

以导数光谱法研究糖胺多糖的结合性质

樊 绘 曾

(天津医药科学研究所)

糖胺多糖 (Glycosaminoglycan, GAG) 是存在于动物结缔组织基质和细胞表面的一类聚阴离子型胞外大分子。GAG 和其他生物大分子的结合性质是研究这类多糖结构和功能的重要内容^[1]。这种结合以静电作用为基础,但也受立体化学因素的调节。GAG 与碱性染料相结合(主要借助静电引力),并引起后者减色 (Hypochromism) 和异染 (Metachromasia)^[2,3]。这一性质已在结缔组织的组化测定、GAG 药物分析和 GAG 空间结构研究等方面逐步得到应用^[4,5] Grant 最近对肝素及其解聚物异染性质与生物活性关系的研究支持了 Jaques 早先的看法: GAG 与碱性染料的结合性质还可能成为一种模型; 它可反映这类多糖与其他生物大分子的相互作用^[6,7]。

Stone 和 Jaques 分别以分光光度法研究多种 GAG 对噻嗪类染料亚甲蓝和天青 I 的导染性质^[4,7]。已知溶液中噻嗪类染料分子可显示其单位和双聚体的光谱特征 (分别为 α 和 β 谱带)^[9]。加入 GAG 后又产生新谱带,即异染带 (又称 μ 带)^[2,3]。三类吸收带彼此重叠,相互干扰。若用一般分光光度法很难显示 GAG 对三种谱带的分别影响。导数光谱法能提高分辨率,以排除光谱干扰为特点^[10]。一阶导数是光吸收变化率 $\left(\frac{dA}{d\lambda}\right)$ 对波长 λ 作图; 二阶导数光谱以 $\frac{d^2A}{d\lambda^2}$ 对 λ 作图。二阶导数光谱最小值(谷)正

是一般吸收光谱的 $\lambda_{\max}$ 。我们对噻嗪染料天青 I 溶液进行二阶导数光谱测定,显示两个分离良好的最小值,分别与其 α 、 β 谱带的 $\lambda_{\max}$ 相当。之后在相同条件下,观察各种 λ 对染料二阶导数光谱的影响。利用谷峰振幅长度比较了

多糖对 α 、 β 带吸收度的影响,而 GAG-染料复合物的异染吸收峰在二阶导数光谱中同样出现相应的最小值,并可用作图法测量谷峰振幅表示其强度。根据 α 、 β 和 μ 带特征波长的振幅变化与 μ 带波长特征,不同结构的 GAG 引起四种典型的导数光谱。

一、材料与方法

糖胺多糖 透明质酸;硫酸角质素;硫酸皮肤素;硫酸软骨素 A; 硫酸软骨素 C; 硫酸乙酰肝素; 肝素,皆由美国芝加哥大学 Mathews, B. 教授赠予。各种 GAG 理化常数参见文献^[11]。精密称量各种 GAG 配制成 4mg/ml。天青 I (生物染料,上海新中化工厂)未进一步精制,用 0.05 M 巴比土缓冲液 (pH8.6) 制成 25 μ g/ml 后暗藏备用。

GAG-天青 I 反应液二次导数光谱测定 以微量注射器吸取 2.4 μ l 或 8 μ l GAG 液放入带塞试管中,分别加入 2ml 天青 I 试液,摇匀后转入 0.5cm 光程吸收池中,以蒸馏水作参比,于 Hitachi 330 分光光度计选取 750—450 nm 扫描, $\Delta\lambda = 8$ nm, 应答时间 1sec, 扫描速度 120 nm/分,量程 ± 0.1 Abs。 D_{632} , D_{587} 和 D_{540} , D_{500} 分别为 α 、 β 和 μ 谱带特征波长振幅,系根据 680 nm—632nm, 560nm—587nm 和 510nm—540nm, 470nm—500nm 的谷峰振幅直接由刻度记录纸读数。

二、结 果

1. 天青 I 溶液的二阶导数光谱 系列浓度的天青 I 溶液二阶导数光谱皆在 632nm, 587nm 两处显示最小值。溶液浓度与 D_{632} 和 D_{587} 成正比关系。见图 1a 图 1b 为各种浓度天青 I

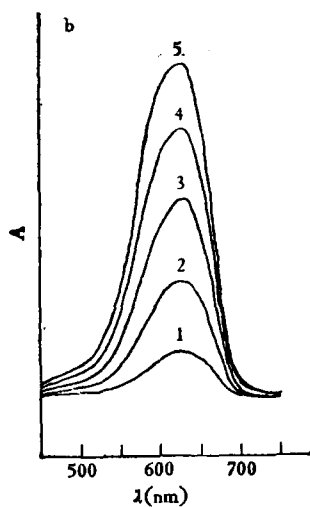
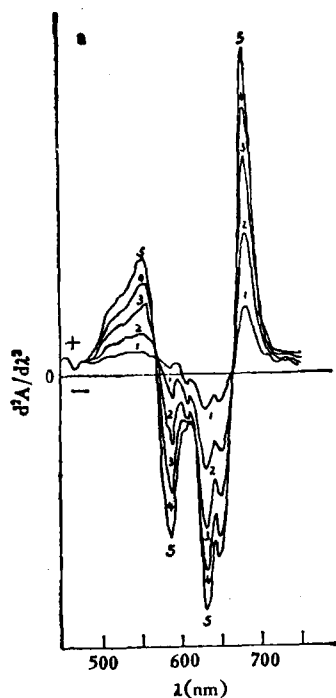


图1 天青I溶液二阶导数光谱(1a)和一般吸收光谱(1b)

1—5 的天青I溶液浓度分别为 5、10、15、20、25 μg/ml。

的一般吸收光谱(零阶导数光谱)。

由图 1a 可见,在 650 nm 处伴有另一最小值,可能为杂质的吸收峰,因其不与 GAG 作用(参见 3),故不影响测定。

2. 含乙醇和氯化钠的天青I溶液二阶导数光谱 已知在天青I溶液中,若加入乙醇或氯化钠后可分别引起染料双聚体或单体的降

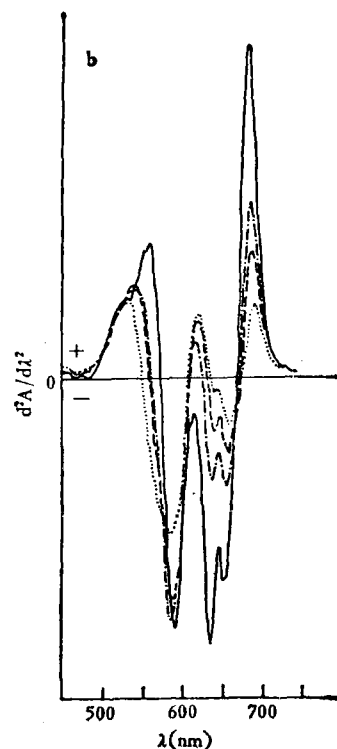
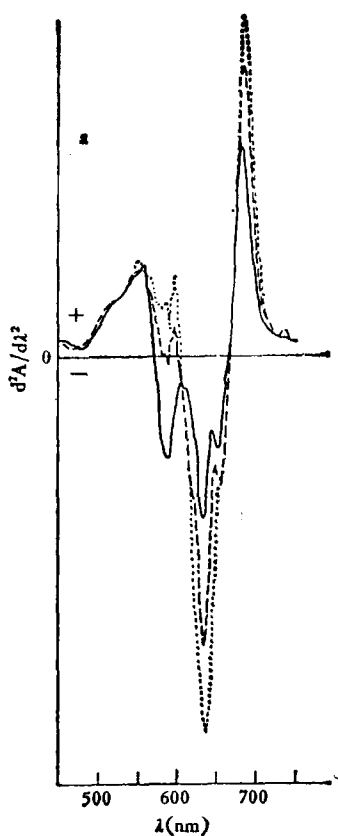


图2 乙醇和氯化钠对天青I溶液二阶导数光谱的影响

a “——” 对照天青I溶液; “----” 含 20% 乙醇天青I溶液; “.....” 含 40% 乙醇的天青I溶液。

b “——” 对照天青I溶液; “-----” 含 1M NaCl 的天青I溶液; “-----” 含 2M NaCl 天青I溶液; “.....” 含 4M NaCl 天青I溶液。

低^[9]。经我们测试，含 20% 和 40% 乙醇的天青 I 溶液， D_{632} 明显增大，同时 D_{587} 变小（图 2a，此处量程为 ± 0.15 Abs，S 其他条件不变）。又含 1，2，4M 氯化钠的天青 I 溶液， D_{632} 和

D_{587} 均变小（图 2b）。乙醇和氯化钠皆不产生新的最小值（异染峰）。实验证明 632nm 乃单单位吸收峰波长（ α 谱带）；587nm 为双聚体吸收峰波长（ β 谱带）。

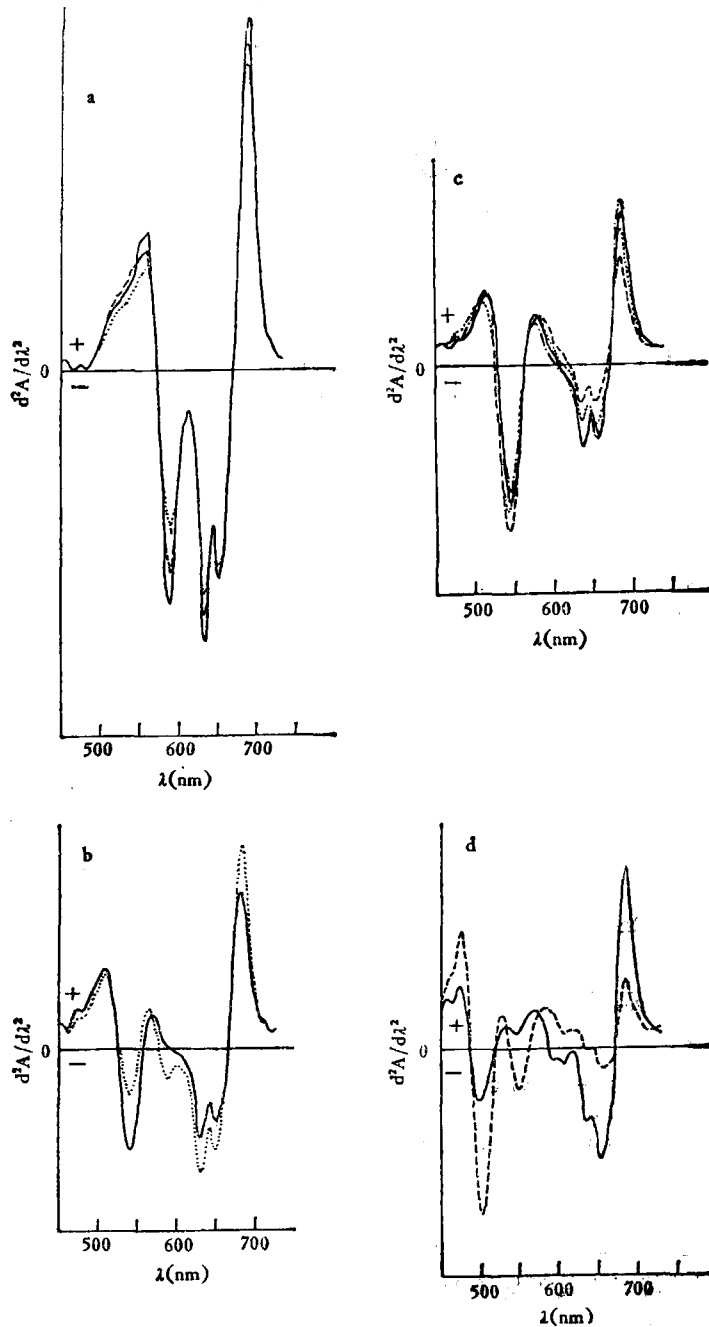


图 3 各种 GAG-天青 I 的二阶导数光谱

- a ——对照天青 I；----含 HA 8μg/ml；.....含 HA 16μg/ml。
 b含 KS 8μg/ml；——含 KS 16μg/ml；（对照天青 I 参见 a）。
 c -.-.-.-含 CSA 8μg/ml；——含 CSC 8μg/ml；.....含 HeS 8μg/ml；-----含 DS 8 μg/ml。
 d ——含 Hep 8μg/ml；-----含 Hep 8μg/ml

3. GAG-天青 I 溶液的二阶导数光谱

(1) HA-天青 I HA 在 8 或 16 $\mu\text{g/ml}$ 仅引起 D_{632} 和 D_{587} 略微降低, 光谱图形与原天青 I 溶液完全一致(图 3a)。

(2) KS-天青 I KS 在 8 $\mu\text{g/ml}$ 引起 D_{632} 和 D_{587} 变小, 并在 540 nm 处出现一新的最小值, KS 浓度为 16 $\mu\text{g/ml}$ 时, 在 587nm 处最小值消失(图 3 b)。

(3) CSA、CSC、DS 或 HeS-天青 I 四种 GAG 在 8 $\mu\text{g/ml}$ 时, 587nm 处最小值消失。 D_{632} 值 CSA, CSC > HeS > DS; 四者在 540 nm 处出现最小值, 其 D_{540} , DS > HeS > CSA, CSC (图 3c)。

(4) Hep-天青 I: 在 4 $\mu\text{g/ml}$ 时, 在 500nm 处出现新的最小值。8 $\mu\text{g/ml}$ 时, 在 540nm 处又有另一新的最小值出现 (图 3d)。按 650nm 处的最小值(由杂质引起)由于 Hep 和天青 I 单体的作用使 D_{632} 明显变小反而突出。

(5) 各种 GAG 对天青 I 三类谱带影响的二阶导数光谱测定比较: 七种 GAG 在 8 $\mu\text{g/ml}$ 时 D_{632} 、 D_{587} 、 D_{540} 和 D_{500} 振幅长度如下(表 1)。

表 1 各种 GAG 对天青 I 单体、双聚体及异染复合物特征吸收带的二阶导数光谱分析

	幅 度			
	α	β	μ	
	D_{632}	D_{587}	D_{540}	D_{500}
天青 I	13.5	8.2	0	0
HA-天青 I	11.6	6.0	0	0
KS-天青 I	7.3	1.6	2.7	0
CSA-天青 I	5.4	0	4.8	0
CSC-天青 I	5.1	0	5.0	0
HeS-天青 I	4.2	0	5.0	0
DS-天青 I	3.1	0	5.6	0
Hep-天青 I	2.0	0	1.6	6.3

三、讨 论

七种 GAG 天青 I 反应液的二阶导数光谱测定表明, 各种多糖都能引起 α 和 β 谱带吸收

(或 D_{632} 和 D_{587}) 程度不同的降低, 此即多糖的减色性; 而除 HA 外其他多糖还能引起不同波长的新最小值(μ 带), 为多糖异染性。多糖减色性及异染性与其结构成分, 特别是阴离子基团的种类和数量有关。每一个重复单位中仅含一羧基的 GAG 对染料导数光谱影响甚小, 近似稀释效应; 而代之以硫酸酯基的 KS, 减色性增强, 并具异染性(D_{540}), 唯较弱; 相同浓度下的 CSA, CSC, HeS 和 DS (它们重复单位中含羧基及硫酸酯基各一), 则 540nm 处振幅明显增大; Hep 双糖单位含一羧基和 2—3 个硫酸基(计有 O—SO₃ 和 N—SO₃ 两种) 减色性最强。由 D_{500} 、 D_{540} 振幅表明含两 μ 带, 以 D_{500} 为主。

Wollin 认为, μ 带波长愈短, 则多糖染料结合力越强^[3]。我们的实验表明, 在等浓度各种 GAG 作用下, 染料导数光谱中 α 、 β 谱带振幅长度, μ 带所在波长及其振幅长度均可反映 GAG 结合染料的强度, 其中 D_{632} 、 D_{587} 、 D_{540} 、 D_{500} 值可直接用作结合强度的比较。研究结果提示, 多糖中硫酸基是引起异染的必要条件(以 HA 与 KS 对比), 但羧基的存在与否也有很大影响(以 CSA 等和 KS 对比)。另外, 羧基在糖醛酸的立体化学位置似乎也影响它们与染料的结合性质: 含 L-艾杜糖醛酸的 DS, HeS 的减色性和异染性变化较含 D-葡萄糖醛酸的 CSA、CSC 为强。Hep-天青 I 导数光谱的特异性反映了 Hep 与染料的高度结合力, 后者既与分子中含 L-艾杜糖醛酸羧基及硫酸基有关, 还可能与阴离子基团在糖链上最适排列有关。有理由认为, Hep 多种生物医学作用和这些结构特征不无关系。如以 GAG 结合染料能力的强弱顺序和 Casu 归纳的 GAG 与血浆蛋白成分(凝血因子、脂蛋白脂酶、补体 1, 低密度脂蛋白和血小板因子)相互作用的活性顺序相比^[12], 可以看出两组结果有较好的相关性, 即 Hep > HeS, DS > CS > HA。提示, 尽管各种 GAG 对染料和各血浆成分的结合位点不同, 但仍存在某种联系。同时, 由于以导数光谱法研究多糖结合性质所需样品少, 试剂易得和结果稳定, 从而为研究 GAG 的结构活性关系提供了一种简便的方法。

参 考 文 献

- [1] Lindahl, U.: *Ann. Rev. Biochem.*, **47**, 385, 1978.
[2] Michaelis, L. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **67**, 1212, 1945.
[3] Wollin, A., et al.: *Thromb. Res.*, **2**, 377, 1973.
[4] Jaques, L. B.: *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **45**, 87, 1967.
[5] Stone, A.: *Methods in Carbohydrate Chemistry* (Whistler, R. L. ed.), **7**, 120, Acad. Press, New York, 1976.
[6] Grant, A. C.: *Anal. Biochem.*, **137**, 25, 1984.
[7] Jaques, L. B.: *Polyelectrolytes and Their Appli-*

cations (Rembaum, A. et al. ed.), 145, Reidel Pub. Co. Dordrecht Holland, 1975.

- [8] Stone, A.: *Biochem. Biophys. Acta*, **148**, 193, 1967.
[9] Rabinowitch, E. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **63**, 69, 1941.
[10] 孟怡等:《国外医学药学分册》**8**, 129, 1981.
[11] Roden, L. et al.: *Methods in Enzymology*, (Ginsburg, V. ed.) **28**, 73, Acad. Press, New York, 1972.
[12] Casu, B.: *Pharmacol. Res. Commun.*, **11**, 1, 1979.

[本文于1984年2月19日收到]

神经元空间性总和随机过程的理论分析*

曹 扬**

(蚌埠医学院, 安徽)

神经网络中的信息处理主要表现为输入一输出频率的转换, 但分析膜电位变化在频率转换过程中的作用却非常困难。频率转换具有非线性关系, 而且神经元往往同时接受多个来源的突触输入, 其输入频率可以相互独立, 相应的突触后电位(PSP)产生随机迭加。用统计学方法描述输入一输出频率转换能反映这种多突触输入来源的特点, 也避开了直接处理膜电位的非线性问题。其次, 由于实验技术上的限制使资料往往不够完全, 实验结果本身也有一定的不确定性, 这使得利用实验资料进行精确的定量分析难以实现。在这种情况下, 应用理论模型分析是有益的。

神经元的动作电位输出由阈下PSP迭加而引起。中枢神经系统中, PSP频率多在40次/秒以下^[1]。PSP的有效作用时间小于25ms(常为5—15ms)^[2], 则单个输入来源的PSP串迭加(时间性总和)实际不会发生, PSP就象一个个“量子事件”。根据这一观点, 即可建立神经元空间性总和的统计学理论模型。本文旨在建立神经元多突触输入与输出频率之间关系的统计学模型, 讨论统计学模型理论与树突神经元

模型对不同位置的突触瞬态反应^[3-5]的关系, 以及与高级神经功能有关的生理学意义。

统计学理论模型

基本假设是不同来源输入的频率 f_{in} 相互独立^[5]。其次, 与信号周期相比, PSP持续时间极短, 因此可视为瞬时过程。另外, 各来源输入的频率相对恒定。各输入突触取相同电学长度, 即从突触部位到胞体的电紧张距离一样。因此, PSP到达胞体的时间和波形相同。

在时间 T 内, 如果某一输入来源的PSP出现一次, 则 $T = \frac{1}{f_{in}}$ 。令PSP的有效持续时间

为 t_0 , 此PSP在时间 T 内出现的几率为 $\frac{t_0}{T} = t_0 f_{in}$ 。令输入通道为 n , 在所有输入频率均为 f_{in} 的情况下, PSPs在 T 内出现的几率为 m , 并且

$$m = n t_0 f_{in} \quad (1)$$

此时, 各来源输入的PSP发生迭加的几率分布

* 曾在第四届全国生物物理学学术会议上提出。

** 现在地址: 中山医学院生理学教研室, 广州。