

★论著★

荧光共振能量转移法测定脂质体与细胞膜间的融合*

王汝涛^{1,2}, 陈涛^{1,2,3*}, 王昭^{1,2}, 张阳²

(1. 西北工业大学生命科学院, 西安 710072 2 陕西脂质体工程技术研究中心, 西安 710068

3. 西安力邦制药有限公司, 西安 710068)

摘要 目的: 利用荧光共振能量转移原理建立测定脂质体与细胞膜间融合能力的方法。方法: 利用荧光共振能量转移原理, 通过检测试样的荧光发射光信号, 来评价高分子酸敏脂质体之间, 高分子酸敏脂质体、红细胞及细菌之间的融合性能。结果: 荧光共振能量转移法可用于测定酸性条件下酸敏脂质体与空白脂质体、红细胞膜影以及细菌之间的融合程度, 本方法的可靠性得到了脂质体融合前后粒径变化的验证, 方法学研究结果显示此方法的稳定性和重现性良好。结论: 利用荧光共振能量转移原理, 建立一种用来评价脂质体之间, 脂质体与细胞膜之间融合性的方法, 此方法简单、快速、有效。

关键词: 脂质体; 酸性; 融合; 荧光共振能量转移

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)11-1785-05

Determination of fusion between liposomes and cell membranes by fluorescence resonance energy transfer assay*

WANG Ru-tao^{1,2}, CHEN Tao^{1,2,3*}, WANG Zhao^{1,2}, ZHANG Yang^{2,3}

(1. Faculty of Life Sciences, Northwestern Polytechnical University Xi'an 710072, China 2. Shaanxi Liposome Research Center, Xi'an 710068, China

3. Xi'an Libang Pharmaceutical Company, Xi'an 710068, China)

Abstract Objective To establish a method for determination of the fusion between the liposomes and membrane of cell by fluorescence resonance energy transfer. **Methods** To use the principle of fluorescence resonance energy transfer, the fusion between the polymer acid sensitive liposomes and red blood cells and bacteria was evaluated by detecting fluorescence emission light signals. **Results** The fluorescence resonance energy transfer method can be used for determination fusion of the pH-sensitive liposomes, blank liposomes, red cell membrane and bacteria. The reliability of the fluorescence resonance energy transfer assay has been verified that liposomal particle size is changed following pH-induced fusion of acid-sensitive polymer-liposomes with non-polymer liposomes. The methodology results showed that this method was stability and good reproducibility. **Conclusion** The simple and quick method to evaluate the pH-sensitivity fusion of liposome with liposomes or cell is established based on the principle of fluorescence resonance energy transfer. All results indicate that this method is simple and reliable.

Key words liposomes, pH-sensitivity fusion, fluorescence resonance energy transfer

荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 是指两个荧光基团在相互间距离足够近时 (10~100 Å) 所发生的能量非放射性地由一个荧光基团向另一个荧光基团转移的现象^[1]。见图 1。

荧光共振能量转移的程度与两个荧光分子之

间的距离有关, 距离近, 能量转移充分; 距离远, 能量转移弱, 直至能量转移消失。我们利用以上原理, 使用红色荧光和绿色荧光标记的磷脂一同构建脂质体, 当不同荧光物质标记的脂质体间距离足够近的时候, 即可发生荧光共振能量转移的现象^[2,3] (图 2)。通过测量 NBD 或者 Rh 荧光发射光

* 陕西省自然科学基金研究计划重点项目 (SJ08ZD03); 陕西省重大科技创新项目 (2006ZKC04)。

** 通讯作者 Tel: (029) 88324761; E-mail: wutao1971@126.com

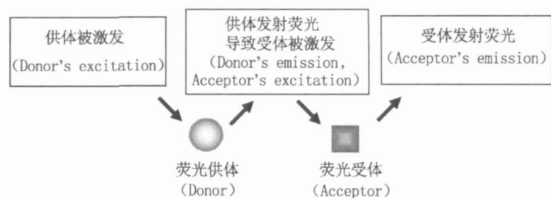


图 1 荧光共振能量转移原理示意图

Fig 1 The diagram of fluorescence resonance energy transfer between fluorescence donor and acceptor

强度的变化,可以间接评价细胞间的融合程度和能力^[4]。本文以荧光标记的脂质体为工具,初步探索了荧光共振能量转移法在测定细胞膜融合中的应用。

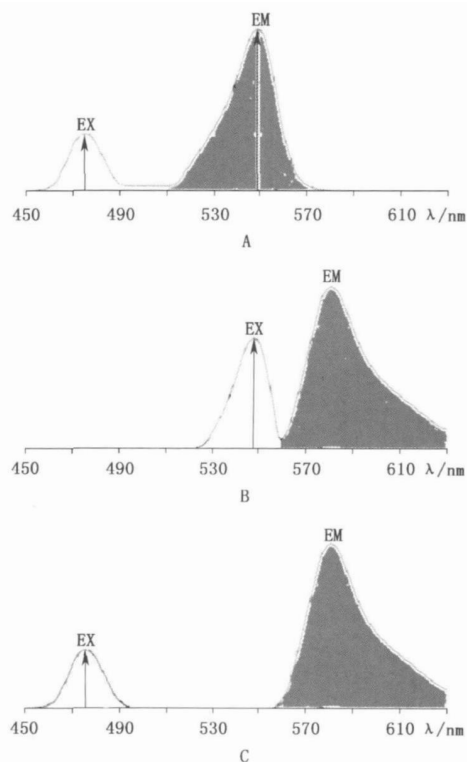


图 2 Rh和 NBD 荧光间的能量共振转移

Fig 2 Fluorescence resonance energy transfer between Rh and NBD

A NBD 荧光的激发和发射光谱 (fluorescence excitation and emission of NBD) B Rh 荧光的激发和发射光谱 (fluorescence excitation and emission of Rh) C Rh 和 NBD 分子间近距离混合物的荧光激发和发射光谱 (fluorescence excitation and emission of a closed mixture of NBD and Rh)

1 材料和方法

1.1 药品和试剂 荧光标记磷脂 *N*-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl) phosphatidylethanolamine (NBD-PE)、rhodamine phosphatidylethanolamine (Rh-PE)、distearoyl phosphatidylcholine (DSPC)、dipalmityl phosphatidylcholine (DPPC) 和 dimyristoyl phosphatidylglycerol (DMPG) 购自美国

Avanti polar lipids 公司,卵磷脂 (EPC, 纯度 98%) 和胆固醇 (Chol 纯度 98%) 由西安力邦制药有限公司提供,聚 2-乙基丙烯酸 (相对分子质量 2 万) 由河南科学院化学所傅经国研究员提供,其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器 LS-50B 荧光分光光度计 (美国 Perkin-Elmer 公司), Nicomp 370 激光散射粒径仪 (加拿大 Santa Barbara 公司), 挤压器 (加拿大 Lipex Biomembranes 公司)。

1.3 实验用细菌和培养液 黏膜绿脓杆菌 ATCC 25668 得自 ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, Md)。菌种接种后在 Mueller-Hinton broth (MH) 培养液中培养过夜,取 30 μL 接种于 20 mL MH 培养液中,置于 37 °C 摇床,为了去除离子的干扰,所用培养液都采用不含 2 价离子的 MH 培养液。

2 方法与结果

2.1 脂质体的制备

2.1.1 普通脂质体的制备 依照发表的薄膜挤压法^[5]制备大单室脂质体。荧光标记的脂质体的制备方法是在磷脂配方中分别加入占总磷脂量百分比各 0.5 mol·L⁻¹ Rh-PE 和 NBD-PE, 其他步骤与文献描述的方法一致。

2.1.2 高分子酸敏脂质体的制备 聚(2-乙基丙烯酸)酸敏脂质体按文献报道的方法^[5]制备。将烷基化修饰程度为 3% 聚 2-乙基丙烯酸脂肪酰胺溶液 (pH 7.4) 与预先制备的脂质体混合,在 40 °C 温度下缓慢搅拌 12 h。高分子的脂溶性侧链会和脂质体连接在一起。以凝胶 Sepharose CL-6B 色谱柱 (1.5 cm × 20 cm) 将未嵌入脂质体的高分子分离。

2.1.3 柔性脂质体的制备 柔性脂质体 (Flexosomes TM) 是具有相对较低的胶晶态-液晶态相变温度 (TC < 37 °C) 的特殊脂质体。柔性脂质体按文献报道的冻干-水合法^[6]制备。同时以 0.5% 的 Rh-PE 和 NBD-PE 荧光标记。

2.2 血红细胞膜影的制备 按照文献方法制备^[7]。适量的人全血经 PBS 磷酸盐缓冲溶液离心洗涤除去血浆和白细胞,将含有红血球的溶液加入膜影液中 (5 mmol·L⁻¹ PB, pH 7.5, 1 mmol·L⁻¹ EDTA, 1 mmol·L⁻¹ PMSF), 4 °C 搅拌 12 h 使细胞破裂,使血红蛋白能够充分从红细胞中泄出。超滤膜影,去除血红蛋白,浓缩膜影至需要的浓度。

2.3 粒径检测 取脂质体样品适量,用去离子水稀释,用激光散射粒径仪测定脂质体的平均粒径和粒径分布情况。

2.4 荧光共振能量转移测定 将 NBD- PE 和 Rh- PE 标记的脂质体与不同比例无标记的脂质体、红细胞膜影、细菌混合, 固定激发波长 475 nm, 根据需要测定溶液 NBD 发射波长 (520 nm) 的增加, 或 Rh (590 nm) 强度的减弱。在细胞融合度计算公式 [1] 中, F_t 为实验测定的溶液荧光强度, F_0 是实验起始时的荧光强度, $F_{\max}$ 表示细胞间发生最大融合, 通过在试样中加入 0. 2% 体积量的 TritonX 100 使脂质膜体彻底破裂, 荧光分子彻底分离, 荧光共振能量转移现象消失。

$$\text{Fusion}(\%) = \frac{F_t - F_0}{F_{\max} - F_0} \times 100\% \quad [1]$$

2.5 测定脂质体与脂质体间的膜融合 荧光标记的酸敏脂质体发生膜融合时的荧光图谱变化见图 3 可以看出, 随着膜融合的增加, 脂质体中 NBD 和 Rh 的距离增大, 能量转移的效率降低, NBD 的荧光增强, Rh 的荧光减弱。通过跟踪荧光强度的变化可以计算出脂质体与脂质体间的膜融合程度。表 1 总结了酸敏脂质体在酸性条件下引起的脂质体间的膜融合, 而非酸敏脂质在酸性条件下没有发生融合, 所以 FRET 法没有检测到荧光强度的变化, 同时测定脂质体粒径在溶液酸化前后没有发生变化 (表 1, 实验 1 和 2)。当酸敏脂质体分别与 EPC /Chol 及 DSPC /Chol 制备的脂质体以 1: 4 的比例混合后, 调整 pH 4. 5, FRET 法测定它们的膜融合度分别为 89% 和 85% (表 1, 实验 3 和 5), 粒径仪测定结果显示: 脂质体粒径都显著增大, 且呈现非均一性变化。粒径相应增大也验证了荧光共振能量转移法测定膜融合的可可靠性。

表 1 荧光共振能量转移测定的
酸敏脂质体融合时伴随的粒径变化

Tab 1 Changes of liposomal size following pH - induced fusion of acidic- sensitive polymer- liposomes with non- polymer associated liposomes

实验编号 (Exp No)	供体 (donor)	受体 (acceptor)	供体/受体比率 (donor/acceptor ratio)	融合度 (degree of fusion) %	粒径 (particle size) / nm
1	非高分子 (non- polymer)	EPC /Chol	1: 4	0	125
2		DSPC /Chol	1: 4	0	122
3	酸敏高分子 (pH- sensitive polymer)	EPC /Chol	1: 4	89	510
4		EPC /Chol	1: 1	52	2469
5		DSPC /Chol	1: 4	85	493

2.6 测定脂质体与红细胞膜影间的膜融合 酸敏高分子脂质体不仅与不同的脂质体融合, 也能同细胞膜发生膜融合。图 4 为酸敏高分子脂质体在酸性条件下与红细胞膜影共孵育时, 试样中的荧光变化情况, 表明酸敏高分子脂质体在酸性环境中可与红细胞膜影发生膜融合, 而在中性环境中没此现象发生。

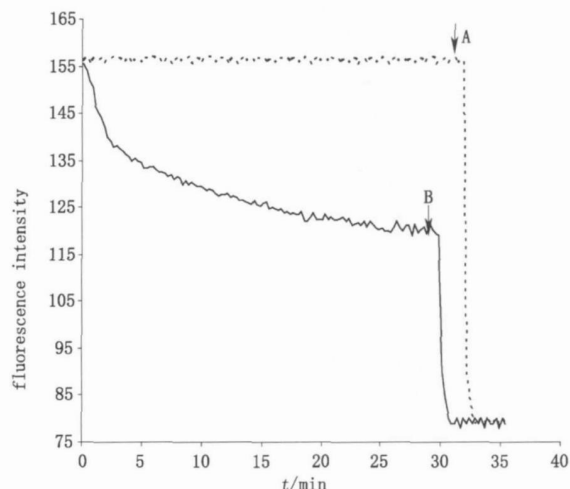


图 3 荧光共振能量转移法测定的柔性脂质体与铜绿假单胞菌 25668 的融合性

Fig 3 Fluidosome fusion with *Pseudomonas aeruginosa* 25668 monitored by fluorescence resonance energy transfer assay

A 柔性脂质体间未发生融合 (fluidosome without fusion with blank fluidosome); B 柔性脂质体与铜绿假单胞菌发生了融合 (fluidosome fusion with *Pseudomonas aeruginosa*)

2.7 测定脂质体与细菌细胞间的膜融合 研究发现脂质体与细菌细胞间可发生膜融合^[8], 荧光共振能量转移法也可以用来定量测定柔性脂质体与细菌细胞膜的融合。黏膜绿脓杆菌在 NBD 的荧光激发光谱区有较强的干扰, 所以选择跟踪 Rh 的最大激发波长 590 nm 进行荧光强度的测定。当荧光标记的柔性脂质体与细菌混合并在 37 ℃ 培养时, 混合液的 Rh 荧光强度减弱, 荧光图谱的变化表明柔性脂质体与细菌发生了膜融合。图 3 记录了柔性脂质体与细菌融合所产生的荧光强度的变化。荧光标记的柔性脂质体与无标记的柔性脂质体混合培养, 没有检测到荧光强弱的变化, 表明柔性脂质体间在相同条件没有发生膜融合。

2.8 荧光共振能量转移法测定脂质体间膜融合的方法学研究 采用酸敏高分子脂质体在酸敏条件下引起的脂质体膜融合实验验证荧光共振能量转移法的稳定性和重现性, 首先固定供体/受体比例为 1: 4,

通过测定荧光强度的变化, 根据公式 [1] 计算膜融合度, 同时测定脂质体粒径的变化来印证 FRET 法的可信性。5 次重复实验的结果见表 2。计算出融合度的 RSD 值为 1. 5%。

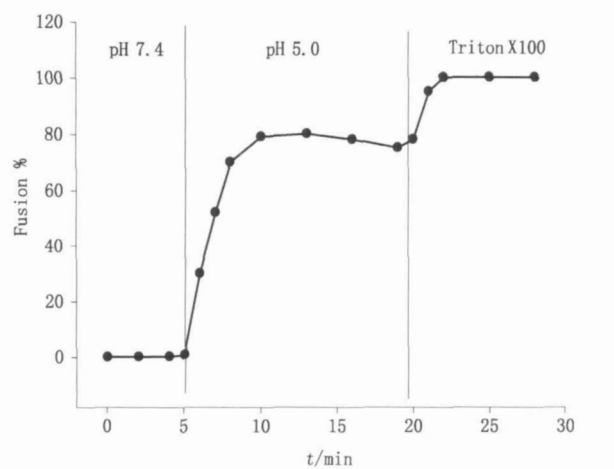


图 4 酸敏高分子脂质体与血红细胞膜影在酸性条件下的膜融合
Fig 4 Fusion of pH - sensitive polymer - liposomes with erythrocyte ghosts

表 2 荧光共振能量转移法的稳定性和重现性
Tab 2 Stability and reproducibility of fluorescence resonance energy transe assay

实验编号 (Exp No)	供体 /受体比率 (donor/acceptor ratio)	融合度 (degree of fusion) %	RSD %	粒径 (particle size) /nm
1	1 : 4	83	1. 5	532
2		85		496
3		86		501
4		87		522
5		85		493

3 讨论

细胞与细胞间的融合是许多生物反应的重要步骤, 例如精子与卵子结合时精子膜与卵子膜之间的融合过程^[9 - 10]。如今我们利用细胞膜的融合原理, 开发出了脂质体智能靶向递药系统, 通过其与细胞膜的融合效应把药物送入细胞内^[11], 在这个过程中脂质体与细胞膜的融合是生物大分子递药的关键所在^[12 - 13]。但是目前还没有十分准确有效的评价细胞膜融合程度的实验方法。所以研发出一种用来检测、分析细胞间融合程度的准确可靠的方法就显得非常必要。

荧光共振能量转移是荧光技术中的一种特有现象。我们利用这一特性, 间接地为我们研究细胞膜融合提供了量化信息。这一技术通过脂质体间的融

合实验得以证明, 实验结果显示: 在酸性环境中酸敏高分子脂质体与其他脂质体发生融合时, 可观测到特定荧光染料发射光强度的改变, 并且其发射光强度的变化与脂质体间的融合程度直接相关。依据此相关性我们可以建立荧光强度变化与脂质体膜融合程度的方法。在以上实验中我们还对实验条件进行了考察, 发现脂质体间的融合程度还与反应体系中供体 /受体的比例有关, 当共体 /受体的比例为 1 : 1 时, FRET 测得膜融合度 52%, 当共体 /受体 1 : 4 时, 膜融合度为 89%。而脂质体融合后的粒径变化则刚好相反, 比例 1 : 4 粒径为 510 nm, 比例为 1 : 1 时, 粒径变得更大为 2469 nm。这也清楚地指明 FRET 的局限性, 该方法受共体 /受体的比例的影响。当比例为 1 : 1 时, 虽然实际上脂质体在第 1 轮融合后, 脂质体表面的酸敏高分子密度仍然很高, 很可能还会继续融合, 而荧光标记的磷脂则因为实验中使用的受体数量的限制, 仅仅能被稀释 1 倍, 无论脂质体是否仍然融合, 荧光分子的相对密度都不再变化。当共体 /受体比例增加到 1 : 4 时, 相对少量的酸敏高分子脂质体与大量的受体脂质体作用 (注意这些受体脂质体表面没有酸敏高分子), 脂质体经过两三轮融合后, 高分子在融合后的脂质体表面的密度被充分稀释, 失去了继续融合的能力, 所以融合后的粒径反而比共体 /受体比例为 1 : 1 时相对要小, 但是荧光分子被充分稀释, 检测到的膜融合度反而要大。所以要对不同体系的膜融合度用 FRET 法进行比较时, 必须控制实验条件尽量一致, 否则, 这种比较是没有意义的。需要同时指出的是 FRET 法不受受体磷脂膜组成的影响, 只要两种脂质体发生膜融合, 就能够用 FRET 法定量地获得它们的膜融合度。

荧光共振能量转移法也能用来研究脂质体与细胞膜的融合。本实验同时考察了酸敏高分子脂质体在酸性条件下与红细胞膜影的融合, 红细胞膜影是细胞内容物去除后的空的血红细胞膜, 它的组成比一般脂质体更复杂, 更接近真实细胞, 能够获得比较真实的细胞融合信息, 是研究细胞融合的理想模型。实验还研究了细菌细胞膜与脂质体的融合特性, 并且把这种融合量化, 为研究耐药菌株的细胞膜的变化提供了有效的方法。

通过对荧光共振能量转移法原理和实际操作的讨论, 我们认为此方法在脂质体融合性研究中必将有广泛的应用前景, 我们希望通过本文列举的实例, 为脂质体技术的应用提供帮助。

参考文献

- 1 Struck DK, Hoekstra D, Pagano RE. Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion. *Biochemistry*, 1981, 20 (14): 4093
- 2 Wolf DE, Winski AP, Ting AE, Bocian KM, *et al*. Determination of the transbilayer distribution of fluorescent lipid analogues by non-radiative fluorescence resonance energy transfer. *Biochemistry*, 1992, 31(11): 2865
- 3 Malin VS, Haque ME, Lentz BR. The rate of lipid transfer during fusion depends on the structure of fluorescent lipid probes: a new chain- labeled lipid transfer probe pair. *Biochemistry*, 2001, 40 (28): 8292
- 4 Morris SJ, Bradley D. Calcium- promoted fusion of isolated chromaffin granules detected by resonance energy transfer between labeled lipids embedded in the membrane bilayer. *Biochemistry*, 1984, 23(20): 4642
- 5 WANG Ru- tao(王汝涛), CHEN Tao(陈涛), WANG Zhao(王昭), *et al*. Acid- sensitive polymer liposomes prepared by poly (2- ethylacrylic acid) alkylamide derivatives(聚 (2- 乙基丙烯酸) 脂肪酰胺衍生物构建的酸敏脂质体). *Acta Pharm Sin*(药学报), 2007, 42(12): 1303
- 6 Beaulac C, Clement- Major S, Havaril J. *et al*. In vitro kinetics of drug release and pulmonary retention of microencapsulated antibiotics in liposomal formulations in relation to lipid composition. *J Microencapsulation*, 1997 (14): 335
- 7 ZHENG Ping(郑萍), ZOU Qiang(邹强), ZHOU Wei(周伟), *et al*. Immunoaffinity purification and activity of decay- accelerating factor from human erythrocytic membranes(人红细胞膜 DAF 的亲亲和纯化及活性研究). *Acta Acad Mil Med Tert*(第三军医大学学报), 24(11): 1316
- 8 Sachetelli S, Khalil H, Chen T, *et al*. Demonstration of a fusion mechanism between a fluid bactericidal liposomal formulation and bacterial cells. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1463(2): 254
- 9 Chen H, McCaffery JM, Chan DC. Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell*, 2007, 130(3): 548
- 10 Glabe CG. Interaction of the sperm adhesive protein, binding with phospholipids vesicles. II Binding induces the fusion of mixed- phase vesicles that contain phosphatidylcholine and phosphatidylserine in vitro. *J Cell Biol*, 1985, 100(3): 800
- 11 Pankov R, Markovska T, Antonov P, *et al*. Influence of membrane phospholipid composition and structural organization on spontaneous lipid transfer between membranes. *Gen Physiol Biophys*, 2006, 25 (3): 313
- 12 Chen T, Choi LSL, Einstein S, *et al*. Proton- induced permeability and fusion of large unilamellar vesicles by covalently conjugated poly (2- ethylacrylic acid). *Liposome Res*, 1999, 9: 375
- 13 CHEN Tao(陈涛), LU Ting- Li(卢亨利), HE Yue- hua(何月华). A study of calcein as an index for evaluation of the pH- sensitive fusion inducement materials and liposomes(荧光素作为酸敏指示剂评价酸敏材料和脂质体酸敏性的方法研究). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2007, 27(7): 1068

(本文于 2008 年 11 月 24 日收到)