

心磷脂蓝莓类结构的形成和演化

陈燕¹, 李莉¹, 邱枫²

(1. 复旦大学分析测试中心, 2. 高分子科学系, 上海 200433)

摘要 用共聚焦显微镜和光学显微镜研究了 NaCl 溶液中心磷脂蓝莓类结构的形成和演化过程. 研究发现, 在 NaCl 溶液(浓度 0.005 ~ 0.25 mol/L)中, 心磷脂海绵相的表面首先生成半球形的层状相微结构元胞, 并逐渐呈蜂窝状六角密堆积排列. 溶液中 NaCl 浓度的轻微增加驱使层状相与海绵相的界面由表面向海绵相内部扩散, 溶液中微弱流场的存在也会影响微结构元胞的形貌, 最终形成蜂窝样网状结构、蓝莓样包状结构和蓝莓样球状结构, 统称蓝莓类结构. 由于心磷脂在线粒体内膜的拓扑结构转变中具有重要作用, 因此相转变及微结构形态演化的研究有助于进一步理解其在线粒体功能发挥中的作用机理.

关键词 心磷脂; 蜂窝样结构; 蓝莓样结构; 海绵相; 层状相

中图分类号 O631

文献标识码 A

DOI: 10.3969/j.issn.0251-0790.2012.01.032

心磷脂是生物膜中唯一头部带 2 个单位负电荷、尾部含 4 条酰基链的磷脂^[1,2], 其溶胀水合度、亚相环境温度、离子种类与浓度及 pH 值等均可显著影响分子的有效体积, 使之具有典型的结构多型性质^[3~7], 在适当条件下分别呈现出层状相(L_α相)、反六角相(H_{II}相)和海绵相(L₃相)等结构. 在哺乳动物细胞中, 心磷脂主要富集在线粒体的内膜嵴和内外膜的连接处^[1], 在膜脂中所占摩尔分数为 9.2%, 是线粒体内膜拓扑结构转变的主要参与者^[8~10], 对细胞能量的产生起关键作用. 因此, 研究心磷脂在细胞的生理功能中的作用在生物、化学和物理等领域备受关注^[1,3~7,11~14]. 但有关相态的研究大多集中在心磷脂的层状相和反六角相结构上^[6,15~17], 研究者认为与线粒体功能态相关的拓扑结构转变可能与这 2 种相态之间的转变有关, 而关于海绵相相关的转变研究较少. 由于心磷脂海绵相的结构参数非常小, 各向同性且透光均匀, 很难直观研究其动态变化. 在亚相溶液中对离子作用效应的研究主要关注二价离子, 而较少关注一价盐对心磷脂的相行为和自组装行为的影响^[18], 这是因为二价离子的存在有利于反六角相结构的产生, 而一价盐对上述相转变的作用不明显. 但一价盐可通过改变膜表面的双电层结构及静电屏蔽效应来改变膜的弯曲刚性和自发曲率, 尤其在 NaCl 溶液浓度为 0.005 ~ 0.25 mol/L 时, 带电膜的静电相互作用、静电屏蔽效应及膜的弯曲刚性等对一价盐的浓度非常敏感. 而线粒体在发挥功能时的形变及环境离子浓度变化比较复杂, 因此, 阐述一价盐对心磷脂相态和形态的影响很有必要. 本文利用共聚焦显微镜和光学显微镜, 研究了 NaCl 溶液中心磷脂自组装体结构的形成和演化过程. 通过对磷脂的蓝莓类结构及海绵相向层状相转变的成核与生长机理的直观研究, 为研究心磷脂在线粒体拓扑结构转变中可能的组装结构变化提供模型依据.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

心磷脂(Cardiolipin, CL), 美国 Sigma 公司; 德克萨斯红修饰的二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(TR-DPPE), 美国 Molecular Probes 公司; 其它试剂均为分析纯; 实验用水为 Milli-Q 高阻抗纯净水.

Zeiss Axiovert 200 倒置显微镜(德国 Zeiss Jena 公司), 载物台配有 PE100ZAL 热台(英国 Linkam 公司), 精度 ±0.1 °C, 由冷制 Xplorer™ Monochrome CCD 记录(美国 Spot Instr. 公司); Olympus FV1000

收稿日期: 2011-01-25.

基金项目: 国家基础研究专项基金(批准号: 2005CB623800)资助.

联系人简介: 李莉, 女, 博士, 副教授, 主要从事高分子材料和生物膜的显微分析技术研究. E-mail: liyang@fudan.edu.cn

共聚焦荧光显微镜(日本 Olympus 公司),配 He-Ne 激光器.

1.2 实验过程

原始心磷脂样品在真空烘箱中干燥后,用 $V(\text{氯仿}):V(\text{甲醇})=9:1$ 的混合溶剂配成 10 mg/mL 的原液备用. 取 $1 \mu\text{L}$ 原液滴于用 Milli-Q 水洗净的硅烷化载玻片上,于 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 静置 20 min , 制得干膜(直径约为 2 mm 的膜块状物). 然后在恒温恒湿条件(温度 $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 湿度 50%)下,以接触式浸润水合法,用 $3 \mu\text{L}$ 水合盐溶液浸润并完全覆盖干膜. 用倒置显微镜观察心磷脂块状物的脂水表面,记录伴随溶液流场和离子强度改变的脂膜溶胀过程中各种自组装结构的形成和演变过程.

在原液中添加微量 TR-DPPE(质量分数 $<0.3\%$), 在相同实验条件下,用共聚焦显微镜观察记录微结构和演化过程.

2 结果与讨论

2.1 蓝莓类结构的形成

选用 $0.005 \sim 0.25 \text{ mol/L}$ 的 NaCl 溶液水合心磷脂干膜,形成常见的脂水界面囊管结构^[19~23][见图 1(A)]. 与其它磷脂不同,无囊管存在的中间部位出现多个隆起的光滑“鼓包”,大小为几十微米,还有成片的光滑“斜坡”. 这些“鼓包”和“斜坡”在形成初期表现出较大的流动性,如同玻璃表面的水滴,可自发迁移和相互融合. 当 NaCl 溶液浓度 $<0.1 \text{ mol/L}$ 时,与“鼓包”性质相似的光滑“球包”漂浮在脂水界面附近. 若水合体系处于密闭环境中时,上述“斜坡”、“鼓包”和“球包”的表面可维持较长时间不变.

在开放环境中,随着水分的缓慢蒸发^[24],“斜坡”、“鼓包”和“球包”结构将逐渐演化,表面变得不再光滑,按其自组装后的外表形貌依次将这些微结构命名为蜂窝样网状结构[图 1(B)]、蓝莓样包状结构[图 1(C)]和蓝莓样球状结构[图 1(D)].

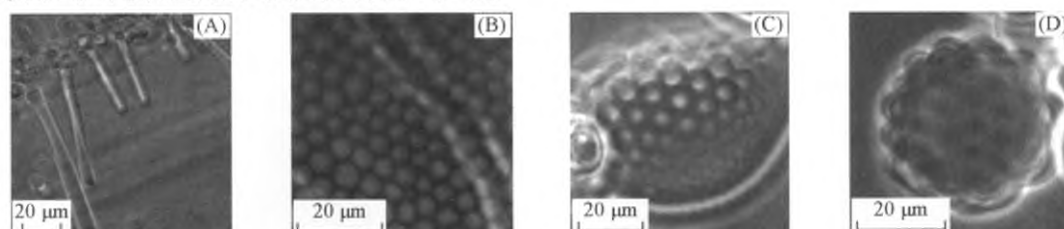


Fig. 1 Four typical self-assembly microstructures in Cardiolipin

(A) Myelin; (B) honeycomb-like structure; (C) raspberry-like dome; (D) raspberry-like sphere.

蜂窝状结构在水合体系界面中分布较多,均由多边形(多数为六边形)的单层囊泡状元胞紧密排列而成. 随着演化的进行,六边形元胞逐渐增大,但并未观察到六边元胞相互间的融合.

蓝莓样包状结构面向水合体系中间部位的一侧一般形成与“斜坡”相似的蜂窝状结构,而另一侧则是露珠状的结构单元,尤其是顶部区域,在相差显微镜下观察非常明显. 2 种结构单元都随时间的延长而增大,直径可增加 $2 \sim 3$ 倍,露珠状结构在后期还会出现膜的分层或分离现象,类似松散的多层囊泡. 图 2 为“鼓包”表面微结构演化的示意图. 图 2(A)展示了水合后的基底上光滑鼓包的原始形貌;图 2(B)~(D)是单个“鼓包”表面微结构的演化过程,元胞直径随时间增大,整个“鼓包”体积也会膨大.

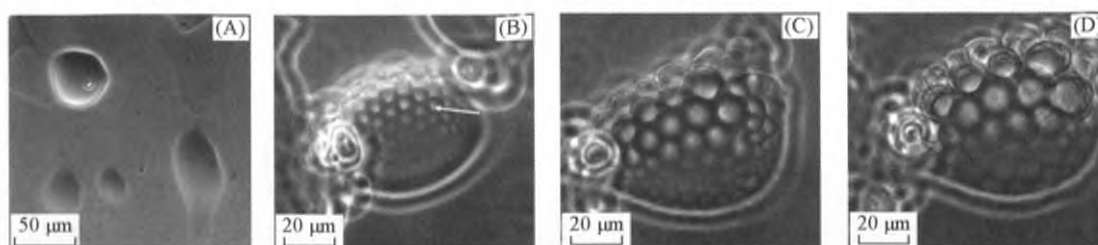


Fig. 2 Evolution of a typical raspberry-like dome in 0.15 mol/L NaCl solution with different time

(A) Start state; (B) $t=0$; (C) $t=222 \text{ min}$; (D) $t=418 \text{ min}$.

蓝莓样球状结构与蓝莓样包状结构不同,但都是空间对称的.最初光滑的球包[图3(A)]表面会同时形成许多微凸的元胞,均匀细密地堆积着[图3(B)],之后元胞逐渐变大,数量减少,但显微镜下能清晰地分辨如露珠状结构的元胞结构[图3(C)].在演化过程中,球包结构维持空间对称,最后,各个元胞结构从外表面一直贯穿到核心[图3(D)],整个球状结构形似一粒熟透的蓝莓.

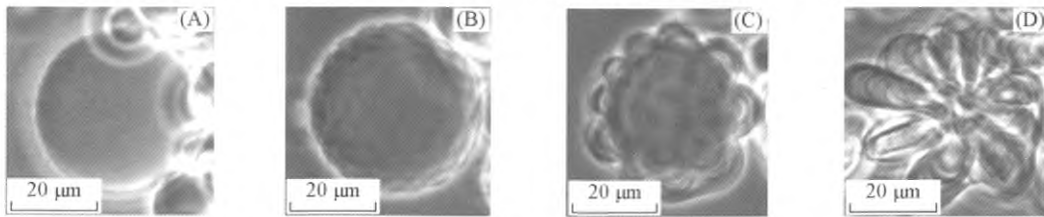


Fig. 3 Evolution of a typical raspberry-like sphere with different time

The NaCl concentration is 0.01 mol/L. t/min : (A) 0; (B) 8; (C) 37; (D) 46.

2.2 蓝莓类结构形成的机理

在相差显微镜下观察发现,“斜坡”、“鼓包”和“球包”的流动性较好,衬度都很小,透光均匀.在偏光模式下,均不具有密堆积层状相常有的正交花纹;在荧光模式下,结构内部图像均匀.因此,初始形成的“鼓包”、“斜坡”和“球包”结构具备了典型的各向同性的空间双连续海绵相的特征.

随着实验的进行,上述3种结构会发生不同程度地向蓝莓类结构的演化,脂水界面的心磷脂表面首先出现透光差异,可观察到微结构元胞的生成.共聚焦层切图(图4)清晰地显示了蜂窝样网状结构和蓝莓类鼓包结构内部的元胞细节.可以看到,层状结构从均匀密实的海绵相脂堆中逐层剥离成核,向侧面扩展生长.其中,蜂窝样结构的元胞多为单层[图4(A)];而蓝莓类结构上的露珠状元胞则为多层[图4(B)],图中*所示位置恰好为该元胞结构的成核生长点.位于外层的层膜,侧向生长得较大,并且鼓起呈珠状.相邻成核的元胞彼此相遇,最外层的层膜在垂直于界面的方向上紧密相贴,构成2个单元结构间的隔离墙(图4中箭头),如同2个紧挨着的囊泡,因此不会轻易融合.

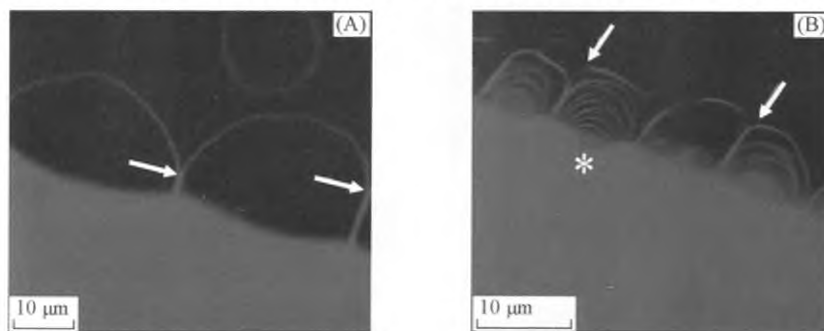


Fig. 4 Nucleation and growth of lamellar phase on the surface

(A) Honeycomb-like structure; (B) raspberry-like dome.

海绵相向层状相转变的两相界面随着实验的进行由表面向内部逐渐扩散.图5为由微分干涉差显微镜记录的蓝莓样包状结构的两相界面的扩散过程.由图5(A)可见,转变初期表面仅为简单的珠泡结构,两相界面基本保持原表面;经过274 s后,珠泡明显长大,内部出现清晰可辨的多层结构[图5(B)];在493 s时,海绵相与层状相之间界面清晰[图5(C)中箭头所指],相对于转变初期,界面已向内部扩散.界面以内的海绵相依然保持均匀密实的状态,界面以外的层状相则比较松散,层状相生成物分布在海绵相周围,而且露珠状元胞所在的一侧更宽些,说明这一侧层状相的转变较另一侧快而且容易[图5(D)].

蜂窝样网状结构与蓝莓样包状结构上微结构元胞的差异(图4)及蓝莓样包状结构上的结构转变不对称性(图5),都具有很强的位置相关性,可以推断与水流的剪切扰动相关.根据经典的咖啡滴形成原理^[25],随着溶剂的蒸发,开放的水合体系中溶液将不停地从中央向四周流动,形成一个微弱的辐射状流场,体系中初始形成的“斜坡”、“球包”和“鼓包”受到的流体压力和剪切力作用不相同^[26].迎着

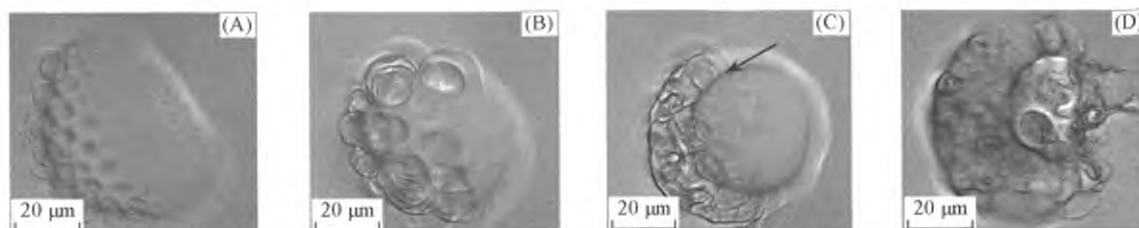


Fig. 5 Moving of the interface between two phases in 0.15 mol/L NaCl solution with different time t/s : (A) 0; (B) 274; (C) 493; (D) 557.

水流的区域,正面的流体压力的作用将使结构转变受抑,层状相生长变得很缓慢,使新形成的微结构元胞为单层或寡层,如“斜坡”及“鼓包”朝向中心一侧的结构形貌。而“鼓包”结构上背向水合体系中间部位,即顺着水流剪切力的一侧,正面受到的水流压力小,有利于海绵相向层状相的转变,而且被剪切,从而形成露珠状结构。独立“球包”结构,由于可在脂水界面附近漂浮滚动,各个部位主要感受水流剪切力的作用,所以表面微结构元胞逐渐隆起成露珠状,并且具有空间对称性。因此,溶液中溶剂蒸发形成的微弱流场虽然非常微弱,但却足以影响元胞结构最终的表面形貌。

研究结果表明,以上蓝莓类结构的形成在心磷脂的一价盐溶液中进行,而且在开放的水合体系中才能被观察到。溶剂蒸发快一点,微结构元胞的形成就会早一些。若一价盐(Na^+)水合体系处于封闭状态时,即溶剂蒸发缓慢时,“斜坡”、“鼓包”和“球包”表面上就不能观察到蓝莓类结构的形成,至多能观察到初始的蜂窝样网状结构,而且出现得很晚,演化也很慢。而同样实验条件下的心磷脂二价盐(Ca^{2+})水合体系中,显微镜下完全未观察到类似的结构现象。因此, Na^+ 离子的存在及其一定速率的浓度变化是这种奇特的蓝莓类结构形成的关键。

在0.005~0.25 mol/L的NaCl溶液中,由于分子极性头部间的静电排斥作用,使海绵相表层脂分子的有效形体更接近柱状,脂水界面上首先形成很薄的层状相外壳。而当 Na^+ 离子的静电屏蔽作用增强时,海绵相的孔径也将因 Na^+ 离子的静电屏蔽作用而趋于减小,迫使海绵相结构中多余的水分排向脂水界面处,使表面壳层与海绵相相互剥离,宏观上看就是元胞的成核与侧向生长,而剥离后的海绵相表面又会形成新的层状相壳层[图4(A)]。如果这时体系中NaCl浓度保持恒定,膜表面的双电层将稳定不变,心磷脂体系的微结构也会基本稳定不变,如密闭体系中只观察到多边形蜂窝样结构。但当溶剂缓慢蒸发时, Na^+ 离子浓度的增加导致双电层的变化,反离子层的分布也相应发生变化,扩散层增厚,引发新的相结构转变。如此反复,就构成了层状相的持续成核与生长。而 Na^+ 离子在负电势的膜表面形成静电屏蔽层,也降低了膜的刚性模量,使膜的波动性增加^[27~29],更有利于层状相膜的生长和形变。在二价盐溶液中,二价离子的存在加强了分子极性头部间的结合,只会导致反转的反六角相结构出现。

综上所述,心磷脂蓝莓类结构的形成源于心磷脂的结构多型性。在0.005~0.25 mol/L的NaCl溶液中,心磷脂可以发生由海绵相向层状相的相结构转变。转变机理是层状相从海绵相表面成核并侧向生长,各生长微结构元胞相遇后排列成了表面呈多边形的蜂窝样网状结构。当心磷脂水合体系处于开放状态时,NaCl浓度的轻微增加驱使了相转变由表及里的继续进行,而溶液蒸发流动对脂水界面造成的剪切流场和流体压力共同调制着层状相微结构元胞的最终形貌,使初始的“斜坡”、“鼓包”和“球包”分别形成奇特的蜂窝样网状结构、蓝莓样包状结构和蓝莓样球状结构。心磷脂在室温下生理盐水浓度附近的相结构转变和形态变化的研究将有助于理解心磷脂在线粒体功能发挥中的作用机理。

参 考 文 献

- [1] Schlame M., Rua D., Greenberg M. L. Prog. Lipid. Res. [J], 2000, 39: 257—288
- [2] Allen C. M., Muth J. D. Biochemistry [J], 1977, 16: 2908—2915
- [3] Seddon J. M., Kaye R. D., Marsh D. Biochim. Biophys. Acta [J], 1983, 734: 347—352
- [4] Mandersloot J. G., Gerritsen W. J., Leunissen-Bijvelt J., VanEchteld C. J. A., Noordam P. C., deGier J. Biochim. Biophys. Acta

- [J], 1981, **640**: 106—113
- [5] Tarahovsky Y. S., Arsenault A. L., MacDonald R. C., McIntosh T. J., Epanand R. M. *Biophys. J.* [J], 2000, **79**: 3193—3200
- [6] Dahlberg M. J. *Phys. Chem. B* [J], 2007, **111**: 7194—7200
- [7] Lewis R. N. A. H., Zweytick D., Pabst G., Lohner K., McElhaney R. N. *Biophys. J.* [J], 2007, **92**: 3166—3177
- [8] Frey T. G., Mannella C. A. *Trends Biochem. Sci.* [J], 2000, **25**: 319—324
- [9] Mannella C. A. *Biochim. Biophys. Acta* [J], 2006, **1762**: 140—147
- [10] Mannella C. A. *Biochim. Biophys. Acta* [J], 2006, **1763**: 542—548
- [11] Hyde S. T. *Colloids Surfaces A* [J], 1997, **130**: 207—225
- [12] Landh T. *FEBS Lett.* [J], 1995, **369**: 13—17
- [13] Danevčič T., Rilfors L., Štrancar J., Lindblom G., Stopar D. *Biochim. Biophys. Acta* [J], 2005, **1712**: 1—8
- [14] Luzzati V. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* [J], 1997, **7**: 661—668
- [15] Sankaram M. B., Powell G. L., Marsh D. *Biochim. Biophys. Acta* [J], 1989, **980**: 389—392
- [16] Rainier S., Jain M. K., Ramirez F., Ioannou P. V., Marecek J. F., Wagner R. *Biochim. Biophys. Acta* [J], 1979, **558**: 187—198
- [17] De Kruijff B., Verkley A. J., van Echteld C. J. A., Gerritsen W. J., Mombers C., Noordam P. C., de Gier J. *Biochim. Biophys. Acta* [J], 1979, **555**: 200—209
- [18] Rand R. P., Sengupta S. *Biochim. Biophys. Acta* [J], 1972, **225**: 484
- [19] Zou L. N., Nagel S. R. *Phys. Rev. Lett.* [J], 2006, **96**: 138301-1—138301-4
- [20] Buchanan M., Egelhaaf S. U., Cates M. E. *Langmuir* [J], 2000, **16**: 3718—3726
- [21] Taribagil R., Arunagirinathan M. A., Manohar C., Bellare J. R. *J. Colloid Interface Sci.* [J], 2005, **289**: 242—248
- [22] Huang J. R., Zou L. N., Witten T. A. *Eur. Phys. J. E* [J], 2005, **18**: 279—285
- [23] Buchanan M., Arrault J., Cates M. E. *Langmuir* [J], 1998, **14**: 7371—7377
- [24] CHEN Yan(陈燕), LI Li(李莉), QIU Feng(邱枫), YANG Yu-Liang(杨玉良). *Acta Chim. Sinica(化学学报)* [J], 2009, **67**: 1375—1382
- [25] Claessens M. A. E., van Oort B. F., Leermakers F. A. M., Hoekstra F. A., Cohen Stuart M. A. *Biophys. J.* [J], 2004, **87**: 3882—3893
- [26] ZHU Ai-Min(朱爱民). *Hydromechanics Basis(流体力学基础)* [M], Beijing: China Metrology Press, 2004: 72—104
- [27] deVries R. *Phys. Rev. E* [J], 1997, **56**: 1879—1886
- [28] Deegan R. D., Bakajin O., Dupont T. F., Huber G., Nagel S. R., Witten T. A. *Nature* [J], 1997, **389**: 827—829
- [29] Delorme N., Bardeau J. F., Carrière D., Dubois M., Gourbil A., Mohwald H., Zemb Th., Fery A. *J. Phys. Chem. B* [J], 2007, **111**: 2503—2505

Formation and Evolution of Raspberry-like Structures from Cardiolipin

CHEN Yan¹, LI Li^{1*}, QIU Feng²

(1. *The Center of Analysis and Measurement*, 2. *Department of Macromolecular Science*,
Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract Using confocal microscopy and optical microscopy, the formation and evolution of the self-assembly structures from cardiolipin were investigated in NaCl solutions. The results show that, as the solution concentration is close to physiological concentrations, micro-hemispherical cells emerge on the surface of sponge phase cardiolipin, which tend to automatically arrange in a honeycomb-like array. The slow increasing of the brine content in solutions would drive the phase transition from sponge phase to lamellar phase continuously developed toward to the deep-center of sponge phase cardiolipin. On the other hand, the pressure and shear stress from weak flowing of the fluid also can affect the final morphology of these micro-cells, make them appear as honeycomb-like structures, raspberry-like domes and raspberry spheres. Since cardiolipid plays an important role for mitochondrial function, we hope these above results on phase transition and morphology evolution may improve our understanding of the acting mechanisms of cardiolipin.

Keywords Cardiolipin; Honeycomb-like structure; Raspberry-like structure; Sponge phase; Lamellar phase

(Ed.: W, Z)

作者: 陈燕, 李莉, 邱枫, CHEN Yan, LI Li, QIU Feng
作者单位: 陈燕, 李莉, CHEN Yan, LI Li (复旦大学分析测试中心, 上海, 200433), 邱枫, QIU Feng (复旦大学高分子科学系, 上海, 200433)
刊名: 高等学校化学学报 
英文刊名: Chemical Journal of Chinese Universities
年, 卷(期): 2012, 33(1)

参考文献(29条)

1. Delorme N; Bardeau J. F.; Carrière D; Dubois M. Gourbil A. Mohwald H. Zemb Th. Fery A Experimental evidence of the electrostatic contribution to the bending rigidity of charged membranes [外文期刊] 2007(10)
2. Deegan R. D.; Bakajin O.; Dupont T. F.; Huber G. Nagel S. R. Witten T. A CAPILLARY FLOW AS THE CAUSE OF RING STAINS FROM DRIED LIQUID DROPS [外文期刊] 1997(6653)
3. deVries R 查看详情 1997
4. 朱爱民 Hydromechanics Basis (流体力学基础) 2004
5. Claessens M. A. E.; van Oort B. F.; Leenackers F. A. M.; Hoekstra F. A. Cohen Smart M. A Charged lipid vesicles: Effects of salts on bending rigidity, stability, and size [外文期刊] 2004(6)
6. 陈燕; 李莉; 邱枫; YANG Yu-Liang (杨玉良) 查看详情 2009
7. Buchanan M; Arrault J; Cates M. E Swelling and dissolution of lamellar phases: Role of bilayer organization [外文期刊] 1998(26)
8. Huang J. R.; Zou L. N.; Witten T. A 查看详情 2005
9. Taribagil R; Arunagirinathan M. A.; Manohar C; Bellare J. R Extended time range modeling of myelin growth [外文期刊] 2005(1)
10. Buchanan M; Egelhaaf S. U.; Cates M. E Dynamics of interface instabilities in nonionic lamellar phases [外文期刊] 2000(8)
11. Zou L. N.; Nagel S. R 查看详情 2006
12. Rand R. P.; Sengupta S 查看详情 [外文期刊] 1972
13. De Kruijff B; Verkley A. J.; van Echteld C. J. A.; Gerritsen W. J. Mombers C. Noordam P. C. de Gier J 查看详情 1979
14. Rainier S; Jain M. K.; Ramirez F; Ioannou P. V. Marecek J. F. Wagner R 查看详情 [外文期刊] 1979
15. Sankaram M. B.; Powell G. L.; Marsh D 查看详情 [外文期刊] 1989
16. Luzzati V 查看详情 1997
17. Danev(c) i (c) T; Rilfors L; (S) trancar J; Lindblom G. Stopar D 查看详情 2005
18. Landh T 查看详情 1995
19. Hyde S. [J]. T 查看详情 1997
20. Mannella C. A 查看详情 2006
21. Mannella C. A 查看详情 2006
22. Frey T. G.; Mannella C. A The internal structure of mitochondria. [外文期刊] 2000(7)
23. Lewis R. N. A. H.; Zweytick D; Pabst G; Lohner K. McElhaney R. N 查看详情 [外文期刊] 2007
24. Dahlberg M Polymorphic phase behavior of cardiolipin derivatives studied by coarse-grained molecular dynamics [外文期刊] 2007(25)
25. Tarahovsky Y. S.; Arsenault A. L.; MacDonald R. C.; McIntosh T. J. Epanand R. M Electrostatic control of phospholipid polymorphism [外文期刊] 2000(6)
26. Mandersloot J. G.; Gerritsen W. J.; Leunissen-Bijvelt J.; VanEchteld C. J. A. Noordam P. C. deGier J 查看详情 [外文期刊] 1981
27. Seddon J. M.; Kaye R. D.; Marsh D 查看详情 [外文期刊] 1983
28. Allen C. M.; Muth J. D 查看详情 [外文期刊] 1977
29. Schlame M; Rua D; Greenberg M. L The biosynthesis and functional role of cardiolipin. [外文期刊] 2000(3)