

生物膜研究的前沿问题

Forward Position in the Research of Biological Membrane

林克椿

(北京医科大学,教授)

生物膜的研究在近代生命科学中越来越引起各国科学家的关注。这是因为:第一,生命的许多基本过程都在膜上进行,包括物质运输、能量转换和信息传递;第二,近代分子生物学的发展,在理论和实验手段上都已经为从大分子向更为复杂的膜体系过渡创造了条件。目前已经能够开始用分子运动的观点讨论膜的结构与功能。因此,生物膜的研究不仅对生物医学中的许多学科的发展将起到推动作用——例如细胞生物学、生理学、生物化学、免疫学、药理学与病理学,而且生物膜本身的独特性质又向物理学和技术科学的各个领域提出了新的要求,从而促进不同学科间的相互结合。其中生物物理学起到了活跃的中间媒介作用。

生物膜研究所包含的范围非常广泛,但从膜组成成分来看主要是膜脂和膜蛋白这两种基本成分,以及二者间的相互作用与功能之间的关系。本文打算从膜脂与膜蛋白两个方面对近十余年来提出的若干新观点和研究趋向作概括介绍。

一、膜脂结构与功能的研究

目前普遍被接受的液态镶嵌模型是1972年Singer与Nicholson提出的,它和所有过去曾经提出过的模型的不同在于它的动态性,即认为组成膜的基本成份——脂与蛋白都处于不断运动之中,这就决定了膜本身具有一种类似于液晶态的性质。对于膜脂与膜蛋白的各种运动的定量研究,以及相互作用所决定的功能性质成为当前膜研究的一个重点方向,即膜的分子动力学,它是近年来文献最多,也最富有成果的领域。

无论是过去的静态模型还是动态模型,其共同之处是认为脂类分子由于双亲性的性质决定了它必然是以脂双层的形式成为膜的基质,而膜蛋白则或结合于其表面,或嵌入膜内。从功能方面来看,起主要作用的是膜蛋白,膜脂只为膜上的蛋白质提供合适的环境,因此是一种被动的作用。脂双层的概念为人们普遍接受,因为双层可

以形成封闭的囊泡,防止细胞内外物质无限制地扩散,这正是细胞膜所要求的基本性质。

但是这一概念在70年代末受到了一次巨大的冲击。人们把细胞膜上的脂加以分离提纯,然后重新水化,发现虽然大多数脂类水化后确实形成了双层,但有一些脂却并不一定如此,例如从细胞质膜提取的磷脂酰乙醇胺(PE),从线粒体内膜提取的心磷脂(CL),从支原体或叶绿体膜提取的单半乳糖酰甘油二脂(MGDG)等等。这些磷脂在合适的条件下可以形成非双层的其它形式,例如六角形相、立方相等。所谓合适条件,多数是由于温度超过了某种脂的主相变温度(如PE),也可能是由于二价离子的存在(如CL)。因此这类脂既可以双层形式存在,也可以非双层形式存在,条件改变时可在这二种形式之间转变,因而被称为脂的多型性(polymorphism)。

多型性现象的发现很自然给膜的研究提出了许多带有根本性的问题。首先是,作为维持细胞或细胞器的膜,显然应该处于双层形式,那么为什么膜上却有易于形成非双层的脂存在?这类脂的存在,其确切的功能作用是什么?在什么情况下这类脂才能发挥其功能作用?在发挥其功能作用前后,膜脂本身的结构有何变化?能否探测到这种变化的存在?这些问题已经引起人们的极大兴趣,并在模式系统中进行过许多研究,例如对单一脂体系多型性转变条件的研究,对于简单的混合脂体系(二种脂的体系)相变行为的研究,对简单的脂—蛋白体系多型性转变的研究,以及来源于生物膜的材料(如红细胞血影)转变可能性的研究等等。通过这些研究不仅掌握了多型性转变的基本规律,而且有些结果还为实际应用提供了有希望的前景。例如二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)是一种非双层脂,但嵌入蛋白质(例如单克隆抗体)后可使其稳定在双层形式,在这种脂蛋白体系中包入药物或指示剂,就可以定向地寻找具有相应抗原的细胞,而在二者结合时,由于蛋白质在脂蛋白体上的不均匀分布将使药物从其中泄漏,从而达到治疗或诊断的目的。

人们很自然地把兴趣逐步引向天然的细胞或细胞器膜,以便进一步揭示这一多型性在天然膜中的确切作用。遗憾的是,这方面的进展始终不是非常理想。这和研究方法和技术的发展有密切联系。回顾历史就可以了解,多型性最早是由Luzzati 等用X射线小角衍射发现的,以后由于应用了³¹P核磁共振,发现双层和非双层脂所得到的核磁共振具有明显的不同面貌:对于双层脂结构,高场处有峰,低场处有一较小的肩部,而对非双层脂(特别是六角相)正好相反,高场有肩,低场有峰,其宽度约为双层脂的一半。从形态上观察主要应用了冰冻裂解的技术:双层裂解后剖面光滑,非双层裂解后往往形成层次分明的条索,有时在双层中出现凹陷或突起的所谓脂颗粒。正是具备了这些技术才使多型性问题的研究有了较好的条件。前一阶段研究工作的蓬勃开展就是在上述技术的基础上进行的。目前进展迟缓,用这类技术还没有得到天然膜多型性变化的确切证据。在这种情况下,对于如何前进的问题,国内外基本上有两种态度,相应地有两个不同的研究方案。第一种观点是认为天然膜上非双层脂含量少,功能过程快,因此必须迅速发展有

效的新技术才能适应这类研究。第二种观点认为在活细胞膜上寻找存在非双层结构的直接证据是无指望的,必须另辟途径。

根据前一种观点已经做了许多工作,由于核磁共振法具有灵敏度较低的缺点,而冰冻裂解则手续繁杂,而且样品结构将受冷冻影响。人们致力于用量少、能在接近天然状态下进行测量的方法,例如扫描量热技术(DSC)、红外光谱技术、拉曼光谱技术、吸收光谱技术、荧光与荧光偏振测定技术等。值得提出的是,这些技术目前都在向时间分辨的方向发展,以便捕捉瞬时发生的过程。看来这种发展趋势对多型性的研究将会有很大帮助,因为许多膜的过程都发生在很短的时间之内,例如人们比较关注的、和多型性转变的表现可能有关的过程是膜的融合、离子或物质的传输等。以融合为例,两个融合细胞的质膜都是双层,融合前必要的一步是两个膜彼此密切接触,在接触部位显然已构成非双层,从这种非双层转变的融合细胞的双层是最有可能体现多型性的过程。我们可以列表说明现在已用于非双层研究的几大类技术(表1):

表1 可用于多型性研究的各种技术及其比较

技术类别	技术名称	原理	优点	缺点	重要参考文献
衍射	X射线小角衍射 时间分子的X-衍射	测层间间距 测结构的时间过程	精确 动态	要求样品长程有规则 要求大型设备同步辐射源	Luzzati V.(1968) Caffrey M.(1985) Gruner SM(1987)
显微	电镜 冰冻裂解	染色后观察 观察剖面	直观 直观	样品须经处理 样品须经处理	Stoeckenius W(1962) Gulik krzywicki(1975) Verkleiz AJ (1984)
	时间分辨冷冻透射电镜	染色观察	动态		Siegel DP(1989)
量热	差示扫描量热(DSC)	焓变	转变点明确 易辨认	宏观方法	Van Dijk PWM(1976)
波谱技术	³¹ P-NMR ² H-NMR	测P的各向异性 测器极短分裂	明确 峰宽明确	灵敏度低 信息少	Cullis PR (1979) Gally HU (1980)
光谱技术	IR FTIR Raman 谱 吸收谱 荧光 荧光偏振	测振动频移 强度比变化 吸收度变化 荧光标记测强度比 标记脂,时间分辨	用量少 用量少 可用稀液 可用稀液 动态	间接法 间接法 间接法 间接法 间接法	Mantsch HH(1981) Levin IW(1984) Veirol IA(1989) Hong K(1988) Cheng KH (1989)

按照这一类工作的思路,力图用各种技术捕捉多型性变化在功能过程中的存在。看来要达到这一目的还有许多工作要做。

另一种观点的主导思想是非双层脂在膜功能中确实起到作用,但不一定能以典型非双层结构的形式存在。因此与其花精力去寻找活细胞中存在这类结构的证据(即便不是完全徒劳,也是极其困难的),还不如从功能方面去了解非双层脂的作用。例如改变生物膜中非双层脂的含量以了

解其对功能的影响,这样就能弄清诸如CL是否线粒体膜中必需的专一性磷脂以及这类磷脂如何与呼吸链个别成分相互作用的特点。

不论用何种观点去研究脂的多型性,都对传统的脂必然形成双层,仅为蛋白质发挥功能作用的想法提出了更深层次的问题,对脂的功能作用的想法有了很大的改变。这无疑将更进一步推动人们对膜的认识,并对其在疾病过程、药物与毒物作用,光合作用及作物品种的差异及改良方面

提供有意义的线索。

二、膜蛋白结构与功能的研究

至少到目前为止,细胞膜的许多功能是靠膜蛋白完成的看法仍占有统治地位。因此膜蛋白结构与功能的研究在膜研究中始终占据主导地位。

膜蛋白种类繁多,它们所完成的功能也表现在许多方面,例如膜上的酶是完成化学变化的催化剂,膜通道控制着物质的输送,膜受体起着接受讯号、传递讯号的作用等等,在每一方面,膜蛋白如何发挥作用都有其独特的作用方式。但是作为膜蛋白,它们也有共同的问题。首先这些膜蛋白处于膜脂的环境之中,这和分子生物学研究蛋白质在溶液中的结构很不相同。其次膜蛋白都必须在特定条件下、尤其是和配体作用下才启动反应,这种相互作用都是特异性的,一般都将改变膜蛋白的构象。因此关于膜蛋白研究的一个重要方向就是研究膜蛋白构象及其在功能状态下的构象改变。

回溯一下蛋白质结构的研究历程是有益的:50年代用X射线衍射研究蛋白质结构获得了巨大成功,由于对DNA、血红蛋白等大分子完整空间结构的研究,开创了近代分子生物学蓬勃发展的局面。但这种结构研究需要把样品做成晶体,而晶体并非活体中蛋白质存在的天然形式。因此从60年代开展起来的蛋白质溶液构象的研究就具有相当重要的地位。可惜的是技术的发展并不能完全满足这一需要。比如常用的圆二色(CD)、核磁共振(NMR)、荧光、红外(IR)和激光拉曼技术都能给出若干信息,但它们或者只给出总体结构中螺旋、片层或无规则卷曲的粗略概况,或者给出蛋白质中局部的特征,而得不到像X射线衍射所能给出的全部原子的精确位置。值得一提的是70年代末发展起来的二维核磁共振技术(2D-NMR),它不仅能辨认各个组成氨基酸残基,而且可以了解彼此之间的相互作用,从而得出彼此间的距离并制订出一套测定溶液结构的策略。至今已完整地测定了一些分子量在1-3万道尔顿的生物分子(或其片断)的完整结构,而且分辨率正逐渐接近X射线衍射所达到的水平,这是近年来的重要发展。80年代又发展了分子动力学方法,从理论和实验两方面证实以往所得的结果只是结构的时间平均,实际上每个原子都围绕本身的平衡位置振动,因此蛋白质总体构象是在变化着的,这就为蛋白质发挥功能作用时的构象变化提供了有用信息。

再回到膜蛋白构象的研究。膜蛋白并不处于水环境,而是处于疏水的脂环境,而将上述一些技术照搬到膜蛋白研究中显然还得不到很多信息,甚至还不知道能否应用以及如何应用,例如2D-NMR用于人工重组的脂蛋白体,国际上也没有取得成功,因为脂质体中众多的脂分子以及

水分子中的氢原子都对蛋白质根据氢原子所得图谱产生严重干扰。现在常用的方法是把脂放在有机溶剂中,加入含有蛋白(或多肽)的少量水溶液,使之形成单层(水和脂只有一个交界面)的反向微囊来观察蛋白质构象变化,然后推测其在和双层作用时也可能有类似的变化。比如我们曾用短杆菌肽S与二棕榈酰卵磷脂作用,发现原来在水溶液中伸展的环状片层短杆菌肽S在和脂作用时将折叠起来,将二端疏水部分插入脂内,并以此说明脂质体或细胞膜诸多性能的改变可能和插入有关。

鉴于膜蛋白结构的重要性,当前国际上正从两个方面进行研究。一是用CDNA克隆的分子生物学技术了解膜蛋白的一级结构,例如日本学者Numa就用这一办法弄清了神经递质受体(乙酰胆碱受体)的全部一级结构,然后根据各氨基酸残基的性质以及此受体的功能推断其在膜内的存在形式。这一成就引起全世界的普遍关注,用此法得到的成果也在逐年增加。由于一般膜蛋白中残基数很大,工作量相当可观,而且对它的空间结构也仅仅是推测性的,但这种方法毕竟已为膜蛋白的研究开辟了一条新的途径。另一方面是企图直接测定膜蛋白的结构。比起前一个方面来,这类研究更是刚刚起步,甚至可以说还没有找到入门的路子。把各种技术联合起来应用,能得到一些零星知识,但毕竟很不完整;把膜蛋白提取出来,然后在合适环境下用分子生物物理学方法研究,显然既累赘又不一定和在膜环境中相同。这方面我们再次需要求助于新技术和新方法的突破,这种新方法应能告诉我们结合于膜的蛋白质的整体构象,其中在膜内部分应处于疏水的脂环境,而在膜外或细胞内的部分则应处于亲水环境。另外鉴于膜蛋白分子量大,组成氨基酸残基数多,在其总体结构中常常可以区分出结构类似或者自成一体的若干亚单位。亚单位之间按不同方式组合,组合起来的亚单位在功能过程中又处于不同的重要地位。

关于膜蛋白结构功能的进一步研究,必须联系具体问题才能深化,其中在近年来引起特别重视的有两个方面。一是关于通道的研究,二是关于受体的研究。

通道可分为配件门控的受体通道和电压门控的离子通道两大类,其中研究较深入的电压门控的离子通道,如 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 通道等都是近年来国际上十分热门的研究课题。通过最近关于膜片钳(patch clamp)技术的应用,对于通道对离子的通透特性有了较深入的了解。所有电压门控的共同点是有高度的离子选择性,对电压有高度敏感性,而且通道的启闭都是毫秒级的快速过程。这就提出了一个问题,即通道如何形成,以及通道启闭的原理何在。为此须首先搞清通道形成的分子机制。现在已经了解,尽管不同的通道可能由不同的亚单位组成,但各亚单位似在离子

通道中起着不同的功能作用。实验表明, Na^+ 通道与 Ca^{2+} 通道中的 α 亚单位是最基本的功能单位 (Ca^{2+} 为通道 α_1 亚单位)。进一步用 cDNA 克隆的方法证明, 它们在结构上有惊人的相似性, 都有四个跨膜区, 每区由 6 个跨膜节段组成。实际上 K^+ 通道也有类似现象。因此, 当前需要解决的问题就是不同通道为什么会有相类似的功能结构, 这种结构如何形成对每一种离子的特异通道, 以及通道的启闭和其中氨基酸残基的侧链运动如何联系起来等等。

相似性说明作为通道形成的共同点; 特异性说明不同通道的差异。没有差异性就无从说明生命现象中无处不存在的特异相互作用, 这一点正是生命物质和无生命物质之间的根本区别。反之, 只有差异性而无共同性则无法理解生命在进化过程或分化过程中的基本规律性, 生命现象就会变得使人眼花缭乱, 无章可循。

这种矛盾统一的观点在研究受体问题时显得更为突出。关于受体的重要性已经被各学科的工作者所了解, 它接受细胞外的信息, 并依靠一整套系统将信息传递并使细胞内以及细胞粒内产生一系列反应, 但受体本身并没有直接作为信息的携带者进入胞内或核内。受体和外界刺激因素(如激素)的作用是高度特异性的。为此许多学者致力于具体的信息传递通路的研究。近年来在这方面也有相当大的进展, 例如激素作用后肌醇磷脂的转化、胞内 Ca^{2+} 离子的释放和 Ca^{2+} 原作用维持胞内 Ca^{2+} 离子的相对稳定, 同时胞内蛋白的磷酸化则体现了信息传递的结果。但是, 如果仔细考察一下这类问题就会产生疑问, 既然受体作用是如此特异, 那么针对细胞外的任何一种作用物, 是否细胞膜上必然存在着相应的受体? 我们现在已经被告知确有许多受体存在于细胞膜上(这已经令人相当怀疑了), 那么还有许多还没有被发现的作用物, 一旦被发现则其相应的特异作

用物——受体又将被宣称为早已存在膜上。按照陈旧的观点, 配体和受体的作用类似于锁和钥匙的关系。怎么能设想在细胞膜上存在着近乎是无数的各自独立的钥匙——受体? 这就不能不重新考虑对这一问题的观点, 是否膜上只存在为数不多的若干种不同的“受体”蛋白, 每种受体通过其构象的改变可以适应不同外来物质的作用? 虽然目前在这方面开展的工作还很少, 但从几种迹象不难得到启发。例如在大分子方面, 人们熟知免疫球蛋白是一个“Y”形分子, 其中分叉的二个 Fab 段是和抗原特异结合的部位。另一个分子超氧化物歧化酶(SOD)则是催化自由基反应的酶。这两个分子从功能上毫无关系, 但 X 射线衍射结果表明, SOD 和 Fab 的绝大部分空间结构是完全相同的, 只有一小部分有差异, 正是这差异部分决定了它们各自不同的功能。这一点为受体的研究提供了有益的启示。这又一次说明膜中的蛋白可能既具有共同性, 也具有差异性。人们有理由指望共同性决定膜蛋白和脂相互作用以保持总体结构和在膜内的运动, 而差异性则决定其特异的、和外界物质的相互作用。差异部分具有较大的柔性, 柔性将保证其和不同配体作用时通过改变构象来和外来配体相适应, 从而触发功能反应。

总结上述基本内容可以看出: 第一, 生物膜的研究是当前分子生物学的诸多成就开始向细胞过渡的第一站, 对膜的研究需要生命科学各个分支学科和技术科学的通力合作; 第二, 为了更深入研究膜所起的确切作用, 现有的技术还远不能完全胜任, 需要发展新的技术方法, 特别是时间分辨的动态方法; 第三, 生物对象的同一性(或称保守性)与差异性(或称特异性)之间的关系是普遍存在的基本性质, 它对今后的研究工作将起到越来越重要的指导作用。

(责任编辑 朱世南)

(上接第 48 页)

因此我们认为, 一个国家的高教发展规模虽然是主观决策的产物, 但它终将受到客观规律的制约, 过热、过快、过大的盲目发展是不能持久的; 但也不宜盲目地过冷、过快地收缩下马。大起大落, 将造成更大的振荡和损失。

四、初步的看法

按我国目前经济状况, GNP 和人均 GNP 的水平, 以及预计到 2000 年将要达到的水平, 现有高校在校生规模(1989 年)为 395.2 万人(其

中普通高校为 221 万人), 每年毕业生约 100 万人, 从规模和数量上看, 不能认为高等教育是我国教育的薄弱环节, 关键是结构和质量。结构需要优化, 质量需要提高。由于结构不合理, 专业重复设置, 口径过窄, 形式单一, 供需脱节, 师生比, 教职工与学生之比过高, 办学效益差。80 年代以来发展过快, 办学条件跟不上发展的需求, 影响教育质量。如果从这方面来看, 高等教育与基础教育相比较, 确实存在问题比较多, 解决的难度相当大, 又可以认为是我国教育的薄弱环节。