论文

间苯二甲酸自组装形成的人工跨膜离子通道

祝平平, 辛鹏洋, 侯军利*

复旦大学化学系, 上海 200433

*通讯作者, E-mail: houjl@fudan.edu.cn

收稿日期: 2015-03-05; 接受日期: 2015-03-15; 网络版发表日期: 2015-04-14

doi: 10.1360/N032015-00031

摘要 本文研究了商品试剂间苯二甲酸对简单离子的跨膜输送性能. 通过基于囊泡的荧光光谱实验以及基于平面脂双层的膜片钳实验证实, 间苯二甲酸可以在脂双层中, 通过多级的组装形成跨膜的离子通道. 这种新型的通道可以实现对简单阳离子的跨膜输送.

关键词间苯二甲酸
人工离子通道
自组装
跨膜输送

1 引言

由于脂双层的疏水部分对极性物质有排斥作用, 因此, 在生物体中, 绝大部分极性的生理活性物质, 如离子、水、氨基酸、糖等, 进出细胞均需要通过膜蛋白的跨膜转运来实现. 膜蛋白在跨膜输送活性物质的过程中展现了很高的输送效率及选择性, 在维持生物体正常运转、生理信号传输等方面发挥了重要作用^[1]. 其中一类膜蛋白通过在细胞膜上形成跨膜孔穴来实现活性物质的跨膜输送, 这类膜蛋白被称为通道蛋白. 近些年来, 超分子化学家成功构筑了具有特定结构的有机分子, 这类分子可以在磷脂双分子层中组装形成跨膜通道, 从而模拟了天然通道蛋白的功能^[2-5]. 虽然已报道的人工跨膜通道实现了对质子、金属离子、水以及氨基酸等小分子活性物质的跨膜输送^[6-15], 但是发展新型的人工跨膜通道体系, 尤其是结构简单的有机小分子体系, 仍然是超分子化学家研究的热点之一, 预期在发展新型的分离纯化和医用材料方面具有重要的应用前景. 在本研究工作中我们发现, 商品化试剂间苯二甲酸可以在脂双层中组装形成人工的跨膜通道.

间苯二甲酸在分子间氢键作用的驱动下组装形成六聚体类型的环状结构(图 1)^[16-21]. 我们设想, 如

果这类环状结构在磷脂双层中足够稳定, 并通过环状结构之间的 π - π 堆积作用形成管状结构, 那么间苯二甲酸这类商品化的小分子就有可能通过多级组装^[22,23], 在脂双层膜中形成人工跨膜通道. 对此, 我们分别以磷脂分子组装形成的囊泡和平面脂双层为平台, 开展动态荧光光谱实验和膜片钳实验.

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

间苯二甲酸从 Sigma Aldrich 公司(USA)购得, 用水重结晶后使用; 卵磷脂(Egg yolk *L*- α -phosphatidyl-

图1 间苯二甲酸在分子间氢键作用的驱动下组装形成环状结构的示意图(图中虚线表示氢键)

choline, 氯仿溶液(100 mg/mL))从 Sigma-Aldrich 公司(USA)购得; 2-(*N*-吗啉代)乙磺酸(Mes)从 J&K 公司(China)购得; 荧光素 Lucigenin 从 ABBIS 公司(USA)购得; 大豆磷脂(asolectin from soybean)从 Sigma-Aldrich 公司(USA)购得. 其他试剂未经处理直接使用.

荧光光谱用 Perkin Elmer LSS 荧光仪(USA)于室温测得. 在膜片钳实验中使用 Warner BC-535D 双层膜片钳放大器来测量膜电流, 使用 PatchMaster (HEKA)来收集数据, 其中采样间隔为 10 kHz, 8 极 Bessel 滤波器的频率为 1 kHz (HEKA). 使用 FitMaster (HEKA)进行数据分析, 其中数字滤波器的频率为 100 Hz.

2.2 基于囊泡的动态荧光光谱实验

2.2.1 囊泡的制备

将卵磷脂的 CHCl_3 溶液(100 mg/mL, 0.15 mL)用 CHCl_3 (5.0 mL)稀释后, 减压旋转蒸发成膜, 再用高真空油泵干燥 3 h. 取 1.5 mL 含荧光素 Lucigenin (2 mmol/L)的 MES 缓冲液(pH 6.2, Mes (10 mmol/L), K_2SO_4 (70 mmol/L))加入瓶中涡旋乳化. 使用孔径 0.2 μm 的滤膜过滤, 将得到的乳浊液放入透析袋(MWCO=14000)中, 用同样的 MES 缓冲液透析 3 次, 尽量除尽游离于囊泡外的荧光素, 得到包结荧光素的囊泡储备液.

2.2.2 荧光光谱实验

在荧光比色皿中加入 Mes 缓冲液(2.0 mL, pH 6.2)和囊泡储备液 100 μL , 以及 KCl 溶液(3.2 mol/L) 60 μL . 通过动力学模式($\lambda_{\text{ex}}=372\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=503\text{ nm}$)监测荧光强度变化, 待读数平稳后(I_0), 加入不同浓度间苯二甲酸的 DMF 溶液, 连续监测 12 min (I_t). 最后用表面活性剂 Triton X-100 的水溶液(50%, 10 μL)将囊泡破坏, 并连续监测至荧光强度不再变化(I_∞). 将收集的数据用公式 $(I_t - I_0)/(I_\infty - I_0)$ 进行归一化处理, 得到荧光强度随时间变化的趋势图^[24].

2.3 基于平面脂双层的膜片钳

取 0.5 μL 25 mg/mL 大豆磷脂的正己烷储备液, 涂抹到 Derlin 杯(Warner Instruments, USA)的杯孔周围(孔径为 0.2 mm), 先使其自然挥发, 然后用氮气流吹干. 孔的左右两侧分别为 *cis* 室(接地)和 *trans* 室.

图2 基于平面脂双层的膜片钳实验装置示意图及涉及的电极反应

两侧均加入 1 mL 1.0 mol/L 的 KCl 溶液, Ag-AgCl 电极直接插在两侧溶液中(图 2). 取 1.0 μL 上述大豆磷脂分子储备液涂在之前已预处理过的孔上. 然后检测其电容, 控制电容值在 80~120 pF 之间. 随后通过施加电压检测其否漏电, 如不漏电即认为小孔上已成功形成了脂双层^[25]. 在典型的实验中, 加入 1.0 μL (1.0 mmol/L)间苯二甲酸的 DMSO 溶液到 *cis* 室, 搅拌 5 min 后开始测试.

3 结果与讨论

3.1 跨膜输送 KCl 的性能研究

由于荧光探针 Lucigenin 与 Cl^- 结合时会引起荧光强度的显著变化, 因此我们通过检测囊泡内荧光探针的荧光强度变化即能判断 KCl 是否发生了跨膜输送. 在未加入间苯二甲酸的情况下, 在 12 min 的范围内, 我们只观察到 15% 的荧光强度变化. 这说明, KCl 自身跨膜输送的能力非常弱. 当我们加入 0.6 和 1.2 mmol/L 的间苯二甲酸时, 可以发现, 1 min 内荧光强度显著增强, 分别达到 26% 和 34%, 随后达到平衡(图 3). 该实验结果证明, 在间苯二甲酸存在的条件下, KCl 跨膜输送能力显著增强, 且间苯二甲酸浓度越高, 增强的效果越明显.

3.2 跨膜输送的机理、效率和选择性研究

3.2.1 跨膜输送的机理

目前文献报道, 离子的跨膜输送可以通过“载体”和“通道”机理进行^[26]. 通过上述荧光实验我们证明, 间苯二甲酸可以显著增强 KCl 的跨膜输送. 为了

图3 加入不同浓度间苯二甲酸后, 荧光素 Lucigenin ($\lambda_{\text{ex}}=372 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=503 \text{ nm}$)相对荧光强度随时间的变化图

进一步证实间苯二甲酸对 KCl 的输送机理, 我们还在平面脂双层上进行了膜片钳实验. 当我们在脂双层膜的两侧分别施加+100 和-100 mV 的电压, 通过记录电流随时间的变化曲线, 我们没有观察到任何电流信号, 这说明 KCl 自身不能跨脂双层进行连续的输送. 当我们在脂双层一侧的溶液中加入间苯二甲酸后, 并在脂双层两侧分别施加同样的电压后, 我们观察到了非常规则的方波状信号(图 4(a, b)), 这些方波信号说明有带电离子持续的流过脂双层结构, 从而证实了间苯二甲酸在脂双层中形成了跨膜的离子通道. 由于脂双层疏水部分的厚度为 30~35 Å, 而典型的 π - π 堆积间距为 3.5 Å, 并且考虑到两端分子中的原子范德华半径, 为此, 我们推测每个通道由 8~12 个间苯二甲酸六聚体堆积形成(图 4(c)). 另外, 我们还发现, 在以上电流随时间变化图中, 电流信号持续的时间可以达到 5 s, 明显长于其他类型的超分子自组装通道^[27], 说明这类通道在脂双层膜中非常稳定. 在相同的条件下, 当加入邻苯二甲酸和对苯二甲酸后, 不能观察到通道电流, 说明这两个化合物不能形成跨膜的通道. 该实验结果进一步佐证了以上我们所提出的间苯二甲酸通道组装模型.

3.2.2 跨膜输送的效率

我们通过在脂双层膜两侧施加不同的电压, 进一步得到了流经该通道的电流(I)与所施加电压(V)之间的关系(图 5(a)). 从图中可以看到, I - V 之间存在良好的线性关系, 这说明这类通道为非电压响应型通道. 通过对 I - V 曲线进行线性拟合, 得到通道的电导

图4 (a, b) 加入间苯二甲酸后, 流经平面脂双层的电流随时间变化图((a) 施加电压为+100 mV; (b) 施加电压为-100 mV); (c) 人工跨膜通道形成机理的示意图

图5 流经通道的电流(I)与所施加电压(V)之间的关系图. (a) *trans* 室: 1.0 mol/L KCl; *cis* 室: 1.0 mol/L KCl; (b) *trans* 室: 1.0 mol/L KCl; *cis* 室: 0.3 mol/L KCl

(γ)为 $17.4 \pm 0.5 \text{ pS}$, 该 γ 值与天然的通道蛋白短杆菌肽相当, 表明这类人工通道的输送效率可以达到与天然通道蛋白相当的程度, 是一类非常高效的人工跨膜通道.

3.2.3 跨膜输送的选择性

我们还进一步研究了这类新型人工通道对不同离子的跨膜输送选择性. 通过在脂双层膜的 *trans* 室加入 KCl (1.0 mol/L) 溶液, 在其 *cis* 室加入 RCl (1.0 mol/L, $R=\text{Li, Na, Rb, Cs}$) 或者 KCl (0.3 mol/L), 分别测得了在这些条件下的 I - V 关系图. 在这些条件下, I - V 仍然

呈现良好的线性关系. 但是, 与上述膜片钳实验不同的是, 由于膜两侧的溶液不同, 从而导致在这些条件下, 线性关系不经过坐标原点(例如, 当 *cis* 室加入 0.3 mol/L KCl, 结果见图 5(b)). 通过对 *I-V* 图进行线性拟合后就可得到在这些条件的反转电位(V_{rev} , 即 $I=0$ 时的电压值), 利用该 V_{rev} 值以及 Goldman-Hodgkin-Katz 方程可以计算出相应离子间透过率的比值(P) (表 1)^[28]. 该比值反映了相应离子通过该通道的相对选择性. 我们发现, 所研究离子的选择性顺序为 $\text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Cl}^- > \text{Li}^+$. 这说明该类基于间苯二甲酸的人工通道是一种输送阳离子的通道. 另外, 这一顺序与 Eisenman I 序列一致, 说明离子的选择性主要由水合离子的去水化速率决定^[29,30]. 同时也说明, 这些离子在经该通道进行跨膜输送的过程中需脱除或部分脱除其络合的水分子.

表 1 脂双层膜 *cis/trans* 侧溶液中离子不同时测得的反转电位(V_{rev})和相应离子间透过率的比值(P)

	Li^+/K^+	Na^+/K^+	Rb^+/K^+	Cs^+/K^+	Cl^-/K^+
V_{rev} (mV)	-53.1	-31.8	14.5	21.5	-37.0
P	0.13	0.29	1.8	2.3	0.12

4 结论

我们通过基于囊泡的荧光光谱实验以及基于平面脂双层的膜片钳实验证实, 间苯二甲酸可以在脂双层中通过多级次的组装形成跨膜的离子通道. 这种新型的人工通道可以实现对阳离子的选择性跨膜输送. 该研究为以间苯二甲酸为基本骨架, 进一步设计和发展新型的、功能化的人工跨膜通道提供了很好的基础.

致谢 本工作得到国家自然科学基金(21422202)资助, 特此致谢.

参考文献

- 1 Ashcroft FM. *Ion Channels and Disease*. San Diego and London: Academic Press, 2000
- 2 Gokel GW, Murillo O. Synthetic organic chemical models for transmembrane channels. *Acc Chem Res*, 1996, 29: 425–432
- 3 Ghadiri MR, Granja JR, Buehler LK. Artificial transmembrane ion channels from self-assembling peptide nanotubes. *Nature*, 1994, 369: 301–304
- 4 Sakai N, Marada J, Matile S. Artificial β -barrels. *Acc Chem Res*, 2008, 41: 1354–1365
- 5 Helsel AJ, Brown AL, Yamato K, Wen F, Yuan LH, Clements AJ, Harding SV, Szabo G, Shao ZF, Gong B. Highly conducting transmembrane pores formed by aromatic oligoamide macrocycles. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 15784–15785
- 6 Kragten UF, Roks MFM, Nolte RJM. Facilitated ion transport in a biomembrane model. Artificial ion channels as pores in dihexadecyl phosphate vesicles. *J Chem Soc, Chem Commun*, 1985: 1275–1276
- 7 Nakano A, Xie QS, Mallen J, Echegoyen L, Gokel GW. Synthesis of a membrane-insertable, sodium cation conducting channel: kinetic analysis by dynamic ^{23}Na NMR. *J Am Chem Soc*, 1990, 112: 1287–1289
- 8 Pregel M, Jullien L, Lehn JM. Towards artificial ion channels: transport of alkali metal ions across liposomal membranes by “Bouquet” molecules. *Angew Chem Int Ed*, 1992, 31: 1637–1640
- 9 Voyer N, Robitaille M. A novel functional artificial ion channel. *J Am Chem Soc*, 1995, 117: 6599–6600
- 10 Abel E, Maguire GEM, Meadows ES, Murillo O, Jin T, Gokel GW. Planar bilayer conductance and fluorescence studies confirm the function and location of a synthetic, sodium-ion-conducting channel in a phospholipid bilayer membrane. *J Am Chem Soc*, 1997, 119: 9061–9062
- 11 Weber ME, Schlesinger PH, Gokel GW. Dynamic assessment of bilayer thickness by varying phospholipid and hydrophilic synthetic channel chain lengths. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 636–642
- 12 Gokel GW, Mukhopadhyay A. Synthetic models of cation-conducting channels. *Chem Soc Rev*, 2001, 30: 274–286
- 13 Si W, Chen L, Hu XB, Tang GF, Chen ZX, Hou JL, Li ZT. Selective artificial transmembrane channels for protons by formation of water wires. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 12564–12568
- 14 Hu XB, Chen ZX, Tang GF, Hou JL, Li ZT. Single-molecular artificial transmembrane water channels. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 8384–8387
- 15 Chen L, Si W, Zhang L, Tang GF, Li ZT, Hou JL. Chiral selective transmembrane transport of amino acids through artificial channels. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 2152–2155

- 16 Fyles TM, Knoy R, Müllen K, Sieffert M. Membrane activity of isophthalic acid derivatives: ion channel formation by a low molecular weight compound. *Langmuir*, 2001, 17: 6669–6674
- 17 Valiyaveetil S, Müllen K. Multiphase self-assembly of 5-alkoxyisophthalic acid and its applications. *New J Chem*, 1998, 22: 89–95
- 18 Yang J, Marende JL, Geib S, Hamilton AD. Hydrogen bonding control of self-assembly: simple isophthalic acid derivatives form cyclic hexameric aggregates. *Tetrahedron Lett*, 1994, 35: 3665–3668
- 19 Enkelmann V, Valiyaveetil S, Moessner G, Müllen K. Self-assembly of 5-alkoxyisophthalic acids: alkyl chain length dependence for the formation of channel-type and sheet-type structures. *Supramol Sci*, 1995, 2: 3–7
- 20 Zimmerman SC, Zeng F, Reichert DEC, Kolotuchin SV. Self-assembling dendrimers. *Science*, 1996, 271: 1095–1098
- 21 朱亮亮, 腾启文, 吴师, 徐凌佳, 陈小鹏. 氢键复合物自组装性质的研究. *化学进展*, 2006, 18: 707–714
- 22 赵彦利, 刘育. 苯基修饰 β -环糊精的自组装行为. *中国科学: 化学*, 2005, 35: 378–384
- 23 黄艳琴, 任厚基, 曹国益, 欧阳浪, 刘兴奋, 黄维. π -共轭体系超分子自组装. *中国科学: 化学*, 2013, 43: 125–141
- 24 Jeon YJ, Kim H, Jon S, Selvapalam N, Oh DY, Seo I, Park CS, Jung SR, Koh DS, Kim K. Artificial ion channel formed by cucurbit[n]uril derivatives with a carbonyl group fringed portal reminiscent of the selectivity filter of K^+ channels. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 15944–15945
- 25 Ashley RH. *Ion Channels: a Practical Approach*. Oxford, UK: Oxford University Press, 1995
- 26 Matile S, Jentsch AV, Montenegro J, Fin A. Recent synthetic transport systems. *Chem Soc Rev*, 2011, 40: 2453–2474
- 27 Chui JKW, Fyles TM. Ionic conductance of synthetic channels: analysis, lessons, and recommendations. *Chem Soc Rev*, 2012, 41: 148–175
- 28 Fyles TM, Looock D, van Straaten-Nijenhuis WF, Zhou X. Pores formed by bis-macrocyclic bola-amphiphiles in vesicle and planar bilayer membranes. *J Org Chem*, 1996, 61: 8866–8874
- 29 Eisenman G, Horn R. Ionic selectivity revised: the role of kinetic and equilibrium process in ion permeation through channels. *J Membr Biol*, 1983, 76: 197–225
- 30 Neher E, Sandblom J, Eisenman G. Ionic selectivity, saturation, and block in gramicidin A channels. *J Membr Biol*, 1978, 40: 97–116

Artificial ion channel formed from isophthalic acid

Pingping Zhu, Pengyang Xin, Jun-Li Hou*

Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433, China

*Corresponding author (email: houjl@fudan.edu.cn)

Abstract: In this paper, we developed a new artificial transmembrane channel from isophthalic acid. The dynamic fluorescence experiments on lipid vesicles and patch clamp experiments on planar lipid bilayer demonstrated that isophthalic acid could form stable transmembrane channels in lipid bilayer driven by the hydrogen bonding and π - π stacking interactions. The channels displayed high transport efficiency and selectivity for cations.

Keywords: isophthalic acid, artificial ion channel, self-assembly, transmembrane transport