

应用原子力显微镜分析正常淋巴细胞和 Jurkat 细胞的形态和机械性质

蔡小芳, 蔡继业, 董世松, 邓华, 胡明铅

暨南大学化学系, 广州 510632

摘要: 淋巴细胞形态和机械性质的变化与人的健康、疾病的治疗和诊断有着密切关系。本研究利用原子力显微镜研究淋巴细胞和 Jurkat 细胞形态和机械性质。结果显示, 这 2 种细胞的形态较为相似, 但通过对力曲线的分析得出这 2 种细胞的机械性质明显不同。正常淋巴细胞粘弹力范围大致为 (796.7 ± 248.5) pN, 而 Jurkat 细胞分布于 (158.5 ± 37.5) pN; 正常淋巴细胞的杨氏模量 $(0.471 \text{ kPa} \pm 0.081 \text{ kPa})$ 近 4 倍于 Jurkat 细胞 $(0.0964 \text{ kPa} \pm 0.0229 \text{ kPa})$; 而 Jurkat 细胞 $(4.322 \text{ mN/m} \pm 0.382 \text{ mN/m})$ 的硬度近 2 倍于正常淋巴细胞 $(2.278 \text{ mN/m} \pm 0.488 \text{ mN/m})$ 。结果表明原子力显微镜能可在临床诊断上区分正常细胞与肿瘤细胞, 即使两者形态区别不明显。

关键词: 原子力显微镜, Jurkat 细胞, 正常淋巴细胞, 表面形态, 机械性质

Morphology and mechanical properties of normal lymphocyte and Jurkat revealed by atomic force microscopy

Xiaofang Cai, Jiye Cai, Shisong Dong, Hua Deng, and Mingqian Hu

Department of Chemistry, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract: Alternations of lymphocyte in biophysical properties (e.g., morphology and viscoelasticity) are related to the human health, disease diagnosis and treatment. Here, we used atomic force microscopy (AFM) to characterize the morphology and mechanical properties of normal lymphocyte and Jurkat. The AFM images revealed that their cell shapes appeared similar. The mechanical properties of the two groups were tracked with AFM-based force spectroscopy. The normal lymphocyte cells had a high adhesion force distribution in (796.7 ± 248.5) pN, whereas the Jurkat cells had a low force distribution in (158.5 ± 37.5) pN. The adhesion force revealed that the Young's modulus of normal lymphocyte cells $(0.471 \text{ kPa} \pm 0.081 \text{ kPa})$ was nearly four times higher than that of Jurkat cells $(0.0964 \text{ kPa} \pm 0.0229 \text{ kPa})$ at the same loading rate. The stiffness of normal lymphocyte cells was (2.278 ± 0.488) mN/m and that of Jurkat cells was (4.322 ± 0.382) mN/m. The differences in mechanical properties of normal and cancerous cells were obvious that healthy and diseased states could be clearly distinguished. These results may be applied to the clinic disease diagnosis for distinguishing the normal cells from the cancer ones even when they show similar shapes.

Keywords: atomic force microscope (AFM), Jurkat, normal lymphocyte cell, morphological structure, mechanical properties

Received: February 10, 2009; **Accepted:** May 18, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 60578025), Key Program of the National Natural Science Foundation of China (No. 30230350).

Corresponding author: Jiye Cai. Tel: +86-20-85223569; Fax: +86-20-85223569; E-mail: tjycail@jnu.edu.cn

国家自然科学基金(No. 60578025), 国家自然科学基金重点项目(No. 30230350)资助。

Jurkat 细胞是一种急性淋巴白血病细胞。在世界各地, 癌症一直是引起死亡的主要原因, 死亡率约 25%^[1]。据估计, 到 2020 年将会有大约 15 万个新的癌症病例^[2]。白血病是诱导死亡的恶性肿瘤之一, 其发生过程是, 白血病细胞在体内无限地增殖, 然后入侵正常骨髓、器官和其他组织等; 正常造血功能受到抑制, 身体遭到破坏。这种疾病的根本原因是体内的正常免疫监视功能失调。在中国, 白血病的发病率约 2%~4%。其中, 年龄低于 35 岁的白血病患者居首位^[3]。

细胞力学性质的变化会影响人体的生理功能并引起疾病^[2,4]。另一方面, 疾病也能引起细胞结构和力学性质的变化^[5]。因此, 细胞的力学性质在研究人类疾病方面发挥着重要作用, 并有助于进一步了解病变细胞与健康细胞不同之处^[6,7]。原子力显微镜已被广泛认为是一个多功能的成像^[8-11]和测量细胞粘弹性的工具^[12-18]。原子力显微镜用于探测细胞生理条件下的力学性能^[19-24]。据文献报道, 癌细胞的杨氏模量明显低于正常细胞的杨氏模量。目前检测白血病的手段有形态学、免疫组织化学、病理学、电子显微镜、染色体和融合基因等方法。已有研究报道用原子力显微镜观测淋巴细胞的形态^[25], 但利用原子力显微镜研究 Jurkat 细胞和淋巴细胞的力学性能还未见报道。本试验主要利用原子力显微镜研究正常淋巴细胞和 Jurkat 细胞的超微结构及其力学性能。

1 材料和方法

1.1 材料

实验所用的试剂皆为分析纯。RPMI - 1640 培养液购自广州 Genewindows 生物技术有限公司, 新生胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司, 淋巴细胞分离液购自 Sigma 公司。

细胞培养: Jurkat, 急性淋巴白血病细胞, 由暨南大学医学院微生物学与免疫学教研室提供。Jurkat 细胞于含 10% 新生小牛血清的 RPMI-1640 完全培养液中, 37 °C、5% CO₂ 条件下培养, 每 3~4 d 传代 1 次。实验前用台盼蓝染色法鉴定细胞活性大于 98%。

淋巴细胞: 抽取新鲜健康人体外周血, 肝素钠抗凝血, 以等体积 PBS 缓冲液稀释后, 加入淋巴细

胞以分离液密度梯度离心法分离获得 PBMC。

1.2 原子力显微镜分析正常淋巴细胞和 Jurkat 细胞样品制备: 取淋巴细胞, 滴于玻片上, 使其自然铺展, 吸附 10 min, 然后用 2.5% 的戊二醛(日本京都产)固定 15 min, 用蒸馏水冲洗 3 次, 室温自然干燥。

将载有细胞样品的玻片固定在使用 AFM (Autoprobe CP Research, Thermomicroscopes 公司, 美国)的扫描台上, 用监视器定位所要扫描的样品区域, 对样品进行扫描成像, 试验采用 100 μm 扫描器, UL20B 硅探针, 力常数为 2.8 N/m, 在空气中进行扫描, 以接触模式成像。所有图像仅经仪器配置软件 (Thermomicroscopes proscan image processing software version 2.1) 平滑处理, 以消除扫描方向上的低频背景噪音。原子力显微镜的力谱用于分析力曲线测量。所有的力曲线都是在同一 loading rate 测量得到。

2 结果与讨论

2.1 原子力显微镜分析正常淋巴细胞和 Jurkat 细胞的形态和超微结构

AFM 是样品表面信息的收集工具, 较易获得细胞的形态、超微结构及其他一些表面信息。细胞膜上有各种不同的受体蛋白。细胞外部信息通过细胞膜转化进细胞内。细胞膜在免疫反应和信号转导中起着重要意义。因此, 有必要探测细胞膜表面的信息。

用原子力显微镜对正常淋巴细胞和 Jurkat 细胞的形态进行探测。拓扑图像显示正常淋巴细胞呈较为规则的圆形, 中间隆起, 细胞表面总体较为平滑(图 1A 和 1B), 高度在 2.5~3.0 μm 之间, 直径约为 6~7 μm (图 1D)。Jurkat 细胞呈现椭圆, 细胞膜表面较不光滑(图 1G), 膜上有一些颗粒。直径约 7~8 μm, 高度约 3.0~3.5 μm(图 1J)。Jurkat 细胞的直径和高度明显大于正常淋巴细胞。图 1D 和 J 分别是淋巴细胞和 Jurkat 细胞的高度曲线图。图 1C 和 I 分别为这 2 种细胞的超微结构。这些差异分别反映在图 1E 和 1K。纵轴是指纳米粒子的个数, 横轴指的是纳米粒子的高度波动范围。由图可看出, 淋巴细胞的波动范围为 11.4~114 nm(图 1E 直方图中两条垂线内的区域)。颗粒大小分布在 108 nm, 颗粒分布不均。Jurkat 细胞高度波动范围在 155~218 nm (图 1K 直方图中 2

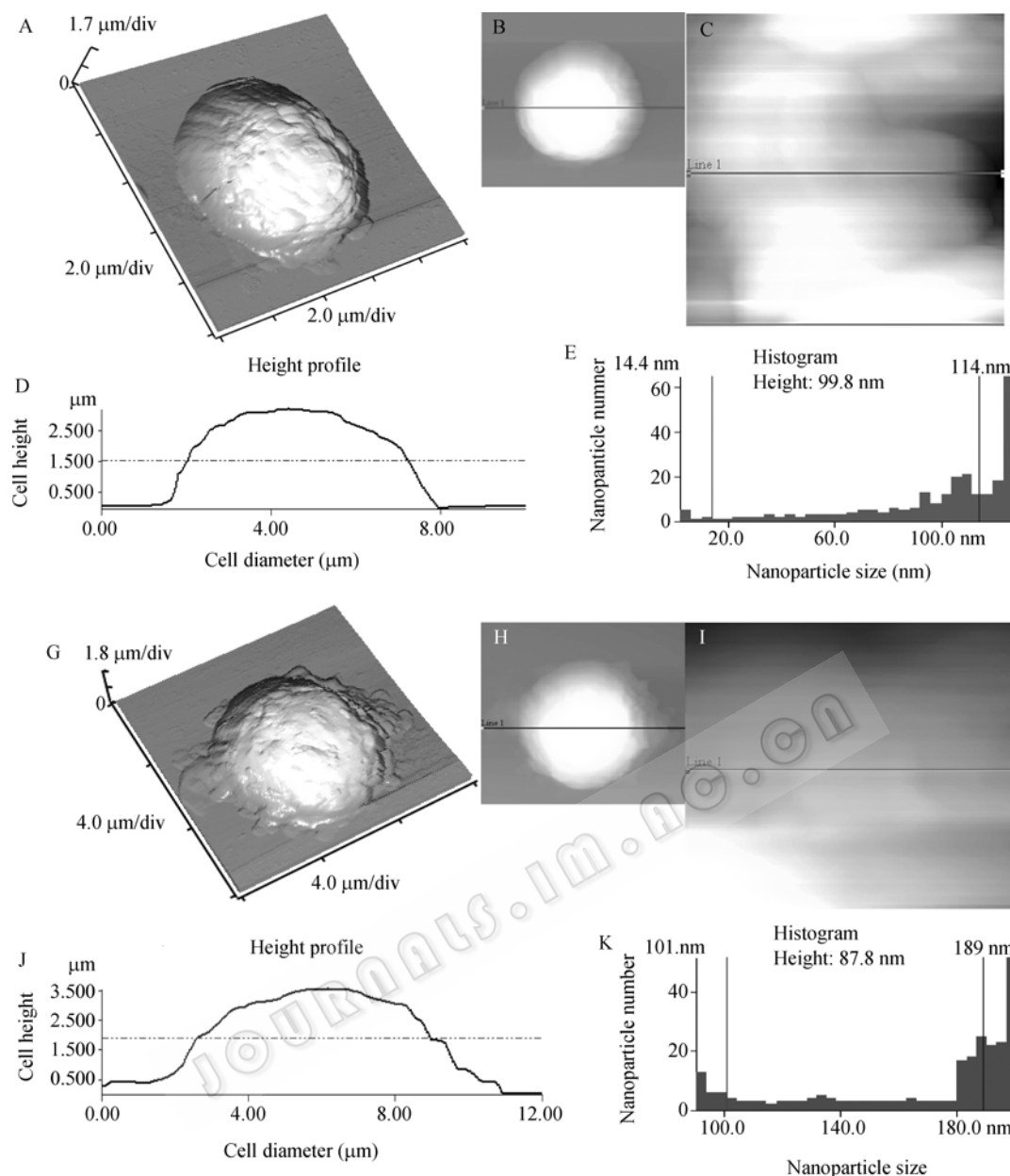


图 1 正常淋巴细胞与 Jurkat 细胞的 AFM 形态图

Fig. 1 AFM images of normal lymphocyte and Jurkat cell. (A–E) First group: AFM images of normal lymphocyte (A)Three-dimensional morphology (size: 10 μm×10 μm). (B) Topological morphology. (C) Ultrastructure of the cell membrane surface zoomed from (B) (size: 1 μm×1 μm). (D) Height profile of (B). (E) Particles histogram of (C). (G–K)Second group: AFM images of Jurkat cell. (G) Three-dimensional morphology (size: 12 μm×12 μm). (H) Topological morphology. (I) Ultrastructure of the cell membrane surface zoomed from (H) (size: 1 μm×1 μm). (J) Height profile of (H). (K) The particles histogram of (I).

条垂线内的区域)。粒子大小分布在 195 nm, 有些分布在 170 nm, 颗粒分布均匀。正常淋巴细胞粒子的分布约为 108 nm, 而 Jurkat 细胞分布约在 197 nm(表 1)。从形态上看, 正常淋巴细胞和 Jurkat 细胞的形态没有明显的区别。但从超微结构中可以看出两者有着明显区别。同时微米级、纳米级的超微结构也显示了原子力显微镜的高分辨率优势, 这是其他方法难以达到的。

表 1 正常淋巴细胞与 Jurkat 细胞的超微结构参数

Table 1 Comparison of ultrastructure parameter of normal lymphocyte and Jurkat cell

Sample	Size fluctuation range (nm)	Size distribution (nm)
Normal lymphocyte	18.85±5.47–115.74±3.59	108.52±1.98
Jurkat cell	160.48±7.83–222.43±7.45	197.48±5.51

2.2 原子力显微镜力曲线分析正常淋巴细胞和 Jurkat 细胞的机械性质

本实验中,通过原子力显微镜测量得到的力-距离曲线用来分析正常淋巴细胞和 Jurkat 细胞细胞膜上的机械性质。由力曲线图可得到细胞膜表面的粘弹力、相对硬度和杨氏模量。图 2A 和图 2B 分别是正常淋巴细胞和 Jurkat 细胞的力曲线示意图。

通过力曲线得出粘弹力的分布范围,正常淋巴

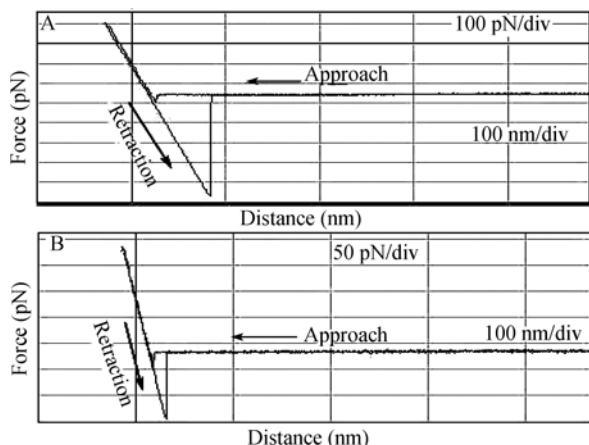


图 2 正常淋巴细胞与 Jurkat 细胞的力曲线示意图
Fig. 2 Representative examples of force-distance curve acquired from the normal lymphocyte and Jurkat, respectively. (A) Representative force curves of normal lymphocyte. (B) Representative force curve of Jurkat cell.

细胞的粘弹力较大,分布在 (796.7 ± 248.5) pN, 而 Jurkat 细胞粘弹力较低,分布在 (158.5 ± 37.5) pN(图 3)。细胞膜上有很多膜蛋白和脂多糖等蛋白粒子。肿瘤细胞的细胞膜表面的糖脂和糖蛋白的结构发生了改变,膜上的糖蛋白含量低于正常淋巴细胞。细胞膜表面的粘弹力与膜上的蛋白粒子的聚集行为有关。Jurkat 细胞的粘弹力低于正常淋巴细胞,可能是 Jurkat 细胞膜上与原子力显微镜的针尖相互作用的蛋白粒子少的缘故。

杨氏模量反映了细胞膜表面的刚性。图 4A 是正常淋巴细胞组和 Jurkat 细胞组的杨氏模量对比,正常淋巴细胞组的杨氏模量 $(0.471 \text{ kPa} \pm 0.081 \text{ kPa})$ 高于 Jurkat 细胞组 $(0.0964 \text{ kPa} \pm 0.0229 \text{ kPa})$ 近 4 倍。杨氏模量越大,细胞越不易变形。Jurkat 细胞的杨氏模量低,表明 Jurkat 比正常淋巴细胞易变形。硬度也是表征细胞膜表面力学性质的一个重要参数。它反映的是刚性随形变的变化。在细胞膜上分布的粒子,如胶原蛋白、蛋白多糖、糖蛋白、以及各种生物大分子。这些大分子调节着细胞的各种行为,包括细胞增殖、细胞分化、细胞迁移和细胞间的相互作用。同样由力曲线图可得出, Jurkat 细胞的硬度 $(4.322 \pm 0.382) \text{ mN/m}$ 近 2 倍高于正常淋巴细胞 $(2.278 \pm 0.488) \text{ mN/m}$ 。细胞膜表面的硬度与膜上的蛋

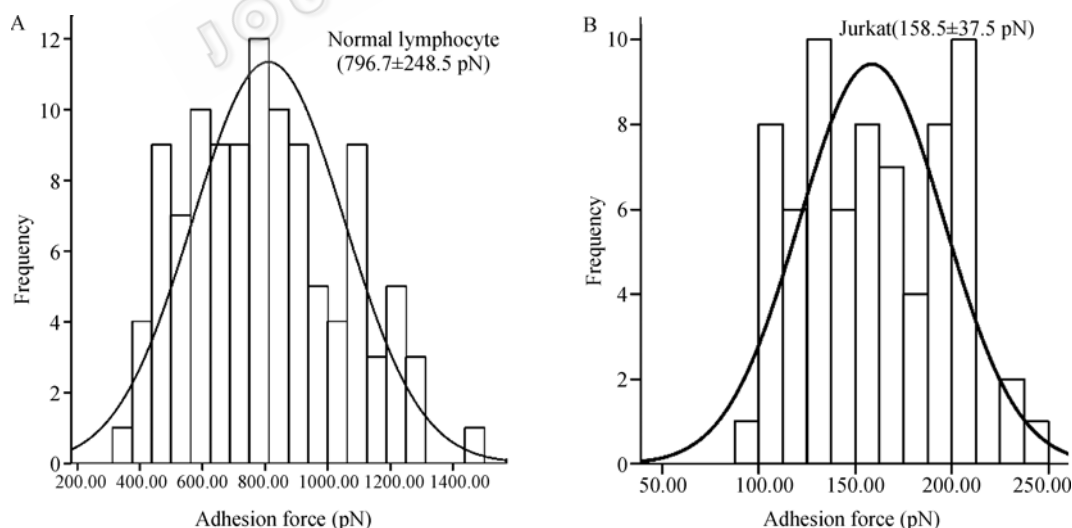


图 3 正常淋巴细胞与 Jurkat 细胞的粘弹力分布图

Fig. 3 Frequency was constructed from an ensemble of forces and gave the distribution of adhesion force. The maximum of the frequency depicted the most probable adhesion force at the same loading rate. (A) Frequency-adhesion force histogram of normal lymphocyte cells, the adhesion force distributed in (796.7 ± 248.5) pN. (B) Frequency-adhesion force histogram of Jurkat cells, the adhesion force distributed in (8.5 ± 37.5) pN.

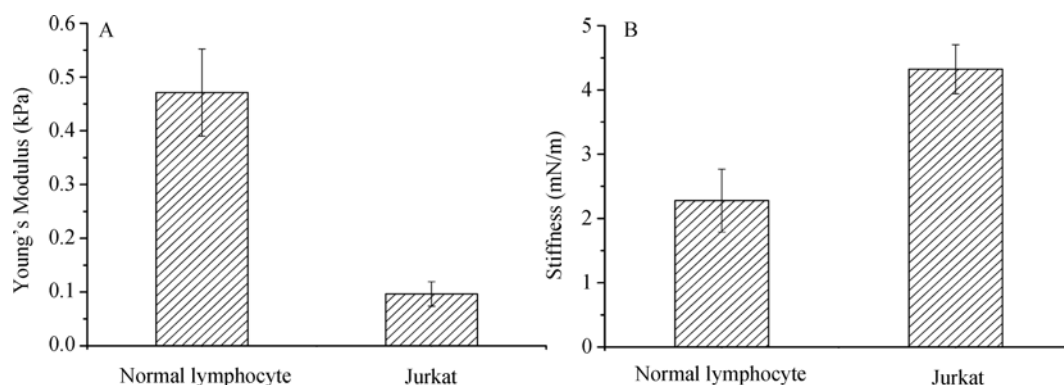


图 4 正常淋巴细胞与 Jurkat 细胞的机械性质图

Fig. 4 Histograms for mechanical properties of normal lymphocyte cells and Jurkat cells group (scanning size: $1\mu\text{m}\times 1\mu\text{m}$). (A) Young's modulus of normal lymphocyte cells and Jurkat cells. (B) Stiffness of normal lymphocyte cells and Jurkat cells. The cell stiffness is the slope of the retraction curve. $\text{Stiffness} = \frac{Y(\text{pN})}{X(\text{nm})}$. The Young's modulus is calculated from the equation^[26] $F = \frac{4}{3} \frac{E}{1-\nu^2} \sqrt{R\delta^3}$, where F is the adhesion force, E is the Young's modulus, ν is the Poisson's ratio, R is the radius of the probe, and δ is indentation depth.

白粒子的含量有关。Jurkat 细胞的硬度较高, 可能是因为膜上的糖蛋白含量低于正常淋巴细胞。细胞的硬度与细胞的形变有关。硬度越大, 细胞越容易变形。结果表明, Jurkat 细胞比正常淋巴细胞更容易变形。

3 结论

原子力显微镜是评估正常淋巴细胞和 Jurkat 细胞的超微结构和力学性质的一种有效手段。通过原子力显微镜可获得正常淋巴细胞和 Jurkat 细胞的形态, 两者的形态相似, 没有明显的差异; 同时由 AFM 的力曲线可得到细胞膜表面的力学性能(粘弹力、硬度和杨氏模量)。通过对力曲线的分析计算得到相应力学性能的数据, 发现正常淋巴细胞和 Jurkat 细胞的力学性能有着明显区别。正常淋巴细胞粘弹力分布于 (796.7 ± 248.5) pN, 明显高于 Jurkat 细胞分布于 (158.5 ± 37.5) pN; 淋巴细胞的杨氏模量 (0.471 ± 0.081) kPa 高于 Jurkat 细胞 (0.0964 ± 0.0229) kPa 近 4 倍; 正常淋巴细胞的硬度分布在 (2.278 ± 0.488) mN/m, 而 Jurkat 细胞分布在 (4.322 ± 0.382) mN/m。因此, 原子力显微镜以其分子力谱的优势可能可以应用于临床区分正常细胞和肿瘤细胞, 即使两者有着相似的形态; 同时有助于推进抗癌新药物的发展, 以及对癌症预防和诊断。

REFERENCES

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al.* Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2007, **57**: 43–66.
 - [2] Lee GYH, Lim CT. Biomechanics approaches to studying human diseases. *Trends Biotechnol*, 2007, **25**(3): 111–118.
 - [3] Walter R., Estey E. The power of comparative studies. *Leuk Res*, 2009, **33**(5): 610–612.
 - [4] Lim CT, Zhou EH, Li A, *et al.* Experimental techniques for single cell and single molecule biomechanics. *Mater Sci Eng C. Biom Supramol Systems*, 2006, **26**(8): 1278–1288.
 - [5] Crick SL, Yin FCP. Assessing micromechanical properties of cells with atomic force microscopy: Importance of the contact point. *Biomech Model Mechanobiol*, 2007, **6**(3): 199–210.
 - [6] Guck J, Schinkinger S, Lincoln B, *et al.* Optical deformability as an inherent cell marker for testing malignant transformation and metastatic competence. *Biophys J*, 2005, **88**(5): 3689–3698.
 - [7] Suresh S. Biomechanics and biophysics of cancer cells. *Acta Materialia*, 2007, **55**(12): 3989–4014.
 - [8] Wu YZ, Cai JY, Cheng Y, *et al.* Atomic force microscope tracking observation of Chinese hamster ovary cell mitosis. *Micron*, 2006, **37**(2): 139–145.
 - [9] Chen Y, Cai JY, Xing SJ, *et al.* Observation of ultrastructures of membrane surface of various tumor cells and preliminary research on the effect of drugs on membrane surface of tumor cells by AFM. *J Chin Electr Micros Soc*, 2003, **22**(2): 100–104.
- 陈勇, 蔡继业, 邢少璟, 等. 多种肿瘤细胞表面超微结构的原子力显微镜观察及药物对细胞膜表面超微结构影响的初步研究. *电子显微学报*, 2003, **22**(2): 100–104.

- [10] Hu MQ, Wang JK, Cai JY, *et al.* Nanostructure and force spectroscopy analysis of human peripheral blood CD4⁺ T cells using atomic force microscopy. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, **374**(1): 90–94.
- [11] Hu MQ, Wang JK, Cai JY, *et al.* Analysis of sodium benzoate biotoxicity using atomic force microscope. *Chin J Biotech*, 2008, **24**(8): 1428–1432.
胡明铅, 王炯坤, 蔡继业, 等. 应用原子力显微镜分析苯甲酸钠生物毒性. *生物工程学报*, 2008, **24**(8): 1428–1432.
- [12] Yang H, Yu J, Fu G, *et al.* Interaction between single molecules of Mac-1 and ICAM-1 in living cells: An atomic force microscopy study. *Exp Cell Res*, 2007, **313**(16): 3497–3504.
- [13] Bremmell KE, Evans A, Prestidge CA. Deformation and nano-rheology of red blood cells: An AFM investigation. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2006, **50**(1): 43–48.
- [14] Kelly GM, Campbell VA, Jarvis SP, *et al.* AFM indentation on osteoblasts shows that elasticity changes during the cell cycle. *J Biomech*, 2008, **41**(Supplement 1): S21.
- [15] Bálint Z, Krizbai IA, Wilhelm I, *et al.* Changes induced by hyperosmotic mannitol in cerebral endothelial cells: An atomic force microscopic study. *Eur Biophys J*, 2007, **36**(2): 113–120.
- [16] Rabinovich YI, Daosukho S, Byer KJ, *et al.* Direct AFM measurements of adhesion forces between calcium oxalate monohydrate and kidney epithelial cells in the presence of Ca²⁺ and Mg²⁺ ions. *J Colloid Interface Sci*, 2008, **325**(2): 594–601.
- [17] Kasas S, Wang X, Hirling H, *et al.* Superficial and deep changes of cellular mechanical properties following cytoskeleton disassembly. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2005, **62**(2): 124–132.
- [18] Volle CB, Ferguson MA, Aidala KE, *et al.* Quantitative changes in the elasticity and adhesive properties of Escherichia coli ZK1056 prey cells during predation by bdellovibrio bacteriovorus 109J. *Langmuir*, 2008, **24**(15): 8102–8110.
- [19] Pelling AE, Sehati S, Gralla EB, *et al.* Local nanomechanical motion of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, 2004, **305**(5687): 1147–1150.
- [20] Cross SE, Jin YS, Rao JY, *et al.* Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nat Nanotechnol*, 2007, **2**(12): 780–783.
- [21] Suresh S. Elastic clues in cancer detection. *Nat Nanotechnol*, 2007, **2**: 748–749.
- [22] Li QS, Lee GY, Ong CN, *et al.* AFM indentation study of breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, **374**(4): 609–613.
- [23] Dulińska I, Targosz M, Strojny W, *et al.* Stiffness of normal and pathological erythrocytes studied by means of atomic force microscopy. *J Biochem Biophys Methods*, 2006, **66**(1-3): 1–11.
- [24] Hsieh CH, Lin YH, Lin S, *et al.* Surface ultrastructure and mechanical property of human chondrocyte revealed by atomic force microscopy. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008, **16**(4): 480–488.
- [25] Liao WT, Zhong LY, Cha QB, *et al.* Observation of the activation of human peripheral blood lymphocytes with atomic force microscopy. *Laser J*, 2006, **27** (5): 89–90.
廖问陶, 钟丽云, 查庆兵, 等. 人外周血淋巴细胞体外刺激活化的原子力显微镜研究. *激光杂志*, 2006, **27**(5): 89–90.
- [26] Brochu H, Vermette P. Young's moduli of surface-bound liposomes by atomic force microscopy force measurements. *Langmuir*, 2008, **24**(5): 2009–2014.