

胆固醇对脂双层结构影响的 SAXS 和 STM 研究

孙润广^{1,2}, 张静¹, 齐浩¹, 王永昌²

(1. 陕西师范大学物理系生命科学院, 陕西 西安 710062; 2. 西安交通大学现代物理所, 陕西 西安 710049)

摘要:用小角 X 射线散射(SAXS)和扫描隧道显微镜(STM)技术分别研究了模拟生物膜脂质体的结构以及胆固醇对生物膜双层结构的影响. 结果表明,在扫描隧道显微镜照片中,磷脂分子在石墨表面形成规则的二维点状排列图像;磷脂胆固醇脂质体在石墨表面形成规则的二维波纹状排列图像. 用小角 X 射线散射研究结果表明, DPPC 脂质体是片层相结构, DPPC + Chol 脂质体是复相片层结构, DPPE + Chol 脂质体是片层立方相结构, DPPC + DPPE + Chol 脂质体是立方六角形相结构.

关键词:胆固醇; 脂质体; 小角 X 射线散射; 扫描隧道显微镜

中图分类号: Q73 文献标识码: A 文章编号: 1000-6737(2001)01-0053-06

生物膜的研究涉及生物物理、生物化学和凝聚态物理等边缘学科. 生命过程中的许多重要功能都与生物膜的液晶态密切相关. 在细胞结构中, 生物膜几乎起着决定性的作用. 因此生物膜的液晶态构象与运动的研究一直是生命科学和凝聚态物理研究的热点问题之一^[1-3].

自从 1972 年 Singer 和 Nicolson^[4] 提出细胞膜的流体镶嵌模型 (Fluid mosaic model) 至今在生物膜的研究方面已做了大量的工作. Luzzatti^[5] 等用 X 射线衍射技术研究了类脂分子在水的分散相中的结构. 他们发现, 含水的类脂分子具有多形性, 除有脂双层的结构外, 还能形成六角形 I 型 (H I)、六角形 II 型 (H II)、立方形等多种形态. 1978 年 Cullis^[6] 等用 ³¹P-NMR 技术研究了 PE 脂质体的结构, 发现在适当条件下, 均能从双层结构转变为六角形 (H II) 结构. 1979 年荷兰学者 Verkleij^[7] 等采用冰冻断裂电子显微镜技术, 从膜的冰冻断裂面直接观察到类脂颗粒分布在脂双层的两个单层之间. 这种类脂翻转团粒结构就是非双层类脂结构. 首次提出生物膜除脂双层为其基本结构外, 尚有非双层的类脂结构, 并认为它是生物膜脂双层结构模型的一个补充. 1982 年 Ferguson^[8] 等采用冰冻断裂电子显微镜技术进一步证实了荷兰学者 Verkleij 的实验结果. 近年来, 我们用生物膜的液晶模型研究了化学物质对生物膜液晶态结构的影响^[9-11], 发现了三个新的液晶相, 不但是对前人研究结果的证实, 而且是对生物膜液晶模型的延拓.

通过研究人们发现, 基于“流体镶嵌模型”来考虑生物膜中的一些问题并不总是恰当的. 比如, 非双层膜的出现与流体镶嵌模型产生了矛盾. 流体镶嵌模型在解释生理状态下细胞膜的

收稿日期: 2000-30-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(29672024); 高等院校骨干教师资助计划项目(教科司[2000]65号);

西安交通大学博士基金资助项目(DFXJU 1998-9)

作者简介: 孙润广, 1958 年出生, 教授, 博士, 电话: 0086-29-5307620; E-mail: sunrun Guang@netscape.net.

结构时比较适宜,但在解释非生理状态下细胞膜结构的变化时,难以得出令人满意的结果。物理学的概念、方法和实验技术向生命科学的延拓和渗透过程中,有力的促进了生物膜的研究。将液晶理论和物理方法与生命科学中的问题相结合,通过对生物膜结构的研究,有可能得出一些新的认识。

胆固醇是哺乳动物细胞的重要成分。胆固醇能被动物吸收利用,也可在体内自行合成。有时会在冠状动脉中形成斑块,使动脉粥样硬化、堵塞,导致冠心病。由于胆固醇在生物体内的双重作用,长期来一直引起人们对它的广泛兴趣,并进行了较深入的研究。Estep, McMullen, Shin, Matuoka, 等人^[12-15]用差示扫描量热(DSC),电子自旋共振(ESR),核磁共振(NMR),富里叶红外光谱(FTIR),同步辐射小角X射线衍射等多种方法研究了胆固醇对磷脂膜的影响,发现胆固醇有促使生物膜形成非双层相的机理。本文用小角X射线散射(ASXS)和扫描隧道显微镜(STM)技术,分别研究了磷脂分子脂质体以及胆固醇对磷脂脂质体结构的影响机理。

1 材料与方法

1.1 脂质体的组分与制备

磷脂酰胆碱(dipalmitoylphosphatidylcholine,简称DPPC)、磷脂酰乙醇胺(dipalmitoyl-phosphatidyl-ethanolamine,简称DPPE)、胆固醇(cholesterol,简称Chol)均购于Sigma公司。

将磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、胆固醇及非离子表面活性剂(吐温80)共溶于乙醚中,配成溶液,然后将聚乙烯吡咯烷酮(polyvinyl-pyrrolidone,简称PVP)溶于M/15磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)中,过滤。滤液置于三角具塞烧瓶中,将该烧瓶放在磁力加热搅拌器上,将温度控制在60~70℃的范围内,高速搅拌,用微量注射器将溶有药物的乙醚溶液缓慢加入,加完后在上述温度范围内继续搅拌90 min。将所制脂质体用100℃流通蒸汽灭菌30 min。冷后振荡,密闭保存待用。多相脂质体的组分见表1。

Table 1 Component of PC and PE liposomes

Sample	Liposomes	Components*
A	DPPC	DPPC, PVP, PBS, PS-80
B	DPPC + Chol	DPPC, PVP, PBS, Chol, PS-80
C	DPPE + Chol	DPPE, PVP, PBS, Chol, PS-80
D	DPPC + DPPE + Chol	DPPC, DPPE, PVP, PBS, Chol, PS-80

*PVP: polyvinyl-pyrrolidone; PBS: phosphate buffered saline;

DPPE: dipalmitoyl-phosphatidylethanolamine; PS-80: polysorbatum-80

Chol: cholesterol; DPPC: dipalmitoyl-phosphatidylcholine.

1.2 扫描隧道显微镜(STM)观察

用微量取液器取1 μ L脂质体(20mg/mL)滴于石墨表面,用SMT-1型扫描隧道显微镜测定STM图谱。X及Y方向的侧向分辨率为0.01~0.02 nm, Z方向的分辨率为0.001

nm。测量时仪器参数设置为 隧道电流 40 nA，偏压 50 mV。所有样品均在室温测试。

1.3 SAXS 图谱测定

SAXS 图谱是在 D/max - rB 型旋转阳极 X 射线衍射仪小角散射附件上测得。测试条件：CuK (辐射, Ni 滤波片, 管压为 40 kV, 管流为 100 mA, 一级狭缝为 0.08 mm, 二级狭缝为 0.06 mm, 三级狭缝为调至最佳状态。接受狭缝为 0.1 mm, 防散射狭缝为 0.25 mm, 扫描速度为 0.5°/min, 时间常数为 2s, 样品均在室温进行测定。

2 实验结果

2.1 脂质体膜微观结构的 STM 观察结果

在所有实验中, 样品均以脂质体的形式滴于石墨表面。将 DPPC 脂质体(样品 A)滴于石墨表面, 用扫描隧道显微镜从 150nm 到 0.5nm 的范围内进行扫描时, 没有发现任何单个或聚集形式的脂质体样图像。当进行大范围扫描时, 可以看到 DPPC 分子在石墨表面形成了连续平滑的膜结构。当增大放大倍数时, 能够分辨出长 1~1.05 nm, 宽约 0.58~0.62 nm 的单个 DPPC 分子的磷脂头部在石墨表面形成的规则二维排列图像。但无法获得原子级分辨率, 这可能是由于分子的柔软性和热振动所致。在图 1.a 中, 图片的尺度为 10 nm。

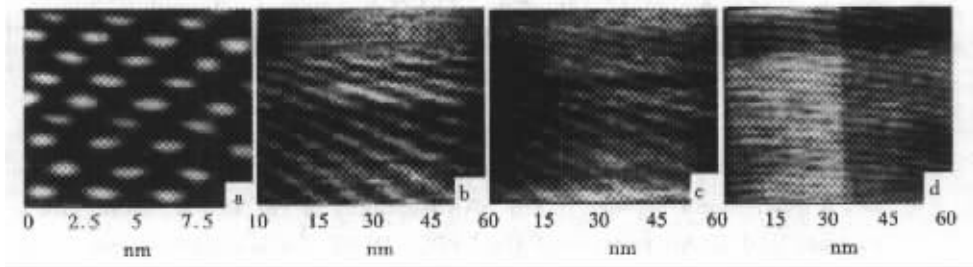


Fig.1 STM picture of liposomes membrane. (a) STM picture of DPPC membrane, (b) STM picture of DPPC - cholesterol liposomes, (c) STM picture of DPPE - cholesterol liposomes, (D) STM picture of DPPC - DPPE - cholesterol liposomes

将样品 B、C、D 分别滴于石墨表面, 当用扫描隧道显微镜进行大面积扫描时, 可以看到脂质体在石墨表面形成了连续平滑的膜结构。当增大放大倍数时, 又能得到磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)和胆固醇(Chol)(摩尔比为 PC:PE:Chol = 1:1:0.5)制成的脂质体分子聚集形式的二维波纹相排列图像(图 1)。通过对图像的观察, 发现样品 A 与样品 B(摩尔比为 PC:Chol = 1:0.5)(图 1.b)、样品 C(摩尔比为 PE:Chol = 1:0.5)(图 1.c)以及样品 D(摩尔比为 PC:PE:Chol = 1:1:0.5)(图 1.d)的图像不同。样品 B 波纹深为 2~4 nm, 周期为 10~12 nm, 具有一定的不对称性。样品 C 与样品 B 的图像相似, 但也有明显的不同。样品 D 与样品 B、样品 C 相比, 图像的波纹较为密集。由此推测样品 A 与样品 B、样品 C 以及样品 D 可能具有不同的结构。在图 1.b, c, d 中, 图片的尺度均为 60 nm。

2.2 胆固醇对脂质体双层结构的影响

将在含有高效分散剂的磷酸缓冲液中制得的脂质体(样品 A, B, C, D)分别滴于铝箔表面, 制成定向多层膜, 用小角 X 射线散射测得样品 A 的图(图 2.a)是典型的磷脂定向多层膜。层

间距的比率为 $5.9:2.9:1.9:1.45 = 1:0.49:0.32:0.245$, 属片层相。样品 B、C、D 与样品 A 最明显的区别是在样品 B、C、D 的衍射图谱中, 出现了一个 $d = 3.4 \sim 3.5$ nm 衍射峰, 这个衍射峰可能是胆固醇在脂双层中的一个特征峰。

从样品的 X 射线散射层间距的 Bragg 空间比率来看, 样品 B 的层间距的 Bragg 空间比率为 $5.8:3.4:2.9:1.7:1.45 = 1:0.586:0.5:0.293:0.25$, 属复相片层相^[5,10]。样品 C 的层间距的 Bragg 空间比率为 $5.7:3.5:2.9:1.8:1.45 = 0.614:0.509:0.316:0.25$, 属片层立方相。样品 D 的层间距的 Bragg 空间比率为 $5.6:3.5:2.8:1.8:1.5 = 0.625:0.5:0.32:0.267$, 属立方六角形。

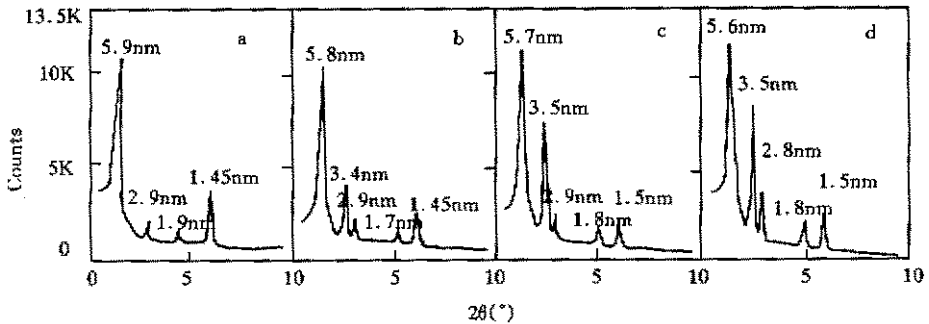


Fig.2 Effects of cholesterol on the phospholipid bilayer structure by methods of SAXS. (a) SAXS patterns of DPPC liposomes, (b) SAXS patterns of the DPPC - cholesterol liposome, (c) SAXS patterns of the DPPE - cholesterol liposome, (D) SAXS patterns of the DPPC - DPPE - cholesterol liposome

3 讨 论

3.1 胆固醇对生物膜液晶态结构的影响一直是人们研究的热点问题之一。31P - NMR 结果表明, 胆固醇能促进脂质体形成六角形 II 结构^[6]。冰冻断裂电子显微镜结果表明, 胆固醇在二油酰磷脂酰乙醇胺及二油酰磷脂酰胆碱混合脂质体中, 能促进混合脂质体形成类脂颗粒及六角形 II 结构^[7]。在含有高效分散剂的磷酸缓冲液中, 胆固醇分别能促使 DPPC 脂质体形成复相片层结构, 促使 DPPE 脂质体形成片层立方相结构, 以及促使 DPPC 和 DPPE 混合脂质体形成立方六角形相结构。进一步证实胆固醇有促使生物膜形成非双层相的作用。

3.2 将纯 DPPC 脂质体滴于石墨表面, 可观察到单个 DPPC 分子的磷脂头部在石墨表面形成的规则的二维点状排列的图像。将磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)和胆固醇(Chol)按一定比例制成脂质体后滴于石墨表面, 可观察到分子聚集形式的二维波纹相排列图像(图 1)。通过比较, 不难看出, 磷脂分子和胆固醇分子聚集形式的线状二维波纹相排列图像。当胆固醇分子不存在时, 单个磷脂分子的头部形成规则的二维点状排列的图像。

3.3 根据 Singer 生物膜的流体镶嵌模型和我们的实验结果, 推测生物膜表面的微观结构是脂质的极性头部与胆固醇相互作用以波纹形式构成二维线状排列。这可能是由于脂质的疏水亲水相互作用、静电相互作用以及分子间的 van der Waals 相互作用所致。我们的实验结果,

是对 Singer 生物膜流体镶嵌模型的进一步证实,也是对生物膜模型的延拓。

参考文献:

- [1] Salyanov V I, Dembo A T. *Transformation of the liquid crystalline phases of circular superhelical DNAs under the action of nuclease* [J]. *Mol. Biol. (moscow)*, 1990,24(6):1525 - 1531.
- [2] Hui S W, Boni L T. *Lipidic particles and cubic phase lipids* [J]. *Nature*, 1982,296(11):175.
- [3] Fang Liu, Istvan P Sugar, Parkson Lee - Gau Chong. *Cholesterol and ergosterol superlatives in three - component liquid crystalline lipid bilayers as revealed by dehydroergosterol fluorescence* [J]. *Biophysical Journal*, 1997,72(5):2243 - 2254.
- [4] Singer S J, Garth L Nicoison. *The fluid model of the structure of cell membranes* [J]. *Science*, 1972,175(4023):720 - 731.
- [5] Luzzati V, Husson F. *The structure of the liquid - crystalline phases of lipid - water systems* [J]. *The Journal of Cell Biology*, 1962,12:207 - 219.
- [6] Cullis P R, De Kruijff B. *Polymorphic phase behaviour of lipid mixtures as detected by ³¹P NMR: Evidence that cholesterol may destabilize bilayer structure in membrane systems containing phosphatidylethanolamine* [J]. *Biochim. Biophys. Acta*, 1978,507(2):207 - 218.
- [7] Verkleij A J et al. *Lipidic intermembranous particles* [J]. *Nature*, 1979,279(5709):162 - 163.
- [8] Ferguson K A, Hui S W, Stewart T P, Yeagle L. *Phase behavior of the major lipids of tetrahymena ciliary membrane* [J]. *Biochim. Biophys. Acta*, 1982,684(2):179 - 186.
- [9] Zhang Jing, Sun Run - Guang. *A study of the physicochemical character of the interaction of the liposome containing oleic acid of the liquid - crystal state and biomembrane* [J]. *Acta Physica Sinica*, 1994,41(9):1495 - 1501. 张静, 孙润广. 用 SAXS, ³¹P - NMR 和 ESR 研究液晶态油酸脂质体与生物膜相互作用的理化特性 [J]. *物理学报*, 1994,43(9):1495 - 1501.
- [10] Sun Run - Guang, Zhang Jing, Dai Zheng - Hua, et al. *A study for the influence of ricinoleic acid on the liquid crystal structure in the mixed phospholipid - cholesterol liposomes by means of SAXS and ³¹P - NMR* [J]. *Acta Physica Sinica*, 1994,43 (4):616 - 621. 孙润广, 张静, 戴正华等. 用小角 X 射线散射法和 ³¹P 核磁共振技术研究蓖麻酸对磷脂胆固醇混合脂质体液晶态结构的影响 [J]. *物理学报*, 1994,43(4):616 - 621.
- [11] SUN Runguang, ZHANG Jing, WANG Yongchang. *Conformation of liquid crystalline state in interaction between chemical materials and biomembrane in terms of modern physics* [J]. *Science in China (Series B)*, 1998,41(1):1 - 13.
- [12] Estep T N, Mountcastle D B, Biltonen R L, Thompson, et al. *Studies on the anomalous thermotropic behavior of aqueous dispersions of dipalmitoylphosphatidylcholine - cholesterol mixtures* [J]. *Biochemistry*, 1978,17(10):1984 - 1989.
- [13] McMullen T P W, Ruthven N A, Lewis H, et al. *Comparative differential scanning calorimetric and FTIR and ³¹P - NMR spectroscopic studies of the effects of cholesterol and androstenol on the thermotropic phase behavior and organization of phosphatidylcholine bilayers* [J]. *Biophysical J.* 1994,66(4):741 - 752.
- [14] Shin Y K, David E B, Jack H F. *Thermodynamics and dynamics of phosphatidylcholine - cholesterol mixed model membranes in the liquid crystalline state: Effects of water* [J]. *Biophysical J.* 1993,65(3):1283 - 1294.
- [15] Matuoka S, Satoru K, Ichiro H. *Temperature change of the ripple structure in full hydrated dimyristoylphosphatidylcholine/cholesterol multibilayers* [J]. *Biophysical J.* 1994,67(2):728 - 736.

EFFECTS OF CHOLESTEROL ON THE LIPID BILAYER STRUCTURE BY SAXS AND STM

SUN Run-guang^{1,2} ZHANG Jing¹, QI Hao¹, WANG Yong-chang²

(1. *Experimental Center, Shaanxi Normal University, Xian 710062, China;*

2. *Xian Jiaotong University, Xian 710049, China*)

Abstract: The effect of cholesterol on the phospholipid bilayer structure and polymorphism of liposomes have been investigated by method of the small angle X-ray diffraction (SAXS) and by the technique of scanning tunneling microscope (STM). The experiments proved that the STM images of the two-dimensional point array of the phospholipid molecules formed on graphite and that the STM images of the two-dimensional corrugated array of the liposomes of phospholipid and cholesterol formed on graphite. By using small angle X-ray diffraction we demonstrate the presence of lamellar phase in the DPPC liposomes. The cholesterol induces spontaneous formation of a complex lamellar phase in the DPPC-cholesterol liposomes and promotes formation of lamellar and cubic phase in the DPPE-cholesterol liposomes. The presence of cholesterol allowed the system to organize in cubic and hexagonal phase in DPPC-DPPE-cholesterol liposomes.

Key Words: Cholesterol; Liposomes; Small angle X-ray diffraction;
Scanned tunneling microscope