

用差示扫描量热法及激光拉曼光谱研究足叶乙甙对二棕榈酰磷脂酰胆碱脂质体膜流动性影响

柳 枫 廖松生

(清华大学化学系, 北京 100084)

摘要 本文用DSC和激光拉曼光谱研究抗癌药物足叶乙甙(4-去甲基表鬼臼毒素- β -D-乙叉吡喃葡萄糖甙, 简称 VP 16-213) 与二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC) 脂质体的作用。VP 16-213 分子掺入 DPPC 脂质体双层中, 不但使相转变温度向高温移动, 而且吸热峰的半高宽度随 VP 16-213 浓度增加而变宽。其 Raman 光谱在频率 2850 cm^{-1} 处的 C-H 键对称伸缩振动亦随着药物浓度增加而减弱。这些结果表明 VP 16-213 分子是定域在脂双层中 DPPC 分子链的 $C_1\sim C_9$ 亚甲基区域, 使脂质体的有序性提高而流动性降低。

关键词 脂质体; 相转变温度; 流动性; 伸缩振动

多年来药物学家已注意到细胞膜与药物作用的重要性, 对细胞膜的组成和功能的研究和了解指出, 药物的不少药理效应是通过与膜的作用干扰和改变膜的功能而体现的。因此对药物与膜相互作用的物理化学基础的了解, 对于确定某些药物的作用机制是很重要的。

足叶乙甙(4-去甲基表鬼臼毒素- β -D-乙叉吡喃葡萄糖甙, 简称 VP 16-213) 商品名为 Etoposide, 是一种新型抗肿瘤药物, 对单核细胞白血病、小细胞肺癌和恶性淋巴瘤等疾病有相当好的疗效。本文用二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC) 脂质体作为模拟膜, 用差示扫描量热法 (DSC) 和激光拉曼光谱研究测定在足叶乙甙分子的作用下, DPPC 脂质体的结构和相转变温度所发生的变化, 从而对膜流动性所产生的影响。

材 料 和 方 法

足叶乙甙 由北京制药工业研究所提供。二棕榈酰磷脂酰胆碱 (L- α -dipalmifoyl phosphatidylcholine, 简称 DPPC) 系美国 Fluka 公司产品, 纯度大于 99%, 使用时未经进一步提纯。

脂质体制备 称取 0.1 mmol DPPC 和一定量的 VP 16-213 粉末, 加入分析纯的 CHCl_3 , 使二者均匀混合后, 在真空下干燥除去 CHCl_3 , 然后加入 100 μl Tris 缓冲液, 用 CQ-50 超声波发生器 (上海超声波仪器厂产品, 功率 50 W) 进行超声处理, 水浴温度保持在 45°C , 超声处理后的溶液呈透明状。

用 DuPont 990 DSC 测定脂质体的相转变温度^(1,2)。取脂质体溶液 20 μl , 用 20 μl Tris 缓冲液作参比, 进行程序升温扫描, 升温速度 $2^\circ\text{C}/\text{min}$ 。用 SPEX 公司的激光拉曼光谱仪测定脂质体膜的结构变化, 在毛细管中加入脂质体试样 10 μl , 置于样品架上, 毛细管与入射光及散射光方向均成垂直。

结果和讨论

一. 差示扫描量热(DSC)

将含有不同摩尔浓度 VP 16-213 的 DPPC 脂质体进行差示扫描量热测定, 得到图 1 所示的一系列加热曲线, 与 VP 16-213/DPPC 摩尔比相对应的相转变温度列于表 1 中。为了比较, 表 1 中也列出了不含 VP 16-213 的 DPPC 脂质体的相转变温度。可以看出, VP 16-213 的摩尔浓度从 0 增加至 0.08 时 DPPC 脂质体的相转变温度从 40.0°C 升高至 42.0°C。相转变温度的升高意味着脂质体双层膜结构中 DPPC 分子链排列的有序性随着 VP 16-213 浓度的增加而提高, 即膜的流动性降低了。

从 DSC 加热曲线还可以看到, 在扫描过程中没有出现新的吸热峰, 在峰形上也没有出现台阶, 而且峰的半高宽度 (HHW) 随 VP 16-213 浓度增加而逐渐增大, 与药物浓度成正变关系, 如图 2 所示。

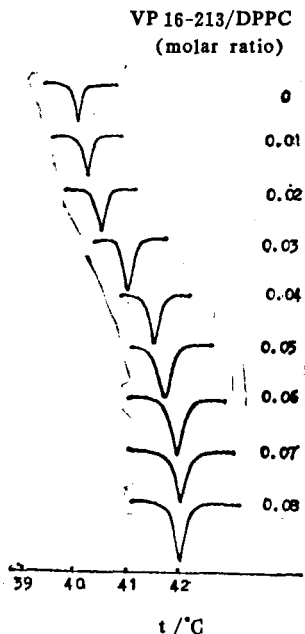


Fig 1. DSC thermogram for VP 16-213/DPPC system.

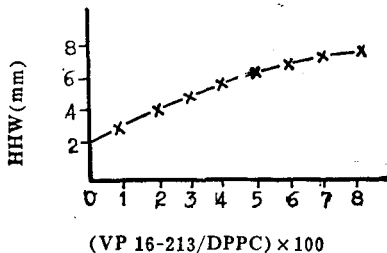


Fig 2. Influence of concentration of VP 16-213 on HHW.

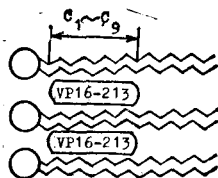


Fig 3. A schematic diagram showing the possible region of localization of VP 16-213 molecules within the liposome bilayer.

1976 年 Jain 等⁽³⁾利用 DSC 研究了九十多种脂溶性添加物对 DPPC 的 DSC 曲线的影响, 并根据 DSC 曲线的变化确定了药物在膜中所处的位置。他们所用的添加物包括: 解偶联剂、烷烃、脂肪酸、表面活性剂、有机溶剂、离子载体、无机离子及常用的自旋标记物和荧光标记物。实验结果发现, 不同的添加物随其浓度的增加对 DSC 峰形的影响有以下四种:

A 型: 峰形变宽, T_c 和 T_f 发生移动, 峰尖位置发生移动;

B 型: 峰形上出现一个小台阶, 小台阶下的面积随添加物浓度的增加而增加, 但总的面积是一定的;

C 型: 峰尖不发生移动, 但 T_c 和 T_f 移动;

D 型: 出现新的峰, 且新峰的面积随添加物浓度增加而增加;

其中 T_c ——吸热峰起始温度; T_f ——吸热峰终止温度。

Jain 等的研究表明: A型添加物主要作用在 $C_1 \sim C_9$ 位置; B型添加物作用在甘油骨架位置; C型添加物作用在 $C_{10} \sim C_{16}$ 区域; D型添加物作用在胆碱头基附近。以上结论经用放射性同位素标记检验, 证明是正确的。

Tab 1. The phase transition temperature of DPPC liposomes and the concentration of drugs

Sample No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
VP 16-213 DPPC(molar ratio)	0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08
Transition temperature ($^{\circ}\text{C}$)	40.0	40.2	40.5	40.0	41.5	41.7	41.9	42.0	42.0

我们在 DSC 实验中测得的这些变化趋势与 Jain 等关于小分子化合物对 DPPC 脂质体双层膜相转变影响的报道是一致的。因此可以认为 VP 16-213 分子属于 A 型添加物, 在 DPPC 脂质体膜中定域在 $C_1 \sim C_9$ 区域, 图 3 为 VP 16-213 分子在膜中位置的示意图。

二. 激光拉曼光谱

DPPC 脂质体中分子的层状有序排列, 限制了烃链的横向运动。在 VP 16-213 分子的存在下这种有序性受到一定程度的影响, 从而引起膜的流动性发生变化。这种影响可以在 Raman 光谱中 C—H 键的伸缩振动变化上得到反映。

DPPC 及其它磷脂的烃链上甲基 ($-\text{CH}_3$) 与亚甲基 ($-\text{CH}_2-$) 中 C—H 键伸缩振动的 Raman 位移出现在 $2700 \sim 3000 \text{ cm}^{-1}$ 区间^(4,5), 由于 DPPC 中亚甲基占大多数, 所以拉曼光谱在 2850 和 2890 cm^{-1} 处的峰最强, 它们分别反映了亚甲基中 C—H 键的对称伸缩振动和反对称伸缩振动。图 4 是随着 VP 16-213 浓度的变化在 Raman 光谱上引起的 2850 cm^{-1} 和 2890 cm^{-1} 两个峰相对强度的改变。

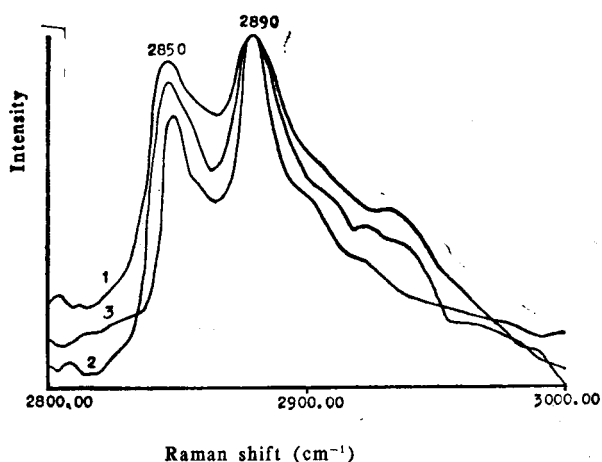


Fig 4. Raman spectra of VP 16-213/DPPC liposome. 1. VP16-213/DPPC=0; 2. VP16-213/DPPC=0.05; 3. VP16-213/DPPC=0.01.

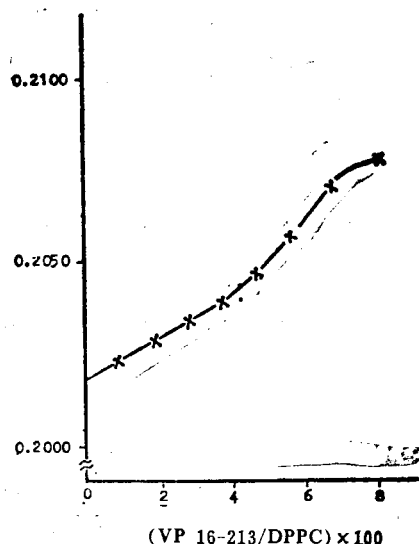


Fig 5. Dependence of S_{L11} on the concentration of VP 16-213.

从 Raman 谱图看出, 随着 VP 16-213 浓度的增加, 与 2890 cm^{-1} 峰的强度相比, 2850 cm^{-1} 峰的强度相对减弱, 表明 C—H 键的反对称伸缩振动增强而对称伸缩振动减弱, 可以认

为这是由于 VP 16-213 分子的插入, 双层中 DPPC 分子受到挤压, 使 C—H 键的对称伸缩振动受到限制造成的。这两个峰的强度之比 (I_{2890}/I_{2850}) 可以反映膜的有序性的变化。根据 Gaber 等⁽⁶⁾提出的计算膜的横向有序参数 S_{La} 的公式:

$$S_{La} = (I_{2890}/I_{2850} - 0.7)/1.5$$

得到在 VP 16-213 相应浓度下膜的横向有序参数, 图 5 所示是二者的相互关系。表明 S_{La} 值随着 VP 16-213 浓度增加而增大, 即有序性增加、流动性下降。此结果与 DSC 获得的结果相符。

足叶乙甙 (VP 16-213) 对膜的相转变温度的影响与已报道的其它药物不同, 不是降低类脂膜从有序到无序 (即从凝胶相到液晶相) 的转变温度, 而是恰恰相反。说明药物对膜的流动性的影响有两种趋势, 即或者使膜更易流动或者使膜更接近于凝固状态, 因此, 或者是增加膜的功能或者是抑制膜的功能, 而足叶乙甙的作用应属于后者。

致谢 本工作曾得到北京制药工业研究所赵俊杰同志、清华大学化学系郁鉴源、李百舸等同志的热情帮助。

参 考 文 献

1. Jain MK, et al. Drug-induced phase change in bilayer as possible mode of action of membrane expanding drugs. *Nature* 1975; 255:494.
2. Cuter BR, et al. Lipid phase transitions and interactions. *Biochim Biophys Acta* 1974; 363:54.
3. Jain MK and Wu NM, Effect of small molecules on the dipalmitoyl lecithin liposomal bilayer. III. Phase transition in lipid bilayer. *J Membrane Biol* 1977; 34:157.
4. Wong PTT. Raman spectroscopy of thermotropic and high-pressure phases of aqueous phospholipid dispersions. *Ann Rev Biophys Bioeng* 1984; 13:1.
5. Lafleur M, et al. Study of the effect of melittin on the thermotropism of dipalmitoylphosphatidylcholine by Raman spectroscopy. *Biochemistry*. 1987; 26:1173.
6. Gaber BP and Peticolas WL. On the quantitative interpretation of biomembrane structure by Raman spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1977; 465:260.

STUDY OF THE EFFECT OF ETOPOSIDE ON THE FLUIDITY OF DIPALMITOYLPHOSPHATIDYLCHOLINE LIPOSOME BY DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY AND RAMAN SPECTROSCOPY

F Liu and SS Liao

(Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084)

ABSTRACT The interaction of the anticancer drug, etoposide (VP16-213), with DPPC bilayer vesicles was investigated by DSC and Laser Raman techniques. The results present the fact that the incorporation of VP16-213 into aqueous dispersion of DPPC not only shifted the temperatures of phase transition towards higher value but also broadened the half-height width. The Raman spectra of the DPPC liposome in the C—H symmetric stretch vibration lost intensity near 2850cm^{-1} , therefore, it can be predicted that VP16-213 is localized at $C_1\sim C_9$ methylene region of the bilayer, which leads to the increase of the membrane's regularity and the decrease of its fluidity.

Key words Liposome; Phase transition temperature; Fluidity; Stretching vibration