

单光镊技术测量红细胞膜弹性新方法的建立*

周 辉¹⁾ 李先锋²⁾ 李银妹¹⁾ 楼立人¹⁾ 乐加昌²⁾**

(¹⁾中国科学技术大学选键化学开放实验室, 合肥 230026)

(²⁾中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家实验室, 北京 100101)

摘要 光镊是对生物样品的力学特性进行研究的方便工具. 红细胞膜弹性是血液的生理功能指标. 利用单光镊技术我们建立了测量红细胞膜弹性的新方法. 利用该方法对红细胞的膜弹性进行测量, 该结果与国外文献报道的双光镊法测量结果相一致. 对不同浓度氧化苯砷 (PAO) 处理的红细胞膜弹性进行了测量, 测量结果表现出浓度与膜弹性之间有明显的线性关系, 证实了这种方法的可行性和灵敏性.

关键词 光镊, 红细胞, 膜弹性, 氧化苯砷 (PAO)

学科分类号 Q6-33

光镊技术使人们得以捕获、移动细胞或细胞器, 而对它们的损伤极其微小^[1]. 对光镊的力进行标定后, 可以利用光镊的 pN 量级力对生物粒子的力学特性进行定量的研究^[2].

红细胞膜的弹性是红细胞的微观力学特征和全血流变学性质的基础, 反映了红细胞变形通过毛细血管的能力和向组织器官输送氧气的能力, 因此成为生物学、医学考察血液输氧能力的重要指标.

已有多种测量红细胞膜弹性的技术, 如微吸量管法^[3], 激光衍射法^[4], 双光镊法^[5]. 上述方法各有特点. 其中, 对于单个细胞膜弹性的测量, 双光镊法是最为直接、准确的方法.

在本工作中建立了单光镊测量红细胞膜弹性的方法. 该方法相对于双光镊法, 设备简单, 操作方便, 易于实现, 有独特的优点. 利用该方法测量了正常红细胞和经氧化苯砷 (PAO) 处理的红细胞的膜弹性. 对正常红细胞膜弹性模量 (H) 的测量结果为 $(1.75 \times 10^{-6} \pm 0.3 \times 10^{-6}) \text{ Nm}^{-1}$, 该值与文献所报道用双光镊测得的值 $(2.5 \times 10^{-6} \pm 0.4 \times 10^{-6}) \text{ Nm}^{-1}$ ^[5] 相接近. 对不同浓度 PAO 处理的红细胞进行膜弹性测量的结果, 敏感地反映了膜弹性的变化趋势. 结果证实了这种方法方便、可靠.

1 材料和方法

1.1 试剂及仪器

新鲜血样从健康人体身上采集. 实验所用小球为 $1 \mu\text{m}$ 聚苯乙烯小球, 表面链接有 protein A 蛋白,

购于 Molecular Probes 公司. 细胞稀释液为 0.01 mol/L PBS ($\text{pH} = 7.4$). 氧化苯砷 (PAO) 购自 Sigma 公司, 其他化学试剂均为分析纯.

光镊装置如图 1 所示. 用一台 Olympus 倒置光学显微镜构建光镊. 光镊光源为 $1.06 \mu\text{m}$ Nd YAG 激光器, 最大输出功率为 600 mW , 激光光束经显微镜内的一片双向分束器反射, 进入 100 倍油浸物

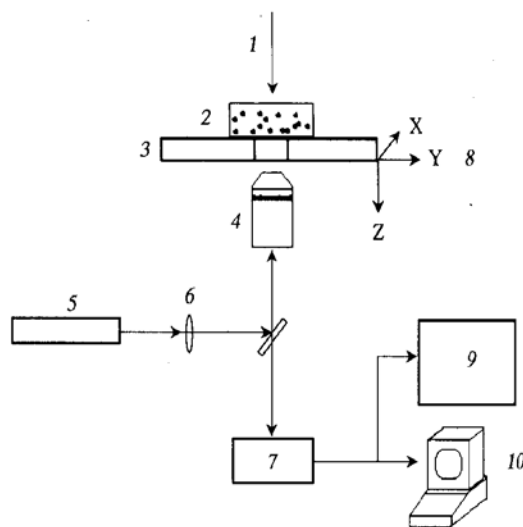


Fig. 1 Scheme of the optical tweezers experimental setup

1: illuminate light; 2: sample cell; 3: sample stage; 4: objective;
5: light source of optical tweezers; 6: lens; 7: CCD camera; 8:
3D motion; 9: video recorder; 10: computer.

* 国家自然科学基金资助项目 (19890380).

** 通讯联系人.

Tel: 010-64888515, E-mail: yuejc@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2001-02-13, 接受日期: 2001-04-05

镜 (数值孔径 1.25), 再会聚到观测点上形成光镊. $1.06 \mu\text{m}$ 的波长光被水和血红蛋白吸收最少, 可避免对红细胞可能的伤害. 样品池置于自动平台上, 由计算机控制其在三维方向以微米精度运动. 通过控制自动平台使被捕获粒子相对于样品池移动, 从而实现对粒子的操控.

1.2 实验准备

1.2.1 细胞处理: 血红细胞在 PBS 中稀释, 使用前用离心洗三次.

1.2.2 小球处理: 为了使小球容易与样品池底表面和细胞表面粘连, 用 IgG 蛋白包裹小球.

1.2.3 样品池处理: 实验前向池中滴 $10 \mu\text{l}$ 多聚赖氨酸溶液, 再滴入以使小球容易粘在样品池底部表面. 待悬浮液蒸发干后, 小球固定于池底面. 再加入牛血清白蛋白 (BSA) 1% 溶液, 将样品池底的多聚赖氨酸封闭, 避免以后加入的红细胞也粘于样品池底部表面上.

1.2.4 光镊操控力的标定: 用光镊操控一个粒子静止于流速为 v 的流体中, 逐步加大流速 v 直到粒子被水流冲走. 此时的流速 v 称为粒子的逃逸速度. 在此速度下, 根据流体力学原理, 粒子所受流体的粘滞阻力 F' , 为:

$$F' = 6\pi R\eta v \quad (1)$$

其中, $R = 1.0 \mu\text{m}$, 为粒子半径, $\eta = 1.655 \times 10^{-3} (\text{Pa}\cdot\text{s})$, 为流体的粘滞系数, $v (\mu\text{m}/\text{s})$ 为流速. 粒子受到的操控力 F 与此时所受流体的粘滞阻力 F' , 大小相等, 方向相反, 可由公式 (1) 算出^[6]. 逐步增大激光输出功率, 分别测定在不同输出功率 (物镜出瞳处) 下的光镊操控力, 可得到图 2 的标定曲线. 在我们的实验中所用到的光镊对 $1 \mu\text{m}$ 聚苯乙烯小球操控力均由该曲线推算出.

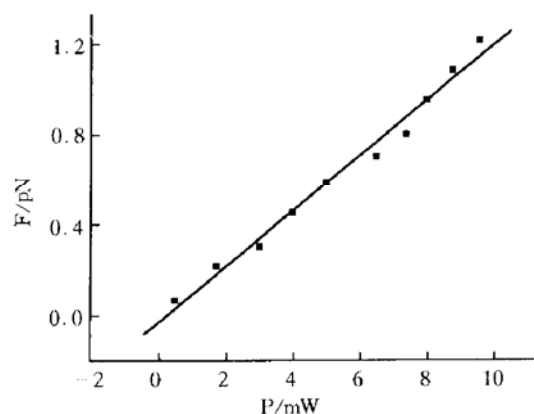


Fig. 2 Calibration curve of optical tweezers manipulation force F.

Force F is roughly proportional to laser power P.

1.3 细胞膜弹性测量

1.3.1 单光镊方法细胞膜弹性测量步骤: 首先将红细胞和小球悬浮液加入已被预处理底面固定有少量小球的样品池中. 再用光镊操控一个细胞, 使其一端粘在一个已固定于池底的小球上面, 被锚定住; 然后, 用光镊捕获一个悬浮的自由小球, 将其粘在细胞直径的另一端; 最后用一定功率的光镊操控粘在细胞可移动端的小球, 向细胞外拖动. 随着小球的移动, 细胞也被拉长, 当细胞被拉伸到一定长度时, 细胞反弹并带动小球从光镊中逃逸, 并最终回复初始的平衡状态. 整个实验过程用计算机记录和显示. 通过事先标定, 可以从屏幕上测量被操控小球逃逸时相对于固定小球的距离, 该距离减去细胞平衡状态时的直径 D , 即为细胞被拉后的伸长长度 L , L/D 为细胞相对伸长 ϵ . 用光镊操控小球的力 F 除以相对伸长 ϵ , 得到一个拉力-伸长比值: F/ϵ ; 逐步加大光镊操控力 F , 细胞相对伸长 ϵ 也加大, 可得到一系列 F/ϵ 值, 在每一次增加拉力之前, 都使细胞恢复到平衡态 (图 3). 用 F 对细胞相对伸长 ϵ 作图, 可得一条拉力-伸长关系曲线 (图 2). 由曲线的线性部分斜率 F/ϵ 可以推算出红细胞的剪切弹性模量^[6,7]:

$$H = \sqrt{\frac{1}{125aB}} \left[\frac{F}{\epsilon} \right]^3 \quad (2)$$

其中, $a = 0.5 \mu\text{m}$ 为粒子半径, $B = 2 \times 10^{-19} \text{Nm}$ 为扭曲弹性模量, ϵ 为细胞相对伸长, $F (\text{pN})$ 为操控力.

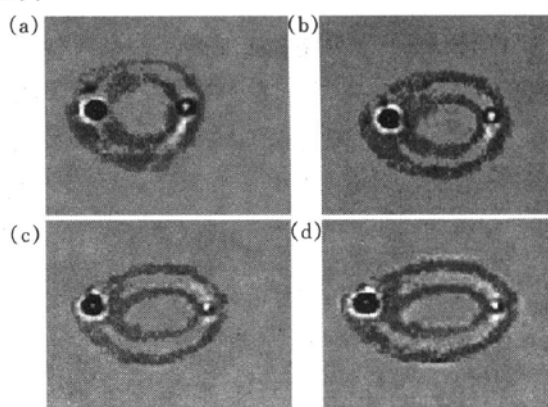


Fig. 3 RBC with two beads in diametrical position

The deformation increased with force F . Each image is taken just before the bead escapes from the trap and F is given by the calibration curve. (a) When the manipulation force F is 0.29 pN , the red cell's relative extension ϵ is 0.074 ; (b) When F is 0.53 pN , ϵ is 0.132 ; (c) When F is 0.67 pN , ϵ is 0.155 ; (d) When F is 0.08 pN , ϵ is 0.189 .

1.3.2 红细胞膜弹性测量: 取 PBS 溶液 20 μL 与 5 μL 红细胞混合, 静置 0.5 h, 然后用上述方法测量膜弹性.

1.3.3 PAO 浓度效应实验: 分别取浓度为 0 $\mu\text{mol/L}$, 0.4 $\mu\text{mol/L}$, 4 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 PAO 溶液 20 μL 与 5 μL 红细胞混合, 静置 5 min, 然后用上述方法测量膜弹性.

2 结 果

2.1 红细胞膜弹性

图 4 为红细胞的拉力-伸长关系曲线. 当用操控力 0.8 pN 拉细胞时, 红细胞相对伸长为 0.189 ± 0.02 . 由该曲线斜率 F/ε 算出细胞剪切弹性模量 H 为 $(1.75 \times 10^{-6} \pm 0.3 \times 10^{-6}) \text{ N m}^{-1}$.

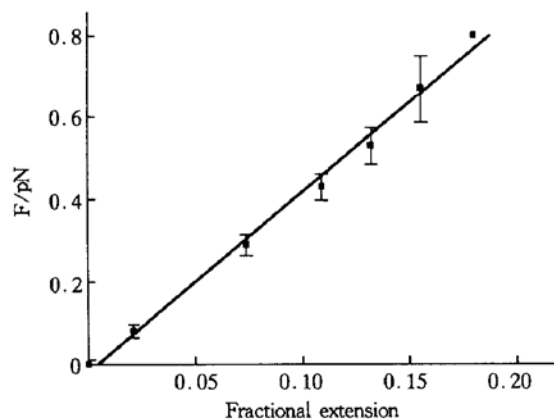


Fig. 4 The dynamic force extension relationships obtained from experiments shown in Fig. 3

Each point represents the average of 15 cells. Error bars correspond to $\pm s$.

2.2 PAO 浓度效应实验的红细胞膜弹性

图 5 为 PAO 浓度实验结果. 对于浓度为 0 $\mu\text{mol/L}$ 、0.4 $\mu\text{mol/L}$ 、4 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 的 PAO 溶液处理过的红细胞, 当用 1.22 pN 操控力拉细胞时, 细胞相对伸长分别为 0.287 ± 0.057 、 0.197 ± 0.04 、 0.102 ± 0.03 、 0.066 ± 0.02 . 由曲线斜率 F/ε 推算出细胞剪切弹性模量 H 分别为 $(1.75 \times 10^{-6} \pm 0.02 \times 10^{-6})$ 、 $(3.07 \times 10^{-6} \pm 0.03 \times 10^{-6})$ 、 $(8.27 \times 10^{-6} \pm 0.07 \times 10^{-6})$ 、 $(15.89 \times 10^{-6} \pm 0.14 \times 10^{-6}) \text{ N m}^{-1}$.

2.3 红细胞弹性恢复的动态过程

测量了正常红细胞被拉伸到最大限度后, 恢复至平衡态的过程中, 粘在细胞两端的两个小球间的距离随时间的变化 (图 6), 对所测数据作指数拟合, 得到恢复时间 τ 为 202 ms. 细胞恢复时间 τ 是判断细胞是否损伤的依据, 一般为 100 至

300 ms^[8]. 该结果表明这种方法对红细胞的损伤很小, 实验测得数据为未受损的正常红细胞弹性值.

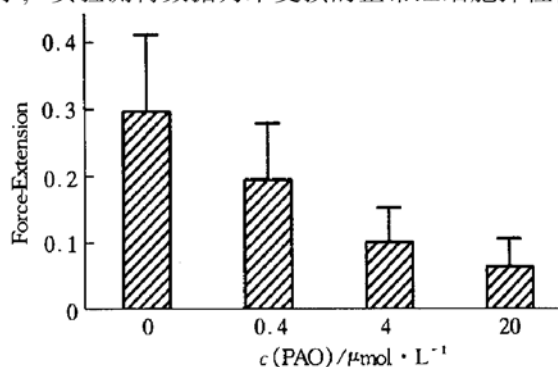


Fig. 5 The Force-Extension of RBC treated with PAO with concentration of 0 $\mu\text{mol/L}$, 0.4 $\mu\text{mol/L}$, 4 $\mu\text{mol/L}$ and 20 $\mu\text{mol/L}$ respectively

Each bar represents the average of 15~20 cells.

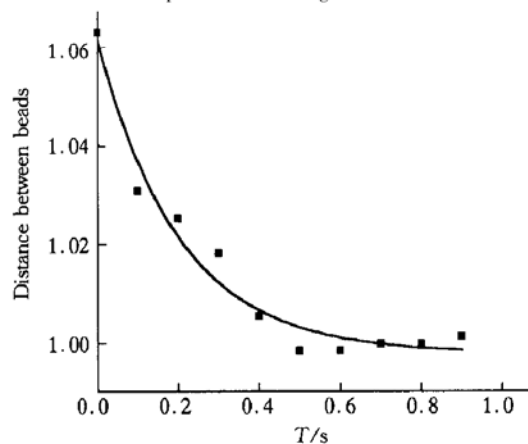


Fig. 6 Distance between two beads bound to cell is plotted versus time, starting when cell escapes from the trap

The solid curve represents the exponential fit, with a time constant $\tau = 202 \text{ ms}$. Each point represents the average of 10 cells.

3 结 论

建立了单光镊测量红细胞膜弹性的新方法. 用这种方法测量了红细胞的膜弹性.

测得正常红细胞膜剪切弹性模量为 $(1.75 \times 10^{-6} \pm 0.3 \times 10^{-6}) \text{ N m}^{-1}$, 与文献所报道用双光镊测得的值 $(2.5 \times 10^{-6} \pm 0.4 \times 10^{-6}) \text{ N m}^{-1}$ ^[5] 相接近. 实验证实了建立的单光镊法简单、可靠.

PAO 处理过的细胞膜弹性会变小^[9]. PAO 浓度效应的实验结果表明: 随着 PAO 浓度增加, 膜弹性模量增加, 膜弹性下降 (膜弹性与膜弹性模量成反比), 且呈现出较好的线性关系. 实验证实了建立本单光镊法的可行性.

这种新方法可在红细胞及其他细胞的膜弹性测

量上进一步推广应用。

致谢 杨福愉院士对本研究工作的鼓励与支持, 谨致感谢。

参 考 文 献

- 1 Ashkin A, Dziedzic J M, Yamane T. Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature*, 1987, **330**: 769~ 771
- 2 Svoboda K, Block S M. Biological applications of optical forces. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 1994, **23**: 247~ 285
- 3 Evans E A. New membrane concept applied to the analysis of fluid shear and micropipette deformed red blood cells. *Biophys J*, 1973, **13**: 941~ 954
- 4 Fierge R, Grebe R. Cell-elastometry: a new method to measure erythrocyte elasticity. *Biotheology*, 1997, **34** (3): 223~ 291
- 5 Sylvie H, Guillaume L, Alain R, *et al*. A new determination of the sheer modules of the human erythrocyte membrane using optical tweezers. *Biophys J*, 1999, **76**: 1145~ 1151
- 6 John S D W L, Robert S, Waslter G. Elasticity of the red cell membrane and its relation to hemolytic disorders: An optical tweezers study. *Biophys J*, 1999, **77**: 3085~ 3095
- 7 Parker K H, Winlve C P. The deformation of spherical vesicles with permeable, constant-area membranes: application to the red blood cell. *Biophys J*, 1999, **77**: 3096~ 3107
- 8 Bronkhorst P J H, Streekstra G J, Grimbergen J, *et al*. A new method to study shape recovery of red blood cells using multiple optical trapping. *Biophys J*, 1995, **69**: 1666~ 1673
- 9 Danid C, Dan D F, Sheetz M P. Extracellular matrix rigidity causes streng thening of intergrin cytoskeleton linkages. *Cell*, 1997, **38**: 39~ 48

A New Method to Measure Red Cell Membrane Elasticity Using Single Optical Tweezers*

ZHOU Hui¹⁾, LI Xian-Feng²⁾, LI Yir-Mei¹⁾, LOU Li-Ren¹⁾, YUE Jia-Chang^{2)**}

¹⁾ *Laboratory of Bond-Selective Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China;*

²⁾ *Institute of Biophysics, Biomacromolecular laboratory, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)*

Abstract The optical tweezers are convenient tools for investigation of mechanical characteristic of biological particle. The elasticity of red cell membrane is an important index for people to appraise the ability of blood transporting oxygen. Using single optical tweezers technology, a new method to measure the elasticity of RBC membrane was established. Adopting this new method, the elasticity of normal RBC membrane was detected and were consistent with the results of double optical tweezers method. Moreover, the membrane elasticity for RBC with phenylarsine oxide (PAO) was measured. The result displayed a linear relationship between elasticity decrease and increase of PAO concentration. Therefore, this new method has high sensitivity and is acceptable.

Key words optical tweezers, red cell, membrane elasticity, phenylarsine oxide

* This work was supported by a grant from the National Natural Sciences Foundation of China (19890380).

** Corresponding author. Tel: 86-10-64888515, E-mail: yuejc@sun5.ibp.ac.cn

Received: February 13, 2001 Accepted: April 5, 2001