

文章编号: 1007-2780(2009)06-0794-05

# 胆固醇对磷脂酰胆碱/神经酰胺二元体系结构的影响

刘晓燕<sup>1,2</sup>, 郝长春<sup>2</sup>, 孙润广<sup>2\*</sup>

(1. 西安文理学院 物理系, 陕西 西安 710065, E-mail: lxy881188@126.com;

2. 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, 陕西 西安 710062)

**摘 要:** 通过 LB 膜仪对表面压力-面积(-A)曲线测量及原子力显微镜(AFM)观测, 研究了胆固醇对磷脂酰胆碱/神经酰胺二元体系结构的影响。-A 曲线分析表明, 随着胆固醇的增加, 加速了相变的发生, 促进了膜稳定状态的形成; AFM 观察结果表明, 磷脂酰胆碱/神经酰胺(PC/CER)二元混合系统单分子膜呈现为小的微区结构, 当 PC/CER 二元混合系统与胆固醇混合时, 随着胆固醇比例的增加, 混合膜呈现从链状结构向较大的片状与网状共存结构的转化, 最终纯胆固醇形成高度紧密的膜结构。

**关 键 词:** 脂筏; LB 膜技术; 原子力显微镜; 胆固醇

**中图分类号:** O753+.2 **文献标识码:** A

## 1 引 言

生物膜是当前分子生物学、细胞生物学、化学生物学和软凝聚态物理中最活跃的领域之一。脂筏作为具有特殊功能的生物膜微区结构, 已成为该领域研究的热点。在正常的生理状态下, 生物膜通常处于液晶态; 当生物膜的成份或外界条件发生变化时, 生物膜的液晶态可能发生变化, 从而伴随脂筏结构和功能发生变化, 导致某些疾病发生。

磷脂分子广泛存在于生物体中, 是脂筏的主要组成成分之一, 液晶态磷脂脂质体和 LB 膜经常作为研究生物膜的简单模型<sup>[1-8]</sup>。神经酰胺是生物膜结构中的一种脂质成份, 分布于脂双层结构的外侧, 在神经细胞尤其是脑细胞中含量丰富, 并在神经细胞的发育、再生和修补过程中具有一定的作用。神经酰胺和鞘磷脂均属鞘脂质类, 其区别是在第一位碳原子处。磷脂酰胆碱是所有脂筏中含量最丰富的磷脂, 是构成生物膜双层骨架的主要分子。目前, 脂筏的模拟研究主要是通过含有饱和脂肪酸链的磷脂与胆固醇间相互作用来实现。胆固醇作为生物膜脂质微区的主要组成成

分, 它与鞘脂的作用对脂双层的形成起着重要的作用, 它的含量变化将直接影响脂筏的形成和稳定性<sup>[9]</sup>。据文献报道, 胆固醇与具有不同相变温度的磷脂分子间相互作用可以形成筏状微区结构<sup>[10-13]</sup>。

本文选择磷脂酰胆碱(PC)与神经酰胺(CER)的二元混合体系作为研究对象, 利用 LB 膜技术, 研究了不同比例的胆固醇(Cho1)对 PC/CER 二元混合体系结构的影响。通过对 -A 等温线进行热力学分析, 研究了空气/水界面上的分子组装特性和凝聚程度随成分的变化特点, 并用原子力显微镜对相同膜压下二元混合系统的形态进行了观测, 这方面的研究对进一步了解生物膜液晶态的变化与某种疾病之间的关联具有重要的生物学意义。

## 2 实验材料与方法

### 2.1 材料

实验所用的材料为磷脂酰胆碱、神经酰胺和胆固醇, 其分子结构式如图 1 所示。其中胆固醇购于美国的 Sigma 公司; 氯仿、甲醇、NaCl 和 NaHCO<sub>3</sub> 等均为分析纯试剂, 购于上海试剂公司。实验用水为离子交换的二次蒸馏水。

收稿日期: 2009-05-13; 修订日期: 2009-05-31

基金项目: 国家自然科学基金(No. 20772077); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金(No. 200807180001); 西安文理学院中青年专业技术人员科研专项基金(No. kyc200809)

\*通讯联系人, E-mail: sunrunguang@snnu.edu.cn



纯胆固醇时,亚相表面的气相过程最长。说明胆固醇具有延长表面膜从气液共存相向液态相转变的作用。

(2) 不同比例下的  $\gamma$ -A 曲线,其突变拐点即相变点显著程度明显不同。当无胆固醇时,PC/CER(1:1 摩尔比)混合膜有明显的相变点;而对于纯胆固醇,则相变点消失。当胆固醇的浓度增大时,混合膜分子排列更加紧密,形成能量更低的晶格结构,减少了重组的驱动力,增加了单分子膜的粘度,从而减慢了向平衡结构移动的速度,使混合膜 PC/CER 分子层变得较为平滑,膜压逐渐降低,拐点不再明显<sup>[15]</sup>,表明相变过程连续发生,且液态聚集相向固相过程缩短。这说明胆固醇的加入,加速了相变的发生,促进了膜稳定状态的形成。

(3) 由图 2 可以看出,胆固醇的含量不同,曲线外扩程度也不同,即在平均分子面积相同的情况下,表面压力不同。在表面积相同的情况下,胆固醇的浓度越大,膜压越小,外扩程度越低。膜压大小与膜分子间的结合强度、膜分子密度、温度等因素有关,结合强度或膜分子密度越大,膜压越大。可见,胆固醇改变了膜分子的结合强度及膜分子的密度。

神经酰胺与磷脂酰胆碱分子相互作用,使尾链相互较链能形成稳定紧密的微区结构。胆固醇

的加入,阻碍了相邻磷脂酰胆碱和神经酰胺分子间的相互作用,扰乱了饱和烃链高度排列的规律,膜压减小。当胆固醇的含量增大时,胆固醇和磷脂分子发生相互作用,逐渐形成聚集体。加入的胆固醇越多,膜压减少越大,曲线下移。胆固醇分子的刚性板状结构只容许其构成部分有极微小的自由运动,因此,崩溃膜压也从无胆固醇的 42 mN/m 降到只有纯胆固醇时的 27 mN/m。说明胆固醇促使了聚集体的形成,促使分子间紧密排列,阻碍了分子的移动,膜的移动性和弹性就减弱,崩溃膜压降低,AFM 观测证实了这一点。

### 3.2 不同摩尔比例的 Chol 对 PC/CER 单层膜影响的 AFM 检测

用 LB 技术在云母表面制备了不同比例的胆固醇和 PC/CER(1:1 摩尔比)单层膜,通过 AFM 来检测验证  $\gamma$ -A 曲线。图 3 给出了膜压在 20 mN/m 压力下,扫描范围  $4\ \mu\text{m} \times 4\ \mu\text{m}$ ,不同比例的混合脂单层膜的原子力显微镜图。原子力显微镜检测表明,随着胆固醇比例的增加,微区结构发生明显变化。

在图 3(a)中,观察到磷脂酰胆碱和神经酰胺形成了单一的、紧密聚集的小微区结构,空间分布较不均匀,此时二元混合系统处在液态扩张相,在图片中微区的覆盖程度较低,亚相液面上的分子

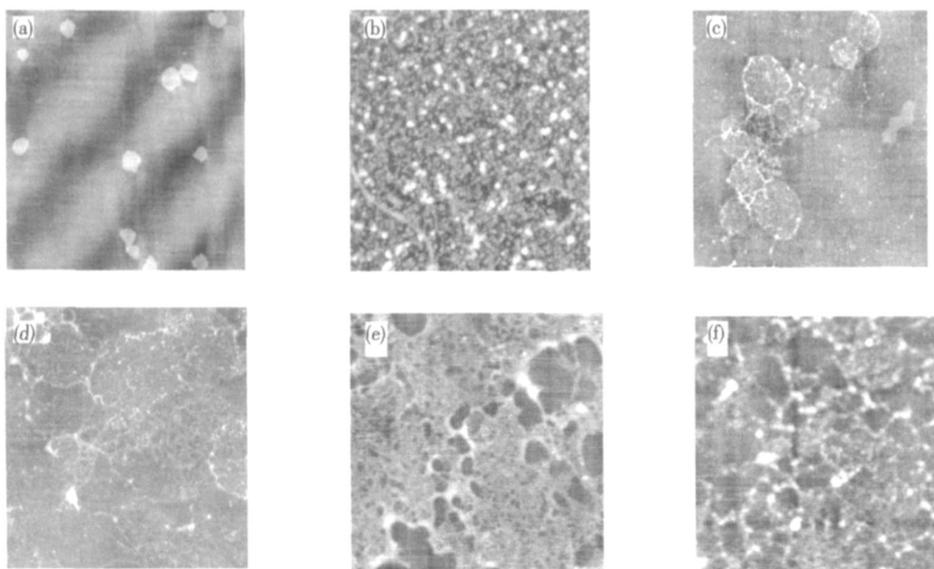


图 3 胆固醇对 PC/CER 二元体系的影响. PC/CER 为 1:1(摩尔比),胆固醇所占的摩尔比例逐渐增大,用 LB 技术在膜压为 20 mN/m 下沉积单层膜. (a) 无胆固醇; (b) 8:8:2; (c) 6:6:4; (d) 4:4:6; (e) 2:2:8; (f) 0:0:1.

Fig. 3 Effect of cholesterol on PC/CER bilayers. PC/CER monolayers (1:1 molar ratio) with increasing amounts of cholesterol were deposited onto mica from the air-water interface using the Langmuir-Blodgett method at a surface pressure of 20 mN/m. (a) No cholesterol; (b) 8:8:2; (c) 6:6:4; (d) 4:4:6; (e) 2:2:8; (f) 0:0:1.

比较分散,较疏松地铺在云母片表面上。胆固醇的加入,促进了混合体系间分子间的相互作用,改变了混合系统分子的分布,从图 3(b)可以看出,当在二元混合系统中加入胆固醇,其摩尔比为 8:8:2(PC/CER/chol,摩尔比)时,单层膜的图像由稀疏的、分布不均匀微区结构,变为致密的、分布较为均匀的微区结构,微区结构面积的发生较大的变化,凝聚程度显著不同,小微区结构几乎覆盖了整个平面。当胆固醇比例增加,达到 6:6:4(PC/CER/chol,摩尔比)时,小的微区结构发生了融合,如图 3(c)所示,并形成了紧密聚集的片状微区结构。图 3(d)显示胆固醇比例增为 4:4:6(PC/CER/chol,摩尔比)时的单层膜图像,图像表明微区结构扩大。当胆固醇比例继续增到 2:2:8(PC/CER/chol,摩尔比)时,微区结构继续扩大,形成较大的片层与网状共存结构(图 3(e))。当无磷脂酰胆碱和神经酰胺时,纯胆固醇形成高度紧密的单层结构(图 3(f))。

生物膜分子是通过范德华力、分子间氢键、离子静电作用以及分子间疏水相互作用形成的超分子体系。神经酰胺分子结构具有二条长链烷基,一个酰胺基团和二羟基基团,这些基团使神经酰胺分子具有亲水性和疏水性,神经酰胺由长链鞘氨醇通过酰胺键与脂肪酸共价结合而成。磷脂酰胆碱含有很长的多不饱和的脂酰基链,这些链排列有序。神经酰胺与磷脂酰胆碱的饱和链与不

饱和链之间,交错对叉排列,其间加入具有双亲性的胆固醇分子,削弱了脂分子的迁移和流动,加速了成膜速度,稳定了云母片表面的膜结构。AFM 观测结果表明胆固醇与两种分子间相互作用形成的链状结构稳定。

## 4 结 论

-A 曲线分析表明,对于 PC/CRE(1:1 摩尔比)单层膜,随着胆固醇浓度的增加,形成微区结构的面积逐渐增大,促使其与饱和脂肪酸的鞘磷脂发生相互作用。胆固醇的刚性环链骨架改变了脂肪酸链的自由度和刚性,发生了凝胶相向液晶相的转变,且在高浓度的胆固醇时,相变点消失。所以胆固醇含量越多,混合膜的弹性系数越大,加速了膜相变的发生,促进了膜稳定状态的形成。

AFM 观测结果表明,PC/CRE 混合膜表现为单一的、较为稀疏的、紧密聚集的小微区结构,空间分布较不均匀。当 PC/CRE 混合膜与不同比例的胆固醇混合时,随着胆固醇的浓度增加(或 PC/CRE 混合液减少),混合膜从片状结构向较大片层与网状共存结构的转化,最终纯胆固醇形成紧密的膜结构。磷脂酰胆碱和神经酰胺以及胆固醇混合体系能形成网状结点结构,说明这种结构<sup>[16]</sup>在物理热力学方面具有一定的稳定性,对生物膜的结构有重要的影响和作用。

## 参 考 文 献:

- [1] Boxer S G. Molecular transport and organization in supported lipid membranes [J]. *Curr. Opin Chem. Biol.*, 2000, 4(6):704-709.
- [2] Sun Run Guang, Zhang Jing, Wang Yong Chang. Conformation of the liquid crystal state in the interaction between several chemical material and biomembrane [J]. *Chin. Science*, 1998, 4(1):1-13.
- [3] 孙润广,张静,王永昌. 脂肪酸多相脂质体与癌细胞膜相互租用的 ESR 谱技术研究 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2000, 27(5):296-300.
- [4] 孙润广,张静,齐浩,等. 胆固醇对双层结构影响的 SAXS 和 STM 研究 [J]. *生物物理学*, 2001, 17(1):53-58.
- [5] 杨福愉. 生物膜结构研究的一些进展 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2003, 30(4):495-502
- [6] 欧阳钟灿. 生物膜形状的液晶模型理论研究 [J]. *液晶与显示*, 2003, 18(1):79-83.
- [7] 何平笙. 空气/水界面单分子膜的弹性 [J]. *化学通报*, 2001, 64(10):608-613.
- [8] 孙润广,张静. 原子力显微镜观察脂胞囊形貌结构及稳定性 [J]. *原子与分子物理学报*, 2003, 20(1):85-88.
- [9] 杨福愉. 生物膜. [M]. 北京:科学出版社, 2005:53.
- [10] Scheiffele P, Simons K, Roth M G. Interaction of influenza virus haemagglutinin with Sphingolipid-Cholesterol membrane domains via transmembrane domain [J]. *EMBO J*, 1997, 16(18):5501-5088.
- [11] Simons K, Vaz W L. Model systems, lipid rafts, and cell membranes [J]. *Annu Rev Bio Phys. Biomol. Struct.*,

2004 ,33 (1) :269-295.

- [12] Ipsen J H, Karlstiöm G, Mouritsen O G, *et al.* Phase equilibria in the Phosphatidylcholine-cholesterol system [J]. *Biochim. BioPhys. Aeta*, 1987 ,905 (1) :162-172.
- [13] 杨小乐,孙润广,张静. LB 膜与 AFM 技术研究磷脂酰乙醇胺单分子膜结构 [J]. *液晶与显示*, 2006 ,21 (4) :348-355.
- [14] 杨福愉. 生物膜[M]. 北京:科学出版社, 2005 :386.
- [15] Dawn Y Takamoto, Eray Aydil, JosePh A, *et al.* Stable ordering in Langmuir-Blodgett films [J]. *Science*, 2001, 293 :1292-1297.
- [16] 郝长春,孙润广. Langmuir-Blodgett 膜超分子 SM/DOPC/Chol 三元脂系的原子力显微镜观察 [J]. *化学学报*, 2007 ,65 (20) :2325-2330.

## Influence of Cholesterol on Structure of Phosphatidylcholine/ Ceramide of Duality System

LIU Xiao-yan<sup>1,2</sup>, HAO Chang-chun<sup>2</sup>, SUN Rur-guang<sup>2</sup>

(1. Department of Physics, Xi'an University of Art and Science, Xi'an 710065, China, E-mail: lxy881188 @26. com;

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

### Abstract

This paper investigated the effect of cholesterol on the structures of the phosphatidylcholine (PC) and ceramide (CER) of duality system by the pressure-area ( $\pi$ -A) isotherm measurements and by atom-force microscopy (AFM) observation. It is shown from the  $\pi$ -A isotherms that the increase of cholesterol can accelerate the occurrence of phase change and advance the stabilization of films. Also, it is found from the observation of AFM that the duality systems (PC/ CER) molecular film takes on micro-region structure. With the increasing of cholesterol content, the mixed films transforms from the chains structure to larger slice and net coexisted structure. In the end, pure cholesterol forms more aggregated structure.

**Key words**: lipid raft; LB technique; atomic force microscopy; cholesterol

**作者简介**: 刘晓燕 (1964 - ) , 女, 广东廉江人, 副教授, 主要从事量子力学的教学研究工作, 以及脂筏微区超分子聚集体结构的动态特征及稳定性的研究。