

文章编号: 1004-7220(2022)02-0287-05

可折叠微板测量单细胞三维状态下的牵张力

赵丽君^{1a}, 王晨艳^{1a}, 张全有^{1b}, 黄 棣^{1a,1b}, 侯晋川², 陈维毅^{1a,1b}

(1. 太原理工大学 生物医学工程研究所 a 材料强度与结构冲击山西省重点实验室, b 纳米生物材料与再生医学研究中心, 太原 030024; 2. 太原理工大学 数学学院, 太原 030024)

摘要:目的 构建可用于单细胞培养的可折叠微板,建立微板折叠的有限元模型,计算单细胞三维收缩时的牵张力。**方法** 测量细胞牵张力引起微板折叠的角度,利用有限元模拟得到弯矩与折叠角之间的关系以及牵张力与弯矩之间的关系,从而实现表征单细胞三维状态下的牵张力。**结果** HSF 和 MC3T3-E1 两种类型细胞在三维状态下的单细胞折叠角度范围分别在 73°~173°和 49°~138°,由此测算出的细胞牵张力范围分别在 55~210 nN 和 52~161 nN。**结论** 构建单细胞培养的可折叠微板表征单细胞在三维结构中牵张力的方法,对进一步发展三维状态下细胞黏附、迁移和铺展中牵张力的计算具有一定参考价值。

关键词: 细胞牵张力; 单细胞培养; 可折叠微板; 弯矩

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2022.02.015

Single Cell Traction Force Measured by Foldable Microplates

ZHAO Lijun^{1a}, WANG Chenyan^{1a}, ZHANG Quanyou^{1b}, HUANG Di^{1a,1b}, HOU Jinchuan², CHEN Weiyi^{1a,1b}

(1a. Shanxi Key Laboratory of Materials Strength & Structural Impact, 1b. Research Center for Nanobiomaterials and Regenerative Medicine, Institute of Biomedical Engineering, College of Biomedical Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, China; 2. College of Mathematics, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, China)

Abstract: **Objective** To fabricate a foldable microplate for single cell culture and establish finite element model of the folding microplate, so as to calculate traction force of single cells during contraction in three-dimensional (3D) state. **Methods** The folding angle of the microplate caused by cell traction force was calculated. Then the relation between bending moment and folding angle as well as the relation between traction force and bending moment were derived by using finite element simulation, so as to realize the characterization of traction force for single cell in 3D state. **Results** The folding angles of the microplate with HSF and MC3T3-E1 cells in 3D state were 73°-173° and 49°-138°, respectively. The single cell traction forces of HSF and MC3T3-E1 cells were 55-210 nN and 52-161 nN, respectively. **Conclusions** The proposed method for measuring traction force of single cells in 3D state by fabricating the foldable microplate for single cell culture will provide some references for further development of calculating traction forces in 3D cell adhesion, spreading and migration.

Key words: cell traction force; single cell culture; foldable microplate; bending moment

收稿日期: 2021-03-23; 修回日期: 2021-05-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(11572213, 11632013, 11502158), 山西省重点研发国际合作项目(201803D421060)

通信作者: 陈维毅, 教授, E-mail: chenweiyi@tyut.edu.cn

细胞牵张力 (cell traction force, CTF) 是贴壁生长的细胞内由肌动-肌球蛋白之间相互作用产生、对细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 或生长基底所施加的张力, 在炎症、伤口愈合、血管生成和肿瘤转移等生理病理过程中发挥重要作用^[1-3]。细胞与 ECM 相互作用, 通过 CTF 驱动细胞迁移, 促进组织形态的发生, 维持组织内在机械张力^[4-5]; 作为细胞铺展、信号转导和功能维持的关键调节因子, CTF 产生过程中细胞骨架发生重构, 触发下游信号传导途径, 参与细胞增殖、分化等行为的调控^[6-9]。

由于 CTF 大小在 pN ~ nN 级别之间, 故在细胞生长过程中很难直接精确地测量单细胞的 CTF, 在三维空间中测量难度则更大。目前, 测量 CTF 的方法通常为利用细胞引起柔性材料的变形推导出细胞在收缩活动中 CTF 的变化规律^[10-11]。细胞在二维生长状态下的 CTF 测量方法基本可分为 3 种: 硅胶薄膜法^[12]、微组装悬臂梁法^[13]和牵张力显微镜技术^[10]。然而, 细胞在生理环境下通常处于三维 ECM 中。细胞在二维和三维环境中会做出不同的生物学和力学响应, 如细胞形态改变引起细胞钙信号和力学特性发生变化^[14]。因此, 如何检测三维环境中的 CTF 成为一种挑战。一些学者对牵张力显微镜技术和微组装悬臂梁技术进行改进, 尝试测量细胞在三维环境中产生的 CTF。Benigno 等^[15]采用“夹心”方法, 在细胞上下表面包埋带有荧光粒子的软凝胶, 结合牵张力显微测量技术, 检测细胞在三维微环境中所产生的 CTF。Chen 等^[16]将细胞完全封装在弹性水凝胶中, 使用线性弹性理论和有限元方法来确定 CTF。虽然采用牵张力显微测量技术或微柱力传感技术部分实现了在三维微环境中 CTF 的估算, 但受技术本身限制, 其计算的复杂性以及理论分析都存在一定困难^[10]。因此, 三维微环境中 CTF 测量仍有待进一步提高和改进。

本文通过构建适合单细胞生长的可折叠微板, 分析可折叠微板在 CTF 作用下折叠角度的变化, 并结合有限元模拟分析, 推导出微板折叠所需弯矩和力的关系, 进而计算单细胞的 CTF。研究结果为细胞在三维环境中的铺展和迁移等生物学过程产生的 CTF 测量提供了一种新方法。

1 材料与方法

1.1 微板制作

采用化学沉积系统 (PDS2010, SCS 公司, 美国) 在直径 101.6 mm、厚度 0.5 mm 的玻璃基板上沉积聚对二甲苯 (Parylene-C), Parylene-C 膜的沉积厚度为 3 μm 。经一系列常规光刻、刻蚀步骤, 将制备于玻璃基片上的 Parylene-C 膜刻蚀成 50 μm \times 106 μm 微板阵列, 用于单细胞培养。每组微板中, 106 μm 的长度中包括 6 μm 中间凹槽部分, 凹槽厚度为 100 nm (见图 1)。将其上制备有 Parylene-C 微板的玻璃基片裁成 15 mm \times 15 mm 样片, 每片样片上覆盖有 12 组 10 \times 10 个 50 μm \times 106 μm 的 Parylene-C 微板组合, 用于后续实验。

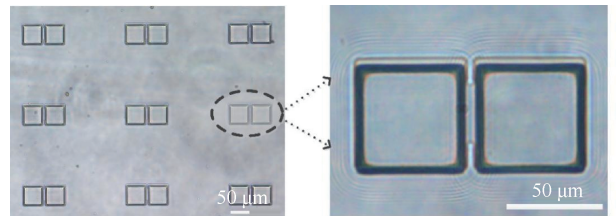


图 1 Parylene C 微板显微镜图

Fig.1 Microscopic images of Parylene-C microplate

微板制作过程中, 玻璃基片表面经 MPC 聚合物涂层处理, 使得细胞只在基片上 Parylene-C 微板存在的部位生长。

1.2 细胞培养

提取原代 HSF 人巩膜细胞, 用含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM/F12 培养液 (含 100 U/mL 青霉素和 0.1 mg/mL 链霉素抗生素), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养。

MC3T3-E1 小鼠胚胎成骨细胞前体细胞, 购自中科院上海细胞库, 用含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM basic (1 \times) 培养液 (含 100 U/mL 青霉素和 0.1 mg/mL 链霉素抗生素), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养。

细胞接种之前, 样片用 PDMS 粘在培养皿底部, 用纤连蛋白溶液孵育过夜, DMEM 培养液漂洗 2 次。

当细胞生长约 80% 的融合时, 用胰酶消化, 得到细胞悬液, 细胞计数, 调整细胞悬液浓度, 接种于粘有样片的培养皿中, 保证每组微板上只有 1 个细胞生长。培养 4~8 h 后换液, 24 h 后进行细胞-微板折叠实验。

1.3 细胞-微板折叠

采用显微操作手(Narishige公司,日本)控制微针,沿微板的水平轴方向触动右侧微板的右边缘,降低微板组合与玻璃基底之间的黏附。细胞在自身CTF的作用下,使其中一侧微板与玻璃基底发生脱离,原来的二维微板结构发生折叠,形成三维结构(见图2)。

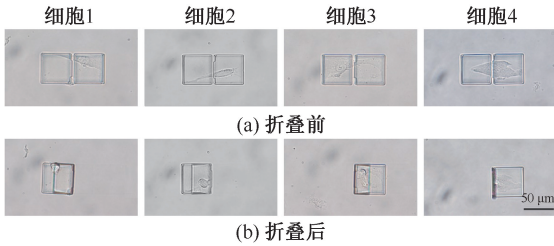


图2 不同细胞使微板发生折叠显微图像

Fig.2 Microscopic image of microplate folding for different cells (a) Before folding, (b) After folding

2 计算

2.1 理论分析

本文将铺展在 Parylene-C 微板上的细胞假设成 1 个简化的模型,即以细胞铺展的长轴 AB 来代替整个细胞, A 、 B 两点为附着点, O 为细胞长轴与未脱离基底一侧微板右侧边缘的交点[见图 3(a)]。 A 、 B 点位置确定在以细胞沿两侧微板铺展后的长轴两端处[见图 3(b)]。

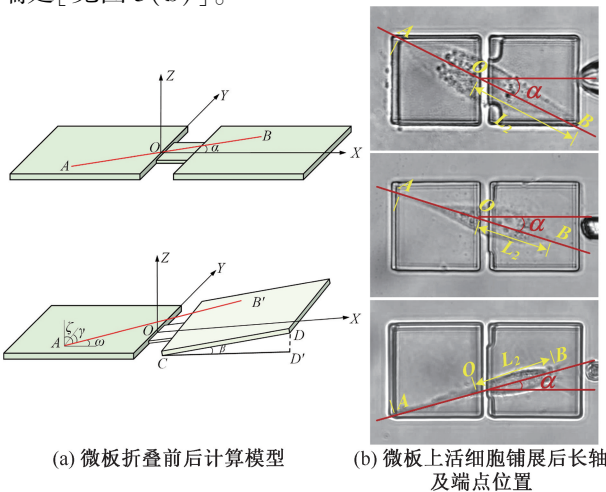


图3 微板折叠计算模型及细胞铺展端点位置示意图

Fig.3 Calculation model of microplate folding and schematic diagram for location of cell spreading endpoints

(a) Calculation model before and after microplate folding, (b) Position of the long axis and endpoints for the living cell spreading on the microplate

设 $OA=L_1$, $OB=L_2$, AB 与 X 轴的夹角为 α , 则 A 、 B 的空间坐标为 $A(-L_1\cos\alpha, -L_1\sin\alpha, 0)$ 、 $B(L_2\cos\alpha, L_2\sin\alpha, 0)$ 。若微板绕 OY 方向折叠的角度为 β , CD 为被折起一侧微板的边长, CD' 为 CD 的投影, 则:

$$\cos\beta = CD'/CD \quad (1)$$

根据共聚焦显微镜图像测得 CD' 和 CD 的长度, 由式(1)可计算出折叠角 β 的大小。

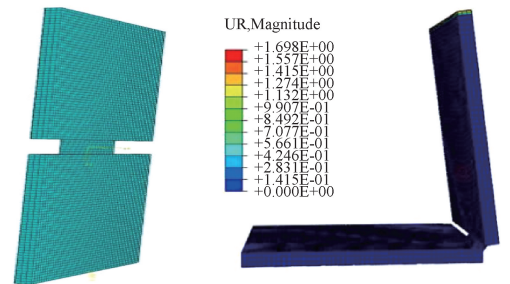
折叠后 B 点的位置变为 B' , 此时 B' 的空间坐标为 $(L_2\cos\alpha\cos\beta, L_2\sin\alpha, L_2\cos\alpha\sin\beta)$ 。设 AB' 与 X 、 Y 、 Z 轴的夹角分别为 ω 、 γ 、 ζ , 若假设此时 CTF (F) 的方向沿着 AB' , 可导出弯矩 M 与 F 的关系:

$$F = \frac{M}{L_2\cos\alpha[\cos\omega\sin\beta - \cos\zeta\cos\beta]} \quad (2)$$

根据图 3 及式(2)可知, AB 的位置直接影响 α 角以及 L_2 , 进而影响 CTF。 L_2 越大, 计算出的 F 越小; α 角越大, 计算出的 F 越大。

2.2 有限元模拟

为了得到弯矩与折叠角度之间的关系, 本文利用有限元软件 ABAQUS 进行模拟。根据微板的形状和尺寸, 在 ABAQUS 中建立微板的三维模型[见图 4(a)]。建立模型时, 设置材料属性为均质、各向同性的线弹性材料, 材料的相关属性如表 1 所示。选取微板右侧边缘的中点作为参考点, 并与微板右侧耦合, 然后在该点施加载荷作用。由于直接施加较大的弯矩, 会使微板凹槽部分出现屈曲现象, 故本文共建立两个加载步, 其中一个加载步施加较小弯矩, 使微板右侧微微折起; 另一个加载步施加较大弯矩, 从而计算弯矩作用下微板的折叠角。结果如图 4(b) 所示。



(a) 微板有限元模型 (b) 微板折叠有限元模拟结果

图4 微板折叠有限元模型

Fig.4 Finite element model of microplate folding (a) Finite element model of the microplate, (b) Finite element simulation results of microplate folding

表1 材料参数和几何尺寸

Tab.1 Material parameters and geometric dimensions

材料	E/GPa	ν	尺寸/ $(\mu\text{m}\times\mu\text{m}\times\mu\text{m})$
微板	4	0.4	$50\times 50\times 3(a\times a\times h)$
凹槽	4	0.4	$25\times 6\times 0.1(b\times w\times t)$

注: a 为微板方形区域边长, h 为方形区域厚度; b 为凹槽长, w 为凹槽宽, t 为凹槽厚度。

有限元计算时通过给定不同的弯矩,可得到相应的折叠角。如图5所示,通过拟合有限元计算结果,可以得到如下弯矩与折叠角度的关系:

$$\beta = 50.76 \times M + 5.29$$

将所得弯矩代入式(2),即可得出生长在可折叠微板上单细胞的CTF。

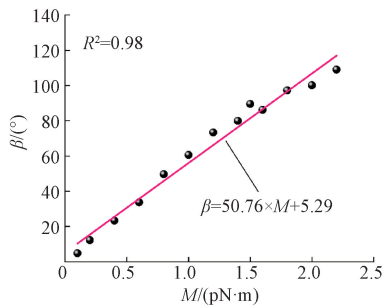


图5 折叠角度与弯矩关系

Fig.5 Relation of folding angle and bending moment

3 结果

如图6所示,HSF和MC3T3-E1两种类型单细胞使微板发生折叠的折叠角度范围分别为 $73^\circ \sim 173^\circ$ 和 $49^\circ \sim 138^\circ$,根据折叠角度计算出的CTF范围分别为 $55 \sim 210 \text{ nN}$ 和 $52 \sim 161 \text{ nN}$,其平均CTF分别

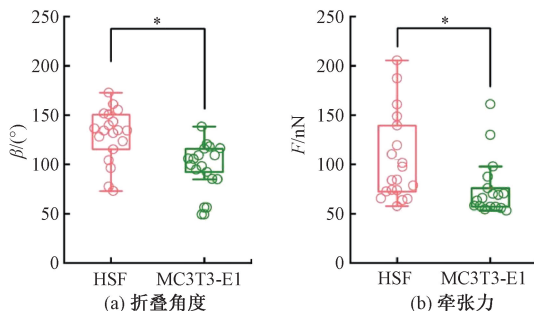
图6 不同单细胞收缩时微板折叠角度和牵张力对比(* $P < 0.05$)

Fig.6 Comparison of folding angle and traction force during contraction of different single cells (a) Folding angle, (b) Traction force

为 $104.64, 75.73 \text{ nN}$ 。HSF单细胞使微板发生折叠的角度明显大于MC3T3-E1单细胞($P < 0.05$),其CTF也显著高于MC3T3-E1的单细胞CTF($P < 0.05$)。

4 讨论与结论

本文基于细胞可折叠微板的折叠角度变化模型,结合有限元模拟,完成单细胞三维状态下的CTF计算。用于培养细胞的基底材料为弹性模量 3.2 GPa 的Parylene C刚性基底^[17]。与传统二维柔性材料测量CTF相比,本文方法避免了基底材料自身变形对CTF计算结果的影响。所测两种细胞的单细胞CTF均在 $10 \sim 200 \text{ nN}$ 范围内,且不同类型细胞的CTF存在差异。细胞在收缩时产生的CTF与细胞类型和功能有关,成纤维细胞在组织损伤修复不同时期需要进行迁移和收缩,以促进伤口愈合,故产生的CTF会更大一些。

在目前所有CTF测量的方法中,细胞基本都培养于近似二维的平面上。本研究模型中细胞随折叠微板发生的变形属于三维变形,与二维状态下测得的CTF相比,本文的实验和计算方法可能更能真实模拟细胞在体铺展、迁移以及细胞分裂过程中的CTF模式。本文测得MC3T3-E1单细胞的平均CTF为 75.73 nN ,该结果显著高于在微柱上测得的CTF结果(28.6 nN)^[18]。Hui等^[18]研究认为,CTF会随着基底接触面积的增加而增加。细胞在微柱上培养时,底部只有部分表面积跟微柱接触。本文结果表明,微板中整个细胞几乎50%表面积跟基底相接触,而在在体环境中,细胞表面完全跟其他细胞或ECM相接触,故实际在体环境中的单细胞CTF可能比本文获得的结果还要大。推测造成上述结果差异的原因如下:①细胞骨架在二维和三维形态下可能表现出不同的力学特性,接触面积不同使其与基底界面形成的黏着斑密度和分布也不尽相同;②本文中细胞生长的基底为刚性基底(3.2 GPa),细胞在硬基底上生长时具有趋硬性,可能使得细胞产生更大的CTF^[19-20]。

三维环境中测量CTF的困难在于跟踪信号标记,而且三维培养材料相比测量二维CTF的合成材料更为复杂。有研究通过跟踪水凝胶中添加的标记物来实现CTF的三维测量^[15]。然而,用测得的标记物位移计算CTF的过程较为复杂。因此,三维

环境中 CTF 的计算问题仍是难题。

本文通过构建可折叠微板反演活细胞在体生理环境中细胞三维铺展,使 CTF 呈三维分布,突破了 CTF 只有平铺的二维模式。事实上,细胞骨架肌动蛋白在 CTF 作用下不断发生聚合和解聚。因此,细胞三维 CTF 是空间和时间的函数,本文仅进行准静态下 CTF 的分析。然而,即使准静态下 CTF 的计算也涉及细胞铺展面积、方向和位置等诸多因素的影响。例如,当细胞铺展长轴与转轴不垂直时,CTF 只有在垂直于转轴方向上的分力使折叠微板转动。此外,本文仅利用折叠微板计算单细胞在收缩过程中这个较短时间内产生的 CTF。如果要研究细胞铺展、迁移或分裂等生物学过程中的 CTF 变化,则需要开展进一步的实验和发展相关的计算方法。

本文依据实验数据及有限元模型,评估更接近细胞在体存活时三维状态下的 CTF。本方法对进一步发展细胞在三维状态下的 CTF 测试分析具有参考价值,对组织工程中进行细胞与周围支架之间相互作用的力学生物学研究具有重要意义。

参考文献:

[1] SCHWARZ US, GARDEL ML. United we stand-integrating the actin cytoskeleton and cell-matrix adhesions in cellular mechanotransduction [J]. *J Cell Sci*, 2012, 125 (13): 3051-3060.

[2] MURTHY SE, DUBIN AE, PATAPOUTIAN A. Piezos thrive under pressure: Mechanically activated ion channels in health and disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18 (12): 771-783.

[3] PELHAM RJ, WANG YL. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(25): 13661-13665.

[4] YANG ZC, LIN JS, CHEN JX, *et al.* Determining substrate displacement and cell traction fields—A new approach [J]. *J Theor Biol*, 2006, 242(3): 607-616.

[5] 徐弘远, 张鹏, 江凌勇. 微环境通过细胞骨架张力对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响 [J]. *医用生物力学*, 2019, 34 (6): 668-672.

XU HY, ZHANG P, JIANG LY. Effects of microenvironment on osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells through cytoskeleton tension [J]. *J Med Biomech*, 2019, 34(6): 668-672.

[6] POLACHEK WJ, CHEN CS. Measuring cell-generated forces: A guide to the available tools [J]. *Nat Methods*, 2016, 13(5): 415-423.

[7] GERSHLAK JR, BLACK LD. Beta 1 integrin binding plays

a role in the constant traction force generation in response to varying stiffness for cells grown on mature cardiac extracellular matrix [J]. *Exp Cell Res*, 2015, 330(2): 311-324.

[8] MCANDREWS K, MCGRAIL DJ, QUACH N, *et al.* Utilizing multiple particle tracking microrheology and traction force microscopy to monitor mechanical progression of differentiating mesenchymal stem cells [C] // *Proceedings of 13 Aiche Meeting*. San Francisco: [s.n.], 2013.

[9] MULLIGAN JA, ADIE SG. Measurement of time-varying displacement fields in cell culture for traction force optical coherence microscopy [C] // *Proceeding of Society of Photo-optical Instrumentation Engineers*. San Diego: [s.n.], 2017.

[10] MULARSKI A, NIEDERGANG F. Force measurement of living professional phagocytes of the immune system [J]. *Aust J Chem*, 2020, 73(3): 104-111.

[11] LI HH, MATSUNAGA D, MATSUI TS, *et al.* Wrinkle force microscopy: A new machine learning based approach to predict cell mechanics from images [J]. *ArXiv*, 2021: 2102.12069

[12] HARRIS AK, WILD P, STOPAK D. *et al.* Silicone rubber substrata: A new wrinkle in the study of cell locomotion [J]. *Science*, 1980, 208(4440): 177-179.

[13] TAN J L, TIEN J, PRIONE DM, *et al.* Cells lying on a bed of microneedles: An approach to isolate mechanical force [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(4): 1484-1489.

[14] ZHANG QY, BAI JD, WU XA, *et al.* Microniche geometry modulates the mechanical properties and calcium signaling of chondrocytes [J]. *J Biomech*, 2020, 104: 109729.

[15] BENINGO KA, DEMBO M, WANG YL. Responses of fibroblasts to anchorage of dorsal extracellular matrix receptors [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(52): 18024-18029.

[16] CHEN CS, LEGANT WR, MILLER JS, *et al.* Measurement of mechanical tractions exerted by cells in three-dimensional matrices [J]. *Nat Methods*, 2010, 7 (12): 969-971.

[17] WRIGHT D, RAJALINGAM B, SELVARASAH S, *et al.* Generation of static and dynamic patterned co-cultures using microfabricated parylene-C stencils [J]. *Lab Chip*, 2007, 7(10): 1272-1279.

[18] HUI J, PANG SW. Cell traction force in a confined microenvironment with double-sided micropost arrays [J]. *RSC Adv*, 2019, 9(15): 8575-8584.

[19] AGARWAL P, LEE HP, SMERIGLIO P, *et al.* A dysfunctional TRPV4-GSK3 β pathway prevents osteoarthritic chondrocytes from sensing changes in extracellular matrix viscoelasticity [J]. *Nat Biomed Eng*, 2021: 1-13.

[20] 宁乐, 张涵, 朱卫平. 细胞在缓变刚度基质上趋硬性迁移的数值试验 [J]. *医用生物力学*, 2019, 34(3): 307-314.

NING L, ZHANG H, ZHU WP. Numerical test for cell durotaxis migration on substrate with moderate gradient stiffness [J]. *J Med Biomech*, 2019, 34(3): 307-314.