

~~18070210~~

(美) D. 勃 兰 顿 著
D. W. 迪 梅 尔

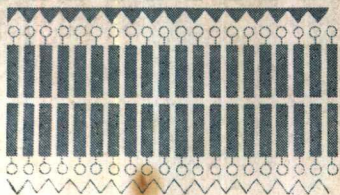
生

物

膜

结

构



科学出版社

生物膜结构

〔美〕D. 勃兰顿 D. W. 迪梅尔 著

汪安珩 杨周美 译

杨纪珂 校

科学出版社

1973

内 容 提 要

本书对有关生物膜结构的物理学和分子生物学原理、各种模型的设想以及用光谱学、X衍射、电子显微镜和其它物理技术所作的种种实验成果作了比较有系统的报导和总结。

本书可供细胞学、生理学、生物物理学、生物化学、生物数学方面的研究人员学习和参考。

Daniel Branton and David W. Deamer

MEMBRANE STRUCTURE

Springer-Verlag Wien, 1972

生 物 膜 结 构

[美] D. 勃兰顿 D.W. 迪梅尔 著

汪安琦 杨周美 译

杨纪珂 校

*

科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1973年9月第一版 开本：787×1092 1/32

1973年9月第一次印刷 印张：2 13/16

印数：0001—5,800 字数：63,000

统一书号：13031·148

本社书号：268·13—10

定 价：0.31 元

目 录

一、引言	1
二、膜间架的一般性组织	3
(一) 在膜结构上的物理限制	3
1. 膜的总面积和总体积	4
2. 类脂占复的面积	5
3. 膜的表面张力	6
(二) 膜的模型	6
1. 蛋白质-类脂-蛋白质膜	8
(1) 髓磷脂膜双折射	8
(2) 髓磷脂膜的 X 衍射	10
(3) 其它膜的 X 衍射	13
(4) 膜的薄切片的电子显微镜技术	15
(5) 类脂和蛋白质的度量	17
(6) 热分析	22
(7) 电子自旋共振	25
(8) 对蛋白质-类脂-蛋白质模型的评论	27
2. 类脂-蛋白质-类脂膜	29
(1) 红外线光谱	29
(2) 光旋转色散与圆振二向色性	32
(3) 核磁共振	34
(4) 膜组成的酶致水解	37
(5) 对类脂-蛋白质-类脂模型的评论	39
3. 散粒型膜	39

(1) 叶绿体膜	40
(2) 其它种膜	44
(3) 解聚实验	45
(4) 对散粒型膜假说的评论	47
4. 关于各种膜模型的总结	49
三、膜的分化和特异化	50
(一) 边界功能和酶功能的分化	52
(二) 冻蚀法	55
四、结束语	74
五、参考文献	77

一、引 言

一切细胞的边界都被一层薄膜所包裹，它把原生质和其外界环境隔开。这种膜的存在首先是由 de Vries (1885), Pfeffer (1897) 和 Overton (1899) 提出来的。他们证实了植物细胞随着外界渗透性的变化而在渗透作用上起反应。可是，细胞膜在物理上的真实性仍然争论了许多年。细胞膜太薄了，不易直接从光学显微镜看到它，而且它的边界又与细胞表面处其它的象动物细胞的胞质外层或植物细胞的细胞壁那样的结构相混杂。所以，早期有关膜结构的看法，间接地来自对膜功能的研究。事实上在还没有能够对个别的膜进行任何直接分析之前，对质膜的化学组成已经从它的渗透性质推断出来了。

到了 1930 年前后，对细胞膜的研究有了新的可采用的技术。其中包括显微操作，表面化学、电度量、X 衍射和电子显微镜等技术。不久，对于细胞膜的存在，首先由显微操作技术 (Plowe 1931)，后来又由许多科学家用电子显微镜的正染色技术(见 Elbers 的评述，1964)予以直接而明确地证实。电子显微镜技术进一步揭示出一件惊人的事实，即大多数细胞质内的组成，包括叶绿体、线粒体、细胞核、高尔基体、液泡和内质网等也都被一层膜所包裹，这些种膜至少在表观上看起来和细胞膜相似。大多数膜的厚度发现是 $60-100 \text{ \AA}$ 。如按垂直于它们的平面而切片时，通常出现为两条深色的边，中间隔着一条约色的间隔(绰号“铁轨”) (Robertson 1959, Whaley 等人 1960)。

随着对细胞的超微结构知识的增多，又产生了分离细胞质内部胞器的技术。生物化学和电子显微镜的联合研究很快就确定了有许多种的细胞活动是由膜包的胞器作媒介或者在内部分区进行的。现在大家都知道，活跃的传递作用、选择性的渗透作用、在光合作用中的量子转变、氧化磷酸化作用、以及神经传导作用等都是由特异的生物膜为媒介而起作用的 (Roodyn 1967, de The 1968, Leslie 1968, Singer 和 Tasaki 1968)。

当有相当纯净的分离的胞器制片可资利用时，许多种膜的组成就可以确定了。发现在每一种类型的膜中都各有其独特一而有不同比例的类脂与蛋白质的组合作为特征 (Benson 1964, Korn 1966, O'Brien 1967)。可是，要使这种组成上的特异性成为各种膜的功能特异性的基础，其方式如何，尚有待于探明。

在过去不多几年中，曾有好几种改进的光谱和量热技术被用来分析生物膜内部分子的组织和运动。这些物理学技术提供了有关膜的蛋白质和类脂在原位的构造的资料，从而在确定膜的整体结构中是有价值的。可是尽管我们对有关膜的功能与组成的知识有所增长，一张膜的生理能力还不能够以它的分子结构为依据而解释之。我们清楚许多种膜的功能，我们对它们的结构和组成也有几分了解，然而我们对它们的生化组成的分子排列还没有足够地了解到能够说明它们各种特异活性的程度。

在这方面的无知是有几个理由的。第一，直到最近才能够对膜的组成进行细致的研究，因为单膜型的纯净制片在过去还没有搞出来。第二，膜蛋白质具有不溶性的倾向，因此就难于使之特征化。第三，膜现象是发生在高度结构好的间架之上或之中的，因此标准的溶液化学技术就用不上去。虽然

那些使用X衍射、旋光或顺磁共振等物理学技术对研究高度结构好的象膜那样的系统已被证实是有力的工具，但这些方法基本上是个平均化技术。在一张膜内的那些具有功能重要性的中心可能不是居少数就是太短暂，不易提供可以为那些平均化技术所辨认得出的结构组织或周期性。因此，这些方法可以为整体的膜间架提供一幅清晰的图象，然而对它的最重要的那些功能单元的结构与分布并无太多的指示。

不少研究膜的生物学工作者曾假定那些有助于了解膜组成的一般组织的结构参量必定也可以用来解释膜的功能。如同我们以后要指出的，基于已有的证据所作的计算并不能支持这个假定，相反的，只要一小部分膜面积就可能说明它的大多数的特异化功能。因此，在本书的第一部分中我们考虑膜间架的总体组织，而不考虑那些可以说明它的特异化功能的任何元素。在本书的第二部分中我们考虑在膜间架内部分化的证据，并且指出在膜平面中那些分化的或特异化的元素怎样作为特异的膜型的特征。膜结构的其它方面近年来已有综述 (Robertson 1964, Kavanau 1965, Van Deenen 1965, Finean 1966, Maddy 1966, Stein 1967, Glaupert 和 Lucy 1968, Rothfield 和 Finkelstein 1968, Sjostrand 1968, Korn 1969, Stoeckenius 和 Engelman 1969, Thompson 和 Henry 1970)。

二、膜间架的一般性组织

(一) 在膜结构上的物理限制

虽然想在分子水平上去解决生物膜结构的问题开始似乎是复杂到没有什么指望似的，但是有好几种简单的物理参量，

它们限制了在一张膜内类脂和蛋白质分子的安排。这些限制使我们得以减少可能有的一般性模型的数目，然后应用实验的检验法在剩下的候选模型中进行抉择。这些限制虽属明显，但在过去并未予以重视，也许是因为关于膜组成的定性和定量的知识还不完全的缘故。由于目前对好几种膜的类脂和蛋白质的含量已有相当精确的估计量可资利用，我们现在就可以讨论有助于选择膜结构模型的三种主要的限制了。

1. 膜的总面积和总体积

很明显，膜的厚度(T)、表面积(A)、体积(V)、质量(M)以及密度(ρ)是由以下几个简单公式关联的：

$$V = A \times T \quad (1)$$

$$\rho = M/V \quad (2)$$

$$A = M/\rho T \quad (3)$$

这些关系可以在红血球膜中予以检验，因为对它的全部参量都可以相当准确地度量出来。例如以人类红血球直径的度量值为依据所作的计算得出其表面积约为 $145 \pm 8 \mu^2$ (Ponder 1948, Westerman 等人 1961)。一个与此相应的数值应由给定的 M , ρ 和 T 的数值从公式(3)推导出来。Dodge 等人(1963)发现每一个红血球血影细胞含有 $5.2 \times 10^{-10} \text{mg}$ 的类脂和大约 $6.0 \times 10^{-10} \text{mg}$ 的蛋白质。它们的水合物的质量约有 15% 是水分 (Finean 等人 1966)。电子显微镜的证据显示了由 KMnO_4 固定的红血球膜厚 $75 \text{ \AA}$ 。对在电子显微镜技术的固定与制备期中引起的收缩作了 10% 的校正后 (Fernandez Moran 和 Finean 1957, Moretz 等人 1969)，水合膜的厚度约为 $80 \text{ \AA}$ 。水合的红血球膜的密度约为 1.13g/cm^3 (Steck 等人 1970)。代入公式(3)：

$$A = \frac{11.2 \times 10^{-13} \text{g 类脂蛋白质} + 1.7 \times 10^{-13} \text{g 水}}{1.13 \text{gcm}^{-3} \times 80 \times 10^{-8} \text{cm}} \\ = 143 \times 10^{-8} \text{cm}^2 = 143 \mu^2$$

这个数字和表面积的估计量 $145 \pm 8 \mu^2$ 相比很接近,说明了在膜的厚度、类脂蛋白质的含量和密度为已知的情况下可以用这种计算来估计膜的表面积。

2. 类脂占复的面积

膜类脂的含量比较容易测定,因为类脂很易提取,并且用色层分析法进行定性和定量的测定现已成为常规的工作了。很明显,类脂必须在膜内占一定的面积和体积。如果把类脂从膜的制片中提取出来,再把它铺成单层,就可以估计出在膜内可能被类脂所占复的面积 (Gorter 和 Grendel 1925, Bar 等人1966)。当然,这样的数据只能提供一个粗略的估计。被一分子提取的类脂在单层中所占复的最小面积乃是在即将压垮它时的压力下的面积。这多少相当于处于晶体状态的分子所占的面积。最大的面积则可以取当表面压力刚开始测得出来时薄膜所占的面积。因此一个类脂分子在一单层中所占复的面积并不是固定的,而是看薄膜被压缩了多少而定。虽然如此,还是有可能度量出所提取的类脂的单层面积,并从而确定这些测定值是否与在原膜中所假设的类脂层次的数目相一致。例如,有人可能提这样的问题: 由一个单层所占复的面积,不论是在压垮压力下的或是在刚能觉察的最低表面压力下的,是否足以在提取类脂的原膜中形成一个类脂双层。

在这些计算中所涉及的通用公式列出如下:

$$\text{类脂层数} = \frac{\text{提取的类脂的面积(单层)}}{\text{膜的面积}} \quad (4)$$

$$\text{类脂分子设为双层的面积} = \frac{\text{膜的面积} \times 2}{\text{分子的数目}} \quad (5)$$

这些公式以后就用来计算好几种类型的膜中类脂所占复的面积。

3. 膜的表面张力

为了测定在膜表面上的界面张力，曾设计出各式各样的方法（参阅 Harvey 1954 的综述）。所得的结果总是比水-碳氢物的界面张力至少低一个数量级。例如 Harvey 和 Shapiro (1934)，用显微镜离心机把一个鲭鱼卵的细胞质中的含油空泡压在细胞膜上变扁的情况照下相来。他们用液滴张力公式算出了在油滴-细胞质间界面处的张力是 0.6 达因/厘米。对鲭鱼体油与几种水溶液间的表面张力用一台 du Nouy 张力计测得其最低值为 10.0 达因/厘米。对于油滴的低界面张力的唯一解释得通的办法是假设它被一层有亲水性表面的膜所包裹。类似的度量显示出所有的膜与水的界面张力都是低的。这些低值只当膜表面如果是亲水性时才会出现。表面张力的度量于是就在膜结构上添设了第三项限制，那就是说大多数疏水性的膜组成——碳氢链和非极性氨基酸侧链——必须是朝向内部的，而让那些亲水基留在膜表面处与周围的水液相起交互作用。可是，这项限制并不能规定在膜表面上的亲水基究竟是蛋白质的还是类脂的。

（二）膜的模型

在思想上有了这几项限制，我们就可以检查两个已经提出来的膜分子结构的基本模型了。第一个模型是以一张连续的类型双层为基础的，在双层的两侧膜表面处附有蛋白质（图 1a）。我们把这种模型称为蛋白质-类脂-蛋白质（PLP）模型。按照这种 PLP 模型，在膜表面处的是蛋白质的亲水基。第二

种模型所提出的或者是一种类脂-蛋白质镶嵌体,或者是渗填了类脂的蛋白质格子。按照这个模型,多数类脂亲水基在膜表面处与周围的水液相直接接触(图 1b)。我们把这个模型称为类脂-蛋白质-类脂(LPL)模型。变相的 LPL 模型提出类脂-蛋白质结构是由明显的亚单位组成的,它们以两维的阵列形成膜结构(图 1c)。



图 1 膜的模型。概括了几种已提出的较细致的结构。这几张图强调了类脂和蛋白质的相对安排: a) 蛋白质-类脂-蛋白质 (PLP), b) 类脂-蛋白质-类脂(LPL), c) 生物膜的亚单位构想引自 Branton(1969)。

当然,图 1 所示的是一些已经提出的完美的膜模型的粗略而又过于简易的图,但即使我们不管这些图示的简单化,而企图把每个分子指定在膜间架中的一个特定位置上也未必能成功。膜的结构,特别是蛋白质相互之间或蛋白质与膜类脂间的关系,不是一成不变的。最近 Frye 和 Edidin (1970) 写的一篇文章提供了一个必须涉及到的动力流动性的显著例子。将家鼠和人的细胞系融合成杂交细胞,并用萤光性抗体处理之(红色为人的,绿色为家鼠的抗原)。融合后不久,大多数杂交细胞立即显示出明显的红色与绿色各半的部分。但在一小时之内颜色就完全混合了。这个结果表明了扩散现象和细胞膜高分子组成在位置上的相对变化,并显示出在一单张膜内的结构肯定随着时间而变化。所以我们必须认识到任何膜的模型最佳也不过是分子结构的一种时间平均化的表示而已。

大多数膜的时间平均的分子组织可能都是在将予讨论的那些一般性模型的序列范畴之内的。由于所有这些模型的制

定都必须和上文所讨论过的总面积与总体积、类脂面积以及表面张力等项限制相适应，因此我们需对一些特异的膜进行检查，看看在这些模型中究竟有没有一种模型在反映生物膜的性质上要比其它模型更接近些。

1. 蛋白质-类脂-蛋白质膜

1935年 Danielli 和 Davson 提出了一种细胞膜的分子模型，它是由极薄的两表面都吸附了蛋白质的类脂层所构成的（图 2a）。他们认为在理论上这样的膜应具有区别大小不相同和溶解度不相同的分子的能力，还可能具有存在于细胞表面的其它各种功能的属性。这种蛋白质-类脂-蛋白质模型后来精确到说明一种以连续的中心双层类脂为基础而有一定厚度的膜（Danielli 1954）（图 2b）。这种模型假设在类脂和蛋白质间的相互作用是由静电力所控制的，这种力使蛋白质在双层类脂的极化表面上展开成 β 折页的构型。Danielli 的这种粗糙的分子模型对生物学家们的思想产生了深远的影响，并由此引导出许多重要的生物化学和生物物理的研究。对髓磷脂膜的探讨尤为重要。因为髓磷脂提供了一个独特的自然排列的膜系统，它能通过各种辐射探索技术，诸如光学双折射、X 衍射和电子显微镜等技术，来研究。因为我们目前有这么多的关于膜结构的设想都是从这些髓磷脂膜的分析的相互关系中发展起来的，所以详细地综述一下这些研究工作的历史是值得的。

（1）髓磷脂膜双折射

在发现神经组织是由膜组成之前的二十多年里，对神经系统的解剖学和生理学的兴趣导致了有关髓磷脂的光学和偏振显微镜的广泛研究。偏振显微镜证实了神经组织具有强烈

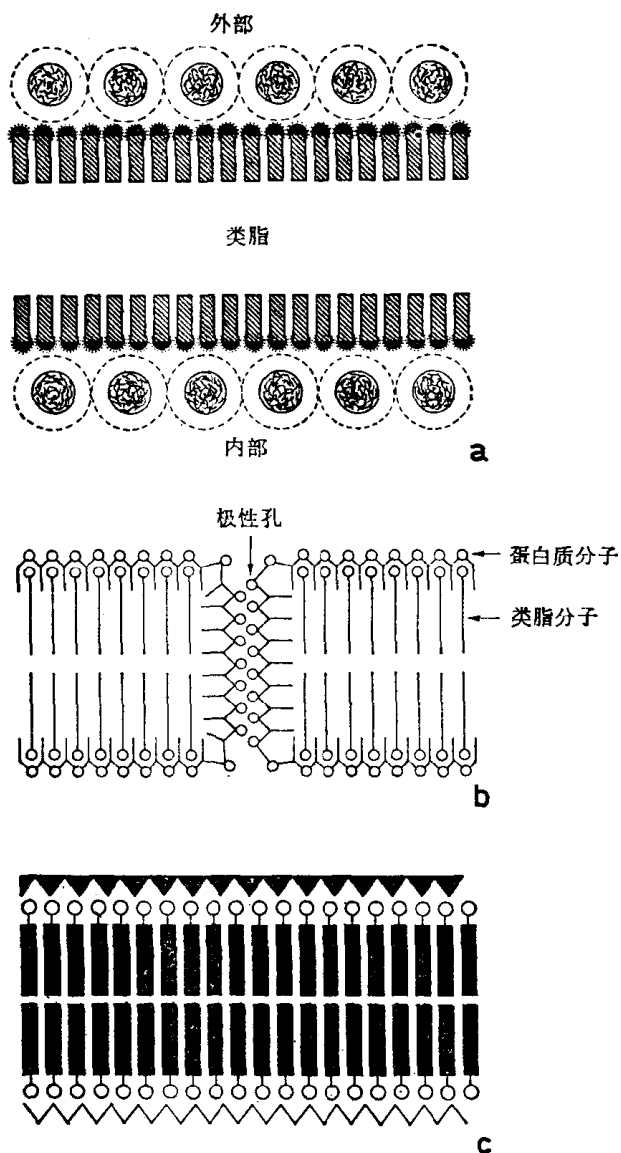


图2 几种 PLP 模型。a) Danielli 和 Davson (1935) 的初始设想显示出有不定厚度的类脂层。b) Danielli 的修订模型(1954)显示出类脂双层和亲水孔。c) 单位膜的图 (Robertson 1959) 显示出上述设想与其它 PLP 模型的关系。

的双折射性质(Wynne 1900),由这些发现所表明的高度有规则的分子排列引起了相当的重视。可是直到 Schmidt (1936)才推导出了一个合理的髓鞘模型,它既能说明其强而正的内在双折射性质,又能说明其弱而负的外表双折射性质。Schmidt 假设了类脂分子层以它的长轴垂直于髓鞘表面而定位,同时交替地以蛋白质片层平行铺于髓鞘表面。虽然 Schmidt 的模型有些方面已被证明是不正确的,但它所提出的归属于类脂与蛋白质的一般性分子定位已由 X 衍射所证实,并在很多现在的对膜结构的见解中被采纳。

(2) 髓磷脂膜的 X 衍射

Schmitt 等人(1935)首先研究了髓磷脂的低角度 X 衍射型式。他们发现在青蛙髓磷脂中有一个大约 $170 \text{ \AA}$ 的意想不到的大间隔,这为 Schmidt 所假设的基本上有重迭性的结构提供了尺度。后来的衍射数据和进一步的分析使 Schmitt 等人(1941)得出了一个结论,即髓鞘是由多层类脂双层同心地包在神经轴突周围而在各层之间填以蛋白质所组成的。因此 Schmitt 等人根据 X 衍射数据所得出的模型强有力地证实了 Schmidt 由双折射研究所推导出来的模型。

虽然这些有关髓鞘内部的分子结构和重迭尺度的提法是有说服力的。但这些尺度对于生物膜的尺度的关系如何不能下结论,直到 Geren (1954)和后来的 Robertson (1959)提供了令人信服电子显微镜证据,说明分层的髓鞘膜是直接由施旺氏细胞膜衍生并和它相连续的;如图 3a 所示者。

Geren 对髓磷脂膜和细胞膜的分子成分和排列可能是相似的设想导使 Fernandez-Moran 和 Finean (1957)去研究髓鞘的电子显微镜图象和它的低角度 X 衍射型式间的相关。这项研究是明确地把髓磷脂膜作为细胞膜研究的一种模型系统来

看待的早期研究之一。它为更加细致的X衍射和电子显微镜分析奠定了基础。

正当 Fernandez-Moran 和 Finean 主要地考虑由X衍射峰的位置所显示的间隔的时候, Finean (1962), Finean 和 Burge (1963) 却把衍射峰的大小或强度与电子密度相关联, 并因此而关联到在重迭的髓磷脂膜内部的原子和分子的位置(图 4a)。

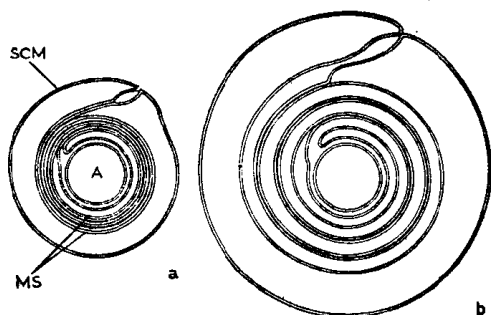


图 3 髓鞘 (MS) 围绕轴突 (A) 而发展并与施旺氏细胞膜 (SCM) 相连续。a) 主要的重迭代表胞质表面的同位, 内周期的重迭则代表外表面同位。b) 在低渗介质中胀开时使外表面脱离 但胞质表面不脱离。引自 Robertson (1959 和 1964)。

虽然他们的结果只由几个在数学上成立的解中选择最合理的来表示, 他们已经从在低渗溶液中胀开的髓磷脂的X衍射研究中获得了令人信服的支持。这一胀开便分离了两层粘在一起的质膜的外表面 (Robertson 1964) (图 3b) 且成为X衍射分析的基础。如果胀开的和原来的髓磷脂膜的分子结构是相同的话, 那么这项分析就能导致一种对神经髓磷脂的独特的变换, 因而导致一种独特的结构上的解释 (Worthington 和 Blaurock 1969a)。这种胀开技术曾被用来对一种模型求算其参量, 这种模型是以达于约 $30 \text{ \AA}$ 的间隔的衍射数据为根据的。这种模型显示出有两个不对称的三层型的膜单位, 每个三层型单位代表一张膜, 它的电子密度分布是和预期从 PLP 模型得来的相同 (Finean 和 Burge 1963, Worthington 和 Blaurock 1969b)。

最近 Caspar 和 Kirschner (1971) 更加详细而直接地测定了在三种类型的髓磷脂中的电子密度分布图。他们的测定

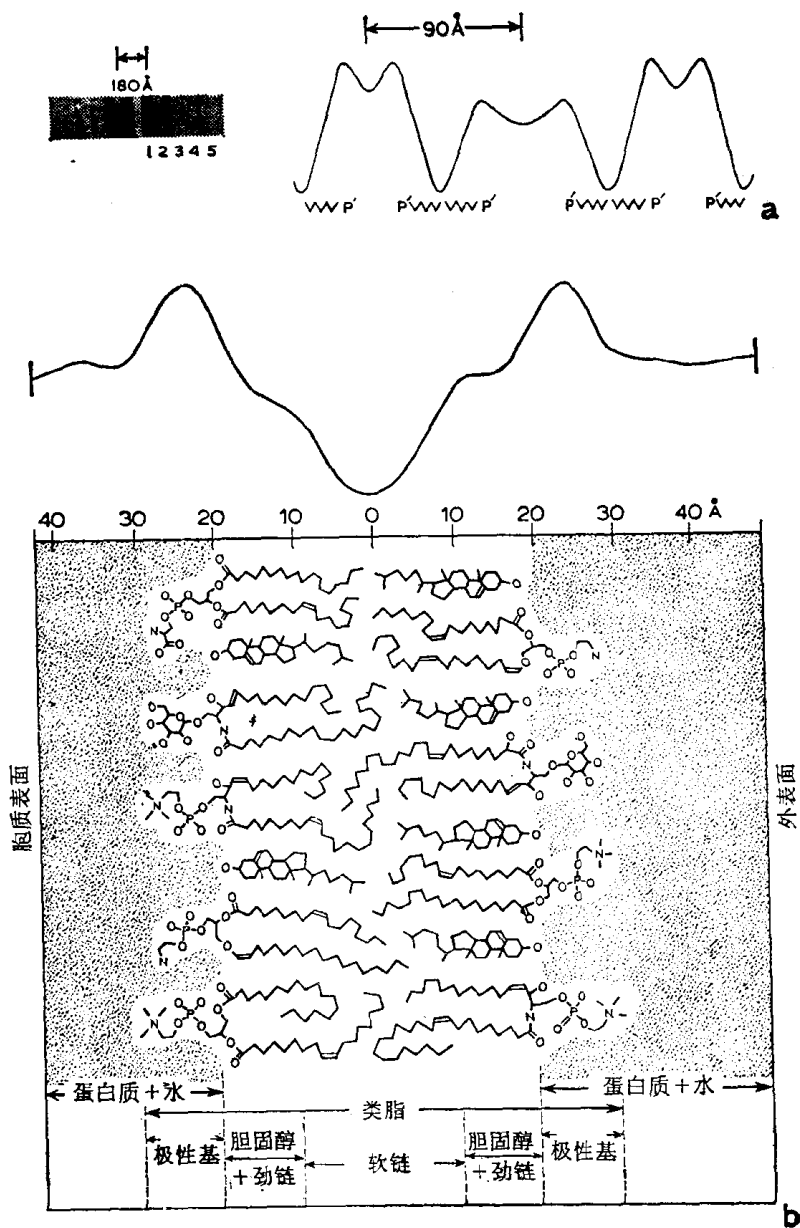


图4 a) 鼠坐骨神经髓磷脂的X衍射图(左图)和所算得的电子密度分布图(右图)。那些高电子密度区与磷酸端基和蛋白质相关联, 那些低电子密度区则与膜类脂的 $-\text{CH}_2$ 基相关联。从 Finean (1962)。b) 一张更详细的兔坐骨神经髓磷脂的电子密度分布图(上图)及分子结构示意图(下图)。从 Caspar 和 Kirschner (1971)。