

# 同步辐射 X 光小角衍射法 研究尿素对磷脂相变的影响\*

尉志武<sup>1;1)</sup> 冯颖<sup>1</sup> 王俊<sup>2</sup> 董宝中<sup>2</sup> P. J. Quinn<sup>3</sup>

1 (清华大学化学系生命有机磷化学实验室 北京 100084)

2 (中国科学院高能物理研究所 北京 100039)

3 (Division of Life Sciences, King's College London, 150 Stamford St., London SE1 8WA, UK)

**摘要** 报道用差示扫描量热和同步辐射 X 光衍射方法研究尿素对二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)相变的影响. 结果表明尿素在任何所研究的浓度下均能稳定层状液晶相而不是反六角相和层状凝胶相, DOPE 多重膜的重复间距随尿素浓度的增加而增大. 磷脂表面和尿素之间形成氢键或者尿素破坏有序水结构的 Hofmeister 效应可能是影响 DOPE 相行为的原因. 此外, 鼠尾胶原蛋白的 X 射线小角衍射图谱可以作为小角衍射仪校准与标定的标准.

**关键词** 磷脂 DOPE 尿素 时间分辨 X 光衍射法

## 1 引言

生物膜不仅仅是镶嵌有蛋白质的磷脂双层结构, 它还是一高度动态的结构. 磷脂酰乙醇胺(PE)因其具有形成非层状相的能力以及它在混合膜中的分相行为对许多生理过程的重要作用, 常被用于研究生物膜稳定性的模型物质<sup>[1,2]</sup>. PE 的相行为受 pH 值、无机盐和有机共溶质等因素的影响<sup>[3,4]</sup>. 有文献报道, 有些添加剂如硫氰化物、盐酸胍能降低层状凝胶相到层状液晶相( $L_{\beta}$ - $L_{\alpha}$ )的相变温度( $T_m$ ), 同时, 升高  $L_{\alpha}$ 到反六角相( $H_n$ )的相变温度( $T_h$ ), 即稳定了  $L_{\alpha}$ 相. 另一类物质如二甲亚砜的作用正好相反, 它使得  $T_m$  升高而使  $T_h$  降低<sup>[5]</sup>.

共溶质对磷脂相变的影响取决于其与磷脂间的作用. 位于脂双层外水中的共溶质能影响磷脂头部基团的水合度或与磷脂头部形成氢键而发生直接作用, 或改变水结构使磷脂疏水性发生变化而发生间接作用<sup>[6]</sup>. 作为体内重要而特殊的水溶性物质, 尿素被发现可

\* 国家自然科学基金(29973019, 20133030)和教育部优秀青年教师资助计划资助

1)联系人

以影响蛋白质的稳定性<sup>[7-10]</sup>. 这里一般认为尿素是通过与水的作用, 破坏了水的结构, 而影响蛋白质结构的. 近年来的研究表明尿素对膜的行为也有影响. 它可作为渗透增强剂影响药物的摄入<sup>[11]</sup>. 有人曾尝试从尿素对水结构破坏的角度解释其对膜结构的影响<sup>[12]</sup>. 但也有学者认为含氨基的化合物能与磷脂之间形成氢键<sup>[13-15]</sup>, 甚至认为尿素与膜的作用可能是因为尿素与膜的疏水中心和亲水头基共同作用的结果<sup>[16]</sup>. 为了进一步认识尿素与生物膜的相互作用规律, 本文将用同步辐射 X 光衍射和差示扫描量热两种方法研究尿素对二油酰磷脂酰乙醇胺相变规律的影响, 这一工作尚未见文献报道.

鼠尾胶原蛋白的 X 射线衍射模式能为小角衍射仪的校准提供一种可靠的标准与标定依据, 它的谱图在主要峰之间没有任何其它的衍射峰, 表现出很高程度的可重复性<sup>[17]</sup>. 因此本研究尝试在北京同步辐射实验室建立以其作为标准的小角衍射标准系统.

## 2 实验药品和方法

二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE, 99%纯度)购自 Sigma 公司, 尿素(AR)购自北京刘李店化工厂. 它们都直接被使用, 没有进一步纯化. 尿素的溶液用去离子蒸馏水配制.

### 2.1 X 光衍射实验

X 光衍射实验分别在北京中科院高能物理研究所的同步辐射实验室小角散射实验站和英国 Daresbury 同步辐射实验室的 8.2 工作站上完成. 对于老鼠尾巴胶原蛋白的 X 光小角衍射实验, 先提取出老鼠尾巴胶原蛋白, 浸泡在 PBS 溶液中, 而后用 PBS 溶液充满样品池, 将它拉紧, 纵向固定, 测定水溶液中鼠尾胶原蛋白的衍射图(5—10min), 重复 3 次, 用 Fuji 感光板收集衍射图样, 得到它的 X 射线小角衍射图样. 对于 DOPE 样品的时间分辨的 X 光衍射实验, 先准备样品: 把尿素溶液加入干燥膜脂中使其重量比为 2 : 1, 用水浴法加热冷却几次样品以使其混合均匀, 然后把样品用薄云母片封入 1 mm 厚的小池中. X 光衍射实验中样品的加热和冷却速率为 3°C/min, 衍射结果采取大角和小角分别同时收集的方式(详细实验方法参见文献[18]).

### 2.2 差示扫描量热(DSC)

用 Mettler Toledo DSC 820° 进行 DSC 量热测定. 把磷脂样品直接加入铝制坩埚中, 然后加入尿素溶液(重量比 1:2). 为了保证混合均匀, 样品在 -40°C 和 40°C 之间循环几次直至得到重复的 DSC 图谱. 扫描速度为 1°C/min, 至少重复两次. 相变温度取加热过程吸热峰起始点. 由于在 -20°C 到 40°C 范围内, 除了磷脂的相变峰之外, 还有尿素溶液本身的相变峰. 为了避免后者对前者的影响, 实验中降温到 DOPE 的主相变完成之后及溶剂峰出现之前再恒温两分钟, 然后开始升温得到 DSC 图.

## 3 结果和讨论

### 3.1 DSC 实验结果

由 DSC 得到的 DOPE 溶于水或尿素溶液中的相变温度与尿素浓度关系总结于图 1 中. 在加热过程中, 可以看到两个相变峰, 第一个为  $L_{\beta}$ — $L_{\alpha}$  的相变峰, 第二个为  $L_{\alpha}$ — $H_{II}$  的相变峰(相的鉴定见 X 光衍射实验部分), 所对应的峰起始点温度即为相变温度.

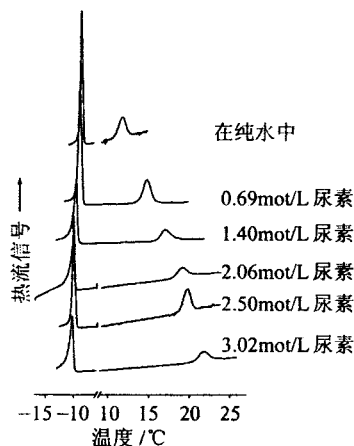


图 1 DOPE 的相变温度—尿素浓度 DSC 图

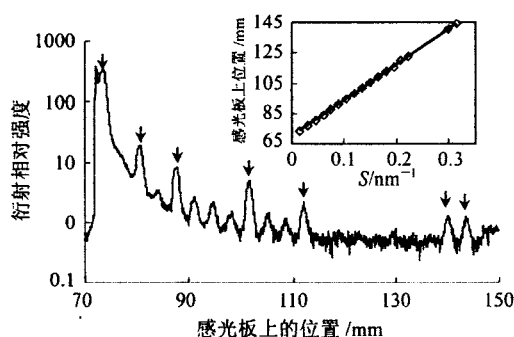


图 2 鼠尾胶原蛋白的同步辐射小角 X 光衍射图  
箭头标出了第 1, 3, 5, 9, 12, 20, 21 级衍射. 插图为各级衍射峰在感光板上位置与倒置间距的关系.

如图 1 所示,  $T_m(L_{\beta}$ — $L_{\alpha})$  随着尿素浓度的升高缓慢降低, 而  $T_h(L_{\alpha}$ — $H_{II})$  却随着尿素浓度的增大而显著升高. 由图 1 可以看出, 增大尿素含量能增大  $L_{\alpha}$  的温度范围, 即相对  $L_{\beta}$  和  $H_{II}$  而言能稳定  $L_{\alpha}$  相.

### 3.2 X 光衍射实验结果

对 PBS 溶液中鼠尾胶原蛋白的小角 X 衍射图样积分, 取一半图样进行数据处理, 得到图 2. 由图 2 可看出, 各个峰之间间距相同, 表现出规则的层状排列, 其中第 1, 3, 5, 9, 12, 20, 21 峰为较强峰, 4, 6, 7, 8, 10, 11 也为清晰的衍射峰. 低于第一峰位置的尖峰来自于遮光板边缘的衍射. 由布拉格方程  $2d\sin\theta=n\lambda$  可知, 各个峰出现在感光板上的位置与倒置间距 ( $S=n/d$ ) 成正比. 根据鼠尾胶原蛋白的结构参数 ( $d=670\text{nm}$ ), 用各个峰所对应的位置与它们所对应的倒置间距  $S$  作图(图 2 中插图), 进行线性拟合并外推, 可得光束中心位置在  $70.076\text{mm}$  处, 同时得到感光板上位置(mm)与  $d(\text{nm})$  间的关系. 除作标定外, 鼠尾胶原蛋白的 X 光小角衍射图谱还可被用来检验光路的调节结果.

3 mol/L 尿素溶液中的 DOPE 样品在从  $-11^{\circ}\text{C}$ — $36^{\circ}\text{C}$  加热过程中的时间分辨的小角和大角衍射图如图 3 所示. 可以看到, 在研究温度范围内有两个相变发生, 它们分别是  $L_{\beta}$ — $L_{\alpha}$  再到  $H_{II}$  相的转变. 相态的确定由小角衍射的结果结合大角衍射的峰形和位置来共同决定. 室温附近的小角衍射给出了  $d$  值比例为  $1:1/\sqrt{3}:1/\sqrt{4}$  的 3 个峰, 表明这是  $H_{II}$  相; 对应的大角结果为一发散的峰, 其峰中心位于  $0.46\text{nm}$  附近, 证明磷脂的尾链结构混乱, 处于液晶相( $\alpha$ ). 低温下的磷脂结构为层状(L), 其小角衍射  $d$  值比应给出  $1:1/2:1/3:1/4\dots$  的关系, 为了使  $H_{II}$  相更清楚, 这里只画出了层状相的第一个峰. 在  $-11^{\circ}\text{C}$  时大角衍射峰较尖锐, 处于  $0.43\text{nm}$  附近, 表明其为  $L_{\beta}$  相, 另外的 3 个峰 ( $0.392, 0.367$  和  $0.356\text{nm}$ ) 来自于冰的衍射<sup>[19]</sup>.

相变过程中小角衍射峰的重复间距( $d$ 值)会发生突变. 在  $L_{\beta}$ — $L_{\alpha}$ 相变中, 随温度的升高,  $d$ 值突然从 5.84nm 降低到 5.35nm. 对于  $L_{\alpha}$ — $H_{II}$ 相变,  $d$ 值从 5.13nm 陡然升高到 6.18nm.  $d$ 值突然变化的温度与量热过程中得到的峰的温度基本一致. 与 Yu 等人<sup>[19]</sup>所做

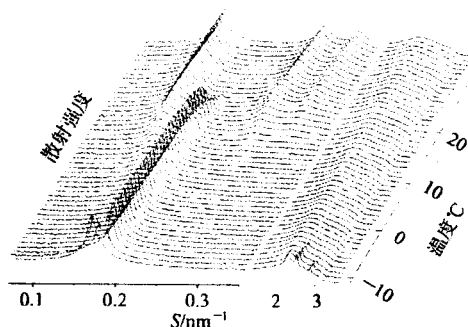


图 3 DOPE 溶于 3mol/L 尿素中的倒置间距( $S$ )与温度关系的小角(左)和大角(右)同步辐射 X 射线衍射图

的 DOPE 在过量水中的衍射图比较, 可以看到尿素能略微降低 DOPE 的  $L_{\beta}$ — $L_{\alpha}$ 的相变温度并升高  $L_{\alpha}$ — $H_{II}$ 的相变温度. 这与 DSC 的结果相一致.

有趣的是, 尿素在影响相变温度的同时, 还可以使 DOPE 在各相中的  $d$ 值随浓度不同而发生规律性的变化.

以 7°C 时 DOPE 在不同浓度的尿素溶液中的结构参数为例. 在此温度下, 所有样品都处于  $L_{\alpha}$ 相. 它们的重复距离  $d$ 值列于表 1. 可以看到, 随着尿素浓度的增加,  $d$ 值不断增大. 对于  $L_{\beta}$ 和  $H_{II}$ 相, 尿素同样增大了 DOPE 样品的  $d$ 值.

表 1 7°C 时不同浓度的尿素溶液中 DOPE 多层结构的  $d$  值

浓度/(mol/L)	0.0	0.5	1.0	2.0	3.0
$d$ /nm	5.10	5.15	5.16	5.17	5.20

### 3.3 尿素稳定 $L_{\alpha}$ 相

图 1 表明尿素能稳定 DOPE 的  $L_{\alpha}$ 相, 而且稳定作用随着尿素浓度的升高而增强. 尿素对磷脂的这种影响作用可以从两种分子机理来解释. 一种是直接作用, 尿素的极性很高, 而且其分子中有 6 个可能形成氢键的位点, 包括质子给体和受体. 位于界面处的尿素分子可与双层膜磷脂分子的头基部分形成氢键, 这将有可能会增大膜内 DOPE 相邻分子间的距离, 增大界面. 因为  $H_{II}$ 相和  $L_{\beta}$ 相的单个磷脂的分子头部截面积比  $L_{\alpha}$ 相小, 这意味着尿素的加入将有利于  $L_{\alpha}$ 相的存在, 即稳定  $L_{\alpha}$ 相而非  $L_{\beta}$ 相和  $H_{II}$ 相<sup>[12,20]</sup>.

另一种是间接作用, 即所谓 Hofmeister 效应<sup>[12]</sup>. 作为水结构破坏剂, 尿素可通过破坏水的有序结构、减弱水分子之间的氢键作用力, 从而减弱水溶液中疏水基团间的聚集趋势, 这将有利益于磷脂分子聚集体扩大其亲疏水界面, 从而稳定  $L_{\alpha}$ 相. 这种解释与文献中对尿素的认识是一致的<sup>[12,21,22]</sup>.

对于尿素而言, 可能直接作用与间接作用都存在, 而且随着尿素浓度的增大, 这两种作用都变得更加显著, 因此尿素稳定磷脂  $L_{\alpha}$ 相的作用随尿素浓度的增大而增大.

### 3.4 尿素与二甲基亚砜和丙酮比较

二甲基亚砜(DMSO)和丙酮都属于水溶性小分子, 且结构对称, 这与尿素相同, 但对 DOPE 相变温度和  $d$  值的影响不同. 相对 DOPE 的  $L_{\beta}$ 相和  $H_{II}$ 相, 丙酮和尿素作为水结构破坏剂都能稳定 DOPE 的  $L_{\alpha}$ 相, 而 DMSO 则相反, 它是水结构促进剂, 使  $L_{\alpha}$ 相存在的温度范围变窄, 从而稳定  $L_{\beta}$ 相和  $H_{II}$ 相<sup>[9]</sup>. 与此 3 种化合物的 Hofmeister 效应是一致的. 有趣的是它们对磷脂多层结构的重复间距  $d$  值的影响是不同的. 当 DOPE 处于  $L_{\alpha}$ 相时, 尿素使其  $d$  值增大, 而 DMSO 和丙酮则使其  $d$  值降低<sup>[19,23]</sup>. 这也许要从这 3 个小分子的分子结构、它们形成氢键的能力以及它们分别与溶剂水和磷脂头基之间的相互作用来解释.

作者感谢高能物理研究所生文君、柳义、张志杰及 Daresbury 实验室 Earnie Komanschek 在同步辐射实验中的帮助.

### 参考文献(References)

- 1 YANG Fu-Yu, HUANG Fen. Membrane Lipid-Membrane Protein Interaction and Application in Medicine and Agriculture. Ji'nan: Science and Technique Publisher of Shandong, 1996. 140—141 (in Chinese)  
(杨福愉, 黄芬. 膜脂—膜蛋白相互作用及其在医学和农业上的应用. 济南: 山东科学技术出版社, 1996. 140—141)
- 2 Shalaev E Y, Steponkus P L. Biochim. Biophys. Acta, 1999, 1419:229—247
- 3 ZHANG Zhi-Hong, LIU Weng-Long. Membrane Biological Physics. Beijing: High Education Press of China, 1987. 44 (in Chinese)  
(张志鸿, 刘文龙. 膜生物物理学. 北京: 高等教育出版社, 1987. 44)
- 4 Koynova R, Caffrey M. Chem. Phys. Lipids, 1994, 69:1—34
- 5 YU Z W, Quinn P J. Mol. Membr. Biol., 1998, 15:59—68.
- 6 Seddon J M. Biochim. Biophys. Acta, 1990, 1031:1—69
- 7 Brennan J D, Kallury K M R, Krull U J. Thin Solid Films, 1994, 244:898—904
- 8 Surrey T, Jahnig F. J. Biol. Chem., 1995, 270:28199—28203
- 9 Carlson S R, Goldstein L. J. Exp. Zool., 1997, 277:275—282
- 10 Patra S K, Alonso A, Goñi F M. Biochim. Biophys. Acta, 1998, 1373:112—118
- 11 Bentley M V L B, Kedor E R M, Vianna R F et al. Int. J. Pharm., 1997, 146:255—262
- 12 Sanderson P W, Lis L J, Quinn P J et al. Biochim. Biophys. Acta, 1991, 1067:43—50
- 13 Bergenstahl B A, Stenius P. J. Phys. Chem., 1987, 91:5944—5948
- 14 Gicquaud C, Auger M, Wong P T T et al. Arch. Biochem. Biophys., 1996, 334:193—199
- 15 Li S J, Kinoshita K, Furuike S et al. Biophys. Chem., 1999, 81:191—196
- 16 Barton K N, Buhr M M, Ballantyne J S. Am. J. Physiol., 1999, 276:R397—R406
- 17 Huxley H E, Brown W. J. Mol. Biol., 1967, 30:383—434
- 18 YU Z W, Quinn P J. Biochim. Biophys. Acta., 2000, 1509:440—450.
- 19 YU Z W, Williams W P, Quinn P J. Arch. Biochem. Biophys., 1996, 332:187—195
- 20 Soloaga A, Ramirez J M, Goni F M. Biochemistry, 1998, 37:6387—6393

- 21 Yeagle P L, Sen A. *Biochemistry*, 1986, 25:7518—7522
- 22 Tovchigrechko A, Rodnikova M, Barthel J. *J. Mol. Liq.*, 1999, 79:187—201
- 23 Kinoshita K, Yamazaki M. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1997, 1330:199—206

## Study of the Effect of Urea on the Phase Transition of Phospholipid by Synchrotron X-Ray Diffraction\*

YU Zhi-Wu<sup>1</sup> FENG Ying<sup>1</sup> WANG Jun<sup>2</sup> DONG Bao-Zhong<sup>2</sup> P. J. Quinn<sup>3</sup>

<sup>1</sup>(Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

<sup>2</sup>(Institute of High Energy Physics, CAS, Beijing 100039, China)

<sup>3</sup>(Division of Life Sciences, King's College London, 150 Stamford St., London SE1 8WA, UK)

**Abstract** Synchrotron X-ray diffraction and differential scanning calorimetry were used to study the effect of urea solutions on the phase behavior of Dioleoylglycero-phosphatidylethanolamine (DOPE). It was found that urea could stabilize lamellar liquid-crystalline phase at the expense of lamellar-gel phase and non-bilayer inverted hexagonal phase. The repeat distance of DOPE multilamellar structure increases with the increasing of urea concentration. The molecular mechanisms are discussed in terms of the possible hydrogen bonds between urea and the phospholipid head groups and the Hofmeister effect of urea, where urea is taken as a water-structure breaker. In addition, X-ray diffraction pattern of a wet rat tail collagen fiber was collected and was used as calibration standard at small-angle diffraction stations.

**Key words** phospholipid, DOPE, urea, synchrotron, X-ray diffraction

---

\* Supported by NSFC(29973019, 20133030) and the Foundation for the Excellent Youth Scholars of the Ministry of Education of China