

文章编号: 1004-7220(2021)01-0068-05

利用原子力显微镜探究食管组织纳米尺度下的硬度性能

林承雄[#], 刘 伟[#], 谢景阳, 李 炜

(西南交通大学 摩擦学研究所, 成都 610031)

摘要:目的 利用原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)探究食管组织纳米尺度下的硬度性能。方法 以猪食管作为实验材料,借助 AFM 研究不同加载率、压入深度及停留时间下食管组织的硬度性能。结果 食管组织在纳米尺度下的硬度与加载率及压入深度呈现出强相关性,硬度随着加载率的增大而增大,而随着压入深度的增加而减小。食管组织硬度性能的差异性与食管组织的黏弹性及黏塑性相关,主要包括接触应力、能量转换及应变塑性梯度等。结论 实验结果对于临床诊断、手术操作及人工材料开发具有重要的意义,从微观尺度上揭示食管组织的力学性能变化规律。

关键词:食管组织;硬度;原子力显微镜;黏弹性

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2021.01.011

Hardness Properties of Pig Esophageal at Nanoscale Using Atomic Force Microscope

LIN Chengxiong[#], LIU Wei[#], XIE Jingyang, LI Wei

(Tribology Research Institute, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

Abstract: **Objective** To study the hardness properties of pig esophageal at the nanoscale using atomic force microscope (AFM). **Methods** The porcine esophagus was chosen as experimental sample to study the hardness properties of esophageal tissues at different loading rates, deflection and dwell time with AFM. **Results** The hardness of esophageal tissues at the nanoscale was strongly correlated with the loading rate and the deflection, which increased with the increasing loading rate and decreased with the increasing deflection of cantilever. The difference in the hardness was associated with the viscoelasticity and viscoplasticity of esophageal tissues, including contact stress, energy transition and strain plastic gradient. **Conclusions** The experimental results have important significance for clinical diagnosis, surgical operation and artificial material development, and reveal the changing patterns for mechanical properties of the esophageal tissues at the microscale.

Key words: esophageal tissues; hardness; atomic force microscope (AFM); viscoelasticity

随着人类对自身生理环境认知的不断深入,人体软组织的微观力学性能引起了越来越多的关注。

由于生物力学与细胞生理状态或功能的相互依存性,细胞力学性能的测量逐步成为判定推断细胞或

收稿日期:2020-03-10; 修回日期:2020-04-22

基金项目:国家自然科学基金项目(51675447)

通信作者:李炜,研究员, E-mail: liweijiani@home.swjtu.edu.cn

[#]为共同第一作者

软组织状态或功能的标准之一^[1-2]。王哲等^[3]采用压陷法检测骨细胞系的弹性模量;党丹等^[4]实现了对6种不同类型细胞(贴壁细胞、悬浮细胞、正常细胞、癌细胞、细胞系和原代细胞等)黏弹性的测量与表征。一方面,当软组织自身产生病变或其繁殖、生长等功能异常时,组织自身会呈现出力学性能的差异性^[5]。例如,Cross等^[6]研究发现,癌细胞的弹性模量低于正常细胞的弹性模量。另一方面,当软组织或细胞所处的力学环境发生变化时,组织或细胞的正常功能表达也会存在异常。食管作为消化系统的一部分,当胃镜经食道输送至人体病变组织进行检测或治疗时,由于缺乏有效的力学及触觉反馈,仅依靠传统显示屏操作胃镜往往会给术中病人带来极大的不适感甚至会损伤食道表面,使得病人抵触内镜检查及手术^[7-8]。因此,食管组织的微观力学研究对消化道内镜进入人体后的交互力学研究及手术参数优化具有重要的指导意义。

对于纳米尺度下生物软组织材料的微观力学性能研究主要依靠原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)^[9-10]。近年来,生物软组织微观力学研究热点主要集中在组织的功能及结构上,例如细胞外基质、胶原纤维、蛋白质及骨架等^[11-12]。由于软组织自身存在的黏弹性等特性,其微观力学性能与时间相关性的研究也逐渐增多,如加载率、压入深度及停留时间等对组织力学性能的影响。研究发现,随着加载率的增加,细胞表面产生更大的应变能,细胞表面变硬^[14]。加载率的变化可以影响纳米尺度下细胞的表现弹性模量,随着加载率的增加,细胞逐渐变硬^[15]。当前对于消化道组织的力学性能的研究,尤其食管组织的研究主要集中在单轴拉伸、膨胀及摩擦等宏观力学性能上,而对其微观力学性能的研究鲜有报道^[9,16]。本文结合文献调研及相关的研究进展,探讨食管组织在不同加载率、压入深度及停留时间下的硬度性能,以期为胃肠镜诊疗的临床操作以及器械与组织界面接触建模提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

选用在结构及功能上与人体食管组织相似的新鲜离体猪食管组织作为实验样品,3根新鲜刚离

体食管组织取自1头20周左右65 kg成华猪。选取食管组织的胸部段,首先沿轴向剖开,用磷酸盐缓冲液(PBS缓冲液,pH=5)清洗,然后去除食管外肌肉层,裁剪出25 mm×15 mm黏膜层组织置于PBS缓冲液中。将食管黏膜层组织用两块不锈钢薄片夹住,两端用绳索固定(见图1)。下不锈钢薄片中间有凸台,上不锈钢薄片中间中空,使得夹持后组织凸起,并使测试时AFM上用来夹持针尖的固定台不会碰撞到不锈钢片。样品固定好后,最终用于测试的食管组织黏膜层区域面积为12 mm×6 mm。所有试样固定后置于4℃环境下冷藏备用。

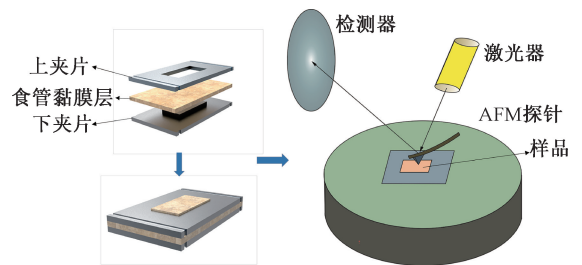


图1 食管组织固定及原子力显微镜原理简图

Fig. 1 Fixation of esophageal tissue and schematic diagram of atomic force microscope

1.2 实验方法

组织的硬度实验在商用AFM(MFP-3D, Asylum Research, 美国)上进行,通过采用设备自带的力图像模式(Force Mapping Mode)模块实现食管组织的微观力学性能的测定。AFM主要由4个部分组成:①针尖,用于与试样接触与操作,本文采用MLCT系列金字塔型氮化硅针尖(Bruker AFM probes),弹性常数为36 pN/nm;②压电管,用于精确控制针尖或试样的位置;③反馈控制系统,该系统可以监测悬臂的振荡特性,进而可控制针尖与样品相互作用力保持恒定;④计算机及软件^[17]。针尖安装完成后,悬臂梁的弹簧常数采用热调谐标定法校准^[13]。食管试样置于 x - y 方向可调的载物台上,竖直 z 方向的操作主要靠移动悬臂梁来实现,在AFM帮助下将探针移动到待观察部位上方后进行力学性能实验。实验开始前,通过注射器将PBS缓冲液注入到针尖及试样接触部位,以保持实验在液体环境中进行。为了隔音和隔振,在AFM自带的钢盖封闭环境下进行实验,加载率为0.2~2.0 Hz,压入深度为20~200 nm,停

留时间为 0~12 s。

在 AFM 上进行不同加载率及压缩深度实验时, 设定力图像模式单元的扫描面积为 $10\ \mu\text{m}\times 10\ \mu\text{m}$, 扫描像素为 10×10 。考虑到力图像模式下停留时间过长使整体试验时间过长, 故不同停留时间下的试验方法改为单点接触模式。每个区域选择 36 个点测试, 选择 5 个不同的区域用于相同参数下的重复试验。

1.3 数据分析

食管组织的硬度性能是由经典 AFM 针尖力-位移 (F - Z) 曲线推导得到。其中, F 根据胡克定律由悬臂梁的变形量与探针的弹性系数所得, Z 为针尖到实验样品待测表面的高度。如图 2 所示, Z_c 即为针尖与试样的接触点, 红、蓝线分别代表针尖与试样的靠近与撤离过程; d 为悬臂梁的偏转位移。当实验样品为表面无限硬的样品时, 如石英、玻璃等, 针尖与样品开始接触后, 针尖下降的高度与悬臂梁变形而偏转的位移相等; 而当实验样品为软组织时, 针尖在试样表面存在压痕 $\delta = Z - Z_c - d$, 这也是实验曲线有效且能拟合的必要条件。食管组织的硬度数据来自力学曲线的卸载曲线, 并结合经典 Oliver-Pharr 模型所得^[18]。

首先, 卸载曲线可用指数方程拟合:

$$P = m (h - h_r)^n$$

式中: P 为针尖采集到的力; h 为针尖的法向位移; h_r 为真实卸载位移。根据拟合数函数, 试样的硬度可由微积分得出:

$$S_h = \partial P / \partial h$$

卸载曲线的有效拟合区间为力值的 10%~90%。最后, 用 F 检验分析食管组织硬度在不加载条件下的

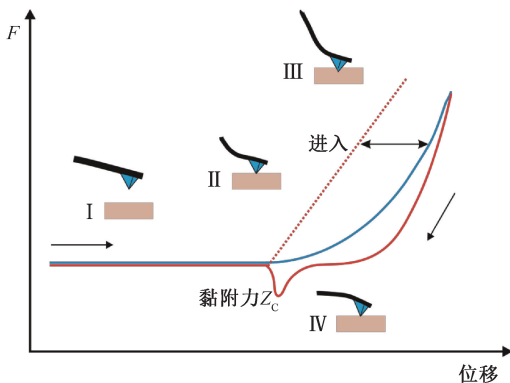


图 2 典型的原子力显微镜针尖力-位移曲线

Fig.2 Tip force-displacement curve of AFM

显著性差异。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义, 数据统计采用箱式图。

2 实验结果

2.1 食管组织在不同加载率下的硬度

加载率是指 AFM 的探针施加在样品表面载荷的加载速率。作为典型的软组织, 食管组织在宏观和微观尺度下均呈现出较为显著的黏弹性与黏塑性性能。随着实验加载率的增加, 食管组织的硬度也随之增加, 其硬度从 10 kPa 逐步增加到 1 MPa, 呈现出强相关性 ($P < 0.05$)。同时, 从箱式图的上下界限可以看出, 相同加载率下食管组织的硬度分布也存在较大的差异性, 这也是食管组织表面异质性的体现 [见图 3(a)]。

2.2 食管组织在不同压入深度下的硬度

针尖压入深度即悬臂梁在竖直方向的位移。根据胡克定律, 在弹性系数为恒定值的情况下, 悬臂梁的位移逐步增大, 意味着针尖压痕力的增大。随着压入深度的逐步增加, 食管组织的硬度呈现出逐步下降的趋势, 其与加载率的变化趋势相反, 即负相关性。压入深度的变化也导致硬度产生数量级的显著性差异 (kPa~MPa), 可以看出组织硬度对压入深度的变化较敏感 [见图 3(b)]。

2.3 食管组织在不同停留时间下的硬度

类似于对软组织的蠕变及应力松弛探究, 针尖在到达预设位移后未立即返回, 保持原位一定时间然后针尖上提, 实验结束。食管组织的硬度在 0 s 无停留与停留时间分别为 3、6、9、12 s 时呈现显著性的差异, 无停留时硬度显著高于停留时间为 3、6、9、12 s 时的硬度。而停留时间分别为 3、6、9、12 s 时, 食管组织的硬度并没有明显的差异性 [见图 3(c)]。

3 讨论与结论

随着生物力学领域研究的不断深入, 研究尺度愈加微观化, 探讨食管组织的微观力学性能对胃镜-食管的交互作用研究具有指导意义, 进而为胃镜操作的参数优化提供理论基础。因此, 本文借助 AFM 探究不同加载率、压入深度及停留时间下食管组织的硬度变化。

当生物软组织受到加载力的作用时, 其变形主

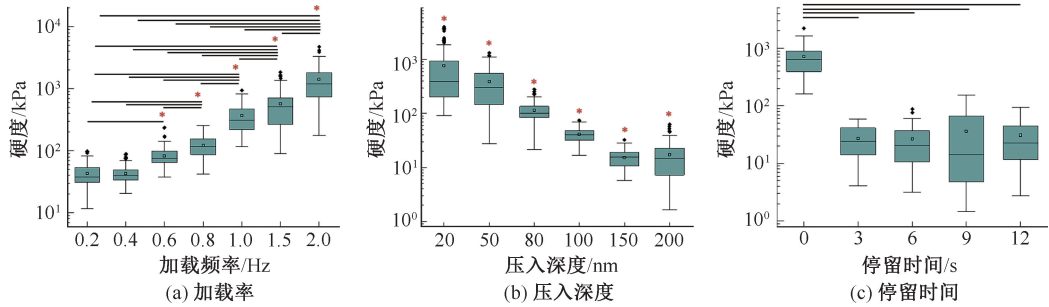


图3 食管组织不同条件下硬度分布 (* $P < 0.05$)

Fig.3 Hardness distributions for esophageal tissues under different conditions (a) Loading rates, (b) Compression depths, (c) Dwell time

要分为弹性及塑性部分。当加载率较小时,软组织变形主要以可恢复的弹性形变为主^[19-20]。随着加载率的增加,组织弹性变形能力减弱,塑性变形逐步占据主导地位,组织表现出逐步硬化的趋势。此外,随着加载率增加,组织的黏性效应增加,同样促使组织呈现出硬化现象^[21]。

与此同时,随着针尖压入深度的增加,食管组织的硬度呈现出负相关的变化趋势,在其他材料的纳米压痕实验中也存在这种压痕尺寸效应^[22-23]。这种趋势也与应变梯度塑性理论一致,即试样表层的硬度高于其在继续深入过程中的硬度。对于本文中使用的MLCT型针尖,在压时,其应变梯度塑性随压痕深度逐渐减小。即随着压痕深度的增加,其弹性变形的部分逐渐减少,试样的同质均匀区域半径迅速增加而到达塑性临界点,随后塑性变形的部分增加,试样的硬度下降^[24-25]。此外,由于离体组织的暴露,外层组织的硬度由于失去活性,其硬度也更高。因此,食管组织在纳米尺度下的硬度与加载率及压入深度呈现出较强的相关性,其随着加载率的增大而增大,随着压入深度的增加而减小。

食管组织的硬度在有无停留时间下存在较为显著的差异性。存在停留时间时,食管组织有相应的时间来进行能量转换,弹性变形成为食管应对外部加载的主导部分,而塑性变形则相对较小,因而食管组织的硬度在有无停留时间的情况下存在较大差异性。但是,停留时间(3~12 s)对食管组织的硬度则无明显的影响。

由食管组织在不同观察倍数扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)下的表面形貌图可知,食管组织黏膜层的表面凹凸不平,表面的粗糙度为微米级(见图4)。因此,探针在组织表面进行压痕测试时,组织表面的异质性是黏膜层表面硬度呈现差异性的原因之一。同时,组织表面的微观单元结构,如纤维、蛋白等也是影响其硬度差异性的重要因素。本文认为,食管组织硬度的差异性与食管组织自身的黏弹性属性相关,主要包括接触应力、能量转换及应变梯度塑性等。

本文研究结果对于临床诊断、手术操作及人工材料开发具有重要的意义:

(1) 随着未来胃肠镜或经自然腔道器械向着

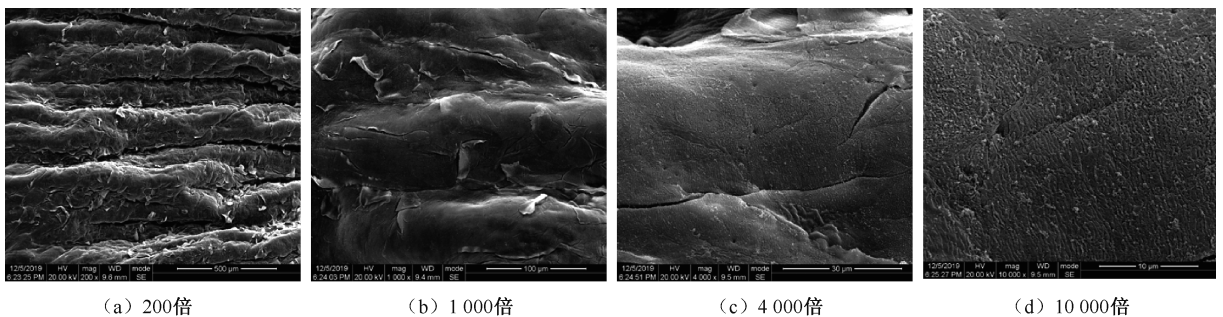


图4 不同观察倍数下食管组织扫描电镜图片

Fig.4 SEM images of esophageal tissues under different observation multiples (a) 200x, (b) 1 000x, (c) 4 000x, (d) 10 000x

更智能化方向发展,具有力觉感知的系统将集成于器械前端。通过比较相同外部加载条件下正常食管组织与病变食管组织的力学特性变化,可以原位诊断与鉴别食管的相关疾病,而食管组织的硬度变化可以为临床上食管类疾病的诊断提供一定参照。

(2) 食管组织微观硬度特性的研究为器械与组织界面接触建模提供材料属性,为建立安全手术操作阈值数据库提供理论依据。

(3) 食管组织的微观力学性能为食管组织置换及人工食管研制提供基础数据。

参考文献:

- [1] WOTTAWAH F, DIETRICH J, SCHINKINGER S, *et al.* Mechanical properties of cells as diagnostic marker for oral cancer [J]. *J Biomech*, 2006, 39(6): S233.
- [2] MOHAMMADALIPOUR A, BENENCIA F, BURDICK MM, *et al.* Mechanical properties of cancer cells: A possible biomarker for stemness [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(8): 3766-3766.
- [3] 王哲, 郝峰涛, 杨周岐, 等. 原子力显微镜技术检测几种骨组织细胞力学性能[J]. *中国细胞生物学学报*, 2014, 36(5): 644-649.
- [4] 党丹, 李密, 项荣武. 基于原子力显微镜(AFM)的细胞黏弹特性测量与分析[J]. *科学通报*, 2019, 64(15): 1610-1619.
- [5] BONIN KD, GUTHOLD M, MACOSKO J, *et al.* Changes in the mechanical properties of cells undergoing neoplastic transformation [J]. *Biophys J*, 2013, 104(2): 321-321.
- [6] CROSS SE, JIN YS, RAO J, *et al.* Nanomechanical analysis of cells from cancer patients [J]. *Nat Nanotechnol*, 2007, 2(12): 780-783.
- [7] 姚礼庆, 时强. 消化内镜在食管疾病微创治疗中的应用进展[J]. *消化肿瘤杂志(电子版)*, 2012, 4(2): 9-11.
- [8] JUSTIN C, ROBERT B, VELDHUYZEN VZS, *et al.* Early experience with unsedated ultrathin 4.9 mm transnasal gastroscopy: A pilot study [J]. *Can J Gastroenterol*, 2008, 22(11): 917-922.
- [9] LIN CX, YU QY, WANG J, *et al.* Friction behavior between endoscopy and esophageal internal surface [J]. *Wear*, 2017, 376: 272-280.
- [10] 朱杰, 郭连红, 王国栋, 等. 原子力显微镜在细胞与生物大分子超微结构和力学研究中的应用[J]. *医用生物力学*, 2012, 27(3): 355-360.
- [11] HUGEL T, SEITZ M. The study of molecular interactions by AFM force spectroscopy [J]. *Macromol Rapid Comm*, 2001, 22(13): 989-1016.
- [12] JORBA I, URIARTE JJ, CAMPILLO N, *et al.* Probing micromechanical properties of the extracellular matrix of soft tissues by atomic force microscopy [J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(1): 19-26.
- [13] DOMKE J, RADMACHER M. Measuring the elastic properties of thin polymer films with the atomic force microscope [J]. *Langmuir*, 1998, 14(12): 3320-3325.
- [14] 杨子楠, 廖贵清. 简易体外细胞压应力加载培养装置的构建及应用[C]// 2017 全国口腔颌面——头颈肿瘤外科学术研讨会论文集. 晋中: [s.n.], 2017.
- [15] LI QS, LEE GY, ONG CN, *et al.* AFM indentation study of breast cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 374(4): 609-613.
- [16] LIN CX, LI W, DENG HY, *et al.* Friction behavior of esophageal mucosa under axial and circumferential extension [J]. *Tribol Lett*, 2019, 67(1): 9-23.
- [17] MA MJ, CHEN YY, YAN ZQ, *et al.* Applications of atomic force microscopy in nanobiomaterials research [J]. *Process Chem*, 2013, 25(1): 135-144.
- [18] OLIVER WC, PHARR GM. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments [J]. *J Mater Res*, 1992, 7(6): 1564-1583.
- [19] 裴璇. 动脉粥样硬化斑块破坏的生物力学研究[D]. 南京: 东南大学, 2016.
- [20] STAFFORD RJ, KALLEL F, PRICE RE, *et al.* Elastographic imaging of thermal lesions in soft tissue: A preliminary study *in vitro* [J]. *Ultrasound Med Biol*, 1998, 24(9): 1449-1458.
- [21] TREPAT X, GRABULOSA M, BUSCEMI L, *et al.* Thrombin and histamine induce stiffening of alveolar epithelial cells [J]. *J Appl Phys*, 2005, 98(4): 1567-1574.
- [22] LUCCA DA, HERRMANN K, KLOPFSTEIN MJ. Nanoindentation: Measuring methods and applications [J]. *Cirp Ann Manuf Techn*, 2010, 59(2): 803-819.
- [23] BRISCOE BJ, FIORI L, PELILLO E. Nano-indentation of polymeric surfaces [J]. *J Phys D Appl Phys*, 1998, 31(19): 2395-2405.
- [24] TYMIAK NI, KRAMER DE, BAHR DF, *et al.* Plastic strain and strain gradients at very small indentation depths [J]. *Acta Mater*, 2001, 49(6): 1021-1034.
- [25] YASUDA K, SHINOHARA K, KINOSHITA C, *et al.* Development of the ultra-microhardness technique for evaluating stress-strain properties of metals [J]. *J Nucl Mater*, 1994, 212-215: 1698-1702.