

• 研究论文 •

盐浓度及磷脂分子结构对多组分带电膜弯曲刚性的影响

刘春英^{a,b} 李莉^{*,a,b} 邱枫^b 杨玉良^b

(^a复旦大学分析测试中心 上海 200433)

(^b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 磷脂膜弯曲刚性模量很难直接测量, 本实验用循环冻融法制备尺寸大小与膜弯曲刚性相关的熵稳定单层囊泡. 粒度仪测量发现, 囊泡尺寸随盐浓度增加呈现先剧烈减小然后缓慢增加的分段变化规律. 但当组分中含有头部带电同时尾链带有不饱和键的二油酰磷脂酰甘油酯时, 囊泡尺寸却在较大的盐浓度范围内不出现回升. 囊泡膜的负 Zeta-电势绝对值均表现为先急剧减小然后趋于平稳的变化规律, 数值大小只与带电组分的含量有关. 而对直接水合法制备的多层囊泡的统计发现, 囊泡尺寸随盐浓度增加急剧减小, 随后趋于稳定值, 均不随分子组合变化而回升. 结果表明在不同的盐浓度范围里, 主导磷脂膜弯曲刚性模量的因素不同. 低盐浓度的体系, 静电屏蔽效应为主导因素; 高盐浓度的体系, 膜双电层中反离子的分布起主导作用. 磷脂分子头部与尾部的不同结构组合会影响膜双电层, 使膜的弯曲刚性不同. 多层囊泡体系中, 高盐浓度下膜的热涨落掩盖了分子结构及双电层分布差异对膜弯曲刚性的影响.

关键词 多组分带电磷脂膜; 冻融法; Zeta-电势; 弯曲刚性; 静电屏蔽; 双电层

Effects of Salt Concentration and Structure of Lipid Molecules on the Bending Rigidity of Multi-Component Charged Membranes

Liu, Chunying^{a,b} Li, Li^{*,a,b} Qiu, Feng^b Yang, Yuliang^b

(^a The Center of Analysis and Measurement, Fudan University, Shanghai 200433)

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

Abstract The mean bending modulus of bilayer is difficult to be measured directly in experiment but found relating to its bending rigidity. In this paper, the size of entropic stabilized vesicles, which were prepared by freeze-thaw cycle method, was investigated. It is observed that the diameters of these freeze-thaw vesicles decrease sharply and then gradually increase with salt concentration of hydration solution increasing. However, the sizes remain unchanging in the range of higher salt concentration when the charged component 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-rac-(1-glycerol) (DOPG) is added in membranes. While the Zeta potential of membranes with various compositions presents the same trend of first rapid decreasing then to be steady. On the other hand, the size of multi-lamellar vesicles, prepared by hydration directly, keeps in a constant after quick decrease as salt concentration increasing. The results indicate that the electrostatic screening and properties of electrostatic double layer of the lipid bilayer are the dominant factor in low and high salt concentrations, respectively. The structure of lipid molecules and the membrane fluctuation of multi-lamellar vesicle would influence the properties of the electrostatic double layer in high salt concentration.

Keywords multi-component charged lipid membrane; freeze-thaw method; zeta potential; bending rigid-

* E-mail: liyang@fudan.edu.cn

Received October 13, 2009; revised December 17, 2009; accepted March 9, 2010.

国家自然科学基金优秀研究群体基金、国家基础专项基金(No. 2005CB623800)和国家杰出青年科学基金(No. 20625413)资助项目.

ity; electrostatic screening; electrostatic double layer

包裹细胞及细胞器的双分子层膜主要是由多种磷脂分子组成的, 其中带有负电荷的磷脂分子约占 10%~20%. 这少量带负电的组分使双分子层膜的表面带有负电荷并且具有负的 Zeta-电势. 通过这些带电组分, 生物膜实现了与带正电的蛋白质、糖类等功能大分子的特定结合. 同时, 细胞膜所处的生理环境通常为含有 0.9% 左右盐的电解质溶液, 负电势的膜表面对溶液中的阳离子种类及浓度非常敏感, 这也是阳离子总是参与许多与膜相关的生命过程的主要原因, 如形变、胞吞、胞吐等^[1,2]. 因此, 澄清膜的组成、电荷密度和膜所处的溶液环境对膜的力学性质及组装形态的影响, 将有助于进一步理解许多生命过程的内在机制.

事实上, 早在 1933 年 Telkes 等^[3]就定性研究过盐的种类及浓度对卵磷脂囊泡形成及形态的影响规律, 但直到最近几年, 有关盐浓度与膜的弯曲刚性之间关系的理论研究才与实验研究联系起来^[4~12]. 其中 Claessens 等^[4,5]通过自洽场理论计算指出, 对于膜表面电荷密度均匀的单组分模型膜体系, 单层囊泡的热力学稳定性与膜的平均弯曲刚性模量 k_c 及高斯弯曲模量 \bar{k} 有关, 前者决定膜的弯曲刚性, 后者决定膜的界面形态. 当两者符号相反、数值相当时, 形成囊泡所需克服的弯曲弹性能将大大减小, 从而使体系熵的增加足以补偿这部分弯曲弹性能, 最终形成熵稳定的囊泡. 同时他们利用多次循环冻融的方法制备尺寸稳定的囊泡, 由囊泡尺寸与盐浓度的关系, 讨论膜弯曲刚性随盐浓度变化的规律, 为理论分析提供了实验依据^[6]. 对于多组分带电膜, Delorme 等^[7]运用 AFM 检测技术发现, 两组分带电膜的弯曲刚性模量随盐浓度增大先骤减后趋于恒定. Claessens 等^[8]也研究过电中性与带负电的两组分二油酰(C_{18:1})磷脂膜, 发现组成比对弯曲模量的影响是非线性的. 另外, Petrache 等^[9,10]发现中性磷脂膜对溶液的盐浓度变化也很敏感, 认为盐浓度改变导致中性磷脂膜之间范德华相互作用的 Hamaker 常数发生了改变. 理论方面 Manciu 等^[11]则分析了盐加入引起的中性磷脂多层膜的溶胀机制中热涨落的贡献. 此外 Petrache 等^[12]还比较了恒定温度和相同分子尾链结构条件下, 磷脂极性头部对双分子层膜性质的影响. 以上这些研究及结果大大丰富了人们对膜的性质的认识, 但由于这些研究是分别在不同的体系、研究方法及限制条件下进行的, 可比较性有限, 特别是构成膜的分子结构与溶液中盐浓度的变化等因素对膜的弯曲刚性的影响还缺乏系统、清楚的认识.

本文通过改变饱和与不饱和及带电与电中性四种磷脂之间的组成比, 设计了一系列多组分磷脂体系, 使

膜表面的电荷密度及不同结构分子的组成比可调控. 在此基础上, 利用平衡囊泡尺寸与弯曲刚性模量之间的关系, 分析盐浓度对膜的力学性质的影响. 实验中以循环冻融法制备基本达到热力学平衡的单层囊泡, 比较各组磷脂膜的囊泡直径与 Zeta-电势随盐浓度的变化规律, 了解不同组成比及表面电荷密度对膜的弯曲刚性的影响. 另一方面, 以直接水合法制备多层膜囊泡, 用显微镜原位检测了各对应磷脂组合在直接水合过程中的自组装行为及多层膜囊泡尺寸变化规律. 结果表明, 带电单层囊泡磷脂膜的弯曲刚性随盐浓度增加主要呈现先骤减后重新缓慢增加的规律. 但值得一提的是, 当磷脂分子头部带电性与尾链饱和性的组合方式不同时, 即使膜表面电荷密度与尾链结构比不变, 膜的弯曲刚性随溶液盐浓度的变化差别也很大. 而对于多层磷脂膜囊泡, 低盐浓度下, 由于反离子对膜层间静电排斥作用的屏蔽, 囊泡尺寸随着盐浓度增加也先呈现急剧减小的趋势; 但当盐浓度进一步增加时, 双电层对弯曲刚性的作用与各层膜的随机热涨落作用相互抵消, 使囊泡的平均直径并不重新增大, 而是基本保持恒定.

1 实验部分

1.1 材料

二豆蔻酰磷脂酰甘油酯(DMPG), 二豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)购于美国 Avanti Polar Lipids, Inc. 二油酰磷脂酰甘油酯(DOPG), 二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)购于美国 Sigma Chemical Co. 甲醇购于上海振兴化工一厂, 分析纯; 氯仿、NaCl 购于上海大合化学品有限公司, 分析纯. 以上样品购买后直接使用, 未经进一步处理. 实验中用电阻率为 18.5 MΩ/cm 的 Milli-Q 水配制 NaCl 溶液及作为纯水, 用于干膜的水合等.

1.2 样品制备

单层磷脂双分子层囊泡(简称单层囊泡)由循环冻融法制备, 即先在圆底烧瓶中形成磷脂干膜, 然后用特定浓度氯化钠溶液水合静置过夜后, 用液氮冷冻、温水浴熔融的冻融法^[4], 使磷脂膜分层破碎并重新自组装形成单层囊泡. 经 11 次以上的冻融循环后, 囊泡尺寸达到平衡, 不再随循环次数及放置时间变化^[4]. 文中我们采取 15 次冻融循环, 以确保尺寸的稳定与可靠. 由于冻融过程中会出现瓶子炸裂, 使数据缺失, 所以每组样品的独立重复实验次数为 2~4 次不等. 最终的磷脂水溶液浓度为 1 mmol·L⁻¹.

多层囊泡采用直接水合溶胀法制样^[13], 即溶液在

玻片上滴样, 先制成干膜, 然后在 50 °C 热台温度的显微镜下直接用特定浓度的氯化钠溶液水合. 制备多层囊泡所用的磷脂溶液浓度为 2 mmol·L⁻¹, 溶剂为 *V*(氯仿):*V*(甲醇)=9:1 混合溶剂. 滴样后在 60 °C 真空烘箱中干燥 2 h, 得到干膜. 相同实验独立重复 2~4 次, 每次记录 3~7 个视场.

1.3 测试方法

单层囊泡尺寸的测量使用粒度仪 (Malvern DTS1060, 英国), Zeta-电势的测量使用电位仪 (Malvern DTS1060, 英国), 均于 50 °C 下测试, 测试前体系热平衡 2 min, 每个样品重复测试 3 次. 数据结果为 2~4 次独立实验的平均值, 误差限为标准偏差.

多层囊泡于正置荧光显微镜 (Olympas BX51, 日本) 下原位水合制备. 观察记录用物镜 50× (Semi-Achroplane, SLD, cor.), 数值孔径为 0.50. 显微镜上所配置的热台 (THMS600, 精度为 ±0.1 °C), CCD 摄像头 (Pixelink, 130 万像素), 图像采集和处理软件 (Linksys32DV) 都是英国 Linkam 公司的. 测试过程中, 热台温度保持在 50 °C. 数据结果为 60~80 个测量值的平均, 误差限为标准偏差.

2 结果与讨论

用多次循环冻融的方法制备囊泡, 能够使自组装囊泡的尺寸快速达到平衡值^[4], 这时的囊泡也称为熵稳定囊泡. 因为从平面膜形成球形囊泡时, 其弯曲弹性能的增量总是大于零, 但是体系平动熵的增加、膜的波动涨落以及囊泡尺寸多分散性增加等因素带来的熵的增加可以抵消这部分自由能的增加. 也就是说, 囊泡尺寸越

小, 囊泡数目越多, 越有利于熵的增加, 体系也越稳定. 但囊泡的尺寸不可能无限缩小, 这个极限值与反映磷脂双分子层膜特性的持久长度 ξ_p (persistence length) 密切相关, 而 ξ_p 又与膜的平均弯曲刚性模量 k_c 有关, 它们之间的关系为^[4,5]:

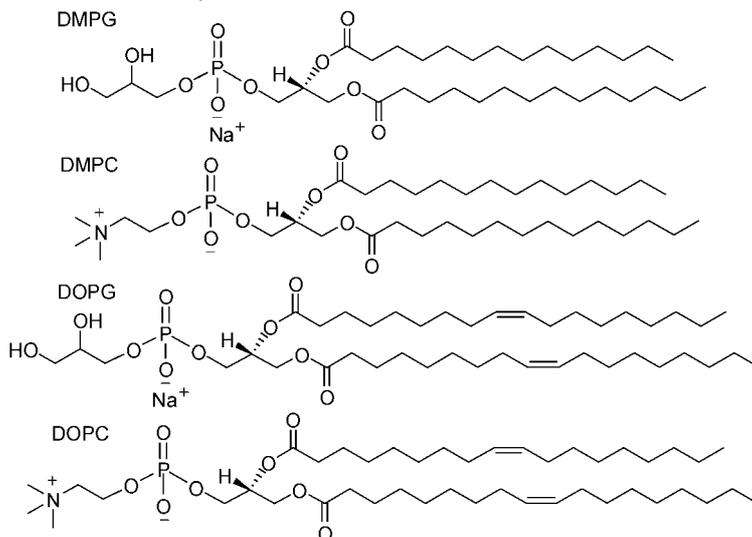
$$\bar{R} \propto \xi_p \propto \exp\left(\frac{k_c}{k_B T}\right)$$

因此囊泡平衡尺寸的大小可以间接地反映膜的弯曲刚性. 对于带电磷脂体系, k_c 由本征弯曲模量 k_{intr} 和静电弯曲模量 k_{el} 两部分组成, $k_c = k_{intr} + k_{el}$ ^[7], 其中 k_{intr} 与膜的厚度即膜的组成及分子结构有关, 而 k_{el} 与温度 T , Bjerrum 长度 l_B , Debye-Hückel 静电屏蔽长度 λ_D 等相关, 一定条件下 $k_{el} = T\lambda_D/l_B$ ^[14]. λ_D 与溶液的盐浓度 n_0 有关,

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_w k_B T}{8\pi e^2 n_0}}$$

l_B 为两个带电体间相互作用为 $k_B T$ 时的距离, T 确定时, l_B 为常数. 水的介电常数 ϵ_w 也可看作常数. 此时影响带电磷脂膜弯曲刚性的主要因素是分子的结构、温度及膜周围溶液的盐浓度, 分子结构包括尾链长度、饱和性、头部带电性, 分子组成比例及表面电荷密度.

由于各种影响因素之间常常会相互耦合, 使膜的带电性质与磷脂膜弯曲刚性模量之间的关系变得复杂. 我们通过设计平行实验对照组, 将各个因素剥离开来, 分别固定带电磷脂组分比、分子尾链的结构比、电解质溶液中的盐浓度改变等因素, 考查单层囊泡平衡直径的变化, 进而了解对磷脂膜弯曲刚性的影响. 实验各组的磷脂摩尔百分比见各图中所列, 四种磷脂分子结构见图式 1. 其中分子的极性头部分别为 -1 价的磷脂酰



图式 1 实验中使用的四种磷脂分子的结构示意图

Scheme 1 Structure of lipid molecules used in the experiment

甘油基团(PG)和电中性磷脂酰胆碱基团(PC), 疏水的双尾链分别为二油酰(DO—)与二豆蔻酰(DM—), 油酰 $C_{18:1}$ 的第 9, 10 位间有一个双键, 主相变温度(T_m)为 $-22\text{ }^\circ\text{C}$, 后者 $C_{14:0}$ 为饱和链, T_m 为 $23\text{ }^\circ\text{C}$. 根据 Riske 等^[15]的研究报导, 在溶液的盐浓度很低时, DMPG 的主相变与预相变之间会存在一个分布很宽的中间相, 为保证各实验样品形成的膜都处于均匀的流体相, 实验温度选在 $50\text{ }^\circ\text{C}$, 高于低盐浓度下中间相出现的最高相变温度(T_m^{off} , 为 $43\text{ }^\circ\text{C}$).

图 1 至 3 列出了几组囊泡尺寸与体系溶液中盐浓度的关系. 结果表明, 随着体系盐浓度的增加, 囊泡尺寸的变化具有一个共同的规律. 在盐浓度比较低的范围里(小于 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 囊泡尺寸随盐浓度增加而骤减; 而在盐浓度比较高的范围里(大于 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 囊泡尺寸随盐浓度增加又重新缓慢增大. 但磷脂膜表面电荷密

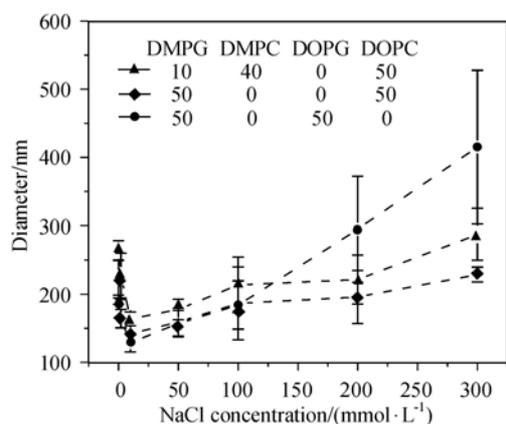


图 1 表面电荷密度不同的囊泡粒径与电解质溶液浓度的关系

Figure 1 The size of vesicles with different surface charge density as a function of the salt concentration

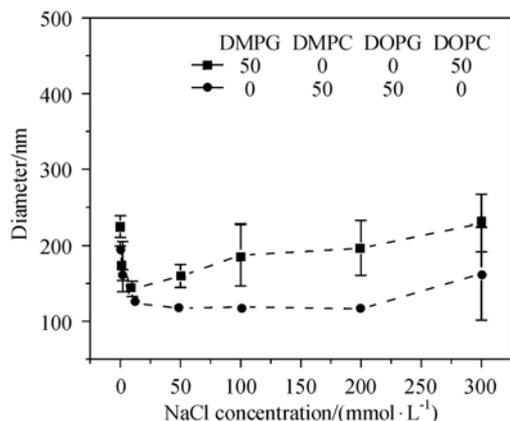


图 2 表面电荷密度相同的囊泡粒径与电解质溶液浓度的关系

Figure 2 The size of vesicles with 50% charged lipid as a function of the salt concentration

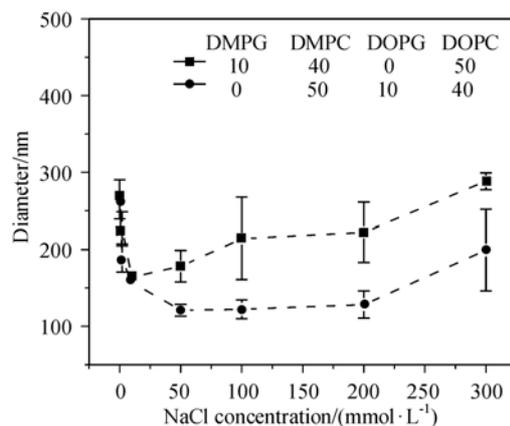


图 3 带电分子不同的囊泡粒径的比较

Figure 3 Comparison of the size of vesicles with charged headgroup located in saturated and unsaturated tail chains

度不同, 即带电磷脂分子的摩尔比不同时, 囊泡尺寸在高盐浓度范围里的增大幅度就不完全相同. 图 1 中三个对照组的分子尾链的结构比相同, 即饱和与不饱和的疏水链各占 50%, 但分子头部带电的比例不同, 分别为 100%, 50% 和 10%, 其中后两个体系的电荷都在饱和的 DMPG 分子上. 因各体系膜都处于均匀的流体相, 可以认为膜表面电荷均匀分布. 由实验数据可知, 随着盐浓度增加, 磷脂膜表面带 100% 电荷密度的囊泡, 其尺寸骤减时达到的值最小, 再次回升时达到的值最大, 即盐的浓度效应最强. 对于饱和磷脂分子分别带 50% 与 10% 电荷密度的两个体系, 盐浓度效应均比 100% 带电的体系弱, 这与文献中关于均匀膜的计算结果是一致的^[4]. 此外, 完全由电中性磷脂组成的体系, 由于其电荷机理与带电磷脂组合体系不同, 囊泡尺寸比后者大近一个数量级, 随盐浓度变化的趋势也略有不同, 在高盐浓度时随着盐浓度增加, 尺寸增大不似带电磷脂体系这样明显(结果未列出). 而当分子头部总的带电量相同, 分子尾链的结构比(1:1)也相同时, 带电头部与分子尾链结构的组合关系对囊泡尺寸的变化规律影响很大, 即带电基团在饱和分子 DMPG 上与在不饱和分子 DOPG 上的差别很大. 比较图 2 与 3, 不饱和分子带电时囊泡尺寸在低盐浓度区域也能发生随浓度增加的骤减; 但在高盐浓度区域, 50% 电荷密度的体系和 10% 电荷密度的体系是在 $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上才出现明显尺寸回升. 这两个体系的最小囊泡尺寸均小于对应的饱和链带电体系.

囊泡尺寸随着盐浓度增加呈现分段变化趋势的原因, 是由于在不同的盐浓度范围里主导磷脂膜弯曲刚性模量的因素不同. 在盐浓度比较低的体系中, 电解质中的反离子(本实验为 Na^+) 在带负电的磷脂膜附近形成双电层, 屏蔽了部分膜电荷, 使得膜分子之间的侧向静电排斥作用急剧减小, 膜变得柔软, 即膜的弯曲刚性减小,

囊泡平衡尺寸也减小,这种屏蔽效应随着盐浓度的增加而增加,直到图中曲线的转折点.而在盐浓度比较高的体系中,屏蔽效应趋于恒定,但磷脂膜附近的双层中反离子密度增加,使得膜的弯曲刚性模量重新增大.分子结构和带电性不同的磷脂的混合,使磷脂膜表面双电层中反离子(Na^+)的分布不同,对高浓度溶液中膜弯曲刚性模量的影响也不尽相同.实验中当分子极性带电头部和不饱和尾链分属不同磷脂分子时,上述影响能明显增大膜的弯曲刚性模量,DOPG越少的体系,囊泡尺寸恒定不回升的盐浓度范围越小.有文献报导,使用原子力显微镜测定磷脂膜弯曲模量时^[7],在高盐浓度下得到的弯曲刚性模量均不随盐浓度增加而改变,这可能是由于测试过程中探针的扫描破坏了双电层中反离子的分布所致.

但头部带电与尾链饱和是否出现在相同分子对膜的 Zeta-电势的影响却不那么明显.图 4 是不同实验对照组的磷脂膜表面 Zeta-电势随溶液盐浓度改变的变化规律.由图中可见,在电解质溶液环境中,带电磷脂膜与中性磷脂膜的 Zeta-电势均呈现随着盐浓度增加先剧烈增加、后变化越来越缓慢的趋势.电中性磷脂膜 Zeta-电势的绝对值明显小于部分或全部带电磷脂组成的膜,在极低盐浓度时 Zeta-电势约为 -25 mV ,而同样浓度下的带电磷脂膜的 Zeta-电势却能够达到 -70 mV 左右.在较高盐浓度的体系中,中性磷脂的表面负电势非常接近零,而达到一定含量带电磷脂的体系,膜的 Zeta-电势却能够恒定在一定值附近.实验中含 50%和 100%带电磷脂的膜的 Zeta-电势均为 -25 mV 左右,而含 10%带电磷脂的膜的 Zeta-电势大约在 -10 mV 左右. Sou 等^[16]在研究带电囊泡表面静电相互作用与补偿激活性质时,也发现磷脂膜中当带电磷脂(PG)的摩尔比小于

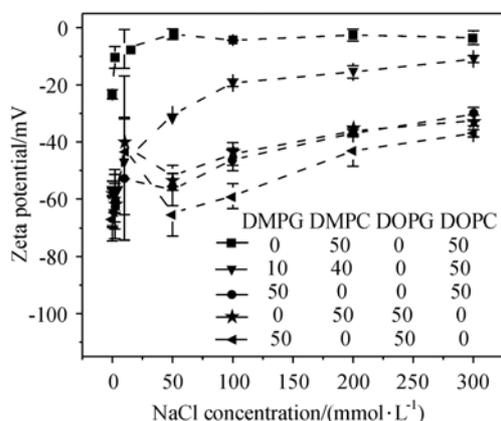


图 4 带电磷脂含量不同的膜的 Zeta-电势随电解质溶液浓度变化的比较

Figure 4 The zeta-potential of the vesicles as a function of the salt concentration

20%时,囊泡 Zeta-电势绝对值会随着 PG 含量的增加而增加.而当磷脂膜表面电荷密度比较高时,电荷密度对膜 Zeta-电势的影响会越来越小,这与我们的实验结果是一致的.而且图 4 中,50%分子头部带电,但尾链分别为饱和与不饱和链的对照组,Zeta-电势几乎完全相同,说明脂分子结构对电势影响不大.

同一膜层中的相邻分子之间存在着侧向静电排斥作用,不同膜层间也存在着静电相互作用.为了比较其对膜弯曲刚性的影响,我们采用直接水合溶胀法制备多层囊泡,显微镜下原位观察并分析其直径随盐浓度变化的规律.从实验结果看,无论是分子尾链的结构比相同($\text{C}_{18:1}:\text{C}_{14:0}=1$)、头部带电比不同(100%, 50%, 0%)(图 5),还是头部带电比及尾链结构比都变化(图 6),多层同心囊泡的直径随盐浓度变化的结果仍旧保持着分段变化的趋势,但囊泡的尺寸增大了近两个数量级.与单层

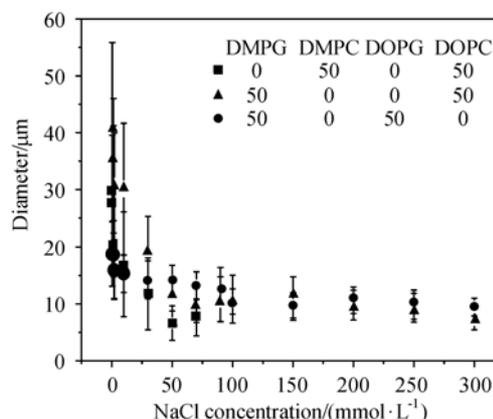


图 5 不同表面电荷密度的多层囊泡直径随电解质溶液浓度的变化

Figure 5 The size of multilamellar vesicles with different surface charge density as a function of the salt concentration

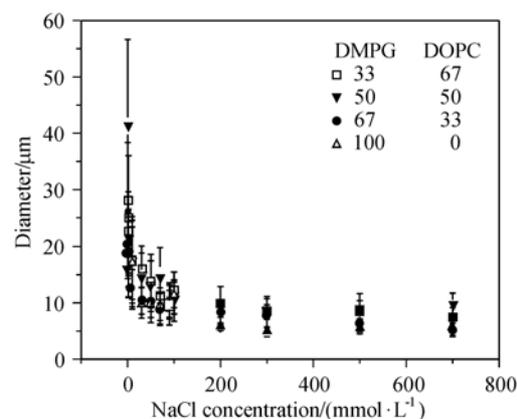


图 6 不同组成的多层囊泡直径随电解质溶液浓度的变化

Figure 6 The size of the vesicles with different composition as a function of the salt concentration

囊泡相比, 多层囊泡的直径不仅与磷脂双分子层膜的弯曲刚性模量有关, 在层数相同的情况下还与膜间的水层厚度即膜间相互作用密切相关. 磷脂膜间的相互作用主要有范德华力、疏水力和静电排斥力, 这些相互作用的大小及平衡决定了双分子层之间的水层厚度. 在低盐浓度的体系, 由于静电屏蔽效应, 膜间静电相互作用随盐浓度增加而急剧减小, 除了膜的弯曲刚性模量减小外, 层间相互排斥力也减小, 导致水层厚度的快速减小, 使多层囊泡的平均尺寸也急剧减小. 而在盐浓度较高的体系中 ($>100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 静电屏蔽作用随盐浓度增加的变化很小, 使水层厚度随盐浓度增加的变化很小; 同时, 不同层的膜的无规热涨落会相互作用并抵消, 掩盖了膜附近的双电层反离子分布随盐浓度变化对双分子层膜弯曲模量的影响相关的信息, 使得表观囊泡直径不再随盐浓度增加而明显变化. 多层囊泡体系的另一个特点是平均直径变化趋势的转折由盐浓度 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 增大到约 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 这说明多层同心囊泡各磷脂双分子层所处的盐浓度可能与本体中的浓度不同, 膜间的静电相互作用及盐离子的屏蔽效应滞后于单层囊泡, 层状相的溶胀还未达到完全平衡.

3 结论

熵稳定的单层囊泡尺寸随着盐浓度增加呈现分段变化的趋势, 其原因是由于在不同的盐浓度范围里主导磷脂膜弯曲刚性模量的因素不同. 低盐浓度的体系, 静电屏蔽效应为主导因素; 高盐浓度的体系, 膜双电层中反离子的分布起主导作用. 但是磷脂分子头部与尾部的不同结构组合会影响膜双电层, 使膜的弯曲刚性不同. 而在多层囊泡体系中, 高盐浓度下膜的热涨落掩盖了分子结构及双电层分布差异对膜弯曲刚性的影响. 但膜的负 Zeta-电势绝对值随膜的带电组分含量增加而增加, 并且均随盐浓度的增加呈先急剧减小后趋于平稳的规律, 与磷脂分子的结构差异无关.

致谢 感谢浙江工商大学食品学院邓少平教授无偿提供粒度及 Zeta-电势测试.

References

- 1 Sui, S.-F. *Molecular Membrane Biology*, Higher Education Press, Beijing, **2003**, pp. 287~300 (in Chinese). (隋森芳, 膜分子生物学, 高等教育出版社, 北京, **2003**, pp. 287~300.)
- 2 Yang, F.-Y. *Biomembranes*, Science Press, Beijing, **2005**, pp. 376~395 (in Chinese). (杨福愉, 生物膜, 科学出版社, 北京, **2005**, pp. 376~395.)
- 3 Telkes, M.; Fencel, D. *Ohio J. Sci.* **1933**, *33*, 85.
- 4 Claessens, M. M. A. E.; van Oort, B. F.; Leermakers, F. A. M.; Hoekstra, F. A.; Cohen Stuart, M. A. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 3882.
- 5 Claessens, M. M. A. E.; Leermakers, F. A. M.; Hoekstra, F. A.; Cohen Stuart, M. A. *Langmuir* **2007**, *23*, 6315.
- 6 Claessens, M. M. A. E.; Leermakers, F. A. M.; Hoekstra, F. A.; Cohen Stuart, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 7127.
- 7 Delorme, N.; Bardeau, J.-F.; Carrière, D.; Dubois, M.; Gourbil, A.; Mohwald, H.; Zemb, T.; Fery, A. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 2503.
- 8 Claessens, M. M. A. E.; van Oort, B. F.; Leermakers, F. A. M.; Hoekstra, F. A.; Cohen Stuart, M. A. *Phys. Rev. E* **2007**, *76*, 011903.
- 9 Petrache, H. I.; Tristram-Nagle, S.; Harries, D.; Kučerka, N.; Nagle, J. F.; Parsegian, V. A. *J. Lipid Res.* **2006**, *47*, 302.
- 10 Petrache, H. I.; Zemb, T.; Belloni, L.; Parsegian, V. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 7982.
- 11 Manciu, M.; Ruckenstein, E. *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, *309*, 56.
- 12 Petrache, H. I.; Tristram-Nagle, S.; Gawrisch, K.; Harries, D.; Parsegian, V. A. *Biophys. J.* **2004**, *86*, 1574.
- 13 Veatch, S. L.; Keller, S. L. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 3074.
- 14 Harden, J. L.; Marques, C.; Joanny, J.-F. *Langmuir* **1992**, *8*, 1170.
- 15 Riske, K. A.; Döbereiner, H.; Lamy-Freund, M. T. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 239.
- 16 Sou, K.; Tsuchida, E. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1778*, 1035.