



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng



Research
Micro and Nano Manipulation and Characterization—Article

基于集成液体交换的微流控芯片的完整单细胞动态变形测量

Xu Du^a, Di Chang^b, Shingo Kaneko^b, Hisataka Maruyama^a, Hiroataka Sugiura^b, Masaru Tsujii^c,
Nobuyuki Uozumi^c, Fumihito Arai^{a,b,*}

^a Department of Micro-Nano Mechanical Science and Engineering, Nagoya University, Nagoya 464-8603, Japan

^b Department of Mechanical Engineering, The University of Tokyo, Tokyo 113-8656, Japan

^c Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku University, Sendai 980-8579, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 July 2021

Revised 9 June 2022

Accepted 30 August 2022

Available online 15 February 2023

关键词

微流控芯片
力学性能
动态变形
单细胞
液体交换

摘要

本文报道了采用一种集成了力感应和液体交换功能的微流控芯片来测量单细胞力学性能的方法。使用光学镊子操纵和定位在推力探针和力传感器探针之间的单个细胞。这两个芯片上的探针被设计用来捕获和使细胞变形。通过移动由外力驱动的推力探针,而使单个细胞变形。层流在探针之间形成液-液界面以改变细胞外环境。通过控制注入压力来改变界面的位置。通过调整两个正压力和一个负压力来平衡流动的扩散和扰动。在微流控芯片中测定了不同渗透浓度环境下的单个集胞藻(*Synechocystis*)菌株 PCC 6803 的力学性能。在 0.3~0.7 s 内实现液体交换过程,同时也显示了单个细胞的动态变形。可以在 30 s 内收集不同渗透浓度下两个杨氏模量值的测量结果以及单个细胞在渗透压冲击下的动态响应。研究了野生型(WT)和突变型集胞藻细胞的动态变形,揭示了机械敏感(MS)通道的功能机制。该系统提供了一种监测单个完整细胞响应快速外部渗透变化的实时力学动力学的新方法;因此,该系统为准确描述细胞中 MS 通道的生理功能提供了新的机会。

© 2023 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

细胞的力学性能是评价细胞生物物理学特性独特而重要的指标。例如,有报道指出,机械力在病灶黏附和黏附连接的形成、稳定和解离中起着重要作用[1]。其他的例子包括红细胞的变形能力(随着储存时间的推移而减少)[2],以及癌细胞的硬度(在宏观上低于正常细胞的硬度)[3–4]。此外,细胞的力学性能是细胞分裂、移动和生长的关键因素[5–6]。

细胞的力学性能可以用传统方法测量,如原子力显微

镜(AFM)[7–10]、微孔板操作[11–12]、微管抽吸[13–14]和光学镊子[2,15]。AFM具有较高的灵敏度和分辨率。然而,AFM需要将细胞固定在基质上,对于一般的悬浮细胞来说,这种操作不易实现[16]。在某些方法中,微孔板操作和微管抽吸的准确性较低,不适合用于几微米范围内的细胞测量。此外,探针或移液管必须被设置在三维(3D)空间,这使得用显微镜捕获图像很困难[17]。光学镊子适合用皮牛顿级的力来操纵单个细胞,但施加的力太弱,无法使某些细胞变形[16]。

集成机器人的微流控芯片是表征单细胞力学性能的一

* Corresponding author.

E-mail address: arai-fumihito@g.ecc.u-tokyo.ac.jp (F. Arai).

2095-8099/© 2023 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

英文原文: *Engineering* 2023, 24(5): 94–101

引用本文: Xu Du, Di Chang, Shingo Kaneko, Hisataka Maruyama, Hiroataka Sugiura, Masaru Tsujii, Nobuyuki Uozumi, Fumihito Arai. Dynamic Deformation Measurement of an Intact Single Cell via Microfluidic Chip with Integrated Liquid Exchange. *Engineering*, <https://doi.org/10.1016/j.eng.2022.08.020>

个有前景的工具。将目标细胞的位置限制在微通道中，并在芯片上形成一系列功能部件的集合，可以完成高通量和高精确的操作和测量工作[18–19]。以前的论文描述了使用一系列微流控芯片来单独和连续地测量细胞的力学性能[16–17,20–21]，设计了芯片上的两个探针来捕捉细胞和使细胞变形。推力探针由压电驱动器进行移动，同时使用芯片上的由空心折叠梁组成的力传感器探针测量反作用力。为了详细探索细胞的特性，使用莫尔条纹的相位检测来提高探针移动的测量精度。

近来，本文作者团队评估了机械敏感（MS）通道对渗透浓度变化的响应。通过一个集成机器人的微流控芯片，测量了一个模型蓝藻，即集胞藻（*Synechocystis*）菌株PCC6803（以下称为集胞藻）的力学性能[16]。一个集胞藻细胞的直径约为2 μm ，因尺寸太小而无法对其进行操作。细菌中的MS通道的家族成员，包括集胞藻，可以感知细胞膜张力并将多余的细胞质溶质释放到细胞外环境中，以保护细胞免受细胞外渗透浓度下降（即渗透压下降冲击）的影响[22–23]。在集胞藻细胞中的多个MS通道里，一个大电导的MS通道同源物（MscL）——位于质膜上的MscL（slr0875），在渗透压下降冲击后的细胞体积恢复中起着关键作用[23]。2018年，本文作者团队设计了一个开放的芯片，以防止微流控通道中气泡造成的干扰，并使用移液管改变了细胞外环境[16]。这种方法有助于减少细胞外环境的干扰，进而能够稳定地测量单个细胞的力学性能。然而，只能测量渗透浓度变化后单个细胞的变形，不能动态地测量细胞的变形。此外，开放的芯片会使细胞暴露在外部环境中（因此有被污染的风险），而且不容易实现高通量测量。

在本文中，提出了一个集成了液体交换功能的封闭式微流控芯片。通过层流在测量区域形成一个液-液界面，

并通过控制溶液的注入压力来移动液面。测量区域周围的压力由两个正压力和一个负压力进行调整，以减少流动干扰。基于这种方法，测量了单个集胞藻细胞在不同渗透浓度环境中的力学性能。此外，分析了野生型（WT）和突变型集胞藻细胞的动态变形过程的差异。与以往研究报道的方法相比，这种微流控芯片可以在低湍流情况下实现更快的液体交换，并能在30 s内测量单个细胞的动态变形过程和杨氏模量。

2. 材料和方法

2.1. 芯片上细胞测量系统的概述

细胞操作和测量系统由三部分组成（图1）。机械控制部分包括集成机器人的微流控芯片中的夹具、压电驱动器和探针。芯片上的两个探针被设计用来捕获细胞和使细胞变形。推力探针由压电驱动器所驱动，同时使用芯片上由空心折叠梁组成的力学传感器探针测量反作用力。采用位移测量法（被称为采样莫尔法），以提高传感精度[17]。小孔在两个探针的尖端和靠近测量区域的边缘上形成图像。这些小孔被用来产生莫尔条纹，有助于放大两个探针的位移，防止图像数据的背景噪声影响测量。

该系统的细胞观察和操作部分包括光学镊子、一个显微镜和两个电荷耦合器件（CCD）相机。微通道中的单个目标细胞被限制在激光器的焦点上，并通过控制焦点的位置进行传输。该系统集成了两个高速摄像机，分别精确测量了两个探针和液-液界面的位移。一个宽视场的单色相机用于测量探针的位移；另一个具有高帧率的红-绿-蓝（RGB）相机则用于捕捉细胞周围的液-液界面所移动的距离。

该系统的流体控制部分包括一个微流控流量控制系统

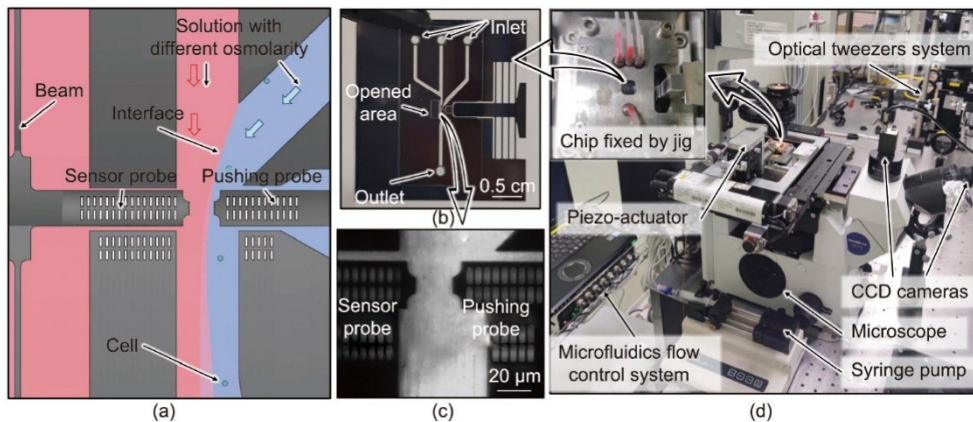


图1. 实验装置和微流控芯片概述。(a) 微流控芯片测量区域的概念图；(b) 集成机器人的微流控芯片的制作；(c) 测量区域的显微图像；(d) 实验装置的照片。CCD：电荷耦合器件。

(MFCS-FLEX; Fluigent公司, 法国)、注射泵 (KDS120; KD Scientific公司, 美国) 和芯片微通道。微流控芯片中有三个入口, 其中两个用于注入不同渗透浓度的溶液, 一个是备用微通道[图1 (b)]。微流控流量控制系统连接三个入口, 用于施加正压力。注射泵连接一个出口, 用于施加负压力以平衡测量区域周围的压力。

微流控芯片的制造过程是基于微机电系统 (MEMS) 技术 (补充信息见附录A)。

2.2. 细胞培养与制备

本研究中使用的所有集胞藻细胞均由日本东北大学 (Tohoku University) 提供。当渗透浓度降低时, 集胞藻细胞的胞内压力由MS通道所调节, 因此使用集胞藻的WT和MscL缺陷突变体 ($\Delta mscL$) 细胞。突变体细胞在 *sym-scl* 基因 (一个编码为slr0875的假定的大电导机械敏感通道同源物的基因) 中插入了一个抗奇霉素基因[23]。两种细胞均在连续光照[3.5 W 发光二极管 (LED) 白光光源]、温度为 28 °C 的BG11培养基中培养6~7天。BG11与 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的山梨糖醇混合作为低渗透浓度 (LOC) 溶液, BG11与 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 山梨糖醇混合作为高渗透浓度 (HOC) 溶液[23]。实验前, 将在BG11中培养的细胞在 $620g$ (g 为重力加速度) 下离心 2 min, 并在HOC溶液中重新悬浮。将少量的罗丹明B引入LOC溶液中, 以区分这两种溶液, 从而可以清楚地观察液-液界面。此外, 将绿色荧光染料SYTO 9和红色荧光染料碘化丙啶 (PI) 混合到溶液中, 因为这些染料可以在实验前去除死亡或受损的细胞 (见附录A中的补充信息)。

2.3. 压缩模型和力传感器的校准

压缩概念如图2 (a) 所示。通过使用压电驱动器来

移动推力探针, 对单个细胞或珠子进行挤压。传感器探针连接到折叠梁式力传感器, 该传感器可将位移转换为力 [图2 (b)]。因此, 可以通过测量两个探头的运动来估计目标物体的变形和应力。当驱动推力探针时, 将传感器探针有位移的点定义为变形起始位置。然后依次驱动推力探针挤压细胞和传感器探针。传感器探针和推力探针各自的位移为 δ_s 和 δ_p 。

细胞的变形为 δ_c , 可以通过两个探针的位移差来计算:

$$\delta_c = \delta_p - \delta_s \quad (1)$$

为了测量目标物体的原始直径, 可以驱动推力探针接触传感器探针的尖端, 将有细胞和无细胞的位移差作为细胞的原始直径 D_0 。

因此, 细胞的直径 D_c 可用以下式表示:

$$D_c = D_0 - \delta_c \quad (2)$$

赫兹模型 (Hertzian model) 可以用来描述球体的变形和非黏性弹性接触的力之间的关系[24–25]。这个模型被广泛用于测量小变形的细胞的杨氏模量[26–27]。该方程可以简化如下:

$$F = k\delta_s = \frac{4\left(\frac{D_0}{2}\right)^{1/2}}{3} \cdot \frac{E_c}{1-\nu^2} \cdot \left(\frac{\delta_c}{2}\right)^{3/2} \quad (3)$$

式中, F 表示反作用力 (N); k 为力传感器的弹簧常数 ($\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$); E_c 是细胞的杨氏模量 (Pa); ν 是细胞的泊松比。如果假设细胞是由不可压缩材料组成的, 则取泊松比为 0.5。

具有矩形截面的端部负载薄梁的弹簧常数可以通过以下公式[28]估算:

$$k = w^3 h E_b / L^3 \quad (4)$$

式中, E_b 是梁的杨氏模量 (Pa); L 、 w 和 h 分别代表矩形

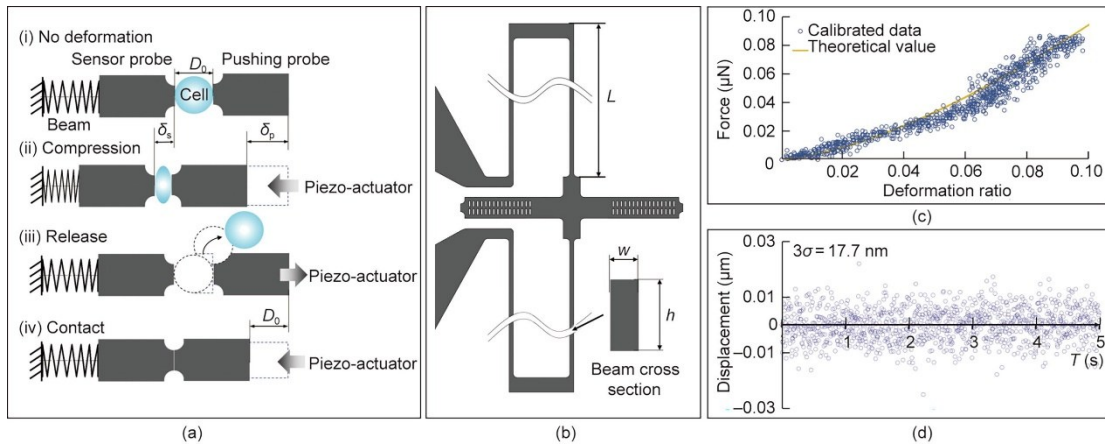


图2. 压缩概念、力传感器的设计和校准。(a) 测量过程的概念; (b) 力传感器部分的设计; (c) 力传感器的理论值和校准数据的例子 (深蓝色点表示校准后使用微流控芯片测量的数据; 橙色曲线表示PDMS的杨氏模量为0.98 MPa时的理论值); (d) 传感器探针的位移稳定性。 D_0 : 细胞的原始直径; δ_s 、 δ_p : 分别为传感器探针和推力探针的位移; L 、 w 、 h : 分别为矩形梁的长度、宽度和厚度 (m); σ : 标准偏差; T : 时间。

梁的长度、宽度和厚度 (m)。在本研究中, 公式 (4) 被用来评估力传感器梁的弹簧常数。

微流控芯片中力传感器梁的弹簧常数用聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 珠进行校准。具体的制造过程在以前的工作 [16] 中报道过。PDMS 珠和 PDMS 棒是在相同的条件下制作的。因此, PDMS 珠和 PDMS 棒的杨氏模量相似。通过负载传感器 (LVS-10GA; Kyowa 电子仪器有限公司, 日本) 的测量, PDMS 棒的杨氏模量约为 0.98 MPa。然后通过测量 PDMS 珠对力传感器的弹簧常数进行校准 [图 2 (c)]。校准后的平均弹簧常数 [平均值 (标准偏差, SD)] 为 $0.0488 (0.016) \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$ 。

通过测量传感器探针的位移来计算反作用力。因此, 力测量的分辨率取决于位移测量的分辨率。使用莫尔采样法来提高位移测量的分辨率 [17]。莫尔采样法的原理如下: 首先, 在两个探针的顶端蚀刻出周期恒定的光栅图案 [图 1 (c)], 通过使用组装了 CCD 相机的显微镜获得两个探针的灰度图像。接下来, 对图像的每几个像素进行向下的采样处理, 并且通过插值处理显现出莫尔条纹的边缘。傅里叶变换被用来分析莫尔条纹的强度。因此, 探针的位移是通过测量莫尔条纹的相移来确定的 [16–17]。为了验证微流控芯片的准确性, 在实验环境中记录了传感器探针位移的测量噪声为 5 s [图 2 (d)]。 3σ 取得的位移稳定性为 17.7 nm (其中 σ 为标准偏差), 对应的力的分辨率为 0.864 nN。

2.4. 液体交换的控制

改变细胞外环境是细胞测量的重要过程, 同时使细胞暴露在刺激和检测环境中。通过层流, 细胞周围的液体环

境可以被快速而简单地进行交换 [29]。使用层流进行流动转换经常被用于分拣、标记和分析细胞 [30–34]。然而, 在力学测量中很难使用层流, 因为层流控制中的压力变化会干扰力传感器。为了准确测量细胞的动态特性, 应尽可能减少液体交换的影响。降低液体交换所需的流速和压力可以减少这些影响。然而, 液体交换所需的时间和层流中的扩散量将会增加。重要的是要确保被测细胞与初始溶液完全分离, 并浸泡在交换的试剂中。

液体交换过程如图 3 所示。在图 3 (a) 中, 施加压力以去除微通道中的气泡, 并验证主要微通道中是否存在稳定的液-液界面。随后, 去除 LOC 溶液的压力, 使 HOC 溶液完全覆盖测量区域。因此, 微通道中的细胞被浸泡在 HOC 环境中。在图 3 (c) 中, 所有的压力源都被关闭, 以降低流速。细胞被光学镊子捕获, 并移动到两个探针之间的区域。捕获细胞后, 通过驱动压电驱动器来挤压细胞。必须仔细控制夹持力, 以防止细胞变形过大。否则, 在 HOC 条件下测量的杨氏模量将不可信。事实上, 集胞藻的细胞外多糖柔软而黏稠, 因此可以通过移动推力探针轻微挤压细胞, 几秒钟后释放推力探针。细胞会黏附在探针的顶端, 这可以防止细胞被水流冲走。另外, 用光学镊子将细胞放在探针的上游以及用适当的距离控制两个探针都是可以的。当 HOC 溶液的压力稍微增加并使细胞从光学镊子上分离时, 细胞将在探针之间流动。因为细胞外多糖是柔软的, 流动的细胞将被两个探针捕获, 而多糖的变形不会改变细胞的硬度。

在流速变得稳定后, 开始记录 (t_0)。在图 3 (d) 中, 通过驱动压电驱动器挤压目标细胞, 可以测量 HOC 条件下单个细胞的杨氏模量。随后, 逐渐增加 HOC 溶液的压

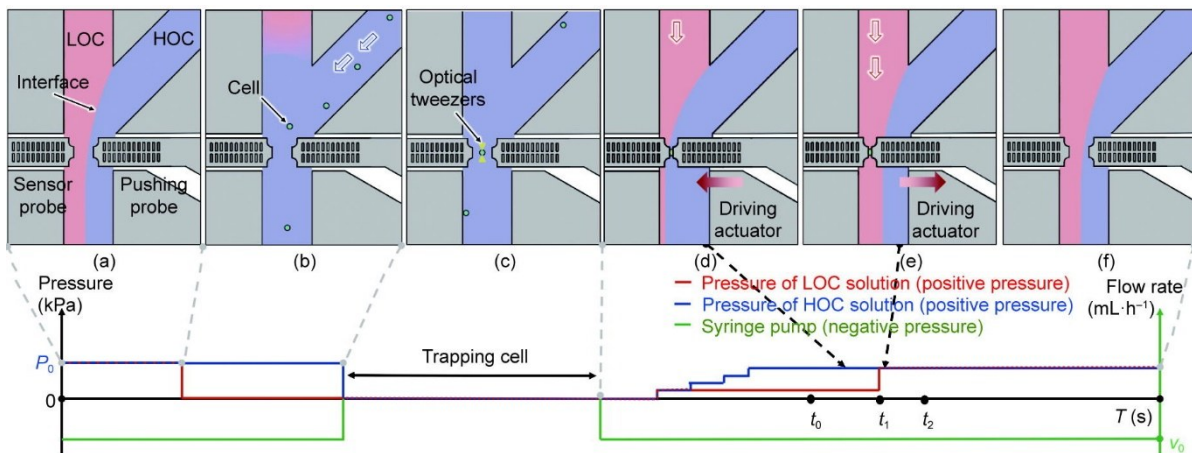


图 3. 细胞操作和液体交换过程, 下方的曲线显示每一步骤对应的压力。(a) 施加压力以去除微通道中的气泡, 并验证主要微通道中间是否存在稳定的液-液界面; (b) 将微通道中的细胞浸入 HOC 溶液中; (c) 用光学镊子和探针操纵单细胞; (d) 挤压目标细胞, 并在 HOC 中测量细胞的杨氏模量; (e) 在 LOC 中测量目标细胞的杨氏模量; (f) 释放细胞。 t_0 : 开始记录的时间; t_1 : 交换溶液的时间; t_2 : 释放推力探针的时间。 P_0 : 微流控流量控制系统施加的初始压力; v_0 : 由注射泵施加的初始流速。

力, 稍微增加LOC溶液的压力, 以保持界面在细胞的左侧。这使得细胞一直浸泡在HOC条件下。在HOC条件下捕获和测量细胞后, 迅速增加LOC溶液的注入压力 (t_1) 以交换溶液。在这个步骤中, 目标细胞的动态变形和液体交换的过程可以被高速摄像机记录下来。几秒钟后, 推力探针被驱动器释放 (t_2); 然后, 测量LOC条件下细胞的杨氏模量, 如图3 (e) 所示。

进行了一系列的实验, 以确定在低扰动下适当压力的范围。将相同渗透浓度的溶液注入两个微通道中, 以消除渗透压冲击的影响并暴露液体交换引起的干扰 [图4 (a)]。

当进行液体交换时, LOC的压力急剧增加, 使界面从细胞的左侧移到右侧。然而, 当LOC的注入压力太低, 无法让界面通过细胞时, 就没有实现液体交换 [没有液体交换, 图4 (b)]。当LOC的压力远远大于其他压力或大于6 kPa时, 急剧增加的压力对传感器探针产生了巨大的影响。在这种情况下, 收集到的细胞变形的动态响应是不可靠的。因此, 适宜的压力应当被限制在一个小范围内。

图4 (c) 显示了一个扰动测试的例子。曲线表示细胞的动态变形, 曲线上的图表示测量区域的显微图像。在第二张图像中可以看到液-液界面; 与该图像对应的曲线显示了在进行液体交换时出现的扰动, 约为30 nm。由于在这个过程中渗透浓度没有变化, 所以细胞直径的变化 (即变形) 应该是由液体交换的扰动引起的。这个扰动足够小 (这将在第3节中解释), 所以在后续的实验中使用了这个实验条件。

在实验中, 使用注射泵将主要微通道的流速控制在约 $0.1 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$ (在测量区域内 $20\text{--}30 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$)。HOC入口的注入压力为4 kPa。当通过增加LOC入口的注入压力 (从0~1 kPa增加到4 kPa) 来进行溶液交换时, 界面移动了约 $40 \mu\text{m}$ 。为了确保被测细胞完全浸没在交换溶液中, 界面

的位移要大于扩散范围 (即扩散距离)。通过分析界面位置周围的灰度水平来测量扩散距离, 约为 $5.3 \mu\text{m}$ (见附录A中的补充信息)。界面的位移远远大于扩散距离, 因此, 细胞外溶液被完全取代。后续的实验是在这些条件下进行的。

除了控制压力外, 还通过微流控芯片的结构设计, 减少了液体交换的干扰 (见附录A中的补充信息)。

3. 结果

当驱动推力探针挤压细胞时, 最大压力稳定在大约 $0.2 \mu\text{N}$, 使细胞变形20%~30%。使用赫兹模型 [公式 (3)] 计算细胞的杨氏模量。只有10%的变形被用来计算细胞的杨氏模量, 因为赫兹模型只在计算弹性球体的小范围变形时可靠。虽然细胞不是一个完全的弹性体, 但细胞总是有非常复杂的力学性能, 如黏弹性、孔弹性和可塑性 [35–36]。已经观察到, 细胞在长时间的挤压后变形不能恢复。然而, 在以前的工作中, 证明了使用赫兹模型来计算具有小范围变形的集胞藻的杨氏模量是可行的 [16]。一项研究也报道, 使用黏弹性和孔弹性模型的拟合曲线没有大的差别 [37]。在这个实验中, 单个细胞的挤压需要几秒钟, 黏弹性的阻尼效应可以被忽略。最大压力的持续时间 (即液体交换过程的时间) 被限制在5 s以内, 以防止因压缩时间过长而导致杨氏模量变化 (图5)。图3中的时间点 t_1 和 t_2 是在这些条件下被确定的。

图5 (b) 中的两条曲线分别代表推力探针和传感器探针的位移, 而纵轴的增加方向代表向右的位移 (即推力探针的方向)。在最初的7 s里, 驱动推力探针挤压细胞。如上所述, 用10%的细胞变形来计算杨氏模量。因此, 图5 (b) 中0~5 s的数据可以转换为图5 (c) (左侧蓝色覆盖区域)。在HOC环境中细胞的杨氏模量可以通过图5

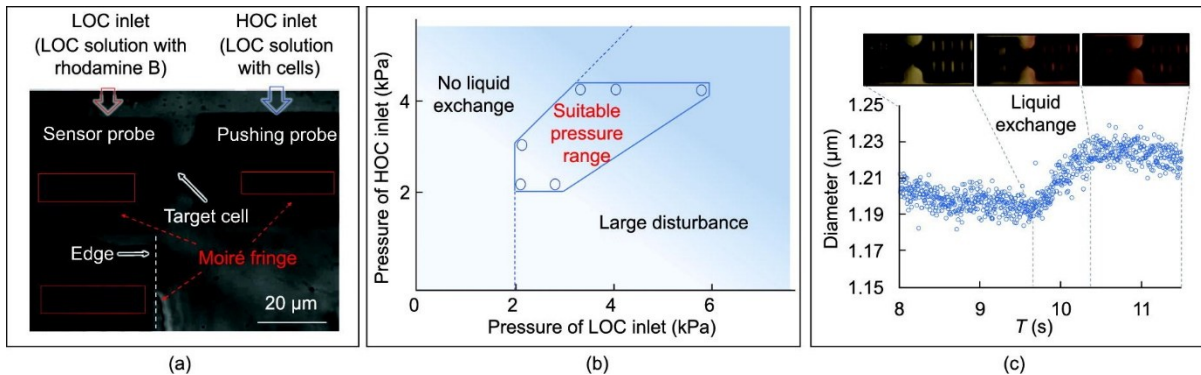


图4. 微流控芯片中的压力控制和液体交换。(a) 测量区域的显微图像。在扰动测试中, 在两个微通道都注入了LOC溶液。(b) 小干扰的压力范围用蓝色轮廓表示, 蓝色的点是用来确定范围边界的数据。(c) 曲线表示扰动测量时细胞的动态变形 (蓝点), 曲线上的图像表示测量区域。

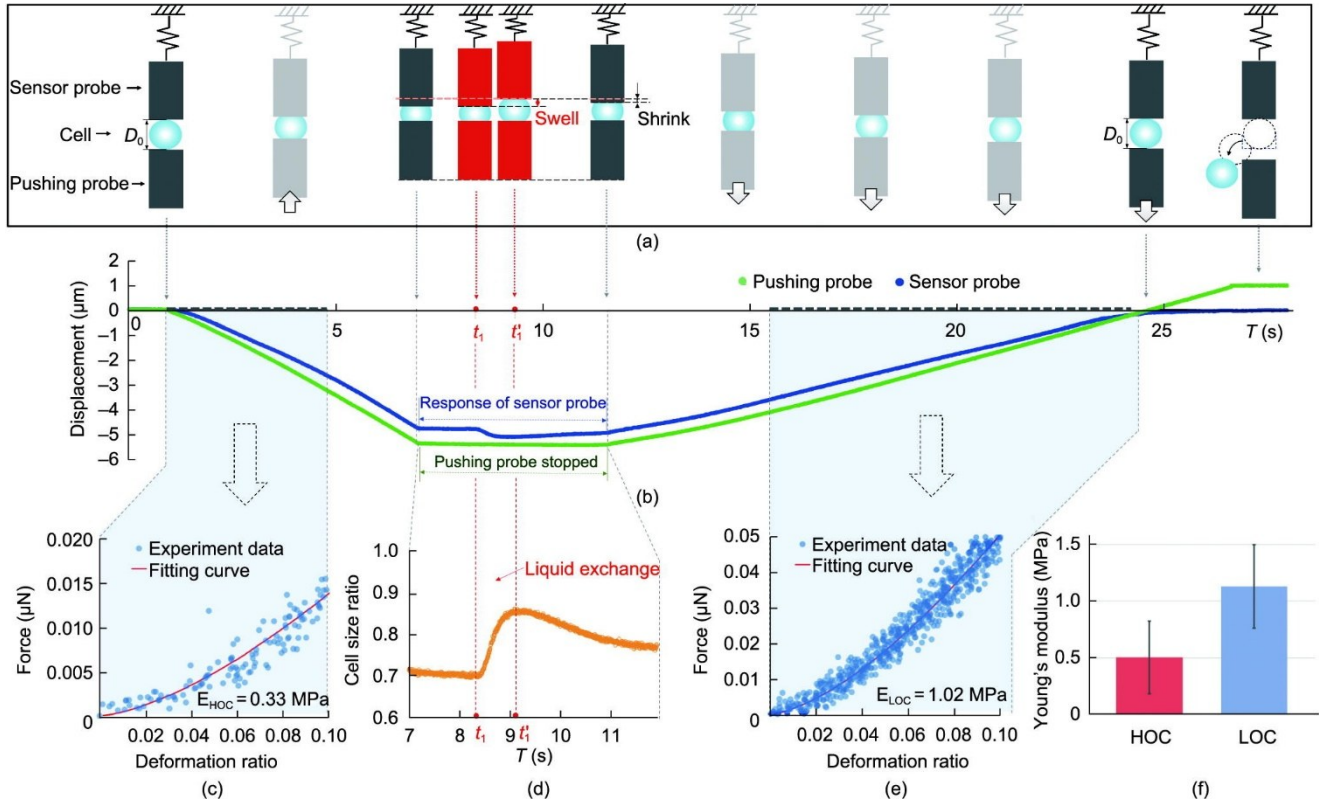


图5. WT集胞藻的测量结果。(a) 两个探针的位置和单个细胞的变形示意图。(b) 蓝点表示传感器探针的位移, 绿色点表示推力探针的位移。(c) HOC的力-形变率。蓝点表示实验数据, 红线表示拟合的赫兹模型。(d) 液体交换过程中单个细胞的动态变形(细胞大小变化)与时间的比率。(e) LOC的力-形变率。蓝点表示实验数据, 红线表示拟合的赫兹模型。(f) 红色条代表HOC溶液中的平均杨氏模量[平均值(SD), 0.51(0.32) MPa], 蓝色条代表LOC溶液中的平均杨氏模量[平均值(SD), 1.13(0.37) MPa]。图5(d): t_1' : 细胞外环境交换的时间; E_{HOC} : HOC溶液中单个细胞的杨氏模量; E_{LOC} : LOC溶液中单个细胞的杨氏模量。

(c) 的拟合曲线来评估。

图5(c)和(e)的横轴标签处的变形率 δ_c/D_0 代表变形量与原始直径 D_0 的比值。从 $T=7$ s到 $T=11$ s, 停止推力探针, 细胞周围的溶液环境在 t_1 时从HOC到LOC交替变换。图5(d)中的曲线显示, 被挤压的集胞藻细胞在液体交换过程中膨胀, 在液体交换后略微收缩——这一发现在任何研究都没有被报道。此外, 渗透压下降冲击前后的细胞变形峰值约为15% ($0.33 \mu\text{m}$)。然而, 如第2.4节所示, 在相同的实验条件下, 液体交换前后的扰动峰值约为30 nm, 远远小于渗透压冲击期间细胞变形的峰值。因此, 用该低扰动液体交换系统测量细胞变形是可行的。

图5(d)纵轴标签处的细胞尺寸比 D_c/D_0 代表变形后的细胞直径与原始直径的比值。液体交换后, 推力探针被释放; 图5(b)中15~25 s的数据可以转换为图5(e)(右侧蓝色覆盖区域)。在这个步骤中, 计算了LOC环境中的杨氏模量。值得注意的是, 液体交换的干扰发生在推力探针停止的时候[在图5(b)中为7~11 s], 这一点从用于计算杨氏模量的数据中可以看出[0~5 s和15~25 s; 图5(b)中的蓝色覆盖区域]。因此, 干扰并不影响杨氏模量

的计算精度。总之, 本研究可以测量同一细胞在不同渗透浓度下的两个杨氏模量, 以及单个细胞在渗透冲击下30 s内的动态响应。

LOC溶液中杨氏模量的平均值[平均值(SD)]为1.13(0.37) MPa [95%置信区间(CI), 0.96~1.30], HOC溶液中杨氏模量的平均值[平均值(SD)]为0.51(0.32) MPa (95%置信区间, 0.35~0.65) [图5(f)]。每个条形图中测量了20个细胞。与以前的研究结果相比, HOC溶液(BG11与 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 山梨糖醇相混合)中的杨氏模量值非常接近, 而LOC(BG11与 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 山梨糖醇相混合)中的杨氏模量值比HOC中的大, 比纯BG11溶液中的小[16]。这些对照阐释了本实验中的测量结果是可靠的。

为了探索MS通道在集胞藻细胞中的功能, 测量了WT和 ΔmscL 集胞藻细胞的动态变形。图6(a)和(b)显示了单个WT细胞和单个突变体细胞在液体交换过程中的动态变形。如上所述, 图中纵轴标注的细胞尺寸比 D_c/D_0 代表变形后的细胞直径与原始直径的比值。峰值 D_1 代表液体交换前后的最大细胞膨胀率。 D_2 代表液体交换开始后3 s变形率的变化, D_3 代表因收缩而减少的变形率,

也是 D_1 和 D_2 之差。由于集胞藻的细胞形状为球形，没有明显的极性[38]，因此细胞的体积可以用球体的体积估算。如图6(a)和(b)所示，WT和 $\Delta mscL$ 细胞之间的 D_1 差异不大。然而，WT细胞的体积比 $\Delta mscL$ 细胞的体积减少得快。这一发现很好地说明了MscL在细胞受到低渗透冲击时的功能。图6(c)显示了细胞表现体积的统计结果。图6(c)和(d)中的误差条表示SD。突变体细胞的表观体积(95% CI, 4.37~5.22)比WT细胞(95% CI, 3.75~5.41)略大，这与以前的研究结果一致[39]。图6(d)显示了WT和 $\Delta mscL$ 之间动态变形曲线中三个典型变形值的比较。每个条形图中都测量了10个以上细胞。在 D_1 和 D_2 的变形率方面，WT小于 $\Delta mscL$ ，并且WT的收缩值 D_3 大于 $\Delta mscL$ 的收缩值 D_3 。变形率数据的95% CI如下：WT D_1 , 95% CI, 0.07~0.10; WT D_2 , 95% CI, -0.04~0.04; WT D_3 , 95% CI, 0.05~0.12; $\Delta mscL$ D_1 , 95% CI, 0.07~0.13; $\Delta mscL$ D_2 , 95% CI, 0.01~0.04; $\Delta mscL$ D_3 , 95% CI, 0.04~0.11。

4. 讨论

研究人员开发了一个具有集成液体交换功能的微流控芯片，并用于测量单个集胞藻细胞的动态变形。当进行液体交换时，该细胞表现出的变形过程非常有意思[图5(d)]。变形首先达到一个峰值(即单个细胞从 t_1 膨胀到 t_1')，其中达到峰值的时间取决于液体交换的速度。液体交换的速度为0.3~0.7 s [WT中液体交换时间的平均值(SD)为0.49 (0.09) s, $\Delta mscL$ 中为0.47 (0.15) s]，这

个速度足够快，足以暴露细胞的动态变形。这个峰值(即渗透压下降冲击前后的细胞变形)大约为0.3 μm 。液体交换的扰动大约为0.03 μm ，与峰值的数值相比，可以忽略不计。达到峰值后，细胞略微收缩。一项研究用非接触方法测量了细胞的大小或体积，并报道在渗透压下降冲击下，集胞藻将迅速膨胀；随后，细胞的大小将保持不变[23]。

为了解释这一现象，在此提供一个假说：当渗透浓度降低(即渗透压下降冲击)时，水进入细胞并使其膨胀；然后MS通道感觉到增加的膜张力并释放细胞内的成分[40~41]。然而，在本实验中，细胞呈压缩状态，这增加了膜张力。在渗透压下降冲击后，MS通道仍然收到高膜张力的响应，因此，它继续释放细胞内的成分，导致细胞收缩。为了证明这一假设，比较了WT和突变体集胞藻细胞动态变形的差异。在统计结果中，峰值 D_1 的差异并不明显。然而， $\Delta mscL$ 细胞恢复到原始细胞体积的速度比WT细胞慢(如 D_2 和 D_3 的值所示)，因为 $\Delta mscL$ 细胞不能利用MS通道释放细胞内的成分，从而适应渗透压下降的冲击(图6)。液体交换完成后，与 $\Delta mscL$ 细胞相比，WT细胞表现出明显的萎缩，表明MS通道可以感知外力并释放细胞质以保护细胞免于爆裂。

5. 结论

本文提出了一个集成了细胞操作、流量控制和细胞力测量功能的系统，用于评估单个细胞的力学性能。使用MEMS技术制造了一个集成机器人的微流控芯片，并结

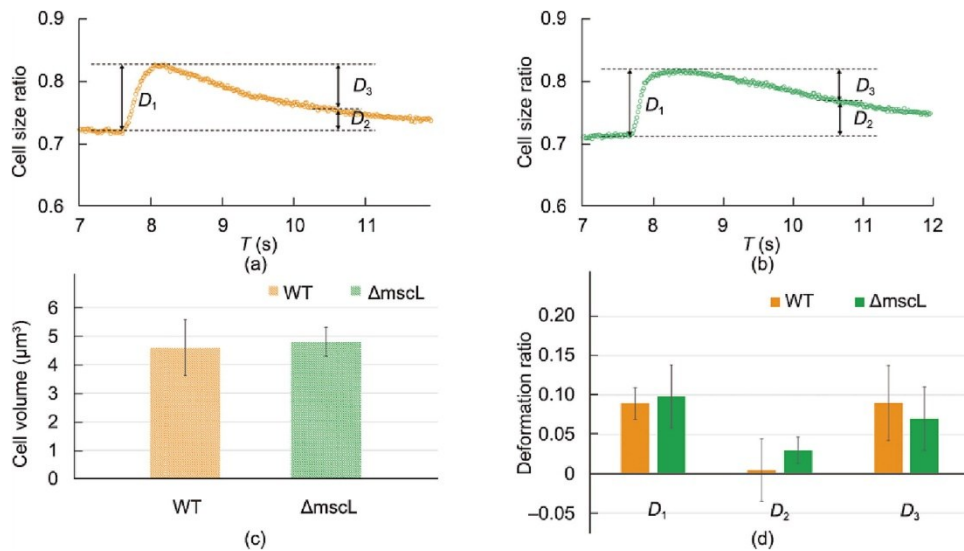


图6. WT和 $\Delta mscL$ 集胞藻细胞的动态变形(细胞大小变化)。单个WT细胞的动态变形(a)和单个突变体细胞在液体交换过程中的动态变形(b);(c)WT(橙色)和突变体(绿色)细胞的表观体积;(d)WT(橙色)和突变体(绿色)细胞的 D_1 、 D_2 和 D_3 的比较。

合液体交换功能来改变渗透浓度。通过层流可以在测量区域形成一个液-液界面，并且可以通过调整注入压力来转移界面。通过无渗透浓度变化的实验揭示了注入压力的低干扰范围。采用赫兹模型计算集胞藻的杨氏模量。测量了一个细胞在不同渗透浓度下的变形和反作用力。LOC溶液（BG11与 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 山梨糖醇相混合）中的杨氏模量平均值为 $(1.13 \pm 0.37) \text{ MPa}$ ，HOC溶液（BG11与 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 山梨糖醇相混合）中的杨氏模量平均值为 $(0.51 \pm 0.32) \text{ MPa}$ 。与本文研究团队以前的研究相比，本研究获得的杨氏模量值是合理的。此外，本研究还揭示了单个集胞藻细胞的动态变形。当渗透浓度降低时，被挤压的细胞首先膨胀，然后轻微收缩。此外，还比较了WT和突变集胞藻的动态变形过程。这些结果证实，MS通道的作用是释放细胞质以适应细胞外环境。

Acknowledgements

This work was partially supported by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology (18H03762 and 21H04543 to Fumihito Arai and Nobuyuki Uozumi). We thank the Chinese Scholarship Council for supporting the author Du Xu in his PhD study.

Compliance with ethics guidelines

Xu Du, Di Chang, Shingo Kaneko, Hisataka Maruyama, Hirotaka Sugiura, Masaru Tsujii, Nobuyuki Uozumi, and Fumihito Arai declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2022.08.020>.

References

- [1] Chen CS, Tan J, Tien J. Mechanotransduction at cell–matrix and cell–cell contacts. *Annu Rev Biomed Eng* 2004;6:275–302.
- [2] Li Y, Wen C, Xie H, Ye A, Yin Y. Mechanical property analysis of stored red blood cell using optical tweezers. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2009;70(2):169–73.
- [3] Miyanaga N, Akaza H, Yamakawa M, Oikawa T, Sekido N, Hinotsu S, et al. Tissue elasticity imaging for diagnosis of prostate cancer: a preliminary report. *Int J Urol* 2006;13(12):1514–8.
- [4] Beil M, Micoulet A, von Wichert G, Paschke S, Walther P, Omary MB, et al. Sphingosylphosphorylcholine regulates keratin network architecture and viscoelastic properties of human cancer cells. *Nat Cell Biol* 2003;5(9):803–11.
- [5] Lautenschläger F, Paschke S, Schinkinger S, Bruel A, Beil M, Guck J. The regulatory role of cell mechanics for migration of differentiating myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(37):15696–701.
- [6] Huang S, Ingber DE. The structural and mechanical complexity of cell-growth control. *Nat Cell Biol* 1999;1(5):E131–8.
- [7] Dufrene YF. Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology. *J Bacteriol* 2002;184(19):5205–13.
- [8] Sit PS, Kohn J. Cell membrane micromechanical properties on polymeric surfaces studied by atomic force microscopy. *Biophys J* 2003;84(2):296A.
- [9] Franz CM, Puech PH. Atomic force microscopy: a versatile tool for studying cell morphology, adhesion and mechanics. *Cell Mol Bioeng* 2008;1(4):289–300.
- [10] Chang D, Hirate T, Uehara C, Maruyama H, Uozumi N, Arai F. Evaluating Young's modulus of single yeast cells based on compression using an atomic force microscope with a flat tip. *Microsc Microanal* 2021;27(2):392–9.
- [11] Thoumine O, Ott A. Time scale dependent viscoelastic and contractile regimes in fibroblasts probed by microplate manipulation. *J Cell Sci* 1997;110(17):2109–16.
- [12] Thoumine O, Ott A, Cardoso O, Meister JJ. Microplates: a new tool for manipulation and mechanical perturbation of individual cells. *J Biochem Biophys Methods* 1999;39(1–2):47–62.
- [13] Hochmuth RM. Micropipette aspiration of living cells. *J Biomech* 2000;33(1):15–22.
- [14] Liu X, Wang Y, Sun Y. Real-time high-accuracy micropipette aspiration for characterizing mechanical properties of biological cells. In: *Proceedings of 2007 IEEE International Conference on Robotics and Automation*; 2007 Apr 10–14; Rome, Italy. IEEE; 2007. p. 1930–5.
- [15] Zheng XR, Zhang X. Microsystems for cellular force measurement: a review. *J Micromech Microeng* 2011;21(5):054003.
- [16] Chang D, Sakuma S, Kera K, Uozumi N, Arai F. Measurement of the mechanical properties of single *Synechocystis* sp. strain PCC6803 cells in different osmotic concentrations using a robot-integrated microfluidic chip. *Lab Chip* 2018;18(8):1241–9.
- [17] Sugiura H, Sakuma S, Kaneko M, Arai F. On-chip method to measure mechanical characteristics of a single cell by using moiré fringe. *Micromachines* 2015;6(6):660–73.
- [18] Koike Y, Yokoyama Y, Hayakawa T. Light-driven hydrogel microactuators for on-chip cell manipulations. *Front Mech Eng* 2020;6:1–9.
- [19] Takayama Y, Perret G, Kumemura M, Ataka M, Meignan S, Karsten SL, et al. Developing a MEMS device with built-in microfluidics for biophysical single cell characterization. *Micromachines* 2018;9(6):275.
- [20] Sakuma S, Arai F. Cellular force measurement using a nanometric-probe-integrated microfluidic chip with a displacement reduction mechanism. *J Robot Mechatron* 2013;25(2):277–84.
- [21] Nakahara K, Sakuma S, Hayakawa T, Arai F. On-chip transportation and measurement of mechanical characteristics of oocytes in an open environment. *Micromachines* 2015;6(5):648–59.
- [22] Ajouz B, Berrier C, Garrigues A, Besnard M, Ghazi A. Release of thioredoxin via the mechanosensitive channel MscL during osmotic downshock of *Escherichia coli* cells. *J Biol Chem* 1998;273(41):26670–4.
- [23] Nanatani K, Shijuku T, Akai M, Yukutake Y, Yasui M, Hamamoto S, et al. Characterization of the role of a mechanosensitive channel in osmotic down shock adaptation in *Synechocystis* sp PCC 6803. *Channels* 2013;7(4):238–42.
- [24] Hertz H. On the contact of elastic solids. *J Reine Angew Math* 1881;92:156–71.
- [25] Johnson KL. *Contact mechanics*. Cambridge: Cambridge University Press; 1987.
- [26] Kuznetsova TG, Starodubtseva MN, Yegorenkov NI, Chizhik SA, Zhdanov RI. Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron* 2007;38(8):824–33.
- [27] Rosenbluth MJ, Lam WA, Fletcher DA. Force microscopy of nonadherent cells: a comparison of leukemia cell deformability. *Biophys J* 2006;90(8):2994–3003.
- [28] Albrecht TR, Akamine S, Carver TE, Quate CF. Microfabrication of cantilever styli for the atomic force microscope. *J Vac Sci Technol A* 1990;8(4):3386–96.
- [29] Tarn MD, Lopez-Martinez MJ, Pamme N. On-chip processing of particles and cells via multilaminar flow streams. *Anal Bioanal Chem* 2014;406:139–61.
- [30] Ong SE, Zhang S, Du H, Fu Y. Fundamental principles and applications of microfluidic systems. *Front Biosci* 2008;13(7):2757–73.
- [31] Pamme N. Continuous flow separations in microfluidic devices. *Lab Chip* 2007;7(12):1644–59.
- [32] Lenshof A, Laurell T. Continuous separation of cells and particles in

- microfluidic systems. *Chem Soc Rev* 2010;39(3):1203–17.
- [33] Gossett DR, Weaver WM, Mach AJ, Hur SC, Tse HTK, Lee W, et al. Label-free cell separation and sorting in microfluidic systems. *Anal Bioanal Chem* 2010; 397(8):3249–67.
- [34] Tsutsui H, Ho CM. Cell separation by non-inertial force fields in microfluidic systems. *Mech Res Commun* 2009;36(1):92–103.
- [35] Chaudhuri O, Cooper-White J, Janmey PA, Mooney DJ, Shenoy VB. Effects of extracellular matrix viscoelasticity on cellular behaviour. *Nature* 2020; 584(7822):535–46.
- [36] Hu J, Jafari S, Han Y, Grodzinsky AJ, Cai S, Guo M. Size- and speed-dependent mechanical behavior in living mammalian cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017;114(36):9529–34.
- [37] Moeendarbary E, Valon L, Fritzsche M, Harris AR, Moulding DA, Thrasher AJ, et al. The cytoplasm of living cells behaves as a poroelastic material. *Nat Mater* 2013;12(3):253–61.
- [38] Schuergers N, Nürnberg DJ, Wallner T, Mullineaux CW, Wilde A. PilB localization correlates with the direction of twitching motility in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology* 2015;161:960–6.
- [39] Bachin D, Nazarenko LV, Mironov KS, Pisareva T, Allakhverdiev SI, Los DA. Mechanosensitive ion channel MscL controls ionic fluxes during cold and heat stress in *Synechocystis*. *FEMS Microbiol Lett* 2015;362(12):fnv090.
- [40] Haswell ES, Phillips R, Rees DC. Mechanosensitive channels: what can they do and how do they do it? *Structure* 2011;19(10):1356–69.
- [41] Perozo E, Cortes DM, Sompornpisut P, Kloda A, Martinac B. Open channel structure of MscL and the gating mechanism of mechanosensitive channels. *Nature* 2002;418(6901):942–8.