

蛋白质、胆固醇对卵磷脂囊泡稳定性的影响

高素君, 徐晓明, 黄铭湘, 蓝 琴, 韩国彬*

(厦门大学化学化工学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 用卵磷脂、胆固醇和蛋白质所形成的囊泡模拟细胞膜, 利用 Langmuir 膜天平、Zeta 电势研究卵磷脂、胆固醇和蛋白质分子之间的相互作用, 以及通过停留法和 TEM 等方法从 Gemini(双子)表面活性剂对细胞膜结构破坏方面来探讨不同组分对囊泡的稳定性的影响. 实验结果表明, 囊泡中的蛋白质、胆固醇和卵磷脂分子之间是相互吸引的. 相对于卵磷脂囊泡, 混合体系囊泡更加稳定. 表面活性剂是通过静电吸引力和疏水效应嵌入囊泡的双分子层中, 导致囊泡被破坏. 通过动力学实验得到 Gemini 表面活性剂对囊泡破坏过程的活化能, 进一步证明加入蛋白质、胆固醇能够使卵磷脂囊泡更加稳定.

关键词: 卵磷脂囊泡; 胆固醇; 牛血清白蛋白; Gemini 表面活性剂

中图分类号: O 648

文献标志码: A

文章编号: 0438-0479(2011)01-0076-06

囊泡是双亲分子有序组合体的一种形式, 它是由密闭的、双亲分子以疏水基对疏水基定向排列的双分子层所形成的球形或者椭球形单室或多室类缔合结构. 细胞膜一般是由磷脂、糖脂等类脂和蛋白质组成, 其中磷脂和糖脂等类脂构成的双分子层是细胞膜的基本骨架, 而蛋白质则定位于表面或包埋于磷脂基质中. 由天然的或合成的磷脂组成的囊泡称为脂质体, 它的结构类似于细胞膜, 是一种模拟细胞膜简单而理想的模型, 具有广泛的应用价值. 通过对它的研究有助于认识许多生命现象, 并且通过表面活性剂对卵磷脂囊泡稳定性的破坏机制研究可以了解表面活性剂对人体是否具有危害; 可以利用模拟细胞膜改变微环境并可作为药物缓释载体等. 可见, 在囊泡的应用中, 都需要囊泡保持稳定, 所以囊泡稳定性的研究对上述可能的应用具有指导作用.

季铵盐型 Gemini 表面活性剂^[1-2] (文中简称 Gemini 表面活性剂) 结构如图 1 所示, 其中 s 表示连接基

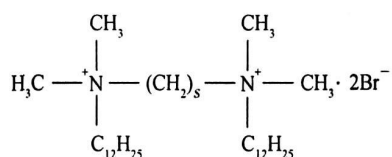


图 1 Gemini 表面活性剂结构图

Fig. 1 Structure of Gemini surfactants

亚甲基的个数, 根据 s 不同可得到不同的 Gemini 表面活性剂 S_s .

牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)是牛血清中的主要蛋白质, 是人们最早发现并对其进行研究的蛋白质之一, 它的性质比较稳定, 在分子生物学和细胞生物学等方面得到了广泛的应用. 基于对分别添加了蛋白质、胆固醇的卵磷脂囊泡与 Gemini 表面活性剂的相互作用的研究成果^[3], 我们将重点研究含有蛋白质、胆固醇的卵磷脂囊泡稳定性.

本文用 Zeta 电势分析仪研究蛋白质 BSA、胆固醇、卵磷脂囊泡及其混合体系的电势关系, 通过 Langmuir 膜天平研究它们的单分子膜在气-液界面的行为和混合物中分子相互作用, 使用停留法探讨 Gemini 表面活性剂对含胆固醇、蛋白质的卵磷脂囊泡结构改变的影响; 并结合透射电子显微镜研究 Gemini 表面活性剂对囊泡的破坏.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

仪器: SS100 超声发生器(美国 Sonix IV 公司); PHS2301 酸度计(厦门分析仪器厂); 微量进样器(上海医用激光仪器厂); Zeta 电势分析仪(美国 Brookhaven 公司); Varian Cary 50 紫外可见分光光度计(美国 Varian 澳大利亚分公司); SFA-20 停流装置(英国 HFTech 公司); N1-2RC 低温循环恒温水槽(杭州博日科技有限公司); LB 膜分析仪(KSV

收稿日期: 2010-05-31

基金项目: 厦门大学科技创新重点基金项目(XMKJCX20052001)

* 通信作者: hangh@xmu.edu.cn

2000-II型, 芬兰); JEM-2100(HR)透射电子显微镜(日本电子公司)。

试剂: 卵磷脂(Sigma Aldrich 公司, 纯度 $\geq 99\%$); 胆固醇(Sigma Aldrich 公司, 纯度 $\geq 99\%$); BSA(上海生工生物工程有限公司, 纯度 $\geq 98\%$); Gemini 表面活性剂, 由本实验室按照文献[4]方法合成, 并用乙酸乙酯-乙醇溶液重结晶3次; 无水乙醇(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 甲醇(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 实验中溶液体相为 Tris-HCl 缓冲液: 0.1 mol/L NaCl 和 0.005 mol/L Tris 溶液用稀盐酸调 pH 值为 7.4; 实验用水为二次去离子水。

1.2 实验过程

1.2.1 卵磷脂囊泡的制备

采用乙醇注射法制备。在搅拌下将卵磷脂的乙醇溶液以 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的速度缓慢注射到 35 $^{\circ}\text{C}$ 恒温的缓冲液中, 继续搅拌 30 min 后冷却至室温, 即制得单分散的卵磷脂囊泡, 其浓度为 1 mmol/L。向制备好的卵磷脂囊泡中通入氮气, 赶出溶解的氧, 密封并在室温下静置 24 h, 以保证形成的囊泡结构稳定。细胞膜的组成因膜的种类不同而有很大差距, 但是一般是由 40% ~ 50% 的类脂和 50% ~ 60% 的蛋白质组成, 我们选取卵磷脂、胆固醇及 BSA 的质量比约为 3:1:6 为实验条件。配置时首先将 BSA 溶解于少量的缓冲液中, 用乙醇定容, 采用上述方式制备囊泡。

1.2.2 Zeta 电势的测定

25 $^{\circ}\text{C}$ 时, 用 Zeta 电势分析仪分别测定 BSA、胆固醇、卵磷脂囊泡、含胆固醇的卵磷脂囊泡溶液和含有胆固醇、BSA 的卵磷脂囊泡溶液的 Zeta 电势以及 S2 溶液、加入 S2 的含有胆固醇、BSA 的卵磷脂囊泡溶液的 Zeta 电势。

1.2.3 单分子膜的表面压-每个分子平均占有面积(π -A)等温线的测定

由于 BSA 不溶于常用铺展剂三氯甲烷, 我们将卵磷脂、胆固醇及 BSA 配制成质量浓度分别为 1.00, 0.333, 2.00 g/L 的甲醇溶液, 其中 BSA 先用少量水溶解, 后用甲醇定容。取适量的 3 种母液配制成卵磷脂、胆固醇、BSA 摩尔比为 44:28.4:1 的混合溶液。先用无水乙醇将 Langmuir 槽(材质为聚四氟乙烯, 内径尺寸 700 mm $\times$ 120 mm $\times$ 10 mm)及滑障清洗干净, 再用二次去离子水冲洗。注满二次去离子水, 用滑障刮水面 3 次, 抽吸, 待膜压小于 0.3 mN/m 时表明杂质被清除干净。用微量注射器取微量溶液均匀地铺在纯水亚相上。亚相温度控制在 (20.0 $\pm$ 0.1) $^{\circ}\text{C}$ 等

待 30 min, 甲醇完全挥发, 溶质在空气-水界面形成单分子膜。滑障以 10 mm/min 的速度从两侧压缩表面膜, 用 Wilhelmy 吊片法测量其表面压并绘制 π -A 等温线。

1.2.4 停流法

用紫外分光光度计扫描, 确定含胆固醇、BSA 的卵磷脂囊泡溶液的最大吸收波长, 实验结果表明该溶液在 280 nm 处有较大的吸收。在温度分别为 25, 30, 35, 40, 45 $^{\circ}\text{C}$ 的情况下, 利用停流装置将囊泡溶液和 S2 溶液(1 mmol/L)快速等体积混合, 并在波长为 280 nm 处检测体系的相对浊度随时间的变化, 从而计算出反应的表现速率常数和活化能。

1.2.5 负染色法透射电镜

为了观察 Gemini 表面活性剂对含有 BSA、胆固醇的卵磷脂囊泡的破坏, 我们用负染色法观察囊泡形貌。待溶液混合相应时间后, 用滴管吸取混合液滴于铜网上, 用滤纸吸去余液, 然后滴加 2% (质量分数) 磷钨酸进行染色, 4 min 后吸去多余的染液, 烘干, 用 JEM-2100 透射电镜观察 Gemini 表面活性剂对囊泡的作用。

2 理论部分

混合单分子膜中各组分之间相容性的相互作用, 可以类比不完全相容、部分相容或不相容。通过相同表面压下的混合单分子膜的面积与非混合、纯组分单分子膜的面积得到过剩面积 $A_{\text{exc}}^{[5]}$

$$A_{\text{exc}} = A_{12} - (A_1 X_1 + A_2 X_2). \quad (1)$$

式中 A_{12} 是混合单分子膜中每个分子所占平均面积, A_1 、 A_2 是相同表面压下组分 1、2 单独铺展单分子膜平均占有面积, 它们都由对应的 π -A 等温线获得, X_1 、 X_2 是组分 1、2 在混合膜中的摩尔分数。

根据过剩面积 A_{exc} , 可以判断混合膜中各物质之间的作用力^[6]: 若 $A_{\text{exc}} = 0$, 表现为混合膜中异种分子之间的相互作用与它们各自相同分子之间的相互作用相同, 两物种为理想混合或者完全不相容; 若 $A_{\text{exc}} < 0$, 与同种分子之间的相互作用相比, 混合膜中异种分子之间主要表现为相互吸引; 若 $A_{\text{exc}} > 0$, 混合膜中异种分子之间主要表现为相互排斥。

压缩模量 ϵ 反映混合单分子膜中分子间的相互作用^[7], 其数值的大小表示单分子膜所处的相态:

$$\epsilon = -A \frac{d\pi}{dA}. \quad (2)$$

当 12.5 mN/m $< \epsilon < 50$ mN/m 时为液相扩张态,

100 mN/m < ε < 250 mN/m 时为液相凝聚态, 250 mN/m < ε 时为固态膜^[8].

囊泡破坏的停流曲线是呈现出单指数衰减的形式, 因此可以按照准一级反应来处理, 用表观速率常数 k_{app} 来作为反应的速率常数. 一级反应进行数据处理公式为^[9]:

$$\ln\left(\frac{\tau_{\infty} - \tau_t}{\tau_{\infty} - \tau_0}\right) = k_{app} t. \quad (3)$$

式中, τ_{∞} 表示平衡时的浊度, τ_0 、 τ_t 为体系在起始和 t 时刻时的浊度. 以 $\ln[(\tau_{\infty} - \tau_t)/(\tau_{\infty} - \tau_0)] \sim t$ 作图, 从直线的斜率可得出反应的表现速率常数.

3 结果与讨论

3.1 胆固醇、BSA 对卵磷脂囊泡 Zeta 电势的影响

图 2 中的 a, d, c, b 分别是卵磷脂囊泡、胆固醇、BSA 及其三者混合体系的电势分布图. 从图中可以看到, 它们的 Zeta 电势依次为 -24.57, 4.13, -13.88, -20.38 mV. 在之前的研究中^[3], 我们已经测定了卵磷脂与胆固醇, 卵磷脂与 BSA 混合膜的 Zeta 电势, 如表 1 所示.

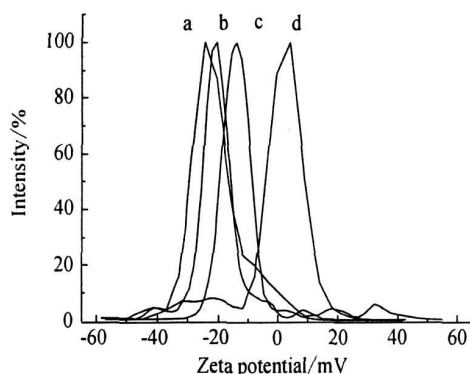


图 2 25 °C 卵磷脂(a)、胆固醇(d)、BSA(c) 及其混合溶液(b) 的 Zeta 电势

Fig. 2 Zeta potential distribution of pure phosphatidylcholine(a), cholesterol(d), BSA (c) and their mixture (b) at 25 °C

表 1 卵磷脂、胆固醇、BSA 不同混合物 Zeta 电势

Tab. 1 Comparison of the Zeta potential of different mixtures

物质	Zeta 电势/ mV
卵磷脂/ 胆固醇	- 4.89
卵磷脂/ BSA	- 25.38
卵磷脂/ 胆固醇/BSA	- 20.38

相对于纯卵磷脂囊泡, 加入胆固醇后电势明显正移, 说明胆固醇与卵磷脂存在静电作用, 而带负电的 BSA 的加入并没有使 Zeta 电势有较大的改变, 这表明静电不是主要作用力, 其原因可从蛋白质复杂的三维结构考虑: BSA 分子中存在着 3 个区域: I、II、III 区域有效电荷分别为 -10、-8 和 0 C^[10], 分子内部都存在疏水腔, 棕榈酸、油酸分子等就是通过与区域 II 和疏水腔发生相互作用^[11-12]. 卵磷脂主要通过疏水作用与 BSA 相互吸引. 当这 3 组分混合后所形成的囊泡时, 其电势为 -20.38 mV, 说明混合囊泡中 3 组分是通过静电和疏水相互作用.

3.2 单分子膜的 π -A 等温线

图 3 中的 a, c, d, b 分别是 20 °C 时胆固醇、卵磷脂、BSA 与三者混合体系 20 °C 时在纯水亚相上的 π -A 等温线. 图 4 为混合物分子膜的 ε -A 曲线. 表 2 列出了该体系单分子崩溃压(π_c)、斜率最大处做切线得到的对应分子表观极限面积(A_0)的参数.

图 3 中, 随着滑障的挤压, 表面压不断增加. 以 3 组分混合膜(b) 为例, 体系在 44.92 mN/m 时崩溃, 该曲线表面压力在 0~18 mN/m (对应 0.54~0.80 nm²), 18~29 mN/m, 29~43 mN/m (对应 0.24~0.33 nm²) 3 个阶段表现出气态-液态扩张-液态凝聚的转变, 成膜分子的疏水链由平卧水面逐渐直立, 对应于液态扩张膜、转变膜、液态凝聚膜, 与典型的 π -A 等温线特征相符. 图 4 可见, 随着表面压增加, 弹性模量随之改变, 各个阶段的成膜分子具有不同的排列取向, 表现出相应的抗形变能力变化趋势. 在分子面积为 0.27 与 0.58 nm² 附近分别达到两个峰值, 即在 0.58 nm² 处膜的刚性较大, 分子以一种相对稳定且紧密的方式存在, 可认为形成了液态扩张膜; 随着压缩进行,

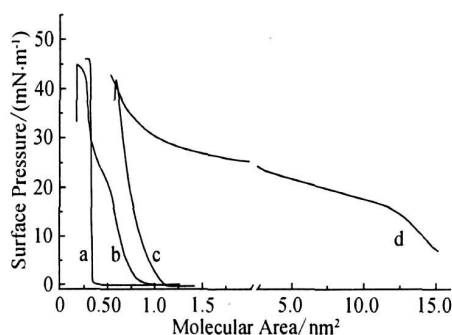


图 3 20 °C 胆固醇(a)、卵磷脂(c)、BSA(d) 及三者混合溶液(b) 的 π -A 曲线

Fig. 3 π -A isotherms of the monolayer of pure cholesterol (a), phosphatidylcholine(c), BSA (d) and their mixture (b) at the air-water interface at 20 °C

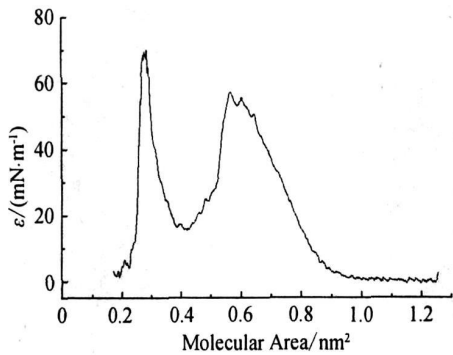


图 4 20 °C 胆固醇、卵磷脂、BSA 混合物的单分子膜的 $\varepsilon \sim A$ 曲线

Fig. 4 εA isotherms for the mixture of cholesterol, phosphatidylcholine and BSA at 20 °C

表 2 25 °C 时 BSA、卵磷脂、胆固醇单分子膜 $\pi \sim A$ 曲线的特征参数

Tab. 2 The basic information of the the $\pi \sim A$ isotherms at 25 °C

物质	$\pi_c / (\text{mN} \cdot \text{m}^{-1})$	A_0 / nm^2
卵磷脂	45.38	0.79
胆固醇	46.08	0.35
BSA	43.10	1.50
三者混合物	44.92	0.42

弹性模量减小,说明膜的相对稳定性减弱,分子呈现又一次无序取向,当平均分子面积减小到 0.27 nm² 时,弹性模量达到最大值 70.2 mN/m,此对应于更为稳定的液态凝聚膜。

在表面压为 27, 10 mN/m 处,我们通过 $\pi \sim A$ 等温线计算得到的过剩面积分别为 $A_{exc} = -0.15, -0.12 \text{ nm}^2$, 均为负值,说明在高表面压和低表面压下,BSA、胆固醇和卵磷脂之间是相互吸引的^[6, 13]。根据实验结果和文献可推测出 3 组分之间的作用机制为:胆固醇的羟基是与卵磷脂极性头基相互作用,而蛋白质疏水性区域是与卵磷脂和胆固醇相互作用,由于 3 组分的碳氢链作用以及疏水相互作用,削弱了卵磷脂分子酯酰链的旋转异构化运动^[14-15],从而提高了膜的稳定性。

3.3 浊度的测定及活化能的求算

图 5 为不同温度下,含胆固醇、BSA 的卵磷脂囊泡/S2 体系的相对浊度随时间变化曲线。进行实验时,囊泡处于稳定期,其浊度保持一定,并随着温

度的升高而略有上升,相对于 25 °C, 25~ 45 °C 温度范围内每升高 5 °C, 浊度依次升高 0.048 2, 0.043 7, 0.039 0, 0.035 5。加入 S2 后, S2 对囊泡的破坏作用导致浊度变化。在 0~ 5 min 内体系浊度变化很明显。以 25 °C 浊度变化曲线为例分析,这段过程可以大致分为 I、II、IIB 个阶段。在 0~ 2.5 min 的 I 阶段中,随着表面活性剂浓度瞬间增加,表面活性剂嵌入到卵磷脂囊泡双分子层的外层中,使囊泡变大,甚至可能融合,散射光强度升高。在 2.5~ 4 min 的 II 阶段中,当囊泡吸附表面活性剂达到一定量后,散射光强度快速下降,这可能是由于 S2 分子的性质与胆固醇、BSA、卵磷脂的性质相差较大,导致 S2 分子并不是均匀地分散于膜中,而是出现了“局部相分离”的情况,从而破坏囊泡,使其分裂为较小的囊泡。到 IIB 阶段后,浊度是先升高后略为下降,可认为是生成的小囊泡增大-破裂的过程,直至最后基本保持不变。从 Zeta 电势方面来看, S2 溶液 Zeta 电势为 9.17 mV, S2 与卵磷脂、胆固醇、蛋白质囊泡混合后体系电势达到 22.27 mV, 与文献 [16] 相符,表明表面活性剂与囊泡结合后中和了表面的负电荷,甚至将表面电势变正,加强了分子间的静电作用,有可能发生囊泡的融合,最终导致囊泡增大一分裂过程。分裂过程中,根据阿累尼乌斯公式 $\ln k = \ln A - (E_a/RT)$, 其中 k 为反应温度 T 时的反应速率常数, E_a 为反应的活化能,以 $\ln k \sim 1/T$ 作图,在 2.5~ 4 min 时间内,由直线的斜率得出活化能 E_a 为 33.75 kJ/mol。

表 3 为含有胆固醇、BSA 的卵磷脂囊泡与 S2 相互作用在 2.5~ 4 min (囊泡的破坏) 过程中的反应速率常数; 温度越高, 反应速率越大, 这与一般化的

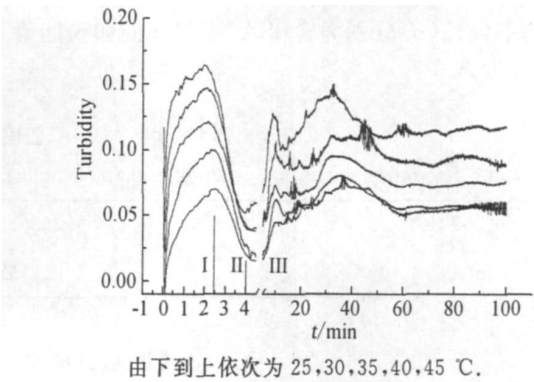


图 5 不同温度下含 BSA、胆固醇的卵磷脂囊泡/S2 体系相对浊度随时间变化

Fig. 5 Turbidity as a function of time for phosphatidylcholine vesicle (with cholesterol and BSA) / S2 at different temperature

学反应的动力学性质相似. 表 4 为各不同混合组分形成的囊泡/ S2 体系反应动力学求得的囊泡破坏的活化能^[3]. 与纯卵磷脂囊泡/ S2 组分的活化能 18. 39 kJ/mol 相比, 加入胆固醇或 BSA 的囊泡活化能都较大, 说明添加了 BSA 或胆固醇的卵磷脂囊泡更不容易被表面活性剂破坏. 但卵磷脂+ 胆固醇/ S2 体系的活化能大于卵磷脂+ BSA/ S2 体系的活化能, 表明卵磷脂+ 胆固醇的混合囊泡的稳定性大于卵磷脂+ BSA 的混合囊泡. 根据上述的实验结果, 胆固醇是通过静电作用、尾链相互作用分布在卵磷脂双分子层中, 使卵磷脂囊泡更稳定. 当卵磷脂+ 胆固醇的混合囊泡与 S2 反应时, 由于此囊泡界面的负电性较小(Zeta 电势为 - 4. 89 mV), 它与 S2 之间的静电作用力较弱, 此外, 卵磷脂+ 胆固醇的混合囊泡中的带正电荷的卵磷脂分子对 S2 有静电排斥作用, 从而使得 S2 分子较难进入到混合囊泡的双分子层中, 反应活化能较高. 对于卵磷脂+ BSA 的混合囊泡, 囊泡界面的负电性较大(Zeta 电势为- 25. 38 mV), 它与 S2 之间的静电作用力较强, 这有利于 S2 吸附在囊泡界面上并进入到囊泡的双分子层中, 反应活化能较小. 而对于 3 组分混合囊泡, 胆固醇+ BSA + 卵磷脂的混合囊泡的 Zeta 电势为 - 20. 38 mV, 其值介于卵磷脂+ 胆固醇混合囊泡和卵磷脂+ BSA 混合囊泡的 Zeta 电势之间. 从表 1 和表 4 可见, 囊泡的 Zeta 电势越负, 活化能越小. 同时, BSA 等电点约为 4. 9, 在本实验条件下, BSA 结构较为舒展且整体电势为负, 增加了 S2 在囊泡表面的吸附. 总之, 正电荷的 S2 与混合囊泡的相互作用是先以静电吸引力为主, 然后以疏水效应使 S2 分子进入到囊泡的双分子层中, 破坏其稳定性.

3. 4 透射电镜观察结果

图6中(a)、(b)分别为含BSA、胆固醇的卵磷脂囊

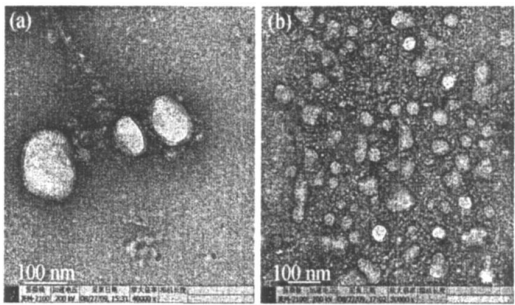


图 6 含有 BSA、胆固醇的卵磷脂囊泡(a)和囊泡与 S2 混合 20 min 后(b)制样的图像

Fig. 6 The phosphatidylcholine vesicle containing BSA and cholesterol (a); after 20 min with S2 (b)

泡及其与 S2 混合 20 min 后制样, 观察到的电镜图, 图片右下角比例尺均为 100 nm. 未混合前, 囊泡粒径约 100 nm 呈现双分子层结构, 加入 S2 后, 大囊泡转变为粒径较小的囊泡. 根据浊度测定的结果, 卵磷脂、胆固醇、BSA 的囊泡最终被破坏为粒径更小囊泡. 其原因是 S2 分子特征吸附于囊泡表面并且不均匀地嵌入双分子层中, 这种“局部相分离”的情况, 破坏了大囊泡的稳定性, 形成了囊泡双分子层中“局部相分离”现象较不明显的小囊泡.

4 结 论

本文用卵磷脂、胆固醇和 BSA 所形成的囊泡模拟细胞膜. 卵磷脂、胆固醇和 BSA 分子通过极性头基之间、疏水尾链之间的相互作用而吸引. 它们的 Zeta 电势依次为- 24. 57, 4. 13, - 13. 38 mV, 表明 BSA、胆固醇、卵磷脂间存在静电吸引. 单分子膜过剩面积在较低表面压和较高表面压下均为负值, 即 3 种组分存在吸引力. 表面活性剂是通过静电吸引力和疏水效应进入到囊泡的双分子层中, 破坏了囊泡的稳定性, 从破坏动力

表 3 不同温度下含 BSA、胆固醇的卵磷脂囊泡/ S2 反应速率常数

Tab. 3 The rate constant of system phosphatidylcholine vesicle with cholesterol and BSA/ S2 at different temperature

T(K)	298. 15	303. 15	308. 15	313. 15	318. 15
ln(<i>k</i> _{app} / s ⁻¹)	0. 3019	0. 3752	0. 4460	0. 5436	0. 7324

表 4 卵磷脂、胆固醇、BSA 不同混合物/ S2 的活化能比较

Tab. 4 Comparison of the activation energy of different mixed system of phosphatidylcholine, cholesterol and BSA mixed with S2

物质	卵磷脂/ S2	卵磷脂+ 胆固醇/ S2	卵磷脂+ BSA/ S2	卵磷脂+ 胆固醇+ BSA/ S2
<i>E</i> _a (kJ· mol ⁻¹)	18. 39	36. 22	29. 63	33. 75

学得到的活化能表明: 加入 BSA、胆固醇的卵磷脂囊泡稳定性处于单独加入 BSA 和胆固醇的卵磷脂囊泡之间, 相对于卵磷脂囊泡, 加入胆固醇和 BSA 可以增加体系的稳定性.

参考文献:

- [1] Menger F M, Littau C A. Gemini surfactants: synthesis and properties[J]. J Am Chem Soc, 1993, 113: 1451-1452.
- [2] Zana R, Xia J D. Gemini surfactants[M]. New York: Marcel Dekker Inc, 2004.
- [3] 蓝琴. 胆固醇和蛋白质对卵磷脂囊泡稳定性的影响研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2009.
- [4] Zana R, Benraou M, Rueff R. Alkanediyl- α , ω -bis(dimethylalkyl ammonium bromide) surfactants. 1. Effect of the spacer chain length on the critical micelle concentration and micelle ionization degree[J]. Langmuir, 1991, 7: 1072-1075.
- [5] Chou T H, Chang C H. Thermodynamic characteristics of mixed DPPC/DHDP monolayers on water and phosphate buffer subphases[J]. Langmuir, 2000, 16: 3385.
- [6] Zou G, Fang K, He P S. Study of molecular interaction in the mixed film of arachidic acid and metal bis(diketonate) complexes by the "surface ions" method[J]. Colloid Interface Sci, 2003, 261: 411-416.
- [7] Fang K, Zou G, He P S, et al. Thermodynamic characterization of mixed monolayers of phosphatidylcholine and arachidic acid on different subphases[J]. Colloids Surf A, 2003, 224: 53-63.
- [8] Davies J T, Rideal E K. Interfacial phenomena[M]. New

York: Academic Press, 1963: 265.

- [9] Brinkmann U, Neumann E, Robinson B H. Thermodynamics and kinetics of vesicle mixed micelle transitions of sodium tridecyl 6-benzene sulfonate and sodium dodecyl sulfate surfactant systems[J]. J Chem Soc, Faraday Trans, 1998, 94: 1281-1285.
- [10] Berde C B, Hudson B S, Simoni R D, et al. Human serum albumin. Spectroscopic studies of binding and proximity relationships for fatty acids and bilirubin[J]. J Biol Chem, 1979, 254(2): 391-400.
- [11] Reed R G, Feldhoff R C, Clute O L, et al. Fragments of bovine serum albumin produced by limited proteolysis. Conformation and ligand binding[J]. Biochemistry, 1975, 14: 4578-4583.
- [12] 陆明刚, 吕小虎. 分子光谱分析新法引论[M]. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 1993: 79.
- [13] 周栋梁, 杨红伟, 朱谱新, 等. 季铵盐型双子表面活性剂与十八醇的混合单分子膜[J]. 高等学校化学学报, 2007, 28(5): 932-935.
- [14] 杨小乐, 孙润广, 张静. LB膜与 AFM 技术研究磷脂酰乙醇胺单分子膜结构[J]. 液晶与显示, 2006, 21(4): 348-355.
- [15] Bos M, Nylander T, Arnebrant T, et al. Food emulsifiers and their applications[M]. New York: Chapman and Hall, 1997: 95.
- [16] 张春艳, 徐晓明, 吴章锋, 等. 季铵盐表面活性剂与卵磷脂囊泡相互作用的研究[J]. 化学学报, 2005, 63(6): 450-454.

Effect of Protein and Cholesterol on the Phosphatidylcholine Vesicle

GAO Su-jun, XU Xiao-ming, HUANG Ming-xiang,

LAN Qin, HAN Guo-bin*

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Biological membrane with phosphatidylcholine, cholesterol and protein (bovine serum albumin, BSA) was simulated. The mixed monolayer at the air/water interface of phosphatidylcholine, cholesterol and BSA was investigated by Langmuir balance technique. The Zeta potential of cholesterol, phosphatidylcholine, BSA and their mixtures were investigated. The excess area of mixed monolayer and Zeta potential showed that there were interactions of mutual attraction among phosphatidylcholine, cholesterol and BSA. The interactions made the mixed vesicle more stable. The effect of cholesterol and BSA on the structure transformation of phosphatidylcholine vesicle was studied by means of kinetic and TEM. Gemini surfactants intercalated the bilayer via electrostatic interaction and hydrophobic effect and made the vesicle breakdown as a result. The E_a was calculated from the change of turbidity at 25, 30, 35, 40 and 45 °C. Comparing with previous results, the E_a of phosphatidylcholine, cholesterol and BSA was larger than phosphatidylcholine vesicle, and between those of phosphatidylcholine vesicle with cholesterol and phosphatidylcholine vesicle with BSA. On the other hand, it indicated that the phosphatidylcholine vesicles with cholesterol and/or BSA were more stable to Gemini surfactants than phosphatidylcholine vesicle and harder to be broken down.

Key words: phosphatidylcholine vesicle; cholesterol; BSA; Gemini surfactant