论文

细胞色素 C/心磷脂相互作用的 Langmuir-Blodgett 膜界面特性研究

李俊花, 孙润广*, 郝长春*, 王娟, 张蕾, 逯晓龙

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, 西安 710062

*通讯作者, E-mail: biophymed@snnu.edu.cn; haochangchun@snnu.edu.cn

收稿日期: 2015-07-22; 接受日期: 2015-08-21; 网络版发表日期: 2015-09-17

doi: 10.1360/N032015-0139

摘要 心磷脂(CL)是真核细胞线粒体内膜中的主要磷脂之一. 细胞色素 C (Cyt c)是线粒体内膜呼吸链的必要成分, 与许多疾病有关. 本文采用 Langmuir-Blodgett 技术结合原子力显微镜(AFM)研究了不同量的 Cyt c 与 CL 单层膜相互作用的特性. 结果表明, Cyt c 在 CL 单层膜上吸附量存在阈值. 单层膜在 5、10 mN/m 膜压时经历压缩扩张循环后, 界面分子几乎无损失, 但是在 20 mN/m 膜压时, 界面分子出现损失. 通过 Volmer 理论模型定量计算界面分子损失的数量, 发现当 Cyt c 分别为 0、2.5、5 μL 时, 界面损失的分子占总分子数的 1/1000, 当 Cyt c 分别为 10、15 μL 时, 界面损失的分子数占总分子数的 1/100. 线粒体内膜中 Cyt c 的缺失或释放会引起某些疾病. 因此, 探究不同量 Cyt c 和 CL 之间的相互作用机理可为线粒体异常引起的疾病提供重要的信息.

关键词细胞色素 C
心磷脂
单层膜
原子力显微镜
理论分析

1 引言

细胞色素 C (Cyt c)是线粒体内膜中一种含金属血红素的外周蛋白, 是线粒体呼吸链的必要成分之一^[1]. Cyt c 是一种分子量相对较小的水溶性球形蛋白(相对分子量为 12000), 直径约为 34 Å^[2,3]. 研究结果表明, Cyt c 是细胞呼吸的激活剂, 它与细胞呼吸困难、神经麻痹、心肌梗塞等许多疾病有关. 临床上 Cyt c 常用于组织缺氧时的急救和辅助用药, 如一氧化碳中毒、严重休克缺氧、肺部疾病及心脏疾病引起的缺氧等. 近几十年, Cyt c 缺失被广泛用来研究对动物细胞胚胎发育和细胞凋亡的影响^[4,5]. 研究线粒体内膜的外周蛋白细胞色素 C 与脂膜之间的相互作用, 可以更好地理解一些重要的细胞生命活动过程, 如在细胞衰老和凋亡过程中, 细胞膜是如何发射传导这种信号等问题^[6].

Cyt c 是一种重要的电子转移载体, 它可以在细胞色素 C 的氧化酶和还原酶之间通过改变自身血红素中铁离子的价态来转移电子^[1,7,8]. Cyt c 在转移电子的过程中可以促进氢和氧结合, 加强细胞的氧化还原反应. 有研究报道, Cyt c 和脂膜之间的相互作用与 Cyt c 转移电子的特性和细胞凋亡过程中 Cyt c 的释放有密切联系^[7,9~11]. 细胞在凋亡前, Cyt c 在线粒体膜上聚集, 形成一条孔道, 便于 Cyt c 从该孔道中释放^[12]. 因此, 研究 Cyt c 和脂膜之间的相互作用, 对探究 Cyt c 转移电子的机理、细胞的新陈代谢和细胞凋亡有重要的生物学意义.

Cyt c 有两个疏水通道, 这两个疏水通道把血红素裂缝和蛋白质表面连接起来^[8], 这使得细胞色素 C 可以吸附在脂膜上. 心磷脂(Cardiolipin, CL)是一种含有 4 个酰基链的带负电性磷脂, 广泛存在于真核细

胞的线粒体内膜中, 约占总脂的 25%~30%^[13]. 在真核生物的能量代谢中, CL 被认为是一种必不可少的磷脂, 其在维持线粒体的结构和功能中发挥着关键性的作用^[8]. 线粒体中 CL 的存在直接影响到线粒体嵴的基本结构和不同蛋白复合体的稳定性. 因此, 研究不同量的 Cyt c 与 CL 相互作用的机理及界面特性, 不仅对阐明 Cyt c 转移电子的机制有重要的意义, 而且对进一步研究一些由线粒体异常引起的疾病有重要的医学参考价值.

Langmuir-Blodgett 是一种能够制备具有生物功能的人造薄膜的技术^[14,15], 原子力显微镜(AFM)提供了一种新型的在纳米范围观测生物薄膜表面形貌的功能. 本文将 Langmuir-Blodgett 技术与 AFM 技术结合, 研究了不同 Cyt c 蛋白量对 CL 单层膜在空气/亚相界面的影响; 观测了 Cyt c 蛋白分子在脂膜上的聚集状态和排列情况, 从而来验证 Cyt c 在 CL 膜表面的吸附特征; 通过对不同量的 Cyt c 与 CL 相互作用的表面压力-平均分子面积(π -A)等温线和滞回曲线的分析, 结合 Volmer 方程来定量研究蛋白-脂的混合单层膜在界面上分子的损失情况.

2 实验部分

2.1 试剂

细胞色素 C (Cyt c)从马心中提取, 是氧化形式的蛋白, 纯度 $\geq 95\%$; 心磷脂(CL), 纯度 $\geq 98\%$, 二者均购于 Sigma 化学试剂公司(USA). 无水乙醇、甲醇、氯仿等有机溶剂均购于天津市科密欧化学试剂有限公司(中国). 实验用水为去离子水. CL 溶解在氯仿/甲醇(3:1, v/v)溶液中配成最终浓度为 1 mg/mL 的脂溶液. 实验中亚相为 50 mmol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 7.4). Cyt c 溶解在磷酸盐缓冲液中, 浓度为 1×10^{-4} mol/L.

2.2 膜实验: 表面压力-平均分子面积(π -A)等温线和滞回曲线

单层膜实验所用仪器为 KSV Minitrough (KSV Instrument, Finland), 槽子的有效长宽分别为 364 和 75 mm, 亚相的体积约为 240 mL. 亚相中加入适量的 Cyt c 溶液, 将适量的 CL 脂溶液用微量注射器滴加在亚相界面, 让其自动迅速铺展, 静置 15 min 使亚相中有机溶剂完全挥发. 然后驱动滑障以 10 mm/min 的速率压膜, 同时, 可以通过 Wilhelmy 天平来自动记录

表面压的变化从而获得 π -A 等温线. 在 20 mN/m 的膜压时以 1 mm/min 的速率使用垂直提膜法将蛋白和脂的混合单层膜转移到新解离的云母片上. 滞回曲线: 单层膜在恒定的目标膜压时, 经过连续压缩和扩张循环后, 通过记录分子面积和表面压的变化, 来计算界面分子的损失情况. 以上实验温度控制在 $21 \pm 1^\circ\text{C}$.

2.3 原子力显微镜观测单层膜

沉积在云母片上的单层膜用原子力显微镜 (SPM-9500-J3 AFM, Shimadzu Instruments Co. Ltd., Japan)来观测. 采用标准扫描头, 微悬臂选用 100 μm , V 形探针, 材料 Si_3N_4 , 悬臂的弹性常数为 0.06 N/m. 扫描采用接触模式, 扫描频率为 1.0 Hz, 所有图片采集的像素点为 512×512 . 整个扫描过程都在室温下进行.

3 结果与讨论

3.1 不同量的 Cyt c 与 CL 单层膜在空气/亚相界面相互作用的 π -A 等温线和压缩系数分析

图 1 给出了不同量的 Cyt c 与 CL 单层膜在空气/亚相界面相互作用的 π -A 等温线和压缩系数曲线. 将适量的 CL 溶液滴加在磷酸盐缓冲液亚相界面, 亚相中加入 Cyt c 的体积分别为 0、2.5、5、10、15 μL , Cyt c 的浓度为 1×10^{-4} mol/L (亚相的体积为 240 mL). 从图 1(a)可以看出, 纯的 CL 单层膜在平均分子面积约为 200 $\text{\AA}$ 时表面压力开始增加, 这与文献报道^[16,17]一致. 亚相中加入 Cyt c 时, 单层膜的 π -A 等温线移向比纯的 CL 单层膜分子面积大的方向, 说明有一部分 Cyt c 分子吸附在了 CL 单层膜上. 随着亚相中 Cyt c 量的增加, 发现混合单层膜的 π -A 曲线逐渐向平均分子面积小的方向移动, 但是 Cyt c/CL 混合的单层膜的平均分子面积还是大于纯的 CL 单层膜. 可以看出, 当 Cyt c 的量为 2.5、5 μL 时, 两条 π -A 曲线基本重合, 当 Cyt c 的量增加到 15 μL 时, π -A 曲线明显向分子面积小的方向移动. 出现这种现象的原因可能是: 当 Cyt c 的量为 2.5 μL 时, Cyt c 在 CL 单层膜上的吸附量达到了最大值; 当 Cyt c 继续增加时, 吸附在 CL 单层膜上的蛋白会携带部分脂质被挤入亚相导致平均分子面积减小, 这与之前的文献报道^[14,18]相一致. 与脂质分子相比, 蛋白分子更大而且具有更复杂的空间结构, 在外力滑障的不断挤压下, 蛋白分子易于浸入亚

相导致混合膜的平均分子面积减小. 这说明 Cyt c 分子在 CL 单层膜上的吸附量存在一个阈值, 超过该值时, 部分蛋白分子会相互聚集甚至携带部分脂质分子浸入亚相导致界面的分子数量减小(与下面滞回曲线结果相一致). 这一点恰好与真核细胞的线粒体内膜中所含 Cyt c 有一个合适的量, 过量或缺失都会导致线粒体功能发生异常相符. 根据之前的报道: Cyt c 分子有两个疏水通道, 将血红素裂缝和蛋白表面连接起来, 在这两个疏水通道中其中一个通道被位于反向的天冬氨酸-52 (Asn-52)、赖氨酸-72 (Lys-72)和赖氨酸-73 (Lys-73)环绕着^[8]. Cyt c 分子在中性 pH 溶液中带 8 个单位的正电荷, 而 CL 分子含有 4 条酰基链, 带两个单位的负电荷, 因此, Cyt c 分子吸附在 CL 单层膜上主要靠静电引力的作用, 以及氢键相互作用. Cyt c 与 CL 之间静电结合主要是 Cyt c 中赖氨酸残基(Lys)与去质子化的 CL 结合, 而氢键相互作用主要是 Cyt c 中的 Asn-52 与质子化的 CL 结合^[8]. 因此, Cyt c 在 CL 单层膜上的吸附情况与 CL 的质子化程度密切相关, CL 的质子化程度成为诱导 Cyt c 与 CL 单层膜相互作用的一个关键因素. 并不是每个到达表面的蛋白分子都能吸附在脂膜上, 而是蛋白分子吸附在脂膜上要克服表面能势^[19]. 由此可见, 蛋白分子在磷脂单层膜上不能无限制的吸附, 而且有一个趋于饱和状态的阈值.

为了研究不同量的 Cyt c 分子吸附在 CL 单层膜上对膜压缩性/弹性的影响, 本文引进了一个物理状态量, 即等温压缩系数(β), 根据 π -A 曲线计算压缩系数公式如下^[14,20-22]:

$$\beta = -\left(\frac{1}{A}\right)\left(\frac{\partial A}{\partial \pi}\right)_T \quad (1)$$

式中 A、 π 分别为平均分子面积和表面压. 从 β - π 曲线

可以得出混合单层膜的压缩性和稳定性. 从图 1(b)中可看出, β - π 曲线在膜压为 40~45 mN/m 之间有唯一的最高峰, 最高峰代表 Cyt c 分子和 CL 分子在该膜压下相互作用最强. 这是由于在该膜压下, 分子与分子之间距离较小, 分子间相互作用最强. 随着膜压继续增大, 单层膜出现崩溃, 部分分子被挤入亚相. 在整个压力范围内, 纯的 CL 单层膜的压缩系数大于 Cyt c/CL 混合膜. 随着单层膜上蛋白的吸附量增加, 混合膜的压缩系数减小. 这说明纯的脂膜较容易被压缩, 膜具有较好的流动性, 当膜上蛋白的吸附量增加时, 混合的单层膜不易被压缩, 整个膜的流动性降低. 对照图 1(a)的 π -A 曲线可知, β 值越小, 脂膜上蛋白的吸附量越大. 这是因为蛋白分子较脂质分子大而且空间结构较复杂, 蛋白分子吸附在脂膜上导致整个混合膜不易被压缩, 膜的流动性降低.

CL 质子化程度决定了 Cyt c 在脂膜上的吸附量, 而蛋白在脂膜上的吸附量会影响膜的流动性. 从生物学角度考虑, 细胞膜具有选择透过性, 通常情况下外源性 Cyt c 分子不能进入健康细胞; 当细胞处于缺氧状态时, 膜的通透性增加, 外源性的 Cyt c 可以进入细胞或线粒体, 从而缓解细胞的缺氧状态^[23]. 膜的通透性增加还可能导致 Cyt c 从线粒体中释放, 诱导细胞的凋亡甚至影响动物的胚胎发育.

3.2 不同量的 Cyt c 与 CL 单层膜在空气/亚相界面相互作用的滞回曲线分析

为了进一步研究不同量的蛋白对脂膜分子在界面的影响, 本文分别研究了在膜压为 5、10、20 mN/m 时, 不同量 Cyt c/CL 混合膜的滞回曲线(压缩扩张曲线). 从图 2 可知, 在膜压为 5 mN/m 时, Cyt c/CL 混合单层膜的扩张曲线与压缩曲线紧密重合在一起, 与

图 1 Cyt c/CL 单层膜的 π -A 等温线(a)和其压缩模量曲线(b)

图2 Cyt c/CL 单层膜在膜压为 5 mN/m 时的滞回循环曲线. 蛋白量分别为 0 μL (a), 2.5 μL (b), 5 μL (c), 10 μL (d), 15 μL (e)

加入的 Cyt c 的量无关. 这表明在 5 mN/m 时, 混合膜被压缩后可以再次扩张到初始状态, 界面上的分子没有损失, 混合膜具有很好的弹性. 如图 3 所示, 当膜压为 10 mN/m 时, 无论 Cyt c 的量是多少, Cyt c/CL 混合单层膜的压缩扩张曲线几乎都重合在一起. 单层膜在低膜压时, 经过压缩扩张循环以后, 单层膜仍具有很好的弹性, 可以自动恢复到初始状态, 界面的分子几乎没有损失. 单层膜经历了一个近似于可逆的压缩和扩张循环过程.

在不同量的 Cyt c 条件下, Cyt c/CL 单层膜在膜压为 20 mN/m 时的滞回循环曲线如图 4 所示. 纯的 CL 单层膜作为对照组, 实验加入的 Cyt c 量分别为 2.5、5、10、15 μL . 纯的 CL 单层膜在膜压为 20 mN/m 时, 脂膜的压缩曲线和扩张曲线不再重合, 扩张曲线滞后于压缩曲线, 它们之间存在小的滞回现象. 在同一压力下, 扩张曲线的平均分子面积小于压缩曲线的平均分子面积, 这表明在膜压 20 mN/m 时压缩纯脂膜, 膜上的分子减少, 界面上出现了分子损失的情况. 在 Langmuir-Blodgett 膜体系中, 理想情况下, 认为纯脂单层膜在压缩过程中界面分子无损失. 但是在实际实验中, 在膜压较高时压缩单层膜界面分子会出现一定的损失(图 4(a)). 纯的心磷脂单分子膜的界面分子损失主要归结于外界滑障的压缩. 从图 4(a, b) 发现, 当加入 Cyt c 的量为 2.5 和 5 μL 时, 混合单层

脂膜的滞回现象几乎与纯的 CL 单层膜一样. 由图 4(c, d) 可以看出, 随着 Cyt c 量的增加, Cyt c/CL 混合单层膜较纯 CL 单层膜的滞回现象越来越明显, 当 Cyt c 为 15 μL 时, Cyt c/CL 混合单层膜的滞回现象最明显, 即在同一压力下, 混合膜的扩张曲线与压缩曲线的平均分子面积减小量最大. 这表明, 混合的单层膜在 Cyt c 为 15 μL 时, 界面的分子损失最多. 这一现象恰好验证了图 1(a) 的 π -A 等温线, 即 Cyt c 为 2.5 和 5 μL 时, 蛋白质分子吸附在脂膜上, 两条等温线几乎重合; Cyt c 从 10 μL 增加到 15 μL 时, 等温线明显向平均分子面积小的方向移动, 界面上的 Cyt c 蛋白分子或脂质分子浸入亚相, 界面分子损失比 Cyt c 为 2.5 和 5 μL 时严重. 出现这一现象的原因可能是: 随着 Cyt c 蛋白浓度的增加, 吸附在心磷脂膜上的 Cyt c 蛋白在高浓度下发生聚集, 形成较大的聚集体(从 AFM 图中可以看出, Cyt c 蛋白浓度越大, 蛋白聚集体的尺寸越大), 这些聚集体在压缩过程中, 分子与分子间的距离减小, 大的聚集体携带部分脂质进入亚相, 而在扩张过程中无法恢复到初始状态, 因此, 界面分子损失较低浓度的明显, 即当 Cyt c 蛋白浓度较大时, 混合单层膜界面分子的损失受膜上高浓度蛋白形成的聚集体携带部分脂质浸入亚相这一因素的影响.

通过对膜压分别为 5、10、20 mN/m 时的压缩曲线与扩张曲线分析可知, 单层膜在低膜压时, 压缩扩

图 3 Cyt c/CL 单层膜在膜压为 10 mN/m 时的滞回循环曲线. 蛋白量分别为 0 μL (a), 2.5 μL (b), 5 μL (c), 10 μL (d), 15 μL (e)

图 4 Cyt c/CL 单层膜在膜压为 20 mN/m 时的滞回循环曲线. 蛋白量分别为 2.5 μL (a), 5 μL (b), 10 μL (c), 15 μL (d). 纯 CL 作为对照组

张循环是可逆循环;而在高膜压时,扩张曲线滞后于压缩曲线,单层膜的压缩扩张循环是不可逆循环,单层膜界面分子出现了损失,单层膜不能自动恢复到

初始状态.

为了定量研究单层膜上分子在界面的损失情况,本文引进一个理论模型,即 Volmer 方程. Volmer 方

程是描述两亲性分子单层膜状态的方程, 它把单层膜上分子的表面压和有效分子面积联系起来, 可以定量给出单层膜上界面分子的总数量. Volmer 方程的形式与二维范德瓦尔斯方程($\pi = \frac{mkT}{A-\omega} - \frac{a}{A^2}$, 其中 π 是表面压(mN/m), A 是每个分子的面积(cm^2), m 是一个参数, 代表动力学中独立单元的数量, k 是玻尔兹曼常数, T 是绝对温度(K), ω 代表单层膜在气相状态下一个分子的极限分子面积(cm^2), $\frac{a}{A^2}$ 是分子间的相互作用力)相似, 即用槽子的面积(S)除以界面分子的总数(n)来代替范德瓦尔斯方程中每个分子的面积(A), 用分子间相互作用的内聚压力(π_{coh})来代替分子间的相互作用力($\frac{a}{A^2}$). 由此可得, Volmer 方程的具体形式如下^[24-26]:

$$\pi = \frac{mkT}{(S/n) - \omega} - \pi_{\text{coh}} \tag{2}$$

式中, n 可以定量地给出单层膜在经历压缩和扩张循环后, 界面上分子的损失数量. 因此, 在 Volmer 方程

中, 我们重点研究 n 值的变化. 设单层膜压缩曲线的界面分子总数量为 n_c , 扩张曲线的界面分子总数量为 n_e , 单层膜经历一次压缩扩张循环后界面上分子损失的量为 Δn ($\Delta n = n_c - n_e$). 从图 4 的实验数据可知, 单层膜在膜压为 20 mN/m 时, 界面分子有损失. 为了定量计算不同蛋白量的单层膜在经历一次压缩扩张循环后界面分子的损失, 本文采用 Volmer 方程来拟合图 4 的实验数据, 理论拟合曲线如图 5 所示. 在图 5 中, 点代表 Cyt c/CL 单层膜在膜压为 20 mN/m 时的滞回循环曲线的实验数据, 实线代表采用 Volmer 方程拟合的理论曲线. 可以看出, 理论拟合曲线与实验数据非常吻合. 理论分析曲线也是在蛋白量为 15 μL 时, 单层膜的压缩扩张循环曲线的滞回现象最明显. 用 Volmer 方程来拟合图 4 滞回曲线的实验数据时, 方程的每个物理量单位必须统一, 所有的数据拟合均在 Origin 8.5 上完成. 在膜压为 20 mN/m 时, 用 Volmer 理论模型拟合不同的蛋白量 Cyt c/CL 单层膜的滞回循环曲线的实验数据, 界面分子的损失结果见表 1.

从表 1 可以看出, 当 Cyt c 的量为 0、2.5、5 μL

图 5 Cyt c/CL 单层膜在膜压为 20 mN/m 时的滞回循环曲线. 点是图 4 对应的实验数据, 实线是理论拟合曲线. 蛋白量分别为 0 μL (a), 2.5 μL (b), 5 μL (c), 10 μL (d), 15 μL (e)

表 1 Volmer 理论模型拟合不同蛋白量的单层膜的滞回实验数据对应的 Δn 值

混合膜中 Cyt c 的量(μL)	0	2.5	5	10	15
Δn 值	8.65×10^{12}	1.41×10^{12}	9.32×10^{12}	6.91×10^{13}	8.80×10^{13}

时, 单层膜在界面损失的分子数 Δn 的值为 10^{12} 数量级; 当 Cyt c 的量为 10 和 15 μL 时, 单层膜在界面上损失的分子数 Δn 的值为 10^{13} 数量级. 我们知道, 实验中滴加在界面上的分子总个数为 10^{15} 数量级, 可以得出当 Cyt c 的量为 0、2.5、5 μL 时, 单层膜界面分子损失的个数占总分子数的 1/1000, 而当 Cyt c 的量增加到 10 和 15 μL 时, 单层膜界面分子损失的分子个数占总分子数的 1/100. 出现这种现象的原因可能是: 随着蛋白量的增加, 单层膜在压缩过程中, 蛋白分子在界面上发生了重排或折叠, 具有复杂空间结构的部分蛋白分子会携带部分脂质向亚相转移, 但是单层膜在扩张过程中不能恢复到初始状态, 导致界面损失的分子数增加. 可以看出, 随着蛋白量的增加, 单层膜在压缩扩张循环过程中界面分子损失的数目增多. 通过理论分析, 验证了 π -A 等温线和滞回曲线的实验分析.

通过 Volmer 理论模型, 定量计算了不同 Cyt c 蛋白量时界面分子损失的数量, 该定量结论可以在生物学方面, 为体外注射 Cyt c 来缓解线粒体中由于 Cyt c 的缺失或释放引起的病变提供重要的理论参考值, 具有重要的生物学意义和潜在的临床应用价值.

在膜压为 20 mN/m、Cyt c 的量为 15 μL 时, 单层膜在压缩扩张循环过程中界面分子损失数目最多, 占总分子数的 1/100. 我们猜想, 在同样的膜压和蛋白量条件下, 经历多次压缩扩张循环, 单层膜会出现连续的滞回现象, 即压缩扩张曲线向左移动, 单层膜的平均分子面积减小. 连续的压缩扩张循环使得单层膜上界面的分子数目连续减少. 图 6 所示为 Cyt c 为 15 μL 、Cyt c/CL 混合单层膜经历 4 次压缩扩张循环后的滞回曲线. 混合单层膜在连续 4 次压缩扩张循

环后, 曲线连续向左移动, 单层膜的平均分子面积连续减小. 图 6 验证了该猜想.

3.3 不同量的 Cyt c 与 CL 单层膜的 AFM 图分析

本实验在 20 mN/m 时采用竖直提膜法, 将单层膜沉积在新解离的云母片上, 然后对不同量的 Cyt c 和 CL 混合单层膜的形貌图进行了 AFM 观测(图 7). 从图 7(a)可看出, 纯的 CL 单层膜整体呈现颗粒状结构, 单层膜由许多小的颗粒紧密组装在一起, 部分 CL 分子相互聚集成一些不规则的枝状结构, 这与之前的文献报道^[16]一致, 脂膜的高度约 2 nm. 图 7(b)中可以看出, 许多白色亮的球形颗粒吸附在脂质单层膜上(图中呈现白色亮的球形结构为蛋白分子, 之前文献报道过 Cyt c 的浓度为 1×10^{-4} mol/L 时其在 AFM 图呈球形颗粒^[27]). 通过 AFM 测量其蛋白的直径为 31~110 nm, 高度为 5~22 nm (远远高于脂膜), 可知我们观察到的白色球形颗粒是蛋白的聚集体. 因之前已报道过单个 Cyt c 分子的直径为 34 Å, 所以该聚集体由 10~30 个 Cyt c 单体构成^[2,3]. 图 7(c~e)中蛋白颗粒大于图 7(b), 大的蛋白聚集体易浸入亚相, 导致膜上的蛋白量减小, 混合膜的平均分子面积较 Cyt c 2.5 μL 减小. 图 7(b~e)中, 加入的 Cyt c 依次为 2.5、5、10、15 μL , 随着 Cyt c 量的增加, CL 单层膜上吸附的蛋白逐渐减少. 在图 7(a)中, 纯的颗粒状 CL 单层膜由于蛋白的作用在图 7(d, e)中呈现出像小油滴一样的片状结构. 可知蛋白质使得 CL 单层膜的表面形貌发生了显著改变. 从图 7(c~e)可以观察到, Cyt c 促使 CL 单层膜变得疏松, 当 Cyt c 为 15 μL 时, 单层膜最疏松, 可以明显观察到在蛋白的边缘围绕着一圈脂质分子, 而在脂质分子的周围出现了一圈缺陷. 为了更清楚地观察图 7(e), 将其放大, 如图 7(f)所示, 可以清楚地看到蛋白周围的脂质膜上出现了分子损失, 单层膜变得疏松. 这验证了之前 π -A 等温线和滞回曲线的分析.

4 结论

本文研究了线粒体内膜中不同量的 Cyt c 与 CL 单层膜相互作用的界面特性. (1) Cyt c 在 CL 单层膜上吸附量存在阈值, 当 Cyt c 的量超过该阈值时, 界面上部分蛋白分子会携带脂质分子浸入亚相, 导致单层膜的平均分子面积减小; (2) 吸附在膜上的 Cyt c

图 6 在膜压为 20 mN/m 时, CL-Cyt c (15 μL) 单层膜经历 4 次压缩扩张循环的滞回曲线

图7 不同量的 Cyt c 和 CL 混合单层膜在 20 mN/m 时的 AFM 图. Cyt c 的量分别为 0 μL (a), 2.5 μL (b), 5 μL (c), 10 μL (d), 15 μL (e). (f)是(e)的放大图; (a~e)的扫描范围为 $5\times 5\ \mu\text{m}$, (f)的扫描范围为 $2.5\times 2.5\ \mu\text{m}$

蛋白越多, 单层膜的压缩系数越小, 膜的流动性越低; (3) 将滞回曲线实验与理论相结合, 通过 Volmer 理论模型, 定量分析给出不同含量 Cyt c 蛋白时界面分子损失的数目及占总分子数的比例; (4) AFM 观测结果表明, 随着 Cyt c 的量增大, CL 单层膜越来越疏松, 脂膜上吸附的蛋白减少, 蛋白的周围出现了缺陷, 这

可能与线粒体的某些疾病有关, 验证了 π -A 曲线和滞回曲线的分析结果; (5) 定量计算了不同 Cyt c 蛋白量时界面分子损失的数量, 该结论可以为体外注射 Cyt c 来缓解线粒体中由于 Cyt c 的缺失或释放引起的病变提供理论参考值, 同时, 对进一步研究和解释某些线粒体疾病具有重要的意义.

致谢 本工作得到国家自然科学基金(21402114)、陕西省自然科学基金(2012JQ1002)、中央高校基本科研业务费专项(GK201402010)资助, 特此一并致谢.

参考文献

- 1 Liu AR, Qiao DJ, Wakayama T, Nakamura C, Miyake J. Monolayers, Langmuir-Blodgett films of carbon nanotubes-Cytochrome C conjugates and electrochemistry. *Colloid Surface A*, 2006, 284-285: 485-489
- 2 Khomutov GB, Belovolova LV, Khanin VV, Soldatov ES, Trifonov AS. STM investigation of electron transport features in Cytochrome C Langmuir-Blodgett films. *Colloid Surface A*, 2002, 198-200: 745-752
- 3 Liu MH, Kira A, Nakahara H, Nagahama A. Monolayer assembly of long-chain histidine derivative for arrangement of Cytochrome C molecules. *Thin Solid Film*, 1998, 327-329: 113-117
- 4 Liu Z, Lin H, Ye S, Liu QY, Meng ZH, Zhang CM, Xia YJ, Margoliash E, Rao ZH, Liu XY. Remarkably high activities of testicular Cytochrome C in destroying reactive oxygen species and in triggering apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 8965-8970
- 5 Li K, Li YC, Shelton J, Richardson JA, Spencer E, Chen ZJ, Wang XD, Williams RS. Cytochrome C deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. *Cell*, 2000, 101: 389-399
- 6 Dabkowska AP, Fragneto G, Hughes AV, Quinn PJ, Lawrence MJ. Specular neutron reflectivity studies of the interaction of Cytochrome C with supported phosphatidylcholine bilayer doped with phosphatidylserine. *Langmuir*, 2009, 25: 4203-4210
- 7 Domènech Ò, Redondo L, Montero MT, Hernández-Borrell J. Specific adsorption of Cytochrome C on cardiolipin-glycerophospholipid monolayers and bilayers. *Langmuir*, 2007, 23: 5651-5656

- 8 Gorbenko GP, Molotkovsky JG, Kinnunen PKJ. Cytochrome C interaction with cardiolipin/phosphatidylcholine model membranes: effect of cardiolipin protonation. *Biophys J*, 2006, 90: 4093–4103
- 9 Pinheiro TJT. The interaction of horse heart Cytochrome C with phospholipid bilayers, structural and dynamic effects. *Biochimie*, 1994, 76: 489–500
- 10 Robinson NC. Functional binding of cardiolipin to Cytochrome C oxidase. *J Bioenerg Biomembr*, 1993, 25: 153–163
- 11 McMillin JB, Dowhan W. Cardiolipin and apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1585: 97–107
- 12 Lim LRM, Lum MG, Hansen TM, Roucou X, Nagley P. On the release of cytochrome c from mitochondria during cell death signaling. *J Biomed Sci*, 2002, 9: 488–506
- 13 Sennato S, Bordi F, Cametti C, Coluzza C, Desideri A, Rufini S. Evidence of domain formation in Cardiolipin-glycerophospholipid mixed monolayers. A thermodynamic and AFM study. *J Phys Chem B*, 2005, 109: 15950–15957
- 14 Kamilya T, Pal P, Talapatra GB. Incorporation of ovalbumin within cationic octadecylamine monolayer and a comparative study with zwitterionic DPPC and anionic stearic acid monolayer. *J Colloid Interf Sci*, 2007, 315: 464–474
- 15 郝长春, 孙润广, 张静, 常怡光, 牛春玲. 鞘氨醇/胆固醇单层分子膜的热力学特性及表面形态的 AFM 观测. *中国科学 B 辑: 化学*, 2008, 38: 1018–1024
- 16 Chen YY, Sun RG, Wang B. Monolayer behavior of binary systems of Betulinic acid and Cardiolipin: thermodynamic analyses of Langmuir monolayers and AFM study of Langmuir-Blodgett monolayers. *J Colloid Interf Sci*, 2011, 353: 294–300
- 17 Wydro P. The influence of Cardiolipin on phosphatidylglycerol/phosphatidylethanolamine monolayers-studies on ternary films imitating bacterial membranes. *Colloid Surface B*, 2013, 106: 217–223
- 18 Kamilya T, Pal P, Talapatra GB. Adsorption of pepsin in octadecylamine matrix at air-water interface. *Biophys Chem*, 2010, 146: 85–91
- 19 Martin AB. Interaction between β -Lactoglobulin and phospholipids at the air/water interface. *Langmuir*, 1996, 12: 2791–2797
- 20 Thapa A, Vernon BC, Peña KDL, Soliz G, Moreno HA, López GP, Chi EY. Membrane-mediated neuroprotection by curcumin from Amyloid- β -peptide-induced toxicity. *Langmuir*, 2013, 29: 11713–11723
- 21 Gao WY, Yu ZW. New features on the phase transitions of Behenic acid monolayers as unveiled by 2D-compressibility coefficient. *Chinese J Chem*, 2008, 26: 1596–1600
- 22 Yu ZW, Jin J, Gao Y. Characterization of the liquid-expanded to liquid-condensed phase transition of monolayers by means of compressibility. *Langmuir*, 2002, 18: 4530–4531
- 23 Morin D, Pires F, Plin C, Tillemant JP. Role of the permeability transition pore in Cytochrome C release from mitochondria during ischemia-reperfusion in rat liver. *Biochem Pharmacol*, 2004, 68: 2065–2073
- 24 Kuo CC, Kodama AT, Boatwright T, Dennin M. Particle size effects on collapse in monolayers. *Langmuir*, 2012, 28: 13976–13983
- 25 Houmadi S, Ciuchi F, Santo MPD, Stefano LD, Rea I, Giardina P, Armenante A, Lacaze E, Giocondo M. Langmuir-Blodgett film of hydrophobin protein from *pleurotus ostreatus* at the air-water interface. *Langmuir*, 2008, 24: 12953–12957
- 26 Fainerman VB, Kovalchuk VI, Lucassen-Reynders EH, Grigoriev DO, Ferri JK, Leser MK, Michel M, Miller R, Möhwald H. Surface-pressure isotherms of monolayers formed by microsize and nanosize particles. *Langmuir*, 2006, 22: 1701–1705
- 27 Yoon JH, Lee KS, Yang JE, Won MS, Shim YB. Electron transfer kinetics and morphology of Cytochrome C at the biomimetic phospholipid layers. *J Electroanal Chem*, 2010, 644: 36–43

The interfacial characteristic of mixed Cytochrome C/Cardiolipin Langmuir-Blodgett monolayer

Junhua Li, Runguang Sun^{*}, Changchun Hao^{*}, Juan Wang, Lei Zhang, Xiaolong Lu

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

^{*}Corresponding authors (email: biophymed@snnu.edu.cn; haochangchun@snnu.edu.cn)

Abstract: Cardiolipin (CL) is one of main phospholipids in the inner membrane of eukaryotic cell mitochondrion. Cytochrome c (Cyt c) is an essential component of the inner mitochondrial respiratory chain. In this work, Langmuir-Blodgett monolayer technique combined with atomic force microscopy (AFM) was used to study the interaction between different amount of Cyt c and CL monolayer at air-buffer interface. It indicates that there is a threshold value of the adsorption quantity of Cyt c on CL monolayer. The hysteresis curves indicate that the molecules of the monolayer have almost no loss at the air-buffer interface after the compression-expansion cycle under a low pressure of 5, 10 mN/m. However, the expansion curves lag the compression curves under a high pressure of 20 mN/m. With the increment of Cyt c, the hysteresis phenomenon is more and more obvious, the number of losing molecules also increased. The Volmer theoretical model was also introduced to quantitatively calculate the amount of interfacial molecular loss. When the amount of Cyt c is 0, 2.5, 5 μL , the number of losing molecules only accounts for 1/1000 of the total molecules; but the amount of Cyt c is 10, 15 μL , the number of losing molecules accounts for 1/100 of the total molecules. This work provides important information for researching some diseases caused by abnormal mitochondrion.

Keywords: Cytochrome c, Cardiolipin, monolayer, atomic force microscopy, theoretical analysis