

[研究简报]

胆酸钠与支撑磷脂双层膜作用的电化学研究

王建国, 杨薇薇, 江黎丽, 吕 慧, 孙巧花, 马 勇, 姜玉春, 臧树良
(辽宁大学化学学院, 沈阳 110036)

关键词 支撑磷脂双层膜; 胆酸钠; 循环伏安; 交流阻抗

中图分类号 O657.1

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2007)05-0859-03

胆盐是一类重要的生物表面活性剂,它能够结合到类脂双层膜中并改变膜的性质^[1,2].胆盐可分配到泡囊中甚至溶解泡囊^[3],还能与脂质体作用,在脂质双分子层上形成小孔^[4],但采用电化学方法研究胆盐与模拟生物膜作用的工作尚未见文献报道.支撑磷脂双层膜(s-BLM)具有制备简易、重现性好等优点.目前已有一些利用电化学方法研究 s-BLM 与生物分子^[5]、药物分子^[6]、离子^[7]及其它物质^[8]作用的报道.本文采用电化学方法研究胆酸钠(NaC)与s-BLM的相互作用,并结合实验结果对NaC与s-BLM的作用机理进行了讨论.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器 卵磷脂(PC, Sigma公司,美国),胆固醇(CH),多巴胺和胆酸钠(Fluka公司,瑞士),其它试剂均为分析纯.实验用水经石英亚沸高纯水蒸馏器蒸馏制得.

采用美国AMETEK公司的273A恒电位、恒电流仪进行循环伏安测定.采用FRD-100频响仪测定交流阻抗,利用软件Zsimp Win进行数据拟合.阻抗测定条件为:交流电压的幅度为5 mV,测量频率范围为0.1~10000 Hz,工作电压为体系的开路电位.所有实验均采用三电极体系,工作电极为铂盘电极(直径1 mm),参比电极为饱和Ag/AgCl电极,对电极为铂片电极.

1.2 s-BLM的制备 配制含20 mg/mL PC和6 mg/mL CH的环己烷溶液作为成膜液.铂电极分别用直径为1.0, 0.3和0.05 μm 的 $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ 粉末抛光,在水中超声2 min,在1.0 mol/L的 H_2SO_4 溶液中进行循环伏安扫描.得到铂电极的标准循环伏安图后,将铂电极分别用亚沸水和丙酮淋洗并超声5 min后,取出,用氩气吹干,用微量进样器吸取5 μL 成膜液滴在电极表面,立即插入0.1 mol/L的KCl溶液中,液膜逐渐变薄,最终形成s-BLM^[9].所有实验均在室温及除氧的条件下进行.

2 结果与讨论

2.1 s-BLM的电化学响应 将成膜前、后的铂电极在 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 探针溶液中进行交流阻抗扫描

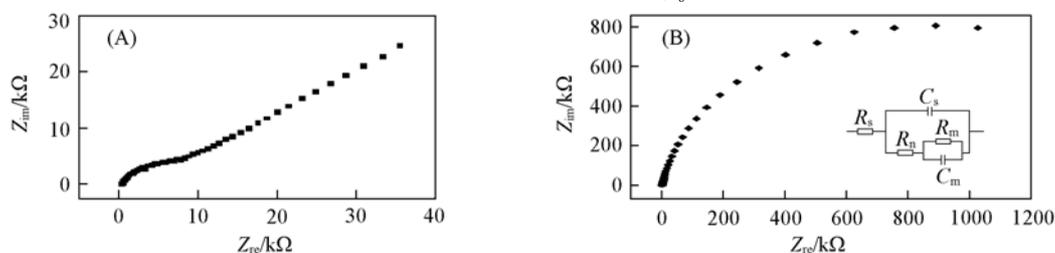


Fig. 1 AC impedance curve of the Pt electrodes without (A) and with (B) the modification of s-BLM in 0.1 mol/L KCl solution with 1.0 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$

Inset: modified Randle's equivalent circuit, R_s is solution resistance, R_m is membranes resistance, C_m is membrane capacitance, R_n is non-membranes resistance and C_s is diffusion capacitance of the whole circuit.

收稿日期: 2006-06-26.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20271024)和辽宁省教育厅青年基金(批准号: 2004F026)资助.

联系人简介: 王建国(1965年出生),男,博士,教授,主要从事模拟生物膜的电化学研究. E-mail: jgwang@lnu.edu.cn

和循环伏安(图1和图2). 图2谱线*f*具有明显的氧化还原峰, 说明探针可自由地到达电极表面发生氧化还原反应. 图2谱线*a*表明探针受到明显的阻碍作用, 说明铂电极表面已被致密的磷脂膜覆盖. 为了判断该磷脂膜是否为 s-BLM, 选择 Randle 等效电路对图1进行拟合, 得到 C_m 值. 将膜看成平板电容器, 则 $C_m = \epsilon_0 k/d$. 磷脂的相对介电常数 k 为 2.05. 真空介电常数 ϵ_0 为 $8.85 \times 10^{-14} \text{ F/cm}^{[10]}$, 膜厚度 $d = 5.5 \text{ nm}$. 与文献[10]报道值(4~10 nm)一致, 说明在铂电极表面成功地自组装了 s-BLM.

2.2 NaC 与 s-BLM 的相互作用 将修饰有 s-BLM 的铂电极与 10 mmol/L 的 NaC 溶液作用, 进行循环伏安扫描(图2). 图2谱线*c*和*d*与*a*相比氧化还原峰电流值增大很多, 这是由于 NaC 能够与 s-BLM 作用, 诱导 s-BLM 产生孔洞, 随着作用时间的增加, 峰电流不断增大, 表明产生的孔洞增多, 并且在 2 h 左右 NaC 与 s-BLM 的作用可达到平衡. 同时发现随着 NaC 浓度的增加, 峰电流增大, 即 NaC 与 s-BLM 的作用是随着 NaC 浓度的增加而增强的. 将与 NaC 作用后的 s-BLM 放入 0.1 mol/L 的 KCl 溶液中, 发现由 NaC 诱导产生的孔洞能够自动修复, 扫描得到的循环伏安曲线与图2谱线*a*基本相同, 即 NaC 与 s-BLM 的作用是可逆的. 采用交流阻抗法对上述实验过程进行了研究, 所得结论与循环伏安法一致, 进一步证实了由循环伏安法所得的结论.

同时研究了胆固醇(CH)对 NaC 与 s-BLM 作用的影响. 通过调节成膜液成分的方法, 制备含有 CH 和不含 CH 的 s-BLM, 将它们分别与 10 mmol/L NaC 作用(图2). 图2谱线*a*比图2谱线*b*的电流值小, 说明含有 CH 的 s-BLM 更加致密. 而图2谱线*e*的电流值比图2谱线*c*大很多, 表明 NaC 与不含 CH 的 s-BLM 作用更强烈, 即 CH 能够增加 s-BLM 的稳定性, 减弱 NaC 与 s-BLM 之间的作用.

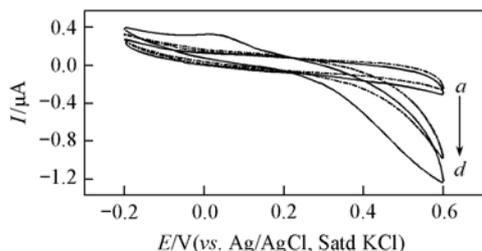


Fig. 3 Cyclic voltammograms of the s-BLM modified Pt electrode in 0.1 mol/L KCl solution with 1.0 mmol/L DA or AA

a. s-BLM in 1.0 mmol/L AA; *b.* s-BLM in 1.0 mmol/L DA; *c.* s-BLM after interaction with 10 mmol/L NaC for 30 min in 1.0 mmol/L AA; *d.* s-BLM after interaction with 10 mmol/L NaC for 30 min in 1.0 mmol/L DA. Scan rate: 50 mV/s.

的 NaC 造成的, 而不是 s-BLM 上的孔洞对不同电荷的探针有选择性.

2.3 NaC 与 s-BLM 作用机理的讨论 Schubert 等^[11]研究了 NaC 与单片层泡囊的相互作用, 认为 NaC 不对称的吸附在单片层泡囊膜的一侧, 且随着吸附的 NaC 分子数目的增多, 使膜的疏水中心的有序性下降. Ulmius 等^[12]也发现 NaC 能够显著地减小蛋黄卵磷脂酰基链的有序性. 由于空间位阻效应, 一部分 NaC 分子会折叠进入 s-BLM 之中^[11], 每个胆盐二聚物周围有 6 个磷脂分子包围^[13].

根据上述实验结果, 对 NaC 与 s-BLM 的作用机理进行如下推测: 将 s-BLM 放入 NaC 溶液中, NaC 首先与磷脂的极性基团发生作用. 吸附在 s-BLM 外层膜上的 NaC 继续插入到 s-BLM 内, 导致磷脂分子间排列变得较松散, 一些磷脂结合到 NaC 周围, 这样不可避免地在 s-BLM 上产生一些孔洞, 探针通过

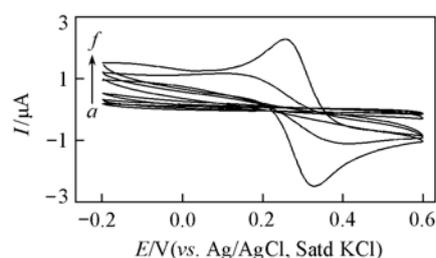


Fig. 2 Cyclic voltammograms of the Pt electrode in 0.1 mol/L KCl solution with 1.0 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$

a. s-BLM containing CH; *b.* s-BLM without CH; *c.* s-BLM containing CH after interaction with 10 mmol/L NaC for 10 min; *d.* s-BLM containing CH after interaction with 10 mmol/L NaC for 2 h; *e.* s-BLM without CH after interaction with 10 mmol/L NaC for 10 min; *f.* bare Pt electrode. Scan rate: 50 mV/s.

利用带不同电荷的探针研究 s-BLM 与 NaC 作用后的带电荷情况. 将与 NaC 作用前、后的 s-BLM 分别放入带正电荷的多巴胺(DA)和带负电荷的抗坏血酸(AA)溶液中, 进行循环伏安扫描(图3)发现, s-BLM 在 DA 和 AA 溶液中的循环伏安图基本相同, 而与 NaC 作用后的 s-BLM 在 DA 溶液中的电流值更大. 这是由于带负电荷的 NaC 嵌入 s-BLM 中, 使 s-BLM 表面带负电荷, 吸引带正电荷的 DA, 排斥带负电荷的 AA, 因此在 DA 溶液中得到的循环伏安图具有较大的电流值. 但是当作用时间增加或作用浓度增大时, 产生的孔洞较大、较多, 两者的电流值相近, 表明上述现象是带负电荷

孔洞与电极表面进行电子传递. 随着作用时间的增加以及 NaC 浓度的增大, 插入 s-BLM 内的 NaC 分子会逐渐增多, 形成更多的孔洞. CH 能够增加磷脂酰基链的有序性, 从而增加膜的稳定性^[14]. 另外, 电泳实验结果表明, CH 通过影响卵磷脂头部偶极子的取向, 增加膜表面的电负性^[15], 这对同样带有负电荷的 NaC 具有排斥作用. CH 的上述性质是 s-BLM 内的 CH 可以明显地减慢 NaC 与 s-BLM 的作用速度的主要原因. 将与 NaC 作用后的 s-BLM 再放入到 0.1 mol/L KCl 溶液中, 插入到 s-BLM 中的 NaC 分子逐渐扩散到溶液之中, 磷脂分子会重新自组装, 孔洞逐渐减小乃至消失, 膜疏水中心的有序性恢复, s-BLM 也恢复到原来的状态. 这说明 NaC 与 s-BLM 之间的作用是可逆的, 它们之间并没有形成强烈的化学键. NaC 与 s-BLM 作用时磷脂并没有从电极表面脱落, 只是聚集在 NaC 周围, 当 NaC 扩散回到溶液中后, 它又重新自组装, 恢复到原来的状态.

参 考 文 献

- [1] O'Connor C. J., Wallace R. G., Iwamoto K., *et al.*. *Biochim. Biophys. Acta*[J], 1985, **817**(1): 95—102
- [2] Donovan J. M., Leonard M. R., Batta A. K., *et al.*. *Gastroenterology*[J], 1994, **107**(3): 831—846
- [3] Hildebrand A., Beyer K., Neubert R., *et al.*. *J. Colloid Interf. Sci.* [J], 2004, **279**(2): 559—571
- [4] LI Feng-Qian(李凤前), HU Jin-Hong(胡晋红), ZHU Quan-Gang(朱全刚). *Chin. Pharm. J. (中国药学杂志)*[J], 2002, **37**(9): 675—678
- [5] Liu X. H., Huang W. M., Wang E. K.. *J. Electroanal. Chem.* [J], 2005, **577**(2): 349—354
- [6] Liu X. H., Bai H. X., Huang W. M., *et al.*. *Electrochim. Acta*[J], 2006, **51**: 2512—2517
- [7] HAN Xiao-Jun(韩晓军), SONG Yong-Hai(宋永海), WU Zheng-Yan(吴正岩), *et al.*. *Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)*[J], 2001, **22**(8): 1298—1300
- [8] SUN Chun-Yan(孙春燕), LI Di(李迪), WANG Mei-Jia(王美佳), *et al.*. *Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)*[J], 2006, **27**(3): 515—518
- [9] Jiang D. L., Diao P., Tong R. T., *et al.*. *Bioelectrochem. Bioenerg.* [J], 1998, **44**(2): 285—288
- [10] Fettiplace R., Andrews D. M., Haydon D. A.. *J. Membr. Biol.* [J], 1971, **5**(3): 277—296
- [11] Schubert R., Beyer K., Wolburg H., *et al.*. *Biochemistry*[J], 1986, **25**(18): 5263—5269
- [12] Ulmius J., Lindblom G., Wennerstrom H., *et al.*. *Biochemistry*[J], 1982, **21**(7): 1553—1560
- [13] Salto H., Sugimoto Y., Tabeta R., *et al.*. *J. Biochem.* [J], 1983, **94**(6): 1877—1887
- [14] Philips M. C.. *Progress in Surface Membrane Science*[M], New York: Academic Press, 1972: 139—221
- [15] XU Yu-Min(徐育敏). *Acta Biophysica Sinica(生物物理学报)*[J], 1996, **12**(2): 223—227

Electrochemical Study on the Interaction of Sodium Cholate with a Supported Lipid Bilayer Membrane

WANG Jian-Guo*, YANG Wei-Wei, JIANG Li-Li, LÜ Hui, SUN Qiao-Hua,
MA Yong, JIANG Yu-Chun, ZANG Shu-Liang
(College of Chemistry, Liaoning University, Shenyang 110036, China)

Abstract The supported bilayer lipid membrane(s-BLM) was served as a biomembrane model. The interaction between sodium cholate(NaC) and s-BLM was investigated by cyclic voltammetry and alternating current (AC) impedance spectroscopy. The following conclusions were obtained: NaC can decrease the orderliness of lecithin molecule arrangement and induce pores or defects on s-BLM and the interaction between them depends on time, concentration and cholesterol. In addition, the defective s-BLM after interaction can be self-repaired in 0.1 mol/L KCl solution, which indicates that the interaction is reversible. Moreover, a possible mechanism of the interaction was proposed finally.

Keywords Supported lipid bilayer membrane; Sodium cholate; Cyclic voltammetry; Alternating current impedance