

基于单畴表征的高/低黏滞磷脂膜中的相分离*

朱玉洁¹⁾ 朱涛^{2)†} 盛洁¹⁾ 周琪¹⁾ 蒋中英^{1)‡}

1) (伊犁师范大学电子与工程学院, 微纳电传感技术与仿生器械重点实验室, 伊宁 835000)

2) (南京大学物理学院, 固体微结构物理国家重点实验室, 南京 210093)

(2022年4月19日收到; 2022年5月11日收到修改稿)

磷脂相分离是细胞脂质筏形成的物理驱动力, 在生命物质的空间组装中发挥着重要的作用. 本研究通过单微畴跟踪、径向波动性分析等手段定量地研究了多组分磷脂相分离动力学. 发现在低线张力差异下, 大相的黏滞性是产生微畴粗化差异的主要原因. 融合产生的流场促进微畴扩散, 加速了低黏滞大相中微畴的融合粗化; 而高黏滞大相中微畴主要依赖布朗运动扩散, 融合粗化较慢. 进一步建立微畴的扩散与融合粗化理论模型, 理解了大相黏滞性较高与较低时, 微畴尺寸与粗化时间分别满足的 0.5 与 1 幂指数关系. 此外还发现, 可以通过胆固醇相对含量调节大相黏滞性, 提高了微畴粗化的可控性. 研究深化了多组分磷脂相分离机制的理解, 为调控细胞膜表面的生物分子再分布提供了有价值的参考.

关键词: 磷脂相分离, 单畴表征, 扩散与融合, 膜黏度**PACS:** 87.16.D-, 87.15.Vv, 87.16.dt, 87.16.dr**DOI:** 10.7498/aps.71.20220752

1 引言

细胞膜表面的生物分子空间组装对生命功能至关重要. 在二维的细胞膜中, 脂质筏将不同性质的磷脂和蛋白分子在侧向分拣成高有序并相对稳定的结构(富饱和磷脂与胆固醇)^[1,2]. 在信号传导、蛋白运输等诸多涉及膜内分子组装的过程中, 脂质筏发挥了高效浓缩特异性分子的作用^[3-5].

研究发现, 可以通过磷脂间相互作用引起侧向组分相分离, 形成与脂质筏组分相近的结构^[6]. 因此, 多组分巨单层囊泡(GUVs)被用于研究脂质筏的物理化学性质. 研究发现, 相分离的热力学性质(如相分离的形成条件及稳定性)由一系列实验参量(如温度^[7,8]、混合磷脂比例^[9]等)决定. 在高温下, 磷脂的混合熵较高, GUVs形成单一的液相;

降温导致熵降低, 不同磷脂间的焓作用差异导致GUVs形成排布有序和无序的相分离结构^[7].

由于细胞不是一个封闭的热力学平衡体系^[10], 研究多组分GUVs相分离的形成动力学对理解脂质筏的动态组装与调控是至关重要的^[11]. 国内外众多课题组立足生物分子组装开展了系统的实验与理论研究^[12,13]. Stanich等^[14]报道, 降温导致GUVs表面形成了许多纳米尺度的微小圆形微畴. 微畴可通过两种机制粗化: 一是融合粗化, 即微畴通过扩散与周边的微畴碰撞、融合形成更大的微畴; 二是蒸发-凝聚粗化, 磷脂从较小的微畴边界蒸发并结合到更大的微畴边界. 并且, 微畴的粗化动力学受到多种因素的影响. Garcia-Saez等^[15]发现, 不同组分间的线张力驱动着微畴的粗化, 以降低微畴的总边长. 提高线张力可显著加快微畴的粗化. Rozovsky等^[16]发现, 在线张力的驱动下, 过量膜

* 国家自然科学基金(批准号: 11904167)、伊犁师范大学校级博士科研启动基金(批准号: 2020YSBS006)和新疆自然科学基金联合基金(批准号: 2022D01C336)资助的课题.

† 通信作者. E-mail: zhuttd@163.com

‡ 通信作者. E-mail: jiangzhying@163.com

面积可诱导产生微畴出芽. 芽颈的膜曲率产生微畴间的近程排斥, 使得融合粗化动力学受阻. Li 等^[17]进一步给出, 当线张力超过临界值, 芽结构可与母体完全分裂. 增大自发曲率可降低该临界线张力值, 并提高微畴分裂的频率. 此外, 降温速率控制的成核点数量等也会影响微畴的粗化动力学^[14]. 但以上研究往往聚焦较高线张力下的微畴粗化动力学. 在细胞脂质筏涉及的低线张力条件下, 相分离的产生及其影响机制尚待深入研究.

最近一些课题组将单微畴表征策略应用于微畴粗化与组装研究. Talbot 等^[18]采用激光共聚焦显微三维 (3D) 重构了单个微畴在温度梯度场中的运动, 发现了线张力梯度引起的异常微畴超扩散, 给出了微畴种类无关的、在高温侧融合粗化的内在机制. Wongsirojkul 等^[19]采用宽场荧光显微追踪了单个微畴的径向波动, 发现了膜张力产生的高线张力, 给出了组分依赖的、低渗条件下磷脂膜相分离机制. 通过单微畴的轨迹跟踪、径向波动分析等, 可以定量地给出线张力、侧向扩散等膜性质, 从而为磷脂相分离研究提供重要的分析数据.

本文采用单微畴表征策略研究了类细胞脂筏的产生与调控. 研究采用了较高的实验温度以产生较低的线张力; 选择了 4 个线张力差异较低的组分, 考察了它们的微畴粗化动力学. 发现可以通过大相黏滞性调控微畴的尺寸. 给出了不同黏滞性下的微畴扩散与粗化机制差异, 获得了大相黏滞性决定的微畴尺寸与时间标度关系. 并发现可以通过胆固醇调控大相黏滞性, 阐明了胆固醇相对含量反向影响液态有序、无序相黏滞性的机制.

2 实验

2.1 电方法制备巨型单层囊泡 (GUVs)

采用电形成方法制备 GUVs^[20]. 二油酰磷脂酰胆碱 (DOPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC)、胆固醇 (Chol) 和 1, 2-二油酰-SN-甘油-3-磷酸乙醇胺 (Rhod-PE) 购于 Avanti Polar Lipids 公司. 一般地, 将给定组分的磷脂溶于氯仿中, 掺杂摩尔分数为 0.5% 的 Rhod-PE. 取 6 μL 磷脂溶液涂抹至 ITO 玻璃导电面 (电阻率为 $5 \times 10^{-4} \Omega \cdot \text{cm}$), 真空干燥 2 h. 在两块 ITO 玻璃中夹放 0.3 mm 硅胶垫片形成 GUVs 制备舱室. 将 300 mmol/L 蔗糖溶液缓慢注入舱内. 施加峰值 5 V、频率 10 Hz 的正

弦交流电, 温度设置为 60 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 h 获得 GUVs.

2.2 荧光显微镜表征三组分磷脂相分离及相图

采用 Olympus IX7 倒置荧光显微镜 (配置 Andor 897 EMCCD、532 nm 激光光源、100 \times 油镜) 观察 GUVs 表面的磷脂相分离. 选用的 GUVs 直径在 20—50 μm , 将 GUVs 静置于两片玻片之间硅胶涂制的舱室里. 在观测前, 电形成的 GUVs 被稀释于 295 mmol/L 葡萄糖溶液中. GUVs 内部的渗透压略高于外部, 低正张力膜可消除过量的膜面积, 并且内外溶液密度差使 GUVs 沉淀至物镜侧玻片表面以便于观测^[21]. GUVs 温度通过 Warner 显微镜热台进行控制 (控温精度 0.1 $^{\circ}\text{C}$). 一般地, 从 42 $^{\circ}\text{C}$ (混溶性转变温度以上) 快速降温至 32 $^{\circ}\text{C}$ (混溶性转变温度以下) 以形成磷脂相分离结构 ($-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$), 并在温度稳定在 32 $^{\circ}\text{C}$ 后再进行显微镜观测. 微畴的平均半径 (r) 通过灰度阈值确定的面积计算获得. 统计使用的微畴中心处于 GUVs 中 3/10 囊泡直径划定的圆形范围内, 以降低二维投影分析产生的误差. 微畴的面密度通过观测半球的微畴数量除以半球表面积获得. 实验获得的 DOPC/DPPC/Chol 三组分相图与之前报道的结果一致^[22]. 基于三组分相图的等温连结线, 获取了液态有序 (L_o) 与液态无序 (L_d) 畴中的磷脂组分. 在相图中绘制 L_o 与 L_d 面积相同的组分连线, 等温连结线近似于该线的垂线. 等温连结线与 L_o - L_d 相分离相区边界的交点即为大相与微畴的组分.

2.3 线张力分析

线张力通过分析微畴的径向波动性获得^[19]. 具体地, 在温度降至 32 $^{\circ}\text{C}$ 约 5 min 后, 采集数次约 5 s 时长的微畴边界波动 (6 帧/s). 边界偏离半径的谱线以傅里叶级数展开的形式给出:

$$\Delta r(\psi) = r \left[1 + a_0 + \sum_{k=1}^{\infty} a_k \cos(k\psi) + \sum_{k=1}^{\infty} b_k \sin(k\psi) \right], \quad (1)$$

其中, ψ 为相位角, k 为波数, a_k 与 b_k 为幅值. 过剩自由能满足:

$$\Delta F \cong \frac{\pi r \lambda}{2} \sum_{k=2}^{\infty} (k^2 - 1)(a_k^2 + b_k^2), \quad (2)$$

其中 λ 为线张力. 根据能量均分定律, 每个独立波

数的自由能均为 $k_B T$ [19]. 其中, k_B 为玻尔兹曼常数, T 为绝对温度. 因此,

$$\langle a_k^2 \rangle + \langle b_k^2 \rangle = \frac{2k_B T}{\pi r \lambda} \left(\frac{1}{k^2 - 1} \right). \quad (3)$$

线张力通过 (3) 式拟合微畴边界波动数据获得. 选择较大 GUVs (直径 $\geq 40 \mu\text{m}$) 中心的微畴用于线张力的计算. 用于线张力分析的微畴仅受到微量的低强度激光辐照 (总辐照时间短于 10 s), 以减小光氧化造成的线张力偏移.

2.4 微畴均方位移及侧向扩散速率分析

采集微畴的运动轨迹以分析其均方位移及侧向扩散速率 [23]. 具体地, 在温度降至 32 °C 后约 2—10 min 内, 荧光显微采集约 1 min 时长的微畴运动 (6 帧/s). 通过 ImageJ 的 TrackMate 模块重构微畴的扩散轨迹, 以微畴中心在 t 时刻各方向的位移 ($\mathbf{x}(t)$, $\mathbf{y}(t)$) 计算均方位移 (MSD (t)):

$$\text{MSD}(t) = \langle \mathbf{x}(t)^2 \rangle + \langle \mathbf{y}(t)^2 \rangle, \quad (4)$$

符合布朗扩散的微畴 MSD(t) 与 t 满足线性关系 [24]:

$$\text{MSD}(t) = 4Dt, \quad (5)$$

其中 D 为侧向扩散速率. 用于均方位移及侧向扩散速率分析的微畴满足以下要求: 1) 微畴的中心处于 GUVs 中 0.7 倍囊泡直径划定的圆形范围内, 用以降低二维模型分析产生的误差 [25]; 2) 微畴近圆形, 其边缘到中心的距离处于 $0.85r - 1.15r$ 范围内.

2.5 膜黏滞性的荧光光谱分析

通过二苯基己三烯 (DPH) 荧光的各向异性表征磷脂膜的黏滞性 [26]. 制备掺杂摩尔分数为 0.5%DPH 给定组分的 GUVs, 使用 Perkin Elmer LS55 荧光分光光度计获取发射光强. 激发光波长设为 360 nm, 发射光波长设为 430 nm. 样品温度通过 PTP1 温控组件 (Perkin Elmer) 恒定在 32 °C. DPH 的各向异性 (a) 使用下式计算:

$$a = (I_0 - I_{90}) / (I_0 + 2I_{90}), \quad (6)$$

其中, I_0 和 I_{90} 分别为平行、垂直于平面偏振激发光的发射光光强分量. a 反映了磷脂膜的黏滞性. a 越低则磷脂膜的黏滞性越低.

3 结果与讨论

首先, 获取了 DOPC/DPPC/Chol 三组分在 32 °C 的相图 (见图 1(a)). 在相图中的灰色区域,

GUVs 形成液态有序 (L_o)-液态无序 (L_d) 相分离. L_o 相主要由分子排布较为紧密的 DPPC 与 Chol 构成, 而 L_d 相主要由分子排布较为疏松的 DOPC 构成 [7]. 荧光染料 Rhod-PE 选择性地混溶入 L_d 相 [27], 在 532 nm 的激发下发出明亮的荧光. 相图中的红色点线表示 L_o 与 L_d 面积相同的组分. 在该点线的左侧, L_o 微畴分散在 L_d 大相之中 (如 DOPC/DPPC/Chol 的摩尔百分比为 27%/53%/20% /

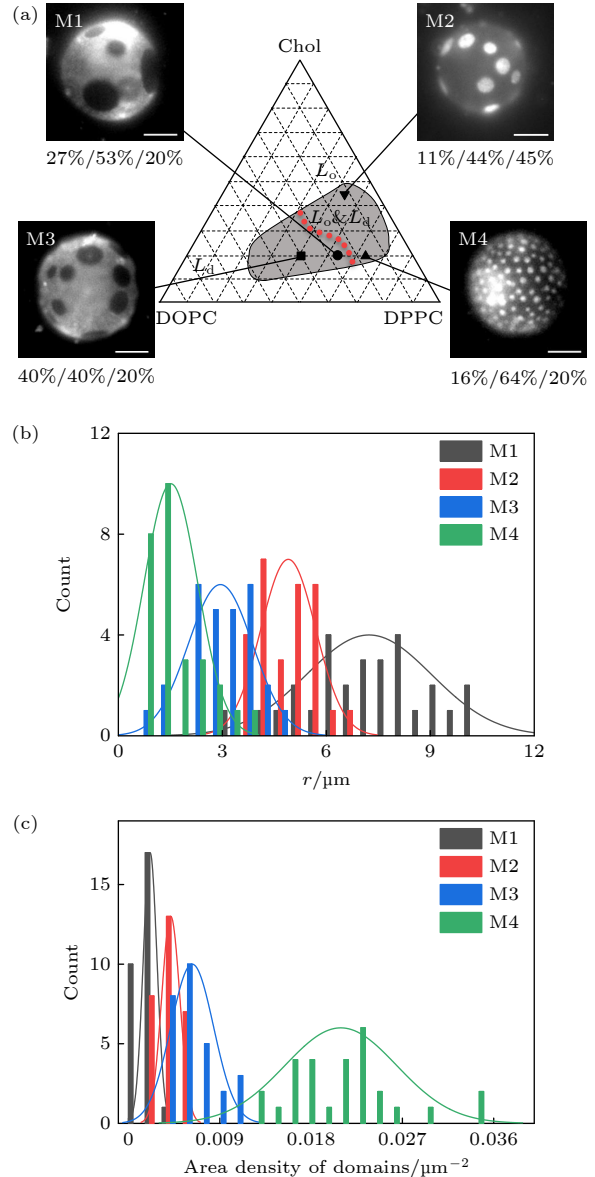


图 1 DOPC/DPPC/Chol 三组分相分离 (a) 32 °C 的相图, 红色点线表示 L_o 与 L_d 面积相同的组分, 标尺为 10 μm ; (b) 微畴尺寸分布图; (c) 微畴面密度分布图

Fig. 1. Phase diagram for vesicles of DOPC/DPPC/Chol: (a) Phase diagram at 32 °C. Red dotted line denotes the composition whose L_o and L_d phases occupy the same surface area. Scale bar is 10 μm . (b) Size distribution of the domains. (c) Surface density of the domains.

20%, 40%/40%/20%, 分别简称为 M1, M2). 而在该线的右侧, L_d 微畴分散在 L_o 大相中 (如 DOPC/DPPC/Chol 的摩尔百分比为 11%/44%/45%, 16%/64%/20%, 分别简称为 M3, M4). 点线的垂直线近似为等温连结线^[7]. 基于等温连结线与相区边界的交点, 可获取大相与微畴的磷脂含量比例 (表 1).

图 1(a) 给出了降温 5 min 的 M1—M4 的 GUVs 显微图像. 采用微畴面积、观测半球的微畴数量

表 1 微畴与大相的混合磷脂含量

Table 1. Lipid composition in domains and bulks.

组分	微畴			大相		
	DOPC	DPPC	Chol	DOPC	DPPC	Chol
M1	4%	67%	29%	52%	39%	9%
M2	2%	66%	32%	60%	24%	16%
M3	41%	26%	33%	5%	48%	47%
M4	62%	26%	12%	10%	70%	20%

(>28 囊泡/组分) 获取了微畴半径 (r) 及面密度, 发现不同组分的相分离微畴尺寸、数量存在显著差异. M1—M3 的微畴半径 (r) 较大, 面密度较低; 而 M4 的微畴尺寸较小, 面密度较高. 图 1(b) 和图 1(c) 给出了微畴尺寸与面密度的统计结果. M1—M3 微畴的平均半径分别是 M4 的 4.7, 3.2, 2.0 倍, 但面密度是后者的 10.1%, 19.8%, 30.0%. 这表明前三个组分微畴更迅速地粗化. 需要指出, 在较高线张力条件下, 微畴可出芽以降低其与大相的接触边长^[8,16]. 但图 1(a) 中未观测到明显的出芽结构. 低线张力 (见下文) 与低渗正膜张力抑制了膜曲率的产生. 最终微畴完全融合形成两个完全分离的 L_o - L_d 大畴结构.

GUVs 微畴的时间演变 (图 2(a) 和图 2(b)) 表明微畴的融合次数具有组分依赖性. 图 2(c) 对降温 2.5—4.0 min 内单位膜面积内的融合次数 (n)

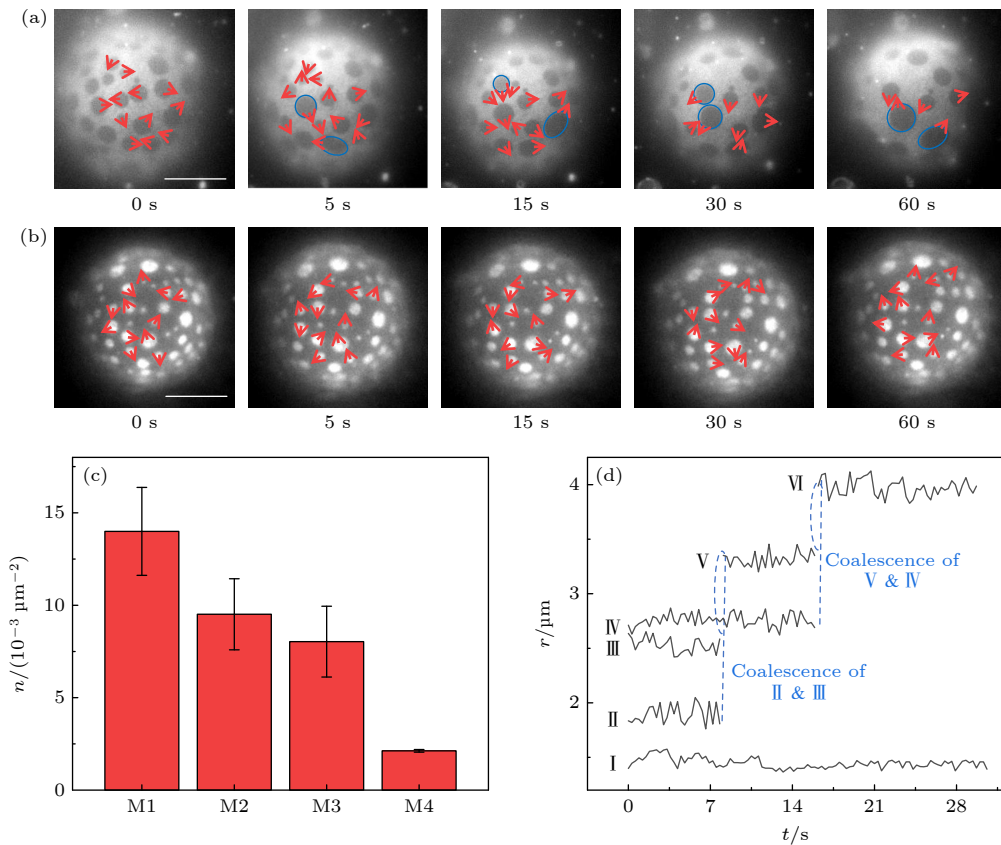


图 2 微畴的粗化 (a) M1 和 (b) M4 的微畴融合粗化. 部分典型微畴的扩散和融合被标记出来. 其中绿色圆环表示发生融合, 红色箭头表示相邻时刻间微畴的扩散方向. (c) 2.5—4.0 min 中 M1—M4 单位膜面积的融合次数. (d) 微畴的尺寸演变. 微畴 II, III, IV 融合生成微畴 VI, 产生了显著微畴粗化. 而未发生融合的微畴 I 尺寸没有发生变化. 标尺为 10 μm

Fig. 2. Coarsening of domains. Coarsening by coalescence of domains in (a) M1 and (b) M4. The diffusion and coalescence of some typical domains are marked. The green circles denote the coalescence. The red arrows denote the diffusion direction of domains between the adjacent images. (c) Number of coalescences in unit surface area between 2.5–4.0 min. (d) Time evolution of domain size. Coarsening of domains is produced by the coalescence of the domains II, III, IV to form domain VI. Size of the domain I remains unchanged without coalescence. Scale bar is 10 μm .

进行了统计. 此时微畴的半径主要分布在 0.4—10.5 μm 之间, 能够准确地进行个体采集与分析. 发现融合次数符合 $n_{M1} > n_{M2} > n_{M3} > n_{M4}$, 其中 M1 在统计时段内的融合次数是 M4 的 19 倍, 表明微畴融合的差异可能是造成不同组分微畴粗化差异的重要原因. 而对融合与未融合微畴尺寸演变的统计 (图 2(d)) 表明, 通过蒸发-凝聚方式的粗化是可以忽略的. 这与之前报道的融合粗化主导了 L_o - L_d 相分离中微畴的粗化一致 [7]. 线张力 (λ) 是微畴融合粗化的主要驱动力, 反映了不同磷脂组分相容性的差异 [9,15]. 为考察实验中观测到的粗化差异是否由线张力产生, 通过微畴的径向波动性分析了 M1—M4 的线张力 (图 3(a)). 图 3(b) 给出了径向波动性谱线, 图 3(c) 给出了对应傅里叶级数展开的波数和系数, 通过 (3) 式对此数据进行线性拟合获得线张力 (图 3(d)). 发现线张力符合 $\lambda_{M1} > \lambda_{M4} > \lambda_{M2} > \lambda_{M3}$, 所有组分的平均线张力都处于同一量级 (0.1 pN). 0.1 pN 量级被认为是微畴尺

寸由纳米向微米转变的临界线张力 [28]. 低于该量级, 微畴受热扰动无法融合为显微镜可见的相分离. 更为重要的是, 线张力与粗化微畴尺寸 (图 1(b)) 的大小排序并不一致. Garcia-Saez 等 [15] 通过改变磷脂尾链长度产生了跨 3 个量级的线张力, 发现微畴的平均面积粗化率与线张力成正比. 但在我们的研究中, 由于所有组分的线张力均处于同一量级, 其他因素可能在相畴融合粗化中发挥了重要作用.

在微畴的融合粗化中, 微畴需要经历扩散碰撞才能实现融合. 进一步考察了微畴在膜内的扩散动力学. 图 4(a) 和图 4(b) 给出了微畴的代表性运动轨迹. 在考察的 GUVs 中, M3 与 M4 的微畴基本符合布朗运动, 而 M1 与 M2 有大量微畴在部分时段不符合布朗运动. 布朗运动微畴的均方位移 (MSD) 和时间呈线性关系 (图 4(a) 蓝线, (5) 式); 而非布朗运动微畴的 MSD 呈指数型增长 (图 4(a) 红线). 微畴的非布朗运动源于 Liang 等 [27] 报道的融合促进的微畴扩散, 即微畴融合时产生的磷脂层流场诱

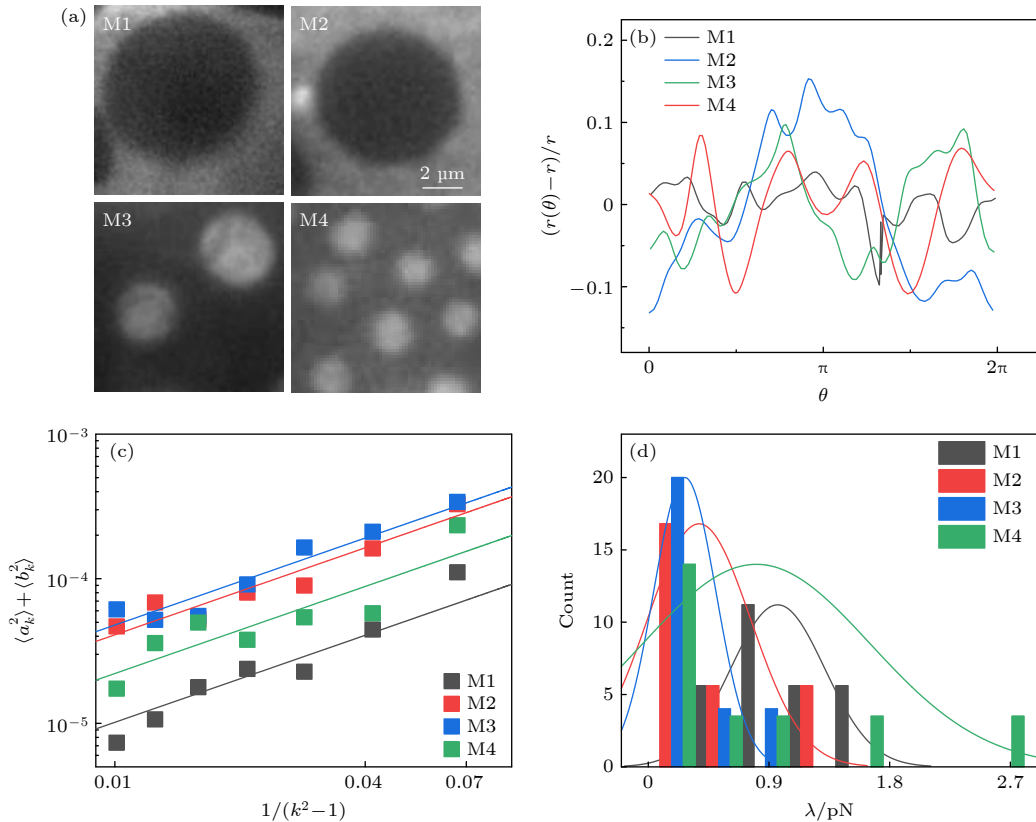


图 3 基于微畴径向波动性计算的线张力 (a) M1—M4 微畴的荧光显微镜图; (b) 微畴极角 (θ) 对应的径向波动性; (c) 由傅里叶级数展开的波数 (k) 和系数 (a_k, b_k) 计算的 $\langle a_k^2 \rangle + \langle b_k^2 \rangle$ 与 $1/(k^2 - 1)$ 关系; (d) 磷脂组分依赖的线张力

Fig. 3. Line tension calculated by domain boundary fluctuation: (a) Fluorescence microscopy of domains in M1—M4; (b) radial fluctuation as a function of polar angle (θ); (c) relationship between $\langle a_k^2 \rangle + \langle b_k^2 \rangle$ and $1/(k^2 - 1)$ calculated from the Fourier coefficients (a_k, b_k) and mode number (k); (d) dependence of line tension on lipid composition.

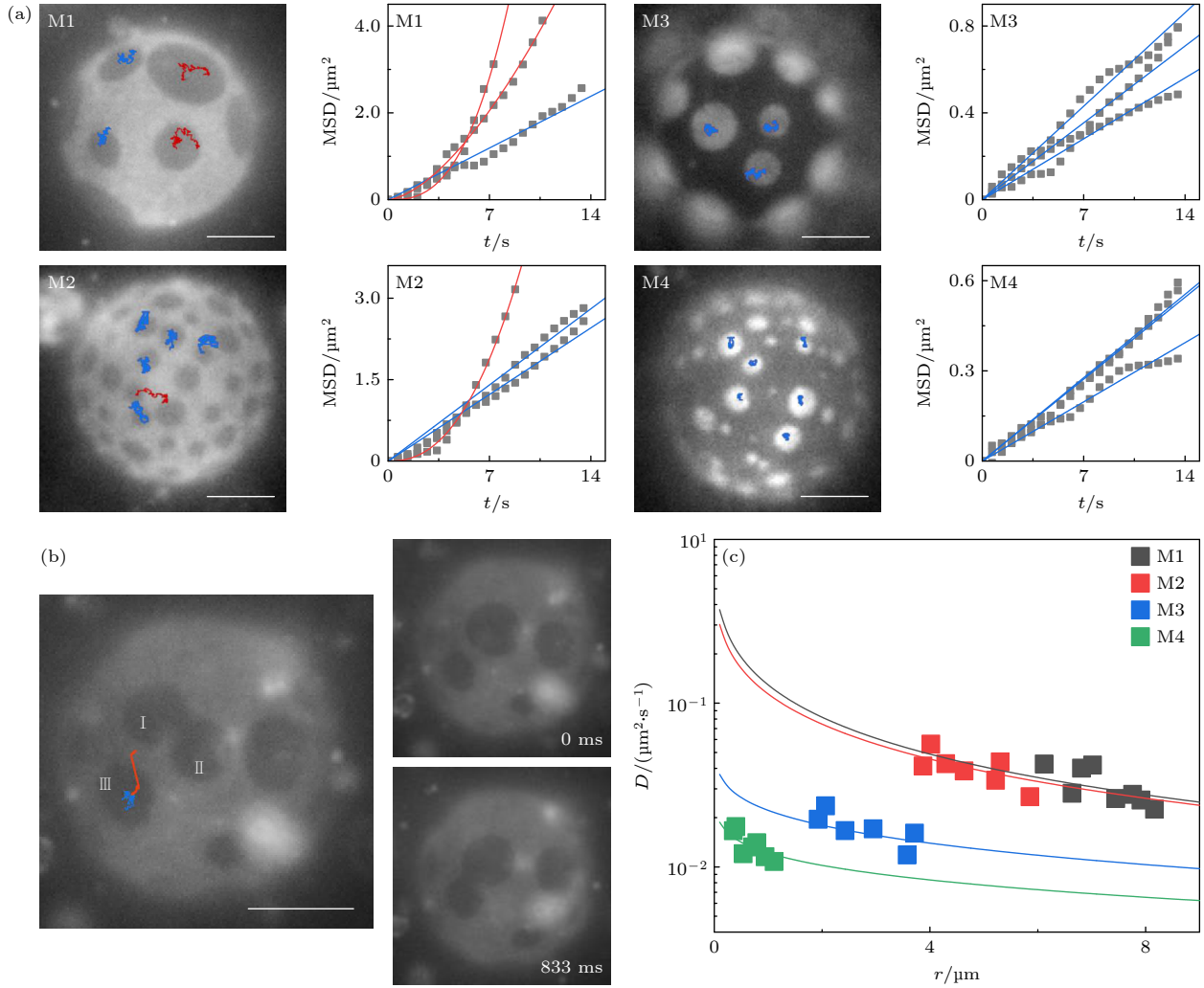


图 4 微畴在膜内的扩散 (a) 典型的运动轨迹与 MSD, 红、蓝色分别标记了布朗运动与非布朗运动. (b) 融合促进的微畴扩散, 在微畴 I 和 II 融合前, 微畴 III 呈布朗运动 (蓝色轨迹); 在微畴 I 和 II 融合后, 微畴 III 以近线性轨迹 (红色) 向 I, II 方向迁移. 微畴 III 在 833 ms 内扩散迁移了约 3 μm (右图). (c) 基于布朗运动的微畴统计获得的扩散速率-微畴尺寸关系. 标尺为 10 μm

Fig. 4. Diffusion of domains in lipid membranes: (a) Typical trajectories and MSD. Brownian and non-Brownian motions are marked by blue and red colors. (b) Coalescence-induced domain diffusion. Before the coalescence of domains I and II, domain III underwent Brownian motion (blue trajectory). After the coalescence, domain III diffused to I and II through a nearly straight line (red trajectory). The diffusion distance of domain III is around 3 μm in 833 ms (images at right). (c) Plot of diffusion coefficient versus domain size obtained from the Brownian motion of the domains. Scale bar is 10 μm .

导了周边微畴的扩散. Yanagisawa 等^[29]将其简化为微畴间吸引. 图 4(b) 给出了一个融合促进微畴扩散的轨迹: 在周边微畴 I 和 II 融合前, 微畴 III 呈布朗运动 (蓝色轨迹); 微畴 I 和 II 融合后, 微畴 III 迅速向 I, II 方向迁移 (红色轨迹). 更多的融合促进的微畴运动见图 2(a). 需要指出, 流场的动能是由微畴融合造成的线张力降低提供的. 流场速率 (v) 为 $v \sim \sigma/\eta$ ^[27], 其中 $\sigma = \lambda/h^2 \sim 10^{-7} \text{ N/m}^2$ (h 为微畴与大相的厚度差)^[15], η 为大相黏滞系数. 由 v 的表达式可得, 降低大相黏滞性可显著提高流场速率. 在 M1 和 M2 组分实验中, 观测到较为显著的

非布朗运动微畴, 即强流场影响, 表明 M1 和 M2 的大相黏滞性可能比 M3 和 M4 低.

基于符合布朗运动微畴的均方位移, 估算了影响微畴扩散的重要参量 η . 首先, 采用 (5) 式计算布朗运动微畴的侧向扩散速率 D (图 4(c)). 发现对于相近尺寸的微畴, 在 L_d 大相的扩散速率高于 L_o 大相. 这源于不同相态磷脂膜自由体积分量的差异^[30]. 磷脂层中侧向扩散的本质是磷脂分子不断占据可用自由体积的过程^[31]. L_o 相磷脂排布相对有序, 自由体积分量较低, 因此其中内含物的扩散较慢. 与之相对, L_d 相磷脂排布的相对无序产生了较快的

侧向扩散. 随后, 基于 Petrov 和 Schwille 等^[32] 构建的 Hughes-Pailthorpe-White (HPW) 经验关系式数值求解大相的黏滞系数:

$$D = \frac{k_B T}{4\pi\eta} \times \left[\ln \frac{2}{\varepsilon} - \gamma + \frac{4\varepsilon}{\pi} - \frac{\varepsilon^2}{2} \ln \frac{2}{\varepsilon} \right] \times \left[1 - \frac{\varepsilon^3}{\pi} \ln \frac{2}{\varepsilon} + \frac{c_1 \varepsilon^{b_1}}{1 + c_2 \varepsilon^{b_2}} \right]^{-1}, \quad (7)$$

其中 $\varepsilon = 2r\eta_m/\eta$, η_m 为溶液黏滞系数; γ 为欧拉常数; c_1, c_2, b_1, b_2 为常数. 获得的 η 值如图 5(a) 所示. 可以看出, L_o 大相的黏滞系数在 10^{-8} — 10^{-7} Pa·s·m, L_d 大相的黏滞系数在 10^{-9} Pa·s·m (图 5(a)), 这与表面剪切流变实验报道的磷脂膜黏滞性范围是一致的^[33]. 并且黏滞系数符合 $\eta_{M4} > \eta_{M3} > \eta_{M2} > \eta_{M1}$ (图 5(a)). $M4$ 的黏滞系数比 $M1$ 高两个量级. 图 5(b) 给出了大相黏滞系数与对应微畴尺寸 (降温 5 min) 的关系, 两者的同向变化说明了两者的内在相关性. 下文将半定量地讨论大相黏滞性与微畴粗化的关系.

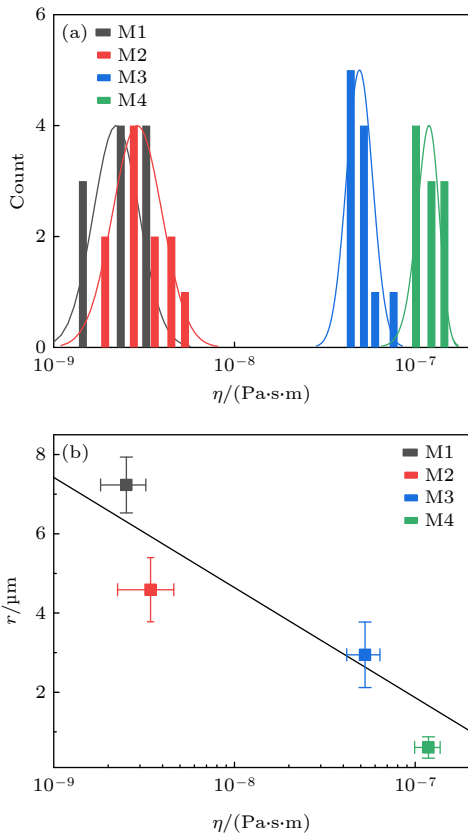


图 5 大相的黏滞性 (a) 数值求解的大相黏滞系数; (b) 大相黏滞系数与降温 5.0 min 的 M1—M4 的微畴尺寸
Fig. 5. Bulk viscosity: (a) Numerically computed bulk viscosity; (b) plot of the bulk viscosity versus domain size in M1–M4 (5.0 min after the temperature quench).

首先讨论产生 $\eta_{M4} > \eta_{M3} > \eta_{M2} > \eta_{M1}$ 的原因. 胆固醇可能显著影响了大相磷脂的密排结构, 从而改变了大相的黏滞性^[31,34]. 通过 DPH 荧光光谱实验考察了胆固醇含量对膜黏滞性的影响. DPH 的摆动影响了发射光各向异性, 反映着周边磷脂双层疏水内核的黏滞性^[26]. 如图 6(a) 所示, 单组分 DOPC 和 DPPC 膜分别具有 DPH 各向异性 (a) 的最低值与最高值, 对应着它们所处的液相 (L_o)、凝胶相 (L_β) 的极低与极高黏滞性 ($\eta_{L_o} \sim 10^{-10}$ Pa·s·m^[34], $\eta_{L_\beta} \sim 10^{-6}$ Pa·s·m^[35]). Chol 的加入引起了 a 的变化. 对于 DOPC/Chol 膜, a 随着 Chol 含量的提高而增大, 表明 Chol 使得 L_o 相磷脂膜的黏滞性提高. 而对于 DPPC/Chol 膜, Chol 含量的提高降低了 a , 表明 Chol 降低了 L_β 相磷脂膜的黏滞性. 基于以上结果, 给出 Chol 影响多组分 GUVs 中大相黏滞性的机制示意图 (图 6(b)). 当 L_o 大相中的 Chol 与 DPPC 含量之比提高时 ($\text{Chol}/\text{DPPC}_{M4} = 0.29$, $\text{Chol}/\text{DPPC}_{M3} = 0.97$), 性质更偏离 DPPC 的 L_β 相, 导致 $\eta_{M3} < \eta_{M4}$. 当 L_d 大相中的 Chol 与 DOPC

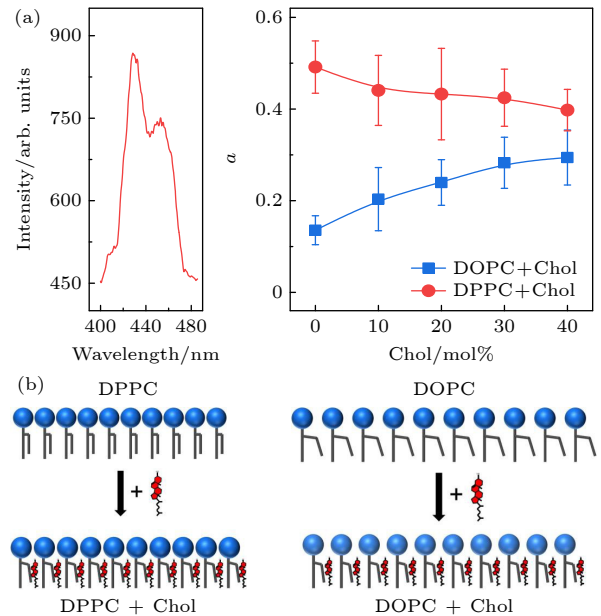


图 6 Chol 影响的磷脂膜黏滞性 (a) 掺杂 DPH 的 DPPC/Chol 与 DOPC/Chol 组分 GUVs 的荧光光谱与各向异性 (32 °C); (b) 黏滞性变化对应的分子排布示意图. 磷脂排布有序度的提高造成膜黏滞性提高^[34]

Fig. 6. Membrane viscosity influenced by Chol: (a) Fluorescence spectrum and anisotropy of DPH-doped DPPC/Chol and DOPC/Chol GUVs (32 °C); (b) schematic illustration for the molecular packing associated with the different membrane viscosity. The increase of the packing order increases the viscosity^[34].

含量之比提高时 ($\text{Chol}/\text{DOPC}_{\text{M1}} = 0.17$, $\text{Chol}/\text{DOPC}_{\text{M2}} = 0.27$), 膜性质更偏离 DOPC 的 L_α 相, 导致 $\eta_{\text{M2}} > \eta_{\text{M1}}$. 以上结果表明, 可通过改变胆固醇的相对含量调节大相黏滞性, 从而间接影响磷脂膜的分相动力学.

进一步考察大相黏滞性与微畴粗化率间的关系. 实验中降温迅速完成 (1.0 min), 以消减二次微畴成核造成的尺寸波动. 图 7 在对数坐标系中给出了归一化的微畴的平均半径与时间关系. 发现所有组分的微畴均满足 $r = t^\alpha$. 但大相黏滞性低实验拟合的 α 值 ($\alpha_{\text{M1}} = 0.96$, $\alpha_{\text{M2}} = 0.93$) 显著高于大相黏滞性高实验的拟合值 ($\alpha_{\text{M3}} = 0.52$, $\alpha_{\text{M4}} = 0.50$). 相近地, Liang 等 [27] 在微畴融合诱导的扩散体系中观测到 $\alpha \sim 1$, Tayebi 等 [36] 在高黏滞的吸附磷脂多层体系中观测到 $\alpha \sim 0.5$. 为理解大相黏滞性相关的微畴粗化标度律, 假设大相中均匀分布着许多尺寸相同的微畴. 当微畴尺寸较小时, 微畴面密度较高导致它们间距较低; 但当微畴融合粗化至较大尺寸时, 微畴密度降低导致它们间距提高. 因此, 微畴的半径 $r(t)$ 近似与微畴的间距 $l(t)$ 成正比. 当大相黏滞性较高时, 微畴需要以布朗运动扩散 $l(t)$ 的距离与周边微畴接触融合, 即 $l(t)^2 \propto Dt$. 由于 $r(t) \propto l(t)$, 因此 $r(t)^2 \propto Dt$. 代入 HPW 的 Saffman-Delbrück 简化式 [25]: $D = \frac{k_B T}{4\pi\eta} \times \left[\ln\left(\frac{\eta}{\eta_m r}\right) - \gamma + \frac{1}{2} \right]$ (需满足 $\eta > \eta_m r$, 实验条件下的估算值见表 2), 忽略对数项近似得到:

$$r(t) \propto t^{0.5}. \quad (8)$$

(8) 式与高黏滞的 M3 和 M4 实验结果相近. 而当大相黏滞性较低时, 微畴融合引起的流场可促进周边微畴的靠拢. 微畴间融合的时间 t_f 近似为 $t_f \propto l(t)/v$. 微畴尺寸的增长满足 $dr(t)/dt = r(t)/\sqrt{2}t_f$. 而由于 $r(t) \propto l(t)$, 可得

$$r(t) \propto t^1. \quad (9)$$

(9) 式与低黏滞的 M1 和 M2 实验结果相近. 因此, 高低黏滞性下不同的微畴尺寸-时间标度律是由不同的微畴扩散机制引起的. 需要指出, 以上 α 值与早些无膜张力体系中观测到的 $\alpha \leq 1/3$ 具有区别. 较小的 α 值可能源于膜形变等因素 [37,38]. 低渗正膜张力实验条件抑制了膜的形变与热波动, 从而促进了相分离的进行 [19]. 综上所述, 在线张力较低的多组分磷脂相分离中, 大相黏滞性可在微畴的粗化动

力学中发挥关键作用.

深入理解 GUVs 微畴的粗化机制对深入理解脂质筏动力学至关重要. 我们的研究给出了大相黏滞性引起的微畴扩散与粗化机制. 但研究尚未给出高/低黏滞性的准确分界值. $\eta_m r$ 可能是重要的参考量 (表 2). 当 $\eta < \eta_m r$, 周围水媒介与磷脂层的动量交换是可忽略的. 而当 $\eta > \eta_m r$, 微畴融合产生的流场可能将动能显著地耗散于周边水媒介, 从而降低其对微畴扩散的影响. 之后的研究将对该分界值进行深入探索.

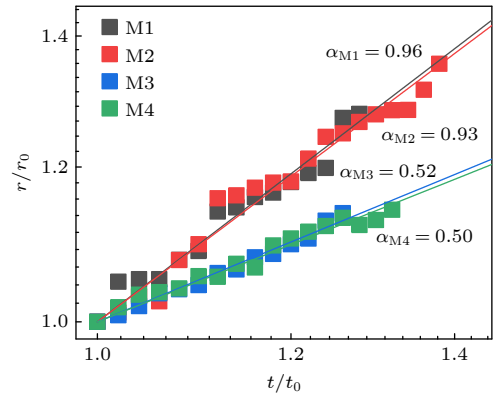


图 7 大相黏滞性依赖的微畴尺寸与时间标度律. r 与 t 被归一化以方便比较 (下标 0 代表初始时刻)

Fig. 7. Bulk viscosity-depended scaling relation between domain size and time. r and t are normalized for comparison of the data (the subscript 0 denotes the initial).

表 2 实验条件下 η 与 $\eta_m r$ 的估算值 (降温后 2.5—4.0 min)

Table 2. Estimated values of η and $\eta_m r$ at the experiments (2.5–4.0 min after the temperature quench).

	$r/\mu\text{m}$	$\eta_m r / (10^{-9} \text{ Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m})$	$\eta / (10^{-9} \text{ Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m})$
M1	1.9–10.5	2.6–14.0	2.5
M2	1.7–6.6	2.3–8.8	3.4
M3	0.7–4.5	0.9–6.0	52.8
M4	0.4–2.9	0.5–3.9	118.0

4 结 论

本文通过单微畴跟踪、径向波动性分析等手段定量地研究了微畴的粗化动力学. 发现当大相黏滞性较低, 微畴融合产生的流场促进了微畴扩散, 加速了微畴融合粗化; 当大相黏滞性较高, 微畴通过布朗运动扩散, 融合粗化较慢. 在两种情况下, 分

别满足 $r(t) \propto t^{0.5}$ 与 $r(t) \propto t^1$ 的微弱粗化标度律。此外, 大相黏滞性可由胆固醇的相对含量调节, 变化的方向具有大相种类依赖性。研究深化了多组分磷脂相分离机制的理解, 为考察细胞脂质筏的动态行为、调控膜表面的分子组装提供了参考。

感谢南京大学物理学院向雅心博士关于理论建模的讨论。

参考文献

- [1] Sezgin E, Levental I, Mayor S, Eggeling C 2017 *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18** 361
- [2] Wang X J, Tian L F, Ren Y S, Zhao Z Y, Du H, Zhang Z Z, Drinkwater B W, Mann S, Han X J 2020 *Small* **16** 1906394
- [3] Zhou R H, Weigl T, Ma Y Q 2020 *Nanoscale* **12** 10426
- [4] Fu M F, Li J B 2018 *Angew. Chem. Int. Ed.* **57** 11404
- [5] Liang Y R, Liang Q 2019 *Acta Phys. Sin.* **68** 028701 (in Chinese) [梁焱然, 梁清 2019 物理学报 **68** 028701]
- [6] Maekawa T, Chin H, Nyu T, Sut T N, Ferhan A R, Hayashi T, Cho N J 2019 *PCCP* **21** 16686
- [7] Veatch S L, Keller S L 2003 *Biophys. J.* **85** 3074
- [8] Baumgart T, Hess S T, Webb W W 2003 *Nature* **425** 821
- [9] Li W W, Lin Z, Yuan B, Yang K 2020 *Chin. Phys. B* **29** 128701
- [10] Ding H M, Yin Y W, Ni S D, Sheng Y J, Ma Y Q 2021 *Chin. Phys. Lett.* **38** 018701
- [11] Ye X Q, Hao C C, Yang J J, Sun R G 2018 *Colloids Surf., B* **172** 480
- [12] Chen J X, Chen Y G, Kapral R 2018 *Adv. Sci.* **5** 1800028
- [13] Chen J X, Yuan R, Cui R F, Qiao L Y 2021 *Nanoscale* **13** 1055
- [14] Stanich C A, Honerkamp-Smith A R, Putzel G G, Warth C S, Lamprecht A K, Mandal P, Mann E, Hua T A D, Keller S L 2013 *Biophys. J.* **105** 444
- [15] Garcia-Saez A J, Chiantia S, Schwille P 2007 *J. Biol. Chem.* **282** 33537
- [16] Rozovsky S, Kaizuka Y, Groves J T 2005 *JACS* **127** 36
- [17] Li J F, Zhang H D, Qiu F 2013 *J. Phys. Chem. B* **117** 843
- [18] Talbot E L, Parolini L, Kotar J, Di Michele L, Cicuta P 2017 *PNAS* **114** 846
- [19] Wongsirojkul N, Shimokawa N, Opaprakasit P, Takagi M, Hamada T 2020 *Langmuir* **36** 2937
- [20] Zhou Q, Wang P, Ma B B, Jiang Z Y, Zhu T 2022 *Chin. Phys. B* **31** 098701
- [21] Zhu T, Jiang Z Y, Ma Y Q, Hu Y 2016 *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8** 5857
- [22] Veatch S L, Keller S L 2005 *Phys. Rev. Lett.* **94** 148101
- [23] Hormel T T, Reyer M A, Parthasarathy R 2015 *Biophys. J.* **109** 732
- [24] Duan Y, Mahault B, Ma Y Q, Shi X Q, Chate H 2021 *Phys. Rev. Lett.* **126** 178001
- [25] Cicuta P, Keller S L, Veatch S L 2007 *J. Phys. Chem. B* **111** 3328
- [26] Bhuyan N N, Pattnaik G P, Mishra A, Chakraborty H 2021 *J. Mol. Liq.* **325** 115152
- [27] Liang X Y, Li L, Qiu F, Yang Y L 2010 *Physica A* **389** 3965
- [28] Usery R D, Enoki T A, Wickramasinghe S P, Weiner M D, Tsai W C, Kim M B, Wang S, Torng T L, Ackerman D G, Heberle F A, Katsaras J, Feigenson G W 2017 *Biophys. J.* **112** 1431
- [29] Yanagisawa M, Imai M, Masui T, Komura S, Ohta T 2007 *Biophys. J.* **92** 115
- [30] Almeida P F F, Vaz W L C, Thompson T E 1992 *Biochem.* **31** 6739
- [31] Nagao M, Kelley E G, Faraone A, Saito M, Yoda Y, Kurokuzu M, Takata S, Seto M, Butler P D 2021 *Phys. Rev. Lett.* **127** 078102
- [32] Petrov E P, Schwille P 2008 *Biophys. J.* **94** L41
- [33] Sakuma Y, Kawakatsu T, Taniguchi T, Imai M 2020 *Biophys. J.* **118** 1576
- [34] Chakraborty S, Doktorova M, Molugu T R, Heberle F A, Scott H L, Dzikovski B, Nagao M, Stingaciu L R, Standaert R F, Barrera F N, Katsaras J, Khelashvili G, Brown M F, Ashkar R 2020 *PNAS* **117** 21896
- [35] Kim K, Choi S Q, Zell Z A, Squires T M, Zasadzinski J A 2013 *PNAS* **110** E3054
- [36] Tayebi L, Ma Y, Vashae D, Chen G, Sinha S K, Parikh A N 2012 *Nat. Mater.* **11** 1074
- [37] Saeki D, Hamada T, Yoshikawa K 2006 *J. Phys. Soc. Jpn.* **75** 013602
- [38] Taniguchi T 1996 *Phys. Rev. Lett.* **76** 4444

Phase separation in high/low viscosity phospholipid membranes based on single domain characterization*

Zhu Yu-Jie¹⁾ Zhu Tao^{2)†} Sheng Jie¹⁾ Zhou Qi¹⁾ Jiang Zhong-Ying^{1)‡}

1) (*Key Laboratory of Micro-Nano Electronic Sensing Technology and Bionic Devices, College of Electronics and Engineering, Yili Normal University, Yining 835000, China*)

2) (*National Key Laboratory of Solid State Microstructures, School of Physics, Nanjing University, Nanjing 210093, China*)

(Received 19 April 2022; revised manuscript received 11 May 2022)

Abstract

Lipid rafts are small biomembrane functional units, resulting from the lateral phase separation of phospholipids. The phospholipid phase separation plays a crucial role in spatially organizing the biomolecules in life activities. Here, we study the kinetics of multi-component phospholipid phase separation quantitatively by using the single domain characterization methods including the movement tracking and radial fluctuation analyses, which provide valuable information about the physical and mechanical properties of the bulks and domains. The study is carried out in a low line tension condition similar to that in cells. The order of magnitude of line tension is ~ 0.1 pN as estimated from the radial fluctuation analysis. Fluorescence microscopy characterization shows that domains mainly coarsen through the coalescence pathways, while the evaporation-condensation is negligible. Through the tracking of domains, it is found that the bulk viscosity dominates the dynamics of domain coalescence. The coalescence of domains produces strong hydrodynamic flows in low viscosity bulk, which promotes the non-Brownian motion of surrounding domains, accelerating the lateral diffusion and coalescence of the domains. However, these hydrodynamic flows decrease significantly in high viscosity bulk. The domains rely mainly on Brownian motion to diffuse in this highly viscous medium, resulting in the slow lateral diffusion and low coalescence. Picking the domains following Brownian motion, the viscosities of liquid ordered bulk and liquid disordered bulk are determined to be, respectively, in a range of 10^{-8} – 10^{-7} Pa·s·m and 10^{-9} Pa·s·m from the Hughes-Pailthorpe-White empirical relation. Furthermore, we observe a bulk-viscosity-dependent scaling relation between the domain size and coarsening time experimentally. A theoretical model of domain diffusion and coalescence is established to understand the scaling relation. If the bulk viscosity is low, the hydrodynamic flow produces a high power exponent of 1.0. And if the bulk viscosity is high, the Brownian diffusion produces a low power exponent of 0.5. In addition, we demonstrate that the bulk viscosity can be regulated through the relative content of cholesterol. The 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene fluorescence anisotropy characterization exhibits that the increase of cholesterol in liquid ordered and liquid disordered bulks disorders and orders the phospholipid packing, thus reducing and increasing the bulk viscosity, respectively. It is expected that this viscosity regulation strategy can be used to control the multicomponent phospholipid phase separation. All in all, our study deepens the understanding of the physical mechanism behind the formation of lipid rafts. It also provides a reference for regulating the biomolecule distribution in cell membranes.

Keywords: phospholipid phase separation, single domain study, diffusion and coalescence, membrane viscosity

PACS: 87.16.D–, 87.15.Vv, 87.16.dt, 87.16.dr

DOI: [10.7498/aps.71.20220752](https://doi.org/10.7498/aps.71.20220752)

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 11904167), the Research Fund for the Doctoral Program in Yili Normal University, China (Grant No. 2020YSBS006), and the Joint Funds of Xinjiang Natural Science Foundation, China (Grant No. 2022D01C336).

† Corresponding author. E-mail: zhuttd@163.com

‡ Corresponding author. E-mail: jiangzhying@163.com



基于单畴表征的高/低黏滞磷脂膜中的相分离

朱玉洁 朱涛 盛洁 周琪 蒋中英

Phase separation in high/low viscosity phospholipid membranes based on single domain characterization

Zhu Yu-Jie Zhu Tao Sheng Jie Zhou Qi Jiang Zhong-Ying

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 71, 188702 (2022) DOI: 10.7498/aps.71.20220752

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7498/aps.71.20220752>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

AlGa_N表面相分离的同位微区荧光光谱和高空间分辨表面电势表征

Characterization of phase separation on AlGa_N surfaces by *in-situ* photoluminescence spectroscopy and high spatially resolved surface potential images

物理学报. 2020, 69(12): 127302 <https://doi.org/10.7498/aps.69.20200099>

三区域膜泡相分离模式之间转变的研究

Phase separation pattern transition of three-domain vesicles

物理学报. 2018, 67(18): 188701 <https://doi.org/10.7498/aps.67.20180828>

全内反射荧光显微研究磷脂支撑膜形成中的片层前沿成长

Total internal reflection fluorescence microscopy to study sheet front growth in phospholipid supported lipid membrane formation

物理学报. 2022, 71(16): 168701 <https://doi.org/10.7498/aps.71.20220309>

FeSe基超导单晶与薄膜研究新进展:自旋向列序、电子相分离及高临界参数

New progress of FeSe-based superconducting single crystals and films: Spin nematicity, electronic phase separation, and high critical parameters

物理学报. 2018, 67(20): 207410 <https://doi.org/10.7498/aps.67.20181638>

复杂氧化物中电子相分离的量子调控

Quantum manipulation of electronic phase separation in complex oxides

物理学报. 2018, 67(22): 227502 <https://doi.org/10.7498/aps.67.20182007>

带电纳米颗粒与相分离的带电生物膜之间相互作用的分子模拟

Molecular simulation of interaction between charged nanoparticles and phase-separated biomembranes containing charged lipids

物理学报. 2019, 68(2): 028701 <https://doi.org/10.7498/aps.68.20181891>