• 研究论文 •

亲和色谱法研究 β_2 -肾上腺素受体与盐酸巴马汀和盐酸药根碱的相互作用

何媛^a 姚苏洋^a 郑晓晖^b 卫引茂^{*,a}

(^a 西北大学合成与天然功能分子化学教育部重点实验室 化学与材料科学学院 西安 710069)

(^b 西北大学生命科学学院 西安 710069)

摘要 采用亲和色谱法研究了 β_2 -肾上腺素受体(β_2 -AR)与中药活性小分子盐酸巴马汀(Pa)和盐酸药根碱(Ja)的相互作用。前沿色谱法说明 Pa 与 β_2 -AR 之间存在一类结合位点, Ja 与 β_2 -AR 之间存在两类结合位点。在 pH 7.4, 25 °C 时, 用竞争洗脱法测得了 Pa 与 β_2 -AR 的结合常数为 $2.93 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 结合位点浓度为 $1.13 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Ja 在 β_2 -AR 低、高亲和位点上的结合常数分别为 1.93×10^4 和 $1.56 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 对应的结合位点浓度分别为 $1.25 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 两类结合位点数的比值为 93 : 7, 且 Pa 和 Ja 在低亲和位点上存在竞争作用。热力学研究表明, 静电力是这两种药物与 β_2 -AR 之间作用的主要驱动力。

关键词 小分子-生物大分子相互作用; 亲和色谱; β_2 -肾上腺素受体; 盐酸巴马汀; 盐酸药根碱

Investigation on the Interaction of Palmatine and Jatrorrhizine with β_2 -Adrenoceptor by High-performance Affinity Chromatography

He, Yuan^a Yao, Suyang^a Zheng, Xiaohui^b Wei, Yinmao^{*,a}

(^a Key Laboratory of Synthetic and Natural Function Molecule Chemistry of Ministry of Education, College of Chemistry & Material Science, Northwest University, Xi'an 710069)

(^b College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069)

Abstract The interaction of two bioactive components of Chinese traditional herb, palmatine (Pa) and jatrorrhizine (Ja), with β_2 -adrenoceptor (β_2 -AR) was investigated by high-performance affinity chromatography. The binding isotherms of two drugs were determined by frontal analysis, and the results showed that Pa had one kind of binding site, and Ja had two kinds of binding sites on β_2 -AR molecular. The association constants and binding sites were determined by zonal elution, at pH 7.4 and 25 °C. The association constant for Pa was $2.93 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, and the concentration of the binding sites was $1.13 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The association constants for Ja at the low and high binding sites were 1.93×10^4 and $1.56 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, and the concentration of the two binding sites were 1.25×10^{-4} and $1.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. The ratio of two binding sites was 93 : 7. It was further proved that Pa and Ja competed the low binding site on β_2 -AR. Thermodynamic results indicated that the interaction between the two drugs and β_2 -AR was mainly driven by electrostatic force.

Keywords small molecular-biopolymer interaction; β_2 -adrenoceptor; palmatine; jatrorrhizine; high-perfor-

* E-mail: ymwei@nwu.edu.cn

Received September 14, 2011; revised and accepted November 20, 2011.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 20975080 and 20875074), Program for New Century Excellent Talents in University (No. NCET-08-0892) and Chinese National Science Foundation for Talent Training (No. J0830417).

国家自然科学基金(Nos. 20975080, 20875074), 教育部新世纪优秀人才支持计划(No. NCET-08-0892)和国家基础科学人才培养基金(No. J0830417)资助项目。

mance affinity chromatography

细胞膜受体、跨膜离子通道和基于膜的药物运输蛋白是药物在体内发挥疗效的主要靶体, 药物分子与靶蛋白的结合是药物发挥药效的前提. 因此, 研究受体与药物间的相互作用对于研究药物作用机制乃至药物筛选具有重要意义^[1]. 目前, 药物与蛋白相互作用的研究方法有: 平衡透析法^[2]、光谱法^[3,4]、超滤法^[5]、核磁共振法^[6]和亲和色谱法^[7]等. 亲和色谱法能够模拟研究人体内药物与蛋白的动态结合过程, 因而在小分子药物与生物大分子相互作用研究中受到了广泛关注^[8].

G-蛋白偶联受体是细胞膜受体中的一大类, 市场上约有 50% 以上的药物是该受体的活性物质. β_2 -肾上腺素受体(β_2 -adrenoreceptor, β_2 -AR)是 G-蛋白偶联受体家族的成员之一, 主要分布于平滑肌中, 具有舒张血管、扩张支气管、松弛胃肠道平滑肌和分解肝糖元等生理学作用, 是一种重要的药物靶体^[9]. β_2 -AR 具有 G-蛋白偶联受体结构的共性, 且其分子序列结构、活性部位以及晶体结构已经比较清楚^[10], 因此成为研究 G-蛋白偶联受体的理想模型. Wainer 课题组将 β_2 -AR 吸附于磷脂膜色谱固定相表面, 用亲和色谱法研究了 CGP 12177A 和普萘洛尔与 β_2 -AR 的结合常数、结合位点, 阐明了受体对药物的选择性作用, 并证明了受体可保持其变构性^[11]. 本课题组从家兔肺组织中纯化出 β_2 -AR, 并将其固载于固定相表面上, 建立了 β_2 -AR 生物色谱模型^[11]. 用该模型从苦杏仁和黄连提取物中筛选出活性物质^[12], 研究了 β_2 -AR 与特步他林和硫酸沙丁胺醇的相互作用^[13].

中药活性成分与蛋白质的相互作用研究对于了解中药的作用机制和药物发现具有重要意义. 研究报道, 盐酸巴马汀(palmatine, Pa)和盐酸药根碱(jatrorrhizine, Ja)作为黄连、黄柏及三棵针等药用植物的活性成分(图 1), 具有抗肾上腺素等一系列的药理活性^[14], 说明这两种药物到达组织器官后, 可能会竞争性地作用于 β_2 -AR 细胞膜靶受体上. 本文拟采用 β_2 -AR 生物色谱模型, 研究中药活性成分 Pa 和 Ja 与 β_2 -AR 的相互作用, 以及当两种药物共存时, 它们与 β_2 -AR 之间的竞争作用.

图 1 Pa (a)和 Ja (b)的分子结构式

Figure 1 Chemical structure of Pa (a) and Ja (b)

1 理论

目前, 前沿色谱、竞争洗脱法和非线性色谱法是研究药物-功能蛋白相互作用的主要方法. 其中, 前两种手段最为常用, 它们主要是获取药物-蛋白结合常数和结合位点的信息. 这两个参数与药物的结构有关, 直接反映了药物与蛋白的选择性结合作用.

1.1 前沿色谱

前沿色谱是动态条件下测定溶质在固定相上吸附等温线的重要方法. 假定药物的吸附仅由蛋白的活性位点吸附所引起, 则 Langmuir 吸附模型是描述药物在固定相上吸附的最佳模型. 当蛋白在固定相表面分布均匀, 而且仅存在一类位点, 则吸附量 q 与药物浓度 C 间的关系可用单 Langmuir 吸附模型表示:

$$q = \frac{q_s b C}{1 + b C} \quad (1)$$

(1)式中, b 为吸附常数, q_s 为药物的饱和吸附容量. 如果药物在蛋白上存在两类且互不影响的作用位点, 则可以用双 Langmuir 吸附模型表示:

$$q = \frac{q_{s1} b_1 C}{1 + b_1 C} + \frac{q_{s2} b_2 C}{1 + b_2 C} \quad (2)$$

(2)式中, q_{s1} , q_{s2} 分别为第一类、第二类位点上溶质的饱和吸附容量, b_1 , b_2 分别为第一、第二类作用位点上溶质的吸附常数.

1.2 竞争置换法

竞争置换分析是以色谱法为基础、分析蛋白-药物作用的一种理论和实验方法^[15]. 包含已知浓度竞争剂 I 的流动相连续地通过配基为 L 的亲合色谱柱, 同时进样药物 A. 如果竞争剂 I 与药物 A 竞争性地与 L 上的单一位点结合, 则可用方程(3)表示 A 的容量因子 k' 与流动相中竞争剂浓度 $[I]$ 的关系为^[16]:

$$\frac{1}{k' - X} = \frac{V_m K_I [I]}{K_A m_L} + \frac{V_m}{K_A m_L} \quad (3)$$

(3)式中, V_m 为色谱系统死体积; m_L 为 L 与 A 及 I 结合的活性位点的摩尔数; K_A 和 K_I 分别是 A, I 与 L 的结合常数; X 为一个常数, 指竞争剂 I 与不参与竞争的活性位点作用产生的容量因子. 如果进样量足够小, 即满足线性洗脱条件, 则方程(3)对单竞争位点来说, $[I]$ 与 $1/(k' - X)$ 成线性关系, 据此, 可求得 K_I 值.

当溶质和竞争剂为同一种物质时, 则 $X=0$, K_A 等于

K_L , 方程(3)可简化为方程(4):

$$\frac{1}{k'} = \frac{V_m[I]}{m_L} + \frac{V_m}{K_A m_L} \quad (4)$$

(4)式中, $[I]$ 与 $1/k'$ 成线性关系, 直线斜率与截距的比值为 K_A , 斜率的倒数为活性位点的浓度 m_L/V_m .

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪, 包括二元梯度泵、二极阵列检测器和柱温箱; ZZXT-A 装柱机购自大连依利特分析仪器有限公司.

γ -氨丙基三乙氧基硅烷购自应城市德邦化工新材料有限公司; 羰基二咪唑购自美国 Sigma 公司; 硅胶(粒径 7 μm , 孔径 30 nm)购自中国科学院兰州化学物理研究所; 盐酸巴马汀和盐酸药根碱标准品购自中国药品生物制品检定所; 其他试剂皆为分析纯.

2.2 β_2 -AR 色谱柱制备

参照前文方法^[11], 从家兔肺组织中提取出 β_2 -AR, 再将其键合于硅胶表面制备 β_2 -AR 色谱柱. 首先, 氨丙基硅胶与羰基二咪唑反应, 然后与 β_2 -AR 反应, 最后用甘氨酸乙酯对固定相封尾. BCA 法测定 β_2 -AR 在硅胶上的键合量为 4.9 mg/g. 采用湿法装柱, 以 50 mmol·L⁻¹, pH 7.4 的磷酸盐溶液为匀浆液和顶替剂, 在 3.5×10^7 Pa 的压力下将 β_2 -AR 固定相和氨丙基硅胶分别装填于不锈钢空柱管中(4.6 mm i.d. $\times$ 50.0 mm, 7 μm).

2.3 Pa 及 Ja 在 β_2 -AR 生物色谱柱上吸附等温线的测定

设定色谱柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$, 以 5.0 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 0.5 mmol·L⁻¹ EDTA 和 1.0 mmol·L⁻¹ MgCl₂ 组成的流动相(pH 7.4)为 A 液, 用 A 液配制而成的 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Pa/Ja 溶液为 B 液. 首先用 A 液平衡色谱柱, 然后控制 A, B 液按一定比例混合, 以 0.5 mL·min⁻¹ 流速通过 β_2 -AR 色谱柱, 直至获得突破曲线平台. 随后用不含药物的流动相将吸附在柱上的 Pa/Ja 冲洗干净, 再增大流动相中 Pa/Ja 浓度获得另一个突破曲线. 以此类推, 可以获得一系列突破曲线. 由突破曲线计算 Pa/Ja 在 β_2 -AR 柱上的突破体积 V_D .

用上述方法, 采用 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Pa/Ja 溶液测定其在氨丙基硅胶柱上的空白突破体积 V_{blank} . 在流动相中药物浓度 C 时, 药物在 β_2 -AR 色谱柱中的吸附量 q (每克硅胶上的吸附量, $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$)用下式计算:

$$q = (V_D - V_{\text{blank}}) \times C \quad (5)$$

2.4 竞争置换分析研究 Pa 和 Ja 与 β_2 -AR 的结合作用

Pa 为竞争剂时, 取 A 液为流动相, 用 A 液配制而成的 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Pa 溶液为 B 液. 首先用 A 液平衡色谱柱 50 min, 然后控制 A, B 液按一定比例混合, 以 0.3 mL·min⁻¹ 流速通过 β_2 -AR 色谱柱, 直至流出液的紫外吸收达到平台值, 分别进样 5 μL 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Pa 与 Ja, 记录出峰时间 t_R . 系统死体积 V_0 用 NaNO₂ 溶液测定. t_R , t_0 均连续测定三次求平均值. 通过公式 $k' = (t_R - t_0)/t_0$ 计算 Pa 的容量因子. Ja 为竞争剂时容量因子的测定方法同 Pa.

2.5 热力学研究

分别在 4, 15, 25, 35 $^{\circ}\text{C}$ 的温度下, 以 Pa 为竞争剂, 分别进样 Pa 和 Ja, 测定各自的容量因子.

3 结果与讨论

3.1 Pa 及 Ja 在 β_2 -AR 柱上吸附等温线的测定

β_2 -AR 受体被固定在硅胶微球表面, 充当固体表面的吸附活性位点, 所以, β_2 -AR 受体固定相与流动相之间构成了液-固吸附体系. 但是, 固定相上除了 β_2 -AR 受体活性位点之外, 可能还残存硅胶基体本身的非特异性识别位点. 尽管该类位点对药物保留的贡献比较小, 但为了消除非特异性识别位点对吸附的影响, 用氨丙基硅胶对照柱将其影响进行扣除. 由于受体-药物作用为可逆性结合作用且具有选择性, 当固定相上活性吸附位点全部被药物占据, 吸附达到饱和. 该过程与 Langmuir 物理模型相符合, 所以, Langmuir 模型可作为药物-受体作用研究的理想模型. 尽管蛋白与药物之间的作用可能存在多位点作用, 但从现有研究结果看, 药物与 β_2 -AR 受体之间的作用一般为单位点和双位点^[12,13], 所以, 本文用单 Langmuir 和双 Langmuir 拟合, 判断 Pa 和 Ja 与 β_2 -AR 受体是否结合以及结合的位点数.

图 2 是 Pa 和 Ja 在 β_2 -AR 受体柱上的前沿突破曲线. 根据突破曲线, 用公式(5)求得药物在固定相表面的吸附量, 得到了吸附等温线(图 3). Pa 吸附等温线数据按照单、双 Langmuir 方程拟合, 拟合相关系数分别为 0.9863 和 0.9624, Ja 单、双 Langmuir 方程拟合的相关系数分别为 0.9131 和 0.9907, 显然, Pa 与 β_2 -AR 作用符合单 Langmuir 吸附模型, 而 Ja 则更符合双 Langmuir 吸附模型, 说明 Pa 和 Ja 与 β_2 -AR 作用时存在一类和二类位点.

3.2 药物- β_2 -AR 作用的竞争置换分析

竞争置换分析法不仅可测定药物与蛋白的结合常数, 而且还可以研究药物与蛋白分子的结合位点情况. 实验方案一般包括自我竞争和药物与竞争剂的直接竞

图2 Pa (a), Ja (b)在 β_2 -AR 色谱柱上的前沿突破曲线Figure 2 Frontal profile of Pa (a) and Ja (b) on immobilized β_2 -AR column

图3 Pa (a)和 Ja (b)的吸附等温线

Figure 3 Best isotherm model of Pa (a) and Ja (b) processed by non-linear regression

争分析法^[17]. 当流动相中添加的药物与进样药物相同时, 即属于药物在蛋白结合位点上的自我竞争. 当流动相中添加药物与进样药物不同时, 即属于两个药物之间在蛋白结合位点上的直接竞争.

3.2.1 Pa 和 Ja 的自我竞争

以 Pa/Ja 作为竞争剂, 进样溶质为 Pa/Ja, 即属于 Pa/Ja 的自我竞争. 在自我竞争条件下, 这两种药物的容量因子($k'_{\text{Pa-Pa}}$, $k'_{\text{Ja-Ja}}$)见表 1. 可见, Pa 和 Ja 的容量因子随流动相中竞争剂浓度的增加而减小.

在自我竞争中, 由于进样药物和竞争剂为同一物质, 故进样药物在色谱柱上无非竞争性结合位点. 因此, 根据公式 4, 以 $1/k'$ 对药物浓度作图(图 4), 可以求出结合常数和结合位点数. 从图 4a 可以看出, Pa 的容量因子倒数与流动相中 Pa 浓度之间呈现良好的线性关系, 说明 Pa 在 β_2 -AR 色谱柱上只有一类结合位点. 依据直线的斜率和截距, 求得 Pa 与 β_2 -AR 的结合常数为 $2.93 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 固定相上结合位点浓度为 $1.13 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

但是, Ja 的自我竞争曲线为非线性关系(图 4b), 说

表1 流动相中不同药物浓度时进样药物的容量因子^aTable 1 Capacity factors of injected Pa and Ja at different concentration of Pa/Ja in mobile phase^a

[Palmitine]/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	$k'_{\text{Pa-Pa}}$	$k'_{\text{Ja-Pa}}$	[Jatrorrhizine]/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	$k'_{\text{Pa-Ja}}$	$k'_{\text{Ja-Ja}}$
0.0	3.34	3.40	0.0	3.34	3.17
1.0	3.30	3.32	1.0	2.90	2.83
2.0	3.13	3.19	2.0	2.73	2.69
4.0	2.90	3.00	4.0	2.42	2.51
6.0	2.82	2.88	6.0	2.24	2.26
8.0	2.62	2.74	8.0	2.11	2.08
10.0	2.50	2.46	10.0	2.03	2.05
15.0	2.24	2.36	15.0	1.85	1.86
20.0	2.15	2.22	20.0	1.64	1.70
25.0	1.90	2.03	25.0	1.55	1.66

^a $k'_{\text{Pa-Pa}}$ 及 $k'_{\text{Ja-Pa}}$ 是当 Pa 为竞争剂, Pa 和 Ja 的容量因子. $k'_{\text{Pa-Ja}}$ 及 $k'_{\text{Ja-Ja}}$ 是当 Ja 为竞争剂, Pa 和 Ja 的容量因子.

明 Ja 在 β_2 -AR 色谱柱上至少有两类结合位点^[15], 该结果与前沿色谱法获得的结果一致. 其中, 一类是与 β_2 -AR 有低亲和力位点, 另一类是有高亲和力位点. 当低浓度

图4 Pa及Ja容量因子与流动相中药物浓度之间的关系
Figure 4 Relationships between capacity of applied Pa/Ja and the concentration of Pa and Ja in mobile phase

Ja 通过 β_2 -AR 色谱柱时(浓度范围 $0.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 至 $6.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), Ja 在低亲和力位点和高亲和力位点之间存在竞争作用. 而当高浓度的 Ja 通过 β_2 -AR 色谱柱时(浓度范围 8.0 至 $25.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 因为高亲和力位点达到饱和, 所以 Ja 只与低亲和力位点之间存在竞争作用. 根据竞争洗脱理论^[15], 首先用公式(4)研究低亲和力位点与药物的结合情况. 以高浓度区域内 Ja 的容量因子与浓度进行拟合, 发现其具有线性关系(图 4b), 依据直线的斜率和截距得到 Ja 与 β_2 -AR 的低亲和力位点的结合常数为 $1.93 \times 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$, 结合位点浓度为 $1.25 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

为了得到 Ja 与 β_2 -AR 高亲和力位点的结合作用信息, 首先需要获得高亲和力位点对容量因子的贡献. Ja 容量因子来源于低、高亲和力位点对其保留的贡献, 所以, 从 Ja 容量因子中扣除低亲和力位点的贡献, 即获得了仅由高亲和力位点引起的容量因子. 扣除的方法是先根据方程 $y = 8015.6x + 0.4156$, 计算出在含低浓度 Ja 流动相中, Ja 保留的理论值 $k'_{\text{理论}}$. 该 $k'_{\text{理论}}$ 表示 Ja 仅与低亲和力位点结合时的容量因子. 然后, 再用实验测定值 $k'_{\text{Ja-Ja}}$ (表1)减去 $k'_{\text{理论}}$, 所得数据就是高亲和力位点所提供的容量因子. 以该容量因子倒数对 Ja 的浓度作图(图 4c), 根据公式(4)得到 Ja 在高亲和力位点上的结合常数为 $1.56 \times 10^5 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$, 结合位点浓度为 $1.00 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. 以上结果说明, Ja 在 β_2 -AR 上存在低、高亲和力位点, 且这两种位点的比例为 $93:7$ ($1.25 \times 10^{-4}:1.00 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

3.2.2 直接竞争法

用直接竞争法可以判断两个药物共存时, 是否发生竞争作用. 如果发生竞争作用, 则说明两个药物作用于同一个位点(竞争性位点), 否则, 两个药物分别作用于相互独立的位点上. 首先, 用 Pa 作为竞争剂, 进样 Ja, 获得其容量因子 $k'_{\text{Ja-Pa}}$ (表 1). 由于药物和竞争剂是两种不同物质, 药物可能与 β_2 -AR 柱上其他非竞争性位点有作用, 故在公式中引入 X 修正该非竞争性作用. X 的取值采用试差法, 当 $X=0.50$ 时, 直线的线性关系最好, 证明 0.50 是 Ja 与不参加竞争的活性位点作用时产生的容量因子, $(k'_{\text{Ja-Pa}} - 0.50)$ 则是 Ja 与参加竞争的活性位点所提供的容量因子. 依据公式(3), 以 $1/(k'_{\text{Ja-Pa}} - 0.50)$ 对 Pa 浓度作图, 线性关系良好(图 5a), 说明 Pa 和 Ja 在该色谱柱上竞争同一类作用位点. 根据直线斜率, 求出 Pa 在此结合位点上的结合常数为 $3.76 \times 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$. 由于 Pa 在 β_2 -AR 上仅存在一类位点, 且在该位点上与 Ja 存在竞争, 所以, 这两个药物拥有一个共同的作用位点, 其数值应等于 Pa 作用位点浓度($1.13 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$). 利用图 5a 中 Ja 曲线的斜率及该数值, 求出 Ja 在该类位点上的结合常数为 $2.56 \times 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$. 这与自我竞争中得到的 Ja 的结合常数($1.93 \times 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$)相一致, 说明 Pa 与 Ja 在 β_2 -AR 低亲和力位点上存在竞争结合作用.

当以 Ja 为竞争剂, Pa 为进样溶质时, 采用同样方法, 也可以求得 Ja 在 β_2 -AR 竞争性位点上的结合常数. 当 $X=0.52$ 时, Pa 的 $1/(k'_{\text{Pa-Ja}} - 0.52)$ 与流动相中 Ja 的浓度成良好的线性关系(图 5b), 支持了 Pa 和 Ja 在 β_2 -AR 色谱柱上竞争同一类结合位点的结论. 根据公式(3), 求得 Ja 在 β_2 -AR 色谱柱上的结合常数为 $5.80 \times 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$, 这与以 Pa 为竞争剂的测定结果($2.56 \times 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$)一致. 通过图 5b 中 Pa 拟合曲线的斜率, 可求得 Pa 的结合常数

图 5 Ja 及 Pa 容量因子与流动相中 Pa/Ja 浓度的关系

Figure 5 Relationship between capacity of injected Ja (a) and Pa (b) with concentration of Pa/Ja in mobile phase

为 $2.17 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 这与通过图 4a 计算的结果($2.93 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$)一致. 这说明, 在直接竞争法中, 一种药物无论作为竞争剂还是进样溶质, 可以获得相似的结果.

综上所述, 根据自我竞争分析, Pa 与 β_2 -AR 作用时, 仅存在一类位点, 结合常数为 $2.93 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 结合位点浓度为 $1.13 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; Ja 与 β_2 -AR 作用存在低、高亲和力位点, 结合常数分别为 $1.93 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 和 $1.56 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$. 根据直接竞争分析, 两种药物与 β_2 -AR 作用时存在竞争关系(图 6), 即两种药物在 Ja 的低亲和位点上发生竞争性结合.

3.3 热力学研究

受体与药物之间的作用力属于分子间的弱相互作用, 包括氢键、范德华力、静电引力和疏水作用力. 对于药物与受体之间的单位点作用体系, 可依据下式计算二者结合过程中的焓变 $\Delta H^\ominus$ 、熵变 $\Delta S^\ominus$ 和吉布斯自由能变化 ΔG :

$$\ln K_a = \frac{-\Delta H^\ominus}{RT} + \frac{\Delta S^\ominus}{R} \quad (6)$$

$$\Delta G = \Delta H^\ominus - T\Delta S^\ominus \quad (7)$$

由于 Pa 和 Ja 在 β_2 -AR 上拥有共同的结合位点, 因此, 以 Pa 为竞争剂时, 分别进样 Pa 和 Ja, 测定不同温度下, Pa 和 Ja 在 β_2 -AR 竞争性作用位点的结合常数 K_a (表 2). 将 Pa 和 Ja 在该位点的 $\ln K_a$ 与 $1/T$ 用 Van't Hoff 公式(6)处理, Pa 的 $\ln K_a$ 与 $1/T$ 的关系式为 $y = 2363.8x + 2.891$, $R^2 = 0.9178$; Ja 的为 $y = 1390x + 5.6491$, $R^2 = 0.9903$. 两种药物 Van't Hoff 作图的线性回归系数皆在 0.9 以上, 说明线性关系良好, 所以, 由公式 6, 7 得到 Pa 和 Ja 与 β_2 -AR 相互作用过程的焓变分别为 -19.65 和 $-11.56 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 熵变分别为 24.04 和 $46.97 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$, 37°C 的吉布斯自由能变化分别为 -27.11

和 $-26.12 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. 通过计算可知, 37°C 时, $\Delta H^\ominus$ 对 Pa 和 Ja 与受体作用能量 ΔG 的贡献为 72.5% 和 44.2%, 说明 Pa 与 β_2 -AR 的作用过程主要受焓驱动, 而 Ja 与 β_2 -AR 的作用过程则是焓变和熵变共同推动.

通常, 热力学函数的大小及符号与蛋白和药物间的作用力类型存在下列关系: $\Delta H^\ominus > 0$ 和 $\Delta S^\ominus > 0$ 主要表现为疏水作用; 若 $\Delta H^\ominus < 0$ 和 $\Delta S^\ominus > 0$ 主要表现为静电作用; 若 $\Delta H^\ominus < 0$ 和 $\Delta S^\ominus < 0$ 主要表现为氢键或者范德华力作用^[18]. 而 Pa 和 Ja 与 β_2 -AR 作用过程中的 $\Delta H^\ominus < 0$, $\Delta S^\ominus > 0$, $\Delta G < 0$, 说明两种药物与 β_2 -AR 作用的主要驱动力为静电作用. β_2 -AR 属于 G 蛋白偶联受体家族, 其跨膜区表面带有净的负电荷, Pa 和 Ja 皆为生物碱类药物, 在流动相的中性环境下, 两者均带正电荷, 所以两药物与 β_2 -AR 之间的作用主要是静电作用力.

表 2 不同温度下 Pa 和 Ja 与 β_2 -AR 的结合常数Table 2 Association constants of Pa and Ja with the immobilized β_2 -AR at different temperatures

T/K	$K_{\text{Pa}}/(10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$K_{\text{Ja}}/(10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$
277.15	5.01	4.00
288.15	4.47	4.71
298.15	4.07	4.32
308.15	2.99	3.02

4 结论

本文采用 β_2 -AR 生物亲和色谱, 研究了中药活性成分 Pa 和 Ja 与 β_2 -AR 的相互作用. 前沿色谱法证明了 Pa 与 β_2 -AR 之间存在一类结合位点, Ja 与 β_2 -AR 之间存在两类结合位点. 竞争分析法支持了该结论, 获得了 Pa 和 Ja 与 β_2 -AR 的结合常数, 并进一步说明了 Ja 与 β_2 -AR 之间存在高、低亲和力位点, 且 Pa 和 Ja 在低亲和力位点上存在竞争. 黄连、黄柏及三棵针是中药配伍中常用的

三味药物, Pa 和 Ja 是这三种药用植物的主要活性成分. 本文的结果说明 β_2 -AR 是 Pa 和 Ja 的作用靶体, 该结论对于揭示这三味药发挥疗效的作用机制具有一定的意义, 同时, 还证明了受体生物色谱不仅可以用于判定药物在体内的作用靶点, 而且可以研究药物与受体的作用强度以及与其他药物的竞争作用. 因此, 以受体生物色谱手段研究药物与受体的相互作用对于靶向性药物的开发具有一定的借鉴作用.

References

- 1 Beigi, F.; Chakir, K.; Xiao, R. P.; Wainer, I. W. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 7187.
- 2 Eriksson, M. A. L.; Gabriellsson, J.; Nilsson, L. B. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, 38, 381.
- 3 Li, C.-X.; Liu, S.-P.; Liu, Z.-F.; Hu, X.-L. *Acta Chim. Sinica* **2011**, 69, 1408 (in Chinese).
(李翠侠, 刘绍璞, 刘忠芳, 胡小莉, 化学学报, **2011**, 69, 1408.)
- 4 He, W.-Y.; Hu, Z.-D.; Yao, X.-J.; Chen, G.-Y. *Acta Chim. Sinica* **2010**, 68, 679 (in Chinese).
(何文英, 胡之德, 姚小军, 陈光英, 化学学报, **2010**, 68, 679.)
- 5 Singh, S. S.; Mehta, J. *J. Chromatogr. B* **2006**, 834, 108.
- 6 Sarver, R. W.; Gao, H.; Tian, F. *Anal. Biochem.* **2005**, 347, 297.
- 7 Lei, G.-H.; Liu, L.-T.; Dai, X.-J.; Wei, Y.-M.; Gong, B.-L. *Acta Chim. Sinica* **2010**, 68, 55 (in Chinese).
(雷根虎, 刘丽亭, 戴小军, 卫引茂, 龚波林, 化学学报, **2010**, 68, 55.)
- 8 Hage, D. S.; Jackson, A.; Sobansky, M. R.; Schiel, J. E.; Yoo, M. J.; Joseph, K. S. *J. Sep. Sci.* **2009**, 32, 835.
- 9 Kamiya, Y.; Reynolds, C. A. *J. Mol. Struct. (Theochem)* **1999**, 469, 229.
- 10 Rasmussen, S. G. F.; Choi, H. J.; Rosenbaum, D. M.; Kobilka, T. S.; Thian, F. S.; Edwards, P. C.; Burghammer, M.; Patnala, V. R. P.; Sanishvili, R.; Fischetti, R. F.; Schertler, G. F. X.; Weis, W. I.; Kobilka, B. K. *Nature* **2007**, 450, 383.
- 11 Zheng, X.-H.; Zhao, X.-F.; Yang, R.; Wang, S.-X.; Wei, Y.-M.; Zheng, J.-B. *Chin. Sci. Bull.* **2007**, 52, 2111 (in Chinese).
(郑晓晖, 赵新锋, 杨荣, 王世祥, 卫引茂, 郑建斌, 科学通报, **2007**, 52, 2111.)
- 12 Zhao, X. F.; Nan, Y. F.; Xiao, C. N.; Zheng, J. B.; Wei, Y. M.; Zhang, Y. Y. *J. Chromatogr. B* **2010**, 878, 2029.
- 13 Zhao, X. F.; Zheng, X. H.; Wei, Y. M.; Bian, L. J.; Wang, S. X.; Zheng, J. B.; Zhang, Y. Y.; Li, Z. J.; Zang, W. J. *J. Chromatogr. B* **2009**, 877, 911.
- 14 Chen, C.; Fang, D.-C. *Chin. Pharm. Bull.* **1992**, 8, 408 (in Chinese).
(陈超, 方达超, 中国药理学通报, **1992**, 8, 408.)
- 15 Tian, R. J.; Xu, S. Y.; Lei, X. Y.; Jin, W. H.; Ye, M. L.; Zou, H. F. *Trends Anal. Chem.* **2005**, 24, 810.
- 16 Jaulmes, A.; Vifal-Madjar, C. *Adv. Chromatogr.* **1989**, 28, 1.
- 17 Kim, H. S.; Hage, D. S. *J. Chromatogr. B* **2005**, 816, 57.
- 18 Ross, D. P.; Sabramanian, S. *Biochemistry* **1981**, 20, 3096.

(A1109141 Zhao, X.)