

文章编号: 1001-4888(2018)06-0831-10

基于单层荧光颗粒的三维细胞牵引力的研究^{*}

刘永嫚, 徐小海, 吴尚犬, 张青川

(中国科学技术大学近代力学系, 中国科学院材料力学行为和 Design 重点实验室, 合肥 230027)

摘要: 细胞与细胞外微环境的力学相互作用对于细胞迁移、增殖和分化起着至关重要的作用。近年来, 基于数字图像相关和数字体积相关方法的细胞牵引力研究得到了广泛的开展。然而, 传统的基于数字图像相关的方法只能测量面内的变形; 传统的基于数字体积相关的方法将荧光标记颗粒置于水凝胶基底内部, 扫描层数过多导致图像采集时间长、光毒性增大。本文中, 我们结合激光扫描共聚焦技术和数字体积相关方法, 将单层荧光颗粒平铺在水凝胶表面, 通过共聚焦显微镜采集细胞迁移过程中不同时刻的图像, 采用二阶形函数的数字体积相关方法得到细胞-基底界面处的三维位移场和三维牵引力场。该方法采用单层荧光颗粒, 不仅有效地降低了多层激光扫描产生的光毒性, 还极大地减少了图像采集时间, 从而在扫描同一序列图像时, 细胞形态变化相对较小, 提高了原始图像的准确性。并且, 采用二阶形函数可以描述细胞迁移过程中基底产生的弯曲等更复杂形式的一阶形函数无法描述的变形。

关键词: 细胞牵引力; 弹性水凝胶; 细胞变形测量; 数字体积相关

中图分类号: Q66; Q348.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.7520/1001-4888-18-044

0 引言

细胞与细胞外基质形成动态力学环境, 细胞内肌动-肌球蛋白收缩产生力, 通过黏着斑传递给细胞外基质, 在黏着斑处产生细胞牵引力^[1-3]。细胞与细胞外基质之间的力学作用被认为是影响细胞黏附、迁移、增殖和凋亡等生物过程的关键因素^[4-10]。研究细胞在弹性基底上产生的动态牵引力对于了解细胞如何感知周围环境力学性能变化具有重要的意义, 因此, 测量细胞牵引力是定量研究细胞迁移、收缩和分裂的重要方法。细胞牵引力非常小, 大约为皮牛顿到纳牛顿量级, 发生在纳米到微米尺度上^[11]。

为了确定细胞与细胞外基质之间力传导的机理和其对细胞行为的影响, 研究者们做了大量的实验。1980 年 Harri 等人观察到培养在硅胶薄膜表面的细胞的迁移会引起硅胶薄膜的弹性变形和起皱, 并估算了细胞牵引力大小^[13], 由此, 使用牵引力显微镜(Traction Force Microscopy, TFM)测量细胞与细胞外基质之间作用力的技术得到大力发展。现在牵引力显微镜技术已经成为了标准的测量细胞牵引力的方法, 被广泛地应用在细胞力学和生物学领域^[14-20]。该技术的基本原理是使用柔软的生物相容性的弹性水凝胶模拟细胞外基质, 将细胞培养在表层修饰有荧光颗粒的弹性基底上, 细胞在弹性基底上黏附或迁移过程中通过黏着斑拉伸基底产生弹性变形。通过普通荧光显微镜或激光扫描共聚焦显微镜记录变形前后荧光颗粒的位置变化信息, 并将荧光颗粒作为“散斑”, 使用数字图像相关技术测量基底位移场,

^{*} 收稿日期: 2018-03-06; 修回日期: 2018-04-03

基金项目: 国家自然科学基金(Nos. 11627803, 11472266 和 11502265)、中国科学院战略性先导科技专项(B类)(XDB22040502)和中央高校基本科研业务费专项资金(WK2480000002)资助

通讯作者: 吴尚犬(1986—), 男, 博士, 副研究员。主要从事基于力学效应的微纳传感技术和细胞力学的研究。Email: wushq@ustc.edu.cn

张青川(1962—), 男, 博士, 教授。主要从事光测实验力学研究。Email: zhangqc@ustc.edu.cn

再根据弹性力学基本解理论反演求出细胞牵引力场^[18]。

传统的基于二维数字图像相关的牵引力显微镜技术发展相当成熟,被用来分析和解释细胞与基质在平面内的相互作用^[2,18,19]。但是,Maskarinec 等研究发现细胞迁移过程中引起的离面位移与面内位移数值大小相当^[20]。传统的借助荧光显微镜的 TFM 技术,只对平面内荧光颗粒的位移进行追踪,忽略了离面方向的位移,因而不能揭示实际上细胞与基底的三维作用力。随着数字图像相关技术的发展^[21-26],有研究者提出将荧光颗粒修饰在水凝胶内部,然后把细胞放在凝胶表面培养的方法,测量细胞引起的凝胶内部三维位移场的变化^[20]。也有研究者将荧光颗粒修饰在水凝胶内部,并且将细胞置于凝胶里面进行三维培养,测量细胞对周围水凝胶的应力场^[27-29]。然而,这些方法在采集三维荧光颗粒图像信息时,法向方向需要采集 $30\mu\text{m}$,耗时约 3 分钟^[20,28]。因此,由于扫描层数的增加和扫描时间的延长,不仅增加了光毒性和光漂白性对细胞的伤害,致使细胞失去活性,不能进行分裂或分化,而且不能保证三维图像采集过程中细胞始终处于同一状态。此外,典型的测量细胞位移场的数字体积相关(Digital Volume Correlation, DVC)方法使用零均值归一化的最小平方距离相关函数(ZNSSD),采用一阶形函数的正向增量型的 Gauss-Newton 迭代算法(FA-GN1)匹配变形前后的微小体元。然而,这种方法的海森(Hessian)矩阵随着变形阶段不断更新,计算效率大幅度降低。将 Gauss-Newton 算法(IC-GN1)^[30]引入 DVC 方法,可以在保证计算精度的同时大幅度提高计算效率^[31,32]。典型的 DVC 方法采用一阶形函数描述子区位移模式,但是一阶形函数只能描述平移、伸缩、转动、剪切变形,不能准确描述细胞引起的复杂变形(如弯曲)场,此时,需要二阶形函数才能更为精确地描述细胞运动过程中产生的复杂变形场。因此,我们采用二阶形函数的 Gauss-Newton 迭代算法(IC-GN2),有效地提高了计算的精度和速度,并根据弹性力学理论^[33]和基底材料的力学性质,由位移重建出牵引力。

本文中,提出了一种能够有效降低细胞光毒性、动态追踪并且精确量化三维细胞牵引力的 3D-TFM 方法。该方法将生物相容性的聚丙烯酰胺水凝胶作为细胞黏附和迁移的基底,然后在凝胶基底的表面修饰单层荧光颗粒作为人造散斑追踪细胞的运动,采用激光扫描共聚焦显微镜(Laser Scanning Confocal Microscope, LSCM)延时采集荧光颗粒的三维位置信息,并采用基于二阶形函数的数字体积相关技术计算位移场,根据基底材料的弹性模量和泊松比以及弹性力学基本理论^[33],由位移场得到应力场。

1 实验方法

1.1 牵引力显微镜

细胞牵引力显微镜技术是最早用来测量细胞与细胞外基质之间作用力的一种技术,也是测量细胞牵引力的标准方法。黏附在柔性基底表面的细胞,对细胞下面的弹性基底产生力,引起细胞周围的材料变形,通过显微镜记录这些变形图像,根据数字图像相关算法得到基底上的变形场,反演推算出细胞表面的应力场。

牵引力显微镜技术基于对柔性基底变形的测量,通过对比细胞施加力前后的两个不同时间段得到的荧光标记物的图像,获得基底的变形信息。数字图像相关算法比较加载前后的图像,算出变形凝胶的位移场。常用于牵引力显微镜的基底材料包括聚丙烯酰胺和硅基凝胶,它们都是线弹性材料,具有良好的光学透明性并且刚度易调节。随着该技术的发展,牵引力显微镜技术从最初的只能测量二维基底上的单细胞引起的二维牵引力,延伸到测量细胞在二维基底上引起的三维牵引力,以及测量细胞在三维基底内部引起的三维牵引力。

1.2 数字体积相关计算凝胶表面的位移场

数字体积相关(DVC)基本原理是对于三维物体在一定时间内发生的变形,按照一定的搜索方法,采用预定义的相关函数,在变形后图像中寻找与变形前图像的每个立方体子区相关系数的极值点。在变形前的三维图像中选取参考子区,在变形后的三维图像中搜索最优匹配子区,确定变形前图像子区中心点的位移。采用相关函数来评价变形前后图像子区的相似程度,即把计算数字体积相关转化为求解相关函数的极值。

典型的 DVC 方法使用零均值归一化的距离平方和相关函数(ZNSSD),采用一阶形函数的正向增

量型的 Gauss-Newton 迭代算法(FN-GN¹)匹配变形前后的微小体元,计算效率低。并且一阶形函数难以完整描述细胞对基底作用产生的局域变形,为了提高细胞牵引力的测量精度,我们采用二阶形函数 Gauss-Newton 算法(IC-GN²)。这里使用 ZNSSD 相关准则来评估参考子区和变形子区的相似程度,将其写成 $\vec{p}$ 的函数,如公式(1)所示。 $\vec{p}$ 为形函数参数矢量, $\Delta\vec{p}$ 代表每次迭代的增量,迭代过程中 $\vec{p} = \vec{p} + \Delta\vec{p}$ 。

$$C_{\text{ZNSSD}}(\Delta\vec{p}) = \sum_{z=-N}^N \sum_{y=-M}^M \sum_{x=-M}^M \left[\frac{f(W(x, y, z; \Delta\vec{p})) - \bar{f}}{\sqrt{\sum_{z=-N}^N \sum_{y=-M}^M \sum_{x=-M}^M (f(W(x, y, z; \Delta\vec{p})) - \bar{f})^2}} - \frac{g(W(x, y, z; \vec{p})) - \bar{g}}{\sqrt{\sum_{z=-N}^N \sum_{y=-M}^M \sum_{x=-M}^M (g(W(x, y, z; \vec{p})) - \bar{g})^2}} \right]^2 \quad (1)$$

其中, f 和 g 分别表示参考子区和变形子区中某点 (x, y, z) 的灰度值; $\bar{f}$ 和 $\bar{g}$ 代表参考子区和变形子区的平均灰度值; M 是子区在 x 和 y 方向的半宽; N 是子区在 z 方向的半宽。

考虑到细胞作用区域的变形梯度较大(局域变形),采用二阶形函数可以得到更为准确的测量结果。公式(2)(下标 2 表示形函数阶数)给出了二阶形函数 $W(x, y, z; \Delta\vec{p})$ 的表达形式,具有更多的自由度,其参数矢量 $\vec{p}$ 由一阶形函数的 12 行增加为 30 行,能够描述的变形也从一阶变形(伸缩、转动、剪切或其组合)扩展到二阶变形(如梁的纯弯曲)。

$$W_2(x, y, z; \vec{p}_2) = \begin{bmatrix} x' \\ y' \\ z' \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \frac{1}{2} u_{xx} & u_{xy} & \frac{1}{2} u_{yy} & u_{yz} & \frac{1}{2} u_{zz} & u_{zx} & 1 + u_x & u_y & u_z & u \\ \frac{1}{2} v_{xx} & v_{xy} & \frac{1}{2} v_{yy} & v_{yz} & \frac{1}{2} v_{zz} & v_{zx} & v_x & 1 + v_y & v_z & v \\ \frac{1}{2} w_{xx} & w_{xy} & \frac{1}{2} w_{yy} & w_{yz} & \frac{1}{2} w_{zz} & w_{zx} & w_x & w_y & 1 + w_z & w \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x^2 \\ xy \\ y^2 \\ yz \\ z^2 \\ zx \\ x \\ y \\ z \\ 1 \end{bmatrix} \quad (2)$$

$$\vec{p}_2 = \begin{bmatrix} u, u_x, u_y, u_z, u_{xx}, u_{xy}, u_{yy}, u_{yz}, u_{zz}, u_{zx}, \\ v, v_x, v_y, v_z, v_{xx}, v_{xy}, v_{yy}, v_{yz}, v_{zz}, v_{zx}, \\ w, w_x, w_y, w_z, w_{xx}, w_{xy}, w_{yy}, w_{yz}, w_{zz}, w_{zx} \end{bmatrix}^T$$

对于采用二阶形函数的反向组合型 Gauss-Newton 算法(IC-GN²),为了对增量形函数求逆,需要补充公式(3)给出的 6 项,并将形函数写成如公式(4)的形式。

$$\begin{aligned} x'^2 &= (1 + S_1) x^2 + S_2 xy + S_3 y^2 + S_4 yz + S_5 z^2 + S_6 zx + S_7 x + S_8 y + S_9 z + S_{10} + o(h^2) \\ x'y' &= S_{11} x^2 + (1 + S_{12}) xy + S_{13} y^2 + S_{14} yz + S_{15} z^2 + S_{16} zx + S_{17} x + S_{18} y + S_{19} z + S_{20} + o(h^2) \\ y'^2 &= S_{21} x^2 + S_{22} xy + (1 + S_{23}) y^2 + S_{24} yz + S_{25} z^2 + S_{26} zx + S_{27} x + S_{28} y + S_{29} z + S_{30} + o(h^2) \\ y'z' &= S_{31} x^2 + S_{32} xy + S_{33} y^2 + (1 + S_{34}) yz + S_{35} z^2 + S_{36} zx + S_{37} x + S_{38} y + S_{39} z + S_{40} + o(h^2) \\ z'^2 &= S_{41} x^2 + S_{42} xy + S_{43} y^2 + S_{44} yz + (1 + S_{45}) z^2 + S_{46} zx + S_{47} x + S_{48} y + S_{49} z + S_{50} + o(h^2) \\ z'x' &= S_{51} x^2 + S_{52} xy + S_{53} y^2 + S_{54} yz + S_{55} z^2 + (1 + S_{56}) zx + S_{57} x + S_{58} y + S_{59} z + S_{60} + o(h^2) \end{aligned} \quad (3)$$

$$W_2(x, y, z; \vec{p}_2) = [x'^2 \quad x'y' \quad y'^2 \quad y'z' \quad z'^2 \quad z'x' \quad x' \quad y' \quad z' \quad 1]^T$$

$$= \begin{bmatrix} 1+S_1 & S_2 & S_3 & S_4 & S_5 & S_6 & S_7 & S_8 & S_9 & S_{10} \\ S_{11} & 1+S_{12} & S_{13} & S_{14} & S_{15} & S_{16} & S_{17} & S_{18} & S_{19} & S_{20} \\ S_{21} & S_{22} & 1+S_{23} & S_{24} & S_{25} & S_{26} & S_{27} & S_{28} & S_{29} & S_{30} \\ S_{31} & S_{32} & S_{33} & 1+S_{34} & S_{35} & S_{36} & S_{37} & S_{38} & S_{39} & S_{40} \\ S_{41} & S_{42} & S_{43} & S_{44} & 1+S_{45} & S_{46} & S_{47} & S_{48} & S_{49} & S_{50} \\ S_{51} & S_{52} & S_{53} & S_{54} & S_{55} & 1+S_{56} & S_{57} & S_{58} & S_{59} & S_{60} \\ \frac{1}{2}u_{xx} & u_{xy} & \frac{1}{2}u_{yy} & u_{yz} & \frac{1}{2}u_{zz} & u_{zx} & 1+u_x & u_y & u_z & u \\ \frac{1}{2}v_{xx} & v_{xy} & \frac{1}{2}v_{yy} & v_{yz} & \frac{1}{2}v_{zz} & v_{zx} & v_x & 1+v_y & v_z & v \\ \frac{1}{2}w_{xx} & w_{xy} & \frac{1}{2}w_{yy} & w_{yz} & \frac{1}{2}w_{zz} & w_{zx} & w_x & w_y & 1+w_z & w \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x^2 \\ xy \\ y^2 \\ yz \\ z^2 \\ zx \\ x \\ y \\ z \\ 1 \end{bmatrix} \quad (4)$$

式(3)、式(4)中, $S_1, S_2, \dots, S_{60}$ 是形函数参数矢量 $\vec{p}_2$ 的函数, 具体形式如下:

$$\begin{aligned} S_1 &= uu_{xx} + (1+u_x)^2 - 1 & S_2 &= 2(uu_{xy} + (1+u_x)u_y) \\ S_3 &= uu_{yy} + u_y^2 & S_4 &= 2(uu_{yz} + u_yu_z) \\ S_5 &= uu_{zz} + u_z^2 & S_6 &= 2(uu_{zx} + u_x(1+u_x)) \\ S_7 &= 2u(1+u_x) & S_8 &= 2uu_y \\ S_9 &= 2uu_z & S_{10} &= u^2 \\ S_{21} &= vv_{xx} + v_x^2 & S_{22} &= 2(vv_{xy} + u_x(1+v_y)) \\ S_{23} &= vv_{yy} + (1+v_y)^2 - 1 & S_{24} &= 2(vv_{yz} + (1+v_y)v_z) \\ S_{25} &= vv_{zz} + v_z^2 & S_{26} &= 2(vv_{zx} + v_zv_x) \\ S_{27} &= 2vv_x & S_{28} &= 2v(1+v_y) \\ S_{29} &= 2vv_z & S_{30} &= v^2 \\ S_{41} &= ww_{xx} + w_x^2 & S_{42} &= 2(ww_{xy} + w_xw_y) \\ S_{43} &= ww_{yy} + w_y^2 & S_{44} &= 2(ww_{yz} + w_y(1+w_z)) \\ S_{45} &= ww_{zz} + (1+w_z)^2 - 1 & S_{46} &= 2(ww_{zx} + (1+w_z)w_x) \\ S_{47} &= 2ww_x & S_{48} &= 2ww_y \\ S_{49} &= 2w(1+w_z) & S_{50} &= w^2 \\ S_{11} &= \frac{1}{2}(uv_{xx} + vu_{xx}) + (1+u_x)v_x & S_{12} &= uv_{xy} + vu_{xy} + (1+u_x)(1+v_y) + v_xu_y - 1 \\ S_{13} &= \frac{1}{2}(uv_{yy} + vu_{yy}) + u_y(1+v_y) & S_{14} &= uv_{yz} + vu_{yz} + u_yv_z + (1+v_y)u_z \\ S_{15} &= \frac{1}{2}(uv_{zz} + vu_{zz}) + u_zv_z & S_{16} &= uv_{zx} + vu_{zx} + u_zv_x + v_z(1+u_x) \\ S_{17} &= uv_x + v(1+u_x) & S_{18} &= u(1+v_y) + vu_y \\ S_{19} &= uv_z + vu_z & S_{20} &= uv \\ S_{31} &= \frac{1}{2}(vw_{xx} + wv_{xx}) + v_xw_x & S_{32} &= vw_{xy} + wv_{xy} + v_xw_y + w_x(1+v_y) \\ S_{33} &= \frac{1}{2}(vw_{yy} + wv_{yy}) + (1+v_y)w_y & S_{34} &= vw_{yz} + wv_{yz} + (1+v_y)(1+w_z) + w_yv_z - 1 \\ S_{35} &= \frac{1}{2}(vw_{zz} + wv_{zz}) + v_z(1+w_z) & S_{36} &= vw_{zx} + wv_{zx} + v_zw_x + (1+w_z)v_x \\ S_{37} &= vw_x + wv_x & S_{38} &= vw_y + w(1+v_y) \\ S_{39} &= v(1+w_z) + wv_z & S_{40} &= vw \end{aligned}$$

$$S_{51} = \frac{1}{2}(wu_{xx} + uw_{xx}) + w_x(1 + u_x)$$

$$S_{52} = wu_{xy} + uw_{xy} + w_x u_y + (1 + u_x)w_y$$

$$S_{53} = \frac{1}{2}(wu_{yy} + uw_{yy}) + w_y u_y$$

$$S_{54} = wu_{yz} + uw_{yz} + w_y u_z + u_y(1 + w_z)$$

$$S_{55} = \frac{1}{2}(wu_{zz} + uw_{zz}) + (1 + w_z)u_z$$

$$S_{56} = wu_{zx} + uw_{zx} + (1 + w_z)(1 + u_x) + u_z w_x - 1$$

$$S_{57} = w(1 + u_x) + uw_x$$

$$S_{58} = wu_y + uw_y$$

$$S_{59} = wu_z + u(1 + w_z)$$

$$S_{60} = wu$$

1.3 制备聚丙烯酰胺水凝胶基底

将玻璃底共聚焦专用培养皿(NEST, 江苏无锡)在4%的3-氨基丙基三甲氧基硅烷(3-Aminopropyltrimethoxy-silane, APTES, Sigma)浸泡15分钟, 然后用去离子水清洗干净, 再用0.5%的戊二醛溶液处理30分钟, 最后将培养皿用去离子水彻底清洗, 干燥后备用。

将5%丙烯酰胺单体和0.1%的双丙烯酰胺, 1μL N, N, N, N-四甲基乙二胺, 10μL 0.1%的过硫酸铵混合均匀形成预聚液^[18]。取1.5μL 聚丙烯酰胺混合液置于预清洁的圆形石英片(直径12mm)上, 活化过的培养皿从一侧倒扣在石英片上面, 将丙烯酰胺液滴在培养皿重力的作用下变平。室温下聚合60分钟, 将石英片缓慢地从一侧剥离, 培养皿底部得到厚度为60~80μm的聚丙烯酰胺凝胶。用去离子水清洗聚丙烯酰胺凝胶, 除去未完全聚合的溶液。

取22μL 2%荧光颗粒原液(直径0.49μm, 505/515nm, F-8813, 分子探针, Life Technologies)与200μL 去离子水混合均匀, 加入到修饰有聚丙烯酰胺薄膜的培养皿内, 静置40分钟。去离子水清洗掉培养皿内未附着在弹性凝胶上的荧光颗粒溶液, N-羟基丁二酰亚胺(N-Hydroxysuccinimide, NHS, Sigma)和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC, 上海生工生物工程有限公司)以1:4的比例与去离子水混合均匀后平铺在培养皿内, 避光静置2.5小时, 用于在连有酰胺基团的表面连接表面修饰有羧基的荧光颗粒。

为了增加细胞在凝胶表面的黏附性, 使用胶原蛋白将聚丙烯酰胺功能化, 通过双功能偶联剂 Sulfo-SANPAH(sulfosuccinimidyl 6-(4'-azido-2'-nitrophenylamino) hexanoate, ThermoFisher)将胶原蛋白连接在凝胶表面。取1mg的Sulfo-SANPAH与40μL无水二甲基亚砜(DMSO)混匀, 取8μL sulfo-SANPAH加入200μL去离子水混匀, 将混合液用移液枪转移到凝胶表面, 用功率为10W的紫外灯照射10分钟, 然后用去离子水清洗。将胶原蛋白I(上海创赛科技有限公司)按照2μg/cm²与6mM的冰醋酸水溶液混合均匀后铺平于凝胶表面, 将培养皿放置在4℃冰箱内过夜孵化。

1.4 测量基底的弹性模量

凝胶基底的刚度用原子力显微镜(Atom Force Microscope, AFM, Bruker's BioScope Resolve™ BioAFM)测量。将1.5μL水凝胶预聚液滴在圆形石英片(直径12mm)上, 将APTES活化过的玻璃底培养皿(直径15mm)倒扣在石英片上形成一层平坦的凝胶层(厚度约80μm)。室温下聚合60分钟, 用去离子水浸泡清洗, 除去未完全聚合的溶液。往培养皿中加入去离子水, 所有的模量都是使用AFM的轻敲模式测试得到。使用金字塔形状的探针(snl-10), 弹性常数K_{sp}约580pN/nm, 测得凝胶的杨氏模量为9000Pa。

1.5 细胞培养

人脐静脉内皮细胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUEVCs, 上海生工生物工程有限公司)在RPMI-1640培养基(Hyclone, Logan city, USA)中培养, 培养基中含有10%胎牛血清(Life Technologies, USA), 100U/mL的青霉素G(Life Technologies, USA), 100μg/mL的链霉素(Life Technologies, USA), 37℃下置于5%CO₂培养箱中。待细胞融合度至90%时, 用0.25%含EDTA的胰蛋白酶(Gibco, USA)消化3分钟, 将细胞从培养瓶中取出, 然后将细胞100g离心5分钟, 一部分细胞继续培养, 另一部分细胞重新悬浮于PBS中备用。

1.6 共聚焦显微镜和时间延时图像采集

所有的图像都是用激光扫描共聚焦显微镜(Zeiss 710 倒置显微镜)采集得到的, 本文使用的物镜为

100X, NA1.40(Numerical Aperture)油镜(Plan-Apochromat 100 $\times$ Zeiss DIC M27)。图像分辨率为 512 $\times$ 512pixel,像素尺寸为 0.12 μm /pixel,每个时间段扫描 8 层,层间距为 0.4 μm ,耗时约 5 秒,相邻两阶段间隔 30 分钟,采集 150 分钟。使用氩气(488nm)激光器激发绿色荧光颗粒(直径 0.49 μm ,ThermoFisher F8813),沿 Z 轴方向由荧光颗粒最下层扫描至荧光颗粒的最上层。整个实验过程中细胞处于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 的活细胞工作站内,保持培养箱湿度和样品情况稳定。

我们提出将单层的荧光颗粒修饰在凝胶基底的表面,代替了传统的将多层荧光颗粒三维分布于凝胶基底内部的方法。采用激光扫描共聚焦显微镜的荧光模式,沿 Z 轴方向由下而上寻找荧光颗粒的最下层,然后间隔 0.4 μm 逐层扫描至荧光颗粒的最上层。同一时刻,共采集 8 层荧光图像作为三维散斑图像,Z 方向深度降低到 3.2 μm ,远远低于传统方法(几十微米)^[20,28],有效地降低了光毒性对细胞的伤害。由于细胞迁移会引起荧光颗粒沿 Z 轴方向的运动,因此,为了得到全场荧光颗粒的位置信息,沿 Z 方向采集的范围大于荧光颗粒本身的直径。

2 实验结果与分析

2.1 模拟实验

为了评估二阶形函数在计算细胞牵引力过程中的准确度,我们采用有限元模拟比较了不同子区尺寸下,一阶形函数和二阶形函数计算得到的位移和力。图 1(a)给出了根据一阶和二阶形函数在不同子区尺寸下(19pixel 和 29pixel)测量得到的基底上表面中心点的位移,Preset 表示有限元模拟得到的基底上表面中心点的位移。二阶形函数的测量结果较一阶形函数的测量结果更为接近理论值。子区尺寸为 19pixel 时的测量结果较子区尺寸为 29pixel 时的测量结果更加接近理论值。二阶形函数和子区尺寸取 19pixel 时,计算得到的位移最接近理论值(Preset)。图 1(b)给出了根据一阶和二阶形函数在不同子区尺寸下测量的位移(即图 1(a))重建出的力,根据文献^[33]由位移场得到力。其中,黄色图表示根据施加的位移场重建得到的力,表示理论值。可以看到,子区尺寸为 19pixel 和 29pixel 时,均是采用二阶形函数测量位移场重建出的牵引力更为接近理论值。这是由于细胞作用区域的变形往往是高应变梯度的局域变形,采用二阶形函数能够得到更为精确的位移场,从而重建出更接近理论值的力。二阶形函数下,子区大小取 19pixel 时,得到的力更接近理论值。因此,在本实验中,采用子区尺寸为 19pixel 的二阶形函数计算位移场。

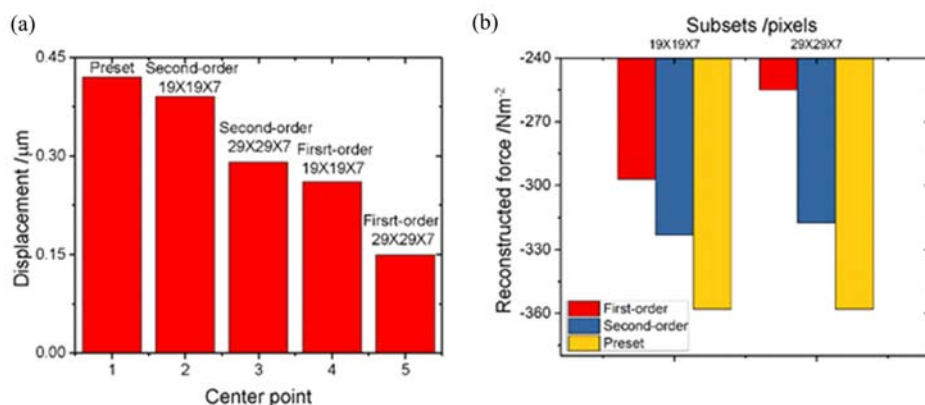


图 1 采用一阶形函数和二阶形函数在不同子区尺寸下的位移和重建力

Fig.1 Displacements and reconstructed force obtained from first- and second- order shape function with different subsets

2.2 三维位移场和三维牵引力场

激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)和数字体积相关(DVC)技术相结合,用于内皮细胞在聚丙烯酰胺基底上迁移的位移场和牵引力测量。细胞牵引力显微镜技术基于弹性水凝胶作为培养细胞的基底,要求凝胶具有很好的生物相容性,常用的基底材料有聚丙烯酰胺(PAM)、明胶或聚二甲基硅氧烷(PDMS)。

其中,PAM 刚度易调节且可调节范围大(1.3Pa~100kPa),PDMS 刚度很难达到 10kPa 以下^[34,35]。我们选择聚丙烯酰胺水凝胶作为细胞的弹性基底,因为它具有广泛的硬度范围,并且在 24~48 小时内刚度稳定^[29]。将荧光颗粒分布在凝胶上,选取荧光颗粒分布均匀且密度大约为 1.5 个/ μm^2 的培养皿。由于荧光颗粒只有单层(见图 2(b)),沿 Z 轴扫描的深度只有单个荧光颗粒的直径大小,而不是整个细胞尺度,因此能够有效地避免多层激光扫描引起的光毒性对细胞的影响,并且能够准确地得到细胞-基底界面附近的变形信息。

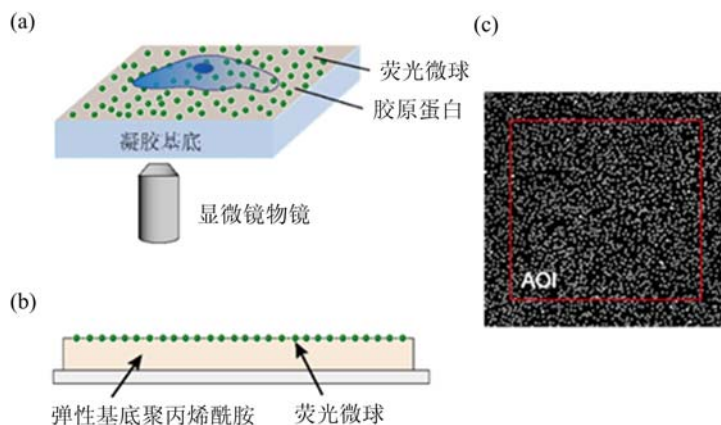


图2 牵引力显微镜平台示意图

Fig. 2 Schematic of traction microscope platform

细胞在凝胶上稳定培养 26 小时后,将培养皿移到活细胞工作站中,在激光扫描共聚焦显微镜下观察,实验装置示意图见图 2(a)。选取细胞贴壁状态良好且周围没有多余细胞的单个细胞区域,选取激发波段为 488nm 的激光,分别采集明场细胞图像和荧光场的三维图像。使用延序列成像功能采集荧光颗粒三维图像,间隔 30 分钟,记录 150 分钟内同一个细胞在自然状态下引起的基底变形信息。将序列切片图像上的荧光颗粒作为散斑,单张图像上计算区域为 $450 \times 450 \text{ pixel}$,序列图像子区大小为 $19 \times 19 \times 7$ 体素,网格步长为 $3 \times 3 \times 1$,采用数字体积相关技术计算得到位移场(见图 3),根据位移场计算得到牵引力场(见图 3)。图 2(c)给出了处于参考阶段的中央层图像,其中的红色方框表示 DVC 计算中设置的感兴趣区域(AOI)。

根据模拟实验结果,我们在数字体积相关技术计算细胞迁移引起的底部凝胶的位移时,采用二阶形函数,子区尺寸取 19pixel。图 3 给出了二阶形函数在子区尺寸为 19pixel 时测量得到的位移场和牵引力分布图。图 3(a)、图 3(c)和图 3(e)分别表示 x , y , z 方向的位移场;图 3(b)、图 3(d)和图 3(f)分别表示 x , y , z 方向的牵引力场。可以看到,位移场的分量和牵引力的各分量分布一一对应,与实际情况相符。图 3 显示了位移和牵引力的最大值及最小值位置,揭示了细胞在基底表面迁移过程中细胞与基底界面处的相互作用力的变化情况。由图 3(e)和图 3(f)可以看出,离面的位移和牵引力在数值上与面内的位移和牵引力相当,不能被忽略。将图 3 中计算得到的位移和细胞牵引力与文献中^[20,27]报道的细胞引起的弹性基底上的位移和力的大小进行对比:图 3 中各个方向产生的位移在 $0 \sim 1.5 \mu\text{m}$,文献中测得的位移范围为 $0 \sim 1.4 \mu\text{m}$,两者数值大小相当;图 3 中重建出的力在数值上处于 $0 \sim 400 \text{ Pa}$ 之间,文献中的力在 $0 \sim 120 \text{ Pa}$ ^[20]和 500 Pa ^[28]左右,与文献中报道的力都属于同一数量级。由于实验中所用细胞种类与文献中的不是同一种类,因此重建出的细胞牵引力的数值大小不完全相同,但是数量级相同,说明采用本方法测得的数据是可信的。

3 总结

本文介绍了一种将 LSCM 采集的单层荧光颗粒的三维图像与 DVC 技术相结合的方法,能够定量地测量细胞迁移引起的细胞-基底界面处的三维位移场和三维牵引力场。该方法有效地降低了图像采集过程中的光毒性,减少了图像采集时间,从而保证同一时间序列图像采集过程中细胞形态发生变化相

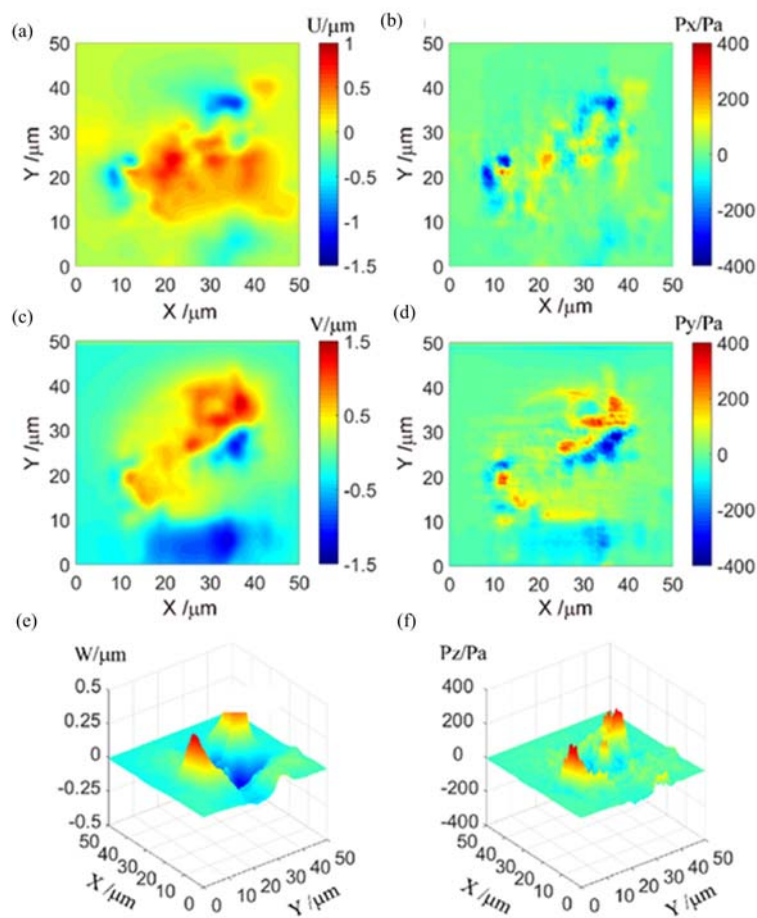


图 3 二阶形函数子区尺寸为 19pixel 时重构出的位移场和牵引力场

(a) 位移场 u ; (b) 牵引力场 P_x ; (c) 位移场 v ; (d) 牵引力场 P_y ; (e) 位移场 w ; (f) 牵引力场 P_z 。

Fig. 3 Displacement fields and reconstructed traction force fields with second-order shape function and subsets of 19pixel (a) displacement field of u ; (b) traction force field of P_x ; (c) displacement field of v ;

(d) traction force field of P_y ; (e) displacement field of w ; (f) traction force field of P_z 。

对较小。我们通过该方法得到了单细胞迁移过程中,位于细胞下方的基底的三维位移场和三维应力场。

本文提出的基于数字体积相关的三维细胞牵引力方法达到了亚微米精度,能够实时捕捉细胞运动引发的三维变形场,有助于揭示细胞与弹性基底之间的相互作用以及对细胞牵引力形成和调整机理的定量研究。该方法将三维体积图像采集时间从 3 分钟降到了 5 秒,极大地降低了图像采集过程的光毒性,能够实时快速捕捉细胞形态变化,在细胞形态变化较快或细胞对光敏感的状况下,该方法有很大的优越性。此外,该研究可以拓展到细胞外微环境力学性质改变时细胞做出响应的机理研究。

参考文献:

- [1] Murrell M, Oakes P W, Lenz M, et al. Forcing cells into shape: the mechanics of actomyosin contractility[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2015, 16(8):486.
- [2] Pelham R J, Wang Y. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997, 94(25):13661—13665.
- [3] Sheetz M P, Felsenfeld D P, Galbraith C G. Cell migration: regulation of force on extracellular-matrix-integrin complexes[J]. Trends in Cell Biology, 1998, 8(2):51—54.
- [4] Discher D E, Janmey P, Wang Y. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate[J]. Science, 2005, 310(5751):1139—1143.
- [5] Geiger B, Bershadsky A. Exploring the neighborhood: adhesion-coupled cell mechanosensors[J]. Cell, 2002, 110

- (2):139–142.
- [6] Engler A J, Sen S, Sweeney H L, et al. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification[J]. *Cell*, 2006, 126(4):677–689.
- [7] Schwarz U. Soft matters in cell adhesion: rigidity sensing on soft elastic substrates[J]. *Soft Matter*, 2007, 3(3): 263–266.
- [8] Orr A W, Helmke B P, Blackman B R, et al. Mechanisms of mechanotransduction[J]. *Developmental Cell*, 2006, 10(1):11–20.
- [9] Bergert M, Lendenmann T, Zündel M, et al. Confocal reference free traction force microscopy[J]. *Nature Communications*, 2016, 7:12814.
- [10] Iskratsch T, Wolfenson H, Sheetz M P. Appreciating force and shape-the rise of mechanotransduction in cell biology[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2014, 15(12):825.
- [11] Polacheck W J, Chen C S. Measuring cell-generated forces: a guide to the available tools[J]. *Nature Methods*, 2016, 13(5):415.
- [12] Sabass B, Gardel M L, Waterman C M, et al. High resolution traction force microscopy based on experimental and computational advances[J]. *Biophysical Journal*, 2008, 94(1):207–220.
- [13] Harris A K, Wild P, Stopak D. Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion[J]. *Science*, 1980, 208(4440):177–179.
- [14] Legant W R, Choi C K, Miller J S, et al. Multidimensional traction force microscopy reveals out-of-plane rotational moments about focal adhesions[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110(3):881–886.
- [15] Munevar S, Wang Y, Dembo M. Traction force microscopy of migrating normal and H-ras transformed 3T3 fibroblasts[J]. *Biophysical Journal*, 2001, 80(4):1744–1757.
- [16] Style R W, Boltyanskiy R, German G K, et al. Traction force microscopy in physics and biology[J]. *Soft Matter*, 2014, 10(23):4047–4055.
- [17] Maruthamuthu V, Sabass B, Schwarz U S, et al. Cell-ECM traction force modulates endogenous tension at cell-cell contacts[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(12):4708–4713.
- [18] Dembo M, Wang Y L. Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts[J]. *Biophysical Journal*, 1999, 76(4):2307–2316.
- [19] Style R W, Boltyanskiy R, German G K, et al. Traction force microscopy in physics and biology[J]. *Soft Matter*, 2014, 10(23):4047–4055.
- [20] Maskarinec S A, Franck C, Tirrell D A, et al. Quantifying cellular traction forces in three dimensions[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(52):22108–22113.
- [21] 牛永强, 胡秋实, 闫德莹, 等. 基于数字图像体相关的物体内部三维位移场分析[J]. *实验力学*, 2011, 26(3): 247–253 (NIU Yongqiang, HU Qiushi, YAN Deying, et al. Internal 3D displacement analysis using digital image volumn correlation method[J]. *Journal of Experimental Mechanics*, 2011, 26(3):247–253(in Chinese))
- [22] 潘兵, 吴大方, 郭保桥. 数字体图像相关方法中基于迭代最小二乘法的物体内部变形测量[J]. *实验力学*, 2011, 26(6):665–673 (PAN Bing, WU Dafang, GUO Baoqiao. Digital volume image correlation by using iterative least-squares for internal deformation measurement of an object[J]. *Journal of Experimental Mechanics*, 2011, 26(6):665–673(in Chinese))
- [23] 黄建永, 邓昊, 彭小玲, 等. 细胞牵引力显微镜反演方法研究进展[J]. *实验力学*, 2011, 26(5):503–517 (HUANG Jianyong, DENG Hao, PENG Xiaoling, et al. Recent progress in cellular traction force microscopy inversion methods[J]. *Journal of Experimental Mechanics*, 2011, 26(5):503–517(in Chinese))
- [24] 邵新星, 陈振宁, 戴云彤, 等. 数字图像相关方法若干关键问题研究进展[J]. *实验力学*, 2017, 32(3):305–325 (SHAO Xinxing, CHEN Zhenning, DAI Yuntong, et al. Research progress of several key problems in digital image correlation method[J]. *Journal of Experimental Mechanics*, 2017, 32(3):305–325(in Chinese))
- [25] Wu R, Kong C, Li K, et al. Real-time digital image correlation for dynamic strain measurement[J]. *Experimental Mechanics*, 2016, 56(5):833–843.
- [26] Huang J W, Zhang L Q, Jiang Z Y, et al. Heterogeneous parallel computing accelerated iterative subpixel digital

- image correlation[J]. *Science China Technological Sciences*, 2018, 61(1):74–85.
- [27] Steinwachs J, Metzner C, Skodzek K, et al. Three-dimensional force microscopy of cells in biopolymer networks [J]. *Nature Methods*, 2016, 13(2):171–176.
- [28] Legant W R, Miller J S, Blakely B L, et al. Measurement of mechanical tractions exerted by cells in three-dimensional matrices[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(12):969–971.
- [29] Huang J, Wang L, Xiong C, et al. Elastic hydrogel as a sensor for detection of mechanical stress generated by single cells grown in three-dimensional environment[J]. *Biomaterials*, 2016, 98:103–112.
- [30] Pan B, Wang B, Wu D, et al. An efficient and accurate 3D displacements tracking strategy for digital volume correlation[J]. *Optics and Lasers in Engineering*, 2014, 58:126–135.
- [31] Wang B, Pan B. Random errors in digital image correlation due to matched or overmatched shape functions[J]. *Experimental Mechanics*, 2015, 55(9):1717–1727.
- [32] Baker S, Matthews I. Equivalence and efficiency of image alignment algorithms[C]//Computer Vision and Pattern Recognition, 2001. CVPR 2001. Proceedings of the 2001 IEEE Computer Society Conference on. IEEE, 2001, 1: 1090–1097.
- [33] Landau L D, Lifshitz E M. *Theory of elasticity*[M]. London: Pergamon, 1970:25.
- [34] Engler A, Bacakova L, Newman C, et al. Substrate compliance versus ligand density in cell on gel responses[J]. *Biophysical Journal*, 2004, 86(1):617–628.
- [35] Yeung T, Georges P C, Flanagan L A, et al. Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion[J]. *Cytoskeleton*, 2005, 60(1):24–34.

Study on three dimensional cell traction force based on monolayer fluorescent beads

LIU Yong-man, XU Xiao-hai, WU Shang-quan, ZHANG Qing-chuan

(Department of Modern Mechanics, University of Science and Technology of China, CAS Key Laboratory of Mechanical Behavior and Design of Materials, Hefei 230027, China)

Abstract: The mechanical interaction between cell and extracellular microenvironment plays a crucial role in cell migration, proliferation and differentiation. In recent years, the studies on cell traction based on digital image correlation and digital volume correlation have been extensively carried out. However, the traditional method based on digital image correlation can only measure in-plane deformations. The traditional method based on the digital volume correlation embed the fluorescent microspheres inside the hydrogel substrate, which increases scanning layers and leading to long time of image acquiring and strong phototoxicity. In this paper, authors combine laser scanning confocal microscope (LSCM) and digital volume correlation (DVC). The monolayer fluorescent beads are laid on the surface of the hydrogel. The images are collected at different times during cell migration by confocal microscope. Three dimensional (3D) displacement field and three dimensional traction field at the cell-substrate interface are obtained by using digital volume correlation method of second-order shape function. This method not only effectively reduces the phototoxicity induced by multi-layer laser scanning, but also greatly reduces the time of image acquisition. Thus, when scanning the same sequence image, the cell morphology changes relatively little, the accuracy of original image is improved. Moreover, the second order shape function can be used to describe more complex form such as substrate bending in cell migration process, which can not be described by the first order shape function.

Keywords: cell traction force; elastic hydrogel; cell deformation measurement; digital volume correlation