

文章编号:1673-1689(2005)04-0022-04

海藻糖对脂质膜保护作用的荧光分析

胥传来, 姚惠源

(江南大学食品学院, 江苏无锡 214036)

摘要:以蛋黄卵磷脂(EPC)为模型,通过反映磷脂头部基团运动情况的荧光各向异性的变化,研究海藻糖对蛋黄卵磷脂(EPC)脂质膜的保护作用,并对其机理进行探讨.试验表明:荧光各向异性A值曲线随温度变化呈抛物线形状.

关键词:蛋黄卵磷脂;海藻糖;荧光各向异性

中图分类号:Q 533

文献标识码:A

Fluorescence Analysis of the Liposomes Membrane under the Protection of Trehalose

XU Chuan-lai, YAO Hui-yuan

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract:In this report, with EPC as a model, the protective effect of trehalose on the EPC liposomes membrane was studied by the variety of fluorescence anisotropy, that showed the movement of the liposomes head groups. The mechanism of their interaction was also explored. The result indicated that the curve of temperature dependence of fluorescence anisotropy displayed a parabolic shape.

Key words: EPC; trehalose; fluorescence anisotropy

海藻糖(Trehalose)是一种稳定的非还原性二糖,它由两个葡萄糖分子通过 $\alpha, \alpha-1, 1$ 半缩醛羟基结合而成.海藻糖的理化性质十分稳定,不能使斐林试剂还原,也不能被 α -糖苷酶水解^[1].

生物膜表面结合水的存在对膜的稳定及完整有着重要作用.正常的情况下,膜表面都存在大量的结合水,例如PC脂质体,通常每一磷脂头部都结合10~15个水分子.结合水的存在使膜表面能降低,但一旦失去结合水,膜结构将发生一系列变化,出现诸如磷脂相变温度升高,磷脂侧向相分离,膜脂缺陷及形成非双层相等,从而使膜通透性增高乃

至产生膜融合,海藻糖或其它糖类(甘露糖,葡萄糖等)由于拥有许多羟基,则能够替代水和磷脂头部发生氢键结合,从而取代失去的结合水,维持着膜表面“水化”状态.海藻糖能稳定脂质体的结构,在干燥状态下亦保持其结构的完整性^[2],这便于脂质体的贮存,包装和运输,有利于脂质体在制药工业上的应用.

研究证明:冻干保护剂海藻糖对磷脂脂双层有保护作用,它可以降低磷脂主相变温度,抑制膜脂侧相分离和膜融合^[3,4].但采用荧光各向异性法研究海藻糖对脂质膜保护作用,国内外文献报道极

收稿日期:2004-04-28; 修回日期:2004-06-20.

基金项目:中央级科研院所基础性专项资金项目(2001DEA-20022)资助课题.

作者简介:胥传来(1965-),男,江苏盐城人,副教授,工学博士.

万方数据

少.作者首先研究了冷冻干燥对 PST(Porcine somatotropin) 脂质体包封率的影响,对冻干保护剂进行了优化选择;其次以蛋黄卵磷脂(EPC)为模型,通过反映磷脂头部基团运动情况的荧光探针的荧光各向异性的变化来研究海藻糖对蛋黄卵磷脂(EPC)脂质膜的保护作用,并对其机理进行探讨.

1 材料与方 法

1.1 试剂与仪器

蛋黄卵磷脂:生化试剂,上海华东师范大学化工厂产品;胆固醇:分析纯,上海生物化学试剂厂产品;十八胺:分析纯,fluka 公司产品;乙醚:分析纯,上海生物化学试剂厂产品;荧光标记磷脂酰胆碱(Rh-PC):美国 Alabaster 公司产品;鱼精蛋白:华美生物工程公司产品;考马斯亮兰:化学纯,上海化学试剂公司产品;牛血清蛋白:生化试剂,华美生物工程公司产品;PST:深圳绿鹏生物技术中心提供;海藻糖:美国 Sigma 公司产品;甘露醇:分析纯,上海化学试剂公司产品;山梨醇:分析纯,上海化学试剂厂产品;果糖、乳糖,生化试剂,上海试剂二厂产品.

旋转蒸发仪,上海玻璃仪器二厂 ZFA-1 型产品;超声波处理器:Sonics & Materials Vibra Cell 公司产品;台式离心机:上海安亭科学仪器厂产品;AB204-N 型天平:上海梅特勒-托利多产品;UV755 β 分光光度计:上海精密科学仪器有限公司产品;NICOCET 公司产品 FTIR 光谱仪;850 型荧光分光光度计:日立公司产品.

1.2 实验方法

1.2.1 PST 脂质体的制备 逆相蒸发法^[5]

1.2.2 脂质体脂质膜的制备 方法同 1.2.1,加入适量的蛋黄卵磷脂(EPC)、海藻糖、乙醚和 PBS 缓冲液,并形成质量浓度为 5 mg/mL 水化磷脂,其中荧光标记磷脂酰胆碱(Rh-PC)为蛋黄卵磷脂(EPC)质量的 0.4%;海藻糖与蛋黄卵磷脂(EPC)质量比分别为 0,0.25,0.5,1,1.8.

1.2.3 包封率的测定 鱼精蛋白法^[5]

1.2.4 荧光各向异性测量 采用 Hitachi 850 型荧光分光光度计,测量时固定激发波长 530 nm,发射波长 588 nm.激发和发射狭缝均为 15 nm,温度用循环水浴进行控制,温度范围为 30~70 $^{\circ}\text{C}$,并用数字温度计监测样品温度,在整个测量过程中,样品用磁力搅拌子加以搅拌.

荧光各向异性 A 值计算公式为:

$$A = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2I_{\perp})$$

万方数据

I_{\parallel} 为起、检偏器光轴方向与样品杯长轴方向平行时的荧光强度, I_{\perp} 为起偏器光轴方向与样品杯长轴方向垂直,检偏器光轴方向与样品杯长轴方向垂直时的荧光强度^[6].

2 结果与讨论

2.1 不同冻干保护剂的选用

冷冻干燥法是目前制备储存脂质体的最佳方法.但在冷冻过程形成的冰晶使脂质体聚集融合,而且在冷冻和解冻过程,膜内外冰晶形成速度不同引起渗透压差,造成脂质体裂解,所以在冷冻干燥过程中,应加入冷冻保护剂(CPA)以减少破坏^[7].以解决 PST 脂质体制备过程和储存中的物理稳定性和渗漏问题和避免不稳定药物的失活、分解.

在制备载药脂质体的过程中分别加入不同的冻干保护剂^[8],然后测定冷冻干燥再水化后载药脂质体的包封率,其结果见表 1.

表 1 不同冻干保护剂的优化
Tab. 1 Optimization of different CPA

保护剂(PA)	包封率/%	
	冻干前	冻干后
甘露醇(mannitol)	75.37	70.72
山梨醇(sorbitol)	75.25	74.16
果糖(fructose)	75.05	74.07
乳糖(lactose)	75.82	73.98
海藻糖(trehalose)	85.95	84.67

从表 1 可以看出几种糖都具有稳定脂质体的作用,从脂质体的粉状外观可以看出,海藻糖的粉针效果较好,而综合考虑外观和包封率,冻干保护剂的效果为:海藻糖>山梨醇>果糖>甘露醇>乳糖,在后面的实验中主要选择了海藻糖作为冻干保护剂.

2.2 海藻糖对 PST 脂质体在干燥-再水化过程中的保护作用

试验采用加入卵磷脂质量 2.5% 的海藻糖制备 PST 脂质体,测定冷冻干燥-再水化产品的包封率,其结果见表 2.

表 2 加入 2.5% 海藻糖的 PST 脂质体包封率
Tab. 2 The encapsulated percentage of PST liposome with 2.5% trehalose added

PST 脂质体	包封率/%	
	干燥前	再水化后
不含海藻糖的 PST 脂质体	73.37	63.29
含有海藻糖的 PST 脂质体	85.95	85.67

脂质体在水化状态的稳定性不够理想,而且在保存的过程中,易于发生聚集、融合并由此导致其内含物的漏出.冷冻烘干能使脂质体处于一种干燥状态,而不损坏其结构的完整性.从表2可以看出,加入海藻糖的PST脂质体重新水化后其包封率基本不变.试验还发现不含糖的PST脂质体样品经冷冻干燥再水化后成混悬液状态,而含海藻糖的样品溶液则较为澄清,因此试验认为不含糖的PST脂质体经干燥-再水化后,由于发生融合而呈混悬液状态.

2.3 荧光各向异性 A 值的测定

在卵磷脂(EPC)中加质量分数为0.25%、0.5%、1.0%、1.8%海藻糖测定荧光各向异性 A 值随温度变化的曲线.由图1和图2可见,纯卵磷脂(EPC)脂质体在48℃左右荧光各向异性 A 值突然降低,而后又回升,而加入各种质量分数的海藻糖后,A 值未有突变出现.

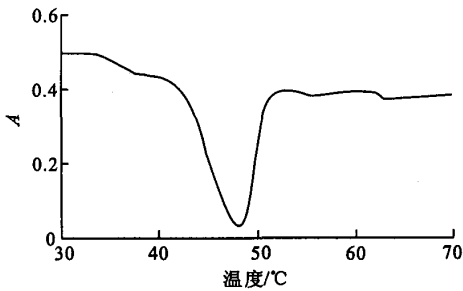


图1 蛋黄卵磷脂(EPC)荧光各向异性 A 值随温度变化的曲线

Fig. 1 Temperature dependence of fluorescence anisotropy of EPC

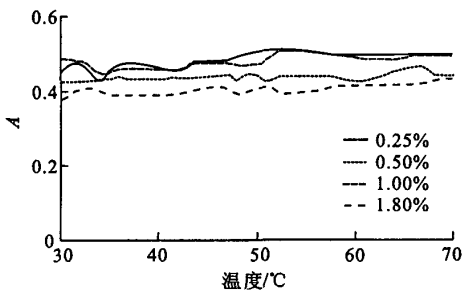


图2 蛋黄卵磷脂(EPC)加海藻糖所测得的荧光各向异性 A 值变化曲线

Fig. 2 Temperature dependence of fluorescence anisotropy of EPC with trehalose present at a trehalose/EPC mass ratio

从图1可以看出:A 值随温度变化曲线呈抛物线形状.这一现象符合 Han and Gross 的解释^[9]:液

晶相随着磷脂的升温,磷脂头部之间的距离增大,头部荧光基团的加速运动成为可能,从而导致 A 值的降低,而在经过双层到非双层相变后,磷脂头部基团间的空间位阻加大,有效地限制了头部基团的自由运动,从而导致 A 值的升高,因而相变发生时,A 值位于整条曲线的最低点.

2.4 海藻糖对脂质膜保护作用探讨

如图3所示,磷脂的分子是由一个极性头基和两条非极性的脂肪酰链组成.在通常状态下,两条磷脂链呈平行排列的全顺式构象;当温度升高时,磷脂的两条脂肪酰链不再平行排列,而是发生歪曲、扭转,开始由顺式向不对称的反式转变.由于磷脂脂肪酰链向反式构象的转变,使磷脂的脂肪酰链侧延,膜厚度下降,发生凝胶-液晶的相转变.当温度升高到使磷脂发生相转变时,磷脂膜中两相共存出现相分离,膜的通透性增加,内容物渗漏.

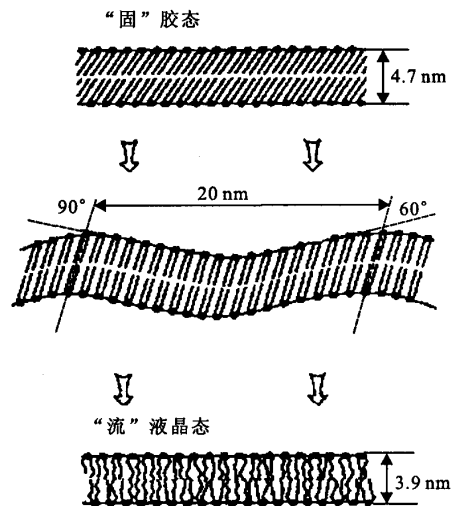


图3 脂质双分子层结构变化

Fig. 3 The variety of liposome bilayer structure

3 结论

分析结果表明:液晶相随着磷脂的升温,磷脂头部之间的距离增大,头部荧光基团 Rh-PE 的加速运动成为可能,从而导致荧光各向异性值的降低,而在经过双层到非双层相变后,磷脂头部基团间的空间位阻加大,有效地限制了头部基团的自由运动,从而导致荧光各向异性值的升高,因而相变发生时,荧光各向异性值位于整条曲线的最低点.

参考文献:

- [1] 童桥, 聂松青, 林克椿. 海藻糖对脂质体在干燥-再水化过程中的保护作用[J]. 生物化学杂志, 1992, 12(8): 711-714.
- [2] 童桥, 聂松青. 糖和膜质的相互作用[J]. 生理科学进展, 1996, 27: 123-128.
- [3] Scherphof G, Crommelin D. Cells involved in removing liposomes from the blood circulation; why are they so special[J]. *J Liposome Res*, 1996, 6(1): 19-32.
- [4] Epanand R M, Bryan T C. Hexagonal phase forming propensity detected in phospholipid bilayers with fluorescent probes[J]. *J Biochemistry*, 1992, 31: 1550-1554.
- [5] 平其能. 现代药剂学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1998. 588-600.
- [6] John H C, Lois M C, John F C. Stabilization of dry phospholipids bilayers and proteins by sugar[J]. *J Biochemistry*, 1987, 242: 1-10.
- [7] Liu D. Liposome clearance; how much do we know about the biological factors that control the process[J]. *J Liposome Res*, 1996; 6(1): 1-2.
- [8] Papahadjopoulos D. Fate of liposome in vivo; a brief introductory review[J]. *J Liposome Res*, 1996; 6(1): 3-17.
- [9] Han Xianlin, Gross R W. Nonmonotonic alterations in the fluorescence anisotropy of polar head group labeled fluorophores during the lamellar hexagonal phase of phospholipids[J]. *J Biophysical Journal*, 1992, 63: 309-315.

(责任编辑: 朱明)

(上接第 21 页)

参考文献:

- [1] 刘多敏, 黄漱石, 胡之杰, 等. 菜籽粕化学脱毒的理论基础[J]. 中国油脂, 1991, 2: 2-6.
- [2] 包承玉. 江苏省菜籽饼粕利用研究(鉴定资料)[R]. 南京: 江苏省农科院, 1994. 1-7.
- [3] 刘多敏, 黄漱石, 吴祥锦, 等. 添加剂对芥子甙降解的影响[J]. 中国油脂, 1994, 4: 29-32.
- [4] 钱和. 硫代葡萄糖甙降解化学与油菜籽脱毒工艺的研究[D]. 无锡: 无锡轻工业学院, 1994.
- [5] 林云鉴, 刘当慧. 油菜籽干法脱壳工艺技术研究[J]. 无锡轻工大学学报, 1997, 4/A: 51-55.
- [6] WETTER L R, YOUNGS C G. A thiourea-UV assay for total glucosinolate content in rapeseed meals[J]. *J American Oil Chemistry Society*, 1976, 53: 162-164.
- [7] 胡之杰. 菜籽粕中芥子甙的水解产物-异硫氰酸酯和噻唑烷硫酮的测定[J]. 中国油脂, 1991, 5: 22-24.
- [8] 无锡轻工业学院. 粮油化学实验讲义[R]. 无锡: 无锡轻工业学院, 1995.
- [9] 杜长安. 菜籽粕热压法脱毒新工艺研究[J]. 郑州粮食学院学报, 1996, 9: 59-62.
- [10] MANSOUR E H. Effect of processing on the anti-nutritive factors and nutritive of rapeseed products[J]. *Food Chemistry*, 1993, 47: 247-252.
- [11] RONALD R S. The effects of dry extrusion of rapeseed with other feedstuffs upon its nutritional value and anti-thyroid activity[J]. *J Sci Food Agric*, 1986, 37: 136-140.
- [12] JOHN T F. Enhancing direct solvent extraction of oilseeds by extrusion preparation[J]. *Oil Mill Gazetteer*, 1986, 11: 30-35.
- [13] 陈春雷. 油料挤压膨化预处理对油脂的影响[J]. 中国油脂, 1992, 6: 11-13.
- [14] 叶凤娟. 油料膨化机理及其影响因素[J]. 武汉粮食工业学院学报, 1992, 4: 8-11.

(责任编辑: 朱明)