

- [10] De Kruijff, B. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **601**, 235, 1980.
- [11] Venechteld, C. J. A. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **648**, 287, 1981.
- [12] Hope, H. J. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **640**, 82, 1981.
- [13] Burnell, E. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **597**, 492, 1980.
- [14] Ferguson, K. A. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **684**, 179, 1982.
- [15] Verkleij, A. J. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **600**, 620, 1980.
- [16] Kachar, B. et al.: *Nature*, **296**, 464, 1982.

[本文于1982年8月31日收到]

膜脂研究的两个新问题*

林 克 椿

(北京医学院生物物理教研室)

在组成生命的重要的分子中,脂的研究比蛋白质与核酸少得多,人们对它的作用也了解不足。例如生物膜,按照目前广泛承认的液态镶嵌模型,脂类分子是按双层形式排列,极性头部基团向膜外,疏水烃链朝向膜内;而蛋白质则以不同程度镶嵌在膜中,或附着于膜的两侧。与过去许多生物膜的模型相比,其突出之点是脂分子的易活动性——围绕脂分子长轴的转动、在膜平面上的侧向扩散和脂分子在内外二层间的翻转(flip-flop),从而使整个膜具有流动性。脂的这种流动性对镶嵌在其中的蛋白质将产生一定的影响,比如能产生聚集和成帽现象等。然而这种模型把脂的功能基本上局限在传统的观念,即脂双层起限制性的屏障作用,最多只是间接的通过脂-蛋白相互作用影响蛋白,从而影响膜的功能。这种模型显然是不完善的。从结构方面看,如果脂只起形成双层的屏障作用,显然只要有一种类脂,例如磷脂酰胆碱(PC),就足以完成,但生物膜中的脂类种类繁多;就其功能而言,脂类在物质运输、细胞融合和与蛋白的作用方面还很少了解,因此膜脂结构与功能的关系是膜生物学中远未解决的一个重要问题。

近几年,膜脂的研究出现了二个新问题,引起人们的关注。第一是脂的多型性,即脂分子不一定按双层排列,有可能形成多种结构。第二是螺旋状脂质体,即脂类分子在过量水作用下不一定形成近乎球形的脂质体,它和蛋白、核

酸相似,也能形成双螺旋状或单螺旋状的结构。本文将对这两个问题作概要的介绍。

一、脂的多型性

细胞膜中的脂类很多,有人估计约有100种,而细胞膜本身基本为双层结构。如果把膜中脂类分别提取,然后用过量水使之形成脂质体,可以看到二种类型:一类仍然形成双层,如同在细胞膜中一样,称为双层脂。大多数脂类属于这一类,其中较重要的是PC和神经鞘磷脂(SM)。另一类是非双层脂,早在1962年Luzzatti用X射线衍射就已观察到某些脂能形成反转微球、六角形结构、立方或单斜晶状结构等。其中较重要的是磷脂酰乙醇胺(PE),心磷脂(CL)(在有 Ca^{2+} 条件下)、磷脂酰丝氨酸(PS)、磷脂酰甘油(PG)等。这样就提出了一些新的问题,即究竟双层脂与非双层脂混合组成的体系呈现何种构型,如果基本上是双层,则非双层脂在其中的作用如何,它在膜的功能方面有何意义,当时未能进一步研究这些问题,主要是因为缺乏必要的技术手段。最近几年, ^{31}P -核磁共振(NMR)与冰冻断裂技术为这一课题的深入研究提供了重要手段。一个含 ^{31}P 样品所得到的NMR谱和P原子在样品中的运动有关。在脂质体中,P原子在类脂分子头部,而类

* 在第二次全国生物膜学术讨论会上的报告。

脂分子既能绕其长轴旋转,也能在膜平面上扩散,此外P原子还受到附近氢原子核的作用。在质子去偶连的测量条件下,NMR主要决定于前二个因素。如果脂质体是直径很小的球形囊,由于各向同性运动,得到的是对称的锐峰。反之如果磷脂分子都排列在一个平面上,则所得谱中峰位与膜平面和磁场的夹角有关。实际上较大的脂质体中,P原子的各向异性运动只是部分被平均化,所得的谱就和膜的结构有关,膜脂为双层时,NMR谱在0 ppm的高场部分有峰,在低场部分则有一肩部,如膜脂呈六角形(一般称 H_{II} 相),则谱形相反,低场有峰,高场有肩,宽度也减小。有各向同性成分时,0 ppm处将显示隆起或有峰。这就为膜脂多型性的研究提供了有利条件。

应用 ^{31}P NMR已经研究过PE、CL等主要非双层脂及各种混合脂在不同条件下的多型性。例如从各种不同生物对象提取的PE或CL做成的脂质体,当温度逐渐升高时,都能发生从双层到 H_{II} 的转变,这种转变常发生在相变温度的高温端10℃范围之内,而且转变是突然发生的(<5℃)。这一转变温度和PE的不饱和程度有关。从大豆提取的PE,-10℃以上即发生转变,而从大肠杆菌提取者饱和程度较大,转变要在54℃才能发生。这种转变的能障很小,所以用一般量热法观察不到,这就更显示出NMR法的优越性。对CL来说,在37℃时是双层结构,但逐渐加 Ca^{2+} 时谱中的各向同性成分逐渐增加,在加等克分子 Ca^{2+} 时就完全转变为 H_{II} 相。鉴于目前还很难设想在双层膜上会出现纯粹 H_{II} 相的六角形结构,因此人们更注意各向同性成分增大的那种中间态,把它看成为一种极短小的,位于双层膜内的 H_{II} ,实际上是一种倒微囊形式的脂粒结构。这种设想被冰冻断裂图中出现突起或凹陷的颗粒结构所证实。混合脂体系也得到类似结果。例如在形成 H_{II} 的PE中逐渐加PC能通过中间态逐渐稳定成为双层结构。CL/PC体系无 Ca^{2+} 时为双层,逐渐加 Ca^{2+} 就形成中间态。对CL/PE体系,CL使PE稳定于双层结构,当 Ca^{2+} /CL

≈ 0.05 时已显示出各向同性的中间态, Ca^{2+} 增多时则只见 H_{II} 相。

现在发现能影响这种转变的因素很多。例如细胞色素c能诱发CL双层转变为 H_{II} 相;麻醉剂荻布卡因、阿霉素、去垢剂、聚L赖氨酸、氯丙嗪等则能使 H_{II} 相逆转为双层。胆固醇能使双层稳定,但加到PE/PC体系中则使之不稳定等。这些发现产生了一系列问题,特别是生物膜中这类结构是否存在、以何种形式存在、它们在细胞中起何作用等。已经研究过红细胞血影,它是异常稳定的双层结构,即使在各种磷脂酶的作用下也能保持其结构,但油酸却能使之破坏而形成 H_{II} 相。内织网微粒体基本上是双层,但有部分各向同性成分,被认为可能和膜蛋白P-450有关。人们对线粒体的研究兴趣更大,因为CL是哺乳动物细胞中,只存在于其线粒体内膜的一种非双层脂,而线粒体又有聚集 Ca^{2+} 的功能。例如已见到线粒体内膜为双层,但有10%的各向同性成分,增加 Ca^{2+} 时此成分增大。完整线粒体4℃下显示双层,另外还有ATP、ADP等的谱成分,37℃时仍保持双层,但放置30'后各向同性成分就逐渐增大,目前特别感兴趣的是线粒体在维持其氧化磷酸化状态下膜脂结构是否有变化。这类实验难度虽较大(在测NMR时需不断加底物与 O_2)但仍然是有可能的。

在细胞功能方面,曾联系几个问题进行过研究,例如 Ca^{2+} 的传输、细胞色素氧化酶与电子传递的关系以及细胞融合过程等等。总的说来,从模式膜所得结果加以推论的较多,而实验证明则还只是开始。细胞融合可能是比较有根据的一个方面,因为融合过程中无论从NMR的变化或冰裂所见的脂粒都说明中间状态的存在。无论如何,这类研究将对脂在细胞功能中的作用提供更深入一步的了解。有人甚至认为液态镶嵌模型可以修正为变型镶嵌模型(metamorphic mosaic model),因为生物膜上可能存在(至少是局部)各种非双层结构。这当然还有待更多的实验加以证实。

二、螺旋状脂质体

膜脂研究的第二个问题是螺旋状脂质体的发现。这是作者1981年在Stanford大学H. M. McConnell实验室开始的一项工作。最初的研究问题是CL与DMPC(二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱)两相体系中自旋标记物TEMPO的分配,实验表明分配系数 β 与CL的克分子比呈现出异乎寻常的、过去在任何两相体系中没有见到过的关系(见另文),特别是当CL为37mol%与58mol%时出现明显的峰。为了探讨这些峰出现的原因,曾经用荧光漂白恢复技术(FRAP或FPR)测量不同CL mol%时的扩散系数。虽然没有能够看出扩散系数的不同,但测量前在荧光显微镜中观察,却意外地见到了螺旋状脂质体。

实验方法并不复杂,按CL为37mol%,DMPC为63mol%,将二者的乙醇液混合,真空抽干,加PBS后于相变温以上温育,然后振荡形成脂质体。最后在普通光学显微镜下观察。通常各种脂在过量水中形成多层脂质体,其形状虽不规则,但都接近于球形。然而在这一体系中却能见到长短不等的管状脂质体,其直径一般在 1μ 以下,长度大多在从10—100 μ ,少数更长,甚至达几百 μ 。这类管状体结构均匀,但一端(有时两端)常成团。较长者常有弯曲或转折。在这种脂质体悬液中加入 Ca^{2+} ,可以见到各种现象,最常见的是缩短,即长度逐渐减小,而两端的团块则变大,最后缩成一团。但在合适条件下就能形成双螺旋或单螺旋。双螺旋比较容易由加 Ca^{2+} 前已对折成头发夹状的管状体形成,在显微镜下可见到从对折的中间开始,二股互相紧密缠绕,最后全部形成双螺旋。这一过程的时间与 Ca^{2+} 离子浓度有关,长则数分钟,短则不到1分钟即完成。对折后如果二部分长度不同,则形成一段为双螺旋,一段为管状体的结构。但有时双螺旋的末端可继续沿剩余管状体盘绕前进,直到全部形成双螺旋为止。单螺旋的形成常从一端开始,整个管状体不断沿一个方向绕圈形成一个螺线管。但无论是单

或双螺旋,在 Ca^{2+} 足够多的情况下,都将继续自身缠绕,最终形成更为复杂甚至无法分辨的结构。因此单螺旋或双螺旋的形成都是由管状到复杂结构的一种中间形式。

螺旋体的形成使膜与膜之间的接触面积增大,在CL/DMPC这一体系中,这种结合是由二价离子 Ca^{2+} 促成的。从热力学的角度考虑,形成螺旋将使整个体系的能量趋于最小,状态趋于稳定。鉴于脂分子在脂质体中是极易流动的,因此无论是扭曲或是盘绕都不需要很多能量。理论计算也表明了这一点。

这项工作很快发表在Nature杂志上(Nature, 296, 164—165, 1982),并在该期封面刊登了照片,因而引起了许多国家学者的注意。应该指出的是,这项工作完成后,曾经收到研究脂质体的Bangham博士寄来的照片,他用卵磷脂也见到了类似的现象。最近也有人指出,早在一百多年前,1854年Virchow就曾经见到过髓磷脂所形成的这类现象。虽然我们还没能找到这本十九世纪的著作,但这一现象应该引起足够的重视,再通过深入研究,来了解脂类的作用则是毋庸置疑的。

首先从理论意义方面来看,生命的基本组分——蛋白质、核酸与脂类中,对蛋白质与核酸的研究从五十年代以来特别是X射线衍射等技术的应用之后,确定了它们的结构,尤其是弄清了它们共同具有的螺旋状结构。根据这一认识进一步引伸到它们的功能意义,首先是在遗传中的作用,从而奠定了分子生物学发展的新时期。脂类是小分子,当然不能和蛋白质与核酸同等对待,但由此而形成的螺旋状结构是否提示了生命基本物质的某些共同物理属性,这种物理属性是否必然密切联系着生命的基本过程,这类问题显然具有较大的吸引力。例如在DNA的研究中,双螺旋的解旋动力是一个没有解决的问题。如果它们具有某些共同之处,那么对螺旋状脂质体解旋机制的研究也许能提供一些线索。这只是其中一个例子。为此需要通过对各种脂类的广泛研究弄清形成螺旋的必要条件。这方面,目前我们正在进行研究,初步结

果表明,在含有 CL 的体系中,用 DPPC (二棕榈酰磷脂酰胆碱)代替 DMPC 具有相类似的效果,而改变 CL 的克分子比,在 CL 小于 10mol% 或大于 80mol% 的条件下将难以得到这类结构。各种二价阳离子在这一体系中都有类似作用,但效率不同。膜间接触不仅可由 Ca^{2+} 引起,在某些情况下,表面活性物质也有类似作用,在广泛研究的基础上将得出相应的结论。

其次,人工膜中所见到的这类现象是否在活体中间同样存在,这一问题的研究困难得多,但这是必要的一步。

管状脂质体与螺旋状脂质体的表面积远大于同分子数的球状脂质体,利用这一性质将有利于某些涉及表面作用的问题的研究,例如融合与相互作用,特别是利用脂质体载带药物的问题等。开展这类研究有可能在实践中提供有益的途径。

上面所提到的只是作者本人所见到的近年来在研究生物膜脂方面的新问题。实际关于膜脂的研究不止于此,但重视膜脂研究则是近年来的一种趋势。

【本文于 1981 年 11 月 19 日收到】

单加氧酶细胞色素 P-450 及其模拟

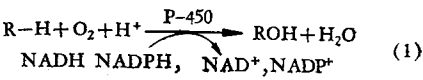
吴 越 张岱山

(中国科学院长春应用化学研究所)

一、细胞色素 P-450^[1,2]

生命有机体中的许多代谢过程与氧化反应和电子转移过程有密切联系。在具有转化底物能力的血红素蛋白中,细胞色素 P-450 意义特别重大,它能催化各种有机物和分子氧之间称之为混合功能氧化的化学反应,诸如,芳族化合物、脂族化合物及其侧链的羟基化,烯烃的环氧

化,氧化脱 (N-)、(O-) 烃,氧化脱氨基等。这些反应中的每个底物分子所需的二个外加电子系由还原的菸酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH) 及其磷酸衍生物 (NADPH, 辅酶 II) 提供:



1. 来历、组成和性质 细胞色素 P-450 广

表 1 一些 P-450 体系的来历、组成和性质

来 历	电子授体	电子转移体系		底 物
		黄素蛋白	第二组份	
鼠、兔	NADPH	NADPH-P-450 还原酶	卵 磷 脂	药 物
牛 (肾上腺)	NADPH	肾上腺素还原酶	肾上腺素 (非血红素铁蛋白)	甾族化合物的 β -11 位
假单胞 菌	NADH	假单胞氧还蛋白还原酶	假单胞氧还蛋白	萜酮的 5-exo 位
大孢子 杆菌	NADPH	大孢子氧还蛋白还原酶	大孢子氧还蛋白	甾类化合物的 β -15 位
念珠菌	NADPH	NADPH 特殊还原酶	(脂 类)	烷 烃
变性念珠菌	NADPH	NADPH 特殊还原酶	磷 脂	烷烃,脂肪酸的 ω -位