

DOPC, DOPE 和神经酰胺对鞘磷脂/ 胆固醇双层膜结构的影响

郝长春¹, 孙润广¹, 张 静²

(1. 陕西师范大学物理学与信息技术学院生物物理与生物医学工程研究室,
2. 食品工程与营养科学学院, 西安 710062)

摘要 用 LB 技术和原子力显微镜 (AFM) 研究了 1,2-二油酸甘油-3-磷脂酰胆碱 (DOPC)、1,2-二油酸甘油-3-磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 和神经酰胺 (Ceramide) 对鞘磷脂 (SM)/胆固醇 (Chol) 结构的影响. 实验结果表明, 在表面压力较低时, 每种混合脂双层膜都呈现均匀分布的脂双层结构. 随着表面压力的增加, 形态发生了明显的变化: (1) SM/Chol 二元组分双层膜形成均一的液态有序相微区结构, 衬底覆盖率达到 80%; (2) DOPC 的加入促使 SM/Chol 双层膜出现相分离现象, SM/Chol 形成的液态有序相“岛状”微区结构漂浮在液态无序相的 DOPC 上部, 约占总面积的 30%; (3) DOPE 与 SM/Chol 形成的双层膜明显不同于 DOPC/SM/Chol, 呈现出液态无序相、液态有序相及凝胶相 3 相共存的结构; (4) Ceramide 诱导了 SM/Chol 双层膜结构发生重排, 两层脂分子间发生翻转形成囊泡结构, 部分神经酰胺从液态有序相中分离形成小颗粒结构. 在较高膜压下, 各系统都呈现出具有特定形态的双层膜结构. 分子官能团的成键能力决定了双层膜形态结构.

关键词 脂筏; LB 膜技术; 原子力显微镜; 相分离

中图分类号 O621; O641

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2009)05-0913-06

生物膜是含有多种脂质、糖类和膜蛋白的超分子聚集体, 其结构与功能的关系一直是很多科学家感兴趣的问题. 脂筏 (Lipid rafts) 是近年来发现的介于液晶相与凝胶相之间的动态微区结构, 它游动于磷脂酰胆碱 (PC) 和磷脂酰乙醇胺 (PE) 为骨架的液晶态双层膜中, 是生物膜不被去垢剂所溶解的部分, 又称 Detergent-insoluble glycolipid-riched domains (DIGs), 或 Detergent-resistant fractions (DRF)^[1,2]. 脂筏含有大量的信号分子, 在细胞信号转导、蛋白质分选、离子通道的调节及膜的粘连等生物学过程中起着重要的作用, 同时还与多种疾病, 如肿瘤、糖尿病和神经退行性疾病 (如老年痴呆症、帕金森氏症等) 的发生有关^[3]. 脂筏结构分离目前主要是通过去垢剂将细胞膜破裂, 提取有效成分进行分析研究. 但在此过程中去垢剂的引入对于脂筏微区结构的形态、尺寸及稳定性研究带来一定困难^[4]. 体外模拟是理解生物膜脂筏微区结构形成的有效途径, 脂与脂间的相互作用是脂筏微区结构形成的基础. 由脂与脂相互作用形成的单层膜或双层膜出现了不溶于非离子去垢剂的微区结构^[5]. LB 技术是制备单层膜和双层膜的一种比较有效的方法, 通过改变单分子膜表面压力和亚相成分, 可以在接近生理状态下模拟生物膜的状态和作用机制^[6].

鞘脂、胆固醇和甘油磷脂组成的系统常被用来研究脂筏微区结构的形成, 在细胞膜中这些微区对于细胞信号的传导起着重要的作用. DOPC 和 DOPE 是生物膜中含量最丰富的甘油磷脂, 神经酰胺是构成脂筏的重要分子之一, 是与生物膜相连的第二信使分子, 参与细胞的分化和凋亡过程^[7]. 本文用 LB 技术和原子力显微镜 (AFM) 研究了 DOPC, DOPE 和 Ceramide 对 SM/Chol LB 双层膜结构的影响. 实验结果表明, 每一组双层膜都呈现出独特的结构特征. 双层膜微区结构主要是由分子间的氢键相互作用、静电相互作用、范德华相互作用引起, 这些相的出现可能与细胞膜中许多生理学过程有关.

收稿日期: 2008-10-28.

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 20772077)、教育部科学技术研究重点项目 (批准号: 104167) 和陕西师范大学研究生创新基金 (批准号: 2008CXB012) 资助.

联系人简介: 孙润广, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事生物物理与生物医学工程研究. E-mail: sunrun Guang@snnu.edu.cn

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

1,2-二油酸甘油-3-磷脂酰胆碱(DOPC)、1,2-二油酸甘油-3-磷脂酰乙醇胺(DOPE)、鞘磷脂(SM)、神经酰胺和胆固醇(Chol)均购自 Sigma 化学试剂公司;氯仿及酒精等其它有机和无机化学试剂均为分析纯;水为二次蒸馏水. 原子力显微镜(WET-SPM-9500-J3, 日本岛津公司); LB 膜仪(KSV-Minitrough, 芬兰 KSV 公司).

1.2 LB 双层膜的制备

用氯仿对聚四氟乙烯槽进行清洗,再用二次蒸馏水冲洗.将不同的脂溶解在氯仿/甲醇(体积比为 3:1)中,形成浓度为 0.5 mg/mL 的溶液.用微量进样器将适量的溶液均匀地滴加到纯水亚相表面,让其自动迅速铺展.静置 15 min,待亚相上有机溶剂完全挥发后,以 10 mm/min 的速度压膜.膜表面压由 Wilhelmy 吊片式天平检测,测量精度为 0.01 mN/m.在固定的膜压下,使用垂直提膜法,以 1 mm/min 的速度制备双层膜.通过实验发现,该方法成功率较高,重复性较好,成膜温度控制在 $(25 \pm 0.5)^\circ\text{C}$.

1.3 原子力显微镜检测

脂双层膜用高分辨率的原子力显微镜进行检测.采用接触模式,标准扫描头,其最大扫描范围为 $125\ \mu\text{m} \times 125\ \mu\text{m}$,探针材料为 Si_3N_4 ,悬臂的弹性常数为 0.06 N/m,对样品作用力控制在 10^{-8} N 量级,图片像素点收集为 512×512 .扫描速度为 0.5 ~ 1 Hz.

2 结果与讨论

脂筏是富含鞘脂、胆固醇和甘油磷脂的动态微区结构.选用鞘磷脂与胆固醇摩尔比为 1:1 作为研究对象,分析 DOPC, DOPE 和神经酰胺对双层膜结构的影响.在制备过程中分子层表面压力决定成膜的物理状态.实验中根据每一种混合脂的 π -A 曲线,选取适当的表面压力制备 LB 双层膜,进行 AFM 观测.

2.1 SM/Chol 双层膜的 AFM 检测

图 1 给出了 SM/Chol 二元脂系统的 π -A 曲线;图 2 给出了在不同表面压力下双层膜的 AFM 图像.

可以看出,在表面压力为 1.5 mN/m 时,双层膜分子间发生相互作用,形成颗粒体与小微区共存相结构,均匀地分布在衬底表面[图 2(C)].随着表面压力的增加, π -A 曲线在 14.7 mN/m 处出现拐点,说明单分子膜从液态无序相逐渐向液态有序相发生转变.从 AFM 图片可以看出,双层膜呈现出许多不规则微区结构,大小约为 200 nm,云母表面上覆盖率高达 80% [图 2(B)],此结构与文献[8]的实验数据一致.当表面压力继续增大到 38.5 mN/m 时,

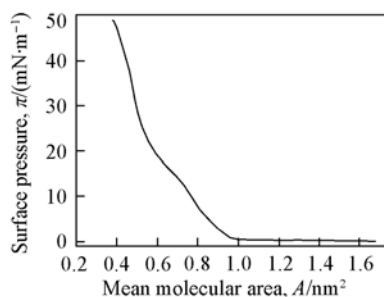


Fig. 1 π -A curve of the SM/Chol(1:1, molar ratio) bilayers

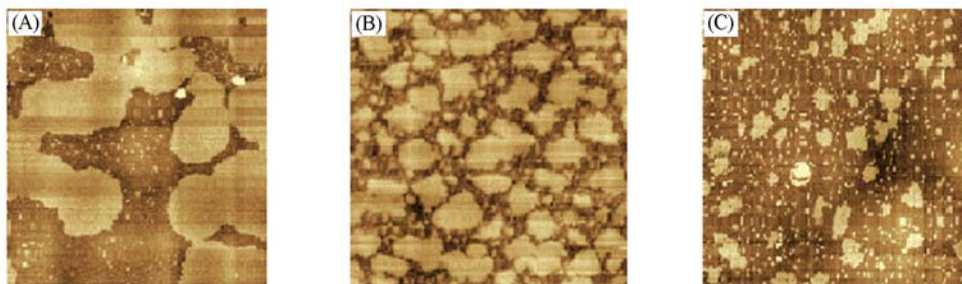


Fig. 2 AFM images of the SM/Chol bilayers deposited on mica at different surface pressure $\pi/(\text{mN} \cdot \text{m}^{-1})$: (A) 38.5; (B) 14.7; (C) 1.5. Scanning range: $2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$.

脂双层微区发生融合形成大平台结构[图 2(A)].

2.2 DOPC 对 SM/Chol 双层膜结构的影响

在 SM/Chol 中加入等摩尔的 DOPC, 双层膜结构发生了明显的变化(图 3 和图 4). 在表面压力较低时, 双层膜呈现均匀分散的小颗粒结构[图 4(C)], 并没有出现图 2(C)中的小微区结构. 说明 DOPC 分子加入到 SM/Chol 系统中, 促使分子间相互作用, 形成了均匀的膜结构. 图 4(B)为表面压力为 13.6 mN/m 时制备的双层膜, 可以看出双层膜出现了明显的分相结构. SM/Chol 形成的液态有序相“岛”状结构漂在液态无序相 DOPC 膜上(DOPC 在常温下为液态)^[9]. 与 SM/Chol 二元组分结构相比较, 在同样的范围内微区的覆盖率较少, 约为 30%, 说明 SM 和 Chol 分子中有部分与 DOPC 一起分散在液态无序相结构中. 当表面压力达到 35.5 mN/m 时, 云母表面出现了较大面积的液态有序相结构, 下层的液态无序相依然存在[图 4(A)].

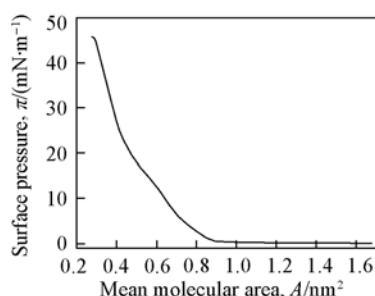


Fig. 3 π -A curve of the SM/Chol/DOPC(1:1:1, molar ratio) bilayers

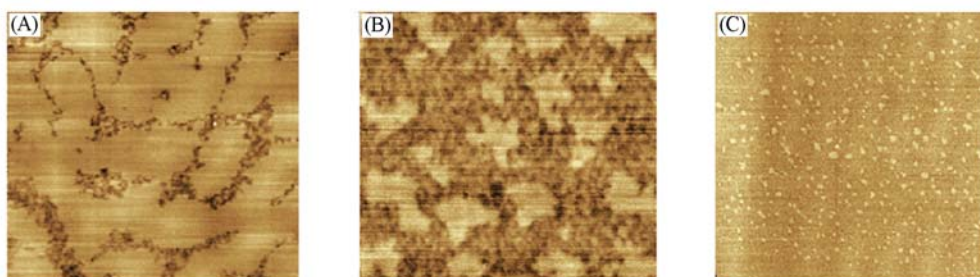


Fig. 4 AFM images of the SM/Chol/DOPC bilayers deposited on mica at different surface pressure $\pi/(mN \cdot m^{-1})$: (A) 35.5; (B) 13.6; (C) 1.4. Scanning range: $2 \mu m \times 2 \mu m$.

2.3 DOPE 对 SM/Chol 双层膜结构的影响

DOPE 加入到 SM/Chol 中表现出与其它系统完全不同的相行为(图 5 和图 6). 当膜压较低(1.7 mN/m)时, 双层膜呈现均匀分散的小微粒结构[图 6(C)], 与其它体系相比较, 结构更加精细, 微粒更加细小, 没出现明显的小微区结构. 在表面压力为 18.5 mN/m 时, 制备的双层膜出现了明显的分相结构, SM/Chol/DOPE 形成的较大的液态有序相微区结构漂浮在液态无序相 DOPE 膜上(常温下 DOPE 为液态), 大小约 $1 \mu m$ [图 6(B)]. 可以看出, 液态有序相平台结构不仅边缘出现了明显的“栅栏”结构, 而且平台上部出现了液态有序相与

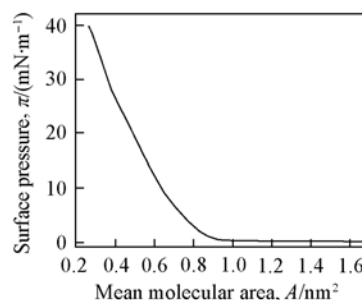


Fig. 5 π -A curve of the SM/Chol/DOPE (1:1:1, molar ratio) bilayers

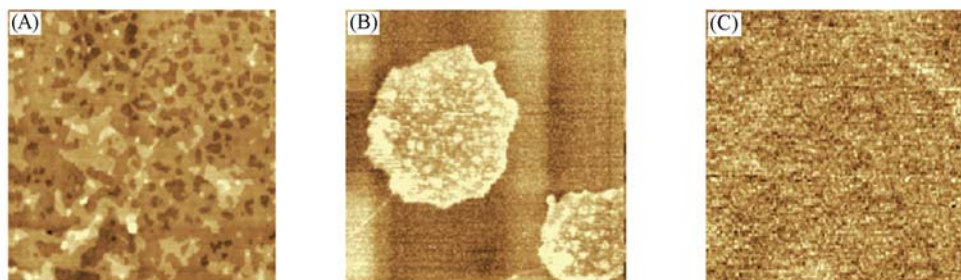


Fig. 6 AFM images of the SM/Chol/DOPE bilayers deposited on mica at different surface pressure $\pi/(mN \cdot m^{-1})$: (A) 33.4; (B) 18.5; (C) 1.7. Scanning range: $2 \mu m \times 2 \mu m$.

凝胶相分离的现象, 凝胶相的颗粒均匀地分布在圆形的微区区域内^[10]. 当表面压力为 33.4 mN/m 时, SM/Chol/DOPE 呈现出多层膜结构, 这可能与制备膜过程中膜的崩溃以及膜中分子间的相互作用力有关[图 6(A)].

2.4 神经酰胺对 SM/Chol 双层膜结构的影响

神经酰胺是以鞘氨醇为分子骨架的分子, 它在脂筏结构形成过程中起着重要的作用. 结果如图 7 和图 8 所示. 在表面压力较低时, SM/Chol/Ceramide 双层膜呈现出与其它体系不同的分散均匀的小微区结构[图 8(C)], 表面压力为 12.5 mN/m 时制备的双层膜表现出高度聚集的囊泡结构, 大小约为 300 nm[图 8(B)]. 每个囊泡结构的顶端都出现了 Ceramide 凝胶相颗粒体结构(囊泡结构上的亮点)^[11]. 双层膜仅出现液态有序相与凝胶相结构, 没有出现液态无序相结构, 这与分子间的作用力有关. 当表面压力为 40.0 mN/m 时, 双层膜表现出紧密聚集结构, 覆盖率达到 98% [图 8(A)].

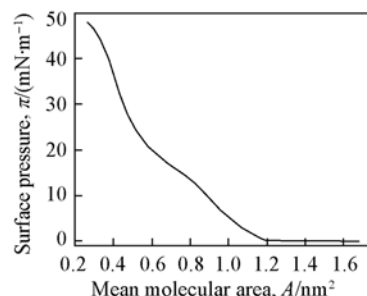


Fig. 7 π -A curve of the SM/Chol/Ceramide (1:1:1, molar ratio) bilayers

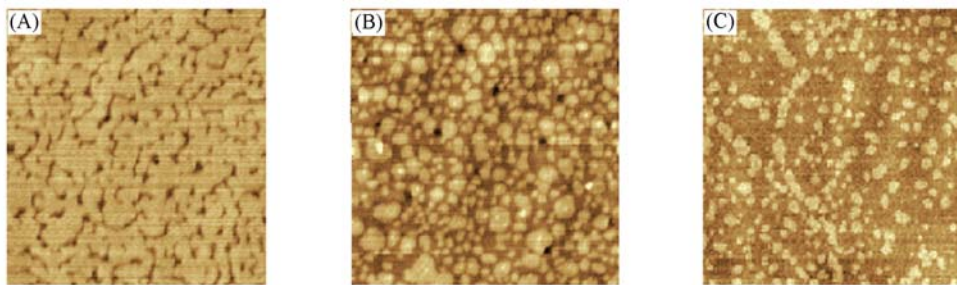


Fig. 8 AFM images of the SM/Chol/Ceramide bilayers deposited on mica at different surface pressure $\pi/(mN \cdot m^{-1})$: (A) 42.4; (B) 12.5; (C) 1.5. Scanning range: $2 \mu m \times 2 \mu m$.

生物膜结构的物理化学属性决定着生物学功能的行使. 脂筏是富含鞘磷脂、胆固醇的动态微区结构. 选用鞘磷脂、胆固醇和不饱和磷脂混合模拟脂筏微区结构是研究中常用的系统^[12]. 实验中将 DOPC, DOPE 和 Ceramide 加入到 SM/Chol 中表现出不同的相行为. 混合物分子间的相互作用决定了双层膜结构的特征. 实验中每种分子结构式如图 9 所示.

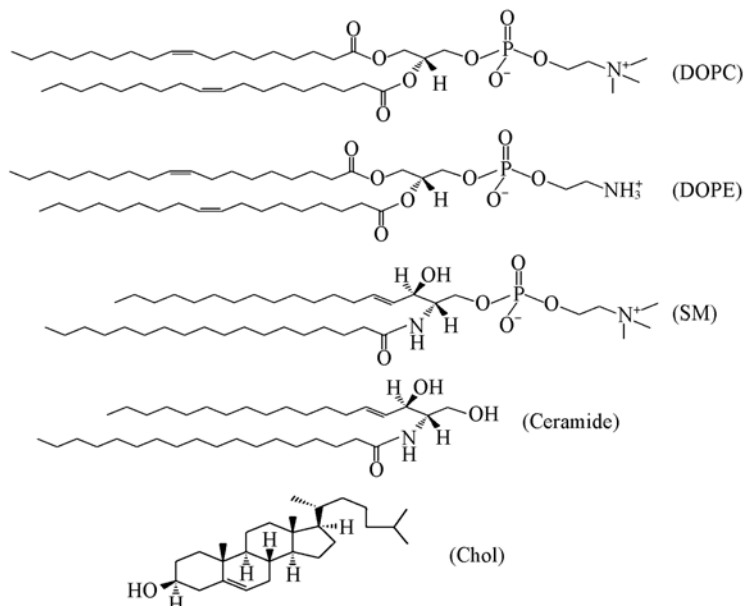


Fig. 9 Molecular structures of DOPC, DOPE, SM, Ceramide and Chol

分子间氢键相互作用是形成结构的主要驱动力. 鞘磷脂分子中的羰基可以作为氢键的受体, 羟基既可以作为供体又可以作为受体, 氨基 N 可以作为氢键的供体, 同时分子中的双键也可以形成 π - π 或 π -氢键相互作用^[13]. 鞘磷脂的氢键结合位点与胆固醇分子骨架 3 号位上的羟基发生相互作用形成微区结构^[14], 结构模型如图 10(A) 所示. DOPC 和 DOPE 分子具有两个酯羰基可以作为氢键的受体. DOPC 和 DOPE 常温下为液态, 在混合脂双层膜中易于形成液态无序相. 实验中将 DOPC 和 DOPE 加入到 SM/Chol 体系时, 出现了液态有序相和液态无序相共存的结构[图 10(B)和(C)], 但是在 SM/Chol/DOPE 体系中还出现了液态有序相与凝胶相共存现象, 液态有序相的边缘出现了“栅栏”结构. DOPC 与 DOPE 分子尾链相同, 仅头部基团不同. 在双层膜形成过程中, 由于 DOPC 具有较大的分子头部, 分子呈现为棒状, 易于形成双层膜结构, 而 DOPE 分子呈现锥状, 头部较小, 易于形成颗粒或者囊泡状结构^[15]. 在实验中液态有序相微区结构上出现了富含 DOPE 的凝胶相颗粒体结构. DOPE 分子的较小头部促使分子形成更加聚集的膜结构, 分子尾链相互缠绕, 极性头部间发生静电排斥, 促使出现相分离, 形成凝胶相. 在表面压力较大时, 膜结构容易崩塌形成多层膜结构^[16].

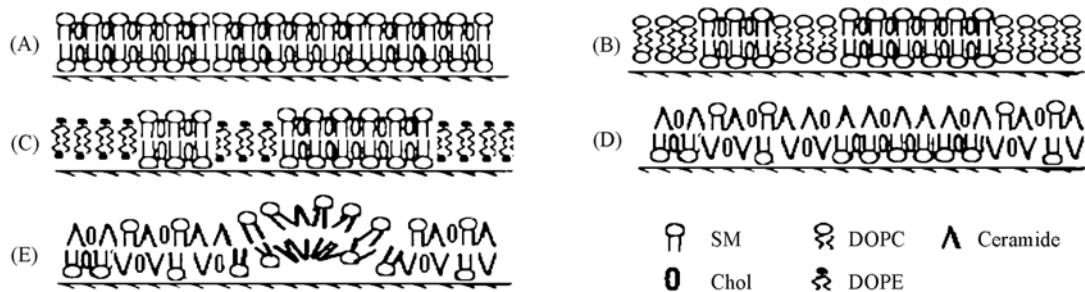


Fig. 10 Schematic diagrams of lipid bilayers

(A) The uniform liquid-ordered phase structure of SM/Chol; (B) and (C) the phase separation occurred when DOPC and DOPE were added; (D) at low surface pressure, the uniform bilayer of ceramide/SM/Chol; (E) as the surface pressure increasing, the lipids of bilayers flip-flop to form vesicle structure.

神经酰胺是生物膜中重要的组成之一, 它是以鞘氨醇为骨架的鞘脂, 它的头部基团较小, 通常在溶液中形成负曲率膜泡结构. 分子结构中的两个羟基赋予了它具有较强的氢键能力. 神经酰胺的加入促使双层膜结构发生重排, 当表面压力较大时, 诱导脂双层膜间发生跨膜翻转形成囊泡结构^[17], 模型如图 10(D)和(E)所示. 已知一个神经酰胺分子可以与 2~3 个鞘磷脂分子发生氢键相互作用. 在模拟脂筏微区结构实验过程中, 神经酰胺可以取代胆固醇, 对生物膜中脂质的物理状态、流动性及渗透性有一定调节作用. 同时神经酰胺和胆固醇也能发生相互作用形成独特的共晶体结构^[18]. 用鞘磷脂酶处理 SM/PC 膜系统时形成了富含 Ceramide 的凝胶相结构. 本实验中神经酰胺加入到 SM/Chol 中, 观察到了囊泡状和富含 Ceramide 的凝胶相结构.

在本文所有的体系中, 双层膜都表现出一些缺陷, 可能是由于固体基片表面性质所致. 云母表面带负电, 鞘磷脂、DOPC 和 DOPE 分子头部基团中的 N 原子带正电, 在水溶液中制备脂双层膜过程中, 云母表面和磷脂头部中间就会出现水层, 促进磷脂的移动, 这种“三明治”结构的形成, 减弱了云母和磷脂头部的静电吸附作用出现缺陷^[19]. McConnell 等^[20]指出, 双层膜表面张力和偶极子密度决定微区结构的大小和形状. 微区边界位置张力促使形成圆形结构, 偶极静电相互作用诱导形成不规则形状^[21]. 当膜压较低时, 脂分子间相互作用形成小的微区结构. 随着表面压力的增加小微区发生移动、相互融合, 形成大的微区结构. 用荧光显微镜进行实验也得到了相同的结论^[22].

鞘磷脂和胆固醇是脂筏结构含量最多的成分. 鞘磷脂和胆固醇能形成不规则的微区结构, DOPC 的加入促使双层膜出现了液态无序相和液态有序相共存结构, 而 DOPE 与神经酰胺的加入, 形成了三相共存的现象. Ceramide 的加入促使双层膜结构发生重排, 双层膜脂成分发生翻转形成高度聚集的囊泡状结构. 分子官能团的成键能力和表面压力决定了微区结构的形态. 脂筏结构模拟研究, 特别是各种脂类分子间相互作用机理研究, 对认识疾病, 探索疾病的治疗与控制, 都具有非常重要的生物学意义, 是值得认真探讨与研究的问题.

参 考 文 献

- [1] Simons K. , Ikonen E. . Nature[J] , 1997 , **387** : 569—572
- [2] Simons K. , Toomre D. . Nat. Rev. Mol. Cell Biol. [J] , 2000 , **1** : 31—39
- [3] Diana C. M. , Chen H. W. , Edward M. C. , *et al.* . Molecular and Cellular Endocrinology[J] , 2006 , **246**(1) : 91—100
- [4] London E. , Brown D. A. . Biochimica. et Biophysica. Acta[J] , 2000 , **1508** : 182—195
- [5] Rinia H. A. , Margot M. E. S. , Jan P. J. M. , *et al.* . FEBS Letters[J] , 2001 , **501** : 92—96
- [6] Chunbo Y. , Linda J. J. . Biophys. J. [J] , 2001 , **81** : 1059—1069
- [7] Bruno M. C. , Rodrigo F. M. , Liana C. S. , *et al.* . Biophys. J. [J] , 2007 , **93** : 1639—1650
- [8] Rinia H. A. , Kruijff B. . FEBS Letters[J] , 2001 , **504** : 194—199
- [9] Bianca Y. V. D. , Dragomir G. , Vladimir C. , *et al.* . FEBS Letters[J] , 2003 , **547** : 101—106
- [10] Giocondi M. C. , Boichot S. , Thomas P. , *et al.* . Ultramicroscopy[J] , 2004 , **100** : 135—143
- [11] Salvatore C. , Nicoletta K. , Petra S. . Langmuir[J] , 2007 , **23** : 7659—7665
- [12] Jared C. L. , David E. S. , Edwardson J. M. , *et al.* . Biophys. J. [J] , 2003 , **84** : 1827—1832
- [13] Vist M. R. , Davis J. H. . Biochemistry[J] , 1990 , **29** : 451—464
- [14] Lalitha S. , Kumar A. S. , Keith J. , *et al.* . Journal of Supramolecular Chemistry[J] , 2001 , **1** : 53—61
- [15] Bodil R. , Slotte J. P. . FEBS Letters[J] , 2002 , **531** : 33—37
- [16] Sergi G. M. , Scar D. , Fausto S. , *et al.* . Biochimica. et Biophysica. Acta[J] , 2007 , **1768** : 1190—1198
- [17] Ira Linda J. J. . Biochimica. et Biophysica. Acta[J] , 2007 , **1768** : 1—13
- [18] Luana S. , Inna S. , Markus J. W. , *et al.* . Biophys. J. [J] , 2005 , **88** : 3381—3391
- [19] Li X. M. , Smaby J. M. , Momsen M. M. , *et al.* . Biophys. J. [J] , 2000 , **78** : 1921—1931
- [20] McConnell H. M. . Annu. Rev. Phys. [J] , 1991 , **42** : 171—195
- [21] Iván L. M. , Marisela V. , Philippe F. D. . Biochimica. et Biophysica. Acta[J] , 2007 , **1768** : 533—561
- [22] James E. S. , Raquel F. E. , Richard M. E. , *et al.* . Biophys. J. [J] , 2006 , **90** : 2170—2178

Influence of DOPC, DOPE and Ceramide on the Organization of Sphingomyelin/Cholesterol Bilayers

HAO Chang-Chun¹ , SUN Run-Guang^{1*} , ZHANG Jing²

(1. Laboratory of Biophysics and Biomedical Engineering, College of Physics and Information Technology,
2. College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract Lipid rafts are of a dynamic microdomain structure found in recent years, enriched in signal molecules. The change of structure and function of lipid rafts can result in many diseases. LB technique and atomic force microscopy were used to study the effect of 1,2-dioleoy-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC), 1,2-dioleoy-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) and ceramide on the structure of sphingomyelin (SM)/Cholesterol LB bilayers. We found that each bilayer of lipid mixtures took on uniform distribution bilayer structure when the surface pressure was low. When increasing the surface pressure, great changes were taken place on the bilayers: (1) The bilayers composed of SM/Chol appeared uniform liquid-ordered microdomains structure, with coverage of 80% of mica. (2) In SM/Chol/DOPC bilayers, the liquid-ordered microdomains formed by SM/Chol floated onto the fluid-disordered small DOPC granule, about 30% coverage. (3) When adding DOPE to SM/Chol, the bilayers had changed obviously, meanwhile liquid-disordered, liquid-ordered and gel phases coexisted on the mica. (4) The Ceramide induced the bilayers of SM/Chol rearrangement, the lipids of bilayers occurred flip-flop to form vesicle structure. At the higher surface pressure, all the systems could form specific platform structure. The bond capabilities of molecular groups play an important role in forming structure.

Keywords Lipid raft; LB technique; Atomic force microscopy (AFM); Phase separation

(Ed. : H, J, Z)