

生物膜及其功能的量热学研究

傅 亚 珍

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

生物膜具多种重要生理功能, 因此近十几年, 国际上对生物膜的研究已深入到生物学、医学的各个领域, 成为当前分子生物学中最活跃的领域之一。

七十年代以来, 很多物理学和生物学技术都证明膜脂流动性是膜结构的一个基本特征, 也是膜行使多种功能的重要体现。膜中各部分的流动性是不均匀的, 它与环境及生理状态有关。生物膜的流动性主要体现为膜脂的流动性和膜蛋白的运动性。膜脂的流动性主要是指膜脂中脂肪酸烃链的运动。在正常生理条件下, 膜脂大多呈液晶相, 当温度降低至某一温度时, 它们可以从流动的液晶相转变为凝胶相(流动性降低), 反之凝胶相也可以通过升高温度熔融为液晶相(流动性增加), 这一相变称为热致相变, 这一转变温度称为相变温度。生物膜的热致相变即膜脂的热致相变与膜脂质的分子组成、膜的化学组成(如功能蛋白、胆固醇等)和物理性质以及其它物质(如药物)的作用密切相关。因此, 生物膜热致相变的研究对于弄清生物膜流动性的本质具有重要意义, 可以为进一步了解生物膜的结构与功能提供重要依据。

六十年代中期差示扫描量热计(DSC)的诞生及日趋精密, 为生物膜的研究开辟了新的途径。量热技术具有其它技术所不能比拟的优点^[1]。用它, 通过测定热致相变温度、相变焓、相变熵以及协同性相变单元的大小, 可以进行很多与膜结构和功能有关的机理研究。所以量热技术已成为生物膜研究必不可少的重要手段。

一、生物膜的热致相变

生物膜的热致相变系指膜脂质的热致相

变。因膜脂质本身组成复杂, 它又受膜上多种组分的影响, 因此导致其热致相变很复杂。主要表现是相变温度范围较宽, 即在一个较宽的温度范围内会同时存在凝胶相脂部分和液晶相脂部分。这可使膜具有一定程度的流动性以完成其特定的生理功能。

下面简单介绍有关植物膜, 支原体膜, 细菌膜及哺乳动物膜的热致相变的量热学研究。

1. 植物膜的热致相变

植物膜脂的组成与膜热致相变关系密切。高等植物膜脂中主要的脂肪酸有月桂酸, 肉豆蔻酸, 棕榈酸, 棕榈油酸, 硬脂酸, 油酸, 亚油酸, 亚麻酸, 花生酸和花生四烯酸。研究结果表明, 膜脂质的脂肪酸链越短, 不饱和度越高, 膜的相变温度越低, 膜的流动性越大。例如将甘薯块根和马铃薯块茎进行低温处理, 可以看到含不饱和磷脂少的甘薯线粒体在 8°C — 10°C 发生线粒体膜的相变, 同时产生一系列生理学上的变化并发生冷害。而含不饱和磷脂多的马铃薯线粒体在 1.5°C — 2.5°C 还不发生膜相变也没出现任何生理变化及冷害。可见膜中脂质结构与膜流动性有关也与冷害有关。其它如顺磁共振波谱技术, X-射线衍射技术都证实了不同植物的生物膜在相同温度下其流动性不同。

2. 支原体膜的热致相变

在支原体中研究的最早最多的是莱氏无胆甾原体 (*Acholeplasma Laidlawii*), 它可以在没有胆固醇供给的情况下生存。早在 1968 年 Steim 等人^[2]就用 DSC 技术证实了单细胞的莱氏无胆甾原体的膜有协同的热致相变现象。

不同的支原体膜其相变温度差别很大 (-20°C — $+50^{\circ}\text{C}$), 与其生长介质中脂肪酸的组成有关。实验结果表明生物膜的热致相变与

脂中碳氢链的结构有密切关系。

支原体膜的热致相变还间接受到不饱和脂肪酸合成的抑制剂 3-癸炔酰-N-乙酰胱胺的影响,量热学的实验表明,该抑制剂可以使膜的相变温度升高,即促进膜的凝胶化,所以高浓度的该抑制剂是支原体的致命因子,当膜的相变温度高于生长温度细胞生长便停止。细胞膜的流动性不仅影响细胞生长而且也影响细胞形态。例如,生长在富有不饱和的有分支的脂肪酸介质中的丝状支原体呈丝状,但如果生长在含有直链饱和脂肪酸的介质中则细胞变成球状,最后膨胀至胞溶。以上实验结果说明维持细胞膜一定程度的流动性对细胞形态和细胞正常生长都是非常重要的。

Wallace 等人^[3]研究了 *A. laialawii* 中脂的物理状态对膜蛋白分布的影响,他们从 X-射线衍射、电子显微镜及 DSC 技术所得的资料中表明蛋白质在膜中的位点是可以移动的,它们间的相对位置受膜脂质的物理状态的影响。作者认为生物膜中各种类脂能调节膜流动性以便影响膜蛋白分布进而影响膜蛋白功能。

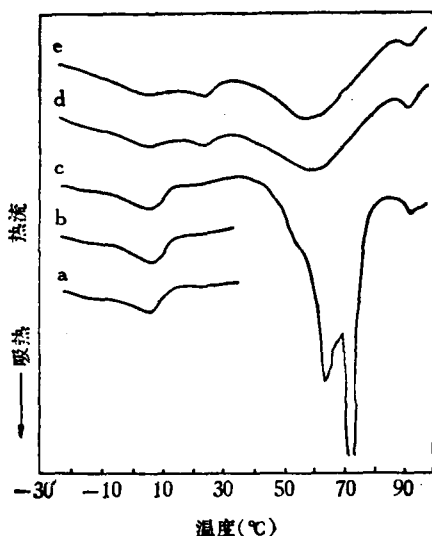


图1 大肠杆菌的 DSC 曲线

a 和 b 是内膜相变曲线,峰温为 5℃,c 曲线是从 -20℃ 扫描到 100℃ 的加热曲线,第一个小峰是内膜相变峰,60℃—70℃ 的峰是蛋白质变性峰。a、b、c 三曲线是大肠杆菌活细胞的指纹曲线。d 曲线是在 c 曲线完成以后冷却再扫描的加热曲线,20℃ 左右出现另一可逆的峰,此峰为外膜相变峰,同时高温侧存在一个面积变小的蛋白质变性峰

3. 细菌膜的热致相变

细菌膜比支原体膜的结构复杂,它由内外两层组成。

Melchior 等人^[4]用 DSC 技术研究了野生型大肠杆菌 W₉₄₅ 细胞(培养温度为 20℃)的热致行为。结果如图 1 所示。

Jackson 1976 年用高灵敏的 DSC 对大肠杆菌的膜和脂的热致相变进行了研究。通过改变生长介质中脂肪酸的种类而改变其膜上脂的脂肪酸成分,同样发现膜的相变温度与膜中脂质的脂肪酸成分密切相关。

一种嗜盐菌 (*Halobacterium halobium*), 具有两种带色的膜,红膜与紫膜。紫膜很硬,组成简单,它含有磷脂,发色团和唯一的蛋白——视紫红质。紫膜高度的结晶性、紫膜与红膜在膜中的区域性分布以及膜在高浓度盐中所具有的稳定性的都是热力学研究感兴趣的课题。Jackson 和 Sturtevant^[5] 对紫膜进行了 DSC 研究。

McElaney 和 Souza 用 DSC 技术研究了嗜热需硬脂酸的芽孢杆菌的生长温度、膜脂组成和脂的相变之间的关系。他们发现这种杆菌生长的温度范围是 37℃—72℃,最佳的生长温度是 65℃,杆菌可以通过恒粘适应 (homeoviscous adaptation) 机制,改变膜脂的脂肪酸组成使从凝胶到液晶的相变温度总是比生长温度低 10℃,这说明高于相变温度时细胞仍能正常生长,因此本质上相变温度不能作为最高的生长温度的度量。

4. 哺乳动物膜的热致相变

哺乳动物的细胞膜比细菌膜更复杂,它不仅有多种脂和蛋白而且有较高含量的胆固醇,因此哺乳动物细胞膜的热行为比较复杂,流动性的调节机制也比较复杂^[6-7]。

Lacbrooke 等人在 1968 年首先开始研究哺乳动物细胞膜的热致相变。他们用 DSC 技术在新鲜的水合的牛脑髓磷脂的热图上没有发现有相变出现。近来关于红细胞膜的量热学研究发现在其 DSC 热图上 (45℃—80℃) 有 4 个与膜蛋白的伸展和变性有关的相变峰,至于红细胞膜上到底有无脂相变目前还有争论,究其原

因是因使用的检测相变和相分离的技术不同。例如,用自旋标记技术,²H 标记脂肪酸的实验中并没有看到红细胞膜任何发生相变的证据,其

它如粘度测量,激光拉曼光谱,X射线衍射、NMR、ESR 及荧光消偏振技术都在 -20°—40℃ 的范围内检测到膜的相变。

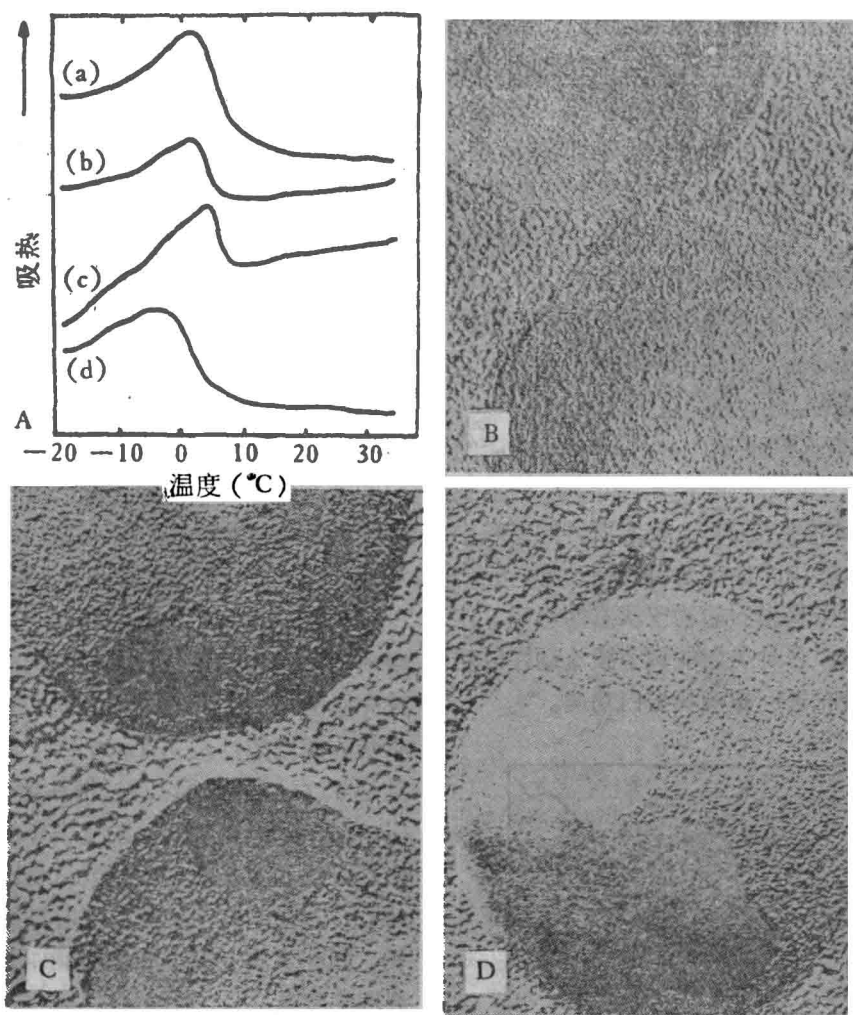


图2 线粒体脂质的相变及蛋白的侧向平动图

A: 线粒体膜的 DSC 曲线: a. 整个线粒体 b. 内膜聚集粒子区域 c. 内膜光滑脂区 d. 外膜
B: 在 30℃ 冰冻的膜断裂面
C: 在 0℃ 冰冻的断裂面
D: 在 -8℃ 冰冻的断裂面

表 1 整个线粒体膜及内、外膜的相变温度

膜	开始温度(50%乙二醇)		开始温度(纠正溶剂影响)		转变范围 ℃
	放热℃	吸热℃	放热℃	吸热℃	
整个线粒体	+3, -5	-21, -14	+9, +1	-15, -8	24
内 膜	-10	-21, -14	-4	-15, -8	11
外 膜	+3, -5	-21	+9, +1	-15	24

在胆固醇含量较少的细胞膜中存在膜的相变,这一点各种技术给出的结果是一致的。其中研究最多的是大鼠肝细胞中的线粒体膜和微粒体膜的热致相变。DSC 技术明显检测到膜脂从有序 $\rightleftharpoons$ 无序的相变。配合电镜的冰冻断裂技术更直观地看到由于这种相变所导致的膜内蛋白侧向平动的聚集现象。表 1^[8]是用 DSC 测定的大鼠肝中整个线粒体及分出的内、外膜的相变温度。图 2 是其 DSC 曲线及电镜的冰冻断裂图。从表中我们可以看到,内膜比外膜相变的协同性强,内膜比外膜的流动性大。这表明内、外膜的分子组成不同,外膜比内膜的脂肪酰链的饱和度大,胆固醇含量多,蛋白含量低。由图 2 看出在 30℃ 时线粒体表面的粒子是均匀随机分布的,在 0℃ 时出现局部脂结晶区,导致膜表面粒子开始聚集,在 -8℃ 时出现更多的脂结晶区使膜表面粒子更加聚集在脂的非结晶区,即流动脂区。由此看来膜的流动性变化导致膜蛋白的平动,这对膜蛋白行使其功能有重要意义。

在其它的细胞膜中如肌质网膜、嗜铬粒细胞膜、肠细胞膜等都表现明显的热致相变。一个有功能意义的膜——脊椎动物视网膜中视杆细胞的光感受盘膜也显示有热致相变^[9]。经研究证明这个转变对应于视紫红质到视蛋白的转变。

二、生物膜流动性与功能关系的量热学研究

量热技术是研究生物膜流动性的极好方法。它可以直接测出作为检验生物膜流动性的相变温度和相变焓,从而可以进行几乎所有与功能有关的机理研究。

1. 膜流动性与植物抗寒性

零上低温造成植物冷害这一问题已为各国科学家关注。随着生物膜流动性与其结构,功能研究的不断深入,人们认识到植物冷害与膜的流动性有关。

Lieberman 发现低温贮藏的甘薯块根切片

的呼吸作用和氧化磷酸化作用降低之前,钾离子发生明显外渗。Lyone 和 Yamaki 认为这是因为在零上低温时,生物膜的流动性首先发生变化,即从液晶相变为凝胶相,此时膜出现收缩,龟裂,使膜通透性增大,质膜内的离子大量外渗,于是破坏了细胞内的离子平衡。又由于膜流动性的降低使膜结合酶活性降低,呼吸受阻,能量供应减少,体内有毒物质积累,导致植物死亡。

Kuiper^[10]研究了不同温度苜蓿叶片的膜脂质的组分,发现组分随温度而变即膜具有自调节作用,表明植物有适应性变化。经分析抗寒品种中脂肪酸的不饱和程度比不抗寒品种大,这与关于脂肪酸种类对膜流动性有影响的结果一致,因此可以利用膜的流动性研究植物品种的抗寒性,为定向培育和挑选耐寒品种提供简易可行的方法。

2. 膜流动性与酶活性

生物膜的功能主要通过膜蛋白体现。不管是外周膜蛋白还是内嵌膜蛋白都与膜双分子脂质相互作用,因此脂质分子的物理状态的变化必然会影脂质——蛋白质的相互作用,继而导致膜蛋白的构象改变,影响其功能的表现。

Morrisett^[11]等人对生长在含有反油酸盐介质中的大肠杆菌膜上的 NADH 氧化酶和 D-lactate 氧化酶的酶活和温度关系进行了研究。分别用两个酶的酶活对温度倒数做 Arrhenius 图,在每条酶活曲线上都有两个明显的拐点,DSC 实验证明较低温的拐点和较高温的拐点分别对应于膜脂从凝胶相向液晶相转变开始和结束的温度。

卵磷脂-胆固醇转酰基酶催化脂肪酰基从磷脂的 2 位转到胆固醇的 3-羟基上。该酶酶活的 Arrhenius 图与以上结果相同,在酶活曲线上也有两个与膜流动性有关的拐点,酶活在相变温度以下明显降低。证明膜上的酶活性和膜的流动性有关,即与酶周围的脂环境的物理状态有关,膜的流动性大就有利于膜中酶分子的旋转和平动,致使酶活性增加。

3. 膜流动性与细胞凝聚

正常细胞间的相互作用,包括“生长接触抑

制”对于组织的形态发生和组织的完整性都是很重要的。恶性细胞因为失去了“生长接触抑制”作用,因此恶性增殖。

Jones 和 Perry^[12] 研究了温度变化对体外培养细胞凝聚的影响。他们发现细胞的凝集程度随温度的升高而增加,而且在某一个温度范围凝集性突然增加。研究证实凝集性的突然增加是膜脂从凝胶相到液晶相转变的结果。图 3 为中国仓鼠成纤维细胞 (CH₂₃) 和卵巢细胞 (CHO-K1) 的凝集百分数与温度的关系图。这两种细胞在 15℃—25℃ 凝集百分数突然增加,它恰好是这些细胞膜发生相变的温度范围。

有关刀豆球蛋白 A(Con A) 引起细胞凝集的实验更直接地证明了细胞凝集与膜流动性

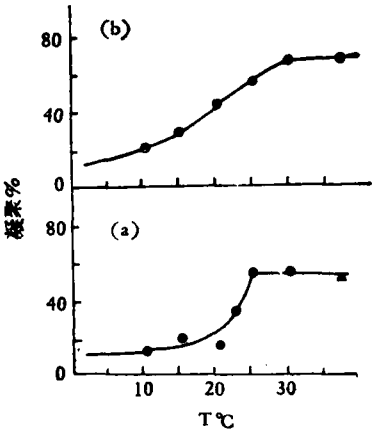


图 3 中国仓鼠成纤维细胞和卵巢细胞的凝集百分数与温度的关系
(引自 Jones 和 Perry, 1978)

表 2 不同细胞株与 ConA 结合及细胞凝聚与温度的关系

细 胞 株	ConA 的结合数 (分子数/克蛋白)		细胞凝聚百分数 (%)	
	0℃	22℃	0℃	22℃
正常细胞 (3T3)	1.5×10^4	1.7×10^5	10	10
被转移细胞 (PY3T3)	4.5×10^4	1.3×10^5	16	95

有关。现已有大量证据证明被转移的肿瘤细胞比正常细胞更易与 ConA 结合^[13]。表 2 是正常小鼠胚胎成纤维细胞及其转移多瘤细胞与 ConA 结合后引起细胞凝集的实验结果。

结果表明温度和膜流动性是细胞凝集的重要参数,细胞由 ConA 引起凝聚的必要条件是膜脂必须具有局部流动性,这样才能使 ConA 的受体在双层膜中侧向平动以利结合 ConA,导致细胞凝集。

4. 膜流动性与信息传递

细胞的信息传递系统是在细胞膜上,外界刺激通过膜传递到细胞内引起一系列变化,从而对刺激作出相应的反应。

目前关于药物分子的生物学和药理学的的作用还不能准确地了解,然而人们都认为药物与膜脂成分的相互作用引起膜流动性的改变可能是药物作用的最重要的方式。

Papahadjopoulos 等人^[14]发现局麻和全麻药、吗啡衍生物及抗-抑制药均显著地影响膜脂从

凝胶相到液晶相的转变。Bach 等人^[15]研究了 Hashish 麻醉药的成分四氢大麻酚 (Δ' -tetrahydrocannabinol 简写成 Δ' -THC) 和大麻二酚 (cannabidiol, 简写成 CBD) 与二棕榈酰卵磷脂 (DPL) 双层的相互作用,发现二者均使卵磷脂的 T_c 降低。当药物浓度高时,DSC 热图中出现双峰,这是药物在磷脂中有限度的溶解而产生的相分离。实验结果见图 4。

上述实验使用的麻醉药浓度一般大于临床所用。而局麻药——盐酸待布卡因为临床所用浓度时已发现对由酸性磷脂制备的囊泡膜的流动性有显著作用^[14]。

Goldman 等人^[16]实验证实治疗癌所用的蒽素及红必霉素是通过与膜脂质的相互作用即增加膜的流动性而起到作用。实验还表明使膜流动性增加与药物的电荷无关,而是与它们的结构,即与它们掺入双层的深度有关。Jain 等人^[17]研究了上百种药物及化学试剂对卵磷脂相变的影响,他们根据药物对卵磷脂 DSC 曲线的影响

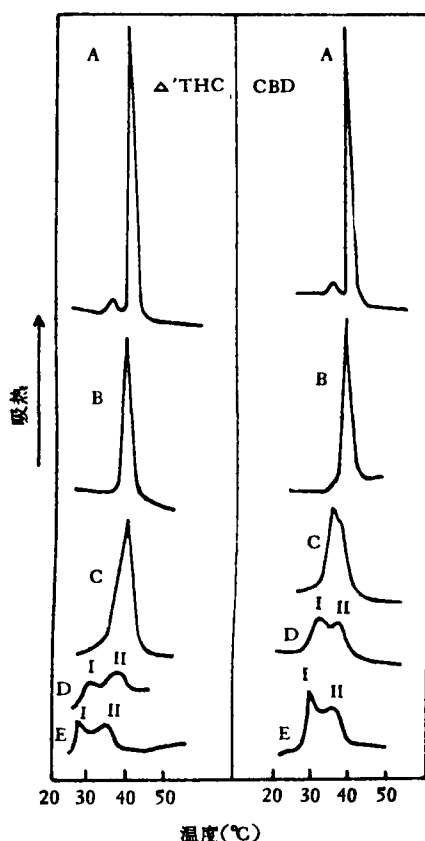


图 4 Δ' -THC 和 CBD 对 DPL 的 DSC 曲线的影响

	Δ' -THC		CBD
(A) DPL.		(A) DPL	
(B) DPL.	1:22 (克分子比)	(B) DPL	1:20 (克分子比)
(C) Δ' -THC-DPL	1:11 (克分子比)	(C) CBD-DPL	1:10 (克分子比)
(D) Δ' -THC-DPL	1:5 (克分子比)	(D) CBD-DPL	1:5 (克分子比)
(E) Δ' -THC-DPL	1:2.4 (克分子比)	(E) CBD-DPL	1:2 (克分子比)

将药物分成四类，并发现每类都与其在磷脂双层中的特定位置有关，即与它们掺入双层的深度有关。

我们曾用 DSC 技术研究^[18] 莨菪类药物对膜流动性的影响。山莨菪碱、樟柳碱、东莨菪碱和阿托品均属于抗胆碱药物。将这四种药物分别作用于二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC) 膜和二棕榈酰磷脂酸 (DPPA) 膜，看其对磷脂膜相变的影响。实验结果表明四种药物均不同程度地使这两种磷脂膜的相变温度 T_c 下降，流动性增加。经分析认为这类药物对膜的影响属于触发机制。图 5 为不同浓度的山莨菪碱对

DPPC 脂质体 DSC 加热曲线的影响。

综上所述，可以看出利用量热技术可以方便地进行有关药物机理，药物筛选以及药物合成的研究。

5. 膜流动性与物质运输

生物膜运输物质主要有三种类型：(1) 被动运输。(2) 易化扩散。(3) 主动运输。

被动运输主要取决于被转移物质在脂双层中的溶解度。人们发现运输系数取决于脂双层的物理状态。对易化扩散和主动运输而言，载体分子的运动性取决于它们在膜中邻近脂环境的物理状态。表 3 为特定的物质运输过程与膜

表3 与膜流动性相关的物质运输过程

运 输 过 程	膜	参 考 文 献
尿核甙和葡萄糖 (P)	卵磷脂脂质体	Read & McElhaney. 1976.
K ⁺ -缬氨霉素, R ⁺ -缬氨霉素 (FD)	莱氏无胆甾原体细胞	Van. der. Neut-Kok. 1974.
β -半乳糖配物 (A)	大肠杆菌 K1062	Overath & Traueble. 1973.
β -糖甙, β -半乳糖配物 (A)	大肠杆菌 30EBOX	Linden et al. 1973.
α -氨基异丁酸丁酯 (A)	小鼠 LM	Wisnicks et al. 1973.

注: P~被动运输 FD 易化扩散 A-主动运输

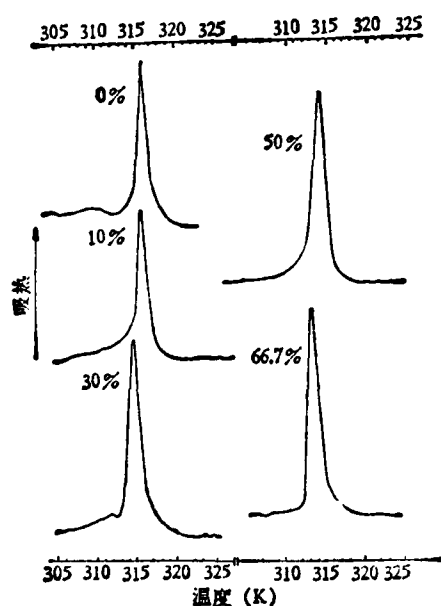


图5 不同浓度的山萸萸碱对 DPPC 脂质体 DSC 加热曲线的影响

药物浓度依次为 0, 10, 30, 50, 66.7 克分子%。

流动性相关的例子。

表3所列的实验中,均发现物质运输的 Arrhenius 图在特定的温度处斜率有明显的改变。用荧光探针技术、自旋标记技术、量热技术等证明此特定温度正好对应于膜的相变发生,因此证明以上过程是与膜的流动性相关。

目前还不能认为所有的通过膜的物质运输都与膜流动性有关。Read 和 McElhaney^[19]发现葡萄糖和尿核甙通过人的红血球膜的易化扩

散不受膜流动性变化的影响,短杆菌肽对 K⁺ 的运输也与膜的热致相变无关。

关于生物膜物质运输的机理尚需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 傅亚珍:《生物化学与生物物理进展》,1,27,1982.
- [2] Stein, J. M.: *Adv. Chem. Series*, 84, 259, 1968.
- [3] Wallace, B. A. et al.: *J. Mol. Biol.*, 107, 255, 1976.
- [4] Melchior, D. L. et al.: *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* 5, 205, 1976.
- [5] Jackson, M. B. et al.: *Biochemistry*, 17, 911, 1978.
- [6] Quinn, P. J.: *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 38, 1, 1981.
- [7] Chapman, D. et al.: *Biological Microcalorimetry*, (Ed. by Beezer, A. E.) 275, 1980.
- [8] Hackenbrock, C. R. et al.: *B. B. A.*, 455, 466, 1976.
- [9] Miljanich, G. et al.: *Biophys. J.*, 16, 37a, 1976.
- [10] Kuiper, P. J. C.: *Plant Physiol.*, 45, 684, 1970.
- [11] Morrisett, J. D. et al.: *J. Biol. Chem.* 250, 6969, 1975.
- [12] Jones, M. N. et al.: *Exp. Cell. Res.*, 112, 167, 1978.
- [13] Nicolson, G. L.: *B. B. A.*, 458, 1—72, 1976.
- [14] Papahadjopoulos, D. et al.: *B. B. A.*, 394, 504, 1975.
- [15] Bach, D. et al.: *B. B. A.*, 436, 889, 1976.
- [16] Golaman, R. et al.: *B. B. A.*, 512, 254, 1978.
- [17] Jain, M. K. et al.: *J. Membrane Biol.*, 34, 157, 1977.
- [18] 王苏民等:《科学通报》,1,60,1983.
- [19] Read, B. D. et al.: *B. B. A.*, 419, 331, 1976.

【本文于1983年5月11日收到】