

破解膜孔之谜：双 **CV** 联手揭示 从成核到扩展的完整能量图景

Free Energy of Membrane Pore Formation and Stability from Molecular
Dynamics Simulations

高旭帆

Institute of Quantitative Biology

October 21, 2025



发表论文



浙江大学 定量生物中心
INSTITUTE OF QUANTITATIVE BIOLOGY
ZHEJIANG UNIVERSITY

通讯作者 (Corresponding Author)

Robert Vácha

CEITEC and NCBR, Faculty of Science
Masaryk University, Brno, Czech Republic



vacha.ceitec.cz | Google Scholar

研究方向:

膜蛋白相互作用、抗菌肽、多尺度分子模拟

第一作者 (First Author)

Timothée Rivel

CTO at InSiliBio
Université de Franche-Comté, France
www.insilibio.com

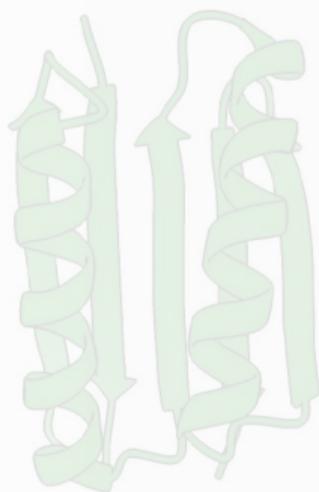


专业领域:
计算生物物理、膜动力学、增强采样方法

发表: *J. Chem. Inf. Model.* **65**, 908–920 (2025) | DOI: [10.1021/acs.jcim.4c01960](https://doi.org/10.1021/acs.jcim.4c01960)

背景和意义

Background





膜孔形成：从抗菌肽到电穿孔的关键过程



生物学意义：膜孔形成是理解细胞防御机制和设计治疗策略的关键。

- 抗菌肽：诱导孔形成破坏细胞屏障
- 药物递送：控制跨膜物质运输
- 电穿孔：促进大分子受控递送
- 细胞生物学：基本膜转运机制

实验局限：中子散射、固态 NMR、AFM 等虽能提供信息，但存在根本缺陷：

- 静态快照难以捕捉瞬态机制，追踪纳秒动态过程
- 原子尺度分辨率不足
- 缺乏定量自由能学数据

MD 模拟优势：

- 获得完整结构动态信息，准确量化膜线张力和成核能垒，解决成核与扩展统一描述难题

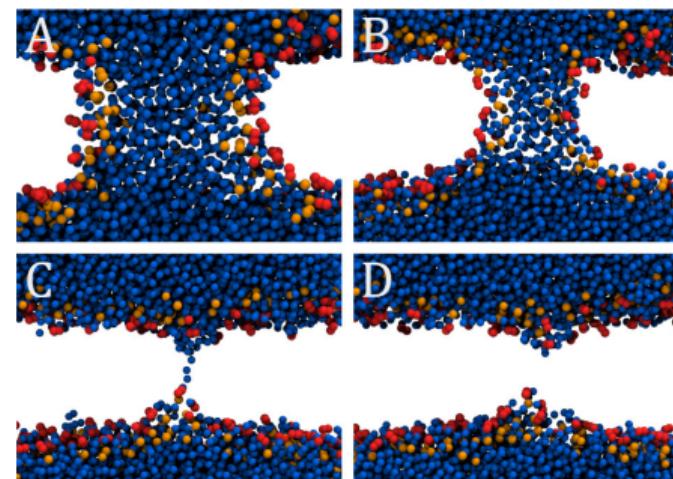


图 3：孔闭合的四个阶段。（A）平衡孔，水
线贯穿膜；（B）半径缩小，脂质重排；（C）
临界瞬间，仅剩水线；（D）孔闭合，膜恢复。



挑战：统一描述成核与扩展两个截然不同的阶段



浙江大学 定量生物中心
INSTITUTE OF QUANTITATIVE BIOLOGY
ZHEJIANG UNIVERSITY

现有方法的问题：

1. 传统 CV 难以统一描述成核和扩展
2. 常出现滞后现象和收敛问题
3. 不同力场预测准确性差异大
4. 缺乏快速评估膜稳定性的方法

为什么这很难：

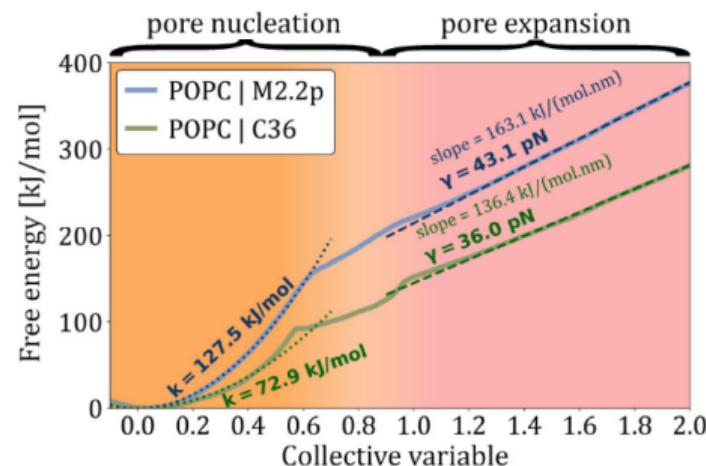
- 成核：极性重原子数量变化
- 扩展：孔半径线性增长
- 两者物理机制，需要无缝切换的描述

时间尺度：

成核 \sim ns, 扩展 \sim μ s, 自发形成 \sim ms

核心挑战

如何通过 MD 模拟准确量化膜孔形成全过程（成核 + 扩展），并可靠预测不同条件下的膜线张力？不同离子条件下的膜线张力如何变化？





研究概览：问题、方法与核心发现

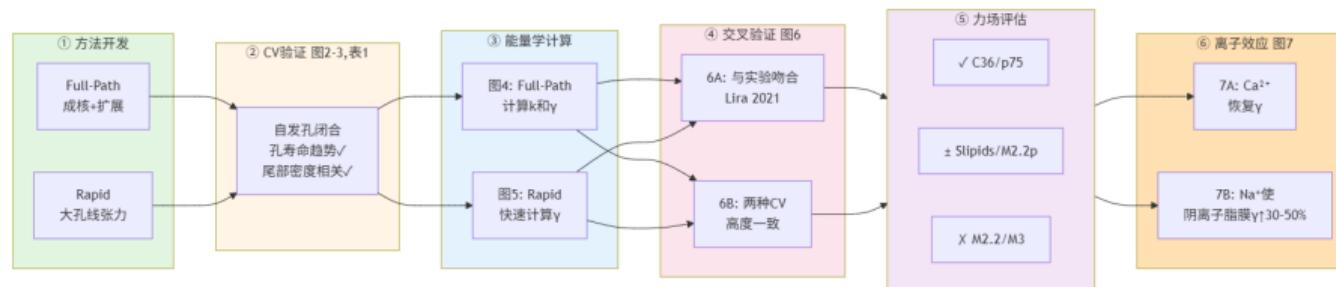


方法创新：

- 双 CV 策略: Full-Path CV (成核 + 扩展统一) + Rapid CV (快速评估)
- Sigmoid 切换函数实现平滑过渡
- 多力场对标验证
(CHARMM36/M2.2p/prosECCo75)

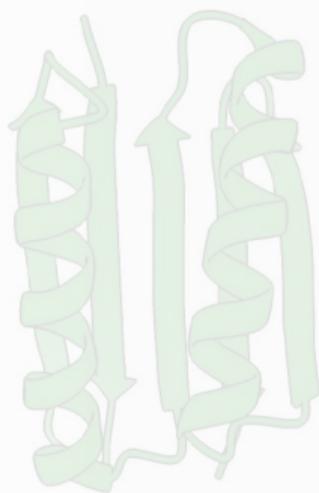
核心发现：

- 线张力直接反映膜孔稳定性
- PG 脂质含量增加导致线张力降低
- Ca^{2+} 恢复膜稳定, Na^+ 增强阴离子效应
- 力场选择关键 (C36 精确, M2.2p 低估)



方法

Methods





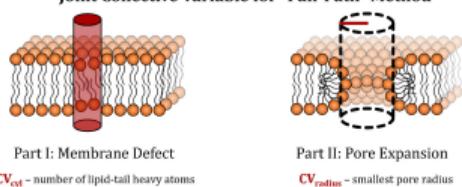
创新：双 CV 策略破解成核-扩展统一描述难题



浙江大学 定量生物中心
INSTITUTE OF QUANTITATIVE BIOLOGY
ZHEJIANG UNIVERSITY

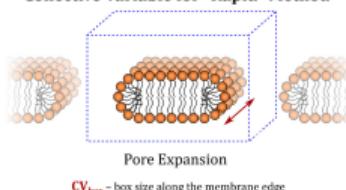
Full-Path CV

Joint Collective Variable for "Full-Path" Method



Rapid CV

Collective Variable for "Rapid" Method



- 成核 + 扩展统一
- 尾部密度驱动
- 无滞后、可逆
- 平滑切换

- 无限大孔模拟
- 脂质条带构型
- 线张力快速评估
- 效率提高数倍

开源实现

PLUMED

- PLUMED 库实现
- GROMACS/LAMMPS
- 全原子/粗粒化
- 参数可定制



Full-Path: 切换函数巧妙结合成核与扩展



成核部分 \mathbf{CV}_{cyl} :

$$\mathbf{CV}_{\text{cyl}} = 1 - d/\mathbf{CV}_{\text{eq}}$$

d : 圆柱内脂质尾部原子数

扩展部分 $\mathbf{CV}_{\text{radius}}$:

$$\mathbf{CV}_{\text{radius}} = r_{\text{min}}/r_{\text{unit}}$$

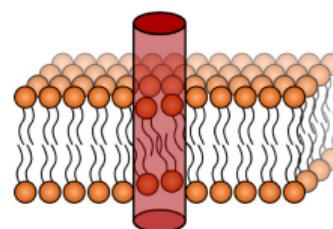
r_{min} : 孔中心到最近脂质距离

联合 \mathbf{CV} :

$$\mathbf{CV} = \mathbf{CV}_{\text{cyl}} s_1 + \mathbf{CV}_r s_2$$

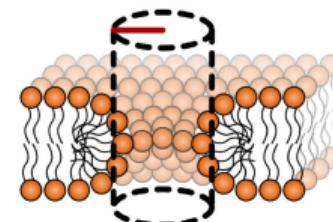
权重函数平滑切换

Joint Collective Variable for “Full-Path” Method



Part I: Membrane Defect

\mathbf{CV}_{cyl} – number of lipid-tail heavy atoms within a cylindrical volume



Part II: Pore Expansion

$\mathbf{CV}_{\text{radius}}$ – smallest pore radius

图 1: Full-Path CV 设计。同时追踪成核（圆柱内尾部密度 \mathbf{CV}_{cyl} ）和扩展（孔半径 \mathbf{CV}_r ）；通过 sigmoid 切换函数平滑过渡。



平滑过渡: sigmoid 函数消除成核-扩展边界



切换函数 s_1, s_2 :

$$s_1 = \frac{1}{1 + e^{\alpha(CV_r - CV_0)}}$$

$$s_2 = \frac{1}{1 + e^{-\alpha(CV_r - CV_0)}}$$

- $\alpha = 20$: 陡峭
- $CV_0 = 0.95$: 切换点
- $CV < 0.95$: 主导 CV_{cyl}
- $CV > 0.95$: 主导 CV_{radius}

关键优势:

- 平滑过渡, 无不连续性
- 避免数值问题
- 单一 CV 占主导

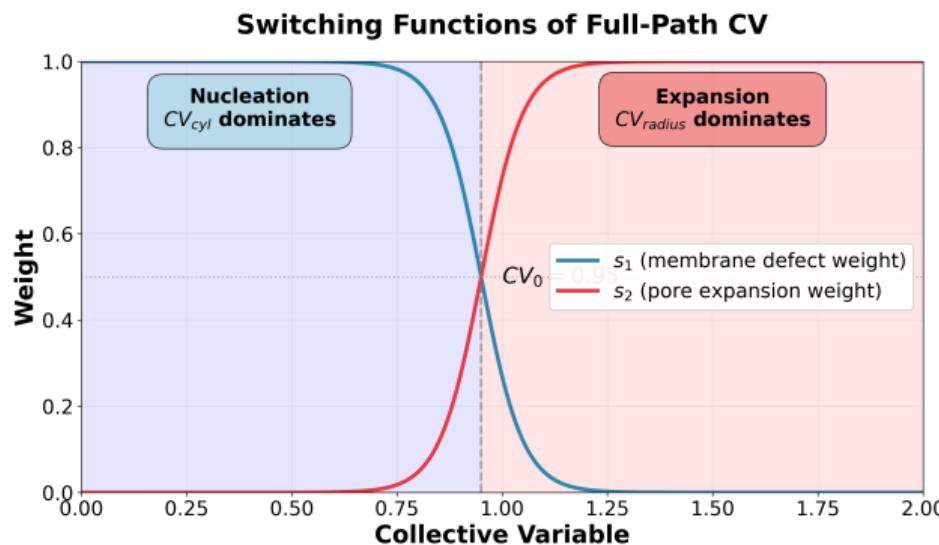


图 S2: Sigmoid 切换函数实现平滑过渡。两条曲线在 $CV_0 = 0.95$ 处相交，权重各为 0.5。



Rapid 方法：脂质条带模拟“无限孔”快速估算线张力



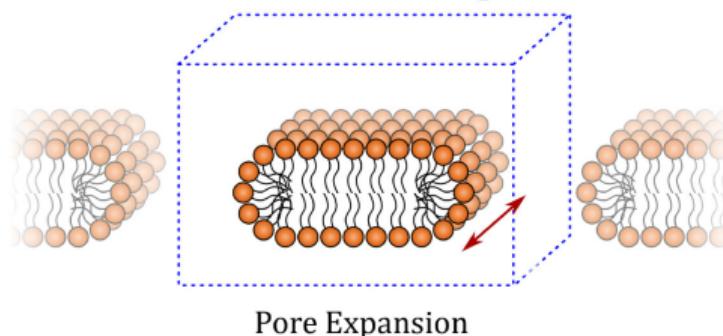
创新思路：(1) 沿膜平面扩展模拟盒子
(2) 自发形成脂质条带 (3) 周期边界
PBC 连接 (4) 形成环形“无限孔”

物理原理：线张力 $\Delta G = 2L\gamma$, 其中 L 为孔边缘总长度, 因子 2 考虑两个孔边缘, 改变盒子尺寸 L_x = 改变孔边缘长度

关键优势：参考态通过线性外推自动确定（无需实际模拟完整膜），周期边界消除边缘效应，物理上等价于 $\Delta G = 2\pi r\gamma$ （圆形孔）

计算效率：Rapid 仅需 21 窗口 \times 150 ns, Full-Path 需要 65 窗口 \times 200 ns, 效率提升 ~ 6 倍, 准确性与 Full-Path 高度一致

Collective Variable for “Rapid” Method

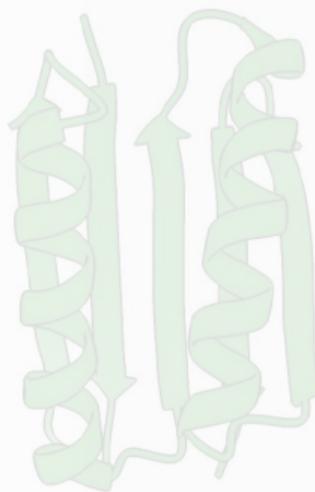


CV_{box} - box size along the membrane edge

图 1B: Rapid 方法示意。(A) 脂质条带侧视图, 两个孔边缘 (膜外界面) 中间夹水; (B) 俯视图, 通过周期边界形成环形“无限孔”; (C) 自由能随盒子尺寸线性增长, 斜率 = 2γ , 线性拟合确定线张力。

结果

Results





孔状态定义：17 层切片追踪跨膜水通道形成



切片划分方法：

- 膜沿 z 轴分 17 个切片，每片厚 0.25 nm
- 范围：[-2.125, 2.125] nm，高斯权重平滑计数

孔状态 $s(t)$ 计算：

- $s_i(t)$: 高斯平滑水原子计数
- $\mathcal{H}(s_i - 1)$: Heaviside 判定
- $s(t) = \frac{1}{17} \sum \mathcal{H}(s_i - 1)$

物理意义：

- $s = 1$: 完全开放跨膜孔； $s = 0$: 完整无孔膜
- $0 < s < 1$: 孔形成/闭合过程

(B) 4 种磷脂闭合过程。孔寿命趋势：DMPC > DPPC > POPC > DOPC。饱和度越高、链越短，寿命越长。

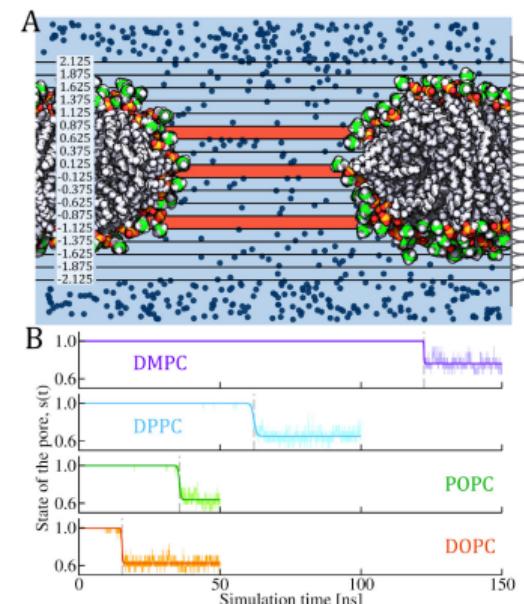


图 2：孔状态追踪及闭合动力学。蓝色为含水通道。



孔闭合过程：尾部碳密度决定膜缺陷稳定性



四阶段闭合动力学：

- (A) 平衡孔：初始稳定孔，连续水柱贯穿膜厚度
- (B) 半径缩小：孔边缘脂质重排，整体结构保持不变
- (C) 水线程：关键瞬间，孔只有纤细连续水线相连
- (D) 膜恢复：孔完全闭合，局部膜厚度恢复

临界发现：脂质尾部密度 \leftrightarrow 孔寿命 τ
($R^2=0.82$)，相关性极强！

设计启示：这一强相关性启发了尾部密度
 $CV(CV_{cyl})$ 的创新设计，追踪圆柱体内脂质尾部
原子数。

孔寿命/ns

力场	DMPC	DPPC	POPC	DOPC
C36	122	94	34	15
Slipids	110	32	27	18

Carbon	R-Squared	Pearson	Spearman	Kendall
C_{-1}	0.82	0.91	0.95	0.82
C_{-2}	0.62	0.79	0.84	0.64
C_{-3}	0.50	0.71	0.74	0.59

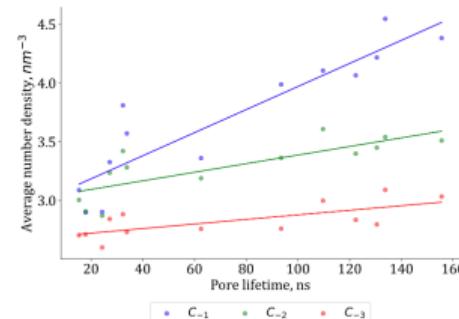


Figure S6: The plot shows the positive correlation between the pore lifetime and the density of the last carbon atoms of the lipid tails. C_{-1} refers to the carbon atom at the very end of the lipid tail, C_{-2} refers to the second-to-last carbon, and C_{-3} refers to the third-to-last carbon. The table reports the respective values of the R-squared correlation coefficient, the Pearson correlation coefficient, the Spearman Rank correlation coefficient, and the Kendall's tau correlation coefficient.



Full-Path 结果：正反向拉伸完全重合，CV 设计可逆无滞后



图 4: Full-Path 自由能分析。(A) 典型孔结构侧视图和俯视图；(B) 自由能剖面展示两阶段，正反向完全重合无滞后；(C) 不同力场线张力对比，CHARMM36 和 prosECCo75 最准确。

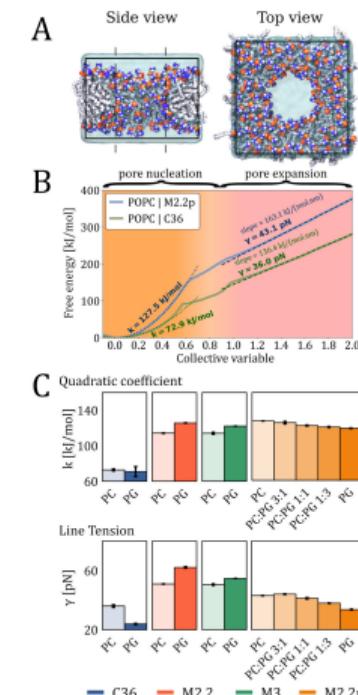
成核阶段 ($\text{CV} < 0.5$): $\Delta G = k \cdot \text{CV}^2 + c$

力场	k (kJ/mol)
CHARMM36	72.9
Martini 2.2p	73.7

扩展阶段 ($\text{CV} > 1.2$): $G(r) = 2\pi r\gamma$

力场	γ (pN)
CHARMM36	32.5
Martini 2.2p	49.2

关键发现：正反向拉伸曲线完全重合，CV 设计无滞后，CHARMM36 和 Martini 2.2p 显示不同的线张力





Rapid 方法：脂质条带模拟“无限孔”快速提取线张力



图 5: Rapid 方法示意。(A) 脂质条带侧视图, 两个孔边缘(膜外界面)中间夹水; (B) 俯视图, 通过 PBC 形成环形无限孔; (C) 自由能随盒子尺寸线性增长, 斜率为 $2\pi\gamma$ 。

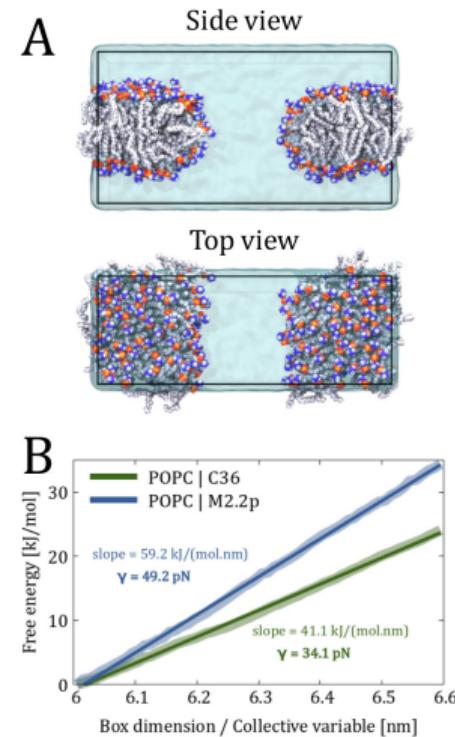
线张力原理: 大孔自由能为 $\Delta G = 2L\gamma$, 其中 L 为孔边缘长度, 因子 2 考虑两个孔边缘, 通过线性拟合斜率直接提取 γ

计算效率对比

方法	窗数	时间	速率
Full-Path	65	200 ns	标准
Rapid	21	150 ns	$\sim 6 \times$ 快

线张力预测结果

脂质系统	力场	γ (pN)
POPC	CHARMM36	34.1
POPC	Martini 2.2p	49.2





力场筛选：仅 CHARMM36 和 prosECCo75 准确复现实验趋势



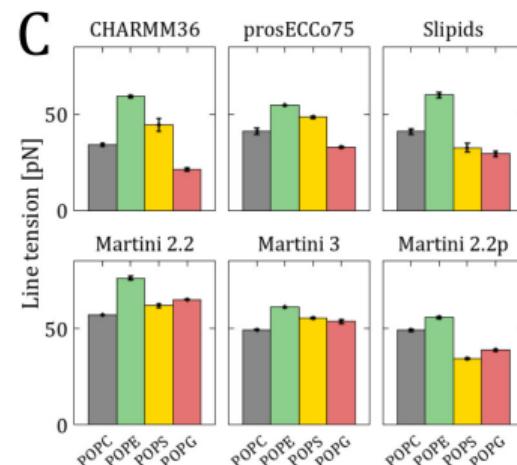
实验趋势：POPE > POPS > POPC > POPG

各力场表现：

- C36/prosECCo75：准确（NMR 调参精细）
- Slipids/M2.2p：部分正确
- M2.2/M3：失败（粗粒化失效）

核心差异：阴离子脂质头部与 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 结合的描述精度

结论：选择头部-离子作用精确的力场至关重要





双重验证: Full-Path 与 Rapid 高度一致, 与实验定性吻合



图 6: 交叉验证。

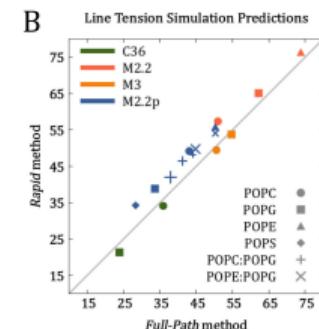
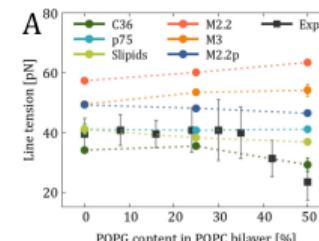
(A) 与实验对标:

- OK 定性吻合 POPC:POPG 膜
- PG 增加导致线张力降低; Ca^{2+} 导致线张力恢复
- 定量偏差: 实验 40 pN vs 模拟 6 pN (离子参数化精度差异)

(B) 两方法互补:

- Full-Path vs Rapid 相关性极高
- C36 Rapid 偏低约 2 pN; M2.2p 偏高 3-5 pN
- 原因: 孔几何差异 (圆柱 vs 环形)

结论: 双 CV 互补, 高可信度





离子效应: Ca^{2+} 恢复被 Na^+ 降低的膜线张力



图 7: 离子效应分析。

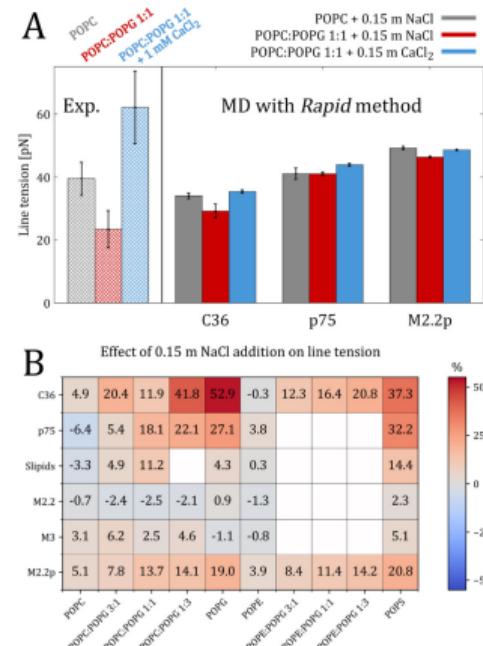
(A) Ca^{2+} 恢复膜稳定性:

- POPC:POPG 体系
- 仅加 NaCl : 线张力降低到 29 pN
- 再加 CaCl_2 : 线张力升高恢复至 35.5 pN
- 机制: Ca^{2+} 与 PG 头部强结合, 静电屏蔽

(B) Na^+ 增强阴离子的效应:

- POPG/POPS: 线张力变化增加 30-50%
- POPC/POPE: 线张力变化约为零
- 结论: Na^+ 特异增强阴离子脂质膜稳定性

力场性能: C36 精确, prosECCo75 偏小,
M2.2p 会低估





对 HA/OP 膜相互作用研究的启发

核心洞察: OP 降低膜线张力 → 促进膜孔形成/稳定 → 可能的透皮机制

1. 线张力计算

- Full-Path CV: 成核 + 扩展全过程
- Rapid CV: 快速评估大孔极限
- 伞形采样 + WHAM 自由能

2. 膜性质表征

- Lindemann 指数: 脂质流动性
- Bond-orientational order: 相态

3. 力场选择

- CHARMM36: 准确离子-脂质作用
- Martini 3: 快速验证

与我们研究的关联:

假说:

- OP 形成“局部阳离子补丁”
- 特异性结合 FFA 羧基 ($-COO^-$)
- 降低膜线张力, 诱导瞬时孔道
- 纳米凝胶通过形变挤压穿过

下一步:

- ⇒ 定量计算 OP-FFA 膜的线张力
- ⇒ 对比纯 SC 膜 vs OP 结合后的 γ
- ⇒ 验证线张力降低假说

Thanks for Listening!

Questions?

参考文献:

Rivel, T., Biriukov, D., Kabelka, I., & Vácha, R. (2025). J. Chem. Inf. Model. **65**, 908–920.