基于原子力显微镜(AFM)的细胞黏弹特性测量与分析

党丹^{1*}, 李密^{2,3*}, 项荣武¹

1. 沈阳药科大学医疗器械学院, 沈阳 110016;

2. 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;

3. 中国科学院机器人与智能制造创新研究院, 沈阳 110016

* 联系人, E-mail: dangdan@syphu.edu.cn; limi@sia.cn

2018-12-18 收稿, 2019-03-03 修回, 2019-03-04 接受, 2019-04-24 网络版发表

国家自然科学基金(61873258, 61503372)和中国科学院青年创新促进会项目(2017243)资助

摘要 细胞机械特性在细胞生理病理变化过程中起着重要指示作用, 对其进行研究有助于了解生命活动奥秘以及疾病发生发展的内在机理. 原子力显微镜(AFM)的发明为单细胞机械特性研究提供了新的技术手段, 给细胞力学及癌症等重大疾病带来了大量新的认识. 然而现有AFM细胞机械特性探测主要集中在细胞弹性特性, 对细胞黏弹特性进行的研究和分析还较为缺乏. 本文基于AFM开展了细胞黏弹特性测量和分析研究. 首先建立了基于AFM单细胞压痕技术的细胞黏弹特性探测方法, 基于此实现了对6种不同类型细胞(包括贴壁细胞、悬浮细胞、正常细胞、癌细胞、细胞系和原代细胞等)黏弹特性(松弛时间)的测量与表征, 随后对测量结果进行回归分析揭示出细胞1阶松弛时间和2阶松弛时间之间的关联. 研究结果加深了人们对细胞黏弹特性的认识, 为单细胞机械特性研究提供了新的思路.

关键词 原子力显微镜, 细胞机械特性, 压痕技术, 黏弹特性, 松弛时间

细胞机械特性在细胞生理病理活动过程中起着重要的调控作用. 一方面, 从分子、细胞到组织、器官, 几乎组成生命机体的任何一个尺度的基本单元均会在其生理活动过程中产生机械力^[1], 如在细胞有丝分裂过程中, 细胞变圆会产生向外的推力^[2]. 这些机械力对分子细胞及组织器官各项生理功能(如染色质组织、细胞分裂、蛋白质转运、细胞黏附、细胞迁移、组织表型等)的执行起着重要的作用^[3]. 另一方面, 微环境中的细胞外基质(ECM)或邻近细胞会不断地施加机械刺激并通过机械传导机制影响细胞的生理行为^[4], 如研究表明ECM的硬度^[5]以及纳米形貌特征^[6]影响细胞分化与增殖. 细胞机械传导机制不仅依赖于相关细胞结构(如整联蛋白、肌动蛋白、微管、细胞核等), 还与细胞机

械特性(如黏弹特性)有关^[7]. 当细胞发生病理变化时(如癌变), 细胞机械传导机制和细胞自身机械特性以及细胞微环境均会发生独特的变化^[8,9]. 在肿瘤生成和转移过程中, 原位癌细胞通过细胞外囊泡(外排体)发送信号以便使微环境适合癌细胞迁移和生长^[10,11], 如ECM纤维变成平行各向异性取向便于癌细胞转移^[9]. ECM纤维聚合及线性化导致肿瘤组织的硬度明显大于正常组织(如乳腺癌组织的硬度约为正常乳腺组织硬度的10倍)^[12], 但与此同时癌细胞本身的硬度则显著小于正常细胞^[13]. 此外与正常细胞相比, 癌细胞具有更强的收缩能力^[8]. 癌细胞自身机械特性的变化有助于其运动转移^[14]. 针对细胞生理病理活动过程中的机械特性变化开展研究不仅有助于癌症转移过程模拟^[15], 还有望给

引用格式: 党丹, 李密, 项荣武. 基于原子力显微镜(AFM)的细胞黏弹特性测量与分析. 科学通报, 2019, 64: 1610–1619

Dang D, Li M, Xiang R W. Measurement and analysis of cellular viscoelastic properties using atomic force microscopy (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64: 1610–1619, doi: [10.1360/N972018-01266](https://doi.org/10.1360/N972018-01266)

癌症临床试验^[16]带来机遇。

原子力显微镜(AFM)的发明为探测单个细胞的机械特性提供了新的工具。与光镊^[17]、磁镊^[18]、微流控^[19]、微管吸取^[20]等单细胞机械特性测量技术相比, AFM的优势是具有纳米级的空间分辨率, 且能够同时获取细胞表面形貌信息以及机械特性信息^[21], 有助于研究细胞结构与细胞机械特性以及细胞生理功能之间的关联。过去的20年中, 研究人员利用AFM对细胞机械特性开展了广泛的研究^[22~24], 揭示了细胞骨架蛋白对细胞弹性的决定作用^[25,26], 阐明了癌细胞与正常细胞机械特性之间的显著差异^[27~29]以及细胞机械特性与细胞侵袭能力之间的密切关联^[30~32], 证明了细胞机械特性是一个可有效指示细胞生理病理变化的生物指标^[33,34]。基于AFM的细胞机械特性探测已成为重要的细胞研究手段^[35,36]。然而需要指出的是, 现有AFM细胞机械特性研究集中在探测细胞弹性特性(如杨氏模量)^[37]。杨氏模量仅仅反映了AFM探针快速接触细胞产生压痕过程中的细胞瞬时弹性特性(尚未发生细胞松弛过程), 而在AFM压痕过程中受细胞自身黏弹特性的影响, 细胞通常表现出明显的力学松弛特性^[38]。尽管已有研究人员利用AFM对细胞的松弛特性进行了研究^[39,40], 但对于细胞黏弹特性实验与理论关联分析的研究仍较为缺乏。

针对上述问题, 本文研究了基于AFM的细胞黏弹特性测量和分析方法。利用所发展的AFM压痕方法对6种不同类型细胞(包括贴壁细胞、悬浮细胞、正常细胞、癌细胞、细胞系和原代细胞等)的松弛时间进行了测量, 并针对实验与理论分析结果进行数学统计揭示出细胞1阶松弛时间和2阶松弛时间之间的线性关联, 为单细胞机械特性研究提供了新的思路。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与样本制备

HEK293(人胚肾细胞)、MCF-7(非侵袭性人乳腺癌细胞)、MDA-MB-231(侵袭性人乳腺癌细胞)、Raji(人B细胞淋巴瘤细胞)购自中国科学院细胞库(上海)。细胞培养基(DMEM, RPMI-1640和L-15)和磷酸盐缓冲液(PBS)购自美国Hyclone公司。HEK293细胞在37°C(5% CO₂)含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素的DMEM(高糖)培养基中培养。MCF-7和Raji细胞在37°C(5% CO₂)含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素的RPMI-1640培养基中培养。MDA-MB-231细胞在37°C(5% CO₂)含10%胎牛

血清和1%青霉素-链霉素的L-15培养基中培养。

HEK293, MCF-7和MDA-MB-231细胞为贴壁生长型细胞, 将其生长在培养皿中, 随后直接将培养皿置于AFM样品台进行AFM测量。Raji细胞为悬浮生长型细胞, 将其生长在培养瓶中。离心收集Raji细胞并将Raji细胞溶液滴至覆盖有多聚赖氨酸(索莱宝科技有限公司, 北京)的载玻片(利用纯水将多聚赖氨酸原液稀释10倍, 随后将多聚赖氨酸稀释液滴至干净的载玻片上, 室温干燥后即可使用)上, 并将载玻片置于含PBS的培养皿中, 随后将培养皿置于AFM样品台进行AFM测量。多聚赖氨酸带正电荷, 细胞表面带负电荷, 因此覆盖有多聚赖氨酸的载玻片通过静电吸附^[41]作用将细胞吸附在载玻片表面。

1.2 原代细胞分选与制备

利用免疫磁珠分离法从B细胞淋巴瘤患者骨髓和外周血中分离出原代B细胞^[38,42,43]。淋巴瘤患者骨髓和外周血样本从辽宁省肿瘤医院(沈阳)获得。原代B细胞分选的具体过程为:

(i) 单核细胞(PBMC)提取。首先利用梯度密度离心法从经过抗凝处理的骨髓或外周血中分离出单核细胞(PBMC)。将2 mL淋巴细胞分离液(索莱宝科技有限公司, 北京)加入至离心管中, 随后取1 mL抗凝血和1 mL PBS混合并将混合溶液加入至离心管中。将离心管以400×g的速度离心20 min后, 离心管内溶液即发生分层(从上到下分别为血浆, PBMC, 分离液和红细胞)。将PBMC层吸取到另一个离心管中, 随后进行离心收集得到PBMC。

(ii) B细胞分离。利用CD19抗体标记的免疫磁珠分离出PBMC中的B细胞。CD19是一种B细胞表面特异性标志物^[44], 不表达于其他类型细胞, 因而修饰有抗CD19抗体的磁珠会特异性识别出B细胞。将PBMC重悬浮于80 μL的PBS中并加入20 μL的CD19抗体磁珠(Miltenyi公司, 美国), 随后在冰箱中孵育15 min。孵育结束后利用PBS清洗并离心以去除未结合的磁珠。紧接着将细胞重悬浮于500 μL的PBS中, 并将细胞溶液转移至分选管中, 随后将分选管置于磁场分选器(Miltenyi公司, 美国)内。将工作液滴至分选管内过滤去除非B细胞, 而B细胞则通过磁珠被磁场截留。最后将分选管移出磁场分选器, 通过冲洗分选管得到纯化的B细胞。

将分离得到的B细胞滴至覆盖有多聚赖氨酸的载玻片上, 并将载玻片置于含PBS的培养皿中。随后将培

养皿置于AFM样品台上进行AFM测量实验。

1.3 AFM细胞黏弹特性测量

利用美国Bruker公司生产的Bioscope Catalyst AFM进行细胞黏弹特性测量实验。该AFM与光学倒置显微镜集成,如图1(a)所示。细胞黏弹特性测量实验在PBS溶液室温下进行。在光学显微镜引导下,控制AFM探针移动到单个细胞进行探测。图1(b)和(c)分别显示了光学导引下探测Raji细胞和MCF-7细胞。Raji细胞为悬浮生长型细胞,在多聚赖氨酸静电吸附作用下Raji细胞牢固吸附到载玻片表面便于AFM探测,而MCF-7细胞则可直接吸附在培养皿底部贴壁生长。实验所采用的探针(型号为MLCT,购自美国Bruker公司)悬臂梁的弹性系数为0.01 N/m。在对细胞进行测量前,首先利用探针在基底空白区域获取力曲线校正悬臂梁的偏转灵敏度,随后利用AFM的热噪声^[45]模块校正得到悬臂梁的精确弹性系数。

通过控制AFM探针在垂直方向进行逼近-停留-回退(approach-dwell-retract)运动测量细胞黏弹特性^[46],如图2所示。光学导引下移动AFM探针针尖至细胞中央区域后控制AFM在细胞中央区域垂直方向进行压痕(indenting)实验。首先,针尖从细胞上方以一定速度(12 $\mu\text{m/s}$)逐步逼近细胞(图2(a)).针尖接触细胞后继续下压,在探针加载力(loadng force)的作用下细胞产生压痕(图2(b)).当探针加载力达到设定的值(1 nN)时,针尖停止下压并在细胞上停留(图2(c))一段时间(1 s)。随后探针从细胞表面回退至垂直方向初始位置(图2(d)).利用示波器记录探针在逼近-停留-回退过程中悬臂梁偏转量随时间的变化,即可得到反映细胞黏弹特性的松弛曲线。对每一类细胞(HEK293, MCF-7, MDA-MB-

图1 (网络版彩色)AFM细胞黏弹特性测量实验平台。(a) AFM实物图。(b)、(c) 光学显微镜引导下控制AFM探针单个细胞进行测量。(b) Raji细胞(悬浮细胞)。(c) MCF-7细胞(贴壁细胞)
Figure 1 (Color online) AFM experimental platform for measuring the viscoelastic properties of cells. (a) Actual photograph of AFM. (b), (c) AFM is controlled to probe individual living cells under the guidance of optical microscopy. (b) Raji cell (a type of mammalian suspended cell). (c) MCF-7 cell (a type of mammalian adherent cell)

231, Raji, 原代骨髓B细胞, 原代外周血B细胞), 在20个细胞表面获取松弛曲线。为了使各个细胞的测量结果具有可比性, AFM探针压痕过程中的相关参数(加载速度、加载力、停留时间)保持一致。

1.4 细胞松弛时间提取

利用Maxwell弹簧黏壶(spring-dashpot)模型^[47]从AFM探针逼近-停留-回退运动过程中获取的松弛曲线提取出细胞松弛时间。Maxwell弹簧黏壶模型公式为

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

图2 (网络版彩色)AFM探针在垂直方向进行逼近-停留-回退运动以探测细胞黏弹特性示意图。(a) 压电陶瓷驱动器驱动探针在细胞表面垂直方向运动。(b) 针尖逼近并接触细胞, 在细胞表面产生压痕。(c) 针尖在细胞表面停留以观测细胞松弛过程。(d) 探针从细胞表面回退
Figure 2 (Color online) Schematic diagram of detecting cellular viscoelasticity by controlling AFM probe to perform approach-dwell-retract movement on cells in the vertical direction. (a) The piezoelectric tube vertically drives AFM probe to gradually move to the cell. (b) The AFM probe contacts and indents the cell. (c) The AFM probe dwells on the cell surface to observe the cellular relaxation process. (d) The AFM probe retracts from cell surface after measurement

$$\tau_i = \frac{\eta_i}{E_i}, i = 1, 2, \dots, N, \quad (2)$$

其中 F 为加载力, A_0 为瞬时弹性特性, A_i 为第 i 阶应力幅值, τ_i 为第 i 阶松弛时间, η_i 为第 i 阶黏性系数, E_i 为第 i 阶杨氏模量. 松弛时间 τ_i 为黏性系数 η_i 与杨氏模量 E_i 的比值, 因此松弛时间 τ_i 反映了细胞的黏弹特性. 利用Maxwell模型从松弛曲线提取松弛时间的流程如图3所示. 首先将示波器记录的原始松弛曲线导出为文本文件, 利用Matlab软件(美国MathWorks公司)将原始松弛曲线进行归一化:

$$x_i = x_i - \min(x), i = 1, 2, \dots, M, \quad (3)$$

$$y_i = y_i - \min(y), i = 1, 2, \dots, M, \quad (4)$$

$$y_i = y_i / \max(y), i = 1, 2, \dots, M, \quad (5)$$

其中 M 表示示波器记录的松弛曲线中的采样数据点数(本研究中取值为500), x_i 和 y_i 分别为第 i 个数据点的横坐标(时间)和纵坐标(加载力), $\min(x)$ 和 $\min(y)$ 分别为所有数据点的最小横坐标和最小纵坐标, $\max(y)$ 为所有数据点的最大纵坐标. 随后利用有限元软件Abaqus(美国Dassault Systems公司)对归一化的松弛曲线进行Maxwell模型拟合得到细胞松弛时间.

1.5 数据统计分析

为了分析细胞1阶松弛时间 τ_1 和2阶松弛时间 τ_2 之间的关联, 对 τ_1 和 τ_2 进行一元线性回归分析. 首先绘制出各类细胞 τ_1 和 τ_2 的散点图, 显示 τ_1 和 τ_2 之间存在线性关联. 随后以 τ_1 为自变量, τ_2 为因变量, 进行不带常数项的回归分析:

$$\tau_2 = k \times \tau_1, \quad (6)$$

其中 k 为回归参数. 基于R语言(一种用于统计计算与图形分析的编程语言), 利用数学统计软件SAS(美国SAS公司)根据最小二乘法求解出 k .

2 结果与讨论

图4显示了AFM测量细胞松弛时间的过程. 图4(a)为MCF-7活细胞的AFM成像. MCF-7细胞能在基底延展生长, 便于对其进行AFM成像. 控制AFM探针在细

胞表面中央区域(图4(a)中绿色圆点指示)进行压痕(逼近-停留-回退)实验, 利用示波器记录压痕过程中的原始曲线, 如图4(b)所示. 探针垂直位置曲线(灰色曲线)清晰指示了探针逼近细胞, 在细胞停留(探针垂直方向位置不便), 从细胞回退的过程. 在细胞停留过程中, 悬臂梁偏转量明显呈现衰减趋势(图4(b)红色曲线中蓝色虚线框指示部分), 表明了细胞的应力松弛过程. 将探针在细胞表面停留阶段对应的悬臂梁偏转量提取出来, 即得到松弛曲线, 如图4(c)所示. 为便于理论分析, 将松弛曲线进行归一化处理, 归一化后的松弛曲线如图4(d)所示. 随后利用Maxwell模型对归一化松弛曲线进行拟合, 拟合结果如图4(e)所示. 从拟合结果(图4(e))可以明显看到2阶Maxwell模型拟合结果与实验松弛曲线吻合. 2阶Maxwell模型拟合得到2个松弛时间, 分别是1阶松弛时间($\tau_1=0.0313$ s)和2阶松弛时间($\tau_2=0.3104$ s). 作为对比, 利用探针在基底空白区域进行逼近-停留-回退实验并记录原始曲线, 如图4(f)所示. 可以看到在探针停留过程中悬臂梁偏转量保持不变(图4(f)蓝色曲线), 显示没有发生松弛现象, 表明了细胞表面进行压痕得到的松弛曲线(图4(b))反映了细胞的黏弹特性. 细胞是一种高度异质的材料, 由细胞膜、细胞骨架、细胞质、细胞核等部分组成, 而各组分具有独特的结构以及机械特性^[48,49], 因此这种细胞组分的结构及机械特性异质性有可能导致单个松弛时间难以描述细胞松弛过程, 而2阶Maxwell模型(2个松弛时间)则能够较好描述细胞松弛过程. 目前细胞黏弹特性测量方法主要分为两类, 分别为被动测量法和主动测量法^[50]. 被动测量法通过跟踪置于细胞内颗粒的布朗运动来测量细胞黏弹特性^[51], 主动测量法则通过施加外部作用力于细胞或颗粒(颗粒吸附于细胞表面或置于细胞内部)来测量细胞黏弹特性^[52]. 被动测量法的缺点是需要将细胞膜穿孔以便将颗粒植入细胞内部^[53], 有可能对细胞生理活性带来影响. 主动测量法主要包括光镊、磁镊和AFM^[54]. 光镊和磁镊需要将颗粒吸附至细胞表面或植入细胞内部, 而AFM可以直接对培养基中的活细胞进行探测而不需要进行预处理, 因此AFM方法更简单. 本文基于AFM构建了细胞黏弹特性测量方法(图4), 结

图3 (网络版彩色)从松弛曲线提取细胞松弛时间流程图

Figure 3 (Color online) Flow chart of extracting cellular relaxation time from the recorded relaxation curve

图4 AFM测量细胞松弛时间过程。(a) MCF-7活细胞的AFM高度图。在细胞中央区域(绿色圆点指示)进行AFM压痕实验。(b) AFM探针在MCF-7细胞表面进行逼近-停留-回退测量过程中记录的原始曲线。红色曲线表示探针悬臂梁偏转量变化情况,灰色曲线表示相对应的探针垂直方向位置变化情况。(c) 原始松弛曲线(即(b)中蓝色虚线框指示部分)。(d) 归一化后的松弛曲线。(e) 利用2阶Maxwell模型拟合归一化松弛曲线得到2个细胞松弛时间(1阶松弛时间 τ_1 和2阶松弛时间 τ_2)。(f) AFM探针在基底表面进行逼近-停留-回退测量过程中记录的原始曲线。蓝色曲线表示探针悬臂梁偏转量变化情况,灰色曲线表示相对应的探针垂直方向位置变化情况

Figure 4 Procedure of measuring cellular relaxation time by AFM. (a) AFM height image of living MCF-7 cells. AFM indentation experiments are performed at the central areas (denoted by the green dots) of cells. (b) Original curves recorded during the approach-dwell-retract process of AFM probe performed on MCF-7 cells. The red curve corresponds to the deflection of AFM cantilever and the gray curve corresponds to the vertical position of AFM probe. (c) Original relaxation curve (denoted by the blue dashed box in (b)). (d) Normalized relaxation curve. (e) Fitting the normalized relaxation curve with two-order Maxwell model gives two cellular relaxation times (the first relaxation time τ_1 and the second relaxation time τ_2). (f) Original curves recorded on the substrate for control experiments. The blue curve is the deflection of AFM cantilever and the gray curve is the vertical position of AFM probe

果显示理论分析和实验结果高度吻合,表明了细胞黏弹特性可由2个松弛时间表示,为细胞机械特性研究提供了新的方法。

利用所建立的AFM细胞黏弹特性测量方法对6种不同类型细胞的松弛时间进行了定量测量。基于图4所示的测量方法,对6种不同类型的细胞(HEK293, MCF-7, MDA-MB-231, Raji, 骨髓原代B细胞和外周血原代B细胞)进行测量。选取的6类细胞涵盖贴壁细胞(HEK293, MCF-7, MDA-MB-231),悬浮细胞(Raji, 原代B细胞),正常细胞(HEK293, 原代B细胞),癌细胞(MCF-7, MDA-MB-231, Raji),细胞系(HEK293, MCF-7, MDA-MB-231, Raji)和原代细胞(原代B细胞)。对每一类细胞,选取20个细胞进行压痕(逼近-停留-回退)实验。AFM压痕实验获取的松弛曲线均能利用2阶Maxwell模型进行拟合(图5),表明了2阶Maxwell模型描述不同类型细胞松弛过程的有效性。图6为细胞松弛时间测量统计结果。图6((a), (b))分别统计显示了6类细胞的

1阶松弛时间 τ_1 (图6(a))和2阶松弛时间 τ_2 (图6(b))对比。图6中各细胞松弛时间数据的统计结果(均值±标准差)总结在表1中。整体上看,悬浮细胞(Raji, 原代B细胞)的1阶松弛时间 τ_1 略微大于贴壁细胞(HEK293, MCF-7, MDA-MB-231)的1阶松弛时间 τ_1 ,如图6(a)所示,但悬浮细胞和贴壁细胞的2阶松弛时间 τ_2 并无明显差异。比较MCF-7和MDA-MB-231,二者均为入源乳腺癌细胞,但MDA-MB-231相比MCF-7更具有侵袭性。AFM测量结果显示MDA-MB-231的1阶松弛时间 τ_1 和2阶松弛时间 τ_2 均显著小于MCF-7,意味着MDA-MB-231的变形恢复能力更强。在癌症转移过程中,癌细胞需要穿过体内很多障碍,如基膜(basement membrane), ECM, 血管(淋巴管)等^[55],因而细胞的变形能力可能有助于癌细胞顺利转移。HEK293与MCF-7以及MDA-MB-231的松弛时间无明显差异,反映了不同类型细胞之间松弛时间的重叠。对比Raji细胞和原代B细胞,骨髓中原代B细胞的2阶松弛时间 τ_2 明显小于Raji细胞,但1阶松弛时间 τ_1 无

图 5 (网络版彩色)在不同类型细胞进行压痕实验获取的典型松弛曲线及2阶Maxwell模型拟合. (a) HEK293细胞. (b) MCF-7细胞. (c) MDA-MB-231细胞. (d) Raji细胞. (e) 骨髓原代B细胞. (f) 外周血原代B细胞. 插图为细胞的光学图像

Figure 5 (Color online) Typical relaxation curves recorded on different types of cells and the Maxwell fitting curves. (a) HEK 293 cells. (b) MCF-7 cells. (c) MDA-MB-231 cells. (d) Raji cells. (e, f) Primary B cells prepared from the bone marrow (e) and peripheral blood (f) from lymphoma patients. The insets in (a)–(f) are the optical images of cells

图 6 (网络版彩色)基于AFM测量的不同类型细胞松弛时间统计图. (a) 松弛时间 τ_1 . (b) 松弛时间 τ_2

Figure 6 (Color online) Statistical comparison of the cellular relaxation times of different types of cells. (a) Cellular relaxation time τ_1 . (b) Cellular relaxation time τ_2

表 1 不同类型细胞松弛时间(均值±标准差)

Table 1 Cellular relaxation times of different types of cells (Mean±SD)

细胞松弛时间	HEK293	MCF-7	MDA-MB-231	Raji	骨髓原代B细胞	外周血原代B细胞
松弛时间 τ_1 (s)	0.0254±0.0043	0.0244±0.0051	0.0198±0.0046	0.0284±0.0072	0.0277±0.0071	0.0287±0.0087
松弛时间 τ_2 (s)	0.2656±0.0376	0.3033±0.0654	0.2706±0.0491	0.2849±0.0879	0.2634±0.0609	0.2978±0.0419

明显差异,反映了细胞1阶松弛时间 τ_1 和2阶松弛时间 τ_2 的变化多样性.

图7显示了细胞1阶松弛时间和2阶松弛时间的统计关联分析结果. AFM压痕实验曲线的Maxwell理论拟合

显示出细胞松弛特性可由两阶尺度松弛时间构成,分别是1阶松弛时间 τ_1 和2阶松弛时间 τ_2 . 1阶松弛时间 τ_1 较快,而2阶松弛时间 τ_2 较慢. 为了考察1阶松弛时间 τ_1 和2阶松弛时间 τ_2 之间的关联性,对6种细胞松弛时间进行了回

图7 细胞1阶松弛时间 τ_1 和2阶松弛时间 τ_2 的相关性分析. 回归分析表明1阶松弛时间和2阶松弛时间之间存在线性关联

Figure 7 Regression analysis of the first relaxation time τ_1 and the second relaxation time τ_2 of cells showing the linear relationship between τ_1 and τ_2

归分析, 结果如图7以及表2所示. 回归分析显示 R^2 较高(>0.89), 表明1阶松弛时间 τ_1 和2阶松弛时间 τ_2 之间存在着明显的线性相关性. 图7显示了各类细胞的1阶松弛时间 τ_1 和2阶松弛时间 τ_2 之间的回归直线. 各回归直线的线性系数如表2所示, 表明线性系数在11~13之间. 本文测得的6种不同类型细胞的1阶松弛时间 τ_1 为0.01~0.03 s, 2阶松弛时间 τ_2 为0.2~0.4 s. 1阶松弛时间和2阶松弛时间可能与细胞内部不同结构的生理活动有关. 控制AFM探针在细胞表面产生机械压痕以测量细胞黏弹特性的过程中, 涉及大量不同类型的细胞结构的参与, 包括糖蛋白、细胞膜、肌动蛋白皮层、细胞液、纤维蛋白和细胞核等^[56]. 这些细胞结构共同形成一个网络来将外部机械刺激信号传递到细胞核并调控细胞对外部机械刺激进行响应: 外部机械信号施加到细胞膜蛋白、膜蛋白与骨架蛋白(肌动蛋白、肌球蛋白、微管、中间丝等)相连, 骨架蛋白与核包膜血影蛋白重复蛋白(Nesprin)相连, 而Nesprin蛋白则通过内核膜蛋白(SUN)和核纤层蛋白(Lamin A)与细胞核相连^[57]. 细胞骨架蛋白分子之间

的相互作用(如聚合和解聚合)有助于细胞形状变化以及细胞内部结构的重组^[58]. 作为重要的细胞骨架马达蛋白, 肌球蛋白分子为物质运输、细胞质流动等提供动力^[59,60]. 利用快速扫描AFM对单个肌球蛋白分子在肌丝纤维上的滑行运动进行研究, 表明肌球蛋白的运动时间间隔大约为0.15 s^[61]. 可以看到本文测量得到的细胞2阶松弛时间 τ_2 为与骨架蛋白分子的生理活动时间在一个时间尺度. 在AFM探针对细胞施加机械力刺激的过程中, 细胞骨架蛋白会发生重排^[62], 因此细胞2阶松弛时间可能对应于细胞骨架蛋白的活动. 细胞质的流动对于细胞生理活动的执行(如细胞运动)起着重要的作用^[63]. AFM探针在细胞表面产生压痕并停留的过程中, 细胞质会迅速发生流动以改变细胞黏弹特性^[64], 因此本文测量得到的细胞1阶松弛时间 τ_1 可能对应于细胞质的生理活动. 总之, AFM实验及Maxwell理论分析显示细胞松弛过程可由两个不同时间尺度的松弛时间表征(1阶松弛时间和2阶松弛时间), 细胞1阶松弛时间和细胞2阶松弛时间可能与细胞内部不同结构的生理活

表2 细胞1阶松弛时间 τ_1 和2阶松弛时间 τ_2 之间的线性关联

Table 2 Linear relationship between the first relaxation time τ_1 and the second relaxation time τ_2 of cells

回归分析	HEK293	MCF-7	MDA-MB-231	Raji	骨髓原代B细胞	外周血原代B细胞
线性关联	$\tau_2=11.8665\times\tau_1$	$\tau_2=12.2897\times\tau_1$	$\tau_2=11.1736\times\tau_1$	$\tau_2=11.0472\times\tau_1$	$\tau_2=11.7918\times\tau_1$	$\tau_2=11.1592\times\tau_1$
R^2	0.9494	0.9244	0.9098	0.9459	0.8979	0.9504

动有关, 但还需要更多的后续生物化学实验来揭示细胞松弛过程的内在分子机理。

3 结论

传统AFM单细胞机械特性研究集中在细胞弹性特性测量(如杨氏模量), 但由于细胞黏弹特性在细胞生理活动过程中起着重要作用, 导致AFM杨氏模量单一指标有时候难以完全反映细胞生理特性变化(如癌症转移^[65])。本文研究了基于AFM的细胞黏弹特性测量与分

析, 建立了基于AFM压痕技术和Maxwell模型分析的细胞松弛时间测量与表征方法。通过对6种不同类型细胞进行测量表明细胞松弛过程可由两个不同时间尺度(较快的1阶松弛时间 τ_1 和较慢的2阶松弛时间 τ_2)的松弛时间表征, 显示了不同类型细胞在1阶松弛时间和2阶松弛时间方面的差异, 同时基于数学分析方法揭示了细胞1阶松弛时间 τ_1 和2阶松弛时间 τ_2 之间的线性关联。研究结果证明了AFM可靠探测细胞黏弹特性的能力, 对于细胞机械特性研究具有潜在的积极意义。

参考文献

- 1 Stewart M P, Toyoda Y, Hyman A A, et al. Force probing cell shape changes to molecular resolution. *Trends Biochem Sci*, 2011, 36: 444–450
- 2 Cattin C J, Düggelein M, Martinez-Martin D, et al. Mechanical control of mitotic progression in single animal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 11258–11263
- 3 Weaver V M. Cell and tissue mechanics: The new cell biology frontier. *MBOC*, 2017, 28: 1815–1818
- 4 Martino F, Perestrelo A R, Vinarský V, et al. Cellular mechanotransduction: From tension to function. *Front Physiol*, 2018, 9: 824
- 5 Ye K, Wang X, Cao L, et al. Matrix stiffness and nanoscale spatial organization of cell-adhesive ligands direct stem cell fate. *Nano Lett*, 2015, 15: 4720–4729
- 6 Ngandu Mpoyi E, Cantini M, Reynolds P M, et al. Protein adsorption as a key mediator in the nanotopographical control of cell behavior. *ACS Nano*, 2016, 10: 6638–6647
- 7 Wang N. Review of cellular mechanotransduction. *J Phys D-Appl Phys*, 2017, 50: 233002
- 8 Zanotelli M R, Bordeleau F, Reinhart-King C A. Subcellular regulation of cancer cell mechanics. *Curr Opin BioMed Eng*, 2017, 1: 8–14
- 9 Chaudhuri P K, Low B C, Lim C T. Mechanobiology of tumor growth. *Chem Rev*, 2018, 118: 6499–6515
- 10 Kiberstis P A. Metastasis: An evolving story. *Science*, 2016, 352: 162–163
- 11 Junttila M R, de Sauvage F J. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*, 2013, 501: 346–354
- 12 Lu P, Weaver V M, Werb Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol*, 2012, 196: 395–406
- 13 Cross S E, Jin Y S, Rao J, et al. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nat Nanotech*, 2007, 2: 780–783
- 14 Plodinec M, Loparic M, Monnier C A, et al. The nanomechanical signature of breast cancer. *Nat Nanotech*, 2012, 7: 757–765
- 15 Malandrino A, Kamm R D, Moeendarbary E. *In vitro* modeling of mechanics in cancer metastasis. *ACS Biomater Sci Eng*, 2018, 4: 294–301
- 16 Lampi M C, Reinhart-King C A. Targeting extracellular matrix stiffness to attenuate disease: From molecular mechanisms to clinical trials. *Sci Transl Med*, 2018, 10: eaao0475
- 17 Brandao M M, Fontes A, Barjas-Castro M L, et al. Optical tweezers for measuring red blood cell elasticity: Application to the study of drug response in sickle cell disease. *Eur J Haematol*, 2003, 70: 207–211
- 18 Bausch A R, Möller W, Sackmann E. Measurement of local viscoelasticity and forces in living cells by magnetic tweezers. *BioPhys J*, 1999, 76: 573–579
- 19 Hur S C, Henderson-MacLennan N K, McCabe E R B, et al. Deformability-based cell classification and enrichment using inertial microfluidics. *Lab Chip*, 2011, 11: 912–920
- 20 Diz-Muñoz A, Fletcher D A, Weiner O D. Use the force: Membrane tension as an organizer of cell shape and motility. *Trends Cell Biol*, 2013, 23: 47–53
- 21 Li M, Dang D, Liu L, et al. Atomic force microscopy in characterizing cell mechanics for biomedical applications: A review. *IEEE Trans NanoBiosci*, 2017, 16: 523–540
- 22 Radmacher M. Studying the mechanics of cellular processes by atomic force microscopy. *Methods Cell Biol*, 2007, 83: 347–372
- 23 Kirmizis D. Atomic force microscopy probing in the measurement of cell mechanics. *Int J Nanomed*, 2010, 5: 137–145
- 24 Kasas S, Longo G, Dietler G. Mechanical properties of biological specimens explored by atomic force microscopy. *J Phys D-Appl Phys*, 2013, 46: 133001
- 25 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
- 26 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
- 27 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
- 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 Lekka M, Pogoda K, Gostek J, et al. Cancer cell recognition – Mechanical phenotype. *Micron*, 2012, 43: 1259–1266
- 30 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
- 31 Luo Q, Kuang D, Zhang B, et al. Cell stiffness determined by atomic force microscopy and its correlation with cell motility. *Biochim Biophys Acta (BBA) General Subjects*, 2016, 1860: 1953–1960
- 32 Nematbakhsh Y, Pang K T, Lim C T. Correlating the viscoelasticity of breast cancer cells with their malignancy. *Converg Sci Phys Oncol*, 2017, 3: 034003
- 33 Di Carlo D. A mechanical biomarker of cell state in medicine. *J Lab Autom*, 2012, 17: 32–42
- 34 Yu W, Sharma S, Gimzewski J K, et al. Nanocytology as a potential biomarker for cancer. *Biomarkers Med*, 2017, 11: 213–216
- 35 Schillers H, Rianna C, Schäpe J, et al. Standardized nanomechanical atomic force microscopy procedure (SNAP) for measuring soft and biological samples. *Sci Rep*, 2017, 7: 5117
- 36 Dufrêne Y F, Ando T, Garcia R, et al. Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology. *Nat Nanotech*, 2017, 12: 295–307
- 37 Lekka M. Discrimination between normal and cancerous cells using AFM. *BioNanoScience*, 2016, 6: 65–80
- 38 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
- 39 Moeendarbary E, Valon L, Fritzsche M, et al. The cytoplasm of living cells behaves as a poroelastic material. *Nat Mater*, 2013, 12: 253–261
- 40 Efremov Y M, Wang W H, Hardy S D, et al. Measuring nanoscale viscoelastic parameters of cells directly from AFM force-displacement curves. *Sci Rep*, 2017, 7: 1541
- 41 Dufrêne Y F. Atomic force microscopy and chemical force microscopy of microbial cells. *Nat Protoc*, 2008, 3: 1132–1138
- 42 Li M, Liu L Q, Xi N, et al. Progress in measuring the mechanical properties of clinical primary cells using atomic force microscopy (in Chinese). *Sci China Life Sci*, 2016, 46: 1370–1381 [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]
- 43 Li M, Liu L Q, Xi N, et al. Atomic force microscopy studies on cellular elastic and viscoelastic properties. *Sci China Life Sci*, 2018, 61: 57–67 [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]
- 44 Tedder T F. CD19: A promising B cell target for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*, 2009, 5: 572–577
- 45 Hutter J L, Bechhoefer J. Calibration of atomic-force microscope tips. *Rev Sci Instruments*, 1993, 64: 1868–1873
- 46 Li M, Liu L, Xu X, et al. Nanoscale characterization of dynamic cellular viscoelasticity by atomic force microscopy with varying measurement parameters. *J Mech Behav BioMed Mater*, 2018, 82: 193–201
- 47 Moreno-Flores S, Benitez R, Vivanco M D, et al. Stress relaxation microscopy: Imaging local stress in cells. *J BioMech*, 2010, 43: 349–354
- 48 Kasza K E, Rowat A C, Liu J, et al. The cell as a material. *Curr Opin Cell Biol*, 2007, 19: 101–107
- 49 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: 697–712
- 50 Squires T M, Mason T G. Fluid mechanics of microrheology. *Annu Rev Fluid Mech*, 2010, 42: 413–438
- 51 Zia R N. Active and passive microrheology: Theory and simulation. *Annu Rev Fluid Mech*, 2018, 50: 371–405
- 52 Fabry B, Maksym G N, Butler J P, et al. Scaling the microrheology of living cells. *Phys Rev Lett*, 2001, 87: 148102
- 53 Nishizawa K, Bremerich M, Ayade H, et al. Feedback-tracking microrheology in living cells. *Sci Adv*, 2017, 3: e1700318
- 54 Ahmed W W, Fodor É, Betz T. Active cell mechanics: Measurement and theory. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Mol Cell Res*, 2015, 1853: 3083–3094
- 55 Stuelten C H, Parent C A, Montell D J. Cell motility in cancer invasion and metastasis: Insights from simple model organisms. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18: 296–312
- 56 Krieg M, Fläschner G, Alsteens D, et al. Atomic force microscopy-based mechanobiology. *Nat Rev Phys*, 2019, 1: 41–57
- 57 Wang N, Tytell J D, Ingber D E. Mechanotransduction at a distance: Mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10: 75–82
- 58 Fletcher D A, Mullins R D. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 2010, 463: 485–492
- 59 Houdusse A, Sweeney H L. How myosin generates force on actin filaments. *Trends Biochem Sci*, 2016, 41: 989–997
- 60 Tominaga M, Ito K. The molecular mechanism and physiological role of cytoplasmic streaming. *Curr Opin Plant Biol*, 2015, 27: 104–110
- 61 Kodera N, Yamamoto D, Ishikawa R, et al. Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy. *Nature*, 2010, 468: 72–76
- 62 Bieling P, Li T D, Weichsel J, et al. Force feedback controls motor activity and mechanical properties of self-assembling branched actin networks. *Cell*, 2016, 164: 115–127
- 63 Zhou E H, Martinez F D, Fredberg J J. Mush rather than machine. *Nat Mater*, 2013, 12: 184–185
- 64 Wirtz D. Particle-tracking microrheology of living cells: Principles and applications. *Annu Rev Biophys*, 2009, 38: 301–326
- 65 Smolyakov G, Thiebot B, Campillo C, et al. Elasticity, adhesion, and tether extrusion on breast cancer cells provide a signature of their invasive potential. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8: 27426–27431

Summary for “基于原子力显微镜(AFM)的细胞黏弹特性测量与分析”

Measurement and analysis of cellular viscoelastic properties using atomic force microscopy

Dan Dang^{1*}, Mi Li^{2,3*} & Rongwu Xiang¹

¹ School of Medical Devices, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

² State Key Laboratory of Robotics, Shenyang Institute of Automation, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China;

³ Institutes for Robotics and Intelligent Manufacturing, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China

* Corresponding authors, E-mail: dangdan@syphu.edu.cn; limi@sia.cn

Cell mechanics plays an important role in cellular physiological and pathological processes. During the formation and progression of tumors, the alterations in the mechanics of cancerous cells and tumor micro-environment promote the growth and migration of cancerous cells. Hence, investigating cell mechanics is of crucial significance in understanding the underlying mechanisms regulating life activities and diseases. The advent of atomic force microscopy (AFM) provides a powerful tool for detecting the mechanical properties of single cells. Compared with other single-cell mechanical analysis techniques, the advantage of AFM is that AFM is able to simultaneously obtain the topography and mechanics of cells, which is particularly useful for investigating the correlation between cell structures and cell mechanics. The biomedical applications of AFM in single-cell mechanics provide considerable novel insights into how cell and tissue mechanics affect tumor development and metastasis, contributing much to the communities of biomechanics and biophysics. However, current AFM single-cell mechanical experiments are commonly performed on measuring the elastic properties of cells and studies about the viscoelastic properties of cells are still scarce. In this work, AFM was utilized to measure and analyze the viscoelastic properties of cells. First, the detailed procedure of detecting the viscoelasticity of cells based on AFM indentation technique was established. AFM probe was controlled to perform approach-dwell-retract movement on cells in the vertical direction. During the approach-dwell-retract process, the deflection of AFM cantilever versus time was recorded, which yielded the force-time (F-T) curves. The original F-T curves were then normalized and fitted by two-order Maxwell model, which gave two cellular relaxation times (the first relaxation time τ_1 and the second relaxation time τ_2). The fitting results showed that the theoretical curve matched the experimental relaxation curve well, indicating that the two-order Maxwell model was suited for characterizing the relaxation behaviors of cells. Second, the established procedure was used to measure the relaxation time of six different types of cells, including mammalian adherent cells, mammalian suspended cells, normal cells, cancerous cells, cell lines cultured *in vitro* and primary cells prepared from bone marrow and peripheral blood of healthy volunteers. The fitting curves were consistent with the experimental relaxation curves for all of the six types of cells used here, indicating the effectiveness of the presented method for detecting the viscoelastic properties of cells. Besides, the results showed the various cellular relaxation times for the different types of cells. The statistical results showed that the first cellular relaxation times were in the range 0.01–0.03 s, which might correspond to the behaviors of cytoplasm. The second cellular relaxation time was in the range 0.2–0.4 s, which might correspond to the behaviors of the cytoskeleton. Finally, regression analysis was performed on the measured cellular relaxation times, showing the linear relationship between the first cellular relaxation time τ_1 and the second cellular relaxation time τ_2 , and the regression coefficients were variable for different types of cells. The research improves our understanding of cellular viscoelasticity and also provides a novel idea to measure the viscoelastic properties of cells, which will have potential impacts on cell mechanics and biomedicine.

atomic force microscopy, cell mechanics, indentation, viscoelastic properties, relaxation time

doi: [10.1360/N972018-01266](https://doi.org/10.1360/N972018-01266)