基于AFM的细胞弹性及黏弹性研究

李密¹, 刘连庆^{1*}, 席宁^{1,2*}, 王越超¹

1. 中国科学院沈阳自动化研究所, 机器人学国家重点实验室, 沈阳 110016;

2. Department of Industrial and Manufacturing Systems Engineering, The University of Hong Kong, Hong Kong

* 联系人, E-mail: lqliu@sia.cn; xining@hku.hk

收稿日期: 2016-12-31; 接受日期: 2017-04-07; 网络版发表日期: 2017-06-12

国家自然科学基金(批准号: 61503372, 61522312, 61327014, 61433017)、中国科学院青年创新促进会(批准号: 2017243)和中国科学院、国家外国专家局创新团队国际合作伙伴计划资助

摘要 原子力显微镜(AFM)的发明为测量生理环境下单个活细胞的机械特性提供了新的技术手段. 现有AFM单细胞机械特性研究集中在测量细胞弹性. 细胞本质上是黏弹性的, 但目前关于细胞黏弹性在细胞生理活动行为中作用的认知还很不足. 基于AFM逼近-停留-回退实验, 发展了可同时对细胞弹性及黏弹性进行测量的方法, 并应用该方法首先测量了正常乳腺细胞和乳腺癌细胞的弹性(杨氏模量)及黏弹性(松弛时间), 显示出正常乳腺细胞和乳腺癌细胞的杨氏模量及松弛时间均有着显著的差异. AFM成像揭示了正常乳腺细胞和乳腺癌细胞在细胞表面形态及几何特征方面的差异. 随后对3种不同类型的细胞系及原代B淋巴细胞进行了测量, 证明了松弛时间在辅助杨氏模量鉴定细胞状态方面的潜力. 实验结果为定量测量细胞机械特性提供了新的方法, 便于从多个角度研究单个细胞的生物力学行为.

关键词 原子力显微镜, 细胞, 机械特性, 黏弹性, 杨氏模量, 松弛时间

过去的数十年中, 原子力显微镜(atomic force microscopy, AFM)在生命科学领域的广泛应用为人们带来了单细胞生理活动的大量新知识. AFM不仅可以对单个活细胞表面超微结构进行成像(如细胞表面单根微绒毛^[1]), 还可以定量测量单个细胞的机械特性^[2]. 从分子、细胞到组织、器官, 几乎组成生命系统的任何一个尺度的基本单元均有其独特异质的结构、物理及化学特性, 这些特性在生命活动过程中不断动态变化以执行各项生理功能^[3]. 研究细胞物理特性对于探索细胞行为内在机制具有重要意义. AFM压痕技术可以对生物分子^[4]、细胞^[5]及组织^[6]的机械特性进行定量测量, 增加了人们对生理活动的认识. 利用AFM探

测细胞机械特性的研究证明了细胞机械特性是一个新的生物标志, 可用于区分癌细胞与正常细胞^[7]. 在乳腺癌的发生发展过程中, 研究发现乳腺组织的机械特性发生显著变化^[8]. 肿瘤形成过程中, 病理因素首先诱导细胞结构(如细胞膜、细胞骨架、细胞质)发生变化. 细胞结构的变化直接导致细胞机械特性(如形变能力、运动能力、黏附能力等)的改变, 最后导致细胞功能(如基因表达、活性、增殖能力等)的变化^[9,10]. 因此, 可以通过生物化学特性(检测细胞结构变化)和/或生物力学特性(检测细胞机械特性变化)识别出病变细胞^[11]. 目前对癌症的诊断主要基于临床活检组织样本染色的细胞形态观察, 包含样本采集、染色、光学观

引用格式: 李密, 刘连庆, 席宁, 等. 基于AFM的细胞弹性及黏弹性研究. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 629–639, doi: [10.1360/N052016-0318](https://doi.org/10.1360/N052016-0318)

英文版见: Li M, Liu L Q, Xi N, et al. Atomic force microscopy studies on cellular elastic and viscoelastic properties. Sci China Life Sci, 2017, in press, doi: [10.1007/s11427-016-9041-9](https://doi.org/10.1007/s11427-016-9041-9)

察等多个步骤, 复杂且耗时^[12]. 此外, 由于有时候正常细胞的形态特征与癌细胞形态特征很相似, 导致基于形态观察的方法并非100%准确. 细胞机械特性检测的引入有望成为细胞形态分析的有益补充. Reich等人^[13]的研究表明, 正常皮肤成纤维细胞和硬皮病皮肤成纤维细胞在形态上无明显差异但在细胞机械特性上却有着显著差异, 显示了细胞机械特性检测在辅助识别病变细胞方面的潜力.

AFM单细胞力学分析为免标记检测细胞状态提供了新的可能. 目前利用AFM对细胞机械特性进行的研究集中在测量细胞杨氏模量(杨氏模量仅反映了细胞弹性)^[14,15], 而细胞实际上是黏弹性的且在细胞生理活动过程中黏弹性不断变化^[16]. 研究人员利用AFM对细胞黏弹性进行了研究^[17-19], 但目前对于细胞黏弹性是否可作为生物标志物用于指示癌变行为仍缺乏直接比较研究^[7]. 为了研究细胞黏弹性在癌细胞相关行为中的变化规律, 本文利用AFM分别对正常乳腺细胞(MCF-10A)和乳腺癌细胞(MCF-7)的弹性及黏弹性进行了测量, 同时利用AFM成像分析了MCF-10A和MCF-7的形态差异. 最后对3种不同细胞系(HEK293, A549, L929)及原代B淋巴细胞的弹性及黏弹性进行了测量.

1 材料与方法

1.1 细胞培养

MCF-10A(人正常乳腺细胞), MCF-7(人乳腺癌细胞), HEK293(人胚肾细胞), A549(人肺癌细胞), L929(小鼠成纤维细胞)和Raji(人淋巴瘤细胞)购自中国科学院细胞库(上海). 细胞培养基购自美国Hyclone公司. MCF-10A, MCF-7, A549和Raji细胞在37℃(5% CO₂)含有10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素的RPMI-1640培养基中培养. HEK293和L929细胞在37℃(5% CO₂)含有10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素的DMEM(高糖)培养基中培养. 将细胞接种于培养瓶, 当细胞铺满80%瓶底时将细胞传代到培养皿, 随后将培养皿置于细胞培养箱中, 培养2~3天后用于实验.

1.2 原代B淋巴细胞分离

从健康志愿者体内抽取外周血, 进行抗凝处理后分离得到原代B淋巴细胞^[20]. 首先利用密度梯度离心法

从健康志愿者抗凝外周血中分离出单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC). 随后利用PBS将PBMC重悬浮并与磁珠(Milteny Biotec Inc., 美国)共孵育. 磁珠连有抗CD19单克隆抗体. CD19是一种特异性表达于B淋巴细胞表面的标志分子(在其他细胞表面均不表达). 因此连有CD19抗体的磁珠可特异性地与PBMC中的B淋巴细胞结合. PBMC与磁珠共孵育完成后, 利用PBS对PBMC重悬浮以洗去未结合B淋巴细胞的磁珠. 随后将细胞悬浮液转移至分离柱, 并将分离柱置于MiniMACS磁场分离器(Milteny Biotec Inc.). 利用缓冲液对分离柱冲洗3遍后, 将分离柱从磁场分离器中移除即收集得到纯化的B淋巴细胞.

1.3 AFM成像

AFM实验在Bioscope Catalyst AFM(Bruker, 美国)上进行(图1A). AFM与倒置显微镜(Ti, Nikon, 日本)联合使用. 探针材料为氮化硅, 悬臂梁弹性系数为0.01 N/m (Bruker). 成像环境为培养基, 成像模式为接触模式. 扫描力为1 nN. 扫描频率为0.5 Hz. 扫描线为256, 每条扫描线的采样点为256.

1.4 AFM细胞机械特性测量

利用AFM压痕实验在培养基中测量活细胞(MCF-10A, MCF-7, HEK293, A549, L929)的机械特性. 利用热噪声方法精确校正悬臂梁弹性系数^[21]. 在光学显微镜引导下, 控制探针移动到细胞中央部位(图1B). 随后控制探针在逼近-停留-回退模式^[20]下测量细胞的弹性及黏弹性(图1D). 探针首先逼近(速度为8 μm/s)并接触细胞直至加载力达到预设值(5 nN). 随后探针在细胞上停留1 s以便观测细胞松弛过程. 随后控制探针从细胞表面回退. 在逼近-停留-回退过程中, 通过AFM操控软件记录得到力曲线, 从力曲线提取得到反映细胞弹性的杨氏模量; 通过图1C所示的示波器(LeCroy, 美国)记录应力松弛曲线. 从应力松弛曲线提取得到反映细胞黏弹性的松弛时间. 在MCF-10A细胞表面获取的一条典型力曲线如图2A所示. 由于探针在细胞表面停留1 s, 导致逼近曲线末端和回退曲线初始端位置并不重合. 图2C是在MCF-10A细胞表面获取的一条典型应力松弛曲线. 可以看到在松弛过程中力不断衰减. 对于每种细胞, 各选取20个细胞进行测量. 对于每个细胞, 在细胞中央区域不同位置获取5条力曲线和5条松弛

图1 实验平台及方法(网络版彩图)

A: AFM; B: 在光学显微镜引导下, 控制探针移动到细胞; C: 示波器与AFM控制器相连; D: 同时测量细胞弹性及黏弹性示意图; 三角梁(E)和矩形梁球形探针(F)SEM图

曲线.

1.5 球形探针制作

基于AFM微操作将微球黏附至AFM探针悬臂梁制作球形探针的过程为: (i) 将环氧树脂胶水滴至载玻片表面, 同时将微球溶液滴至载玻片表面的其他位置. (ii) 将载玻片置于AFM样品台, 控制AFM探针移动到胶水区域, 探针接触胶水液滴后立即回退. (iii) 控制探针移动至微球区域并接触单个微球(接触时间10s). (iv) 控制探针回退, 将探针置于探针盒中(微球朝上). 制作好的微球探针在室温下放置24h以便胶水固化. 图1E和F分别是制作好的三角梁球形探针和矩形梁球形探针的SEM图像.

1.6 数据分析

通过Hertz-Sneddon模型^[7]从力曲线中提取出细胞杨氏模量(Hertz模型适用于球形针尖, Sneddon模型适用于锥形针尖):

$$F_{\text{球形针尖}} = \frac{4ER^{1/2}\delta^{3/2}}{3(1-\nu^2)}, \quad (1)$$

$$F_{\text{锥形针尖}} = \frac{2E\delta^2 \tan\theta}{\pi(1-\nu^2)}. \quad (2)$$

式中 ν 为细胞泊松比(通常将细胞考虑为不可压缩材料^[22~24], 因此 $\nu=0.5$), F 为探针加载力, δ 为压痕深度, E 为细胞杨氏模量, θ 为锥形针尖半开角, R 为球形针尖半径. 根据胡克定律计算得到 F :

$$F = kx, \quad (3)$$

其中 k 为悬臂梁弹性系数, x 为悬臂梁的偏转量(可直接从原始力曲线中得到). 将原始力曲线导入至Matlab(Mathworks, 美国)软件中. 利用Matlab编写的程序对力曲线进行处理. 力曲线包含逼近曲线和回退曲线两部分, 其中逼近曲线用于计算细胞杨氏模量, 而回退曲线用于分析探针与样本之间的黏附力^[25]. 根据逼近曲线上的接触点(图2A中黑色箭头指示)将逼近曲线转化为压痕曲线(压痕深度等于探针垂直方向位置变

图2 从实验曲线中提取出细胞杨氏模量和松弛时间(网络版彩图)

利用锥形针尖在MCF-10A细胞表面获取的典型力曲线(A)及Sneddon模型对(B)拟合。MCF-10A细胞表面获取的典型应力松弛曲线(C)及2阶Maxwell模型(D)拟合。

化量减去探针悬臂梁偏转量)。利用Hertz-Sneddon模型对压痕曲线进行拟合即得到细胞杨氏模量。图2B为对图2A压痕曲线进行Sneddon拟合结果。图2A为锥形探针获取的力曲线,因此利用Sneddon模型进行拟合。可以看到理论曲线与实验压痕曲线吻合,拟合结果表明从压痕曲线提取得到的细胞杨氏模量为6.1 kPa。

利用Maxwell弹簧黏壶(spring-dashpot)模型^[17]对示波器记录的应力松弛曲线进行拟合得到细胞松弛时间:

$$F(t) = A_0 + A_i \sum_{i=1}^n e^{-t/\tau_i}, \quad (4)$$

式中 F 为加载力, A_0 为瞬时弹性响应, A_i 为第 i 阶起始应力, τ_i 为第 i 阶松弛时间。松弛时间与细胞的弹性模量及黏性系数有关^[17],因此松弛时间反映了细胞的黏弹特性。利用有限元软件Abaqus 6.13(Dassault Systems Simulia Corp., 美国)对归一化的松弛曲线进行拟合,如图2D所示。可以看到2阶Maxwell模型与实验曲线吻合。拟合结果显示细胞的1阶松弛时间(τ_1)为0.037s,

2阶松弛时间(τ_2)为0.381s。应用 t 检验分析细胞杨氏模量和松弛时间的显著性差异。

2 结果与分析

图3显示了在MCF-10A和MCF-7上记录的典型力曲线和应力松弛曲线。图3A和B分别为力曲线,图3C~F为应力松弛曲线。通过控制AFM探针在细胞表面进行往复的逼近-停留-回退运动,可以得到一系列松弛曲线。在细胞松弛过程中,AFM探针在垂直方向的位置保持不变(图3C和F红色曲线),而AFM探针施加在细胞上的作用力则不断衰减(图3C和F绿色曲线)。通过应用2阶Maxwell模型,可以对应力松弛曲线进行很好地拟合(图3D和F)。在实验过程中发现1阶Maxwell模型难以对应力松弛曲线进行很好地拟合,这可能跟细胞结构的复杂性有关。AFM探针挤压下的细胞松弛过程是细胞质的流动引起的^[16]。细胞质由很多不同的成分组成,包括肌动蛋白丝、中间丝、微管、细胞核、细胞器等^[26]。这些不同的组分有着不同的黏弹特性,因此1阶Maxwell模型难以对松弛曲线进行很好地拟

图3 在MCF-10A和MCF-7细胞表面获取的典型力曲线和应力松弛曲线

MCF-10A(A)和MCF-7细胞表面获取的典型力曲线(B)的Sneddon拟合. MCF-10A(C)和MCF-7(E)细胞表面获取的典型应力松弛曲线. C和E中红色曲线指示探针垂直方向位置变化. D对C中一条应力松弛曲线(C中方框指示)的Maxwell拟合. F对E中一条应力松弛曲线(E中方框指示)的Maxwell拟合

合, 而2阶Maxwell模型^[20,27]则可以很好地对应力松弛曲线进行拟合.

图4显示了基于AFM逼近-停留-回退实验的MCF-10A和MCF-7的弹性及黏弹性测量结果. 图4中杨氏模量和松弛时间具体值在表1中. 可以看到MCF-10A的杨氏模量显著大于MCF-7的杨氏模量(图4A), 而MCF-10A的松弛时间也显著大于MCF-7的松弛时间(图4B和C), 表明MCF-10A细胞(正常乳腺细胞)和MCF-7细胞(乳腺癌细胞)在弹性及黏弹性上均有着明显的差异. 2008

年, Li等人^[28]利用AFM测量了MCF-10A和MCF-7的杨氏模量, 结果显示MCF-10A的杨氏模量比MCF-7的杨氏模量大1.4~1.8倍, 与本文的实验结果一致. 利用AFM测量细胞杨氏模量受到多个因素的影响, 如探针类型(弹性系数、针尖形状)、基底、环境温度、探针加载速度、细胞探测部位、培养基等^[6,29]. 利用AFM测量细胞松弛时间受到加载力大小的影响^[27]. 因此, 为了使测量结果具有可比性, 本文中MCF-10A和MCF-7的实验条件保持一致. 当前基于AFM的单细胞机械特性

图4 MCF-10A和MCF-7的弹性及黏弹性对比
A: 细胞杨氏模量; B: 细胞松弛时间 τ_1 ; C: 细胞松弛时间 τ_2 .

表1 MCF-10A和MCF-7机械特性及几何特征的对比

细胞类型	杨氏模量 (kPa)	1阶松弛时间 τ_1 (s)	2阶松弛时间 τ_2 (s)	细胞长度(μm)	细胞宽度(μm)	细胞高度(μm)
MCF-10A	5.03 $\pm$ 0.16	0.034 $\pm$ 0.001	0.356 $\pm$ 0.008	58.03 $\pm$ 3.17	22.97 $\pm$ 0.89	5.10 $\pm$ 0.23
MCF-7	3.57 $\pm$ 0.15	0.024 $\pm$ 0.009	0.339 $\pm$ 0.007	38.16 $\pm$ 1.08	27.67 $\pm$ 0.96	3.42 $\pm$ 0.14

分析实验集中在测量细胞杨氏模量^[14,15,30]. 杨氏模量与细胞骨架(尤其是肌动蛋白丝^[31])之间有着密切的关联. 图4的结果显示除了杨氏模量, MCF-10A和MCF-7的松弛时间也存在着显著的不同. 细胞松弛时间与细胞质直接相关^[16], 意味着MCF-10A和MCF-7在细胞质力学行为上存在着差异, 增强了对正常乳腺细胞和乳腺癌细胞的认识.

细胞结构决定细胞机械特性^[32,33]. 因此利用AFM成像研究了MCF-10A和MCF-7的形貌差异(图5). MCF-10A和MCF-7的光学图像(图5A和F)显示了二者在生长方式上的差异: MCF-10A分散生长, 而MCF-7聚团生长. 光学显微镜由于受到200nm分辨率的限制难以观测细胞精细结构, 因此利用AFM对MCF-10A和MCF-7的精细形貌进行观察. 图5B~E为MCF-10A的AFM图像, 图5G~J为MCF-7的AFM图像. 可以看到MCF-10A和MCF-7在细胞形状及细胞边缘结构方面均有着明显的不同. MCF-10A为梭形, 而MCF-7呈现三角形或多边形形态; MCF-10A的边缘较为模糊(图C和E箭头指示)而MCF-7细胞则有明显的边缘结构(图H和J箭头指示). 进一步从AFM图像中提取出细胞的几何特征信息(图6). 从细胞AFM图像的截面曲线提取出细胞长度、宽度和高度(图6A和B). 截面曲线通过离线软件Nanoscope(Bruker)得到. 图6A是MCF-10A的一幅典型AFM图像, 显示其呈现椭圆形状. 图6B是两条截面曲线, 分别来自细胞长轴(红色曲线)和短轴(蓝色曲线). 从截面曲线可以得到细胞的长度和宽度, 而细胞

高度则等于截面曲线顶点与基底之间的距离. 对20个MCF-10A和MCF-7的AFM图像进行分析得到细胞几何特征统计结果, 如图6C~E所示. 图6C~E中几何特征的具体值在表1中. 可以清晰地看到MCF-10A的长度和高度大于MCF-7的长度和高度, 但MCF-10A的宽度要小于MCF-7的宽度. 几何特征提供了关于细胞形态的定量信息. 当正常细胞变为癌细胞后, 其结构和功能均会发生显著的变化^[34]. 例如, 正常细胞表面微绒毛与癌细胞表面微绒毛有着显著的不同^[35]. 本文中可以看到正常乳腺细胞和乳腺癌细胞在细胞生长方式、细胞形状、细胞边缘以及几何特征等方面均有着显著的不同, 这种细胞结构的不同进而可能导致细胞机械特性的差异.

随后对3种不同类型细胞(HEK293, A549, L929)的弹性及黏弹性进行了测量(图7). 图7A~C为锥形探针测量结果, 图7D~F为球形探针测量结果. 如图7A所示, A549的杨氏模量显著大于HEK293和L929的杨氏模量, 但HEK293与L929的杨氏模量无明显差异. 3种细胞在松弛时间方面无明显差异(A549和L929的2阶松弛时间 τ_2 除外). 可以根据细胞杨氏模量区分A549与其他两种细胞(HEK293和L929). 对于HEK293和L929, 可以看到二者在松弛时间方面的差异明显大于二者在杨氏模量方面的差异(τ_1 和 τ_2 的P值分别为0.17和0.11(图7B和C), 而杨氏模量P值为0.94(图7A)), 表明松弛时间比杨氏模量更能区分HEK293和L929. 随后利用球形探针对这3种细胞的弹性及黏弹性进行了测量, 可以看到

图5 MCF-10A和MCF-7的形貌对比

A~E: MCF-10A; F~J: MCF-7; A和F: 光学图像. AFM高度图(B, D, G, I)及对应的偏差图(C, E, H, J)

图6 MCF-10A和MCF-7的几何特征对比

A和B: 从细胞AFM图像上提取细胞几何特征(长度、宽度、高度). MCF-10A的高度图(A)及截面曲线(B). C~E: MCF-10A和MCF-7几何特征对比. C: 长度; D: 宽度; E: 高度

3种细胞的杨氏模量均有着明显的差异(图7D). A549的松弛时间与其他两种细胞的松弛时间有着明显的差异, 但HEK293与L929的松弛时间接近. 图7实验结果表明与锥形探针相比, 球形探针可以更好地分辨不同类型细胞的机械特性(弹性和黏弹性). 球形探针探测的细胞区域远大于锥形探针探测的细胞区域, 因此球形探针测量结果能更好地表征细胞整体的机械特性, 但锥形探针的优势是其可以探测细胞表面不同区域机械特性的异质性, 对于研究细胞结构与其机械特性之间的关联具有重要意义. 迄今为止研究人员利用

AFM对大量不同类型细胞的杨氏模量进行了测量, 这些研究显示的一个重要的问题是不同类型细胞间杨氏模量的重叠^[36-39], 导致有时候仅根据杨氏模量难以准确分辨某种特定细胞^[29]. 图7实验结果表明了细胞松弛时间在辅助杨氏模量鉴别不同类型细胞(尤其是具有相近杨氏模量的细胞)的潜力.

图4和7的结果来自体外培养细胞系. 应用建立的方法进一步研究了人体内细胞的弹性及黏弹性. 对原代正常B淋巴细胞的杨氏模量及松弛时间进行测量, 并与癌变B细胞进行了比较(图8). 原代正常B细胞来

图7 HEK293, A549和L929的弹性及黏弹性对比

A~C: 锥形针尖测量结果。A: 细胞杨氏模量; B: 细胞松弛时间 τ_1 ; C: 细胞松弛时间 τ_2 ; D~F: 球形针尖测量结果; D: 细胞杨氏模量; E: 细胞松弛时间 τ_1 ; F: 细胞松弛时间 τ_2

图8 原代正常B淋巴细胞及癌变B细胞(Raji)的弹性及黏弹性对比(网络版彩图)

原代正常B淋巴细胞(A)及Raji细胞(B)的光学图。细胞杨氏模量(C)、细胞松弛时间 τ_1 (D)及细胞松弛时间 τ_2 (E)对比

自健康志愿者外周血, 癌变B细胞来自Raji细胞系。可以看到Raji细胞的杨氏模量明显小于原代正常B细胞的杨氏模量。Raji细胞与原代正常B细胞之间的1阶松弛时间(τ_1)无明显差异, 但Raji细胞的2阶松弛时间(τ_2)大于原代正常B细胞的2阶松弛时间(τ_2)。除机械特性外, 原代正常B细胞与Raji细胞在形态上也有着显著的差异。如图6A和B所示, 可以看到Raji细胞的尺寸明显

大于正常B细胞的尺寸。在图4中, 乳腺癌细胞MCF-7的杨氏模量及松弛时间均小于正常乳腺细胞的杨氏模量及松弛时间。而在图8中, Raji细胞的杨氏模量小于正常B细胞的杨氏模量, 但2阶松弛时间(τ_2)大于正常B细胞的2阶松弛时间(τ_2)。这可能与本文采用的细胞有关。首先本文采用的正常乳腺细胞及乳腺癌细胞均为体外培养的细胞系, 而本文采用的正常B细胞来

自健康志愿者外周血,但癌变B细胞来自体外培养的细胞系.其次,乳腺细胞为贴壁生长细胞,而淋巴细胞为悬浮生长细胞.因此,细胞的差异有可能造成细胞弹性及黏弹性的差异.图8的实验结果揭示了原代正常B细胞与癌变Raji细胞之间在杨氏模量及松弛时间方面的显著差异,表明了黏弹性在指示细胞状态方面的潜在意义.为了更好地研究细胞弹性及黏弹性在癌变过程中的指示作用,需要直接对从病人体内分离出的癌变细胞及其对应的正常细胞进行测试.对于B细胞淋巴瘤,近年来的研究表明受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(the receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1, ROR1)是一种特异性表达于癌变B细胞表面的标志分子,其在正常B细胞及其他细胞表面均不表达^[40,41].因此ROR1是一个从淋巴瘤患者体内分离出癌变B细胞的合适标志分子.

本文发展了一种基于AFM逼近-停留-压痕实验的单细胞机械特性分析方法,可同时测量细胞弹性及黏弹性.统计结果(图4)显示,MCF-7(乳腺癌细胞)的杨氏模量及松弛时间均明显小于MCF-10A(正常乳腺细胞),意味着MCF-7细胞比MCF-10A细胞更柔软更易变形.2012年Plodinec等人^[8]测量了乳腺癌组织及正常乳腺组织的杨氏模量,显示乳腺癌细胞比正常乳腺细胞要软且癌细胞柔软特性与肿瘤的侵袭转移密切相关.2016年Hu研究组^[41]利用微流控技术测量了MCF-10A和MCF-7的杨氏模量和形变能力,结果表明与MCF-10A细胞相比MCF-7细胞具有更小的杨氏模量和更好的形变能力.本文的结果显示,MCF-7的松弛时间明显小于MCF-10A的松弛时间(即MCF-7变形能力更强),与参考文献^[8,42]结果一致,加深了对乳腺癌细胞的认知.细胞机械特性的变化便于癌细胞完成特定生物学功能,如癌症转移^[43].与MCF-10A相比,MCF-7具有侵袭性和转移性^[44].癌细胞转移包括一系列步骤,包括从原位肿瘤脱离,侵入局部组织,穿破血管或淋巴管,在脉管内存活,从血管或淋巴管穿出,在新的组织增殖等^[45].癌细胞柔软易形变的特性可以帮助癌细胞穿过这些障碍(细胞外基质、血管、淋巴管等)实现转移.除了黏弹特性外,MCF-7和MCF-10A在细胞生长方式,细胞形态和细胞几何特征等方面也有着明显的不同(图5和6).对于细胞来说,维持合适的形状对于其生理功能(如感知、运动、表面黏附、营养摄取等^[46])的执行有着关键性的意义.细胞形状是细

胞骨架、细胞膜、细胞基底黏附作用等多种因素共同作用的结果^[47].例如,在细胞有丝分裂时,细胞肌动蛋白骨架重新改变其结构形状生成坚硬的肌球蛋白皮层,细胞失去与基底黏附的能力^[48].肌动蛋白是哺乳动物细胞质内含量最为丰富的蛋白质之一^[49].因此肌动蛋白的改变可能导致细胞形态的改变,进而导致细胞机械特性(弹性和黏弹性)的变化.

应用所建立的方法测量了3种不同类型细胞和原代B淋巴细胞的弹性及黏弹性,结果显示了细胞松弛时间在辅助细胞杨氏模量鉴别细胞类型上的潜力,这有助于发展可指示细胞生理状态的新型免标记生物标志物^[50].传统上,细胞形态广泛用于识别病理细胞.例如,临床癌症诊断即是基于病理活检样本的形态观察.2014年,利用循环癌细胞(circulating tumor cell, CTC)尺寸远大于血细胞尺寸的特点,研究人员发展了一种基于尺寸的微流控芯片,并应用该芯片从血液中分离出CTC^[51].由于某些情况下癌细胞和正常细胞在形态和尺寸方面的重叠,测量细胞弹性及黏弹性有望辅助识别病理细胞.例如,B淋巴细胞的尺寸与T淋巴细胞尺寸接近,但B细胞(Raji细胞系)的杨氏模量显著小于T细胞(Hut细胞系)的杨氏模量^[52].本文为了研究细胞黏弹性在癌细胞及其对应的正常细胞上的差异,选取了MCF-7和MCF-10A这两种广泛使用的细胞系进行测量.为了研究原代细胞的黏弹特性,从健康志愿者外周血中分离出B淋巴细胞进行测量.未来将应用所建立的方法直接对从临床患者体内获取的原代癌细胞进行研究.临床活检样本中包含有癌细胞和正常细胞(如肿瘤包含癌细胞、成纤维细胞、基质细胞、血细胞、免疫细胞等),因此对原代癌细胞进行测试的前提是从正常细胞中分离出癌细胞.基于此,为了研究细胞弹性及黏弹性在分辨不同类型细胞方面的作用,选取了3种细胞系(HEK293, A549和L929)进行测量.

总结来说,传统AFM单细胞机械特性分析研究集中在测量细胞弹性(杨氏模量),但细胞质及其决定的细胞黏弹性与细胞生理活动过程有着密切的关联^[54-56].因此,定量测量细胞黏弹性有助于人们更好地理解细胞行为.事实上已有研究结果显示有时候细胞杨氏模量单一指标难以指示癌症的转移^[57].本文基于AFM逼近-停留-回退模式实现了对单个细胞杨氏模量和松弛时间的同时测量,对于获取多种物理参数以更好地表

征细胞力学行为有着积极的意义. 实验结果证明了细胞松弛时间在指示细胞状态及鉴别不同类型细胞方

面的潜力, 加深了对癌细胞的认识, 为AFM单细胞机械特性分析提供了新的思路.

参考文献

- Schillers H, Medalsy I, Hu S, et al. PeakForce tapping resolves individual microvilli on living cells. *J Mol Recognit*, 2016, 29: 95–101
- Liang X, Shi X, Ostrovidov S, et al. Probing stem cell differentiation using atomic force microscopy. *Appl Surf Sci*, 2016, 366: 254–259
- Dufrène Y F, Martínez-Martín D, Medalsy I, et al. Multiparametric imaging of biological systems by force-distance curve-based AFM. *Nat Meth*, 2013, 10: 847–854
- Medalsy I D, Müller D J. Nanomechanical properties of proteins and membranes depend on loading rate and electrostatic interactions. *ACS Nano*, 2013, 7: 2642–2650
- Cross S E, Jin Y S, Rao J, et al. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nat Nanotech*, 2007, 2: 780–783
- Lekka M, Pogoda K, Gostek J, et al. Cancer cell recognition—mechanical phenotype. *Micron*, 2012, 43: 1259–1266
- Lekka M. Discrimination between normal and cancerous cells using AFM. *Bionanoscience*, 2016, 6: 65–80
- Plodinec M, Loparic M, Monnier C A, et al. The nanomechanical signature of breast cancer. *Nat Nanotech*, 2012, 7: 757–765
- Suresh S. Biomechanics and biophysics of cancer cells. *Acta Biomater*, 2007, 3: 413–438
- 李密, 刘连庆, 席宁, 等. 基于AFM的临床原代细胞机械特性测量研究进展. *中国科学: 生命科学*, 2016, 46: 1370–1381
- Zheng Y, Nguyen J, Wei Y, et al. Recent advances in microfluidic techniques for single-cell biophysical characterization. *Lab Chip*, 2013, 13: 2464–2483
- Suresh S. Nanomedicine: elastic clues in cancer detection. *Nat Nanotech*, 2007, 2: 748–749
- Reich A, Meurer M, Eckes B, et al. Surface morphology and mechanical properties of fibroblasts from scleroderma patients. *J Cell Mol Med*, 2009, 13: 1644–1652
- Canetta E, Riches A, Borger E, et al. Discrimination of bladder cancer cells from normal urothelial cells with high specificity and sensitivity: combined application of atomic force microscopy and modulated Raman spectroscopy. *Acta Biomater*, 2014, 10: 2043–2055
- Rianna C, Ventre M, Cavalli S, et al. Micropatterned azopolymer surfaces modulate cell mechanics and cytoskeleton structure. *ACS Appl Mater Interf*, 2015, 7: 21503–21510
- Moeendarbary E, Valon L, Fritzsche M, et al. The cytoplasm of living cells behaves as a poroelastic material. *Nat Mater*, 2013, 12: 253–261
- Moreno-Flores S, Benitez R, Vivanco M D, et al. Stress relaxation microscopy: imaging local stress in cells. *J Biomech*, 2010, 43: 349–354
- Okajima T, Tanaka M, Tsukiyama S, et al. Stress relaxation of HepG2 cells measured by atomic force microscopy. *Nanotechnology*, 2007, 18: 084010
- Ketene A N, Roberts P C, Shea A A, et al. Actin filaments play a primary role for structural integrity and viscoelastic response in cells. *Integr Biol*, 2012, 4: 540–549
- Li M, Liu L, Xiao X, et al. Viscoelastic properties measurement of human lymphocytes by atomic force microscopy based on magnetic beads cell isolation. *IEEE Transon Nanobiosci*, 2016, 15: 398–411
- Hutter J L, Bechhoefer J. Calibration of atomic-force microscope tips. *Rev Sci Instrum*, 1993, 64: 1868–1873
- Vargas-Pinto R, Gong H, Vahabikashi A, et al. The effect of the endothelial cell cortex on atomic force microscopy measurements. *Biophys J*, 2013, 105: 300–309
- Nijenhuis N, Zhao X, Carisey A, et al. Combining AFM and acoustic probes to reveal changes in the elastic stiffness tensor of living cells. *Biophys J*, 2014, 107: 1502–1512
- Hecht F M, Rheinlaender J, Schierbaum N, et al. Imaging viscoelastic properties of live cells by AFM: power-law rheology on the nanoscale. *Soft Matter*, 2015, 11: 4584–4591
- Li M, Xiao X, Zhang W, et al. AFM analysis of the multiple types of molecular interactions involved in rituximab lymphoma therapy on patient tumor cells and NK cells. *Cell Immunol*, 2014, 290: 233–244
- Kirmizis D, Logothetidis S. Atomic force microscopy probing in the measurement of cell mechanics. *Int J Nanomed*, 2010, 5: 137–145
- Li M, Liu L, Xiao X, et al. Effects of methotrexate on the viscoelastic properties of single cells probed by atomic force microscopy. *J Biol Phys*, 2016, 42: 551–569
- Li Q S, Lee G Y H, Ong C N, et al. AFM indentation study of breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 374: 609–613
- Li M, Liu L Q, Xi N, et al. Effects of temperature and cellular interactions on the mechanics and morphology of human cancer cells investigated

- by atomic force microscopy. *Sci China Life Sci*, 2015, 58: 889–901
- 30 Simon M, Dokukin M, Kalaparthi V, et al. Load rate and temperature dependent mechanical properties of the cortical neuron and its pericellular layer measured by atomic force microscopy. *Langmuir*, 2016, 32: 1111–1119
 - 31 Rotsch C, Radmacher M. Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an atomic force microscopy study. *Biophys J*, 2000, 78: 520–535
 - 32 Kliche K, Jeggle P, Pavenstädt H, et al. Role of cellular mechanics in the function and life span of vascular endothelium. *Pflügers Arch*, 2011, 462: 209–217
 - 33 Eghiaian F, Rigato A, Scheuring S. Structural, mechanical, and dynamical variability of the actin cortex in living cells. *Biophys J*, 2015, 108: 1330–1340
 - 34 Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011, 144: 646–674
 - 35 Iyer S, Gaikwad R M, Subba-Rao V, et al. Atomic force microscopy detects differences in the surface brush of normal and cancerous cells. *Nat Nanotech*, 2009, 4: 389–393
 - 36 Kuznetsova T G, Starodubtseva M N, Yegorenkov N I, et al. Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron*, 2007, 38: 824–833
 - 37 Yu H, Mouw J K, Weaver V M. Forcing form and function: biomechanical regulation of tumor evolution. *Trends Cell Biol*, 2011, 21: 47–56
 - 38 Li M, Liu L, Xi N, et al. Nanoscale imaging and mechanical analysis of Fc receptor-mediated macrophage phagocytosis against cancer cells. *Langmuir*, 2014, 30: 1609–1621
 - 39 Hayashi K, Iwata M. Stiffness of cancer cells measured with an AFM indentation method. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2015, 49: 105–111
 - 40 Baskar S, Kwong K Y, Hofer T, et al. Unique cell surface expression of receptor tyrosine kinase ROR1 in human B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res*, 2008, 14: 396–404
 - 41 Bicocca V T, Chang B H, Masouleh B K, et al. Crosstalk between ROR1 and the Pre-B cell receptor promotes survival of t(1;19) acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*, 2012, 22: 656–667
 - 42 Hu S, Liu G, Chen W, et al. Multiparametric biomechanical and biochemical phenotypic profiling of single cancer cells using an elasticity microcytometer. *Small*, 2016, 12: 2300–2311
 - 43 Wirtz D, Konstantopoulos K, Searson P C. The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11: 512–522
 - 44 Darbre P D, Bakir A, Iskakova E. Effect of aluminium on migratory and invasive properties of MCF-7 human breast cancer cells in culture. *J Inorganic Biochem*, 2013, 128: 245–249
 - 45 Kiberstis P A. Metastasis: an evolving story. *Science*, 2016, 352: 162–163
 - 46 Ursell T S, Nguyen J, Monds R D, et al. Rod-like bacterial shape is maintained by feedback between cell curvature and cytoskeletal localization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: E1025–E1034
 - 47 Keren K, Pincus Z, Allen G M, et al. Mechanism of shape determination in motile cells. *Nature*, 2008, 453: 475–480
 - 48 Matthews H K, Delabre U, Rohn J L, et al. Changes in Ect2 localization couple actomyosin-dependent cell shape changes to mitotic progression. *Dev Cell*, 2012, 23: 371–383
 - 49 Plessner M, Melak M, Chinchilla P, et al. Nuclear F-actin formation and reorganization upon cell spreading. *J Biol Chem*, 2015, 290: 11209–11216
 - 50 Di Carlo D. A mechanical biomarker of cell state in medicine. *J Lab Autom*, 2012, 17: 32–42
 - 51 Huang T, Jia C P, Jun-Yang C P, et al. Highly sensitive enumeration of circulating tumor cells in lung cancer patients using a size-based filtration microfluidic chip. *Biosens Bioelectron*, 2014, 51: 213–218
 - 52 Li M, Liu L Q, Xi N, et al. Atomic force microscopy imaging and mechanical properties measurement of red blood cells and aggressive cancer cells. *Sci China Life Sci*, 2012, 55: 968–973
 - 53 Junttila M R, de Sauvage F J. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*, 2013, 501: 346–354
 - 54 Kasas S, Longo G, Dietler G. Mechanical properties of biological specimens explored by atomic force microscopy. *J Phys D Appl Phys*, 2013, 46: 133001
 - 55 李密, 刘连庆, 席宁, 等. 基于AFM的细胞表面超微形貌成像与机械特性测量研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2015, 42: 697–712
 - 56 Zhou E H, Martinez F D, Fredberg J J. Cell rheology: mush rather than machine. *Nat Mater*, 2013, 12: 184–185
 - 57 Park S, Lee Y J. AFM-based dual nano-mechanical phenotypes for cancer metastasis. *J Biol Phys*, 2014, 40: 413–419