中国科学 C辑:生命科学 2008 年 第 38 卷 第 11 期: 1013 ~ 1027
www.scichina.com life.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

红细胞膜弹性特性的 AFM 力曲线测量

杨谦, 孙润广*

陕西师范大学物理学与信息技术学院, 生物物理学与生物医学工程实验室, 陕西 710062

* 联系人, E-mail: sunrunguang@snnu.edu.cn

收稿日期: 2007-12-26; 接受日期: 2008-04-21

国家自然科学基金(批准号: 20772077)和教育部科学技术研究重点项目(批准号: 104167)资助

摘要 人血红细胞生存环境的微小变化都会直接影响到膜骨架蛋白网络形变和细胞膜弹性力学性能的改变. 利用原子力显微镜力曲线测量红细胞膜表面弹性, 根据相关力-距离曲线图谱信息, 分析活性红细胞在不同生理溶液环境中细胞膜弹性、黏附性与渗透脆性等变化特征. 实验结果表明, 经不同生理溶液制备的红细胞在维持其渗透压平衡条件下, 细胞形态特征基本正常, 直径约 7~8 μm. 当力曲线图谱表征的膜弹性等力学特性, 波动较大且差异明显时, 形变恢复作用力变化范围为 30~150 pN, 黏附力变化范围为 3.9~35 nN. 尤其是在探针接近和撤离膜表面过程中, 不同程度的多峰锯齿波、压痕深度、黏滞拖拽线程和链状伸展形式的相关力曲线图谱, 表征细胞膜表面存在着复杂作用力. 在无Ca^{2+}/Mg^{2+}的D-PBS缓冲液中, 通过调节Na^{+}, K^{+}浓度, 改变生理溶液渗透压, 红细胞形变显著, 出现棘轮状、球形和血影空囊等形态, 对应的细胞膜弹性等力曲线图谱信息也相对更为复杂. 研究表明红细胞膜弹性特性和膜骨架形变都与生理环境中的溶质(糖类与晶体电解质等)、浓度和渗透压等因素有直接关系. 这为深入了解生物膜的结构和动力学提供了证据, 也为原子力显微镜应用于红细胞膜病的临床诊断提供了依据.

关键词
原子力显微镜
红细胞膜骨架
力曲线
双电层力
黏附力

人血红细胞的弹性形变是多年来的研究热点, 这主要与红细胞膜特殊的生物物理特性有关. 首先, 红细胞具有相对简单的结构[1,2], 为定量分析生物膜结构的形变提供了一个良好模型, 能够避免真核细胞类膜系统的相对复杂性. 其次, 液晶态质膜结构和内表面嵌套的膜骨架蛋白网络, 不仅能维持红细胞独特的双凹圆盘形态, 还使细胞膜具有伸缩弹性和柔韧变形功能, 对仿生学的合成研究有潜在的应用价值. 尤为重要的是, 临床研究表明, 红细胞变形能力异常是一些疾病发病机理和病程发展中的关键环节, 如癌症、疟疾、遗传性贫血症、心脑血管病和血循环系统障碍等红细胞膜病[3~6]. 膜骨架形变能力可能直接与红细胞生存环境和细胞膜弹性的调控机制有密切关系. 因此, 许多理论性、实验性和计算模拟性研究都重点集中在阐明红细胞膜弹性特性上[7~10].

红细胞膜弹性特性是研究红细胞微观力学与血液流变特性的基础[11], 反映了红细胞在循环血流中经受毛细血管挤压、脏器壁剪切和心脏瓣膜涡流冲击的变形性、柔韧性与可塑性. 值得注意的是, 红细胞要完成供氧使命, 血液环境的轻微变化, 如血管舒张压、血浆黏稠度、组织液pH和细胞渗透压等, 都会激起红细胞膜弹性、膜蛋白功能、胞内液黏度和细胞几

何形状等特性的显著响应, 使得红细胞形变明 显[12].

目前, 研究红细胞膜力学特性的单分子技术主要有激光光镊、微针和原子力显微镜(atomic force microscopy, AFM). 光镊是应用高斯光束汇聚的激光势阱囚禁红细胞, 并对其产生线性牵引力, 测量红细胞弹性伸缩的变形能力和膜结构恢复的快慢程度[10,13,14]. 在液态生理环境下它能够对红细胞实现动态捕获和实时观测. 微针是利用负压吮吸松软的细胞膜形成伸展突起, 突起程度与负压相关; 随负压改变, 膜松弛率与剪切黏度相关, 即利用剪切弹性模量表征细胞膜的黏弹性和变形性[15,16]. 原子力显微镜是预先对探针进行分子修饰, 在空气或液态环境中利用探针感应细胞表面特异性标记区域, 实现测量红细胞变形性与膜表面亲和力, 细胞膜溶胀压、剪切力和膜蛋白间特异性识别结合力与自由能的关系等[17,18]. AFM是目前仅有能够在高分辨率条件下, 对活细胞实时成像并测量分析的单分子技术. 它填补了电子显微镜真空条件不能实现实时分析的空白, 避免了光镊技术对生物样品产生热效应和布朗运动等带来的干扰因素, 也在一定程度上克服了微针操控时负压可能对细胞表面造成损伤以及成像分辨率有限等缺陷. 文献报道[19~21], AFM测量分子或原子级的作用力伸展范围(0~1 nN)比激光光镊(<500 pN)大很多, 同时它比微针技术更为精确. 用原子力显微镜力曲线测量表面弹性特性是近年来形成的一种行之有效的新方法. 但到目前为止, 有关用原子力显微镜力曲线测量红细胞膜表面弹性, 根据相关力-距离曲线图谱信息, 分析活性红细胞在不同生理溶液环境中细胞膜弹性、黏附性与渗透脆性等变化特征的研究工作尚未见报道.

本文主要是利用原子力显微镜力曲线对不同生理溶液制备的活性红细胞膜进行弹性特性研究. 根据红细胞在不同生理环境下具有不同渗透压、黏附性等特征, 通过改变生理溶液中相关溶质参量, 量化地分析探针与形变后红细胞膜表面的相互作用力, 利用探针在正常形态红细胞膜表面获取对应的力图谱曲线信息. 实验结果表明, 不同程度的多峰锯齿波、压痕深度、黏滞拖拽线程和链状伸展形式的相关力曲线图谱表征自然态或变形态的细胞膜表面存在着复杂作用力, 并且膜表面的恢复弹性、黏弹性和刚性等力学特性差异明显. 红细胞膜弹性特性和膜骨架形变都与生理环境中的溶质(糖类与晶体电解质等)、浓度、渗透压等因素有直接关系. 这为深入了解生理环境下生物膜如何进行结构动力学的自稳平衡提供了机会, 也为进一步探究红细胞膜病与体液环境之间的诱因关系提供了实验依据[12].

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

NaCl, KCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$, Na_2HPO_4, NaH_2PO_4, KH_2PO_4, 葡萄糖, 腺嘌呤(上海山浦化工有限公司)、肝素(北京奥博星生物技术有限责任公司)、肌苷(Sigma), Hepes (Sigma), BSA白蛋白(Sigma), EDTA-Na_2 (Sigma), 多聚赖氨酸(Sigma). 实验所用其他试剂均为分析纯.

高速离心机为日本日立公司(CF16RX, HITACHI Corporation), 荧光倒置显微镜为日本奥林巴斯公司出品(OLYMPUS IX71), 原子力显微镜为日本岛津公司出品(SPM-9500J3, SHIMADZU Corporation). Si_3N_4 材质V-型探针(OLYMPUS OMCL-TR800PSA-1), 悬臂长度 200 μm; 弹性常数 0.12 nN/m.

1.2 生理缓冲液制备

0.9%灭菌生理盐水. 5%静脉注射葡萄糖溶液. 生理血浆缓冲液(pH 7.4). 参照文献[14]的配置方法并加以改进. 该缓冲液组成是 100 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Hepes缓冲液(pH 7.4), 25 mmol/L葡萄糖, 5 mmol/L KCl, 3 mmol/L $CaCl_2$, 2 mmol/L $MgCl_2$, 0.1 mmol/L 腺嘌呤, 0.1 mmol/L 肌苷, 1% (体积)血浆, 0.25%~1.5% BSA白蛋白, 5 U/mL 肝素. 无Ca^{2+}/Mg^{2+}的D-PBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline)缓冲液(pH 7.4), 配制 138 mmol/L NaCl, 2.67 mmol/L KCl, 8.1 mmol/L Na_2HPO_4, 1.47 mmol/L KH_2PO_4. 实验所用试剂均为分析纯.

1.3 红细胞制备

新鲜人血始终由同一健康供血者提供, 每次实

验采血量 2~4 mL, EDTA-Na_2作为抗凝剂. 放入高速冷冻离心机中, 4℃, 2000 r/min离心 10 min, 使红细胞沉淀, 收集部分血浆保存备用. 为避免膜上含有或吸附的蛋白酶使膜蛋白发生变化, 整个制备过程均在冰浴条件下进行. 无菌标准注射器(1 mL)将沉淀于红细胞表层白色蓬松状漂浮物和沉淀层吸尽, 以避免其他类型细胞混入. 每次实验取上述 4 种生理缓冲溶液中的一种进行预冷, 然后取 0.5 mL红细胞沉淀, 缓慢轻轻沿离心管壁将红细胞置于离心管内 3 倍体积量的上述同种预冷生理缓冲液界面上, 保持红细胞缓慢扩散悬浮. 1000 r/min, 4℃, 离心 10 min, 每次除去上清液及沉淀表层白色绒毛, 重复洗涤 3 次. 最后将洗涤后的红细胞悬浮液 4℃冰箱冷藏, 静置待用. 每次制样红细胞冰浴保存时间不超过 3 天.

1.4 AFM 观测样品的制备

云母片剪成 8 mm×8 mm 的小方片, 轻轻解离, 直到露出新鲜平整的光面. 用多聚赖氨酸对新鲜剥离的云母做预处理. 首先用 95%无水乙醇浸泡 1 min 后, 取 5 mg/mL 多聚赖氨酸 20 μL 滴加在云母新解离面, 表面稍作倾斜展平水膜, 2 h 后用蒸馏水连续冲洗 20 s, 严格控制时间. 然后斜立于滤纸上, 干燥 15 min. 将实验所用缓冲液(同种红细胞制备液)从冰箱中取出, 室温中恢复 1 h 左右, 调节校正 pH. 磁性金属载样片上黏贴 5 mm×5 mm 双面胶, 将已处理的云母基底轻轻平黏到双面胶上. 取 10 μL 待测的稀释后活性红细胞悬浮液直接滴于基底表面, 沿着一个方向平铺, 用滤纸吸去多余液. 室温条件下, 湿度 75%恒定, 静置 5 min 后 AFM 观测.

1.5 力-距离曲线的测量原理与方法

AFM是利用一束低功率激光聚焦到一弹性微悬臂梁前端, 其端部为非固定端, 正下方沉积锐利针尖, 通过探针尖在待测样品上进行光栅式扫描(通常是三维压电扫描器带动样品沿水平方向移动), 探测器接受探针偏移量对应的反射激光光强差来获取样品表面形貌信息. 随后, 立刻释放探针, 离开在线测量模式, 进入离线状态力曲线测量阶段, 改变三维压电扫描器运动方式, 设定扫描频率或速率, 使样品相对探针沿垂直方向上下往复移动, 探针尖与样品表面间存在相互作用力, 其复杂变化会引起微悬臂在垂直轴向的轻微偏移, 反射激光光斑位置移动量转换为激光垂直电压差与微悬臂偏移量的对应关系, 作为样品与针尖相互作用力直接表征. 通过收集样品表面上作用力图谱信息来研究样品的生物物理特性. 当AFM探针沿接近、接触并撤离的路径在待测样品表面某一微小区域进行垂直轴向相对运动时, 探针和样品间会因距离变化而相互施加作用力, 产生力-距离图谱曲线, 简称力曲线[22~25].

力曲线的不同部位能够提供丰富的信息. 图 1 中横坐标代表探针与样品间距离或探针到样品间相对位置, 而纵坐标代表探针与样品间作用力或微悬臂偏移量. 整个力曲线周期性图谱是从横轴右侧开始向左行进, 继而返回右侧结束. 完整力曲线图谱中心点位置会随探针无载荷时的起始点(零力线)与探针撤离样品表面后最大偏移点的垂直坐标自动定位. 首先, 探针尖与样品的作用力遵循胡克定律, 是微悬臂弹性力的表征. 当探针接近样品时(A-B段), 因受到样品表面电荷吸引, 微悬臂由初始无载荷状态逐渐向下弯曲; 随着相对距离逐渐减小, 出现吸引力超过弹性力瞬间而位移尚未发生改变时刻, 探针尖发生突跳直接与样品表面接触(B). 随后, 样品与探针一同向微悬臂初始状态位置移动, 相对位移和作用力都降到最小. 当样品继续垂直向上运动时, 微悬臂因受到样品斥力作用而朝上翘起, 此时探针尖可能压入样品内部, 样品表面发生形变(B-C段). 前进接触部分的力曲线能够体现样品表面一些作用力, 包括范德华力、静电力、溶剂化作用、水化作用, 而跳触点反映了样品对探针的黏附力大小[26].

当探针运行到整个测量周期的后退撤离阶段时, 样品表面为恢复形变具有离开探针尖的撤离趋势, 但样品对探针尖黏附力比微悬臂弹性力大, 针尖仍处于接触区域. 微悬臂继续随样品下行并受样品表面的黏附拖拽而弹性力逐渐增加(C-D 段). 当样品相对探针尖距离逐渐增大, 出现弹性力超过黏附拖拽力的瞬间而位移还未变化时, 探针尖再次发生突跳与样品表面完全脱离(E). 跳离点距零力线的线程表征样品表面黏附弹性大小. 当探针从样品上收回时,

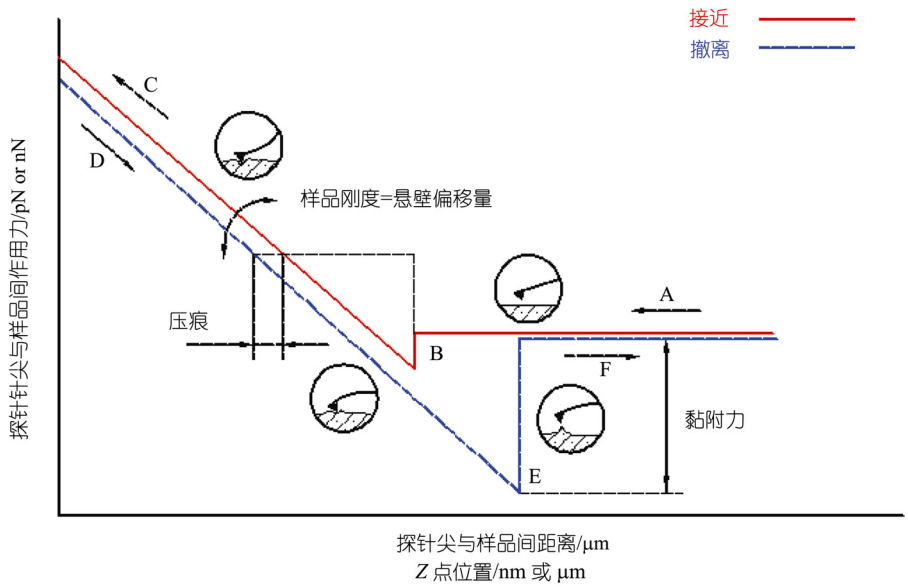


图 1　AFM 探针单次接触-释放循环过程的力曲线示意图

后退撤离部分图谱线形经常表现出拖拽滞后现象, 能够直接从中获得有关样品柔韧性、黏弹性、黏滞性和分子特异性识别等信息. 这些信息可用于评估样品表面能和配体间约束力[27], 分析细胞膜上附连体的表面弹性与刚度和表面大分子拉伸形变量和物理化学(表面疏水性)等特性. 对于长而柔软的分子而言, 吸引力归为伸展形变力, 可能是大分子伸展产生非线性黏弹性特性的表现. 利用力-距离曲线可以获得样品的弹性、静电性、磁性和黏滞性等方面的信息, 涉及到分子间不同的相互作用力, 如范德华力、静电力、磁力、双电层力、疏水力、溶剂力、水合力和空间/交联作用力等[28].

1.6　AFM 力曲线测量红细胞膜弹性特性的实验方法

利用AFM以在线方式对样品进行成像扫描, 并采用离线方式进行力曲线测量. 整个实验过程均严格保持在室温条件, 空气相对湿度 75%恒定的环境腔中进行. 该原子力显微镜已安装V-型Si_3N_4探针, 标定悬臂长度为 200 μm, 弹性常数为 0.12 nN/m, 金字塔形针尖高度 2.9 μm, 曲率半径估计值为 50 nm. 以接触模式中的恒力方式扫描成像, 扫描频率控制在 0.5~2 Hz.

进行力曲线测量活性红细胞膜弹性时, 在力曲线测量对话框中选择悬臂列表, 设定与机型匹配的Z轴压电型号为 21.4 nm (SPM)、信号显示方式为竖直. 设置列表中选择与成像扫描匹配的扫描器参数(x–y=125 μm, z=8 μm扫描范围), 相应悬臂弹性系数、力曲线轴向坐标参量值等. 力曲线列表中预设定相关参量：扫描频率 1 Hz, 图像捕捉重复 8 次, 灵敏度×1, 同时标记探测位点坐标. 通过AFM探针沿快进、慢进、接触、按压、释放和停止流程, 对红细胞膜表面同一半径环面上对称位点进行测量. 动态测量过程中随时调节力曲线列表内扫描样品与悬臂间的终点位置与探针的位移宽度范围, 以此捕捉样品与悬臂间的起始点, 从而确保力曲线图谱的完整有效性. 采用探测频率 1 Hz, 针尖的线性速率为 1, 2 或 4 nm/ms, 对至少 15 个以上具有 20 个压痕点的红细胞表面进行力曲线弹性特性的测量, 每点进行 8 次力图谱捕捉成像. 记录AFM探针和细胞间的相互作用力, 统计分析力曲线图谱中的压痕深度、弹塑性形变恢复程度和黏附力大小等信息. 当AFM探针接触到活性红细胞表面时, 膜表面的弹性恢复特性经常在力谱图中表现为前进线与后退线间的跨度, 即压痕深度, 对应膜形变恢复作用力[26]. 两曲线曲率大小表征膜

表面柔软或刚性程度. 而后退曲线经常表现出拖拽拉伸现象, 例如黏附波峰群呈非线性变化, 表明探针持续受到样品表面的吸引力, 根据拖拽伸展程度的不同则反映出细胞膜表面的黏弹性状况.

2 结果与分析

2.1 AFM 观测生理血浆缓冲液中的活性红细胞微观结构

正常红细胞膜表面柔顺光滑, 形态为双凹或单凹圆盘状, 直径约 7.5 μm, 厚度 1.7 μm, 体积 83 μm^3, 表面积 145 μm^2, 表面积与体积比值较大, 有利于细胞变形、气体交换和携带.

目前, 临床医学上规定血浆渗透压浓度正常范围是 280~310 mmol/L, 血浆渗透压的通用公式为: 血浆渗透压(毫渗量)=2×[血钠(mmol/L)+血钾(mmol/ L)]+血糖(mg/dL)/18+非蛋白质(mg/dL)/6(或尿素氮/2.8). 体液中溶质浓度单位都为 mmol/L, 无论是电解质还是非电解质, 只要浓度相等则渗透压相等. 体液渗透压等于体液各种物质的物质的量浓度相加. 当细胞内液与细胞外液渗透压相等时, 红细胞在血浆正常范围内生存环境属等渗溶液. 若低于此范围溶液为低渗溶液, 反之则为高渗溶液.

利用AFM观测生理血浆缓冲液制备的活性红细胞微观结构, 其膜表面粗糙, 具有规则细微结构. 表面均匀分布高度约 1.5~5 nm错落有致的下陷孔洞(宽度 25~40 nm)与隆起缓坡(宽度 30~50 nm),二者呈网格交织排列(图 2 和 3). 推测可能是细胞膜蛋白、结合蛋白或电解质分子在细胞质膜表面上的堆积, 也可能是膜上功能性通道或细胞膜镶嵌的内衬膜骨架[29], 有待进一步对细胞膜骨架及其力学特性进行研究.

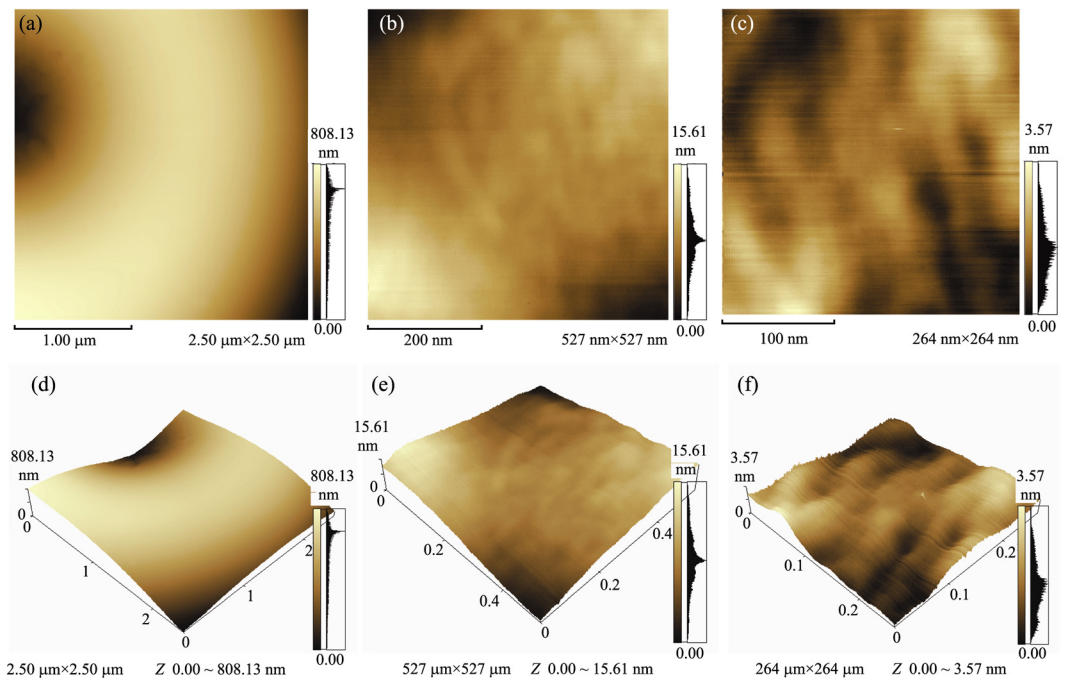


图 2 红细胞膜的 AFM 形貌扫描图

(a)~(c) 形貌扫描二维图. (a) 扫描范围 2.50 μm×2.50 μm, 扫描频率 1.0 Hz; (b) 扫描范围 527.00 nm×527.00 nm, 扫描频率 0.8 Hz; (c) 扫描范围 264.00 nm×264.00 nm, 扫描频率 0.5 Hz. (d)~(f)分别为对应(a)~(c)的扫描成像三维图, 对应细胞膜表面最大成像高度, (d)~(f)分别显示为 808.13, 15.61 和 3.57 nm

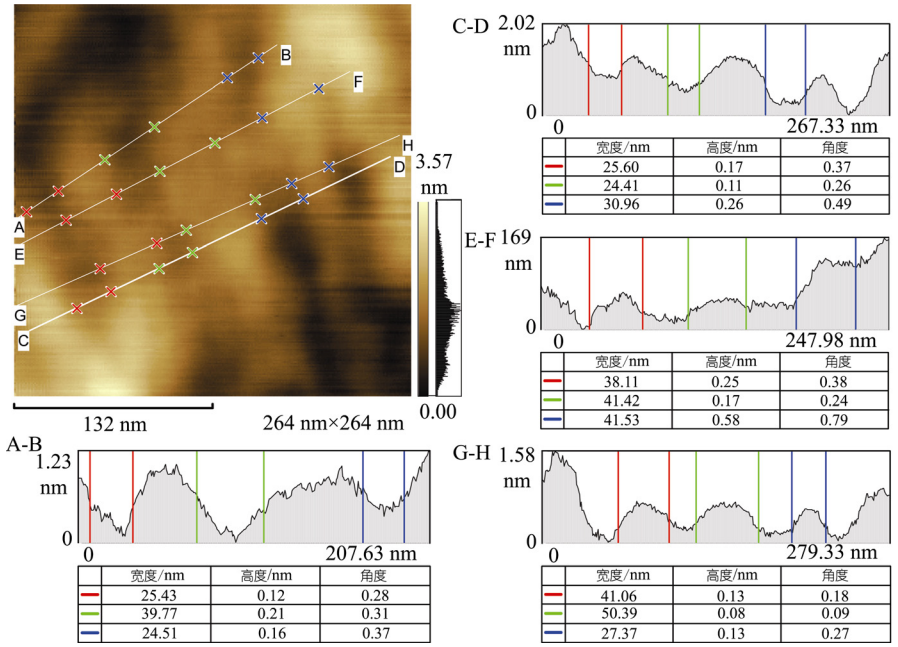


图 3 红细胞膜表面细微结构

膜表面均匀分布下陷孔洞(宽度 25~40 nm)和隆起缓坡(宽度 30~50 nm), 前者由测量线 A-B, C-D 段表征; 后者由测量线 E-F, G-H 段表征. 二者呈规则地网格交织排列

2.2 力曲线测定经生理盐水制备的活性红细胞膜弹性

实验过程中, 0.9%生理盐水制备的红细胞经 AFM 扫描成像, 发现膜表面有损伤, 膜内溶物向外渗透, 膜出现皱缩形变现象, 处于轻度高渗状态(渗透压约为 308 mmol/L). 对生理盐水进行一系列梯度制备, 当溶液浓度为 0.8%~0.85%属等张缓冲液时(溶液渗透压范围为 273.50~290.60 mmol/L), 红细胞维持正常形态, 平均直径测量值为 d=(7.49±0.12) μm, n=50; 膜轮廓较为清晰, 但膜表面有局部微溶胀现象, 并且黏附电解质晶体颗粒(见图 4(a)和(b)).

图 4(c)是实验测得力曲线图谱. 当探针接近细胞表面时, 线形相对平直, 无非线性锯齿状波形, 此时接近线近乎处于无载荷零力状态. 出现突触点, 但线程很短, 表明探针与膜表面接触瞬间范德华力与疏水作用力很弱. 探针接触膜表面过程中前进线与后退线的力图谱中均存在很多微小的锯齿波纹, 推测细胞膜表面存在水膜层, 固液界面间可能存在双电层力. 这主要是由于电解质溶液对膜表面的电荷密度分布有影响, 同时考虑到功能性膜蛋白的位点电荷不均匀分布, 造成膜表面存在异质性的非等势电

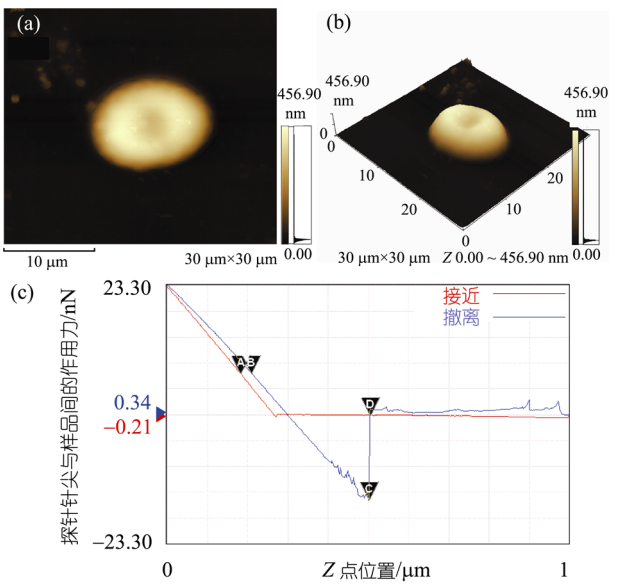


图 4 经 0.85%生理盐水制备的红细胞 AFM 扫描图像

(a) 细胞二维形貌图; (b) 细胞三维形貌图. 扫描范围: 30.00 μm×30.00 μm, 扫描频率, 2.0 Hz. (c) 红细胞膜表面采点测量的力曲线图谱

位. 探针在嵌入细胞膜过程中, 接触部位始终存在非连续的相层电势差, 力谱线出现动态锯齿波形. 根据嵌入距离, 可比较出细胞膜柔软, 形变弹性良好. 探针在样品上压痕深度平均约为 27.34 nm, 对应数据显示该点膜表面形变恢复作用力平均约 31.56 pN. 同时, 压入过程力谱线表现出连续线性变化, 可推测细胞膜表面发生非完全弹性形变, 膜是弹塑性复合体. 但值得注意的是, 在探针跳离样品前后, 力谱图首先呈现无规则剧烈波动然后突然跳离, 跳离线程较大, 约为 121.30 nm, 对应的黏附力 14.56 nN, 表明细胞膜具有良好的黏弹性. 然而, 回归力谱线高于零力线, 并且偶尔有尖锐峰出现, 估计可能是探针压入膜表面过程中, 将部分液态电解质分子黏附到探针尖上并带离膜表面, 造成探针与样品间静息电位发生改变, 作用力曲线中残存一定的外加斥力, 探针并未完全恢复到零载荷状态.

2.3 力曲线测定经 5%生理葡萄糖溶液制备的红细胞膜弹性

光学显微镜检测 5%葡萄糖溶液中的悬浮红细胞, 细胞形态正常, 分散性良好. 经计算 5%葡萄糖溶液渗透压约为 277.78 mmol/L. AFM 扫描成像见图 5(a)和(b)所示, 观测到红细胞形态基本对称, 双凹或单凹区域较为明显. 个体细胞表面均无颗粒沉积, 膜表面圆滑, 细胞间黏附现象明显, 黏附细胞边缘均有微小堆皱. 统计测量细胞平均直径约为(7.58±0.16) μm, n=50.

对单个独立细胞最高环面上重复采点进行力曲线测量. 由图 5(c)相关力图谱信息可知, 探针与细胞膜表面存在明显突跳点, 表明二者间具有一定的分子吸引力, 大小 2.65 nN. 探针在整个接触过程中, 前进线与后退线跨距明显, 线形略微上弯成曲线. 探针对细胞膜表面的压痕深度为 30.65 nm, 对应的膜发生局部形变恢复力大小为 123.83 pN, 这表明细胞膜柔软并富有弹性. 最令人意外的是, 整个后退线出现平滑过渡长弧线, 造成跳离点线程很大, 统计平均为 278.7 nm, 对应的黏附力约为 34.15 nN. 这表明葡萄糖溶液中红细胞膜具有强黏弹性, 使得探针脱离膜表面时持续受到拖拽黏滞力. 推测可能是葡萄糖溶液本身黏度, 使膜表面过度糖基化修饰甚至受到糖衣包裹, 造成探针与样品间静电场势增强, 相互吸引力增大. 因为流动态细胞膜中带 4.1 蛋白的 N 端 30 kD

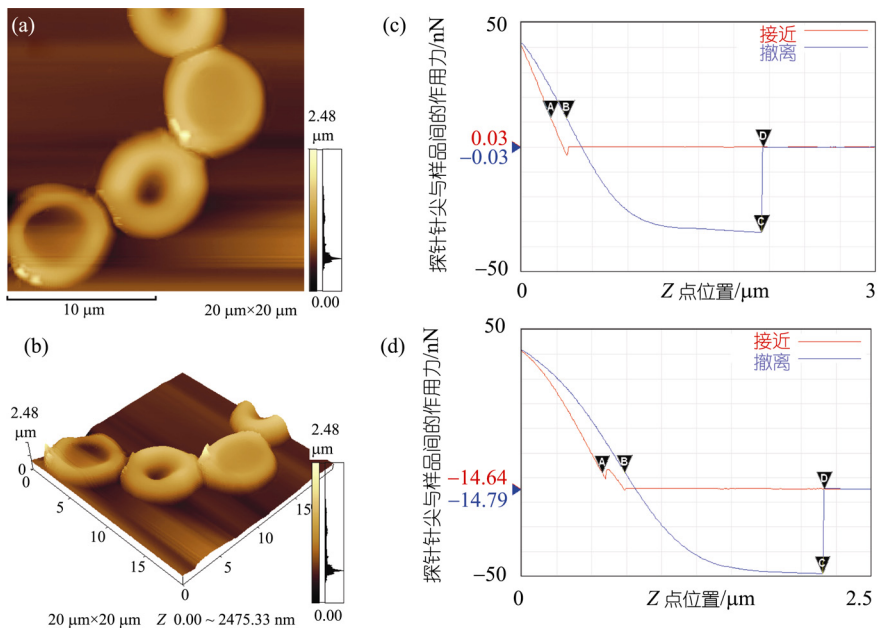


图 5 经 5%生理葡萄糖溶液制备的红细胞 AFM 扫描图像

(a) 细胞二维形貌图; (b) 细胞三维形貌图. 扫描范围: 20.00 μm×20.00 μm, 扫描频率, 1.0 Hz. (c) 红细胞膜表面采点测量的力距离曲线图谱; (d) 红细胞中央凹陷区采点测量的力曲线

区在生理状态下带正电荷, 而与它相互作用的血型糖蛋白带负电荷, 二者结合增强了质膜的静电稳定性. 膜骨架蛋白中重要的带 3 蛋白, 是主要的跨膜蛋白, 其N端深藏于膜内胞浆中, C端延伸到红细胞膜外, 具有多个结合位点可被糖基化修饰. 锚定蛋白作为链接载体将带 3 蛋白与血影蛋白相互结合, 就使得骨架蛋白与质膜相连. 当膜表面被过度糖基化修饰或形成糖衣时, 整个细胞保持高度稳定状态, 细胞膜虽柔软有弹性, 但本身膜表面负电荷状态发生改变, 细胞间容易黏附造成膜通透性降低, 形变能力变弱, 细胞识别反应迟钝. 尤其是在红细胞中央凹陷区内采点测量, 图 5(d)力曲线图谱中出现突触点反弹现象. 这表明此时探针受到膜表面是较强排斥力而非黏附吸引力, 膜上静电荷促使探针瞬间上翘并再次缓冲接触, 证明膜上糖蛋白或糖衣的存在为抵抗外力干扰自身膜结构具有保护功能[23,30].

2.4 力曲线测定经生理血浆溶液制备的红细胞膜弹性

血浆对红细胞内环境的某些理化性质变化具有一定“缓冲”作用. 本实验是模拟红细胞的生理环境, 并进行 AFM 表面形态学观测, 从图 6(a)和(b)中获得信息: 红细胞形态完整、轮廓清晰、无电解质颗粒的黏附、中央凹陷明显、膜表面柔润平滑、弧度流畅、富有光泽. 经统计测量细胞平均直径为(7.34±0.21) μm, n=50. 由图 6(c)可知, 探针接近细胞膜表面时, 存在突触点, 表明此刻微悬臂弹性系数较大, 膜表面对探针存在原子级范围的作用力, 弹性力接近探针与样品间的吸引力. 首先, 对红细胞最大高度环面上采点测量, 探针压痕较浅, 约 15.12 nm, 表明细胞膜黏附弹性形变程度不大, 可能膜表面具有剪切张力. 但是对应的膜形变恢复力平均约为 149.57 pN, 细胞在膜骨架的内衬下仍近似为弹性体. 更有趣的是, 探针在撤离样品表面时力图谱呈现自然弯曲, 跳离点前后连续出现柔性降序波线, 探针跳离瞬间线程较大, 为 120.9 nm, 次级波动线程依次约为 17.35 和 25.03 nm. 此刻受到的膜弹性最大黏附力为 14.28 nN. 表明探针与样品间存在多重黏附结合点, 随着间距增大, 多股黏附会逐渐递减为单股黏附直至探针完全脱离膜表面. 探针与细胞膜 之间可能有分子特异

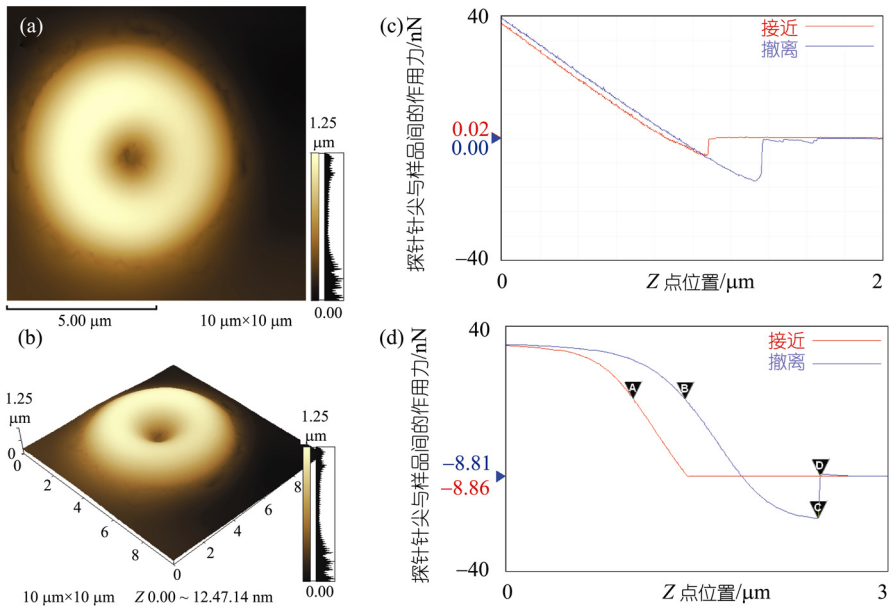


图 6 经生理血浆溶液制备的红细胞 AFM 扫描图像

(a) 细胞二维形貌图; (b) 细胞三维形貌图. 扫描范围: 10.00 μm×10.00 μm, 扫描频率, 1.0 Hz. (c) 红细胞膜表面最大高度环面上采点测量的力距离曲线图谱; (d) 红细胞中央凹陷区采点测量的力曲线

性相互作用力, 膜表面存在能级跳跃势阱. 细胞膜为维持自身完整性与减少膜损伤, 弹性形变的修复过程往往采取逐级缓冲释放[31].

其次, 在细胞中央凹陷区域得到的力图谱更具有特点(图 6(d)), 探针压痕很深, 约 410.35 nm, 膜形变恢复力为 281.55 pN, 致使微悬臂在其弹性形变范围内的最大偏移点受力不随位移变化. 推测可能是由于细胞膜表面非常柔软, 探针持续下陷, 造成细胞膜骨架局部受力发生构型改变, 出现流动膜层空穴, 致使膜弹性形变超过探针绕度范围, 膜压痕还未恢复原形时探针受水膜界面毛细管力而保持恒定. 探针在整个后退过程中再次与膜上黏附位点发生吸引, 移动拖拽距离超过膜张力范围, 为维持膜层完整并弥补空穴, 周围膜骨架重组构型产生突起以适应外来的机械牵引. 探针跳离瞬间线程较大, 经统计平均约为 115.31 nm, 此刻受到弹性黏附力为 13.84 nN. 推测生理环境下活性红细胞为实现其正常的新陈代谢功能, 膜表面紧致而有弹性, 黏附但不黏滞. 外围膜骨架采取有效自我调控机制优化空间结构, 中央凹陷区域保持低能损耗态势, 膜骨架的局部解离与装配也以最低能耗、最快路径进行, 都是为扩大自身表面积做准备.

2.5 力曲线测定等渗无Ca^{2+}/Mg^{2+}的D-PBS缓冲液制备的活性红细胞

光学显微镜检发现PBS等渗缓冲液中的红细胞维持正常形态. 经计算得到这种无Ca^{2+}/Mg^{2+}的D-PBS缓冲液其渗透压为 292.38 mmol/L, 属于等张溶液. AFM观测红细胞形貌的扫描成像图(图 7(a)和(b))显示细胞呈现双凹圆环状, 且中央凹陷区域面积较大, 凹陷程度较深. 细胞平均直径为(7.31± 0.15) μm, n=50. 细胞边界有微小絮状物聚集, 细胞膜表面有轻度变形, 存在不对称隆起.

图 7(c)是探针测量红细胞最大高度环半径上膜表面作用力图谱. 当探针与样品接触瞬间出现跳触点, 随后是连续非线性锯齿抖动波形. 在样品表面接触的探针其前进线与后退线均存在微小幅度的锯齿波纹, 两线型具有微小下倾弧度. 探针压痕深度约为 23.74 nm, 膜形变恢复力平均为 137.64 pN. 表明膜表面最初受到探针接触有扰动现象, 相互作用力处于动态平衡调节状态. 可能由于细胞中央凹陷程度较深, 造成细胞骨架支撑膜外周环的空间增加, 膜边缘隆起弧度明显, 致使红细胞膜具有一定刚性特征. 但是相应的弹性作用力表明膜仍具有正常的恢复性能. 并且在跳离点前后撤离线呈柔性非光滑圆弧曲线, 最大跳离线程约为 114.36 nm, 弹性黏附力为 12.07 nN. 这表明探针在撤离样品表面时, 细胞膜受到非线性吸引力但无逐级阶梯黏附波线, 细胞质膜结构紧致与探针尖无浸润黏滞性, 整个细胞的黏弹性相对良好.

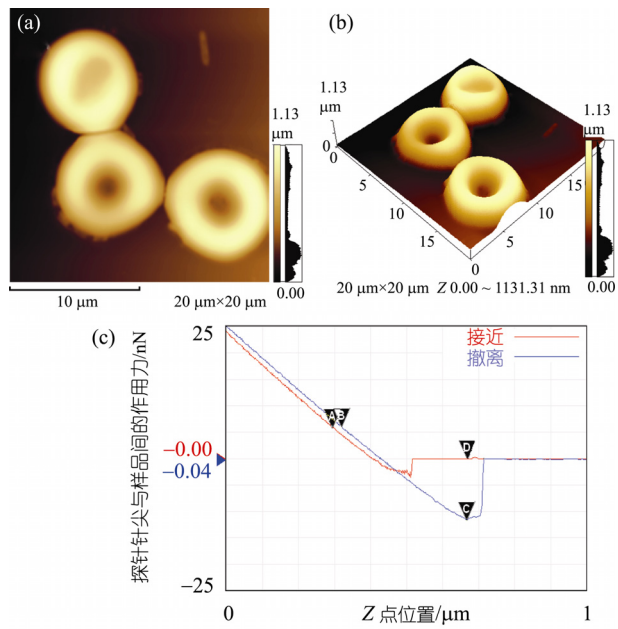


图 7 经无Ca^{2+}/Mg^{2+}的D-PBS缓冲液制备的红细胞AFM扫描图像

(a) 细胞二维形貌图; (b) 细胞三维形貌图. 扫描范围: 20.00 μm×20.00 μm, 扫描频率, 1.0 Hz. (c) 红细胞膜表面最大高度环面上采点测量的力距离曲线图谱

由于红细胞具有渗透脆性, 细胞膜对不同渗透性的电解质溶液具有一定的抵抗能力. 当红细胞内渗透压与血浆的渗透压基本相等时, 细胞维持正常形状和大小. 但当等渗缓冲液中的Na^+, K^+含量有轻微变化时, 溶液处于高渗、低渗等状态时, 细胞将发生显著形变.

(1) K^+ 浓度变化对红细胞膜弹性特性的影响.

在无Ca^{2+}/Mg^{2+}的等渗D-PBS缓冲液中, 当KCl浓度增大 1 倍, 即为 5.34 mmol/L, 此时溶液渗透压(295.05 mmol/L)虽未明显变化, 仍属于等渗溶液范围. 但是, AFM观测到红细胞边缘轮廓模糊, 中央凹陷半径减小, 细胞高度降低, 约为 1.23 μm. 红细胞膜表面轻度消融, 膜边缘絮状微溶物增多, 膜周围有内容物渗出环带(图 8(a)和(b)).

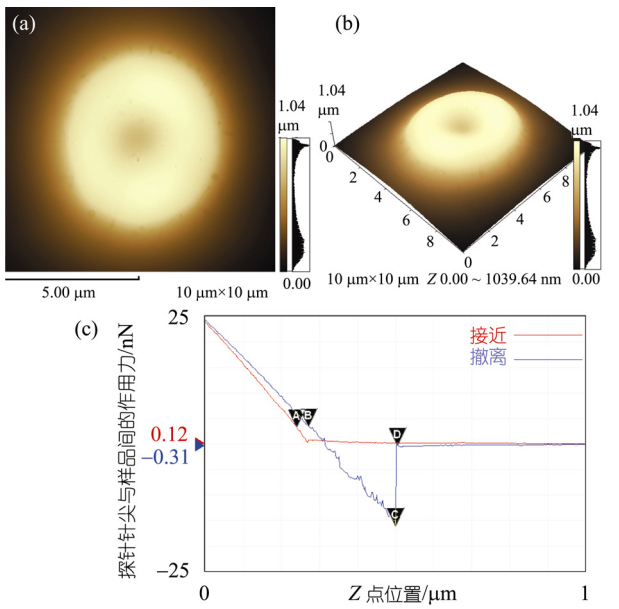


图 8 经无Ca^{2+}/Mg^{2+}的D-PBS缓冲液制备(5.34 mmol/L KCl)的红细胞AFM扫描图像

(a) 细胞二维形貌图; (b) 细胞三维形貌图. 扫描范围: 10.00 μm×10.00 μm, 扫描频率, 1.0 Hz. (c) 红细胞膜表面最大高度环面上采点测量的力距离曲线图谱

力曲线测量图谱(图 8(c))显示, 探针与细胞膜表面接触前后线形呈锯齿波连续平稳变化, 但在后退撤离过程中, 探针与样品间相互作用明显, 力曲线波形持续抖动, 并出现不规则跳跃峰值, 推测这主要是电解质溶液对膜表面电荷密度分布有影响, 固液界面间可能存在双电层力. 而且, 功能性膜蛋白位点电荷不均匀分布, 存在非连续的相层电势差等共同作用的结果. 接触线近乎为直线, 表明膜表面具有刚性特征, 压痕深度较小, 统计平均约为 16.35 nm, 膜表面形变恢复特征不显著, 约为 23.47 pN. 跳离点前后无拖拽迟滞现象, 膜表面略显刚性, 但黏附作用力约为 113.39 nm, 表明膜表面仍具有黏弹性, 黏附力大小为 12.76 nN.

红细胞维持膜内外渗透压恒定, 始终处于膜内高钾低钠与膜外高钠低钾的动态平衡体系. 但是, 膜外过量K^+的存在, 造成细胞膜外K^+超负荷输入而膜内Na^+因输出受阻, 细胞兴奋时因钠离子在膜内过分蓄积而使钠泵活动增强, 泵出钠量明显超过泵入钾量, 使膜内Na^+, Ca^{2+}积聚, 负电荷相对增多, 血红蛋白液晶态发生胶凝相变, 导致蛋白结构异常, 红细胞膜上的肌纤凝样蛋白收缩, 细胞膜的渗透感应位点受阻, 红细胞变硬[8,19]. 同时, 膜外过量K^+聚集导致细胞膜上ATPase酶水解活性降低, 细胞内外离子浓度持续失衡, 跨膜电化学和能量代谢失调、细胞膜损伤、膜内溶物渗出. 继而影响膜脂双层中磷脂分子运动状态、膜蛋白功能和分子运动方式, 最终造成膜流动性下降、红细胞变形性降低、膜弹性减弱、脆性增加[8].

(2) Na^+浓度变化对红细胞膜弹性特性的影响. 无Ca^{2+}/Mg^{2+}的等渗D-PBS缓冲液中, 仅以一定梯度系列改变NaCl浓度时, 红细胞为适应渗透压变化而发生急剧形变, 相应的膜表面作用力复杂而多样.

(i) 对高渗 D-PBS(145 mmol/L NaCl)中的红细胞测定结果. 当 D-PBS 缓冲液中 NaCl 浓度为 145 mmol/L, 此时溶液渗透压为 306.38 mmol/L. 对该环境下的红细胞进行 AFM 扫描成像(图 9(a)和(b))显示, 细胞急剧皱缩, 中央凹形区域基本消失, 膜边缘突起, 呈现棘轮状.

首先, 利用力曲线对红细胞膜同半径的平坦表面环带采点, 图 9(c)力图谱中探针与细胞膜表面接触瞬间跳触点明显, 表明探针与样品间的范德华力与黏附吸引力较强. 接触过程前进线与后退线始终呈现具有微小波纹的下凹曲线, 压痕距离平均约为 18.75 nm, 但是膜表面刚性特征明显, 接近塑性体形变, 平均大小仅仅约为 31.6 pN. 探针压入膜表面位移距离较长, 接触点与跳离点间距较大, 约为 102.4 nm, 表明膜表面仍存在拖拽黏附力, 平均为 13.56 nN. 跳离点近似刚性变化, 探针与样品间无逐级变化锯齿波形, 说明红细胞膜结构紧致, 无浸染黏附特征,

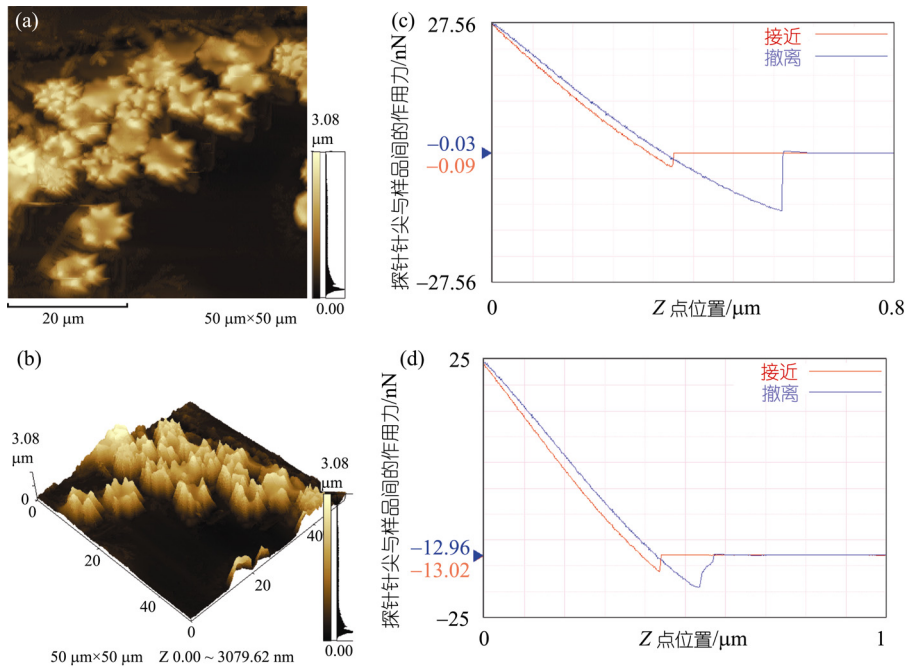


图 9 经无Ca^{2+}/Mg^{2+}的D-PBS缓冲液(145 mmol/L NaCl)制备的红细胞AFM扫描图像

(a) 细胞二维形貌图; (b) 细胞三维形貌图. 扫描范围: 50.00 μm×50.00 μm, 扫描频率, 1.2 Hz. (c) 棘轮态细胞表面平坦区采点测量力曲线图谱; (d) 棘轮突起区域采点测量力曲线图谱

与探针无特异性结合作用. 图 9(d)是对棘轮突起部位测量的力曲线图谱, 接触曲线均出现连续非线性锯齿, 探针压入样品过程中线形陡峭压痕程度小, 平均约为 17.66 nm, 棘轮突起部位膜形变弹力约为 92.17 pN. 跳离前后线程不大, 图谱具有链状逐级递减黏附波形, 约为 52.10 nm, 对应膜表面黏弹性大小约为 6.25 nN. 推测可能是胞内水分大量流失改变膜内外压强, 细胞整体发生皱缩. 而边缘骤变呈棘轮态突起, 是尽可能为细胞中央区域冗余出有限延展空间来维持残存的生理功能, 因此造成膜骨架与质膜密集度增加, 膜表面整体刚性增强, 黏附弹性减弱, 弹性形变能力明显下降.

(ii) 对低渗D-PBS(128.21 mmol/L NaCl)中红细胞测定结果. 当无Ca^{2+}/Mg^{2+}的D-PBS缓冲液中NaCl浓度为 128 mmol/L, 此时溶液渗透压为 272.80 mmol/L. 由AFM扫描图像显示, 红细胞双凹盘面消失、细胞体积急剧膨胀呈球形, 其直径(5.96±0.18) μm, n=50. 个别细胞表面具有突触角, 如图 10(a)和(b)所示.

图 10(c) 是力曲线图谱, 显示球形红细胞仍具有弹塑形变特性, 探针与膜表面接触过程中曲线柔软有弧度, 且压痕较小, 约为 19.5 nm. 膜形变恢复力平均约为 88 pN. 探针受到样品黏附吸引, 跳离线程为 33.21 nm, 作用力大小为 3.96 nN. 但发生跳离前后, 探针近似刚性反弹, 表明细胞膜表面具有柔软弹性, 但膜溶胀后剪切张力和脆性都增加. 图 10(d)对球形细胞表面突触角进行力曲线测量发现, 探针对突触角压痕深度很大, 约 29.64 nm, 形变恢复力较大, 约为 127.33 pN. 但是, 探针跳离瞬间线程小约为 56.39 nm, 对应力为 9.01 nN. 表明突触角表面柔软、有弹性和低黏附性. 推测可能是因细胞膜内压强较高, 突触角部位膜骨架受剪切作用而沿垂直膜表面方向延展, 膜骨架蛋白中交叉复合物构型改变, 肌动蛋白寡聚体丝状中心轴过度悬垂伸展, 六角晶格列阵单体空间重心位点升高. 同时由于溶液渗透压减低, 过量水分进入膜内而内容物向膜外微渗漏时, 因内外流速不同对质膜产生涡流冲击, 诱发细胞膜载体积水通道聚集, 导致细胞膜出现局部快速水内流, 从而

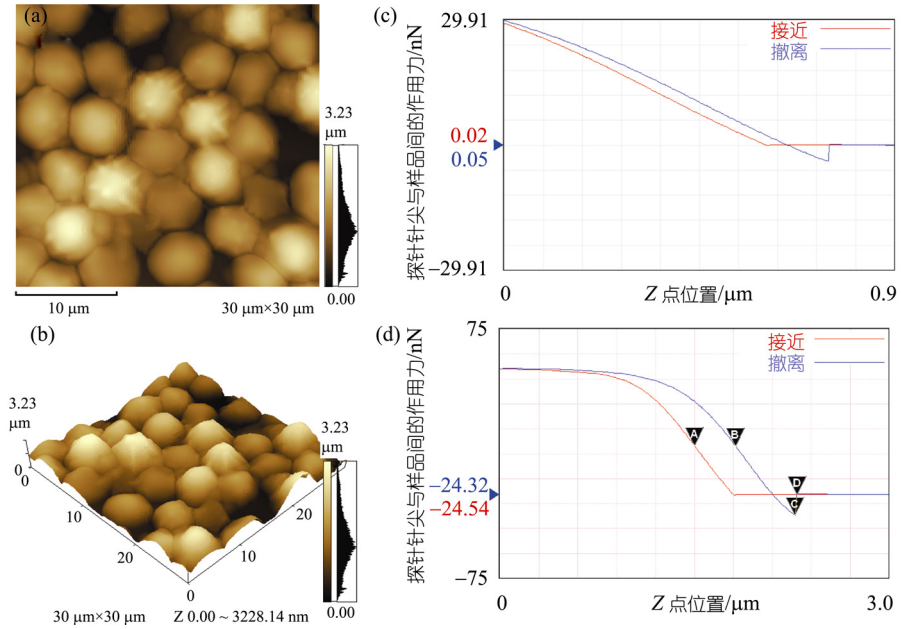


图 10　经无Ca^{2+}/Mg^{2+}的D-PBS缓冲液(128.21 mmol/L NaCl)制备的红细胞AFM扫描图像

(a) 细胞二维形貌图; (b) 细胞三维形貌图. 扫描范围: 30.00 μm×30.00 μm, 扫描频率, 1.0 Hz. (c) 球形红细胞表面光滑区域采点测量力曲线图谱; (d) 球形红细胞突触角采点测量力曲线图谱

促使细胞膜瞬间突起[20], 造成局部质膜无膜骨架内衬而形成柔软突触角.

(iii) 对D-PBS(94 mmol/L NaCl)中红细胞的观测结果. 当无Ca^{2+}/Mg^{2+}的D-PBS缓冲液中NaCl浓度为94 mmol/L, 此时溶液渗透压为 204.38 mmol/L. AFM观测图像(图 11(a)和(b))显示①红细胞膜严重受损, 均呈现凹陷圆盘形膜囊及血影空壳残片, 其直径约为(9.59±0.14) μm, n=50, 高度仅为 39.4~137.55 nm; ②扫描图像中残留单层膜囊, 边缘及膜内部中央区域较高, 发生相互重叠的膜层近乎透明; ③这是由于低渗溶液中红细胞脆性增加, 对周围溶液渗透抵抗能力降低, 水分子大量进入细胞, 使其迅速膨胀后破裂发生溶血; ④血红蛋白逸出溶解到缓冲溶液中致使整个观测背景较暗.

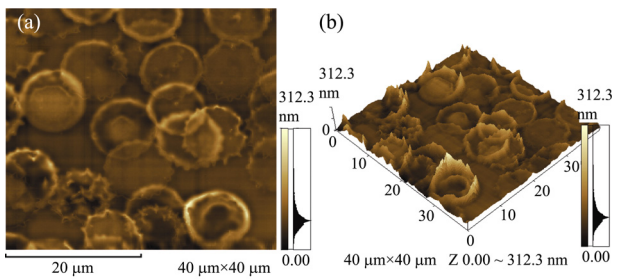


图 11 经无Ca^{2+}/Mg^{2+}的D-PBS缓冲液(94 mmol/L NaCl)制备的红细胞AFM扫描图像

(a) 细胞二维形貌图; (b) 细胞三维形貌图. 扫描范围: 40.00 μm×40.00 μm, 扫描频率 1.0 Hz

3　讨论

人血红细胞膜由磷脂双分子层构成, 其分子C端头部分别伸向胞浆和血浆, N端尾部网状交织, 成为液晶态膜的疏水核心, 有利于细胞膜动态调节胞内外离子平衡和液态营养物质的输送. 在血循环过程中, 红细胞膜受到晶体渗透压与胶体渗透压共同作用. 血浆和体液成分复杂, 主要为电解质、葡萄糖和蛋白质等. 其中属两性电解质又是胶体渗透压必要组分的是蛋白质, 它对渗透浓度影响并不大. 所以, 真正影响体液渗透浓度的物质主要是糖类与晶体性溶质, 特别是离子化溶质微粒, Na^{+}, K^{+}, Ca^{2+}, PO_4^{3-}等. 因胞浆和胞浆中多数晶体物质不易透过细胞膜, 细胞外液晶体渗透压相对稳定对保持胞内外动态平衡尤为重要.

利用AFM对活性红细胞膜弹性特性进行力曲线测量时, 必须考虑不同生理环境中细胞膜的渗透压、黏附性等因素对红细胞特殊膜骨架结构的影响. 细胞骨架是活细胞维持正常生存形态特征的决定因素, 也是表征细胞微观动态机械特性的关键所在. 实验表明红细胞在不同渗透压溶液环境中膜骨架蛋白网络的形变与细胞表面弹性有一定关系[12]. 利用AFM力曲线对不同生理溶液制备的活性红细胞膜进行弹性特性的初步量化分析, 得到形变程度不同的红细胞膜表面弹性恢复特性、黏附弹性等有效信息. 研究结果表明, 分别在 0.85%等张生理盐水、5%葡萄糖溶液、等渗生理血浆缓冲液和等渗无Ca^{2+}/Mg^{2+}的D-PBS缓冲液中制备的活性红细胞, 细胞形态均保持双凹或单凹圆盘状. 经AFM力曲线对上述制备液中的红细胞逐一测量, 发现生理血浆环境对维持红细胞膜形变恢复性能有优势, 尽管探针对膜表面压痕深度相对较小. 同时该生理血浆缓冲液中红细胞膜弹性恢复特性因测量位点不同而差异显著, 细胞膜中央凹陷区近似为弹性体, 膜表面紧致有良好弹性但不黏滞. 而边缘区细胞因膜骨架内衬弧度较大, 显示出弹塑刚性, 但力曲线图谱显示该膜表面区域存在逐级释放的柔性链状曲线, 表明边缘区膜具有黏滞性. 对比 0.85%等张生理盐水与等渗无Ca^{2+}/Mg^{2+}的D-PBS缓冲液中制备的活性红细胞力曲线图谱, 发现前者红细胞膜表面形变恢复作用力(31.56 pN)比后者相应值(137.64 pN)小很多, 但是红细胞膜黏附弹性前者大于后者, 约 2.49 nN. 推测可能与缓冲介质中的溶质成分对细胞膜表面电荷分布和膜渗透脆性有直接影响. 5%生理葡萄糖溶液中制备的红细胞膜具有一定形变恢复特性和强黏附弹性特征, 但细胞间容易黏附造成膜通透性降低, 形变能力变弱, 细胞识别反应迟钝. 力曲线图谱出现长线程光滑弯曲黏滞弧线, 跳触点出现斥力反弹现象, 推测这可能与溶质黏滞性, 膜表面过度糖基化修饰有直接关系.

在无Ca^{2+}/Mg^{2+}的等渗D-PBS缓冲液中, 轻微改变Na^{+}, K^{+}含量细胞将发生显著形变. 实验结果显示, 当K^{+}浓度增大, 红细胞膜表面轻度消融, 膜边缘絮状微溶物增多. 力曲线图谱显示膜具有一定刚性, 形变恢复性能和弹性黏附力较小. 推测由于红细胞本身具有渗透脆性, 而过量K^{+}存在使细胞膜上ATPase酶水解活性降低, 细胞内外离子浓度持续失衡, 造成膜表面轻度硬化而结构损伤, 膜抵抗形变能力下降[8]. 当无Ca^{2+}/Mg^{2+}的等渗D-PBS缓冲液中仅以一定梯度系列改变NaCl浓度时, 红细胞为适应渗透压变化而发生急剧形变, 相应膜表面作用力具有多形性特征, 反映出红细胞膜与骨架网络之间具有复杂生物物理特性. 在等渗环境中制备的细胞维持正常形态, 细胞膜表面压痕深度、形变恢复特性和膜黏附弹性均接近于生理血浆缓冲液中的红细胞相应测量参数. 当该缓冲溶液处于高渗状态(145 mmol/L NaCl)时, 细胞急剧皱缩呈现棘轮状, 膜表面刚性特征明显, 接近塑性体形变, 恢复力大小仅为 31.6 pN. 当该缓冲溶液处于低渗状态(128 mmol/L NaCl)时, 细胞溶胀呈球形, 探针与膜表面接触过程中膜表现出近似刚性反弹, 膜剪切张力和脆性都增加. 个别细胞表面具有突触角, 推测可能是由于红细胞膜内压强较高, 突触角部位膜骨架受剪切作用而使交叉复合物构型改变. 同时由于溶液渗透压减小, 内外物质流速不同对质膜产生涡流冲击, 诱发细胞膜载体积水通道聚集, 导致细胞膜出现局部快速水内流, 造成局部质膜无膜骨架内衬而形成突触角[20]. 当缓冲液中NaCl浓度为 94 mmol/L, 此时红细胞膜严重受损, 均呈现凹陷圆盘形膜囊及血影空壳残片.

参考文献

1 Liu S C, Derick L H, Palek J. Visualization of the hexagonal lattice in the erythrocyte membrane skeleton. J Cell Biol, 1987, 104: 527—536[DOI]

2 Wandersee N J, Birkenmeier C S, Bodine D M. Mutations in the murine erythroid-spectrin gene alter spectrin mRNA and protein levels and spectrin incorporation into the red blood cell membrane skeleton. Blood, 2003, 101: 325—333[DOI]

3 Andreev O A, Dupuy A D, Sejala M. Mechanism and uses of a membrane peptide that targets tumors and other acidic tissues *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(19): 7893—7898[DOI]

4 McQueen G P , Kenzie F E. Age-structured red blood cell susceptibility and the dynamics of malaria infections. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(24): 9161—9166[DOI]

5 Ballas S K, Larner J, Smith E D. Rheologic predictors of the severity of the painful sickle cell crisis. Blood, 1988, 72(4): 1216—1223

6 Li J, Lykotrafitis G, Dao M, et al. Cytoskeletal dynamics of human erythrocyte. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(12): 4937—4942[DOI]

7 Lee C M James, Discher D E. Deformation-enhanced fluctuations in the red cell skeleton with theoretical relations to elasticity, cnnectivity and spectrin unfolding. Biophys J, 2001, 81: 3178—3192

8 Gov N S, Safran S A. Red blood cell membrane fluctuations and shape controlled by ATP-Induced cytoskeletal defects. Biophys J, 2005, 88: 1859—1874[DOI]

9 Fischer T M. Shape memory of human red blood cells. Biophys J, 2004, 86: 3304—3313

10 Li J, Dao M, Lim C T, et al. Spectrin-level modeling of the cytoskeleton and optical tweezers stretching of the erythrocyte. Biophys J, 2005, 88: 3707—3719[DOI]

11 Ismail S, Jayaweera A R, Gimple L W. Relation between air-filled albumin microbubble and red blood cell rheology in the human myocardium: influence of echocardiographic systems and chest wall attenuation. Circulation,1996, 94: 445—451

12 Steltenkamp S, Muller M M, Deserno M. Mechanical properties of pore-spanning lipid bilayers probed by atomic force microscopy. Biophys J, 2006, 91: 217—226[DOI]

13 Bronkhorst P J H, Streekstra G J, Grimbergen J, et al. A new method to study shape recovery of red blood cells using multiple optical trapping. Biophys J,1995, 69: 1666—1673

14 Guck J, Ananthakrishnan R, Mahmood H. The optical stretcher: a novel laser tool to micromanipulate cells. Biophys J, 2001, 81: 767—784

15 Evans E, Heinrich V, Leung A, et al. Nano-to microscale dynamics of P-selectin detachment from leukocyte interfaces.I. membrane separation from the cytoskeleton. Biophys J, 2005, 88: 2288—2298[DOI]

16 Desprat N, Richert A, Simeon J, et al. Creep function of a single living cell. Biophys J, 2005, 88: 2224—2233[DOI]

17 Sen S, Subramanian S, Discher D E. Indentation and adhesive probing of a cell membrane with AFM: theoretical model and experiments. Biophys J, 2005, 89: 3203—3213[DOI]

18 Marshall B T, Sarangapani K K, Wu J H, et al. Measuring molecular elasticity by atomic force microscope cantilever fluctuations. Biophys J, 2006, 90: 681—692[DOI]

19 Tokumasu F, Jin A J, Feigenson G W. Nanoscopic lipid domain dynamics revealed by atomic force microscopy. Biophys J, 2003, 84: 2609—2618

20 Chen X M, O'Hara S P, Huang B Q. Localized glucose water influx facilitates Cryptosporidium parvum cellular invasion by means of modulation of host-cell membrane protrusion. Proc Natl Acad Sci USA, 2005 102(18): 6338—6343[DOI]

21 You H X, Yu L. Atomic force microscopy imaging of living cells: progress, problems and prospects. Method Cell Sci, 1999, 21: 1—17[DOI]

22 Sun Z, Martinez-Lemus L A, Trache A. Mechanical properties of the interaction between fibronectin and α5β 1-integrin on vascular smooth muscle cells studied using atomic force microscopy. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 289: H2526—H2535[DOI]

23 Willemsen O H, Cambi A, Greve J. Biomolecular interactions measured by atomic force microscopy. Biophys J, 2000, 79: 3267—3281

24 Afrin R, Alam M T, Ikai A. Microscopy anhydrase Ⅱ as probed by single molecule atomic force pretransition and progressive softening of bovine carbonic. Protein Sci, 2005, 14: 1447—1457[DOI]

25 Shahin V, Ludwig Y, Nikova D. Glucocorticoids remodel nuclear envelope structure and permeability. J Cell Sci, 2005, 118: 2881—2889[DOI]

26 Henderson R M, Oberleithner H. Pushing, pulling, dragging, and vibrating renal epithelia by using atomic force microscopy. Am J Physiol Renal Physiol, 2000, 278: 689—701

27 Butt H J, Jaschke M, Ducker W. Measuring surface forces in aqueous electrolyte solution with the atomic force microscope. Bioelectrochem Bioenerg, 1995, 38: 191—201[DOI]

28 Dufrene Y F. Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology. J Bacteriol, 2002, 184(19): 5205—5213[DOI]

29 Yamashina S, Katsumata O. Structural analysis of red blood cell membrane with an atomic force microscope. J Electr Microsc, 2000, 49(3): 445—451

30 Rief M, Oesterhelt F, Heymann B, et al. Single molecule force spectroscopy on polysaccharides by atomic force microscopy. Science,1997, 275: 1295—1297[DOI]