### 拉曼光谱研究乳铁蛋白及其肽段与 DPPC、DPPG 脂质体的相互作用

张 伟1,任发政1,葛绍阳1,2,张录达3,姜 鹭1,毛学英1,郭慧媛1\*

1 中国农业大学食品科学与营养工程学院,教育部功能乳品重点实验室,北京 100083

2 畜产品北京市高等学校工程研究中心,北京 100083

3 中国农业大学理学院,北京 100094

摘 要 利用拉曼光谱研究了乳铁蛋白及其肽段 Lactoferrein B<sub>4-14</sub>和 Lactoferrampin 与 DPPC、DPPG 脂质体的相互作用。通过分析作用前后两种磷脂拉曼光谱的变化,探讨了乳铁蛋白及其肽段与磷脂的作用模式,为阐明乳铁蛋白及其肽段抗菌机理提供了重要依据。拉曼光谱显示,乳铁蛋白及其肽段加入中性磷脂 DPPC 脂质体后,属于磷脂脂酰链的 C-H 对称、反对称伸缩振动的 2 847 和 2 882 cm<sup>-1</sup>处的峰强没有发生明显改变;而当乳铁蛋白及其肽段与 DPPG 作用后,2 882 cm<sup>-1</sup>处的峰强度明显下降,磷脂的侧向相互作用序参数 由未加入时的 0 19 分别下降到了 0 17, 0 14, 0 12,变化率分别为-11%, - 27%, - 34%,表明乳铁蛋白及其肽段可能通过静电相互作用与负电性 DPPG 脂质体吸引并结合,且 Lactoferrein B<sub>4-14</sub>和 Lactoferrampin 比乳铁蛋白与磷脂的作用更为强烈。

关键词 拉曼光谱;乳铁蛋白;乳铁蛋白肽;脂质体;相互作用 中图分类号:0657.3 文献标识码:A **DOI**:10.3964/j issn 1000-0593(2011)06-1533-04

#### 引 言

乳铁蛋白(Lactoferrin, LF) 是一种分子质量约为 80 kDa 的铁结合性糖蛋白,其广泛存在于哺乳动物的乳汁和各种分 泌液中,具有广谱高效的抗菌活性。Lactoferrcin B<sub>4-4</sub> (LfcinB<sub>4-4</sub>)和Lactoferrampin(LfampinB)来源于牛源乳铁蛋 白 N 端的两条肽段,是 LF 抗菌活性的核心序列<sup>[1-3]</sup>。虽然 LF 及其肽段的抗菌活性已经得到了广泛的研究和认可,但 其抗菌机理还不明确,因此研究乳铁蛋白及其活性肽段与细 胞膜的相互作用,对阐明其抗菌机理有着重要的意义。

近年来,国内外学者利用多种手段研究药物或其他分子 与生物膜的相互作用,如X射线衍射、电子自旋共振、核磁 共振、圆二色谱、紫外和荧光光谱等,但这些方法均需要高 浓度的样品或是需要对目标分子进行光谱标记,操作过程复 杂费时,不便于进行原位无损检测<sup>[5]</sup>,而拉曼光谱在这一领 域的应用弥补了以上手段的不足。拉曼光谱由于其具有实 时、快速、无损等特点,已经在生物学、医学、食品科学等领 域得到了广泛应用<sup>[68]</sup>。运用拉曼光谱技术研究生物活性物 质与磷脂脂质体(模型生物膜)相互作用时,能准确的获得磷 脂的反式(trans)和扭曲(gauche)等构象信息以及磷脂分子的 链内和链间序参数。通过比较物质作用前后磷脂序参数的变 化率,可以判断磷脂分子链内及链间相互作用的变化情况, 从而得知脂质体磷脂分子的流动性和有序性的变化,以及物 质与脂质体的相互作用方式<sup>(9,10)</sup>。

本文运用拉曼光谱技术从分子水平研究了乳铁蛋白及其 肽段与模型生物膜二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二棕榈酰 磷脂酰甘油(DPPG)脂质体的相互作用,为阐明乳铁蛋白及 其肽段的抗菌机理提供重要的依据,并为新型抗菌药物的设 计提供思路。

#### 1 实验部分

#### 1.1 材料

牛源乳铁蛋白购于 Yosica 公司,纯度 95%。LfcinB<sub>4-14</sub> (RRWQWRMKKLG)、LfampinB(WKLLSKAQEKFGKNK-SR)由本实验室采用基于 Fmoc 保护和 Wang 树脂的固相化 学方法合成。合成后的多肽经液相色谱仪进行纯度分析,达 到 95% 以上,并通过 HPLC MS/MS 分析,鉴定其分子量。

二棕榈酰磷脂酰胆碱(Dipalmitoy + phosphatidy lcholine, DPPC)、二棕榈酰磷脂酰甘油(Dipalmitoy + phosphatidy lgly c

基金项目:国家自然科学基金项目(31000771)和高等学校博士学科点专项科研基金项目(20100008120009)资助

作者简介: 张 伟, 1984年生, 中国农业大学博士生 email: zw\_7431@163 com

收稿日期: 2010 06-25, 修订日期: 2010 09-20

erol, DPPG) 购于德国 Lipoid 公司, 纯度 99%。其他试剂均 为国产优级纯。

#### 1.2 样品的制备

分别称取 DPPC 和 DPPG 固体 37 mg 按照超声法<sup>11</sup> 制备 单层脂质体各 5 mL, 贮存于 4 ℃。肽或蛋白的水溶液与脂质 体以适当比例混合,最终磷脂: 肽(蛋白)质量比为 10: 1。 所有样品制备后于当天内进行拉曼光谱测定,固体磷脂不经 处理直接进行拉曼光谱的测定。

#### 1.3 拉曼光谱测定

将样品置于直径1 cm,高05 cm 的圆柱形玻璃样品池中。全部拉曼光谱测定工作均在 Renishaw inVia Reflex 型拉曼光谱仪上完成。配备 532 nm 固体激光器,液氮冷却 CCD 检测器。实验条件如下:激发波长 532 nm,功率 50 mW,光 谱分辨率  $\leq 2 \text{ cm}^{-1}$ ,曝光时间 10 s,累积次数 3 次。全部光 谱均由 Origin 软件寻峰,并通过峰值计算强度比。

#### 2 结果与讨论

#### 2.1 磷脂的拉曼光谱分析

为了研究乳铁蛋白及其肽段与磷脂脂质体的相互作用, 我们选取了中性磷脂 DPPC 和负电性磷脂 DPPG,以分别模 拟真核细胞膜和细菌细胞膜的主要磷脂组分。首先对此两种 固体磷脂样品进行了拉曼光谱分析(如图 1)。



Fig 1 Raman spectra of solid DPPC and DPPG

图 1 显示了 DPPC 与 DPPC 在 500~1 800 cm<sup>-1</sup>和 2 700 ~ 3 000 cm<sup>-1</sup>两个波数段的拉曼图谱。由于 DPPC 与 DPPG 的疏水部分均为两条 16 个 C 的饱和脂肪酰基链,因此二者 在拉曼光谱上对于磷脂分子构象敏感的 C - C 和 C - H 伸缩 振动的五根谱线无明显差别,如属于 C - C 骨架反式构象的 1 062, 1 128 谱线,属于 C - C 骨架扭曲构象以及 PO<sub>2</sub> 伸缩 振动的 1 096 cm<sup>-1</sup>谱线,属于 C - H 对称伸缩振动的 2 847 cm<sup>-1</sup>谱线以及属于 C - H 反对称伸缩振动的 2 882 cm<sup>-1</sup>谱 线。另一方,面由于两种磷脂的极性头部基团有所不同(DP PC 为胆碱残基, DPPG 为甘油残基),因此 DPPC 的拉曼光 谱在 720 cm<sup>-1</sup>处有一条属于 C - N 伸缩振动的谱线<sup>[9,12]</sup>。  $I_{280}/I_{280}$ ,并带入 Gaber 等 $^{[12]}$ 提出的公式,可以得出磷脂 的侧向相互作用序参数  $S_{1at}$ 。

$$S_{\text{lat}} = \frac{I_{\text{CH}_2} - 0.7}{1.5} \ddagger P I_{\text{CH}_2} = I_{2\,880} / I_{2\,850}$$

S<sub>la</sub>可以反映磷脂链间侧向相互作用的强弱,以及分子 链间的有序性。由表1可知,固体DPPC和DPPG的侧向相 互作用序参数分别为041和052,这代表了两种磷脂在有 序度较高时的序参数值。

# Table 1Order parameter for the lateral interactions between<br/>chains $S_{lat}$ of solid DPPC and DPPG

样品	I <sub>2 880/2 850</sub>	Slat
DPPC	1. 31	0 41
DPPG	1.48	0 52

#### 2 2 乳铁蛋白及其肽段与 DPPC 脂质体的相互作用

利用拉曼光谱研究磷脂构象灵敏的谱线主要在 2 个范 围: C-C 伸缩振动和 C-H 伸缩振动范围。C-H 伸缩振动 模式和 C-C 伸缩振动模式可以给出同样的信息,但前者对 构象变化更为敏感<sup>[10]</sup>。对于 C-C 伸缩振动,由于  $I_{1000}$ 不仅 属于碳氢链的反式构象,还反映  $PO_2$  的对称伸缩振动,因 此当外界分子与磷脂的极性头部基团相互作用时, $S_{stans}$ 可能 无法给出结构变化的准确信息<sup>[9]</sup>。金元浩等也指出了  $S_{stans}$ 应 用的局限性。因此本实验着重观察了磷脂脂质体在C-H 伸 缩振动模式的拉曼光谱。

磷脂酰胆碱(PC) 是真核生物细胞膜的主要成分,由于磷 脂酰胆碱分子不带静电荷,因此使得真核细胞表面呈现电中 性<sup>14</sup>,本实验用中性磷脂 DPPC 脂质体来模拟真核细胞的细 胞膜。DPPC 脂质体以及分别加入 LF, LfampinB, LfcinB<sub>4-14</sub> 后 DPPC 脂质体的拉曼光谱如图 2 所示。



a: DPPC; b: DPPC+ LF; c: DPPC+ Lfampin B;

◎通过2 880 和 2 850 cm<sup>-1</sup>附近的两个峰强度值计算 ◎ 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <sup>-1</sup>http://www.cnki.net 拉曼光谱中 2 846 78 和 2 881 51 cm<sup>-1</sup>处的谱线分别属于 CH<sub>2</sub> 基团的 C-H 对称伸缩振动和反对称伸缩振动模式<sup>[12]</sup>, 通过计算 2 846 78 和 2 881 51 cm<sup>-1</sup>的峰强度比值,得出了 DPPC 脂质体在与乳铁蛋白及其肽段作用前后的侧向相互作 用序参数及其变化率(表 2)。

Table 2Order parameter for the lateral interactions between<br/>chains  $S_{lat}$  and the variation rate of  $S_{lat}$  in DPPC lipo<br/>somes before and after the interactions with lacto<br/>ferrin and its peptides

样品	I 2 880/ 2 850	$S_{\rm lat}$	$S_{\text{lat}}$ 变化率/ %
DPPC	1. 03	0 22	
DPPC+ LF	1.01	0 21	- 5
DPPC+ LfampinB	1.02	0 21	- 5
DPPC+ LfcinB <sub>4-14</sub>	1.00	0 20	- 9

由表 2 可知, 当加入 LF, Lfampin B 及 Lfein B<sub>4-14</sub> 后, 磷 脂的侧向相互作用序参数由未加入时的 0 22 分别下降到了 0.21, 0 21 和 0 20。虽然以上三种物质的加入均使  $S_{lat}$ 有所 降低,但其变化率分别仅为: -5%, -5% 和-9%,变化并 不明显。这说明乳铁蛋白及其肽段有可能仅仅在脂质体表面 与磷脂分子的极性头部基团发生作用,而并未深入到脂质体 的疏水内核与脂酰链相互作用,即并未引起磷脂脂酰链结构 的改变,因此磷脂碳氢链骨架的侧向堆积并未受到大的影 响。Vogel等<sup>[4]</sup>通过差示扫描量热分析也证实了高浓度的 Lfein B 不会对 DPPC 脂质体的相变过程产生影响。由以上结 果还可以得知,对于中性磷脂 DPPC 分子侧向堆积的影响, Lfein B<sub>4-14</sub>, Lfampin B, LF 三者间的差别也不明显。



Fig 3 Raman spectra of DPPG liposomes interacted with lactoferrin and its peptides a: DPPG; b: DPPG+ LF; c: DPPG+ LfampinB;

2 3 乳铁蛋白及其肽段与 DPPG 脂质体的相互作用 细菌细胞膜与真核细胞膜有所不同,其主要成分为磷脂

酰甘油(PG), PG 头部极性基团为磷酸甘油残基,带有一个 负电荷<sup>[4]</sup>。PG 与其他表面分子共同使细菌表面呈负电性。 因此本研究使用 DPPG 来模拟细菌细胞膜的主要成分。DP-PG 脂质体以及分别加入 LF, LfampinB, LfeinB4-14后的 DP-PG 脂质体的拉曼光谱如图 3 所示。

结果表明, LfeinB<sub>4-14</sub>和 LfampinB 使得 DPPG 脂质体的 拉曼光谱发生了明显改变。位于 2 882 59 cm<sup>-1</sup>处的峰强在 LfeinB<sub>4-14</sub>和 Lfam pinB 加入后有明显下降, C-H 反对称伸 缩振动减少, 对称伸缩振动比例增加, 这说明磷脂链间侧向 堆积变得松弛, 磷脂双分子层流动性变大, 有序性降低<sup>[12]</sup>。 已有许多研究表明由于温度升高或药物的作用等原因, 而使 侧向堆积变得松弛时,  $S_{1at}$ 明显下降的情况<sup>[5,14]</sup>。

Table 3Order parameter for the lateral interactions between<br/>chains  $S_{tat}$  and the variation rate of  $S_{kt}$  in DPPG lipo<br/>somes before and after the interactions with lactor<br/>ferrin and its peptides

样品	I2 880/2 850	$S_{\rm lat}$	Slat 变化率/ %
DPPG	0.98	0 19	
DPPG+ LF	0 96	0 17	- 11
DPPG+ LfampinB	0 90	0 14	- 27
DPPG+ Lf cin B <sub>4-14</sub>	0 88	0 12	- 34

由表 3 可知,当加入LF,LfampinB,LfeinB<sub>4-14</sub>后,磷脂 的侧向相互作用序参数由未加入时的 0 19 分别下降到了 0 17,014 和 0 12。其变化率分别为-11%,-27% 和-34%。将表 2 与表 3 进行对比可以发现,LF,LfeinB<sub>4-14</sub>, LfampinB对 DPPG 脂质体磷脂结构的影响明显大于对 DP PC 的影响。由于 DPPC 与 DPPG 在结构上的差别仅在头部 极性基团及其所带电荷上,因此我们推测 DPPG 脂质体构象 的变化是由于带有正电荷的肽及蛋白与带有负电荷的磷脂间 发生静电相互作用的结果,这也解释了抗菌肽可以杀死细菌 而对真核细胞不产生影响的原因。LfeinB<sub>4-14</sub>和LfampinB 与 其他抗菌肽类似,均含有较多的精氨酸(R)和色氨酸(W), 在肽段与磷脂脂质体的相互作用时,精氨酸侧链基团所带的 正电荷和色氨酸吲哚环的疏水特性可能起到了关键作用。

通过以上结果还可以发现,LfcinB<sub>4-14</sub>,LfampinB 与 DPPG 的相互作用要明显强于乳铁蛋白,这是因为这两条肽 段处于乳铁蛋白中时的构象与处于游离态时的构象是不同 的。如LfcinB 在乳铁蛋白中时以α螺旋形式存在,当LfcinB 被水解成为游离状态后,其二级结构则变为β折叠<sup>[15]</sup>,这种 二级结构的改变以及肽段中精氨酸、色氨酸侧链基团的充分 暴露可能是LfcinB<sub>4-14</sub>与LfampinB 的作用大于乳铁蛋白的 原因。

#### 3 结 论

生物膜 DPPC 和 DPPG 脂质体的相互作用。结果表明:(1) 乳铁蛋白及其肽段 LfeinB4-14和 LfampinB 对 DPPC 脂质体 磷脂分子的结构和链间侧向堆积影响较小。(2)带正电的乳 铁蛋白及其肽段可以通过静电相互作用与带负电的 DPPG 脂质体相互吸引并结合,从而影响磷脂双分子层的分子结构 和链间侧向堆积,使其有序性下降。(3)在与 DPPG 脂质体 作用时,LfcinB<sub>4</sub> 和 LfampinB 比 LF 与磷脂的作用更为强 烈,这可能与肽段的二级结构改变有关。拉曼光谱在研究药 物与细胞相互作用时可以给出丰富的结构信息并能够对活细 胞进行无损快速检测,因此在解释药物作用机理研究等方面 有着广泛的应用前景。

#### References

- [1] Gifford J L, Hunter H N, Vogel H J. Cellular and Molecular Life Sciences, 2005, 62(22): 2588.
- [2] Ward P P, Paz E, Conneely O M. Cellular and Molecular Life Sciences, 2005, 62(22): 2540.
- [3] Kraan V D, Marieke I A, Groenink J, et al. Peptides, 2004, 25(2): 177.
- [4] Vogel H J, Schibli D J, Jing W, et al. Biochemistry and Cell Biology, 2002, 80(1): 49.
- [5] Fox C B, Horton R A, Harris J M. Analytical Chemistry, 2006, 78(14): 4918.
- [6] LIU Gui qiang, MENG Yao yong, LIU Song-hao(刘桂强, 孟耀勇, 刘颂豪). Acta Laser Biology Sinica(激光生物学报), 2004, 13(02):
  136.
- [7] Hanlon E B, Manoharan R, Koo T W, et al. Physics in Medicine and Biology, 2000, 45 (2): R1.
- [8] Li Chan, E C Y. Trends in Food Science and Technology, 1996, 7(11): 361.
- [9] Tu A T. Raman Spectroscopy in Biology: Principles and Applications. New York: Jhon Wiley & Sons Inc., 1982. 187.
- [10] XU Yiming(许以明). Raman Spectroscopy and Its Application in Structural Biology(拉曼光谱及其在结构生物学中的应用). Beijing: Chemical Industry Press(北京: 化学工业出版社), 2005. 101.
- [11] Torchilin V P, Weissig V. Liposomes: A Practical Approach(脂质体). Translated by DENG Yi hui, XU Hui(邓意辉, 徐 晖, 译).
  Beijing: Chemical Industry Press(北京: 化学工业出版社), 2007. 85.
- [12] Gaber B P, Peticolas W L. Biochimica et Biophysica Acta, 1977, 465(2): 260.
- [13] Yeaman M R, Yount N Y. Pharmacological Reviews, 2003, 55(1): 27.
- [14] Bonora S, Foggia M D, Iafisco M. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2008, 92(3): 144.
- [15] Chan D I, Prenner E J, Vogel H J. Biochimica et Biophysica Actar Biomembranes, 2006, 1758(9): 1184.

## Interaction of Lactoferrin and Its Peptides with DPPC and DPPG Liposomes Studied by Raman Spectroscopy

ZHANG Wei<sup>1</sup>, REN Fa zheng<sup>1</sup>, GE Shao yang<sup>1, 2</sup>, ZHANG Lu da<sup>3</sup>, JIANG Lu<sup>1</sup>, MAO Xue ying<sup>1</sup>, GUO Hui yuan<sup>1\*</sup>

- College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Key Laboratory of Functional Dairy, Ministry of Education, Beijing 100083, China
- 2. Beijing Higher Institution Engineering Research Center of Animal Product, Beijing 100083, China
- 3. College of Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China

**Abstract** Interaction of lactoferrin and its peptides  $LfcinB_{4-14}$  and LfampinB with dipalmitoylglycero phosphocholine (DPPC) and dipalmitoylglycero phosphoglycerol (DPPG) liposomes were studied by means of Raman spectroscopy. In our study, conformational changes in the phospholipid molecules were investigated by measuring the intensities of 2 847 and 2 882 cm<sup>-1</sup> Raman bands which are assigned to acyl chains' symmetric and asymmetric C—H stretching vibrations. The addition of lactoferrin and its peptides  $LfcinB_{4-14}$  and LfampinB caused a decrease in the 2 882 cm<sup>-1</sup> intensity of DPPG liposomes, thus the order parameter for the lateral interactions between chains  $S_{1at}$  decreased from 0 19 to 0 17, 0 14 and 0 12 respectively. On the contrary, the intensities at 2 847 and 2 882 cm<sup>-1</sup> of DPPC liposomes were poorly affected by lactoferrin and its peptides. The results show that lactoferrin and its peptides present a stronger effect on the molecular structure and order degree of anionic lipid DPPG than that of zwitterionic lipid DPPC. This suggests that lactoferrin,  $LfcinB_{4-14}$  and LfampinB can interact and combine with the negatively charged DPPG liposomes by electrostatic interaction and perform its antibacterial activity. Besides,  $LfcinB_{4-14}$  and LfampinB can affect the lipid more strongly than lactoferrin.

Keywords Raman spectroscopy; Lactoferrin; Lactoferricin; Liposome; Interaction

\* Corresponding author (Received Jun. 25, 2010; accepted Sep. 20 2010) © 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net