

原子力显微术应用于活细胞及新鲜组织成像的新进展

陈佩佩, 董宏涛, 陈龙, 孙全梅, 韩东*

国家纳米科学中心纳米生物医学成像与表征实验室, 北京 100190;

青海省海西蒙古族藏族自治州茫崖行委公安局法医室, 青海 816400

* 联系人, E-mail: ghan@nanoctr.cn

2008-12-25 收稿, 2009-02-24 接受

国家自然科学基金(批准号: 90709054)和国家重点基础研究发展计划(编号: 2005CB724700, 2006CB705600)资助项目

摘要 原子力显微术由于其独特的成像方式, 为生物医学领域高分辨表征与成像研究提供了崭新的手段, 但其在活细胞及新鲜组织成像上仍存在着巨大挑战. 本文结合作者在活细胞及新鲜组织成像方面的工作, 对原子力显微术两种常用工作模式(接触模式和轻敲模式)的特点和局限、新的轻敲模式(磁驱动轻敲模式, MAC mode)用于活体生物样本的优势以及 MAC mode 所提供的一种反映样品表面新信息的 TREC 像进行了叙述, 进而介绍了目前原子力显微术在活体生物样本成像方法及表征研究方面的进展.

关键词

原子力显微镜

活细胞

组织

磁驱动轻敲模式

生物力学

原子力显微术(atomic force microscopy, AFM)是扫描探针显微镜(scanning probe microscopy, SPM)家族中的一员^[1]. 随着纳米科技的发展, 原子力显微术已广泛应用于物理、化学、生命科学、材料科学等研究领域并日益展现出强大的发展势头^[2~5]. 近年来, 随着具有生命力、异质性以及可变性的生物样本层出不穷, AFM在生物医学领域的应用崭露头角^[6]. 初期多是研究经过自然干燥的生物样本, 但干燥过程会严重影响样本的正常形态, 并且样本不再具有生理活性^[7]. 之后, 研究者们普遍研究溶液状态下化学固定的细胞和组织, 但化学处理后的细胞活性大大降低^[8]. 因此, 研究这些经过自然干燥或化学固定的细胞和组织已远远不能满足生物医学领域的要求. 现在, 利用AFM在生理条件下对真正具有活性的细胞和新鲜组织进行高分辨成像以及研究它们的动态变化过程成为研究热点. 例如, Rotsch等人^[9]利用AFM研究了生腺癌细胞分泌的生长因子引起其伪足的伸展及伪足部分弹性的变化. Han等人^[10]使用AFM实时观测了微血管内皮细胞铺展的动态过程. 由于细胞膜的屈服性强, 所以AFM的针尖不仅可以对活细

胞表面进行成像, 还可以在不穿透细胞膜的情况下对活体细胞内部的一些微细结构, 如细胞骨架和一些微小细胞器进行成像^[11,12]. 从而为生物医学领域提供了强大的研究工具. 但由于AFM的“触摸”成像方式, 被探测细胞要求保持相对稳定, 因此在对活体细胞的成像过程中, 就要求细胞对培养瓶壁或培养皿壁具有很好的贴壁能力. 而对复杂的多层次组织来说, 高的背景噪声也大大影响了成像质量. 此外, 在成像时还要通过参数的调节来尽可能减少AFM针尖对活体细胞的影响甚至破坏, 而这些参数的调节尚需长时间的经验摸索与反复实践. 因此, 迄今为止, 能够使用AFM在生理条件下对活体生物样本进行高分辨成像的细胞种类还不多, 而且成像质量有待提高. 所以, 使用AFM对活体生物样本, 尤其是具有多层组织结构的新鲜组织表面进行高分辨成像仍然存在着巨大的挑战.

1 原子力显微镜的成像原理和用于活细胞成像的两种工作模式

AFM采用带有针尖的对微弱力极其敏感的微悬

引用格式: 陈佩佩, 董宏涛, 陈龙, 等. 原子力显微术应用于活细胞及新鲜组织成像的新进展. 科学通报, 2009, 54: 2027~2032

Chen P P, Dong H T, Chen L, et al. Application of atomic force microscopy to living samples from cells to fresh tissues. Chinese Sci Bull, 2009, 54: 2410–2415, doi: 10.1007/s11434-009-0374-1

臂在样本表面进行扫描从而得到图像。扫描过程中, 针尖顶部最外层原子与样品表面原子之间的相互作用力使微悬臂不断发生形变或改变运动状态, 因此一束激光经由微悬臂的光滑背面反射到光电探测器上的位置也不断发生变化。AFM就是通过光电探测器来检测微悬臂的偏转从而获得样品形貌和作用力等信息, 其成像原理类似于临床体格检查中的“触诊”。AFM由于独特的成像方式、被检测样本尤其是生物样本不需要任何处理就可在大气或液体等多种环境中进行纳米尺度的高分辨成像, 因此AFM已广泛应用于生物样品, 如DNA^[13,14]和蛋白^[15,16]的研究, 为生物医学领域高分辨形态学研究提供了崭新的手段。同时, 已有学者将此种方法应用于法医学的鉴定之中^[17]。

AFM发展至今, 接触模式(contact mode)和轻敲模式(tapping mode)是两种最主要的工作模式, 其中接触模式是针尖始终接触样本表面进行逐点扫描成像, 从而产生形貌像、对高低起伏敏感的偏转像以及反映侧向力的摩擦像等多个信息的通道像。在扫描过程中, 样本要承受来自针尖的法向应力以及相当于10倍法向力的侧向力, 因此即使使用很软的针尖(弹性常数为0.01 N/m), 也会在一定程度上对样本尤其是活体细胞产生影响^[18]。与接触模式不同, 轻敲模式是运用压电感应器驱动微悬臂高频振动进行扫描。其优点是微悬臂上的探针只与被检测样本表面作间断性接触, 可大大减少接触模式成像过程中针尖产生的侧向力对样本表面的损伤, 更适合对生物样本等柔软物体进行非破坏性成像。

在以往的研究中, 我们分别运用接触模式和轻敲模式对生理条件下培养的大鼠脑微血管内皮细胞进行了活体高分辨成像^[19]。微血管内皮细胞大部分厚度在200~500 nm之间, 贴壁能力强, 表面相对平坦, 细胞骨架网络丰富, 力学性质表现突出。以上优异的特性使微血管内皮细胞成为AFM进行细胞骨架网络活体成像研究的模式细胞。我们在研究中使用相对较软的弹性常数为0.38 N/m的微悬臂探针, 通过调节参数, 在培养液中使用接触模式和轻敲模式两种成像方式均可得到活体微血管内皮细胞表面及细胞骨架网络的高分辨成像, 在垂直于图像中X、Y轴的方向上, 也就是反映细胞高低起伏的Z轴分辨率可达20 nm。由于接触和轻敲这两种成像模式扫描方式的不同, 所获得的图像也存在着一定程度上的差异:

接触模式能更好反映细胞深层骨架网络的信息; 而轻敲模式更多的是获取细胞表面的信息, 同时也包括一部分细胞骨架网络信息。从这两种模式得到不同信息的图像反映出这两种模式的不同作用机制。接触模式由于针尖在扫描过程中施加给细胞的强大侧向力使内皮细胞骨架凸显以此来抵抗如此强大的侧向力, 因而得到的图像骨架信息十分丰富; 而轻敲模式作用于细胞的侧向力要小得多, 因此得到的是更多的细胞表面信息。

考虑到AFM的工作原理, 我们进一步将AFM针尖既作为成像工具又作为纳牛顿(nN)量级的施力工具, 观察了微血管内皮细胞在特定微区受力后的整个细胞骨架网络的表现。当细胞骨架网络的主要应力纤维束在纳米微区受到纳牛顿(nN)量级法向力轻敲时^[20], 其周围局部骨架网络会出现分叉应力纤维增加的现象。这种应力纤维网的响应性变化可能用来抵抗局部增大的应力刺激。而当细胞边缘的某些分叉应力纤维受到轻敲时, 则可引起整个细胞骨架网络的变化, 甚至某些细胞器也可随之出现位置移动。上述实验说明, 细胞骨架网络可能存在应力敏感微区。另外, 当细胞骨架网络受到纳牛顿量级的侧向力连续刺激时, 整个骨架网络出现顺应性改变, 长轴与施力方向一致^[21]。以上实验结果与宏观力作用于内皮细胞所产生的细胞骨架顺应性改变结果相符。而对一些病理性损伤的细胞, 细胞骨架网络的应力承载能力下降, 纳牛顿量级的连续侧向应力就可引起细胞皱缩, 而当应力去除后细胞骨架网络还可在一定程度上恢复。上述实验将活体细胞骨架的力学特性研究引入微米甚至纳米尺度, 其中AFM的介入为细胞骨架的在体微观观察提供了崭新的手段及方法。

2 新型工作模式——磁驱动轻敲模式在活细胞成像中的应用

大多数类型的哺乳动物体细胞, 贴壁能力不足以抵抗接触模式成像时的侧向力, 因此高分辨成像非常困难。应用轻敲模式成像可以大大减少侧向力的产生, 减少机械应力对细胞的损伤。但当带有针尖的微悬臂在液体中尤其是在黏度较高的细胞培养液中振动时, 振幅/频率共振曲线所受的干扰非常大^[22], 参数调整的复杂性和图像的不稳定性限制了这种技术对活细胞以及具有多层结构生物组织的高分辨成

像。近期发展的新型轻敲模式——磁驱动轻敲模式(MAC mode)^[23], 利用微悬臂上方或下方的磁力螺线管产生交变磁场, 直接驱动背面镀有磁膜的微悬臂产生振动, 大大提高了在液体环境中对微悬臂驱动的实效性, 使轻敲模式更适合在液体环境中进行, 并有效提高了活体样本的成像分辨率。目前此成像模式已应用在生物分子的液体环境高分辨成像研究中, 并取得了理想的结果^[24,25]。但对表面信息相对复杂的活细胞乃至多层结构的生物新鲜组织的应用研究还刚刚开展。

在我们的研究中^[26], 比较了含 10% 胎牛血清的 DMEM 细胞培养基中, 普通压电感应器驱动(AAC)与磁驱动(MAC)作用下微悬臂的振动曲线。我们选用

了弹性常数为 0.6 N/m 和 0.03 N/m 的针尖, 考察了在较大驱动力和较小驱动力作用下针尖的振动情况。结果表明, 常常用于活细胞成像的弹性常数为 0.6 N/m 的微悬臂(图 1), 在较大驱动力(30%)作用时(图 1(a)与(b)), MAC能更有效减少微悬臂的振动噪声, 但有效Q值($\Delta f/f$)与AAC区别不大; 而在小驱动力(4%)作用时(图 1(c)与(d)), 由于细胞培养液的阻尼作用, 两者都不能产生有效谐振峰(图 1)。弹性常数为 0.03 N/m 的微悬臂(图 2), 在较大驱动力(30%)作用时(图 2(a)与(b)), MAC与AAC相比较能更有效地增加谐振峰的驱动振幅, 但Q值基本相似; 在小驱动力(4%)作用时(图 2(c)与(d)), MAC仍可产生有效谐振峰, 而AAC则不能。因此, 不难看出, MAC可使我们在成像过程

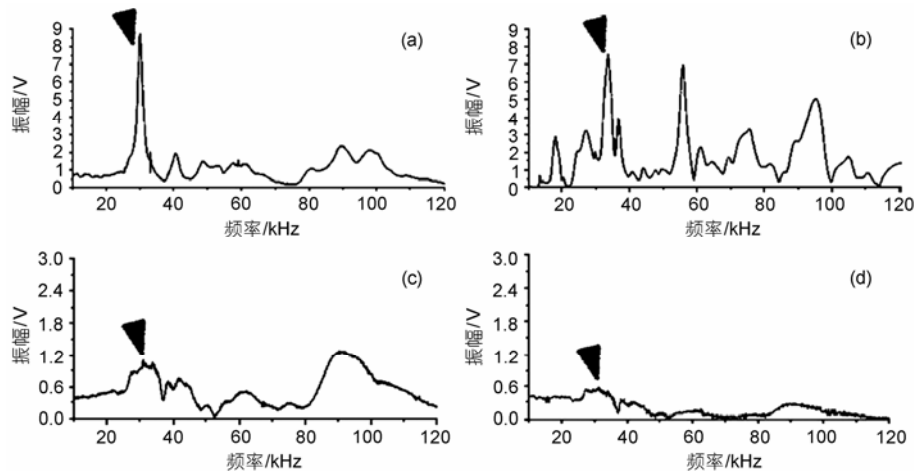


图 1 弹性常数为 0.6 N/m 的探针在 AAC 与 MAC 作用下微悬臂的振动曲线^[26]

(a) MAC 模式, 30%驱动力; (b) AAC 模式, 30%驱动力; (c) MAC 模式, 4%驱动力; (d) AAC 模式, 4%驱动力

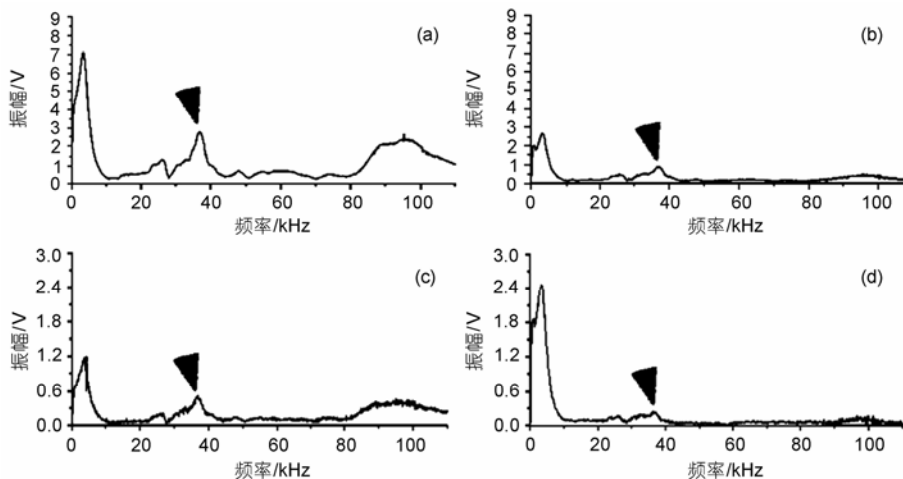


图 2 弹性常数为 0.03 N/m 的探针在 AAC 与 MAC 作用下微悬臂的振动曲线^[26]

(a) MAC 模式, 30%驱动力; (b) AAC 模式, 30%驱动力; (c) MAC 模式, 4%驱动力; (d) AAC 模式, 4%驱动力

中选择更软的微悬臂,使用更小的驱动力.这两点在活细胞成像中,对减少损伤、提高分辨率是非常重要的.

在实际的工作中^[26,27],我们使用弹性常数为 0.03 N/m的微悬臂,当谐振频率为 30 kHz时,对多种活细胞如大鼠海马神经元细胞、星形胶质细胞(图3和4)等进行了成像研究.同时与场发射扫描电子显微镜比较.结果表明,使用相对软的微悬臂及小的驱动力,在细胞培养液中可获得高分辨的活细胞表面形貌信息.在此基础上,我们还使用MAC mode AFM对具有多层结构的新鲜大鼠胸主动脉内壁进行了成像研究.以上结果表明对于背景如此“噪杂”的新鲜组织,MAC仍能获得与场发射扫描电子显微镜相媲美的高分辨率.

另外,MAC还可为我们提供一种额外的样本表面信息——TREC像(topography and recognition).当微悬臂以较小振幅振动时,样本表面的形貌只影响悬臂振摆的下半部分,而样本表面的黏附力会影响振摆的上半部分,提取振摆的上半部分信息就形成了TREC像. Hinterdorfer等研究人员^[24,25,28]将配体分子通过 8 nm长的分子链连接在AFM针尖上,在获得高分辨形貌同时可提取受体配体分子相互黏附的

位点信息.在我们的工作中,观察了裸针尖在活体生物样本成像时提取的 TREC 像.与相位像(phase imaging)相比较, TREC 像受形貌及弹性变形的影响很小,反映样本表面黏附力信息比较专一.总之,MAC mode AFM 由于独特的驱动方式,可使我们在活体样本的成像研究中使用更软的微悬臂,由此提高微悬臂振动曲线的信噪比,还可以选择更小的驱动力,从而最大限度地减小对样本的影响,提高图像分辨率.同时,结合所获得的形貌像(topography imaging)、振幅像(amplitude imaging)、相位像(phase imaging)以及 TREC 像等多角度信息,可对样本进行较全面的表征.此成像模式必将在生物医学活体样本高分辨成像研究中做出巨大的贡献.

3 结论与展望

AFM 成像技术将生物医学的原位高分辨成像研究提升至纳米尺度,是目前生物医学微观可视化研究中不可或缺的重要手段.但由于它属于表面技术,且对样本的稳定性要求较高,因此需要专门的设备及技术.此外,复杂参数的操纵与控制、数据的处理及解释,均需要具有较强物理背景的专业人员介入.

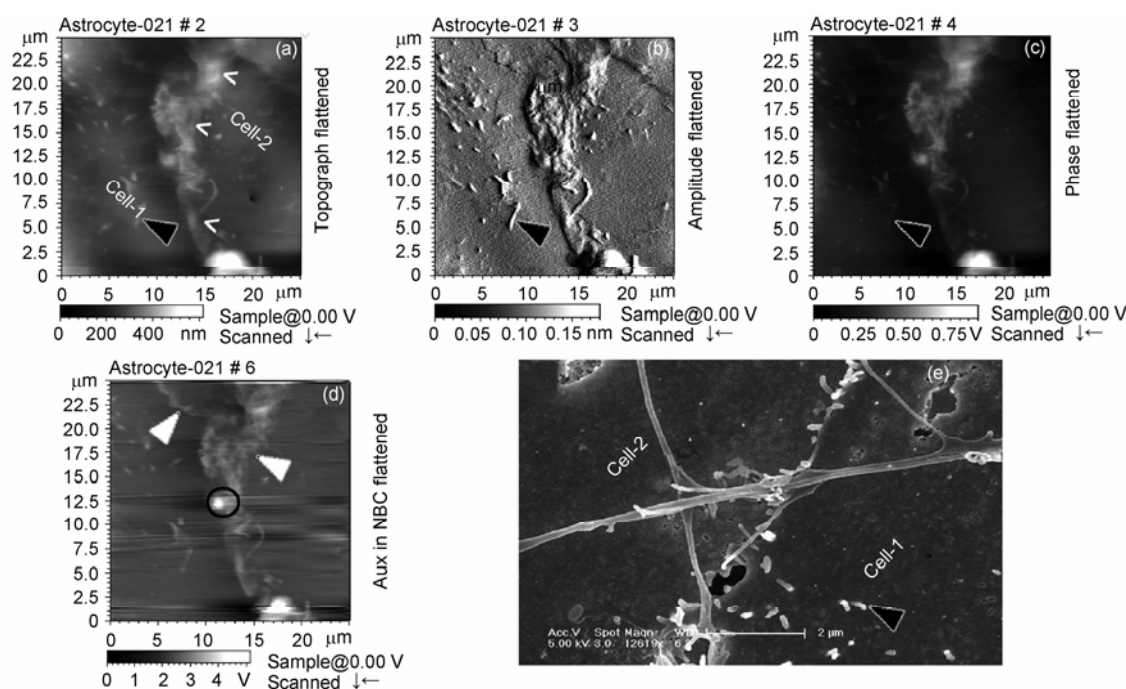


图3 在磁驱动模式下,活体状态的两个星形胶质细胞连接区域的成像^[26]

(a) 形貌像; (b) 振幅像; (c) 相位像; (d) TREC 像, 扫描区域: $25\ \mu\text{m} \times 25\ \mu\text{m}$; (e) 两个星形胶质细胞连接区域的电子显微镜图像, 标尺: $2\ \mu\text{m}$

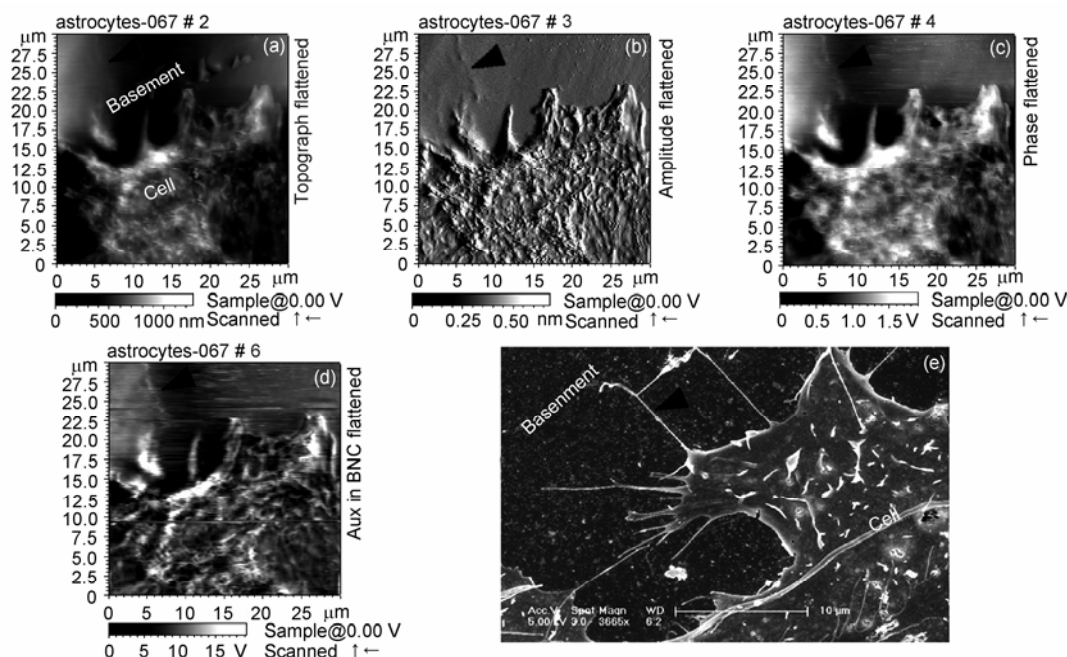


图4 在磁驱动模式下, 活体状态下的星形胶质细胞铺展区域的成像^[26]

(a) 形貌像; (b) 振幅像; (c) 相位像; (d) TREC 像, 扫描区域: $30\ \mu\text{m} \times 30\ \mu\text{m}$; (e) 两个星形胶质细胞铺展区域的电子显微镜图像, 标尺: $10\ \mu\text{m}$

因此, AFM 在生物医学研究领域尚未得到广泛的认同及使用, 还有许多亟待解决的问题, 如活体状态下 AFM 的在体探测以及活体悬浮细胞的 AFM 高分辨成像. 这些技术层面的问题同样困扰着 AFM 在生物

医学领域的广泛应用和发展. 但我们相信, 随着 AFM 技术本身的不断提升, 以及一些重要实验结果的获得, AFM 将从另一新的视点为生物医学的发展起到巨大的促进作用.

参考文献

- 1 Binning G, Quate C F, Gerber C. Atomic force microscopy. *Phys Rev Lett*, 1986, 56: 930—933[doi]
- 2 王静, 何世颖, 徐丽娜, 等. 细菌表面镀镍的透射电子显微镜与原子力显微镜表征. *科学通报*, 2007, 52: 1748—1752
- 3 Wu H, Li M, Sun M X. Atomic force microscopic view of the fine topography on the tobacco stigma surface during its response to pollination. *Chinese Sci Bull*, 2008, 53: 1015—1020[doi]
- 4 Zhu X Y, Cheng G, Wang S J, et al. Fabrication of metal oxide nanostructures based on atomic force microscopy lithography. *Sci China Ser G-Phys Mech Astron*, 2008, 51: 1448—1454[doi]
- 5 田孝军, 王越超, 席宁, 等. SWCNT 的脉冲气流定向排列及 AFM 操作. *科学通报*, 2008, 53: 251—256
- 6 鲁哲学, 张志凌, 庞代文. 原子力显微镜技术及其在细胞生物学中的应用. *科学通报*, 2005, 50: 1161—1166
- 7 Butt H J, Wolff E K, Gould S A C, et al. Imaging cells with the atomic force microscope. *J Struct Biol*, 1990, 105: 54—61[doi]
- 8 Nowakowski R, Luckham P, Winlove P. Imaging erythrocytes under physiological conditions by atomic force microscopy. *BBA-Biomembranes*, 2001, 1514: 170—176[doi]
- 9 Rotsch C, Jacobson K, Condeelis J, et al. EGF-stimulated lamellipod extension in adenocarcinoma cells. *Ultramicroscopy*, 2001, 86: 97—106[doi]
- 10 Han D, Ma W Y, Liao F L, et al. Time-series observation of the spreading out of microvessel endothelial cells with atomic force microscopy. *Phys Med Biol*, 2003, 48: 3897—3909[doi]
- 11 Haydon P G, Lartius R, Parpura V, et al. Membrane deformation of living glial cells using atomic force microscopy. *J Microsc-Oxford*, 1996, 182: 114—120[doi]
- 12 Riethmueller C, Schaeffer T E, Kienberger F, et al. Vacuolar structures can be identified by AFM elasticity mapping. *Ultramicroscopy*,

- 2007, 107: 895—901[[doi](#)]
- 13 Fritzsche W, Takac L, Henderson E. Application of atomic force microscopy to visualization of DNA, chromatin, and chromosomes. *Crit Rev Eukar Gene*, 1997, 7: 231—240
- 14 李进都, 陈森, 张浩波, 等. 原子力显微镜研究包含偶氮苯的肽核酸与纳米颗粒标记 DNA 的杂交. *科学通报*, 2008, 53: 1235—1237
- 15 Heymann J B, Muller D J, Mitsuoka K, et al. Electron and atomic force microscopy of membrane proteins. *Curr Opin Struc Biol*, 1997, 7: 543—549[[doi](#)]
- 16 杨培慧, 郑志雯, 曾古城, 等. 转铁蛋白及其抗体分子间作用的原子力显微镜探测. *科学通报*, 2006, 51: 138—141
- 17 Chen Y, Cai J Y. Membrane deformation of unfixed erythrocytes in air with time lapse investigated by tapping mode atomic force microscopy. *Micron*, 2006, 37: 339—346[[doi](#)]
- 18 You H X, Lau J M, Zhang S W, et al. Atomic force microscopy imaging of living cells: A preliminary study of the disruptive effect of the cantilever tip on cell morphology. *Ultramicroscopy*, 2000, 82: 297—305[[doi](#)]
- 19 林丹樱, 王秀凤, 韩东. 活体细胞骨架的原子力显微成像. *电子显微学报*, 2004, 23: 125—128
- 20 Han D, Ma W Y, Liao F L, et al. Intracellular structural changes under the stress of applied force at a nanometre range investigated by atomic force microscopy. *Nanotechnology*, 2004, 15: 120—126[[doi](#)]
- 21 Ma W Y, Sun Y X, Han D, et al. Cytoskeletal response of microvessel endothelial cells to an applied stress force at the submicrometer scale studied by atomic force microscopy. *Microsc Res Tech*, 2006, 69: 784—793[[doi](#)]
- 22 Han W H, Lindsay S M. Probing molecular ordering at a liquid-solid interface with a magnetically oscillated atomic force microscope. *Appl Phys Lett*, 1998, 72: 1656—1658[[doi](#)]
- 23 Han W H, Lindsay S M, Jing T W. A magnetically driven oscillating probe microscope for operation in liquids. *Appl Phys Lett*, 1996, 69: 4111—4113[[doi](#)]
- 24 Schindler H, Badt D, Hinterdorfer P, et al. Optimal sensitivity for molecular recognition MAC-mode AFM. *Ultramicroscopy*, 2000, 82: 227—235[[doi](#)]
- 25 Stroh C M, Ebner A, Geretschlager M, et al. Simultaneous topography and recognition imaging using force microscopy. *Biophys J*, 2004, 87: 1981—1990[[doi](#)]
- 26 Ge G L, Han D, Lin D Y, et al. MAC mode atomic force microscopy studies of living samples, ranging from cells to fresh tissue. *Ultramicroscopy*, 2007, 107: 299—307[[doi](#)]
- 27 Sun Y X, Lin D Y, Rui Y F, et al. Three-dimensional structural changes in living hippocampal neurons imaged using magnetic ac mode atomic force microscopy. *J Electron Microsc*, 2006, 55: 165—172[[doi](#)]
- 28 Stroh C, Wang H, Bash R, et al. Single-molecule recognition imaging-microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 12503—12507[[doi](#)]