

平衡透析法研究小檗碱与人血清白蛋白的相互作用

叶志钧, 刘英菊, 朱丽

(华南农业大学 理学院 应用化学系, 广东 广州 510642)

[摘要]蛋白质和小分子相互作用的研究, 对促进生命科学的发展有着重要意义。在本实验中, 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跟人血清白蛋白的相互作用。实验表明, 在 37 ℃ 的水浴恒温培养 4 h 后, 两物质发生相互作用, 紫外光谱有所改变, 同时, 通过方程拟合, 测得其结合常数为 $1.32 \times 10^3 \text{ (mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1}$, 最大结合量为 $406 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

[关键词]小檗碱; 人血清白蛋白; 平衡透析; 紫外可见吸收

[中图分类号]J7

[文献标识码]A

[文章编号]1007-1865(2009)01-0073-04

Investigation on the Interaction of Berberine with Human Serum Albumin by Equilibrium Dialysis

Ye Zhijun, Liu Yingju, Zhu Li

(Department of Applied Chemistry, College of Sciences, South China Agriculture University,
Guangzhou 510642, China)

Abstract: The investigation on the interaction between protein and small molecules is very important in the development of life science. Thus, equilibrium dialysis and UV-vis spectra were used to investigate the interaction of berberine with human serum albumin in the experiment. Experimental results showed the UV-vis spectra changed and there was a strong interaction between these two substances after 4 h culture in 37 ℃ water bath, with a binding constant as $1.32 \times 10^3 \text{ (mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1}$ and the maximum binding amount as $406 \mu\text{mol/L}$.

Keywords: berberine; human serum albumin; equilibrium dialysis; UV-vis spectra

蛋白质是重要的生命物质, 它与营养、发育、遗传、新陈代谢等生命活动有着密切的联系。对蛋白质和小分子相互作用的研究, 不仅对改进和发展检测蛋白质的方法有作用, 而且对研究生物大分子和小分子相互结合作用的配位本质, 促进生命科学的发展有着重要意义^[1-2]。

生物碱小檗碱作为黄连、黄柏及三棵针等药用植物的重

要组成部分, 临床上主要用于治疗肠道细菌感染性疾病, 能清热燥湿, 泻火解毒等^[3-4]。因此, 研究中药有效成分小檗碱与人血清白蛋白之间的相互作用, 对于提高用药的科学性, 了解药物分子在体内的转运和代谢等具有特别重要的意义。文献中通常基于蛋白质与小檗碱相互作用后蛋白内源性荧光发生猝灭的方法来测定^[5]。文章以平衡透析法来研究蛋白质和小檗碱

[收稿日期] 2008-06-11

[基金项目] 华南农业大学校长基金资助

[作者简介] 叶志钧(1986-), 男, 广东人, 本科, 主要研究方向为中草药现代化。

的相互作用,通过小檗碱的紫外可见吸收曲线来确定游离的小檗碱浓度,并对数据进行拟合。

1 材料与试剂

盐酸小檗碱标准物购自江西本草天工科技有限公司。磷酸缓冲溶液(PBS, pH 7.4)由 $1/15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾、 $1/15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸氢二钠以及 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钾溶液配制。人血清蛋白(66478Da)购自 Sigma, 并用 PBS 配制成 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液。透析袋(14000Da)购自上海生工。所有其它试剂均为分析纯。紫外可见吸收光谱在 Pharmacia Biotech Ultrospec 4000 型紫外/可见吸收光谱仪上进行。

2 方法

2.1 绘制标准曲线

称取盐酸小檗碱标准品 0.0037 g 于 1 mL EP 管中, 加 70% 的乙醇溶解后定容至 1 mL , 得到浓度为 $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ 盐酸小檗碱溶液, 并依次稀释, 得到浓度分别为 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 、 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准溶液。然后向 2 mL 的 PBS 中加入不同体积的 1.0×10^{-4} 、 1.0×10^{-3} 、 $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准溶液, 并以 2 mL PBS 缓冲溶液为空白对照, 测定其紫外可见吸收光谱曲线。

2.2 与 HSA 相互作用研究

透析袋使用前在二次水中浸泡 5 min 。向透析袋中加入 $100 \mu\text{L}$ $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HSA 溶液和 $100 \mu\text{L}$ $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 小檗碱溶液, 封闭好。将透析袋放入盛有 2 mL PBS 缓冲溶液的离心管中, 使之完全浸没, 再在 37°C 的水浴中恒温培养 4 h 。

3 结果与讨论

3.1 标准曲线

由于小檗碱的最大吸收通常在波长 264 、 343 、 423 nm 处,

记录不同浓度的小檗碱在这三个波长下的吸光度, 并对浓度作图, 得到标准曲线, 如图 1。回归拟合得回归方程分别为:

$$264 \text{ nm 处, 方程 a: } y=0.016x+0.01 \quad (r=0.999); \quad (1)$$

$$343 \text{ nm 处, 方程 b: } y=0.014x+0.0002 \quad (r=0.999); \quad (2)$$

$$423 \text{ nm 处, 方程 c: } y=0.0031x+0.00002 \quad (r=0.999). \quad (3)$$

其中, y 为吸光度, x 为浓度。可见, 在一定的浓度范围内, 即 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \sim 8.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 在三个波长处吸光度与浓度均呈线性响应, 并且相关性比较好。

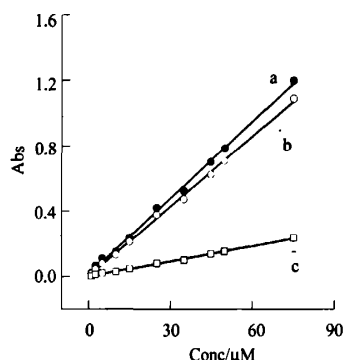


图 1 小檗碱 264 nm (a)、 343 nm (b)、 423 nm (c)处吸光度与浓度的关系

Fig.1 The relationship between the adsorption and berberine concentration at 264 nm (a), 343 nm (b), and 423 nm (c)

3.2 与 HSA 相互作用的定性分析

在 2 mL PBS 缓冲溶液中分别加入以下溶液: $50 \mu\text{L}$ $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HSA 溶液(a)、 $10 \mu\text{L}$ $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的小檗碱标准溶液(b)、 $10 \mu\text{L}$ $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的小檗碱标准溶液 + $50 \mu\text{L}$ $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HSA 溶液(c)、 $100 \mu\text{L}$ 透析袋外的培养液(d)、 $100 \mu\text{L}$ 透析袋内的培养液(e), 测定其紫外光谱, 见图 2。

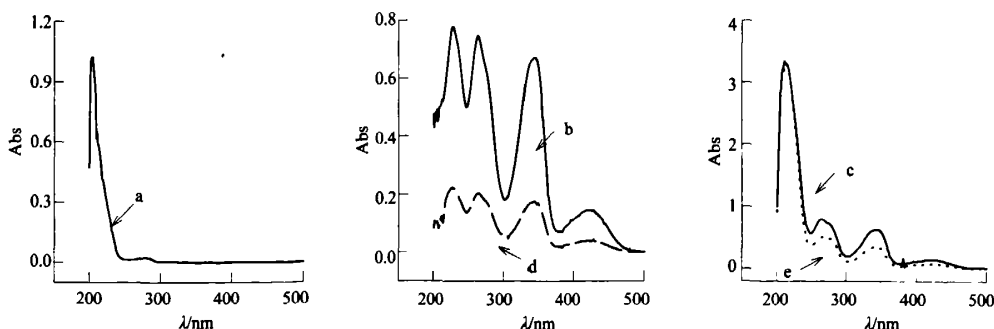


图 2 $50 \mu\text{L}$ $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HSA 溶液(a)、 $10 \mu\text{L}$ $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 小檗碱溶液(b)、 $10 \mu\text{L}$ $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的小檗碱溶液 + $50 \mu\text{L}$ 的 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HSA 溶液(c)、 $100 \mu\text{L}$ 透析袋外的培养液(d)、 $100 \mu\text{L}$ 透析袋内的培养液(e)

Fig.2 $50 \mu\text{L}$ $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HSA solution(a), $10 \mu\text{L}$ $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ berberine(b), $10 \mu\text{L}$ $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Berberine + $50 \mu\text{L}$ $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HSA(c), $100 \mu\text{L}$ culture solution outside of the dialysis(d), $100 \mu\text{L}$ culture solution inside of the dialysis(e)

由曲线 a, HSA 的特征吸收峰在 280 nm 附近。比较曲线 b 和曲线 d, 吸收峰所对应的波长都是 264、343、423 nm, 只是吸光度大小不同, 说明透析袋外面的溶液只有小檗碱, 并且浓度比 b 溶液低。透析袋可以容许分子量<14000 的分子自由通过, 所以小檗碱在透析袋中是自由渗透并最终达到平衡。比较曲线 c 和曲线 e, HSA 溶液与小檗碱溶液简单混合立即测定与经过一段时间培养后的曲线不完全一样, 表现在 264 nm 处峰峰形的变化以及红移。因此, 有一部分的小檗碱跟血清白蛋白结合, 改变了原来的性质。

3.3 与 HSA 相互作用的定量分析

同样, 向 5 个透析袋中均加入 30 μL 的 $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HSA 溶液, 然后分别加入 15、20、30、50、60 μL $1.0\times 10^{-2}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 小檗碱溶液后封闭。再把透析袋放入盛有 2 mL PBS 缓冲溶液的离心管中, 使之完全浸没。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴中恒温培养 4 h, 取出, 移取 100 μL 透析袋外面溶液于 1 mL PBS 中测定的紫外可见吸收曲线, 发现随着加入透析袋的小檗碱的量越大, 平衡后透析袋外的溶液的吸光度越大。同时, 记录在 264、343、423 nm 处的吸光度。如表 1, 并根据方程 1、2 和 3 来计算实际样品中游离的小檗碱, 以及在袋内跟人血清白蛋白结合的小檗碱的量。

表 1 不同浓度的小檗碱与人血清白蛋白培养后的紫外可见吸收测定

Tab.1 The Ultra-visible adsorption detection of berberine solution with different concentrations after being cultured with HSA
(Abs: nm; Conc.: $10^{-6}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

Abs 264	Conc.	Abs 343	Conc.	Abs 423	Conc.	Aver. Conc.	Free Conc.	Tot. Conc.	Bound Conc.
0.066	3.52	0.054	3.57	0.009	2.92	3.33	36.63	75.00	38.37
0.089	4.94	0.069	4.92	0.015	4.99	4.95	54.45	100.00	45.55
0.142	8.27	0.116	8.30	0.026	8.36	8.31	91.41	150.00	58.59
0.221	13.16	0.183	13.08	0.041	13.20	13.15	144.65	250.00	105.35
0.251	15.05	0.209	14.90	0.046	14.92	14.95	164.45	300.00	135.55

由于透析袋容许分子量小于 14000 的物质透过, 因此, 游离态的小檗碱将在透析袋里外达到平衡。在透析袋内 HSA 浓度一定时, 根据 Langmuir 等温吸附方程^[6], 即

$$\theta = \frac{Kc}{1 + Kc} \tag{4}$$

其中 θ 是结合率, K 是结合常数, c 是小檗碱的本体浓度。并且

$$\theta = \frac{\alpha_c}{\alpha_{\max}} \tag{5}$$

其中, α_c 是浓度不同的小檗碱时与 HSA 的结合量, α_{\max} 是在实验条件下即 HSA 浓度一定时小檗碱的最大结合量。因此, 联合方程 4 和 5 可以得到:

$$\alpha_c = \frac{Kc\alpha_{\max}}{1 + Kc} \tag{6}$$

进一步变形可以得到:

$$\frac{1}{\alpha_c} = \frac{1}{\alpha_{\max}} + \frac{1}{\alpha_{\max} Kc} \tag{7}$$

对实验数据用方程 7 作图(如图 3)并进行拟合, 得到

$$\frac{1}{\alpha_c} = 2.46\times 10^{-3} + \frac{1.86}{c} \tag{8}$$

($r=98.5\%$)

考虑到图中所用的单位, 因此最大结合量为 $406\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 结合常数为 $1.32\times 10^3\text{ (mol}\cdot\text{L}^{-1})^{-1}$ 。

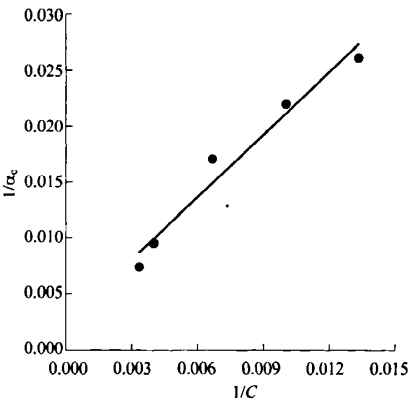


图 3 与 HSA 结合的小檗碱和本体溶液中小檗碱的浓度之间的双倒数关系

Fig.3 The double reciprocal relationship between the berberine bounded with HSA and the berberine in the solution

4 结论

血清蛋白是一种重要的运输蛋白。药物与血浆蛋白的结合将影响药物在体内的分布, 药物在体内以游离态发挥药效等, 因此, 从不同角度研究药物与血清蛋白的作用是非常重要的。文章以平衡透析法研究了小檗碱与人血清白蛋白在 37 ℃ 的水浴恒温培养 4 h 后, 两物质发生相互作用, 最大结合量为 $406 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 结合常数为 $1.32\times 10^3(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})^{-1}$ 。

参考文献

[1]Liu Y J, Li Y L, Liu S C, et al. Monitoring the self-assembly of chitosan/glutaraldehyde/cysteamine/Au-colloid and the binding of human serum albumin with hesperidin[J]. Biomaterials, 2004, 25: 5725-5733.

[2]周大伟, 李发美. 盐酸丙咪嗪—人血清白蛋白结合作用的毛细管区带电泳测定法[J]. 色谱, 2003, 21(2): 143-146.

[3]王相海, 王真芝, 范守成, 等. 黄连素药理研究及临床应用进展[J]. 临床荟萃, 1994, 9(10): 454.

[4]马志刚, 马秀英, 杨平荣. 我国 30 年来对小檗属药用植物的研究[J]. 甘肃科学学报, 1999, 11(1): 75-77.

[5]方云, 刘雪峰, 夏咏梅, 等. 中药黄连有效成分盐酸小檗碱与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 高等学校化学学报, 2004, 25(11): 2099-2102.

[6]傅献彩, 沈文霞, 姚天扬. 物理化学[M]. 北京: 高教出版社, 1989: 937.

(本文文献格式: 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[J]. 广东化工, 2009, 36(1): 73-76)

(上接第 12 页)

可与无机材料表面的羟基等作用, 形成氢键或化学键, 提高其与底物表面的粘接强度^[7-8]。但加入过多的硅氧烷后其水解缩聚反应增强, 导致涂膜变脆, 柔韧性、抗冲击性都随之下降。

2.5 粒径大小及分布

在 3×10^4 倍电镜下观察, 可以看出实验制备的改性水性环氧乳液粒子形状圆滑, 平均粒径为 50 nm, 处于纳米分散状态, 因此该乳液有良好的贮存稳定性, 如图 3 所示。

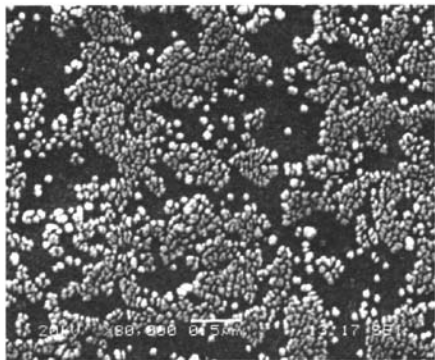


图 3 改性后水性环氧树脂乳液的扫描电镜

Fig.3 The SEM of the modified waterborne epoxy

3 结论

通过氨基硅氧烷KH-550对水性环氧丙烯酸接枝共聚物进行开环改性, 合成了有机硅改性水性环氧树脂乳液, 其粒径约 50 nm, 在水中有良好的分散性和稳定性。通过IR, SEM等测

试手段证实了该改性是化学改性, 不同于物理共混; 其树脂具有良好的成膜性和物理性能, 通过热稳定性、耐水性分析可知, 改性后的乳液涂膜具有较好的热稳定性和耐水性。解决了乳液贮存稳定性和防腐性能之间的矛盾, 具有理论价值和实际应用意义。

参考文献

[1]陈键, 施雪珍, 顾国芳. 双组份水性环氧树脂涂料[J]. 高分子通报, 2002, (6): 63-70.

[2]杨振忠, 许元泽. 环氧树脂微粒化水基化体系[J]. 高分子通报, 1997, (3): 190-194.

[3]Zhang Z Y, Huang Y H, Liao B, et al. Studies of waterborne emulsion of chemically modified epoxy resin[J]. POLYMERS FOR ADVANCED TECHNOLOGIES, 2004, (15): 26-29.

[4]刘晓东, 陈志明, 董劲. 单组分水性环氧乳液的合成研究[J]. 应用化工, 2007, 36(1): 68-71.

[5]石磊, 刘伟区, 刘艳斌, 等. 新型水性环氧树脂涂料的研制[J]. 涂料工业, 2006, 36(9): 11-14.

[6]Woo J T K, Ting V, Evans J. Synthesis and characterization of water-reducible graft epoxy epoxy copolymers[J]. J Coat Tech, 1982, 54(889): 41-55.

[7]陈丽琼, 刘杰, 李伟, 等. 乙烯基硅烷-丙烯酸酯乳液共聚动力学研究[J]. 功能高分子学报, 2003, 16(2): 166-170.

[8]Park H S, Yang I M, Wu J P, et al. Synthesis of silicone-acrylic resins and their applications to super weatherable coatings[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2001, 81: 1614-1623.

(本文文献格式: 毛晶晶, 张良均, 童身毅. 有机硅改性水性环氧树脂的合成研究[J]. 广东化工, 2009, 36(1): 10-12)