

文章编号: 1004-0374(2009)01-0156-07

· 技术与应用 ·

原子力显微镜在细胞弹性研究中的应用

叶志义*, 范霞

(重庆大学生物工程学院, 重庆400044)

摘要: 细胞表面的力学性质会随着细胞所处环境的不同而发生改变, 它的变化间接反映出胞内复杂的生理过程。原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)能以高的灵敏度和分辨率检测活体细胞, 通过利用赫兹模型分析力曲线可以获得细胞的弹性信息。本文简介了原子力显微镜的工作原理与工作模式, 着重介绍利用AFM力曲线检测细胞弹性的方法及其在细胞运动、细胞骨架、细胞黏附、细胞病理等方面的应用成果, 表明AFM已经成为细胞弹性研究中十分重要的显微技术。

关键词: 原子力显微镜; 力曲线; 细胞弹性; 杨氏模量

中图分类号: Q2-33; Q-336 **文献标识码:** A

Application of atomic force microscopy in cell elasticity

YE Zhi-yi*, FAN Xia

(College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract: Mechanical properties of living cells vary with the surrounding around, which is indirectly reflects the complex physiological processes in the cell. The atomic force microscope (AFM) can be used to probe the Young's modulus of living cells with high sensitivity and resolution. Hertz model is used to analyse the cell force curve. The review introduces AFM and the method of probing the elasticity of cell by force curves and its application in locomotion, adhesion, cytoskeleton as well as cell pathology and so on. All these shows that AFM has been an important technology in the research of cell elasticity.

Key words: atomic force microscopy; force-curve; cell elasticity; Young's modulus

细胞是生命的最小单位, 所有的生命现象最终都需从细胞中寻求答案, 而细胞的功能依赖于细胞的结构特性。从某种程度上来说, 细胞的力学特性可作为细胞结构的一个表征。在不同生理条件下, 比如细胞分化、黏附以及受到不同外界环境(剪切力、应力等)影响的情况下, 细胞的力学特性都会存在差异。

目前有两套方法来研究细胞的力学性质。对细胞个体而言, 将细胞的弹性性质作为一个整体加以研究; 利用分离出的脂膜、生物膜、胞质蛋白具体地研究细胞结构成分的力学性质^[1]。相应地, 出现了许多成熟的技术手段, 例如微吸管技术、干涉差显微技术、扫描式声波显微技术、光镊、磁扭转等^[2-9], 这些方法得到的相关特性是对于区域较大的样品而言的, 在空间分辨率上是有限的。然而,

原子力显微镜(AFM)可以通过施加一定大小的力对固定条件以及生理条件下的细胞进行表面性质的扫描, 不仅具有纳米级的高分辨率, 而且对细胞的损伤可以降低到最低, 所以它被视为一种理想的工具用以研究细胞表面的相关力学性质。Tao等^[10]第一次利用AFM检测弹性性质, 通过记录力曲线可以得到样品弹性的二维曲线图, 并利用赫兹模型^[11]得到在特定的加载力下样品的弹性模量, 这种方法已经被应用于微生物细胞^[12]、心肌细胞^[13]、MDCK细胞^[14]等的研究。

收稿日期: 2008-07-28; 修回日期: 2008-10-16

基金项目: 国家自然科学基金(30570453); 高等学校学科创新引智计划“111”(B06023); 重庆大学重点实验室对本科生开放创新基金

* 通讯作者: yzybioafm@163.com

1 AFM 的工作原理

AFM 主要是由样品扫描器、激光发生器、光斑检测器、探针和信号控制系统五部分组成。当探针在样品表面进行扫描时, 由于针尖上的原子与样品表面的原子发生相互作用, 使微悬臂发生偏移, 同时作用于微悬臂尖端的激光也随着微悬臂的偏移而发生偏转, 结果显示在激光光斑检测器上, 通过检测器上的光斑的变化反映样品表面的三维相关信息(图1)。

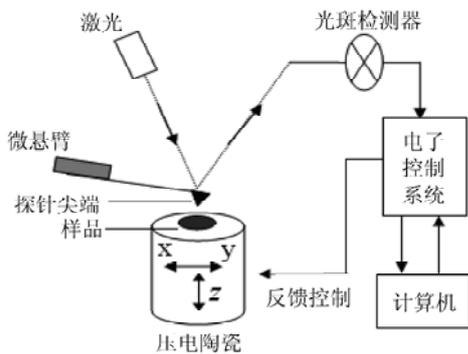


图1 AFM 的工作原理示意图

2 AFM 研究活细胞的工作模式

2.1 图象扫描模式 根据样品的相关性质, AFM 可通过不同的工作模式进行检测, 主要存在三种: 接触模式、轻敲模式和非接触模式, 其中前两种模式较为常用。在接触模式中, 探针与样品在扫描过程中呈接触状态, 两者之间的相互作用保持恒定。当一个细胞样品呈高低起伏的状态时, 为了防止在扫描过程中细胞发生移位, 细胞可以被捕获到过滤器的小孔内, 并吸附于盖玻片表面, 也可以利用已经铺展了聚L-赖氨酸或黏附蛋白的玻片或硅胶片进行包被, 这些方法都可以使细胞铺展于平坦的表面上。对于轻敲模式而言, 探针是处于振动状态, 当工作频率接近于探针的共振频率, 将发生共振, 移动共振探针直到它轻轻接触到样品表面使共振振幅减小。振荡振幅的减小作为反馈控制信号, 用以测量样品表面形貌。由于对样品实行间歇性接触, 所以对样品产生的横向力很小, 对样品的损伤也相应较小, 因此, 轻敲模式更有利于扫描活细胞。

2.2 力曲线扫描模式 当微悬臂固定端垂直接近, 然后离开细胞表面时, 微悬臂和样品间产生了相对移动。而在这个过程中微悬臂自由端的探针也在接近, 甚至压入细胞表面, 然后脱离, 此时原子力

显微镜测量并记录了探针所感受的力, 从而得到力-距离曲线, 它几乎包含了所有关于细胞和针尖间相互作用的必要信息。

图2 是一个探针偏移量与压电陶瓷Z方向位移的距离曲线。微悬臂从位置1开始不断接近样品表面, 如果微悬臂感受到的长程吸引或排斥力的力梯度超过了弹性系数 K , 它将在与表面接触之前, 向上或是向下弯曲。图中所显示的是具有最小长程吸引力的情况, 因此曲线中的这个非接触部分没有显示形变。当针尖非常接近样品而且受到足够的吸引力, 它就可能突然跳跃地同样品接触(如点2及其放大图)。一旦针尖同样品接触, 微悬臂固定端继续接近样品, 微悬臂型变量增加。如果微悬臂的刚性很大, 针尖就可能压入样品表面, 此时曲线在接触部分的形状和斜率能提供样品表面的弹性信息。如双箭头所指部分, I 值表示样品被压缩的形变量(indentation)。若样品为刚性远大于探针的弹性系数, 则曲线应该沿着位置3的方向偏转。在微悬臂受到的力达到了预定的值之后, 微悬臂将被提起而后再退。由于探针同样品表面接触过程中有可能形成黏附或化学键, 引起微悬臂被黏附在样品一段距离(如4后区域)超过接近曲线的初始接触点, 而微悬臂继续被提起一段距离 d 后, 黏附就能被打断(如位置5), 微悬臂在表面上方重新达到自由状态6, 此时可以测量出断裂键或黏附所需要的力的大小。在此曲线的基础上, 将纵坐标的偏移量乘以微悬臂的弹性系数, 即可获得作用力 $F = K \times d$, 则可转换为力-距离曲线。

3 赫兹模型

赫兹模型是Hertz于1882年提出的一个关于接触形变的一个理论模型, 最初主要应用于固体之间的接触作用, 后来经过一系列的演化有效地运用于

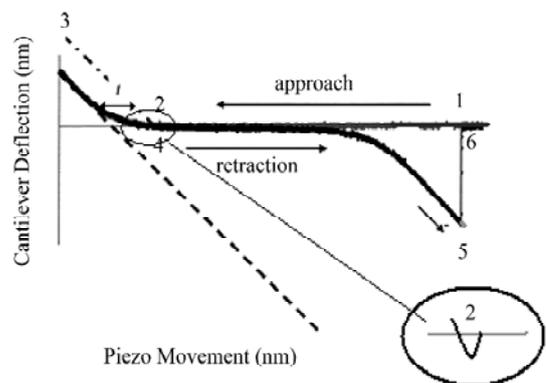


图2 距离曲线模型^[15] (部分修改)

生物样品^[16]。如今赫兹模型描述的是一个无限硬的探针施加一定的作用力到一个软而平坦的物体上, 加载力和压痕之间存在如下关系式^[17]:

$$F = \delta^2 \frac{\pi}{2} \frac{E}{(1-\nu^2)} \tan(\alpha) \quad (1)$$

其中 F 是加载力, E 为杨氏模量, ν 是泊松比, α 是探针的半开角度, δ 是压痕的深度。此模型反映出接触面积可作为加载力功能化的指标, 如下式:

$$r = \sqrt{F \frac{2}{\pi \times \tan(\alpha)} \frac{(1-\nu^2)}{E}} \quad (2)$$

其中 r 为接触面积的半径。

当样品硬度远远大于探针的弹性系数, 则偏离量 d 与样品高度 Z 相等:

$$z = d \quad (3)$$

但如果样品的硬度很小, 偏移量则需要加上压痕深度进行修正, 上式要转换成:

$$z = d + d \quad (4)$$

无论在何种情况下, 加载力 F 都应是探针的偏移量与弹性系数之间的乘积, 如下式:

$$F = \kappa \times d \quad (5)$$

将(5)式与(1)式联合起来就可以得到:

$$\kappa \times d = \delta^2 \frac{\pi}{2} \frac{E}{(1-\nu^2)} \tan(\alpha) \quad (6)$$

(6)式通过转化与(4)式结合就可以得到 z 与 E 的关系式:

$$\delta = \sqrt{\frac{\kappa}{(\pi/2)[E/(1-\nu^2)]\tan(\alpha)}} \sqrt{d} \quad (7)$$

$$z = d + \sqrt{\frac{\kappa}{(\pi/2)[E/(1-\nu^2)]\tan(\alpha)}} \sqrt{d} \quad (8)$$

一般 ν 设为 0.5, 选择在细胞核上方区域进行力曲线测定, 根据力曲线我们可以得到一个偏移量 d 与 Z 方向压电陶瓷的位移, 代入(8)式则可获得样品表面的杨氏模量 E 。

4 细胞的杨氏模量 (E)

随着 AFM 弹性检测方法的建立, 已经运用于许多不同种类, 不同性质的细胞, 表 1 是有关细胞杨氏模量的总结。

从上表可以看到对于不同类别和不同来源的细胞所表现出来的细胞弹性都存在明显的差异。现可将影响细胞弹性的因素归结为以下几个方面:

第一, 样品的处理。利用原子力显微镜可以检

测空气界面下固定的样品以及生理条件下的样品。生理条件下样品相对来说要软些, 但是操作较为复杂。而样品通过一些物理化学方法固定虽然能够提高扫描图象的质量以及压痕结果, 但是这些过程将会改变细胞的结构、活性以及弹性。就如上表中显示的, 黏液球菌用戊二醛固定后细胞弹性 (1.34 ± 0.66 KPa) 比正常情况下 (0.25 ± 0.18 KPa) 增加了 4 倍多^[18]。同样的, 红血球用福尔马林处理后的弹性 (119.5 ± 15 KPa) 比生理条件下 (16.05 ± 2.3 KPa) 增加了 10 倍^[19]。

第二, 样品所处的环境。在很多情况下都将细胞吸附在基底上用以模仿体内环境, 而基底的物理性质将直接影响与细胞的吸附, 从而进一步影响细胞表面的性质。Domke 等^[20]将造骨细胞吸附于不同粗糙度的基底上, 例如: 钛钒、钛、聚苯乙烯、玻璃。结果发现在不同基底上造骨细胞展现出来的弹性是有差别的 (TiV 为 2.1 KPa, Ti 为 8.8 KPa, PS 为 7.5 KPa, 玻璃为 5.5 KPa)。Abu-Lail 和 Camesano^[21]使 *E. coli* JM109 处于不同的极性溶液中, 同样发现在甲酰胺中的弹性为 0.8 ± 0.3 MPa, 水中是 12.8 ± 0.1 MPa, 甲醇中的弹性是 182 ± 34.6 MPa, 低极性的溶液会促使柔软样品表面多聚物压缩, 形成一个坚硬的外壳。

第三, 细胞本身的异质性。从细胞整个个体来说, 核区细胞膜与边缘区域的细胞膜之间的弹性模量是存在差异的。Mathur 等^[22]检测人的脐静脉内皮细胞的弹性发现, 在细胞核上方弹性约为 7.22 ± 0.46 KPa, 细胞边缘区域为 1.27 ± 0.36 KPa; Costa 和 Yin^[23]发现牛肺动脉内皮细胞体区的弹性模量要比边缘小 2—3 倍; Rotsch 和 Radmacher^[24]在研究细胞骨架对细胞弹性影响时发现细胞伸展区域的弹性为 3—5 KPa, 而稳定区域弹性为 12 KPa。从总结的数据来看, 我们会发现在富含微丝 (F-actin) 这样的细胞骨架的区域表现出来的弹性模量都很大, 而有的时候由于外界环境的改变, 细胞为了适应新的环境, 使细胞骨架发生重排, 导致弹性分布有了变化, 所以细胞骨架在决定细胞弹性方面起了决定性作用。

5 AFM 弹性检测在细胞生物学中的运用

5.1 血管内皮细胞的相关力学特性 血管内皮细胞袂衬在整个心血管系统的内表面, 为单层扁平上皮, 是血管壁与血液之间的分界细胞, 是形成心血管封闭管道系统的形态基础。由于血管内皮细胞处

表1 相关细胞杨氏模量的总结

细胞类型	细胞的杨氏模量	补充信息	参考文献
造骨细胞	TiV(钛钒): 2.1 KPa Ti: 8.8 KPa PS(聚苯乙烯): 7.5 KPa Glass: 5.5 KPa	置于不同的衬底上	[20]
<i>E. CoLi</i> JM109	甲酰胺: 0.8 ± 0.3 MPa 水: 12.8 ± 0.1 MPa 甲醇: 182 ± 34.6 MPa	将大肠杆菌细胞处于不同溶剂中的弹性膜量	[21]
肌肉细胞	11.5 ± 3.5 KPa 84.0 ± 18.1 KPa	肌原纤维呈放松状态 肌原纤维呈收缩状态	[25]
红血球	16.05 ± 2.3 KPa 119.5 ± 15 KPa	生理状态 用 5% 福尔马林处理后	[19]
黏液球菌	0.25 ± 0.18 MPa 1.34 ± 0.66 MPa	野生型 用戊二醛固定后	[18]
肌细胞	18 ± 6 KPa	来源于营养不良的小鼠中	[26]
肌细胞	50 ± 30 KPa	伤口愈合处的肌细胞(富含肌原纤维)	
心肌细胞	18 ± 2 KPa	健康的小鼠体内	[13]
心肌细胞	55 ± 15 KPa	心肌梗塞的小鼠内	
癌症病人体内的细胞	0.53 ± 0.10 KPa 1.94 ± 0.70 KPa	癌细胞 正常细胞	[27]
鼠心肌细胞	35.1 ± 0.7 KPa 42.5 ± 1.0 KPa	年轻的小鼠体内(4月龄) 年长的小鼠体内(30月龄)	[28]
内皮细胞-MDCK	5—7 KPa	细胞的顶端	[14]
人类血小板	1.5—4 KPa 100 KPa	细胞核 细胞边缘	[29]
鸡的心肌细胞	5—30 KPa 100—200 KPa	细胞体 应力纤维	[22]
3T6 鼠胚	1.8 KPa 20—60 KPa	细胞核 细胞边缘	[22]
3T3 纤维原细胞	3—5 KPa 12 KPa	伸展区域 稳定区域	[24]
人脐静脉内皮细胞	7.22 ± 0.46 KPa 2.97 ± 0.79 KPa 1.27 ± 0.36 KPa	细胞核 细胞体 细胞边缘	[22]
动脉中间层平滑肌细胞	5—8 KPa	---	[30]
骨髓样细胞(HL60)	855 ± 670 Pa	---	[31]
淋巴细胞(Jurkat)	48 ± 35 Pa	---	[31]
嗜中性粒细胞	156 ± 87 Pa	---	[31]
星形胶质细胞	2—20 KPa	存在异质性	[32]
表层角质细胞	10—55 KPa	存在异质性	[33]

于血流与血管壁这么个特殊位置, 所以随着血液的流动, 血管内皮细胞必然会受到不同程度的机械力剪切的作用。若在此过程中出现异常, 将有可能发生动脉硬化。因此很多学者都从流体动力学的角度建立不同的剪切力模型来模拟体内环境。Barbee等^[34]最早利用 AFM 研究动脉内皮细胞在剪切力作用下细

胞结构以及力学方面的一些变化。Ohashi 等^[35]发现在剪切力下, 动脉内皮细胞的弹性模量从 0.87 ± 0.23 KPa 增至 1.75 ± 0.43 KPa。

Trache等^[36]将炎症调节因子组胺作用于动脉内皮细胞, 发现其可以促使细胞的收缩以及细胞间隙的形成, 而且作用后细胞表面的弹性模量也发生了

改变,从 8 ± 2 KPa增加到 20 ± 5 KPa,可见组胺会导致血管屏障紊乱。

5.2 细胞运动 细胞的运动归根结底是一个力学行为,但是对运动细胞纳米尺度下的机械行为研究甚少,这其中包括在细胞运动的某一阶段或是细胞本身某一区域所表现出来的力学性质。

早期有些报道将纤维原细胞做为研究对象,利用AFM实时观察细胞结构、细胞运动以及细胞所展现出来的纳米机械行为的变化。Sasaki等^[37]在培养基中发现鼠的纤维原细胞的形态和弹性系数之间一定的联系,数小时内,细胞会持续地收缩,同时细胞表面的硬度也发生了一定的改变。Nagayama等^[38]发现静态的细胞与处于运动状态的细胞两者的表面硬度分布存在差异。对于静态的细胞,它的硬度为一个常数,但是当运动后,细胞核区对应的表面硬度会明显的下降。而运动细胞的伸展区域,比如说伪足,是力学研究的一个热点。Laurent等^[33]对鱼的表皮角质细胞研究发现,虽然细胞伪足的垂直高度几乎恒定,但是其伸展区的硬度是最大的,而且弹性随着与边缘距离的拉大而减小。

此外,利用微悬臂的灵敏性,可以反映细胞的运动情况,Pelling等^[39]测得酿酒酵母细胞壁存在具有特征频率的并依赖于温度的局部纳米机械运动,在 30°C 时,振动的频率为 1.634 KHz; 26°C 时频率为 1.092 KHz; 20°C 则变为 0.873 KHz,并且用代谢抑制剂 NaN_3 处理细胞后,运动情况却消失了,因此可以说明这种运动是受代谢驱动的。

5.3 细胞黏附 细胞黏附指的是细胞与细胞之间或是细胞与基底、基质的黏附,它们之间往往是要通过黏附分子相互作用而形成一定的黏附力。而且当与不同的基底发生作用时,细胞表面的弹性模量也会发生很大的变化。Domke等^[20]研究骨细胞与不同的移植材料作用,发现细胞表面的弹性模量具有基底依赖性。在钛钒衬底上,细胞弹性为 2.1 KPa,聚苯乙烯上的细胞弹性为 7.5 KPa,而在玻璃上时,细胞的弹性又变成 5.5 KPa。Takai等^[40]发现造骨细胞MC3T3-E1与细胞外基质蛋白黏附时所表现出的弹性模量要远远大于与玻璃或是聚L-赖氨酸吸附时的弹性模量。通过分析可知这种弹性的变化主要是由于细胞骨架的重排引起的,而且细胞吸附于不同的基底上可能会导致细胞力学信号转导的改变。

另外,利用AFM的力曲线可以得到细胞与细胞之间或是与基质之间的黏附力大小,其中研究的

最多的是整合素与纤连蛋白之间黏附力的大小。Puech等^[41]用AFM检测斑马鱼原肠胚祖细胞的黏附情况。由于Wnt11是调节原肠胚细胞运动的一条重要的信号通路,通过敲除Wnt11基因可以破坏细胞的黏附作用。最终将野生型细胞和Wnt11突变细胞黏附于包被有纤连蛋白的基底上,结果发现野生型细胞的解离力为 $198 - 405$ pN,而突变型细胞为 $123 - 156$ pN,可见Wnt11信号通路的重要性,同时整合素和纤连蛋白的作用对于维持细胞黏附也起着重要的作用。

5.4 细胞骨架的研究 在细胞弹性的研究中,对细胞的骨架的研究可以说是一个不可或缺的部分。若对每一次细胞弹性改变的情况进行深层次的分析,其实会发现这种改变在很大程度上来说都是由于细胞骨架随外界环境的变化而发生重排造成的。所以了解细胞的动态变化对于了解细胞分化,运动是十分必要的。为了能够实时观察到细胞骨架的变化,一般都会将AFM与共聚焦荧光显微镜联合起来分析,有时为了研究特定的细胞骨架对整个细胞弹性的影响,都会选择特定作用的药物作用于细胞,并进行定性研究。

Rotsch和Radmacher^[24]利用不同的药物(细胞松弛素和Latrunculin A)作用于纤维原细胞(3T3和NRK),发现细胞经细胞松弛素作用后,细胞的弹性模量减少了 65.5% ,而Latrunculin A的参与使弹性模量减少了 61.5% 。因此,肌动蛋白纤维解聚将会使细胞弹性明显降低,而微管的重组与否对细胞弹性作用不明显,可见肌动蛋白纤维在维持整个细胞弹性稳定方面具有十分重要的意义。Pelling等^[42]研究了不同微管对细胞形态以及稳定性的影响。当细胞处于血清饥饿条件下时,Glu-MT不存在,此时细胞的弹性模量与血清富集条件下的弹性模量没有明显差异。当细胞用分解Tyr-MT的药物诺考达唑处理后,血清饥饿条件下,细胞弹性呈指数下降,而在血清富集情况下,细胞弹性需经历一次线性下降后才出现指数下降的情况,并且在所有的过程中肌动蛋白微丝是保持不变的,由此可以说明Tyr-MT和中间纤维在维持细胞稳定方面起主要作用,Glu-MT的存在起到支撑中间纤维的作用,而使细胞出现暂时的“亚稳定”状态。

5.5 病理研究 AFM对于细胞病理方面的研究来说是一个十分有效的工具,因为影响细胞结构的因子必然也会促使细胞力学性质的改变。利用细胞的体

外培养技术可以在培养的过程中, 利用 AFM 来观察某种或某些因子对细胞结构影响的同时对细胞表面力学性质所造成的变化。这种 AFM 力学检测可以作为一种敏感的工具来对病态细胞进行检测。

Cross 等^[27]利用 AFM 技术成功的从疑患有癌症的患者体内分辨出正常细胞和癌细胞。由于癌细胞都具有转移特性, 若发生转移细胞弹性势必会有所改变, 所以对癌症患者体内积液中的细胞进行力学分析, 结果发现转移性癌细胞比良性的细胞的弹性模量要小 70%, 正常细胞的弹性大约为 1.94 ± 0.70 KPa, 癌细胞的弹性模量为 0.53 ± 0.10 KPa, 两者的弹性分布规律也不相同并且这种规律是不依赖于癌症种类的。这种新颖的诊断方法要比传统的组织化学、形态学法要准确得多, 因为正常的内皮细胞往往会出现癌细胞的形态, 或是由于体外培养技术, 正常细胞在形态上有时会与癌细胞混淆而出现假阳性, 但是弹性上的差异是不会改变的, 因此为癌细胞的诊断提供了一条更准确的途径。

6 结束语

当处于一个动态环境变化以及一个动态行为的过程中, 细胞为了适应新的环境需求, 细胞信号通路以及细胞骨架势必发生一定的调整, 而这些结果将体现在细胞膜表面的力学性质变化。AFM 以其高分辨率和对细胞的损害小等特性成为细胞膜表面研究的一个十分有利的工具, 它不仅反映细胞表面的形态特征, 而且还能间接定性的研究膜内的一些结构变化, 例如细胞骨架的动态行为。但是在运用原子力显微镜的同时, 我们依然会遇到一些棘手的问题: 一是原子力显微镜在扫描过程会造成细胞的变形, 最终将导致力曲线的变形, 从而影响弹性的测定; 二是针尖的驱动有可能造成细胞的滑动, 这对实验将带来不少困难; 三是有关杨氏模量的测定; 虽然赫兹模型是目前主要运用的模型, 但是它与细胞实际本身的弹性依然有些偏差, 所以有望更好模型的建立。总而言之, 我们相信随着软件以及硬件的进一步发展, 原子力显微镜在细胞纳米力学问题的研究上势必发挥更重要的作用。

[参 考 文 献]

- [1] Kuznestsova TG, Starodubtseva MN, Yegorenko V, et al. Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron*, 2007, 38: 824-3
- [2] Young A, Evans E. Cortical shell-liquid core model for passive low of liquid-like spherical cells into micropipettes. *Biophys J*, 1989, 56:139-49
- [3] Shao J, Hochmuth RM. Micropipette suction for measuring piconewton forces of adhesion and tether formation from neutrophil membranes. *Biophys J*, 1996, 71: 2892-901
- [4] Zilker A, Engelhardt H, Sackmann E. Dynamic reflection interference contract(RIC) microscopy:a new method to study surface excitations of cells and to measure membrane bending elastic moduli. *J Phys*, 1987, 48: 2139-51
- [5] Zeman K, Engelhardt H, Sackmann E. Bending undulations and elasticity of the erythrocyte membrane: effect of cell shape and membrane organization. *Eur Biophys J*, 1990, 18: 203-19
- [6] Luers H, Hillmann K, Litniewski J, et al. Acoustic microscopy of cultured cells:distribution of forces and cytoskeletal elements. *Cell Biophys*, 1991, 18: 279-93
- [7] Ashkin A, Dziedzic JM. Internal cell manipulation using infrared laser traps. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 7914-8
- [8] Valberg PA, Feldman HA. Magnetic particle motions within living cells. *Biophys J*, 1987, 52: 551-61
- [9] Wang N, Ingber DE. Control of cytoskeletal mechanics by extracellular matrix, cell shape, and mechanical tension. *Biophys J*, 1994, 66: 2181-9
- [10] Tao NJ, Lindsay SM, Lee S, et al. Measuring the microelastic properties of biological material. *Biophys J*, 1992, 63: 1165-9
- [11] Hertz H. über den kontakt elastischer körper. *J Reome Amgew Mathematik*, 1882, 92: 156-71
- [12] Gaboriaud F, Dufrene YF. Atomic force microscopy of microbial cells:Application to nanomechanical properties, surface forces and molecular recognition forces. *Colloids Surf B:Biointerfaces*, 2007, 54: 10-9
- [13] Berry MF. Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 290 (6): 2196-203
- [14] Hoh JH, Schoenenberger CA. Surface morphology and mechanical properties of MDCK monolayers by atomic force microscopy. *J Cell Sci*, 1994, 107 (Pt 5): 1105-14
- [15] Afrin R, Alam MT, Ikai A. Pretransition and progressive softening of bovine carbonic anhydrase II as probed by single molecule atomic force microscopy. *Protein Sci*, 2005, 14: 1447-57
- [16] Laney DE, Garcia RA, Parson SM, et al. Changes in the elastic properties of cholinergic synaptic vesicles as measured by atomic force microscopy. *Biophys J*, 1997, 72: 806-13
- [17] Radmacher M, Fritz M, Kacher CM, et al. Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope. *Biophys J*, 1996, 70: 556-67
- [18] Pelling AE, Li Y, Shi WY, et al. Nanoscale visualization and characterization of *Myxococcus xanthus* cells with atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 6484-9
- [19] Mozhanova AA, Nurgazizov NI, Bukharaev AA, et al. Local elastic properties of biological material studied by SFM [C]. SPM-2003, Proceedings Nizhni Novgorod, 2003, March 2-5, 266-7

- [20] Domke J, Dannohl S, Parak WJ. Substrate dependent differences in morphology and elasticity of living osteoblasts investigated by atomic force microscopy. *Colloids Surf.B: Biointerfaces*, 2000, 19: 367-79
- [21] Abu-Lail NI, Camesano TA. The effect of solvent polarity on the molecular surface properties and adhesion of *Escherichia coli*. *Colloids Surf B:Biointerfaces*, 2006, 51:62-70
- [22] Mathur AB, Collinworth AM, Reichert WM, et al. Endothelial, cardiac muscle and skeletal muscle exhibit different viscous and elastic properties as determined by atomic force microscopy. *J Biomech*, 2001, 34: 1545-53
- [23] Costa KD, Yin FCP. Analysis of indentation: implications for measuring mechanical properties with atomic force microscopy. *J Biomech Eng*, 1999, 121: 462-71
- [24] Rotsch C, Radmacher M. Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an atomic force microscopy study. *Biophys J*, 2000, 78: 520-35
- [25] Yoshikawa Y, Yasuike T, Yagi A, et al. Transverse elasticity of myofibrils of rabbit skeletal muscle studied by atomic force microscopy. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 256 (1): 13-9
- [26] Engler AJ. Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments. *J Cell Biol*, 2004, 166 (6): 877-87
- [27] Cross SE, Jin YS, Rao JY, et al. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nat Nanotechnol*, 2007, 2:780-3
- [28] Lieber SC, Aubry N, Pain J, et al. Aging increases stiffness of cardiac myocytes measured by atomic force microscopy nanoindentation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 287: H645-51
- [29] Radmacher M. Measuring the elastic properties of biological samples with the AFM. *IEEE Eng Med Biol Mag*, 1997, 16:47-57
- [30] Engler AJ, Richert L, Wong JY, et al. Surface probe measurements of the elasticity of sectioned tissue, thin gels and polyelectrolyte multilayer films: Correlations between substrate stiffness and cell adhesion. *Surface Sci*, 2004, 570: 142-54
- [31] Rosenbluth MJ, Lam WA, Fletcher DA. Force microscopy of nonadherent cells: a comparison of leukemia cell deformability. *Biophys J*, 2006, 90: 2994-3003
- [32] Yamane Y, Shiga H, Haga H, et al. Quantitative analyses of topography and elasticity of living and fixed astrocytes. *J Electron Microsc (Tokyo)*, 2000, 49(3): 463-71
- [33] Laurent VM, Kasas S, Yersin A, et al. Gradient of rigidity in the lamellipodia of migrating cells revealed by atomic force microscopy. *Biophys J*, 2005, 89:667-75
- [34] Barbee KA, Davies PF, Lal R. Shear stress-induced reorganisation of the surface topography of living endothelial cells imaged by atomic force microscopy. *Circ Res*, 1994, 74: 163-71
- [35] Ohashi T, Ishii Y, Ishikawa Y, et al. Experimental and numerical analyses of local mechanical properties measured by atomic force microscopy for sheared endothelial cells. *BioMed Mater Eng*, 2002, 12: 319-27
- [36] Trache A, Trzeciakowski JP, Gardiner L, et al. Histamine effects on endothelial cell Fibronectin interaction studied by atomic force microscopy. *Biophys J*, 2005, 89: 2888-98
- [37] Sasaki S, Morimoto M, Haga H, et al. Elastic properties of living fibroblasts as imaged using force modulation mode in atomic force microscopy. *Arch Histol Cytol*, 1998, 61(1): 57-63
- [38] Nagayama M, Haga H, Kawabata K. Drastic change of local stiffness distribution correlating to cell migration in living fibroblasts. *Cell Motil Cytoskel*, 2001, 50 (4):173-9
- [39] Pelling AE, Sehati S, Gralla EB, et al. Local nanomechanical motion of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, 2004, 305: 1147-50
- [40] Takai E, Costa KD, Shaheen A, et al. Osteoblast elastic modulus measured by atomic force microscopy is substrate dependent. *Annals Biomed Eng*, 2005, 33 (7):963-71
- [41] Puech PH, Taubenberger A, Ulrich F, et al. Measuring cell adhesion forces of primary gastrulating cells from zebrafish using atomic force microscopy. *J Cell Sci*, 2005, 118: 4199-206
- [42] Pelling AE, Dawson DW, Carreon DM, et al. Distinct contributions of microtubule subtypes to cell membrane shape and stability. *Nanomedicine: NBM*, 2007, 3: 43-52