

磷脂膜研究的一些进展

徐 惠

(浙江医科大学药理学系,杭州)

提 要

磷脂分子在双层膜中的排列方式随两条脂酰链长度、环境条件不同而生成非交错对插、全交错对插、混合交错对插及部分交错对插系统。这些排列方式的变化,影响膜的物理、化学性质、与蛋白质等大分子的相互作用及生物功能。

关键词 磷脂双层膜,交错对插排列,差示扫描量热法,相变焓,双软脂酰磷酸胆碱

脂质是生物膜的主要成分之一,其中磷脂占总脂质量的50%以上。研究磷脂膜的理化性质可以提供脂质在生物膜中的结构、动力学方面的重要资料。过去几年,我们对磷脂两条酰链长度不同引起的效应进行了研究^[1-3]。从对称系统的多相变到交错对插双层膜,这些结构上的变化改变生物膜的分子排列、疏水区、表面静电性质、厚度、可塑性等。这些知识除具有分子生物学、生物化学的基本理论意义外,还与医学有着很密切的联系。本文简述这方面研究工作的一些进展。

一、磷脂膜的排列方式

磷脂双层在过量水中的排列方式,取决于几种作用力之间的平衡。寻找以最低能量的排列方式,脂酰链有使范德华作用力取最大的排列趋势。同时,这种有序排列要使每条链的旁式旋转异构体数最小,在双层疏水区也不能形成空隙,因为这在能量上不利。最后,界面区脂头基的表面积必需与脂酰基的横断面相匹配。在双层膜的经典排列中,两条脂酰链对一个脂质头基形成非交错对插排列[图1a]。而在一定条件下,形成交错对插排列系统在能量上更为有利。

交错对插双层排列随两条烃基全伸展型的长度差异,可大致分为三种排列方式。1)当脂质系统可能有最高程度不对称时,如脱酸脂质及类似物,可形成全交错对插系统,表现为脂酰单链穿透整个膜宽,一个头基对两条脂酰链(图1b)。2)当两条脂酰链不对称参数($\Delta C/CL$)近0.5时,产生混合交错对插,脂长酰链以全反式构型(锯齿型)完全伸展于整个双层跨距,而两条短链在双层中间平面尾-尾相对,一个头基对三条脂酰链(图1c)。3)第三种交错对插排列方式为部分交错对插。一个单叶短脂酰链与

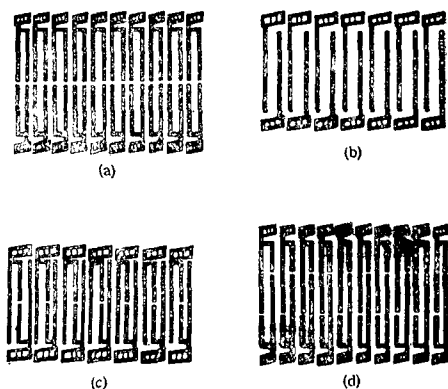


图1 凝胶状态交错与非交错对插排列方式

(a) 非交错对插; (b) 溶血脂及类似物的全交错对插;
(c) 混合交错对插; (d) 部分交错对插

另一单叶长脂酰链配对，一个头基对两条脂酰链[图 1d]。

二、非交错对插磷脂排列的相变与亚稳态

当磷脂在过量水中水合时，聚合成几种有序的相，常见的有胶束、双层、六方形。双层(或胶束)磷脂随温度、pH、压力、介质离子成分不同可排列成晶相、凝胶相或液晶相。不同的相之间的转变，可以差示扫描量热法(DSC)、核磁共振谱(NMR)、电子共振谱(ESR)、荧光振动谱加以研究。磷脂双层的主相变以脂酰链的突然旋转无序和链-链范德华作用力减少为特征。由于已占空间的相互作用，脂酰链不能单个无序化，结果双层相变是大量分子旋转无序的协作事件。DSC 是高分辨技术，可测定双层相变的焓、熵及相变温度(T_m)，也能提供相变的分子事件和协作性。如双软脂酰磷酸胆碱($C_{16}:C_{16}PC$)¹⁾在过量水的双层中有三个热致相变。在 16.5°C 的称作亚相变($L_c-L_{c'}$)，只在近 0°C 恒温长时间后观察到。第二个相变在 35.7°C，是前相变，是可逆的凝胶 \leftrightarrow 凝胶相变($L_{\beta'}\leftrightarrow P_{\beta'}$)；主相变在 41.4°C，是可逆的凝胶 \leftrightarrow 液晶双层相变($P_{\beta'}\leftrightarrow L_{\alpha}$) (图 2)。具有长链的对称 PC 也具有类似相变，只是随链增长，相变温度升高。有趣的是，这三个相变温度受链长增长效应的影响程度不同，前相变受影响最大，亚相变受影响最小。随链增长，前相变温度逐渐靠近主相变温度，以致在 $C_{22}:C_{22}PC$ 时消失。从 $C_{12}:C_{12}PC$ 到 $C_{22}:C_{22}PC$ 同系物，主相变克服相变能障所需热量 $\Delta H(kcal/mol) = 1.16n - 10.1$ ，其中 n 为每条酰链的碳原子数。若酰链中存在顺式双键，则使主相变温度降低、横断面增加。横断面的增加使得脂酰链与 PC 头基部分的面积更接近，减小了脂酰链倾斜排列程度，使亚相变与前相变消失。

以乙醇胺取代胆碱，头基较小而能与两条饱和酰链的横断面相适应。这样在凝胶相中脂酰链轴与双层平面垂直，如 DSC 测定^[3]发现未经加热的双十一烷磷脂酰乙醇胺($diC_{11}PE$)在

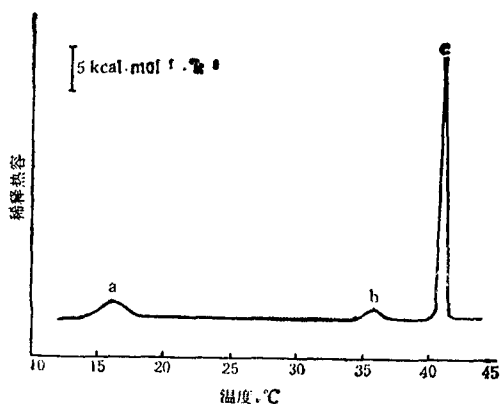


图 2 $C_{16}:C_{16}PC$ 在过量水中的 DSC 热相变
(a) 为亚相变；(b) 为前相变；(c) 为主相变

过量水中，10—50°C 间只有 38.37°C 一个吸收相变，为 $G(I) \rightarrow L_{\alpha}$ 相变；将此样品缓慢冷却到 10°C，立即进行第二次加热扫描，在 18.64°C 处出现一较小吸热转变，为 $G(II) \rightarrow L_{\alpha}$ 相变。再将样品从 55°C 冷却下来，在量热计中 10°C 以下恒温长时间，SC 测定显示两个吸热相变，低温的 $G(II) \rightarrow L_{\alpha}$ 和高温的 $G(I) \rightarrow L_{\alpha}$ 。说明 $G(II)$ 相为亚稳态，在低温培养时慢慢转变为 $G(I)$ 相。这与 ^{31}P -核磁共振分析结果相一致^[3]。从计算可知，高低温的相变熵分别为 44.81 和 9.80 eu/mol^[3]，有力提示近相变温度时 $G(I)$ 态脂酰链排列比 $G(II)$ 态更有序，链-链范德华相互作用更大。这种亚稳态随 PE 脂酰链增长而逐渐变小，推知当脂酰链碳原子数为 20 时将消失。

三、对称链磷脂的交错对插

在特定条件下，对称链磷脂也能生成交错对插排列系统。

1. 压力引起的交错对插排列 液压增加使平衡向系统总容量减少的方向移动。有报道，在高压下， $C_{16}:C_{16}PC$ 、 $C_{18}:C_{18}PC$ 生成全交错对插相^[4]。与 $G(II)$ 凝胶相相比，在压力引

1) $C_x:C_yPC$, PC 为磷酸胆碱, x 表示在 sn-1-胆碱链有 x 个饱和碳原子数, y 表示在 sn-2-脂酰链有 y 个饱和碳原子数; diC_xPE , 表示在两条脂酰链上有相同饱和的 x 个碳原子数的磷脂酰乙醇胺。

起的全交错对插双层相,脂酰链横断面积略小。高压中子衍射提示,在压力下可将非交错对插的凝胶相诱至形成全交错对插相。形成交错对插所需的压力与链长有关,链越长所需压力越低。这种相变的发生速率随温度下降而下降。

2. 化学引起的交错对插排列 许多化合物能引起对称链磷脂形成全交错对插凝胶相。尽管各种能起诱导作用的化合物分子差异很大但可归纳如下: 1) 必需是两性分子; 2) 必须能分布于双层的界面区; 3) 受分子大小限制。如胆甾醇因长链脂肪酸, 尽管存在于界面或近于界面, 并不诱导交错对插, 提示诱导物不能穿羟轴太深。诱导剂必须能置换一些与头基缔合的水分子, 使头基表面积增加。最早以 x 射线衍射法观察浓甘油、乙二醇、甲醇溶液能使 $C_{16}:C_{16}$ PC 双层厚度突然下降^[9], 电子密度分析发现以全交错对插排列, 这时计算得每个脂头基表面对每个脂酰链横断面积的比例为 4。已观察到, 随链长增加, 形成交错对插排列所需的醇浓度越低。具有类似作用的还有: 氯丙噻、丁卡因、苯甲醇、苯乙醇、苯丁醇、乙醇等。

带负电头基的脂质也能在带正电诱导剂存在下形成交错对插双层。如鞘磷脂碱性蛋白, 带有正电荷, 能和带负电荷的脂质头基区产生静电相互作用, 也能嵌入双层内部起亲脂作用。

X-射线衍射研究提示, 双棕榈磷脂酰甘油和多粘菌素-B 相互作用, 形成交错对插凝胶相双层。其它能使双棕榈磷脂酰甘油形成完全交错对插的物质, 包括胆碱、乙酰胆碱, 还有 Tris 缓冲液。

四、不对称链磷脂的交错对插

生物膜的脂质分子中, 烃区的两条链一般并不相同。尽管对称链的研究对双层膜的性质提供了大量信息, 分子内脂链不同, 对膜结构和功能的影响也不可低估。

脂酰链的不对称性可以 $\Delta C/CL$ 值定量, 这里 CL 是长链的长度, ΔC 是两条烃链长度的差加 1.5 的绝对值, $\Delta C = |n_1 - n_2 + 1.5|$, n_1 和 n_2 分别是 sn-1 和 sn-2 脂酰链的碳原子

数。1.5 的引入, 是因为 sn-2 脂酰链起始段平行于双层表面取向在界面区形成不对称的 1.5 个 C-C 链长, 所以其表观长度为近全反构象链总长度减 1.5 个 C-C 链长^[8]。从 $C_{18}:C_{13}$ PC 到 $C_{18}:C_0$ PC, 随两条脂酰链相对长度不同而形成不同的排列双层。

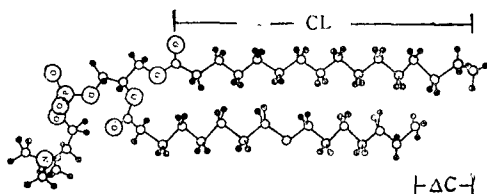


图3 $C_{16}:C_{16}$ PC 的全反式分子构象

CL 为长链的长度, ΔC 为两条烃链长度的差加 1.5 的绝对值。由于 sn-2 脂酰链起始段的转向, 使具有对称链的 $C_{16}:C_{16}$ PC 的 $\Delta C = 1.5$

1. 全交错对插排列 溶血脂及其类似物的链不对称性最大, 它们在 sn-2 的链被氢原子所取代。这些脂质生成全交错对插排列, 如 $C_{16}:C_0$ PC 和 $C_{18}:C_0$ PC 在主相变温度以下, 全水合分散能够自发聚合成高度有序的二维空间排列, 脂酰链全交错对插。当温度高于主相变温度, 则重排成小胶束。溶血磷脂酰乙醇胺也有类似性质^[6]。这种片层结构可能使离子不易穿透。

2. 混合交错对插排列 对十对不对称 PC 的研究发现^[11], 在过量水存在下, 不论长链是在 sn-1 位还是 sn-2 位, 只要 $\Delta C/CL$ 值近 0.5, 都生成混合交错对插排列。大量证据说明 PC 多层膜在 DSC 的主相变温度是脂酰链的连续函数^[7,8], 但对称链 PC 与不对称链 PC 的主相变温度与脂酰链长的函数关系不同, 各自形成不同的连续函数, 提示二者排列相当不同。如 $C_{20}:C_{12}$ PC 的亚甲基单位总数与 $C_{16}:C_{15}$ PC 的相同, 水合 $C_{16}:C_{16}$ PC^[7,9,10] 在 0°C 先恒温 3 天后呈现多种相变, 温阈为 16.5°C ($\Delta H = 2.7 \text{ kcal/mol}$)、35.7°C ($\Delta H = 1.3 \text{ kcal/mol}$) 及 41.4°C ($\Delta H = 8.6 \text{ kcal/mol}$) (图 2)。而同样条件下制备的 $C_{20}:C_{12}$ PC 只在 33.2°C 有一个不对称相变 ($\Delta H = 11.6 \text{ kcal/mol}$)^[11]。这种单过度态与样品的热历程无关, 符合主相变的特征, 也就

是凝胶 (P_{β}) 到液晶 (L_{α}) 相变。同样差别也存在于 $C_{14}:C_{14}PC$ 与 $C_{18}:C_{10}PC$ 等。这证明不对称 PC 的过度态焓比相应对称链 PC 的要大得多。这样, 不对称链的 PC 从 $\Delta H/T_m$ 计算得熵要大得多^[1], 有力提示 $\Delta C/CL$ 为 0.5 的不对称链的 PC 的脂酰链在凝胶态比对称链的 PC 中的脂酰链更为有序, 符合混合交错对插双层的特征^[11]。拉曼光谱法也以被广泛地用于表示脂聚合物的烃链有序/无序变化的两个强度指数, 证明在凝胶状态, $C_{18}:C_{10}PC$ 的烃链比 $C_{14}:C_{14}PC$ 的排列更为有序^[11,12]。 $C_{18}:C_{10}PC$ 在过量水中的这种混合交错对插排列也存在于室温时压力诱发的凝胶相^[13]。

高度不对称脂酰链 PC 的二元混合物的热力学行为和受热性研究^[2]发现, $C_{10}:C_{22}PC$ 与 $C_{22}:C_{12}PC$ 在凝胶和液晶相均能近理想混合^[3], 在 DSC 中呈现单吸热峰介于单个纯化合物之间。这种互溶可归因于组成的脂质形成混合交错对插排列的能力。³¹PNMR 谱分析证明在凝胶状态, 这些不对称链 PC 的轴向旋转运动速率的下降而致运动均值下降。

在高于主相变温度, 混合交错对插双层变成部分交错对插双层, 一叶的短链与对叶的长链尾-尾相对, 脂酰链也无序化。

3. 部分交错对插排列 $\Delta C/CL$ 值在 0.1—0.4 和 0.6—0.9 的混合链 PC, 在低于主相变温度时的过量水中最易形成部分交错对插排列 (图 1d)。如在 $C_{18}:C_{18}PC$ 、 $C_{18}:C_{16}PC$ 及 $C_{18}:C_{14}PC$ 中, 以 DSC 得到的相变熵对碳单位数表示时, 有下列顺序:



随链长的不对称增加, 凝胶态部分脂酰链处于无序化以维持最佳范德华接触, 因长链近甲基末端区必须补偿以使短的 sn-2 脂酰链产生的空隙填满。

另外, 在 $\Delta C/CL$ 近 0.5 的 PC, 当低于主相变温度, 在过量水中以混合交错对插系统存在, 但当热至过主相变温度时, 转变成部分交错对插方式排列。

五、膜脂质交错对插的生物效应

研究链长不对称效应的意义在于许多重要膜磷脂链差别很大, 如含 C_{24} 脂酰链的神经鞘脂类在生物膜中常见, 这些脂质类的 $\Delta C/CL$ 约为 0.5, 在生理温度下可聚成混合交错对插双层^[12]。类似的不对称也出现在其它如脑苷脂、神经节苷脂等。另一例子是 1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱, 这种物质也许是哺乳类生物膜最丰富的脂质。在转换率低或不转换的组织如红细胞、脑细胞, 这个脂质由自动氧化生成 sn-2 脂酰链 C_9 和 C_{10} 间顺式双键的断裂。这样所产生的脂质, 高度不对称, 化学结构上类似于 $C_{16}:C_9PC$ 。一些生物膜随着年龄增长, 可能有些区域由于自动氧化转变成交错对插结构。在一些疾病条件下, 溶血磷脂也可能在膜中聚积。另外, 如血小板激活因子差 14—16 个亚甲基单位, 合成链长不对称程度较小的血小板因子, 生理活性大大减弱。

膜双层交错对插对膜结构与功能至少有下列影响:

1. 单层偶联 随交错对插的形成, 单层之间逐渐相互紧密偶联。这可直接从混合交错对插 ³¹PNMR 线型变宽观察到。³¹PNMR 分析说明转变成两个偶联脂质分子组成的旋转单位时, 两个分子各自来自不同单层^[2]。这种偶联影响一单层转运过双层的能力, 也影响特定脂质在双层平面形成径向分离区的能力。

2. 改变表面电荷密度与水斥压 转变成交错对插相, 常常引起脂质头基表面积的改变。表面积增加必然减少单位面积电荷密度。交错对插也影响到水斥压。水斥压是优势相互作用之一, 在于防止完全水合磷脂胆碱的双层-双层面接触和后续熔融。水斥压随头基表面积的增加而减少。提示这作用可能是致融物质的一种作用机制, 因为许多致融物都能诱导交错对插。

3. 改变双层厚度 对插双层的形成影响双层膜厚度。一些脂质-蛋白的相互作用研究, 说明一些膜内蛋白最佳功能需要一定厚度的磷脂双层。如对视紫红质重建膜的光吸收研究说

明,当重建膜脂酰链长为14个碳原子或更短,正常的构象变化不再发生。又如二聚短杆菌肽传导通道所测得的半衰期显然取决于它掺入的双层厚度。

4. 失去双层中板 交错对插出现时,原由脂酰链末梢甲基组成的双层中板消失了。这个区域能为生物膜的多肽大侧链等提供理想环境。从非交错对插双层状态的转变,失去双层中板可能触发构型转变,因为这些被排出的肽侧链被迫寻找新的环境。

六、结 论

非交错对插双层早已被认为是膜磷脂在过量水中的一般排列结构。最近,对各种不对称磷脂的热力学、结构分析证实有交错对插双层存在,在低温时更易形成。这样,在饱和混合磷脂酰胆碱中,当两条脂酰链不对称增加时,从非交错对插到部分交错对插、到混合交错对插、到

最后完全交错对插凝胶相双层排列。脂酰链的这种交错对插在其它许多双层系统也可观察到,可以认为是个普遍现象,可能具有重要的膜功能意义。

参 考 文 献

- 1 Xu X, Huang C. *Biochem*, 1987; 26: 1036
- 2 Xu H *et al.* *Biochem*, 1987; 26: 5448
- 3 Xu H *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1988; 943: 63
- 4 Braganza L F, Worcester D L. *Biochem*, 1986; 25: 2591
- 5 McDaniel R V. *Biochim Biophys Acta*, 1984; 731: 97
- 6 Tilcock C P S *et al.* *Biochem*, 1986; 25: 816
- 7 Finegold L, Singer M A. *Biochim Biophys Acta*, 1986; 855: 417
- 8 Mason T T, Huang C. *Lipids*, 1981; 16: 604
- 9 Chem S C *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980; 77: 5060
- 10 Wu W *et al.* *Biophys J*, 1985; 47: 237
- 11 Hui S W *et al.* *Biochem*, 1984; 23: 5570
- 12 Levin I W *et al.* *Biochem*, 1985; 24: 6282
- 13 Wong R T T, Huang C. *Biochem*, 1989; 28(3): 1259

[本文于1989年6月5日收到]

(上接第267页)

染超过许多倍才产生。因此, α 和 β 水平比率在调节 activin 和/或 IB 可能起关键作用。在动情周期,IB- α 和- β 表达的各自独立的改变,可能是由于 IB 和 activin 两者精细地调节 FSH 释放的结果^[16]。IB 和 activin 具有相反功能,在性腺和性腺以外可能以双重的调节方式而发挥作用^[16]。activin 可能作为一种激素和生长/分化因子在体内产生生理效应^[18]。

参 考 文 献

- 1 De Jong F H. *Physiol Rev*, 1988; 68: 555
- 2 Burger H G, Igarashi M. *Acta Endocr*, 1988; 118: 159
- 3 Woodruff T K *et al.* *Mol Endocr*, 1987; 1: 561
- 4 Fritz I B. *Mol Cell Endocr*, 1988; 59: 147
- 5 Keinan D *et al.* *Mol. Endocr*, 1989; 3: 29
- 6 Toebosch A M W *et al.* *Mol Cell Endocr*, 1988; 55: 101
- 7 龚守良,刘树铮.白求恩医科大学学报,1986;12:279

- 8 Li C H, Ramasharnia K. *Ann Rev Pharmacol*, 1987; 27: 1
- 9 Yamashiro D *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984; 81: 5399
- 10 Merchenthaler I *et al.* *Mol Cell Endocr*, 1987; 54: 239
- 11 Mason A J *et al.* *Nature*, 1985; 318: 659
- 12 Fukuda M *et al.* *Mol Cell Endocr*, 1986; 44: 55
- 13 Mayo K E *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; 83: 5849
- 14 Stewart A G *et al.* *FEBS Lett*, 1986; 206: 329
- 15 Chen C-LC, Madigan M B. *Endocrinology*, 1987; 121: 590
- 16 Meunier H *et al.* *Mol Endocr*, 1988; 2: 1352
- 17 Davis S R *et al.* *J Endocr*, 1987; 115: R21
- 18 Meunier H *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85: 247
- 19 Crawford R J *et al.* *Mol Endocr*, 1987; 1: 699
- 20 Hodgen G D *et al.* *Proceedings of CONRAD international workshop on contraceptive developments*, Norfolk VA: Jones Institute Press, 1988; 19--29

[本文于1989年5月25日收到]