

利用原位 X 射线散射研究神经酰胺 E 与海藻糖的相互作用

王寅宁 赵佰金 李良彬*

(中国科学技术大学国家同步辐射实验室 核科学与技术学院 合肥 230029)

摘 要 海藻糖和神经酰胺在皮肤保湿中具有重要作用。利用原位 X 射线散射设备研究了在干燥和升降温过程中海藻糖与神经酰胺之间的分子相互作用。结果表明,在海藻糖的存在下,神经酰胺 E 与细胞膜脂分子一样难以失水而延缓了结晶过程。反之,神经酰胺也抑制了海藻糖在干燥过程中结晶,从而延缓了水分挥发。此外,在海藻糖的存在下,冷冻干燥的神经酰胺乳液样品加热至 105 °C 再降至室温,形成了皮肤中广泛存在的正交晶相和液晶相共存的结构,很好地模拟了皮肤细胞间脂层的相结构。发现海藻糖代替了角质层中的其它成分,保护神经酰胺分子以真实皮肤中的方式排列。

关键词 海藻糖 神经酰胺 X 射线散射 皮肤

中图分类号: O648.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-0518(2010)10-1149-07

DOI: 10.3724/SP.J.1095.2010.90878

神经酰胺是人体皮肤最外层角质层的重要成分,保护皮肤免受外部侵害。正常皮肤的角质层包括角化细胞和细胞间脂层。前者是皮肤的物理屏障,而后者是皮肤的渗透屏障^[1]。细胞间脂层的主要成分有^[2-3]神经酰胺(45%~50%)、胆固醇(20%~25%)和脂肪酸(10%~15%)。其中神经酰胺还包含众多亚类,如人体中就含有 9 种不同亚类^[4-5],在维持角质层的渗透平衡中尤其重要。此外,脂分子的组织方式对于皮肤的渗透障碍同样具有重要作用。

采用 X 射线衍射^[6-7]和电子衍射^[8]对皮肤角质层进行检测表明,皮肤中基本存在 3 种晶型:液晶、六方晶和正交晶。正交晶型的存在说明在角质层中脂分子以非常紧密的方式排列,保证了皮肤的屏障作用。而液晶相的存在保证了皮肤具有足够的柔韧性。

随着季节变化或者年龄的增加,人类角质层中的神经酰胺种类发生改变,脂总量减少^[9],随着神经酰胺流失,皮肤失水干燥,出现干裂和皱纹等现象。因此,需要从优质化妆品中补充神经酰胺。

海藻糖具有显著的保湿作用,它是由 2 个葡萄糖通过 α 糖苷键连接形成的天然二糖分子。它在有机体脱水生活(在极端条件下动植物仍能维持较长时间存活的状态)中起着重要的作用^[10-12]。海藻糖对有机体保护的机理主要有以下 3 种假说:1)“水代替”假说,认为一些亲水性分子代替水分子通过氢键与大分子相互作用而起到保护作用^[13];2)“锁水”假说,认为海藻糖的存在可以聚集并把关键水分子锁在脂分子周围,从而保护膜结构的完整性^[14];3)“玻璃态”假说,认为在脱水的情况下细胞内积累的非还原性糖类形成一种玻璃态,从而固定细胞膜及大分子物质免受损伤^[15]。

目前海藻糖已广泛应用于生物、医药和食品等各个领域^[16-18]。此外,还作为优良的保湿成分用于优质化妆品中。海藻糖作为化妆品的成分之一,与之作用的物质主要是神经酰胺,阐明二者之间的作用机理以及它与磷脂间相互作用的分子机理对制备会有这二者的化妆品及其与皮肤的作用具有指导意义。

X 射线衍射(XRD)可以直接解读分子的排列方式,常被用来研究脂分子的组织。但绝大多数的研究均集中在对细胞膜脂分子的研究上。Bouwstra 等^[19-20]用 XRD 研究了角质层的结构及其在皮肤渗透中的影响。从中了解到单纯的神经酰胺并不能排列成人体皮肤中的形式,而必须有胆固醇和脂肪酸的协同作用。本文发现海藻糖代替了角质层中的其它成分,使神经酰胺分子以其正常的方式排列,保护了

2009-12-25 收稿,2010-03-05 修回

通讯联系人:李良彬,男,博士,研究员;E-mail: lbli@ustc.edu.cn;研究方向:软物质物理

皮肤正常的渗透功能。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

合成海藻糖(上海生物技术公司),98%;合成神经酰胺 E(南京斯达科生物技术公司),98%;SCIENTZ-II D型超声波细胞粉碎机;X射线装置(自制):在 40 kV 45 mA 条件下激发 Cu 靶产生 $K\alpha$ 射线($\lambda=0.154$ nm,使用单色器)作为 X 射线源,散射光使用位置敏感的 PSD-50M 线性探测器(德国 MBraun 公司)收集。

1.2 样品制备

将神经酰胺加热溶解在酒精中,旋转蒸干后再加入不同浓度的海藻糖溶液配置成 6% 神经酰胺溶液,加热搅拌 2 h 后用超声波细胞粉碎机进行探头超声,功率 40 W,每 10 s 超声 2 s,共超声 30 min。得到不同摩尔比神经酰胺水乳液样品。另外制备一份经过冷冻干燥后得到粉末样品。

1.3 原位干燥

所有实验在室内 X 射线装置上进行,样品距离探测器 190 cm,测量角度 2θ 为 $1^\circ \sim 20^\circ$ 。由于样品均匀不存在取向,为了可以同时得到更大角度的信息,调整样品台与探测器位置,使探测器最终只检测 $1/2$ 的散射信息。将不同比例海藻糖乳和神经酰胺 E 水乳液样品放入样品池内,在饱和氯化锂溶液蒸汽压(13% RH)中干燥,并原位进行 XRD 检测,每幅图曝光 15 min。

1.4 原位升降温

将冷冻干燥粉末,放入样品池子内,以 0.4 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速率由 25 $^\circ\text{C}$ 升温至 105 $^\circ\text{C}$ 再降回 25 $^\circ\text{C}$,进行 XRD 升降温过程原位检测,每幅图曝光时间 5 min。

自制的 XRD 样品池:1 mm 厚的全氟材料制成 U 形池,kapton 膜做窗口(X 射线透明),进行升降温部分的实验。全氟膜本身有 2 个衍射峰(分别在 0.52 和 0.60 nm^{-1})作为背景峰扣除,不影响数据分析。

1.5 干燥动力学

不同比例乳液在氯化锂饱和蒸汽压中干燥,每 1 h 取出称重,获得干燥过程中质量随时间的变化曲线。

2 结果与讨论

2.1 海藻糖与神经酰胺 E 样品干燥过程中的原位 X 射线散射

原料海藻糖是二水合海藻糖^[21],纯神经酰胺 E 乳液干燥样品与文献中报道的天然神经酰胺 NP 和 AS 具有相似 XRD 图^[22]。图 1 和图 2 分别为海藻糖和纯神经酰胺乳液的二维衍射图和各比例样品干燥过程的一维衍射图。从图中可以看到,各比例神经酰胺乳液随干燥过程在小角 $q=1.34$ nm^{-1} 和宽角 q 为 14.11 、 14.44 和 15.80 nm^{-1} 处逐渐出现了神经酰胺 E 的结晶峰,对应于实空间中神经酰胺 E 的晶面间距分别为 4.69 、 0.435 、 0.445 和 0.400 nm,且结晶度不断增加。其中 4.69 nm 为神经酰胺形成的脂层

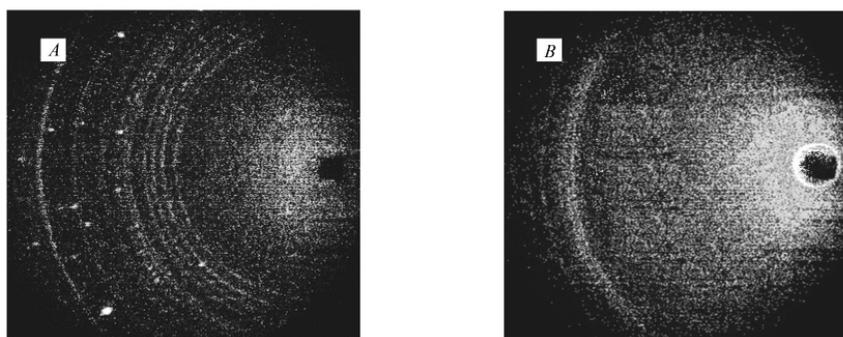


图 1 海藻糖(A)及纯神经酰胺(B)二维衍射图

Fig. 1 2-D X-ray diffractions of trehalose crystal(A) and pure ceramide(B)

间距 ρ . 435、0. 445 和 0. 400 nm 为神经酰胺分子链间的晶面间距。糖过量(图 2d) 样品在干燥最后海藻糖出现结晶, 但与已知海藻糖晶体衍射图^[19]均不一样, 是一种新的海藻糖晶体结构。

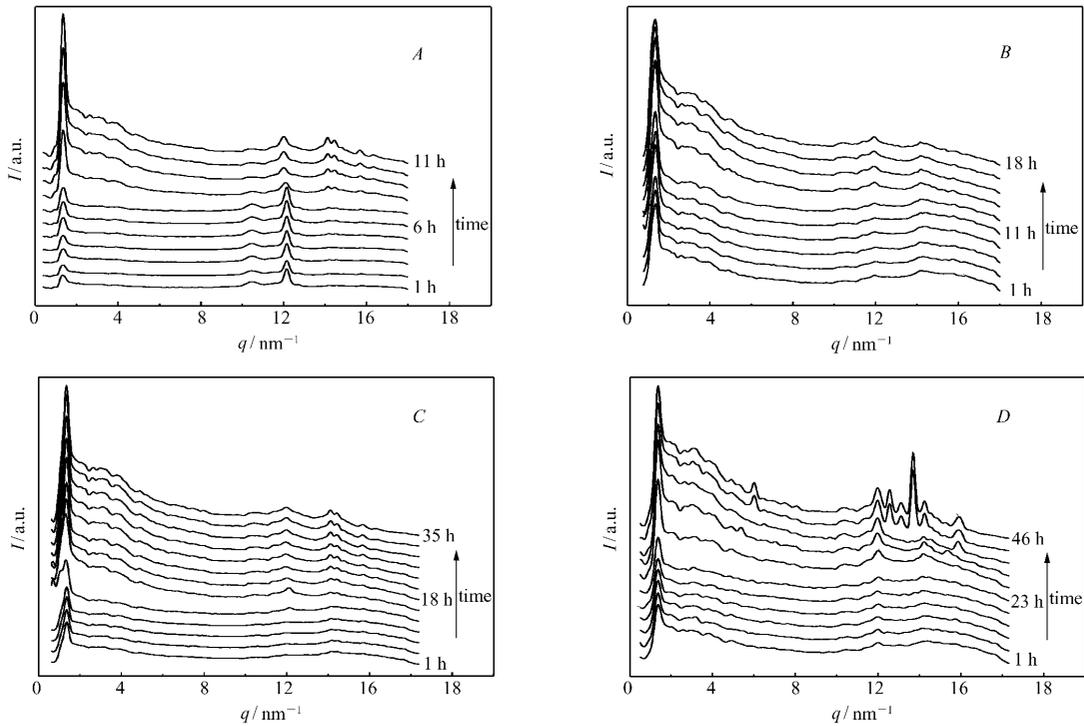


图 2 不同比例海藻糖和神经酰胺乳液干燥过程一维衍射图

Fig. 2 1-D SAXD/WAXD curves of emulsion samples with different molar ratios of ceramide to trehalose during drying
 $n(\text{TRE}) : n(\text{CER}) : A. 0:1; B. 1:1; C. 5:1; D. 10:1$

不同比例样品小角处结晶情况如图 3 所示。从图 3 可见, 纯神经酰胺乳液干燥后脂层间距从 4. 7 nm 减小至 4. 6 nm; 而含有海藻糖的样品干燥后脂层间距与纯神经酰胺最终干燥层间距基本一致 (4. 6 nm)。说明在海藻糖的存在下, 神经酰胺分子层间排列更紧密。海藻糖在干燥前填充在各脂层之间, 与神经酰胺相互作用, 取代了水的作用, 从而抑制了结晶。这与在海藻糖与磷脂体系中得到的随海藻糖含量增加, 脂分子层间距略有增加的结果不同。这是因为神经酰胺具有更小的头部和更弥散的亲水基团, 导致与其相互作用的海藻糖不能很好的困在脂分子层间。

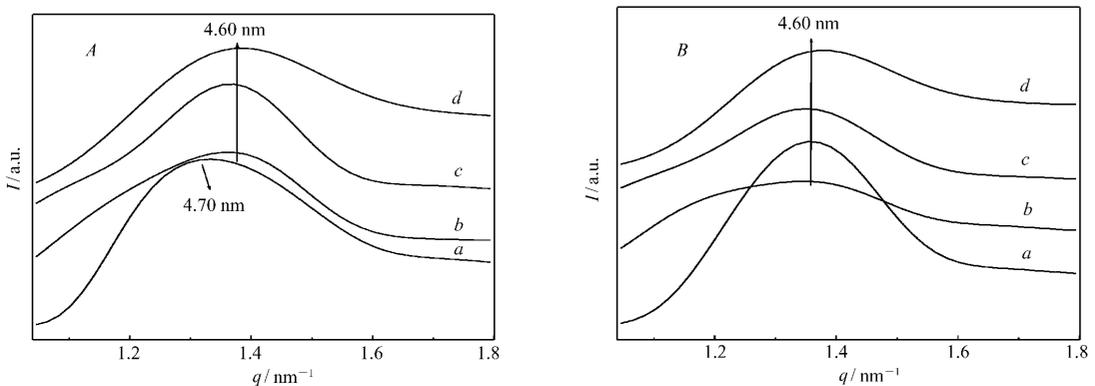


图 3 各比例乳液样品干燥前(A)、后(B)一维小角衍射图

Fig. 3 1-D SAXD curves of emulsion samples with different molar ratios of trehalose to ceramide before(A) and after(B) drying
 $n(\text{TRE}) : n(\text{CER}) : a. 0:1; b. 1:1; c. 5:1; d. 10:1$

通过对干燥过程质量变化的监测, 比较干燥过程中含水量变化和神经酰胺结晶度变化(图 4)。从

图 4 可以看到,海藻糖与神经酰胺不同摩尔比的样品在干燥过程中的最初几个小时中结晶度保持不变,失水速率分别为平均每个神经酰胺分子对应失去 95、38、15、7.5 个水分子/h,之后结晶度均出现突然增加的现象,突变时间分别为 4、9、12、28 h,即随着海藻糖含量的增加而移后,说明海藻糖的存在抑制了神经酰胺的结晶。

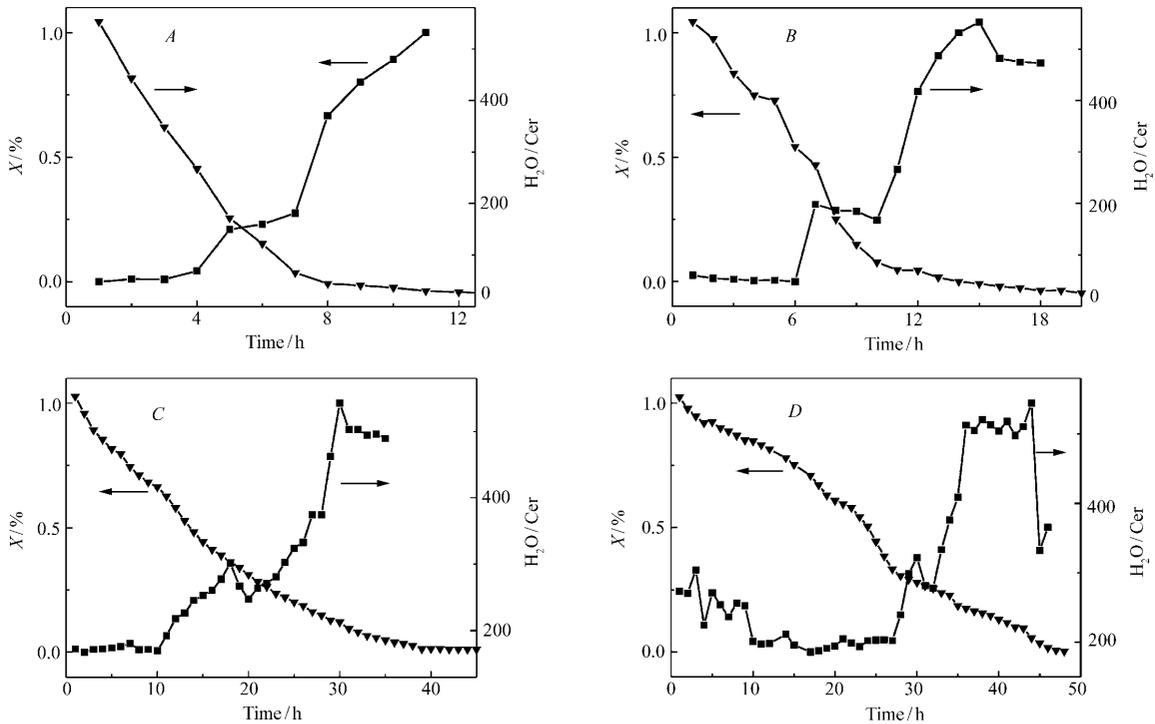


图 4 各比例海藻糖和神经酰胺乳液样品干燥过程中相对结晶度 X (%) 和水含量的变化
 Fig. 4 Variation of relative crystallinity X of ceramide along with water content during drying of emulsion samples with different molar ratios of trehalose/ceramide
 $n(\text{TRE}) : n(\text{CER}) : A. 0:1; B. 1:1; C. 5:1; D. 10:1$

其中 $n(\text{海藻糖}) : n(\text{神经酰胺}) = 10:1$ 的样品结晶度与水含量先是缓慢下降,以后水含量下降速率加大,而神经酰胺结晶度则保持不变,当神经酰胺在干燥 28 h 后结晶快速增加时,水含量降低速率减缓,结晶度在增加至最大并保持一段时间后骤减,它对应于其中出现海藻糖结晶(图 5),而此时失水速率基本不变。可能是神经酰胺结晶后,分子排列更紧密失水速率减慢。而最后神经酰胺结晶度的下降,对应于海藻糖结晶的形成,破坏了神经酰胺层间结晶。其余比例的样品整个干燥过程中失水速率基本

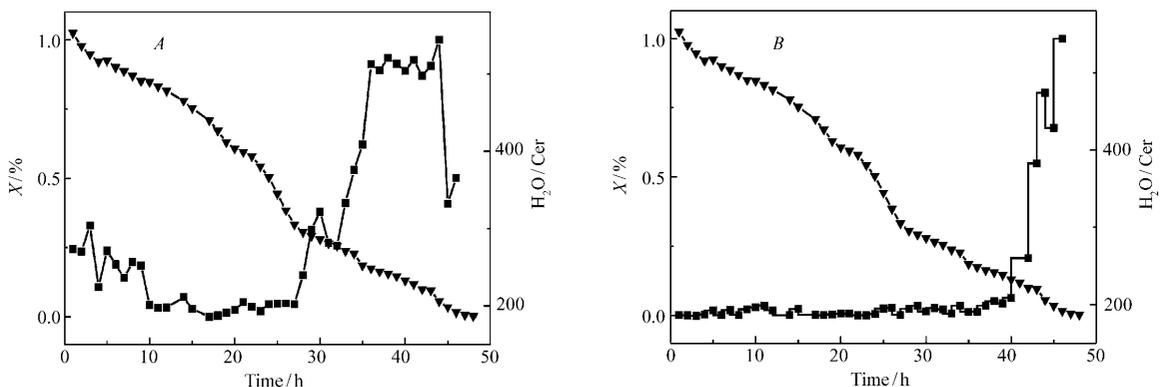


图 5 $n(\text{海藻糖}) : n(\text{神经酰胺})$ 为 10:1 的样品在干燥过程中相对结晶度 X (%) 及对应的水含量的变化
 Fig. 5 Variation of the relative crystallinity X of ceramide(A) and trehalose(B) along with water content at $n(\text{TRE}) : n(\text{CER})$ being 10:1 during drying

不变, 在神经酰胺结晶出现突变后失水减慢。

2.2 海藻糖与神经酰胺 E 的混合样品升降温过程的原位 X 射线散射检测

干燥前各个比例混合物的样品经过冷冻干燥后的原位升降温结果如图 6 所示。升温 and 降温过程中混合物存在 3 种晶型: 1) 加热前与纯天然神经酰胺的 XRD 图类似; 2) 加热至 90 °C 形成液晶相(在 0.49 nm 处峰), 它广泛存在于哺乳动物皮肤的角质层中, 分子排列较为疏松, 渗透性最强; 3) 降温形成的正交晶型(图 7), 以位于 0.45 与 0.39 nm⁻¹ 处的 2 个峰为代表。它是人类皮肤角质层细胞间脂中的神经酰胺形成的唯一的结晶相, 是保护人体皮肤渗透障碍的重要支持相。小角处的神经酰胺层间距变化如图 8 所示。从图 8 可见, 不含海藻糖的神经酰胺升温后, 排列由原来的 4.65 nm 变为 4.98 nm 稍有疏松。而含有海藻糖的样品由加热前的 4.65 nm 变为冷却后的 5.31 nm。这很有可能与分子链间排列

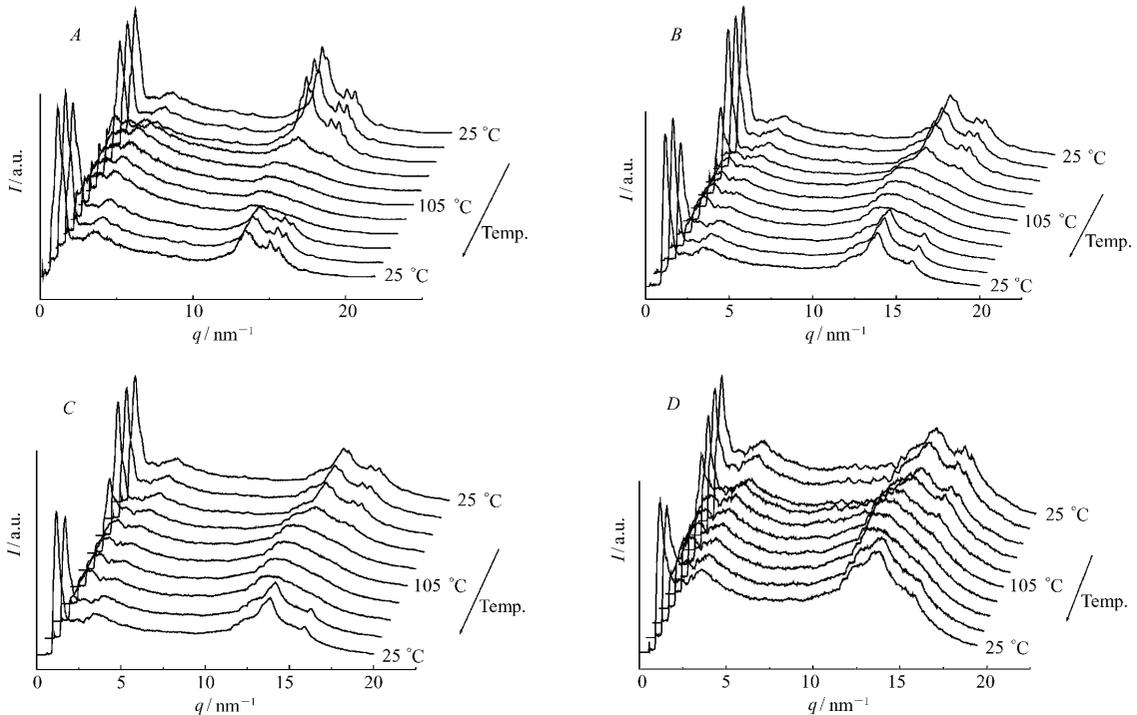


图 6 不同比例海藻糖和神经酰胺冷冻干燥样品升降温过程一维衍射图

Fig. 6 1-D SAXD/WAXD curves of freeze dried samples with different molar ratio of trehalose to ceramide during heating and cooling
n(TRE) : n(CER) : A. 0:1; B. 1:1; C. 2.5:1; D. 5:1

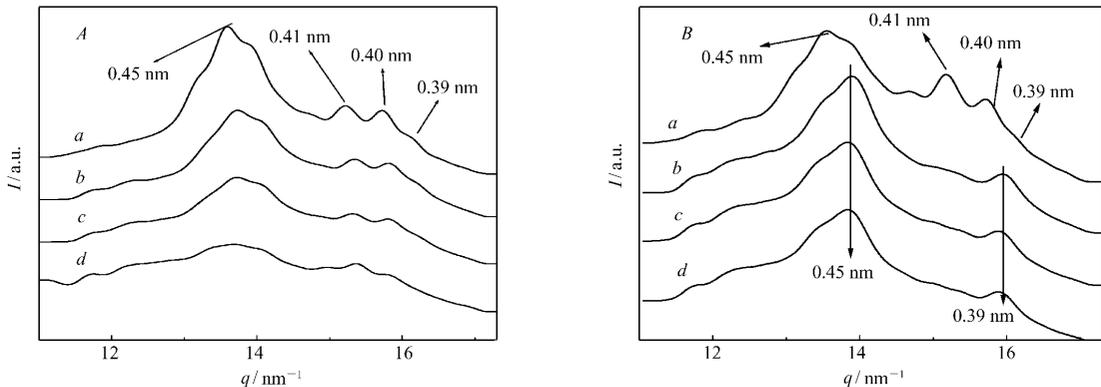


图 7 各比例冷冻干燥样品加热前(A) 和后(B) 一维宽角衍射图

Fig. 7 1-D WAXD curves of freeze dried samples with different molar ratio of trehalose to ceramide before(A) and after(B) heating
n(TRE) : n(CER) : a. 0:1; b. 1:1; c. 2.5:1; d. 5:1

晶型变化有关。

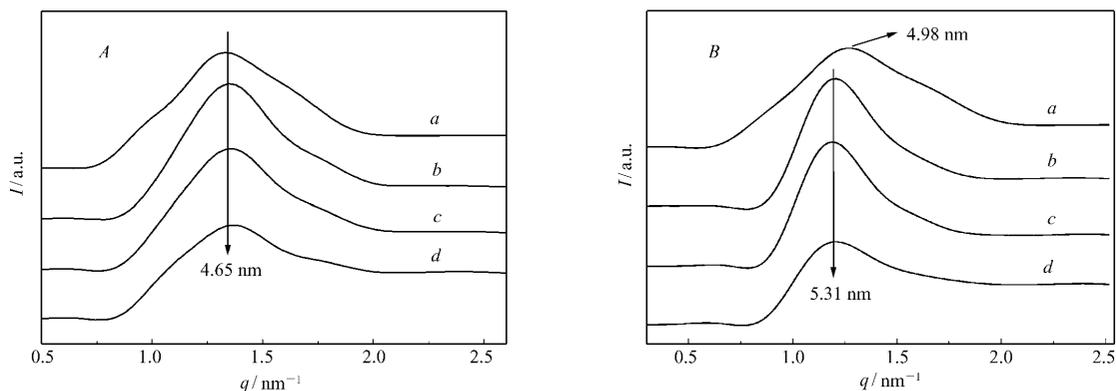


图 8 各比例冷冻干燥样品加热前 (A) 和后 (B) 一维小角衍射图

Fig. 8 1-D SAXD curves of freeze dried samples with different molar ratio of trehalose to ceramide before (A) and after (B) heating
 $n(\text{TRE}) : n(\text{CER}) : a. 0:1; b. 1:1; c. 2.5:1; d. 5:1$

由图 6 不难看出,降温后形成了液晶与正交晶共存结构。这正是人体皮肤中神经酰胺排列的方式。因此可以认为,经过加热,在海藻糖的作用下,神经酰胺按照正常人体角质层细胞间脂层的结构组织。众所周知,单纯的神经酰胺并不能排列成人体皮肤中的形式,必须有胆固醇和脂肪酸的协同作用。海藻糖是否代替了角质层中的其它成分,起着稳定作用。

图 9 比较了各个比例样品在升降温过程中神经酰胺分子结晶度的变化。从图 9 可以看出,含有海藻糖的样品熔点略有增加,均在 86 °C 附近,而纯神经酰胺熔点为 83 °C。此外,含有海藻糖的样品在降温 45 °C 后均回到与初始状态相似的结晶状态,而纯神经酰胺降温后层间结晶显著增加。这也表明海藻糖阻碍了神经酰胺的结晶。

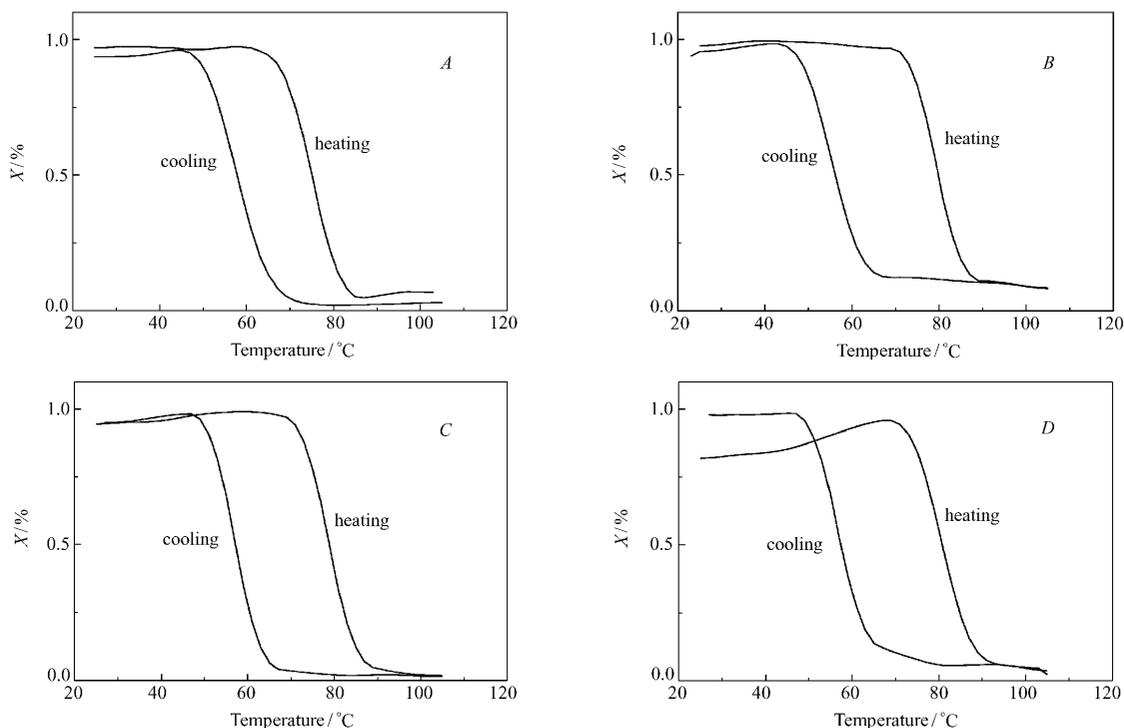


图 9 不同比例样品升降温过程相对结晶度 $X(\%)$ 的变化

Fig. 9 Variation of relative crystallinity $X(\%)$ during heating and cooling course
 $n(\text{TRE}) : n(\text{CER}) : A. 0:1; B. 1:1; C. 2.5:1; D. 5:1$

参 考 文 献

- 1 Bonté F ,Saunois A ,Pinguet P ,Meybeck A. *Arch Dermatol Res* [J] ,1997 **289**: 78
- 2 Wertz P W ,Downing D T. *Physiology , Biochemistry and Molecular Biology of the Skin* [M] 2nd ed. New York: Oxford Univ Press ,1991: 205
- 3 MA Hui-Jun(马慧军) ZHAO Guang(赵广) . *Chinese J Aesthetic Med*(中国美容医学) [J] 2007 **1**: 131
- 4 Stewart M E ,Downing D T. *J Lipid Res* [J] ,1999 **40**: 1434
- 5 Ponc M ,Weerheim A ,Lankhorst P ,Wertz P W. *J Invest Dermatol* [J] 2003 **120**: 581
- 6 Bouwstra J A ,Gooris G S ,Salomons-de Vries M A ,van der Spek J A ,Bras W. *Int J Pharm* [J] ,1992 **84**: 205
- 7 Bouwstra J A ,Gooris G S ,Salomons-de Vries M A ,Bras W. *Int J Pharm* [J] ,1992 **79**: 141
- 8 Pilgram G S K ,Engelsma-van Pelt A M ,Bouwstra J A ,Koerten H K. *J Invest Dermatol* [J] ,1999 **133**: 403
- 9 Rogers J ,Harding C ,Mayo A ,Banks J ,Rawlings A. *Arch Dermatol Res* [J] ,1996 **288**: 765
- 10 Crowe J H ,Crowe L M ,Chapman D. *Science* [J] ,1984 **223**: 701
- 11 Crowe J ,Hoekstra F ,Nguyen K ,Crowe L. *Biochim Biophys Acta* [J] ,1996 **1280**: 187
- 12 Crowe J H ,Crowe L M ,Carpenter J F ,Aurell Wistrom C. *Biochem J* [J] ,1987 **242**: 1
- 13 Crowe J H ,Hoekstra F A ,Crowe L M. *Annu Rev Physiol* [J] ,1992 **54**: 570
- 14 Belton P S ,Gil A M. *Biopolymers* [J] ,1994 **34**: 957
- 15 Crowe L M. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* [J] 2002 **131**: 505
- 16 Illouz S ,Nakamura T ,Webb M ,Thava B ,Bikchandani J ,Robertson G ,Lloyd D ,Berry D ,Wada H ,Dennison A. *Transplant Proc* [J] 2008 **40**: 1706
- 17 Matsuo T ,Tsuchida Y ,Morimoto N. *Ophthalmology* [J] 2002 **109**: 2024
- 18 SHI Chuan(石钊) ,HAN Jun-Ling(韩俊领) . *Med Recapit*(医学综述) [J] 2008 **19**: 2908
- 19 Bouwstra J A ,Dubbelaar F E R ,Gooris G S ,Weerheim A M ,Ponc M. *Biochim Biophys Acta* [J] ,1999 **1419**: 127
- 20 Bouwstra J A ,Gooris G S ,Dubbelaar F E R ,Ponc M. *J Lipid Res* [J] ,1999 **40**: 2303
- 21 Kishi A ,Toraya H. *Adv X-ray Anal* [J] 2004 **47**: 240
- 22 Tae Hwa Jeong ,Seong-Geun Oh. *Bull Korean Chem Soc* [J] 2007 **28**: 1021

Interaction between Trehalose and Ceramide Studied by *in-situ* X-ray Scattering

WANG Yin-Ning , ZHAO Bai-Jin , LI Liang-Bin *

(National Synchrotron Radiation Laboratory and College of Nuclear Science and Technology ,
University of Science and Technology of China , Hefei 230029)

Abstract Trehalose and ceramide both play important roles in retaining skin water. With an X-ray scattering instrument , we studied the interaction between ceramide E and trehalose systematically in the course of drying and heating-cooling scan. It was found that ceramide E , similar to lipids in membrane , was difficult to crystallize in the presence of trehalose. Similarly , ceramide also suppresses the crystallization of trehalose during drying and therefore prevents water loose. Furthermore , after cooling from 105 °C to room temperature with the presence of trehalose , the freeze-dried ceramide formed a structure similar to that of stratum corneum in human skin in which both liquid and orthorhombic crystal exist. It is the first time to be found that trehalose , in stead of other components in skin , help ceramide to be organized by the form in the real human skin.

Keywords trehalose , ceramide , X-ray diffraction , skin