

研究简报

LB 膜诱导下草酸钙晶体的生物矿化研究

钟玖平 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)

关键词: 草酸钙晶体 LB 膜 二棕榈酰磷脂酰胆碱 生物矿化
 分类号: 0614.23 0782*.9

草酸钙 (CaC_2O_4) 结石是生物体内异常矿化形成的产物, 是泌尿系结石的主要组成部分^[1]。它形成于泌尿系统中尿路表皮细胞上^[2]。磷脂的 Langmuir-Blodgett (LB) 膜是生物细胞膜的简化模拟体系^[3]。用磷脂 LB 膜作为模板来研究 CaC_2O_4 晶体的形成过程, 比在水溶液中更能接近 CaC_2O_4 结石在生物体内细胞膜表面形成的真实情况, 将有助于对尿路结石的形成及防治的研究^[4]。

尿大分子硫酸软骨素 A (C4S) 存在于尿液中, 但不存在于 CaC_2O_4 结石中。在结石病人尿液中 C4S 的含量明显低于正常人尿液中的含量, 因此推测其在体内能影响 CaC_2O_4 结石的形成^[5]。生物小分子 L-谷氨酸 (L-Glu) 作为尿蛋白中的一种氨基酸残基, 既存在于尿液中也存在于结石基质中, Azoury 等^[6]的研究表明 L-Glu 对 CaC_2O_4 结晶具有明显抑制作用, 而天冬氨酸和丙氨酸影响甚微。酶的活性可以将天冬氨酸和丙氨酸转变成谷氨酸, 以提高正常人尿液对结石形成的抑制活性。

Whipps 等^[7]研究了在一系列磷脂和花生酸单分子膜诱导下一水草酸钙 (COM) 晶体的成核和生长。这些磷脂包括: 二棕榈酰磷脂酰甘油 (DPPG)、二棕榈酰磷脂酰丝氨酸 (DPPS) 和二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC) 等。在上述各单分子膜的诱导下, 90% 的 COM 晶体以 (101) 晶面面向膜/液界面定向生长。Letellier 等^[8]研究了在不同磷脂单分子膜诱导下, CaC_2O_4 晶体在其过饱和溶液的膜/液界面的有

序生长过程。在两性的 DPPC 单分子膜诱导下, 形成的 COM 晶体具有特定的形态: COM 晶体的 (101) 晶面优先与 DPPC 单分子膜的平面平行伸展。而在带负电的双十四烷基磷脂酰丝氨酸 (DMPS) 单分子膜下面, CaC_2O_4 晶体同样优先生长, 但这些晶体却没有 COM 晶体的特定形态。为了阐明磷脂单分子膜与 CaC_2O_4 晶体相互作用的机理, Letellier 等同时还研究了双十四烷基磷脂酰氨基乙醇 (DMPE)、双十四烷基磷脂酸 (DMPA)、花生酸和花生醇单分子膜诱导下 CaC_2O_4 晶体的生长, 讨论了晶格匹配、氢键力、立体化学和静电作用等对 CaC_2O_4 晶体形成的影响。但上述研究仅仅是在单纯的 CaC_2O_4 亚稳溶液中进行磷脂 LB 膜诱导 CaC_2O_4 晶体的生长, 没有考虑到尿液中存在的尿大分子对 CaC_2O_4 结石形成的影响。本文以磷脂 DPPC 的 LB 膜作为模板, 研究了 C4S 和 L-Glu 对 CaC_2O_4 晶体形成的影响, 发现在 DPPC 的 LB 膜诱导下, 所形成的 CaC_2O_4 晶体均为 COM 晶体, 但受 C4S 和 L-Glu 所调控, COM 呈现出了不同的形貌。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

WM-II 型全自动双向压缩 LB 膜仪 (东南大学); XD2 粉末 X 射线衍射仪 (XRD) (北京大学研制), XL-30 型环境扫描电子显微镜 (ESEM) (Philips 公司); XSP-8F-0300 系列生物显微镜 (带 CCD 镜头)

收稿日期: 2002-07-14。收修改稿日期: 2002-09-09。

国家自然科学基金重点项目 (No. 20031010), 教育部重点科学技术项目 (No. 1998-121), 广东省自然科学基金资助项目 (No. 980898, 013202) 和广东省重点攻关项目 (No. C31401)。

* 通讯联系人。E-mail: toyjm@jun.edu.cn

第一作者: 钟玖平, 男, 27 岁, 硕士研究生; 研究方向: 生物无机化学。

(广西梧州市光学仪器厂); PH-3C 精密 pH 计(上海雷磁仪器厂)。

二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC), Sigma 公司产品; 硫酸软骨素 A 和 L-谷氨酸为 ICN 公司产品; 一水草酸钾、二水氯化钙、氢氧化钠、氯化钠和氯仿均为分析纯, Tris · HCl 试剂由三羟甲基甲胺 $[\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_3\text{OH})_3]$ 和分析纯盐酸配制而成, 原始 pH = 2.04, 实验用水均为从石英亚沸蒸馏器体系制得的二次蒸馏水。

1.2 实验方法

磷脂 LB 膜的制备: 以二次水为亚相, 在 LB 槽内铺展两亲分子 DPPC 的氯仿溶液, 待水面上氯仿溶剂完全挥发后, 以 $10\text{mm} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度压膜, 控制膜压为 $20\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$, 保持 2h, 然后采用垂直提拉法将单分子膜转移到疏水的石英基片上, Y 型挂膜法提膜 3 层, 亲水功能基团朝外, 提膜速度为 $3\text{mm} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

晶体的生长: 用预先配好的 $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 溶液, $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 溶液和 $0.50\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 溶液配制 CaC_2O_4 亚稳溶液, 然后将制备好的磷脂 DPPC 的 LB 膜斜立在烧杯中。亚稳体系中 $c(\text{Ca}^{2+}) = c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 0.22\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $c(\text{NaCl}) = 10\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, C_4S 的浓度控制为 $0.50\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, L-Glu 的浓度为 $0.50\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。用 Tris · HCl 试剂和 NaOH 溶液调节 pH 为 6.0。在用 LB 膜诱导晶体生长之前, 先用孔径为 $0.22\mu\text{m}$ 的微孔滤膜过滤亚稳溶液, 防止体系中事先形成的晶体干扰 LB 膜诱导晶体生长。为防止由于溶剂水的挥发而造成体系过饱和驱动晶体形成, 晶体生长是在密闭环境中进行, 生长时间为 3d。整个实验在一个无尘箱内完成, 温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。

保持 $c(\text{Ca}^{2+}) = c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 0.22\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $c(\text{NaCl}) = 10\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 将体系中尿大分子 C_4S 的浓度调节为 0.01、0.05、0.10 和 $0.50\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, L-Glu 的浓度调节为 0.01、0.05、0.10 和 $0.50\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 研究添加剂浓度和生长时间 (3d 和 10d) 对 CaC_2O_4 晶体矿化的影响。

晶体的物相分析和形貌观察: 用 XRD 对 LB 膜诱导形成的晶体进行物相分析, 测试条件为: Cu 的 $K\alpha$ 辐射, 40kV, 30mA, 石墨弯晶单色器, 狭缝: DS, 1° , RS, 0.15mm , SS, 1° , 扫描速度: $4^\circ \cdot \text{min}^{-1}$, 步宽: 0.02° ; 用 SEM 进行形貌观察, 测试条件为: 样品喷

金处理, 测量电压 15kV。

2 结果与讨论

体内 CaC_2O_4 结石的形成是个复杂的过程, 既受尿路表皮细胞粘附作用的影响, 也受尿液中尿大分子作用的影响。 CaC_2O_4 晶体在泌尿系统中首先依靠晶面与细胞表面接触, 并将其粘附在尿路中的某一固定位置^[9]。LB 膜作为一种有序的生物膜模拟体系, 可以通过晶格匹配、氢键、立体化学和静电作用等调控发生在膜/液界面的晶体矿化过程。

2.1 CaC_2O_4 晶体物相分析与形貌比较

当 C_4S 的浓度控制为 $0.50\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, L-Glu 的浓度为 $0.50\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, LB 膜诱导下的草酸钙晶体的 XRD 图谱如图 1 所示。图中仅出现了 4 条衍射峰, 前 3 个强峰的 d 值分别为 0.5935、0.3652 和 0.2968nm, 依次归属于 COM 的 $(\bar{1}01)$, (020) 和 $(\bar{2}02)$ 晶面。其中 $(\bar{1}01)$ 晶面的衍射峰强度明显比其它晶面的衍射峰强。

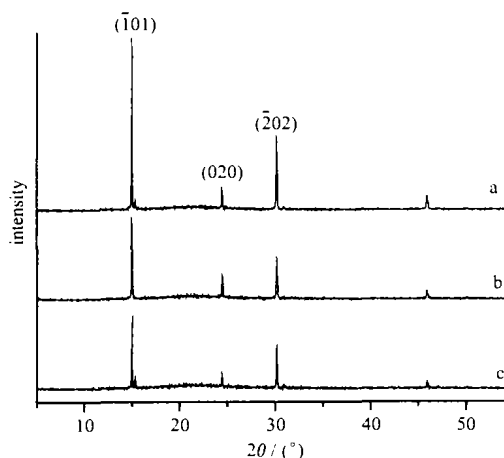


图 1 LB 膜诱导下不同体系中形成的 CaC_2O_4 晶体的 XRD 图谱

Fig. 1 X-ray diffraction patterns of calcium oxalate crystals induced by LB film

(a) no additive, (b) added C_4S , (c) added L-Glu

将不同体系中 LB 膜诱导下形成的草酸钙晶体进行 SEM 观察, 结果如图 2。在不加 C_4S 和 L-Glu 的 CaC_2O_4 亚稳溶液中形成的 COM 晶体为六棱柱型晶体, 其 $(\bar{1}01)$ 晶面与 LB 膜接触生长 (图 2a); 在含有 C_4S 的 CaC_2O_4 亚稳溶液中诱导形成的 COM 晶体虽然也是以 $(\bar{1}01)$ 晶面与 LB 膜接触生长的六棱柱型晶体, 但 $(\bar{1}01)$ 晶面明显被拉长, 而且厚度方向明显要薄, 变为六边薄片状晶体 (图 2b); 在含有 L-Glu

的 CaC_2O_4 亚稳溶液中诱导形成的 COM 晶体出现了不同于前两者晶体的形貌, 呈现出没有固定几何形状的 COM 晶体(图 2c)。不同条件下 COM 晶体生长

过程的总结模型图如图 2d 所示。

COM 晶体属于单斜晶系, 空间点群为 $P2_1/n$, 晶胞参数 $a = 9.976\text{nm}$, $b = 7.294\text{nm}$, $c = 6.291\text{nm}$, $\alpha = \gamma = 90.0^\circ$, $\beta = 107.0^\circ$ 。在 COM 晶体的 $(\bar{1}01)$ 晶面上, 钙离子呈密集分布(如图 3a)^[10], 而 (010) 晶面上含有更多的草酸根离子(如图 3b)。在 DPPC 的 LB 膜诱导下, 钙离子同 LB 膜上磷脂 DPPC 的亲水功能基团发生最有效的结合, 使得富钙离子晶面 $(\bar{1}01)$ 晶面与 LB 膜接触生长, 并在膜/液界面首先形成如图 2d 中的①晶体。然后由于 (010) 晶面的生长速率快于 $(\bar{1}01)$ 晶面, 晶体①转化为晶体②。当 (010) 晶面进一步优先生长时, 导致 COM 晶体的一个或两个 $(\bar{1}01)$ 晶面消失, 晶体变为③或④。 $(\bar{1}01)$ 晶面与 LB 膜接触生长时, 正好使得 XRD 图谱中 $(\bar{1}01)$ 晶面的衍射峰强度明显增强(见图 1)。

由 Gibbs 等^[11]提出的晶体生长定律和晶体形貌判断准则可知, 晶面的生长速度与配位多面体在界面上显露的顶点数有关, 在界面上显露配位多面体顶点数最多的晶面生长速度最快。尿大分子 C₆S 是

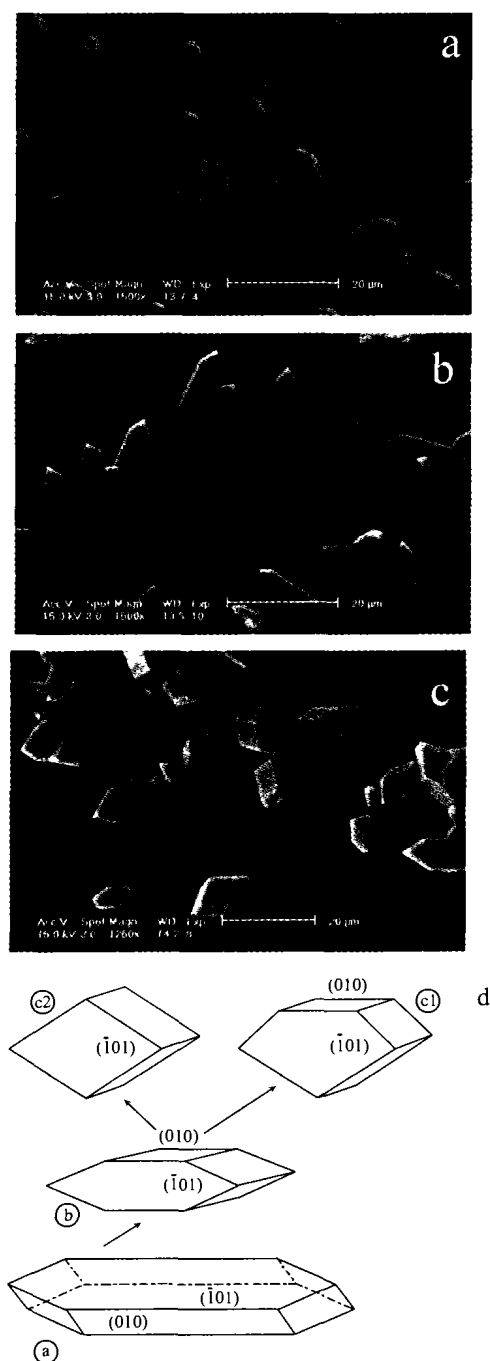


图 2 LB 膜诱导下不同体系中形成的 CaC_2O_4 晶体的 SEM 图

Fig. 2 Pictures of SEM of calcium oxalate crystals induced by LB film

(a) no additive, (b) added C_6S , (c) added L-Glu , (d) Schematic illustration showing a likely growth sequence of COM crystals

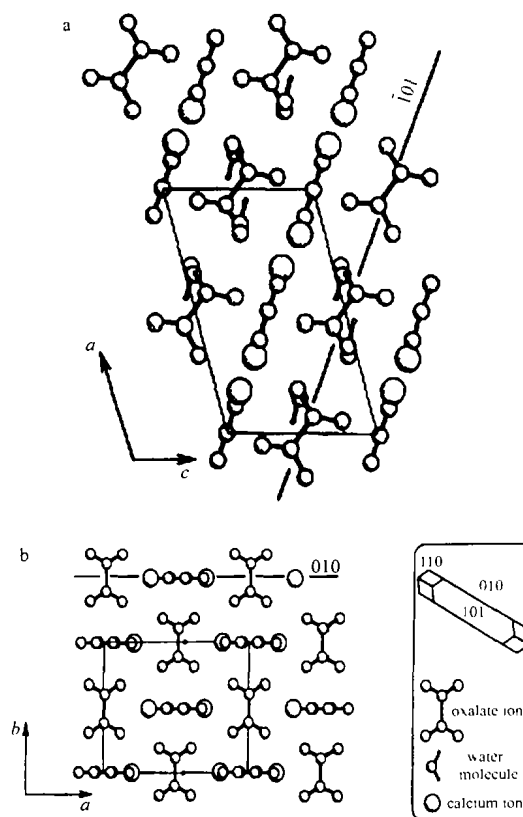


图 3 COM 晶体中 $(\bar{1}01)$ 晶面和 (010) 晶面^[10]

Fig. 3 $(\bar{1}01)$ and (010) crystal faces in COM crystal

一种没有分支的一系列不同长度的聚阴离子多糖链, 由己糖醛酸和己糖胺通过 $\beta_{1,3}$ 和 $\beta_{1,4}$ 交替相联组成, 每个单元均含有一个羧基, 其结构如图 4 所示。在含有 CaS 的亚稳溶液当中, 由于 CaS 分子对界面的屏蔽作用不同, 富钙离子的 $(\bar{1}01)$ 晶面结合有更多的 CaS 的悬键, 容易被屏蔽, 其生长速度受到抑制, 因而导致形成薄片状的 COM 晶体。 $L\text{-Glu}$ 是一种生物小分子, 每个分子中含有两个羧基。小分子 $L\text{-Glu}$ 对晶体生长不具有屏蔽作用, 晶面生长没有受到抑制, $(\bar{1}01)$ 晶面和 (010) 晶面同时生长。但是, $L\text{-Glu}$ 带负电荷的羧基与钙离子结合, 在溶液中“捕获”钙离子, 当运动到靠近晶体的 (010) 晶面时, 由于 $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ 和 Ca^{2+} 的结合能力强于 Ca^{2+} 和 $L\text{-Glu}$ 的结合能力, (010) 晶面上分布较多的 $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ 会迅速同 Ca^{2+} 结合, 导致 (010) 晶面生长速度快于 $(\bar{1}01)$ 晶面, 使 COM 晶体的一个或两个 (010) 晶面消失。

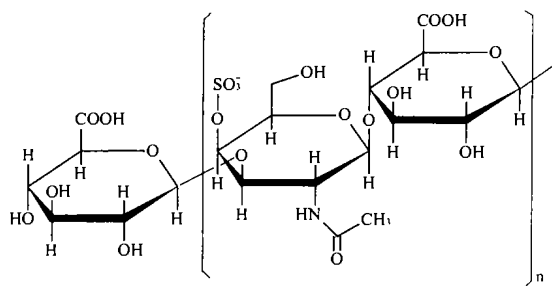
图 4 硫酸软骨素 A (C_4S) 的分子结构示意图

Fig. 4 Molecular structure of chondroitin sulfate A

2.2 添加剂浓度与生长时间对草酸钙晶体形貌的影响

用带 CCD 镜头的显微镜对不同生长时间里不同添加剂浓度下磷脂 LB 模板上 CaC_2O_4 晶体的生长情况进行了观察, 发现: (1) 生长时间为 3d 和 10d 所形成的 CaC_2O_4 晶体并无明显区别; (2) 添加物 C_4S 和 $L\text{-Glu}$ 的加入使得六边棱柱晶体逐渐减少。图 5 为加入 C_4S 和 $L\text{-Glu}$ 后 LB 膜诱导下不同形貌的 COM 晶体统计分布图 ($d < 0.01$)。

3d 和 10d 里形成的 CaC_2O_4 晶体并无明显区别, 说明在晶体沉降和溶解达到平衡时, 体系中的 C_4S 和 $L\text{-Glu}$ 对磷脂 LB 膜诱导下形成的 CaC_2O_4 晶体不再具有明显的影响作用。但晶体分布受添加剂浓度的影响。 C_4S 浓度的增加使 CaC_2O_4 晶体由六边棱柱晶体转变为六边薄片状晶体, 特别是当 C_4S 浓度为 $0.50\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, CaC_2O_4 晶体全部为六边薄

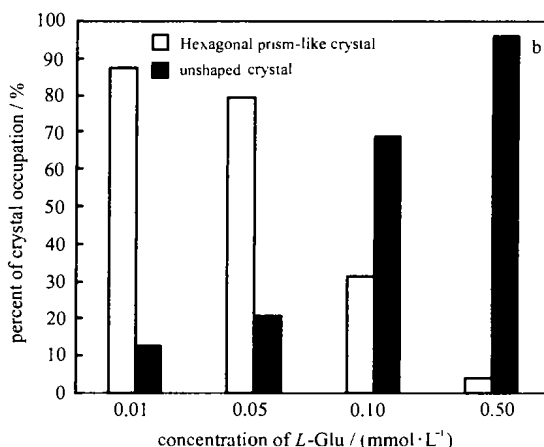
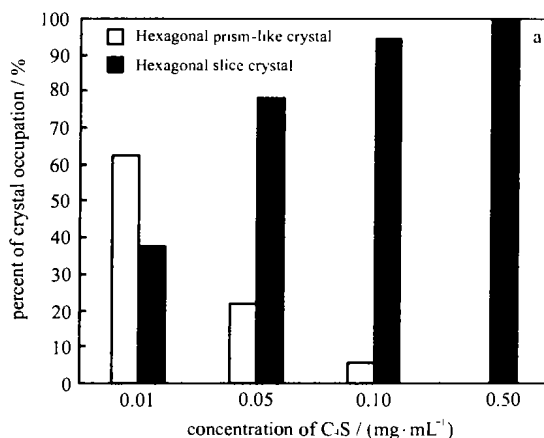


图 5 添加物浓度对 COM 晶体分布的影响

Fig. 5 Effect of additives' concentration on the distribution of COM crystals

(a) C_4S 浓度对晶体分布的影响(b) $L\text{-Glu}$ 浓度对晶体分布的影响

片状晶体 (如图 5a)。 $L\text{-Glu}$ 浓度的增加使 CaC_2O_4 晶体由六边棱柱晶体逐渐转变为“不定形”晶体, 但影响程度比 C_4S 小, 在 $L\text{-Glu}$ 浓度为 $0.50\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 磷脂 LB 膜上仍然有少量的六边棱柱晶体 (如图 5b)。

3 总 结

综上所述, 磷脂 DPPC 的 LB 膜作为生物细胞膜的简单模拟, 可以诱导亚稳溶液中 CaC_2O_4 晶体的异相成核, 并促使 CaC_2O_4 晶体产生晶面取向生长。尿大分子 C_4S 和生物小分子 $L\text{-Glu}$ 通过调控 CaC_2O_4 晶体的晶面生长而影响晶体的形貌, C_4S 使 CaC_2O_4 晶体由六边棱柱晶体转变为六边薄片状晶体, $L\text{-Glu}$ 使 CaC_2O_4 晶体由六边棱柱晶体逐渐转变为“不定

形”晶体。

参 考 文 献

- [1] OUYANG Jian-Ming(欧阳健明) *Huaxue Tongbao* (Chemistry), **2002**, **65**(5), 326.
- [2] Wiessner J. H., Hasegaw A. T., Hung L. Y. et al *Kidney Int.*, **2001**, **59**, 637.
- [3] Yuan C. B., Zhao D. Q., Ni J. Z. *J. Colloid Interf. Sci.*, **1995**, **172**, 536.
- [4] OUYANG Jian-Ming(欧阳健明), YAO Xiu-Qiong(姚秀琼) *Huaxue Yanjiu Yu Yingyong* (Chemical Research and Application), **2001**, **13**(4), 353.
- [5] Suzuki K., Mayne K., Doyle I. R. et al *Scanning Microsc.* **1994**, **8**(3), 523.
- [6] Azoury R., Garti N., Sarig S. *Urol. Res.*, **1986**, **14**, 295.
- [7] Whipps S., Khan S. R. *J. Cryst. Growth*, **1998**, **192**, 243.
- [8] Letellier S. R., Lochhead M., Vogel V. *Biochim Biophys Acta*, **1998**, **1380**, 31.
- [9] Ebisuno S., Nishihata M., Inagaki T. et al *J. Am. Soc. Nephrol.*, **1999**, **10**(Suppl), S436.
- [10] Tunik L., Furedi-Milhofer H., Garti N. *Langmuir*, **1998**, **14**, 3351.
- [11] ZHANG Ke-Cong(张克从), ZHANG Le-Hui(张乐惠) *Science and Technology of Crystal Growth*(晶体生长科学与技术), Beijing: Science Press, **1997**, p126.

The Study on the Biomineralization of Calcium Oxalate Crystals Induced by LB Film

ZHONG Jiu-Ping OUYANG Jian-Ming* DENG Sui-Ping

(Institute of Biomineralization and Lithiasis Research, Jinan University, Guangzhou 510632)

The effects of urinary macromolecule chondroitin sulfate A(C₄S) and L-glutamic acid (L-Glu) on the crystallization of calcium oxalate were studied using Langmuir-Blodgett(LB) film of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) as templet. All the calcium oxalate crystals induced by the LB film of DPPC were calcium oxalate monohydrate(COM). However, the morphology of COM was influenced by the additives of C₄S and L-Glu. C₄S induced thin and long hexagonal COM crystals; L-Glu made one or two (010) crystal face of COM crystals disappeared. The crystallization time had no effect on the morphology of COM crystals, but the concentration of C₄S and L-Glu changed it. As increasing the concentration of C₄S, the amount of COM crystals with a hexagonal prism decreased and that with a thin hexagonal slice increased. When the concentration of C₄S was 0.50mg · mL⁻¹, all the calcium oxalate crystals were thin hexagonal slice COM crystals. However, as the concentration of L-Glu increased from 0.01 to 0.50mmol · L⁻¹, the hexagonal prism-like COM crystals gradually transformed to COM crystals with one or two (010) crystal face disappearance.

Keywords: calcium oxalate crystal LB film dipalmitoylphosphatidylcholine biomineralization