

异鼠李素-3-*O*-新橙皮糖苷与牛血清蛋白的结合及分子对接研究

戴国梁¹, 马世堂¹, 刘史佳², 孙冰婷¹, 程小桂¹, 居文政^{2*}, 谈恒山³

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210029; 2. 南京中医药大学附属医院临床药理科, 南京 210029;
3. 南京军区总医院临床药理科, 南京 210002)

[摘要] 目的: 研究异鼠李素-3-*O*-新橙皮糖苷与牛血清蛋白的相互作用。方法: 采用平衡透析法, 高效液相色谱测定异鼠李素-3-*O*-新橙皮糖苷与牛血清蛋白的结合率。采用同源建模和分子对接技术分析药物相互作用模式。结果: 异鼠李素-3-*O*-新橙皮糖苷与牛血清蛋白的最佳平衡透析时间为16 h, 异鼠李素-3-*O*-新橙皮糖苷低、中、高(2, 4, 8 mg·L⁻¹) 3个质量浓度的牛血清蛋白结合率分别为(43.23 ± 2.23)%, (45.16 ± 3.12)%, (44.71 ± 3.25)%。牛血清白蛋白同源建模和分子对接结果显示: 异鼠李素-3-*O*-新橙皮糖苷能够与牛血清白蛋白氨基酸残基形成6个氢键。结论: 异鼠李素-3-*O*-新橙皮糖苷与牛血清蛋白发生中等强度的结合。

[关键词] 异鼠李素-3-*O*-新橙皮糖苷; 牛血清; 平衡透析; 分子对接

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)14-0109-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014140109

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140528.1333.014.html>

[网络出版时间] 2014-05-28 13:33

Study of Binding and Molecular Docking Between Isorhamnetin-3-*O*-neohesperidoside and Bovine Serum Protein

DAI Guo-liang¹, MA Shi-tang¹, LIU Shi-jia², SUN Bing-ting¹,
CHENG Xiao-gui¹, JU Wen-zheng^{2*}, TAN Heng-shan³

(1. College of Pharmacy of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanjing 210029, China;
2. Department of Clinical Pharmacology, Affiliated Hospital of Nanjing University of TCM,
Nanjing 210029, China; 3. Department of Clinical Pharmacology, General Hospital
of Nanjing Military Area Command, Nanjing 210002, China)

[Abstract] **Objective:** To study the binding ratio of isorhamnetin-3-*O*-neohesperidoside with bovine serum protein *in vitro*. **Method:** Equilibrium dialysis and HPLC were employed to determine the binding rate of isorhamnetin-3-*O*-neohesperidoside and calf serum. And homology modeling and molecular docking were employed to simulate their interaction. **Result:** The balance time of dialysis was 16 hours approximately. The serum protein binding rate of isorhamnetin-3-*O*-neohesperidoside at low, middle and high concentrations (2, 4, 8 mg·L⁻¹) were (43.23 ± 2.23)%, (45.16 ± 3.12)% and (44.71 ± 3.25)%, respectively. The molecular docking showed that isorhamnetin-3-*O*-neohesperidoside was able to bind to residue of bovine serum albumin and formed six hydrogen bonds. **Conclusion:** Isorhamnetin-3-*O*-neohesperidoside has a medium extent of protein bind with bovine calf serum.

[收稿日期] 20130801(006)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09303009-002); 江苏省中医领军人才项目(LJ200906); 江苏高校优势学科建设工程项目(2010)

[第一作者] 戴国梁, 硕士, 从事中药药代动力学研究, Tel: 025-86617141-60310, E-mail: daiguoliangdgl@163.com

[通讯作者] * 居文政, 博士, 教授, 从事中药药代动力学研究, Tel: 025-86617141-60310, E-mail: wzhju333@163.com

[Key words] isorhamnetin-3-*O*-neohesperidoside; bovine calf serum; equilibrium dialysis; molecular docking

蒲黄来源于香蒲科狭叶香蒲 *Typha angustifolia* L 及东方香蒲 *T. orientalis* Presl 等多种香蒲属植物的花粉。现代药理研究表明,蒲黄具有多种活性:升高 cAMP 水平^[1]、促进体内微循环^[2]、抗凝^[3]等。蒲黄用于治疗动脉粥样硬化^[4],促进伤口愈合^[5]以及刺激体外角质形成细胞的增殖^[6]。黄酮类化合物是蒲黄中的主要活性成分,其中尤以异鼠李素-3-*O*-新橙皮糖苷和香蒲新苷作用显著^[7-9]。

目前,异鼠李素-3-*O*-新橙皮糖苷的体内药代动力学报道较少,而药物蛋白结合率是药物代谢动力学的重要参数之一,是新药临床评价中不可缺少的指标^[10],目前尚未见国内外文献有关异鼠李素-3-*O*-新橙皮糖苷蛋白结合率的报道。本实验建立了异鼠李素-3-*O*-新橙皮糖苷在牛血清及透析液中的含量测定方法,采用平衡透析法考察了异鼠李素-3-*O*-新橙皮糖苷的血清蛋白结合率,为进一步开展异鼠李素-3-*O*-新橙皮糖苷的药动力学研究提供参考,并为临床合理使用蒲黄及蒲黄的相关制剂提供依据。

1 材料

1100 高效液相色谱仪[配有 G1311A 四元泵、G1313A 自动进样器、G1316A 柱温箱、G1314A 检测器及 Chemstation(A. 10. 02)工作站,Agilent],梅特勒-托利多 AE240 型电子天平(上海梅特勒-托利多有限公司),Thermo 型冷冻离心机(美国 Thermo 公司),Millipore Driect-Q5 型超纯水机(法国 Millipore 公司),WH-2 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂),透析袋 MD25 (8 000 ~ 14 400 D, Biosharp 公司)。

异鼠李素-3-*O*-新橙皮糖苷(I-3)(实验室自制,HPLC 峰面积归一化法得纯度 > 98%),牛血清(上海楷洋生物技术有限公司)。乙二胺四乙酸二钠(东京化成工业株式会社),甲醇、乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 色谱条件

Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱(4. 6 mm × 150 mm, 5 μm),检测波长 254 nm,流速 1. 0 mL · min⁻¹,柱温 40 °C,流动相 乙腈-0. 4% 甲酸水溶液 15: 85,进样量 20 μL。

3 I-3 与血清蛋白的结合率测定

3. 1 溶液配制

3. 1. 1 空白透析液 精密称取磷酸氢二钾 14. 11 g、磷酸二氢钾 2. 59 g、氯化钠 1. 99 g 于 1 L 量瓶中,加

去离子水溶解并稀释至刻度,得 pH 7. 4 磷酸缓冲液。

3. 1. 2 I-3 系列溶液 I 精密称定 I-3 对照品 9. 0 mg,置 10 mL 量瓶中,用甲醇定容至 10 mL,得 0. 9 g · L⁻¹的 I-3 对照品贮备液。取适量贮备液用甲醇稀释成质量浓度分别为 150, 75, 50, 37. 5, 18. 75, 9. 38, 4. 69 mg · L⁻¹的对照系列溶液,用于透析内液的方法学研究。

3. 1. 3 I-3 系列溶液 II 分别精密吸取适量 I-3 对照品贮备液,取适量贮备液用空白透析液稀释成质量浓度分别为 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0. 5 mg · L⁻¹的对照系列溶液,用于透析外液的方法学研究。

3. 2 样品的预处理 精密吸取血清样品(透析内液)100 μL 到 1. 5 mL 离心管中,涡旋 30 s,加入 100 μL 10% 三氯乙酸-甲醇溶液(20: 80),涡旋 3 min,12 000 r · min⁻¹离心 15 min,吸取上清液。

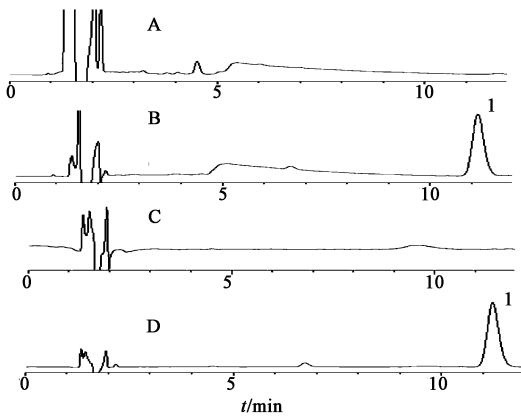
3. 3 平衡透析实验方法 半透膜袋经 1: 1 的 2% 碳酸氢钠和 1 mmol · L⁻¹ 乙二胺四乙酸二钠(EDTA)溶液煮沸处理,纯水洗净备用。将处理后的透析袋一端折叠用线结扎,将空白血清 1 mL 加入透析袋,透析袋内留一小空气泡,将透析袋另一端扎紧,使其悬浮于盛有 30 mL 透析外液的带盖玻璃瓶中,透析外液中 I-3 质量浓度分别为 2, 4, 8 mg · L⁻¹,调整透析袋的高度,使其内外液面保持同一水平,并避免透析袋贴壁,将该样品 4 °C 放置至药物扩散平衡。透析结束后,用 10% 高氯酸溶液检查透析外液是否有蛋白漏出,有漏出者该样品作废。

4 结果

4. 1 专属性 在本实验条件下,I-3 出峰时间为 11. 1 min 左右,峰形良好,空白透析液和空白血清中均无杂峰干扰测定(图 1)。

4. 2 标准曲线制备 透析内液:取空白血清 100 μL,加入 I-3 系列溶液 I 10 μL,分别配成相当于 I-3 血清质量浓度为 15, 7. 5, 5, 3. 75, 1. 88, 0. 94, 0. 47 mg · L⁻¹的模拟生物样品,按“样品的预处理”项下方法操作。以峰面积(*Y*)对其血药浓度(*X*)作图,求得回归方程: $Y = 12. 664X - 0. 678$ ($r = 0. 9997$)。结果表明,牛血清中 I-3 在 0. 47 ~ 15 mg · L⁻¹的线性关系良好,定量下限为 0. 47 mg · L⁻¹。

透析外液:取 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0. 5 mg · L⁻¹的对照系列溶液 II 20 μL 直接进样。以峰面积(*Y*)对其



A. 空白血清;B. 空白血清加 I-3;
C. 空白透析液;D. 空白透析液加 I-3; 1. I-3

图1 透析液和血清的 HPLC 色谱

表1 I-3 的日内和日间精密度($\bar{x} \pm s$)

透析内液				透析外液			
质量浓度 /mg·L ⁻¹	日内 RSD/% (n=5)	日间 RSD/% (n=15)	RE/%	质量浓度 /mg·L ⁻¹	日内 RSD/% (n=5)	日间 RSD/% (n=15)	RE/%
0.94	5.31	2.16	-4.8	0.5	5.4	2.1	-3.9
3.75	4.12	3.42	-1.2	4	3.2	4.5	-2.1
10	6.9	3.61	-5.4	8	4.9	3.1	1.8

4.4 提取回收率 配制“精密度、准确度”项下低、中、高3个浓度的 I-3 模拟血清样品,每一浓度平行6份,按“样品的预处理”项下方法处理后进样分析,峰面积记为 A;同时,另以水代替血清同法操作,峰面积记为 B。以每一浓度两种处理方法的峰面积比值(A/B)计算提取回收率,低、中、高3个浓度下 I-3 的提取回收率分别为(98.1 ± 3.2)%, (102.1 ± 5.3)%, (99.3 ± 5.5)%。

4.5 稳定性 分别考察模拟血清样品和模拟透析外液样品在 -20 ℃冻藏 14 d、预处理后室温放置和 4 ℃条件下放置的稳定性。结果表明:平衡透析液和血清样品中, I-3 在 -20 ℃冻藏 14 d、室温放置 6 h 和 4 ℃放置 24 h 均稳定。

4.6 平衡时间考察 在透析袋内以空白透析液代替血清,透析外液中 I-3 的质量浓度分别为 2, 4, 8 mg·L⁻¹ (n=3),按“平衡透析实验方法”项下方法进行实验,分别于 8, 16, 24 h 结束实验。按“样品的预处理”项下方法处理透析内液,以当日标准曲线计算透析内、外液 I-3 质量浓度,以两者质量浓度比值确定平衡时间。结果表明 16 h 时已达到平衡。

4.7 透析膜的吸附考察 参照文献[13-14]方法,考察透析膜对药物的物理吸附作用。透析平衡后 2, 4, 8 mg·L⁻¹ 的 I-3 透析膜吸附率(透析膜吸附的药物量占总药物量的百分比) (n=3) 分别为

浓度(X)作图,求得回归方程: $Y = 28.214X - 3.848$ ($r = 0.9996$)。结果表明,透析外液中 I-3 在 0.5 ~ 10 mg·L⁻¹ 的线性关系良好,定量下限为 0.5 mg·L⁻¹。

4.3 精密度、准确度 透析内液:按“标准曲线制备”项下方法配制低、中、高(0.94, 3.75, 10 mg·L⁻¹)3个质量浓度的模拟血清样品(n=5),按“样品的预处理”项下方法处理后测定,连续测定3d,考察日内、日间精密度和准确度,准确度以相对误差(RE%)。透析外液:按“I-3 系列溶液 II”项下方法重新配制低、中、高(0.5, 4, 8 mg·L⁻¹)3个质量浓度的模拟透析液样品(n=5),直接吸取 20 μL 样品进行分析,连续测定3d,考察日内、日间精密度和准确度。结果见表1。

(3.12 ± 1.78)%, (3.45 ± 1.02)%, (3.31 ± 1.31)%, 表明存在微量吸附作用,对测定结果无显著影响。

4.8 血清蛋白结合率的测定 精密移取透析内、外液 100 μL,按“样品的预处理”项下方法处理透析内液后进样分析,透析外液直接进样分析。分别测定透析袋内血清药物浓度(总浓度 D_t)和透析外液中药物浓度(游离药物浓度 D_f),根据公式:血清蛋白结合率 = (D_t - D_f)/D_t × 100% 计算 I-3 的血清蛋白结合率,结果见表2。

表2 I-3 在牛血清中的蛋白结合率($\bar{x} \pm s$) %

透析液质量 浓度/mg·L ⁻¹	蛋白结合率	RSD
2	43.23 ± 2.13	4.93
4	45.16 ± 2.54	5.62
8	44.71 ± 2.36	5.28

5 同源模建和分子对接

同源模建是一种依据模板蛋白三维结构将一级序列转成三维结构的技术,因目前尚无牛血清白蛋白(BSA)的 X 射线晶体结构,本实验选用 Maestro Prime(version 2.0)模块对其三维结构采用同源模建方法进行构建,选用人源血清白蛋白(HSA)三维晶体结构(PDB ID 1N5U),该蛋白 resolution, R-value, R-free 分别为 1.90, 0.235, 0.280, 而且 BSAA 与 HAS 两者一级氨基酸结构序列比对同源性

较高(75.77%),符合同源建模相关要求。对建模的三维结构选用拉氏 Ramachandran 图进行评价(图 2),仅有 GLY206, GLY15, GLY398, GLY247, GLY61, GLY85 和 ASP111 在白色区域(不合理区),而上述氨基酸残基距离蛋白活性口袋较远,说明建模的结果符合要求,可以应用于分子对接。分子对接依据配体与受体作用的“锁-钥原理”(lock and key principle),模拟小分子配体与受体生物大分子相互作用,本技术可较好的可以预测小分子配体与受体间的结合模式和亲和力,从而进行药物的虚拟筛选。本实验选用 Glide(version 2.0)模块研究异鼠李素-3-*O*-新橙皮糖苷与牛血清蛋白的结合模式,两者结合模式及机制详见图 3,4,由图 4 可知,两者间存在较好的结合效应(Docking score-6.840)。Glide 采用系统搜索方法进行结合位置优化,并选用半经验的自由能评价函数进行结合自由能预测,基于能量和空间匹配区分开氢键供体、氢键受体及相互作用能,羟基可与羰基形成氢键,即异鼠李素-3-*O*-新橙皮糖苷糖链上羟基和苷元上酚羟基分别于 BSA 的 LYS294, VAL292, GLU291, ASP450, SER343 形成了 6 个氢键。以上结果表明两者在实体实验及分子对接实验均显示了较好的结合效应。

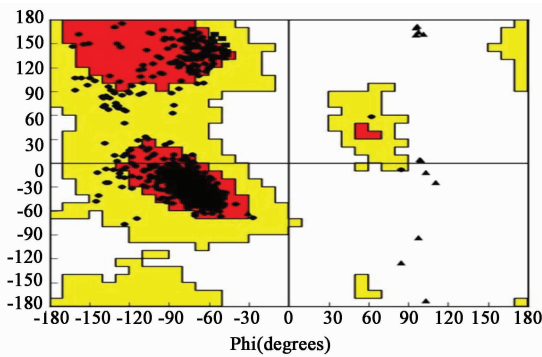
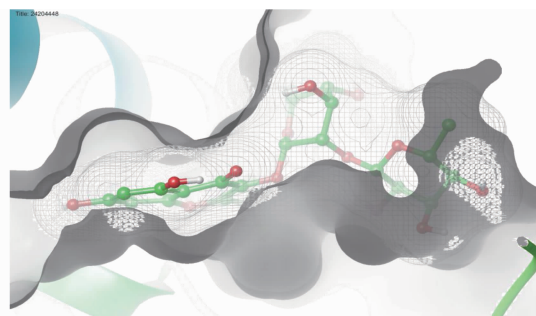
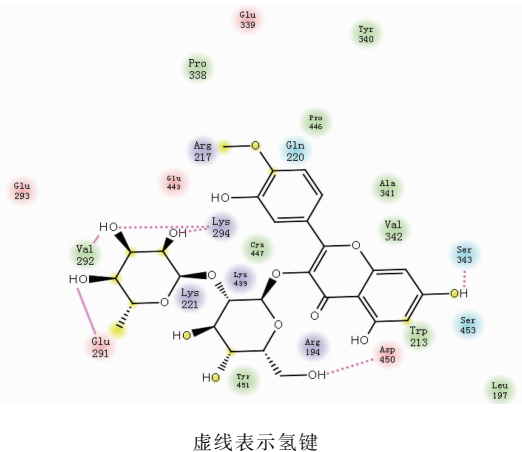


图 2 同源建模 BSA 拉氏 Ramachandran



球棍状为异鼠李素-3-*O*-新橙皮糖苷;
网格线为其分子表面;空穴为牛血清白蛋白活性口袋

图 3 异鼠李素-3-*O*-新橙皮糖苷与牛血清白蛋白结合模式



虚线表示氢键

图 4 异鼠李素-3-*O*-新橙皮糖苷
与牛血清白蛋白结合关键氨基酸残基

6 结论与讨论

异鼠李素-3-*O*-新橙皮糖苷低、中、高(2, 4, 8 mg·L⁻¹)3 个质量浓度的牛血清蛋白结合率分别为(43.23 ± 2.23)%, (45.16 ± 3.12)%, (44.71 ± 3.25)%, 同源建模和分子对接结果显示:异鼠李素-3-*O*-新橙皮糖苷能够与牛血清白蛋白氨基酸残基形成 6 个氢键。异鼠李素-3-*O*-新橙皮糖苷与牛血清发生中等强度的结合。

本文对血清中 I-3 的提取方法进行了考察:甲醇沉淀、乙腈沉淀、10% 三氯乙酸沉淀、乙酸乙酯提取、乙酸乙酯/乙醚提取,每个提取或沉淀条件考察了不同的酸化条件(加不同量的 1 mol·L⁻¹ 盐酸:10, 20, 30, 50, 100 μL)。结果发现:当用乙酸乙酯提取或乙酸乙酯/乙醚提取时,不论是否酸化样品,提取回收率均较低;当用甲醇、乙腈或 10% 三氯乙酸沉淀样品,甲醇和乙腈的回收率均较低,而 10% 三氯乙酸的回收率较高,但也只有 50% 左右。由此本文考虑使用混合蛋白沉淀剂:将 10% 三氯乙酸与甲醇按一定的比例混合使用,同时考察了不同比例(10% 三氯乙酸-甲醇 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40)与样品回收率之间的关系,发现随着甲醇比例的增加,样品中 I-3 的回收率也同步提高。在综合考虑蛋白沉淀效率和 I-3 的回收率的基础上,最终选择 10% 三氯乙酸-甲醇(20:80)处理样品,使用该方法处理后的样品,无内源性物质干扰,重复性好。

体外实验结果显示, I-3 具有中等强度的蛋白结合率,在实验浓度范围内,蛋白结合率与透析液的药物浓度无关。本实验所建立的血清和透析液中 I-3 的含量测定方法具有灵敏度高、重复性好、操作简单等优点,能够满足临床上药物分析的要求。

新穿心莲内酯在 Caco-2 细胞单层模型中的吸收机制研究

姚媛^{1*}, 廖琼峰², 谢智勇³, 曾元儿²

(1. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405; 2. 广州中医药大学中药学院, 广州 510006;
3. 中山大学药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:研究新穿心莲内酯在 Caco-2 细胞单层模型中的吸收机制。方法:通过研究新穿心莲内酯在模型中的双向转运,考察时间、药物浓度(50,75,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、温度(4,25,37 $^{\circ}\text{C}$)和抑制剂(碘乙酰胺、维拉帕米和 MK-571)对新穿心莲内酯吸收的影响。用 LC-MS-MS 检测药物浓度,计算其表观渗透系数(P_{app})。结果:新穿心莲内酯在 Caco-2 细胞模型中,随时间和浓度的增加,药物吸收呈线性增加。 $P_{\text{BA}}/P_{\text{AB}} \approx 1.0$;温度 37 $^{\circ}\text{C}$ 时, P_{app} 为 $(2.02 \pm 0.31) \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$,与 4 $^{\circ}\text{C}$ [$(5.97 \pm 0.11) \times 10^{-7} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$],25 $^{\circ}\text{C}$ [$(9.17 \pm 0.50) \times 10^{-7} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$] 比较有显著性差异($P < 0.05$);受抑制剂碘乙酰胺影响, P_{app} 为 $(4.79 \pm 0.42) \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ 与对照组新穿心莲内酯 P_{app} [$(1.28 \pm 0.69) \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$] 比较有显著性差异($P < 0.05$)。结论:新穿心莲内酯在 Caco-2 细胞中的吸收方式主要是被动转运和载体介导的主动转运。

[关键词] 新穿心莲内酯; Caco-2 细胞模型; 被动转运; 主动转运

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)14-0113-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014140113

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140513.1508.009.html>

[网络出版时间] 2014-05-13 15:08

Absorption Mechanism of Neoandrographolide in Human Caco-2 Cell Monolayer Model

YAO Yuan^{1*}, LIAO Qiong-feng², XIE Zhi-yong³, ZENG Yuan-er²

[收稿日期] 20130623(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30600823); 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09304-003, 2009ZX09501-017)

[通讯作者] *姚媛, 硕士, 从事中药药代动力学研究, Tel:020-36591443, E-mail: flyaoyuan@qq.com

[参考文献]

- [1] 姚稚明, 姚平. 蒲黄抗动脉粥样硬化作用[J]. 中草药, 1994, 25(6):324.
- [2] Qin F, Sun H X. Immunosuppressive activity of pollen Typhae, ethanol extract on the immune responses in mice[J]. J Ethnopharmacol, 2005, 102(3):424.
- [3] 刘斌, 陆蕴如, 孙建宁. 蒲黄不同炮制品药理活性的比较研究[J]. 中成药, 1998, 20(3):25.
- [4] Lee B C, Park H M, Sims H S, et al. Biological activity and chemical analysis of cattail pollens[J]. J Agric Sci, 2009, 36(7):185.
- [5] Gescher K, Deters A M. Typha latifolia L. fruit polysaccharides induce the differentiation and stimulate the proliferation of human keratinocytes *in vitro*[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 137(1):352.
- [6] Tao W W, Yang N Y, Duan J A, et al. Simultaneous determination of eleven major flavonoids in the pollen of Typha angustifolia by HPLC-PDA-MS[J]. Phytochem Anal, 2011, 22(5):455.
- [7] Zhao J, Zhang C Y, Xu D M, et al. The antiatherogenic effects of components isolated from Pollen Typhae[J]. Thromb Res, 1990, 57(6):957.
- [8] Zhao J, Zhang C Y, Xu D M, et al. Further study of Pollen Typhae's effects on the production of tPA and PGI₂ by cultured endothelial cells[J]. Thromb Res, 1989, 56(6):677.
- [9] 陈熾, 方圣鼎, 顾云龙, 等. 水烛香蒲花粉中的活性成分[J]. 中草药, 1990, 21(2):2.
- [10] 刘睿, 谢跃生, 张伯礼, 等. 药物血浆蛋白结合率测定方法的研究进展[J]. 天津中医药, 2007, 24(6):526.
- [11] 童成亮, 吴小英. 牡荆素血浆蛋白结合率的测定[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(14):2168.

[责任编辑 邹晓翠]