

丙甲菌素对磷脂膜结构的影响*

李大鹏 胡书新 麦振洪 李明¹⁾

(中国科学院物理研究所 北京 100080)

摘要 丙甲菌素是富含 α -氨基异丁酸的膜活性肽,能自发插入到脂双层中并相互聚集成通道结构,对真菌以及革兰氏阳性菌都有抗菌作用.用丙甲菌素与二油酰磷脂酰胆碱的混合溶液在硅片表面制作高度取向的多层膜,并将其浸入水中,用固-液界面X射线散射测量方法,研究了丙甲菌素对磷脂多层膜的结构的影响.实验结果表明,高浓度条件下,丙甲菌素使脂双层厚度变薄,脂膜的弯曲模量减小.该实验结果有助于理解丙甲菌素与脂双层的相互作用.

关键词 丙甲菌素 脂多层膜 固-液界面 X射线散射

1 引言

抗菌肽是一类平均含有20—30个氨基酸序列、与细胞膜直接作用的短肽,是生物免疫系统中的重要武器^[1].有关此类分子与生物膜的相互作用是目前生物物理学中的一个研究热点.随着近年来临床发现越来越多的病原体对常规使用药物的耐药性逐渐增强,人们对于开发新型抗菌试剂的呼声也越来越高.通过对抗菌肽与细胞膜相互作用的研究,人们试图从其抗菌机理中得到启示,以设计合成更廉价而高效的药物试剂.

丙甲菌素是一种取自绿色木霉(*Trichoderma viride*)富含 α -氨基异丁酸的膜活性肽.它是电中性的双亲分子,当自发插入到黑脂膜以及其他细胞膜时具有类似于电位调控型离子通道行为.根据离子通道蛋白的结构,人们推测丙甲菌素单体插入到膜中之后会彼此聚集,形成一种其中充满水的孔洞结构^[2].这些形成于膜上的孔洞破坏了细胞内外之间的跨膜电化学梯度^[3—5],随着细胞中水分的增加以及离子的流失,细胞不断膨胀直至破碎^[6, 7].这是人们对丙甲菌素抗菌行为的普遍解释.

在研究抗菌肽与脂膜相互作用的过程中,人们发现浓度(P/L , 抗菌肽与磷脂的摩尔比)是一个重要的实验参数.随着浓度的变化,抗菌肽在两种形态间转

变^[8].在临界浓度(不同抗菌肽以及不同磷脂之间,该值有所区别)以下,抗菌肽吸附于脂膜亲水层表面,即 S 态.随着抗菌肽浓度的提高,磷脂膜逐渐变薄^[9, 10],磷脂分子的疏水尾链摆动得到加强^[11].当达到临界浓度时,抗菌肽逐渐转为插入脂膜层中,即 I 态,磷脂分子的亲水头和疏水尾的摆动都受到了抑制.基于这些发现,人们提出了抗菌肽在脂膜上穿孔的理论解释^[12].不过需要指出的是,上述实验中抗菌肽的浓度都是在较小的范围(在临界浓度附近或以下)内.相对而言,对于高浓度(远大于临界浓度)情况的研究少有报道,而这部分的研究工作对于人们进一步揭示其抗菌机理是不可或缺的.

衬底支持的取向多层膜是探讨抗菌肽与细胞膜相互作用的常用模型^[13].与其他实验手段相比,界面敏感的X射线及中子散射技术对这一体系的表征有其独到的优点.为了模拟实际的生理状态,样品通常被置于充满饱和水蒸汽的样品池中.然而这种条件下脂膜中的含水量往往小于将样品浸于溶液中时的含水量^[14],这就容易引发人们对实验结果有效性的质疑.如果研究体系选择浸泡在水或水溶液中的脂多层膜,样品虽处于其生理状态,但此时对光源就提出了很高的要求.经过反复摸索,我们在北京同步辐射装置(BSRF)漫散射站成功实现了固-液界面的X射线散射测量^[15],这种方法在垂直于界面的方向上可以获得分

* 国家自然科学基金(10325419)和北京同步辐射实验室资助

1) E-mail: mingli@aphy.iphy.ac.cn

辨率达 0.2\AA 的结构信息. 将这一方法应用于研究高浓度条件下丙甲菌素对磷脂膜的作用, 实验结果表明高浓度条件下丙甲菌素对磷脂膜的厚度以及弯曲模量都有很大影响, 这一结果有助于进一步认识其抗菌行为, 同时也为蛋白与脂膜相互作用的理论研究提供更多的实验依据.

2 实验方法

实验平台为 BSRF 漫散射站的 Huber 五圆衍射仪. 样品池在原自行设计的封闭式^[15]基础上进一步得到改进, 如图 1 所示. 不锈钢样品池厚度为 4mm , 底部固定一个 $13\text{mm}\times 3.5\text{mm}$ 样品, 窗口用 Mylar 膜封闭, 溶液由注射器送入, 样品池温度从室温到 99°C 可调节, 控温精度为 0.05°C . 使用前, 样品池分别经氯仿、甲醇、双蒸水中各超声 15min , 以确保样品池的清洁.

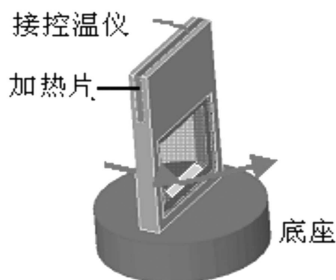


图 1 液体样品池示意图

池厚 4mm , X 射线从窗口进入, 在界面反射后从另一个窗口射出. 样品池通过底座直接固定在衍射仪上.

制备样品所用试剂为丙甲菌素 (alamethicin, Sigma); 二油酰磷脂酰胆碱 (DOPC, Avanti); 甲醇 (分析纯); 氯仿 (分析纯); 过氧化氢 (30%); 浓硫酸 ($>95\%$); 氨水 (25%, A.R.); 超纯水 (电阻率为 $1.8\times 10^5\Omega\cdot\text{m}$). 将抛光后的硅片浸泡于 $\text{H}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{SO}_4=5:1:1$ (体积比) 的混合溶液中煮沸 20min , 用超纯水反复冲洗后, 再浸泡于 $\text{H}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}=5:1:1$ (体积比) 的混合溶液中煮沸 20min , 用超纯水反复冲洗, 得到亲水硅片. 处理后的硅片保存于超纯水中备用, 使用前在氮气流中吹干. 分别配 DOPC (样品 A) 和丙甲菌素 / DOPC (1:15, mol/mol) (样品 B) 的甲醇 / 氯仿 (1:1, V/V) 混合溶液 (其中 DOPC 的浓度均为 $50\text{mg}/\text{mL}$), 用微量进样器在亲水处理后的硅片 ($13\text{mm}\times 3.5\text{mm}$) 上点样. 样品在自制的密闭容器中放置 12h 后取出, 于真空干燥器中干燥 24h .

实验前将样品硅片固定于液体样品池底部, 用 Mylar 膜封闭, 用注射器将超纯水缓缓注入样品池中.

将样品池固定在衍射仪的测角头上, 待平衡一小时后开始测量, 实验方法和普通散射实验类似^[16]: 反射率测量采用低角度范围内的 $\theta-2\theta$ 扫描方式; 漫散射测量则保持 2θ 不变, 对 θ 进行扫描.

3 结果与讨论

在 30°C 下, 纯 DOPC 多层膜样品 (样品 A) 和混合丙甲菌素 / DOPC 多层膜样品 (样品 B) 的反射曲线如图 2(a) 所示. 束缚在固液界面的 DOPC 多层膜处于溶致液晶的层状相, 丙甲菌素的加入没有引起新相的产生. 由于 Landau-Peierls 不稳定性, 各脂双层存在强烈的热起伏, 因此实验中观测不到三级以上的 Bragg 峰. 通过对反射曲线的拟合, 可以获得沿垂直膜面方向的电子密度分布 (图 2(b)), 亲水头基之间的距离即为脂膜的厚度. 根据已有关于丙甲菌素在 DOPC 中临界浓度的研究^[8], 本实验中样品 B 所采用的浓度 ($P/L=1:15$) 远高于临界浓度 ($\sim 1:180$). 可以看出, 高浓度条件下, 丙甲菌素使得脂膜变薄.

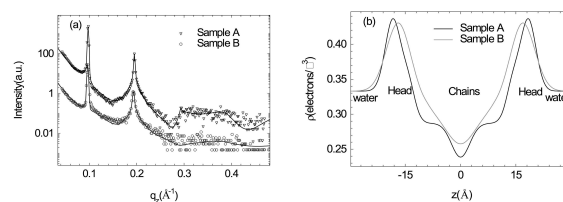


图 2 (a) 样品的反射率 (符号) 及拟合结果 (实线); (b) 反射率曲线拟合后得到的电子密度分布

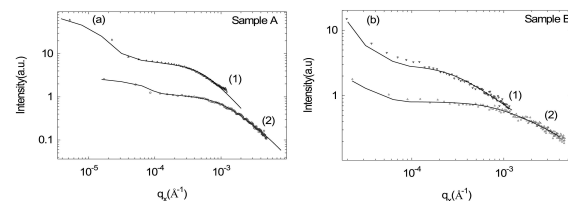


图 3 样品的漫散射曲线

数字代表 Bragg 衍射级数, 符号为实验数据, 实线为拟合结果.

细胞膜力学参量是表征膜本身物理性质的重要指标, 其变化能够反映细胞的新陈代谢、呼吸作用、光合作用、信息传导、物质跨膜运输等生命活动的改变. 其中弯曲模量可以通过漫散射测量获得. 样品 A 和 B 在各自一、二级 Bragg 峰处分别作的漫散射曲线如图 3 所示, 拟合方法源于修正后的 Caillé 理论^[15, 17]. 与高 q 区相比, 漫散射信号在低 q 区被 Bragg 峰处的强反射信号所掩盖, 所以

前者的实验数据对拟合结果起决定性作用. 拟合结果表明样品B($K_c = (5.5 \pm 0.3) \times 10^{-20} \text{J}$)比样品A($K_c = (6.3 \pm 0.2) \times 10^{-20} \text{J}$)的弯曲模量小.

根据已有低浓度条件下抗菌肽与磷脂膜相互作用的实验结果, 有关膜蛋白与脂膜这一混合系统的理论研究也逐步进行^[18-21]. 在建立模型时, 蛋白的几何形状通常被简化为圆柱形, 蛋白与脂双层的位置关系为: 蛋白垂直插入脂双层中. 基于此模型, 理论上不但成功地解释了随蛋白浓度的增加, 脂双层逐渐变薄的实验现象, 同时还预言了脂膜的弯曲模量随蛋白浓度的提高呈线性上升^[22]. 从我们的实验结果(丙甲菌素使得脂膜的弯曲模量变小)来看, 在高浓度条件下这一理论是不适用的, 究其原因很可能是该简化模型在高浓度条件下是失效的. 近期对脂膜中抗菌肽的

结构分析^[23]也证实了这一点. 人们发现丙甲菌素的 α 螺旋轴与膜表面并非简单的垂直关系, 而是在脂膜中有较大的倾角分布.

4 结论

应用固-液界面的X射线散射方法, 研究了高浓度条件下丙甲菌素对磷脂膜的作用. 反射率曲线的拟合结果表明丙甲菌素使脂双层变薄. 漫散射曲线的拟合结果表明丙甲菌素使脂膜的弯曲模量变小.

作者感谢漫散射站贾权杰在实验过程中给予的帮助.

参考文献(References)

- Zaslloff M. Nature, 2002, **415**(6870): 389
- Sansom M S P. Eur. Biophys. J., 1993, **22**: 105
- Sansom M S P. Prog. Biophys. Molec. Biol., 1991, **55**: 139
- Bechinger B. Biochim. Biophys. Acta, 1999, **1462**: 157
- Shai Y. Biochim. Biophys. Acta, 1999, **1462**: 55
- de Grado W F, Musso G F et al. Biophys. J., 1982, **37**: 329
- Tosteson M T, Holmes S J et al. J. Membrane Biol., 1985, **87**: 35
- HUANG H, WU Y. Biophys. J., 1991, **60**: 1079
- Ludtke S, HE K, HUANG H. Biochemistry, 1995, **34**: 16764
- HE K, Ludtke S J et al. Biophys. J., 1996, **71**: 2669
- Kikukawa T, Araiso T. Arch. Biochem. Biophys., 2002, **405**: 214
- HUANG H W, CHEN F Y, Lee M T. Phys. Rev. Lett., 2004, **92**: 198304
- LI C H, Constantin D, Salditt T. J. Phys.: Condens. Matter, 2004, **16**: S2439
- Rand R P, Parsegian V A. Biochim. Biophys. Acta, 1989, **988**: 351
- HU S X, LI X H, JIA Q J et al. J. Chem. Phys., 2005, **122**: 124712
- JIANG X, ZHENG W, WU J et al. Rev. Sci. Instrum., 1995, **66**(2): 1694
- LI X H, LI M, MAI Z H. J. Phys. Chem., 2004, **B108**: 8338
- Goulian M, Bruinsma R, Pincus P. Europhys. Lett., 1993, **22**: 145
- DAN N, Berman A et al. J. Phys. (Paris), 1994, **4**: 1713
- Fournier J B. Phys. Rev. Lett., 1996, **76**: 4436
- Weikl T R, Kozlov M M, Helfrich W. Phys. Rev., 1998, **E57**: 6988
- CHEN C M. Physica, 2000, **A281**: 41
- Spaar A, Munster C, Salditt T. Biophys. J., 2004, **87**: 396

Effect of Alamethicin on the Structure of Lipid Bilayers^{*}

LI Da-Peng HU Shu-Xin MAI Zhen-Hong LI Ming¹⁾

(Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract Alamethicin is a 20-amino acid membrane-active peptide from the fungus *Trichoderma viride* that spontaneously inserts into lipid membranes and self-associates into transmembrane channels. It has an antimicrobial activity against fungi and Gram-positive bacteria. We have investigated the effect of the peptide on the structure of lipid membranes by X-ray scattering method. The highly aligned stacks of membranes were prepared by evaporation of organic solutions of alamethicin and 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine deposited on clean silicon surfaces and were immersed in excess ultra pure water. The in-situ X-ray measurements show that the membranes with inserted peptides become thinner and softer at high molar peptide/lipid ratio.

Key words alamethicin, lipid multilayers, liquid-solid interfaces, X-ray scattering

^{*}Supported by National Natural Science Foundation of China (10325419) and Beijing Synchrotron Radiation Laboratory

1) E-mail: mingli@aphy.iphy.ac.cn