

抗冻剂抗冻机制的近红外光谱与分子模拟研究^{*}

王海朋^{a,b} 蔡文生^{a,b} 邵学广^{*,a,b}

(^a南开大学化学学院分析科学研究中心 天津市生物传感与分子识别重点实验室 药物化学生物学国家重点实验室 天津 300071)

(^b物质绿色创造与制造海河实验室 天津 300192)

摘要 抗冻剂在生物样品的冷冻保存中广泛使用,生物体为抵御冻害产生抗冻蛋白,因此,抗冻机制研究一直备受关注。抗冻剂通过与水/冰晶发生相互作用,使体系的冰点降低并抑制体系中冰晶的形成。水结构对温度变化非常敏感,结合温控近红外光谱技术和化学计量学方法,利用随温度变化的水光谱信息,研究了低温环境下水的结构以及抗冻剂与水/冰晶之间产生的相互作用,在分子层面上认识了抗冻剂的抗冻机制。利用分子动力学模拟考察了原子尺度上抗冻剂与水/冰晶相互作用的细节,并与光谱实验手段结合揭示了抗冻剂的抗冻机制。本文概述了抗冻剂抗冻机制的研究进展,总结了温控近红外光谱及分子动力学模拟在抗冻剂与水/冰晶之间相互作用研究的工作进展,旨在为抗冻剂抗冻机制研究提供新的思路。

关键词 近红外光谱; 化学计量学; 分子动力学模拟; 抗冻剂; 抗冻机制

Antifreeze Mechanism of Antifreeze Agents by Near Infrared Spectroscopy and Molecular Simulations^{*}

Wang, Haipeng^{a,b} Cai, Wensheng^{a,b} Shao, Xueguang^{*,a,b}

(^a Research Center for Analytical Sciences, Tianjin Key Laboratory of Biosensing and Molecular Recognition, State Key Laboratory of Medicinal Chemical Biology, College of Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China)

(^b Haihe Laboratory of Sustainable Chemical Transformations, Tianjin 300192, China)

Abstract Cryopreservation is an essential technology for long-term storage of organs, tissues, cells and other biological samples. During cryopreservation, antifreeze agents are commonly used to reduce the freezing point of the system and inhibit the formation of ice crystals (ice nucleation, ice growth, and ice crystal recrystallization), thereby avoiding damage to biological samples caused by uncontrolled ice formation at low temperature. However, due to the difficulty in obtaining microscopic details of the interaction between antifreeze agents and water/ice in experiment, the mechanism of antifreeze has not yet been clearly understood. The hydrogen-bonded structure of water is very sensitive to temperature changes. By combining temperature-dependent near-infrared spectroscopy (NIRS) and chemometric methods, the hydrogen-bonded structure of water in low-temperature environments and the interactions between antifreeze agents and water/ice crystals are studied. The antifreeze mechanisms are understood at the molecular level using spectral information of water that changes with temperature. The details of the interaction between antifreeze agents and water/ice crystals at the atomic level are investigated using molecular dynamics (MD) simulation, and the antifreeze mechanisms are revealed by combining spectroscopic experimental methods. This Account provides an overview of the research progress on the antifreeze mechanism of antifreeze agents, with a focus on the recent advances in the study of the interaction between antifreeze agents and water/ice crystals using temperature-dependent NIRS and MD simulations. Overall, the Account aims to provide new ideas for the study of antifreeze mechanisms and deepen our understanding of the molecular details of the antifreeze mechanism. Finally, the challenges and prospects of using NIRS to reveal the antifreeze mechanism of antifreeze agents are discussed and possible further improvements are proposed, such as developing more effective chemometric methods to extract the spectral information of water molecules with different hydrogen-bonded structures from the NIRS of water, introducing importance sampling technique specially designed for water icing into MD simulations to enhance the sampling efficiency, so that MD simulations can be used to explore the entire process of water freezing inhibition by antifreeze agents, deepening the understanding of the antifreeze mechanism.

Keywords near-infrared spectroscopy; chemometric method; molecular-dynamics simulation; antifreeze agents; mechanism of antifreeze

^{*} Dedicated to the 90th anniversary of *Acta Chimica Sinica*.

^{*} E-mail: xshao@nankai.edu.cn; Tel.: 022-23503430

Received April 29, 2023; published June 15, 2023.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 22174075, 22073050) and the Haihe Laboratory of Sustainable Chemical Transformations.

^{*} 庆祝《化学学报》创刊 90 周年。

项目受国家自然科学基金(Nos. 22174075, 22073050)和物质绿色创造与制造海河实验室资助。

1 引言

冷冻保存(Cryopreservation)是指在非常低的温度下(−80 °C或−196 °C)实现器官、组织、细胞和其他生物样品的长期储存过程^[1-4]. 冷冻保存的生物样品不仅能保持正常的结构和解冻后功能的完整性,而且允许进一步的临床应用与基础研究,例如器官移植、组织工程学、再生医学等^[3,5]. 然而,在冷冻过程中,冰晶的不可控形成会导致细胞机械损伤和渗透压应力,对细胞内和细胞外的结构造成不可逆的破坏,最终使得解冻后的生物样品丧失生理功能^[4-5]. 为了最大限度降低冷冻过程对细胞的破坏并获得高的细胞存活率,需要使用抗冻剂来抑制冰晶的形成,涉及冰成核、冰生长和冰晶重结晶^[5-6].

广义上的抗冻剂指的是一类加入到目标液体(水或含水液体)中以降低体系冰点(即避免体系结冰)或抑制体系中冰晶/水合物^[7-9]生长的物质,其种类繁多,通常包括小分子类(如乙二醇、甘油(glycerol, GCL)、二甲基亚砜(DMSO)等)、糖类(如蔗糖、海藻糖等)、聚合物类(如聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA)等)、纳米材料、水凝胶等^[3]. DMSO是目前低温保存领域使用最广泛的抗冻剂^[2]. 尽管它可以成功保存相当多的生物样品,但由于具有细胞毒性,其不可避免地会造成细胞毒性损伤甚至死亡,限制了其在临床应用中的广泛使用^[3,5]. 抗冻蛋白(antifreeze proteins, AFPs)是生物体为抵御低温冻害而进化出的一类蛋白质,具有热滞后活性(thermal hysteresis, TH)、动态冰成形(dynamic ice shaping, DIS)能力和冰重结晶抑制(ice recrystallization inhibition, IRI)活性,这使得其在低温保存领域展现出极大的潜在应用价值^[6,10-12]. 1977年, Raymond等^[13]提出了吸附-抑制机制,认为 AFPs是通过吸附在冰晶的特定表面诱发 Kelvin效应来抑制冰晶的生长. 该机制是目前公认的 AFPs 抗冻机制^[4,14],但是,由于没有明确 AFPs 与冰晶结合的具体作用力,这种机制通常只能解释 AFPs 引起的冰晶生长速率的降低和热滞后活性的产生而不能解释冰晶的生长停止. 后来研究者们对 AFPs 与冰晶之间相互作用力进行了广泛研究^[15-21],发现 AFPs 的抗冻机制基本可以分为两大类,“氢键结合”机制和“受体-配体”机制. “氢键结合”机制反映了氢键相互作用力在激活 AFPs 抗冻活性方面的主导作用^[15]. “受体-配体”机制^[16]认为 AFPs 冰晶结合位点表面或所形成的类冰结构表面与冰晶表面互补,故而也称“表面互补”机制. 表面互补的作用力归因于多种相互作用力,包括氢键相互作用力、疏水相互作用力和范德华力等^[16]. 例如,基于吸附-抑制机制的“包合物锚定”机制认为 AFPs 通过疏水作用使水分子按晶格方式排列,并通过氢键锚定这些水分子晶格(类冰状水结构),而后携带着这部分水分子(anchored clathrate water, ACW)通过氢键与冰面匹配结合^[21-22]. 由于实验体系难以获得 AFPs 与冰-水界面层相互作用的微观细节,精确解析 AFPs 的抗冻机制仍是一个科学难

题.

近红外光谱(NIRS)是研究水结构以及水与溶质相互作用的有力工具^[23-24]. 它不仅能反映含氢基团的结构信息,还能反映氢键等分子内和分子间相互作用的信息,可用于研究水溶液体系或含水的实际样品体系(例如食品、生物组织等^[25]). 由于研究体系中富含水,当加入扰动条件(例如温度、浓度、pH等)时,水的 NIRS 会发生明显变化,变化的水光谱能反映物质结构的改变或水与溶质之间的相互作用,故而可获得分子尺度上的关键信息. 2006年, Tsenkova等^[26]提出了“水光谱组学(Aquaphotomics)”,标志着一个新研究领域的出现. 水光谱组学是指以水作为研究对象,利用光谱技术探测水结构在温度等扰动条件下产生的变化,从分子水平上间接反映溶质的结构与功能. 到目前为止,水光谱组学已经取得了丰硕的研究成果. 例如 Ozaki 课题组^[27]研究了不同温度下水的 NIRS,借助化学计量学方法解析出了5种不同类型的水结构,即含有 0~4 个氢键的水结构. Gowen 课题组^[28]通过研究无机盐(NaCl, KCl, MgCl₂ 和 AlCl₃)水溶液中水的 NIRS 光谱信息随温度改变而产生的变化,发现 NaCl 和 KCl 倾向于扰乱水分子间的氢键网络,而 MgCl₂ 和 AlCl₃ 倾向于促进水分子间氢键的形成. 臧恒昌课题组^[29]将水光谱组学用于药物生产纯化过程中的醇-水体系,提出了一种利用水的 NIRS 信息变化定量分析发酵过程中低含量甲醇的方法. 本课题组基于温控 NIRS 技术,开展了大量水光谱组学方面的研究工作. 例如利用水的 NIRS 信息和化学计量学方法实现了有机小分子水溶液^[23,30-31]、血清^[32]和脯氨酸溶液^[33]等混合体系的定量分析;通过研究不同温度下的葡萄糖 NIRS,发现葡萄糖与水之间的相互作用可以稳定四面体水结构,从而使水的结构更加有序^[34];在限域环境中,通过温控 NIRS 技术获得了反胶束中壳层水和核心水结构的光谱信息^[35],还有水凝胶在溶胀过程中的不同水结构信息^[36].

为了从微观层面上认识抗冻剂的抗冻机制,研究者们运用光谱技术和分子动力学(MD)模拟技术开展了大量富有成效性的工作. Oh等^[37]通过分析 DMSO-水混合物的红外光谱发现, DMSO 与水在共晶点附近的相互作用最强,这可能是混合物冰点降低的原因. Zhang等^[38]采用分子动力学(MD)模拟证实 DMSO 是通过与水形成氢键来增加未冻结水的比例,从而增强了溶液体系的低温耐受性. Meister 课题组^[39]使用振动和频光谱(vibrational sum-frequency generation, VSFG)技术探测到了 III 型 AFP 冰结合位点处类冰状水结构的存在,证实了 AFPs 识别冰晶的预有序结合(preordering-binding, POB)机制的合理性. Ebbinghaus 课题组^[40-41]使用 THz 光谱技术研究了 AFPs 水合动力学,证实了长程蛋白-水相互作用在激活 AFPs 抗冻活性方面的关键作用. 近年来,本课题组也在抗冻剂抗冻机制的研究方面开展了多项研

究工作. 例如使用温控 NIRS 结合 MD 模拟研究了低温下 DMSO 与水之间的相互作用, 揭示了 DMSO-水混合物体系冰点降低的机理^[42]; 采用 NIRS 结合 MD 模拟的方法研究了聚脯氨酸(Polypoline, PPro)与冰-水界面产生结合作用的原理^[43]; 使用 MD 模拟揭示了 AFPs 与冰晶之间相互作用的细节^[44-46]; 使用 MD 模拟和自由能计算研究了影响 AFPs 与冰晶结合能力的因素^[47]. 本文对我们课题组开展的抗冻剂抗冻机制的 NIRS 及 MD 模拟的研究工作进行评论, 旨在为抗冻剂抗冻机制研究提供新的思路.

2 近红外光谱用于抗冻机制的研究

在 DMSO-水二元混合物中, 水既能充当氢键受体又能作为氢键供体, 而 DMSO 仅能充当氢键受体, 这种差异导致混合物的性质(例如冰点^[3]、粘度^[48]、混合热^[49]、疏水性^[50]等)出现异常^[38]. 尽管人们对 DMSO-水混合物体系进行了广泛的研究, 但体系中氢键的形成和断裂机制仍不清楚^[37]. 因此, 深入理解 DMSO 与水的相互作用, 对揭示 DMSO 的抗冻机制至关重要. 为了研究 DMSO 与水之间的相互作用^[42,51], 采集了不同浓度 DMSO-水混合物在 20 °C 时的 NIRS, 如图 1A 所示. 通过连续小波变换(CWT)计算了原始光谱的近似四阶导数光谱. 图 1B 为纯水和纯 DMSO 的近似四阶导数 NIRS, 可以看到, 纯水在 7109, 6978 和 6839 cm^{-1} 处均

存在吸收峰, 可分别归属为游离、弱氢键键合和强氢键键合的 OH 基团. 而纯 DMSO 在 7120, 7000, 6908, 6846, 6731 和 6510 cm^{-1} 处均出现吸收峰, 其中前 5 个谱峰源自于 CH 基团伸缩振动和弯曲振动的组合频, 第 6 个峰可归属为 S=O 基团的伸缩振动倍频峰. 由图 1C 可见, 水的 3 个特征峰的强度随 DMSO 含量的增加迅速减小, 其中弱氢键键合的 OH 基团光谱特征峰几乎被完全掩盖, 说明 DMSO 与水之间的相互作用破坏了水分子的氢键网络, 导致水结构的改变. 此外, 图 1C 中的 6442 cm^{-1} 处还出现了一个新的谱峰, 该谱峰归属于 DMSO 与水形成氢键的 S=O 基团. 图 1D 给出了该谱峰强度随 DMSO 含量的变化, 可以看到该谱峰强度随 DMSO 含量的增加先快速增加, 30% 时增速放缓, 60% 时达到最大, 随后迅速降低. 由于 30% 和 60% 两个明显的拐点分别对应 DMSO 与水的物质的量比为 1:2 和 2:1 的情况, 故而据此推测 DMSO-水混合物中可能存在 1:2 和 2:1 的氢键结构, 表示为 DW2 和 D2W. DW2 结构是指 DMSO 上的 S=O 与 2 个水分子形成氢键且随着 DMSO 含量的增加而增多, 对应 DMSO 含量少于水含量的情况; D2W 结构是指水分子与 2 个 DMSO 形成氢键且随着水含量的减少而减少, 对应 DMSO 含量明显多于水含量的情况. 为了进一步了解低温对水结构的影响, 采用温控 NIRS 测定了 -70~20 °C 条件下 30% DMSO-水混合物的 NIRS, 并使用 CWT 提高光谱的分辨率, 结果

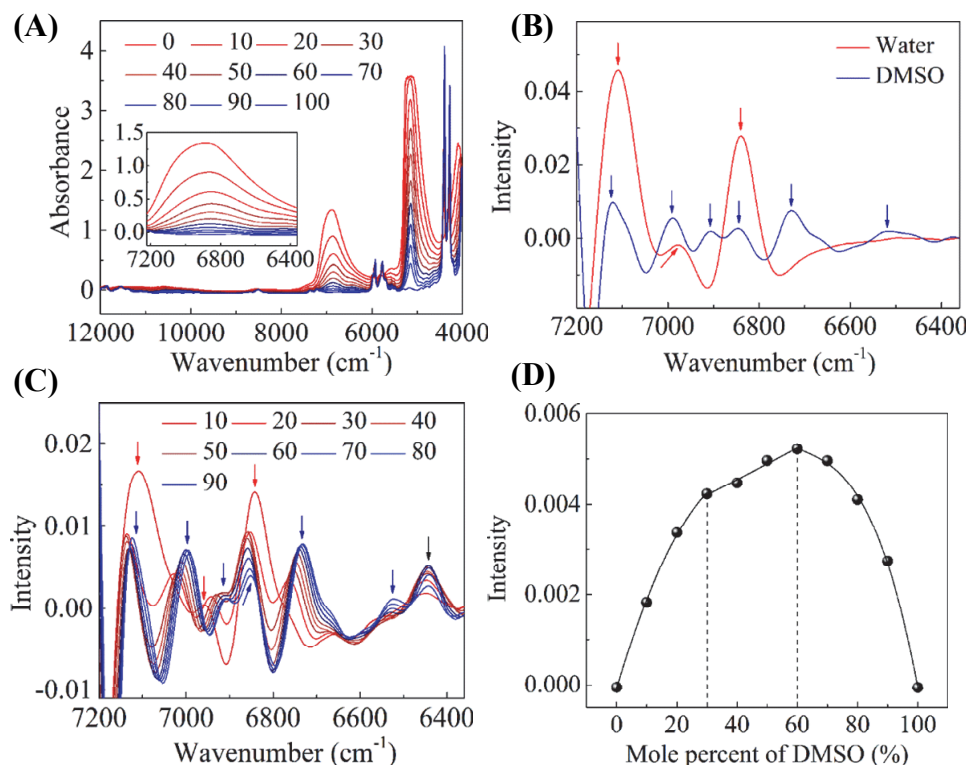


图 1 (A) $x\%$ DMSO-水混合物的 NIRS; (B) 水和 DMSO 的高分辨 NIR 光谱; (C) $x\%$ DMSO-水混合物的高分辨率 NIRS; (D) $x\%$ DMSO-水混合物在 6442 cm^{-1} 处的谱峰强度变化^[42]

Figure 1 (A) NIRS of $x\%$ DMSO-water mixture; (B) transformed NIRS of water and DMSO; (C) transformed NIRS of $x\%$ DMSO-water mixture; (D) variation of the peak intensity at 6442 cm^{-1} of $x\%$ DMSO-water mixture^[42]

发现,随着温度的降低,DW2 光谱特征峰的强度逐渐增加,表明混合物中形成了更多的 DW2 结构.在超冷条件下,水趋向于形成四面体结构.DMSO-水混合物则因降温会产生 DW2 结构,该结构在一定程度上抑制了四面体结构的形成,这可能正是混合物冰点下降的原因^[42,51].为了了解蛋白质对 DMSO 抗冻性能的影响,使用温控 NIRS 研究了蛋白质模型化合物甲酰胺(FA)对 DMSO-水混合物的氢键结构的影响^[52].通过 CWT 提高 NIRS 的分辨率,得到了 DMSO 与水形成氢键的光谱特征峰,而且发现该特征峰的强度随着 FA-DMSO-水混合物体系中 FA 的含量增加而降低,这可能说明 FA 取代了部分的 DMSO,与水形成了氢键.进一步利用交替三线分解(ATLD)和多元线性回归方法,分离出了与水含量以及 DMSO 含量相关的光谱特征变化,但没有发现与 FA 含量相关的显著光谱特征变化,这表明尽管 FA 可能会使 DMSO-水混合物体系的抗冻效果略微降低,但 DMSO 仍是发挥抗冻作用的主要成分.

与 DMSO 相比,AFPs 属于生物大分子型抗冻剂,由于包含众多的官能团,故而与水产生相互作用的形式更加多样.AFPs 分子通常包含大量的亲水基团和疏水基团,属于典型的两亲型生物大分子,它可以通过平衡亲水基团与水的氢键相互作用和疏水基团与水的疏水相互作用将自身稳定分散在溶剂水中.温度的改变会导致分子间相互作用的变化,例如降低温度会使疏水相互作用变弱而氢键相互作用变强,进而引起 AFPs 的结构与功能(抗冻活性)的变化,因此,借助温控 NIRS 技术可帮助理解 AFPs 的抗冻机制.聚脯氨酸(PPro)是最近开发出的一类 AFPs 模拟物,具有生物相容性好、合成成本低等优点,已在卵母细胞和贴壁细胞的冷冻保存中得到成功应用,展现出增强的抗冻活性^[53-54].然而,目前关于 PPro 的抗冻机制的研究还尚未报道,因此,为了更好地应用和优化该材料,甚至启发新颖抗冻材料的设计,

有必要对 PPro 的抗冻机制进行深入研究.为了研究 PPro 抑制冰生长的机理^[43],在 -4°C 下采集了不同 PPro 浓度的冰-水混合物在不同结冰时刻的 NIRS.图 2A 展示了通过小波包变换(WPT)方法得到的高分辨 NIRS 及冰的特征光谱($6300\sim 6000\text{ cm}^{-1}$).可以看到,在光谱测量初期,由于光谱中只含有溶液而无冰的成分,故而在冰特征光谱范围内几乎没有冰的光谱吸收.随着冰的生长,光谱信号逐渐增强,直到结冰过程结束,最后光谱强度基本保持不变.图 2B 展示了冰在 6142 cm^{-1} 特征峰处随时间的强度变化,反映了不同浓度 PPro 溶液中冰的生长过程.可以看到,在 10 、 20 和 $30\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 三个低浓度条件下,冰的特征峰强度变化与纯水结冰过程相似,表明低浓度 PPro 溶液不能展现抗冻活性.而在 40 和 $50\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 这两个高浓度条件下,冰的特征峰强度增速变缓,且在结冰末期,冰的特征峰强度明显低于纯水和低浓度 PPro 溶液结冰末期的特征峰强度,说明高浓度 PPro 溶液能有效抑制冰生长.为了研究 PPro 吸附到冰-水界面层时水与 PPro/冰之间的相互作用,分析了冰含量为 30% 的 PPro 冰-水混合物的高分辨率光谱,结果发现,达到高浓度的 PPro 冰-水混合物的高分辨率光谱中出现了新的特征峰,这些特征峰与 PPro/冰发生相互作用的界面水结构有关,它主要存在于 PPro 与冰晶之间.考虑到 PPro 分子中含有丰富的亚甲基疏水官能团,推测界面水结构可能来自于亚甲基与冰之间的水合水,且具有三个或四个氢键^[43].

3 抗冻机制的分子模拟研究

分子动力学(MD)模拟是在原子水平上研究分子体系结构与性质的计算机模拟方法.得益于计算机硬件技术的发展和普及,MD 模拟已被广泛应用于生物和非生物体系中物理化学机理的研究^[55-58].通过分析 MD 模拟

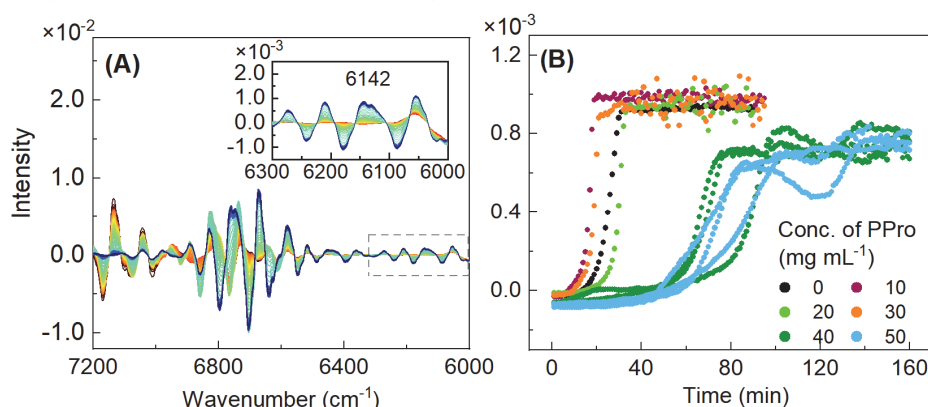


图2 -4°C 下 $40\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ PPro 溶液中冰生长过程的高分辨 NIR 光谱成分和冰的特征光谱(A)以及不同浓度的 PPro 溶液光谱在 6142 cm^{-1} 处的特征峰强度随时间的变化(B). 其中, (A) 中的内插图是冰的特征光谱的放大, 波数区间为 $6300\sim 6000\text{ cm}^{-1}$; 40 和 $50\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 PPro 溶液实验重复了三次

Figure 2 NIR spectral component with enhanced resolution for ice growth in $40\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ PPro solution (A) and the change of peak intensity at 6142 cm^{-1} with time of PPro solutions with different concentration (B) at -4°C . The inset shows an amplification of the spectra from 6300 to 6000 cm^{-1} . For the concentration of 40 and $50\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, three repeated experiments were conducted. Reproduced from Ref. [43] with permission from American Chemical Society, copyright 2023

的轨迹不仅可以获取变化过程中体系中的稳定态和过渡态结构,还可以获得物理化学过程的自由能变化等热力学统计结果,这使得从原子尺度上定量分析分子结构与功能的关系、揭示复杂化学和生物过程的机理成为了可能^[14,55],极大地弥补了实验手段的不足。

近年来,MD模拟已被广泛用于 AFPs 在冰-水混合物体系的模拟研究,而且已经成为揭示 AFPs 与冰结合稳定性以及冰晶分子尺度生长动力学的有力工具^[59]。例如 Chakraborty 等^[60]使用 MD 模拟从蛋白构象和溶剂化水的角度论证了 AFP I 是通过苏氨酸甲基周围的有序水笼与冰晶发生相互作用而不是直接通过氢键; Chakraborty 等^[61]通过 MD 模拟和自由能计算证实了 sbwAFP 与冰晶基面的结合能力最强; Grabowska 等^[62]利用 MD 模拟阐明了 AFP III 的抗冻活性依赖于其周围溶剂化水向类冰结构的转变以及这种结构与冰晶表面的匹配程度。研究表明,尽管超活性抗冻蛋白(hypAFPs)具有一定结构化周围水分子的能力,但在水溶液中不能诱导水分子形成类冰结构^[63-66],那么它究竟是如何识别冰晶并与之结合?为了回答这一问题,本课题组使用 MD 模拟在原子水平上研究了超活性 TmAFP 抑制冰生长的整个过程,揭示了 AFPs 与冰晶之间的协同作用,并提出了 TmAFP 与冰面结合的三阶段作用机制模型:促进-吸附-抑制^[44]。在 TmAFP 与冰晶结合之前,由于 TmAFP 的冰结合位点(ice-binding site, IBS)结构化了周围的部分水分子,故而在一定范围内(该范围既是 IBS 的水合水区域,又是冰的界面水区域)加速了其正下方冰晶的生长。随着冰前锋的不断推进,IBS 周围的水分子更加有序,最终成为 IBS 与冰晶结合的桥梁,使得 TmAFP 牢固锚定在冰面上。稳定吸附的 TmAFP 诱发了 Kelvin 效应,从而抑制了冰晶的进一步生长。此研究阐明了 TmAFP 是通过其与冰晶之间的协同效应,促进冰晶的快速生长,最终实现 TmAFP 与冰晶的结合。为了进一步了解是否其他 AFPs 也具有促进冰生长的作用,使用 MD 模拟研究了五种具有不同结构和不同活性天然 AFPs 抑制冰生长的过程,包括 RiAFP(超活性),sfAFP(超活性),TmAFP(超活性),LpAFP(中等超活性)和 AFP III(中等超活性)^[45]。结果发现,只有超活性 AFPs 才能促进冰面的生长,而中等活性 AFPs 不能,说明促进冰生长在 AFPs 中并不是普遍现象。此外,这项研究还发现冰面类型对 AFPs 促进冰生长的作用起着关键作用,即 AFPs 促进冰生长的现象只能发生在具有较厚冰/水界面层的基面冰上。为了理解与 TmAFP 尺寸相似的 LpAFP 表现为中等活性的原因,使用 MD 模拟和自由能计算^[52]研究了 LpAFP 的 IBS 上苏氨酸(Thr)含量对其与冰晶结合能力的影响^[47]。首先通过突变 LpAFP 的 IBS 上的部分苏氨酸残基,构建了一系列 LpAFP 突变体结构,使其 IBS 上苏氨酸含量逐步增加,然后利用增强采样方法计算了 LpAFP 及其突变体与冰晶结合过程的自由能变化。结果表明,IBS 上苏

氨酸含量越高,其与冰晶的结合在能量上越有利;当突变的 IBS 与 TmAFP 的 TXT (Thr-X-Thr, Thr 是苏氨酸残基, X 是非保守的氨基酸(主要是疏水氨基酸))基序一样时,其与冰的结合能力最强。通过分析 IBS 周围液态水分子的含量、IBS 与冰面之间的氢键个数和氢键网络,进一步研究了 LpAFP 突变体与冰晶结合能力增强的原因,结果表明,苏氨酸含量越高,IBS 锚定的液态水分子数目越多,其稳定存在的时间也越长,与冰面之间的氢键网络也越稳定。综上所述, LpAFP 表现为中等活性的主要原因是 IBS 处苏氨酸含量的缺乏,因此,增加苏氨酸的含量可以有效提高中等活性 AFPs 抗冻活性。

抗冻糖蛋白(antifreeze glycoproteins, AFGPs)分子极具柔性且含有独特的二糖基团,是目前最有效的冰重结晶抑制剂,但其抗冻机制仍存在广泛的争议。2018 年, Molinero 课题组^[67]利用 MD 模拟证实了 AFGPs 通过肽链和糖基上的疏水基团与冰晶表面可逆结合。同年, Meister 课题组^[68]通过微流体交换实验证实了 AFGPs 的两个亚型都是通过不可逆的方式与冰晶结合。最近,本课题组^[46]使用 MD 模拟研究了 AFGP8 的抗冻机制,结果表明 AFGP8 既可以通过其疏水性甲基可逆地结合到冰晶表面,又可以通过其亲水性糖基部分不可逆地与冰晶结合。通过自由能计算进一步研究了这两种结合模式的强度,表明了糖基结合比肽链结合更稳定。在糖基结合中, AFGP8 的一个或两个二糖侧链通过氢键与冰面锚定并被冻结在冰晶格中,导致不可逆的结合;在肽链结合中, AFGP8 通过甲基的疏水相互作用吸附到冰面上,导致可逆结合。此外,当 AFGP8 的一个二糖部分被冻结时,其他二糖部分对水的显著扰动不仅防止了周围的水冻结,还导致前进的冰锋融化。实验上发现,较大的 AFGP 亚型在抑制冰生长方面表现出更优异的性能,因此,不可逆的结合机制可在很大程度上解释 AFGP 对冰生长抑制的尺寸效应,即与较小的亚型(AFGP7, AFGP8)相比,较大的亚型具有更多的未冻结糖部分,可以长距离干扰水分子,使其展现出更优的抗冻性能。

值得一提的是,本课题组还将 MD 模拟应用于结合了化学计量学方法的 NIRS 实验,在原子水平上给与实验结果的分析以强有力的支持。在对 DMSO 抗冻机制的研究中^[42],为了验证 DW2 结构(即 S=O 与 2 个水分子形成的氢键结构)的存在是 DMSO-水混合物体系冰点降低的原因,采用 MD 模拟分别对 30%DMSO-水混合物在 -70 °C 和 20 °C 时动力学过程进行了模拟,然后统计了模拟轨迹中游离 S=O 基团、D2W 和 DW2 氢键结构的出现概率。结果表明,混合物中的 DMSO 和水分子主要以 DW2 结构的形式存在,而且在低温时 DW2 的含量有所增加,与实验结果高度一致,有力支持了 DW2 结构抑制四面体水结构的形成而导致混合物冰点降低的结论。在对聚脯氨酸抗冻机制的研究中^[43],为了验证 NIRS 探测到界面水结构的稳定存在,构建了大小两个 PPro 冰-水混合物模拟体系,分别对应低浓度(无抗

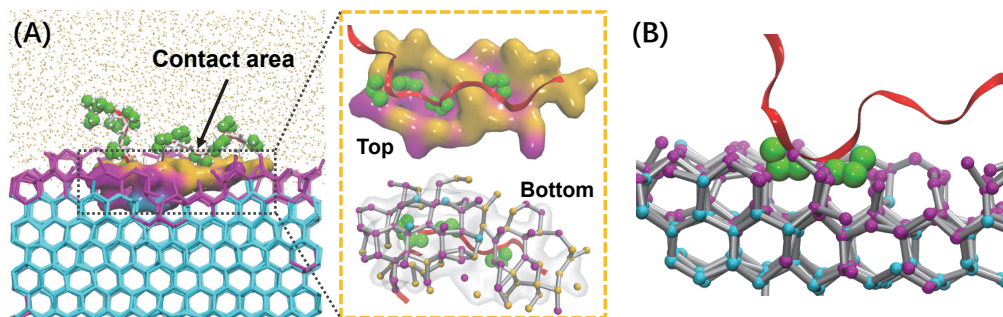


图3 聚脯氨酸(PPro)分子与冰生长面结合的微观视图。(A) 结冰区域的水分子被分类为液态、类冰状和冰, 分别用橙色点、紫色线和青色线表示。聚脯氨酸(PPro)分子的肽骨架和亚甲基分别以红色 NewRibbon 表示和绿色球体表示。PPro 和冰之间的有效接触区域以 QuickSurf 表示。右侧的放大图为接触区域的俯视图和仰视图。(B) PPro 亚甲基与接触区域内的类冰状水形成的空腔结合

Figure 3 Adsorption of methyl groups of PPro on the growth surface. (A) Water molecules in the area of ice growth are classified as liquid, ice-like, and ice, shown by orange dots, purple, and cyan lines, respectively. The peptide backbone and methylene groups of PPro are shown in red NewRibbon representation and as green spheres, respectively. Effective contact area between PPro and ice, represented by QuickSurf. Right-hand side: top and bottom views of the contact area. (B) Binding of the methylene groups to the cavities formed by ice-like water within the contact area. Reproduced from Ref. [43] with permission from American Chemical Society, copyright 2023

冻活性)和高浓度(有抗冻活性)的 PPro 冰-水混合物实验体系。图 3 为聚脯氨酸(PPro)分子与冰生长面结合的微观视图。由图 3A 可见, 模拟体系结冰区域的水分子被分类为液态水分子、冰状水分子和冰分子, 并且 PPro 的部分单体与冰状水分子层接触, 而在接触区域内, 具有三到四个氢键的冰状水分子主要分布在亚甲基的周围。据此推测, NIRS 探测到的界面水结构可能与这种冰状水分子有关。为了证实上述推测, 统计了接触区域内不同类型水分子的含量随模拟时间的演化规律, 结果发现, 在小模拟体系中, 冰状水分子的含量随模拟先增大后趋于平稳, 与高浓度 PPro 实验体系中界面水特征峰的强度随结冰量变化的规律一致。与冰状水相反, 液态水分子含量随模拟时间先快速衰减后趋于平稳, 而冰分子的含量则在整个模拟时间内保持在零左右。上述结果表明, 接触区域在冰生长阶段经历了一个动态水分子交换过程, 即由于亚甲基的去溶剂化作用, 接触区域内的液态水分子不断被冰状水分子取代。这种取代导致接触区域的壳层结构受阻, 使得 PPro 的亚甲基嵌入冰的生长面(如图 3B 所示), 诱发开尔文效应, 从而抑制了冰生长。在大模拟体系中, 冰状水分子的含量在达到峰值后, 出现了明显的衰减过程, 与低浓度 PPro 实验体系在结冰末期界面水特征峰的强度随结冰量变化的规律一致, 说明接触区域内冰状水分子含量的下降是 PPro 低浓度下不能展现抗冻活性的原因。因此, 稳定存在的界面水(冰状水)在 PPro 抑制冰生长的过程中起着至关重要的作用。

4 总结与展望

抗冻剂在生物样品的冷冻保存中发挥着重要的作用, 然而, 关于抗冻剂在低温环境下如何与水/冰晶结合或产生相互作用从而降低体系冰点及抑制体系中冰晶的形成一直以来未得到清晰且系统的解析。本文概述了

抗冻剂抗冻机制的研究进展, 总结了温控近红外光谱及分子动力学模拟在抗冻剂抗冻机制研究的工作进展, 旨在为抗冻剂抗冻机制的研究提供新的思路。基于本文的总结, 对抗冻剂抗冻机制研究的展望如下: (1)从水的近红外光谱中提取不同氢键结构水分子的光谱信息具有挑战性, 仍需针对此问题开展相关的化学计量学方法研究, 如基于离散小波变换的高分辨光谱信号提取方法、基于主成分(载荷)旋转的解析方法等; (2)在 MD 模拟中采用重要性采样技术^[55]以增强采样, 由于重要性采样方法依赖于能够描述变化过程的反应坐标, 建议设计新型的反应坐标以高效描述水结冰过程, 从而能够极大提高 MD 的采样效率, 使得抗冻剂抑制水结冰的模拟从水分子的均相结冰开始, 而不是从冰-水混合物开始成为现实, 这样可以展现抗冻剂从抑制冰核形成到吸附到新生冰晶的整个过程, 有利于加深对抗冻机制的理解; (3)通过应用新颖光谱分析手段, 例如振动和频光谱(vibrational sum-frequency generation, VSFG)、太赫兹光谱(THz)、偏振分辨飞秒红外光谱^[69]等, 并与 MD 模拟结合, 获得抗冻剂与冰-水界面层产生相互作用的细节信息, 实现对抗冻机制的多层次、多角度的认识与理解。

作者简介



王海朋, 南开大学化学学院 2022 级博士生, 现于南开大学化学信息学实验室攻读博士学位。目前的研究方向为抗冻剂在水结冰过程中的作用机制研究。



蔡文生, 南开大学教授, 博士生导师. 1994 年获中国科学技术大学博士学位. 主要从事分子模拟与理论化学计算领域的研究工作, 发展了一系列重要性采样和自由能计算新方法, 开展了一系列新算法在复杂化学和生物过程、蛋白质-配体结合自由能计算以及分子机器运动机制解析中的应用研究. 目前正在开展基于人工智能的分子模拟新方法及应用研究.



邵学广, 南开大学教授, 博士生导师, 1992 年获中国科学技术大学中日联合培养博士学位. 2002 年获教育部第三届高校青年教师奖, 2003 年获国家自然科学基金委杰出青年基金. 主要从事化学计量学及近红外光谱分析方面的研究工作. 建立了小波变换和免疫算法用于复杂信号解析和在线处理的新方法以及一系列用于近红外光谱信号处理和建模的化学计量学方法.

References

- Nagashima, H.; Kashiwazaki, N.; Ashman, R. J.; Grupen, C. G.; Nottle, M. B. *Nature* **1995**, *374*, 416.
- Ma, Y.; Gao, L.; Tian, Y.; Chen, P.; Yang, J.; Zhang, L. *Acta Biomater.* **2021**, *131*, 97.
- Chang, T.; Zhao, G. *Adv. Sci.* **2021**, *8*, 2002425.
- Lin, M.; Cao, H.; Li, J. *Acta Biomater.* **2023**, *155*, 35.
- Liu, Z.; Zheng, X.; Wang, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 5685.
- He, Z.; Liu, K.; Wang, J. *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51*, 1082.
- Hu, W.; Chen, C.; Sun, J.; Zhang, N.; Zhao, J.; Liu, Y.; Ling, Z.; Li, W.; Liu, W.; Song, Y. *Commun. Chem.* **2022**, *5*, 33.
- Chen, Z.; Liu, W.; Sun, J.; Chen, C.; Song, Y. *J. Mol. Liq.* **2023**, *370*, 121008.
- Chen, Z.; Sun, J.; Wu, P.; Liu, W.; Chen, C.; Lang, C.; Dai, S.; Zhou, W. *Fuel* **2023**, *33*, 127041.
- DeVries, A. L.; Wohlschlag, D. E. *Science* **1969**, *163*, 1073.
- Marshall, C. B.; Fletcher, G. L.; Davies, P. L. *Nature* **2004**, *429*, 153.
- Bar Dolev, M.; Braslavsky, I.; Davies, P. L. *Annu. Rev. Biochem.* **2016**, *85*, 515.
- Raymond, J. A.; DeVries, A. L. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1977**, *74*, 2589.
- Zhang, W.; Shao, X.; Cai, W. *Prog. Chem.* **2021**, *33*, 1797 (in Chinese). (张维佳, 邵学广, 蔡文生, 化学进展, **2021**, *33*, 1797.)
- DeVries, A. *Annu. Rev. Physiol.* **1983**, *45*, 245.
- Jia, Z.; Davies, P. L. *Trends in Biochem. Sci.* **2002**, *27*, 101.
- Yang, D.; Sax, M.; Chakrabarty, A.; Hew, C. *Nature* **1988**, *333*, 232.
- Knight, C. A.; Driggers, E.; DeVries, A. L. *Biophys. J.* **1993**, *64*, 252.
- Zhang, W.; Laursen, R. A. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 34806.
- Knight, C. A. *Nature* **2000**, *406*, 249.
- Garnham, C. P.; Campbell, R. L.; Davies, P. L. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 7363.
- Nutt, D. R.; Smith, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13066.
- Shao, X.; Kang, J.; Cai, W. *Talanta* **2010**, *82*, 1017.
- Wojtków, D.; Czarnecki, M. A. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 10552.
- Chu, X.; Chen, P.; Li, J.; Liu, D.; Xu, Y. *J. Instrum. Anal.* **2020**, *39*, 1181 (in Chinese). (褚小立, 陈瀑, 李敬岩, 刘丹, 许育鹏, 分析测试学报, **2020**, *39*, 1181.)
- Tsenkova, R. *J. Near Infrared Spec.* **2009**, *17*, 303.
- Maeda, H.; Ozaki, Y.; Tanaka, M.; Hayashi, N.; Kojima, T. *J. Near Infrared Spec.* **1995**, *3*, 191.
- Gowen, A. A.; Amigo, J. M.; Tsenkova, R. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *759*, 8.
- Li, D.; Li, L.; Quan, S.; Dong, Q.; Liu, R.; Sun, Z.; Zang, H. *J. Mol. Struct.* **2019**, *1182*, 197.
- Kang, J.; Cai, W.; Shao, X. *Talanta* **2011**, *85*, 420.
- Shan, R.; Zhao, Y.; Fan, M.; Liu, X.; Cai, W.; Shao, X. *Talanta* **2015**, *131*, 170.
- Wang, M.; Cui, X.; Cai, W.; Shao, X. *Acta Chim. Sinica* **2020**, *78*, 125 (in Chinese). (汪明圆, 崔晓宇, 蔡文生, 邵学广, 化学学报, **2020**, *78*, 125.)
- Han, L.; Cui, X.; Cai, W.; Shao, X. *Talanta* **2020**, *217*, 121036.
- Cui, X.; Liu, X.; Yu, X.; Cai, W.; Shao, X. *Anal. Chim. Acta* **2017**, *957*, 47.
- Wang, M.; Sun, Y.; Duan, C.; Cai, W.; Shao, X. *J. Near Infrared Spec.* **2022**, *30*, 154.
- Ma, B.; Cai, W.; Shao, X. *Appl. Spectrosc.* **2022**, *76*, 773.
- Oh, K. I.; Rajesh, K.; Stanton, J. F.; Baiz, C. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 11375.
- Zhang, N.; Li, W.; Chen, C.; Zuo, J. *Comput. Theor. Chem.* **2013**, *1017*, 126.
- Meister, K.; Strazdaite, S.; DeVries, A. L.; Lotze, S.; Olijve, L. L.; Voets, I. K.; Bakker, H. J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111*, 17732.
- Ebbinghaus, S.; Meister, K.; Prigozhin, M. B.; DeVries, A. L.; Havenith, M.; Dzubiella, J.; Gruebele, M. *Biophys. J.* **2012**, *103*, L20.
- Meister, K.; Ebbinghaus, S.; Xu, Y.; Duman, J. G.; DeVries, A.; Gruebele, M.; Leitner, D. M.; Havenith, M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110*, 1617.
- Zhao, H.; Sun, Y.; Guo, Y.; Cai, W.; Shao, X. *Chem. J. Chin. Univ.* **2020**, *41*, 1968 (in Chinese). (赵洪涛, 孙岩, 郭一畅, 蔡文生, 邵学广, 高等学校化学学报, **2020**, *41*, 1968.)
- Han, L.; Wang, H.; Cai, W.; Shao, X. *J. Phys. Chem. Lett.* **2023**, *14*, 4127.
- Cui, S.; Zhang, W.; Shao, X.; Cai, W. *J. Chem. Inf. Model.* **2022**, *62*, 5165.
- Cui, S.; Zhang, W.; Shao, X.; Cai, W. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2022**, *24*, 7901.
- Zhang, W.; Liu, H.; Fu, H.; Shao, X.; Cai, W. *J. Phys. Chem. B* **2022**, *126*, 10637.
- Cui, S.; Zhang, W.; Shao, X.; Cai, W. *Chem. J. Chin. Univ.* **2022**, *43*, 97 (in Chinese). (崔韶丽, 张维佳, 邵学广, 蔡文生, 高等学校化学学报, **2022**, *43*, 97.)
- Schichman, S. A.; Amey, R. L. *J. Phys. Chem.* **1971**, *75*, 98.
- Catalán, J.; Díaz, C.; García-Blanco, F. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5846.
- Banerjee, S.; Roy, S.; Bagchi, B. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 12875.
- Han, L.; Sun, Y.; Wang, S.; Su, T.; Cai, W.; Shao, X. *J. Raman Spectrosc.* **2022**, *53*, 1686.
- Su, T.; Sun, Y.; Han, L.; Cai, W.; Shao, X. *Spectrochim. Acta A* **2022**, *266*, 120417.
- Graham, B.; Bailey, T. L.; Healey, J. R. J.; Marcellini, M.; Deville, S.; Gibson, M. I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 15941.
- Qin, Q.; Zhao, L.; Liu, Z.; Liu, T.; Qu, J.; Zhang, X.; Li, R.; Yan, L.; Yan, J.; Jin, S.; Wang, J.; Qiao, J. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 18352.
- Fu, H.; Shao, X.; Cai, W.; Chipot, C. *Acc. Chem. Res.* **2019**, *52*, 3254.
- Fu, H.; Zhang, H.; Chen, H.; Shao, X.; Chipot, C.; Cai, W. *J. Phys. Chem. Lett.* **2018**, *9*, 4738.
- Zong, Z.; Li, Q.; Hong, Z.; Fu, H.; Cai, W.; Chipot, C.; Jiang, H.; Zhang, D.; Chen, S.; Shao, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 14451.
- Zong, Z.; Mazurkewich, S.; Pereira, C. S.; Fu, H.; Cai, W.; Shao, X.; Skaf, M. S.; Larsbrink, J.; Lo Leggio, L. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 1449.
- Nada, H.; Furukawa, Y. *Polym. J.* **2012**, *44*, 690.
- Chakraborty, S.; Jana, B. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 11678.
- Chakraborty, S.; Jana, B. *Langmuir* **2017**, *33*, 7202.
- Grabowska, J.; Kuffel, A.; Zielkiewicz, J. *J. Chem. Phys.* **2016**, *145*, 075101.

- [63] Duboué-Dijon, E.; Laage, D. *J. Chem. Phys.* **2014**, *141*, 22D529.
- [64] Hudait, A.; Moberg, D. R.; Qiu, Y.; Odendahl, N.; Paesani, F.; Molinero, V. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2018**, *115*, 8266.
- [65] Marks, S. M.; Patel, A. J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2018**, *115*, 8244.
- [66] Modig, K.; Qvist, J.; Marshall, C. B.; Davies, P. L.; Halle, B. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 10189.
- [67] Mochizuki, K.; Molinero, V. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 4803.
- [68] Meister, K.; DeVries, A. L.; Bakker, H. J.; Drori, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 9365.
- [69] Groot, C. C. M.; Meister, K.; DeVries, A. L.; Bakker, H. J. *J. Phys. Chem. Lett.* **2016**, *7*, 4836.

(Cheng, B.)