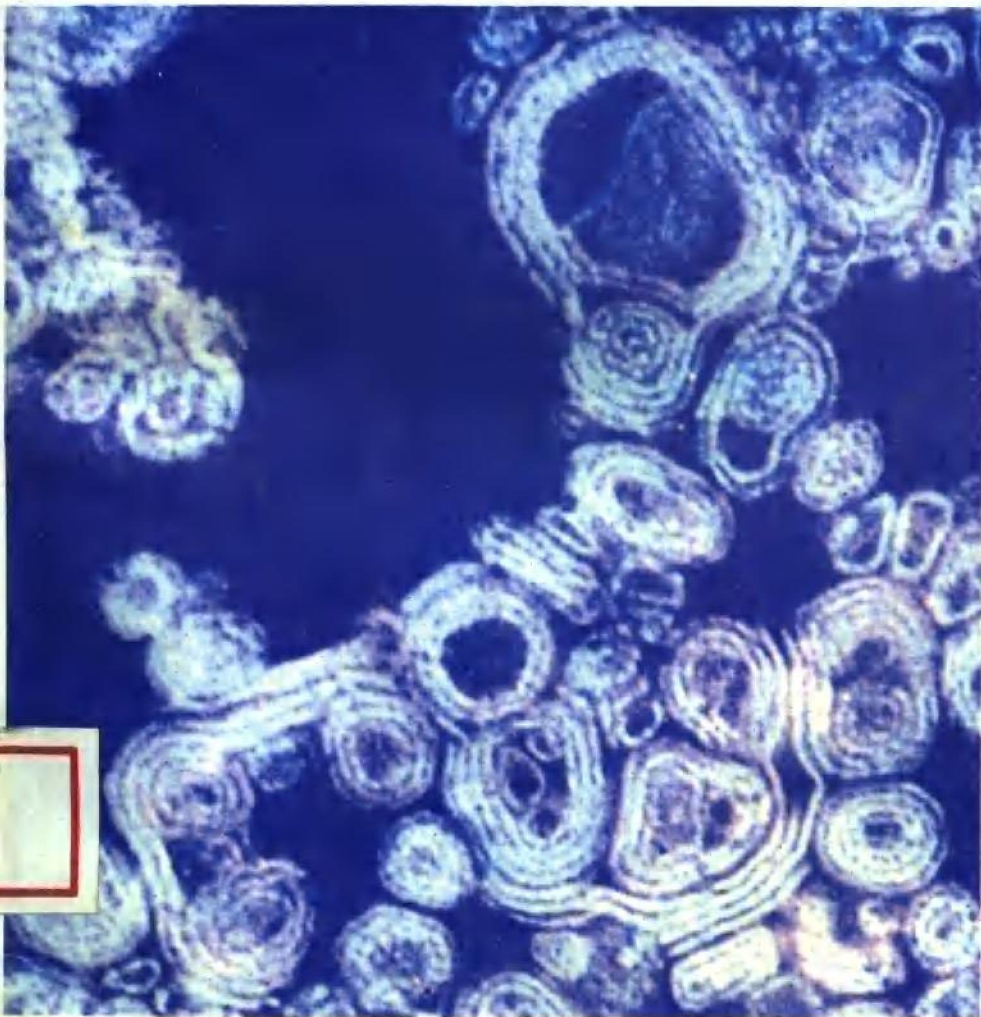


生物膜与脂质体技术

刘文龙 张志鸿编著 ● 湖南科学技术出版社



生物膜与质脂体技术

刘文龙 张志鸿 编著

责任编辑：沙一飞

*

湖南科学技术出版社出版发行

(长沙市展览馆路8号)

湖南省新华印刷二厂印刷

*

1989年5月第1版第1次印刷

开本：850×1168毫米 1/32 印张：6.25 插页：4 字数：159,000

印数：1—1,000

ISBN 7—5357—0443—3

Q·10 定价：3.95元

地目88—14

序 言

生物膜是近十多年来得到飞速发展的一门新兴学科。生物膜的特有脂质双分子层结构已被认为是和DNA双螺旋结构、蛋白质 α 螺旋结构等一样是生命的一种基本结构。它维持细胞内各部位的结构有序性；它关系到细胞内的能量代谢、蛋白质等大分子的生物合成、细胞和外界环境的物质交流、信息传递等。可以毫不夸张地说，一些重要的生命功能都是以生物膜为舞台而展现出来的。对生物膜结构和功能的了解也是细胞工程、基因工程、基因产物的分离和提取等生物工程研究开发领域中的必备基础。本书编者根据生物工程文库的宗旨着重介绍和生物工程密切相关的生物膜的基本特性（包括物质通过膜运输的机制）及人工双分子层脂膜在生物技术中的应用。

人工双分子层脂膜主要分两大类。一类是平板人工双分子层脂膜；另一类是球形双分子层脂膜即脂质体。它们既是生物膜研究的模型，又具有工程上的实用意义。为此，本书对平板双分子层脂膜作为生物膜的模型，在研究膜电位、膜融合、物质转运、光能转换及药物机理等方面的作用进行介绍。本书以一半左右的

篇幅介绍脂质体技术，因为近几年来脂质体技术已步入生物工程的实际开发研究领域。脂质体作为新型的“给药系统”、基因工程的载体系统等方面已取得了不少进展，国际上亦已成立了好几家脂质体公司并陆续有产品投放市场。我们相信通过本书对脂质体技术的基础及近几年发展的综合介绍，能对我国从事这方面研究开发的专业人员及有关研究人员、大专院校师生有所裨益。也热切期望广大读者对本书不吝指教。

作 者

1988年于复旦大学

目 录

1	生物膜的基本特性.....1
§ 1.1	脂双层 2
1.	膜脂的双亲性 3
2.	脂双层的二维流体特性 4
3.	脂双层的流动性 7
4.	脂双层和膜蛋白 10
5.	脂双层的不对称性 11
6.	膜表面糖脂 12
§ 1.2	膜蛋白 14
1.	脂双层与膜蛋白的疏水相互作用 14
2.	SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳在膜蛋白研究中的应用 17
3.	红血球血影细胞中膜蛋白的研究 18
4.	血影蛋白 19
5.	血型糖蛋白 21
6.	带III蛋白 21
7.	细菌视紫红质 24
8.	冰冻断裂电镜研究膜蛋白 25

9. 矢量标记试剂用于研究某些质膜蛋白 26
10. 膜蛋白的移动 28
- § 1.3 膜碳水化合物 36
 1. 糖类在生物膜中的分布 36
 2. 膜表面糖类在细胞-细胞相互作用中的意义 37

2 物质通过膜的转运.....39

- § 2.1 离子及小分子在膜内的转运 39
 1. 没有蛋白质的脂双层的通透特性 40
 2. 转运特定的小分子穿过膜的是膜上的转运蛋白 41
 3. 几种转运蛋白 43
 4. 闸门通道与细胞动作电位 52
- § 2.2 蛋白质大分子的跨膜运输 64
 1. 蛋白质运输的实例 64
 2. 分泌蛋白的跨膜运输 65
 3. 转译后蛋白质的运输 69

3 平板人工双分子层脂膜及其应用.....71

- § 3.1 平板双分子层脂膜的制备 72
 1. 制备BLM的脂溶液 72
 2. 对称BLM的铺制 73
 3. 由单层合成双层的BLM铺制法 74
 4. 在滤纸的微孔中形成BLM 75
- § 3.2 平板双分子层脂膜的物理特性 76
 1. 界面性质 76
 2. 双分子层脂膜的厚度 79
 3. 双分子层脂膜的电特性 82
- § 3.3 平板双分子层脂膜在生物膜研究中的应用 91
 1. 动作电位的模拟研究 92
 2. 膜融合的研究 96
 3. 膜通道的研究 97
 4. 用离子导体研究离子转运 99
 5. 光能转换的研究 102

6. 用于医药学研究 106

4

脂质体技术109

§ 4.1 脂质体的制备 109

1. 小单片层囊泡 110
2. 多片层囊泡 113
3. 多片层囊泡的脱水形成(脱水一再水化循环法) 113
4. 大单片层囊泡 114
5. 脂质体内物质的包裹法、脂质体的灭菌 117

§ 4.2 脂质体的物理化学特性 119

1. 脂双层的相变 119
2. 脂质体的通透性及其测量 121
3. 非双分子层结构 124

§ 4.3 蛋白质、药物和脂质体的相互作用 126

1. 蛋白质和脂质体的相互作用 126
2. 药物和脂质体的相互作用 130

§ 4.4 脂质体和细胞的相互作用 132

1. 融合 133
2. 吸附 134
3. 脂质交换 134
4. 内食作用 135
5. 其他可能存在的机制 136

§ 4.5 应用脂质体将大分子掺进真核细胞 136

1. 蛋白质的传递 137
2. RNA的传递 142
3. DNA的传递 145
4. 其它生物活性物质的传递 147

§ 4.6 脂质体作为药物载体的应用 149

1. 脂质体作为药物载体系统的合理性 149
2. 体内脂质体的命运 150
3. 脂质体包裹药物的治疗效果 156
4. 脂质体的靶向性 164

5. 敏感性脂质体	169
§ 4.7 脂质体在疾病诊断中的应用	177
参考文献	179

1

生物膜的基本特性

在生命的早期形式产生的过程中，质膜的出现是极为关键的一步，如果没有质膜，细胞生命的产生是不可能的。质膜包围着每个细胞，并确定了细胞的范围，维持细胞内部和外部环境间的差别。但这个膜并不只是一个被动的屏障，而是有着高度选择性的过滤器，使膜的两边保持离子及其它物质的浓度差别，允许营养物质进入细胞，代谢废物排出细胞。

所有生物膜，包括质膜和真核细胞的内膜，有一共同的结构，它们是由类脂和蛋白质结合而成的，这种结合是非共价结合。如（图1-1）所示。脂分子呈连续的双层排列，约4-5纳米厚。这种脂双层提供了膜的基本结构并对多数水溶性分子起着相对不易通透的屏障作用。蛋白质分子是“溶解”在脂双层中并起着膜具有的各种功能作用：起着某些特定分子进出细胞的运输作用；另一些是酶，催化与膜有关的反应；再有一些则是细胞骨架和细胞外基质间的连结结构或者作为接受和转换来自细胞外环境化学信号的受体。

所有细胞膜都是动态的流动结构：它们的多数脂和蛋白分子

在膜平面上可以作快速运动。膜还是不对称的结构：其两面的脂和蛋白分子是不完全一样的，这也反映了两面的功能是不同的。

虽然不同类型膜的脂及蛋白质成分不同，但基本结构及功能有其共同点。本章只讨论生物膜的主要结构——脂、蛋白质、糖类的基本特征。^{〔1〕〔2〕}

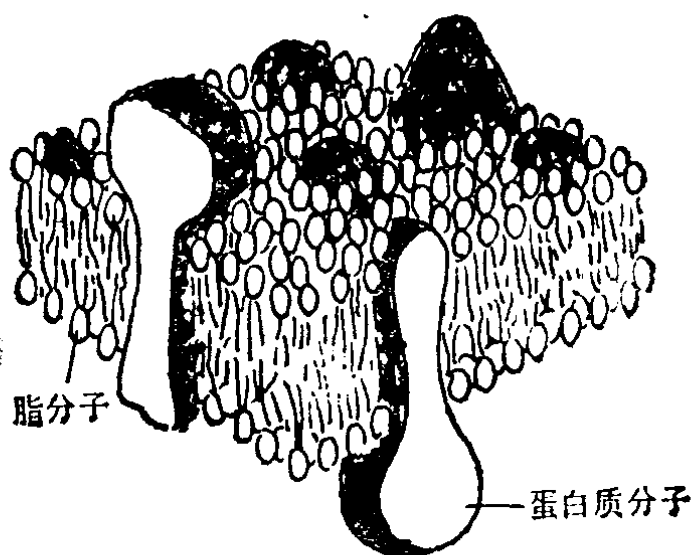


图1-1 细胞膜(约10nm平方)的三维模式图

§ 1.1 脂双层^{〔3〕}

首先报道生物膜是由双层脂分子 (Lipid bilayer) 组成的时间是在1925年。把红血球用丙酮抽提出脂，并把脂浮于水面，然后用一力使其在水平面成一单分子层。结果发现这个单层的面积正好是所用红血球总表面积的一倍，因为红血球内并无其它膜结构，只有质膜。所以就提出脂在红血球质膜中是呈双层分子排列的。这一结论无疑是正确的，但它是两个错误的实验结果互相抵消后得到的结论。一方面，丙酮并不能提取出红血球质膜中的全部脂分子。另一方面，他所计算的红血球表面积是用干的标本，因而比湿标本小。然而这个结论对细胞生物学有深远的影响，成为多数膜模型接受的脂双层结构模板，而且最终仍被证实是正确的。

高度有序的生物膜用 X-线衍射进行研究亦表明脂分子在膜中呈双分子排列。所有各类生物膜的冰冻撕裂电镜研究亦都证明在脂双分子层的中间能被机械力所分裂开来。

为什么所有生物膜都是由双层脂分子构成？一个理由是这些脂分子具有的特殊性质使它们（即使在细胞外也是这样）能自动地聚集成双层结构。

1. 膜脂的双亲性〔4〕

脂占多数动物细胞质膜的50%左右。每1平方微米的脂双层中约有 5×10^6 个脂分子。一个小的动物细胞的质膜约有 10^9 个脂

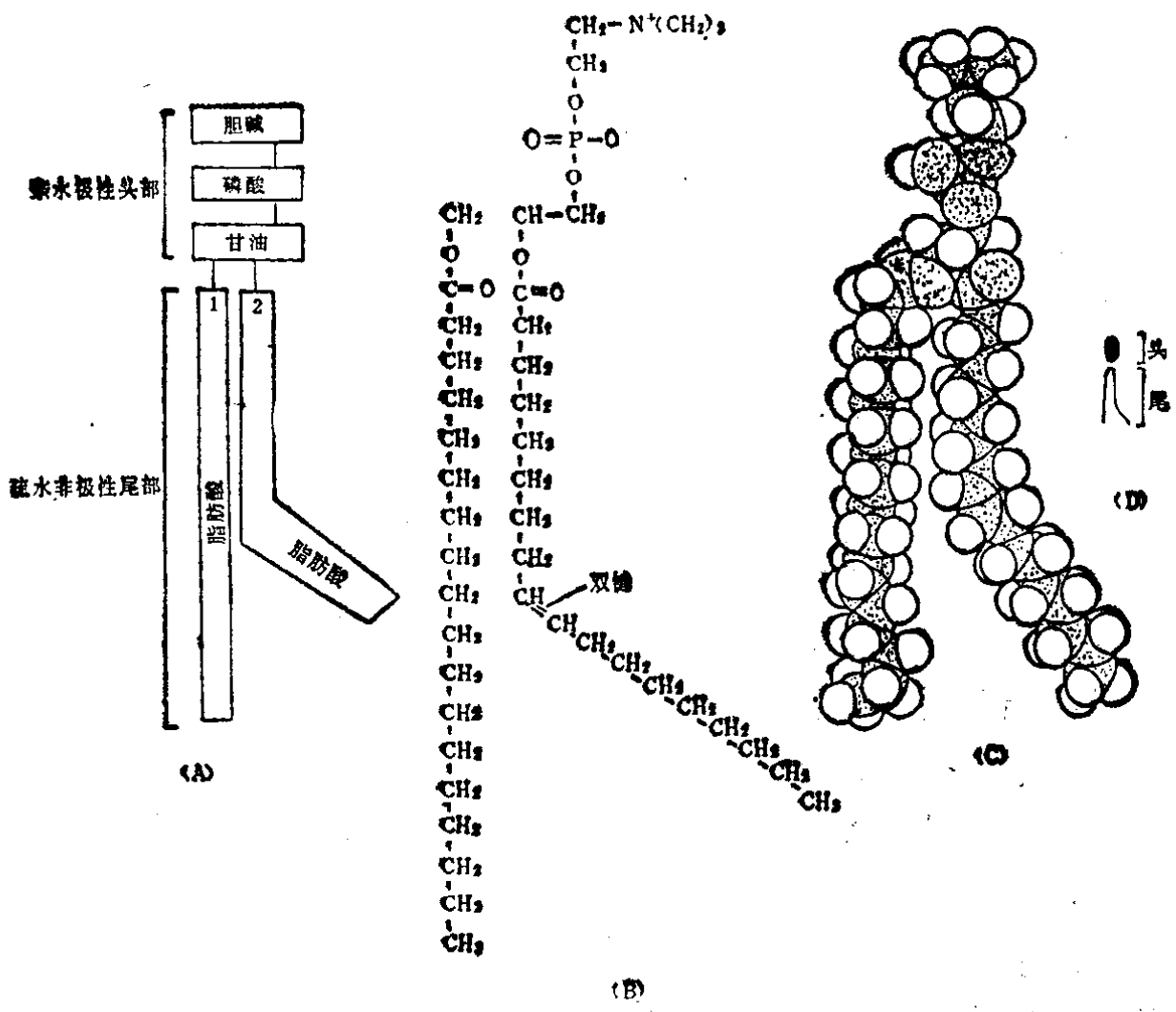


图1-2 磷脂分子磷酸酰胆碱的各个部分(A),分子式(B)及填满的空间模型(C),代表符号(D)。

为了使不饱和脂肪酸同饱和脂肪酸区别，不饱和链用一弯转来表示。事实上只有双键是牢固的，因为所有单个碳-碳键都可自由转动。不论饱和的和饱和脂肪酸链在每一磷脂单层中均平行排列。

分子。质膜中有三大类脂：磷脂(最多)、胆固醇和糖脂(图1-2)。这三类脂都是两性分子——即有亲水端和疏水端。例如，典型的磷脂分子(图1-2)有一极性头部基团和两条疏水碳氢链尾巴。尾巴的长度变化较大(一般为14-24个碳原子)，其中一条含有一个或几个双键(即不饱和键)而另一条则不含双键(即饱和的)(图1-2)，每一双键使尾巴产生一个弯曲。这种尾巴在长度及饱和度上的差别很重要，因为它们影响膜的流动性(fluidity)。

当两性分子的四周环境都是水相时，就要凝聚而把疏水尾部掩盖起来，只使亲水头部向水暴露。这是通过两条途径实现的：它们可以形成球状微团(micelles)，尾部朝内，或者形成双分子片层(sheets)或双层(bilayers)，疏水尾部与亲水头部基团两者相间排列。此两种可能性见(图1-3)。



图1-3 表示-磷脂微团和-磷脂双层的横切面。磷脂分子在水中自发地形成这种结构。

多数磷脂和糖脂自发地形成双层(在水相环境中)。因此，生物膜的脂双层的形成是一自聚集过程(self-assembling)。这种脂双层趋于把自己包成一封闭的腔，免除自由的边缘，因为自由边缘的疏水尾部将同水接触。同样理由，当由脂形成的腔破裂后它会重新封闭起来。

除了自聚集和自封闭(self-sealing)特性外，一脂双层还有其它特性使其成为细胞膜的理想结构，其中极重要的一点就是流动性，这一特性对许多功能都是关键。

2. 脂双层的二维流体特性〔5〕〔6〕

七十年代初，研究者第一次观察到个别脂分子能在脂双层中自由扩散。最早的实验是来自合成的脂双层的研究。这种人工双

层有两类在研究中特别有用：(1) 双层形成的球形微囊，称脂质体(Liposome),其直径大小在25纳米—100微米之间。主要看用什么方法制备(图1-4)。(2) 平板双层，称黑膜，是在两个水相间隔板的小孔上形成的(图1-5)。

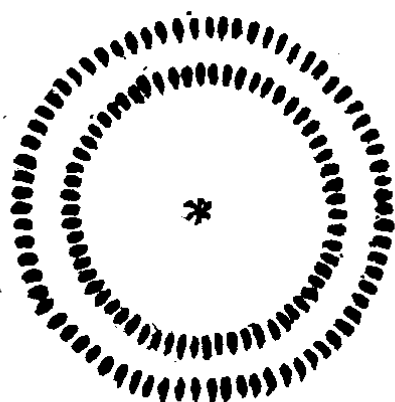


图1-4 小的球形脂质体的横切面，脂质体常用于模型膜的实验

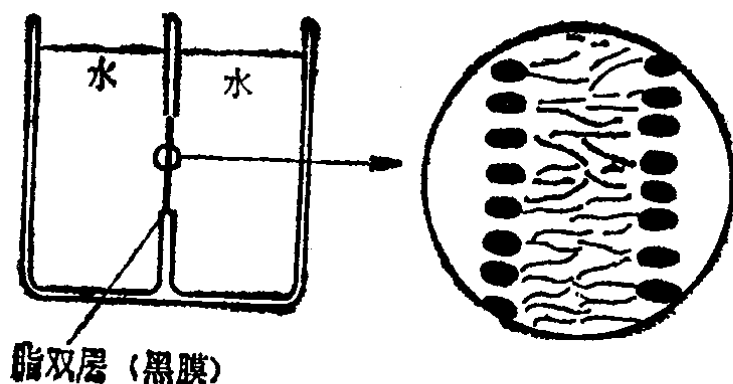


图1-5 人工脂双层的横切面图示，所谓的黑(脂)膜是铺制于两边为水相的小孔上的脂双层

有许多方法可用于测量个别脂分子的运动，例如，可以使脂分子的极性头部带上一“自旋标记”(spin-Label)物，如氮氧基团；它含有一不配对电子，其自旋产生一顺磁信号，可用电子自旋共振谱仪(ESR)测量。因此在双层中的自旋标记的脂的运动和取向就能被测出。这些研究表明在人工双层中的一边单层中的脂分子迁向另一单层是极少发生的，这种运动称“翻转”(flip-flop)，大约两个星期只发生一次(图1-6)(表1-1)。另一方面，脂分子与其邻近分子(在同一单层中)的交换位置则很易发生(~每秒 10^7 次)，这样就产生了快速的侧向扩散。扩散系数约为 10^{-8} 平方厘米每秒，也就是说每一脂分子，在一秒钟内可以扩散的距离相当于一个大细菌的长度(2微米)。某些脂探剂在人工膜上的侧向扩散系数见表1-2、表1-3、表1-4。还有，这些研究指出脂分子绕其长轴作快速旋转，其碳氢链则弯曲，在双层的中心弯曲度最大，而靠近极性头部则弯曲最小(图1-6)。脂分子的旋转弛豫时间平均为 10^{-8} 秒。

表1-1 几种磷脂在膜上的翻转速率

膜	脂 种 类	翻转半寿期
脂质体	卵磷脂	~11天
脂质体	胆固醇	~6天
脂质体	卵磷脂	>4天
甘油二油酸脂平板双分子层	油酸磷酸脂	>15天
流感病毒	胆固醇	~13天

表1-2 某些脂探剂在人工双脂层膜中的侧向扩散〔1〕

探 剂	膜的组成和形式	温度(℃)	$D \cdot 10^8 \text{cm}^2/\text{s}$
diI—C ₁₈	卵PC多双层	25	2.2 ± 0.9
diI—C ₁₈	卵PC,大、单层脂质体	25	1.2 ± 0.5
diD—C ₁₈	卵PC, 多双层	25	14—17
NBD—PE	卵PC, 多双层	25	3—5
硬脂右旋糖酐 (stearyl dextrans)	卵PC,大、单层脂质体	25	0.4 ± 0.4
NBD—PE	卵PC多双层	25	3—4.5
NBD—PE	DMPC多双层	30	5.5
NBD—PE	DPPC多双层	45	7
NBD—PE			
NBD—短杆菌肽	DMPC多双层	30	1.5
FI—M13噬菌体蛋白	DMPC多双层	30	4
NBD—PE	DMPC多双层	26	4
NBD—PE	卵PC 多双层	15	2.5
diI—C ₁₈	DMPC多双层	30	1.6
diI—C ₁₈	DMPC大、单层脂质体	30	1.1
diI—C ₁₈	DPPC多双层	48	1.0
diI—C ₁₈			
diI—C ₁₈			
DMPC ₁	dimyristoyl PC		

用离体的真核细胞的质膜或细胞器内膜及完整的原核细胞的质膜，如黏菌原生质体的质膜，细菌的细胞质膜及无核的红血球的质膜作为实验材料。用同样的标记脂分子作类似的研究，得知生物膜中脂分子的行为是与在合成的人工膜中基本一样：脂质双层是二维流体。它们的分子运动很快，但主要只局限于同一单层。

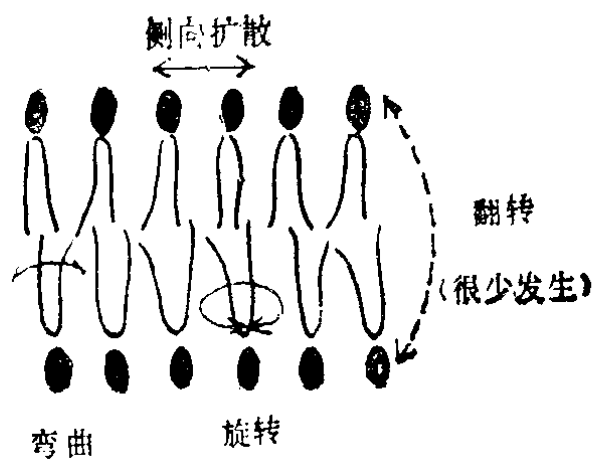


图1-6 在脂双层中磷脂分子的几种可能运动形式

表1-3 从荧光和磁共振的测量对脂侧向扩散的估计〔1〕

脂	形 式	测量方法	温度℃	$D \cdot 10^8 \text{cm}^2/\text{s}$
卵PC	超声制备的脂质体	荧光	20	3
DMPC	超声制备的脂质体	荧光	30	3
卵PC	多层液晶	EPR	25	1.8
卵PC	超声制备的脂质体	NMR	25	1.5
二月桂酰PC Dilauryloyl PC	多层液晶	荧光	20—25	2.6
二棕榈酰PC Dipalmitoyl PC	超声制备的脂质体	荧光	>43	20
红血球膜		荧光	25	2.8
红血球膜		荧光	40	10
V ₇₉ 细胞系(hamster)		荧光	37	≥0.6

3.脂双层的流动性〔7〕

一个用单一类型的磷脂制备的人工脂双层。从液态转变为固态晶体有一很陡的特征冰点，这一状态变化称为相变 (phase-transition)。如果碳氢链短或有双键，则产生此一变化的温度低 (即膜变得很难冰冻)。链短，减少了碳氢尾部相互作用的趋势；

表1-4

脂探针在质膜中的侧向扩散〔1〕

探 剂	细 胞 类 型	温度℃	$D \cdot 10^3 \text{cm}^2/\text{s}$
diI—C ₁₈	L-6大鼠肌纤维母细胞系	室温	0.8 ± 0.03
diI—C ₁₈	鸡胚成纤维细胞	室温	$0.7 - 0.9 \pm 0.3$
diI—C ₁₈	大鼠腹膜肥大细胞	室温	0.8
diI—C ₁₈	小鼠3T3细胞系	室温	0.6 ± 0.3
diI—C ₁₈	小鼠淋巴细胞	室温	1.7 ± 0.3
diI—C ₁₆	未发育的海胆卵	15	0.6 ± 0.3
diI—C ₁₈	未发育的小鼠卵细胞	室温	1.9 ± 0.27
diI—C ₁₈	神经母细胞	室温	$1.9 - 6.1 \pm 0.04$
diI—C ₁₈	V79细胞系 (hamster)	22	0.6 ± 0.3

双键的扭曲导致碳氢链的扭结，使得它们更难于排列整齐。(图1-7)

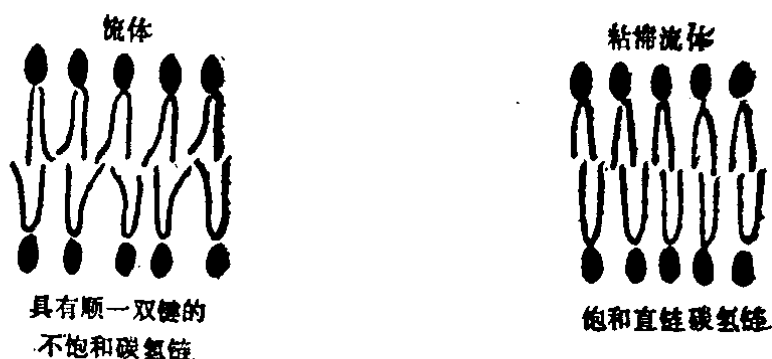


图1-7 在不饱和碳氢链中的双键增加磷脂双层的流动性，因为使得链紧排在一起变得困难

在人工双层中含有混合的磷脂，它们具有不同的饱和度（因此有不同的相变点），故可产生相分离。当达到“冰点”时，同一类型的磷脂形成一群。因为生物膜中，饱和的和不饱和脂肪酸链总是同时存在于一个脂分子中（一条链饱和，一条链不饱和），故不会如上面那样的分离。

另一决定膜流动性的是胆固醇。真核的质膜含有较多的胆固醇，磷脂分子与胆固醇分子的比例为1:1。从调节流动性来讲，胆固醇是加强双层的机械稳定性。胆固醇分子在双层中的取向是其羟

基紧靠磷脂分子的极性头部；其板状的固醇环紧接极性头部的碳氢链区域，并与之相互作用。而与链的其余部分分开（图1-8）。对多数真核细胞的质膜，胆固醇也起着防止碳氢链互相紧靠而形成晶态的作用。这样，胆固醇就抑制了由温度引起的相变并因此防止了在低温时膜的流动性的突然降低。

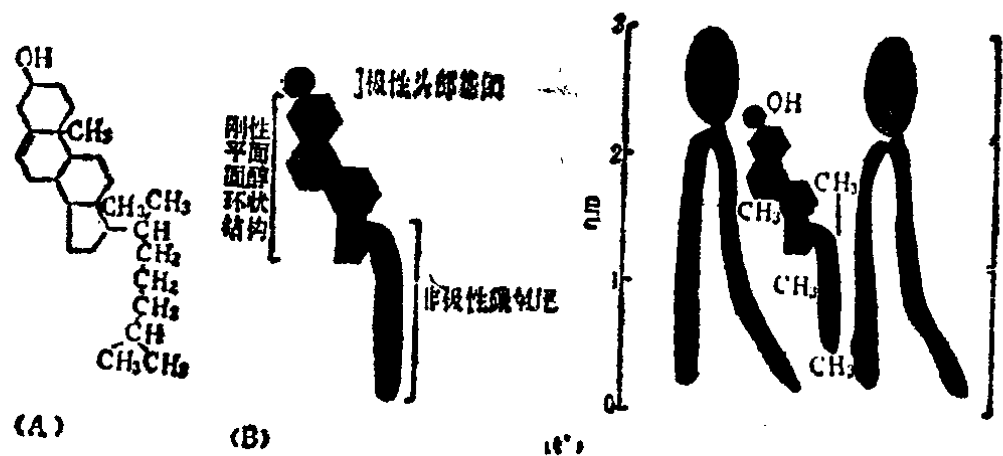


图1-8 胆固醇分子式 (A)，模式表示(B)，在单层中胆固醇与两个磷脂分子的相互作用(C)

胆固醇在维持膜的机械稳定性中的重要作用也可由不能合成胆固醇的突变动物细胞系的实验加以证明。这种细胞必须在培养液中加入胆固醇，否则细胞很快会溶解。加入的胆固醇是掺入到质

表1-5 不同细胞膜的脂类成分

脂	占 脂 总 重 量 的 百 分 数					
	肝细胞 质 膜	红血球 质 膜	髓磷脂	线 粒 体 (内膜和外膜)	内质网	大 肠 杆 菌
胆固醇	17	23	22	3	6	0
磷脂酰乙醇胺	7	18	15	35	17	70
磷脂酰丝氨酸	4	7	9	2	5	微量
磷酸酰胆碱	24	17	10	39	40	0
鞘磷脂	19	18	8	0	5	0
糖 脂	7	3	28	微量	微量	0
其 它	22	13	8	21	27	30