

药物与血浆蛋白相互作用的体外研究

张晓威 赵凤林 李克安*

(北京大学化学与分子工程学院 北京 100871)

摘 要 本文对近 10 年来药物与血浆蛋白相互作用的体外研究进行了综述。介绍了人血清白蛋白(HSA)的分子结构和配体结合部位, 用于研究药物-蛋白结合的数学模型以及各种研究方法的应用特点。

关键词 药物 血浆蛋白

Progress in the Research of the Interaction between Drug and Serum Protein in vitro

ZHANG Xiaowei, ZHAO Fenglin, LI Ke'an

(College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871)

Abstract The development of the research on the interaction of drug and serum protein in vitro is reviewed. Molecular structure and the binding site of drugs, along with the mathematical model used in drug-protein binding and the characteristics of different methods, are introduced.

Key words Drug, Serum protein

许多药物与一些内源物质类似, 可以高亲和性地与血浆蛋白可逆性地结合。这种结合可以延长药物分子在血液中的寿命, 但同时也减少了具有药理活性的游离药物分子的浓度。与蛋白质结合可以起到“缓释”作用, 这对于那些在血浆中溶解度非常低的药物尤为重要。但过于紧密的结合会严重降低甚至完全抑制药物的作用。因而, 从药物动力学的角度而言, 只有在游离药物分子的浓度一直高于其治疗浓度的前提下, 药物与蛋白结合使药物在血液中的寿命延长才是有益的。

药物-蛋白相互作用在药物动力学上的重要意义, 使得这一领域的研究一直十分活跃。建立药物-蛋白结合的体外模型, 了解结合的紧密程度、结合部位、结合力、结合数等问题, 不仅对于揭示体内的药物动力学问题, 指导合理用药具有一定意义, 同时对于进行药物分子设计、开发新药, 也具有重要的指导意义。

人血清白蛋白(HSA)是人血浆中含量最为丰富的蛋白质(约 4g/100mL), 是最为重要的药物结合蛋白。人们对于药物与 HSA 结合情况已经进行了近 60 年的研究。近年来, 随着研究手段的日益发展, 测试水平的不断提高, 人们对 HSA 的结构有了进一步的认识, 从而使这方面的研究更加深入。

1 HSA 的结构

关于 HSA 结构的最早描述, 出现于 1960 年^[1], 在没有关于氨基酸序列信息的情况下, Förster

提出了白蛋白由四个功能域 (domain) 组成, 它们通过重排产生一系列结合位点。

1975 年, Meloun^[2]和 Brown 小组^[3]同时发表了完整的 HSA 氨基酸序列。HSA 是由 585 个氨基酸残基组成的一条单肽链, 分子量 66500, 其氨基酸序列包含三个相似的重复序列区域, 每个区域内还存在重复性, 在此基础上, Brown^[4]提出了 HSA 的三功能域结构, 每个功能域包含两个相似的亚域, 他认为配体的结合位置并不象 Förster 所描述的在功能域间的交界处, 而是位于每个功能域内的空穴里。早期的研究表明, HSA 的二级结构包括大约 55%的 α -螺旋和 15%的 β -折叠^[5-7], 由于长期以来, 人们一直无法得到适于作晶体衍射的 HSA 的单晶, 因而对于 HSA 的三级结构的认识, 只来自于一些间接数据, 如通过溶剂微扰实验、化学修饰以及大量的配体结合研究所得到的某些氨基酸的可接近程度。

1989 年, Carter 小组发表了 HSA 的低分辨晶体结构^[5], 并于 1990 年进行了一些修正^[6], 而后, 又于 1992 年发表了 HSA 的高分辨晶体结构^[7], 从而最终揭开了这一生物大分子的真面目。正象以前的预测一样, HSA 分子包括三个结构上相似的功能域(domain I, II, III), 每个功能域又包含两个相似的螺旋结构的亚域(subdomain A 和 subdomain B), 六个亚域聚集在一起, 形成了一个不对称的心型分子。分子有约 67%的螺旋结构, 其余则为转角及伸展肽链。每个功能域主要有 10 个螺旋结构(h1~h10), 其中 h1~h4 和 h7~h10 分别构成了亚域 A 和 B 的相似的主要部分, 亚域 A 还包括另外的两个反平行螺旋 h5 和 h6, 亚域 B 则还包括 N-端的一段伸展肽链, 亚域 IA-IB, IIA-IIB, IIIA-IIIB 间的连接, 则分别是 Lys106 至 Glu119, Glu292 至 Val315, Glu492 至 Ala511 的三段伸展肽链。整个 HSA 分子内共有 17 个二硫键, 主要分布于 α -螺旋之间, 除亚域 IA 中 h1 和 h3 间二硫键缺失外, 各亚域的二硫键分布相似, 这一点与配体结合有关, 将在本文的以后部分中提到^[7]。

另外, 由于牛血清白蛋白 (BSA) 与 HSA 的结构相似, 二者的氨基酸序列高度相似, 且不同氨基酸均为保守性替换^[4], 而 BSA 更价廉易得, 故人们常研究药物-BSA 的结合情况, 作为对 HSA 结合情况的参考。

2 药物-白蛋白结合部位

1981 年, Klaus J. Fehske^[8]指出, 药物在 HSA 上的结合部位有三个: (1)吲哚及苯二氮卓结合部位, 亦称为部位 II; (2)华法令及阿扎丙宗结合部位, 亦称为部位 I; (3)洋地黄毒甙结合部位, 亦称为结合部位 III。通过对 HSA 特定部位的氨基酸进行修饰, 研究其与药物的结合情况, 或者通过各种途径将 HSA 水解, 研究所得片断与药物的结合情况, 人们对以上三个结合部位的氨基酸组成有过一些推测, 但由于缺乏 HSA 三维结构信息而无法确定它们的确切氨基酸组成及空间结构。

1992 年, Carter 在报道 HSA 的高分辨晶体结构的同时, 也报道了几种配体与 HSA 结合的情况^[7]。他们指出 HSA 上的亚域 IIA 和 IIIA 上的疏水腔是其主要的配体结合部位。与以往的研究结果相对应, 结合部位 I 即华法令及阿扎丙宗结合部位位于亚域 IIA, 结合部位 II 即吲哚及苯二氮卓结合部位位于亚域 IIIA, 而洋地黄毒甙结合部位则被证明亦位于亚域 IIIA, 亚域 IA 由于结构上与 IIA 和 IIIA 的差别, 未能形成配体结合所需的空穴, 故没有结合活性。

在这两个主要的配体结合部位中, 亚域 IIIA 的结合能力较强。许多研究表明, 配体的羧基

在与这一部位的结合过程中具有重要意义。Rahman 等^[9]曾研究了一系列非甾体抗炎药(NSAIDs)与 HSA 的相互作用,结果表明,分子中带有羧基的 NSAIDs 结合于部位II,而无羧基的 NSAIDs 则结合于部位I; Carter 等^[7]在研究 2,3,5-三碘苯甲酸(TIB)与 HSA 结合过程中,发现分子中的羧基与 HSA 结合部位II的 Arg-257,Arg-222 和 Lys-199 具有相互作用。利用荧光探针技术, Irikura, Mitssuru 等^[10]对这一部位的结构进行了研究。他们合成了一系列 7-脂肪胺基香豆素-4-乙酸荧光配体,这些荧光配体 7-位的脂肪胺的碳链长度不同。通过比较这些荧光配体与 HSA 的结合情况,他们推出了这一部位的疏水裂隙约有 2.1~2.5nm 深,结合于此的配体距离 Trp-214 约 1.5~1.7nm。

3 数学模型

Scatchard 模型^[11]用于解释药物-HSA 结合情况,获得了很大成功,因而被广泛用于这方面的研究。它的基本内容是:定义一个平均结合数 $r = (\text{与蛋白质结合的配体浓度}) / (\text{蛋白质的总浓度})$,若配体在蛋白质上只有一类结合位点,假定 1mol 蛋白质可以结合 n mol 的配体分子,

$[L]$ 为游离配体的浓度, K 为结合常数,则由质量作用定律,可以推出 $\frac{r}{[L]} = nK - Kr$,以 $r/[L]$

对 r 作图,得到的直线称 Scatchard 线,由其斜率及截距可以求得 n 及 K 。若配体在蛋白质上存

在两种不同的结合位点,则 $r = \frac{n_1 K_1 [L]}{1 + K_1 [L]} + \frac{n_2 K_2 [L]}{1 + K_2 [L]}$,此时 $r/[L] \sim r$ 为双曲线,可以从两段直

线部分求出 n_1 、 K_1 和 n_2 、 K_2 。可以看出,利用 Scatchard 模型求取药物与蛋白的结合位点数及结合常数,关键在于确定游离药物与结合型药物的浓度。表 1 给出了近年来的一些研究结果。

4 研究方法的发展

对于药物与血浆蛋白的相互作用,传统的研究方法包括平衡透析法、超滤法和一些光谱方法。

超滤法因常需进行放射性或荧光标记而给其应用带来很大不便;平衡透析法由于需建立结合平衡,因而通常耗时较长,需几个小时甚至几天才能完成,但由于其结果可靠,故可以作为经典的参比方法。

1991 年 Houin G 等报道了将一阶导数光谱法用于药物与血浆蛋白的结合反应的研究。其原理是某一溶质吸收光谱的谱峰处,在其一阶导数光谱中为零点,此波长处的 $dA/d\lambda$ 仅依赖于溶液中其它溶质的浓度,而与该溶质的浓度无关。利用此原理,若游离态药物与结合态药物的吸收峰位置不同,则可以不经分离而在不同波长处同时测定它们的浓度,从而求得结合反应的一些参数。他们用此方法研究了甲氨喋呤^[20]和利福霉素^[23]与 HSA 的结合反应,所得到的数据与传统的平衡透析法得到的结果一致。

荧光技术在研究药物-蛋白相互作用方面,无论是定性还是定量的研究,都获得了成功。通过药物对蛋白质内源荧光的猝灭现象,确定猝灭机理及猝灭常数,可以了解药物和蛋白的作用机理和作用强度;根据能量转移机理,可以求出结合于蛋白的药物分子距蛋白中色氨酸的距离^[24,25]。另外,荧光法还是确定药物在蛋白上结合部位的最主要的方法。通过药物分子与结合部位已知的荧光探针(即标记配体)竞争蛋白结合部位,可以确定药物在蛋白质上的结合部位。

表 2 列出了药物在蛋白上结合部位的研究结果, 表 3 列出了一些常用的标记配体。

高效液相色谱 (HPLC) 技术是一种易于自动化的技术, 其分离效能非常高, 目前在药物与蛋白质结合反应的研究中应用越来越广泛, 特别是对于结合反应的立体选择性研究, 有着很大的优势。研究手性药物与 HSA 的相互作用, 通常是使用固定化 HSA 的色谱柱, 已知浓度的药物 R-和 S-异构体存在于流动相中, 通过二者竞争与 HSA 结合, 可以分别确定它们的结合常数^[21]。另外, 药物分子的疏水性常是影响其与 HSA 结合的重要因素。Kailbara, Atsunori 等^[42]应用反向高效液相色谱技术研究了一些酸性药物与蛋白的结合过程中的疏水作用, 他们定义了一个疏水性指数 r : 容量因子的对数值对甲醇-水流动相中甲醇浓度倒数的对数值作图, 斜率为 r 。测定结果表明药物的结合常数的对数值 ($\lg K$) 与 r 值有线性关系。

核磁共振 (NMR) 技术在研究药物分子的结构对其与蛋白相互作用的影响方面, 具有显著的优势。通过比较药物分子中不同原子在与蛋白质作用前后的 NMR 信号, 可以确定药物分子中参与结合反应的基团。表 4 列举了一些通过 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 所得到的结果。

人们已经发现, HSA 所结合的药物大部分为酸性及中性药物, 但也可以结合部分碱性药物。另外, 血浆中存在的另一种载体蛋白 α_1 -酸性糖蛋白 (AGG), 可以结合大部分碱性药物^[48]。在生理 pH 下, 碱性药物带正电荷, 而载体蛋白 (HSA 和 AGG) 带负电荷, 因而高效毛细管电泳 (HPCE) 技术可以用于研究碱性药物与蛋白质的结合反应。Shibuka, Akimasa 等^[49]用 HPCE 技术研究了碱性药物维拉帕米与 AGG 的相互作用, 得到了与传统方法基本一致的结果。此方法对于研究碱性药物与 HSA 的相互作用亦应适用, 但目前尚未见报道。

5 结束语

对 HSA 三级结构的清晰了解, 使得药物-蛋白相互作用的研究进入了一个新的阶段, 人们对于药物与蛋白相互作用情况的预测有了更加坚实的理论基础。这方面研究的不断深入, 对于指导临床合理用药, 以及指导新药的设计合成, 都具有重要意义。

表 1 一些药物与血浆蛋白的结合位点数及结合常数^[12-22]

药物	蛋白	n_1	K_1	n_2	K_2	研究方法
酮洛芬	HSA	3.5	3.8×10^6	14	5×10^4	圆二色性法
卡马西平	BSA	0.880	1.06×10^4			微透析和高效液相色谱法
西米替丁	HSA	4	630			超滤法
华法令	HSA	1.0	3.30×10^5	2.1	2.03×10^4	高效液相色谱法
卡洛芬	HSA	1	5.1×10^6	5-7	3.7×10^5	荧光法
		1	3.7×10^6	5-7	1.3×10^5	平衡透析法
萘普生	BSA	9.8	9.4×10^5			电位离子探针技术
保泰松	BSA	3.2	1.4×10^5			电位离子探针技术
水杨酸	BSA	2.6	1.8×10^5	21.5	1.0^4	电位离子探针技术
苯酯						
阿扎丙宗	BSA	0.5	7.8×10^5	26.3	1.9×10^4	电位离子探针技术
吲哚布芬	BSA	5.8	5.8×10^5	19.9	3.8×10^5	电位离子探针技术
舒林酸	HSA	1.4	7.6×10^6	6.6	1.7×10^6	圆二色性法
头孢替安	HSA	1.00 ± 0.14	1457 ± 352			平衡透析法
甲氨喋呤	HSA	2	3200			一阶导数光谱法
R-布洛芬	HSA	1	5.3×10^5			高效亲和色谱法
S-布洛芬	HSA	1	1.1×10^5	≥ 1	1.2×10^5	高效亲和色谱法
Sebacic Acid	HSA	1	3.69×10^4	4-5	7.14×10^2	平衡透析法

表 2 药物及体内物质在白蛋白上的结合部位^[17,27-35]

结合部位	药物或体内物质
亚域 IIA	胆红素, 阿司匹林, 华法令, 羧苄青霉素, 酮洛芬, 依托度酸
亚域 IIIA	长链脂肪酸, 阿司匹林, 地西泮, 色氨酸, 洋地黄毒甙, 氯贝丁酯, 布洛芬, 噻丙嗪, 舒洛芬, 五种巴比妥类药物, 吡洛芬, 扑尔敏

表 3 HSA 配体结合部位的标记配体^[32,36-41]

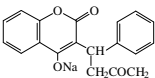
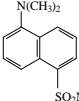
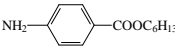
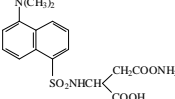
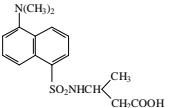
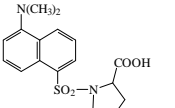
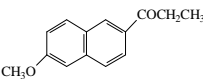
标记配体	分子结构	结合部位	$\lambda_{\text{ex}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$
华法令		亚域 IIA	320	385
DSA		亚域 IIA	340	470
p-ABE		亚域 IIA	310	346
DNSA		亚域 IIA	350	470
DS		亚域 IIIA	340	470
DNSP		亚域 IIIA	340	476
Promen		亚域 IIIA	310	445

表 4 参与药物—白蛋白结合反应的药物分子的主要基团^[43-47]

药物	蛋白	基团
布洛芬	BSA	ph
氯霉素	HSA	-CHNH ₂ -CHCl ₂ -C-NO ₂
硫唑嘌呤	BSA	咪唑环上的 Me
吲哚美辛	BSA	芳环部分

参考文献

- [1] Putnam W., The Plasma Proteins, 1st edn. (ed.), Vol.1, Oxford: Academic Press, 1960: 179.
- [2] Meloun B., Moravek L. and Kostka V.. FEBS Lett., 1975, 58: 134.
- [3] Behrens P. Q., Spiekerman A. M. and Brown J. R.. Fed. Proc., 1975, 34: 591.
- [4] Rosenoer V. M., Oratz M. and Rothschild M. A.. Albumin Structure, Function and Uses, Oxford: Pergamon Press, 1977: 27.
- [5] Carter D.C. and He Xiao-Min et al, Science, 1989, 244: 1195.
- [6] Carter D.C. and He Xiao-Min, Science, 1990, 249: 302.
- [7] He Xiao-Min and Carter D.C., Nature, 1992, 358(16): 209.

- [8] Fehske K. J., Müller W. E. and Wollert U., *Biochem. Pharmacol.* 1981, 30(7): 687.
- [9] Rahman, Mohammed Habibur et al, *Bio. Pharm. Bull.*, 1993, 16(11): 169.
- [10] Irikura, Mitssuru et al, *Chem. Pharm. Bull.*, 1991, 39(3): 724.
- [11] Scatchard G., Scheinberg I. H., Armstrong S. H. *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, 72: 535.
- [12] Russeva V. et al, *Pharmazie*, 1994, 49(7): 519.
- [13] Wang H. L., Zou H. F. and Zhang Y. K., *Chromatographia*, 1997, 44(3/4): 205 .
- [14] Wilson C. J., Bogoyevitch M. A. and Winzor D. J., *Biochem. Pharmacol.*, 1990, 40(7): 1672.
- [15] Pinkerton T. C. and Koepfinger K. A., *Anal. Chem.*, 1990, 62(19): 2114.
- [16] Rahman M. H. et al, *Biochem. Pharmacol.*, 1993, 46(10): 1721.
- [17] Angelakou A. T. et al, *J. Pharm. Sci.*, 1994, 83(8): 1150.
- [18] Russeva V. et al, *Arzneim.-Forsch.*, 1994, 44(2): 159.
- [19] Querol-Ferrer V., Zini R. and Tillement J. P., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1991, 43(12): 863.
- [20] Rochas M. A., Tufenkji. A. E. and Levillain, P. et al, *Arzneim.-Forsch.*, 1991, 41(12): 1286.
- [21] Hage D. S. et al, *J. Chromatogr. A*, 1995, 693(1): 23.
- [22] Bertuzzi A. et al, *Biochem. Pharmacol.*, 1993, 45(3): 697.
- [23] Lachau S. et al, *J. Pharm. Sci.*, 1992, 81(3): 287.
- [24] YANG Man-Man(杨曼曼), YANG Pin(杨频), ZHANG Li-Wei (张立伟), *Chinese Science Bulletin(科学通报)*, 1994, 39: 31.
- [25] ZHANG Xiao-Wei(张晓威), ZHAO Feng-Lin(赵凤林), LI Ke-An(李克安), *Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报)*, 1999, 20(7), 1063.
- [26] Gonzalez-Jimenez J., Frutos G., Cayre I. and Cortijo M., *Biochimie*, 1991, 73: 551.
- [27] Itoh and Tomoo et al, *Chirality*, 1996, 8: 201.
- [28] Dubois and Nathalie et al, *Chirality*, 1993, 5: 126.
- [29] Muller and Noelle et al, *Chirality*, 1992, 4: 240.
- [30] Mignot and Isabelle et al, *Chirality*, 1996, 8: 271.
- [31] Aubry and Anne-Francoise et al, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1995, 47: 937.
- [32] Maruyama T., Lin C. C. and Yamasaki D. et al, *Biochem. Pharmacol.*, 1993, 45: 1017.
- [33] Gonzalez-Jimenez J. et al, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1995, 47: 436.
- [34] J. Oravcova et al, *Chirality*, 1991, 3: 412.
- [35] Gonzalez-Jimenez J. et al, *Chem.-Biol. Interact.*, 1994, 91: 65.
- [36] Epps D. E., Raub T. J. and Dezdy F. J., *Analytical Biochemistry*, 1995, 227: 342.
- [37] Keishi Yamasaki, Toshimi Miyoshi and Toru Maruyama et al, *Biol. Pharm. Bull.*, 1994, 17: 1656.
- [38] Sudlow G.; Dirckx D. J. and Wade D. N., *Mol. Pharmacol.*, 1975, 11: 824.
- [39] Keishi Yamasaki; Toru Maruyama and Kori Yoshimoto et al, *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1999, 1432: 313.
- [40] Takaaki Tsuchida; Gang Zheng and Ravindra K. Pandey et al, *Photochemistry and Photobiology*, 1997, 66: 224.
- [41] Fermin Moreno and Gonzalez-Jimenez J., *Chem.-Biol. Interact.*, 1999, 121: 237.
- [42] Kailbasa A., Hirose M. and Nakagawa T., *Chem. Pharm. Bull.*, 1991, 39(3): 720.
- [43] Tanaka M. et al, *Chem. Pharm. Bull.*, 1991, 39(1): 1.
- [44] Schchipanova I. et al, *Antibiot. Khimioter*, 1995, 40(1): 8.
- [45] Panov V. et al, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 1995, 35(2): 457.
- [46] Tanaka M. et al, *Chem. Pharm. Bull.*, 1991, 39(11), 2771.
- [47] Tanaka M., Asahi Y. and Masuda S., *Polymer*, 1994, 35(7): 1512.
- [48] Josephina M. H. Kremer; Jaap Wilting and Lambert H. M. Janssen, *Pharmac. Rev.* 1988, 40(1): 1.
- [49] Shibukawa and Akimasa et al., *J. Pharm. Sci.* 1994, 83(5): 616.