

生 物 膜 的 流 动 性

杨 福 愉

(中国科学院生物物理研究所)

生物膜分子结构的模型目前比较流行的仍然是美国 Singer 与 Nicolson 1972 年所提出的“流体镶嵌”模型(图 1)。这个模型认为,生物

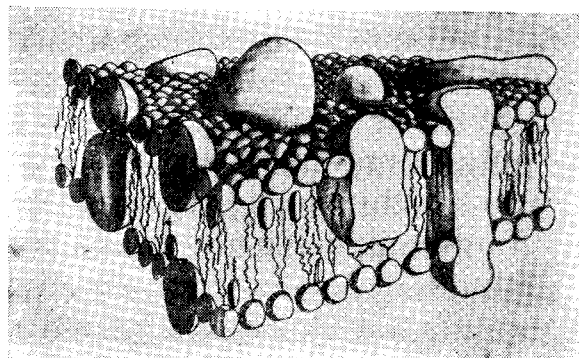


图 1 “流体镶嵌”模型

[自: The Molecular Biology of Plant Cells. (Eds. Smith, H.) p 42]

膜是由脂质和蛋白质分子按二维排列构成的流态。它一是突出了膜的流动性,流态的脂质双分子层组成膜的连续体,二是显示了膜蛋白分布的不对称性。有的分布在双分子脂质层两侧表面,有的部分或全部嵌入其内部,有的则横跨膜层。多年来,由于实验技术的创新与改进,对生物膜组份的动态结构继续作了大量的研究,进一步支持了“流体镶嵌”模型。与此同时,也发现膜的各部分的流动性是不均匀的,这就加深了对生物膜复杂结构的认识,修正并发展了“流体镶嵌”模型。

什么叫膜的流动性 (Fluidity)? 原初这主要是指膜脂脂肪酸链部分的运动状态。在正常生理条件下,它们大多呈液晶态,不断处于热运动之中。当温度降低至某一点时,它们可以从

流动的液晶态转为晶态(或称凝胶态),晶态也可以“熔解”为液晶态。这个温度称之为膜的相变温度。每种膜脂由于其组分不同而有其各自的相变温度。除膜脂外,大部分膜蛋白也不断处于运动状态,称为运动性 (Mobility)。因此,膜的动态结构的含义既包括膜脂的流动性,也包括膜蛋白等组分的运动状态。“流动性”与“运动性”两个名词应用时往往并不太严格。也可以说,广义的“膜的流动性”既包括膜脂也包括膜蛋白的运动状态。

大量的研究表明,生物膜的各种重要功能(能量转换,物质运送,信息传递等)都与膜的流动性密切相关。合适程度的流动性对膜功能的正常表现是一个极为重要的条件。因此膜流动性的问题日益引起人们广泛的兴趣与注意,从而成为膜生物学主要研究课题之一。

一、膜脂的流动性

通过差示扫描量热术 (Differential scanning calorimetry, DSC), 电子顺磁共振, X 线衍射, 电镜冰冻蚀刻, 核磁共振, 荧光探针等技术和方法的应用, 对于膜脂的流动性有了进一步的认识。研究的结果表明, 在相变温度以上的条件下, 膜脂的运动可归纳为下列五种方式^[1-2]:

1. 膜脂脂肪酸链的全反式 (All Trans) 构型——Gauche 构型的旋转异构运动 这种旋转异构运动的速度很快, 其跳动频率为 10^9 — 10^{10} /秒。Gauche 构型增多, 流动性加大。

2. 膜脂脂肪酸链沿双分子层平面相垂直的轴进行振荡与伸缩运动 运动的速度为 10^{-9}

秒。值得注意的是,从整个膜脂分子来看,这种运动还表现出梯度现象。脂肪酸烃部分的运动速度最快,甘油骨架较慢,极性基团部分的运动又较快。

3. 膜脂分子的旋转运动 膜脂分子可围绕与膜平面相垂直的轴进行旋转。运动的平均相关时间约为 10^{-6} — 10^{-9} 秒。

4. 膜脂的侧向扩散 膜脂在二维流体侧向移动的速度也很快。运动速度以扩散常数(D)来表示,一般为 10^{-8} 厘米²/秒。换言之,每秒钟约扩散 1 微米左右。

5. 膜脂分子的翻转运动 (Flip-Flop) 膜脂分子从双分子的一层翻至另一层的运动。这种方式的运动速度很慢。以红血球膜为例,膜脂分子翻转运动的半存期为 20—30 秒。人工膜的脂质分子的翻转运动的速度就更慢,其半存期一般为 6.5 小时—几天。有人猜想,生物膜与人工膜在脂质分子翻转运动速度方面的差异可能是由于生物膜内含一种“翻转酶”的缘故,但迄今没有证实。

综上所述,生物膜脂质分子在相变温度以上的条件下具有多种运动形式(除 AllTrans—Gauche 构型的旋转异构运动外,总结于图 2)。

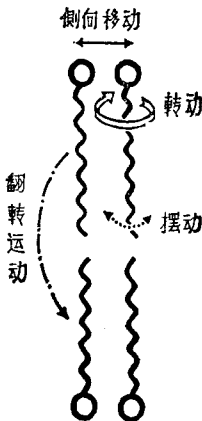


图 2 膜脂运动的几种方式的示意图

每种膜脂由于其组成不同,运动速度也就不尽相同。生物膜膜脂的分布是不对称的。换言之,脂双层的每一层的脂质分子的组成是不完全相同的,这样就提出一个问题。每一层脂质分子的流动性是否也有差异呢?看来这要取决

于两层膜脂分子之间的连系情况^[2]。如果它们之间没有任何交错,两层脂质分子的流动性可以不相同,但一般情况下,生物膜两层脂质分子相互是交错的。例如,具有较长的 α -链(含 24 个 C 原子)的鞘磷脂分子就足以跨伸至另外一层。所以一般来说,生物膜两层脂质分子的流动性是基本一致的,当然这并不排除在局部由于脂质分子没有发生交错,两层膜脂的运动状态也可以表现出有一定的差异性。

二、膜蛋白的运动性

生物膜脂质分子不断处于热运动之中,可以想象,膜蛋白也不会处于静止状态。研究结果说明,它们的运动可分为两类:(1)被动扩散,(2)细胞代谢驱使的运动。后一类是指膜蛋白与微管、微丝相结合形成复合体的运动,膜脂流动性对之仅具有间接的影响。在这里,只准备讨论直接受膜脂流动制约的膜蛋白被动扩散。它又可分为两种:(1)侧向扩散,(2)旋转扩散。

1. 侧向扩散 系指膜蛋白在生物膜二维流体的侧向移动。首先证明膜蛋白具有这种运动方式的是 Frye 与 Edidin^[3]。他们在 1970 年将离体培养的小鼠和人细胞融合在一起形成人、鼠杂交细胞,然后利用间接免疫荧光法通过细胞表面抗原分布的变化来研究膜蛋白的侧向扩散。具体的做法是把两种细胞表面膜抗原的抗体接上两种不同的荧光染料标记:发绿光的荧光素(Fluorescein)和发红光的碱性蕊香红(Rhodamine)。当小鼠和人细胞融合后形成一个新的杂交细胞时,由于连结有两种荧光标记的抗体已分别与两种细胞的膜抗原相结合,因此,开始时一半呈绿色,一半呈红色。但经 37℃ 保温 40 分钟后,二种颜色的荧光点就呈均匀分布。这是原来各自分布于两种细胞表面的膜抗原运动的结果。Frye 与 Edidin 的实验为膜的侧向扩散提供了一个有力的证据。目前测定膜蛋白的侧向扩散常采用光致漂白荧光恢复法(Fluorescence Photobleaching Recovery, FPR)。这种方法利用激光使膜上某一微区内结合有荧光素的膜蛋白不可逆地漂白,然后当其它部位的膜蛋白

由于侧向扩散而进入这个微区时, 荧光又重新呈现, 因此通过光致漂白荧光恢复的监测可以研究膜蛋白的侧向扩散情况, 根据移动速度的大小, 膜蛋白的侧向扩散大致可分为三类: (1) **自由扩散** 扩散常数 (D) = 10^{-8} — 10^{-9} 厘米²/秒, 例如, 视杆细胞外段盘状膜视紫红质的侧向扩散就属于这一种。(2) **限制扩散** 扩散常数 (D) = 10^{-9} — 10^{-11} 厘米²/秒, 例如, 大鼠肌细胞表面的乙酰胆碱受体的扩散。(3) **基本不扩散** 扩散常数 (D) < 10^{-11} 厘米²/秒, 例如, 嗜盐菌的菌紫质就属于这一类。

与膜脂相比较, 显然, 膜蛋白的侧向扩散速度要慢得多, 有人曾粗略估计, 膜脂分子从长度为 1—2 微米的大肠杆菌的一端扩散到另一端, 如果需要 10 分钟的话, 在同样条件下膜蛋白的扩散则需数天之久。

2. 旋转扩散 除侧向扩散外, 膜蛋白还能围绕与膜平面相垂直的轴进行旋转运动。测定膜蛋白的旋转扩散一般用闪光光解法 (Flash photolysis) 与饱和跃迁电子顺磁共振 (Saturation transfer electron puramagnetic resonance)。值得注意的是与侧向扩散相似, 不同膜蛋白由于本身及微环境的差别, 它们的旋转扩散速度也有很大的差异 (表 1)。例如, 从表中可以看出, 视杆外段视紫红质的旋转扩散速度就比嗜盐菌菌紫质要快得多, 通过闪光光解法测定, 它们的旋转弛豫时间分别为 20 和 400 微秒。从已有测定的结果来看, 与侧向扩散相比较, 膜蛋白的旋转扩散速度显得更为缓慢。

表 1 不同膜蛋白的旋转弛豫时间

膜 蛋 白	旋转弛豫时间 ϕ_{11} (微秒)
视紫红质	20
Ca ²⁺ -ATP 酶	100
嗜盐菌菌紫质	400
红血球膜带 3 蛋白	200
微粒体膜细胞色素 P ₄₅₀	270

三、影响膜脂流动性的因素

膜脂流动性一般用微粘度 η 来定量表示:

$$\eta = Ae^{\Delta E/RT}$$

其中 T 为绝对温度, R 为气体常数, A 也为常数, ΔE 是流动活化能, η 可用荧光偏振方法测试。通过不同温度下 η 的变化可求出流动活化能 ΔE , 它既是能量的参数也能反映膜脂的有序性。 A 可通过作图后的截距来计算。

影响膜脂流动性的因素较多, 现归纳为下列几项加以简单说明:

1. 胆固醇/磷脂比值 胆固醇一般都集中在细胞外周膜。在相变温度以上胆固醇含量增加具有增加膜脂有序性, 降低膜脂流动性的作用。但在低于相变温度的情况下, 胆固醇却又能扰乱膜脂有序性的出现, 阻止晶态的形成。换言之, 这时它具有“流动剂”的作用。但在生理条件下, 对绝大多数细胞膜来说, 后一种情况不太会出现。

2. 膜脂脂肪酸链的不饱和程度和链长 膜脂脂肪酸的不饱和键的存在会降低膜脂分子间排列的有序性从而增加其流动性。但是流动性并不随不饱和键数量的增加而成比例增加。例如, 以油酸 (C_{18:1}) 替代硬脂酸 (C_{18:0}) 可明显地增加膜脂的流动性, 但用亚油酸 (C_{18:2}) 替代油酸, 其流动性的进一步增加就不甚明显。膜脂脂肪酸链的不饱和程度主要通过细胞代谢来调节, 这是细胞为了适应温度以及其它变化而调整膜流动性的主要途径。

膜脂脂肪酸的链长也会影响膜脂的流动性。增加链的长度会使流动性降低。

3. 卵磷脂/鞘磷脂比值 在哺乳动物细胞膜系中卵磷脂和鞘磷脂含量约占整个膜脂的 50%。两者由于结构上的差异, 流动性有很大的差异。卵磷脂所含的脂肪酸不饱和程度高, 相变温度较低, 而鞘磷脂则相反, 它含的脂肪酸饱和程度高, 其相变温度较高而且范围较宽 (在 25—35℃ 之间)。此外, 在 37℃ 卵磷脂和鞘磷脂即使都处于流动状态, 后者的微粘度值 (η) 也比前者大 6 倍。

衰老和动脉粥样硬化都伴随着 卵磷脂/鞘磷脂比值的降低, 而胎儿在成熟过程中其肺泡内侧表层表面活化剂的卵磷脂/鞘磷脂的比

值有明显升高的现象。

4. 膜蛋白的影响 膜蛋白与膜脂结合后对流动性的影响因结合方式(静电结合,疏水结合等)的差异而有所不同。一般讲,当蛋白质嵌入膜脂疏水区后,具有与胆固醇相似的作用,使膜的微粘度增加。当膜脂发生相变时,蛋白质的存在会影响膜脂的协同效应使相变温度的范围变宽。在低于相变温度的情况下,蛋白质的嵌入会导致“区块”(patch)形成“区块”中蛋白质四周的膜脂虽具有较高的微粘度,但仍稍低于呈凝胶态的整体膜脂。

蛋白质与膜脂的影响是相互的,当膜脂流动性降低,嵌入的膜蛋白暴露于水相的部分就会相应增加。相反,如果膜脂流动性增加,嵌入的膜蛋白将更多地深入膜脂内部。因此,膜脂流动性的变化无疑将影响膜蛋白(受体、酶、抗原等)功能的表现。

5. 其它因素的影响 除上述因素外,膜脂的极性基团,环境的温度, pH、离子强度,金属离子等等都会不同程度地影响膜脂的流动性。

四、膜流动的不均匀性

从整体来讲,生物膜的结构不是静止而是动态的。但是膜的各部分的流动性又不是均匀的。下列两方面的现象都说明这一问题:

1. “界面脂”(Boundary lipid, Annulus lipid)

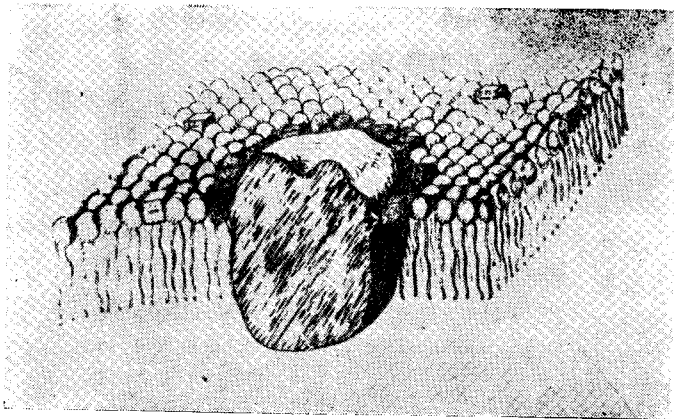


图3 围有“界面脂”的细胞色素氧化酶的模式图

[自: Griffith, O. H. a Jost, p. c. in Cytochrome Oxidase (Eds. King, T. E et al.) p 217]

图中细胞色素氧化酶分子四周的深色部分代表‘界面脂’分子。

实验结果表明,很多膜蛋白的周围含有一层相对不流动的脂质分子。Jost 等应用顺磁标记化合物对细胞色素氧化酶-磷脂复合体的脂质流动性进行研究。实验结果表明,其中部分脂质分子与一般双分子脂质一样呈自由运动状态,而与细胞色素氧化酶紧密结合的单层脂质分子则基本上处于不流动状态(图3)。除细胞色素氧化酶外,很多膜蛋白(如内质网膜的细胞色素 b_5 ,细胞色素 P_{450} 还原酶系,肌质网膜 Ca^{2+} -ATP酶等)的周围都证明有一层数量不等的“界面脂”^[5-7]。有的认为“界面脂”对膜蛋白的功能具有一定的调节作用,如西德 Sackmann 曾报道^[7]在肝内质网膜细胞色素 P_{450} 还原酶系中,酶蛋白周围的膜脂分子呈凝胶态。在 $32^{\circ}C$ 以上,这层“脂圈”才进行相变而形成流动态,这时脂溶性底物(如脂肪酸和芳香胺等)才得以进入酶系而起反应。因此这层“脂圈”对细胞色素 P_{450} 酶系参与的催化作用可能具有调控作用。但是,迄今为止,对“界面脂”的功能和结构都缺乏深入的了解。最近有的还对是否存在“界面脂”的问题也提出了怀疑^[8]。这些作者认为,顺磁标记化合物的参入可能影响膜的结构,不能反映膜脂分子的正常状态。他们用核磁共振技术进行研究的结果表明,“界面脂”的存在可能是瞬间的现象而并非是一种经常性的结构形式。

2. “区块”结构 生物膜含有很多种类的脂质分子,它们具有各自的相变温度。在一定温度下,有的膜脂处于晶态,有的则呈流动的液晶态。流动与不流动的膜脂分别汇集的现象称为分相。即使都处于液晶态,在一定温度下各种脂质分子的微粘度也不尽相同。此外,生物膜中蛋白质-脂质,蛋白质-蛋白质的相互作用,尤其是后者的长距离相互作用(Long range order)会导致分子间的聚集而形成一定的“区域”或“区块”结构。例如,嗜盐菌质膜的菌紫质聚集成成为有规则的晶格结构,因而在这个区域内的流动性就极为有限。外界环境和 pH、金属离子等都会不同程度地影响膜“板块”结构的形

成。生物膜中各个“板块”结构的组分、组织特性以及流动性也可以具有较大的差异。

综上所述,无论是“界面脂”还是“区块”结构都说明生物膜的流动性是不均匀的。这是原先“流体镶嵌”模型所不能反映的。于是,1977年 Jain 与 White^[1]又提出一种“板块镶嵌”模型(图4)。这种模型显示,在膜中高度流动性的区域和非任意分布的区域可能是同时存在的。整个生物膜是具有不同流动性的“板块”相间隔的动态结构。随着生理状态和环境条件的变化,这些“板块”结构的晶态和非晶态是可以变化的。因而生物膜各部的流动性也不断处于动态的变化之中。

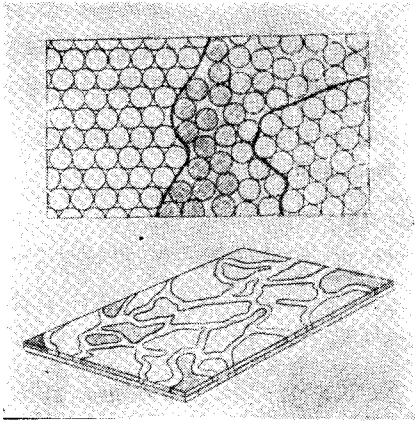


图4 ‘板块镶嵌’模型

[自 Jain, M. K. White, H. B. Adv. in Lipid Res. Vol. 15, p. 1]

上图中表示膜脂呈流动的液晶态,两侧为不流的晶态。
下图表示在生物膜中不同流动性的‘板块’同时相间隔存在。

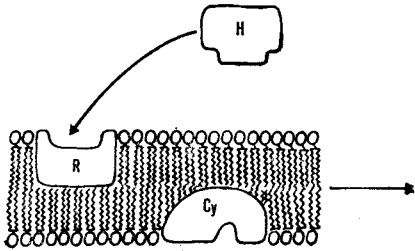
五、膜流动性与生理功能

大量研究表明,生物膜合适的流动性是表现生物膜正常功能的必要条件。例如,物质运送,能量转换,细胞识别、细胞分化,细胞免疫,激素作用等等都与膜的流动性有密切关系。

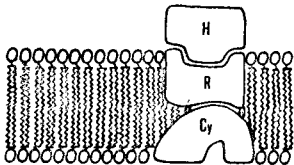
我们实验室对线粒体内膜 ATP 酶复合体活性与膜流动性的关系曾进行过一些研究^[9-10]。当猪心线粒体 ATP 酶复合体用胆酸盐稀释法重组于微囊型人工膜(脂质体)时, Mg^{++} 能明显地提高重组酶的活性。通过顺磁标记以及荧光探针等的初步研究,表明 Mg^{++} 的促进作用

与它能减少嵌有 ATP 酶复合体的脂质体的流动性有关。可以设想,要表现较高的 ATP 酶活性必须具有一定的构象,而合适的流动性则是维持这种构象的必要条件。 Mg^{++} 的作用在于它影响 ATP 酶复合体与磷脂的重组过程,使形成的脂酶体中的脂质分子表现出适度的流动性。

激素作用也与膜的流动性有密切的关系,大部分激素作用时并不需要进入细胞而与细胞表面的受体相结合,然后使嵌在膜上的腺苷酸环化酶活化,从而使 ATP 合成第二信使——cAMP 后者再连锁地活化一系列酶的活性,最终产生生理效应。根据“移动受体 (mobile receptor)”假说,受体与腺苷酸环化酶在膜上的定位并不是固定的,当某种激素分子与膜上特异的受体结合后,导致后者的构象发生变化。从而增加与腺苷酸环化酶的亲合性。由于膜的流动性,结合激素的受体可以侧向移动,一旦它与腺苷酸环化酶相遇而结合时,又引起后者构象变化而使之活化(图5)。可以设想,不具有合适的流动性,激素作用也就不能正常表现。



不活化状态



活化状态

图5 激素作用的“移动载体”假说

H: 激素分子 R: 受体 Cy: 腺苷酸环化酶

[自: Lenaz, G. in Sub-cellular Biochemistry Vol. 6 (Ed. Roodyn, D. B.) p 281]

在细胞周期中膜的流动性也有明显的变化。lai 等应用顺磁共振技术研究中国田鼠卵巢

细胞膜流动性的变化^[14]结果细胞分裂期(M期)细胞膜的流动性最高。分裂后第一个生长期(G₁期)和合成DNA期(S期)膜的流动性最低。

在发育过程中细胞膜的流动性有明显的变化。例如,与幼年鼠相比较,成年鼠脂肪细胞膜磷脂的饱和脂肪酸含量较高,流动性较低^[15]。在胎儿发育过程中,肺泡内侧表层表面活性剂的卵磷脂/鞘磷脂比值不断增加,如果婴儿早产常因这个比值过低影响肺泡内侧表层膜的流动性,使O₂-CO₂交换不能正常进行,引起呼吸窘迫症状(Respiratory distress syndrome)因此目前临床上尝试用分析羊水中卵磷脂/鞘磷脂比例来决定婴儿引产的时间是否成熟。

为了使生物膜具有合适的流动性以表现其正常功能,生物体可以通过细胞代谢等方式予以调控,结果超出调节的范围,细胞就难以表现正常的功能而产生病变。例如 β -脂蛋白缺乏病(abetalipoproteinemia)和遗传性球形红血球型贫血(hereditary spherocytosis)患者的红血球膜的流动性明显低于正常^[11],恶性淋巴瘤和白血病淋巴细胞膜的流动性则比正常要高得多^[12]。进行性肌肉营养障碍(Progressive muscular dystrophy)病人的红血球、骨骼肌、肝以及红血球细胞膜的流动性都比正常人要低^[13]。

此外,很多药物的作用机理也发现与膜的流动性有一定的关系。例如,很多麻醉剂都具有增加膜流动性的作用。

在低温下生物膜能否保持适度的流动性与农作物耐寒性之间也可能有一定的相关性^[16]。我们实验室最近曾比较耐寒与不耐寒玉米品种线粒体琥珀酸氧化酶活性的 Arrhenius 图^[17],实

验结果反映,不耐寒玉米品种线粒体膜脂分子的物理状态当低于一定温度时即发生明显变化,而耐寒玉米品种的线粒体在同样条件下并没有出现相似的变化。

综上所述,流动性是生物膜结构的基本特征,合适的流动性是表现生物膜正常功能的必要前提。从发展来看,这一问题将日益成为膜生物学重要研究课题之一。而且,生物膜流动性的研究不仅具有重要的理论意义,对于工、农、医和国防建设方面也都有广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Jain, M. K. et al.: *Adv. in lipid Res.*, **15**, 1, 1977.
- [2] Shinitzky, M. et al.: *Intern. Rev. Cytol.*, **60**, 121, 1979.
- [3] Frye, L. D.: *J. Cell Sci.*, **1**, 319, 1970.
- [4] Sandermann, H.: *Biochem. Biophys. Acta.*, **575**, 209, 1978.
- [5] Gennis, R. B. et al.: *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **6**, 195, 1977.
- [6] Jost, P. C. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **311**, 141, 1973.
- [7] Stier, A. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **311**, 400, 1973.
- [8] Rice, D. M. et al.: *Biochemistry*, **18**, 5893, 1979.
- [9] 杨福愉等:《中国科学》1981年,1期,85页。
- [10] 杨福愉等:《科学通报》待发表。
- [11] Aloni, B. et al.: *Brit. J. Haematol.*, **31**, 117, 1975.
- [12] Shinitzky, M. et al.: *J. Mol. Biol.*, **85**, 603, 1974.
- [13] Kunze, D. et al.: *Clin. Chim. Acta*, **43**, 333, 1973.
- [14] Lai, C. S. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **602**, 117, 1980.
- [15] Hubbard, R. E. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **600**, 701, 1980.
- [16] Lyons, J. M. et al.: in *Low Temperature Stress in Crop Plants* (Eds. Lyons, J. M. et al.: Academic Press 1979), p. 1.
- [17] 杨福愉等:《生物化学与生物物理学报》待发表。

[本文于1981年6月8日收到]