

柠檬醛作用下黄曲霉细胞膜的多力学参数测定^{*}

李 晶^{1,2}, 赵海燕³, 黄耀熊⁴, 罗 曼⁴, 张勤奋², 李鲲鹏², 张景强²

(1. 成都军区昆明总医院, 云南 昆明 650032; 2. 中山大学生物防治国家重点实验室, 广东 广州 510275;
3. 云南省第一人民医院眼科, 云南 昆明 650030; 4. 暨南大学生物医学工程研究所, 广东 广州 510632)

摘 要: 在无扰、在位、实时的情况下, 测量了黄曲霉细胞膜的力学参量: 弯曲模量 K_C 、剪切模量 μ 及表征切向与弯曲模量之比 ϵ 。对不同柠檬醛浓度作用下黄曲霉细胞各力学参量进行了连续动态检测。结果表明, 柠檬醛浓度的提高黄曲霉毒素细胞的变形能力逐渐减弱, 提示出柠檬醛对黄曲霉毒素细胞膜的破坏作用。

关键词: 图像分析技术; 细胞膜力学参量; 单个活态细胞; 膜变形能力

中图分类号: Q6 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2005) 06-0090-03

由于光学衍射极限以及检测器灵敏度的限制, 普通方法无法对细胞膜搏动如此微小的运动(约 30~100 nm)力学参量进行检测。因此, 一些研究探索用特殊的方法去检测, 已报道的方法包括^[1-4]: 建立各种分析检测模型, 利用各种微小探针技术来感应搏动并得到检测数据; 利用准弹性激光技术进行检测, 等等。这些方法中前者是侵入性的, 对细胞本身有影响, 后者则需要较复杂的技术条件。并且, 测量结果的稳定度不够理想^[5]。本文应用序列动态图象分析技术, 设计实验方法对单个活态细胞力学参量进行准确、在位、无扰、实时、连续、多参数分析测量。对植物黄曲霉(随添加柠檬醛浓度)做了分析测量。得出弯曲膜量 K_C 、剪切膜量 μ 、及其比率 ϵ 并测量了当外部条件变化时它们的变化情况, 得到了较好结果。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 黄曲霉的制备 培养基: 成分(按一升配)马铃薯 250 g 葡萄糖 20 g 琼脂 20 g pH 5.5~5.7 水 1 000 mL。制作: 马铃薯洗净去皮, 切成小块, 按配方将马铃薯水煮 30 min (或 116 °C 煮 20 min), 纱布过滤, 挤出所有液体, 补足 1 000 mL 水量, 加入葡萄糖、琼脂, 加热融化, 调 pH (0.5 mol/L 盐酸或 0.5 mol/L NaOH); 分装试管或平皿(试管为 2×20, 容量为 8~10 mL; 培养皿 Φ 9 cm, 容量 15 mL)放高压消毒锅中 121 °C 20 min 高压灭菌(压力调至 0.55×10^5 Pa), 然后停止加热, 保持 30

min, 放气后取出。接种: 在超净台上用食指和中指取出菌种试管口棉塞, 并夹住, 将接种针于酒精灯上烧红, 伸入培养黄曲霉试管内壁, 稍冷却蘸取少许样品, 划线接种于培养基上, 再将棉塞于酒精灯上熏一下, 塞回试管口。注意在接种前, 需提前 30 min 打开紫外灯照 15 min, 关灯 15 min 后才能接种。培养: 将上接种的试管或平皿放在 26~28 °C 培养箱中培养 48 h, 即可作为实验材料。

1.1.2 试验观察 试验组的设立, 将设立浓度的柠檬醛趁分装时加入培养基中, 充分摇匀, 然后将培养基冷凝即可。

1.2 实验方法

实验硬件装置: 图 1 所示为实验所用图像分析系统的结构和图像获取原理。图中面阵 CCD 摄像头(IMAC-CCD30 768×572)用于摄取显微镜所成显微图像, 再用图像捕捉卡(MATROX-METEOR II PCI)将摄像头输出的信号送入计算机, 计算机实现图像的显示、存储、处理、和分析。

实验软件: 本实验使用相差显微镜获得细胞的带 Flicker 亮晕(halo)的单个细胞灰度图像(256 灰阶), 动态连续记录 100 s (30 帧/s)。取回一单张图像, 设定亮度域值, 在晕边缘的最上、最下、最左、最右 4 个方向规定 4 个等域值点, 对动态连续拍摄的 3 000 张图像进行自动分析, 求出上下两点垂直方向和左右两点水平方向的波动值。对于获得的 4×3 000 的位置波动值, 求其方差 $\hat{\sigma}_i$ ($n=0, 1, 2, 3$) 然后按下式计算细胞的各力学参量。

* 收稿日期: 2004-11-17

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(05300638); 国家博士后科学基金资助项目(2004035183)

作者简介: 李晶(1966年生), 男, 博士后; E-mail: li_jingkm@126.com

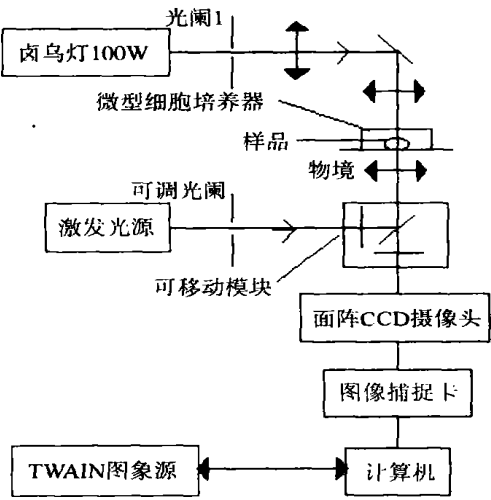


图 1 实验装置结构

Fig 1 Structure of experimental set

$$\hat{q}_m = \frac{1}{4} \sum_{n=0}^3 \hat{q}_n(N) e^{2\pi i m / 4} \tag{1}$$

$$\epsilon = \frac{\hat{q}_{m=1}^2}{\hat{q}_{m=2}^2} \tag{2}$$

$$\hat{q}_{m=2}^2 = \frac{R^2 K_B T}{K_c} \tag{3}$$

$$\epsilon = \frac{\mu R^2}{K_c} \tag{4}$$

式（1）为由 4 个方向边缘位置波动值求细胞 3 种分运动的 Fourier 变换式。式（2）为利用两个分运动的比来计算切应变与弯曲弹性比率 ϵ 。式（3）中 R 为红细胞的半径， K_B 为玻尔兹曼常数， T 为绝对温度。由此式可计算出弯曲模量 K_c 值，弯曲模量 K_c 是表征细胞膜变形能力的重要参量。其值越小表明细胞膜的变形能力越强，细胞的生理特性越佳，细胞越不容易破裂。反之值越大表明细胞膜的变形能力越差，细胞越容易破裂。式（4）表示的是 ϵ 与剪切模量 μ 及弯曲模量 K_c 的关系。实验中是通过测定测出的位置波动值以及细胞的形态结构参数（如红细胞的半 R 等）后，以（2）式和（3）式分别得出 ϵ 和 K_c 的值，然后再利用（4）式得出剪切模量 μ 。剪切模量 μ 值体现了细胞膜的黏附能力。

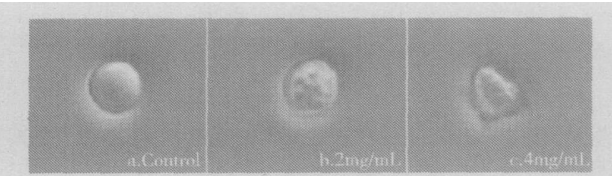


图 2 不同柠檬醛浓度下黄曲霉细胞的形态

Fig 2 Configuration of aflatoxins variety with different citral

3 结 果

图 2 所示为黄曲霉细胞在大浓度（2 000 mmol/L）柠檬醛作用下细胞膜形态的改变 A 为正常状态 B 为加 2 000 mmol/L 柠檬醛于黄曲霉细胞形态。由图所示黄曲霉细胞形态随外加柠檬醛而有明显的改变。图 3 和图 4 示出实验软件对细胞图像所做处理的运行结果。图 3 为四条扫描线对细胞的边缘最上、最下、最左、最右方向的连续动态跟踪。之所以称为连续动态是因为在对图像的处理中计算机不断地把 Avi 格式的图像文件连续地将每一帧图像读入内存，四条扫描线自动跟踪每帧图像的四个边缘。这样使得一个包含 900 张图像 60 兆 Avi 文件在小于 2 s 的时间中便可以完成处理与计算，接近实时处理。图 4 为 4 个方向膜波动结果的直观显示。

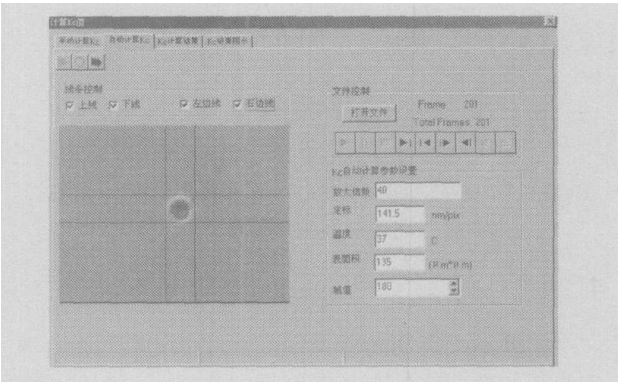


图 3 测试软件界面

Fig 3 illumination software interface

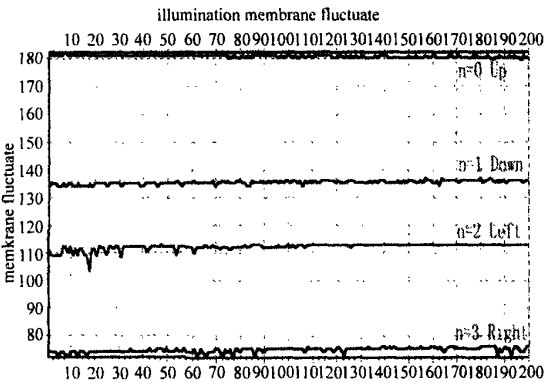


图 4 黄曲霉细胞的测试结果图示

Fig 4 illumination results of software scan aflatoxins cell Flicker halo 表 1 示出对黄曲霉细胞分析测量的结果。实验中检测了用不同浓度（500~2 000 mmol/L）的柠檬醛作用于黄曲霉细胞的力学参量。图 5 显示随浓度改变各力学参量值的变化。

表 1 黄曲霉素细胞随所加柠檬醛浓度变化弯曲模量值(K_c)剪切模量(μ)及其比例系数 ϵ 结果

Tah 1 Aflatoxins cell parameter of K_c (bending modulus), μ (shear elasticity), ϵ (ratio of shear and bending elasticity) As concentration of citral

力学参数 浓度/(mmol·L ⁻¹)	弯曲模量 $K_c \cdot 10^{-18}$	剪切模量 μ ($10^{-6} \text{N} \cdot \text{m}^{-1}$)	比例系数 ϵ
normal	2.864	0.345	1.098
500	1.185	0.151	1.157
1000	2.150	0.322	1.362
1500	2.165	0.390	1.641
2000	4.138	0.662	1.457

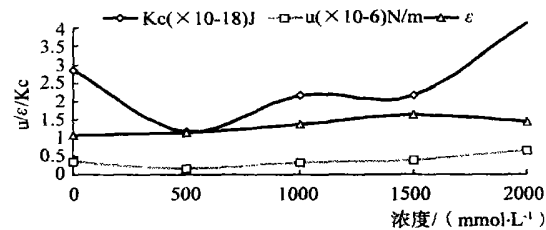


图 5 在不同的柠檬醛浓度下黄曲霉素细胞膜的力学参数 $u/\epsilon/K_c$ 的变化趋势

Fig. 5 Aaflatoxins cell membrane parameter $u/\epsilon/K_c$ trendline following citral concentration variety

4 讨 论

实验结果表明随着柠檬醛浓度的提高黄曲霉素细胞膜的弯曲模量有不断提高的趋势，说明柠檬醛浓度越高，黄曲霉素细胞的变形能力越差，越容易破裂。这与我们实验预测相符，验证了柠檬醛有破坏黄曲霉素细胞膜的作用。应用图像处理手段对 Flicker 现象进行光强强度涨落的频谱分析也是估计测量细胞膜较多地使用的一种方法^[6,7]。其优点为：

计算力学量不需估计细胞的表面积，计算可以避免由于计算表面积给结果所带来的误差；另外还可以估计出细胞膜的表面张力等力学量。缺点为：计算量异常的庞大，并且计算结果受所拍摄的图像质量影响很大。本文利用序列和多幅图像发展了新的运动模型，使模型更加接近于真实运动情况；通过这一改进使本方法的测量精度和可靠性均有提高。所测结果与准弹性激光方法方法所测结果相符^[8]，说明本文方法的正确性。

参考文献:

[1] CHENG Z. Kinetics and mechanics of cell adhesion[J]. Journal of Biomechanics, 2000, 33: 23—33.
[2] FLIEGER R, GREBE R. Cell—elastometry: a new method to measure erythrocyte membrane elasticity[J]. Bioheology, 1997, 3 (34) : 223—234.
[3] ULFENDAHL M, KHANNA S M. The vibration patten of the hearing organ in the waltzing guinea—pig measured using laser heterodyne int eferometry[J]. Neuroscience, 1996, 1 (72) : 199—212.
[4] MORGAN, JEFFREY J, SUROVTSEV I, et al. A framework for whole—cell mathematical modeling[J]. Journal of Theoretical Biology, 2004, 4 (231) : 581—596.
[5] PETER G, GÖRAN L, GÖRAN S. In-situ measurements of gas permeability in fuel cell membranes using a cylindrical microelectrode[J]. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2002, 518: 115—122.
[6] IRANI M, PELEG S. Motion analysis for image enhance-ment; Resolution, occlusion and transparency [J]. J Vis Comm And Image Rep, 1993, 4: 324—335.
[7] KIM S P, SU W Y. Recursive high-resolution reconstruction of blurred multiframe images[J]. IEEE Trans Image Proc, 1993, 3 : 534—539.
[8] 李晶, 黄耀熊, 籍涛, 等. 基于图象分析技术的红细胞膜力学特性多参数动态测量的研究[J]. 生物物理学报, 2002, 18(3): 351—354

Measurement of Aflatoxins Membrane Mechanics Characteristic
Multi parameter Under the Influence of Citral

LI Jing^{1,2}, ZHAO Hai yan³, HUANG Yao xiong⁴, LU Man⁴, ZHANG Qin feng², LI Kun peng², ZHANG Jing qiang²
(1. Department of Medical Engineering, Kunming General Hospital, Kunming 650032, China; 2. School of Life Sciences, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China; 3. Department of Ophthalmic, The First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650030, China; 4. Institute of Biomedical Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: The purpose of this paper is to develop a new dynamic image analyzing technique with the ability of performing non—invasive, in situ, real time measurement on viscoelastic parameters of single intact aflatoxins cell membrane. With these techniques, the bending modulus K_c , shear elasticity μ , and ϵ , the ratio of shear and bending elasticity have been measured as functions under the influence of citral.

Key words: image analyzing technique; membrane flexibility; cell morphology; membrane mechanics parameter
(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>