

等温滴定量热技术在药物研究中的应用

余丹丹, 邬瑞光*

北京中医药大学中药学院, 北京 102488

摘要: 等温滴定量热 (ITC) 技术是一项可实时、定量、在线和动态描述反应过程的热分析技术, 可给出主客体相互作用的结合常数 (association constant, K_A)、解离常数 (disassociation constant, K_D)、结合化学计量比 (stoichiometry ratio, Δn)、焓变 (enthalpy change, ΔH) 和熵变 (entropy change, ΔS) 等热力学参数。该技术具有量热灵敏度高、测量准确等优点。阐述了 ITC 技术的原理及应用特点, 从药物与蛋白之间相互作用、药物与 DNA 分子间相互作用、临床用药相容性、在药物制剂中的应用及药物与生物膜间相互作用等方面综述了 ITC 在药物研究领域中的应用进展, 并对该技术在非特异性相互作用方面的应用进行了展望。

关键词: 等温滴定量热; 热分析; 特异性相互作用; 非特异性相互作用; 热力学参数

中图分类号: R283 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)22-5463-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.22.034

Application of isothermal titration calorimetry in drug research

YU Dan-dan, WU Rui-guang

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Isothermal titration calorimetry (ITC) is a real-time, quantitative, on-line, and dynamic thermal analysis technique for describing reaction processes. Some thermodynamic parameters, such as association constant, dissociation constant, stoichiometry ratio, enthalpy change, and entropy change of host and guest interaction, can be obtained in ITC analysis. This technique has the advantages of high calorimetric sensitivity and accurate measurement. In this paper, the principle and application characteristics of ITC technology are described, and the application of this technique in drug research are reviewed, including the interaction between drugs and proteins, the interaction between drugs and DNA molecules, clinical drug compatibility, the application in pharmaceutical preparations and the interaction between drugs and biomembrane. Lastly, the application of this technique in the nonspecific molecular interaction is prospected.

Key words: isothermal titration calorimetry; thermal analysis; specificity interaction; nonspecificity interaction; thermodynamic parameters

等温滴定量热法 (isothermal titration calorimetry, ITC) 是一种微量热方法, 可通过检测样品池补偿功率的变化, 以参加反应的物质总浓度变化和反应的热量变化为函数, 并结合一定的数学模型获取热力学参数^[1-3]。一次 ITC 实验即可计算出结合常数 (association constant, K_A)、解离常数 (disassociation constant, K_D)、结合化学计量比 (stoichiometry ratio, Δn)、焓变 (enthalpy change, ΔH) 和熵变 (entropy change, ΔS) 等热力学参数^[4]。ITC 具有灵敏度高、实时在线等特点, 并且具有差热功率补偿系统, 可以快速平衡以适应连续滴定。

普通的量热方法如差热分析、差示扫描量热等只能提供反应过程的热量, 不能提供 ΔS 、 K_A 及 Δn 等重要热力学参数。本文阐述了 ITC 技术的原理及应用特点, 从药物与蛋白之间相互作用、药物与 DNA 分子间相互作用、临床用药相容性、在药物制剂中的应用及药物与生物膜间相互作用等方面综述了 ITC 在药物研究领域中的应用进展。

1 ITC 的原理及特点

1.1 ITC 的基本原理

ITC 采用功率补偿的原理, 直接测量反应的热量变化。该法需要先将量热池中的反应体系维持在恒

收稿日期: 2018-06-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81773916); 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (2017-JYB-JS-155)

作者简介: 余丹丹, 硕士研究生。E-mail: yudandan315@126.com

*通信作者 邬瑞光, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为中药制剂新技术与新剂型。E-mail: wurg@bucm.edu.cn

温状态后再进行反应和监测^[5]。ITC 有样品池和参比池(对照),二者通过绝热装置隔开,在恒定温度下,加样针以一定速度向样品池中不断滴加客体,且加样针具有搅拌功能,在客体分子滴加过程中,由于热量变化造成 2 个加样池温度差异,热敏传感器将检测到的热量差异信号传递给功率补偿装置,功率补偿装置会对样品池进行热量补偿使 2 个加样池保持温度一致。

仪器实时记录的热量信号是功率补偿信号,当功率补偿信号为正值时表示样品池中发生了吸热反应,当功率补偿信号为负值时表示样品池中发生了放热反应^[6]。根据测量出的热量峰曲线形状选择合适的模型进行数据拟合,处理后可得到反应平衡时的 K_A 、 K_D 及 ΔH ,进而计算出反应的自由能(ΔG)和 ΔS ^[7]。

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (1)$$

$$\Delta S = (\Delta H - \Delta G)/T \quad (2)$$

1.2 ITC 的特点

ITC 能直接测量反应体系中放出或吸收的热量,是研究分子间弱相互作用最有效的实验手段之一。该法适用于任何反应,且样品用量小,实验过程不破坏样品,反应时间短,不需修饰和固定化,操作简便。研究者只需设置好实验参数,如温度、注射次数、注射量即可由计算机来连续准确地检测各种热效应,并通过量热曲线记录反应的变化过程^[8]。此外其具有非特异性,即对样品的溶剂性质、光谱性质及电学性质等没有任何限制,但生物体系本身具有特异性,所以在某些情况下,这种非特异性的方法也可以得到用特异性方法得不到的结果,有助于发现新现象和新规律,特别适用于研究生物体系中的各种特异性过程^[9-11]。

虽然可以利用生物体系本身具有的特异性来弥补 ITC 的非特异性的局限,但 ITC 仍旧不适用于酶和蛋白质的特异性识别及细胞的选择性识别^[10]。除此之外,即使是非常符合测定要求的样品,若在反应中无显著的热效应,ITC 也可能无法提供有用的数据^[12]。

2 ITC 在药物研究中的应用

2.1 在药物与蛋白间相互作用研究中的应用

王文娟等^[13]采用差示扫描量热(DSC)与 ITC 联合考察不同辅料(氨基酸、糖类、非离子型表面活性剂)对蛋白药物免疫球蛋白 G1(IgG1)单抗热稳定性的影响,判断辅料与蛋白之间是否存在结

合作用,实验结果表明 IgG1 单抗与辅料之间不存在特异性相互作用。

人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)属于简单蛋白质中的一种,常被用作体外模拟研究的对象,在分子生物学、生物化学及医疗科学等领域有广泛的应用。解媛哲^[14]在研究分子模拟药物结构类似物与蛋白的相互作用时,应用 ITC 测定了 4 种生物碱与 HSA 作用时的热力学参数,结果显示 4 种生物碱中,只有茶碱和咖啡因与 HSA 有相互作用,二羟丙茶碱和多索茶碱与 HSA 无相互作用,而且茶碱、咖啡因与 HSA 的结合都属于以熵驱动为主的焓熵共同驱动过程。Mondal 等^[15]在研究间苯三酚衍生物 2,4,6-三乙酰间苯三酚(TAPG)与 HSA 的相互作用时采用 ITC 测定其相互作用热力学参数,结果显示 TAPG 与 HSA 反应时的 ΔG 为负值,且其随着体系温度的升高而降低,表明 HSA-TAPG 复合物的形成是自发过程。

王静等^[16]在测定姜黄素与热休克蛋白 90(Hsp90)的结合作用时应用 ITC 测定反应过程的热量变化,求得二者 K_A 、 ΔH 、 ΔS 及 ΔG ,依据这些数据推断姜黄素与 Hsp90 之间的相互作用主要是以氢键和疏水作用为主。

研究药物与蛋白质相互作用的机制,目前主要通过建立体外模型以研究药物与蛋白质相互作用的结合部位、结合程度及结合位点数等,这对于了解药物在体内的吸收、分布、代谢等有重要的意义^[17]。由于 ITC 在测定过程中的非特异性,测定时通常会结合一些特异性方法(如光谱学方法),共同验证实验结果的可靠性^[18-20]。

2.2 在药物与 DNA 分子间相互作用研究中的应用

王欢等^[21]利用 ITC、光谱、黏度测量等方法,研究了小牛胸腺 DNA 与抗癌药物达卡巴嗪的相互作用。结果表明,达卡巴嗪与 DNA 作用后,会出现吸收光谱增色、蓝移及黏度减小等现象。采用 ITC 法得到了结合常数以及结合位点数,发现达卡巴嗪与 DNA 以非经典嵌插式及表面作用 2 种方式结合,反应均可自发进行。第一类发生在 DNA 分子内部,结合稳定,为熵驱动为主的焓熵协同驱动过程,疏水作用是其主要驱动力;第二类发生在 DNA 分子表面,为熵驱动过程,静电相互作用是其主要驱动力。

Qais 等^[22]采用 ITC 研究头孢噻肟与小牛胸腺 DNA 的体外结合反应特点,测定结果表明二者结合生成头孢噻肟 DNA 复合物是自发过程, ΔG 为 -46.6

kcal/mol, 推断二者通过氢键形成复合物。除此之外, 头孢噻肟与小牛胸腺 DNA 只有 1 个结合位点, 且其反应亲和力常数为 2.43×10^3 mol/L。实验结果表明可以使用 ITC 结合分子光谱、分子对接技术等其他分析手段来阐明头孢噻肟与小牛胸腺 DNA 的反应机制。

DNA 是生物遗传信息的载体, 其主要功能是资讯存储, 是遗传基因的组成材料, 可以作为抗癌药物的靶标与抗癌药物发生相互作用, 故而在体外研究抗癌药物的靶标与抗癌药物的相互作用意义重大, 用 ITC 测定药物与 DNA 之间的热力学参数可以为探讨药物分子在生物体内发挥作用的机制提供数据支撑^[23]。

2.3 在临床用药相容性方面的应用

冯雪等^[24]采用 ITC 考察益气复脉冻干粉针与常用联合用药维生素 C 注射液 (Vc) 及 5% 葡萄糖注射液 (5% GS) 的相容性, 以 ΔG 、 ΔH 、 ΔS 等热力学参数判断溶合反应类型, 以反应活性谱判断反应热量变化, 辅以化学特征色谱法进行佐证。结果显示, 益气复脉冻干粉针与 Vc 溶合过程为焓驱动反应, 化学反应起主导作用; 与 5% GS 溶合过程为熵驱动反应, 物理反应起主导作用。实验结果表明益气复脉冻干粉针与 Vc 能够发生化学反应, 临床用药中应避免二者混合使用。

鄢丹等^[25]运用 ITC 建立了一种揭示中西药注射剂临床联合用药相互作用表征的新方法, 以清开灵注射液为模式药, 分别加入注射用头孢唑肟钠与 5% GS, 用 ITC 分别考察药物间相互作用, 以 ΔG 、 ΔH 、 ΔS 等热力学参数判断溶合反应类型, 通过对比不同注射剂混合前后化学指纹图谱特征信息对结果进行佐证。结果显示清开灵注射液与头孢唑肟钠滴定过程为焓驱动反应, 且释放热量较大, 提示二者之间的相互作用以化学反应为主, 内在物质发生改变。清开灵注射液与 5% GS 溶合时为熵驱动反应, 且反应活性谱显示放热较少, 提示二者间的相互作用以物理反应为主, 活性成分仅被溶解稀释, 未发生物质改变。

刘红宇等^[26]以注射用益气复脉 (冻干) 为模式药, 考察其分别与盐酸肾上腺素和 5% GS 的相容性, 以 ΔG 、 ΔH 、 ΔS 等热力学参数判断溶合反应类型, 结果表明注射用益气复脉 (冻干) 与盐酸肾上腺素滴定过程为焓驱动反应, 且释放热量较大, 提示二者之间的相互作用以化学反应为主, 内在物质

发生改变。注射用益气复脉 (冻干) 与 5% GS 溶合为熵驱动反应, 且反应活性谱显示放热较少, 提示二者之间的相互作用以物理反应为主, 活性成分仅被溶解稀释, 未发生质变。通过对比不同注射剂混合前后化学指纹图谱特征信息也得到了相同的结论。

注射剂类药品特别是中药注射剂, 由于辅料的加入使得成分复杂多样^[27-28], 而 ITC 反应时无需知道反应溶液中的全部成分即可通过参数判断反应类型, 还可以弥补无标准品、成分无紫外吸收导致的普通化学方法无法检出的缺憾, 故而 ITC 在注射剂合用及临床用药相容性评价中具有广阔的应用前景。

2.4 在药物制剂中的应用

刘荻等^[29]用 ITC 技术研究雷公藤红素微乳的最优处方, 以油酸乙酯为油相, 研究乳化剂蓖麻油聚氧乙烯醚 (ELP) 与助乳化剂正丁醇质量比分别为 1:1、1.5:1、2:1、3:1 下形成微乳时各组分的质量, 根据混合溶液与水滴定过程中的热量变化曲线得出形成微乳时水的质量, 做出 4 个比例下的伪三元相图, 最终得出雷公藤红素微乳的最优处方为油酸乙酯-ELP-正丁醇质量比 0.16:0.56:0.28。与传统的肉眼观察溶液由澄清透明变浑浊时的加水量相比, ITC 测量更加科学严谨, 而以最优处方比例配制的微乳稳定性好, 粒径符合微乳的尺度, 证明利用 ITC 技术指导雷公藤红素微乳制备具有可行性。

郑妍^[30]在儿茶素和表儿茶素与羟丙基- β -环糊精包合物在不同 pH 值缓冲溶液中的量热-谱学研究中, 应用 ITC 并结合荧光光谱法和核磁共振法得到了包合过程的化学计量比及各热力学参数, 并推测出羟丙基- β -环糊精与药物可能的包合模式。儿茶素、表儿茶素与羟丙基- β -环糊精包合过程的 ΔH 和 ΔG 均为负值, 说明为自发的放热过程。

微乳及包合物作为新型给药剂型, 不仅可以增加药物溶解度、提高药物生物利用度及减小药物毒性, 而且在肿瘤的防治、多药耐药的抵抗及靶向给药方面也有良好的应用前景^[31-32]。由 ITC 测得的一系列参数可从量热学方面表征制剂成型的可能过程, 并为制剂的工艺优化提供理论支持。

2.5 在药物与生物膜相互作用研究中的应用

研究药物与细胞膜的作用对于了解药效及改善其生物性能是极为重要的。不论药物是穿过细胞膜、

与膜中的蛋白结合,还是直接影响磷脂分子本身的结构,药物都必须首先与细胞膜发生作用^[33]。部分药物尤其是天然产物表现出广泛的活性,包括抗肿瘤、抗抑郁、抗炎症及抗菌等。机制研究表明这种活性的多样性可能是药物通过影响细胞膜的性质而表现出来的,而不是通过结合某些特定的靶标分子^[34]。因此,研究药物与膜的相互作用对于药物的药学性质优化及作用机制研究十分重要。

Moreno 等^[35]通过 ITC 技术研究非甾体抗炎药(NSAIDs)布洛芬、双氯芬酸以及萘普生与二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)磷脂膜间相互作用,发现 3 种非甾体抗炎药与 DMPC 磷脂膜滴定过程中没有明显的热效应,表明 3 种非甾体抗炎药没有插入到磷脂膜的疏水尾链区。结合 Förster 共振能量转移光谱(FRET)、傅里叶变换红外光谱(FTIR)及 DSC 等技术,认为 3 种非甾体抗炎药与 DMPC 磷脂膜的相互作用为磷脂膜中脂/水界面处的熵驱动过程。

目前市场上有大量的低分子靶向膜定位蛋白药物,如作用于受体和离子通道的大量低分子药物^[36-38],这些低分子药物可以直接或者间接与蛋白周围的脂质膜相互作用,在相互作用的过程中药物本身的功能及性质可能发生改变。因此,了解药物分子与磷脂膜相互作用的本质意义重大。

3 结语与展望

由于 ITC 技术只能得到被研究体系的宏观热性质,无法得到分子水平的微观信息,故无法单独应用于药物研究。深入全面地研究物质相互作用的本质需结合其他的分析方法如傅里叶变换红外光谱、紫外光谱、圆二色光谱等加以佐证。虽然如此,ITC 用样量少、反应速度快、灵敏度高、实时、动态在线、可定量描述反应过程等优点使其成为了一种强有力的分析手段。ITC 技术主要被应用于药物与蛋白等特异性相互作用过程,近年来也有学者开始利用 ITC 技术研究非特异性相互作用,如 Omanovic-Miklicanin 等^[39]利用 ITC 技术推断蛋白质在纳米粒子表面吸附时所呈现的结构变化。相信随着科学技术的不断进步,ITC 将会在更多的非特异性相互作用,如药物与生物膜相互作用等研究领域发挥重要的作用。

参考文献

[1] Velazquezcampoy A, Freire E. Isothermal titration calorimetry to determine association constants for

high-affinity ligands [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(3): 186-191.

- [2] Schönbeck C, Holm R, Westh P. Higher order inclusion complexes and secondary interactions studied by global analysis of calorimetric titrations [J]. *Anal Chem*, 2012, 84(5): 2305-2312.
- [3] Zhao H, Piszczek G, Schuck P. SEDPHAT—a platform for global ITC analysis and global multi-method analysis of molecular interactions [J]. *Methods*, 2015, doi: 10.1016/j.ymeth.2014.11.012.
- [4] Liang Y. Applications of isothermal titration calorimetry in protein science [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2008, 40(7): 565-576.
- [5] 齐心洁, 王 玥, 王彦晟, 等. 等温滴定量热法在蛋白质-配体相互作用中的应用 [J]. *生物技术通报*, 2017, 33(5): 40-49.
- [6] 朱志玲. 基于核酸适配体的赭曲霉毒素 ASPR 检测技术研究 [D]. 北京: 北京化工大学, 2015.
- [7] 王丽华. 微量热滴定技术的发展和运用 [J]. *实验室科学*, 2013, 16(5): 32-35.
- [8] 黄 妍, 张迎庆. 等温滴定量热法在分子印迹技术中的应用 [J]. *中国生化药物杂志*, 2016, 36(8): 153-156.
- [9] 赵志娟. 蛋白质-小分子相互作用的研究方法 [J]. *华中师范大学研究生学报*, 2014, 21(4): 155-162.
- [10] 刘 获, 曾 勤, 马 卓. 等温滴定微量热法在中药研究中的应用 [J]. *食品与药品*, 2017, 19(1): 67-70.
- [11] 彭 尚, 孙丽霞, 熊珍爱, 等. 等温滴定量热法测定酶催化反应的热力学参数 [J]. *化工进展*, 2016, 35(11): 3459-3464.
- [12] Meulen K A V, Butcher S E. Characterization of the kinetic and thermodynamic landscape of RNA folding using a novel application of isothermal titration calorimetry [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(5): 2140-2151.
- [13] 王文娟, 王炳全, 韩 军. 热力学研究辅料与蛋白药物之间的相互作用 [J]. *中国生化药物杂志*, 2015, 35(7): 5-9.
- [14] 解媛哲. 量热法及分子模拟研究药物结构类似物与蛋白的相互作用 [D]. 郑州: 郑州大学, 2015.
- [15] Mondal M, Lakshmi T P, Krishna R, et al. Molecular interaction between human serum albumin (HSA) and phloroglucinol derivative that shows selective anti-proliferative potential [J]. *J Lumin*, 2017, doi: 10.1016/j.jlumin.2017.08.007.
- [16] 王 静, 张雅雅, 刘 涛, 等. 姜黄素对 Hsp90 的结合及抑制作用 [J]. *现代肿瘤医学*, 2015, 23(1): 32-35.
- [17] 张 慧. 等温滴定量热法和荧光淬灭法测定 DPF2 与抗癌药物的结合作用 [D]. 武汉: 华中师范大学, 2016.

- [18] Neamtu S, Mic M, Bogdan M, *et al.* The artifactual nature of stavudine binding to human serum albumin. A fluorescence quenching and isothermal titration calorimetry study [J]. *J Pharm Biomed*, 2013, 72(2): 134-138.
- [19] Yong J P, Kim K H, Dong W L, *et al.* Effects of pH and protein conformation on in-solution complexation between bovine α -lactalbumin and oleic acid: Binding trend analysis by using SPR and ITC [J]. *Process Biochem*, 2015, 50(9): 1379-1387.
- [20] 李志刚. 量热法与光谱法研究小分子结构类似物与蛋白的相互作用 [D]. 郑州: 郑州大学, 2016.
- [21] 王欢, 王姣, 李宗孝, 等. ITC 研究达卡巴嗪与 DNA 反应动力学 [J]. *发光学报*, 2016, 37(12): 1560-1565.
- [22] Qais F A, Ahmad I. *In vitro* interaction of cefotaxime with calf thymus DNA: Insights from spectroscopic, calorimetric and molecular modelling studies [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, doi: 10.1016/j.jpba.2017.10.016.
- [23] 刘叶, 赵微微, 李宗孝, 等. 紫外光谱与 ITC 法研究乌头碱与粘虫 DNA 相互作用 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2018, 38(3): 851-856.
- [24] 冯雪, 鄢丹, 闫琰, 等. 基于等温滴定量热技术表征的中药注射剂临床联合用药相容性评价 [J]. *药学报*, 2011, 46(3): 322-328.
- [25] 鄢丹, 陈龙虎, 冯雪, 等. 基于等温滴定量热技术的清开灵注射液临床联合用药相互作用表征研究 [J]. *中草药*, 2012, 43(11): 2217-2221.
- [26] 刘红宇, 马丽娜, 张萍, 等. 基于等温滴定量热法的注射用益气复脉 (冻干) 临床联合用药相容性研究 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(5): 889-893.
- [27] 马静, 李学林, 唐进法. 中药注射剂的定位与特点 [J]. *中国现代中药*, 2016, 18(2): 259-262.
- [28] 张晓霞. 中药注射剂的不良反应研究进展 [J]. *中医临床研究*, 2017, 9(9): 141-142.
- [29] 刘获, 马卓. 等温滴定微量热法在雷公藤红素微乳制备中的应用 [J]. *湖北工业大学学报*, 2016, 31(5): 114-117.
- [30] 郑妍. 茶多酚类药物与载体及生物大分子相互作用的量热学-波谱学研究 [D]. 聊城: 聊城大学, 2015.
- [31] 王传邦, 刘亭亭, 牟丽秋, 等. 新型微乳载药系统的研究进展和应用前景 [J]. *中国药业*, 2016, 25(1): 5-10.
- [32] 孙家艳, 庞芳苹, 刘墨祥. 羟丙基- β -环糊精在天然药物中的应用研究进展 [J]. *中成药*, 2015, 37(2): 388-391.
- [33] Fox C B, Horton R A, Harris J M. Detection of drug-membrane interactions in individual phospholipid vesicles by confocal Raman microscopy [J]. *Anal Chem*, 2006, 78(14): 4918-4924.
- [34] 陈舟, 任丁, 朴莲花, 等. 分子动力学模拟在药物与膜相互作用研究中的应用 [J]. *北京工业大学学报*, 2017, 43(12): 1802-1810.
- [35] Moreno M M, Garidel P, Suwalsky M, *et al.* The membrane-activity of ibuprofen, diclofenac, and naproxen: A physico-chemical study with lecithin phospholipids [J]. *BBA-Biomemb*, 2009, 1788(6): 1296-1303.
- [36] Boudker O, Oh S. Isothermal titration calorimetry of ion-coupled membranetransporters [J]. *Methods*, 2015, doi: 10.1016/j.ymeth.2015.01.012.
- [37] Huang D, Zhao T, Xu W, *et al.* Sensing small molecule interactions with lipid membranes by local pH modulation [J]. *Anal Chem*, 2013, 85(21): 10240-10248.
- [38] Yasmeen S, Riyazuddeen. Biophysical insight into the binding of triprolidine hydrochloride to human serum albumin: Calorimetric, spectroscopy and molecular docking approaches [J]. *J Mol Liq*, 2017, doi: 10.1016/j.molliq.2017.02.099.
- [39] Omanovic-Miklicanin E, Manfield I, Wilkins T. Application of isothermal titration calorimetry in evaluation of protein-nanoparticle interactions [J]. *J Therm Anal Calorim*, 2017, 127(1): 605-613.