

拉曼光谱研究人参皂苷 Rb1 与 DPPC 双层膜的作用

惠歌¹, 赵雨², 张巍¹, 谢云飞¹, 杨竞秀¹, 赵大庆², 赵冰^{1*}

1. 吉林大学超分子结构与材料国家重点实验室, 吉林 长春 130012
2. 长春中医药大学新药研发中心, 吉林 长春 130117

摘要 为深入了解人参皂苷的分子药理学特性, 阐明人参皂苷与细胞膜的作用机制, 利用拉曼光谱从分子水平研究了不同浓度人参皂苷 Rb1 与 DPPC(二棕榈酰磷脂酸胆碱)双层膜的作用。结果表明, 人参皂苷 Rb1 没有改变 DPPC 的极性头部 O—C—C—N⁺ 的稳定构象, 极性头仍然平行于膜表面。并且, 拉曼峰值比 I_{1096}/I_{1126} , I_{1096}/I_{1062} 和 I_{2848}/I_{2880} 随着药物浓度的增加而相应的变大, 说明 Rb1 增加了烃链的无序度, 增强了双层膜的流动性。由此推测该药物与 DPPC 的作用可能由于皂苷分子内及分子间的氢键与磷脂双层膜的极性头部相作用而停留在膜的表面。

关键词 拉曼光谱; 人参皂苷 Rb1; DPPC 双层膜

中图分类号: O657.3 **文献标识码**: A **DOI**: 10.3964/j.issn.1000-0593(2010)09-2393-04

引言

研究药物与细胞膜的作用对于了解药效及改善其生物性能是极为重要的。不论它们是否穿过细胞膜, 与膜中的蛋白结合, 还是直接影响磷脂分子本身的结构, 药物都必须与细胞膜发生作用。磷脂不仅是细胞膜的重要组成成分之一, 而且磷脂双分子层是细胞膜结构的基本骨架。由于 DPPC(1,2-dipalmitoyl-glycero-3-phosphocholine, 二棕榈酰磷脂酸胆碱)具有脂质双分子层结构, 因此常作为自然膜的模型广泛应用于研究药物与生物膜的相互作用^[1-3]。

人参皂苷是人参中的主要活性成分^[4], Rb1 作为其中一种重要的四环三萜皂苷, 因具有显著的药理作用而受到国内外学者的重视^[5-7]。目前, 人参皂苷 Rb1 的生理活性研究已从动物整体水平发展到细胞水平^[8, 9], 因此研究人参皂苷 Rb1 对细胞膜的影响显得非常重要, 有助于了解 Rb1 对机体的药理学作用。王凡等利用差示扫描量热技术和核磁共振技术研究了 DPPC 双层膜相变温度与 Rb1 的关系, 发现 Rb1 降低了 DPPC 的相变温度, 增加了膜的流动性^[10]。目前尚无从分子角度研究两者之间作用的文献报道。

拉曼光谱对研究分子内和分子间的相互作用非常敏感, 常作为研究细胞膜结构和构象变化的有力工具^[11], 许多工作研究了应用拉曼光谱技术探讨金属离子对 DPPC 双层膜结

构的影响^[12, 13]。

本文利用拉曼光谱技术研究了不同浓度 Rb1 作用下的 DPPC 双层膜的结构, 通过分析极性头部区域 C—N 伸缩 ($650\sim 850\text{ cm}^{-1}$)、C—C 伸缩 ($1\ 000\sim 1\ 600\text{ cm}^{-1}$) 以及 C—H 伸缩 ($2\ 750\sim 3\ 000\text{ cm}^{-1}$) 等几种振动模式, 进一步揭示了 DPPC 分子的构象变化信息, 为深入了解人参皂苷的分子药理学特性, 阐明人参皂苷的作用机制提供了依据。

1 实验部分

1.1 样品制备

人参皂苷 Rb1 标准品由中国药品生物制品检定所提供, 分子主要由四环三萜母核、葡萄糖环及与 C₂₀ 相连的碳链 3 部分组成[图 1(a)]。DPPC[图 1(b)]购于 Avanti 公司, 将 Rb1 与 DPPC 按不同比例混合, 二者浓度比分别为 0, 10, 20 和 30 mol%, 首先将其溶于氯仿-甲醇溶液(V:V=7:3)中, 通氮气, 待溶剂挥发完毕后, 在真空条件下过夜。加入一定量二次去离子水进行水化, 保持所有样品中 DPPC 终浓度均为 $100\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下超声 2 h。测量前样品于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存 24 h。

1.2 Raman 光谱检测

样品用 Renishaw 公司 System 1000 型共聚焦显微拉曼光谱仪进行检测, 使用 Ar⁺ 激光器的 514.5 nm 线为激发光

收稿日期: 2009-11-28, 修订日期: 2010-02-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(20773044, 20873050, 30873371)和国家科技支撑计划项目(2007BAI38B02)资助

作者简介: 惠歌, 女, 1981 年生, 吉林大学超分子结构与材料国家重点实验室博士研究生

* 通讯联系人 e-mail: zhaobing@jlu.edu.cn

源, 到达样品上的激光功率约为 1 mW, 分辨率为 4 cm^{-1} , 积分时间 30 s, 10 次累加。室温下检测。

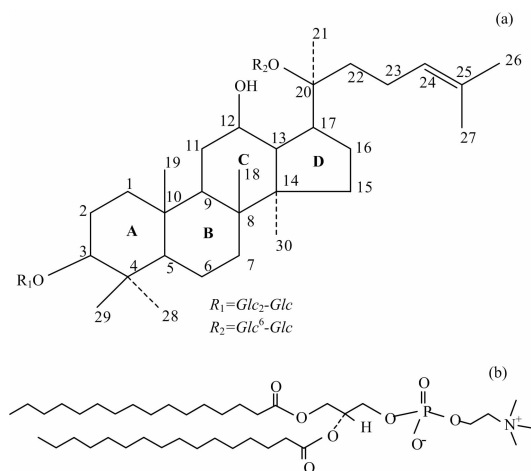


Fig. 1 Molecular structure of ginsenoside Rb1 (a) and DPPC (b)

2 结果与讨论

2.1 人参皂苷 Rb1 对 DPPC 分子极性头部 O—C—C—N⁺ 骨架的影响

不同浓度 Rb1 作用下的 DPPC 双层膜在 $650\sim 850\text{ cm}^{-1}$ 的拉曼光谱如图 2 所示。当 DPPC 极性头部的 O—C—C—N⁺ 骨架处于旁式构象时, C₄N⁺ 的 C—N 伸缩振动出现在 717 cm^{-1} 处^[14]; 而当 O—C—C—N⁺ 骨架处于反式构象时, 则在 770 cm^{-1} 处出现振动峰^[15]。当加入不同浓度的 Rb1 后, 717 cm^{-1} 峰保持不变, 并且未出现新的 770 cm^{-1} 峰, 说明 Rb1 并未造成 DPPC 双层膜极性头部骨架构象的改变, 极性头仍处于旁式构象且平行于 DPPC 双层膜的表面。

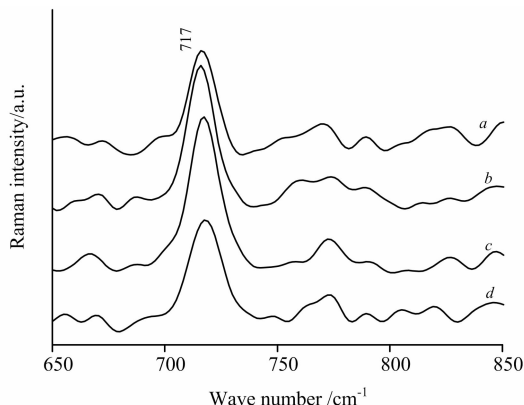


Fig. 2 Raman spectra of DPPC with different concentration of ginsenoside Rb1 ($650\sim 850\text{ cm}^{-1}$)

a: DPPC alone; b: DPPC+Rb1(10%);
c: DPPC+Rb1(20%); d: DPPC+Rb1(30%)

2.2 Rb1 对 DPPC 分子脂链部分 C—C 骨架构象的影响

拉曼光谱中的 C—C 骨架振动可以用来表征脂链的反式-旁式构象变化。面内和面外的 C—C 伸缩振动出现在

$1\ 000\sim 1\ 200\text{ cm}^{-1}$ 区域内(如图 3 所示), 表现为 $1\ 062$, $1\ 096$, $1\ 126\text{ cm}^{-1}$ 3 个峰。 $1\ 062$ 和 $1\ 126\text{ cm}^{-1}$ 是全反式脂链片段振动的 B_{1g} 和 A_g 模式^[12], 同时 $1\ 096\text{ cm}^{-1}$ 是由于脂链结构中有旁式构象的振动模式。通常用 $I_{1\ 096}/I_{1\ 126}$ 和 $I_{1\ 096}/I_{1\ 062}$ 表示脂链的无序程度。由表 1 可以看出, 随着 Rb1 浓度的增加, $I_{1\ 096}/I_{1\ 062}$ 和 $I_{1\ 096}/I_{1\ 126}$ 也逐渐增大, 这意味着 DPPC 脂链中 C—C 的旁式构象增多, 脂链的无序性增强。其他的拉曼谱峰指认如表 2 所示。

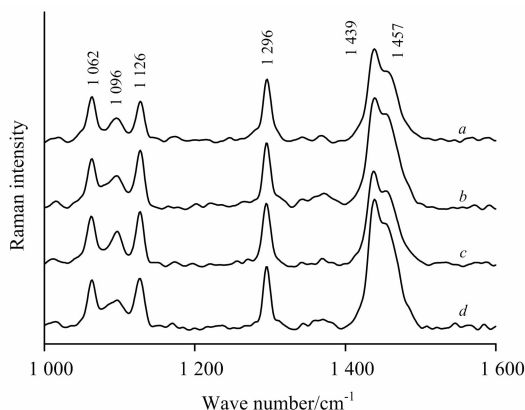


Fig. 3 Raman spectra of DPPC with different concentration of ginsenoside Rb1 ($1\ 000\sim 1\ 600\text{ cm}^{-1}$)

a: DPPC alone; b: DPPC+Rb1(10%);
c: DPPC+Rb1(20%); d: DPPC+Rb1(30%)

Table 1 Peak intensity ratios (I_a/I_b) corresponding to the DPPC bilayers containing different mole fraction of ginsenoside Rb1

Sample/(mol %)	$I_{1\ 096}/I_{1\ 062}$	$I_{1\ 096}/I_{1\ 126}$	$I_{2\ 848}/I_{2\ 880}$
DPPC	0.808 7	1.012 36	1.000 4
DPPC/Rb1(10)	0.957 89	1.068 41	1.002 08
DPPC/Rb1(20)	1.473 99	1.440 21	1.007 84
DPPC/Rb1(30)	1.650 4	1.457 24	1.026 32

Table 2 Other Raman spectral assignments of the interactions between ginsenoside Rb1 and DPPC

Wave number/ cm^{-1}	Assignments
1 296	ρCH_2 of acyl chain
1 439	ρCH_2 of acyl chain
1 457	ωCH_2 of acyl chain
2 936	Fermi resonance, terminal methyl $\nu_s\text{ C-H}$ of the acyl chain

2.3 Rb1 对 DPPC 双层膜流动性的影响

亚甲基 C—H 键伸缩振动出现在 $2\ 750\sim 3\ 000\text{ cm}^{-1}$ 区域内(如图 4 所示)。 $2\ 848$ 和 $2\ 880\text{ cm}^{-1}$ 分别为 DPPC 分子中亚甲基的对称和反对称伸缩振动, 它们对 DPPC 脂链的链间构象和晶格堆积特别敏感, 峰值比 $I_{2\ 848}/I_{2\ 880}$ 反映了侧链间的相互作用, 界定了双层膜的动力学特性^[13], 因此常用 $I_{2\ 848}/I_{2\ 880}$ 表征脂链侧向耦合能力以及有序-无序排列^[16]。从表 1 可以看出, 加入 Rb1 后比值有所增加, 说明由于人参皂

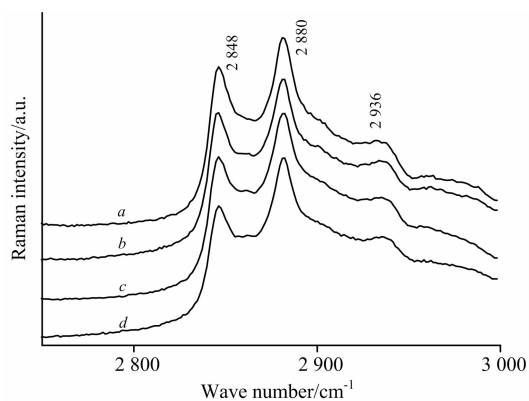


Fig. 4 Raman spectra of DPPC with different concentration of ginsenoside Rb1 (2 750~3 000 cm^{-1})
a: DPPC alone; *b*: DPPC+Rb1(10%);
c: DPPC+Rb1(20%); *d*: DPPC+Rb1(30%)

昔 Rb1 分子的加入, 降低了侧链间的有序性排列, 膜的流动性得到增强。

3 结 论

本文利用拉曼光谱研究了不同浓度人参皂苷 Rb1 对 DPPC 双层膜的相互作用, 结果表明, Rb1 没有改变 DPPC 极性头部骨架构象变化, 极性头仍然平行于膜表面。对 DPPC 分子脂链部分 C—C 骨架构象的作用表明, Rb1 分子的加入, 脂链中无序性的构象增多, 烃链间的无序性增强。并且 DPPC 在 2 750~3 000 cm^{-1} 内的 C—H 伸缩振动表明, Rb1 增强了双层膜的流动性。该药物与 DPPC 的相互作用可能是由于皂苷分子中多个糖环和羟基的存在, 分子内及分子间相互作用容易形成氢键, 与 DPPC 分子极性头部相作用而聚集在膜的表面。

参 考 文 献

- [1] Hayet B, Karim S, Laurence L, et al. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, 1778: 2535.
- [2] Fox C B, Horton R A, Harris J M. *Anal. Chem.*, 2006, 78: 4918.
- [3] Kyrikou I, Hadjidakou S K, Kovala-Demertzi D, et al. *Chem. Phys. Lipids*, 2004, 132: 157.
- [4] QU Xiao-bo, ZHAO Yu, SONG Yan, et al(曲晓波, 赵 雨, 宋 岩, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2008, 28(3): 567.
- [5] Jiang Q S, Huang X N, Dai Z K, et al. *J. Ethnopharmacol.*, 2007, 111: 567.
- [6] Lee H U, Bae E A, Han M J, et al. *Liver Int.*, 2005, 25: 1069.
- [7] Park E K, Shin Y W, Lee H U, et al. *Biol. Pharm. Bull.*, 2005, 28(4): 652.
- [8] Xia C H, Wang G J, Sun J G, et al. *J. Chromatogr. B*, 2008, 862: 72.
- [9] Wang Y G, Ye X, Ma Z C, et al. *Eur. J. Pharmacol.*, 2008, 601: 73.
- [10] WANG Fan, et al(王 凡, 等). *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Jilinensis(吉林大学自然科学学报)*, 1995, (3): 65.
- [11] Cherney D P, Conboy J C, Harris J M. *Anal. Chem.*, 2003, 75: 6621.
- [12] Zhao B, Li X M, Zhao D Q, et al. *Spectro. Lett.*, 1998, 31(8): 1825.
- [13] Li X M, Zhao B, Zhao D Q, et al. *Thin Solid Films*, 1996, 284-285: 762.
- [14] Gardikis K, Hatziantoniou S, Viras K, et al. *Thermochim. Acta*, 2006, 447: 1.
- [15] Akutsu H. *Biochemistry*, 1981, 20: 7359.
- [16] Lamba O P, Borchman D, Sinha S K, et al. *J. Mol. Struct.*, 1991, 248: 1.

Raman Spectroscopy Study on the Interaction of Ginsenoside Rb1 with DPPC Bilayers

HUI Ge¹, ZHAO Yu², ZHANG Wei¹, XIE Yun-fei¹, YANG Jing-xiu¹, ZHAO Da-qing², ZHAO Bing^{1*}

1. State Key Laboratory of Supramolecular Structure and Materials, Jilin University, Changchun 130012, China

2. Center for New Drugs Research, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China

Abstract In the present work, the authors studied the interaction of ginsenoside Rb1 with lipid bilayers composed of DPPC using Raman spectroscopy. The conformational changes of DPPC molecule were further revealed by analyzing its vibrational modes such as the C—N stretching mode in the polar head-group region (650-850 cm^{-1}), C—C stretching (1 000-1 200 cm^{-1}), and C—H stretching (2 750-3 000 cm^{-1}). The results indicated that there was little influence of Rb1 on the conformation of O—C—C—N⁺ backbone in the choline group of DPPC bilayers. The polar head group is still extending parallel to the bilayer surface. The intensity ratios $I_{1\ 096}/I_{1\ 126}$ and $I_{1\ 096}/I_{1\ 062}$ represent the gauche/trans ratio. Both of them increased with adding the concentration of Rb1 to DPPC bilayers. The increment of gauche/trans ratio indicates that the disorder/order proportion of the

alkyl chains arises. The ordering conformations in lipid chains decreased while the interchain disorder increased. The intensity ratio I_{2848}/I_{2880} in the region of hydrocarbon chain C—H stretching mode reflects phase transition and has been demonstrated as a sensitive parameter of both inter-chain and intra-chain disorder/order intensity ratio in bilayer alkyl chains. The higher the ratio, the more disordered the hydrocarbon chains. Therefore, the increasing ratio I_{2848}/I_{2880} with increasing amount of Rb1 indicates that this drug decreases the intermolecular ordering of the lipid lattice, and simultaneously increases the membrane lipid fluidity. In addition, previous study showed that an electrostatic interaction exists between sphingomyelin bilayers and drugs like scopolamine and anisodamine. Compared with those results, the action mode of ginsenoside Rb1 on DPPC bilayers may be because of hydrogen bonds that can be easily formed for the sugar moieties and the hydroxyls in Rb1 molecule. Therefore, the mechanism of drug action on DPPC bilayers may be resulting from the intra or inter hydrogen bonds and the head-group hydrophilic region of the DPPC membrane.

Keywords Raman spectroscopy; Ginsenoside Rb1; DPPC bilayers

(Received Nov. 28, 2009; accepted Feb. 26, 2010)

* Corresponding author

欢迎订阅 欢迎投稿 欢迎刊登广告

《分析测试学报》

国内刊号: CN 44-1318/TH

国际刊名化代码 CODEN: FCEXES

国外代号: BM 6013

国际标准刊号: ISSN 1004-4957

邮发代号: 46-104

广告经营许可证: 440000100186

《分析测试学报》是由中国分析测试协会、中国广州分析测试中心共同主办的全国性学术刊物, 中文核心期刊。刊登质谱学、光谱学、色谱学、波谱学、电化学、电子显微学等方面的分析测试新理论、新方法、新技术的研究成果, 介绍新仪器装置及在生物、医药、化学化工、商检、食品检验等方面实用性强的实验技术。适合科研院所、高等院校、检测机构、医药、卫生以及厂矿企业分析测试工作和管理人员阅读。

经过多年的发展, 本刊已成为国内知名的化学类核心期刊。2006年, 影响因子在全国分析学科刊物排名中列第1名, 被引频次每年递增约30%, 稿源丰富, 基金论文比超过70%。近几年, 本刊刊发的论文被CA(美国化学文摘)收录率达94%, 2006年引文频次在CA千种表中国部分中列第38名, 并被国际上其它知名的数据库如日本科技文献速报、俄罗斯文摘、英国分析文摘(AA)、《质谱公报》等收录。在《中文核心期刊要目总览》2008年版的化学类期刊列第10位; 进入由全国8000种期刊遴选出的500种科技期刊组成的“中国科技期刊精品数据库”; 中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计刊源; 中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊); 《中国科学引文数据库》来源期刊; 中国期刊全文数据库(CJFD)收录期刊; 《中国核心期刊(遴选)数据库》收录; 《中国学术期刊(光盘版)》全文收录期刊; 《中国期刊网》全文收录期刊; 《中国学术期刊文摘(中、英文版)》收录为源期刊等。

本刊为月刊, 国内外公开发行。大16开, 单价: 12.00元/册, 全年144元。请在全国各地邮局订阅。未在邮局订到者可直接向本编辑部补订。补订办法: 请从邮局汇款至广州市先烈中路100号《分析测试学报》编辑部, 邮编: 510070, 写明订户单位、详细地址、收刊人姓名、邮编及补订份数(全年或某期), 电话: (020)87684776 或 37656606, <http://www.fxcsxb.com>(可在线投稿), e-mail: fxcsxb@china.com。