

用平板双分子层脂膜模拟研究锌离子跨细胞膜的传递过程*

朱 宪** 叶宇慧 孙当如

(上海大学环境与化学工程学院, 上海, 201800)

摘 要 制备了氧化胆固醇-卵磷脂(脑磷脂)平板双分子层脂膜, 研究了膜配方对双分子层脂膜的稳定性和离子传递性能的影响, 得到了最佳制膜工艺, 并建立了锌离子跨卵(脑)磷脂膜的吸附-扩散模型, 其计算值与实验值基本吻合。

关键词 双分子层脂膜, 细胞膜, 模拟膜, 氧化胆固醇, 锌离子, 物质传递。

长期以来, 人们对细胞膜进行了大量的研究, 根据文献报道, 人体细胞膜为一种主要由脂质体和蛋白质组成的双分子层脂质膜(细胞膜中卵磷脂约占 74%, 胆固醇约占 25%, 其余为糖脂)^[1, 2]。

本文采用卵磷脂和脑磷脂作为模拟细胞膜的脂质体部分, 采用氧化胆固醇作为模拟细胞膜的蛋白质部分, 模拟锌离子跨细胞膜的传递过程, 并通过测量模拟膜的电化学性质对其进行监控。

1 实验部分

1.1 实验装置

有机玻璃实验槽分左、右两室, 单室容积为 35mL, 中间夹有聚四氟乙烯板(0.5mm), 在板上间距约 5mm 圆周排布 10 个直径为 0.5mm 的孔, 用微量取样针管将少量成膜液滴入小孔中, 待其自动散开成为双层膜。在左、右室插入电极(Ag/AgCl), 装入 30mL 用三(羟甲基)氨基甲烷和盐酸配制的 tris 缓冲溶液, 累积取样 5mL 以后, 液面下降不会达到小孔。

1.2 平板双分子层脂膜的制备

将氧化胆固醇与卵磷脂或脑磷脂以一定比例混合制备成膜液。取 4g 胆固醇, 再量取 100mL 正辛烷放入三口烧瓶中, 然后接好回流装置, 以 $120\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度通入氧气, 125°C 左右, 回流 5—6h, 结束后取出冷却备用^[3]。

按卵(脑)磷脂:氧化胆固醇 = 1:0, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 1:2, 2:3 的质量比取卵(脑)磷脂若干溶于 1mL 制得的氧化胆固醇溶液中, 搅拌均匀作为成膜液, 用光学法观察该成膜液在空气中的成膜情况, 发现在 5—10min 的时间内, 基本都可成膜^[4]。

采用电化学分析仪(工作站(上海辰华仪器公司))将两侧电极从溶液中搜集的电流信号经处理发送到电脑中转化成检测图像。

2 结果与讨论

2.1 最佳膜配方

图 1 和图 2 为平板小孔中用不同配比卵(脑)磷脂/氧化胆固醇成膜的时间-电流图像。

图 1 和图 2 显示, 由于小孔中有膜阻隔, 电阻非常大, 因此, 整个实验装置几乎没有电流通过。另外, 由于界面张力的作用, 膜会自动变薄, 直至形成双分子层膜, 这时膜电阻达到 $10^6 \Omega$, 与文献值一致。双分子层膜偶尔会有扰动产生, 导致膜短时间破损, 电流瞬时增大, 但是一般都可以自动修复, 图中出现的尖峰, 反映了这种情况。

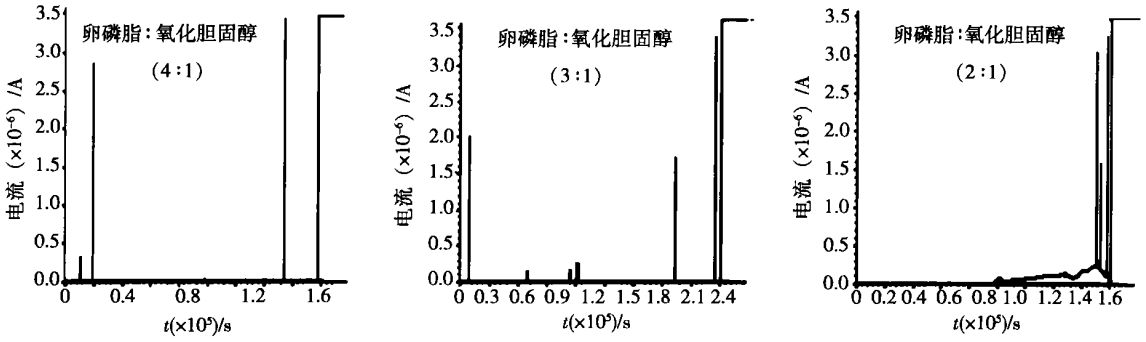


图 1 不同配比的卵磷脂 / 氧化胆固醇膜液成膜的时间 - 电流图

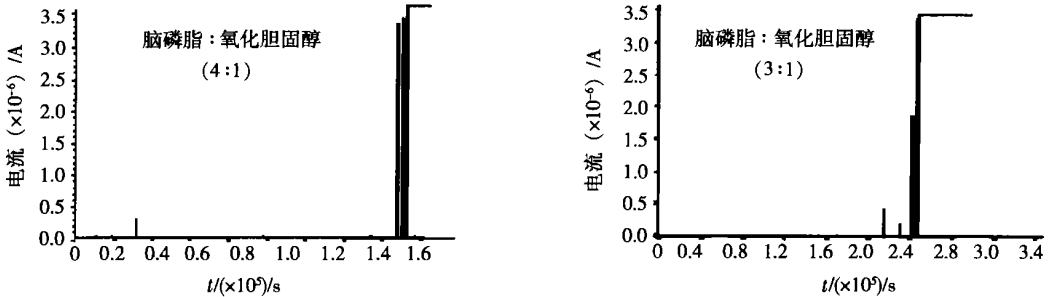
Fig 1 *I*-*t* curve of membranes comprised by lecithin / oxidized cholesterol at different ratio

图 2 不同配比的脑磷脂 / 氧化胆固醇膜液成膜的时间 - 电流图

Fig 2 *I*-*t* curve of membranes comprised by cephalin / oxidized cholesterol at different ratio

图 1 和图 2 还表明, 在卵磷脂:氧化胆固醇 = 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1; 脑磷脂:氧化胆固醇 = 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1 中, 膜存在时间超过 27h, 其中以 3:1 的配方最理想, 成膜时间达到 60h 以上, 可以根据不同的目的和需要配置使用. 根据对人类细胞膜的组成分析, 脂质体:胆固醇 = 3:1, 因此, 卵磷脂:氧化胆固醇 = 3:1 或脑磷脂:氧化胆固醇 = 3:1 的膜配方也最适合对细胞膜的模拟研究. 下述实验中所使用的膜均为卵(脑)磷脂:氧化胆固醇 = 3:1 的配方.

2.2 锌离子跨细胞膜传递的吸附-扩散模型

图 3 是传递时间为 12h, 锌离子浓度与氧化胆固醇含量的关系 (此项实验以磷脂含量为准, 氧化胆固醇的质量百分比从 10% 开始依次增加 10% 直至 100%). 图 3 显示, 随着氧化胆固醇含量的增加, 相同时间 (12h) 内传递的锌离子呈增加趋势, 但增加到一定程度 (40% 左右), 浓度增加就不明显了, 而是趋于恒定, 这也说明了阻力主要集中在膜-水界面, 锌离子在界面被氧化胆固醇吸附并进入膜相是整个跨膜传递的速率控制步骤.

图 4 是锌离子浓度与传递时间之间的关系, 取卵磷脂:氧化胆固醇为 3:1 的配方. 从图 4 可见, 除膜将近破裂 (55h 左右) 时由微孔传质产生的一个浓度突变外, 基本是直线关系, 即表现出平板模型的传递特性.

采用吸附-扩散平板模型计算锌离子的传递量^[5-7]:

$$J = -D \frac{\partial C}{\partial X} = -D \frac{[Zn^{2+}]_{外} - [Zn^{2+}]_{内}}{R} = [Zn^{2+}]_{内} \times V / (S \times t)$$

$$D = - \{ [Zn^{2+}]_{内} \times V / (S \times t) \} / \left\{ \frac{[Zn^{2+}]_{外} - [Zn^{2+}]_{内}}{R} \right\}$$

式中, J 为膜通量 ($kg \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$); $[Zn^{2+}]_{外}$ 为膜外侧锌离子浓度 ($mg \cdot l^{-1}$); $[Zn^{2+}]_{内}$ 为膜内侧锌离子浓度 ($mg \cdot l^{-1}$); R 为膜厚度 ($1.0 \times 10^{-8} m$)^[4]; D 为扩散系数 ($m^2 \cdot s^{-1}$); S 为膜面积

(m²); t为传递时间 (h); V为溶液体积 (L).

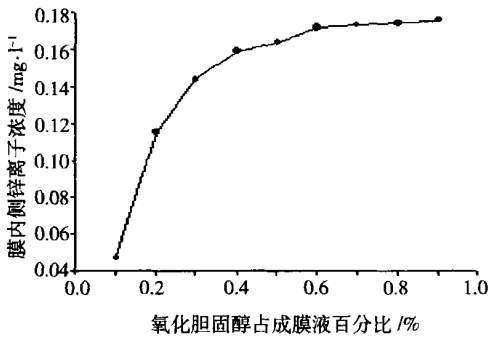


图 3 氧化胆固醇含量对 12h 采样浓度的影响

Fig 3 Effect of oxidated cholesterol on 12h sampled concentration

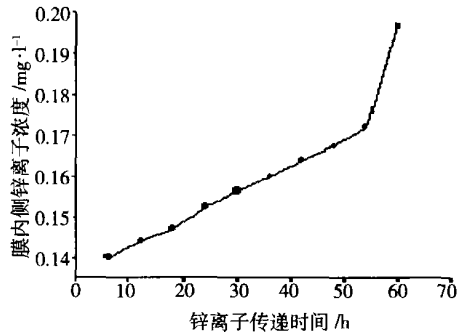


图 4 锌离子浓度与传递时间关系

Fig 4 Relationship between zinc concentration and transporting time

对膜两侧的锌离子浓度差为 $500\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, 膜配方为卵磷脂:氧化胆固醇 = 3:1; 脑磷脂:氧化胆固醇 = 3:1 两组进行实验测定, 每间隔 6h 取样, 两种配方平行实验各三组并取平均值, 按不同取样时间所得数据的平均值分别计算 D 值, 所得结果以及所有 D 的平均值列于表 1, 另外, 做参照数据 $50\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 和 $5000\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, 卵磷脂:氧化胆固醇 = 3:1 的双分子层膜进行理论计算, 并与实验测定值进行比较, 结果如图 5 所示.

表 1 卵(脑)磷脂 D 值的计算结果 (单位为 $\times 10^{-15}\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$)

Table 1 The calculated value of lecithin (cephalin) modulus ($\times 10^{-15}\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$)

D	D_6	D_{12}	D_{18}	D_{24}	D_{30}	D_{36}	D_{42}	D_{48}	D_{54}	$D_{\text{平均}}$
卵磷脂	2.0464	1.5942	1.0872	0.8844	0.7725	0.7061	0.6513	0.6144	0.5854	0.9935
脑磷脂	1.9652	1.6305	1.2025	0.9574	0.8258	0.7625	0.7053	0.6785	0.6038	1.0368

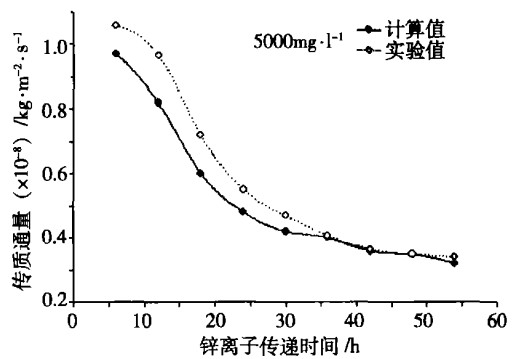
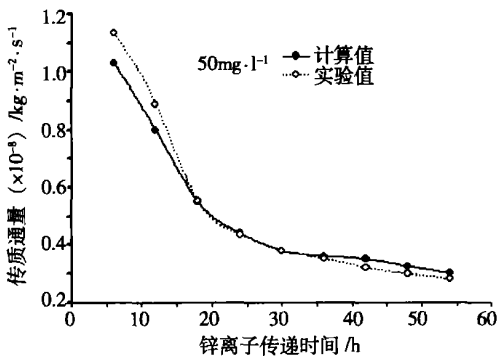


图 5 双分子层脂膜的实验值与计算值

Fig 5 Experimental value and calculated value on bilayer lipid membranes

由表 1 和图 5 可知, 计算值与实验值十分接近, 可以用于锌离子跨细胞膜传递通量的预测计算.

3 结论

成膜配方中以卵磷脂 (脑磷脂) :氧化胆固醇 = 3:1 的效果最好, 成膜时间最长.

Zn^{2+} 传递速度在一定范围内 (氧化胆固醇含量为 40%), 随氧化胆固醇含量增加而增加, 超过这一范围则增加不明显.

卵磷脂(或脑磷脂):氧化胆固醇 = 3:1的传质模型, 其平均参数分别为: $D_{\text{卵磷脂}} = 0.9935 \times 10^{-15} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; $D_{\text{脑磷脂}} = 1.0368 \times 10^{-15} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, 经验证可以用于锌离子跨细胞膜传递通量的预测计算。

参 考 文 献

- [1] 周晴中, 何艳梅, 模拟生物膜的聚合单层、双层和脂质体 [J]. 大学化学, 1994, 9 (1) : 25—30
- [2] 范玉贞, 生物膜脂质液晶的结构、性质及功能 [J]. 生物学教学, 2000, 25 (4) : 2—4
- [3] Rush L Robinson, Alfred Strickholm, Oxidized Cholesterol Bilayers Dependence of Electrical Properties on Degree of Oxidation and Aging [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1978, 509: 9—20
- [4] 田心棣, 人造双分子层膜 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1987, 5—7
- [5] 解玉冰, 马小军, 王毓福等, 生物微胶囊传递模型的研究 [J], 膜科学与技术, 1997, 17 (4) : 51—60
- [6] 陆小华, 王俊, 朱宇等, 分子动力学模拟研究流体微观结构和扩散性质 [J], 南京工业大学学报, 2002, 24 (1) : 7—11
- [7] 朱宪, 路琼华, 李盘生等, 乳状液膜分离 Zn^{2+} 的界面传质阻力及传质模型 [J], 高校化学工程学报, 1996, 10 (1) : 31—35

PREPARATION OF PLANAR BILAYER LIPID MEMBRANES AND ITS APPLICATION FOR RESEARCH ON Zn^{2+} TRANSFER ACROSS BLM

ZHU Xin YE Yu-hui SUN Dang-ru

(School of Environmental and Chemical Engineering, Shanghai University, Shanghai 201800)

ABSTRACT

The planar bilayer lipid membranes (BLM) comprised by oxidated cholesterol and lecithin / cephalin have been made, Its stability and its ion penetrating ability also have been researched. The optimal technics of making membrane was confirmed. The transport process of simulating zinc across the membranes was studied. Finally the adsorption-diffuse model has been founded, the calculated value based on this model tallied basically with the experimental value.

Keywords bilayer lipid membranes, cell membranes, simulation membranes, oxidated cholesterol, zinc ion, mass transfer