

LB 膜中的缺陷畴区及其诱导形成环形草酸钙图形

邓穗平 欧阳健明*

(暨南大学生物矿化与结石病防治研究所, 广州 510632)

摘要: 利用存在缺陷的 LB 膜来模拟受损伤的肾上皮细胞膜诱导肾结石矿物草酸钙(CaOxa)晶体生长. 经 2.5 mmol·L⁻¹ 的草酸钾溶液对二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)的 LB 膜进行处理后, 可强化 LB 膜中液态扩张相(LE)和液态凝聚相(LC)之间的结构差异, 原子力显微镜(AFM)证实了圈状缺陷的存在. 以 LB 膜的圈状缺陷为模板, 诱导了一水草酸钙(COM)晶体环状图案. 相比之下, 未经草酸钾处理的 LB 膜只诱导生成零散的六边形 COM 晶体.

关键词: 缺陷 LB 膜; 生物矿化; 草酸钙; AFM

中图分类号: O641.3; O647.11

Defective Domains in LB Film and Its Induction Growth of Ring-shaped Calcium Oxalate Patterns

DENG Sui-Ping OUYANG Jian-Ming*

(Institute of Biomineralization and Lithiasis Research, Jinan University, Guangzhou 510632, P. R. China)

Abstract: Defective LB film was used as model for injured renal epithelial membrane to induce the growth of calcium oxalate monohydrate (COM) crystals, which was the major inorganic component found in renal calculi. After the LB film of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) was treated by 2.5 mmol·L⁻¹ potassium oxalate, the structural differentiation between liquid expanded (LE) phase and liquid condensed (LC) phase in LB film was strengthened and circular defects appeared. These circular defects were proved by atomic force microscopy (AFM). Such circular defects could induce ring-shaped patterns of COM crystals. In comparison, the LB films without pretreatment by potassium oxalate only induced randomly growth of COM crystals.

Key Words: Defective LB Film; Biomineralization; Calcium oxalate; AFM

生物矿化的核心问题之一是有有机基质(蛋白质/类脂)对无机矿物成核、生长和沉积图形的调控作用, 从而使得生物矿物具有优异的物理性能和生物功能^[1]. 肾结石是生物体内异常矿化的产物, 发病率约为5%–15%^[2], 但80%以上的肾结石患者病因不清, 其形成机制未完全阐明, 因而对其预防尚无十分理想的方法^[3]. 在肾结石中, 80%以上为草酸钙(CaOxa)结石. 由于肾结石的形成过程极为缓慢, 原位研究难度大, 时间长, 因此, 体外模拟肾结石形成的方法已被许多学者采用. 目前已在水溶液和尿液中充分研究了结石

矿物 CaOxa 的成核、生长和聚集过程^[4,5]. 由于肾结石形成于受损伤的肾上皮细胞表面^[6,7], 普通溶液体系不能充分反映肾结石的形成环境, 因此, 近年来用类似细胞膜的有序分子膜体系如囊泡、单分子膜^[8]和自组装膜^[9]等作为模板, 模拟肾上皮细胞膜表面肾结石微晶的形成, 成为肾结石体外模拟方法的重要方向.

Y-型 LB 膜具有与生物膜类似的骨架结构, 是生物膜的简化模型. 通过调节成膜分子的电荷密度、头基间距、膜的物理状态等, 可以使得 LB 膜与特定

Received: November 6, 2006; Revised: December 21, 2006; Published on Web: April 18, 2007.

*Corresponding author. Email: toyjm@jnu.edu.cn; Tel: +8620-85223353.

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

状态的细胞膜相似^[10]. LB 膜的缺陷是限制其应用的主要原因之一. 本文反其道而行之, 利用存在缺陷的 LB 膜来模拟受损伤的肾上皮细胞膜去诱导肾结石矿物晶体生长, 将为深入了解肾结石的形成机制提供更可靠的实验数据.

前文^[11]研究了二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)缺陷 LB 膜诱导一水草酸钙(COM)微晶排列成实心圆图形. 本文在 LB 膜中制造了环形缺陷, 并以此为模板, 诱导了 COM 环状图案形成.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)为 Sigma 公司产品; 氯化钙(CaCl_2)、草酸钾(K_2Oxa)、氯化钠(NaCl)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. 孔径 $0.22\ \mu\text{m}$ 的微孔滤膜为上海半岛实业有限公司净化器材厂生产.

AFM 为美国 THERMO MICROSCOPE 仪器公司产品, 型号为 Autoprobe CP Research, 配置 AP-SC20100 型扫描器, 扫描针尖为商用 Si_3N_4 针尖. XL-30 型环境扫描电子显微镜(ESEM, Philips 公司). KSV-3000 全自动 LB 膜仪(芬兰).

1.2 实验方法

单分子膜和 LB 膜的制备: 参照文献[12]进行, 即先在二次水亚相表面铺展 DPPC 氯仿溶液, 待水面上的氯仿溶剂完全挥发后, 以 $10\ \text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速率压膜, 沉积表面压为 $10\ \text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$. 采用垂直提膜法将单分子膜同时转移至 2 片疏水云母基片上, 亲水功能基团朝外, 单层膜, 提膜速率 $3\ \text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$. 然后按照下面方法制备缺陷 LB 膜.

缺陷 LB 膜制备: 将 LB 膜浸泡在 $2.5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的草酸钾溶液中 2 h, 取出后用二次水小心洗去膜表面的草酸钾, 然后进行膜控晶体生长.

缺陷 LB 膜形貌的 AFM 观察: 将制备好的缺陷 LB 膜固定在 AFM 的 XY 扫描台上, 用监视器定位所要扫描的区域, 在空气中采用轻敲模式对 LB 膜进行扫描成像.

缺陷 LB 膜诱导草酸钙晶体生长^[8]: 用预先配好的 $22\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CaCl_2 、 $22\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 K_2Oxa 和 $1.0\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaCl 溶液配制 CaOxa 亚稳溶液, 亚稳溶液中各物质的最终浓度为: $c(\text{Ca}^{2+})=c(\text{Oxa}^{2-})=0.30\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $c(\text{NaCl})=10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. 缺陷 LB 膜漂浮在 CaOxa 亚稳溶液表面, 膜的头基与溶液接触, 晶体生长 1 d.

为防止由于溶剂水的挥发而造成体系饱和度变化, 晶体生长在密闭环境中进行. 整个实验在无尘箱内完成, 重复 3 次, 温度为 $(29\pm 1)\ ^\circ\text{C}$.

晶体形貌的 SEM 观察: 晶体样品喷金处理后, 在电压为 15–20 kV 时用 SEM 观测.

2 结果和讨论

图1是经草酸钾处理的DPPC LB膜诱导生成的CaOxa晶体图形的SEM图, 可以清楚地看到, 绝大部分晶体生长为环状的晶体群, 在环内和环外, 晶体均较少. 这些环的直径从 $10\ \mu\text{m}$ 到 $150\ \mu\text{m}$ 不等, 其中 $20\ \mu\text{m}$ 以下的约占 30%, $20\text{--}50\ \mu\text{m}$ 的占 45%, $50\text{--}100\ \mu\text{m}$ 的占 17%, $100\ \mu\text{m}$ 以上的约占 8%. XRD 结果 (图 2a) 表明, 这些晶体为一水草酸钙(COM), 对应的衍射峰的 d 值分别为 0.593 、 0.365 和 $0.296\ \text{nm}$, 分别归属于 COM 晶体的 $(\bar{1}01)$ 、 (020) 和 $(\bar{2}02)$ 晶面. 而未经草酸钾处理的正常 LB 膜只诱导零散的 COM 晶体生成 (图 3).

比较缺陷 LB 膜和正常 LB 膜诱导的 COM 晶

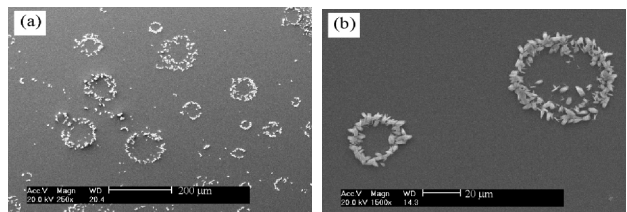


图1 LB膜中环形缺陷畴区诱导生成的环形COM晶体沉积图形的SEM图

Fig.1 SEM images of ring-shaped patterns of COM crystals induced by circular defective domains in the DPPC LB film

deposited surface pressure: $10\ \text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$; crystallization time: 1 d; temperature: $(29\pm 1)\ ^\circ\text{C}$; hydrophobic mica substrate; the concentration of potassium oxalate used to treat LB film: $2.5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

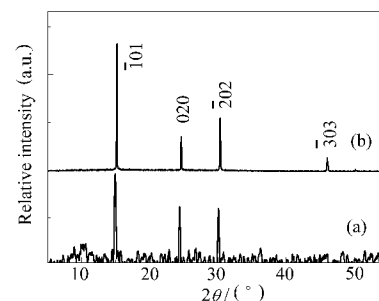


图2 缺陷LB膜(a)和正常LB膜(b)诱导的草酸钙晶体XRD图谱

Fig.2 XRD patterns of COM crystals induced by defective LB film (a) and beneath normal LB film (b) of DPPC

体形貌,可以发现,正常 LB 膜诱导下的 COM 晶体主要(85%)为($\bar{1}01$)面择优生长的拉长六边形(图 3a),另外有少部分叉生形COM(图3b),其XRD谱(图 2b)中($\bar{1}01$)面也很强,并出现($\bar{1}01$)面的 2 个次级衍射峰($\bar{2}02$)和(303).而缺陷 LB 膜诱导的 COM 晶体包括更多的形貌,如六边形、叉生形、针状、菱形和其它不规则形貌的晶体.这表明,缺陷 LB 膜在诱导 COM 晶体的生长过程中,缺陷主要起到提供成核位点的作用,并不进一步诱导 COM 晶体的有序生长,归因于 LB 膜缺陷处的 DPPC 分子排列无序,难以对 COM 晶体的有序生长起诱导作用.

在表面压为 $10 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ 的实验条件下, DPPC 单分子膜处于液态扩张相(LE)和液态凝聚相(LC)共存的状态^[2,12-14],且 LC 畴区以圆形出现,其原因是由于在相同表面积时,以圆形的周长最短,因此,形成圆形的边界有利于减少边界处磷脂分子的数量,从而降低其界面能量,形成稳定的新相^[14];此外,LC 相畴区与LE相畴区之间的线性张力(类似于二维空间中的表面张力)亦导致了圆形畴区形成.

虽然在 LC 畴区或 LE 畴区内,成膜分子 DPPC 各自排列有序,如图 4a 所示.但是,在 LE 畴区内,DPPC 分子的密度、头基间的相互作用、头基区域的电偶极均与LC畴区不同^[15,16].在LC畴区中,DPPC分子排列比 LE 畴区的紧密,单位面积内 DPPC 分子头基的电荷密度比 LE 畴区的大,这使得处在 LC/LE 两相边界处的成膜分子排列处在一种较为无序的状态,导致边界处形成缺陷.在单分子膜转移到云母基片上的过程中,虽然单分子膜的 LC 和 LE 微畴之间的差异可能发生变化,但畴区间的缺陷结构仍然可以转移到 LB 膜中^[17,18].

在正常 LB 膜的极性(亲水头基)区,相邻的磷酸基团可以形成分子间氢键,从而稳定了 LB 膜的结

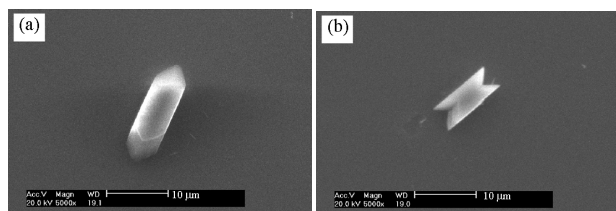


图 3 未经草酸钾处理的正常 LB 膜诱导生成的 COM 晶体的 SEM 图

Fig.3 SEM images of COM crystals grown on the normal LB film without potassium oxalate treatment deposited surface pressure: $10 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$; crystallization time: 1 d; temperature: $(29 \pm 1)^\circ\text{C}$; hydrophobic mica substrate

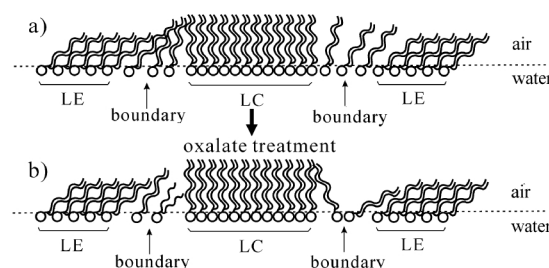


图 4 在草酸钾处理之前(a)和之后(b)的 DPPC 单分子膜结构示意图

Fig.4 Schematic representation of the DPPC monolayer film before (a) and after (b) treatment by potassium oxalate

In the scheme, the molecular array of DPPC in the liquid condensed (LC) state, the liquid expanded (LE) state and the LC/LE boundary were shown, respectively.

构和存在.当正常 LB 膜被草酸钾处理后,草酸根与 DPPC 亲水的磷脂酰头基之间存在强的相互作用,包括氢键和静电作用,特别是处在圆形 LC/LE 边界处的 DPPC 分子,由于其排列没有规律,更加容易被溶液中的草酸根进攻,从而进一步破坏了边界处 DPPC 分子的排列,导致圆形的 LC/LE 相边界的无序性被加强(图4b),边界DPPC分子列阵进一步被破坏. AFM 证实了上述 LB 膜所具有的环状结构.图 5 为转移到疏水云母基片上的经草酸钾处理后的 DPPC 单层 LB 膜的接触式 AFM 图像,扫描范围为 $7 \mu\text{m} \times 7 \mu\text{m}$.从图 5 可以清晰地看到环形圈的存在.

当以此存在环形缺陷的 LB 膜诱导草酸钙晶体生长时,诱导了环形 COM 晶体图案,这解释如下:首先,LC/LE 畴区边界处存在的缺陷可为 COM 晶体成核提供更低的自由能,因为 LC/LE 相间的线张力减小能够给晶体沉积提供足够的自由能,使得晶体在此处生长很快;且 LC/LE 相间静电排斥作用的减弱也可以促进COM的异相成核和生长^[13].这些因素导致COM晶体优先在LC/LE相边界缺陷处成核和生长. Talham等^[2]的研究也表明, CaOxa优先在 LC/LE 相边界生长; Loste 等^[9]在研究膜控碳酸钙晶体生长时亦发现,在一系列脂肪酸单分子膜诱导下,当单分子膜处于 LC 和 LE 两相共存时,碳酸钙晶体易在 LC 微畴的边缘处结晶,但他们均没有发现如图 1 所示的环状晶体图形出现,其原因是 LB 膜被草酸钾处理后,膜中相边界处的缺陷被加强,更能促进 COM 晶体的成核和生长.其次,缺陷为COM晶体的初始成核提供了更多的活性生长位点,成核位点增加后,使得单个COM晶体的尺寸减少,但COM微晶

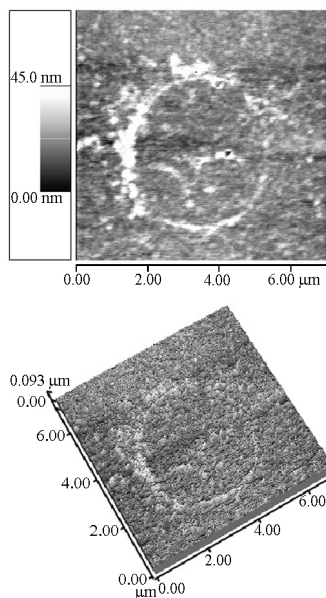


图5 含环形缺陷的 DPPC LB 膜的 AFM 图像(a) 及其三维图(b)

Fig. 5 AFM images of the DPPC LB film with circular defect (a) and its 3D image (b)

deposited surface pressure: $10 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-2}$; hydrophobic mica substrate; scanning size: $7 \mu\text{m}\times 7 \mu\text{m}$

的数量增加,这也是图1和图3中COM晶体尺寸存在差异的原因.其三,LC/LE相边缘成膜分子排列处在一种无序的状态,其较强的流动性能使磷脂分子发生重组,给晶体成核晶面提供一个更为匹配的膜分子矩阵,有效地稳定成核晶体相^[12].其四,边缘处对晶体的粘附能力也比其它区域强,因而,在此处诱导生成的晶体能够继续生长,最终形成晶体环.

比较图1和图5,可以看到AFM检测到的缺陷环的直径比环形COM晶体图形的直径小,这一方面是因为AFM不容易在宽度为几十微米的范围内找到高度只有纳米级的环形缺陷,另一方面是当COM晶体在缺陷环上成核和生长时,COM会向环的两边同时生长.

3 结论

通过草酸钾对DPPC的LB膜进行处理,可以进

一步破坏LB膜中LC/LE相边缘分子的有序排列,导致环形缺陷的形成.这种缺陷LB膜为晶体的成核提供了更多的有效位点,从而促进草酸钙微晶的成核、生长及其与LB膜的粘附,最终形成环形COM晶体沉积图形.相比之下,未经草酸钾处理的LB膜只诱导零散的六边形和叉生形COM晶体生成.

References

- 1 Yu, S. H.; Cölfen, H. *J. Mater. Chem.*, **2004**, **14**: 2124
- 2 Benítez, I. O.; Talham, D. R. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, **127**: 2814
- 3 Allen, S. E.; Singh, S.; Robertson, W. G. *Urol. Res.*, **2006**, **34**: 239
- 4 Deng, S. P.; Zheng, H.; Ouyang, J. M. *Mater. Sci. Eng. C*, **2006**, **26**(4): 683
- 5 Wang, L. J.; Zhang, W.; Qiu, S. R.; Zachowicz, W. J.; Guan, X. Y.; Tang, R. K.; Hoyer, J. R.; De-Yoreo, J. J.; Nancollas, G. H. *J. Cryst. Growth*, **2006**, **291**(1): 160
- 6 Rabinovich, Y. I.; Esayanur, M.; Daosukho, S.; Byer, K. J.; El-Shall, H. E.; Khan, S. R. *J. Coll. Interf. Sci.*, **2006**, **300**(1): 131
- 7 Kumar, V.; Farrell, G.; Deganello, S.; Lieske, J. C. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **2003**, **14**: 289
- 8 Talham, D. R.; Backov, R.; Benítez, I. O.; Sharbaugh, D. M.; Whippis, S.; Khan, S. R. *Langmuir*, **2006**, **22**(6): 2450
- 9 Sheng, X.; Ward, M. D.; Wesson, J. A. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, **125**: 2854
- 10 Ouyang, J. M. *Chinese Sci. Bul.*, **2004**, **49**(2): 107 [欧阳健明. 科学通报, **2004**, **49**(2): 107]
- 11 Ouyang, J. M.; Deng, S. P. *Science in China B*, **2007**, in press [欧阳健明, 邓穗平. 中国科学 B), **2007**, 印刷中]
- 12 Benítez, I. O.; Talham, D. R. *Langmuir*, **2004**, **20**: 8287
- 13 Backov, R.; Lee, C. M.; Khan, S. R.; Mingotaud, C.; Fanucci, G. E.; Talham, D. R. *Langmuir*, **2000**, **16**: 6013
- 14 Shiku, H.; Dunn, R. C. *J. Phys. Chem. B*, **1998**, **102**: 3791
- 15 Kane, S. A.; Compton, M.; Wilder, N. *Langmuir*, **2000**, **16**: 8447
- 16 Minones, J. J.; Patino, J. M. R.; Conde, O.; Carrera, C.; Seoane, R. *Coll. Surf. A*, **2002**, **203**: 273
- 17 Cruz, A.; Vazquez, L.; Velez, M.; Perez-Gil, J. *Langmuir*, **2005**, **21**(12): 5349
- 18 Ross, M.; Steinem, C.; Galla, H. J.; Janshoff, A. *Langmuir*, **2001**, **17**: 2437
- 19 Lose, E.; Diaz-Marti, E.; Zorbakhsh, A.; Meldrum, F. C. *Langmuir*, **2003**, **19**: 2830