

基于 AFM 的细胞表面超微形貌成像 与机械特性测量研究进展 *

李 密¹⁾ 刘连庆^{1)**} 席 宁^{1, 2)**} 王越超¹⁾

¹⁾ 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;

²⁾ Department of Electrical and Computer Engineering, Michigan State University, East Lansing, MI 48824, USA)

摘要 原子力显微镜(AFM)以其独特的优势(纳米级空间分辨率、皮牛级力灵敏度、免标记、可在溶液下工作)成为细胞生物学的重要研究手段. AFM 不仅可以对活细胞表面超微形貌进行可视化表征, 同时还可通过压痕技术对细胞机械特性(如杨氏模量)进行定量测量, 为原位探索纳米尺度下单个活细胞动态生理活动及力学行为提供了可行性. 过去的数十年中, 研究人员利用 AFM 在细胞超微形貌成像和机械特性测量方面开展了广泛的应用研究, 展示了有关细胞生理活动的大量新认识, 为生命医学领域相关问题的解决提供了新的思路; 同时 AFM 自身的性能也在不断得到改进和提升, 进一步促进了其在生命科学领域的应用. 本文结合作者在应用 AFM 观测纳米尺度下癌症靶向药物作用效能方面的研究工作, 介绍了 AFM 成像与细胞机械特性测量的原理, 总结了近年来 AFM 用于细胞表面超微形貌成像与机械特性测量所取得的进展, 讨论了 AFM 表征与检测细胞生理特性存在的问题, 并对其未来发展方向进行了展望.

关键词 原子力显微镜, 细胞, 超微形貌, 成像, 机械特性, 杨氏模量

学科分类号 Q24, Q66

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0158

细胞是构成生命有机体的基本结构和功能单元. 组成细胞的各种生物分子(蛋白质、糖类、脂类等)之间相互作用, 共同构成一个繁忙而有序的系统, 使得细胞执行各种生物学功能(生长、增殖、迁移、分化、衰老、物质运输、信号传递、免疫反应等), 以维持机体正常的生理活动. 细胞的生理状态与生命机体的健康状况有着密切的联系, 细胞偏离其正常生理状态往往导致机体的病理性变化(如正常细胞癌变后具有无限复制的能力, 且可诱导血管生成, 进而形成肿瘤^[1]), 因此对细胞生理特性进行检测对于认识疾病发生发展的内在机理有着重要的基础意义. 传统细胞生理特性检测主要基于细胞的生物化学特性, 即通过聚合酶链反应(PCR)、免疫组化、蛋白质印迹、X 射线晶体衍射、核磁共振、流式细胞仪等技术手段来分析细胞的生化特征, 如基因突变情况、蛋白质表达水平、生物分子构象、胞内离子浓度变化以及细胞组分差异等^[2-6]. 然而, 这些方法需要利用各种化学试剂对细胞进行

处理(如裂解、固定、染色、标记), 破坏细胞的原有结构, 且检测过程耗时费力、费用昂贵^[7-8]. 细胞固有的生物化学和生物物理学特性使得其执行特定的生物学功能(如红细胞运输氧气), 而细胞的病理生理学变化常常伴随着细胞化学和物理学特性的变化与重组^[9], 如镰刀形红细胞贫血症(sickle-cell anemia)患者的红细胞不仅含有基因突变导致的镰刀状异常血红蛋白(化学特性变化)^[10], 且研究发现与健康红细胞相比镰刀状红细胞具有更大的硬度和更强的黏性(物理特性变化)^[11]. 因此, 我们可以根据细胞的化学和(或)物理学特性来辨识病变细胞^[9]. 与细胞的化学特性相比, 细胞物理学特性检测的优

* 国家自然科学基金(61175103, 61375107, 61327014, 61433017), 机器人学国家重点实验室自主课题(2014-Z07)和中国科学院、国家外国专家局创新团队国际合作伙伴计划资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 024-23970981, E-mail: lqliu@sia.cn, xin@egr.msu.edu

收稿日期: 2015-05-26, 接受日期: 2015-06-30

点是免标记,可以直接对自然状态下的活细胞进行探测且样本制备简单^[12],这使得我们可以实时监测细胞生理活动过程中或外部因素作用下(如药物分子刺激)细胞物理特性的动态变化,可带来有关细胞生理活动行为的新认识,有助于发展新型药物筛选方法和疾病诊治技术。

1986年Binnig等^[13]发明的原子力显微镜(atomic force microscopy, AFM)为获取纳米尺度下单个活细胞的物理特性提供了新的技术手段。AFM不仅具有纳米级的空间分辨率和皮牛级的力灵敏度^[14],还可以在溶液环境下工作,同时不需要对细胞进行固定、标记、染色等预处理^[15],这使得其特别适合于活细胞物理特性的原位高分辨率探测。与现有的其他单细胞技术(如微流控芯片^[9]、光/磁镊^[16]、生物膜力探针^[17])相比,AFM是目前唯一可以对活细胞表面单个膜蛋白分子进行定位和操作的工具^[18]。自AFM出现以来的近30年里,研究人员利用其对相关生物学问题进行了广泛的研究,在一系列研究领域(如活细胞超微结构成像^[19]、细胞机械特性测量^[20]、膜蛋白原位成像与机械特性表征^[21]、DNA动态观测^[22]、单分子力谱^[23]、单细胞力谱^[24]等)带来了大量新的认识,为生命医药领域相关问题的解决提供了新的思路。近年来,AFM的性能不断得到增强,如高速扫描AFM使得获取一幅图像的时间降至毫秒级^[25],峰值力轻敲成像模式可以同时获取多个反映样本物理特性的参数(如形貌、能量耗散、弹性模量、黏附力、形变等)^[26],而多频AFM技术则可对细胞内部结构进行成像^[27],进一步提升了AFM应用于细胞物理特性检测的潜能。在AFM的诸多细胞生物学应用中,对细胞超微结构进行高分辨率成像是其最基本的应用,而AFM细胞机械特性测量则在近几年取得了具有显著临床转化医学意义的成果。基于此,本文结合作

者在利用AFM观测纳米尺度药物分子作用效能方面的研究工作,介绍了AFM成像与机械特性测量原理,总结了近年来AFM用于细胞表面超微形貌成像与机械特性测量方面的进展,并对AFM细胞生理学特性检测面临的困难和未来发展方向进行了讨论。

1 AFM成像与细胞机械特性测量原理

AFM主要由激光发生器、四象限位置敏感器(position sensitivity detector, PSD)、信号处理与反馈控制电路、压电陶瓷管驱动器和探针等构成,如图1a所示。探针为一根柔性微悬臂梁,悬臂梁的一端连有一个具有纳米级曲率半径的针尖,另一端与压电陶瓷管驱动器相连。压电陶瓷管驱动器驱动探针在垂直(z)和水平(x, y)方向上运动。一束激光照射到悬臂梁背面再反射到PSD上来检测悬臂梁的形变。AFM成像模式主要有接触模式和轻敲模式这两种。在接触模式下,探针针尖与样品之间的相互作用力(即悬臂梁形变量)保持恒定。在轻敲模式下,探针振动的振幅保持恒定。在细胞生物学应用中,目前最常用的AFM成像模式是接触模式^[28],特别是在活体贴壁细胞成像^[29-30]、膜蛋白高分辨率原位成像^[31-33]等方面接触模式可以获得高分辨率AFM图像。然而在对动物悬浮细胞进行成像时,轻敲模式更为有效^[34-35],这是因为动物悬浮细胞不能在基底表面延展生长且细胞表面十分柔软,轻敲模式可以有效减少扫描成像过程中探针施加的侧向力对细胞表面形貌的影响。在对活细胞进行成像时,接触模式由于扫描过程中施加给细胞的侧向力较大因而成像结果能较好地反映细胞骨架网络的信息^[36],而轻敲模式则由于侧向力很小导致其成像结果更多地反映了细胞表面的信息^[37]。

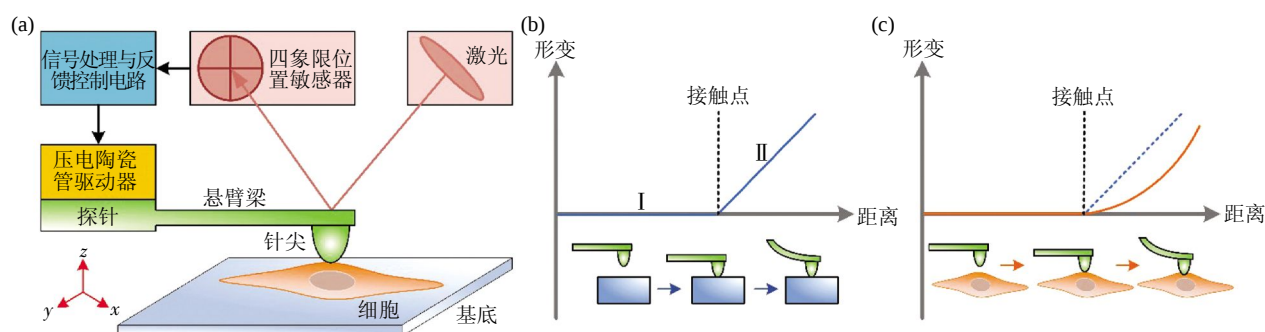


Fig. 1 The principle of AFM imaging and cellular mechanical properties measurement

图1 AFM成像与细胞机械特性测量原理

(a) AFM的基本组成及获取样品表面形貌的成像原理。(b, c)控制探针在细胞表面进行压痕实验测量细胞机械特性。坚硬基底(b)和细胞(c)上获取的力曲线示意图。

通过控制 AFM 针尖在细胞表面某个位置点进行压痕实验并记录压痕实验过程中的力 - 距离曲线(简称力曲线), AFM 可以定量分析细胞的机械特性(如杨氏模量). 在压痕实验过程中, 压电陶瓷驱动针尖在垂直方向做逼近 - 回退的往复运动. 图 1b 显示了在坚硬基底表面进行压痕实验获取力曲线的过程. 首先针尖从初始位置开始逐步逼近基底, 此时悬臂梁形变量为 0 且保持不变, 反映在力曲线上则是一条斜率为 0 的直线(图 1b 中 I); 当针尖与基底接触后, 针尖与基底之间的相互作用力使得悬臂梁发生形变, 且由于坚硬基底不发生形变(或形变很微弱), 因此悬臂梁形变量与压电陶瓷驱动探针在垂直方向上运动的距离相等(或近似相等), 反映在力曲线上是一条斜率为 1 的直线(图 1b 中 II); 当探针形变量达到预设的最大值时, 探针回退. 如果在细胞表面进行压痕实验, 则针尖与细胞接触后会在细胞表面产生压痕, 导致悬臂梁形变量小于压电陶瓷驱动的驱动探针在垂直方向上运动的距离, 反映在力曲线上则是一段曲线(图 1c). 根据力曲线上的接触点将力曲线转化为压痕曲线, 随后利用接触理论模型对压痕曲线进行拟合即可得到细胞杨氏模量. 目前有多个模型可用于从压痕曲线中提取出细胞杨氏模量, 如 Hertz-Sneddon、Johnson-Kendall-Roberts (JKR)、Derjaguin-Muller-Toporov (DMT) 和 Tatara^[38-39]. 但在实际中由于 Hertz-Sneddon 模型简单有效, 是应用得最为广泛的模型^[38]. Hertz 模型适用于微球 AFM 针尖, Sneddon 对 Hertz 模型进行了扩展使其适用于锥形针尖. 需要注意的是在应用 Hertz-Sneddon 模型时, 为保证压痕深度小于细胞厚度的 10%^[40], 通常只取数百纳米以内的压痕曲线部分进行拟合以得到细胞杨氏模量^[41-42].

Hertz-Sneddon 模型公式为:

$$F_{\text{Hertz}} = \frac{4ER^{1/2}\delta^{3/2}}{3(1-\nu^2)} \quad (1)$$

$$F_{\text{Sneddon}} = \frac{2E\delta^2 \tan\theta}{\pi(1-\nu^2)} \quad (2)$$

式中 F 为探针加载力, E 为样本的杨氏模量, R 为微球针尖半径, δ 为压痕深度, θ 为锥形针尖半开角, ν 为被测样本的泊松比(一般认为活细胞为不可压缩材料, 因此活细胞的泊松比为 0.5). 根据胡克定律:

$$F=kx \quad (3)$$

其中 k 为探针悬臂梁弹性系数. 可知通过测量探针悬臂梁的形变量 x , 即可根据公式(3)算出探针

加载力 F . 根据公式(1)~(3)可知, 只需得到探针悬臂梁形变量 x 和压痕深度 δ , 即可计算得到细胞杨氏模量, 公式中的其余参量为已知量或是可以通过实验测量得到的: 半开角 θ 可从探针制造商得到或者利用 SEM 进行精确测定, 微球探针的半径可以由光学显微镜或 SEM 进行测定^[42], 而弹性系数 k 则需要在实验中进行校正, 常用的校正方法为热噪声方法^[43].

2 淋巴瘤靶向治疗药物 Rituximab 的作用机理

近年来, 分子靶向治疗以其具有疗效高、副作用低的特点备受瞩目, 正成为肿瘤临床治疗的重要组成部分^[44]. 第一个用于临床治疗的靶向药物为 rituximab, 于 1997 年被美国 FDA 批准用于治疗复发性或顽固性低度或滤泡性 B 细胞非霍奇金淋巴瘤^[45]. Rituximab 的作用靶点为淋巴瘤细胞表面的 CD20 抗原分子. 体外实验研究表明 rituximab 与淋巴瘤细胞表面的 CD20 结合之后通过抗体依赖细胞介导的细胞毒作用 (antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC)、补体依赖的细胞毒作用 (complement dependent cytotoxicity, CDC) 和直接诱发程序性细胞死亡 (programmed cell death, PCD) 这三种机制来杀灭靶细胞, 如图 2 所示. 传统基于光学显微镜的集群平均研究方法受制于 200 nm 极限分辨率而无法观察到细胞精细结构, 导致目前对于纳米尺度下 rituximab 作用于靶细胞的细节情况仍不清楚. AFM 的出现为原位研究纳米尺度下单细

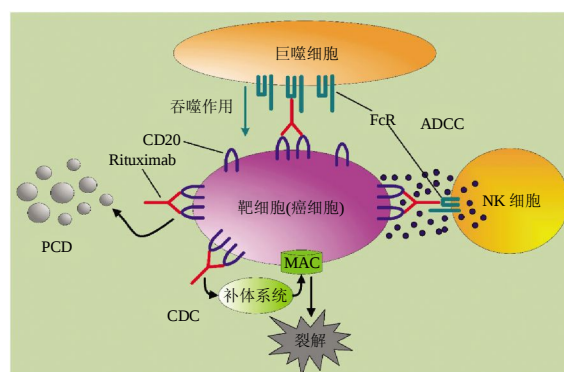


Fig. 2 The mechanisms of lymphoma rituximab targeted therapy

图 2 Rituximab 靶向治疗淋巴瘤的作用机制

Rituximab 与癌细胞表面的 CD20 结合后通过直接诱导细胞程序性死亡(PCD); 可以激活补体系统在细胞表面生成膜攻击复合物 (membrane attack complex, MAC) 裂解癌细胞(CDC); 还可以通过招募效应细胞来攻击癌细胞(ADCC).

胞生理活动提供了新的技术手段, 基于此, 我们利用 AFM 对 rituximab 三种机制作用过程中细胞表面超微结构和细胞机械特性的动态变化情况进行了定量研究^[34-35, 46-50], 在下面的内容中, 将基于这些研究工作对近年来 AFM 应用于细胞表面超微形貌成像与机械特性测量所取得的进展进行总结与分析。

3 AFM 细胞超微形貌成像

利用 AFM 对细胞超微形貌进行成像是 AFM 在生物领域的最基本应用。AFM 细胞成像可分为空气中成像和溶液中成像这两种。在空气中对细胞进行成像时, 为了使细胞结构尽可能保持其生活时的状态, 需要利用化学固定剂对细胞进行处理。常用的化学固定剂有 2.5% 戊二醛^[51]和 4% 多聚甲醛^[52]。2010 年陈晓爱等^[51]对聚乙二醇-聚乙烯亚胺纳米颗粒刺激 8 h 后的骨髓间质干细胞进行化学固定, 随后在空气中利用 AFM 进行了成像, 结果清晰地显示出纳米颗粒在细胞表面分布的细节情况, 而在延长刺激时间至 20 h 后则可以观察到细胞表面由于内吞纳米颗粒形成的凹陷形貌。2009 年 Hu 等^[53]分别对休眠态、活化态和凋亡态的淋巴细胞表面形貌进行了 AFM 成像, 结果显示, 休眠态细胞表面光滑, 而活化态和凋亡态的细胞表面粗糙并出现颗粒。经过化学固定后的细胞表面变得坚硬, 因此在空气中对化学固定细胞进行 AFM 成像的空间分辨率较高, 这有助于认识细胞表面超微形貌, 但将细胞暴露在空气中会不可避免地导致细胞本身结构的改变, 从而给成像结果的解释带来困难。此外空气中成像获得的仅是静态图像, 很多时候人们更感兴趣的是活细胞生理活动过程中超微结构的动态变化, 因为这种情况下获得的结果能更好地帮助我们认识细胞的活动行为。在溶液环境下对细胞进行 AFM 成像时, 需要首先将细胞吸附到基底上。对于贴壁细胞, 可直接将其生长在基底(如培养皿、盖玻片等), 待细胞牢固贴附于基底表面并延展生长后即可利用 AFM 对细胞形貌进行成像。有时候为了增强细胞贴壁效果, 可在基底表面覆盖一层多聚赖氨酸^[54]。多聚赖氨酸带正电荷, 而活细胞一般带负电荷, 因此覆盖了多聚赖氨酸的基底可通过静电吸附作用固定细胞, 但多聚赖氨酸的引入可能会对细胞的生长及结构产生影响。2007 年 Ge 等^[55]利用磁驱动轻敲 AFM 成像模式对活体状态的星形胶质细胞进行了成像, 揭示出胶质细胞之间连接区域以及胶质细胞在基底上铺展区域的细节情况, 同时

通过与星形胶质细胞的 SEM 成像进行比较, 显示出 AFM 对活细胞的成像分辨率与 SEM 对干燥细胞的成像分辨率一致, 表明了 AFM 在观测活细胞表面纳米形态上的独特优势。

由于 AFM 本身不具有特异性识别能力, 使得大部分情况下仅从 AFM 图像中还难以辨识出人们感兴趣的细胞精细结构, 因此研究人员大多通过将 AFM 与荧光显微术进行互补联用来精确识别细胞生理活动过程中精细结构变化。膜型 1 基质金属蛋白酶 (membrane type 1 matrix metalloproteinase, MT1-MMP) 是一种表达于癌细胞上的可降解肿瘤基质中基质的酶, 其表达水平的变化与癌症的侵袭转移密切相关^[29]。2011 年 Kirmse 等^[29]通过将转染 MT1-MMP 的人黑色素瘤 MV3 细胞系接种于覆盖有纤维胶原 I 型基质(对基质预先进行绿色荧光标记)的云母片上, 结合荧光共聚焦显微术和 AFM 对癌细胞降解胞外基质的过程进行了研究。荧光图像显示, 当 MV3 细胞(红色荧光染色)没有转染 MT1-MMP 时, 纤维胶原基质保持完整, 表明 MV3 细胞没有切割纤维胶原基质(图 3a), 而当转染 MT1-MMP 时则明显地可以观察到纤维胶原被切断(图 3c 中星号指示); AFM 图像(图 3b, d)则更清晰地揭示出细胞与单根纤维胶原接触时的结构变化情况(图 3d 中箭头指示了被细胞拉聚并切割的纤维胶原)。胞吐是一项重要的细胞生理活动。在胞吐过程中, 大分子物质先在细胞内形成囊泡, 囊泡随后移动到细胞膜处并与细胞膜结合, 将大分子物质排出细胞。传统的研究胞吐的方法基于光学显微镜, 无法直接在单个细胞表面观察到胞吐过程中细胞精细结构的变化情况。2012 年 Hecht 等^[56]将 AFM 与荧光显微术联用对单个肺泡 II 型细胞的胞吐过程进行了原位成像(图 3e~g)。肺泡 II 型细胞通过胞内的板层小体(lamellar bodies, LBs)分泌肺泡表面活性物质。激动剂 UTP/PMA 可诱导肺泡细胞内 LB 与细胞膜的融合。利用 UTP/PMA 刺激肺泡细胞 II 型细胞 15 min 后从荧光图像(图 3e)上可以观察到 LB 与细胞膜的融合, 而从 AFM 图像上则可以更加清晰地观察到细胞表面出现的凸起结构(图 3f 中圆圈指示), 通过与荧光图像对比可确认凸起结构为与细胞膜融合的 LB。生命活动过程的本质是动态的, 因此利用 AFM 对细胞生理活动过程进行纳米精度的实时成像对于揭示生命奥秘有着积极的意义。基于此, 我们利用 AFM 对人乳腺癌 MCF-7 细胞收缩运动过程中细胞伪足的动态变化

进行了连续成像^[57], 如图 3h 所示. 将生长有 MCF-7 细胞的培养皿从 CO₂ 培养箱中取出并置于 AFM 载物台后立即对 MCF-7 细胞的边缘部分进行连续成像. 连续成像结果(图 3h)显示, MCF-7 细胞从 37℃ 适应室温的过程中板状伪足不断向细胞中心区域收缩, 并出现很多丝状伪足(红色圆圈指示), 这些丝状伪足最后重组为一个新的板状伪足; 对运动前后细胞板状伪足厚度的测量结果表明板状

伪足的厚度在细胞收缩后显著增加, 为细胞运动提供了新的认识. 这些研究结果表明, AFM 与荧光显微术联用可以提供互补的信息, 使得我们可以精确识别细胞生理活动过程(如癌细胞侵袭转移、胞吐、细胞运动)中细胞精细结构的变化, 从而构建细胞生理活动过程中胞内信号通路 with 细胞超微结构变化之间的联系.

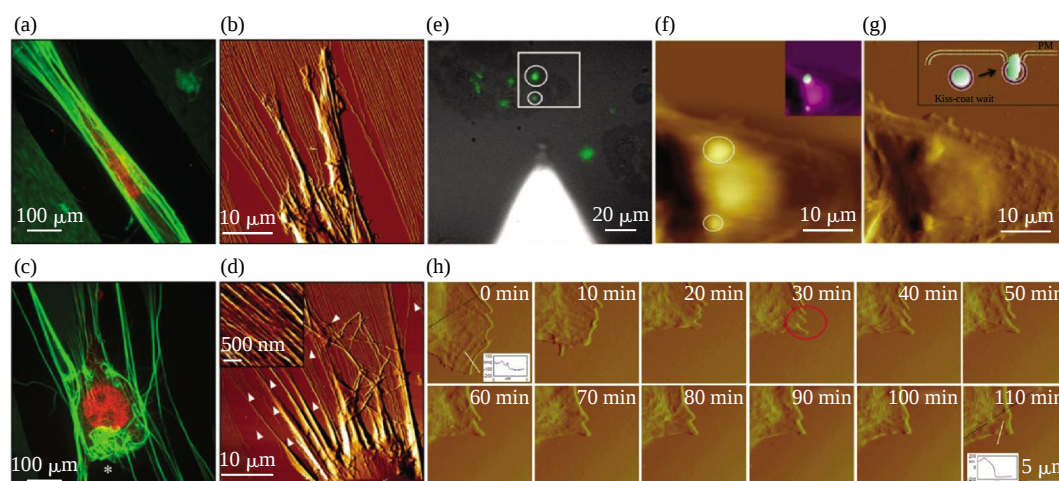


Fig. 3 *In situ* visualizing the physiological activities of adherent cells by AFM imaging^[29, 56-57]

图 3 贴壁细胞生理活动的原位 AFM 成像^[29, 56-57]

(a~d)癌细胞降解胞外基质的荧光与 AFM 成像. 未转染 MT1-MMP 蛋白酶(a, b)和转染 MT1-MMP 蛋白酶(c, d)的人黑色素瘤细胞的荧光共聚焦图(a, c)和 AFM 图(b, d). (e~g)肺泡 II 型细胞胞吐过程的荧光与 AFM 成像. (e)药物刺激后的肺泡 II 型细胞的光学明场和荧光叠加图. (f, g)肺泡 II 型细胞的 AFM 形貌图(f)和偏差图(g). (h) MCF-7 细胞收缩过程中板状伪足动态变化的 AFM 连续成像.

对于微生物细胞, 如细菌、酵母菌等, 由于它们自身不能贴壁生长, 通常采用微孔滤膜固定法或多聚赖氨酸静电吸附法^[58]将其固定. 微孔滤膜固定法是利用注射器推动细胞溶液透过微孔滤膜使得细胞被嵌于滤膜的微孔中, 然后利用双面胶将滤膜黏附于基底表面. 然而微孔滤膜固定法基于商品化的滤膜, 只能对尺寸与滤膜孔径相近的圆形微生物细胞进行固定, 无法对杆状细胞进行固定. 近年来, 研究人员提出了基于聚二甲基硅氧烷 (polydimethylsiloxane, PDMS) 材料制作的微坑阵列细胞固定方法^[59], 该方法首先在硅基底利用光刻蚀工艺加工出微柱阵列模具, 随后通过往模具浇灌液体 PDMS 并固化形成 PDMS 微坑阵列结构. 对 PDMS 芯片进行亲水性处理(如利用氧等离子清洗)后将微生物细胞悬浮液滴至芯片表面, 随后利用盖玻片拖曳细胞液滴使细胞在毛细力作用下嵌入微坑中, 实验结果表明了该方法可对细菌孢子、酵母菌等多种微生物细胞进行有效固定, 但是该方法仍然

无法用于杆状微生物细胞. 由于微生物细胞尺寸小, 且具有坚硬的细胞壁, 因此在基底覆盖多聚赖氨酸, 通过细胞与多聚赖氨酸之间的静电吸附作用, 可以有效地实现对微生物细胞的固定并进行 AFM 成像^[60-61]. 与微孔滤膜法相比, 多聚赖氨酸的优点是可用于圆形和杆状微生物细胞的固定, 但缺点是静电吸附作用可能会对细胞本身造成影响.

对于动物悬浮细胞来说, 微孔滤膜固定法并不适用, 因为动物悬浮细胞的尺寸比微生物细胞要大得多, 没有适合动物悬浮细胞尺寸的商品化微孔滤膜. 此外, 单纯的多聚赖氨酸吸附法也难以实现动物悬浮细胞的 AFM 成像, 因为动物悬浮细胞表面柔软(没有微生物细胞那样坚硬的细胞壁), 不能在基底上延展生长. 针对动物悬浮细胞, 研究人员提出了利用光刻蚀工艺加工的微坑芯片对细胞进行固定的方法^[62]. 虽然微坑可以在水平方向帮助细胞抵抗扫描探针的侧向力影响, 但在垂直方向上还缺少基底对细胞的牵引力, 因而在对细胞进行成像时,

细胞会在微坑内移动甚至还会被带出坑外, 导致该方法主要用于对细胞进行力学特性测试, 还难以用于细胞成像。

针对目前还缺乏对动物悬浮细胞 AFM 成像的有效固定方法, 我们提出了一种结合光刻蚀工艺加工的微柱阵列机械夹持和多聚赖氨酸静电吸附的细胞固定方法^[34-35]。首先利用 MEMS 光刻蚀工艺在硅基底加工出微柱阵列芯片(微柱高度为 5 μm , 直径为 10 μm , 间距为 10 μm), 在制作好的微柱基底覆盖一层多聚赖氨酸分子, 这样微柱可以在水平方向对细胞进行夹持, 而多聚赖氨酸则在垂直方向对细胞进行吸附, 对淋巴瘤 Raji 细胞的实验结果^[34]表明该方法可有效实现动物悬浮活细胞的固定, 并在此基础上得到淋巴瘤活细胞的整体(图 4a)及表面超微结构(图 4b)的 AFM 形貌图。基于结合微柱机械夹持和多聚赖氨酸静电吸附的固定, 观察了 rituximab 直接诱导淋巴瘤 Raji 细胞凋亡的 PCD 机制中细胞超微形貌变化^[35], AFM 成像结果(图 4c~f)表明, rituximab 刺激后细胞表面褶皱增加, 且随着 rituximab 刺激浓度的增加, 细胞表面出现明显的凸起结构(图 4f 中绿色箭头指示)。进一步利用

AFM 成像观察了 rituximab 的 CDC 和 ADCC 机制中细胞超微形貌的变化。利用含 rituximab 和人血清的培养基对淋巴瘤 Raji 细胞培养 2 h 后, 将离心收集的细胞悬浮液滴至覆盖有多聚赖氨酸的载玻片, 并利用 4% 多聚甲醛进行化学固定, 随后在 PBS 溶液中进行 AFM 成像。AFM 成像结果(图 4g~l)表明 rituximab 介导的 CDC 过程可分为 3 个阶段^[50]: a. 在细胞表面出现微孔(图 4g, h, 绿色箭头指示微孔), b. 细胞表面的微孔尺寸变大并导致细胞质的溢出(图 4i, j, 溢出的细胞质由红色箭头指示), c. 细胞质完全溢出细胞坍塌形成细胞膜碎片(图 4k, l)。通过将预先进行了荧光标记并覆盖有 rituximab 的淋巴瘤细胞与巨噬细胞共培养, 利用 AFM 成像观察了 rituximab 介导的巨噬细胞吞噬癌细胞 ADCC 机制中细胞超微形态的变化^[48]。AFM 成像结果(图 4m~r)显示, 巨噬细胞与癌细胞接触(图 4m, n)、巨噬细胞开始吞噬癌细胞(图 4o, p)以及巨噬细胞已经吞噬完一部分癌细胞(图 4q, r)的动态过程, 揭示出巨噬细胞和癌细胞之间接触区域的细节情况。这些结果清晰地显示了纳米尺度下 rituximab 的 3 种作用机制对淋巴瘤细胞形态的影响, 为理解

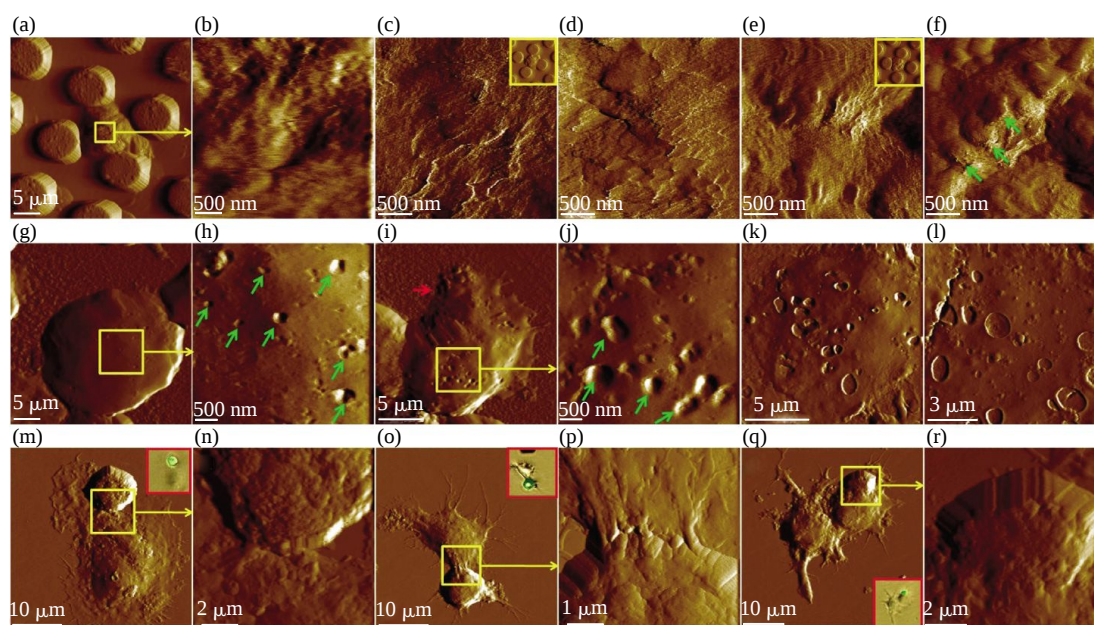


Fig. 4 Changes of cellular ultra-microstructures during the rituximab's three killing mechanisms visualized by AFM imaging ^[34-35, 48, 50]

图 4 Rituximab 三种作用机制过程中细胞表面超微形貌变化的 AFM 成像 ^[34-35, 48, 50]

(a, b) 基于微柱机械夹持和多聚赖氨酸静电吸附固定的淋巴瘤 Raji 细胞的整体(a)及表面局部区域(b) AFM 形貌图^[34]。(c~f) Rituximab 直接诱导 PCD 机制中淋巴瘤细胞表面超微形貌变化^[35]。0.2 g/L(c, d)和 0.5 g/L(e, f) rituximab 刺激前(c, e)和刺激 2 h 后(d, f)的 Raji 细胞表面同一局部区域成像。(c, e)中插图为细胞整体成像。(f)中绿色箭头指示细胞表面凸起结构。(g~l) Rituximab 介导的 CDC 机制中淋巴瘤细胞表面超微形貌变化^[50]。(h, j)中绿色箭头指示细胞表面出现微小孔洞, (i)中红色箭头指示细胞质溢出。(m~r) Rituximab 介导的巨噬细胞吞噬淋巴瘤细胞过程中细胞超微形态的变化^[48]。(m, o, q)中的红色方框插图为对应的荧光标记图像, 荧光指示了淋巴瘤细胞。

rituximab 对淋巴瘤细胞的杀伤作用提供了新的认识. 传统光学显微镜由于 200 nm 分辨率限制, 无法观察到细胞生理活动过程中精细结构的变化, AFM 则可以直观地揭示溶液环境下活细胞生理活动过程中或外部因素作用下(如药物刺激)细胞表面超微结构的变化, 这一方面丰富了人们对细胞生理活动行为的认识, 另一方面使得我们可以通过实时监测细胞超微形貌变化(如药物刺激后)来发展新型药物效能评价与预测方法.

4 AFM 细胞机械特性测量

AFM 在细胞生物学领域的另一个重要应用是测量细胞机械特性. 细胞自身的机械特性(如形变能力、黏附能力等^[63]) 在细胞生理活动中起着重要作用, 如在癌细胞转移过程中血液中的循环癌细胞需要首先黏附至血管内壁并抵挡血液流体剪切力的影响(依赖于细胞的黏附能力), 随后需要克服血管内皮细胞的挤压以穿过血管壁(依赖于细胞的形变能力)^[64], 因此只有具备合适机械特性的癌细胞才能发生转移. 2007 年 Suresh^[65]总结了细胞机械特性与癌变之间的关系, 指出细胞病理变化会导致细胞机械特性的变化, 进而诱导细胞功能发生改变(如基因表达、生存能力、运动能力), 最终引起癌症的发生. 因此研究细胞机械特性有助于认识癌症等重大疾病发生发展过程中的内在机理.

AFM 测量细胞机械特性研究的一个重要思路是鉴别癌细胞与其对应的正常细胞之间机械特性的差异. 1999 年 Lekka 等^[65]最早利用 AFM 测量并比较了癌细胞与正常细胞机械特性的差异, 结果表明正常膀胱细胞的杨氏模量($\sim 10\text{kPa}$)比膀胱癌细胞的杨氏模量大 10 倍. 2008 年 Li 等^[66]利用球型探针(通过将 $4.5\text{ }\mu\text{m}$ 直径聚苯乙烯微球修饰到悬臂梁上制成)分别测量了正常乳腺细胞和乳腺癌细胞的杨氏模量, 结果表明乳腺癌细胞的杨氏模量($0.3\sim 0.5\text{kPa}$)比正常乳腺细胞的杨氏模量($0.5\sim 1.1\text{kPa}$)要小 40%~55%. 这些结果表明了细胞癌变后其杨氏模量显著降低, 也证明了细胞机械特性作为用于区分癌细胞和正常细胞的新的免标记生物标志物的有效性. 随后人们进一步利用 AFM 研究细胞机械特性与癌细胞侵袭转移之间的关联. 2012 年 Xu 等^[67]利用球型探针分析了不同类型卵巢癌细胞及正常卵巢上皮细胞杨氏模量的差异, 结果显示卵巢癌细胞的杨氏模量要明显小于正常的卵巢上皮细胞, 同时结合细胞迁移和侵袭实验揭示出侵袭性

越强的癌细胞的杨氏模量越小, 表明了癌细胞机械特性与其侵袭迁移能力有着密切的联系. 2013 年 Zhou 等^[68]对不同侵袭类型的舌鳞状细胞癌细胞的机械特性进行了测量, 结果同样显示出侵袭性越强的癌细胞的杨氏模量越小. 2014 年 Efremov 等^[69]对成纤维细胞的研究结果也证明了癌细胞在获得侵袭能力的同时会伴有细胞杨氏模量显著减小. 我们利用球型探针对侵袭性淋巴瘤 Raji 细胞和惰性淋巴瘤 Hut 细胞杨氏模量的测量结果^[42]同样表明侵袭性癌细胞的杨氏模量明显小于惰性癌细胞的杨氏模量. 这些研究证明了细胞机械特性不仅可用于区分癌细胞和正常细胞, 还可用于指示癌细胞的侵袭转移能力. 然而需要指出的是, 这些研究均是在体外培养的细胞系上进行的, 在体外培养的细胞与人体内的细胞有着明显的结构和功能上的差异, 因此这些结论(如癌细胞比正常细胞要软、侵袭性越强的癌细胞越软)是否在人体内环境下依然成立还不清楚.

为了分析人体内真实环境下癌细胞与正常细胞机械特性之间的差异, 研究人员开始利用 AFM 直接对从病人体内获取的癌细胞进行探测. 2007 年 Cross 等^[70]通过收集临床不同癌症患者(非小细胞肺癌、乳腺导管癌、胰腺癌)体腔液样本并提取出样本中的癌细胞, 同时提取健康志愿者的体腔液样本作为对照, 利用 AFM 分别测量了癌症患者体内癌细胞和正常细胞的杨氏模量, 统计结果显示癌细胞的杨氏模量($\sim 0.5\text{kPa}$)显著小于正常细胞的杨氏模量($\sim 2\text{kPa}$). 2012 年 Lekka 等^[71]利用 AFM 对癌症组织和正常组织的机械特性进行了测量, 揭示出癌症组织的杨氏模量要小于正常组织的杨氏模量. 2012 年 Plodinec 等^[72]进一步研究了良性肿瘤组织和恶性肿瘤组织机械特性的差异, 对临床制备的三种活检乳腺组织(正常乳腺组织、良性乳腺肿瘤、恶性乳腺肿瘤)的机械特性进行了测量, 结果表明, 在乳腺癌的不同阶段(正常组织、良性肿瘤、恶性肿瘤)癌细胞的硬度图谱存在着显著的差异: 正常和良性乳腺肿瘤硬度呈现单一峰分布, 而恶性乳腺肿瘤硬度则呈现多峰分布且硬度显著降低. 这些结果表明在人体内癌细胞/组织比正常细胞/组织要柔软, 与在体外细胞系上获得的研究结果一致, 同时也证明了细胞机械特性不仅可用于区分癌症组织和正常组织, 还能区分良性肿瘤和恶性肿瘤. 由于这些研究采用的是临床制备的活检样本, 因而能较好地反映人体内的真实情况, 同时这些结果为将来发展基于细胞机械特性的新型癌症诊断方法提供了

概念验证,因而具有显著的临床转化医学意义.但是需要指出的是这些研究虽然是直接对提取自病人体内的癌细胞进行测量,但测量过程是在体外进行的,因此仍然不能完全反映人体内真实情况.2009年 Mao 等^[73]通过将 AFM 与手术操作相结合直接在活体老鼠上对老鼠血管的机械特性进行了测量,并对药物诱导的血管舒张和收缩过程中血管机械特性的实时变化进行了监测,为研究 *in vivo* 环境下生物系统纳米机械特性的动态变化提供了新的思路.

为了研究细胞机械特性在 rituximab 杀伤机制中的作用,我们利用 AFM 压痕技术对 rituximab 三种机制作用过程中相关细胞机械特性变化进行了定量测量^[33-34, 48, 50, 74],如图 5 所示.图 5a 为在活细胞表面获取的一条典型力曲线,其中红色曲线为逼近曲线,蓝色曲线为回退曲线.根据逼近曲线上的接触点,将逼近曲线转化为压痕曲线并应用 Hertz 模型对压痕曲线进行拟合得到细胞杨氏模量.图 5a 插图显示压痕曲线和 Hertz 拟合曲线的对比,可以看到二者吻合,表明了 Hertz 模型用于描述 AFM 针尖与细胞接触并产生压痕过程的有效性.通过测量

rituximab 作用前后淋巴瘤 Raji 细胞的杨氏模量并结合 AO/EB 双荧光染色,结果显示 rituximab 直接诱导 Raji 细胞凋亡的 PCD 机制过程中会导致细胞杨氏模量减小^[33-34].对 rituximab 介导的 CDC 机制作用过程中三种情况下(分别是未进行 rituximab 和人血清处理、rituximab 和人血清处理后无 CDC 效果、rituximab 和人血清处理后有 CDC 效果)Raji 细胞的杨氏模量进行了测量,结果表明在 CDC 作用过程中 Raji 细胞杨氏模量呈现先减小后增加的趋势(图 5b).为了识别具有 CDC 效应的 Raji 细胞,对 rituximab 和人血清处理后的细胞进行 PI 染色,如图 5b 插图所示.经过 rituximab 和人血清处理后有 CDC 效果的细胞会被 PI 分子染成红色,从而在荧光引导下控制探针移动到细胞表面.对单个 Raji 细胞在 CDC 过程中杨氏模量的变化进行了动态测量,结果同样显示在 rituximab 和人血清处理后(60 min 加入)细胞呈现先变软后变硬的趋势(图 5c).在 rituximab 介导的巨噬细胞吞噬淋巴瘤细胞的 ADCC 机制过程中,细胞机械特性测量结果表明吞噬淋巴瘤细胞后巨噬细胞的杨氏模量增加(图 5d).这些结果分

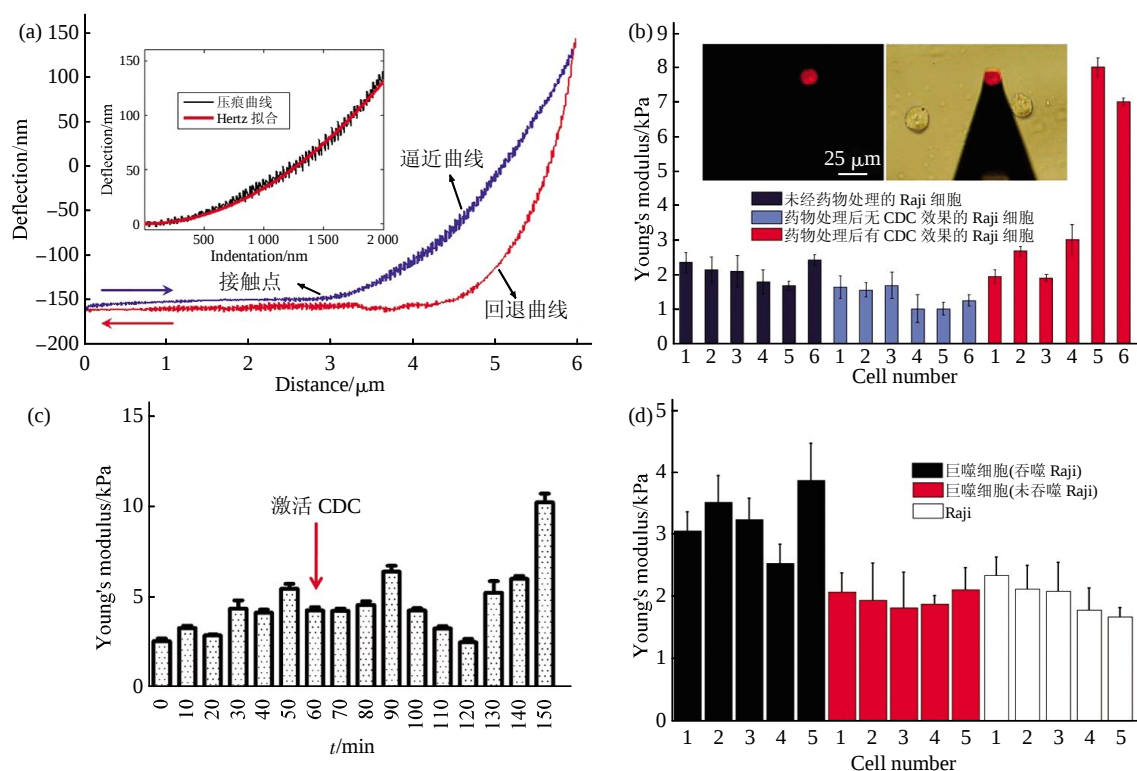


Fig. 5 Changes of cellular mechanical properties during rituximab's killing mechanisms quantified by AFM ^[48, 50, 74]

图 5 Rituximab 作用机制过程中细胞机械特性变化的 AFM 测量^[48, 50, 74]

(a) 活细胞表面获取的力曲线^[74]. 插图显示压痕曲线的 Hertz 模型拟合. (b) Rituximab 介导的 CDC 机制中淋巴瘤细胞杨氏模量变化^[50]. 插图为通过荧光染色识别出具有 CDC 效应的细胞, 控制 AFM 探针移动到细胞表面进行探测. (c) CDC 过程中淋巴瘤细胞杨氏模量的连续测量^[50]. 红色箭头指示加入 rituximab 和人血清以激活 CDC 机制. (d) Rituximab 介导的巨噬细胞吞噬淋巴瘤细胞的 ADCC 机制作用过程中巨噬细胞杨氏模量的变化^[48].

别揭示了 rituximab 三种作用机制过程中淋巴瘤细胞以及效应细胞机械特性的变化规律, 表明了细胞机械特性对于 rituximab 作用过程的指示作用, 其实际意义在于可以通过监测细胞机械特性变化来发展新型药物评价方法。

5 细胞动态活动的高速 AFM 成像

生命活动的本质是动态的, 如细胞表面分布有各种生物分子, 这些分子并非独立作业而是在细胞表面的微米 / 纳米区域内与其他分子不断地进行组装、结合、解离等反应来完成细胞的各种特定功能^[75]。然而细胞表面起伏不平的形貌导致传统 AFM 获取一幅高分辨率活细胞图像的时间需要数分钟, 这远大于大多数细胞生理活动所需的时间^[28], 因此提高 AFM 成像速度以实现细胞分子活动的实时观察是 AFM 成像需要解决的问题。可喜的是近年来高速 AFM 成像研究取得了突破性的进展, 使得我们可以实时探索微小时间尺度(如秒级、亚秒级^[76])下的细胞分子生理活动。高速 AFM 的基本结构与常规 AFM 一致, 其区别在于高速 AFM 通过对一系列组成部件进行优化来实现高速扫描成像, 如采用更小的悬臂梁(长 6 μm , 宽 2 μm , 厚 90 nm), 基于角度的光束偏转检测器、快速振幅检测器、高速扫描头、动态 PID 控制、以及基于二阶振幅检测的温漂补偿系统等^[77-78]。为简单起见, 假定样品表面为褶皱形貌, 且可用周期为 λ 的正弦波表示, 则高速扫描 AFM 的最大成像速度 $R_{\max}$ 可用公式表示为^[76]:

$$R_{\max} = \frac{2\lambda\theta_{\max}f_B}{\pi NW} \quad (4)$$

其中 λ 为样品表面褶皱形貌的变化周期, $\theta_{\max}$ 为最大允许相位时延, f_B 为反馈带宽, N 为扫描线条数, W 为 x 方向的扫描范围, f_B 取决于样本高度以及悬臂梁自由振幅。在对高度为 1~5 nm 的蛋白质分子进行成像时 f_B 通常为 ~100 kHz, $\theta_{\max}$ 通常为 $\pi/9$ 。于是对于扫描范围 150 nm, 扫描线为 100, λ 为 10 nm 时, 则 $R_{\max}$ 为 14.8 帧 / 秒。高速 AFM 在对分离纯化的蛋白质分子动态成像方面(通过将蛋白质分子吸附到平整的基底表面如云母)取得了极大的成功(这是因为蛋白质分子尺寸小, 且云母表面光滑), 直观地揭示出亚秒时间尺度下单分子动态活动过程, 如肌球蛋白 V 分子滑行^[79]、马达蛋白旋转^[80]、抗体分子运动^[81]等, 为单分子动态生理

活动行为提供了新的认识。然而需要指出的是, 尽管包括这些生理活动在内的很多动态生物现象可以从单纯分子尺度进行研究, 但人们往往更希望能直接在细胞尺度对这些动态生物现象进行研究。在细胞尺度对动态生物现象进行研究可以确保被探测分子的原位性, 同时还可以研究被探测分子与细胞上其他分子之间的相互作用^[82]。

与动物细胞相比, 微生物细胞的尺寸较小、具有坚硬的细胞壁, 因而被研究人员首选为高速 AFM 的实验对象, 并在过去的几年中取得了显著的进展。2010 年 Fantner 等^[60]通过采用小悬臂梁, 并对光束偏转检测系统进行改进, 实现了对药物刺激后大肠杆菌细胞表面结构动态变化的连续快速成像(成像间隔为 13 s), 直观地显示出抗菌剂作用后使得细胞表面由光滑状变为褶皱状, 如图 6a 所示。需要指出的是 13 s 获取一幅图像的速度还不够快, 与在提纯蛋白质分子上获取的亚秒级成像速度^[80]相比还有着较大的差距。2012 年 Yamashita 等^[83]实现了对活性趋磁细菌细胞表面单个分子的高速扫描成像(成像速度提升为 0.5 秒 / 帧), 结果显示, 细菌外膜呈现网状结构的形貌并有粒子在膜表面进行快速扩散运动。应用于提纯蛋白质分子成像的高速 AFM 扫描头在 x 和 y 方向的最大扫描范围分别为 1 μm 和 4 μm , 这使得其难以观察更大尺寸的样本, 如活细胞^[84]。为了对动物细胞进行成像, 2013 年 Watanabe 等^[84]发展了大范围(46 $\mu\text{m} \times 46 \mu\text{m}$)扫描头并实现了对单个 HeLa 细胞内吞作用的连续快速成像(成像速度为 5 s), 如图 6b 所示。图 6b 中虚线圆圈指示 HeLa 细胞在内吞颗粒时细胞膜上形成的 2 个纳米坑, 随着时间的增加, 这 2 个纳米坑逐渐消失。2013 年 Colom 等^[85]发展了结合光学显微镜和高速 AFM 的联合成像系统, 并应用该系统对透镜状细胞表面单个分子的动态活动进行了连续成像(成像间隔为 1 s), 揭示出透镜状细胞表面纳米区域内单个 AQP0 分子的动态组装活动, 如图 6c 的 3.84 s 和 4.80 s 这两幅图像中箭头指示区域。这些研究证明了高速 AFM 用于观察单个活细胞表面生理活动的可行性, 为细胞 / 分子生物学带来了新的认识, 但是目前高速 AFM 还仅能在相对坚硬的细菌细胞以及特定真核细胞(如透镜状细胞)实现单分子原位成像^[25], 如何对更多类型活细胞(尤其是动物细胞)进行单分子快速扫描成像成为高速 AFM 面临的问题。

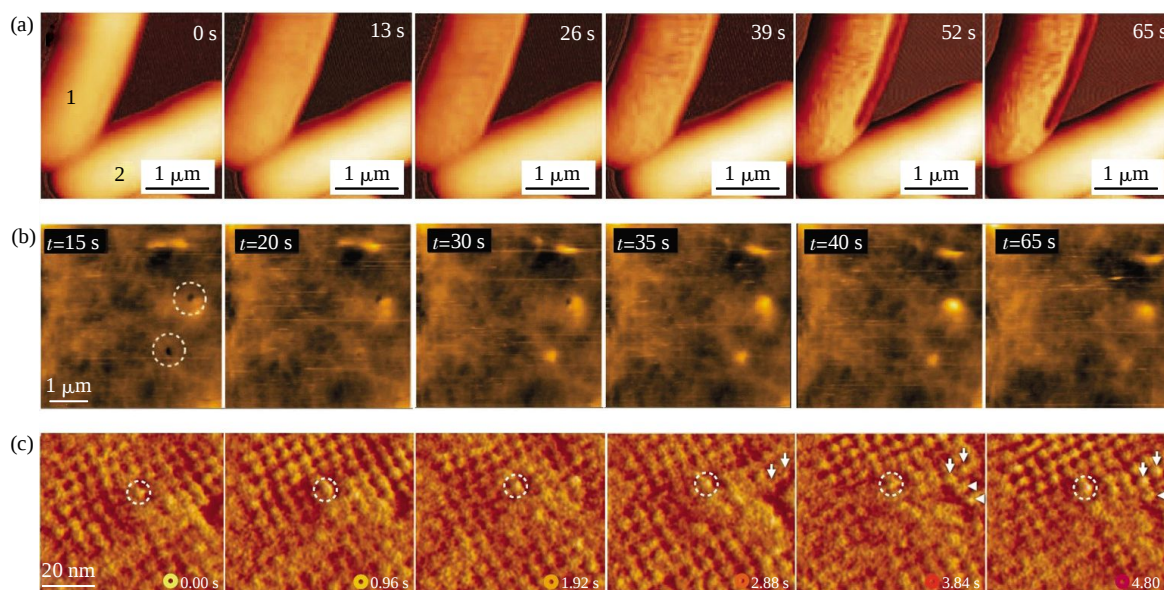


Fig. 6 Visualizing the physiological activities of single cells by high-speed AFM imaging^[60, 84-85]

图 6 单细胞生理活动的高速 AFM 连续成像^[60, 84-85]

(a)药物刺激大肠杆菌细胞后的连续成像^[60]. (b)HeLa 细胞内吞作用过程的连续成像^[84]. (c)透镜状细胞表面单个蛋白质分子的连续成像^[85].

6 多参数 AFM 成像

当前应用 AFM 压痕技术测量细胞机械特性时需要获取的大量力曲线进行离线处理, 导致其效率低下. 为了提高 AFM 实验效率, 近年来出现了一种新的成像模式, 即峰值力轻敲模式(peak force tapping, PFT)^[26]. 在 PFT 模式下, 振动针尖(振动频率远小于悬臂梁的共振频率)在每个采样点记录力曲线. 通过实时分析力曲线的不同部分, 即可同时得到多个反应样本物理化学特性的参数(如形貌、杨氏模量、黏附力、形变、能量耗散等): 通过分析回退曲线可以得到杨氏模量和黏附力, 通过分析逼近曲线可以得到形变信息, 通过分析逼近曲线和回退曲线之间所夹的区域可以得到能量耗散信息^[86]. 我们知道, 普通轻敲模式通过控制针尖与样本间歇接触减小了探针侧向力对样本的影响, 但普通轻敲模式的振动频率约为探针的共振频率, 导致针尖与样本之间的作用力较大, 而 PFT 模式的探针振动频率远小于其共振频率(溶液下 PFT 振动频率 <2kHz, 而溶液下探针的共振频率通常 >10kHz), 因而与普通轻敲模式相比, PFT 模式显著减小了针尖与样本之间的作用力, 这对于无损探测生物活性样本(如活细胞)有着积极的意义. 需要注意的是, 在利用

PFT 模式同时获取生物样本的多个参数时, 需要对探针的参数(如偏转灵敏度、探针弹性系数、针尖半径)进行校正. 偏转灵敏度可以通过在坚硬的基底获取力曲线进行校正, 弹性系数可以通过 AFM 的 Thermal Tune 模块进行校正, 而针尖半径则可以通过扫描多孔标准样本进行校正. 进行参数校正后还需要对已知样本(如已知杨氏模量的样本)进行成像以进一步精确校正参数, 确保探测结果的准确性. 此外, 为了减少成像过程对针尖的磨损, 在实验中需要控制成像的范围以及速度. PFT 模式在探测提纯蛋白质分子的物理化学特性(如机械特性^[87]、电学特性^[88]、结合位点^[89])上取得了显著的成功, 使得我们可以直观地将纳米尺度下单个蛋白分子的 AFM 形貌信息与其物理化学特性相关联, 这对于认识蛋白质分子的结构和功能有着重要的意义. 将提纯的蛋白质分子吸附到云母表面进行研究时, 由于云母表面光滑平整, 且提纯后重组的蛋白质在人工膜上分布均匀、形状规则^[88], 使得扫描成像时的背景噪声很低, 因而便于进行 PFT 扫描成像. 但当应用于更复杂的样本(如活细胞)时, 细胞表面的复杂性(柔软、尺寸大、结构异质)使得 PFT 成像变得困难, 需要对探针与细胞之间的作用力进行精确控制以避免造成对细胞的损伤. 近年来研究人员开始应用 PFT 成像模式研究细胞的物理化学特性.

2012 年 Heu 等^[86]应用 PFT 成像模式同步观测了草甘膦(一种除草剂)作用下 HaCaT 表皮角化细胞超微形貌和机械特性的变化, 结果表明草甘膦作用后 HaCaT 细胞表面出现细丝状结构且细胞硬度显著增加. 2015 年 Eghiaian 等^[90]利用 PFT 成像模式研究了活体成纤维细胞表面肌动蛋白皮层的形貌及机械特性, 结果显示出肌动蛋白丝的两种排列结构, 分别是长束状(10 μm)松散结构和网格状短小紧致(<1 μm)结构, 这两种结构的不同组合导致了成纤维细胞机械特性和动力学行为的异质性. 这些研究表明, PFT 目前不仅可用于提纯的蛋白质分子还可对活细胞进行多参数观测, 便于人们分析所获取的各个参数之间的关联, 从而有助于全面认识细胞的生理特性. 然而需要指出的是目前能够成功进行 PFT 扫描成像的细胞种类还不多, 特别是对于动物悬浮细胞来说, 由于其不能贴壁生长且表面柔软, 导致在应用 PFT 模式对其进行成像时获取的力曲线往往不规则, 从而给结果的解释带来困难.

7 总结与展望

AFM 的出现为纳米尺度下原位可视化表征细胞表面超微形貌及定量分析细胞机械特性提供了新的技术方法, AFM 所具有的独特优势使得其在过去的数十年中在生命科学领域得到了广泛应用, 为单细胞生理活动行为及相关疾病(如癌症)带来了大量新的认识, 已成为细胞 / 分子生物学的重要研究手段. 利用 AFM 对活细胞超微成像是其在生物学上的最基本应用, 可以揭示出细胞生理活动过程中表面超微形貌的变化. AFM 的理想成像条件是样品相对探针的位置保持不变, 然而活细胞(微生物细胞除外)表面十分柔软且细胞膜处于动态运动之中, 这导致细胞表面与探针接触后容易产生形变, 进而影响到 AFM 成像的分辨率, 基于此目前在动物活细胞表面的极限成像分辨率为 50 nm, 尚无法实现对动物活细胞表面单个分子的成像^[28, 33]. 为了提高 AFM 对动物活细胞的成像分辨率, 一方面可以发展新型固定方法对细胞膜的运动进行抑制, 如可以设计加工出含有孔洞(直径~100 nm)的薄膜^[78, 91], 这样被薄膜孔洞夹持的细胞部分将较为坚硬, 从而便于获取高分辨率 AFM 图像, 另一方面可以对 AFM 成像方式进行改进, 如受扫描离子电导显微镜(scanning ion conductance microscopy, SICM)的启发可以发展非接触 AFM 扫描成像模式^[92], 该成像模式由于不与细胞接触因此将有望提高 AFM 对

活细胞的成像分辨率. 此外, 样本表面硬度与其尺寸有着直接的联系, 因此作为可选的策略可以从细胞内提取出细胞器(如线粒体^[93]、高尔基体)进行研究, 这将可能实现对这些细胞器表面单分子动态生理活动的观测^[25]. 利用 AFM 对细胞机械特性进行测量(特别是对临床癌症患者的活检细胞 / 组织进行探测^[70-72])在过去的 10 年中取得了显著的成果, 从生物力学方面给癌症的发生发展机制带来了大量新的认识, 为发展基于细胞机械特性检测的癌症诊治新方法提供了实验基础. 然而目前 AFM 机械特性测量存在的主要问题是: a. 吞吐量低(low throughput)^[8, 94]. 当前利用 AFM 测量细胞机械特性时, 首先在光学显微镜引导下人工控制探针移动到细胞, 随后在细胞表面获取力曲线, 待测量结束后人工移动探针到下一个细胞继续测量, 这种完全依赖于人工的测量过程导致实验效率十分低下: 一次仅能测量一个细胞, 而测量一个细胞往往需要数分钟. 而在实际应用中为了得到具有统计学意义的数据, 往往需要对大量细胞进行测量, 这将导致庞大的工作量, 使得在有限时间内获得的数据有限, 成为阻碍 AFM 细胞机械特性实际应用的重要因素^[95]. 为了提高 AFM 机械特性测量的实验效率, 一方面可以引入自动化技术以减少人工的参与, 如可以利用图像检测技术识别出视场中的细胞并控制样本台运动以实现对细胞机械特性的自动化测量^[96]; 另一方面可以联合其他生化技术手段以确定比较典型的细胞, 对典型细胞进行测量将可有效提升工作效率^[97]. b. 目前对细胞机械特性测量结果的解释还存在困难^[94]. 在压痕实验过程中, 探针先后与细胞膜、细胞骨架、细胞核等不同细胞部位接触, 这导致获取的力曲线中包含了探针与细胞不同部位接触的情况, 但实际过程中采用的理论模型(如 Hertz 模型)假定细胞为均质体, 使得对实验曲线拟合得到的杨氏模量为压痕过程中的平均值, 导致对于细胞各部位所得到的细胞杨氏模量的贡献仍不清楚. c. 细胞除了具有弹性特性外, 还具有黏性. 在细胞内部, 细胞质的水凝胶特性, 细胞骨架蛋白的异质性, 细胞核和其他细胞器的存在等均影响着细胞的机械特性^[98]. 因此仅通过测量细胞杨氏模量还难以完全表征细胞的黏弹特性. 目前通常通过控制探针在细胞表面进行应力 - 松弛实验来测量细胞黏弹特性, 即首先控制探针快速在细胞表面产生压痕, 随后保持探针垂直方向位置不变并维持一段时间, 记录这个过程中悬臂梁变化量随时间的变化曲线

(即得到力-时间曲线),对曲线进行拟合即可得到能反映细胞黏弹特性的参数^[99]。但目前利用 AFM 对细胞黏弹特性进行的研究还相对较少,细胞黏弹特性测量的生物医学意义还有待进一步研究。

在应用 AFM 研究生物学问题的实践中,针对常规 AFM 存在的速度慢、效率低等不足,研究人员不断对 AFM 的功能进行改进和提高,并在近年来取得了显著的进展,如高速 AFM 使得人们可以实时观察亚秒时间尺度下的细胞分子活动行为^[79-81],而多参数 AFM 成像模式则使得人们可以将细胞/分子的形貌结构信息与其物理化学特性相关联^[86-90],极大地提升了 AFM 研究生物学问题的潜能。但需要指出的是这两种新技术目前还主要适用于提纯的蛋白质分子以及具有坚硬外壳的微生物细胞,对于动物细胞尤其是动物悬浮细胞来说,细胞的复杂性(柔软、尺寸大、细胞膜的动态性、表面组分的异质性)使得应用这两种技术时则还存在着严峻的挑战^[25],这需要来自包括物理学、工程学、生物学等在内的多个学科领域的研究人员共同解决。过去数十年中 AFM 在纳米尺度下细胞/分子生理活动原位探测上取得的成绩显示出其所具有的强大生命力,这一方面在于其本身所拥有的独特优势,另一方面还在于 AFM 可以与多种其他细胞检测技术进行联合使用,以此来得到互补的信息,从而提升 AFM 的检测能力。AFM 本身不具有特异性,通常将 AFM 与光学/荧光显微镜联用,通过光学形态观察或荧光标记来识别出感兴趣的细胞(如临床病例活检样本中的癌细胞^[100]),从而控制探针移动到感兴趣细胞上进行 AFM 探测。AFM 无法检测细胞膜表面离子通道的电流信息,而膜片钳技术无法实现对单个离子通道的机械刺激,我们通过构建 AFM-膜片钳一体化检测平台^[101],实现了对细胞表面超微机械刺激和离子通道电流的同步检测,为机械门控离子通道提供了新的认识。此外,Meister 等^[102]将 AFM 与纳流控技术相结合,通过将纳米管道整合到 AFM 探针上,实现了对单个细胞的药物递送,使得人们可以对细胞进行精确的药物刺激。总之,AFM 在原位表征和定量分析纳米尺度下单细胞生理特性上获得了极大的成功,但仍有很多问题有待解决,解决这些问题将进一步提升 AFM 的功能,同时随着 AFM 在生命科学领域的不断应用也将带来更多新的认识。

参 考 文 献

- [1] Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011, **144**(5): 646-674
- [2] Singh D, Chan J M, Zoppoli P, *et al.* Transforming fusions of FGFR and TACC genes in human glioblastoma. *Science*, 2012, **337**(6099): 1231-1235
- [3] Burrell R A, McGranahan N, Bartek J, *et al.* The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature*, 2013, **501**(7467): 338-345
- [4] Tanenbaum M E, Gilbert L A, Qi L S, *et al.* A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. *Cell*, 2014, **159**(3): 635-646
- [5] Ma D, Lu P, Yan C, *et al.* Structure and mechanism of a glutamate-GABA antiporter. *Nature*, 2012, **483**(7391): 632-636
- [6] Wei C, Wang X, Chen M, *et al.* Calcium flickers steer cell migration. *Nature*, 2009, **457**(7231): 901-905
- [7] Yu X, Xu D, Cheng Q. Label-free detection methods for protein microarrays. *Proteomics*, 2006, **6**(20): 5493-5503
- [8] Carlo D D. A mechanical biomarker of cell state in medicine. *J Lab Autom*, 2012, **17**(1): 32-42
- [9] Zheng Y, Nguyen J, Wei Y, *et al.* Recent advances in microfluidic techniques for single-cell biophysical characterization. *Lab Chip*, 2013, **13**(13): 2464-2483
- [10] Rees D C, Williams T N, Gladwin M T. Sickle-cell disease. *Lancet*, 2010, **376**(9757): 2018-2031
- [11] Lee G Y H, Lim C T. Biomechanics approaches to studying human diseases. *Trends Biotechnol*, 2007, **25**(3): 111-118
- [12] Gossett D R, Tse H T K, Lee S A, *et al.* Hydrodynamic stretching of single cells for large population mechanical phenotyping. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(20): 7630-7635
- [13] Binnig G, Quate C F, Gerber C. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett*, 1986, **56**(9): 930-933
- [14] Hinterdorfer P, Dufrene Y F. Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy. *Nat Methods*, 2006, **3**(5): 347-355
- [15] Muller D J, Dufrene Y F. Atomic force microscopy as a multifunctional molecular toolbox in nanobiotechnology. *Nat Nanotechnol*, 2008, **3**(5): 261-269
- [16] Neuman K, Nagy A. Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nat Methods*, 2008, **5**(6): 491-505
- [17] Liu B, Chen W, Evavold B D, *et al.* Accumulation of dynamic catch bonds between TCR and agonist peptide-MHC triggers T cell signaling. *Cell*, 2014, **157**(2): 357-368
- [18] Dupres V, Alsteens D, Andre G, *et al.* Fishing single molecules on live cells. *Nano Today*, 2009, **4**(3): 262-268.
- [19] Eghiaian F, Rigato A, Scheuring S. Structural, mechanical, and dynamical variability of the actin cortex in living cells. *Biophys J*, 2015, **108**(6): 1330-1340
- [20] Zimmer C C, Liu Y X, Morgan J T, *et al.* New approach to

- investigate the cytotoxicity of nanomaterials using single cell mechanics. *J Phys Chem B*, 2014, **118**(5): 1246–1255
- [21] Bippes C A, Muller D J. High-resolution atomic force microscopy and spectroscopy of native membrane proteins. *Rep Prog Phys*, 2011, **74**(8): 086601
- [22] Alonso-Sarduy L, Longo G, Dietler G, *et al.* Time-lapse AFM imaging of DNA conformational changes induced by Daunorubicin. *Nano Lett*, 2013, **13**(11): 5679–5684
- [23] Li M, Liu L, Xi N, *et al.* Progress in measuring biophysical properties of membrane proteins with AFM single-molecule force spectroscopy. *Chin Sci Bull*, 2014, **59**(22): 2717–2725
- [24] Te Riet J, Helenius J, Strohmeyer N, *et al.* Dynamic coupling of ALCAM to the actin cortex strengthens cell adhesion to CD6. *J Cell Sci*, 2014, **127**(7): 1595–1606
- [25] Ando T. High-speed AFM imaging. *Curr Opin Struct Biol*, 2014, **28**: 63–68
- [26] Dufrene Y F, Martinez-Martin D, Medalsy I, *et al.* Multiparametric imaging of biological systems by force-distance curve-based AFM. *Nat Methods*, 2013, **10**(9): 847–854
- [27] Garcia R, Herruzo E T. The emergence of multifrequency force microscopy. *Nat Nanotechnol*, 2012, **7**(4): 217–226
- [28] Muller D J, Dufrene Y F. Atomic force microscopy: a nanoscopic window on the cell surface. *Trends Cell Biol*, 2011, **21**(8): 461–469
- [29] Kirmse R, Otto H, Ludwig T. Interdependency of cell adhesion, force generation and extracellular proteolysis in matrix remodeling. *J Cell Sci*, 2011, **124**(11): 1857–1866
- [30] Wildling L, Rankl C, Haselgrubler T, *et al.* Probing binding pocket of serotonin transporter by single molecular force spectroscopy on living cells. *J Biol Chem*, 2012, **287**(1): 105–113
- [31] Kowal J, Chami M, Baumgartner P, *et al.* Ligand-induced structural changes in the cyclic nucleotide-modulated potassium channel MloK1. *Nat Commun*, 2014, **5**: 3106
- [32] Liu L N, Scheuring S. Investigation of photosynthetic membrane structure using atomic force microscopy. *Trends Plant Sci*, 2013, **18**(5): 277–286
- [33] Li M, Liu L, Xi N, *et al.* Progress of AFM single-cell and single-molecule morphology imaging. *Chin Sci Bull*, 2013, **58**(26): 3177–3182
- [34] Li M, Liu L, Xi N, *et al.* Imaging and measuring the rituximab-induced changes of mechanical properties in B-lymphoma cells using atomic force microscopy. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, **404**(2): 689–694
- [35] Li M, Liu L, Xi N, *et al.* Drug-induced changes of topography and elasticity in living B lymphoma cells based on atomic force microscopy. *Acta Phys Chim Sin*, 2012, **28**(6): 1502–1508
- [36] Domke J, Dannohl S, Parak W J, *et al.* Substrate dependent differences in morphology and elasticity of living osteoblasts investigated by atomic force microscopy. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2000, **19**(4): 367–379
- [37] 陈佩佩, 董宏涛, 陈 龙, 等. 原子力显微术用于活细胞及新鲜组织成像的新进展. *科学通报*, 2009, **54**(14): 2027–2032
- Chen P P, Dong H T, Chen L, *et al.* *Chin Sci Bull*, 2009, **54**(14): 2410–2415
- [38] Kasas S, Longo G, Dietler G. Mechanical properties of biological specimens explored by atomic force microscopy. *J Phys D Appl Phys*, 2013, **46**(13): 133001
- [39] Butt H J, Cappella B, Kappl M. Force measurements with the atomic force microscope: technique, interpretation and applications. *Surf Sci Rep*, 2005, **59**: 1–152
- [40] Stolz M, Raiteri R, Daniels A U, *et al.* Dynamic elastic modulus of porcine articular cartilage determined at two different levels of tissue organization by indentation-type atomic force microscopy. *Biophys J*, 2004, **86**(5): 3269–3283
- [41] Martens J C, Radmacher M. Softening of the actin cytoskeleton by inhibition of myosin II. *Pflugers Arch Eur J Physiol*, 2008, **456**(1): 95–100
- [42] Li M, Liu L, 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**(11): 968–973
- [43] Hutter J L, Bechhoefer J. Calibration of atomic-force microscope tips. *Rev Sci Instrum*, 1993, **64**(7): 1868–1873
- [44] 胡 政, 周桂生, 周光飏. 肿瘤的分子靶向治疗. *中国医药生物技术*, 2010, **5**(5): 335–341
- Hu Z, Zhou G, Zhou G. *Chin Med Biotechnol*, 2010, **5**(5): 335–341
- [45] Cheson B D, Leonard J P. Monoclonal antibody therapy for B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*, 2008, **359**(6): 613–626
- [46] 李 密, 刘连庆, 席 宁, 等. 基于 AFM 的淋巴瘤细胞成像及其机械特性测定. *科学通报*, 2010, **55**(22): 2188–2196
- Li M, Liu L, Xi N, *et al.* *Chinese Sci Bull*, 2010, **55** (22): 2188–2196
- [47] Li M, Liu L, Xi N, *et al.* Imaging and measuring the biophysical properties of Fc gamma receptors on single macrophages using atomic force microscopy. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, **438**(4): 709–714
- [48] Li M, Liu L, Xi N, *et al.* Nanoscale imaging and mechanical analysis of Fc receptor-mediated macrophage phagocytosis against cancer cells. *Langmuir*, 2014, **30**(6): 1609–1621
- [49] Li M, Xiao X, Zhang W, *et al.* AFM analysis of the multiple types of molecular interactions involved in rituximab lymphoma therapy on patient tumor cells and NK cells. *Cell Immunol*, 2014, **290**(2): 233–244
- [50] Li M, Liu L, Xi N, *et al.* Quantitative analysis of drug-induced complement-mediated cytotoxic effect on single tumor cells using atomic force microscopy and fluorescence microscopy. *IEEE Trans Nanobiosci*, 2015, **14**(1): 84–94
- [51] 陈晓爱, 周艳芳, 邓宇斌. 聚乙二醇-聚乙烯亚胺纳米微囊介导质粒转染骨髓间质干细胞. *中国科学: 生命科学*, 2010, **40**(8): 694–703
- Chen X, Zhou Y, Deng Y. *Scientia Sinica Vitae*, 2010, **40** (8): 694–703
- [52] Gudzenko T, Franz C M. Inverting adherent cells for visualizing ECM interactions at the basal cell side. *Ultramicroscopy*, 2013, **128**: 1–9
- [53] Hu M, Wang J, Zhao H, *et al.* Nanostructure and nanomechanics

- analysis of lymphocyte using AFM: from resting, activated to apoptosis. *J Biomech*, 2009, **42**(10): 1513–1519
- [54] Duman M, Pflieger M, Zhu R, *et al.* Improved localization of cellular membrane receptors using combined fluorescence microscopy and simultaneous topography and recognition imaging. *Nanotechnology*, 2010, **21**(11): 115504
- [55] Ge G, Han D, Lin D, *et al.* MAC mode atomic force microscopy studies of living samples, ranging from cells to fresh tissue. *Ultramicroscopy*, 2007, **107**(4–5): 299–307
- [56] Hecht E, Thompson K, Frick M, *et al.* Combined atomic force microscopy-fluorescence microscopy: analyzing exocytosis in alveolar type II cells. *Anal Chem*, 2012, **84**(13): 5716–5722
- [57] Li M, Liu L, Xi N, *et al.* Atomic force microscopy imaging of living mammalian cells. *Sci China Life Sci*, 2013, **56**(9): 811–817
- [58] Dufrene Y F. Atomic force microscopy and chemical force microscopy of microbial cells. *Nat Protoc*, 2008, **3**(7): 1132–1138
- [59] Formosa C, Pillet F, Schiavone M, *et al.* Generation of living cell arrays for atomic force microscopy studies. *Nat Protoc*, 2015, **10**(1): 199–204
- [60] Fantner G E, Barbero R J, Gray D S, *et al.* Kinetics of antimicrobial peptide activity measured on individual bacterial cells using high-speed atomic force microscopy. *Nat Nanotechnol*, 2010, **5**(4): 280–285
- [61] Lonergan N E, Britt L D, Sullivan C J. Immobilizing live *Escherichia coli* for AFM studies of surface dynamics. *Ultramicroscopy*, 2014, **137**: 30–39
- [62] Rosenbluth M J, Lam W A, Fletcher D A. Force microscopy of nonadherent cells: a comparison of leukemia cell deformability. *Biophys J*, 2006, **90**(8): 2994–3003
- [63] Suresh S. Biomechanics and biophysics of cancer cells. *Acta Biomater*, 2007, **3**(4): 413–438
- [64] Wirtz D, Konstantopoulos K, Searson P C. The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nat Rev Cancer*, 2011, **11**(7): 512–522
- [65] Lekka M, Laidler P, Gil D, *et al.* Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy. *Eur Biophys J*, 1999, **28**(4): 312–316
- [66] 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**(4): 609–613
- [67] 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**(10): e46609
- [68] Zhou Z, Zheng C, Li S, *et al.* AFM nanoindentation detection of the elastic modulus of tongue squamous carcinoma cells with different metastatic potentials. *Nanomedicine*, 2013, **9**(7): 864–874
- [69] Efremov Y M, Lomakina M E, Bagrov D V, *et al.* Mechanical properties of fibroblasts depend on level of cancer transformation. *Biochem Biophys Acta*, 2014, **1843**(5): 1013–1019
- [70] Cross S E, Jin Y S, Rao J, *et al.* Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nat Nanotechnol*, 2007, **2**(12): 780–783
- [71] Lekka M, Gil D, Pogoda K, *et al.* Cancer cell detection in tissue sections using AFM. *Arch Biochem Biophys*, 2012, **518** (2): 151–156
- [72] Plodinec M, Loparic M, Monnier C A, *et al.* The nanomechanical signature of breast cancer. *Nat Nanotechnol*, 2012, **7**(11): 757–765
- [73] Mao Y, Sun Q, Wang X, *et al.* *In vivo* nanomechanical imaging of blood-vessel tissues directly in living mammals using atomic force microscopy. *Appl Phys Lett*, 2009, **95**(1): 013704
- [74] Li M, Liu L, Xi N, *et al.* Effects of temperature and cellular interactions on the mechanics and morphology of human cancer cells investigated by atomic force microscopy. *Sci China Life Sci* (In press)
- [75] Hinterdorfer P, Garcia-Parajo M F, Dufrene Y F. Single-molecule imaging of cell surfaces using near-field nanoscopy. *Acc Chem Res*, 2012, **45**(3): 327–336
- [76] Ando T, Uchihashi T, Scheuring S. Filming biomolecular processes by high-speed atomic force microscopy. *Chem Rev*, 2014, **114**(6): 3120–3188
- [77] Ando T, Uchihashi T, Kodera N, *et al.* High-speed AFM and nano-visualization of biomolecular processes. *Pflugers Arch Eur J Physiol*, 2008, **456**(1): 211–225
- [78] Ando T. High-speed atomic force microscopy coming of age. *Nanotechnology*, 2012, **23**(6): 062001
- [79] Kodera N, Yamamoto D, Ishikawa R, *et al.* Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy. *Nature*, 2010, **468**(7320): 72–76
- [80] Uchihashi T, Iino R, Ando T, *et al.* High-speed atomic force microscopy reveals rotary catalysis of rotorless F₁-ATPase. *Science*, 2011, **333**(6043): 755–758
- [81] Preiner J, Kodera N, Tang J, *et al.* IgGs are made for walking on bacterial and viral surfaces. *Nat Commun*, 2014, **5**: 4394
- [82] Casuso I, Rico F, Scheuring S. High-speed atomic force microscopy: structure and dynamics of single proteins. *Curr Opin Chem Biol*, 2011, **15**(5): 704–709
- [83] Yamashita H, Taoka A, Uchihashi T, *et al.* Single-molecule imaging on living bacterial cell surface by high-speed AFM. *J Mol Biol*, 2012, **422**(2): 300–309
- [84] Watanabe H, Uchihashi T, Kobashi T, *et al.* Wide-area scanner for high-speed atomic force microscopy. *Rev Sci Instrum*, 2013, **84**(5): 053702
- [85] Colom A, Casuso I, Rico F, *et al.* A hybrid high-speed atomic force-optical microscope for visualizing single membrane proteins on eukaryotic cells. *Nat Commun*, 2013, **4**: 2155
- [86] Heu C, Berquand A, Elie-Caille C, *et al.* Glyphosate-induced stiffening of HaCaT keratinocytes, a peak force tapping study on living cells. *J Struct Biol*, 2012, **178**(1): 1–7
- [87] Rico F, Su C, Scheuring S. Mechanical mapping of single membrane proteins at submolecular resolution. *Nano Lett*, 2011, **11**(9): 3983–3986
- [88] Pfreundschuh M, Hensen U, Muller D J. Quantitative imaging of the electrostatic field and potential generated by a transmembrane protein pore at subnanometer resolution. *Nano Lett*, 2013, **13**(11): 5585–5593

- [89] Pfreundschuh M, Alsteens D, Hilbert M, *et al.* Localizing chemical groups while imaging single native proteins by high-resolution atomic force microscopy. *Nano Lett*, 2014, **14**(5): 2957–2964
- [90] Eghiaian F, Rigato A, Scheuring S. Structural, mechanical, and dynamical variability of the actin cortex in living cells. *Biophys J*, 2015, **108**(6): 1330–1340
- [91] Li G, Xi N, Wang D H. Probing membrane proteins using atomic force microscopy. *J Cell Biochem*, 2006, **97**(6): 1191–1197
- [92] Ando T, Uchihashi T, Kodera N. High-speed AFM and applications to biomolecular systems. *Ann Rev Biophys*, 2013, **42**: 393–414
- [93] Tian Y, Li J, Cai M, *et al.* High resolution imaging of mitochondrial membranes by *in situ* atomic force microscopy. *RSC Adv*, 2013, **3**(3): 708–712
- [94] Li M, Liu L, Xi N, Wang Y. Research progress in quantifying the mechanical properties of single living cells using atomic force microscopy. *Chin Sci Bull*, 2014, **59**(31): 4020–4029
- [95] Li M, Liu L, Xi N, *et al.* Nanoscale monitoring of drug actions on cell membrane using atomic force microscopy. *Acta Pharmacol Sin*. (In press). doi: 10.1038/aps.2015.28.
- [96] Wang Z, Liu L, Wang Y, *et al.* A fully automated system for measuring cellular mechanical properties. *J Lab Autom*, 2012, **17**(6): 443–448
- [97] 姜 博, 汤孝妍, 宋 宇, 等. AFM 单分子力谱在真实材料及生物体系中的应用——挑战与机遇并存. *中国科学: 化学*, 2013, **43**(12): 1780–1797
- Jiang B, Tang X, Song Y, *et al.* *Scientia Sinica Chimica*, 2013, **43**(12): 1780–1797
- [98] Kirmizis D, Logothetidis S. Atomic force microscopy probing in the measurement of cell mechanics. *Int J Nanomed*, 2010, **5**: 137–145
- [99] Darling E M, Zauscher S, Guilak F. Viscoelastic properties of zonal articular chondrocytes measured by atomic force microscopy. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006, **14**(6): 571–579
- [100] Li M, Xiao X, Liu L, *et al.* Nanoscale mapping and organization analysis of target proteins on cancer cells from B-cell lymphoma patients. *Exp Cell Res*, 2013, **319**(18): 2812–2821
- [101] Zhang C, Li P, Liu L, *et al.* Development of mechanostimulated patch-clamp system for cellular physiological study. *IEEE-ASME Trans Mech*, 2014, **19**(4): 1138–1147
- [102] Meister A, Gabi M, Behr P, *et al.* FluidFM: combining atomic force microscopy and nanofluidics in a universal liquid deliver system for single cell applications and beyond. *Nano Lett*, 2009, **9**(6): 2501–2507

In situ* Imaging The Cellular Ultra-microstructures and Measuring The Cellular Mechanical Properties Using Atomic Force Microscopy

LI Mi¹⁾, LIU Lian-Qing^{1)**}, XI Ning^{1,2)**}, WANG Yue-Chao¹⁾

⁽¹⁾ State Key Laboratory of Robotics, Shenyang Institute of Automation, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China;

⁽²⁾ Department of Electrical and Computer Engineering, Michigan State University, East Lansing, MI 48824, USA)

Abstract Due to the unique advantages (*e.g.*, nanometer spatial resolution, picoNewton force sensitivity, label-free, can work in aqueous conditions), atomic force microscopy (AFM) has become an important instrument in cell biology. AFM can not only visualize the ultra-microstructures on the surface of living cells, but also can quantify the cellular mechanical properties (such as Young's modulus) by indenting technique, opening the doors to *in situ* explore the dynamical physiological activities and mechanical behaviors of single living cells at the nanoscale. In the past decades, researchers have carried out extensive investigations in imaging the cellular ultra-microstructures and measuring the cellular mechanical properties using AFM, yielding novel insights into our understanding of cellular physiological activities and providing a new idea to solve the related issues in the field of biomedicine. The AFM's own performances have also been steadily improved, which further promote its applications in biology. In this paper, based on our own research in investigating the killing effects of targeted cancer drugs at the nanoscale using AFM, the principle of AFM imaging and measuring the cellular mechanical properties was presented, the progress in visualizing the cellular ultra-microstructures and quantifying the cellular mechanical properties using AFM was summarized, the challenges facing AFM single-cell assay and its future directions were discussed.

Key words atomic force microscopy, cell, ultra-microstructure, imaging, mechanical properties, Young's modulus

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0158

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (61175103, 61375107, 61327014, 61433017), The Research Fund of the State Key Laboratory of Robotics (2014-Z07) and CAS FEA International Partnership Program for Creative Research Teams.

**Corresponding author.

Tel: 86-24-23970981, E-mail: lqliu@sia.cn, xin@egr.msu.edu

Received: May 26, 2015 Accepted: June 30, 2015