科 学 通 报
第 38 卷 第 12 期 CHINESE SCIENCE BULLETIN 1993 年 6 月

用 NMR 方法研究稀土离子对 DPPC 脂质体构象的影响

赵大庆 高新风 裴奉奎 倪嘉缵
(中国科学院长春应用化学研究所,长春 130022)
黄 芬
(中国科学院生物物理研究所,北京 100080)

关键词 稀土、核磁共振、二棕榈酰磷脂酰胆碱

随着稀土元素在工农业中的广泛应用，稀土进入机体内的作用机理是人们日益关心的问题. 而稀土对生物体的作用,首先是通过生物膜. 因此研究稀土与生物膜的作用是阐明其生理过程的重要环节. 生物膜的结构比较复杂，而磷脂脂质体却能表现出生物膜膜脂结构的许多性质,是生物膜的理想模型.

磷脂极性基团处于亲水区和疏水区界面，其构象的变化直接影响着脂双层的结构从而影响膜蛋白的生理功能. 自 70 年代初，人们开始用 ^2H 四极劈裂和镧系位移试剂 NMR 技术研究磷脂酰胆碱极性基团构象并进行了报道[1-4]，建立了金属离子与极性基团作用的经典模型,认为在金属离子作用下,极性基团构象由平行于膜平面变成垂直于膜平面.

由于二维 (2D) NOESY NMR 技术是研究生物大分子构象的有力工具[5]，它可以直接提供各基团之间空间距离的信息. 本文用该方法研究了稀土离子对二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC) 极性基团构象的影响. 结果表明，DPPC 脂质体的极性基团平行于膜平面,当与稀土作用后,其构象并没有从平行于膜平面转变成垂直于膜平面.

1 材料与方法

DPPC 系 Sigma 公司产品，D_2O (99.8%) 为北京化工厂产品，其它试剂为分析纯. DPPC 脂质体和稀土重水溶液制备按文献[6]. 稀土离子与 DPPC 脂质体混合物浓度摩尔比为 1:5.

NMR 实验在 Varian Unity-400 型核磁共振仪上进行,实验温度为 50℃,以 DSS 为内标，2D NOESY 采用的脉冲序列为 $(\pi/2 - t_1 - \pi/2 - \tau_m - \pi/2 - t_2)$，为了压制 J 偶合交叉峰,在混合时间内引入 10% 的随机变化.

2 结果与讨论

2.1 DPPC 脂质体 2D NOESY 谱

图 1 给出 DPPC 脂质体 2D NOESY 谱,图 1 上部为一维谱及谱线归属. 极性基团氮上

1992-07-15 收稿,1993-01-10 收修改稿.

的甲基 (N—Me)，不仅与邻近的两个亚甲基有相关峰，并且与脂酰链上的亚甲基也有 NOE 作用．氘代 DPPC 脂质体 2D NOESY 研究结果表明[7]，该体系自旋扩散不是主要的驰豫机理，而交叉驰豫主要是分子间作用．两个基团上的H有 NOE 作用，其空间距离应在 5 Å 以内，DPPC 脂质体极性头只有平行于膜平面，与脂酰链部分亚甲基的距离才能在这个范围内，否则距离太远，不会出现 N—Me 与脂酰链亚甲基的交叉峰． 因此 DPPC 的极性基团平行膜平面的结论与经典模型一致． 从图 1 还可以看到 N—Me 与脂酰链端甲基 (t-Me) 的交叉峰．Xu 等[7]认为这可能是由于在高于主相变温度，DPPC 脂质体存在交叉结构所致．

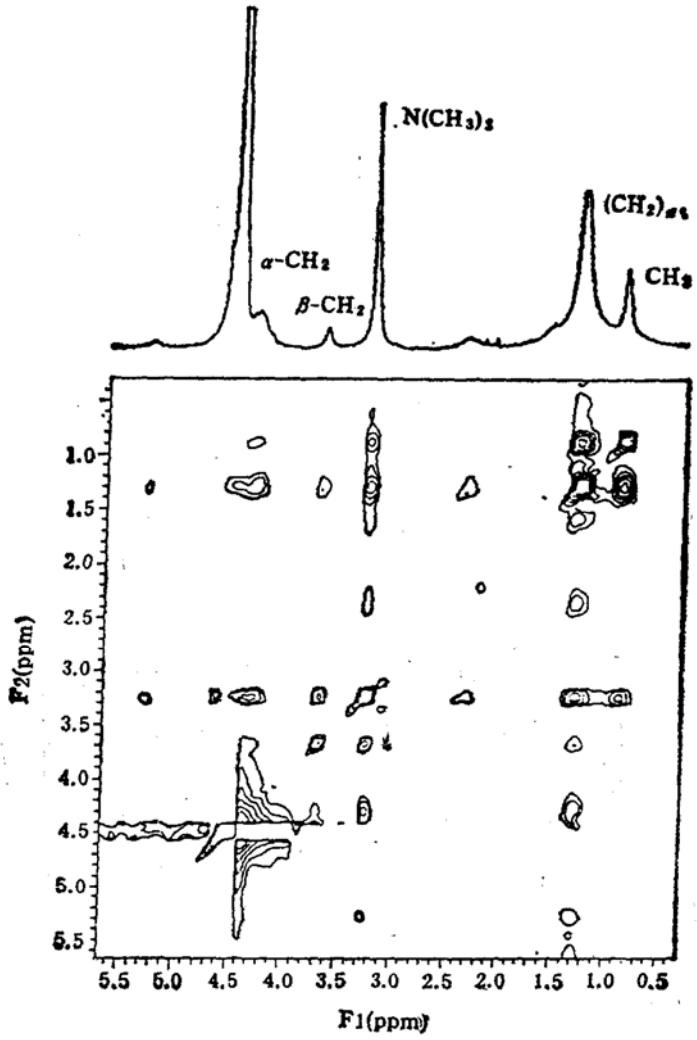

图 1　DPPC 脂质体 2D NOESY 谱

$\tau_m = 500$ms

2.2 稀土离子与 DPPC 脂质体混合物的 2D NOESY 谱

从 Pr^{3+} 与 DPPC 脂质体混合物的 2D NOESY 谱(图 2)可以看到，引入稀土 Pr^{3+} 离子后，脂酰链各基团间的相关峰强度未发生变化，说明稀土离子对两条脂酰链的构象没有影响．稀土离子与 DPPC 极性头 P—O 键配位[2]，不能扩散到脂质体内层，只能位于脂质体外表面．将顺磁离子 Pr^{3+} 引入到 DPPC 脂质体，表征外层极性基团的谱线将向低场移动，内层和外层谱线归属分别用 i 和 e 表示． 图 2 中出现了两个分别表征内层和外层 N—Me 与

t-Me 的交叉峰，说明稀土离子对 DPPC 脂质体交叉结构没有影响．我们感兴趣的是 N—Me 与脂酰链亚甲基 $(CH_2)_n$ 的交叉峰，从图 2 可以清楚地看到无论内层还是外层 N—Me 与 $(CH_2)_n$ 均有 NOE 交叉峰．考虑到对角峰的强度，内外层 N—Me 与 $(CH_2)_n$ 交叉峰的相对强度基本相同，为了确证内外层极性基团谱线的归属及其与脂酰链亚甲基的交叉峰，以 Eu^{3+} 离子替代 Pr^{3+} 离子，除表征外层极性基团的谱线向高场移动外，其它结果均相同．

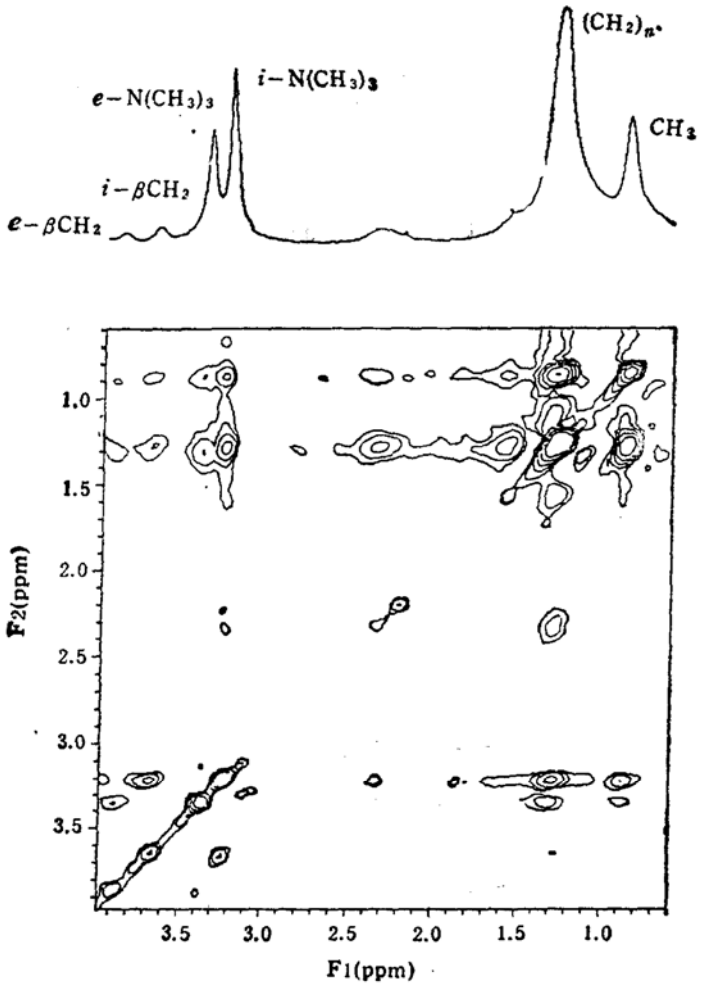

图 2 Pr^{3+} 离子键合后 DPPC 脂质体的 2D NOESY 谱

$\tau_m = 500ms$

N- -Me 与 $(CH_2)_n$ 的 NOE 作用可以通过自旋扩散和空间作用两种途径实现，对于超声处理得到的脂质体，自旋扩散是可能性相当小的驰豫机理[8]．对于空间驰豫机理，极性头构象发生变化，与酯酰链的距离将改变，势必影响 NOE 相关峰的强度．即使自旋扩散机理具有较多成分，极性基团构象变化后，自旋扩散速率也会发生变化，N—Me 与 $(CH_2)_n$ 相关峰强度也将受到影响；而事实上，引入稀土离子后，DPPC 质脂体内外层 N—Me 与 $(CH_2)_n$ 的相关峰相对强度未发生变化．该实验的结果充分说明稀土与 DPPC 键合后极性基团仍处于平行于膜平面的位置，而不是经典模型所描述的垂直于膜平面．

建立 DPPC 脂质体与金属离子作用经典模型的两种实验方法本身都可能产生一定的系统误差．稀土位移的方法忽略了接触位移的贡献，势必带来一定的误差．DPPC 各基团谱线强度相差较大，并且谱线较宽，引入顺磁离子，特别是能使谱线严重加宽的重稀土离子，很难得

到顺磁位移真实值。

由于引入金属离子后，DPPC 极性基团选择氘代 ^2H 四极劈裂值很小，不可能确切地归属为构象变化所致[9]。两种方法在构象拟合时起始模型的选择是非常重要的，选择不同的模型，可能得到不同的结论。Akutsu 等人[10]用同一组 ^2H 四极分裂数据，选择不同模型，拟合出的两种构象 P—N 矢量与膜平面的夹角相差近 30°。

由于 2D NOESY 谱可以直观地给出各基团之间空间距离的信息，避免了上述两种方法的不足之处，因此我们认为稀土离子对 DPPC 脂质体极性基团构象影响很小，键合后仍处于平行于膜平面的位置，而不是文献[3]所描述的垂直于膜平面的构型。

参　考　文　献

[1] Gally, H. U., Niedesberg, W., Seelig, J., *Biochemistry*, 1975, **14**: 3647—3662.
[2] Hauser, H., Phillips, M. C., Lerine, B. A. *et al.*, *Nature*, 1976, 261: 390—394.
[3] Brown, M. F., Seelig, J., *Nature*, 1977, **269**: 721—723.
[4] Akutsu, H., Seelig, J., *Biochemistry*, 1981, **20**: 7366—7373.
[5] Noggle, J. H., Schirmer, R. E., *The Nuclear Overhauser Effect*, Academic Press, New York, 1971.
[6] Bystrov, V. F., Dubrovina, N. I., Barsulkov, L. I. *et al.*, *Chem. Phys. Lipids*, 1971, **3**: 343—350.
[7] Xu, Z. C., Cafiso, D. S., *Biophys. J.*, 1986, **49**: 779—783.
[8] Horwitz, A. F., Horsely, W. J., Klein, M. P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1972, **69**: 590—593.
[9] Brown, M. F., Seelig, J., *Biochemistry*, 1981, 20: 7123—7133.
[10] Akutsu, H., Nagamori, T., *Biochemistry*, 1991, **30**: 4510—4516.