

## 阿霉素对 H<sup>+</sup> 诱导心磷脂多形性相变的影响

张凤立、程德基、林克椿 (北京医科大学生物物理教研室, 北京 100083)

**提要** 本文报告了阿霉素对 H<sup>+</sup> 诱导的含心磷脂人工膜多形性相变的影响。<sup>31</sup>P NMR 结果表明, 在 pH < 4.0 时能诱导含心磷脂脂质体由双层到六角形 II 相相变; 这种相变在 pH 5.0-1.0 范围内受到阿霉素的抑制。在 pH < 0.5 时, 由于阿霉素分解, 这种抑制作用消失。本文讨论了阿霉素对心肌毒性可能的机理。

**关键词** 阿霉素; 心磷脂质类; 质子; 脂质体; 核磁共振

阿霉素 (doxorubicin, Dox) 是由 adriamycinone 和 daunosamine 通过糖苷键连接而成的抗癌药物。Dox 不仅以 DNA 为作用靶子<sup>(1)</sup>; 而且也以生物膜作为靶子<sup>(2)</sup>, 显示其治疗和毒性作用。一般认为 Dox 对心肌的毒性作用与它对线粒体的氧化磷酸化功能的抑制有关。心磷脂是线粒体内膜的特征磷脂, 我们曾报告, 心磷脂的六角形 II 相在人工膜上具有 H<sup>+</sup> 的载体特征, 易化 H<sup>+</sup> 的跨膜转运。<sup>31</sup>P NMR 技术是研究磷脂分子在水分散相中多形性的一种简便方法, 本文用 <sup>31</sup>P NMR 技术研究 Dox 对 H<sup>+</sup> 诱导的含心磷脂的脂质体膜由双层转变成六角形 II 相的多形性相变的影响, 以探讨 Dox 对线粒体膜作用可能的机理。

### 材料与方 法

牛心心磷脂 (cardiolipin, CL) 及二棕榈酰磷脂酰胆碱 (dipalmitoylphosphatidylcholine, DPPC) 为 Sigma 产品。Dox 为 Farmitalia 产品, 含乳糖 80%。

**含 CL 脂质体的制备** 用乙醇混溶 CL 和 DPPC 1:1 (wt:wt) 于心形玻璃瓶中, 用旋转蒸发器在 45℃ 左右除去乙醇, 使磷脂在瓶壁形成均匀薄膜, 加入适量的 HEPES 缓冲液 (含甘

露醇 225 mmol/L, 蔗糖 75 mmol/L, HEPES 2 mmol/L, pH 7.4), 在 45℃ 左右使磷脂水化, 轻微振荡使之形成多层脂囊泡。脂浓度为 56 mg/ml。用于 <sup>31</sup>P NMR 研究。

**<sup>31</sup>P NMR 谱的测定** 脂质体的 <sup>31</sup>P NMR 用 JEOL FX-90 Q 型 NMR 谱仪测定, 10 mm 直径的样品管, <sup>2</sup>D 内锁锁场, 60 度脉冲, 观察频率 36.19 MHz, 测试温度 27℃, 应用高功率质子全去偶, 谱线展宽 50 Hz (线宽因子 322), 每次采样时间 0.512 s, 脉冲延迟 0.5 s, 累加次数 10 000 次 (其中时域 100 次, 频域 100 次)。

### Dox 在不同 pH 缓冲液中稳定性的测定

Dox 是水溶性化合物, 在酸性环境下分解, 生成脂溶性的 adriamycinone 和水溶性的 daunosamine, 而 adriamycinone 在 300-600 nm 有特征吸收峰<sup>(3)</sup>。分别取 20 μg Dox, 溶在 2 ml HEPES 缓冲液 (pH 见表 1) 中振荡约 10 min 后加二甲基苯继续振荡约 5 min, 300 × g 离心 3 min, 取有机相在日立 850 型荧光分光光度计上测定激发谱, 发射波长为 600 nm。为了得到校正激发谱 (相当于吸收光谱), 用标准的罗达明 (rhodamine-B) 对仪器进行校正。

### 结 果

由 CL 和 DPPC 制成的多层脂囊泡的 <sup>31</sup>P NMR 谱, 显示为不对称图形, 谱宽 50 ppm 左右, 具有高场峰低场肩的脂双层排列特征 (图 1 A-a)。加 HCl 使脂质体悬液的 pH 逐渐从 7.4 下降到 2.0 时, <sup>31</sup>P NMR 谱的不对称性逐渐翻转, 峰移至低场而肩移至高场, 谱宽度为 25 ppm 左右 (图 1 A-d), 显示出典型的六角形 II 相的特点。图 1 A-b, c 是两种结构的谱相互叠加的结果, 说明在 pH 4.0 时已有部分 CL 呈

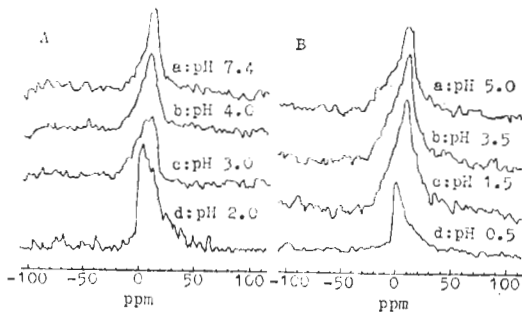


Fig 1.  $^{31}\text{P}$  NMR spectra of large multilayer liposomes made of cardiolipin and dipalmitoyl-phosphatidylcholine (1:1 wt:wt) at different pH in media without (A) and with (B) doxorubicin.

六角形Ⅱ相。在脂质体中加入 Dox (CL 与 Dox 的重量比是 7:5) 后测  $^{31}\text{P}$  NMR 谱 (图 1 B), 在 pH 值为 5.0, 3.5, 1.5 时, 含 Dox 的脂质体的  $^{31}\text{P}$  NMR 谱仍显示双层排列的谱形; 当 pH 降到 0.5 时,  $^{31}\text{P}$  NMR 谱的不对称性翻转, 为低场峰高场肩, 谱线明显变窄, 显示典型的六角形Ⅱ相的特点。

以上结果表明:  $\text{H}^+$  诱导 CL 从双层到六角形Ⅱ相的相变在 pH 4.0 时就有发生, 在 pH 2.0 时已全部转变成六角形Ⅱ相; 由于 Dox 的加入, 使 CL 在 pH 1.5 时仍保持典型的双层结构。所以 Dox 在 pH 1.5-5.0 范围内能稳定 CL 的双层结构。

为解释 Dox 在 pH 0.5 时对 CL 的双层排列无保护作用, 我们对 Dox 在酸性环境下的稳定性进行了研究。结果表明: 在 pH 1.0-7.0 范围内, 二甲苯萃取液在 300-600 nm 的激发

Tab 1. Maximal intensities of correcte fluorescence excitation spectra of adriamycinone extracted from the media of different HCl concentrations with dimethylbenzene (DMB).

pH	Intensity	pH	Intensity
(HCl 1 mol/L)	0.692	3.0	0.260
0.5	0.407	4.0	0.270
1.0	0.297	5.0	0.246
1.5	0.252	6.0	0.275
2.0	0.297	7.0	0.250
2.5	0.300	DMB	0.025

峰较弱, 并且基本保持不变; 在  $\text{pH} < 0.5$  时, 萃取液在 300-600 nm 的激发峰明显增强, 并且随  $\text{H}^+$  浓度的增加而进一步加强 (表 1)。也就是说在 pH 1.0-7.0 范围内, Dox 只有少量分解, 仍具有活性; 当  $\text{pH} < 1.0$  时, Dox 分解明显加剧。因此在 pH 0.5 时含 Dox 的 CL 呈六角形Ⅱ相, 是由于 Dox 分解, 对 CL 双层不再起保护作用之故。

## 讨 论

CL 的极性头部带有两个负电荷, 非极性尾部是 4 条碳氢链。在无阳离子作用时, 由于头部基团之间的斥力、结合水的存在和尾部之间的范德瓦耳力作用, 使 CL 呈双层排列。在酸性环境中,  $\text{H}^+$  中和了 CL 极性头部的负电荷使斥力减小, 同时由于去水化作用, 使 CL 的极性头部变小, 因而呈六角形Ⅱ相。

Dox 的 daunosamine 部分带有一个单位的正电荷。在与 CL 结合时, 两个 Dox 与一个 CL 结合, Dox 分子平行排列时的分子间距正好是 CL 紧密排列时分子间距离的一半<sup>(4)</sup>, 由于 Dox 自身分子间的相互作用, 使 CL 与 Dox 结合后仍维持双层排列。这可能就是 Dox 与 CL 结合, 使  $\text{H}^+$  不能诱导 CL 产生六角形Ⅱ相的原因。所以 Dox 对  $\text{H}^+$  诱导的 CL 由双层排列转变成六角形Ⅱ相有抑制作用。当 Dox 分解时, 这种抑制作用就消失。

Dox 与 CL 的特殊相互作用可能是 Dox 对线粒体功能抑制的基础<sup>(4)</sup>。膜磷脂 (如心磷脂、磷脂酰乙醇胺等) 在一定条件下由双层排列转变成六角形Ⅱ相, 是脂多形性特点的表现。六角形Ⅱ相与离子跨膜转运等功能活动密切相关<sup>(5)</sup>。  $\text{Ca}^{2+}$  可诱导 CL 形成六角形Ⅱ相, 成为  $\text{Ca}^{2+}$  转运的载体<sup>(6,7)</sup> 在含 CL 的人工膜上和线粒体膜上 Dox 可抑制这种诱导作用, 也抑制  $\text{Ca}^{2+}$  的转运。按照化学渗透学说,  $\text{H}^+$  的跨膜转运是线粒体内膜实现氧化磷酸化功能的中心环节。CL 的六角形Ⅱ相易化  $\text{H}^+$  的跨膜转运<sup>(8)</sup>。 Dox 有可能是通过抑制 CL 的非双层相

的形成,阻止 $H^+$ 的转运,从而表现其心肌毒性。

### 参 考 文 献

- 1 Patel DJ, Kozlowski SA, Rice JA. Hydrogen bonding, overlap geometry, and sequence specificity in anthracycline antitumor antibiotic DNA complexes in solution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78 : 3333
- 2 Tritton TR, Yee G. The anticancer agent adriamycin can be actively cytotoxic without entering cells. *Science* 1982; 217 : 248
- 3 Swenton JS, Reynolds PW. A regiospecific synthesis of the anthracycline aglycones, daunomycinone and adriamycinone. *J Am Chem Soc* 1978; 100 : 6188
- 4 Goormaghtigh E, Ruyschaert JM. Anthracycline glycoside-membrane interactions. *Biochim Biophys Acta* 1984; 779 : 271
- 5 Cullis PR, Hope MJ, De Kruijff B, Verkleij AJ, Tilcock CPS. Structural properties and functional roles of phospholipids in biological membranes. In: Kuo JF, ed. *Phospholipids and cellular regulation*; vol 1. 1st ed. Boca Raton : CRC Press, 1985 : 1-60
- 6 Nicolay K, Van der Neut R, Fok JJ, De Kruijff B. Effects of adriamycin on lipid polymorphism in cardiolipin-containing model and mitochondrial membranes. *Biochim Biophys Acta* 1985; 819 : 55
- 7 Goormaghtigh E, Vandenbranden M, Ruyschaert JM, De Kruijff B. Adriamycin inhibits the formation of non-bilayer lipid structure in cardiolipin containing model membranes. *Ibid* 1982; 685 : 137
- 8 程伯基, 林克椿, 张凤立, 蒋桂森, 冯元怡.  $H^+$ 诱导心磷脂的六角形 II 相和  $H^+$  的跨膜转运. *生物物理学报* 1987; 3 : 60

*Acta Pharmacologica Sinica* 1988 Mar; 9 (2) : 175-177

## Effect of doxorubicin on polymorphic phase transition of cardiolipin-containing membrane induced by protons

ZHANG Feng-Li, CHENG Bo-Ji, LIN Ke-Chun

(Department of Biophysics, Beijing Medical University, Beijing 100083)

**ABSTRACT** Cardiolipin specific to inner mitochondrial membrane is one of the lipids which can form nonbilayer phase under certain conditions. With  $^{31}P$  NMR, it was observed that the hexagonal II phase in cardiolipin-containing liposome membrane was formed by proton induction. Gradual lowering of pH from 7.4 to 2.0 by addition of HCl transformed the  $^{31}P$  NMR spectrum of membrane lipid from a broad asymmetric signal with high field peak and low field shoulder to a reversed asymmetric signal with high field shoulder and low field peak. The alteration in signal indicated a polymor-

phic phase transition of cardiolipin from bilayer to hexagonal II phase. This transition set going at pH 4.0. In the presence of doxorubicin, the induced polymorphic phase transition for cardiolipin by proton was prevent in the pH range from 5.0 to 1.5. However, at pH 0.5 the prevention was not seen due to decomposition of doxorubicin. The possible mechanism for doxorubicin to inhibit mitochondrial function is discussed.

**KEY WORDS** doxorubicin; cardiolipins; protons; liposomes; nuclear magnetic resonance