

DOI: 10.3969/j.issn.0254-0150.2009.12.003

## 红细胞表面摩擦特性的 AFM 研究\*

龙东平<sup>1</sup> 谭建平<sup>2</sup>

(1. 湖南科技大学机电工程学院 湖南湘潭 411201; 2. 中南大学机电工程学院 湖南长沙 410083)

**摘要:** 利用 CSPM5000型原子力显微镜 观察了吸附在云母基底上的红细胞表面形貌, 对比分析了云母表面和红细胞表面微摩擦力回路曲线及摩擦力-载荷关系曲线, 通过观察红细胞表面形貌及其表面进行摩擦力分析发现: 由于红细胞表面柔软粗糙, 且其表面吸附一定的血浆和水, 导致测得微摩擦力较大; 红细胞表面的摩擦力随载荷的增大而增大; 坚硬的探针与柔软的红细胞表面接触并施加一定的载荷时, 载荷增大首先使红细胞发生变形, 当载荷增大到红细胞膜的变形极限时会导致红细胞膜破损, 此时所测得的摩擦力为探针切割红细胞膜的力。

**关键词:** AFM; 红细胞; 表面形貌; 微摩擦力; 细胞膜损伤

**中图分类号:** TH117.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-0150(2009)12-010-5

## Experimental Study on Blood Micro-friction by AFM

Long Dongping<sup>1</sup> Tan Jianping<sup>2</sup>

(1. College of Electromechanical Engineering, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan Hunan 411201, China;

2. College of Mechanical Electrical Engineering, Central South University, Changsha Hunan 410083, China)

**Abstract:** The surface morphology of red blood cell adsorbed on the surface of mica was observed by using the atomic force microscope (AFM) of CSPM5000. The micro-friction between erythrocyte and probe, and the relation between load and friction force were studied. The result shows that erythrocyte morphology has definite influence on the micro-friction, and moisture, plasma and surface charge adsorbed on the erythrocyte surface also have some effect on the friction force of the blood cell. Friction force increases with the increase of load. With the increase of load, the distance between probe and erythrocyte surface decreases, which first makes the micro-friction increase, then results in the deformation of erythrocyte membrane, at last results in the erythrocyte membrane damage. The friction that results in the erythrocyte membrane damage may be the force of probe cutting the erythrocyte membrane.

**Keywords:** AFM; red blood cell; surface morphology; micro-friction; membrane damage

人工心脏中存在的摩擦和磨损是阻碍其发展的重要因素, 国内外研究者结合人工心脏的结构特征, 提出了直接采用血液进行润滑的方式, 如 Walowit 等<sup>[1]</sup>对 CCF 的新一代血泵 (NAS) 进行了研究, 该血泵转子轴承采用血液直接润滑, 他们通过计算机模拟对轴承的结构参数进行了优化。Malanoski 等<sup>[2]</sup>也对此类利用磁浮轴承的血泵进行了研究, 通过计算与试验表明, 当血液润滑膜厚度较大时, 轴承系统将不会引起振动, 此时旋转轴轴心稳定在磁载荷一侧, 并在此侧形成流体动压, 据此, 他们计算了径向滑动轴承在低剪切情况下保证低溶血的同时应具备的润滑膜厚度。Jarvik 2000 钛合金血泵<sup>[3-4]</sup>及 Baylor Gyro 系列离心泵<sup>[5]</sup>均采用血液直接润滑。研究者们从宏观和微

观角度对直接利用血液润滑的方式进行了研究。龚中良、龙东平等<sup>[6-8]</sup>从宏观角度对血液润滑轴承进行了理论分析和试验研究。从微观角度, 马亚敏<sup>[9]</sup>从观察血细胞的形貌着手研究细胞的生理特性、流变特性、力学特性, 从理论上建立反映血细胞黏附性的力学模型; Lavalle 等<sup>[10]</sup>利用实验方法对红细胞与固体材料的黏附特性进行了研究, 并建立了红细胞黏附模型; 尹红梅等<sup>[11]</sup>以生物力学方法为基础, 基于液滴模型建立了白细胞与内皮细胞的黏附模型, 为研究白细胞-内皮细胞黏附引起的血流阻力、压力梯度、速度分布、应力分布、流场扰动等变化规律开辟了全新的方法; 黄耀能<sup>[12]</sup>研究了组成细胞的各种材料与亚结构的力学特性, 细胞及其分子所产生的力和细胞对力作用的响应, 介绍了描述细胞形态结构与力学行为的本构方程和研究细胞力学的有关实验技术。

血液的润滑性能是由血液的宏观流变性决定的, 但血液的宏观流变性受血液组分的影响, 血细胞的结构和组成决定了细胞的流动性、变形性及黏弹性, 血

\* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (50775223)。

收稿日期: 2009-07-01

作者简介: 龙东平 (1977—), 女, 博士, 主要从事摩擦学及人工器官的润滑等方面研究。E-mail: ldp\_1030@163.com。

液的微观吸附特性和吸附形貌, 会对其润滑产生影响。因此, 对直接采用血液润滑来说, 从微观上研究血细胞的微摩擦特性和机制对血液的宏观摩擦和润滑性能的影响规律; 研究血细胞在材料表面的吸附, 从力学角度探讨血栓的形成; 从力学的角度研究微观摩擦力与血细胞破损的关系, 对改进血液润滑效果, 提高润滑效率, 减少血细胞受损是非常重要也是非常必要的。但由于受到微观研究手段限制和活红细胞表面难以控制摩擦的限制, 从微观角度去研究血细胞摩擦性能的研究尚鲜见报道。

在直径只有  $7 \sim 8 \mu\text{m}$  的活生物细胞表面进行摩擦实验具有一定的难度。利用 AFM 对离体活红细胞进行微观摩擦力研究, 可观察红细胞表面微观形貌、摩擦力的基本特征及红细胞膜表面摩擦力和微载荷之间关系等。本文作者从摩擦学的角度, 利用 AFM 观察原子力探针与红细胞表面的微摩擦力, 研究了血液润滑的微观特性及规律。

### 1 实验部分

将云母剪成  $8 \text{ mm} \times 8 \text{ mm}$  左右的小方片, 用双面胶黏在磁性金属载样片上, 待实验时轻轻解理云母, 露出光滑平整的新鲜表面。

抽取健康青年供血者血液  $2 \sim 5 \text{ mL}$ , 放入加 EDTA 抗凝剂的采血试管中, 静置, 去上清, 取底部含有大量红细胞的血液少许, 均匀地涂抹到新解理的云母表面, 静置  $1 \sim 2 \text{ min}$ 。

为了获得准确的实验数据和高质量的图像, 所制备的样品需要满足以下要求: (1) 尽量保证样品的生物活性; (2) 要保证样品较好地固定在基片上, 在扫描的过程中样品不脱落, 不移动<sup>[10-11]</sup>。基片要平整光滑, 减小表面形貌产生的影响。云母表面粗糙度为  $R_a 0.1 \text{ nm}$  左右, 具有原子级平整度, 能够在最大程度上减少表面形貌等因素的干扰, 且云母具有很好的解理性, 实验时很容易剥离上表面而得到新鲜洁净的表面, 新鲜剥离的云母表面具有化学惰性, 常用作生物样品表面的基底, 也是研究微观摩擦最常用的材料基底。

利用 CSPM5000型原子力显微镜, 在室温时对样品进行表面形貌和摩擦特性测试, 湿度控制在  $75\%$  左右, 采用接触模式, 所用针尖为 CSEM5000型 AFM 自带针尖 (Contact A1) 探针, 扫描频率为  $1.0 \text{ Hz}$ , 扫描面积 (范围) 为  $40 \mu\text{m}^2$  左右, 扫描角为  $90^\circ$ ; 测吸附于云母表面的红细胞形貌, 并测其摩擦力 (横向力)。

## 2 结果与分析

### 2.1 红细胞的形态形貌

云母是理想的生物样品的基底, 且其表面光滑平整, 能够减少表面形貌等因素的干扰, 也是研究微观摩擦最常用的材料基底。图 1, 2 分别示出了利用 CSPM5000型原子力显微镜 观察的新解理的云母二维表面形貌和三维表面形貌。

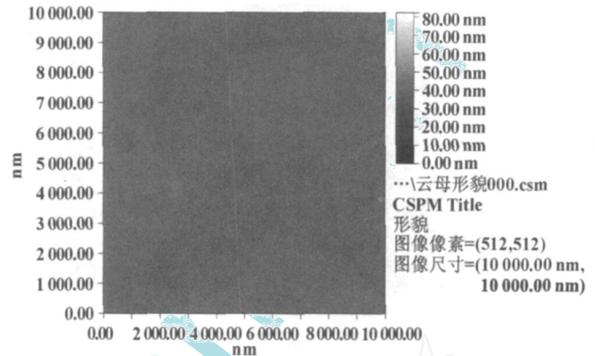


图1 原子力显微镜下云母的二维表面形貌

Fig 1 The 2D morphology of mica surface by AFM

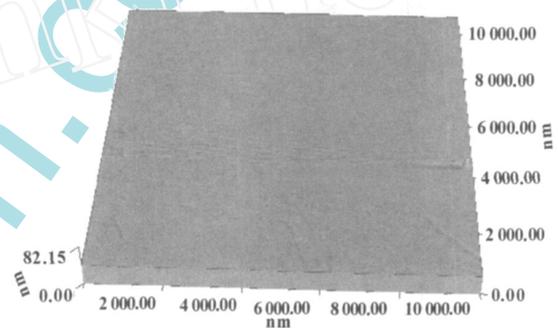


图2 原子力显微镜下云母的三维表面形貌

Fig 2 The 3D morphology of mica surface by AFM

正常红细胞膜表面柔软光滑, 呈双面凹圆盘状, 直径为  $7 \sim 8 \mu\text{m}$ , 厚度为  $1.7 \mu\text{m}$ , 体积约为  $80 \mu\text{m}^3$ , 红细胞膜比较柔软, 容易发生变形。图 3 示出了实验中利用原子力显微镜观察到的吸附在云母表面的红细胞, 可以看出, 吸附在云母表面的红细胞形态完整, 细胞轮廓清晰, 中间稍凹边缘略凸, 细胞膜表面非常柔软; 红细胞膜非常柔软, 易发生变形。

在图 3 (c) 中红细胞 A 上选择  $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$  的范围进行扫描, 观察细胞表面的局部细微结构, 结果如图 4 所示, 可以看出, 红细胞表面柔润光滑, 表面上有些细小的凸起。关于细胞表面的微凸起, 有研究认为是细胞表面的小节瘤<sup>[10]</sup>, 也有认为红细胞膜表面的凸起是红细胞膜蛋白、结合蛋白或者其他电解质分子在细胞膜表面上的堆积, 或是细胞膜上功能性的通道或者细胞镶嵌的内衬膜骨架<sup>[13]</sup>。细胞膜主要是由多种蛋白质、脂类和糖类组成, 其中蛋白质约占  $50\%$ , 主要有膜血影蛋白 (Spectrin)、肌动蛋白 (Actin)、锚蛋白 (Ankyrin) 等; 脂类约占  $42\%$ , 主

要有磷脂、胆固醇和糖脂等分子排列成 4.5 nm 厚双分子层，即脂双层膜结构，球蛋白分子部分镶嵌于脂双层内，部分突出于脂双层表面，这些球蛋白分子可在脂双层上移动。查阅相关文献，结合细胞膜的结构

特征作者推测这些微小的凸起是红细胞膜蛋白中的表面蛋白和结合蛋白，这些均匀分布的微小凸起，高度不超过 10 nm，使得红细胞表面略显粗糙。

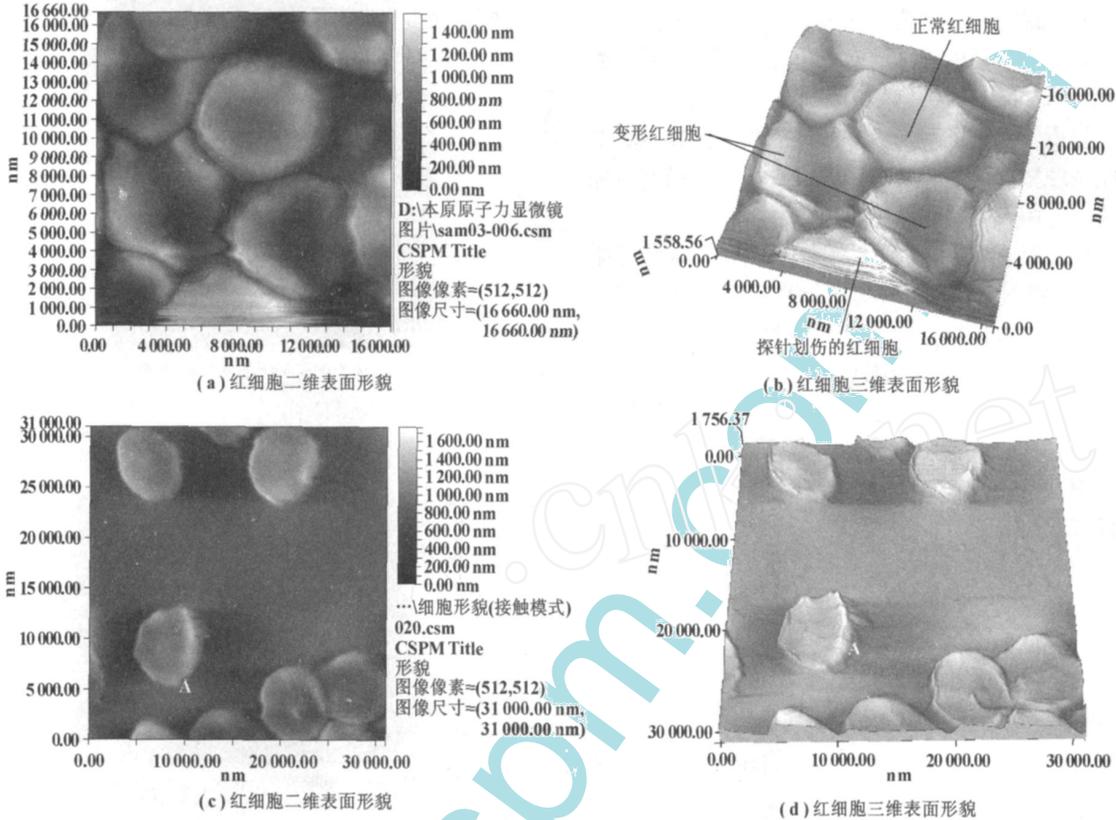


图3 原子力显微镜下的红细胞

Fig 3 The morphology of red blood cells by AFM (a), (c) the 2D morphology of red blood cells surface; (b), (d) the 3D morphology of red blood cells surface

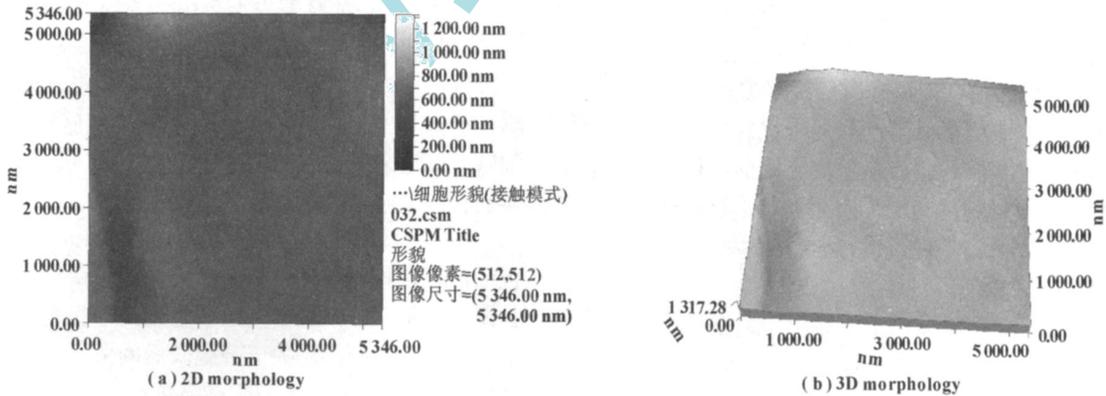


图4 血细胞膜的微观表面特征

Fig 4 The microscopic surface characteristics of blood cell membrane

### 2.2 红细胞膜表面的摩擦力

采用 CSPM5000型原子力显微镜在图 4所示的红细胞表面测试其微摩擦力，以云母表面的摩擦力回路曲线为参照，如图 5, 6所示。图 5为图 1所示的云

母表面的微摩擦力回路曲线，摩擦力回路曲线是探针在扫描区域的中心水平线上由左向右扫描（图 5 中上面的曲线）和由右向左扫描（下面的曲线）所得到的摩擦力的信号。根据 AFM 的工作原理，摩擦力

的大小等于探针在同一位置扫描时，往返两个相反方向的信号之差值，也就是图 5 中上下两条曲线的差值。探针所测得信号比较微小，经几级放大后再转换成电信号，原子力显微镜所测得的微观摩擦力（横向力）反映的是微悬臂的变形量，这种变形通过一定的函数关系转变成电压信号显示，单位为 V，如图 5 所示。云母表面具有原子级平整度，探针与云母表面的微摩擦力变化平缓，没有大的起伏，由图 5 可以看出云母表面的微摩擦力约为 0.4 V，根据所选用的原子力显微镜和探针的型号，约为 11.59 nN。

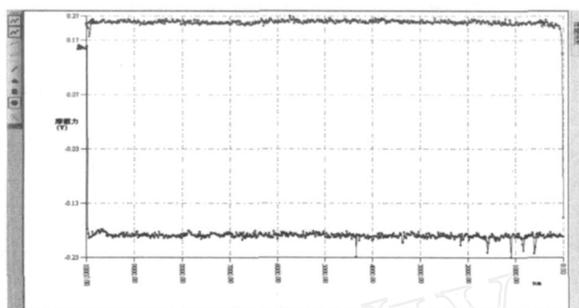


图 5 云母表面的摩擦力回路曲线  
Fig 5 The friction curves of mica surface

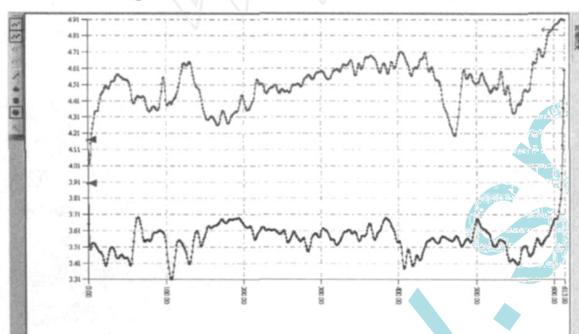


图 6 红细胞表面的摩擦力回路曲线  
Fig 6 The friction curves on the surface of red blood cell

图 6 为探针在图 4 所对应的红细胞表面所测得的微摩擦力回路曲线，可看出探针与血细胞之间的摩擦力与云母表面的摩擦力相比起伏大很多，这是因为红细胞本身形状不像云母表面那样具有原子级的光滑平面，红细胞表面呈两面凹的圆碟状，且十分柔软，通过红细胞表面形貌可以看出，红细胞表面均布着微小凸起。表面柔软使得探针接触红细胞时红细胞极易变形，表面布满的微小凸起使红细胞表面变得粗糙导致所测摩擦值起伏大。由图 6 可以看出，往返两条曲线的差值约为 1 V，亦即说红细胞表面的微摩擦力为 1 V 左右，根据所选用的原子力显微镜和探针的型号，计算出红细胞表面的摩擦力约为 28.98 nN。

原子尺度的摩擦力变化与表面形貌变化相互对应，并具有相同的变化周期。但是摩擦力变化峰值的

变化位置相对于表面形貌峰值会存在一定的偏移。在微纳米尺度下，材料表面的摩擦力除受几何形貌影响之外，材料表面的物理、化学状态也是控制摩擦学行为和过程的重要因素，材料表面的电子和原子结构，表面特性、环境污染物等都会对微摩擦力造成影响。实验中利用原子力显微镜中的探针在活细胞表面所测得的微摩擦力为多种微观力的合力。这些微观力主要包括<sup>[14]</sup>：红细胞表面吸附一定量的水和血浆，这使得探针和细胞膜之间存在较大的毛细管力，毛细管力与吸附膜的表面形貌和表面能有关；红细胞膜的表面柔软粗糙造成的机械互锁而产生的摩擦力；红细胞表面有一定的电荷会产生静电力。多种微观力的共同作用使红细胞表面的摩擦力较大。

在图 4 所示的红细胞表面研究探针与红细胞之间的摩擦力-载荷关系。摩擦力-载荷曲线是原子力探针在扫描区域的首行进行测试，载荷是以电压的方式显示，本试验中所用载荷范围在 0.1 ~ 0.8 V（载荷为 2.89 ~ 23.19 nN），扫描频率为 1 Hz，采集载荷 20 个。

图 7 为云母表面的摩擦力-载荷关系曲线，宏观摩擦理论中将摩擦力与载荷的比值称为摩擦因数，本试验中作者借用此概念。由图 7 可以看出云母表面的摩擦力-载荷基本成线性关系，探针与云母样品表面之间的摩擦因数约为 0.347，新解理的云母表面带有一定的电荷，会造成所测摩擦力偏大。

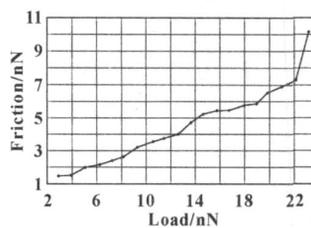


图 7 云母表面的摩擦力-载荷之间的关系  
Fig 7 The relationship between the load and friction on the mica surfaces

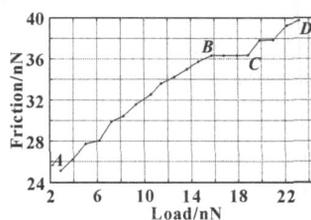


图 8 红细胞表面的摩擦力-载荷之间的关系  
Fig 8 The relationship between the load and friction on the surface of red blood cell

图 8 为图 4 所示红细胞表面的摩擦力-载荷曲线。可以看出，红细胞表面的摩擦力-载荷曲线可分为 3

段 (AB、BC、CD 段), 起始的 AB 段斜率较大, 约为 0.95; BC 段载荷增大, 摩擦力基本保持不变; CD 段载荷增大, 摩擦力增大, 此段斜率约为 0.6。探针所测得的这种原子尺度上的摩擦力与载荷的关系呈分段函数关系。下面进一步分析其原因。

AFM 测微摩擦力时载荷是通过控制压电陶瓷的伸缩使微悬臂弯曲, 从而实现微载荷定量设定的, 微载荷  $N = k \cdot h = kp \cdot V$ , 其中  $k$  是微悬臂的弹性系数,  $h$  是微悬臂的法向位移,  $p$  是压电陶瓷的伸缩系数,  $V$  是压电陶瓷的电压变化。在 AB 段, 探针恰好与红细胞膜表面的吸附层轻轻地接触 (此时尚未真正地接触红细胞膜表面), 摩擦力主要包括毛细管力、范德华力和红细胞表面的静电力, 当加在红细胞表面的载荷增大时也使微悬臂的法向位移增大, 亦即探针与红细胞表面的距离变小, 这就导致与距离有关的力——范德华力、静电力等力的增大, 从而导致摩擦力也随之增大。当法向压力继续增大时, 探针继续靠近红细胞, 当探针与红细胞膜开始真正地接触时, 即 BC 段, 此时毛细管力和范德华力及静电力基本不再随着法向力的变化而增大, 此时法向压力增大会使红细胞膜变形, 所以压力增大摩擦力基本保持不变。继续增大法向压力红细胞膜变形达到极限, 探针刺破红细胞膜插入到细胞内部, 即 CD 段, 所测摩擦力为探针切割红细胞膜的力, 力的大小与探针插入深度有关, 法向压力增大, 探针插入红细胞内部越深, 导致所测得的横向力 (摩擦力) 增大。由于探针插入到红细胞内部, 探针划伤红细胞膜, 使红细胞受损伤。

### 3 结论

(1) 红细胞表面微摩擦力的大小与红细胞的表面形貌及红细胞表面吸附物及表面电荷有关, 活红细胞表面吸附大量的水和血浆导致红细胞表面的微摩擦力较大, 试验中测得的红细胞表面的微摩擦力在几十纳牛量级。

(2) 由于微观活红细胞表面的微观摩擦力的组成比较复杂, 只能根据当前对微观摩擦力的研究推测其组成, 通过研究发现在微观条件下原子力探针与红细胞间的摩擦力与表面形貌有关, 且摩擦力随着载荷的增大而逐渐增大, 当载荷增大到一定程度探针会损伤红细胞, 使红细胞受损伤。

(3) 利用原子力显微镜从微观角度研究红细胞表面的摩擦力, 对研究红细胞的膜结构及红细胞的摩擦学和力学特性, 减少细胞受损、改进血液润滑效果、提高润滑效率提供了依据。

### 参考文献

- [1] Walowit J, Malanoski S B, Horvath D, et al The analysis, design and testing of a blood lubricated hydrodynamic journal bearing [J]. ASA D, 1997, 43 (5): 556 - 559.
- [2] Malanoski S B, Belowski H, Horvath D, et al Stable blood lubricated hydrodynamic journal bearing with magnetically suspended impeller [J]. ASA D, 1998, 44 (5): 737 - 740.
- [3] Francis D, Pagani Continuous-flow Rotary Left Ventricular Assist Devices with "3rd Generation" Design [R]. Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2008, 20 (3): 255 - 263.
- [4] Ranjit John Current Axial-flow Devices: the HeartMate II and Jarvik 2000 Left Ventricular Assist Devices [R]. Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2008, 20 (3): 264 - 272.
- [5] Minato N, Sakuma I, Sasaki T, et al A sealless centrifugal pump (Baylor Gyro Pump) for application to long-term circulatory support [J]. Artificial Organs, 1993, 17 (1): 36 - 42.
- [6] 龚中良, 谭建平. 血液润滑膜组分的动态变化规律研究 [J]. 摩擦学学报, 2006, 26 (6): 505 - 509.  
GONG Zhongliang, TAN Jianping Study on Regulations of Blood Constituent Changing in Blood Lubricating Film [J]. Tribology, 2006, 26 (6): 505 - 509.
- [7] 龚中良, 谭建平. 高切稳态载荷条件下人体血液润滑模型与仿真 [J]. 润滑与密封, 2006, 31 (8): 72 - 74.  
Gong Zhongliang, Tan Jianping Research on the Lubricant Model of Human Blood under Steady Load and High Shear Rate [J]. Lubrication Engineering, 2006, 31 (8): 72 - 74.
- [8] 龙东平, 谭建平, 吴士旭. 血浆润滑性能的试验研究 [J]. 润滑与密封, 2007, 32 (3): 125 - 127.  
Long Dongping, Tan Jianping, Wu Shixu Research on Experiments of the Lubricant Properties of Blood Plasma [J]. Lubrication Engineering, 2007, 32 (3): 125 - 127.
- [9] 马亚敏. 原子力显微镜对八种溶液及经溶液处理后人红细胞形态结构的观察 [D]. 北京: 中国人民解放军进修学院, 2004.
- [10] Lavalle Ph, Senger B, Schaaf P, et al Adhesion of red blood cells to solid surfaces: experimental results and modeling [J]. Clinical Hemorheology, 1996, 16 (1): 38 - 42.
- [11] 尹红梅, 刘肖珩. 白细胞与内皮细胞的粘附模型及其生物力学基础 [J]. 山东生物医学工程, 2000, 19 (3): 50 - 55.  
Yin Hongnei, Liu Xiaoheng Models of leukocytes adhesion to endothelia and its biomechanical basis [J]. Shandong Journal of Biomedical Engineering, 2000, 19 (3): 50 - 55.
- [12] 黄耀熊. 细胞生物力学 [J]. 物理, 2005, 6: 433 - 441.  
HUANG Yaoxiong. Cell biomechanics [J]. Physics, 2005, 6: 433 - 441.
- [13] Yamashina S, Katsumata O. Structural analysis of red blood cell membrane with an atomic force microscope [J]. J Electr Microsc, 2000, 49 (3): 445 - 451.
- [14] M 谢尔格, S 戈尔博. 微/纳米生物摩擦学: 大自然的选择 [M]. 李健, 杨膺, 顾卡丽, 等译. 北京: 机械工业出版社, 2004.