

文章编号:1004-7220(2011)03-0225-08

## 高分辨率细胞牵引力频域反演技术

李姗姗<sup>a</sup>, 黄建永<sup>b</sup>, 邓昊<sup>b</sup>, 庞明珠<sup>b</sup>, 彭小玲<sup>b</sup>, 熊春阳<sup>a,b</sup>, 方竞<sup>a,b</sup>  
(北京大学 a. 前沿与交叉学科研究院, b. 工学院生物医学工程系, 北京 100871)

**摘要:** **目的** 针对经典细胞牵引力反演算法的病态特征, 发展基于二维傅立叶空间的高分辨率细胞牵引力反演新技术。**方法** 根据基底表面位移测量数据和积分核函数在二维傅立叶空间各自的分布特点和规律, 探讨牵引力反演过程中出现的反卷积病态现象, 构建一套自适应加窗滤波算法来约束反演计算过程中出现的高频噪声放大效应。**结果** 经典细胞牵引力频域反演算法(Fourier transform traction cytometry, FTTC)具有明显的反卷积病态特征, 特别是在位移采样网格较密情况下, 牵引力反演结果极不可靠。利用本文提出的频域滤波方法则能显著削弱位移场高频噪声对于力反演结果的影响。**结论** 这种细胞牵引力频域反演新方法可有效抑制反问题病态现象的发生, 显著提高力场测量的稳定性和空间分辨率。该方法有望在细胞与胞外基质相互作用研究中得到广泛应用。

**关键词:** 细胞力学; 基底; 弹性模量; 数字图像相关; 细胞牵引力; 傅立叶空间

**中图分类号:** R 318.01 **文献标志码:** A

## High-resolution cellular traction force recovery in two-dimensional Fourier domain

LI Shan-shan<sup>a</sup>, HUANG Jian-yong<sup>b</sup>, DENG Hao<sup>b</sup>, PANG Ming-shu<sup>b</sup>, PENG Xiao-ling<sup>b</sup>, XIONG Chun-yang<sup>a,b</sup>, FANG Jing<sup>a,b</sup> (*a. Academy for Advanced Interdisciplinary Studies; b. Department of Biomedical Engineering, Peking University, Beijing 100871, China*)

**Abstract: Objective** To develop a new set of algorithms for high-resolution cellular traction force recovery based on two-dimensional Fourier domain by addressing the ill-posed nature of classic cellular force traction recovery. **Methods** By exploring the inherent characteristics and rules of displacement data on the substrates and Green's function in the Fourier domain, the phenomenon of ill-posed deconvolution arising in cellular force traction recovery was investigated and a set of self-adaptive filtering algorithms was consequently developed to remarkably restrain the high frequency noise amplification. **Results** The ill-posed nature of classical Fourier transform traction cytometry (FTTC) made cellular traction force recovery extremely unstable, especially for relatively dense displacement data sampling. In contrast, the proposed self-adaptive filtering algorithms based on FTTC could make cellular traction force distribution more stable and reliable, as the effect of high frequency noise in displacement field on recovery results was weakened significantly. **Conclusions** This new technique for cellular traction force recovery can effectively suppress the noise and therefore improve the stability of force recovery procedure and spatial resolution, which is expected to find wider application in the study of cell-substrate interactions.

**Key words:** Cellular mechanics; Substrates; Elastic modulus; Digital image correlation; Cellular traction force; Fourier domain

收稿日期:2011-02-27; 修回日期:2011-04-12

基金项目:国家自然科学基金资助项目(10872008, 11002003, 11072004)。

通讯作者:熊春阳, Tel: (010)62757940; E-mail: cyxiong@pku.edu.cn。

一般来说,动物组织由各种细胞以及支撑细胞的细胞外基质组成,细胞外基质是指由胶原蛋白、糖蛋白以及蛋白多糖等形成的网状结构。细胞不仅与其相邻的细胞产生细胞间相互作用,同时也与细胞外基质相互接触和作用<sup>[1]</sup>。由细胞肌动蛋白丝与肌球蛋白相互作用产生的力,即细胞牵引力(*cellular traction forces*)能通过其自身黏附结构(主要是黏着斑)传递到细胞外基质<sup>[2]</sup>;与此同时,黏着斑上丰富的信号蛋白分子也可将感知到的细胞外微环境中的物理和化学信息传递到细胞内部,引发一系列胞内生物化学反应,从而对细胞的功能和行为产生重要影响(如细胞骨架结构的变化、基因表达的改变、细胞凋亡等)<sup>[3-10]</sup>。

单个细胞的直径一般在  $10 \sim 40 \mu\text{m}$ ,与细胞外基质相互作用产生的力大小一般在  $\text{nN}$  量级(甚至更小),作用区域一般不超过  $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ ,最近几年发展起来的弹性基底方法<sup>[11]</sup>,实现了在不破坏细胞生物活性的前提下分析细胞与细胞外基质(基底)微环境的相互作用<sup>[12-13]</sup>。细胞与细胞外基质相互作用研究中所采用的弹性基底主要包括微柱阵列基底<sup>[9,14]</sup>和弹性膜基底<sup>[15]</sup>两种类型。微柱基底可以直接根据微柱的弯曲变形程度测定细胞牵引力,但基底制作工艺相对复杂,细胞与基底之间属于非完全接触;而弹性膜基底与单个细胞之间的接触为面接触,更为接近细胞真实生理环境,因此也更容易被广大研究人员所接受。如今,用凝胶弹性膜基底的方法在单细胞水平上探究细胞与其周围微环境的相互作用已经受到越来越多的关注<sup>[8,15]</sup>。

使用弹性薄膜基底测量细胞牵引力的方法始于20世纪80年代初 Harris 等<sup>[16-17]</sup>的开创性工作。他们首先设法在液态硅酮表面形成一层硅胶薄膜,然后把成纤维细胞(*fibroblasts*)培养在硅胶薄膜上,并观察到了细胞牵引力引起的硅胶膜褶皱变形,并由此估计了细胞牵引力的大小。但由于褶皱变形的高度非线性特点,力学分析上比较困难,通常只能获得半定量的(甚至定性的)牵引力计算结果。90年代末, Pelham 和 Wang 等<sup>[15,18]</sup>开始应用聚丙烯酰胺(*polyacrylamide*, PAA)材料制作弹性薄膜进行细胞培养及相应的牵引力测量。聚丙烯酰胺凝胶是一种由丙烯酰胺与二丙烯酰胺交联而成的疏松多孔高聚物,具有如下特点:(1)通过调节两种组分的配比,

可改变其交联程度,从而改变凝胶的孔径大小和硬度,适用于生物体内各种不同物理力学微环境的模拟;(2)透明,光学特性好,可以制作较薄的膜,很适合在透射生物显微镜下使用,并且能与免疫荧光等其他生化实验配合应用<sup>[15]</sup>;(3)无毒,生物相容性好,经过简单的表面处理后,即可使细胞在其表面黏附生长;(4)在较大变形范围内,具有较好的线性弹性变形能力<sup>[19]</sup>。聚丙烯酰胺凝胶材料的上述显著特点使其在细胞与细胞外基质之间的相互作用研究中得到广泛应用。

细胞与弹性基底相互作用研究的一个重要方面是利用细胞导致的基底变形计算细胞牵引力,定量获得细胞在收缩或迁移活动中的牵引力时间空间变化规律。理论上说,细胞牵引力的测量计算属于反问题范畴,而反问题的一个共同重要特点是他们的病态,这使得无论是理论分析或是数值计算都有特定的困难<sup>[20-21]</sup>,主要表现为方程的解不是连续地依赖于观测数据(输入数据)。换句话说,观测数据的微小偏差都可能导致解的很大变动。在实际问题中,一般观测数据的误差(或噪声)在所难免,因此,通过这些或多或少带有误差(或噪声)的观测数据反推得到的方程解极有可能偏离真解相对较远。

本文拟通过分析细胞-基底位移场在二维傅立叶空间的分布特点,采用二维频域自适应低通滤波技术来抑制反演计算中噪声的放大效应,从而增强牵引力反演测量的稳定可靠性,进而发展出基于二维傅立叶空间的高分辨细胞牵引力反演技术,为建立高效细胞牵引力显微分析系统奠定坚实的算法基础。

## 1 基底材料制备、力学性能表征和细胞实验

### 1.1 聚丙烯酰胺基底的制备

根据 Dembo 和 Pelham 提出的方法<sup>[15,22]</sup>,将聚丙烯酰胺薄膜制备于 3-aminoprpyltrimethoxysilane 表面改性的盖玻片上。本文所用到的聚丙烯酰胺基底由 10% 丙烯酰胺(w/v, Amresco)和 0.13% 二丙烯酰胺(w/v, Amresco)聚合形成,其中混入的  $1/100$  直径为  $200 \text{ nm}$  的荧光微球(*Invitrogen*),并加入  $1/200$  过硫酸铵(v/v, Sigma)和  $1/2000$  N, N, N', N'-tetramethyl ethylenediamine(v/v, Fluka)催化反应。将  $15 \mu\text{L}$  混合液滴在 3-aminoprpyltrimethoxysilane 表面改性的盖玻片上(厚度为  $0.08 \sim 0.13 \text{ mm}$ ,

面积为  $22 \text{ mm} \times 22 \text{ mm}$ ), 并用另一盖玻片 ( $18 \text{ mm} \times 18 \text{ mm}$ ) 形成类似“三明治”的结构以便液体铺展形成薄层, 然后迅速倒置, 以利于荧光颗粒沉积于薄膜表面, 室温固化  $50 \text{ min}$  后小心地揭去盖玻片 ( $18 \text{ mm} \times 18 \text{ mm}$ )。为了促进细胞贴壁, 在聚丙烯酰胺薄膜上用紫外激活偶联剂 sulfo-SANPAH (Pierce), 然后在  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中孵育  $0.2 \text{ g/L}$  的 I 型胶原 (rat tail, In-vitrogen) 并过夜。

### 1.2 聚丙烯酰胺基底的力学性能表征

根据 Peng 等<sup>[19]</sup> 提出的自重弯曲方法对聚丙烯酰胺基底进行力学表征: 将聚丙烯酰胺预聚物混合液吸入  $1.0 \text{ mL}$  针管, 在水平台面上推出聚合后的聚丙烯酰胺凝胶柱体, 利用 CCD 从侧面拍摄在重力作用下的变形图像。沿推出部分根部将凝胶切下, 测量质量, 根据自身重力和最大弯曲挠度计算出其弹性模量。本文所用到的聚丙烯酰胺基底的弹性模量为  $(34.7 \pm 4.1) \text{ kPa}$ 。

### 1.3 原代新生乳大鼠心肌细胞的分离和培养

根据 Sen 等<sup>[23]</sup> 对新生乳大鼠心肌细胞进行分离和培养。最终得到的心肌细胞以  $2 \times 10^5/\text{mL}$  的密度接种于聚丙烯酰胺基底上, 并培养于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{ CO}_2$  的培养箱内,  $24 \text{ h}$  后进行观察。

### 1.4 显微镜观察和图像采集

细胞的相差和荧光图像通过倒置荧光显微镜系统 ( $40\times/0.6 \text{ NA}$ , IX71, Olympus) 采集, 采集模式为 time-lapse sequence, 采集速度为  $12 \text{ 帧/s}$ 。整个采集过程利用显微镜恒温平台 (Tokai Hit, INU series, 日本) 使细胞均处于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $5\%$  的  $\text{CO}_2$  环境中。

## 2 基于数字图像相关算法的位移场计算

数字图像相关 (digital image correlation, DIC) 技术<sup>[24]</sup> 最早应用于实验固体力学领域, 现在已经比较广泛地应用于材料力学行为测试、微尺度变形测量、电子封装、断裂力学以及生物力学等许多领域<sup>[25]</sup>。目前, 基于数字图像相关技术的位移提取算法已经开始应用于求解细胞图像位移场<sup>[26-28]</sup>。数字图像相关技术主要是通过对变形前的数字图像 (参考图) 与变形后的图像 (变形图), 进行一系列的互相关运算<sup>[29]</sup>, 来获得变形后的图像相对于变形前图像的位移场。具体地讲, 在参考图中选取适当的 (矩形) 子区域 (参考区域), 然后在变形图中的对应

区域附近搜索该子区域, 计算他们的互相关系数, 则相关系数的峰值所在的位置就代表变形前参考区域当前最可能的位置, 通过亚像素搜索技术, 这种数字相关技术得到的位移场能够精确到亚像素水平<sup>[25-29]</sup>。

本文将根据聚丙烯酰胺基底表面荧光粒子分布的特征 (包括粒子的分布密度、局部粒子分布差异性特征), 采用数字图像相关方法来提取位移场, 这种方法能够获得全场的位移分布, 且测量精度较高。通过对位移场统计特性的分析, 刚体位移也可以消除<sup>[27]</sup>。

## 3 细胞牵引力频域反演理论

在空间域下, 基底表面位移向量为  $\mathbf{u}(\mathbf{r})$  与细胞牵引力向量为  $\mathbf{T}(\mathbf{r})$  之间的关系呈现下面的第一类 Fredholm 积分方程形式<sup>[13,22]</sup>:

$$u_i(\mathbf{r}) = \int G_{ij}(\mathbf{r} - \mathbf{r}') T_j(\mathbf{r}') d\mathbf{r}' \quad (1)$$

式中:  $G_{ij}$  是基于集中力 Boussinesq 基本解的格林函数 (积分核), 在空间域下, 计算  $N \times N$  的网格的积分核的计算量为  $N^4$  量级。为了降低计算上的复杂性, 提高计算效率, 可根据傅里叶变换中的卷积定理, 对方程 (1) 进行解卷积。具体过程如下:

首先对方程两侧同时进行二维傅里叶变换, 即:

$$\begin{aligned} \tilde{\mathbf{u}} &= FT_2(\mathbf{u}) = FT_2(\mathbf{G} \otimes \mathbf{T}) = \\ &FT_2(\mathbf{G}) \times FT_2(\mathbf{T}) = \tilde{\mathbf{G}} \times \tilde{\mathbf{T}} \end{aligned} \quad (2)$$

上式两边左乘  $\tilde{\mathbf{G}}^{-1}$ , 则有:

$$\tilde{\mathbf{T}}(\mathbf{k}) = \tilde{\mathbf{G}}(\mathbf{k})^{-1} \tilde{\mathbf{u}}(\mathbf{k}) \quad (3)$$

再经过傅立叶逆变换, 可知:

$$\mathbf{T}(\mathbf{r}) = FT_2^{-1}(\tilde{\mathbf{G}}(\mathbf{k})^{-1} \tilde{\mathbf{u}}(\mathbf{k})) \quad (4)$$

通过上述变换, 空间域中基底位移向量  $\mathbf{u}(\mathbf{r})$  与细胞牵引力向量  $\mathbf{T}(\mathbf{r})$  之间的卷积关系解耦变为二维频域下向量  $\tilde{\mathbf{u}}(\mathbf{k})$  与牵引力向量  $\tilde{\mathbf{T}}(\mathbf{k})$  之间的简单相乘关系, 其中  $\mathbf{k} = (k_x, k_y)^T$  表示二维傅立叶空间内的波数向量,  $k_x$  和  $k_y$  是二维傅立叶空间内分别沿着  $x$  和  $y$  方向上的波数。在傅里叶变换过程中积分核的二维傅立叶空间表示形式已经由 Butler 等<sup>[30]</sup> 通过解析的方法求得, 即:

$$\begin{aligned} \tilde{\mathbf{G}}(\mathbf{k}) &= \tilde{\mathbf{G}}(k_x, k_y) = \\ &A \frac{2\pi}{k^3} \begin{bmatrix} (1-\nu)k^2 + \nu k_y^2 & -\nu k_x k_y \\ -\nu k_x k_y & (1-\nu)k^2 + \nu k_x^2 \end{bmatrix} \end{aligned} \quad (5)$$

式中:  $A = \frac{(1+\nu)}{\pi E}$ ,  $k = |\mathbf{k}| = \sqrt{k_x^2 + k_y^2}$ ,  $E$  和  $\nu$  分别代表聚丙烯酰胺基底的弹性模量和泊松比。在上述细胞牵引力求解方法中,波向量的零点  $(k_x, k_y) = (0, 0)$  对应于空间域中的刚体位移部分,与基底的弹性变形(位移场)无关,因此,可不计算这一波数处的细胞牵引力分量,即令  $T(0) = 0$ 。基于方程(4)和(5)的细胞牵引力求解方法通常称为 FTTC (Fourier transform traction cytometry) 方法<sup>[30]</sup>。这一方法是将表征力与位移之间关系的第一类 Fredholm 积分方程(卷积关系)变换到傅立叶空间来处理,这样,通过对不同波数位置处的位移分量与相应的系数矩阵直接相乘就可获得这一波数处的牵引力分量。由于在傅立叶空间中力与位移不存在耦合关系,FTTC 方法将极大地节省数据存储空间。此外,FTTC 方法可利用成熟的快速傅立叶变换(FFT)技术来提高求解计算速度,易于实现实时动态牵引力反演运算<sup>[21]</sup>。

然而,本质上讲 FTTC 方法仍属于一类病态的离散反卷积问题,我们发现在采样网格稍密情况下,其牵引力反演结果对于噪声(特别是高频噪声)尤为敏感<sup>[21,31]</sup>。通过分析积分核二维傅立叶空间解析表达式(即方程(5)),可以发现积分核  $\tilde{G}(\mathbf{k})$  在相对高频区域的频谱值远大于其在零频附近的取值。另一方面,细胞所引起的基底位移场在二维傅立叶空间下的频谱成份往往集中于零频附近,且随着频率的增加,其位移频谱将迅速衰减(注:基底位移场中噪声的频谱一般不随频率的增加而衰减)。因此,在上述细胞牵引力反演过程中,由于积分核的频谱与基底位移场的频谱需对位相乘(如方程(4)所示),高频位移噪声将被放大,从而致使牵引力反演结果极不可靠<sup>[21]</sup>。

针对以上问题,引入自适应加窗滤波方法来降低噪声对于计算结果的影响。具体过程如下:

(1) 对  $x$  和  $y$  方向位移场进行傅里叶变换,分别求出其频域下的二维分量矩阵,取出其中  $k_x = 0$ ,  $k_y = 0$  两条线上的 4 个能量分量,这里不妨分别用  $\text{PowerFreq}U_y, \text{PowerFreq}U_x, \text{PowerFreq}V_y, \text{PowerFreq}V_x$  表示,利用这 2 对(4 个)一维数组进行后续分析。

(2) 以 1 个波数  $M$  为中心,将其连同左右各 2 个,共 5 个波数处能量值划分为 1 组(即  $M-2, M-1, M, M+1, M+2$ ),计算每组方差值。噪声在各个

波数上能量分布相对平均,即方差稳定且较小;而真实位移场能量主要集中于零频附近且各个波数之间差异较大,即方差在零频附近最大且在其它波数上衰减迅速。根据这一特性即可很好地区分出噪音和真实位移场。此处采用计算方差,而非直接采用能量值作为标准,也是考虑到在不同信噪比情况下,能量标准难以统一,而方差标准相对稳定。

(3) 求出(b)中得到的各数组方差中的最大值(设为 Max),设定窗口滤波参数 ParaWin(噪声方差同真实位移场方差的经验比值),根据经验,ParaWin 取为  $1 \times 10^{-4}$  时效果较好。实际计算结果对于窗口滤波参数不敏感(ParaWin 取值  $1 \times 10^{-3}$  至  $1 \times 10^{-5}$  结果基本一致)。

(4) 在  $\text{PowerFreq}U_y, \text{PowerFreq}U_x, \text{PowerFreq}V_y, \text{PowerFreq}V_x$  中,将对应的  $\text{Max} \times \text{ParaWin}$  设为阈值,以方差大于此阈值的波数范围作为滤波窗口,将窗口外  $x$  和  $y$  方向位移场分量统一设为 0,生成滤波后位移场,据此可直接求出牵引力场。

## 4 结果与讨论

借助于聚丙烯酰胺弹性基底测量细胞牵引力的过程如图 1 所示。黏附在弹性基底上的单细胞在收缩或迁移(运动)过程中将引起基底弹性变形,随机分布于基底表层的绿色荧光颗粒(直径为 200 nm)也将随之产生位置移动,从而记录下基底变形的时空动态变化信息。

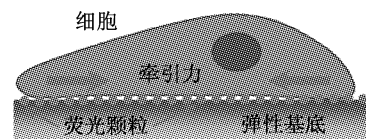


图 1 利用聚丙烯酰胺弹性基底测量细胞牵引力示意图

Fig. 1 Schematic of cellular traction force measurement using polyacrylamide gel substrates

图 2 展示了实验过程中采集到的图像数据,其中:图 2(a)是一个单个新生大鼠心肌细胞黏附在制作好的聚丙烯酰胺凝胶弹性基底上的相差图像,而图 2(b)和(c)是相应基底表层变形前后荧光颗粒的分布图案。如上所述,利用现已发展较为成熟的数字(散斑)图像相关算法<sup>[26-29]</sup>,便可求得弹性基底表面位移场(见图 3)。由此可以发现,较大位移一般出

现在细胞黏附边缘附近,而在细胞的中心位置附近则相对较小(接近于0)。

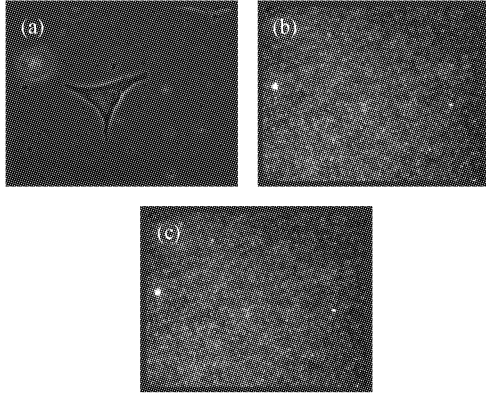


图2 单个心肌细胞黏附在聚丙烯酰胺弹性基底上的相差图和基底表面的荧光分布图 (a)单个心肌细胞黏附在聚丙烯酰胺弹性基底上的相差图,(b)未变形的基底表面荧光颗粒分布图,(c)变形后的基底表面荧光颗粒分布图

Fig. 2 A phase-contrast image of neonatal rat ventricular myocyte and fluorescent images of the polyacrylamide gel substrate beneath the cell (a) A phase-contrast image of neonatal rat ventricular myocyte adhering on polyacrylamide gel substrates, (b) and (c) Undeformed and deformed substrate fluorescent patterns, respectively

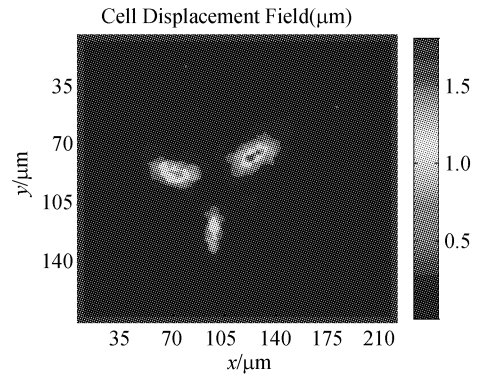


图3 根据图2(b)和(c)所示的变形前后基底表面荧光颗粒分布图计算得到的基底位移场

Fig. 3 Displacement field of cell-substrate interaction calculated by comparing the deformed fluorescent pattern with the undeformed one

原则上,根据图(3)所示的基底表面位移场就可以计算出细胞牵引力场,图4给出了基于前面所述经典 FTTC 算法直接反演计算得到的细胞牵引力场。

其中:图4(a)~(d)采用的离散采样点间距依次为30、20、10、5个像素。经观察对比发现,随着采

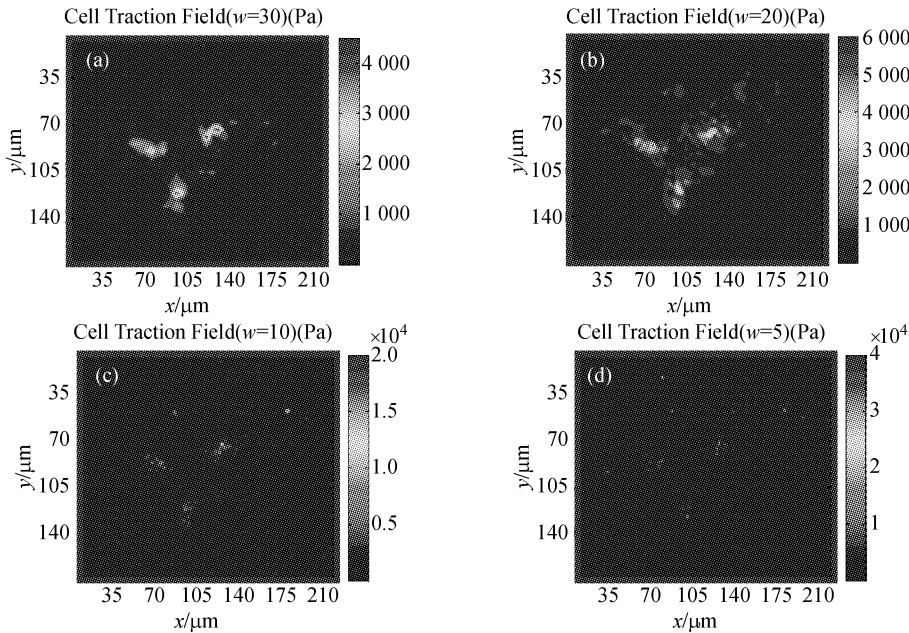


图4 根据图3所示的基底位移场经由经典 FTTC 算法得到的细胞牵引力场,在反演过程中,(a)~(d)采用的离散采样点间距依次为30、20、10和5个像素

Fig. 4 Cellular traction force fields recovered from the identical displacement field as shown in Fig. 3. For (a), (b), (c) and (d), the discrete sampling distances adopted in the traction recoveries were 30, 20, 10 and 5 pixels, respectively

样点间距变小(即采样网格的加密),即使同一基底位移场所反演得到的细胞牵引力场也大相径庭。例如,比较图4(b)和(d)易知,不但细胞牵引力场的分布具有显著差异,而且牵引力的最大值也相差近一个量级,这些事实表明基于经典 FTTC 算法的细胞牵引力反演的稳定性较差,很可能得不到可靠的反演计算结果。

图5是采用本文所提出的基于傅立叶空间自适应加窗滤波方法反演得到的细胞牵引力场,其中:图5(a)和(b)对应的离散采样点间距分别为20和5个像素。依次对比图4(b)和5(a)、图4(d)和5(b),可以发现,基于本文所述方法获得的细胞牵引力场在不同网格密度下其相对分布和绝对数值都明显更加稳定,这也就表明了本文提出的滤波方法可以有效地抑制反演噪声放大,提高牵引力反演的空间分辨率。应该指出,在实际情况下,图像采集设备的物理分辨率也会影响最终牵引力反演的空间分辨率。本文提出的方法主要针对于频域空间中的位移场(即 $u(k)$ )进行滤波,图像像素点实际距离的影响主要体现在方程(2)、(4)的傅里叶变换及其反变

换中。此方法可在图像物理分辨率(像素点距离)保持一定的情况下显著提高牵引力反演的空间分辨率。本文所述滤波方法的另一优势在于其原理简单,不需要事先估计位移场的信噪比,便于推广应用。

## 5 结论

细胞牵引力显微镜技术作为一种新兴细胞力学实验手段已开始被越来越多的科研工作者所熟知,但由于其力反演的病态特点,通过基底位移场直接反演计算得到的细胞牵引力场往往空间分辨率较低且稳定性较差。本文在经典 FTTC 算法的基础上,提出了一种基于傅立叶空间自适应滤波方法用于细胞牵引力反演计算,通过截断高频位移分量的方式,在损失较小实际牵引力场信息的代价下,极大地削弱了噪声在 FTTC 方法中对于牵引力计算结果的影响,从而获得较高分辨率的细胞牵引力场。此方法操作简单,不需要事先精确估计位移场噪声量级大小,可应用于大规模细胞牵引力场测量分析。

## 参考文献:

- [1] Alberts B, Bray D, Johnson A, *et al.* Essential cell biology—An introduction to the molecular biology of the cell [M]. New York: Garland Publishing, 1998.
- [2] Reichl EM, Ren Y, Morphew MK, *et al.* Interactions between myosin and actin crosslinkers control cytokinesis contractility dynamics and mechanics [J]. *Curr Biol*, 2008, 18(7): 471-480.
- [3] Vogel V, Sheetz M. Local force and geometry sensing regulate cell functions [J]. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2006, 7(4): 265-275.
- [4] Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD. Environmental sensing through focal adhesions [J]. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2009, 10(1): 21-33.
- [5] Chicurel ME, Chen CS, Ingber DE. Cellular control lies in the balance of forces [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1998, 10(2): 232-239.
- [6] Geiger B, Bershadsky A. Assembly and mechanosensory function of focal contacts [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, 13(5): 584-592.
- [7] 姜宗来. 心血管生物力学研究的新进展[J]. *医用生物力学*, 2010, 25(5): 313-315.  
Jiang ZL. Recent advances in cardiovascular biomechanics

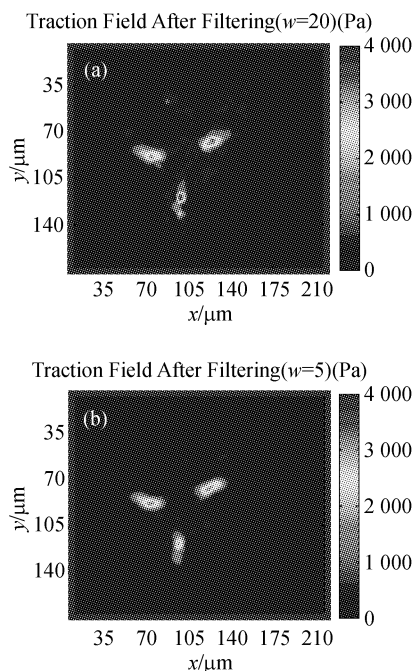


图5 经过滤波之后的细胞牵引力场,(a)和(b)图中采样点间距分别为20和5个像素

Fig. 5 Cellular traction force fields after filtering. The discrete sampling distances in (a) and (b) were 20 and 5 pixels, respectively

- [J]. *J Med Biomech*, 2010, 25(5): 313-315.
- [ 8 ] 吕守芹,杨帆,龙勉. 细胞-分子生物力学研究进展[J]. 医用生物力学, 2009, 24(2): 79-84.  
Lv SQ, Yang F, Long M. Advances in study on cellular and molecular biomechanics [J]. *J Med Biomech*, 2009, 24(2): 79-84.
- [ 9 ] 周治国,刘志文,范哲意. 基于 BioMEMS 微柱矩阵的细胞牵引力测量(英文)[J]. 医用生物力学, 2009, 24(2): 112-117.  
Zhou ZG, Liu ZW, Fan ZY. Cell traction forces measurement based on BioMEMS microposts matrix [J]. *J Med Biomech*, 2009, 24(2): 112-117.
- [10] 张东升. 数字图像相关测量技术及其应用[J]. 医用生物力学, 2009, 24(2): 85-88.  
Zhang DS. Digital image correlation: Theory and applications [J]. *J Med Biomech*, 2009, 24(2): 85-88.
- [11] Wang JH, Lin JS. Cell traction force and measurement methods [J]. *Biomech Model Mechan*, 2007, 6(6): 361-371.
- [12] Beningo KA, Dembo M, Kaverina I, *et al.* Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts [J]. *J Cell Biol*, 2001, 153(4): 881-887.
- [13] Huang JY, Zhu T, Qin L, *et al.* Study on mechanical interactions between single cardiac myocyte and elastic substrate [J]. *Acta Mech Solida Sin*, 2009, 22(6): 563-570.
- [14] Zhao Y, Zhang X. Adaptation of flexible polymer fabrication to cellular mechanics study [J]. *Appl Phys Lett*, 2005, 87(14): 144101.
- [15] Pelham RJ, Wang YL. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(25): 13661-13665.
- [16] Harris AK, Wild P. Silicone rubber substrata: A new wrinkle in the study of cell locomotion [J]. *Science*, 1980, 208(4440): 177-179.
- [17] Harris AK, Stopak D, Wild P. Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis [J]. *Nature*, 1981, 290(5803): 249-251.
- [18] Pelham RJ, Wang YL. High resolution detection of mechanical forces exerted by locomoting fibroblasts on the substrate [J]. *Mol Biol Cell*, 1999, 10(4): 935-945.
- [19] Peng XL, Huang JY, Qin L, *et al.* A method to determine Young's modulus of soft gels for cell adhesion [J]. *Acta Mech Sinica*, 2009, 25(4): 565-570.
- [20] Huang JY, Peng XL, Qin L, *et al.* Determination of cellular tractions on elastic substrate based on an integral boussinesq solution [J]. *J Biomech Eng-T ASME*, 2009, 131(6): 061009.
- [21] Huang JY, Qin L, Peng XL, *et al.* Cellular traction force recovery: An optimal filtering approach in two-dimensional fourier space [J]. *J Theor Biol*, 2009, 259(4): 811-819.
- [22] Dembo M, Wang YL. Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts [J]. *Biophys J*, 1999, 76(4): 2307-2316.
- [23] Sen A, Dunnmon P, Henderson SA, *et al.* Terminally differentiated neonatal rat myocardial-cells proliferate and maintain specific differentiated functions following expression of SV40 Large T Antigen [J]. *J Biol Chem*, 1988, 263: 19132-19136.
- [24] Sutton MA, Turner JL, Bruck HA, *et al.* Full-field representation of discretely sampled surface deformation for displacement and strain analysis [J]. *Exp Mech*, 1991, 31(2): 168-177.
- [25] Pan B, Qian KM, Xie HM, *et al.* Two-dimensional digital image correlation for in-plane displacement and strain measurement: A review [J]. *Meas Sci Technol*, 2009, 20(6): 062001.
- [26] Huang JY, Pan XC, Peng XL, *et al.* High-efficiency cell-substrate displacement acquisition via digital image correlation method using basis functions [J]. *Opt Laser Eng*, 2010, 48(11): 1058-1066.
- [27] Marganski WA, Dembo M, Wang YL. Measurements of cell-generated deformations on flexible substrata using correlation-based optical flow [J]. *Methods Enzymol*, 2003, 361: 197-211.
- [28] Fang J, Xiong CY, Yang ZL. Digital transform processing of carrier fringe patterns from speckle-shearing interferometry [J]. *J Mod Optic*, 2001, 48(3): 507-520.
- [29] Huang JY, Zhu T, Pan XC, *et al.* A high-efficiency digital image correlation method based on a fast recursive scheme [J]. *Meas Sci Technol*, 2010, 21(3): 035101.
- [30] Butler JP, Tolic-Norrelykke IM, Fabry B, *et al.* Traction fields, moments, and strain energy that cells exert on their surroundings [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002, 282(3): C595-605.
- [31] Sabass B, Gardel ML, Waterman CM, *et al.* High resolution traction force microscopy based on experimental and computational advances [J]. *Biophys J*, 2008, 94(1): 207-220.

文章编号:1004-7220(2011)03-0232-08

## 细胞联合培养杯膜的孔径对血小板源性生长因子通透的影响

沈宝荣, 姜隽, 齐颖新, 姜宗来

(上海交通大学 力学生物学与医学工程研究所, 上海 200240)

**摘要:**目的 探讨细胞联合培养杯膜的孔径对生物大分子通透的影响,解决血管细胞分子力学生物学实验的关键技术问题。**方法** 以杯底 PET 膜孔径为 0.4  $\mu\text{m}$  和 1.0  $\mu\text{m}$  的两种型号细胞联合培养杯作为研究对象,将大鼠血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)和内皮细胞(endothelial cells, ECs)分别种植于联合培养杯底 PET 膜的内外侧面。实验分为 EC/VSMC 联合培养施加低切应力组、PET 膜未接种细胞静止组、PET 膜单侧接种细胞静止组和 PET 膜双侧接种细胞静止组。ELISA 检测低切应力组 ECs 侧和 VSMCs 侧培养液中血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor BB, PDGF-BB)含量,Western blotting 检测重组 PDGF-BB(rPDGF-BB)刺激后,各组细胞内信号转导分子 p-ERK1/2 和 p-Akt 以及核骨架蛋白 Lamin A 的表达变化。**结果** EC/VSMC 联合培养施加 0.5 Pa 层流低切应力 12 h 后,0.4  $\mu\text{m}$  联合培养杯 VSMCs 侧 PDGF-BB 浓度显著高于 ECs 侧。0.4  $\mu\text{m}$  和 1.0  $\mu\text{m}$  两种孔径的 PET 膜未接种细胞时,rPDGF-BB 上调了隔开培养细胞的 p-ERK1/2 和 p-Akt 表达,并下调 Lamin A 表达。PET 膜外侧面接种单层细胞时,rPDGF-BB 上调了对侧细胞的 p-ERK1/2 和 p-Akt 表达,并下调 Lamin A 表达。PET 膜内外侧面均接种细胞时,rPDGF-BB 仅能影响 0.4  $\mu\text{m}$  PET 膜同侧细胞的 p-ERK1/2、p-Akt 和 Lamin A 表达,对对侧细胞无明显作用;而 1.0  $\mu\text{m}$  PET 膜两侧细胞的 p-ERK1/2、p-Akt 和 Lamin A 表达无显著性差异。**结论** 两种有孔 PET 材料本身均允许生物大分子的通透,而细胞接种会影响有孔 PET 膜对生物大分子的通透。0.4  $\mu\text{m}$  孔径 PET 膜两侧均接种细胞时,对生物大分子的通透明显减弱,更接近于在体情况。

**关键词:** 切应力; 细胞培养; 内皮细胞; 血管平滑肌细胞; 血小板源性生长因子; 通透

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

### Effect from different pore sizes of co-culture inserts on the permeability of platelet-derived growth factor

SHEN Bao-rong, JIANG Jun, QI Ying-xin, JIANG Zong-lai (*Institute of Mechanobiology and Medical Engineering, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China*)

**Abstract; Objective** To investigate the effect from different pore sizes of co-culture inserts on the permeability of biomacromolecules through polyethylene terephthalate (PET) membrane so as to solve the key technology problem in mechanobiology experiment on vascular cells. **Methods** Inserts with 0.4  $\mu\text{m}$  and 1.0  $\mu\text{m}$  pores on the PET membrane were studied using flow chamber system. Low shear stress was subjected to the co-cultured system of endothelial cell (EC)/vascular smooth muscle cell (VSMC) and the concentration of platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB) was detected by ELISA. Under the static condition, vascular cells were cultured on the plate (with no cell on PET membrane), on the outer side of PET membrane, and on the both sides of PET membrane, respectively. Then the recombinants PDGF-BB (rPDGF-BB) were added on the different sides of PET membrane. Western blotting was used to detect the change in expressions of p-ERK1/2, p-Akt and Lamin A after cells were stimulated by rPDGF-BB. **Results** After low shear stress subjection for 12 h, the concentration

收稿日期:2011-03-24; 修回日期:2011-03-29

基金项目:国家自然科学基金资助项目(10972140,30970703,10732070)。

通讯作者:齐颖新,Tel:(021)34204863;E-mail:qiyx@sjtu.edu.cn。