

HP- β -CD 对脂质体和真核细胞通透性的影响

崔兰玉, 王 敏, 申雁冰, 骆健美, 郑 宇

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘 要: 以薄膜水化法制备的阴离子脂质体的平均粒径为 (180 ± 2.3) nm, Zeta 电位为 -33.9 mV. 分别以脂质体中钙黄绿素的泄露量和紫外分光光度法测定蛋白含量, 以表征羟丙基- β -环糊精 (HP- β -CD) 对脂质体和真核微生物蓝色犁头霉 (*Absidia coerulea*) 细胞通透性的影响. 结果表明: 在 HP- β -CD 作用下, 两者的通透性变化趋势一致. 分析比较 HP- β -CD 作用下的甾体化合物 17 a, 21-二羟基孕甾-4-烯-3, 20-二酮 (RS) 在脂质体和菌体细胞中的通透变化的相关性, 表明脂质体与细胞通透变化的拟合度达到 97.9%, 相关性显著 ($P < 0.05$). 由此说明, 本研究建立的脂质体制备方法以及获得的脂质体能够模拟真核细胞, 应用于真核微生物的生物学研究.

关键词: 脂质体; 羟丙基- β -环糊精; 蓝色犁头霉; 通透性

中图分类号: Q31 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2012)04-0007-05

Influence of HP- β -CD on the Penetration of Nuclear Microbial Cell and Liposome

CUI Lanyu, WANG Min, SHEN Yanbing, LUO Jianmei, ZHENG Yu

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Liposome with negative charge was prepared by film hydration method. The average diameter of the liposome was about 180 ± 2.3 nm and zeta potential was about -33.9 mV. The effect of hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) on the penetration of liposome was determined by calculating the leakage of calcium. With the increase of the concentration of HP- β -CD and cholesterol, the penetration of liposome increased. Similarly, the penetration of *Absidia coerulea* cells increased when the concentration of HP- β -CD increased. The penetration of steroid 17 a-Hydroxypregna-4-ene-3, 20-dione (RS) into liposome had preferable relationship with the results of RS having penetrated into *Absidia coerulea* cells, and the relative coefficient was 97.9%. The liposome could be used to investigate the penetration of steroid into cells.

Key words: liposome; HP- β -CD; *Absidia coerulea*; penetration

脂质体由脂质双分子层组成, 内部为水相的闭合囊泡, 主要成分为磷脂, 如磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺等. 脂质体的组成与生物膜的组成类似. 磷脂形成脂质体时, 非极性尾部向内, 极性头部向外与水相接触, 具有脂双层结构, 与生物膜结构相似. 20 世纪 90 年代中期开始, 脂质体被广泛应用于药物与生物膜相互作用的研究领域. Pidgeon^[1] 研究小组根据药物的细胞膜通透性, 建立脂质体色谱技术模拟小肠上皮细胞对药物吸收过程. 由于脂质体

能很好地模拟细胞膜的脂双层结构和膜的流动性, 20 世纪 90 年代中期以来, 脂质体模拟细胞膜通透性方面得到发展. Balon 等^[2] 研究了药物在脂质体中的分配系数与药物小肠被动吸收的关系, 发现药物的小肠被动吸收量与药物在脂质体中的分配系数有良好的相关性. 由于甾体化合物生物催化过程中微生物具有种类多样性, 在不同的生长时期细胞膜组成出现不同的变化. 采用脂质体对细胞进行模拟以研究各种物质对菌体细胞的作用机理是一条有效的途径^[3-6].

收稿日期: 2012-02-27; 修回日期: 2012-03-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21076158); 教育部新世纪优秀人才计划 (NCET-08-0911)

作者简介: 崔兰玉 (1986—), 女, 山东青岛人, 硕士研究生; 通信作者: 王 敏, 教授, minw@tust.edu.cn.

脂质体的制备方法较多,常用的制备方法主要有逆向蒸发法、薄膜分散法、冻融法、注入法等^[7-9]。根据细胞表面负电荷的性质,本实验选用负电荷磷脂,采用薄膜水化法制备脂质体。同时通过比较羟丙基- β -环糊精(HP- β -CD)对甾体化合物 17 a, 21-二羟基孕甾-4-烯-3, 20-二酮(RS)在脂质体和蓝色犁头霉细胞中通量的影响,对制备的脂质体的性能进行研究。

1 材料与方法

1.1 试剂

卵磷脂、胆固醇均为色谱纯, Sigma 公司; HP- β -CD(平均取代度 6.5), 西安德立生物化工有限公司; RS(纯度 98.5%), 天津津药药业有限公司; 其他试剂均为市售分析纯。

1.2 脂质体的制备及表征

1.2.1 脂质体的制备方法^[10-12]

将适量的卵磷脂与胆固醇混合,溶于 7 mL 氯仿, 56 °C 旋转蒸发, 干膜后 55 °C 真空干燥过夜, 加入纯净水 20 mL, 超声 0.5 h, 即得表观均一、有乳光脂质体溶液。将制得的脂质体于 4 °C 保存备用。

1.2.2 粒径表征

水化超声后的脂质体采用 DelsaTM Nanoc 电位及纳米粒度分析仪测定粒度。

1.2.3 形态表征

将脂质体制成水浸片, 将相机 Nikon Digital camera D60 与光学显微镜 Motic BA400 联接获取脂质体图像。

1.2.4 稳定性表征

采用 DelsaTM Nanoc 电位及纳米粒度分析仪测定其电位稳定性及粒度分布稳定性^[13]。

1.3 蓝色犁头霉菌体的制备

蓝色犁头霉(*Absidia coerulea*)菌体的培养同文献[14]: 150 r/min 培养 7 h 后调节转速 170 r/min, 继续培养至稳定期(约 19 h)。收集培养液, 5 000 r/min 离心洗涤 3 次, 获得菌体, 4 °C 保存备用。

1.4 脂质体和蓝色犁头霉细胞通透性测定

采用钙黄绿素作为荧光探针, 将钙黄绿素以 0.25 mmol/L 溶于纯净水, 在脂质体制备过程中作为水相水化脂质膜, 考察 HP- β -CD 浓度对脂质体膜通透性的影响。

检测钙黄绿素的荧光强度, 采用激发光波长 492 nm, 发射光波长 517 nm。钙黄绿素的释放率用式(1)表征^[15-16]:

$$R_t = \frac{I_t - I_0}{I_{\max} - I_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中: R_t 是钙黄绿素的释放率, I_t 是当前荧光强度, I_0 是初始荧光强度, I_{\max} 是最大荧光强度。

最大荧光强度为加入足量 TritonX-100 将脂质体完全破坏, 即钙黄绿素全部释放的荧光强度。由于细胞在不同的生长阶段其磷脂和胆固醇的比例不同, 本研究采用如下 3 种不同磷脂和胆固醇相对含量的脂质体(A: 卵磷脂 0.10 mmol; B: 卵磷脂 0.08 mmol, 胆固醇 0.02 mmol; C: 卵磷脂 0.06 mmol, 胆固醇 0.04 mmol)来研究 HP- β -CD 作用下的脂质体膜通透性。

将蓝色犁头霉细胞在不同浓度的 HP- β -CD 中培养 8 h, 5 000 r/min 离心取上清液, 采用紫外分光光度计测定其在 280 nm 的吸光度。HP- β -CD 的浓度为 5、10、30、50、100 mmol/L, 生理盐水作为对照。

1.5 HP- β -CD 对甾体化合物进入脂质体以及蓝色犁头霉菌细胞的影响

分别取不同浓度的 HP- β -CD 溶液, 加入过量的 RS 充分饱和。将饱和溶液经 0.22 μ m 膜过滤, 除去未溶解的 RS, 此时溶液体积为 V_0 (单位为 mL), RS 的浓度为 c_0 (单位为 μ mol/L)。将质量为 m 的脂质体(单位为 g)与 RS 饱和溶液混合, 室温静置 0.5 h, 15 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 高效液相色谱法(HPLC)检测上清液中残留的 RS 浓度^[17], 此时 RS 浓度记为 c_1 (单位为 μ mol/L), 此时溶液的体积记为 V_1 (单位为 mL)。由式(2)计算单位质量脂质体吸附的 RS 量(单位为 μ mol/g)。

$$\text{吸附量} = \frac{V_0 c_0 - V_1 c_1}{m} \quad (2)$$

分别取不同浓度的环糊精溶液, 加入过量的 RS 充分饱和。将饱和液经 0.22 μ m 膜过滤, 除去未溶 RS, 此时溶液浓度为 c_0 (单位为 μ mol/L), 体积为 V_0 (单位为 mL)。将等量菌体与 RS 饱和液混合, 室温静置 0.5 h, 15 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 高效液相色谱检测上清液中残留的 RS 浓度^[17], 此时溶液的体积记为 V_1 (单位为 mL), 同理由式(2)计算单位质量的菌体吸附 RS 量(单位 μ mol/g)。

2 结果与讨论

2.1 脂质体的制备与表征

2.1.1 脂质体的形态与粒径分布

脂质体贮存期间各种外部物理化学环境因素主

要包括浓度、温度、添加剂、聚合物以及 pH 和金属离子等, 可以调控脂质体的聚集, 造成脂质体粒径的改变^[15-16]. 由于脂质体的热力学不稳定性, 在一定粒度范围内, 其粒径越大, 体系越不稳定. 本实验制得脂质体为球形, 独立分散(见图 1). 纳米激光粒度仪测定其粒径分布在 (180 ± 2.3) nm(见图 2), 粒度分布范围集中.

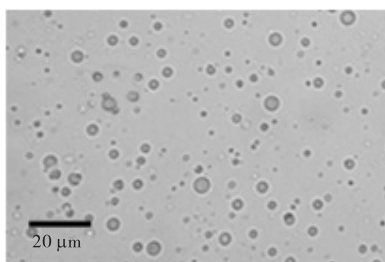


图 1 显微镜观察脂质体粒径的分布
Fig. 1 Microscope image of liposome

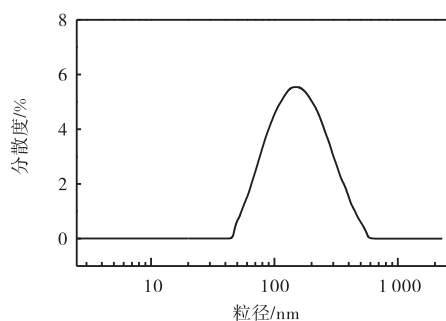


图 2 纳米激光粒度仪分析脂质体的粒径

Fig. 2 Diameter of liposome nano-analysed by PCS

2.1.2 脂质体稳定性分析

脂质体根据表面电荷的不同可以分为中性脂质体、阳性脂质体、阴性脂质体. 脂质体本身带有电荷, 脂质体的稳定性与电荷大小有关. 通过 DelsaTM Nanoc 电位分析仪确定制备的脂质体 Zeta 电位为 -33.90 mV, 绝对值大于 30, 是稳定分散体系^[18].

定时取样, 采用纳米粒度分析仪测定脂质体粒径, 以确定脂质体粒径的稳定性, 结果见表 1. 制备的脂质体粒径随保存时间的增加呈增大趋势, 在 7 d 内, 粒径在 180 nm 左右, 分布稳定.

表 1 脂质体粒径随时间变化

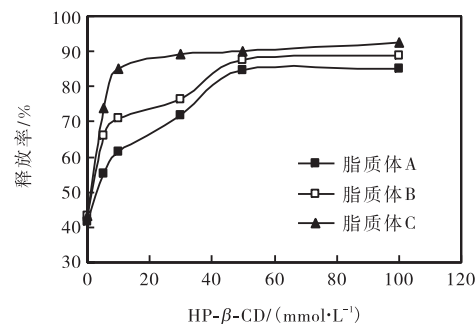
Tab. 1 Diameter of liposome with time

时间/d	1	7	21	30
粒径/nm	177.4	178.1	184.2	196.6

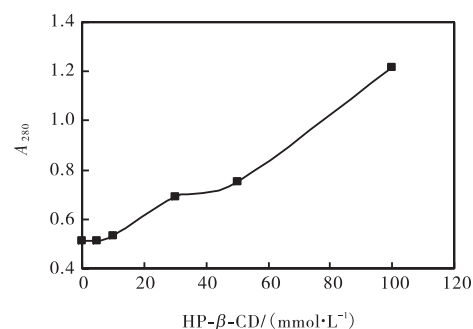
2.2 HP- β -CD 对脂质体膜通透性的影响

钙黄绿素是一种三苯甲烷类酸性染料, 在中性溶

液中发出非常强的黄绿色荧光. 钙黄绿素荧光强度随反应温度的升高而减弱, 温度升高加剧了分子的热运动, 使分子碰撞加剧, 产生自熄灭^[19]. 为更接近真核细胞模型, 本实验选择在生物转化反应温度下进行. 由于荧光有自猝灭现象, 当钙黄绿素的浓度很高时, 分子碰撞加剧, 因此猝灭现象非常明显, 由于猝灭的荧光将不再有荧光显示, 当钙黄绿素溶液被包覆于脂质体内部时, 其脂质体内部的荧光强度可忽略不计, 当钙黄绿素通过脂膜释放到溶液中后, 则可通过检测溶液环境中荧光强度的变化并计算荧光百分比以监测荧光剂的释放量^[11,19]. 不同种类的脂质体在 HP- β -CD 作用下钙黄绿素的释放曲线如图 3(a) 所示. 采用紫外分光光度计检测 280 nm 处的吸光度来表征细胞中蛋白泄露情况, 用于检测 HP- β -CD 对蓝色犁头霉细胞膜通透性影响, 结果如图 3(b) 所示.



(a) HP- β -CD 对脂质体中钙黄绿素的释放的影响



(b) HP- β -CD 对蓝色犁头霉细胞膜通透性的影响

图 3 HP- β -CD 对脂质体中钙黄绿素的释放以及蓝色犁头霉细胞通透性影响

Fig. 3 Influence of HP- β -CD on calcein released from liposome and *A. coerulea* cells penetration

由图 3(a) 可见, 加入 HP- β -CD 后, 脂质体内所包覆的钙黄绿素呈指数关系释放, 且其释放率随溶液中 HP- β -CD 浓度增加而增加. 同样, 如图 (b) 所示, 随着环糊精含量的增加, 蓝色犁头霉细胞中蛋白的释放程度也增加. HP- β -CD 对脂质体和蓝色犁头霉细

胞膜通透性的影响一致。

2.3 HP- β -CD 对甾体底物进入脂质体以及蓝色犁头霉细胞的影响

药物的转运是通过生物膜的过程, 药物在生物膜中的分配决定着药物的吸收、分布和疗效。生物膜是由磷脂双分子层构成, 脂质体膜与其极相近。利用脂质体色谱技术预测药物在机体内的小肠吸收情况, 发现药物在脂质体色谱中色谱行为与药物的吸收量之间存在着良好的相关性^[19]。而 HP- β -CD 对脂溶性化合物具有增溶效应^[20], 这种效应会导致脂溶性化合物在水相和细胞膜上的重新分配, 因此有必要研究 HP- β -CD 对生物转化中的重要化合物 RS 在膜中分配的影响。由图 4 可知, 进入细胞的 RS 量随着 HP- β -CD 浓度的提高而增加, 脂质体与蓝色犁头霉细胞的结果基本一致。通过 Matlab 7.1 分析两者的相关系数为 97.9%, 相关性显著 ($P < 0.05$)。进入细胞和脂质体的 RS 量随 HP- β -CD 浓度的提高而增加, 推测其原因主要是 HP- β -CD 的增溶效应, 使 RS 在水溶液的溶解度增大, 使得 RS 在两相中的总浓度增大; 由于 HP- β -CD 增加了细胞膜和脂质体的通透性, 在一定浓度范围内, 进入细胞和脂质体中的 RS 含量也会随之增加。

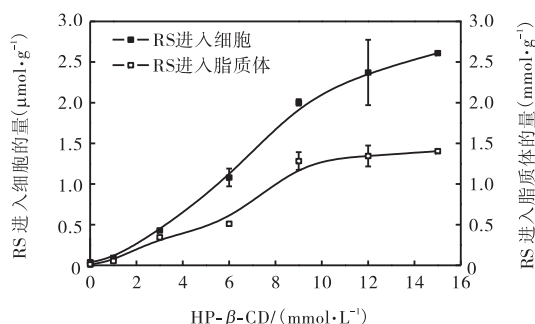


图 4 HP- β -CD 对 RS 透过脂质体以及蓝色犁头霉细胞的影响

Fig. 4 Influence of HP- β -CD on the penetration of RS into cells and liposome

3 结论

(1) 采用薄膜水化法制备的脂质体呈球形, 粒径 (180 ± 2.3) nm, 均一、稳定。

(2) 脂质体和蓝色犁头霉细胞在 HP- β -CD 作用下两者通透性的变化趋势一致; 通过比较甾体化合物 RS 在脂质体与蓝色犁头霉细胞中的通量, 相关系数为 97.9%, 相关性显著 ($P < 0.05$)。表明本文获得的脂

质体能够模拟真核细胞, 应用于微生物催化和抑菌物质作用机理等生物学研究。

参考文献:

- [1] Pidgeon C, Ong S, Liu H, et al. Chroma-tography: An in vitro screen for predicting drug membrane permeability[J]. Journal of Medicine Chemistry, 1995, 38(3): 590-594.
- [2] Balon K, Riebesehl B U, Muller B W. Drug liposome partitioning as a tool for the prediction of human passive intestinal absorption[J]. Pharmacology Research, 1999, 16(2): 882-888.
- [3] Suginta W, Mahendran K R, Chumjan W, et al. Molecular analysis of antimicrobial agent translocation through the membrane porin BpsOmp38 from an ultraresistant *Burkholderia pseudomallei* strain[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2011, 1808(6): 1552-1559.
- [4] Porins H E, Bessonov A, Molitor A, et al. Toward screening for antibiotics with enhanced permeation properties through bacterial [J]. Biochemistry, 2010, 49(32): 6928-6935.
- [5] Kuhn P, Eyer K, Allner S, et al. A microfluidic vesicle screening platform: Monitoring the lipid membrane permeability of tetracyclines [J]. Analytical Chemistry, 2011, 83(23): 8877-8885.
- [6] Helle A, Makitalo J, Huhtanen J, et al. Antibiotic fusidic acid has strong interactions with negatively charged lipid membranes: An electrokinetic capillary chromatographic study[J]. Biochimica Biophysica Acta Biomembranes, 2008, 1778(11): 2640-2647.
- [7] Huang Y Z, Gao J Q, Chen J L, et al. Cationic liposomes modified with non-ionic surfactants as effective non-viral carrier for gene transfer [J]. Colloids Surface B: Biointerfaces, 2006, 49(2): 158-164.
- [8] Zhang Y. DC-Chol/DOPE cationic liposomes: A comparative study of the influence factors on plasmid pDNA and siRNA gene delivery [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2010, 390(2): 198-207.
- [9] Maitani Y, Igarashi S, Sato M, et al. Cationic liposome(DC-Chol/DOPE = 1:2) and a modified ethanol injection method to prepare liposomes, increased gene expression [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2007, 342(2): 33-39.
- [10] Grit M, Crommelin D J. The effect of surface charge on the hydrolysis kinetics of partially hydrogenated egg

- phosphatidylcholine and egg phosphatidylglycerol in aqueous liposome dispersions[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1993, 1167(1): 49–55.
- [11] Komatsu H, Okada S. Increased permeability of phase-separated liposomal membranes with mixtures of ethanol-induced interdigitated and non-interdigitated structures [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1995, 1237(2): 169–175.
- [12] Annesini M C, Memoli A, Petralito S. Kinetics of surfactant-induced release from liposomes: A time-dependent permeability model [J]. *Journal of Membrane Science*, 2000, 180(1): 121–131.
- [13] Cevc G. Decrease of negative charge and increase of positive charge per lipid molecule [J]. *Chemical Physics Lipids*, 1993, 64(4): 163–186.
- [14] 赵荣, 王敏, 骆健美, 等. 蓝色犁头霉 JY-2[#]的选育与发酵特性 [J]. *天津科技大学学报*, 2006, 21(4): 44–47.
- [15] Shinpei O, Nejat D, Kenneth L. Phospholipid vesicle aggregation: Effect of monovalent and divalent ions [J]. *Biochemistry*, 1982, 21(9): 2127–2133.
- [16] Minami H, Inoue T. Aggregation of dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles induced by some metal ions with high activity for hydrolysis [J]. *Langmuir*, 1999, 15(20): 6643–6651.
- [17] Shen Y B, Ma B, Zheng Y, et al. The mechanism of β -cyclodextrin on the 11 β -hydroxylation biotransformation of steroid [C]. *Biomedical Engineering and Informatics (BMEI)*, 2010: 1964–1967.
- [18] 安树, 刘宁. DHA 脂质体的制备及其性质研究 [J]. *食品工业科技*, 2010, 31(1): 99–102.
- [19] Annesini M C, Memoli A, Petralito S. Kinetics of surfactant-induced release from liposomes: A time-dependent permeability model [J]. *Journal of Membrane Science*, 2000, 180(7): 121–131.
- [20] Ong S, Liu H, Pedgeon C. Immobilized artificial membrane chromatography measurement of membrane partition coefficient and predicting drug membrane permeability [J]. *Journal of Chromatography*, 1996(3): 728–733.

责任编辑: 郎婧