

Heparin 과 Acridine Orange 와의 상호작용

조 종 수 · 강 성 우

전남대학교 고분자공학과

(1986년 9월 29일 접수)

Interaction between Heparin and Acridine Orange

Chong-Su Cho and Seong-Woo Kang

Dept. of Polymer Eng., Chonnam National Univ., Kwangju 505, Korea

(Received September 29, 1986)

Abstract: The interaction between heparin and acridine orange(AO) was studied by circular dichroism (CD), absorption and fluorescence spectra measurements. The strength of the dye-dye interaction (stacking tendency) between acridine orange cations bound to neighboring sites on the heparin was measured in terms of a stacking coefficient (K) and other method (β/α) derived from the spectrum of the bound dye. As the P/D molar ratio was increased, α band of AO at 492nm was decreased while β band at 470nm and γ band at 450nm were increased. The most stacking of AO was obtained at the P/D molar ratio of 25. An extrinsic optical activity was induced in the region corresponding to the absorption bands of AO when the dye became bound to the heparin. The magnitude of the molar ellipticity of heparin-AO complex was dependent on the P/D ratios. The conformational change of heparin occurred by forming complex with acridine orange.

서 론

Stryer^{1~2}은 처음으로 optical activity를 갖지 않는 acridine orange (AO) 가 polypeptide에 결합하였을 때 optical activity 가 유도됨을 보고하였으며 DNA에 결합된 AO³와 다른 여러가지 aminoacridine⁴에서도 optical activity가 유도됨이 관찰되었다. optical activity가 유도되는 것을 induced circular dichroism (ICD)이라고 하는데 ICD는 생체고분자와 저분자 물질간의 상호작용을 연구하는데 이용되고 있으며 이제까지 대부분의 ICD는 poly(L-glutamic acid) (PLGA)^{1,2}, poly(L-lysine)(PLL)^{5~7} 그리고 poly(L-arginine)등⁸의 구조변화를 연구하는데 사용되어 왔다. Hatano등⁹과 Imae등¹⁰은 AO와 결합에 의하여 PLGA가

구조변화하고 있는 것을 보고 하였으며 Fenyo등¹¹과 Nishida등¹²은 AO와 α -carboxylic poly-sulfonamide 및 cellobiose sulfate의 결합에 있어서 나타나는 ICD는 AO의 stacking에 의한 것이라고 논의하였으며 Hatano등¹³도 PLL-methylene orange(MO)계에서 같은 경향의 결과를 보고하였다. Bradley등¹⁴과 Lifson¹⁵은 생체고분자와 AO의 상호작용에 수반하는 흡수 spectrum 변화를 유도된 이론식에 의하여 해석하여 고분자에서 염료-염료 상호작용을 나타내는 stacking coefficient를 산출하였으며 宗田등¹⁶도 같은 방법으로 PSSK와 malachite green이나 crystal violet의 결합상태를 해석하기 위하여 UV spectrum을 이용 하였다. Bradley등¹⁴에 의하면 고분자 전해질에 염료가 결합시의 stacking 현상은 아래 나타난 Fig.1과

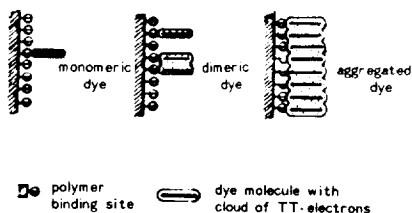


Fig. 1. Diagram of dye stacking on polymer.

같다.

본 연구는 생체고분자가 가지고 있는 binding site에서의 부분적인 구조를 알아내기 위한 수단으로서 생체고분자 중에서 항혈액응고 작용을 하는 heparin의 구조를 더욱 명백히 하기 위하여 optical activity를 갖지않는 염료의 일종인 AO가 heparin과 결합하였을때 염료의 stacking에 의하여 유도되는 ICD를 P/D에 따라서 stacking coefficient를 산출하여 비교하였으며 형광 spectra로 stacking현상을 확인하였고, 염료의 결합으로 heparine의 2차구조¹⁷의 영향도 아울러 검토하였다.

실 험

시약 및 시료 : KH_2PO_4 와 Na_2HPO_4 는 日本和光제품의特級試藥을 그대로 사용하였다. heparin은 15,000의 분자량을 갖는 Diosynth 社의 porcine intestinal mucosal heparin을 사용하였으며 biological activity는 160u/mg 이었다. acridine orange (AO)는 동경농공대학의 Nishida 교수가 제공한 것을 사용하였다.

실험방법 : pH조절은 Sørensen의 buffer solution을 사용하여 pH=6.98로 조절되었다. 자외선 흡수 스펙트럼은 Varian Super Scan 3으로 측정하였다. 형광스펙트럼은 Perkin-Elmer社의 Luminescence LS-5 Spectrometer로 측정하였다. circular dichroism은 日本 JASCO 500-A Model 1을 사용하여 측정하였으며 10mm 석영 cell이 사용되었다.

결과 및 고찰

Heparin-AO복합체의 자외선 흡수 스펙트라 :

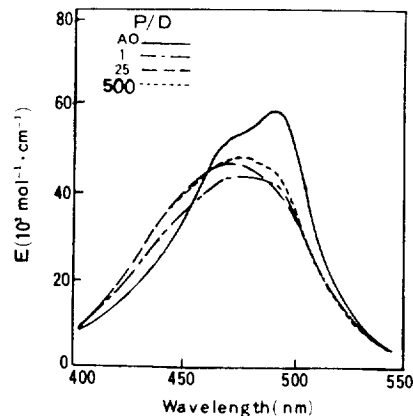


Fig. 2. Absorption spectra of heparin-AO complex as a function of P/D ratio at pH=6.98. $[\text{AO}] = 2 \times 10^{-5} \text{ M}$.

Fig.2에 pH6.98(중성영역)의 buffer solution에서 heparin과 acridine orange(AO) 복합체의 자외선 흡수 스펙트라를 AO의 흡수영역에서 나타냈다. heparin과 염료의 농도비인 P/D가 증가할수록 492nm의 α -band (monomeric AO)⁹가 점차 감소하면서 470nm의 β -band (dimeric AO)⁹와 450nm의 γ -band (aggregated AO)⁹로 점차 blue shift하는 것을 알 수 있었다. 염료에 고분자 전해질이 첨가됨에 따라 염료의 흡수 스펙트럼이 단파장으로 이동하는 것을 metachromasia라고 하는데¹⁸ 이는 염료의 hydrophobic한 성질에 의한 염료-염료 상호작용에 의하여 나타나는 것으로서 heparin-AO계에서는 P/D=25에서 가장 많은 염료-염료 상호작용이 일어나나 그 이상의 heparin이 첨가된 상태에서는 흡수 스펙트럼이 α -band로 다시 전환됨을 알 수 있었다. 이는 heparin의 binding site가 아주 많이 존재하게 되면 stacking 되었던 염료가 재분배가 일어나 염료의 stacking이 감소하기 때문이라 생각되는데 이것은 Shirai등¹⁹이 보고한 것과 같은 경향을 나타내었다.

Heparin-AO 복합체의 Induced CD(ICD) : Fig. 3은 P/D비율에 따른 induced circular dichroism (ICD) 변화를 나타낸 것으로 AO단독에서는 optical activity를 갖고 있지 않아서 CD spec-

troscopy에서 관측되지 않던 것이 heparin과 결합함으로써 CD현상의 유도 즉 ICD가 관측되었다. P/D의 비율이 증가함에 따라 2개의 positive band와 1개의 negative band의 ICD가 증가함은 P/D=25에 최대를 나타내다가 그 이상에서는 감소하고 있음을 알 수 있었다. Fenyo¹¹와 Nishida¹²은 AO와 α -carboxylic polysulfonamide 및 cellobiose sulfate결합에 있어서 나타나는 ICD는 AO의 stacking에 의한 것이라고 설명한 바 있

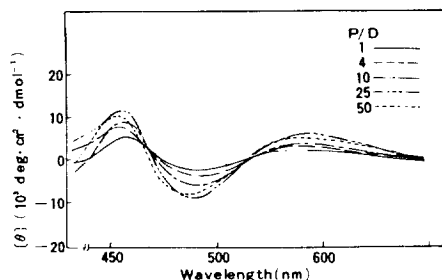


Fig. 3. Induced CD spectra of heparin-AO complex as a function of P/D ratio at pH=6.98. [AO]= 2×10^{-5} M.

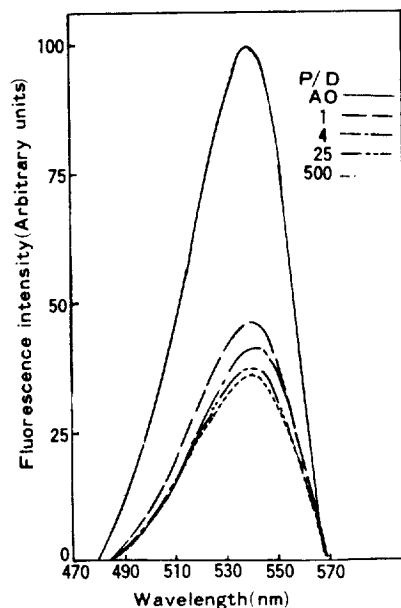


Fig. 4. Fluorescence spectra of heparin-AO complex as a function of P/D. [AO]= 2×10^{-5} M, excited at 450 nm.

며 Fig.3의 ICD는 Fig.2의 자외선 흡수 스펙트라에서 나타난 현상과 일치되는 경향으로서 AO의 stacking에 의하여 나타나는 것임을 알 수 있었다.

Heparin-AO복합체의 형광 스펙트라 : Fig.4에 heparin에 결합된 AO의 stacking 경향을 확인하기 위하여 AO단독과 P/D 비율에 따른 형광 스펙트라를 나타냈다. 539nm에서 형광 intensity는 P/D가 증가함에 따라, 염료의 aggregation에 의하여 염료의 형광성이 quenching되어 AO단독의 intensity보다 현저하게 감소하다가 P/D=25에서 가장 작은값을 나타냈으며 그 이상에서는 intensity가 증가하는 경향을 나타냈다. 이것은 P/D비율에 따른 Fig.2의 자외선 흡수 스펙트라와 Fig.3의 ICD 데이터들과 잘 일치되었다.

Heparin-AO 복합체에서 AO의 Stacking

Coefficient : Table 1에 heparin-AO 복합체의 자외선 흡수 스펙트라와 ICD에서 나타나는 염료-염료 상호작용의 변화를 정량적으로 비교하기 위해서 Bradley의 방법(K)¹⁴과 Fenyo의 방법(β/α)¹¹을 이용하여 stacking coefficient를 구하였다.

식에서 사용된 E , $E_{1:1}$, E_{∞} 는 α -band (492 nm)에서 각각 $P/D > 1$, $P/D = 1$, $P/D \rightarrow \infty$ 일 때 흡

Table 1. Stacking Coefficient of AO for the Heparin-AO Complex

P/D	1	4	10	25	50
Method					
K	1.000	1.142	3.881	76.892	4.516
β/α	1.020	1.034	1.042	1.051	1.049

$$K = 1 + \frac{P/D(1-F_{1/2})-1}{F_{1/2}(1+F-F_{1/2})}$$

$$F = \frac{E-E_{1:1}}{E_{\infty}-E_{1:1}}$$

(Fraction of unstacked dye molecules)

β/α

α : molar extinction coefficient of α band (492 nm)

β : molar extinction coefficient of β band (470 nm)

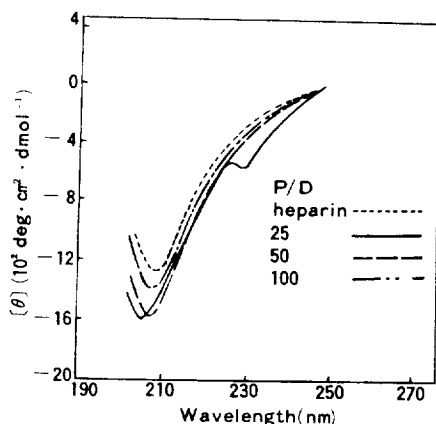


Fig. 5. CD spectra of heparin-AO complex at pH=6.98. [heparin] $=5 \times 10^{-4}$ M.

광계수이며 특히 $P/D-\alpha$ 의 값은 $(1-D/P)^2$ vs. E의 plot를 사용하여 외삽하여 구하였다. 표에 나타난 바와같이 P/D가 증가함에 따라 stacking coefficient를 나타내는 K, β/α 모두 증가하여 P/D=25에서 최대값을 나타내다가 그 이상에서는 다시 감소하여 Fig.2의 자외선 흡수스펙트라와 Fig.3의 ICD경향과 일치함을 알 수 있었다.

Heparin-AO 복합체에서 Heparin의 구조 변화:

Fig.5는 pH 6.98에서 heparin 단독과 heparin에 염료를 첨가함으로써 heparin과 염료의 이온결합에 의한 heparin의 구조변화를 CD로 나타냈다. 고차구조를 갖는 heparin에 염료가 첨가됨으로서 210nm의 peak가 증가하고, 염료가 더욱 많이 첨가된 상태에서 230nm 부근의 새로운 peak가 나타나는 것²⁰은 첨가된 염료의 stacking이 heparin의 고차구조를 변화시키기때문이라생각된다.Stone²¹은 수용액상에서 heparin/methylene blue 복합체를 CD로 관찰하여 heparin이 고차구조를 갖고 있다고 밝혔으며 neutral solution 에서 heparin 단독의 CD스펙트럼은 210nm에서 peak를 나타낸다는 것을 밝힌 바 있다.

결 론

heparin-AO 복합체를 CD, UV, 형광분광기로 측정한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

폴리머 제11권 제2호 1987년 4월

1. P/D가 증가할수록 AO의 492nm의 α -band (monomeric AO)가 점차 감소하면서 470nm의 β -band (dimeric AO)와 450nm의 γ -band (aggregated AO)로 점차 blue-shift하여 P/D=25에서 가장 많은 염료의 stacking이 일어남을 알 수 있었으며 그 이상의 heparin이 첨가된 상태에서는 AO의 흡수 spectrum이 다시 α -band로 전환됨을 알 수 있었다.
2. AO 단독에서는 optical activity를 갖지 않아 CD에서 관측되지 않던 것이 heparin과 결합함으로써 CD현상이 유도(ICD) 되었는데 이것은 자외선 흡수 스펙트라, 형광 스펙트라 그리고 stacking coefficient에 의하여 나타난 바와 같이 AO의 stacking에 의하여 ICD가 나타남을 알 수 있었다.
3. Heparin에 결합된 AO의 stacking으로 인하여 AO의 형광성이 quenching되어 현저히 감소 되었으며 그 현상은 P/D=25에서 가장 뚜렷하였다.
4. Heparin에 AO가 결합함으로써 heparin의 2차구조가 더욱 안정되게 변화되었다.

참 고 문 헌

1. L. Stryer and E. Blout, *J. Amer. Chem. Soc.*, **83**, 1441(1961).
2. E. Blout and L. Stryer, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **45**, 1591(1959).
3. D. M. Neville, Jr., and D. F. Bradley, *Biochim. Biophys. Acta*, **50**, 397(1961).
4. A. Blake and A. R. Peacocke, *Biopolymers*, **5**, 871(1967).
5. H. Yamamoto, A. Nakazawa, and T. Hayakawa, *J. Polym. Sci. Polym. Lett. Ed.*, **21**, 131(1983).
6. H. Yamamoto and A. Nakazawa, *Chem. Lett.*, 47(1983).
7. H. Yamamoto, *Makromol. Chem.*, **184**, 1479(1983).
8. H. Yamamoto and A. Nakazawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **56**, 2535(1983).

9. M. Hatano, M. Yoneyama, and Y. Sato, *Biopolymers*, **12**, 895(1973).
10. T. Imae and S. Ikeda, *Ibid.*, **15**, 1655(1976).
11. J. Beaumais, J. C. Fenyo, and G. Muller, *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, **18**, 1367(1980).
12. K. Nishida, Y. Ando, and H. Kodama, *Colloid Polym. Sci.*, **258**, 447(1980).
13. M. Hatano, M. Yoneyama, and Y. Sato, *Biopolymers*, **12**, 2423(1973).
14. D. F. Bradley and M. K. Wolf, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **45**, 944(1959).
15. D. F. Bradley and S. Lifson, "Molecular Association in Biology", B. Pullman, Ed., Academic Press, New York, N. Y., 1968. p.261.
16. 宗田敏郎, 吉岡甲子郎, 日化, 1019(1965).
17. L. B. Jaques, *Science*, **206**, 528(1979).
18. M. K. Pal, M. Schubert, and J. Histochem, *Cytochem.*, **9**, 673(1961).
19. M. Shirai, T. Nagatsuka, and M. Tanaka, *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, **15**, 2083(1977).
20. J. W. Park and B. Chakrabarti, *Biochem. and Biophys. Reser. Comm.*, **78**(1977).
21. A. L. Stone, *Fed. Proc.*, **36**, 101(1977).