

文章编号: 1001-4888(2011)05-0503-15

细胞牵引力显微镜反演方法研究进展^{*}

黄建永, 邓昊, 彭小玲, 李姗姗, 熊春阳, 方竞

(北京大学工学院, 北京 100871; 北京大学前沿交叉学科研究院, 北京 100871)

摘要: 细胞与胞外基质微环境的物理力学相互作用涉及许多复杂的生物信号转导通路, 对于细胞的增殖、分化、收缩、迁移和凋亡等都起着重要的调控作用。在单细胞水平上, 运用细胞牵引力显微镜方法定量研究细胞活动规律及特点具有重要的生理病理学意义。牵引力显微镜方法的核心在于如何通过基底变形信息反演得到细胞牵引力场。本文首先介绍细胞牵引力反演方法的基本原理, 然后针对细胞牵引力求解过程中所涉及到的反问题的病态本性, 重点介绍近十几年来细胞牵引力反演算法的研究进展(包括边界元反演算法、基于集中力假设的反演算法、基于积分 Boussinesq 解的反演算法、基于傅立叶变换的反演算法、基于最优滤波的反演算法等)。

关键词: 细胞; 弹性基底; 牵引力显微镜; 数字图像相关; 病态反问题; 正则化

中图分类号: R318.01

文献标识码: A

0 引言

一般来说, 动物组织中的细胞是由膜包围着的微小单元, 它充满着高浓度的化合物水溶液, 并且具有一种特别的能力, 即通过生长及分裂制造出它自身的复制品^[1]。细胞是生命体的结构与生命活动的基本单元, 在细胞内部实现着物质代谢、能量转换和信息传递等一系列相互交织而又精确有序的生命过程, 从而展现一个生机盎然、绚丽多姿的生命世界^[1,2]。细胞一般生活在细胞外基质(即由分泌蛋白和多糖组成的充满胞外空间的复杂网络结构)所形成的微环境中, 细胞与细胞外基质之间主要通过粘着斑(Focal Adhesion)连接在一起^[1,3-5]。粘着斑是由众多蛋白分子构成的“超分子复合体”, 呈椭圆形(一般长轴尺寸为 $2\sim 5\mu\text{m}$, 短轴为 $1\sim 2\mu\text{m}$), 其上面至少包含 150 种以上的不同功能蛋白分子^[6-8], 它一端通过踝蛋白(Talin)与细胞内肌动蛋白骨架相衔接, 另一端通过跨膜蛋白——整合素(Integrin, 也称整合蛋白)与细胞外基质相连, 从而实现细胞与胞外基质的粘附^[9-12]。细胞内肌动蛋白骨架产生的收缩力可以经由粘着斑传递到细胞外基质, 产生所谓的细胞牵引力(Cellular Traction Forces)^[13-20]。在此过程中, 粘着斑上分布的丰富蛋白分子也会积极主动地感知外部微环境的物理化学变化, 适时做出相应的功能性响应^[21-28]。近些年来的研究表明, 细胞与胞外基质微环境之间的这种生物物理力学相互作用涉及许多复杂的信号转导通路, 不仅对于细胞的增殖、分化、收缩、迁移以及凋亡等基本生理过程起着重要的调控作用^[29-34], 而且也直接与诸多严重疾病(例如心血管疾病和肿瘤疾病)的发生发展密切相关^[35-38]。在单细胞水平上定量研究细胞生物物理力学活动规律及特点具有重要的生理病理学意义。

单个细胞与外部基质(基底)之间的作用力一般在纳牛顿量级(甚至更小), 作用区域一般不超过 $50\mu\text{m}^2$, 近几年发展起来的细胞牵引力显微镜方法(Cellular Traction Force Microscopy), 实现了在不破坏细胞生理活性的前提下, 定量表征细胞与细胞外基质(弹性基底)之间的力学相互作用^[39-42]。细胞牵引力显微镜方法的基本思路是将细胞培养在软的凝胶(例如聚丙烯酰胺(Polyacrylamide, PAA))^[43]

^{*} 收稿日期: 2011-05-05; 修回日期: 2011-09-17

通讯作者: 熊春阳(1971—), 男, 博士, 教授。主要研究领域为实验力学和细胞力学。E-mail: cyxiong@pku.edu.cn

或高分子聚合物(例如聚二甲基硅氧烷(Polydimethylsiloxane, PDMS))^[44,45]弹性基底表面,通过分析计算细胞引起的基底弹性变形进而求得细胞牵引力场(如图 1 所示)。采用上述思路求解时,细胞在弹性基底上运动(例如细胞收缩和迁移)过程中各个时刻牵引力变化分布图都可以可视化在计算机屏幕上,因此这种技术通常形象地称作“细胞牵引力显微镜方法”。

细胞牵引力测量方法始于上个世纪八十年代初 Harris 等人^[46,47]的开创性研究工作,他们当时设法在硅酮液体表面形成一层硅胶薄膜,然后把成纤维细胞培养在这层薄膜之上,首次观察到了牵引力导致的硅胶薄膜褶皱变形,并以此估算了细胞牵引力大小。后来, Burton 等人^[17,18]利用紫外照射的方法软化含三甲基末端的苯甲基聚硅氧烷,获得了更加柔软的基底膜,从而提高了这一方法的分辨率。然而,由于基底膜褶皱变形具有高度非线性特点,致使牵引力求解十分困难,因此 Harris 等人开创的测力方法只能获得半定量甚至是定性的计算结果。1997 年, Pelham 和 Wang 等人提出了应用聚丙烯酰胺凝胶材料制作弹性薄膜进行细胞牵引力测量的方法^[43]。聚丙烯酰胺是一种疏松多孔的高聚物,由丙烯酰胺与二丙烯酰胺交联而成,通过调节两种组分的配比,可改变孔径大小,形成不同交联程度、不同硬度的凝胶弹性基底。此种凝胶材料不仅透明,无毒,生物相容性好,适合细胞在其上面粘附生长,而且在制作过程中可以方便地掺入荧光颗粒,在薄膜表面形成随机分布的荧光标记图案(类似于散斑图,如图 1 所示),便于使用光力学测量方法进行基底变形分析^[30,41,43]。以聚丙烯酰胺凝胶弹性基底为例,细胞牵引力显微镜方法主要包括如下几个步骤^[30,41]:(1)根据需要确定丙烯酰胺与二丙烯酰胺的浓度配比,同时掺入适量的荧光标记颗粒,制作硬度合适的弹性薄膜基底,并在基底表面形成随机荧光标记图案;(2)在其上面粘附生长细胞,然后在荧光显微镜下观察细胞活动导致的弹性基底表面变形,并拍摄变形前后的基底荧光“散斑”图案;(3)运用图像处理方法提取弹性基底表面变形信息;(4)根据基底变形反演计算细胞牵引力场。

应该指出,由测量得到的弹性基底位移场求解细胞牵引力场的过程属于数学物理问题中的一类病态“反问题”,这使得无论是理论分析还是数值计算都有特定的困难^[41,48-50]。所谓病态反问题,主要表现为数字物理方程的解不是连续地依赖于观测数据(输入数据),即观测数据的微小偏差都可能导致解的很大变化。对于实际问题,一般观测数据的误差(或噪声)在所难免,因此,基于这些或多或少带有误差的观测数据反推得到的方程解极有可能偏离真解甚远。如何通过尽可能多的先验知识,运用适当的数学物理方法反演得到稳定可靠、高时空分辨率的引力场是细胞牵引力显微镜方法的核心所在,也是本文关注的重点。为此,我们将首先简要介绍一下弹性基底位移场的求解方法,然后着重论述细胞牵引力显微镜反演方法的最新研究进展。

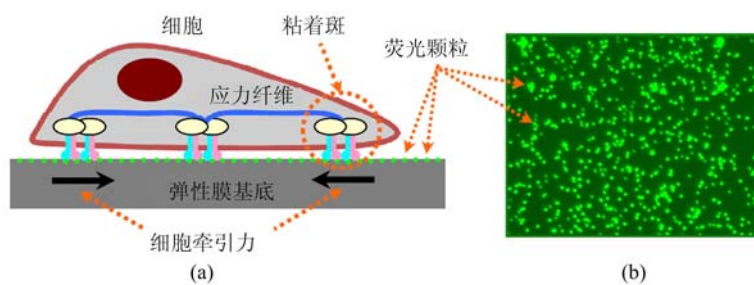


图 1 (a)细胞牵引力显微镜方法示意图;(b)弹性基底表面的荧光颗粒图案

Fig. 1 (a) Schematic of cellular traction force microscopy;

(b) Pattern of fluorescence beads on surface of elastic substrates

1 基底位移场求解方法

在细胞牵引力显微镜方法中,弹性基底膜的制备、力学性能表征、细胞培养与显微观察等前期实验技术相对简单,且已经形成了比较完善的实验流程,限于篇幅,本文将不再进行详细介绍,有兴趣的读者可以参考相关文献^[30,41,43,51-60]。归纳起来,基底位移场的求解方法可以大致分为两种,即基于模式识别技术的荧光粒子位移跟踪方法(Pattern Recognition in Identifying Pairs of Beads)和数字图像相关方法

(Digital Image Correlation, DIC)。

1.1 基于模式识别技术的荧光粒子位移跟踪方法

该方法通过精确匹配弹性膜基底变形前后其表面荧光微颗粒位置信息,达到快速准确获取基底弹性变形信息的目的^[61,62]。用模式识别技术提取弹性基底位移场的基本思路如图 2 所示。

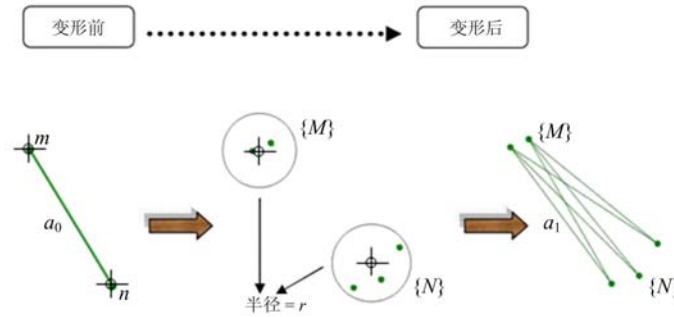


图 2 基于模式识别技术的荧光粒子位移跟踪方法计算弹性膜基底位移场示意图

Fig. 2 A schematic view of fluorescence bead matching algorithm

首先,把变形前的弹性基底荧光图作为参考图像,并在其中任选一个荧光颗粒点 m ,找到其邻近荧光颗粒点 n ;其次,在变形后的弹性基底荧光图像中分别预搜索荧光颗粒点 m 和 n 的可能位置集合 $\{M\}$ 和 $\{N\}$;最后,精确匹配从集合 $\{M\}$ 到 $\{N\}$ 所有可能情况,这样,根据基底弹性位移场唯一确定性这一限制条件,我们总能确定荧光颗粒 m 和 n 之间相对位置。依次类推,就可以获得基底弹性变形后所有荧光颗粒点相对位置信息^[61,62]。此方法通过对单个的荧光粒子位置的跟踪方式,最终可获得所有粒子的位移,整个弹性基底的位移场可以通过插值的方法计算出来。显而易见,这种方法的计算精度严重依赖于荧光标记颗粒的分布密度和分布的均匀性,当表面荧光颗粒分布密度较高时,单个荧光粒子的位移场的“错误识别”也会增多,当表面荧光颗粒分布密度较低时,远离荧光颗粒的位置处的位移需要由插值方法求得,这在一定程度上也会损失精度。

1.2 数字图像相关方法

众所周知,数字图像相关方法主要通过一系列的图像互相关运算,来获得变形后的图像相对于变形前图像的位移(以及应变)场^[63-65]。具体来说,在参考图中选取适当的(矩形)子区域 A ,然后在变形图中的对应区域附近搜索该子区域,计算它们的互相关系数,则相关系数的峰值所在的位置就代表变形前 A 区域当前最可能的位置,通过采用亚像素搜索算法,该方法得到的位移场能够精确到亚像素水平。数字图像相关技术最早应用于实验固体力学领域,现已在材料力学行为测试、微尺度变形测量等领域得到广泛应用^[66-71]。目前,基于数字图像相关技术的位移(以及应变)提取算法已经开始应用于求解细胞基底图像变形场^[72-75]。根据基底表面荧光粒子分布的特征(包括粒子的分布密度、局部粒子分布差异性特征),这种方法能够比较准确高效地计算出基底图像的全场位移和应变信息^[72-75]。

2 细胞牵引力反演方法

2.1 基本原理

一般细胞的直径^[22]大约 $10 \sim 40 \mu\text{m}$,而近似椭圆形的粘着斑^[5]长轴大约 $2 \sim 5 \mu\text{m}$,短轴大约 $1 \sim 2 \mu\text{m}$,基底的变形^[39-41]一般不超过 $3 \mu\text{m}$,而(聚丙烯酰胺)弹性基底厚度^[40,41,52,53]一般都至少是 $60 \sim 70 \mu\text{m}$,理论分析表明对于细胞与弹性基底相互作用而言,这种厚度的基底可以采用基于半空间无穷厚度假设的 Boussinesq 基本解来分析处理^[40,41,76-78]。若把每一个孤立的基底粘附位置所承担的细胞骨架收缩力看成一个集中力 $F(r)$,且这些集中力都切向作用于基底表面,用 $u(r)$ 表示由此引起的弹性基底表面位移,则细胞牵引力 $F(r)$ 和基底表面位移 $u(r)$ 之间满足下面的第一类 Fredholm 积分方程^[40,41,48]:

$$u_i(r) = \int G_{ij}(r-r') F_j(r') dr' \quad (1)$$

其中, $r = (x, y)^T = (x_1, x_2)^T$ 代表位置向量, 积分号内重复出现的下标(亚指标)项代表求和运算; G_{ij} 是基于 Boussinesq 基本解的格林函数(积分核), 可表示为如下形式:

$$G_{ij}(d) = \frac{1+\nu}{\pi E d} \left[\delta_{ij}(1-\nu) + \frac{(x_i - x'_i)(x_j - x'_j)}{d^2} \nu \right] \quad (2)$$

其中, $d = |r - r'|$ 代表相对位置向量; E 和 ν 分别代表各向同性的聚丙烯酰胺弹性基底的弹性模量和泊松比; δ_{ij} 是 Kronecker 符号(即当 $i = j$ 时, $\delta_{ij} = 1$; 否则 $\delta_{ij} = 0$), $1 \leq i, j \leq 2$ 。考虑到各向同性的聚丙烯酰胺弹性基底的近乎不可压缩特性, 一般可将其泊松比设为 $\nu = 0.5$, 这样, 积分核 G_{ij} 也可以进一步简化为^[78-81]:

$$G_{ij}(d) = \frac{3}{4\pi E d} \left[\delta_{ij} + \frac{(x_i - x'_i)(x_j - x'_j)}{d^2} \right] \quad (3)$$

对于实际的细胞牵引力数值计算, 通常将(1)式表示的连续方程进行离散化处理, 即:

$$u = GF \quad (4)$$

其中, 细胞牵引力场为 $F = (F_1(r'_1) \quad F_2(r'_1) \quad F_1(r'_2) \quad F_2(r'_2) \quad \cdots \quad F_1(r'_N) \quad F_2(r'_N))^T$, 基底表面位移场为 $u = (u_1(r_1) \quad u_2(r_1) \quad u_1(r_2) \quad u_2(r_2) \quad \cdots \quad u_1(r_N) \quad u_2(r_N))^T$, 而基于 Boussinesq 基本解的离散格林函数(积分核)矩阵可以写作:

$$G = \begin{bmatrix} G_{11}(r_1 - r'_1) & G_{12}(r_1 - r'_1) & G_{11}(r_1 - r'_2) & G_{12}(r_1 - r'_2) & \cdots \\ G_{21}(r_1 - r'_1) & G_{22}(r_1 - r'_1) & G_{21}(r_1 - r'_2) & G_{22}(r_1 - r'_2) & \cdots \\ G_{11}(r_2 - r'_1) & G_{12}(r_2 - r'_1) & G_{11}(r_2 - r'_2) & G_{12}(r_2 - r'_2) & \cdots \\ G_{21}(r_2 - r'_1) & G_{22}(r_2 - r'_1) & G_{21}(r_2 - r'_2) & G_{22}(r_2 - r'_2) & \cdots \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \ddots \end{bmatrix} \quad (5)$$

注意, 由于位移采样点的个数不一定与牵引力采样点的个数相等, 因此上述矩阵 G 不一定为方阵^[78-81]。

原则上, 我们就可以利用(4)式根据测量得到的基底位移场求解出细胞牵引力场, 但事实远非如此。正如前面所述, 由基底位移场求解细胞牵引力场的过程涉及具有奇异积分核(即 $G_{ij}(d=0) = \infty$)的第一类 Fredholm 积分方程, 属于高度病态的反问题范畴^[48-50]。积分核 G_{ij} 在(1)式等号右端的积分过程中通常起着光滑的作用, 这种光滑作用的结果实际上常常丢失信息, 而逆运算(即由测量得到的位移场求解细胞牵引力场)却很难直接还原这些丢失的信息, 这将导致细胞牵引力场的求解计算结果极其不稳定。在通过公式(1)和(4)直接反求细胞牵引力场过程中, 输入位移数据的微小波动或误差都极有可能引起反演结果的巨大波动^[40, 41]。为了尽可能准确地重建细胞牵引力场, 必须根据当前问题的特点, 寻找一些先验的知识来最大限度地恢复丢失的信息, 从而获得比较可靠的反演结果。

2.2 牵引力反演算法

一般来说, 处理病态反问题的通常办法是采用所谓的正则化(也称规整化, Regularization)^[48-50]。正则化的目的就是修改一个病态问题成为一个良态问题, 使得问题的解在物理上是合理的, 并且连续地依赖于数据。当然, 对问题的任何一种修改都必须是合理的, 必须符合人们对于问题的解的先验知识。事实上, 所谓正则化, 其基本思想就是利用关于解的先验知识, 构造附加约束或改变求解策略, 使得反问题的解变得确定和稳定^[41, 48-50]。由于物理问题的多样性以及人们对于先验知识的了解和利用方面的差异, 不同的问题和不同的研究者往往会构建不同的反演方法。对于细胞牵引力反演而言, 目前主要存在如下几种方法^[39-41]:

(1) DW 方法。

DW 方法是由 Dembo 和 Wang 在 1999 年首先提出的^[78], 有的文献中^[40]也称此方法为边界元法(Boundary Element Method, BEM)。DW 方法出现早期, 这一方法把细胞与弹性基底接触区域划分为网格, 假设细胞牵引力以集中力的形式分别作用在这些网格的节点上, 然后通过位移场来反演相应的细胞牵引力场。由于位移采样点的总数(这里用 m 表示)一般多于网格节点上的细胞牵引力采样点的总数(这里用 n 表示), 因此, 表征牵引力与基底位移场之间关系的离散格林函数系数矩阵为非方阵, 这使

得直接通过系数矩阵求逆的方法求得细胞牵引力场的思路变得行不通。另一方面,由于基于集中力假设的 Boussinesq 解生成的格林函数具有奇异性,这样得到的 DW 方程是具有弱奇异核的第一类 Fredholm 积分方程,这类方程一般来说是高度病态的。针对这些问题, Dembo 和 Wang 采用著名的 Tikhonov 正则化方法 (Tikhonov Regularization)^[39-41,48-50] 来提高细胞牵引力反演结果的稳定可靠性。此时,正则化参数 λ 可基于使下面的表达式达到最小值来确定:

$$\chi^2 + \lambda I^2 \quad (6)$$

其中 χ^2 代表 χ^2 统计,即:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^m \frac{(d_i - \sum_{j=1}^n G(r_{ij}) F_j)^2}{\sigma_i^2} \quad (7)$$

上式中, d_i 代表聚丙烯酰胺弹性基底表面第 i 个荧光粒子的位移测量值大小; σ_i 代表 d_i 的误差; $G(r_{ij})$ 是基于集中力假设的 Boussinesq 解的离散格林函数矩阵; F_j 代表第 j 个网格节点上的细胞牵引力分量。 I^2 是与网格划分有关的约束项,其具体取值比较复杂,有兴趣的读者可以参考文献[20]。

DW 方法试图通过先验的信息来提高反演结果的可靠性,但操作过程十分复杂,不利于数据的实时处理;由于只假设细胞牵引力仅在网格的节点上存在,不同的网格划分将直接导致这些细胞牵引力作用点位置发生变化,这说明 DW 方法具有一定的“主观性”,细胞牵引力反演结果将因此受到影响。另外, DW 方法在确定约束项 I^2 时假设细胞牵引力场分布是光滑的^[39],这与实际情况也有较大差别。

(2) TRPF 方法。

TRPF (Traction reconstruction with point forces) 方法 (基于集中力假设的细胞牵引力反演方法) 是 Schwarz 等人在 2002 年首先提出的^[40,76,81]。该方法假设在细胞与基底的每个粘附位置 (粘着斑) 上受到集中力的作用,由于在集中力作用点处经典 Boussinesq 解呈现奇异性,因此,这种方法要求位移采样点与集中力的作用点位移必须分开一段距离,TRPF 方法中的格林函数矩阵一般具有较大的条件数,集中力假设导致的牵引力反演病态问题较严重。为了提高反演结果的可靠性,TRPF 方法采用零阶 Tikhonov 正则化方法,即:

$$\min_F \{ \|GF - u\|^2 + \lambda_0^2 \|F\|^2 \} \quad (8)$$

上式中, G 是基于集中力假设的 Boussinesq 解的离散格林函数矩阵; F 和 u 分别代表细胞牵引力场和弹性基底表面位移场; λ_0 是零阶正则化参数。一般来说,此正则化参数的选取十分关键,否则得到的反演结果会很糟糕^[81]。TRPF 方法采用 L 曲线法来确定 λ_0 的取值,需要指出的是, L 曲线法需要专门的曲线拐角识别算法 (Corner-finding Algorithm) 来确定最优的正则化参数,这在一定程度上降低了 TRPF 方法的反演效率。另外,使用 TRPF 方法求解细胞牵引力场时,一般将单个粘着斑位置处的牵引力作用点人为地选在其几何中心处,因此,反演前必须事先准确知道粘着斑分布的位置^[40,76,81,82],否则由此带来的误差将会对细胞牵引力反演造成很大影响。

(3) 基于 Boussinesq 积分分解的牵引力反演方法。

细胞主要经由粘着斑对细胞外基质 (弹性基底) 施加力。Balaban 等人的生物学实验表明^[82],作用在粘着斑上的切向力大小与粘着斑的面积近似成正比,这一事实显示单个粘着斑上所受的牵引力呈现均匀分布的特点。根据上述实验结果并考虑到以往基于集中力 Boussinesq 基本解对于细胞牵引力反演的一些弊端,本文作者提出了基于分布力的 Boussinesq 积分分解来代替基于集中力的 Boussinesq 基本解进行细胞牵引力反演计算^[83]。其基本思路是把细胞下面的弹性基底划分为矩形网格 (作为采样栅格),并假设每个矩形网格上的细胞牵引力呈均匀分布,如图 3 所示。

设矩形网格单元的长和宽分别为 $2l$ 和 $2b$,其上作用有切向均布牵引力,强度用 p 表示,局部坐标原点 O 选择在此矩形单元的几何中心位置,则这个网格单元上均匀分布的牵引力引起弹性基底表面上任意一点 (x, y) 位置处的弹性变形可以表示为如下的积分形式 (即把经典的 Boussinesq 基本解在此矩形区域上进行积分):

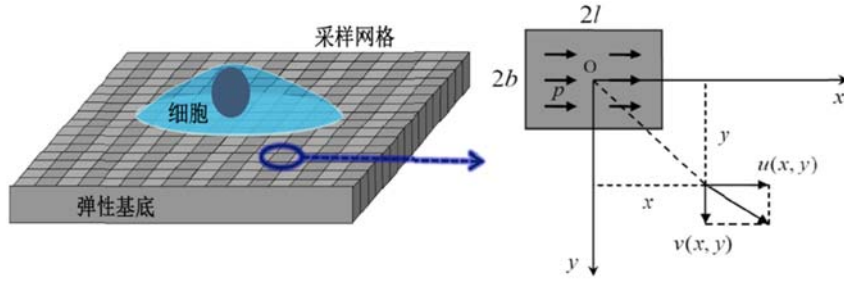


图 3 基于分布力 Boussinesq 积分解的细胞牵引力反演方法示意图

Fig. 3 Schematic of cellular traction recovery based upon an integral Boussinesq solution

$$\begin{cases} u(x, y) = \int_{-b}^b \int_{-l}^l \frac{p(1+\nu)}{2\pi ER} \left\{ 1 + \frac{(x-\xi)^2}{R^2} + (1-2\nu) \left[\frac{R}{R+z} - \frac{(x-\xi)^2}{(R+z)^2} \right] \right\} d\xi d\eta \\ v(x, y) = \int_{-b}^b \int_{-l}^l \frac{p(1+\nu)(x-\xi)(y-\eta)}{2\pi ER} \left[\frac{1}{R^2} - \frac{1-2\nu}{(R+z)^2} \right] d\xi d\eta \end{cases} \quad (9)$$

经过一系列较复杂繁琐的数学积分运算,可以得到如下的解析表达式^[41,83]:

$$\begin{aligned} u(x, y) = & \frac{p(1+\nu)}{2\pi E} (2 \times ((b-y) \times \log(\frac{(l-x)+R_1}{(-l-x)+R_3}) - (-b-y) \times \log(\frac{(l-x)+R_2}{(-l-x)+R_4})) \\ & + (l-x) \times \log(\frac{(b-y)+R_1}{(-b-y)+R_2}) - (-l-x) \times \log(\frac{(b-y)+R_3}{(-b-y)+R_4}) \\ & + (1-2\nu) \times ((l-x) \times \log(\frac{(b-y)+R_1}{(-b-y)+R_2}) - (-l-x) \times \log(\frac{(b-y)+R_3}{(-b-y)+R_4}))) \end{aligned} \quad (10)$$

$$v(x, y) = \frac{p\nu(1+\nu)}{\pi E} (-R_1 + R_2 + R_3 - R_4) \quad (11)$$

其中, $R_1 = \sqrt{(l-x)^2 + (b-y)^2}$, $R_2 = \sqrt{(l-x)^2 + (b+y)^2}$, $R_3 = \sqrt{(l+x)^2 + (b-y)^2}$, $R_4 = \sqrt{(l+x)^2 + (b+y)^2}$ 。应该指出,上述基于矩形分布力的 Boussinesq 积分解消除了经典 Boussinesq 基本解在集中力作用点位置处的奇异性。为了构建新的离散格林函数矩阵,我们设牵引力为单位强度($p=1$),基底泊松比 $\nu=0.5$ (聚丙烯酰胺基底),这样,以上两式可进一步化简为:

$$\begin{aligned} \tilde{u}(x, y) = & \frac{3}{4\pi E} (2 \times ((b-y) \times \log(\frac{(l-x)+R_1}{(-l-x)+R_3}) - (-b-y) \times \log(\frac{(l-x)+R_2}{(-l-x)+R_4})) \\ & + (l-x) \times \log(\frac{(b-y)+R_1}{(-b-y)+R_2}) - (-l-x) \times \log(\frac{(b-y)+R_3}{(-b-y)+R_4})) \end{aligned} \quad (12)$$

$$\tilde{v}(x, y) = \frac{3}{4\pi E} (-R_1 + R_2 + R_3 - R_4) \quad (13)$$

由此,可以得到新的基于矩形分布力 Boussinesq 积分解的离散格林函数矩阵^[41,83]:

$$[g_{ij}] = \begin{bmatrix} g_{11} & g_{12} \\ g_{21} & g_{22} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \tilde{u}(x, y) & -\tilde{v}(y, -x) \\ \tilde{v}(x, y) & \tilde{u}(y, -x) \end{bmatrix} \quad (14)$$

这样,细胞牵引力场和基底表面位移场之间的对应关系可重新数值离散为如下形式:

$$u = gT \quad (15)$$

其中,位移场为 $u = (u_1(r_1) \quad u_2(r_1) \quad u_1(r_2) \quad u_2(r_2) \quad \cdots \quad u_1(r_N) \quad u_2(r_N))^T$, 切向的细胞牵引力场为 $T = (T_1(r'_1) \quad T_2(r'_1) \quad T_1(r'_2) \quad T_2(r'_2) \quad \cdots \quad T_1(r'_N) \quad T_2(r'_N))^T$, N 代表采样点总数,而此时系数矩阵为 $(2N \times 2N)$ 阶方阵,即:

$$g = \begin{bmatrix} g_{11}(r_1 - r'_1) & g_{12}(r_1 - r'_1) & g_{11}(r_1 - r'_2) & g_{12}(r_1 - r'_2) & \cdots \\ g_{21}(r_1 - r'_1) & g_{22}(r_1 - r'_1) & g_{21}(r_1 - r'_2) & g_{22}(r_1 - r'_2) & \cdots \\ g_{11}(r_2 - r'_1) & g_{12}(r_2 - r'_1) & g_{11}(r_2 - r'_2) & g_{12}(r_2 - r'_2) & \cdots \\ g_{21}(r_2 - r'_1) & g_{22}(r_2 - r'_1) & g_{21}(r_2 - r'_2) & g_{22}(r_2 - r'_2) & \cdots \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \ddots \end{bmatrix}_{2N \times 2N} \quad (16)$$

最后,基于矩形分布力 Boussinesq 积分分解的细胞牵引力场可以通过下式求解:

$$T = g^{-1} u \quad (17)$$

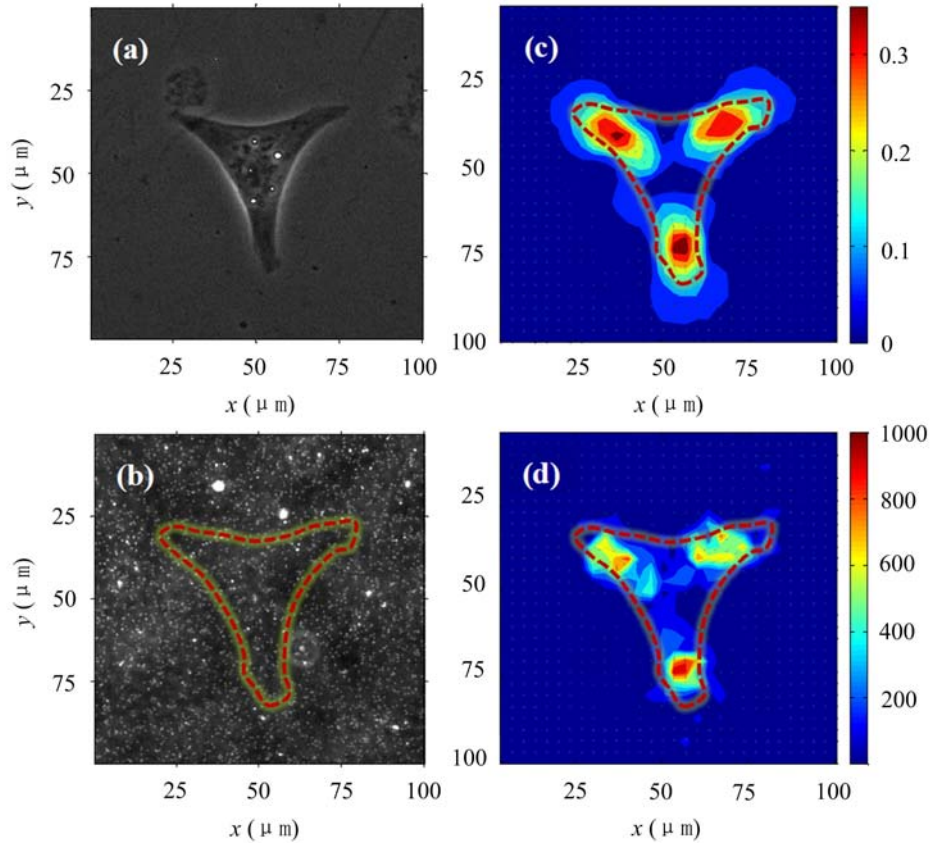


图4 (a)鼠心肌细胞相差图;(b)基底荧光图;(c)使用数字图像相关方法计算得到的基底位移场(单位:μm);(d)基于分布力 Boussinesq 积分分解反演方法得到的细胞牵引力场(单位:Pa)

Fig. 4 (a) A phase-contrast image of neonatal rat ventricular myocyte; (b) the corresponding fluorescence image of polyacrylamide gel substrate; (c) substrate displacement field calculated by the DIC method(unit of colorbar: μm) and (d) cell traction stress field reconstructed by the algorithm based up an integral Boussinesq solution(unit of colorbar: Pa)

对于这种基于矩形分布力 Boussinesq 积分分解的细胞牵引力反演算法而言,采样网格单元的实际尺寸一般可以达到 $(1 \sim 2 \mu\text{m}) \times (1 \sim 2 \mu\text{m})$,这与粘着斑的短轴尺寸 $(1 \sim 2 \mu\text{m})$ 大致相当。此时,离散格林函数矩阵 g 的 2 范数下的条件数一般不会超过 10^2 量级,反演过程中位移噪声的放大效应会被显著抑制,牵引力的计算结果比较稳定可靠。在这种情况下,可以不必进行复杂的正则化处理,反演计算得以大大简化,这对于发展具有实时处理功能的高效牵引力显微分析系统是至关重要的。然而需要说明的是,当矩形采样单元尺寸进一步减小时,此问题所涉及到的病态效应将开始显现,此方法对噪声的抑制能力开始减弱,反演的可靠性将会降低^[41,83]。因此,运用如上所述反演方法时,我们推荐使用的采样单元实际尺寸为 $(1 \sim 2 \mu\text{m}) \times (1 \sim 2 \mu\text{m})$ 。

(4) FTTC 方法。

FTTC 是 Fourier transform traction cytometry 的英文缩写(基于傅立叶变换的细胞牵引力反演方法),这一细胞牵引力反演方法是由 Butler 等人在 2002 年首先提出的^[84]。他们当时注意到表征细胞牵引力与基底表面位移之间关系的第一类 Fredholm 积分方程(即公式(1))可等效地写作如下的卷积形式:

$$\vec{u}(r) = G(r) \otimes \vec{T}(r) \quad (18)$$

其中位移向量用 $\vec{u}(r) = (u_x(r), u_y(r))^T$ 表示,而相应的牵引力向量用 $\vec{T}(r) = (T_x(r), T_y(r))^T$ 表示(注:在(1)式中牵引力(集中力)用符号 $F(r)$ 代表,而(15)和(18)式中的牵引力(分布力)用符号 $T(r)$ 代表); $G(r)$ 是基于集中力 Boussinesq 基本解的格林函数(积分核),其分量形式如公式(2)和(3)所示。对(18)式两端作二维傅里叶变换并运用卷积定理^[48,49]可知:

$$\vec{u}(\vec{k}) = \tilde{G}(\vec{k}) \vec{T}(\vec{k}) \quad (19)$$

上式两边左乘 $\tilde{G}^{-1}$,然后在进行傅里叶逆变换,则有:

$$\vec{T}(r) = FT_2^{-1}(\tilde{G}(\vec{k})^{-1}\vec{u}(\vec{k})) \quad (20)$$

其中, $FT_2^{-1}(\cdot)$ 表示二维傅立叶逆变换; $\vec{u}(\vec{k})$ 、 $\tilde{G}(\vec{k})$ 和 $\vec{T}(\vec{k})$ 分别表示位移场、离散格林系数矩阵以及细胞牵引力场的二维傅立叶变换形式, $\vec{k} = (k_x, k_y)^T$ 表示二维傅立叶空间内的波数向量。在实际求解过程中,位移场从 $\vec{u}(r)$ 变换到 $\vec{u}(\vec{k})$,细胞牵引力场从 $\vec{T}(\vec{k})$ 变换到 $\vec{T}(r)$ 的过程均可直接通过快速傅立叶变换(FFT)实现;空间域中的系数矩阵 $G(r)$ 所对应的二维傅立叶空间表示形式 $\tilde{G}(\vec{k})$ 已经由 Butler 等通过解析的方法巧妙求得^[40,84],其表达式为:

$$G(\vec{k}) = G(k_x, k_y) = A \frac{2\pi}{k^3} \begin{bmatrix} (1-\nu)k^2 + \nu k_y^2 & -\nu k_x k_y \\ -\nu k_x k_y & (1-\nu)k^2 + \nu k_x^2 \end{bmatrix} \quad (21)$$

其中, $A = \frac{(1+\nu)}{\pi E}$, $k = |\vec{k}| = \sqrt{k_x^2 + k_y^2}$ 。另外,由于波向量的零点 $(k_x, k_y) = (0, 0)$ 对应于空间域中的刚体位移部分,与基底的弹性变形(位移场)无关,因此 FTTC 方法通常不计算这一波数处的细胞牵引力分量^[84],即直接令 $\vec{T}(0) = 0$ 。

FTTC 方法把细胞牵引力反演变换到 Fourier 空间来实现,这样,通过对不同波数位置处的位移分量与相应的系数矩阵直接相乘,就可获得这一波数处的牵引力分量。由于在傅立叶空间中力与位移不存在耦合关系,因此,FTTC 方法将极大地节省数据存储空间。另一方面,FTTC 方法可利用成熟的快速傅立叶变换(FFT)技术来提高求解计算速度,易于进行高效牵引力反演运算。与此同时,也应该指出,在上述 FTTC 方法中,由于输入的位移场不具有严格的周期性,往往在牵引力场的边界会产生频率混叠效应,但这些仅在图像视场边界处出现,一般不会影响细胞位置处的粘附力反演效果(因为通常细胞总是在远离图像边界的中心位置)。FTTC 方法通过傅立叶变换的方式有效地避免了基于集中力的 Boussinesq 基本解的奇异性问题,但是,在解卷积过程中依然存在病态的问题,严格的理论和数值分析表明^[40,41,60,85],较稀疏采样网格的情况下(例如 20~30 个像素),即其对应的奈奎斯特采样频率与位移场的频谱大致相当时,FTTC 方法不会表现出反演病态现象,具有较好的稳定性。但是当采用网格进一步增加时,FTTC 方法会出严重的病态,对高频噪声异常敏感,牵引力反演结果极不可靠^[41,60,85]。

(5) 基于二维傅里叶空间最优滤波的牵引力反演方法。

上述经典 FTTC 方法首次实现了在傅立叶空间求解细胞牵引力场,但这一方法的一个致命弱点在于没有充分考虑到反卷积的病态问题,因此,它用于细胞牵引力反演存在很大风险,特别是在位移场信噪比较低的情况下,其反演获得的牵引力场往往被噪声严重“污染”,反演精度显著降低,甚至得不到可靠的牵引力反演结果^[40,41,60]。为此,本文作者基于经典 FTTC 方法,发展了一整套基于二维傅立叶空间最优滤波的细胞牵引力反演方法^[41,85]。

考虑到测量得到的位移场含有噪声,即:

$$\vec{u}(x, y) = \vec{u}(x, y) + \vec{n}(x, y) \quad (22)$$

或写作分量形式:

$$\begin{bmatrix} \hat{u}_x(x, y) \\ \hat{u}_y(x, y) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} u_x(x, y) \\ u_y(x, y) \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} n_x(x, y) \\ n_y(x, y) \end{bmatrix} \quad (23)$$

其中, $\hat{\vec{u}}(x, y) = [\hat{u}_x(x, y) \quad \hat{u}_y(x, y)]^T$ 代表测量得到的含噪声位移场(例如通过 DIC 方法得到的弹性基底表面位移场); $\vec{u}(x, y) = [u_x(x, y) \quad u_y(x, y)]^T$ 表示无噪声的真实位移场; $\hat{\vec{n}}(x, y) = [n_x(x, y) \quad n_y(x, y)]^T$ 代表加性白噪声。对(22)式进行二维傅立叶变换,则有:

$$\hat{\vec{u}}(k_x, k_y) = \vec{u}(k_x, k_y) + \vec{n}(k_x, k_y) \quad (24)$$

其分量形式可以等效地表示为:

$$\begin{bmatrix} \hat{u}_x(k_x, k_y) \\ \hat{u}_y(k_x, k_y) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} u_x(k_x, k_y) \\ u_y(k_x, k_y) \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} n_x(k_x, k_y) \\ n_y(k_x, k_y) \end{bmatrix} \quad (25)$$

另一方面,在经典的 FTTC 方法中,由于没有考虑位移场噪声的影响,所以根据(20)式可知:

$$\vec{T}(\vec{k}) = \vec{G}(\vec{k})^{-1} \vec{u}(\vec{k}) \quad (26)$$

即在没有噪声(或不考虑噪声)的情况下,其分量形式可以表示为:

$$\begin{cases} T_x(\vec{k}) = R_{11}(\vec{k}) u_x(\vec{k}) + R_{12}(\vec{k}) u_y(\vec{k}) \\ T_y(\vec{k}) = R_{21}(\vec{k}) u_x(\vec{k}) + R_{22}(\vec{k}) u_y(\vec{k}) \end{cases} \quad (27)$$

注,在上式中我们已经事先设 $R(\vec{k}) = \vec{G}(\vec{k})^{-1}$, 即:

$$\begin{bmatrix} R_{11}(k_x, k_y) & R_{12}(k_x, k_y) \\ R_{21}(k_x, k_y) & R_{22}(k_x, k_y) \end{bmatrix}_{2 \times 2} = \left[A \frac{2\pi}{k^3} \begin{bmatrix} (1-\nu)k^2 + \mathcal{K}_y^2 & -\mathcal{K}_x \mathcal{K}_y \\ -\mathcal{K}_x \mathcal{K}_y & (1-\nu)k^2 + \mathcal{K}_x^2 \end{bmatrix} \right]^{-1} \quad (28)$$

对于实际含有噪声的位移场(即(24)式),可以通过类比(27)式,构造出带有最优(Wiener)滤波^[48,49]参数的细胞牵引力表达式,即:

$$\begin{cases} \hat{T}_x(\vec{k}) = R_{11}(\vec{k}) \hat{u}_x(\vec{k}) \Phi_{xx}(\vec{k}) + R_{12}(\vec{k}) \hat{u}_y(\vec{k}) \Phi_{xy}(\vec{k}) \\ \hat{T}_y(\vec{k}) = R_{21}(\vec{k}) \hat{u}_x(\vec{k}) \Phi_{yx}(\vec{k}) + R_{22}(\vec{k}) \hat{u}_y(\vec{k}) \Phi_{yy}(\vec{k}) \end{cases} \quad (29)$$

其中, $\Phi_{xx}(\vec{k})$, $\Phi_{xy}(\vec{k})$, $\Phi_{yx}(\vec{k})$, $\Phi_{yy}(\vec{k})$ 分别为实最优滤波参数。

接下来,我们期望选取适当的上述滤波参数,使求得的牵引力 $\hat{\vec{T}}$ (如公式(29)所示)在最小均方差意义下尽可能地接近真实细胞牵引力场 $\vec{T}$ (尽管如公式(27)所示的真实牵引力场 $\vec{T}$ 总是未知的),即要求下面的表达式取得最小值:

$$\begin{aligned} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} |\hat{\vec{T}}(\vec{r}) - \vec{T}(\vec{r})|^2 d\vec{r} &= \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} |\hat{\vec{T}}(x, y) - \vec{T}(x, y)|^2 dx dy \\ &= \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} |\hat{\vec{T}}(k_x, k_y) - \vec{T}(k_x, k_y)|^2 dk_x dk_y \end{aligned} \quad (30)$$

由此,经过一系列较复杂繁琐的数学推导^[41,85],便可得到滤波系数 $\Phi_{xx}(\vec{k})$, $\Phi_{xy}(\vec{k})$, $\Phi_{yx}(\vec{k})$, $\Phi_{yy}(\vec{k})$ 的解析表达式:

$$\begin{aligned} \Phi_{xx}(\vec{k}) &= \begin{cases} \frac{G_6 G_2 - G_5 G_4}{G_3 G_2 - G_1 G_4} & (k_x, k_y \neq 0) \\ 0 & (k_x, k_y = 0) \\ \frac{|u_x|^2}{|u_x|^2 + |n_x|^2} & (\text{otherwise}) \end{cases}, & \Phi_{xy}(\vec{k}) &= \begin{cases} \frac{G_5 G_3 - G_1 G_6}{G_3 G_2 - G_1 G_4} & (k_x, k_y \neq 0) \\ 0 & (\text{otherwise}) \end{cases} \\ \Phi_{yx}(\vec{k}) &= \begin{cases} \frac{Q_6 Q_2 - Q_5 Q_4}{Q_3 Q_2 - Q_1 Q_4} & (k_x, k_y \neq 0) \\ 0 & (\text{otherwise}) \end{cases}, & \Phi_{yy}(\vec{k}) &= \begin{cases} \frac{Q_5 Q_3 - Q_1 Q_6}{Q_3 Q_2 - Q_1 Q_4} & (k_x, k_y \neq 0) \\ 0 & (k_x, k_y = 0) \\ \frac{|u_y|^2}{|u_y|^2 + |n_y|^2} & (\text{otherwise}) \end{cases} \end{aligned}$$

其中,

$$Q_1 = 2R_{21}^2(|u_x|^2 + |n_x|^2), \quad Q_2 = R_{21}R_{22}(u_y^* u_x + u_y u_x^*),$$

$$Q_3 = R_{21} R_{22} (u_x^* u_y + u_x u_y^*), \quad Q_4 = 2R_{22}^2 (|u_y|^2 + |n_y|^2),$$

$$Q_5 = 2R_{21}^2 |u_x|^2 + R_{21} R_{22} (u_y^* u_x + u_y u_x^*), \quad Q_6 = 2R_{22}^2 |u_y|^2 R_{21} R_{22} (u_x^* u_y + u_x u_y^*)$$

最后,把上述四个滤波系数 $\Phi_{xx}(\vec{k}), \Phi_{xy}(\vec{k}), \Phi_{yx}(\vec{k}), \Phi_{yy}(\vec{k})$ 的解析表达式代入(29)式,就可计算出经过最优滤波的细胞牵引力频率分量 $\hat{T}(\vec{k}) = [\hat{T}_x(k_x, k_y) \quad \hat{T}_y(k_x, k_y)]^T$, 通过二维傅立叶逆变换,可得到相应的细胞牵引力场^[41,85],即:

$$\hat{T}(\vec{r}) = FT_z^{-1}[\hat{T}(\vec{k})] \quad (31)$$

理论和数值模拟实验表明,这种基于二维傅立叶空间最优滤波的细胞力反演方法能有效抑制反卷积病态,显著降低牵引力反演误差,提高反演精度。特别是在较低位移信噪比情况下,这种滤波方法的优势更加明显。对比而言,经典 FTTC 方法一般只能在较高位移信噪比(例如位移信噪比在 30dB 以上)情况下应用才不至于引起较大的反演误差^[41,85]。

除此以外,有些学者也提出了一些其它的反演算法,例如 Ambrosi 等人用伴随方程法^[86,87]、Rieu 等人用迭代算法^[79,80],Yang 等人用有限元方法^[39,62]也分别尝试进行了细胞牵引力反演计算。限于篇幅,本文不再赘述,有兴趣的读者可以参考相关文献。最后应该指出,本文所述的细胞牵引力显微镜(反演)方法都是针对细胞与二维平面弹性基底相互作用的,而实际的细胞往往生活在三维的环境中^[88-91],最近一两年已经有学者开始借助于三维共聚焦显微镜技术发展三维细胞牵引力反演新技术,并取得了一些新成果^[92-98]。

3 结束语

最近十几年发展起来的细胞牵引力显微镜方法,已经作为一种新兴的细胞力学测量工具,被越来越多的生物医学领域研究人员所关注和使用。本文首先介绍了细胞牵引力显微镜方法的基本原理和实现步骤,随后重点论述了细胞牵引力显微镜反演方法的最新进展,希望本文的工作能对实验力学与细胞力学相关研究领域的科研工作者有所帮助。

参考文献:

- [1] Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Essential Cell Biology—An Introduction to the Molecular Biology of the Cell[M]. New York: Garland Publishing, 1998.
- [2] Boal D. Mechanics of the Cell[M]. Cambridge University Press: Cambridge, U. K., 2002.
- [3] Sastry S K, Burridge K. Focal adhesions: A nexus for intracellular signaling and cytoskeletal dynamics[J]. Experimental Cell Research, 2000, 261(1): 25—36.
- [4] Gumbiner B M. Cell adhesion: The molecular basis of tissue architecture and morphogenesis[J]. Cell, 1996, 84(3): 345—357.
- [5] Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada K M. Transmembrane extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2001, 2(11): 793—805.
- [6] Zaidel-Bar R, Geiger B. The switchable integrin adhesome[J]. Journal of Cell Science, 2010, 123(9): 1385—1388.
- [7] Zaidel-Bar R, Itzkovitz S, Ma'ayan A, Iyengar R, Geiger B. Functional atlas of the integrin adhesome[J]. Nature Cell Biology, 2007, 9(8): 858—868.
- [8] Zamir E, Geiger B. Components of cell-matrix adhesions[J]. Journal of Cell Science, 2001, 114(20): 3577—3579.
- [9] Engler A J, Humbert P O, Wehrle-Haller B, Weaver V M. Multiscale modeling of form and function[J]. Science, 2009, 324(5924): 208—212.
- [10] Reichl E M, Ren Y, Morphew M K, Delannoy M, Effler J C, Girard K. Interactions between myosin and actin crosslinkers control cytokinesis contractility dynamics and mechanics[J]. Current Biology, 2008, 18(7): 471—480.
- [11] Wang N, Tytell J D, Ingber D E. Mechanotransduction at a distance: Mechanically coupling the extracellular

- matrix with the nucleus[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, 10(1): 75–82.
- [12] Besser A, Safran S A. Force-induced adsorption and anisotropic growth of focal adhesions[J]. *Biophysical Journal*, 2006, 90(10): 3469–3484.
- [13] Boal D. *Mechanics of the Cell*[M]. Cambridge University Press, Cambridge, 2002.
- [14] Lee J, Leonard T, Oliver A, Ishihara A, Jacobson K. Traction forces generated by locomoting keratocytes[J]. *Journal of Cell Biology*, 1994, 127(6): 1957–1964.
- [15] Beningo K A, Wang Y L. Flexible substrata for the detection of cellular traction forces[J]. *Trends in Cell Biology*, 2002, 12(2): 79–84.
- [16] Zhao Y, Zhang X. Adaptation of flexible polymer fabrication to cellular mechanics study[J]. *Applied Physics Letters*, 2005, 87(14): 144101.
- [17] Burton K, Taylor D L. Traction forces of cytokinesis measured with optically modified elastic substrata[J]. *Nature*, 1997, 385(6615): 450–454.
- [18] Burton K, Park J H, Taylor D L. Keratocytes generate traction forces in two phases[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 1999, 10(11): 3745–3769.
- [19] Pelham R J, Wang Y L. High resolution detection of mechanical forces exerted by locomoting fibroblasts on the substrate[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 1999, 10(4): 935–945.
- [20] Dembo M, Oliver T, Ishihara A, Jacobson K. Imaging the traction stresses exerted by locomoting cells with the elastic substratum method[J]. *Biophysical Journal*, 1996, 70(4): 2008–2022.
- [21] Discher D E, Janmey P, Wang Y L. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate[J]. *Science*, 2005, 310(5751): 1139–1143.
- [22] Vogel V, Sheetz M. Local force and geometry sensing regulate cell functions[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2006, 7(4): 265–275.
- [23] Orr A W, Helmke B P, Blackman B R, Schwartz M A. Mechanisms of mechanotransduction[J]. *Developmental Cell*, 2006, 10(1): 11–20.
- [24] del Rio A, Perez-Jimenez R, Liu R C, Roca-Cusachs P, Fernandez J M, Sheetz M P. Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding[J]. *Science*, 2009, 323(5914): 638–641.
- [25] Geiger B, Bershadsky A. Assembly and mechanosensory function of focal contacts[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2001, 13(5): 584–592.
- [26] Lo C M, Wang H B, Dembo M, Wang Y L. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate[J]. *Biophysical Journal*, 2000, 79(1): 144–152.
- [27] Ghibaudo M, Saez A, Trichet L, Xayaphoummine A, Browaeys J, Silberzan P, Buguin A, Ladoux B. Traction forces and rigidity sensing regulate cell functions[J]. *Soft Matter*, 2008, 4(9): 1836–1843.
- [28] Frey M T, Tsai I Y, Russell T P, Hanks S K, Wang Y L. Cellular responses to substrate topography: Role of myosin II and focal adhesion kinase[J]. *Biophysical Journal*, 2006, 90(10): 3774–3782.
- [29] Engler A J, Sen S, Sweeney H L, Discher D E. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification[J]. *Cell*, 2006, 126(4): 677–689.
- [30] 秦雷. 心肌细胞对基底刚度响应研究[D]. 北京大学博士学位论文, 2008年6月(Qin Lei. Responses of Cardiac Myocytes to Substrate Stiffness[D]. Ph.D dissertation, Peking University, June, 2008(in Chinese))
- [31] Chicurel M E, Chen C S, Ingber D E. Cellular control lies in the balance of forces[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 1998, 10(2): 232–239.
- [32] Girard P P, Cavalcanti-Adam E A, Kemkemer R, Spatz J P. Cellular chemomechanics at interfaces: Sensing, integration and response[J]. *Soft Matter*, 2007, 3(3): 307–326.
- [33] Lopez J. I, Mouw J. K, Weaver V. M. Biomechanical regulation of cell orientation and fate[J]. *Oncogene*, 2008, 27(55): 6981–6993.
- [34] Wozniak M. A, Chen C. S. Mechanotransduction in development: A growing role for contractility[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, 10(1): 34–43.
- [35] Jaalouk D. E, Lammerding J. Mechanotransduction gone awry[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, 10(1): 63–73.

- [36] Huang S, Ingber D. E. Cell tension, matrix mechanics, and cancer development[J]. *Cancer Cell*, 2005, 8(3): 175—176.
- [37] Li Y, Haga J H, Chien S. Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells[J]. *Journal of Biomechanics*, 2005, 38(10): 1949—1971.
- [38] Barry S P, Davidson S M, Townsend P A. Molecular regulation of cardiac hypertrophy[J]. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2008, 40(10): 2023—2039.
- [39] Wang J H C, Lin J-S. Cell traction force and measurement methods[J]. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 2007, 6(6): 361—371.
- [40] Sabass B, Gardel M L, Waterman C M, Schwarz U S. High resolution traction force microscopy based on experimental and computational advances[J]. *Biophysical Journal*, 2008, 94(1): 207—220.
- [41] 黄建永, 细胞与弹性基底相互作用研究[D]. 北京大学博士学位论文, 2009 年 6 月 (Huang Jianyong. A study on interaction between cells and elastic substrates [D]. Ph. D dissertation, Peking University, June, 2009 (in Chinese))
- [42] Munevar S, Wang Y L, Dembo M. Traction force microscopy of migrating normal and H-ras transformed 3T3 fibroblasts[J]. *Biophysical Journal*, 2001, 80(4): 1744—1757.
- [43] Pelham R J, Wang Y L. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(25): 13661—13665.
- [44] Kawamura T, Urayama K, Kohjiya S. Multiaxial deformations of end-linked poly(dimethylsiloxane) networks. 1. Phenomenological approach to strain energy density function[J]. *Macromolecules*, 2001, 34(23): 8252—8260.
- [45] Yu Y S, Zhao Y P. Deformation of PDMS membrane and microcantilever by a water droplet: Comparison between mooney-rivlin and linear elastic constitutive models[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2009, 332(2): 467—476.
- [46] Harris A, Wild P. Silicone rubber substrata: A new wrinkle in the study of cell locomotion[J]. *Science*, 1980, 208(4440): 177—179.
- [47] Harris A K, Stopak D, Wild P. Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis[J]. *Nature*, 1981, 290(5803): 249—251.
- [48] Press W H, Teukolsky S A, Vetterling W T, Flannery B P. *Numerical Recipes: the Arts of Scientific Computing* [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.
- [49] 邹谋炎著. 反卷积和信号复原[M]. 北京: 国防工业出版社, 2001 年 3 月第 1 版 (Zou Mouyan. Deconvolution and Signal Recovery[M]. Beijing: National Defence Industrial Press, March, 2001(in Chinese))
- [50] 刘继军著. 不适定问题的正则化方法及应用[M]. 北京: 科学出版社, 2005 年 9 月第 1 版 (Liu Jijun. Regularization methods for improperly posed problems and their applications [M]. Beijing: Science Press, September, 2005(in Chinese))
- [51] Frey M T, Engler A, Discher D E, Lee J, Wang Y L. Microscopic methods for measuring the elasticity of gel substrates for cell culture: Microspheres, microindenters, and atomic force microscopy[J]. *Methods in Cell Biology*, 2007, 83: 47—65.
- [52] Qin L, Huang J Y, Xiong C Y, Zhang Y Y, Fang J. Dynamical stress characterization and energy evaluation of single cardiac myocyte actuating on flexible substrate[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 360(2): 352—356.
- [53] Huang J Y, Zhu T, Qin L, Peng X L, Xiong C Y, Fang J. Study on mechanical interactions between single cardiac myocyte and elastic substrate[J]. *Acta Mechanica Solida Sinica*, 2009, 22(6): 563—570.
- [54] Boudou T, Ohayon J, Picart C, Tracqui P. An extended relationship for the characterization of young's modulus and poisson's ratio of tunable polyacrylamide gels[J]. *Biorheology*, 2006, 43(6): 721—728.
- [55] Boudou T, Ohayon J, Arntz Y, Finet G, Picart C, Tracqui P. An extended modeling of the micropipette aspiration experiment for the characterization of the young's modulus and poisson's ratio of adherent thin biological samples: Numerical and experimental studies[J]. *Journal of Biomechanics*, 2006, 39(9): 1677—1685.
- [56] Peng X L, Huang J Y, Qin L, Xiong C Y, Fang J. A method to determine young's modulus of soft gels for cell adhesion[J]. *Acta Mechanica Sinica*, 2009, 25(4): 565—570.

- [57] Tracqui P, Ohayon J, Boudou T. Theoretical analysis of the adaptive contractile behaviour of a single cardiomyocyte cultured on elastic substrates with varying stiffness[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 2008, 255(1): 92–105.
- [58] Liao Q Z, Huang J Y, Zhu T, Xiong C Y, Fang J. A hybrid model to determine mechanical properties of soft polymers by nanoindentation[J]. *Mechanics of Materials*, 2010, 42(12): 1043–1047.
- [59] Peng X L, Huang J Y, Deng H, Xiong C Y, Fang J. A multi-sphere indentation method to determine Young's modulus of soft polymeric materials based on the Johnson-Kendall-Roberts contact model[J]. *Measurement Science and Technology*, 2011, 22(2): 027003.
- [60] 李姗姗, 黄建永, 邓昊, 庞明姝, 彭小玲, 熊春阳, 方竞. 高分辨率细胞牵引力频域反演技术研究[J]. *医用生物力学*, 2011, 26(3): 225–231 (Li Shanshan, Huang Jianyong, Deng Hao, Pang Mingzhu, Peng Xiaoling, Xiong Chunyang, Fang Jing. Research on high-resolution cellular traction recovery in two-dimensional Fourier domain [J]. *Journal of Medical Biomechanics*, 2011, 26(3): 225–231 (in Chinese))
- [61] Yang Z C. A new image processing technique for determination of cell-generated deformations on substrata[J]. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*, 2008, 11(2): 159–167.
- [62] Yang Z C, Lin J S, Chen J X, Wang J. Determining substrate displacement and cell traction fields — a new approach[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 2006, 242(3): 607–616.
- [63] Peters W H, Ranson W F. Digital imaging techniques in experimental stress-analysis[J]. *Optical Engineering*, 1982, 21(3): 427–431.
- [64] Sutton M A, Turner J L, Bruck H A, Chae T A. Full-field representation of discretely sampled surface deformation for displacement and strain analysis[J]. *Experimental Mechanics*, 1991, 31(2): 168–177.
- [65] Pan B, Qian K M, Xie H M, Asundi A. Two-dimensional digital image correlation for in-plane displacement and strain measurement: A review[J]. *Measurement Science and Technology*, 2009, 20(6): 062001.
- [66] Fan T Y, Sutton M A, Zhang L X. Crack growth of plane stress state in hardening material[J]. *Chinese Science Bulletin*, 1997, 42(17): 1487–1492.
- [67] Vendroux G, Knauss W G. Submicron deformation field measurements: Part 2. Improved digital image correlation [J]. *Experimental Mechanics*, 1998, 38(2): 86–92.
- [68] Zhang D S, Eggleton C D, Arola D D. Evaluating the mechanical behavior of arterial tissue using digital image correlation[J]. *Experimental Mechanics*, 2002, 42(4): 409–416.
- [69] Li X D, Gao H S, Scrivens W A, Fei D L, Xu X Y, Sutton M A, Reynolds A P, Myrick M L. Nanomechanical characterization of single-walled carbon nanotube reinforced epoxy composites [J]. *Nanotechnology*, 2004, 15(11): 1416–1423.
- [70] Chang S, Wang C S, Xiong C Y, Fang J. Nanoscale in-plane displacement evaluation by AFM scanning and digital image correlation processing[J]. *Nanotechnology*, 2005, 16(4): 344–349.
- [71] Berfield T A, Patel H K, Shimmin R G, Braun P V, Lambros J, Sottos N R. Fluorescent image correlation for nanoscale deformation measurements[J]. *Small*, 2006, 2(5): 631–635.
- [72] Marganski W A, Dembo M, Wang Y L. Measurements of cell-generated deformations on flexible substrata using correlation-based optical flow[J]. *Methods in Enzymology*, 2003, 361: 197–211.
- [73] Tolic-Norrelykke I M, Butler J P, Chen J X, Wang N. Spatial and temporal traction response in human airway smooth muscle cells[J]. *American Journal of Physiology—Cell Physiology*, 2002, 283(4): C1254–C1266.
- [74] Huang J Y, Pan X C, Peng X L, Zhu T, Qin L, Xiong C Y, Fang J. High-efficiency cell-substrate displacement acquisition via digital image correlation method using basis functions[J]. *Optics and Lasers in Engineering*, 2010, 48(11): 1058–1066.
- [75] Huang J Y, Zhu T, Pan X C, Qin L, Peng X L, Xiong C Y, Fang J. A high-efficiency digital image correlation method based on a fast recursive scheme[J]. *Measurement Science and Technology*, 2010, 21(3): 035101.
- [76] Stricker J, Sabass B, Schwarz U S, Gardel M L. Optimization of traction force microscopy for micron-sized focal adhesions[J]. *Journal of Physics — Condensed Matter*, 2010, 22(19): 194104.
- [77] Merkel R, Kirchgebner N, Cesa C M, Hoffmann B. Cell force microscopy on elastic layers of finite thickness[J]. *Biophysical Journal*, 2007, 93(9): 3314–3323.

- [78] Dembo M, Wang Y L. Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts[J]. *Biophysical Journal*, 1999, 76(4): 2307—2316.
- [79] Rieu J P, Barentin C, Maeda Y, Sawada Y. Direct mechanical force measurements during the migration of dictyostelium slugs using flexible substrata[J]. *Biophysical Journal*, 2005, 89(5): 3563—3576.
- [80] Barentin C, Sawada Y, Rieu J P. An iterative method to calculate forces exerted by single cells and multicellular assemblies from the detection of deformations of flexible substrates[J]. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, 2006, 35(4): 328—339.
- [81] Schwarz U S, Balaban N Q, Riveline D, Bershadsky A, Geiger B, Safran S A. Calculation of forces at focal adhesions from elastic substrate data: The effect of localized force and the need for regularization[J]. *Biophysical Journal*, 2002, 83(3): 1380—1394.
- [82] Balaban N Q, Schwarz U S, Riveline D, Goichberg P, Tzur G, Sabanay I, Mahalu D, Safran S, Bershadsky A, Addadi L, Geiger B. Force and focal adhesion assembly: A close relationship studied using elastic micropatterned substrates[J]. *Nature Cell Biology*, 2001, 3(5): 466—472.
- [83] Huang J Y, Peng X L, Qin L, Zhu T, Xiong C Y, Zhang Y Y, Fang J. Determination of cellular tractions on elastic substrate based on an integral Boussinesq solution [J]. *Journal of Biomechanical Engineering — Transactions of the ASME*, 2009, 131(6): 061009.
- [84] Butler J P, Tolic-Norrelykke I M, Fabry B, Fredberg J J. Traction fields, moments, and strain energy that cells exert on their surroundings[J]. *American Journal of Physiology—Cell Physiology*, 2002, 282(3): C595—C605.
- [85] Huang J Y, Qin L, Peng X L, Zhu T, Xiong C Y, Zhang Y Y, Fang J. Cellular traction force recovery: An optimal filtering approach in two-dimensional Fourier space[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 2009, 259(4): 811—819.
- [86] Ambrosi D. Cellular traction as an inverse problem[J]. *SIMA Journal on Applied Mathematics*, 2006, 66(6): 2049—2060.
- [87] Ambrosi D, Duperray A, Peschetola V, Verdier C. Traction patterns of tumor cells[J]. *Journal of Mathematical Biology*, 2009, 58(1-2): 163—181.
- [88] Even-Ram S, Yamada K M. Cell migration in 3d matrix[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2005, 17(5): 524—532.
- [89] Almany L, Seliktar D. Biosynthetic hydrogel scaffolds made from fibrinogen and polyethylene glycol for 3D cell cultures[J]. *Biomaterials*, 2005, 26(15): 2467—2477.
- [90] Lutolf M P. Integration column: Artificial ECM: Expanding the cell biology toolbox in 3d[J]. *Integrative Biology*, 2009, 1(3): 235—241.
- [91] Dutta R C, Dutta A K. Cell-interactive 3D-scaffold: advances and applications[J]. *Biotechnology Advances*, 2009, 27(4): 334—339.
- [92] Legant W R, Miller J S, Blakely B L, Cohen D M, Genin G M, Chen C S. Measurement of mechanical tractions exerted by cells in three-dimensional matrices[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(12): 969—971.
- [93] Maskarinec S A, Franck C, Tirrell D A, Ravichandran G. Quantifying cellular traction forces in three dimensions [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(52): 22108.
- [94] Franck C, Maskarinec S A, Tirrell D A, Ravichandran G. Three-dimensional traction force microscopy: A new tool for quantifying cell-matrix interactions[J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e17833.
- [95] Huang J Y, Pan X C, Li S S, Peng X L, Xiong C Y, Fang J. A digital volume correlation technique for 3-D deformation measurements of soft gels[J]. *International Journal of Applied Mechanics*, 2011, 3(2): 335—354.
- [96] Franck C, Hong S, Maskarinec S A, Tirrell D A, Ravichandran G. Three-dimensional full-field measurements of large deformations in soft materials using confocal microscopy and digital volume correlation[J]. *Experimental Mechanics*, 2007, 47(3): 427—438.
- [97] Hur S S, Zhao Y H, Li Y S, Botvinick E, Chien S. Live cells exert 3-dimensional traction forces on their substrata[J]. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 2009, 2(3): 425—436.
- [98] Delanoe-Ayari H, Rieu J P, Sano M. 4D traction force microscopy reveals asymmetric cortical forces in migrating dictyostelium cells[J]. *Physical Review Letters*, 2010, 105(24): 248103.

Recent Progress in Cellular Traction Force Microscopy Inversion Methods

HUANG Jian-yong, DENG Hao, PENG Xiao-ling,

LI Shan-shan, XIONG Chun-yang, FANG Jing

(Department of Biomedical Engineering, Peking University, Beijing 100871, China;

Academy for Advanced Interdisciplinary Studies, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: Physical and mechanical interaction between cell and extracellular matrix in a microenvironment involves a large number of complex signaling transduction pathways, so it plays a key role in mediating cellular behaviors and functions such as cell proliferation, differentiation, contraction, migration and apoptosis. It is very important, both physiologically and pathologically, to quantitatively characterizing single cell activities based upon cellular traction force microscopy (CTFM). The core of CTFM consists in how to retrieve cellular traction force field from the measured substrate deformation data. This paper presents first an introduction about the principle of CTFM, and then point out the pathological nature of cellular traction inversion. Accordingly, some well-developed traction force inversion algorithms are specifically introduced, including: boundary element method (DW method), traction reconstruction with point forces (TRPF method), cellular traction recovery method based on an integral Boussinesq solution, Fourier transform traction cytometry (FTTC method), and optimal filtering method in two-dimensional Fourier space.

Keywords: cell; elastic substrate; traction force microscopy; digital image correlation; ill-posed inverse problem; regularization