

• 研究通讯 •

## 电解质对带电磷脂自组装行为的影响

林美玉 李莉 邱枫 杨玉良\*

(复旦大学高分子科学系 聚合物分子工程教育部重点实验室 上海 200433)

**摘要** 运用光学显微镜研究了电解质对心磷脂聚集形态的影响. 结果表明, 阳离子的价态和浓度对心磷脂的聚集形态有很大影响, 而离子半径及同一价态下离子种类的影响相对较小. 在一定浓度范围的一价电解质溶液中, 可见同中心的多层管状囊泡的生长, 而且囊管的长度  $L$  与生长时间  $t$  的标度关系不因电解质种类和浓度的改变而改变. 随着电解质浓度的增加, 除通常的囊管结构外, 还出现了单螺旋、双螺旋甚至超螺旋的结构.

**关键词** 带电膜; 电解质; 心磷脂; 囊管

## Effects of Electrolytes on the Assembling Structures of Charged Lipids

LIN, Mei-Yu LI, Li QIU, Feng YANG, Yu-Liang\*

(The Key Laboratory of Molecular Engineering of Polymers, Ministry of Education, Department of Macromolecular Science, Fudan University, Shanghai 200433)

**Abstract** The effects of electrolytes on the assembling structures of cardiolipin were studied by microscopy. The results show that the assembling structures greatly depend on the concentration and valency of cations, rather than their types or ionic radii. Myelin figures, consisting of concentric cylindrical membranes, appear in the certain concentration range of univalent electrolyte. The kinds and concentration of electrolyte do not influence the scaling relationship between the myelin length  $L$  and its growing time  $t$ . Besides the normal shape of myelin figures, single, double or even super helices were found when the electrolyte concentration increased.

**Keywords** charged membrane; electrolyte; cardiolipin; myelin

带电磷脂是构成生物膜的脂类家族的重要成员. 膜的结构性质及许多重要的生物功能, 如膜的刚性、结构稳定性、侧向相分离、动力学过程, 以及膜对蛋白质的分类识别与膜间的信号传导等, 都与膜中带电磷脂的种类、含量直接相关, 而其中起关键作用的是膜与膜之间或膜与各种分子之间的静电相互作用<sup>[1,2]</sup>. 静电相互作用除了与膜本身的带电性有关外, 还与膜所处的环境密切相关. 众所周知, 细胞膜所处的液体环境中含有大量的一价离子如  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$  等, 还有少量或微量的二价离子及三价离子, 如  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Gd^{3+}$  等. 电解质平衡

的破坏及微量离子浓度的改变都会对细胞的生理功能产生很大的影响<sup>[1~3]</sup>. 因此, 研究带电磷脂膜在电解质溶液中自组装结构的形成、生长及形态的演化将有助于进一步认识影响生命过程的一些机制.

理论方面, 带电双分子层膜的静电性质以及电解质对其的影响, 包括膜表面电势分布、膜的弯曲刚性等方面, 已有大量的研究, 并建立了各种理论模型<sup>[1~4]</sup>. 近 10 年来, 作为细胞和细胞器的模型体系, 两亲性的脂类或普通表面活性剂的自组装行为也日益引起重视. 人们发现, 当层状相的干膜与水溶液接触后, 膜表面会自组

\* E-mail: yuliangyang@fudan.edu.cn

Received December 30, 2006; revised March 16, 2007; accepted May 11, 2007.

国家自然科学基金(No. 20574015)、国家自然科学基金优秀研究群体基金及国家自然科学基金专项基金(No. 2005CB623800)资助项目.

装出大量的同中心多层管状囊泡, 或称囊管(myelin figure), 有时也会出现洋葱状的多层球形囊泡等结构. 如 Sakurai<sup>[5-7]</sup>, Buchanan<sup>[8]</sup>, Bellare<sup>[9-11]</sup>和 Zou<sup>[12]</sup>等分别研究了磷脂酰胆碱(PC)<sup>[5,6,12]</sup>、非离子表面活性剂十二醇聚氧乙烯醚(C<sub>12</sub>E<sub>3</sub>)<sup>[8]</sup>, 以及离子型表面活性剂琥珀酸二(2-乙基己基)酯磷酸钠(AOT)<sup>[9,13]</sup>等体系的水合自组装现象及机理, 其中 Bellare 等<sup>[9]</sup>研究的离子表面活性剂 AOT 与对甲苯磺酸溶液作用的体系就是带电膜与电解质溶液作用的体系. 但至今为止, 从静电相互作用的角度考察电解质的价态、种类、浓度等因素对自组装结构、性能影响的实验工作仍非常少, 即使涉及带电磷脂膜的体系, 较多关注的也是对多组分体系分相与形变的影响<sup>[14,15]</sup>, 或与某些生物大分子的作用<sup>[16]</sup>等. 对此, 本文从静电相互作用的角度出发, 研究了单组分带负电的心磷脂体系, 着重考察了不同价态及浓度的电解质溶液对带电磷脂膜自组装微结构形态的影响, 讨论了单根囊管的生长动力学及螺旋结构在不同电解质溶液环境下的稳定性.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂和仪器

心磷脂(cardiolipin, 简称 CL, 从牛心中提取)购于 Sigma Chemical Co.(美国); CsCl 购于 Aldrich(美国); 聚二烯丙基二甲基氯化铵(PDADMAC)购于 Fluka(日本), 其余药品(包括有机溶剂)均购于国内正规化学药品公司, 级别均为分析纯.

实验中所用光学显微镜为正置式 Olmpas BX51(日本); 摄像记录为 Linkam 公司的 Pixelink CCD(英国), 130 万像素, 采集处理软件为 Linkam Co. 的 Linksys32DV, 显微镜上还配有 Linkam Co. 的 THMS600 热台, 控温精度为  $\pm 0.1$  °C.

### 1.2 样品制备及实验方法

样品干膜的制备及实验方法类似于文献<sup>[17,18]</sup>, 采用原位直接水合的方法, 干膜制备用的烘箱温度设为 45 °C, 实验观察用的热台温度设定在 28 °C. 样品原液中溶剂甲醇与氯仿的体积比为 1:9, 心磷脂浓度为 10 mg/mL, 水合溶液为蒸馏水或一定浓度的电解质溶液.

## 2 结果和讨论

对于相同条件下制备的心磷脂干膜, 分别用不同价态的电解质溶液水合, 显微镜下原位观察发现: 阳离子的价态对水合后心磷脂的聚集形态有很大的影响, 而离子半径及同一价态的离子种类的影响则不明显. 图 1a

是 0.10 mol/L NaCl 水溶液浸润干膜后生成大量囊管的照片. 若将 NaCl 换成等浓度的其它一价电解质, 如 KCl, CsCl, 季铵盐等, 观察到的现象相似, 即也形成大量的囊管结构. 但当电解质的阳离子是二价或三价离子 Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>等, 以及是聚电解质聚二烯丙基二甲基氯化铵时, 虽然对应的阴离子均是 Cl<sup>-</sup>, 心磷脂的自组装聚集形态却完全不同. 一定浓度范围内电解质溶液水合时, 干膜表面均没有如图 1a 所示的囊管结构形成. 图 1b 是二价的 CaCl<sub>2</sub> 溶液(0.01 mol/L)的水合结果, 可见表面出现大块区域, 其中规则排列着锯齿状的凸起条纹, 在正交偏光显微镜下显示很强的双折射效应, 并且当水挥发至干后, 双折射现象基本消失, 说明该结构是溶致液晶结构; 图 1c 是 0.01 mol/L 三价的 AlCl<sub>3</sub> 溶液的水合结果, 膜表面形成了一些不规则的结构, 在正交偏光下未见明显的双折射效应, 说明这种结构中的分子排列比较复杂; 图 1d 是 0.03 mol/L 聚电解质 PDADMAC 溶液的水合结果, 膜表面形成了大量形状不规则的团聚状结构. 导致这一结果的原因是虽然外加电解质主要通过静膜屏蔽起作用, 但不同价态的阳离子与心磷脂分子的作用方式可能不同<sup>[19]</sup>. 如一价阳离子以游离的形式存在于心磷脂的磷酸负电荷周围, 而二价阳离子可能相对稳定在同一个心磷脂分子的两个磷酸负电荷之间的区域, 也可能同时与两个不同心磷脂分子的磷酸负电荷作用; 三价阳离子及聚电解质与心磷脂分子的作用情况更为复杂. 这种相互作用的不同对心磷脂极性头部的形状、分子的有效体积以及磷脂分子的排列影响很大, 从而进一步影响其聚集形态.

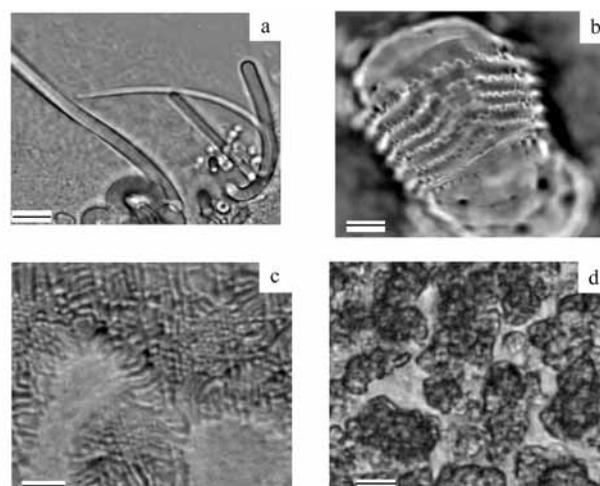


图 1 电解质溶液中阳离子价态对心磷脂聚集形态的影响(标尺为 20  $\mu\text{m}$ )

Figure 1 The effect of the valence of cation in electrolyte on the assembling structures of cardiolipin (the scale bars correspond to 20  $\mu\text{m}$ )

a—0.1 mol/L NaCl; b—0.01 mol/L CaCl<sub>2</sub>; c—0.01 mol/L AlCl<sub>3</sub>; d—0.03 mol/L PDADMAC

在一价电解质溶液的水合体系中, 生成的聚集形态虽然对阳离子的种类不太敏感, 但对电解质的浓度比较敏感, 当用纯蒸馏水或 NaCl 浓度低于 0.003 mol/L 的水溶液水合时, 只有洋葱状的囊泡结构形成, 图 2a 为纯蒸馏水的水合结果; 而当 NaCl 的浓度略微增加时, 囊管结构的生成物数量增加; 图 2b 是 0.15 mol/L NaCl 溶液水合后的照片, 视野中主要为长短不一的囊管; 当 NaCl 浓度继续增加时, 就会形成如图 2c 所示的不规则结构, 该结构在正交偏光显微镜下具有很强的双折射效应. 这种一价离子浓度对聚集形态的影响可通过离子对带电膜表面的静电屏蔽作用增强来理解. 随着电解质浓度的增加, 膜与膜之间的相互排斥作用减弱, 同一层膜内分子的排列趋向于规则紧密, 膜双分子层间的层间距减小, 双折射效应变得明显. 这也解释了当一价阳离子的半径不是特别大时, 电解质种类不同对生长出来的聚集物形态影响不大的原因.

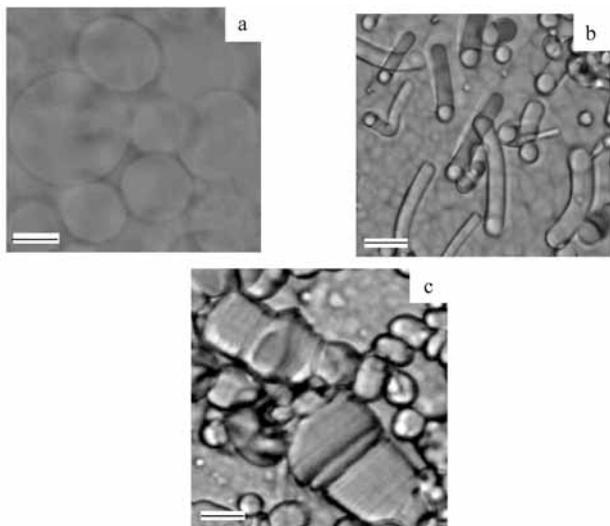


图 2 一价电解质浓度对心磷脂聚集形态的影响(标尺为 20  $\mu\text{m}$ )

Figure 2 The effect of the concentration of univalent electrolyte on the assembling structures of cardiolipin (the scale bars represent 20  $\mu\text{m}$ )

a— $\text{H}_2\text{O}$ ; b—0.15 mol/L NaCl solution; c—0.75 mol/L NaCl solution

除电解质价态对心磷脂聚集形态的影响外, 我们还研究了一价电解质溶液中心磷脂囊管的生长动力学机制. 通过测量水合后单根囊管的长度(图 3a), 考察电解质种类、浓度对囊管生长动力学的影响. 结果发现: 大多数囊管在生长初期的 2~6 s 内, 囊管长度  $L$  随时间  $t$  的变化基本符合  $L \propto t$  (或  $L=At$ ) 的标度关系, 这里  $A$  是速率常数; 随后, 囊管的生长趋势减缓, 指数关系转变为扩散类的  $L \propto t^{1/2}$  (或  $L=Bt^{1/2}$ ), 这里  $B$  相当于扩散系数, 这个阶段可以持续十几秒甚至几十秒. 图 3b 是典型的囊管长度随时间生长的测量结果(图中附加的虚线和

实线的斜率分别为 1 和 1/2, 供参考比较). 实验发现, 这种生长的标度规律几乎不受一价电解质种类与浓度的影响, 但随着电解质浓度的增加, 系数  $A$  或  $B$  仍会有所增大. 另外, 只有极少数囊管在整个生长过程中符合单一的标度关系,  $L \propto t$ . 这些结果说明, 囊管的最初形成可能与一些特殊的驱动力有关, 如干膜中存在由膜的折叠造成的各种缺陷及通道, 在水分子突然渗入时迫使磷脂分子向反方向挤出, 形成囊管. 当这种力释放后, 囊管的继续生长就靠干膜与亚相之间的浓度梯度驱动的扩散来控制. 而以往的工作大多是研究膜在受限条件下水合后, 膜中囊管在侧向方向上集体返流的平均性质<sup>[9,10]</sup>, 由于最初时段的生长特性较难区分检测, 通常得到的结果都认为囊管的生长是扩散生长机制. 最近, Zou 等<sup>[12]</sup>研究了单根囊管的生长机制, 一个例子是在亚相处于缓慢蒸发的体系中, 扁平圆盘囊泡通过侧向突出形成囊管, 另一个例子是在平面溶胀膜体系中, 通过人为形成膜的破缺生成囊管, 实验测得的生长标度关系均为  $L \propto t$ . 我们实验中观察到的囊管生长方式经历了上述两种生长机制, 可能因为它们是以一种更为自然的方式从膜的表面形成的.

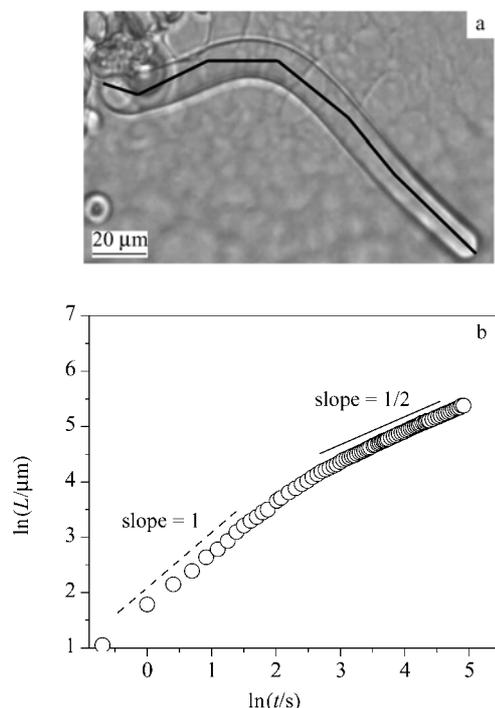


图 3 囊管长度  $L$  随时间  $t$  的变化

a—囊管长度的测定; b—测量结果

Figure 3 The increasing of the myelin length  $L$  with time  $t$   
a—The measurement of the myelin length; b—the result of the measurement

由于电解质浓度增加会导致带电膜表面静电屏蔽作用增强, 在电解质浓度较高时, 囊管的稳定性下降, 有的缠绕成单螺旋, 有的缠绕成双螺旋, 有的甚至进一

步缠绕成超螺旋结构(图 4). 螺旋结构的稳定性也与周围电解质溶液的浓度改变有关, 如注入微量纯水, 附近的螺旋结构会自动解开, 等待足够长时间后, 电解质浓度的恢复使螺旋结构又重新自动形成.

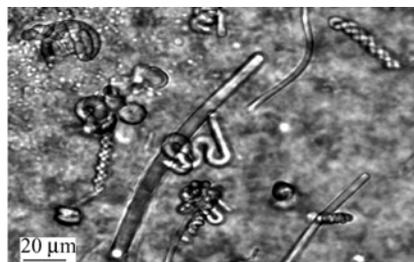


图 4 随着电解质浓度的增加, 膜表面出现了螺旋结构

Figure 4 With the increasing of the concentration of univalent electrolyte, the helices and coiling structures appeared on the membrane surface

总之, 对电解质溶液中带电磷脂自组装现象的研究, 有助于从一个新的角度去认识生物膜体系的许多性质和现象.

## References

- 1 Andelman, D. *Handbook of Biological Physics*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, **1995**, pp. 603~641.
- 2 Langner, M.; Kubica, K. *Chem. Phys. Lipids* **1999**, *101*, 3.
- 3 Cevc, G. *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1031*, 311.
- 4 Harden, J.; Marques, C.; Joanny, J. E.; Andelman, D. *Langmuir* **1992**, *8*, 1170.
- 5 Sakurai, I. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *815*, 149.
- 6 Sakurai, I.; Kawamura, Y. *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *777*, 347.
- 7 Sakurai, I.; Suzuki, T.; Sakurai, S. *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *985*, 101.
- 8 Buchanan, M.; Egelhaaf, S. U.; Cates, M. E. *Langmuir* **2000**, *16*, 3718.
- 9 Haran, M.; Chowdhury, A.; Manohar, C.; Bellare, J. *Colloids and Surfaces* **2002**, *205*, 21.
- 10 Dave, H.; Surve, M.; Manohar, C.; Bellare, J. *J. Colloids Interface Sci.* **2003**, *264*, 76.
- 11 Taribagil, R.; Arunagirinathan, M. A.; Manohar, C.; Bellare, J. R. *J. Colloids Interface Sci.* **2005**, *289*, 242.
- 12 Zou, L. N.; Nagel, S. R. *Phys. Rev. Lett.* **2006**, *96*, 138301.
- 13 Buchanan, M.; Arrault, J.; Cates, M. E. *Langmuir* **1998**, *14*, 7371.
- 14 Petersheim, M.; Sun, J. *Biophys. J.* **1990**, *57*, A483.
- 15 Portis, A. N.; Pangborn, C. W.; Papahadjopoulos, D. *Biochemistry* **1979**, *18*, 780.
- 16 Menger, F. M.; Seredyuk, V. A.; Kitaeva, M. V.; Yaroslavov, A. A.; Melik-Nubarov, N. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2846.
- 17 Li, L.; Liang, X.-Y.; Lin, M.-Y.; Qiu, F.; Yang, Y.-L. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17996.
- 18 Li, L.; Lin, M.-Y.; Qiu, F.; Yang, Y.-L. *Acta Chim. Sinica* **2005**, *63*, 1375 (in Chinese). (李莉, 林美玉, 邱枫, 杨玉良, *化学学报*, **2005**, *63*, 1375.)
- 19 Rand, R. P.; Sengupta, S. *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, *255*, 484.

(A0612305 LI, W. H.)