

## 海藻糖对膜脂液晶相到六角相变温度的影响

马晓翠, 邱阳, 黄力新, 林克椿, 聂松青\*

(北京大学医学部生物物理系, 北京 100083)

**摘要:** 应用荧光偏振技术, 差示扫描量热技术(Differential Scanning Calorimetry, DSC), 傅立叶变换红外光谱技术(Fourier-transform infrared spectroscopy, FTIR)等检测手段, 通过测定磷脂液晶相到六角相( $L_{\alpha} \rightarrow H_{II}$ )的相变温度来研究不同浓度的海藻糖对水化棕榈油酰磷脂酰乙醇胺(L- $\alpha$ -phosphatidylethanolamine,  $\beta$ -oleoyl- $\gamma$ -palmitoyl, POPE)的脂多型性的影响。发现海藻糖存在时, 在 30°C - 70°C 温度范围内  $H_{II}$  相相变消失, 表明海藻糖有稳定脂质体于双层相的能力。

**关键词:** 液晶相到六角相相变; 海藻糖; 相变温度; POPE

中图分类号: Q73 文献标识码: A 文章编号: 1000-6737(2001)01-0059-06

生物细胞在执行生理功能时, 存在各种生物膜的融合现象, 如精子与卵子的融合, 胞饮和胞吐, 有壳病毒感染宿主细胞等。因而膜融合的研究特别是其分子机理的研究成为许多学科关注的课题。目前比较公认的看法是: 在膜融合过程中, 磷脂采取六角形  $H_{II}$  相(hexagonal  $H_{II}$ ,  $H_{II}$ ) 或反微团构象, 即存在脂的多型性现象<sup>[1,2]</sup>。因此, 近年来有关脂多型性的问题引起了人们越来越多的兴趣。很多报道指出,  $H_{II}$  相本身并不具有生物学功能, 但易于形成  $H_{II}$  相的双层膜容易发生膜融合<sup>[3]</sup>。在活体生物中, 非双层构象比较少见, 因为这时生物膜不能维持其屏障作用, 所以目前研究脂多形性大都用人工膜。在人工膜研究中, 双层相和非双层相之间在一定条件(如温度, pH 值等)下, 可相互转变, 转变温度称双层-非双层( $L_{\alpha} \rightarrow H_{II}$ )的相变温度。磷脂形成  $H_{II}$  相的倾向性可通过测定  $T_{bh}$  得到判断。

海藻糖对冻干磷脂脂双层有保护作用, 它可以降低磷脂主相变温度, 抑制膜脂侧向相分离和膜融合。目前, 有关海藻糖和水化磷脂相互作用的研究还不多见。本实验以 POPE 为模型, 通过  $L_{\alpha} \rightarrow H_{II}$  相变发生时磷脂吸热量的变化、反映磷脂头部基团运动情况的荧光探针的荧光各向异性的变化、以及磷脂脂肪酸链  $CH_2$  基团的对称伸展振动频率的变化等三个方面研究海藻糖对 POPE 脂  $L_{\alpha} \rightarrow H_{II}$  相变温度的影响, 并进而探讨其作用机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

海藻糖(trehalose)为进口分装(美国 Sigma 公司生产), 纯度为分析纯。棕榈酰油酰磷脂

收稿日期: 2000-07-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(批准号: 39770181)

作者简介: 马晓翠, 1970 年出生, 在读博士研究生, 电话: 010-62092444, E-mail: xiaocui@263.net.

\* 通讯联系人

酰乙醇胺(L- $\alpha$ -phosphatidylethanolamine  $\beta$ -oleoyl- $\gamma$ -palmitoyl, POPE)购自 Sigma 公司。荧光标记磷脂罗丹明标记的磷脂酰乙醇胺(Rhodamine-PE, Rh-PE)为 Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA)产品,其他试剂均为国产分析纯。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 脂质体的制备<sup>[4]</sup>

取适量的磷脂溶于氯仿/甲醇(2:1, v/v)中,氮气吹干,然后真空干燥至少3小时,加入 PIPES 缓冲液(20mmol/L PIPES, 1mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl, 0.002% NaN<sub>3</sub>, pH 7.4)水化磷脂,并使之终浓度分别为荧光测定时的 0.25mmol/L 和 DSC、FTIR 测定时的 5mg/ml。制备 FTIR 样品时缓冲液用 D<sub>2</sub>O 配制,制备荧光样品时 Rh-PE 与 POPE(0.4%, M/M)同时溶于氯仿/甲醇。将待测样品 pH 值调至 7.4。剧烈振荡,最后将所得的水化脂质体分成四份,其中的三份加入浓度为 0.5, 1.0, 1.8 的海藻糖(每 mgPOPE 中含糖 0.5, 1.0, 1.8mg), 37°C 温育 30 分钟后进行测定。

### 1.2.2 DSC 谱测量<sup>[5]</sup>

进行 DSC 测量时,参比杯中加入等量的缓冲液,所用仪器型号为 Micro DSC II 型(法国)温度范围 30°C - 70°C, 热扫描率为 0.5°C/min, 数据用 Micro software 软件分析。

### 1.2.3 荧光各向异性测量<sup>[6]</sup>

所用仪器为 Hitachi 850 型荧光分光光度计,测量时固定激发波长 530nm, 发射波长 588nm。激发和发射狭缝均为 15nm, 温度用循环水浴进行控制,并用数字温度计监测样品温度,在整个测量过程中,样品用磁力搅拌子加以搅拌。荧光各向异性(fluorescence anisotropy, A)  $A = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2I_{\perp})$ ,  $I_{\parallel}$  为起、检偏器光轴方向与样品杯长轴方向平行时的荧光强度,  $I_{\perp}$  为起偏器光轴方向与样品杯长轴方向平行, 检偏器光轴方向与样品杯长轴方向垂直时的荧光强度。

### 1.2.4 FTIR 测量 $\nu_{\text{CH}_2}$ 的变化<sup>[7]</sup>

分别取纯 POPE 脂质体及加入不同浓度海藻糖的样品 25 $\mu$ l 滴于两片 KBr 窗片之间, Teflon 垫片的厚度为 50 $\mu$ m, 温度用循环水浴进行控制,测量仪器为 Bio-Rad FTS-165 型红外光谱仪。扫描次数 200 次,分辨率 4cm<sup>-1</sup>。每升温 2°C 收集一次吸收谱,每次升温后间隔 15 分钟进行热力学平衡后再采谱。

## 2 结果与讨论

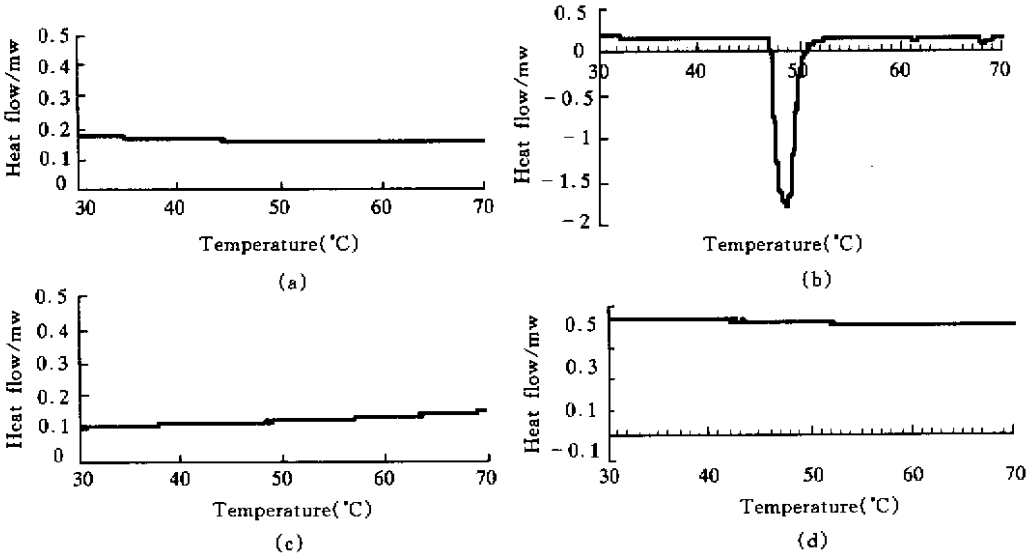
### 2.1 DSC 结果

图 1 为海藻糖 纯 POPE, POPE 加 0.5 和 1.8 浓度海藻糖的 DSC 图谱。可以看出,海藻糖在 30°C - 70°C 之间并无吸热峰出现,纯 POPE 在 48.8°C 出现一吸收峰,此处即为 POPE 的  $T_{\text{bh}}$ <sup>[5]</sup>。加入不同浓度糖后的 POPE,在测量范围内没有出现吸热峰。

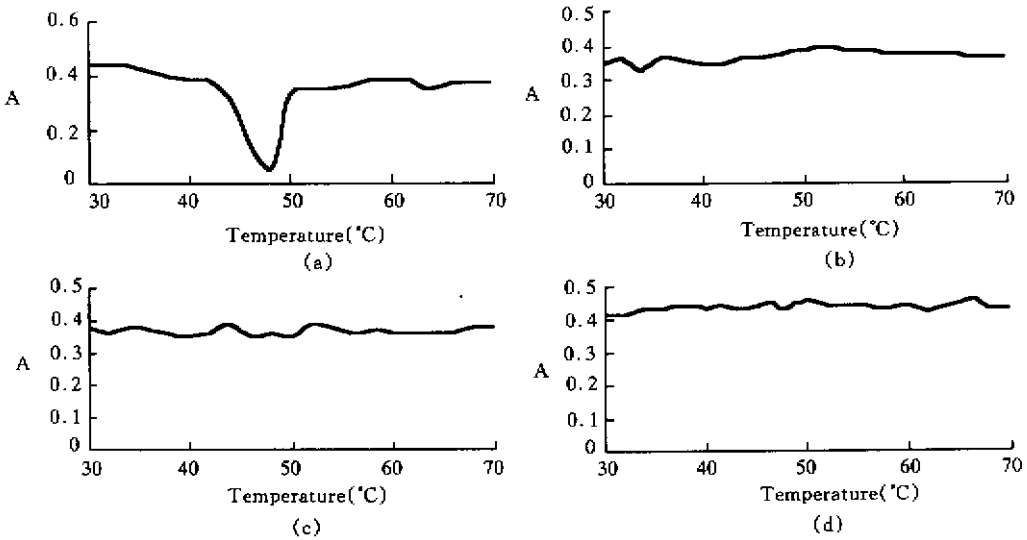
### 2.2 荧光各向异性测定结果

图 2 为实验测得的荧光各向异性 A 值随温度变化的曲线。由图可见纯 POPE 在 48°C 左右荧光各向异性 A 值突然降低,而后又回升(a),加入各种浓度海藻糖后, A 值未有突变出现(b, c, d)。

在从  $L_{\alpha} \rightarrow H_{\parallel}$  相变过程中,标记在磷脂头部,反映其运动的荧光探针 Rh-PE 的荧光各向

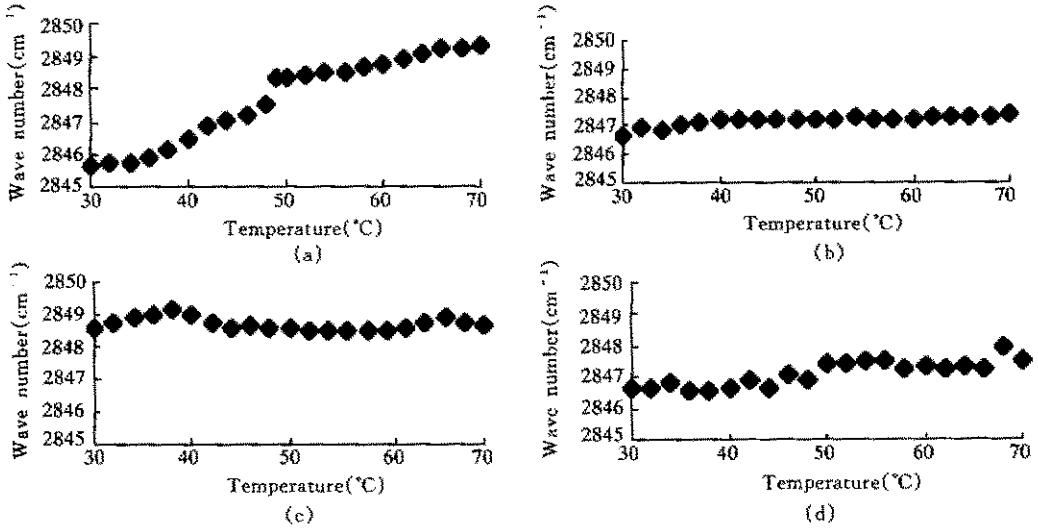


**Fig.1** DSC scan of trehalose(a), pure POPE(b), POPE with trehalose present at a trehalose/lipid mass ratio of 0.5(c), 1.8(d). pH 7.4 and DSC heating scan rate was 0.5°C/min



**Fig.2** Temperature dependence of fluorescence anisotropy of Rh - PE incorporated into vesicle. (a) POPE alone, (b). (c) and (d) POPE with trehalose present at a trehalose/lipid mass ratio of 0.5, 1.0 and 1.8 respectively

异性随温度变化曲线呈抛物线形状，这种相变探测技术非常灵敏。对这一现象，Han and Gross 做了如此解释<sup>[6]</sup>：液晶相随着磷脂的升温，磷脂头部之间的距离增大，头部荧光基团 Rh - PE 的加速运动成为可能，从而导致 A 值的降低，而在经过  $L_{\alpha} \rightarrow H_{II}$  相变后，磷脂头部基团间的空间位阻加大，有效地限制了头部基团的自由运动，从而导致 A 值的升高，因而相变发生时，A 值位于整条曲线的最低点。

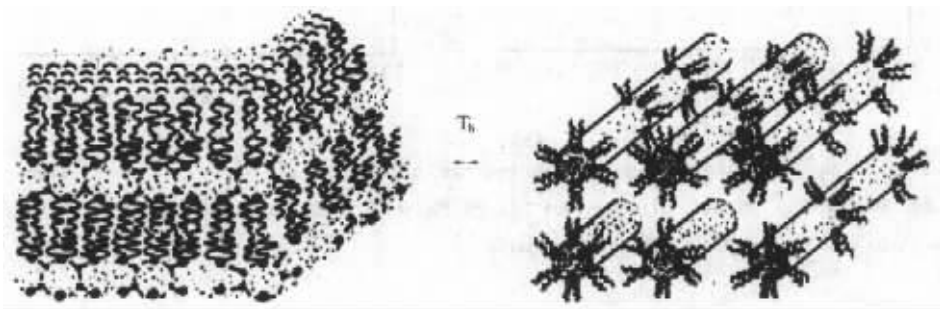


**Fig.3** Temperature profiles of symmetric CH<sub>2</sub> stretching vibration between 30°C and 70°C. (a) POPE alone, (b). (c) and (d) POPE with trehalose present at a trehalose/lipid mass ratio of 0.5, 1.0 and 1.8 respectively

### 2.3 红外测量 $\nu_{CH_2}$ 结果

图3为CH<sub>2</sub>基团的伸展振动频率随温度变化的曲线,可以看出在纯POPE脂中 $\nu_{CH_2}$ 值在49°C左右突然升高,而在加入各种浓度海藻糖后未见有此情况发生。

红外光谱技术通过对CH<sub>2</sub>伸展振动的测量,可以精确监测磷脂的L<sub>α</sub>→H<sub>II</sub>相变<sup>[8]</sup>,在液晶相时,由于要维持连续的脂双层表面,烃链的无序程度(*gauche*构象的数目)受到一定限制,当温度上升到六角相变时,*gauche*构象数突然增加,头部基团迅速转变为中间含水的柱状结构,活动程度更大的烃链则充满在这些柱状结构之间,如图4所示<sup>[8]</sup>。因此对CH<sub>2</sub>伸展振动(亦即*gauche*构象数)的监测可以给出L<sub>α</sub>→H<sub>II</sub>相变的信息。



**Fig.4** Model for the reversible phase change at T<sub>bh</sub>

本实验通过DSC,荧光各向异性及FTIR性法测定了纯POPE脂的相变温度及不同浓度海藻糖对此温度的影响,发现海藻糖可以抑制水化磷脂POPE的L<sub>α</sub>→H<sub>II</sub>相变,从而将脂质体稳定于双层相。

目前,海藻糖对膜脂多型性影响的机理并不十分清楚。比较公认的看法是海藻糖之所以能在相变温度  $T_{bh}$  以上将水化 PE 脂维持在双层相,是由于海藻糖和磷脂酰乙醇胺的头部基团形成氢键,这是一种直接相互作用的结果。PE 之所以能形成六角形  $H_{II}$  相是由于 PE 脂的头部基团所占体积较小,彼此之间能直接形成氢键。但当海藻糖和 PE 头部基团形成氢键后,增大了磷脂头部的体积,因此降低了脂双层的曲率。

研究糖与磷脂的相互作用,可以深入了解生物学中的某些基本问题,特别是对糖抑制磷脂  $L_{\alpha} \rightarrow H_{II}$  相变的研究,可为一些病毒和靶细胞的融合如 HIV 感染细胞的防治提供新思路新方法<sup>[9]</sup>。

### 参考文献:

- [1] 董桥, 聂松青. 糖和膜脂的相互作用[J]. 生理科学进展, 1996, 27: 123 - 128.
- [2] Siegel D P, Epand R M. *The Mechanism of Lamellar - to - Inverted Hexagonal Phase Transition in Phosphatidylethanolamine. Implication for Membrane Fusion Mechanisms*[J]. *Biophysical Journal*, 1997, 73: 3089 - 3111.
- [3] Eri Hayakawa, Mutsuo Naganuma, Koichi Mukasa. *Change of Motion and Localization of Cholesterol Molecule during  $L_{\alpha} \rightarrow H_{II}$  Transition*[J]. *Biophysical Journal*, 1998, 74: 892 - 898.
- [4] Veiga M P, Arrondo J L R, Goni F M. *Ceramides in Phospholipid Membrane: Effects on Bilayer Stability and Transition to Nonlamellar Phase*[J]. *Biophysical Journal*, 1999, 76: 342 - 350.
- [5] Epand R M, Bryan T. -C. Leon. *Hexagonal Phase Forming Propensity Detected in Phospholipid Bilayers with Fluorescent Probes*[J]. *Biochemistry*, 1992, 31: 1550 - 1554.
- [6] Han Xianlin, Gross R W. *Nonmonotonic alterations in the fluorescence anisotropy of polar head group labeled fluorophores during the lamellar hexagonal phase transition of phospholipids*[J]. *Biophysical Journal*, 1992, 63: 309 - 315.
- [7] Chia Nian - Cherng, Richard Mendelsohn. *Conformational disorder in unsaturated phospholipids by FTIR spectroscopy*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1996, 1283: 141 - 150.
- [8] Mantsch H HA, Martin A, Cameron D J. *Characterization by Infrared Spectroscopy of the Bilayer to Nonbilayer Phase Transition of Phosphatidylethanolamines*[J]. *Biochemistry*, 1981, 20: 3138 - 3145.
- [9] Pritsker M, Jone P, Blumenthal R. *A Synthetic all D - amino acid peptide corresponding to the N - terminal sequence of HIV - 1 gp41 recognizes the wild - type fusion peptide in the membrane and inhibits HIV - 1 envelope glycoprotein - mediated cell fusion*[J]. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1998, 95: 7287 - 7292.

致谢: 实验中所用 POPE 样品由蒋桂森先生赠送, DSC 测量得到清华大学生命科学技术系丁晓岚老师的帮助, 在此一并深表谢意。

**THE EFFECT OF TREHALOSE ON THE PHASE TRANSITION  
TEMPERATURE OF HEXAGONAL PHASE OF LIPID**

MA Xiao - cui, QIU Yang, HUANG Li - xin, LIN Ke - chun, NIE Song - qing  
(*Department of Biophysics, Basic Medical College, Peking University, Beijing, 100083, China*)

**Abstract:** In this paper, the effect of trehalose on the polymorphism of hydrated-POPE (L -  $\alpha$  - phosphatidylethanolamine,  $\beta$  - oleoyl -  $\gamma$  - palmitoyl) was studied by monitoring the phase transition temperature of hexagonal phase ( $T_{bh}$ ). Fluorescence anisotropy, FTIR (Fourier - transform infrared spectroscopy), and DSC (Differential Scanning Calorimetry) were used to measure the  $T_{bh}$ . The experimental results showed that trehalose can inhibit the  $L_{\alpha} \rightarrow H_{II}$  phase transition of the hydrated POPE, thus stabilized the lipid membrane in a planar form.

**Key Words:**  $L_{\alpha} \rightarrow H_{II}$ ; Trehalose; Phase transition temperature; POPE