生物膜的生物物理观*
——从微区到脂筏

王景雪 张兴堂 蒋晓红 李蕴才 黄亚彬 杜祖亮**
（河南大学特种功能材料省重点实验室，开封 475001）

摘要 大量的实验表明，在细胞质膜中，由于不同成分具有不同的生物化学特性，发生相分离而局部形成微区．不同的微区可行使不同的功能．近年来一种富含胆固醇、鞘脂类以及大量的受体和信号分子的液态有序相的微区，即脂筏（lipid rafts），由于被发现参与信号转导和一些物质的生理循环过程而备受关注．随着实验手段的提高，人们对生物膜在分子水平上认识的不断深化，脂筏结构和功能的物理、化学基础研究方面也取得了初步的进展．

关键词 微区，相分离，脂筏
学科分类号 Q73

现代生物物理学研究的一个重要目标就是阐述生物分子和它们聚集体的结构、组织及功能之间的联系．早在 1977 年，Jain 和 White 就提出了生物膜结构的微区（Microdomain or lipid domains）模型，指出生物膜是由处于动态的微区（domains）组成（实验已证实）[1~3]，这一模型强调了质膜的流动镶嵌模型的镶嵌块特征．进一步研究发现，在这些富含鞘脂类和胆固醇的微区（现称为脂筏）具有独特的物理化学特性，即其形成的液态有序相漂浮于甘油磷脂的流体海洋中[4~7]，在生物生理过程中发挥着重要的作用．1992 年 Brown 和 Rose[8] 通过周密详实的实验提出了脂筏（lipid rafts）的假设，旨在说明这类脂锚定蛋白和信号激酶可以进出的特殊微区，而且脂筏已被证实是由大小为 10 ~ 100 nm 的膜片（membrane patches）组成，且可以作为中介将与它相互作用的细胞蛋白和外周蛋白输送到细胞表面．近几年来新发展起来的实验手段，如扫描探针显微镜（SPM）等已经可以观察到生物膜纳米尺度上的结构和动态特性，从而使在分子水平上阐述生物膜微结构和功能的物理化学机制成为可能．

1 生物体系中的相分离

脂类通常以长程有序的二维体系聚集在一起，然而在脂肪酰链区通常有相当的无序微区存在．简单的双组分和三组分膜模型体系展现了脂类组织的几个基本特性．对一种由两种脂类组成的生物膜，如果温度在两种脂类的相变温度之间，体系的物理状态将是凝胶和流体相共存，即会发生相分离，形成微区（图 1）[9]．当然，对于同一种磷脂，如果处于两相共存区，也会发生相分离，比如，二棕榈酰磷脂酰胆碱（DPPC）处于液态凝聚相和液态扩张相共存区[10,11]．

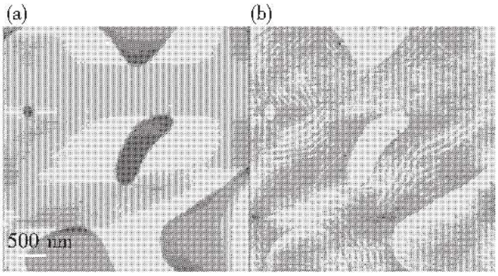

Fig. 1 DFM morphologic（a）and phase image（b）of DSPC/DMPC 1∶1 bilayer in PBS buffer solution (31.7℃)[9]
图 1 轻敲模式 AFM 的 DSPC/DMPC 1∶1 脂双层在 PBS 缓冲液(31.7℃) 中的形貌像(a) 和相位图(b)[9]

为了深刻理解生物组成成分之间的相容性、微区形状以及这些复合结构的分子排布情况，对磷脂与胆固醇、糖脂类、多肽以及蛋白质[5]的复合膜也有相当多的研究．结果表明，生物膜中发生相

* 国家自然科学基金（90306010，20371015）和国家重点基础研究发展规划前期专项资助项目（973）（2002CCC02700）．
** 通讯联系人．
Tel（Fax）：0378-2867282，E-mail：zld@henu.edu.cn
收稿日期：2004-05-27，接受日期：2004-06-30

分离的因素是很多的[12]，但主要有以下几个：a. 类脂的碳氢链. 不同的碳氢链在生理温度下，具有不同的疏水性和相态. 疏水性的不匹配（类脂分子之间的相溶性）是决定膜的整体有序度的一个关键因素，比如由带特长和特短脂肪链的脂类按一定摩尔比组成的脂双层，便会由链长的不匹配产生一些局域无序态，相态的不互溶发生一定的相分离. b. 头基. 类脂的头基是多种多样的，头基的大小和带电性，以及特殊头基间相互作用形成的氢键也会影响膜的结构. c. 膜中胆固醇和膜蛋白的加入也会形成微区结构. 胆固醇分子对膜结构特性有显著影响：当它平行插入磷脂分子之间，其刚性的四环核与磷脂脂肪酰链的相互作用，可改变脂肪链排布的紧密程度——增加凝胶相的流动性（无序性）和增强流体相的刚性（有序度）. 当胆固醇加入凝胶/流体相共存的双组分脂类体系中，情况则更为复杂，在特定的体系中，温度和摩尔比一定时，会出现一种液态有序相. 该相中，胆固醇的含量比较高，脂肪链区域比较有序. 而且，胆固醇含量的降低，可增加体系的相分离程度，而胆固醇含量的提高，可降低相分离程度甚至使相分离消失. 液态有序相正是后一种情况[13]. 许多跨膜蛋白通常通过配体聚集或者偶联在膜中形成特定区域，例如 Shiga 病毒通过鞘糖脂受体存在于细胞表面，只是受体在小窝（caveolae）中聚集而有效的地包于其中，偶联的糖肌醇磷脂锚定蛋白、Src 家族激活酶等易嵌入富含胆固醇-鞘磷脂的区域组成特殊的脂类-蛋白质复合体. d. 膜的曲率. 膜中分子的形状大概可分为三类：圆柱、圆锥和倒圆锥. 头基和尾巴横截面积大致相等的磷脂，如饱和的和仅一个不饱和键的磷脂酰胆碱易形成圆柱构型；像溶血磷脂这样的头基截面大于尾巴的，易形成倒圆锥构型；而诸如磷脂酸、磷脂酰丝氨酸这类头基截面小于尾巴截面的易形成类似圆锥的构型. 单从几何形状考虑，圆柱构型的分子易形成平板双层膜，圆锥和倒圆锥构型的分子易形成反曲率的分子膜. 值得一提的是许多细胞转导（比如囊泡、微管的形成，发生内吞作用囊泡的变换和融合等）都伴随着细胞膜曲率的巨大变化. 另外，根据生物膜中分子的构型，可推测一些特殊复合体中的分子排布情况.

大量的研究已经证明，许多生物膜都会发生相分离，形成微区. 不同成分的大的（微米量级）微区已经在特定细胞（比如极化上皮细胞的顶部和底部、神经元的轴突和体细胞以及哺乳动物精子的头部和尾巴）中观察到[3,14]. 然而，大多数在 10～100 nm 之间的细胞岛状结构（domains）称为微区（microdomains），由于它们太小，无法在光学显微镜中直接被观测到，给研究它们的各种特性带来了很大的困难. 近几年来，新的实验技术和研究方法使得清楚观测细胞膜高分辨率的微观结构和动态特性成为可能，从而极大地加深了对生物膜结构模型与功能的研究.

2　脂筏（lipid rafts）

含有不同种类磷脂的脂质体会形成不同组分相分离的微区，已为大家理解和接受. 人们发现这些

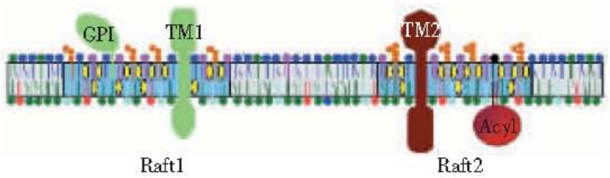

Fig.2　Structure of lipid rafts (From L. J. Pike. J Lipid Research, 2003, 44: 655~667)

图 2　脂筏的结构示意图(引自 L. J. Pike. J Lipid Research, 2003, 44: 655~667)

: PC; : PE; : PS; : PI; : SPM; : Chol; : Gang.

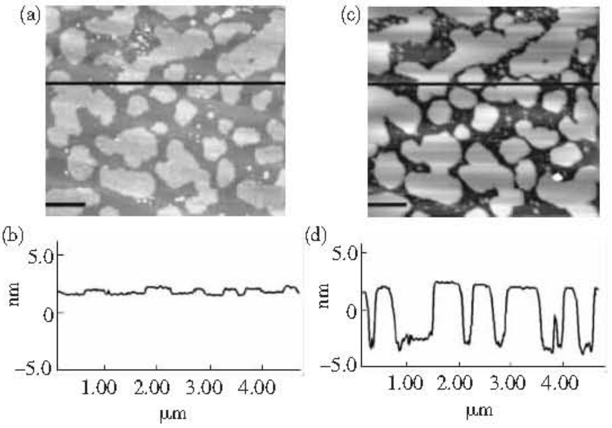

Fig. 3　Visualization of SpM /DOPC bilayer (1∶1) containing 25% cholesterol (molar ratio) before (a) and after (c) processed by Triton X-100 detergent at 4℃[6]

图 3　Sph /DOPC (1∶1) 和摩尔百分比为 25% 的胆固醇脂双层膜在用冷的(4℃) Triton X-100 去垢剂处理前(a) 后(c) AFM 形貌的变化[6]

图中亮的区域由 SpM 和胆固醇组成，（a）中暗的区域为处于流体相的 DOPC（高度差为 1 nm）；（c）中暗的区域表示溶去 DOPC 后形成更大高度差（5.5 nm）.（b）和（d）分别为（a）和（c）图中直线对应的高度差分析. 图中标尺为 1 μm，高度标尺为 10 nm.

微区因组成和结构不同而具有不同的生物功能．有一种由鞘糖脂、鞘磷脂（SpM）和胆固醇（Chol）以及特殊的蛋白质组成的微区，在生物生理过程中具有重要的作用．这种不溶于冷去垢剂 Triton X-100 糖脂富含区的微区被称作“脂筏”（lipid rafts）（其结构示意图见图 2，原子力显微镜（AFM）图像见图 3，分子构型示意图见图 4）．2001 年在西班牙召开的欧洲研究讨论会（EURESCO）上对该方面的研究作了专题的讨论，Meer[15] 于 2002 年在《Science》上综述了此专题：脂筏是膜脂双层内含有特殊脂质及蛋白质的一种液态有序相微区．在生物物理方面，我们比较关心这种微区的相行为、结构、大小、分子成分、动力学以及脂类之间的相互作用等问题．

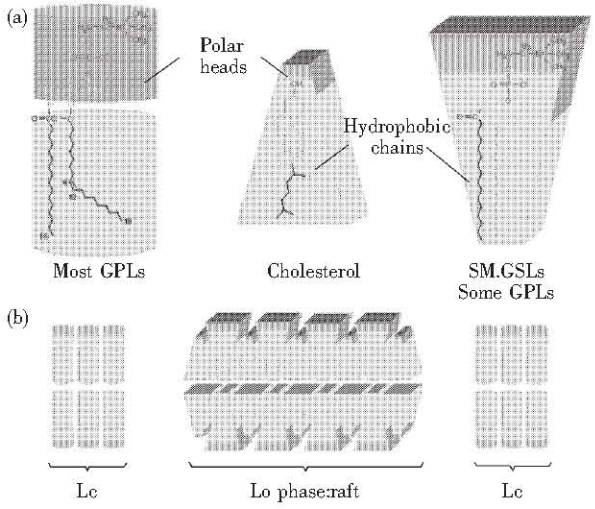

Fig. 4 Lipid organisation in raft microdomains: a simplified model based on the theoretical shape of membrane lipids[4]

图 4 脂筏微区中脂类分子排布的简单理论模型[4]

2.1 脂筏的形成、相结构特点和组成成分之间的相互作用

鞘磷脂的两条疏水链大多较长且高度饱和，这使得它们能够充分伸直而紧密排布，这也是脂筏组装体的一个重要特征．鞘脂类和磷脂不同的排布能力可能正是他们的混合膜发生相分离的关键因素．因此，富含鞘磷脂的脂筏与大家熟悉的疏松无序排布的磷脂区是共存的．处于不同相态（大多是液态凝聚相和类固态的凝胶相）的脂类之间发生的相分离已得到了广泛的研究．众所周知，在纯的磷脂双层中加入胆固醇，可使正常的胶态和液态凝聚相之间明显的热转变相消失，这表明了高浓度胆固醇的环境下，有序态和无序态不能共存．进一步研究表明，在胆固醇和两种磷脂的混合体系中可发生一种不同的相分离行为：类液晶相区和一种新的液态有序相区共存，在这种新的液态有序相中，脂类的脂肪酰链充分伸直并密集排布，和胶态类似，但有高度的侧向流动性．

脂筏可能存在于这种液态有序相或者具有与之类似的相态中．因此我们可以说脂筏以液态有序相存在．这些研究结果证实，在含有两种磷脂（或其中一种是鞘磷脂）与胆固醇的三项混合体系（它们具有不同的熔点）中，可以发生两个并列的液态有序相/液晶相和胶态相/液晶相的相分离：磷脂/鞘脂类混合体系既可在没有胆固醇存在的情况下，发生胶态和液晶态之间的相分离，也可以在胆固醇存在的情况下发生液态有序相和液晶相之间的相分离．

胆固醇可以促使相分离行为的发生．因此，胆固醇存在下形成液态有序相所需要的鞘脂类含量，比没有胆固醇情况下形成胶态需要的鞘脂类量少，在鞘脂类含量相对较少的细胞膜中形成脂筏，胆固醇的耗尽导致脂筏的破裂而影响脂筏的功能，再者，这也可以解释相变温度处于 37～41℃ 的神经鞘磷脂，可以和具有较高熔点的鞘甘脂一样有效地促使脂筏的形成，但其稳定性没有胆固醇形成的脂筏好[7]．究其根本原因，可能是饱和脂类与胆固醇之间的相互作用．另外，SpM 有更多的官能团参与在极性头基区形成氢键，然而氢键对胆固醇和/SpM 相互作用到底有多大的贡献，现在仍不清楚[7]．

由于类脂的头基也是调节类脂排布结构的一个重要因素，因此它们对脂筏的形成起着重要的作用．比如，磷脂酰乙醇胺，头基很小，和对应的磷脂酰胆碱相比，具有较高的熔点温度，这种作用可能在鞘脂类含量较少而磷脂酰乙醇胺较多的脂双层内叶中更为重要[15]．

2.2 脂筏（**lipid raft**）的大小、种类、结构和功能

脂筏这类特殊的微区，其尺寸大多数在纳米量级上（数十个到上百个纳米），由于太小而无法用光学显微镜观测到，故而长期徘徊在我们的视野之外．脂质双层中含有的脂筏是不同的：外层的微区主要含有鞘脂、胆固醇及 GPI 锚固蛋白，这种流动性差，而且黏稠的区域与邻近多含不饱和脂肪酸的磷脂区发生分相；膜内侧也有相似的微区，但与外

侧的脂质不完全相同，其具体的化学成分至今仍不完全清楚，除了知道在此区有许多酰化的蛋白质（比如信号转导蛋白）和胆固醇，不含鞘磷脂（图2）. 虽然两层分别有脂筏，但它们是偶联的[15]，而且发现在一定条件下内外层的成分可以发生上下翻转[16]. 以前人们研究用非离子性去垢剂提取出来的脂筏，其许多生物物理特性其实已经遭到了损坏. 因而，人们为了对细胞膜造成较小的损伤，转向了原位的测试研究脂筏. 这种早期的实验结果表明，脂筏在质膜里以微米尺寸大小团簇在一起. 然而，人们对富含脂筏微区的动力学特征，特别是在细胞激活过程中，还不清楚. 为此，Jordan 等[17]用时间分辨共聚焦荧光显微镜，研究了一系列活体细胞表达靶向脂筏 GFP 融合蛋白的过程，包括富含脂筏的微区在细胞膜外叶片、附有抗体的乳珠/T 细胞受体界面以及 T 细胞/B 细胞（含抗原）界面（免疫抗原表达过程）的运动. 研究结果证实了含脂筏的微区是运动的.

脂筏可能有三类：小窝、富含糖鞘脂膜区、富含多磷酸肌醇膜区. 不同的脂筏有其各自的特异蛋白，并有不同的功能. 小窝是脂筏中最主要的一种，由胆固醇、鞘脂（糖基神经鞘脂、神经鞘磷脂）及蛋白质组成，大约有数十个纳米，形态有多种多样，有瓶型、囊泡型及管型，多数是瓶型. 在细胞表面有开放型，如形成胞吐囊泡，也有封闭型，如形成胞吞囊泡. 小窝表面由曲纹覆盖，曲纹主要由小窝蛋白结合胆固醇而成. 胆固醇与小窝蛋白的比例大约在4.5∶1，小窝蛋白是小窝的标记蛋白. 脂筏内的蛋白质，有的是经跨膜直接插入膜，但更多的蛋白质需酰化，由酰化后的脂肪酸插入膜，而且不同的酰化蛋白插入不同的脂筏. 在脂筏中有许多蛋白质聚集，便于相互作用. 脂筏的环境有利于蛋白质的变构，形成有效的构象. 从而使它具有许多功能：参与信号转导[18]、参与细胞蛋白质运转（包括参与跨细胞运转、细胞胞内吞作用和细胞分选）[18~21]、参与胆固醇、鞘磷脂的体内循环过程. 脂筏生理功能具有多向性，如果它的正常生理过程发生改变，则会引发多种疾病.

其实，对脂筏的研究，不仅有借助于仪器的实验工作，而且还有理论方面的模拟[4]，比如脂筏（lipid-rafts）中的分子排布可根据分子的构型进行推测（图4）. 这是目前对脂筏研究的一种主要方法和结果.

3　微区和脂筏的区别与联系

我们已清楚知道，微区（lipid domains）和脂筏（lipid rafts）都是由不同膜成分之间相分离的结果. 前者普遍存在于生物膜中，只要生物膜中的成分不互溶（液态扩张相/液晶相，液晶相/凝胶相，液晶相/液态有序相），就会有微区存在；而脂筏是膜脂双层内含有特殊脂质（鞘脂类、胆固醇）及信号蛋白的一种液态有序相动态微区，一种结构、成分和功能特殊的微区. 比如现在已经比较清楚的质膜外叶中富含胆固醇-鞘磷脂的微区和内外叶片中都存在的小窝.

4　存在的问题及研究前景

有关生物膜结构与功能之间的关系是一项富有挑战性的研究工作，至今仍有不少问题有待深入研究，比如内膜的组分与结构和膜脂双层的动态结构，现在仅知道不同头基的磷脂在质膜内外叶片中的分布是不对称的. 但是目前在理论方面建立起来的分子模型和分子力学（MM）、分子动力学（MD）、量子力学（QM）、蒙特卡洛 MC（Monte-Carlo）、布朗（Brownian）动力学等计算机模拟手段和在实验仪器方面的改造和创新，特别是随着纳米科技的发展，显微成像技术和显微光谱显示了独特的优越性，使得在分子层次上研究脂筏的结构和功能成为可能.

原子力显微镜（AFM）由于对操作环境的要求不高，使得 AFM 不仅可以对生物分子在其固有的状态下进行高分辨成像，而且可以对生物分子进行操纵. AFM 对微小相互作用力的灵敏度，使其成为探测控制无数生命过程分子间相互作用力的有效工具. 单分子力谱与高分辨成像的结合使得分析生物分子的分子内力、分子间力成为可能，其中包括脂双分子层中的脂筏微区的模拟研究和直接观察. D'Onofrio 研究组[1]通过联合同步双色荧光显微镜技术，微管吹气以及光学捕获技术，将不同时刻拍下的图片进行堆叠，从而首次得到在 1 s 时间尺度上，大视场生物囊泡的二维相分离微区的三维动态分布. 这为我们全面理解相分离微区和脂类之间的相互作用提供了便利，也为理解和控制模拟生物膜的局部结构和膜的曲率，从而达到对膜功能（比如膜的融合和运输）空间控制的长期目标. Müller 和 Bonn 等[22~26]利用分子的特异性识别，联合相干反斯托克斯拉曼散射（CARS）和频发生器

（SFG）光谱，得到脂筏及连续相的热力学特性、化学组成、脂筏的动态尺寸、胆固醇在这些相态中的空间分布情况以及其含量对脂筏动态特性的影响，从而得到脂双层内外叶片中相分离微区（包括脂筏）的存在证据，确定脂筏的时空尺度，分析判断脂双层内外叶片中脂筏耦合的形成机理.

总之，随着实验和理论方面对脂双层膜的成分和形成微区之间的基本关系进一步阐明，生物膜结构与功能之间的关系将进一步明朗，其生物生理功能的物理和化学基础也将逐步被认识.

参 考 文 献

1 D'Onofrio T G, Binns C W, Muth E H, *et al.* Controlling and measuring local composition and properties in lipid bilayer membranes. J Biol Phys, 2002, **28** (4): 605 ~617

2 Wolf D E, Kinsey W, Lennarz W, *et al.* Changes in the organization of the sea urchin egg plasma membrane upon fertilization: indications from lateral diffusion rates of lipid-soluble fluorescent dyes. Dev Biol, 1981, **81** (1): 133 ~138

3 Brown D A. Seeing is believing: Visualization of rafts in model membranes. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, **98** (19): 10517 ~ 10518

4 Jacques F, Nicolas G, Radhia M, *et al.* Lipid Rafts: Structure, Function and Role in HIV, Alzheimer's and Prion Diseases. http://www.erpertreviews.org/02005392h.htm, 2002-12-20

5 Rinia H A, de Kruijff B. Imaging domains in model membranes with atomic force microscopy. FEBS Letters, 2001, **504** (3): 194 ~199

6 Rinia H A, Snel M E, de Kruij B, *et al.* Visualizing detergent resistant domains in model membranes with atomic force microscopy. FEBS Letters, 2001, **501** (1): 92 ~96

7 Mattjus P, Slotte J P. Does cholesterol discriminate between sphingomyelin and phosphatidylcholine in mixed monolayers containing both phospholipids? Chem Phys Lipids, 1996, **81** (1): 69 ~80

8 Brown D A, Rose J K. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipids-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. Cell, 1992, **68** (3): 533 ~544

9 Li G B, Hyde R, Colyer J, *et al.* Atomic force microscopy of lipid bilayers and membrane bound proteins. http://www.astbury.leeds.ac.uk/Report/2001/Report/42Smith.Atomicforce.pdf

10 Shiku H, Dunn R C. Direct observation of DPPC phase domain motion on mica surfaces under conditions of high relative humidity. J Phys Chem B, 1998, **102** (19): 3791 ~379

11 Masai J, Shibata-Seki T, Sasaki K, *et al.* Scanning force microscopy characterization of thin lipid films on a substrate. Thin Solid Films, 1996, **273** (2): 289 ~296

12 Mukherjee S, Maxfield F R. Role of membrane organization and membrane domains in endocytic lipid trafficking. Traffic, 2000, **1** (3): 203 ~211

13 Yuan C B, Furlong J, Burgos P, *et al.* The size of lipid rafts: an atomic force microscopy study of ganglioside GM1 domains in sphingomyelin/ DOPC/cholesterol Membranes. Biophys J, 2002, **82** (3): 2526 ~2535

14 Bagnat M, Keränen S, Shevchenko A, *et al.* Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, **97** (7): 3254 ~3259

15 Meer G V. The different hues of lipid rafts. Science, 2002, **296**: 855 ~857

16 van Blitterswijk W J, van der Luit A, Caan W, *et al.* Sphingolipids related to apoptosis from the point of view of membrane structure and topology. Biochem Soc Trans, 2001, **29** (6): 819 ~ 824

17 Jordan S, Rodgers W. T cell glycolipid-enriched membrane domains are constitutively assembled as membrane patches that translocate to immune synapses. J Immunology, 2003, **171** (1): 78 ~87

18 Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. Nature Rev Mol Cell Biol, 2000, **1** (1): 31 ~39

19 Edidin M. Lipid on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. Nature Rev Mol Cell Biol, 2003, **4** (5): 414 ~418

20 陈 岚，许彩民，袁建刚，等. 脂筏的结构与功能. 生物化学与生物物理进展，2003，**30**（1）：54 ~59
Chen L, Xu C M, Yuan J G, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2003, **30** (1): 54 ~59

21 杨福愉. 生物膜结构研究的一些进展. 生物化学与生物物理进展，2003，**30**（4）：495 ~502
Yang F Y. Prog Biochem Biophys, 2003, **30** (4): 495 ~502

22 Roke S, Schins J M, Müller M, *et al.* Vibrational spectroscopic investigation of the phase diagram of a biomimetic lipid monolayer. Phys Rev Lett, 2003, **90** (12): 128101

23 Müller M, Schins J M. Imaging the thermodynamic state of lipid membranes with multiplex CARS microscopy. J Phys Chem B, 2002, **106** (14): 3715 ~3723

24 Wurpel G W H, Schins J M, Müller M. Chemical specificity in 3D imaging with multiplex CARS microscopy. Opt Lett, 2002, **27** (13): 1093 ~1095

25 Schins J M, Schrama T, Squier J, *et al.* Determination of material properties by use of third-harmonic generation microscopy. J Opti Soc Am B, 2002, **19** (7): 1627 ~1634

26 Bonn M, Hess C H, Miners J H, *et al.* Novel surface vibrational spectroscopy: Infrared-infrared-visible sum frequency generation. Phys Rev Lett, 2001, **86** (8): 1566 ~1569

Biophysical Viewpoint of Biomembrane: From Microdomains to Lipid Rafts*

WANG Jing-Xue, ZHANG Xing-Tang, JIANG Xiao-Hong, LI Yun-Cai, HUANG Ya-Bin, DU Zu-Liang**

(*Key Laboratory for Special Functional Materials, Henan University, Kaifeng* 475001, China)

Abstract Many investigations revealed that, because of different biophysical and biochemical properties of different ingredients of plasma membrane, they are phase-separated into local domains. Different domains may have different functions. In the past few years, a special kind of cholesterol, sphingolipids, receptor and signal molecules-rich liquid-ordered domain, lipid rafts, which have been implicated in processes as diverse as signal transduction, cell sort, endocytosis and cholesterol trafficking, have been paid much attention. Hereupon, primary progress has been made in fundamental investigations on the structure and function of lipid rafts.

Key words microdomains, phase-separation, lipid rafts

---

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (90306010, 20371015) and The Special Funds for Major State Basic Research of China (2002CCC02700).

** Corresponding author. Tel (Fax): 86-378-2867282, E-mail: zld@henu.edu.cn

Received: May 27, 2004 Accepted: June 30, 2004