

细胞与注射针间动态接触模型的建立与分析

潘亮,吴洪涛,宋治成,李想

(南京航空航天大学 机电学院,江苏 南京 210016)

摘要:显微注射过程中,细胞的变形量和受力大小对注射成功率有直接影响,为提高自动化注射系统的可靠性,需对细胞力学特性进行研究。基于膜理论建立了细胞的接触模型,针对静态膜理论模型无法描述细胞的受力和变形关系随穿刺速度及加速度变化的问题,提出动态修正细胞膜材料参数的方法。采用不同的穿刺速度和加速度对分形期的斑马鱼卵进行穿刺实验,导出了细胞膜的动态接触经验模型,较好地表征不同穿刺条件下细胞膜的变刚度现象,为控制系统的设计提供参考。

关键词:显微注射;膜理论;穿刺速度;穿刺加速度;接触受力模型

中图分类号:TP391.9 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-5276(2023)02-0114-05

Construction and Analysis of Dynamic Contact Model between Cell and Micropipette

PAN Liang, WU Hongtao, SONG Zhicheng, LI Xiang

(College of Mechanical and Electrical Engineering, Nanjing University of Aeronautics and Astronautics, Nanjing 210016, China)

Abstract: As the deformation amount and force of cells have a direct impact on the success rate of injection in the process of microinjection, it is necessary to study the mechanical characteristics of cells in order to improve the reliability of automatic injection system. A force deformation model of cells is constructed based on membrane theory. To address the inability of the static membrane theory model to describe the change of force deformation relationship of cells with different injection speed and acceleration, a method of dynamically modifying cell membrane material parameters is proposed. Different injection speeds and accelerations are applied to conduct experimental injection in zebrafish oocyte in segmentation stage, deriving the dynamic contact empirical model of cell membrane, which better characterizes the variable stiffness of cell membrane under different injection conditions, and provides a reference for the design of control system.

Keywords: microinjection; membrane theory; injection speed; injection acceleration; contact force model.

0 引言

显微注射是一种利用管尖极细的玻璃注射针将外源物质注入细胞内部的一种技术,已被广泛运用于转基因学、药物研发、辅助生殖等生命科学领域。为提高显微注射的效率和成功率,许多学者开始研究显微注射的自动化系统,内容主要包括细胞的固定与调整方式^[1]、细胞的视觉识别与定位^[2-3]、注射的视觉伺服控制^[4]、注射的力跟踪控制^[5]等,而对细胞本身力学特性研究较少。

目前,细胞的力学模型大致可分为3类:连续介质模型、能量模型以及张拉整体模型,后两者由于模型复杂且无法获得反馈信息,较难应用于实时控制^[6]。对于连续介质模型, YEUNG A 等^[7]创建了牛顿液滴模型,将细胞视作连续皮层包裹的球形液滴; SCHMID-SCHÖNBEIN G W 等^[8]将细胞视作均质的固体,用 Maxwell 模型和一根弹簧并联,得到了标准线性固体模型; SUN Y 等^[9]建立了细胞的点载荷模型,将细胞视为线弹性体,推导出了细胞受力

关于细胞几何参数和弹性模量的解析表达式; TAN Y H 等^[10]将细胞视为由超弹性膜包裹的液体球,根据膜理论完成了细胞膜受力变形的数值计算,通过对不同发育时期的斑马鱼卵进行穿刺实验,证明了模型能够较好地描述细胞的非线性力学特征。

然而,有研究表明^[11],穿刺速度对细胞的变形量和受力大小有显著影响,注射针在匀速运动下穿刺速度越大细胞形变越小,受力越大。上述连续介质模型大多没有考虑应变率对细胞受力产生的影响。此外, CHEN P C Y 等^[12]优化得到的穿刺曲线还具有加速度,如果仍然采用与应变率无关的静态模型进行控制将会出现较大误差,这就对动态接触模型提出了需求。

基于上述分析,本文在膜理论的基础上,进一步研究注射针的穿刺速度及加速度对细胞变形受力的影响,对分形期的斑马鱼卵进行了穿刺实验,通过辨识超弹性膜的材料参数并分析其变化趋势,归纳出了细胞与注射针间的动态接触经验模型,能较为准确地描述在不同的穿刺速度和穿刺加速度下,细胞膜表现出的变刚度现象。

基金项目:国家自然科学基金面上项目(51975277);国家重点研发计划项目(2018YFC0309100);江苏高校“青蓝工程”资助项目

第一作者简介:潘亮(1996—),男,江苏常州人,硕士研究生,研究方向为细胞微注射自动化系统。

1 膜理论静态接触模型

膜理论模型将细胞视为由弹性膜包裹的液体球,有以下假设:1)静水压力均布于细胞内表面;2)细胞膜为不可压缩、均质、各向同性材料,厚度保持不变;3)变形时细胞质不可压缩,无渗透作用,细胞体积保持不变。

1.1 基本描述

设细胞在原始状态下半径为 r_0 ,厚度为 h ,在初始压力 P_0 作用下膨胀为初始状态,半径变为 r_s 。细胞置于平板上,半径为 ρ_0 的刚性注射针垂直对称加载于细胞中心,如图 1 所示。采用球坐标 (r, θ, ψ) 描述细胞在原始状态和初始状态下的形状,柱坐标 (ρ, θ, η) 描述细胞变形后的状态,变形后细胞仍然旋转对称。

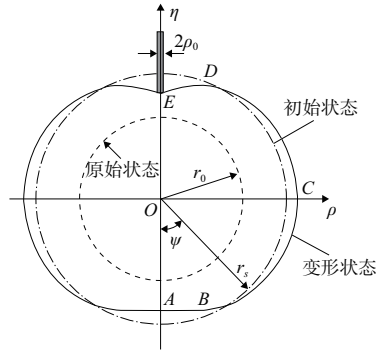


图 1 各状态细胞外轮廓示意图

设细胞在原始状态下沿着经线方向的无限小弧长为 ds ,变形后变为 dS ,有以下关系式成立:

$$ds = r_0 d\psi \quad (1)$$

$$dS = \sqrt{(d\rho)^2 + (d\eta)^2} \quad (2)$$

沿经线和纬线方向的主拉伸比 λ_1, λ_2 可分别写作:

$$\lambda_1 = \frac{dS}{ds} = \frac{\sqrt{\rho'^2 + \eta'^2}}{r_0} \quad (3)$$

$$\lambda_2 = \frac{\rho d\theta}{r_0 \sin\psi d\theta} = \frac{\rho}{r_0 \sin\psi} \quad (4)$$

式中撇号指对 ψ 的导数。后文下标为 1 表示经线方向,2 表示纬线方向。膜微元的几何方程为:

$$\rho = \lambda_2 r_0 \sin\psi \quad (5)$$

$$\eta' = \pm r_0 \sqrt{\lambda_1'^2 - (\lambda_2 \sin\psi)'^2} \quad (6)$$

细胞变形后在经线和纬线方向的曲线都具有相应的曲率,写作 K_1, K_2 ,根据曲率的计算公式可得:

$$K_1 = \pm \frac{d\theta}{dS} = \pm \frac{1}{r_0 \lambda_1} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 - \frac{(\lambda_2 \sin\psi)'^2}{\lambda_1^2}}} \left[\frac{\lambda_1' (\lambda_2 \sin\psi)' - (\lambda_2 \sin\psi)'' \lambda_1}{\lambda_1^2} \right] \quad (7)$$

$$K_2 = \frac{\sin\theta}{\rho} = \frac{\sqrt{\lambda_1'^2 - (\lambda_2 \sin\psi)'^2}}{r_0 \lambda_1 \lambda_2 \sin\psi} \quad (8)$$

式中正负号的选择应使得曲率为正数。

细胞膜材料为 Mooney-Rivlin 超弹性材料,在细胞的

模拟中已有应用。应变能函数表达式为

$$W = C_1(I_1 - 3) + C_2(I_2 - 3) = C_1[(I_1 - 3) + \alpha(I_2 - 3)] \quad (9)$$

式中: C_1 和 C_2 分别为第一和第二弹性系数; I_1 和 I_2 是应变不变量,可表示为主伸长比 λ_1 和 λ_2 的函数:

$$I_1 = \lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \frac{1}{\lambda_1^2 \lambda_2^2} \quad (10)$$

$$I_2 = \lambda_1^2 \lambda_2^2 + \frac{1}{\lambda_1^2} + \frac{1}{\lambda_2^2} \quad (11)$$

细胞膜主应力 σ_i 和主张力 T_i 可由应变能函数求得:

$$\sigma_i = \lambda_i \frac{\partial W}{\partial \lambda_i}, \quad (i=1,2) \quad (12)$$

$$T_i = \frac{h}{\lambda_1 \lambda_2} \sigma_i, \quad (i=1,2) \quad (13)$$

1.2 基本微分方程

在膜上取微分单元作受力分析,如图 2 所示,因细胞旋转对称且处于轴对称加载情况下,膜表面切应力和膜内剪切张力均为 0,忽略注射针与细胞膜之间的摩擦力,可得细胞膜在经线和纬线方向的力平衡方程:

$$\frac{\partial(T_1 \rho)}{\partial S} - T_2 \frac{\partial \rho}{\partial S} = 0 \quad (14)$$

$$K_1 T_1 + K_2 T_2 = P \quad (15)$$

式中 P 为细胞膜在法线方向受到的净压力之和。

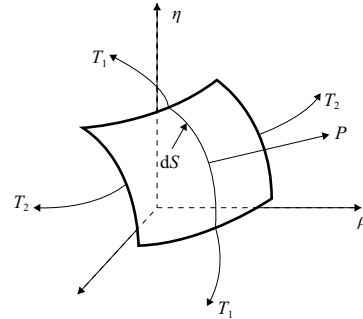


图 2 膜微元受力示意图

将式(14)进行改写,微分变量替换为 ψ 得

$$\frac{\partial T_1}{\partial \lambda_1} \lambda_1' + \frac{\partial T_2}{\partial \lambda_2} \lambda_2' - (T_2 - T_1) \frac{\rho'}{\rho} = 0 \quad (16)$$

细胞轮廓可分为平面区与曲面区。平面区内,曲率为 0,平板的支持力与细胞内部压力平衡, $P=0$,式(15)恒成立, η 方向的变化率为 0,故平面区内经线方向主拉伸比为

$$\lambda_1 = \pm \frac{\rho'}{r_0} \quad (17)$$

AB 区平衡方程:

$$\lambda_1' = \frac{\lambda_1}{\lambda_2 \sin\psi} \left(\frac{f_3}{f_1} \right) - \left(\frac{\lambda_1 - \lambda_2 \cos\psi}{\sin\psi} \right) \left(\frac{f_2}{f_1} \right) \quad (18)$$

$$\lambda_2' = \frac{\pm \lambda_1 - \lambda_2 \cos\psi}{\sin\psi} \quad (19)$$

将式(7)和式(8)代入式(15),得到曲面区 BC 和 CD 段的平衡方程:

$$\lambda_1' = \left(\frac{\delta \cos\psi - \omega \sin\psi}{\sin^2 \psi} \right) \left(\frac{f_2}{f_1} \right) + \left(\frac{\omega}{\delta} \right) \left(\frac{f_3}{f_1} \right) \quad (20)$$

$$\delta' = \omega \quad (21)$$

$$\omega' = \frac{\lambda_1' \omega}{\lambda_1} + \frac{(\lambda_1^2 - \omega^2)}{\delta} \left(\frac{T_2}{T_1} \right) - \frac{\lambda_1 \sqrt{(\lambda_1^2 - \omega^2)} Pr_0}{T_1} \quad (22)$$

对于 DE 段,此段的细胞膜为褶皱的内凹面,纬线方向的主应力和主拉力趋近于 0^[13],平衡方程式(22)简化为

$$\omega' = \frac{\lambda_1' \omega}{\lambda_1} + \frac{\lambda_1 \sqrt{(\lambda_1^2 - \omega^2)} Pr_0}{T_1} \quad (23)$$

式中: $\delta = \lambda_2 \sin \psi$; $\omega = \delta'$; $f_1 = \partial T_1 / \partial \lambda_1$; $f_2 = \partial T_1 / \partial \lambda_2$ 。

求解上述微分方程组即可得到 λ_1, λ_2 或 $\lambda_1, \delta, \omega$ 与 ψ 角的对应关系,从而得出细胞外轮廓,细胞膜主应力和主张力的值,此外还可得到细胞轴向变形量 d 及细胞受力大小 F 。

$$d = 2r_s - (\eta_E - \eta_B) \quad (24)$$

$$F = P \pi \rho_B^2 = P \pi (r_0 \lambda_{2B} \sin \psi_B)^2 \quad (25)$$

图 3 是仿真所得细胞轮廓形变示意图,图 4 是对应的变形与受力关系图,呈现非线性。该模型虽能模拟恒速穿刺时细胞受力变形情况,但当注射针速度和加速度变化时,该模型得出的受力变形曲线不发生变化,与实际不符,后续实验也证明了这一点。因此需要引入穿刺速度和穿刺加速度这两个变量,对该静态模型做出调整。

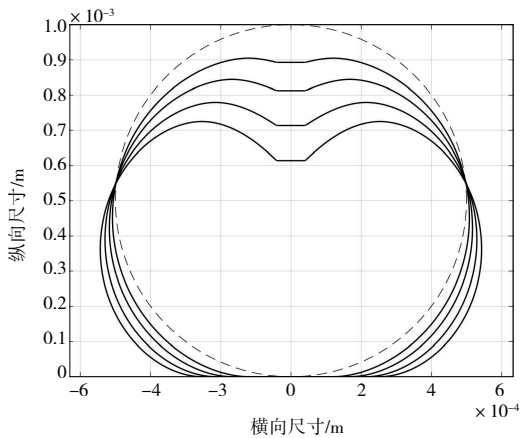


图 3 细胞穿刺形变图

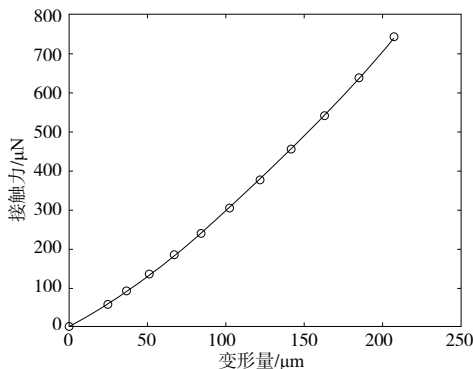


图 4 变形量与接触力间关系曲线图

2 实验

为定量研究穿刺速度和穿刺加速度对细胞受力变形的影响,本文设计了如下细胞穿刺实验。

2.1 实验设备

穿刺实验的布局如图 5 所示,实验选取分形期的斑马鱼卵细胞为穿刺对象,细胞布置方式如图 6 所示。将载玻片安装在一个高精度三轴移动平台上,注射用穿刺针安装在另一台高精度电动三轴移动平台上,实验使注射针对准细胞的中心,穿刺针直径 80 μm。采用 PVDF 薄膜作为力传感元件,注射针安装在薄膜上,构成悬臂梁结构,电荷放大器放大 PVDF 薄膜产生的微弱电荷,转为电压量后传入数据采集卡。使用量程 300 g,分辨率 0.001 g 的高精度电子天平对 PVDF 薄膜进行标定,标定曲线如图 7 所示。

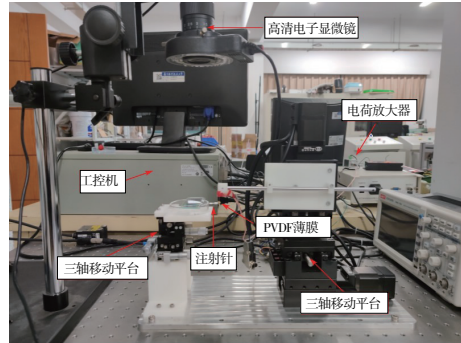


图 5 细胞穿刺实验布局

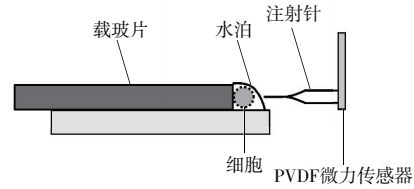


图 6 细胞布置方式

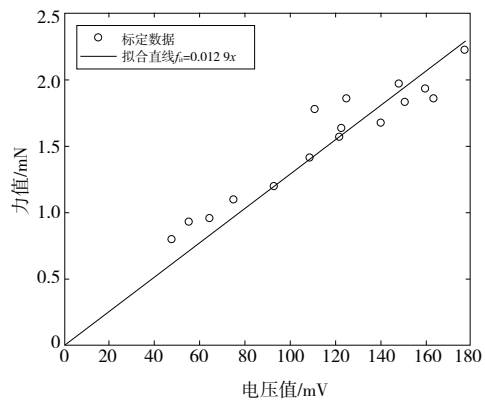


图 7 PVDF 传感器标定图

2.2 实验方法

本文的穿刺实验选取了文献中常用的 8 个穿刺速度,分别为 0.2 mm/s、0.4 mm/s、0.6 mm/s、0.8 mm/s、1 mm/s、1.2 mm/s、1.5 mm/s 和 2 mm/s,通过预实验选定了 5 个穿刺成功率较高的穿刺加速度,分别为 0.5 mm/s²、1 mm/s²、2 mm/s²、3 mm/s²、5 mm/s²,均为从静止开始的匀加速穿

刺。每个穿刺速度或加速度均进行 10 次试验,通过录像确定细胞被穿透的时刻,将该时刻穿刺针的进给量视为细胞变形量,取平均值作为每组实验结果。穿刺实验过程如图 8 所示。

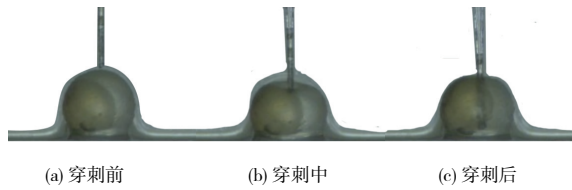


图 8 穿刺实验过程图

3 结果与讨论

3.1 恒速穿刺

细胞被穿透时刻,不同穿刺速度对应的接触力大小和细胞变形量如表 1 所示,变形对比如图 9 所示。随穿刺速度的增加,细胞变形量减小,接触力增大。相比于 0.2 mm/s 的穿刺速度,2 mm/s 速度下细胞的变形量减小 50%,接触力增加 290%,可见随着穿刺速度的增加,细胞膜呈现出刚度变大的趋势。

表 1 恒速穿刺实验结果

穿刺速度 $v/(mm \cdot s^{-1})$	细胞变形量 $d/\mu m$	接触力大小 F/mN
0.2	561	0.51
0.4	519	0.64
0.6	488	0.75
0.8	432	0.80
1.0	386	0.82
1.2	351	1.01
1.5	336	1.25
2.0	280	1.97

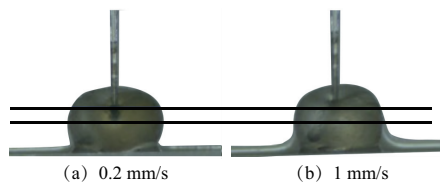


图 9 恒速穿刺下细胞即将被刺破前的变形对比图

3.2 加速穿刺

注射针从静止开始加速穿刺,细胞被穿透时刻,不同穿刺加速度对应的接触力大小,细胞变形量以及穿透时刻的瞬时速度如表 2 所示,变形对比如图 10 所示。随加速度的增加,细胞变形量进一步减小,接触力大小进一步增大。相比于 0.5 mm/s², 5 mm/s² 加速度的变形量减小 28%,接触力增加 68%。细胞膜刚度呈现变大的趋势,与恒速穿刺结果一致。

表 2 加速穿刺实验结果

穿刺加速度 $a/(mm \cdot s^{-2})$	细胞变形量 $d/\mu m$	接触力大小 F/mN	刺破瞬时速度 $v_c/(mm \cdot s^{-1})$
0.5	439	0.60	0.663
1.0	399	0.64	0.894
2.0	377	0.80	1.228
3.0	350	0.91	1.449
5.0	317	1.00	1.782

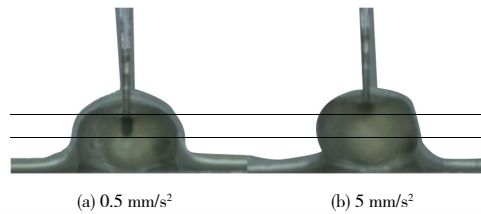


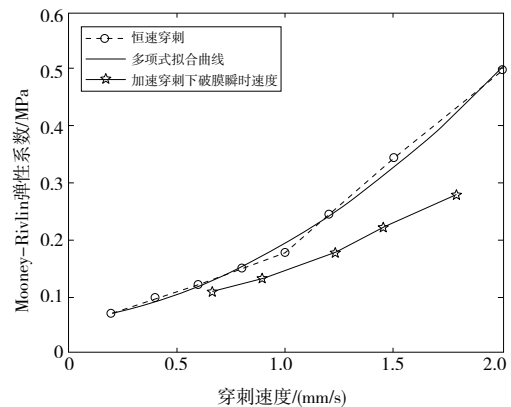
图 10 加速穿刺下细胞即将被刺破前的变形对比图

上述实验结果证实了细胞膜对不同的穿刺速度和穿刺加速度具有不同的力学响应。

3.3 基于应变能函数的本构方程

根据文献[14]的描述,Mooney-Rivlin 类超弹性延展材料的应变率相关行为,可结合材料的应变能吸收能力进行阐述。由式(11)可知,影响应变能的变量有主拉伸比和弹性系数,对应细胞膜变形量和刚度。根据实验结果,细胞膜刚度随穿刺速度和加速度变化显著,因此本文对弹性系数 C_1 进行辨识。

首先考虑恒速穿刺。给定一组仿真变量: $\alpha = 0.2, h = 3 \mu m, r_0 = 425 \mu m, \lambda_s = 1.176 47, \rho_0 = 40 \mu m$ 。根据表 1 的数据辨识细胞被刺破时 C_1 的值,结果如图 11 所示。

图 11 C_1 辨识结果及多项式拟合

可见细胞在 0.2~1 mm/s 的穿刺速度下, C_1 与穿刺速度成近似线性关系,穿刺速度大于 1 mm/s 时, C_1 的值增长幅度更大,曲线整体具有二次函数的特征,通过多项式拟合可得恒速穿刺情况下 C_1 的计算公式。

$$C_1 = 0.087 5v^2 + 0.049 5v + 0.057 \quad (26)$$

加速穿刺情况下,需要考虑加速度对应变能函数的影响。计算出各组加速穿刺实验中注射针刺破细胞时达到的瞬时速度。采用与恒速穿刺时相同的仿真变量,根据表

2 的实验数据辨识细胞被刺破时 C_1 的值,其结果如图 11 所示。

可见 C_1 在加速穿刺下的值整体要低于恒速穿刺,这说明加速度的引入使得细胞膜一定程度上表现出刚度被削弱的趋势。通过式 (26),可得与刺破细胞时瞬时速度相对应的恒速穿刺下 C_1 的值,记为 C_{1v} ,设加速穿刺下到达该瞬时速度时的 C_1 值为 C_{1a} ,则比值 C_{1a}/C_{1v} 可表示出刚度被削弱的程度,称作削减系数记为 ε 。特别地,恒速穿刺情况即加速度为 0 的情况下比值为 1,代表无刚度削弱,具体情况如图 12 所示。

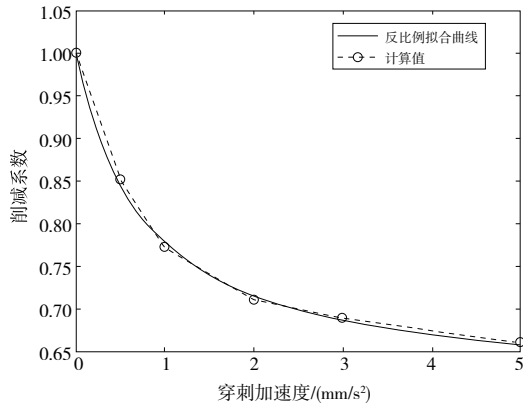


图 12 各加速度下的削减系数

利用加速度的反比例函数来近似描述此类刚度削弱现象,对数据点进行拟合可得到以下关系式:

$$\varepsilon = 0.6066 + \frac{1}{2.5333 + 3.3922a} \quad (27)$$

最终 C_1 的经验公式为

$$C_1 = (0.0875v^2 + 0.0495v + 0.057) \left(0.6066 + \frac{1}{2.5333 + 3.3922a} \right) \quad (28)$$

4 结语

本文通过穿刺实验,研究了注射针的不同穿刺速度和穿刺加速度对细胞形变和受力大小的影响,得出以下结论:1)对于 0.2~2 mm/s 的恒速穿刺,随穿刺速度增加,细胞变形量减小,接触力增大,呈现出刚度变大的趋势;2)在 0.5~5 mm/s² 的穿刺加速度范围内,加速度的引入使得与恒速穿刺相比,相同瞬时速度下细胞膜的刚度被削弱,削弱程度随加速度的增大而减小。

本文在由膜理论建立的静态接触模型的基础上,通过改变细胞膜弹性系数来对细胞膜变刚度现象进行表征。由实验数据导出了细胞膜材料参数的经验公式,建立了动态接触模型,具有一定的工程应用价值,后续将根据此模型对注射针的穿刺速度进行规划,以保障穿刺过程的安全性。

参考文献:

- [1] CHOW Y T, CHEN S X, LIU C, et al. A high-throughput automated microinjection system for human cells with small size[J]. IEEE/ASME Transactions on Mechatronics, 2016, 21(2):838-850.
- [2] DU Q L, ZHANG Q, TIAN L F, et al. Object detection and tracking for a vision guided automated suspended cell injection process[C]//2010 IEEE International Conference on Mechatronics and Automation. Xi'an, China: IEEE,2010:1760-1764.
- [3] ZHANG H M, LIANG C Y, WANG Y. Chord midpoint randomized Hough transform for the cell image segmentation[C]// Proceedings of 2011 Cross Strait Quad-Regional Radio Science and Wireless Technology Conference. Harbin: IEEE, 2011:1446-1450.
- [4] XIE Y, YANG H J, LIU K, et al. Visual servoing methods in robot-assist cell microinjection system [C]//2013 13th IEEE International Conference on Nanotechnology. Beijing, China: IEEE,2013:195-198.
- [5] WANG G W, XU Q S. Design and precision position/force control of a piezo-driven microinjection system[J]. IEEE/ASME Transactions on Mechatronics, 2017,22(4):1744-1754.
- [6] WEI Y Z, XU Q S. A survey of force-assisted robotic cell microinjection technologies [J]. IEEE Transactions on Automation Science and Engineering, 2019,16(2):931-945.
- [7] YEUNG A, EVANS E. Cortical shell-liquid core model for passive flow of liquid-like spherical cells into micropipets[J]. Biophysical Journal, 1989,56(1):139-149.
- [8] SCHMID-SCHÖNBEIN G W, SUNG K L, TÖZEREN H, et al. Passive mechanical properties of human leukocytes [J]. Biophysical Journal, 1981,36(1):243-256.
- [9] SUN Y, WAN K T, ROBERTS K P, et al. Mechanical property characterization of mouse zona pellucida[J]. IEEE Transactions on Nanobioscience, 2003,2(4):279-286.
- [10] TAN Y H, SUN D, HUANG W H, et al. Mechanical modeling of biological cells in microinjection[J]. IEEE Transactions on Nanobioscience, 2008,7(4):257-266.
- [11] HAJIYAVAND A M, SAADAT M, ABENA A, et al. Effect of injection speed on oocyte deformation in ICSI [J]. Micromachines,2019,10(4):226.
- [12] CHEN P C Y, ZHOU S F, LU Z, et al. Speed optimization in automated microinjection of zebrafish embryos[J]. International Journal of Control, Automation and Systems, 2015, 13(5): 1233-1241.
- [13] SZYSZKOWSKI W, GLOCKNER P G. Spherical membranes subjected to concentrated loads [J]. Engineering Structures, 1987,9(1):45-52.
- [14] MOHOTI D, ALI M, NGO T, et al. Strain rate dependent constitutive model for predicting the material behaviour of polyurea under high strain rate tensile loading[J]. Materials and Design,2014,53:830-837.

收稿日期:2021-11-03