

膜脂非对称与渗透压差协同调控巨型单层囊泡形态相图 *

欧阳皓琛^{1)2)#} 王碧原^{2)#} 孙运海¹⁾²⁾ 高欢²⁾³⁾ 金帆²⁾³⁾
付航^{1)†} 李明^{1)2)‡} 陆颖^{1)2)‡†}

1) (中国科学院物理研究所, 软物质物理重点实验室, 北京 100190)

2) (中国科学院大学物理学院, 北京 100049)

3) (中国科学院深圳先进技术研究院, 深圳 518055)

合成细胞分裂依赖膜形变与体积调控的协同作用, 但膜自发曲率与约化体积如何共同决定囊泡是否进入分裂相关形变通道仍缺乏系统实验研究。本研究以巨型单层囊泡为模型, 通过在 POPC/POPE 基础膜中引入不同浓度 LPC 调节膜有效自发曲率, 并通过改变外液葡萄糖浓度施加跨膜渗透压差, 结合阶梯式微流控低扰动换液平台和原位共聚焦成像, 系统考察囊泡形变路径及形变稳态形貌。结果表明, 渗透压差增大通过降低约化体积推动囊泡形变加深, 而自发曲率决定形变优先沿外凸还是内陷方向发展; 无 LPC 时囊泡主要表现为球形、口形及内凹颈部等内凹形貌, 随 LPC 浓度升高则逐步转向梨形、带颈部哑铃形和长尾形等外凸形貌。进一步建立了囊泡形变稳态形貌的实验相图, 发现与分裂兼容的哑铃形颈部结构仅出现在适中的正自发曲率和适中的体积收缩条件下。该研究阐明了自发曲率与约化体积协同调控囊泡形变的规律, 为可分裂人工细胞的理性设计提供了实验依据。

关键词: 巨型单层囊泡; 自发曲率; 约化体积; 囊泡形变; 合成细胞

PACS: 87.16.D-, 87.14.Cc

1 引言

合成细胞为自下而上研究生命基本过程提供了一个可控平台, 并被广泛用于探索生命体系的物理原理及构建具有可编程功能的类细胞系统^[1-7]。对膜界面上元件工作机制的解析和重构使得研究人员能够赋予了合成细胞功能^[8-10], 实现了物质与信号的跨膜传递。在众多核心功能中, 膜塑形与分裂被认为是合成细胞走向自我复制和增值能力的关键步骤^[2,11-13]。这一过程是建立在膜生长、体积调节和磷脂分子重排等前驱过程之上^[14]。因此, 膜曲率、渗透压和脂质组成等物理化学因素如何共同决定囊泡是否能够进入分裂相关的形变通道, 已成为合成细胞研究中的重要问题^[15-17]。

同等贡献作者。

† 通信作者. E-mail: fuhang@iphy.ac.cn

‡ 通信作者. E-mail: mingli@iphy.ac.cn

‡† 通信作者. E-mail: yinglu@iphy.ac.cn

* 国家重点研发计划 (批准号: 2025YFA0922903)、中国科学院战略性先导科技专项 (批准号: XDB0480000)、国家自然科学基金 (批准号: T2221001 to M.L., 12504245 to F.H.)、中国科学院基础研究青年科学家项目 (批准号: YSBR-104)、中国博士后科学基金 (批准号: 2024M763506)

巨型单层囊泡（GUVs）因其尺寸接近细胞、脂质组成明确且便于光学观测，被广泛用作人工细胞的模型区室^[18,19]。作为一种经典膜模型，GUV 为研究膜组成、曲率弹性和渗透条件对形态转变的影响提供了理想体系^[20]。然而，并非所有囊泡形变都与分裂相关^[21]。对合成细胞而言，具有分裂意义的中间态通常要求囊泡形成两个串联的子区室并通过颈部结构相连，其几何特征应与后续子囊泡分离过程相兼容^[22]。相比之下，内凹颈部更易形成嵌套结构，长尾形则常处于失稳演化状态，因此二者通常不对应有效且稳定的分裂路径。^[16]。因此，一个关键问题在于：在何种物理条件下，GUV 会优先进入与分裂兼容的形变分支，而非转入其他非分裂形貌。

从理论上讲，囊泡形变可由 Helfrich 膜弹性理论描述^[23]。在该框架下，膜的自发曲率和囊泡的约化体积是决定囊泡形态选择的两个关键物理量^[22]。其中，脂质组成及其跨叶分布可改变膜的本征曲率偏好^[24]，而渗透压失衡则可通过调节体积收缩改变约化体积^[25]。尽管这两个因素均被认为与囊泡形变密切相关，但它们如何协同决定囊泡形变方向、稳态选择以及分裂兼容形貌出现的参数窗口，仍缺乏系统的实验图景。

基于此，本文以 GUV 为模型体系，通过在基础膜中引入磷脂酰乙醇胺（PE）建立负自发曲率背景，并通过向外液加入溶血磷脂酰胆碱（LPC）调节膜外叶曲率偏好，从而实现膜有效自发曲率的连续调控。同时，通过改变外液溶质浓度施加跨膜渗透压差，以调节囊泡约化体积。结合低扰动微流控换液与原位共聚焦成像，本文系统考察了不同自发曲率和渗透压条件下 GUV 的动态形变行为及其稳态形貌分布。结果表明，囊泡形变并非在整个参数空间中均匀发生，而是受到膜曲率偏好与体积约束的共同限制；其中，与分裂兼容的颈缩形貌仅出现在特定参数窗口内。基于此，本文进一步构建了囊泡形变稳态形貌图谱，从实验上建立了连接膜自发曲率、约化体积与形貌选择之间的参数化关系，为理解合成细胞分裂相关形变的物理机制及其理性设计提供了实验基础。

2 理论模型：囊泡形变的边界条件

根据 Helfrich 模型，对于闭合的囊泡体系，自由能 G 可表示为^[23]：

$$G = \int \left[\frac{1}{2} \kappa (2H - c_0)^2 + \bar{\kappa} K \right] dA + \lambda A + pV. \quad (1)$$

其中 H 代表囊泡的平均曲率， c_0 代表囊泡的自发曲率， K 代表囊泡的高斯曲率， $\kappa, \bar{\kappa}$ 分别代表平均曲率与高斯曲率对自由能的贡献系数， $\lambda A, pV$ 分别代表膜面积与体积对囊泡的约束。为了分析囊泡颈部形成的临界条件，本研究以球形囊泡为初始状态，分析其在扰动下自由能失稳的临界条件。首先，采用球谐函数展开径向扰动，并对 Helfrich 自由能进行变分展开，将二阶变分为 0 的方程作为囊泡形态变化的临界条件。

$$\delta^2 F = \frac{\kappa}{2} \sum_{l,m} \Lambda_l |u_{lm}|^2. \quad (2)$$

当膜拓扑结构不变时，高斯曲率项对自由能的贡献为常数，所以只需要考虑平衡态附近 ($\delta F = 0$) 平均曲率与约束对囊泡形变自由能二阶变分的贡献项，得到其关于模态函数的线性叠加的线性系数为：

$$\Lambda_l = (l-1)(l+2) \left[l(l+1) - \left(c_0^2 + \frac{\lambda}{\kappa} \right) R_0^2 \right]. \quad (3)$$

其中 R_0 为初始球状囊泡的半径。考虑到本实验中囊泡体积受渗透压差的调控而实质上仅有面积不变的约束，所以线张力 λ 实际上是囊泡体积 V 的函数。我们定义无量纲参数约化自发曲率 $\tilde{c}_0 = c_0 R_0$ 与约化体积 $v = V / \frac{4}{3} \pi R_0^3$ 去除囊泡初始形态的影响（其中 V 为囊泡的体积）。考虑囊泡体积亏损带来的膜自由能变化有：

$$\lambda \propto \frac{\kappa (1-v)^{2/3}}{R_0^2} \quad (4)$$

考虑 $\Lambda_l = 0$ 得到囊泡在不同模式下失稳的形变临界条件：

$$l(l+1) = \tilde{c}_0^2 + C_\lambda (1-v)^{\frac{2}{3}}. \quad (5)$$

其中 C_λ 为式 (4) 中比例系数； $l = 0$ 与 $l = 1$ 分别为体积模与平移模，对应于体积和面积的约束； $l = 2$ 对应双极子模，对应于囊泡从球形向椭球形形变的临界条件； $l = 3$ 时对应多极子模，对应于囊泡从球形向颈部结构形变的临界条件。

3 实验方法

所有磷脂均购自 Avanti Polar Lipids 公司。除非另有说明，化学试剂购自 Sigma-Aldrich 公司。

GUV 采用水包油 (w/o) 乳液转移法制备^[18]。分别称取 6.85 g 蔗糖和 3.60 g 无水葡萄糖，各自溶于 10 mL 蒸馏水中得到 2 M 母液；取蔗糖母液用二次水稀释至 220 mM 作为内相工作液，取葡萄糖母液稀释至 200 mM 作为外相工作液。将 POPC 和 POPE 按 9:1 的分子比混合，溶于氯仿中，浓度为 25 mg/mL，并将 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Rho 标记的 POPE 进一步加入到脂质混合物中对脂质膜进行可视化。取 50 μL 脂质混合物，用氮气流吹干。向磷脂薄膜中加入 500 μL 矿物油 (sigma 330760-1L) 涡旋振荡片刻使脂质重新悬浮。20 μL 内相溶液与含混合磷脂的 500 μL 矿物油涡旋混合 30 秒，随后在冰上静置 10 分钟。接着，将 500 μL 此乳液小心铺在 200 μL 外相溶液之上，并在 4°C 下以 2,000 g 离心 10 分钟。从离心管底部收集 GUV，并重悬于新鲜外相溶液中。根据不同实验条件加入不同浓度的 LPC 溶液在 4 °C 孵育 1 h 后用于下游实验。

微流控通道组装。实验时，向各腔室分别加入 5 μL 囊泡悬液，并在相邻腔室间的通道中加入总体积 10 μL 200 mM 葡萄糖溶液填充通道。移除封口膜后覆盖盖玻片，从而形成封闭的灌注通道；随后在储液槽中加入 50 μL 待更换的外部溶液并通过并外接蠕动泵以 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速抽出溶液，实现外部溶液的程序化切换（详见补充图 S1）。

图像采集。使用奥林巴斯 FV3000 共聚焦激光扫描显微镜，配备 Plan-Apochromat 60x/1.40 油浸物镜对脂质囊泡样品进行成像。荧光染料的激发光源分别为：488 nm 固态激光器（用于羧基荧光素）和 561 nm 二极管泵浦固态激光器（用于 Rho 磷脂）。图像采集通常采用 512 \times 512 像素分辨率，20-25 层 Z 轴堆叠，层间距 1-2 μm ，采集时间为 10 分钟至 3 小时。所有记录的 TIFF 图像均使用 Fiji 进行处理、可视化和分析。为客观界定囊泡形态分类我们提取囊泡中心截面轮廓，并基于局部曲率分析跟踪以下四个参数（详见补充图 S2）：两个子区室的平均曲率记为 c_1 、 c_2 ($c_1 < c_2$)，结合部两个主曲率记为 $c_j^{(1)}$ 、 $c_j^{(2)}$ ($c_j^{(1)} < c_j^{(2)}$)，凸曲率为正、凹曲率为负。定义无量纲参数 $\lambda_c = c_2/c_1$ 、 $\lambda_j = c_j^{(2)}/c_j^{(1)}$ ，各形态判据如下：球形囊泡子区室曲率均为正、无明确结合部 ($1 \leq \lambda_c < 1.05$)。椭球形或梨形子区室曲率均为正，结合部近似为柱面膜，未形成鞍形弯曲 ($1.05 \leq \lambda_c \leq 3.0$ 且 $\lambda_j \geq 20$)。哑铃形在子区室曲率为正 ($1.05 \leq \lambda_c \leq 5.0$) 的基础上，结合部形成鞍面 ($-10.0 \leq \lambda_j < -3.0$)；若鞍部进一步缩窄则形成颈部结构 ($\lambda_j < -10.0$)。长尾形具备哑铃形的颈部特征，且子区室曲率比较大 ($\lambda_c > 5.0$)。与外凸形貌不同，内凹形貌子区室曲率异号 ($\lambda_c < 0$) 但结合部主曲率同号 ($\lambda_j > 0$)，其中内凹口形 ($1 \leq |\lambda_c| \leq 3.0$) 结合部无明显缩窄 ($1.05 < \lambda_j < 3.0$)；内凹颈部则在口形基础上进一步缩窄，结合部两主曲率均为正且比值较大 ($\lambda_j \geq 10.0$)。当连续 10 帧（对应约 16.1s 时间窗口）内，上述四个参数的变化率均低于 10% 时，判定囊泡已进入形变稳态。

4 结果与讨论

4.1 不对称磷脂膜调控 GUV 自发曲率

如图1(a) 左侧所示，脂质双层的自发曲率由构成磷脂分子的几何形状所决定^[26,27]，并可由堆积参数 $P = v/(a_0l)$ 定量描述^[28]，其中 v 为疏水尾链体积， a_0 为头基有效面积， l 为尾链长度。对于头部较小、尾部相对较大的锥形分子，通常有 $P > 1$ ，其几何偏好对应负自发曲率；而对于头部较大、仅含单尾链的倒锥形分子，通常有 $P < 1$ ，更倾向于诱导正自发曲率。因此，膜的本征弯曲偏好与脂质分子的形状及其跨膜分布密切相关。当囊泡在渗透压驱动下发生体积收缩时，自发曲率将显著影响其形变方向与演化路径^[22]。如图1(b) 所示，正自发曲率条件下，囊泡优先沿外凸方向演化，通常经历球形、长椭球和梨形等中间态，并最终形成外凸颈部；负自发曲率条件下，囊泡则更倾向于内陷方向形变，由球形逐步转变为盘形

和口形囊泡，并形成向内凹陷的颈部结构。由此可见，自发曲率的正负差异决定了囊泡形变的基本分支。

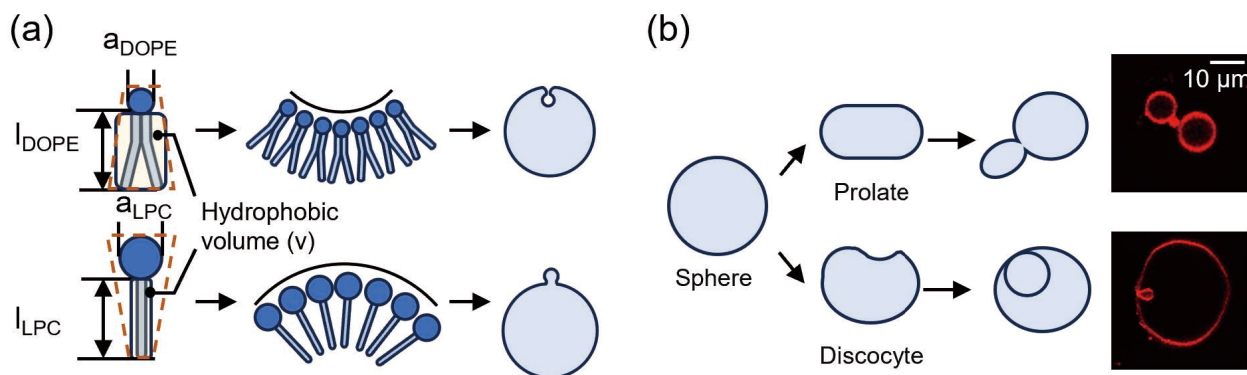


图 1 不同混合磷脂构成的不同曲率囊泡及通过渗透压差调控约化体积的囊泡形态变化示意图。(a) 分子形状控制自发曲率；(b) 体积减小时囊泡的形变：正曲率下为长椭球到梨形，负曲率下为盘形到内凹口形。
Fig. 1. Schematic diagram of vesicle morphology with different curvatures controlled by mixed phospholipid composition and reduced volume regulated by osmotic pressure difference. (a) Molecular shape controls spontaneous curvature; (b) Vesicle deformation upon volume reduction for positive curvature: prolate to pear and negative curvature: discocyte to stomatocyte.

为实现对囊泡自发曲率的实验调控，本研究采用 POPC/DOPE 作为基础膜体系，并利用外加 LPC 调节膜的跨叶不对称性。其中，DOPE 具有负曲率倾向，使膜处于负曲率背景^[29]；在此基础上，我们进一步引入溶血磷脂酰胆碱（LPC）作为外源正曲率调节分子。LPC 仅含一条疏水尾链，呈明显倒锥形，具有较强的正曲率偏好。此外，LPC 具有一定水溶性，因此可在 GUV 制备完成后直接加入外部水相，而无需在成囊阶段预混入总脂质体系^[30]。加入外液后的 LPC 可自发吸附并插入囊泡膜外叶^[31]，而磷脂在双层两叶之间的自发翻转在实验时间尺度内极慢^[32]，因此 LPC 可近似视为主要停留于外叶。由此产生的跨叶分布不对称进一步增强了正曲率调控的效果，使我们能够通过调节外液中的 LPC 浓度，在不破坏囊泡结构的前提下，对膜曲率进行连续可控的调节。

4.2 阶梯式微流控灌注平台实现快速低扰动外液切换

为了在研究囊泡形态演化过程中实现快速外液切换，同时避免液流冲击和剪切力对囊泡造成额外扰动，本研究构建了一种用于 GUV 原位观测的阶梯式微流控灌注平台，如图2(a)所示。该平台由多孔样品腔芯片与可封闭灌流通道组成，其中芯片包含多孔微流控槽和可移除的黏性封口膜，阶梯式通道结构则用于承载囊泡样品并缓冲外部流动对局部微环境的影响。

为评估该平台的换液性能及其对囊泡稳定性的影响，采用羧基荧光素（CF）进行了荧光示踪实验。初始时，通道内充满 200 mM 葡萄糖溶液；随后切换为含 1 μM CF 的 200 mM 葡萄糖溶液，并以 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 流速进行灌流，同时记录通道内平均荧光强度变化。在荧光信号稳定后，再以相同流速引入不含 CF 的 200 mM 葡萄糖溶液，对通道进行洗脱。结果如图2(b)所示，引入含 CF 外液后，通道内平均荧光强度由约 160 a.u. 升高至 260 a.u. 以上，并稳定在 260-300 a.u. 之间，说明外液能够有效置换原有溶液；洗脱后，荧光强度进一步由约 300 a.u. 降至 150 a.u.，表明残余 CF 可被有效清除。整个过程中，通道内荧光信号变化连续且稳定，证明该平台具备可靠的快速换液能力。进一步对同一视野内囊泡进行连续追踪发现，在换液及洗脱过程中囊泡未出现明显随流漂移，仅存在热涨落引起的微小位置波动，且在实验观测时间尺度内可忽略。这说明平台在 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 流速下能够实现低剪切、低扰动的溶液交换，不影响囊泡的完整性与空间稳定性。相较于手动换液方式，该阶梯式微流控灌注平台更适合用于渗透压变化和外源脂质添加条件下的囊泡原位动态观测，可在无需反复移动样品或重新寻找视野的情况下，连续记录囊泡对外界刺激的形变响应。

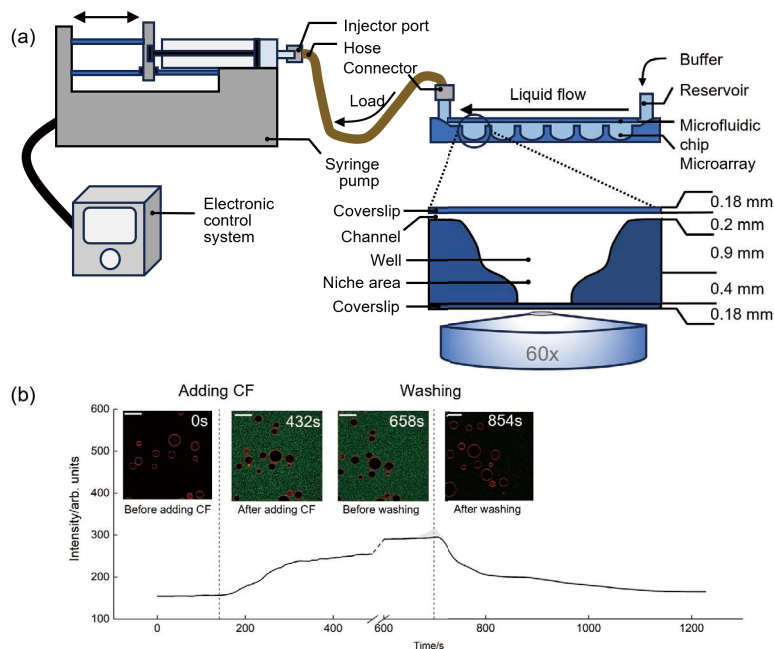


图 2 微流控芯片实现无扰换液示意图。(a) 芯片结构与实验设备示意图；(b) 灌注换液过程中的环境荧光强度变化及囊泡共聚焦图像。

Fig. 2. Schematic diagram of the microfluidic chip for non-perturbative solution exchange. (a) Schematic diagram of the chip structure and experimental setup; (b) Environmental fluorescence intensity variation and confocal images of vesicles during perfusion-based solution exchange.

4.3 正/负自发曲率下囊泡形态对渗透压差的响应

在前述曲率调控体系的基础上，本研究首先通过改变外液浓度调控跨膜渗透压差，以改变囊泡约化体积，并考察不同自发曲率条件下囊泡形态演化的差异。为此，选取两组具有相反曲率偏好的体系进行对比：一组在 POPC:DOPE = 9:1 的基础膜组成上加入 10 μM LPC，以构建正自发曲率条件；另一组保持相同基础膜组成而不加入 LPC，作为负自发曲率条件。两组实验均采用 200 mM、230 mM、250 mM 和 280 mM 葡萄糖外液，分别对应 0 mM、30 mM、50 mM 和 80 mM 的渗透压差，并在 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 换液条件下进行含时形态观测。

如图3(a)所示，在每一固定渗透压差条件下，均以 1.6 s 的时间间隔连续采集囊泡形态图像，并以形变起始时刻作为时间零点展示代表性演化过程。结果表明，囊泡在渗透压驱动下的形变路径不仅取决于体积收缩程度，也受到膜自发曲率符号的显著影响。对于正自发曲率体系，囊泡整体上表现出沿外凸方向发展的形变趋势。图3(b)显示，在无渗透压差下（样本总数 $N=125$ ），95.2% 的囊泡保持球形；当渗透压差为 30 mM 时（样本总数 $N=153$ ），42.5% 的囊泡仍维持球形，52.3% 则转变为梨形；进一步增大至 50 mM 时（样本总数 $N=91$ ），83.5% 的囊泡在中部发生明显缢缩，形成带颈部结构的哑铃形；当渗透压差增加至 80 mM 后（样本总数 $N=84$ ），54.8% 的囊泡进一步发展出细长尾部，另有 27.4% 维持为带颈部结构（详见补充图 S3 与表 S1）。总体而言，随着渗透压差增大，正自发曲率囊泡表现出由局部外凸向高曲率外伸结构持续发展的演化特征。

相比之下，负自发曲率体系在相同渗透压驱动下表现出明显不同的形变方向。图3(c)显示，在等渗条件下（样本总数 $N=52$ ），95% 以上的囊泡在较长时间内保持球形；当渗透压差为 30 mM 时（样本总数 $N=88$ ），35.2% 的囊泡出现局部向内折叠，形成内凹口形结构，少量样品 (<5%) 进一步发生更深的内陷并形成内凹颈部结构（详见补充表 S2）。值得注意的是，在撤去渗透压梯度并恢复等渗条件后，这些内凹结构可恢复为球形囊泡（详见补充图 S4），说明该形变过程主要由渗透胁迫驱动下的磷脂分子分布重排，并未伴随明显的膜破裂或不可逆结构损伤。

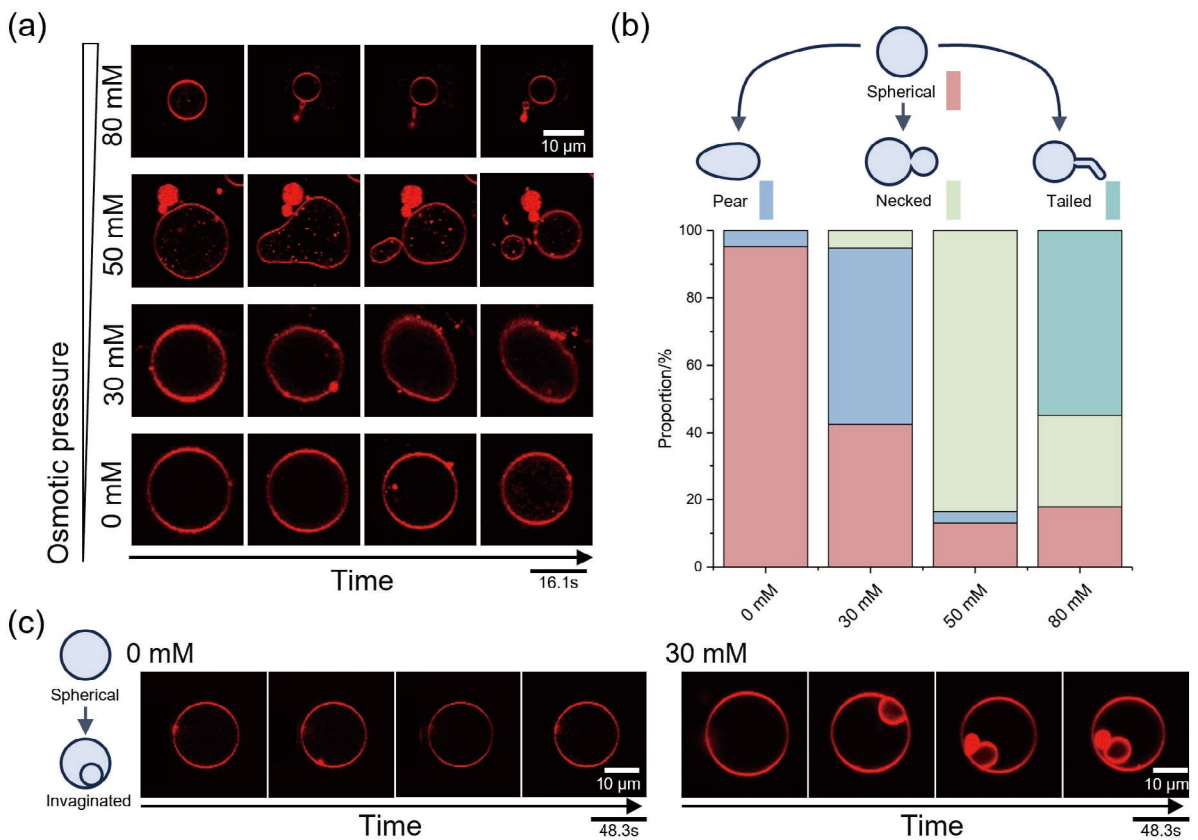


图 3 自发曲率符号调控渗透压诱导的囊泡形变图。(a) 正自发曲率囊泡在不同跨膜渗透压差下的形变示意图；(b) 对应 (a) 中不同渗透压差下囊泡稳定后的形态统计；(c) 负自发曲率囊泡在低渗透压差下的形变图。

Fig. 3. Spontaneous curvature sign regulates osmotic-pressure-induced vesicle deformation. (a) Schematic diagram of deformation of positive spontaneous curvature vesicles under different transmembrane osmotic pressure differences; (b) Morphological statistics of vesicles stabilized under different osmotic pressure differences corresponding to (a); (c) Deformation diagram of negative spontaneous curvature vesicles under low osmotic pressure differences.

综合上述实验结果，渗透压差的增大是驱动囊泡形变的直接因素。随着外液浓度升高、跨膜渗透压差增大，囊泡内部水分持续外流，约化体积逐渐减小，因而需要通过更显著的膜重排来释放多余膜面积。在较小渗透压差下，囊泡通常仅表现为轻微偏离球形的初始形变；而当渗透压差进一步增大时，则会逐步出现颈部、尾部等更高曲率的复杂结构。另一方面，在相似的体积收缩驱动力下，膜自发曲率的符号进一步决定了形变发展的具体方向。正自发曲率条件下，囊泡优先形成外凸型中间态，其典型序列为球形 (Spherical)、长椭球/梨形 (Prolate/Pear)、带颈部结构 (Necked) 以及长尾形 (Tailed)；而负自发曲率条件下，囊泡则更倾向于产生内凹型形变，典型序列表现为球形 (Spherical)、内凹口形囊泡 (Stomatocyte) 及进一步发展的内凹颈部 (Invaginated) 结构。说明渗透压差主要决定形变发生的程度，而自发曲率则主导形变演化的分支路径。

4.4 自发曲率与约化体积对囊泡形变稳态形貌的协同调控

前文已表明，在固定自发曲率条件下，跨膜渗透压差的增大可推动囊泡由近球形状态向更复杂的非球形构型演化。为进一步考察囊泡形变稳态形貌如何同时受膜自发曲率与体积收缩程度控制，本研究系统调

节外液中的 LPC 浓度和跨膜渗透压差，并记录不同参数组合下囊泡的形变稳态形貌，如图4(a) 所示。实验中，LPC 浓度设置为 0、5、10 和 20 μM ，跨膜渗透压差覆盖 0-80 mM 范围。在等渗条件下，LPC 浓度高于 20 μM 则导致囊泡质量下降与体系纯净度降低，且 LPC 浓度更高时囊泡失稳破裂（详见补充图 S5），故参数组浓度上限设为 20 μM 。

在无 LPC 条件下，膜的曲率偏好主要由 POPE 所赋予的负自发曲率背景决定。随着渗透压差增大，囊泡形变稳态由球形逐步转变为内凹口形、内凹颈部以及更深的内凹结构，表明在负自发曲率主导下，体积收缩优先通过向内弯曲的方式得到释放。这一结果可视为体系在负曲率背景下的基线形貌分支。在此基础上，随着外液中 LPC 浓度升高，囊泡形变稳态逐渐由内凹分支转向外凸分支，并且形成高局部曲率外凸结构所需的渗透压差明显降低。在较弱正曲率调控条件下，当 LPC 浓度为 5 μM 时，即使渗透压差增大至 50 mM，囊泡仍主要保持近球形或仅表现出轻微拉伸的椭球形，只有在 80 mM 时才出现明显的非近球形外凸形变稳态。相比之下，当 LPC 浓度升至 10 μM 时，在 30-50 mM 的中等渗透压差下即可观察到带颈部的哑铃形结构，而在 80 mM 条件下，长尾形逐渐成为主导终态。进一步将 LPC 浓度提高至 20 μM 后，仅需 30 mM 的渗透压差，囊泡便可形成长尾形终态。说明随着正自发曲率增强，体系进入高曲率外凸形貌区域所需的体积收缩阈值显著降低。

理论上，囊泡形变稳态由膜的约化自发曲率 \tilde{c}_0 与约化体积 v 共同决定。本工作中，我们通过两个独立实验参数分别调控上述物理量：LPC 浓度调控 \tilde{c}_0 ，跨膜渗透压差调控 v 。

在弹性理论框架下，膜的自发曲率来源于脂质分子几何形状的非对称性。当少量曲率调节分子（如 LPC）掺入基质膜时，膜的总自发曲率可视为各组分贡献的线性叠加，总自发曲率与 LPC 浓度成线性关系。但在非理想的实验环境下，我们采用经验幂律关系

$$\tilde{c}_0 \propto [\text{LPC}]^\alpha, \alpha \approx 1, \quad (6)$$

进行修正。

本实验中最大跨膜渗透压差为 80 mM，对应的膜张力不足以造成显著面积变化^[33]；且实验内液使用蔗糖，其对磷脂膜的反射系数接近 1，在实验时间尺度内跨膜泄漏可忽略^[34]。因此，囊泡膜面积不变且内部溶质不泄露的情况下体积变化与渗透压差的关系可由范特霍夫定律 $pV = \text{常数}$ 描述。我们定义无量纲参数约化渗透压差 $\Delta p/p_0$ 以消除初始条件的影响。在此情况下，约化体积作为囊泡形变前后的体积比有：

$$v = \frac{V}{V_0} = \frac{p_0}{p_0 + \Delta p} \propto \left(1 + \frac{\Delta p}{p_0}\right)^{-1}, \quad (7)$$

其中 p_0 为环境初始渗透压。因此，约化渗透压差直接控制了囊泡的约化体积。

上述参数关系可以通过式 (5) 纳入描述囊泡形变模式的弹性理论框架统一描述。图4(b) 总结了不同 LPC 浓度与约化渗透压差下囊泡的形变稳态形貌，其中横轴为 LPC 浓度，纵轴为约化渗透压差。根据实验观测与理论计算，形态相图可划分为六个特征区域：区域 I（低 LPC 浓度、低约化渗透压差）：球形囊泡。此时自发曲率和体积收缩均较小，膜难以克服形变能垒。区域 II（中低 LPC 浓度、较低约化渗透压差）：椭球形或梨形（对应 $l = 2$ 椭球模态主导）。自发曲率增大或体积轻微减小导致轴对称拉伸失稳。区域 III（较高 LPC 浓度、中约化渗透压差）：具颈部的哑铃形（对应 $l = 3$ 模态，多极子模与椭球模共同主导）。形变加剧，出现局部缢缩与颈部结构。区域 IV（高 LPC 浓度、高压差）：长尾形（对应 $l \geq 4$ 模态，多极高阶模主导）。体积显著收缩且正自发曲率很强，膜向外极度伸长。区域 V（无 LPC 或极低 LPC 浓度、中压差）：内凹口形。DOPE 主导的负自发曲率驱动膜向内凹陷。区域 VI（无 LPC 浓度、高压差）：内凹颈部结构。在负曲率下进一步演化出内凹的颈部。需要指出，长尾形囊泡（区域 IV）不能仅用 $l = 4$ 或更低阶球谐模解释。理论推导给出的失稳临界条件，是基于球形参考态的二阶变分分析，其在严格意义上仅预测初始失稳时所激发的模态。因此， $l=2$ （椭球模态）和 $l=3$ （多极子模态）更适用于判别囊泡从球形出发时优先进入的早期形变分支。同时，随着囊泡形变幅值增大，理论分析中线性近似不再成立。实验中观察到的长尾形终态，其形态特征涉及高度局域化的膜颈缩与伸长，超出了单模态线性分析所能描述的范畴。这一形貌应理解为早期模态（如 $l=2$ 、 $l=3$ ）在非线性阶段通过高阶模态耦合与膜弹性非线性效应共同演化的结果。基于此，图4(b) 中长尾区域的划分主要用于表征该类终态在参数空间中的出现范围，而其

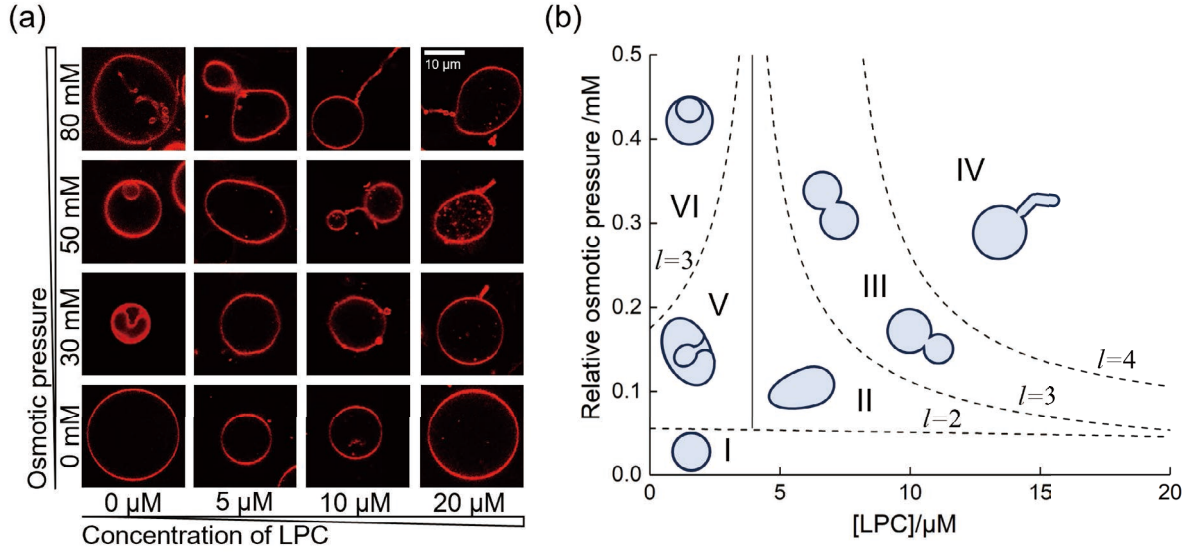


图 4 LPC 浓度与渗透压差对囊泡形变稳态形貌的协同调控。(a) 不同参数组合下囊泡的共聚焦形变稳态图像；(b) 形态相图：随 LPC 浓度（横轴）和渗透压差（纵轴）变化的形貌分区（I-VI）。图中分区边界为根据实验数据点的统计结果绘制的指导性曲线，相邻数据点之间的实际转变区间存在由参数采样分辨率和形态分布涨落引入的不确定性。

Fig. 4. Synergistic regulation of vesicle final morphology by LPC concentration and osmotic pressure difference. (a) Confocal final-state images of vesicles under different parameter combinations; (b) Morphological phase diagram: morphology partitions (I-VI) as a function of LPC concentration (horizontal axis) and osmotic pressure difference (vertical axis). The phase boundaries in the figure are drawn as guiding curves based on the statistical results obtained at discrete experimental data points. The actual transition intervals between adjacent data points are subject to uncertainties arising from the limited resolution of parameter sampling and statistical fluctuations in the morphological distributions.

内部更精细的几何结构仍有待结合非线性理论模型作进一步分析。此外，图4(b)中各形貌分区的边界是基于本实验中离散参数点的稳态统计结果绘制的边界。当同一参数点上观察到两种或以上形貌共存时，边界位置存在由形态分布统计涨落和参数采样分辨率共同引入的不确定性，因此各区域之间的分割线应理解为过渡带的趋势。

综合实验结果与理论分析可以看出，本工作建立的形貌相图4(b)实质上是两个无量纲控制参数——即约化自发曲率 \tilde{c}_0 与约化体积 v 协同调控囊泡形变的直观映射。其中，约化曲率表征由 LPC 浓度调控；约化体积差由跨膜渗透压差调控。渗透压差通过降低约化体积推动囊泡偏离球形并触发形变，而自发曲率则决定形变沿外凸还是内陷方向发展，并决定特定形变稳态出现的体积阈值。在此框架下，与分裂兼容的哑铃形颈部结构（区域 III）仅出现在约化自发曲率与约化体积均处于中等水平的狭窄窗口内，任何一方驱动过强均会将体系推向非分裂形貌。随 LPC 浓度升高，形成哑铃形或长尾形等外凸终态所需的渗透压差明显降低；而在负约化自发曲率背景下，体系则更容易进入内陷分支。这一无量纲视角将本工作的具体实验参数提升为更普适的物理语言，使本文结果可直接迁移至不同囊泡尺寸或不同脂质组成的体系，为可分裂人工细胞的实验提供更具一般性的参考。

5 结 论

本研究系统地阐明了膜自发曲率与渗透压差对巨型单层囊泡形变方向与形变稳态形貌选择的协同调控作用。结果表明, 渗透压差通过降低囊泡约化体积推动形变逐步加深, 而自发曲率则决定形变优先沿外凸还是内陷方向发展。在正自发曲率条件下, 囊泡形变稳态形貌随渗透压差增大依次表现为球形、梨形、带颈部哑铃形和长尾形等特征类型; 在负自发曲率条件下, 则对应出现球形、口形、内凹颈部等稳态形貌, 两类分支在几何特征上呈现明显的对应关系。

进一步地, 本研究建立了以 LPC 浓度和渗透压差为控制参数的囊泡形变稳态形貌图谱, 明确了不同形貌区域在参数空间中的分布规律。结果显示, 与分裂兼容的哑铃形颈部结构并非广泛存在, 而是明确对应于特定的参数区间。在本研究体系中, 该形貌仅出现在 LPC 浓度为 10 μM 左右所对应的适中正自发曲率, 以及跨膜约化渗透压差为 0.15-0.25 所定义的适中体积收缩范围内。当 LPC 浓度偏高(例如达到 20 μM)或约化渗透压差超过 0.5 时, 囊泡形变稳态形貌将不可逆地转向长尾状等非可分裂形貌区域。由此, 本文在 Helfrich 弹性理论框架下, 将膜自发曲率与约化体积两个关键物理量落实为可实验调控的参数, 并归纳了囊泡形变稳态形貌选择的实验图景。这些结果为理解膜形变的物理机制以及设计可分裂人工细胞提供了定量依据。

参考文献

- [1] Miele Y, Holló G, Lagzi I, Rossi F 2022 *Life* **12** 841
- [2] Kretschmer S, Ganzinger K A, Franquelim H G, Schwille P 2019 *BMC Biol.* **17** 43
- [3] Kurisu M, Imai M 2024 *Soft Matter* **20** 8976
- [4] Mann S 2012 *Acc. Chem. Res.* **45** 2131
- [5] Guindani C, da Silva L C, Cao S, Ivanov T, Landfester K 2022 *Angew. Chem.* **134** e202110855
- [6] Schwille P, Spatz J, Landfester K, Bodenschatz E, Herminghaus S, Sourjik V, Erb T J, Bastiaens P, Lipowsky R, Hyman A, et al. 2018 *Angewandte Chemie International Edition* **57** 13382
- [7] Fu H, Ma L, Xu C, Li J, Ouyang H, Xie C, Sun Y, Tao Y, Wang H, Hu S, et al. 2026 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **123** e2517323123
- [8] Tao Y X, Fu H, Hu S X, Li M, Lu Y 2025 *Acta Phys. Sin.* **74** 138702(in Chinese)[陶渊啸, 付航, 胡书新, 李明, 陆颖 2025 物理学报 **74** 138702]
- [9] Ma D F, Hou W Q, Xu C H, Zhao C Y, Ma J B, Huang X Y, Jia Q, Ma L, Liu C, Li M, Lu Y 2020 *Acta Phys. Sin.* **69** 038701(in Chinese)[马东飞, 侯文清, 徐春华, 赵春雨, 马建兵, 黄星樞, 贾棋, 马璐, 刘聪, 李明, 陆颖 2020 物理学报 **69** 038701]
- [10] Fan Q K, Yang C G, Hu S X, Xu C H, Li M, Lu Y 2023 物理学报 **72** 147801(in Chinese)[樊秦凯, 杨晨光, 胡书新, 徐春华, 李明, 陆颖 2023 物理学报 **72** 147801]
- [11] Murtas G 2013 *Mol. BioSyst.* **9** 195
- [12] Higgs P G 2021 *Life* **11** 966
- [13] Staufer O, Schröter M, Platzman I, Spatz J P 2020 *Small* **16** 1906424
- [14] Döbereiner H G, Käs J, Noppl D, Sprenger I, Sackmann E 1993 *Biophys. J.* **65** 1396
- [15] Campelo F, Arnarez C, Marrink S J, Kozlov M M 2014 *Adv. Colloid Interface Sci.* **208** 25
- [16] McMahon H T, Gallop J L 2005 *Nature* **438** 590

- [17] Hanczyc M M, Szostak J W 2004 *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8** 660
- [18] Walde P, Cosentino K, Engel H, Stano P 2010 *ChemBioChem* **11** 848
- [19] Luisi P L, Stano P 2010 *The minimal cell: the biophysics of cell compartment and the origin of cell functionality* (Springer Science & Business Media)
- [20] Seifert U 1997 *Adv. Phys.* **46** 13
- [21] Lipowsky R 1995 *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5** 531
- [22] Seifert U, Berndl K, Lipowsky R 1991 *Phys. Rev. A* **44** 1182
- [23] Helfrich W 1973 *Z. Naturforsch. C* **28** 693
- [24] Callan-Jones A, Sorre B, Bassereau P 2011 *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3** a004648
- [25] Li Y, Ten Wolde P R 2019 *Phys. Rev. Lett.* **123** 148003
- [26] Cooke I R, Deserno M 2006 *Biophys. J.* **91** 487
- [27] Bryant S J, Bryant G, Greaves T L 2024 *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **204** 114472
- [28] Yokoyama H, Ikeda K, Wakabayashi M, Ishihama Y, Nakano M 2013 *Langmuir* **29** 857
- [29] Cullis P t, De Kruijff B 1979 *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **559** 399
- [30] Dimova R, Lipowsky R 2012 *Soft Matter* **8** 6409
- [31] Papadopoulos A, Vehring S, Lopez-Montero I, Kutschenko L, Stockl M, Devaux P F, Kozlov M, Pomorski T, Herrmann A 2007 *J. Biol. Chem.* **282** 15559
- [32] Gurtovenko A A, Vattulainen I 2007 *J. Phys. Chem. B* **111** 13554
- [33] Ho J C, Rangamani P, Liedberg B, Parikh A N 2016 *Langmuir* **32** 2151
- [34] Sperelakis N 2012 *Cell physiology source book: essentials of membrane biophysics* (Elsevier)

录用稿件，非最终出版稿

Morphology diagram of giant unilamellar vesicles synergistically regulated by membrane lipid asymmetry and osmotic pressure difference*

OUYANG Haochen^{1)2)#} WANG Biyuan^{2)#} SUN Yunhai¹⁾²⁾ GAO Huan²⁾³⁾ JIN Fan²⁾³⁾ FU Hang^{1)†} LU Ying^{1)2)†} LI Ming^{1)2)†}

1) (*Key Laboratory of Soft Matter Physics, Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China*)

2) (*School of Physical Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

3) (*Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China*)

Abstract

Giant unilamellar vesicles (GUVs) serve as a well-defined model system for investigating the physical principles underlying synthetic cell division. A central challenge is to direct GUVs toward division-compatible morphologies, for example dumbbell-shaped intermediates with a distinct neck, while avoiding non-productive deformations such as elongated tubes or deep invaginations. Although membrane deformation and volume confinement are known to act synergistically in cell division, how spontaneous curvature and reduced volume jointly determine whether a vesicle enters division-related deformation pathways remains experimentally unexplored.

In this work, we systematically investigate this synergy using a low-perturbation microfluidic perfusion platform combined with confocal imaging. Membrane spontaneous curvature is independently tuned by incorporating different concentrations of lysophosphatidylcholine (LPC) into a POPC/POPE base membrane, while transmembrane osmotic pressure differences are applied by varying the external glucose concentration to precisely control the reduced volume. Real-time imaging reveals that the sign of spontaneous curvature dictates the deformation direction: positive curvature drives an outward deformation pattern; whereas negative curvature induces an inward deformation pattern. Increasing the osmotic pressure difference promotes deeper deformation by decreasing the reduced volume, while the curvature sign determines whether the deformation proceeds outward or inward.

* Project supported by the National Key Research and Development Program of China(Grant No. 2025YFA0922903), Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences(Grant No. XDB0480000), Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. T2221001 to M.L., 12504245 to F.H.), Chinese Academy of Sciences Project for Young Scientists in Basic Research (Grant No. YSBR-104), Project supported by the China Postdoctoral Science Foundation (Grant No. 2024M763506).

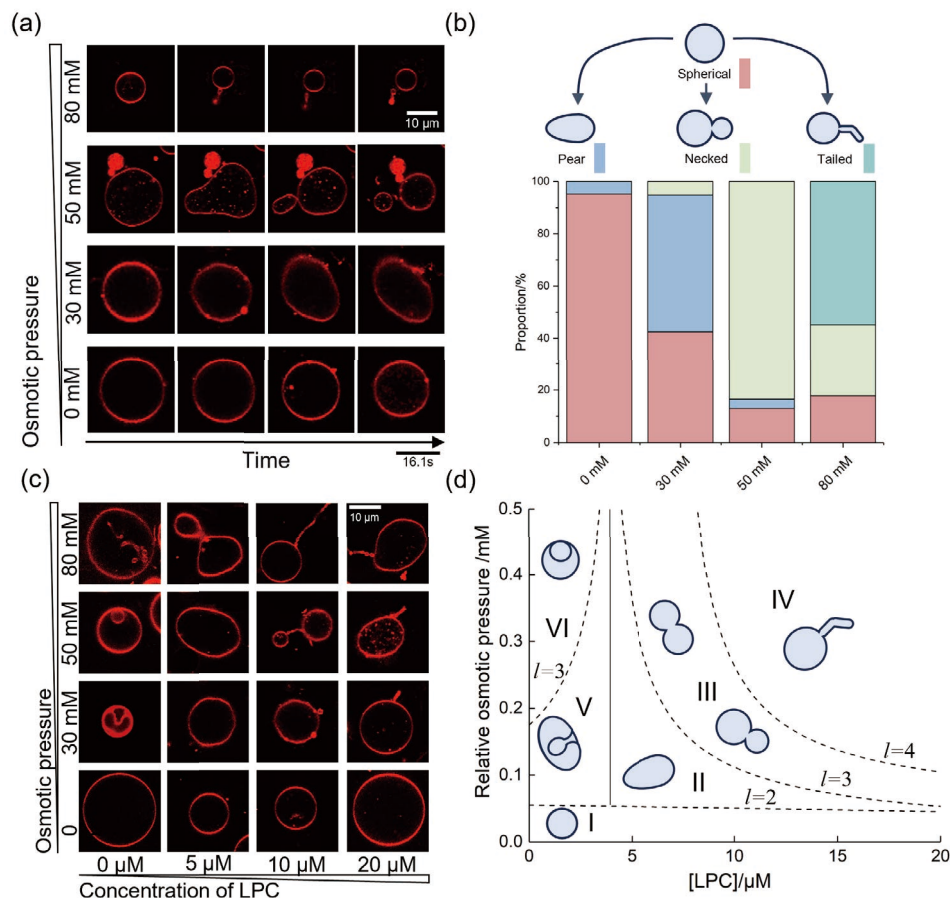
These authors contributed equally.

† Corresponding author. E-mail: fuhang@iphy.ac.cn

‡ Corresponding author. E-mail: mingli@iphy.ac.cn

‡† Corresponding author. E-mail: yinglu@iphy.ac.cn

By constructing a morphology diagram with LPC concentration and osmotic pressure difference as coordinates, we identify six distinct morphological regimes. Importantly, the division-compatible dumbbell morphology with a well-defined neck emerges only within an intermediate window of both positive spontaneous curvature and moderate volume shrinkage. Excessive curvature or osmotic stress redirects the system into non-productive long-tail or deep-invagination states. The elongated tail represents a highly localized nonlinear budding instability that lies beyond the scope of linear stability analysis. This study reveals the synergistic regulation of vesicle deformation by spontaneous curvature and reduced volume, providing an experimental basis for the rational design of divisible artificial cells.



Keywords: Giant unilamellar vesicle, Spontaneous curvature, Reduced volume, Vesicle deformation, Synthetic cell

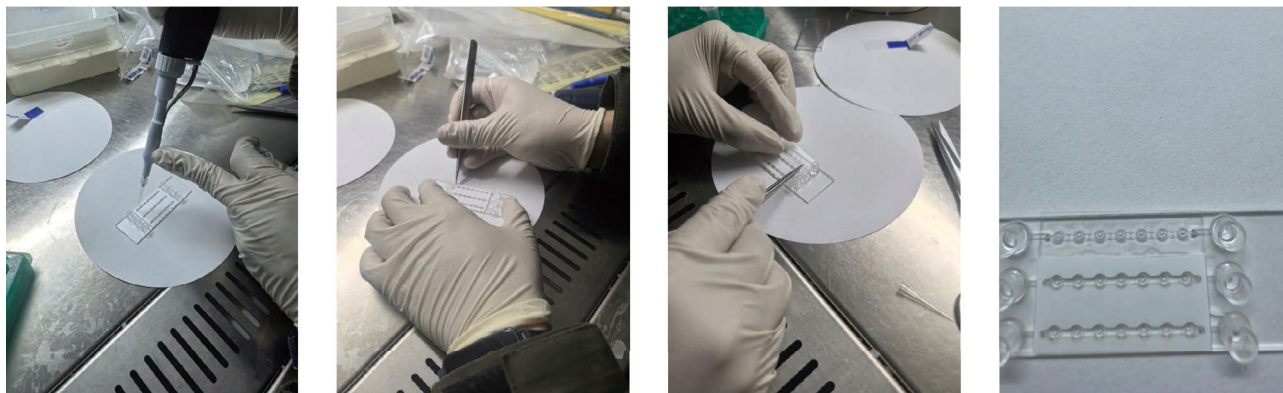


图 S1 微流控装置的组装流程。从左至右的操作分别为：向储液槽中添加囊泡悬液与环境浴液，撕开保护膜，封装液体灌注通道。第四张图为封装好的微流控器件图。

Fig.S1. Assembly process of the microfluidic device. From left to right, the operations are: adding vesicle suspension and bath solution to the reservoir, peeling off the protective film, and sealing the liquid filling channel. The fourth image shows the assembled microfluidic device.

录用稿件，非最终出版稿

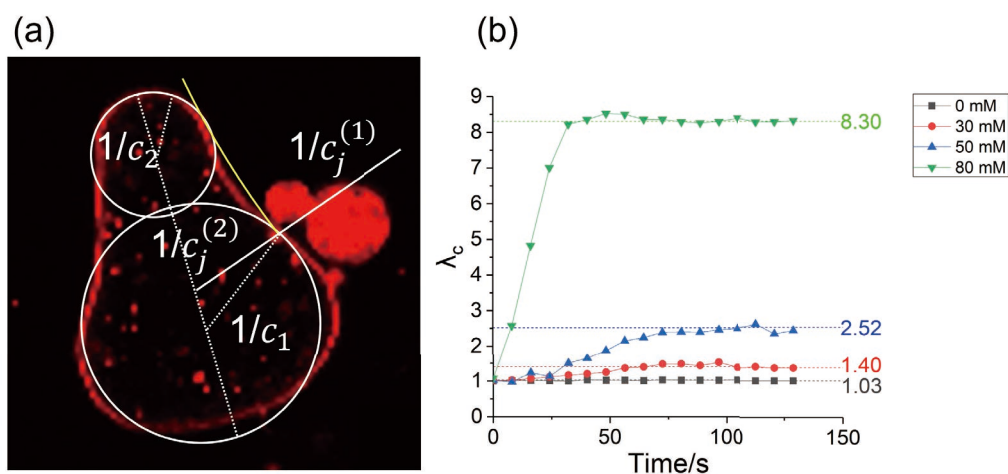


图 S2 囊泡形变各项参数几何关系示意图与不同渗透压差下囊泡子区室曲率比 λ_c 的时间演化曲线。

Fig.S2. Schematic illustration of the geometric relationships among vesicle deformation parameters and temporal evolution of the daughter-vesicle curvature ratio λ_c under different osmotic pressure differences.

注：图 (a) 为正文 Fig3(a) 中囊泡在 50 mM 渗透压差下对形变中间态形成鞍部结构的参数刻画。其中 c_1, c_2 为子区室拟合球形的曲率； $c_j^{(1)}, c_j^{(2)}$ 为结合部对应的两个主曲率。图 (b) 为正文 Fig3(a) 中各渗透压差条件下各组囊泡的子区室曲率比 λ_c 随时间演化的图像，曲率比值在 30s 内变化率小于 10% 视为达到形变稳态形貌。

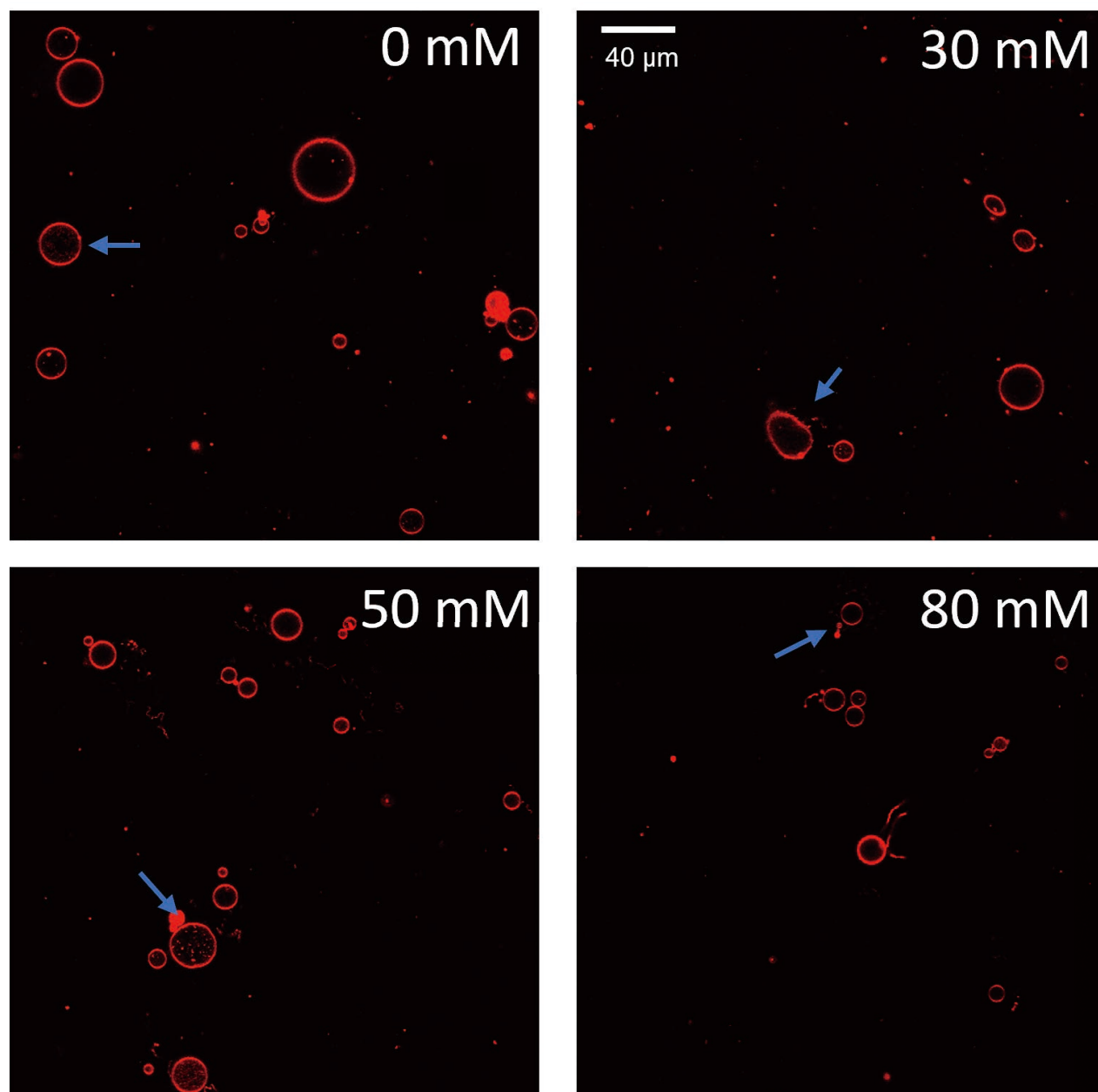


图 S3 Fig3 (a) 中不同渗透压差参数下的囊泡全局图。每幅图中蓝色箭头所指的囊泡代表正文中出现的典型形变囊泡。

Fig.S3. Global view of vesicles under different osmotic pressure difference parameters in Fig. 3(a). In each image, the vesicle indicated by the blue arrow represents a typical deformed vesicle appearing in the main text.

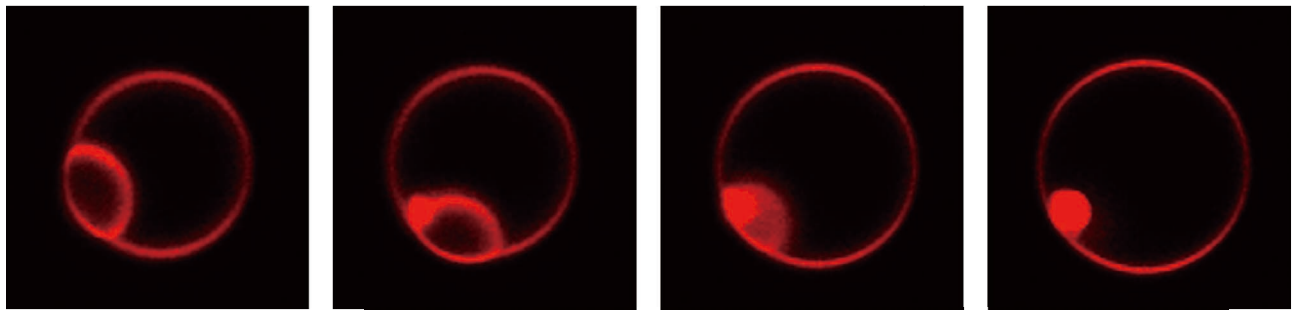


图 S4 Fig3 (c) 中负自发曲率囊泡形变还原示意图。在恢复渗透压为初始条件下，囊泡形态重新恢复成球形。时间与空间比例尺均同 Fig3 (c)。

Fig.S4. Schematic diagram of shape recovery of negatively spontaneous curvature vesicles in Fig. 3(c).

Under the condition that the osmotic pressure is restored to the initial state, the vesicle morphology returns to a spherical shape. The temporal and spatial scales are the same as those in Fig. 3(c).

录用稿件，非最终出版稿

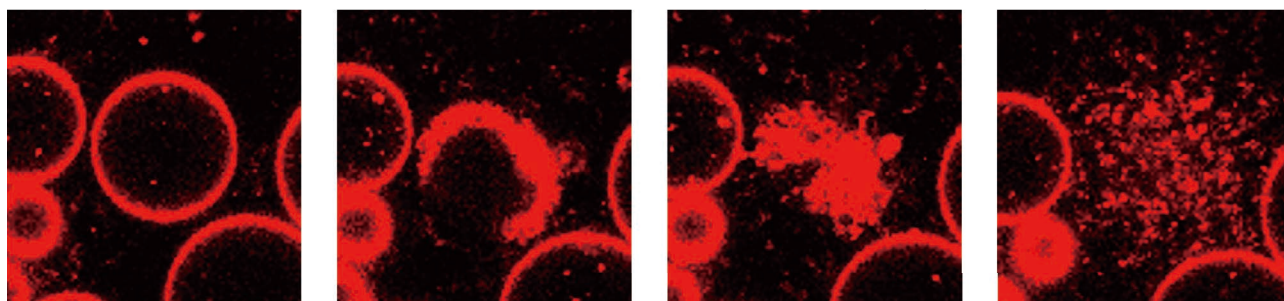


图 S5 囊泡在高 LPC 环境中极为不稳定。图为 50 μM 环境中囊泡在 20 mM 渗透压差下破裂的共聚焦图像。

Fig.S5. Vesicles are extremely unstable in a high LPC environment. The figure shows a confocal image of vesicle rupture under an osmotic pressure difference of 20 mM in a 50 μM environment.

录用稿件，非最终出版稿

表 S1 正自发曲率囊泡在不同渗透压差下的形态统计。

Table.S1. Morphological statistics of vesicles with positive spontaneous curvature under different osmotic pressure differences.

渗透压差 (mM)	球形	椭球形	颈部 (哑铃形)	长尾形	总计
0	119 (95.2%)	6 (4.8%)	–	–	125
30	65 (42.5%)	80 (52.3%)	8 (5.2%)	–	153
50	12 (13.0%)	3 (3.3%)	76 (83.5%)	–	91
80	15 (17.9%)	–	23 (27.4%)	46 (54.8%)	84

录用稿件，非最终出版稿

表 S2 负自发曲率囊泡在不同渗透压差下的形态统计。

Table.S2. Morphological statistics of vesicles with negative spontaneous curvature under different osmotic pressure differences.

渗透压差 (mM)	球形	内凹口形	内凹颈部	总计
0	50 (96.2%)	2 (3.8%)	–	52
30	54 (61.3%)	31 (35.3%)	3 (3.4%)	88

录用稿件，非最终出版稿

表 S3 图 Fig4(a) 中不同渗透压差与 LPC 浓度参数下典型形变囊泡样本数统计。

Table.S3. Sample number statistics of typical deformed vesicles under different osmotic pressure differences and LPC concentrations in Fig. 4(a).

渗透压差	LPC 浓度	LPC 浓度			
		0 μ M	5 μ M	10 μ M	20 μ M
80 mM		12	42	33	37
50 mM		23	50	40	33
30 mM		16	41	32	18
0 mM		70	68	92	53

录用稿件，非最终出版稿