



# 跨膜蛋白对细胞膜中亲水通道形成的影响

颜志卿, 胡娟梅, 吴锋民

(浙江理工大学, a.理学院; b.浙江省光场调控技术重点实验室, 杭州 310018)

**摘要:** 为了探究跨膜蛋白在药物分子直接跨膜易位入胞过程中的作用,用粗粒化(Coarse grained,CG)分子动力学方法分析 KALP<sub>n</sub> 跨膜蛋白对离子非平衡下细胞膜形成亲水通道的影响。结果表明:磷脂双分子层中加入的 KALP<sub>n</sub> 跨膜蛋白会加剧对附近磷脂分子的扰动,从而促进细胞膜形成亲水通道;单次 KALP<sub>n</sub> 跨膜蛋白的长度与细胞膜的厚度相比越短、中间疏水段的亲水基团越多,其对附近磷脂分子的扰动越大,磷脂分子翻转所需的自由能越小,细胞膜越容易产生亲水通道,即单次跨膜蛋白与磷脂分子的匹配度越弱对形成亲水通道的促进作用越大;6次修饰后的 KALP<sub>23</sub> 跨膜蛋白除了促进磷脂分子的翻转外,还可通过自身的聚集和舒展方式来调节细胞膜上亲水通道的开合,从而大幅减小形成亲水通道所需的离子非平衡度。研究结果是对药物分子或载体直接易位入胞机制的补充,为设计和研发新型具有高转运效率的药物分子或载体提供理论指导。

**关键词:** 跨膜蛋白;细胞膜;亲水通道;直接跨膜转运;自由能

中图分类号: Q66

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851(2022)01-0095-08

## The effect of transmembrane proteins on the formation of hydrophilic channels in cell membranes

YAN Zhiqing, HU Juanmei, WU Fengmin

(a. School of Science; b. Key Laboratory of Optical Field Manipulation of Zhejiang Province, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** In order to explore the role of transmembrane proteins in the direct translocation of drug molecules into cells, we used coarse-grained molecular dynamics to analyze the effects of KALP<sub>n</sub> transmembrane proteins on the formation of hydrophilic channels in cell membranes under ionic nonequilibrium. It was found that the KALP<sub>n</sub> transmembrane proteins added to the phospholipid bilayer can aggravate the disturbance of nearby phospholipid molecules, therefore promoting the formation of hydrophilic channels in cell membranes. Specific studies showed that the shorter length of a single KALP<sub>n</sub> transmembrane protein relative to the thickness of cell membrane, the more hydrophilic groups in the middle hydrophobic segments, and the greater disturbance of KALP<sub>n</sub> transmembrane protein to nearby phospholipid molecules. Therefore, the smaller free energy is required for the flipflop of phospholipid molecules and the cell membrane is more likely to produce hydrophilic channels. This means that the weaker matching degree between single transmembrane protein and phospholipid molecules, the greater promotion effect on the formation of hydrophilic channels. Studies have shown that in addition to promoting the flipflop of phospholipid molecules, the KALP<sub>23</sub> transmembrane proteins after six

收稿日期: 2021-04-25 网络出版日期: 2021-07-05

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LQ18B040002); 浙江理工大学科研启动基金(17062061-Y)

作者简介: 颜志卿(1994-), 男, 上海人, 硕士研究生, 主要从事软物质计算方面的研究。

通信作者: 吴锋民, E-mail: wfm@zstu.edu.cn

modifications can also regulate the opening and closing of hydrophilic channels through their own aggregation and stretching, resulting in great reduction of ionic nonequilibrium required for the generation of hydrophilic channels. The results of this work not only serve as a supplement to the mechanism of direct translocation of drug molecules or carriers into cells, but also provide a theoretical basis for the design and development of new drug molecules or carriers with high transport efficiency.

**Key words:** transmembrane protein; cell membrane; hydrophilic channel; direct transmembrane transport; free energy

## 0 引言

细胞膜是分隔细胞内外环境的界面,细胞内外的物质运输、能量转换和信号传递等生命活动都需要克服细胞膜天然屏障<sup>[1]</sup>,因此,外界物质与细胞膜的相互作用是研究其入胞方式和效率的关键。随着药物分子或载体入胞机制的深入研究,Tang等<sup>[2]</sup>发现生物大分子经细胞膜以直接穿孔易位方式进入细胞,一部分带正电荷的药物分子或载体(如细胞穿膜肽等)易吸附到细胞膜外叶,与细胞膜内叶带负电的脂质分子或蛋白质形成一个局部的附加跨膜电势。附加跨膜电势可促进细胞膜上磷脂分子的内外翻转,从而使细胞膜产生局部的亲水通道,药物分子或载体再经亲水通道直接进入细胞液,完成转运后,细胞膜的局部跨膜电势减小,亲水通道自动关闭,细胞膜重新恢复完整<sup>[3-4]</sup>。直接穿孔易位入胞方式无需消耗能量,对温度的依赖性低且穿膜效率高,是药物运输的理想选择<sup>[2]</sup>。因此,从分子层面研究药物分子直接穿孔易位入胞机制,对提高药物的有效运输和靶向给药将起到重要的指导作用。

细胞膜上的磷脂分子内外翻转是细胞膜形成亲水通道的关键,细胞膜两侧的跨膜电势与磷脂分子内外翻转密切相关。组成磷脂双分子层的二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)分子因头部的胆碱和磷酸基团分别带有正负电荷而形成电偶极子,在外正内负的跨膜电势下,细胞膜外叶的DPPC分子因受到力矩作用而发生翻转,从而促进细胞膜形成亲水通道<sup>[5]</sup>。由纯磷脂分子组成的细胞膜形成亲水通道所需的跨膜电势约为 $-2\text{ V}$ ,而由细胞穿膜肽等药物载体吸附而产生的附加跨膜电势比较小,难以使常温下的磷脂双分子层形成亲水通道<sup>[3-4]</sup>。因此,现有理论在研究药物分子或载体的穿孔易位入胞机制过程中常在细胞膜内外人为地提供一个远大于细胞自身具有的跨膜电势( $\sim -80\text{ mV}$ )<sup>[6-7]</sup>,改变细胞膜内外钠离子( $\text{Na}^+$ )和氯离子( $\text{Cl}^-$ )的分布,或者细胞膜内叶采用带负电荷的磷脂酰丝氨酸(PS)代

替等<sup>[8]</sup>。

蛋白质作为生物体的重要组成部分和生命活动的主要载体,在各项生命活动中起着不可或缺的作用,是膜功能的主要承担者<sup>[9-10]</sup>,在动物细胞的脂质细胞膜中约50%的物质为蛋白质。与磷脂分子的疏水尾部相比,膜蛋白往往具有更强的极性和亲水性,因而会加剧对附近磷脂分子的扰动<sup>[11-12]</sup>。跨膜蛋白贯穿细胞膜两侧的结构,使其周围磷脂分子的热力学性质和动力学结构受到较大的影响,会加剧对磷脂双分子层有序度的影响<sup>[13]</sup>。磷脂分子的翻转往往发生在细胞膜中被跨膜蛋白或者其他外来物质所干扰的区域<sup>[14-15]</sup>,某些跨膜蛋白可促进细胞膜亲水通道的形成,减小药物分子或载体直接穿孔易位入胞所需的跨膜电势,从而提高药物的效率。

跨膜蛋白种类多样、结构复杂,特别是其跨膜状态的复杂性给研究其对直接穿孔易位入胞的促进作用带来了很大的难度<sup>[16-17]</sup>。因此,在研究药物分子直接穿孔易位入胞机制的过程中,跨膜蛋白所起的作用一直未被考虑。到目前为止,跨膜蛋白如何影响磷脂分子的翻转和形成亲水通道,跨膜蛋白介导的细胞膜亲水通道形成、关闭的动力学过程,以及跨膜蛋白对药物分子转运效率的影响等都尚不清楚。

本文主要通过粗粒化(Coarse grained, CG)分子动力学方法研究了KALP<sub>n</sub>跨膜蛋白对细胞膜形成亲水通道的影响。分别从KALP<sub>n</sub>跨膜蛋白的性质对磷脂分子的扰动,及其与磷脂分子翻转自由能之间的关系,以及多次KALP<sub>n</sub>跨膜蛋白对细胞膜形成亲水通道的动力学过程等进行了计算模拟。本文结果初步揭示了跨膜蛋白对细胞膜形成亲水通道的作用,进一步完善了直接穿孔易位入胞机制,可为药物分子或载体的高效、靶向运输提供理论指导。

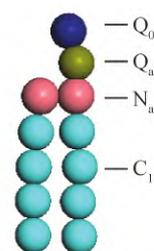
## 1 模型和模拟方法

本文的计算模拟工作采用基于MARTINI力场的粗粒化分子动力学方法<sup>[18-19]</sup>。MARTINI力场的粗粒化采用4:1的映射法则,即平均4个非氢原

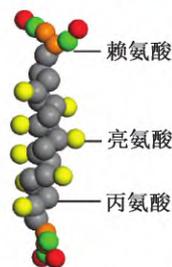
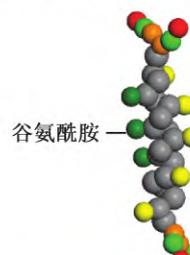
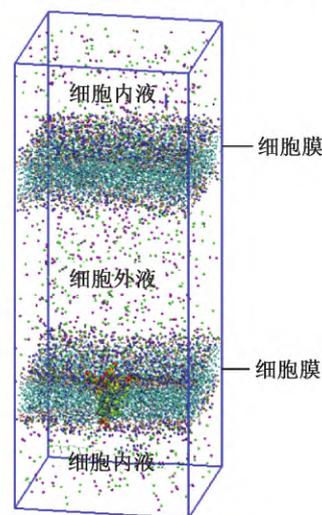
子及其相连的氢原子用 1 个粗粒化小球表示。根据基团的性质,粗粒化小球分为带电粒子(Q)、极化粒子(P)、非极化粒子(N)和反极化粒子(C)4 个类型。每一类型又分为 4~5 个子类,共 18 个子类。与全原子力场相比,粗粒化模型在计算过程中忽略了原子的自由度,计算效率提高了两到三个数量级,常用于生物膜、蛋白质和 DNA 等生命体系的模拟研究。在模拟体系中,细胞膜由双层 DPPC 分子组成,其粗粒化结构如图 1(a)所示。头部的胆碱和磷酸基团分别用带一个单位正电荷的小球  $Q_0$  和带一个单位负电荷的小球  $Q_a$  表示,中间的甘油部分用两个非极性的小球  $N_a$  表示,两条尾链分别用含有 4 个疏水的小球  $C_1$  表示,整个分子呈电中性。跨膜蛋白采用一次跨膜的螺旋型 KALP<sub>n</sub> 分子。KALP<sub>n</sub> 与许多跨膜蛋白的跨膜段具有相同的结构,即中间为交替的非极性丙氨酸和亮氨酸残基,两头的氨基端和羧基端分别连接两个亲水的赖氨酸残基,整个分子由  $n$  个氨基酸组成(Ac-KK-(AL)<sub>m</sub>-AKK-NH<sub>2</sub>),如图 1(b)所示。4 个实际水分子用 1 个粗粒化极化水分子表示。模拟体系为 14.5 nm × 14.5 nm × 28.0 nm 的双层膜结构,如图 1(d)所示。其中每一层细胞膜的 DPPC 分子数为 648 个,体系中的水粒子数为 53600 个,盐浓度为 150 mmol/L。跨膜电势由细胞膜内外两侧的钠离子(Na<sup>+</sup>)和氯离子(Cl<sup>-</sup>)的分布来调节,整个体系保持电中性。

本文基于 Gromacs(5.0.4) 软件模拟。模拟过程采用 NPT 系综,其中细胞膜和细胞液的温度采用 Berendsen 方法分开控制,均控制在 323 K,压强采用 Berendsen 方法控制在一个大气压, $x$  和  $y$  方向压强耦合控制, $z$  方向压强单独控制。粒子间的范德华相互作用采用 Lennard-Jones 势表示,截断半径为 1.2 nm,其中 0.9~1.2 nm 之间采用平滑方式以消除截断噪音。带电粒子间的库仑相互作用的截断半径为 1.2 nm,长程相互作用采用 Particle-Mesh-Ewald 方法,精度取  $1.0 \times 10^{-4}$ 。粒子间、分子内部键、角相互作用势与 MARTINI 力场文献<sup>[18-19]</sup>保持一致。极化水体系的介电常数取 2.5,时间步长取 2 ps。

DPPC 分子的翻转自由能采用伞形抽样法计算<sup>[20-21]</sup>。固定细胞膜的质心位置,取跨膜蛋白附近一个磷脂分子的胆碱粒子  $Q_0$ ,通过一个劲度系数为 10000 kJ/(mol<sup>-1</sup>·nm<sup>-2</sup>) 的简谐势( $w = k(z - z_0)^2$ ,其中: $w$  为简谐势, $k$  为劲度系数, $z$  为运动以后的位置, $z_0$  为初始位置)将胆碱粒子以



(a) DPPC 分子粗粒化模型

(b) KALP<sub>23</sub> 跨膜蛋白粗粒化模型(c) KALP<sub>23</sub>-Gln<sub>3</sub> 跨膜蛋白粗粒化模型

(d) 双层膜体系

图 1 DPPC 分子、KALP<sub>23</sub> 跨膜蛋白、KALP<sub>23</sub>-Gln<sub>3</sub> 跨膜蛋白的粗粒化模型和模拟体系示意图

0.02 nm/ns 的速度垂直细胞膜(沿  $z$  轴)从外叶拉至内叶,反应坐标总长度为 5 nm。再将该反应坐标分成 50 小段,每段间隔为 0.1 nm。对这 50 个采样窗口,采用劲度系数为 1000 kJ/(mol<sup>-1</sup>·nm<sup>-2</sup>) 的简谐势限制胆碱粒子的  $z$  轴位置,在 NPT 系综下让体系做热运动 400 ns,每 100 步记录一次粒子坐标。

取各窗口的后 200 ns, 计算胆碱粒子沿  $z$  轴出现的概率密度  $g'(z)$ 。结合该过程中加入的弹簧势, 采用加权柱状图分析法 (Weighted histogram analysis method, WHAM)<sup>[22]</sup>, 将有偏概率密度转化为无偏概率密度, 将各个窗口得到的概率密度加权平均  $g(z)$ , 并使得最终的结果误差最小。将概率密度转换成每一小段上的自由能, 得到平均力势 (Potential of mean force, PMF) 曲线  $w(z) = -k_B T \ln(g(z))$ , 其中:  $k_B$  为玻尔兹曼常数,  $T$  为热力学温度。整个伞形抽样过程中, 对跨膜蛋白和胆碱粒子在膜平面内作柱状限制, 以确保胆碱粒子沿着跨膜蛋白 ( $z$  轴) 翻转。为了消除磷脂分子翻转过程中细胞膜凹陷带来的误差, 伞形抽样时采用大小为  $8.0 \text{ nm} \times 8.0 \text{ nm} \times 27.0 \text{ nm}$  的双层细胞膜体系。伞形抽样计算磷脂分子反转自由能的过程中, 水分子采用非极化的粗粒化模型。

## 2 结果与讨论

### 2.1 含有 KALP<sub>19</sub> 跨膜蛋白的细胞膜直接穿孔过程

KALP<sub>*n*</sub> 跨膜蛋白两头亲水中间疏水, 其在细胞膜内易形成稳定的跨膜结构, 两头的亲水基团分别和细胞内液和外液接触, 中间的疏水基团与细胞膜的中间疏水区域结合<sup>[19]</sup>, 因此, 在离子平衡时 KALP<sub>*n*</sub> 分子呈稳定的跨膜状态。细胞膜两侧的跨膜电势由膜内外的 NaCl 不平衡产生, 将细胞内液的一个 Na<sup>+</sup> 和外液的一个 Cl<sup>-</sup> 交换, 产生的离子非平衡度定义为  $1/324$ <sup>[5]</sup>, 324 为模拟体系中单层磷脂的个数。常温下纯 DPPC 组成的细胞膜在离子非平衡达到 0.06 时可自动形成亲水通道。对含有 KALP<sub>19</sub> 跨膜蛋白的 DPPC 双分子层施加 0.06 的离子非平衡度, 观察其在该跨膜电势下的动力学过程, 结果如图 2 所示。图 2 表明: 在初始时刻, KALP<sub>19</sub> 呈跨膜状态; 在 25 ns 时, KALP<sub>19</sub> 分子附近的细胞膜破裂, 出现了亲水通道; 在 100 ns 时, 细胞膜又重新自动修复完整, KALP<sub>19</sub> 分子已由跨膜状态进入细胞, 吸附在细胞膜内叶。含 KALP<sub>19</sub> 分子的 DPPC 双分子层在跨膜电势下的整个穿孔过程和纯 DPPC 细胞膜的直接穿孔非常相似<sup>[3]</sup>。经过多次模拟发现, 细胞膜总是在 KALP<sub>19</sub> 分子附近开孔, 说明 KALP<sub>19</sub> 分子加剧了对周围磷脂分子的扰动, 使得周围的磷脂分子更容易翻转而使细胞膜形成亲水通道。

### 2.2 KALP<sub>*n*</sub> 跨膜蛋白长度对磷脂分子翻转自由能的影响

由于 KALP<sub>19</sub> 跨膜蛋白加剧了对周围磷脂分子

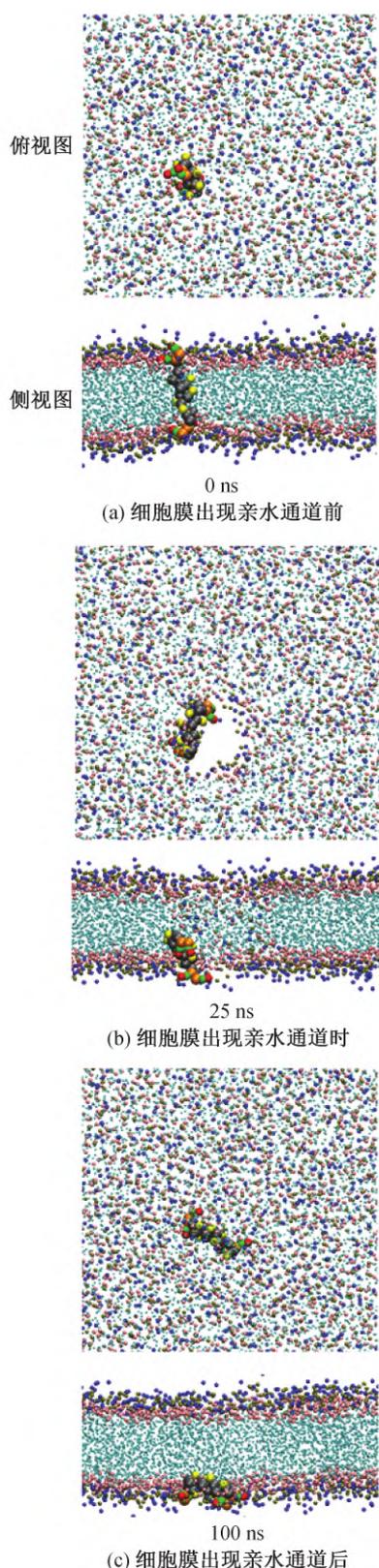


图 2 含有 KALP<sub>19</sub> 跨膜蛋白细胞膜在 0.06 离子非平衡度下的动力学演化过程

的扰动, 使得 KALP<sub>19</sub> 分子处的细胞膜更易出现亲水通道。采用结构相同、氨基酸数分别为 23、19、15 的跨膜蛋白 KALP<sub>23</sub>、KALP<sub>19</sub> 和 KALP<sub>15</sub>, 分析跨膜

蛋白长度对细胞膜上磷脂分子翻转的影响。图 3 为无离子非平衡度时, KALP<sub>23</sub>、KALP<sub>19</sub> 和 KALP<sub>15</sub> 与细胞膜结合的结构图。图 3 显示, 3 种跨膜蛋白的长度不同, 三者都呈稳定的跨膜状态。

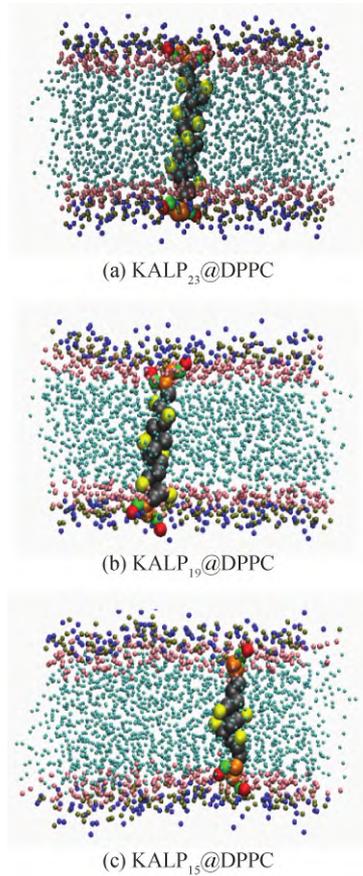


图 3 含 KALP<sub>23</sub>、KALP<sub>19</sub>、KALP<sub>15</sub> 跨膜蛋白的细胞膜示意图

对含有这 3 种跨膜蛋白的细胞膜厚度进行了统计, 结果如图 4 所示。细胞膜厚度指细胞膜内外叶中 DPPC 分子碱基小球之间的垂直距离, 六边形为统计时 3 种跨膜蛋白分子所在的位置。图 4 结果显示, KALP<sub>19</sub> 和 KALP<sub>15</sub> 跨膜蛋白附近的细胞膜比其他地方薄, 而 KALP<sub>23</sub> 肽分子附近的细胞膜厚度变化不明显。其原因是 KALP<sub>23</sub> 的长度与纯 DPPC 细胞膜的厚度接近, KALP<sub>19</sub> 和 KALP<sub>15</sub> 的长度比细胞膜的厚度小。当跨膜蛋白的长度小于细胞膜的厚度时, 要使得跨膜蛋白头部的赖氨酸基团与 DPPC 分子的亲水胆碱和磷酸基团亲和, 将 DPPC 分子的疏水双链压缩, 使得细胞膜变薄。

为了计算细胞膜内不同长度的 KALP<sub>n</sub> 跨膜蛋白对周围磷脂分子扰动的影响, 采用伞形抽样法计算了无离子非平衡度时 KALP<sub>n</sub> 分子附近磷脂分子的翻转自由能—平均力势。计算过程中, 翻转的磷

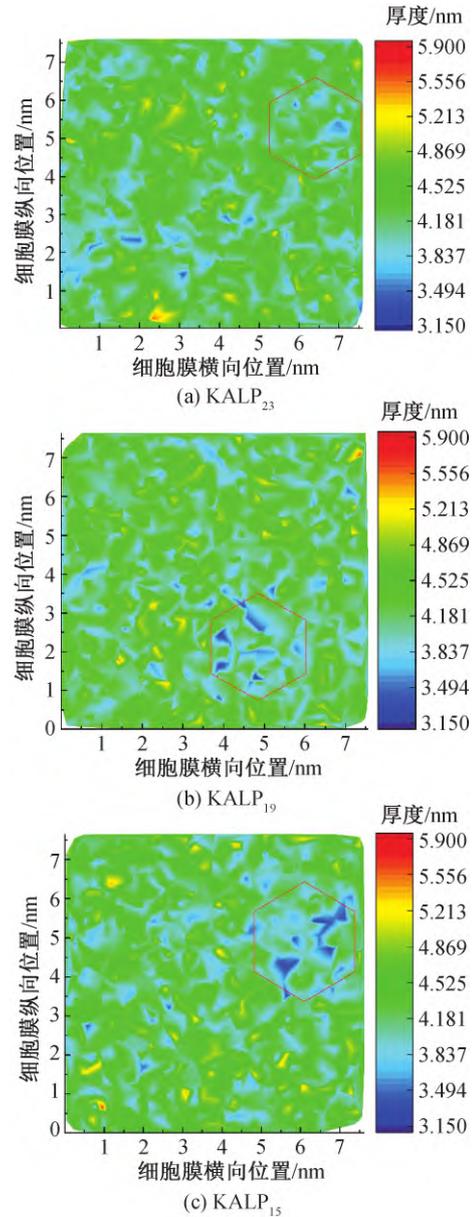


图 4 含有 KALP<sub>23</sub>、KALP<sub>19</sub>、KALP<sub>15</sub> 跨膜蛋白的细胞膜厚度

脂分子头部胆碱与 KALP<sub>n</sub> 之间的距离采用柱状限制方式控制在 1 nm 之内。KALP<sub>n</sub> 分子附近磷脂分子的翻转自由能曲线如图 5(a) 所示, 横坐标表示细胞膜质心与翻转的磷脂分子胆碱粒子之间的垂直距离。由图 5(a) 可知: 当翻转的磷脂分子胆碱基团与细胞膜质心距离约 2 nm 时, 即翻转的磷脂分子与其他磷脂分子并处在细胞膜外叶或内叶时, 自由能最低; 当胆碱基团处于细胞膜质心的位置时, 自由能最高; 磷脂分子从细胞膜外叶翻转到细胞膜内叶的过程中, 自由能呈对称分布。为了验证计算结果的准确性, 本文同时计算了纯 DPPC 双分子层中磷脂分子的翻转自由能。计算得到纯 DPPC 磷脂双

分子层中磷脂分子的翻转自由能约为 90 kJ/mol, 与已报道的计算结果相吻合<sup>[5,23]</sup>; 加入  $KALP_n$  分子后,  $KALP_n$  附近的磷脂分子翻转自由能均低于纯 DPPC 双分子层中的翻转自由能, 且随着  $KALP_n$  分子长度的减小, 附近磷脂分子翻转自由能逐渐减小。  $KALP_{15}$  附近的磷脂分子翻转自由能约为 45 kJ/mol, 仅为纯 DPPC 双分子层的一半。为了分析  $KALP_n$  跨膜蛋白对附近磷脂分子结构的影响, 计算了  $KALP_n$  分子周围 1 nm 范围内的磷脂分子有序度。有序度定义为磷脂分子头部的胆碱基团到磷脂分子疏水链尾部最后一个基团的矢量与细胞膜法向夹角的余弦值, 计算结果如图 5(b) 所示。常温下, 由于分子热运动, 有纯 DPPC 分子组成的细胞膜的有序度为  $\sim 0.9$ 。图 5(b) 结果表明,  $KALP_n$  分子附近的磷脂分子有序度均小于纯磷脂双分子层的有序度, 且随着  $KALP_n$  分子长度的减小, 附近磷脂分子的有序度逐渐减小。其中,  $KALP_{15}$  肽分子附近的磷脂分子有序度最低, 仅为 0.83。

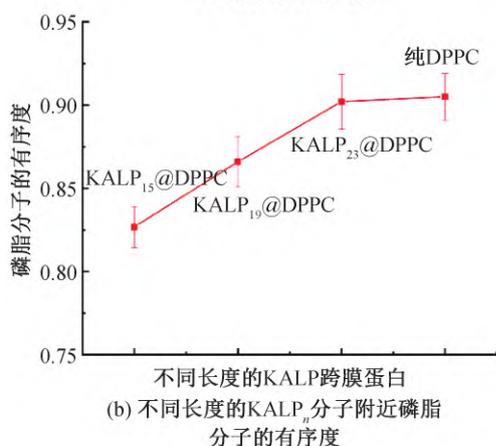
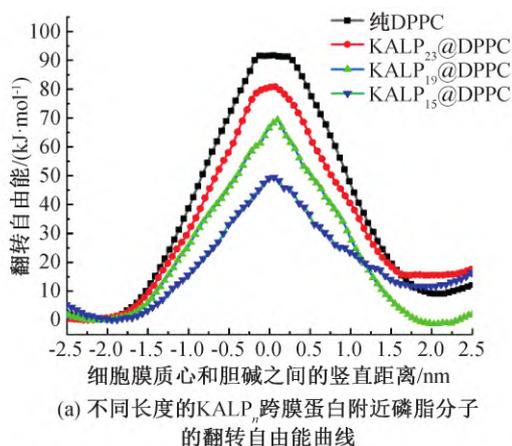


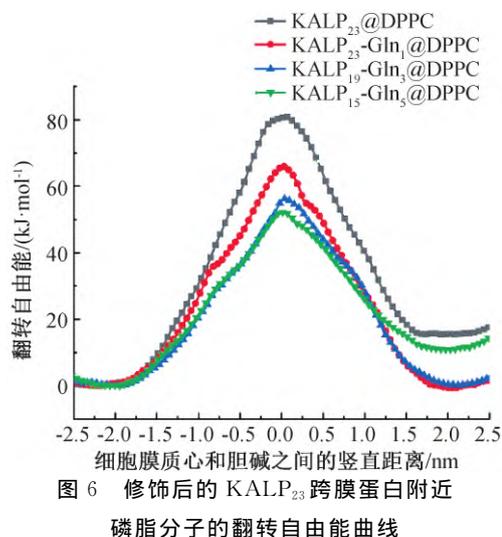
图5 不同长度的  $KALP_n$  跨膜蛋白对附近磷脂分子的扰动

以上计算结果说明, 磷脂双分子层中加入  $KALP_n$  跨膜蛋白, 加剧了对附近磷脂分子的扰动,

使得附近磷脂分子的有序度降低, 局部细胞膜变薄, 受到扰动的磷脂分子更容易发生翻转。因此, 在相同的离子非平衡度下, 细胞膜的直接穿孔发生在  $KALP_n$  分子附近。

### 2.3 跨膜蛋白基团性质对磷脂分子翻转自由能的影响

$KALP_n$  跨膜蛋白对其附近磷脂分子的扰动是影响磷脂双分子层形成亲水通道的直接原因, 除了  $KALP_n$  分子的长度,  $KALP_n$  分子上不同基团的性质和分布也会对附近磷脂分子的扰动产生不同的影响<sup>[24]</sup>。本文对  $KALP_{23}$  跨膜蛋白一侧的部分疏水亮氨酸基团进行了修饰, 将其改为亲水的谷氨酰胺基团, 其中修饰 1 个, 3 个和 5 个亮氨酸的  $KALP_{23}$  分子分别命名为  $KALP_{23}\text{-Gln}_1$ 、 $KALP_{23}\text{-Gln}_3$  和  $KALP_{23}\text{-Gln}_5$ , 分别计算了这 3 种修饰后的  $KALP_{23}$  跨膜蛋白附近的磷脂分子翻转自由能, 计算结果如图 6 所示。图 6 表明, 被谷氨酰胺修饰后的跨膜蛋白附近的磷脂分子翻转自由能也在细胞膜质心位置最高, 细胞膜内外基本呈对称分布。修饰后的跨膜蛋白附近的磷脂分子翻转自由能比未修饰的  $KALP_{23}$  附近的磷脂分子翻转自由能低, 且随着被修饰基团个数的增加, 翻转自由能也逐渐降低。其原因可能是谷氨酰胺基团比亮氨酸基团亲水性强, DPPC 分子的头部胆碱基团易与谷氨酰胺基团结合。因此, 在磷脂分子的跨膜翻转过程中, 胆碱基团倾向于沿着谷氨酰胺基团的位置翻转, 从而降低了其翻转自由能。



### 2.4 多次跨膜蛋白对细胞膜形成亲水通道的影响

细胞膜内除了单次跨膜蛋白以外, 还含有多次跨膜蛋白。为了探究跨膜蛋白聚集体对细胞膜形成亲水通道的影响, 将 6 个  $KALP_{23}\text{-Gln}_5$  跨膜蛋白首

尾的氨基和羧基通过化学键连接,构成一个 6 次跨膜蛋白,观察含有 6 次 KALP<sub>23</sub>\_Gln<sub>5</sub> 跨膜蛋白的细胞膜在离子非平衡下的动力学演化。谷氨酰胺基团修饰后的 KALP<sub>23</sub> 分子对附近磷脂分子的扰动增大,因此,含有 KALP<sub>23</sub>\_Gln<sub>5</sub> 的磷脂双分子层形成亲水通道所需的离子非平衡度会比纯 DPPC 双分子层小。图 7 为含有 6 次 KALP<sub>23</sub>\_Gln<sub>5</sub> 跨膜蛋白的细胞膜在 0.03 离子非平衡度下的直接穿孔过程。图 7 表明:在 0 ns 时,细胞膜内的 6 次 KALP<sub>23</sub>\_Gln<sub>5</sub> 跨膜蛋白在离子平衡下处于聚集状态,其中谷氨酰胺基团处于聚集体的中心而亮氨酸基团处于聚集体的周围。谷氨酰胺基团的亲水性使其在疏水性的细胞膜中间不稳定,因此,多个谷氨酰胺基团聚集在多次跨膜蛋白的中心可以最大限度减小其与磷脂分子疏水尾部的接触;在 0.03 的离子非平衡度下,细胞膜在 27 ns 时开始出现亲水通道,结合俯视图和侧视图可以看出,亲水通道的一半由正在翻转的磷脂分子组成,一半由跨膜蛋白组成,聚集的 6 次 KALP<sub>23</sub>\_Gln<sub>5</sub> 跨膜蛋白呈现展开状态,其中亲水的谷氨酰胺基团面向亲水通道而疏水的亮氨酸基团与磷脂双分子层结合,开孔过程中,细胞内外的 Cl<sup>-</sup> 和 Na<sup>+</sup> 通过亲水通道交换,离子非平衡度减小;在 80 ns 时,亲水通道关闭,6 次 KALP<sub>23</sub>\_Gln<sub>5</sub> 跨膜蛋白又呈现聚集状态,细胞膜重新恢复完整。以上结果表明,细胞膜上一定性质的跨膜蛋白会影响其对磷脂分子的扰动而改变磷脂分子的翻转自由能,从而影响细胞膜直接开孔所需的跨膜电势,即跨膜蛋白可促进细胞膜形成亲水通道,从而引导药物分子或载体的直接易位入胞。因此,跨膜蛋白是研究细胞在一定跨膜电势下是否能完成直接跨膜易位的重要因素。

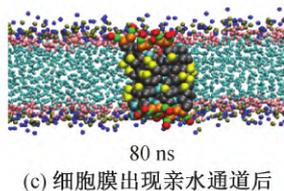
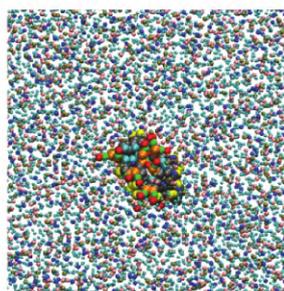
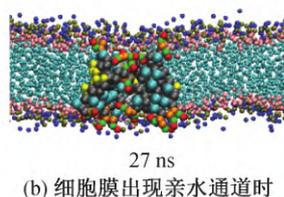
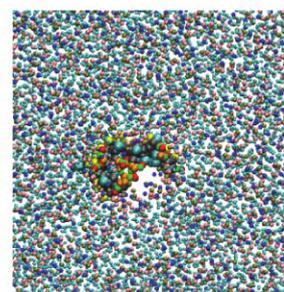
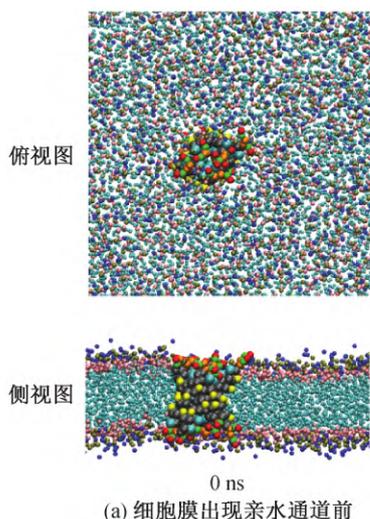


图 7 含 6 次 KALP<sub>23</sub>\_Gln<sub>5</sub> 跨膜蛋白的磷脂双分子层在 0.03 离子非平衡度下产生亲水通道的动力学过程

### 3 结 论

本文基于 MARTINI 力场的粗粒化分子动力学方法,研究 KALP<sub>n</sub> 跨膜蛋白对细胞膜形成亲水通道的影响,主要结果如下:

a) 细胞膜内一定性质的 KALP<sub>n</sub> 分子会加剧对附近磷脂分子的扰动,促进附近细胞膜出现亲水通道,减少细胞膜开孔所需的离子非平衡度。

b) 与细胞膜的厚度相比,KALP<sub>n</sub> 分子越短、疏水段的亲水基团越多,KALP<sub>n</sub> 分子对附近磷脂分子的扰动越大,磷脂分子翻转所需的自由能越小,细胞膜越容易出现亲水通道,单次跨膜蛋白与磷脂双分子层的匹配度越弱对细胞膜产生亲水通道的促进作用越大。

c) 多次跨膜蛋白主要通过自身的聚集和舒展方式控制细胞膜亲水通道的开关,可减小细胞膜形成亲水通道所需的离子非平衡度。

d)在药物分子或载体的直接跨膜易位入胞过程中,跨膜蛋白起到非常重要作用。

本文结果为设计和研发新型的药物大分子或载体的直接易位入胞提供了初步的理论基础,跨膜蛋白对药物分子或载体的详细直接易位动力学过程将在后续工作中进一步探究。

#### 参考文献:

- [1] Edidin M. Lipids on the frontier: A century of cell-membrane bilayers[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2003, 4(5): 414-418.
- [2] Tang M, Waring A J, Hong M. Phosphate-mediated arginine insertion into lipid membranes and pore formation by a cationic membrane peptide from solid-state NMR [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129(37): 11438-11446.
- [3] Gurtovenko A A, Vattulainen I. Pore formation coupled to ion transport through lipid membranes as induced by transmembrane ionic charge imbalance: Atomistic molecular dynamics study[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(50): 17570-17571.
- [4] Tieleman D P, Leontiadou H, Mark A E, et al. Simulation of pore formation in lipid bilayers by mechanical stress and electric fields[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(21): 6382-6383.
- [5] Lin J Q, Dargazany R, Alexander-Katz A. Lipid flip-flop and pore nucleation on zwitterionic bilayers are asymmetric under ionic imbalance[J]. *Small*, 2017, 13(22): 1603708.
- [6] 余元勋. 中国分子神经病学[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2015: 221.
- [7] Gao X L, Hong S, Liu Z P, et al. Membrane potential drives direct translocation of cell-penetrating peptides [J]. *Nanoscale*, 2019, 11(4): 1949-1958.
- [8] Li Z L, Ding H M, Ma Y Q. Translocation of polyarginines and conjugated nanoparticles across asymmetric membranes [J]. *Soft Matter*, 2013, 9(4): 1281-1286.
- [9] Marinko J T, Huang H, Penn W D, et al. Folding and misfolding of human membrane proteins in health and disease: from single molecules to cellular proteostasis [J]. *Chemical Reviews*, 2019, 119(9): 5537-5606.
- [10] Goossens K, Winter H D. Molecular dynamics simulations of membrane proteins: An overview[J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2018, 58(11): 2193-2202.
- [11] Muller M P, Jiang T, Sun C, et al. Characterization of lipid-protein interactions and lipid-mediated modulation of membrane protein function through molecular simulation [J]. *Chemical Reviews*, 2019, 119(9): 6086-6161.
- [12] Nakao H, Sugimoto Y, Ikeda K, et al. Structural feature of lipid scrambling model transmembrane peptides: Same-side positioning of hydrophilic residues and their deeper position [J]. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 2020, 11(5): 1662-1667.
- [13] Nawrocki G, Im W, Sugita Y, et al. Clustering and dynamics of crowded proteins near membranes and their influence on membrane bending[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(49): 24562-24567.
- [14] Corradi V, Mendez-Villuendas E, Ingólfsson H I, et al. Lipid-protein interactions are unique fingerprints for membrane proteins[J]. *ACS Central Science*, 2018, 4(6): 709-717.
- [15] Nakao H, Hayashi C, Ikeda K, et al. Effects of hydrophilic residues and hydrophobic length on flip-flop promotion by transmembrane peptides[J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2018, 122(15): 4318-4324.
- [16] Corradi V, Sejdiu B I, Mesa-Gallosio H, et al. Emerging diversity in lipid-protein interactions [J]. *Chemical Reviews*, 2019, 119 (9): 5775-5848.
- [17] Barrera E E, Machado M R, Pantano S. Fat SIRAH: Coarse-grained phospholipids to explore membrane-protein dynamics[J]. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2019, 15 (10): 5674-5688.
- [18] Marrink S J, Risselada H J, Yefimov S, et al. The MARTINI force field: Coarse grained model for biomolecular simulations [J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2007, 111(27): 7812-7824.
- [19] Monticelli L, Kandasamy S K, Periole X, et al. The MARTINI coarse-grained force field: Extension to proteins [J]. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2008, 4(5): 819-834.
- [20] Torrie G M, Valleau J P. Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free-energy estimation: Umbrella sampling [J]. *Journal of Computational Physics*, 1977, 23(2): 187-199.
- [21] Lei X T, Liu S T, Zhou R H, et al. Molecular dynamics simulation study on interactions of cycloviolacin with different phospholipids[J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2021, 125(14): 3476-3485.
- [22] Kumar S, Rosenberg J M, Bouzida D, et al. The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method[J]. *Journal of Computational Chemistry*, 1992, 13(8): 1011.
- [23] Yesylevskyy S O, Schäfer L V, Sengupta D, et al. Polarizable water model for the coarse-grained martini force field[J]. *Plos Computational Biology*, 2010, 6 (6): e1000810.
- [24] Sinha S, Dastidar S G. Shifting polar residues across primary sequence frames of transmembrane domains calibrates membrane permeation thermodynamics[J]. *Biochemistry*, 2020, 59(45): 4353-4366.

(责任编辑:廖乾生)