

- 17 Williams R S. Am J Med Sci, 1993; 306 (2): 129
18 Barinaga M. Science, 1994; 265: 738
19 Ohno T, Gordon D, San H *et al.* Science, 1994; 265: 781

Recent Advances in the Study of Gene Therapy. Zhou Chen, Xu Qian (*Department of Biochemistry, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China*).

Abstract The recent results in the research of gene therapy have been encouraging, in spite of numerous problems still remaining to be solved. The basic studies on gene therapy and the study on the techniques of the gene introduction are reviewed. The latter is one of

the most important topics in basic studies, including retrovirus vectors, DNA virus vectors as well as non-viral techniques. The recent advances in the establishment of the experimental models are also described. Then the recent advances in the gene therapy of hereditary diseases, malignant tumors and other diseases are briefly discussed, especially emphasizing the strategies of the gene therapy of AIDS and cardiovascular diseases.

Key words gene therapy, genetic diseases, cancer, AIDS, cardiovascular diseases, gene transfer

固体载体支承的双层膜系统*

韩 兴 李 刚**

(北京医科大学生物物理系, 北京 100083)

摘要 固态载体支承的双层膜的各种制备过程都简便易行, 较脂质体等系统有重复性好、其物化性质可严格控制等优越性, 并可膜蛋白质分子镶嵌其中, 是研究生物膜的良好模型。由于其研究方法日益成熟, 固态载体支承的双层膜系统越来越成为研究生物膜与膜蛋白的有利工具之一。对固态载体支承的双层膜的制备技术和研究方法进行了系统的综述, 并列举了一些在膜生物物理化学领域的应用。

关键词 固态载体, 双层膜, 磷脂, 膜蛋白

固态载体支承的双层膜系统 (solid supported bilayer system) 可分为平面支承双层膜系统和球面支承双层膜系统。这些膜系统与黑脂膜 (black lipid membranes)、气-水界面单层膜 (monolayer at air-water interface)、脂质体 (liposome) 等人工膜系统的主要差别在于其整个双层膜由一固态载体支承。固态载体 (substrate, 以下简称载体) 可以用硅片、石英片、石墨、云母等, 从而构成平面支承; 也可以为玻璃珠、硅珠等, 构成球面支承。所用固体表面可先进行化学处理, 使其具有亲水性或疏水性, 然后进行双层膜的铺展, 其优越性在于所载双

层膜的组分、分子密度及取向等都可得到严格的控制, 且样品的均一性范围可达到宏观尺度。

载体支承的双层膜系统的一个重要应用是将具有生物活性的膜蛋白分子, 如细胞膜的受体、膜通道或细胞表面标记抗原等吸附或整合到所支承的脂双分子层中, 然后在此基础上进行膜蛋白结构与功能的研究。研究载体支承双层膜的方法众多, 但大致可归为波谱分析方法和显微成象方法。前者主要是用于研究双层膜

* 国家自然科学基金和教委启动基金资助。

** 通讯联系人。

收稿日期: 1994-06-18, 修回日期: 1994-09-02

中分子的各种物理化学性质; 后者则着重于研究其表面形貌及构象。

1 载体支承双层膜系统的制备

1.1 平面支承双层膜的制备

1.1.1 Langmuir-Blodgett 膜技术 是一种将气-液界面的脂单分子层通过多次转移, 在固体表面铺展多层脂分子的方法^[1]。Tamm 等人^[2]将此方法用于亲水的玻片、石英片和硅片等载片上磷脂双分子层的制备。其具体作法是: 先将气-液界面上的磷脂单分子层压入固相(42—35mN/m), 将表面亲水化处理的载片向上缓慢提拉, 当载片穿过气-液界面单分子层时, 磷脂的极性头与亲水的载片表面吸附, 脂单层向基底表面转移, 待水从载片表面滴落后, 将载片水平(所附磷脂单层向下)压入磷脂单分子层覆盖的气-水界面。这样载片上便覆盖了双层磷脂膜。Tamm 等用测量表面压与分子所占面积的关系曲线(π -A 曲线)的方法和荧光漂白恢复技术(FRAP)对上述膜转移方法的质量和磷脂分子在其中的侧向扩散及相行为进行了研究。他们发现, 上述方法所转移的双层磷脂膜是均匀的, 在膜转移速率不过高的情况下载片上双层膜中的缺陷很少, 在载片上每个磷脂分子所占的面积与其在气-液界面上所占面积大致相同, 其侧向扩散及相行为与多层磷脂膜的相同。Tamm 等推断在双层磷脂膜与基底间有一些水分子存在, 所以如此由载体支承的脂双分子层是生物膜研究中的良好模型。

Tamm^[3]用上述模型研究了抗体与磷脂双层膜的相互作用及抗体在膜表面的扩散。在实验技术上比用传统的脂质体方法更为方便, 且结果更为可靠。Wright 等人^[4]进一步研究了用上述方法制成的磷脂双层膜中的相畴及抗体对不同相畴的亲合性。

1.1.2 脂囊泡直接融合技术 脂囊泡在一定的条件下可以融合形成膜结构。Brian 等人^[5]利用脂囊泡在载体表面的融合得到了平面的磷脂双分子层。其具体作法是: 先将磷脂溶于脱氧胆酸的溶液滴在玻璃皿中, 然后将表面处理过

的盖玻片盖在磷脂/脱氧胆酸溶液滴上, 孵育一定时间后磷脂即在盖玻片向下的表面上形成双层膜。用磷酸盐缓冲液充满玻璃皿, 然后在膜表面用载玻片加以保护, 并避免与空气的接触, 制得的样品用缓冲液渗过两玻片洗涤。

用直接脂囊泡融合技术可较为方便地将蛋白质整合到磷脂双层膜中。Watts 等人^[6]用此方法制成了嵌合有多肽的载体支承的平面双层膜, 用来研究免疫分子之间的相互作用; Sui 等人^[7]也用此方法制成嵌有胰岛素受体的双层膜, 并以此模型来研究胰岛素受体与磷脂的相互作用及带有不同电荷的磷脂分子对胰岛素与其受体结合的影响。

1.1.3 间接脂囊泡融合技术 Fringeli^[8]首先利用脂囊泡与固体支承的单层膜的融合制成了载体支承的平面脂双分子层。其具体作法: 是先用脂单层膜技术在表面亲水的固态载片上形成一层疏水脂肪酸链向外的磷脂单层膜, 然后在上面滴加脂囊泡使之与单层膜融合, 形成脂双分子层。Kalb 等人^[9]用 FRAP 方法和全内反射红外显微术(TIRIM)对比了用上述三种方法制成的磷脂双分子层, 并用荧光方法研究了脂囊泡与固体支承的磷脂单分子层的融合过程。他们发现荧光探针 NBD-PE 在用三种不同方法制成的磷脂双分子层中有同样的侧向扩散系数。Kalb 和 Tamm^[10]还用此方法将细胞色素 b₅ 整合到载体支承的磷脂双层膜中, 他们发现在这些双层膜中, 部分蛋白具有等同于脂质体中的侧向扩散速率, 而另一些蛋白的扩散受到一定的限制。

1.1.4 膜自组合技术 Tien 和 Salamon^[11]利用新切割形成的洁净金属表面与磷脂亲水头部的相互作用, 在金属丝断面上附着了脂双分子层。当表面涂有疏水层的金属丝在脂的有机溶液中被切割出新的断面时, 脂的亲水头部便与金属丝断面结合形成一脂单层。金属丝侧面的疏水涂层对有机溶液具有一定的吸附力。这使得在金属丝从溶液中抽出时在其下端挂有液滴。当挂有液滴的金属丝插入盐溶液后, 有机溶剂逐渐消失, 其中脂分子自动在金属丝的断

面上形成一脂双分子层。如此制成的脂双层膜较传统的黑脂膜更为稳定,且简单易行;是脂分子界面电化学研究的有利工具。

1.2 球面双层膜的制备

Bayerl 和 Bloom^[12]于 1990 年首先建立了载体支承的球面双层膜系统的制备方法。他们将用超声方法制得的小单层脂囊泡 (small unilamellar vesicles) 在 60℃ 孵育,然后把直径为 0.3—10 μm 的玻璃珠在剧烈搅拌的情况下投入其中。在这样的条件下,高曲度的脂囊泡破裂并吸附到玻璃珠表面上,形成连续的脂双层膜。

如此制成的脂双层在大小、曲率等方面的均一性远较传统的多层脂质体要好;且稳定性强。在以氘核磁共振方法对磷脂的物化性质进行研究中,高磁场对多层脂质体的取向作用带来一些困难。而采用玻球支承的脂双层膜则避免了这些困难。Reinl 和 Bayerl^[13]用此方法制备了表面吸附有髓碱性蛋白 (MBP) 的球形脂双层,并以此为模型研究了 MBP 蛋白与磷脂分子的相互作用。

2 载体支承双层膜系统的优势与缺陷

载体支承的人工膜系统 (包括单层膜) 是随着这些系统在免疫应答研究中的应用发展起来的。McConnell 及其合作者^[2,5,6,9,10,14]在这方面作了大量开拓性的工作。这些系统在对于组织相容性复合物的基因产物的识别与应答的研究中比用传统的脂囊泡或小单层脂质体更有效;也是用光学显微镜来研究细胞对靶膜的相互作用的理想模型。结合近年来发展起来的扫描探针显微镜技术,载体支承的人工膜系统在膜分子生物学研究中会有极其广阔的应用前景。用各种技术得到的载体支承的脂双层膜系统各有其特点。

LB 膜技术简单易行。在其操作过程中可控制膜压恒定 (30 mN/m 左右),温度恒定,可保证压膜与挂膜过程中膜的晶相结构^[1,2]。因此其结果重复性好,并且制备过程本身就提供了一些有关系统物化性质的信息。但在气-液界面

铺膜过程是其应用受到限制的一个主要因素。这是因为大多数有生物功能的分子,尤其是跨膜蛋白,在成膜过程中由于部分暴露于空气而导致变性。

直接脂囊泡融合技术更便于将蛋白整合到脂双层中。但由此得到的镶嵌蛋白一般没有侧向运动。其原因可能是蛋白分子与亲水的固体表面的相互作用所致^[5]。间接脂囊泡融合技术在一定程度上克服了上述缺点。但还存在一些问题。如在整合到通过间接脂囊泡融合形成的双层膜中的细胞色素 b₅ 分子总量中也仅有 35% 的分子有正常的侧向扩散速率^[10]。这说明整合到膜中的蛋白与载体表面还有过强的相互作用。

膜自组合技术为研究脂双层的电化性质提供了新的途径。在样品的稳定性和制备的简便性方面都具有明显的优越性。Tien 等^[11]报道的膜脂分子可在 36h 内保持有不变的动力学性质;但载体有一定的电势降。此方法的另一不足是样品的尺度较小,且由于载体的性质所限,对其检测方法不多。固态球形载体支承的双层膜系统比传统的多层和单层脂质体的优越性是显而易见的,有相当可观的应用前景。

3 对载体支承的双层膜系统的研究方法

载体支承的双层膜的制备方法是与其检测方法同时发展的。各种检测技术在精度上和操作的便捷方面都在过去的 10 年中得到很快的发展,因而消除了对三维体系样品的信号强度的依赖性。例如同步辐射的应用使 X 光衍射从单分子层或双分子层即可获得足够的结构信息。这些检测技术的发展无疑会使载体支承的双层膜系统得到更为广泛的应用。至今所用的检测方法大致可分为下列两大类:

3.1 波谱分析方法

3.1.1 荧光漂白恢复技术 (fluorescence recovery after photobleaching, FRAP) 是研究膜系统中分子运动状态的一种经典的方法。其基本作法是先将少量的荧光探针掺入到脂溶液

中, 成膜后对膜进行光漂白, 然后测漂白斑点中的荧光强度恢复, 以得到荧光探针在膜中的扩散系数. 最初制成的载体支承双层膜中磷脂分子运动就是用这一方法进行测量的^[5]. 用 FRAP 技术也可以对载体支承双层膜中带有荧光标记的膜蛋白及荧光色素分子的侧向运动进行测量^[3,4,10].

3.1.2 全内反射荧光显微镜法 (total internal reflection fluorescence microscopy, TIRFM)

是非常适于对载体支承的双层膜的研究的^[15]. 在用此方法进行测量时, 有一束激光在载体到膜与溶液的交界面之间进行全反射传递, 从而在与膜邻近的溶液分子中产生一层瞬间场 (evanescent field). 这一瞬间场有选择性地激发膜表面的荧光分子. 这时用荧光显微镜即可研究底物与细胞接触区^[16], 也可测膜表面结合底物的运动性^[17], 测定侧向扩散^[18]和蛋白-蛋白相互作用^[19]. 在所有这些应用中, TIRFM 对于膜表面的配体与受体的特异结合的研究最具有优势. Poglitsch 和 Thompson^[20]用此方法研究了单克隆抗体片段与载体支承平面双层膜的结合.

3.1.3 衰减全反射红外光谱法 (attenuated total reflection infrared spectroscopy, ATR-IR) 的应用 在 Brauner 等人^[21]对插入到磷脂双层中蜂毒素的二级结构的研究中起了重要作用. Frey 和 Tamm^[22]用间接脂囊泡融合技术将蜂毒素整合到衰减全反射锗片上的双层膜中, 再将样品中所含 H₂O 换成 D₂O 后, 用傅立叶变换红外波谱方法对蜂毒素的构象进行了研究. 此后 Reinl 和 Bayerl^[13]也用此方法对硅片两侧双层膜上附着的 MBP 蛋白进行了研究.

3.1.4 ³¹P 核磁共振方法 是研究磷脂膜结构的有力工具. 单晶样品的 NMR 谱线是空间各向异性的. 球对称膜系统中磷脂分子 NMR 谱的各向异性为整个样品中磷脂分子的取向随机性所平均. 然而高磁场对非球对称脂质体的取向作用会导致样品中磷脂分子取向分布脱离球对称性, 从而造成了谱线的复杂化. Bayerl 等人^[12,13]用玻璃珠支承磷脂双层膜解决了这一

问题.

3.1.5 其他物理化学技术 如表面等离子激元谱 (surface plasmon spectroscopy, SPS)^[23]、中子反射 (neutron reflection)^[24]及差示量热扫描 (differential scanning calorimetry, DSC)^[14]等技术都已成功地用于对固态载体支承双层膜的研究. Schmidt 等^[23]用 SPS 和 NMR 方法研究了抗生素链蛋白 (streptavidin) 与膜的结合反应; 而 Reinl^[13]等用 DSC 测量了载体上双层膜的量热曲线. 其他用于研究 LB 膜技术转移到固态载体表面上的多层膜的技术同样也可以用来对双层膜进行研究, 如原位椭圆偏振术 (ellipsometry), 扫描电镜, 电子和中子衍射, 奥革电子谱 (Auger electro spectrum), 布鲁斯特角显微镜 (Bruster angle microscope), 激光二次谐波 (second harmonic generation), 二次离子质谱 (secondary-ion mass spectrometry), X 光电子谱 (X-ray electro spectrum), 各种 X 光吸收谱方法 (如 extended X-ray absorption fine structure, EXAFS; X-ray absorption near edge structure, XANES 等), 及电子顺磁共振 (EPR) 等^[1].

3.2 扫描探针显微镜 (scanning probe microscope, SPM)

是近年来得到迅速发展的一种纳米级分辨率的显微成像技术. 这些技术的核心是通过压电陶瓷以 0.1—0.01nm 的精度控制探针在样品表面的扫描, 同时通过探针与样品之间的隧道电流或原子力来描绘样品表面的形貌. 在其生物学应用中最突出的特点是不需对样品作过多的处理, 可在含水的近生理条件下操作. 因此这些技术很快就被用于生物大分子及生物膜的表面结构研究, 从而使最近的两年中膜蛋白表面结构研究取得了很大的进展. 固体载体支承的双层膜是 SPM 技术非常理想的研究对象, 这方面成功的例子很多, 如 Singh 和 Keller^[25]用原子力显微镜 (atomic force microscope, AFM) 对载体上的磷脂膜进行了观察, 并与表面荧光显微镜观察的结果进行了比较. 非常值得提出的是, AFM 技术已成功地用于

对脂膜的修饰^[26], 因此我们可以期望用 AFM 技术对固态载体上的双层膜和生物膜进行外科手术式的操作。

致谢 作者感谢本系聂松青教授审阅全文并提出了宝贵意见。

参 考 文 献

- 1 Roberts G G. Langmuir-blodgett films. New York and London: Plenum Press, 1990
- 2 Tamm L K, McConnell H M. Biophys J, 1985; **47**: 105
- 3 Tamm L K. Biochemistry, 1988; **27**: 1450
- 4 Wright L L, Palmer I I I A G, Thompson N L. Biophys J, 1988; **54**: 463
- 5 Brian A A, McConnell H M. Proc Natl Acad Sci USA, 1984; **81**: 6159
- 6 Watts T H, Brian A A, Kappler J W *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1984; **81**: 7564
- 7 Sui S-F, Urumow T, Sackmann E. Biochemistry, 1988; **27**: 7463
- 8 Fringeli A P. In: Schlunegger V P ed. Biologically active molecules. Berlin: Springer-Verlag, 1989; 241
- 9 Kalb E, Frey S, Tamm L K. Biochim Biophys Acta, 1992; **1103**: 307
- 10 Kalb E, Tamm L K. Thin Solid Films, 1992; **210/211**: 763
- 11 Tien H T, Salamon Z. Bioelectrochem Bioenerg, 1989; **22**: 211
- 12 Bayerl T M, Bloom M. Biophys J, 1990; **58**: 357
- 13 Reinl H M, Bayerl T M. Biochim Biophys Acta, 1993; **1151**: 127
- 14 McConnell H M, Watts T H, Weis R M *et al.* Biochim Biophys Acta, 1986; **864**: 95
- 15 Axelrod D, Burghardt T P, Thompson N L. Annu Rev Biophys Bioeng, 1984; **13**: 3247
- 16 Lanai F, Waggoner A S, Taylor D L. J Cell Biol, 1985; **100**: 1091
- 17 Burghardt T P, Axelrod D. Biophys J, 1981; **33**: 455
- 18 Thompson N L, McConnell H M, Burghardt T P. Biophys J, 1984; **46**: 739
- 19 Watts T H, Gaub H E, McConnell H M. Nature, 1986; **320**: 176
- 20 Poglitsch C L, Thompson N L. Biochemistry, 1990; **29**: 248
- 21 Brauner J W, Mendelsohn R, Drendergast F G. Biochemistry, 1987; **26**: 8151
- 22 Frey S, Tamm L K. Biophys J, 1991; **60**: 922
- 23 Schmidt A, Spinke J, Bayer T *et al.* Biophys J, 1992; **63**: 1385
- 24 Als-Nielsen J, Kjaer K. In: Riste T eds. Phase transitions in soft condensed matter. New York: Plenum Press, 1989; 113
- 25 Singh S, Keller D J. Biophys J, 1991; **60**: 1401
- 26 Brandow S L, Turner D C, Ratna B R *et al.* Biophys J, 1993; **64**: 898

Supported Bilayer Systems on Solid Substrates. Han Xing, Li Gang (*Department of Biophysics, Beijing Medical University, Beijing 100083, China*).

Abstract The various methods to make supported bilayer systems on solid substrates are straight forward. Comparing with liposomes and other systems, these systems have the advantages of better reproducibility, tighter controls over their physicochemical properties. Since membrane proteins can be incorporated into these supported bilayers, they are ideal model systems in the studies of biomembranes. Along with the improvements in the investigation methods, studies on these membranous systems are progressing into deeper details and there have appeared more applications of these model systems in biological and medical researches. The producing and studying methods of supported bilayer systems on solid substrate are reviewed, and some examples of successful applications of these systems in membrane biophysical chemistry are attempted to give.

Key words solid substrate, bilayers, membrane proteins