扫描离子电导显微镜在细胞表征中的应用研究

郎瑾新^{1,2}, 李亚北^{1,2}, 杨耀维^{2,3}, 焦阳博翰⁴, 王蒙^{2,3}, 庄健⁴, 李菲^{2,3*}

1. 西安交通大学理学院化学系, 西安 710049

2. 西安交通大学仿生工程与生物力学中心(BEBC), 西安 710049

3. 西安交通大学生命科学与技术学院, 生物医学信息工程教育部重点实验室, 西安 710049

4. 西安交通大学机械工程学院, 西安 710049

*通讯作者, E-mail: feili@mail.xjtu.edu.cn

收稿日期: 2018-12-25; 接受日期: 2019-01-11; 网络版发表日期: 2019-03-12

国家自然科学基金(编号: 21775117)、2017年度陕西省留学人员科技活动择优资助优秀项目(编号: 2017010)、陕西省国际科技合作与交流计划项目(编号: 2016KW-064)、中国博士后科学基金面上项目(编号: 2016M592773)和西安交通大学基本科研业务费重点研发计划专项培育类项目资助

摘要 细胞的微观形貌、电学和力学功能在细胞生物学研究具有重要意义。但传统细胞表征方法无法实现对活体细胞微/纳观尺度的无损、原位表征。扫描离子电导显微镜(scanning ion conductance microscopy, SICM)作为新型的扫描探针显微镜技术, 由于非接触式扫描模式及纳米探针的使用, 可实现对活细胞无损、高分辨地实时表征, 近年来被广泛用于各种细胞生物学和细胞表征研究中。本综述主要介绍了SICM的发展历史及其在细胞表征中的应用。首先介绍SICM的仪器组成和工作原理、三种常见的工作模式及优缺点, 之后分类介绍SICM在细胞生物学领域的应用进展, 包括SICM在细胞形貌表征、细胞电学性质和力学性质研究中的具体应用实例, 总结和比较了SICM与传统细胞生物学表征方法在细胞原位表征中的优势。最后, 提出SICM在细胞表征方面面临的挑战, 对其未来技术发展方向进行了展望。

关键词 扫描离子电导显微镜, 细胞形貌, 细胞电学, 细胞力学

1 引言

细胞是构成生物体的基本结构和功能单位。细胞的形态和结构决定其功能, 是行使细胞功能的基础, 细胞的功能又影响其形态和结构等外在表现(图1)^[1]。细胞表面形貌超微结构是细胞不断与周围环境进行信息交流的必经途径。例如, 微纤毛、突触微结构和膜表面跨膜结构等细胞膜表面的超微结构在众多生物学功能中承担着重要作用^[2], 细胞膜的运输及识别功能主

要依赖膜表面蛋白的分布和超微尺度的构象变化^[3]; 神经细胞、心肌细胞等可兴奋细胞中膜表面离子通道、转运蛋白的分布及结构变化是其发挥相应生理功能的结构基础^[4]; 细胞膜上离子通道和离子泵的活性调控细胞内外的电位差、细胞的表面电荷等, 改变细胞整体的电学性质, 最终导致可兴奋细胞和中性粒细胞等免疫细胞的生理行为发生变化^[5]。另外, 细胞形貌、细胞膜下骨架和应力纤维的结构会引起细胞力学性质(如杨氏模量、应力松弛等)的改变, 影响细胞对

引用格式: Lang J, Li Y, Yang Y, Jiao Y, Wang M, Zhuang J, Li F. Application of scanning ion conductance microscope in cell characterizations. *Sci Sin Chim*, 2019, 49: 844–860, doi: 10.1360/N032018-00266

图1 细胞形貌、电学、力学和化学等功能的相关性(网络版彩图)

Figure 1 Correlation among cell morphology, electric function, mechanical function and chemical function (color online).

胞外力学刺激的感知和转导过程, 最终导致细胞的增殖、分化和迁移等行为产生差异^[6]. 针对细胞形态、结构与功能相关性的研究一直是细胞生物学和生命科学各领域的研究重点, 细胞形貌和功能的表征手段也在这一需求下有了长足的发展, 推动着细胞生物学和生命科学的研究进展.

针对细胞形貌和各种功能研究的需要, 已发展出不少技术和方法^[7-9]. 目前, 表征细胞形貌最常用的方法是光学显微镜(包括传统光学显微镜和荧光显微镜^[10-12]). 但光学显微镜受光学衍射的限制, 目前分辨率仍难突破180 nm的下限. 激光共聚焦显微镜虽具有很高的分辨率并可实现活细胞成像, 但细胞样品需要进行染色处理, 为非原位、有损的表征手段, 并且无法得到细胞膜的表面信息. 最新的超高分辨率共聚焦显微镜技术(如光激活定位显微术和随机光学重建显微术等), 虽然分辨率可达20 nm的单分子水平, 但其对仪器设备要求较高, 且仍受样本需染色的限制. 电子显微镜(扫描电子显微镜和透射电子显微镜)虽然将成像分辨率提高到 ≤ 3 nm, 但无法实现对活体细胞的无损、原位观察. 在细胞电学性质研究手段方面, 目前最常用的是膜片钳技术, 它通过检测离子通道的离子电流反映细胞膜上单个或多个离子通道的分子活动. 但膜片钳只能通过光学显微镜进行手动定位, 而具备特殊选择性的离子通道通常非均匀地分布于特定的亚细胞结构上(如微绒毛精细结构和神经细胞的细树突分支等), 膜片钳技术无法完全精准表征离子通道在亚细胞结构上的分布. 在细胞力学性质研究手段方面, 常用的表征方法包括微管吸吮技术^[13]、光延伸器^[14]、

原子力显微镜(atomic force microscopy, AFM)^[15]等, 但这些方法都达不到亚细胞级分辨率, 也无法实现对细胞局部力学的非接触测量, 容易造成细胞损伤, 导致细胞死亡, 限制了它们在活细胞及细胞生理学研究中的应用. 实时、高分辨地研究活细胞的表面微结构、电学性质和力学性质等有助于人们深入了解细胞微观结构与其生理功能的关系, 但以上这些传统技术对于实时表征活细胞的表面微结构、电学性质和力学性质仍存在局限. 实现实时、无损且高分辨的表征活细胞的各项参数和理化性质一直是当前生物医学研究者亟待解决的问题.

以AFM为代表的扫描探针显微镜(scanning probe microscopy, SPM)技术的出现为细胞形貌和功能表征提供了有力手段. 目前, AFM已被广泛用于各种细胞形貌及细胞膜力学性质的研究中. 但由于扫描过程中AFM探针尖端与细胞表面之间产生的相互作用会使细胞产生形变, 影响细胞的真实形貌. 为了更好地研究生物样品, 1989年, Hansma等^[16]发明了一种专门用于非接触研究非导电样品的新型SPM技术——扫描离子电导显微镜(scanning ion conductance microscopy, SICM). 该技术使用亚微米/纳米玻璃管作为探针, 当玻璃管探针在贴近样品表面扫描时, 通过实时记录玻璃管内电极和电解池中参比电极之间电导的变化, 实现对待测样本表面形貌的表征. 早期的SICM由于当时负反馈控制等技术不成熟, 在扫描过程中玻璃微探针经常与样品表面发生意外接触而撞断, 只适用于较平坦样品(如聚酯薄膜)的成像. 1997年, Korchev等^[17]开发了距离控制模式, 实现了SICM对活体生物样品的实时成像功能. 2001年, Shevchuk等^[18]又发明了调制模式, 实现了对活细胞的长期连续观察. 但对于高纵横比的样品, SICM扫描易发生探针与样品碰撞的问题. 为了表征起伏较大的样品, 2009年, Novak等^[19]进一步发明了跳跃模式, 实现了对高纵横比样品和细胞各种功能的表征, 如神经元形貌的表征、微纤毛、膜表面跨膜结构分布、心肌细胞体积的测量等. 近些年, SICM与其他技术联用进一步拓宽了SICM在细胞表征方面的应用范围, 如实现了细胞膜表面受体蛋白空间分布的精确定位^[20]、细胞膜表面离子通道的不均匀分布呈现、活细胞表面电荷的可视化^[21]、细胞电学性质和力学性质的表征等(图2)^[22].

SICM原位无损的扫描特征、精准的信息采集功

图2 扫描离子电导显微镜的发展历史和其在细胞研究中的代表性应用^[16-27] (网络版彩图)

Figure 2 The development history of SICM and its typical applications in cell researches ^[16-27] (color online).

能和微纳米操控能力使其在细胞生物学研究中得到广泛应用。图2的Web of Science数据库的统计显示,自1989年的近30年间,有关SICM在细胞表征应用研究方面的文献发表数量逐年递增,截止2018年10月文献发表数量达600余篇,近5年每年发表文献超过50篇。因此,有必要对SICM在细胞表征中的研究进行分类总结,并讨论分析其研究进展和发展趋势。

本文关注扫描离子电导显微镜在细胞表征中的应用研究,首先介绍了SICM的仪器组成和工作原理、三种常见的工作模式及各自的优缺点和发展,之后分类介绍了SICM在细胞生物学领域的应用研究进展,包括SICM在细胞形貌(单细胞和多细胞、细胞超微结构、细胞体积等)表征、细胞电学性质(细胞膜表面离子通道和表面电荷等)和力学性质(细胞弹性模量和力学响应等)研究中的具体应用实例,总结和比较了SICM与传统细胞生物学表征方法(如光学显微镜、扫描电子显微镜、膜片钳技术、原子力显微镜等)在细胞原位表征中的优势,介绍了SICM与其他技术(扫描电化学显微镜、膜片钳和激光共聚焦显微镜)联用的最新进展。最后,提出并展望了SICM在细胞表征研究领域中面临的挑战和发展方向。希望通过本文为SICM在细胞生物学领域的应用研究提供参考。

2 SICM的仪器组成和工作原理

2.1 SICM仪器的组成

用于细胞研究的SICM仪器系统主要由亚微米/纳

米玻璃管、光学显微镜、压电控制器、电流放大器和计算机等5部分组成。其中,亚微米/纳米玻璃管作SICM扫描的探针,用于记录待测细胞样品的形貌等信息。根据细胞研究的不同需求,光学显微镜有倒置显微镜和荧光显微镜两种配置,常规倒置显微镜用于SICM对细胞表征时观察细胞及定位探针和细胞之间的距离,荧光显微镜除了具有探针与细胞间的定位功能外,还可进一步记录细胞产生的荧光信息(如钙离子的荧光信号)。压电控制器是确保探针扫描和精确定位的控制装置。电流放大器用于将探针检测到的微弱离子电流(一般在pA~nA级)采集并放大。计算机及控制卡负责向压电陶瓷控制器发送扫描命令,并采集和分析扫描到的数据。

近些年,随着细胞多行为和多功能同时研究的需要,在SICM仪器基本组成基础上,还与其他仪器联合进一步实现了更多种类细胞以及细胞更多功能的同时检测。例如, SICM与扫描电化学显微镜(scanning electrochemical microscopy, SECM)联用,实现了对细胞形貌及化学信息的同时表征; SICM与膜片钳结合,实现了细胞膜微观结构上单个离子通道活性的研究; SICM与激光共聚焦显微镜联合,实现了对细胞膜微观结构与标记的荧光蛋白等关系的研究。

2.2 SICM的工作原理

SICM实验前向SICM探针玻璃管中灌注电解质溶液并插入一根银/氯化银(Ag/AgCl)电极,在含待测样品的同样电解质溶液中插入另一根Ag/AgCl电极。简

单来说, 实验时在两根Ag/AgCl电极上施加一定电压后产生通过玻璃管探针尖端的离子电流(I), 通过记录该电流值并作为反馈信号控制压电陶瓷, 保证扫描过程中探针与样品间的距离恒定, 再通过计算机采集分析扫描过程中产生的离子电流数据, 间接得到样品表面的形貌图像和其他信息.

SICM的理论工作原理如图3所示, 两根Ag/AgCl电极施加一定电压(U)后, 产生通过玻璃管探针尖端的离子电流(I), 其大小由外加电压 U 决定, 并与玻璃管探针总电阻(R_T)有关, R_T 为玻璃管探针电阻(R_p)与尖端电阻 R_{ac} 之和(式(1))^[28].

$$I(d) = \frac{U}{R_T} = \frac{U}{R_p + R_{ac}} \approx I_{MAX} \left(1 + \frac{1.5 \ln(r_o/r_i) \cdot r_p \cdot r_i}{b \cdot d} \right)^{-1} \quad (1)$$

其中, r_o 是玻璃管探针尖端开口的外半径, r_i 是玻璃管探针开口尖端的内半径, r_p 是玻璃管主体部分的内半径, b 是探针长度, d 是探针与样品表面间的距离. 当 d 比较大时(即探针离样品表面距离较远时), 只需考虑玻璃管探针的电阻, 此时探针的离子电流具有最大值 I_{MAX} (式(2)).

$$I_{MAX} = \frac{U}{R_p} \quad (2)$$

另外, 玻璃管电阻 R_p 和尖端电阻 R_{ac} 分别由式(3)和(4)表示.

$$R_p = \frac{b}{\kappa \cdot \pi \cdot r_p \cdot r_i} \quad (3)$$

$$R_{ac} \approx \frac{1.5 \ln\left(\frac{r_o}{r_i}\right)}{\kappa \cdot \pi \cdot d} \quad (4)$$

其中, κ 是在玻璃管中溶液的电导率. 根据式(3), 当玻璃管具有相同的几何形状且玻璃管中溶液不变时(即 κ 、 π 、 r_p 、 r_i 均为定值时), 玻璃管电阻 R_p 为恒定值, 此时探针-样品间通过探针尖端的电阻 R_{ac} 受探针与样品之间距离 d 的影响.

SICM实验开始时, 首先通过记录探针的离子电流 I 和探针-样品间距离 d 关系的渐进曲线, 将探针移到接近样品表面的位置. 当玻璃管离样品表面较远时(即 d 较大时), 根据式(4), R_{ac} 的值较小, 此时离子电流达到最大值 I_{MAX} ; 当玻璃管逐渐接近样品表面时(即渐进

图3 SICM的工作原理示意图

Figure 3 Illustration of SICM working principle.

时), 由于玻璃管非常接近样品表面使探针表面的离子电流被样品表面阻碍, 根据式(1), R_{ac} 逐渐增大, 离子电流迅速下降. 因此, 基于探针离子电流的变化值, 系统中的压电陶瓷可通过反馈作用控制探针离样品间的距离, 再通过反馈环路控制玻璃管何时停止渐进(一般为距离玻璃管尖端内半径的位置处停止渐进). 选择合适的参数进入工作区后, 玻璃管在样品表面进行 X 、 Y 方向的平面扫描, 并进一步通过控制玻璃管在离样品表面的垂直方向(即 Z 方向)上的离子电流值, 使玻璃管在靠近样品表面相等的一定距离内随样品表面的高低起伏运动, 进行样品表面非接触地扫描, 由记录的离子电流获得样品表面的三维图像和其他信息. 另外, 类似于其他扫描探针显微镜技术, SICM的扫描分辨率也由作为探针的玻璃管内径决定. 一般作SICM探针的玻璃管内径在20~100 nm, 因此对于使用20 nm直径的玻璃管探针, SICM的扫描分辨率在10 nm左右.

2.3 SICM的工作模式

SICM有三种常见的工作模式: 直流模式、调制模式和跳跃模式. 下面分别对这三种模式的工作原理和优缺点进行介绍.

2.3.1 直流模式

直流模式是最早发明和使用的SICM工作模式. 如图4(a)所示, 在两个Ag/AgCl电极间施加恒定电压时, 检测回路中产生的离子电流. 该模式下, 当探针尖端与样品间的距离接近玻璃管尖端的内半径时, 探针尖端扩散层的缩小限制了离子进出探针, 离子电流减小, 探针停止渐进(图4(b)). 因此, 直流模式是通过持续监

图4 SICM的三种常见工作模式. 直流模式(a)及其渐进曲线(b); 调制模式(c)及其渐进曲线(d), I_{dc} 和 I_{ac} 分别代表 I_{MOD} 的直流部分和交流部分; (e) 跳跃模式; (f) 改进的跳跃扫描模式(先粗略预扫描, 之后选择感兴趣区域再次精细扫描) (网络版彩图)

Figure 4 Three working modes of SICM. (a) Non-modulated (DC) mode and (b) the DC approach curve. (c) Distance-modulated (AC) mode and (d) the AC approach curve. I_{dc} represents the dc component of I_{MOD} , and I_{ac} represents the ac component of I_{MOD} . (e) Hopping feedback mode. (f) Modified hopping feedback mode (Prescan and precisely rescan of interested area) (color online).

测流经玻璃管探针间的离子电流来调整Z方向上探针距离样品间的距离, 使之恒定, 对样品进行逐行扫描, 由探针扫描的轨迹得到样品表面形貌的工作模式。

作为最早发明的SICM工作模式, 直流模式在实际应用中存在一些缺点. 如由于使用时为防止探针与样品表面发生碰撞, 探针与样品间需要保持在相对安全的距离范围内, 使得该模式的成像灵敏度大大降低. 另外, 之前的研究发现^[29], 如果设定探针与样品间的恒定距离约为玻璃管半径时, 可达到最好的图像分辨率, 但此时扫描过程中电流变化值为最初平稳电流时的0.2%~3%, 如此小的电流变化值容易受到实验中其他非距离因素(如探针尖端堵塞、溶液中杂质、电压波动、电子噪声等)的影响, 使得到的图像分辨率降低, 因此目前直流模式已逐渐被后期发展的调制模式和跳跃模式所取代。

2.3.2 调制模式

为了解决直流模式存在的问题, Shevchuk等^[18]利用调制电流进行反馈控制的技术发明了调制模式. 如图4(c)所示, 调制模式把一个高频低幅的周期性电压施加到反馈控制系统中的探针上, 使探针在垂直方向上进行高频运动, 产生调制电流 I_{MOD} . 如图4(d)所示, I_{MOD} 传送信号给扫描控制器来控制探针离样品的高度. 由于调制电流只受距离变化而不受其他任何非距

离因素的影响, 因此该模式可很好地控制探针与样品间的距离. 另外, 调制模式还具有高灵敏度、小的电流漂移及高扫描分辨率等优点. 由于调制反馈模式稳定性的提高, 可实现对活细胞的长期、连续观察^[30], 但直流和调制这两种工作模式在扫描高纵横比的样品(如海马神经元^[19])时都存在易发生探针与样品碰撞的问题。

2.3.3 跳跃模式

为了表征起伏较大的样品, Novak等^[19]发明了跳跃模式. 如图4(e)所示, 跳跃模式首先将距离样品区域上方较远距离处作为起始点, 以探针远离样品表面的电流值作为参比电流, 然后探针渐进样品, 直到反馈电流减小了主体电流的0.25%~1%, 将此时的Z值记录为样品的高度值, 随后探针被撤回开始设定的起始高度, 水平移动到下一个成像点, 重复上述步骤, 完成扫描. 相对于前两种工作模式, 跳跃模式上下移动探针, 因此在扫描起伏较大样品表面具有优势^[31]. 但同时由于探针接近样品和从样品表面撤回需要更多时间, 跳跃模式扫描样品花费的时间也比前两种模式长, 因此不利于捕捉样品表面的快速变化. 如图4(f)所示, 鉴于成像点的数目决定了图像的分辨率和成像时间, 为了加快跳跃模式的图像采集速率, 使用跳跃模式时可首先在低分辨率下成像来确定样品表面的大致粗糙

度和复杂性, 对于不感兴趣的样品区域可减少成像点并选择合适的探针撤回距离, 也可根据样品粗糙度调整以加快图像采集速率的方法。

3 SICM在细胞表征方面的应用

基于SICM可实现在细胞培养液中非接触地对软生物样品(如细胞)微/纳米尺度原位扫描和无损表征的特点, 已被广泛用于活细胞形貌和表面超微结构、细胞电生理、细胞膜力学等细胞形貌和各种功能的表征中。以下介绍SICM在细胞表征中的具体应用实例。

3.1 细胞形貌表征应用

细胞形貌在生长过程中不断变化以适应不同的生长环境和生理状态。例如, 在不同生理状态或药物分子刺激下, 细胞形貌会发生变化并伴随复杂的亚细胞结构的重组。由于SICM可实现非接触式地对单个或多个细胞的成像, 且可对细胞形貌变化实时、原位表征, 被广泛用于各种细胞的形貌表征中。另外, 随着跳跃模式的发展, SICM也被用于研究细胞膜的精细结构(如细胞粗糙度和膜突起等), 区分具有细胞异质性的细胞系亚群(如表征具有不同形态学特征的神母细胞瘤SK-N-SH细胞的三种不同表型变体^[32])。SICM还被进一步用于原位追踪和观察单粒子在细胞膜表面的动力学过程^[33], 实现对复杂细胞膜上微小结构的成像, 如听毛细胞、神经细胞的轴突和突触等^[19,34]。此外, SICM还可通过监测细胞的高度和体积变化来研究细胞的多项生理活动等(如环境渗透压改变^[35])。

3.1.1 细胞拓扑形貌表征应用

相对于传统细胞形貌的表征手段, SICM具有原位无损表征的特点。例如, 与SEM和荧光显微镜相比, SICM不需要对样本特殊处理(如染色或导电处理), 不会破坏样品表面的微观结构。与AFM^[36]相比, SICM非接触式扫描, 对细胞结构和活性影响小。例如, Rheinlander等^[37]利用SICM和AFM对同一固定后的单个成纤维细胞进行了成像。如图5(a)所示^[37~40], 与AFM图像对比, SICM的细胞表征图像没有明显的细胞形貌变形, 且细胞成像分辨率与AFM相当。鉴于以上优点, SICM已被广泛用于各种细胞的形貌研究中, 如黑色素细胞^[17]、少突胶质细胞^[38]、神经元^[19]、心肌细胞^[39]、

肾上皮细胞^[41]、肿瘤细胞^[30,42]、干细胞^[43,44]等。如图5(b)所示, Korchev等^[17]最早利用SICM研究了黑色素细胞形貌, 开启了SICM在活细胞方面的应用先例; Happel等^[38]利用SICM实现了对单个少突胶质细胞的成像, 观察了细胞形貌的变化; Novak等^[19]利用SICM跳跃模式完成了高纵横比的细胞(如单个神经元)的成像; Miragoli等^[39]利用苯肾上腺素刺激心肌细胞肥大, 通过SICM观察了其形貌体积的变化; Kim等^[45]利用SICM探究了不同浓度多聚甲醛固定的成纤维细胞与活细胞的形貌差别, 为优化细胞固定提供了参考; Zhu等^[46]利用SICM研究了加入外源性二月桂酰磷脂酰丝氨酸后对人类红细胞的形态变化。

与单细胞表征相比, 由多个细胞组成的微组织结构更加复杂, 对活体微组织进行高分辨的三维立体成像也更困难。最新发展的SICM跳跃模式可实现不同微组织的表征。如图5(c)所示, Potter等^[40]利用SICM分别对主动脉内部和外部的细胞进行了成像。由SICM的扫描结果可知, 暴露在不同血液动力环境下的主动脉内皮细胞的排列方式明显不同: 低血流动力部分细胞排列呈明显的鹅卵石形状, 并且排列松散无序; 高血流动力部分的细胞排列整齐, 呈条索状, 并且排列方式与血流的方向相同。SICM表征结果可观察到主动脉内部和外部细胞存在细胞形貌和排列的差异, 该结果对理解心脏瓣膜疾病的病因及发生发展提供了更多直接的依据。Masato等^[47]利用SICM在磷酸盐缓冲盐水中得到气管、肾脏等复杂组织样本的形貌图。SICM图像与真空干燥后得到的SEM图像的对比结果表明, SICM成像质量良好, 可用于软组织样品的三维表面结构研究。因此, SICM有望用于在培养液中对多细胞和固定或活的组织高分辨成像。

3.1.2 细胞表面微观结构表征应用

细胞膜及其相关结构的动力学对细胞功能至关重要, 但以往一直缺乏合适的表征方法。SICM不仅可用于细胞的整体成像, 还可对细胞膜表面精细结构(纳米结构)进行表征, 如微绒毛^[19,41,48~50]、神经细胞的轴突和树突^[19,51]、心肌细胞表面T管和Z线^[22,52~56]等。例如, Gorelik等^[41]应用SICM实时追踪了蟾蜍肾表皮细胞表面微绒毛的动态形成过程。SICM表征结果表明微绒毛的生命周期可分为迅速形成期、稳定期和匀速消退期, 并且微绒毛的生成速度与高度有直接关系: 微绒毛

图 5 (a) 固定后的成纤维细胞的AFM图像和SICM图像^[37]; (b) 黑色素细胞^[17]、少突胶质细胞^[38]、神经元^[19]和心肌细胞^[39]的SICM图像; (c) 猪胸主动脉内部细胞和外部细胞的SICM图像^[40] (网络版彩图)

Figure 5 (a) SICM and AFM images of a fixed fibroblast cell ^[37]. (b) SICM images of a murine melanocyte ^[17], an immature oligodendrocyte ^[38], live hippocampal neurons ^[19] and neonatal rat ventricular myocytes ^[39]. (c) SICM images of the inner and outer part of the porcine aorta ^[40] (color online).

越高,生成的速度越慢;微绒毛的消退与其高度无关。Ida等^[50]利用高速SICM对A431细胞的表面微绒毛进行了观察,发现用EGF刺激A431细胞后大部分微绒毛从细胞表面消失,并在20 min内发生其他结构的改变。Zhou等^[57]使用SICM观察了不同类型细胞原纤毛的形貌,通过将SICM与荧光成像结合成功区分了从细胞表面向外生长的纤毛和纤毛孔。如图6(a)所示,纤毛囊是纤毛周围质膜的凹陷处,追踪这个特定的区域有助于更好地了解纤毛吸收。他们通过SICM研究了NIH3T3细胞纤毛囊的结构,得到的纤毛囊深度约为250 nm。这些例子证明SICM可对细胞表面微纤毛的形成过程及微观结构成像,是表征单细胞表面纳米级形态变化的有力工具。

神经细胞由轴突和树突组成,其胞体直径达几十微米,轴突直径约十几微米,树突直径约1 μm 甚至更细。由于胞体和突起的高度差达数十微米,加之神经网络结构复杂,一般扫描探针显微镜无法满足对其纳米尺度高分辨扫描成像的要求。而SICM可实现神经细胞及其精细表面结构的表征,如Novak等^[19]利用SICM

对海马椎体神经元进行了成像。如图6(b)所示,应用SICM的跳跃模式控制探针与神经细胞表面在纳米尺度距离内,实现了多次快速对数十微米高度变化的神经细胞的扫描,得到了其复杂的三维结构形貌图。该SICM结果可较好地反映由神经细胞胞体、突起组成的复杂神经网络之间及其与培养皿基底间高度上的急剧变化。另外,SICM还被成功用于心肌细胞表面超微结构的成像。如Gorelik等^[52]应用SICM对正常心肌细胞与患病心肌细胞上的超微结构进行了高分辨成像,得到了心肌细胞膜上的膜褶、膜沟及膜沟内的T形管的图像。Lyon等^[53]研究了缺血性心脏病患者、特发性扩张型心肌病和肥厚型梗阻性心肌病患者的心肌细胞,并用荧光和SICM方法结合测定了T管的结构,研究了心肌梗塞后慢性心力衰竭大鼠模型的心肌细胞的T管变化。结果表明,SICM成像可观察到表面结构发生变平和消失的变化,慢性心力衰竭模型的大鼠心肌细胞表现出T管消失和Z型凹槽损失的现象。Lorin等^[58]利用SICM表征了活的mdx小鼠心肌细胞表面是否出现膜和横管的损伤,并研究了扩张型心肌病与杜氏肌

图 6 不同细胞表面超微结构的SICM图像. (a) NIH3T3细胞表面微绒毛囊的SICM图像^[57]; (b) 活的海马神经元高分辨率SICM成像^[19]; (c) 单个纳米粒子与细胞膜相互作用动态过程观察的荧光和SICM形貌图^[60]; (d) 玉米根毛细胞对 $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ 的摄入过程的SICM和SECM图像^[63] (网络版彩图)

Figure 6 SICM images of the ultrastructure of different cell surfaces. (a) SICM mapping of the ciliary pocket from a NIH3T3 cell ^[57]. (b) SICM images of live hippocampal neurons with high resolution ^[19]. (c) Simultaneous fluorescence and topography imaging of interaction between single nanoparticle and structures in the cell membrane ^[60]. (d) SICM-SECM topographical and $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ uptake mapping of Zea mays root hair cells ^[63] (color online).

营养不良之间的关系. SICM的实验结果与对照组相比, mdx中的膜表面结构发生变化(Z-线指数下降39%), 横向小管解体(横向小管比率下降21%). SICM结果表明肥厚型梗阻性心肌病的心肌细胞和扩张型心肌病的心肌细胞的Z线指数减少、横向小管比率下降, 导致细胞功能异常, 该研究有助于理解心脏疾病患病的病理学.

了解病毒、细菌、自然产生的和合成的纳米颗粒(nanoparticles, NPs)如何相互作用和穿透细胞膜的机制是开发药物或基因传递系统的关键. SICM也被用于研究合成聚合物和纳米粒子对细胞膜表面的影响中. 例如, Yang等^[59]利用SICM原位表征并观察了单个肺

泡上皮细胞在氧化锌纳米颗粒(nZnO)作用下的细胞膜变化过程, 并结合电生理及血清乳酸脱氢酶测定试剂盒研究了nZnO纳米颗粒对肺泡上皮急性损伤的可能机制. Novak等^[60]利用SICM以15秒/帧的速度对直径为200 nm的单个羧基修饰的乳胶粒子与肺泡上皮I型细胞相互作用进行了快速成像, 实现了纳米尺度下单个纳米粒子与细胞膜相互作用动态过程的观察(图6(c)). Shan等^[61]利用SICM研究了双亲带正电的共轭聚合物纳米粒子(CPNs)与疏水、带负电的人宫颈癌细胞的细胞膜之间的相互作用, 应用SICM与共聚焦荧光成像技术共同观察了CPNs以聚集形式进入细胞、吸附到细胞表面及被细胞内吞的过程, 证明SICM可高分辨地

呈现细胞表面形态及纳米颗粒内吞早期阶段的动态交替过程. Su等^[62]使用SICM观察了SH-SY-5Y神经母细胞瘤细胞的形态学变化, 观察了在培养基中加入 α -突触核蛋白聚集物后细胞膜表面的完整性.

SICM除了提供高分辨的细胞形态学信息外, 还具有良好的开放性, 可与其他设备联用进一步研究细胞的超微结构. 例如, Nikolaev等^[20]利用SICM与荧光共振能量转移技术(fluorescence resonance energy transfer, FRET)联用研究了正常及慢性心力衰竭下的心肌细胞上 β_1 与 β_2 肾上腺素受体的准确分布. 研究发现, 在健康成年大鼠和小鼠的心肌细胞中, β_2 肾上腺素受体有选择性地分布T管, 而 β_1 肾上腺素受体分布在整个细胞表面. 在慢性心力衰竭大鼠模型的心肌细胞中, β_2 肾上腺素受体从T管重新分布到细胞嵴, 使得受体介导的环腺苷酸(cAMP)信号传导扩散. 因此, 心力衰竭中 β_2 肾上腺素受体重新分布改变了cAMP的区室, 可能导致心肌表型的衰竭, 与心肌细胞的功能状态密切相关. Novak等^[60]通过SICM与SECM联用研究了玉米根毛细胞对 $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ 的摄入过程. 如图6(d)所示, SECM探针可在空间上分辨单个细胞对目标分子的吸收, SICM探针可实时对目标分子和细胞渗透性(分子吸收)的变化进行检测^[63]. 通过成像的单个单元格高亮显示判断出吸收速率的不均匀性, 利用有限元模拟对这些差异进行了定量分析, 使细胞对目标分子的摄入探针电流的变化相对应, 因而可区分细胞不同区域的摄入率.

3.1.3 细胞体积表征应用

细胞体积的自稳平衡态在细胞生长分化过程中起重要作用^[64], 细胞体积调控的失衡直接影响细胞的生长、代谢、分化、凋亡等众多基本生物学功能^[65]. 例如, 在内部或外部刺激下, 细胞可通过不同的调节反应调整细胞形态, 进行体积重组. 常见的细胞体积表征包括通过荧光显微镜和激光共聚焦显微镜对细胞扫描^[66,67]或使用电生理方法持续测量细胞高度的变化得到细胞体积相对变化的方法^[68]. 但这两种方法都需要在细胞体系中额外加入试剂或用微电极进行刺激, 可能对细胞本身产生影响. 基于SICM非光学检测的原理和可原位得到样品表面三维形貌的特点, 它已被用于细胞体积的表征中. 如图7(a)所示, Korchev等^[35]应用SICM扫描细胞形貌过程中记录得到的细胞表面每个点的高度, 通过积分计算得到了细胞体积. 目前, SICM

已被用于各种细胞的体积表征研究中, 如肝细胞^[38]、心肌细胞^[39]、上皮细胞^[30,69,70]、成纤维细胞^[37,45]、神经元细胞^[32,71~74]和胶质细胞^[75]等. 例如, Happel等^[38]使用SICM观察到了在高渗和低渗溶液中肝细胞体积的调节过程. 如图7(b)所示, SICM结果显示当肝细胞暴露于高渗溶液中, 细胞体积开始收缩; 当肝脏细胞从高渗溶液转移至低渗溶液中后, 细胞体积膨胀. Miragoli等^[39]利用SICM表征了苯肾上腺素刺激心肌细胞肥大前后的细胞体积的变化过程, 研究表明SICM可对活细胞在外界环境刺激下形态与体积变化进行实时、原位表征. 另外, SICM还被用于研究细胞长时间的持续动态体积变化. 如Happel等^[75]利用SICM观察了30 min内少突胶质细胞体积的变化和细胞膜的运动. Gorelik等^[30]利用SICM在正常生理条件下持续24 h观察了A6肾上皮细胞的高度和体积改变及其边界重塑. Pellegrino等^[71]用SICM非接触地记录了刺激后水蛭的神经元的生长锥增长过程. Tanaka等^[74]通过SICM持续观察了大鼠大脑皮层单个神经元细胞凋亡的生化 and 形态学变化, 从凋亡早期体积减少到细胞膜起泡和磷脂酰丝氨酸的易位等过程(图7(c)).

另一方面, SICM与其他技术联用进一步用于表征细胞体积与其他功能的关系. 例如, 如图7(d)所示, Zhou等^[69]通过SICM结合膜片钳技术研究了磷脂酰肌醇激酶参与哺乳动物肾上皮钠通道(ENaC)的早期醛固酮作用. 通过SICM成像的直接观察, 他们发现醛固酮治疗使肾mpkCCDc14上皮细胞体积增大, 根尖膜升高, 提高了ENaC的开放概率. 细胞体积的减少是细胞凋亡最早的形态学变化之一, 并伴随着生物学和形态学的变化. SICM的这些研究结果表明其作为一种新技术目前已成为体外原位实时表征细胞体积的重要工具, 同时SICM的直接成像功能为研究细胞内部的生化反应与细胞形态学变化之间的关系提供了新方法.

3.2 细胞电学性质研究应用

所有细胞(如上皮细胞、心肌细胞、神经细胞和肌肉细胞等)均含有离子通道, 机体的功能和细胞的活性受到离子通道蛋白的调控和影响, 如肌肉收缩、血管舒张和心脏的电信号传递等^[76,77]. 同时, 细胞膜上的离子通道可调节细胞内外渗透压, 具有维持细胞膜电位的重要功能, 如神经细胞的讯号传导通过离子的进出造成膜电位的变化. 因此, 研究细胞膜上离子通

图 7 SICM在细胞体积表征中的应用研究示例。(a) 细胞体积的积分计算方法^[35], (b) 肝细胞体积变化统计图^[38], (c) 神经元凋亡过程的SICM图^[74], (d) 药物诱导细胞形态变化的SICM图^[69] (网络版彩图)

Figure 7 The applications of SICM in cell volume characterization. (a) Integral calculation of cell volume using SICM ^[35]. (b) Volume change measurement of hepatic cells by SICM ^[38]. (c) Time-lapse SICM images of neuron apoptosis ^[74]. (d) Effects of drug-induced changes in cell morphology by SICM ^[69] (color online).

道具有深入了解通道蛋白调控细胞功能机理的重要意义。膜片钳技术通过检测离子通道上的离子电流反映细胞膜上单个或多个离子通道的分子活动,是研究细胞膜上离子通道最常用的现代电生理技术。然而,由于膜片钳只能通过光学显微镜进行手动定位,非均匀分布在细胞特殊结构上的离子通道(如微绒毛和细树突分支等),膜片钳技术无法完全精准表征。基于SICM探针本身可作为膜片钳并同时实现精准定位功能,可提高离子通道研究时的定位时空分辨率,通过将膜片钳或细胞内电压测量技术与SICM相结合,可实现细胞膜表面离子通道的精准表征^[78]。例如, Gorelik等^[79]利用SICM与膜片钳技术联合研究了海胆的精子细胞和颈上神经节的钙离子通道形貌及钡离子通过的局部离子电流。研究结果表明SICM-膜片钳联合可用于非常小的细胞(如精子细胞)和亚细胞结构(如微绒毛)的表征,还可研究不透明的细胞(如完整的组织、脑切片、

上皮细胞和根毛细胞等)。Bhargava等^[24]利用优化的SICM-膜片钳技术(超高分辨率扫描-膜片钳技术)对心肌细胞表面的结构分布(T管、Z槽、膜嵴)进行了成像,记录了细胞膜表面离子通道的电流(图8(a))^[80]。他们首先利用直径 ≈ 100 nm的“小”探针对细胞形貌进行了表征,之后利用直径为1 μm 的“大”探针研究了细胞固定区域的电生理性质,并对心肌细胞表面的L型钙离子通道进行了准确空间定位,发现其分布在T管的离子通道不像钾离子通道和大多数阴离子通道均匀分布在Z槽上。他们的工作将离子通道实验记录的成功率提高到了28.75%,解决了以往SICM-膜片钳技术低分辨率限制的问题。另外,应用SICM还可实现对细胞膜表面离子通道蛋白分布的精准检测^[25]。

在一定病理或生理状态下,特异性的离子通道会发生重排,这很难通过荧光等表征方法检测,而具有较高分辨率的SICM-膜片钳联用技术可解决这一问题。

图 8 应用SICM表征细胞的电学性质研究示例。(a) SICM-膜片钳技术对心肌细胞表面结构及离子通道分布成像^[24]；(b) SECM-SICM联用对脂肪细胞电化学和离子电流成像^[80]；(c) SICM对玉米根毛细胞形貌及表面电荷的成像^[21] (网络版彩图)

Figure 8 Characterization of electrical properties of cells by SICM. (a) The SICM image of a cardiomyocyte revealing topographic structures and functional ion channels ^[24]. (b) Electrochemical imaging and ion current measurements on an adipocyte by SECM-SICM ^[80]. (c) Surface charge mapping of living *Zea mays* root hairs by SICM ^[21] (color online).

例如, Shi等^[81]采用双管离子通道探针, 实现了SICM功能和膜片钳技术的联用. 其中一个通道通过距离-电流曲线实现无损成像, 另一个通道用来检测离子通道活性, 实现了对 α HLs通道蛋白在细胞膜磷脂双分子层分布的成像, 检测了离子通道蛋白的重排过程. 另外, SICM-膜片钳技术的联用除了可高分辨地实现细胞膜表面离子通道的精准定位外, 还可用于靶向药物释放等研究领域的药物筛选研究^[44]. 例如, Gorelik等^[43]使用SICM对干细胞分化心肌细胞进行了表征, 从细胞簇中识别了不同分化阶段的细胞, 同时验证了艾斯洛儿等药物对干细胞分化心肌细胞的影响. 另外, SICM还与其他仪器联用于检测细胞膜局部渗透性. 如Takahashi等^[80]使用SECM-SICM联用对脂肪细胞进行三维电化学和离子电流成像, 并预测了纳米级局部细胞膜渗透性和离子强度(图8(b)). 在脂肪细胞成像中, 跳跃式SECM-SICM打破了SECM微尺度空间分辨率的限制, 脂肪细胞的三维电化学成像显示细胞膜的不均匀渗透性, 即使是固定的细胞, 也可观察细胞表面的离子强度差异. 该SECM-SICM方法可得到单个细胞化学物质和渗透性的不均匀分布(如神经递质浓度分

布、呼吸活性等).

另外, 细胞表面的电荷与细胞生理功能的改变密切相关, 如细胞通讯^[82,83]、细胞表面黏附^[84]、营养物质吸收^[85]、分子和粒子的摄取^[86,87]、细胞生长和分裂^[88,89]等. 此外, 细胞(淋巴细胞)的表面电荷还可反映机体的免疫状态. 因此, 细胞局部表面电荷的可视化表征及细胞表面电荷的不均匀性检测有利于深度了解细胞功能^[90]. 目前, 虽然广泛用于细胞形貌表征的AFM技术可检测细胞的表面电荷^[91,92], 但由于AFM力作用于探针^[93], 力-距离曲线不易分析, 而且在高电解质浓度(生理条件)下, AFM对表面电荷变得敏感, 当尖端到基底距离压缩到1 nm或更小时, 细胞表面的电荷测量很困难^[21]. 由于SICM可检测带电界面周围的离子氛, 因而可实现对细胞表面电荷分布非接触式的原位成像. 例如, Perry等^[21]使用偏压调制SICM和有限元方法模拟相结合, 在离子强度为150 mM的高浓度盐溶液中量化表征了细胞的表面电荷, 确定了细胞膜表面电荷的不均匀分布特性^[94]. 在普通玉米根毛细胞和AbSc细胞同时存在时应用SICM识别了单个细胞表面的电荷, 并对不同的细胞识别出不同特性的电荷分布, 该研究

有助于深入研究细胞功能与表面电荷的关系(图8(c)).

3.3 细胞力学性质研究应用

细胞的力学性质包括细胞膜硬度、刚度、细胞骨架张力、细胞与基底的黏附性以及细胞受到机械应力后细胞膜和细胞骨架的变形等力学性能. 研究细胞的力学性质对理解其功能具有十分重要的作用. 例如, 细胞可从外部环境条件和内部生理条件感受和响应机械应力, 细胞的内在收缩性即细胞骨架张力的变化会影响癌细胞的迁移模式等^[6]. 细胞力学性质的传统表征方法包括微管吸吮技术^[13]、光延伸器^[14]、AFM^[15,36]等, 但这些方法都达不到亚细胞级分辨率, 也无法实现对细胞局部力学的非接触测量. SICM不仅可实现对细胞非接触测量, 同时也能实现对细胞局部区域的力学性质的表征. Sánchez等^[23]应用SICM在探针与细胞表面非接触的情况下, 通过探针施加力测量了一系列不同细胞的力学性能. 如图9(a)所示, SICM实验中, 将压力施加到血红细胞上, 通过监测SICM探针的位置测量细胞在压力下产生的变形, 通过细胞膜的变形得到了血红细胞的表现杨氏模量值. 随后他们使用同样的方法测量了上皮细胞、心肌细胞和神经元的弹性模量, 并进一步得到了背部神经节神经元膜下的初始柔软区和再往下较硬区域的弹性模量区别, 如图

9(b)所示. 之后, Zhang等^[95]使用SICM研究了细胞特征与亚细胞结构(如心肌细胞搏动和细胞骨架)之间的关系. 他们基于SICM的非接触模式测量了活心肌细胞的搏动, 通过模拟研究了细胞骨架黏弹性对细胞搏动幅度的影响, 并借助其他实验方法, 如应用荧光染色观察到细胞骨架、AFM压痕测量了细胞的杨氏模量和使用微柱技术测量了细胞收缩力, 在对照组和实验组中观察到细胞骨架的变化、搏动幅度和心肌细胞的收缩性, 间接和定性验证了所提出的理论模拟模型, 证实所鉴定的细胞骨架弹性与心肌细胞搏动幅度之间的关系与模拟得到的结果一致.

随后, 又不断有新的SICM方法被发展并实现细胞弹性模量的测定. 例如, Pellegrino等^[96]报道了另一种应用SICM测量活细胞杨氏模量的方法. 他们从电流-距离曲线中根据不同压力值获得了样品的压痕信息, 然后使用探针与样品间的距离 Z_{avg} 与所施加压力 P_0 的公式估算出细胞的局部杨氏模量值. 该方法可用于测量成纤维细胞三个不同区域的局部杨氏模量值, 并具有可在距离样品尖端很短距离处施加低压力的优点. Rheinlaender等^[97]通过观察离子电流与探针到样品间的距离的关系(I - Z 曲线), 对比细胞与聚碳酸酯表面离子电流的变化情况, 进而通过 I - Z 曲线斜率计算出样品的弹性模量. 该方法使SICM的测量速度增加了2~3个

图9 SICM在细胞力学性质表征中的应用. (a) 使用SICM对细胞施加力学刺激示意图^[23]; (b) 老鼠背部感觉神经元的压力响应^[23]; (c) SICM对神经元细胞生长锥受诱导增长的形态学变化成像^[22]

Figure 9 Characterization of mechanical properties of cells by SICM. (a) Schematic diagram of applying mechanical stimuli to cells using SICM [23]. (b) Pressure response of a living rat dorsal sensory neuron [23]. (c) Morphologic changes imaging in the induced growth of neuron growth cones by SICM [22].

数量级,同时得到了高分辨率的细胞硬度的量化图.之后,他们还使用SICM和AFM两种方式分别测量了固定的成纤维细胞的刚度^[37].由SICM实验结果得出细胞体的最高区域是细胞核和核周区域存在的局部区域,其模量约为100 kPa,细胞表面上微米尺寸的结构区域也更软,这些SICM表征结果无法从AFM图像中得到.由该研究证实SICM在细胞弹性模量测量方面比较AFM具有显著优势.另外, Miragoli等^[98]使用SICM研究了在完整主动脉瓣瓣膜或自然瓣膜上培养的内皮细胞的力学性质.他们通过用玻璃探针探测细胞,在获得SICM扫描图像后,通过压力端口(0.1~40 kPa)供应正静水压射流来探测细胞特定部位的力学性能,使用SICM测量的EC膜顺应性显示完好瓣膜的主动脉侧细胞明显比心室侧更柔软.

SICM除了直接被用于研究细胞的力学性能外,还可对细胞实时施加力学刺激,进而研究细胞对机械应力刺激的生理变化.例如, Pellegrino等^[22]利用SICM的填充溶液的探针尖端对神经元细胞施加微弱且可调节的压力刺激,诱导神经细胞生长锥的增长,而神经细胞这一形态学的变化同时也被SICM扫描并成像出来(图9(c)).此外,细胞对于药物刺激所产生的力学性能的变化也可由SICM即时表征得到.例如, Zhang等^[95]为了测量功能性药物(细胞松弛素和肾上腺素)对心肌细胞收缩频率和力量强度的影响,利用SICM非接触地扫描了心肌细胞的跳动(跳动频率和振幅),测量过程中由

于玻璃探针与细胞之间的距离控制在一个恒定值,因此玻璃探针的变化高度可反映搏动的活体心肌细胞的跳动,因而实现了对细胞受到药物刺激后的即时表征.

4 总结与展望

自1997年SICM首次被用于研究活细胞形貌以来,经过30多年的实验室仪器开发和应用研究拓展, SICM理想的时空分辨率和原位非接触的扫描特点使其广泛应用于细胞研究中,包括基本的细胞形貌表征到细胞局部超微结构成像及细胞体积计算、细胞电学和力学生理特性等多方面,成为目前对活细胞形貌和功能原位、实时表征的有力手段.近些年,与其他表征技术的联用进一步丰富了SICM在细胞研究中的应用范围.

为进一步满足细胞生物学领域的应用需求, SICM技术在如下三方面有待进一步发展: (1) 为满足动态快速捕捉细胞变化过程的需要, SICM的时间空间分辨率仍需进一步提高.目前科学家在不断通过硬件更新和软件开发(如新的工作模式^[99,100])来提高SICM的高速扫描功能; (2) 为满足细胞形貌和更多功能及行为同时表征的需要, SICM需与更多光学和电学等表征方法进行联用(图10); (3) 传统的单玻璃管SICM探针选择单一,采用多通道玻璃管或对玻璃管尖端进行修饰或改造可实现SICM更多的检测功能.例如,采用双管玻璃

图 10 SICM与其他技术的联用(网络版彩图)

Figure 10 Combination of SICM with other techniques (color online).

管作SICM-SECM双功能探针, 可实现对细胞形貌、化学、电学等行为的同时表征. 综上所述, 未来SICM技术有望在时空分辨率的进一步提高、细胞多功能和行

为的高通量检测与其他表征手段联用方面进一步发展, 为活细胞微观形貌及其各种功能的研究做出更大贡献.

参考文献

- Huang G, Li F, Zhao X, Ma Y, Li Y, Lin M, Jin G, Lu TJ, Genin GM, Xu F. *Chem Rev*, 2017, 117: 12764–12850
- Tilney LG, Mooseker M. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1971, 68: 2611–2615
- Hu Q, Milenkovic L, Jin H, Scott MP, Nachury MV, Spiliotis ET, Nelson WJ. *Science*, 2010, 329: 436–439
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. *Nature*, 1997, 389: 816–824
- Kirichok Y, Krapivinsky G, Clapham DE. *Nature*, 2004, 427: 360–364
- Parsons JT, Horwitz AR, Schwartz MA. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11: 633–643
- Liu N, Wang Y, Hu X, He B, Qu G, Shi J, Hu L, Jiang G. *Sci Sin Chim*, 2018, 48: 1217–1225 (in Chinese) [刘念, 王园园, 胡新笑, 何滨, 曲广波, 史建波, 胡立刚, 江桂斌. 中国科学: 化学, 2018, 48: 1217–1225]
- Li H, Zhang Y, Lin J. *Sci Sin Chim*, 2014, 44: 777–783 (in Chinese) [李海芳, 张英, 林金明. 中国科学: 化学, 2014, 44: 777–783]
- Gong X, Xiong X, Zhang S, Fang X, Zhang X. *Sci Sin Chim*, 2016, 46: 133 (in Chinese) [龚晓云, 熊行创, 张四纯, 方向, 张新荣. 中国科学: 化学, 2016, 46: 133–152]
- Yin H, Tang J, Zhang J. *Sci Sin Chim*, 2017, 47: 267–276 (in Chinese) [尹昊琰, 唐娟, 张俊龙. 中国科学: 化学, 2017, 47: 267–276]
- Li D, Li Z, Yang X, Zhang C. *Sci Sin Chim*, 2018, 48: 45–57 (in Chinese) [李东钰, 李照, 杨兴斌, 张成孝. 中国科学: 化学, 2018, 48: 45–57]
- Tian T, Zhou X. *Sci Sin Chim*, 2016, 46: 419–428 (in Chinese) [田涸, 周翔. 中国科学: 化学, 2016, 46: 419–428]
- Evans EA. *Biophys J*, 1983, 43: 27–30
- Guck J, Ananthakrishnan R, Mahmood H, Moon TJ, Cunningham CC, Käs J. *Biophys J*, 2001, 81: 767–784
- Radmacher M, Fritz M, Kacher CM, Cleveland JP, Hansma PK. *Biophys J*, 1996, 70: 556–567
- Hansma PK, Drake B, Marti O, Gould SAC, Prater CB. *Science*, 1989, 243: 641–643
- Korchev YE, Bashford CL, Milovanovic M, Vodyanoy I, Lab MJ. *Biophys J*, 1997, 73: 653–658
- Shevchuk AI, Gorelik J, Harding SE, Lab MJ, Klenerman D, Korchev YE. *Biophys J*, 2001, 81: 1759–1764
- Novak P, Li C, Shevchuk AI, Stepanyan R, Caldwell M, Hughes S, Smart TG, Gorelik J, Ostanin VP, Lab MJ, Moss GWJ, Frolenkov GI, Klenerman D, Korchev YE. *Nat Methods*, 2009, 6: 279–281
- Nikolaev VO, Moshkov A, Lyon AR, Miragoli M, Novak P, Paur H, Lohse MJ, Korchev YE, Harding SE, Gorelik J. *Science*, 2010, 327: 1653–1657
- Perry D, Paulose Nadappuram B, Momotenko D, Voyias PD, Page A, Tripathi G, Frenguelli BG, Unwin PR. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 3152–3160
- Pellegrino M, Orsini P, Pellegrini M, Baschieri P, Dinelli F, Petracchi D, Tognoni E, Ascoli C. *Neurosci Res*, 2011, 69: 234–240
- Sánchez D, Johnson N, Li C, Novak P, Rheinlaender J, Zhang Y, Anand U, Anand P, Gorelik J, Frolenkov GI, Benham C, Lab M, Ostanin VP, Schäffer TE, Klenerman D, Korchev YE. *Biophys J*, 2008, 95: 3017–3027
- Bhargava A, Lin X, Novak P, Mehta K, Korchev Y, Delmar M, Gorelik J. *Circ Res*, 2013, 112: 1112–1120
- Shevchuk AI, Frolenkov GI, Sánchez D, James PS, Freedman N, Lab MJ, Jones R, Klenerman D, Korchev YE. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 45: 2212–2216
- Comstock DJ, Elam JW, Pellin MJ, Hersam MC. *Anal Chem*, 2010, 82: 1270–1276
- Vivekananda U, Novak P, Bello OD, Korchev YE, Krishnakumar SS, Volynski KE, Kullmann DM. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: 2395–2400
- Chen CC, Zhou Y, Baker LA. *Annu Rev Anal Chem*, 2012, 5: 207–228
- Anariba F, Anh JH, Jung GE, Cho NJ, Cho SJ. *Mod Phys Lett B*, 2012, 26: 1130003
- Gorelik J, Zhang Y, Shevchuk AI, Frolenkov GI, Sánchez D, Lab MJ, Vodyanoy I, Edwards CRW, Klenerman D, Korchev YE. *Mol Cell Endocrinol*, 2004, 217: 101–108

- 31 Zhuang J, Jiao Y, Li Z, Lang J, Li F. *Ultramicroscopy*, 2018, 190: 66–76
- 32 Liu X, Yang X, Zhang B, Zhang X, Lu H, Zhang J, Zhang Y. *Brain Res*, 2011, 1386: 35–40
- 33 Chiao CC, Lane AB. *Analyst*, 2010, 136: 90–97
- 34 Takahashi Y, Murakami Y, Nagamine K, Shiku H, Aoyagi S, Yasukawa T, Kanzaki M, Matsue T. *Phys Chem Chem Phys*, 2010, 12: 10012–10017
- 35 Korchev YE, Gorelik J, Lab MJ, Sviderskaya EV, Johnston CL, Coombes CR, Vodyanoy I, Edwards CRW. *Biophys J*, 2000, 78: 451–457
- 36 Li M, Liu L, Xi N, Wang Y, Dong Z, Xiao X, Zhang W. *Chin Sci Bull*, 2010, 55: 2188 (in Chinese) [李密, 刘连庆, 席宁, 王越超, 董再励, 肖秀斌, 张伟京. 科学通报, 2010, 55: 2188–2196]
- 37 Rheinlaender J, Geisse NA, Proksch R, Schaffer TE. *Langmuir*, 2011, 27: 697–704
- 38 Happel P, Wehner F, Dietzel ID. *Modern Res Edu Topics Micro*, 2007, 2: 968–975
- 39 Miragoli M, Moshkov A, Novak P, Shevchuk A, Nikolaev VO, El-Hamamsy I, Potter CMF, Wright P, Kadir SHSA, Lyon AR, Mitchell JA, Chester AH, Klenerman D, Lab MJ, Korchev YE, Harding SE, Gorelik J. *J R Soc Interface*, 2011, 8: 913–925
- 40 Potter CMF, Schobesberger S, Lundberg MH, Weinberg PD, Mitchell JA, Gorelik J. *PLoS ONE*, 2012, 7: e31228
- 41 Gorelik J, Shevchuk AI, Frolenkov GI, Diakonov IA, Lab MJ, Kros CJ, Richardson GP, Vodyanoy I, Edwards CRW, Klenerman D, Korchev YE. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 5819–5822
- 42 Zhuang J, Wang Z, Li Z, Liang P, Vincent M. *Microsc Microanal*, 2018, 24: 264–276
- 43 Gorelik J, Ali NN, Sheikh Abdul Kadir SH, Lab M, Stojkovic P, Armstrong L, Sviderskaya EV, Negulyaev YA, Klenerman D, Bennett DC, Lako M, Harding SE, Stojkovic M, Korchev YE. *Tissue Eng Part C-Methods*, 2008, 14: 311–318
- 44 Gorelik J, Ali NN, Shevchuk AI, Lab M, Williamson C, Harding SE, Korchev YE. *Tissue Eng*, 2006, 12: 657–664
- 45 Kim SO, Kim J, Okajima T, Cho NJ. *Nano Conv*, 2017, 4: 5–13
- 46 Zhu C, Shi W, Daleke DL, Baker LA. *Analyst*, 2018, 143: 1087–1093
- 47 Masato N, Yusuke M, Futoshi IUT. *Semin Cell Dev Bio*, 2017, 125–131
- 48 Kemp SJ, Thorley AJ, Gorelik J, Seckl MJ, O'Hare MJ, Arcaro A, Korchev Y, Goldstraw P, Tetley TD. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008, 39: 591–597
- 49 Seifert J, Rheinlaender J, Novak P, Korchev YE, Schäffer TE. *Langmuir*, 2015, 31: 6807–6813
- 50 Ida H, Takahashi Y, Kumatani A, Shiku H, Matsue T. *Anal Chem*, 2017, 89: 6015–6020
- 51 Happel P, Dietzel ID. *J Nanobiotechg*, 2009, 7: 1–9
- 52 Gorelik J, Yang LQ, Zhang Y, Lab M, Korchev Y, Harding SE. *Cardiovasc Res*, 2006, 72: 422–429
- 53 Lyon AR, MacLeod KT, Zhang Y, Garcia E, Kikonda Kanda G, Lab MJ, Korchev YE, Harding SE, Gorelik J. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 6854–6859
- 54 Ibrahim M, Al Masri A, Navaratnarajah M, Siedlecka U, Soppa GK, Moshkov A, Al-Saud SA, Gorelik J, Yacoub MH, Terracciano CMN. *FASEB J*, 2010, 24: 3321–3329
- 55 James AF, Sabirov RZ, Okada Y. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391: 841–845
- 56 Schobesberger S, Jönsson P, Buzuk A, Korchev Y, Siggers J, Gorelik J. *Biophys J*, 2016, 110: 141–146
- 57 Zhou Y, Saito M, Miyamoto T, Novak P, Shevchuk AI, Korchev YE, Fukuma T, Takahashi Y. *Anal Chem*, 2018, 90: 2891–2895
- 58 Lorin C, Gueffier M, Bois P, Faivre JF, Cognard C, Seville S. *Cell Biochem Biophys*, 2013, 66: 723–736
- 59 Yang X, Liu X, Lu H, Zhang X, Ma L, Gao R, Zhang Y. *Chem Res Toxicol*, 2012, 25: 297–304
- 60 Novak P, Shevchuk A, Ruenaroengsak P, Miragoli M, Thorley AJ, Klenerman D, Lab MJ, Tetley TD, Gorelik J, Korchev YE. *Nano Lett*, 2014, 14: 1202–1207
- 61 Shan Y, Panday N, Myoung Y, Twomey M, Wang X, Li W, Celik E, Moy V, Wang H, Moon JH, He J. *Macromol Biosci*, 2016, 16: 599–607
- 62 Su SW, Chieng A, Parres-Gold J, Chang M, Wang Y. *Faraday Discuss*, 2018, 210: 131–143
- 63 Page A, Kang M, Armitstead A, Perry D, Unwin PR. *Anal Chem*, 2017, 89: 3021–3028
- 64 Wang M, Chai N, Sha B, Guo M, Zhuang J, Xu F, Li F. *J Cell Physiol*, 2017, 233: 1414–1423
- 65 Yang YH, Jiang HY. *Chin Sci Bull*, 2018, 63: 502–510 (in Chinese) [杨月华, 姜洪源. 科学通报, 2018, 63: 502–510]
- 66 Lee GM. *J Cell Science*, 1989, 94: 443–447
- 67 Crowe WE, Altamirano J, Huerto L, Alvarez-Leefmans FJ. *Neuroscience*, 1995, 69: 283–296

- 68 Kawahara K, Onodera M, Fukuda Y. *Jpn J Physiol*, 1994, 44: 411–419
- 69 Zhou Y, Chen X, Liu X, Lu H, Li Y, Zhu H, An G, Zhang N, Zhang J, Ma Q, Zhang Y. *J Membr Biol*, 2014, 247: 461–468
- 70 Ivanova R, Orsini D, Munye M, Rangseesornnan S, Hart SL, Moss GWJ. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019
- 71 Pellegrino M, Orsini P, De Gregorio F. *Neurosci Res*, 2009, 64: 290–296
- 72 Mann SA, Meyer JW, Dietzel ID. *J Microsc*, 2010, 224: 152–157
- 73 Happel P, Möller K, Kunz R, Dietzel ID. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11: 1–16
- 74 Tanaka A, Tanaka R, Kasai N, Tsukada S, Okajima T, Sumitomo K. *J Struct Biol*, 2015, 191: 32–38
- 75 Happel P, Hoffmann G, Mann SA, Dietzel ID. *J Microsc*, 2003, 212: 144–151
- 76 Klippenstein V, Mony L, Paoletti P. *Trends Biochem Sci*, 2018, 43: 436–451
- 77 Paulsen CE, Armache JP, Gao Y, Cheng Y, Julius D. *Nature*, 2015, 520: 511–517
- 78 Shi W, Zeng Y, Zhu C, Xiao Y, Cummins TR, Hou J, Baker LA. *Small*, 2018, 14: 1702945
- 79 Gorelik J, Gu Y, Spohr HA, Shevchuk AI, Lab MJ, Harding SE, Edwards CRW, Whitaker M, Moss GWJ, Benton DCH, Sánchez D, Darszon A, Vodyanoy I, Klenerman D, Korchev YE. *Biophys J*, 2002, 83: 3296–3303
- 80 Takahashi Y, Ida H, Matsumae Y, Komaki H, Zhou Y, Kumatani A, Kanzaki M, Shiku H, Matsue T. *Phys Chem Chem Phys*, 2017, 19: 26728–26733
- 81 Shi W, Zeng Y, Zhou L, Xiao Y, Cummins TR, Baker LA. *Faraday Discuss*, 2016, 193: 81–97
- 82 Christianson HC, Svensson KJ, van Kuppevelt TH, Li JP, Belting M. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 17380–17385
- 83 Shih H, Lin CC. *Macromol Rapid Commun*, 2013, 34: 269–273
- 84 Busscher HJ, van der Mei HC. *PLoS Pathog*, 2012, 8: e1002440
- 85 Gregory PJ. *Plant Roots: Growth, Activity and Interactions with the Soil*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2008
- 86 Rivera-Gil P, Jimenez de Aberasturi D, Wulf V, Pelaz B, del Pino P, Zhao Y, de la Fuente JM, Ruiz de Larramendi I, Rojo T, Liang XJ, Parak WJ. *Acc Chem Res*, 2013, 46: 743–749
- 87 Tedja R, Lim M, Amal R, Marquis C. *ACS Nano*, 2012, 6: 4083–4093
- 88 Haupt A, Campetelli A, Bonazzi D, Piel M, Chang F, Minc N. *PLoS Biol*, 2014, 12: e1002029
- 89 Wong JY, Langer R, Ingber DE. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 3201–3204
- 90 Chen F, Manandhar P, Ahmed MS, Chang S, Panday N, Zhang H, Moon JH, He J. *Macromol Biosci*, 2018, 18: 1800271
- 91 Alsteens D, Dupres V, Yunus S, Latgé JP, Heinisch JJ, Dufrêne YF. *Langmuir*, 2012, 28: 16738–16744
- 92 Almonte L, Lopez-Elvira E, Baró AM. *ChemPhysChem*, 2014, 15: 2768–2773
- 93 Sotres J, Baró AM. *Appl Phys Lett*, 2008, 93: 715–717
- 94 Zeisberg EM, Kalluri R. *Circ Res*, 2010, 107: 1304–1312
- 95 Zhang C, Wang W, He W, Xi N, Wang Y, Liu L. *Biophys J*, 2018, 114: 188–200
- 96 Pellegrino M, Pellegrini M, Orsini P, Tognoni E, Ascoli C, Baschieri P, Dinelli F. *Pflugers Arch-Eur J Physiol*, 2012, 464: 307–316
- 97 Rheinlaender J, Schäffer TE. *Soft Matter*, 2013, 9: 3230–3236
- 98 Miragoli M, Yacoub MH, El-Hamamsy I, Sanchez-Alonso JL, Moshkov A, Mongkoldhumrongkul N, Padala M, Paramagurunathan S, Sarathchandra P, Korchev YE, Gorelik J, Chester AH. *Am J Physiol-Heart Circul Physiol*, 2014, 307: H15–H24
- 99 Choi M, Baker LA. *Anal Chem*, 2018, 90: 11797–11801
- 100 Li G, Fang X. *Micron*, 2018, 114: 8–13

Application of scanning ion conductance microscope in cell characterizations

Jinxin Lang^{1,2}, Yabei Li^{1,2}, Yaowei Yang^{2,3}, Yangbohan Jiao⁴, Meng Wang^{2,3}, Jian Zhuang⁴, Fei Li^{2,3*}

¹ Department of Chemistry, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China

² Bioinspired Engineering and Biomechanics Center (BEBC), Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China

³ The Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education, School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China

⁴ School of Mechanical Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China

*Corresponding author (email: feili@mail.xjtu.edu.cn)

Abstract: Cell morphology, electrical and mechanical functions are of great significance in cell biology. However, traditional cell characterization methods are not suitable for study of living cells in a non-invasive, *in situ* and micro/nano-scaled way. As a new type of scanning probe microscopy, scanning ion conductance microscopy (SICM) enables non-invasive, high-resolution and real-time imaging of living cells based on its non-contact scanning mode and usage of nanopipette as its probe. In recent years, SICM has been widely applied in cell biology and cell characterizations. This review mainly introduces the SICM applications in cell characterizations. First, we introduce the instrumental composition, working principle and three work modes of SICM, and compare the strengths and weakness of the three working modes. Then the applications of SICM in cell morphology, cellular electrical and mechanical properties are described in detail. In addition, in contrast to the traditional cell characterization methods, SICM has the distinct advantages in *in situ* characterization of cells. Finally, the challenges of SICM in cell characterizations are discussed and its future development is proposed.

Keywords: scanning ion conductance microscope, cell morphology, cell electrical properties, cell mechanical properties

doi: [10.1360/N032018-00266](https://doi.org/10.1360/N032018-00266)