

基于太赫兹光谱技术的生物膜界面水研究

潘亚涛^{1,2}, 吕军鸿²

¹上海大学理学院, 上海 200444;

²中国科学院上海应用物理研究所微观界面物理与探测重点实验室, 上海 201800

摘要 界面水对生物膜的功能发挥起着至关重要的作用,但由于水对太赫兹波有极强的吸收,限制了液体样品的透射谱研究。将磷脂包覆水球的制备方法引入太赫兹时域光谱技术探测界面水的实验体系中,不仅大大减少了所需被测样品的用量,而且可调节水对太赫兹的吸收程度。基于此方法,在获得多种磷脂乳液的太赫兹介电谱的基础上,揭示了磷脂极性头部的化学基团差异会明显影响其界面的水合状态及界面水分子的动力学行为。

关键词 光谱学; 太赫兹时域光谱; 界面水; 乳液; 磷脂膜

中图分类号 O433.4 **文献标识码** A

doi: 10.3788/LOP54.043001

Terahertz Spectroscopy of the Interfacial Water in Phospholipid Membranes

Pan Yatao^{1,2}, Lü Junhong²

¹ College of Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China;

² Key Laboratory of Interfacial Physics and Technology, Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China

Abstract Interfacial water plays an important role in the function of biological membranes. However, due to the significant absorption of water on the terahertz wave, it is very difficult to obtain the terahertz transmission spectra of the membrane interfaces. Herein, we develop a system to study the membrane interfacial water by combining the preparation of water droplets in lipid and terahertz time domain spectroscopy. It only needs a few biological samples but has high sensitivity of water state in this method. Based on this system, we have successfully measured the terahertz dielectric spectra of kinds of lipid emulsions. The results revealed that the hydration state and water dynamics upon the membrane interface are dependent on the lipid headgroup components.

Key words spectroscopy; terahertz time domain spectroscopy; interfacial water; emulsion; lipid membrane

OCIS codes 300.6495; 160.1435; 120.4530

1 引言

磷脂膜界面水是指膜表面 1 nm 左右范围内介电弛豫等物理特性明显受到磷脂分子溶剂化干扰的多层水分子。这些界面水分子对膜本身的流动性和功能发挥以及膜间排斥力都起着至关重要的作用^[1-2];膜与界面水分子的相互作用也会影响界面偶极电位,从而调控离子和生物分子等在膜间的传输^[3-5]。因此,为深入理解磷脂膜界面水分子的理化性质,核磁共振^[6],非弹性中子散射^[7],傅里叶转换红外光谱^[8],原子力显微镜^[9]等技术已经被用于研究磷脂膜界面水分子的结构和介电弛豫过程。

太赫兹时域光谱 (THz-TDS) 技术是研究磷脂膜界面水分子介电弛豫的一种强有力工具。由于其时间测量尺度范围为 $10^{-9} \sim 10^{-11}$ s,只有少数紧紧束缚在磷脂界面的水分子能被探测到^[6-8]。利用 THz-TDS,

收稿日期: 2016-10-08; **收到修改稿日期:** 2016-12-26

基金项目: 国家自然科学基金(11474298)、中国科学院前沿科学重点研究项目(QYZDJ-SSW-SLH019)

作者简介: 潘亚涛(1990—),男,硕士研究生,主要从事生物膜界面水方面的研究。E-mail: 1229241441@qq.com

导师简介: 吕军鸿(1972—),男,博士,研究员,主要从事物理学与生物医学的交叉方面的研究。

E-mail: lujunhong@sinap.ac.cn(通信联系人)

Hishida 等^[10]首次揭示了磷脂膜界面的长程水合效应。目前,THz-TDS 研究磷脂膜界面水的制备方法主要有两种:1) 控制磷脂所处环境的湿度^[11-12];2) 超声磷脂水溶液形成囊泡^[13]。前者没有形成相对真实的膜状态,而第二种方法下磷脂分子虽然近似生理状态,但体系中含量较高的水对 THz 波有极强的吸收性^[14-15],从而使得研究液体样品的透射谱相对困难。选用对太赫兹波的吸收较小^[16]的十六烷作为脂溶剂,将磷脂包覆水球的制备方法引入 THz-TDS 系统的测量中,既降低了体系中的水含量和样品用量,又能同时满足磷脂膜尽可能接近真实的生理状态。基于这种方法,获得了三种磷脂乳液的太赫兹透射式 THz-TDS 获得介电谱,并对不同磷脂膜的界面水合状态和水分子动力学行为进行了讨论。

2 实验方法和材料

实验材料包括 1,2-二油酰磷脂酰甘油(DOPG),1,2-二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)和 1,2-二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)三种磷脂分子(图 1)。三种磷脂均购于 Avanti Lipids 试剂公司,纯度大于 99%,购买的磷脂均溶于氯仿,溶液质量浓度 25 mg/mL,保存于冰箱冷冻室中。十六烷购于 Sigma 试剂公司。所有样品使用前未经进一步纯化处理。去离子水由二次蒸馏水经过微孔过滤处理得到。分别取 116 μL DOPC、110 μL DOPE 和 117 μL DOPG 磷脂溶液于试管中,室温下用氮气吹干。完毕后形成胶白状磷脂膜多层结构。将得到的样品放置在真空干燥箱中抽气 5 h 以排除残余的氯仿分子。将十六烷分别滴加到含有磷脂的玻璃试管中。为了得到体系所需的合适烷水体积配比,实验前首先以 DOPC 磷脂为乳化剂,乳液体积固定为 100 μL ,水含量(体积分数,下同)设置为 5%,10%,20%三个梯度。涡旋振荡 10 min 使得水滴在烷中尽可能分散均匀以形成图 2 所示磷脂膜包覆的水滴结构,水滴包括核中心的体相水和磷脂膜的界面水两部分,其他磷脂乳液中烷与水的体积比固定。

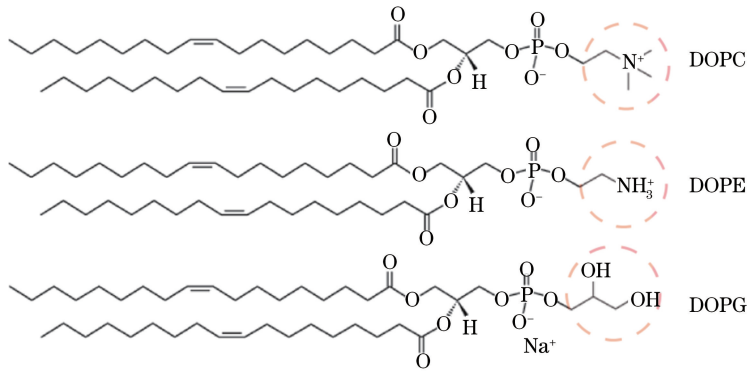


图 1 三种磷脂分子的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of three lipid molecules

实验用 THz-TDS 系统采用光电导天线发射和接收 THz 波。飞秒激光器的中心波长为 800 nm,平均功率大于 700 mW,脉冲宽度小于 100 fs,重复频率为 80 MHz。激光脉冲被分为两路,一路作为抽运光,激发电导天线产生 THz 脉冲;另一路作为探测光,利用电光采样原理探测 THz 波的电场强度。通过扫描探测激光脉冲和 THz 脉冲的相对时间延迟,可获得 THz 脉冲随时间变化的电场波形。整个太赫兹光学系统在一个密闭的盒子中,为减少空气中水对 THz 波的吸收,测量过程中对太赫兹光路部分充以干燥空气,湿度维持在 1%以下,测量在 295 K 下进行。实验测量可以得到 THz 脉冲时域电场波形,穿过样品前后的电场强度分别记作 $E_0(t)$ 和 $E(t)$,通过傅里叶变换得到穿过样品前后的 THz 脉冲的频谱,分别记作 $E_0(\omega)$ 和 $E(\omega)$,满足关系式:

$$E(\omega) = A(\omega) \exp[i\phi(\omega)] = A_0(\omega) \exp[i\phi_0(\omega)] T(n, \kappa) \exp[-\alpha(\omega)d] \exp\left[i \frac{2\pi}{\lambda}(n-1)d\right] = E_0(\omega) T(n, \kappa) \exp[-\alpha(\omega)d] \exp\left[i \frac{2\pi}{\lambda}(n-1)d\right], \quad (1)$$

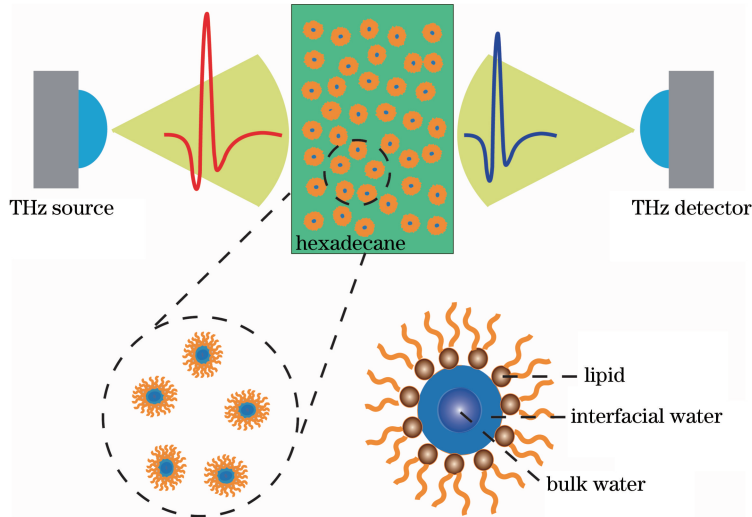


图 2 THz 脉冲透过样品槽和磷脂膜覆盖水滴的示意图

Fig. 2 Schematic of THz pulse passing through the sample cell and water droplet surrounded by lipid membrane

式中 d 为样品的厚度, ω (斜体) 为 THz 辐射角频率, κ 为样品的消光系数, $A(\omega)$ 和 $\phi(\omega)$ 是 THz 波的幅度和相位, $T(n, \kappa)$ 是 THz 波在样品两界面处透射系数的乘积。通过(1)式可以得到样品的吸收系数 α 和折射率 n 等物理参量。

3 结果与讨论

实验中以非极性溶剂十六烷为参考信号, 十六烷对 THz 的吸收较弱, 对 THz 信号影响很小。不同含水量的微乳液在 0~14 ps 时段的时域曲线如图 3 所示。可以看出以 DOPC 磷脂作为乳化剂时, THz 脉冲的振幅随着水含量的增加出现了不同程度的衰减。当磷脂膜达到完全水合状态后, 界面水层不再随水含量增加而变化, 这种振幅衰减是由于磷脂膜覆盖水滴结构中的体相水在体系中所占比例不断提高造成。分子模拟的结果^[17]显示影响界面水分子动力学行为的主要因素是表面活性剂和表面离子, 而非液滴的粒径。同时抽运探测实验^[18]已经证实在水与溶质的物质的量比确定的情况下, 液滴内的水分子振动弛豫时间相较于多层膜结构下的水分子来讲更长, 但这种纳米受限长度并不是影响界面水弛豫过程的关键因素。核-壳模型仍然可以定量模拟和研究液滴内部水分子的动力学行为^[19]。如图 3(b)所示, 水含量在 5% 时的乳液样品信号与参考信号的差异很小, 而含水量在 10% 和 20% 时的情况都可以与参考信号区分开。为了降低水的吸收, 实验中确定体系含水量为 10%。此状态下水与磷脂的物质的量比为 150:1。

在此实验方法的基础上, 比较了 DOPC, DOPE 和 DOPG 这三种纯磷脂及其水合状态下的 THz 介电谱(图 4)。图 4 中横坐标为频率 f , 纵坐标表示介电常数虚部。图 4(a)显示单纯的磷脂溶于十六烷后对 THz

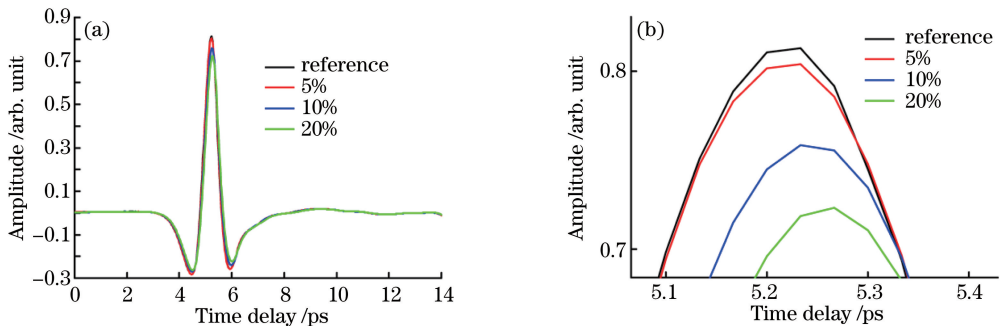


图 3 微乳样品的时域光谱。(a)不同含水量下的波形对比图;(b)局部放大图

Fig. 3 Time-domain spectra of emulsion samples. (a) Comparison of waveforms for different water content; (b) partially enlarged drawing

波均没有吸收,介电常数虚部 $\text{Im}(\epsilon)$ 为 0;图 4(b)为水合状态下不同磷脂乳液介电常数虚部的差异及其与体相水的比较。DOPG 和 DOPC 乳液的介电常数小于体相水,而 DOPE 乳液的介电常数却高于体相水,表明不同磷脂界面水分子的动力学行为差异明显。进一步,将磷脂乳液的 THz 介电常数来源进行划分,具体包括磷脂本身、体相水及磷脂膜界面水三部分^[13]。其中界面水又分成两部分,紧紧束缚在磷脂极性头周围的称为第一水合层,其重排动力学过程比体相水慢,第二部分包括围绕在第一水合层周围的水分子。THz 谱对此不能准确区分,只能给出平均结果。参考 NaCl 等盐离子对水分子之间的氢键网络结构具有破坏作用,认为 DOPE 乳液的介电常数高于体相水是由于界面水的第二部分的动力学过程加速并且高于第一水合层的减缓作用造成^[20]。

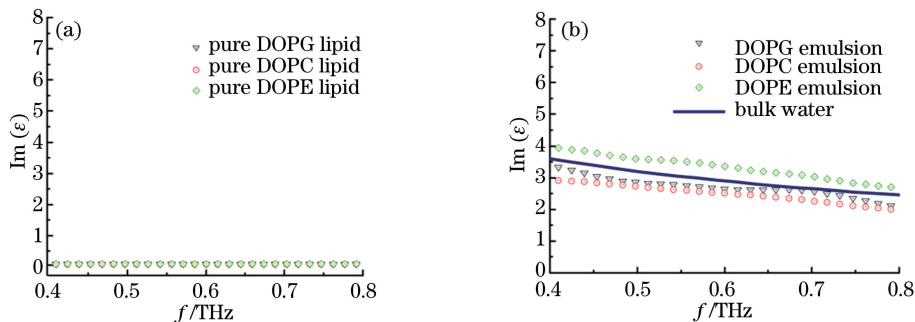


图 4 (a)纯 DOPG、DOPC 和 DOPE 磷脂的介电常数虚部比较;

(b) DOPG、DOPC 和 DOPE 磷脂乳液和体相水介电常数虚部的比较

Fig. 4 (a) Comparison of the imaginary part of the dielectric constants of pure DOPG, DOPC and DOPE lipids; (b) comparison of imaginary part of the dielectrics constants of the DOPG, DOPC and DOPE lipid emulsions and bulk water

体相水的 THz 介电常数可分成 GHz 弛豫模、THz 弛豫模和分子间伸缩振动模三部分^[21],复介电常数可表示为

$$\epsilon_{\text{bulk}}^{\text{water}}(\omega) = \frac{\Delta\epsilon_1}{1 + i\omega\tau_1} + \frac{\Delta\epsilon_2}{1 + i\omega\tau_2} + \frac{A_s}{\omega_s^2 - \omega^2 + i\omega\gamma_s} + \epsilon_\infty, \quad (2)$$

式中 $\Delta\epsilon_1$ (74.9) 和 $\Delta\epsilon_2$ (1.67) 是双德拜弛豫模型的弛豫强度, τ_1 (9.47 ps) 和 τ_2 (248 fs) 对应 GHz 和 THz 弛豫模的弛豫时间, A_s (1242.3)、 ω_s (33.3) 和 γ_s (33.6) 分别代表分子间伸缩振动模的振幅、角频率和阻尼常数, ϵ_∞ (2) 表示介电常数的高频极限值。对应弛豫模型,水分子的三种动力学过程及体相水的 THz 介电谱理论曲线如图 5(a) 所示。体相水的分子极化率包括 GHz 弛豫模、THz 弛豫模和伸缩振动模,界面水的分子极化率相比于体相水失去了 GHz 弛豫模。对于 DOPG 和 DOPC 两种磷脂乳液,认为其界面水分子的动力学过程受磷脂影响均变慢,以下曲线拟合过程以界面水的 GHz 弛豫模变慢并且在 THz 频谱中消失为标准,而 THz 弛豫模和伸缩振动模不受磷脂分子的影响,对应界面水的 THz 介电谱也显示在图 5(a) 中。对于 DOPG 和 DOPC 磷脂乳液的 THz 测量介电谱,假定体系中界面水所占比例为 $A\%$,实验曲线和弛豫模型分析的拟合方程为: $\text{Im}(\epsilon) = (1 - A\%) \times \text{Im}(\epsilon_{\text{bulk}}^{\text{water}}) + A\% \times \text{Im}(\epsilon_{\text{interfacial}}^{\text{water}})$, 如图 5(b) 所示,拟合曲线表示界

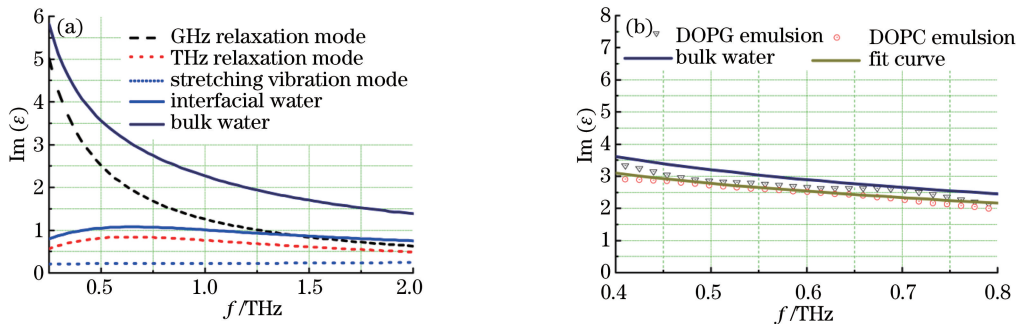


图 5 (a)体相水和界面水的分子极化率比较;(b) DOPG 和 DOPC 磷脂乳液的分子极化率拟合曲线

Fig. 5 (a) Comparison of polarizability of bulk and interfacial water; (b) fit curves of polarizability of DOPG and DOPC lipid emulsions

面水在体系中所占的比例为 20% 左右,而水和磷脂的物质的量比为 150:1,所以单个 DOPG 和 DOPC 磷脂分子对应的界面水分子个数约为 30,这一结果和 Hishida 等^[22]的实验结果相符。

4 结 论

将磷脂膜包覆水滴的制备方法引入 THz-TDS 系统用于探测磷脂膜界面水合程度,有效减少了水对太赫兹波的强烈吸收。对磷脂乳液在太赫兹波段的介电谱进行测量,实验结果显示不同磷脂分子极性头部的基团差异会显著影响膜界面水分子的动力学行为,相比于体相水,DOPE 磷脂界面水分子的动力学行为被加速,而 DOPG 和 DOPC 磷脂乳液的介电常数均小于体相水。以界面水分子的介电弛豫丢失 GHz 弛豫模为标准,估测出单个 DOPG 和 DOPC 磷脂分子水化的界面水分子个数约为 30。这些结果将有助于进一步研究磷脂膜与水分子之间的相互作用。

参 考 文 献

- [1] Milhaud J. New insights into water-phospholipid model membrane interactions[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1663(1-2): 19-51.
- [2] Disalvo E A, Lairion F, Martini F, *et al.* Structural and functional properties of hydration and confined water in membrane interfaces[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1778(12): 2655-2670.
- [3] Ostmeier J, Chakrapani S, Pan A C, *et al.* Recovery from slow inactivation in K⁺ channels is controlled by water molecules[J]. *Nature*, 2013, 501(7465): 121-124.
- [4] Ghosh A, Smits M, Bredenbeck J, *et al.* Membrane-bound water is energetically decoupled from nearby bulk water: an ultrafast surface-specific investigation[J]. *Journal of the American Chemistry Society*, 2007, 129(31): 9608-9609.
- [5] Cheung M S, García A E, Onuchic J N. Protein folding mediated by solvation: water expulsion and formation of the hydrophobic core occur after the structural collapse[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99(2): 685-690.
- [6] Hsieh C H, Wu W G. Solvent effect on phosphatidylcholine headgroup dynamics as revealed by the energetics and dynamics of two gel-state bilayer headgroup structures at subzero temperatures[J]. *Biophysical Journal*, 1995, 69(1): 4-12.
- [7] Swenson J, Kargl F, Berntsen P, *et al.* Solvent and lipid dynamics of hydrated lipid bilayers by incoherent quasielastic neutron scattering[J]. *Journal of Chemical Physics*, 2008, 129(4): 045101.
- [8] Gruenbaum S M, Pieniazek P A, Skinner J L. Vibrational spectroscopy of water in hydrated lipid multi-bilayers. II. Two-dimensional infrared and peak shift observables within different theoretical approximations[J]. *Journal of Chemical Physics*, 2011, 135(16): 164506.
- [9] Fukuma T, Higgins M J, Jarvis S P. Direct imaging of individual intrinsic hydration layers on lipid bilayers at angstrom resolution[J]. *Biophysical Journal*, 2007, 92(10): 3603-3609.
- [10] Hishida M, Tanaka K. Long-range hydration effect of lipid membrane studied by terahertz time-domain spectroscopy [J]. *Physical Review Letters*, 2011, 106(15): 158102.
- [11] Tielrooij K J, Paparo D, Piatkowski L, *et al.* Dielectric relaxation dynamics of water in model membranes probed by terahertz spectroscopy[J]. *Biophysical Journal*, 2009, 97(9): 2484-2492.
- [12] Andachi T, Yamamoto N, Tamura A, *et al.* Low-frequency spectra of a phospholipid bilayer studied by terahertz time-domain spectroscopy[J]. *Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves*, 2013, 35(1): 147-157.
- [13] Choi D H, Son H, Jung S, *et al.* Dielectric relaxation change of water upon phase transition of a lipid bilayer probed by terahertz time domain spectroscopy[J]. *Journal of Chemical Physics*, 2012, 137(17): 175101.
- [14] Lu Chengzhen, Liu Wei, Sun Ping, *et al.* Terahertz time domain spectroscopy of different kinds of water[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2015, 52(4): 043004.
卢承振, 刘 维, 孙 萍, 等. 不同水的太赫兹时域光谱[J]. *激光与光电子学进展*, 2015, 52(4): 043004.
- [15] He Quanhua, Jia Dagong, Zhang Hongxia, *et al.* Study on ratio demodulation for ammonia concentration measurement based on THz-TDS[J]. *Chinese J Lasers*, 2013, 40(9): 0915002.
何全华, 贾大功, 张红霞, 等. 基于太赫兹时域光谱技术比例法解调氨气浓度的研究[J]. *中国激光*, 2013, 40(9):

0915002.

- [16] Zhao Lijun, Gao Lei, Jiang Chen, *et al.* Determination of dibutyl phthalate with THz time-domain spectroscopy[J]. *Acta Optica Sinica*, 2015, 35(s1): s130001.
赵丽君, 高磊, 姜晨, 等. 邻苯二甲酸二丁酯的太赫兹光谱研究[J]. *光学学报*, 2015, 35(s1): s130001.
- [17] Faeder J, Ladanyi B M. Molecular dynamics simulations of the interior of aqueous reverse micelles[J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2000, 104(5): 2514-2520.
- [18] Cringus D, Bakulin A, Lindner J, *et al.* Ultrafast energy transfer in water-AOT reverse micelles[J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2007, 111(51): 14193-14207.
- [19] Moilanen D E, Fenn E E, Fayer M D, *et al.* Geometry and nanolength scales versus interface interactions: water dynamics in AOT lamellar structure and reverse micelles[J]. *Journal of the American Chemistry Society*, 2009, 131(23): 8318-8328.
- [20] Kondoh M, Ohshima Y, Tsubouchi M. Ion effects on the structure of water studied by terahertz time-domain spectroscopy[J]. *Chemical Physics Letters*, 2014, 591(3): 317-322.
- [21] Yada H, Nagai M, Tanaka K. Origin of the fast relaxation component of water and heavy water revealed by terahertz time-domain attenuated total reflection spectroscopy[J]. *Chemical Physics Letters*, 2008, 464(4-6): 166-170.
- [22] Hishida M, Tanaka K, Yamamura Y, *et al.* Cooperativity between water and lipids in lamellar to inverted-hexagonal phase transition[J]. *Journal of the Physical Society of Japan*, 2014, 83(4): 359-363.