重要依据。图 1 表示的是 NA 主链 C α 原子的 RMSD 值随时间的变化值, 其中, 横坐标表示的是时间, 纵坐标表示的是 RMSD

值, 由图中可以看出时间大于 350 ps 以后, AGI 和 AEK 的主链 C α 原子的 RMSD 值达到 1.5 埃左右并保持平衡。同时体系动能、势能和总能的变化迅速达到稳定值, AGI 的动能、势能和总能分别保持在 62 760、-292 880、-230 120 kJ/mol, AEK 分别保持在 83 680、-376 560、-292 880 kJ/mol, 表明 AGI 和 AEK 在 500 ps 的动力学模拟过程中都达到了平衡, 因此, 可从模拟的最后阶段选取 NA 的稳定结构。

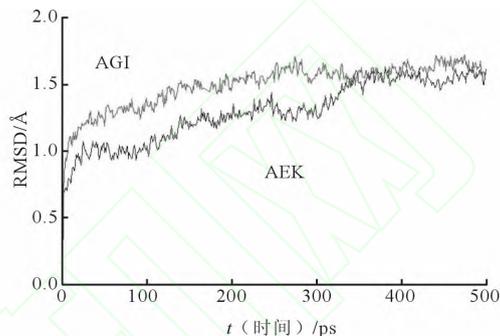


图 1 NA 的主链 C α 原子在平衡阶段的动力学模拟的 RMSD 值变化

AGI 和 AEK 与奥司他韦、扎那米韦和帕拉米韦的结合能如表 1 所示。从表 1 可以看出, 奥司他韦、扎那米韦和帕拉米韦对 AGI 的抑制作用比较明显; 而 AEK 与药物分子的结合能力较 AGI 略大, 第 118 位活性位点 R 到 T 的突变并未减弱药物分子对 AEK 的抑制作用。3CL2 是通过与 NA 和奥司他韦晶体结构 (PDB Code: 3CL2) 直接计算获得的数值, 该值直接反映了 3CL2 和奥司他韦之间较强的相互作用^[10], 其与奥司他韦的结合能与 AGI 和 AEK 接近。上述结果说明奥司他韦、扎那米韦和帕拉米韦对人感染 H7N9 病毒株 NA 的抑制作用比较明显。

表 1 AGI 和 AEK 与奥司他韦、扎那米韦和帕拉米韦的结合能 kJ/mol

| NA 来源 | 奥司他韦 | 扎那米韦 | 帕拉米韦 |
|---------|--------|--------|--------|
| AGI(人) | -22.89 | -22.84 | -21.38 |
| AEK(其他) | -26.19 | -25.86 | -26.36 |
| 3CL2(人) | -22.47 | - | - |

综上所述, 人流感 H7N9 病毒株 NA 序列变化小, 结构比较保守, 未发生活性位点突变; 药物分子对其的抑制作用明显, 因此对 H7N9 流感病毒在体内释放会有较好的抑制效果。但 AEK 活性位点的突变说明 H7N9 NA 有可能产生抗药性突变, 需引起关注。

参考文献

- [1] Alcorn, T. As H7N9 spread in China, experts watch and wait[J]. Lancet, 2013, 381(9875): 1347
- [2] 张宝, 黄克勇, 郭劲松, 等. H7N9 病毒的来源和重组模式[J]. 南方医科大学学报, 2013, 33(7): 1017
- [3] Horby P. H7N9 is a virus worth worrying about[J]. Nature, 2013, 496(7446): 399
- [4] From SARS to H7N9: will history repeat itself? [J]. Lancet, 2013, 381(9875): 1333
- [5] Colman PM, Varghese JN, Laver WG. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase[J]. Nature, 1983, 303(5912): 41
- [6] McKimm-Breschkin JL. Resistance of influenza viruses to neuraminidase inhibitors: a review [J]. Antiviral Res, 2000, 47(1): 1

- [7] Nielsen M, Lundegaard C, Lund O, et al. CPHmodels-3.0-Remote homology modeling using structure guided sequence profiles[J]. Nucleic Acids Research, 2010, 38 (Web Serve issue): W576
- [8] Duan Y, Wu C, Chowdhury S, et al. A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations[J]. J Comput Chem, 2003, 24(16): 1999
- [9] Morris G, Goodsell D, Halliday R, et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function[J]. J Comput Chem, 1998, 19(14): 1639
- [10] Collins PJ, Haire LF, Lin YP, et al. Crystal structures of oseltamivir-resistant influenza virus neuraminidase mutants [J]. Nature, 2008, 453(7199): 1258
- (2013-08-15 收稿 责任编辑李沛寰)

doi:10.13705/j.issn.1671-6825.2014.03.047

血库储存红细胞物理特性变化规律

郝希平^{1)Δ}, 宋霄薇²⁾, 曹彬³⁾

1) 河南科技大学物理与工程学院 洛阳 471003 2) 河南科技大学医学技术与工程学院 洛阳 471003 3) 暨南大学生物医学工程研究所 广州 510632

Δ女, 1964年9月生, 硕士, 副教授, 研究方向: 医用物理, E-mail: hxp516@126.com

关键词 红细胞; 储存; 几何形态; 弯曲弹性模量

红细胞作为血液中数量最多的一种血细胞, 是氧气和二氧化碳的最主要载体, 同时还参与物质转运、信息传递、细胞免疫等功能。红细胞功能的正常发挥与其形态、细胞膜力学性能以及胞内血红蛋白的结构和功能有关。研究^[1-4]表明血库血储存的过程中, 红细胞的变形能力会大大下降, 但以上研究中的测量方法均为有扰测量, 所测值为群体信息, 不能对红细胞作连续跟踪测定。红细胞在其生存期内, 青、中、老龄红细胞的形态结构和变形能力有所差异^[5]。作者采用对细胞正常生理状态无扰测量的快速显微动、静态图像分析技术^[5]对不同储存时间的红细胞进行测定, 探讨血库血红细胞的数目、形态结构、力学性能随储存时间的变化规律, 从而为临床上血库血的合理使用提供指导, 以提高临床用血的有效性。

1 材料与方法

1.1 血库血样品的制备 抽取6个健康人的静脉血, 立即加入CPDA血液储存液(每100 mL全血中加入14 mL), 于4℃下密封储存。以刚抽取的新鲜血(储存0 d)以及用CPDA储存5、10、15 d的血用于实验。

1.2 不同胞龄红细胞的分离和提取

1.2.1 缓冲溶液的配制 ① HEPES 缓冲溶液(HBS): 原料为2.66 mol/L NaCl, 0.09 mol/L KCl, 0.2 mol/L HEPES。② BSA-HEPES 缓冲溶液(SA): 将三蒸水与上述配好的HBS以体积比19:1混合, 再加入适量牛血清蛋白(BSA)。③ BSA-Percoll-HEPES 缓冲溶液(SB): 将Percoll液与上述配好的HBS以体积比19:1混合好, 再加入适量BSA。