

生物膜类脂的多形性 ——非双层 (non-bilayer) 类脂的结构模型

黄 芬

(中国科学院生物物理研究所)

生物膜主要由类脂和蛋白质组成。1925 年 Gorter 等首次提出类脂双分子层为生物膜的基本结构。经过 50 多年,大量实验证明了这一概念。1972 年 Singer 与 Nicolson^[1] 提出流动镶嵌模型,将生物膜看成球蛋白和类脂二维排列的流体,类脂以双分子层排列,外周蛋白以静电作用与膜脂极性头部结合并吸附于膜外,内部蛋白以疏水作用镶嵌于膜的脂双层内部(见图 1)。然而生物膜除以脂双层为其主要结构外,是否还有其他结构,一直是不少人感兴趣的问题。

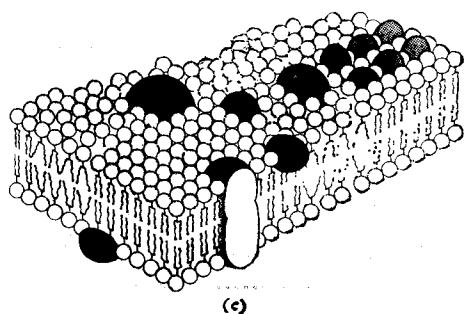


图 1 “流动镶嵌”模型

[引自 *Introduction to Biological Membranes*
(Eds. Jain. M. A. et al.) p.4, 1980]

1962 年 Luzzatti 等^[2]用 X-光衍射技术研究类脂分子在水的分散相中(如脂质体)的结构。他们发现,含水的类脂分子具有适应多种相的能力,除有脂双层的结构外,还能形成多种形态,如六角形(H_I)、六角形(H_{II})、立方及单斜晶系等等,称为类脂的多形性。他们认为这些非双层类脂结构可能与生物膜的结构与功能有关系。但是由于 X-光衍射结构分析方法的局

限性,关于类脂分子在水分散相中的多形性特征,一直没有得到更充分的实验证据,因而这种概念长期被忽视。近年来由于核磁共振波谱

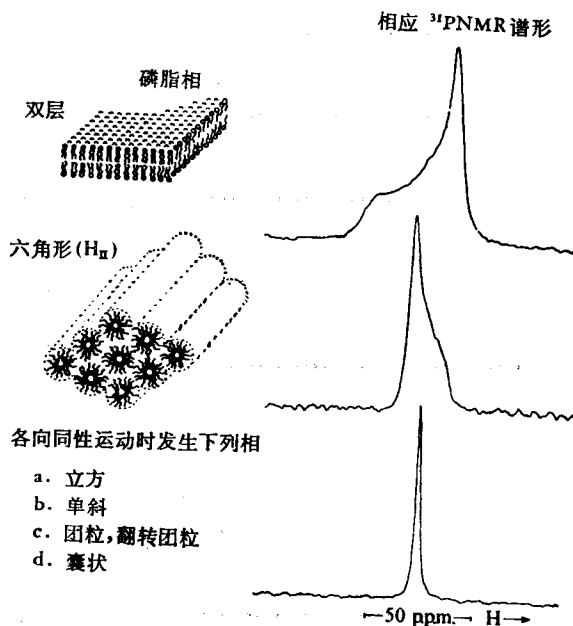


图 2 类脂多形性: 磷脂脂质体液晶相与相应 ^{31}P -NMR 谱形

双层谱形(卵黄 PC);六角形(H_{II})谱形(大豆 PE);各向同性 ^{31}P NMR 谱系大豆 PE; 卵黄 PC (85:15 克分子%)混合脂质体。

(引自 *Biochim. Biophys. Acta*, **559**, 399, 1979)

本文名辞缩写 NMR:核磁共振;DSC:差示扫描量热法;ESR:电子自旋共振;PE:磷脂酰乙醇胺;PC:磷脂酰胆碱;PS:磷脂酰丝氨酸;PG:磷脂酰甘油;DPG:心磷脂;DOPA:二油酰磷脂酸;DOPC:二油酰磷脂酰胆碱;DEPE:二反油酰磷脂酰乙醇胺;DOPE:二油酰磷脂酰乙醇胺。



图3 PC:DPG (1:1克分子%) 混合脂质体冰冻断裂电子显微镜图片(从冰冻断裂面可观察到类脂颗粒)

(引自 *Nature* 279, 162, 1979)

(NMR) 技术的发展, 用 ^{31}P -NMR 技术研究人工膜或生物膜, 可在 NMR 谱线上显示出不对称的线形, 即带有低场肩的磷脂双分子层特征图谱, 以及区别于脂双层结构的六角形 (H_{II})

(Hexagonal(H_{II})) 相的谱线^[3](图 2)。采用冰冻断裂电子显微镜技术, 从膜的冰冻断裂面可直接观察到类脂颗粒, 这种类脂颗粒分布在脂双层两个单层之间。代表类脂翻转团粒结构, 即非双层类脂结构(图 3)。这种生物膜上非双层类脂结构的发现与近年来膜类脂分离技术及人工合成磷脂技术的发展有关, 它为人工膜的制备提供了有利的条件, 为用物理手段研究生物膜非双层类脂结构奠定了基础。1979 年荷兰学者 Verkleij 等^[4]首次提出生物膜除脂双层为其基本结构外, 尚有非双层的类脂结构, 并认为它是生物膜脂双层结构模型的一个补充。

一、类脂多形性模型系统

Reiss-Hussan 等^[5]用 X-光衍射技术研究不同类脂与水的体系, Rand 等用它研究纯天然 PE 与水的体系, 他们发现 PE 特别容易形成六角形 (H_{II}) 排列, 但这种六角形 (H_{II}) 却受温度的影响。用 ^{31}P NMR 测定^[6], 无论从天然物分离的 PE 或人工合成的含不饱和脂肪酰链的 PE, 它们形成的脂质体, 在适当条件下, 均能从脂双层结构转变为六角形 (H_{II}) 结构。图 4 是

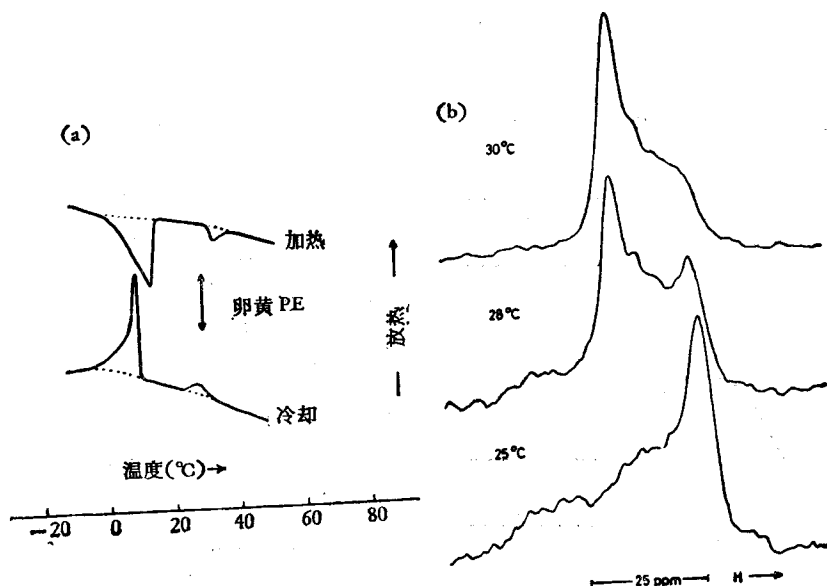


图4 (a) 卵黄 PE 脂质体 DSC 热曲线
(↓表示双层向六角形 (H_{II}) 转变的温度)

(b) 卵黄 PE 脂质体 ^{31}P -NMR 谱线

(引自 *Biochim. Biophys. Acta*, 559, 399, 1979)

用 DSC 与 ^{31}P NMR 研究卵黄 PE 脂质体,在一定温度时从脂双层相转变为六角形 (H_{II})^[7],此种相转变过程中,用 DSC 法测其热焓变化很小,说明脂双层向六角形 (H_{II}) 相转变的能障很小,磷脂分子的脂酰基链在六角形 (H_{II}) 相时,其有序程度并无明显变化。用 NMR 与 ESR 技术测定磷脂分子脂双层与六角形 (H_{II}) 间其序参数也无改变。此后有人发现除天然物中分离出的 PE,人工合成含不饱和脂肪酰链的 PE,以及某些糖脂形成的脂质体容易形成六角形 (H_{II}) 结构外,生物膜上其它磷脂(在正常情况下),一般均为脂双层排列,其中某些酸性磷脂,如心磷脂,磷脂酰丝氨酸 (PS)、磷脂酰甘油 (PG) 等。若加入适当比例的 Ca^{2+} 可使它们从脂双层结构转变为六角形 (H_{II})。用 ^{31}P -NMR 与冰冻断裂电镜技术均能证实这种转变。膜磷脂产生多形性的变化可能与磷脂分子结构有关, Papahajopoulos 等^[8]认为 PE 之所以

容易形成六角形 (H_{II}) 结构,可能由于 PE 的极性头部面积比较小,磷脂分子间可能以氢键相连接,因而使类脂与水的界面上每个磷脂分子面积减小,结果容易形成锥形或六角形 (H_{II})。PC 极性头部的面积比 PE 大,易形成稳定脂双层结构。最近 Hauser 等用 X-光衍射技术比较了 PE 与 PC 的分子构象以及它们的极性头部结构,结果发现 PE 极性头部的面积为 35—42 平方埃,而 PC 为 47—54 平方埃因而推测与 PE 容易形成六角形 (H_{II}) 结构有关。图 5 是生物膜上磷脂分子的多形相与相应的分子形状。

二、影响类脂分子形成六角形 (H_{II}) 结构的因素

1. 温度 PE 在形成六角形 (H_{II}) 的过程中易受到温度的影响,从红细胞膜分离出的 PE 只有温度在 10℃ 以上才能形成。一般认为 PE 脂质体在超过其相变温度 10℃ 左右时方能形成六角形 (H_{II}) 结构。

2. 类脂组成 从大豆磷脂中分离出的 PE 形成脂质体,在 ^{31}P NMR 谱上可看到六角形 (H_{II}) 结构,若 PE 中加入卵黄 PC 形成混合磷脂脂质体,当 PC 浓度达 30 克分子%时,则 PE-PC 脂质体由六角形 (H_{II}) 向脂双层结构转变,当 PE-PC (50:50 克分子%)时, ^{31}P -NMR 谱上出现脂双层结构,可见,PC 能稳定脂质体的脂双层结构。用人工合成的 PC 或牛脑鞘磷脂形成脂质体,也具有上述作用。因此有人认为生物膜上的 PC 与鞘磷脂主要是形成稳定的脂双层结构,在 PE 脂质体形成六角形 (H_{II}) 结构时,胆固醇的作用值得探讨。若在 PC 与 PE 混合体系中加入胆固醇,形成脂质体后,胆固醇可以起到稳定脂双层的作用,但在此混合体系中 PC 的脂肪酸必须为饱和脂肪酸,如果 PC 的疏水侧链是不饱和脂肪酸,则胆固醇可促使此混合磷脂脂质体形成六角形 (H_{II}) 结构,胆固醇对鞘磷脂没有这种作用,因而设想生物膜中的鞘磷脂即使有高浓度的胆固醇,也能维持生物膜的脂双层结构和膜的正常功能。最近有人

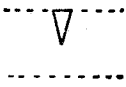
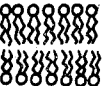
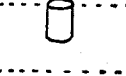
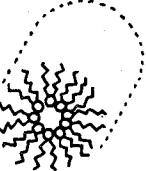
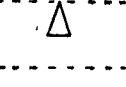
类脂	相	分子形状
溶血磷脂去污剂	 团粒	 翻转锥形
PC 鞘磷脂 PS PG	 双层	 圆柱形
PE(带不饱和 脂肪酸链) PDG- Ca^{2+} PA- Ca^{2+}	 六角形 (H_{II})	 锥形

图 5 不同磷脂分子的多形性相及相应的动力学分子形状
(引自 *Biochim. Biophys. Acta*, 559, 399, 1979)

从豆科植物的叶绿体膜上分离出单半乳糖基甘油二酯与双半乳糖基甘油二酯,形成脂质体后,从冰冻断裂面上可看到类脂颗粒与似颗粒状的结构。这种颗粒在适当温度时可以变为脂双层结构。因而可能是类脂翻转团粒向脂双层结构过渡的一种形态。

3. 二价金属离子 二价金属离子可促使心磷脂(DPG)或PC/DPG形成的脂质体转变为六角形(H_{II})结构^[9]。如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 或 Ba^{2+} ,其中 Ca^{2+} 诱发形成六角形(H_{II})的作用最强, Ba^{2+} 最弱。从脂质体冰冻断裂面上可观察到管状结构与类脂颗粒,这种类脂颗粒被认为是脂双层结构向六角形(H_{II})转变的中间形态。据最近报道,在适当pH与二价金属离子 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 存在时,可使DOPA脂质体诱发形成六角形(H_{II})结构。另外, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 也可使牛心DPG与枯草杆菌膜DPG脂质体形成六角形(H_{II})。

4. 多肽及抗菌素 Ca^{2+} 加到DPG脂质体中,可促使它形成六角形(H_{II})结构,在上述体系中加入多聚赖氨酸能抑制 Ca^{2+} 的作用,使DPG脂质体仍保持脂双层结构。若在DPG与PE混合体系所形成的脂质体中,多聚赖氨酸能降低DPG形成脂双层的稳定性,使PE又变为六角形(H_{II})结构,这种现象似乎表明,多聚赖氨酸有调节膜上脂双层变为六角形(H_{II})结构的作用^[10]。短杆菌肽可促使DEPE脂质体DOPE以及DOPC脂质体形成六角形(H_{II})结构^[11]。

此外,局部麻醉药狄布卡因可使由 Ca^{2+} 诱导形成的牛脑PS脂质体六角形(H_{II})逆转为脂双层结构。氯普吗嗪在pH6时,可使DOPE脂质体形成六角形(H_{II})结构。但氯普吗嗪却使PC-DOPA混合磷脂脂质体在上述pH时生成类脂颗粒,醇类麻醉药,链烷类麻醉药以及其它类型局部麻醉药均能影响PE脂质体使它形成六角形(H_{II})结构。

三、生物膜中的非双层类脂结构

上述实验结果表明,无论从生物膜或天然

材料中提取的类脂或人工合成磷脂,在适当条件下均能形成六角形(H_{II})结构。但在完整的生物膜中是否也存在非双层类脂结构,是需要进一步探讨的问题。人红细胞膜是生物膜中典型的代表,从 ^{31}P NMR谱上示出的类脂分子绝大部分呈脂双层结构,这种脂双层排列相当稳定,如果采用各种方法使膜上组分降解,也不易生成非双层类脂结构。这可能主要是膜蛋白的影响。有人推测之所以红细胞寿命较长,并在血管中不断地流动也不产生溶血现象,这与它有稳定的脂双层结构有关。如果在红细胞膜中加入一种融合剂(如油酸或单油酰甘油酯)则可使红细胞膜的脂双层结构发生扰乱,促使其向六角形(H_{II})转变,因而被认为在细胞融合过程中,可能产生非双层类脂结构^[12]。从大鼠、牛以及家兔肝细胞中分离内质网,并从中制备管状部分,再用 ^{31}P NMR测定,可观察到内源磷脂脂双层内部都在37℃时,出现翻转团粒与圆柱形结构,这种现象表明在生物膜内大量的脂双层类脂分子与形成六角形(H_{II})的类脂分子在进行快速交换,在30℃时, ^{31}P NMR谱上主要反映出脂双层结构。在低温情况脂质体也能出现这种结构。 ^{31}P NMR也能测定完整内质网膜脂双层与六角形(H_{II})结构转变过程,这种转变与温度有密切关系。肌质网膜及线粒体内膜也有非双层类脂结构。用 ^{31}P NMR与冰冻断裂电子显微镜技术研究大肠杆菌质膜,当细菌生长温度为37℃,分离出的质膜在25℃时,用 ^{31}P NMR测定,其主要结构为脂双层;若大肠杆菌质膜在37℃或45℃测定,则可出现六角形(H_{II})结构^[13]。四膜虫纤毛膜中PE占膜类脂中主要部分,膜中也有六角形(H_{II})结构^[14]。

四、生物膜中非双层类脂结构与生理功能

生物膜中某些类脂分子在适当条件下能够形成非双层类脂结构,它可以与脂双层结构互相转变,转变过程中有一中间阶段,可以从冰冻断裂电镜下,看到“类脂颗粒”,这种类脂颗粒相

当于脂双层内部翻转团粒结构^[14]。在生物膜中这些非双层类脂结构有哪些生理功能是令人注意的问题。例如生物膜中类脂的翻转运动,易化运送以及细胞融合等。由于膜类脂分子在膜上分布的不对称性,有的类脂在脂双层内部容易生成翻转团粒,可能翻转团粒结构是膜类脂跨膜翻转运动的中间过渡形式,图6示出脂双层中翻转团粒形成过程模型。用³¹P NMR研究内质网膜、肌质网膜均能显示出磷脂分子快速翻转运动。大肠杆菌膜磷脂也具有类似运动。膜的易化运送过程中也能产生类脂翻转团粒结构。 Ca^{2+} 可促使 DPG-PC 脂质体形成翻转团粒,心磷脂具有 Ca^{2+} 离子载体作用。³¹P NMR 与冰冻断裂电子显微镜可观察到卵黄 PE/DOPC/胆固醇/DOPA (50:16:30:4) 混合脂质体的非双层类脂结构。由于非双层类脂结构的出现,可以促进 PC 跨膜运动。

细胞融合时一般需有 Ca^{2+} 存在,而 Ca^{2+} 又能导致某些类脂分子形成非双层类脂结构。例

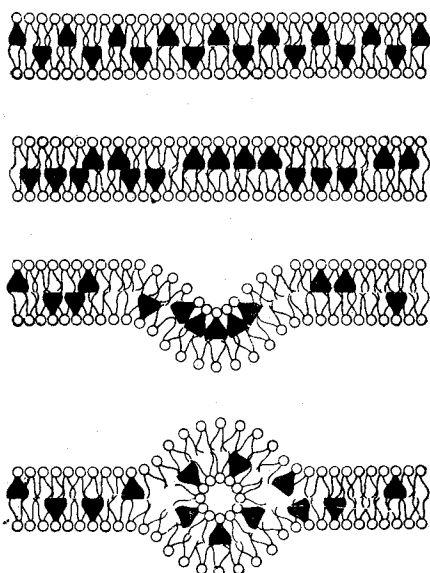


图6 类脂分子在脂双层内部形成翻转团粒结构导致膜类脂跨膜运动时分子重排模型图

(引自 *Biochim. Biophys. Acta*, 559, 399, 1979)

如 Ca^{2+} 既促使心磷脂脂质体形成非双层类脂结构,又能使牛心磷脂与卵黄 PC (50:50 克分子%)脂质体产生融合,同时产生翻转团粒结

构。因而生物膜的融合现象可能与非双层类脂结构有必然联系。红细胞膜膜上类脂在内侧分布比例 PE 占 49%, PS 占 25%, PC 与鞘磷脂各占 12%, 因而 Ca^{2+} 容易使红细胞膜内层形成六角形 (H_n) 结构,其原因可能是 PE 含量较高。上述结果表明,生物膜上非双层类脂结构是生物膜对不同生理功能的适应,它具有某些特殊的作用。但机制尚须进一步探讨。

五、结论与展望

生物膜非双层类脂结构模型的提出,仅是最近两年的事,最初这个设想也遭到一些人的怀疑,但从最近一年多的研究工作来看,支持这种设想的人日益增多。最近 Kachar 等^[16]发现大鼠前列腺上皮细胞膜紧密接合部为非双层类脂结构,这些事实均说明生物膜类脂多形性确实存在。

由于生物膜上类脂组成复杂,功能各异,如果生物膜上脂双层是唯一结构,那么 PC 与鞘磷脂就足以保持这种结构,其它各种类脂的作用仍不清楚。在生物膜上除以脂双层为其基本结构外,还可能有其它结构。支原体是最小的原核细胞,膜的磷脂主要是 PG,据报道,一般支原体膜上以脂双层排列的类脂结构仅占 80% 左右,其他类脂具有非双层结构是完全可能的。生物膜非双层类脂结构与类脂在生物膜上的作用有密切关系,对它的研究必将为今后膜的研究工作开辟广阔的道路。

参 考 文 献

- [1] Singer, S. J. et al.: *Science*, 175, 720, 1972.
- [2] Luzzatti, V. et al.: *J. Cell Biol.*, 12, 207, 1962.
- [3] Cullis, P. R. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 559, 399, 1979.
- [4] Verkleij, A. J. et al.: *Nature*, 279, 162, 1979.
- [5] Reiss-Husson, F.: *J. Mol. Biol.*, 25, 363, 1967.
- [6] Cullis, P. R. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 507, 207, 1978.
- [7] Cullis, P. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 513, 33, 1978.
- [8] Papahajopoulos, D. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 135, 624, 1967.
- [9] Venetic, R. V. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 645, 262, 1981.

- [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。