基于激光共聚焦显微镜的细胞骨架结构分析

孙青, 张慕天, 霍波*

北京理工大学宇航学院, 北京 100081

*联系人, E-mail: huobo@bit.edu.cn

收稿日期: 2020-04-27; 接受日期: 2020-05-25; 网络出版日期: 2020-08-11

国家自然科学基金(编号: 11372043, 11572043)资助项目

摘要 肌动蛋白微丝是细胞骨架的主要组成部分, 已有研究表明细胞的黏附状态会通过影响微丝结构来调控分化和凋亡等生物学行为. 目前观察微丝结构的主要方法是利用激光共聚焦显微镜进行荧光成像, 但通常只针对微丝的二维结构进行分析, 很少有研究关注微丝的三维结构信息. 本文针对这个问题, 提出一种基于激光共聚焦显微镜技术的细胞微丝三维重建方法. 此方法利用三维高斯函数拟合共聚焦显微镜的点扩散函数, 并将函数的 x - y 方向与 z 方向解耦, 得到 z 轴光强的高斯分布形式. 随后通过图像处理得到细胞中主要纤维的几何参数, 再对纤维图进行拟合计算、密度聚类、椭球拟合等操作, 提取微丝纤维的三维空间信息. 本文还利用微模式化方法构建了面积为 $1256 \mu\text{m}^2$ 的圆形以及枝条形微模式化基底, 将骨髓间充质干细胞培养于两种基底上, 并通过荧光染色方法获得微丝结构的荧光图像, 进而应用所建立的方法对细胞微丝图像进行三维重建和分析. 分析结果显示, 两种形状细胞中微丝取向、交联点数目、体积和长细比等参数的空间分布有显著差异, 表明细胞中的力学状态受到铺展形状的影响. 本研究旨在建立一种提取细胞微丝三维结构参数的方法, 从而可为揭示细胞内部力学转导机制提供研究基础.

关键词 细胞微丝, 三维高斯函数, 图像处理

PACS: 42.30.Wb, 87.57.Nk, 87.16.Ka

1 引言

细胞骨架由微管、微丝、中间纤维等三种成分组成, 可为细胞提供力学支撑, 并参与细胞内的物质运输以及细胞迁移、分化、增殖等生理过程^[1-3]. 大量研究表明, 在不同的力学微环境下, 细胞骨架结构会发生适应性变化^[4,5]. 例如, Ingber等人^[6-8]建立的细胞张力完整性模型, 用刚性杆模拟微管, 用线性弹簧模拟微丝,

从而构建了一种张力结构, 其研究结果表明外力作用下此结构会发生相应变化并调节细胞的形状. 微丝是由球状的肌动蛋白(Actin)单体组装形成的实心纤维, 纤维直径约为4-7 nm. 大量微丝平行排列可构成应力纤维(Stress Fiber), 其在细胞力学转导、细胞形态发生和组织形成方面具有重要的作用^[9-11]. Discher课题组^[12]研究发现, 培养于不同刚度基底上的间充质干细胞(Mesenchymal Stem Cells, MSC)可以分化为不同种

引用格式: 孙青, 张慕天, 霍波. 基于激光共聚焦显微镜的细胞骨架结构分析. 中国科学: 物理学 力学 天文学, 2020, 50: 090011

Sun Q, Zhang M T, Huo B. Analyses on cytoskeleton structure basing on confocal microscope (in Chinese). Sci Sin-Phys Mech Astron, 2020, 50: 090011, doi: [10.1360/SSPMA-2020-0150](https://doi.org/10.1360/SSPMA-2020-0150)

类的细胞, 在此过程中细胞微丝结构具有明显区别. Chen等人^[13]的研究结果表明, MSC细胞的分化方向受到细胞铺展面积和形状的影响, 当破坏细胞的微丝结构后, 这种铺展几何形状依赖的分化现象消失, 进一步说明细胞微丝是细胞力学转导过程中的重要影响因素. 目前人们已经发现, 力学信号由细胞外基质传递到细胞内部主要经由细胞外基质、黏附斑和细胞骨架, 最终到达细胞核以影响基因表达^[14-16]. 此外, Qin等人^[17]建立了一个基于细胞骨架的力学模型, 涉及肌动蛋白聚合、肌球蛋白收缩、整合素结合动力学、细胞膜变形和基底刚度等生物力学和生物化学机制, 并应用此力学模型模拟了不同刚度基底上细胞形状的时空演变. 因此, 研究细胞微丝的三维结构对揭示细胞的力学自适应性以及细胞-基底间的力学转导机制有着重要的意义.

人们通常使用荧光染色结合普通倒置荧光显微镜或激光共聚焦显微镜的方法来观察和获取细胞骨架的结构^[18]. 与细胞中特定分子结合的染料被激发后会发出荧光, 由某点发射的荧光会经过物镜成像为三维衍射斑, 二维平面情况下的衍射斑称为艾里斑. 激光共聚焦显微镜利用照明针孔来缩小激发光照射到样本的光斑面积, 并利用探测针孔排除来自非焦平面的发射光对成像的干扰, 从而实现了高精度成像. 为了进一步提高图像的精度, 研究人员通常先构建共聚焦显微镜的点扩散函数再对成像进行反卷积以建立更加清晰的图像. 同时, 人们也提出一些迭代方法进行反卷积计算来提高图像的清晰度^[19-22]. 构建共聚焦点扩散函数的方法通常包括理论推导、微珠实验测试等^[23-26]. 在实际处理中, 根据成像强度在三维衍射斑的形心处最高, 距离越远则强度逐渐递减的规律^[27,28], 常用高斯函数对点扩散函数进行描述^[29]. 利用高斯函数拟合点扩散函数在图像处理中具有数学模型简单、计算速度快、精度较高等优点^[30,31]. Anderson等人^[32]用高斯拟合对平面内的荧光粒子进行x-y平面的定位, 得到了细胞表面病毒的移动轨迹. Thomann等人^[33]应用高斯函数对不同层的光强进行拟合得到点源的三维坐标从而定位荧光点位置. 人们通常对共聚焦显微镜二维图像相邻层进行插值计算, 以得到样本的三维结构, 当样本比较小时误差较大^[34]. 上述插值算法用于评估微丝结构时, 只能判断微丝应力纤维的大致结构, 如要获得骨架单根纤维的取向、分布、尺寸以及多根纤维网

络之间的交联等几何参数则较为困难.

诸多文献在研究细胞黏附以及迁移时, 均会对细胞微丝的结构进行分析, 如Théry等人^[35]将细胞接种于不同形状的基底上, 并通过分析二维图像中微丝纤维的荧光强度来研究纤维表达量、细胞黏附与细胞张力之间的关系. 同样, Hotulainen等人^[36]通过分析细胞迁移时片状伪足中微丝的二维荧光变化以研究微丝结构的动态变化过程. 以上研究均通过统计微丝的荧光强度以及二维长度信息对微丝结构进行分析, 而忽略了微丝的三维结构. 另外一些研究将MSC细胞接种于不同形状、面积的模式化基底并分析黏附力学微环境参数对细胞分化的影响, 发现微丝是调控这一过程的关键因素, 但很少有工作详细地分析微丝三维结构的影响^[37-40]. 本工作首先利用微模式化技术得到具有不同铺展形状的MSC细胞, 应用荧光染色方法和激光共聚焦显微镜获得微丝纤维的断层扫描照片. 随后建立了基于共聚焦显微镜的微丝三维信息提取方法, 该方法根据共聚焦显微镜的成像特点, 采用三维高斯函数拟合其点扩散函数, 可以提取得到微丝纤维点的z轴坐标, 进而重建出三维单根纤维并提取其三维几何信息. 我们利用此方法对接种于圆形以及枝条形微模式化基底的MSC细胞的微丝进行重建, 并提取了纤维与x-y平面的夹角, 纤维的径向夹角、交联数目, 纤维的体积、长度、平均直径、长细比等空间几何参数. 本文发展的方法可以对微丝的三维几何信息进行更为准确的分析, 从而为研究微丝结构与细胞分化等生物学行为的关系提供基础.

2 材料及方法

2.1 微模式化基底制作

本文利用微接触印刷的方法制备微模式化基底, 通过控制细胞铺展形状研究黏附形态对细胞骨架结构的影响. 首先设计圆形和枝条形两种图案, 图案面积为 $1256\ \mu\text{m}^2$, 并将图案制成掩模版, 然后利用紫外曝光转印至光刻胶表面, 得到表面具有立体图案的硅片(母版). 进而在母版表面覆盖聚二甲基硅氧烷(PDMS)(Dow Corning, 美国)涂层, 80°C 烘烤2 h后固化, 从母版上脱模并切割成长方体PDMS印章, 印章上具有立体的图案印模. 将印章置于75%的酒精溶液中超声清洗5 min后, 用离子溅射仪对其表面进行亲水化处理.

在印章上滴加comb-polymer抗黏附分子, 然后以1500 r/min速度甩胶1 min, 使分子均匀地黏附于印章表面. 再迅速将此PDMS印章轻轻压印到共聚焦培养皿表面, 30 s后揭开得到微模式化基底.

2.2 细胞培养和荧光染色

GIBCO小鼠(C57BL/6)MSC购自Invitrogen公司(美国), 培养液为含10%胎牛血清(FBS, Gibco公司, 美国)和1%青霉素-链霉素双抗(Hyclone公司, 美国)的 α -MEM培养基(Hyclone公司, 美国). 细胞消化后以 10^5 /mL的浓度接种于微模式化基底, 在37°C、5% CO₂条件下培养1天, 利用4%多聚甲醛固定15 min, 之后用磷酸盐缓冲溶液(PBS)清洗3次, 再加入Hoechst33342溶液(0.161 μ g/mL)孵育20 min, 用37°C的PBS清洗3次, 再加入5 μ L/mL的鬼笔环肽在37°C的条件下避光孵育1 h. 最后用PBS清洗3次, 置于激光共聚焦显微镜下观察和拍照.

2.3 激光共聚焦扫描成像

本实验采用Leica TCS SPE共聚焦显微镜和100倍油镜进行观察. 选择波长为488 nm的激光作为光源并调整拍照参数: 曝光强度为20%, 扫描速度为200 Hz. 拍照时z轴步距为0.2 μ m, x-y平面的成像尺寸为1024像素 $\times$ 1024像素, 对应的像素尺寸为0.043 μ m $\times$ 0.043 μ m.

3 激光共聚焦显微镜三维高斯点扩散分析方法

应用普通显微镜观察小样本时, 会因衍射现象引起成像不清晰, 如对点光源进行成像时会在平面上形成艾里斑(图1(a)). 另外, 非焦平面上的样本点也会成像, 从而降低成像质量. 显微镜的成像质量通常用点扩散函数来衡量, 其本质上反映的是光学能量的空间分布, 成像质量越好则其能量越集中. 相对于普通光学显微镜, 激光共聚焦显微镜采用波长更短的激光作为光源, 并使用相对于物镜焦平面共轭的照明针孔和探测针孔, 避免了非焦平面点在探测针孔处成像, 从而大大提高了分辨率(图1(b)). 由于共聚焦显微镜的2次聚焦作用, 其点扩散函数理论上成为2次点扩散函数的叠加(图1(c)), 很大程度上消除了艾里斑及非焦平面

成像的影响. 下面我们对其点扩散进行分析以得到其z方向的成像特点.

共聚焦显微镜的点扩散函数可以由高斯函数拟合^[41]:

$$\text{PSF}_{\text{fit}} = A_0 \exp\left(-\frac{x^2+y^2}{2\sigma_{xy}^2} - \frac{z^2}{2\sigma_z^2}\right), \quad (1)$$

其中, σ_{xy} 和 σ_z 分别表示三维点扩散函数x-y平面以及z方向的标准方差. 将其进行分解可得

$$\begin{aligned} \text{PSF}_{\text{fit}} &= A_0 \exp\left(-\frac{x^2+y^2}{2\sigma_{xy}^2} - \frac{z^2}{2\sigma_z^2}\right) \\ &= A_0 \exp\left(-\frac{x^2+y^2}{2\sigma_{xy}^2}\right) \times \exp\left(-\frac{z^2}{2\sigma_z^2}\right) \\ &= A_0 \exp\left(-\frac{\rho^2}{2\sigma_\rho^2}\right) \times \exp\left(-\frac{z^2}{2\sigma_z^2}\right), \end{aligned} \quad (2)$$

其中 A_0 表示成像中心部分的光强, $\rho = \sqrt{x^2+y^2}$ 表示到中心点的距离, z 表示偏离焦平面的距离.

由公式可知共聚焦显微镜在焦平面进行成像时, 即 z 为0时, 其x-y平面的光强为二维高斯分布. 当固定 ρ 时, 其光强在z轴方向是以焦平面 $z=0$ 为峰的一维高斯函数. 利用这一特性, 可以基于微丝共聚焦层扫图的亮度变化求解出对应样本的z轴坐标, 进而较精确地解析其三维结构.

对于单根微丝而言, 其成像时可以看作多个点光源叠加的效果. 另外, 由上述分析可知成像得到的亮度实际上是焦平面附近一定范围内微丝荧光亮度的叠加.

在进行下述分析前, 假设微丝纤维整体染色均匀, 即在相同强度的激发光照射下纤维中每一点的发射光强相同. 基于上述假设以及三维点扩散函数的高斯近似, 焦点的微丝成像时的亮度 $I_{(x_0, y_0, z_0)}$ 可以表示为

$$\begin{aligned} I_{(x_0, y_0, z_0)} &= \int_{x_0-\Delta x}^{x_0+\Delta x} \int_{y_0-\Delta y}^{y_0+\Delta y} \int_{z_0-\Delta z}^{z_0+\Delta z} A_0 \exp\left[-\frac{(x-x_0)^2 + (y-y_0)^2}{2\sigma_{xy}^2}\right] \\ &\quad \times \exp\left[-\frac{(z-z_0)^2}{2\sigma_z^2}\right] dx dy dz, \end{aligned} \quad (3)$$

其中 $I_{(x_0, y_0, z_0)}$ 表示焦点成像的光强, (x_0, y_0, z_0) 表示显微镜主光轴与焦平面的交点(或称为焦点). Δx , Δy , Δz 表

图 1 (网络版彩图) 激光共聚焦显微镜原理. (a) 艾里斑及相应的点扩散函数; (b) 共聚焦显微镜成像光路示意图; (c) 共聚焦显微镜双聚焦作用下的点扩散函数

Figure 1 (Color online) The principle of laser confocal microscope. (a) Airy disks and the corresponding point spread functions; (b) the schematic diagram of imaging optical path of confocal microscope; (c) point spread function under double focusing of confocal microscope.

示成像的范围.

将式(3)进一步化简可得:

$$\begin{aligned}
 I_{(x_0, y_0, z_0)} &= \int_{x_0 - \Delta x}^{x_0 + \Delta x} \int_{y_0 - \Delta y}^{y_0 + \Delta y} A_0 \exp \left[-\frac{(x - x_0)^2 + (y - y_0)^2}{2\sigma_{xy}^2} \right] dx dy \\
 &\quad \times \int_{z_0 - \Delta z}^{z_0 + \Delta z} \exp \left[-\frac{(z - z_0)^2}{2\sigma_z^2} \right] dz \\
 &= A_0 I_{(x_0, y_0)} \int_{z_0 - \Delta z}^{z_0 + \Delta z} \exp \left[-\frac{(z - z_0)^2}{2\sigma_z^2} \right] dz, \quad (4)
 \end{aligned}$$

其中,

$$I_{(x_0, y_0)} = \int_{x_0 - \Delta x}^{x_0 + \Delta x} \int_{y_0 - \Delta y}^{y_0 + \Delta y} \exp \left[-\frac{(x - x_0)^2 + (y - y_0)^2}{2\sigma_{xy}^2} \right] dx dy. \quad (5)$$

实际上, 微丝在共聚焦显微镜的成像区域小且均匀, 即成像区域是一个微小的三维空间. 因此, Δz 为一微小量, 所以可以对式(4)中右侧第二项进行近似得到

$$I_{(x_0, y_0, z_0)} = A_0 I_{(x_0, y_0)} \times 2\Delta z. \quad (6)$$

继续推导非焦平面 z_1 处微丝的光强:

$$I_{(x_0, y_0, z_1)} = \int_{x_0-\Delta x}^{x_0+\Delta x} \int_{y_0-\Delta y}^{y_0+\Delta y} \int_{z_1-\Delta z}^{z_1+\Delta z} A_0 \exp\left[-\frac{(x-x_0)^2 + (y-y_0)^2}{2\sigma_{xy}^2}\right] \times \exp\left[-\frac{(z-z_0)^2}{2\sigma_z^2}\right] dx dy dz. \quad (7)$$

同样, 对其进行简化得

$$I_{(x_0, y_0, z_1)} = A_0 I_{(x_0, y_0)} \times \exp\left[-\frac{(z_1-z_0)^2}{2\sigma_z^2}\right] \times 2\Delta z. \quad (8)$$

对比式(6)及(8)可以看出, 共聚焦显微镜对微丝进行成像时, 同一 (x, y) 位置但不同层的点的成像光强在 z 方向呈高斯分布, 从而可以对光强进行高斯拟合得到发光点的 z 轴位置.

4 研究结果

4.1 基于点扩散函数的单根纤维重建

先将单根纤维从整个图中截取出来(图2(a)). 截取的图片长216像素、宽87像素, 像素点对应的尺寸为 $0.043 \mu\text{m}$. 一共5层, 层与层之间的距离为 $0.2 \mu\text{m}$. 得到单根纤维的层扫图后, 将每张图片分别减去其背景平均值进行降噪. 则整个图构成 $87 \times 216 \times 5$ 的三维数组, 如果只按照 (x, y) 坐标分组, 则共有 $87 \times 216 = 18792$ 组, 计算量十分巨大. 进一步观察可以发现, 整个图片只需要计算微丝成像的部分, 因此将所有层的光强平均值作为参考, 将平均光强值大于20的像素点作为阈值, 筛选后只有2074组, 从而大大减少了计算量. 用高斯函数式(8)拟合每组点的分布, 并记录其均值, 将均值作为这组像素点的 z 轴坐标, 也就是对应微丝上点的 z 轴位置(图2(b)和(c)).

对这些点逐个计算完之后可以得到单根微丝的三维点云图(图2(d)). 通过观察可以发现, 三维点云图中有一些明显游离在空间各处的噪点. 随后通过密度聚类, 即判断点与点之间的距离来排除这些点. 具体流程为: 计算选中点 $0.5 \mu\text{m}$ 范围内的区域内其他点的个数, 如果这个区域其他点的个数少于5个, 则这个点为孤立点, 并定义其为噪点. 经过上述密度聚类算法, 可以筛选出微丝上的点(图2(e)). 进而利用凸包算法, 将整个三维散点覆盖, 提取其包络的表面点作为三维散点的表面点(图2(f)). 再利用表面点对其进行椭球拟合,

计算其体积以及与 x - y 平面的夹角等参数(图2(g)).

通过拟合的椭球可以将纤维的空间三维信息提取出来, 纤维的长半轴 a 为 $4.68 \mu\text{m}$, 短半轴 b 和 c 分别为 0.39 和 $0.45 \mu\text{m}$, 微丝的体积 v 为 $3.45 \mu\text{m}^3$. 另外, 微丝的偏心率 e 为 0.996 , 其计算方法如下:

$$e = \frac{\sqrt{a^2 - \left[\frac{(b+c)}{2}\right]^2}}{a}. \quad (9)$$

微丝与 x - y 平面的夹角为 2.90° . 我们根据显微镜的成像特点对微丝参数进行估计, 拾取图像上纤维两端的坐标计算得到纤维在 x - y 上的投影长度为 $9.20 \mu\text{m}$, 纤维对应的层高为3-5层之间, 据此估计单根纤维的长度应在 $9.21 \mu\text{m}$ 左右. 估计的角度应在 2.48° - 3.73° 之间, 与拟合结果基本一致.

4.2 基于点扩散函数以及密度聚类的多根纤维重建

上面已经初步完成了对单根纤维空间几何信息的提取, 相对而言, 多根纤维的空间信息提取会面临更复杂的情况. 在细胞内, 细长的微丝之间可能存在各种空间几何关系, 如平行、相交、异面等. 如果两个微丝平行, 则只需分别将其按照单根纤维提取即可. 当两根微丝相交时, 由于荧光叠加的效果, 会对三维重建产生影响. 当两个微丝异面时需要分成两种情况讨论: (1) 如果两个微丝之间的距离较远, 此时两个纤维互相独立, 成像互不影响; (2) 如果两个微丝之间的距离比较近, 则交叉位置的光强叠加, 从而影响微丝空间信息的提取. 综上所述, 在多根纤维共存的状态下, 最主要的问题是微丝在相交以及异面且距离比较近时成像交叉点的光强会影响 z 方向的坐标提取. 因此, 我们先根据图像中微丝分叉的特点建立对应的图像匹配模板, 随后利用击中击不中算法对纤维的交点进行识别, 然后将交点剔除, 将一些纤维打断, 然后对其进行三维重建, 提取各个纤维的空间角以及纤维之间的距离. 将空间角小于 10° 的纤维判断为平行, 再通过判断它们之间的中心距离以及长度确定两根纤维端点之间的距离, 当两端点距离小于 $0.4 \mu\text{m}$ 时判定两者相连. 如果不相连, 再根据两纤维最近距离确定相交或者互相异面的空间关系, 最后得到所有纤维的空间几何信息.

如图3(a)所示, 我们用共聚焦显微镜对荧光染色

图 2 (网络版彩图)单根细胞微丝纤维提取流程. (a) 细胞微丝荧光图(细胞接种在 $1256 \mu\text{m}^2$ 枝条形微模式化基底); (a1) 微丝的局部放大图((a)中红色区域); (a2) 单根纤维的放大图((a1)中黄色区域). (b) 单根微丝纤维共聚焦二维图像(层间距: $0.2 \mu\text{m}$); (c) 单根纤维序列图中不同区域像素灰度值及高斯拟合曲线; (d) 单根微丝纤维像素的三维散点图; (e) 单根微丝纤维三维散点的聚类图(图中空心圆圈为噪点, 红色实心圆为纤维主体); (f) 单根纤维的三维包络图; (g) 单根微丝纤维的椭球拟合图

Figure 2 (Color online) Extraction process of single microfilament. (a) Fluorescence image of microfilament in the cells seeded on the micropatterned substrate with $1256 \mu\text{m}^2$ branch-shaped pattern; (a1) enlarged view of microfilament (red area in a); (a2) enlarged view of single microfilament (yellow area in a1). (b) Two dimensional image of single microfilament under confocal microscope; (c) gray values of different regions in different images from single microfilament and Gaussian fitting curves; (d) three-dimensional scatter plot of single microfilament; (e) clustering graph of scattered points of single microfilament, in which open circles are noise points and red solid circles are the body of the fiber; (f) convex envelope graph of single microfilament; (g) ellipsoid fitting diagram of single microfilament.

图 3 (网络版彩图)多根微丝纤维提取流程. (a) 细胞微丝的成像示意图; (b) 细胞微丝的共聚焦二维图像(细胞接种在 $1256 \mu\text{m}^2$ 圆形微模式化基底); (c) 多层微丝图像叠加; (d) 微丝二值化; (e) 微丝图案骨架化; (f) 去除毛刺; (g) 微丝相交点识别; (h) 多根纤维分离; (i) 多根纤维空间信息提取

Figure 3 (Color online) Extraction process of multiple microfilaments. (a) Schematic diagram of microfilament imaging; (b) fluorescence image of microfilament in the MSCs seeded on the micropatterned substrate with $1256 \mu\text{m}^2$ circular pattern; (c) overlay of multiple confocal images; (d) binary image; (e) skeletalization; (f) glitches removing; (g) recognition of microfilaments intersection; (h) separation of multiple microfilaments; (i) extraction of the separated microfilaments.

的细胞进行逐层扫描(图3(a)), 并获取一系列的细胞微丝图像(图3(b)). 以一个圆形模式的细胞为例, 沿 z 向提取5个图像, 对其光强进行叠加并求其平均值(图3(c)), 以图像的平均灰度作为阈值将图像转化为二值图(图3(d)), 计算各个纤维的面积并去除面积小于50个像素以及长细比小于3的纤维, 随后将纤维进行骨架化处理(图3(e)). 接下来我们去除因为骨架化所导致的图像毛刺(图3(f)), 再根据模板采用击中不中算法提取纤维相交点(图3(g)). 然后根据相交点的坐标将微丝打断得到单根纤维(图3(h)), 通过单根纤维的重建算法将各纤维的空间信息提取出来. 最后我们根据纤维之间的取向以及距离关系判断是否相连并更新纤维的空间信

息, 最终得到各个纤维的空间几何信息(图3(i)).

为了对细胞纤维的空间几何信息进行统计分析, 本文根据纤维几何中心到细胞中心的距离, 沿径向将细胞均匀地分为中心区域、中间区域以及边缘区域等三个部分(图4(a)和(b)). 统计结果表明, 当细胞接种在面积为 $1256 \mu\text{m}^2$ 的圆形微模式化基底后, 细胞微丝与 x - y 平面的角度随着与细胞中心的距离增加而增加(图4(c)). 对于接种在枝条微模式化基底的细胞其微丝与 x - y 平面的夹角随着与细胞中心距离增大而减小(图4(d)), 这个结果和接种在圆形模式的结果相反. 采用径向偏向角 θ 来分析纤维取向与位置之间的关系, 其定义为细胞中心和微丝中心连线与纤维长轴之间的夹角.

图 4 (网络版彩图)细胞微丝取向和交联参数统计分析. (a), (b) 圆形和枝条形细胞中微丝纤维划分方法示意图; 圆形细胞中微丝几何参数的分布图: 纤维与x-y平面的夹角(c), 纤维的径向偏向角(e), 纤维交联点个数(g); 枝条形细胞中微丝几何参数的分布图: 纤维与x-y平面的夹角(d), 纤维的径向偏向角(f), 纤维交联点个数(h)

Figure 4 (Color online) Statistical analysis on orientation and interaction of the microfilaments in micropatterned MSCs. (a), (b) Schematic diagram of division method for microfilament in circular and branch-shaped MSCs. The distribution of geometric parameters in circular MSCs: the angle with x-y plane (c), angle with radial direction (e) and number of intersections (g), respectively. The distribution of geometric parameters for branch-shaped MSCs: angle with x-y plane (d), angle with radial direction (f), number of intersections (h), respectively.

此外, 我们定义微丝的中心与图案中心的连线与x轴的夹角为微丝方位角, 以及细胞微丝在x-y平面投影的方

位角 β , 通过与 β 之间的角度关系即可算出微丝径向偏向角 θ . 这个角度反映细胞微丝沿半径方向的偏角. 铺

展在圆形模式化基底的细胞其径向偏向角随着与细胞中心的距离增加而增加(图4(e)). 通过分析可以发现, 细胞微丝在中心区域取向具有较高的一致性, 而在细胞边缘区域, 微丝的取向有两种倾向, 即一种沿着半径方向, 另一种垂直于半径方向, 这样使平均结果在边缘处较大. 对于接种在枝条微模式化基底的细胞, 其微丝的径向偏向角随着与细胞中心的距离增加而减小, 这表明细胞在细胞中心区域倾向于随机分布, 在细胞边缘区域纤维的取向倾向于沿着半径方向, 使得整体的径向偏向角较小(图4(f)). 对两种模式上细胞中微丝的交点进行分析, 结果表明在圆形情况下微丝交点数从中心向边缘逐渐增加(图4(g)), 枝条形细胞微丝交点主要分布在中心区域并向外逐渐减小(图4(h)).

培养于圆形微模式化基底上的细胞微丝体积随着与细胞中心的距离增加而减小(图5(a)). 直接从纤维的荧光照片也可以观察到, 长纤维主要集中在细胞的中心区域并且跨度较大, 而短纤维主要集中于细胞边缘区域(图3(c)). 对于培养于枝条微模式化基底的细胞, 其微丝纤维的体积随着与细胞中心的距离增加而先增大后减小(图5(b)). 圆形细胞中纤维长度随着与细胞中心的距离增加而减小(图5(c)), 而枝条形细胞纤维长度呈现先增加后减小的趋势(图5(d)). 圆形细胞中纤维平均半径的分布没有显著差异(图5(e)), 而枝条形细胞中间区域的纤维平均半径显著高于中心及边缘区域(图5(f)). 圆形微模式化基底上细胞中微丝长细比随着与细胞中心距离的增大而减小(图5(g)), 而在枝条形细胞的中间区域微丝长细比显著高于中心以及边缘区域(图5(h)).

5 讨论与结论

微丝是细胞骨架的主要组成部分, 具有支撑细胞以及传递胞内信号的功能. 为了探索外力作用下细胞骨架结构变化及其在胞内力学信号转导过程中的作用机制, 需要对微丝的三维网络结构进行观察和分析. 因此, 本文发展了一套图像处理和数据分析方法, 并对不同铺展形状的MSC细胞中微丝的三维空间几何参数进行了提取和统计分析.

通过分析多根纤维的几何信息可以发现, 对于接种于圆形微模式化基底的细胞, 其微丝与 x - y 平面的夹角在细胞边缘大, 而在细胞中部角度较小; 对于接种于

枝条微模式化基底的细胞, 其微丝与 x - y 平面的夹角在细胞边缘的角度小, 而在细胞中部角度较大. 对比两者结果可以发现, 在具有较长微丝纤维的区域, 纤维与 x - y 平面的夹角较小; 而在短小微丝富集区域, 微丝与 x - y 平面的夹角较大. 已有研究表明, 较长的微丝纤维具有较大的张力^[42-44]. 因此由上述结果可以推测, 微丝与 x - y 平面的夹角可能受微丝纤维的张力影响, 长纤维的高张力会降低其与 x - y 平面的夹角. 对于铺展在相同面积、不同形状的MSC而言, 铺展形状的差异可能会导致微丝在胞内不同区域形成不同的张力结构, 最终影响和调控细胞的分化.

本文通过分析激光共聚焦显微镜的成像特点, 建立了一个提取并分析细胞微丝三维空间几何信息的方法. 相对于仅仅对微丝的二维几何信息进行提取以及分析, 此方法通过对微丝进行三维重建, 在提取微丝长度、体积、长细比等几何参数时具有更高的精度. 另外, 因为在分析微丝结构过程中增加了一个维度的信息, 能够针对更多的微丝几何参数进行分析. 例如, 针对细胞黏附力学问题, 可以结合实验观察进一步解释细胞微丝三维结构的力学自适应现象; 当研究细胞迁移过程的力学机制时, 可以分析细胞不同区域微丝三维空间结构变化、微丝交联的规律等. 此外, 此方法还可用于分析细胞骨架的其他成分(如微管、中间丝纤维等)的三维几何结构信息.

需要指出的是, 本文研究仍存在着不足之处. 例如, 在进行细胞微丝荧光照片的图像过程中, 为了提取主要纤维结构的几何信息, 忽略了一些尺寸较小或光强较低的微丝以及一些曲线形的微丝, 可能在分析微丝整体结构时引起误差. 另外, 虽然文中能够得到多根纤维的交联点信息, 但对微丝互相连接形成的网状结构尚未定义更详细的几何参数, 也未做更细致的分析, 需要在未来工作中加以改进和完善.

本文根据共聚焦显微镜的成像特点, 发展了提取细胞中主要微丝三维几何信息的方法. 在后续工作中, 我们将对该方法进行改进. 例如, 将改进微丝纤维的分割方法, 提高微丝分割的准确性以及完整性; 优化坐标演算方法, 加快运算速度; 加入微丝网络结构分析方法, 以更全面地分析网络结构. 此外, 该方法还能对细胞骨架的其他成分进行三维重建, 从而完善整个细胞骨架结构. 该方法将来可以与纤维力学性能测量方法相结合^[45], 进一步构建整个微丝网络的力学结构, 从

图 5 (网络版彩图)细胞微丝形状参数统计分析. 圆形细胞中微丝形状参数的分布图: 体积(a)、长度(c)、平均直径(e)以及长细比(g); 枝条形细胞中微丝形状参数的分布图: 体积(b)、长度(d)、平均半径(f)以及长细比(h)

Figure 5 (Color online) Statistical analysis on shape parameters of the microfilaments in micropatterned MSCs. The distribution of shape parameters of microfilaments in circular MSCs: volume (a), length of major axis (c), average radius (e) and aspect ratio (g). The distribution of shape parameters of microfilaments in branch-shaped MSCs: volume (b), length of major axis (d), average radius (f) and aspect ratio (h).

而帮助研究人员深入理解细胞的生物学行为与其力学微环境之间的关联, 并最终为发育生物学和组织修复

方面的机制研究以及组织工程和再生医学领域的实际应用提供研究基础.

参考文献

- 1 Chen C S, Mrksich M, Huang S. Geometric control of cell life and death. *Science*, 1997, 276: 1425–1428
- 2 Chen B, Kumar G, Co C C, et al. Geometric control of cell migration. *Sci Rep*, 2013, 3: 2827
- 3 Guilak F, Cohen D M, Estes B T, et al. Control of stem cell fate by physical interactions with the extracellular matrix. *Cell Stem Cell*, 2009, 5: 17–26
- 4 Gupta S K, Li Y, Guo M. Anisotropic mechanics and dynamics of a living mammalian cytoplasm. *Soft Matter*, 2019, 15: 190–199
- 5 Rckerl F, Lenz M, Betz T, et al. Adaptive response of actin bundles under mechanical stress. *Biophys J*, 2017, 113: 1072–1079
- 6 Ingber D E, Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *J Cell Sci*, 2003, 116: 1157–1173
- 7 Ingber D E, Bojanowski K, Chen C, et al. Cellular tensegrity: An architectural basis for control of cell shape and morphogenesis. *Mol Biol Cell*, 1996, 7: 1975
- 8 Ingber D E. Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks. *J Cell Sci*, 2003, 116: 1397–1408
- 9 Fu J, Wang Y K, Yang M T, et al. Mechanical regulation of cell function with geometrically modulated elastomeric substrates. *Nat Methods*, 2010, 7: 733–736
- 10 McBeath R, Pirone D M, Nelson C M, et al. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell*, 2004, 6: 483–495
- 11 Peng R, Yao X, Ding J. Effect of cell anisotropy on differentiation of stem cells on micropatterned surfaces through the controlled single cell adhesion. *Biomaterials*, 2011, 32: 8048–8057
- 12 Engler A J, Sen S, Sweeney H L, et al. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 2006, 126: 677–689
- 13 Chen C S, Alonso J L, Ostuni E, et al. Cell shape provides global control of focal adhesion assembly. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 307: 355–361
- 14 Damania D, Subramanian H, Tiwari A K, et al. Role of cytoskeleton in controlling the disorder strength of cellular nanoscale architecture. *Biophys J*, 2010, 99: 989–996
- 15 Lavenus S, Pilet P, Guicheux J, et al. Behaviour of mesenchymal stem cells, fibroblasts and osteoblasts on smooth surfaces. *Acta Biomater*, 2011, 7: 1525–1534
- 16 Ingber D E. The mechanochemical basis of cell and tissue regulation. *Mech Chem Biosyst*, 2004, 1: 53–68
- 17 Qin Y, Li Y, Zhang L Y, et al. Stochastic fluctuation-induced cell polarization on elastic substrates: A cytoskeleton-based mechanical model. *J Mech Phys Solids*, 2020, 137: 103872
- 18 Macdonald L, Baldini G, Storrie B. Does super-resolution fluorescence microscopy obsolete previous microscopic approaches to protein co-localization? *Methods Mol Biol*, 2015, 1270: 255–275
- 19 Pankajakshan P, Zhang B, Blanc-Fraud L, et al. Blind deconvolution for thin-layered confocal imaging. *Appl Opt*, 2009, 48: 4437–4448
- 20 Wang Y, Dai Q, Cai Q, et al. Blind deconvolution subject to sparse representation for fluorescence microscopy. *Opt Commun*, 2013, 286: 60–68
- 21 McNally J G, Karpova T, Cooper J, et al. Three-dimensional imaging by deconvolution microscopy. *Methods*, 1999, 19: 373–385
- 22 Kenig T, Kam Z, Feuer A. Blind image deconvolution using machine learning for three-dimensional microscopy. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell*, 2010, 32: 2191–2204
- 23 Haeberle O, Ammar M, Furukawa H, et al. Point spread function of optical microscopes imaging through stratified media. *Opt Express*, 2003, 11: 2964–2969
- 24 Haeberle O. Focusing of light through a stratified medium: A practical approach for computing microscope point spread functions - Part II: confocal and multiphoton microscopy. *Opt Commun*, 2004, 235: 1–10
- 25 Ghosh S, Preza C. Fluorescence microscopy point spread function model accounting for aberrations due to refractive index variability within a specimen. *J Biomed Opt*, 2015, 20: 075003
- 26 de Monvel J B, Le Calvez S, Ulfendahl M. Image restoration for confocal microscopy: Improving the limits of deconvolution, with application to the visualization of the mammalian hearing organ. *Biophys J*, 2001, 80: 2455–2470
- 27 Biggs D S C. 3D deconvolution microscopy. *Curr Protocols Cytometry*, 2010, 52: 12.19.1

- 28 Cheezum M K, Walker W F, Guilford W H. Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles. *Biophys J*, 2001, 81: 2378–2388
- 29 Stallinga S, Rieger B. Accuracy of the Gaussian Point Spread Function model in 2D localization microscopy. *Opt Express*, 2010, 18: 24461
- 30 Zhang B, Zerubia J, Olivo-Marin J C. A study of Gaussian approximations of fluorescence microscopy PSF models. In: *Three-Dimensional and Multidimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing XIII*, 2006. 6090
- 31 Juette M F, Gould T J, Lessard M D, et al. Three-dimensional sub-100 nm resolution fluorescence microscopy of thick samples. *Nat Methods*, 2008, 5: 527–529
- 32 Anderson C M, Georgiou G N, Morrison I E G, et al. Tracking of cell-surface receptors by fluorescence digital imaging microscopy using a charge-coupled device camera-low-density-lipoprotein and influenza-virus receptor mobility at 4-degrees-C. *J Cell Sci*, 1992, 101: 415–425
- 33 Thomann D, Rines D R, Sorger P K, et al. Automatic fluorescent tag detection in 3D with super-resolution: Application to the analysis of chromosome movement. *J Microsc*, 2002, 208: 49–64
- 34 Newman T S, Yi H. A survey of the marching cubes algorithm. *Comput Graphics*, 2006, 30: 854–879
- 35 Théry M, Pépin A, Dressaire E, et al. Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2006, 63: 341–355
- 36 Hotulainen P, Lappalainen P. Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J Cell Biol*, 2006, 173: 383–394
- 37 Ruiz S A, Chen C S. Emergence of patterned stem cell differentiation within multicellular structures. *Stem Cells*, 2008, 26: 2921–2927
- 38 Kilian K A, Bugarija B, Lahn B T, et al. Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 4872–4877
- 39 Sen B, Uzer G, Samsonraj R M, et al. Intranuclear actin structure modulates mesenchymal stem cell differentiation. *Stem Cells*, 2017, 35: 1624–1635
- 40 Chen L, Hu H, Qiu W, et al. Actin depolymerization enhances adipogenic differentiation in human stromal stem cells. *Stem Cell Res*, 2018, 29: 76–83
- 41 Zhang B, Zerubia J, Olivo-Marin J C. Gaussian approximations of fluorescence microscope point-spread function models. *Appl Opt*, 2007, 46: 1819–1829
- 42 Ghibaud M, Di Meglio J M, Hersen P, et al. Mechanics of cell spreading within 3D-micropatterned environments. *Lab Chip*, 2011, 11: 805–812
- 43 Gupta M, Sarangi B R, Deschamps J, et al. Adaptive rheology and ordering of cell cytoskeleton govern matrix rigidity sensing. *Nat Commun*, 2015, 6: 7525
- 44 Chugh P, Clark A G, Smith M B, et al. Actin cortex architecture regulates cell surface tension. *Nat Cell Biol*, 2017, 19: 689–697
- 45 Ye X, Wang T, Zhuang Z, et al. Tensile properties of individual multicellular *Bacillus subtilis* fibers. *Sci China-Phys Mech Astron*, 2019, 62: 994611

Analyses on cytoskeleton structure basing on confocal microscope

SUN Qing, ZHANG MuTian & HUO Bo^{*}

School of Aerospace Engineering, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China

Actin microfilaments are the main components of cytoskeleton. Some previous studies have shown that the state of cell adhesion regulates the biological behavior of stem cells such as differentiation and apoptosis by affecting the structure of microfilaments. The primary method of observing the structure of microfilaments is using laser confocal microscopy to obtain fluorescence images of microfilament, but usually only the two-dimensional structure of microfilaments was analyzed, and few studies have focused on the three-dimensional structure of microfilaments. In this paper, we proposed a three-dimensional reconstruction method of microfilaments based on laser confocal microscopy. The point spread function of a confocal microscope was fitted by three-dimensional Gaussian function, and then we got the Gaussian distribution of the z -axis light intensity by decoupling the x - y direction with the z direction of the function. Subsequently, the geometric parameters of the major fibers in a cell were obtained through image processing methods, and then the three-dimensional geometric information of the microfilament was extracted by using fitting calculation, density clustering, ellipsoid fitting and other operations to deal with filament images. In addition, we constructed circular and branch-shaped micropatterned substrates with an area of $1256\ \mu\text{m}^2$, and we adopted the three-dimensional reconstruction method established in this study to reconstruct and analyze the microfilaments of bone marrow mesenchymal stem cells, which were cultured on the micropatterned substrates. The results showed that the spatial distribution of geometric parameters such as the orientation of the microfilaments, the number of intersection, the volume, and the aspect ratio for the cells with two shapes were significantly different, indicating that the mechanical state of the cells was influenced by the spreading shape. The purpose of this study is to establish a method for extracting the three-dimensional structural parameters of microfilaments, which can provide a basis for revealing the mechanism of mechanotransduction inside cells.

microfilament, 3-dimentional point spread function, image process

PACS: 42.30.Wb, 87.57.Nk, 87.16.Ka

doi: [10.1360/SSPMA-2020-0150](https://doi.org/10.1360/SSPMA-2020-0150)