

生物立方膜 *

吕文华^{1)**} 刘菲菲^{2)**} 邓瑜如^{1)***}

(¹⁾温州生物材料与工程研究所, 温州 325000; (²⁾常州大学制药与生命科学学院, 常州 213000)

摘要 脂质立方液晶在药物载体方面有着较为广泛的应用。然而在生物体内, 有一种与之类似的结构, 称为立方膜。具体而言, 立方膜就是指含有脂蛋白的三维周期性脂质双分子单层、双层或多层的纳米曲面结构。亚细胞器中的这种生物立方膜结构可能也能作为药物载体, 同时有抗氧化、紫外滤光等潜在作用。本文将主要介绍立方膜的研究进展、形成机理, 以及在自然界中的存在情况, 及其功能和潜在的应用价值。

关键词 生物膜, 膜脂质, 立方膜, 立方相

学科分类号 Q2, Q6

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0063

细胞膜是生命活动的必需组成。在原核细胞中, 作为唯一膜结构的质膜将其生命物质与外界环境隔离开, 形成了最初意义上的细胞。但是这种细胞的生命活动比较简单, 细胞内膜系统的形成和完善是生物进化过程中的一次飞跃。这些内膜将细胞分隔成若干独立空间。在每个膜包裹的亚细胞器三维空间聚集着特定种类的生物大分子, 共同完成着某些特定的生命活动。经过漫长的研究^[1], 已经普遍认识到细胞膜主要是由脂质、蛋白质和糖类组成二维平面磷脂双层膜。其中, 构成细胞膜的脂质统称为膜脂(membrane lipid), 膜脂主要包括甘油磷脂、鞘脂和固醇三种基本类型^[2]。这些分子均具有双亲性(amphipathic), 即这些分子都有一个亲水末端(极性端)和一个疏水末端(非极性端)。

20 世纪 60 年代, Luzzati 提出由具有两亲性的脂质分子在三维空间内扩展形成的脂类双层膜和两条水道组成的脂质立方液晶^[3]。由于其独特的内部双水道结构和巨大的膜表面积的存在, 使得脂质立方液晶能够作为药物载体, 多样化地包封各种不同极性和剂量的药物^[4-9]。双连续立方结构在膜蛋白结晶和药物输送系统中有着巨大的应用潜力^[10]。然而, 随着进一步的研究, 发现在特定的生理或病理条件下细胞的细胞器中观察到了类似脂质立方液晶结构的立方曲面结构, 被称为生物立方膜^[11]。传统

观点认为生物膜是一种平面结构, 最多是一种简单折叠, 但立方膜的研究彻底打破了这一认识。跟脂质立方液晶相相似, 细胞器中这些立方结构的膜可能也能作为药物载体, 同时有抗氧化、紫外滤光等潜在功能。本文将对立方膜的发现、结构、可能的形成机理、特性与功能、潜在的技术应用和研究现状及存在的问题进行介绍。

1 生物立方膜的研究进展

含有混合脂质的系统在合适条件下可形成对应形式的相, 而且具有双分子层的相分离、脂质在囊泡的内侧和外侧的不对称分布等各种现象, 这些现象在生物学上可能很重要。随着电子显微镜技术的发展与应用, 人们在细胞内观察到了类似脂质立方相的立方膜结构^[11-12]。立方膜是一种具有极小曲面的周期性立方对称结构, 它包括三种空间结构(图 1b): Gyroid (G) 型、Double diamond (D) 型和

* 国家自然科学基金(31670841)和温州生物材料与工程研究所科技重大专项(WIBEZD2015010-02)资助项目。

** 并列第一作者。

*** 通讯联系人。

Tel: 13912340803, E-mail: dengyr@wibe.ac.cn

收稿日期: 2017-02-28, 接受日期: 2017-10-20

Primitive (P) 型. 其与立方相的主要的区别在于晶格尺寸的大小, 立方相的晶格尺寸通常小于 20 nm, 而立方膜的晶格尺寸则通常在 50~500 nm 之间^[1]. 立方膜的结构主要是通过透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 得到.

TEM 可以获得一个三维物体切成薄片(50~70 nm)后进行投影的二维图像, 即能够看出该样品的内部结构 (图 2b). 连续切片及样品倾斜和旋转等方法的发展, 促进了我们对生物膜超微结构的进一步理解. 但是 TEM 技术手段只能提供立方膜某一截面

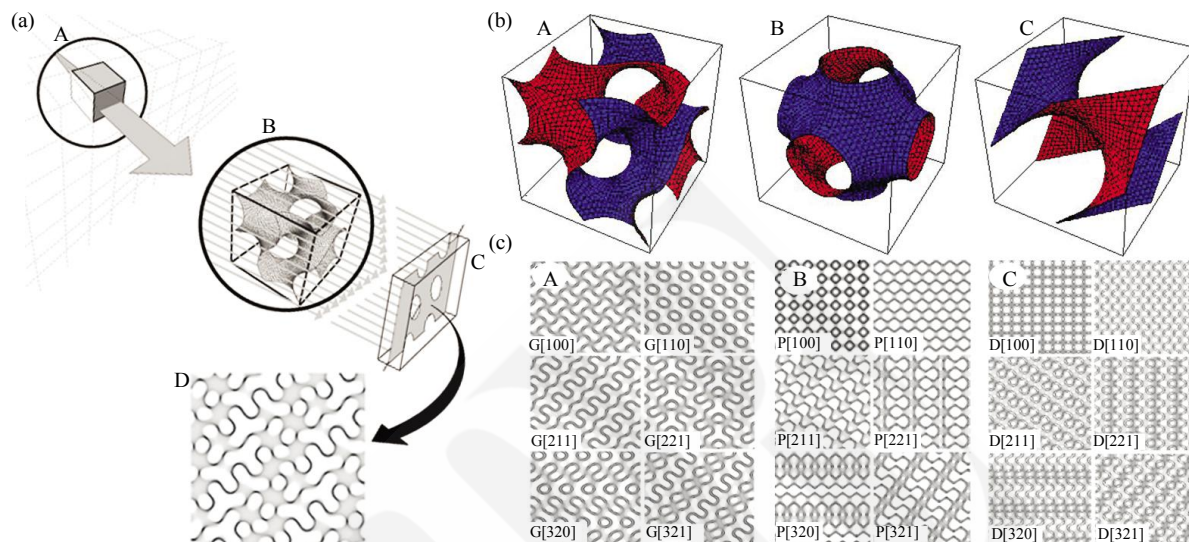


Fig. 1 Computer simulation of TEM images

图 1 计算机模拟的 TEM 仿真图像

(a) 对一定厚度的样本进行投影, 获得的 TEM 投影示意图. A: 电子束穿透的 3D 物体; B: 一个晶格单位的 Gyroid 型立方膜; C: 电子束入射的二维投影图; D: 2D 投影仿真图像. (b) 立方膜的三种空间结构. A: Gyroid (G) 型; B: Primitive (P) 型; C: Double Diamond (D) 型. (c) 计算机模拟产生的不同方向的二维投影图. A: Gyroid (G) 型; B: Primitive (P) 型; C: Double Diamond (D) 型.

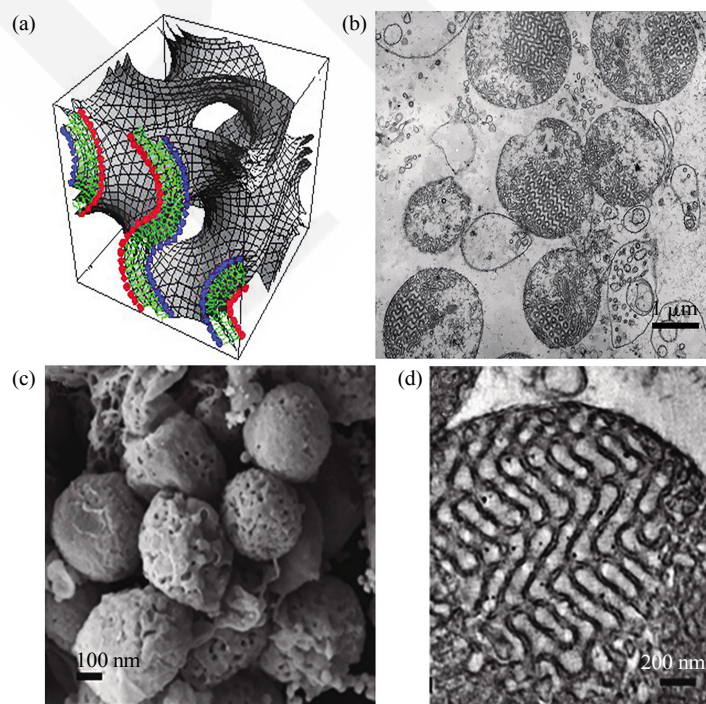


Fig. 2 Three-dimensional structure of cubic membranes and their TEM, SEM and ET images

图 2 立方膜的三维结构、透射电子显微镜 (TEM)、扫描电子显微镜 (SEM) 和电镜断层扫描技术 (ET) 图像

(a) 立方膜 G 型结构的三维空间图. (b) 饥饿态阿米巴细胞内线粒体的 TEM 图, 其内膜变成立方膜结构. (c) 饥饿态阿米巴细胞分离出的线粒体立方膜的 SEM 图像. (d) 饥饿态阿米巴细胞线粒体的电镜断层图像.

的二维结构信息, 当切片过程中切的角度不同, 会获得不同截面的结构投影图像, 从而会造成同一三维结构呈现出不同二维几何图案的现象, 对我们正确辨识立方膜的结构造成一定困扰. Landh, Mieczkowski & Deng 等开发了一种“直接模板匹配”(direct template correlative, DTC)方法, 很好地解决了这一问题^[13-14]. DTC 方法就是先对一定厚度的标准立方膜样品进行各个方向的投影, 获得计算机模拟 TEM 二维投影图案模板(图 1). 再将生物样品进行超薄切片, 在透射电镜下观察, 把获得的图像与计算机模拟仿真的模板对照, 匹配出其对应的三维结构, 能更好地辨别立方膜的纳米结构. 另外, 扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)可以提供立方膜颗粒的表面形貌(图 2c), 而精密的三维重建电镜断层扫描技术(electron microscopic tomography, ET)也为理解立方膜结构提供了膜的整体形貌和连续变形与更高的全面拓扑分辨率^[15](图 2d).

2 自然界中的立方膜

随着上述高端电镜技术手段的出现, 人们逐渐发现自然界中存在着很多立方膜(图 3). 例如, 多篇文献报道在许多亚细胞器内质网膜中观察到了立方膜, 但是由于对三维结构的不了解, 并没有统一的命名, 所以我们可以看到各种各样的“昵称”^[11]: “起伏的膜”^[16]、“锁子甲(cotte de mailles)”^[17]、“膜晶格”^[18]、“晶体膜”^[19]、“亚晶状的 ER”^[20]、“管网状结构(TRS)”^[21]、“有序的光滑型内质网(OSER)”^[22]等.

研究发现线粒体内膜结构也有类似的立方膜出现^[23-25]. Deng 等在阿米巴原虫 *Chaos* 细胞中观察到的由线粒体内膜形成的立方膜结构是目前最具表征的立方膜结构之一^[13](图 3a). 在普通树鼯(*Tupaia glis*)和北方树鼯(*Tupaia belangeri*)的视网膜视锥感光细胞内线粒体^[26-28]内膜中发现了迄今为止最为复杂的 8~12 层 Gyroid 生物立方膜超微结构^[29].

另外, 高等植物内的原片层体(prolamellar body, PLB)也呈现出 D 型立方膜结构^[30-36]. 光照以后, 这些原片层体(D 型立方膜)又会转变为经典的片层膜. 因此, 可以推测这类立方膜可能对光照极为敏感. 但在某些绿藻中, 叶绿体中的类囊体膜倾向于形成比平板层状结构更为复杂的膜结构. 双星绿藻(*Zygnema* sp.)中的叶绿体在细胞培养的对数生长末期到静止期会转变成 Gyroid 型立方膜(图 3b)^[37-38]. 在这个阶段, *Zygnema* sp. 的光合作用器发育已完全, 并且此立方膜的出现对光照条件并不敏感, 与高等植物中原片层体立方膜的出现条件刚好相反^[39], 这也表明细胞老化或营养匮乏等应激反应可能是决定 *Zygnema* sp. 叶绿体内立方膜形态转换的重要因素. 比较有趣的是, 在这项研究中不仅发现了单层的立方膜结构, 同时也有双层和多层立方膜结构出现, 而且与之前同一种绿藻叶绿体中发现的 P 型结构不同^[40], 该研究中发现的都是 G 型结构. 这些立方膜结构并不是单独存在, 而是跟层状结构形成一个层状-立方膜连续变形结构. 另有报道表明其他绿藻超微结构在温度应激作用下也会有立方膜出现^[41].

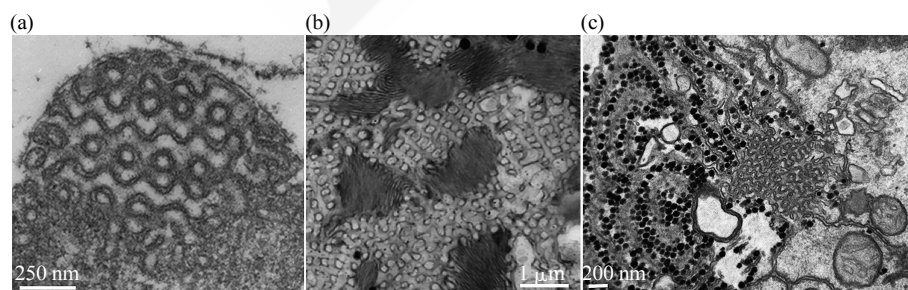


Fig. 3 Examples of cubic membranes in nature

图 3 立方膜在自然界中存在的例子

(a) 饥饿态阿米巴细胞中的立方膜结构. (b) 培养 41 天后的绿藻双星藻中叶绿体的超微结构. (c) Huh7 细胞中登革热病毒 NS4B 蛋白过表达时形成的立方膜结构.

除此之外, 一些自身免疫疾病细胞^[42]、癌细胞^[16]、病毒感染细胞^[43]、磷酸酶异常表达时的肌肉

细胞^[44]以及其他疾病的细胞中也会有立方膜的出现. 有时细胞内立方膜的形成并不局限于细胞质

侧,也可能发生在细胞核内.快速复制的肿瘤细胞^[45-46]或非癌细胞如卵母细胞^[47-48]的细胞核内也会出现立方或管网状的膜结构^[11].

3 立方膜形成机理

可能的自组装驱动形成的细胞膜的多态性,也许是为了适应生存逆境而形成的一种最优三维膜结构.这是一个动态且暂时存在的过程,而且依赖于膜脂质、膜蛋白和离子微环境等.在线粒体中有立

方膜形成的饥饿态阿米巴 *Chaos* 细胞内(图 4b)二十二碳五烯酸(C22:5)的浓度很高^[49],约是喂食态的1.6倍.而且在其饥饿状态下,缩醛磷脂 PC(C16:0/C22:5)的含量约是喂食态的1.2倍^[49],实验数据显示,缩醛磷脂(也存在于哺乳动物细胞膜)可以作为膜在三维空间非层状变形背后的驱动因素之一,因为它有促进脂质六角相结构形成的倾向^[50],同时在促进膜融合方面也有潜在作用^[51].

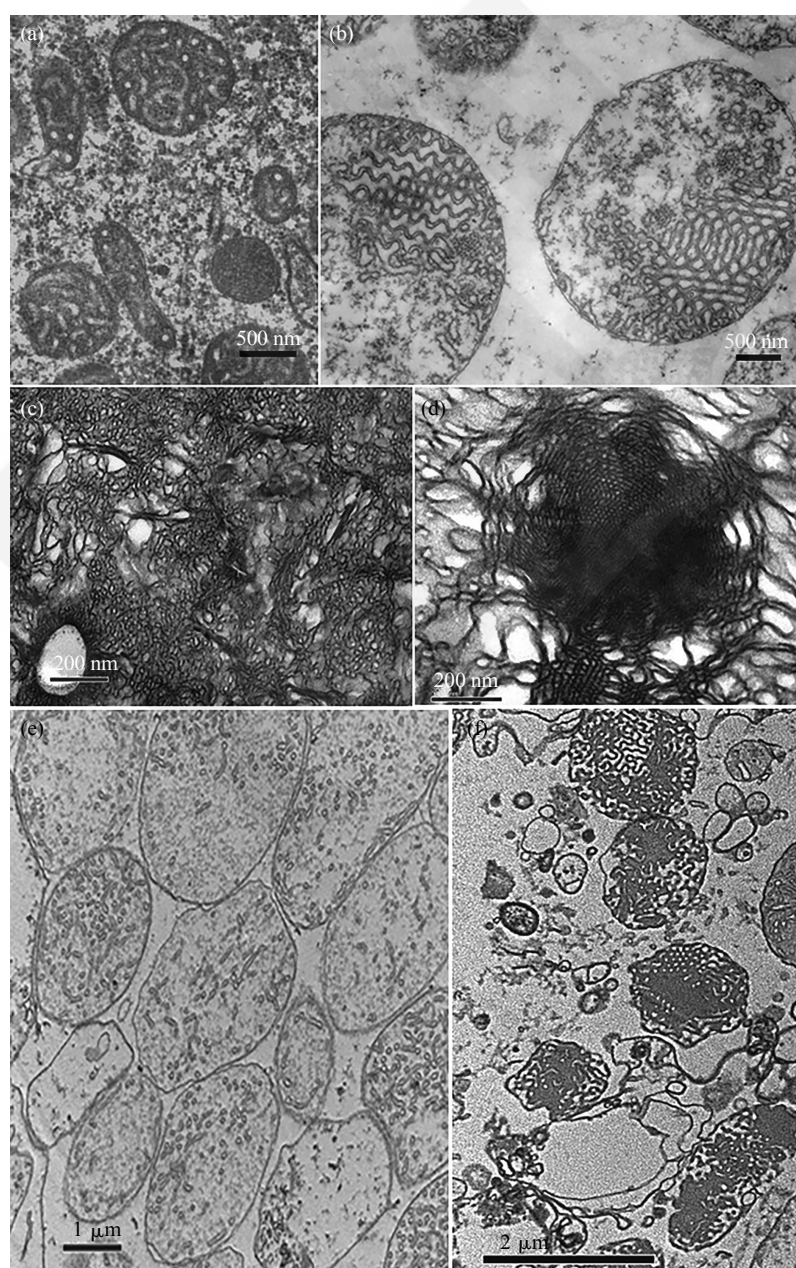


Fig. 4 Biological cubic membrane in vivo and in vitro

图 4 细胞内的生物立方膜的形成及其体外构建

(a) 喂食态阿米巴线粒体. (b) 饥饿态阿米巴线粒体. (c) 喂食态阿米巴提取脂质的体外构建. (d) 饥饿态阿米巴提取脂质的体外构建. (e) 当 EDTA 浓度为 1 mmol/L 时, 阿米巴线粒体内膜在体外的状态. (f) 当 EDTA 浓度为 10 mmol/L 时, 阿米巴线粒体内膜在体外的状态.

另外, 蛋白质也可能引起体外脂质膜相变从而促进膜三维结构的变形^[52]. 从饥饿态阿米巴 *Chaos* 细胞中提取的脂质可以在体外聚成立方相(图 4d), 但晶格大小与胞内的立方膜差异显著, 说明胞内其他调控因素(如蛋白质等), 可能参与并决定了这些三维膜结构晶格尺寸大小, 与脂质立方相的不同(如多层结构与较大孔径)^[49]. Angelova 等^[53]在近期的体外研究中发现, 将脑源性神经营养因子(BDNF)与脂质体混合后, 体系转变成三相共存的液晶结构, 而这一结构与植物细胞中的 HMG-CoA 还原酶过表达时出现的结构非常相似^[54]. 另外, 哺乳动物 UT-1 细胞中 HMG-CoA 还原酶过表达^[55]以及 COS-7/CV-1 细胞中细胞色素 b5 过表达^[22]时也会形成类似的膜结构, 这一结果说明立方膜的形成很可能是细胞中由于微环境改变导致的蛋白质表达改变后与细胞膜相互作用的结果. 此外, 离子的静电荷在立方相的形成、稳定以及变形中也起了重要作用: 由膜蛋白质介导的分子间较弱的相互作用, 可能会导致胞内立方膜形成, 这也表明电荷作用在这一过程中发挥了重要作用^[22, 56]. 最近, 有关分离线粒体时缓冲溶液中二价阳离子(如 Ca^{2+})影响的报道表明当缓冲溶液渗透压和可溶性蛋白 BSA 的浓度改变时并不影响含有立方膜结构的分离态线粒体的完整性. 然而, 在 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 螯合剂 EDTA 的作用实验中, 当 EDTA 浓度为 0.05 mmol/L 时, 对线粒体片段有明显的破坏作用, 当 EDTA 浓度为 1 mmol/L 时, 外膜保存, 内膜原结构被破坏(图 4e), 而当 EDTA 浓度高达 10 mmol/L 时, 线粒体的内膜立方结构和外膜都保存完整, 说明当 EDTA 浓度为 10 mmol/L 时线粒体的立方膜结构可以在体外有效完整地保存(图 4f). 但是, 在此基础上加入 8 mmol/L 的 Ca^{2+} 时, 立方膜结构立即被破坏, 同时加入 Mg^{2+} 也有类似的破坏^[57]. 这一研究表明, 二价阳离子(Ca^{2+} , Mg^{2+} 等)是立方膜形成过程中保持三维膜结构稳定的关键, 而细胞内微环境中的 pH 值也可能是影响立方膜形态和完整性的重要因素之一. 体外对含有带负电的二油酰磷脂酸的甘油单油酸酯膜的研究表明, 膜表面电荷引起的静电作用^[58]、带电短肽^[56]、 Ca^{2+} 浓度^[59]、低 pH 值^[60]在层状相和立方相之间的转变以及立方相的稳定性方面起到了重要作用. 由于膜表面电荷密度的增加以及离子浓度的降低引起膜表面静电作用的改变, 脂质膜相可以从层状相转变为立方相, 这说明立方膜可能是为迅速适应细胞内特定的膜区域中对水含量、离

子浓度、电荷分布的一种即刻生理反应^[11].

4 立方膜的特性

4.1 与生物大分子相互作用的特性

近期研究发现, 从饥饿态阿米巴细胞中分离出的具有立方膜结构的线粒体微米颗粒可以高效地吸附并保留寡核苷酸(oligonucleotides, ODN)^[61](图 5a). ODN 和立方膜为何有如此高亲和力的分子机理还不是很清楚, 但是可以提出合理假设, 即电荷作用促进了 ODN 和高度弯曲并延伸的膜表面的吸附结合. 立方膜表面通道摄入和保留生物大分子的能力, 也许可以解释立方膜结构为什么会在病毒于宿主细胞中组装以及释放过程中出现^[43, 62]. 病毒进入宿主细胞, 其增殖和释放与立方膜形成密切相关的过程^[43]. 病毒基因组增殖过程中诱导产生的寄主细胞立方膜可为保护病毒 RNA 免受氧化损伤提供一个庇护所, 从而促进基因组的正确转录与翻译^[63].

另外, Xiao 等^[64]近期通过体外构建多糖立方液晶纳米颗粒(glycodendrimericubosomes, GDCs)和洋葱状颗粒(glycodendrimerosomes, GDSs), 并与凝集素进行作用, 发现 GDCs 对刀豆蛋白 A 有更高的活性, 并对野生型和变异型香蕉凝集素有更高的敏感性和选择性, 而 GDSs 组则没有明显的影响. 作者提出, 这可能说明处于病变状态下的细胞可能会从层状结构转成立方膜结构来进行细胞防御作用, 而且这种结构对凝集素的凝集有较大的影响作用.

4.2 光学特性

目前对基于三重周期性立方曲面(G, D 和 P)的光学性质已经有了较深入的研究^[65-67]. 在一般情况下, 光子晶体的晶格尺寸和受控波长的大小是相近或一样的. 已经发现具有 D 和 G 型立方曲面结构呈现非常广泛、完整的光子晶体的带隙特性^[61]. 有趣的是, 在小型哺乳动物树鼩的视锥感光细胞“晶状体线粒体”中也出现多层(8~12 层)gyroid 立方膜的结构^[11, 27]. 近期三维模拟仿真的结果显示树鼩视网膜感光细胞内线粒体多层立方膜结构能够对光线进行调节和过滤, 可作为紫外线过滤器和微纳米透镜、甚至有波导的作用(图 5c)^[29].

近年来, 昆虫鳞片细胞(比如蝴蝶翅膀)的光子晶体结构的研究也越来越广泛, 这些结构在某些特定条件下可以决定昆虫的结构色, 这在它们的生命活动中起着至关重要的作用^[68]. 在这些光子晶体结构中有很多具有 gyroid 型立方结构^[69-71], 而这类型生物光子晶体结构的研究是对 gyroid 光子晶体光学

性质研究的最直接简单的实验途径^[70].

4.3 抗氧化特性

在饥饿态的阿米巴细胞中, 线粒体内膜的三维结构发生了戏剧性的变化. 阿米巴细胞经历 1 天的饥饿后, 70% 的线粒体内膜会发生形态的转变; 而饥饿 7 天后, 几乎所有的线粒体中都能观察到这样的立方膜结构^[72]. Deng 等^[15]利用电镜断层扫描技术已证明, 在饥饿条件下阿米巴细胞线粒体内膜会转变为立方膜结构. 然而, 这种诱导转变同时伴随着细胞内活性氧的大幅度增加, 所以进一步推测立方膜的形成可能与氧化应激有关^[63, 73]. 有趣的是, 在再次喂养后, 阿米巴中已形成的立方膜结构可逆地转变回到原来的无序管状形态^[13].

与此同时, 饥饿态阿米巴 *Chaos* 细胞中自由基的含量比喂食态细胞中的含量高很多^[73]. 因此推测线粒体内三维空间膜结构的转变可能在细胞应对氧化刺激过程中发挥了重要作用^[73]. 高含量活性氧自由基与立方膜的同时出现让我们有理由相信, 饥饿处理后的细胞内抗氧化酶的含量应该会普遍提高. 但是对两种状态下细胞裂解物中的过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶进行定量分析, 发现其在喂食态 *Chaos* 细胞内抗氧化酶活性均较饥饿态高. 这一发

现显示饥饿态 *Chaos* 细胞中可能存在另一种对抗氧化损伤的保护机制^[63]. 通过进一步分析两种状态下的氧化损伤标志物, 发现喂食态 *Chaos* 细胞中丙二醛(MDA: 脂质过氧化的标志)含量大约是饥饿态细胞的 3 倍, 喂食态 *Chaos* 细胞中 OHG(RNA 氧化损伤的标志)含量也较饥饿态 *Chaos* 细胞高, 没有立方膜线粒体存在时 8-OHdG 的含量(DNA 损伤的标志物)大约是有立方膜线粒体存在时的 4 倍, 这些结果都表明立方膜很有可能是一种因其三维空间结构而具备生物物理特性的抗氧化防御系统^[63]. 另外, ODNs 除了可以被立方膜高效吸附保留外, 它还可以通过立方膜的相互作用降低其被体外自由基氧化的程度. 由于研究所用的 ODNs 和 RNAs 之间极其相似, 所以立方膜也可能是 RNAs 等生物大分子物质免受氧化的保护伞^[63](图 5b).

有文献报道, 立方膜形成的关键性脂质缩醛磷脂在脂质过氧化中起着保护作用^[74-75]. 缩醛磷脂是一种在 sn-1 有一个醚键, 在 sn-2 点富含长链多不饱和脂肪酸(PUFAs)的醚脂^[76], 这些脂质不仅是立方膜形成的主要脂质, 同时在膜的可塑性及转变成立方膜中可能起着关键作用^[49]. 由于缩醛磷脂中的醚脂键更易受到氧化攻击, 所以它可以作为抗氧化

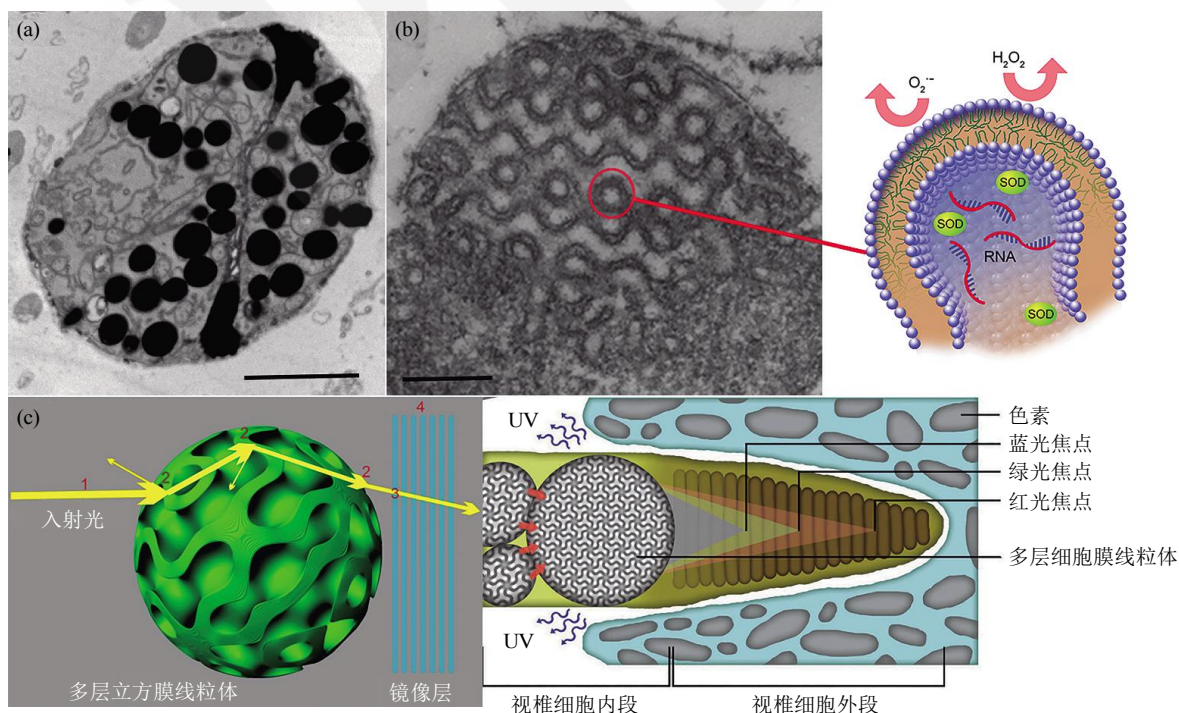


Fig. 5 Properties and functions of cubic membranes

图 5 立方膜的特性与功能

(a) 吸附 ODN 后的立方膜 TEM 图. (b) 饥饿态阿米巴细胞中的立方膜结构 TEM 图及其可能存在的抗氧化机理. (c) 树鼩视网膜锥体感光细胞线粒体内部的立方膜结构的模拟图及其体外仿真结构的光学特性.

剂^[77]. 研究表明, 由于邻近醚脂键的氢有较低的离解能, 暴露于各种自由基时迅速被氧化, 单线态氧与缩醛磷脂的反应明显比其他脂质快^[78-79]. Deng 等^[63]提出了一个集成模型, 由自然界选择立方膜结构优化分子组成, 使其同时是富含带有非常长链多不饱和脂肪酸(VLC-PUFA)的缩醛磷脂的三维膜结构. 这种带有 VLC-PUFA 的缩醛磷脂能够促进细胞膜从层状变为立方膜结构, 这种结构可以确保 RNA 正确的转录和翻译. 立方膜中对氧化敏感的缩醛磷脂和 VLC-PUFA 进一步阻止了 RNAs 的氧化. 因此, 立方膜可能在 RNAs 的防御系统中起到了间接作用^[63].

5 立方膜的潜在技术应用

立方膜的以上性质决定了其在仿生纳米技术等方面的潜在应用: a. 作为大分子的载体. 由于立方膜中大量缩醛磷脂与多元不饱和脂肪酸(C22:5n-6)脂质的存在, 载有寡核苷酸的立方膜由于与 RNA 等核酸分子间的相互作用, 在接近细胞质膜和核膜时更容易与膜融合^[80-81], 可作为有效的药物或基因载体. b. 作为结构抗氧化剂. 立方膜中含有大量具有抗氧化特性的缩醛磷脂, 这暗示立方膜形成可能是因为化学成分本身还有其三维空间结构而具有抗氧化特性. c. 作为光学滤镜. 立方膜作用相当于一个准 3D 生物光子晶体, 能够更有效率地抑制大部分短波长紫外光线的通过, 却允许较长波长的红光与绿光通过. 通过三维仿真数据(图 5c), 我们可以解释为什么树鼯视网膜会阻断光感受器外段近蓝光和紫外光的传播, 而起到保护视网膜避免紫外损伤的作用^[29]. d. 作为细胞内应激与发病机制的生物标志物. 立方膜的出现通常与各种环境应激、蛋白质合成或折叠失调、或更严重的细胞病理状况有关, 这种观点也许是因为相关研究主要都是研究病变细胞, 而不是针对所谓的正常生理应激状态下的细胞, 急性或慢性的细胞内外环境应激过程与特定的三维膜结构转变之间的联系还有待更进一步深入探究与厘清.

6 立方膜的研究现状及其存在的主要问题

虽然对立方膜的三维空间结构、可能的生物功能和应用价值有了一些前期的了解, 但是其形成分子机理仍是一个未解之谜. 作为生命科学研究领域的一个新分支, 立方膜的研究并没有为人们熟知. 近几年来关于生物立方膜的研究并没有很大的发

展, 归结主要原因可能是研究模型的缺乏. 自由生长的单细胞巨型阿米巴原虫 *Chaos* 是目前研究立方膜最好的表征系统之一, 但是由于它们的基因组学以及蛋白质组学的研究数据缺乏, 很难从根本上去解决立方膜形成机理问题的研究, 从而很难实现立方膜在真正意义上的应用. 然而, 在近期的研究中发现, 基因、蛋白质研究比较完善的毕赤酵母体系在非折叠蛋白响应(unfolded protein response, UPR)相关的 HAC1p 蛋白质过量表达的同时会有 P 型立方膜的出现^[82], 这给立方膜的研究指出了一个新的思路, 相对于阿米巴, 毕赤酵母不论从培养还是分析角度都有很大的优势, 因此, 利用酵母作为立方膜研究的模型可能是立方膜研究一个新的转折点.

此外, 虽然这种复杂的三维结构在相关合成的软物质材料中也比较多见^[83-85], 这些特殊的形态如何出现和为什么出现, 它们与生物体内大分子的相互作用, 与体外物理化学等因素的作用, 以及生物材料与合成的软物质自组装材料在结构形成机理中的异同目前都不是很清楚, 这也需要进一步深入探索.

7 立方膜的研究前景

鉴于立方膜对氧化应激、病毒感染与多种细胞病变(肿瘤、自身免疫疾病与多种疾病)的生物医学影响, 首先确立了生物立方膜这一普遍却又独特的高度有序三维膜结构模型, 可用来研究各种细胞或亚细胞器在纳米尺度上的正常与异常功能. 一旦了解立方膜结构形成的确切分子机理, 即可把立方膜作为诊断上的超微结构生物标志物, 并进一步通过设计药物来诱导或抑制立方膜的形成, 以应用于临床治疗. 同时, 了解生物立方膜的形成与作用将使得我们对细胞的生理和病理机制有深刻的认识, 这对人类健康与未来生物医学领域的应用有着重要的影响. 另外, 立方膜在未来有可能给我们提供基础的技术开发和各种先进仿生技术应用, 如立方膜纳米结构作为光子晶体器件的制造模板或新型的大分子及药物载体等, 这不仅具有重要的科学意义, 而且可能会带来巨大的社会效益.

参 考 文 献

- [1] Shan Y, Wang H. The structure and function of cell membranes examined by atomic force microscopy and single-molecule force spectroscopy. *Chemical Society Reviews*, 2015, **44**(11): 3617-3638
- [2] 翟中和, 王喜忠, 丁明孝. 细胞生物学. 北京: 高等教育出版社, 2011: 56

- Zhai Z H, Wang X Z, Ding M X. Cell Biology. Beijing: Higher Education Press, 2011: 56
- [3] Luzzati V, Tardieu A, Gulik-Krzywicki. The cubic phases of lipid-water systems. *Nature*, 1968, **220**(5166): 485–488
- [4] 付建武. 复方姜黄素脂质立方液晶的制备、表征与评价[D]. 广州: 广州中医药大学, 2013
- Fu J W. Preparation, characterization and evaluation of Compound Curcumin Lipid-based cubic liquid crystalline phase [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2013
- [5] 吴红兵, 霍东风, 蒋新国. 脂质立方液晶纳米粒作为药物载体的研究进展. *药学报*, 2008, **43**(5): 450–455
- Wu H B, Huo D F, Jiang X G. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2008, **43**(5): 450–455
- [6] Bangham A D, Horne R W. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *Journal of Molecular Biology*, 1964, **8**(5): 660–668
- [7] Koynova R, Tenchov B. Recent patents on nonlamellar liquid crystalline lipid phases in drug delivery. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 2013, **7**(3): 165–173
- [8] Guo C, Wang J, Cao F, *et al.* Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. *Drug Discovery Today*, 2010, **15**(23–24): 1032–1040
- [9] Van' H L, Shen H H, Lu J, *et al.* Deconvoluting the effect of the hydrophobic and hydrophilic domains of an amphiphilic integral membrane protein in lipid bicontinuous cubic mesophases. *Langmuir*, 2015, **31**(44): 12025–12034
- [10] Barauskas J, Johnsson M, Joabsson F, *et al.* Cubic phase nanoparticles (Cubosome): principles for controlling size, structure, and stability. *Langmuir*, 2005, **21**(6): 2569–2577
- [11] Almsheqi Z A, Landt T, Kohlwein S D, *et al.* Chapter 6: cubic membranes the missing dimension of cell membrane organization. *International Review of Cell & Molecular Biology*, 2009, **274**: 275–342
- [12] Chong K, Deng Y. The three dimensionality of cell membranes: lamellar to cubic membrane transition as investigated by electron microscopy. *Methods in Cell Biology*, 2012, **108**(1): 319–343
- [13] Deng Y, Mieczkowski M. Three-dimensional periodic cubic membrane structure in the mitochondria of amoebae *Chaos carolinensis*. *Protoplasma*, 1998, **203**(1): 16–25
- [14] Landt T. From entangled membranes to eclectic morphologies: cubic membranes as subcellular space organizers. *Febs Letters*, 1995, **369**(1): 13–17
- [15] Deng Y, Marko M, Buttle K F, *et al.* Cubic membrane structure in amoeba (*Chaos carolinensis*) mitochondria determined by electron microscopic tomography. *Journal of Structural Biology*, 1999, **127**(3): 231–239
- [16] Schaff Z, Lapis K, Grimley P M. Undulating membraneous structures associated with the endoplasmic reticulum in tumour cells. *International Journal of Cancer*, 1976, **18**(5): 697–702
- [17] Franke, W W, Scheer, U. Some structural differentiations in HeLa cell: Heavy bodies, annulate lamellae, and cote de maillet endoplasmic reticulum. *Cytobiologie*, 1971, **4**(2): 317–329
- [18] Linder J C, Staehelin L A. The membrane lattice: a novel organelle of the Trypanosomatid flagellate *leptomonas collosoma*. *Journal of Ultrastructure Research*, 1980, **72**(2): 200–205
- [19] Yamamoto A, Masaki R, Tashiro Y. Formation of crystalloid endoplasmic reticulum in COS cells upon overexpression of microsomal aldehyde dehydrogenase by cDNA transfection. *Journal of Cell Science*, 1996, **109**(Pt 7)(2): 1727–1738
- [20] Wolf K W, Motzko D. Paracrystalline endoplasmic reticulum is typical of gametogenesis in hemiptera species. *Journal of Structural Biology*, 1995, **114**(2): 105–114
- [21] Grimley P M, Schaff Z. Significance of tubuloreticular inclusions in the pathobiology of human diseases. *Pathobiology Annual*, 1976, **6**: 221–257
- [22] Snapp E L, Hegde R S, Francolini M, *et al.* Formation of stacked ER cisternae by low affinity protein interactions. *Journal of Cell Biology*, 2003, **163**(2): 257–269
- [23] Brandt P W, Pappas G D. Mitochondria: II . The nuclear-mitochondrial relationship in *Pelomyxa carolinensis* Wilson (*Chaos Chaos* L.). *Journal of Biophysical & Biochemical Cytology*, 1959, **6**(1): 91–96
- [24] Kalt M R. Mitochondrial pleiomorphism in sustentacular cells of *Xenopus laevis*. *The Anatomical Record*, 1975, **182**(1): 53–60
- [25] Tahmisian T N, Powers E L, Devine R L. Light and electron microscope studies of morphological changes of mitochondria during spermatogenesis in the grasshopper. *Journal of Biophysical & Biochemical Cytology*, 1956, **2**(4): 325–330
- [26] Foelix R F, Kretz R, Rager G. Structure and postnatal development of photoreceptors and their synapses in the retina of the tree shrew (*Tupaia belangeri*). *Cell and Tissue Research*, 1987, **247**(2): 287–297
- [27] Knabe W, Kuhn H J. Morphogenesis of megamitochondria in the retinal cone inner segments of *Tupaia belangeri* (Scandentia). *Cell and Tissue Research*, 1996, **285**(1): 1–9
- [28] Knabe W, Skatchkov S, Kuhn H J. "Lens mitochondria" in the retinal cones of the tree-shrew *Tupaia belangeri*. *Vision Research*, 1997, **37**(37): 267–271
- [29] Almsheqi Z, Margadant F, Deng Y. A look through 'lens' cubic mitochondria. *Interface Focus*, 2012, **2**(2): 539–545
- [30] Gunning B E S, Jagoe M P. *Biochemistry of Chloroplasts*. New York: Academic Press, 1967: 656
- [31] Israelachvili J N, Wolfe J. The membrane geometry of the prolamellar body. *Protoplasma*, 1980, **102**(3): 315–321
- [32] Gunning B E S. The greening process in plastids I . The structure of the prolamellar body. *Protoplasma*, 1965, **60**: 113–130
- [33] Murakami S, Yamada N, Nagano M, *et al.* Three-dimensional structure of the prolamellar body in squash etioplasts. *Protoplasma*, 1985, **128**(2): 147–156
- [34] Osumi, M, Yamada, N, Nagano, M, *et al.* Three-dimensional observation of the prolamellar bodies in etioplasts of squash *Cucurbita moschata*. *Scan. Electron Microsc.* 1984, **1**: 111–119
- [35] Wehrmeyer, W. On the crystal structure of the so called prolamellar body in proplastids of etiolated beans. II . Zincblende as a tubular

- model of the prolamellar body. *Z Naturforsch*, 1965, **20b**: 1278–1288
- [36] Kowalewska L, Mazur R, Suski S, *et al*. Three-dimensional visualization of the internal plastid membrane network during runner bean chloroplast biogenesis. Dynamic model of the tubular-lamellar transformation. *The Plant Cell*, 2016, **28**(4): 875–891
- [37] Deng Y, Landh T. The cubic gyroid-based membrane structure of the chloroplast in *Zygnema* (Chlorophyceae *Zygnematales*). *Zool Stud*, 1995, **34**: 175–177
- [38] Zhan T, Lv W, Deng Y. Multilayer gyroid cubic membrane organization in green alga *Zygnema*. *Protoplasma*, 2017: doi: 10.1007/s00709-017-1083-2
- [39] Cao X, Xu D, Yao Y, *et al*. Interconversion of triply periodic constant mean curvature surface structures: from double diamond to single gyroid. *Chem Mater*, 2016, **28**(11): 3691–3702
- [40] McLean R J, Pessoney G F. A large quasi-crystalline lamellar lattice in chloroplasts of the green algae *Zygnema*. *J Cell Biol*, 1970, **45**(3): 522–531
- [41] Stamenković M, Woelken E, Hanelt D. Ultrastructure of *Cosmarium* strains (Zygnematophyceae, Streptophyta) collected from various geographic locations shows species-specific differences both at optimal and stress temperatures. *Protoplasma*, 2014, **251**(6): 1491–1509
- [42] Mak A, Almshergqi Z A M, Lai Y W, *et al*. Intracellular tubulo-reticular structures of peripheral blood mononuclear cells as an ultra-structural marker of disease activity in systemic lupus erythematosus: a pilot study. *International Journal of Rheumatic Diseases*, 2013, **16**(6): 692–697
- [43] Deng Y, Almshergqi Z A, Ng M M L, *et al*. Do viruses subvert cholesterol homeostasis to induce host cubic membranes? *Trends in Cell Biology*, 2010, **20**(7): 371–379
- [44] Amoasii L, Hnia K, Chicanne G, *et al*. Myotubularin and PtdIns3P remodel the sarcoplasmic reticulum in muscle *in vivo*. *Journal of Cell Science*, 2013, **126**(8): 1806–1819
- [45] Babai F, Tremblay G, Dumont A. Intranuclear and intranucleolar tubular structures in *Novikoff* hepatoma cells. *Journal of Ultrastructure Research*, 1969, **28**(1): 125–130
- [46] Karasaki S. An electron microscope study of intranuclear canaliculi in *Novikoff* hepatoma cells. *Cancer Research*, 1970, **30**(6): 1736–1742
- [47] Kessel R G, Beams H W. Intranucleolar membranes and nuclear-cytoplasmic exchange in young crayfish oocytes. *Journal of Cell Biology*, 1968, **39**(3): 735–741
- [48] Miller O L. Structure and composition of peripheral nucleoli of salamander oocytes. *National Cancer Institute Monograph*, 1966, **23**: 53–66
- [49] Deng Y, Almshergqi Z A, Shui G, *et al*. Docosapentaenoic acid (DPA) is a critical determinant of cubic membrane formation in amoeba *Chaos* mitochondria. *Faseb Journal*, 2009, **23**(9): 2866–2871
- [50] Nagan N, Zoeller R A. Plasmalogens: biosynthesis and functions.. *Progress in Lipid Research*, 2001, **40**(3): 199–229
- [51] Brites P, Waterham H R, Wanders R J A. Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2004, **1636**(2–3): 219–231
- [52] Bouligand Y. Comparative geometry of cytomembranes and water-lipid systems. *Le Journal De Physique Colloques*, 1990, **51** (C7): C7-35-C7-52
- [53] Angelova A, Angelov B, Mutařchieva R, *et al*. Biocompatible mesoporous and soft nanoarchitectures. *J Inorg Organomet Polym Mater*, 2015, **25**: 214–232
- Angelov B, Angelova A, Filippov S K, *et al*. Multicompartment lipid cubic nanoparticles with high protein upload: millisecond dynamics of formation. *Acs Nano*, 2014, **8**(5): 5216
- [54] Ferrero S, Grados-Torrez R E, Leivar P, *et al*. Proliferation and morphogenesis of the endoplasmic reticulum driven by the membrane domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in plant cells. *Plant Physiol*, 2015, **168**(3): 899–914
- [55] Chin D J, Luskey K L, Anderson R G, *et al*. Appearance of crystalloid endoplasmic reticulum in compactin-resistant Chinese hamster cells with a 500-fold increase in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, **79**(4): 1185–1189
- [56] Masum S M, Li S J, Awad T S, *et al*. Effect of positively charged short peptides on stability of cubic phases of monoolein/dioleoylphosphatidic acid mixtures. *Langmuir*, 2005, **21** (12): 5290–5297
- [57] Chong K, Tan O L, Almshergqi Z A, *et al*. Isolation of mitochondria with cubic membrane morphology reveals specific ionic requirements for the preservation of membrane structure. *Protoplasma*, 2015, **252**(2): 689–696
- [58] Li S J, Yamashita Y, Yamazaki, M. Effect of electrostatic interactions on phase stability of cubic phases of membranes of monoolein/dioleoylphosphatidic acid mixtures. *Biophys J*, 2001, **81**(2): 983–993
- [59] Awad T S, Okamoto Y, Masum S M, *et al*. Formation of cubic phases from large unilamellar vesicles of dioleoylphosphatidylglycerol/monoolein membranes induced by low concentrations of Ca^{2+} . *Langmuir*, 2005, **21**(25): 11556–11561
- [60] Okamoto Y, Masum S M, Miyazawa, H. *et al*, M. Low-pH-induced transformation of bilayer membrane into bicontinuous cubic phase in dioleoylphosphatidylserine/monoolein membranes. *Langmuir*, 2008, **24**(7): 3400–3406
- [61] Almshergqi Z, Hyde S, Ramachandran M, *et al*. Cubic membranes: a structure-based design for DNA uptake. *Journal of the Royal Society Interface*, 2008, **5**(26): 1023–1029
- [62] Almshergqi Z A, McLachlan C S, Mossop P, *et al*. Direct template matching reveals a host subcellular membrane gyroid cubic structure that is associated with SARS virus. *Redox Report Communications in Free Radical Research*, 2005, **10**(3): 167–171
- [63] Deng Y, Almshergqi Z A. Evolution of cubic membranes as antioxidant defence system. *Interface Focus*, 2015, **5**(4): 20150012
- [64] Xiao Q, Wang Z, Williams D, *et al*. Why do membranes of some unhealthy cells adopt a cubic architecture?. *Acs Central Science*,

- 2016, **2**(12): 943–953
- [65] Babin V, Garstecki P, Holyst R. Photonic properties of multicontinuous cubic phases. *Physical Review B*, 2002, **66**(23): 126–130
- [66] Maldovan M, Urbas A M, Yufa N, *et al.* Photonic properties of bicontinuous cubic microphases. *Physical Review B*, 2002, **65**(16): 165123–165149
- [67] Urbas A M, Maldovan M, Derege P, *et al.* Bicontinuous cubic block copolymer photonic crystals. *Advanced Materials*, 2002, **14**(24): 1850–1853
- [68] Sabry K H. Insect's photonic crystals and their applications. *Bioscience Research*, 2016, **13**(1): 15–20
- [69] Saba M, Wilts B D, Hielscher J, *et al.* Absence of circular polarisation in reflections of butterfly wing scales with chiral gyroid structure. *Materials Today Proceedings*, 2014, **1** (Supplement): 193–208
- [70] Dolan J A, Wilts B D, Vignolini S, *et al.* Optical properties of gyroid structured materials: from photonic crystals to metamaterials. *Advanced Optical Materials*, 2015, **3**(1): 12–32
- [71] Michielsen K, Stavenga D G. Gyroid cuticular structures in butterfly wing scales: biological photonic crystals. *Journal of the Royal Society Interface*, 2008, **5**(18): 85–94
- [72] Daniels E W, Breyer E P. Starvation effects on the ultrastructure of amoeba mitochondria. *Cell and Tissue Research*, 1968, **91** (2): 159–169
- [73] Deng Y, Kohlwein S D, Mannella C A. Fasting induces cyanide-resistant respiration and oxidative stress in the amoeba *Chaos carolinensis*: implications for the cubic structural transition in mitochondrial membranes. *Protoplasma*, 2002, **219**(3): 160–167
- [74] Zoeller R A, Lake A C, Nagan N, *et al.* Plasmalogens as endogenous antioxidants: somatic cell mutants reveal the importance of the vinyl ether. *Biochem J*, 1999, **338**(3): 769–776
- [75] Sindelar P J, Guan Z, Dallner G, *et al.* The protective role of plasmalogens in iron-induced lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med*, 1999, **26**(3–4): 318–324
- [76] Braverman N E, Moser A B. 2012 Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochim Biophys Acta*, 2012, **1822** (9): 1442–1452
- [77] Brosche T, Platt D. The biological significance of plasmalogens in defense against oxidative damage. *Exp Gerontol*, 1998, **33** (5): 363–369
- [78] Murphy R C. Free-radical-induced oxidation of arachidonoyl plasmalogen phospholipids: antioxidant mechanism and precursor pathway for bioactive eicosanoids. *Chem Res Toxicol*, 2001, **14**(5): 463–472
- [79] Lessig J, Fuchs B. Plasmalogens in biological systems: their role in oxidative processes in biological membranes, their contribution to pathological processes and aging and plasmalogen analysis. *Curr Med Chem*, 2009, **16**(16): 2021–2041
- [80] Basañez G. Membrane fusion: the process and its energy suppliers. *Cellular & Molecular Life Sciences Cmls*, 2002, **59**(9): 1478–1490
- [81] Tarahovsky Y S, Koynova R, Macdonald R C. DNA release from lipoplexes by anionic lipids: correlation with lipid mesomorphism, interfacial curvature, and membrane fusion. *Biophysical Journal*, 2004, **87**(2): 1054–1064
- [82] Guerfal M, Ryckaert S, Jacobs P P, *et al.* The HAC1 gene from *Pichia pastoris*: characterization and effect of its overexpression on the production of secreted, surface displayed and membrane proteins. *Microbial Cell Factories*, 2010, **9**(1): 1–12
- [83] Atluri R, Hedin N, Garciabennett A E. Hydrothermal phase transformation of bicontinuous cubic mesoporous material AMS-6. *Chemistry of Materials*, 2008, **20**(12): 3857–3866
- [84] Yamamoto T, Nishiyama I, Yoneya M, *et al.* Novel chiral effect that produces the anisotropy in 3D structured soft material: chirality-driven cubic-tetragonal liquid crystal phase transition. *Journal of Physical Chemistry B*, 2009, **113**(34): 11564–11567
- [85] Efrat R, Kesselman E, Aserin A, *et al.* Solubilization of hydrophobic guest molecules in the monoolein discontinuous QL cubic mesophase and its soft nanoparticles. *Langmuir*, 2009, **25**(3): 1316–1326

Biological Cubic Membranes*

LÜ Wen-Hua^{1)**}, LIU Fei-Fei^{2)**}, DENG Yu-Ru^{1)***}

⁽¹⁾ Wenzhou Institute of Biomaterials and Engineering, Wenzhou 325000, China;

⁽²⁾ School of Pharmaceutical Engineering & Life Science, Changzhou University, Changzhou 213000, China)

Abstract Biomembranes play fundamental roles in all living systems to partition cells into subcellular compartments. However, these typically flat membranes may also fold into 3D periodic nanostructures, termed cubic membranes (CM), under certain physiological or pathological conditions. Three types of CM arrangements—gyroid (G), double diamond (D) and primitive (P)—have been identified in multiple cell types, yet their biological function is still obscure. The surfaces describing CM are triply periodic minimal or level surfaces and of great technological potential in crystalline and liquid crystalline materials at various length scales. This review briefly introduces: (1) the characterization of CM nanostructures by transmission electron microscope (TEM), scanning electron microscope (SEM) and EM tomography in biological systems; (2) an update on experimental data describing the role of lipids, proteins and Ca^{2+} on CM formation; (3) the proposed optical and antioxidant properties of CM; (4) the potential applications as a diagnostic biomarker for various human diseases, use of CM-derived lipids as gene delivery vehicles, use of CM as structural antioxidant, and CM-based photonic crystals as versatile light-modulators.

Key words biomembrane, membrane lipid, cubic membrane, cubic phase

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0063

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31670841) and WIBEZD2015010-02.

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-13912340803, E-mail: dengyr@wibe.ac.cn

Received: February 28, 2017 Accepted: October 20, 2017