

文章编号: 1004-0374(2010)08-0817-06

· 技术与应用 ·

原子力显微镜研究细胞弹性的数据分析方法

叶志义*, 张 丽

(重庆大学生物工程学院生物流变科学与技术教育部重点实验室, 重庆 400044)

摘 要: 细胞的力学性质与生命体的功能和健康都是息息相关的, 而原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)是研究细胞力学性质最好的仪器之一。该文较为详细叙述了AFM力曲线测量原理, 以及分析AFM实验数据的常用模型。作者用该文所提到的模型分析了肺癌细胞的弹性, 结果显示在加载速率比较低的情况下, 三种计算方法计算得到的结果没有显著差别, 而在加载速率高于8 $\mu\text{m}/\text{s}$ 时, 结果则有显著差异。

关键词: 原子力显微镜; 力曲线; 杨氏模量; 模型

中图分类号: Q-336; Q2-33 **文献标识码:** A

Elasticity measurement of cells with AFM: the data processing

YE Zhi-yi*, ZHANG Li

(Key Laboratory of Biorheological Science and Technology, Ministry of Education, Bioengineering College, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract: Mechanical properties of individual living cells which can be probed by AFM, one of the best tools, are known to be closely related to both health and function of the human body. Measurement principle of force curve of AFM, as well as several models applied to analyze the experimental data, is introduced in this review. Furthermore, elasticity of lung cancer cells is calculated according to the models proposed in this paper, which indicates that corresponding Young's modulus are approximate under slow loading rate, but different significantly when loading rate is greater than 8 $\mu\text{m}/\text{s}$.

Key words: AFM; force curve; Young's modulus; model

细胞的物理性质, 如细胞的硬度、弹性以及黏性等, 在生物体生命活动中起着非常重要的作用。这些物理性质的改变既可能改变细胞的生理功能, 使得生命体产生疾病, 同时, 细胞功能的异常也可以通过这些物理性质表征出来。因此, 研究细胞的物理性质对探索生命体的生理功能有着非常直接的意义。原子力显微镜具有高分辨率和能在生理状态下研究生物样品的优点, 已经广泛应用于细胞黏弹性、细胞硬度以及细胞表面分子间相互作用的研究。Yang等^[1]研究了细胞表面黏附分子整合素Mac-1和ICAM-1相互作用。AFM单分子力谱结果表明, Mac-1在静息状态下与ICAM-1有一定结合, 被活化后对ICAM-1结合力增大。Bálint等^[2]用AFM

研究甘露醇对脑血管内皮细胞的形状和力学性质的影响。通过AFM力曲线测量细胞的弹性, 发现未经甘露醇处理细胞的杨氏弹性模量是(8.04±0.12) kPa, 而经过甘露醇处理后细胞变软了, 其杨氏弹性模量是(0.93±0.04) kPa。Kasas等^[3]用AFM研究细胞的膜下蛋白和深层微管的力学性质, 这一研究表明, AFM成为研究细胞表层和深层的生物力学性质的一个重要工具。Cross等^[4]用AFM测量来自肺癌、乳

收稿日期: 2009-12-30; 修回日期: 2010-01-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(30570453); 高等学校学科创新引智计划("111"计划)(B06023)

*通讯作者: E-mail: zzybioafm@163.com; Tel: 023-65112452

腺癌和胰腺癌患者胸膜转移癌细胞的硬度,发现转移癌细胞的细胞硬度比良性细胞软70%。被氧化的低密度脂蛋白(ox-LDL)对内皮细胞的伤害起着很重要的作用,Chouinard等^[5]用AFM对HUVEC细胞(human umbilical vein endothelial cells,人脐静脉血管内皮细胞)进行力曲线的测量,结果表明ox-LDL对HUVEC的硬度有影响,而LDL对HUVEC的硬度基本没影响,该研究在一定程度上说明细胞物理性质能够反映出细胞的功能。利用AFM分析细胞力学性质的研究已经是非常热门的一个领域,要想更好地利用AFM研究细胞的物理性质,必须要深刻认识AFM力曲线的测量原理和数据分析方法。目前分析力曲线的最经典模型是赫兹模型。对于细胞而言,虽然并不完全符合以上的假设,但是,赫兹模型对于研究细胞的弹性仍然是非常有用的。赫兹模型把细胞考虑成一个弹性体,忽略了细胞的黏性。此外Sirghi等^[6]利用力曲线回针曲线分析细胞的物理性质(该理论以下简称为回针曲线模型),这一理论考虑了细胞与探针之间的黏附力,而且还能够获取细胞与探针之间的黏附力。本文将介绍AFM力曲线测量原理和三种分析力曲线的方法,并且用这三种方法进行分析,并以此进一步分析这三种方法之间的异同。

1 AFM 力曲线测量原理

AFM 探针在靠近、接触和压入细胞这一过程中,探针微悬臂由于受到细胞的阻碍而弯曲变形,使得通过微悬臂反射得到光敏二极管阵列的激光信

号发生变化而记录下探针所受到的力变化过程。AFM 力曲线是将AFM 探针与细胞表面之间的距离(distance)作为横坐标,将探针微悬臂的变形(cantilever deflection)作为纵坐标而得到的曲线,根据胡克定律,探针所受到的作用力(force)与探针微悬臂变形量之间的关系:力=微悬臂形变量×探针弹性系数,其中探针弹性系数可以由热振动得到。力曲线测量过程示意图如图1所示。

从图1可以看到,在探针没有接触到细胞之前,探针微悬臂没有变化,此时,力曲线是一条几乎平行于横坐标的直线;当探针接触细胞,并继续压细胞时,探针由于受到细胞对它的反作用力而使得微悬臂变形,力曲线开始慢慢上走。细胞膜性质不一样,探针受到的反作用力就会不一样,所得到的力曲线也会有差别。

2 AFM 数据分析方法

2.1 赫兹模型

赫兹模型^[7]是赫兹在1882年建立的模型,主要用于计算弹性材料的力学性质。赫兹模型作了一些假设,比如:表面是连续的、光滑的,变形是相对很小的。对于细胞而言,虽然并不完全符合以上的假设,但是,赫兹模型对于研究细胞的弹性仍然是非常有用的,在细胞的变形小于细胞高度的一半时^[8],认为细胞的变形规律符合弹性体。因此,赫兹模型广泛应用于细胞力学性质的计算,是现在应用最为广泛的一个模型。

根据AFM 探针形状的不同,赫兹模型有两个

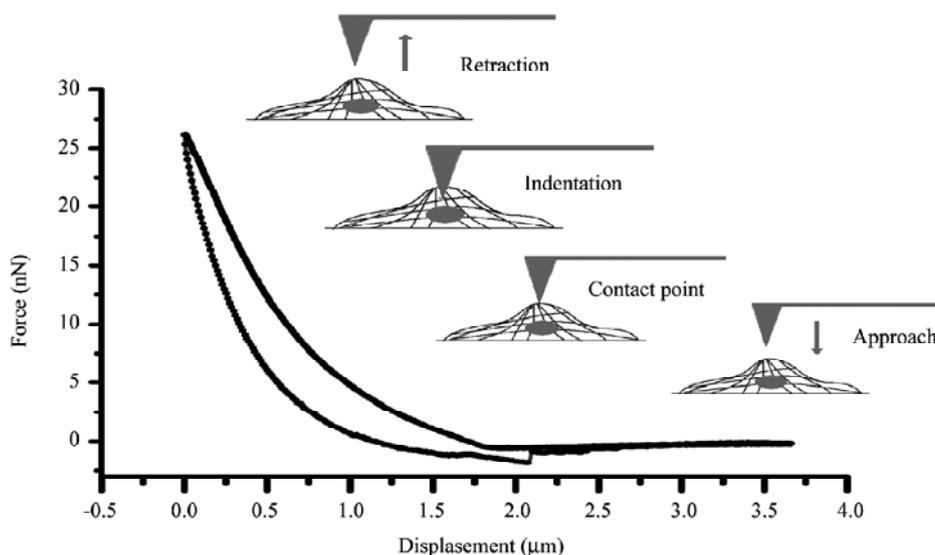


图1 AFM 力曲线测量过程示意图

表达式，当探针形状为锥形时，赫兹模型方程为：

$$f_{cone} = \frac{2}{\pi} \frac{E}{1-\nu^2} \tan \delta \delta^2 \dots\dots\dots (1)$$

当探针形状是球形时，赫兹模型表达式为：

$$f_{sphere} = \frac{4}{3} \frac{E}{1-\nu^2} \sqrt{R} \delta^{\frac{3}{2}} \dots\dots\dots (2)$$

其中， f 是探针对细胞所施加的压力， E 是杨氏模量， ν 是泊松比，生物样本取值为0.5^[9,10]， δ 是探针半开角， R 是探针半径， δ 是压痕深度。下面我们列出两种常见的计算方法。

2.1.1 斜率法^[11]

我们将式子(1)(2)等号两边同时乘方，线性化后分别如下：

$$(f_{cone})^{\frac{1}{2}} = \left(\frac{2}{\pi} \frac{E}{1-\nu^2} \tan \delta\right)^{\frac{1}{2}} \delta \dots\dots\dots (3)$$

$$(f_{sphere})^{\frac{2}{3}} = \left(\frac{4}{3} \frac{E}{1-\nu^2} \sqrt{R}\right)^{\frac{2}{3}} \delta \dots\dots\dots (4)$$

从(3)(4)两式可以看到，通过变形之后， $f_{cone}^{\frac{1}{2}}$ —— δ (或者 $(f_{sphere}^{\frac{2}{3}})$ —— δ)呈一次关系式，通过对力曲线进行拟合之后可以得到杨氏模量 E ，分别如以下两式所述：

$$\left(\frac{2}{\pi} \frac{E}{1-\nu^2} \tan \delta\right)^{\frac{1}{2}} = \frac{\Delta(f_{cone})^{\frac{1}{2}}}{\Delta\delta} = slop \dots\dots\dots (5)$$

$$\left(\frac{4}{3} \frac{E}{1-\nu^2} \sqrt{R}\right)^{\frac{2}{3}} = \frac{\Delta(f_{sphere})^{\frac{2}{3}}}{\Delta\delta} = slop \dots\dots\dots (6)$$

其中 $slop$ 是斜率，所以，杨氏模量的计算方法如下：

$$E = \frac{\pi}{2} \left(\frac{\Delta(f_{cone})^{\frac{1}{2}}}{\Delta\delta}\right)^2 \frac{1-\nu^2}{\tan \delta} = \frac{\pi}{2} (slop)^2 \frac{1-\nu^2}{\tan \delta} \dots (7)$$

$$E = \frac{3}{4} \left(\frac{\Delta(f_{sphere})^{\frac{2}{3}}}{\Delta\delta^{\frac{2}{3}}}\right)^{\frac{3}{2}} \frac{1-\nu^2}{\sqrt{R}} = \frac{3}{4} (slop)^{\frac{3}{2}} \frac{1-\nu^2}{\sqrt{R}} (8)$$

Carl和Schillers^[11]应用这种方法分析了中国仓鼠卵巢细胞在生理条件下的力学性质，得到了细胞不同层面所表现的弹性不同，如图2所示。他们的结果显示：在膜下500 nm时，细胞表现出来的弹性约340 Pa，在膜下约1 000 nm的压痕下表现出来的弹性是525 Pa，造成这种差异的原因可能是由于细胞内部骨架分布不同，前者只要是表现出膜的性质，如膜蛋白、膜下骨架的性质；后者是由细胞内的骨架结构引起的，如微管、微丝等网状结构。

线性化的第二种处理方法^[12]是直接将式子(1)(2)

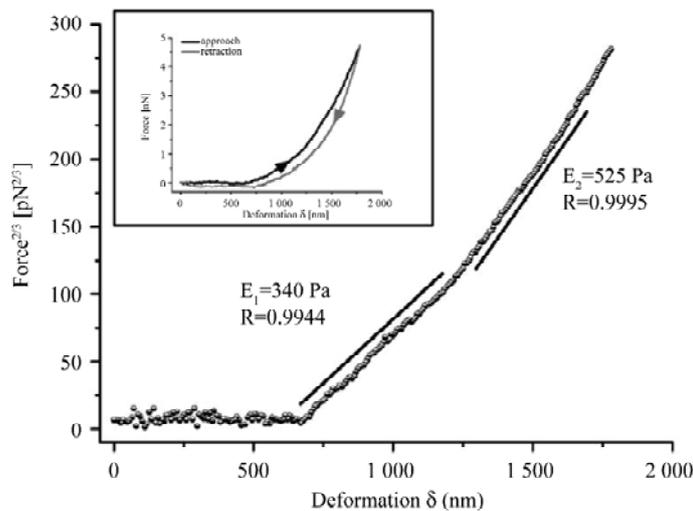


图2 赫兹模型斜率法示意图^[11]

将力曲线的进针曲线变形得到 $f^{\frac{2}{3}}-\delta$ 的曲线关系，再将该曲线线性拟合得到两段直线，其斜率即是该压痕下细胞膜的杨氏模量 E 。插入图是一条完整的力曲线。

分别看成 $(f_{cone}) \sim \delta^2$ 、 $(f_{sphere}) \sim \delta^{\frac{3}{2}}$ 的一次关系式，得到两者的关系图后，拟合得到曲线斜率 $slop$ ，这样杨氏模量就可以计算得到：

$$E = \frac{\pi}{2} \left(\frac{\Delta(f_{cone})}{\Delta\delta^2} \right)^2 \frac{1-\nu^2}{\tan \partial} = \frac{\pi}{2} (slop)^2 \frac{1-\nu^2}{\tan \partial} \quad (9)$$

$$E = \frac{3}{4} \left(\frac{\Delta(f_{sphere})}{\Delta\delta^{\frac{3}{2}}} \right)^2 \frac{1-\nu^2}{\sqrt{R}} = \frac{3}{4} (slop)^2 \frac{1-\nu^2}{\sqrt{R}} \quad (10)$$

Tamara 等^[12]用这种处理方法得到了人内皮细胞的弹性，如图 3 所示，同样内皮细胞在不同层面所表现的弹性也有所差异。

线性化方法分析数据的好处在于不用找接触点，直接将原始数据乘方后作图拟合得到斜率即可，而且还能同时得到不同深度压痕下细胞的弹性差异。但是这种方法要求力曲线比较平滑，而且测量环境中的液体黏性不能过大，所以在 AFM 实验过程中要求仪器稳定性好，外界噪音很小，否则得到的力曲线所拟合成的直线线性关系不好，导致难以确定直线的斜率而无法很好地得到杨氏模量。

2.1.2 两点法^[13]

由 (1) (2) 两个式子可以看出，只要知道 f 和 δ ，就可以求出样本杨氏模量 E 。如果我们找到探针与细胞的接触点，在力曲线中得到接触点所对应的压力 $f_{contact}$ 和距离 $d_{contact}$ ，以及我们所测量压痕深度对应的结束点所对应的压力 f_{end} 和距离 d_{end} ，就可以得到在这一深度压痕处探针施加给细胞的压力 f 和细胞

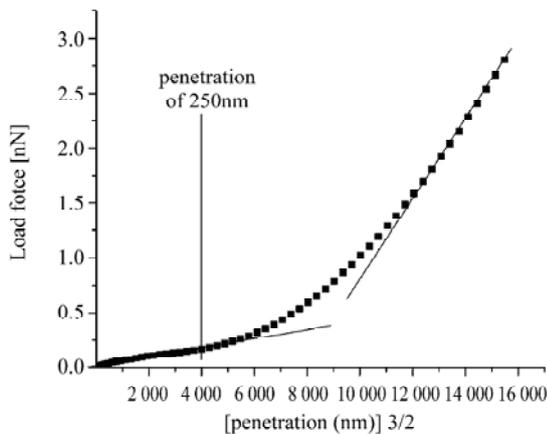


图3 赫兹模型斜率法示意图^[12]

将力曲线的进针曲线变形得到 $f \sim \delta^{\frac{3}{2}}$ 的曲线关系，再将该曲线线性拟合得到两段直线，其斜率即是该压痕下细胞膜的杨氏模量 E

压痕 δ ，再利用赫兹模型求出细胞的杨氏模量 E 。下面给出这种方法的计算过程：

$$f = f_{end} - f_{contact} \quad (11)$$

$$\delta = d_{end} - d_{contact} \quad (12)$$

将上面两个式子代入式子 (1) (2) 分别得到：

$$|f_{end} - f_{contact}| f = \frac{2}{\pi} \frac{E}{1-\nu^2} \tan \partial (d_{end} - d_{contact})^2 \quad (13)$$

$$|f_{end} - f_{contact}| = \frac{4}{3} \frac{E}{1-\nu^2} \sqrt{R} (d_{end} - d_{contact})^{\frac{3}{2}} \quad (14)$$

其中， f_{end} 、 $f_{contact}$ 分别是力曲线中结束点和接触点所对应的力， d_{end} 、 $d_{contact}$ 分别是力曲线中结束点和接触点所对应的距离值，如图 4 所示。所以我们确定接触点和压痕深度之后，代入相应数据就可以求解出样本杨式模量 E 。Charles 等^[13]用这种方法分析了活细胞膜的物理性质。这种方法计算简单，但是因为 AFM 实验过程中受到很多因素影响^[14]，比如探针移动过程中液体对探针的作用力、细胞本身的黏性，以及实验过程中环境的噪音和系统本身的不稳定性等，所以很难准确地确定接触点。

2.2 回针曲线模型^[15]

赫兹模型是通过分析力曲线中进针曲线来得到

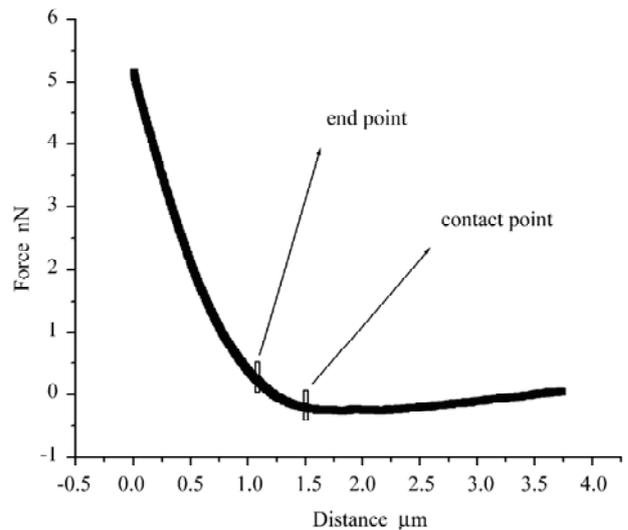


图4 两点法示意图

如图是一条力曲线的进针曲线，在图上已经标明接触点 (contact point) 和某一深度压痕处的结束点 (end point)，(我们以压痕 500 nm 为例)，将这两个点分别对应的距离 $d_{contact}$ 、 d_{end} 和压力值 $f_{contact}$ 、 f_{end} 代入式子 (13) 或者式子 (14) 就可以求得杨氏模量 E 。

杨氏模量, Oliver和Pharr^[15]发现从回针曲线中也能得到杨氏模量, 而且还能得到所研究样本的黏性。Sirghi等^[6]利用AFM压痕曲线的回针曲线分析得到了细胞膜的弹性和黏性, 其表达式如下:

$$P(h) = \frac{4E^* \tan \alpha}{\pi\sqrt{\pi}} h^2 - \frac{32\gamma_a \tan \alpha}{\pi^2 \cos \alpha} h \dots\dots\dots (15)$$

其中 $P(h)$ 表示微悬臂变形为 h 时探针施加的压力, α 是探针半开角, h 是微悬臂变形量, E^* 是杨氏模量 E 的近似值, 两者的关系是

$$E^* = E / (1 - \nu^2) \dots\dots\dots (16)$$

γ_a 是细胞黏性系数, 它与探针抵抗细胞黏性做功 W_a 的关系是:

$$W_a = -\gamma_a A_c \dots\dots\dots (17)$$

A_c 是探针与细胞的接触面积

该模型示意图如图 5 所示:

由于 AFM 所获得的力曲线通常会受到黏附力的影响, 探针与细胞之间的黏附力会同时影响压痕实

验中加载和非加载部分, 在加载区域它会加速探针的位移, 在非加载区域它会阻止探针的回拉。因此, 若是忽略探针与细胞之间的黏附力, 将会给最后结果带来系统性的误差^[6]。回针曲线模型是 Sirghi 等^[6]建立的理论分析方法, 考虑 AFM 所得到的力曲线受到探针与细胞之间黏附力的影响, 而且利用该模型可以获取细胞表面的弹性信息以及探针与细胞膜表面之间黏附力信息。黏附力可以用探针和细胞接触面积上的黏附能量来表示, 而且黏附能量和接触面积在整个压痕过程中是处于一个连续的变化状态。探针和细胞之间的黏附力同时影响压痕过程中的进针和回针, 但是在非加载(回针)时间段可以直接获得黏附力的大小。当黏附力是探针和活体细胞接触区域上大量分子相互作用的结果时, 需要引用一个更适合的参数 γ_a , 它指的是单位面积上分开两个物体所需要的能量值。

这个理论分析方法能够较为准确地计算出探针与细胞发生力学接触的面积, 在压痕的非加载过程中细胞骨架弹性会发生松弛, 并且细胞和探针接触面积会连续地变小, 探针和细胞之间接触面积的连续变化决定了两者之间黏附能量和黏附力的变化。从锥形探针对活体细胞进行的压痕实验来看, 探针和细胞膜之间存在有限的黏附力。通过该理论模型拟合力曲线可以获取细胞表面弹性以及细胞和探针接触面上黏附能量的信息。

3 讨论

本文较为详细地介绍了分析 AFM 力曲线求解细胞弹性的常用模型, 下面分别用以上三种方法分析实验数据三种方法的异同。用 AFM 在不同加载速率下对肺癌细胞 A549 做力曲线, 分别用以上三个方法得到杨氏模量, 其结果如图 6 所示。

从结果可以看到, 随着加载速率的增加, 杨氏模量也随之增大, 这与很多研究是一致^[14], 这可能是因为受到细胞黏性的影响。在加载速率较小时(小于 $8 \mu\text{m/s}$), 三种方法计算得到的杨氏模量没有显著性差异; 在加载速率较大的时候(大于 $8 \mu\text{m/s}$), 从图中可以看到, 回针曲线模型得到的杨氏模量更小, 这可能是因为回针曲线模型考虑了细胞的黏性影响。有研究表明, 在加载速率小于 $10 \mu\text{m/s}$ 的情况下, 液体对探针的影响很小^[11], 加载速率越大, 细胞黏性对 AFM 杨氏模量的测量结果影响越大^[16]。所以, 在加载速率较大的情况下, 用回针曲线模型可能会更为符合实际, 在加载速率较小的情况下, 赫兹模

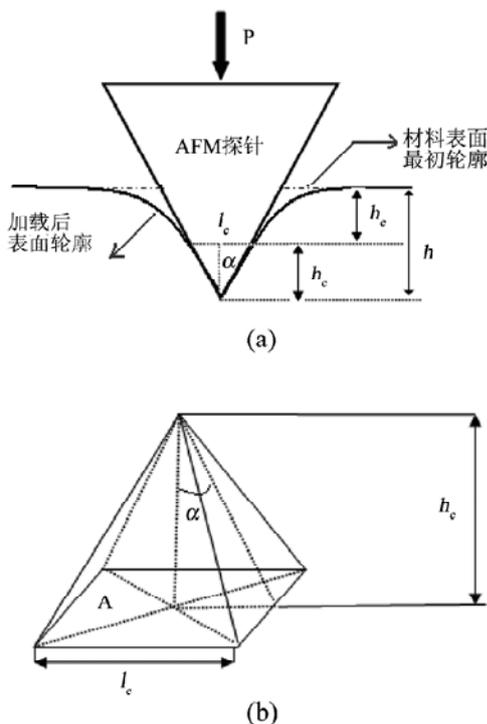


图5 探针与细胞接触示意图^[6]

a 图是坚硬的锥形探针对一个半空间软的弹性材料的压痕示意图(其中 α 为锥形探针的半开角, h_c 表征的是材料表面的变形, h_c 为探针接触深度, h 为探针向细胞内移动的整个距离深度); b 图为与细胞完全接触的那部分探针的立体示意图(其中 A 为接触面的投影面积, l_c 接触面的边长)

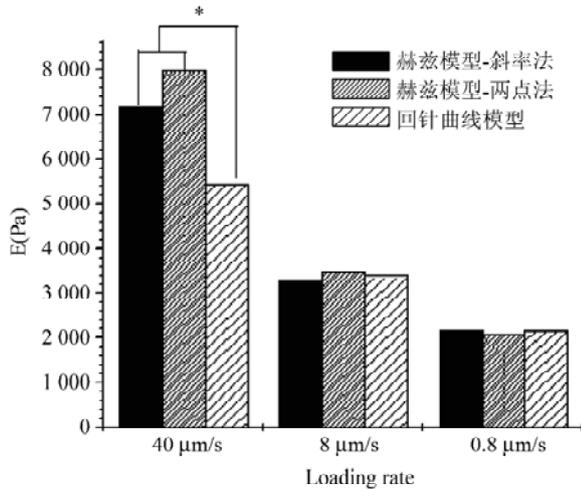


图6 在三种加载速率下,分别用上述三种方法所得到的杨氏模量 E

型计算更简单一些。

文献调查发现,不同研究组所测到的细胞杨氏模量差异非常显著^[17-20],一方面这是由不同细胞本身性质导致的,另一方面,使用不同模型进行数据分析,使用不同仪器进行实验,这些对测量结果的影响可能也是非常大的。所以如果要比较细胞性质差异,我们建议用同一仪器实验和同一种模型进行数据分析,只有在相同条件下所得到的结果才能更好反映细胞之间弹性的差异。

[参 考 文 献]

- [1] Yang H, Yu J, Fu G, et al. Interaction between single molecules of Mac-1 and ICAM-1 in living cells: an atomic force microscopy study. *Exp Cell Res*, 2007, 313(16): 3497-504
- [2] Bálint Z, Krizbai IA, Wilhelm I, et al. Changes induced by hyperosmotic mannitol in cerebral endothelial cells: an atomic force microscopic study. *Eur Biophys J*, 2007, 36(2): 113-20
- [3] Kasas S, Wang X, Hirling H, et al. Superficial and deep changes of cellular mechanical properties following cytoskeleton disassembly. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2005, 62(2): 124-32
- [4] Cross SE, Jin YS, Rao JY, et al. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nat Nanotechnol*, 2007, 2(12): 780-3
- [5] Chouinard JA, Grenier G, Khalil A, et al. Oxidized-LDL induce morphological changes and increase stiffness of endothelial cells. *Exp Cell Res*, 2008, 314(16): 3007-16
- [6] Sirghi L, Ponti J, Broggi F, et al. Probing elasticity and adhesion of live cells by atomic force microscopy indentation. *Eur Biophys J*, 2008, 37(6): 935-45
- [7] Hertz H. über den kontakt elastischer körper. *J Reome Angew Mathematik*, 1882, 92: 156-71
- [8] Zhao MH, Charudharshini S, Diane JB, et al. Rate- and depth-dependent nanomechanical behavior of individual living Chinese hamster ovary cells probed by atomic force microscopy. *J Mater Res*, 2006, 21(8): 1906-12
- [9] Costa KD. Single-cell elastography: probing for disease with the atomic force microscope. *Dis Markers*, 2003, 2(3): 139-54
- [10] Radmacher M, Fritz M, Kacher CM, et al. Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope. *Biophys J*, 1996, 70(1): 556-67
- [11] Carl P, Schillers H. Elasticity measurement of living cells with an atomic force microscope: data acquisition and processing. *Eur J Physiol*, 2008, 457(2): 551-9
- [12] Tamara KB, Craig DW, Igor S. Human epithelial cells increase their rigidity with aging *in vitro*: direct measurements. *Phys Med Biol*, 2005, 50(1): 81-92
- [13] Charles RF, Gisouvan der G, Paolo DLR, et al. Elastic membrane heterogeneity of living cells revealed by stiff nanoscale membrane domains. *Biophys J*, 2008, 94(4): 1521-32
- [14] Li QS, Lee GY, Ong CN, et al. AFM indentation study of breast cancer cell. *Biochem Biophys Res Commun* 2008, 374(4): 609-13
- [15] Oliver WC, Pharr GM. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *J Mater Res*, 1992, 7(6): 1564-83
- [16] Bremmell KE, Evans A, Prestidge CA. Deformation and nano-rheology of red blood cells: an AFM investigation. *Colloids Surf B: Biointerfaces*, 2006, 50(1): 43-8
- [17] Berry MF. Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 290(6): 2196-203
- [18] Yoshikawa Y, Yasuie 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
- [19] 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
- [20] 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(2): H645-51