

## 二次谐波光谱和布鲁斯特角显微镜研究二棕榈酰磷脂酰胆碱和维生素 B<sub>2</sub> 的相互作用

刘江清<sup>1</sup>, 于长卉<sup>2,3</sup>, 郭源<sup>2,3</sup>, 雷圣宾<sup>1\*</sup>, 张贞<sup>2,3\*</sup>

1. 天津大学理学院化学系, 天津 300072
2. 北京分子科学国家研究中心, 中国科学院化学研究所, 北京 100190
3. 中国科学院大学, 北京 100049

**摘要** 二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)分子在气液界面上形成的 Langmuir 膜是一种重要的生物膜模拟体系, 其手性结构及其与外来物质的相互作用一直是相关学科研究的前沿问题。维生素 B<sub>2</sub>(VB<sub>2</sub>)是人体中一种重要的营养物质, 它在代谢障碍引起的脂质沉积性类疾病中有大量的实例应用, 经常在一些特殊的临床症状中有出乎意料的治疗奇效。目前, VB<sub>2</sub> 如何参与到膜上生物事件的过程和细胞乃至生命的作用过程中的研究报道较少, 特别是 VB<sub>2</sub> 分子与磷脂分子靶标的立体相互作用, 其可能发生的手性分子识别现象会在许多生物事件中起着关键作用。综合二次谐波-线二色光谱(SHG-LD)、Langmuir 膜天平和布鲁斯特角显微镜(BAM)技术初步研究了 VB<sub>2</sub> 和 DPPC 分子在气液界面上的相互作用, 分别从气液界面上介观水平和宏观水平上互补表征脂质分子在气液界面上的分子骨架自组装的结构。压缩等温线发现纯水界面 L-DPPC 和 D-DPPC 液态扩展相/液态凝聚相(LE/LC)共存阶段的膜压几乎不变, *rac*-DPPC 的共存相膜压区域稍微缩短, VB<sub>2</sub> 水溶液界面上 *rac*-DPPC 的 LE/LC 共存相消失。此外, 弹性模量研究表明 VB<sub>2</sub> 分子可以提高 L-DPPC 单分子层膜的弹性模量, 但降低 D-DPPC 和 *rac*-DPPC 单层膜的弹性模量。结合 SHG-LD 研究发现, 在膜压 13 mN·m<sup>-1</sup> 下, L-DPPC 在纯水和 VB<sub>2</sub> 水溶液界面上表面手性过量值(DCE)保持不变。与纯水界面相比较, D-DPPC 在 VB<sub>2</sub> 水溶液上 DCE 值出现反转, 而 *rac*-DPPC 的 DCE 值则不随亚相改变而变化。相同膜压下, BAM 观察到单一手性相互作用使得 L-DPPC 和 D-DPPC 在纯水界面上各自组装成不同枝臂弯曲方向的手性三叶草微畴(microdomain)。VB<sub>2</sub> 诱导 D-DPPC 微畴, 使其直径增大 1~2 倍。同时, VB<sub>2</sub> 也诱导了 *rac*-DPPC 单层膜上近似圆形状的微畴伸展, 并长出了三条有曲率的枝臂。对此可以解释为 VB<sub>2</sub> 降低了非单一手性相互作用的能量, 使得 *rac*-DPPC 出现手性相分离。与此同时, VB<sub>2</sub> 也诱导了 *rac*-DPPC 单层膜微畴的手性结构发生变化。该研究有助于理解 VB<sub>2</sub> 调节磷脂膜横向组织结构的分子机理, 在细胞膜界面发生的过程中, 脂层单层的二维特性和生物分子之间的相互作用可能决定了生物分子的亲和力。

**关键词** 二次谐波-线二色谱; 布鲁斯特角显微镜; 维生素 B<sub>2</sub>; 二棕榈酰磷脂酰胆碱; 分子间相互作用; 手性  
**中图分类号**: O657.38 **文献标识码**: A **DOI**: 10.3964/j.issn.1000-0593(2022)05-1484-06

### 引言

界面手性是当今物理化学及相关学科研究的重点科学问题。其对于药物特异性设计、手性传感器的开发以及手性分离技术的发展具有重要意义<sup>[1]</sup>。其中, 磷脂 Langmuir 单层膜因为常常作为研究生物膜的模型体系而倍受青睐<sup>[2]</sup>。二

棕榈酰磷脂酰胆碱(dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC)是 Langmuir 单层膜研究最多地分子。其在界面的手性结构及其与其他分子的相互作用一直是这方面研究的前沿问题。磷脂荧光显微镜和布鲁斯特角显微镜已经发现 L-DPPC, D-DPPC 能在气液界面形成手性相反的两种手性微畴结构<sup>[3]</sup>。如何从分子水平解释这两种相反手性微畴结构的形成机理及外来物质对此的影响, 一直是一个有待解决的科学问

收稿日期: 2021-04-19, 修订日期: 2021-06-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(21773258, 21873104, 91856121), 北京市自然科学基金项目(2202067)资助

作者简介: 刘江清, 1994 年生, 天津大学理学院化学系硕士研究生 e-mail: 1903843666@qq.com

\* 通讯作者 e-mail: shengbin.lei@tju.edu.cn; zhangz@iccas.ac.cn

题,需要联合应用具有界面选择性和灵敏性的谱学方法和成像技术进行深入研究。

维生素 B<sub>2</sub> (VB<sub>2</sub>) 作为一种针对组织脂质沉积疾病的有效药物,已经被证明可以显著改善乙酰-CoA 脱氢酶缺乏症 (riboflavin-reactive multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency, RR-MADD) 的临床症状,甚至减少或去除某些患者肌肉纤维中的脂质聚集体<sup>[4]</sup>。VB<sub>2</sub> 作为一种药物分子,它和磷脂手性的选择性相互作用可能有助于理解 VB<sub>2</sub> 如何在膜生物事件中起到关键性作用。

二次谐波-线二色谱 (second harmonic generation linear dichroism, SHG-LD) 也已经成为单层膜手性研究中一种重要的手性识别原位方法之一,可以通过表面手性过量值 (degree of chiral excess, DCE) 值的大小和方向判别界面是否具有手性结构,为描绘界面微畴组织中分子骨架的扭转排列提供依据<sup>[5]</sup>。

布鲁斯特角显微镜 (Brewster angle microscopy, BAM) 是一种实时原位监测脂质单层膜形貌和相变过程的技术<sup>[6]</sup>。其最大优势是可以给出共存相上微畴的位置、密度、形状、大小和数目及分子之间的相互作用<sup>[7]</sup>。

本工作利用二次谐波光谱、Langmuir 膜天平和布鲁斯特角显微镜研究了 L-DPPC, D-DPPC 以及 race-DPPC 三者与 VB<sub>2</sub> 分子间相互作用,发现 VB<sub>2</sub> 既可以调控界面 DPPC 微畴尺寸,也能诱导 race-DPPC Langmuir 单层膜出现手性相分离。

## 1 实验部分

### 1.1 材料和样品制备

本研究中使用的 L-DPPC, D-DPPC, race-DPPC 购买于 Sigma-Aldrich 公司 (>99.5%), 甲醇和氯仿 (98%) 购自 Fisher Scientific 公司, VB<sub>2</sub> 购买于 Sigma-Aldrich 公司 (纯度 >99.5%)。L-DPPC, D-DPPC 和 VB<sub>2</sub> 分子结构式如图 1 所示,以上试剂均未经进一步处理直接使用。实验所用纯水为超纯水仪 (Millipore company, 18.2 MΩ·cm) 处理过的去离

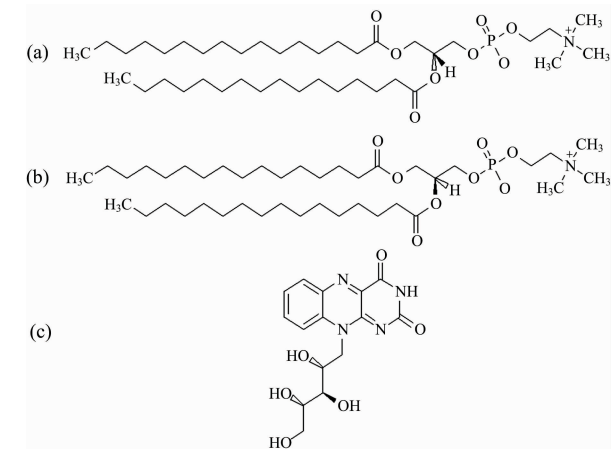


图 1 (a) L-DPPC 分子结构式; (b) D-DPPC 结构式; (c) VB<sub>2</sub> 分子结构式

Fig. 1 Structural of L-DPPC (a), D-DPPC (b) and VB<sub>2</sub> (c)

子水。所有实验均在室温 (23 °C) 和常压下进行。L-DPPC, D-DPPC, race-DPPC 溶于氯仿/甲醇混合物 (体积比: 3 : 1 V/V), 配制成 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> 浓度的溶液。为了研究 VB<sub>2</sub> 分子对 DPPC 单层膜微畴的影响, 本实验将该 DPPC 溶液用微量进样器铺展在纯水界面和亚相为 VB<sub>2</sub> 溶液 (0.085 mmol·L<sup>-1</sup>) 上形成 Langmuir 单层膜。

### 1.2 表面压力面积-等温线 (等温线)

等温线研究是在 Langmuir 膜天平中进行测量的。该天平配备了一个 324 mm×75 mm 特氟龙样品槽 (KSV, 芬兰)、两个滑障 (Delrin) 用来提供对称的薄膜压缩和平衡。采用 Wilhelmy 吊片法 (铂片) 对薄膜压缩过程中的表面压力和平均分子面积进行实时监测。使用微量进样器将 60 μL 的溶液均匀铺展在界面上, 等待 10 min 使有机溶剂完全挥发。滑障的平均压缩速率为 10 mm·min<sup>-1</sup>。所有的等温线经过多次重复。通过对每个单独的和混合的 DPPC 单层膜进行多次 Langmuir 膜平衡和 BAM 显微镜实验, 并确保每条等温线都在误差范围内, 确定其可重复性。所有实验均在常温常压下进行。

### 1.3 二次谐波-线二色谱法

二次谐波-线二色谱 (SHG-LD) 研究界面单层膜手性的实验描述已经在以往的研究报导过<sup>[8]</sup>。本研究所用的 SHG-LD 仪器简要描述如下, 脉冲宽度为 80 fs、重复频率为 82 MHz 的宽带可调谐锁模飞秒钛宝石激光器 (Tsunami 3960C, SpectraPhysics) 产生中心波长为 800 nm 的基频光作为入射光, 入射光通过偏振器和半波片, 最后通过光学透镜 (f=100 mm) 聚焦在空气/水界面上, 入射光强度为 600 mW·cm<sup>-2</sup>。界面上产生的二次谐波 (SH) 信号光通过短通滤波片过滤, 由单色仪 (WDG10, 北京精工成机电设备有限公司) 收集, 然后经过前置放大器 (SR445A, Stanford research system)、单光子计数器 (SR400, Stanford research system) 及光电倍增管 (R585, Hamamatsu) 检测。通过自动旋转半波片, 在不同的人射偏振角下进行 S 偏振检测, 得到偏振曲线, 由此偏振曲线确定体系的 DCE 值。样品池直径为 7 cm, 通过检查 H<sub>2</sub>O 界面手性信号, 确定其 DCE=0, 表明实验中手性检测不存在系统误差。使用微量进样器将浓度为 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> 的 L-DPPC, D-DPPC 和 race-DPPC 的溶液以体积分别为 25, 28 和 30 μL 铺展在界面上, 形成 Langmuir 单层膜。

### 1.4 布鲁斯特角显微镜

布鲁斯特角显微镜 (BAM) 是基于 KSV Langmuir 膜天平由本实验室自行搭建的。该装置使用 He-Ne 激光 (HNL210LB, Thorlabs) 作为入射光源。该光源波长为 632.8 nm, 输出功率为 21 mW 的平行光, 以 53.1° 的角度入射到气液界面, 经过半波片和格兰棱镜衰减和起偏后入射到气液界面。反射光通过无穷远校正的 20×Nikon 物镜和半消色差透镜 (f=200 mm) 进入到 CCD (Retiga R6™, Teledyne Photometrics), 收集 BAM 成像信息。研究中全幅图像的视野大小为 648 μm×400 μm, 使用 ImageJ 软件对 BAM 捕获的图像进行处理。图像仅进行裁剪以及图片增强, 未对图像进行其他处理。

## 2 结果与讨论

### 2.1 $\pi$ -A 等温线

如图 2 所示, 在  $VB_2$  分子的影响下, L-DPPC 单层膜起始单分子面积右移了约  $10 \text{ \AA}^2$ 。分析认为  $VB_2$  分子趋向于与 L-DPPC 酰基之间相互作用, 使 DPPC 分子亲水基团与水的接触面积变大<sup>[9]</sup>。从纯水界面上的 L-DPPC 和 D-DPPC  $\pi$ -A 等温线中可以观察到当单分子面积减小到约  $86 \text{ \AA}^2$  时, 液态扩展相 (liquid expand phase, LE 相) 开始向凝聚相 (liquid condensed phase, LC 相) 转变。表 1 为 DPPC 单层膜的不同相变点 ( $\pi_{i1}$  表示 LE/LC 共存相的初始膜压和终止膜压), 从图 2 和表 1 中可以看出 LE/LC 相都处于  $3 \sim 10 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  的膜压范围。纯水界面外消旋单层膜的 LE/LC 共存阶段的平均分子面积位置和膜压区域发生变化, 说明在相同的膜压外消旋单层膜上分子的空间排列和取向发生了变化<sup>[10]</sup>, 而  $VB_2$  水溶液上 race-DPPC 单层膜的 LE/LC 共存相的平台区

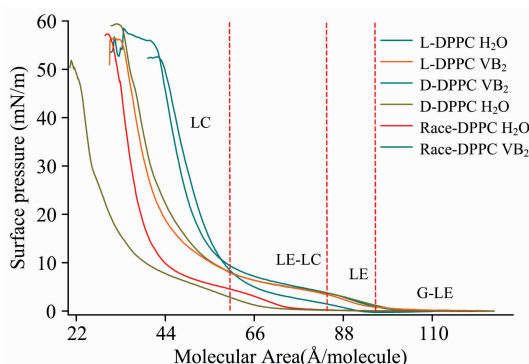


图 2 在超纯水和  $VB_2$  水溶液界面上扩散的 L-DPPC, D-DPPC 和 race-DPPC 单层膜的  $\pi$ -A 等温线

Fig. 2  $\pi$ -A isotherms of L-DPPC, D-DPPC and race-DPPC monolayers diffused at the interface between ultrapure water and  $VB_2$  aqueous solution

表 1 L-DPPC, D-DPPC, race-DPPC 的相变点和 LC 相的极限单分子面积

Table 1 The phase transition points of L-DPPC, D-DPPC, racemic DPPC and the limiting monomolecular area of LC phase

	L-DPPC		D-DPPC		race-DPPC	
	H <sub>2</sub> O	VB <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	VB <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	VB <sub>2</sub>
$\pi_{r1}$	3.5	3.0	3.3	3.9	2.2	—
$\pi_{r2}$	10.6	9.8	9.9	9.3	7.9	—
$\pi_c$	51.6	55.8	55.6	58.8	56.2	50.9
$A_c$	43.0	34.0	41.0	33.0	30.0	21.0

注:  $\pi_{r1}$  和  $\pi_{r2}$  分别为 LE/LC 共存相的初始膜压和终止膜压 ( $\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$ ),  $\pi_c$  为崩溃膜压,  $A_c$  为 LC 相的极限单分子面积 ( $\text{\AA}^2$ )

Note:  $\pi_{r1}$ ,  $\pi_{r2}$  represents the initial film pressure and the termination film pressure of LE /LC coexisting phase ( $\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$ ),  $\pi_c$  represents the collapse film pressure,  $A_c$  represents the limiting monomolecular area of LC phase ( $\text{\AA}^2$ )

域消失。两种亚相下 L-DPPC 和 D-DPPC 单层膜 LE-LC 阶段的膜压几乎不发生变化。然而, 仅通过膜压并不能推断在  $3 \sim 10 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  内,  $VB_2$  对 L-DPPC 和 D-DPPC 的分子间排列没有影响, 因为可能存在着烷基链异构化的二级相变<sup>[11]</sup>。此外, 水溶性  $VB_2$  结构中存在大量的亲水基团, 其表面活性非常低,  $VB_2$  不可能通过渗透作用取代  $H_2O$  分子, 更不可能替代高表面活性的 DPPC 分子, 因此  $VB_2$  与 DPPC 分子发生相互作用的区域主要在脂质分子的亲水头基。

$VB_2$  溶液界面 DPPC 单层膜的 LC 相线段都向左移动, 从表 1 中 L-DPPC 分别在纯水与  $VB_2$  表面上  $A_c$  差值 ( $\approx 9$ ) 来看,  $VB_2$  的这种诱导似乎没有手性选择性。因此, 在 LC 相时纯水界面上 race-DPPC 单层膜内自发的非单一手性 (heterochiral interaction,  $E_{L,D}$ ) 相互作用和  $VB_2$  分子的诱导都使可压缩面积减小, 这种自发的非单一手性相互作用大于单一手性 (homochiral interaction,  $E_{L,L}$ ,  $E_{D,D}$ ) 相互作用, 即  $L-D > L-L \approx D-D$ 。  $VB_2$  也影响了单层膜内 DPPC 分子之间横向的单一手性相互作用和非单一手性相互作用, 其强弱关系为  $L-D \approx L-L \approx D-D$ 。从表 1 中的崩溃膜压 (collapse pressure)  $\pi_c$  来看,  $VB_2$  分子的存在导致了 L-DPPC 和 D-DPPC 单层膜的崩溃膜压升高, 说明  $VB_2$  比水更有利于 DPPC 头基的自由能最小化<sup>[12]</sup>, 使 DPPC 头基的空间结构体积变小。相反,  $VB_2$  诱导 race-DPPC 的塌缩膜压降低, 破坏了这种较强的非单一手性相互作用, 导致崩溃压降低。

弹性模量  $C_S^{-1}$  或压缩性系数常常作为单分子层相变和单分子层上分子排列紧密程度的重要参量, 是分析单分子层力学性质的重要参数<sup>[13-14]</sup>。为研究 DPPC 单分子层在 LE/LC 共存相的特性, 进一步分析了在超纯水和  $VB_2$  水溶液上 DPPC 单层膜弹性模量的数值。弹性模量  $C_S^{-1}$  可以通过  $\pi$ -A 曲线进行计算获得, 其计算公式为

$$C_S^{-1} = -A \left( \frac{\partial \pi}{\partial A} \right)_{T \text{ 恒定}}$$

式中,  $\pi$  为单分子层的表面压力,  $A$  为单分子面积。

如图 3 所示, 在单层膜处于 LE/LC 相时, 表面张力处于

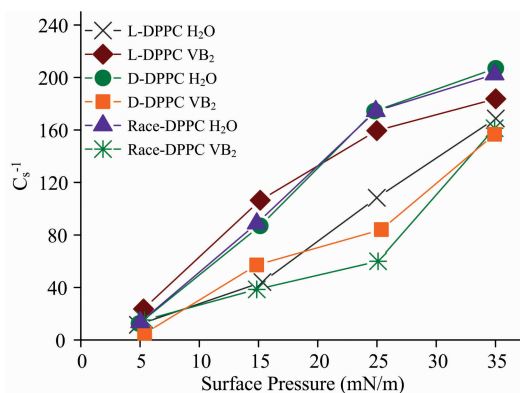


图 3 在超纯水和  $VB_2$  水溶液界面上 L-DPPC, D-DPPC 和 race-DPPC 单层膜的表面张力分别为 5, 15, 25 和  $35 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  时的弹性模量

Fig. 3 The elastic Modulus of L-DPPC, D-DPPC and race-DPPC monolayer on  $\mu\text{L}$  ultrapure water and  $VB_2$  aqueous solution are 5, 15, 25 and  $35 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$

5~15 mN · m<sup>-1</sup>，由于 VB<sub>2</sub> 的存在，L-DPPC 弹性模量升高，L-DPPC 的单层膜的分子排列得更紧密，L-DPPC 烷基链相对界面法线的取向变得有序。当膜压为 15~35 mN · m<sup>-1</sup> 时，VB<sub>2</sub> 仍然使 L-DPPC 烷基链变得更有序，诱导 D-DPPC 和 race-DPPC 烷基链变得更无序。为了进一步理解这种相互作用的微观细节，利用 SHG-LD 方法研究 DPPC 分子在界面上的手性变化。

2.2 SHG-LD 光谱

不同手性的 DPPC 分子单分子膜在 VB<sub>2</sub> 溶液界面相互作用不同，因此有必要从分子水平研究界面 L-DPPC，D-DPPC 和 race-DPPC 分子的手性变化。采用 SHG-LD 方法来检测膜压为 13 mN · m<sup>-1</sup> 时，L-DPPC，D-DPPC 和 race-DPPC 的手性，图 4 为膜压 13 nN · m<sup>-1</sup> 时 L-DPPC，D-DPPC 和 race-DPPC 的 SH 强度随入射偏振化曲线。从图 4(a, c) 可以

看出，在纯水界面上，L-DPPC 和 D-DPPC 的 SH 信号强度相近 (~60 counts)。而在 VB<sub>2</sub> 水溶液亚相，D-DPPC 与 SH 信号强度相近 (~40 counts)，L-DPPC 信号强度有所提升 (~55 counts)，表明此时分子取向更加有序；D-DPPC 信号强度有所下降 (~40 counts)；表明此时分子取向变得较为无序。从图 4(e, f) 中可见，race-DPPC 在两种亚相上的 SH 信号强度大致相等 (~73 counts)，说明 VB<sub>2</sub> 对 race- DPPC 微畴在界面上的分子结构没有影响。如表 2 所示，L-DPPC 和 D-DPPC 在纯水界面的 DCE 值表明，这两种 DPPC 分子的自组装微畴具有微弱的手性<sup>[15]</sup>；当亚相为 VB<sub>2</sub> 水溶液，D-DPPC 的 DCE 增大，表明 D-DPPC 单层膜内的宏观微畴也具有一定的手性结构。为了形象说明 VB<sub>2</sub> 对 DPPC Langmuir 膜的影响，对此体系进行了布鲁斯特角显微镜测量。

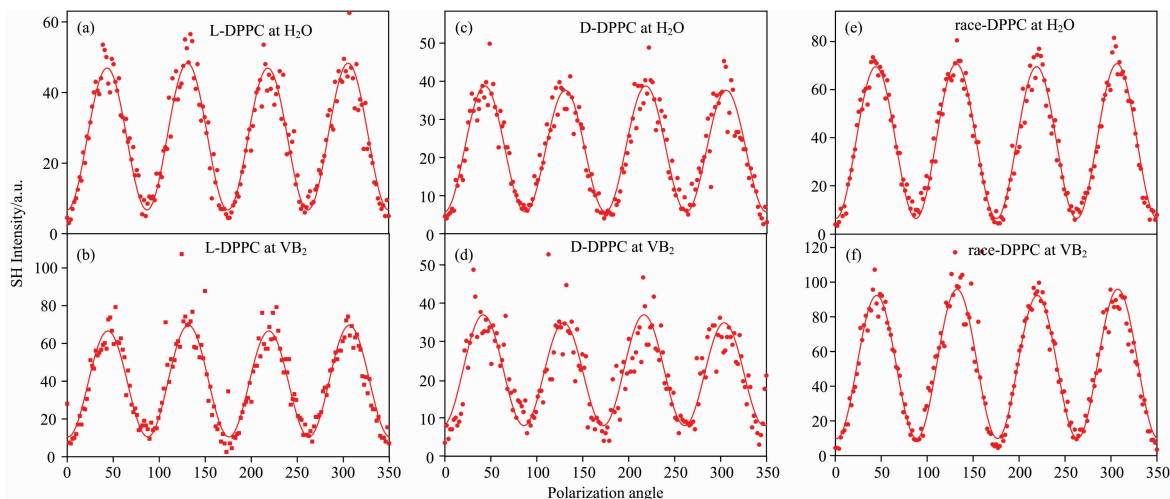


图 4 单层膜处于 13 mN · m<sup>-1</sup>，(a)，(b) 为 L-DPPC 在纯水和 VB<sub>2</sub> 水溶液表面的 SH 强度和 DCE 值；(c)，(d) 为 D-DPPC 在纯水和 VB<sub>2</sub> 水溶液表面的 SH 强度和 DCE 值；(e)，(f) 为 race-DPPC 在纯水和 VB<sub>2</sub> 水溶液表面的 SH 强度和 DCE 值

Fig. 4 The monolayer is at 13 mN · m<sup>-1</sup>，(a)，(b) represent SH Intensity and DCE of L-DPPC on pure water and VB<sub>2</sub> aqueous solution；(c)，(d) represent SH Intensity and DCE of E-DPPC on pure water and VB<sub>2</sub> aqueous solution；(e)，(f) represent SH Intensity and DCE of L-DPPC on pure water and VB<sub>2</sub> aqueous solution

表 2 单层膜处于 13 mN · m<sup>-1</sup>，L-DPPC，D-DPPC 和 race-DPPC 单层膜的 DCE 值

Table 2 The monolayer is at 13 mN · m<sup>-1</sup>，DCE Value of L-DPPC，D-DPPC and race-DPPC monolayers diffused at the interface between ultrapure water and VB<sub>2</sub> aqueous solution

Monolayer	DCE Value
L-DPPC H <sub>2</sub> O	-0.033
L-DPPC VB <sub>2</sub>	-0.029
D-DPPC H <sub>2</sub> O	-0.034
D-DPPC VB <sub>2</sub>	0.127
race-DPPC H <sub>2</sub> O	-0.025
race-DPPC VB <sub>2</sub>	-0.024

2.3 BAM 观察横向微畴

如图 5(a) 和 (c) 所示，纯水界面上的 L-DPPC 和 D-DPPC 单层膜上都经历了成核和生长过程。当膜压升高至 13 mN ·

m<sup>-1</sup>，微畴会长出伸展臂以逆时针或者顺时针方式弯曲，L-DPPC 和 D-DPPC 形成直径大小为 15~30 μm 的左旋和右旋的螺旋三叶草形状的手性微畴，与文献报道一致<sup>[16]</sup>。这种三叶草形成的条件与有机溶液中初始的 DPPC 的分子手性有关<sup>[16]</sup>。此外，压缩速率和温度均对最后形成微畴的大小有影响，但是不会改变 L-DPPC 和 D-DPPC 相反的宏观手性<sup>[17-18]</sup>。从物理角度分析，微畴的形状是微畴之间静电排斥和线张力之间竞争作用的结果，脂质分子垂直偶极距之间的静电排斥使畴变长，而线张力将畴拉成紧凑的形状<sup>[19]</sup>。

如图 5(d) 所示，在 VB<sub>2</sub> 水溶液界面上 D-DPPC 微畴在 13 mN · m<sup>-1</sup> 处长成直径大小约为 40 μm 的大三叶草结构，类似的这种左旋和右旋三叶草微畴对应的 DCE 分别为正值和负值，与本研究的 SHG-LD 的结果相符合。与纯水亚相相比，微畴与微畴之间的距离增大，微畴的面积增大了 1~2 倍。VB<sub>2</sub> 分子诱导微畴变大的原因，可能来源于 VB<sub>2</sub> 在弱酸性条件下质子化。质子化后的 VB<sub>2</sub> 与 DPPC 的磷脂头基发生

静电相互作用,使得微畴之间相互吸引。

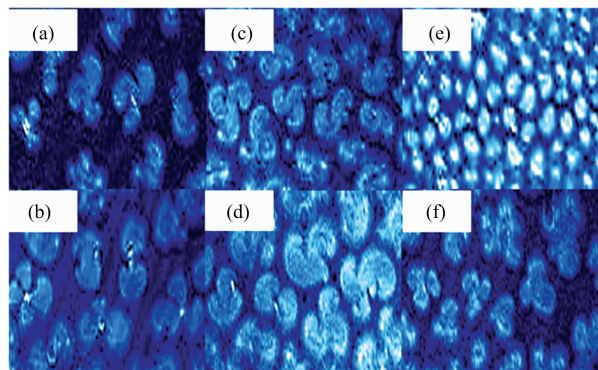


图 5 单层膜处于  $13 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ , (a), (b) 分别为在纯水和  $\text{VB}_2$  水溶液表面上的 L-DPPC 微畴; (c), (d) 分别为在纯水和  $\text{VB}_2$  水溶液表面上的 D-DPPC 微畴; (e), (f) 分别为在纯水和  $\text{VB}_2$  水溶液表面上的 race-DPPC 微畴, 每张图像大小为  $150 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$

Fig. 5 The monolayer is at  $13 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ , (a), (b) represent L-DPPC microdomains on the surface of pure water and  $\text{VB}_2$  aqueous solutions; (c), (d) represent D-DPPC microdomains on the surface of pure water and  $\text{VB}_2$  aqueous solutions; (e), (f) represent race-DPPC microdomains on the surface of pure water and  $\text{VB}_2$  aqueous solutions. The size of each image is  $150 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$

如图 5(b)所示,  $\text{VB}_2$  水溶液上的 L-DPPC 的 BAM 图像除了三叶草微畴外, 还出现了四叶草微畴, 其枝臂曲率的方向没有统一的指向, 而且其微畴枝臂上的手性状态也不一致。L-DPPC 和 D-DPPC 单层膜在  $\text{VB}_2$  水溶液界面上出现了镜像的心脏型微畴, 这种不同于三叶草形状微畴的出现可能是由 DPPC 不同水解位点产生的两个对映体产物的分离。此外, 还观察到 DPPC 分子在界面上不同位置碰撞成核生长的速率也不尽相同。导致图 5(b)和(d)中夹杂着其他心脏型结构的微畴。另外, 在图 5(b)中也发现了四叶草微畴结构, 可能因 L-DPPC 的水解产物聚集而形成。图 5(e)展示了  $\text{VB}_2$  和 race-DPPC 的相互作用。从图中可见, race-DPPC 单层膜的微畴的密度较大, 最后长成直径为  $10 \mu\text{m}$  大小的圆形微畴, 非单一手性相互作用使微畴的密度增大, 畴与畴之间的斥力较大, 在纯水界面上的 race-DPPC 的微畴圆形有被拉长的趋势。SHG-LD 也表明其 DCE 不等于零[图 4(f)]。这是一个有趣的新现象。其原因可能有两种, 一是微畴内对映体过剩, 存在着手性相分离; 二是 DPPC 的水解产物聚集引起的。这种现象从图 5(f)可以看得更清楚。 $\text{VB}_2$  溶液的界面 race-DPPC 微畴密度降低, 脂质分子聚集集中垂直偶极矩的斥力

## References

- [1] Moon R J, Martini A, Nairn J, et al. Chemical Society Reviews, 2011, 40: 3941.
- [2] Stefaniu C, Brezesinski G, Moehwald H. Advances in Colloid and Interface Science, 2014, 208: 197.
- [3] Ou-yang W, Yamamoto T, Aida T, et al. Thin Solid Films, 2008, 516: 2649.

相互作用使圆形的微畴周围出现了枝臂, 存在着手性相分离, 导致了非零值的 DCE。由二次谐波光谱测量的 DCE 的绝对值的大小反映了微畴结构的不对称度, 表明了微畴内对映体的相对剩余量。微畴中某一种对映结构的相对剩余量越多, 就会在宏观上表现出相应的宏观手性。

图 6(a)–(f)为  $\text{VB}_2$  水溶液上 L-DPPC 结构随膜压变化的 BAM 图。从此图能够实时观察到了在  $\text{VB}_2$  水溶液上的 L-DPPC 的成核生长过程。因此可以推断 L-DPPC 在  $\text{VB}_2$  溶液界面自组装过程。首先 DPPC 界面上成核生长至心脏型微畴, 然后心脏型微畴之间相互识别, 心脏型的尖端边缘的分子密度很大, 心脏尖端与尖端之间进行组装, 形成了 S 型的微畴结构, 最后这些 S 型的微畴结构, 组装成了左旋的三叶草。

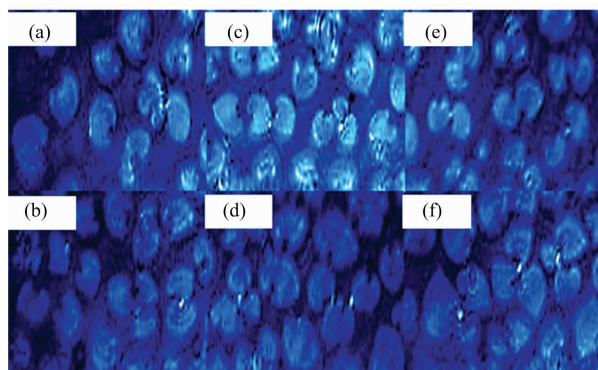


图 6 L-DPPC 单层膜处于  $13 \sim 15 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  处在  $\text{VB}_2$  水溶液界面三叶草生长过程(a–f)的 BAM 图片, 每张图像大小为  $150 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$

Fig. 6 L-DPPC monolayer film at the interface of  $13 \sim 15 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  and  $\text{VB}_2$  aqueous solution during the growth process (a–f) of clover. The size of each image is  $150 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$

## 3 结论

通过二次谐波-线二色(SHG-LD)光谱、布鲁斯特角显微镜(BAM)及膜压曲线研究了维生素  $\text{B}_2$  ( $\text{VB}_2$ ) 与二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)气液界面 Langmuir 膜的相互作用。

(1) 膜压曲线表明,  $\text{VB}_2$  可与 DPPC 分子发生明显的相互作用。 $\text{VB}_2$  可以提高 L-DPPC 单层膜的稳定性。

(2) SHG-LD 测量表明,  $\text{VB}_2$  对于 L/D-DPPC 手性的形成具有促进作用, 并且诱导 race-DPPC 也形成手性结构。

(3) BAM 研究表明,  $\text{VB}_2$  可使 D-DPPC 三叶草形状的大小增长  $1 \sim 2$  倍, 且不改变分枝数。 $\text{VB}_2$  可诱导 race-DPPC 发生手性相分离。

- [ 4 ] Wu Y, Han J Z, Wang Y Y, et al. *Journal of International Medical Research*, 2020, 48: 8.
- [ 5 ] Verbiest T, Kauranen M, Maki J J, et al. *The Journal of Chemical Physics*, 1995, 103: 8296.
- [ 6 ] Hénon S, Meunier J. *Review of Scientific Instruments*, 1991, 62: 936.
- [ 7 ] Fanani M L, Hartel S, Oliveira R G, et al. *Biophysical Journal*, 2002, 83: 3416.
- [ 8 ] Dong B, Bai R, Zheng W, et al. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2019, 123: 11798.
- [ 9 ] Nieuwkerk A C, van Kan E J M, Kimkes P, et al. *Langmuir*, 1998, 14: 6448.
- [10] Nassoy P, Goldmann M, Bouloussa O, et al. *Physical Review Letters*, 1995, 75: 457.
- [11] Hossain M M, Suzuki T, Kato T. *Langmuir*, 2000, 16: 9109.
- [12] Weidemann G, Vollhardt D. *Biophysical Journal*, 1996, 70: 2758.
- [13] Behroozi F. *Langmuir*, 1996, 12: 2289.
- [14] Khattari Z, Maghrabi M, Al-Abdullah T. *Phase Transitions*, 2015, 88: 668.
- [15] Lin L, Liu A, Guo Y. *Journal of Physical Chemistry C*, 2012, 116: 14863.
- [16] Li J B, Miller R, Vollhardt D, et al. *Thin Solid Films*, 1998, 327: 84.
- [17] Nag K, Boland C, Rich N, et al. *Biochim. Biophys. Acta*, 1991, 1068: 157.
- [18] Hossain M M, Imura K I, Kato T. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2008, 319: 295.
- [19] McConnell H M, Moy V T. *The Journal of Physical Chemistry*, 1988, 92: 4520.

## Interaction Between Dipalmityl Phosphatidylcholine and Vitamin B<sub>2</sub> Studied by Second Harmonic Spectroscopy and Brewster Angle Microscopy

LIU Jiang-qing<sup>1</sup>, YU Chang-hui<sup>2,3</sup>, GUO Yuan<sup>2,3</sup>, LEI Sheng-bin<sup>1\*</sup>, ZHANG Zhen<sup>2,3\*</sup>

1. Department of Chemistry, School of Science, Tianjin University, Tianjin 300072, China

2. Beijing National Research Center for Molecular Sciences, Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract** Langmuir monolayers formed by dipalmityl phosphatidylcholine (DPPC) molecules at the air/liquid interface are an important model system for studying the biomembranes, and their chiral structure and interaction with foreign substances have been the frontiers of related fields. Vitamin B<sub>2</sub> (VB<sub>2</sub>) is an important medicine for treating lipid deposition diseases caused by metabolic disorders. The molecular mechanism of the interaction between VB<sub>2</sub> and phospholipids is the key to understanding the function of VB<sub>2</sub>. In this report, the interaction between VB<sub>2</sub> and DPPC at the air/water interface was studied using second-harmonic generation linear dichroism (SHG-LD), Langmuir membrane balance and Brewster Angle Microscopy (BAM). The compression isotherm shows that the surface pressure in the liquid expansion phase/liquid condensed phase (LE/LC) of L-DPPC and D-DPPC at the water interface is almost unchanged, while the film pressure region in the co-existing phase of race-DPPC is slightly shortened. The LE /LC coexistence phase of race-DPPC disappears at the interface of the VB<sub>2</sub> aqueous solution. In addition, the elastic modulus studies show that the VB<sub>2</sub> molecule can increase the elastic modulus of L-DPPC monolayers, but reduce the elastic modulus of D-DPPC and race-DPPC monolayers. SHG-LD results showed that the Degree of Chiral Excess (DCE) of L-DPPC at the interface between VB<sub>2</sub> and water was unchanged at the surface pressure of 13 mN · m<sup>-1</sup>, and the DCE of D-DPPC at the interface between VB<sub>2</sub> and water was reversed. The DCE value of race-DPPC does not change with the change of subphase. Under the same surface pressure, BAM observed that the interaction of L-DPPC and D-DPPC to assemble into homochiral microdomains with different arm curvature directions at the pure water interface, and VB<sub>2</sub> could induced the increase of D-DPPC microdomains by 1 to 2 times. Meanwhile, VB<sub>2</sub> induced the extension of approximately circular microdomains on race-DPPC monolayer and the growth of three curvature arms, which could be explained as VB<sub>2</sub> reducing the energy of non-monolayer chiral interactions and resulting in chiral phase separation. VB<sub>2</sub> also induced changes in the chiral structure of race-DPPC monolayers. This study is of great significance for understanding the regulation of VB<sub>2</sub> on the macrostructure and biological function of the phospholipid membrane.

**Keywords** SHG-LD; BAM; VB<sub>2</sub>; DPPC; Molecular interaction; Chiral

\* Corresponding authors

(Received Apr. 19, 2021; accepted Jun. 17, 2021)