缺陷 LB 膜诱导草酸钙晶体环图形形成

欧阳健明* 邓穗平

(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, 研究了膜缺陷的微结构及其影响一水草酸钙(COM)晶体成核、生长、沉积图形和黏附的分子机制. 二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)LB 膜经草酸钾处理后可形成圆形缺陷, 并诱导 COM 微晶排列成环状图形, 相比之下, 没有经草酸钾处理的 LB 膜只诱导零散的六边形 COM 晶体生成. 随着生长时间增加, 环内单个 COM 晶体的尺寸明显增加, 空心的环状晶体图形倾向于转变为实心的圆形图形, 且小尺寸(5~20 μm)的圆形晶体图案数量增加. 本结果有助于在分子和超分子的水平上进一步了解肾上皮细胞膜损伤后诱导肾结石形成的分子机制.

关键词 缺陷 LB 膜 草酸钙 SEM 生物矿化

从物理化学的观点看, 肾结石形成至少与 3 个因素密切相关^[1]: (1) 尿液中尿石盐的高度过饱和; (2) 抑制剂浓度或活性降低, 促进剂浓度增加; (3) 肾上皮细胞膜表面损伤. 从分子和超分子的水平上, 肾上皮细胞膜表面损伤后, 膜的极性、磷脂的对称性和有序分子阵列遭到破坏, 暴露出更多的晶体黏附位点, 从而促进晶体的黏附和滞留^[2~4].

Langmuir-Boldgett(LB)膜的缺陷是限制其作为一种纳米级材料应用的主要原因之一^[5]. LB膜的缺陷小到分子级别的晶格位错、针孔、微畴区内分子排列的有序性与微畴区边缘分子的无序性差异等, 大到成膜分子所形成的微晶、台阶、层与层之间的大规模重排^[6~8], 这种重排是由于LB膜从堆积结构到热力学稳定结构的转变; 此外, 还有膜崩溃而形成的堆积/多层膜. 但另一方面, 由于LB膜具有与细胞膜类似的结构, 因此, 可将LB膜作为模拟细胞膜的模型, 并通过调节成膜分子的电荷密度、头基间距、膜的物理状态等而使之与特定性质的细胞膜相似^[9,10]. 因此,

用磷脂LB膜作为模板来研究草酸钙(CaOxa)晶体的形成过程, 比在水溶液中更能接近 CaOxa 结石在生物体内尿路细胞膜表面形成的真实情况. 特别是利用存在缺陷的LB膜可以模拟受损伤的肾上皮细胞膜诱导肾结石矿物 CaOxa 晶体生长, 为进一步探讨尿石形成的机理、更有效地治疗尿路结石病和临床上寻找修复损伤膜的药物提供重要的参考价值.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)为 Sigma 公司产品; 荧光探针分子 1-十六烷酰-2-[12-[(7-硝基-2-1,3-苯基噁二唑-4-基)氨基]十二烷酰]-*sn*-丙三氧基-3-胆碱磷酸(NBD-PC)购自 Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL); 草酸钾、氯化钙、氯化钠和氯仿等均为分析纯试剂; Tris-HCl 试剂由三羟甲基甲胺和盐酸配制而成, 原始 pH=2.04, 用 NaOH 溶液调节 pH. 实验用水均为从石英亚沸蒸馏器体系制得的二次蒸馏水; 孔径 0.22 μm

收稿日期: 2006-01-20; 接受日期: 2006-07-16

国家自然科学基金(批准号: 20471024)、教育部留学回国人员科研启动基金(批准号: 教外司[2005]55号)和中国科学院化学研究所有机固体实验室 开放基金资助项目

* 联系人, E-mail: toyjm@jnu.edu.cn

的微孔滤膜为上海半岛实业有限公司净化器材厂生产.

XL-30 型环境扫描电子显微镜(ESEM, Philips 公司), 样品喷金处理, 测量电压 15~20 kV. KSV-3000 全自动 LB 膜仪(芬兰). PHS-3C 精密 pH 计(上海雷磁仪器厂). 荧光显微镜为德国产品(Leica DMRA2), 荧光标记物 NBD-PC 的浓度为 1%, 激发波长 460 nm, 发射波长 534 nm.

1.2 实验方法

单分子膜和LB膜的制备参照文献 [11,12]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氯仿溶液, 待水面上氯仿挥发 20 min后, 以 $0.03 \text{ nm}^2 \cdot \text{molecule}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度压膜至目标表面压, 采用垂直提拉法将单分子膜转移到云母基片上, 提膜速度为 3 mm/min, 沉积表面压 10 mN/m. DPPC 亲水功能基团朝外, 单层膜, 在干燥器中放置 1 d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 0.6 mmol/L 的草酸钾溶液中, 浸泡时间为 2 h. 取出后用二次水小心洗去膜表面的草酸钾, 干燥, 将其中一片进行 AFM 观察, 另一片放入 CaOxa 亚稳溶液中进行晶体生长.

LB膜诱导CaOxa晶体生长 [13]. 在培养皿中放入用孔径为 0.22 μm 的微孔滤膜过滤的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, 有膜一面朝向CaOxa溶液. 晶体生长在密闭环境中进行, 以防止由于溶剂水的挥发而造成体系饱和度的变化. 整个实验在无尘箱内完成, 重复 3 次, 温度为 $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$.

2 结果与讨论

2.1 缺陷 LB 膜诱导 COM 晶体的形貌

图 1 为被草酸钾损伤后的缺陷 LB 膜诱导一水草酸钙(COM)生长不同时间后晶体的 SEM 照片. 当在 0.3 mmol/L 的 CaOxa 亚稳溶液中生长 20 min 后, 就可在缺陷 LB 膜上发现由 COM 微晶排列成的环状晶体图形(图 1(a)), 在环外的 COM 晶体很少, 但此时环状图形的边界不太清晰. 构成环状图形的 COM 晶体很薄, 尺寸约 1~2 μm , 大都是针状或由针状晶体发展而成的棱角不很清晰的六边形、棱形和叉生 COM 晶体. 相比之下, 没有被草酸钾处理的 DPPC LB 膜在 1 h 后才可在其表面生长出相当于图 1(a)尺寸(1~2 μm)的 COM 微晶; 而没有 LB 膜存在时, 至少 6 h 才

图 1 在不同时间后, 缺陷 LB 膜诱导 CaOxa 亚稳溶液生成的环状 COM 晶体图形的 SEM 照片
(a) 20 min; (b) 1 h; (c) 4 h; (d) 24 h. LB 膜沉积表面压: 10 mN/m; $c(\text{CaOxa}) = 0.30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 云母基片; 晶体生长温度: $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$

有CaOxa均相沉淀产生, 即促进COM晶体的异相成核的强度依次为: 缺陷LB膜 > 常规LB膜 > 无LB膜水溶液。

随着生长时间增加到40 min、1 h(图1(b))、2 h和4 h(图1(c))后, 单个晶体的尺寸逐渐增加, 针状晶体减少, 出现更多叉生和棱形的COM晶体, 同时环状图案里面COM晶体数量也增加。与生长时间为20 min相比, 生长4 h的COM晶体(图1(c))尺寸增大至4~5 μm 。至生长24 h后, 环内基本填满了COM晶体, 但环外晶体仍然较少。

相比之下, 未经草酸钾处理的LB膜则不能诱导生成环状COM晶体图形, 而是诱导生成单个的六边形COM晶体(图2), 零散地分散在LB膜表面; 生长24 h后其尺寸增加至10 μm 左右, 远大于相同条件下缺陷LB膜诱导的COM微晶的尺寸(图1(d))。Khan等^[14,15]的研究也表明, 在磷脂单分子膜表面诱导生成的COM晶体主要为六边形。

图2 未经草酸钾处理的LB膜诱导的草酸钙晶体的SEM照片

在饱和溶液中, 晶体有两种可能的成核方式: 一种是在溶液中发生均相成核; 另一种则是在已有物质表面发生异相成核。LB膜诱导晶体成核实际上就是促进异相成核而抑制均相成核^[16]。缺陷LB膜在很短的时间内就能诱导生成由大量COM微晶聚集而成的环状图形, 说明缺陷LB膜比一般常规LB膜更能促进异相成核。缺陷LB膜诱导晶体图形的出现是由于缺陷畴区尤其是缺陷的边界能提供更多的成核位点。图3为含1%荧光探针分子NBD-PC的DPPC缺陷LB膜的荧光显微镜图片, 可以清楚地看到尺寸约10~20 μm 的畴区结构。Talham^[2,11], Vanderlick^[17]和Kane^[18]等的研究也证明, DPPC单分子膜存在圆形的缺陷畴区。

我们的结果不但反过来证明了DPPC单分子膜上的确存在圆形缺陷, 而且, 这些缺陷畴区可优先促进COM晶体的成核。

Vogel等^[19]的研究表明, DPPC单分子膜诱导下的COM晶体大多数(85%)是($\bar{1}01$)面择优生长的拉长六边形(图4(a)), 少量(15%)为(010)面择优生长的拉长方块形(图4(b))。而环状图形里面的COM晶体则还包括更多的形貌, 如叉生、针状和棱形COM晶体, 这种情况与在各种水溶液体系^[20]和在凝胶体系^[21]中常见的COM晶体形貌更接近。这就表明, 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, 并不进一步指导COM晶体的有序生长, 因为在这些诱导COM成核的缺陷处, DPPC分子排列无序, 难以对COM晶体的有序生长起指导作用, 导致环状图形里面COM晶体的形貌与在水溶液和凝胶体系中形成的COM晶体相似。而分子有序排列的常规LB膜却能在诱导COM成核后, 继续指导COM晶体的整个生长过程, 使得COM晶体沿一定晶面择优生长, 最终得到规则的具有立体感的拉长六边形COM晶体^[12,22,23]。这也从另一方面证明了环状COM晶体图形是由于LB膜的缺陷诱导而成。

图3 缺陷LB膜LC/LE畴区的荧光显微镜图像

图4 不同形貌COM晶体示意图^[17]

2.2 缺陷 LB 膜诱导的 COM 晶体图形尺寸分布

环状晶体图形的尺寸可分为大(50~200 μm)、中(20~50 μm)和小(5~20 μm)三类. 通过对相同基片面积(约 40 mm^2)内的环状晶体图形进行统计, 基片上环状晶体图形的数目从 49 个到 148 个不等, 且膜上图形的分布不是很均匀. 随着生长时间的增加, 小尺寸的环状晶体图形数量增加, 从 20 min 的 20.4%, 增加到 1 h 的 40.6%, 4 h 的 62.5% 和 24 h 的 81.7%(图 5); 大尺寸的环状晶体图形数量从 20 min 的 51.0%, 下降到 1 h 的 23.4%, 4 h 的 7.9% 和 24 h 的 4.8%; 中等尺寸的环状晶体图形的百分比在生长 20 min, 1 h 和 4 h 后分别为 30.6%, 35.9% 和 29.7%. 图 6 为在不同生长时间内缺陷 LB 膜诱导的不同尺寸 COM 晶体环图形的 SEM 照片, 可以看到, 随着生长时间增加, 小尺寸环状晶体图形数量增加.

图 5 在不同生长时间内缺陷 LB 膜诱导的小尺寸环状晶体图形的比例

上述结果是因为在 LB 膜内, 大尺寸的缺陷畴区边界不但缺陷位点多, 能提供更多的成核位点, 而且其 DPPC 分子列阵比小尺寸缺陷畴区边界的分子更加无序, COM 初始微晶在此处的成核自由能更低^[22], 因此, 最先诱导与缺陷本身形貌相似的大尺寸环状 COM 微晶图形生成, 即在生长时间比较短(如 20 min)时主要诱导大尺寸的环状晶体图形(占 51%). 随着生长时间的延长, 这些大尺寸缺陷畴区被 COM 微

晶占据后, COM 便开始在尺寸越来越小的环状缺陷处成核和生长, 导致小尺寸的环状晶体图形的比例逐渐增加.

中等尺寸(20~50 μm)晶体环的比例, 在生长 20 min 至 4 h 的期间内保持在 30%~35% 左右, 没有显著的变化, 这归因于随着生长时间的增加, 在生长初期诱导形成的小尺寸晶体图形会向环的两侧延伸生长, 导致环状晶体图形的半径变大, 如图 7 箭头 A 和 B 所示, 可以看出, 在晶体环的内侧和外侧, 主要为处于生长初期的针状 COM 晶体, 其尺寸比环中间的晶体尺寸小, 这说明晶体环的内侧和外侧均是晶体成核和生长的活性部位. 因此, 生长时间延长后, 虽然小尺寸的环形晶体数量增加使得中等尺寸的晶体图形比例减小, 但部分小尺寸的图形长大后又增加了中等尺寸图形的数量, 最终其百分比变化不大.

随着生长时间的增加, 不同尺寸的实心圆晶体图案比例均增加. 小尺寸(5~20 μm)的晶体环变成实心圆晶体图案的时间最短, 生长 1 h 后实心圆图案占 40.3%, 2 h 后所有的小尺寸环状晶体图形里面基本上均长满了 COM 晶体. 中等尺寸(20~50 μm)的实心圆晶体图案比例在生长 1 h 后占 6.5%, 2 h 后则上升到 78.1%. 而对于大尺寸(>50 μm)的晶体图形, 在生长 1 h 后仍然见不到实心圆图案, 在生长 4 h 后, 环状图形和实心圆图案约为 1:1. 这些结果的产生归因于随着生长时间的增加, 环状晶体图形从边界向内、外两侧生长(图 7), 由于小尺寸的环容易长满晶体, 因此, 生长时间较短即可形成实心圆图形, 而大尺寸的晶体环即使在生长 4 h 后仍然不能被 COM 全部覆盖.

3 结论

经过草酸钾处理后的 LB 膜由于存在圆形缺陷, 因此诱导生成了环形和圆形 COM 晶体图形, 相比之下, 没有经草酸钾处理的 LB 膜只诱导零散的六边形 COM 晶体生成, 即促进 COM 晶体的异相成核的强度

图 6 在不同生长时间内缺陷 LB 膜诱导的不同尺寸 COM 晶体环图形的 SEM 照片

(a) 1 h; (b) 4 h; (c) 24 h

图7 缺陷LB膜诱导生长20 min后生长的COM晶体SEM的放大图

依次为: 缺陷LB膜 > 常规LB膜 > 无LB膜水溶液。这表明, 模型膜的缺陷是晶体生长的主要促进因素。随着生长时间增加, 环内单个COM晶体的尺寸明显增加, 空心的环状COM晶体图形逐渐转变为实心圆晶体图案。由于LB膜的缺陷结构及其性质与受损的肾上皮细胞膜表面具有相似性, 因此, 本文的结果有助于从分子和超分子的水平上进一步了解肾上皮细胞膜表面损伤后引起肾结石形成的分子机制。

参 考 文 献

- Wiessner J H, Hung L Y, Mandel N S. Crystal attachment to injured renal collecting duct cells: influence of urine proteins and pH. *Kidney Int*, 2003, 63: 1313—1320 [DOI]
- Benítez I O, Talham D R. Calcium oxalate monohydrate precipitation at membrane lipid rafts. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 2814—2815 [DOI]
- Khan S R, Shevock P N, Hackett R L. Membrane associated crystallization of calcium oxalate in vitro. *Calc Tiss Int*, 1990, 46: 116—120 [DOI]
- 邓穗平, 欧阳健明. 受损伤肾小管细胞膜诱导草酸钙结晶形成的分子机制. *江西医学院学报*, 2005, 45(5): 165—167
- 欧阳健明. LB膜原理与应用. 广州: 暨南大学出版社, 1999. 243—253
- Takamoto D Y, Aydil E, Zasadzinski J A, Ivanova A T, Schwartz D K, Yang T, Cremer P S. Stable ordering in Langmuir-Blodgett films. *Science*, 2001, 293: 1292—1295 [DOI]
- Peltonen J P K, He P, Rosenholm J B. Order and defects of Langmuir-Blodgett films detected with the atomic force microscope. *J Am Chem Soc*, 1992, 114(20): 7637—7642 [DOI]
- Schwartz D K. Langmuir-Blodgett film structure. *Surf Sci Rep*, 1997, 27: 241—334 [DOI]
- 欧阳健明. 单分子膜调控草酸钙晶体成核和生长的研究进展. *科学通报*, 2004, 49(2): 107—114
- 欧阳健明. 单分子膜诱导生物矿物晶体生长中的晶格匹配和电荷匹配. *化学进展*, 2005, 17(5): 931—937
- Benítez I O, Talham D R. Brewster angle microscopy of calcium oxalate monohydrate precipitation at phospholipid monolayer phase boundaries. *Langmuir*, 2004, 20: 8287—8293 [DOI]
- Ouyang J M, Deng S P, Zhong J P, Tiek B, Yu S H. Crystallization of calcium oxalate monohydrate at dipalmitoylphosphatidylcholine monolayers in the presence of chondroitin sulfate A. *J Cryst Growth*, 2004, 270: 646—654 [DOI]
- 钟玖平, 欧阳健明, 邓穗平. LB膜诱导下草酸钙晶体的生物矿化研究. *无机化学学报*, 2002, 18(12): 1253—1257
- Backov R, Khan S R, Mingotaud C, Byer K, Lee C M, Talham D R. Precipitation of calcium oxalate monohydrate at phospholipid monolayers. *J Am Soc Nephrol*, 1999, 10: S359—S363 [DOI]
- Khan S R, Glenton P A, Backov R, Talham D R. Presence of lipids in urine, crystals and stones: implications for the formation of kidney stones. *Kidney Int*, 2002, 62: 2062—2072 [DOI]
- Bunker B C, Rieke P C, Tarasevich B J, Campbell A A, Fryxell G E, Graff G L, Song L, Liu J, Virden J W, Mcvay G L. Ceramic thin-film formation on functionalized interfaces through biomimetic processing. *Science*, 1994, 264: 48—55 [DOI]
- McConlogue C W, Vanderlick T K. A close look at domain formation in DPPC monolayers. *Langmuir*, 1997, 13: 7158—7164 [DOI]
- Kane S A, Compton M, Wilder N. Interactions determining the growth of chiral domains in phospholipid monolayers: experimental results and comparison with theory. *Langmuir*, 2000, 16: 8447—8455 [DOI]
- Letellier S R, Lochhead M, Vogel V. Oriented growth of calcium oxalate monohydrate crystals beneath phospholipid monolayers. *Biochim Biophys Acta-Gen Subject*, 1998, 1380: 31—45
- 欧阳健明, 姚秀琼, 钟玖平, 谢瑜珊, 白钰, 邝荔, 唐雯霞. 不同模拟体系中草酸钙结晶的比较研究. *高等学校化学学报*, 2002, 23(12): 2237—2239
- 郑辉, 李祥平, 欧阳健明. 过饱和度、反应物化学计量比及离子强度对草酸钙晶体生长的影响. *无机化学学报*, 2005, 21(9): 1375—1378
- Whipps S, Khan S R. Growth of calcium oxalate monohydrate at phospholipid Langmuir monolayers. *J Cryst Growth*, 1998, 192: 243—249 [DOI]
- Deng S P, Ouyang J M. Effects of dipalmitoylphosphatidylcholine monolayers to the crystallization of calcium oxalate monohydrate from the solution containing chondroitin sulfate C. *Coll Surf A*, 2005, 257-258: 47—50 [DOI]