

基因载体材料聚乙烯亚胺与磷脂酰胆碱脂质体的相互作用对膜结构的影响

韦艳珊, 韦邦帜, 黄爱民, 马林
(广西大学化学化工学院, 南宁 530004)

摘要 采用动态光散射、荧光光谱、*zeta* 电位测定和等温滴定量热技术分析了分子量分别为 25000, 10000 和 1800 的聚乙烯亚胺(PEI)与二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)脂质体的相互作用及其对脂质体膜内环境极性和膜通透性的影响。结果表明, PEI 通过氨基与 DOPC 的磷脂基团和胆碱基团产生氢键或范德华作用, 从而与脂质体结合形成复合物; 低浓度 PEI (<0.075 mg/mL) 导致 DOPC 脂质体的聚集和表面电位的增加, 但未引起脂质体膜融合和表面电位反转; 进一步增加 PEI 的浓度对脂质体表面电位的影响很小, 而结合在表面的 PEI 分子链之间的排斥作用阻碍了脂质体聚集。PEI 分子与 DOPC 脂质体的结合降低了脂质分子碳氢链的堆积密度和脂质体膜内环境的疏水性, 从而增强了钙黄绿素和榭皮素在脂质体膜中的通透性。PEI 与 DOPC 脂质体的相互作用具有明显的分子尺寸效应, 增大 PEI 的分子量可以增强与脂质体的相互作用及对脂质体膜结构的影响。

关键词 聚乙烯亚胺; 磷脂酰胆碱; 脂质体; 相互作用; 膜结构

中图分类号 O648 文献标志码 A

基因治疗是现代医学领域最前沿的研究课题之一, 其核心是建立高效、安全的基因载体系统^[1-3]。聚乙烯亚胺(PEI)因其高电荷密度和独特的“质子海绵效应”而具有良好的转染效率, 分子量分别为 25000 的支化 PEI 和 22000 的线性 PEI 被认为是高分子基因载体的“黄金标准”^[4-9]。在实际应用中, 生物医用材料不可避免地及各种生物大分子、细胞、组织和器官接触, 因此材料的安全性是最重要的研究内容之一, 需要进行严格的评估^[10-12]。研究表明, PEI 材料具有不同程度的细胞毒性, 然而这些细胞毒性评估多数是建立在体外细胞活性分析(如 MTT)基础上的, 通常在利用材料处理细胞后 4~8 h 进行, 其结果只能反映细胞对材料的急性应答, 并不一定代表载体材料安全性的真实情况。Moghimi 等^[12]研究发现, 利用 PEI 处理细胞 24 h 后, 受处理细胞才表现出明显的半胱天冬酶激活现象(细胞凋亡的表现)。目前, 尽管 PEI 基因载体材料的改性工作已被大量报道^[4-9], 仍然缺乏针对 PEI 进入生物体后对各种生物大分子和细胞器结构功能的影响和作用机理的了解。

通常认为, PEI 可通过静电作用将核酸长链压缩形成复合物纳米颗粒, 其表面正电荷有利于复合物颗粒与细胞质膜的相互作用, 从而启动胞吞或者胞饮作用进入细胞并形成内涵体和溶酶体; 也有研究者认为复合物颗粒通过 PEI 介导的在细胞膜和溶酶体膜上形成的纳米孔洞进入细胞质^[13-15]。由此推断 PEI 的毒性与其对生物膜的扰动有关。脂质是生物膜的主要成分, 由于 PEI 的氨基易于质子化而带正电荷, 目前的研究主要关注 PEI 与阴离子脂质体的相互作用^[16, 17], 而对 PEI 与中性脂质体如磷脂酰胆碱脂质体的相互作用及对脂膜结构的研究报道尚不多见。

为了解 PEI 对中性脂质体的结构性质的影响, 本文通过荧光光谱、动态光散射(DLS)、*zeta* 电位测定和等温滴定量热(ITC)技术研究了分子量分别为 25000, 10000 和 1800 的支化 PEI(分别记为 PEI25k, PEI10k 和 PEI1.8k)与二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)脂质体的相互作用及机理, 并以 *N*-(7-硝基

收稿日期: 2017-04-28. 网络出版日期: 2017-11-20.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 21373062)资助.

联系人简介: 马林, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事生物物理化学和药物缓控释方面的研究. E-mail: malinzu@163.com

苯并-2-氧杂-1,3-二唑-4-氨基)-磷脂酰乙醇胺三乙胺盐(NBD-PE)、*N*-丽丝胺罗丹明 B-磷脂酰乙醇胺三乙胺盐(Rh-PE)和8-苯氨基萘-1-磺酸(ANS)为荧光探针,以钙黄绿素和槲皮素为小分子模型化合物,探讨了PEI对DOPC脂质体之间相互作用、脂质体膜内环境和膜通透性的影响。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

二油酰磷脂酰胆碱(DOPC,冻干粉)、支化聚乙烯亚胺(PEI)和8-苯氨基萘-1-磺酸(ANS,纯度>98%)购自美国Sigma公司;*N*-(7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑-4-氨基)-磷脂酰乙醇胺三乙胺盐(NBD-PE)和*N*-丽丝胺罗丹明 B-磷脂酰乙醇胺三乙胺盐(Rh-PE)均为分析纯,购自美国Molecular Probes公司;钙黄绿素(分析纯)购自天津博迪化工股份有限公司;Triton X-100(分析纯)购自美国Amresco公司;槲皮素(Que,生化纯)购自国药集团试剂有限公司;氯仿、甲醇和乙醇(分析纯)购自广东汕头西陇化工有限公司。所有试剂均未经进一步纯化直接使用;分析所用溶液和储备液使用磷酸盐缓冲液(PBS,10 mmol/L,pH=7.4)配制。

将PEI溶解于PBS缓冲液中配制成5 mg/mL储备液,以HCl/NaOH溶液调节pH=7.4,于0~5 °C保存备用,使用时稀释至所需要浓度。由于实验所用的PEI平均分子量相差很大,为便于比较,PEI的浓度以质量浓度表示,其它物料的浓度则以摩尔浓度表示。将ANS溶解于PBS缓冲液中配制成储备液,于0~5 °C保存。ANS储备液浓度根据350 nm吸光度计算,摩尔吸光系数取 $6300 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ^[18]。将槲皮素溶解于乙醇中配制成 $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ 储备液,于0~5 °C保存备用。使用前以PBS缓冲液稀释至所需浓度,稀释后2 h内使用。

UV-2501PC型分光光度计(日本Shimadzu公司);HandExtruder™-1ml型脂质体挤出器(美国Genizer公司);Zetasizer Nano ZS纳米粒度电位测定仪(英国Malvern公司);RF6000型荧光分光光度计(日本Shimadzu公司);MicroCal ITC₂₀₀型等温滴定量热仪(美国GE公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 脂质体的制备 称取一定量的DOPC溶解于6 mL $V(\text{氯仿}) : V(\text{甲醇}) = 2 : 1$ 的混合溶剂中,于45 °C旋转蒸发去除溶剂,用氮气冲刷磷脂膜30 s,真空干燥过夜;加入5 mL PBS缓冲液进行水化,超声波分散后,利用脂质体挤出器挤压通过100 nm碳酸酯膜21次。所得大单层脂质体(LUV)用PBS缓冲液稀释至100 mL,根据Stewart法^[19]测定磷脂含量,于0~5 °C保存备用。

将NBD-PE和Rh-PE与DOPC按摩尔比0.8:100混合^[20],参照上述方法制备NBD-PE和Rh-PE共标记脂质体。

钙黄绿素负载脂质体采用相同方法制备,区别在于使用80 mmol/L的钙黄绿素溶液水化,并利用Sephadex G-50葡聚糖凝胶柱分离除去未包封的钙黄绿素^[20],以PBS缓冲液稀释脂质体分散液至50 μmol/L。

1.2.2 粒径和zeta电位的测定 将PEI储备液以PBS缓冲液稀释至所需浓度,加入脂质体储备液并混合均匀(DOPC终浓度为50 μmol/L),于25 °C测定脂质体的流体动力学直径和zeta电位。相同条件下至少测定3次,结果取平均值。

1.2.3 脂质体膜融合 将NBD-PE和Rh-PE共标记脂质体与未标记脂质体按摩尔比1:9混合^[20],加入不同浓度的PEI溶液(DOPC终浓度为50 μmol/L),于25 °C温育30 min后,测定其发射荧光光谱($\lambda_{\text{ex}} = 463 \text{ nm}$),波长扫描范围500~650 nm。

1.2.4 等温滴定量热分析 等温滴定量热实验在25 °C下进行。PEI溶液(5.0 mg/mL)和DOPC脂质体分散液(750 μmol/L)在实验前配制,并利用HCl或NaOH溶液(0.1 mol/L)调节pH=7.4,配制好的溶液经脱气处理后分别装入滴定针和样品池。滴定过程中,PEI溶液由滴定针逐滴滴入测量池,每次滴定体积为1 μL,时间间隔90 s,搅拌转速300 r/min,滴定过程的热效应由仪器自动记录。在相同条件下将PEI溶液滴定至PBS缓冲液中,得到PEI的稀释热效应。

1.2.5 ANS荧光的测定 配制系列不同PEI浓度的ANS-PEI溶液和ANS-PEI-脂质体分散液(ANS和

DOPC 终浓度分别为 2.5 和 50 $\mu\text{mol/L}$), 测定 ANS 的荧光发射光谱($\lambda_{\text{ex}} = 388 \text{ nm}$), 波长扫描范围为 400~700 nm.

1.2.6 钙黄绿素泄漏实验 将 100 μL 钙黄绿素负载脂质体储备液用 PBS 缓冲液稀释至 1900 μL , 置于 1 cm \times 1 cm 石英比色皿中, 搅拌下用微量进样针加入 100 μL 预先配制的不同浓度的 PEI 溶液, 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 下记录加入 PEI 前后钙黄绿素发射荧光强度随时间的变化情况. 测定所用激发波长为 490 nm, 发射波长为 520 nm. 实验结束后, 加入 100 μL Triton X-100 溶液(体积分数 10%) 裂解脂质体, 使其中钙黄绿素完全释放. t 时刻钙黄绿素的累积泄漏百分率($q_t, \%$) 根据以下方程计算^[20]:

$$q_t = (F_t - F_0) / (F_{\text{max}} - F_0) \times 100\% \quad (1)$$

式中: F_t 为 t 时刻的荧光强度; F_0 为加入 PEI 前的荧光强度; F_{max} 为脂质体裂解后的荧光强度.

1.2.7 PEI 对槲皮素通透性的影响 配制系列不同 PEI 浓度的槲皮素-PEI 溶液和槲皮素-PEI-脂质体分散液(槲皮素和 DOPC 终浓度分别为 5 和 50 $\mu\text{mol/L}$), 测定槲皮素的荧光发射光谱($\lambda_{\text{ex}} = 465 \text{ nm}$), 波长扫描范围为 475~700 nm.

2 结果与讨论

2.1 PEI 对脂质体粒径的影响

粒径是反映脂质体结构稳定性的重要参数, 为了解 PEI 对脂质体结构的影响, 分析了 DOPC 脂质体在含不同浓度 PEI 的缓冲液中的粒径变化, 结果如图 1 所示. 可见, PBS 缓冲液中 DOPC 脂质体的粒径为 155 nm, 添加少量 PEI25k (<0.03 mg/mL) 对脂质体的粒径无明显影响. 随着溶液中 PEI25k 浓度的增加, 脂质体的粒径先急剧增加后迅速减小, 在约 0.05 mg/mL 时达到最大值, 当 $c(\text{PEI25k}) \geq 0.075 \text{ mg/mL}$ 时, 脂质体的粒径基本保持不变, 且与无 PEI 缓冲液时脂质体粒径相近. 在含 PEI10k 的缓冲液中 DOPC 脂质体的粒径也有相同的变化规律, 但是与 PEI25k 相比, PEI10k 对脂质体粒径的影响较小, 当 PEI25k 和 PEI10k 的浓度为 0.05 mg/mL 时, 脂质体粒径分别为 291 和 201 nm. PEI 对 DOPC 脂质体粒径的影响随着 PEI 分子量的减小而降低, 在实验浓度范围内(0~0.15 mg/mL), 含 PEI1.8k 的缓冲液中脂质体的粒径几乎保持不变.

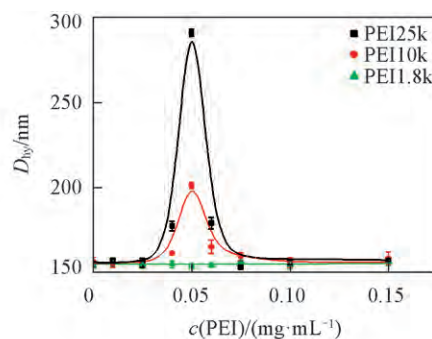


Fig.1 PEI concentration dependence of hydrodynamic diameter (D_{hy}) of DOPC LUVs in PBS

$c_{\text{DOPC}} = 50 \mu\text{mol/L}$.

含 PEI 缓冲液中脂质体粒径增大的可能原因如下: (1) PEI 分子发生聚集, 对溶液体系粒径的测定产生影响; (2) PEI 与脂质体结合形成复合物; (3) 脂质体产生聚集或者膜融合. 为了解 PEI 是否会产生聚集, 将高支化 PEI 作球形近似^[16], 利用 DLS 技术测定了 PEI 在 0.1, 0.5 和 1.0 mg/mL 浓度下的流体动力学直径. 结果显示, PEI 分子的流体动力学直径远小于脂质体, 改变浓度对 PEI 分子的流体动力学直径的影响可以忽略(表 S1, 见本文支持信息), 这表明 PEI 自身不会产生大的聚集, 脂质体粒径的变化归因于 PEI 与脂质体的结合及其引起的脂质体的聚集或融合.

2.2 脂质体的聚集

脂质体的聚集和融合均会导致其粒径发生变化, 为探究 DOPC 脂质体粒径增加的机理, 本文利用 NBD-PE 和 Rh-PE 膜探针针对脂质体进行标记, 并与非标记的脂质体按摩尔比 1:9 混合, 考察了 PEI 对 NBD-PE 与 Rh-PE 间荧光共振能量转移的影响. 图 2 示出了含典型浓度 PEI25k 的缓冲液中荧光标记脂质体的荧光光谱, 含 PEI10k 和 PEI1.8k 的缓冲液中也有相似结果(见支持信息图 S1). 如图 2 所示, 荧光标记脂质体在约 520 和 590 nm 处出现 NBD-PE 和 Rh-PE 的特征荧光^[16, 21, 22], 由于从 NBD-PE 到 Rh-PE 的共振能量转移作用, NBD-PE 的荧光很弱, 脂质体主要表现为 Rh-PE 的荧光特征. 实验中, 脂质体膜融合将引起供体/受体对(即 NBD-PE/Rh-PE) 从“标记”脂质体转移到“非标记”的脂质体而被稀

释, NBD-PE 和 Rh-PE 分子之间的距离增大降低了两者间能量转移效率, 从而导致供体 NBD-PE 的荧光强度增强及受体 Rh-PE 的荧光强度减弱^[16, 21, 22]. 实验中发现, 可能由于 PEI 在脂质体表面的结合减少了溶剂分子对脂质体中 NBD-PE 和 Rh-PE 荧光的碰撞猝灭, 两者的特征荧光同时随着溶液中 PEI 浓度的增加而轻微增强, 但是其荧光强度比变化并不明显(图 2 和支持信息图 S1 中插图), 表明 DOPC 脂质体并未产生膜融合, 其粒径的变化是由于脂质体聚集所致.

2.3 PEI 对脂质体表面电位的影响

PEI 与脂质体的结合还表现为脂质体表面电位的变化. 图 3 示出了分别含不同浓度 PEI25k, PEI10k 和 PEI1.8k 的缓冲液中 DOPC 脂质体的 *zeta* 电位. DOPC 为中性磷脂, 在 pH=7.4 的 PBS 缓冲液中其 *zeta* 电位为小的负值(-3.6 mV), PEI 的存在导致脂质体的 *zeta* 电位增加, 但是这一作用随着溶液中 PEI 浓度的增加而迅速减弱, 当 PEI 浓度大于 0.075 mg/mL 时脂质体表面电位基本不变.

PEI 为多胺化合物, 其氨基易发生质子化而带正电荷. 实验结果显示, PEI25k, PEI10k 和 PEI1.8k 在 PBS 缓冲液(pH=7.4)中的 *zeta* 电位分别为 7.0, 10.7 和 14.1 mV, 与文献[16, 17]结果相符, 说明低分子量的 PEI 更易于质子化. DOPC 脂质体与 PEI 形成静态复合物或简单混合均会导致脂质体的 *zeta* 电位增大. 由于低分子量的 PEI 更易于质子化, 其与脂质体仅发生简单混合时, 脂质体 *zeta* 电位增大应更为明显. 然而, 本实验结果与上述推测不符. 如图 3 所示, 当 PEI 浓度相同时, 脂质体的 *zeta* 电位

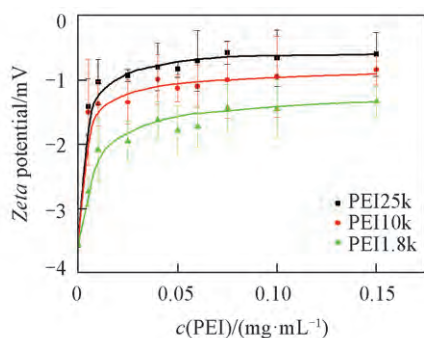


Fig.3 Variation of *zeta* potential of DOPC LUVs in PBS (pH=7.4) containing PEIs
c(DOPC) = 50 μ mol/L.

2.4 PEI 与 DOPC 脂质体的等温滴定量热

为探讨 PEI 与 DOPC 脂质体之间相互作用的机理, 采用等热量热仪测定了 PEI 滴定 DOPC 脂质体的热效应. PEI 在水中的稀释是一个显著的放热过程, 而 DOPC 脂质体的稀释热可以忽略不计. 因此, 在相同条件下将 PEI 溶液滴定到 PBS 缓冲液中, 记录 PEI 的稀释热, 并从 PEI-DOPC 脂质体滴定曲线中点对点扣除, 得到滴定过程中 PEI 与 DOPC 脂质体相互作用的热效应. 实验中发现, PEI 与 DOPC 脂质体相互作用的热效应不大, 使用高浓度的 PEI 和脂质体才能出现明显的热效应. 但是, 高浓度 PEI 在滴定过程中巨大的稀释热对获得 PEI 与 DOPC 脂质体相互作用的热谱图会造成很大的影响. 因此, 本文使用浓度为 5.0 mg/mL 的 PEI 溶液滴定浓度为 750 μ mol/L 的 DOPC 脂质体. 图 4(A) 和 (B) 分别示出了 PEI25k 对 DOPC 脂质体的等温滴定量热曲线和 PEI25k 与 DOPC 的相互作用焓随着滴定过程中 PEI25k 与 DOPC 摩尔比的变化关系. PEI10k 和 PEI1.8k 的滴定结果与此相似, 但是与 DOPC 的相互作

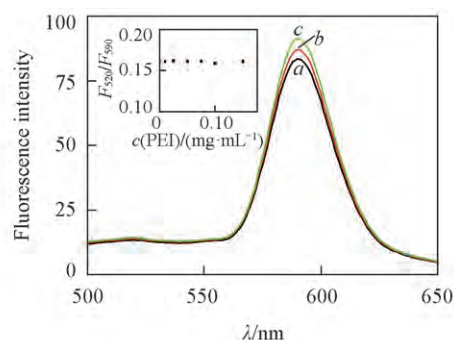


Fig.2 Fluorescence spectra of DOPC LUVs labeled with NBD-PE and Rh-PE in PBS (pH=7.4) containing 0 (a), 0.05 (b) and 0.1 (c) mg/mL PEI25k

Insert: relative intensity of fluorescence emission of NBD-PE and Rh-PE (F_{520}/F_{590}) in DOPC LUVs in PBS containing different concentrations of PEI25k. λ_{ex} = 463 nm, c(DOPC) = 50 μ mol/L.

随着溶液中 PEI 分子量的增加而增大. 当 PEI25k, PEI10k 和 PEI1.8k 浓度为 0.075 mg/mL 时, 脂质体的 *zeta* 电位分别为 -0.58, -1.00 和 -1.44 mV, 表明 DOPC 脂质体 *zeta* 电位的提高不是由于脂质体和带正电荷的 PEI 分子的简单混合, 而是由于 PEI 在脂质体表面结合形成复合物所导致. 由于 PEI 分子之间的静电排斥作用, 脂质体对 PEI 的亲合力将随着已结合 PEI 分子数的增加而降低, 这就很好地解释了低浓度 PEI 导致 DOPC 脂质体表面电位明显增大, 而高浓度 PEI 对脂质体表面电位影响很小的现象.

用焓随着 PEI 分子量的降低而减小(见本文支持信息图 S2)。

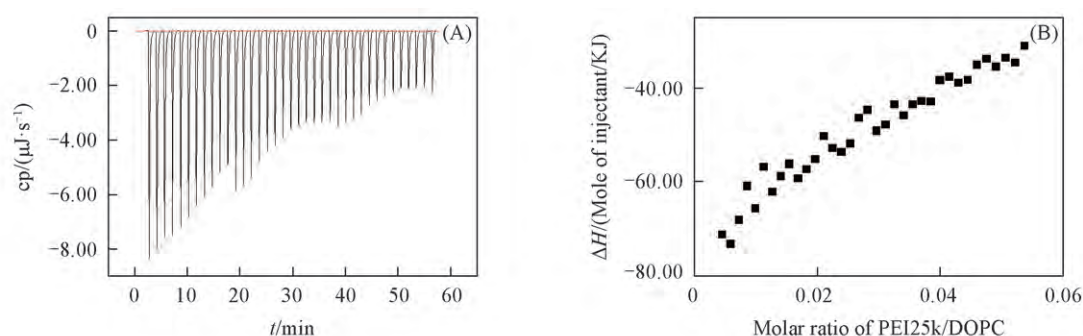


Fig.4 ITC profiles for titration of PEI25k into DOPC LUVs in PBS solution at 25 °C and pH=7.4

(A) Exothermic heat release upon injection of PEI25k into DOPC LUVs dispersion; (B) integrated heat data associated with the interaction of PEI25k and DOPC LUVs. $c(\text{PEI25k}) = 5.0 \text{ mg/mL}$, $c(\text{DOPC}) = 750 \text{ } \mu\text{mol/L}$.

分子间非键相互作用通常可以归纳为疏水相互作用、静电结合(电荷中和)、氢键和范德华力。根据热力学理论,疏水相互作用是焓驱动过程,伴随着焓和熵的增加($\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$, $|\Delta H| < |T\Delta S|$);而氢键和范德华作用是焓驱动过程,伴随着焓和熵的减少($\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$, $|\Delta H| > |T\Delta S|$);静电结合则表现为熵的增加和小的焓增加($\Delta H \approx 0$ 或 $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$)^[23]。可能由于 PEI 分子与 DOPC 脂质体并非特异性结合,利用常见的数学模型难以根据滴定热曲线拟合计算两者相互作用的热力学参数,因此仅根据 PEI 与 DOPC 的相互作用焓对其作用机理进行了定性分析。由图 4(B) 可见,PEI 与 DOPC 的相互作用焓为负值,说明 PEI 分子 CH_2CH_2 基团的疏水性较弱,而且其分子链亲水基团-疏水基团之间的结构使得 PEI 分子难以通过疏水相互作用插入脂质体双分子层疏水区;同时,质子化氨基与 DOPC 极性头部的胆碱基团之间的电荷排斥作用使其不易接近脂质分子的磷脂基团而产生稳定的静电结合。因此,PEI 与 DOPC 的相互作用应该以未发生质子化的氨基与 DOPC 胆碱基团之间的范德华作用以及与磷脂基团之间的氢键作用为主。这种弱的静电相互作用可能也是 PEI 未能引发 DOPC 脂质体融合及表面电位反转的原因,这与 PEI 与阴离子脂质体-二油酰磷脂酰丝氨酸(DOPS)的静电结合区别显著^[16]。

综上所述,质子化氨基与胆碱基团的静电排斥作用不利于 PEI 与 DOPC 脂质体的结合。由表面电位分析可知,与高分子量 PEI 相比,低分子量的 PEI 更易于发生质子化而具有更高的电荷密度,与脂质分子头部的胆碱基团和其它 PEI 分子之间可以产生更强的静电排斥作用,这可能也是高分子量 PEI 对 DOPC 脂质体的粒径和表面电位的增强作用更明显的原因。

2.5 PEI 与 DOPC 脂质体间相互作用的方式

阳离子高分子表面吸附是影响脂质体稳定性的重要因素,这主要归因于高分子的桥联作用和脂质体表面性质的变化^[16,24]。根据补丁电荷模型,由于 PEI 分子间的静电排斥作用,其在负电荷脂质体表面的吸附并不均匀,只有部分脂质体表面与 PEI 结合形成“补丁”状的微区结构^[16,24]。另一方面,由于分子链之间的静电排斥作用,已吸附的 PEI 分子中只有部分链段与脂质体表面产生结合,因此在 PEI 溶液中多个脂质体可能通过 PEI 分子的桥联作用形成聚集体,甚至融合^[16]。PEI 吸附的增多对脂质体间相互作用具有多个方面的影响:(1) 裸露的脂质体表面减少,但是脂质体表面 PEI 分子未结合的链段增加;(2) 脂质体之间的静电排斥作用减弱,但是结合在表面的 PEI 分子间静电排斥作用增强。受到上述因素的共同作用,阴离子脂质体-DOPS 脂质体的粒径和表面电位在特定 PEI 浓度范围内急剧增加,进一步增加 PEI 浓度导致脂质体的粒径迅速减小,而表面电位保持不变^[16]。PEI 对 DOPC 脂质体的粒径和表面电位的影响也有类似规律,区别是 PEI 与 DOPC 脂质体之间的范德华作用和氢键作用不足以破坏脂质体表面局部区域的稳定性而产生膜融合,只能通过桥联作用使 DOPC 脂质体产生聚集。

结合动态光散射(图 1)和表面电位测定(图 3)结果,PEI 浓度变化引起的 DOPC 脂质体聚集状态的改变可以用图 5 描述。在低浓度的 PEI 溶液中,少量 PEI 的结合降低了 DOPC 脂质体表面电位的负值及脂质体之间的静电排斥作用,使得脂质体可以相互接近并通过 PEI 的桥联产生聚集,随着脂质体

表面结合的 PEI 分子的增加, PEI 分子间的静电排斥作用增强, 妨碍了脂质体聚集.

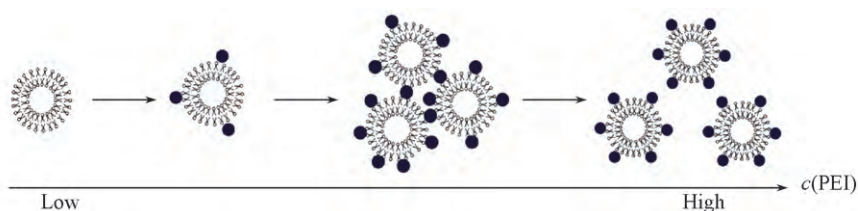


Fig.5 Schematic representation of concentration-dependent interaction of PEI with DOPC LUVs

2.6 PEI 对脂质体膜内环境疏水性的影响

与两亲型高分子材料的相互作用常常引起脂质体结构的变化, 应用荧光探针可了解脂质体的结构变化情况^[25]. 脂质分子间疏水相互作用是维持其结构稳定的重要基础, 为考察 PEI 对脂质体膜内环境的影响, 本文选择 ANS 为探针分子, 测定了含系列浓度 PEI 的 ANS-PEI-DOPC 脂质体分散液中 ANS 的荧光发射光谱 ($\lambda_{\text{ex}} = 388 \text{ nm}$), 考虑到 PEI 对 ANS 荧光的可能影响, 同时测定了 ANS-PEI 溶液中 ANS 的荧光光谱 (见本文支持信息图 S3 和 S4), 其最大荧光发射强度随着溶液中 PEI 浓度的变化规律示于图 6.

作为研究疏水相互作用的荧光探针, ANS 的荧光量子产率和最大发射波长与其所处环境的极性密切相关, 其荧光发射光谱蓝移和荧光强度的增强通常归因于所处微区环境疏水性的增强^[26]. 实验结果表明, 在 PBS 缓冲液中 ANS 在约 525 nm 处有非常弱的荧光, 添加 PEI 引起 ANS 的最大荧光发射波长蓝移和荧光强度轻微增强 (见本文支持信息图 S3), 说明 PEI 能与 ANS 结合并略微增强 ANS 所处环境的疏水性. 在 DOPC 脂质体分散液中, ANS 的最大荧光发射波长蓝移至约 476 nm, 荧光强度急剧增加 (见本文支持信息图 S4), 表明 ANS 已进入脂质体双分子层的疏水区域内.

结合动态光散射和表面电位分析结果可知, ANS-PEI-DOPC 脂质体三元体系中任何 2 个组分间都能形成复合物. 由于 PEI 和 ANS 分别结合在脂质体表面和内部的疏水区域, 同时 PEI 分子由大量的 CH_2CH_2 基团和氨基构成, 因此可以假设 DOPC-PEI 复合物的形成对 PEI 与 ANS 的亲合力影响较小, DOPC 脂质体与 ANS 结合的变化主要归因于脂质体膜结构的变化和 PEI 的竞争结合. 由于 PEI 对 ANS 荧光的增强作用远小于 DOPC 脂质体 (见图 6), 三元体系中 ANS 的荧光取决于与 DOPC 脂质体的结合, PEI 的竞争结合将降低 ANS 的荧光强度. 由图 6 可见, 在实验所用 PEI 浓度范围内, ANS-PEI 溶液中 ANS 荧光随着 PEI 浓度的增加而线性增强. 由 zeta 电位分析可知, 当体系中 PEI 浓度大于 0.075 mg/mL 时, 其在 DOPC 脂质体表面的吸附不再增加 (图 3). 在不考虑脂质体膜结构变化的情况下, 三元体系中 ANS 的荧光强度将随着 PEI 浓度的增加而进一步下降. 然而, 当 PEI 浓度大于 0.075 mg/mL 时, 三元体系中 ANS 的荧光强度几乎保持不变 (见图 6), 说明 DOPC 脂质体对 ANS 的亲合力远大于 PEI, 与 PEI 的相互作用对 ANS 与 DOPC 脂质体的结合影响很小. 含低浓度 PEI 的脂质体分散液中, ANS 荧光强度的下降应该归因于脂质体膜内环境极性的增强, 这意味着 PEI 在 DOPC 脂质体表面结合降低了膜内碳氢链的堆积密度, 使得水分子更易于进入脂质体的膜内空间. 此结果与聚乙二醇 (PEG) 对二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱/双十六烷基二甲基溴化铵脂质体和二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC) 膜结构的影响类似^[25 27 28], 可以归因于结合到脂质体表面的两亲型高分子亲水链段之间及其与脂膜之间的排斥作用对脂膜产生的拉伸和弯曲效应^[29 30].

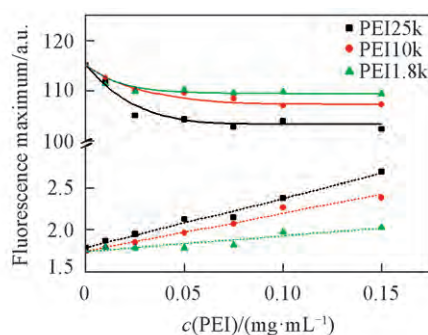


Fig.6 PEI concentration dependence of ANS fluorescence emission maximum in PBS ($\text{pH}=7.4$) in the absence (dash line) and presence (solid line) of DOPC LUVs
 $\lambda_{\text{ex}} = 388 \text{ nm}$; $c(\text{ANS}) = 2.5 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{DOPC}) = 50 \mu\text{mol/L}$.

2.7 PEI 对钙黄绿素从脂质体泄漏的影响

物质运输是生物膜的基本生物学功能之一,选择性透过是物质分子跨膜转运的基本特征,与生物膜的结构具有密切的关系.钙黄绿素泄漏是了解水溶液中脂质体膜通透性的常用方法^[20].本文将钙黄绿素包封于 DOPC 脂质体的内水相,绘制了脂质体在含系列浓度 PEI 的缓冲液中的泄漏曲线.图 7 示出了含 PEI25k 的缓冲液中钙黄绿素从 DOPC 脂质体的泄漏动力学曲线,含 PEI10k 和 PEI1.8k 缓冲液中也有相似的结果(见支持信息图 S5).可见,DOPC 脂质体在 PBS 缓冲液中具有相当高的稳定性,钙黄绿素的泄漏几乎可以忽略,添加 PEI 使得钙黄绿素的泄漏急剧增加.

应用伪二级动力学方程对钙黄绿素泄漏动力学曲线进行拟合:

$$t/q_i = 1/(kq^2) + t/q \quad (2)$$

式中: q 为最大泄漏百分率; k 为泄漏过程的速率常数.结果表明,钙黄绿素从 DOPC 脂质体的泄漏与伪二级动力学方程符合良好(拟合相关系数>0.99).由于含 PEI 溶液中钙黄绿素从 DOPC 脂质体的泄漏是一个快速过程(图 7),其速率常数容易受到起始阶段 PEI 与脂质体结合速率、脂质体聚集、实验过程中 PEI 与脂质体的混合情况等因素干扰,因此图 8 仅给出最大泄漏百分率随着溶液中 PEI 浓度的变化关系.可见,钙黄绿素的最大泄漏百分率随着溶液中 PEI 浓度的增加而增加,但是其增加速率迅速减小,当 PEI 浓度>5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时钙黄绿素的最大泄漏百分率基本保持不变.

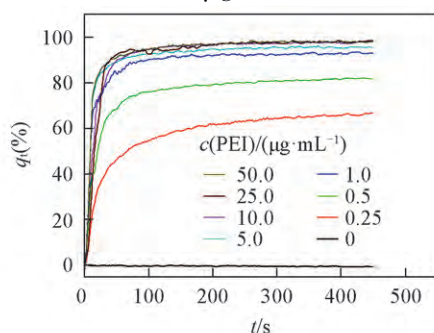


Fig.7 Time course leakage of calcein from DOPC LUVs in PBS containing PEI25k

$c(\text{DOPC}) = 2.5 \mu\text{mol}/\text{L}$.

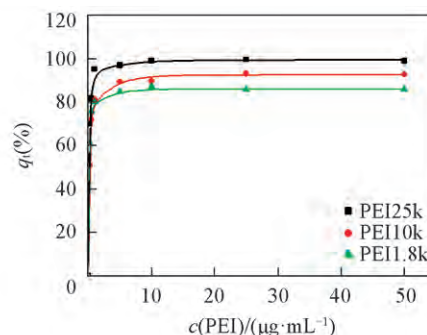


Fig.8 PEI concentration dependence of maximum leakage of calcein from DOPC LUVs

$c(\text{DOPC}) = 2.5 \mu\text{mol}/\text{L}$.

生物小分子通过被动扩散机理实现跨膜转运时对脂质分子的排列非常敏感^[31].原子力显微镜分析结果显示,聚酰胺-胺(PAMAM)使 DPPC 脂质体膜形成小的缺陷,并导致钙黄绿素泄漏的增加^[32].PEI 和 PAMAM 都是阳离子聚胺型高分子,由 ANS 荧光分析可知,PEI 与 DOPC 脂质体的相互作用降低了脂质分子碳氢链的堆积密度和膜内环境的疏水性,本质上与 PAMAM 在 DPPC 脂质体表面形成缺陷相同,有利于亲水性的钙黄绿素分子从内水相扩散到外水相.由图 6 可见,高分子量的 PEI 对 DOPC 脂质体膜结构的影响更明显,与此一致,在含相同浓度 PEI 的缓冲液中,钙黄绿素从脂质体的最大泄漏百分率随着 PEI 分子量的增加而增大(见图 8).

2.8 PEI 对槲皮素通透性的影响

槲皮素是一种常见的类黄酮化合物,适中的亲水/疏水性使其具有良好的生物膜通透性^[33],是研究细胞膜通透性变化的良好模型.槲皮素分子具有荧光活性,但是由于 5-羟基与 4-羰基之间的分子内氢键作用,槲皮素容易发生激发态质子转移反应,在水中观察不到明显的发射荧光^[34].质子性溶剂,如乙醇和纤维素,可与槲皮素的 5-羟基形成氢键,从而消除槲皮素分子内氢键导致的荧光猝灭^[35,36].为分析含 PEI 的缓冲液中槲皮素在 DOPC 脂质体中通透性的变化,测定了槲皮素-PEI 溶液和槲皮素-PEI-脂质体分散液中槲皮素的荧光发射光谱(见本文支持信息图 S6).结果表明,在含 PEI 的缓冲液中槲皮素在约 564 nm 附近显示出较强的荧光,与乙醇中槲皮素的发射荧光光谱类似^[35],表明 PEI 通过氨基与槲皮素分子 5-羟基形成氢键结合.溶液中添加 DOPC 脂质体对槲皮素荧光光谱特征无影响,但是使其荧光强度明显降低(见本文支持信息图 S7),说明槲皮素已进入脂质体膜内区域.如图 9 所示,PEI 浓度相同的槲皮素-PEI 溶液和槲皮素-PEI-脂质体分散液中槲皮素的荧光强度差随着 PEI 浓度的

增加而增强,说明 PEI 增强了槲皮素在脂质体中的通透性.同时,槲皮素在 DOPC 脂质体膜上的通透性随着 PEI 分子量的增加而增强,这与钙黄绿素泄漏结果相一致(图 9).

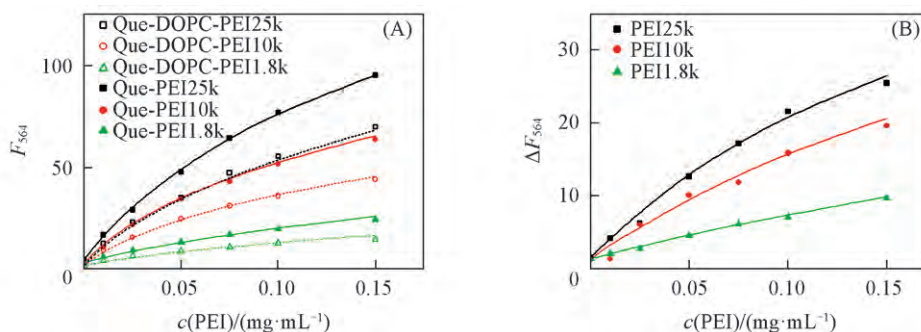


Fig.9 PEI concentration dependence of fluorescence intensity of quercetin at 564 nm(F_{564})

(A) In the absence(solid line) and presence(dash line) of DOPC LUVs in PBS(pH=7.4); (B) difference in the fluorescence emission in the absence and presence of DOPC LUVs. $\lambda_{\text{ex}} = 465 \text{ nm}$, $c(\text{DOPC}) = 50 \mu\text{mol/L}$, $c(\text{Que}) = 5 \mu\text{mol/L}$.

3 结 论

阳离子高分子 PEI 通过氢键或者范德华作用与 DOPC 脂质体结合形成静态复合物,并对脂质体的膜结构和表面性质产生影响.低浓度 PEI ($<0.075 \text{ mg/mL}$) 可导致 DOPC 脂质体的聚集和表面电位的增加,却不能引起脂质体产生膜融合和表面电位反转;高浓度 PEI 对脂质体表面电位的影响很小,而结合在脂质体表面的 PEI 分子链之间的排斥作用则妨碍了脂质体的聚集. PEI 分子与 DOPC 脂质体的结合降低了脂质分子碳氢链的堆积密度和脂质体膜内环境的疏水性,从而增强了钙黄绿素和槲皮素在脂质体中的通透性. PEI 与 DOPC 脂质体的相互作用具有明显的分子尺寸效应,增加 PEI 的分子量可以增强与 DOPC 脂质体的相互作用及其对脂质体膜结构的影响.

支持信息见 <http://www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/10.7503/cjcu20170273>.

参 考 文 献

- [1] Yin H., Kanasty R. L., Eltoukhy A. A., Vegas A. J., Dorkin J. R., Anderson D. G., *Nat. Rev. Genet.*, **2014**, *15*, 541—555
- [2] Giacca M., Zacchigna S., *J. Control. Release*, **2012**, *161*, 377—388
- [3] Tiera M. J., Shi Q., Winnik F. M., Fernandes J. C., *Curr. Gene Ther.*, **2011**, *11*, 288—306
- [4] Neu M., Fischer D., Kissel T., *J. Gene Med.*, **2005**, *7*, 992—1009
- [5] Sawant R. R., Sriraman S. K., Navarro G., Biswas S., Dalvi R. A., Torchilin V. P., *Biomaterials*, **2012**, *33*, 3942—3951
- [6] Yamano S., Dai J., Hanatani S., Haku K., Yamanaka T., Ishioka M., Takayama T., Yuvienco C., Khapli S., Moursi A. M., Montclare J. K., *Biomaterials*, **2014**, *35*, 1705—1715
- [7] Chen L. N., Wang Y., Zhu Y., Sun Y. X., Wang Y. X., *Chem. J. Chinese Universities*, **2013**, *34*(3), 720—725(陈丽娜,王颖,朱莹,孙一新,王幽香. 高等学校化学学报, **2013**, *34*(3), 720—725)
- [8] Liu Y. J., Zhang P., Du J. W., Wang Y. X., *Chem. J. Chinese Universities*, **2016**, *37*(5), 1003—1009(刘亚杰,张鹏,杜建委,王幽香. 高等学校化学学报, **2016**, *37*(5), 1003—1009)
- [9] Yang S., Guo Z., Yang X., Xie J., Robert J. L., Jiang D., Teng L., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2015**, *31*(3), 401—405
- [10] Zhong D., Jiao Y., Zhang Y., Zhang W., Li N., Zuo Q., Wang Q., Xue W., Liu Z., *Biomaterials*, **2013**, *34*, 294—305
- [11] Larsen A. K., Malinska D., Koszela-Piotrowska I., Parhamifar L., Hunter A. C., Moghimi S. M., *Mitochondrion*, **2012**, *12*, 162—168
- [12] Moghimi S. M., Symonds P., Murray J. C., Hunter A. C., Debska G., Szweczyk A., *Mol. Ther.*, **2005**, *11*, 990—995
- [13] Won Y. Y., Sharma R., Konieczny S. F., *J. Control. Release*, **2009**, *139*, 88—93
- [14] Gabrielson N. P., Pack D. W., *J. Control. Release*, **2009**, *136*, 54—61
- [15] Parhamifar L., Larsen A. K., Hunter A. C., Andresen T. L., Moghimi S. M., *Soft Matter*, **2010**, *6*, 4001—4009
- [16] Yasuhara K., Tsukamoto M., Tsuji Y., Kikuchi J., *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, **2012**, *415*, 461—467
- [17] Sabín J., Vázquez-Vázquez C., Prieto G., Bordini F., Sarmiento F., *Langmuir*, **2012**, *28*, 10534—10542
- [18] Haouz A., Mohsni S. E., Zentz C., Merola F., Alpert B., *Eur. J. Biochem.*, **1999**, *264*, 250—257

- [19] Stewart J. C. M. , *Anal. Biochem.* , **1980** , *104* , 10—14
- [20] Torchilin V. P. , Weissig V. ; translated by Deng Y. H. , Xu H. , *Liposomes: A Practical Approach* , Chemical Industry Press , Beijing , **2007** , 89—92(Torchilin V. P. , Weissig V. 著; 邓意辉, 徐晖[译]. 脂质体, 北京: 化学工业出版社, **2007** , 89—92)
- [21] Struck D. , Hoekstra D. , Pagano R. E. , *Biochem.* , **1981** , *20* , 4093—4099
- [22] Morgan C. G. , Thomas E. W. , Yianni Y. P. , *Biochim. Biophys. Acta* , **1983** , *728* , 356—362
- [23] Ross P. D. , Subramanian S. , *Biochem.* , **1981** , *20* , 3096—3102
- [24] Pfau A. , Schrepp W. , Horn D. , *Langmuir* , **1999** , *15* , 3219—3225
- [25] Rao Z. , Taguchi T. , *Colloids Surf. B: Biointerf.* , **2012** , *97* , 248—253
- [26] Lakowicz J. R. , *Principles of Fluorescence Spectroscopy* , 2nd Ed. , Plenum Press , New York , **1999** , 185—486
- [27] Montesano G. , Bartucci R. , Belsito S. , Marsh D. , Sportelli L. , *J. Biophys.* , **2001** , *80* , 1372—1383
- [28] Marsh D. , *J. Biophys.* , **2001** , *81* , 2154—2162
- [29] Tribet C. , Vial F. , *Soft Matter.* , **2008** , *4* , 68—81
- [30] Tirosh O. , Barenholz Y. , Katzhendler J. , Prieve A. , *J. Biophys.* , **1998** , *74* , 1371—1379
- [31] Kozlova N. O. , Bruskovskaya I. B. , Okuneva I. B. , Melik-Nubarov N. S. , Yaroslavov A. A. , Kabanov V. A. , Menger F. M. , *Biochim. Biophys. Acta* , **2001** , *1514* , 139—151
- [32] Evans K. O. , Laszlo J. A. , Compton D. L. , *Biochim. Biophys. Acta* , **2014** , *1838* , 445—455
- [33] Tammela P. , Laitinen L. , Galkin A. , Wennberg T. , Hezcko R. , Vuorela H. , Slotte J. P. , Vuorela P. , *Arch. Biochem. Biophys.* , **2004** , *425*(2) , 193—199
- [34] Wolfbeis O. S. , Begum M. , Geiger H. , *Z. Naturforsch.* , **1984** , *39b* , 231—237
- [35] Falkovskaia E. , Sengupta P. K. , Kasha M. , *Chem. Phys. Lett.* , **1998** , *297* , 109—114
- [36] Sengupta P. K. , Kasha M. , *Chem. Phys. Lett.* , **1979** , *68*(2/3) , 382—385

Membrane Structure Alteration of DOPC Liposome Induced by Interaction with Gene Carrier Polyethyleneimine[†]

WEI Yanshan , WEI Bangzhi , HUANG Aimin , MA Lin*

(School of Chemistry and Chemical Engineering , Guangxi University , Nanning 530004 , China)

Abstract To get a better understanding on the molecular basis of the cytotoxicity of PEI which has been considered as “golden standard” for polymeric gene delivery carriers. Dynamic light scattering , fluorescence spectra , zeta-potential measurement and isothermal titration calorimetry were conducted to reveal the mechanism of interaction between PEIs(average molecular weight of 25000 , 10000 and 1800) and 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine(DOPC) liposome. The influence on the polarity of microenvironment and the permeability of liposome bilayer were also investigated. The result showed that PEI bound to DOPC vesicles *via* hydrogen bond or van Waals interactions between the amide groups and the phosphorylcholine heads. The complex formation with PEI induced aggregation and increase in zeta potential of liposomes at low PEI concentration up to 0.075 mg/mL. A further increase in PEI concentration made little change on the surface potential , however reduced the aggregation of the vesicle due to the repulsion between the adsorbed PEI chains. PEI binding decreased the packing density of hydrocarbon chain of lipid molecules and the hydrophobicity in the bilayer membrane , and thus resulted in an enhanced permeability of calcein and quercetin through the membrane. The polymer size played an important role in PEI-DOPC liposome interaction. PEI with higher molecular weight was more favorable to interact with DOPC and more efficient to perturb the structural properties of the membrane.

Keywords Polyethyleneimine; Phosphatidylcholine; Liposome; Interaction; Membrane structure

(Ed.: P , H , N , K)

[†] Supported by the National Natural Science Foundation of China(No.21373062) .