

· 研究简报 ·

可聚合脂质体的研究*

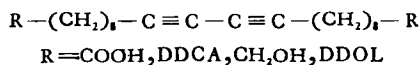
I. 含共轭双炔基团的两亲性单体及其脂质体

李子臣 何巍 李福绵

(北京大学化学系 北京 100871)

关键词 10,12-二十二碳二炔-1,22-二酸(DDCA), 脂质体, 10,12-二十二碳二炔-1,22-二醇(DDOL), 光聚合

聚合型脂质体由于其较高的稳定性近年来在生物膜的研究中日益受到重视。这类脂质体是由可聚合的磷脂或类脂化合物在水中超声后经紫外光照射聚合而成的, 聚合基团可以是共轭或孤立双键, 共轭双炔等^[1-2]。对于磷脂-聚合物型混合脂质体的研究表明, 混合型脂质体期望具有更为接近天然生物膜的性质, 其稳定性比一般合成脂质体有所提高; 而流动性要比纯聚合物型脂质体为好等, 其中聚合物部分可以由可聚合的合成磷脂^[3], 双链双亲单体^[4], 单链双亲单体^[5]形成脂质体后经紫外光照射而成。以往的研究发现^[6], 在单长链的分子两端各含有一个亲水基团的化合物也可以形成单分子脂质体结构, 但关于可聚合的这类单体的研究较少。本文合成了两种在分子中含有共轭双炔基团的单链双极性单体: 10,12-二十二碳二炔-1,22-二酸(DDCA)和10,12-二十二碳二炔-1,22-二醇(DDOL), 并研究了这两种单体与双十四碳酰磷脂酰胆碱(DMPC)形成混合型脂质体的情况以及DDCA和DDOL在脂质体上的聚合。



1 单体的合成与表征

10-十一碳炔酸和10-十一碳炔-1-醇根据文献[7]的方法合成。

DDCA 根据文献[8]的方法由10-十一碳炔酸合成。产率: 65%, m. p. 118—120°C。元素分析: 理论值(%): C73, 51, H9, 45; 实测值(%): C72, 93, H9, 50。

DDOL 根据文献[9]的方法由10-十一碳炔-1-醇合成。产率: 45%, m. p. 79—81°C。元素分析: 理论值(%): C78, 99, H11, 45; 实测值(%) C78, 40, H11, 61, 所有化合物均经 IR, ¹H-NMR 光谱表征。

2 混合型脂质体的形成

将 DDCA 或 DDOL 与 DMPC 按等摩尔比混合, 用少量氯仿溶解, 减压下旋转蒸发除去氯仿, 然后加入一定量的 Tris-HCl 缓冲溶液 (pH8.5), 在氮气气氛下超声波处理 20 分钟 (60°C 水浴, 上海超声波仪器厂)。将所得脂质体悬浮液滴于喷过碳的铜网上, 用 4% 醋酸双氧铀水溶液染色 1 分钟, 干燥后用 JEOL-100CXII 电子显微镜观察, 得到

* 1993-06-28 收稿; 高等学校博士学科点专项科研基金资助课题; 中关村分析测试基金资助

如图 1 的电镜照片。从图中可以看出,存在明显的脂质体结构,脂质体的直径大小分布在 100—300nm。由于 DDCA 和 DDOL 分子中作为亲水基团的 $-OH$, 或 $-COOH$ 的极性及体积相对较小, 而分子本身的刚性又较大, 很难在超声下自组织为球状的微囊结构, 但它们可以作为膜扩展化合物穿插在 DMPC 脂质体的双分子层膜中, 形成稳定的脂质体。

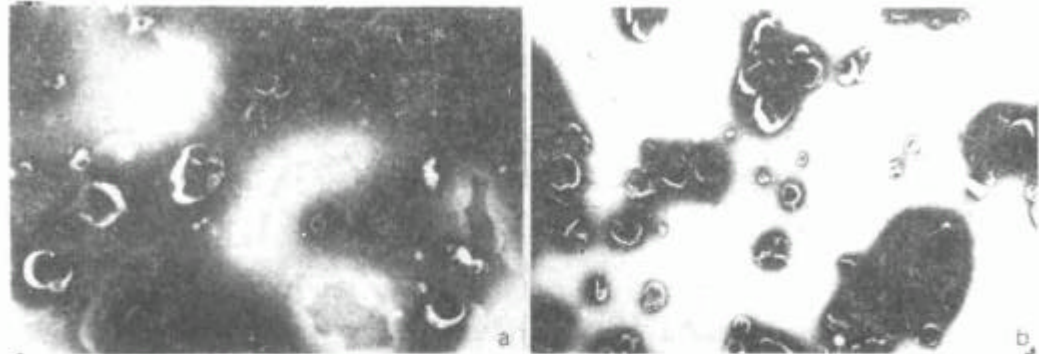


Fig. 1 Electron microscopic photographs of the mixed liposomes
A: DMPC-DDCA = 1:1 (M/M) liposome ($\times 17000$)
B: DMPC-DDOL = 1:1 (M/M) liposome ($\times 8100$)

为了进一步证明所得到的脂质体不是由 DMPC 单独形成的, 我们将这两种混合型的脂质体悬浮液经 Sephadex G-50 (Fine, Pharmacia 进口分装) 凝胶柱分离 ($2 \times 20\text{cm}$), 淋洗液为与脂质体相同的缓冲溶液, 在空白体积 $V_0 = 6-9\text{ml}$ 内得到含脂质体的悬浮液, 置于紫外分光光度计检测, 参比为纯缓冲溶液, DMPC 本身没有紫外吸收, 图

2 为测定结果, 可以看出脂质体与 DDCA 或 DDOL 的乙醇溶液的紫外吸收很相似, 这说明 DDCA 或 DDOL 确实存在于脂质体中, 我们得到的脂质体为混合型的脂质体。

脂质体的一个重要性质是可以包容水溶性化合物, 脂质体对荧光探针化合物的包藏与释放也是研究脂质体稳定性的一个重要方法, 通常用的水溶性荧光探针化合物为 5(6)-羧基荧光素 (5(6)-CF)^[10]。我们用 100mM 的 5(6)-CF 缓冲溶液 (Tris-HCl, pH8.5) 来制备两种混合脂质体, 然后经 Sephadex G-50 凝胶柱将没有被包藏的 5(6)-CF 分离掉, 测定在 50℃ 恒温水浴中放置不同时间的荧光光谱。荧光测定在 Hitachi M-850 荧光光谱仪上进行, 激发波长 330nm, 最大发射波长在 520nm, 图 3 为记录到的两种混合脂质体的荧光发射光谱随时间的变化, 可以看

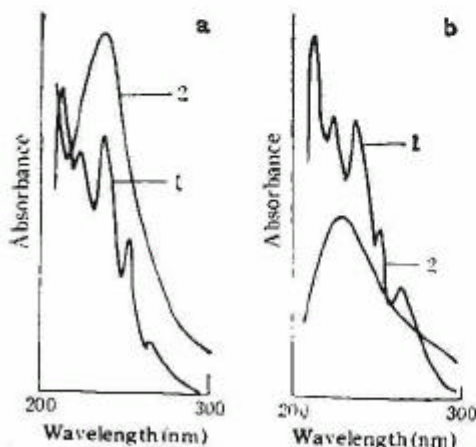


Fig. 2 UV spectra of DDCA and DDOL ethanol solutions and the mixed liposomes after treated by gel separation
a: DDCA in ethanol (1) and DMPC-DDCA = 1:1 (M/M) liposome (2) b: DDOL in ethanol (1) and DMPC-DDOL = 1:1 (M/M) liposome (2)

出不论 DMPC-DDCA = 1:1 (M/M) 或 DMPC-DDOL = 1:1 (M/M) 脂质体, 在测定初期的荧光均较弱, 这是由于 5(6)-CF 在脂质体的内水相浓度较高荧光自猝灭的结果, 随着在 50°C 的水浴中放置时间的加长, 荧光强度逐渐增强, 5(6)-CF 逐渐从内水相渗透到外水相, 这也间接证明了混合型脂质体的存在。

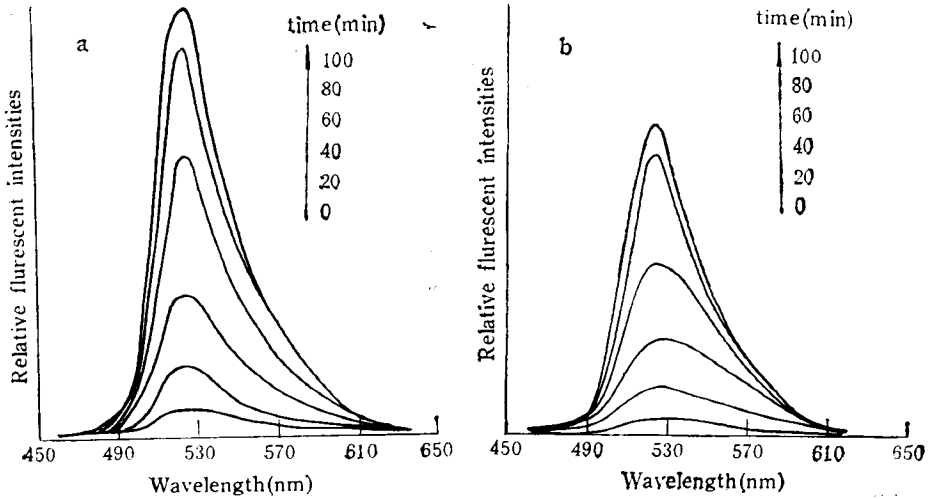


Fig. 3 Dye releases from the mixed liposomes at 50°C

a: DMPC-DDCA = 1:1 (M/M) liposome b: DMPC-DDOL = 1:1 (M/M) liposome

3 脂质体的聚合

将 5ml DMPC-DDCA = 1:1 (M/M) 或 DMPC-DDOL = 1:1 (M/M) 的脂质体悬浮液放在一石英管中, 在 0°C 及氮气保护下, 用 40 瓦高压汞灯相距 5cm 照射聚合, 取出经不同照射时间的样品, 用 Shimadzu UV-250 分光光度计测定吸收光谱的变化。图 4 为 DMPC-DDCA = 1:1 (M/M) 和 DMPC-DDOL = 1:1 (M/M) 脂质体在 0°C 时

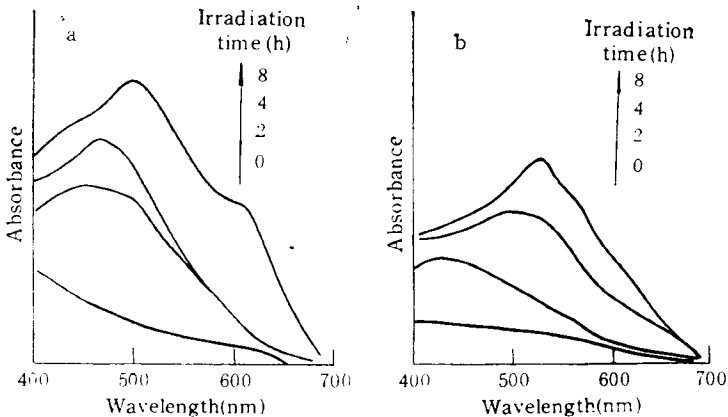


Fig. 4 Absorption spectra of mixed liposomes by UV irradiation

a: DMPC-DDCA-1:1 (M/M) liposome, [DDCA] = 5×10^{-4} M

b: DMPC-DDOL = 1:1 (M/M) liposome, [DDOL] = 5×10^{-4} M

经紫外光照射不同时间的吸收光谱变化图,从图中可以看出,紫外光照射前的脂质体在400—700nm 范围内没有明显吸收,当照射到2 小时后,在这一吸收范围内出现新的吸收峰,这与从宏观上肉眼所观察到的脂质体逐渐由近乎无色逐渐变为蓝色是一致的,当照射到8 小时后,脂质体则又变为淡红色,吸收峰位置则表现为明显的蓝移;这是由于聚合进一步完全,聚合物的共轭结构进一步增大的结果。由此可见,DDCA 和 DDOL 由于和DMPC 混合形成了脂质体,使得 DDCA 和 DDOL 分子的排列趋于整齐,才可以在紫外光的照射下发生双炔基团的聚合反应。

参 考 文 献

- [1] Fendler J H. *Membrane Mimetic Chemistry*, New York: Wiley-Interscience, 1982
- [2] Ringsdorf H, Schlarb B, Venzmer J. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1988, **27**: 113
- [3] Davis D E, Grainger D, Ringsdorf H, et al. *Biochem Soc Trans*, 1989, **17**: 713
- [4] Kurikara K, Fendler J H. *J Chem Soc Chem Commun*, 1983, **21**: 1188
- [5] Fang Y. *Chinese J Polym Sci*, 1987, **4**: 346
- [6] Okahata Y, Kunitake T. *J Am Chem Soc*, 1979, **101**: 5231
- [7] Krafft F. *Chem Ber*, 1896, **29**: 2232
- [8] Seher A. *Justus Liebig's Ann Chem*, 1954, **589**: 234
- [9] Bader H, Ringsdorf H. *J Polym Sci, Polym Chem Ed*, 1982, **20**: 1623
- [10] Weinstein J H, Yoshikami S, Henkart P, et al. *Science*, 1977, **195**: 489

POLYMERIZABLE LIPOSOMES

I. SYNTHESIS AND LIPOSOMES OF TWO POLYMERIZABLE α,ω -DIPOLAR AMPHIPHILES HAVING DIYNE MOIETY

LI Zichen, HE Wei, LI Fumian

(Department of Chemistry, Peking University, Beijing 100871)

Abstract Two α,ω -dipolar amphiphiles, 10,12-docosadiyne-1,22-dicarboxylic acid (DDCA) and 10,12-docosadiyne-1,22-diol(DDOL) were synthesized by coupling the corresponding 10-undecylcarboxylic acid and 10-undecynol, respectively. They could form hybrid liposomes when ultrasonically dispersed with dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) at equal molar ratio. Liposome formation was confirmed by electron microscopy, UV measurement as well as encapsulation of fluorescent probes. UV irradiation of the mixed liposomes induced the polymerization of DDCA and DDOL on the liposomes, which could be followed by UV-Vis measurement.

Key words 10,12-Docosadiyne-1,22-dicarboxylic acid (DDCA),10,12-Docosadiyne-1,22-diol (DDOL), Mixed liposome, Photopolymerization