

## 基于多参数成像 AFM 的细胞及分子力学特性探测研究进展\*

李密<sup>1)\*\*</sup> 席宁<sup>1,2)</sup> 王越超<sup>1)</sup> 刘连庆<sup>1)\*\*</sup>

<sup>1)</sup>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;

<sup>2)</sup> *Department of Industrial and Manufacturing Systems Engineering, The University of Hong Kong, Hong Kong, China)*

**摘要** 原子力显微镜(AFM)的发明为微纳尺度下高分辨率探测天然状态生物样本的物理特性提供了强大工具, 是对传统生化特性检测方法的有力补充. 近年来, 多参数成像模式 AFM 的出现使得人们不仅可以获取生物样本表面形貌特征, 还能同时获取生物样本多种力学特性图(如杨氏模量、黏附力、形变等), 为研究生物结构、力学特性及其生理功能之间的关联提供了新的技术手段. 多参数成像 AFM 的生物医学应用研究为细胞/分子生理活动及相关疾病内在机理带来了大量新的认识. 本文结合作者在 AFM 细胞探测方面的研究工作, 介绍了多参数成像 AFM 工作原理, 总结了多参数成像 AFM 在细胞及分子力学特性探测方面的研究进展, 并对其存在的问题进行了讨论和展望.

**关键词** 原子力显微镜, 多参数成像, 力学特性, 细胞, 分子  
**学科分类号** Q66, Q73

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0125

细胞力学特性在细胞生理活动过程中起着重要的调控作用. 对于复杂生物体来说, 细胞通常生长在包含有多个组分(如细胞外基质、其他细胞、可溶性生长因子等)的微环境中<sup>[1-2]</sup>. 一方面, 细胞在其生命活动过程中不断感知微环境中的机械特征(如基质硬度<sup>[3]</sup>、基质形貌<sup>[4]</sup>等), 通过力学信号传导机制将机械信号转化为细胞内的化学信号<sup>[5]</sup>、调整基因和蛋白质表达<sup>[6]</sup>、维持细胞稳态<sup>[7]</sup>、并在微环境出现病变时对微环境进行修复<sup>[8]</sup>. 另一方面, 细胞与微环境的相互作用导致细胞或组织呈现出独特的力学特性, 如在柔软基底(0.1~1 kPa)上生长的干细胞分化为脑细胞(杨氏模量较小), 而在坚硬基底(25~40 kPa)上生长的干细胞则分化为成骨细胞(杨氏模量较大)<sup>[9]</sup>. 来自细胞内外的作用力通过改变细胞骨架结构影响细胞机械特性<sup>[10]</sup>. 在肿瘤形成过程中, 细胞外基质中胶原纤维的聚合及线性化导致基质变硬, 如乳腺癌组织的硬度为正常乳腺组织的 10 倍<sup>[11]</sup>, 而癌细胞的杨氏模量则显著减小以便于癌细胞穿过机体内细胞外基质、血管等实现转移<sup>[12-13]</sup>. 因此, 开展细胞力学特性研究对于理解生

命活动内在规律和认识疾病发生机理具有重要基础意义.

原子力显微镜(AFM)的发明为微纳尺度细胞/分子生物力学特性研究提供了新的技术手段. AFM 具有纳米级(0.5~1 nm)的空间分辨率和皮牛级(10~10<sup>4</sup> pN)的力感知灵敏度<sup>[14]</sup>, 不仅可以在溶液环境下获取天然状态生物样本(如组织<sup>[15]</sup>、细胞<sup>[15]</sup>、生物膜<sup>[16]</sup>等)的形貌特征, 还能对生物样本的力学特性进行测量, 已成为细胞与分子生物学领域的重要研究工具<sup>[17]</sup>. 与光镊、磁力扭转、微流控、平行板、微管吸取、微柱形变等<sup>[18]</sup>细胞力学特性测量方法相比, AFM 的独特优势是能以纳米级的空间分辨率同时获取细胞表面精细结构形貌及力学特性.

\* 国家自然科学基金(61503372, 61522312, U1613220, 61433017, 91748212), 中国科学院青年创新促进会(2017243)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.

李密. Tel: 024-23970540. E-mail: limi@sia.cn

刘连庆. Tel: 024-23970181. E-mail: lqliu@sia.cn

收稿日期: 2018-04-22, 接受日期: 2018-06-20

特别是近年来多参数成像 AFM<sup>[19]</sup>的出现使人们可以同时获取多种生物力学特性图(如杨氏模量、黏附力、形变等), 极大地便利了生物结构、力学特性、生理功能三者之间的高分辨直观关联研究. 多参数成像 AFM 在解决生物学实际问题上的应用为细胞 / 分子生理学活动及相关疾病内在机理带来了大量新的认识. 本文结合作者在 AFM 细胞探测方面的研究工作, 对多参数成像 AFM 在细胞及分子力学特性探测方面的研究进展及面临的挑战和未来发展进行了综述.

## 1 多参数成像 AFM

传统 AFM 成像模式主要包括接触模式和轻敲模式. AFM 利用一根末端连有一个极细针尖(针尖半径纳米级)的软悬臂梁(悬臂梁长度 2~200  $\mu\text{m}$ , 厚度约 1  $\mu\text{m}$ )<sup>[20]</sup>在样本表面进行光栅式扫描, 同时利用压电陶瓷驱动器控制悬臂梁在垂直方向运动来感知针尖原子与样本表面原子之间的相互作用力, 获取反映样本表面起伏形貌的三维图像<sup>[21]</sup>. 接触模式下, 针尖与样本接触扫描时针尖原子与样本表面原子之间的库仑排斥力作用导致悬臂梁弯曲, 压电陶瓷驱动器控制悬臂梁上下运动维持针尖原子与样本表面原子之间作用力恒定获取图像. 轻敲模式下, 以一定频率振动的悬臂梁与样本间歇接触扫描时针尖原子与样本表面原子之间的范德华吸引力作用导致悬臂梁振动的变化(如振幅、频率)<sup>[22]</sup>, 压电陶瓷驱动器控制悬臂梁上下运动维持悬臂梁振幅或频率<sup>[23]</sup>恒定获取图像. 振动悬臂梁的频率对于针尖上作用力的变化比振幅更敏感<sup>[24]</sup>, 但其反馈控制回

路复杂(需要 3 条反馈回路)<sup>[17]</sup>, 而振幅检测控制在技术上更简单(仅需 1 条反馈控制回路), 因此目前基于振幅检测的轻敲模式最为广泛.

AFM 多参数成像模式为同步获取样本多种物理特征提供了新的方法. 在多参数成像模式下, 振动探针在  $xy$  水平面对样本进行光栅扫描<sup>[25]</sup>(图 1a). 由图 1 可见在每个采样点控制探针在  $z$  方向进行逼近 - 回退运动<sup>[26]</sup>, 记录这个过程中压电陶瓷驱动器  $z$  方向位置变化和悬臂梁偏转量的变化, 得到力曲线. 探针首先从初始位置(1)逼近样本表面. 当探针与样本表面接触并产生压痕(2)时, 样本表面原子与针尖原子之间的排斥作用导致悬臂梁偏转量显著增加. 当悬臂梁偏转量到达设定的最大值(3)时, 探针开始回退. 在回退过程中, 当施加在悬臂梁上的拉力大于针尖 - 样本之间的黏附力(4)时, 探针回复至初始位置(5)(图 1b). 逼近过程中悬臂梁最大偏转量对应的力即为峰值力. 在多参数成像模式中, 压电陶瓷驱动器控制悬臂梁上下运动维持峰值力保持恒定获取图像. 通过实时分析力曲线的不同部分, 即可得到反应样本物理和化学特性的多个参数. 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(图 1c). 图 1d 显示了利用多参数成像 AFM 在缓冲溶液中对吸附在云母表面的嗜盐细菌紫膜的成像结果<sup>[27]</sup>, 同时得到紫膜的形貌图、杨氏模量图、形变图和黏附力图, 揭示出 100 pN 峰值力扫描下紫膜的杨氏模量为(10 $\pm$ 5) MPa, 形变为(1.0 $\pm$ 0.5) nm, 黏附力为(10 $\pm$ 5) pN.

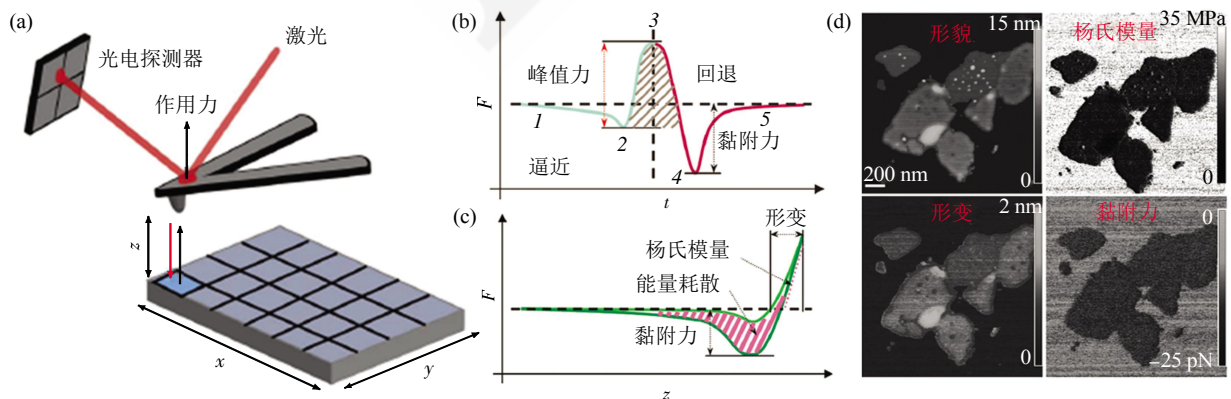


Fig. 1 The principle of multiparametric imaging AFM

图 1 多参数成像 AFM 原理

(a) 多参数成像过程中, AFM 探针在样本表面每个采样点获取力曲线<sup>[25]</sup>. (b, c) 多参数成像过程中在样本表面获取的力曲线. 控制压电陶瓷驱动器上下运动维持探针与样本之间峰值力恒定进行成像. 通过分析力曲线得到多种力学参数图. (b) 力 - 时间曲线. (c) 力 - 距离曲线<sup>[26]</sup>. (d) 多参数成像 AFM 对生物膜进行探测, 同时获取形貌图、杨氏模量图、形变图和黏附图<sup>[27]</sup>.

与传统接触成像模式和轻敲成像模式相比, AFM 多参数成像模式在生物样本探测上具有独特的优势. 接触模式下, 探针在样本表面施加的侧向力会导致样本(特别是活性生物样本, 如活细胞)表面结构容易发生形变, 降低了成像分辨率; 轻敲模式下, 为了对柔软生物样本成像, 需要采用小振幅驱动以降低探针与样本之间的作用力, 这将导致探针对样本表面的刮擦, 影响了成像质量<sup>[28]</sup>. 多参数成像模式的探针驱动频率远小于探针的共振频率, 显著降低了探针与样本之间的相互作用力, 可以清晰地对活细胞表面单个微绒毛结构进行成像<sup>[29]</sup>. 此外, 接触模式和轻敲模式均基于悬臂梁弯曲量或振动幅度进行检测, 无法感知探针与样本之间相互作用的动态过程. 多参数成像模式通过记录力曲线可以清晰地感知探针与样本之间的接触过程, 如图 1b 中步骤 2~4 即对应探针与样本之间的接触过程, 因而便于对样本准确施加外部刺激. 近期, 研究人员将多参数成像 AFM 与红外成像联合<sup>[30]</sup>, 在探针接触样本过程中施加红外激光脉冲, 实现了对样本红外特征和力学特征的同步探测, 有助于对生物样本的物理化学特征多维信息进行探测.

## 2 多参数成像 AFM 探测细胞力学特性

肌动蛋白纤维的动态重组在调控细胞机械特性方面起着重要作用. 2015 年, Eghiaian 等<sup>[31]</sup>利用多参数成像 AFM 对活细胞中肌动蛋白皮层的结构、机械特性及动态变化进行了观测. 在 200 pN 峰值力下对 3T3 成纤维活细胞进行扫描成像, 揭示出构成肌动蛋白皮层的 2 种基本结构单元(纤维结构和网络结构). 在不同类型的细胞中纤维结构和网络结构以不同比例组合形成肌动蛋白皮层. AFM 多参数成像显示了肌动蛋白皮层结构动态变化(纤维结构和网络结构之间相互转化)过程中细胞杨氏模量的显著变化. Kronlage 等<sup>[32]</sup>联合 AFM 与荧光显微术, 对牛主动脉内皮细胞进行的研究进一步发现, 细胞肌动蛋白皮层网络结构包括粗网格和细网格两种组成单元. AFM 连续扫描成像结果显示出粗网格的运动及融合轨迹, 而细网格则不断消失和出现, 揭示了肌动蛋白纤维的持续快速重组动态过程. 利用微丝骨架解聚剂(细胞松弛素)对细胞进行处理后, 发现肌动蛋白皮层结构显著减弱, 而利用微丝聚合剂对细胞进行处理后, 发现肌动蛋白皮层结构显著增强. Yoshida 等<sup>[33]</sup>的研究也显示了肌动蛋白纤维网络在活细胞上的快速重组, 而 Zhang

等<sup>[34]</sup>的研究揭示出肌动蛋白皮层与囊泡相互作用调控细胞膜生理行为. 这些研究证明了 AFM 直接对活细胞内骨架蛋白组分结构及其机械特性进行精细动态观测的能力<sup>[31-34]</sup>.

细胞机械特性对于癌症发生有着显著的指示意义. 2016 年, Calzado-Martin 等<sup>[35]</sup>利用多参数 AFM 直观显示了正常乳腺细胞和乳腺癌细胞在骨架蛋白结构和细胞机械特性方面的显著差异(图 2a). 选取 3 种细胞进行测试, 分别是 MCF-10A 正常乳腺细胞、MCF-7 非侵袭型乳腺癌细胞和 MDA-MB-231 侵袭型乳腺癌细胞. 基于多参数 AFM 成像同时获取这 3 种细胞的形貌图和杨氏模量图. 结果表明, MCF-10A 正常乳腺细胞骨架蛋白呈现纤维状结构, 且细胞杨氏模量较大(80~200 kPa), 而乳腺癌细胞(MCF-7 和 MDA-MB-231)的骨架蛋白则无明显的特征, 且杨氏模量明显较小(10~30 kPa). 对细胞的肌动蛋白微丝进行荧光染色的结果显示, MCF-10A 正常乳腺细胞中肌动蛋白微丝的含量明显高于乳腺癌细胞(MCF-7 和 MDA-MB-231)中肌动蛋白微丝的含量, 导致正常细胞和癌细胞之间机械特性的显著差异. 癌细胞与正常细胞不仅杨氏模量有显著差异, 其黏弹特性也存在着明显的不同<sup>[36]</sup>. 我们课题组利用 AFM 定量测量了 MCF-10A 正常乳腺细胞和 MCF-7 乳腺癌细胞的松弛时间<sup>[37]</sup>. 利用二阶 Maxwell 弹簧-黏壶模型<sup>[38]</sup>对获取的力时间曲线进行拟合提取得到细胞松弛时间, 发现 MCF-7 细胞的松弛时间显著小于 MCF-10A 的松弛时间. 进一步研究了不同测量参数情况下细胞松弛时间的响应. 通过在不同探针加载速度下对细胞松弛时间测量, 发现与癌细胞相比, 正常细胞的松弛时间对 AFM 探针加载速度变化更为敏感<sup>[39]</sup>, 表明了癌细胞和正常细胞之间黏弹特性的差异.

微生物细胞生理活动过程通常伴随着细胞力学特性的动态变化. 2016 年, Formosa-Dague 等<sup>[40]</sup>利用多参数 AFM 研究了金黄色葡萄球菌的生物膜形成机制. 金黄色葡萄球菌是一类可引起人类感染(特别是手术部位感染<sup>[41]</sup>)的重要病原菌. 金黄色葡萄球菌的致病过程通常与其形成生物膜的能力有关. 细菌首先黏附到表面(如静脉导管、假关节)随后聚集生长形成生物膜. AFM 多参数成像清晰地显示了  $Zn^{2+}$  对金黄色葡萄球菌表面结构和力学特性的影响. 没有  $Zn^{2+}$  存在的时候, 细菌表面起伏不平(500×500 nm<sup>2</sup> 区域粗糙度为(2.5±1.0) nm), 杨氏模量较小((495±272) kPa)且黏附能力很微弱; 而



在加入  $Zn^{2+}$  后, 细菌表面变得光滑( $500 \times 500 \text{ nm}^2$  区域粗糙度为  $(0.4 \pm 0.1) \text{ nm}$ ), 杨氏模量增加 1 倍 ( $(1092 \pm 377) \text{ kPa}$ ) 且黏附能力显著增强, 直观揭示了细菌结构与力学特性之间的关联. 2013 年, Alsteens 等<sup>[42]</sup>利用多参数 AFM 研究了噬菌体感染细菌的过程(图 2b). 通过对噬菌体进行组氨酸标记, 并将探针进行功能化以特异性识别组氨酸, 实现了对噬菌体侵染细菌过程中的形貌图、杨氏模量

图和黏附图的同时获取. 黏附图显示了噬菌体的分布, 而同步获取的杨氏模量图和形貌图则显示了噬菌体主要分布在细菌较软局部区域内, 加深了对噬菌体侵染细菌过程的认识. 此外, 研究人员还利用 AFM 多参数成像揭示了细菌黏附<sup>[43]</sup>和细菌膨胀<sup>[44]</sup>等生理过程中细胞表面精细结构及力学特性变化, 从细胞物理特性方面为微生物细胞生理活动行为提供了新的认识.

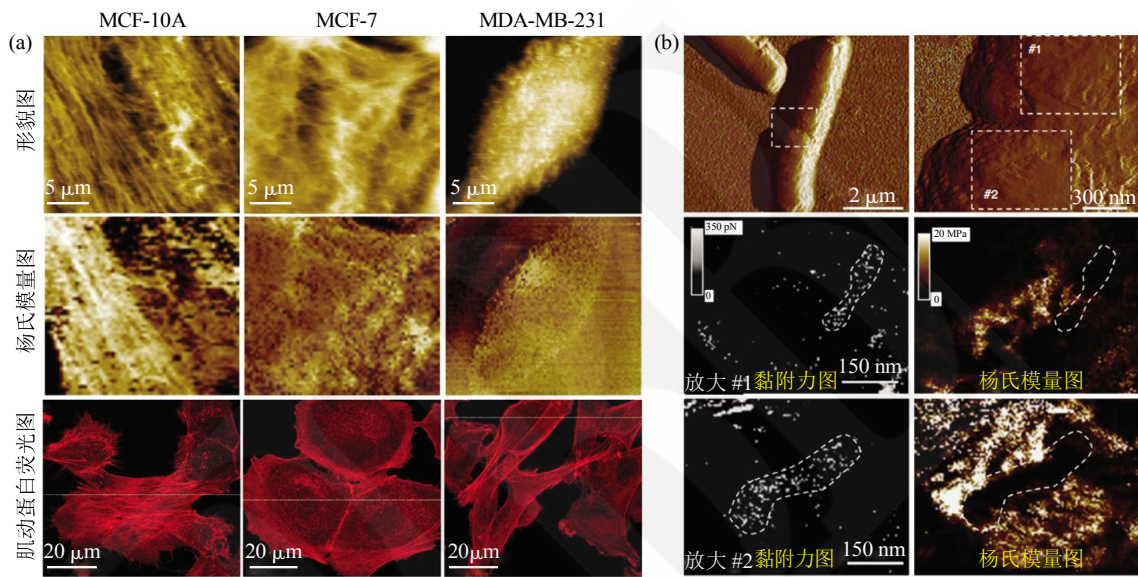


Fig. 2 Detecting the mechanical dynamics during cellular physiological processes by multiparametric imaging AFM

图 2 多参数成像 AFM 探测细胞生理活动过程中力学特性变化

(a) 多参数成像 AFM 探测正常乳腺细胞和乳腺癌细胞杨氏模量的差异<sup>[35]</sup>. 乳腺癌细胞杨氏模量显著小于正常乳腺细胞杨氏模量. (b) 多参数成像 AFM 探测噬菌体感染细菌过程<sup>[42]</sup>.

### 3 多参数成像 AFM 探测分子力学特性

多参数成像 AFM 为同步研究天然状态下膜蛋白分子结构和力学特性提供了新的方法. 2011 年, Rico 等<sup>[45]</sup>利用多参数成像 AFM 对嗜盐细菌紫膜进行了研究. 将紫膜吸附到剥去表层的云母片上, 并在缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L KCl, pH 7.4) 中进行多参数成像扫描. 大范围扫描成像显示了紫膜层和细胞膜脂质层. 脂质层的厚度为  $(2.8 \pm 0.2) \text{ nm}$ , 而紫膜的厚度为  $(6.4 \pm 0.2) \text{ nm}$ . 形貌图显示了紫膜上的视紫红质蛋白分子的六角形晶格结构特征. 弹性图显示脂质层的硬度 ( $(61 \pm 4) \text{ pN/nm}$ ) 略小于紫膜硬度 ( $(79 \pm 8) \text{ pN/nm}$ ). 2014 年, Pfreundschuh 等<sup>[46]</sup>结合多参数成像 AFM 和功能化探针对膜蛋白分子进行了研究. 将纺锤体组装异常

蛋白(SAS)吸附到云母表面, 利用功能化探针(针尖表面连有可特异性结合 SAS 表面组氨酸位点)进行多参数扫描成像. AFM 形貌图显示出 SAS 低聚体组装形成的车轮状形貌结构, 而黏附图则显示了 SAS 与探针之间的特异性结合相互作用(特异性作用力范围  $100 \sim 200 \text{ pN}$ ). 使用普通探针则只能探测到分子间非特异性相互作用(非特异性作用力范围  $50 \sim 80 \text{ pN}$ ). 通过将两种化学功能团分子修饰到 AFM 探针, 在多参数成像模式下, 可以实现对膜蛋白分子不同结合位点的同时探测<sup>[47]</sup>. AFM 形貌图显示了吸附到云母表面的人蛋白酶激活受体 (PAR) 分子, 而黏附图则显示了 PAR 上两个不同结合位点的特异性分子间相互作用.

利用多参数成像 AFM 可以对细胞表面膜蛋白分子进行快速识别与定量分析. 基于 AFM 多参数

成像技术, 2016年我们课题组对淋巴瘤细胞表面CD20靶点蛋白进行了探测<sup>[48]</sup>(图3)。首先对云母表面吸附的纯化蛋白质分子进行实验。将亲和素分子吸附到云母表面, 利用修饰有生物素的探针在PBS溶液中进行扫描多参数成像。AFM形貌图可以清晰地看到云母表面的单个亲和素分子(图3a中箭头)。AFM黏附图则清晰地显示了生物素-亲和素之间的分子特异性识别信息(图3a中椭圆)。进一步在特异性识别点上获取的力曲线上呈现特异性突变峰, 证明了特异性分子间相互作用。随后将rituximab抗体修饰到AFM针尖对淋巴瘤Raji细胞表面的CD20分子进行探测。Rituximab是一种抗CD20单抗, 用于治疗非霍奇金B细胞淋巴瘤<sup>[49]</sup>。Rituximab与淋巴瘤细胞表面的CD20结合后通过三种机制杀灭瘤细胞, 分别是直接诱导细胞凋亡(PCD), 补体系统依赖的细胞毒作用(CDC)和抗体依赖细胞介导的细胞毒作用(ADCC)<sup>[21, 50]</sup>。AFM黏附图显示了Raji细胞表面CD20分子的分布(图3b)。对识别区域获取的力曲线上成像特异性突变峰也证明了识别区域的特异性分子间相互作用。进一步对

临床淋巴瘤患者骨髓中的原代淋巴瘤细胞进行了探测。图3c显示了原代淋巴瘤细胞形貌和黏附图的叠加, 图中天蓝色像素指示了CD20在细胞表面的分布情况。通过对黏附图进行图像处理与统计分析, 发现CD20在淋巴瘤细胞表面的聚类区域集中在100~3000 nm<sup>2</sup>, 为定量研究纳米尺度下细胞表面蛋白质分子的空间分布提供了新的方法。

多参数成像AFM为研究病毒分子生理活动行为提供了新的方法。2017年, Alsteens等<sup>[51]</sup>利用多参数成像AFM对病毒分子与MDCK细胞之间相互作用过程的力学特性进行了观测。病毒分子通过扩散作用与细胞接触, 随后病毒分子通过与细胞表面的TVA受体分子结合而进入细胞内部(图3d)。通过聚乙二醇(PEG)长链分子将病毒分子连接到AFM针尖表面, 利用修饰有病毒的探针在多参数成像模式下对活细胞进行扫描。通过对TVA受体进行荧光标记识别出表达有TVA受体分子的细胞。AFM形貌图显示了细胞表面的微绒毛结构, 而黏附图则显示了病毒分子与细胞表面TVA受体分子之间的特异性相互作用。表达有TVA受体的

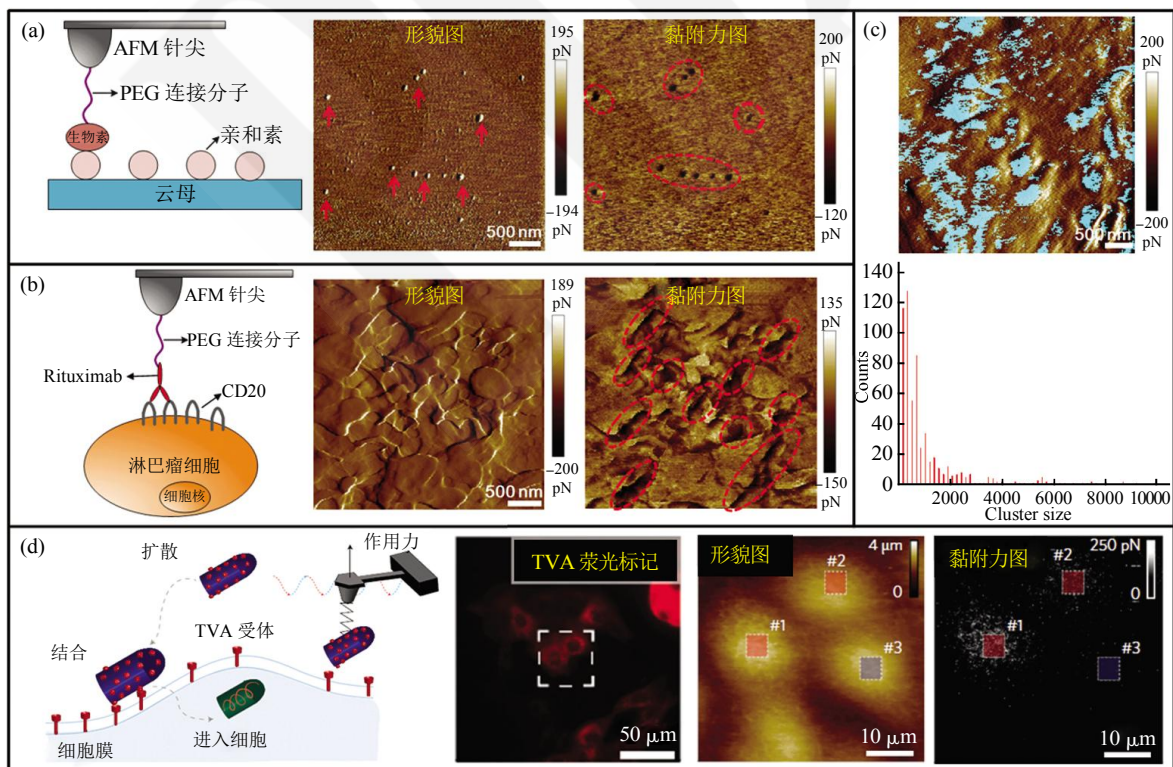


Fig. 3 Detecting the molecular mechanics by multiparametric imaging AFM

图3 多参数成像AFM探测分子力学特性

(a)云母表面吸附的亲和素蛋白质分子与探针表面修饰的生物素分子特异性相互作用<sup>[48]</sup>。(b)淋巴瘤Raji细胞表面CD20抗原与探针表面修饰的rituximab特异性相互作用识别<sup>[48]</sup>。(c)临床淋巴瘤患者癌细胞表面CD20抗原的分布及定量聚类分析<sup>[48]</sup>。(d)病毒分子与细胞表面受体分子之间的特异性相互作用<sup>[51]</sup>。



细胞黏附图上有明显的力信息(#1 和 #2), 而未表达 TVA 受体的细胞黏附图上则没有力信息(#3). 进一步对多参数成像过程中获取的力曲线进行分析发现单个病毒分子可以和细胞表面 1 个、2 个或 3 个 TVA 受体分子结合, 表明了病毒分子与细胞之间相互作用的多样性. 当 AFM 探针加载速度从  $10^4$  pN/s 增加到  $3 \times 10^6$  pN/s 时, 单个病毒与细胞表面 TVA 受体分子之间的作用力从 50 pN 增加为 500 pN. 利用 Bell-Evans 模型<sup>[52]</sup>对 AFM 力探测结果进行拟合得到单个病毒分子与 1 个、2 个和 3 个 TVA 受体分子之间的解离常数( $k_{off}$ )分别为  $(20.5 \pm 6.7) \text{ s}^{-1}$ 、 $(5.0 \pm 3.8) \text{ s}^{-1}$  和  $(4.2 \pm 1.5) \text{ s}^{-1}$ . 解离常数随着病毒结合受体分子对的增加而显著下降, 表明病毒分子通过与细胞表面多个受体分子形成化学键来便于其稳固停留在细胞表面.

#### 4 总结与展望

近年来, 多参数成像 AFM 的出现为探测细胞及分子力学特性提供了新的技术方法<sup>[53]</sup>, 有助于在微纳尺度原位直观研究生物结构、力学特性及生理功能三者之间的关联, 为细胞 / 分子生理活动及疾病机理(如癌症<sup>[35]</sup>、微生物感染<sup>[40]</sup>、免疫治疗<sup>[48]</sup>、病毒侵袭<sup>[51]</sup>等)带来了大量新的认识, 促进了细胞和分子生物学的发展. 然而, 多参数成像 AFM 应用于细胞分子生物学研究时仍存在很多问题有待解决.

首先成像扫描速度和适用范围有待提高. 目前利用多参数成像 AFM 对活细胞进行高分辨率扫描时, 典型扫描频率和扫描线分别为 0.125 Hz 和 256 条<sup>[51]</sup>, 意味着获取一幅图像需要至少 30 min, 这种成像速度远远大于细胞内分子活动所需的时间(细胞外基质信号传递到细胞内部所需时间约为 1 ms<sup>[54]</sup>), 难以在更小时间尺度对细胞实时动态生理活动进行观测. 虽然近年来出现了商用快速扫描 AFM<sup>[55]</sup>, 但快速扫描 AFM 主要适用于平坦坚硬的样本, 如云母表面吸附的生物分子<sup>[56-57]</sup>、微生物细胞<sup>[58-59]</sup>等. 对活细胞的快速扫描 AFM 成像时间为 2~5 s<sup>[60]</sup>, 距离细胞生理活动反应时间仍有巨大差距. 怎样借鉴快速扫描技术提高多参数成像 AFM 的扫描速度已成为迫切需要解决的问题, 这对于实时研究细胞分子生理活动动态过程中的结构及力学特性协同变化具有重要意义. 此外, 目前多参数成像 AFM 细胞研究主要集中在微生物细胞<sup>[40, 42]</sup>以及少数几种动物贴壁细胞<sup>[35, 51]</sup>. 微生物细胞尺寸小且表面坚硬, 而动物贴壁细胞可在基底表面延展生长

成为扁长形状, 这些细胞特性便于进行多参数成像 AFM 观测. 动物悬浮细胞尺寸大, 表面柔软且不能在样本表面延展生长, 导致目前对动物悬浮细胞进行的多参数成像 AFM 观测还需要对细胞进行化学固定而影响细胞活性<sup>[48]</sup>, 直接对活体状态的动物悬浮细胞的多参数成像 AFM 研究尚未见报道. 为了对动物悬浮活细胞进行观测, 需要发展可对柔软细胞膜的运动进行有效抑制<sup>[61]</sup>的方法(如微柱阵列固定<sup>[44]</sup>).

其次探测细胞表面特定生物分子仍然具有挑战性. 多参数成像模式下, 为了探测细胞表面特定蛋白质分子, 需要在探针表面进行功能化修饰, 如将能与细胞表面特定分子结合的抗体连接到针尖表面<sup>[62]</sup>. 在对探针进行功能化时, 需要化学合成特殊连接分子, 如利用 acetal-PEG-NHS 分子可将未经处理的抗体分子连接到氮化硅针尖<sup>[63]</sup>. 然而需要指出的是目前的探针功能化流程复杂费力, 且合成连接分子需要很多化学专业知识<sup>[64]</sup>, 这给很多非化学类实验室带来困难. 因而为了使 AFM 单分子探测更进一步广泛应用、吸引更多科研人员注意, 还需要简单易用的探针功能化流程. 在利用功能化探针探测活细胞时, 溶液中的生物分子以及细胞表面的生物分子可能会与探针表面抗体分子结合从而使功能化探针污染<sup>[19]</sup>, 导致实验效率低下. 目前对于功能化探针在 AFM 实验过程中的活性情况还缺少实时检测手段, 这将可能给实验结果的解释及检测结果带来困扰. 为了得到具有统计学意义的结果需要对大量细胞进行测试<sup>[65]</sup>, 使得 AFM 单分子实验探测往往十分耗时. 此外, 多参数成像 AFM 在对细胞表面进行扫描过程中根据探针与细胞之间的黏附力的大小来生成黏附力图, 而没有考虑黏附力峰的形状(在利用基于 PEG 长链分子的功能化探针进行分子力测试时, 特异性分子间相互作用力峰的形状具有非线性特征)<sup>[66-67]</sup>, 因而难以分辨出特异性分子间相互作用力和非特异性分子间相互作用力.

再次是目前多参数成像 AFM 探测的生物信息较为有限. 利用多参数成像 AFM 进行的研究集中在细胞表面超微结构(如细胞骨架<sup>[35]</sup>、细胞膜微绒毛<sup>[51]</sup>). 这是因为 AFM 本质是一种表面探测仪器, 无法探测细胞内部结构. 分离出细胞内部细胞器(如线粒体<sup>[68]</sup>、细胞核<sup>[69]</sup>等), 对其开展多参数成像 AFM 探测研究将有助于认识细胞器结构及其力学特性. 多参数成像 AFM 的独特之处是可以直接对活体状态的生物样本的结构及力学特性进行同时探

测, 这使得可以对已经进行了 AFM 探测的细胞进行后续生化实验检测(如癌细胞侵袭实验)<sup>[70]</sup>以分析细胞的生物学功能, 这对于研究生物结构、力学特性及生理功能之间的直接联系具有重要意义, 但目前将多参数成像 AFM 与生化分析手段进行联用以对细胞进行在线探测的研究还很缺乏. 由于生命系统活动的高度复杂性<sup>[17]</sup>, 将多参数成像 AFM 与互补技术(如荧光显微术<sup>[51, 71-72]</sup>)联用有助于从多个角度更好地理解细胞生理活动. 总之, 作为一种新的技术方法, 多参数成像 AFM 为研究微纳尺度下细胞及分子力学特性提供了新的可能, 随着科研人员利用多参数成像 AFM 研究更多生物学实际问题, 将有望给细胞分子生物学及相关疾病内在机理带来更多新的认识.

### 参 考 文 献

- [1] Discher D E, Mooney D J, Zandstra P W. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science*, 2009, **324**(5935): 1673-1677
- [2] Kuttner V, Mack C, Rigbolt K, *et al.* Global remodeling of cellular microenvironment due to loss of collagen VII. *Mol Syst Biol*, 2013, **9**: 657
- [3] 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**(7): 4720-4729
- [4] Dalby M J, Gadegaard N, Oreffo R O. Harnessing nanotopography and integrin-matrix interactions to influence stem cell fate. *Nat Mater*, 2014, **13**(6): 558-569
- [5] Hoffman B D, Grashoff C, Schwartz M A. Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction. *Nature*, 2011, **475**(7356): 316-323
- [6] Swift J, Ivanovska I L, Buxboim A, *et al.* Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science*, 2013, **341**(6149): 1240104
- [7] Medema J P, Vermeulen L. Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature*, 2011, **474**(7351): 318-326
- [8] Humphrey J D, Dufresne E R, Schwartz M A. Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, **15**(12): 802-812
- [9] Engler A J, Sen S, Sweeney H L, *et al.* Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 2006, **126**(4): 677-689
- [10] Fletcher D A, Mullins R D. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 2010, **463**(7280): 485-492
- [11] Lu P, Weaver V M, Werb Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol*, 2012, **196**(4): 395-406
- [12] Plodinec M, Loparic M, Monnier C A, *et al.* The nanomechanical signature of breast cancer. *Nat Nanotechnol*, 2012, **7**(11): 757-765
- [13] Alibert C, Goud B, Manneville J B. Are cancer cells really softer than normal cells?. *Biol Cell*, 2017, **109**(5): 167-189
- [14] Li M, Dang D, Xi N, *et al.* Nanoscale imaging and force probing of biomolecular systems using atomic force microscopy: from single molecules to living cells. *Nanoscale*, 2017, **9**(45): 17643-17666
- [15] 孙全梅, 冯建涛, 韩东. 纳米生物医学成像表征与医学功能生物界面. *科学通报*, 2013, **58**(24): 2449-2465  
Sun Q M, Feng J T, Han D. *Chin Sci Bull*, 2013, **58**(24): 2449-2465
- [16] Shan Y, Wang H. The structure and function of cell membranes examined by atomic force microscopy and single-molecule force spectroscopy. *Chem Soc Rev*, 2015, **44**(11): 3617-3638
- [17] Dufrene Y F, Ando T, Garcia R, *et al.* Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology. *Nat Nanotechnol*, 2017, **12**(4): 295-307
- [18] 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**(6): 523-540
- [19] 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.
- [20] Kasas S, Stupar P, Dietler G. AFM contribution to unveil pro- and eukaryotic cell mechanical properties. *Semin Cell Dev Biol*, 2018, **73**: 177-187
- [21] 李密, 刘连庆, 席宁, 等. 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. *生物化学与生物物理进展*, 2015, **42**(8): 697-712  
Li M, Liu L Q, Xi N, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2015, **42**(8): 697-712
- [22] Lyubchenko Y L. Preparation of DNA and nucleoprotein samples for AFM imaging. *Micron*, 2011, **42**(2): 196-206
- [23] Herruzo E T, Perrino A P, Garcia R. Fast nanomechanical spectroscopy of soft matter. *Nat Commun*, 2014, **5**: 3126
- [24] Ido, S, Kimura K, Oyabu N, *et al.* Beyond the helix pitch: direct visualization of native DNA in aqueous solution. *ACS Nano*, 2013, **7**(2): 1817-1822
- [25] Pfreundschuh M, Martinez-Martin D, Mulvihill E, *et al.* Multiparametric high-resolution imaging of native proteins by force-distance curve-based AFM. *Nat Protoc*, 2014, **9**(5): 1113-1130
- [26] Adamcik J, Berquand A, Mezzenga R. Single-step direct measurement of amyloid fibrils stiffness by peak force quantitative nanomechanical atomic force microscopy. *Appl Phys Lett*, 2011, **98**(19): 193701
- [27] Medalsy I, Hensen U, Muller D J. Imaging and quantifying chemical and physical properties of native proteins at molecular resolution by force-volume AFM. *Angew Chem Int Ed*, 2011, **50**(50): 12103-12108
- [28] Schillers H, Medalsy I, Hu S, *et al.* Peakforce tapping resolves individual microvilli on living cells. *J Mol Recognit*, 2016, **29**(2): 95-101
- [29] 李密, 刘连庆, 席宁, 等. AFM 单细胞单分子形貌成像的研究进展. *科学通报*, 2013, **58**(18): 1711-1718  
Li M, Liu L Q, Xi N, *et al.* *Chin Sci Bull*, 2013, **58**(26): 3177-3182

- [30] Wang L, Wang H, Wagner M, *et al.* Nanoscale simultaneous chemical and mechanical imaging *via* peak force intrared microscopy. *Sci Adv*, 2017, **3**: e1700255
- [31] 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
- [32] Kronlage C, Schafer-Herte M, Boning D, *et al.* Feeling for filaments: quantification of the cortical actin web in live vascular endothelium. *Biophys J*, 2015, **109**(4): 687–698
- [33] Yoshida A, Sakai N, Uekusa Y, *et al.* Probing *in vivo* dynamics of mitochondria and cortical actin networks using high-speed atomic force/fluorescence microscopy. *Genes Cells*, 2015, **20**(2): 85–94
- [34] Zhang X, Tang Q, Wu L, *et al.* AFM visualization of cortical filaments/network under cell-bound membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta*, 2015, **1848**(10): 2225–2232
- [35] Calzado-Martin A, Encinar M, Tamayo J, *et al.* Effect of actin organization on the stiffness of living breast cancer cells revealed by peak-force modulation atomic force microscopy. *ACS Nano*, 2016, **10**(3): 3365–3374
- [36] Schierbaum N, Rheinlaender J, Schaffer T E. Viscoelastic properties of normal and cancerous human breast cells are affected differently by contact to adjacent cells. *Acta Biomater*, 2017, **55**: 239–248
- [37] 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**(12): 1370–1381  
Li M, Liu L Q, Xi N, *et al.* *Sci Sin Vitae*, 2016, **46**(12): 1370–1381
- [38] Li M, Liu L, Xi N, *et al.* Atomic force microscopy studies on cellular elastic and viscoelastic properties. *Sci China Life Sci*, 2018, **61**(1): 57–67
- [39] 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
- [40] Formosa-Dague C, Speziale P, Foster T J, *et al.* Zinc-dependent mechanical properties of *Staphylococcus aureus* biofilm-forming surface protein SasG. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, **113**(2): 410–415.
- [41] Bebko S P, Green D M, Awad S S. Effect of a prooperative decontamination protocol on surgical site infections in patients undergoing elective orthopedic surgery with hardware implantation. *JAMA Surg*, 2015, **150**(5): 390–395
- [42] Alsteens D, Trabelsi H, Soumillion P, *et al.* Multiparametric atomic force microscopy imaging of single bacteriophages extruding from living bacteria. *Nat Commun*, 2013, **4**: 2926
- [43] Formosa C, Schiavone M, Boisrame A, *et al.* Multiparametric imaging of adhesive nanodomains at the surface of *Candida albicans* by atomic force microscopy. *Nanomedicine*, 2015, **11**(1): 57–65
- [44] Dover R S, Bitler A, Shimoni E, *et al.* Multiparametric AFM reveals turgor-responsive net-like peptidoglycan architecture in live streptococci. *Nat Commun*, 2015, **6**: 7193
- [45] Rico F, Su C, Scheuring S. Mechanical mapping of single membrane proteins at submolecular resolution. *Nano Lett*, 2011, **11**(9): 3983–3986
- [46] 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
- [47] Pfreundschuh M, Alsteens D, Wieneke R, *et al.* Identifying and quantifying two ligand-binding sites while imaging native human membrane receptors by AFM. *Nat Commun*, 2015, **6**: 8857
- [48] Li M, Xiao X, Liu L, *et al.* Rapid recognition and functional analysis of membrane proteins on human cancer cells using atomic force microscopy. *J Immunol Methods*, 2016, **436**: 41–49
- [49] 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
- [50] Li M, Liu L, Xi N, *et al.* Applications of atomic force microscopy in exploring drug actions in lymphoma-targeted therapy at the nanoscale. *Bionanoscience*, 2016, **6**(1): 22–32
- [51] Alsteens D, Newton R, Schubert R, *et al.* Nanomechanical mapping of first binding steps of a virus to animal cells. *Nat Nanotechnol*, 2017, **12**(2): 177–183
- [52] Zhang X, Shi X, Xu L, *et al.* Atomic force microscopy study of the effect of HER 2 antibody on EGF mediated ErbB ligand-receptor interaction. *Nanomedicine*, 2013, **9**(5): 627–635
- [53] Alsteens D, Muller D J, Dufrene Y F. Multiparametric atomic force microscopy imaging of biomolecular and cellular systems. *Acc Chem Res*, 2017, **50**(4): 924–931
- [54] 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**(1): 75–82
- [55] Ando T, Uchihashi T, Scheuring S. Filming biomolecular processes by high-speed atomic force microscopy. *Chem Rev*, 2014, **114**(6): 3120–3188
- [56] Miyagi A, Chipot C, Rangl M, *et al.* High-speed atomic force microscopy shows that annexin V stabilizes membranes on the second timescale. *Nat Nanotechnol*, 2016, **11**(9): 783–790
- [57] 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
- [58] 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
- [59] 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
- [60] Watanabe H, Uchihashi T, Kobashi T, *et al.* Wide-area scanner for high-speed atomic force microscopy. *Rev Sci Instrum*, 2013, **84**(5): 053702
- [61] Li M, Liu L, Xi N, *et al.* Nanoscale monitoring of drug actions on cell membrane using atomic force microscopy. *Acta Pharmacol Sin*, 2015, **36**(7): 769–782
- [62] Chtcheglova L A, Hinterdorfer P. Simultaneous AFM topography and recognition imaging at the plasma membrane of mammalian



- cells. *Semin Cell Dev Biol*, 2018, **73**: 45–56
- [63] Wildling L, Unterauer B, Zhu R, *et al.* Linking of sensor molecules with amino groups to amino-functionalized AFM tips. *Bioconjugate Chem*, 2011, **22**(6): 1239–1248
- [64] Shi Y, Cai M, Zhou L, *et al.* The structure and function of cell membranes studied by atomic force microscopy. *Semin Cell Dev Biol*, 2018, **73**: 31–44
- [65] 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 Y, Song Y, *et al.* *Sci Sin Chim*, 2013, **43**(12): 1780–1797
- [66] Puntheeranurak T, Neundlinger I, Kinne R K, *et al.* Single-molecule recognition force spectroscopy of transmembrane transporters on living cells. *Nat Protoc*, 2011, **6**(9): 1443–1452
- [67] Beaussart A, Abellan-Flos M, El-Kirat-Chatel S, *et al.* Force nanoscopy as a versatile platform for quantifying the activity of antiadhesion compounds targeting bacterial pathogens. *Nano Lett*, 2016, **16**(2): 1299–1307
- [68] 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
- [69] Sakiyama Y, Mazur A, Kapinos L E, *et al.* Spatiotemporal dynamics of the nuclear pore complex transport barrier resolved by high-speed atomic force microscopy. *Nat Nanotechnol*, 2016, **11**(8): 719–723
- [70] Yu W, Sharma S, Gimzewski J K, *et al.* Nanocytology as a potential biomarker for cancer. *Biomark Med*, 2017, **11**(3): 213–216
- [71] Cascione M, de Matteis V, Rinaldi R, *et al.* Atomic force microscopy combined with optical microscopy for cells investigation. *Microsc Res Tech*, 2017, **80**(1): 109–123
- [72] Moores A N, Cadby A J. Simultaneous AFM and fluorescence imaging: a method for aligning an AFM-tip with an excitation beam using a 2D galvanometer. *Rev Sci Instrum*, 2018, **89**(2): 023708

## Applications of Multiparametric Imaging Atomic Force Microscopy in Probing Cellular and Molecular Mechanics\*

LI Mi<sup>1</sup>\*\*, XI Ning<sup>1,2</sup>, WANG Yue-Chao<sup>1</sup>, LIU Lian-Qing<sup>1</sup>\*\*

<sup>1</sup> State Key Laboratory of Robotics, Shenyang Institute of Automation, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China;

<sup>2</sup> Department of Industrial and Manufacturing Systems Engineering, The University of Hong Kong, Hong Kong, China

**Abstract** The advent of atomic force microscopy (AFM) provides a powerful tool for probing the physical properties of native biological samples with unprecedented spatiotemporal resolution at the micro/nanoscale, significantly complementing traditional biochemical assays. In recent years, multiparametric imaging AFM, which is able to simultaneously obtain the topographical features and multiple mechanical properties (*e.g.*, Young's modulus, adhesion, and deformation) of biological samples, emerges as a new method for investigating the correlations between structure, mechanics and functions of biological systems. The biomedical applications of multiparametric imaging AFM have yielded considerable novel insights into cellular/molecular activities and the underlying mechanisms guiding pathological processes. In this paper, based on our own research in single-cell detection using AFM, the principle of multiparametric imaging AFM is presented and the progress in utilizing multiparametric imaging AFM to probe cellular and molecular mechanics is summarized. The challenges and future directions are also discussed.

**Key words** atomic force microscopy, multiparametric imaging, mechanics, cells, molecules

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2018.0125

\* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (61503372, 61522312, U1613220, 61433017, 91748212), the Youth Innovation Promotion Association CAS (2017243) and CAS FEA International Partnership Program for Creative Research Teams.

\*\*Corresponding author.

LI Mi. Tel: 86-24-23970540. E-mail: limi@sia.cn

LIU Lian-Qing. Tel: 86-24-23970181. E-mail: lqliu@sia.cn

Received: April 22, 2018 Accepted: June 20, 2018