

蛋白纳米颗粒与人体生物渗透压

郑子慧, 胡云峰, 郭军*

(南京中医药大学医学院整合医学学院, 南京 210023)

摘要: 渗透压是以半透膜为基础的物理特征, 被认为是生命体液流动的重要驱动力。不同于物理渗透压, 生物渗透压是以脂质双分子层质膜为基础的生命活动, 其离子和水的流动依赖于特异通道的开放, 具有选择性。在体内, 大量生成的蛋白纳米颗粒能吸附游离阳离子, 诱导膜电位变化, 促进离子通道的激活和离子流动, 继而调控细胞渗透势能改变。同时, 体液离子组成也参与了蛋白纳米颗粒吸附离子的调节, 以至形成了生物渗透压依赖蛋白纳米颗粒、离子种类和离子通道通透性的特有生命现象。因而, 合理解释生物渗透势能发生机制, 能为细胞极化、结构改变和肿瘤侵袭转移的力学机制提出新观点, 丰富生命科学生物渗透压研究新内容。

关键词: 蛋白纳米颗粒; 生物渗透压; 离子扩散; 膜电位; 非选择性离子通道

Protein nanoparticles and bio-osmotic pressure

ZHENG Zihui, HU Yunfeng, GUO Jun*

(School of Medicine & Holistic Integrative Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, Jiangsu)

Abstract: Physical osmotic pressure (OP) is decided by the solution quantity difference between semipermeable membrane. A new viewpoint of “biological OP (Bio-OP)” is proposed in this review, which depends on the flow of ions and water across the opening of selective ion channels on plasma membrane. Bio-OP is related to the solute property, especially the interplay between protein nanoparticles and ions. *In vivo*, abundant protein nanoparticles can adsorb free cations and result in changes of membrane potential, activation of ion channels and ion flux, and further hyper-osmotic effects. In addition, plasma components are closely associated with adsorbing ability of protein nanoparticles, further regulating permeability of ions channels, free ion diffusion and bio-OP. Therefore, the mechanism underlying the osmotic potential regulation and water metabolism of cell swelling and shrinkage needs to be rationally clarified, for further investigating the roles of mechanical activity in cell polarization, membrane potential, structural change, tumor invasion and metastasis. The new theory of bio-OP provides reasonable interpretation of osmotic potential in life sciences.

Key Words: protein nanoparticles; bio-osmotic pressure; ion diffusion; membrane potential; non-selective ion channel

渗透压是生物体液的重要物理特性之一, 分为晶体渗透压和胶体渗透压^[1]。生物晶体渗透压是由无机离子、尿素、葡萄糖等低分子物质形成的

渗透压; 而胶体渗透压是蛋白质等高分子产生的渗透势能。两者在人体水盐代谢调节过程中发挥重要作用, 共同维系着人体的生命活动, 成为人

收稿日期: 2022-06-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(82073826, 82273908)

第一作者: E-mail: zihuizheng@njucm.edu.cn

*通信作者: E-mail: guoj@njucm.edu.cn

体内细胞体积变化及其结构改变的重要物理机制。研究表明, 细胞渗透势能的改变是脑水肿、炎症效应、急性呼吸窘迫综合征、肿瘤侵袭转移、血管内皮损伤等多种疾病发生的重要病理机制^[2-6]。因而, 揭示生物渗透压对人体生理和病理活动的调控, 对现代医学发展至关重要。

1 传统物理渗透压及其理论与生物渗透压调控的差异

1887年, 荷兰化学家Van't Hoff建立了估算渗透压的公式并沿用至今^[7,8]。依据Van't Hoff渗透压公式, 在离子溶液(晶体)和大分子稀溶液(胶体)中, 渗透压可表示为: $\pi=cRT$; 其中 π 为溶液的渗透压, c 为离子或大分子溶质的浓度, R 为通用气体常数($8.314 \text{ J/mol}\cdot\text{K}$), T 为绝对温度($273 \text{ K}+\text{室温}$)。如果大分子在溶液中解离的离子数量为 Z , 则该公式可以被转换为: $\pi=(Z+1)cRT$ 。因而, 在一定温度下, 渗透压的大小取决于单位体积稀溶液里溶质数量的多少, 而与溶质本身的性质与种类无关。该公式成为渗透压力学效应的基本物理理论基础。

1911年, F. G. Donnan针对胶体颗粒诱导的渗透压又提出了Donnan效应^[9-12]。他们认为, 胶体不能通过半透膜, 而水及小离子可以渗透过膜。由于带电荷的胶体($1\ 000 \text{ nm}$ 以下的颗粒, 又称纳米颗粒)能吸附反离子, 迫使膜两侧带正、负电荷的离子重新分布, 并调节膜两侧的隔室内达到电中性(图1C)。离子重新分布的趋势能导致渗透不平衡, 随之带来水的移动, 调节了离子浓度的平衡, 进而引发体积变化(图1D)。因而, 当半透膜一侧存在不能过膜的大分子胶体(如蛋白质钠盐), 小分子电解质会在膜的两侧溶液形成不对称性分布, 促使半透膜两侧达成新平衡, 即Donnan效应或平衡。一个达到平衡的Donnan体系应具有以下两个特征: (1)膜两侧存在电势差, 据此能建立可渗性离子的平衡; (2)膜两侧存在渗透压差, 可建立水的平衡。

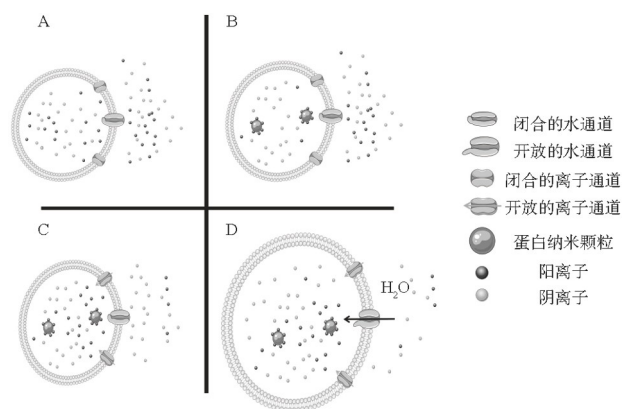
依据上述渗透压理论, 人们普遍认为: 人体渗透压的力学效应只取决于内液中离子和蛋白质颗粒数目的多少, 与离子的种类和蛋白质颗粒大小无关。然而, 这一认识并不能完全解释人体渗

透压改变调控细胞体积变化及水代谢的众多现象, 甚至一些实验观察明显违反了热力学基本原理。例如, 按照Van't Hoff渗透压公式, 0.9% NaCl、 5% 葡萄糖和 1.9% 尿素溶液均能产生 300 mOsm/L 的渗透势能, 但是, 1.9% 尿素而不是葡萄糖和NaCl溶液能显著诱导溶血发生, 表明所谓的“物理等渗”和“等张”均不能等同于“生物等渗”^[13]。同时, 血液中 42 mg/mL 血浆白蛋白仅能形成 25 mmHg 渗透压, 相当于 1.3 mOsm/L , 因而, 人体蛋白质颗粒生成的胶体渗透压被认为其力学作用微乎其微。但是, 国内临床治疗普遍认为, 血浆蛋白形成的胶体渗透压对人体极为重要, 并不能等同于离子渗透压, 两者并不分享相似的力学机制。有研究应用创新性生物技术——中间纤维角度荧光张力检测探针, 将细胞渗透势能变化转换为光学信号^[2,3,14]。该研究发现, 由细胞骨架解聚和炎症小体激活生成的大量蛋白纳米颗粒(胶体), 能诱导神经细胞内离子渗透压增强, 参与细胞膨胀、炎性焦亡、脑水肿及肺水肿调控。以上研究提示, 蛋白纳米颗粒对人体生物渗透压及其相关疾病发生有极其重要的调节作用。

2 与传统渗透压理论不同, 蛋白纳米颗粒是调控生物渗透压的重要机制

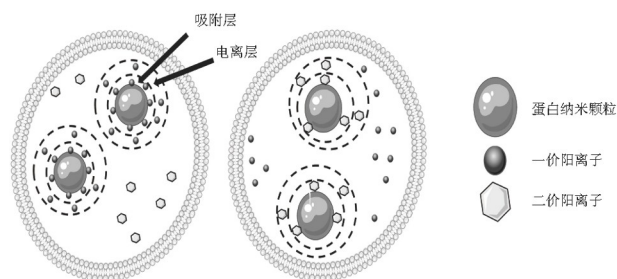
“唐南效应”似乎能对上述实验结果提供合理的解释: 蛋白纳米颗粒能通过吸附阳离子, 调控细胞内外游离离子含量变化, 调控渗透压的改变。Qian等^[4]采用细胞膜片钳研究发现, 细胞内微丝和微管骨架解聚诱导的蛋白纳米颗粒增加, 能显著的诱导细胞超极化。因而, 蛋白纳米颗粒很可能通过诱导膜电位及其相关离子通道激活参与了人体和细胞渗透压的调控(图1)。

此外, 纳米颗粒“双电层压缩理论”又提出^[15,16]: 不同离子比例能调控纳米颗粒的吸附离子能力。该理论认为, 纳米颗粒吸附的高价离子(人体内主要是 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 二价离子)能诱导其插入纳米颗粒“吸附和扩散”离子层, 置换出已吸附的低价离子(如 Na^{+} 、 K^{+} 一价离子), 使双电层吸附的一价离子数目减少而压缩扩散层的厚度, 降低其对阳离子的吸附能力, 提高溶液中游离阳离子浓度(图2), 这一理论也在Zheng等^[6]的细胞实验中得到



A: 正常状态下, 细胞膜内外正负离子浓度近似, 膜两侧势能平衡;
B: 病理状态下诱导产生的胞内蛋白纳米颗粒携带负电荷能够吸附细胞内的阳离子, 致使膜内侧附近的阴离子增加, 膜两侧存在异常电势能差; C: 膜两侧的电位变化促进离子通道的激活, 胞外离子内流导致胞内离子浓度升高, 此时膜两侧存在渗透压差; D: 胞内高渗透压导致水内流形成新电势能和渗透势能平衡, 导致水肿发生

图1 蛋白纳米颗粒参与跨膜渗透势能平衡的潜在机制



当胞内钙镁离子含量升高时, 带负电荷的蛋白纳米颗粒因吸附高价离子, 而破坏了吸附层和扩散层一价阳离子(Na^+ 和 K^+)的吸附结构, 导致一价阳离子吸附减少, 并伴随胞内离子浓度增加及高渗发生

图2 蛋白纳米颗粒依据“双电层压缩理论”调控细胞渗透势能的机制图

到了验证。

因此, 当溶液中离子数量固定时(即物理渗透压值不变), 胞外二价钙、镁离子减少, 能上调蛋白纳米颗粒吸附离子的双电层厚度, 增加纳米颗粒吸附一价离子的数量, 导致细胞内游离阳离子大量减少, 推测蛋白纳米颗粒协同二价钙镁离子参与了细胞膜电位改变及其相关胞内离子渗透压变化的调节。

3 细胞内外不同离子渗透势能对抗是蛋白纳米颗粒调控生物渗透压的力学基础

那么, 蛋白纳米颗粒是如何通过诱导胞内离子改变调控生物渗透压的呢? 物理渗透压原理认

为^[7,13]: 渗透压变化与溶质种类和大小无关, 是基于半透膜自由通透性而提出的。而离子扩散均质性原理认为: 离子扩散分布与离子的种类密切相关 $[10\text{K}^+ | \text{膜} | 10\text{Na}^+(\text{初始态}) \rightarrow 5\text{K}^+ + 5\text{Na}^+ | \text{膜} | 5\text{Na}^+ + 5\text{K}^+(\text{最终态})]$ 。同时, 细胞质膜对离子的通透有选择性, 且跨膜离子通道能控制各种离子的特异性进出及数量^[4,17]。有实验也表明, *sulfonylurea receptor 1-transient receptor potential melastatin subfamily member 4* (SUR1-TRPM4)通道的抑制能显著下调血管紧张素 II 和缓激肽诱导的渗透压增强; 且SUR1-TRPM4通道密切联系钙通道voltage-gated calcium channel (VGCC)和transient receptor potential canonical 6 (TRPC6)的激活^[4]。由此推测, 细胞生物渗透压改变与不同离子通道控制的离子特异通透有密切联系, 与传统物理渗透压原理并不一致。

既然生物渗透压与离子种类有关, 可以以阳离子钠、钾为例实施单因素分析。当 Na^+ 通道单一开放时, 胞外大量的 Na^+ 会顺离子浓度内流, 依据Van't Hoff渗透压基本理论, 可知 Na^+ 渗透压为 $\pi_{\text{Na}} = (c_{\text{Na外}} - c_{\text{Na内}})RT$, Na^+ 浓度外高内低; 当外向 K^+ 通道单一开放时, K^+ 会顺离子浓度外流, K^+ 渗透压为 $\pi_{\text{K}} = (c_{\text{K内}} - c_{\text{K外}})RT$, 内高外低, 上述单一离子依据渗透势能的跨膜扩散流动合理符合了热力学原理。反之, 如果依据“传统物理理论”认为生物渗透压与离子种类无关, 那么神经细胞水肿伴随细胞由“等渗”通过离子通道开放形成细胞内“高渗”(钠离子大量内流)的现象^[2,3], 就明显违反了热力学基本原理。因而, 生理状态下的细胞处于渗透压平衡, 实质是细胞外“高Na渗透势能”和细胞内“高K渗透势能”的对抗平衡, 同时因水进出相等而不产生膨胀力或渗透压力均衡。此外, 离子泵诱导的耗能 Na^+ 和 K^+ 回流, 也支持了上述“细胞外 Na^+ 内 K^+ 是‘高’渗透势能对抗平衡”的合理性。

此外, 电生理膜片钳研究表明, 跨膜离子通道的开放程度可调节, 如 Na^+ 通道抑制剂能剂量依赖性下调离子内流及细胞内渗透压的增加^[4,17]。进而推测, 细胞离子通道开放程度或单位面积离子通过的数量(压强)也至关重要地参与了生物渗透压调控, 且有饱和效应(开放到一定程度, 与通道开

放数量无关)。但是当质膜所有离子通道极低或关闭时, 即使胞内离子浓度很高, 因特异离子通透很弱, 其渗透压也低, 甚至为零。不能通透的膜没有离子扩散现象, 不能生成渗透势能。这种情况应在细胞静息时存在, 提示静息细胞的渗透压平衡。此时离子通道开放程度有限, 限制了离子扩散能力, 应该是“低” Na^+ 和 K^+ 渗透势能对抗平衡, 所以细胞内外渗透势能差被推测为等渗($\pi=0$)^[7,13]。因而, 细胞内外渗透势能差(生物渗透压)受多种离子通道开放程度协同调节。

但是离子通道开放程度越大, 渗透势能降低越快。如 Na^+ 通道开放远大于 K^+ 通道, 此时细胞外 Na^+ 内 K^+ 高渗透势能对抗平衡被打破, Na^+ 向内渗透势能的降低要远大于 K^+ 向外渗透势能的降低, 表现为细胞内 K^+ 向外渗透压高而 Na^+ 向内渗透压快速降低, 随后调控了水通道开放及水的进入。这种调控模式能合理解释细胞的水肿现象, 其实质是胞内 K^+ 向外的渗透势能远高于胞外 Na^+ 向内的渗透势能差(仅限阳离子), 使向外渗透的势能升高, 从而有效诱导水流动及细胞膨胀。

总之, 生物渗透压受多种特异离子通道开放程度调控, 是其介导离子进出的矢量合(内外流动和)。但是如果缺少 Na^+ 、 K^+ 通道开放或离子扩散, 则不能产生“阳离子”渗透势能。因而, 上述生物渗透压理论可能为细胞低渗调节性容积减少(regulatory volume decrease, RVD)和高渗调节性容积增大(regulatory volume increase, RVI)现象提供合理的解释^[18], 解析人体生命活动中生物渗透压特有的力学活动。

4 离子通道介导的不同离子差异通透参与了生物渗透压及人体水代谢调控

那么, 哪类离子通道开放最能有效触发细胞内生物渗透压增加和诱导细胞水肿发生? 依据上述研究推测^[4,17], 跨膜渗透压主要受到阳离子钠、钾通道和阴离子氯通道等的协同调控。以阳离子为例, $\pi=\pi_k-\pi_{\text{Na}}=(c_{\text{K}^+ \text{内}}-c_{\text{K}^+ \text{外}}-c_{\text{Na}^+ \text{外}}+c_{\text{Na}^+ \text{内}})RT$, Na^+ 大量内流和 K^+ 有限外排能最大限度地实现跨膜渗透压的增强, 诱导水的快速内流, 触发神经元突触形态结构改变及功能丧失。同时, 如果没有钾通道有效开放和离子扩散, 也不能生成胞内高渗膨胀的

渗透势能, 即 $\pi=c_{\text{Na}^+ \text{内}}-c_{\text{Na}^+ \text{外}}(\pi_k=0, c_{\text{Na}^+ \text{内}}<c_{\text{Na}^+ \text{外}})$, 反而是胞外高渗萎缩。

因而, 非选择性钠钾通道激活可能是诱导胞内 Na^+ 快速升高和 K^+ 缓慢降低的重要途径, 成为调控跨膜渗透压增强的重要调控机制。目前, 已识别的钠钾离子差异通透的主要离子通道有^[19-22]: 磺胺类受体SUR1调节的TRPM4/5通道、嘌呤能受体purinergic P2X 7 receptor (P2RX7)、酸敏感性离子通道acid-sensing ion channel (ASIC)、瞬时受体电位香草素通道transient receptor potential vanilloid (TRPV1-4)等。研究揭示, 水通道蛋白AQP4能与SUR1-TRPM4装配, 形成特异的水-离子通道, 且细胞膜电位改变能加剧其诱导的神经细胞水肿发生。因此, 临床给予SUR1-TRPM4抑制剂磺胺类药物(格列本脲), 能减弱离子内流和细胞毒性水肿, 成为治疗脑水肿发生的潜在药物^[17,23]。值得注意的是, 成孔蛋白TRPM4与SUR1装配后, 能提升对胞内钙的灵敏度, 提示细胞内蛋白纳米颗粒生成及钙信号通过双电层效应协同调控了SUR1-TRPM4通道活性及其相关跨膜渗透压的改变。此外, 非选择性钠钾通道激活不仅密切联系膜电位的改变, 也与胞内化学信号密切联系。如第二信使甘油二酯能诱导TRPC通道活性上调, 介导钙离子内流, 是TRPM4通道钠钾差异通透的重要调控机制^[4]。因而, 化学信号、电活动和张力改变构成了人体和细胞的协同调控机制。

5 小结与展望

生物渗透压是调控人体及细胞的重要力学活动, 是细胞形态、结构及功能改变的重要调控机制。目前的研究提出蛋白纳米颗粒呈现的胶体吸附反离子性质是调控细胞离子渗透压改变的重要因素, 通过诱导膜两侧电位改变, 激活电压依赖型离子通道, 形成细胞内外渗透势能新的对抗平衡, 因而, 多种离子及其相关离子通道的开放程度均参与了生物渗透压的调控, 成为不同于传统物理渗透压的特有生命活动。人体细胞骨架解聚、炎症小体生成、血浆白蛋白减少、 $\text{A}\beta$ 蛋白积累以及 α 突触核蛋白异常, 已被识别是多种疾病发生的重要机制^[2-6]。合理揭示依赖蛋白纳米颗粒的生物渗透压对人体生理病理功能的调控, 意义重

大。同时,基于神经元形态结构极化对中枢神经生理功能至关重要,提示生物渗透压很可能是诱发缺血性脑水肿、阿尔兹海默病和帕金森病等众多退行性神经疾病的重要诱因,该生物物理机制的揭示能为多种神经及重大疾病的发病和治疗机制研究带来新发展。

参考文献

- [1] Masic A, Bertinetti L, Schuetz R, et al. Osmotic pressure induced tensile forces in tendon collagen. *Nat Commun*, 2015, 6(1): 5942
- [2] Zhang JR, Wang YX, Zheng ZH, et al. Intracellular ion and protein nanoparticle-induced osmotic pressure modify astrocyte swelling and brain edema in response to glutamate stimuli. *Redox Biol*, 2019, 21: 101112
- [3] Zheng Z, Wang T, Chen J, et al. Inflammasome-induced osmotic pressure and the mechanical mechanisms underlying astrocytic swelling and membrane blebbing in pyroptosis. *Front Immunol*, 2021, 12: 688674
- [4] Qian ZZ, Wang QY, Qiu ZS, et al. Protein nanoparticle-induced osmotic pressure gradients modify pulmonary edema through hyperpermeability in acute respiratory distress syndrome. *J Nanobiotechnol*, 2022, 20(1): 314
- [5] Hu Y, Xie Q, Chen S, et al. Par3 promotes breast cancer invasion and migration through pull tension and protein nanoparticle-induced osmotic pressure. *Biomed Pharmacother*, 2022, 155: 113739
- [6] Zheng Z, Wang Y, Li M, et al. Albumins as extracellular protein nanoparticles collaborate with plasma ions to control biological osmotic pressure. *Int J Nanomed*, 2022, Volume 17: 4743-4756
- [7] Guo YC, Wang YX, Ge YP, et al. Analysis of subcellular structural tension in axonal growth of neurons. *Rev Neurosci*, 2018, 29(2): 125-137
- [8] Lopez MJ, Hall CA. Physiology, Osmosis[M]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022: 1
- [9] Lang GE, Stewart PS, Vella D, et al. Is the Donnan effect sufficient to explain swelling in brain tissue slices? *J R Soc Interface*, 2014, 11(96): 20140123
- [10] Yu Z, Moomaw JF, Thyagarajapuram NR, et al. A mechanistic model to account for the Donnan and volume exclusion effects in ultrafiltration/diafiltration process of protein formulations. *Biotechnol Prog*, 2021, 37(2): e3106
- [11] Bolton GR, Boesch AW, Basha J, et al. Effect of protein and solution properties on the Donnan effect during the ultrafiltration of proteins. *Biotechnol Prog*, 2011, 27(1): 140-152
- [12] Nguyen MK, Kurtz I. Quantitative interrelationship between Gibbs-Donnan equilibrium, osmolality of body fluid compartments, and plasma water sodium concentration. *J Appl Physiol*, 2006, 100(4): 1293-1300
- [13] 朱大年, 王庭槐. 生理学[M]. 8版. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 57
- [14] Li C, Chen LL, Wang YY, et al. Protein nanoparticle-related osmotic pressure modifies nonselective permeability of the blood-brain barrier by increasing membrane fluidity. *Int J Nanomedicine*, 2021, 16: 1663-1680
- [15] López-García JJ, Horno J, Grosse C. Influence of the dielectrophoretic force in mixed electrical double layers. *J Colloid Interface Sci*, 2013, 405: 336-343
- [16] Bohinc K, Bossa GV, May S. Incorporation of ion and solvent structure into mean-field modeling of the electric double layer. *Adv Colloid Interface Sci*, 2017, 249: 220-233
- [17] Jha RM, Raikwar SP, Mihaljevic S, et al. Emerging therapeutic targets for cerebral edema. *Expert Opin Ther Targets*, 2021, 25(11): 917-938
- [18] Bortner CD, Cidlowski JA. Ions, the movement of water and the apoptotic volume decrease. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 611211
- [19] García CR, Bravo-Tobar ID, Duarte Y, et al. Contribution of non-selective membrane channels and receptors in epilepsy. *Pharmacol Ther*, 2022, 231: 107980
- [20] Luo Z, Ovcjak A, Wong R, et al. Drug development in targeting ion channels for brain edema. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(10): 1272-1288
- [21] Woo SK, Kwon MS, Ivanov A, et al. The sulfonylurea receptor 1 (Sur1)-transient receptor potential melastatin 4 (Trpm4) channel. *J Biol Chem*, 2013, 288(5): 3655-3667
- [22] Diszházi G, Magyar ZÉ, Lisztes E, et al. TRPM4 links calcium signaling to membrane potential in pancreatic acinar cells. *J Biol Chem*, 2021, 297(3): 101015
- [23] Stokum JA, Kwon MS, Woo SK, et al. SUR1-TRPM4 and AQP4 form a heteromultimeric complex that amplifies ion/water osmotic coupling and drives astrocyte swelling. *Glia*, 2018, 66(1): 108-125