

## 脂质膜体与线粒体内膜的融合

刘树森 丁友真 李清焕 魏影允

(中国科学院动物研究所细胞生物学研究室, 北京)

膜融合现象在细胞免疫、细胞识别和相互作用、病毒感架、细胞分泌以及细胞器之间相互关系等方面均有重要意义。利用人工脂质膜体 (liposome) 与细胞 (器) 膜之间的融合, 不但为阐明上述问题的分子机理提供了一种模型, 而且将为细胞生物工程研究提供手段。本文是我们实验室关于脂质膜体与鼠肝线粒体内膜体 (mitoplast) 融合的一系列研究结果的简要报道。

### 材 料 与 方 法

脂质膜体是用二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 与油酸 (OA) 按8:2的的克分子比混合在磷酸缓冲液中用超声法制成, 为单层脂双分子层微小脂质体。鼠肝线粒体内膜体是用毛地皂苷除去线粒体膜制备。用滴加少量 HCl 到膜混合液中使 pH 降到 5.0—5.5 进行酸诱导融合, 然后迅速加入等量 NaOH 中和。测定脂质膜中的荧光磷脂、N-7-氯-4-硝基苯-2-噻-1,3-重氮盐-磷脂酰乙醇胺 (N-NBD-PE) 和 N-罗丹明-磷脂酰乙醇胺 (N-Rhodamine-PE) 的荧光能量共振转移来监视膜融合程度。线粒体内膜体以琥珀酸为底物时的耗氧速率用氧电极测定。ATP 合成反应用荧光素酶-荧光素偶联系统在 LKB1250-1 型 ATP 光度仪上测量。ATP 水解活性用无机磷的释放速率进行测量。线粒体内膜体膜疏水区流动性用 1,6-二苯基 1,3,5-己三烯 (DPH) 标记后测量荧光偏振度。膜脂脂肪酸链不同深度的流动性分别用第 2、第 9、第 12 和第 16 碳原子上标记的 9-蒽甲酰硬脂酸和棕榈酸来标记, 测定荧光偏振度, 后者与流动性呈反相关。

### 结 果 和 讨 论

#### 一、荧光能量共振转移的测定

图 1 是脂质膜体与线粒体内膜体融合的荧光能量共振转移的荧光光谱曲线。N-NBD-PE 的激发波长为 467 毫微米, 发射波长为 530 毫微米。但融合前的曲线表明, 在 467 毫微米波长光激发下, N-NBD-PE 在 530 毫微米波长下无荧光发射, 其吸收的能量全部转移到 N-Rhodamine-PE, 因而在 592 毫微米波长处有很强的发射荧光。但在融合后, 由于脂质膜的磷脂分子相互稀释, N-NBD-PE 和 N-Rhodamine-PE 之间距离加大, 荧光能量共振转移大为减弱, 故在 N-NBD-PE 的荧光发射峰 530 毫微米区有很强的发射荧光, 同时, 在 592 毫微米区 N-Rhodamine-PE 发射荧光相对明显减弱。

## 二、融合前后线粒体内膜体结构和功能的比较

以琥珀酸为底物时的电子传递活性测定表明,随着导入线粒体内膜体膜中脂质膜体的增加,耗氧速率呈反相关下降。如以融合前线粒体内膜体(0.52毫克/2毫升)耗氧为100,与30微升脂质膜体融合后耗氧为87,与300微升及600微升后者融合后耗氧分别为62.4和52。这说明脂质膜体融合于线粒体内膜体中,加大了呼吸链组分之间的距离。降低了它们之间的相互作用的速率,因而导致呼吸活性下降。这与 Hackenbrock<sup>[2]</sup> 用保温法诱导膜融合的测定结果相符。但保温法诱导融合后的线粒体内膜体完全解偶联,而且 ATP 水解活力明显提高。我们用酸诱导融合的线粒体内膜体仍可保留15-42%的 ATP 合成活力,而 ATP 水解显著减小。DPH 标记证明线粒体内膜体膜的疏水区在膜融合后的流动性显著降低,表现光偏振度增大。上述结果对探索能量机理是十分有意义的。

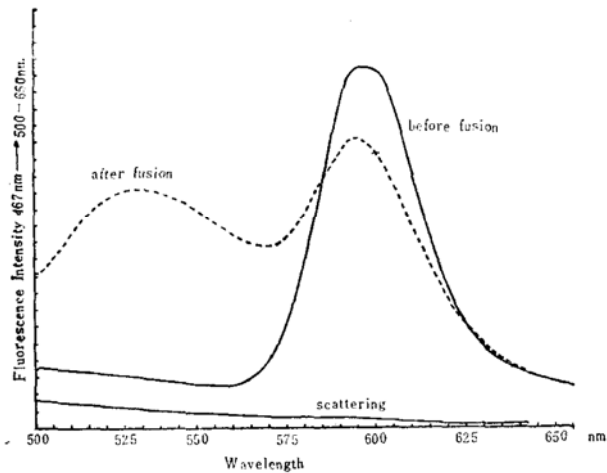


Fig.1. Acid-Induced Fusion Between Mitoplast of Rat Liver Mitochondria and Small Unilamellar Phosphatidyl-ethanolamine (DOPE)/OLEIC(OA) (Molar Ratio 8:2) Liposomes, Labeled with N-NBD-PE and N-Rh-PE.

Fusion was measured by fluorescence Energy Resonance Transfer Assay. The increase of donor (N-NBD-PE) fluorescence at 530 nm as a result of dilution of the fluorophores into the inner membrane of mitochondria.

## 三、膜融合机制的探讨

虽然酸诱导膜融合的机制尚不清楚,但我们的初步结果提示,膜融合似与线粒体内膜体膜表面电荷的分布及融合时(pH5.0—5.5条件下),其膜脂疏水区(C<sub>12</sub>和C<sub>16</sub>)与脂质膜体近亲水端脂区(C<sub>2</sub>)流动性增高有关。因为实验证明,预先用酸碱处理线粒体内膜体,则不再与脂质膜体融合;在pH5.5时,发现线粒体内膜体膜脂脂肪酸的第二碳原子处的流动性不变,但C<sub>12</sub>和C<sub>16</sub>处的流动性增大,而脂质膜体在pH5.5时,脂肪酸的第2碳原子区的流动性增大,而内层C<sub>12</sub>和C<sub>16</sub>区的流动性下降。

## Fusion between Liposome and the Inner

### Membrane of Mitochondria

Liu, ShuSen Ding, YouZhen Li, QingHuan Wei, YingYun

(The Laboratory of Membrane Biology, Institute of Zoology, Academia Sinica, Beijing)