

## 阳离子环肽对 Caco-2 细胞膜超微结构与渗透性的影响

李晓晖<sup>1</sup>, 常明明<sup>2\*</sup>, 汪 晴<sup>1\*</sup>, 孙玉明<sup>1</sup>, 刘 洋<sup>1</sup>

(1. 大连理工大学, 大连 辽宁 116023; 2. 北京农学院, 北京 102206)

**摘要:** 本文考察了阳离子环肽处理后 Caco-2 细胞膜表面的微观形态变化, 研究了细胞膜形态变化与亲水性大分子药物胰岛素跨膜渗透性的关系。采用原子力显微镜轻敲模式, 在大气条件下对 Caco-2 细胞膜进行实时观察, 发现阳离子环肽 TD-34 (ACSSKSKSHCG) 作用于 Caco-2 细胞膜后, 细胞膜表面失去原有的平整性和光滑性, 细胞膜表面粗糙度较未处理组提高近一倍, 胰岛素跨 Caco-2 细胞膜表观渗透系数增大, 为原来的 2.5 倍。研究表明, 原子力显微镜可用于阳离子环肽作用后细胞膜表面微观形态变化的实时观测, 阳离子环肽通过增加 Caco-2 细胞膜流动性促进了胰岛素通过胞吞途径的跨膜吸收。

**关键词:** Caco-2 细胞膜; 阳离子环肽; 胰岛素

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2014) 07-1062-07

## Influence of cationic cyclopeptide on microstructure and permeability of Caco-2 cell membrane

LI Xiao-hui<sup>1</sup>, CHANG Ming-ming<sup>2\*</sup>, WANG Qing<sup>1\*</sup>, SUN Yu-ming<sup>1</sup>, LIU Yang<sup>1</sup>

(1. Dalian University of Technology, Dalian 116023, China; 2. Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

**Abstract:** The microstructure of cationic cyclopeptide (TD-34) treated Caco-2 cell membrane was observed, and we discussed the relationship between membrane structure and insulin transmembrane permeability. Atomic force microscope (AFM) was used to observe living cell membrane in air condition and tapping mode. Results showed that the surface of Caco-2 cell membrane treated with TD-34 lost its smoothness and nearly doubled its roughness. Apparent permeability coefficients ( $P_{app}$ ) of insulin in Caco-2 cell monolayers increased 2.5 times. In conclusion, AFM can be used to observe microstructure of cationic cyclopeptide treated cell membrane and cationic cyclopeptide enhanced insulin delivery across Caco-2 cell membrane by increasing membrane fluidity.

**Key words:** Caco-2 cell membrane; cationic cyclopeptide; insulin

细胞膜是细胞与外界环境间的屏障。小分子药物主要通过被动扩散的方式跨细胞膜转运, 而亲水性大分子药物跨膜吸收相对困难。细胞膜表面形态反映了细胞膜的流动性, 进而影响到细胞膜的屏障

作用及亲水性大分子药物的跨膜渗透性<sup>[1]</sup>。目前, 对细胞膜表面形态主要通过: 光学显微镜<sup>[2]</sup>、单粒子追踪<sup>[3]</sup>、荧光显微镜<sup>[4]</sup>、电泳<sup>[5]</sup>、质子激发 X-射线衍射<sup>[6]</sup>和原子力显微镜 (AFM)<sup>[7]</sup>等观察研究。

原子力显微镜不仅可以进行二维纳米级微观形态成像, 还可以提供三维表面形貌图, 因此尽管成像质量受到处理条件和观测条件的影响<sup>[8]</sup>, 但仍广泛用于活细胞表面形态的观察。轻敲模式是原子力显微镜对活细胞进行实时观察的常规方法, 但由于液体环境中阻尼较大, 影响了细胞表面的成像效果<sup>[9]</sup>。Christian

收稿日期: 2014-01-13; 修回日期: 2014-03-13.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30873448); 大北农青年教师科研基金资助项目 (13ZK002).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-80795321,

E-mail: changmingming@bua.edu.cn;

Tel: 86-411-84986176, Fax: 86-411-84986175,

E-mail: qwang@dlut.edu.cn

团队<sup>[10]</sup>应用原子力显微镜在大气条件下观察了非洲绿猴肾细胞在不同温度下细胞膜表面微观形态的变化,发现随着温度升高细胞膨胀导致细胞高度增加,成像更加清晰。原子力显微镜还可用于细胞膜形态的观察, Schneider 等<sup>[11]</sup>应用原子力显微镜实时观察到胰岛细胞分泌过程中胞浆膜结构凹陷。此外, Park 等<sup>[12]</sup>用原子力显微镜探讨了生化处理后大肠杆菌的外膜形态和渗透性的变化。近年来,应用原子力显微镜对药物跨细胞膜转运机制的研究为人们药物跨膜转运方式的探索提供了新的科学手段。Kawaura 等<sup>[13]</sup>应用原子力显微镜进行了阳离子脂质体跨细胞转运方式的研究,发现阳离子脂质体在跨细胞转运过程中存在胞吞和膜融合联合作用的结果,但有关应用原子力显微镜对细胞穿膜肽跨膜转运方式的研究尚未见报道。

细胞穿膜肽是一类具有细胞穿透能力的阳离子多肽,其中的正电荷区域是细胞穿膜肽的活性区域<sup>[14-17]</sup>。有研究表明阳离子多肽通过增加细胞膜的流动性完成跨细胞膜转运<sup>[18]</sup>。本课题组前期研究发现一种阳离子环肽 TD-34 能有效促进胰岛素的经皮转运,经皮给药 8 h 后糖尿病大鼠血糖持续下降,为初始值的 26%,同时发现不同促渗活性的阳离子环肽对胰岛素的经皮促渗与跨 Caco-2 细胞单层膜 (BL-AP) 的促渗效果具有较好相关性 ( $R^2=0.73$ ),推测是由于 TD-34 提高了胰岛素在皮肤毛囊底部未角化上皮细胞的渗透性所致<sup>[19]</sup>。尽管 TD-34 在 Caco-2 细胞单层膜外排侧 (BL-AP) 的促渗作用主要是通过可逆地打开 Caco-2 细胞间紧密连接,增加了胰岛素在 Caco-2 细胞单层膜外排侧的细胞旁路转运所致,研究也表明胰岛素和 TD-34 跨 Caco-2 细胞单层膜过程存在胞吞转运方式<sup>[20]</sup>,但 TD-34 对胰岛素胞吞转运过程的影响未进行深入研究。

原子力显微镜具有较高的分辨率,成像前不需要对细胞进行复杂的预处理,目前在活细胞的膜表面微观形态研究中发挥着越来越重要的作用<sup>[21]</sup>。本研究以原子力显微镜实时观察大气条件下 Caco-2 细胞单层膜超微结构,以未处理的 Caco-2 细胞单层膜作为空白对照,阳离子细胞穿膜肽多聚精氨酸 RR-7 (RRRRRRR) 为阳性对照,分析不同阳离子多肽 (TD-34 和 RR-7) 处理后 Caco-2 细胞单层膜表面微观形态的异同及变化规律,研究 TD-34 处理 Caco-2 细胞后细胞膜表面形态变化及对胰岛素跨膜渗透性的影响,并探讨阳离子环肽 TD-34 对胰岛素跨膜转运的可能作用机制。

## 材料与方法

**实验材料** CSPM5500 原子力显微镜和 Tap 300 系列探针分别购自本原仪器有限公司 (中国) 和 Budget Sensors (美国)。Discover 微波合成仪购自 CEM 有限公司 (美国)。SpectraMax Plus 384 酶标仪购自 Molecular Devices (美国)。LC2010A 高效液相色谱仪购自岛津中国有限公司 (日本)。Caco-2 细胞由上海细胞库提供 (中国)。猪胰岛素由江苏万邦制药有限公司提供 (中国)。Millicell<sup>®</sup> ERS-2 细胞电阻仪购自密立博公司 (美国)。Hyclone 胎牛血清和 DMEM 分别购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司和赛默飞试剂有限公司 (美国)。RR-7 由吉尔生物化学有限公司合成 (中国)。

**多肽合成** 采用微波辅助固相合成法合成阳离子环肽 TD-34<sup>[19]</sup>,以 Wang 树脂为固相载体。首先精密称取 0.1 mmol Fmoc-Gly-Wang 树脂于固定相反应器中,用二氯甲烷 (DCM) 7 mL 溶胀 30 min,再用二甲基甲酰胺 (DMF) 7 mL 洗涤充分溶胀后的树脂 2 次。向树脂中加入 20% (v/v) 哌啶/DMF 溶液 7 mL,在微波固相合成仪中于 60 °C 20 W 反应 3 min 脱除 Fmoc 氨基保护基,依次用 7 mL DMF、异丙醇、DCM 和 DMF 分别洗涤树脂 3 次,抽干洗涤液。用 Kaiser 法检测树脂上游离氨基,树脂全部呈蓝紫色为阳性,证明 Fmoc 保护基完全脱除。

分别称取 0.3 mmol·L<sup>-1</sup> 的 Fmoc-AA-OH、苯并三氮唑-N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐 (HBTU) 和 1 水合 1-羟基苯并三唑 (HOBt·H<sub>2</sub>O) 溶解于 DMF 中,缩合反应前加入 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> N,N'-二异丙基乙胺 (DIEA, 139 μL),上述反应液与树脂混合均匀后在微波合成仪中于 60 °C、20 W 反应 5 min。反应完成后依次用 7 mL DCM 和 DMF 洗涤 3 次,抽干后用 Kaiser 法定性检查,若树脂颜色不变,则证明氨基酸连接完全。重复上述各步反应,TD-34 序列合成过程中依次接入 Fmoc-Cys(Acm)-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Cys(Acm)-OH 和 Boc-Ala-OH。反应完成后,将固相反应器中的树脂用 7 mL DMF 和 DCM 洗涤后,加入乙醚 7 mL,抽干后置于干燥塔中。

待残留溶剂完全去除后,将树脂转移至茄形瓶中,加入 7 mL 三氟乙酸 (TFA)-水 (H<sub>2</sub>O)-三异丙基硅烷 (TIS) (95 : 2.5 : 2.5, v/v/v),室温反应 2 h,切除树脂和部分保护基。反应完成后,用 DCM 冲洗树

脂至滤液呈现无色, 合并滤液后旋转蒸发至体积小于 2 mL, 冰乙醚结晶、离心 2 次得到 TD-34 粗产物, 称重, 备用。采用碘氧化法使 TD-34 分子内半胱氨酸保护基脱除形成分子内二硫键。经冷冻干燥得到环肽 TD-34 粗产品。

为了去除多肽合成过程中产生的缺失肽等杂质, 采用 Sephadex G-15 进行凝胶分离。最后以 HPLC 检测样品纯度 (>96%), ESI-MS (安捷伦, 美国) 检测 TD-34 分子质量 ( $[M_w+H]^+$  = 1 133.6, 理论  $M_w$  = 1 132.51)。

**细胞培养** Caco-2 细胞为 40~60 代, 细胞在含有 10% 胎牛血清、1% 非必需氨基酸、2 mmol·L<sup>-1</sup> L-谷氨酰胺、100 u·mL<sup>-1</sup> 青霉素和 100 μg·mL<sup>-1</sup> 链霉素的 DMEM 培养液中, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度条件下培养, 每周更换 3 次培养基, 细胞长满培养瓶底约 80% 后, 按 1:3 进行传代。

**溶液的配制**<sup>[16]</sup> 在转运实验中, 用 0.01 mol·L<sup>-1</sup> HCl 50 μL 溶解胰岛素, 加入 Hank's 平衡盐缓冲液稀释胰岛素溶液, 再加入 0.01 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 调节胰岛素溶液的 pH 值为 7.0 左右, 最后用 Hank's 平衡盐缓冲液定容至所需浓度。将 TD-34 加入到胰岛素溶液中混合配制成转运溶液。

**MTT 实验** 采用 MTT 法研究不同浓度 TD-34 对细胞活性的影响。将 Caco-2 细胞以细胞数 2×10<sup>4</sup> 个/mL 接种于 96 孔板中培养 24 h。TD-34 溶解于 Hank's 平衡盐缓冲液 (HBSS) 配制所需浓度溶液。细胞分别在 200 μL HBSS (空白对照组) 和一定浓度的 TD-34 溶液中培养 24 h。加入 500 μg·mL<sup>-1</sup> 3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT) 继续培养 4 h。用二甲基亚砜 (DMSO) 200 μL 替换原有培养液, 通过酶标仪测定 550 nm 处吸光度, 与空白对照组比较计算细胞的活性。

**跨膜转运实验** Caco-2 细胞以细胞数 2×10<sup>5</sup> 个/mL 接种于 3460 Transwell 12 孔板中 (Costar, 美国), 每周换 3 次培养液。20~22 天后细胞单层膜形成, 转运实验开始前用细胞电阻仪检测培养板中每孔的细胞电阻值, 选取电阻值大于 400 Ω·cm<sup>2</sup> 的细胞单层膜用于转运实验。用含 25 mmol·L<sup>-1</sup> 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES, pH 7.4) 的 HBSS (37 °C) 清洗去除培养基, 孵育 10 min。转运介质为 21 u·mL<sup>-1</sup> 胰岛素和 5 μmol·mL<sup>-1</sup> TD-34, 取转运介质 1.5 mL 加入到细胞单层膜的 BL 侧, Hank's 溶液 0.5 mL 加入到 AP 侧。分别于 0.5、1、1.5 和 2 h, 从 AP 侧取样 100 μL, 同时立即补充等体积的空白接收介质。HPLC 检测样品中

胰岛素转运浓度。

选择氧化苯砷 (PAO) 作为药物跨膜转运的胞吞抑制剂, TD-34 和胰岛素溶液在转运实验前现配, 首先将氧化苯砷溶于 DMSO 中, 待氧化苯砷完全溶解后加入到转运溶液中, 保证 DMSO 在配制好的转运介质中的浓度小于 0.5%。将细胞在含有氧化苯砷的空白接收介质中孵育 10 min, 用不含氧化苯砷的空白接收介质冲洗 3 次, 分别加入 5 μmol·mL<sup>-1</sup> TD-34 溶液、21 u·mL<sup>-1</sup> 胰岛素、25 μmol·L<sup>-1</sup> 氧化苯砷与 5 μmol·mL<sup>-1</sup> TD-34 的混合溶液和 25 μmol·L<sup>-1</sup> 氧化苯砷与 21 u·mL<sup>-1</sup> 胰岛素的混合溶液于细胞单层膜的 AP 侧和 BL 侧, 进行不同转运介质分别在 Caco-2 细胞两侧的转运实验。于不同时间点 (0.5、1、1.5 和 2 h) 取接收液 100 μL, 同时立即补充等体积预热的空白接收介质。HPLC 检测样品中 TD-34 和胰岛素的转运浓度。

**含量测定及数据处理** 高效液相色谱检测条件为: 色谱柱 Zorbax 300 SB-Aq (250 mm×4.6 mm, 5 μm)。胰岛素的流动相为水-乙腈 (68.5:31.5, v/v), 其中含 0.1% 三氟乙酸; TD-34 的流动相为: 水-乙腈 (10:90, v/v), 其中含 0.1% 三氟乙酸。进样量 20 μL, 流速: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 214 nm。胰岛素浓度 (C) 在 0.12~60 μmol·L<sup>-1</sup> 内与峰面积 (A) 线性范围良好 ( $R^2 > 0.999$ )。TD-34 浓度 (C) 在 17~532 μmol·L<sup>-1</sup> 内与峰面积 (A) 线性范围良好 ( $R^2 > 0.999$ )。

转运实验中胰岛素表观渗透系数  $P_{app}$  (cm·s<sup>-1</sup>) 计算方法如下:

$$P_{app} = \frac{dQ/dt}{C_0 \cdot A} \quad (1)$$

$dQ/dt$ : 渗透速率 (μmol·s<sup>-1</sup>); A: 细胞单层膜面积 (1.1 cm<sup>2</sup>);  $C_0$ : 胰岛素在供给侧初始浓度 (μmol·mL<sup>-1</sup>)。

**AFM 样品制备** 将 Caco-2 细胞以细胞数 2×10<sup>5</sup> 个/mL 接种在含有盖玻片的 6 孔板内。两天后, 用 PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min。分别用 1 mL 的 PBS、5 μmol·mL<sup>-1</sup> RR-7 和 5 μmol·mL<sup>-1</sup> TD-34 的 PBS 溶液培养 2 h。

**AFM 成像条件** Caco-2 细胞用 PBS 冲洗 2 次后, 将载有细胞样品的盖玻片固定在原子力显微镜的扫描台上, 监视器定位所要扫描的样品区域, 进行细胞膜表面的扫描成像。采用 25 μm 扫描器, Tap 300 Al 硅探针 (Budget Sensors), 力常数为 40 N·m<sup>-1</sup>, 在空气中以轻敲模式成像。使用 AFM 自带软件进行图像采集和实时分析。不同多肽处理后的细胞数表面粗糙度显著性差异实验用 Student's *t*-text 法进行检验。当

多肽处理组与空白对照组之间  $P < 0.05$  认为存在显著性差异,  $P < 0.01$  认为差异非常显著。

## 结果

### 1 TD-34 浓度的选择

MTT 法检测不同浓度 TD-34 对 Caco-2 细胞活性的影响。结果发现: 当 TD-34 浓度低于  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$  时, 细胞活性高于 95% (图 1), 说明 TD-34 在该浓度下不会对细胞产生明显的毒性; 当 TD-34 浓度高于  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$  时, TD-34 与 Caco-2 细胞共同孵育后, 细胞活性下降为初始值的 80.4%, 并且 TD-34 浓度越高, Caco-2 细胞的活性下降越快。为了防止因 TD-34 浓度变化导致的转运方式改变, 本研究选择了与前期在体研究<sup>[19]</sup>相同浓度的 TD-34 ( $5 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 进行实验。

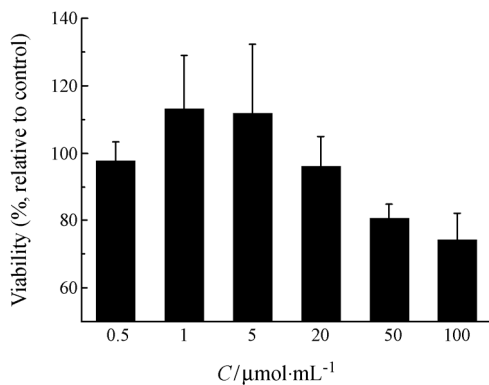


Figure 1 Viability of Caco-2 cells which were treated with TD-34 in different concentrations ( $n = 3$ )

### 2 TD-34 对胰岛素跨膜渗透性影响

比较 TD-34 对胰岛素跨 Caco-2 细胞单层膜转运过程表观渗透系数 ( $P_{\text{app}}$ ) 的影响。转运实验结果表明胰岛素在 Caco-2 细胞单层膜 (BL-AP) 中的  $P_{\text{app}}$  值为  $2.55 \times 10^{-7} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ 。当转运溶液中加入 TD-34 后, 胰岛素渗透速率提高约 2.5 倍,  $P_{\text{app}}$  值升高为  $6.90 \times 10^{-7} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$  (图 2), 说明 TD-34 对胰岛素在 Caco-2 细胞单层膜的转运具有一定的促进作用。

### 3 TD-34 和胰岛素跨膜转运方式

TD-34 和胰岛素跨 Caco-2 细胞单层膜 (AP-BL) 侧表观渗透速率分别为  $2.58 \times 10^{-6}$  和  $3.25 \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ 。采用  $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PAO 处理 Caco-2 细胞单层膜后, TD-34 和胰岛素在 Caco-2 细胞单层膜 (AP-BL) 侧的  $P_{\text{app}}$  值分别下降为初始值的 49% 和 39% (表 1)。该结果表明 TD-34 和胰岛素在 Caco-2 细胞单层膜 (AP-BL) 侧存在比较明显的胞吞转运的过程; 而在外排侧

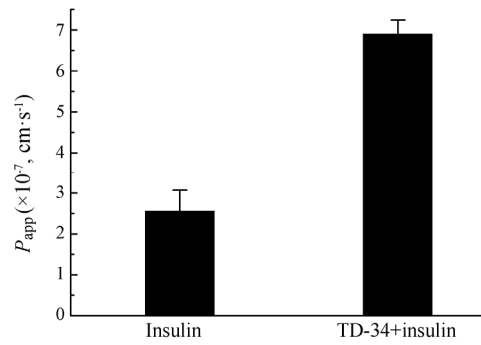


Figure 2 Influence on  $P_{\text{app}}$  value of insulin when Caco-2 cell monolayers (BL-AP) were treated with  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$  TD-34 ( $n = 3$ )

Table 1  $P_{\text{app}}$  of TD-34 or insulin in Caco-2 cell monolayers ( $n = 3$ ). (+) included; (-) not included. PAO: Phenylarsine oxide

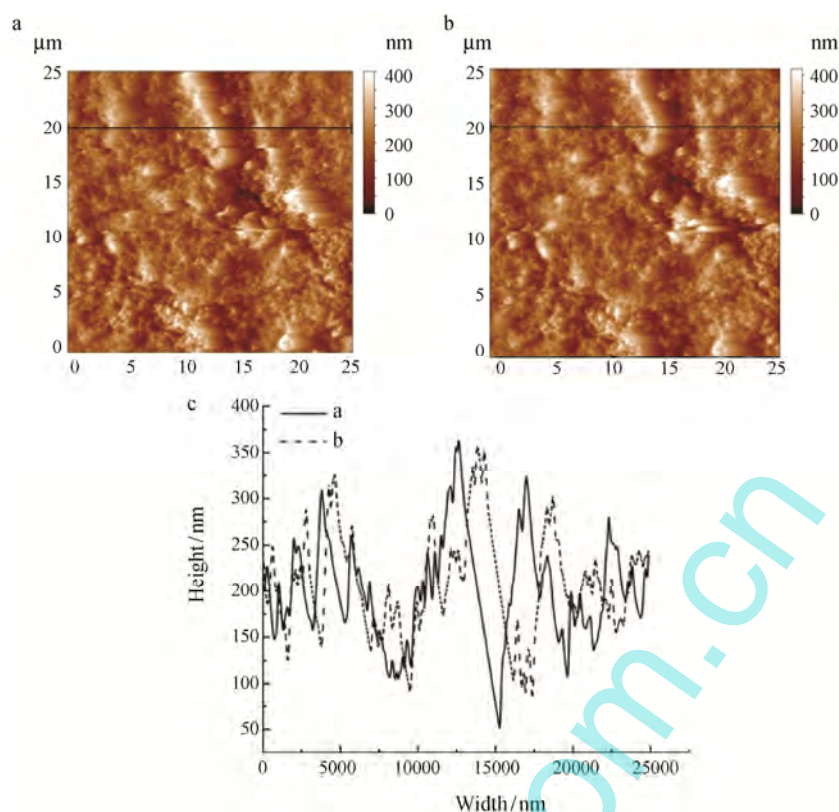
TD-34 ( $5 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Insulin ( $21 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	PAO ( $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$P_{\text{app}} (\times 10^{-6}, \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1})$	
			AP-BL	BL-AP
+	-	-	$2.58 \pm 0.18$	$1.60 \pm 0.17$
+	-	+	$1.27 \pm 0.12$	$0.73 \pm 0.08$
-	+	-	$3.25 \pm 0.23$	$0.27 \pm 0.06$
-	+	+	$1.10 \pm 0.03$	$0.25 \pm 0.09$

(BL-AP) 跨膜转运实验中, 加入 PAO 后, TD-34 跨 Caco-2 细胞单层膜的  $P_{\text{app}}$  值下降约 54%, 胰岛素的  $P_{\text{app}}$  值变化则不明显, 说明在 BL-AP 侧 TD-34 同样存在明显的胞吞过程, 但胞吞并不是胰岛素在 BL-AP 侧的主要跨膜转运途径。

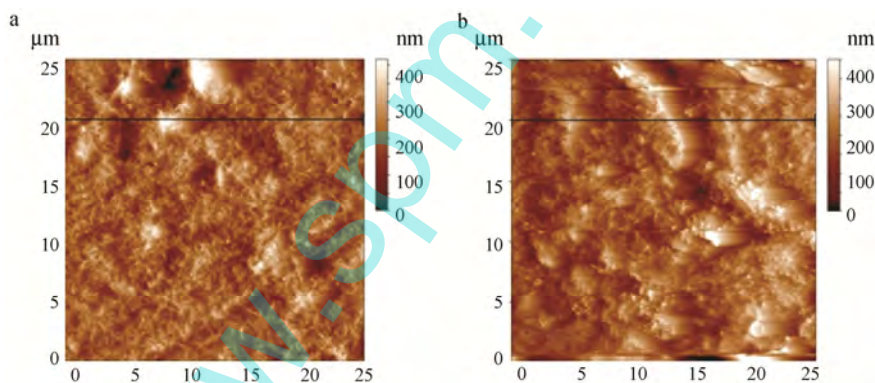
### 4 原子力显微镜对 Caco-2 细胞膜的观察

由于原子力显微镜是通过细胞爬片对细胞表面进行观察的, 因此可观察到 Caco-2 细胞单层膜表面 (AP) 侧的微观形貌。对同一细胞同一区域连续扫描两次, 可以观察到细胞表面的形貌成像重现性较好 (图 3a, 3b)。进一步对连续两次成像图的同一位置 ( $20 \mu\text{m}$  处) 进行高度分析, 发现细胞表面高度没有显著的变化 (图 3c)。因此采用轻敲模式在该条件下对同一细胞连续两次扫描, 可以较好的满足成像重现性要求。

进一步对不同细胞扫描后成像结果的可信性进行分析。从图中可以看出不同的细胞膜形态变化不大, 膜表面比较光滑 (图 4)。为了能够更清晰地观察不同细胞扫描后表面形态的差别, 对细胞表面高度分析发现细胞的高度变化范围具有一定的相似性, 两个细胞高度变化范围分别为  $75 \sim 400 \text{ nm}$  和  $40 \sim 375 \text{ nm}$ , 说明采用原子力显微镜在该条件下可以对细胞膜表面微观形态进行分析。



**Figure 3** Caco-2 cells membrane morphology in the same distribution using AFM. (a, b) Surface image of Caco-2 cells. (c) Height image of virtual line in a and b (20  $\mu\text{m}$ ). The height image of virtual line in the same distribution was similar



**Figure 4** Caco-2 cells membrane morphology in different cells using AFM. (a, b) Surface image of Caco-2 cells

### 5 原子力显微镜对多肽处理后 Caco-2 细胞膜的观察

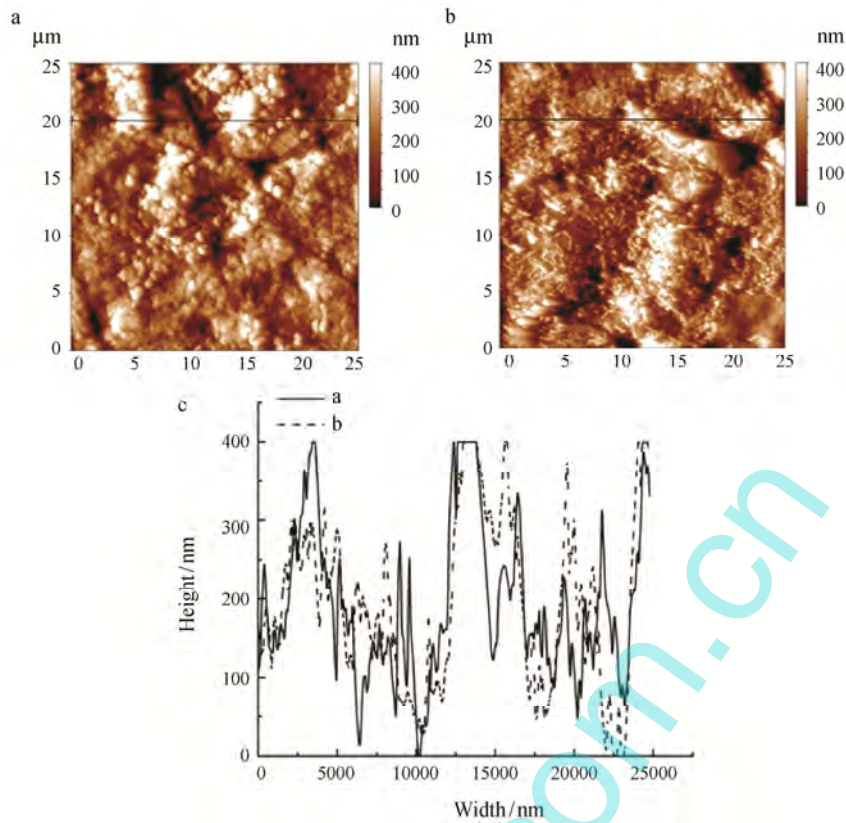
多聚精氨酸 RR-7 (RRRRRRR) 处理后的细胞膜表面原子力显微镜成像显示, 细胞表面平滑性变差, 突起变大 (图 5a)。对所选位置的高度分析发现, 与未处理细胞空白组比较, 细胞表面高度变化范围明显增加, 超出了 400 nm 色标的显示范围 (图 5c), 说明 RR-7 增加了细胞膜表面的粗糙程度。

观察阳离子环肽 TD-34 处理后 Caco-2 细胞膜的表面形态。结果发现, TD-34 处理后的 Caco-2 细胞膜表面同样呈现较大的突起, 细胞膜表面的平滑性变差 (图 5b)。高度曲线变化范围超出 400 nm 色标

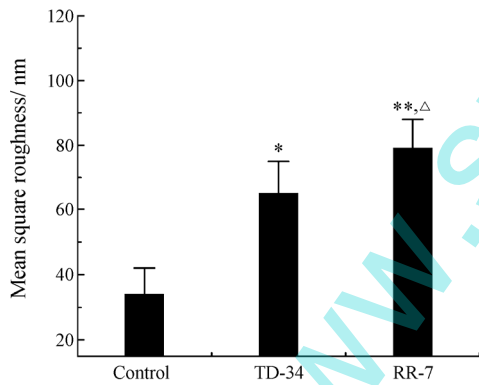
的显示范围 (图 5c)。说明 TD-34 作用于 Caco-2 细胞单层膜后, 膜表面突起增加, 细胞膜表面的粗糙程度变大。进一步通过软件分析定量比较不同穿膜肽处理后细胞膜表面的粗糙度变化发现, 与空白组相比, TD-34 和 RR-7 显著增加了细胞膜表面的粗糙度, 其中 RR-7 和 TD-34 分别使细胞膜表面的粗糙度增加约 132% 和 91% (图 6)。

### 讨论

在本研究条件下, Caco-2 细胞膜表面可以清晰成像, 并且具有较高的重现性, 说明应用原子力显微镜



**Figure 5** Membrane morphology of peptide treated Caco-2 cells using AFM. (a) Surface image of Caco-2 cells treated with RR-7. (b) Surface image of Caco-2 cells treated with TD-34. (c) Height image of virtual line in a and b (20 μm). The height image of virtual line in cells treated with peptide (RR-7 or TD-34) changed a lot compared with cells in Figure 3c. The surface of cells treated with peptide (RR-7 or TD-34) became rough



**Figure 6** The mean square roughness of Caco-2 cells which were treated with TD-34 and RR-7 respectively ( $n = 3$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control;  $\Delta P < 0.05$  vs TD-34

观察 Caco-2 细胞 (AP) 侧表面微观形貌可行。在跨膜转运实验中, Caco-2 细胞单层膜 BL 侧所含转运蛋白和酶系较少, 对 TD-34 和胰岛素跨膜转运影响较小。选择 Caco-2 细胞单层膜 BL-AP 侧进行 TD-34 对胰岛素的跨膜促渗实验发现, TD-34 对胰岛素跨膜转运具有较好的促渗效果。由于胞吞抑制剂氧化苯砷能在一定程度上抑制 TD-34 和胰岛素吸收侧 (AP-BL) 的跨膜转运, 说明 TD-34 和胰岛素存在内吞方式的跨膜

转运过程。以阳离子穿膜肽 RR-7 为对照, 通过原子力显微镜研究 TD-34 和 RR-7 对 Caco-2 细胞单层膜 (AP 侧) 作用的实验发现, 阳离子细胞穿膜肽 RR-7 和阳离子环肽 TD-34 都使得 Caco-2 细胞膜表面的平滑性变差, 细胞膜表面粗糙度显著增加。有文献<sup>[22]</sup>报道阳离子穿膜肽 RR-7 可以增加细胞膜的流动性, 属于以内吞途径跨细胞膜进行转运。因此, 与 RR-7 相似, TD-34 是通过改变了细胞膜磷脂双分子层的有序排列, 提高了细胞膜流动性, 促进了胰岛素胞吞方式的跨膜转运。

通过定量比较不同穿膜肽处理后 Caco-2 细胞的表面粗糙度, 发现 RR-7 处理后细胞膜表面粗糙度明显高于 TD-34 ( $P < 0.05$ ), 可能是由于 RR-7 所带正电荷数量更多, 因此与细胞膜作用更强所致<sup>[23]</sup>。如果细胞穿透肽中正电荷数量较多, 与细胞膜间强烈的相互作用可以引起细胞膜的屏障功能明显下降, 甚至导致细胞膜完整性受到非可逆性损伤。而作为一种安全有效的细胞穿透肽 (药物跨膜转运促渗剂), 其对细胞膜的作用强度应有合理的限度。通过 MTT 实验发现, 当 TD-34 在浓度低于  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$  时, 对细胞不会产生明显毒性的同时表现出较好的跨膜促渗能

力 (图 1), 说明  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$  TD-34 对细胞膜作用适度, 对 Caco-2 细胞的毒性较低, 可作为一种潜在的理想的亲水性大分子药物跨膜渗透促渗剂。

综上所述, 对多肽处理后细胞表面微观形态的研究有助于深入了解细胞膜形态变化对胰岛素跨膜转运的影响。通过原子力显微镜对阳离子多肽处理后细胞膜表面形态成像, 可以清晰地观察到阳离子多肽增加了细胞膜表面的粗糙程度。推测阳离子环肽通过增加 Caco-2 细胞膜表面的粗糙度, 提高了细胞膜磷脂双分子层的流动性, 从而提高了 Caco-2 细胞的内吞作用, 在一定程度上促进了内吞方式的胰岛素跨细胞膜转运过程。

## References

- [1] Hsu T, Mitragotri S. Delivery of siRNA and other macromolecules into skin and cells using a peptide enhancer [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108: 15816-15821.
- [2] Pralle A, Keller P, Florin EL, et al. Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells [J]. J Cell Biol, 2000, 148: 997-1008.
- [3] Dietrich C, Yang B, Fujiwara T, et al. Relationship of lipid rafts to transient confinement zones detected by single particle tracking [J]. Biophys J, 2002, 82: 274-284.
- [4] Lenne PF, Wawrezynieck L, Conchonaud F, et al. Dynamic molecular confinement in the plasma membrane by microdomains and the cytoskeleton meshwork [J]. EMBO J, 2006, 25: 3245-3256.
- [5] Xia ZN, Li LX, Yang J, et al. Investigation of interaction between the drug and cell membrane by capillary electrophoresis [J]. Sci Chin Ser B: Chem (中国科学 B 辑: 化学), 2009, 52: 2200-2204.
- [6] Cheng Y, Li Y, Li RC, et al. Studies of Ce intake and erythrocyte membrane permeability in  $\text{CeCl}_3$  gavaged rats [J]. Nat Sci Dev (自然科学进展), 1999, 9: 512-518.
- [7] Lesniewska E, Milhiet PE, Giocondi MC, et al. Atomic force microscope imaging of cells and membranes [J]. Meth Cell Biol, 2002, 68: 51-65.
- [8] Qi H, Liu Y, Zhuang YN, et al. The research on best imaging condition of the AFM on cells [J]. Acta Photo Sin (光子学报), 2007, 36: 138-143.
- [9] Sun QM, Chen L, Chen PP, et al. Application of magnetic AC mode AFM on *in situ* imaging of living cells [J]. J Chin Electr Microsc (电子显微学报), 2008, 27: 311-315.
- [10] Espenel C, Giocondi MC, Seantier B, et al. Temperature-dependent imaging of living cells by AFM [J]. Ultramicroscopy, 2008, 108: 1174-1180.
- [11] Schneider SW, Sritharan KC, Geibel JP, et al. Surface dynamics in living acinar cells imaged by atomic force microscopy: identification of plasma membrane structures involved in exocytosis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 316-321.
- [12] Park K, Mao FW, Park H. Morphological characterization of surface-induced platelet activation [J]. Biomaterials, 1990, 11: 24-31.
- [13] Kawaura C, Noguchi A, Furuno T, et al. Atomic force microscopy for studying gene transfection mediated by cationic liposomes with a cationic cholesterol derivative [J]. FEBS Lett, 1998, 421: 69-72.
- [14] Li CC, Zhang ZH, Zhang YL, et al. *In situ* rat intestine absorption of paclitaxel-loaded solid lipid nanoparticles modified with cell-penetrating peptides [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2013, 48: 131-137.
- [15] Liu XL, Zhang WJ, Wei G, et al. Poly (arginine) 8 enhanced intestinal absorption of insulin-loaded nanoparticles [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2012, 47: 512-516.
- [16] Yang PH, Xu H, Zhang QH, et al. Pharmacokinetics of a fusion protein for human acidic fibroblast growth factor and transcriptional activator protein in rat and its penetration across blood-brain barrier [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2011, 46: 1204-1208.
- [17] Chen W, Jin MJ, Gao ZG, et al. Preparation and *in vitro* evaluation of pH-sensitive TAT peptide conjugated micelles [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2011, 46: 599-604.
- [18] Joanne P, Galanth C, Goasdoué N, et al. Lipid reorganization induced by membrane-active peptides probed using differential scanning calorimetry [J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1788: 1772-1781.
- [19] Chang MM, Li XH, Sun YM, et al. Effect of cationic cyclopeptides on transdermal and transmembrane delivery of insulin [J]. Mol Pharm, 2013, 10: 951-957.
- [20] Chen YP, Shen YY, Guo X, et al. Transdermal protein delivery by a coadministered peptide identified *via* phage display [J]. Nat Biotech, 2006, 24: 455-460.
- [21] Zhuang YN, Qi H, Sun RG, et al. Real time observation on cells in different fixed conditions and living cells in buffer solution by AFM [J]. Acta Biophys Sin (生物物理学报), 2005, 21: 345-350.
- [22] Zhang LX, Zhang SX. Mechanism of cell-penetrating peptides-mediated internalization and its application [J]. Chin J Biochem Mol Biol (中国生物化学与分子生物学报), 2008, 24: 1092-1096.
- [23] Zhao J, Xiao W, Fu WB, et al. Prokaryotic expression and biological activity of poly-arg protein transduction domain-apoptin fusion protein [J]. Chin J Biol (中国生物制品学杂志), 2009, 22: 448-451.