

低聚壳聚糖与角质层蛋白相互作用的体外研究*

周雪琴^{1,2**} 由桂枫² 刘东志¹ 姚康德²

(天津大学¹ 化工学院² 高分子材料研究所 天津 300072)

摘 要 以脱脂鼠角质层和提取角蛋白为模型,利用电化学交流阻抗谱、SEM、DSC、FTIR 等手段,研究了低聚壳聚糖及氨基葡萄糖与角质层蛋白之间的相互作用.结果发现,氨基葡萄糖溶液处理不影响脱脂角质层膜的阻抗,而低聚壳聚糖溶液处理却可明显降低脱脂角质层膜的阻抗,阻抗值由 $3.79 \times 10^6 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 降至 $8.379 \times 10^5 \Omega \cdot \text{cm}^2$. 此外,壳聚糖溶液和氨基葡萄糖溶液都可明显破坏角蛋白表面致密均匀的结构,并使得角蛋白二级结构中 α -螺旋结构含量减少,同时推动角蛋白 α -螺旋结构向 β -折叠结构和无规则卷曲结构转变.这些结果表明低聚壳聚糖与角质层蛋白相互作用,一方面可有效降低鼠角质层结构的紧密程度,另一方面可影响角蛋白的微结构,使其结构松散并出现微细孔道,从而为药物的经皮吸收与传递疏通了通道.

关键词 低聚壳聚糖, 角蛋白, 相互作用, 角质层, 经皮给药

经皮给药系统(transdermal delivery system, TDS)利用皮肤将药物直接可控、恒速地吸收进入体内,既避免了口服药物经过胃肠道的降解和肝脏的“首过效应”(first-pass effect),又减轻或消除某些药物的副作用等,是发挥许多生理活性物质疗效的技术平台^[1].但是由于皮肤尤其是皮肤最外层由角质层细胞和细胞间脂质组成的角质层(stratum corneum, SC)天然屏障,极大阻碍了大部分药物的经皮传递^[1-3],必须借助适当的辅助手段通过与皮肤中脂质^[3-6]或蛋白质^[6-8]等相互作用来促进药物的经皮吸收.

高分子量壳聚糖(chitosan, CS)及其衍生物是某些难吸收药物的吸收增强剂,在生物黏附给药、透膜及靶向给药系统的开发中倍受青睐^[9,10].作为外用药物载体,壳聚糖还可增强心得安等药物的经皮传递^[11,12].低聚壳聚糖(oligo-chitosan, oligo-CS)作为壳聚糖的降解产物具有良好的水溶性,易被人体吸收,具有抑菌、抗肿瘤、调节免疫等多种生理功能,其对药物经膜传递等有较高的增强作用^[13].我们前期研究结果表明,低聚壳聚糖也具有可促进黄芩苷等药物经皮吸收的特性,而且其促渗效果还高于氨基葡萄糖和高分子量壳聚糖;进一步的研究结果表明,低聚壳聚糖促渗的主要位置在于其中的氨基葡萄糖单元或 2~6 个氨基葡萄糖的低聚物.深入了解低聚壳聚糖的促进机制,有助于研究与设计高效无毒的新一代透

皮给药系统.本文以脱脂处理的鼠角质层和提取角蛋白为模型,详细研究了低聚壳聚糖及氨基葡萄糖与角质层蛋白之间的相互作用,探讨了低聚壳聚糖的促渗机制.

1 实验部分

1.1 原料

低聚壳聚糖(oligo-CS, DD $\geq 80\%$, $M_w = 1000$)由江南大学夏文水提供;D-氨基葡萄糖盐酸盐(DG)购自于 Sigma 公司;角蛋白按照文献[14]中的方法从人发中提取;胰蛋白酶(0.25%, 含 0.02% EDTA)购自于天津联星生物技术有限公司;氨水、氯仿、甲醇和氯化钠均是来自于天津大学科威公司提供的分析纯试剂.

1.2 角蛋白膜的制备

采用 10 wt% 氨水溶液配制浓度为 10 mg/mL 的角蛋白溶液,并在搅拌的条件下向溶液中滴加 12% 的 β -巯基乙醇,使其混合均匀制成角蛋白溶液备用.取适量角蛋白溶液滴在衬底上,室温自然干燥,制成角蛋白膜.

1.3 SEM 测试

将所制备的角蛋白膜连同玻璃衬底(每平方厘米含角蛋白约 15 g)分别浸入去离子水,浓度为 0.5 wt%, 1 wt%, 5 wt% 的低聚壳聚糖溶液和 1 wt%, 5 wt% 的氨基葡萄糖溶液中,静置 2 h 左右,取出,去离子水漂洗,除去角蛋白膜表面残留的溶

* 庆祝杨士林先生 90 华诞专稿;2009-02-27 收稿,2009-05-04 修稿;国家自然科学基金(基金号 20606024)资助项目;** 通讯联系人,
E-mail: zhouxueqin@tju.edu.cn

液,用滤纸吸干膜两侧水分.30℃下真空干燥,喷金处理后采用 Philips ESEM XL30 型扫描电镜扫描测试膜表面变化情况.

1.4 DSC 测试

以 DSC 固体盘为衬底,盘内角蛋白膜质量为 4 mg 左右,30℃下真空干燥后作为角蛋白空白对照膜.同时将角蛋白溶液分别与浓度为 1 wt%,5 wt%的低聚壳聚糖溶液和 5 wt%氨基葡萄糖溶液以 2:1 比例混合,按角蛋白膜制备方法在 DSC 固体盘上制备经不同促进剂处理的角蛋白膜.将系列角蛋白样品采用 Perkin Elmer Diamond 热分析仪进行差式扫描量热测试.扫描温度范围为 30 ~ 270℃,扫描速度为 10 K/min.

1.5 傅立叶红外光谱(FTIR)测试

分别称取 50 mg 角蛋白粉末,各加入 1 mL 的去离子水,以及浓度为 1 wt%的低聚壳聚糖和氨基葡萄糖溶液.室温浸泡约 2 h 后,在 7000 r/min 的转速下离心分离 15 ~ 20 min,弃去上层清液,沉淀物加去离子水重新稀释,重复离心 2 ~ 3 次,最后经无水乙醇洗涤,离心,收集沉淀物,30℃下真空干燥.KBr 混合压片,采用 Magna-56 型傅立叶变换红外光谱仪(美国 Nicolet 公司)进行测试,条件为扫描次数 20 次,分辨率 4 cm⁻¹,扫描范围 400 ~ 4000 cm⁻¹.

1.6 鼠角质层的交流阻抗谱测试

取健康昆明小白鼠(体重 20 ~ 25 g,天津市药检所提供),断颈处死后除去腹部鼠毛,剥离腹部鼠皮,取出皮下脂肪.将鼠皮的脂肪层向下,置于 37℃胰蛋白酶溶液中,处理约 12 ~ 16 h 左右.当观察鼠毛可轻轻脱落时,取出置于 20 目的分样筛上,用大量去离子水反复冲洗除去残留的消化酶、鼠毛和真皮脂肪.将洗净后的鼠角质层平整的铺在分样筛上,置于相对湿度为 75.5%的过饱和 NaCl 溶液气氛中晾置 24 h 后,用氯仿-甲醇-水(50:40:1, V/V)浸泡 1 h,再用大量水洗干净,以 ATR-FTIR 观察至无脂质羰基峰(1750 cm⁻¹).然后将该脱脂角质层置于相对湿度为 75.5%的过饱和 NaCl 溶液气氛中,4℃冷藏保存备用.

将鼠角质层分别浸泡于 0.5 wt%,5 wt%的低聚壳聚糖溶液中,37℃水浴加热 24 h.取出后用大量去离子水冲洗干净,取滤纸吸干其两侧表面的水分.空白鼠角质层浸泡于缓冲溶液中 24 h 作为对照.采用 PARSTAT2263 型电化学综合测试仪(美国 Princeton 公司)测试角质层交流阻抗谱.三

电极测量体系缓冲溶液为 0.9%的生理盐水.交流阻抗测试所加正弦波幅值为 10 mV,频率扫描范围为 100 kHz ~ 10 mHz.恒温水浴控制温度为 37℃.所得阻抗数据采用 ZSimpwin 解析软件进行分析.

2 结果与讨论

2.1 低聚壳聚糖对角质层阻抗值的影响

图 1 是鼠脱脂角质层在 37℃生理盐水中的 Nyquist 图,其中曲线末端的弯曲半径,直接对应着角质层膜的平均电阻^[15,16];半径越小,电阻也越小.比较图 1 中的数据点,可以看出低聚壳聚糖溶液处理后,角质层膜的 Nyquist 图末端的弯曲半径明显变小了,说明低聚壳聚糖溶液处理可明显降低角质层膜的电阻.

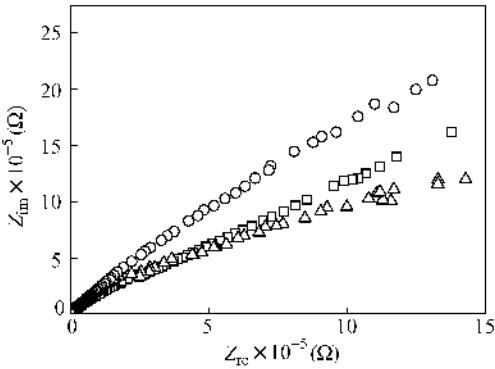


Fig. 1 Nyquist plots of various mouse stratum corneums Controlled (○); Pretreated with 0.5 wt% CS80-1000 solution at 7.5 (□); 5 wt% CS80-1000 solution (△)

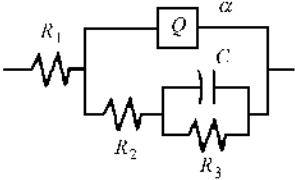


Fig. 2 Equivalent electric circuit for SCs with resistors (R_1 , R_2 and R_3 correspond to the resistances from electrolyte, SC membrane and charge-transfer), capacitor (C) and constant phase element (Q) α is a parameter relative to the slope of plot of $\lg Z$ against $\lg f$ in the Nyquist spectrum and accounts for the distribution of time constants similar to the constant phase element.

图 2 为实验中所采用的等效电路,其中 R_1 表示溶液电阻, R_2 表示试样的活化极化电阻,即角质层膜电阻, Q 是常相位角元件,表示弥散效应, C 为双电层电容, R_3 为极化电阻.采用该等效电

路对图 1 的数据点进行拟合,绝大部分拟合数据的错误率都在 $-2\% \sim 2\%$ 之间,表明用这种等效电路来拟合阻抗数据的准确度比较高.拟合结果列于表 1,其中 n 与波特图中 $\lg Z$ 对 $\lg f$ 的斜率有关.表 1 中的数据表明,鼠脱脂角质层经过 0.5 wt% 的低聚壳聚糖溶液处理后,其阻抗值由 $3.79 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^2$ 下降至 $1.478 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^2$; 当提高低聚壳聚糖浓度至 5 wt% 时,可使得角质层的阻抗值进一步降低至 $8.379 \times 10^5 \Omega \cdot \text{cm}^2$,相对于未处理的空白样品下降了一个数量级.由于角质层的干态组分主要包括 75% ~ 80% 蛋白质、5% ~ 15% 脂质和 5% ~ 10% 其它成分^[17],在这里脂质已被脱除,角

质层膜中主要是蛋白质了.角质层膜的阻抗值反应了细胞单分子层的紧密连接程度^[18,19].因此,以上这些结果表明低聚壳聚糖可以与角质层蛋白相互作用,从而破坏了其细胞间结构紧密程度,降低其阻抗值.这些结果与文献报道高分子量壳聚糖可以与细胞上蛋白质相作用、从而打开细胞间紧密结点相一致^[9,20,21].然而,氨基葡萄糖溶液处理对鼠脱脂角质层的阻抗值影响很小,说明氨基葡萄糖几乎不能对角质层细胞间紧密结构产生作用.这与氨基葡萄糖对黄芩苷等药物的促渗效果远低于低聚壳聚糖的结果是相吻合的.

Table 1 The results of EIS of mouse stratum comeum treated with oligo-CS aqueous solutions

Impedance parameter	$Q (\Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-n})$	n	$R_2 (\Omega \cdot \text{cm}^2)$	c
Control	3.086×10^{-6}	0.805	3.79×10^6	6.763×10^{-6}
Treated with 0.5 wt% oligo-CS	1.213×10^{-6}	0.7783	1.478×10^6	4.707×10^{-6}
Treated with 5 wt% oligo-CS	6.539×10^{-7}	0.7392	8.379×10^5	3.141×10^{-6}
Treated with 1 wt% DG	3.132×10^{-6}	0.807	3.81×10^6	6.802×10^{-6}
Treated with 5 wt% DG	3.125×10^{-6}	0.807	3.80×10^6	6.794×10^{-6}

2.2 低聚壳聚糖对角蛋白膜形貌的影响

图 3 给出了空白和经系列浓度低聚壳聚糖溶液处理的角蛋白膜 SEM 结果.在经系列浓度的糖类促进剂处理后,角蛋白膜表面形态都发生了较大的变化.其中,用 1 wt% 的低聚壳聚糖处理 2 h 后,角蛋白膜表面的均匀致密性改变最为明显,粗糙度变化最大,并有小于 100 nm 的孔洞出现.当采用 1 wt% 氨基葡萄糖促渗 2 h 后,角蛋白膜表面的粗糙度和均匀性也出现了明显的交错孔洞.增大氨基葡萄糖浓度至 5 wt%,膜表面的粗糙度进一步增大.低聚壳聚糖与氨基葡萄糖对角蛋白膜作用情况与相似,随着促进剂浓度的加大,角蛋白膜表面结构的改变程度也相应加大.糖类促进剂对角蛋白的作用引起膜表面形态的变化,在一定程度上破坏了角蛋白膜的表面致密性和分布均匀性,可能是因为这类化合物在促渗过程中,影响了角蛋白膜微结构,使其结构松散出现微细孔道,疏通了膜的促渗通道,使药物易于传送.

2.3 低聚壳聚糖对角蛋白二级结构的影响

图 4 给出了低聚壳聚糖和氨基葡萄糖处理后角蛋白膜的 DSC 曲线.空白角蛋白膜在 201℃ 左右即出现了较为明显的吸热峰,这是角蛋白结构中的 α -螺旋微晶发生熔化^[22].角蛋白和 1 wt% 低聚壳聚糖溶液复合膜的结晶熔融峰降低至

190℃,较空白样品(图 4a)降低了约 11℃,而浓度为 5 wt% 的低聚壳聚糖复合膜的结晶熔融峰为 189℃,与 1 wt% 的低聚壳聚糖作用效果相比没有明显的变化,然而 5 wt% 的氨基葡萄糖溶液却使角蛋白的 α -螺旋结晶熔融峰下降至 165℃ 左右.这些结果表明低聚壳聚糖溶液与氨基葡萄糖溶液的处理可在一定程度上降低角质层角蛋白中 α -螺旋结晶结构的含量,影响了角蛋白的结晶结构. FTIR 可进一步测定蛋白质分子二级结构的变化.

以空白对照角蛋白(图 5a)酰胺吸收峰 I 的峰位 1653 cm^{-1} 为基准,发现经低聚壳聚糖处理后,角蛋白酰胺吸收峰 II 峰位从 1523 cm^{-1} 向低波数位移到 1520 cm^{-1} (图 5b),同时,氨基葡萄糖则使角蛋白酰胺吸收峰 II 峰位的波数由 1523 cm^{-1} 降低到 1521 cm^{-1} (图 5c).文献报道,酰胺吸收峰 II 峰位在 1539 cm^{-1} 处表明角蛋白为 α -螺旋结构;当吸收峰位于 1508 cm^{-1} 时,角蛋白则为 β -折叠结构^[8,23].因此,1% 的低聚壳聚糖和氨基葡萄糖溶液作用于角蛋白后,使其酰胺吸收峰 II 峰位向低波数移动,造成角蛋白的 α -螺旋结构含量减少,并使角蛋白从 α -螺旋结构向 β -折叠结构和无规则卷曲结构转变,对角蛋白的二级结构产生了一定影响.

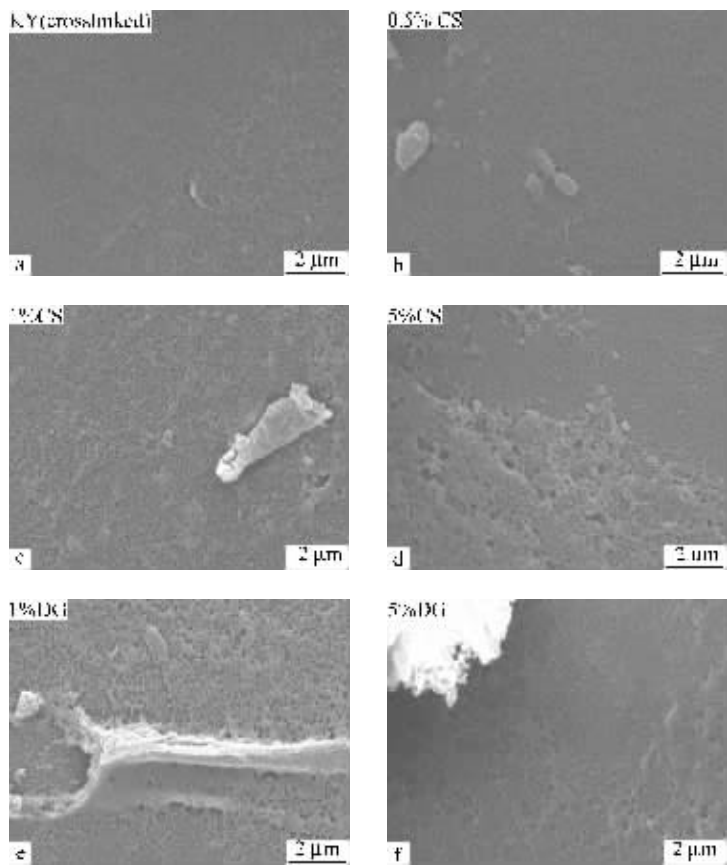


图 3 SEM pictures of keratin membrane control (a) and keratin membranes treated with 0.5 wt% CS solution (b), 1 wt% oligo-CS solution (c), 5 wt% oligo-CS solution (d), 1 wt% DG solution (e), and 5 wt% DG solution (f)

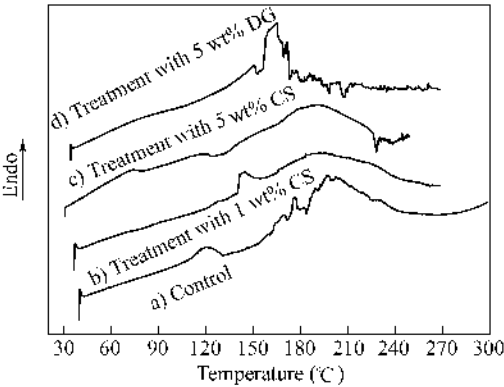


图 4 DSC profiles of keratin membranes with different treatments

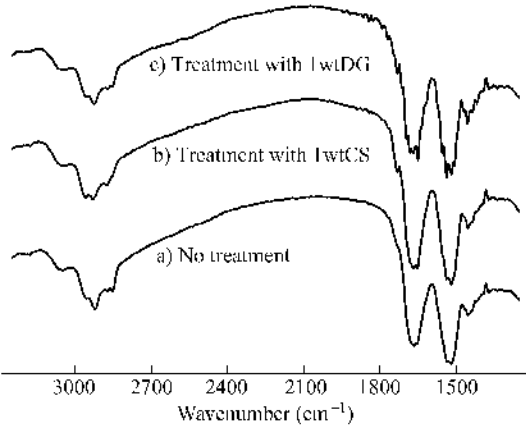


图 5 FTIR spectra of keratin with different treatments

3 结论

氨基葡萄糖与角质层蛋白之间相互作用只能改变部分角蛋白的二级结构,却不能明显影响角质层结构的紧密程度.低聚壳聚糖与角质层蛋白之间相互作用却可以引起两种效果,即一方面可

有效降低鼠角质层结构的紧密程度,另一方面可影响角蛋白的微结构,使得角蛋白 α -螺旋结构向 β -折叠结构和无规则卷曲结构转变.而正是这种综合作用疏通了角质层角蛋白膜的促渗通道,使药物易于传送,从而表现出更高的药物促渗性能.

REFERENCES

1 Zheng Junmin(郑俊民). Transdermal Drug Delivery System (经皮给药新剂型). Beijing(北京): People Sanitation Press(人民卫生出版社),

- 1999, 36 ~ 178
- 2 Drakulic B J, Juranic I O, Eric S, Zloh M. *Int J Pharmaceut*, 2008, 363(1-2): 40 ~ 49
- 3 Darlenski R, Sassning S, Tsankov N, Fluhr J W. *Eur J Pharm Biopharm*, 2009, doi: 10.1016/j.ejpb.2008.11.013
- 4 Guillard E C, Tfayli A, Laugel C, Baillet-Guffroy A. *Eur J Pharm Sci*, 2009, 36(2-3): 192 ~ 199
- 5 Zhang C F, Yang Z L, Luo J B, Zhu Q H, Zhao H N. *Eur J Pharm Biopharm*, 2007, 67: 413 ~ 419
- 6 Adrian C W, Brian W B. *Adv Drug Delivery Rev*, 2004, 56(5): 603 ~ 618
- 7 Lin S Y, Duan K J, Lin T C. *Spectrochimica Acta, Part A*, 1996, 52: 1671 ~ 1 678
- 8 Zhou X Q, Xu J, Yao K D, Liu D Z, Wang L, Wang X Y, Yang X J, Liu Y, Fang Y Q. *J Biomater Sci Polymer Ed*, 2005, 16: 563 ~ 574
- 9 Smith J M, Wood E J. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 2003, 14: 46 ~ 49
- 10 Illum L. *Pharm Res*, 1998, 15(9): 1326 ~ 1331
- 11 Fang J, Sung K, Wang J, Chu C, Chen K. *J Pharm Pharmacol*, 2002, 54: 1329 ~ 1337
- 12 Cerchiara T, Luppi B, Bigucci F, Orienti I, Zecchi V. *J Pharm Pharmacol*, 2002, 54: 1453 ~ 1459
- 13 Köping-Höggård M, Vårum K M, Issa M, Danielsen S, Christensen B E, Stokke B T, Artursson P. *Gene Ther*, 2004, 11: 1441 ~ 1452
- 14 Zhou Xueqin(周雪琴), Liu Dongzhi(刘东志), You Guifeng(由桂枫), Yao Kangde(姚康德), Zhang Yang(张扬). *Fine Chemicals (精细化工)*, 2008, 25: 25 ~ 27
- 15 Pappinen S, Tikkinen S, Pasonen-Seppänen S, Murtomäki L, Suhonen M, Urtti A. *Eur J Pharm Sci*, 2007, 30: 240 ~ 250
- 16 Sánchez M, Gregori J, Alonso C, García-Jareño J J, Takenouti H, Vicente F. *Electrochim Acta*, 2007, 52: 7634 ~ 7641
- 17 Wilkes G L, Brown I A, Wildnauer R H. *CRC Crit Rev Biomed Eng*, 1973, 1: 453 ~ 495
- 18 Felt O, Buri P, Gurny R. *Drug Dev Ind Pharm*, 1998, 24: 979 ~ 993
- 19 Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S. *J Cell Biol*, 2002, 156: 1099 ~ 1111
- 20 Dodane V, Vilivalam V D. *Pharm Sci Technol Today*, 1998, 1: 246 ~ 253
- 21 Prabakaran M, Mano J F. *Drug Deliv*, 2005, 12: 41 ~ 57
- 22 Hu Jiwen(胡继文), Yang Yuqin(杨玉芹), Lin Lie(林列), Chen Mingcai(陈鸣才), Shen Jiarui(沈家瑞). *Polymeric Materials Science & Engineering(高分子材料科学与工程)*, 2002, 18(2): 131 ~ 133
- 23 Lawson E E, Anigbogu A N, Williams A C, Barry B W, Edwards H G. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 1998, 54A: 543 ~ 558

IN VITRO INVESTIGATION ON THE INTERACTIONS OF OLIGO-CHITOSAN WITH KERATIN

ZHOU Xueqin^{1,2}, YOU Guifeng², LIU Dongzhi¹, YAO Kangde²

(¹ School of Chemical Engineering, ² Research Institute of Polymeric Materials, Tianjin University, Tianjin 300072)

Abstract To investigate the enhancement mechanism of the oligo-chitosan (oligo-CS) on the transdermal delivery of drugs, the interactions of oligo-CS and D-glucosamine (DG) with the stratum corneum (SC) keratin were investigated in vitro with the lipid-extracted mouse SC and extracted keratin as models by EIS, SEM, DSC and FTIR methods. It was found that the DG solutions had no influence on the EIS value of the lipid-extracted mouse SCs. But oligo-CS solutions could reduce the EIS value of the lipid-extracted mouse SCs from the original $3.79 \times 10^6 \Omega \cdot \text{cm}^2$ to $8.379 \times 10^5 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Moreover, SEM pictures showed that both oligo-CS solutions and DG solutions could destroy the keratin membranes. Furthermore, DSC determination revealed that the melting point of the α -helix micro-crystals in the keratin membranes was lowered from 201 °C to 190 °C, 189 °C and 165 °C after compositing with 1 wt% oligo-CS, 5 wt% oligo-CS and 5 wt% DG, respectively. FTIR spectra exhibited that the amide II absorption peak of keratin shifted from 1523 cm^{-1} to 1520 and 1521 cm^{-1} after the treatment with 1 wt% oligo-CS solution and 1 wt% DG solution, respectively. These results indicated that the interactions between the oligo-CS and the SC keratin could destroy the tight junctions of the keratin cells and vary the keratin conformation from α -helix to β -sheet or random coil, resulting in a decreased skin barrier and an improved drug percutaneous permeation property.

Keywords oligo-Chitosan, Keratin, Interaction, Stratum corneum, Transdermal delivery