

# 应用平衡透析法分析药物小分子与蛋白质相互作用

李瑞光<sup>1 2</sup> 陈历俊<sup>2</sup> 姜铁民<sup>2</sup> 徐晨<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>大连工业大学, 大连 116034; <sup>2</sup>北京三元食品有限公司, 北京 100085)

**摘要:** 蛋白质的相关信息一直是生命科学研究的重点, 其中药物小分子与蛋白质的相互作用成为近年来的研究热点。平衡透析法是研究药物小分子与蛋白质相互作用的经典方法, 通过该方法可以定量的讨论药物小分子与蛋白质结合的结合数量、结合常数。就平衡透析法用于分析药物小分子与蛋白质的作用方式、作用模型及国内外研究进展进行综述。

**关键词:** 平衡透析 药物小分子 蛋白质 相互作用

## Studies on the Interactions Between Proteins and Drug Small Molecules by Equilibrium Dialysis

Li Ruiguang<sup>1 2</sup> Chen Lijun<sup>2</sup> Jiang Tiemin<sup>2</sup> Xu Chen<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dalian Polytechnic University, Dalian 116034; <sup>2</sup>Beijing Sanyuan Foods Co. Ltd., Beijing 100085)

**Abstract:** Research on interactions between proteins and drug small molecules have become increasingly popular in recent years. The classical equilibrium dialysis method was used to measure the amount and coefficient of a drug small molecular bound to proteins. This article summarized recent development of interaction modes between drug small molecular and protein by equilibrium dialysis method.

**Key words:** Equilibrium dialysis Drug small molecule Protein Interaction

研究药物小分子与蛋白质相互作用对促进生命科学的发展有着重要意义, 实际上许多蛋白质的重要生理和药理功能都有药物小分子的参与, 药物小分子通过与蛋白质的相互作用可以促进或者抑制蛋白质的功能的实现, 尤其是药物与血浆蛋白结合会影响到药物的生物学活性, 即影响作用强度和时间的长短, 进而对药物的吸收、分布、代谢、排泄和毒性 (ADMET)<sup>[1]</sup>等方面产生重要作用。因此蛋白质与药物小分子相互作用一直是引人关注的问题, 对此已经有很多文献进行了报道。为了研究药物小分子与蛋白的相互作用机制, 人们提出了几种结合模型, 如 Scatchard 模型、专一性和非专一性结合模型、分配模型等<sup>[2]</sup>。常用研究方法有平衡透析法、超滤法、凝胶色谱法、超速离心法、荧光光谱法、紫外可见光谱法、核磁共振法、红外光谱法和圆二色谱法等

等<sup>[3]</sup>。本文就应用平衡透析法分析药物小分子与蛋白质结合的研究现状和发展方向进行综述。

### 1 平衡透析法

平衡透析是用透析膜将蛋白质溶液与缓冲液分隔开, 建立在两者之间的一种平衡状态, 只有分子量小的药物小分子可以通过。透析的动力是扩散压, 扩散压是由横跨膜两边的浓度梯度形成的。透析的速度与膜的厚度、透析的小分子溶质在膜两边的浓度梯度及透析温度等因素有关。虽然目前还没有测定蛋白与药物小分子结合的标准方法, 但平衡透析法通常被认为是参考方法<sup>[3]</sup>, 因为它能直接测出未与蛋白结合的药物小分子的数量, 这是分析蛋白与小分子物质结合的关键, 从而能求出结合位点数及结合常数, 因此平衡透析法被认为是比较准确的方法<sup>[4]</sup>。

收稿日期: 2010-01-25

作者简介: 李瑞光, 男, 硕士研究生, 研究方向: 乳品安全; E-mail: liruiguang007@163.com

通讯作者: 陈历俊, 男, 教授级高工; E-mail: chljl@263.net

## 2 药物小分子与蛋白质的作用方式与作用模型

### 2.1 作用方式

药物小分子与蛋白质作用时,主要存在共价作用和非共价作用两种作用方式。一般对于蛋白质靶分子来说,与药物小分子的非共价作用比共价作用更为常见,因为非共价作用更有利于药物的代谢和排泄<sup>[5]</sup>。

在溶液中,一个小分子与蛋白靶分子相互作用涉及两个分子在一定时间内的物理接触,并导致相互吸引。这种相互作用可以用如下方程表示:



其中  $P$  代表蛋白质,  $L$  泛指小分子或离子,  $PL$  代表两者的复合物。上述反应体系更准确地表达应该为:



以上两个公式有明显的区别,即后者指出一旦  $P$  和  $L$  参与反应,结合后将不复存在,而是被复合物取代。当体系达到平衡时,结合平衡常数可以用下式表示:

$$K_a = \frac{[P'L']}{[P][L]}$$

而在一些文献中,也常用解离平衡常数即结合平衡常数的倒数,表示小分子与大分子的结合亲和性:

$$K_d = \frac{[P][L]}{[P'L']}$$

一般可以认为,当  $K_d$  小于  $5 \mu\text{mol/L}$  为强结合,而大于  $50 \mu\text{mol/L}$  为弱结合。而对于一些较为复杂的反应就不能简单的用公式来表示,而要对此公式进行改进,即:  $nP + mL \rightleftharpoons P_n'L_m'$ , 而  $K_d$  变为:

$$K_d = \frac{[P]^n [L]^m}{[P_n'L_m']}$$

这些公式体现了小分子与蛋白质相互作用方式的本质,然而小分子与蛋白质作用十分复杂,人们为了定量地来研究小分子与蛋白质的作用,提出了不同的结合模型和结合参数的计算方法。

### 2.2 作用模型

2.2.1 Scatchard 模型 Scatchard 在研究  $\text{Cl}^-$  与入血清白蛋白 (HSA) 作用时所确立的数学模型被称为 Scatchard 方法<sup>[6]</sup>,成为处理生物大分子和小分子

作用的常用方法。该模型的基本假设是对于一种配体,假设蛋白质上每个结合部位都一样(即结合体和每个结合部位作用的自由能相等),并且这些结合部位与配体的作用是相互独立的,不存在相互作用。由此推导出的 Scatchard 方程为:

$$n/[L] = KN - Kn, \quad (1)$$

其中  $n$  是每一分子蛋白质上结合的配体数,  $[L]$  是溶液中游离的配体浓度,  $K$  为结合常数,  $N$  为最大结合部位数。以  $n$  对  $n/[L]$  作图,就可以得到最大结合部位数  $N$  和结合常数  $K$ 。如果与蛋白分子中存在两种不同的结合部位,则 Scatchard 方程为:

$$n = N_1 K_1 [L] / (1 + K_1 [L]) + N_2 K_2 [L] / (1 + K_2 [L]) \quad (2)$$

此时  $n/[L] - n$  为双曲线,可以从两段直线部分求出  $N_1$ 、 $K_1$  和  $N_2$ 、 $K_2$ 。以此类推可推出蛋白质上有多个独立结合位点的情形<sup>[7]</sup>。Congdon<sup>[8]</sup>在研究 CBBG-250 与蛋白质的作用时,对 Scatchard 方程进行了修正,推导出两个方程:

$$1/[L] = KN/n - K, \quad (3)$$

$$1/[L] = (1/KN)(1/[L]) + 1/N \quad (4)$$

如果引入 Hill 参数  $n/(n-1)$ ,则推导出的修正方程为:

$$(n-1)/n = (1/NK)(1/[L]) + (N-1)/N \quad (5)$$

Congdo 认为,当蛋白质与染料浓度之比较大时,只有蛋白质上的强结合位点与染料作用。用不同的方程对数据进行处理,所得结果不同。用方程 (4) 和 (5) 所得结果相近,且所得  $K$ 、 $N$  值都大于方程 (3) 所得结果。当结合位点在 1-2 时,方程 (5) 能得到准确的结果;当结合位点大于 4-5 后,所得结果不准确,方程 (3) 则无此限制。

2.2.2 专一性和非专一性模型 Taira 等<sup>[9]</sup>提出在白蛋白和配体之间存在专一性结合 (specific) 和非专一性结合 (non-specific) 两种作用,专一性结合遵循 Scatchard 模型,其特点是高亲和性以及结合容量小(即最大结合数小);非专一性结合就好像在水相和有机相中的分配,特点是低亲和性,对配体的结合容量是无限的(即不存在最大结合数)。两种作用之间不存在协同作用,因而平均结合数  $n$  是这两种结合部位数之和。

$$n = n_s + n_{ns}, \quad (6)$$

其中  $n_s$  表示专一性结合数,  $n_s = NK_s [L] / (1 + K_s [L])$ ;  $n_{ns}$  表示非专一性结合数,  $n_{ns} = K_{ns} [L]$  这一模型被称为“专一性结合和非专一性结合模型”(简称 S-NS 模型)。Taira 等比较了用 Scatchard 模型和 S-NS 模型分别处理了药物华法令、以及水杨酸与白蛋白结合的数据,认为两种模型的处理方法所得到的结果是一致的,两种结合模型的强结合部位的结合数大致相同,结合常数很相近,有一定的差异,但不十分显著。

2.2.3 相分配模型 Plsavento<sup>[10]</sup>抛开了 Scatchard 模型的假设,提出了相分配模型。他认为牛血清白蛋白(BSA)对阴离子染料的吸收光谱和质子化常数的影响类似于表面活性剂胶束的作用,没有明显的专一性结合点。由此 Plsavento 提出假设:血清白蛋白可以被认为是一个不同于水的微相,配体在微相和水相中分配。微相分散在水相中,当一种物质 X 在这两相中分配,便有如下平衡式:



则分配常数  $K_d = \alpha'_x / \alpha_x = [X'] \gamma'_x / [x] \gamma_x$ , 其中:  $\alpha$ 、 $\gamma$  分别表示 X 的活度及活度系数,  $\alpha'$ 、 $\gamma'$  分别表示 X' 的活度及活度系数, X' 表示与蛋白质结合的小分子(即在蛋白质微相中的小分子), X 表示游离态的小分子。以这个模型为基础, Plsavento 研究了 T-azo-R (1-四唑基偶氮-2-萘酚-3,6-二磺酸)与牛血清白蛋白的作用,结果比较满意。

### 3 平衡透析法研究药物小分子与蛋白质相互作用的研究进展

药物小分子与蛋白质相互作用的研究主要集中在药物小分子与蛋白质结合强度、结合方式、结合位点、结合距离以及能量转移效率等<sup>[2]</sup>方面。平衡透析法有着操作简单、温度易于控制、pH 值可调、设备成本低廉等优点。但是其自身的缺点也很多,如达成平衡时间较长,一般为 6-24 h 有的甚至几天;存在溶液体积的变化;透析时间过长可能会造成由加热或代谢引起的被测物质的降解等等<sup>[6,11]</sup>。而且仅利用平衡透析法不能说明药物小分子与蛋白质之间的具体结合部位、相互作用后蛋白质的结构变化及相互作用时的能量变化等问题。因此在利用平衡透析法研究药物小分子与蛋白质相互作用时还需要与其他的一些方法联用,才能获得更准确的作用

信息<sup>[12,13]</sup>。

#### 3.1 平衡透析法与紫外光谱联用

紫外可见吸收光谱是研究小分子与生物大分子相互作用的一种最方便、最常用的技术。药物小分子与蛋白质的相互作用会引起吸收带的红移(蓝移)现象或增色(减色)效应。在蛋白质分子中某些氨基酸残基(尤其是芳香氨基酸残基)和许多药物小分子中都有生色团,在紫外光谱中能产生吸收峰,根据峰形和峰位的变化即可判定小分子是否与蛋白质发生作用。因此,可利用药物小分子与蛋白质结合前后,两者之一的吸收光谱的变化来判断是否存在相互作用,从而得到作用方式、热力学参数等信息,还可以进一步研究试验条件对热力学参数的影响。叶志钧等<sup>[14]</sup>利用平衡透析法结合紫外可见吸收光谱,研究了中药有效成分小檗碱与人血清白蛋白的相互作用,结果表明,在 37℃ 的水浴恒温培养 4 h 透析达到平衡后,通过紫外光谱的改变发现两物质发生相互作用,同时通过 Langmuir 等温吸附方程的变形并进行数据的拟合,测得其结合常数为  $1.32 \times 10^3 (\text{mol/L})^{-1}$ ,最大结合量为  $406 \mu\text{mol/L}$ 。

#### 3.2 平衡透析法与荧光光谱联用

荧光光谱法也是研究药物小分子与蛋白质相互作用的重要手段之一。色氨酸残基、酪氨酸残基和苯丙氨酸残基均含有生色基团,其  $\lambda_{em}$  分别为 348、303 和 282 nm。通过研究蛋白质的荧光猝灭过程就能得到小分子与蛋白质作用的结合常数、作用区域及位置等信息。黄瑾等<sup>[15]</sup>采用紫外光谱法、荧光光谱法并结合平衡透析法研究了磷钨杂多酸与 HSA 和 BSA 的结合平衡。观测到当 pH7.43 时磷钨杂多酸使 HSA 和 BSA 的紫外吸收峰加强,并使 HSA 和 BSA 的特征荧光峰猝灭。Scatchard 曲线分析表明,磷钨酸在 HSA 和 BSA 中均有一个强结合部位。通过非线性最小二乘法拟合 Bjerrum 方程,得出磷钨酸-HSA 和磷钨酸-BSA 体系的逐级稳定常数。谢宝刚等<sup>[16]</sup>把平衡透析法和紫外吸收示差光谱、稳态和动态荧光光谱法结合起来研究了生理条件下 Zn-PcS2P2(二磺基二邻苯二甲酰亚胺基酞菁锌,是一种具有光动力活性的两亲性抗癌光敏剂)与 BSA 之间的相互作用并得到了较为理想的结果。基于 Hill 位点模型,应用改进的蛋白内源荧光猝灭法求得

ZnPCs2P2 与 BSA 形成复合物的结合参数,结果与平衡透析法基本一致。

### 3.3 平衡透析法与微量热法联用

微量热法(包括等温滴定量热和差示扫描量热)是近年来发展起来的一种研究生物热力学与生物动力学的重要结构生物学方法,它通过高灵敏度、高自动化的微量热仪连续、准确地监测和记录一个变化过程的热量曲线,原位、在线和无损伤的同时提供热力学和动力学信息。Taboada 等<sup>[7]</sup>用平衡透析法和微量热法研究了 25℃ 时 HSA 与青霉素(penicillin、nafcillin、cloxacillin、dicloxacillin 和 flucoxacillin)在 pH7.4 时相互作用的热力学参数。人血清白蛋白对这类药物的束缚有很大的非专一性,当自由态的药物浓度接近能够形成聚集物的临界浓度时,每个 HSA 分子最多能够束缚 1 200(dicloxacillin)到 3 000(nafcillin)个药物分子。Nafcillin 和 cloxacillin 这两种药物的等温束缚的最大值可能与接近临界浓度的单体药物的最大活度有关,这些药物与蛋白质相互作用的热力学参数的数量级类似于阴离子表面活性剂与球状蛋白质的相互作用,这种结果与药物分子在蛋白质上聚集成胶束状结构相一致。Dzmitry Shecharbin 等<sup>[8]</sup>利用平衡透析法、等温滴定量热法和电位测量法研究了  $\text{Cd}^{2+}$  与 PAMAM 4.5 树状大分子的结合,得出在水中  $n = 23.8 \pm 9.5$ ,  $K_b = 4.7 \pm 0.9 \times 10^3$ ; 在 0.15 mol/L 的磷酸盐缓冲液中  $n = 41.3 \pm 13.4$ ,  $K_b = 2.1 \pm 0.8 \times 10^3$ 。并且用荧光法和平衡透析法研究了 BSA 和 PAMAM 4.5 树状大分子与  $\text{Cd}^{2+}$  的结合,发现  $\text{Cd}^{2+}$  与 BSA 和 PAMAM 4.5 树状大分子的结合存在竞争性,从而推出 PAMAM 4.5 树状大分子可以从水中提取  $\text{Cd}^{2+}$  来,这点在环境保护方面有着积极的作用。

### 3.4 平衡透析法与其他方法联用

在分析药物小分子与蛋白质相互作用中,除以上介绍的分析方法外,其它分析方法也较为常用,如高效液相色谱、质谱、毛细管电泳、电势测定等。Wan 等<sup>[9]</sup>研究了一种新的高通量筛选血浆蛋白结合的方法,该方法是在平衡透析法的基础上联合了 LC-MS 的生物分析法,通过对 1 个酸性和 10 个碱性的药物标品及 36 个新的化学药品的测试,发现单一和混合组分的未结合分数  $f_u$ (%) 有着良好的相互

关系( $R^2 > 0.95$ ),表明至少有 10 种组分能在可接受的精度内同时测量。在各种药物与蛋白质浓度下用一个简单的药物与蛋白结合模型来计算药物的  $f_u$ (%) 并且还可以从理论上解释样品混合方法的应用,该方法将有助于药物开发过程和更快速的评估药物与蛋白质结合的潜力。Sydney 等<sup>[20]</sup>使用二氟尼柳和 2-羟丙基-13-环糊精作为模式系统应用平衡透析法测定药物-环糊精稳定常数。数据分析显示存在一条线性的 Scatchard 图,这表示二氟尼柳和 2-羟丙基-13-环糊精复合物是一比一组成的,复合物化学计算的验证使用适当的质量作用定律方程。使用平衡透析法得到的复合物的常数  $K_c$ ( $3801 \pm 541$ ) L/mol 与使用电势测定法得到的  $K_c$ ( $5564 \pm 56$ ) L/mol 相比,表明用平衡透析法于研究药物与环糊精的结合是可靠的,而且比电势测定法简单易行,可以成为首选方法。

## 4 平衡透析装置的开发

随着平衡透析法在分析药物小分子与蛋白质结合领域中的应用越来越广泛,一些专门用于平衡透析法的设备和仪器也不断被开发出来。刘昌孝等<sup>[21]</sup>发明了一种平衡透析装置并申请了专利,该发明由 2n 个透析池和 n 个透析膜(高分子膜、生物膜或其他透析材料)组成,结构简单。可测定化学或生物物质(如药物、农药、兽药、日化产品等)的蛋白结合及其对不同蛋白组成的结合差异,在血浆中结合浓度与游离浓度的比例,以及在外用制剂或混合物研究中测定不同制剂在不同透析材料下进行的体外透过速率测定,以获得最佳制剂处方和工艺。美国哈佛生命科学公司<sup>[22]</sup>开发出了多种用于平衡透析的装置并投入市场,有一次性平衡透析器、微平衡透析器、96 孔平衡透析装置等等,为平衡透析法提供了专用设备,使其应用更加广泛,测量更加精确。Nigel 等<sup>[23]</sup>又研究出一种快速平衡透析设备,该设备包括一个装有 48 个一次性的透析池特氟龙底板,每个嵌入的透析池都是由两个挨着的用透析膜分隔开的竖直圆筒状槽组成的。与标准的平衡透析法相比,该套设备具有快速、分析可重复、精度高和使用简易等优点,因此较适合进行药物小分子与蛋白质结合的分析并可极大地节省透析时间。

## 5 结束语

从 1932 年由 Marrack 和 Smith 报道以来,平衡透析法这一技术一直被认作是定量分析蛋白质与小分子相互结合的经典方法。通过平衡透析法可以讨论蛋白质与药物小分子的结合位点数、结合平衡常数、作用力情况等,但是仅利用平衡透析法不能说明它们之间的具体结合部位、相互作用后蛋白质的结构变化及相互作用时的能量变化等问题,因此还需要结合光谱技术和热力学分析等方法。通过平衡透析法与多种技术的综合运用,不仅可以从宏观的数值上,而且还可以从微观的角度全方位的对药物小分子与蛋白质的结合进行分析,使用多个参数同时表征作用过程,多种试验手段对比分析而得出的试验结果必将对药物小分子与蛋白质结合的分析更加精确并具有说服力。

### 参考文献

- [1] Benet LZ, Hoener BA. Changes in plasma protein binding have little clinical relevance. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2002, 71 (3): 115-21.
- [2] 朱铿, 李娜, 李克安, 等. 蛋白质与有机小分子反应机理的研究. *化学试剂* 1999, 21(1): 17-21.
- [3] Heinze A, Holzgrabe U. Determination of the extent of protein binding of antibiotics by means of an automated continuous ultrafiltration method. *International Journal of Pharmaceutics* 2006, 311(1-2): 108-112.
- [4] Vogel HG, Hock FJ, Maas J, et al. Drug discovery and evaluation: safety and pharmacokinetic assays. Berlin Heidelberg: Springer, 2006: 473-486.
- [5] 芦海云, 李俊国. 小分子与蛋白质靶分子相互作用的研究方法. *内江科技* 2007, 6: 71-72.
- [6] Scatchard G, Scheinberg IH, Armstrong SH. Physical chemistry of protein solutions. IV. The combination of human serum albumin with chloride ion. *Journal of the American Chemical Society* 1950, 72: 535.
- [7] 祝庆麟. Scatchard 作图及其参数求解法. *中国医学科学院学报*, 1986, 8(6): 466-472.
- [8] Congdon RW, Much GW, Splittgerber AG. The binding interaction of Coomassie blue with proteins. *Anal Biochim* 1993, 213(2): 407.
- [9] Taira Z, Terada H. Specific and non-specific ligand binding to serum albumin. *Biochem Pharmacol* 1985, 34(11): 1999-2005.
- [10] Plesavento M, Profumo A. Interaction of serum albumin with a sulfonated azo dye in acidic solution. *Talanta* 1991, 38(10): 1099-1106.
- [11] Oravcovà J, Böhs B, Lindner W. Drug-protein binding studies trends in analytical and experimental methodology. *Journal of Chromatography B* 1996, 677(1): 1-28.
- [12] 卢继新, 李惠芬, 蔡乐, 等. 药物小分子与生物大分子相互作用的研究方法进展. *分析科学学报* 2007, 23(5): 601-606.
- [13] 李锐, 任海平, 孙艳亭, 等. 小分子与生物大分子间非共价相互作用分析方法研究进展. *分析化学评述与进展* 2006, 34: 1801-1806.
- [14] 叶志钧, 刘英菊, 朱丽. 平衡透析法研究小檗碱与人血清白蛋白的相互作用. *广东化工* 2009, 36(36): 73-76.
- [15] 黄瑾, 袁余洲, 梁宏. 紫外光谱、荧光光谱及平衡透析研究磷钨杂多酸与 HSA 或 BSA 的结合平衡. *中国科学 B* 2001, 31(6): 530-535.
- [16] 谢宝刚, 黄剑动, 薛金萍, 等. 两性性酞菁锌与牛血清白蛋白结合的研究. *分析化学研究报告* 2003, 31(10): 1159-1163.
- [17] Taboada P, Mosquera V, Ruso JM, et al. Interaction between penicillins and human serum albumin: a thermodynamic study of micellar-like clusters on a protein. *American Chemical Society* 2000, 16(3): 934-938.
- [18] Shcharbin D, Mazur J, Szwedzka M. Interaction between PAMAM 4.5 dendrimer, cadmium and bovine serum albumin: a study using equilibrium dialysis, isothermal titration calorimetry, zeta-potential and fluorescence. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2007, 58(2): 286-289.
- [19] Wan H, Rehngren M. High-throughput screening of protein binding by equilibrium dialysis combined with liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2006, 1102(1-2): 125-134.
- [20] Ugwu SO, Alcalá MJ, Bhardwaj R, et al. The application of equilibrium dialysis to the determination of drug-cyclodextrin stability constants. *Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry* 1996, 25(1-3): 173-176.
- [21] 刘昌孝. 平衡透析装置: 中国, 01104903. CN 1308229A. 2001-8-15.
- [22] Harvard Bioscience. Guide to equilibrium dialysis. The Nest Group, Inc 2002, 21-28.
- [23] Waters NJ, Jones R, Williams G, Sohal B. Validation of a rapid equilibrium dialysis approach for the measurement of plasma protein binding. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2008, 97(10): 486-4595.