

鞘氨醇/胆固醇单层分子膜的热力学特性及表面形态的 AFM 观测

郝长春^①, 孙润广^{①*}, 张静^②, 常怡光^①, 牛春玲^①

① 陕西师范大学物理学与信息技术学院生物物理与生物医学工程研究室, 西安 710062;

② 陕西师范大学食品工程与营养科学学院, 西安 710062

* 联系人, E-mail: sunrunguang@snnu.edu.cn

收稿日期: 2008-06-16; 接受日期: 2008-08-07

国家自然科学基金项目(批准号:20772077)和教育部科学技术研究重点项目(批准号:104167)资助

摘要 脂筏是近年来在生物膜研究中发现的一种富含鞘脂、胆固醇和特殊蛋白质的动态微区结构, 其结构和功能的改变, 会引发多种疾病. 本文利用 LB 膜技术模拟脂筏的动态微区结构, 通过测量表面压力与平均分子面积(π - A)曲线数据, 计算出鞘氨醇/胆固醇 LB 单层膜的过量分子面积 (ΔA_{ex})、表面过量吉布斯自由能 (ΔG_{ex})、活度系数(f_1 和 f_2)以及弹性模量 (C_s^{-1}), 系统的研究了二元组份混合单层膜的热力学特性, 并用原子力显微镜对鞘氨醇与胆固醇混合膜的形态进行观察. 热力学分析表明过量分子面积和过量吉布斯自由能相对理想状态都具有负偏差作用, 这说明分子间相互作用表现为吸引力, 且单层膜的稳定性、弹性模量和活度系数的数值明显的依赖于胆固醇与鞘氨醇的比例. AFM 观察结果表明, 纯鞘氨醇单分子膜表现为小的颗粒体结构; 当鞘氨醇与胆固醇按不同摩尔比混合时, 随着胆固醇摩尔比例的增加, 混合膜呈现出从链状结构向较大的片层与网状共存结构的转化. 最终纯胆固醇形成高度紧密的膜结构. AFM 实验有力的支持了理论分析的结果.

关键词

单层膜
过量吉布斯自由能
活性系数
弹性模量
原子力显微镜

脂筏(lipid rafts)微区是近年来对生物膜研究中发现的一种富含鞘脂、胆固醇和特殊蛋白质的动态结构^[1~4]. 这些微区介于液晶相与凝胶相之间, 游动于磷脂酰胆碱 (PC)和磷脂酰乙醇胺 (PE)为骨架的液晶态双层膜中, 是生物膜不被去垢剂所溶解的部分, 又称 detergent-insoluble glycolipid-rich domains (DIGs), 或称detergent-resistant fractions (DRF). 研究结果表明, 脂筏含有大量的信号分子^[5,6], 可以参与信号转导、蛋白质分选、离子通道的调节、膜的粘连、细胞的生长、分化、衰老、凋亡以及应急反应. 它们

结构和功能的改变, 会引发多种疾病, 如肿瘤、糖尿病、神经退行性疾病(如老年痴呆症, 帕金森氏症, 阿尔兹罕默氏病等)^[7,8]. 因此, 对脂筏结构和功能的研究不仅对于阐明生物膜微区结构的形成机制具有重要的意义, 而且对于理解信号传导途径等生物过程并进一步指导临床实践均有重要的意义, 已成为该领域近年来的热点问题之一.

体外模拟组装生物膜是理解脂筏微区结构形成的有效途径, 脂筏中胆固醇与鞘脂间的相互作用是形成微区结构的基础, 目前国内外研究人员在此方面

已经做了大量的工作^[9-11],但是在脂筏的尺寸、结构的稳定性、组成成份和物理属性等方面仍然存在许多亟待解决的问题.鞘氨醇(sphingosine)是体内合成鞘脂、鞘磷脂、鞘糖脂(如脑苷脂、神经节苷脂等)的母体化合物,也是鞘磷脂酶水解细胞膜鞘磷脂的产物,可作用于PKC调节区的二酰基甘油结合位点,竞争性地抑制二酰基甘油对PKC的激活作用,是生物膜中重要的组份之一^[12-14].鞘氨醇作为鞘磷脂合成的前体化合物在合成鞘脂物质过程中有可能与生物膜中胆固醇发生相互作用形成脂筏,所以系统的研究胆固醇与鞘氨醇间的相互作用对于研究脂筏结构的形成机制具有重要的生物学意义.

Langmuir-Blodgett(LB)膜技术是一种能精确控制薄膜厚度和分子排列的制备技术,是比较理想的单分子膜制备方法^[15,16].通过表面压力与平均分子面积(π - A)曲线数据可以计算出在一定膜压下的平均分子面积、过量吉布斯自由能、压缩系数等参数,用来分析二元组份的混合性和表征单层膜的稳定性.国外研究人员用类似的方法研究了制霉菌素、硬脂酸、油酸、亚麻酸、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)等与胆固醇类物质(胆固醇、胆甾醇、豆固醇)间的相互作用^[17-20],对鞘氨醇与胆固醇间相互作用未见报道,所以本文系统的对胆固醇与鞘氨醇间的相互作用进行了研究,通过计算胆固醇与鞘氨醇二元组份单层膜的平均分子面积、过量吉布斯自由能、压缩模量和活度系数,分析了两组份间的相互作用和热力学行为并在理论分析的基础上用AFM检测了单层膜的形态学特征.

1 实验材料与方法

1.1 材料与试剂

神经鞘氨醇(D-Sphingosine)和胆固醇(cholesterol from porcine liver, Chol)均是从Sigma化学试剂公司购买,氯仿、酒精等其他有机和无机化学试剂均为分析纯.水为离子交换二次蒸馏水.

1.2 混合脂单层膜的表面压力-平均分子面积(π - A)曲线

将不同比例的鞘氨醇与胆固醇成份溶解在氯仿/甲醇(3:1, V/V)中形成浓度为 0.5 mg/mL 的溶液 LB

膜用 KSV-Minitrough (芬兰 KSV 公司,槽子: 323 mm×75 mm)进行制备.用微量进样器将适量的溶液均匀的滴加到纯水亚相表面,让其自动迅速铺展,静置 15 min,待亚相上有机溶剂完全挥发后,以 10 mm/min 的速度压膜.膜表面压由 Wilhelmy 吊片式天平检测,测量精度为 0.01 mN/m. π - A 曲线由计算机控制自动获得.每组数据最少重复三次,本文数据为最具代表性的三组数据的平均值,每点的表面压力变化范围在 ± 1 mN/m.在固定的膜压下,使用垂直提膜法以 1 mm/min 的速度将单分子层转移到新解离的云母基片上,用 AFM 进行检测.成膜温度控制在 $(20 \pm 0.5)^\circ\text{C}$.

1.3 原子力显微镜检测

脂单层膜用高分辨率的原子力显微镜(日本岛津公司:SPM-9500-J3)进行检测.测量采用接触模式,整个实验观测过程是室温下进行测量.所采用的是标准扫描头,针尖材料为 Si_3N_4 ,悬臂的弹性常数为 0.06 N/m,对样品作用力控制在 10^{-8} N 量级,图片像素点收集为 512×512.扫描速度为 0.5~1 Hz.

2 结果与讨论

2.1 不同比例的鞘氨醇与胆固醇单分子膜的 π - A 曲线

图 1 给出了不同比例的鞘氨醇/胆固醇单分子膜在纯水亚相表面上表面压力-平均分子面积(π - A)等温线.从图中可以看出随着鞘氨醇比例的增加, π - A 曲线呈现规律性排列,脂混合物单层膜曲线介于两种单一脂成分之间.对于胆固醇单一组份,表面压力增加较快,胆固醇分子刚性骨架及其疏水性促进了单分子膜具有较高的抗挤压能力,这与后面的压缩性分析数据相一致,在膜压为 $34.86 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ 时,单层膜发生了褶皱,出现了一个明显的平台区域,该特征与参考文献相一致^[21].随着鞘氨醇在混合脂中比例的增加,当 $X_{\text{D-Sph}}=0, 0.2, 0.4$ 时, π - A 曲线的平台区域的出现在相同的表面压力处,并且平台区域逐渐减小,单层膜发生褶皱的位置对应的平均分子面积逐渐缩小,崩溃终极膜压逐渐增大.当鞘氨醇的比例含量增大到 $X_{\text{D-Sph}}=0.6$ 以上(包括 $X_{\text{D-Sph}}=0.6$),平台特征消失,表明两组份间发生了相互作用.

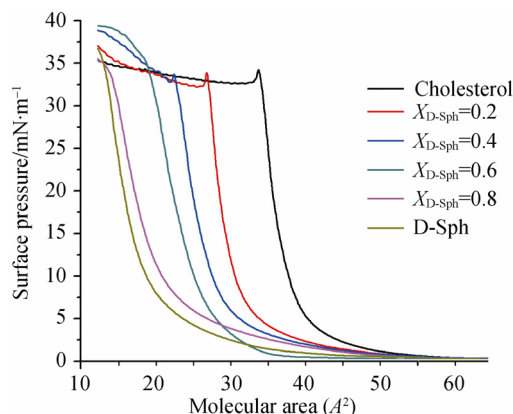


图 1 鞘氨醇/胆固醇单层膜的表面压力-分子面积(π - A)等温线

2.2 不同比例的鞘氨醇与胆固醇单分子膜混合性分析

在 π - A 曲线的基础上, 两组分间的相互作用可以用单层膜的混合性方程^[17]来研究. 对于理想混合情况,

$$A_{12,\text{ideal}} = (A_1)_\pi X_1 + (A_2)_\pi X_2, \quad (1)$$

式中 $A_{12,\text{ideal}}$ 表示两种成份理想混合的平均分子面积, A_1 , A_2 分别是一定膜压下单一组份的分子面积, X_1 , X_2 分别是 1 和 2 组份在混合脂中的比例含量. 数据处理中 $A_{12,\text{exp}}$ 表示的为实验中获得的平均分子面积数据, 对其进行分析可以获得单层膜的混合性以及分子间的相互作用.

当两种组份可以混合时, 单层膜分子面积数据就会表现出非理想行为, 与理想数值就会出现偏差. 在图 2 中给出了表面压力 $\pi = 5, 10, 15, 20, 25$ 和 $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ 情况下, 平均分子面积随着鞘氨醇含量逐渐增加的混合脂单层膜实验数据. 从图中可以看出, 平均分子面积随着鞘氨醇含量的增加并不是呈线性关系, 由此可以判断鞘氨醇与胆固醇在所研究的比例范围内分子间发生了相互作用.

两组份的混合性也可以通过分析过量分子面积 ΔA_{ex} 来进行研究^[22,23]. ΔA_{ex} 计算公式如下:

$$\Delta A_{\text{ex}} = A_{12,\text{exp}} - A_{12,\text{ideal}}, \quad (2)$$

当两种组分不可混合时, ΔA_{ex} 为零. 如果实验值与理想值出现了负偏差则表明分子间的相互作用为吸引

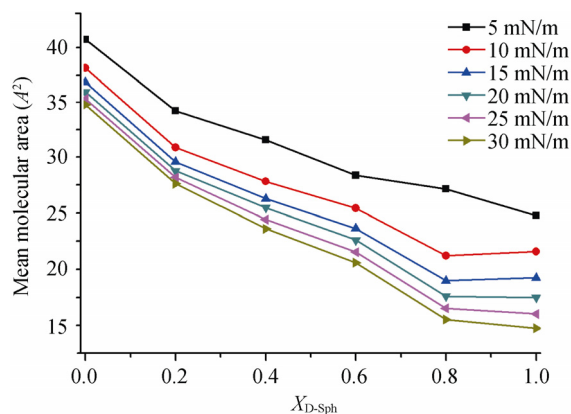


图 2 鞘氨醇/胆固醇混合脂单层膜在固定的表面压力下平均分子面积

力, 相反, 如果出现了正偏差, 则分子间的相互作用为排斥力^[24]. 实验中鞘氨醇与胆固醇单层膜在不同的表面压力下都出现了负偏差如图 3, 说明两种分子间表现为吸引力, 同时分子间的力促使单层膜出现聚集现象, 这与后面的 AFM 观测相一致. 在所研究的膜压下(除了 $5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$)对所研究的比例范围过量分子面积的最大值出现的位置相同, 均出现在 $X_{\text{D-Sph}} = 0.2, 0.8$ 位置处, 说明在此位置两种分子发生相互作用较强, 凝聚效应较为明显. 过量分子面积在 $5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ 时与其他膜压的极值位置有所不同, 数值分析可以看出在该点仍为负偏差, 说明了分子间发生了吸引的相互作用. 在表面压力较低的情况下, 两组份分子间的距离相对较远, 分子间仅部分发生相互作用致使曲线在该处出现异常.

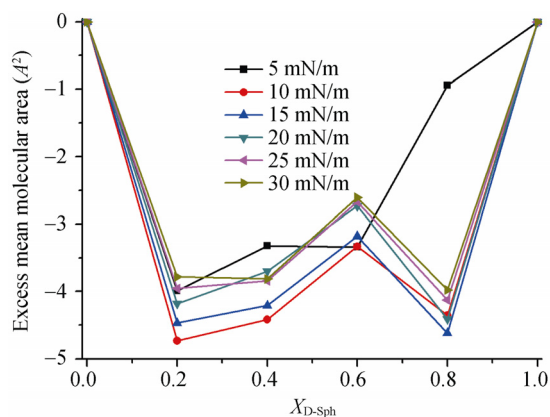


图 3 鞘氨醇/胆固醇混合脂单层膜在固定的表面压力下过量分子面积

2.3 不同比例的鞘氨醇与胆固醇单分子膜稳定性分析

鞘氨醇与胆固醇单层膜间相互作用的热力学稳定性可以通过计算过量吉布斯自由能进行研究^[25]. 两组份混合的吉布斯自由能的变化 ΔG_{mix} 等于理想状况下的自由能加上过量的自由能变化, 如方程 3 所示:

$$\Delta G_{\text{mix}} = \Delta G_{\text{ideal}} + \Delta G_{\text{ex}}. \quad (3)$$

对理想的混合吉布斯能量变化仅涉及到熵, 公式为

$$\Delta G_{\text{ideal}} = RT(X_1 \ln X_1 + X_2 \ln X_2), \quad (4)$$

式中 X_i ($i=1,2$) 代表单一组份在混合脂中的摩尔比例, R 为气体常数 T 为绝对温度. 因此, 过量的吉布斯能量可以通过下式表达:

$$\Delta G_{\text{ex}} = \int_0^\pi [A_{12} - (X_1 A_1 + X_2 A_2)] d\pi, \quad (5)$$

式中 A_{12} , A_1 和 A_2 分别代表的是混合物、组份 1 和组份 2 的分子面积, π 表示单层膜的表面压力, 如果单层膜是理想混合的, ΔG_{ex} 应为零^[18].

通过方程 5 可以计算出各种状态下的过量吉布斯能量值. 图 4 给出了表面压力 $\pi=5, 10, 15, 20, 25$ 和 $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ 时 ΔG_{ex} 对鞘氨醇摩尔含量变化的数据. 从图可以看出随着表面压力的增加, ΔG_{ex} 负值也越小, 对不同的表面压力极值位置不同. 当表面压力 $\pi=5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ 时, 最小值出现在 $X_{\text{D-Sph}}=0.2$ 位置处, 对于 $\pi=5, 10, 15, 20$ 和 $25 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ 时, ΔG_{ex} 最小值在 $X_{\text{D-Sph}}=0.2, 0.8$ 两位置处, 在 $\pi=30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ 时, $X_{\text{D-Sph}}=0.2, 0.4, 0.8$ 都出现了较小的负值. 在所选择的比例下, 所有的膜压位置都表现为负值, 这表明分子间的相互作用的吸引力比单一成份强, 而排斥力比单一成分弱, 并且 ΔG_{ex} 值越小越稳定^[17].

通过正规溶液理论可知活度系数 f_i 可以反映分

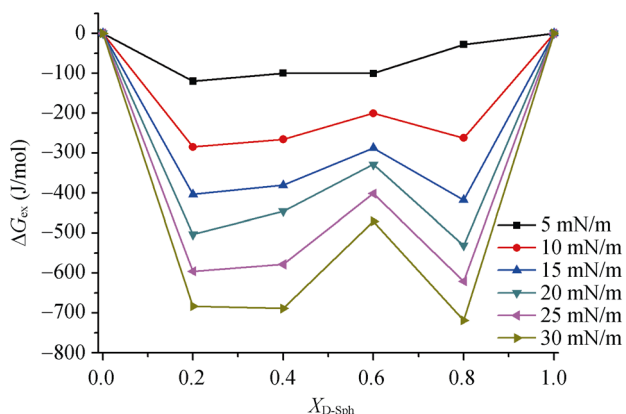


图 4 鞘氨醇/胆固醇混合脂单层膜在固定的表面压力下过量表面吉布斯自由能

子间相互作用^[17,18], 任意组份 i 在单层膜中的化学势为

$$\mu_i = \mu_i^0 + RT \ln f_i X_i, \quad (6)$$

式中 μ_i^0 是标准化学势, f_i 是活化系数, 关系式如下:

$$\ln f_i = \left(\frac{\omega}{RT} \right) (1 - X_i)^2, \quad (7)$$

式中 ω 是两组份分子间的粘合力相互作用所产生的交换能量^[26]. 所以 ΔG_{ex} 可以用下式表示:

$$\Delta G_{\text{ex}} = \sum RT(X_i \ln f_i) \quad (8)$$

则有下面关系式成立:

$$\ln f_2 = \left(\frac{\Delta G_{\text{ex}}}{RT} \right) \left(\frac{X_2^2}{1 - X_2} + X_2 \right)^{-1},$$

$$\ln f_1 = \frac{(1 - X_1)^2}{X_1^2} \ln f_2, \quad \omega = \frac{\Delta G_{\text{ex}}}{X_1 X_2}. \quad (9)$$

从上面的关系中, 可以计算出活化系数 f_1 和 f_2 , 同时也可获得相互作用参数 ω ^[27].

从表 1 可以看出相互作用参数 ω 在 $X_{\text{D-Sph}}=0.2$ 时

表 1 不同摩尔比例的单层膜在不同膜压下相互作用参数 ω 值

	$\pi=5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$	$\pi=10 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$	$\pi=15 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$	$\pi=20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$	$\pi=25 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$	$\pi=30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$
$X_{\text{D-Sph}}=0.2$	-750.61	-1781.16	-2622.75	-3345.45	-3821.11	-4468.93
$X_{\text{D-Sph}}=0.4$	-416.38	-1108.18	-1584.01	-1856.16	-2409.25	-2870.03
$X_{\text{D-Sph}}=0.6$	-418.89	-835.77	-1196.47	-1369.55	-1673.05	-1961.01
$X_{\text{D-Sph}}=0.8$	-176.83	-1638.94	-2507.41	-3118.52	-3779.13	-4290.16

具有最大值说明鞘氨醇与胆固醇发生了较强的相互作用^[19]. 通过方程(9)计算出的活化系数 f_1 和 f_2 如图5所示. 从图中可以看出, f_1 在鞘氨醇含量较高时随着表面压力的增加变化很小,在鞘氨醇含量较低时有较大的 f_2 值. 在参考文献[25]中研究阳离子脂质体1,2-二油酰基-3-三甲胺丙烷(DOTAP)与二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)相互作用时,单层膜活化系数 f_1 在DOTAP含量较高时随着表面压力的增加变化也很小,在DOTAP含量较低时有较大的 f_2 值,这与本文的结果相类似.

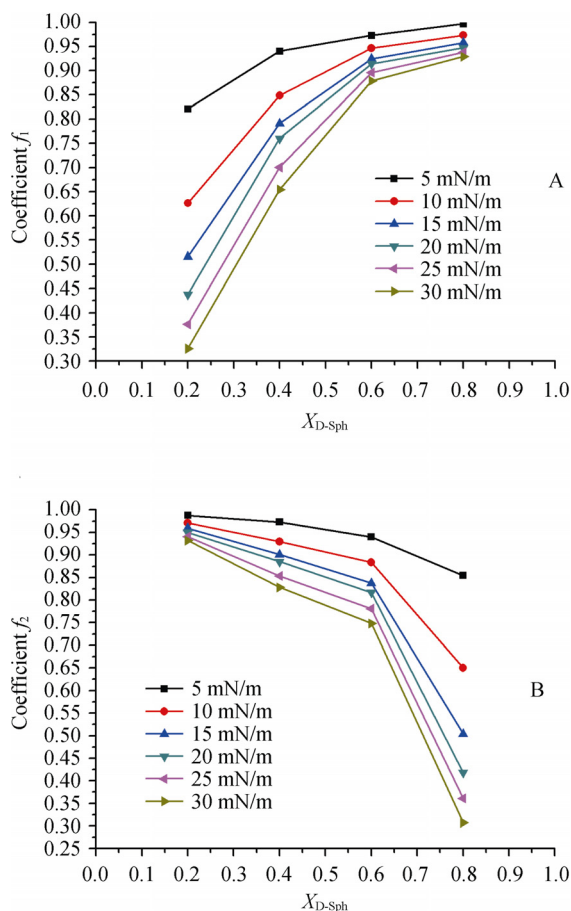


图5 不同表面压力下鞘氨醇/胆固醇单层膜的活化系数 f_1 和 f_2

2.4 不同比例的鞘氨醇与胆固醇单分子膜压缩性分析

压缩性 C_s 或弹性系数 C_s^{-1} 也是分析单层膜的一个重要的参数^[20]. 计算式如下:

$$C_s = -\frac{1}{A} \left(\frac{\partial A}{\partial \pi} \right)_T, \quad (10)$$

式中 A 和 π 分别表示平均分子面积与表面压力. 本文计算了弹性系数来表征单层膜的属性. 图6给出了不同鞘氨醇含量单层膜的弹性系数与表面压力关系. 从图中可以看出,单层膜的弹性系数随着鞘氨醇的增加而减小. 弹性系数的变化是由于单层膜中组份的变化和分子结构性质所决定的. 胆固醇具有刚性的分子骨架致使弹性能力较强,这与前文中的 π - A 曲线结果相一致.

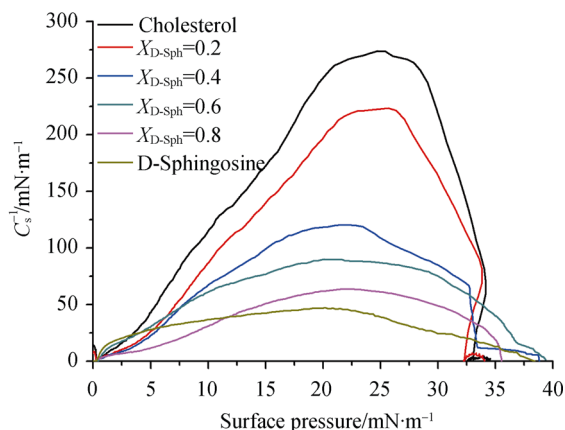


图6 鞘氨醇/胆固醇单层膜的弹性模量对表面压力曲线

2.5 不同比例的鞘氨醇与胆固醇单分子膜 AFM 观测

用 AFM 观察胆固醇与鞘氨醇单分子膜的聚集相行为是理解分子间相互作用的一个重要途径. 图7给出了表面压力为 $10 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$, 扫描范围为 $4 \mu\text{m} \times 4 \mu\text{m}$ 时不同比例的混合脂单层膜的形貌图. 纯鞘氨醇单分子膜呈现出小的颗粒体结构, 如图7(a). 胆固醇的加入促进分子间发生相互作用. 图7(b)为鞘氨醇含量 $X_{D-Sph}=0.8$ 时呈现出分散均匀的链状结构, 随着鞘氨醇摩尔比例的减小形成了网状结构如图7(c). 当鞘氨醇的含量减小到 $X_{D-Sph}=0.4$ 时, 混合膜表现出微区结构图7(d). $X_{D-Sph}=0.2$ 时, 微区结构出现了融合, 形成较大的片层与网状共存结构. 纯胆固醇形成高度紧密的单层膜结构. AFM 观测结果与上文中表面吉布斯自由能数据相结合, 当 $X_{D-Sph}=0.2, 0.8$ 是吉布斯自由能出现最小值, 表明两种分子间相互作用形成的

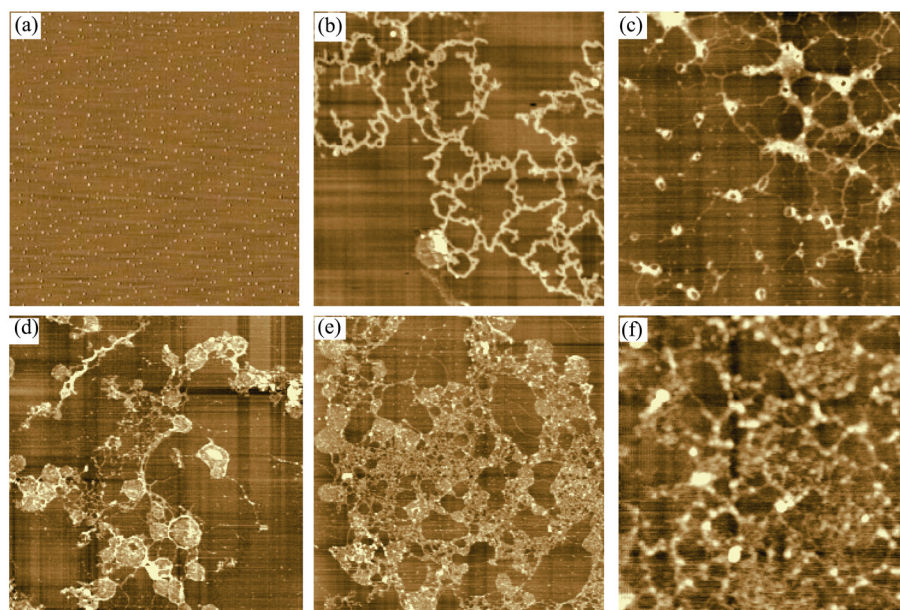


图 7 不同比例下鞘氨醇/胆固醇单层膜 AFM 观测

(a) 纯鞘氨醇, (b) $X_{D-Sph}=0.8$, (c) $X_{D-Sph}=0.6$, (d) $X_{D-Sph}=0.4$, (e) $X_{D-Sph}=0.2$, (f) 纯胆固醇. 扫描范围: $4\ \mu\text{m}\times 4\ \mu\text{m}$, 沉积膜压: $10\ \text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$

链状结构(图 7(b))和大片层微区结构(图 7(e))的稳定
性较高.

3 结论

本文系统的研究了鞘氨醇/胆固醇单分子膜的热力学性质. 实验数据分析表明过量分子面积与理想状况相比具有负偏差作用, 表明分子间的作用力表现为吸引力. 在二元系统中鞘氨醇的含量 $X_{D-Sph}=0.2$ 、

0.8 时, 过量吉布斯自由能具有最小值, 形成的单层膜较稳定. 活度系数和 AFM 数据进一步验证了两者间的相互作用. 分子骨架决定了单层膜的弹性模量的数值变化, 胆固醇具有刚性环状骨架, 胆固醇的含量越多弹性系数越大. 利用热力学参数表征单层膜性质对于研究脂与脂间相互作用提供了重要的实验依据, 对于理解脂筏结构的形成并进一步指导临床实践均有重要的意义.

参考文献

- 1 Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 1997, 387: 569—572[DOI]
- 2 Zajchowski L D, Robbins S M. Lipid rafts and little caves. Compartmentalized signalling in membrane microdomains. *Eur J Biochem*, 2002, 269: 737—752[DOI]
- 3 Annarita G, Verena B, Marco C, Wolfgang F G, Klaus G. Cholesterol- and caveolin-rich membrane domains are essential for phospholipase A-dependent EDHF formation. *Cardiovas Res*, 2004, 64(2): 234—242[DOI]
- 4 Maguy A, Terence E H, Stanley H. Involvement of lipid rafts and caveolae in cardiac ion channel function. *Cardiovas Res*, 2006, 69(4): 798—807[DOI]
- 5 Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000, 1(1): 31—39[DOI]
- 6 Diana C M, Chen H W, Edward M C, Wade V W, Richard J P. Estrogen receptors in membrane lipid rafts and signal transduction in breast cancer. *Mole Cell Endocrinol*, 2006, 246(1): 91—100[DOI]
- 7 杨福愉. 生物膜结构研究的一些进展. *生物化学与生物物理进展*, 2003, 30(4): 495—502
- 8 Vetrivel K S, Cheng H, Lin W. Association of gamma-secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosome membranes. *J Biol Chem*,

- 2004, 279: 44945—44954[DOI]
- 9 Brown D A, London E. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem*, 2000, 275: 17221—17224[DOI]
- 10 London E, Brown D A. Insolubility of lipids in triton X-100: Physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1508: 182—195[DOI]
- 11 McMullen T P, Lewis R N, McElhaney R N. Cholesterol-phospholipids interactions, the liquid-ordered phase and lipid rafts in model and biological membranes. *Curr Opin Coll Int Sci*, 2004, 8: 459—468[DOI]
- 12 Johnson J A, Clark R B. Multiple nonspecific effects of sphingosine on adenylate cyclase and cyclic AMP accumulation in S49 lymphoma cells preclude its use as a specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem J*, 1990, 268: 507—511
- 13 Ju T Z, Chen H L, Gu J X. Regulation of N-acetylglucosaminyltransferase V by protein kinases. *Glycoconj J*, 1995, 12: 767—772[DOI]
- 14 Souktani R, Berdeaux A, Ghaleh B, Giudicelli J F, Guize L, Heuzey J Y, Henry P. Induction of apoptosis using sphingolipids activates a chloride current in *Xenopus laevis* oocytes. *Am J Phys Cell Phys*, 2000, 279: 158—165
- 15 Shao Z, Mou J, Czikowsky D M, Yang J, Yuan J Y. Biological atomic force microscopy: what is achieved and what is needed. *Adva Phys*, 1996, 45: 1—86 [DOI]
- 16 Hide A R, Rudy A D, Jan P J M, Van D E, Ben D K. Atomic force microscopy of hydrated phosphatidylethanolamine bilayers. *Biophys J*, 1991, 77: 1683—1693
- 17 Katarzyna H W, Paweł W. The influence of fatty acids on model cholesterol/phospholipid membranes. *Chem Phys Lipids*, 2007, 150: 66—81[DOI]
- 18 Komada M, Shibata O, Nakamura S, Lee S, Sugihara G. A monolayer study on the three binary mixed systems of dipalmitoyl phosphatidylcholine with cholesterol, cholestanol and stigmasterol. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2004, 33: 211—226[DOI]
- 19 Higemi N, Nozomi S, Yauko M, Takeo Y, Hiromichi N, Osamu S, Chien H C, Gohsuke S. Monolayers (Langmuir films) behavior of multi-component systems composed of a bile acid with different sterols and with their 1:1 mixtures. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2007, 58: 121—136[DOI]
- 20 Ling Y Z, Shen S F. Effects of lipid chain unsaturation and headgroup type on molecular interactions between paclitaxel and phospholipid within model biomembrane. *J Colloid Interface Sci*, 2005, 285: 326—335[DOI]
- 21 Gupta R K, Suresh K A. AFM studies on Langmuir-Blodgett films of cholesterol. *Eur Phys J E*, 2004, 14(1): 35—42[DOI]
- 22 Dynarowicz A P, Kita K. Molecular interaction in mixed monolayers at the air/water interface. *Adv Colloid Interf Sci*, 1999, 79: 1—17[DOI]
- 23 Katarzyna H W, Patrycja D. Interaction between nystatin and natural membrane lipids in Langmuir monolayers—The role of a phospholipids in the mechanism of polyenes mode of action. *Biophys Chem*, 2006, 123: 154—161[DOI]
- 24 Tzung H C, Ming C. Behavior of DSPC/DSPE-PEG2000 mixed monolayers at the air/water interface. *Colloid Surf A Physicochem Eng Asp*, 2002, 211: 267—274[DOI]
- 25 Bordi F, Cametti C, Venanzio C D, Sennato S, Zuzzi S. Influence of temperature on microdomain organization of mixed cationic-zwitterionic lipidic monolayers at the air-water interface. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2008, 61: 304—310[DOI]
- 26 Senoo M. *Entropy*. Tokyo: Kyouritu Shuppan, 1993. 114—122
- 27 Nagadome S, Okazaki Y, Lee S, Sasaki Y, Sugihara G. Selective solubilization of sterols by bile salt micelles in water: A thermodynamic study. *Langmuir*, 2001, 17: 4405—4412[DOI]