chem.scichina.com



药物与细胞膜相互作用的毛细管电泳方法研究

夏之宁*, 李丽仙, 杨靖, 熊彩侨

重庆大学化学化工学院药学系, 重庆 400044

* 通讯作者, E-mail: chem lab cqu@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-01-03; 接受日期: 2009-03-03

摘要 以细胞膜在毛细管内构成假固定相,建立一种基于毛细管电泳测定药物与细胞膜相互作用参数的方法. 以西酞普兰和兔红细胞膜为相互作用模型,以不同浓度的细胞膜混悬液为电泳缓冲液,采用峰漂移法,并结合Scatchard分析,测得西酞普兰与兔红细胞膜的结合常数为 0.977 g⁻¹·L. 该方法简单、快速,为研究药物与细胞膜的相互作用提供了新的技术手段,为高通量筛选药物膜通透性和活性,以及评价药物在体内吸收提供一种新的方法.

关键词 毛细胞管电源 相互作用 结合常数

1 引言

研究药物与生物分子之间的相互作用,在医学、药学及生物学等领域具有重要的意义. 药物只有通过与人体内的各种功能蛋白、DNA 以及细胞膜等的相互作用才能够发挥它的药理药效作用. 药物与靶标的相互作用分析是很重要的,这种相互作用分析在新药研制中有三方面作用:直接用于筛选新药;用于指导设计新药;用于减少药物毒副作用. 从这类相互作用研究的发展来看,多集中于药物与细胞膜上的酶靶和受体靶方面.

细胞膜也称生物膜或质膜,是由脂类、蛋白质和糖类等组成的超分子体系.细胞膜是细胞与细胞外界环境进行物质和能量交换及信息传递的载体,药物的吸收、分布、代谢及排泄等都涉及到跨生物膜的转运.药物的生物膜通透性是药物被吸收并进入靶点发挥药理活性的前提,因此研究各类新药成分的生物膜通透性,即药物分子的生物膜转运性能,有助于新药研发初期大容量样品的快速筛选.而药物与生物膜相互作用的大小,反映了药物在细胞膜上的穿透能力.

生物色谱法(Biochromatography)于 20 世纪 80 年 代中后期出现, 曾经被用于研究药物在生物膜上的 通透性. 该方法在色谱系统中引入类生物膜结构, 以 色谱学方法仿真药物与生物膜的相互作用. Zhang等 人尝试应用脂质体电动色谱模拟生物膜与药物的相 互作用[1.2]. 但是这种类生物膜在模拟生物膜本质属 性上有所欠缺. He等人首次建立了细胞膜色谱法并用 其分析药物成分与特定的细胞膜受体之间的特异性 结合和立体性选择研究[3~6]. 关键做法是将活性组织 细胞膜固定在载体表面, 制备成细胞膜固定相. 但该 方法仍然存在测定繁琐、含膜固定相色谱柱不易制备 且耗损等问题. Yang等人通过溶胶-凝胶技术把细胞 膜涂到毛细管内壁作为假固定相研究了β-内酰胺类 药物与细胞膜的定量保留-活性关系□. 我们认为这 种做法,细胞膜依然有所附着,与生物体系、尤其是 药物转运系统, 即血液循环系统中的一些药物与生 物分子之间的相互作用仍有距离;而细胞膜附着之 后,也许存在性质的一定程度变化.

在毛细管电泳中,将不同浓度的细胞膜加入运行缓冲液中作为假固定相,测定药物与细胞膜的结

合常数尚未有详细报道.本文将细胞膜加入运行缓冲液作为假固定相,任其自由游动,可以更好地模拟机体内环境的条件,细胞膜不需附载在其他承载物或担体上,保持了其更接近于原本性能.本相互作用分析采用了毛细管电泳峰漂移法作为基础^[8-10],依据治疗抑郁药西酞普兰(Citalopram, CIT)与兔红细胞膜的相互作用进行了方法学上的研究,利用Scatchard方程回归求解两者之间的结合常数K.

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

自组装毛细管电泳仪(带有 0~30 kV 连续可调高 压直流电源; 波长连续可调的紫外-可见吸收检测器; 光电倍增管探测器); HW-2003 色谱工作站(南京千谱 软件有限公司); 石英毛细管(总长度 57 cm, 有效长 度 49 cm, 内径 100 μm, 河北永年锐沣色谱器件有限 公司); AY 120 型电子天平(岛津公司); AS 3120A 超声 波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司); TGL-16B 型台式高速离心机(上海安亭科学仪器厂), Leica DMI3000B 研究型倒置生物显微镜(天津市科学器材 公司).

三羟甲基氨基甲烷(Tris, BR, 北京奧博星生物技术有限责任公司); 柠檬酸(AR, 北京化工厂); CIT(纯度>98.5%, 重庆莱美药物技术有限公司馈赠); 丙酮(AR, 重庆川东化工集团有限公司化学试剂厂); 二甲亚砜(DMSO, AR, 成都科龙化工试剂厂).

2.2 细胞膜的制备

取兔静脉或动脉血,用 3.8%柠檬酸三钠抗凝,在台式离心机 4000 r·min^{-1} 转速下,用 $4^{\circ}\mathbb{C}$ 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl等渗液离心洗涤,弃去上清液及沉淀层表面一层白色的白细胞等物,重复洗涤 3 次. 在洗净的红细胞中,按照 1:40 的比例加入预冷的 10 mmol·L⁻¹ pH 7.4 低渗Tris-HCl 缓冲液,边加边缓慢搅拌,置于 $4^{\circ}\mathbb{C}$ 冰箱中 $1\sim2$ h,使完全溶血. 然后以7000 r·min⁻¹离心 15 min,使红细胞膜沉淀. 重复洗涤、离心 $3\sim5$ 次,得到乳白色的兔红细胞膜. 根据沉淀的细胞膜的称重,用电泳缓冲液配成不同浓度的兔红细胞膜悬浮液.

电泳前对细胞膜混悬液进行适当的小功率超声,

可避免细胞膜的聚集,使细胞膜在缓冲液中均匀分散,如图 1.

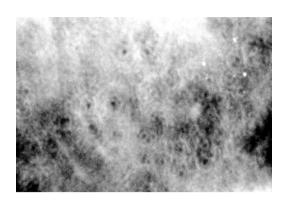


图 1 运行缓冲液中悬浮兔红细胞膜显微图像

2.3 电泳条件

运行缓冲液: 25 mmol·L⁻¹ Tris-柠檬酸盐(pH 7.4). CIT 储备液和兔红细胞膜储备液均用缓冲液配置; 实验温度: 25℃; 运行电压: 15 kV; 高差进样 5 s, 高度差均为 18 cm; 检测波长: 210, 245 nm.

新毛细管在使用前用 $0.1 \text{ mol·L}^{-1} \text{ NaOH} \times \text{H}_2\text{O}$ 各 冲洗 30 min,最后用缓冲溶液冲洗 10 min.每次电泳运行之前,依次用 $0.1 \text{ mol·L}^{-1} \text{ NaOH} \times \text{H}_2\text{O} \times$ 含有相应浓度兔红细胞膜的缓冲液冲洗毛细管 3 min,避免细胞膜吸附造成的影响.

2.4 毛细管电泳测定结合常数的方法

将荷负电的生物膜加入到缓冲液中作为"假固定相",依靠电泳及分配两种机制来影响药物的表观淌度,这类似于电动色谱.由于细胞膜的表面存在着带电的基团,使得细胞膜在电场中可以电泳迁移.细胞膜荷负电使其向电渗流相反方向迁移,形成测定所需的迁移窗口.生物膜结构作为分离过程中的主要可与药物相互作用的活性组成,决定着药物的保留.药物保留反映了药物与生物膜的作用强度,这便是用来计算膜结合常数的基础.

依据毛细管电泳相互作用常采用的峰漂移模型,按照Scatchard方程,结合常数与药物的有效淌度有以下关系[11,12]:

$$\mu_{\text{ef1}} - \mu_{\text{ef2}} = -\frac{1}{K[CM]} (\mu_{\text{ef1}} - \mu_{\text{ef2}}) + b,$$
 (1)

$$y = ax + b . (2)$$

式中: μ_{efl} 为毛细管电泳中药物在没有添加细胞膜的有效淌度, μ_{ef2} 为毛细管电泳中药物在添加不同浓度 [CM]细胞膜的有效淌度,[CM]为电泳缓冲液中添加细胞膜的不同浓度,x 为 $\frac{1}{[CM]}(\mu_{\text{efl}} - \mu_{\text{ef2}})$,y 为

$$\mu_{\text{efl}} - \mu_{\text{ef2}}, a$$
 为 $-\frac{1}{K}, K$ 为药物与细胞膜的结合常数.

依据实验结果,对方程(2)进行线性回归,便可求得药物与细胞膜的结合常数 *K*.

本文中的做法是,取适量纯的兔红细胞膜加入到pH 7.4 的 25 mmol·L⁻¹ Tris-柠檬酸盐的缓冲液中,制备成所需浓度的兔红细胞膜悬浮液. 在缓冲液中兔红细胞膜的浓度分别为 0, 1, 5, 10, 15, 20 g·L⁻¹的条件下,以 0.3 g·L⁻¹ 的CIT与 0.5 %的丙酮混合进样.以丙酮为电渗流标记物,采用峰漂移法考察CIT在不同浓度的兔红细胞膜缓冲液中与兔红细胞膜的相互作用,计算出CIT与兔红细胞膜的结合常数.

3 结果与讨论

3.1 检测波长选择

为了避免在电泳过程中细胞膜的背景吸收对药物峰的干扰,对细胞膜及药物进行紫外波长扫描.兔红细胞膜在 205~235 nm 有较强的紫外吸收,在240~300 nm 下几乎没有紫外吸收. CIT 在 200~220,230~250 nm 下都有强的紫外吸收,为了避免实验中缓冲液的背景吸收对 CIT 峰的影响,故选择 245 nm为 CIT 的检测波长.

3.2 兔红细胞膜及 CIT 荷电表征

3.2.1 兔红细胞膜的荷电表征

在pH 7.4 的 25 mmol·L⁻¹ Tris-柠檬酸盐的缓冲液, 检测波长为 210 nm下,分别以体积分数为 0.5%的二 甲亚砜、53.9 g·L⁻¹的兔红细胞膜为样品进样,通过比 较二甲亚砜、兔红细胞膜的迁移时间,来判断兔红细胞膜的荷电性.

由实验得出,二甲亚砜、兔红细胞膜的迁移时间分别为 6.806, 8.466 min. 兔红细胞膜在所在的电泳

缓冲液条件下荷负电. 兔红细胞膜与电渗流形成一 定的时间窗口.

3.2.2 CIT 荷电表征

在 245 nm 波长下,分别以 CIT、丙酮、CIT 和丙酮的混合物为样品进样.由于电渗流标记物为中性,从 CIT 出峰时间更短而知 CIT 荷正电.故在 CIT 与兔红细胞膜相互作用的实验中,在电场作用下, CIT 最先出峰,而兔红细胞膜向正极迁移,与电渗流的方向相反,但电渗流的速度要大于兔红细胞膜本身的电泳速度,所以兔红细胞膜最终也向负极迁移.在这电泳过程中,保证了细胞膜与 CIT 有充分的相互作用时间.

3.3 兔红细胞膜与 CIT 之间的结合常数测定

在pH 7.4 的 25 mmol·L⁻¹ Tris-柠檬酸盐-不同浓度 的兔红细胞膜缓冲液中,以丙酮为内标,采用峰漂移法,考察兔红细胞膜与CIT之间的相互作用,其结果如图 2. 可以发现丙酮的迁移时间基本不变,说明兔红细胞膜浓度的增加不会显著影响到丙酮的保留行为,即丙酮与缓冲液中的兔红细胞膜之间没有明显的相互作用. 在pH 7.4 的 25 mmol·L⁻¹ Tris-柠檬酸盐-不同浓度的兔红细胞膜缓冲液中,随着缓冲液中

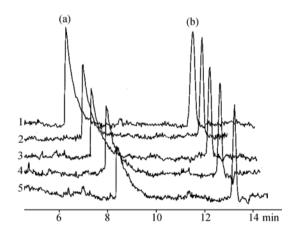


图 2 CIT与兔红细胞膜(rRBCM)相互作用电泳谱图操作条件: 电压 15 kV, 检测波长 245 nm, 运行缓冲液: 一系列浓度rRBCM的pH 7.4, 25 mmol·L⁻¹ Tris-柠檬酸盐悬浮液, rRBCM浓度(从 1~5)分别为: 1, 5, 10, 15, 20 g·L⁻¹. (a) CIT峰; (b) 丙酮峰

	The concentrations of rRBCM (g·L ⁻¹)					
	0	1	5	10	15	20
t _{acetone} (min)	6.608	11.32	13.23	13.31	13.24	13.67
$t_{\rm CIT}$ (min)	4.773	7.236	8.331	8.424	8.493	8.711
$h_{\mathrm{CIT}}(\mathrm{mV})$		6.177	4.525	4.256	4.068	3.390
$\mu_{\text{ef-CIT}} (\times 10^{-7} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$	10.83	9.276	8.277	8.115	7.859	7.753

表 1 系列浓度兔红细胞膜缓冲液中 CIT 的淌度值

兔红细胞膜浓度的增加, CIT 的迁移时间延长.

改变电泳缓冲液中兔红细胞膜浓度,得到 CIT、电渗流标记物丙酮的迁移时间,根据式(1),计算得到 CIT 在不同浓度兔红细胞膜混悬液中的有效淌度及其变化量,结果见表 1. CIT 的运行时间是以其极大峰所处的时间量测的.

由表1可以看出CIT的出峰时间随着缓冲液中兔红细胞膜浓度的增加而推迟,其有效淌度随着缓冲液中兔红细胞膜浓度的增加而减小;CIT的峰高随着缓冲液中兔红细胞膜浓度的增加而逐渐降低.表明随着缓冲液中兔红细胞膜浓度的增加,CIT与兔红细胞膜之间存在着越来越强的相互作用.

依据图 2、表 1 的实验结果,由Scatchard分析法,根据方程(1),(2),以 $x = \frac{1}{[CM]}(\mu_{efl} - \mu_{ef2})$ 为横坐标,以 $y = \mu_{efl} - \mu_{ef2}$ 为纵坐标作图,进行线性回归,便可求得CIT与兔红细胞膜的结合常数K,如图 3 所示.图 3 为当兔红细胞膜浓度单位为 $g\cdot L^{-1}$ 时的线性回归,

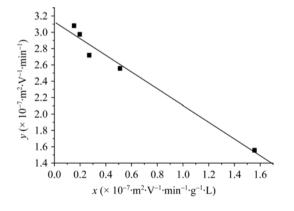


图 3 系列浓度兔红细胞膜运行缓冲液中 CIT 的 Scatchard 工作线

y = -1.023x + 3.128, R = 0.988. 根据公式求出CIT与兔红细胞膜的结合常数K = 0.977 g⁻¹·L. 细胞膜主要由脂类、蛋白质和糖类组成,以质量计,蛋白质占一定的比例. 为了便于测得的值与前人文献中CIT与其他蛋白质结合常数值的大小有半定量的比较,假设了细胞膜可参考的一个分子量约为 68000 g·mol⁻¹,可以获得 CIT 与兔红细胞膜的一个参考结合常数为 $K = 5 \times 10^4$ mol⁻¹·L. 这是一个相对不小的值,说明CIT与兔红细胞膜的相互作用是较明显的.

3.4 西酞普兰与兔红细胞膜相互作用后峰形分析

在图 2 电泳谱图中, CIT与兔红细胞膜相互作用后, 其电泳峰存在较明显的拖尾现象. 这是因为细胞膜在毛细管内构成流动性的假固定相, CIT在毛细管内不断与新的细胞膜发生相互作用形成结合物. 在相互作用形成结合物的同时, 也存在解离的过程. 而解离速率小于结合速率. 结合物和游离药物的电荷数不同, 离子半径相差较大, 两者的电泳淌度便不一致. 不断解离出来的CIT游离物就体现在拖尾的部分. 如果结合动平衡毛细管电泳[13,14], 从CIT在谱图上的拖尾现象也许可以获得一些动力学参数.

4 结论

本文建立了一种药物相互作用的细胞膜毛细管电泳方法.测定了 CIT 与兔红细胞膜的结合常数.这种方法的建立,理论上可以更好地模拟机体内生理环境,细胞膜在运行缓冲液中保持了其立体结构,保留了细胞膜的酶活性及流动性等特性,可更客观地评价药物与膜的相互作用.对今后筛选新药及研究药物的生物活性提供一种新方法.

致谢 本工作得到国家自然科学基金项目(批准号: 20775096)和重庆市自然科学基金项目(批准号: 2006BB5177)资助,特此一并致谢.

参考文献.

- 1 Zhang Y, Zhang R, Hjertén S, Lundahl P. Liposome capillary electrophoresis for analysis of interactions between lipid bilayers and solutes. Electrophoresis, 1995, 16(8): 1519—1523[DOI]
- 2 Carrozzino J M, Khaledi M G. Interaction of basic drugs with lipid bilayers using liposome electrokinetic chromatography. Pharm Res, 2004, 21(12): 2327—2335[DOI]
- 3 He L C, Yang G D, Geng X D. Enzymatic activity and chromatographic characteristics of the cell membrane immobilized on silica surface. Chinese Sci Bull, 1999, 44(9): 826—830[DOI]
- 4 He L C, Wang S C, Geng X D. Coating and fusing cell membrane onto a silica surface and their chromatographic characteristics. Chromatographia, 2001, 54(1): 71—76[DOI]
- Wang Y, Yuan B X, Deng X L, He L C, Zhang Y Y, Han Q D. The preparation of HEK293 α_{1A} or HEK293 α_{1B} cell membrane stationary phase and the chromatographic affinity study of ligands of α_1 adreneroceptor. Anal Biochem, 2005, 339(2): 198—205[DOI]
- 6 Yuan B X, Hou J, He L C, Yang G D. Evaluation of drug-muscarinic receptor affinities using cell membrane chromatography and radioligand binding assay in guinea pig jejunum membrane. Acta Pharmacol Sin, 2005, 26(1): 113—116[DOI]
- 7 Yang G L, Cao W M, Zhu T, Bai L G, Zhao Y. The QRAR model study of β-lactam antibiotics by capillary coated with cell membrane. J Chromatogr B, 2008, 873(1): 1—7[DOI]
- 8 Heegaard N H H, Hansen B E, Svejgaard A, Fugger L H. Interactions of the human class II major histocompatibility complex protein HLA-DR4 with a peptide ligand demonstrated by affinity capillary electrophoresis. J Chromatogr A, 1997, 781(1-2): 91—97[DOI]
- 9 Fraga M F, Ballestar E, Esteller M. Capillary electrophoresis-based method to quantitate DNA-protein interactions. J Chromatogr B, 2003, 789(2): 431—435[DOI]
- 10 Krylova S M, Musheev M, Nutiu R, Li Y F, Lee G, Krylov S N. Tau protein binds single-stranded DNA sequence specifically-the proof obtained *in vitro* with non-equilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures. FEBS Lett, 2005, 579(6): 1371—1375[DOI]
- Hage D S. Chromatographic and electrophoretic studies of protein binding to chiral solutes. J Chromatogr A, 2001, 906(1-2): 459—481[DOI]
- 12 Tanaka Y, Terabe S. Estimation of binding constants by capillary electrophoresis. J Chromatogr B, 2002, 768(1): 81—92[DOI]
- 13 曾礼娜, 夏之宁, 董志强, 熊彩侨. 动平衡毛细管电泳的研究进展. 化学通报, 2008, 71(5): 323—328
- 14 Xiong C Q, Xia Z N, Huang R, Chen H, Xu P. Establishment and application of a new method for the determination of kinetic parameters by plug-plug kinetic capillary electrophoresis (ppKCE). Sci China Ser B-Chem, 2008, 51(11): 1087—1092[DOI]

Investigation of interaction between the drug and cell membrane by capillary electrophoresis

XIA ZhiNing*, LI LiXian, YANG Jing & XIONG CaiQiao

Department of Pharmaceutics, College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China

Abstract: By introducing cell membrane into electrophoretic buffer as pseudo-stationary phase, a novel capillary electrophoresis method was established to explore the interaction between drugs and cell membrane, where the interaction between citalopram and rabbit red blood cell membrane was used as an example. A series of concentrations of cell membrane were suspended into the running buffer by peak-shift method. The binding constant of citalopram to rabbit red blood cell membrane of 0.977 g⁻¹·L was obtained after treatment of Scatchard plot. This method could provide not only a new way for the investigation on the interactions between drugs and cell membrane, but also a new approach for high throughput screening of the drug membrane permeability, biological activity, and evaluating drugs *in vivo*.

Keywords: capillary electrophoresis, cell membrane, interaction, binding constant