

文章编号: 1004-7220(2022)03-0448-06

一种微管吸持细胞泊松比测定方法

李孝伟^{a,b}, 张文杰^a, 张丹^b, 袁惠宇^b, 刘娜^b

(上海大学 a. 力学与工程科学学院; b. 机电工程与自动化学院, 上海 200444)

摘要: **目的** 提出一种基于微管吸持技术的细胞泊松比测定方法。**方法** 基于变形对称性假设, 通过提取微管吸持下细胞发生的挤压变形特征, 根据广义虎克定律, 推导细胞泊松比与变形量之间的解析表达式, 依据细胞膜表面标记点的位置变化, 实现细胞泊松比的准确测定。**结果** 对前列腺癌细胞中的 LNCaP 细胞进行泊松比测定, 结果表明, LNCaP 细胞的泊松比在 0.44~0.46 之间, 平均值为 0.45; 同一个细胞特征点选取位置不同, 对泊松比计算结果的影响在 1.6% 的误差范围内。**结论** 本文方法简单易行, 可提高细胞泊松比的测量精度, 有助于临床利用细胞力学特性进行细胞检测和筛选。

关键词: 泊松比; 微管吸持法; LNCaP 细胞

中图分类号: R 318.01 **文献标志码:** A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2022.03.010

A Method for Determining Poisson's Ratio of Cells Based on Micropipette Aspiration Technique

LI Xiaowei^{a,b}, ZHANG Wenjie^a, ZHANG Dan^b, YUAN Huiyu^b, LIU Na^b

(a. School of Mechanics and Engineering Science; b. School of Mechatronic Engineering and Automation, Shanghai University, Shanghai 200444, China)

Abstract: **Objective** To propose a method for determining cell Poisson's ratio based on micropipette aspiration technique. **Methods** Based on the assumption of deformation symmetry, the analytical expression between Poisson's ratio and the amount of deformation was derived by extracting the extrusion deformation characteristics of the cells under micropipette aspiration according to the generalized Hooke's law. The accurate determination of Poisson's ratio of cells was realized according to position changes of markers on the surface of cell membrane. **Results** The Poisson's ratio of LNCaP cells in prostate cancer cells was measured. The result showed that the Poisson's ratio of LNCaP cells was between 0.44 and 0.46, with an average value of 0.45. The influence of the location of the same cell feature points on calculation results of Poisson's ratio was within the error range of 1.6%. **Conclusions** This method is simple and feasible, can improve the measurement accuracy of Poisson's ratio of cells, and is helpful for cell detection and screening by using cell mechanical properties in clinic.

Key words: Poisson's ratio; micropipette aspiration; LNCaP cells

力学特性是细胞的重要属性, 细胞的力学特性测量对细胞的分类和筛选工作有重要意义。当前

主流的测量方法是微流控芯片法、微管吸持法、电场力法、原子力显微镜法及光镊法等方法^[1-6]。

收稿日期: 2021-06-23; 修回日期: 2021-08-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(62073208)

通信作者: 张丹, 副研究员, 博士生导师, E-mail: dan.zhang@shu.edu.cn

Mitchson 等^[7]开发了微管吸吮法,即利用微管将细胞进行挤压变形,参考细胞的形变量从而计算细胞的弹性模量等力学参数。Marszalek 等^[8]利用电场力拉伸了海胆卵细胞,并对其弹性模量等力学参数进行测量。MacQueen 等^[9]利用自行设计的微流控芯片,对中国仓鼠卵巢细胞和人类前单核白细胞施加拉伸作用,通过测量拉伸变形测得细胞的弹性模量。宋华东^[10]基于光镊技术,通过红细胞的膜剪切模量和直接拉伸两种手段对离体红细胞的弹性变化进行表征,从而测得其细胞力学的参数。张晟泓等^[11]利用微管吸持法测量循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)弹性模量,同时对比3种癌细胞系的弹性模量。结果发现,癌细胞弹性模量在细胞系内以及不同细胞系间均存在较大差异。

陈昕妍等^[12]结合原子力显微镜法测得兔角膜基质细胞的弹性模量。伍诚麟等^[13]运用原子力显微镜法测得高脂组大鼠内皮细胞的弹性模量高于正常饲养组,从而证明高脂肪饮食可使大鼠内皮细胞刚度发生变化。上述研究集中在对细胞弹性模量的测量上,而假设细胞不可压缩,即泊松比为0.5。

但实际上细胞具有一定的可压缩性,并且不同种类细胞的泊松比存在差异,故泊松比取值会影响细胞弹性模量的测量精度。获得准确的泊松比有助于更完全地掌握细胞的力学特性。近年来,已有研究者开始对细胞泊松比进行测量。Trickey 等^[14]采用微管吸持法和有限元模拟法,通过实验数据和理论预测的拟合,从而测量出骨关节炎软骨细胞的泊松比为 0.36 ± 0.08 。但该测量方法需要通过大量数值迭代过程,计算成本较高。

本文提出一种新的泊松比测量方法,基于广义虎克定律,建立细胞微变形量和泊松比之间的力学模型。该模型可采用常用的微管吸持法,通过追踪细胞膜表面标记点的位置变化获得细胞的泊松比。

1 理论模型与实验

1.1 泊松比计算模型

如图1所示,将细胞的形态简化为内部充满细胞液的壁厚为 h 的弹性球体。在负压作用下细胞进入微吸管并发生变形,通过对微吸管内压力的控制,可将其静止于管道内某一位置,此时变形后的细胞形态呈现轴对称分布。

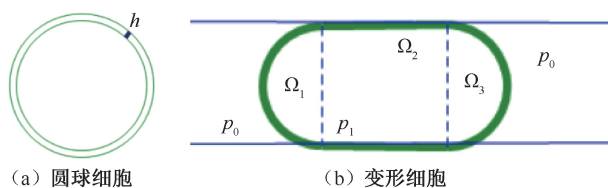


图1 细胞变形前后形态示意图

Fig. 1 Morphological diagram of cells before and after deformation (a) Sphere cell, (b) Deformed cell

注: p_0 、 p_1 分别表示变形后细胞外和变形细胞内的压强。

模型的基本假设如下:①管壁是光滑壁面,对于微吸管内静止的细胞可不考虑管壁与细胞间的摩擦力。②细胞在压缩过程中与环境没有基质的交换,即体积保持一定。③细胞具有弹性,在微吸管释放之后仍能恢复原有形状。

将变形后的细胞分为三部分, Ω_1 区域为左半球细胞, Ω_2 区域为中间段细胞, Ω_3 区域为右半球细胞。在对称性假设下,其左右半球形状和大小相等。以右半球细胞为分析对象,其受力如图2所示。

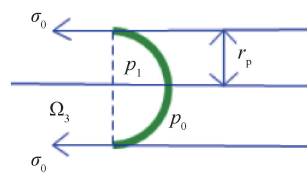


图2 右半球细胞受力图

Fig.2 Force diagram for right hemisphere of the cell

根据力的平衡可知:

$$2\pi h r_p \sigma_0 = (p_1 - p_0) \pi r_p^2 \quad (1)$$

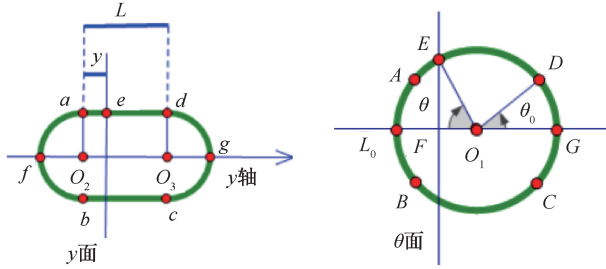
$$\sigma_0 = \frac{p_1 - p_0}{2h} r_p \quad (2)$$

式中: r_p 为管道的截面圆半径; h 为细胞膜的厚度; p_0 为被管道挤压发生形变后的细胞外压强, p_1 为变形细胞内的压强; σ_0 表示变形细胞的右半球的轴向拉应力即沿着微管轴方向的应力,变形细胞右半球轴向拉应力的方向见图2。

由于细胞膜的厚度 h 远小于管道的截面圆半径 r_p ,因此由式(2)可知, σ_0 远大于 $p_1 - p_0$,意味着变形细胞的轴向拉应力远大于其径向压应力,据此可以认为细胞膜厚度不发生改变。

如图3所示,假设变形后细胞上的 a 、 b 、 c 、 d 点分别对应圆球细胞的 A 、 B 、 C 、 D 点。变形细胞的弧

ab 、线段 ad 、弧 dc 和线段 bc 分别对应于圆球细胞的弧 AB 即 L_0 、弧 AD 、弧 DC 和弧 BC 。



(a) 变形细胞上标记点

(b) 圆球细胞上标记点

图3 平面假设示意图

Fig.3 Schematic diagram of plane hypothesis (a) Markers on deformed cells, (b) Markers on spheric cells

由虎克定律可知,变形细胞的右半球细胞的应变计算公式为:

$$\varepsilon_0 = \frac{(1 - \mu)\sigma_0}{E} \quad (3)$$

式中: μ 为细胞的泊松比; E 为细胞的弹性模量; σ_0 为变形细胞的右半球的轴向拉应力。从而可得 L_0 的计算公式为:

$$L_0 = \frac{\pi r_p}{1 + \varepsilon_0} \quad (4)$$

圆球细胞膜上的每个点会对应 1 个 θ 角,该 θ 角为圆球细胞上的标记点和细胞中心 O_1 连线与水平线的夹角。每个圆球细胞上的标记点会对应于变形后细胞上的 1 个点。过每个变形后细胞上的标记点做水平轴的垂线可以得到 1 个 y 面。圆球细胞上的每个标记点对应于每个 θ 面,而每个 θ 面又对应每个变形后细胞的 y 面,即 θ 面和 y 面这两个面之间的关系一一对应,此即为本文的平面假设(见图 3)。

标定 $\angle AO_1F = \angle DO_1G = \theta_0$,则有:

$$\theta_0 = \frac{L_0}{2R_0} = \frac{\pi r_p / R_0}{2(1 + \varepsilon_0)} \quad (5)$$

定义初始圆球细胞的半径 R_0 与微吸管截面圆半径 r_p 的比值为 \bar{R}_0 ,将 \bar{R}_0 代入式(5)中可得:

$$\varepsilon_0 = \frac{\pi}{2\theta_0 \bar{R}_0} - 1 \quad (6)$$

对于在微流管道中变形后的细胞,将其处于 y 平面处的沿着半径方向的应变标记为 ε_r ,应力标记

为 σ_r ,其沿 y 方向(微吸管轴向)的应变标记为 ε_y ,应力为 σ_y ,则依据虎克定律可知:

$$\sigma_y = \sigma_0 \quad (7)$$

$$\varepsilon_r = \frac{\sigma_r}{E} - \frac{\mu}{E}\sigma_y \quad (8)$$

$$\varepsilon_y = \frac{\sigma_y}{E} - \mu \frac{\sigma_r}{E} \quad (9)$$

由图 3 中对应的 y 、 θ 面上细胞膜周线长度可知:

$$\varepsilon_r = \frac{2\pi r_p - 2\pi R_0 \sin\theta}{2\pi R_0 \sin\theta} = \frac{r_p}{R_0 \sin\theta} - 1 \quad (10)$$

结合式(6)~(10),可得:

$$\varepsilon_y = (1 + \mu) \left(\frac{\pi}{2\theta_0 \bar{R}_0} - 1 \right) - \mu \left(\frac{r_p}{R_0 \sin\theta} - 1 \right) \quad (11)$$

由图 3 可知,圆球细胞的短弧长 AE 经过变形后对应于变形细胞的 ae 段长度,即为 y_0 ,从而可得:

$$Y = \int_0^y dy = \int_{\theta_0}^{\theta} (\varepsilon_y + 1) R_0 d\theta = \frac{R_0 \pi}{2\theta_0 \bar{R}_0} (1 + \mu) (\theta - \theta_0) - \mu r_p \left(\ln \tan \frac{\theta}{2} - \ln \tan \frac{\theta_0}{2} \right) \quad (12)$$

由图 3(b)可知, $\angle EO_1F = \theta$, E 点为标记点其位置可以在弧 AD 上移动,当 E 、 D 点重合时,即 $\theta = -\theta_0$ 时,由图 3(a)可知,此时 $y = L$,则:

$$L = \frac{R_0 \pi}{2\theta_0 \bar{R}_0} (\pi - 2\theta_0) (1 + \mu) + 2\mu r_p \ln \tan \frac{\theta_0}{2} \quad (13)$$

由于细胞在压缩过程中与环境没有基质的交换,即体积保持不变,由此可得:

$$\frac{\pi}{2\theta_0} (1 + \mu) (\pi - 2\theta_0) + 2\mu \ln \tan \frac{\theta_0}{2} = \frac{4}{3} (\bar{R}_0^3 - 1) \quad (14)$$

从而可以求得细胞泊松比的计算公式:

$$\mu = \frac{\frac{4}{3} (\bar{R}_0^3 - 1) - \pi \left(\frac{\pi}{2\theta_0} - 1 \right)}{\pi \left(\frac{\pi}{2\theta_0} - 1 \right) + 2 \ln \tan \frac{\theta_0}{2}} \quad (15)$$

式中: \bar{R}_0 为圆球细胞的半径 R_0 与微吸管截面圆半径 r_p 的比值。由式(15)可以看出,在 \bar{R}_0 已知的情况下,泊松比 μ 仅为 θ_0 的函数。据此,本文提出一种通过微吸管技术测量细胞泊松比的方法,即采取一定手段确定 θ_0 ,然后由式(15)计算出细胞的泊松比。由于直接测量 θ_0 有一定困难,故本文采用测量细胞变形前后特征点位置的办法推算 θ_0 。

1.2 实验模型

1.2.1 材料 实验所用细胞为LNCaP细胞和PC3细胞。微吸管采用内径为0.78 mm、外径1 mm的硼酸盐玻璃制作,经过拉针仪和烧针器加工后形成尖端内径为10~20 μm 微管。

1.2.2 实验装置 1个常规的微吸管系统由微吸管,操作支架,显微镜和支架操作平台组成。当微吸管处于细胞的微环境中时,利用微操作器控制毛细微吸管的位置。将差压传感器与计算机进行连接,将注射器的活塞部分与直线推杆电机进行连接。通过改变压强从而控制细胞的运动。当需要将管内物质排出微吸管外时,需要在管内产生正压,即将推杆电机向内部进行活塞的推动从而产生正压。当需要将目标细胞吸入微吸管内时,需要在管道内增加一个负压作用,应该往外拉活塞产生负压,从而将细胞吸入微吸管内。

1.2.3 实验过程 实验前,先用胰酶对待测量细胞进行消化,使细胞呈现悬浮状态。用磷酸盐缓冲溶液(PBS)对微细管道进行清洗。操作细胞过程是在光学显微镜下进行。当在光学显微镜下发现目标细胞时,利用微型操纵器去操作微吸管,使得微吸管的管口紧靠目标细胞的位置,并且施加负压,从而将目标细胞缓缓吸入到微吸管内。

2 结果与讨论

2.1 标记点选取

当细胞在负压的驱动下进入微吸管内时,细胞上面的标记点会随细胞形态的改变而产生位置的变化。位置转移后的标记点可能会静止于变形细胞的左半球上半部分,也可能静止于变形细胞的中间段部分。因此,分为两种情形进行讨论。

2.1.1 情况1 如图4所示,圆球细胞的初始标记

点在细胞的左半球上半部位, M 点为标记在圆球细胞上的标记点,当细胞被吸入微吸管内从而产生变形后,其位置发生移动,最终静止于变形细胞的左半球上半部分的细胞膜 m 点处。 θ_1 表示 m 点与形变细胞左半球中心 O_2 的连线与水平线的夹角, θ'_1 表示 M 点与圆球细胞中心 O_1 的连线与水平线的夹角。由图4可知: $\theta'_1: \theta_0 = \theta_1: \frac{\pi}{2}$,从而可得 θ_0 、 θ_1 以及 θ'_1 之间的关系:

$$\theta_0 = \frac{\pi\theta'_1}{2\theta_1} \quad (16)$$

结合式(15)、(16),可计算出细胞的泊松比。

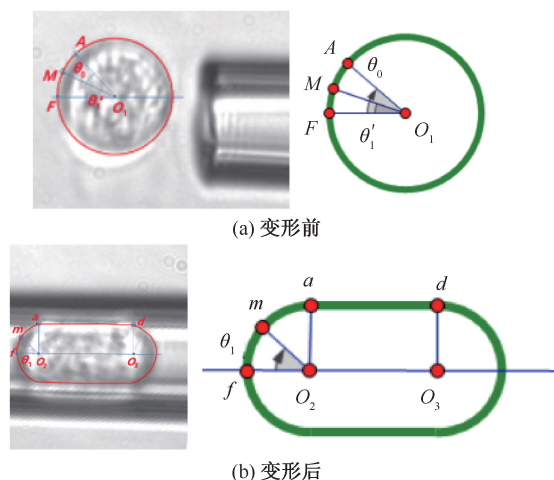


图4 细胞变形前后标记点位置示意图(情况1)

Fig.4 Schematic diagram of marker position before and after cell deformation (Case 1) (a) Before cell deformation, (b) After cell deformation

2.1.2 情况2 如图5所示,原始标记点在圆球细胞的左半球上半部位 N 处,细胞经过管道挤压发生变形后,标记点在变形细胞的中间段部位 n 处。 θ_0 表示 A 点与圆球细胞中心 O_1 的连线与水平线的夹角, θ_2 表示 N 点与圆球细胞中心 O_1 的连线与水平线的夹角。 y_1 表示 n 点与变形细胞的左半球圆心 O_2 的水平距离。定义 $\bar{y}_1 = \frac{y_1}{r_p}$,结合式(12)可得:

$$\bar{y}_1 = \frac{\pi}{2\theta_0}(1 + \mu)(\theta_2 - \theta_0) - \mu \left(\text{Intan} \frac{\theta_2}{2} - \text{Intan} \frac{\theta_0}{2} \right) \quad (17)$$

结合式(15)、(17)可得:

$$\left[\bar{y}_1 - \frac{\pi}{2} \left(\frac{\theta_2}{\theta_0} - 1 \right) \right] \left[\frac{\pi}{2} \left(\frac{\pi}{\theta_0} - 2 \right) + 2 \ln \tan \frac{\theta_0}{2} \right] = \left[\frac{4}{3} (\bar{R}_0^3 - 1) - \frac{\pi}{2} \left(\frac{\pi}{\theta_0} - 2 \right) \right] \left[\frac{\pi}{2} \left(\frac{\theta_2}{\theta_0} - 1 \right) - \ln \tan \frac{\theta_2}{2} + \ln \tan \frac{\theta_0}{2} \right] \quad (18)$$

运用式(18),通过迭代计算可得出 θ_0 ,之后代入式(15)即可计算出细胞泊松比。

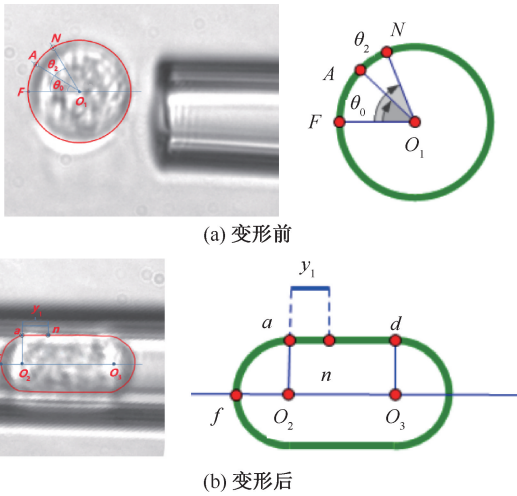


图5 细胞变形前后标记点位置示意图(情况2)

Fig.5 Schematic diagram of marker position before and after cell deformation (Case 2) (a) Before cell deformation, (b) After cell deformation

2.2 泊松比计算

在进行细胞的微吸管实验时,在显微镜观测下,细胞表面有一些特殊的位置点。这些位置点在细胞发生挤压变形前后的位置有所差异。针对细胞的微管吸持实验结果,提取 126 个 LNCaP 细胞的实验数据。将实验数据代入到其对应情况的公式中,从而计算出细胞的泊松比(见表 1)。

表1 两种情况下细胞泊松比

Tab.1 Cell Poisson's ratio in two cases

情况 1		情况 2	
$R_0 / \mu\text{m}$	8.5~9.5	$R_0 / \mu\text{m}$	8.5~9.5
$r_p / \mu\text{m}$	7.5	$r_p / \mu\text{m}$	7.5
\bar{R}_0	1.13~1.27	\bar{R}_0	1.13~1.27
$\theta'_1 / (^\circ)$	28.5~31.7	$\theta_2 / (^\circ)$	58~77.3
$\theta_1 / (^\circ)$	37.5~39.7	$\gamma_1 / \mu\text{m}$	6.4~9.8
μ	0.44~0.45	μ	0.45~0.46

2.2.1 情况 1 圆球细胞的初始标记点位于细胞的左半球部分,当细胞被吸入微吸管内从而产生变形后,标记点的位置发生移动,最终静止于变形细胞的左半球部分。根据实验统计,标记点最终静止于变形细胞的左半球的 LNCaP 细胞有 58 个。将表 1 数据代入情况 1 中的式(15)和(16),可计算出细胞的泊松比。

2.2.2 情况 2 原始标记点在初始圆球细胞的左半球部位,细胞经过管道挤压发生变形后,标记点在变形细胞的中间部分。根据实验统计,标记点最终静止于变形细胞的中间部分的 LNCaP 细胞有 68 个。将表 1 数据代入情况 2 中式(15)和(17),可计算出细胞的泊松比。

3 结果

由表 1 可知,将 LNCaP 细胞的数据,根据变形后细胞上标记点位置的差异,分别代入本文建立的两种不同情况下细胞泊松比的计算公式中。在两种情况下,计算出的同一个 LNCaP 细胞泊松比在 1.6% 的误差范围内相等。计算结果表明,LNCaP 细胞的泊松比在 0.44~0.46 之间,该测定值不是通常假定的 0.5。

4 结论

为了获取准确的细胞力学特性,本文基于微管吸持法,通过弹性变形对称性假设,根据广义虎克定律推导出细胞泊松比与细胞变形量之间的解析表达式,提出一种基于微管吸持技术的细胞泊松比测定方法。运用该方法对 LNCaP 细胞的泊松比进行测量,结果表明,测得的同一种细胞泊松比在 0.44~0.46 之间。同一个细胞特征点选取位置的不同,对泊松比计算结果的影响在 1.6% 的误差范围内,其对计算结果的影响很小。本文方法简单易行,可提高细胞泊松比的测量精度,有助于利用细胞力学特性进行细胞检测和筛选技术的发展。

参考文献:

[1] SOHAIL T, TANG T, NADLER B. Micropipette aspiration of an inflated fluid-filled spherical membrane [J]. Z Angew Math Phys, 2012, 63(4): 737-757.
 [2] KAMAT NP, LEE MH, LEE D, et al. Micropipette aspiration of double emulsion-templated polymersomes

- [J]. *Soft Matter*, 2011, 7(21): 9863-9866.
- [3] MOHAMMADALIPOUR A, CHOI YE, BENENCIA F, *et al.* Investigation of mechanical properties of breast cancer cells using micropipette aspiration technique [J]. *FASEB J*, 2012, DOI: 10.1096/fasebj.26.1_supplement.905.9.
- [4] ZHAO RG, SIMMONS CA. A simple method to estimate the exponential material parameters of heart valve tissue based on analogy between uniaxial tension and micropipette aspiration [J]. *Biomech Model Mech*, 2013, 12(6): 1283-1290.
- [5] GUO HL, LIU CX, DUAN JF, *et al.* Mechanical properties of breast cancer cell membrane studied with optical tweezers [J]. *Chin Phy Lett*, 2004, 21(12): 2543-2546.
- [6] Li YJ, WEN C, XIE HM, *et al.* Mechanical property analysis of stored red blood cell using optical tweezers [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2009, 70(2): 169-173.
- [7] MIYAZAKI H, HASEGAWA Y, HAYASHI K. A newly designed tensile tester for cells and its application to fibroblasts [J]. *J Biomech*, 2000, 33(1): 97-104.
- [8] MARSZALEK P, TSONG TY. Cell fission and formation of mini cell bodies by high frequency alternating electric field [J]. *Biophys J*, 1995, 68(4): 1218-1221.
- [9] MACQUEEN LA, BUSCHMANN MD, WERTHEIMER MR. Mechanical properties of mammalian cells in suspension measured by electro-deformation [J]. *J Micromech Microeng*, 2010, 20(6): 065007.
- [10] 宋华东. 基于光镊技术的离体红细胞弹性研究[D]. 徐州: 江苏师范大学, 2007.
- [11] 张晟泓, 魏桥栋, 刘洁, 等. 循环肿瘤细胞的微流控芯片分离及其物理性质测量分析[J]. *医用生物力学*, 2019, 34(2): 139-144.
- ZHANG SH, WEI QD, LIU J, *et al.* Microfluidic chip separation and physical property measurement of circulating tumor cells [J]. *J Med Biomech*, 2019, 34(2): 139-144.
- [12] 陈昕妍, 曾正, 张海霞, 等. 基于原子力显微镜力曲线阵列模式获得兔角膜基质细胞弹性模量的方法研究[J]. *北京生物医学工程*, 2020, 39(6): 574-581.
- [13] 伍诚麟, 郭嘉馨, 杨佳丽, 等. 高脂饮食对大鼠主动脉内皮细胞形态及刚度的影响[J]. *医用生物力学*, 2020, 35(4): 449-454.
- WU CL, GUO JX, YANG JL, *et al.* Effects of high-fat diet on rat aortic endothelial cell morphology and stiffness [J]. *J Med Biomech*, 2020, 35(4): 449-454.
- [14] TRICKEY WR, BAAIJENS FP, LAURSEN TA, *et al.* Determination of the Poisson's ratio of the cell: Recovery properties of chondrocytes after release from complete micropipette aspiration [J]. *J Biomech*, 2005, 39(1): 78-87.