

· 综述 ·

## 原子力显微镜在糖尿病及其并发症发病机制研究中的应用

耿新倩, 王从容\*

(上海交通大学附属第六人民医院内分泌代谢科, 上海市糖尿病研究所, 上海市糖尿病重点实验室, 上海市糖尿病临床医学中心, 上海 200233)

**【摘要】** 原子力显微镜(AFM)具有原子级分辨率, 不仅能获得所测样品表面的形貌信息, 还能测得其力学性能。将细胞和生物分子的形貌特征和生物力学特性变化与人类疾病相关联, 有助于深入理解疾病的病理生理机制。近年, AFM已经广泛应用于细胞生物学领域以及糖尿病等疾病的研究, 在疾病的早期诊断及指导治疗方面具有很大潜力。本文主要综述 AFM在糖尿病及其相关并发症发病机制研究中的应用。

**【关键词】** 原子力显微镜; 糖尿病; 并发症; 发病机制

**【中图分类号】** R587.1; R445.9 **【文献标志码】** A **【DOI】** 10.11915/j.issn.1671-5403.2017.06.107

## Application of atomic force microscopy in pathogenetic study of diabetes mellitus and its complications

GENG Xin-Qian, WANG Cong-Rong\*

(Department of Endocrinology and Metabolism, Shanghai Jiao Tong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai Diabetes Institute, Shanghai Key Laboratory of Diabetes Mellitus, Shanghai Clinical Center for Diabetes, Shanghai 200233, China)

**【Abstract】** Atomic force microscopy (AFM) can not only obtain topographical information of samples, but also measure their mechanical properties at an atomic resolution. This leads to a better understanding of pathophysiological mechanisms of human diseases because the alterations of topographical information and biomechanical properties of cells and molecules can be correlated to diseases. In recent years, AFM has been widely used in cell biological studies and study of diseases like diabetes mellitus, showing great potential in the early diagnosis and treatment guidance of the diseases. This review mainly summarized the application of AFM in the pathogenetic studies of diabetes and its related complications.

**【Key words】** atomic force microscope; diabetes mellitus; complications; pathogenesis

*This work was supported by the Interdisciplinary Training (Medicine and Engineering) Fund of Shanghai Jiao Tong University (YG2016MS16); The Innovation Foundation of Translational Medicine of Shanghai Jiao Tong University School of Medicine — Project of Precision Medicine (15ZH4006), and Shanghai Major Clinical Disease Clinical Sample Pool of Professional and Technical Services Platform (15DZ2292100).*

*Corresponding author: WANG Cong-Rong, E-mail: crwang@sjtu.edu.cn*

糖尿病是继恶性肿瘤、心脑血管病之后的第三大慢性非传染性疾病, 其患病率呈逐年升高趋势。据估计, 全球糖尿病患者人数将从 2015 年的 4.15 亿上升到 2040 年的 6.42 亿<sup>[1]</sup>。糖尿病主要由胰岛 B 细胞功能受损和(或)胰岛素生物作用缺陷所致, 随病程进展可发生心血管疾病、视网膜病变等严重并发症<sup>[2]</sup>, 严重影响患者生活质量并带来沉重经济

负担。目前, 大量研究主要从分子、代谢产物、免疫等多个方面探究糖尿病发病机制, 但具体机制尚无统一论, 因而寻找新方法深入研究其病理生理机制具有重大意义。

生物力学现已发展成有助于研究人类疾病的新兴领域。研究表明, 疾病不仅引起人体生物功能改变, 还可导致病变细胞表面形貌和力学特征异常<sup>[3,4]</sup>。

收稿日期: 2016-12-29; 修回日期: 2017-02-03

基金项目: 上海交通大学多学科交叉项目培育(医工)基金(YG2016MS16); 上海交通大学医学院转化医学创新基金——精准医学研究项目(15ZH4006); 上海市重大疾病临床生物样本实体库专业技术服务平台(15DZ2292100)

通信作者: 王从容, E-mail: crwang@sjtu.edu.cn

因此,了解细胞力学性能可以为病因学研究提供新视角。原子力显微镜(atomic force microscopy, AFM)具有皮牛级力学分辨率和纳米级空间分辨率,能在近生理状态下研究细胞和组织超微结构<sup>[5,6]</sup>。通过在纳米尺度下观察样品形貌特征和测量其杨氏模量等力学参数<sup>[7]</sup>,并将其与疾病相关联,可为疾病的早期监测及病理机制研究提供有力线索。本文主要就 AFM 在糖尿病及其并发症研究中的相关应用作一综述。

## 1 AFM 的工作原理及检测特性

AFM 是 1986 年由 Binnig 等<sup>[6]</sup>首次提出,主要由压电扫描器、微悬臂和针尖、光学偏转系统及电反馈系统四个核心部件构成;根据针尖与样品相互作用力的不同形式,其工作模式分为 3 种:接触模式、非接触模式和轻敲模式。

AFM 最基本的功能是通过探测弹性微悬臂上装载的纳米级针尖与被测样品间的相互作用力而获得样品表面形貌信息,对表面进行整体图像分析即可得到样品的高度、宽度、表面粗糙度等参数<sup>[8]</sup>。AFM 的另一个重要功能是通过测量微悬臂和样品间作用力随距离的变化而获得力-距离曲线。运用合适的模型将记录的力-距离曲线拟合成相应的力-压痕曲线,根据后者可获得所测样品区域的弹性模量及黏附力等信息<sup>[9]</sup>。AFM 综合高分辨率成像和力-距离曲线测量特点,可得到传统测量手段无法获得的参数,诸如样品表面粗糙度、高度等形貌参数及黏弹力等力学性能。

## 2 AFM 在糖尿病研究中的应用

糖尿病与氧化应激紧密相关,外周血红细胞尤其容易受到氧化应激损害。2010 年, Jin 等<sup>[10]</sup>运用 AFM 测量红细胞,发现与年龄匹配的正常人相比,糖尿病患者的红细胞在形态学上表面粗糙度增加 $[(690.2 \pm 71.7) \text{ vs } (1333.5 \pm 55.2) \text{ nm}]$ ,而细胞的峰谷差和细胞表面积/体积比减小;在力学性能方面,糖尿病患者红细胞硬度 $[(1.53 \pm 0.41) \times 10^5 \text{ vs } (1.78 \pm 0.39) \times 10^5 \text{ N/m}^2]$ 和黏附力 $[(420 \pm 25) \text{ vs } (510 \pm 63) \text{ pN}]$ 均增加。另一项针对 2 型糖尿病的研究亦发现,2 型糖尿病患者的红细胞膜杨氏模量较健康人增大,说明该病变细胞硬度增大,变形性减小<sup>[11]</sup>。红细胞表面积/体积比减小、硬度增加会导致细胞变形能力下降,引起血液黏度增高、阻力增大、组织缺氧等,这可能是 2 型糖尿病患者心血管疾病的发病率和死亡率高于非糖尿病者的重要原因。

Zhang 等<sup>[12]</sup>运用单分子力谱技术,通过将胰岛素修饰在 AFM 探针上,研究 1 型糖尿病酮症酸中毒患者红细胞膜上胰岛素受体与胰岛素的相互作用。与正常人相比,患者红细胞膜上的胰岛素受体与胰岛素间结合率 $[(17 \pm 3)\% \text{ vs } (12 \pm 2)\%]$ 和结合力均下降,且结合后复合物稳定性亦降低,揭示胰岛素受体功能缺陷。该技术从单分子水平为 1 型糖尿病酮症酸中毒致病机制提供了新颖的实验证据,具有传统研究技术无法比拟的优越性。

## 3 AFM 在糖尿病并发症研究中的应用

### 3.1 糖尿病心血管疾病

糖尿病是公认的心血管疾病危险因素之一。2014 年 Benech 等<sup>[13]</sup>首次利用 AFM 研究糖尿病动物左心室心肌细胞的力学性能,研究者在近生理状态下测量从糖尿病小鼠中分离的心肌细胞,发现糖尿病组心肌细胞表观弹性模量比正常对照组高 112% $[(91 \pm 14) \text{ vs } (43 \pm 7) \text{ kPa}, P < 0.01]$ ;且糖尿病组心肌细胞的硬度和黏附力均大于对照组。该研究从纳米水平表明糖尿病会影响心肌细胞的力学性能。2014 年, Akhtar 等<sup>[14]</sup>对大鼠主动脉纤维素微纤维进行 AFM 检测,发现与正常大鼠相比,糖尿病大鼠的微纤维长度减小、延展性降低,但微纤维上典型重复距离数增大 $[(57.2 \pm 0.6) \text{ vs } (59.2 \pm 0.8) \text{ nm}]$ 。由此可见高血糖状态下血管存在大分子积累损害,并且由于微纤维在组织中有较长的半衰期,因此,其可能会成为糖尿病病程进展中组织重塑的结构生物标志物。

### 3.2 糖尿病肾病

糖尿病肾病是糖尿病微血管病变引起的一种长期并发症。有明确证据表明转化生长因子  $\beta 1$  (transforming growth factor beta 1, TGF- $\beta 1$ ) 是导致早期肾小管损伤的最主要介质<sup>[15]</sup>。2012 年 Hills 等<sup>[16]</sup>发现高糖处理 HK2 细胞可增加其 TGF- $\beta 1$  的分泌,且 TGF- $\beta 1$  可使细胞最大分离力减少 20%,分离能降低 53%,即 TGF- $\beta 1$  可降低两个细胞间的黏附力。此研究表明,糖尿病状态下 TGF- $\beta 1$  诱导上皮细胞间充质转化,促使近端小管细胞黏附力和细胞间通讯缺失,并且这些改变出现在明显肾脏损害之前。2016 年, Siamantouras 等<sup>[15]</sup>利用 AFM 研究糖尿病肾病,亦发现 TGF- $\beta 1$  处理后的 HK2 细胞黏附力降低,运用赫兹模型根据力-距离曲线计算出细胞的弹性模量后发现其弹性模量增加 70%,即细胞硬度增大。TGF- $\beta 1$  可能通过影响细胞骨架重组而导致细胞力学性能发生变化,显性糖尿病肾病出现

之前,肾脏上皮细胞力学性能就已发生明显改变,因此,AFM有望成为早期诊断糖尿病肾病的强大工具。

### 3.3 糖尿病视网膜病变

研究表明,约25%的1型或2型糖尿病患者会发生视网膜病变,导致视力下降甚至失明<sup>[17]</sup>。To等<sup>[18]</sup>对13例糖尿病患者捐赠的眼球进行研究,发现与正常人相比,糖尿病患者视网膜内界膜变厚,硬度增大 $[(37.9 \pm 1.2) \text{ vs } (24.3 \pm 1.2) \text{ kPa}]$ 。这些变化可能与糖尿病患者视网膜含有较高密度的蛋白和含水量较低有关,使得基底膜易碎,从而发生视网膜病变。

此外,视网膜微血管内皮细胞的激活是糖尿病视网膜病变早期至关重要的步骤。动物实验表明,糖尿病鼠的视网膜微血管内皮细胞的赖氨酰氧化酶(l lysyl oxidase, LOX)表达水平增高<sup>[19]</sup>。2016年, Yang等<sup>[20]</sup>研究视网膜内皮细胞发现,高糖组内皮下基质硬度是正常含糖组的2倍,而经LOX抑制剂处理后,增加的基质硬度水平有所下降。因此,这可能是高糖状态下LOX表达上调、从而使内皮下基底膜硬度增加、进而激活内皮细胞引起视网膜炎、最终发生糖尿病视网膜病变的分子生物学机制。

### 3.4 糖尿病神经病变

糖尿病神经病变亦是糖尿病最常见的并发症之一,可累及约50%的1型或2型糖尿病患者<sup>[21]</sup>。Wang等<sup>[22]</sup>运用AFM从纳米水平研究糖尿病鼠神经发生的细微结构改变。研究者对鼠坐骨神经内膜、外膜及尾部肌腱的胶原纤维进行测量,发现糖尿病鼠的胶原纤维直径均比对照鼠大;并且糖尿病病程越长,神经和肌腱中胶原纤维的变化越明显。糖尿病时神经的这种结构改变可能与神经内膜压力和力学性能变化有关,尚需要更多的AFM研究来进一步证实。

### 3.5 糖尿病皮肤病变

糖尿病也会造成皮肤损害,约30%~70%的糖尿病患者会发生皮肤病变<sup>[23]</sup>。2016年,Argyropoulos等<sup>[24]</sup>对糖尿病患者(45~62岁)和年龄与之匹配的正常人活检得到的皮肤进行研究,并使用AFM测量真皮层的纳米级形态和力学性能,发现糖尿病患者真皮层胶原纤维排列紊乱,粗糙度比正常人增加176%。在力学性能方面,与正常人相比,糖尿病患者胶原纤维的牵引力、抗拉强度分别增加182%和197%,但变形性降低58%。以上数据表明,糖尿病患者皮肤真皮层结构会发生改变,这些改变可能是发生糖尿病的早期征象及其内部并发症<sup>[25]</sup>的预警

信号,对临床医师早期开展糖尿病筛查具有提示作用。

### 3.6 糖尿病骨骼病变

糖尿病对多器官系统可产生不利影响,糖尿病患者骨折风险亦增加<sup>[26]</sup>。在一项动物实验中,Hammond等<sup>[27]</sup>运用AFM观察来自胫骨和肌腱的胶原纤维,均发现糖尿病大鼠的胶原纤维间距比正常大鼠更宽、移位更大,且两者有显著性差异( $P < 0.05$ ),此变化在肌腱中更明显。该研究揭示,糖尿病会诱导骨骼中胶原纤维发生形态改变,推测可能亦存在相关力学性能改变,从而使糖尿病患者的骨骼质量改变,进而增加骨折风险。

## 4 展望

综上所述,利用AFM研究细胞、组织结构的表面微观形貌和纳米级机械性能,有利于从纳米水平了解糖尿病及其并发症的发病机制,辅助疾病的早期诊断,并为疾病的临床研究及治疗提供新依据和新思路。相信随着分子生物学技术的不断完善和进展,AFM在糖尿病的研究中必将发挥更加重要的作用。

### 【参考文献】

- [1] Zimmet P, Alberti KG, Magliano DJ, *et al.* Diabetes mellitus statistics on prevalence and mortality: facts and fallacies [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2016, 12(10): 616-622. DOI: 10.1038/nrendo.2016.105.
- [2] Balakumar P, Arora MK, Ganti SS, *et al.* Recent advances in pharmacotherapy for diabetic nephropathy: current perspectives and future directions [J]. *Pharmacol Res*, 2009, 60(1): 24-32. DOI: 10.1016/j.phrs.2009.02.002.
- [3] Hayashi K, Iwata M. Stiffness of cancer cells measured with an AFM indentation method [J]. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2015, 49: 105-111. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2015.04.030.
- [4] Lee GY, Lim CT. Biomechanics approaches to studying human diseases [J]. *Trends Biotechnol*, 2007, 25(3): 111-118.
- [5] Lehenkari PP, Charras GT, Nykanen A, *et al.* Adapting atomic force microscopy for cell biology [J]. *Ultramicroscopy*, 2000, 82(1-4): 289-295.
- [6] Binnig G, Quate CF, Gerber C. Atomic force microscope [J]. *Phys Rev Lett*, 1986, 56(9): 930-933. DOI: 10.1103/PhysRevLett.56.930.
- [7] Ikai A. A review on atomic force microscopy applied to nanomechanics of the cell [J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2010, 119: 47-61. DOI: 10.1007/10\_2008\_41.
- [8] Girasole M, Pompeo G, Cricenti A, *et al.* Roughness of the plasma membrane as an independent morphological parameter to study RBCs: a quantitative atomic force microscopy investigation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1768(5): 1268-1276. DOI: 10.1016/j.bbame.2007.01.014.

- [9] Dufrene YF, Pelling AE. Force nanoscopy of cell mechanics and cell adhesion[J]. *Nanoscale*, 2013, 5(10): 4094–4104. DOI: 10.1039/c3nr00340j.
- [10] Jin H, Xing X, Zhao H, *et al.* Detection of erythrocytes influenced by aging and type 2 diabetes using atomic force microscope[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391(4): 1698–1702. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.12.133.
- [11] Pretorius E, Bester J, Vermeulen N, *et al.* Poorly controlled type 2 diabetes is accompanied by significant morphological and ultrastructural changes in both erythrocytes and in thrombin-generated fibrin; implications for diagnostics [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2015, 14: 30. DOI: 10.1186/s12933-015-0192-5.
- [12] Zhang L, Pi J, Shi Q, *et al.* *In situ* single molecule detection of insulin receptors on erythrocytes from a type 1 diabetes ketoacidosis patient by atomic force microscopy[J]. *Analyst*, 2015, 140(21): 7407–7416. DOI: 10.1039/c5an01417d.
- [13] Benech JC, Benech N, Zambrana AI, *et al.* Diabetes increases stiffness of live cardiomyocytes measured by atomic force microscopy nanoindentation[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2014, 307(10): C910–919. DOI: 10.1152/ajpcell.00192.2013.
- [14] Akhtar R, Cruickshank JK, Zhao X, *et al.* Localized micro- and nano-scale remodelling in the diabetic aorta[J]. *Acta Biomater*, 2014, 10(11): 4843–4851. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.07.001.
- [15] Siamantouras E, Hills CE, Squires PE, *et al.* Quantifying cellular mechanics and adhesion in renal tubular injury using single cell force spectroscopy[J]. *Nanomedicine*, 2016, 12(4): 1013–1021. DOI: 10.1016/j.nano.2015.12.362.
- [16] Hills CE, Siamantouras E, Smith SW, *et al.* TGF $\beta$  modulates cell-to-cell communication in early epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *Diabetologia*, 2012, 55(3): 812–824. DOI: 10.1007/s00125-011-2409-9.
- [17] Lu CH, Lin ST, Chou HC, *et al.* Proteomic analysis of retinopathy-related plasma biomarkers in diabetic patients[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2013, 529(2): 146–156. DOI: 10.1016/j.abb.2012.11.004.
- [18] To M, Goz A, Camenzind L, *et al.* Diabetes-induced morphological, biomechanical, and compositional changes in ocular basement membranes [J]. *Exp Eye Res*, 2013, 116: 298–307. DOI: 10.1016/j.exer.2013.09.011.
- [19] Chronopoulos A, Tang A, Beglova E, *et al.* High glucose increases lysyl oxidase expression and activity in retinal endothelial cells: mechanism for compromised extracellular matrix barrier function[J]. *Diabetes*, 2010, 59(12): 3159–3166. DOI: 10.2337/db10-0365.
- [20] Yang X, Scott HA, Monickaraj F, *et al.* Basement membrane stiffening promotes retinal endothelial activation associated with diabetes[J]. *FASEB J*, 2016, 30(2): 601–611. DOI: 10.1096/fj.15-277962.
- [21] Pasnoor M, Dimachkie MM, Kluding P, *et al.* Diabetic neuropathy part 1: overview and symmetric phenotypes [J]. *Neurol Clin*, 2013, 31(2): 425–445. DOI: 10.1016/j.ncl.2013.02.004.
- [22] Wang H, Layton BE, Sastry AM. Nerve collagens from diabetic and nondiabetic Sprague-Dawley and biobreeding rats: an atomic force microscopy study [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2003, 19(4): 288–298. DOI:10.1002/dmrr.372.
- [23] Makrantonaki E, Jiang D, Hossini AM, *et al.* Diabetes mellitus and the skin [J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2016, 17(3): 269–282. DOI:10.1007/s11154-016-9373-0.
- [24] Argyropoulos AJ, Robichaud P, Balimunkwe RM, *et al.* Alterations of dermal connective tissue collagen in diabetes; molecular basis of aged-appearing skin [J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0153806. DOI: 10.1371/journal.pone.0153806.
- [25] Shemer A, Bergman R, Linn S, *et al.* Diabetic dermopathy and internal complications in diabetes mellitus [J]. *Int J Dermatol*, 1998, 37(2): 113–115.
- [26] Napoli N, Chandran M, Pierroz DD, *et al.* Mechanisms of diabetes mellitus-induced bone fragility [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2017, 13(4): 208–219. DOI: 10.1038/nrendo.2016.153.
- [27] Hammond MA, Gallant MA, Burr DB, *et al.* Nanoscale changes in collagen are reflected in physical and mechanical properties of bone at the microscale in diabetic rats [J]. *Bone*, 2014, 60: 26–32. DOI: 10.1016/j.bone.2013.11.015.

(编辑: 兆瑞臻)