

生物科学参考资料

第十三集

科学出版社

内 容 提 要

本集一共有 28 篇文章,基本上都是 1979 年 3 月间,中国科学院于北京举行的“生物膜学术会议”中宣读的综述性报告。本集首先介绍了近年来研究生物膜新使用的实验技术;然后从细胞学、生物化学、生物物理、有机化学、动物生理、植物生理、药理学、免疫学、肿瘤学等方面来研究生物膜的最近成就,作了综述性的报道。

关于生物膜的研究,近年来发展迅速,对许多基本的生命活动过程、能量转换、物质运输、信息识别和传递、细胞发育和分化以及神经传导、激素和药物作用、肿瘤发育等都和生物膜有密切关系。这些重要问题的解决,都有赖于生物膜基本结构和功能研究的深入发展。

本书可作为生物科学工作者的阅读资料。

生 物 科 学 参 考 资 料

第 十 三 集

责任编辑 黄宗甄

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

*

1981 年 5 月第 一 版 开本: 787 × 1092 1/16

1981 年 5 月第一次印刷 印张: 17 3/4

印数: 0001—4,400 字数: 412,000

统一书号: 13031 · 1536

本社书号: 2108 · 13—10

定 价: 2.75 元

目 录

示差扫描量热计应用于生物膜热致相变的研究·····	胡粹青	1
激光喇曼散射光谱在生物膜研究中的应用·····	蔡惠罗	16
核磁共振及其在膜研究中的应用·····	林克椿	23
电子自旋共振与自旋标记相结合技术及其在膜生物学上的应用·····	忻文娟	32
生物膜 X 射线小角衍射的分析原理及应用·····	徐森根	40
突触膜受体的分离与鉴定·····	葛邦轮 朱友成	48
从味觉的分子识别到一个新的生物膜模型·····	曾广植	57
生物膜的基本结构·····	刘树森	69
脂质体与生物膜研究·····	杨福愉	92
生物膜的不对称性与磷脂交换·····	陈丽筠	104
泛醌与氧化磷酸化·····	唐海伦	116
叶绿体被膜的结构和功能·····	魏家绵 沈允钢	124
ATP 酶复合体在光合膜能量转换中的作用·····	李淑俊 李有则	134
支原体膜·····	黄 芬	145
细胞表面的糖类·····	王克夷	161
细胞膜结构动力学的越膜控制与肿瘤细胞膜的关系·····	王祖武	170
细胞松弛素和细胞表面膜·····	高魁雄	178
生物膜的介晶态结构与功能·····	谈曼琪 丁学泉	186
可兴奋细胞外膜和内膜的功能联系问题·····	范世藩	203
杆细胞光感受器膜中视紫红质分子受光照后的结构变化·····	温业绍	209
植物细胞膜与离子运转·····	倪晋山	214
高等植物生物膜流动性和膜结构功能·····	王洪春	220
紫膜蛋白的光化学·····	程极济	230
细胞膜激素受体及效应器与膜流体结构的关系·····	张世荣	236
高等植物原生质体质膜的研究·····	陈季楚	247
白血病细胞膜的研究·····	王祖武	253
凝集素及其对发育过程中的细胞表面的作用·····	刘 黎	261
粒细胞抑素·····	陈海琛	272

示差扫描量热计应用于生物膜热致相变的研究

胡 粹 青

(中国科学院化学研究所)

1. 引 言

生物膜具有一普遍而又重要的性质,就是它会发生热致相变 (thermotropic phase transition)。若将生物膜自低温逐渐加热,达某一温度范围时,在膜上会出现一个相转变。经过多方面的研究工作^[1-6],现在已经比较明确,这一相转变是发生在膜的脂质成分上。

多数脂质的水悬浮液是呈双分子层结构的。如图 1 所示:图中○代表分子中的极性基团,两根长长的尾巴是为两条脂肪链。脂肪链相互内聚而形成分子的疏水性区域,极性基团则位于层的表面,层与层之间充满了水溶液。在相变温度以下,脂质的疏水区部分呈二维六方晶系结构,相变温度以上则呈液晶状态。相变以后仍然维持其双层结构,只是层的厚度 D 减小了,并且向水平方向体积略有所膨胀。因为是液晶态,分子排列的有序性减小了,所以膜的流动性与通透性亦均有所增加。

生物膜的热致相变与膜脂质的分子结构、膜的物理性质以及膜与其他物质的作用等,都有着密切的关系,因此,此相变的研究,对于弄清生物膜的基本结构、膜的生理功能以及膜脂质的状态,对膜上其他成分的生理功能的影响,如物质的主动运输、膜蛋白酶的活性等,都是极为有用的。

研究生物膜热致相变的历史不算悠久,最早是在 1964 年,Byrne 和 Chapman^[7] 报道了将磷脂酰乙醇胺在加热过程中,于红外光谱可以观察到有好几个相转变。不久,他们又报道了用差热分析仪^[5] 观察到脂质悬浮液自晶相对液晶相的转变峰。1969 年 Steim 等^[1] 应用示差扫描量热计,直接来研究衣原体细胞的热致相变。第一次以实验证明天然生物膜中的脂质,亦是脂双层结构。近十年来,这方面的研究工作发展得相当快。

生物膜热致相变研究所应用的主要工具,是各种波谱与光学仪器。如核磁共振、电子自旋共振、X 射线衍射、电子显微镜、红外光谱、喇曼光谱以及荧光光谱等。六十年代中期

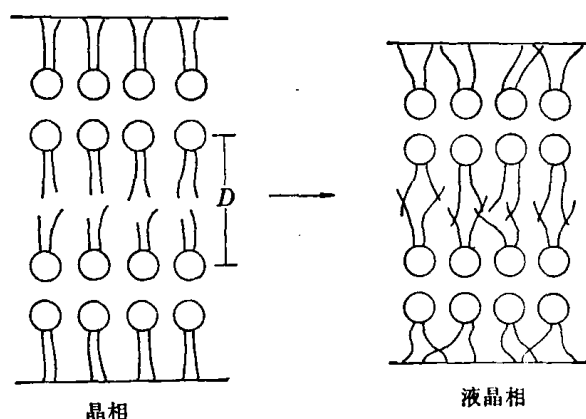


图 1 脂质的热致相变

由于示差扫描量热计这样一种新型仪器的出现,于是又增加了热力学方法研究的内容。许多工作均表明,示差扫描量热计是进行生物膜热致相变以及其他分子生物学研究的一个很得力的工具。

2. 示差扫描量热计的简单工作原理

示差扫描量热计 (Differential Scanning Colorimeter, 简称 DSC) 是一种动态的量热计,它是由差热分析仪 (DTA) 改进演变而来的。目前所用的 DSC 有两种类型,乃是热流计型的与功率补偿型的,后一种用得最为普遍。下面是功率补偿型 DSC 的简单工作原理^[8]。

功率补偿型 DSC 的核心部分,是一对制作与物理参数完全相同的量热计支架,对称地、热匹配地安置在一种恒温环境里。量热计支架的底部均装有加热器和温度计,其引出

线分别与有关电学线路部分相联接 (图 2)。

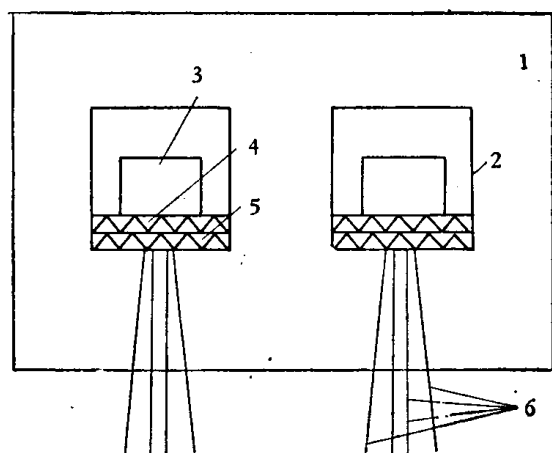


图 2 DSC 本体示意图

1. 恒温环境; 2. 量热计支架; 3. 样品盘;
4. 温度计; 5. 加热器; 6. 引出线。

DSC 的电学部分如图 3 所示: 主要分为两个线路环,一是程序温度线路环,一是功率补偿线路环。程序温度线路环的作用是同时对一双量热计支架按照设定好的程序温度指令进行温度扫描。程序温度扫描指令一般有: 等速升温、等速降温、恒温以及进行一次或多次地等速升温、降温循环等。功率补偿线路环的作用,是当此对量热计支架的温度有差异时,能自动地进行能量补偿,以使两者的温度在实验过程中始终维持相同。

进行实验时,一只量热计支架内盛放待测样品,另一只量热计支架内则盛放参考样品(惰性物质,一般用空气作为参考物质,即放置一空的样品盘)。然后对它们同时进行程序温度扫描,当达到某一温度时,样品即发生物理的或化学的变化,并伴随有吸热或放热的热效应,两只量热计支架的温度会有差异。此时,仪器即自动进行功率补偿,并将瞬时补偿的功率与扫描温度连续地记录下来,是为样品的热曲线。

图 4 是 DSC 的典型热曲线图,热曲线的座标分别为热流速度即功率 (W) 与温度 (T)。由于是程序温度,即单位时间的温度变化是恒定的,故温度座标亦可换算成为时间 (t) 的座标。当样品无变化时,曲线记录的是基线,当样品发生变化时,基线即开始偏转,一般出现向上的或向下的峰。从热曲线上,我们可以得到这样一些参数: 反应的起始温度、反应的温度范围 (如图上的 $T_1 \rightarrow T_2$ 、 $T_3 \rightarrow T_4$)、由峰的方向来判断热效应的性质(放热反应或吸热反应)、由峰面积的测量得到焓变值 ΔH 以及由热力学关系式计算得到熵变值 ΔS 等。此外,我们从 DSC 的热曲线上,还可以得到其他一些性质的参数,例如动力学参数、物质的纯度等。

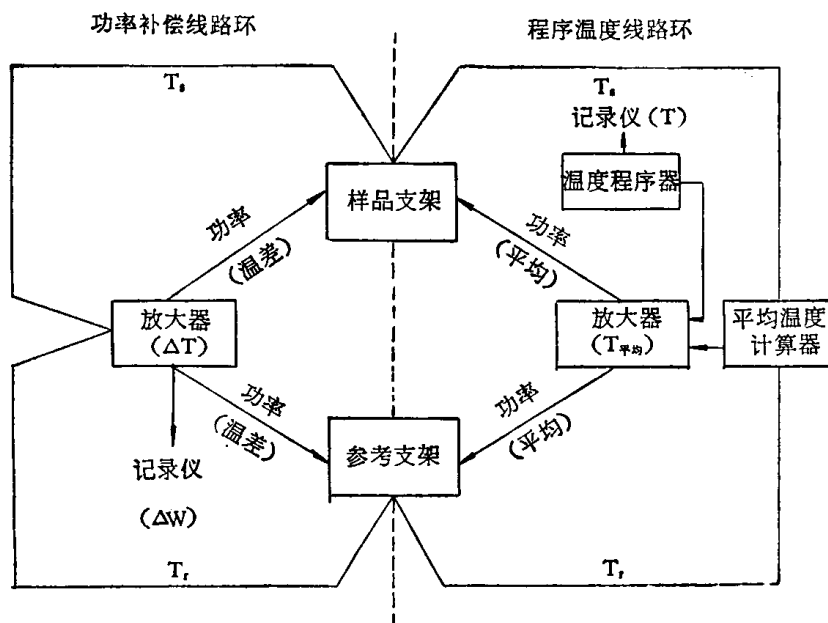


图3 DSC 电学部分工作原理

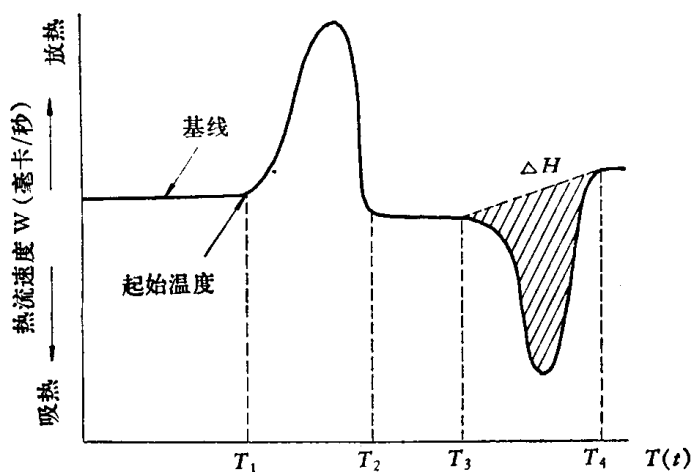


图4 DSC 热曲线

DSC 的优点是微量、快速、自动化程度高。对于生物膜的研究，由于扫描温度不高，一般一、二十分钟即能完成一次实验。样品量只需要几微升或几毫克。对于更稀溶液的研究，例如研究蛋白质、核酸的构象变化，有些实验室^[9,10]还自己制造了灵敏度更高的微卡级绝热式 DSC。此外，如 Steim 等^[11]在研究天然膜热致相变时，由于热效应小，他们将商品 DSC 进行了改装，增大样品盘的尺寸，以便提高测试的准确性。

3. DSC 应用于生物膜热致相变的研究

生物膜热致相变的研究，最初是着眼于膜的结构，后来逐渐发展到研究膜相变与其生理功能的关系，以及脂质与其他膜成分如膜蛋白质、胆固醇以及各种离子之间的作用等。就研究对象而言，鉴于天然生物膜结构与成分的复杂性，所以多数的工作是在合成脂质模拟膜上进行的。近年来，对于一些简单、易于提取的天然膜的研究工作，亦逐渐有所开展。

下面分别对 DSC 应用于膜相变与分子结构的关系,膜上其他成分对膜相变的影响、以及天然膜的研究等方面的工作进行一些介绍。前两个课题的研究主要是在人工模拟膜上进行的,尤其是在卵磷脂膜上进行的。选择卵磷脂作为模型物,是因为它的水悬浮液已被可靠地证明是双层结构,同时它又是动物细胞膜的主要成分之一。

3.1 脂质的分子结构与相变的关系

天然膜的脂质分子均为混合物,如含有不同长短、不同饱和度的脂肪链(分子中的疏水性部分)以及不同的磷脂取代基(分子中的极性部分)。由于各种脂质之间的相变温度不一样,因此天然膜的相变温度范围一般均较宽,并且往往是细胞的最适宜生长温度均落在相变温度范围之内。此说明细胞膜在生理温度下,是处于晶相与液晶相共存的。当细胞膜处于完全晶态的温度时,细胞就不繁殖和生长。但若仅有 5—10% 的脂质处于液晶态,细胞的生长则仍能继续进行^[4,12]。更值得注意的是:有些细胞当它们处在不同的生长温度时,会自动调节其细胞膜上脂质的成分比率,并趋向于保持其膜的稳定的流动度。由此可以提出设想:即天然膜中脂质分子结构的复杂性并不是偶然的,很可能是有其生理功能的特定意义的。研究脂质分子的结构与相变的关系,实为了解生物膜功能的重要一环。

3.1.1 脂肪长链性质的影响

用 DSC 研究结果表明^[6,13],相变温度 T_c 与脂质分子中的疏水性部分,即分子中的长链

表 1 1, 2-脂酰-L-磷脂酰胆碱-水体系 ($C < 0.7$) 的 T_c 与 ΔH

1, 2-脂酰- 磷脂酰胆碱	碳数目	双键数	$T_c(^{\circ}\text{C})$	ΔH (千卡/ 克分子)	ΔS (卡/ 克分子·度)	预熔峰温度 ($^{\circ}\text{C}$)
二山萘脂酰	22	0	73	14.9	42.8	—
二硬脂酰	18	0	58	10.70	32.4	56
二棕榈脂酰	16	0	41	8.65	27.6	35
二肉豆蔻脂酰	14	0	23	6.65	22.4	14
二月桂脂酰	12	0	0	—	—	—
二油脂酰	18	1	-22	7.6	30.3	—

脂肪酸的性质有关,其规律与一般烷烃或脂肪酸相似,就是碳氢链愈长,则 T_c 愈高, ΔH 亦依次增加。自表 1 可以看到每增加二个次甲基, ΔH 约增加 2 千卡/克分子。

天然膜的脂质分子上往往还含有不饱和的脂肪链,如含一个双键的有油酸脂链、鳕酸脂链,含二个双键的有亚油酸脂链,以及含三个双键的亚麻酸脂链等。对于这些脂质的相变温度,均要比含有相同碳数目的饱和脂肪链的要低得多。如表 1 中所示,1, 2-二硬脂酰-L-磷脂酰胆碱的 T_c 为 58°C , 而 1, 2-二油脂酰-L-磷脂酰胆碱(在第九个碳原子上有一双键)的 T_c , 则下降到 -22°C 。

鉴于脂质分子中的脂肪长链的性质与相变温度 T_c 的关系,其规律与一般烷烃或脂肪酸的性质与其熔点规律一致,由此亦能证明膜的热致相变,是发生在脂质分子中的疏水性

部分。

3.1.2 磷脂取代基的影响

脂质分子极性部位磷脂取代基的不同,亦会影响相变温度与焓变值。如表 2 所示,胆

表 2 磷脂取代基对相变的影响

脂 肪 链	磷脂取代基	T_c (°C)	ΔH (千卡/克分子)	文 献
二肉豆蔻脂酰	胆 碱	23.7	6.26	[3]
	乙醇胺	51	6.6	[14]
二棕榈脂酰	胆 碱	41	9.69	[3]
	乙醇胺	63	8	[14]

碱取代基的 T_c 比乙醇胺取代基的要低,估计是由于胆碱分子 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ 的

尾部空间位阻大,影响脂肪链的结晶。

在这里,特别要提到的是卵磷脂(即二脂酰磷脂酰胆碱)的热致相变曲线(见图 5),它有两个峰,而其他脂质均无此现象。在 35°C 开始有一小峰,为“预熔峰”, $\Delta H = 1.6$ 千卡/克分子。41°C 以后出现一大峰,是为晶相 $\rightarrow$ 液晶相转变的主峰, $\Delta H = 8.7$ 千卡/克分子。关于“预熔峰”机理的阐明尚未统一,Chapman 等^[15]认为是由于此分子的极性基团的运动状态有所改变,使原来呈 58° 倾斜角的脂肪链成为垂直了,因为在此温度下每克分子极性基团所占的面积减小了。但 Hinz^[3] 等却有另外的观点,他们认为是在此温度下,脂肪链由斜方晶系转变为六方晶系,是属另一种相变峰。

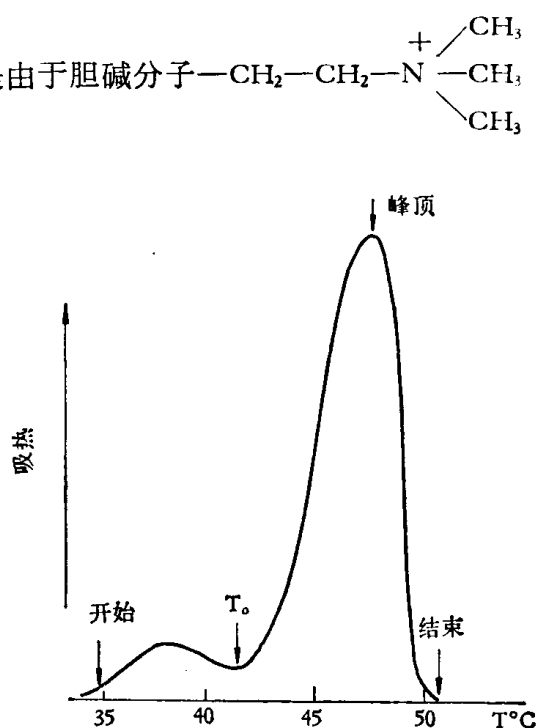


图 5 1,5-二棕榈脂酰-卵磷脂-水(50:50)体系 DSC 热曲线

3.1.3 脂质混合物的相转变

上面已经提到,天然生物膜都是脂质混合物,因此,有必要研究脂质混合物的相转变。

例如: 1,2-二肉豆蔻脂酰卵磷脂(DML)与 1,2-二棕榈脂酰卵磷脂(DPL)的 T_c 分别为 23°C 与 41°C,但将它们按不同比例混合,则混合物的相变温度有规律地变化^[15]。如图 6 所示, T_c 随着 DPL 成分的增加而提高。混合物的峰略变宽,在混合比为 1:1 时为最宽,但仍不失却峰形的对称性。由于只存在一个相变峰,说明在 T_c 以下任何成分的混合物均呈单相的共熔体。

以上 DML 与 DPL 两种分子比较相似,只是脂酰上的碳数目相差 2。若将不同极性

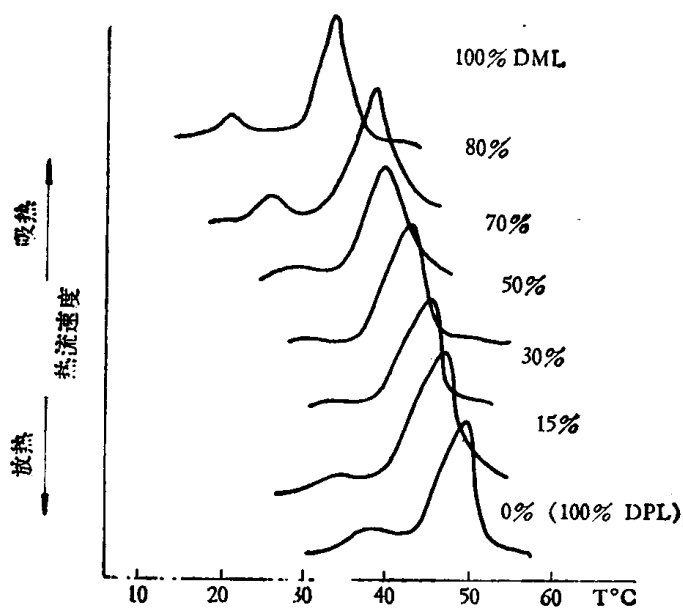


图6 DML-DPL-H₂O 体系

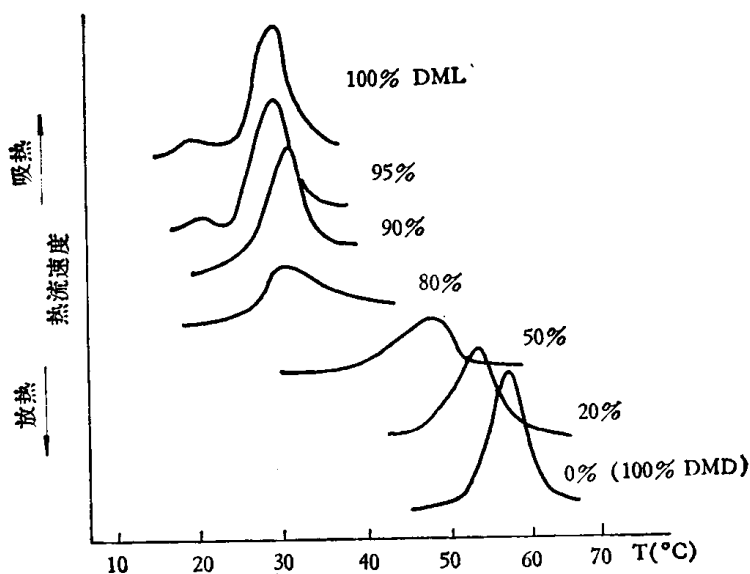


图7 DML-DME-H₂O 体系

基团的分子混合,如1,2-二肉豆蔻脂酰卵磷脂(DML)与1,2-二肉豆蔻脂酰磷脂酰乙醇胺(DME)按不同比例混合,则其DSC曲线如图7所示。此两种分子结构差别较大,故在DML中加入DME以后,峰宽明显增大,说明相变的协同性降低,两相共存的温区也变大,其中当混合比为80:20与20:80之间,峰的形状也变得不对称了。

若将相变温度差别较大的类脂分子相混合^[13],例如:在1,2-二油脂酰卵磷脂(DOL)与1,2-二硬脂酰卵磷脂(DSL)的1:1混合物的DSC曲线上(图8d)可以看到有两个峰,分别稍低于其单组份时的相变点(图8a、b),峰宽略增。因此认为当此混合物处于两组份各自相变点的中间温区时,两种分子是分开而形成区域的,一种区域处于晶态,而另一种区域则处于液晶态。关于这一点,用其他研究手段亦能观察得到,例如,使用冰冻断裂法(freeze-fracture technique)。

假如脂质分子中的两条脂肪链的性质不一样,例如: 1-硬脂酰-2-油酰卵磷脂, 则它的相变温度 T_c 介于 DOL 与 DSL 的中间 (图 8c), 并只呈一个峰。

3.2 膜上其他成分对膜相变的影响

生物膜的成分除含脂质以外, 还含有蛋白质、碳水化合物、胆固醇等其他的成分。此外, 膜的周围有水溶液, 溶液中又有各种离子、溶质等。因此, 除了研究脂质本身的分子结构与膜相变的关系外, 还需要研究其他膜成分与膜相变的关系。它对于弄清楚其他成分与脂质的作用、膜的结构、以及膜的状态, 对其他成分如蛋白质的生理功能的影响等都是很重要的。

下面分别讨论水、胆固醇、离子、蛋白质等对膜的热致相变的影响。

3.2.1 水分的影响

脂质颗粒悬浮在水中时, 有的是呈单一的脂双层, 有的如髓磷脂则是呈多层结构, 即由许多层的脂双层呈同心圆式的排列。水能与脂质缔合。缔合的水主要是位于脂质的极性部位, 亦即位于脂双层的表面, 或是位于多层膜的层与层之间。水分子的存在能影响脂双层的相变。

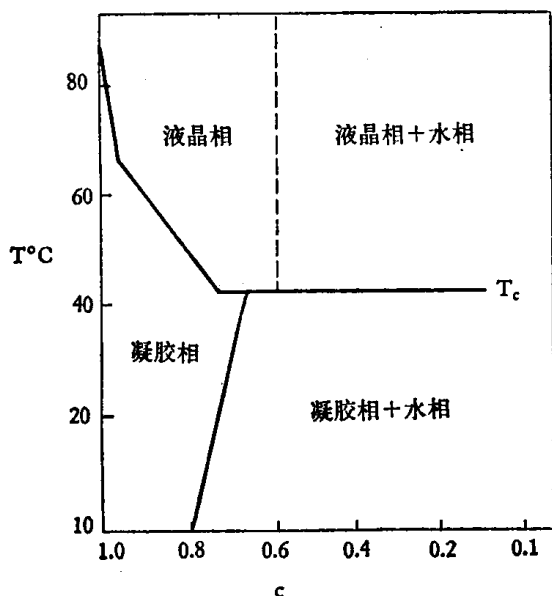


图9 DPL-H₂O 体系相图

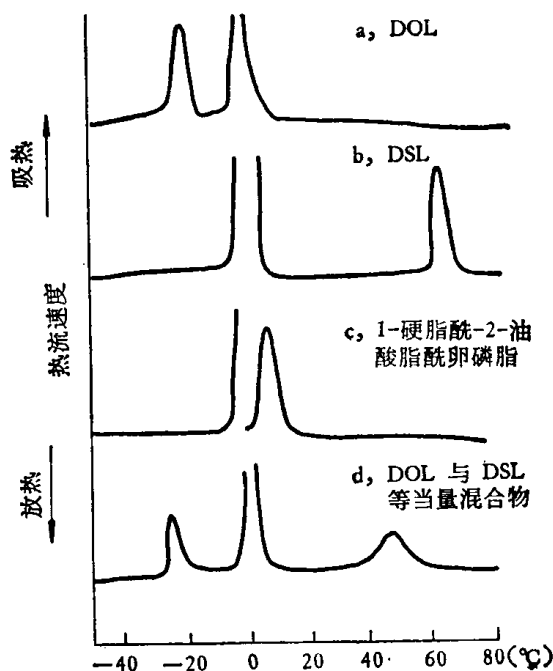


图8 DOL-DSL-H₂O 体系

Chapman 等^[2]曾应用 DSC 研究了 1, 2-二棕榈脂酰卵磷脂-水体系的相图 (图 9)。无水卵磷脂的 T_c 异常地高。加入水后, 当类脂的浓度为 $1.0 \geq c \geq 0.8$ 时, 随着类脂浓度 c 的减小而 T_c 急剧下降, 最后到 $c < 0.8$, 即体系中的水的含量 $> 20\%$ 之后, T_c 即达到一稳定值。此时 DSC 热曲线出现另一吸热峰 (0°C), 是为冰的熔融峰, 并且峰的面积随着水量的增加而增加。通过以上定量的研究, 说明卵磷脂是以一定的比例与水缔合的, 相当于 4:1 (重量比), 亦即 1 克分子的卵磷脂与 10 克分子的水相缔合, 其余的均为自由的水分子。X 射线衍射法^[16,17]

测得缔合的水是与脂质的极性基团作用, 位于层与层之间。近年来, Finer 和 Darke^[18]

还报道了磷脂酰丙氨酸钠及磷脂酰乙醇胺与水缔合的研究。

3.2.2 胆固醇的影响

天然生物膜中往往含有不等量的胆固醇,例如,髓磷脂、红血球膜中胆固醇与脂质的含量比几乎接近于 1,因此研究胆固醇对脂质相变的影响是有意义的。

Ladbrooke 等^[19]研究了 1, 2-二棕榈脂酰卵磷脂-胆固醇-水(水的重量比为 50%)体系的热致相变,得到如下的结果(见图 10):随着加入的胆固醇的量的增加,先是卵磷脂的“预熔峰”面积逐渐减小,至胆固醇量达到 12.5% (克分子百分比)时,则此小峰完全消

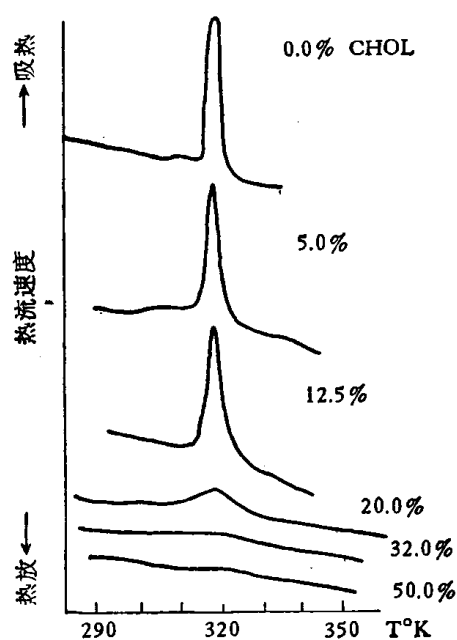


图 10 DPL-CHOL-H₂O 体系

失。再增加胆固醇的量,热致相变的主峰亦随之改变。 T_c 下降,峰形变宽,峰面积也变小,至胆固醇加入量达 50% 时,相变峰完全消失。作者认为加入胆固醇后,预熔峰的逐渐消失,是由于脂肪链由原来呈 58° 倾斜角的排列,变成呈垂直角度排列了。胆固醇与脂质的作用是“疏水性”的作用,即加入的胆固醇插入到脂肪长链中去,使得碳氢链之间的内聚力减小了,因而增加其流动性,并降低类脂的热致相变温度,同时相变焓也减小了。当加入一定量的胆固醇(50%)时,脂质的晶态完全被破坏,相变也就不存在了。

在这方面比较新的还有 Hinz 和 Sturtevant 的工作^[20]。他们测定了胆固醇对 DML、DPL 相变的影响,用的是自己制作的绝热式示差扫描量热计,具有更高的灵敏度。他们的试验结果,当胆固醇与脂质的克分子混合比为 1:2 时,相变峰就消失

了。

Kruffy 等^[21]用 DSC 研究了胆固醇与脂质混合物的作用,发现胆固醇在脂膜中不是随意混乱排列的,如图 11 中所示,图中曲线 a 是 1, 2-二月桂脂酰卵磷脂($C = 12$)与 1, 2-二硬脂酰卵磷脂($C = 18$)等克分子比混合物的 DSC 热曲线,具有高低温两个相变峰。当加入不同量的胆固醇后,先是 1, 2-二月桂脂酰卵磷脂的相变峰逐渐消失,然后 1, 2-二硬脂酰卵磷脂的峰也随之减小以至消失,说明胆固醇先与低 T_c 的脂质作用,然后与高 T_c 的脂质作用。

关于胆固醇对脂质热致相变的影响,应用其他仪器亦曾作了不少工作,如核磁共振、X 射线衍射等。Engelman 等^[22]用 X 射线衍射法研究的结果,当胆固醇浓度低时,存在两个衍射峰,一为 $4.15 \text{ \AA}$ 的锐峰,相当于纯卵磷脂的晶态;另一峰为 $4.75 \text{ \AA}$ 的弥散峰,相当于卵磷脂-胆固醇络合物的液晶态。当胆固醇浓度逐渐增加, $4.15 \text{ \AA}$ 峰逐渐变得微弱,至胆固醇含量为 33% 时,此峰完全消失,与 DSC 的结果完全一致。

通过上述研究,说明胆固醇能插入到脂双层中间去,与膜呈“疏水性”的作用,同时它还能对膜的流动性起调节的作用,即当膜处于晶态时,可使其增加流动性,表现在使 T_c 降低。当膜处于液晶态时,又能减小其运动的自由度。用核磁共振测得 T_c 以上,加入胆固

醇的脂质的脂肪链端基 $-CH_3$ 的运动减小了。鉴于胆固醇能自由地出入于脂双层,因此有可能胆固醇的作用是瞬时地在膜的局部区域调节生理功能上需要的流动度和通透性。

3.2.3 离子的影响

与胆固醇不同,离子与膜的作用不是伸入到脂双层中间去,而是通过与脂质极性基团的静电作用,来影响膜的相变的,这种机理称之为触发机理(trigger mechanism)。

Verkleiz^[23]研究了 pH、 Ca^{++} 对 1,2-二月桂脂酰磷脂酰甘油相变的影响(图 12)。 H^+ 与 Ca^{++} 浓度增加, T_c 亦高,其中特别可以观察到 Ca^{++} 对膜生理作用的重要性,当 Ca^{++} 浓度仅含 1% 时,对相变温度就起较大的改变,但再增加 Ca^{++} ,变

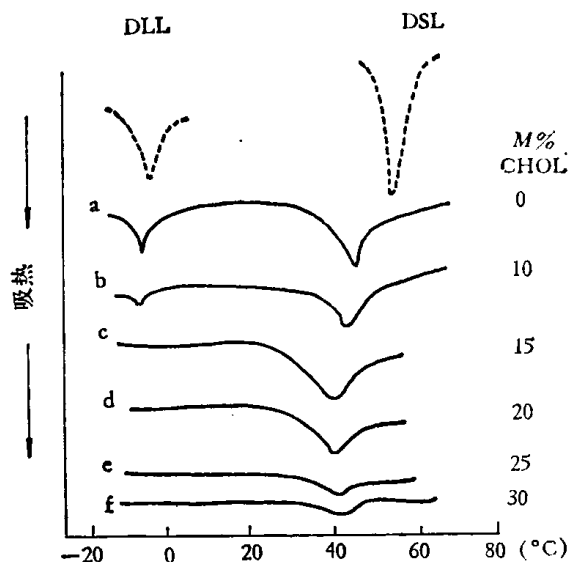


图 11 胆固醇对脂质混合物相变的影响

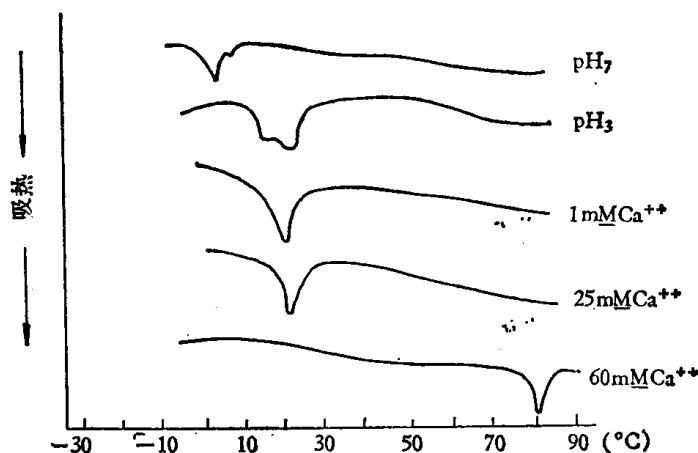


图 12 H^+ 、 Ca^{++} 对脂质相变的影响

化就不太显著了。当 Ca^{++} 浓度增加到 60%, T_c 又出现一突变,变得异常高了,并且用肉眼就能看到有部分沉淀出现。作者认为当 Ca^{++} 浓度小于 60% 时,主要是 Ca^{++} 中和了脂质的负电荷,但当 Ca^{++} 浓度大于 60% 后,即产生脂质-Ca-脂质络合物,此时表现出特高的 T_c 以及颗粒形状由球形变成圆柱形。

Chapman 等^[24]将等当量的 Ca^{++} 与 UO_2^{++} 分别加到磷脂酰丙氨酸的水悬浮液中去,也得到了相似的结果。两者均不同程度地提高了相变温度,表明在特定的温度下,这些离子的作用是使得脂双层中碳氢链排列紧凑,并减小膜的通透性。

Chapman 等研究在 DPL 中,加入不同量的 UO_2^{++} 时得到了很有趣的结果。从图 13 中可以看到,当 DPL: UO_2^{++} 为 10:1 时,原来单一的峰变成两个叠加峰,前峰较大,后峰较小。随着 UO_2^{++} 浓度的增加,后峰变大,前峰变小,最后当 DPL: UO_2^{++} 为 1:1 时,又只有一个峰了。出现两个峰,说明加入 UO_2^{++} 后,在膜中呈两个区域;一个区域是属于与

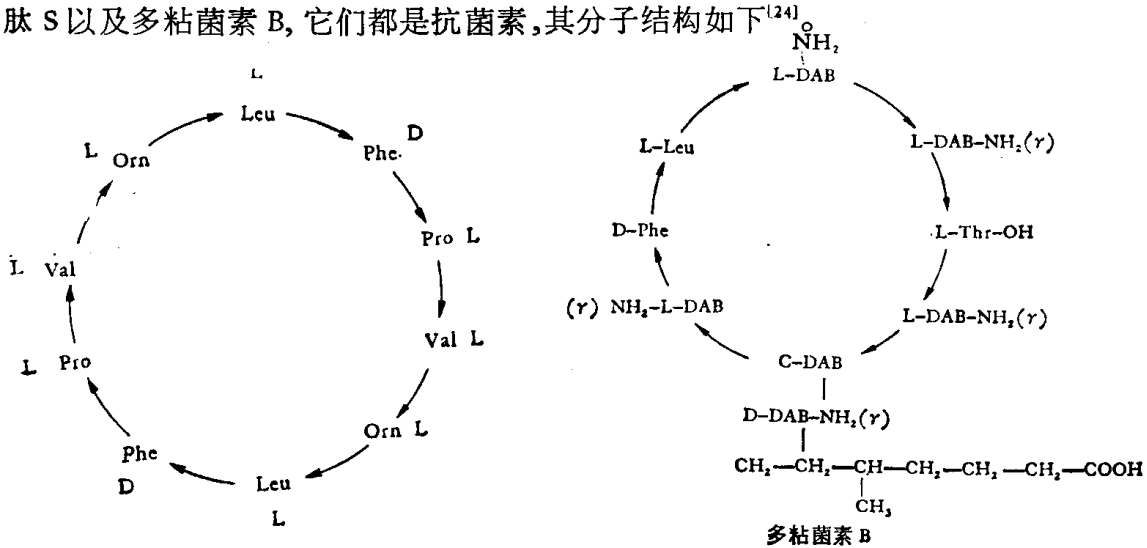
UO_2^{++} 结合的膜，一个区域是尚未与其作用的膜。 UO_2^{++} 对膜具有较大的亲和性，很可能是由于膜与 UO_2^{++} 形成的络合键，具有部分共价键性质的缘故。

红外光谱观察到 UO_2^{++} 与卵磷脂、磷脂酰羟丙氨酸的作用，主要是与脂质的极性区域作用。加入 UO_2^{++} 后，脂质的 $P=O$ 伸缩频带自 1,250/厘米位移到 1,170/厘米。 UO_2^{++} 与膜作用并络合在膜的表面，并阻碍钠离子与葡萄糖通过膜。

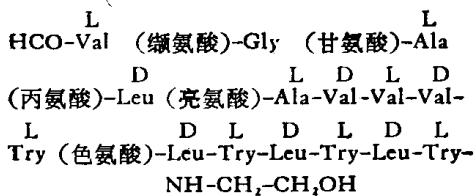
3.2.4 蛋白质、多肽的影响

蛋白质是生物膜的重要组份之一，特别是功能性较高的细胞，膜上的蛋白质含量亦较高。研究蛋白质与脂质的作用，无论是对于了解蛋白质影响脂膜的状态与功能，或是脂膜的状态对蛋白质功能的影响，均是很重要的。

关于蛋白质对膜相变的影响，有不少的工作。这里通过介绍三种蛋白质与脂质的作用，说明不同的蛋白质与膜作用的机理，亦不完全相同，这三种蛋白质是短杆菌肽 A、短杆菌肽 S 以及多粘菌素 B，它们都是抗菌素，其分子结构如下^[24]



短杆菌肽 S



短杆菌肽 A

短杆菌肽 S 是环状结构，其肽链上带有极性残基。它对膜相变的影响如图 14 所示^[25]，

按不同比例,将短杆菌肽 S 与 1, 2-二棕榈脂酰卵磷脂相混合。随着短杆菌肽 S 含量的增加, T_c 依次降低, 但热效应无什变化, 说明它与脂质的作用属于“触发机理”, 即凭借短杆

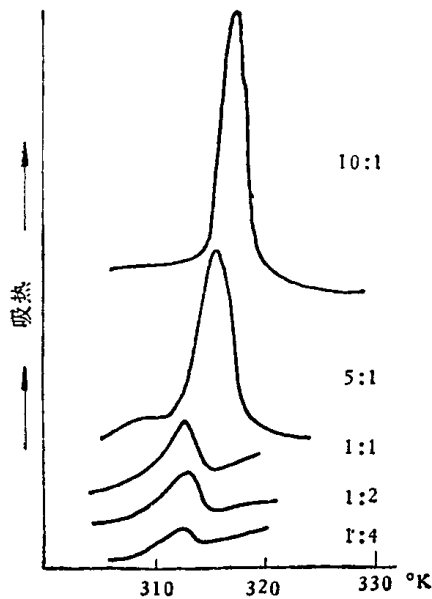


图 14 卵磷脂-短杆菌肽 S 体系

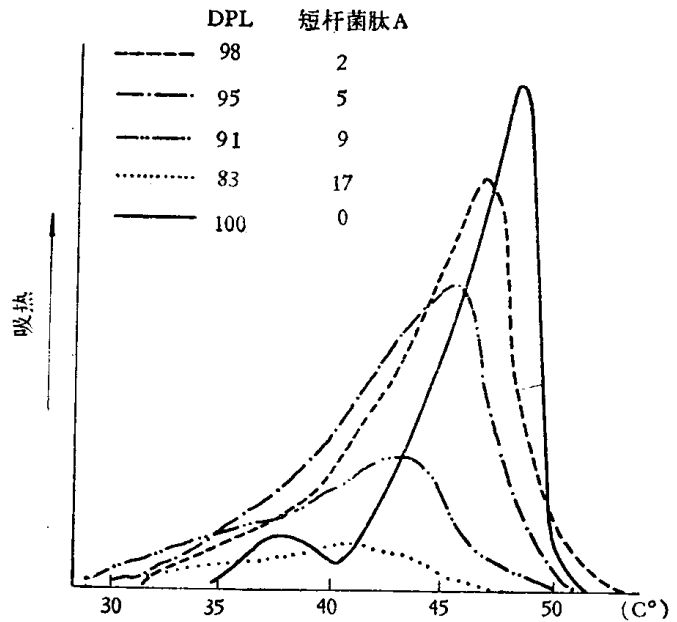


图 15 卵磷脂-短杆菌肽 A 体系

菌肽 S 分子上的极性残基与卵磷脂分子的极性区以静电相互作用, 使得极性部位的排列发生变化, 从而影响到脂质疏水性部分的状态, 表现在 T_c 的降低。由于短杆菌肽 S 分子的极性以及环状结构的大的空间位阻, 因此它的分子不可能插到脂双层中间去, 表现在相变焓没有受到影响。与此相似的还有溶菌酶、细胞色素 C、聚赖氨酸等蛋白质与脂质的作用^[15]。

短杆菌肽 A 却与短杆菌肽 S 的作用完全不同, 短杆菌肽 A 是一种离子载体, 其氨基酸不带极性残基, 是一种疏水性强的蛋白质, 它往往是以端基形成氢键的方式, 以二聚体存在, 分子长约 37 Å。短杆菌肽 A 与卵磷脂的作用如图 15 所示^[15], 少量的短杆菌肽 A (2%) 即能使卵磷脂的“预熔峰”消失。再增加其浓度, 一方面降低脂质相变温度 T_c , 另一方面焓变值亦显著地减小。此情况与胆固醇的作用甚为相似, 说明短杆菌肽 A 与脂质作用主要是“疏水性”的作用, 其分子是插入到脂双层中间去了。又鉴于短杆菌肽 A 分子二聚体的长度与脂双层的厚度 (约 36 Å) 十分接近, 因此可以认为是穿过整个层的, 此结果对于认为短杆菌肽 A 是以“孔道机理”来运载离子的说法是十分有利的。

多粘菌素 B 与脂质的作用又不一样。多粘菌素 B 的分子结构是呈环状的, 并在氨基酸的侧链上拖着一条长长的脂肪酸尾巴, 环的残基上有极性的一 NH_2 。它与脂质作用后的 DSC 曲线指出: 当多粘菌素 B 与脂质的混合比为 1:1 时, 相变峰完全消失, 说明疏水性的脂肪酸尾巴插到脂双层中间去了。同时, 从红外光谱又观察到 $\nu = 0$ 的伸缩频带自 1,250/厘米位移到了 1,240/厘米, 说明多粘菌素 B 与脂质的作用除疏水性的外, 尚有与脂质极性区域的静电作用。

通过以上三种蛋白质与脂质作用的例子, 说明蛋白质与脂质的作用由于蛋白质分子结构的不同机理亦不尽相同。有的蛋白质与脂质的极性基以静电相作用, 此时蛋白质是位于脂双层的表面。有的蛋白质与脂质的疏水性部分作用, 此时蛋白质是插进脂双层中

去的。另一些蛋白质仅仅一部分分子插入脂双层,其余部分仍暴露在层的表面。此结果为 Singer 和 Nicolson^[13] 提出的膜的流动镶嵌式模型,提供了有力的实验证据。

此外,如用 DSC 与冰冻断裂法相结合来研究,得到蛋白质在膜的平面上会移动,并且会聚集在 T_c 低的脂质区域中,因此蛋白质在膜上的分布是非均匀的^[26]。

以上是膜上其他成分对脂质相变的影响。除此之外,亦有些工作是属于非膜成分作用的研究的,例如药物的作用^[27],此类工作具有生物膜和药理研究的双重意义。

3.3 天然膜相变的研究

天然膜脂质热致相变的性质和规律性与模拟膜的相似,但由于天然膜脂质都是混合物,所以它的 DSC 曲线的特征是: (1) 相变峰的宽度要大得多,温度范围可能是一、二十度,甚至六、七十度,假若膜内的脂质性质相差较远,则亦可能呈几个相变峰; (2) 焓变较小,这是因为天然膜中不是所有的脂质均呈脂双层结构,例如鼠肝脏线粒体膜是 80% 呈脂双层,鼠肝脏微粒体膜则有 75% 呈双层结构^[28]。

上面已经提到,最早应用 DSC 研究天然膜的热致相变是在 1969 年,十年来已经被研究过的天然膜已有几十种之多,其中以莱氏无胆甾原体 (*Acholeplasma laidlawii*) 膜与大肠杆菌 (*E. coli*) 膜被研究得最多。

天然膜热致相变研究的着眼点,除了天然膜的结构、状态外,还着重于研究膜的生理功能,如相变温度与膜上蛋白酶的活性、细胞生长速度的关系等。

下面简单地介绍莱氏无胆甾原体膜与大肠杆菌膜 DSC 的研究。

3.3.1 莱氏无胆甾原体膜

无胆甾原体作为膜研究的有利材料的原因是: (1) 它没有细胞壁,因此可以用简单的低渗法来制取; (2) 细胞膜上没有胆固醇; (3) 若在培养介质中,加入不同类型的脂肪酸,它能吸收并改变其脂质上的脂肪酸成分,所以它是一种很适宜于作膜热致相变研究的对象。

它的典型的 DSC 曲线如图 16 所示^[1], a 是从培养介质中含有硬脂酸盐的细胞中提取

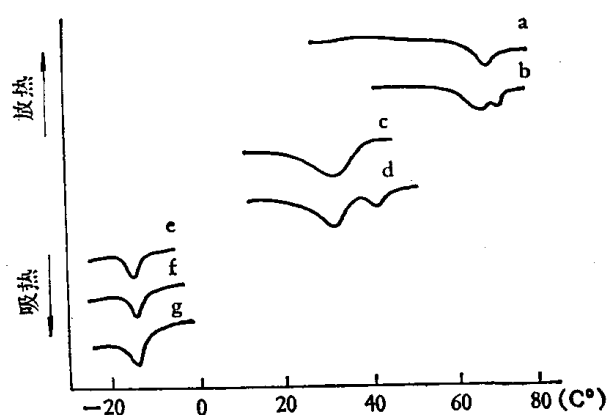


图 16 莱氏无胆甾原体 DSC 曲线

的膜脂质的热曲线; b 是培养条件与 a 相同的细胞膜的热曲线; c 是从培养液中不加脂肪酸的细胞中提取的膜脂质的热曲线; d 培养条件与 c 相同的细胞膜的曲线; e 是从培养液中加硬脂酸盐的细胞中提取的脂质的热曲线; f 是培养条件与 e 相同的细胞膜的热曲线; g 是培养条件与 e 相同的整细胞的热曲线。将 c、f 与 g 的 DSC 曲线相比较,可以得到相变是发生在细胞膜脂质成分上的结论。将曲线 a、c、e 相比较,可以看出相变的温度与膜上脂肪酸的性质有关,其规律与合成膜的相同。b、d 的曲线上分别有两个

相变的温度与膜上脂肪酸的性质有关,其规律与合成膜的相同。b、d 的曲线上分别有两个

峰,高温的峰是不可逆的,属于蛋白质的构象变化峰,热致相变峰的温度在细胞膜与提取脂质的 DSC 曲线上是一样的,说明蛋白质的存在,对衣原体膜相变的影响不大。此外,假若分别把从细胞膜和膜脂质 DSC 曲线中得到的焓变值,换算到单位脂质重量的 ΔH 并进行比较,发现膜上脂质相变焓要比纯脂质膜的 ΔH 稍小一些,说明膜上约有 $90 \pm 10\%$ 的脂质是呈双层结构的。

3.3.2 大肠杆菌膜

大肠杆菌膜的结构比无胆甾原体膜的复杂些,它的细胞膜有内外两层,内层与细胞质直接接触,外层是一薄层肽糖膜,是由短的肽链与多糖链交联而成的一种网状结构,是 L 型膜。外膜与内膜之间由外周细胞质隔开。

图 17 是野生型大肠杆菌 W945 整细胞(培养温度为 20°C)的 DSC 曲线^[4]。

a 与 b 是低于蛋白质构象变化温度的热曲线,此峰属于内膜的相变峰,是可逆的,中心温度约在 5°C 。c 是温度扫描到 100°C 的热曲线,其中第一峰为内膜的相变峰, $60-70^\circ\text{C}$ 的峰是蛋白质构象变化峰。 90°C 附近的峰可能是细胞中 DNA 的构象变化峰。a、b、c 三曲线为大肠杆菌活细胞的指纹图。d 是将 c 实验后的样品再度进行温度扫描的曲线,可以看到,在第一峰旁边出现了另一小峰,是为外膜的相变峰,中心温度在 25°C

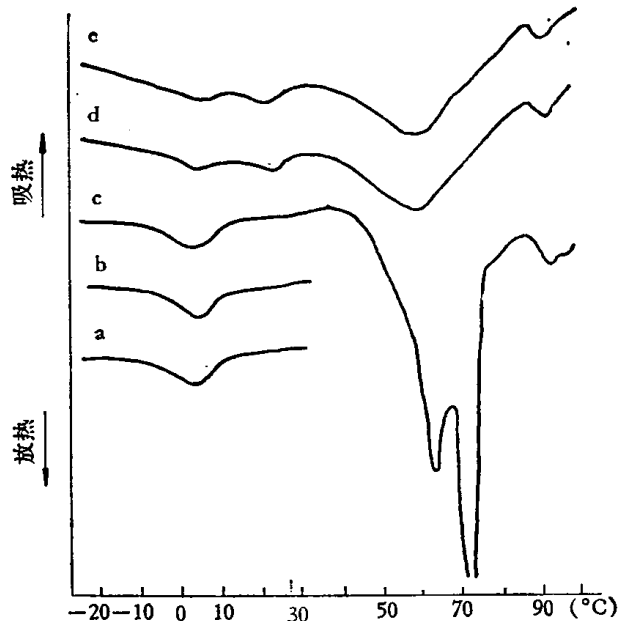


图 17 大肠杆菌整细胞的热曲线

左右,外膜的峰亦是可逆的。经过高温处理后,才出现的第二峰的事实,说明外膜的相变必须经过热扰动后才能进行,作者认为可能是由于原来可以渗透小分子的筛样结构的外膜,在经过热扰动后才形成双层结构的。

关于生物膜相变温度与其生理作用之间的关系,到目前为止,还远远没有研究清楚,但是,有一点是可以肯定的,即膜的生理作用需要膜处于流动态,全部的或部分的。例如,许多哺乳动物膜(mammalian membrane)在本身的体温时,已全部呈液晶态。一些革兰氏阳性细菌也如此。若 T_c 太高,细胞的生长会停止,细胞膜变脆,容易漏裂。延长增殖时间,酶的活性与主动运输等性质均会改变。因此,活的系统似乎有一种倾向,即尽量通过外吸收或体内生物合成的途径来改变膜内脂肪酸的性质,使 T_c 变低,以便保持适当的膜的流动性。McElhaney^[29] 用 DTA 处理的结果,与细胞的绝对生长速度相对照,得到当生物膜处于 10% 以下液晶态温度时,生长才停止的结论。

又如在野生大肠杆菌 W945 的培养皿中加入 DNAC (3-decynoyl-N-acetyl-cysteamine, 3-癸炔基-N-乙酰-半胱胺), DNAC 的作用是阻止非饱和脂肪酸的生物合成。其结果可以从图 18 看到^[4], a、b 是未加 DNAC 的典型的大肠杆菌 DSC 曲线, c、d 是加了 DNAC 的结果,内膜相变峰温度提高了,峰变窄了。改变 DNAC 的浓度的 DSC 实验与

细胞生长的观察实验相结合,得到当膜处于 5—10% 以下液晶态时,细胞开始停止生长与分裂。

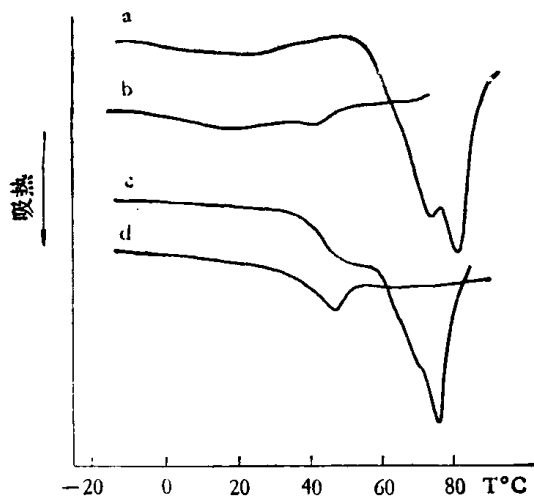


图 18 DNAC 对大肠杆菌相变的影响

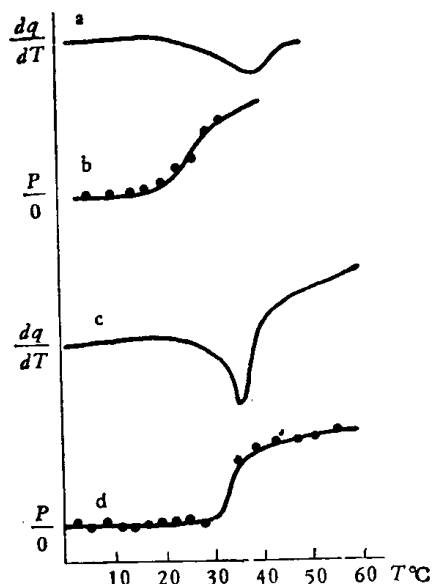


图 19 衣原体膜在各种温度下吸收 P、O 的比例

关于细胞能自发地选择吸收适当的脂肪酸以调节其膜的流动性, Melchior 等^[4]作了一个很有趣的实验,他们将在 37°C 温度下培育的无胆甾原体整细胞,放到另一含有 H^3 -标记的油酸盐 (O) 和 C^{14} -标记的棕榈酸盐 (P) 的培养器皿中,分别在不同温度下培育 5 分钟,使其吸收并进行脂化。然后把细胞的脂质提取出来,用薄层色谱将其与未脂化的脂肪酸分离,用闪烁计数器定出脂化的 P、O 的量。

图 19 是无胆甾原体与卵磷脂的 DSC 曲线与其在不同温度下吸收 P、O 量的对照, a 是典型的无胆甾原体 DSC 热致相变曲线, b 是不同温度时,无胆甾原体从培养皿中吸收并脂化的 P 与 O 的比例,此曲线与 DSC 热致相变曲线完全对应的,可以看到低温时吸收非饱和脂肪酸多,高温时吸收饱和脂肪酸多,吸收的 P/O 比,在相变温度 T_c 附近有一明显的转折点。c、d 是二棕榈脂酰-卵磷脂与蛋卵磷脂 (25%) 混合物的同样实验结果,得到模型物与天然膜的规律是一致的。

4. 总 结

1. 生物膜的热致相变是膜的重要性能之一,它与膜的生理功能有着密切的关系。
2. DSC 是研究生物膜热致相变的有力工具。它的优点是:快速、灵敏并能同时得到多种热力学或动力学参数。但它毕竟是一种宏观的研究工具,不能用它的结果直接得到分子水平的结论。DSC 若与 X 射线衍射、红外光谱、核磁共振等结构工具相结合,则对生物膜的研究将是非常有利的。

3. DSC 对生物膜研究已经取得的较好的成果有: (1) 肯定了生物膜的脂质是呈双层结构,并会发生热致相变,其规律性与合成脂质膜相同; (2) 其他物质与膜脂质的作用可分为疏水性作用与极性作用的触发机理,并不同程度地影响膜的状态; (3) 膜的状态