

用非线性光谱从分子层面上研究药物与细胞膜的作用

陈战*

(美国密歇根大学 化学系, 密歇根州 48109, 美国)

[摘要] 本文阐明不同药物与细胞膜原位作用的分子机制。应用一种非线性光谱-和频振动光谱来研究抗菌药物分子以及氯丙嗪、金刚烷胺和美金刚与电中性和电负性模型细胞膜的相互作用。细胞膜的主要组成部分是磷脂双层膜,因而细胞膜可以被认为是一个界面。从分子层面上原位地在水溶液的环境下阐述了各种材料包括药物分子,纳米材料,高分子,生物大分子与磷脂双层膜作用的机制,本文从非线性光谱-和频振动光谱角度予以综述。揭示了不同药物分子与不同模型细胞膜的不同作用。如一、阐述了抗菌药物分子是怎样破坏模型细胞膜的;二、揭示了氯丙嗪、金刚烷胺和美金刚与不同电性模型细胞膜作用时的相同及不同之处。和频振动光谱已成为一种研究药物分子与细胞膜相互作用的有力工具,可望用于研究中药与细胞膜的相互作用。

[关键词] 和频振动光谱; 细胞膜; 药物分子

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)01-0012-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017010012

Molecular Level Studies on Drug and Cell Membrane Interactions Using Nonlinear Optical Spectroscopy

CHEN Zhan*

(Department of Chemistry, University of Michigan, Michigan 48109, USA)

[Abstract] The research goal is to elucidate molecular interactions between various drug molecules and cell membranes in situ. A nonlinear optical spectroscopic method, sum frequency generation (SFG) vibrational spectroscopy, was applied to investigate molecular interactions between antimicrobial compounds, chlorpromazine, amantadine, memantine and neutral or negatively charged model cell membranes. The different interactions between different drug molecules and different model cell membranes were successfully elucidated. For example, the molecular mechanisms of how antimicrobial compounds disrupt model cell membranes were revealed. The similarity and differences when chlorpromazine, amantadine, and memantine interact with model cell membranes with different charges were reported. SFG was developed into a powerful technique to study interactions between drug molecules and cell membranes, which can be applied to study interactions between Chinese medicine and cell membranes in the future.

[Key words] sum frequency generation vibrational spectroscopy; cell membrane; drug molecules

很多药物的疗效与它们能否直接进入细胞或与细胞膜作用密切相关,因此研究药物分子与细胞膜的相互作用是非常必要的。细胞膜主要由磷脂双层膜组成,可被认为是一个界面。传统上大部分研究界面的技术都需要高真空,而需要高真空的研究技

术无法研究溶液环境。细胞膜处于水溶液环境,因此无法用传统研究界面的技术原位研究细胞膜与药物的相互作用。

近些年来,笔者在密歇根大学的实验室系统地发展了一系列应用非线性光谱(和频振动光谱)的

[收稿日期] 20160906(012)

[基金项目] 美国海军研究项目(N0014-02-1-0832, N0014-03-1-0503, N0014-08-1-1211)

[通讯作者] * 陈战, 博士, 教授, 从事生物界面及高分子材料界面的研究, Tel: 001-734-615-4189, E-mail: zhanc@umich.edu

方法,来研究表面和界面的分子结构,其中包括研究各种分子例如药物分子和模型细胞膜相互作用的方法^[1-5]。这些方法可以从分子层面上原位在水溶液的环境下阐述各种材料,包括药物分子、纳米材料、高分子、生物大分子与磷脂双层膜作用的机制。在这里笔者简单总结一下本实验室在药物分子与模型细胞膜作用方面的研究。迄今为止尚未有应用非线性光谱研究中药的报道,本实验室发展的系统地研究药物和细胞膜相互作用的方法在未来可以有效地应用于研究中药成分或中药分子与细胞膜的作用,为理解中药的药理提供分子层面上的信息。

非线性光谱是和频振动光谱,是一种二阶非线性光谱。和频振动光谱的选择定则决定了它具有单分子层或亚单分子层的表界面灵敏度。和频振动光谱可以广泛地应用于研究各种表面和界面的分子结构,包括各种隐藏界面,例如固-液界面以及固-固界面^[6-10]。这篇综述将介绍用和频振动光谱来研究药物分子,例如新型的抗菌素、氯丙嗪、金刚烷胺和美金刚等与模型细胞膜的作用。

1 方法

和频振动光谱的理论和数据处理方法已多次发表在综述文章中^[1-10]。和频振动光谱是一种二阶非线性振动光谱。振动光谱可以提供分子的“指纹”,因此振动光谱可以提供分子层面的结构信息。与常见的红外及拉曼振动光谱不同的是,和频振动光谱可以选择性地研究表面和界面。这是根据和频振动光谱(二阶非线性振动光谱)的选择定则而确定,只有没有对称中心的体系才能产生和频振动光信号^[6-10]。绝大多数材料的体相都有对称中心,所以它们不会产生和频振动光信号。表面和界面则不同,由于对称中心的缺失,就可以产生和频振动光信号。理论计算及实验结果都表明和频振动光谱对于表面和界面非常灵敏,灵敏度为一个单分子或亚单分子层。

和频振动光谱的仪器也在已发表的文章中有过多次介绍,这里笔者只简单介绍一下本实验室的仪器。笔者在密歇根大学的实验室拥有三台商用的和频振动光谱仪,都是 EKSPLA 公司生产的。其中一台是 EKSPLA 公司生产的第一台和频振动光谱仪,是 EKSPLA 公司跟笔者在 2000 年商讨后专门为本实验室生产的。和频振动光谱仪共分为激光器、非线性装置及探测装置三部分。激光器的出射光为近红外光(1 064 nm, 20 Hz, 20 ps)。这束光一部分经过倍频系统成为 532 nm 的绿光,另一部分经过复杂

的非线性装置成为一束频率可调的中红外光。绿光和中红外光照射在表界面的同一位置,产生和频光信号。用采集的和频光信号强度对红外入射光的频率作图,就可得到表面和界面的振动光谱。图 1 显示了和频振动光谱从表界面上产生的示意图。根据和频振动光谱中各个峰中心的波数,可以确定表面或界面上有什么样的基团,例如是否有甲基、乙基、羟基或羰基等。另外根据光谱的强度,也可以了解各个基团在表面或界面的浓度或有序性。在收集和频振动光谱时,入射激光及和频信号光的偏振方向可以改变,这样从收集的和频振动光谱中可以计算各个基团在表面或界面的取向。在和频振动光谱研究中,最常见的偏振光谱是 ssp(s-偏振的和频光,s-偏振的绿入射光,p-偏振的红外入射光),ppp 和 sps 光谱。

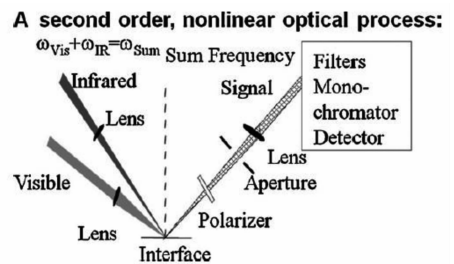


图 1 和频振动光谱从表界面收集信号的示意

Fig.1 Schematic showing detection of SFG signals generated from an interface (Reproduced with permission from Ref. 1. Copyright 2010, Elsevier)

本文综述了运用和频振动光谱来研究药物分子与模型细胞膜之间的相互作用。本报导的研究采用磷脂双层膜作为模型细胞膜。文献中广泛报道了用磷脂双层膜作为模型细胞膜的可靠性及制作模型细胞膜的方法^[11]。本实验采用 Langmuir-Blodgett 和 Langmuir-Shafer 的方法在固体基底的表面上制备磷脂双层膜^[12]。具体的制备方法已多次报道,这里就不详细叙述。本研究研究了多种磷脂双层膜,包括电中性的 DPPC/DPPC, PSPC/DSPC 和带负电的 DPPG/DPPG 等。值得提到的是磷脂双层膜有中心对称性,不产生和频振动信号。为了解决这个问题,本实验室在有些实验中采用了一层氘代的和一层正常的磷脂双层膜。这样就可以分别用碳-氢(CH)及碳-氘(CD)的振动来分别研究药物分子与磷脂双层膜中两层不同的磷脂分子的作用。

2 结果与讨论

2.1 新型抗菌素与模型细胞膜作用 笔者的研究组首先运用和频振动光谱研究了新型抗菌素与模型

细胞膜的作用。图 2 显示了药物与模型细胞膜相互作用时收集和频振动光谱信号的示意图。近年来细菌的抗药性使得很多传统的抗菌药物失去了药效,成为医学上的一个难题。开发新型抗菌素成为重要的研究方向。其中文献报道的一些有机分子能够有效地破坏细菌的细胞膜,但是不会引起人类细胞膜的损坏,很有发展成为新型抗菌素的潜力^[13]。但是至今为止人们仍不清楚这些分子与细胞膜作用的机制,主要是缺乏强有力的手段来研究药物与细胞膜的相互作用。笔者的研究组成功地运用和频振动光谱研究了新型抗菌素与模型细胞膜的作用机制。

图 3 显示了笔者研究的几种新型抗菌分子^[12-14]。它们都具有相似的分子结构。每个分子

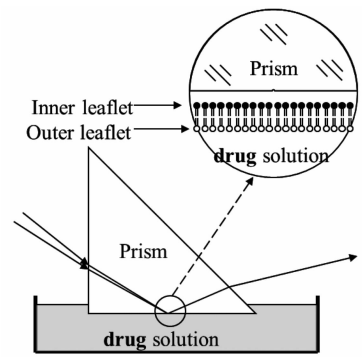
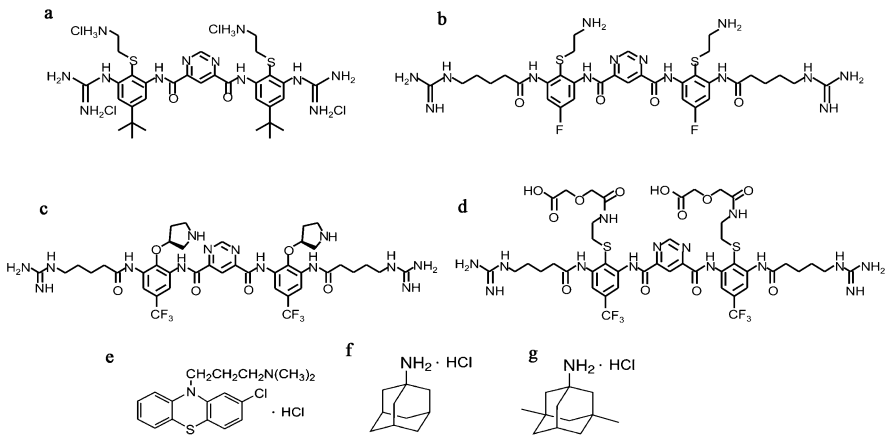


图 2 药物与模型细胞膜相互作用时收集和频振动光谱信号示意图
Fig. 2 Schematic showing the collection of SFG signals from drug molecules and model cell membrane during their interactions (Reproduced with permission from Ref. 12. Copyright 2006, American Chemical Society)



a, b, c, d. 新型的抗菌素 1, 2, 3, 4; e. 氯丙嗪; f. 金刚烷胺; g. 美金刚

图 3 几种药物分子的分子结构

Fig. 3 Molecular formulas of several drug molecules studied in this article (Reproduced with permission from Refs. 14, 16, 21, 22. Copyright 2009, 2014, 2014, 2015, American Chemical Society)

都基本上是一个平面结构,有相似的主链,但是在主链上下有不同的官能团。其中一边是疏水基团,另一侧是氨基,可以带正电荷。

先来看分子 1 与模型细胞膜的作用^[12]。在这个实验中,笔者使用了 DPPG/dDPPG 磷脂双层膜,也就是说一层(内层)是正常的磷脂膜,另一层(外层)是氘代的磷脂膜。图 4 显示了从磷脂双层膜和不同浓度的药物 1 的溶液界面收集的和频振动光谱信号。从图中可以看出在接触药物 1 之前,磷脂双层膜是非常有序的,都产生了很强的信号。当磷脂双层膜和 0.1 mg·L⁻¹ 的药物 1 溶液接触后,外层的氘代磷脂膜被破坏,CD 的和频振动光谱信号降低,但是内层的磷脂膜未被破坏,CH 的和频振动光谱信号未降低。这说明在这么低的浓度下,药物 1 还不能破坏磷脂双层膜。当跟磷脂双层膜接触的药物 1 的溶液质量浓度增加到 0.8 mg·L⁻¹ 后,CD 和 CH 的和频振动光谱信

号都降低了,说明磷脂双层膜的两层膜都被破坏了。当药物 1 溶液质量浓度继续增加到 4.0 mg·L⁻¹ 后,磷脂双层膜的两层膜同样都会被破坏。前期发表的细菌研究发现,杀死细菌需要药物 1 的溶液浓度需要达到一定的量^[12]。这个浓度跟笔者通过和频振动光谱研究发现的浓度是一致的。这说明药物 1 是通过破坏细菌的细胞膜从而杀死细菌。

那么对于其它几个新型抗菌药物分子来说,它们与模型细胞膜的作用是否跟药物 1 一样呢? 本课题组同样地从磷脂双层膜和不同浓度的药物 2, 3 以及 4 的溶液界面收集了和频振动光谱信号。发现药物 2 的溶液质量浓度只要达到 0.25 mg·L⁻¹, 它就可以破坏磷脂双层膜,而药物 3 的溶液质量浓度只要达到 0.41 mg·L⁻¹, 它也能破坏磷脂双层膜。也就是说药物 2 和 3 都能够在比药物 1 质量浓度低的情况下破坏磷脂双层膜,可见它们具有更强的杀菌效力。相反

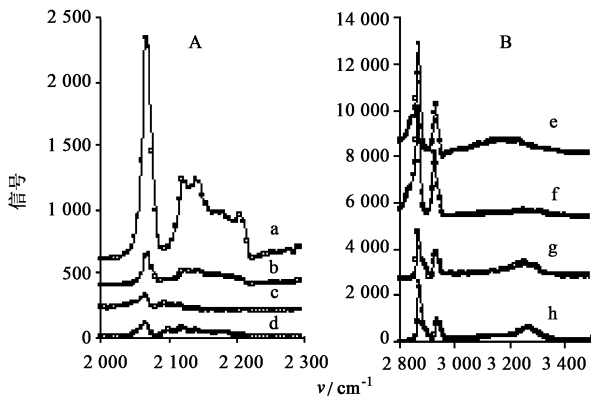


Fig. 4 SFG spectra collected from interfaces between lipid bilayers and compound 1 solutions with different concentrations (Reproduced with permission from Ref. 12. Copyright 2006, American Chemical Society)

图 4 从磷脂双层膜和不同浓度的药物 1 的溶液界面收集的和频振动光谱信号

Fig. 4 SFG spectra collected from interfaces between lipid bilayers and compound 1 solutions with different concentrations (Reproduced with permission from Ref. 12. Copyright 2006, American Chemical Society)

的是, 药物 4 却不与磷脂双层膜作用, 直到药物 4 的质量浓度增加到 $5.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 磷脂双层膜的两层膜依然没有变化(图 5), 可见药物 4 没有杀菌的作用^[14]。

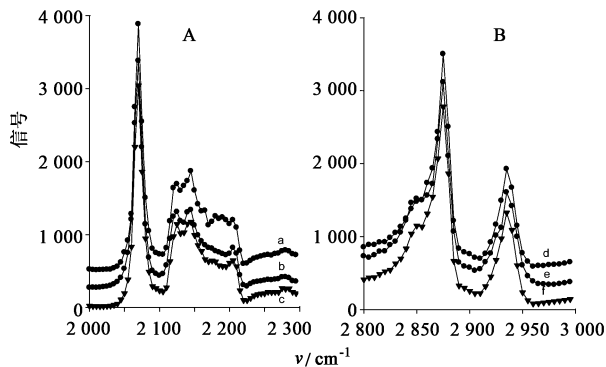


图 5 从磷脂双层膜和不同浓度的药物 4 的溶液界面收集的和频振动光谱信号

Fig. 5 SFG spectra collected from interfaces between lipid bilayers and compound 4 solutions with different concentrations (Reproduced with permission from Ref. 14. Copyright 2009, American Chemical Society)

笔者还具体地研究了药物分子 1 与模型细胞膜的作用机制^[12]。通过采用不同的偏振入射光和不同的偏振信号光, 笔者能够计算出分子的取向。和频振动偏振光信号显示药物分子 1 与模型细胞膜作用时, 分子的平面是垂直与细胞膜的平面的, 象一把分子刀一样把细胞膜切开。所以可以把分子 1 叫作

“分子刀”^[12]。

药物 1, 2 和 3 能破坏磷脂双层膜, 而药物 4 却不与磷脂双层膜作用的原因是因为药物 4 有胺基的支链较长, 自由度太大, 使得分子 4 不能有效地插入磷脂双层膜。

2.2 氯丙嗪与模型细胞膜作用 研究氯丙嗪与细胞膜的作用是非常重要的。氯丙嗪(图 3)广泛地用于对精神病的治疗, 并具有阻止呕吐的药效, 对很多原因引起的呕吐都有效。另外它也用于低温麻醉及人工冬眠。氯丙嗪是一个两亲性的分子。它能有效地和磷脂双层膜作用, 插入磷脂双层膜, 如细胞膜。氯丙嗪要到中枢神经中起到治疗的作用, 就必须穿过一系列的磷脂双层膜。文献中有报道说氯丙嗪跟带负电的磷脂双层膜作用尤其强烈, 因为在正常的生理 pH 范围内, 氯丙嗪是带正电的^[15]。迄今为止, 氯丙嗪跟磷脂双层膜相互作用时在分子水平上的行为尚未有报道。

笔者利用和频振动光谱和全反射红外光谱详细地研究了氯丙嗪与模型细胞膜的作用, 加深了对氯丙嗪与细胞膜相互作用的理解^[16]。在这个研究中, 采用了 2 种不同的模型细胞膜, 分别是 dDSPC/DSPC 和 dPPG/DPPG 磷脂双层膜(图 6)。DSPC 是电中性(或称为两性)的磷脂, 而 DPPG 是带负电的。

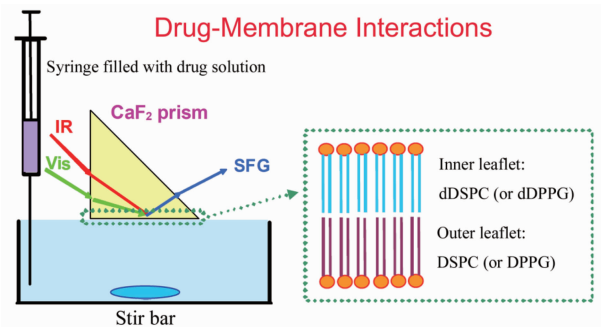
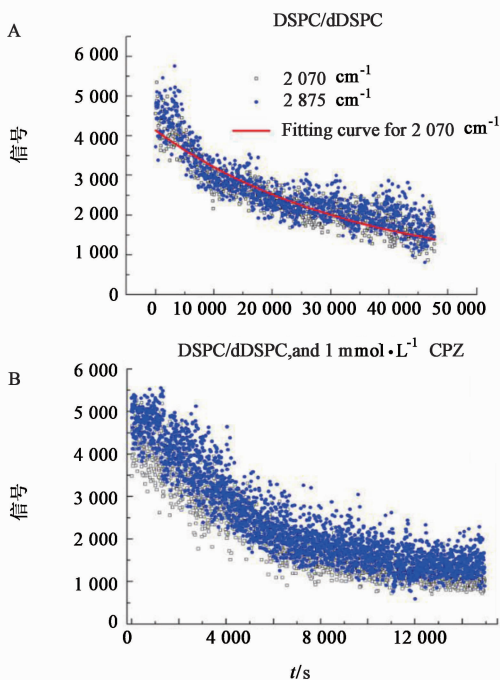


图 6 从氯丙嗪溶液与模型细胞膜的界面收集的和频振动光谱信号的示意图

Fig. 6 Schematic showing detection of SFG signals from the model cell membrane/ chlorpromazine solution interface (Reproduced with permission from Ref. 16. Copyright 2014, American Chemical Society)

笔者发现对于 dDSPC/DSPC 的磷脂双层膜, 和频振动光谱从 dDSPC 和 DSPC 收集到的 CD 和 CH 的振动信号的强度随着时间变小, 而且双层膜信号强度变小的速度是一样的。这说明 dDSPC/DSPC 磷脂双层膜中两层的磷脂会互相交换, 发生“flip-flop”(图 7)。当 dDSPC/DSPC 磷脂双层膜与氯丙嗪溶液相接触以后, 和频振动光谱 CD 和 CH 的振动信

号的强度会更快地减小,说明氯丙嗪与 dDSPC/DSPC 的作用会使“flip-flop”的过程加速(图 7)。因为氯丙嗪在这里是带正电的,会插入 dDSPC/DSPC 磷脂双层膜中间的疏水区域,引起电中性的 dDSPC/DSPC 的“flip-flop”加快。表 1 中列举了在与不同浓度的氯丙嗪溶液作用时,dDSPC/DSPC 双层膜“flip-flop”的速度。从表 1 中可以看出氯丙嗪的浓度越高,引起的 dDSPC/DSPC 双层膜“flip-flop”的速度越快。对于发生“flip-flop”的磷脂双层膜来说,双层膜中的磷脂分子会互相交换,但磷脂分子的数量并不会减少。全反射红外光谱的实验结果证实了这一点^[16]。

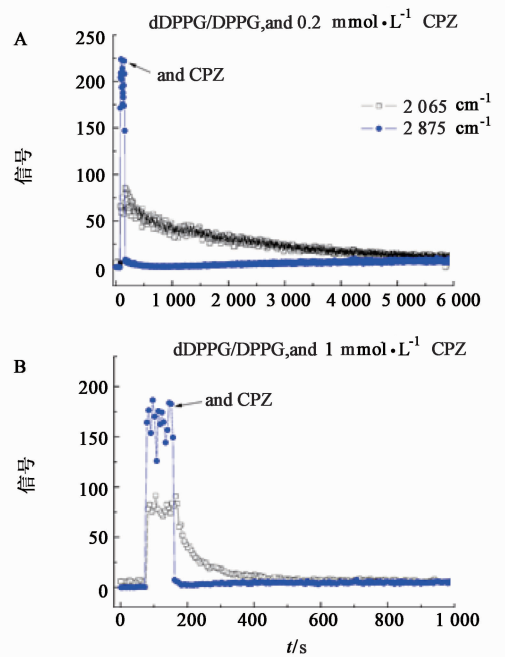


A. 未加入 1 mmol·L⁻¹ 氯丙嗪溶液; B. 加入 1 mmol·L⁻¹ 氯丙嗪溶液;

图 7 DSPC/dDSPC 双层膜随时间变化的和频振动光谱信号

Fig. 7 Time-dependent SFG signals collected from DSPC/dDSPC lipid bilayer before and after in contact with a chlorpromazine solution (Reproduced with permission from Ref. 16. Copyright 2014, American Chemical Society)

笔者也研究了氯丙嗪与带负电的 dDPPG/DPPG 磷脂双层膜作用的具体细节^[16]。与 dDSPC/DSPC 双层膜不同的是,当与氯丙嗪作用时,dDPPG 和 DPPG 的两层膜的和频振动光谱信号随时间减小有不同的速度。外层膜的信号在与氯丙嗪作用时立刻降为零,而内层膜的信号逐渐下降(图 8)。这是因为带正电的氯丙嗪与带负电的 dDPPG/DPPG 磷脂双层膜的外层膜作用很强,使得外层膜的有序性立刻被破坏。也正是因为氯丙嗪分子与外层膜的强烈



A. 0.2 mmol·L⁻¹ 氯丙嗪; B. 1 mmol·L⁻¹ 氯丙嗪

图 8 dDPPG/DPPG 的内层及外层膜与不同浓度的氯丙嗪作用时随时间变化的和频振动光谱信号

Fig. 8 Time-dependent SFG signals detected from inner and outer leaflets of dDPPG/DPPG bilayers in contact with chlorpromazine solutions of different concentrations (Reproduced with permission from Ref. 16. Copyright 2014, American Chemical Society)

作用,使它们不能立刻进入双层膜内与内层膜相互作用。但是随着时间的推移,氯丙嗪能够进入双层膜,使内层膜的结构也被逐渐被破坏,引起和频振动光谱信号的下降。当氯丙嗪的浓度不同时,dDPPG/DPPG 内层膜被破坏的速度是不一样的。氯丙嗪的浓度越高,内层膜被破坏的速度越快,定量的结果列于表 1。在氯丙嗪的浓度范围内 (>0.1 mmol·L⁻¹),外层膜的信号总是立刻减小到零,说明氯丙嗪会立刻破坏外层膜。全反射红外光谱的结果表明氯丙嗪不但破坏了 dDPPG/DPPG 的有序结构,而且引起了磷脂分子的减少,更加说明氯丙嗪与 dDPPG/DPPG 的作用强于与 dDSPC/DSPC 的作用。本实验表明氯丙嗪与带不同电荷的模型细胞膜的作用是不同的。通过以上对氯丙嗪的研究,我们认为只有和频振动光谱才能如此详细地研究药物分子与模型细胞膜作用的详细机制。

2.3 金刚烷胺与模型细胞膜作用 金刚烷胺(图 3)是被美国食品与药物管理局批准的抗病毒及治疗帕金森氏病的药物。它也是最早用于抑制流感病毒的药物。金刚烷胺在细胞膜上与病毒的相互作用曾经被报道过^[17]。金刚烷胺是两亲性的分子,可以

表 1 dDSPC/DSPC 双层膜及 dDPPG/DPPG 内层膜与不同浓度的氯丙嗪作用时和频振动光谱信号

Table 1 Time-dependent SFG signal change parameters deduced from SFG signal changes detected from the dDSPC/DSPC bilayers and the inner layer of the dDPPG/DPPG bilayers in contact with chlorpromazine solutions of different concentrations (Reproduced with permission from Ref. 16. Copyright 2014, American Chemical Society)

C_{CPZ} /mmol·L ⁻¹	dDSPC/DSPC		dDPPG/DPPG
	k/s^{-1}	$t_{1/2}/s$	t_{end}/s
0	7.3×10^{-6}	4.7×10^4	$> 4.0 \times 10^4$
0.1	7.9×10^{-6}	4.4×10^4	1.3×10^4
0.2	1.2×10^{-5}	2.9×10^4	5.8×10^3
0.5	3.0×10^{-5}	1.2×10^4	1.2×10^3
1.0	6.0×10^{-5}	5.8×10^3	4.0×10^2
2.0	9.7×10^{-5}	3.6×10^3	2.0×10^2
5.0	2.2×10^{-4}	1.6×10^3	1.5×10^2
10.0	5.9×10^{-4}	5.9×10^2	1.0×10^2

注:k.“flip-flop”的速度常数; $t_{1/2}$.和频振动光谱信号强度减少一半所需时间; t_{end} .和频振动光谱信号强度减少到最少所需时间。

溶于水。研究金刚烷胺与细胞膜的相互作用是非常重要的。比如在治疗疾病时,金刚烷胺必须要穿越不同的膜环境,包括细胞膜。文献中曾报导过用不同的技术手段来研究金刚烷胺与细胞膜的相互作用,包括中子及 X 光衍射、核磁共振和分子动力学模拟等^[18-20],但是迄今为止金刚烷胺与细胞膜相互作用的细节以及动力学信息还是未知。这里笔者利用和频振动光谱研究了金刚烷胺与模型细胞膜的相互作用机制^[21]。

笔者首先研究了金刚烷胺与电中性的 dDPPC/DPPC 磷脂双层膜的相互作用^[21]。dDPPC/DPPC 磷脂双层膜本身会“flip-flop”。当 dDPPC/DPPC 磷脂双层膜与金刚烷胺溶液相互作用时,只要金刚烷胺溶液的浓度在 10 mmol·L⁻¹ 以下,dDPPC/DPPC 的“flip-flop”速度并未增加,说明在这个浓度范围,金刚烷胺与电中性的 dDPPC/DPPC 磷脂双层膜没有明显的相互作用。当金刚烷胺达到 10 mmol·L⁻¹,dDPPC/DPPC 的“flip-flop”速度就会加快,可能是在较高浓度时,与 dDPPG/DPPG 作用的金刚烷胺会在外层膜聚集,加快了 dDPPC/DPPC 的“flip-flop”。利用 dDPPC/dDPPC 磷脂双层膜,根据和频振动光谱水(OH)的信号,笔者可以研究金刚烷胺是否与电中性的磷脂双层膜(如 DPPC 双层膜)结合,富集到磷脂双层膜上;根据和频振动光谱 CH 的信号,笔者可以研究金刚烷胺的结构信息。这里发现金刚烷胺可以与电中性的磷脂双层膜(如 DPPC 双层膜)结

合,富集到磷脂双层膜上,而且当金刚烷胺的浓度越高,富集到电中性的磷脂双层膜上越快。金刚烷胺富集到电中性的磷脂双层膜上时,在细胞膜上没有固定的取向。

笔者也研究了金刚烷胺与带负电的磷脂双层膜的作用^[21]。为了研究与这样的磷脂双层膜作用时金刚烷胺的结构,选用了 dDPPG/dDPPG 双层膜。当这个磷脂双层膜与金刚烷胺的溶液相接触时,能够探测到很强的和频振动光谱的 CH 信号,说明金刚烷胺在跟带负电的磷脂双层膜作用时,是有固定取向的。这一点是与它跟电中性的磷脂双层膜作用时是不一样的。另外发现在 dDPPG/dDPPG 与金刚烷胺作用后,和频振动光谱中的 CD 信号也能够被探测到,这是因为金刚烷胺能够破坏 dDPPG/dDPPG 的外层膜,使得 dDPPG/dDPPG 两层膜不再对称,于是产生了 CD 信号。为了更好地研究内层和外层膜与金刚烷胺作用时的不同表现,笔者也用了 dDPPG/DPPG 磷脂双层膜来研究它与金刚烷胺的相互作用。在金刚烷胺溶液的浓度 < 5 mmol·L⁻¹ 时,dDPPG/DPPG 磷脂双层膜的和频振动光谱的 CD 信号没有变,说明在 dDPPG/DPPG 磷脂双层膜与金刚烷胺作用时,内层膜的结构没有变化。也就是说金刚烷胺没有与内层膜作用。在金刚烷胺的浓度不同时,外层膜的 CH 信号随时间的变化有不同的改变。当金刚烷胺的浓度是 0.2 mmol·L⁻¹ 时,外层膜的和频振动光谱信号的强度先迅速下降然后逐渐上升,最后达到平衡。当浓度达到 5 mmol·L⁻¹ 时,信号的强度很快下降并稳定,达到平衡的时间要短的多。金刚烷胺分子的尺寸较小,与带负电的磷脂双层膜作用时,只跟外层膜作用,不能跟内层膜作用。图 9 显示了金刚烷胺与 dDPPG/DPPG 相互作用时的不同的浓度效应。

跟上面讨论的氯丙嗪相比,金刚烷胺的分子要小一些。比较大的氯丙嗪与电中性的磷脂双层膜作用时,可以引起“flip-flop”。而较小的金刚烷胺在一定的浓度范围内,不会引发类似的“flip-flop”。另外在与带负电的磷脂双层膜作用时,较大的氯丙嗪可以与双层膜的两层膜都作用,尽管内层膜被破坏的慢一些。不同的是较小的金刚烷胺只与外层膜作用,无法破坏内层膜。

2.4 美金刚与模型细胞膜作用 美金刚(图 3)也是被美国食品与药物管理局批准的药物,广泛地用于治疗中度至重度的阿尔茨海默型痴呆。笔者也用和频振动光谱研究了美金刚与电中性及带负电的磷

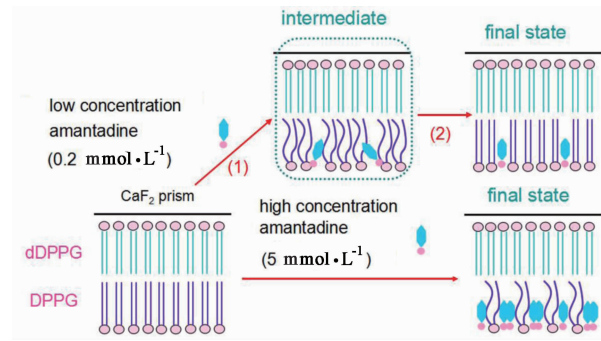


图 9 不同浓度的金刚烷胺与 dDPPG/DPPG 相互作用的示意图
Fig. 9 Schematic showing different interactions between dDPPG/DPPG bilayers and amantadine solutions with different concentrations (Reproduced with permission from Ref. 21. Copyright 2014, American Chemical Society)

脂双层膜的相互作用,发现它与磷脂双层膜的相互作用和金刚烷胺与磷脂双层膜的相互作用有许多相近之处^[22]。

笔者首先研究了美金刚与电中性的 dDPPC/DPPC 磷脂双层膜的相互作用。美金刚的浓度为 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,与金刚烷胺相似,美金刚没有加快 dDPPC/DPPC 磷脂双层膜的“flip-flop”速度,也就是说美金刚与 dDPPC/DPPC 磷脂双层膜没有明显的作用。利用 dDPPC/dDPPC 磷脂双层膜,根据和频振动光谱水(OH)的信号,笔者发现美金刚可以很快地与电中性的磷脂双层膜(如 DPPC 双层膜)结合,富集到磷脂双层膜上。与电中性的磷脂双层膜作用时,美金刚在细胞膜上没有固定的取向,与金刚烷胺是非常相似的^[22]。

当美金刚与带负电的 dDPPG/DPPG 磷脂双层膜作用时,它们的行为也与金刚烷胺相似。美金刚很快地与外层膜作用,破坏其有序性,但是不与内层膜作用。利用 dDPPG/dDPPG 磷脂双层膜,可以清楚地探测到美金刚的 CH 信号,说明美金刚与带负电的磷脂双层膜作用时是有固定取向的,这一点也与金刚烷胺相似。图 10 表明在不同的美金刚浓度下,水(OH)和美金刚(CH)的信号强度是不同的,显示在 dDPPG/dDPPG 磷脂双层膜富集的美金刚分子数目是不同的^[22]。

3 总结

本文综述了运用和频振动光谱在分子层面上原位研究药物分子与模型细胞膜之间的相互作用。结果表明和频振动光谱可以同时研究药物分子与模型细胞膜的内外两层膜在相互作用时的行为。在研究新型抗菌素与细菌模型细胞膜作用时,笔者发现在不同的药物浓度下,细胞膜的被破坏程度是不一样

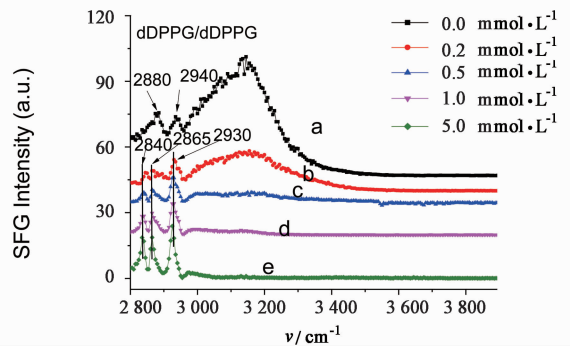


图 10 不同浓度的美金刚与 dDPPG/DPPG 相互作用时收集的和频振动光谱信号
Fig. 10 SFG spectra collected from interfaces between dDPPG/DPPG bilayers and amantadine solutions with different concentrations (Reproduced with permission from Ref. 22. Copyright 2015, American Chemical Society)

的,而药物与细胞膜的作用取决于药物分子的结构。若分子的支链太长自由度太大时,并不能有效地破坏细胞膜来杀死细菌。另外笔者也阐明了新型抗菌素是象一把刀一样切开细胞膜来杀死细菌。氯丙嗪、金刚烷胺和美金刚都与电中性和带负电的模型细胞膜有不同的相互作用。因为氯丙嗪分子较大,它可以加快电中性的磷脂双层膜“flip-flop”的速度。当氯丙嗪与带负电的磷脂双层膜作用时,能够迅速破坏外层膜,并逐渐破坏内层膜。对于尺寸较小的金刚烷胺和美金刚,与磷脂双层膜的作用相似。在与带负电的磷脂双层膜作用时,都能破坏外层膜,但对内层膜没有影响。以上这些研究系统地发展了利用和频振动光谱来研究药物与细胞膜作用机制的方法。这些方法未来可以用来有效地研究中药成分或中药分子与细胞膜的作用。众所周知,中药的成分非常复杂,各种成分含量悬殊,这也是中西药物的主要区别。将来在采用该技术进行研究中中药与细胞膜的作用时,应先研究中各个主要成分分别与细胞膜的相互作用,再研究整体中药药剂与细胞膜的相互作用。这样可以充分了解中药中的哪些成分主导中药与细胞膜的相互作用,为理解中药的药理提供分子层面上的信息。

[致谢]感谢美国海军研究项目及密歇根大学对本文报道的研究的大力支持。感谢东南大学卢晓林教授对文章进行的修改及润色。

[参考文献]

[1] CHEN Z. Investigating buried polymer interfaces using sum frequency generation vibrational spectroscopy [J]. Prog Polym Sci, 2010, 35(11):1376-1402.
[2] Hankett J, LIU Y, ZHANG X, et al. Molecular level

- studies of polymer behaviors at the water interface using sum frequency generation vibrational spectroscopy [J]. *J Poly Sci B Poly Phys*, 2013, 51(5): 311-328.
- [3] CHEN Z. Molecular structures of buried polymer interfaces and biological interfaces detected by sum frequency generation vibrational spectroscopy [J]. *Acta Phys Chim Sin*, 2012, 28(3): 504-521.
- [4] ZHANG C, Meyers J, CHEN Z. Elucidation of molecular structures at buried polymer interfaces and biological interfaces using sum frequency generation vibrational spectroscopy [J]. *Soft Matter*, 2013, 9(19): 4738-4761.
- [5] SHEN L, Ulrich N, Mello C, et al. Determination of conformation and orientation of immobilized peptides and proteins at buried interfaces [J]. *Chem Phys Lett*, 2015, 619: 247-255.
- [6] SHEN Y R. Phase-sensitive sum-frequency spectroscopy [J]. *Ann Rev Phys Chem*, 2013, 64: 129-150.
- [7] Bain C D. Sum-frequency vibrational spectroscopy of the solid/liquid interface [J]. *J Chem Soc Faraday Trans*, 1995, 91(9): 1281-1296.
- [8] Eisenthal K B. Liquid interfaces probed by second-harmonic and sum-frequency spectroscopy [J]. *Chem Rev*, 1996, 96(4): 1343-1360.
- [9] CHEN Z, SHEN Y R, Somorjai G A. Studies of polymer surfaces by sum frequency generation vibrational spectroscopy [J]. *Ann Rev Phys Chem*, 2002, 53: 437-465.
- [10] Moore F G, Richmond G L. Integration or segregation; How do molecules behave at oil/water interfaces [J]. *Acc Chem Res*, 2008, 41(6): 739-748.
- [11] Tamm L K, McConnell H M. Supported phospholipid bilayers [J]. *Biophys J*, 1985, 47(1): 105-113.
- [12] CHEN X, TANG H, Even M A, et al. Observing a molecular knife at work [J]. *J Am Chem Soc*, 2006, 128(8): 2711-2714.
- [13] Scott R W, DeGrado W F, Tew G N. De novo designed synthetic mimics of antimicrobial peptides [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2008, 19(6): 620-627.
- [14] Avery C, Som A, Xu Y, et al. Dependence of antimicrobial selectivity and potency on oligomer structure investigated using substrate supported lipid bilayers and sum frequency generation vibrational spectroscopy [J]. *Anal Chem*, 2009, 81(20): 8365-8372.
- [15] Nerdal W, Gundersen S A, Thorsen V, et al. Chlorpromazine interaction with glycerophospholipid liposomes studied by magic angle spinning solid state ¹³C-NMR and differential scanning calorimetry [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1464(1): 165-175.
- [16] WU F, YANG P, ZHANG C, et al. Investigation of drug-model cell membrane interactions using sum frequency generation vibrational spectroscopy: A case study of chlorpromazine [J]. *J Phys Chem C*, 2014, 118(31): 17538-17548.
- [17] Cady S D, Hong M. Amantadine-induced conformational and dynamical changes of the influenza M2 transmembrane proton channel [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(5): 1483-1488.
- [18] Duff K C, Cudmore A J, Bradshaw J P. The location of amantadine hydrochloride and free base within phospholipid multilayers; a neutron and X-ray-diffraction study [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1993, 1145(1): 149-156.
- [19] WANG J F, Schnell J R, CHOU J J. Amantadine partition and localization in phospholipid membrane: a solution NMR study [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 324(1): 212-217.
- [20] LI C, YI M, HU J, et al. Solid-state NMR and MD simulations of the antiviral drug amantadine solubilized in DMPC bilayers [J]. *Biophys J*, 2008, 94(4): 1295-1302.
- [21] WU F, YANG P, ZHANG C, et al. Molecular interactions between amantadine and model cell membranes [J]. *Langmuir*, 2014, 30(28): 8491-8499.
- [22] LI B, WANG H, FENG P, et al. Qualitative and quantitative analyses of the molecular-level interaction between memantine and model cell membranes [J]. *J Phys Chem C*, 2015, 119(30): 17074-17083.

[责任编辑 周冰冰]