

[研究简报]

制菌霉素与固体支撑磷脂膜的相互作用

王青^{1,2,3,4}, 羊小海^{1,2,3,4}, 汪红^{1,2,4}, 王柯敏^{1,2,3,4}

(1. 湖南大学化学生物传感与计量学国家重点实验室, 2. 化学化工学院, 3. 生物医学工程中心,
4. 生物纳米与分子工程湖南省重点实验室, 长沙 410082)

关键词 表面等离子体共振; 交流阻抗; 固体支撑磷脂膜; 制菌霉素

中图分类号 O657.39

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2007)11-2078-03

多烯类抗生素制菌霉素(Nystatin)具有广谱抗真菌作用,对新型隐球菌、念珠菌属及曲霉属等大多数深部真菌感染等均有良好疗效.对于其抗真菌机理,有人认为是多烯类抗生素与真菌细胞膜上的麦角固醇相结合,导致细胞膜通透性改变,氨基酸及电解质等外流,引起真菌死亡^[1].但制菌霉素也能与哺乳动物细胞膜上的胆固醇结合后引起同样的损伤,故其毒性较大^[2].还有人认为多烯类抗生素也能与不含固醇的生物膜相互作用而起到抗真菌的作用^[3,4].

为了更好地了解制菌霉素的作用机理,本文利用表面等离子体共振(SPR)和交流阻抗两种技术,考察了制菌霉素与不含固醇的固体支撑纯磷脂膜的相互作用,结果发现,制菌霉素可与纯磷脂膜相互作用,并可能在膜上形成微孔.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器 二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC, Sigma); 烷基十六硫醇(HDM, Fluka); 羟基十一硫醇(MUN, Aldrich); 其余试剂均为国产分析纯或优级纯试剂,实验用水均为二次蒸馏水.

SPR生物分析仪^[5],仪器装置主要由平行偏振光源、敏感元件、分光系统、信号采集与处理系统等几部分构成(自行研发);电化学工作站(PARSTAT2263,美国).

1.2 金膜的修饰 先依次用丙酮、无水乙醇和水清洗金膜,再用Piranha溶液 $[V(30\% H_2O_2)/V(浓H_2SO_4) = 3:7]$ 处理1 min(具有强腐蚀性,请小心使用),用水洗净,高纯氮气吹干备用.将洗净的金膜在2 mmol/L HDM或MUN的乙醇溶液中浸泡24 h之后用无水乙醇冲洗,即可形成Au/HDM或Au/MUN膜,然后将其安装在SPR生物分析仪中.将脂质体^[6]溶液加入到流通池中,反应1 h后,用水洗掉未反应的脂质体,即可在Au/HDM表面形成磷脂单层(Au/HDM/磷脂膜),并在Au/MUN表面形成磷脂双层(Au/MUN/磷脂膜).

1.3 抗生素与固体支撑双层膜的相互作用 将制菌霉素先溶于5 mg/mL DMSO中,再用水稀释成一系列不同浓度的溶液.先将氯霉素、青霉素及利福平配成0.25 mg/mL的水溶液,再将以上抗生素溶液分别流过磷脂膜表面,并用SPR生物分析仪监测共振波长的变化.

1.4 电化学交流阻抗的测量 用电化学工作站对制菌霉素与Au/HDM/磷脂膜相互作用所引起的膜阻抗变化进行监测.参比电极为Ag/AgCl电极,对电极为Pt丝电极.电解液为含1 mmol/L $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ 的0.1 mol/L KCl溶液.频率范围:0.01 ~ 10⁵ Hz,交流电压:5 mV.

2 结果与讨论

2.1 SPR技术表征制菌霉素与磷脂单层的相互作用 当不含制菌霉素的DMSO水溶液(110 mg/mL)

收稿日期:2007-04-03.

基金项目:国家“九七三”计划项目(批准号:2002CB513110)、国家科技攻关计划(批准号:2005EP090026)、国家自然科学基金重点项目(批准号:90606003)、国家自然科学基金(批准号:20475015)及湖南大学校基金资助.

联系人简介:王柯敏,男,博士,教授,博士生导师,主要从事生物与化学传感器及纳米尺度上的生物分析化学研究.

E-mail: kmwang@hnu.cn

以及质量浓度小于 0.002 mg/mL 的制菌霉素溶液流过磷脂单层膜之后, 均未引起共振波长的位移. 随着制菌霉素浓度的增大, 共振波长不断地发生红移, 当质量浓度大于 0.35 mg/mL 时, 共振波长位移变化趋于平稳(图 1).

可见, 制菌霉素能与纯磷脂膜发生明显作用, 且其相互作用所引起 SPR 信号变化的大小与浓度密切相关. 另外, 作为药物助溶剂的 DMSO 不会干扰药物与磷脂膜的相互作用.

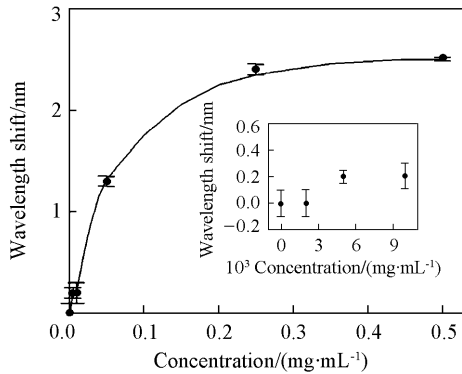


Fig. 1 Interaction of different mass concentrations of nystatin with Au/HDM/DPPC

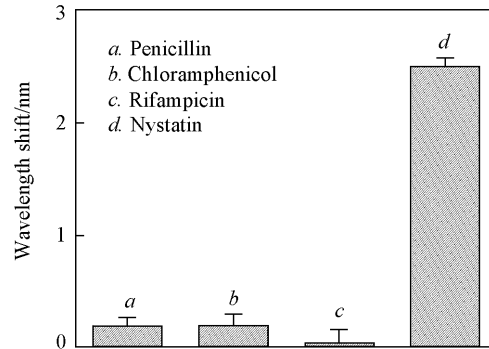


Fig. 2 Interaction of 0.25 mg/mL antibiotic with Au/HDM/DPPC

抗生索的作用机制可以分为 4 大类^[7]: (1) 抑制细胞壁合成(如青霉素); (2) 干扰蛋白质合成(如氯霉素); (3) 抑制核酸合成(如利福平); (4) 影响细胞膜功能(如制菌霉素).

本文利用 SPR 生物分析仪分别考察了上述 4 种抗生素与磷脂单层膜的相互作用: 质量浓度为 0.25 mg/mL 的青霉素、氯霉素和利福平引起的共振波长位移非常小, 但同样质量浓度的制菌霉素则引起共振波长发生明显位移(图 2), 说明制菌霉素可明显作用于纯磷脂膜, 与文献[4]的报道结果一致. 这也说明制菌霉素在杀死真菌的同时会对人体产生较大的毒副作用.

2.2 SPR 技术表征制菌霉素与磷脂双层的相互作用 细胞膜是磷脂双层, 因此本文还在 Au/MUM 亲水表面铺展了磷脂双层, 考察了其于制菌霉素的相互作用. 当不含制菌霉素的 DMSO 水溶液(110 mg/mL)及质量浓度小于 0.002 mg/mL 的制菌霉素溶液流过磷脂双层膜后, 不会引起共振波长位移. 而随着制菌霉素浓度的进一步增大, 共振波长才会发生红移(图 3).

由此可见, 无论磷脂单层还是磷脂双层, 制菌霉素均可与磷脂膜发生相互作用. 同时还考察了 4 种抗菌机制不同的抗生素与磷脂双层膜相互作用所引起的 SPR 共振波长的变化(图 4).

同样, 只有影响细胞膜功能的制菌霉素引起的共振波长最大, 这再次说明制菌霉素可作用于纯磷脂膜.

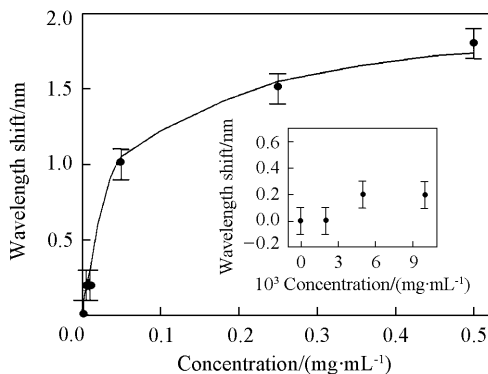


Fig. 3 Interaction of different concentration of nystatin with Au/MUN/DPPC

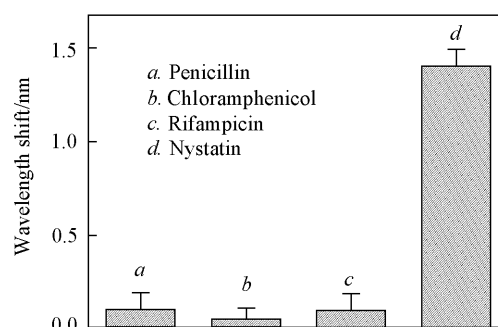


Fig. 4 Interaction of 0.25 mg/mL antibiotic with Au/MUN/DPPC

2.3 交流阻抗表征制菌霉素与磷脂膜的相互作用 以 Au/HDM/磷脂膜为例, 考察了制菌霉素与磷脂膜的相互作用时的交流阻抗的变化情况(图 5).

Au/HDM 表面形成磷脂膜后, 阻碍了电极与溶液中探针之间的电子传递, 使电极表面的绝缘性能增强, R_m 增加(图 5 曲线 *a* 和 *b*).

不含制菌霉素的 55 mg/mL DMSO 溶液与磷脂膜作用后阻抗值没有改变(图 5 曲线 *c*); 0.002 mg/mL 制菌霉素与磷脂膜相互作用后, 阻抗值基本不变(图 5 曲线 *d*); 而 0.25 mg/mL 制菌霉素与磷脂膜相互作用后(图 5 曲线 *e*), 膜阻抗明显下降, 由 $4.5 \times 10^6 \Omega$ 减至 $3 \times 10^6 \Omega$. 这有可能是制菌霉素嵌入磷脂膜, 在膜上形成了微孔的结果^[8].

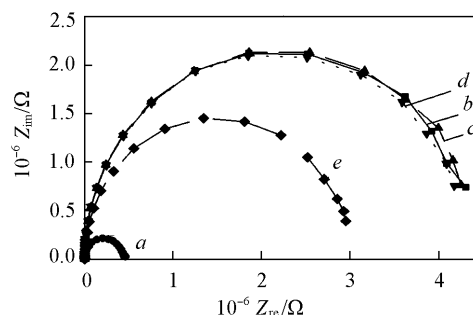


Fig. 5 Impedance plane plots

a. Au/HDM; *b.* Au/HDM/DPPC; *c.* Au/HDM/DPPC treated with 55 mg/mL DMSO; *d.* Au/HDM/DPPC treated with 0.002 mg/mL nystatin; *e.* Au/HDM/DPPC treated with 0.25 mg/mL nystatin.

参 考 文 献

- [1] Akaike N., Harata N. . Jpn. J. Physiol. [J], 1994, **44**(5): 433—473
- [2] Silva L., Coutinho A., Fedorov A., *et al.*. Biochim. Biophys. Acta[J], 2006, **1758**(4): 452—459
- [3] Cotero B. V., Rebollo-Antunez S., Ortega-Blake I. . Biochim. Biophys. Acta[J], 1998, **1375**(1): 43—51
- [4] Milhaud J., Berrehar J., Lancelin J. M., *et al.*. Biochim. Biophys. Acta[J], 1997, **1326**(1): 54—66
- [5] Yang X., Wang Q., Wang K., *et al.*. Langmuir[J], 2006, **22**(13): 5654—5659
- [6] Artyukhin A. B., Stroeve P. . Ind. Eng. Chem. Res. [J], 2003, **42**(10): 2156—2162
- [7] WANG Hong-Hai(王洪海), LUE Jun(乐军). Foreign Med. Sci. (国外医学: 微生物分册)[J], 2002, **25**(3): 1—5
- [8] Silva L., Coutinho A., Fedorov A., *et al.*. Biophys. J. [J], 2006, **90**(10): 3625—3631

Investigation of the Interaction Between Nystatin and Solid-supported Phospholipid Membranes

WANG Qing^{1,2,3,4}, YANG Xiao-Hai^{1,2,3,4}, WANG Hong^{1,2,4}, WANG Ke-Min^{1,2,3,4*}

(1. State Key Laboratory of Chemo/Biosensing and Chemometrics, 2. College of Chemistry and Chemical Engineering, 3. Biomedical Engineering Center, 4. Key Laboratory for Bio-Nanotechnology and Molecular Engineering of Hunan Province, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract Nystatin is a polyene antifungal drug to which many molds and yeasts are sensitive, including *Cryptococcus neoformans*, *Candida*, *Aspergillus*, *etc.* To realize the mechanism of nystatin more particularly, the techniques of SPR and impedance were used to investigate the interaction between nystatin and two kinds of solid-supported phospholipid membranes. The results show that nystatin could interact with pure phospholipid membranes, whether they are monolayer or bilayer. In addition, impedance spectra show that ion channels may be formed when nystatin interacted with phospholipid membranes.

Keywords Surface plasmon resonance; A. C. impedance; Solid-supported phospholipid membrane; Nystatin (Ed.: A, G)