

[Article]

www.whxb.pku.edu.cn

动、静态光散射在线跟踪 DPPC/PA 脂质体的聚集、融合过程

邓 林 梁德海*

(北京大学化学与分子工程学院, 北京分子科学国家实验室, 北京 100871)

摘要: 结合动、静态激光光散射在线跟踪了经低温培养的二棕榈酰基磷脂酰胆碱/棕榈酸(摩尔比为 1:2)脂质体在 25–41 °C 温度范围内的聚集和融合过程. 在升温过程中, 脂质体的尺寸和相对分子质量明显增大, 表明有聚集发生. 另外, 尺寸分布出现角度依赖性, 证明囊泡结构遭到破坏. 而在接下来的降温过程中, 粒径和相对分子质量继续增大, 没有回到初始状态. 根据光散射结果, 我们认为脂质体富集脂肪酸分子的区域随温度升高会发生黏合而形成聚集, 该聚集体形态类似反六方柱状相. 融合发生的比例较小. 降温过程中的变化表明囊泡是动力学稳定态, 一旦聚集发生, 会自发继续进行.

关键词: 脂质体; 囊泡; 相变; 融合; 光散射

中图分类号: O648

Online Monitoring of the Aggregation and Fusion of DPPC/PA by Static and Dynamic Light Scattering

DENG Lin LIANG De-Hai*

(Beijing National Laboratory for Molecular Sciences, College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, P. R. China)

Abstract: Static and dynamic light scattering were employed to monitor the temperature-induced aggregation and fusion processes of liposomes consisting of 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) and palmitic acid (PA) in a molar ratio of 1:2. At 25 to 41 °C, the size and the relative molecular mass of the liposome increased with increasing temperature indicating the occurrence of aggregation or fusion. Meanwhile, the size showed strong angular dependence, suggesting that the vesicle structure was at least partially destroyed upon aggregation. During the subsequent cooling process, the size and relative molecular mass continued to increase. On the basis of these results, we propose that the aggregation is caused by the adhesion of liposomes in the palmitic acid rich zones. The formed aggregate had a structure between that of bilayers and inverted hexagonal (H_{II}) packing. Upon aggregation, the ratio of fusion was small. Our results also indicate that the vesicle was kinetically stable. Once the transition from the gel state to semi-inverted hexagonal (H_{II}) packing was triggered, the aggregation or fusion of the liposome proceeded automatically.

Key Words: Liposome; Vesicle; Phase transition; Fusion; Laser light scattering

脂质体是一类由磷脂分子构成的具有双分子层结构的囊泡^[1]. 由于其具有和细胞膜类似的结构, 因而在生物、化学、医药等领域得到广泛研究^[2]. 对脂质体的热分析研究得知, 脂质体可能以一种或多种

液晶态形式存在^[3]. 以常用的磷脂分子二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)为例, 早期文献表明, DPPC 在 41 °C 时由凝胶相(L_{β})转变为液晶相(L_{α}), 该温度被称为 DPPC 的链融化温度(主相变温度) T_m ^[4]. 在 L_{β} 和

Received: November 10, 2009; Revised: January 29, 2010; Published on Web: March 1, 2010.

*Corresponding author. Email: dliang@pku.edu.cn; Tel: +86-10-62756170.

The project was supported by the National Natural Science Foundation of China (20774004).

国家自然科学基金(20774004)资助项目

L_{α} 相之间还存在一些小的相态, 如波纹相 P_{β}' 等^[5-6]. 由于脂质体双分子层的相态和流动性是脂质体稳定性的重要决定因素, 因此研究这些相态之间的转变就非常有意义^[7].

脂质体的融合是脂质体的一个重要特性, 即不同的脂质体相互靠近时, 双分子层结构打开并形成一个新的较大的脂质体. 研究脂质体融合过程对理解生命现象, 如细胞的胞吞作用和神经信号的传递过程, 都有着非常重要的意义. 并且脂质体的融合也会影响对所载药物的释放^[8]. 因此, 自上世纪七十年代以来, 脂质体的融合过程得到了广泛的研究^[8-11]. 虽然到目前为止, 控制脂质体聚集和融合的分子机理仍不完善, 但是, “stalks” 中间态的假说被广为接受^[12]. 该理论提出融合的必要条件是磷脂分子形成非层状的相态, 如反转六方柱状相 H_{II} 和双连续的立方相 Q . 这些相态造成的双分子层缺陷导致了融合的发生^[13].

磷脂酰胆碱/脂肪酸(PC/FA)体系对温度和 pH 有双响应性, 常用来研究由温度引导的融合过程. 大量文章报道了链长^[14]、头基^[15]、pH 值^[16]、离子化程度^[17]等因素对 T_m 的影响以及 PC/FA 配比对相态的影响^[13-14], 并且指出脂肪酸的加入会导致脂质体的聚集及融合^[18]. 研究表明, 在 PC 和 FA 摩尔比为 1:2 的囊泡中, 长链(碳原子数>16)脂肪酸可以消除凝胶相到液晶相的转变($L_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$), 在更高的温度, 会完全由凝胶相转变为反六方柱状相或立方相($L_{\beta} \rightarrow H_{II}/Q$), 从而导致大量脂质体聚集并沉淀, 该温度也被定义为形成反六方柱状相临界温度 T_h . 并且, 低温培养的 PC 和 FA 摩尔比为 1:2 的脂质体, PC 和 FA 会通过氢键复合形成共结晶的亚稳凝胶相 L_{β} . 该亚稳相态会导致脂质体产生侧向相分离而生成膜缺陷, 并随温度变化发生融合^[15,19].

动、静态光散射技术是研究胶体、高分子和纳米粒子体系的有力工具, 可以获得尺寸大小和分布, 聚集和解离过程以及构象变化等丰富的信息. 但在以往工作中, 人们多采用监测荧光或紫外光强的变化来跟踪脂质体融合过程, 动态光散射偶尔被用来验证脂质体尺寸大小, 因此, 所得信息有限. 本文旨在结合动态和静态激光光散射, 在线跟踪二棕榈酰基磷脂酰胆碱/脂肪酸(DPPC/FA)体系在 25–41 °C 范围内随温度变化而发生的聚集、融合过程, 并验证囊泡结构的稳定性.

1 实验部分

1.1 试剂

氯仿($CHCl_3$, 分析纯, 北京化学试剂公司). 无水氯化钙浸泡过夜, 常压蒸出, 密封保存. 二棕榈酰基磷脂酰胆碱 (1, 2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC), 99%, Sigma-Aldrich 公司). 棕榈酸 (palmitic acid (PA), 90%, Merck 公司). 实验中所用水为 Milli-Q (Millipore) 超纯水(电阻为 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$). 4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 北京华美生物技术公司), 将已知量的 HEPES 和 NaCl 溶于水中, 加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液调节 pH 为 7.4, 制得 HEPES 缓冲液($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HEPES, $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl).

1.2 脂质体的制备

制备方法同文献[20]. 在圆底烧瓶中, 加入 0.25 mg DPPC, 0.174 mg PA(DPPC 和 PA 摩尔比为 1:2), 20 mL 氯仿溶解, 加入 25 g 玻璃珠, 在 50 °C 下旋转蒸发除去氯仿, 真空干燥 12 h. 加入 25 mL HEPES 缓冲液, 在 50 °C 下水化磷脂膜, 振荡, 涡旋. 将混悬液置于冰水浴中, 用探头式超声 (100 W, 有效工作时间/总工作时间为 75%)破碎 5 min×2, 制得单室脂质体, 4 °C 培养 2 天. 光散射实验前, 将脂质体溶液通过 $0.22 \mu\text{m}$ Millipore 膜过滤, 除去灰尘等杂质, 静置 1 h 后使用.

1.3 测试及表征

激光光散射(laser light scattering, LLS)采用 Brookhaven 公司生产的 BI-200SM (相关器为 BI-Turbocorr)系统测定. 激光光源为长春新产业光电技术有限公司的 GXL-III 型固体激光器(100 mW, 波长 532 nm). 激光出射为垂直偏振, 测试角度为 20°–120°.

静态光散射中在 θ 角度下测得垂直偏振方向的时间平均净剩散射光强, 也可以用瑞利比 $R_v(q)$ 表示, q 为散射矢量. 光学常数 H , 重均分子量 M_w , 均方回转半径 R_g , 第二维利系数 A_2 之间的关系为:

$$\frac{HC}{R_v(q)} \approx \frac{1}{M_w} \left(1 + \frac{1}{3} R_g^2 q^2 \right) + 2A_2 C \quad (1)$$

$$H = 4\pi^2 n^2 (dn/dC)^2 / (N_A \lambda_0^4) \quad (2)$$

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (3)$$

其中 N_A , n , (dn/dC) 和 λ 分别是阿佛加德罗常数、溶

剂的折光指数、溶剂的比折光指数增量以及激光在真空中的波长. 囊泡结构的静态光散射形状因子 (form factor) 为^[21]

$$P(q) = \left(\frac{\sin(qR)}{qR} \right)^2 \quad (4)$$

动态光散射模式中散射光强的时间相关函数采用自差频模式测定

$$G^{(2)}(\tau) = A[1 + \beta |g^{(1)}(\tau)|] \quad (5)$$

其中 A 是测量基线, β 是相干因子, τ 为延迟时间, 而 $g^{(1)}(\tau)$ 是归一化一阶电场时间相关函数. 线宽分布函数 $G(\Gamma)$ 采用反拉普拉斯变换程序 CONTIN 计算

$$g^{(1)}(\tau) = \int_0^{\infty} G(\Gamma) e^{-\Gamma\tau} d\Gamma \quad (6)$$

平均线宽可以根据 $\bar{\Gamma} = \int \Gamma G(\Gamma) d\Gamma$ 计算. 峰的多分散度定义为 $PDI = \mu_2 / \bar{\Gamma}^2$, 其中 $\mu_2 = \int (\Gamma - \bar{\Gamma})^2 G(\Gamma) d\Gamma$. 此外 $\bar{\Gamma}$ 与浓度 C 及散射矢量 q 有如下关系:

$$\bar{\Gamma}/q^2 = D(1 + k_d C) [1 + f(R_g/q)^2] \quad (7)$$

其中 D 是平动扩散参数, k_d 是扩散第二维利系数, f 是无量纲常数. 当溶液浓度非常稀, 影响不大时, 将 D 外推到零角度, 根据 Stokes-Einstein 公式可以得到流体力学半径 R_h :

$$R_h = k_B T / 6\pi\eta D \quad (8)$$

其中 k_B 为波尔兹曼常数, T 是绝对温度, η 是溶液粘度.

光散射实验在 $T=25-41$ °C 范围内, 每升高或降低 2 °C, 平衡 30 min, 散射光强稳定后, 进行测量.

2 结果与讨论

2.1 DPPC/PA 脂质体的光散射表征

图 1 是 DPPC/PA 脂质体在五个不同角度 ($\theta=90^\circ, 75^\circ, 60^\circ, 45^\circ, 30^\circ$) 下的粒径 ($R_{h,app}$) 分布图, 内插图是该脂质体的静态光散射 (SLS) 结果. 由图可以看出在五个角度下, 只观察到分布较窄的单峰, 且无明显角度依赖性, 表明所形成结构为囊泡. 囊泡结构还可以通过结构参数 (R_g/R_h) 来验证. 由文献可知, 实心圆球和无规柔性链所对应的结构参数分别是 0.775 和 1.5, 而中空球的理论值是 1.0^[22-23]. 由图 1 可求得 $R_h=89.4$ nm, 根据公式(1), 由内插图计算可得 $R_g=93.5$ nm, 其比值 $R_g/R_h=1.05$. 确证为囊泡结构^[24].

2.2 升温过程中脂质体的变化

单一组分脂类构成的脂质体在温度小于 T_m 时

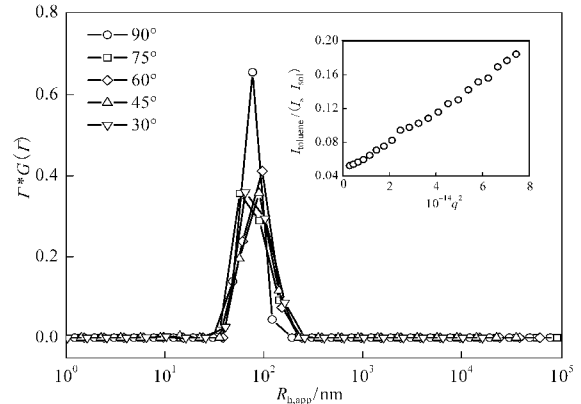


图 1 25 °C 下 DPPC/PA 脂质体的粒径 ($R_{h,app}$) 分布
Fig.1 Size ($R_{h,app}$) distribution of DPPC/PA liposome at 25 °C
Inset is the SLS result.

能够保持囊泡结构的稳定^[1]. 但是, 对于含有脂肪酸的二元脂类脂质体来说, 结构会随着温度的升高发生聚集、破裂、融合等现象. 本文研究了 $T=25-41$ °C 范围内, 升温 and 降温两个过程中, DPPC/PA 脂质体体系的变化. 图 2 为升温过程中, 在选定的温度 $T=25, 31, 37, 41$ °C, 脂质体粒径分布的对比. 可以看出, 随着温度的升高, 粒径保持一个单峰的分布, 但分布变宽, 粒径变大, 并出现角度依赖性, 证明囊泡体系遭到破坏.

图 3A 为外推到零散射角度下, 流体力学半径 R_h 随温度的变化曲线. 随着温度的升高, 脂质体的粒径从 25 °C 时的 89.4 nm 提高到 41 °C 时的 140 nm. 在整个变化过程中, 没有明显的拐点, 说明该脂质体体系在该温度范围内没有突变, 没有大的相变. 图 3B 将 4 个不同温度 (25、31、37、41 °C) 脂质体的静态数据进行对比, 可以清晰地看出脂质体的相对分子质量 ($q \rightarrow 0, HC/R_w=1/M_w$) 随着温度的升高而增加. 对于 DPPC/PA (摩尔比为 1:2) 脂质体体系, 在 $T < T_m$ 时, 由于大量长链脂肪酸的存在, 磷脂分子难以保持稳定的凝胶态结构 (L_β); 并且由于低温培养, 产生一种共晶体的结构. 随着温度的升高, DPPC 和 PA 间的氢键被破坏, 共晶体消失, 链运动能力增强, 脂质体膜缺陷产生, 导致聚集、融合, 甚至破裂. 图 2 中没有观察到小尺寸粒子出现, 而且 R_h 和分子量随温度显著增加 (图 3), 这都表明脂质体的破裂是可以忽略的. 聚集或者通过融合而形成非对称的囊泡结构应该是占主导的, 这与粒子分布随温度增加出现角度依赖性相符的. 在更高的温度下, 脂质体会因缺陷过大和剧烈的聚集而发生相分离, 但我们更感兴趣

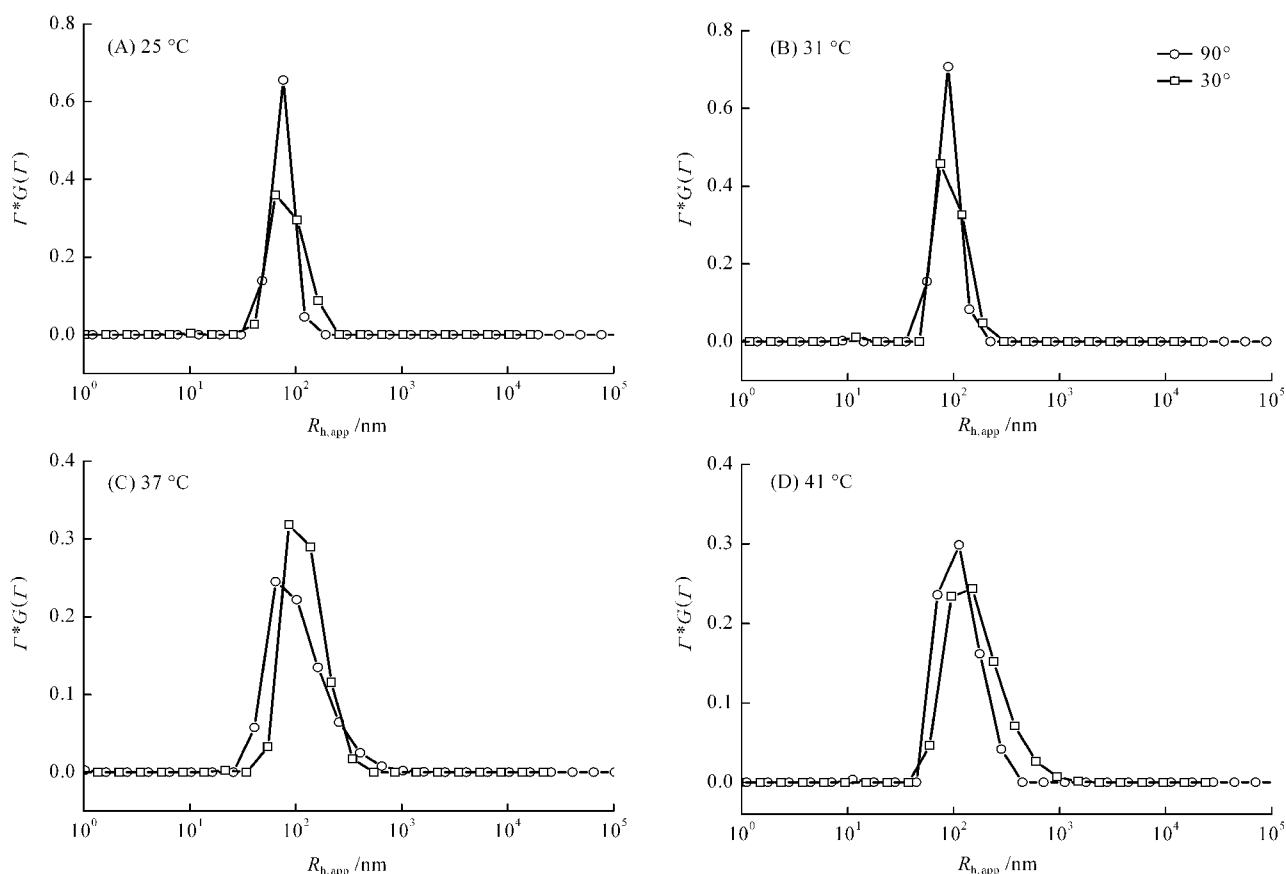


图 2 升温过程中 DPPC/PA 脂质体在不同温度下的粒径分布

Fig.2 $R_{h,app}$ distribution of DPPC/PA liposome at different temperatures during the heating process

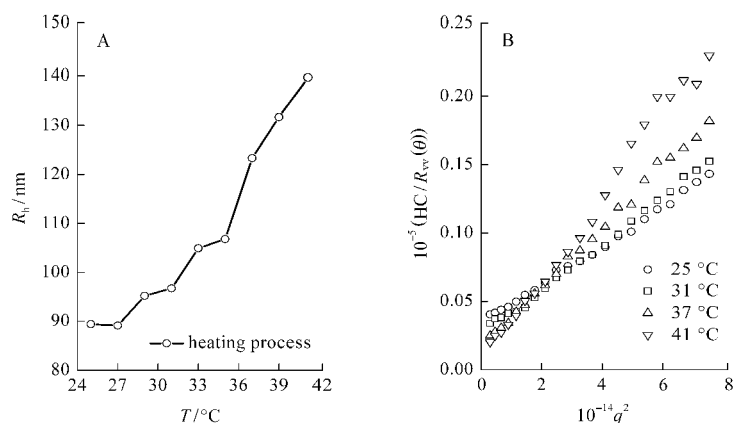


图 3 升温过程中 DPPC/PA 脂质体在不同温度下零角度的流体力学半径(A)和静态光散射图(B)

Fig.3 R_h (A) and SLS results(B) of DPPC/PA liposome in HEPES buffer at different temperature during the heating process

的是相变前降温对体系的影响。

2.3 降温过程中脂质体的变化

图 4 是同一体系在降温过程中粒径的分布。随着温度的降低, 粒径仍然保持一个单峰的分布, 并且逐渐变宽, 粒径也有变大的趋势, 说明体系中仍然有较大粒子的生成。降温无法使脂质体回到初始状态, 这也说明脂质体是一个非热力学平衡的体系, 一旦

引发融合或聚集, 该过程会自发进行。

图 5A 为外推到零散射角度下, 流体力学半径 R_h 随温度降低的变化曲线。随着温度的降低, 脂质体的粒径仍然在不断增长。整个过程可以分为两个部分: 41–37 °C 时, 脂质体粒径快速上升, 聚集和融合仍然占主导地位; 37–25 °C 时, 粒径增速减缓。图 5B 将 4 个不同温度(41、37、31、25 °C)下脂质体的静

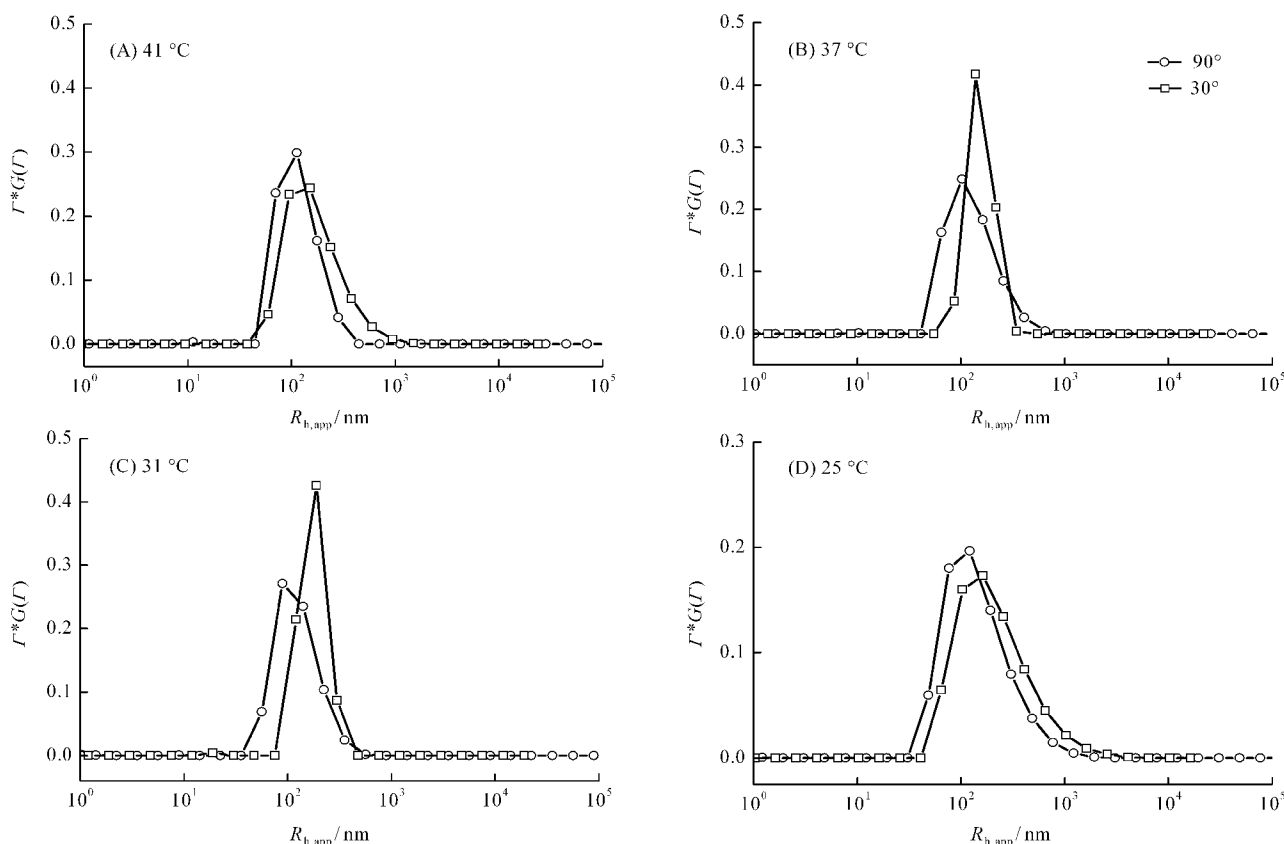


图 4 降温过程中 DPPC/PA 脂质体在不同温度下的粒径分布

Fig.4 $R_{h,app}$ distribution of DPPC/PA liposome at different temperatures during the cooling process

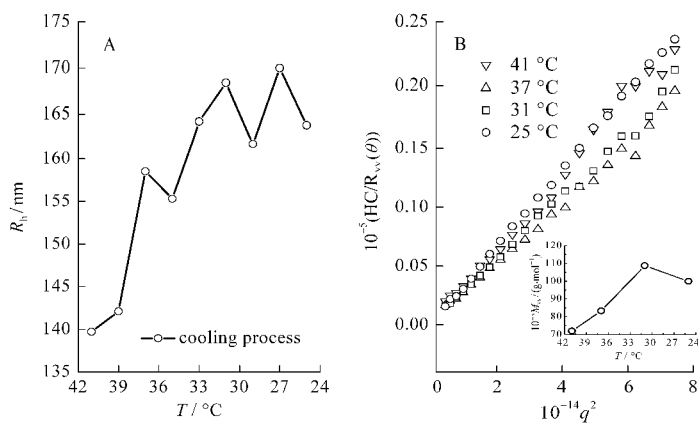


图 5 降温过程中在不同温度下 DPPC/PA 脂质体在零角度的流体力学半径(A)和静态光散射图(B)

Fig.5 R_h (A) and SLS results (B) of DPPC/PA liposome at different temperature during the cooling process

Inset in (B) shows the temperature dependence of the relative molecular mass.

态数据进行了对比. 可以看出脂质体的相对分子质量随温度也在增加. 重新降温到 25 °C 时, 脂质体的 R_h 是升温前的 $164/89.4=1.8$ 倍, 相对分子质量是升温前的 3.7 倍. 如果仅有融合过程存在, 那么分子量增加的倍数应该是粒径增加倍数的平方(即 $1.8^2=3.24$ 倍). 我们得到的结果比 3.24 要大, 说明有比较密集的堆积发生.

2.4 变温过程中脂质体结构的稳定性

根据光散射理论, 囊泡结构的形状因子符合公式(4). 如图 6A 所示, 初始脂质体的光强角度分布与拟合曲线比较一致, 证明其为囊泡结构^[21,25-26]. 误差可能是囊泡的多分散性引起的. 但在升温或降温过程中所测得的曲线(图 6(B, C))与理论拟合结果有较大偏离, 说明囊泡结构遭到破坏, 这与图 2 和图 4 的

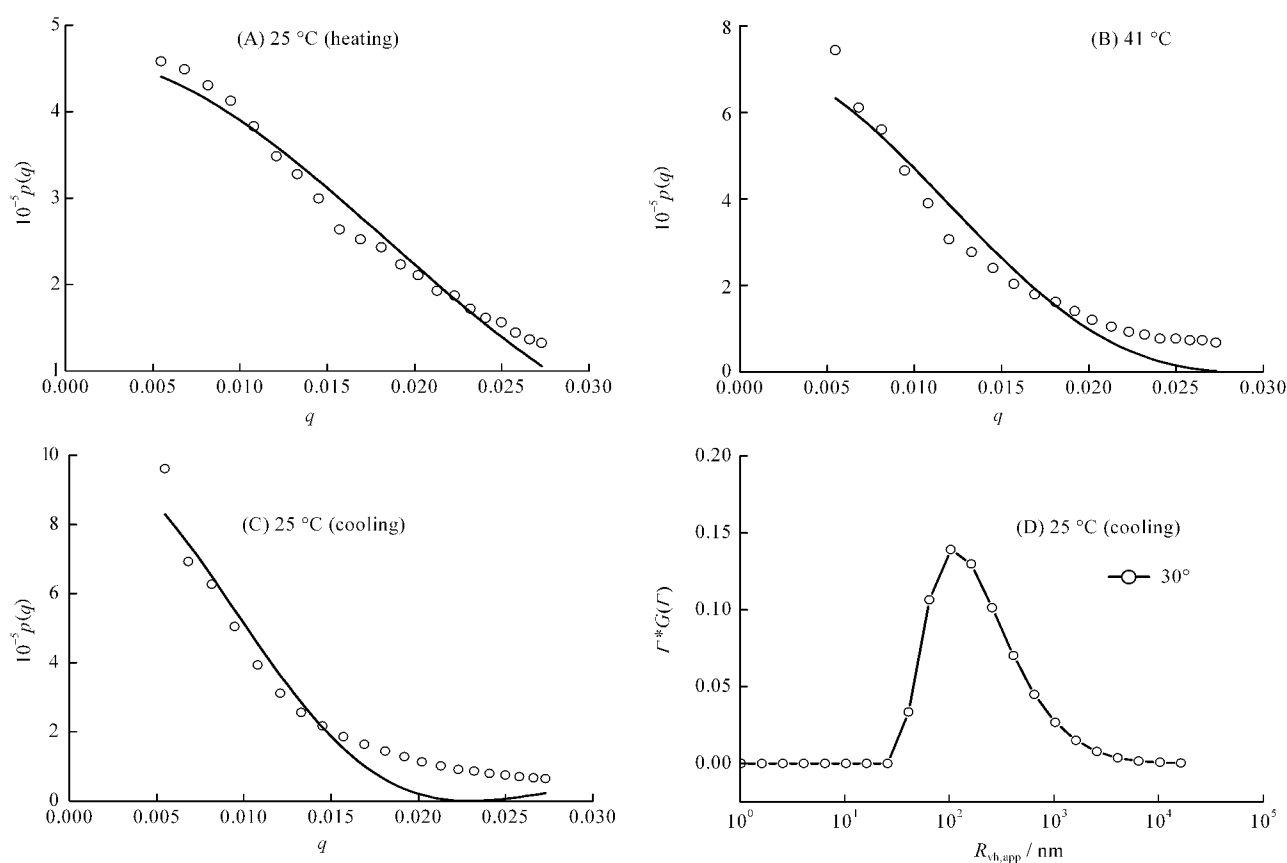


图 6 变温实验中 DPPC/PA 脂质体结构的不稳定性(A-C)和脂质体的各项异性(D)

Fig.6 Unstability (A-C) and anisotropic structure (D) of DPPC/PA liposome at different temperature

结果一致. 另外我们还测定了变温实验后, R_{vh} 散射模式下的粒径分布(散射角为 30°). 由于激光为偏振光, 对各向同性体系而言, 在垂直于偏振光方向的散射可以忽略不计. 如图 6D 所示, DPPC/PA 脂质体在降温到 25°C 时, R_{vh} 有很强的散射, 说明体系中存在着一定的各项异性. 一则是融合过程中, 囊泡的对称结构发生了改变, 二则是聚集体结构存在特定取向.

综合以上光散射结果, 并结合文献中关于磷脂酰胆碱/脂肪酸(PC/FA)体系随温度发生相变的报道^[13,15,17], 我们认为 $25\text{--}41^\circ\text{C}$ 的温度变化过程是由脂质体由凝胶相到类反六方柱状相的转变引起的. 脂质体是由磷脂分子构成的具有双分子层结构的囊泡, 各个囊泡在水中相互排斥保持了一定的稳定性. 然而对于粒径较小的脂质体, 由于脂质膜表面的张力和曲率的影响, 倾向于融合形成较大的脂质体. 对于单一组分的脂质体, 缺乏外加的影响促进它的融合或聚集. 而大量脂肪酸的加入破坏了磷脂分子烷基链之间的协同作用, 也就是破坏了磷脂分子的凝胶态, 并且能够随温度的升高加剧这一影响. 不同囊

泡上的富含脂肪酸的区域倾向于形成胶束并在脂质膜表面形成缺陷位置. 由于整个囊泡上的缺陷部位扩大造成整个囊泡的不稳定, 从而导致囊泡的聚集及融合. 当升温超过 42°C 时, DPPC/PA 脂质体开始沉淀, 直到其 T_h 温度, 沉淀物呈反六方柱状相堆积^[27]. 但在相变点之前, 由于脂肪酸分子的流动性, 脂质体在富集脂肪酸分子的区域发生黏合, 黏合区呈类反六方柱状相, 也就是过渡态. 这种聚集随温度升高而加剧, 表现为尺寸和分子量的增加(图 3). 由于聚集偏离了囊泡结构, 从而表现出角度依赖性. 另外, 由于囊泡是动力学稳定态, 即便温度降低, 聚集仍然会发生(图 5). 类反六方柱状相具有一定的取向, 因而 R_{vh} 方向有散射峰出现. 相对于聚集体, 脂质体融合形成大囊泡的比例比较小.

3 结论

结合动、静态激光光散射, 我们跟踪了 DPPC/PA 脂质体随温度的变化过程, 并获得了关于 DPPC/PA 脂质体聚集过程的大量信息, 例如分子量, 形态,

尺寸及其分布的变化规律;通过对数据拟合结果与光散射理论公式进行对比,可以观察到聚集和融合现象的共存;光散射各项异性结果也对经典的聚集-“stalk”中间态-融合这一理论是有力的补充.通过光散射的运用,对脂质体融合和聚集机理有了更深入的认识.从而也证明了动、静态光散射可以获得荧光共振能量转移技术所得不到的关于脂质体融合机理的信息.

References

- 1 Bangham, A. D.; Horne, R. W. *Journal of Molecular Biology*, **1964**, **8**: 660
- 2 Basu, S. C.; Basu, M. *Methods in Molecular Biology*, **2002**, **199**: 1
- 3 Lo, Y. L.; Rahman, Y. E. *J. Pharm. Sci.*, **1995**, **84**: 805
- 4 van Dijck, P. W. M.; Kaper, A. J.; Oonk, H. A. J.; de Gier, J. *Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes*, **1977**, **470**: 58
- 5 Blaurock, A. E.; McIntosh, T. J. *Biochemistry*, **1986**, **25**: 299
- 6 Slater, J. L.; Huang, C. *Biophys. J.*, **1987**, **52**: 667
- 7 Koynova, R.; Caffrey, M. *Biochimica Et Biophysica Acta: Reviews on Biomembranes*, **1998**, **1376**: 91
- 8 Cevc, G.; Richardsen, H. *Adv. Drug Deliver Rev.*, **1999**, **38**: 207
- 9 Lentz, B. R. *Eur. Biophys. J. Biophys.*, **2007**, **36**: 315
- 10 Bentz, J.; Duzgunes, N.; Nir, S. *Biochemistry*, **1983**, **22**: 3320
- 11 Jahn, R.; Scheller, R. H. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.*, **2006**, **7**: 631
- 12 Papahadjopoulos, D.; Nir, S.; Duzgunes, N. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **1990**, **22**: 157
- 13 Knecht, V.; Mark, A. E.; Marrink, S. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, **128**: 2030
- 14 Templer, R. H.; Seddon, J. M.; Warrender, N. A.; Syrykh, A.; Huang, Z.; Winter, R.; Erbes, J. *J. Phys. Chem. B*, **1998**, **102**: 7251
- 15 Seddon, J. M.; Templer, R. H.; Warrender, N. A.; Huang, Z.; Cevc, G.; Marsh, D. *Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes*, **1997**, **1327**: 131
- 16 Zellmer, S.; Cevc, G.; Risse, P. *Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes*, **1994**, **1196**: 101
- 17 Cevc, G.; Seddon, J. M.; Hartung, R.; Eggert, W. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1988**, **940**: 219
- 18 Kantor, H. L.; Prestegard, J. H. *Biochemistry*, **1978**, **17**: 3592
- 19 Rogerson, M. L.; Robinson, B. H.; Bucak, S.; Walde, P. *Colloid Surface B*, **2006**, **48**, 24
- 20 Torchilin, V. P.; Weissig, V. *Liposomes: a practical approach*. New York: Oxford University Press, 1994 [Torchilin, V. P.; Weissig, V. 脂质体. 邓意辉, 徐 辉 译. 北京: 化学工业出版社, 2007: 3-10]
- 21 Pencer, J.; Hallett, F. R. *Langmuir*, **2003**, **19**: 7488
- 22 Wu, C.; Zhou, S. *Macromolecules*, **1995**, **28**: 8381
- 23 Schmidt, M.; Stockmayer, W. H. *Macromolecules*, **1984**, **17**: 509
- 24 Zhou, S. Q.; Burger, C.; Chu, B.; Sawamura, M.; Nagahama, N.; Toganoh, M.; Hackler, U. E.; Isobe, H.; Nakamura, E. *Science*, **2001**, **291**: 1944
- 25 Li, S.; Palmer, A. F. *Langmuir*, **2004**, **20**: 4629
- 26 Hallett, F. R.; Watton, J.; Krygsman, P. *Biophys. J.*, **1991**, **59**: 357
- 27 Koynova, R.; Tenchov, B. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **2001**, **6**: 277