

國立臺灣大學工學院高分子科學與工程學研究所

碩士論文

Institute of Polymer Science and Engineering

College of Engineering

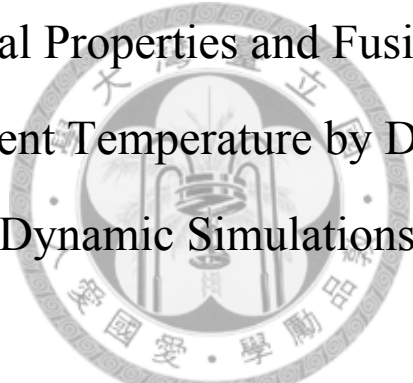
National Taiwan University

Master Thesis

以耗散粒子動力學法研究囊胞在不同溫度下之物理性

質與融合機制

Studies of Physical Properties and Fusion Mechanism of  
Vesicles in Different Temperature by Dissipative Particle  
Dynamic Simulations

The logo of National Taiwan University, featuring a circular emblem with a central figure and the university's name in Chinese characters around the perimeter.

吳幸倫

Hsing-lun Wu

指導教授： 湛玉真 博士

Advisor: Yu-Jane Sheng, Ph.D.

中華民國 101 年 7 月

July, 2012

國立臺灣大學碩士學位論文  
口試委員會審定書

以耗散粒子動力學法研究囊胞在不同溫度下之物理性質與  
融合機制

Studies of Physical Properties and Fusion Mechanism of Vesicles in  
Different Temperature by Dissipative Particle Dynamic Simulations

本論文係吳幸倫君 (R98549024) 在國立臺灣大學高分子科學與  
工程學研究所、所完成之碩士學位論文，於民國 101 年 7 月 17 日承  
下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

謝 之 真

(簽名)

曹 恆 乞 (指導教授)

陳 儀 帆

林 祥 毅

謝 之 真

系主任、所長

林 如 珍

(簽名)



## 致謝

時光飛逝，隨著這本論文的完成，碩士班的生活也告個段落。首先最要感謝的是指導老師謙玉真教授，碩一的時候身體不好，無法長時間在原本的實驗室作實驗，很感謝老師能夠在二年級的時候收容我。老師總是花費了很多時間與我討論研究的方向，指導我走上正確的道路，平時老師也很關心我們的日常生活，研究之餘也常常聊起實驗室與生活中大大小小的瑣事，使得實驗室在穩定的做研究之中又充滿了輕鬆和樂的氛圍。此外，感謝曹恆光教授、林祥泰教授、謝之真教授以及陳儀帆教授撥空前來參加我的口試，悉心地審閱論文並提供寶貴的意見，使論文能臻於完善。同時也謝謝台大計算機中心提供的高效能 hp cluster，讓我能順利完成研究。

感謝和我一起走過碩士班生活的實驗室每位成員。在我什麼都不懂的時候，俊民學長和佩吟帶領我開始進行囊胞的研究，使得我這個新手在短時間內可以快速的上手。還有什麼問題都能夠解決的勢濠學長和漢洲學長，真的靠你們的幫助我才能搞定一切，以及建立實驗室 cluster 的東和學長，還有 QQ 辛苦的管理，讓我的研究能夠順利進行。同時也感謝實驗室其它各位成員的幫助，斯瑋學姊、阿哲、彥旭、弘郁、柏宇、USE、正忠、佳伶，還要感謝從未謀面的拉丁學長，感謝你當初辛苦的建立了 DPD 的系統，讓我這個後人能夠在大樹底下乘涼。未來的好幾年，我還要在這邊念博班，還在實驗室的大家，我們一起加油吧。

我也要謝謝很多好朋友，在這段歲月給我的幫助以及鼓勵，跟我一起大吃大喝，到處玩樂，快樂度過每一天。還要感謝碩一的指導老師徐善慧教授，雖然我離開了，還是很謝謝您一年的照顧。另外還有蔡璧名教授，雖然我只當過您一年的助理，但在學校內仍然得到您很大的幫助。最後要感謝一直以來支持我的家人，爸媽、弟弟、外公跟外婆。雖然我不是個很乖的小孩，謝謝你們的關懷、鼓勵和包容，沒有你們我一定無法做到這一切！

## 摘要

囊胞是由脂質所組成的雙層膜球型聚集體，其構造類似生物體的細胞膜，此外囊胞擁有良好的生物相容性及生物降解性，因此廣泛應用於藥物釋放載體以及模擬細胞膜的各種反應。囊胞會受到溫度的影響，出現三種不同的型態，由低溫到高溫分別為 tilted gel phase、rippled phase、liquid disordered phase。本研究利用耗散粒子動力學法來研究囊胞在不同溫度下，囊胞之物理性質的變化以及囊胞融合程序受到的影響。

根據模擬的結果，可以發現囊胞的大小、含水量，滲透率都隨著溫度升高而變大；而膜的厚度以及 order parameter 則隨著溫度升高而變小。囊胞的表面張力在第二相轉移溫度之前，隨著溫度上升而變大；在第二轉移溫度之後囊胞的型態轉變為 liquid disordered phase，囊胞的表面張力隨著溫度上升而下降。此外測量不同溫度下囊胞的伸展模數，在第二相轉移溫度之前，隨著溫度上升而下降，表示越高溫越好拉；在第二相轉移溫度之後，隨著溫度上升而上升，表示越高溫越難拉。當脂質分子的尾端越疏水，rippled phase 的範圍也變的越大，也能夠在更低的溫度形成囊胞。

將不同溫度和不同  $a_{BW}$  的囊胞進行融合的模擬，可以發現融合的時間並不僅是像文獻上所說，隨著表面張力變大，融合的時間會變的更短。囊胞的滲透率可能也演了影響融合的角色，當滲透率越大，融合的時間會變的更長。若是表面張力與滲透率的影響互相競爭，變化比較大的一方將主導融合的趨勢。

# Abstract

Vesicles are spherical aggregates composed of lipid monomers. Its structure is similar to the cell membrane which exists in organisms. Vesicles are widely used for drug delivery carriers and simulation of cell membrane behavior due to their high biodegradability and biocompatibility. Vesicles are affected by temperature, and it changes its morphology from tilted gel phase to rippled phase and finally to liquid disordered phase when temperature increases. In this work, simulations based on dissipative particle dynamics are performed to study the temperature influence on vesicle. The effects of temperature on the physical properties and fusion process of vesicles are investigated.

According to the simulation results, we can find that the size, inner water, and permeability of vesicles are increasing when temperature increases. But the thickness of membrane and order parameter of vesicles is decreasing when the temperature increases. Surface tension increases with temperature before main transition, but decreases after main transition because the morphology of vesicles turns into liquid disordered phase. The stretching module decreases before main transition. It means that vesicles are easier to be stretched before main transition. After main transition, the tendency is totally different. When the lipid tails are more hydrophobic, the range of rippled phase is broader, and it is easier to form vesicles in lower temperature.

We use vesicles with different temperature or  $a_{BW}$  to fusion process, and find that fusion time not only affect by the surface tension of vesicles, but also affect by the permeability. When surface tension increases, vesicles need less time to finish fusion process. Otherwise when permeability increases, vesicles are difficult to fuse. If the surface tension and the permeability competes with each other, which one changes

more will dominate the trend of fusion.



# 目錄

口試委員會審定書.....	I
致謝.....	II
摘要.....	III
Abstract.....	IV
目錄.....	VI
表目錄.....	VIII
圖目錄.....	IX
Chapter 1 緒論.....	1
1-1 簡介.....	1
1-2 囊胞(Vesicle).....	1
1-3 脂雙層膜的相變化.....	7
1-4 融合作用.....	9
Chapter 2 模擬原理與方法.....	12
2-1 耗散粒子動力學法(Dissipative Particle Dynamics ; DPD).....	12
2-2 DPD 原理.....	14
2-3 作用力參數和 Flory-Huggins Theory.....	19
$\chi$ 參數的選擇.....	22
2-4 模擬方法.....	23
2-4-1 DPD 附加的力.....	24
2-4-2 作用力參數設定.....	24
脂質(lipid)的參數設定.....	24
2-5 分析方法.....	26
表面張力的計算.....	26
Order parameter ( $S$ )的計算.....	28
Chapter 3 結果與討論.....	31
3-1 溫度對囊胞的影響.....	31
囊胞的型態.....	31

囊胞的基本性質.....	36
滲透率(permeability)的計算.....	44
囊胞的機械性質.....	46
3-2 改變脂質分子尾端長鏈段性質的影響.....	54
3-3 融合程序(Fusion Process).....	59
Chapter 4 結論.....	66
Chapter 5 參考文獻.....	68





## 表目錄

<b>Table 1-1</b> 微脂粒的應用[18]。 .....	6
<b>Table 2-1</b> lipid-water 系統的作用力參數表，A 為 lipid 的親水頭基，B 為 lipid 的疏水鏈段，W 為系統選擇的 solvent。 .....	25



## 圖目錄

<b>Fig. 1-1</b> 囊胞(Vesicle)示意圖。 .....	2
<b>Fig. 1-2</b> 囊胞的分類[3]。 .....	3
<b>Fig. 1-3</b> 囊胞作為表面改質之應用[8]。 .....	4
<b>Fig. 1-4</b> 微脂粒做為藥物載體應用的示意圖。 .....	6
<b>Fig. 1-5</b> 脂雙層膜的各種型態。 .....	7
<b>Fig. 1-6</b> 相轉移溫度隨脂質分子尾端疏水鏈段長度之變化。 [19] .....	8
<b>Fig. 1-7</b> 囊胞融合示意圖。 .....	10
<b>Fig. 1-8</b> a. 低表面張力系統(a) $t = 700$ ns 為 kissing 階段; (b) $t = 960$ ns 為 adhesion 階段; (c) $t = 1040$ ns 時其中一囊胞脂雙層開孔; (d) $t = 1100$ ns 時兩囊胞親水端被排開; (e) $t = 1360$ ns 為 hemifusion 階段; (f) at $t = 1460$ ns 完成融合。 b. 高表面張力系統(a) $t = 260$ ns 為 kissing 階段; (b) $t = 320$ ns 時 stalk 形成; (c) $t = 360$ ns 為 hemifusion 階段; (d) $t = 400$ ns 完成融合[2]。 .....	11
<b>Fig. 1-9</b> 兩顆囊胞接觸之際，lipid bridge 形成後進而促使融合發生[35]。 ..	11
<b>Fig. 2-1</b> 各種模擬方法之長度與時間尺度關係圖。 .....	13
<b>Fig. 2-2</b> 截斷半徑示意圖。 .....	14
<b>Fig. 2-3</b> Modified Velocity-Verlet Algorithm 示意圖。 .....	16
<b>Fig. 2-4</b> 於 $\sigma = 3$ ， $\rho = 4$ 時，溫度誤差對步階(time step)做圖。 Eu：Euler-like algorithm；Ve：Verlet-like algorithm；Ve <sub>(-)</sub> ：計算下個時刻位置 $r_i(t + \Delta t)$ 時，不將 $\frac{1}{2}(\Delta t)^2 f_i(t)$ 項列入的結果[37]。 .....	17
<b>Fig. 2-5</b> 二維週期性邊界條件(Periodic Boundary Condition)示意圖。 .....	18
<b>Fig. 2-6</b> 二維 Cell List 示意圖。 .....	19
<b>Fig. 2-7</b> Flory parameter $\chi$ vs. $(a_{AB} - a_{AA})$ [37]。 .....	22
<b>Fig. 2-8</b> (a) Lipid-water 系統示意圖，(b)真實磷脂質與 coarse-grained 之脂質對照圖。 .....	26
<b>Fig. 2-9</b> 囊胞表面張力之靜力平衡示意圖。 .....	27
<b>Fig. 2-10</b> 在囊胞內水區和外水區各框選一區域，即綠色區域，計算內壓及外	

壓。	28
<b>Fig. 2-11</b> 兩硬桿間的 included angle( $\theta$ )示意圖。	29
<b>Fig. 2-12</b> 排列與 order parameter 對應示意圖。	29
<b>Fig. 2-13</b> 計算 order parameter 所需定義的圓柱區域示意圖。	30
<b>Fig. 3-1</b> 脂質分子排列成開洞的球型起始結構。	31
<b>Fig. 3-2</b> 溫度由 0.8 至 1.5 囊泡型態。紅色為脂質分子親水的頭基，黃色是尾端兩條長鏈段，綠色是長鏈段的最後一顆粒子。	35
<b>Fig. 3-3</b> $T^*=1$ 時由平板狀起始結構形成囊泡。	36
<b>Fig. 3-4</b> 囊泡半徑隨溫度之變化圖。	39
<b>Fig. 3-5</b> 囊泡厚度隨溫度之變化圖。	39
<b>Fig. 3-6</b> 囊泡內部水區隨溫度之作圖。	40
<b>Fig. 3-7</b> 囊泡膜的排列與厚度的變化。	40
<b>Fig. 3-8</b> 囊泡 order parameter 隨溫度之變化圖。	41
<b>Fig. 3-9</b> 囊泡內、外層脂質分子疏水鏈段長對溫度做圖。	41
<b>Fig. 3-10</b> 囊泡內、外層脂質分子體積隨溫度之作圖。	42
<b>Fig. 3-11</b> 囊泡內、外層單位面積親水端粒子隨溫度之變化圖。	42
<b>Fig. 3-12</b> 囊泡內、外層單位面積疏水端粒子隨溫度之變化圖。	43
<b>Fig. 3-13</b> 囊泡內、外層 packing parameter 隨溫度之作圖。	43
<b>Fig. 3-14</b> 囊泡表面張力隨溫度之作圖。	44
<b>Fig. 3-15</b> 計算滲透率系統標定圖。(a)、(b)為重新標定；(c)、(d)經過 100,000 步平衡。其中紅色粒子為脂質分子親水端，黃色為脂質分子疏水端，綠色為重新標定的囊泡內部水分子，紫色為囊泡外部的水分子。	45
<b>Fig. 3-16</b> 囊泡滲透率隨溫度之變化圖。	46
<b>Fig. 3-17</b> 囊泡平均半徑隨表面積增加率之變化圖。	49
<b>Fig. 3-18</b> 囊泡厚度隨表面積增加率之變化圖。	49
<b>Fig. 3-19</b> 囊泡 order parameter 隨表面積增加率之變化圖。	50
<b>Fig. 3-20</b> 囊泡表面張力差隨表面積增加率之變化圖。	50
<b>Fig. 3-21</b> 囊泡伸展模數隨溫度之變化圖。	51
<b>Fig. 3-22</b> 囊泡在 $T^*=1.0$ 能量隨表面積增加率之變化圖。	52

<b>Fig. 3-23</b> 囊胞在 $T^*=1.3$ 能量隨表面積增加率之變化圖。	53
<b>Fig. 3-24</b> 不同 $a_{BW}$ 囊胞平均半徑隨溫度之變化圖。	55
<b>Fig. 3-25</b> 不同 $a_{BW}$ 囊胞內部水區隨溫度之變化圖。	56
<b>Fig. 3-26</b> 不同 $a_{BW}$ 囊胞厚度隨溫度之變化圖。	56
<b>Fig. 3-27</b> 不同 $a_{BW}$ 囊胞 order parameter 隨溫度之變化圖。	57
<b>Fig. 3-28</b> 不同 $a_{BW}$ 囊胞表面張力隨溫度之變化圖。	58
<b>Fig. 3-29</b> 不同 $a_{BW}$ 囊胞 permeability 隨溫度之變化圖。	59
<b>Fig. 3-30</b> 囊胞融合程序的四個階段。	60
<b>Fig. 3-31</b> $a_{BW}=50$ 、 $T^*=0.9$ 囊胞融合過程。	62
<b>Fig. 3-32</b> $a_{BW}=50$ 、 $T^*=1.0$ 囊胞融合過程。	62
<b>Fig. 3-33</b> $a_{BW}=50$ 、 $T^*=1.1$ 囊胞融合過程。	63
<b>Fig. 3-34</b> $a_{BW}=50$ 、 $T^*=1.3$ 囊胞融合過程。	63
<b>Fig. 3-35</b> 囊胞融合所需時間隨溫度之變化圖。	64
<b>Fig. 3-36</b> $a_{BW}=45$ 、 $T^*=1.0$ 囊胞融合過程。	64
<b>Fig. 3-37</b> $a_{BW}=70$ 、 $T^*=1.0$ 囊胞融合過程。	65
<b>Fig. 3-38</b> 囊胞在 $T^*=1.0$ 時，融合時間隨 $a_{BW}$ 之變化圖。	65

# Chapter 1 緒論

---

## 1-1 簡介

囊胞(vesicle)的結構最早在 1965 年由 Bangham[1]發現，其主要構成分子為脂質分子(lipid)，而其中一種脂質分子—磷脂質(phospholipid)為組成細胞膜的主要成分。脂質分子的結構一親水鏈段與兩條疏水鏈段，將其灑在親水溶劑中並且達到一定濃度時，將會自組裝(self-assembling)形成囊胞，以保護尾端的疏水鏈段接觸到親水溶劑。囊胞具有特殊中空構造和類似細胞膜的雙層膜結構，加上脂質分子本身良好的生物可分解性和生物相容性，使囊胞廣泛應用在生物、醫學等領域上。

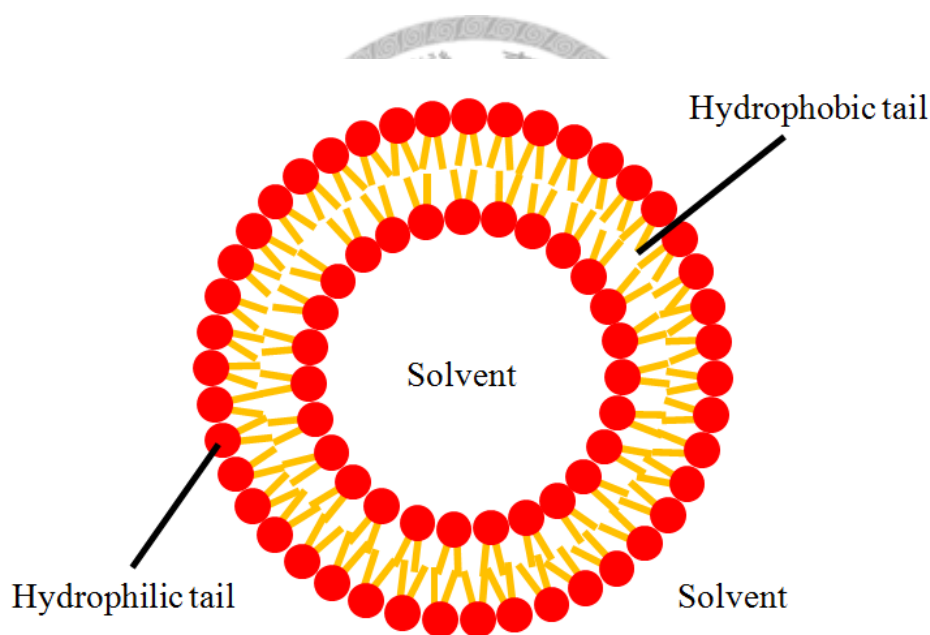
溫度對於由脂質分子所組成的脂雙層膜的影響受到了廣泛的研究，在不同溫度之下，脂雙層膜具有不同的型態以及性質。由低溫到高溫，膜將由 tilted gel phase 變為 rippled phase 最後再變為 liquid disordered phase。本研究將溫度對於脂雙層膜的影響進一步的從平面膜的結構擴展到囊胞外層的雙層膜結構。

囊胞是處於熱力學介穩狀態(metastable state)，容易受到外界環境影響發生結構改變。本研究主要將探討不同溫度對於囊胞的型態以及性質的影響，例如：囊胞脂雙層的表面張力、膜厚、尾端疏水鏈段的排列整齊度，滲透率以及膜的機械性質等等。藉由上述特定性質以及囊胞的型態定義出囊胞的脂雙層膜脂雙層膜相變化的溫度。最後並進一步觀察在不同溫度下囊胞的融合程序。文獻[2]指出膜的表面張力大者，其融合的速率較快。我們將不同溫度的系統下平衡的囊胞進行融合的模擬，其表面張力與融合速率的關係與之前研究並不完全相同，我們推測影響融合程序除了膜的表面張力之外，滲透率可能也會對囊胞的融合產生影響。

## 1-2 囊胞(Vesicle)

囊胞(vesicle)或者稱為微脂粒(liposome)，是一種由兩性分子(amphiphilic)所構成的雙層膜球型聚集體。最早是由英國科學家 Bangham[1]定義微脂粒的名稱。

微脂粒的基本組成分子是脂質分子(lipid)，包含了脂肪、蠟、膽固醇、脂溶性維生素等等，脂質分子是一種兩性分子，具有親水頭基與疏水尾鏈段。微脂粒的雙層膜結構，外層與內層是親水頭基，兩端親水頭基之間是疏水尾鏈段，雙層膜中空區域含有溶劑分子，如 **Fig. 1-1** 所示。此種結構的組成類似生物膜(biomembrane)，因此常被用於模擬細胞膜的研究，例如細胞膜之滲透性(permeability)、融合(fusion)以及細胞膜與蛋白質的反應等。此外微脂粒特別的中空球體結構，在雙層膜之間可攜帶疏水性藥物，而內部可攜帶親水性藥物，因此微脂粒被廣泛應用在藥物釋放(drug delivery)上[3]。最常見用於製備微脂粒的脂質是卵磷脂(lecithin)，其主要成分 phosphatidylcholine 也存在於細胞膜中，使得此類微脂粒有良好的生物相容性(bio-compatible)和生物降解性(biodegradable)，因此在生物、醫療領域中，微脂粒皆扮演著重要角色。



**Fig. 1-1** 囊胞(Vesicle)示意圖。

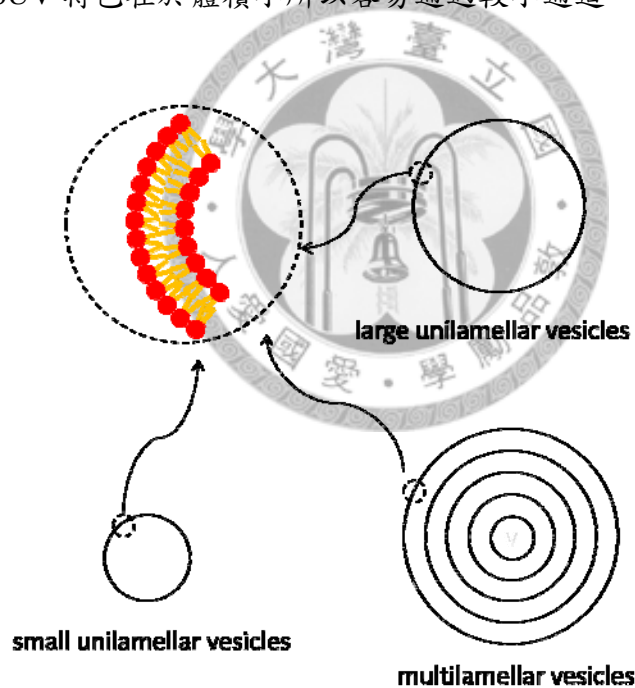
微脂粒的分類方法包可由結構、粒徑、性能，或是電荷性等不同特性來區分。其中依照結構和粒徑來區分，可將微脂粒分為三類，如 **Fig. 1-2**[3]所示：

1. 多層微脂粒(multilamellar vesicles, MLV)：粒徑約 100~1000 nm，由數個同心脂雙層組成一顆微脂粒，就像是洋蔥的構造。最簡單的製備方法為將乾燥的脂質分子溶在水相，即可得到 MLV，另外也可以使用凍融循環法(freez-thaw)[4]

製備 MLV。

2. 單層大微脂粒(large unilamellar vesicles, LUV)：粒徑大約 200~1000 nm，由一個脂雙層組成一顆微脂粒。可利用界面活性劑透析法(detergent dialysis)[5]或是利用 MLV 以擠壓法(extrusion)製備[6]。
3. 單層小微脂粒(small unilamellar vesicles, SUV)：粒徑約 20~100 nm，是脂雙層所能形成的最小微脂粒，最常使用超音波震盪法(sonication)來製備 [7]。

不同大小的微脂粒可用於不同的用途，根據目的之不同，可以選擇最適當的微脂粒做為使用。如 MLV 的特色為多層同心圓結構，可持續釋放內容物(sustained release)；LUV 的內部水區較大，對於大分子擁有較好的包覆能力，如高分子水溶性物質；SUV 特色在於體積小所以容易通過較小通道，如微血管壁。



**Fig. 1-2** 囊胞的分類[3]。

在 1960 年代 Bangham[1]發現微脂粒十餘年之後，微脂粒逐漸發展包括表面改質(coating)[8]、生物感測器(biosensor)[9]、微反應器(microreactor)[10]、藥物釋放載體(drug delivery carrier)等應用。某些膠體粒子可用來檢測蛋白質，但是蛋白質若離開細胞膜便會失去活性，若將粒子表面加上微脂粒改質，即可利用微脂粒

類似生物膜的特性保護蛋白質。也可根據所需不同，選擇不同的改質立體型態，如 Fig. 1-3 所示。製備微脂粒時，可根據需求控制微脂粒的大小，甚至在內部包覆適量的奈米粒子，以改善大量奈米粒子會在溶液中聚集而影響反應效果的困擾，而且將反應物包覆在囊胞內還可增加其碰撞機率，也就是將微脂粒作為微反應器之應用。

Gregoriadis[11]依據微脂粒之特性提出作為攜藥系統的概念，使得微脂粒在醫藥學領域開始蓬勃發展，主要做為靶向性藥物釋放載體(targeted drug delivery carriers)。微脂粒擁有成為藥物載體的良好條件：

1. 微脂粒由磷脂質構成，與細胞膜成分相同，在生物體內可被分解，不具毒性，不像蛋白質會引起免疫反應，所以能多次使用。
2. 微脂粒的控釋性(controlled release)良好，能在到達患部後以適當的速率持續釋放出藥物。
3. 微脂粒包覆藥物的療效比游離藥物來的高，能保護所包覆物質，如藥物[12]、血紅素、遺傳物質等，在生物體內不被分解，進而送達患部或細胞內。
4. 藉由微脂粒輸送高毒性的藥物，可降低藥物的副作用。
5. 針對不同需求，能選擇使用不同粒徑、脂質、結構的微脂粒，達到最佳的效率。

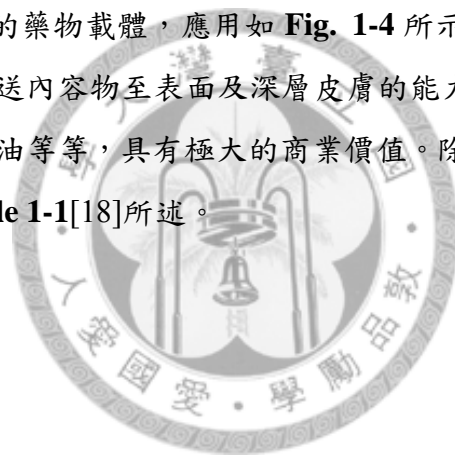


Fig. 1-3 囊胞作為表面改質之應用[8]。

然而脂雙層膜存在穩定性的問題，影響微脂粒的應用與發展。微脂粒的穩定性可分成三大方面來討論：物理穩定性、化學穩定性以及生物穩定性。影響物理穩定性的機制包括聚集(aggregation)和融合(fusion)等現象會造成微脂粒粒徑變化，

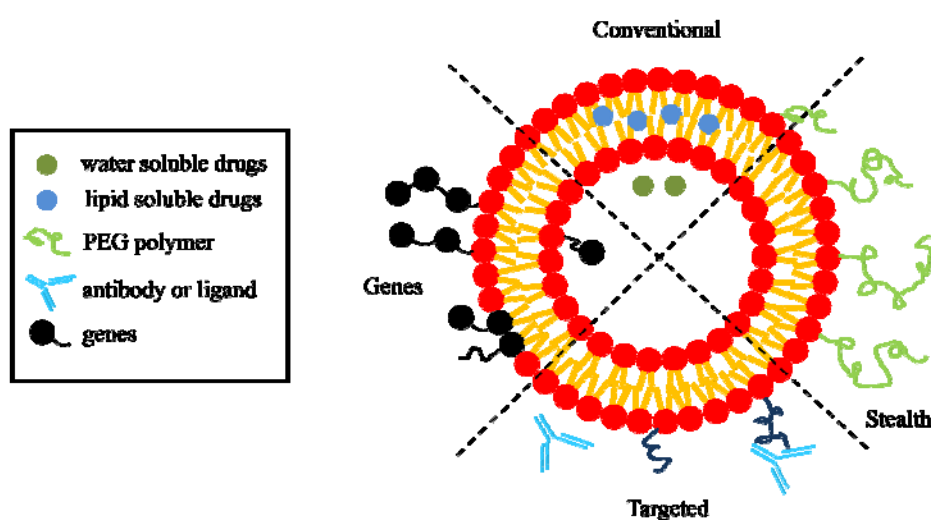


或是滲透作用(permeability)使包覆內容物流失；在化學穩定性方面，由於脂質含有不飽和鍵或特殊官能基，造成微脂粒有氧化(oxidation)和水解(hydrolysis)的問題；而儘管微脂粒的構造類似生物膜，仍舊存在生物穩定性的問題，在體內會被免疫系統移除。1991年，Papahadjopoulos[13]等人利用在脂質分子具極性的頭基修飾上某些特定醣基，降低活化免疫系統的機率，如同人體內細胞為了避免受到巨噬細胞吞食或免疫系統的其他成分攻擊，也會採取類似的措施。近年來則使用polyethylene glycol(PEG or PEO)修飾微脂粒[14]，接枝在微脂粒外圍的PEG提供立體障礙，有保護的作用，此類微脂粒被稱為S-微脂粒(stealth liposomes)。且Lasic[15],[16]等人證實了接枝PEG的微脂粒在血液中循環的時間比一般的微脂粒長，因此能延長藥物的半衰期。配合設計改變微脂粒的大小體積、層數多寡、電荷性，以及外圍官能基等條件，可以讓微脂粒對特定目標的標定性質大為提升[17]。微脂粒作為熱門的藥物載體，應用如**Fig. 1-4**所示，此外也運用在化妝品工業上。微脂粒具有運送內容物至表面及深層皮膚的能力，攜帶物質包含香水、蛋白質、維生素、防曬油等等，具有極大的商業價值。除此之外，微脂粒還有許多的應用端，如同**Table 1-1**[18]所述。



**Table 1-1** 微脂粒的應用[18]。

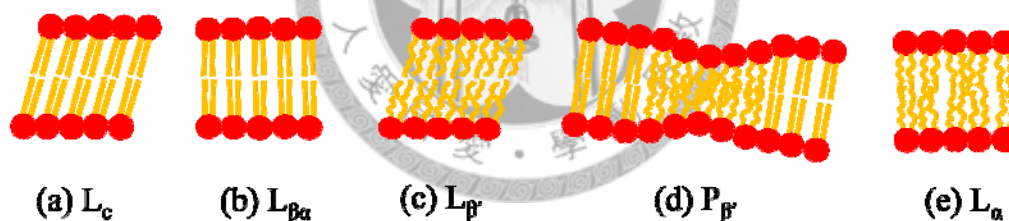
Discipline	Application
Mathematics	Topology of two-dimensional space governed only by bilayer elasticity
Physics	Aggregation behaviour, fractals, soft and high-strength materials
Biophysics	Permeability, phase transitions in two-dimensions, photophysics
Physical Chemistry	Colloid behaviour in a system of well-defined physical characteristics, inter- and intra-aggregate forces, DLVO
Chemistry	Photochemistry, artificial photosynthesis, catalysis, microcompartmentalization
Biochemistry	Reconstitution of membrane proteins into artificial membranes
Biology	Model biological membranes, cell function, fusion, recognition
Pharmaceutics	Studies of drug action
Medicine	Drug-delivery and medical diagnostics, gene therapy



**Fig. 1-4** 微脂粒做為藥物載體應用的示意圖。

### 1-3 脂雙層膜的相變化

由脂質分子所形成的雙層膜結構受到溫度、壓力、脂質分子的頭基的組成或者疏水鏈段的長度等各種不同因素的影響，可能有數種不同的型態，如同 **Fig. 1-5**。從最常見的脂質分子來看，在低溫的時候膜的型態為 subgel phase( $L_C$ )，在這個型態下尾端的疏水鏈段排列的相當的整齊，排列的方向稍微傾斜於膜平面法向量。經過加熱後 subgel phase 會轉變為 lamellar gel phase，此時稱為 subtransition。根據脂質分子親水頭基的結構或者組成的不同，lamellar gel phase 又可以分成 gel phase ( $L_\beta$ )與 tilted gel phase ( $L_{\beta'}$ )，例如脂質分子是 phosphatidylethanolamines 可以形成 gel phase，若脂質分子是 phosphatidylcholines 則會形成 tilted gel phase ( $L_{\beta'}$ )。這兩種 lamellar gel phase 的不同在於 gel phase 疏水鏈段的排列會和膜的法向量平行，而 tilted gel phase 則跟 subgel phase 一樣，排列的方向稍微傾斜於膜平面法向量。在 lamellar gel phase 的時候，膜的親水性較 subgel phase 的時候好，脂質分子尾端的排列稍為差了一點，但仍然非常的整齊。

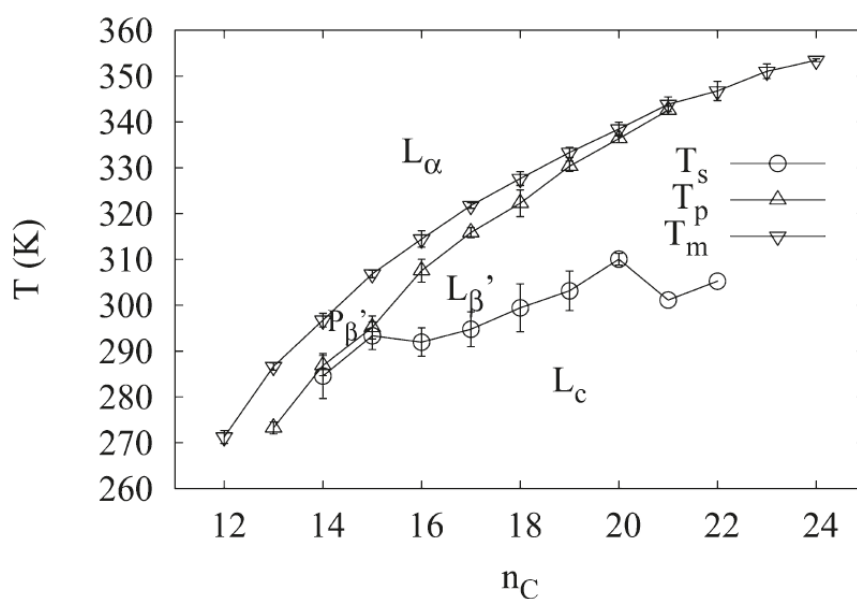


**Fig. 1-5** 脂雙層膜的各種型態。

當溫度再往上提升，gel phase 將轉換成為 fluid phase 或稱為 liquid disordered phase( $L_\alpha$ )，此時脂質分子尾端的排列差，並且排列的方向不會傾斜膜平面法向量。進入 liquid disordered phase 的相轉移稱為 main transition。

對於某些脂質分子來說，溫度提升對於膜的相轉換並不只是像上述由 gel phase 到 liquid disordered phase 這麼單純，在這個範圍中，會發生兩階段的轉換，第一個轉換是由 gel phase 到 rippled phase( $P_{\beta'}$ )，稱為 pretransition；接著第二個轉換再從 rippled phase 轉換成為 liquid disordered phase，稱為 main transition。Rippled phase 的特色是膜表面具有長波長的波浪狀表面，疏水鏈段的排列方向稍微傾斜於膜平面法向量。Pretransition 與 main transition 的溫度區間會隨著脂質分子疏水

鏈段的長度增長而降低，當鏈段上碳原子的數目大於 20，pretransition 將不會存在[19]，文獻上提到可能是 pretransition 完全消失了，或者是這個區間太小而不容易區分[20]，如同 Fig. 1-6。Rippled phase 僅能夠在 phosphatidylcholines 類別的脂質分子觀察到，也就是在較低溫時會形成 tilted gel phase，溫度升高時會從 tilted gel phase 變成 rippled phase，在我們後面的模擬中，我們所使用參數的正好就是對應於此類的脂質分子；而像是 phosphatidylethanolamines 與 glucolipids 之類的脂質分子，在較低溫時的狀態是 gel phase，這種情況下溫度升高時就會直接進入 liquid disorderd phase[21]。



**Fig. 1-6** 相轉移溫度隨脂質分子尾端疏水鏈段長度之變化。[19]

Rippled phase 是由 Tardiey 等人在 1973 年所發現[22]，這個現象吸引了許多科學家的注意，許多的實驗與理論紛紛在探討為何會存在這樣子一個波浪狀的型態，而在 rippled phase 前後的 tilted gel phase 與 liquid disorderd phase 卻是平面的型態。一般的模型將波浪的型態設定成不對稱的鋸齒狀[22-[25]，或者是一個正弦的波形[21]，而這樣子的型態是如何轉變過來的呢？有些人認為是疏水鏈段在改變其排列傾斜的角度時造成膜厚的變化；而有的人則認為在 rippled phase 中，同時存在著 tilted gel phase 與 liquid disorderd phase 的特性與型態，在我們後面的模擬當中也可以看到這樣的現象。

## 1-4 融合作用

融合作用(fusion)是指當兩個原本獨立的微脂粒靠的很近時，相互接觸後，兩顆微脂粒的脂雙層膜混合，直至兩個微脂粒打開混合的地方變成一個較大微脂粒的過程，如 **Fig. 1-7** 所示。融合作用發生在內吞作用(endocytosis)、胞吐作用(exocytosis)、細胞運輸(intracellular trafficking)等過程中，為研究生物膜性質不可或缺的程序之一。如同前面所提到，良好的藥物釋放載體預期能穩定到達患部，再以適當速度與患部細胞融合並釋出藥物，以達到最佳療效。所以瞭解在不同溫度條件下微脂粒的融合程序也是相當重要的研究。

在實驗上，常見用來分析融合的方法有二：一是螢光驟冷(quenching)，利用 Tb-微脂粒與 DPA-微脂粒融合， $Tb^{3+}$  離子與  $DPA^{2-}$  離子錯合成  $Tb(DPA)_3^{3-}$  錯離子，再使用螢光偵測儀定量分析[26]；二是利用粒徑分析儀直接觀測微脂粒粒徑變化。Wilschut 等人[26]實驗發現加入鈣離子能加快微脂粒的融合，鈣離子能增加微脂粒接觸的機會，並產生無水錯合物(anhydrous complex)，進一步促使微脂粒的脂雙層膜不穩定發生融合。Connor[27]等人也提出在酸性環境下，微脂粒也會加速融合作用，其原因被認為是酸性容易使 lipid 結構發生改變，驅使融合速度增快，此機制如同會誘導融合作用的蛋白質，例如：serum albumin[28]、clathrin[29]等等。此外，研究也指出在溶液中加入 PEG 分子也是促進融合的方法[30]，但是實際上確切的機制還不清楚，Lentz 等人[31]提出十種可能的機制。但若將 lipid 接枝上 PEG，即 1-2 節提到的 S-微脂粒(stealth liposomes)，則會增加微脂粒的立體障礙，降低融合可能性。有些文獻[32]提出界面活性劑也被用來促使囊胞融合現象的發生，其理由為界面活性劑會使囊胞型態不規則，增加囊胞接觸的機會。

實驗中未能瞭解融合作用的機制，但隨著模擬技術的普及，陸續有人提出可能的融合機制。Gao 等人[2]利用 DPD 設計兩個表面張力不同的囊胞系統，研究其融合過程。Gao 提出當囊胞的表面張力較小時，如 **Fig. 1-8 a** 所示，在融合過程中會出現平坦接觸區(flattened adhesion zone)，接著兩囊胞接觸的外層親水端會被排開，進一步到 hemifusion，終至囊胞的內水區相通完成融合。另一方面，當囊胞的表面張力較大時，參照 **Fig. 1-8 b**，當囊胞接觸後，會形成開孔，一般稱為 stalk，接著囊胞疏水鏈段會較快的擴張，直到內部水區相通。因此一般認為表面張力大者會誘使融合程序較快完成，Shillcock 等人[33]也利用不同表面張力

的平板膜與囊胞進行模擬，得到相同結論。

就微脂粒脂雙層結構觀點看來，影響微脂粒融合的主因來自脂雙層的不穩定。一般認為粒徑較小的微脂粒，曲率較大，其膜容易變形，較不穩定，故容易發生融合。Ohki[34]認為提高溫度，脂雙層的 lipid 分子自由能會提高，造成脂雙層表面張力上升，如此一來也會加速融合現象發生。

許多學者也利用模擬工具研究囊胞融合時 lipid 的型態以及融合時的動態過程。一般認為在囊胞脂雙層上的 lipid 會翻轉(flip-flopping)，當兩顆囊胞互相接觸之際，若 lipid 某部分離開了原本的囊胞，碰觸到另一顆囊胞，即會形成 lipid bridges[35]，如 Fig. 1-9 所示。隨之 lipid 的親水端就會開始擴張，直至融合完成。

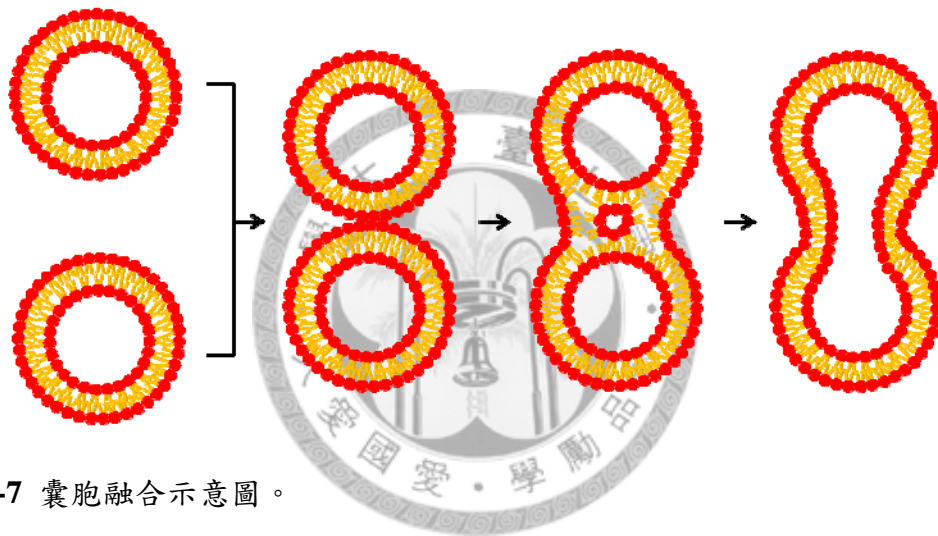
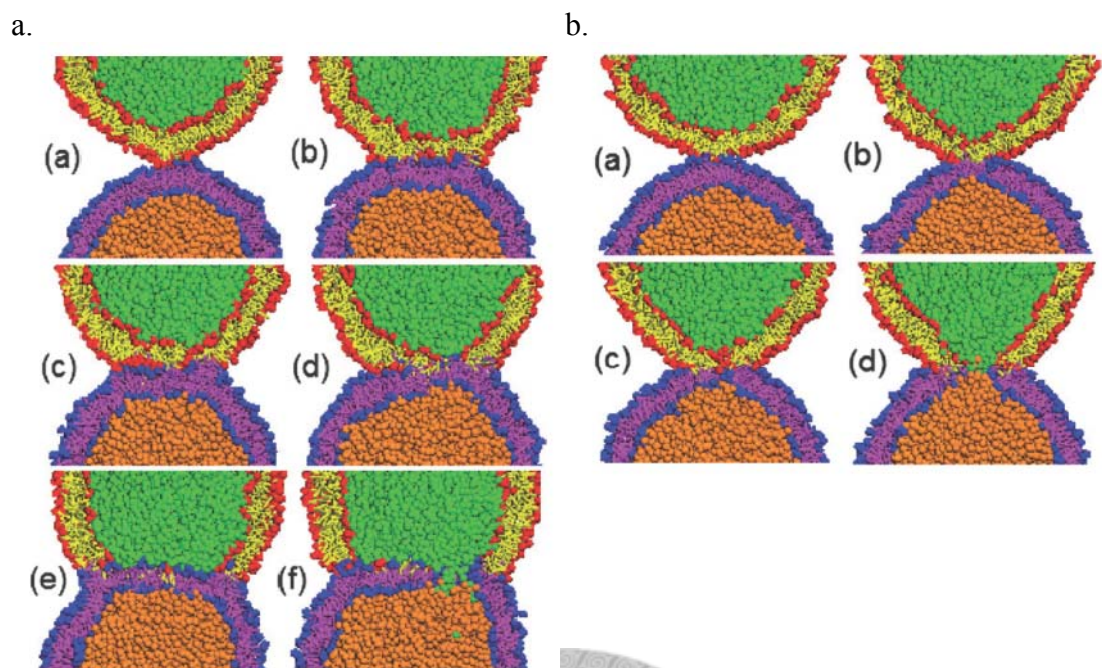
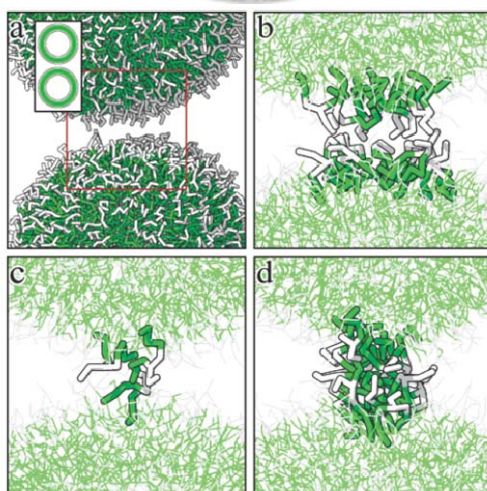


Fig. 1-7 囊胞融合示意圖。



**Fig. 1-8** a.低表面張力系統(a)  $t = 700$  ns 為 kissing 階段; (b)  $t = 960$  ns 為 adhesion 階段; (c)  $t = 1040$  ns 時其中一囊胞脂雙層開孔; (d)  $t = 1100$  ns 時兩囊胞親水端被排開; (e)  $t = 1360$  ns 為 hemifusion 階段; (f) at  $t = 1460$  ns 完成融合。b. 高表面張力系統(a)  $t = 260$  ns 為 kissing 階段; (b)  $t = 320$  ns 時 stalk 形成; (c)  $t = 360$  ns 為 hemifusion 階段; (d)  $t = 400$  ns 完成融合[2]。



**Fig. 1-9** 兩顆囊胞接觸之際，lipid bridge 形成後進而促使融合發生[35]。

# Chapter 2 模擬原理與方法

## 2-1 耗散粒子動力學法(Dissipative Particle Dynamics ; DPD)

電腦模擬(computer simulation)是利用理論(theory)與模型(model)的搭配，來佐證或者預測實驗觀察到的現象。隨著科技日新月異，電腦的硬體與軟體越來越進步，利用電腦模擬來觀察微觀尺度的物質特性也逐漸普遍。傳統上，分子模擬最常被使用的方法是分子動力學法(Molecular Dynamics ; MD)，經由計算系統中分子所受到的各種作用力，可以觀察到微觀暫態的變化行為，並可以得知分子的運動軌跡與分子間的交互作用。但實際上 MD 的使用卻受到了某些限制，因為使用硬核心模型(hard core model)，所以 MD 系統所模擬的空間尺度大概在數奈米到數十奈米左右(1~100 nm)；而時間步階(time step)大約是 0.5~1 飛秒(femtosecond ; fs)，以現在電腦的運算速度和記憶體容量來估計，合理且有效率的模擬步數約在數百萬到數千萬之間，因此 MD 系統實際上的模擬時間約在數奈秒(nanosecond ; ns)左右。總結以上的限制，若是想模擬較長時間或者較大尺度的系統，MD 可能就不是太適合。

1992 年 Hoogerbrugge 和 Koelman[36]提出了耗散粒子動力學法(Dissipative Particle Dynamics ; DPD)，DPD 結合了分子動力學法(MD)和晶格理論(Lattice Gas Automata)，能夠在介觀的時間和空間尺度上進行分子模擬，如 **Fig. 2-1** 為各種模擬方法之長度與時間尺度關係圖。1997 年，Groot 與 Warren[37]發現微觀模擬方法所得到的  $\chi$  參數與 DPD 的作用力參數  $a_{ij}$  之間的關係，使得微觀與介觀模擬能夠連接起來，也使得作用力參數在設定上有更明確的標準。

耗散粒子動力學法使用的是粗粒化方法(course grained method)[38]，基本的組成單體是粒子(bead)，粒子代表一特定質量和大小的區域，根據模擬尺度的不同，一個粒子代表的原子數也不同。此外耗散粒子動力學法所採用的作用力都假設是軟作用力(soft potential)，就算任意兩個粒子間的距離非常相近，粒子間的排斥力也不會是無窮大，這樣的假設有別於 MD 的硬核心模型對時間步階產生的限制，因此在 DPD 系統中每一個時間步階可以比 MD 系統大，而短距力(short-ranged force)的使用也加快了單一時間的運算速度。也就是說 DPD 能夠模擬較大的空間尺度，而且在較短的時



間之內就能夠達到系統自由能的絕對最小狀態(global minima state)。

耗散粒子動力學法的假設使它成為在介觀尺度下計算效果良好的模擬方法，可以在真實實驗處理條件（壓力、溫度、實驗時間等）下模擬奈米至微米尺度之複雜流體，例如：膠體、界面活性劑於溶液中的行為、高分子共聚物相分離等現象，為聚合物複雜流體的研究提供了強大的理論預測工具。

目前沒有簡單可循的方法來判斷哪些高分子能夠共混以及瞭解在共混時如何形成穩定相態的機制，如果想從實驗上(包括化學合成和物性檢驗等方法)來尋找有效的方案，相當耗費金錢與時間。近來電腦運算技術提升與硬體製造成本下降，讓我們可以利用分子模擬的方法來預測高分子共混時的作用機制及最後穩定型態，如此一來可以節省大量的成本和時間。

耗散粒子動力學法的計算架構跟分子動力學法十分相似，都是以粒子為基本單位，再利用牛頓力學和統計力學的概念，計算系統中所有粒子互相作用而形成各自的運動軌跡。

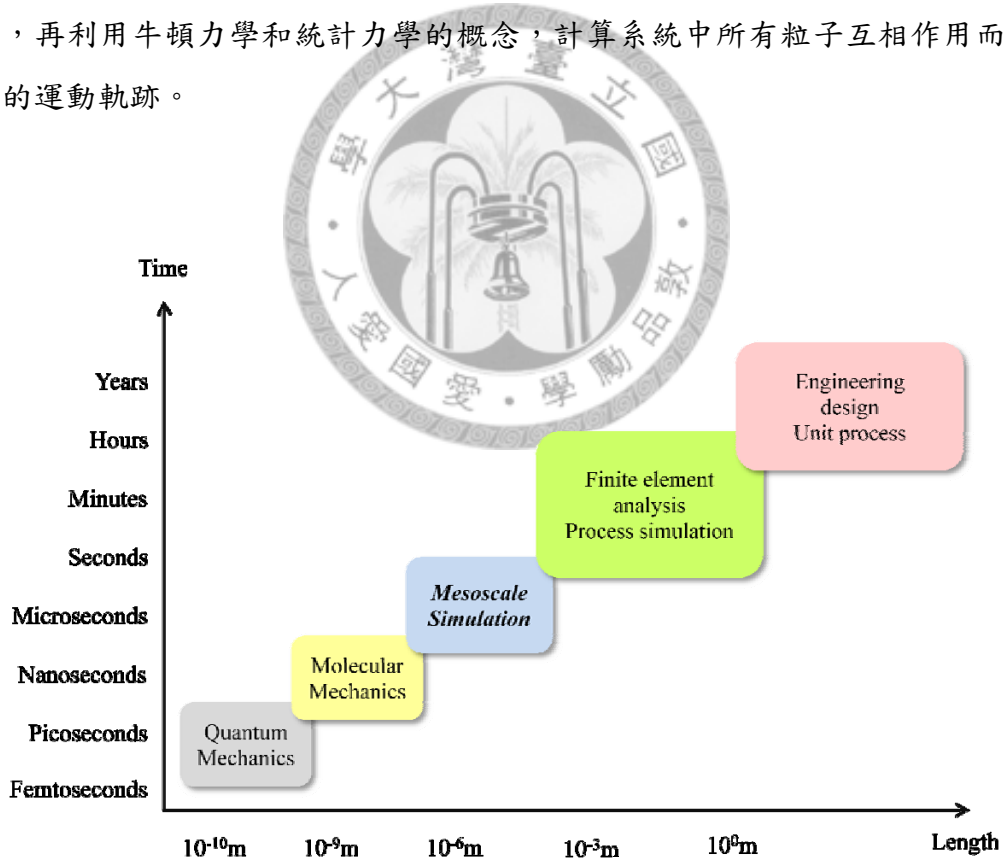


Fig. 2-1 各種模擬方法之長度與時間尺度關係圖。

## 2-2 DPD 原理

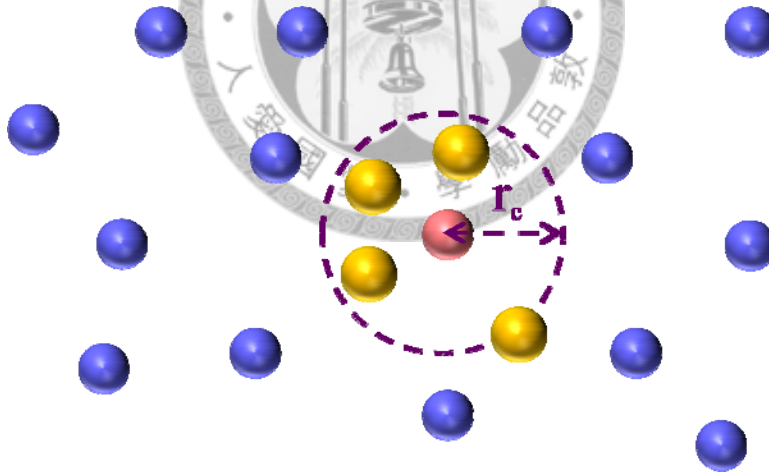
耗散粒子動力學系統中，粒子運動遵循古典力學的牛頓運動方程式：

$$\frac{dr_i}{dt} = v_i, \quad \frac{dv_i}{dt} = \frac{f_i}{m_i} \quad (2-1)$$

$r_i$ ， $v_i$  分別代表第  $i$  顆粒子的位置及速度， $m_i$  是粒子的質量， $f_i$  為其合力。在我們的系統中，為了簡化而將質量設為 1，因此作用在粒子上的合力就等於粒子的加速度。在 DPD 系統中，作用在粒子上的合力由三個部分組成：保守力(conservative force)、耗散力(dissipative force)以及隨機力(random force)，如下式：

$$f_i = \sum_{j \neq i} (F_{ij}^C + F_{ij}^D + F_{ij}^R) \quad (2-2)$$

保守力、耗散力和隨機力皆屬於短距力，如果兩顆粒子之間的距離在截斷半徑(cut-off radius,  $r_c$ )內，才計算其作用力；反之，超出截斷半徑  $r_c$  以外的粒子受力即為 0，如 **Fig. 2-2** 所示。本研究中，我們將設  $r_c = 1$ 。



**Fig. 2-2** 截斷半徑示意圖。

保守力(conservative force)是兩粒子質心之間的斥力，其作用是保持粒子均勻分布在系統中，其定義為：

$$F_{ij}^C = \begin{cases} a_{ij} (1 - r_{ij} / r_c) \hat{r}_{ij}, & |r_{ij}| < 1 \\ 0, & |r_{ij}| > 1 \end{cases} \quad (2-3)$$

$a_{ij}$  是調整粒子 i 與 j 之間斥力大小的參數。(2-3)式中的  $r_{ij} = r_i - r_j$ ,  $\hat{r}_{ij} = r_{ij} / |r_{ij}|$ 。

耗散力(dissipative force)相當於粒子間成對產生的摩擦力，會讓系統的動量降低，系統若缺少此力將會發散。耗散力與粒子間的相對速度成正比，其定義為：

$$F_{ij}^D = -\gamma\omega^D(\hat{r}_{ij} \cdot v_{ij})\hat{r}_{ij} \quad (2-4)$$

$\gamma$  為控制耗散力大小的常數， $\omega^D$  為一與  $r$  相依的權函數(r-dependent weight function)，作用為確保兩兩粒子間及系統中的總動量守恆， $v_{ij} = v_i - v_j$ 。

隨機力(random force)和耗散力一樣，也是成對產生。目的在使系統產生能量擾動(fluctuation)以補充因耗散力而失去的能量，其表示式如下：

$$F_{ij}^R = \sigma\omega^R(r_{ij})\theta_{ij}\hat{r}_{ij} \quad (2-5)$$

$\sigma$  用來控制耗散力的大小， $\omega^R$  為一與  $r$  相依的權函數(r-dependent weight function)， $\theta_{ij}$  為一均值為零的亂數函數(noise)：

$$\langle\theta_{ij}(t)\rangle = 0, \quad \langle\theta_{ij}(t)\theta_{kl}(t')\rangle = (\delta_{ij}\delta_{kl} + \delta_{il}\delta_{jk})\delta(t-t') \quad (2-6)$$

加入了耗散力會使系統的能量降低，而隨機力扮演的角色即為系統不斷補充能量，來抵消因耗散力所消耗的能量，進而使系統能量守恆。此兩種力彼此間存在一關係式，使此二者能平衡到特定的熱力學狀態。1995 年 Espagnol 和 Warren[39] 證明耗散力和隨機力兩者的權函數只要其中一者決定了，另一者也隨之確定：

$$\omega^D(r) = [\omega^R(r)]^2 = \begin{cases} \left(1 - \frac{r}{r_c}\right)^2 & (r < 1) \\ 0 & (r \geq 1) \end{cases} \quad (2-7)$$

此外，他們同時也發現  $\sigma$  與  $\gamma$  之間的關係式：

$$\sigma^2 = 2\gamma k_B T \quad (2-8)$$

$T$  為絕對溫度， $k_B$  是波茲曼常數。當  $\sigma$  的值超過 8 時，溫度會劇烈上升使系統變得不穩定；當  $\sigma$  等於 3 且溫度介於  $1k_B T \sim 10k_B T$  時，系統會得到合理的鬆弛。因此本研究將  $\sigma$  設為 3，溫度則設定為  $1k_B T$ 。

一般來說，噪音的分布會符合高斯分布，但是 Groot 和 Warren[37]發現，隨機

力中的亂數，不論是使用高斯噪音(Gaussian noise)或是均勻噪音(Uniform noise)，結果並無顯著差異，但使用均勻噪音有利於縮短 CPU 的計算時間。

在過去探討粒子運動軌跡時，通常使用 Euler-type 或是 Leap-frog Algorithm。在 DPD 則使用 Modified Velocity-Verlet Algorithm[40]，數學表示式如下：

$$r_i(t + \Delta t) = r_i(t) + \frac{1}{2}(\Delta t)^2 f_i(t) \quad (2-9)$$

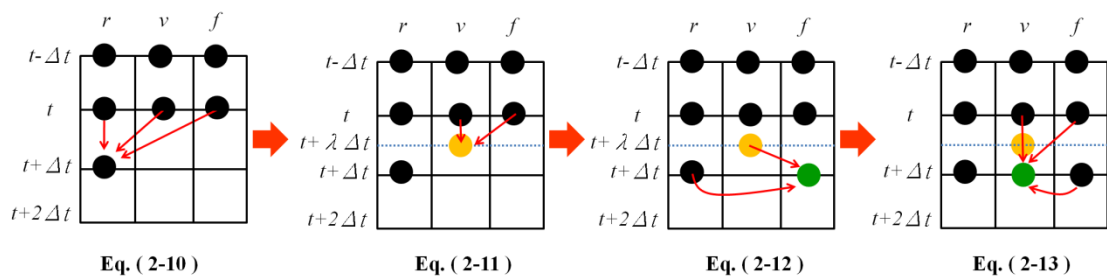
$$\tilde{v}_i(t + \lambda \Delta t) = v_i(t) + \lambda \Delta t f_i(t) \quad (2-10)$$

$$f_i(t + \Delta t) = f_i(r(t + \Delta t), \tilde{v}_i(t + \lambda \Delta t)) \quad (2-11)$$

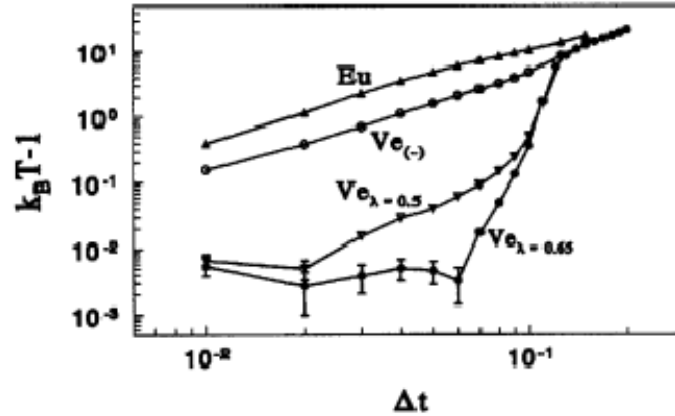
$$v_i(t + \Delta t) = v_i(t) + \frac{1}{2} \Delta t (f_i(t) + f_i(t + \Delta t)) \quad (2-12)$$

此演算法是由某個特定時間的位置、速度和加速度計算粒子經過一個步階 (time step) 後的速度。再利用特定時間的位置和下一時刻的速度計算下一時刻所受到的作用力，便可得到下一時刻的位置、速度和加速度，示意圖如 **Fig. 2-3**。

Groot 與 Warre[37]根據經驗將  $\lambda$  設定為 0.65，可以在此條件下得到最好模擬結果。**Fig. 2-4** 為使用不同運動軌跡演算法所得到的系統平衡溫度誤差，可以發現當  $\lambda$  為 0.65 時，時間步階在 0.01~0.06 間的系統誤差皆小於  $10^{-2}$ 。



**Fig. 2-3** Modified Velocity-Verlet Algorithm 示意圖。



**Fig. 2-4** 於  $\sigma=3$ ， $\rho=4$  時，溫度誤差對步階(time step)做圖。Eu：Euler-like algorithm；Ve：Verlet-like algorithm； $Ve_{(-)}$ ：計算下個時刻位置  $r_i(t+\Delta t)$  時，不將  $\frac{1}{2}(\Delta t)^2 f_i(t)$  項列入的結果[37]。

由於耗散粒子動力學所採用的粒子並非一個實際的原子，而是代表一特定區塊的流體性質，因此在真實系統和模擬系統間，需要做尺度的轉換。Allen 與 Tildesley[40]等人將長度、速度和時間做出如下的無因次轉換：

$$\bar{r} = \frac{r}{r_c} \quad (2-13)$$

$$\bar{v} = \frac{v}{\sqrt{k_B \frac{T}{m}}} \quad (2-14)$$

$$\bar{t} = \frac{t}{\sqrt{\frac{m r_c^2}{k_B T}}} \quad (2-15)$$

受限於電腦的計算能力，要模擬接近真實系統的實際原子數是相當費時的工作，故我們選取一個足以代表整體系統的單位空間，再將此單位空間週期排列組合成真實系統，即為周期性邊界條件(periodic boundary condition)。**Fig. 2-5** 示意了二維的週期性邊界條件，編號 5 的系統是實際模擬的範圍，其餘空間則為複製平

移的投影。在編號 5 的範圍內，計算灰色粒子截斷半徑內的粒子數為零，但考量週期性邊界條件，會發現黃色粒子也在截斷半徑內，因此灰色粒子與黃色粒子的作用力就要考慮。週期性邊界條件的使用可以節省模擬的時間，但並非所有情形皆可套用，僅適用在具有某種程度週期性的系統。

DPD 使用了粗粒化和截斷半徑的概念，比起傳統模擬法已經節省了許多時間。然而要判斷兩兩粒子其距離是否小於截斷半徑，此步驟降低了計算的效能。為了加速運算的時間，我們使用了 Cell List 的技術優化 DPD。二維的 Cell List 的概念如 Fig. 2-6，先將系統劃分為多個巢室(cell)，cell 的邊長必須大於截斷半徑，再將系統每個粒子分類到各個 cell。假設我們要計算哪些粒子在綠色粒子的截斷半徑內，只需要計算它所屬的 cell 內以及鄰近 cell 的粒子即可，意即 Fig. 2-6 中紅色粒子，而藍色粒子不屬於綠色粒子鄰近的 cell 範圍，可以不去計算，故此種做法可以大幅節省模擬的時間。

整個系統要分割成  $N \times N \times N$  個 cell， $N$  值的大小取決於模擬系統的邊長和截斷半徑。在本研究中，大部分系統被切割成  $45 \times 45 \times 45$ ，共 273,375 個 cell；在融合(fusion)系統中，則被切割成  $90 \times 45 \times 45$ ，共 546,750 個 cell。並且每 10 個時間步階更新一次每個粒子的所在 cell，如此一來計算距離只要跟鄰近 cell 內的粒子做計算，達到減少模擬時間的目的。

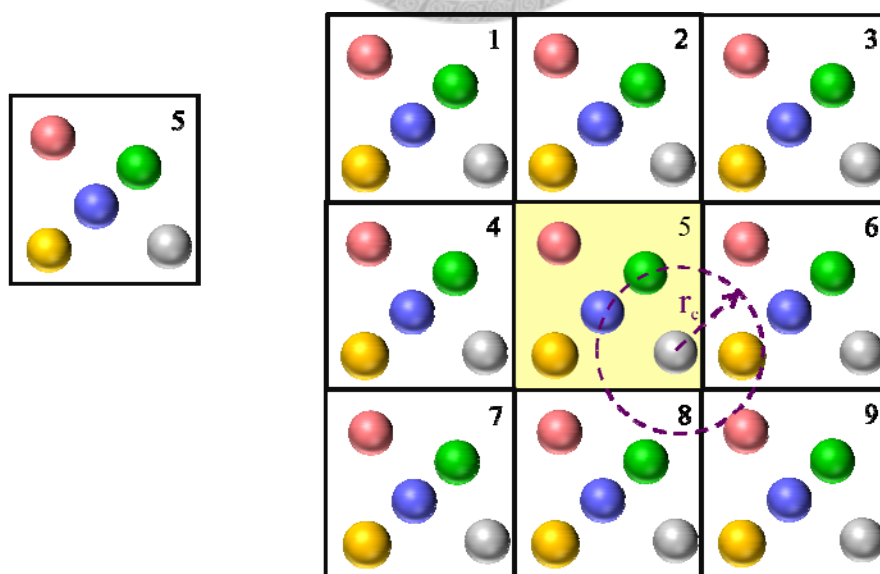


Fig. 2-5 二維週期性邊界條件(Periodic Boundary Condition)示意圖。

Fig. 2-6 二維 Cell List 示意圖。



### 2-3 作用力參數和 Flory-Huggins Theory

由維里理論(Virial theorem)可得到壓力的表示式如下：

$$\begin{aligned} p &= \rho k_B T + \frac{1}{3V} \left\langle \sum_{j>i} (r_i - r_j) \cdot f_i \right\rangle \\ &= \rho k_B T + \frac{1}{3V} \left\langle \sum_{j>i} (r_i - r_j) \cdot F_{ij}^C \right\rangle \\ &= \rho k_B T + \frac{2\pi}{3} \rho^2 \int_0^1 r f(r) g(r) r^2 dr \end{aligned} \quad (2-16)$$

其中  $\rho$  是密度， $g(r)$  為徑向分布函數(radial distribution function)。Groot[37]等人提出當密度在 3~10 之間，壓力可表示為：

$$p = \rho k_B T + \alpha \rho^2 \quad (\alpha = 0.101 \pm 0.001) \quad (2-17)$$

真實流體壓縮係數為：

$$\kappa^{-1} = \frac{1}{k_B T} \left( \frac{\partial p}{\partial \rho} \right)_T \quad (2-18)$$

將(2-17)式帶入(2-18)式，可得到下式：

$$\kappa^{-1} = 1 + \frac{2\alpha a \rho}{k_B T} \approx 1 + \frac{0.2a\rho}{k_B T} \quad (2-19)$$

在室溫(300K)下，水的壓縮係數  $\kappa^{-1} = 16$ ，代入(2-19)式可得：

$$\frac{a\rho}{k_B T} \cong 75 \quad (2-20)$$

Groot 等人指出藉由找到代表粒子之間作用的參數  $\chi$ ，再將  $\chi$  代入 Flory-Huggins theory 所導出的近似關係式，便可得到複雜流體間的斥力參數。

Flory-Huggins theory 是以晶格模型為基礎來描述高分子溶液之理論。對於 A、B 兩成分系統的自由能(Free energy,  $F$ )表示如下：

$$\frac{F}{k_B T} = \frac{\phi_A}{N_A} \ln \phi_A + \frac{\phi_B}{N_B} \ln \phi_B + \chi_{AB} \phi_A \phi_B \quad (2-21)$$

其中  $\phi_A$ 、 $\phi_B$  代表兩成分的體積分率， $N_A$ 、 $N_B$  代表兩者的聚合度， $\chi_{AB}$  是兩成分的相容性參數。

假設  $N_A = N_B$ ，則可得到化學勢能為(chemical potential)：

$$\mu = \frac{\partial F}{\partial \phi_A} = 0 \quad (2-22)$$

將自由能對  $\phi_A$  作一次微分，即微分(2-21)式，並令其值為零，可得：

$$\chi N_A = \frac{\ln[(1-\phi_A)/\phi_A]}{1-2\phi_A} \quad (2-23)$$

再對自由能作二次微分及三次微分，並令其等於零，如下：

$$\begin{cases} \frac{1}{N_A \phi_A} + \frac{1}{N_B \phi_B} - 2\chi = 0 \\ \frac{1}{N_A \phi_A^2} - \frac{1}{N_B \phi_B^2} = 0 \end{cases} \quad (2-24)$$



聯立上式可求得  $\chi$  的臨界值  $\chi^{crit}$  :

$$\chi^{crit} = \frac{1}{2} \left( \frac{1}{\sqrt{N_A}} + \frac{1}{\sqrt{N_B}} \right)^2 \quad (2-25)$$

從( 2-17 )式得知系統壓力和理想壓力的差值是密度的二次式，單成分流體的自由能密度可表示為：

$$\frac{f_v}{k_B T} = \rho(\ln \rho - 1) + \frac{\alpha \rho^2}{k_B T} \quad (2-26)$$

因此兩成分系統的密度可表示為：

$$\frac{f_v}{k_B T} = \frac{\rho_A}{N_A} (\ln \rho_A - 1) + \frac{\rho_B}{N_B} (\ln \rho_B - 1) + \frac{\alpha(a_{AA}\rho_A^2 + 2a_{AB}\rho_A\rho_B + a_{BB}\rho_B^2)}{k_B T} \quad (2-27)$$

假設  $a_{AA} = a_{BB}$  ,  $\rho_A + \rho_B = \text{constant}$  , 上式可寫成：

$$\frac{f_v}{(\rho_A + \rho_B)k_B T} \approx \frac{x}{N_A} \ln x + \frac{(1-x)}{N_B} \ln(1-x) + \chi_{AB} x(1-x) + \text{const} \quad (2-28)$$

將  $x = \frac{\rho_A}{(\rho_A + \rho_B)}$  代入( 2-28 )式後可得到  $\chi_{AB}$  、作用力參數( $a$ )和  $\rho$  的關係式：

$$\chi_{AB} = \frac{2\alpha(a_{AB} - a_{AA})(\rho_A + \rho_B)}{k_B T} \quad (2-29)$$

Groot 和 Warren 測試  $\rho = 3$  和  $\rho = 5$  的情況，發現 excess pressure 正比於  $x(1-x)$ 。但是當  $a_{AB} - a_{AA} \leq 5$  時，呈現非線性關係，如 **Fig. 2-7**。但是我們關心的是何時產生相分離，即  $\chi \geq \chi^{crit}$  時，所以我們仍可利用上述式子找出  $\chi$  與作用力參數  $a$  的關係。

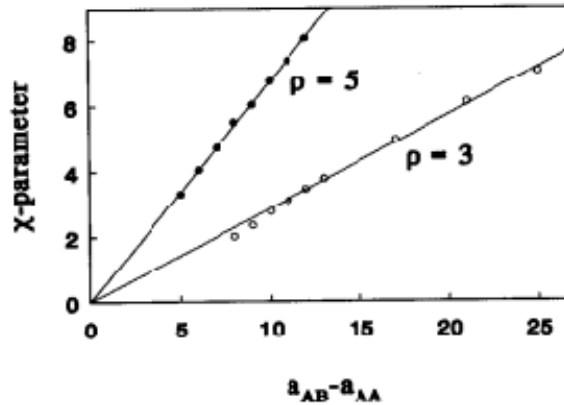


Fig. 2-7 Flory parameter  $\chi$  vs.  $(a_{AB} - a_{AA})$ [37]。

接著利用  $x = \phi_A$ ，代入(2-23)式，發現不同密度下作用力參數與  $\chi$  的關係：

$$\chi_{AB} = (0.286 \pm 0.002)(a_{AB} - a_{AA}) \quad (\rho = 3) \quad (2-30)$$

$$\chi_{AB} = (0.689 \pm 0.002)(a_{AB} - a_{AA}) \quad (\rho = 5) \quad (2-31)$$

由 Groot 等人的研究可發現  $\rho = 3$  或  $\rho = 5$  結果不會有差別，但密度和粒子數成正比，粒子數的平方又和作用力個數成正比。故為了節省模擬時間，我們設定密度為 3。將(2-20)式代入  $a_{ij} = a_{ii} + \Delta a$ ，可得：

$$a_{ij} = \frac{75k_B T}{\rho} + \Delta a \quad (2-32)$$

其中  $\Delta a = a_{AB} - a_{AA}$ ，又假設  $k_B T = 1$ ，便可得作用力參數為：

$$a_{ij} = 25 + \Delta a \quad i \neq j \quad (2-33)$$

### $\chi$ 參數的選擇

根據上一節的推導，我們將(2-30)式代入(2-33)式，可得到：

$$a_{ij} = 25 + 3.5\chi_{ij} \quad (2-34)$$

由(2-3)式可以得知，作用力參數  $a_{ij}$  是控制保守力的重要參數，而在選擇作用

力參數  $a_{ij}$  時， $\chi$  參數及扮演著決定性的角色。Material Studio<sup>®</sup>(Accelrys Inc.) 其中的 Blends 模組(Blends module) 結合了 Flory-Huggins model 和分子模擬工具，可用來預測兩成份系統的互溶行為，包括高分子溶液、高分子混參和合金(alloys)。在 Blends 模組中，只要提供混合物兩成份的化學結構以及選用的力場(forcefield)，即可預測系統的熱力學性質。Blends 模組提供了許多力場可供選擇，例如 Dreiding、Universal、COMPASS、cvff 和 pcff 等。

高分子溶液的  $\chi$  參數可由溶解度參數(solubility parameter) 得到，表示如下：

$$\chi = \frac{V_m (\delta_s - \delta_p)^2}{RT} \quad (2-35)$$

其中  $V_m$  是溶劑的莫耳體積(molar volume)； $\delta_s$  和  $\delta_p$  分別為溶劑和高分子的溶解參數。舉例來說，由文獻[41]得知在 25°C 時，水和聚苯乙烯(poly(styrene)) 的溶解參數分別為  $23.4(\text{cal/cm}^3)^{1/2}$  和  $8.7(\text{cal/cm}^3)^{1/2}$ ，由(2-35)式可推得  $\chi$  參數為 6.56。利用 Blends 模組以及選擇 Dreiding 力場作結構最佳化(geometry optimization) 可得到  $\chi = 6.52$ ，十分接近文獻值。因此我們可以利用 Blends 模組求得  $\chi$  參數，當作我們研究中作用力參數  $a_{ij}$  的參考值。

## 2-4 模擬方法

1. 模擬系統大小為  $45 \times 45 \times 45$ ，但融合(fusion)是兩個 vesicles 的作用，所以模擬系統增大為  $90 \times 45 \times 45$ 。
2. 系統密度  $\rho = 3$ ， $k_B T = 1$ 。
3. 在 simulation step 的部分，平衡步數為 50 萬步，time steps 是 0.01；fusion 的步數則為 50 至 100 萬步不等，time step=0.01；而物理性質則為 25 萬步的平均，time step=0.01。
4. 改變  $k_B T$  的值以達到改變系統溫度的效果， $T^* = k_B T$ 。

### 2-4-1 DPD 附加的力

在聚合物共聚合物系統中，除了 2-2 節提到的三種作用力之外，還需要另外加入連結各個粗粒化粒子間的簡諧彈簧力(harmonic spring force)，其定義為：

$$F_{ij}^S = -C(r_{eq} - r_{ij})\hat{r}_{ij} \quad (2-36)$$

$C$  為彈性係數(spring constant)，其大小代表鍵結伸縮的難易程度。 $C$  值大時，鍵長不容易被改變；而  $C$  值越小，鍵結的延展性越好。 $r_{eq}$  則代表鍵長平衡的長度。本研究設定  $C=100$ ， $r_{eq}=0.4$ 。

除此之外，鄰近每三顆粒子會再加上鍵角力(bending force)，定義為：

$$U^\theta = k_\theta(\theta - \theta_{eq})^2 ; F^\theta = -\nabla U^\theta \quad (2-37)$$

$U^\theta$  是鍵角位能，在鍵角( $\theta$ )等於平衡鍵角( $\theta_{eq}$ )時，鍵角位能為最小值。 $F^\theta$  是 angle force， $k_\theta$  是鍵角力係數(bending force constant)，本研究中設  $\theta_{eq} = \pi$ ， $k_\theta = 20$ 。

本研究中，考慮脂質(lipid)疏水鏈段通常有雙鍵存在，於是在 lipid tail 額外加上每間隔一個粒子的兩粒子間的 spring force，表示如下：

$$F_{ij}^{S\theta} = -C^\theta \cdot (r_{ij} - r_{eq}^\theta)\hat{r}_{ij} \quad (2-38)$$

上式中  $C^\theta$  是 force constant， $r_{eq}^\theta$  是平衡鍵長，此處的平衡鍵長( $r_{eq}^\theta$ )是簡諧彈簧力平衡鍵長( $r_{eq}$ )的兩倍。本研究設定  $C^\theta = 100$ ， $r_{eq}^\theta = 0.8$ 。

### 2-4-2 作用力參數設定

#### 脂質(lipid)的參數設定

我們系統中形成囊胞的脂質分子(lipid)可相對於真實的磷脂質(phospholipid)：1,2-diarachidonoyl-snglycero-3-phosphocholine 和 phosphatidylinositol，**Fig. 2-8** (b) 為真實脂質和我們系統 coarse-grained 之脂質對照示意圖。脂質親水端的官能基：choline、phosphate 和 glycerol groups，其 coarse-grained 之一個 bead 直徑分別約為

5.8 Å、5.9 Å 和 4.9 Å。Lipid 疏水鏈段的一個 bead 是  $\alpha$ -butylene，其直徑約 5.5 Å。此外，一顆水粒子單體約 1.5 Å，因此我們模擬系統中一顆溶劑 bead 約為 3 顆真實水粒子。

在本研究中，lipid 的結構為 3 個 beads 的親溶劑鏈段 (hydrophilic head) 與兩條 6 個 beads 的疏溶劑鏈段 (hydrophobic tail) 所組成。如 **Fig. 2-8 (a)** 所示，紅色粒子為親溶劑鏈段，代號為 A；黃色粒子為疏溶劑鏈段，代號為 B；藍色粒子為溶劑：水，代號為 W。

DPD 系統中，藉由作用力參數控制彼此之間的相容性。利用 Material Studio® (Accelrys Inc.) 的 Blends 模組，選擇 COMPASS 力場，計算 1,2-diarachidonoyl-snglycero-3-phosphocholine 與水的  $\chi$  參數。參考  $\chi$  參數，lipid-water 的作用力參數如 **Table 2-1** 所示。根據 (2-33) 式，相同粒子的作用力參數為： $a_{AA} = a_{BB} = a_{WW} = 25$ ，脂質的親溶劑端與溶劑的作用力參數設為 26，而疏溶劑端與溶劑的作用力參數則為 50，如此一來，使我們研究中的囊胞內外水區的水不易進出。為了使脂質的親溶劑端與疏溶劑端不互相參雜，兩者之間的作用力參數設定成 50。

**Table 2-1** lipid-water 系統的作用力參數表，A 為 lipid 的親水頭基，B 為 lipid 的疏水鏈段，W 為系統選擇的 solvent。

$a_{ij}$ ( $\chi_{ij}$ )	A	B	W
A	25	50	26
B	50 (5.99)	25	50
W	26 (0.47)	45~70 (7.93)	25

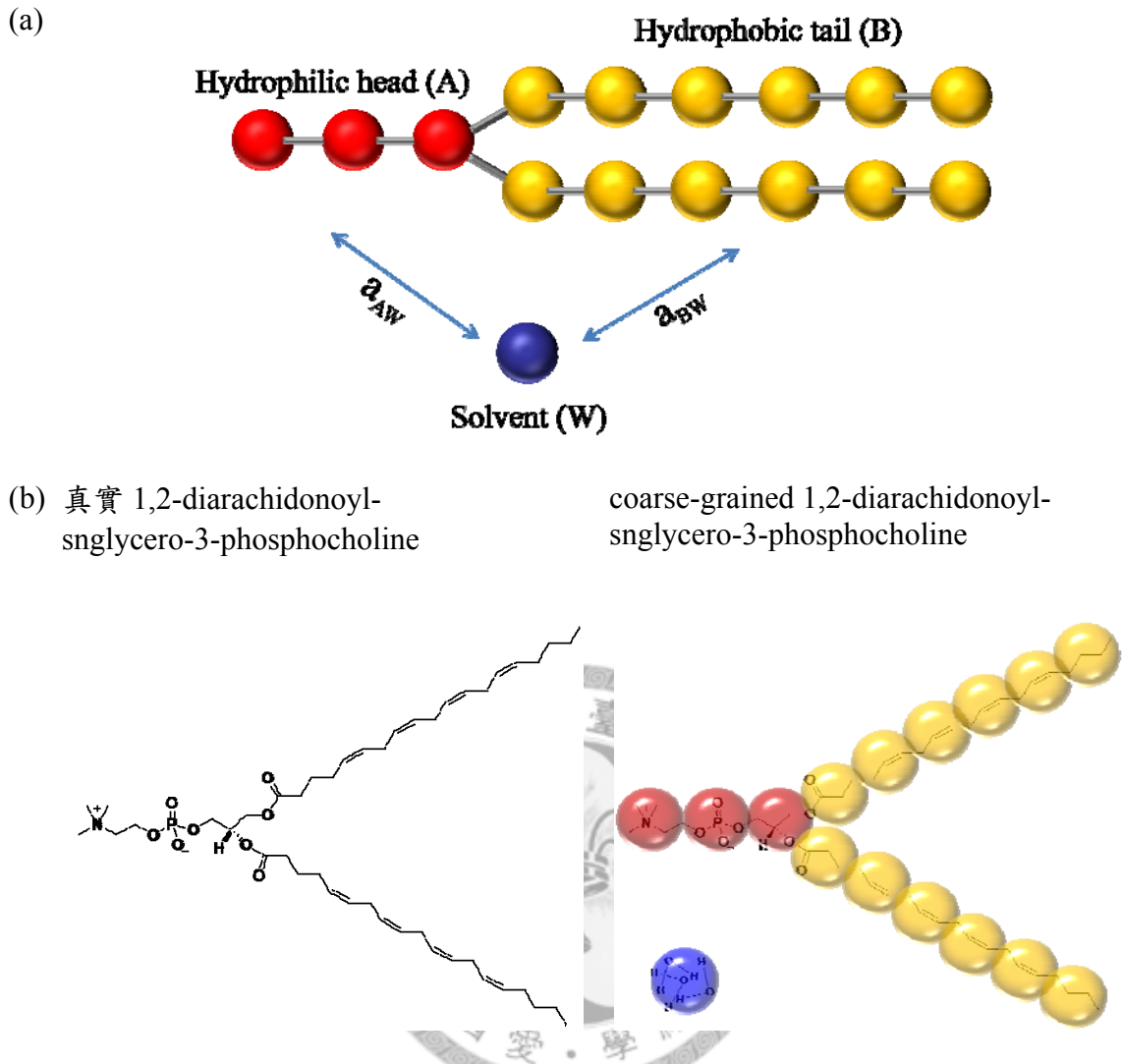


Fig. 2-8 (a) Lipid-water 系統示意圖，(b)真實磷脂質與 coarse-grained 之脂質對照圖。

## 2-5 分析方法

### 表面張力的計算

表面張力是指作用在液體表面，欲使液體表面積縮小的力。在液體的內部，每一分子受到週遭其他分子的作用力合力為零，但是表面的分子因上層氣相分子對其吸引力小於內部液相其他分子對它的吸引力，導致合力不為零，合力方向垂直指向液體內部，使得表面分子被往內拉進而靠攏在一起，導致液體表面有向內縮小的趨勢。就能量的角度來看，表面張力的物理意義為使液體表面每增加一個單

位面積，外力所需作的功；或液體表面每單位面積所儲存的位能。

若從靜力平衡的角度討論囊胞的表面張力，如 Fig. 2-9 中  $F_0$  是外部壓力作用於膜外表面的合力， $F$  是囊胞內部粒子作用於內表面的合力， $F'$  為膜表面張力作用於內外表面的合力。囊胞內壓為  $P$ ，外壓為  $P_0$ ， $r$  是囊胞的半徑， $\gamma$  為表面張力 (surface tension)，靜力平衡可得：

$$F = F_0 + F' \quad (2-39)$$

$$P \times \pi r^2 = P_0 \times \pi r^2 + 2 \times (\gamma \times 2\pi r) \quad (2-40)$$

計算以上兩式可得：

$$P - P_0 = \frac{4\gamma}{r} \quad (2-41)$$

在 DPD 系統中，壓力的表示如下：

$$pv = \frac{1}{2} \langle \sum_i v_i^2 \rangle + \frac{1}{3} \langle \sum_i \sum_j r_{ij} \cdot F_{ij} \rangle \quad (2-42)$$

(2-42) 式中  $p$  為粒子間的壓力， $v$  為粒子所佔體積， $v_i$  為編號  $i$  粒子的速度， $r_{ij} \cdot F_{ij}$  表示兩粒子間距離與作用力的內積。由上式得知壓力來自粒子速度和粒子彼此間作用力的貢獻。利用囊胞 lipid membrane 的內外半徑界定內水區和外水區，在囊胞內外各框選出一個不會計算到 lipid 的水區，如 Fig. 2-10 之示意圖，再利用 (2-42) 便可求得囊胞的內壓和外壓，內壓減外壓即為壓差 ( $\Delta P$ )。

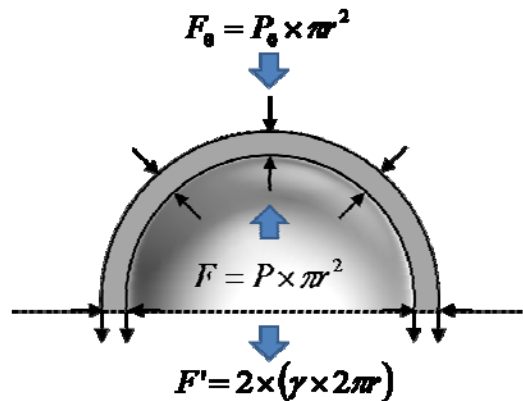
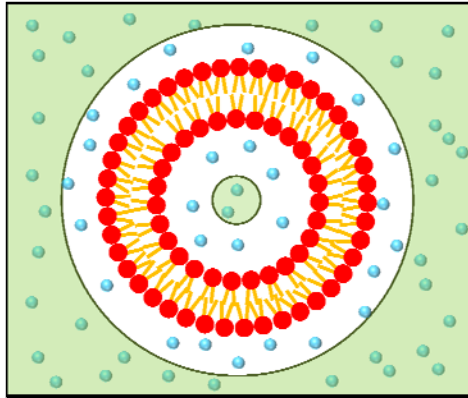


Fig. 2-9 囊胞表面張力之靜力平衡示意圖。



**Fig. 2-10** 在囊胞內水區和外水區各框選一區域，即綠色區域，計算內壓及外壓。

(2-41)式可表示為：

$$\gamma = \frac{\Delta P}{4\left(\frac{1}{R}\right)} = \frac{\Delta P}{2\left(\frac{1}{R_i} + \frac{1}{R_o}\right)} \quad (2-43)$$

(2-43)式中  $\Delta P$  是囊胞的內壓減外壓，即壓差； $R_i$  是囊胞的內半徑； $R_o$  是囊胞的外半徑。利用(2-42)式算出的壓差代入(2-43)式，即可求得表面張力。但是此計算方法在囊胞形狀嚴重偏離圓球形時，框選的內外水區可能會包含 lipid，造成計算誤差，此方法便不適用。

## Order parameter ( $S$ )的計算

The average of the second Legendre polynomial 常被用在描述液晶系統的排列：

$$S = \langle P_2(\cos\theta) \rangle = \left\langle \frac{3\cos^2\theta - 1}{2} \right\rangle \quad (2-44)$$

(2-44)式中  $S$  即為 order parameter， $\theta$  為兩硬桿的 included angle( $\theta$ )，如 **Fig. 2-11**。

$S$  為 0~1 的數，若是等向性(isotropic, orientationally disordered)的排列， $S=0$ ；若為完美排列， $S=1$ 。液晶的 order parameter 大約在 0.3~0.8，示意圖如 **Fig. 2-12**。

本研究考慮短距作用力，利用(2-44)式計算局部的 order parameter ( $S$ )而非原本定義之全系統排列整齊度。以某 lipid 的一條疏水鏈段做為中心，界定此疏水鏈



段的 end to end distance 為柱高， $R_g$  為半徑的圓柱區域，如 **Fig. 2-13**，計算在此圓柱範圍內中心的 lipid tail 對其它 lipid tail 的排列整齊度。在囊胞系統中，當 lipid 的疏水鏈段排列越整齊時，order parameter ( $S$ ) 越大；當 lipid 疏水鏈段出現差排情形(interdigitated) 時，其 order parameter ( $S$ ) 越小。

**Fig. 2-11** 兩硬桿間的 included angle( $\theta$ ) 示意圖。



**Fig. 2-12** 排列與 order parameter 對應示意圖。

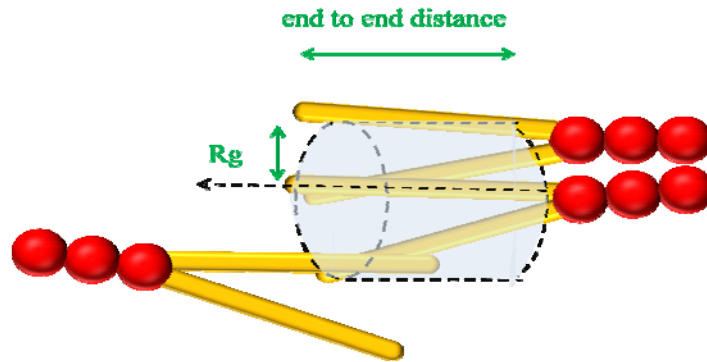


Fig. 2-13 計算 order parameter 所需定義的圓柱區域示意圖。



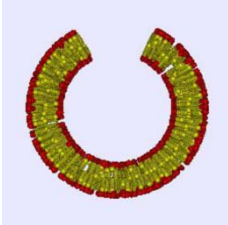
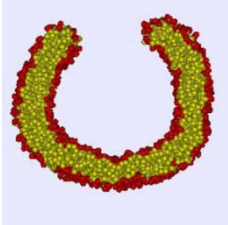
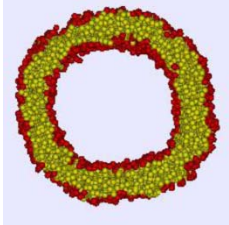
# Chapter 3 結果與討論

在我們模擬的系統中，脂質分子粗粒化模型的結構是  $A_3(B_6)_2$ ，為了加快系統平衡的時間，我們將脂質分子預先排成開洞的球型結構，如 **Fig. 3-1** 所示。接下來的模擬以探討溫度對囊胞的影響為主，因此我們固定了系統中脂質分子的體積分率( $\phi_l$ )為 0.06，在  $60 \times 60 \times 60$  的系統中脂質分子的粒子數為 38,880 個，脂質分子體積分率表示式如(3-1)：

$$\phi_l = \frac{\text{total no. of lipid beads}}{\text{total no. of beads}} = \frac{n_l \cdot 15}{n_w + n_l \cdot 15} \quad (3-1)$$

其中  $n_l$  為脂質分子的數目， $n_w$  為水分子的數目。我們將這樣子的起始結構放在不同溫度的系統中，平衡的時間為 500,000 步。在我們之前的模擬當中，系統的溫度皆是設定成  $T^*$  為 1.0，脂質分子尾巴對水的參數設定為  $a_{BW}=50$ 。

而在操作上為了更進一步減少模擬所花費的時間，我們將同樣由 38,880 個粒子所形成的起始結構，放在  $45 \times 45 \times 45$  的系統中。而最後的模擬結果與  $60 \times 60 \times 60$  的系統中是一致的，但模擬的時間卻可以大幅降低。

Initial configuration	Equilibrating process	Metastable configuration
		

**Fig. 3-1** 脂質分子排列成開洞的球型起始結構。

## 3-1 溫度對囊胞的影響

### 囊胞的型態

本節當中我們所使用的脂質分子尾巴對水的參數皆設為  $a_{BW}=50$ 。首先我們將

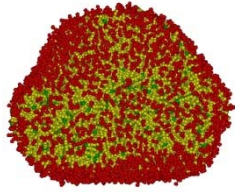
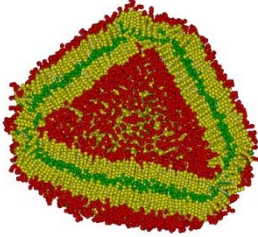
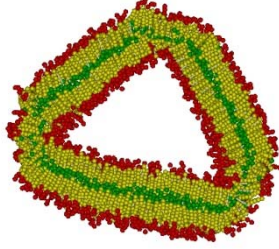
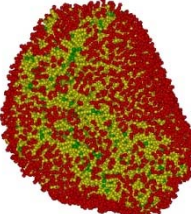


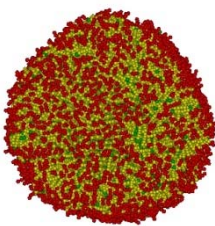
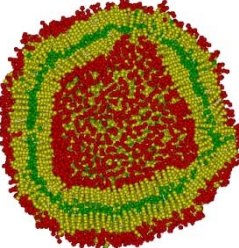
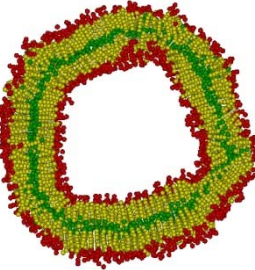
系統溫度往下降低，當  $T^*$  為 0.8 時，系統中的脂質分子依然能夠將起始結構的洞合起來形成囊胞的結構，當  $T^*$  低於 0.8 時，起始結構的洞將無法合起，也就是無法形成囊胞的結構。

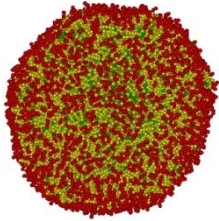
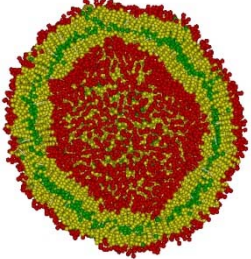
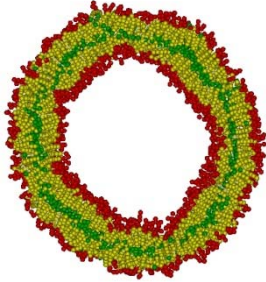
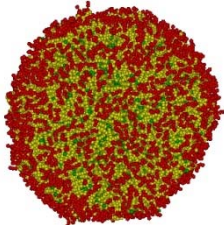
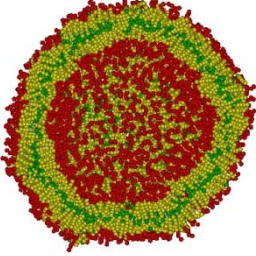
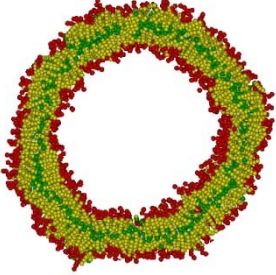
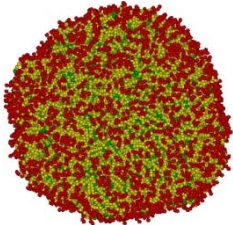
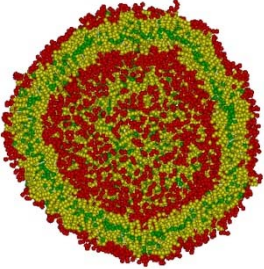
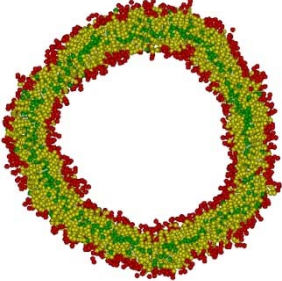
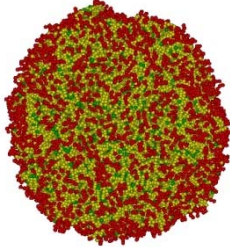
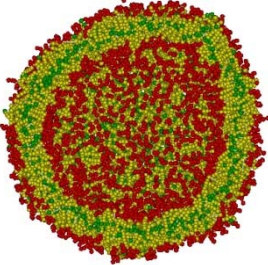
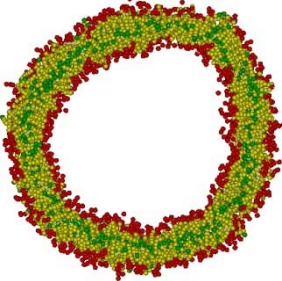
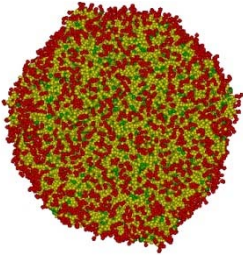
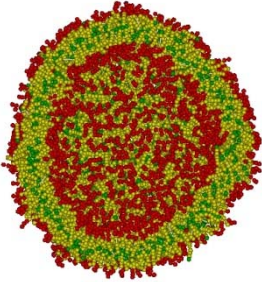
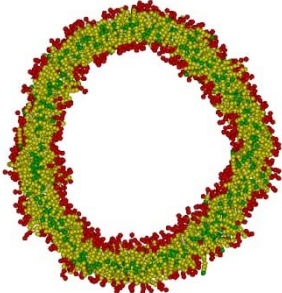
在各種不同溫度的系統中，平衡時囊胞的型態如 **Fig. 3-2**。圖中紅色的粒子代表親水端頭基(A)，黃色的粒子代表疏水端的長鏈段(B)，我們特別將尾端長鏈段的最後一個粒子標示成綠色，以便於觀察雙層膜的內、外層重疊與交錯的情況。從文獻上得之當溫度由低溫到高溫的過程中，脂質分子雙層膜的型態是由 tilted gel phase( $L_{\beta}'$ ) 變成 rippled phase( $P_{\beta}'$ ) 再變成 liquid disordered phase( $L_{\alpha}$ )。在我們模擬的結果中，溫度 0.8 時從全視圖來看，囊胞的外觀並不是一個對稱的球形，反而是一個多面體的結構。從其剖面圖與切面圖更可以看到三角形的構造，就像是一塊硬板，無法彎曲但又硬是把它折起來使其頭尾相接，就會產生一些稜角，而不是平滑的曲線。這是因為溫度低的時候，膜的型態是 tilted gel phase，膜上面的脂質分子排列較整齊，所以脂質分子在膜上移動較困難，膜就不容易彎曲，即脂質分子在溫度 0.8 時傾向形成平板的結構，但若是平板的結構在膜的邊緣疏水的尾端會暴露在水中，因此必須犧牲膜上某些區域的平板構造使得膜能夠折起來，讓膜的邊緣能夠相接而形成囊胞的結構。若將一樣體積分率( $\phi_l$ ) 為 0.06 的脂質分子排列成平面的結構，而溫度 1.0 時初始的平板結構則會捲起來形成囊胞，過程如 **Fig. 3-3**。此外在  $T^*=0.8$  時我們觀察脂質分子尾端粒子的位置，即 **Fig. 3-2** 上綠色的地方，可以發現綠色很整齊的在膜的中間形成一條線，表示的脂質分子的尾端排列的很整齊，並且內層與外層重疊與交錯的地方很少，因此膜也比較厚。

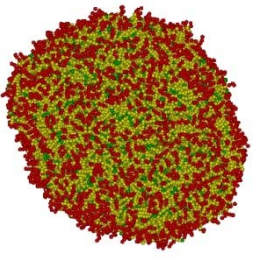
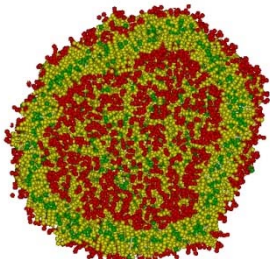
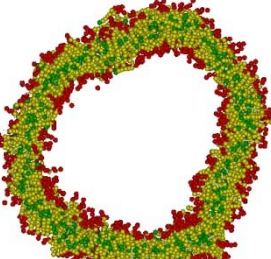
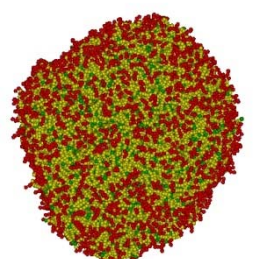
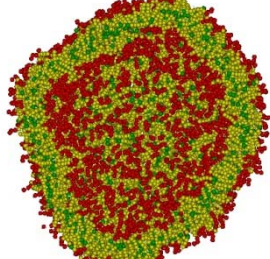
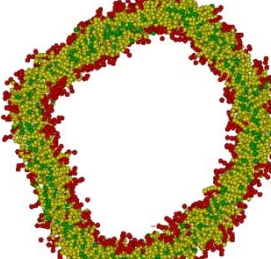
由囊胞的型態來觀察，tilted gel phase 的型態在系統的溫度高於 0.86 之後，膜上有稜角地方就消失了，整體的外觀呈現球體的形狀，而從切片圖與剖面圖來看，膜的形狀變成了圓形。因此我們定義在溫度超過 0.86 之後膜的型態轉變成 rippled phase。rippled phase 的型態介於 tilted gel phase 與 liquid disordered phase 之間，此時膜上能夠觀察到有些地方排列的比較整齊，因此圖上綠色的部份可以看到是直線，這些地方膜也比較厚，就像是 tilted gel phases 時的型態；同時膜上也能看到有些地方排列的比較不好，並且內、外層的脂質分子尾端出現重疊與交錯的型態，因此圖上綠色的部份變的比較參差不齊，不再是直線，這些地方膜的厚度就比較

小，就像溫度更高時 liquid disordered phase 的型態。所以當系統的溫度位於 rippled phase 的區間時，膜的厚度是不均勻的，溫度越高 liquid disordered phase 的特徵就越顯著。

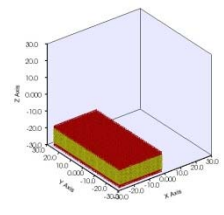
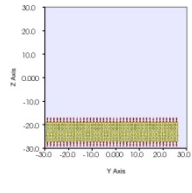
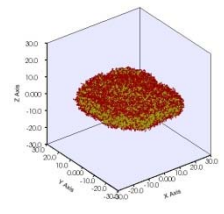
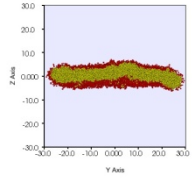
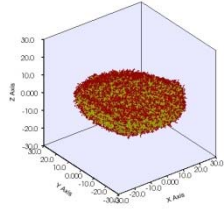
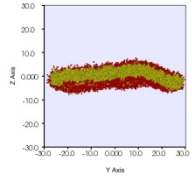
溫度再往上提高，膜的型態會從 rippled phase 轉變成 liquid disordered phase，此時型態上改變的程度並不像 tilted gel phase 到 rippled phase 這麼的顯著。從後面膜性質的分析可以知道溫度 1.05 是相轉變的溫度。從 **Fig. 3-2** 可以看到膜的厚度變的均勻，不再明顯的有薄有厚。膜上脂質分子的排列隨著溫度的上升越來越不整齊，膜中間綠色的部份雜亂的分佈在黃色的區間，而囊泡整體的形狀也隨著溫度的上升開始變得有些扭曲。

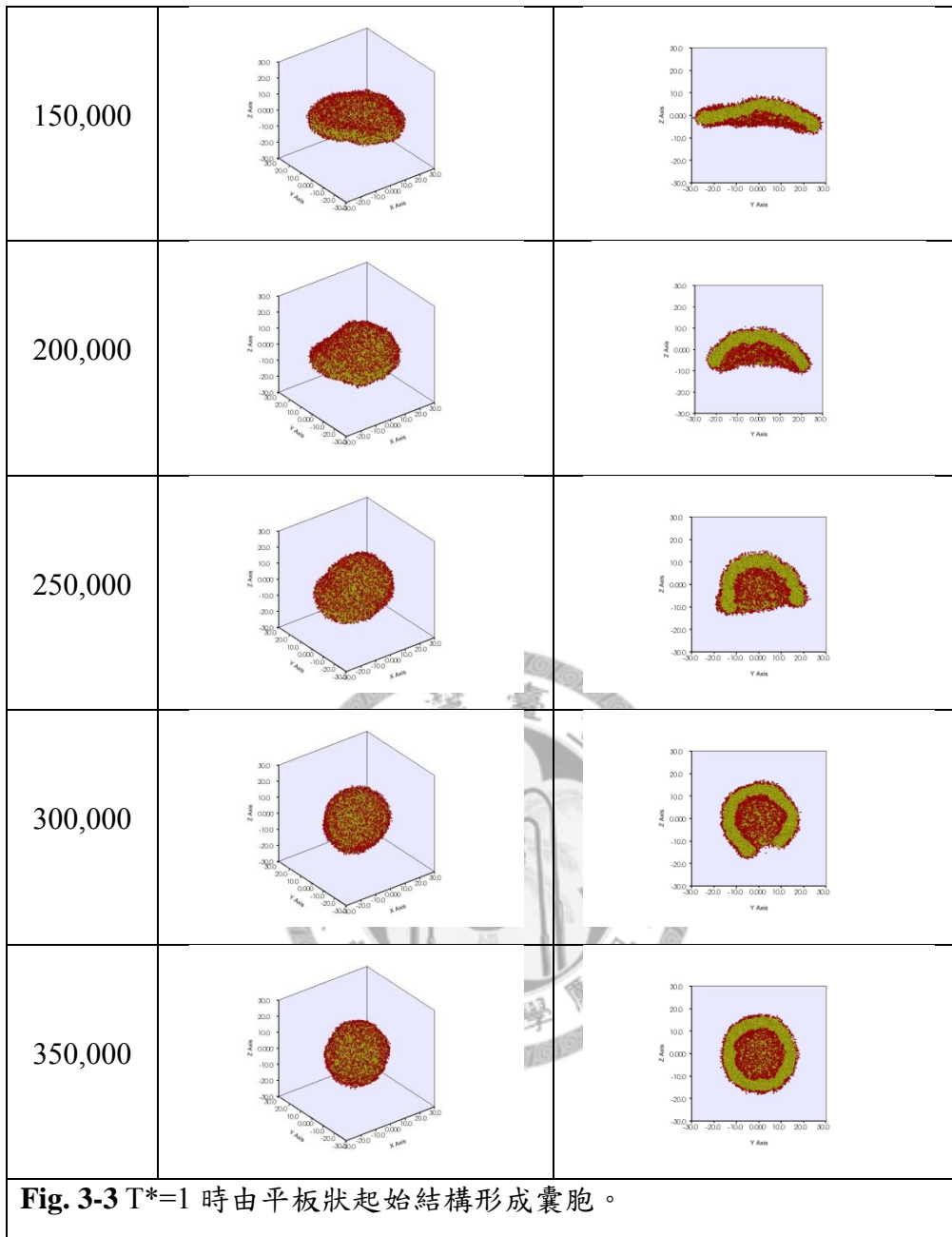
T*	全視圖	剖面圖	切片圖	phase
0.8				$L_{\beta}'$
0.82				$L_{\beta}'$
0.86				$L_{\beta}'$

0.9				$P_{\beta}'$
1.0				$P_{\beta}'$
1.1				$L_{\alpha}$
1.2				$L_{\alpha}$
1.3				$L_{\alpha}$

1.4				$L_{\alpha}$
1.5				$L_{\alpha}$

**Fig. 3-2** 溫度由 0.8 至 1.5 囊泡型態。紅色為脂質分子親水的頭基，黃色是尾端兩條長鏈段，綠色是長鏈段的最後一顆粒子。

steps	全示圖	剖面圖
0		
50,000		
100,000		



### 囊胞的基本性質

進一步分析囊胞的性質，首先我們可以發現在一樣的起始結構下，平衡時候囊胞的大小會隨著溫度越高而越來越大，如同 **Fig. 3-4** 所示，不論是內半徑、外半徑或者是平均半徑都隨著溫度而提高，但是上升的幅度越來越小，在系統溫度超過 1.3 時，達到一個穩定的狀態，此時囊胞的平均半徑約為 13.85，平均半徑  $r = (r_o + r_i)/2$ 。將囊胞的外半徑與內半徑相減可以得到囊胞的厚度， $h = r_o - r_i$ ，如 **Fig. 3-5**



所示。在溫度低於 0.86 時，因為內、外半徑上升的幅度差不多，在這個溫度區間囊胞的厚度大約是 5.55。溫度大於 0.86 之後，因為內半徑增大的幅度比外半徑快，囊胞的厚度隨著溫度的增加而減少。溫度大於 1.3 之後囊胞的膜厚逐漸達到一個穩定值約為 4.3。囊胞作為藥物載體的應用，其內水區可以攜帶親水性的藥物，而由脂質分子構成的膜可以攜帶疏水性藥物。所以當溫度越高，囊胞的尺寸越大能夠承載的親水性分子量也越多，如同 **Fig. 3-6** 隨著溫度上升囊胞內部的含水量也越高。但另一方面囊胞的膜厚隨著溫度的上升而下降，膜上能夠攜帶疏水性藥物的空間減少。

從文獻上[42]可以得之由脂質分子形成的雙層膜，其厚度隨著溫度變化的圖形可以找到一個反曲點，此點的溫度即為膜由 rippled phase 轉移至 liquid disordered phase 的相轉移溫度，我們將其稱為第二相轉移溫度(second transition temperature; 2nd.  $T_{\text{transition}}$ )，在我們的模擬結果此時的溫度為 1.05，如同 **Fig. 3-4** 至 **Fig. 3-14** 藍色線所在的位置。而在前面提到 tilted gel phase 轉移至 rippled phase 的溫度，可以在 **Fig. 3-5** 發現在溫度小於 0.86 時，膜厚保持在一個穩定的值，我們將其稱為第一相轉移溫度(first transition temperature; 1st.  $T_{\text{transition}}$ )，如同 **Fig. 3-4** 至 **Fig. 3-14** 橘色線所在的位置。

而比較囊胞的厚度與排列整齊度(Order parameter; S)如同 **Fig. 3-7**，在  $T^*=0.8$  時，囊胞的膜為 tilted gel phase 的型態，脂質分子的排列非常的整齊，觀察疏水鏈段最後一個粒子的位置，可以發現因為內、外層脂質分子交錯的情況少，所以尾端最後一個粒子能夠整齊的排列在膜的中間，在圖上出現綠色的直線。在  $T^*=1.3$  時，囊胞的膜為 liquid disordered phase 的型態，脂質分子的排列非常的雜亂，並且內、外層脂質分子尾端疏水鏈段互相交錯，如同圖上綠色的尾端粒子散亂分佈在膜的內部黃色區域中。在  $T^*=1.0$  時，囊胞的膜為 rippled phase 的型態，此時膜上同時出現 tilted gel phase 與 liquid disordered phase 型態的特性，膜的厚度與排列因為有兩種型態的特性而不均勻，綠色的疏水鏈段最後一個粒子，有時在膜中間形成一直線，有時散亂的分佈在膜的內部。整體而言隨著溫度上升囊胞變大，因此厚度變小且整齊度下降，厚度及整齊度的關係與本實驗室之前的模擬結果是吻合的。在體積分率固定為 0.06 的情況下，囊胞越大顆，其厚度必須下降以維持囊胞的完整性，而厚度下降的結果會使得脂質分子擠在一起，自然膜上脂質分子的整

齊度就會下降。囊胞排列整齊度隨溫度的變化如同 **Fig. 3-8**。

接著經由計算脂質分子疏水鏈段的長度( $l$ )，內、外層脂質分子體積( $v$ )，以及內、外層單位面積粒子的數量( $\sigma$ )，可以進一步得到囊胞的 packing parameter ( $P$ ;  $P = v/\sigma l$ )。從 **Fig. 3-9** 可以看出脂質分子疏水鏈段的長度隨著溫度的升高稍微的下降，在第二相轉移溫度之前內層脂質分子疏水鏈段比外層稍大( $l_i > l_o$ )，之後兩者大小大致相等( $l_i = l_o$ )。從 **Fig. 3-10** 可以看出脂質分子體積的變化，內層的體積比外層的大( $v_o > v_i$ )，而且在第二相轉移溫度之前內層體積先上升，之後開始下降。從 **Fig. 3-11**、**Fig. 3-12** 可以看出內、外層粒子單位面積的數量，在親水粒子的部份，內層單位面積的數量大於外層( $\sigma_{i,head} > \sigma_{o,head}$ )；疏水粒子的部份，外層單位面積的數量大於內層( $\sigma_{o,tail} > \sigma_{i,tail}$ )。親、疏水粒子的單位面積的數量皆隨著溫度上升而下降，內層的兩種粒子單位面積的數量在第二相轉移溫度之前的變化都明顯比之後大。而綜合以上的數據可以得到 packing parameter，如同 **Fig. 3-13**，不論是內層或者外層，基本上都隨著溫度上升而下降，比較特別的是內層的 packing parameter 在第一相轉移溫度之前隨著溫度上升而變大，因為在  $T^* = 0.86$  之前膜上大部份的區域想要維持平面的構造，而平面的 packing parameter 約等於 1，所以會看到  $P$  在相轉移之前會變小。

由 **Fig. 3-14** 可以看到囊胞表面張力隨溫度的變化，在第一相轉移溫度之前，囊胞的表面張力幾乎等於 0，接著隨著溫度上升表面張力開始上升，直到第二相轉移溫度之前。這個現象與我們之前的模擬是符合的，當囊胞的 order parameter 值下降時，脂質分子排列變得不整齊，表面張力的值是上升的。而囊胞的壓力在第二相轉移溫度時達到了最大值，之後進入了 liquid disordered phase，因為溫度的上升，使得囊胞變得越軟而表面張力下降，溫度對表面張力下降的效應在這邊超過了膜上脂質分子排列變差對表面張力變大的效應。

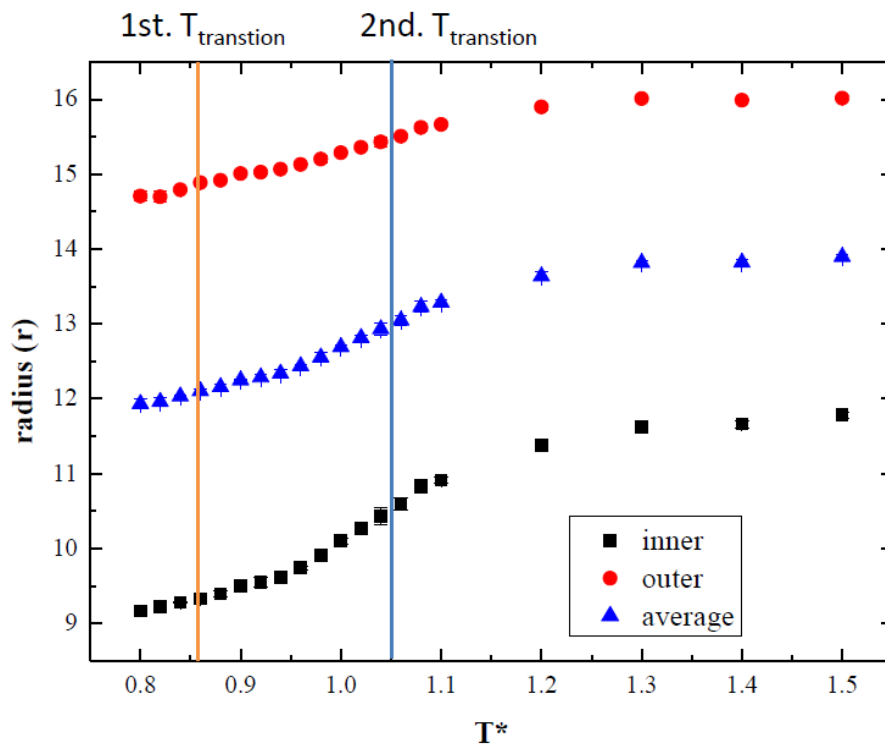


Fig. 3-4 囊胞半徑隨溫度之變化圖。

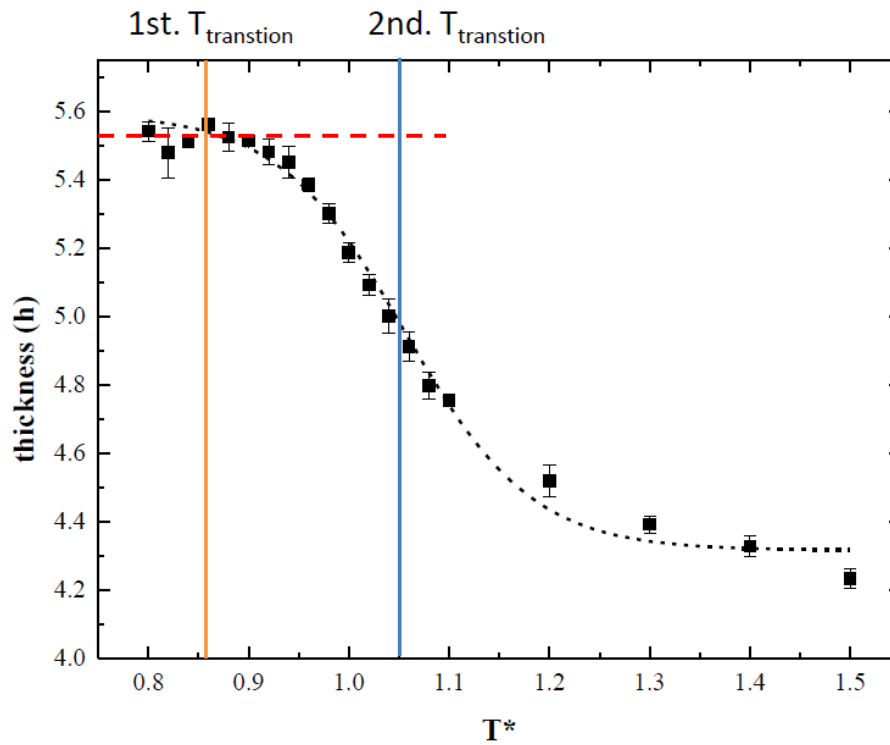


Fig. 3-5 囊胞厚度隨溫度之變化圖。

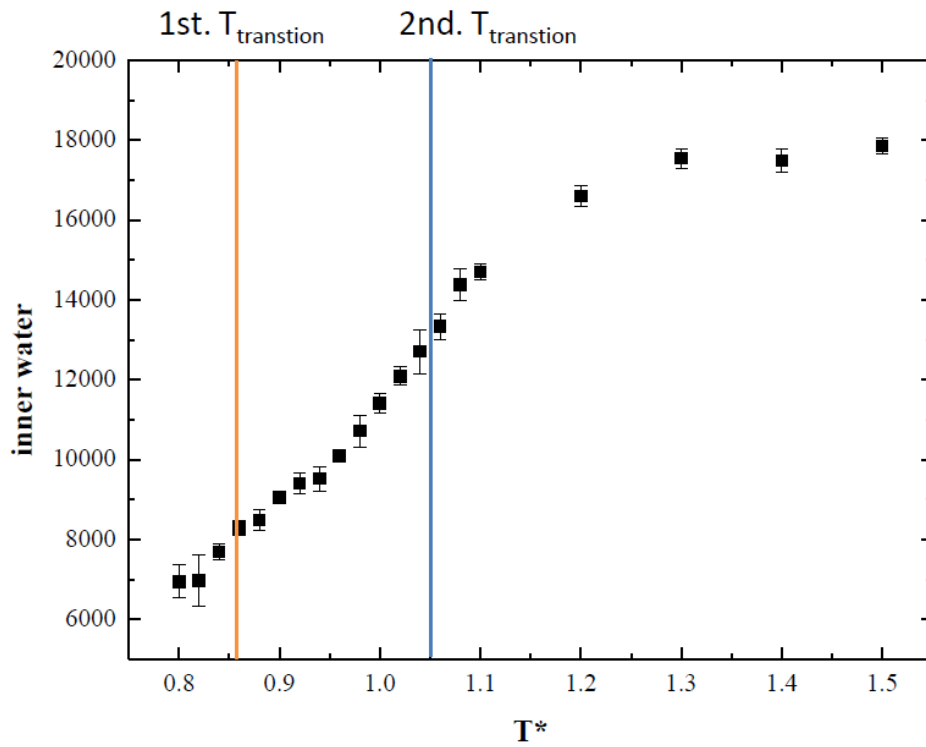


Fig. 3-6 囊胞內部水區隨溫度之作圖。

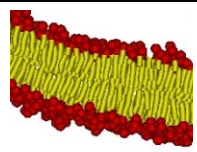
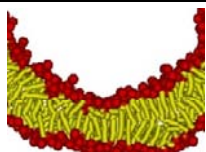
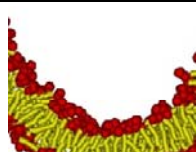
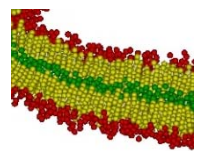
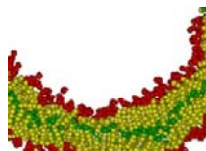
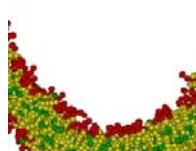
T* = 0.8	T* = 1.0	T* = 1.3
tilted gel phase	rippled phase	liquid diordered phase
h = 5.54 S = 0.67	h = 5.19 S = 0.27	h = 4.39 S = 0.17
		
		

Fig. 3-7 囊胞膜的排列與厚度的變化。

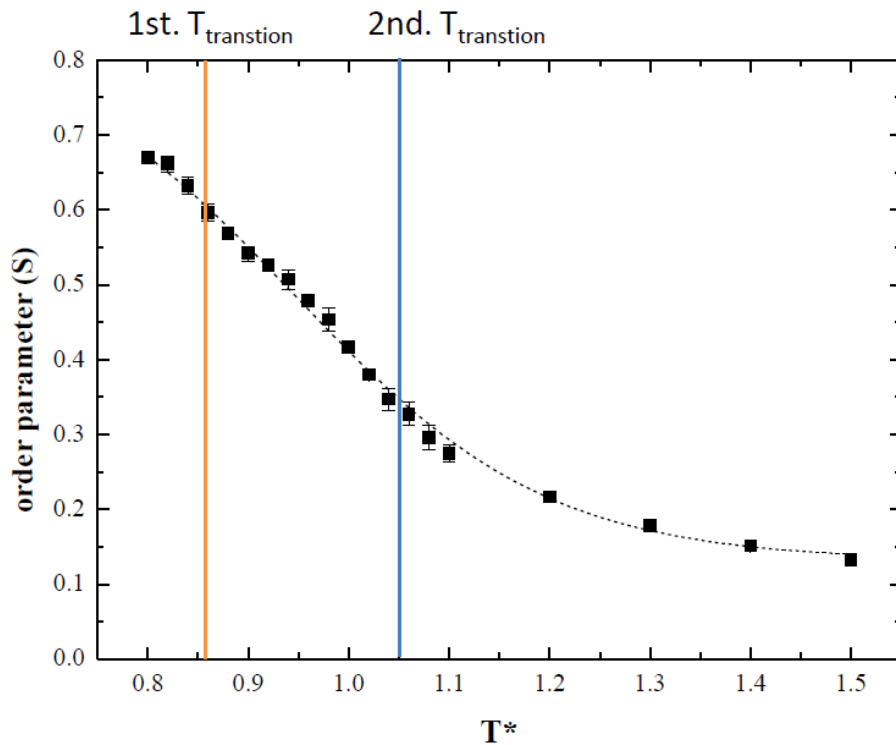


Fig. 3-8 囊胞 order parameter 隨溫度之變化圖。

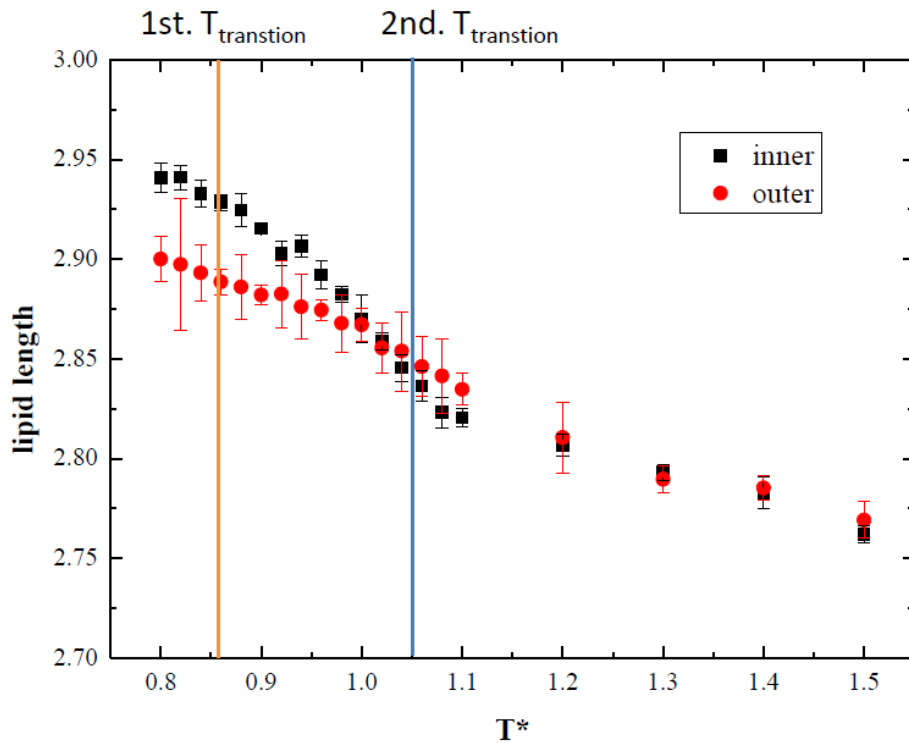


Fig. 3-9 囊胞內、外層脂質分子疏水鏈段長對溫度做圖。

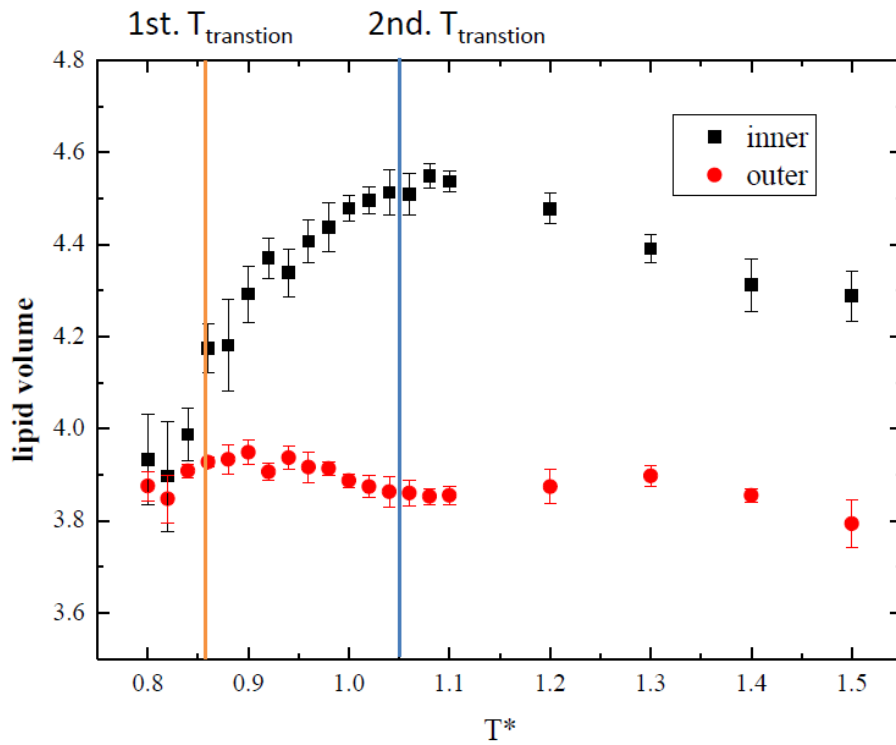


Fig. 3-10 囊胞內、外層脂質分子體積隨溫度之作圖。

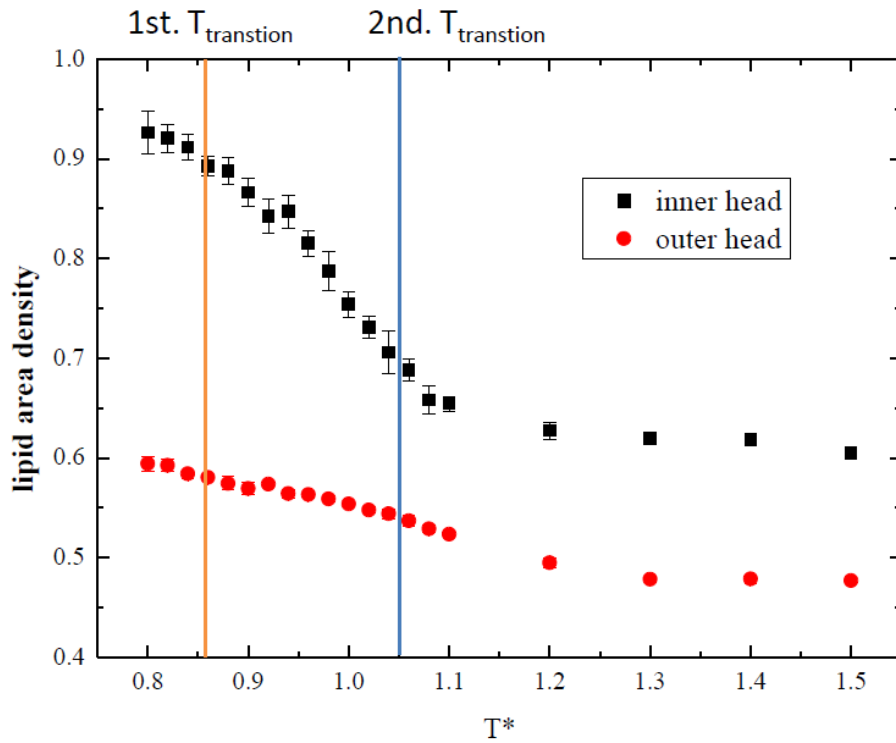


Fig. 3-11 囊胞內、外層單位面積親水端粒子隨溫度之變化圖。

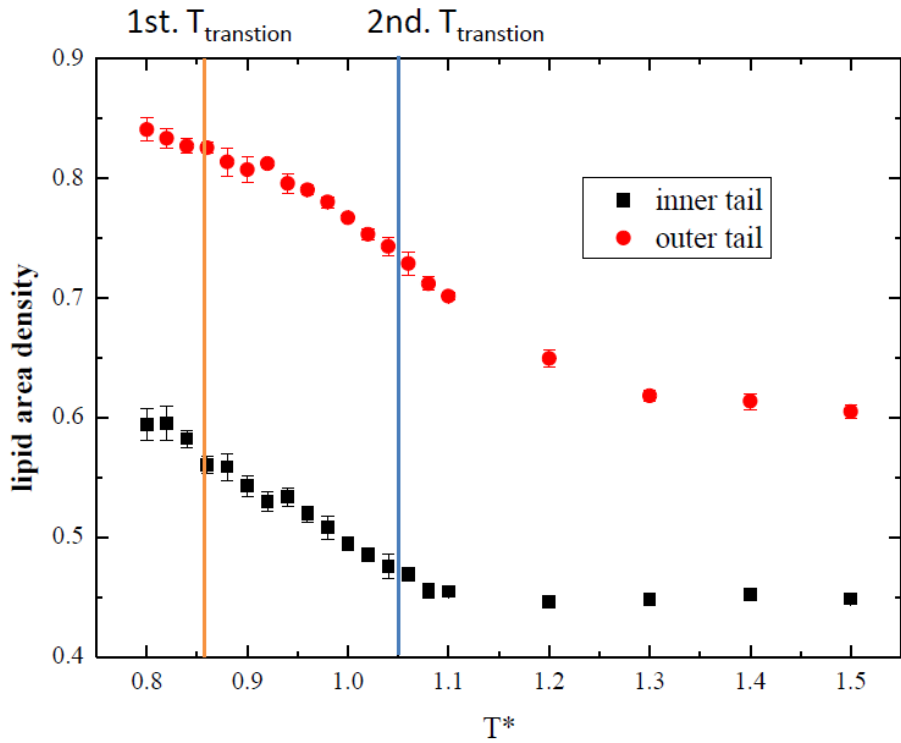


Fig. 3-12 囊胞內、外層單位面積疏水端粒子隨溫度之變化圖。

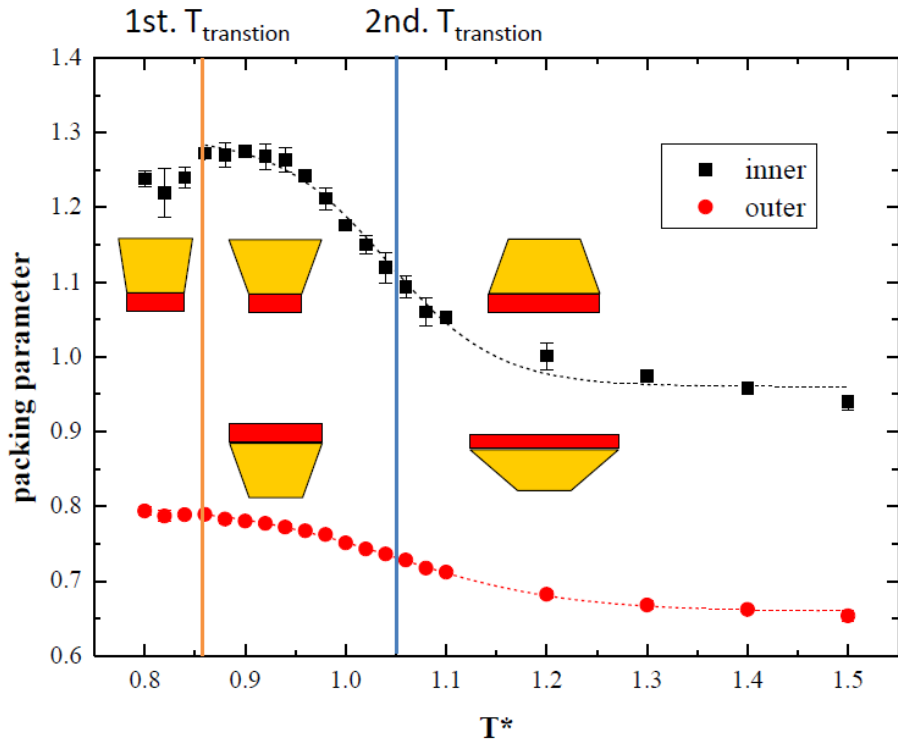


Fig. 3-13 囊胞內、外層 packing parameter 隨溫度之作圖。

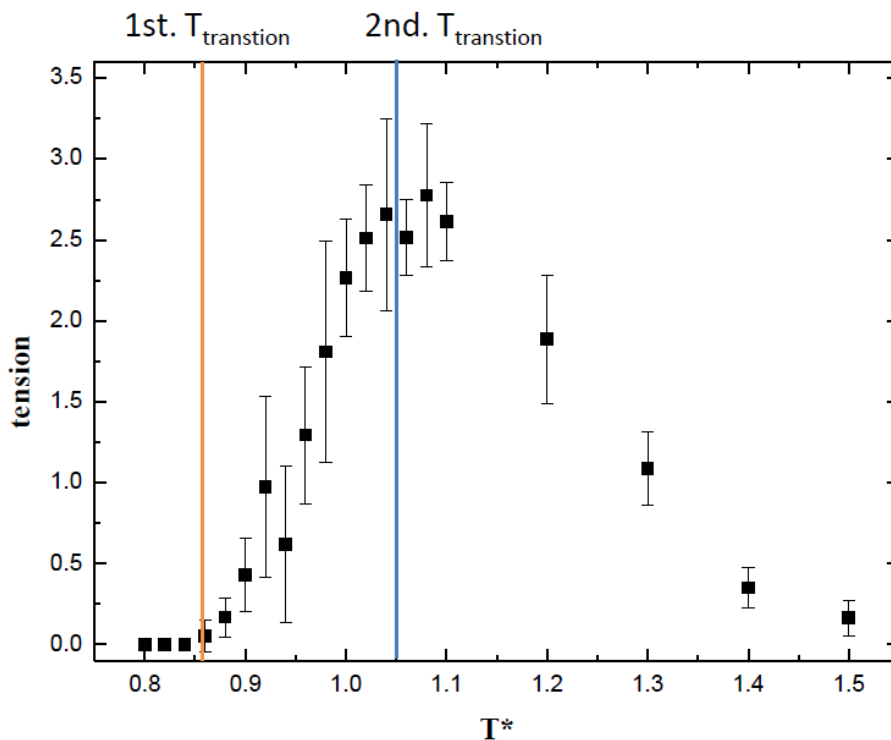


Fig. 3-14 囊胞表面張力隨溫度之作圖。

### 滲透率(permeability)的計算

囊胞作為藥物的載體，其內部水區所裝載的親水性藥物的釋放顯得十分的重要，若是能夠精確控制其釋放的時機，將能夠使標靶藥物的作用最佳化。因此囊胞內部親水性分子通過膜的滲透率是我們想要了解的。

為了計算滲透率，我們先將一個經過平衡的囊胞內部水分子找出來，此時囊胞內部水分子的數目為  $w_0$ ，接著將其標定成系統中的第四種粒子，但實際上這種粒子的參數設定跟原先水分子的設定是相同的，特別將其標定的目的是為了之後計算水分子進出膜的數量。

接著將重新設定過後的系統平衡 100,000 步，平衡後再一次找尋囊胞內部的水分子，此時囊胞內部水分子的數目為  $w_1$ 。因為水分子會進出囊胞，所以此時囊胞內部的水分子有兩種組成，一種是原本就在囊胞內部標定過的水分子，其數目為  $w_{1,i}$ ；一種是由囊胞外部進入的水分子，其數目為  $w_{1,o}$ ， $w_1 = w_{1,i} + w_{1,o}$ 。以上如 Fig. 3-15 所示。



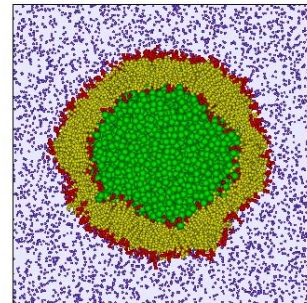
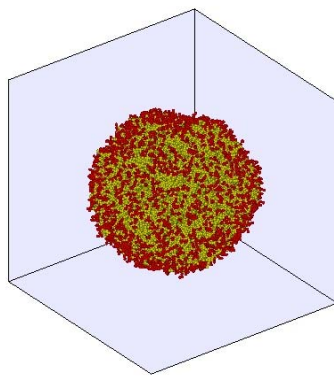
因此我們可以得到在經過 100,000 步後，從外部進入囊胞的水量為  $w_{l,o}$ ，從囊胞內部跑出的水量為  $w_0 - w_{l,i}$ 。囊胞的滲透率如同(3-2)：

$$permeability = \frac{\text{water penertrate membrane}}{\text{area} \cdot \text{time}} = \frac{w_{l,o} + (w_0 - w_{l,i})}{4\pi r^2 \cdot t} \quad (3-2)$$

經過計算，可以得到囊胞在不同溫度之下的滲透率，如 **Fig. 3-16** 所示。隨著系統溫度的升高，囊胞內部的水分子或者是親水性分子越容易通過囊胞的雙層膜，達到釋放的效果。

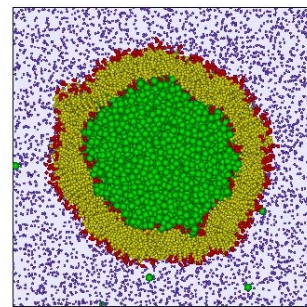
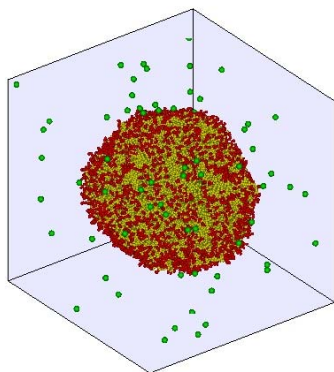
(a) 全視圖

(b) 切片圖



(c) 全視圖

(d) 切片圖



**Fig. 3-15** 計算滲透率系統標定圖。(a)、(b)為重新標定；(c)、(d)經過 100,000 步平衡。其中紅色粒子為脂質分子親水端，黃色為脂質分子疏水端，綠色為重新標定的囊胞內部水分子，紫色為囊胞外部的的水分子。

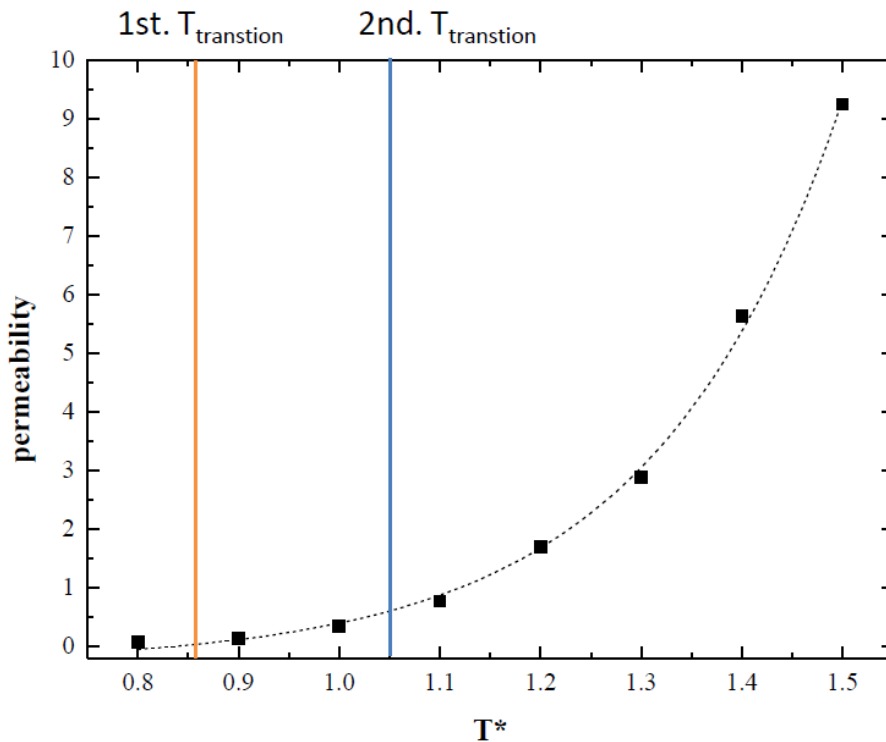


Fig. 3-16 囊胞滲透率隨溫度之變化圖。

### 囊胞的機械性質

我們選擇了脂質分子疏水鏈段對水的參數為 50，體積分率( $\phi_l$ )為 0.06 的囊胞在溫度為 0.9、1.0、1.1 和 1.3 的條件下進行囊胞機械性質的模擬。伸展模數(stretching module;  $K_a$ )可以透過雙層膜表面張力的變化對上囊胞表面積變化來求得，因此我們操作的方法是將囊胞中間的水區注入水粒子，使囊胞因為內部加水的關係而膨脹，發生表面積與表面張力的變化。加水前的表面積與表面張力分別定義為  $A_0$  與  $\tau_0$ ，加水後表面積的變化率定義為  $\alpha = (A - A_0) / A_0$ ，表面張力差為  $\Delta\tau = \tau - \tau_0$ 。根據文獻可以得到在  $\alpha$  較大的時候， $K_a$ 、 $\alpha$  和  $\Delta\tau$  的關係式如(3-3)[43]。

$$\Delta\tau = K_a \cdot \alpha \quad (3-3)$$

我們以每 100 步注入 10 個水粒子的速率進行加水的步驟，注入的水粒子由囊包外部的區域任意選擇 10 個。約每 5,000 步記錄一個位置檔，每個位置檔約增加 500 個水粒子在囊胞中間的水區。將每個記錄檔經過 100,000 步的平衡後做囊胞性質的分析。隨著囊胞內部水粒子的注入，囊胞的表面積會增加，囊胞的大小隨著注入水量的增加而變大，如 **Fig. 3-17** 所示。而加水變大的囊胞，因為膜上脂質分子的濃度固定，因此在囊胞變大的同時，雙層膜的厚度必須要下降才能夠維持囊胞的型態，如 **Fig. 3-18** 所示。而當脂質分子被擠入較薄的雙層膜中，因為更擁擠，脂質分子尾端疏水鏈段的排列整齊度必須要下降，如 **Fig. 3-19**。

**Fig. 3-20** 為囊胞表面張力差( $\Delta\tau$ )對表面積變化率( $\alpha$ )作圖，由圖上迴歸所得到的斜率及為伸展模數( $K_a$ )，將伸展模數對溫度作圖可以得到 **Fig. 3-21**。由 **3-1** 的結果可以知道在脂質分子疏水鏈段對水的參數為 50 的情況下，囊胞的第二相轉移溫度為 1.05，對照伸展模數的變化，可以發現在溫度小於 1.05 的時候，囊胞的伸展模數隨著溫度的上升而下降；溫度大於 1.05 的時候，囊胞的伸展模數隨著溫度的上升而上升。為什麼在第二相轉移溫度的前後，伸展模數會隨著溫度有不同的趨勢變化呢？為了了解這個現象，以下我們將對系統內的能量變化做進一步的探討。

囊胞表面張力的定義為  $\tau = (\partial F / \partial A)_T$ ，所以我們可以得到系統自由能( $\Delta F$ )的變化如同(3-4)。

$$\Delta F(\alpha) = \int_{A_0}^{A_i} \Delta \tau dA \quad (3-4)$$

另一方面在模擬的過程中，在計算系統內作用力的同時，我們可以同時算出系統的內能( $\Delta U$ )。再根據(3-5)，

$$\Delta F = \Delta U - T \cdot \Delta S \quad (3-5)$$

我們可以得到系統熵的變化。**Fig. 3-22** 和 **Fig. 3-23** 分別為囊胞在  $T^*=1.0$  以及  $T^*=1.3$  的能量圖，在  $T^*=1.0$  時，隨著囊胞表面積的增大，系統內能的變化大於自由能的變化，熵的變化是增加的( $\Delta S > 0$ )；在  $T^*=1.3$  時，隨著囊胞表面積的增大，系統內能的變化小於自由能的變化，熵的變化是減少的( $\Delta S < 0$ )。故在第二相轉移溫度( $T^*=1.05$ )之前，囊胞在充水拉伸的過程隨著溫度的上升越來越容易，伸展模數會隨著溫度的上升而下降；而在第二相轉移溫度( $T^*=1.05$ )之後， $\Delta S < 0$ ，原本已經很薄的膜在拉伸的過程只能變得更薄，膜上脂質分子的排列組合數目變小，亂度上升，因此囊胞在充水拉伸的過程會遭到抗拒，伸展模數會隨著溫度的上升而上升。

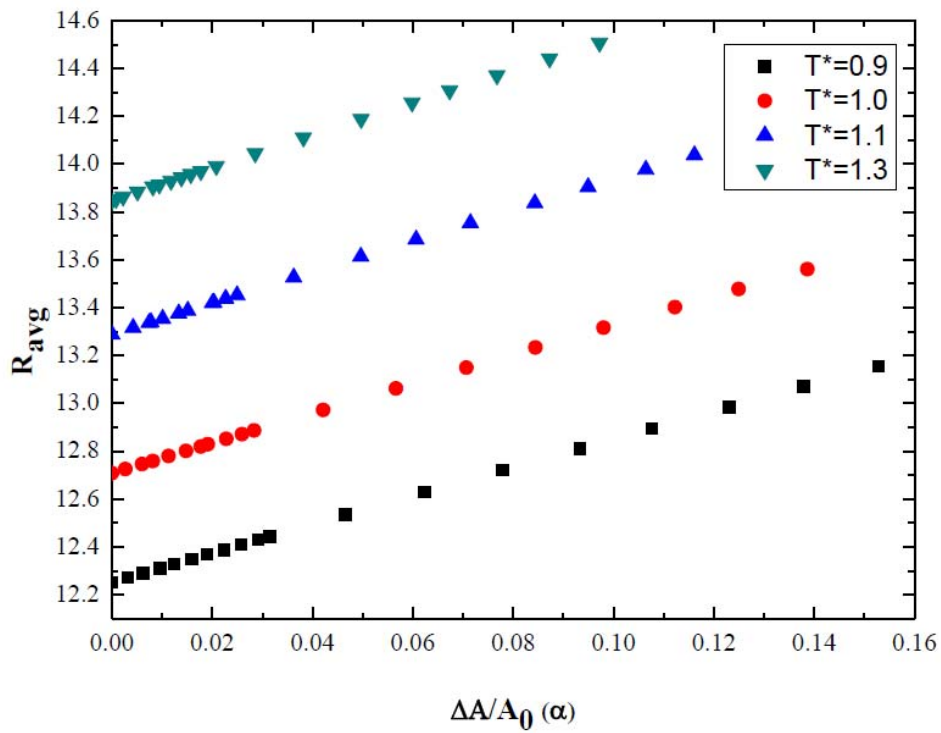


Fig. 3-17 囊胞平均半徑隨表面積增加率之變化圖。

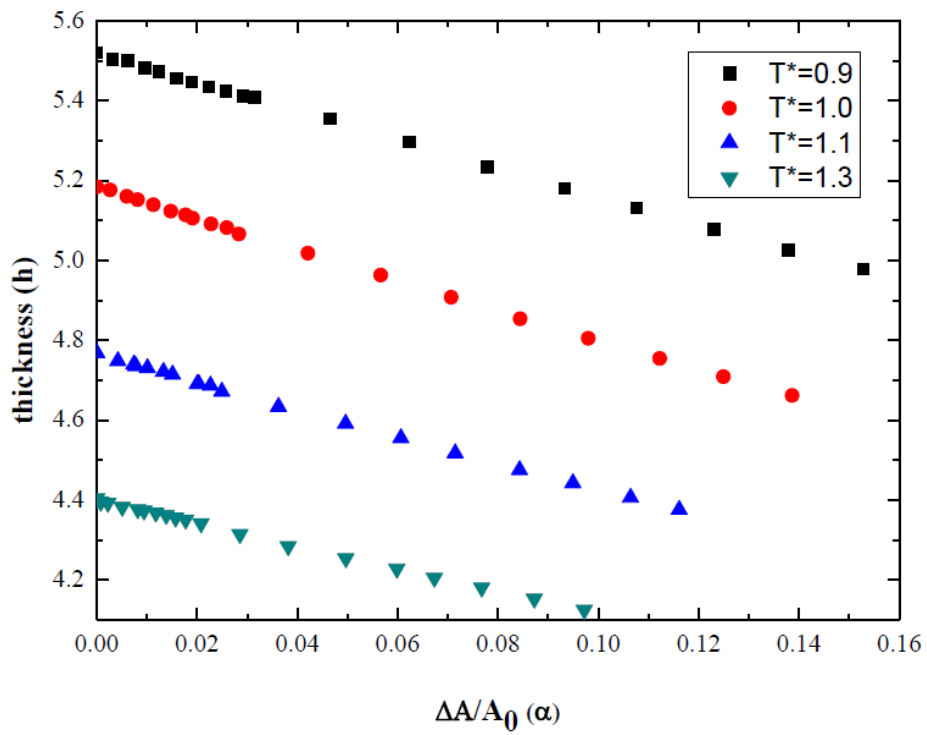


Fig. 3-18 囊胞厚度隨表面積增加率之變化圖。

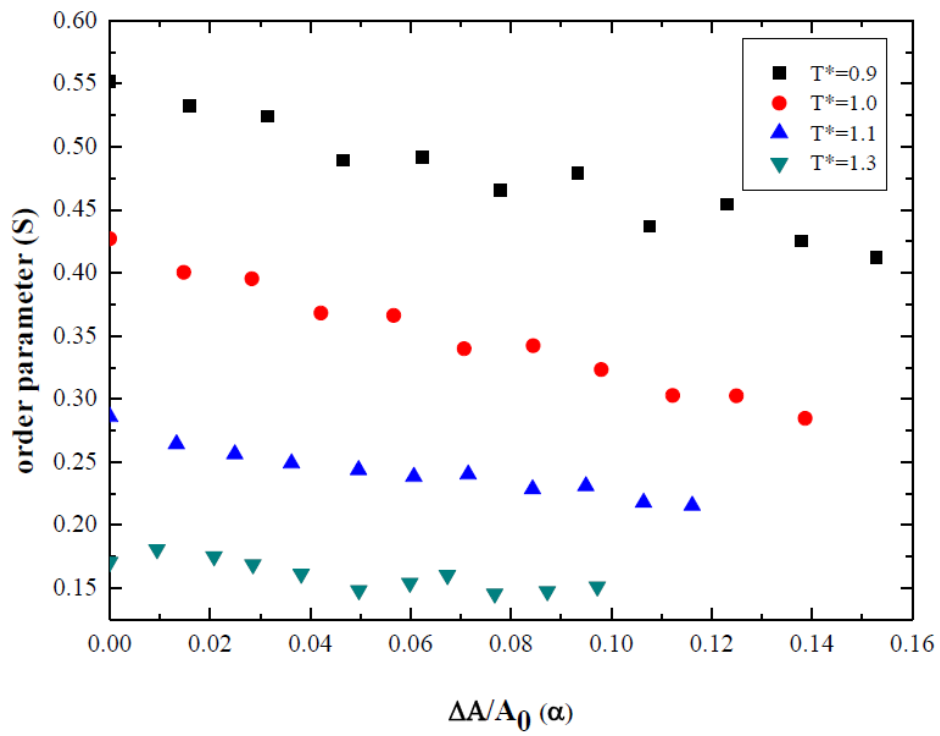


Fig. 3-19 囊胞 order parameter 隨表面積增加率之變化圖。

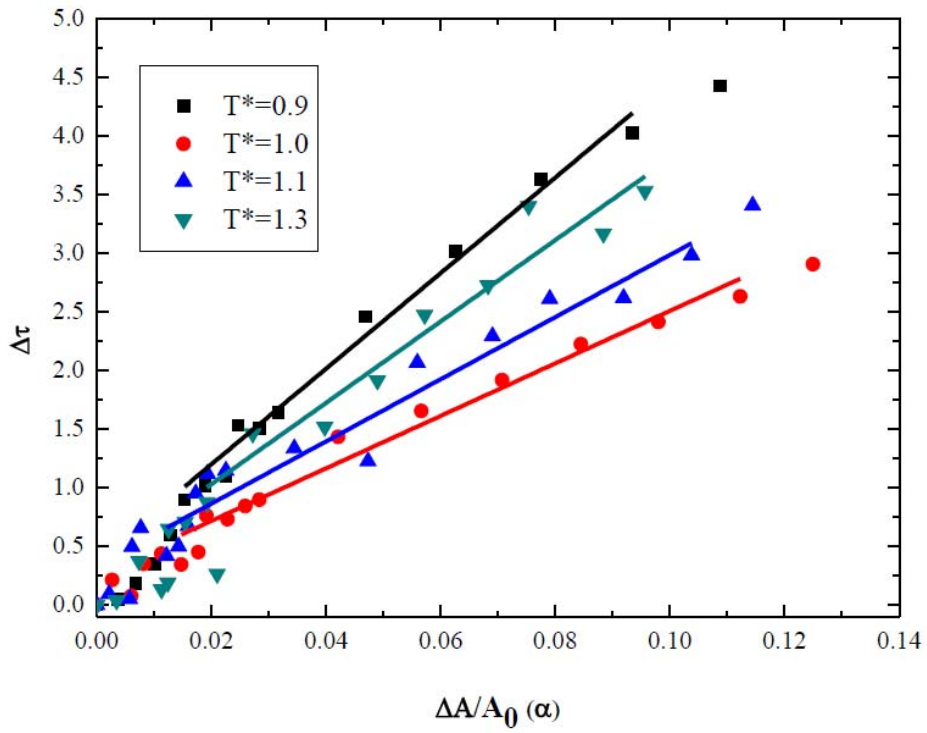


Fig. 3-20 囊胞表面張力差隨表面積增加率之變化圖。

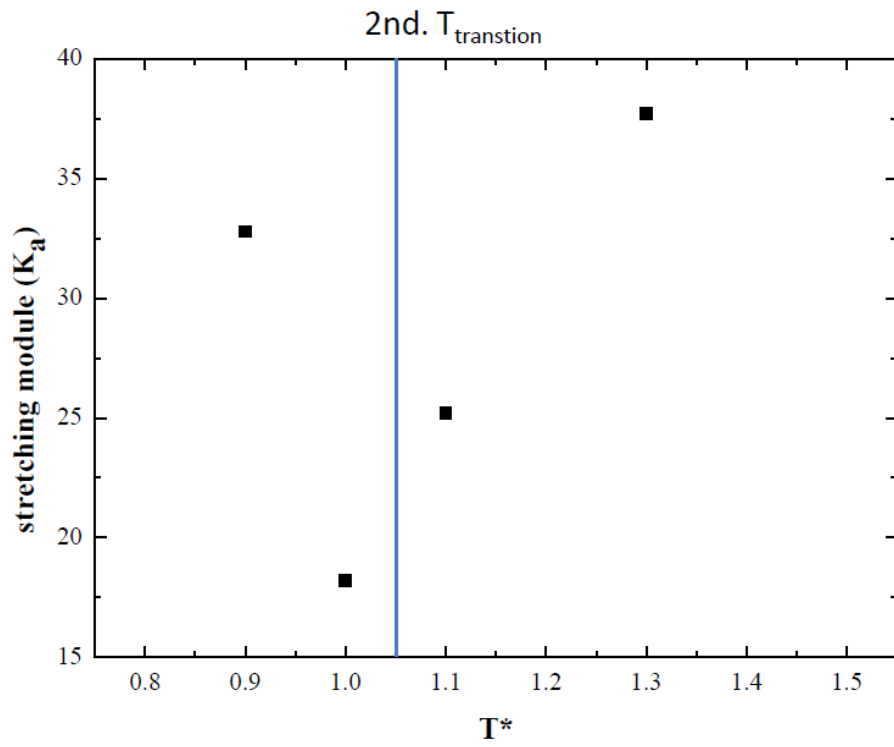
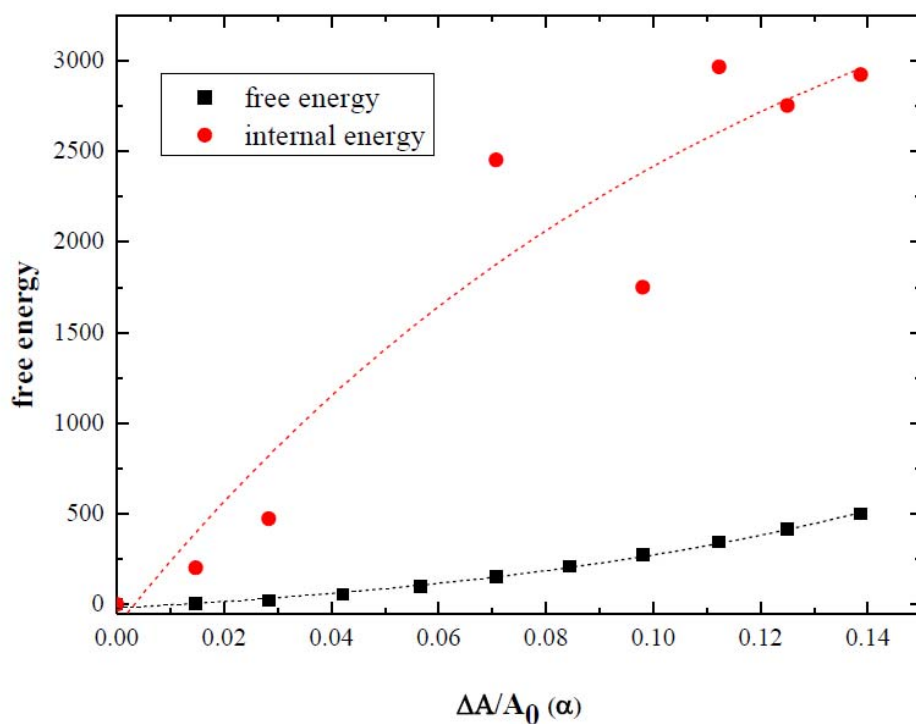


Fig. 3-21 囊胞伸展模數隨溫度之變化圖。



(a) 自由能及內能之變化圖。



(b) 熵之變化圖。

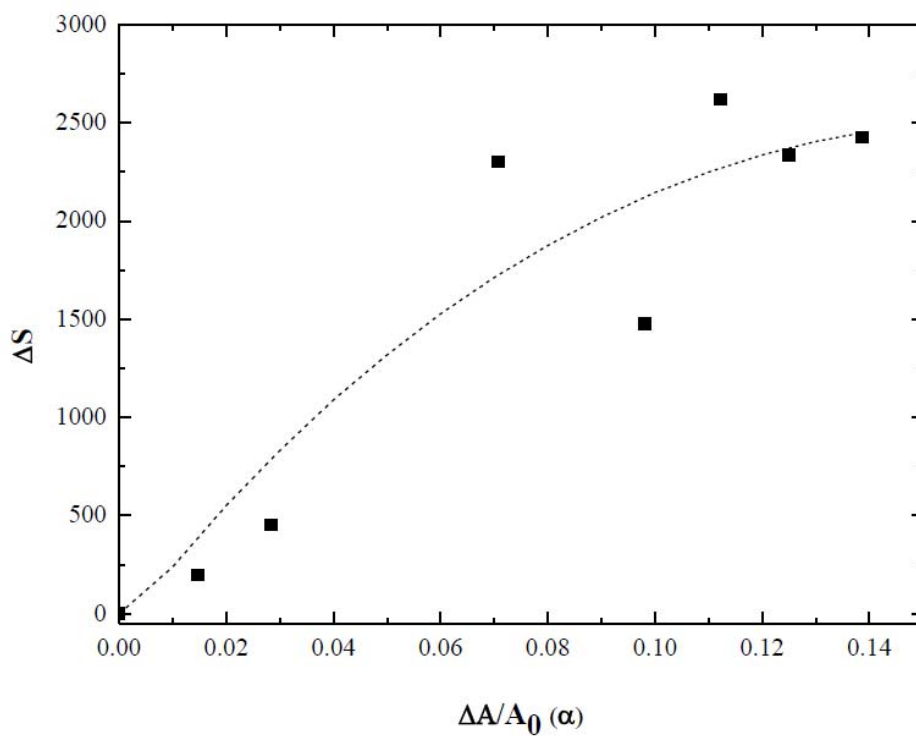
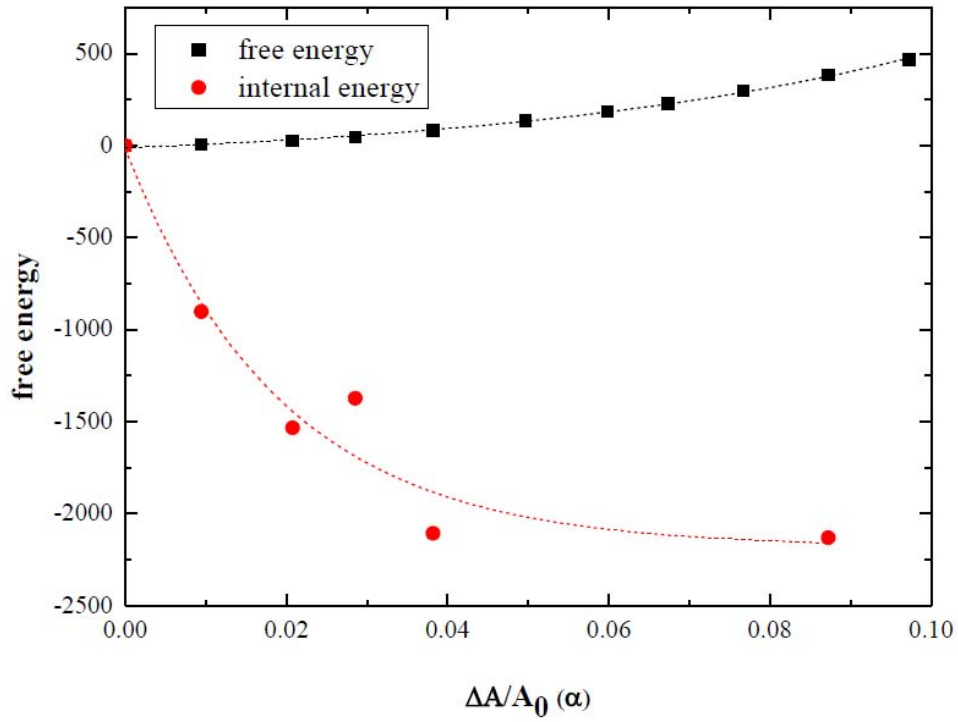


Fig. 3-22 囊胞在  $T^*=1.0$  能量隨表面積增加率之變化圖。



(a) 自由能及內能之變化圖。



(b) 熵之變化圖。

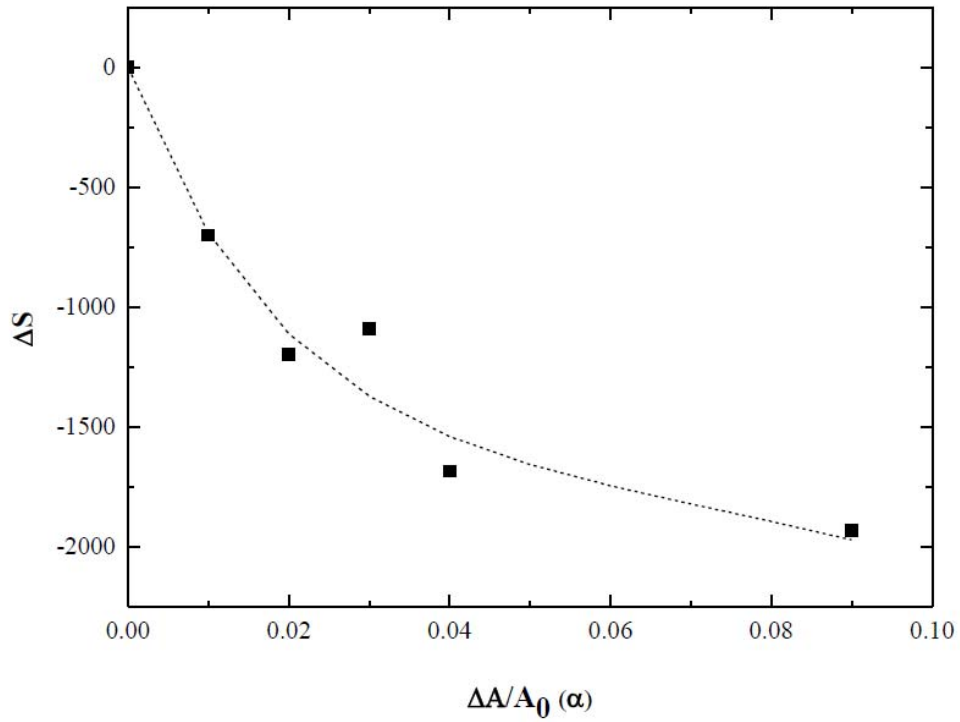


Fig. 3-23 囊胞在  $T^*=1.3$  能量隨表面積增加率之變化圖。

### 3-2 改變脂質分子尾端長鏈段性質的影響

在這一節當中，我們變更了脂質分子尾端疏水鏈段的參數，來探討溫度對不同種類囊胞的影響，除了上一節  $a_{BW50}$  的囊胞外，加入了  $a_{BW45}$  和  $a_{BW70}$  囊胞的模擬。在上一節提到， $a_{BW50}$  的脂質分子在溫度高於 0.8 時，能夠將起始結構開的口合起來形成囊胞的結構。而當脂質分子尾端疏水鏈段的參數為 45 時，溫度必須高於 0.84 才能夠穩定的將開口合起。當脂質分子尾端疏水鏈段的參數為 70 時，溫度只要高於 0.7 就能夠將開可合起了。也就是脂質分子尾端疏水鏈段的參數越大，疏水性越高，可以在越低的溫度形成囊胞。這點是很好理解的，因為若是無法將洞補起來，那麼邊緣一定會有些許的疏水鏈段暴露在親水溶劑中，若是疏水性越高，必然要盡量避免疏水鏈段接觸到親水溶劑，因此也就越容易將原本在邊緣的洞補起來。

不論脂質分子尾端疏水鏈段的參數為何，囊胞的大小都會隨著溫度的上升而變大，而越親水的脂質分子形成的囊胞，整體的大小較疏水的脂質分子形成的囊胞大，這是因為親水的原故，所以內部的水粒子數量越多造成囊胞的大小越大，如同 **Fig. 3-24**、**Fig. 3-25** 所示。

觀察 **Fig. 3-26** 和 **Fig. 3-27** 的結果，首先我們可以發現疏水的脂質分子排列的整齊度高於親水的脂質分子，因為疏水的原故，排列的越整齊、越緊密可以避免接觸到親水溶劑。而整齊度高自然也會使得脂雙層膜兩層之間拉的越開，膜的厚度也就越高。整體而言，不論是哪一種囊胞，膜的厚度與整齊度都隨著溫度的上升而下降。

根據 3-1 的方法我們可以找出不同參數下囊胞的相轉移溫度，從 **Fig. 3-24** 至 **Fig. 3-28** 的圖中，黑色代表  $a_{BW45}$  的數據以及相轉移溫度，紅色代表  $a_{BW50}$ ，藍色代表  $a_{BW70}$ 。可以發現隨著脂質分子的尾端鏈段越疏水，第二相轉移的溫度越高，第一相轉移的溫度越低，rippled phase 的範圍越大。而三種不同參數的囊胞，在第二相轉移溫度之後，囊胞的 order parameter 的值剛好都低於 0.3，這一個值剛好是液晶最小的排列整齊度。換個角度來想，若是以 order parameter 低於 0.3 當作是第二相轉移的標準，則疏水的囊胞原先的 order parameter 較大，要降到 0.3 以下必然得提高較多的溫度，因此第二相轉移溫度也越高。

從 Fig. 3-28 可以看到表面張力隨著溫度的變化。不論是那一組的囊胞，其表面張力隨著溫度的變化並沒有太大的差異，低溫時表面張力為 0，當超過第一相轉移溫度之後，表面張力開始變大，直到超過第二相轉移溫度之後，表面張力開始隨溫度上升而下降。將不同參數的表面張力進行比較，在第二相轉移溫度之前，可以發現當  $a_{BW}$  越小，囊胞的表面張力就越大。因為此時囊胞接近 gel phase 的型態， $a_{BW}$  小的時候 order parameter 也小，所以表面張力就會較大。但在超過第二相轉移溫度之後，囊胞進入了 liquid disordered phase，反而  $a_{BW}$  越小，囊胞的表面張力就越小，因為在這個階段，囊胞接近液相的型態，使得表面張力隨溫度增加而降低，而  $a_{BW}$  越大，也就是越疏水，會導致疏水鏈段排的較整齊，囊胞越不像液相的型態，因此表面張力的下降就比較緩慢。

Fig. 3-29 為不同親疏水性的囊胞的滲透率隨著溫度的變化。整體來看，囊胞的滲透率隨著溫度的提升而變大。 $a_{BW}$  越小囊胞越親水，因此水粒子就容易通過膜，滲透率就會比較大，當溫度越高，不同親疏水性囊胞的滲透率差異就變得更加顯著。 $a_{BW}70$  的時候因為太疏水了，即使提高溫度也很難增加滲透率。

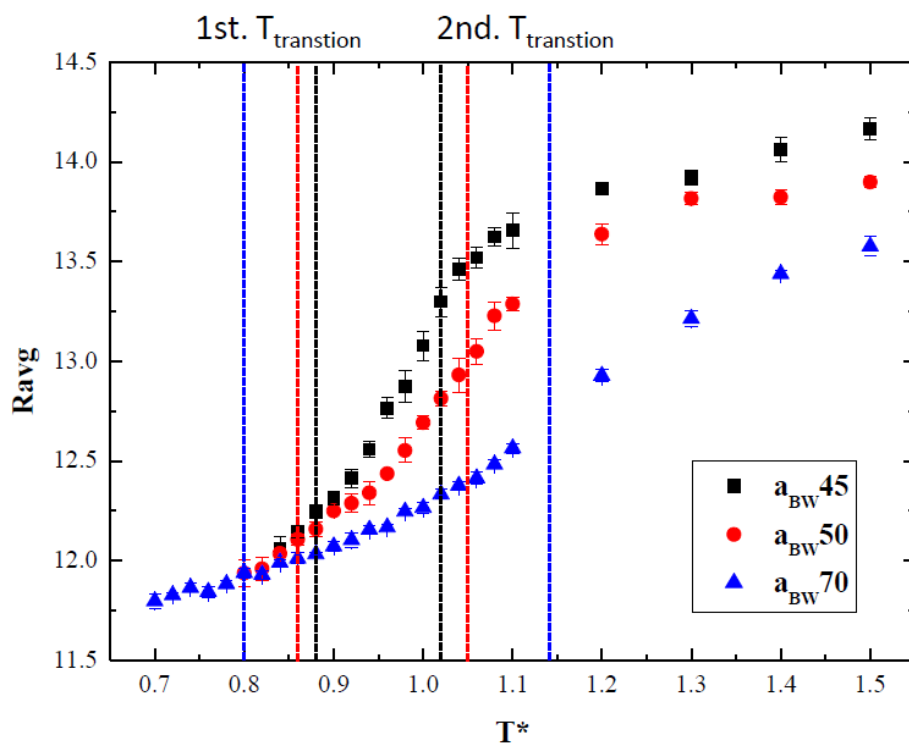


Fig. 3-24 不同  $a_{BW}$  囊胞平均半徑隨溫度之變化圖。

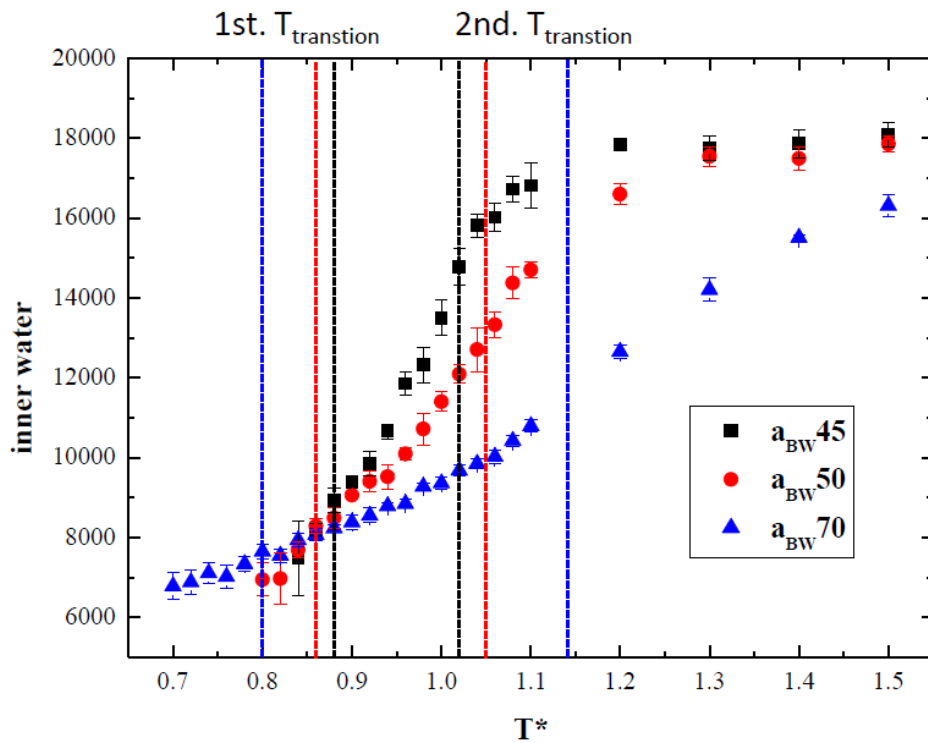


Fig. 3-25 不同  $a_{BW}$  囊胞內部水區隨溫度之變化圖。

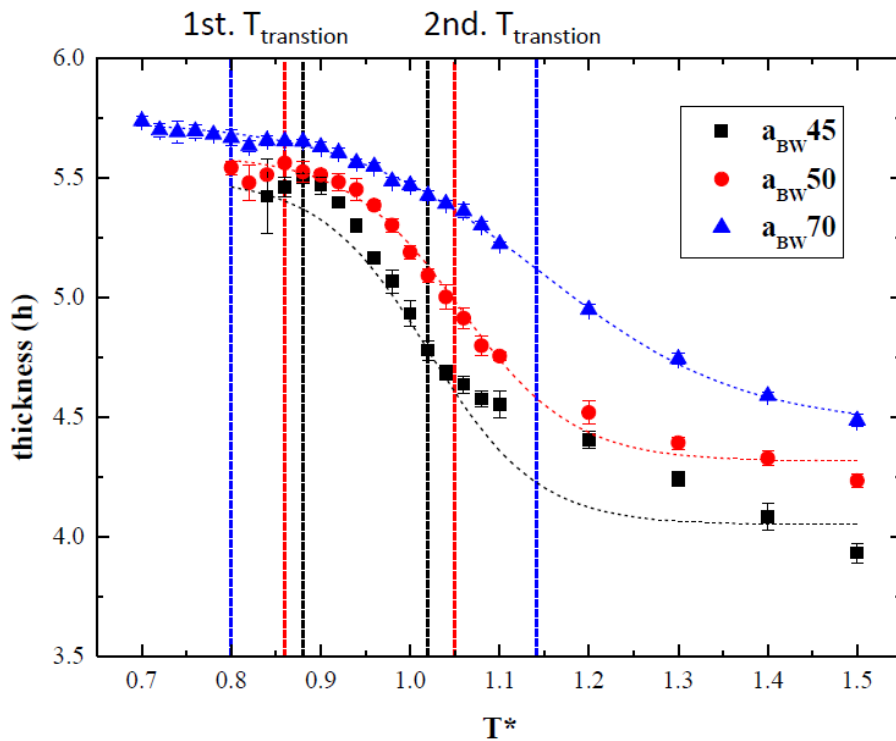


Fig. 3-26 不同  $a_{BW}$  囊胞厚度隨溫度之變化圖。

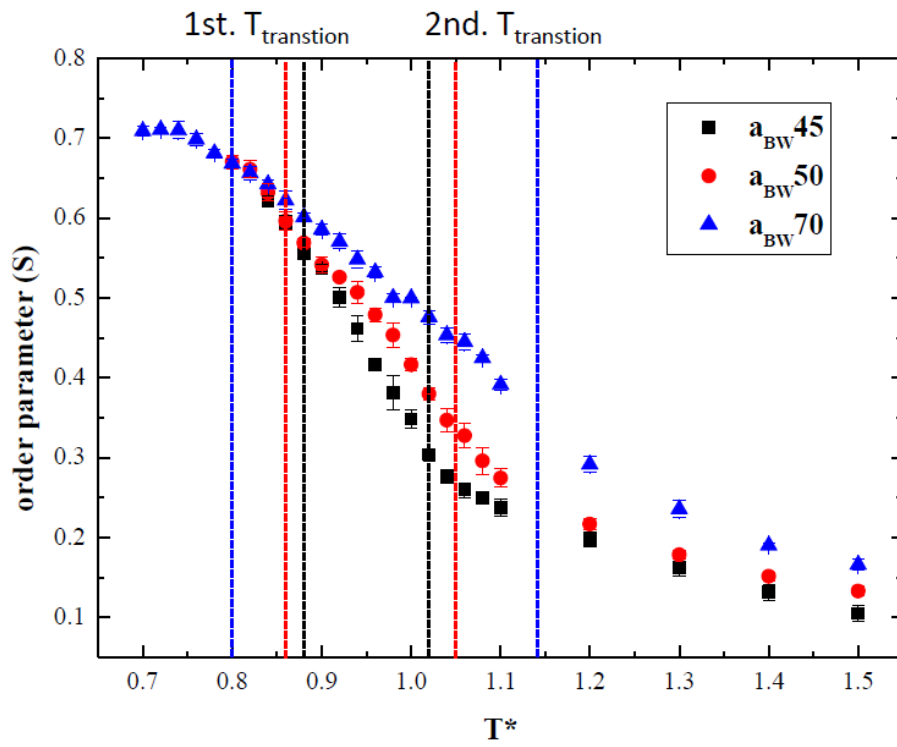
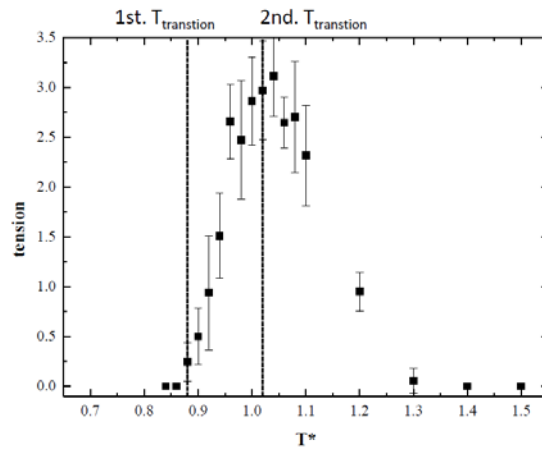


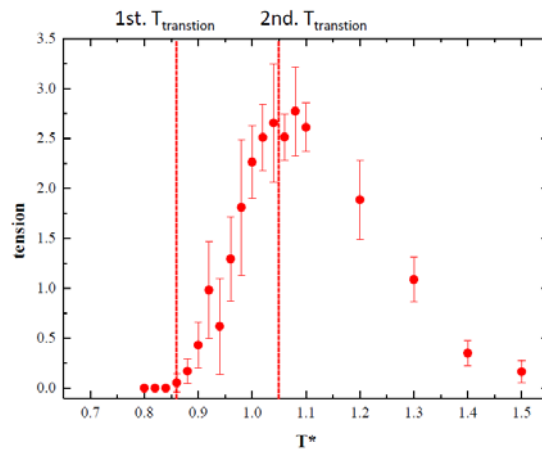
Fig. 3-27 不同  $a_{\text{BW}}$  囊胞 order parameter 隨溫度之變化圖。



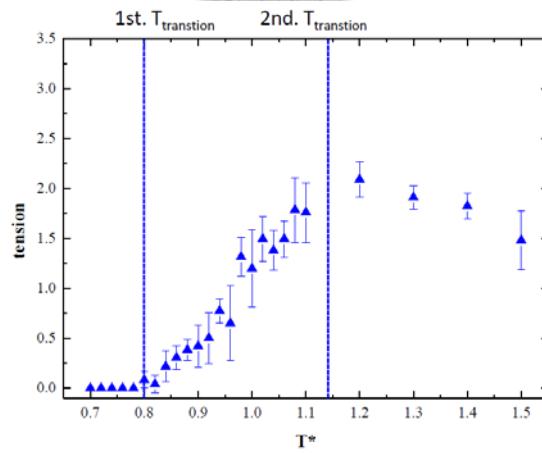
(a)  $a_{BW}=45$



(b)  $a_{BW}=50$



(c)  $a_{BW}=70$



**Fig. 3-28** 不同  $a_{BW}$  囊胞表面張力隨溫度之變化圖。

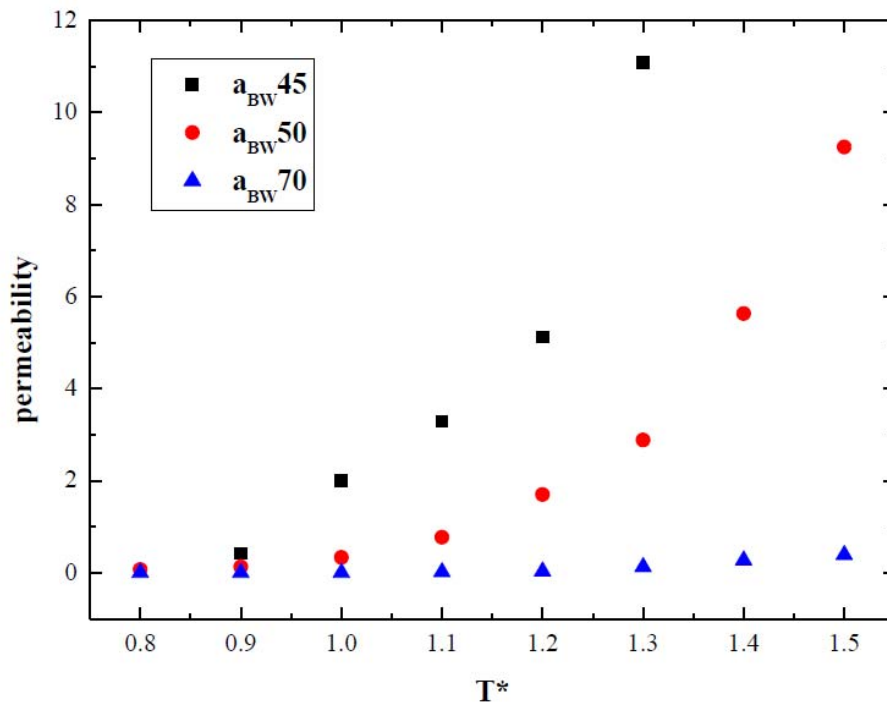


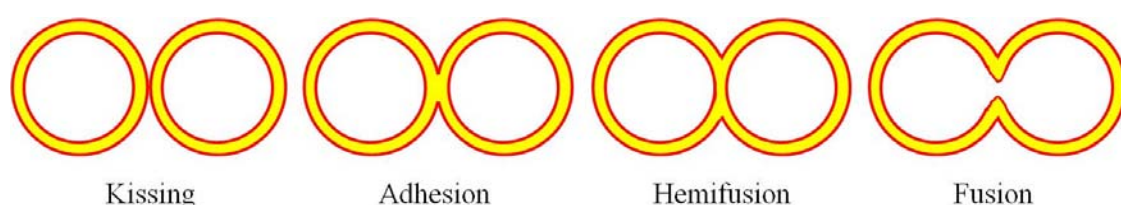
Fig. 3-29 不同  $a_{BW}$  囊胞 permeability 隨溫度之變化圖。

### 3-3 融合程序(Fusion Process)

囊胞被大量應用於藥物釋放的領域上，而良好的藥物適放必須使載體能夠穩定的到達治療的部位，使囊胞與細胞膜進行融合，並以適當的速率釋放藥物，才能達到良好的療效，因此在這個章節我們將進行囊胞融合程序的模擬。前面的章節探討了囊胞性質隨著溫度的變化，在此我們將不同溫度系統下平衡的囊胞進行融合的模擬，比較不同溫度以及不同脂質分子尾端鏈段性質對於融合程序的影響。根據 1-4 節所述，我們在模擬之前預期當囊胞的表面張力越大，囊胞所須的融合時間就越短。

我們將達到平衡的囊胞，複製成兩顆放到一個兩倍大也就是  $90 \times 45 \times 45$  的系統中。為了避免浪費不必要的時間，我們將兩個囊胞擺的很近，如 Fig. 3-30 最左邊的 kissing 階段，以免囊胞在系統中無法發生碰撞。而模擬的時間設定為 500,000 至 1,000,000 步，視融合完成的情況做適度的增減。在囊胞融合的過程中，參考文獻後定義了囊胞融合的四個階段，如同 Fig. 3-30。Kissing 指的是兩顆囊胞靠得很

近，脂雙層膜的最外圍的親水端已經接觸；adhesion 代表兩顆囊胞之脂雙層膜的最外圍已經黏在一起，黏住的部份表面的脂質分子像旁邊移動，使得兩個囊胞的疏水鏈段開始能夠接觸，剖面圖看起來像 8 字型，但此時囊胞接觸的地方大致還是呈現兩個脂雙層膜；hemifusion 為中間接觸的面積擴大，親水端向外擴張，脂雙層膜中的疏水鏈段互通面積增加，此時囊胞接觸的地方共用一個脂雙層膜；最後一階段為 fusion，此時兩囊胞的內部水相區已互通，原本中間接觸的地方已經完全打開完成融合。在我們研究中，定義囊胞融合的時間為 adhesion 至 fusion 所需的時間。



**Fig. 3-30** 囊胞融合程序的四個階段。

首先，我們將脂質分子疏水鏈段對水的參數為 50 的囊胞進行融合的模擬，選擇的溫度為  $T^* = 0.9$ 、 $1.0$ 、 $1.1$  和  $1.3$ ，**Fig. 3-31** 至 **Fig. 3-34** 分別為融合過程截取的切片圖。**Fig. 3-35** 囊胞融合所需時間隨溫度之變化圖， $T^* = 1.3$  時因為囊胞僅能夠到達 hemifusion 的階段，因此並未在圖上標示，而  $T^* = 1.1$  時雖然在圖上標示的時間是 244,000 步，但實際上在模擬的時候，僅有一半的機會囊胞能夠達到 fusion 的階段，另一半只停留在 hemifusion 的階段。因此我們可以得到溫度越高，囊胞需要越多的時間完成融合。然而參照 **Fig. 3-14** 表面張力隨溫度的變化，卻發現以上的模擬結果並沒有完全符合文獻上所提到的，表面張力越大囊胞越容易融合的論點，僅有在  $T^* = 1.3$  時表面張力小，囊胞也越難融合，只停留在 hemifusion 的階段。 $T^* = 0.9 \sim 1.1$  時，囊胞隨著表面張力變大，融合越不容易。因此在這邊只有兩個可能，一是我們的模擬發生問題，二是可能有表面張力以外的因素影響囊胞的融合。

接著我們固定了溫度在  $T^* = 1.0$ ，將脂質分子疏水鏈段對水的參數為 45 以及 70 的囊胞進行融合的模擬。模擬的結果如同 **Fig. 3-36**、**Fig. 3-37**，將上述結果整理可以得到 **Fig. 3-38** 溫度在 1.0 時囊胞融合時間隨  $a_{BW}$  之變化。可以發現在  $a_{BW}$  越大時，融合所需要的時間越短，同時參考 3-2 的結果，我們知道  $a_{BW}$  越大時囊胞的表面張力越小，因此在這邊又出現了與上一段相同的結果，表面張力越大並沒有使得



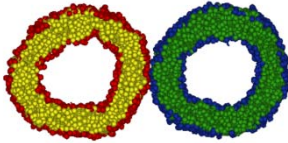
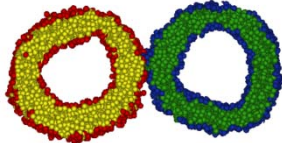
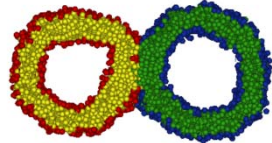
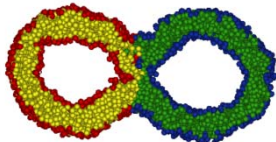
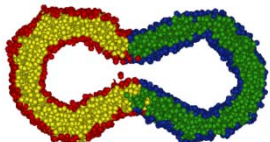
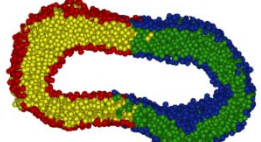
囊胞越容易融合。連續兩組的模擬都發生與文獻並不相符的現象，因此我們猜想很可能有表面張力以外的因素影響囊胞的融合程序，而我們假設可能影響的原因是囊胞的滲透率，因為上面的兩組模擬都出現了這樣子的現象：當囊胞的滲透率越小時，融合越容易發生。

比較在  $T^*=1.0$  時  $a_{BW}=45$  與  $a_{BW}=50$  囊胞的性質，雖然  $a_{BW}=45$  的囊胞表面張力較大( $tension_{45}/tension_{50}=1.27$ )，但  $a_{BW}=45$  的囊胞的滲透率與  $a_{BW}=50$  的囊胞相比卻更大( $permeability_{45}/permeability_{50}=5.93$ )，因此滲透率對於囊胞融合的影響較顯著， $a_{BW}=45$  的囊胞隨著滲透率越大而融合時間越久。而  $a_{BW}=50$  的囊胞與  $a_{BW}=70$  的囊胞相比， $a_{BW}=70$  的囊胞表面張力較小( $tension_{70}/tension_{50}=0.53$ )，但滲透率降低的比率卻更大( $permeability_{70}/permeability_{50}=0.03$ )，因此同樣的滲透率對於囊胞融合的影響較顯著， $a_{BW}=70$  的囊胞隨著滲透率越小而融合時間越短。

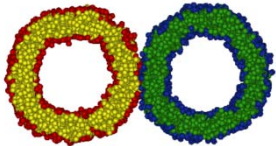
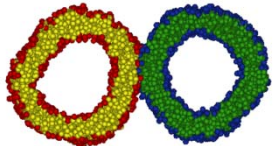
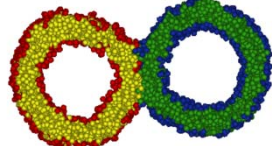
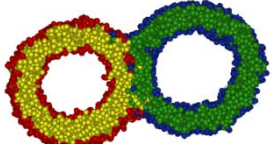
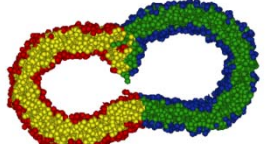
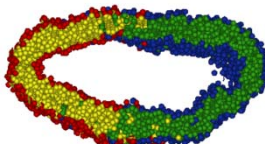
此外，在  $T^*=1.3$  時  $a_{BW}=50$  的囊胞會停留在 hemifusion 的階段，我們將這一組的囊胞分別在中間的水區注入約 5000 和 10000 個水粒子，經過 100,000 步的平衡後進行融合的模擬。在注入水之後，囊胞的滲透率以及表面張力都有上升，滲透率分別增加了 1.04 與 1.31 倍，而表面張力分別增加了 4.59 以及 6.05 倍，表面張力的影響較大，融合的時間也隨著壓力的增大而縮短，分別為 55,000 與 40,000 步。

回顧我們實驗室之前所作的模擬，不同濃度的脂質分子( $T^*=1.0$ ， $a_{BW}=50$ )形成的囊胞，當濃度越小時，囊胞越小顆表面張力也越大，同時融合的時間也隨著囊胞壓力變大而更快。現在我們進一步的做了滲透率的模擬，結果發現隨著濃度的變化，囊胞的滲透率並沒有太大的變化，大約都維持在 0.34 左右。因此在這一組的融合模擬當中，囊胞的表面張力扮演了關鍵的角色，融合的時間隨著表面張力變大而縮短。

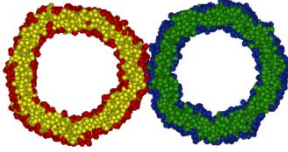
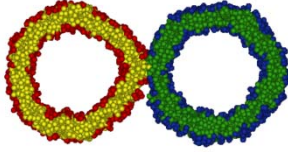
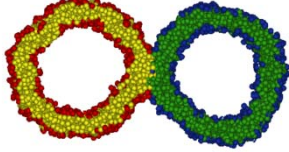
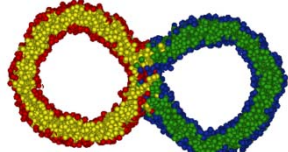
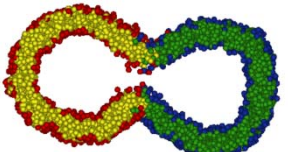
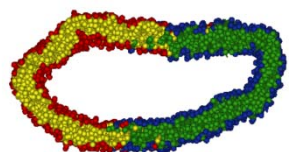
根據上面幾組討論的結果，我們發覺除了文獻上所提到的表面張力之外，囊胞的滲透率也扮演了影響融合的因素。表面張力增大會縮短融合的時間，但滲透率增大則會增加融合的時間，這兩者變化比較大的會影響融合的結果。

initial	kissing : 30,000	adhesion : 90,000
		
hemifusion : 115,000	fusion : 170,000	final : 500,000
		

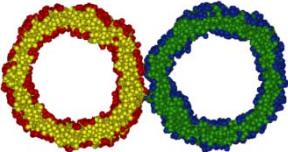
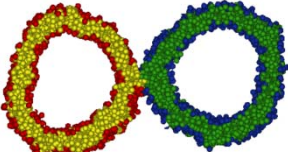
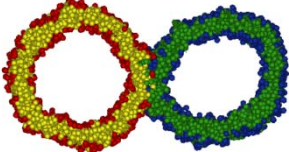
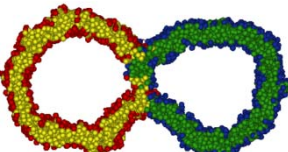
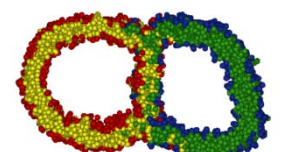
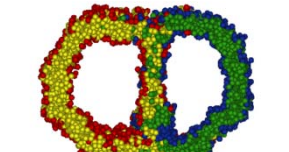
**Fig. 3-31**  $a_{BW}=50$ 、 $T^*=0.9$  囊胞融合過程。

initial	kissing : 30,000	adhesion : 65,000
		
hemifusion : 180,000	fusion : 255,000	final : 500,000
		

**Fig. 3-32**  $a_{BW}=50$ 、 $T^*=1.0$  囊胞融合過程。

initial	kissing : 15,000	adhesion : 40,000
		
hemifusion : 150,000	fusion : 240,000	final : 500,000
		

**Fig. 3-33**  $a_{BW}=50$ 、 $T^*=1.1$  囊胞融合過程。

initial	kissing : 90,000	adhesion : 125,000
		
hemifusion : 180,000	hemifusion : 500,000	final : 900,000
		

**Fig. 3-34**  $a_{BW}=50$ 、 $T^*=1.3$  囊胞融合過程。

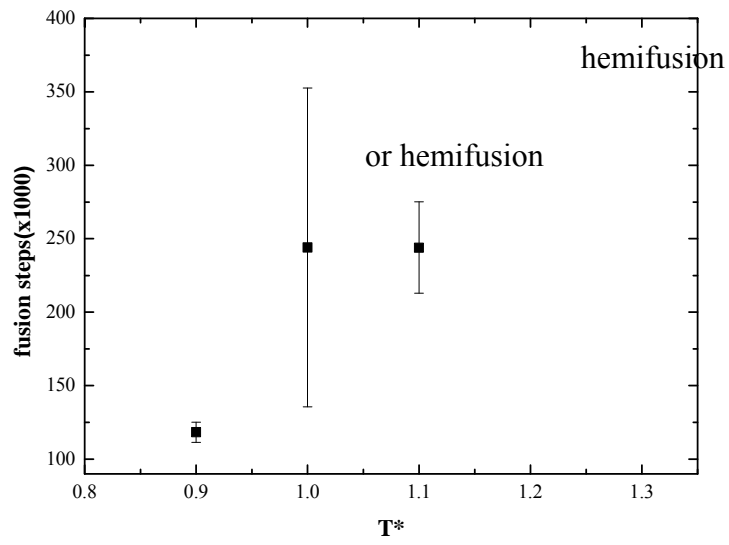
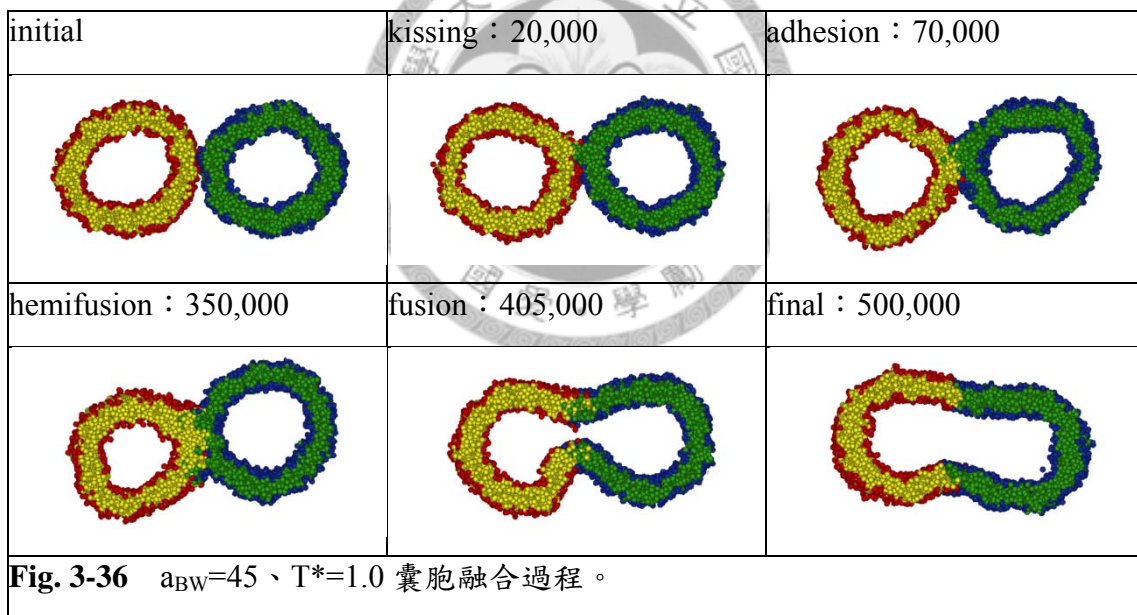
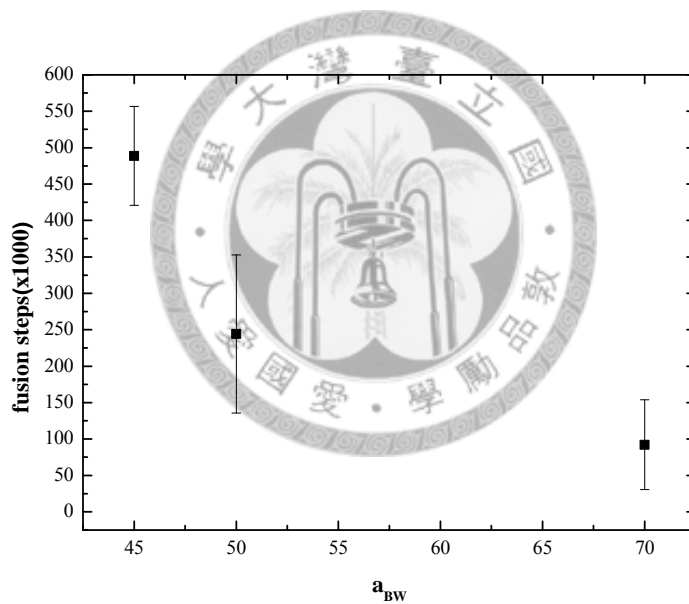
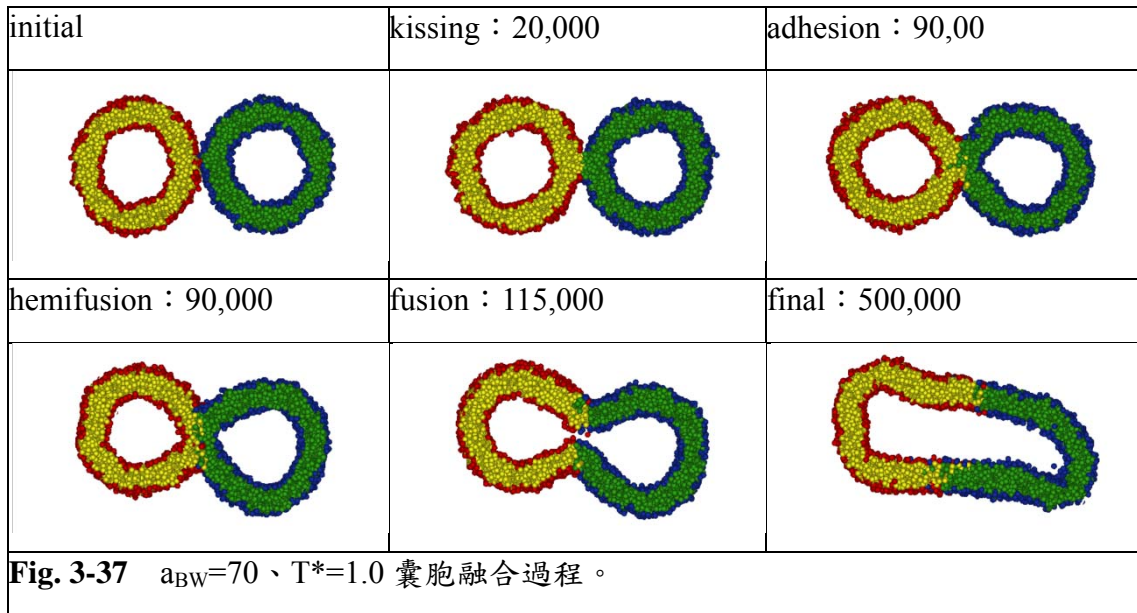


Fig. 3-35 囊胞融合所需時間隨溫度之變化圖。





**Fig. 3-38** 囊胞在  $T^*=1.0$  時，融合時間隨  $a_{BW}$  之變化圖。

## Chapter 4 結論

---

溫度的高低，會影響由脂質分子所形成的脂雙層膜的型態。而囊胞也是由脂質分子形成的脂雙層結構，自然也會受到溫度的影響，膜的型態隨著溫度的變化將會從 tilted gel phase 變成 rippled phase 最後變成 liquid diordered phase。本研究首先將濃度固定的脂質分子在不同溫度之下平衡形成囊胞，探討囊胞的各項基本性質受溫度的影響，例如大小、厚度、含水量、表面張力、order parameter、packing parameter、滲透率等，並找出囊胞的相轉移溫度，之後更進一步的研究不同溫度之下囊胞的伸展模數。接著我們比較了當囊胞本身親疏水性的不同，在溫度的效應之下有什麼不同的特點。最後結合以上的結果，將囊胞更進一步的進行融合的模擬。

由脂質分子尾端疏水鏈段對水的參數 50 以及體積濃度為 0.06 的起始結構進行模擬，我們發現當溫度高於 0.8 的時候，脂質分子能夠修補起始結構的破洞，形成穩定的囊胞結構。T\*=0.8 時囊胞是 tilted gel phase 的型態，此時囊胞疏水鏈段排列整齊，膜的局部呈現平板的型態，膜厚維持一穩定的大小，表面張力為 0。隨著溫度的變化在溫度高於 0.86 之後進行第一次的相轉換，此時轉變為 rippled phase 的型態，囊胞的排列開始變差，order parameter 開始下降，膜的局部呈現波浪狀的型態，某些部份維持原先 gel phase 的型態，某些地方開始變成了 liquid disordered phase 的型態，囊胞有的地方厚有的地方薄。隨著溫度的提升膜的表面張力、囊胞的大小、滲透率以及含水量變大，膜厚度變小。當溫度超過 1.05 之後，囊胞進行了第二次的相轉換，由 rippled phase 變成了 liquid diordered phase。此始疏水鏈段的排列雜亂，兩層的尾端互相交錯，order parameter 下降到 0.3 以下，膜的厚度依然隨著溫度的上升而下降，但整體卻變得較均勻。膜的表面張力在 liquid disordered phase 的階段轉變成為隨著溫度的上升而下降。

接著我們做了伸展模數的模擬，我們發現在第二相轉移溫度之前，囊胞的伸展膜數隨著溫度的上升而下降；第二相轉移溫度之後，伸展膜數隨著溫度的上升而上升。更進一步的分析系統內部的能量，可以得知在第二相轉移溫度之前囊胞

充水拉伸的行為受到 enthalpy 的主導，伸展的過成是容易的，因此囊胞的伸展膜數隨著溫度的上升而下降。在第二相轉移溫度之後囊胞充水拉伸的行為受到 entropy 的主導， $\Delta S < 0$ ，拉伸的行為受到抗拒，因此伸展膜數隨著溫度的上升而上升。

除了 a<sub>BW</sub>50 的囊胞之外，接著我們比較了不同親疏水性的囊胞受溫度的影響。囊胞的各項性質受到溫度影響的變化趨勢是相同的，但是越疏水的囊胞，越不喜歡變成 liquid disordered phase 的型態，同時也能夠在更低的溫度形成囊胞。此外越疏水的囊胞，第一相轉移溫度較低，第二相轉移溫度較大，rippled phase 的範圍比較大。

在本研究的最後，我們將上述不同條件下平衡的囊胞進行融合的模擬。但卻發現與文獻上不同的現象，囊胞並不完全隨著表面張力的增大，而更容易融合。結合本實驗室之前研究的融合的結果，我們推測除了表面張力之外，囊胞的滲透率可能也扮演了影響融合的角色，滲透率越大，囊胞越不容易融合。而若是表面張力與滲透率的影響互相對抗，變化較大的條件將主導融合的趨勢。



## Chapter 5 參考文獻

---

- [1] Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Watkins, J. C., *J. Mol. Biol.* **1965**, *13* (1), 238-252.
- [2] Gao, L. H.; Lipowsky, R.; Shillcock, J., *Soft Matter* **2008**, *4* (6), 1208-1214.
- [3] Lasic, D. D., *Trends in Biotechnology* **1998**, *16* (7), 307-321.
- [4] Mayer, L. D.; Hope, M. J.; Cullis, P. R.; Janoff, A. S., *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *817* (1), 193-196.
- [5] Enoch, H. G.; Strittmatter, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1979**, *76* (1), 145-149.
- [6] Hope, M. J.; Bally, M. B.; Webb, G.; Cullis, P. R., *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1985**, *812* (1), 55-65.
- [7] Abramson, M. B.; Katzman, R.; Gregor, H. P., *J. Biol. Chem.* **1964**, *239* (1), 70-76.
- [8] Yang, B.; Furusawa, K.; Matsumura, H., *Langmuir* **2003**, *19* (21), 9023-9027.
- [9] Vamvakaki, V.; Chaniotakis, N. A., *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22* (12), 2848-2853.
- [10] Oberholzer, T.; Luisi, P. L., *J. Biol. Phys.* **2002**, *28* (4), 733-744.
- [11] Gregoriadis, G., *N. Engl. J. Med.* **1976**, *295* (13), 704-710.
- [12] Zeng, X. M.; Martin, G. P.; Marriott, C., *Int. J. Pharm.* **1995**, *124* (2), 149-164.
- [13] Papahadjopoulos, D.; Allen, T. M.; Gabizon, A.; Mayhew, E.; Matthay, K.; Huang, S. K.; Lee, K. D.; Woodle, M. C.; Lasic, D. D.; Redemann, C.; Martin, F. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88* (24), 11460-11464.
- [14] Allen, T. M.; Hansen, C.; Martin, F.; Redemann, C.; Yauyoung, A., *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1066* (1), 29-36.
- [15] Lasic, D. D.; Papahadjopoulos, D., *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **1996**, *1* (3), 392-400.
- [16] Woodle, M. C.; Lasic, D. D., *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1113* (2), 171-199.
- [17] Kawakami, S.; Munakata, C.; Fumoto, S.; Yamashita, F.; Hashida, M., *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90* (2), 105-113.
- [18] Lasic, D. D., *Applications of liposomes*. Elsevier Science Publishers B.V.; Elsevier Science Publishing Co., Inc.: The Netherlands., **1995**; p 491-519.
- [19] Koynova, R.; Caffrey, M., *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1376*, 91-145.



- [20] Jørgensen, K. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1240*, 111–114.
- [21] Heimburg, T. *Biophys. J.* **2000**, *78*, 1154–1165.
- [22] Tardieu, A.; Luzzatti, V.; Reman, F. C. *J. Mol. Biol.* **1973**, *75*, 711–733.
- [23] Woodward, J. T.; Zasadzinski, J. A. *Biophys. J.* **1997**, *72*, 964–976.
- [24] Sun, W.-J.; Tristram-Nagel, S.; Suter, R. M.; Nagle, J. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 7008–7012.
- [25] Sengupta, K.; Raghunathan, V. A.; Katsaras, J. *Phys. Rev. E* **1999**, *59*, 2455–2457.
- [26] Wilschut, J.; Duzgunes, N.; Papahadjopoulos, D., *Biochemistry* **1981**, *20* (11), 3126-3133.
- [27] Connor, J.; Yatvin, M. B.; Huang, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1984**, *81* (6), 1715-1718.
- [28] Schenkman, S.; Araujo, P. S.; Dukman, R.; Quina, F. H.; Chaimovich, H., *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1981**, *649* (3), 633-641.
- [29] Blumenthal, R.; Henkart, M.; Steer, C. J., *J. Biol. Chem.* **1983**, *258* (5), 3409-3415.
- [30] Kasbauer, M.; Lasic, D. D.; Winterhalter, M., *Chem. Phys. Lipids* **1997**, *86* (2), 153-159.
- [31] Lentz, B. R., *Eur. Biophys. J. Biophys.* **2007**, *36* (4-5), 315-326.
- [32] Liang, E.; Hughes, J. A., *J. Membr. Biol.* **1998**, *166* (1), 37-49.
- [33] Shillcock, J. C.; Lipowsky, R., *Nat. Mater.* **2005**, *4* (3), 225-228.
- [34] Ohki, S., *J. Membr. Biol.* **1984**, *77* (3), 265-275.
- [35] Smeijers, A. F.; Markvoort, A. J.; Pieterse, K.; Hilbers, P. A. J., *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (26), 13212-13219.
- [36] Hoogerbrugge, P. J.; Koelman, J., *Europhys. Lett.* **1992**, *19* (3), 155-160.
- [37] Groot, R. D.; Warren, P. B., *J. Chem. Phys.* **1997**, *107* (11), 4423-4435.
- [38] Nielsen, S. O.; Lopez, C. F.; Srinivas, G.; Klein, M. L., *J. Phys.: Condens. Matter* **2004**, *16* (15), R481-R512.
- [39] Espanol, P.; Warren, P., *Europhys. Lett.* **1995**, *30* (4), 191-196.
- [40] Allen, M. P. ; Tildesley, D. J., *Computer Simulation of Liquids*. Clarendon Press: Oxford, England, **1987**.
- [41] Brandrup, J.; Immergut, E. H.; Grulke, E. A.; Abe, A.; Bloch, D. R., *Polymer Handbook*. 4<sup>th</sup> ed.; John Wiley: New York, **1999**.
- [42] Venturoli, M. ; B. Smit; M. M. Sperotto. , *J. Biophys.* **2005**, *88*, 1778–1798.

- [43] C.-M. Lin, C.-H. Li, D. Wu, H.-K. Tsao and Y.-J. Sheng, *Langmuir*, **2012**, 28, 689.

