

## 胰岛素与脂质体的相互作用

张 焯, 齐宪荣, 张 强\*

(北京大学药学院药剂教研室, 北京 100083)

**摘要:** 目的 研究胰岛素与脂质体的相互作用。方法 用荧光扫描、荧光淬灭、HPLC 测定及微量量热方法, 对胰岛素脂质体相互作用样品和超速离心、凝胶柱分离样品进行研究。结果 胰岛素与脂质体相互作用后, 胰岛素的荧光发射峰未发生蓝移, 仅强度有所增加, 荧光淬灭实验结果与胰岛素溶液基本相同,  $K_{sv}$  之比分别为 0.9 及 0.81, 微量量热实验表明为非共价键结合。分离后的样品经 HPLC 测定, 胰岛素与脂质体的结合率只有 0.2%, 说明胰岛素与脂质体作用属弱吸附方式, 未发生插膜(镶嵌); 结合量小且强度低。结论 胰岛素与脂质体相互作用的数量及程度均较弱, 属于弱吸附的范畴。

**关键词:** 胰岛素; 脂质体; 相互作用; 荧光; 微量量热; 吸附

中图分类号: R943.3; R977.15 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2002)05-0370-04

作为蛋白多肽脂质体给药系统的研究, 人们把重点放在给药的可行性、有效性及安全性上。而对蛋白、多肽药物与脂质体的相互作用进行研究, 可为蛋白多肽药物脂质体的制备提供重要的理论依据。蛋白、多肽药物与脂质体的相互作用主要表现为 3 种方式: 吸附、镶嵌和穿膜。① 吸附方式: 如果是弱吸附, 则应采取必要的措施以提高其包封率, 如果是强吸附, 则应注意药物在脂质体外表面的吸附, 因为这种吸附可能会导致药物的突释以及由于未被包裹而易被破坏; ② 镶嵌方式: 说明药物与脂质体的膜有特异性结合, 此时应注意药物的释放情况以及对药效的影响; ③ 穿膜方式: 应深入研究其发生的条件以及所发生的外力, 以此作为制备脂质体的方法(如 pH 梯度法), 同时也应重视由此可能会引起药物泄露的条件。

胰岛素是疗效确切的降血糖药物, 也是常见的蛋白、多肽模型药物。以往对胰岛素脂质体给药系统的研究集中于对胰岛素或脂质体结构进行修饰, 以改善其吸收、稳定性和靶向性<sup>[1-3]</sup> 或延长其体内停留时间<sup>[4,5]</sup>。本文用荧光扫描和荧光淬灭技术及通过微量量热方法研究胰岛素与空白脂质体的相互作用方式, 对超速离心、凝胶柱分离后的胰岛素脂质

体相互作用样品进行荧光扫描、HPLC 测定, 研究胰岛素与脂质体相互作用的结合量。

### 材料与 方法

**仪器与试剂** 荧光分光光度计(RF-540 岛津), 超声仪(Jc-3, 通化市超声设备厂), 标准型 Calvet 微量热量计(Calorimetre e. calvet, Type 1425 Setaram Lyon France), HPLC(Spectrystem PI000 AST 公司)。胰岛素(徐州生化厂  $26 \text{ u} \cdot \text{mg}^{-1}$ ); 卵磷脂、胆固醇和丙烯酸酰胺均为 Sigma 公司产品; Sephadex G75 为 Pharmacia 公司产品, 磷酸盐缓冲液( $\text{NaCl } 137 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $\text{KCl } 2.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $\text{Na}_2 \text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O } 6.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4 1.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  pH 7.3), 其余试剂均为分析纯。

**脂质体的制备** 取卵磷脂 14 mg 及胆固醇 7 mg 溶解于一定量的氯仿-甲醇(5:1)中, 旋转蒸发仪上抽干, 得均匀的膜, 干燥过夜。加入一定量的磷酸盐缓冲液超声 10 min 得脂质体。

**荧光光谱及解离常数(dissociation constant  $K_d$ )的测定** 利用胰岛素内源性酪氨酸残基具有荧光的特点, 测定胰岛素磷酸盐缓冲液的荧光光谱, 激发波长为 280 nm, 扫描范围为 200 ~ 400 nm。将一定量的脂质体加入胰岛素磷酸盐缓冲液中, 室温平衡 5 min 后, 测定发射峰位移动及强度的变化, 以加入脂质体的量对相应的荧光强度作饱和曲线图, 同时作双倒数图<sup>[6]</sup>, 求胰岛素与脂质体相互作用的解离常数

收稿日期: 2001-07-09.

基金项目: 国家自然科学基金重大项目(29992590-7)。

作者简介: 张 焯(1967-), 男, 博士后;

张 强(1958-), 男, 教授, 博士生导师。

\* 通讯作者 Tel: (010) 62092791, Fax: (010) 62015584,

E-mail: zqdodo@mail.bjmu.edu.cn

$K_d$ 。

碘化钠及丙烯酰胺对酪氨酸残基荧光的淬灭 分别将  $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  水溶性淬灭剂  $\text{NaI}$  (含  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , 防止碘离子被氧化形成过碘离子) 及  $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  丙烯酰胺加入胰岛素磷酸盐缓冲液中, 室温平衡  $5 \text{ min}$ , 测定相应的荧光强度。根据 Stern-Volmer 公式对荧光淬灭数据进行分析:

$$F_0/F = 1 + K_{sv}[Q]$$

$F_0$  为胰岛素磷酸盐缓冲液的荧光强度,  $F$  为加入淬灭剂后的荧光强度,  $K_{sv}$  为碰撞淬灭过程的 Stern-Volmer 常数,  $[Q]$  为淬灭剂浓度。以  $[F_0/F - 1]$  对  $[Q]$  作图求  $K_{sv}$ 。

微量热量法测定胰岛素与脂质体相互作用的热效应 分别精密吸取胰岛素溶液 ( $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )  $4.0 \text{ mL}$ , 脂质体 ( $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $100 \mu\text{L}$ , 加入微量热量计 ( $25^\circ\text{C}$ ,  $10 \text{ uv}$  档, 灵敏度  $1 \text{ uv}$ , 分辨率 1 档) 的试管中, 预热  $2 \sim 3 \text{ h}$ , 直至恒温。操作微量热量计, 使胰岛素溶液和脂质体相混合, 记录热效应数据。

超速离心-凝胶柱分离样品 将脂质体与胰岛素磷酸盐缓冲液按  $2:1$  比例 (胰岛素浓度  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 相混合, 超声  $2 \text{ min}$ , 配制成胰岛素脂质体相互作用样品。将此样品进行超速离心分离, 转速  $50\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $30 \text{ min}$ , 控制温度为  $0^\circ\text{C}$ 。弃去上清液, 加入一定量的磷酸盐缓冲液同上法继续超速离心, 弃去上清液, 取磷酸盐缓冲液  $5 \text{ mL}$  与沉淀物混合, 制备成超速离心分离样品。用 Sephadex G-75 对胰岛素脂质体相互作用样品进行凝胶柱分离, 收集混浊的脂质体溶液  $5 \text{ mL}$ , 为凝胶柱分离样品。

分离样品的荧光扫描及 HPLC 测定 将超速离心分离样品、凝胶柱分离样品进行荧光扫描, 激发波长:  $280 \text{ nm}$ , 发射扫描范围:  $295 \sim 350 \text{ nm}$ 。取超速离心分离样品、凝胶柱分离样品进行 HPLC 测定。色谱柱 Hyper sil ODS<sub>2</sub>  $5 \mu\text{m}$ ; 流动相为乙腈-磷酸盐缓冲液 =  $28:72$  (含  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$  及  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_4$ ); 流速  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 检测波长  $214 \text{ nm}$ ; 进样体积  $20 \mu\text{L}$ 。

## 结 果

### 1 荧光光谱扫描及解离常数的测定

胰岛素含有 51 个氨基酸, 其中 A14 和 A19 的酪氨酸可产生荧光, 经扫描得发射峰位为  $302 \text{ nm}$  (图 1A)。加入一定量的脂质体后, 发射峰位未发生蓝

移, 仅荧光强度有所增加 (图 1B), 说明胰岛素与脂质体有一定的相互作用, 但未发生插膜 (镶嵌作用)。因为, 若发射荧光的基团由极性较大的水相移至极性较小或非极性的疏水相, 则发射峰位会产生蓝移。

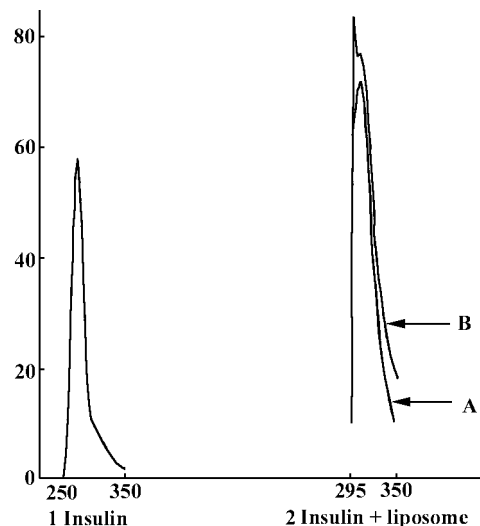


Figure 1 Fluorescence emission spectra of insulin (A) and adding phosphatidylcholine liposome (B)

胰岛素与脂质体的结合饱和曲线, 随脂质体加入量的增加, 荧光强度增加, 但很快趋于饱和。根据饱和曲线计算出肽脂摩尔比为  $0.119$ 。求得解离常数  $K_d$  为  $0.068 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 解离常数较大, 说明胰岛素与脂质体结合弱, 易解离。

### 2 碘化钠及丙烯酰胺对酪氨酸残基的淬灭

水溶性淬灭剂碘化钠对胰岛素荧光淬灭表明, 淬灭强度随碘离子浓度的增加而增加。加入脂质体后, 碘离子对其淬灭作用略有减弱, 图 2A 为碘化钠对胰岛素酪氨酸残基荧光淬灭的 Stern-Volmer 曲线, 经线性回归分别为:

$$\begin{aligned} \text{胰岛素} \quad [F_0/F - 1] &= 1.99[Q] + 0.0397, \\ \gamma &= 0.9912, K_{sv} = 1.99 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{胰岛素脂质体} \quad [F_0/F - 1] &= 1.80[Q] + 0.0115, \\ \gamma &= 0.9901, K_{sv} = 1.80 \end{aligned}$$

$K_{sv}$  之比为  $0.9$ 。

图 2B 为丙烯酰胺对胰岛素荧光的淬灭, 随丙烯酰胺浓度的增加, 淬灭强度增加, 当加入脂质体后, 丙烯酰胺对其淬灭作用有所减小, 荧光淬灭的 Stern-Volmer 曲线, 经线性回归得:

$$\begin{aligned} \text{胰岛素} \quad [F_0/F - 1] &= 18.95[Q] - 0.1936, \\ \gamma &= 0.9958, K_{sv} = 18.95 \end{aligned}$$

胰岛素脂质体  $[F_0/F - 1] = 15.28[Q] - 0.1349$ ,

$$y = 0.9903, K_{sv} = 15.28$$

$K_{sv}$  之比为 0.81。

作为水溶性淬灭剂,碘化钠可淬灭位于分子表面的酪氨酸残基,丙烯酰胺可淬灭除深埋之外的大部分酪氨酸残基,淬灭实验表明:碘化钠及丙烯酰胺对胰岛素磷酸盐缓冲液与胰岛素脂质体相互作用样品荧光淬灭的作用相似,  $K_{sv}$  之比分别为:0.9 和 0.81。说明酪氨酸残基未受到脂双层的屏蔽保护,即未发生插膜作用。

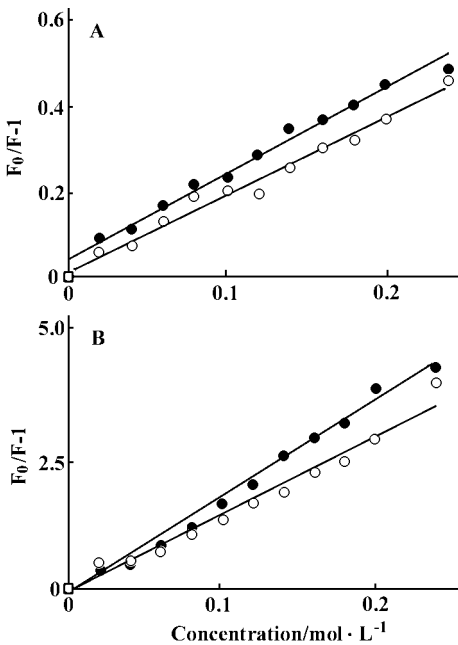


Figure 2 Stern-Volmer plots of insulin fluorescence quenching by iodide (A) and acrylamide (B). •—• Insulin; ○—○ Adding liposome

The Stern-Volmer equation:  $F_0/F = 1 + K_{sv}[Q]$ .  $F_0$  is the emission strength of the insulin solution (or insulin liposome mixture),  $F$  is the emission strength of the insulin solution (or insulin liposome mixture) added the quencher (A or B).  $K_{sv}$  is the Stern-Volmer constant.  $[Q]$  is the concentration of the quencher. The plot is  $[F_0/F - 1] - [Q]$  equation, the slope is  $K_{sv}$ . The X-axis and Y-axis is variation percentage of  $(F/F_0 - 1)$  and the concentration of added quencher (A or B), respectively

### 3 胰岛素溶液与脂质体相互作用的热效应

胰岛素溶液与脂质体混合后,有一定的热效应,通过计算为  $1.98 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,属于非共价键类型<sup>[7]</sup>,因此胰岛素与脂质体间的相互作用属于弱相互作用。

### 4 分离样品的荧光扫描及 HPLC 测定

分别将超速离心分离及凝胶柱分离的样品进行荧光扫描,未发现胰岛素发射峰,而未经分离的胰岛素脂质体相互作用样品则有胰岛素发射峰(图 3A)。HPLC 测定结果为:超速离心分离及凝胶柱分离的样品胰岛素与脂质体的结合率分别为 0.2% 及 0.24% (1 mg 胰岛素有 2 μg 及 2.4 μg 与脂质体结合),说明胰岛素与脂质体结合力弱且结合量小。

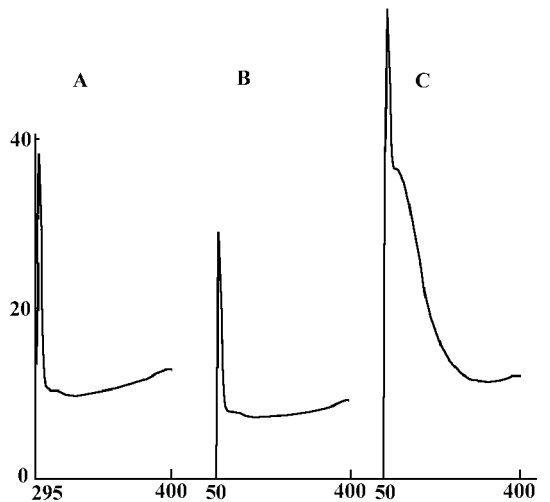


Figure 3 Fluorescence emission spectra of insulin  
A. Insulin-liposome mixture after separated by ultracentrifuge; B. Insulin-liposome mixture after separated by Sephadex G-75; C. Insulin-liposome mixture sample

## 讨 论

以二聚体形式存在的胰岛素,其分子内部是由非极性侧链组成的一个疏水核;全部的极性侧链分布在外表面<sup>[8]</sup>,胰岛素的结构特点为表面亲水,内核疏水。脂质体为双分子膜,其结构特点为表面亲水,双分子层内部疏水。

脂质体加入到胰岛素溶液中,荧光扫描结果显示,发射峰位未出现蓝移,只是荧光强度有所增加;淬灭实验结果表明,淬灭剂对胰岛素溶液与胰岛素脂质体相互作用样品的荧光淬灭情况相似。说明胰岛素与脂质体有相互作用,但这种作用仅发生在脂质体的外表面,未发生插膜(镶嵌),它们的结合弱、易分离,应属吸附方式。

胰岛素脂质体相互作用样品经分离后,分离样品的测定结果显示,胰岛素与脂质体相互作用力弱、结合量小,综合荧光扫描和淬灭实验的结果,说明胰岛素与脂质体的相互作用属于弱吸附的范畴。微量热实验从热效应方面也证实了这一点。

由于胰岛素分子表面带有亲水基团,故很难通过脂质体的双分子层内部的疏水区;虽然其表面的亲水基团与脂质体双分子层的亲水表面有一定的结合能力,但这种结合较弱。因此,胰岛素与脂质体的这种无特异性、弱吸附的结合,导致在制备胰岛素脂质体的过程中,胰岛素的包封是被动的,且包封率很难达到一个较高的水平(如高于80%,文献报道<sup>[4,5]</sup>胰岛素脂质体的包封率一般在30%~60%之间)。通过本文的研究可以解释这种低包封的原因是由于胰岛素与脂质体的弱作用所致;同样由于胰岛素与脂质体无特异性结合,所以脂质体本身不会影响胰岛素的结构,因而不会影响胰岛素的药效。因此,解决胰岛素脂质体包封率低的方法之一是对胰岛素分子表面进行适当结构修饰,以增加胰岛素与脂质体相互作用的程度,从而尝试制备出具有高包封率的胰岛素脂质体。

#### REFERENCES:

[1] Wei H, Yu XC, Chan KK. NBI-C16-insulin: site-specific synthesis, purification, and biological activity [J]. *Pharm Res*, 1999, **16**(11):1680 - 1686.

- [2] Asada H, Douen T, Mizokoshi Y, *et al.* Stability of acyl derivatives of insulin in the small intestine: relative importance of insulin association characteristic in aqueous solution [J]. *Pharm Res*, 1994, **11**(8):1115 - 1120.
- [3] Asada H, Douen T, Waki M, *et al.* Absorption characteristics of chemically modified insulin derivatives with various fatty acids in the small and large intestine [J]. *J Pharm Sci*, 1995, **84**(6):682 - 687.
- [4] Kim A, Yun MO, Oh YK, *et al.* Pharmacodynamics of insulin polyethylene glycol-coated liposomes [J]. *Int J Pharm*, 1999, **180**(1):75 - 81.
- [5] Iwanaga K, Ono S, Narioka k, *et al.* Application of surface-coated liposomes for oral delivery of peptide: effect of coating the liposome's surface on the GI transit of insulin [J]. *J Pharm Sci*, 1999, **88**(2):248 - 252.
- [6] Yeagle PL. Cholesterol and the cell membrane [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1985, **822**(3 - 4):267 - 287.
- [7] Yang M. *The Molecular Recognition in Medicine Research* (药物研究中的分子识别) [M]. Beijing: Peking Union Medical College and Beijing Medical University Press, 1999. 4.
- [8] Tao WL, Li W, Jiang YM. *Molecular Basis of Proteins* (蛋白质分子基础) [M]. Beijing: People's Education Press, 1982. 207.

## INTERACTION BETWEEN INSULIN WITH LIPOSOME

ZHANG Xian, QI Xiarrong, ZHANG Qiang

(School of Pharmaceutical Science, Peking University, Beijing 100083, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To study the characteristics of the interaction between insulin and liposome. **METHODS** The interaction between insulin and liposome was studied by fluorescence spectra and microcalorimetry methods. The sample of insulin liposome interaction after separation by super-centrifugation or gel filtration was determined by fluorescence and HPLC. **RESULTS** The results indicate that there was only little increase in fluorescence intensity and no blue shift of peak in fluorescence spectrum. Fluorescence quenching experiments with NaI and acrylamide as quenchers showed that the  $K_{sv}$ s (the slope of Stern-Volmer equation) of insulin were more similar to that with added liposome, indicating low interaction between insulin with liposome. The microcalorimetric results indicate that the heat released during the mixture of liposome with insulin, was  $1.98 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ , suggesting that the reaction belongs to weak reaction. The quantity of insulin in the insulin-liposome mixture sample after separation by ultracentrifuge or by Sephadex G75 determined by HPLC, the combination percent was only 0.2%, indicating low interaction between insulin and liposome. **CONCLUSION** The interaction between insulin and liposome was weak.

**KEY WORDS:** insulin; liposome; interaction; fluorescence; microcalorimetry; adsorption