基于AFM的临床原代细胞机械特性测量研究进展

李密^①, 刘连庆^{①*}, 席宁^{①②*}, 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 Electrical and Computer Engineering, Michigan State University, East Lansing MI 48824, USA

* 联系人, E-mail: lqliu@sia.cn; xin@egr.msu.edu

收稿日期: 2016-06-02; 接受日期: 2016-07-07; 网络版发表日期: 2016-11-14

国家自然科学基金(批准号: 61503372, 61522312, 61375107, 61327014, 61433017)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)的出现为免标记研究近生理环境下单个活体状态细胞的机械特性提供了新的技术手段. 自20世纪90年代中期以来, 研究人员在利用AFM测量细胞机械特性方面开展了大量研究, 结果表明细胞机械特性是一个新的免标记生物标志物(可有效指示细胞生理状态的变化), 加深了人们对癌症等重大疾病的认识, 促进了细胞生物力学的发展. 然而, 现有的AFM单细胞机械特性研究主要集中在体外培养的细胞系, 由于体内体外环境的巨大差异导致测量结果难以完全反映人体内的真实情况. 特别是在精准医疗时代, 需要对来自患者的原代细胞进行测试分析以实现疾病的个性化诊治. 因此发展直接对临床患者原代细胞(癌变细胞和正常细胞)机械特性进行离体检测的方法具有潜在的转化医学实际意义. 本文结合作者在基于AFM的淋巴瘤病例细胞机械特性测量与表征方面的研究工作, 介绍了AFM测量细胞机械特性的原理与方法, 总结了近年来AFM在检测原代细胞机械特性方面的进展, 并对其面临的问题和挑战进行了讨论.

关键词 原子力显微镜, 原代细胞, 机械特性, 弹性, 黏弹性

原子力显微镜(atomic force microscopy, AFM)由Binnig等人^[1]于1986年发明. AFM利用一根末端连有极细针尖的微悬臂梁对样品表面进行光栅扫描, 同时利用一束照射到悬臂梁背面随后反射至四象限光电探测器(position sensitivity detector, PSD)的激光来检测悬臂梁的偏转量. 通过控制探针驱动器在垂直方向上下运动以维持针尖与样品表面之间相互作用力恒定来获取反映样品表面三维地貌特征的图像. AFM的出现为细胞成像提供了新的工具. 光学显微镜受制于200 nm极限分辨率无法观察细胞纳米结构的细节情

况, 而电子显微镜则需要对细胞进行固定、脱水、镀金等处理^[2], 破坏了细胞固有结构, 无法对活体状态细胞进行观察. 虽然环境扫描电子显微镜(environmental scanning electron microscopy, ESEM)可以对含一定水分的样本进行成像, 但ESEM提供的环境(0℃, 600 Pa大气压^[3])与细胞生存环境(37℃, 标准大气压)相比仍有着巨大的差距, 目前ESEM尚不能实现对生理环境下活细胞的成像^[4]. 与光学显微镜和电子显微镜/ESEM相比, AFM不仅可以在溶液下工作, 具有纳米级的空间分辨率(0.5~1 nm^[5]), 并且不需要对样品进行固定、

引用格式: 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
Li M, Liu L Q, Xi N, et al. Progress in measuring the mechanical properties of clinical primary cells using atomic force microscopy. Sci Sin Vitae, 2016, 46: 1370–1381, doi: [10.1360/N052016-00200](https://doi.org/10.1360/N052016-00200)

染色、标记等预处理(无损探测),因此AFM特别适合于原位观察活细胞的超微精细结构,如囊泡^[6]、微丝蛋白^[7]、细胞膜脂筏^[8]、微绒毛^[9]等. AFM连续成像可直观地显示出细胞超微精细结构的动态变化过程,如囊泡分泌^[6,10]、细胞分裂与融合^[11]、真菌感染^[12]、药物作用^[13]等,为细胞生理活动行为提供了新的认识.

AFM已成为细胞生物学的重要研究工具,这不仅是因为AFM可以对细胞超微精细结构进行高分辨率成像,另外一个重要原因是AFM可以在压痕模式下探测细胞机械特性^[14]. 从分子、细胞到组织、器官,几乎组成生命有机体的任何一个单元均有着其独特的机械特性^[15-17]. 研究人员利用AFM对癌症等重大疾病发生发展过程中细胞机械特性的变化规律进行了大量研究,研究结果表明细胞机械特性是一个新的生物标志物,可用于定量指示细胞病理性变化和鉴别细胞类型^[18](如癌变细胞的杨氏模量比正常细胞的杨氏模量小70%^[19],且侵袭型癌细胞的杨氏模量小于惰型癌细胞的杨氏模量^[20,21]),这是因为细胞发生病理性变化(如癌变)后其形状和内部支架(细胞骨架)发生改变,这种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)的变化,并最终诱导细胞功能(如基因表达、生存能力、增殖能力等)的改变^[22]. 目前临床上癌症诊断主要依赖于对活检组织进行的细胞形态学观察,然而由于有时候正常细胞与癌细胞的形态学特征重合,导致这种方法并非100%准确^[23]. 细胞机械特性检测的引入将可作为临床细胞形态学检查的有益补充,例如,2009年Reich等人^[24]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(硬皮病皮肤成纤维细胞的弹性常数($\sim 0.47 \times 10^{-3}$ N/m)明显小于比正常皮肤成纤维细胞的弹性常数($\sim 0.6 \times 10^{-3}$ N/m)),显示出细胞机械特性检测在提升疾病诊断准确率方面的积极作用. 自从20世纪90年代中期以来^[25],各国学者在AFM单细胞机械特性检测方面开展了大量研究^[26-29],但目前这些研究大多集中在体外培养的细胞系^[30]. 体外培养的细胞系与体内细胞有着显著的差异,导致其检测结果难以反映人体内的真实情况. 直接对人体原代细胞进行探测更接近临床环境同时也有助于更好地理解细胞机械特性在疾病发生发展中的作用. 基于此在过去的数年中研究人员开始利用AFM对临床原代样本(细胞/组织等)进行探测并取得

了显著进展,这对于推进细胞机械特性检测在精准医疗中的实际应用有着重要的基础意义. 本文结合作者在淋巴瘤病例细胞黏弹性检测方面的工作,介绍了AFM测量细胞机械特性(弹性和黏弹性)的原理和方法,总结了近年来AFM应用于原代细胞机械特性检测方面的进展,最后对其面临的问题和挑战进行了讨论.

1 AFM测量细胞机械特性的原理与方法

目前利用AFM在压痕模式下获取的细胞机械特性信息主要包括细胞弹性和细胞黏弹性这两类^[31],测量原理与方法如图1所示^[32]. 在压痕模式(indenting mode)下,AFM探针在细胞表面某个位置点进行垂直方向的往复运动. 探针首先从远离细胞的位置不断逼近细胞,接触细胞后在细胞表面产生压痕直至悬臂梁加载力(loading force)达到设定的最大值,此后探针停留一定时间(探针驱动器的垂直位置保持不变),随后从细胞表面回退至初始位置. 探针停留的目的是为了测量细胞的黏弹性(如松弛时间),因此逼近-停留-回退(approach-reside-retract)的过程也称为AFM细胞应力松弛(stress relaxation)实验^[32,33]. 如果只需测量细胞弹性(如杨氏模量),则探针在逼近到最大加载力后立即回退(不需要停留这个步骤). 在逼近-停留-回退过程中记录探针与基底之间的距离变化和探针悬臂梁偏转量的变化,即得到力-距离曲线(简称力曲线,图1B),该曲线可由AFM操控软件记录得到. 同时记录逼近-停留-回退过程中悬臂梁偏转量随时间的变化,即得到力-时间曲线(又称应力松弛曲线,图1D),该曲线可通过AFM外接示波器记录得到. 图1E为与图1D相应的探针垂直方向位置变化曲线. 图1D和E中红色虚线指示的是松弛过程,可以看到松弛过程中力逐步衰减而探针在垂直方向的位置保持不变.

根据力曲线上的接触点(图1B)将力曲线转化为压痕曲线(探针驱动器在垂直方向上的变化量减去悬臂梁的偏转量即为压痕深度),随后利用理论模型对压痕曲线进行拟合即可得到细胞杨氏模量. 目前可用于提取细胞杨氏模量的模型主要有Hertz-Sneddon, JKR(Johnson-Kendall-Roberts)和DMT(Derjaguin-Muller-Toporov)^[17]. Hertz模型适用于球型探针, Sneddon对Hertz模型进行了扩展使得其可适用于锥形探针. Hertz模型忽略了针尖与细胞接触区域的作用力,如静电力、黏附力、摩

图1 AFM测量细胞机械特性(弹性和黏弹性)的原理和方法

A: 逼近-停留-回退过程示意图; B: 活细胞上的典型力曲线; C: 实验压痕曲线的Hertz模型拟合; D: 活细胞上获取的应力松弛曲线及相应的(E)探针垂直方向位置变化曲线; F: 应力松弛曲线的Maxwell模型拟合; B~F引自文献[32]; G: 球型探针的光学及SEM(插图)成像[21]

擦力等。JKR和DMT模型考虑了接触区域内的黏附力, JKR模型适用于针尖较大且与样本之间黏附力较大的情况而DMT模型则适用于针尖较小且与样本之间黏附力较小的情况[34]。但在实际中应用得最广的模型是Hertz模型[17,18]。Hertz模型基于一系列对被探测样本的假设, 如各向同性、均质、线弹性、轴对称、无限厚、表面光滑等[35]。尽管细胞并不符合这些条件, 但研究表明在压痕深度小于样本厚度10%的情况下, Hertz模型适用[36]。此外力曲线包含逼近部分和回退部分, 其中逼近部分用于计算细胞杨氏模量, 回退部分则用于计算细胞黏附力[28]。从图1D应力松弛曲线可以看到在逼近阶段无松弛现象发生(松弛现象仅发生在停留阶段), 因此在逼近阶段测量得到的杨氏模量为不依赖于细胞黏弹特性的瞬时模量, 表明了Hertz模型(只考虑弹性而不考虑黏弹性)的有效性。Hertz模型公式为[30]:

$$F_{\text{spherical}} = \frac{4E\sqrt{R}\delta^{1.5}}{3(1-\nu^2)}, \quad (1)$$

$$F_{\text{conical}} = \frac{2E\delta^2 \tan\theta}{\pi(1-\nu^2)}, \quad (2)$$

其中 ν 为细胞泊松比(通常将活细胞考虑成不可压缩材料, 因此 $\nu=0.5$), F 为探针加载力, δ 为探针压痕深度, E 为细胞杨氏模量, θ 为锥形针尖半开角, R 为球型针尖半径。根据胡克定律($F=kx$, k 为探针悬臂梁弹性系数)可知通过测量探针悬臂梁的偏转量 x , 即可得到探针

加载力 F 。得到 F 和 δ 之后, 即可利用公式(1)或(2)(取决于采用的是球型探针还是锥形探针)对压痕曲线进行拟合得到细胞杨氏模量。探针类型的选取取决于实验目的, 锥形针尖可以精确地分辨细胞不同区域之间杨氏模量的差异从而利于建立细胞机械特性与结构之间的关联[37], 而球型探针则可以较好地探测细胞整体杨氏模量[20]。通过将微球修饰至悬臂梁上即可制成球型探针(如利用树脂胶水[21])(图1G)。将图1B中逼近曲线转化为压痕曲线后, 利用Hertz模型对压痕曲线进行拟合, 拟合结果如图1C所示, 可以看到拟合曲线与实验曲线吻合。需要指出的是在测量细胞杨氏模量时要求探针弹性系数与细胞硬度在一个量级上, 因此通常选取弹性系数在0.01~0.5 N/m[18]范围内的探针以确保测量的有效性。此外, AFM细胞杨氏模量测量结果与很多因素有关, 如探针类型(悬臂梁弹性系数、针尖形状)、基底、环境温度、探针加载速度、细胞被探测部位、培养基等[30,38]。因此为了使测量结果具有可比性, 需要保证压痕实验条件环境的一致性。

利用Hertz模型对力曲线进行拟合得到的细胞杨氏模量仅反映了细胞的瞬时弹性特性。由于细胞质的存在导致细胞还具有黏弹特性[14]。利用广义Maxwell模型[33,39]可以对获取的应力松弛曲线进行拟合得到细胞松弛时间。广义Maxwell模型将弹簧-黏壶(spring-dashpot)单元进行并联, 同时并联一个弹簧:

$$F(t) = A_0 + A_i \sum_{i=1}^n e^{-t/\tau_i}, \quad (3)$$

其中 A_0 为瞬时弹性响应, τ_i 为第 $i(i=1,2,\dots,n)$ 阶松弛时间, A_i 为 $t=0$ 时的第 $i(i=1,2,\dots,n)$ 阶起始应力. 利用公式(3)对获取的松弛曲线即可得到细胞松弛时间. 决定细胞黏弹特性的因素是细胞质, 但细胞质包含各种物质, 如细胞液、细胞器、细胞骨架、内含物等, 具有高度的异质性和复杂性. 组成细胞质的不同单元具有不同的松弛时间特性, 导致1阶Maxwell模型通常难以准确描述细胞的复杂的松弛行为, 而2阶Maxwell模型则能较好地描述细胞松弛行为^[32,33,40]. 利用2阶Maxwell模型对图1D中松弛曲线进行拟合, 拟合结果如图1F所示, 可以看到2阶Maxwell模型与实验松弛曲线吻合.

2 AFM测量临床原代细胞机械特性

癌症转移过程中原发灶癌细胞需要通过一系列障碍, 包括从原发肿瘤脱离, 侵袭局部组织, 挤入血管或淋巴管并在脉管内存活, 挤出脉管, 在新的组织增殖等^[41]. 直接对临床患者样本中原代癌细胞的机械特性进行测量, 并进而研究细胞机械特性在癌症转移机制中的作用是AFM细胞机械特性研究领域的一个重要方向, 这不仅对于认识癌症转移的机理有着重要的基础意义, 而且也有助于发展新型癌症诊治和预防方法^[42].

2.1 细胞弹性

在对原代癌细胞进行探测时的一个重要问题是怎样识别出癌细胞, 因为活检样本中癌细胞通常与正常细胞混合在一起. 2007年Cross等人^[19]利用AFM测量并比较了癌症患者胸腔液中转移腺癌细胞和正常间皮细胞的杨氏模量. 临床收集癌症患者胸腔液中的细胞, 离心并利用培养基重悬浮细胞后在37℃(5% CO₂)环境下培养12 h. 经过12 h的培养, 正常细胞呈现平铺的形状, 而癌细胞则呈现圆形(图2A). 进一步通过细胞表面特异性标志物荧光染色来确认癌细胞和正常细胞(通过Ber-EP4标记鉴别癌细胞表面, 通过钙视网膜蛋白(calretinin)标记鉴别正常间皮细胞). 随后利用AFM对7个临床病例(4个转移癌, 3个健康人)的细胞进行机械特性测量(图2B). 对每个转移癌病例在37℃下利用AFM分别测量8个癌细胞和8个正常间皮细胞的杨氏模量, 结果显示癌细胞的杨氏模量约为0.5 kPa, 而正常间皮细胞的杨氏模量为2 kPa, 揭示出转移癌细胞与正

常间皮细胞在机械特性上的显著差异(即癌细胞比正常间皮细胞明显更柔软). 针对胸腔液细胞样本制作时间长(需要体外培养12 h待细胞分化)的不足, 2008年该研究组发展了胸腔液细胞离心涂片样本制作方法^[43], 该方法将制样时间缩短为1 min并避免了细胞培养过程中可能的人为因素对测量结果的影响, AFM细胞机械特性测量实验结果证明了该制样方法的有效性.

Cross等人^[19,43]的研究聚焦于从活检样本中分离的瘤细胞, 但肿瘤是一个包含瘤细胞、胞外基质、血管、其他类型细胞(如成纤维细胞、内皮细胞、免疫细胞等)的组织^[44]. 因此直接对活检肿瘤组织进行探测将更接近于临床实际情况. 2012年Plodinec等人^[45]利用AFM测量并比较了正常乳腺组织、良性乳腺组织和恶性乳腺组织的杨氏模量. 选取30个临床病例进行实验. 对每个病例, 通过超声诊断得到肿瘤的位置, 随后获取5个圆柱状活检乳腺组织样本(直径0.2 cm, 长0.2~1 cm), 其中1个样本用于AFM测量, 另外4个样本用于后续的病理学实验. AFM实验时没有任何临床先验知识. 利用生物相容胶水将活检组织样本黏附至聚四氟乙烯(teflon)基底(图2C). 对每个活检组织, 室温下(Ringer溶液中)在20个不同局部区域(大小: 20×20 μm², 相邻局部区域之间间隔500 μm)获取24×24点阵力曲线, 测量组织杨氏模量(图2D). AFM实验后, 通过组织病理学实验(包括H&E染色和肿瘤标志物免疫组化)来鉴别活检组织的状态(正常、良性、恶性)(图2D). 实验结果揭示出正常乳腺组织和良性乳腺组织的杨氏模量均呈现单峰分布, 而恶性乳腺组织的杨氏模量呈现双峰分布且有一个明显癌细胞的峰值(0.57±0.16 kPa), 证明了肿瘤组织具有独特的机械特性以及AFM对临床活检组织机械特性进行测量的能力. 同样是在2012年Lekka等人^[46]利用AFM对肿瘤活检组织及其对应的正常组织的杨氏模量进行了测量. 利用剃刀将获取的活检组织切割成薄片(6 mm×2 mm×2 mm), 并通过胶水将其黏至载玻片, 随后在室温下(DMEM培养基中)对组织的杨氏模量进行测量. 同时通过对活检样本进行H&E染色来判断其状态(正常组织或肿瘤组织). 结果显示, 肿瘤组织的杨氏模量显(0.57±0.19 kPa)著小于正常组织的杨氏模量(1.27±0.13 kPa)(图2E和F). 2013年Zhou等人^[47]利用AFM研究了舌鳞状细胞癌(tongue squamous cell carcinoma, TSCC)原代细胞的机械特性与其转移能力之间的关联. 对4个TSCC临床病例进行

图2 利用AFM测量原代癌细胞的杨氏模量^[19,45,46]

A和B: 测量胸腔液中癌细胞与正常细胞杨氏模量^[19]。A: 光学图像, 箭头(i)指示癌细胞(圆形), 箭头(ii)指示正常细胞(平铺); B: 杨氏模量对比。C和D: 测量乳腺组织的杨氏模量^[45]。C: 光学图像; D: 杨氏模量对比, 插图为H&E染色。E和F: 测量子宫内腺癌组织和正常组织的杨氏模量^[46]。E: 杨氏模量对比; F: H&E染色

了实验。从获取的TSCC活检组织中提取出原代癌细胞并进行体外培养, 随后对细胞的杨氏模量进行测量同时通过肿瘤细胞侵袭实验测试细胞的侵袭能力。结果表明, 转移能力越强的细胞的杨氏模量越小, 证明了癌细胞机械特性与其转移能力之间的关联。细胞杨氏模量越小意味着其变形能力越强, 这样便于其在转移过程中通过各种障碍, 如胞外基质、血管壁等^[41]。

2.2 细胞黏弹性

目前利用AFM对临床原代癌细胞机械特性进行的测量主要集中在细胞弹性特性(杨氏模量)^[19,43,45-47], 而对于细胞黏弹特性在癌症发生发展过程中的作用的研究还不多见^[18]。研究细胞黏弹特性有助于深入认识细胞物理特性在其生理活动中的调控作用。基于此, 本课题组结合AFM与磁珠细胞分选技术, 应用2阶Maxwell模型, 实现了对人外周血中B淋巴细胞弹性特性和黏弹特性的同步测量^[32], 如图3所示。选取6个健康志愿者进行实验, 抽取外周血并随后加入抗凝剂。首先对抗凝血进行密度梯度离心提取出外周血单核细

胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)以消除血液中红细胞的干扰(图3A)。随后应用连有CD19抗体的磁珠分选出PBMC中的B细胞(图3B)。CD19是一种特异性表面标志物, 仅表达在B细胞上。将磁珠与PBMC共孵育后控制细胞悬浮液通过磁场, B细胞会停留在磁场中, 而其他细胞会流出磁场。去掉磁场后, 收集得到的细胞即为B细胞。对收集的细胞进行荧光染色实验(图3C~E)证明了细胞具有活性同时确认收集的细胞为B细胞。首先采用活细胞染色剂羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(carboxyfluorescein succinimidyl ester, CFSE)对收集的细胞进行染色(图3C), 表明细胞可以被CFSE染色。随后对细胞进行碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色(图3D), 表明细胞膜是完整的。CFSE和PI荧光染色实验结果证明了分选得到的细胞具有活性。随后对细胞进行了CD20荧光标记。与CD19一样, CD20也是一种特异性标志物, 只表达于B细胞上。从CD20荧光标记结果(图3E)可以看到细胞发明亮的荧光, 证明了分选得到的细胞为B细胞。随后对B细胞进行了AFM形貌表征(图3F~H), 统计结果显示B细胞直径为6~7 μm ,

图3 利用AFM测量健康人外周血中B细胞的杨氏模量和松弛时间^[32]

A: 人外周血密度梯度离心得到的PBMC的光学图; B: 利用磁珠分选从PBMC中得到的B细胞的光学图; C~E: B细胞的CFSE染色(C), PI染色(D), 和CD20标记(E), C~E中插图为对应的光学明场图像; F~H: B细胞的AFM高度图(F), 三维图(G)和截面曲线(H); I: B细胞上获取的应力松弛曲线的2阶Maxwell模型拟合; J~L: 6个健康志愿者外周血中B细胞的杨氏模量(J), 1阶松弛时间 τ_1 (K)和2阶松弛时间 τ_2 (L)对比

高度为3~4 μm . 在磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)溶液下在活体状态的B细胞表面获取力曲线和应力松弛曲线. 利用Hertz模型对力曲线进行拟合得到杨氏模量, 利用2阶Maxwell模型对应力松弛曲线进行拟合得到细胞松弛时间(图3I~L). 统计结果表明, 健康B细胞的杨氏模量为2~3 kPa, 松弛时间为0.03~0.06 s (τ_1)和0.35~0.55 s (τ_2). 为了比较正常B细胞与癌变B细胞之间黏弹特性的差异, 进一步测量了淋巴瘤Raji细胞系的杨氏模量和松弛时间, 结果表明正常B细胞的杨氏模量明显大于Raji细胞杨氏模量, 而正常B细胞的松弛时间则小于Raji细胞的松弛时间, 为细胞黏弹特性在淋巴瘤形成中的作用提供了新的认识. 实验结果证明了AFM测量血液中原代细胞黏弹特性的能力, 同时细胞黏弹特性可用于指示细胞生理状态, 下一步将应用建立的方法对B淋巴瘤/白血病患者外周血中B细胞的弹性(杨氏模量)和黏弹性(松弛时间)进行测量, 定量分析B细胞机械特性在血液疾病形成过程中的作用.

3 AFM探测原代细胞表面靶点-药物分子间相互作用

药物-靶点之间的相互作用对于理解药物作用机制并进而设计更好的药物有着重要的基础意义. 将药物分子修饰到针尖表面后AFM可以通过在细胞表面获取力曲线来对细胞表面的单个靶点分子进行探测, 这种技术被称为单分子力谱(single-molecule force spectroscopy, SMFS)^[48]. 在获取力曲线的过程中, 如果针尖上修饰的药物分子与细胞表面的靶点分子发生结合, 则在回退过程中药物-靶点分子对会被拉伸, 当悬臂梁施加的拉力大于药物-靶点化学键时, 则药物-靶点分子对断裂, 体现在力曲线上则会出现特异性突变峰^[49]. 控制修饰到针尖表面的药物分子的密度使得针尖与细胞每次接触过程中只形成一个药物-靶点分子对, 则力曲线上的突变峰的幅值即为单对药物-靶点分子的结合力. 目前进行的SMFS研究主要集中在体外培养的细胞系或基底表面吸附的纯化蛋白分子^[50],

由于体内体外环境的巨大差异, 这些结果无法完全反映真实的分子活动行为. 直接对临床环境下获取的原代癌细胞表面靶点分子活动进行探测有助于更好地理解药物的作用机制. 基于此, 本课题组结合荧光标记对B细胞淋巴瘤患者骨髓样本中瘤细胞表面的靶点分子进行了探测(图4)^[51~53]. 近年来的研究表明, 受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1, ROR1)是一种特异性淋巴瘤细胞表面标志物, 只表达于B细胞白血病和B细胞淋巴瘤(如套细胞淋巴瘤、Burkitt淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、弥漫大B细胞淋巴瘤、滤泡淋巴瘤等)的癌细胞表面^[54,55], 而在正常的B细胞表面及其他细胞表面均不表达. 因此ROR1是一种特异性淋巴瘤细胞标志物. 选取骨髓受侵的B细胞淋巴瘤患者, 抽取患者骨髓随后制成细胞涂片并进行ROR1荧光染色(图4A~C). 可以清晰地看到一个细胞发出明亮的荧光, 指示其为癌细胞. 随后进行的AFM成像(图4D和E)则进一步揭示出细胞表面形貌

细节. 通过NHS-PEG-MAL连接分子将rituximab连接到AFM针尖表面(图4F), 随后在癌细胞表面进行SMFS实验, 获取力曲线. 获取的典型力曲线上在回退部分可见明显的特异性突变峰(图4G), 对结合力进行统计的结果显示癌细胞表面CD20-rituximab结合力为 54 ± 38 pN(图4H). 为了证明测量的力对应CD20-rituximab特异性相互作用, 进行了阻断实验. 往溶液中加入过量的rituximab后获取力曲线, 结果显示力曲线上突变峰消失(图4I), 证明了CD20-rituximab特异性相互作用. 进一步通过在细胞表面局部区域($500\times 500\text{ nm}^2$)获取点阵(16×16)力曲线, 则可以得到CD20分布图(图4J), 图中亮色像素对应于癌细胞表面的CD20. 应用所建立的方法对3个临床淋巴瘤病例癌细胞表面CD20的亲合力及分布密度进行了测量(图4K和L), 并与临床rituximab治疗结果进行对比, 结果显示淋巴瘤病例癌细胞表面CD20的分布密度越大则实际疗效越好.

个性化治疗的前提是对患者进行精确的诊断以

图4 AFM探测淋巴瘤病例骨髓中瘤细胞表面靶点分子^[51~53]

A~C: 对骨髓样本细胞进行ROR1荧光标记的明场图像(A), ROR1荧光图(B)和叠加图(C); D和E: 对骨髓样本细胞进行AFM成像得到的AFM高度图(D)和AFM偏差图(E); F: SMFS测量CD20-rituximab相互作用原理; G: 在病例癌细胞表面获取的有突变峰的典型力曲线; H: 癌细胞表面CD20-rituximab结合力统计柱状图; I: 加入rituximab阻断后获取的典型力曲线; J: 通过获取点阵力曲线来测量癌细胞表面CD20的分布; K和L: 3个淋巴瘤患者的CD20结合力(K)和CD20分布密度(L)对比. A~E, J引自文献^[51]; G~I引自文献^[52]; K和L引自文献^[53]

明确患者是否会从治疗中受益,这就要求对患者的病理情况进行准确描述.目前大部分研究针对体外培养的细胞系,与临床实际需求还有着较大的差距.加强实验室研究与临床实际之间的联系对于推动研究成果向临床应用快速转化有着重要的意义^[56].AFM可以提供独有的信息(如机械特性和细胞表面靶点分子特性),是对其他检测方法的有益补充.将AFM检测结果与其他检验结果结合可以多方面更好地理解疾病,从而有助于提高疾病诊治水平.目前AFM不仅可以对临床原代细胞机械特性进行探测,还可以探测原代细胞表面的特定分子,使得可以在更接近真实情况下研究细胞活动和药物作用,具有重要的基础意义.

4 挑战与展望

AFM的出现为细胞机械特性测量表征提供了新的技术手段,其在癌症研究上的应用为细胞生理活动行为带来了大量新的认识.特别是过去数年中在临床样本(胸腔液、活检组织、血液、骨髓等)^[19, 32, 44, 45-47, 51-53]进行的研究证明了AFM在测量原代细胞/组织机械特性(弹性和黏弹性)和分子特性上的能力,揭示了细胞机械特性在癌症发生发展过程中的指示作用,显示了AFM检测辅助临床疾病诊治的巨大潜力.然而需要指出的是现有的研究距离临床实际检测的需求还有着巨大的差距,特别是还有许多技术性问题有待解决.

(1) AFM细胞机械特性测量技术本身还有待改进. AFM细胞机械特性测量结果跟很多外部因素有关,如环境(温度、基底、培养基等^[38])、实验参数(探针类型、加载速度、压痕深度等^[18])、细胞(探测部位、细胞状态)、数据处理(模型选择、接触点选取^[57])等.由于不同研究组进行AFM细胞压痕实验的条件通常难以保持一致,导致测量结果(甚至是对同一类细胞进行测量的结果^[30])往往存在差异.因此为了使来自不同研究组的研究结果具有可比性,需要对测量过程进行标准化,这就要求定义标准测量过程以及标准样品. Demichelis等人^[58]利用聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)制作了杨氏模量在500~5000 kPa范围的样本,随后对样本进行的压痕实验证明了不同尺度下(宏观、微米、纳米)AFM机械特性测量结果的可重复性,为AFM细胞机械特性测量标准化提供了可行的思路.目前AFM细胞机械特性测量

主要依赖于人工参与(在光学显微镜引导下控制探针移动至目标细胞,控制探针在细胞表面进行压痕实验,测量完成移动探针到下一个细胞进行测量),导致效率十分低:一次仅能测量1个细胞,而测量1个细胞往往需要数分钟^[29].为了得到具有统计学意义的数据,通常需要对大量细胞进行测量,这将耗费大量时间,成为阻碍AFM细胞机械特性实际应用的重要因素^[59].尽管近年来出现了自动数据处理和结果实时显示的AFM峰值力轻敲(peak force tapping, PFT)成像模式^[60].在PFT模式下,探针在样本表面进行光栅扫描,在每个采样点获取力曲线,通过实时分析力曲线可以同时得到细胞形貌图和杨氏模量图,有助于人们直观分析细胞结构与其机械特性之间的关联.但目前利用该技术仅能应用于微生物细胞(如B群链球菌^[61])和少数贴壁细胞(如3T3成纤维细胞^[7]、MDCK犬肾细胞^[9]、HaCaT表皮细胞^[62]).怎样使PFT技术可应用于更多类型的细胞,尤其是动物悬浮细胞(不能贴壁生长、表面柔软),是目前亟需解决的问题.此外PFT技术仅解决了数据自动处理及显示的问题,为了进一步提升AFM实验效率,还需要提高AFM实验的自动化程度以尽可能地减少人工的参与,如AFM自动识别细胞并控制探针移动到目标细胞,探测完成后AFM自动移动到下一个细胞进行探测等.本课题组发展了一种AFM细胞机械特性自动化检测方法^[63],通过图像处理识别出视场中的细胞,随后对细胞进行局部扫描(仅扫描两条线,分别是垂直方向和水平方向)将探针定位到细胞中央部位,测量完成后控制探针移动到视场中下一个细胞进行探测.该方法目前仅适用于圆形细胞,对于形状不规则细胞(如贴壁细胞),则还面临着怎样快速定位到细胞中央部位的问题.

(2) AFM细胞机械特性测量应用于临床实际时还面临着许多具体问题.目前对临床原代样本进行的探测实验结果证明了细胞/组织机械特性可用于区分正常细胞/组织和癌细胞/肿瘤组织.为了达到临床应用的水平,还需要结合临床病理诊断开展大规模临床病例探测实验以检验AFM机械特性检测的可靠性,并需要建立标准的临床样本制备和AFM测量程序,确定肿瘤细胞/组织机械特性相关阈值(如正常值范围、癌变值范围).然而肿瘤是一个高度异质(基因型和表现型差异)的疾病,不仅患者之间肿瘤具有异质性(肿瘤间异质),同一肿瘤的不同部位也有异质性(肿瘤内异

质)^[64]。因此怎样确保制备的活检样本可代表患者肿瘤状态是首要解决的问题, 否则将直接影响探测结果, 导致假阴性和假阳性的出现, 给患者造成极大的痛苦。对实体瘤来说, 可以直接对临床制备的活检组织的机械特性进行探测, 但这种测量结果仅反映了肿瘤组织局部区域的整体(包括了癌细胞、正常细胞和基质等的复合物)机械特性, 难以判断肿瘤组织中各成分对测量结果的具体贡献, 且测量结果会受到样本制作的影响(如取材部位、样本厚度、基底等)。对于非实体瘤来说, 如白血病, 则需要对患者体内的单个细胞的机械特性进行探测, 其样本制作将与实体瘤有着显著的差异, 但目前有关这方面的研究还很缺乏。癌症的形成是一个与多种因素有关的复杂过程, 包括很多化学

特性(结构、功能、组成等)的变化, 而AFM的探测结果是直接的物理信息^[22,65]。尽管目前对于细胞机械特性与其结构^[66]以及信号转导^[67]之间的认识有了显著的进步, 但对于细胞机械特性改变是怎样导致癌症发生的内在机理仍不清楚^[68,69], 阻碍了细胞机械特性检测在疾病诊治中的实际应用。

总而言之, 尽管基于AFM的细胞机械特性检测在临床实际应用上还面临着许多困难和挑战, 但过去数年内AFM在临床原代细胞上取得的令人兴奋的成绩使我们相信, 随着基于AFM的细胞机械特性检测技术的进步和对癌症研究的深入, 机械特性检测所具有的独特优势将为患者的个性化精准诊治带来新的突破。

参考文献

- 1 Binnig G, Quate C F, Gerber C. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett*, 1986, 56: 930–933
- 2 Foster C M, Collazo R, Sitar Z, et al. Cell behavior on gallium nitride surfaces: peptide affinity attachment versus covalent functionalization. *Langmuir*, 2013, 29: 8377–8384
- 3 Ahmad M R, Nakajima M, Kojima S, et al. Nanoindentation methods to measure viscoelastic properties of single cells using sharp, flat, and buckling tips inside ESEM. *IEEE Trans Nanobiosci*, 2010, 9: 12–23
- 4 Li M, Liu L Q, Xi N, et al. Progress of AFM single-cell and single-molecule morphology imaging. *Chin Sci Bull*, 2013, 58: 3177–3182
- 5 Neuman K C, Nagy A. Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nat Meth*, 2008, 5: 491–505
- 6 Hecht E, Thompson K, Frick M, et al. Combined atomic force microscopy–fluorescence microscopy: analyzing exocytosis in alveolar type II cells. *Anal Chem*, 2012, 84: 5716–5722
- 7 Eghiaian F, Rigato A, Scheuring S. Structural, mechanical, and dynamical variability of the actin cortex in living cells. *Biophys J*, 2015, 108: 1330–1340
- 8 Cai M, Zhao W, Shang X, et al. Direct evidence of lipid rafts by *in situ* atomic force microscopy. *Small*, 2012, 8: 1243–1250
- 9 Schillers H, Medalsy I, Hu S, et al. PeakForce Tapping resolves individual microvilli on living cells. *J Mol Recognit*, 2016, 29: 95–101
- 10 Chen L, Chu W, Xu Y, et al. Time-series investigation of fused vesicles in microvessel endothelial cells with atomic force microscopy. *Microsc Res Tech*, 2010, 73: 152–159
- 11 Stadler B, Blattler T M, Franco-Obergon A. Time-lapse imaging of *in vitro* myogenesis using atomic force microscopy. *J Microsc*, 2010, 237: 63–69
- 12 El-Kirat-Chatel S, Dufrêne Y F. Nanoscale imaging of the *Candida*-macrophage interaction using correlated fluorescence-atomic force microscopy. *ACS Nano*, 2012, 6: 10792–10799
- 13 Lamprecht C, Hinterdorfer P, Ebner A. Applications of biosensing atomic force microscopy in monitoring drug and nanoparticle delivery. *Expert Opin on Drug Deliver*, 2014, 11: 1237–1253
- 14 Kirmizis D, Logothetidis S. Atomic force microscopy probing in the measurement of cell mechanics. *Int J Nanomed*, 2010, 5: 137–145
- 15 Engler A J, Sen S, Sweeney H L, et al. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 2006, 126: 677–689
- 16 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
- 17 Kasas S, Longo G, Dietler G. Mechanical properties of biological specimens explored by atomic force microscopy. *J Phys D-Appl Phys*, 2013, 46: 133001
- 18 Lekka M. Discrimination between normal and cancerous cells using AFM. *BionanoSci*, 2016, 6: 65–80

- 19 Cross S E, Jin Y S, Rao J, et al. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nat Nanotech*, 2007, 2: 780–783
- 20 Xu W, Mezencev R, Kim B, et al. Cell stiffness is a biomarker of the metastatic potential of ovarian cancer cells. *PLoS ONE*, 2012, 7: e46609
- 21 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
- 22 Suresh S. Biomechanics and biophysics of cancer cells. *Acta Biomater*, 2007, 3: 413–438
- 23 Suresh S. Nanomedicine: elastic clues in cancer detection. *Nat Nanotech*, 2007, 2: 748–749
- 24 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
- 25 Radmacher M, Fritz M, Kacher C M, et al. Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope. *Biophys J*, 1996, 70: 556–567
- 26 Liu Y, Feng J, Shi L, et al. *In situ* mechanical analysis of cardiomyocytes at nano scales. *Nanoscale*, 2012, 4: 99–102
- 27 Efremov Y M, Lomakina M E, Bagrov D V, et al. Mechanical properties of fibroblasts depend on level of cancer transformation. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843: 1013–1019
- 28 Li M, Liu L, Xi N, et al. Research progress in quantifying the mechanical properties of single living cells using atomic force microscopy. *Chin Sci Bull*, 2014, 59: 4020–4029
- 29 Li M, Liu L, Xi N, et al. *In situ* imaging the cellular ultra-microstructures and measuring the cellular mechanical properties using atomic force microscopy. *Prog Biochem Biophys*, 2015, 42: 687–712
- 30 Lekka M, Pogoda K, Gostek J, et al. Cancer cell recognition—mechanical phenotype. *Micron*, 2012, 43: 1259–1266
- 31 Haase K, Pelling A E. Investigating cell mechanics with atomic force microscopy. *J R Soc Interface*, 2015, 12: 20140970–20140970
- 32 Li M, Liu L, Xi N, et al. Viscoelastic properties measurement of human lymphocytes by atomic force microscopy based on magnetic beads cell isolation. *IEEE Trans Nanobiosci*, 2016, 15: 398–411
- 33 Moreno-Flores S, Benitez R, Vivanco M M, et al. Stress relaxation microscopy: imaging local stress in cells. *J Biomech*, 2010, 43: 349–354
- 34 Butt H J, Cappella B, Kappl M. Force measurements with the atomic force microscope: technique, interpretation and applications. *Surface Sci Rep*, 2005, 59: 1–152
- 35 Costa K D. Single-cell elastography: probing for disease with the atomic force microscope. *Disease Markers*, 2004, 19: 139–154
- 36 Stolz M, Raiteri R, Daniels A U, et al. Dynamic elastic modulus of porcine articular cartilage determined at two different levels of tissue organization by indentation-type atomic force microscopy. *Biophys J*, 2004, 86: 3269–3283
- 37 Wang X, Bleher R, Brown M E, et al. Nano-biomechanical study of spatio-temporal cytoskeleton rearrangements that determine subcellular mechanical properties and endothelial permeability. *Sci Rep*, 2015, 5: 11097
- 38 Li M, Liu L, 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
- 39 Babahosseini H, Carmichael B, Strobl J S, et al. Sub-cellular force microscopy in single normal and cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 463: 587–592
- 40 Moeendarbary E, Valon L, Fritzsche M, et al. The cytoplasm of living cells behaves as a poroelastic material. *Nat Mater*, 2013, 12: 253–261
- 41 Kiberstis P A. Metastasis: an evolving story. *Science*, 2016, 352: 162–163
- 42 Yallapu M M, Katti K S, Katti D R, et al. The roles of cellular nanomechanics in cancer. *Med Res Rev*, 2015, 35: 198–223
- 43 Cross S E, Jin Y S, Tondre J, et al. AFM-based analysis of human metastatic cancer cells. *Nanotechnology*, 2008, 19: 384003
- 44 Junttila M R, de Sauvage F J. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*, 2013, 501: 346–354
- 45 Plodinec M, Loparic M, Monnier C A, et al. The nanomechanical signature of breast cancer. *Nat Nanotech*, 2012, 7: 757–765
- 46 Lekka M, Gil D, Pogoda K, et al. Cancer cell detection in tissue sections using AFM. *Archives Biochem Biophys*, 2012, 518: 151–156
- 47 Zhou Z, Zheng C, Li S, et al. AFM nanoindentation detection of the elastic modulus of tongue squamous carcinoma cells with different metastatic potentials. *Nanomedicine*, 2013, 9: 864–874
- 48 Muller D J, Helenius J, Alsteens D, Dufrene Y F. Force probing surfaces of living cells to molecular resolution. *Nat Chem Biol*, 2009, 5: 383–390
- 49 Li M, Liu L, Xi N, et al. Progress in measuring biophysical properties of membrane proteins with AFM single-molecule force spectroscopy. *Chin Sci Bull*, 2014, 59: 2717–2725
- 50 Dufrene Y F, Evans E, Engel A, et al. Five challenges to bringing single-molecule force spectroscopy into living cells. *Nat Methods*, 2011, 8: 123–127
- 51 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

- 52 Li M, Xiao X, Liu L, et al. Nanoscale mapping and organization analysis of target proteins on cancer cells from B-cell lymphoma patients. [Exp Cell Res](#), 2013, 319: 2812–2821
- 53 Li M, Xiao X, Zhang W, et al. Nanoscale distribution of CD20 on B-cell lymphoma tumour cells and its potential role in the clinical efficacy of rituximab. [J Microscopy](#), 2014, 254: 19–30
- 54 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
- 55 Barna G, Mihalik R, Timár B, et al. ROR1 expression is not a unique marker of CLL. [Hematol Oncol](#), 2011, 29: 17–21
- 56 Alduaij W, Illidge T M. The future of anti-CD20 monoclonal antibodies: are we making progress? [Blood](#), 2011, 117: 2993–3001
- 57 Radmacher M. Measuring the elastic properties of living cells by the atomic force microscope. *Methods Cell Biol*, 2002, 68: 67–90
- 58 Demichelis A, Divieto C, Mortati L, et al. Toward the realization of reproducible Atomic Force Microscopy measurements of elastic modulus in biological samples. [J Biomech](#), 2015, 48: 1099–1104
- 59 Carlo D D. A mechanical biomarker of cell state in medicine. *J Lab Autom*, 2012, 17: 32–42
- 60 Dufrene Y F, Martinez-Martin D, Medalsy I, et al. Multiparametric imaging of biological systems by force-distance curve-based AFM. *Nat Methods*, 2013, 10: 847–854
- 61 Dover R S, Bitler A, Shimoni E, et al. Multiparametric AFM reveals turgor-responsive net-like peptidoglycan architecture in live streptococci. [Nat Commun](#), 2015, 6: 7193
- 62 Heu C, Berquand A, Elie-Caille C, et al. Glyphosate-induced stiffening of HaCaT keratinocytes, a Peak Force Tapping study on living cells. [J Struct Biol](#), 2012, 178: 1–7
- 63 Wang Z, Liu L, Wang Y, et al. A fully automated system for measuring cellular mechanical properties. [J Lab Autom](#), 2012, 17: 443–448
- 64 Burrell R A, McGranahan N, Bartek J, et al. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. [Nature](#), 2013, 501: 338–345
- 65 Sun Q M, Feng J T, Han D. Nanoimaging and medically functional biointerfaces. [Chin Sci Bull \(Chin Ver\)](#), 2013, 58: 2449–2465
- 66 Fletcher D A, Mullins R D. Cell mechanics and the cytoskeleton. [Nature](#), 2010, 463: 485–492
- 67 Miller C J, Davidson L A. The interplay between cell signalling and mechanics in developmental processes. [Nat Rev Genet](#), 2013, 14: 733–744
- 68 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
- 69 Dufrêne Y F, Pelling A E. Force nanoscopy of cell mechanics and cell adhesion. *Nanoscale*, 2013, 5: 4094–4104

Progress in measuring the mechanical properties of clinical primary cells using atomic force microscopy

LI Mi¹, LIU LianQing¹, XI Ning^{1,2} & WANG YueChao¹

1 State Key Laboratory of Robotics, Shenyang Institute of Automation, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China;

2 Department of Electrical and Computer Engineering, Michigan State University, East Lansing MI 48824, USA

The advent of atomic force microscopy (AFM) provides a novel instrument for label-free measuring the mechanical properties of single living cells under near-physiological conditions. Since the mid-1990s, researchers have used AFM to investigate the mechanical properties of cells with impressive results and demonstrated that cell mechanics is a new label-free biomarker which can effectively indicate the changes of cellular physiological states, improving our understanding of cancers and simultaneously promoting the development of cell biomechanics. However, current AFM single-cell mechanical assays are commonly performed on cell lines cultured *in vitro*. Due to the huge difference between *in vitro* and *in vivo* environments, the results acquired from cell lines cannot completely reflect the real situations in the body. Especially in the era of precision medicine, we need to test and analyze the primary cells from patients to achieve personalized diagnosis and treatment. Hence, developing methods that can directly detect the mechanical properties of primary cells (cancerous cells and normal cells) from clinical patients is of potential significance in translational medicine. In this paper, based on the authors' own research in applying AFM to measure and characterize the mechanical properties of lymphoma patient cells, the principle and method of measuring the mechanical properties of cells by AFM is presented, then the recent progress in measuring the mechanical properties of primary cells by AFM is summarized, and finally the challenges are discussed.

atomic force microscopy, primary cell, mechanical property, elasticity, viscoelasticity

doi: [10.1360/N052016-00200](https://doi.org/10.1360/N052016-00200)