

DOI: 10.19650/j.cnki.cjsi.J1904739

基于光镊技术的红细胞膜剪切模量测量^{*}

刘佳琪^{1,2}, 祝连庆^{2,3}, 曲兴华¹, 张帆^{2,3}, 董明利^{2,3}

(1. 天津大学 精密测试技术及仪器国家重点实验室 天津 300072; 2. 北京信息科技大学 光电信息与仪器北京市工程研究中心 北京 100016; 3. 北京信息科技大学 先进光电子器件与系统创新引智基地 北京 100192)

摘要:为了测量细胞外钙离子浓度对人红细胞力学特性的影响,提出了一种基于光镊技术的细胞膜剪切模量测量方法。在倒置显微镜上集成光镊系统,可利用双光阱对粘贴微球的人红细胞进行横向拉伸操控并分析细胞形变与光阱力的关系,从而测量得到细胞膜的剪切模量。通过测量不同浓度氯化钙溶液中红细胞膜剪切模量,分析了红细胞力学特性受细胞外钙离子浓度的影响。测量结果显示对比 PBS 中的正常红细胞,经浓度为 100、200、300、400 和 500 μM 的氯化钙溶液处理过的红细胞膜的平均剪切模量分别减少了 7.8%, 20.3%, 34.4%, 48.4% 及 59.3%。为了验证测量结果,建立了红细胞力学模型并对其施加单向拉伸力进行仿真,得到的仿真结果与测量结果一致。此测量方法为其他细胞力学特性的测量提供了参考。

关键词: 剪切模量; 细胞形变; 光镊; 细胞外钙离子

中图分类号: Q241 TH741 **文献标识码:** A **国家标准学科分类代码:** 510.20

Shear modulus measurement of RBCs based on optical tweezers technique

Liu Jiaqi^{1,2}, Zhu Lianqing^{2,3}, Qu Xinghua¹, Zhang Fan^{2,3}, Dong Mingli^{2,3}

(1. State Key Laboratory of Precision Measuring Technology and Instruments, Tianjing University, Tianjin 300072, China; 2. Beijing Engineering Research Center of Optoelectronic Information and Instruments, Beijing Information Science and Technology University, Beijing 100016, China; 3. Overseas Expertise Introduction Center for Discipline Innovation ("111 Center"), Beijing Information Science & Technology University, Beijing 100192, China)

Abstract: In order to measure the influence of extracellular Ca^{2+} concentration on the mechanical properties of human red blood cells, a measurement method of cell membrane shear modulus based on optical tweezers is proposed. An optical tweezers system is integrated on the inverted microscope, the optical tweezers system can utilize the dual traps to transversely stretch and manipulate the human red blood cell attached with microspheres, and analyze the relationship between the cell deformation and the optical trap force, and then the shear modulus of the cell membrane is measured. Through measuring the shear modulus of the red blood cell membrane in the CaCl_2 solution with different concentrations, the influence of extracellular Ca^{2+} concentration on the mechanical properties of red blood cells is analyzed. The results show that compared with normal red blood cells in PBS, the mean shear modulus of red blood cell membrane treated with CaCl_2 solutions with concentrations of 100, 200, 300, 400 and 500 μM decreases by 7.8%, 20.3%, 34.4%, 48.4% and 59.3%, respectively. In order to verify the measurement results, a mechanical model of red blood cell is established and a uniaxial stretching force is applied to simulate the uniaxial stretching force applied to the cell. The simulation results are consistent with the measured results. This method provides a reference for the measurement of other cellular mechanical properties.

Keywords: shear modulus; cell deformation; optical tweezers; extracellular Ca^{2+}

0 引言

人红细胞承担着气体交换、养料运输等重要任务,是人体中重要的功能细胞。由于人体内毛细血管的直径可能小于红细胞的直径,红细胞常常需要变形以顺利通过毛细血管,所以红细胞的形变能力对其完成正常的生理功能是非常重要的。弹性模量是衡量物体变形能力的重要指标之一。已有研究对生物体组织内部的弹性模量差异进行检测^[1]。而细胞膜的弹性模量则可反应细胞的力学特性,对细胞膜弹性模量如剪切模量的测量可帮助区分外表相似但生理结构发生变化的细胞,由此可见测量红细胞膜的弹性模量对一些疾病病理的研究和药物的研发具有重要的意义和广阔的应用前景。

人体内不同的生理环境对血细胞的力学特性会造成不同的影响,血液中各种离子的浓度变化也会诱导细胞膜产生相应的力学响应。在这些离子中,钙离子是重要组成成分,已有国内外的各项研究表明,细胞外钙离子的浓度变化可影响细胞的形态、体积及变形能力等特性^[2-3],进而对细胞的各项功能产生影响^[4-5]。2017年,Vahideh等^[6]使用数字全息显微法研究了钙对红细胞膜的影响,在研究中使用光镊技术固定红细胞便于记录它的干涉条纹。通过红细胞进行相位提取及形貌恢复,分析了红细胞表面粗糙度以及细胞体积等参数受钙影响的变化。该研究使用相位提取算法恢复形貌,需进行大量数据处理,最终并未测量出细胞膜的弹性模量,也并未使用光镊对细胞施加力致其变形。

近年来,单分子操纵技术被广泛应用于生命科学、生物技术、表面技术等领域^[7],单分子研究技术例如MEMS^[8]、微管吸吮法^[9]、原子力显微镜^[10]等被广泛应用于细胞力学特性测量中。在这些方法中均存在与细胞膜的直接接触,可能对细胞造成不同程度的损伤。光镊与这些传统方法相比具有非机械接触的的优点,对被测样本温和和无机械损伤,且由于光镊对施加力的操控可精确至皮牛顿量级,使光镊成为研究微粒静态与动态特性的理想技术方法。Ashkin等^[11]于1986年首次实现了使用激光捕获原子,光镊于1987年第一次被应用于生物样本。之后光镊技术被广泛应用于各种细胞研究,光阱力的计算也被广泛研究^[12-13]。已有一些研究利用光镊技术对不同药物刺激下红细胞的力学特性进行测量,如2018年,德黑兰大学的研究人员使用光镊分析了一种名为阿托伐他汀的降血脂药物对血细胞弹性的影响^[14]。光镊也被应用于对患有不同疾病的病人的红细胞力学特性进行测量分析,如患有糖尿病^[15]、地中海贫血^[16]、疟疾^[17]等疾病的病人,其红细胞的形貌、体积、弹性等都会发生变化。但是这些测量未曾直接量化细胞形貌、弹

性模量与光镊拉力间的相关关系,且测量过程不够简便、直观。

在光镊操控生物样本时,对被测样本形貌的测量是研究其性质的基础。有研究将光镊技术与激光扫描共聚焦显微技术相结合,使用光镊操纵叶片中叶绿体的位置,同时用共聚焦显微镜对叶绿体在植物细胞中的三维位置扫描成像^[18]。但是,激光扫描共聚焦显微成像的单个视场扫描过程通常耗时几分钟,无法对活细胞在光镊操纵下的形貌变化进行实时动态观测。2016年,Yareni等^[19]提出基于普通光学显微镜的微球标记变焦方法,在贴壁细胞表面粘贴一个微球,同时在载玻片上放置另一个微球作为参照,实验中使用光镊拉动细胞表面的微球使细胞发生形变,两个微球在竖直方向上的相对距离发生改变,通过对比两个微球的聚焦位置,得出细胞粘附微球的位置在光镊作用前后的厚度变化。该方法受制于显微镜调焦精度,且只能测量细胞在垂直方向的单点变形量,应用场景比较单一。2016年,Song等^[20]使用单光阱对离体红细胞的弹性模量随离体时间的变化进行了测量,在施力过程中仅拉动细胞单侧的微球,这要求与细胞单侧连接的微球另一端与培养皿底部黏连,加大了样品制备难度。同时单光阱拉伸无法保证细胞受力平衡稳定,为弹性模量的测量增加了不确定性因素。

针对以上研究现状存在的细胞形貌测量不够简便、直观,细胞在形变过程中可能无法保证受力平衡等问题,本文采用了双光阱方法固定并拉伸测量红细胞在梯度浓度氯化钙溶液中的力学特性。能够在对被测红细胞无机械损伤且不干扰被测环境的前提下对细胞膜的剪切模量进行测量;同时,双光阱固定法可微控施加给细胞的拉伸力,精度可至皮牛顿量级,提高了测量精度;设置了阶梯浓度的氯化钙溶液,在细胞仅受氯化钙浓度不同的影响下,测量细胞膜剪切模量的微弱变化,试验针对性强;采用双凹盘形结构模型及Neo-Hookean应变能本构关系对细胞受力进行仿真,对比试验得到的拉伸力与形变关系,验证了方案的有效可靠性。通过对不同浓度氯化钙溶液中的红细胞膜剪切模量进行测量,定量分析细胞外钙离子浓度对红细胞力学特性的影响。

1 理论分析

1.1 光阱刚度标定原理

为了实时获取光镊对微球的操控力大小,在进行测量之前需要标定光阱刚度。光阱刚度的标定采用热噪声分析法^[21],使用光镊捕获一个悬浮在PBS溶液中的微球,由CMOS相机记录其被捕获时的布朗运动轨迹可获得微球中心的位置分布概率曲线,如图1(a)所示。结合

波尔兹曼分布可得出微粒的势能分布曲线,如图1(b)所示,再计算得出光阱刚度大小,从而完成对光阱刚度的标定。

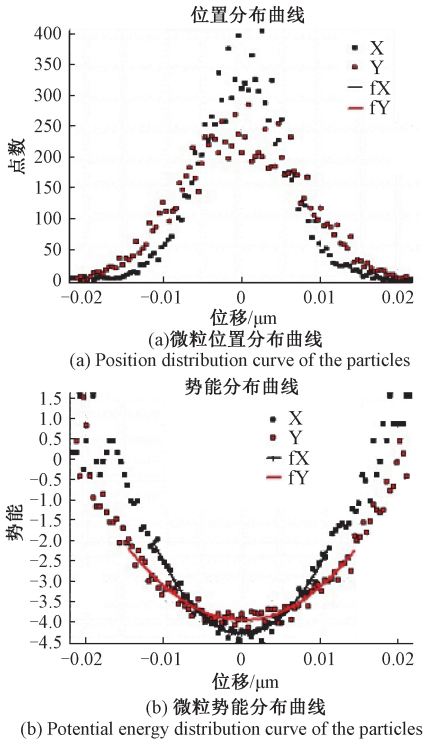


图1 微粒位置和势能分布曲线

Fig.1 Position and potential energy distribution curves of the particles

波尔兹曼分布如式(1)所示^[22],其中 $E(x)$ 为微粒的势能, $p(x)dx$ 是具有该势能的微粒的位置分布概率。势能与光阱刚度 k 的关系如式(2)所示,通过计算可以得出光阱刚度的值。

$$p(x)dx = Ce^{-\frac{E(x)}{kT}} \quad (1)$$

$$E(x) = \frac{k\Delta x^2}{2} = -\frac{1}{2}F \times \Delta x \quad (2)$$

由于光镊对微粒施力的过程与弹簧相似,光阱力大小由光阱刚度及光阱与微粒的中心间距共同决定。测量过程中的光阱中心坐标由光镊系统记录,微粒中心的坐标可由图像处理识别微粒边缘后计算获得。

1.2 红细胞力学模型仿真

为了研究血红细胞受力时的形变情况,学者们使用不同工具对细胞的模型进行了仿真分析^[23-24]。本文使用ABAQUS对血红细胞的力学模型进行了仿真与计算。根据1972年由Evans等^[25]根据血红细胞的双凹盘形结构提出的形状函数,对血红细胞形状的建模遵循以下表达式:

$$z = \pm R \sqrt{\frac{1}{4} - \frac{x^2 + y^2}{4R^2}} \cdot \left[C_0 + C_1 \frac{x^2 + y^2}{R^2} + C_2 \left(\frac{x^2 + y^2}{R^2} \right)^2 \right] \quad (3)$$

式中: R 为细胞的初始半径,根据血红细胞的正常半径范围将其设定为 $3.9 \mu\text{m}$ 。根据Evans建模的数据^[25],式中的参数 C_0 、 C_1 和 C_2 分别设定为0.207 161、2.002 558和-1.122 762。按照此模型表达式建立出的模型如图2所示。

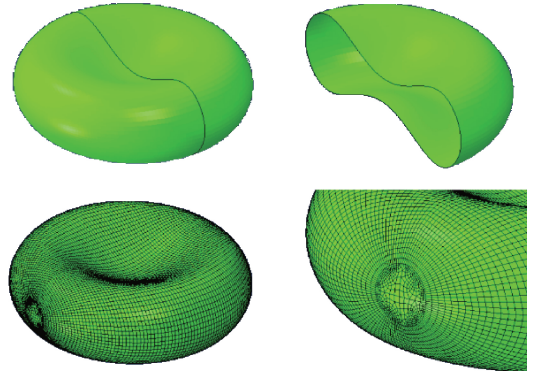


图2 建立完成的双面凹陷盘形红细胞模型

Fig.2 The completed biconcave-disk model of RBC

在对细胞膜的仿真研究中,通常将细胞膜归属为超弹性材料。超弹性材料的本构关系可通过对材料变形能的定义来确定^[26]。这里将血细胞膜当作不可压缩的各向同性简单超弹性材料,则其变形可按照超弹性本构关系分析。由Neo-Hookean应变能表达式,当忽略温度对细胞膜的力学性能的影响时,应变能可按照式(4)表达。

$$U = \frac{G_0}{2} (\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2 - 3) \quad (4)$$

式中: λ_1 、 λ_2 和 λ_3 分别是细胞在 x 、 y 和 z 方向的伸长比。在细胞形变仿真中,通常假定在细胞形变时细胞膜的面积为定值^[25-26],且细胞膜的厚度 $h = 100 \text{ nm}$ ^[27]也不变。由此假设可得以下关系:

$$\lambda_1 \times \lambda_2 = 1 \quad (5)$$

$$\lambda_3 = 1$$

式中: G_0 是材料的初始体剪切模量值。根据Neo-Hookean超弹性模型,当最大应变与模型的初始尺寸大小相当时,对应变势能的计算是相对准确的。故此仿真模型更适合对大形变的情况进行分析。当细胞受到拉伸力操纵时,沿 x 和 y 的不同轴向拉伸力分别用 T_1 和 T_2 表示。此处由于只施加了水平方向的横向拉伸力,故拉伸力是单轴的。则作为超弹性材料考虑的细胞膜受到的拉伸应力 T_2 为0,而 T_1 如以下表达式所示:

$$T_1 = h \frac{\partial U}{\partial \lambda_1} = G_0 h (\lambda - \lambda_1^{-3}) \quad (6)$$

再通过膜的剪切应力与拉伸应力的关系,剪切应力 T_s 符合以下表达式:

$$T_s = \frac{T_1 - T_2}{2} = \frac{T_1}{2} = \frac{G_0 h (\lambda_1 - \lambda_1^{-3})}{2} \quad (7)$$

由式(7),可将细胞膜的剪切模量 μ 表示成:

$$\mu = \frac{\partial T_s}{2 \partial \gamma_s} = \frac{G_0 h (\lambda_1 - \lambda_1^{-3})}{(\lambda_1^2 + \lambda_1^{-2})} \quad (8)$$

在初始时刻,细胞未发生形变时, x 方向的伸长比 $\lambda_1 = 1$,代入式(8)可得出细胞膜的初始剪切模量 μ_0 为:

$$\mu_0 = G_0 h \quad (9)$$

如图 3 所示,通过以上建立的细胞力学模型,通过已知的剪切模量 μ_0 即可得出细胞在受到不同大小的应力 T_1 时的载荷分布以及伸长比 λ_1 。

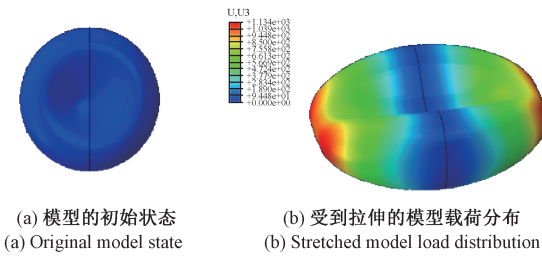


图 3 红细胞初始模型及受到单轴方向拉伸力的红细胞模型载荷分布

Fig.3 Original model of RBC and the stretched model load distribution with uniaxial stretching force exerted

2 方法实现

2.1 测量系统

测量系统如图 4 所示,由光镊系统 (Tweez250si, Aresis, 欧洲) 及倒置显微镜 (Nikon Ti, 日本) 两部分组成。倒置显微镜配置有 60×油浸物镜,其数值孔径为 1.4。利用显微镜内部的光学元件可保证光路的稳定性与精密性,同时简化了测量系统的搭建过程。光镊系统包括了波长为 1 064 nm 的 Nd:YAG 激光器 (5 W) 及声光偏转装置 AOD。激光器发出的激光束通过 AOD 调整后由配置在显微镜中的二向色镜反射进入显微镜内,并通过物镜聚焦在样品表面形成光阱,从而完成对微粒的捕获和操控。实验过程中的图像可由装置在显微镜上的 CMOS 相机 (IDS, 2 048×2 048, 5.5 μm, 德国) 记录,用于数据分析。

在前期理论分析与仿真的基础上,根据图 4 设计的测量系统,建立起了如图 5 所示的实验系统。光镊激光器集成在倒置显微镜上,光镊的参数由光镊控制器进行操控。细胞受到光镊作用力发生的形状变化可由倒置显微镜上的 CMOS 相机进行实时动态记录,用于后续细胞拉长比的计算。通过使用搭建完成的测量系统开展实

验,可对细胞力学特性开展测量研究。

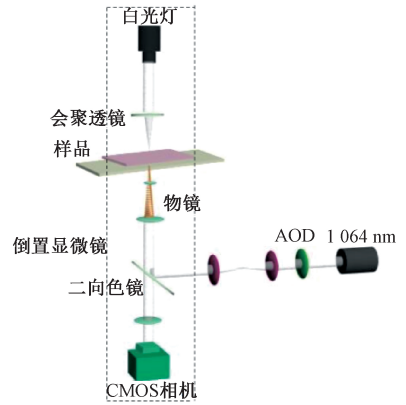


图 4 测量系统

Fig.4 The measurement system

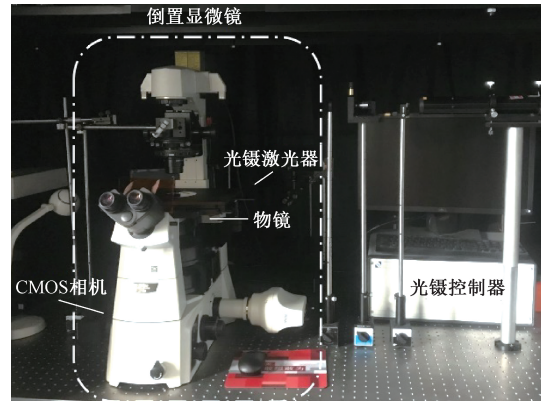


图 5 实际搭建完成的测量系统

Fig.5 The actual constructed measurement system

2.2 测量系统标定

该测量系统对被测细胞的剪切模量测量是通过光阱力及细胞的拉长比进行测量完成的。对光阱力的测量需要完成光阱刚度的标定,标定方法如前文所述,该实验中标定得到的光阱刚度为 $12.16 \pm 0.14 \text{ pN}/\mu\text{m}$ 。

由于系统对细胞拉长比的测量是通过使用显微镜对样本的长度测量功能完成的,为了确定该系统对样品长度的测量准确性,需要对样品长度的测量进行标定。已知该倒置显微镜 (Nikon Ti) 在二维方向的分辨率为 200 nm。采用该系统分别对标尺及直径 4 μm 的聚苯乙烯微球进行测量,将测量结果与标尺及微球的真实尺寸进行对比,从而完成对系统测量准确度的标定。对标尺间隔进行测量,结果如图 6 所示,所用标尺是 Nikon 显微镜配套用来定标的标准样品,其刻度线之间的最小间隔是 10 μm。对同一位置进行 10 次测量并求取平均值作为测量结果,与间隔的真实值进行对比,得出测量的绝对误差约为 0.1 μm。

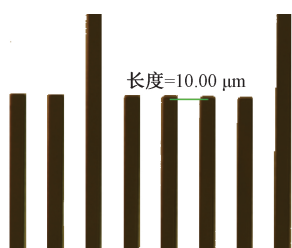


图 6 使用倒置显微镜对标尺间隔进行测量

Fig.6 Measuring the standard gauge interval utilizing inverted microscope

为了进一步确认该系统对样本二维尺寸测量的准确性,使用该系统对直径 $4\ \mu\text{m}$ 的聚苯乙烯微球的横向尺寸进行测量,对比扫描电镜拍摄得出的微球尺寸,确定系统的测量精度。通过在玻片上做标记,可通过标记确定特定微球的位置,从而对同一个微球分别进行显微镜测量及扫描电镜测量。这里使用的是实验室现有的超高分辨电子束曝光成像系统(Raith,德国)的成像功能对微球进行超高分辨率成像,该系统的最优成像精度为 $8\ \text{nm}$,分辨率为 $1.5\ \text{nm}$ 。如图 7 所示,分别是使用显微镜测得的微球尺寸与扫描电镜测得的微球尺寸。使用显微镜对同一个微球进行 10 次测量,并求取平均值作为测量结果,与扫描电镜测量的尺寸进行对比,得出测量绝对误差约为 $0.1\ \mu\text{m}$ 。与用标尺标定的测量精度一致。

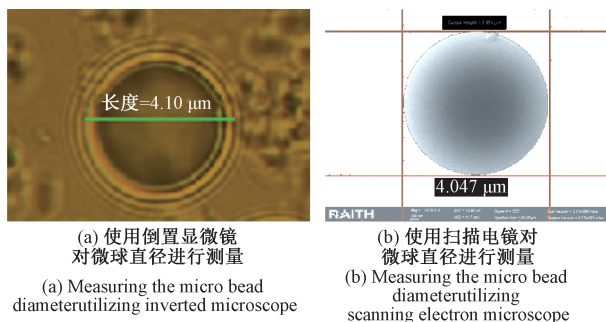


图 7 使用倒置显微镜和扫描电镜对微球直径进行测量

Fig.7 Measuring the micro bead diameter utilizing inverted microscope and scanning electron microscope

2.3 样品制备

人血红细胞(6%,盖宁生物有限公司,上海)采自健康人体,为了保持细胞活性,使用低温环境运输且实验时细胞离体时间不超过 $72\ \text{h}$ 。购买直径为 $4\ \mu\text{m}$ 的链霉素和素包被的聚苯乙烯微球(Bangs Lab,美国)与血红细胞按照浓度比例 $2:1$ 混合共培养。之前有研究使用单光阱操控血细胞,先使微球与细胞共培养,再寻找左右两侧均与微球粘连的血细胞,且要求其中一个微球已粘贴在培养皿底部。由于培养皿也事先用 BSA 封闭,微球与培养皿底部的粘连并不容易,整个过程需要大量时间寻找符

合要求的样品且成功率不高,增加了样品制备的难度。本文采用的方法简化了样品制备的工序,提高了成功率^[20]。为了去除细胞及微球表面的杂质,在混合之前血红细胞与微球分别离心 3 次($1\ 000\ \text{rpm}$, $3\ \text{min}$),并使用磷酸盐缓冲液(PBS)处理使其重新悬浮。血红细胞与微球混合液置于 4°C 共同培育 $1\ \text{h}$,使细胞与微球发生粘连。为了避免细胞与微球在实验时与培养皿底部粘连,预先使用浓度 1% 的牛血清白蛋白(BSA)溶液对培养皿底部进行封闭。为观察不同浓度氯化钙溶液对血红细胞弹性的影响,共准备 6 个直径 $35\ \text{mm}$ 的玻底培养皿(Thermo Fisher,美国),每个都加入 $100\ \mu\text{L}$ BSA 溶液进行封闭,待溶液完全蒸发后即可使用。将共同培育后的细胞与微球再次离心($1\ 000\ \text{rpm}$, $3\ \text{min}$)并均分为 6 份,6 份样品分别使用 $2\ \text{ml}$ PBS 及浓度为 100 、 200 、 300 、 400 和 $500\ \mu\text{M}$ 的氯化钙溶液重悬后加入 6 个处理过的培养皿中待用。所有样品置于室温 $20\ \text{min}$ 后再进行下一步实验观测。

2.4 测量步骤

首先将制备完成的细胞微球样本放置于倒置显微镜载物台上进行观察,可发现经过 $1\ \text{h}$ 共培养后,有大量细胞与微球粘连。为了满足后续双光阱操控,需要找到水平两侧分别粘贴一个微球的血红细胞。由于血红细胞的正常直径范围约为 $6\sim 9\ \mu\text{m}$,为了排除细胞自身尺寸不同带来的测量误差,在每组样品中满足测量要求的细胞中随机挑选 10 个细胞进行测量。在观察视野中设置 2 个参数一致的光阱分别捕获细胞两侧粘贴的两个微球并使细胞处于正常形态。在操控过程中,左侧光阱的位置保持不变,右侧光阱以 $20\ \text{nm/s}$ 的速度匀速缓慢向右运动,带动微球拉伸细胞产生形变。拉伸过程的匀速缓慢是为了保证细胞在形变过程中保持受力平衡。拉伸过程中的图像由 CMOS 相机记录。6 组样品均进行同样操作。

3 实验验证

3.1 血细胞膜剪切模量测量结果

在搭建完成的测量系统上开展细胞膜剪切模量测量实验,按照上述实验步骤,选取 PBS 中符合操控要求的一个血红细胞为例,细胞两侧的微球受到双光阱拉伸后产生的形变如图 8 所示。

血红细胞膜的剪切模量 H 可由式(10)计算得出:

$$H = \sqrt{\frac{1}{125rB} \left[\frac{F}{\varepsilon} \right]^3} \quad (10)$$

式中: r 为细胞的初始半径; $B(2 \times 10^{-19}\ \text{N}\cdot\text{m})$ 是血红细胞膜的弯曲模量^[28]; F 为光阱力; ε 是细胞拉长比,定义

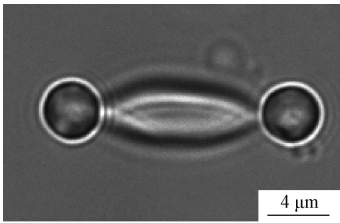


图 8 粘贴微球的红细胞受双光阱拉伸产生形变
Fig.8 The RBC attached with two microbeads is stretched to deform by two optical traps

为 $(R-R_0)/R_0$, R_0 和 R 分别为血红细胞的初始半径及在拉伸过程中的横向半径。细胞的半径可通过对 CMOS 相机记录的细胞图像进行图像处理获得。

以 PBS 中随机选择的满足操控要求的一个血红细胞为例,细胞在拉伸过程中受到的光阱力与细胞的拉长比的关系如图 9 所示,分析各个时刻拉力与拉长比的比值,可计算出 F/ε 拟合直线的斜率 k_c ,该图中的拟合直线斜率约为 15.89。将各参数代入式(10)中,即可计算出细胞膜的剪切模量。

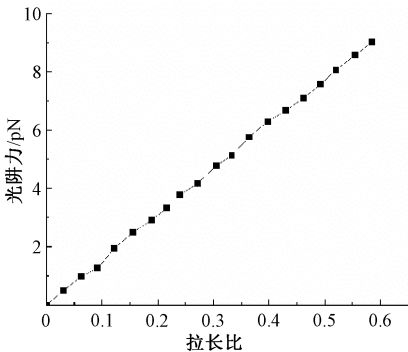


图 9 细胞在拉伸过程中受到的光阱力和细胞拉长比的对应关系

Fig.9 Relationship of the optical trap force and cell extension ratio during the stretching process of the cell

按照上述步骤分别对 6 组样品中的细胞进行测量,将参数代入式(1)得出细胞膜的剪切模量。对每组样品中的 10 个细胞测得的剪切模量取平均值作为该组的平均剪切模量。图 10 所示为 6 组样品的平均剪切模量对比。可明显看出与 PBS 中的血红细胞相比,血红细胞膜的弹性模量随着氯化钙溶液浓度的增加而减小。PBS 中的正常血红细胞的平均剪切模量为 $6.42\text{ pN}/\mu\text{m}$,处于 $100\sim 500\text{ }\mu\text{M}$ 浓度的氯化钙溶液中的血红细胞平均弹性模量分别为 5.92 、 5.12 、 4.21 、 3.31 及 $2.61\text{ pN}/\mu\text{m}$ 。对比测量出的正常血红细胞的平均剪切模量,在不同浓度氯化钙溶液的作用下,血红细胞的平均剪切模量分别减少了 7.8% 、 20.3% 、 34.4% 、 48.4% 及 59.3% 。本文测

得的细胞膜弹性模量随钙离子浓度增大而减小,实验结果与以往对钙离子影响红细胞力学特性的研究结果一致^[29]。这一现象产生的原因是,磷脂分子由于受到钙的诱导在血红细胞膜上产生局部疏水性聚集,但会导致膜硬度整体下降,溶血加剧^[30]。

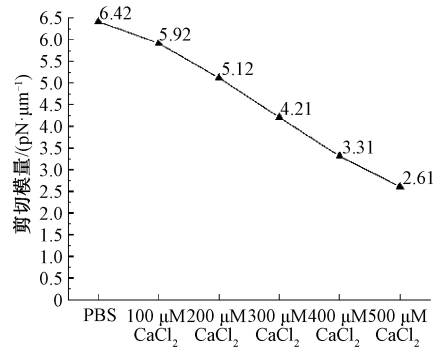


图 10 正常 PBS 和不同氯化钙浓度下 6 组血红细胞膜平均剪切模量(10 个单个细胞平均值)测量结果对比
Fig.10 Measurement result comparison of the mean shear modulus of cell membrane (average of 10 individual RBCs) among 6 groups of samples in normal PBS and CaCl_2 solutions with different concentrations

与其他测量方法如单光阱拉伸法、全息成像法等对比,本文采用的方法能够获取细胞的拉长比作为形变指标,更加直观地体现了细胞的实时动态形变,且说明了细胞形变与光阱力、剪切模量之间的对应关系,计算过程简单,最终定量分析了细胞力学特性的变化。

3.2 仿真结果与测量结果对比

将以上测量得到的 6 组不同的弹性模量分别代入模型中作为初始剪切模量,对模型施力后分析模型的拉长比。细胞模型的初始直径定为 $d_0=7.8\text{ }\mu\text{m}$,图 11 中(a)~(f)分别对应剪切模量为 $\mu_0=6.42$ 、 $\mu_1=5.92$ 、 $\mu_2=5.12$ 、 $\mu_3=4.21$ 、 $\mu_4=3.31$ 和 $\mu_5=2.61\text{ pN}/\mu\text{m}$ 时的模型受力分布,图 11 中不同颜色表示了模型不同区域受到的拉力载荷大小,由于力施加在模型水平两侧,故两侧受到的拉力载荷最大。为了对比不同弹性模量对细胞形变能力的影响,对 6 个模型施加同样大小的拉力 6 pN ,由图 11(a)~(f)中 6 个模型的形状变化可以看出,在同样的拉力下,剪切模量越小的模型横向拉长比越大。从仿真结果中提取模型左右两侧的坐标值来获取变形后的水平尺寸,再对比模型最初的直径,即可计算得出(a)~(f)对应的拉长比。根据拉长比与拉力的关系可分析出细胞的形变能力。

为了定量验证实验结果与仿真结果是否一致,从实验中实际测得的 6 组数据中,每组 10 个细胞中随机挑选一个细胞,将测得的该细胞的剪切模量和初始半径作为

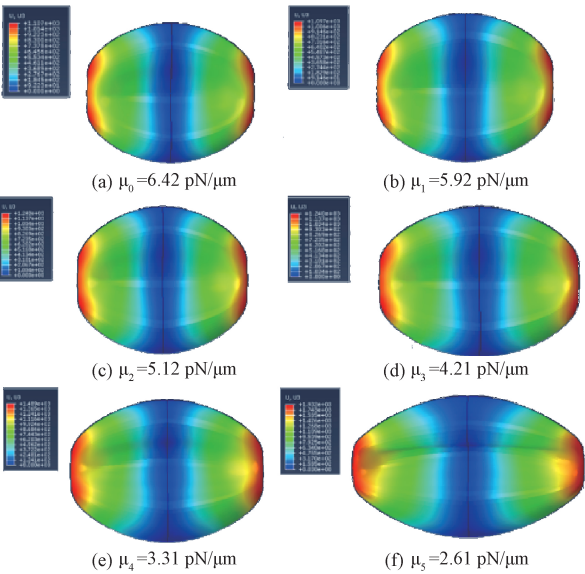


图 11 不同剪切模量条件下的血细胞建模仿真
Fig.11 RBC modeling and simulation under different shear modulus conditions

参数建立对应的模型。对该模型施加水平单轴拉伸力,分别记录拉力 F 和模型水平拉长比 ε 的值,计算 F/ε 拟合直线的斜率 k_s 。表 1 所示为 6 个模型在受到拉力过程中的 $k_s = F/\varepsilon$ 与实验中实际测得的对应细胞 $k_e = F/\varepsilon$ 的对比。从表 1 中的数据对比可以看出,仿真结果与实验结果基本一致,验证了此测量方法的准确性。

表 1 不同剪切模量下仿真与实测拉长比对比
Table 1 Simulated and measured extension ratio under different shear modulus

剪切模量 $\mu/(\text{pN} \cdot \mu\text{m}^{-1})$	仿真 $k_s = F/\varepsilon$	实测 $k_e = F/\varepsilon$
6.42	16.04	15.99
5.92	15.23	15.18
5.12	13.82	13.76
4.21	11.90	11.95
3.31	10.27	10.22
2.61	8.75	8.72

4 结 论

本文提出了一种细胞膜剪切模量测量方法,使用双光阱操控细胞两侧粘贴的微球使红细胞产生形变,再结合光阱力与细胞拉长比测量红细胞在不同浓度氯化钙溶液中的剪切模量。对比 PBS 中的正常红细胞,处于氯化钙溶液浓度由 $100 \sim 500 \mu\text{M}$ 递增的五组样品中的

红细胞平均剪切模量随着溶液浓度的增加而减小。实验结果表明了细胞外钙离子浓度的增加会使红细胞变形能力增强。这与早期基于诱导溶血测量的各种钙孵育细胞的研究是一致的^[30]。本文使用的弹性模量测量方法操作直观简便,其中选用的光阱刚度热运动分析标定法标定精度高;双光阱操控过程保证了细胞受力平衡,同时能够更加精确获取光阱力大小,从而能够准确测量出细胞膜的剪切模量。经过对不同弹性模量条件下的红细胞受力进行仿真,对比了仿真得到的拉力与拉长比的比值与同等受力条件下实际测得的比值,仿真结果验证了测量结果的准确性。该测量应用可为其他细胞的力学特性测量提供参考。

参考文献

[1] 罗建文,白净,汪伟,等.超声弹性成像实验系统的研制[J].仪器仪表学报,2006,27(5):541-547.
LUO J W, BAI J, WANG W, et al. An experimental system for ultrasound elastography[J]. Chinese Journal of Scientific Instrument, 2006, 27(5):541-547.

[2] 高欣,仇红霞,王菊娟.血清钙离子浓度及白蛋白水平在继发性噬血细胞性淋巴瘤组织细胞增多症中的临床意义[J].中华血液学杂志,2017,38(12):529:1031-1035.
GAO X, QIU H X, WANG J J. Clinical significance of serum calcium and albumin in patients with secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis[J]. Chinese Journal of Hematology, 2017, 38(12):529:1031-1035.

[3] DANESE A, PATERGNANI S, BONORA M, et al. Calcium regulates cell death in cancer: Roles of the mitochondria and mitochondria-associated membranes (MAMs) [J]. Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics, 2017, 1858(8):615-627.

[4] 薛芸,梁尚栋.钙信号在糖尿病周围神经病变中感觉神经元和神经胶质细胞功能异常的研究进展[J].中国药理学通报,2017,33(33):308-311.
XUE Y, LIANG SH D. Progress of calcium signaling in sensory neurones and neuroglial cell in diabetic peripheral neuropathic dysfunction [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2017, 33(33):308-311.

[5] CAPIOD T. Extracellular calcium has multiple targets to control cell proliferation[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2016:898:133-156.

[6] VAHIDEH F R, RAHIM T, ALI R M, et al. Calcium

- effect on membrane of an optically trapped erythrocyte studied by digital holographic microscopy[J]. *Applied Physics Letters*, 2017
- [7] 田文超,贾建援.单分子操纵技术[J].*仪器仪表学报*, 2003,24(z1):531-533,542.
TIAN W CH, JIA J Y. Single molecule manipulation technology[J]. *Chinese Journal of Scientific Instrument*, 2003, 24(Z1):531-533,542.
- [8] SWARNALATHA K, SRIPRIYA T, PRAVEENKUMAR S. Separation of blood cells using silicon-based microfilter in artificial intelligence and evolutionary computations in engineering systems[M]. New Delhi: Springer, 2016, 130(1): 925-932.
- [9] SVETINA S, KOKOT G, KEBE T S, et al. A novel strain energy relationship for red blood cell membrane skeleton based on spectrin stiffness and its application to micropipette deformation[J]. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 2016, 15(3): 745-758.
- [10] 田孝军,王越超,刘连庆,等.具有三维力反馈的原子力显微镜纳米操作系统[J].*仪器仪表学报*, 2006, 27(7):661-665.
TIAN X J, WANG Y CH, LIU L Q, et al. AFM based nanomanipulation system with 3D force feedback[J]. *Chinese Journal of Scientific Instrument*, 2006, 27(7): 661-665.
- [11] ASHKIN A, DZIEDZIC J M. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria[J]. *Science*, 1987, 235(4795): 1517-1520.
- [12] 刘永红,史锦珊.激光微束轴向光阱力分析[J].*仪器仪表学报*, 2005,26(8):1799-1800.
LIU Y H, SHI J SH. Analysis on the axial trapping force of the laser micro-beam[J]. *Chinese Journal of Scientific Instrument*, 2005, 26(8):1799-1800.
- [13] 刘永红,史锦珊.基于T矩阵的激光光阱力计算[J].*仪器仪表学报*, 2006,27(Z2):1200-1202.
LIU Y H, SHI J SH. Computation of optical trapping force based on T-matrix method[J]. *Chinese Journal of Scientific Instrument*, 2006, 27(Z2):1200-1202.
- [14] VAHID S, MEHRAD B, ALI A, et al. Atorvastatin treatment softens human red blood cells: an optical tweezers study[J]. *Biomedical Optics Express*, 2018, 9(3): 1256-1261.
- [15] SMART T J, RICHARDS C J, BHATNAGAR R, et al. A study of red blood cell deformability in diabetic retinopathy using optical tweezers[J]. *Proceedings of the SPIE*, 2015, 9548: 954825.
- [16] LUCA A C, RUSCIANO G, CIANCIA R, et al. Spectroscopical and mechanical characterization of normal and thalassemic red blood cells by Raman tweezers[J]. *Optics Express*, 2008, 16(11): 7943-7957.
- [17] PAUL A, PADMAPRIYA P, NATARAJAN V. Diagnosis of malarial infection using change in properties of optically trapped red blood cells[J]. *Biomedical Journal*, 2017, 40(2):101-105.
- [18] HOFFMANN A, MEYER Z H G. Optical tweezers for confocal microscopy[J]. *Applied Physics B*, 2000, 71, 747-753.
- [19] YARENI A, A, BRUNO P, Diney S E, et al. Rheological properties of cells measured by optical tweezers[J]. *BMC Biophysics*, 2015, 9(1):5.
- [20] SONG H D, LIU Y. Study of in vitro RBCs membrane elasticity with AOD scanning optical tweezers[J]. *Biomedical Optics Express*, 2017, 8(1): 384-394.
- [21] FLORIN E L, PRALLE A, STELZER E H K, et al. Photonic force microscope calibration by thermal noise analysis[J]. *Applied Physics*, 1998, 66(1): 75-78.
- [22] KEIR C N, STEVEN M B. Optical trapping[J]. *Review of Scientific Instruments*, 2004, 75(9): 2787.
- [23] DAOA M, LIMB C T, SURESH S. Mechanics of the human red blood cell deformed by optical tweezers[J]. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, 2003, 51: 2259-2280.
- [24] 战庆亮,焦古月,张若京.红细胞在渗透实验中的变形分析[J].*医用生物力学*, 2012, 27(6): 687-691.
ZHAN Q L, JIAO G Y, ZHANG R J. Deformation analysis of red blood cells in osmosis experiment[J]. *Journal of Medical Biomechanics*, 2012, 27(6): 687-691.
- [25] EVANS E A, FUNG Y C. Improved measurements of the erythrocyte geometry[J]. *Microvascular Research*, 1972, 4:335-347.
- [26] SIMO J C, ORTIZ M. A unified approach to finite deformation elastoplastic analysis based on the use of hyperelastic constitutive equations[J]. *Computer Methods*

in Applied Mechanics and Engineering, 1985, 49(2): 221-245.

- [27] 陶祖莱. 生物流体力学[M]. 北京: 科学出版社, 1984.
TAO Z L. Biological fluid mechanics [M]. Beijing: Science Press, 1984.
- [28] PARKER K H, WINLOVE C P. The deformation of spherical vesicles with permeable, constant-area membranes: application to the red blood cell [J]. Biophysical Journal, 1999, 77(6): 3096-3107.
- [29] MORADI A R, ALI M K, DANESH PANAH M, et al. Detection of calcium-induced morphological changes of living cells using optical traps [J]. IEEE Photonics Journal, 2010, 2(5): 775-783.
- [30] ALI M K, TAYYAB S. Calcium-induced bilirubin-dependent hemolysis of human erythrocytes [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1997, 1326(1): 124-130.

作者简介



刘佳琪, 2012 年于东北大学获得学士学位, 2015 年于北京理工大学获得硕士学位, 现为天津大学博士研究生, 主要研究方向为光镊操控技术及细胞力学特性测量。
E-mail: lj424@126.com

Liu Jiaqi received her bachelor degree from Northeastern University in 2012 and M. S. degree from Beijing Institute of Technology in 2015. Now, she is a Ph. D. candidate in Tianjin University. Her main research direction includes optical tweezers manipulation technology and cell mechanical property study.



祝连庆(通信作者), 分别在 1982 年和 1989 年于合肥工业大学获得学士和硕士学位, 2013 年于哈尔滨工业大学获得博士学位, 现为北京信息科技大学教授、博士生导师, 主要研究方向为光纤传感、光纤激光器、光电精密测试技术等。
E-mail: zhulqbistu@126.com

Zhu Lianqing (Corresponding author) received his B. Sc. and M. Sc. degrees both from Hefei University of Technology in 1982 and 1989, respectively; and received his Ph. D. degree from Harbin Institute of Technology in 2013. Now, he is a professor and Ph. D. supervisor in Beijing Information Science and Technology University. His main research direction includes fiber sensing technology, fiber laser and precise opto-electric measurement technology.