

• 研究论文 •

## 电解质浓度改变对心磷脂囊管结构稳定性的影响

陈燕<sup>a,b</sup> 李莉<sup>\*.a,b</sup> 邱枫<sup>b</sup> 杨玉良<sup>b</sup>

(<sup>a</sup> 复旦大学分析测试中心 上海 200433)

(<sup>b</sup> 复旦大学高分子系 聚合物分子工程教育部重点实验室 上海 200433)

**摘要** 心磷脂是构成线粒体内膜的特殊磷脂组分, 是线粒体内膜不同功能态下的拓扑结构变化的主要参与者. 本实验通过溶剂自然蒸发与微操注射两种途径, 原位研究了溶液中电解质浓度改变程度对心磷脂构成的囊管结构稳定性的影响, 以期对线粒体功能状态的变化机理有进一步的认识. 实验发现, 即使没有蛋白质对膜曲率的调制作用, 单纯由溶液浓度改变造成的刺激也可以引起心磷脂膜组装形态的改变. 皱缩的发生与膜表面的电势变化有关, 是可受浓度调控的可逆过程.

**关键词** 心磷脂; 囊管; 结构稳定性; 组装形态

## Effect of Electrolyte Concentration on the Stability of Myelin Figure Composed of Cardiolipin

Chen, Yan<sup>a,b</sup> Li, Li<sup>\*.a,b</sup> Qiu, Feng<sup>b</sup> Yang, Yuliang<sup>b</sup>

(<sup>a</sup> The Center of Analysis and Measurement, Fudan University, Shanghai 200433)

(<sup>b</sup> Key Laboratory of Molecular Engineering of Polymers of Ministry of Education, Department of Macromolecular Science, Fudan University, Shanghai 200433)

**Abstract** In order to understand the mechanism of the transition between different mitochondrial functional states, an *in-situ* study of the stability of myelin figure composed of cardiolipin was performed by changing the electrolyte concentration of systems. The methods of changing electrolyte concentration are the solvent-evaporation method and the micro-injection method. It was found that, even without protein regulation, the morphology of cardiolipin membrane could be reversibly mediated by only increasing or decreasing the electrolyte concentration. Moreover, the myelin crimple was related to the rising of zeta potential on the surface of membrane.

**Keywords** cardiolipin; myelin figure; stability of structure; morphology of self-assembly

心磷脂是线粒体中特有的、而且含量极丰富的一种特殊带电磷脂, 主要存在于线粒体的内膜嵴和内外膜的连接处<sup>[1]</sup>. 哺乳动物细胞中的心磷脂通常都由带两个单位负电荷的头部和四条不饱和酰基尾链(C<sub>18:2</sub>)组成<sup>[1]</sup>, 典型的分子结构见图 1, 这种结构使分子很容易呈现锥形的几何形状. 但由于分子带电头部间的静电排斥作用的存在, 使得心磷脂仍能以层状排列的结构形式存在,

可是, 当心磷脂头部间的静电排斥作用被屏蔽时, 如与蛋白质作用或受离子和质子的影响, 分子就可能组装成非层状的结构, 如反六角相(H<sub>II</sub>)结构等<sup>[2-5]</sup>. 这种相结构的转变将有利于膜与膜之间的连接或融合等过程的发生. 另外, 心磷脂的带电头部还起稳定线粒体内膜两侧电化学势的作用<sup>[1]</sup>, 保证呼吸链质子传递的正常进行; 它还参与线粒体上的绝大多数功能蛋白构成非特异结合<sup>[1]</sup>, 保证

\* E-mail: liyang@fudan.edu.cn

Received November 20, 2008; revised and accepted February 18, 2009.

国家自然科学基金优秀研究群体基金、国家基础研究专项基金(No. 2005CB623800)及自然科学基金(No. 20574015)资助项目.

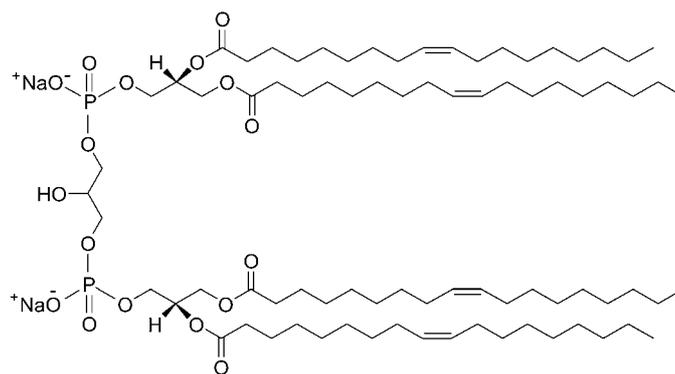


图1 心磷脂的分子结构示意图

Figure 1 Molecular structure of cardiolipin

这些蛋白质的功能得到最有效地发挥, 这种作用是其它任何磷脂都无法取代的. 线粒体中心磷脂含量及分子结构的变异还与多种疾病相关<sup>[1,6,7]</sup>, 如巴氏综合症、心脏功能衰竭、甲状腺功能衰退等. 显然, 心磷脂对线粒体功能的正常发挥有着举足轻重的作用. 研究发现, 心磷脂也是线粒体内膜不同功能态下的拓扑结构变化的主要参与者<sup>[6]</sup>.

不同功能状态的线粒体有两种主要的拓扑结构, 即紧缩态和常态<sup>[6]</sup>. 两态的主要差别是内膜嵴结构形态的不同. 紧缩态时, 线粒体内的基质只有常态时基质体积的 50%, 线粒体的内部空间主要被大量与内膜连接或彼此连通的嵴结构充满, 这时的三磷酸腺苷(ATP)生成系统处于活动状态, ATP 大量生成. 现有研究的主要观点认为: 紧缩态和常态结构的相互转变主要是通过内膜的分裂与融合来实现的, 而蛋白质的调制作用保证了这一过程的实现, 已发现的与线粒体内膜形态转变相关的蛋白质有 tBid, 腺嘌呤核苷酸转位子(ANT), ATP 合成酶和 Mitofilin 等<sup>[6]</sup>, 它们通过调制与其结合的脂质内膜的组装弧度来实现膜结构的转变, 而与这些蛋白质结合的脂质主要是心磷脂.

构成生物膜连续基底的磷脂组分对膜形态的直接调制, 与膜上蛋白对膜形态的间接调制, 两者的作用孰轻孰重, 目前尚无定论. 但是, 在细胞复杂的生理环境中, 除蛋白质之外, 环境因子对线粒体内膜形态变化的潜在影响是不可忽略的. 研究者们<sup>[3-5,8]</sup>已分别从电解质溶液的离子种类、价态、浓度、pH 值以及温度等方面, 借助 DSC, XRD, NMR 等技术, 较为精确地检测了心磷脂组装产物的相结构特点, 其中, 层状相和反六角相是心磷脂存在的两种主要相态, 对形成这两种相态各自所需的条件也已做了较为全面的研究. 但遗憾的是, 这些结果都是基于对心磷脂膜悬浮液的整体性质的研究, 其中相态的改变也不涉及空间约束的影响, 与真实线粒体内膜功能态改变的对应关系不够确定, 除相结构外, 对心

磷脂组装产物的整体形态及性质也仍然知之甚少.

本文的目的是研究电解质溶液中盐浓度改变对心磷脂构成的囊管结构稳定性的影响. 囊管结构, 即同中心多层管状囊泡(myelin)<sup>[9]</sup>, 是心磷脂干膜在水合时自发形成的一种亚稳态结构, 其结构特点与线粒体内膜功能态变化时受到的空间限制和物质交换制约相似. 通过溶剂自然蒸发与微操注射浓溶液两种途径, 我们原位研究了囊管结构的形态在离子浓度缓慢改变与急剧改变两种方式下发生的演化. 实验发现, 盐浓度的这两种变化途径都将导致该结构出现皱缩, 但皱缩响应速率和形成的产物结构却有差别. 不同的初始水合盐浓度, 在水分自然蒸发实验中出现皱缩所需的等待时间也不同. 随着浓度的变化, 皱缩现象会可逆地出现或消失.

## 1 实验部分

### 1.1 实验药品

心磷脂(从牛心中提取, 原始状态为  $4.7 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的甲醇溶液)购于美国 Sigma 化学公司(Sigma, USA); 甲醇购于上海振兴化工一厂, 氯仿购于上海菲达工贸有限公司和桥分公司, 两者均为分析纯. NaCl 购于上海精析化工科技有限公司, 分析纯. 所有上述样品使用前均未经进一步纯化.

### 1.2 实验药品

从试样瓶中取一定量  $4.7 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的心磷脂甲醇原液, 置于真空烘箱中,  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  下干燥 3 h, 除去残留的甲醇, 然后溶于  $V(\text{氯仿}) : V(\text{甲醇}) = 9 : 1$  的混合溶剂中, 配成  $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的原液, 保存于  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ , 备用.

硅烷化载玻片预先用超纯水(Milli-Q)水清洗, 擦拭干净后, 将玻片置于  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  的显微镜热台上, 取  $1 \text{ } \mu\text{L}$  上述原液滴于玻片上, 让溶剂挥发, 20 min 后以  $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  的速度降温至  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , 然后在干膜上滴加  $3 \text{ } \mu\text{L}$  的 NaCl

溶液,使心磷脂完全浸没在电解质溶液的亚相中.实验中,根据需要,还可用显微操作仪在选定的囊管周围注入适量选定的盐溶液,实现对其周围环境的调制.

### 1.3 实验仪器

实验观察主要在蔡司 Axiovert 200 倒置显微镜(Zeiss, Jena, Germany)上进行.物镜为平场复消色差微分干涉相差镜头,数值孔径为 0.6,工作距离为 1.5 mm.载物台上配有 Linkam 公司的 PE100ZAL 热台(Linkam, England),精确度为 0.1 °C.实验结果由冷制 CCD Xplorer™ Monochrome 记录(Spot, Xplorer™, USA),图像分析由 CCD 自带的软件(Spot advanced)处理.主要辅助设备是 Narishige IM-9C 显微操作仪(Olympus-Narishige, Japan),可进行定点微量注射.

囊泡膜表面电势的测量在电位仪(Malvern DTS1060, England)上于 50 °C 下进行.测试前样品热平衡 2 min.

## 2 实验结果

0.005~0.37 mol·L<sup>-1</sup> 的 NaCl 溶液滴加到心磷脂干膜后,膜的四周一圈会长出很多囊管结构.大部分囊管滞留一段时间后就回缩到基膜中,但体系中依然会存在少量不发生回缩的囊管,这些囊管结构的稳定性就是我们的主要研究对象.通过 NaCl 溶液浓度的缓慢和急剧改变两种途径,观察研究电解质浓度变化对囊管结构的影响.

### 2.1 电解质浓度缓慢变化——水分自然蒸发

侧向显微镜下观察可见,心磷脂干膜水合时,液滴在基膜上方形成一个稳定的球冠状水层,见图 2(a),水层暴露于空气中,水分会缓慢地不断蒸发.在此蒸发过程中,球冠状液层的高度随之下降,而液层与玻璃基底的接触面积却保持不变.因液滴很小,当初始水合液滴的体积一定时,NaCl 溶液的浓度对水合液滴完全蒸发所需时间的影响很小.若以底面直径不变、高度线性减小的球冠模型来描述水层在蒸发过程中体积的变化,球冠体积就可以表示为:

$$V = \frac{\pi}{6} \left( h_0 - \frac{h_0}{t_0} t \right) \left[ 3a_0^2 + \left( h_0 - \frac{h_0}{t_0} t \right)^2 \right] \quad (1)$$

其中,球冠的起始高度  $h_0$ ,球冠与基底的接触面半径  $a_0$ ,水分完全蒸发所需的时间  $t_0$ .根据水层体积的变化,可计算出对应的 NaCl 溶液浓度,图 2(b)给出了四种典型初始 NaCl 溶液浓度体系的计算结果,由图中可见,每一个体系中的浓度变化都是先经历一段较缓慢的线性增长阶段,然后才快速升高的.而且,初始溶液的 NaCl 溶液浓度越低,线性变化阶段就越长,整个过程的浓度变化也就越缓慢.

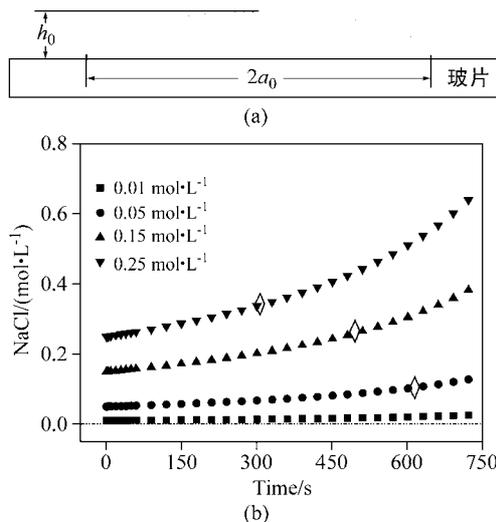


图 2 敞开体系中溶液浓度随时间的变化

Figure 2 Changes of electrolyte concentration with time in the solvent evaporation system

(a) The cross-section of the coronary hydration droplet on a dry lipid film.  $a_0$  is the radius of the contact surface between the solution and the substrate.  $h_0$  is the initial height of the coronary solution; (b) The calculated concentrations in four systems with the typical initial electrolyte concentration: 0.01, 0.05, 0.15 and 0.25 mol·L<sup>-1</sup>, respectively. During the process of the solvent evaporating, the system concentration rises with time. In the calculation according to Eq. 1,  $h_0=0.55$  mm,  $a_0=1.85$  mm, and the evaporating time of 3  $\mu$ L solvent  $t_0=1200$  s. The markers  $\diamond$  on each curve stands for the average time needed for myelin crimping in each system

在这种水分自然蒸发的液滴体系中,随着时间的推移,体系中的囊管结构随之出现了皱褶和波纹.通常,起皱现象总是首先出现在囊管水合液层中靠外侧的那些膜上,然后,沿着指向液滴中心的方向,囊管各层依次先后发生起皱.这类起皱的过程大多是先在原本透光均一的囊管结构中出现肉眼可分辨的水层,以及波浪形扭曲的膜层结构.图 3 是一组这类囊管结构随时间演化的典型过程.其中,在图 3(a)中可见到多根囊管存在,但到了图 3(b),只剩下一根,其余都发生了回缩.

接着,这根剩下的囊管先沿着管长方向出现清晰的水层,被该水层包裹的轴心膜管逐渐发生波浪形的整股扭曲,类似于常见的层状结构在长度不足、伸展受限时而出现的弯曲折叠的现象.此时,虽然囊管结构内层的管状结构已经整体扭曲成波纹状,但是外层结构仍是均匀规则的.随着体系中水分的继续蒸发和溶液中盐浓度的进一步升高,囊管中水层外侧的层状结构上也出现了微小的波浪样皱褶,而且还伴随着膜的局部分层,使原来均匀的层状结构中出现新的较细碎的水层,囊管的外表面也变得不光滑起来(图 3d).比较图 3d 和图 3f,还可发现囊管结构发生了轻微的缩短和增粗.同时,囊管的柔软性和活动性降低,最后,整个结构如同凝固了一般.在相衬光学显微镜下,起皱后的囊管亮度不均匀.

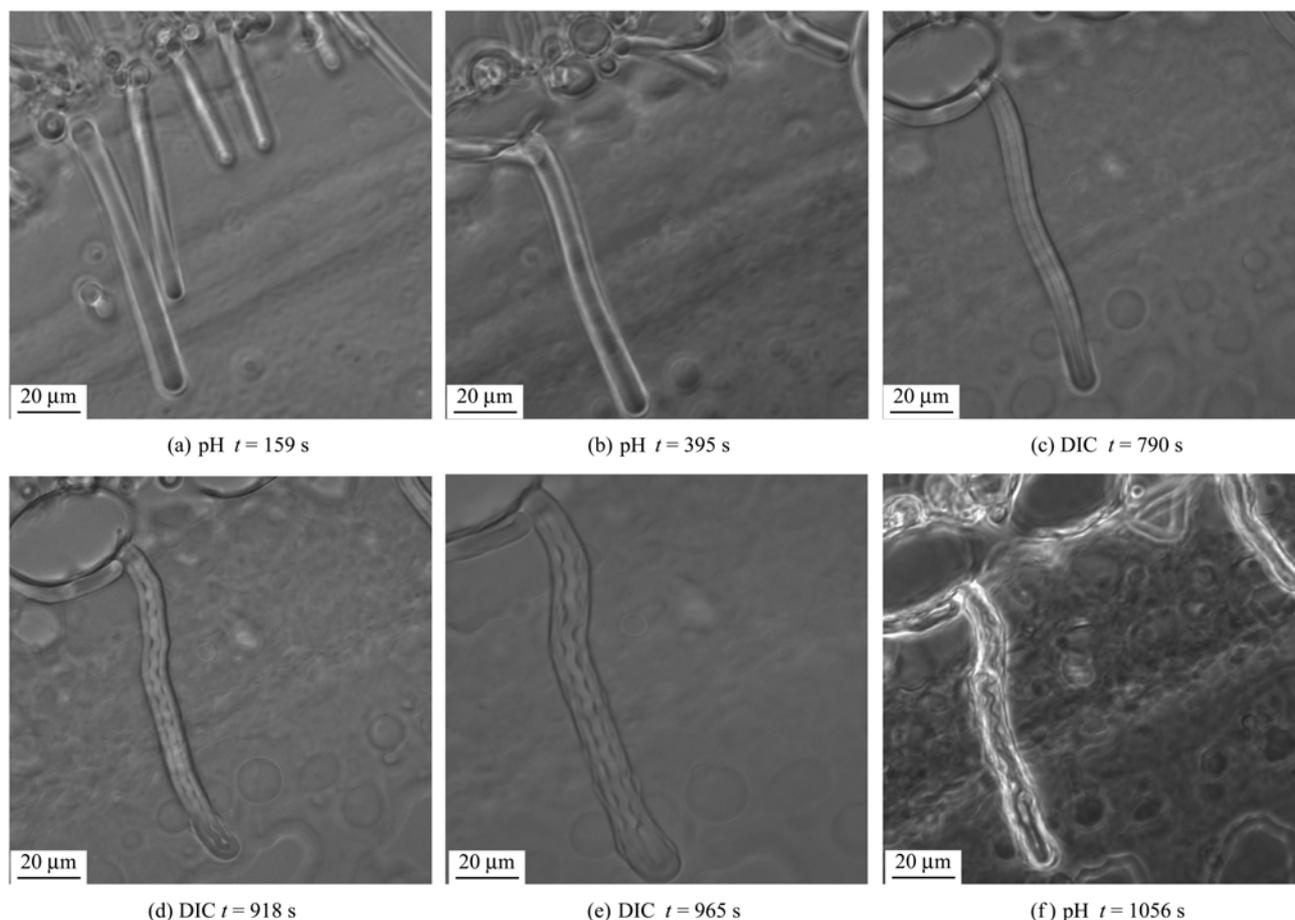


图3 溶剂自然蒸发体系中囊管结构随时间起皱的变化过程

Figure 3 Crimpling process of myelin figure with time in the solvent evaporation system

The initial electrolyte concentration is  $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . The scale bar is  $20 \mu\text{m}$ . pH means the photos were taken by phase contrast microscopy; and DIC means the photos were taken by differential interference contrast microscopy. The time marked on each photo is counted from the moment when the solvent droplet contacts with the dry membrane

不同初始浓度的水合盐溶液中, 囊管结构起皱现象出现的时间不同. 以液滴与干膜水合的瞬间为时间起点, 以体系中刚开始出现起皱现象的时刻为时间终点, 从起点到终点所经历的时间即为该初始盐浓度下发生囊管起皱所需的等待时间. 图4分别给出了初始溶液浓度为  $0.05$ ,  $0.15$  和  $0.25 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时体系中出现皱褶所需的等待时间的统计结果. 可见, 随着水合溶液初始盐浓度的降低, 起皱出现所需的时间逐渐增加, 并且与初始水合盐浓度成线性关系. 但在  $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  甚至浓度更低的水合盐溶液中, 我们始终没有观察到囊管发生起皱.

将图4的实验数据与图2b的计算结果相比较, 见图2b上的 $\diamond$ 标记, 这些 $\diamond$ 标记恰好落在各对应曲线盐浓度偏离线性变化的转折点之后. 根据咖啡滴蒸发模型的原理<sup>[10]</sup>, 我们的球冠状水层在水分蒸发的过程中, 溶液中的离子也会发生沿着底部由中心向外缘的迁移扩散, 使液层中的外侧盐浓度高于中心部位, 因此, 囊管的起皱

现象总是最先出现在水层的边缘处.

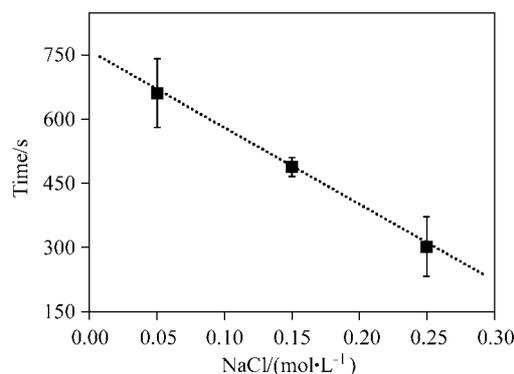


图4 囊管的平均起皱时间与初始水合溶液浓度的关系

Figure 4 Relation between the average time needed for myelin crimpling starting and the initial electrolyte concentration of the solution

Each data point in the figure is the arithmetic mean of the results from five individual observation, and the error bar is the average deviation.

## 2.2 电解质浓度急剧变化——微操原位注射高盐溶液

为了比较盐浓度的改变幅度与速率对微结构变化的影响,我们借助显微操作仪,在选定的囊管结构附近原位注入微量的高盐溶液,以使其周围的局部浓度瞬间升高.以  $0.15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的初始 NaCl 溶液中生长的囊管为例,在水分蒸发导致囊管起皱的现象发生之前,向其附近注入极微量的  $0.55 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 NaCl 溶液,观察记录结构的变化.多次实验结果显示,高盐溶液加入到囊管附近后,目标囊管会出现两种现象,即要么快速回缩到基膜中,要么出现起皱.其中,起皱现象占实验次数的 70%~80%.有些囊管在起皱的同时还会出现明显的长度缩短.如图 5 中的囊管,从图中结构变化的时间历程看,囊管的收缩过程很快,而且起皱和形变严重,团缩后的结构表面粗糙.由于显微注射的量很微小,使得周围的其它囊管所处的环境没有很大的浓度变化,因而也没有观察到相应的皱缩现象.

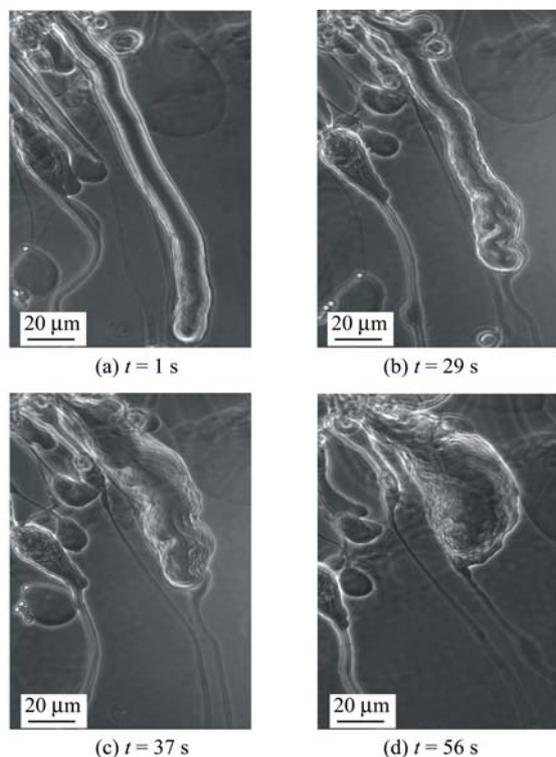


图 5 微操注射体系中囊管结构随时间的变化过程

Figure 5 Crimple process of myelin figure in the micro-injection system

The initial electrolyte concentration is  $0.15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , and the electrolyte concentration of micro-injected solution is  $0.55 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . The scale bar is  $20 \mu\text{m}$ , and the time on each photo is counted from the moment when the micro-injection performed

为了区分微操注入高盐溶液时盐浓度影响与水流扰动及渗透压影响之间的相互干扰,我们分别做了两组参比实验.第一组参比实验中,我们以相同的注射条件和注射量,用同样的方法在囊管结构附近加入与初始水

合溶液同浓度的盐溶液,结果在相应时间内没有发现起皱现象,说明水流扰动并不会导致囊管的起皱.而在第二组参比实验中,我们用相同的方法和实验条件在囊管结构附近加入高浓度的蔗糖溶液,发现目标囊管会出现收缩或变形等现象,而且这些现象发展得很缓慢,但并没有起皱现象出现.蔗糖分子由于体积较大,不容易穿越磷脂膜,因而会在磷脂膜内外形成浓度梯度,使囊管的渗透压增加.可见,渗透压可以使囊管收缩或变形,但不能使其出现起皱现象.

## 3 讨论

在  $0.005\sim 0.37 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的浓度范围内,用任意浓度的 NaCl 水溶液去水合心磷脂干膜,总能得到平整光滑的心磷脂层状相<sup>[11]</sup>,即囊管结构.当溶液中的水分自然蒸发时,在盐浓度线性增加的阶段,目标囊管的结构没有明显的改变,说明实验所用的初始水合盐浓度不仅适合心磷脂形成层状相,同时还由于带电膜与盐溶液之间动态界面<sup>[12,13]</sup>的存在,已形成的层状结构在盐浓度缓慢线性变化的阶段仍能保持稳定.但是,当盐溶液的浓度增长加速至偏离线性轨迹后,即图 2b 中  $\diamond$  标记的浓度附近,带电膜周围的离子密度随之迅速增多,使动态界面层失衡,部分钠离子与心磷脂的极性头部结合<sup>[14,15]</sup>,膜表面的电势升幅也加大.图 6 是不同盐浓度下心磷脂囊泡表面的 Zeta 电势的测量值.由图可见,随着溶液浓度的增加,膜表面的电势是逐渐升高的,而且,相同的电势改变量,在低浓度区所对应的浓度变化量远小于高浓度区对应的浓度变化量.结合图 2(b),图 4 的结果便得以解释,即:初始水合液浓度不同的体系中,起皱现象的出现与膜表面的电势变化量有关.虽然同样的电势变化量所需的盐浓度的增加量,随初始浓度的增加而增加,但由于自然蒸发体系中高盐溶液体系的浓度增加更迅速,因而等待的时间更短.

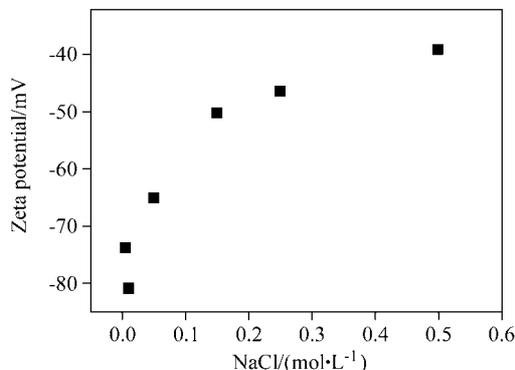


图 6 心磷脂囊泡表面的 zeta 电位与盐浓度的关系

Figure 6 Relation between the zeta potential on the surface membrane of cardiolipin vesicle and the electrolyte concentration of the solution they exist in

在干膜水合液的体系中, 那些直接与溶液接触的囊管结构外表层心磷脂将最先感受到溶液中离子强度增加的变化. 随着膜表面有效带电性的下降, 分子头部间静电排斥作用减弱, 分子间的氢键相互作用加强<sup>[16]</sup>, 分子头部采取更致密的方式排列, 使得每个心磷脂分子所占的横向面积减小. 另一方面, 膜表面的带电性下降也会使膜的通透性改善, 水分子透膜扩散的可能性增加. 在盐浓度升高造成的囊管内外渗透压增加的共同作用下, 其内部的水分子更多地透过膜进入到外部环境中, 造成内部的水层体积减小. 结果, 囊管内部水层体积的减小与外膜心磷脂分子排列增密导致的表面积减小共同作用, 使得整个结构发生轻微的收缩, 如图 3 所示.

囊管结构内部水含量减少将导致其内部膜环境中盐浓度的微量升高, 虽然这一增量不足以明显改变内部膜的分子排列密度, 却足以使层间的静电排斥作用减弱. 一般认为, 双分子层的膜间相互作用  $\Pi_{\text{tot}}(d_w)$  由四个部分组成<sup>[15]</sup>:

$$\Pi_{\text{tot}}(d_w) = \Pi_{\text{hydr}} + \Pi_{\text{und}} + \Pi_{\text{vaw}} + \Pi_{\text{ele}} \quad (2)$$

其中,  $d_w$  为双分子层与层之间的水层厚度;  $\Pi_{\text{hydr}}$  与  $\Pi_{\text{vaw}}$  分别为近程水合排斥力与远程范德华吸引力.  $\Pi_{\text{und}}$  是膜热涨落的 Helfrich 排斥力:  $\Pi_{\text{und}} \propto \frac{1}{\kappa_c d_w^3}$ , 其中  $\kappa_c$  是膜的弯曲模量, 它随分子间静电排斥作用的下降而减小<sup>[15]</sup>, 可见膜的热波动效应会随着盐浓度的增加而逐渐突显出来<sup>[18]</sup>.  $\Pi_{\text{ele}}$  是带电膜之间的静电排斥力, 与膜表面的静电屏蔽长度  $\lambda_D$  相关:  $\Pi_{\text{ele}} \propto \exp(-d_w/\lambda_D)$ , 由于  $\lambda_D$  随盐浓度升高而减小, 因而静电排斥力也相应减小. 当上述囊管内部溶液浓度增加引起  $\Pi_{\text{ele}}$  减小时, 层与层之间的水层厚度  $d_w$  也需要相应地减小, 以保持层间相互作用的平衡.  $d_w$  的减小及  $\kappa_c$  的减小都有助于  $\Pi_{\text{und}}$  增大, 达到一定程度时, 膜的热波动效应将不可忽略. 这时, 膜通过随机波动涨落将层间多余的水集中在局部区域, 以部分缓解膜间相互作用的失衡. 与此同时, 受外层膜收缩挤压的作用, 膜的这种随机波动涨落因空间受限而被保留, 最终形成显微镜下可分辨的膜分层现象, 见图 7 的示意图(a)及实际的囊管结构分层照片(b). 膜的这种波纹起皱现象在类似实验条件的 -1 价带电磷脂体系中也能观察到, 但在中性磷脂体系中却未发现.

由于囊管结构形成时, 水是从其根部进入其各层膜之间的<sup>[19,20]</sup>, 如果囊管的根部存在膜的折叠缺陷(这样的囊管通常难以发生回缩), 则其内部就有可能存在与外界直接连通的水通道. 实验中也较多地观察到带有明显水层的囊管, 如图 3. 随着外界溶液中离子浓度的增加, 水通道内的溶液浓度也会相应改变, 使水通道和外

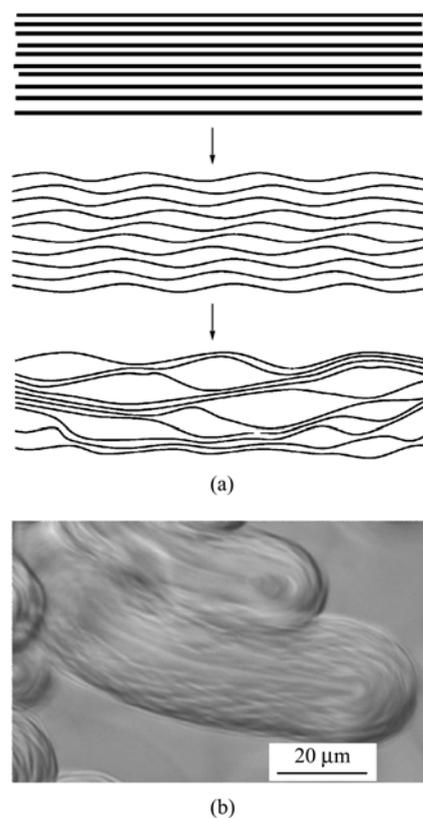


图 7 水分自然蒸发条件下电解质浓度变化造成的膜的起皱  
Figure 7 Crimple of membrane induced by increasing electrolyte concentration under the condition of solvent evaporation in system

(a) Scheme of the mechanism of the myelin crimple; (b) the photo of crimple myelin in the evaporation system, the scale bar is 20  $\mu\text{m}$

界溶液之间的膜层两侧都受到浓度变化的影响, 两侧膜的排列同时增密. 膜的通透性增加及渗透压增大又都使得排入水通道内的水量逐渐增加, 水通道变得清晰可见, 见图 3c. 囊管中这部分膜的收缩结果使得其包裹部分的体积减小, 被水通道环绕的那部分中心膜管被迫出现扭曲, 见图 3d 和图 3e. 图 8a 的示意图描述了外膜收缩后内膜弯曲的状态. 同时, 因水通道内的盐浓度变化与外部环境基本一致, 其被水通道包裹的中心膜管与根部无缺陷的囊管的变化情况类似, 随后也出现因随机波动涨落造成的膜分层现象, 见图 3f.

但是, 在浓度极低的水合盐溶液中, 如小于  $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 水分蒸发造成的盐浓度增加及陡增现象都很微小, 由计算得知, 溶液中盐的离子的绝对数目小于磷脂所带的电荷数, 因此, 双分子层膜的刚性始终比较高, 热波动效应因过于微弱而被掩盖, 起皱现象就不会出现.

以上关于水分自然蒸发实验的结果分析表明, 体系溶液的浓度缓慢改变时, 囊管结构内多层膜管上的各分子层所受到的膜压力是通过热涨落调整而达到协调形变的, 这使得心磷脂分子已经形成的层状规则排列结构

不至于被破坏. 与此相反, 当用微操局部注射高盐溶液时, 瞬间加入的高浓度盐溶液受浓度梯度的驱动, 会迅速向囊管的四周扩散, 除了有一部分离子可能会从其根部的缺陷处进入囊管内部<sup>[19,20]</sup>, 大多数离子主要与囊管的表层发生强烈作用, 作用的结果可能使膜表面的局部被撕裂<sup>[21,22]</sup>或者是在其表面形成  $H_{II}$  反转相的通道, 使离子能够快速进入到结构的内部, 同时, 囊管内部的一些水分子也可能会反向流出. 这时, 囊管内部分子头部间的氢键作用会有一个明显的加强, 分子的倒圆锥状几何效应也更加明显<sup>[4,23]</sup>, 使相邻膜层在较强的波动涨落过程中发生局部膜的结构重组, 见示意图 8b, 形成包裹水滴的反转隔离区间, 即原囊管结构的内部形成了一些隔离区, 局部结构很可能转变为不规则的海绵相或六角密堆相结构. 有关心磷脂在 NaCl 溶液中由层状相向反转六角相转变的事实, Powell 与 Marsh 等<sup>[4]</sup>曾用 XRD 和  $^{31}\text{P}$  NMR 检测证实过, 但他们用的溶液浓度较高, 为  $1\sim 2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 NaCl 溶液.

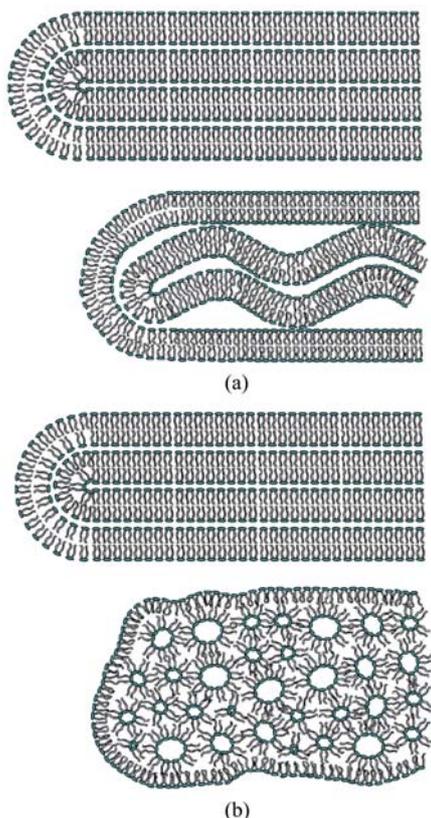


图 8 两种盐浓度改变条件下囊管结构中分子排列随盐浓度改变而改变的示意图

**Figure 8** Scheme of cardiolipin self-assembled structures in the two different methods

(a) the inner membrane of myelin folded like crimple when the electrolyte concentration increases slowly in the solvent evaporation system; (b) when the electrolyte concentration rises suddenly, the inner lamellar structure of myelin figure may rearrange and transform into the inversed hexagonal phase  $H_{II}$  or random structure in the micro-injection system

虽然囊管内部的结构变化很复杂, 但最外层膜由于与水溶液直接接触, 为了保护疏水的尾链, 分子间仍以层状紧密堆积为主, 只是整个表面随内部结构的起伏变形而不再光滑. 相衬显微镜下, 整个囊管的亮度不均匀反映其内部结构上的不均匀. 同时, 由于囊管结构的内部已由层状相转变成无序的类似海绵相的结构, 使膜的波动性及整个结构的形变能力都受到很大的限制, 因此, 如图 5d, 后期观察到的团状结构就如同被凝固了一样.

更有趣的是, 无论是盐浓度缓慢变化还是急剧变化, 所形成的起皱囊管结构在溶液浓度被重新稀释后, 皱褶现象均会消失, 而且结构还可恢复到最初平滑膜的相状态, 说明起皱现象是一种可受盐浓度调控的可逆过程. 几年前曾有报道<sup>[24]</sup>发现温度可以调控囊管的起皱, 现在的发现是盐浓度也可以调控囊管起皱.

#### 4 结论

上述实验表明, 即使没有蛋白质对膜曲率的调制作用, 仅仅是盐溶液浓度骤变的刺激也能引起心磷脂膜的组装形态的改变. 实验发现, 生长以后不易发生回缩的囊管结构基本不受水流扰动和单纯渗透压改变等因素的影响, 但却会因环境溶液中盐浓度改变造成的膜电势增幅加大而发生形态与结构的改变. 当盐溶液的浓度缓慢增长时, 囊管的层状结构基本保留, 但整体出现轻微的收缩, 内部的膜出现波纹状扭曲变形及膜与膜之间的分层. 而当盐溶液的浓度突然大幅增加时, 大量离子与心磷脂快速作用, 使得心磷脂的倒圆锥形分子构型效应凸显, 囊管结构很可能快速地由层状相转变为六角密堆积或不规则的海绵相结构. 从显微镜下看, 形变后的囊管内部的结构不均匀, 存在孔隙, 整个结构的柔软性降低. 皱缩的发生还与膜表面的电势变化有关, 是可受浓度调控的可逆过程.

#### References

- Schlame, M.; Rua, D.; Greenberg, M. L. *Prog. Lipid Res.* **2000**, *39*, 257.
- Rand, R. P.; Sengupta, S. *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, *225*, 484.
- Seddon, J. M.; Kaye, R. D.; Marsh, D. *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, *734*, 347.
- Sankaram, M. B.; Powell, G. L.; Marsh, D. *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *980*, 389.
- Rainier, S.; Jain, M. K.; Ramirez, F.; Ioannou, P. V.; Marecek, J. F.; Wagner, R. *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *558*, 187.
- Mannella, C. A. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1763*, 542.

- 7 Houtkooper, R. H.; Vaz, F. M. *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 2493.
- 8 Dekruiff, B.; Verkley, A. J.; Vanechteld, C. J. A.; Gerritsen, W. J.; Mombers, C.; Noordam, P. C.; Degier, J. *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *555*, 200.
- 9 Dave, H.; Surve, M.; Manohar, C.; Bellare, J. J. *Colloid Interface Sci.* **2003**, *264*, 76.
- 10 Deegan, R. D.; Bakajin, O.; Dupont, T. F.; Huber, G.; Nagel, S. R.; Witten, T. A. *Nature* **1997**, *389*, 827.
- 11 Lin, M.-Y.; Li, L.; Qiu, F.; Yang, Y.-Y. *Acta Chim. Sinica* **2007**, *65*, 1285 (in Chinese).  
(林美玉, 李莉, 邱枫, 杨玉良, 化学学报, **2007**, *65*, 1285.)
- 12 Zemb, T.; Belloni, L.; Dubois, M.; Aroti, A.; Leontidis, E. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2004**, *9*, 74.
- 13 Kabalnov, A.; Olsson, U.; Wennerstrom, H. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 6220.
- 14 Aroti, A.; Leontidis, E.; Dubois, M.; Zemb, T. *Biophys. J.* **2007**, *93*, 1580.
- 15 Leontidis, E.; Aroti, A.; Belloni, L.; Dubois, M.; Zemb, T. *Biophys. J.* **2007**, *93*, 1591.
- 16 Lewis, R.; McElhaney, R. N. *Biophys. J.* **2000**, *79*, 1455.
- 17 Saveyn, P.; Van der Meeren, P.; Cocquyt, J.; Drakenberg, T.; Olofsson, G.; Olsson, U. *Langmuir* **2007**, *23*, 10455.
- 18 de Vries, R. *Phys. Rev. E* **1997**, *56*, 1879.
- 19 Buchanan, M.; Egelhaaf, S. U.; Cates, M. E. *Langmuir* **2000**, *16*, 3718.
- 20 Haran, M.; Chowdhury, A.; Manohar, C.; Bellare, J. *Colloids Surf. A* **2002**, *205*, 21.
- 21 Umeda, T.; Nomura, F.; Inaba, T.; Takiguchi, K.; Hotani, H. *ChemPhysChem* **2005**, *6*, 1047.
- 22 Eband, R. F.; Martinou, J. C.; Fornallaz-Mulhauser, M.; Hughes, D. W.; Eband, R. M. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 32632.
- 23 Lewis, R.; Zwegtack, D.; Pabst, G.; Lohner, K.; McElhaney, R. N. *Biophys. J.* **2007**, *92*, 3166.
- 24 Arunagirinathan, M. A.; Manohar, C.; Bellare, J. R. *Langmuir* **2004**, *20*, 4318.

(A0811201 Qin, X.; Zheng, G.)