

细胞内扩散动力学与胞内空间维度的关系*

高博 周宇萱 张明丽 李辉†

(北京师范大学系统科学学院, 非平衡系统研究所, 100875, 北京)

摘要 扩散对于细胞内生物分子的运输至关重要, 是各种生命过程的物理基础. 由于细胞内部微环境的复杂性, 其内部生物大分子的扩散呈现出异常扩散、空间异质性、各向异性等新奇动力学特性. 然而, 细胞内扩散动力学与胞内微环境空间维度之间的关系并不清楚. 利用活细胞单分子荧光跟踪技术研究了细胞内量子点探针的扩散, 定量分析了细胞内准二维扩散和丝状伪足内准一维扩散的动力学特征. 研究发现相比于细胞内的准二维扩散, 丝状伪足内的扩散速度更快, 且扩散加速现象与丝状伪足的直径成反比, 表明丝状伪足提供了一种更加有效的胞内物质运输途径. 本研究不仅阐明了细胞内扩散动力学与胞内空间维度的关系, 而且揭示了细胞通过亚细胞结构调控生物大分子运输的复杂机制.

关键词 扩散; 空间维度; 丝状伪足; 单分子跟踪

中图分类号 Q27; Q63

DOI: 10.12202/j.0476-0301.2023157

0 引言

细胞质是细胞内各种生化反应发生的场所, 由大量生物大分子、细胞骨架和细胞器构成拥挤且复杂的环境. 细胞内扩散是细胞质中生物大分子运输的主要途径, 受到细胞质内拥挤微环境以及细胞内结构特征的影响^[1-2]. 由于细胞内扩散是分子间相互作用及实现各种生命活动的物理基础, 理解扩散动力学在细胞内的调控规律十分重要.

在过去的30年中, 研究人员对细胞内扩散已经进行很多研究, 测量了细胞内不同大小颗粒的扩散动力学特征^[3-6]. 通过分析分子的扩散动力学, 可以探究到无法直接观察到的细胞内微纳尺度的结构信息, 以及细胞内微环境的物理特征. 相比传统的光漂白后荧光恢复 (fluorescence recovery after photobleaching, FRAP) 和荧光相关光谱 (fluorescence correlation spectroscopy, FCS) 技术, 单分子 (颗粒) 跟踪 (single molecule tracking) 方法可以直接观测活细胞中单个分子的运动, 不仅可以研究细胞膜上的跨膜蛋白及生物分子, 还可以研究细胞内的生物大分子及细胞器, 例如膜蛋白质扩散、膜泡内吞、定向运输以及病毒侵袭等^[7-10]. 荧光探针的选取对于实现活细胞内的单分子跟踪十分重要. 量子点 (quantum dot, QD) 作为一种半导体荧光探针, 因其量子产率高、与细胞内生物大分子的尺寸类似, 以及修饰后的高生物相容性等, 已成

为单分子荧光测量活细胞内各种动力学活动的理想探针^[11-12]. 我们在过去的研究中发现了细胞内扩散的空间异质性^[13-15] 以及准二维特征^[16-17]. 然而, 细胞外围存在一种称为丝状伪足 (filopodium) 的纤细状突起, 由微丝骨架向外聚合以改变局部细胞膜形貌所形成, 其参与了细胞迁移、形态发生、内吞等生物过程. 丝状伪足的直径 $< 1 \mu\text{m}$ ($0.1 \sim 0.3 \mu\text{m}$), 构成了类似一维的管状空间^[18-19]. 尽管丝状伪足的生物学功能已经发现了很多年, 但对其内部空间维度约束下的准一维扩散动力学特征并不清楚. 因此, 进一步揭示细胞内扩散动力学与胞内空间维度的复杂关系, 有助于理解细胞内物质运输的调控机制.

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 细胞实验使用 DMEM (dulbecco's modified eagle medium) 培养基、胎牛血清、链霉素、青霉素和 0.25% 胰酶-EDTA (均购自 Gibco 公司), 单分子跟踪实验使用量子点 QD 655 (购自 Thermo Fisher 公司).

实验使用本实验室自己搭建的全内反射转盘共聚焦显微成像系统, 包括激光光源、温度控制器、活细胞培养室、EMCCD、电脑控制系统及倒置显微镜, 显微镜型号为 IX83 (Olympus).

1.2 A549 细胞培养 实验中使用的细胞为人肺癌肺泡基底上皮细胞 (A549), 来源于北京协和细胞资源

* 国家自然科学基金资助项目 (12122402, 12074043)

† 通信作者: 李辉, 男, 教授, 博士生导师. 研究方向: 生物复杂系统. E-mail: huili@bnu.edu.cn

收稿日期: 2023-05-09

中心, 培养在含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素、链霉素的 DMEM 培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 条件的培养箱内. 当细胞密度达到 70% 左右时, 使用 0.25% 胰酶-EDTA 消化 A549 细胞, 按照 1 : 4 的比例进行传代, 以保持细胞在培养瓶中生长的良好状态.

1.3 活细胞的量子点导入 实验中选取量子点 QD655 作为探针来研究细胞不同空间维度上的扩散动力学特征. 首先将量子点 QD655 以 1 : 100 的体积比稀释, 通过高渗溶液诱导胞饮囊泡内吞入 A549 细胞中, 而后借助低渗溶液引发囊泡裂解, 将量子点以单个分子分散的形式导入细胞质中.

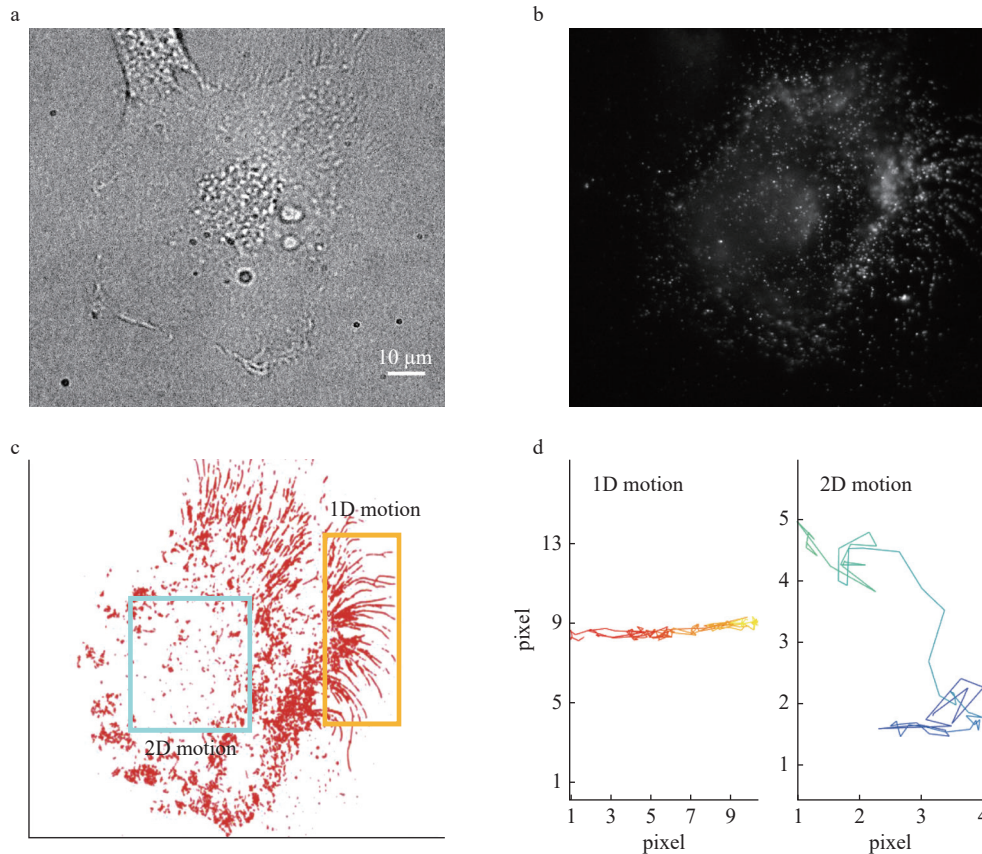
1.4 单分子荧光跟踪成像及数据分析 使用 561 nm 激光进行激发, 通过斜掠射薄层照明 (highly inclined and laminated optical sheet imaging, HILO) 成像方式对细胞内的量子点进行观察, 以 30 ms 的时间分辨率对量子点在细胞内的运动进行实时记录.

随后使用 ImageJ 软件中的插件提取出长于 40 帧的量子点运动轨迹, 通过 matlab 程序对运动轨迹进行分析, 包括计算轨迹的均方位移 (mean square displacement, MSD), 拟合得到量子点的扩散速率 D 和扩散

指数 α , 以表征扩散的动力学特征.

2 结果

2.1 细胞内准一维和准二维的扩散现象 为了测量细胞内的扩散, 通过胞饮技术向 A549 细胞内导入量子点探针 QD655, 其表面带有 PEG 修饰, 避免与细胞内其他结构的非特异性结合. 通过斜掠射薄层照明技术观测跟踪细胞内的单个量子点探针 (图 1-a、b). 为了保持实验中细胞的活力, 细胞培养皿置于显微镜载物台上的活细胞培养盒中, 并维持环境条件至 37 °C、5% CO₂. 为了降低荧光背景, 显微成像时使用无血清、无酚红的 DMEM 培养基. 以 30 ms 的时间分辨率对细胞内的量子点进行连续 1 min 的图片采集, 以获取量子点的运动录像. 进一步地, 通过软件提取出整个细胞内长于 40 帧的量子点扩散轨迹 (图 1-c). 我们发现, 处于细胞边缘丝状伪足区域的量子点呈现出准一维的往复运动 (图 1-d 左), 而细胞内的量子点进行的是准二维扩散运动 (图 1-d 右), 从它们的典型轨迹可以看出, 丝状伪足区域中的量子点运动轨迹狭长, 而细胞内的量子点呈类似于布朗运动的二维随机



a. 导入量子点 QD655 的 A549 细胞明场图像; b. 导入量子点 QD655 的 A549 细胞荧光场图像; c. 导入于细胞内 >40 帧的全部量子点轨迹, 浅蓝色方框圈出的为部分细胞中心准二维扩散的量子点轨迹, 黄色方框圈出的为部分丝状伪足内准一维扩散的量子点轨迹; d. 丝状伪足内的量子点运动轨迹 (左) 和细胞内的量子点运动轨迹 (右).

图 1 细胞内准一维和准二维的扩散现象

扩散.

2.2 细胞内准一维和准二维扩散的动力学特征比较

为了探究细胞内及丝状伪足区域中量子点扩散的动力学特征,首先通过轨迹形态的线性拟合,以筛选出丝状伪足区域符合准一维运动的轨迹(阈值 >0.85).随后,分别将丝状伪足和细胞 2 个区域内的量子点运动轨迹沿垂直的 x 和 y 方向进行分解.对于准一维扩散,将所有沿着丝状伪足延伸方向的量子点运动定义为 x 方向,垂直于丝状伪足为 y 方向;对于细胞内的准二维扩散,由于其轨迹没有偏向性,直接对其按原始的实验坐标系进行 x 和 y 方向分解.对细胞内及丝状伪足区域的量子点轨迹分别分析在 x 和 y 方向上的均方位移:

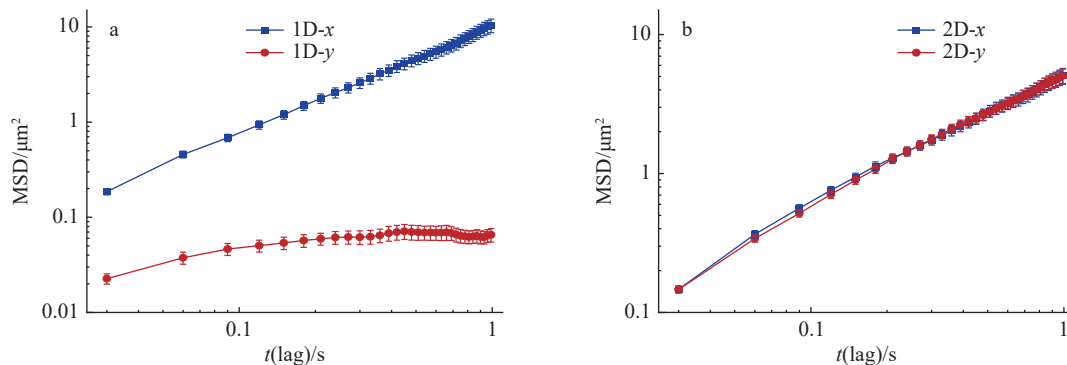


图 2 a.丝状伪足内准一维扩散在 x 和 y 方向的均方位移(轨迹数: 689); b.细胞内准二维扩散在 x 和 y 方向的均方位移(轨迹数: 362).

图 2 细胞内准一维和准二维扩散在 x 和 y 方向的均方位移

更进一步地,我们通过拟合 MSD 曲线的前 3 个点,以测定量子点的 D ,即

$$\text{MSD}(t) = 2dDt + c, \quad (2)$$

式中 d 表示维度.

如图 3-a、b 所示:细胞丝状伪足内量子点运动的时间扩散速率在 x 方向为 $0.195 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$,在 y 方向上为 $0.006 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$;细胞内量子点运动的时间扩散速率在 x 方向为 $0.155 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$,在 y 方向上为 $0.146 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.细胞丝状伪足 y 方向上的扩散速率远小于 x 方向上的扩散速率,也显示出丝状伪足区域内的量子点运动在 2 个方向上存在着巨大的差异.有趣的是,我们发现丝状伪足内量子点沿 x 方向上的扩散速率明显高于细胞内准二维扩散的速率.

还可以通过拟合来确定量子点的运动模式

$$\text{MSD}(t) = At^\alpha, \quad (3)$$

式中 α 代表了 MSD 和 t 之间的非线性关系.已知 $\alpha = 1$ 表示布朗运动; $\alpha < 1$ 表示亚扩散; $\alpha < 0.5$ 表示受限运动.由图 3-c 可知,细胞丝状伪足内的量子点在

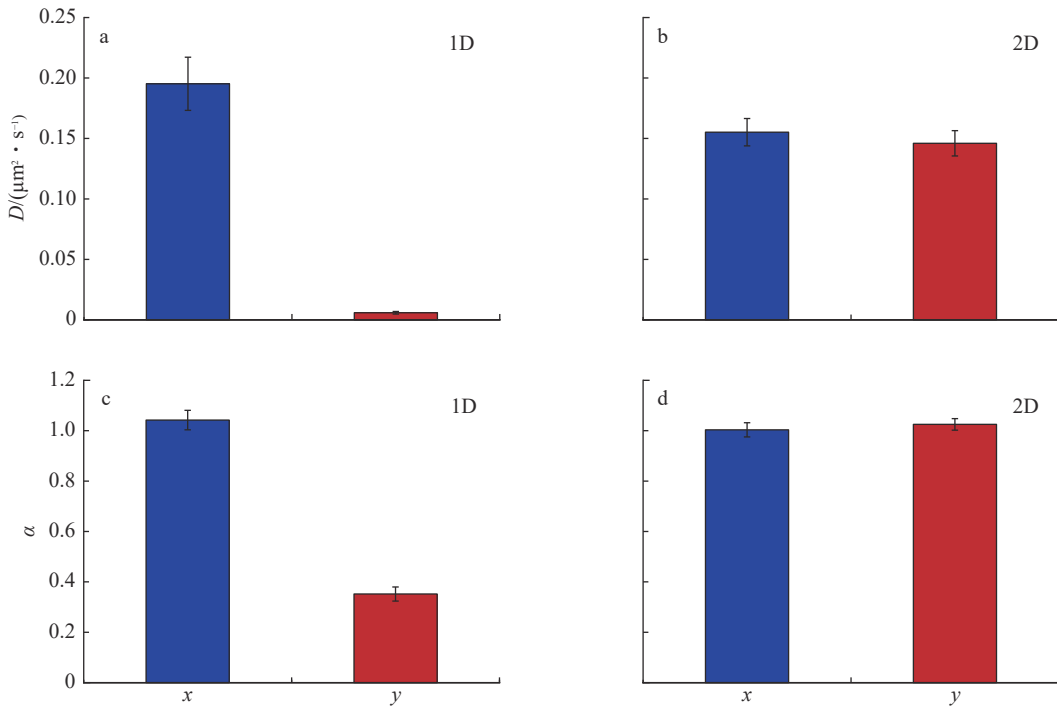
$$\text{MSD}(\tau) = \langle |r(t+\tau) - r(t)|^2 \rangle, \quad (1)$$

式中: r 为坐标; τ 为间隔时间.

结果表明:丝状伪足内呈线性准一维运动的量子点在 y 方向上的扩散远小于 x 方向(图 2-a),而细胞内呈准二维扩散的量子点在 2 个方向上的扩散几乎完全相等(图 2-b);丝状伪足内量子点表现为 x 方向为主的准一维布朗运动,而在 y 方向则为受限运动.通过观察图 1-d 所示例的特征轨迹,其在 y 方向并非固定在某个位点,因而可以排除附着于丝状伪足膜上的可能;通过丝状伪足内 y 方向扩散的均方位移在 1 s 后达到稳定,可以估算出丝状伪足的内径尺寸,约为 $0.07 \mu\text{m}$,与过去报道的丝状伪足大小一致^[18].

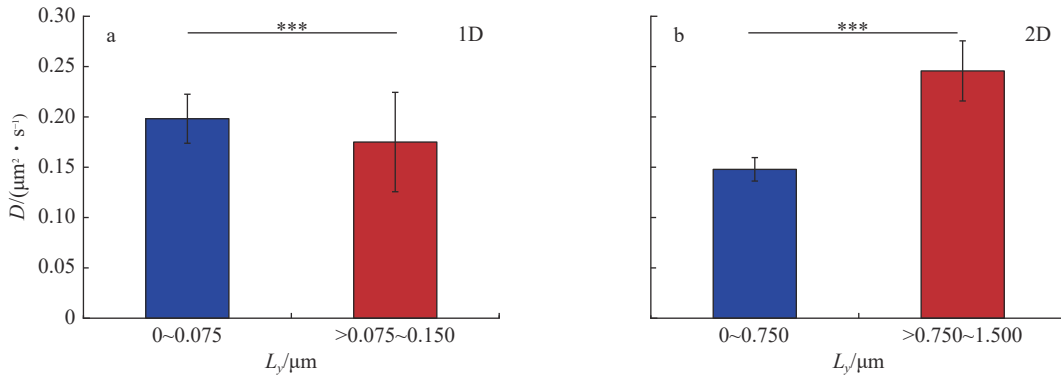
y 方向上的运动明显受到限制,被丝状伪足束缚;而其在 x 方向上的运动与细胞内的准二维扩散模式相当(图 3-d).以上结果表明:细胞内的准二维扩散在 x 和 y 方向的扩散速度是相似的,并且扩散类型均为接近布朗运动的亚扩散,即细胞内的扩散是二维各向同性;而丝状伪足内,量子点的扩散在垂直于伪足的方向严重受限,但是在沿伪足的方向则较为自由,且其扩散速度相比细胞内的准二维扩散更快.

2.3 丝状伪足内的准一维扩散速度与伪足直径呈负相关 基于丝状伪足内的准一维扩散加速,进一步研究该现象是否与丝状伪足的直径有关,即 y 方向的空间约束是否影响了 x 方向的准一维扩散.为此,我们分析了量子点沿 x 方向的扩散速率(D_x)与其在 y 方向上可到达空间长度(L_y)的关系.如图 4-a、b 所示,根据准一维与准二维扩散的运动特点,把量子点的运动轨迹以 y 方向的可到达空间长度(L_y)分为 2 组.准一维扩散分组为 $0 \sim 0.075$ 和 $>0.075 \sim 0.150 \mu\text{m}$;准二维扩散分组为 $0 \sim 0.750$ 和 $>0.750 \sim 1.500 \mu\text{m}$,以观察丝状伪足内径的大小对于其垂直方向运动的影响.我们发现,随着 L_y 的减小,量子点沿伪足方向的扩散速率 D_x 在



a. 丝状伪足内准一维扩散在 x 和 y 方向的扩散速率; b. 细胞内准二维扩散在 x 和 y 方向的扩散速率; c. 丝状伪足内准一维扩散在 x 和 y 方向的运动模式; d. 细胞内准二维扩散在 x 和 y 方向的运动模式.

图 3 细胞内准一维和准二维扩散的均方位移分析



a. 丝状伪足内量子点扩散速率与空间长度的关系 ($P < 0.001$); b. 细胞内量子点扩散速率与空间长度的关系 ($P < 0.001$).

图 4 扩散速率空间长度的关系

增加. 对比细胞内的准二维扩散, x 方向的扩散速率与 y 方向的扩散距离呈现正相关, 表明 x 和 y 方向的扩散是正相关, 与前文结果中的准二维各向同性结论一致. 以上结果表明对于丝状伪足内的准一维扩散, 伪足的直径与内部扩散速率呈现负相关, 即在更细的伪足内部, 量子点的准一维扩散更快.

3 讨论

本研究基于活细胞单分子跟踪技术, 以量子点为探针, 研究了细胞内准二维扩散与丝状伪足内准一维扩散的动力学特征, 并发现相比于细胞内的准二维扩散, 丝状伪足内的准一维扩散速率更快, 而且丝状伪足内的扩散加速与该伪足的直径成反比关系. 结果表明丝状伪足提供了一种更加有效的胞内物质运输

途径: 由于丝状伪足的亚微米纤维状结构特征, 能够对其内部分子的扩散起到空间整流的效果, 即通过削弱垂直于伪足方向的随机扩散, 增强沿丝状伪足方向的运输效率; 并且我们发现丝状伪足内部的扩散速率也更快, 其原因可能与丝状伪足内的骨架结构及微环境拥挤程度有关. 综上所述, 本工作不仅阐明了细胞内扩散动力学与胞内空间维度的关系, 而且揭示了细胞通过亚细胞结构调控生物大分子运输的复杂机制.

4 参考文献

[1] BRANGWYNNE C P, KOENDERINK G H, MACKINTOSH F C, et al. Intracellular transport by active diffusion[J]. *Trends in Cell Biology*, 2009, 19(9): 423
 [2] BERG O G, VON HIPPEL P H. Diffusion-controlled macromolecular interactions[J]. *Annual Review of Bio-*

- physics and Biophysical Chemistry, 1985, 14: 131
- [3] VERKMAN A S. Solute and macromolecule diffusion in cellular aqueous compartments[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2002, 27(1): 27
- [4] PINAUD F, CLARKE S, SITTNER A, et al. Probing cellular events, one quantum dot at a time[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(4): 275
- [5] LI B, DOU S X, YUAN J W, et al. Intracellular transport is accelerated in early apoptotic cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(48): 12118
- [6] YUAN J W, ZHANG Y N, LIU Y R, et al. Diffusion behaviors of integrins in single cells altered by epithelial to mesenchymal transition[J]. *Small*, 2022, 18(5): e2106498
- [7] MANZO C, GARCIA-PARAJO M. A review of progress in single particle tracking: from methods to biophysical insights[J]. *Reports on Progress in Physics*, 2015, 78(12): 124601
- [8] SHEN H, TAUZIN L J, BAIYASI R, et al. Single particle tracking: from theory to biophysical applications[J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(11): 7331
- [9] 李辉, 段兆文, 窦硕星, 等. 利用轨迹自动识别方法研究单细胞内表皮生长因子受体的运输 [J]. *物理学报*, 2012, 61(6): 479
- [10] 王康, 徐成, 吴晋锋, 等. 蜂毒肽与单组分脂膜相互作用的单分子研究 [J]. *物理学报*, 2021, 70(17): 178701
- [11] MICHALET X, PINAUD F F, BENTOLILA L A, et al. Quantum dots for live cells, *in vivo* imaging, and diagnostics[J]. *Science*, 2005, 307(5709): 538
- [12] ZHANG M L, TI H Y, WANG P Y, et al. Intracellular transport dynamics revealed by single-particle tracking[J]. *Biophysics Reports*, 2021, 7(5): 413
- [13] LI H, DOU S X, LIU Y R, et al. Mapping intracellular diffusion distribution using single quantum dot tracking: compartmentalized diffusion defined by endoplasmic reticulum[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137(1): 436
- [14] JIANG C, YANG M C, LI W, et al. Spatiotemporal three-dimensional transport dynamics of endocytic cargos and their physical regulations in cells[J]. *iScience*, 2022, 25(5): 104210
- [15] JIANG C, DOU S X, WANG P Y, et al. Quantifying transport dynamics with three-dimensional single-particle tracking in adherent cells[J]. *STAR Protocols*, 2022, 3(4): 101790
- [16] JIANG C, LI B, DOU S X, et al. Quasi-two-dimensional diffusion in adherent cells revealed by three-dimensional single quantum dot tracking[J]. *Chinese Physics Letters*, 2020, 37(7): 078701
- [17] CHEN X S. Strong anisotropy of 3D diffusion in living cells[J]. *Chinese Physics Letters*, 2020, 37(8): 080103
- [18] MATTILA P, LAPPALAINEN P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008, 9: 446
- [19] FAIX J, ROTTNER K. The making of filopodia[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2006, 18(1): 18

Dynamics of intracellular diffusion under various intracellular spatial dimensions

GAO Bo ZHOU Yuxuan ZHANG Mingli LI Hui

(School of Systems Science and Institute of Nonequilibrium Systems, Beijing Normal University, 100875, Beijing, China)

Abstract Diffusion is crucial for biomolecule transportation in cells and is the physical basis for various life processes. Due to complexity of intracellular microenvironment, biomolecule diffusion inside cells exhibits novel dynamic characteristics such as anomalous diffusion, spatial heterogeneity, and anisotropy. The relationship between intracellular diffusion dynamics and spatial dimensions of intracellular microenvironment is not well understood. Live-cell single-molecule fluorescence tracking techniques were used in this study to investigate the diffusion of quantum dots inside cells, to quantitatively analyze dynamic features of intracellular quasi-two-dimensional diffusion and quasi-one-dimensional diffusion in filopodia. Compared to intracellular quasi-two-dimensional diffusion, diffusion within filopodia was found to exhibit higher rate, and the phenomenon of diffusion acceleration was inversely proportional to the diameter of the filopodia, suggesting that the filopodia is a more efficient pathway for intracellular substance transport. The relationship between intracellular diffusion dynamics and spatial dimensions of intracellular environment is elucidated, mechanisms of cellular regulation of biomolecule transport through subcellular structures are clarified.

Keywords diffusion; spatial dimension; filopodium; single molecule tracking

【责任编辑: 武 佳】