

# 草酸钾诱导的 LB 膜缺陷及对草酸钙堆积图形的影响

邓穗平, 张 生, 欧阳健明, 蔡继业

(暨南大学生物矿化与结石病防治研究所, 广州 510632)

**摘要** 采用扫描电子显微镜(SEM)和原子力显微镜(AFM)研究了经不同浓度草酸钾( $K_2C_2O_4$ )处理后二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)的缺陷 LB 膜及其对一水草酸钙(COM)成核和生长的影响。 $K_2C_2O_4$  的处理可进一步破坏 LB 膜中圆形畴区内的分子列阵, 尤其是使处在液态扩张相(LE)/液态凝集相(LC)边界的分子列阵无序程度增加, 从而促进了 COM 晶体在此处的成核和生长, 最终诱导圆形堆积的 COM 晶体图形出现。随着损伤 LB 膜的  $K_2C_2O_4$  浓度  $c(K_2C_2O_4)$  从 0.3 mmol/L 增加到 5.0 mmol/L, 其对 LB 膜畴区有序结构的破坏作用逐渐增强, 圈状堆积的晶体图形数量增多。当  $c(K_2C_2O_4)$  为 0.3 mmol/L 时, 主要诱导实心的圆形堆积的 COM 晶体图形, 而当  $c(K_2C_2O_4)$  增加至 5.0 mmol/L 时, 生成圈状 COM 晶体图形, 且图形的半径减小。这一研究结果将有助于从分子和超分子水平上了解肾小管上皮细胞膜损伤后的微结构变化及其与肾结石形成的关系。

**关键词** 缺陷; AFM; 草酸钙; 二棕榈酰磷脂酰胆碱; LB 膜; 肾结石

**中图分类号** O614.23; O782<sup>+</sup>.9 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2007)02-0199-05

关于 LB 膜技术的系统研究尽管已经历 90 多年了, 但其实际应用却由于 LB 膜所存在的缺陷而受到限制<sup>[1]</sup>。LB 膜缺陷的形式多种多样, 缺陷大小亦存在差异, 常见的缺陷有晶格位错、台阶、针孔、微晶和膜内不同微畴间的差异等<sup>[2,3]</sup>。二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)是哺乳动物细胞膜的主要成分, 其单分子膜可用作细胞双层膜的简单模型<sup>[1]</sup>。在室温下, DPPC 可以形成液态扩张相(LE)和液态凝集相(LC), 同一相畴区的尺寸从几微米到 200  $\mu\text{m}$  不等<sup>[4~8]</sup>。在这两种不同畴区中, DPPC 分子列阵存在差异, 其表面能亦不相同。

在肾结石的形成过程中, 肾小管上皮细胞损伤是中心环节之一<sup>[9]</sup>。肾小管上皮细胞膜损伤后, 可暴露出更多的晶体粘附位点<sup>[10]</sup>, 促进晶体直接成核, 并加速肾结石晶体在肾内的滞留和粘附。对化学损伤的膀胱上皮<sup>[11]</sup>、庆大霉素预处理过的鼠肾<sup>[12]</sup>、葡胺聚糖层遭受破坏后的肾上皮<sup>[13]</sup>的研究都表明, 细胞膜的损伤可促进晶体的粘附。当肾小管上皮细胞受损伤或者凋亡时, 带负电荷的磷脂如磷脂酰丝氨酸(PS)可通过静电作用吸引钙离子, 钙离子继而与草酸根和磷酸根等相互作用, 导致含钙矿物沉积, 引发尿石症。草酸盐可以诱导 PS 出现在细胞膜外侧<sup>[14]</sup>。动物实验结果表明, 在草酸盐浓度为 0.25 mmol/L 或 0.5 mmol/L 时, 在 15 min 内就可使细胞膜外侧的 PS 明显增加。随着草酸钠的浓度增大, PS 的分布从分散逐渐变为聚集<sup>[14,15]</sup>。草酸盐诱导 PS 在细胞膜外侧的可能机理是: 草酸盐可与细胞表面的 PS 结合, 阻止 PS 重新返回细胞膜内侧。

肾小管上皮细胞损伤包括氧化性损伤、表面组织缺欠和晶体停留时间延长等, 细胞膜结构缺欠即膜表面分子阵列缺欠是细胞损伤的重要原因之一。本文以存在缺陷的 LB 膜为模型, 模拟受损伤的肾小管上皮细胞膜表面分子阵列缺欠后诱导肾结石矿物草酸钙( $\text{CaOxa}$ )晶体生长, 进一步探讨由于细胞损伤及草酸盐的存在所导致尿石症的分子机理, 期望为更有效地治疗尿石症提供参考。

收稿日期: 2006-07-25.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20471024)和教育部留学回国人员科研启动基金(教外司[2005]55号)资助。

联系人简介: 欧阳健明(1963年出生), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事生物矿化研究. E-mail: toyjm@jnu.edu.cn

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

二棕榈酰磷酸酰胆碱(DPPC)为Sigma公司产品;草酸钾、二水氯化钙、氯化钠和氯仿均为分析纯.实验用水为从石英亚沸蒸馏器制得的二次蒸馏水.

XL-30型扫描电子显微镜(SEM, Philips公司),用SEM表征前先对样品喷金,测量电压为20 kV. WM-II型全自动双向压缩LB膜仪(东南大学).美国Thermo Microscope仪器公司生产的Autoprobe CP Research型原子力显微镜,APSC20100型扫描器,微悬臂长度为180  $\mu\text{m}$ ,扫描针尖为商用氮化硅针尖,成像模式为接触式,AFM图像数据采用512  $\times$  512点阵存储,图像经自动平滑处理,以消除扫描方向上的低频噪音.

### 1.2 实验过程

LB膜的制备参照文献[16,17]进行.以二次水为亚相,在LB槽内铺展浓度为1.0 mmol/L的磷脂DPPC的氯仿溶液,待氯仿挥发15 min后,以0.03  $\text{nm}^2/(\text{min} \cdot \text{molecule})$ 的速度压膜至目标表面压为10 mN/m.采用垂直提拉法将单分子膜同时转移到2片新劈开的云母基片上,提膜速度为3 mm/min. DPPC亲水功能基团朝外,单层膜在干燥器中放置24 h后,按照下面方法制备缺陷LB膜.

缺陷LB膜制备:将上述方法制备的LB膜浸泡在一定浓度(分别为0.3, 0.6, 1.2, 2.5和5.0 mmol/L)的草酸钾溶液中,浸泡时间为2 h.取出后小心用二次蒸馏水洗去膜表面的草酸钾,干燥,其中一片用于AFM观察,将另一片放入草酸钙亚稳溶液中进行晶体生长.

缺陷LB膜诱导CaOxa晶体生长参照文献[7,14]进行:在培养皿中放入经微孔滤膜(孔径0.22  $\mu\text{m}$ )过滤的CaOxa亚稳溶液,最终浓度 $c(\text{Ca}^{2+}) = c(\text{Oxa}^{2-}) = 0.30 \text{ mmol/L}$ ,  $c(\text{NaCl}) = 10 \text{ mmol/L}$ .然后将制备好的LB膜水平放置在气液界面处,有膜的一面朝向CaOxa溶液,生长24 h后取出基片进行XRD和SEM表征.为防止由于溶剂水的挥发而造成体系饱和度发生变化,在密闭环境中进行晶体生长,生长温度为 $(25 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ .整个实验重复3次,在无尘箱内完成.

## 2 结果与讨论

### 2.1 对COM晶体图形的影响

图1为不同浓度 $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 损伤的LB膜诱导生长的一水草酸钙(COM)晶体图形的SEM图像.可以看出,损伤LB膜诱导生成的COM晶体图形都是圈状堆积图形,但经0.3 mmol/L的 $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 损伤的LB

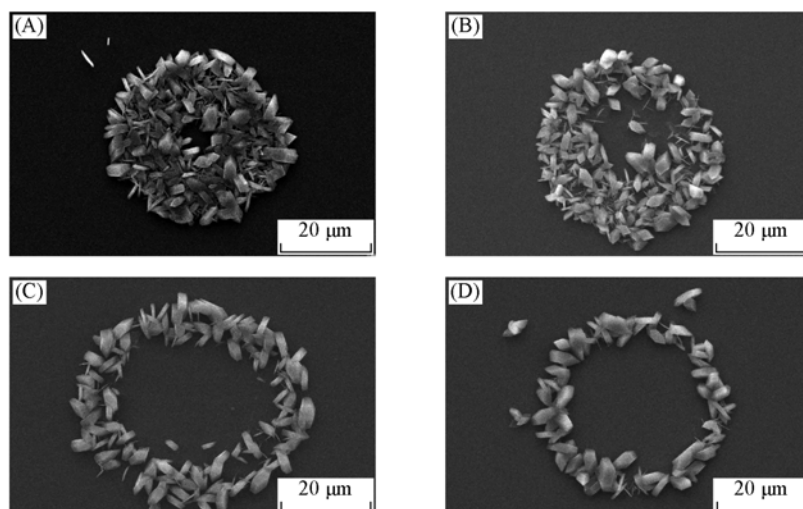


Fig. 1 SEM images of COM crystals induced by defective LB films of DPPC treated by different concentrations of  $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$

$c(\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4)/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$ : (A) 0.3; (B) 0.6; (C) 2.5; (D) 5.0. Crystallization time: 24 h.

膜诱导的图形中心空的面积较小[图 1(A)], 晶体几乎布满整个圈内, 排列紧密. 组成这种圈状图形的 COM 晶体包括六边形、五边形、针状和一些形貌不规则的晶体. 随着草酸盐浓度  $c(\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4)$  增加到 0.6 mmol/L, 圈状图形里面的 COM 晶体数量减少, 但 COM 晶体形貌基本没有发生变化[图 1(B)].  $c(\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4)$  增加至 2.5 mmol/L 时, 圈内晶体进一步减少[图 1(C)]; 当  $c(\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4)$  增加到 5.0 mmol/L 时, 圈内已经基本上没有晶体, 晶体图形为圈状[图 1(D)].

由于 DPPC 单分子膜在室温(25 °C)下易发生相转变, 如在膜压为 10 mN/m 条件下, DPPC 单分子膜处于 LE 相(图 2), 但易转变成 LC 相<sup>[4,8,18]</sup>, 因而形成了 LE 相和 LC 相微畴. 由于两种不同微畴内 DPPC 分子的密度、头基间的相互作用、头基区域的电偶极均不相同<sup>[6]</sup>, 导致畴区边缘形成缺陷, 这种微畴边缘缺陷转移到固体基片上时依然可保留原有形态<sup>[19~23]</sup>. 图 3(A)为转移表面压为 10 mN/m 时 DPPC LB 膜畴区的接触式 AFM 照片, 从图 3 可见, 圆形 LC 相与 LE 相共存, 与文献[20]报道[图 3(B)]的一致. 实际上, 荧光显微镜<sup>[8,24]</sup>、AFM<sup>[19]</sup>和 BAM<sup>[8,25]</sup>均直接观测到了单分子膜和 LB 膜中的 LE/LC 相共存现象. 深入研究发现, LC 和 LE 的纳米级缺陷存在显著差异, LC 畴区中的 4% ~ 8% 的面积含有纳米孔, 而 LE 畴区内则高达 60% ~ 80% 的面积含有这种纳米级缺陷<sup>[20]</sup>.

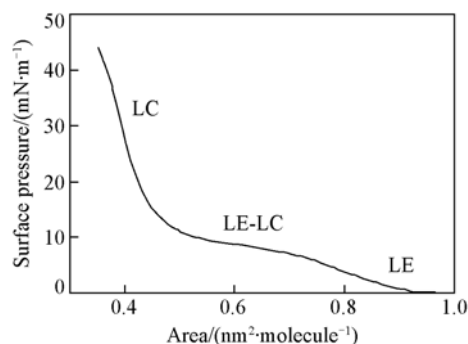


Fig. 2 Surface pressure-area isotherm for DPPC monolayer at 25 °C

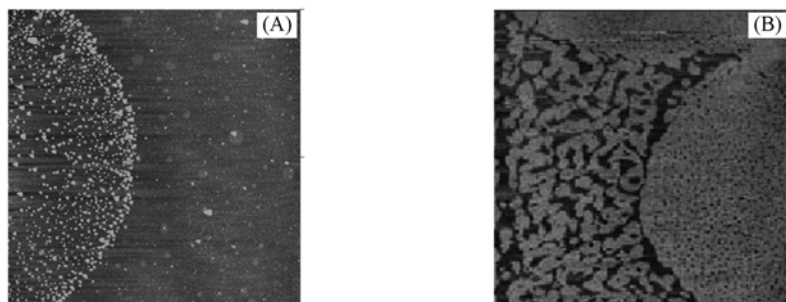


Fig. 3 AFM images of a defective domain in DPPC LB film

Scanning range: (A) 5  $\mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ ; (B) from reference [19], 10  $\mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ .

在低浓度  $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$  存在下,  $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$  可通过两个方面损伤 LB 膜: (1) 与 DPPC 亲水头基之间的静电作用削弱了 DPPC 分子间的作用力, 破坏了 LB 膜的有序结构, DPPC 分子列阵的无序性表明其具有更大的流动性和可压缩性, 更加适配晶体的成核<sup>[7]</sup>. 无序的分子排列为 COM 在其表面成核提供了额外的能量<sup>[16,17]</sup>, 使 COM 的成核自由能降低, 同时为草酸钙晶体提供更多的成核位点, 在热力学上有利于草酸钙晶体的异相成核. 另外, 由于晶体成核位点增多, 使得晶体的生长速度减慢, 表明 DPPC 分子列阵的无序性也在动力学上影响晶体的成长. 因此, 被草酸盐损伤的 LB 膜诱导生成了由众多 COM 微晶组成的圆形晶体图形, 晶体的堆积图形与 DPPC LB 膜的缺陷的形貌和程度有关; 而未经  $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$  处理的 DPPC LB 膜由于缺陷相对较少, 只诱导少量大尺寸(约 10  $\mu\text{m}$ )、零散分布的 COM 晶体<sup>[7,17]</sup>. (2) 使 DPPC 疏水尾链与云母基片之间的范德华力减小, 导致 DPPC 分子更易于脱离云母表面, 加剧缺陷的形成. 随着  $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$  浓度的增加, 草酸盐对 LB 膜的损伤作用增强, 使得缺陷内的 DPPC 分子慢慢脱离基片, 圆形缺陷里面的 DPPC 分子越来越

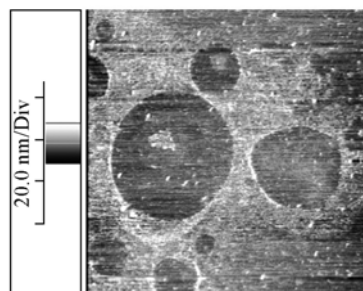


Fig. 4 AFM image for DPPC LB film injured by 5.0 mmol/L of  $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$

Scanning range: 10  $\mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ .

少,圈内的成核位点减少,因而诱导的 COM 晶体密度减小.当  $K_2C_2O_4$  的浓度增加至 5.0 mmol/L 时,大部分 DPPC 分子已经脱离基片.图 4 为经 5.0 mmol/L 草酸钾处理后 DPPC LB 膜的 AFM 图像,可以看到,部分畴区内的 DPPC 分子显著减少.此时 LB 膜的圆形区域内 DPPC 分子很少,因此,畴区内诱导生成的 COM 晶体也很少,最后只剩下圈状堆积晶体图形[图 1(D)].

## 2.2 对 COM 晶体图形数量和尺寸的影响

随着草酸盐浓度的增加,圈状堆积的晶体图形数量增多,特别是小尺寸( $<20\ \mu\text{m}$ )的圈状晶体图形增加.图 5 为不同浓度  $K_2C_2O_4$  损伤的 LB 膜诱导生长的圈状堆积的晶体图形的 SEM.虽然用 0.3 mmol/L 草酸盐损伤的 LB 膜诱导的 COM 晶体主要为中心空面积较小的圈状堆积图形[图 1(A)],但图形的数量较少,图形的平均半径约  $50\ \mu\text{m}$ .当  $K_2C_2O_4$  浓度增加到 0.6 mmol/L 时,形成的晶体堆积图形数量增加,但圈状堆积图形里面的 COM 晶体数量减少,其中心空面积增加[图 5(A)],并开始出现一些小尺寸( $<20\ \mu\text{m}$ )的晶体图形.随着  $K_2C_2O_4$  浓度增加至 2.5 和 5.0 mmol/L 时[图 5(B)],圈状 COM 晶体图形数量进一步增加,其平均半径也进一步减小,同时圈外零散的 COM 晶体明显增加.不同浓度  $K_2C_2O_4$  损伤的 LB 膜诱导生长的 COM 晶体图形的数量和尺寸分布如表 1 所示.

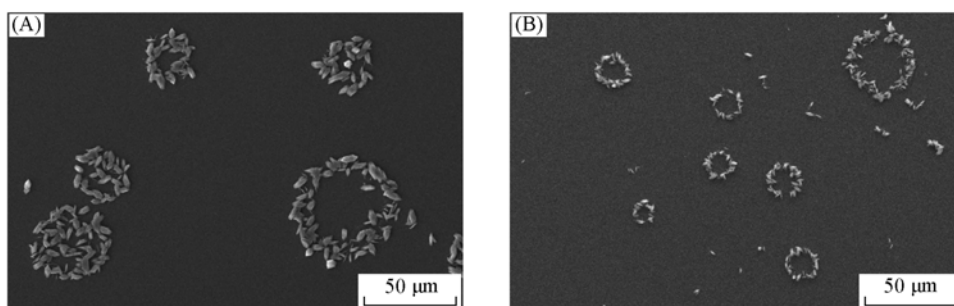


Fig. 5 SEM images of COM crystals induced by defective LB films of DPPC injured by different concentrations of  $K_2C_2O_4$

$c(K_2C_2O_4)/(mmol \cdot L^{-1})$ : (A) 0.6; (B) 5.0.

Table 1 The number and size distribution of circular patterns of crystals induced by LB films injured by potassium oxalate with different concentration

$c(K_2C_2O_4)/(mmol \cdot L^{-1})$	Number of crystal patterns	Size distribution/ $\mu\text{m}$	Percentage(%)
0.6	33	0—20	9.1
		20—50	36.4
		50—100	24.2
		>100	30.3
1.2	74	0—20	29.7
		20—50	47.3
		50—100	14.9
		>100	8.1
2.5	90	0—20	54.4
		20—50	30.0
		50—100	13.3
		>100	2.2
5.0	99	0—20	67.7
		20—50	30.3
		50—100	2.0
		>100	0

草酸钾浓度增加后导致圈外零散的 COM 晶体增加归于如下原因:在 LB 膜中的 LC 畴区和 LE 畴区,均存在针孔缺陷,其尺寸大都在  $1 \sim 2\ \mu\text{m}$ <sup>[20]</sup>,随着  $K_2C_2O_4$  浓度增加, $K_2C_2O_4$  可进一步破坏 LB 膜中针孔周围的 DPPC 分子列阵,导致畴区外小尺寸缺陷形成,因而在圈外生长出零散的 COM 晶体.

感谢中国科学院北京化学研究所江雷教授课题组提供的部分 AFM 测试.

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Ouyang Jian-Ming(欧阳健明). Principle and Applications of LB Films(LB膜原理与应用)[M], Guangzhou: Jinan University Press, 1999; 243—254
- [ 2 ] Takamoto D. Y., Aydil E., Zasadzinski J. A., *et al.*. Science[J], 2001, **293**: 1292—1295
- [ 3 ] Peltonen J. P. K., He P., Rosenholm J. B. J. Am. Chem. Soc. [J], 1992, **114**(20): 7637—7642
- [ 4 ] Schwartz D. K. Surf. Sci. Rep. [J], 1997, **27**: 241—334
- [ 5 ] Mazloff M. R., Yang J. Langmuir[J], 2001, **17**(9): 2727—2732
- [ 6 ] Kane S. A., Compton M., Wilder N. Langmuir[J], 2000, **16**: 8447—8455
- [ 7 ] Backov R., Lee C. M., Khan S. R., *et al.*. Langmuir[J], 2000, **16**: 6013—6019
- [ 8 ] McConlogue C. W., Vanderlick T. K. Langmuir[J], 1997, **13**: 7158—7164
- [ 9 ] Schepers M. S. J., Boom B. G., Romin J. C., *et al.*. J. Urol. [J], 2002, **167**(4): 1844—1847
- [ 10 ] Khan S. R., Shevock P. N., Hackett R. L. Calc. Tiss. Int. [J], 1990, **46**: 116—120
- [ 11 ] Smith C. L. J. Urol. [J], 2004, **171**(2): 882—884
- [ 12 ] Sigmon D., Kumar S., Carpenter B., *et al.*. Am. J. Kid. Dis. [J], 1991, **17**: 376—380
- [ 13 ] Grasses F., Prieto R. M., Costa-Bauza A. ATLA[J], 1998, **26**: 481—503
- [ 14 ] Cao L. C., Jonassen J., Honeyman T. W., *et al.*. Am. J. Nephrol. [J], 2001, **21**(1): 69—77
- [ 15 ] Wiessern J. H., Hasegawa A. T., Hung L. Y., *et al.*. J. Am. Soc. Nephrol. [J], 1999, **10**: 441—445
- [ 16 ] Benítez I. O., Talham D. R. Langmuir[J], 2004, **20**: 8287—8293
- [ 17 ] Ouyang J. M., Deng S. P., Zhong J. P., *et al.*. J. Cryst. Growth[J], 2004, **270**: 646—654
- [ 18 ] Kane S. A. Langmuir[J], 2002, **18**: 9853—9858
- [ 19 ] Shiku H., Dunn R. C. J. Phys. Chem. B[J], 1998, **102**: 3791—3797
- [ 20 ] Cruz A., Vazquez L., Velez M., *et al.*. Langmuir[J], 2005, **21**(12): 5349—5355
- [ 21 ] Kang Y. S., Lee D. K., Lee C. S., *et al.*. J. Phys. Chem. B[J], 2002, **106**(36): 9341—9346
- [ 22 ] Ross M., Steinem C., Galla H. J., *et al.*. Langmuir[J], 2001, **17**: 2437—2445
- [ 23 ] Wang H. S., Ozaki Y., Iriyama K. Langmuir[J], 2000, **16**(11): 5142—5147
- [ 24 ] Weis R. M., McConnell H. M. Nature[J], 1984, **310**: 5972—5973
- [ 25 ] Honig D., Mobius D. J. Phys. Chem. [J], 1991, **95**: 4590—4592

## Defective LB Films Induced by Potassium Oxalate and Its Effect on Deposited Patterns of Calcium Oxalate

DENG Sui-Ping, ZHANG Sheng, OUYANG Jian-Ming\*, CAI Ji-Ye

(*Institute of Biomineralization and Lithiasis Research, Jinan University, Guangzhou 510632, China*)

**Abstract** The defective Langmuir-Blodgett (LB) film of 1, 2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) induced by potassium oxalate ( $K_2C_2O_4$ ) and its effect on nucleation and growth of calcium oxalate monohydrate (COM) were investigated with the aid of atomic force microscopy (AFM) and scanning electron microscopy (SEM).  $K_2C_2O_4$  can destruct the molecules arrangement in the circular domains in LB film especially at the boundaries of liquid condensed (LC) and liquid expanded (LE) phases, which provides much more nucleating sites for COM crystals and promotes the nucleation and growth of COM crystals. It results in the formation of circular COM crystals patterns. As the concentration of potassium oxalate increases from 0.3 mmol/L to 5.0 mmol/L, the patterns of the COM crystals change from a solid circle to a ring-shape, the number of patterns increases and the average diameter of the patterns decreases. The results would shed light on the molecular mechanism of structure change in renal epithelial membrane injured by oxalate at the molecular and supramolecular level, and on the relationship between urolithiasis and the injury of renal epithelial membrane.

**Keywords** Defect; AFM; Calcium oxalate; DPPC; Langmuir-Blodgett film; Nephrolith

(Ed.: M, G)