

文章编号:1000-6281(2012)06-0529-05

GM1/DPPC 单层膜中分子间相互作用机理初探

郝长春¹, 孙润广¹, 张 静², 何光晓¹, 杨 静¹

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

摘 要: 单唾液酸四己糖神经节苷脂(GM1)是生物膜重要的组分之一, 在神经系统病变治疗中起到重要的作用。本文通过分析 GM1/二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)混合脂单层膜等温线数据研究了脂膜分子间的相互作用机理, 并利用原子力显微镜(AFM)对其形态进行了观测。实验结果表明: DPPC 在混合脂中的比例含量 $X_{\text{DPPC}} = 0.2$ 时, GM1 与 DPPC 分子间的相互作用力为吸引力, 膜较稳定; 其它比例混合时分子间的相互作用力为排斥力, 且在 $X_{\text{DPPC}} = 0.6$ 时, 分子间相互排斥力最大, 单层膜出现了明显的富含 DPPC 的微区和 GM1 网状共存的结构。AFM 形态观测与理论分析结果相一致。该研究为了解 GM1 在不同的膜脂系统中形态和功能的变化提供了重要的实验依据和理论支持。

关键词: 单唾液酸四己糖神经节苷脂; 单层膜; 热力学分析; 原子力显微镜; 相互作用

中图分类号: O621; Q73; Q336 **文献标识码:** A

细胞膜包含丰富的磷脂和糖脂, 在神经细胞膜中神经节苷脂(Gangliosides)大约占总脂的 6%^[1], 在脑部细胞膜中单唾液酸四己糖神经节苷脂(GM1)占总脂的 13%^[2], 它在细胞的生长、分化、损伤修复及分子识别过程中起到重要的作用^[3]。在细胞膜中神经节苷脂可用来与磷脂发生相互作用形成“筏”状微区结构。“筏”微区含有大量的信号分子, 可参与信号转导、蛋白质分选、离子通道的调节、膜的粘连、细胞的生长、分化、衰老、凋亡以及应急反应。它们结构和功能状态的改变, 会引发多种疾病, 如肿瘤、糖尿病、神经退行性疾病(如老年痴呆症, 帕金森氏症, 阿尔兹罕默氏病等)^[4,5]。因此, 对“筏”状微区结构和功能的研究不仅对于揭示生物膜微区结构的形成机制具有重要的意义, 而且对于理解信号传导途径等生物过程从而指导临床实践具有重要的意义。

对“筏”状微区结构的研究常使用体外模拟方法研究脂与脂、脂与蛋白间的相互作用。尽管关于 GM1 与 DPPC 分子相互作用的机理文献已有报道, 但文献中仅给出了个别混合比例的情况下分子间的相互作用, 对于系统地改变二者组分比例的理论分析和 AFM 形态观测的研究仍未见到。Langmuir-Blodgett(LB)膜是一种能精确控制薄膜厚度和分子排列的理想分子膜制备方法^[6]; AFM 具有纳米

尺度的表面成像技术, 可以较精细地对脂膜进行相变行为观测^[7]。本文利用 LB 技术制备了表面压力为 30 mN/m 的 GM1/DPPC 单层膜, 并利用 AFM 对其进行观测。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

单唾液酸四己糖神经节苷脂(GM1)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)均购于 Sigma 化学试剂公司, 氯仿、酒精等其它化学试剂均为分析纯; 水为离子交换 3 次蒸馏水。

1.2 混合脂单层膜的表面压力 - 平均分子面积(π -A)曲线

分别将不同比例的 GM1 和 DPPC 混合脂溶解在氯仿/甲醇(3:1, V/V)中形成浓度为 1 mg/ml 的溶液。LB 膜用 KSV-Minitrough(芬兰 KSV 公司, 槽子: 323 mm × 75 mm)进行制备。用微量进样器将溶液均匀地滴加到纯水表面, 让其自动迅速铺展, 静置 15 min, 待液面上有机溶剂完全挥发后, 以 10 mm/min 的速度压膜。膜表面压力由 Wilhelmy 吊片式天平检测, 测量精度为 0.01 mN/m。 π -A 曲线由计算机控制自动获得。每组数据最少重复三次, 本文数据为最具代表性的三组数据的平均值, 每点的表面压力变化范围在 ± 1 mN/m。在固定的膜压下,

收稿日期: 2012-08-03; 修订日期: 2012-10-10

基金项目: 陕西省自然科学基金基础研究计划资助项目(No. 2012JQ1002); 中央高校基本科研业务费专项资助项目(No. GK201102029)。

作者简介: 郝长春(1982-), 男(汉族), 山西侯马人, 讲师。E-mail: haochangchun@snnu.edu.cn

使用垂直提膜法以 5 mm/min 的速度将单分子层转移到新解离的云母基片上,成膜温度控制在 $(20 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 然后对样品进行 AFM 检测。

1.3 原子力显微镜检测

原子力显微镜 (岛津公司 WET-SPM-9500-J3 型) 扫描采用接触模式, 整个实验观测过程在室温下进行。采用标准扫描头, 探针材料为 Si_3N_4 , 悬臂的弹性常数为 0.32 N/m, 调节压电陶瓷管电压值使针尖对样品以最小作用力进行扫描, 图片像素点收集为 512×512 , 扫描速度为 1 Hz。

2 结果与讨论

2.1 不同比例的 GM1/DPPC 单分子膜的 π -A 曲线

分子间的相互作用主要是通过分析单层膜 π -A 等温线来进行。图 1 给出了 GM1 与 DPPC 不同比例单层膜等温线。从图中可见在此温度下纯 DPPC 等温线表面压力为 (4.0 ± 0.5) mN/m 时出现了明显的液态扩张相 (LE) 向液态聚集相 (LC) 过渡现象, 该结果与文献 [8] 相一致。随着 GM1 含量的增加, 单层膜等温线向平均分子面积大的方向偏移, 且 LE 与 LC 间的相变点越来越模糊。纯 GM1 单层膜等温线没有观察到明显的相变点, 混合脂的曲线介于两种纯物质之间。从图中可以看出混合脂单层膜的崩溃压保持在 (62 ± 1.5) mN/m。

2.2 不同比例的 GM1/DPPC 单分子膜混合性分析

由物理化学理论, 两组分间的相互作用可以用混合性方程来表示。两组分理想混合时, 平均分子面积 $A_{12,ideal}$ 为^[9]:

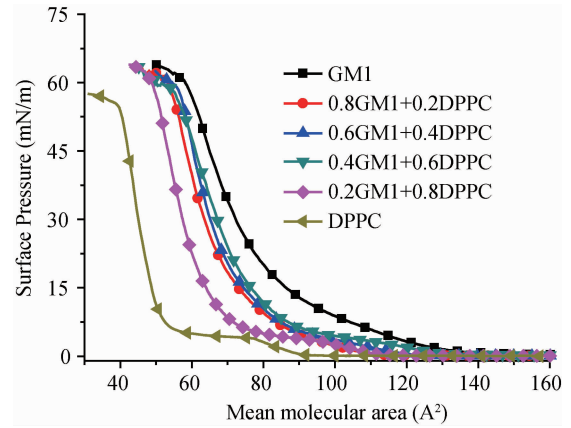


图 1 GM1/DPPC 单层膜的表面压力 - 分子面积 (π -A) 等温线。

Fig. 1 Surface pressure-molecular area (π -A) isotherms of mixed GM1/DPPC monolayers.

$$A_{12,ideal} = (A_1)_\pi X_1 + (A_2)_\pi X_2, \quad (1)$$

式中 A_1, A_2 分别是固定压力下单一组分的分子面积, X_1, X_2 分别是组分 1 和 2 在混合脂中的比例含量。当两种组分相互作用时混合脂单层膜平均分子面积数据就会表现出非线性关系, 与理想数值出现偏差。

图 2A 中给出了表面压力 $\pi = 5, 10, 15, 20, 25$ 和 30 mN/m 情况下随着 DPPC 含量逐渐增加的混合脂单层膜平均分子面积实验数据。由图可见平均分子面积随着 DPPC 含量的增加呈非线性关系, 由此可以判断 GM1 与 DPPC 分子间发生了相互作用。

分子间的相互作用可通过分析过量分子面积 (ΔA_{ex}) 来进一步的进行研究。(A_{ex} 计算公式如下^[10]:

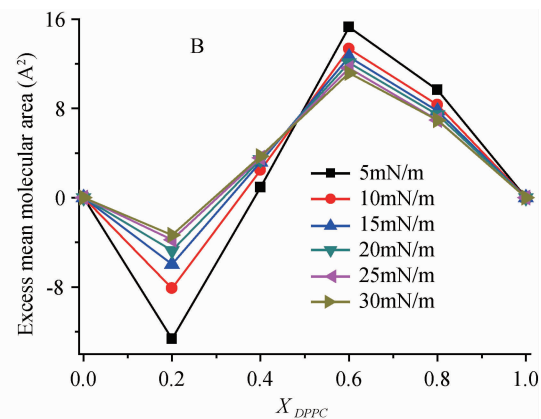
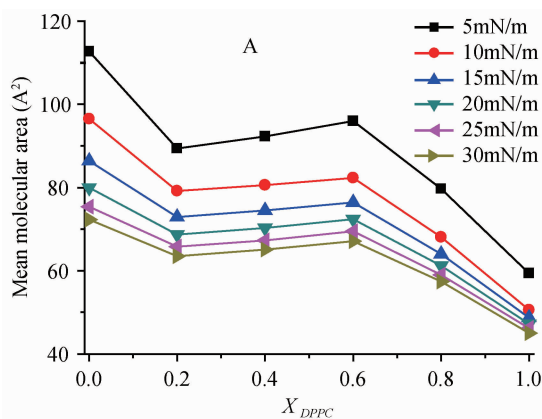


图 2 GM1/DPPC 混合脂单层膜在固定表面压力下平均分子面积 (A) 和过量分子面积 (B)。

Fig. 2 The mean molecular area (A) and excess molecular area (B) of the mixed monolayers of GM1/DPPC at certain surface pressure.

$$\Delta A_{\text{ex}} = A_{12,\text{exp}} - A_{12,\text{ideal}}, \quad (2)$$

式中 $A_{12,\text{exp}}$ 为平均分子面积实验值。当两种组份不发生相互作用理想混合时, (A_{ex} 为零。当 ($A_{\text{ex}} < 0$ 时表明分子间的相互作用为吸引力, 相反, ($A_{\text{ex}} > 0$ 分子间的相互作用为排斥力。

图 2B 给出了 GM1/DPPC 单层膜在不同的表面压力下的过量分子面积。从图中可见, 当 DPPC 在混合脂中含量 $X_{\text{DPPC}} = 0.2$ 时过量分子面积为负, 说明两种分子间相互作用表现为吸引力, 该实验结果与参考文献报道的 GM1/DPPC 混合脂单层膜在 25°C , $X_{\text{DPPC}} = 0.2$ 时结果相一致^[11]; 当 $X_{\text{DPPC}} = 0.4$ 、 0.6 、 0.8 时, 在所研究的表面压力范围内过量分子面积为正, 说明分子间的相互作用为排斥力, 诱导单层膜出现相分离现象, 这与后面的 AFM 观测相一致。

2.3 不同比例的 GM1/DPPC 单分子膜稳定性分析

单层膜的稳定性通过过量吉布斯自由能进行评估。混合系统吉布斯自由能的变化 (G_{mix} 等于理想状况下的自由能加上过量的自由能, 如公式 3 所示^[12],

$$\Delta G_{\text{mix}} = \Delta G_{\text{ideal}} + \Delta G_{\text{ex}}, \quad (3)$$

对理想混合系统吉布斯能量改变仅涉及到熵的方面, 公式为:

$$\Delta G_{\text{ideal}} = RT(X_1 \ln X_1 + X_2 \ln X_2), \quad (4)$$

式中 X_{X_i} ($i = 1, 2$) 代表单一组份在混合脂中的摩尔比例, R 为气体常数, T 为绝对温度。因此, 过量吉布斯能量可以通过下式表达:

$$\Delta G_{\text{ex}} = \int_0^\pi [A_{12} - (X_1 A_1 + X_2 A_2)] d\pi, \quad (5)$$

式中 A_{12} 、 A_1 和 A_2 分别代表的是混合系统、组分 1 和组分 2 的平均分子面积, π 表示单层膜的表面压力。如果单层膜中两组分是理想混合, ΔG_{ex} 为零。

图 3 给出了单层膜相互作用在不同表面压力下的过量吉布斯自由能值。由图可见随着表面压力的增加, ΔG_{ex} 值越大。 ΔG_{ex} 正值说明分子排斥力促使单层膜发生相分离, 正、负极值位置出现在 $X_{\text{DPPC}} = 0.2$ 和 0.6 , ΔG_{ex} 负值越小, 单层膜越稳定。

2.4 不同比例的 GM1/DPPC 单分子膜压缩性分析

压缩性 C_s 或弹性系数 C_s^{-1} 也是分析单层膜的一个重要的参数。计算公式如下^[13]:

$$C_s = -\frac{1}{A} \left(\frac{\partial A}{\partial \pi} \right)_T, \quad (6)$$

式中 A 和 π 分别表示平均分子面积与表面压力。

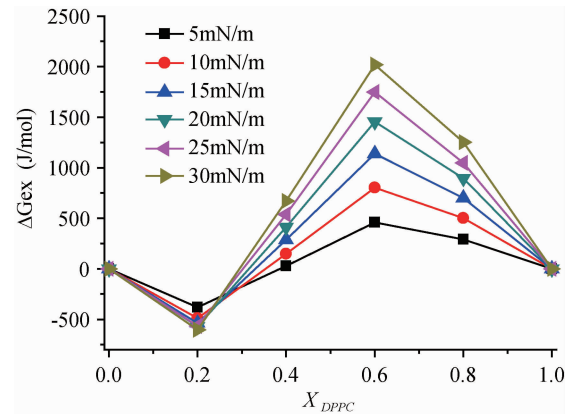


图 3 GM1/DPPC 混合脂单层膜在固定的表面压力下过量表面吉布斯自由能。

Fig. 3 The excess Gibbs energy of mixed GM1/DPPC monolayers at certain surface pressure.

本文计算了弹性系数来表征单层膜的属性。图 4 给出了不同 GM1/DPPC 比例单层膜的弹性系数与表面压力关系曲线。从图中可见, 单层膜的弹性系数随着 DPPC 比例的增加而增大, 分子结构决定了弹性性质。DPPC 为饱和的脂肪酸链, 形成膜具有较强的刚性, 这与文献报道结果相一致^[14]。

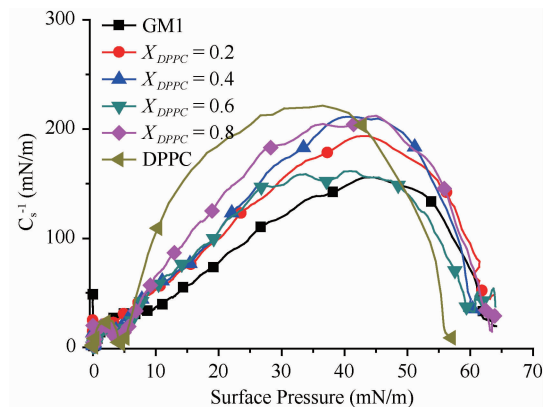


图 4 GM1/DPPC 单层膜的弹性模量对表面压力曲线。

Fig. 4 The elastic modulus (C_s^{-1}) vs. surface pressure (π) dependencies for mixed GM1/DPPC monolayers.

2.5 不同比例的 GM1/DPPC 单分子膜 AFM 观测

用 AFM 观察脂膜结构的相态行为是研究分子间相互作用的一个重要的途径。单层膜在表面压力为 $30 \sim 35$ mN/m 时最接近生物膜的性质^[15]。图 5 给出了混合脂膜在 30 mN/m, 扫描范围为 $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ 情况下的形态观测图。图 5A 给出了纯 GM1 单层膜结构图, 可看出 GM1 呈现出紧密排列的链状结构。随着 GM1 比例含量的减少, GM1 分子链间出现了明显的空隙。当 DPPC 的含量 $X_{\text{DPPC}} = 0.2$ 时, 在单层膜结构中可看到少许富含 DPPC 的微区

结构(图 5B 中所圈的区域为 DPPC 微区)。两种分子间发生相互吸引作用, GM1 分子头部糖基团相互交联, DPPC 分子分散在其中。AFM 高度分析表明 DPPC 微区高度与周围的 GM1 没有明显差别, 仅能通过观察图中不同物质膜表面的平整程度来判断。富含 DPPC 微区分子排列紧密, 微区表面没有明显的孔洞, 较为平整, 这与 DPPC 分子具有饱和的脂肪酸链相关。当 $X_{\text{DPPC}} = 0.4$ 时, GM1 单分子膜内部空隙逐渐增大, 凝胶相的 DPPC 微区覆盖率逐渐增大, 但在微区边缘两种分子由于相互排斥作用促使 DPPC 区域边界不明显, 表明两种组分处于形成稳定膜的过渡阶段(图 5C), 在该比例下虽然分子间的相互作用力为斥力, 但还没有达到极值, 所以在

边界区域两种分子相互渗透, 诱导 GM1 区域出现孔洞。当 $X_{\text{DPPC}} = 0.6$ 时分子间的排斥作用达到最大值, 单层膜出现相分离现象, 凝胶相 DPPC 微区边界较为明显, 富含 GM1 和 DPPC 的区域均匀的分布在衬底上(图 5D 中圈住的区域为 DPPC 微区结构), GM1 促使 DPPC 微区结构边缘变得平滑, 形成稳定的微区结构。随着 DPPC 含量进一步的增加, DPPC 微区面积逐渐增大, DPPC 微区发生融合形成较大的平台结构(图 5E), 极少数的 GM1 分子分散在微区的中间。相比于纯 GM1, 纯 DPPC 单分子膜更加致密平坦(图 5F), 在此压力下分子紧密排列均匀铺展在云母衬底上。AFM 实验结果与理论分析结果相一致。

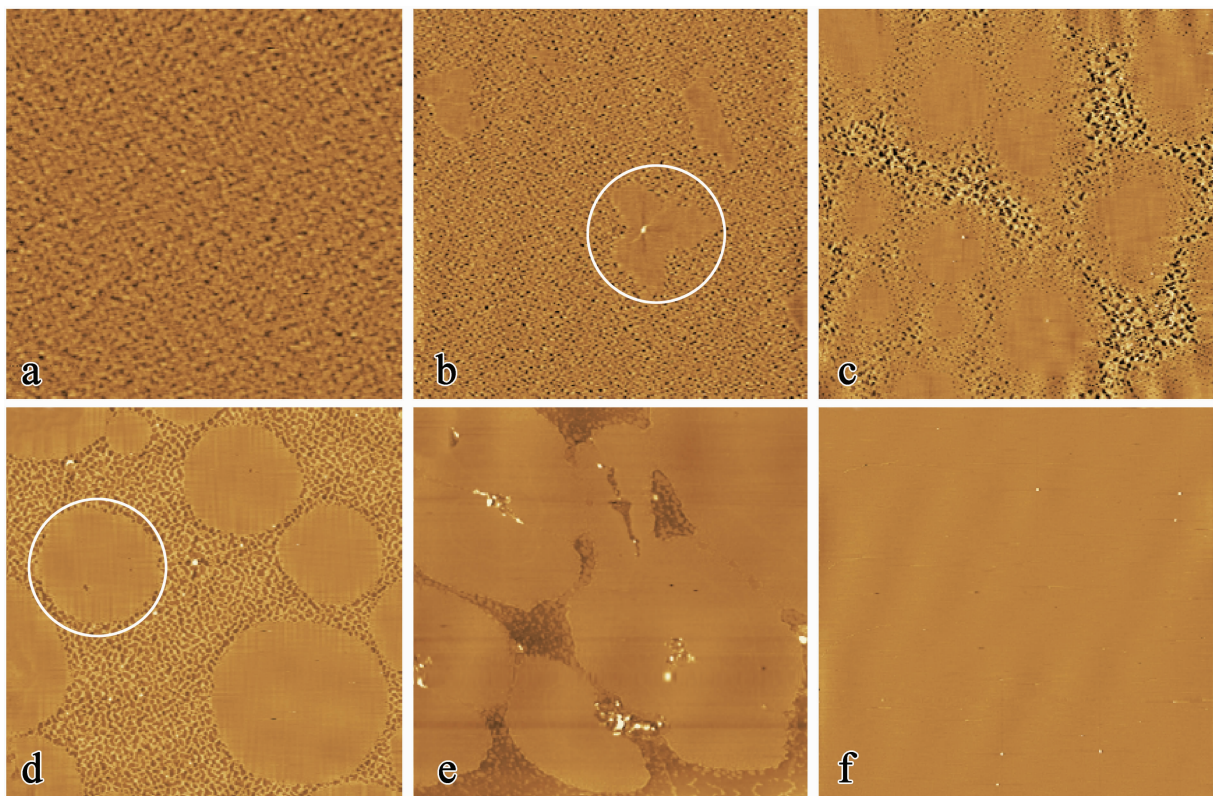


图 5 不同比例下 GM1/DPPC 单层膜 AFM 观测。a: 纯 GM1; b: $X_{\text{DPPC}} = 0.2$; c: $X_{\text{DPPC}} = 0.4$; d: $X_{\text{DPPC}} = 0.6$; e: $X_{\text{DPPC}} = 0.8$; f: 纯 DPPC 扫描范围: $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$, 沉积膜压: 30 mN/m

Fig. 5 The AFM images of GM1/DPPC monolayers at different mole fraction. a: pure GM1; b: $X_{\text{DPPC}} = 0.2$; c: $X_{\text{DPPC}} = 0.4$; d: $X_{\text{DPPC}} = 0.6$; e: $X_{\text{DPPC}} = 0.8$; f: pure DPPC Scanning range: $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$, Deposited pressure: 30 mN/m

3 结论

本文系统地研究了 GM1/DPPC 单分子膜中分子间的相互作用和聚集相行为。实验数据分析表明 DPPC 含量 $X_{\text{DPPC}} = 0.2$ 时, 两组组分间的相互作用为吸引力, $X_{\text{DPPC}} = 0.4, 0.6, 0.8$ 时分子间的相互作用为排斥力, 且 $X_{\text{DPPC}} = 0.6$ 时排斥力最大, 诱导单

层膜出现相分离结构, AFM 观测结果表明在此比例下出现富含 DPPC 的微区和富含 GM1 的链状共存结构。分子结构决定了膜的压缩特性, 具有饱和脂肪酸链的 DPPC 相较于 GM1 具有较强的刚性。AFM 形态观测与理论分析结果相一致。该研究对于研究脂与脂间相互作用提供了一种可靠的实验方法, 对于理解 GM1 在不同脂类环境下的形态与结构

功能具有重要的指导意义。

参考文献:

- [1] Luckham P, Wood J, Froggatt S. The surface properties of gangliosides I. monolayer properties [J]. J Colloid Interface Sci, 1993, 156: 164 – 172.
- [2] Shoko Y, Tadahiro T, Masahiko A. Inhibition effects of gangliosides GM1, GD1a and GT1b on base-catalyzed isomerization of prostaglandin A2 [J]. Colloids Surf B: Biointerfaces, 2001, 20: 361 – 368.
- [3] Beitinger H, Vogel V, Mobius D. Surface potentials and electric dipole moments of ganglioside and phospholipid monolayers: Contribution of the polar headgroup at the water/lipid interface [J]. Biochim Biophys Acta, 1989, 984: 293 – 300.
- [4] Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000, 1: 31 – 39.
- [5] Vetrivel K S, Cheng H, Lin W. Association of gamma-secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosome membranes [J]. J Biol Chem, 2004, 279: 44945 – 44954.
- [6] Bruno L P, Renata C S, Luciano C. Interaction of chlorhexidine with biomembrane models on glass ionomer by using the Langmuir-Blodgett technique [J]. Colloids Surf B: Biointerfaces, 2012, 97: 57 – 61.
- [7] Nicholas E K, Zouheir D, Vamsi K. Measurement of nanomechanical properties of biomolecules using atomic force microscopy [J]. Micron, 2012, 43: 116 – 128.
- [8] Michael J D, Linda S, Nicola T. Towards crystal engineering via simulated pulmonary surfactant monolayers to optimise inhaled drug delivery [J]. Int J Pharm, 2011, 421: 1 – 11.
- [9] Katarzyna H W, Pawel W. The influence of fatty acids on model cholesterol/phospholipid membranes [J]. Chem Phys Lipids, 2007, 150: 66 – 81.
- [10] Dynarowicz A P, Kita K. Molecular interaction in mixed monolayers at the air/water interface [J]. Adv Colloid Interf Sci, 1999, 79: 1 – 17.
- [11] Yumiko O, Shoko Y, Hideki S. Membrane properties of mixed ganglioside GM1/phosphatidylcholine monolayers [J]. Colloids Surf B: Biointerfaces, 2004, 33: 191 – 197.
- [12] Bordi F, Cametti C, Venanzio C D. Influence of temperature on microdomain organization of mixed cationic-zwitterionic lipidic monolayers at the air – water interface [J]. Colloids Surf B: Biointerfaces, 2008, 61: 304 – 310.
- [13] Ling Y Z, Shen S F. Effects of lipid chain unsaturation and headgroup type on molecular interactions between paclitaxel and phospholipid within model biomembrane [J]. J Colloid Interface Sci, 2005, 285: 326 – 335.
- [14] 郝长春, 孙润广, 张静. DOPC, DOPE 和神经酰胺对鞘磷脂/胆固醇双层膜结构的影响 [J]. 高等学校化学学报, 2009, 30: 913 – 918.
- [15] Ohta Y, Yokoyama S, Sakai H A. Membrane properties of binary and ternary systems of ganglioside GM1/dipalmitoylphosphatidylcholine/dioleoylphosphatidylcholine [J]. Colloids Surf B: Biointerfaces, 2004, 34: 147 – 153.

Research on mechanism of the interaction between GM1 and DPPC in monolayers

HAO Chang-chun¹, SUN Run-guang¹, ZHANG Jing², HE Guang-xiao¹, YANG Jing¹

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

Abstract: Monosialotetrahexosylganglioside (GM1) is one of the most important components in the biological membrane and plays an important role in the nervous lesion treatment. This paper investigated the mechanism of the interaction between GM1 and 1, 2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) by analyzing the mixed lipids isotherms data. The morphology of monolayer was measured using atomic force microscopy (AFM). The results show that the molecular interaction between GM1 and DPPC is attractive and the lipid monolayer is more stable when the proportion of DPPC in the mixed lipids is $X_{\text{DPPC}} = 0.2$. At the selected other ratios of DPPC, the molecular interaction is repulsive and the maximum locates at $X_{\text{DPPC}} = 0.6$. The coexistence structure of DPPC-enriched domains and GM1-enriched net can be observed from the AFM image. AFM observation results are consistent with the theoretical analysis. This research provides an important experimental basis and theoretical support for understanding the change of morphology and function of GM1 in different membrane systems.

Keywords: monosialotetrahexosylganglioside; monolayer; thermodynamic analysis; atomic force microscopy; interaction