



论文

姜黄素与模拟生物膜相互作用的电化学研究

陈桂芳^①, 陈阳阳^①, 杨娜娜^②, 朱雪琚^③, 孙丽洲^{②*}, 李根喜^{①③*}^① 上海大学生命科学学院分子识别与生物传感实验室, 上海 200444;^② 南京医科大学第一附属医院产科, 南京 210036;^③ 南京大学生物化学系, 医药生物技术国家重点实验室, 南京 210093

* 联系人, E-mail: lizhou_sun121@hotmail.com; genxili@nju.edu.cn

收稿日期: 2012-01-18; 接受日期: 2012-03-09

国家杰出青年科学基金(批准号: 20925520)、国家自然科学基金(批准号: 81070511)和上海市教委重点学科建设项目(批准号: J50108)资助

摘要 姜黄素是姜黄根茎提取物中的主要活性成分, 具有广泛的抗氧化、抗癌、抗菌、抗炎等特性. 有研究表明, 姜黄素能够在一个大致相似的浓度, 作用于多种结构上互不相关、横跨多个信号通路的膜蛋白, 并且推测姜黄素可能是通过对细胞膜产生直接作用, 从而间接影响细胞膜蛋白. 本文通过在金电极表面共价连接 1,2-二棕榈酰-sn-甘油磷脂酰硫代乙醇(DPPTE)/1,2-二棕榈酰-sn-甘油磷脂酰胆碱(DPPC)磷脂双层膜来构建模拟生物膜, 运用电化学交流阻抗和循环伏安等技术手段, 研究不同浓度的姜黄素与模拟生物膜的相互作用. 结果表明, 姜黄素对模拟生物膜的影响呈浓度依赖关系: 在较低浓度时, 姜黄素能够嵌入外层膜中, 改变膜的结构使膜变薄; 在较高浓度时, 姜黄素能够以寡聚体的形式贯穿双层膜, 引起膜阻抗的大幅减小. 本研究有助于进一步理解姜黄素的生理活性及其对细胞膜及膜蛋白可能产生的影响.

关键词姜黄素
模拟生物膜
分子间相互作用
电化学

姜黄又称黄姜, 是姜科姜属植物, 其根茎所磨成的粉末为咖喱的主要成分之一. 姜黄在亚洲烹饪和印度传统医学方面的应用具有悠久的历史^[1-3]. 多酚姜黄素(1,7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-庚二烯-3,5-二酮)是其主要的活性成分(图 1). 据报道, 姜黄素具有抗氧化、抗肿瘤、抗菌、降血脂、抑制血小板聚集、清除自由基等广泛的药理作用^[4-11]. 正是由于这些特性以及它的天然无毒性, 姜黄素一直是许多生化研究的关注点. 以前的一些研究都主要集中在它的药用价值以及它与某些特定蛋白的相互作用方面, 而关于姜黄素发挥作用的一般机制却未见报道. 姜黄

素可以影响较大范围的互不相关的蛋白质, 其中包括转录因子、抗凋亡蛋白以及交叉多个信号通路的膜蛋白^[12-14]. 对于大多数受姜黄素调控的膜蛋白而言, 并没有发现相关的姜黄素结合位点, 但尽管缺少一致的结合机制, 姜黄素却能够在一个大致相同的浓度对这些蛋白产生作用^[15]. 于是提出这样一种假设, 姜黄素并不直接与蛋白质结合, 而是通过影响细胞膜的性质间接调节蛋白质的行为特性^[15]. 基于上述假设, Ingolfsson 等人^[15]利用短杆菌肽通道作为表征双层膜性质改变的探针, 研究了姜黄素对双层膜性质的影响, 结果显示, 姜黄素降低了双层膜的硬度,

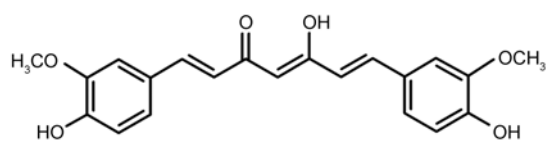


图1 姜黄素的化学结构式

增加了短杆菌肽通道的存在时间和出现频率, 即姜黄素能够降低双层膜发生形态改变的能量需求. Hung 等人^[16]和 Sun 等人^[17]进一步研究发现, 姜黄素能够以两种方式跟膜结合: 低浓度时与膜表面缔合, 高浓度时以跨膜方式与膜结合. Barry 等人^[18]利用固态核磁共振和差示热量扫描相结合的方法, 对姜黄素引起的双层膜物理性质改变的细节问题进行了深入研究, 发现姜黄素会使脂双层膜的流动性产生较大的改变, 另外他们还推断, 姜黄素很有可能在较高浓度时以二聚体的形式贯穿整个膜.

生物膜是所有生物有机体的基本要素, 具有多种功能. 由于生物膜本身的复杂性, 利用简单的模型模拟生物膜的研究引起了人们的广泛兴趣. 这些模型包括脂质体、LB 膜层、双层类脂膜以及固体支撑的磷脂双层膜(s-BLM)等. 其中, 固体支撑的磷脂双层膜由于制备方法简便、易于重复、具有更好的机械稳定性及可用于电化学检测以及表面分析等特性, 被越来越多地应用于生物膜领域的研究^[19].

近年来, 电化学技术已经成为表征自组装单层膜以及金属表面支撑磷脂双层膜的重要工具. 在膜研究中, 电化学技术中的循环伏安法以及交流阻抗法能够提供膜通透性的初步评估, 并且能够作为膜结构变化的灵敏探测器^[20,21]; 另一方面, 电化学技术既可以对有氧化还原活性的分子进行定性研究, 也可以进行定量研究. 对于姜黄素的电化学研究也有过报道^[22]. 基于此, 电化学技术可以发展为一个独特的手段来研究姜黄素和模拟生物膜之间的相互作用. 相对经常用来研究小分子与生物膜相互作用的生物物理学方法, 很多只能读取生物膜单方面的信号, 而电化学技术可以得到姜黄素和生物膜两方面的信号, 并且可以提供一些生物化学方面的有用信息. 因此, 本工作首次尝试采用电化学技术来研究姜黄素与模拟生物膜的相互作用. 利用“冰冻-涂抹”法在电极表面共价构建了磷脂双分子层以模拟生物膜, 运用电化学循环伏安法(CV)和交流阻抗法(EIS)检测了姜黄素与磷脂双层膜的相互作用.

1 材料与方法

1.1 材料

姜黄素粉末($\geq 98\%$)购于上海友思生物技术有限公司, 粉末状 1,2-二棕榈酰-sn-甘油磷脂酰胆碱(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC)和 1,2-二棕榈酰-sn-甘油磷脂酰硫代乙醇(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphothioethanol, DPPTE)购于 Avanti; 正癸烷(99%)购自安耐吉化学. 姜黄素溶于无水乙醇, 浓度 1 mmol/L, 避光保存于玻璃管中, 存放在 4℃冰箱. 实验所用其他化学试剂为分析纯, 实验用水经过 Milli-Q 纯化系统(Barnstead 公司, 美国)纯化至电阻率大于 18 MΩ cm.

1.2 金电极表面支撑磷脂双层膜的构建

(1) 金电极表面 DPPTE 自组装单层膜的形成. 金电极首先在 3000 目的砂纸上打磨, 随后依次用直径为 1.0、0.3 和 0.05 的氧化铝粉末与水的混合物在丝绸和麂皮上抛光至镜面. 接下来分别在无水乙醇和超纯水中超声清洗 3 min. 之后用浓硫酸和过氧化氢体积比为 3:1 的混合溶液(新鲜配制)作用于电极表面 2 min, 随后用蒸馏水冲洗干净. 于 0.1 mol/L 硫酸溶液中, 0~1.6 V 电位区间内以 100 mV/s 的速度扫描 20 周, 蒸馏水清洗后氮气吹干备用.

将处理好的金电极浸入 2 mmol/L DPPTE 的无水乙醇溶液中约 16 h, 通过 DPPTE 头部的巯基和金自发形成“Au-S”共价键, 以形成自组装单层膜. 之后, 将电极浸入无水乙醇中 2 min 以除去表面非共价结合的 DPPTE 分子, 随后用超纯水冲洗, 再用氮气吹干表面.

(2) 金电极表面支撑磷脂双层膜的形成. 磷脂双分子层的构建依照“涂抹-冷冻”的方法^[23,24], 在已形成的 DPPTE 自组装单层膜上加一层甘油磷脂分子层. 具体做法: 首先将 DPPC 溶于正癸烷中, 终浓度 20 mg/mL. 在已形成的单层膜表面滴加 5 μL DPPC 的正癸烷溶液, 将金电极在室温放置 5 min, 然后放入 -20℃冰箱 0.5 h 左右, 以此让溶剂挥发, 随后将电极拿出置于室温下约 20 min, 最后将电极浸入 0.1 mol/L KCl 溶液中 2 h, 浸泡期间, 磷脂分子由于亲水和疏水作用力的共同作用, 自发形成双层膜.

1.3 电化学检测

实验采用的电化学仪是 CHI 660C 电化学工作站(上海辰华仪器公司); 采用三电极系统, 经修饰的金电极作为工作电极, 参比电极为饱和甘汞电极(saturated calomel electrode, SCE), 对电极为铂电极. 本实验所用的电化学检测方法主要为循环伏安和交流阻抗两种. 循环伏安检测在 5 mL 0.1 mol/L pH 6.8 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)中进行, 姜黄素溶液通过微量注射器加入缓冲溶液中, 并由磁力搅拌子搅拌均匀. 交流阻抗检测的频率范围为 0.01 Hz~100 kHz, 信号振幅 5 mV, 所用的电解液为 5 mmol/L 铁氰化钾+0.1 mol/L 氯化钾+0.1 mol/L, PBS (pH 6.8). 交流阻抗的数据用 Echem 软件公司的 ZsimpWin 软件进行处理.

2 结果与讨论

2.1 支撑磷脂双层膜和姜黄素电化学研究

(1) 支撑磷脂双层膜在金电极上的电化学表征. 循环伏安和交流阻抗技术非常适合用来表征电极表面的修饰情况, 因此, 本工作首先用这两种技术表征了支撑磷脂双层膜在金电极表面的修饰状态. 图 2A 为裸金电极、DPPTE 单层修饰电极以及 DPPTE/DPPC 双层膜修饰电极在含有 0.1 mol/L KCl 和 5 mmol/L 铁

氰化钾分子的 pH 6.8 PBS 电解液中的循环伏安图. 由图可见, 在裸金电极上可以得到一对明显可逆的铁氰化钾的氧化还原峰(黑色曲线), 当电极表面修饰上一层 DPPTE 分子之后, 铁氰化钾分子探针的氧化还原峰消失, 峰电流大大降低(红色曲线). 这说明 DPPTE 单层膜的形成阻碍了铁氰化钾分子到达电极表面. 再次加入 DPPC 分子层, 在电极表面形成磷脂双层膜后, 进一步阻碍了铁氰化钾与电极表面的电子传递, 反映在循环伏安图上即铁氰化钾氧化还原峰完全消失, 几乎成为直线(绿色曲线). 这一结果可用交流阻抗技术加以验证和支持. 图 2B 显示的是裸金电极、DPPTE 单层修饰电极以及 DPPTE/DPPC 双层膜修饰电极的交流阻抗检测图谱. 图 2B 中的插图显示的是刚打磨好的裸金电极阻抗谱, 阻抗谱在所有频率范围内基本是一条直线, 在高频部分没有出现半圆部分, 表明在此情况下反应是受扩散控制的过程, 铁氰化钾非常容易到达电极的表面发生反应, 电极上不存在阻挡电子传输的物质. 图 2B 中红色线和绿色线分别显示的是 DPPTE 单层和 DPPTE/DPPC 双层膜修饰金电极的交流阻抗图. 由图可见, 当电极表面被修饰之后, 交流阻抗谱显示出明显的不同, 图中出现了明显的半圆, 这表明电极表面的电子传递受到了阻碍, 而且随着 DPPC 分子层的加入, 磷脂双层膜形成之后, 绿色曲线高频部分半圆的直径增大, 阻抗在所观测的频率范围内成数量级增大, 表明磷

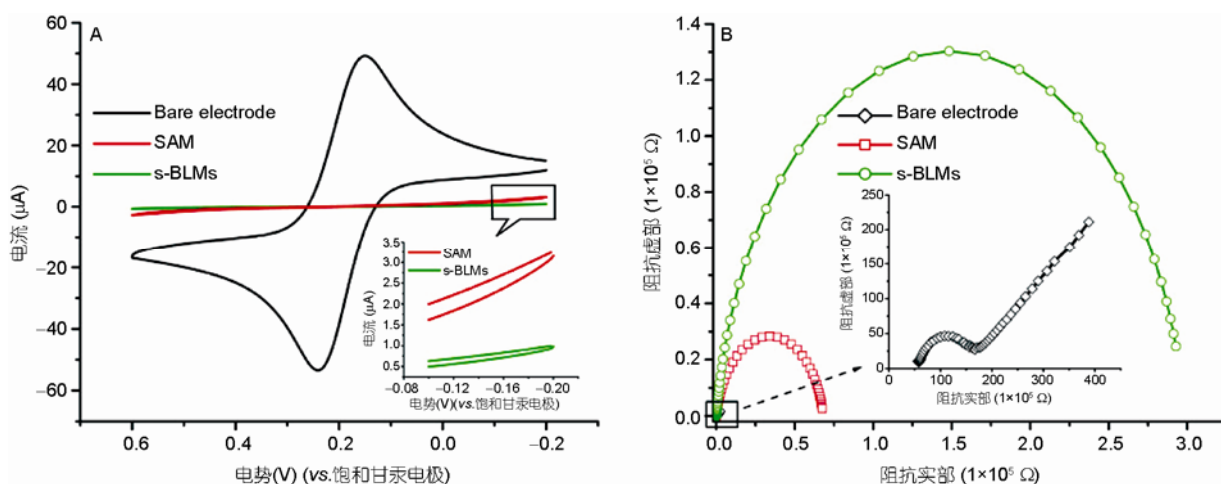


图 2 裸金电极、DPPTE 单层修饰金电极以及 DPPTE/DPPC 双层膜修饰金电极在含 5 mmol/L 铁氰化钾的电解缓冲液中的循环伏安图(A)和交流阻抗复数平面图(B)

循环伏安扫速: 200 mV/s; 交流阻抗频率范围: 0.01 Hz~100 kHz; 信号增幅: 10 mV. Bare electrode: 裸金电极; SAM: 单层膜修饰的金电极; s-BLMs: 双层膜修饰的金电极

脂双层膜对电子的阻碍作用进一步增强, 铁氰化钾难以通过双层膜到达电极表面. 上述结果可以说明, 电极表面成功地构建了稳定的双层膜体系, 并且该体系可以在缓冲液中至少几天保持不变.

(2) 姜黄素电化学性质的研究. 研究了姜黄素在金电极上的电化学行为, 图 3 显示的是不同浓度姜黄素在裸金电极表面的循环伏安图. 由图可见, 在扫描范围内姜黄素有一对明显的氧化还原峰(P_{a1} 和 P_{c1}) 和一个不明显的氧化副峰(P_{a2}), 这一对氧化还原峰(P_{a1} 和 P_{c1}) 对应于儿茶酚基团的氧化还原反应, 而 P_{a2} 则对应于酚羟基的氧化反应^[22]. 图 3 插图显示了还原峰电流值与姜黄素的浓度关系, 还原峰电流随姜黄素浓度增大而增大, 且具有良好的线性关系, 符合线性方程: $y=2.4683+1.1082x$ ($r=0.9788$). 以上结果表明, 姜黄素有很好的电化学活性, 在一定的电压范围内, 它可以跟金电极之间进行电子交换. 进一步研究显示, 姜黄素的峰电流与扫速成正比, 表明其电子传递是一个吸附控制的过程(数据未显示).

以上结果表明, 可以从姜黄素和模拟生物膜两方面来研究其各自电化学信号的变化, 从而探讨二者之间的相互作用关系. 从这一点来说, 电化学技术优于其他一些只能得到单方面信息的技术与方法.

2.2 姜黄素与支撑磷脂双层膜相互作用电化学研究

对姜黄素在支撑磷脂双层膜上的电化学行为进

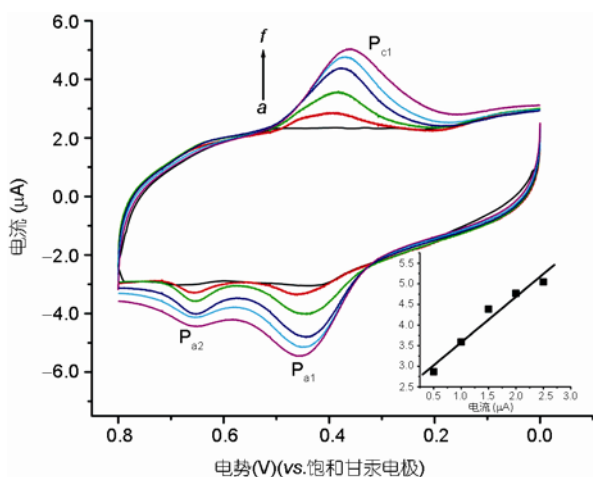


图 3 不同浓度的姜黄素在裸金电极上的循环伏安图

a~f: 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 和 2.5 $\mu\text{mol/L}$; 扫速: 50 mV/s; 插图显示了还原峰电流值(P_{c1})与姜黄素浓度的关系

行了研究. 由于磷脂双层膜是非导电性的, 因此对于电极界面与溶液中姜黄素之间的电子传递非常不利, 可以推测在双层膜修饰的金电极上得不到姜黄素的电化学响应. 实验结果也是如此, 当使用磷脂双层膜修饰的金电极作为工作电极, 向电解液中加入姜黄素, 刚开始完全观察不到姜黄素的氧化还原峰(图 4 黑色曲线). 然而, 5 min 后, 一个小峰逐渐出现至稳定(图 4 红色曲线), 表明一些姜黄素分子嵌入脂双层, 姜黄素与电极之间的电子传递开始恢复, 因而表现出峰电流信号. 并且, 由于仅有少数姜黄素分子嵌入到双层膜中, 因此得到的电化学信号比在裸电极上微弱很多, 计算表明姜黄素在磷脂双层膜修饰的金电极上得到的峰电流净值仅为裸金电极上的 8%左右.

为了更清楚地表明这一电化学响应, 将该循环伏安图的局部典型区域(P_{c1} 部分)放大, 得到图 5. 如图 5A 所示, P_{c1} 随着姜黄素浓度的增大而增大, 与图 3 中姜黄素在裸电极上的行为相似. 然而, 峰电流值与浓度之间的关系不再呈线性增加(图 5B), 取而代之的是一种非线性关系, 表明姜黄素在电极表面发生了其他行为控制的电子传递. 正如先前所推测, 这应该这是由于姜黄素插入了磷脂双层膜内所造成的. 通常, 一步式的相互作用表现为一条结合等温曲线, 可以用双曲线方程或 S 形曲线方程进行模拟. 然而, 在图 5B 中所观察到的曲线包含了两个上升部分和两个平台部分, 表明姜黄素与磷脂双层膜的相互作用可能是通过两步式的插入完成的, 姜黄素先插入磷脂双层膜的外层然后再嵌入内层, 而不是均一地插

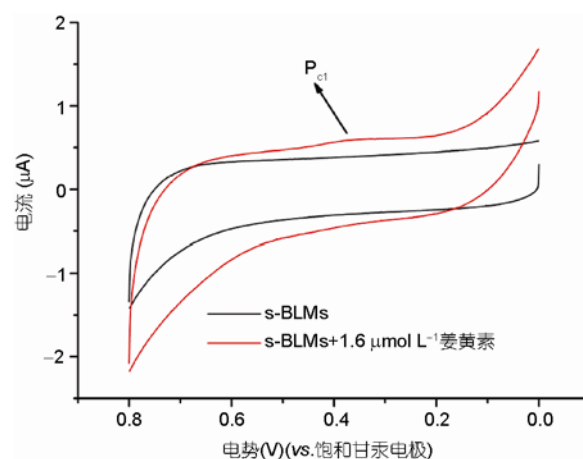


图 4 姜黄素在磷脂双层膜修饰的金电极上的循环伏安图

扫速: 50 mV/s

入整个磷脂双层膜.

同时, 用电化学交流阻抗方法研究了磷脂双层膜在不同浓度姜黄素影响下所发生的变化, 结果证实了本研究的推测. 如图 6 所示, 磷脂双层膜的阻抗也呈两步式变化. 当加入姜黄素的浓度为 0.5 和 1 $\mu\text{mol/L}$ (对应于图 5B 中的第一个结合等温曲线) 时, 阻抗稍有增加; 然而, 当姜黄素的浓度增加到 1.5 和 2 $\mu\text{mol/L}$ (对应于图 5B 中的第二个结合等温曲线) 时, 阻抗大幅度降低. 因此, 交流阻抗实验的结果不仅表明姜黄素对磷脂双层膜的作用是一个两步式的步骤, 而且阐明了两者之间存在如下相互作用. 一方面, 姜黄素插入磷脂双层膜可能增大了磷脂双层膜的空间位阻, 使电化学探针与电极之间的电子传递变得更

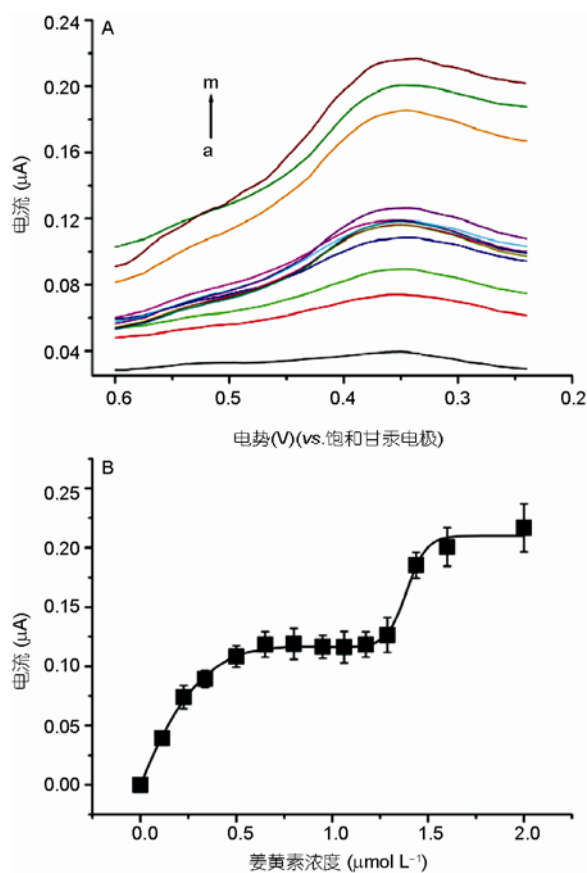


图 5 不同浓度姜黄素在 DPPE/DPPC 修饰的金电极表面的循环伏安图的局部放大图(P_{cl} 减去基线)(A)和还原峰电流对姜黄素浓度的关系曲线图(B)

a~m: 0.11, 0.22, 0.34, 0.5, 0.65, 0.8, 0.95, 1.06, 1.18, 1.29, 1.44, 1.6 和 2.0 $\mu\text{mol/L}$

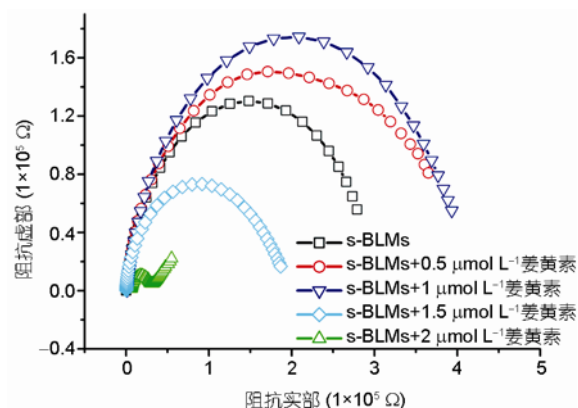


图 6 DPPE/DPPC 修饰电极与不同浓度姜黄素作用后的交流阻抗复数平面图

频率范围: 0.01 Hz~100 kHz; 信号增幅: 10 mV

加困难; 另一方面, 由于姜黄素是有电活性的, 可以充当电极和电化学探针之间的媒介. 因此, 当姜黄素以较低浓度介入时, 它主要插入磷脂双层膜的外层, 此时, 空间位阻作用占主导地位, 使阻抗增加; 而当姜黄素浓度增加到 1.5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 它侵入磷脂双层膜的内层, 使电极表面的部分区域与电化学探针发生联系, 从而使阻抗大大降低.

本实验的电化学结果表明, 姜黄素与生物膜以浓度依赖的方式发生作用, 这与文献报道一致, 也证实了姜黄素在较高浓度下可能插入双层膜的内层^[16-18]. 另外, 由于电化学技术可以直接监控姜黄素的行为, 因此本实验结果显示, 姜黄素是以两步式与生物膜发生作用的, 并且一些动力学参数, 如姜黄素的作用浓度也可以方便地计算得到.

3 结论

本文通过直接在金电极表面共价构建 DPPE/DPPC 支撑磷脂双层膜, 用电化学手段研究了姜黄素与模拟生物膜的相互作用. 首先证实姜黄素与磷脂双层膜两者均可得到电化学信号, 奠定了二者相互作用的研究基础. 随后的研究发现, 姜黄素与磷脂双层膜以两步式发生作用, 并以姜黄素和磷脂双层膜两方面的一致信号为基础, 提出了可能的作用机理. 由于电化学方法的独特优势, 该工作不仅有助于深入了解姜黄素对细胞膜的作用, 并且可以将该方法应用到其他活性分子与生物膜相互作用的研究上.

参考文献

- 1 Bodding P O. Santal Medicine. 2nd ed. Calcutta: Janasiksha Prochar Kendra, 1983. 226–302
- 2 Nadkarni K M. Indian Materia Medica. 3rd ed. Bombay: Popular Book Depot, 1954. 78–106
- 3 Jain S K, Tarafder C R. Medicinal plantlore of the santals (a review of P. O. bodding's work). Econ Bot, 1970, 24: 241–278
- 4 Joe B, Vijaykumar M, Lokesh B R. Biological properties of curcumin-cellular and molecular mechanisms of action. Crit Rev Food Sci Nutr, 2004, 44: 97–111
- 5 Hafner-Bratkovic I, Gaspersic J, Smid L M, et al. Curcumin binds to the alpha-helical intermediate and to the amyloid form of prion protein—a new mechanism for the inhibition of PrPSc accumulation. J Neurochem, 2008, 104: 1553–1564
- 6 Ono K, Hasegawa K, Naiki H, et al. Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils *in vitro*. J Neurosci Res, 2004, 75: 742–750
- 7 Reinke A A, Gestwicki J E. Structure-activity relationships of amyloid beta-aggregation inhibitors based on curcumin: influence of linker length and flexibility. Chem Biol Drug Des, 2007, 70: 206–215
- 8 De Clercq E. Current lead natural products for the chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. Med Res ReV, 2000, 20: 323–349
- 9 Goel A, Kunnumakkara A B, Aggarwal B B. Curcumin as “Curecumin”: from kitchen to clinic. Biochem Pharmacol, 2008, 75: 787–809
- 10 Strimpakos A S, Sharma R A. Curcumin: preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials. Antioxid Redox Signal, 2008, 10: 511–545
- 11 Jagetia G C, Aggarwal B B. “Spicing up” of the immune system by curcumin. J Clin Immunol, 2007, 27: 19–35
- 12 Aggarwal B B, Kumar A, Aggarwal M S, et al. Curcumin derived from turmeric (*Curcuma longa*): a spice for all seasons. Phytopharmaceuticals in Cancer Chemopre-Vention. In: Bagchi D, Preuss H G, eds. Boca Raton, FL: CRC Press, 2005. 349–387
- 13 Shishodia S, Sethi G, Aggarwal B B. Curcumin: getting back to the roots. Ann N Y Acad Sci, 2005, 1056: 206–217
- 14 Bilmen J G, Khan S Z, Javed M U H, et al. Inhibition of the SERCA Ca^{2+} pumps by curcumin-Curcumin putatively stabilizes the interaction between the nucleotide-binding and phosphorylation domains in the absence of ATP. Eur J Biochem, 2001, 268: 6318–6327
- 15 Ingolfsson H I, Koeppe R E, Andersen O S. Curcumin is a modulator of bilayer material properties. Biochemistry, 2007, 46: 10384–10391
- 16 Hung W C, Chen F Y, Lee C C, et al. Membrane-thinning effect of curcumin. Biophys J, 2008, 94: 4331–4338
- 17 Sun Y, Lee C C, Hung W C, et al. The bound states of amphipathic drugs in lipid bilayers: study of curcumin. Biophys J, 2008, 95: 2318–2324
- 18 Barry J, Fritz M, Brender J R, et al. Determining the effects of lipophilic dugs on mmbrane sructure by slid-sate NMR sectroscopy: the case of the antioxidant crcumin. J Am Chem Soc, 2009, 131: 4490
- 19 Tien H T, Salamon Z. Fomation of self-assembled lipid bilayers on solid substrates. Bioelectrochem Bioenerg, 1989, 22: 211
- 20 Sugawara M, Kojima K, Sazawa H, et al. Ion-channel sensors. Anal Chem, 1987, 59: 2842
- 21 Harris J J, Bruening M L. Electrochemical and in situ ellipsometric investigation of the permeability and stability of layered polyelectrolyte films. Langmuir, 2000, 16: 2006
- 22 Stanic Z, Voulgaropoulos A, Girousi S. Electroanalytical study of the antioxidant and antitumor agent curcumin. Electroanal, 2008, 20: 1263–1266
- 23 Ding L, Li J H, Dong S J, et al. Supported phospholipid membranes: comparison among different deposition methods for a phospholipid monolayer. J Electroanal Chem, 1996, 416: 105–112
- 24 White S H. Temperature-depended structural-changes in planar bilayer membranes-solvent freeze-out. Biochim Biophys Acta, 1974, 356: 8–16