



基于流体力显微镜的单细胞贴壁黏附动力学研究*

章思颖^{1,2)**} 游天齐¹⁾ 徐涛^{1,2)} 罗燕^{1,2)} 胡西³⁾¹⁾ 北京大学生命科学学院, 北京 100871; ²⁾ 国家蛋白质研究中心(北京)北京大学分中心, 北京 100871;³⁾ 清砥量子科学仪器(北京)有限公司, 北京 100015)

摘要 目的 细胞黏附是调控细胞生理功能的关键过程, 对其进行定量表征有助于揭示生命活动的内在力学机制。原子力显微镜单细胞力谱技术虽应用广泛, 但其依赖复杂的活细胞探针化学修饰步骤, 存在操作复杂、检测通量低、易影响细胞活性等问题。本研究采用流体力显微镜单细胞力谱技术, 以更简便高效的方式实现对单细胞贴壁黏附动力学的长时程定量表征, 探究细胞在黏附建立过程中的动力学变化与差异。**方法** 以人胚肾细胞 HEK 293T 和人视网膜色素上皮细胞 hTERT RPE-1 为研究对象, 在 40 h 贴壁培养过程中, 通过流体力显微镜的微流控系统, 将活细胞非破坏性吸附于探针悬臂, 通过细胞-基底分离实验采集力-距离曲线, 获取黏附力、黏附能、最大脱附距离等黏附力学参数, 结合细胞铺展面积的实时变化, 系统表征单细胞的黏附动力学变化。**结果** hTERT RPE-1 细胞在贴壁 1 h 后即迅速进入黏附稳定期, 单位面积黏附力、单位面积黏附能达到峰值, 而 HEK 293T 细胞需要 4 h, 之后两种细胞的黏附力、黏附能与最大脱附距离分别稳定在约 240 nN/30 nN、2.2 pJ/0.12 pJ、6 μ m/4 μ m, 表明两种细胞呈现不同的黏附动力学模式, 其中 hTERT RPE-1 细胞具有更强的黏附能力以及更高的黏附效率。**结论** 本研究采用流体力显微镜单细胞力谱技术实现了对单细胞贴壁黏附动力学的长时程原位定量检测, 揭示 HEK 293T 与 hTERT RPE-1 两种细胞的黏附动力学特征存在差异, 为深入理解细胞黏附行为提供了定量力学实验依据。

关键词 流体力显微镜, 单细胞力谱, 细胞黏附, 力-距离曲线, 细胞力学

中图分类号 Q27, Q66

DOI: 10.3724/j.pibb.2026.0159

CSTR: 32369.14.pibb.20260159

细胞黏附, 指的是细胞与细胞、细胞与基质之间的黏附行为, 对细胞生理调节有着重要的作用, 其过程由多种细胞黏附分子介导^[1], 包括钙黏着蛋白、选择素、整合素、免疫球蛋白等, 参与细胞增殖与凋亡、细胞分化与迁移、胚胎发育、肿瘤转移、感染与炎症等生理与病理过程^[2]。对细胞黏附过程进行定量分析, 能够直观反映其动态变化规律, 有助于揭示其内在分子调控机制。目前, 用于定量检测细胞黏附强度的传统方法包括漂洗计数法^[3-4]、离心法^[5-6]、转盘法^[7]等, 这些方法简单易操作, 但难以避免剪切力、离心力等对细胞造成机械损伤, 且不能检测单细胞的黏附强度, 只能针对细胞群体做统计比较^[8-9]。对于单细胞黏附强度的定量检测, 近年来发展了微吸管法^[10-11]、原子力显微镜单细胞力谱^[12]、微流控芯片^[13]、牵引力

显微镜^[14]、光镊^[15-17]、磁镊^[18-19]等技术方法, 其中原子力显微镜单细胞力谱技术 (atomic force microscopy-based single-cell force spectroscopy, AFM-SCFS) 通过将活细胞修饰在探针悬臂上从而定量检测细胞和细胞、细胞和基质之间的黏附强度, 检测范围从皮牛 (pN) 到纳牛 (nN) 级别, 是应用最为广泛的单细胞黏附强度定量检测技术之一^[20-22]。在 AFM-SCFS 中, 将活细胞通过化学修饰不可逆地黏附于 AFM 探针悬臂这一操作步骤难度较大^[23-24], 且容易改变细胞的生化性质与生理状态^[25], 每次实验需要制备多个活细胞探针, 导

* 北京市科技计划 (Z251100006925026) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 010-62751853, E-mail: qinsiyang@pku.edu.cn

收稿日期: 2026-03-30, 接受日期: 2026-06-16

致该技术的检测通量较低, 技术门槛较高。另外, AFM-SCFS 的力学检测范围受到细胞黏附探针悬臂的力的限制, 不能检测黏附时间过长、黏附强度过大的测试, 否则检测过程中细胞会脱离探针悬臂^[26]。

流体力显微镜 (fluidic force microscopy, FluidFM) 是在 AFM 的基础上发展起来的一种单细胞显微操作系统, 它将 AFM 与微流控系统结合起来, 采用中空的 FluidFM 探针悬臂, 可以在溶液环境中对生物样品进行显微操作^[27-28] (图 1a)。微流控系统与中空的探针悬臂相连接, 可以提供正压或负压从而控制探针悬臂微通道开口的溶液进行释放或抽吸。采用不同微通道开口孔径的探针型号可实现不同类型的显微操作, 如单细胞注射、细胞质或

细胞核内物质抽提、单细胞分选、单细胞黏附强度测定等^[29-32]。在单细胞黏附强度测定的显微操作方面, FluidFM 通过微流控系统施加负压可将活细胞吸附于探针悬臂上, 施加正压可释放细胞, 因此同一根探针可重复使用, 且吸附细胞的过程不影响细胞的生化性质与生理状态^[33], 可以检测不同类型的细胞与细胞、细胞与基质之间的黏附强度。与 AFM-SCFS 相比, FluidFM-SCFS 避免了将活细胞修饰至探针悬臂的操作, 大大缩短了活细胞探针的准备时间, 从原本的几小时缩短至几分钟, 提高了检测通量并且降低了技术门槛^[34-36], 同时扩大了力学检测范围 (百纳牛 (nN) 甚至微牛 (μN) 级别^[37]), 可满足黏附时间长、黏附能力强的细胞样品测试需求。

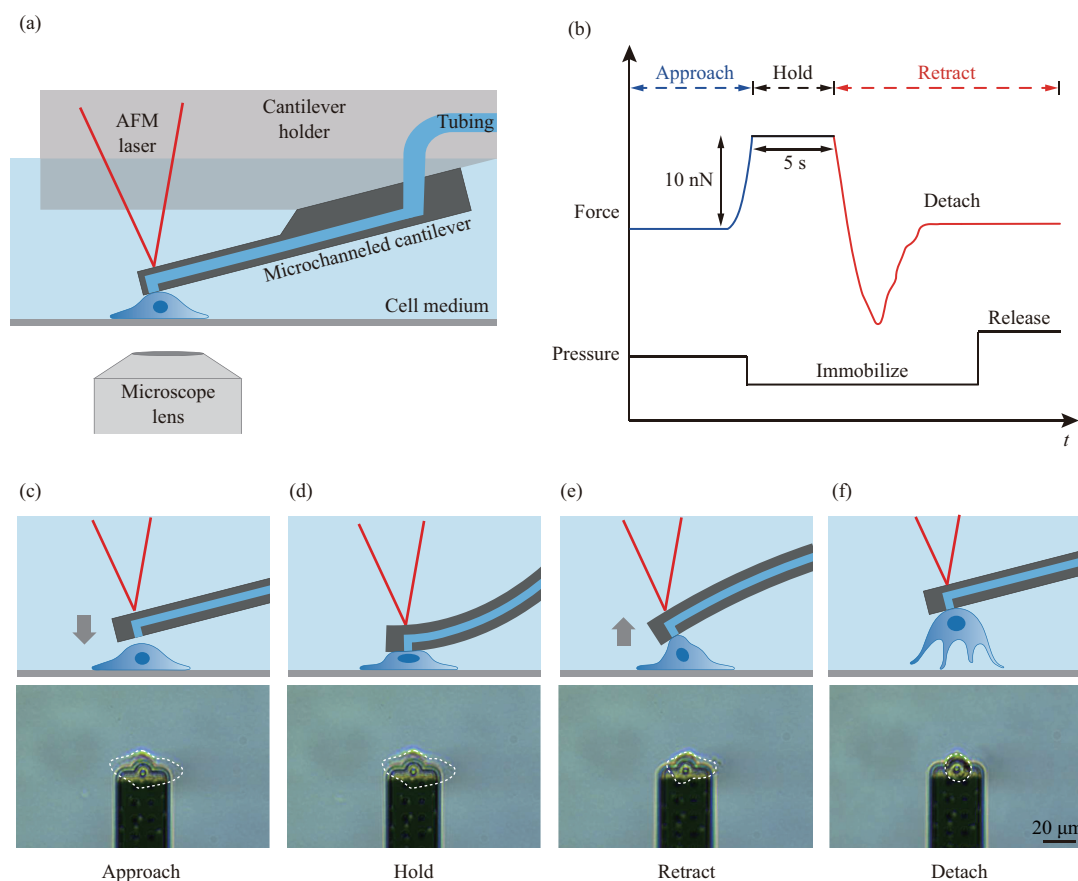


Fig. 1 Cell adhesion measurements by FluidFM-based single-cell force spectroscopy

(a) Basic principles of FluidFM. (b) Workflow of cell adhesion measurements. (c-f) Schematic and optical images of cell adhesion measurements. The optical images are under the schematic diagrams. The hollow cantilever was approached to the adhered cell (c). Upon contact, vacuum was applied to attach the top of the cell to the aperture (d). The cantilever was retracted (e) until the cell was totally detached from the surface (f).

本研究以人胚肾细胞 HEK 293T 和人视网膜色素上皮细胞 hTERT RPE-1 为实验材料, 采用 FluidFM-SCFS 对这两种细胞在 40 h 贴壁过程中的黏附力学特性进行长时程的多参数定量测量。作为实验室常用的哺乳动物细胞系, hTERT RPE-1 是用 hTERT 永生化的人视网膜色素上皮 RPE-1 细胞系, 保留了稳定的核型以及正常的染色体数 (46 条), 作为模式细胞被广泛用于基础研究中, 如细胞铺展与迁移研究。HEK 293T, 基于其易转染及易感染的属性, 是最常用于包装病毒的工程细胞, 也是基础科研中最为常用的细胞之一。两种细胞均来自人源上皮组织的非癌化细胞, 与 hTERT RPE-1 细胞相比, HEK 293T 细胞的分化程度低, 铺展程度较小, 贴壁能力较弱, 形态和特征更偏向于成纤维细胞, 而 hTERT RPE-1 细胞有着典型的上皮细胞的特点如贴壁紧密、高度极化等, 并拥有较强的上皮-间质转化能力。本研究通过 FluidFM-SCFS 定量检测与比较 HEK 293T 和 hTERT RPE-1 两种细胞在贴壁过程中的动态黏附力学特性, 为进一步解析细胞分化程度对黏附能力的影响提供了相关力学数据支持与实验依据, 对研究细胞黏附与迁移过程有一定的启示。

1 材料与方法

1.1 细胞培养及试剂

HEK 293T 和 hTERT RPE-1 细胞系均由北京大学魏文胜教授实验室惠赠。HEK 293T 细胞使用杜尔贝科改良伊格尔培养基 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM) (Gibco, 美国), hTERT RPE-1 细胞使用 DMEM/F12 (Gibco, 美国), 所有培养基使用前加入 10% 胎牛血清 (ViVaCell, 南美)、 10^5 U/L 青霉素和 10^5 U/L 链霉素 (Gibco, 美国)。所有细胞培养于 37°C , 5% CO_2 培养箱中。

1.2 仪器设备

流体力显微镜 (Cytosurge AG, 型号 FluidFM BOT), 其中微流控系统可提供 $-800\sim 1\,000$ mBar 的液体压力, 搭建于倒置显微镜 (Olympus, 型号 IX83) 上, 配备活细胞培养系统 (37°C , 5% CO_2)。

1.3 FluidFM-SCFS

1.3.1 FluidFM 探针的准备

本研究使用的 FluidFM 探针型号为 BIO FluidFM Micropipette (Cytosurge AG, 瑞士), 该型号为无针尖探针, 其微通道圆形开口 (aperture) 在探针悬臂尖端的下方, 直径为 $4\,\mu\text{m}$, 悬臂的弹性系数为 $0.3\,\text{N/m}$ 。每次使用前, 探针需在 $0.1\,\text{g/L}$ 聚赖氨酸-聚乙二醇接枝共聚物 (poly-L-lysine-graft-polyethylene glycol, PLL-g-PEG) (Surface Solution SuSoS AG, 瑞士) 溶液浸泡 30 min, 可减少实验时细胞碎片的非特异黏附污染^[38-39]。在探针样品池内加入 $1\,\mu\text{l}$ PBS 溶液。将探针放置于设备的探针架中, 在成像软件 FluidFM ANYA 的 Preparation Advanced 模式中进行探针的抓取与校准^[40], 获得探针的两个参数——弹性系数 k (spring constant) 与反向光杠杆灵敏度 (inverse optical lever sensitivity, InvOLS)。

1.3.2 细胞样品的准备

使用 0.25% Trypsin-EDTA (VivaCell, 南美) 将细胞消化后, 使用全培养基终止消化, 随后低速离心 ($1\,000\,\text{r/min}$, 5 min) 去除上清, 用培养基将细胞重悬, HEK 293T 细胞在 12 孔板 (Corning Costar 3513) 中的接种密度为 1×10^5 /孔, hTERT RPE-1 细胞的接种密度为 1×10^4 /孔, 接种时刻记为零时刻。12 孔板中提前放入 PBS ($1\times$, pH 7.4) 与 Trypsin-EDTA (2.5%) 溶液各 2 ml, 用于探针的清洗。本实验将最长贴壁检测时长设定为 40 h, 一方面确保细胞已经达到黏附力学稳态, 另一方面避免培养周期过长而引发营养匮乏、代谢产物累积及细胞密度过大而对实验造成干扰。

1.3.3 细胞-基底分离实验

将 12 孔板放置于设备 XY 载物台的孔板架中, 在成像软件 FluidFM ANYA 的 Adhesion 模式中进行细胞-基底分离实验。在 20 倍物镜下寻找合适的单细胞, 选择细胞中间偏高的位置作为探针抓取点。具体参数设置: 按压细胞力阈值 $10\,\text{nN}$; 探针升降速度: $1\,\mu\text{m/s}$; 按压细胞停留时间: 5 s; 按压细胞后微流控压力: $-300\,\text{mBar}$; 探针回撤抬升高度: $50\,\mu\text{m}$ (图 1b)。按照以上设定的参数, 探针以 $1\,\mu\text{m/s}$ 的速度下降, 直至按压细胞表面的力反馈达

到 10 nN, 探针停止下降, 同时微流控系统控制探针开口的液流压强为 -300 mBar, 停留 5 s 以吸住细胞后, 探针以 1 $\mu\text{m/s}$ 的速度抬起, 直至抬升高度为 50 μm , 细胞完全脱离基底, 获得一组力-距离曲线数据 (图 1c~f)。之后对探针进行清洗, 调节微流控系统控制的液流压强为 1 000 mBar 使得吸附的细胞脱离探针悬臂, 将探针转移到 Trypsin-EDTA (2.5%) 中浸泡 2 min 后, 在 PBS (1 $\times$, pH 7.4) 中漂洗 3 次, 确保探针悬臂上没有细胞碎片且探针处于通畅状态后, 可进行下一个单细胞的测定。

为了避免细胞与细胞之间相互作用的影响, 只挑选单独铺展的单细胞进行测定。在实验过程中保持活细胞培养条件 (37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2), 每小时更换新的细胞以保证良好的细胞状态。本研究共测定 626 个细胞, 其中 HEK 293T 细胞 352 个, hTERT RPE-1 细胞 274 个, 每个时间段测定的细胞数为 10~30 个, 在至少 3 批独立细胞培养中重复开展数据采集。数据分析时, 对异常力-距离曲线数据进行识别与舍弃, 如细胞在拉离基底时从探针上脱落、细胞未完全拉离基底等情况。

1.4 细胞铺展面积的计算

在进行单细胞力谱测定前对细胞进行拍照记录。在软件 ImageJ 中打开细胞图片, Properties 中输入像素大小为 0.3 $\mu\text{m} \times 0.3 \mu\text{m}$, 使用 freehand selections 描画细胞轮廓, 利用 Measure 功能进行面积的计算, 得到待测细胞的铺展面积 (cell spreading area, A_{cell})。

1.5 力-距离曲线的分析

基于胡克定律, 探针受力的计算公式为:

$$F = U \times k \times \text{InvOLS} \quad (1)$$

其中, F 为探针悬臂按压细胞所受到的力 (N), U 为光电检测器接收到的探针悬臂背面的反射激光信号 (V), k 为探针悬臂的弹性系数 (N/m), InvOLS 为探针悬臂的反向光杠杆灵敏度 (m/V)。探针悬臂的 k 与 InvOLS 在每次实验前通过校准获得。

力-距离曲线如图 2a 所示, 蓝线为逼近 (approach) 曲线, 红线为回撤 (retract) 曲线, 黏附力 F_{adh} (adhesion force) 为细胞从基底分离过程中记录到的最大黏附力, 最大脱附距离 D_{max} (maximum detachment distance) 为达到最大黏附力时细胞的垂直拉伸距离, 黏附能 E_{adh} (adhesion energy) 为黏附力做的功, 通过对力-距离曲线进行积分来获得, 用来描述细胞从基底上脱离所需的能量。 F_{adh} 、 E_{adh} 与 D_{max} 这 3 个黏附力学参数可表征细胞与基底之间的黏附强度与稳定性^[41]。

使用软件 FluidFM GUI 3.2 对力-距离曲线数据进行分析^[41], 获得每个贴壁细胞的 F_{adh} 、 E_{adh} 与 D_{max} 。另外可用软件 Origin 进行验证, 将原始测试数据导入 Origin2023 软件中进行力-距离曲线的绘制与分析, 使用 distance between two points 功能获得细胞与基底的 F_{adh} 和 D_{max} , 使用 Polygon Area 功能计算 E_{adh} 。

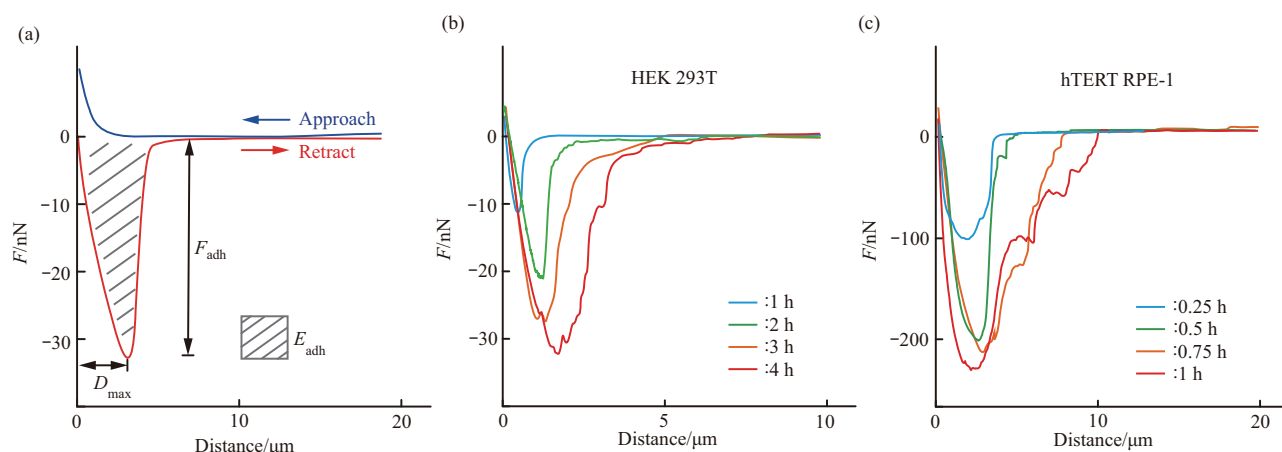


Fig. 2 Force-distance curves of FluidFM-SCFS

(a) A typical force-distance curve of a measured cell, presenting the primary parameters F_{adh} , E_{adh} , and D_{max} . Representative force-distance retraction curves for HEK 293T (b) and hTERT RPE-1 (c).

2 结 果

2.1 贴壁时长对单细胞铺展与黏附力学特性的影响

HEK 293T 细胞与 hTERT RPE-1 细胞的力-距离回撤曲线 (图 2b, c) 表明, 随着贴壁时间延长, 两种细胞的 F_{adh} 、 E_{adh} 与 D_{max} 均呈现不同程度的增加。图 3 和表 1 进一步展示了两种细胞在 40 h 贴壁过程中 A_{cell} 、 F_{adh} 、 E_{adh} 与 D_{max} 的动态变化。两种细胞的 A_{cell} 随时间持续增长, hTERT RPE-1 从初始约 $316 \mu\text{m}^2$ 增加至约 $1680 \mu\text{m}^2$, HEK 293T 从初始约 $162 \mu\text{m}^2$ 增加至约 $824 \mu\text{m}^2$ 。在黏附力学特性方面, hTERT RPE-1 细胞的 F_{adh} 与 E_{adh} 在贴壁 1 h 后迅速达到平台期, 分别稳定在约 241 nN 与 2.2 pJ, 而 HEK 293T 细胞的生长较为缓慢, 在 4 h 后进入平台期, 分别为 31 nN 与 0.12 pJ。此外, hTERT RPE-1 细胞的 D_{max} 在 0.75 h 左右进入平台期 (约 $6 \mu\text{m}$), HEK 293T 细胞则在 6 h 左右进入平台期 (约 $4 \mu\text{m}$), 之后仍随时间缓慢增长, 至 40 h 达到约 $6 \mu\text{m}$ 。

从变化趋势来看, 两种细胞的 A_{cell} 和 F_{adh} 的增长并不同步, 而 F_{adh} 与 E_{adh} 、 D_{max} 的变化则呈现较强的同步性, 分别在贴壁 1 h (hTERT RPE-1 细胞)、4 h (HEK 293T 细胞) 左右趋于稳定。在稳定状态下, hTERT RPE-1 细胞的 A_{cell} 、 F_{adh} 、 E_{adh} 与 D_{max} 分别为 HEK 293T 细胞的约 2 倍、8 倍、1.8 倍与 1.6 倍。上述结果表明, hTERT RPE-1 细胞具有更强的铺展与黏附能力, 且能更快达到稳定的贴壁状态。

2.2 贴壁时长对单细胞单位面积黏附特性的影响

为比较两种细胞的单位面积黏附特性, 本研究对 F_{adh} 、 E_{adh} 与 D_{max} 进行了面积归一化处理。如表 1 和图 4 所示, HEK 293T 细胞的 F_{adh}/A_{cell} 、 E_{adh}/A_{cell} 与 D_{max}/A_{cell} 在贴壁 4 h 达到峰值, 分别为 $0.13 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$ 、 $0.46 \text{ fJ}/\mu\text{m}^2$ 、 14.91 mm^{-1} , 而 hTERT RPE-1 细胞则在贴壁 0.75~1 h 期间达到峰值, 分别为 $0.56 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$ 、 $3.54 \text{ fJ}/\mu\text{m}^2$ 、 15.19 mm^{-1} , 其 F_{adh}/A_{cell} 、 E_{adh}/A_{cell} 的最大值分别为 HEK 293T 细胞的约 4.3、7.7 倍, D_{max}/A_{cell} 则相近。上述结果表明, hTERT RPE-1 在单位面积上表现出更强的黏附能力, 且达到峰值黏附状态的时间更短, 说明其具有更高的黏附效率。

2.3 单细胞贴壁黏附特性的动态相关性

为探究细胞贴壁 F_{adh} 与其他物理参数的关联,

本研究分析了 HEK 293T (图 5a~c) 与 hTERT RPE-1 (图 5d~f) 两种细胞在 40 h 贴壁过程中 F_{adh} 分别与 E_{adh} 、 D_{max} 及 A_{cell} 的动态相关性, 不同贴壁时期的皮尔逊相关系数整理于表 2。HEK 293T 细胞的 F_{adh} 变化范围为 0~100 nN, 在贴壁早期 (0.25~3 h) 分布较为集中, 中期 (4~7 h) 与后期 (8~40 h) 向高值区延伸, 最高达 97 nN。hTERT RPE-1 细胞的 F_{adh} 变化范围更宽 (0~600 nN), 分布随贴壁时长逐步扩展, 最高达 564 nN。

F_{adh} - E_{adh} 的动态相关性分析显示, 两种细胞的 E_{adh} 与 F_{adh} 呈正相关, HEK 293T 细胞的相关性较强 ($R \approx 0.86$), E_{adh} 最高达 0.7 pJ; hTERT RPE-1 细胞的相关性较弱 ($R \approx 0.56$), 数据离散度较高, E_{adh} 最高为 6.7 pJ。两种细胞的 F_{adh} 与 D_{max} 同样呈正相关, HEK 293T 细胞的相关性较强 ($R \approx 0.68$), D_{max} 最高约 $12.5 \mu\text{m}$; hTERT RPE-1 细胞的相关性较弱 ($R \approx 0.35$), D_{max} 最高约 $20.5 \mu\text{m}$ 。两种细胞的 F_{adh} 与 A_{cell} 的相关性均较弱 (R 分别约为 0.44 与 0.41)。两种细胞的 A_{cell} 均随贴壁时长增长, HEK 293T 细胞最高约 $1350 \mu\text{m}^2$, hTERT RPE-1 细胞最高约 $2860 \mu\text{m}^2$, 数据点均呈离散化趋势。HEK 293T 细胞在贴壁各个时期的 F_{adh} - E_{adh} 相关性变化不大, 随着贴壁时长增加, F_{adh} - D_{max} 相关性有所变弱, 而 F_{adh} - A_{cell} 相关性有所变强。hTERT RPE-1 细胞在贴壁中期 (1.5~7 h) 的 F_{adh} - E_{adh} 、 F_{adh} - D_{max} 与 F_{adh} - A_{cell} 相关性较弱。

结果表明, HEK 293T 细胞的 E_{adh} 、 D_{max} 与 F_{adh} 线性关联均强于 hTERT RPE-1 细胞。hTERT RPE-1 细胞在贴壁中期 (1.5~7 h) 出现 A_{cell} 持续增大而 F_{adh} 稳定在约 200 nN 的现象, 且 F_{adh} - E_{adh} 、 F_{adh} - D_{max} 与 F_{adh} - A_{cell} 相关性较弱, 而 HEK 293T 细胞无此阶段, 提示两种细胞在黏附动力学机制上存在差异。此外, 两种细胞的 A_{cell} 与 F_{adh} 的相关性较弱, A_{cell} 的增大并不必然导致 F_{adh} 增强。

2.4 单细胞贴壁单位面积黏附特性的动态相关性

为探究细胞 F_{adh}/A_{cell} 与其他物理参数的关联, 本研究分析了 HEK 293T (图 6a, b) 与 hTERT RPE-1 (图 6c, d) 两种细胞在 40 h 贴壁过程中 F_{adh}/A_{cell} 分别与 E_{adh}/A_{cell} 、 D_{max}/A_{cell} 的动态相关性, 不同贴壁时期的皮尔逊相关系数整理于表 2。经过面积归一化处理后, hTERT RPE-1 细胞的 F_{adh}/A_{cell} - E_{adh}/A_{cell} 、 F_{adh}/A_{cell} - D_{max}/A_{cell} 的相关系数 R 分别约为 0.60 与 0.54, 较未面积归一化处理的 F_{adh} - E_{adh} 、

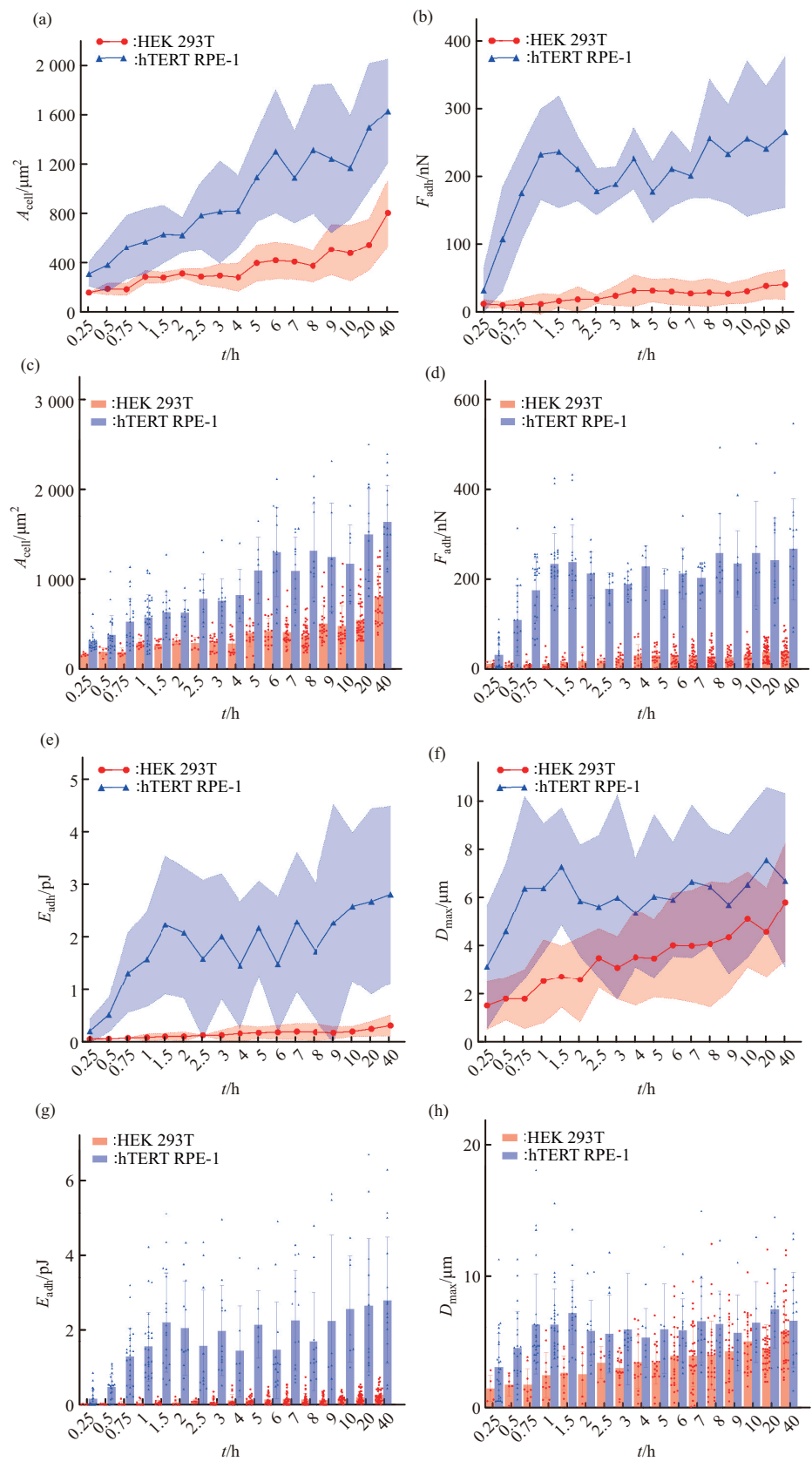


Fig. 3 Dynamic changes of single-cell adhesion parameters for HEK 293T and hTERT RPE-1 cells during 40 h adhesion (a, c) Cell spreading area ($A_{\text{cell}}/\mu\text{m}^2$). (b, d) Adhesion force (F_{adh}/nN). (e, g) Adhesion energy (E_{adh}/pJ). (f, h) Maximum detachment distance ($D_{\text{max}}/\mu\text{m}$). Data are presented as mean±standard deviation (SD), with shaded areas (a, b, e, f) and error bars (c, d, g, h) indicating the SD range. Experiments were reproducible in at least three independent cell cultures.

Table 1 Summary of key mechanical properties of HEK 293T and hTERT RPE-1 cells during spreading (mean±SD)

Parameters	HEK 293T	hTERT RPE-1
Initial $A_{\text{cell}}/\mu\text{m}^2$	162.04±19.16	315.63±99.18
Max $A_{\text{cell}}/\mu\text{m}^2$	823.59±280.54	1 680.22±429.22
Time to max A_{cell}/h	40	40
Initial F_{adh}/nN	10.74±6.54	31.44±33.41
Steady F_{adh}/nN	30.85±24.13	240.95±70.43
Time to steady F_{adh}/h	4	1
Initial E_{adh}/pJ	0.01±0.01	0.16±0.23
Steady E_{adh}/pJ	0.12±0.16	2.20±1.34
Time to steady E_{adh}/h	4	1.5
Initial $D_{\text{max}}/\mu\text{m}$	1.45±0.99	3.08±2.58
Steady $D_{\text{max}}/\mu\text{m}$	3.96±2.23	6.38±3.82
Time to steady D_{max}/h	6	0.75
Initial $F_{\text{adh}}/A_{\text{cell}}/(\text{nN}\cdot\mu\text{m}^{-2})$	0.07±0.04	0.10±0.14
Max $F_{\text{adh}}/A_{\text{cell}}/(\text{nN}\cdot\mu\text{m}^{-2})$	0.13±0.10	0.56±0.31
Time to max $F_{\text{adh}}/A_{\text{cell}}/\text{h}$	4	1
Initial $E_{\text{adh}}/A_{\text{cell}}/(\text{fJ}\cdot\mu\text{m}^{-2})$	0.07±0.06	1.24±0.96
Max $E_{\text{adh}}/A_{\text{cell}}/(\text{fJ}\cdot\mu\text{m}^{-2})$	0.46±0.56	3.54±2.84
Time to max $E_{\text{adh}}/A_{\text{cell}}/\text{h}$	4	0.75
Initial $D_{\text{max}}/A_{\text{cell}}/\text{mm}^{-1}$	8.96±6.10	10.35±10.75
Max $D_{\text{max}}/A_{\text{cell}}/\text{mm}^{-1}$	14.91±8.50	15.19±11.57
Time to max $D_{\text{max}}/A_{\text{cell}}/\text{h}$	4	1

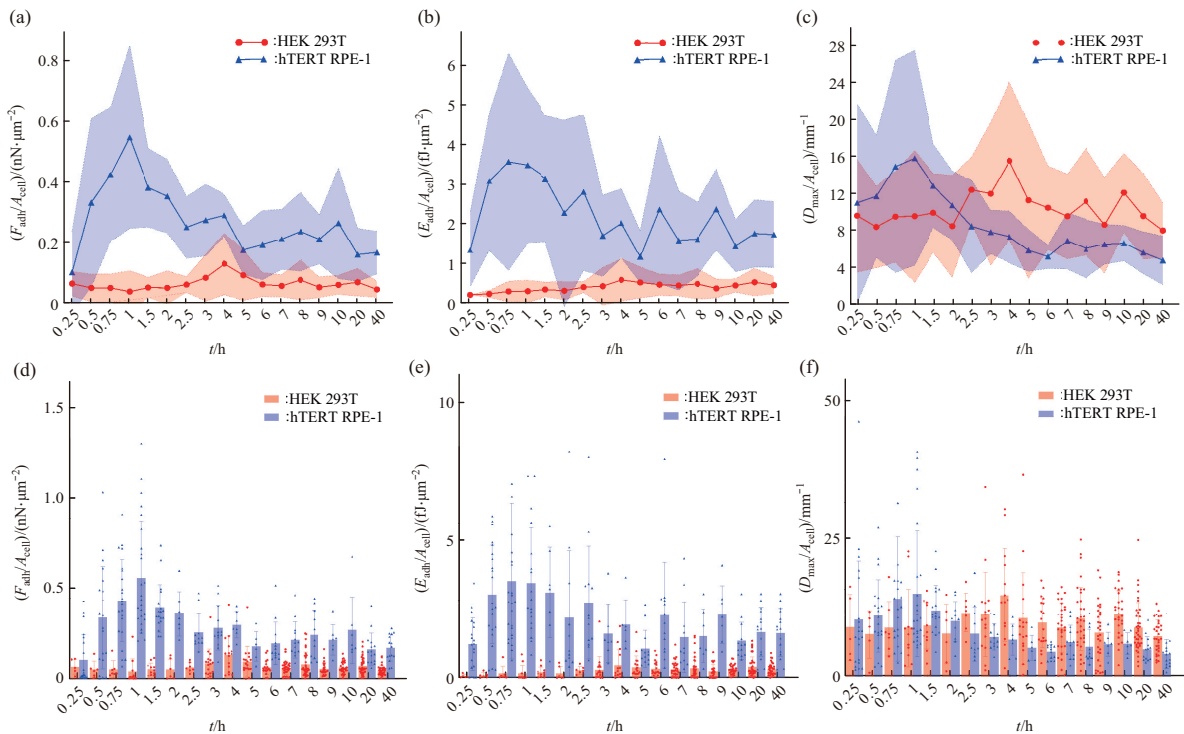


Fig. 4 Dynamic changes in area-normalized single-cell adhesion parameters for HEK 293T and hTERT RPE-1 cells during 40 h adhesion

(a, d) Area-normalized adhesion force ($(F_{\text{adh}}/A_{\text{cell}})/(\text{nN}\cdot\mu\text{m}^{-2})$). (b, e) Area-normalized adhesion energy ($(E_{\text{adh}}/A_{\text{cell}})/(\text{fJ}\cdot\mu\text{m}^{-2})$). (c, f) Area-normalized maximum detachment distance ($(D_{\text{max}}/A_{\text{cell}})/\text{mm}^{-1}$). Data are presented as mean±standard deviation (SD), with shaded areas (a, b, c) and error bars (d, e, f) indicating the SD range. Experiments were reproducible in at least three independent cell cultures.

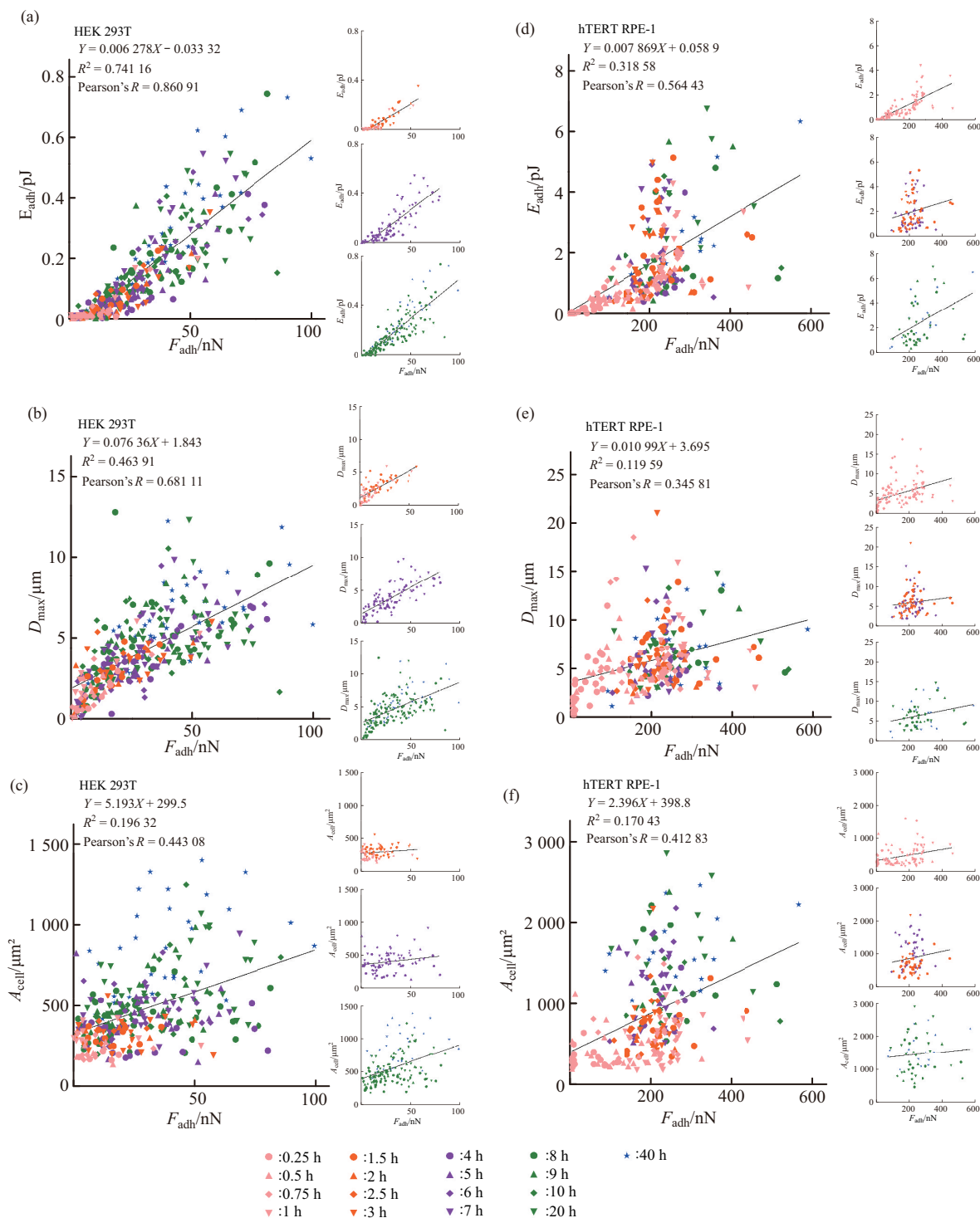


Fig. 5 Correlations between adhesion force (F_{adh}) and other single-cell adhesion parameters for HEK 293T (a-c) and hTERT RPE-1 (d-f) cells during 40 h adhesion

(a, d) E_{adh} vs. F_{adh} , (b, e) D_{max} vs. F_{adh} , (c, f) A_{cell} vs. F_{adh} . Data points with different shapes are color/shape-coded by time (0.25–40 h), with linear regression lines, R^2 values, and Pearson correlation coefficients shown for each panel. Insets show the same correlations at three representative time intervals for clarity.

F_{adh} - D_{max} 的相关系数 R (分别约为 0.56 与 0.35) 略有提升, 其中贴壁中期 (1.5~7 h) 的增加幅度较大

(分别从约 0.18、0.11 增加至约 0.43、0.57), 而 HEK 293T 细胞则变化不大。

Table 2 Summary of pearson correlation coefficients of single-cell adhesion parameters for HEK 293T and hTERT RPE-1 cells during 40 h adhesion

Cell type	Pearson <i>R</i>	$F_{adh}-E_{adh}$	$F_{adh}-D_{max}$	$F_{adh}-A_{cell}$	$F_{adh}/A_{cell}-E_{adh}/A_{cell}$	$F_{adh}/A_{cell}-D_{max}/A_{cell}$
HEK 293T	$R_{(0.25-40\text{ h})}$	0.860 9	0.681 1	0.443 1	0.835 9	0.749 0
	$R_{(0.25-3\text{ h})}$	0.892 3	0.756 3	0.164 8	0.876 4	0.811 1
	$R_{(4-7\text{ h})}$	0.849 5	0.746 5	0.202 0	0.850 7	0.828 3
	$R_{(8-40\text{ h})}$	0.841 6	0.563 5	0.418 6	0.838 2	0.619 6
hTERT RPE-1	$R_{(0.25-40\text{ h})}$	0.564 4	0.345 8	0.412 8	0.603 1	0.535 1
	$R_{(0.25-1\text{ h})}$	0.768 0	0.384 6	0.321 4	0.746 3	0.468 2
	$R_{(1.5-7\text{ h})}$	0.182 4	0.107 6	0.127 2	0.435 3	0.568 7
	$R_{(8-40\text{ h})}$	0.446 1	0.276 3	0.100 0	0.316 5	0.470 4

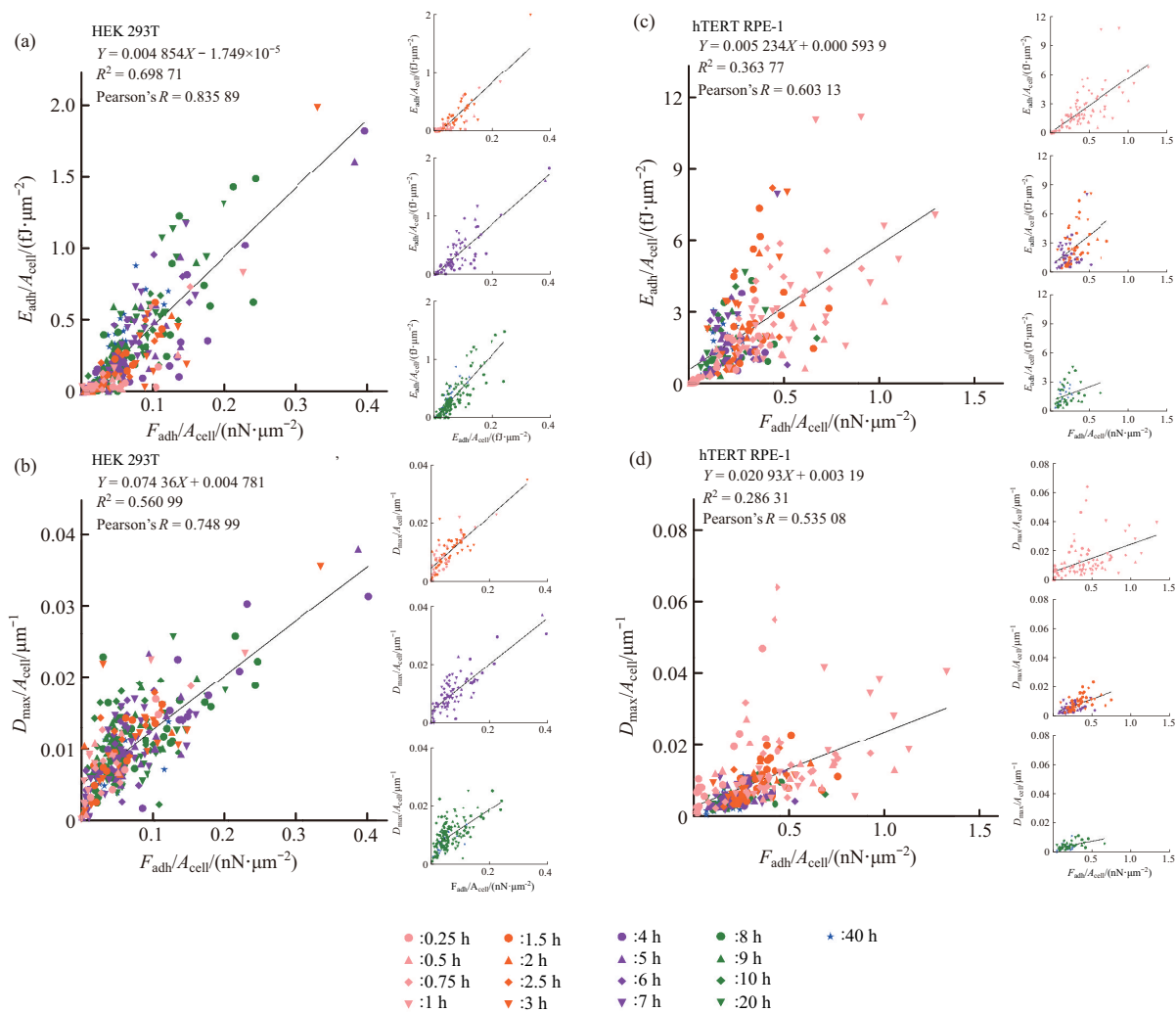


Fig. 6 Correlations between area-normalized adhesion force (F_{adh}/A_{cell}) and other area-normalized single-cell adhesion parameters for HEK 293T (a, b) and hTERT RPE-1 (c, d) cells during 40 h adhesion

(a, c) E_{adh}/A_{cell} vs. F_{adh}/A_{cell} . (b, d) D_{max}/A_{cell} vs. F_{adh}/A_{cell} . Data points with different shapes are color/shape-coded by time (0.25–40 h), with linear regression lines, R^2 values, and pearson correlation coefficients shown for each panel. Insets show the same correlations at three representative time intervals for clarity.

HEK 293T 细胞的 F_{adh}/A_{cell} 变化范围为 0~0.4 nN/ μm^2 , 各时期数据点分布未见明显差异, 单

位面积黏附参数 F_{adh}/A_{cell} 、 E_{adh}/A_{cell} 、 D_{max}/A_{cell} 分别集中在 0.1 nN/ μm^2 、0.5 fJ/ μm^2 、0.02 μm^{-1} 以内。相比

之下, hTERT RPE-1 细胞的 F_{adh}/A_{cell} 变化范围较大 ($0 \sim 1.5 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$), 贴壁早期数据点较为分散, 随着贴壁时间延长, 数据点逐渐向坐标原点聚集, 表明在贴壁中后期单位面积黏附参数呈同步下降趋势, 贴壁后期的 F_{adh}/A_{cell} 、 E_{adh}/A_{cell} 、 D_{max}/A_{cell} 分别集中在 $0.5 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$ 、 $3 \text{ fJ}/\mu\text{m}^2$ 、 $0.01 \mu\text{m}^{-1}$ 以内。该结果表明, 在单位面积黏附特性上, 两种细胞呈现显著差异。HEK 293T 细胞的单位面积黏附强度在贴壁过程中保持相对稳定, 数值范围在各时期分布基本一致, 而 hTERT RPE-1 细胞的单位面积黏附强度在贴壁早期较高, 随贴壁过程逐步下降, 提示两种细胞在贴壁过程中采用了不同的黏附策略。

3 讨 论

细胞黏附是细胞与细胞以及细胞外基质发生相互作用的基础生物学过程, 对细胞迁移、组织形成、免疫应答以及肿瘤转移等关键生理与病理活动有重要调控作用。深入理解细胞黏附的动力学特性与力学机制, 是揭示相关生命活动规律的重要途径。本研究利用 FluidFM-SCFS 系统比较了 HEK 293T 与 hTERT RPE-1 两种细胞在 40 h 贴壁培养过程中的铺展行为、黏附力学特性及其动态关联, 揭示了二者在黏附强度与黏附动力学策略上的显著差异。

本研究结果表明, hTERT RPE-1 细胞在铺展速度、黏附强度以及达到黏附力学稳定状态的速度上均显著优于 HEK 293T 细胞, 具体表现为:

a. hTERT RPE-1 细胞的 A_{cell} 、 F_{adh} 、 E_{adh} 与 D_{max} 的稳定值均高于 HEK 293T 细胞, 且更快进入力学稳定状态, 表明其具有更强的黏附能力和更快的黏附成熟速率; b. 单位面积黏附力学特性的分析结果显示, hTERT RPE-1 细胞在贴壁 1 h 即达到 F_{adh}/A_{cell} 与 E_{adh}/A_{cell} 的峰值 (HEK 293T 细胞为 4 h), 之后随贴壁时间延长逐步下降, 表明 hTERT RPE-1 细胞在贴壁初期可快速建立高强度黏附, 迅速形成与基底之间的锚定, 而 HEK 293T 细胞达到 F_{adh}/A_{cell} 与 E_{adh}/A_{cell} 峰值的时间更长, 随后两种细胞随着铺展面积的增加, 细胞进入黏附成熟与力学稳定阶段。两种细胞达到 F_{adh}/A_{cell} 与 E_{adh}/A_{cell} 峰值的时间不同, 提示两者的黏着斑组装与成熟的速率可能存在差异。

动态相关性分析结果表明, HEK 293T 与 hTERT RPE-1 两种细胞的 A_{cell} 与 F_{adh} 的整体相关性较弱, 数据离散度高, 尤其是 hTERT RPE-1 细胞在贴壁中期出现了 A_{cell} 持续增大而 F_{adh} 保持稳定的

现象, 说明两种细胞 A_{cell} 与 F_{adh} 的相关性会随贴壁进程动态改变, 表明 A_{cell} 的增大与 F_{adh} 的增强并非存在必然协同关系。细胞 A_{cell} 与 F_{adh} 的解耦现象, 反映了细胞在铺展过程中可能存在“黏附饱和”的适应性调控机制, 是力学信号与黏附分子通路协同调控的结果。细胞骨架的牵引力可诱导踝蛋白 (talins)、黏着斑蛋白 (vinculin) 等黏着斑相关蛋白发生构象变化从而促进黏着斑的成熟^[42-43], 而成熟黏着斑能够更高效地传递机械信号、维持细胞铺展, 从而在铺展面积增大的同时维持整体黏附力处于相对稳定水平。hTERT RPE-1 细胞在贴壁前期, 单位面积黏附参数 F_{adh}/A_{cell} 、 E_{adh}/A_{cell} 、 D_{max}/A_{cell} 升高, 以保障细胞快速锚定, 中后期单位面积黏附参数呈同步下降趋势, 说明细胞已建立稳定的细胞-基质连接, 从强黏附锚定转变到稳定成熟状态, 这一现象也体现了细胞的“黏附饱和”机制, 同时可能与 hTERT RPE-1 细胞极性的建立有关。以上结果表明, 两种细胞的黏附策略存在显著差异, hTERT RPE-1 细胞在贴壁初期迅速与基底形成锚定, 随着铺展面积扩大, 可能通过调节黏着斑的大小、分布与成熟度或者改变细胞骨架的张力等状态, 以适应长期贴壁, 推测其具备更复杂、更多元的信号通路来动态调节黏附状态, 从而具备更强的微环境适应能力与力学调节能力, 以实现上皮-间质转化能力。HEK 293T 细胞的黏附动力学策略可能更依赖于时间的累积, 而非初期爆发式的力学构建, 反映其渐进和保守的黏附策略。

与 HEK 293T 相比, hTERT RPE-1 细胞的黏着斑激酶、vinculin、桩蛋白 (paxillin) 等黏附相关分子和肌动蛋白表达水平更高, 同时两种细胞在整合素亚型表达谱存在明显差异, HEK 293T 的整合素表达整体偏低, 而 hTERT RPE-1 细胞中高表达 $\alpha 3$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 5$ 等多种整合素亚型 (数据来源于 the human protein atlas 数据库), 与基底形成半桥粒结构从而进一步增强细胞与基底之间的黏附作用。本研究针对两种细胞黏附力学差异得出的相关推论, 仍需开展分子生物学实验加以验证, 如检测不同贴壁阶段细胞内黏着斑激酶的磷酸化活化水平。后续研究可通过构建细胞黏附过程的力学-化学耦合模型^[44], 并结合 FluidFM-SCFS 定量结果, 系统解析细胞力学信号与黏附分子信号通路的动态关联, 以期阐明细胞黏附行为的调控机制。

FluidFM-SCFS 目前主要应用于单个细胞测量, 难以快速获取大样本统计数据, 在反映细胞群体异

质性方面存在不足。本研究利用细胞铺展投影面积对黏附力学参数开展归一化分析,仍存在一定局限性。一方面,细胞铺展投影面积与真实基底接触面积存在偏差,另一方面,细胞内黏着斑呈非均匀分布状态,细胞中央与边缘区域对整体黏附力的贡献并不一致,因此该分析方式仅适用于单细胞整体黏附力学特性评价,无法精准区分细胞不同贴壁区域的力学差异。同时,两种细胞的形态结构与固有力学特性各不相同,FluidFM探针吸附捕获细胞时产生的机械作用存在差异,获取的力-距离曲线是探针-细胞-基底复杂相互关系的综合体现,除了细胞自身黏附特性之外,还需考虑探针接触几何、流体力学环境等的影响^[45]。另外,细胞所处不同细胞周期也会对黏附力学检测结果造成干扰^[46]。上述多种因素均会给FluidFM-SCFS检测细胞贴壁黏附力学特性带来系统性偏差。

本研究采用的FluidFM-SCFS为长时程、多参数、动态监测单细胞黏附力学特性提供了强大工具,能够实时、连续地获取细胞在完整贴壁周期中的力-距离曲线,捕捉瞬态力学状态和长期动态变化趋势,单次测量可同时提取 F_{adh} 、 E_{adh} 与 D_{max} 等多个关键黏附力学指标,并可与显微形态学观察(如 A_{cell})进行关联分析,提供多维度的黏附强度表征。FluidFM-SCFS可联合多种检测手段用对单细胞贴壁进行黏附强度定量测量,如牵引力显微镜^[47-49]、共振波导光栅(resonant waveguide grating, RWG)无标记光学生物传感器^[50]、计算机控制微量移液系统^[51]等,后续还可进一步与布里渊显微镜、生物电阻抗检测等新兴技术联用,有望揭示细胞黏附过程中力学-化学-生物学耦合的动态作用机制。

4 结 论

本研究通过FluidFM-SCFS动态解析了HEK 293T与hTERT RPE-1两种细胞在贴壁过程中的单细胞黏附动力学行为,揭示了二者在黏附建立速度、黏附强度以及单位面积黏附效率等方面的显著差异。hTERT RPE-1细胞展现出高效且具有动态调节能力的黏附特性,而HEK 293T细胞则表现为稳定、渐进的黏附模式。两种细胞在黏附特征上的差异,反映了细胞分化程度与黏附表型的紧密关联,提示细胞分化状态可能通过调控黏附相关分子的表达进而影响细胞的黏附与迁移能力。FluidFM-SCFS为理解细胞的黏附行为提供了定量依据,同时也为评价材料表面生物相容性、筛选调控细胞黏

附的药物建立了关键的生物物理指标体系。进一步结合分子动力学模拟、单细胞转录组学等技术,有望系统揭示黏附动力学差异背后的分子机制及其调控网络,从而为生物材料的设计、靶向黏附药物的开发以及肿瘤侵袭、组织修复等生理病理过程的理解提供力学视角的参考依据。

数据可用性声明 本论文的关联数据(DOI: 10.57760/sciencedb.39404/CSTR: 31253.11.sciencedb.39404)可在Science Data Bank数据库(<https://www.scidb.cn/s/ZB7jEj>)中访问获取。

参 考 文 献

- [1] Shinde A, Illath K, Gupta P, *et al.* A review of single-cell adhesion force kinetics and applications. *Cells*, 2021, **10**(3): 577
- [2] Khalili A, Ahmad M. A review of cell adhesion studies for biomedical and biological applications. *Int J Mol Sci*, 2015, **16**(8): 18149-18184
- [3] 袁博, 谢佳忆, 江思瑜, 等. 脂肪干细胞源性外泌体对体外巨噬细胞迁移能力的影响. *吉林大学学报(医学版)*, 2024, **50**(3): 718-727
Yuan B, Xie J Y, Jiang S Y, *et al.* *Jilin Univ J (Med Sci)*, 2024, **50**(3): 718-727
- [4] Wang Y, Su J, Fu D, *et al.* The role of YB1 in renal cell carcinoma cell adhesion. *Int J Med Sci*, 2018, **15**(12): 1304-1311
- [5] Channavajjala L S, Eidsath A, Saxinger W C. A simple method for measurement of cell-substrate attachment forces: application to HIV-1 Tat. *J Cell Sci*, 1997, **110**(Pt 2): 249-256
- [6] 盛佳, 曾衍钧, 庄逢源. 离心法与细胞显微操作法对内皮细胞-白细胞黏附特性的初步研究. *生物物理学报*, 1999, **15**(1): 187-193
Sheng J, Zeng Y J, Zhuang F Y. *Acta Biophys Sin*, 1999, **15**(1): 187-193
- [7] Fuhrmann A, Engler A J. Acute shear stress direction dictates adherent cell remodeling and verifies shear profile of spinning disk assays. *Phys Biol*, 2015, **12**(1): 016011
- [8] Ungai-Salánki R, Peter B, Gerecsei T, *et al.* A practical review on the measurement tools for cellular adhesion force. *Adv Colloid Interface Sci*, 2019, **269**: 309-333
- [9] Christ K V, Turner K T. Methods to measure the strength of cell adhesion to substrates. *J Adhes Sci Technol*, 2010, **24**(13/14): 2027-2058
- [10] 钱天威, 王颖. 细胞黏附的微吸管法测定及其应用进展. *上海交通大学学报(医学版)*, 2016, **36**(10): 1517-1521
Qian T W, Wang Y. *J Shanghai Jiao Tong Univ (Med Sci)*, 2016, **36**(10): 1517-1521
- [11] Hogan B, Babataheri A, Hwang Y, *et al.* Characterizing cell adhesion by using micropipette aspiration. *Biophys J*, 2015, **109**(2): 209-219
- [12] Helenius J, Heisenberg C P, Gaub H E, *et al.* Single-cell force

- spectroscopy. *J Cell Sci*, 2008, **121**(11): 1785-1791
- [13] 专行, 郑国侠, 王云华. 微流控芯片技术在细胞黏附研究中的优势与应用前景. *中国组织工程研究*, 2019, **23**(22): 3584-3590
Zhuan H, Zheng G X, Wang Y H. *Chin J Tissue Eng Res*, 2019, **23**(22): 3584-3590
- [14] Mulligan J A, Bordeleau F, Reinhart-King C A, *et al.* Traction force microscopy for noninvasive imaging of cell forces. *Adv Exp Med Biol*, 2018, **1092**: 319-349
- [15] Thoumine O, Kocian P, Kottelat A, *et al.* Short-term binding of fibroblasts to fibronectin: optical tweezers experiments and probabilistic analysis. *Eur Biophys J*, 2000, **29**(6): 398-408
- [16] Neuman K C, Nagy A. Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nat Methods*, 2008, **5**(6): 491-505
- [17] Zhang H, Liu K K. Optical tweezers for single cells. *J R Soc Interface*, 2008, **5**(24): 671-690
- [18] Gosse C, Croquette V. Magnetic tweezers: micromanipulation and force measurement at the molecular level. *Biophys J*, 2002, **82**(6): 3314-3329
- [19] de Vries A H, Krenn B E, van Driel R, *et al.* Micro magnetic tweezers for nanomanipulation inside live cells. *Biophys J*, 2005, **88**(3): 2137-2144
- [20] 党丹, 项荣武, 刘斌, 等. 基于 AFM 单细胞力谱技术的淋巴瘤细胞黏附力测量. *生物化学与生物物理进展*, 2019, **46**(1): 89-98
Dang D, Xiang R B, Liu B, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2019, **46**(1): 89-98
- [21] Friedrichs J, Legate K R, Schubert R, *et al.* A practical guide to quantify cell adhesion using single-cell force spectroscopy. *Methods*, 2013, **60**(2): 169-178
- [22] Puech P H, Poole K, Knebel D, *et al.* A new technical approach to quantify cell-cell adhesion forces by AFM. *Ultramicroscopy*, 2006, **106**(8/9): 637-644
- [23] Beaussart A, El-Kirat-Chatel S, Sullan R M A, *et al.* Quantifying the forces guiding microbial cell adhesion using single-cell force spectroscopy. *Nat Protoc*, 2014, **9**(5): 1049-1055
- [24] Friedrichs J, Helenius J, Muller D J. Quantifying cellular adhesion to extracellular matrix components by single-cell force spectroscopy. *Nat Protoc*, 2010, **5**(7): 1353-1361
- [25] Schubert R, Strohmeyer N, Bharadwaj M, *et al.* Assay for characterizing the recovery of vertebrate cells for adhesion measurements by single-cell force spectroscopy. *FEBS Lett*, 2014, **588**(19): 3639-3648
- [26] Taubenberger A V, Huttmacher D W, Muller D J. Single-cell force spectroscopy, an emerging tool to quantify cell adhesion to biomaterials. *Tissue Eng Part B Rev*, 2014, **20**(1): 40-55
- [27] Meister A, Gabi M, Behr P, *et al.* FluidFM: combining atomic force microscopy and nanofluidics in a universal liquid delivery system for single cell applications and beyond. *Nano Lett*, 2009, **9**(6): 2501-2507
- [28] Zambelli T, Guillaume-Gentil O, Sarajlic E, *et al.* Fluidic force microscopy. *Nat Rev Meth Primers*, 2026, **6**(1): 15
- [29] Qiu Y, Chien C C, Maroulis B, *et al.* Extending applications of AFM to fluidic AFM in single living cell studies. *J Cell Physiol*, 2022, **237**(8): 3222-3238
- [30] Li M, Liu L, Zambelli T. FluidFM for single-cell biophysics. *Nano Res*, 2022, **15**(2): 773-786
- [31] Saha P, Duanis-Assaf T, Reches M. Fundamentals and applications of FluidFM technology in single-cell studies. *Adv Mater Interfaces*, 2020, **7**(23): 2001115
- [32] Guillaume-Gentil O, Potthoff E, Ossola D, *et al.* Force-controlled manipulation of single cells: from AFM to FluidFM. *Trends Biotechnol*, 2014, **32**(7): 381-388
- [33] Sankaran S, Jaatinen L, Brinkmann J, *et al.* Cell adhesion on dynamic supramolecular surfaces probed by fluid force microscopy-based single-cell force spectroscopy. *ACS Nano*, 2017, **11**(4): 3867-3874
- [34] Luo M, Yang W, Cartwright T N, *et al.* Simultaneous measurement of single-cell mechanics and cell-to-materials adhesion using fluidic force microscopy. *Langmuir*, 2022, **38**(2): 620-628
- [35] McGrath J S, Quist J, Seddon J R, *et al.* Deformability assessment of waterborne protozoa using a microfluidic-enabled force microscopy probe. *PLoS One*, 2016, **11**(3): e0150438
- [36] Potthoff E, Guillaume-Gentil O, Ossola D, *et al.* Rapid and serial quantification of adhesion forces of yeast and mammalian cells. *PLoS One*, 2012, **7**(12): e52712
- [37] Sancho A, Vandersmissen I, Craps S, *et al.* A new strategy to measure intercellular adhesion forces in mature cell-cell contacts. *Sci Rep*, 2017, **7**: 46152
- [38] Guillaume-Gentil O, Zambelli T, Vorholt J A. Isolation of single mammalian cells from adherent cultures by fluidic force microscopy. *Lab Chip*, 2014, **14**(2): 402-414
- [39] Konradi R, Acikgoz C, Textor M. Polyoxazolines for nonfouling surface coatings — a direct comparison to the gold standard PEG. *Macromol Rapid Commun*, 2012, **33**(19): 1663-1676
- [40] Sader J E, Chon J W M, Mulvaney P. Calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers. *Rev Sci Instrum*, 1999, **70**(10): 3967-3969
- [41] Nagy Á G, Székács I, Bonyár A, *et al.* Cell-substratum and cell-cell adhesion forces and single-cell mechanical properties in mono- and multilayer assemblies from robotic fluidic force microscopy. *Eur J Cell Biol*, 2022, **101**(4): 151273
- [42] Schwarz U S, Gardel M L. United we stand: integrating the actin cytoskeleton and cell-matrix adhesions in cellular mechanotransduction. *J Cell Sci*, 2012, **125**(Pt 13): 3051-3060
- [43] Liang H, Fang W, Chen X, *et al.* Multiscale mechanobiochemical modeling of cell-substrate adhesion dynamics. *Biophys J*, 2026, **125**(3): 962-977
- [44] 龙勉. 细胞-分子层次的多尺度力学-化学-生物学耦合. *医用生物力学*, 2016, **31**(4): 327-332
Long M. *J Med Biomech*, 2016, **31**(4): 327-332
- [45] Weder G, Vörös J, Giazson M, *et al.* Measuring cell adhesion forces during the cell cycle by force spectroscopy. *Biointerphases*, 2009, **4**(2): 27-34

- [46] Nagy Á G, Kanyó N, Vörös A, *et al.* Population distributions of single-cell adhesion parameters during the cell cycle from high-throughput robotic fluidic force microscopy. *Sci Rep*, 2022, **12**: 7747
- [47] Chala N, Zhang X, Zambelli T, *et al.* 4D force detection of cell adhesion and contractility. *Nano Lett*, 2023, **23**(7): 2467-2475
- [48] Buisson J, Zhang X, Zambelli T, *et al.* Reverse mechanotransduction: driving chromatin compaction to decompaction increases cell adhesion strength and contractility. *Nano Lett*, 2024, **24**(14): 4279-4290
- [49] Chala N, Moimas S, Giampietro C, *et al.* Mechanical fingerprint of senescence in endothelial cells. *Nano Lett*, 2021, **21**(12): 4911-4920
- [50] Sztilkovics M, Gerecsei T, Peter B, *et al.* Single-cell adhesion force kinetics of cell populations from combined label-free optical biosensor and robotic fluidic force microscopy. *Sci Rep*, 2020, **10**(1): 61
- [51] Gerecsei T, Erdödi I, Peter B, *et al.* Adhesion force measurements on functionalized microbeads: an in-depth comparison of computer controlled micropipette and fluidic force microscopy. *J Colloid Interface Sci*, 2019, **555**: 245-253

Study of Single-cell Adhesion Kinetics by Fluidic Force Microscopy*

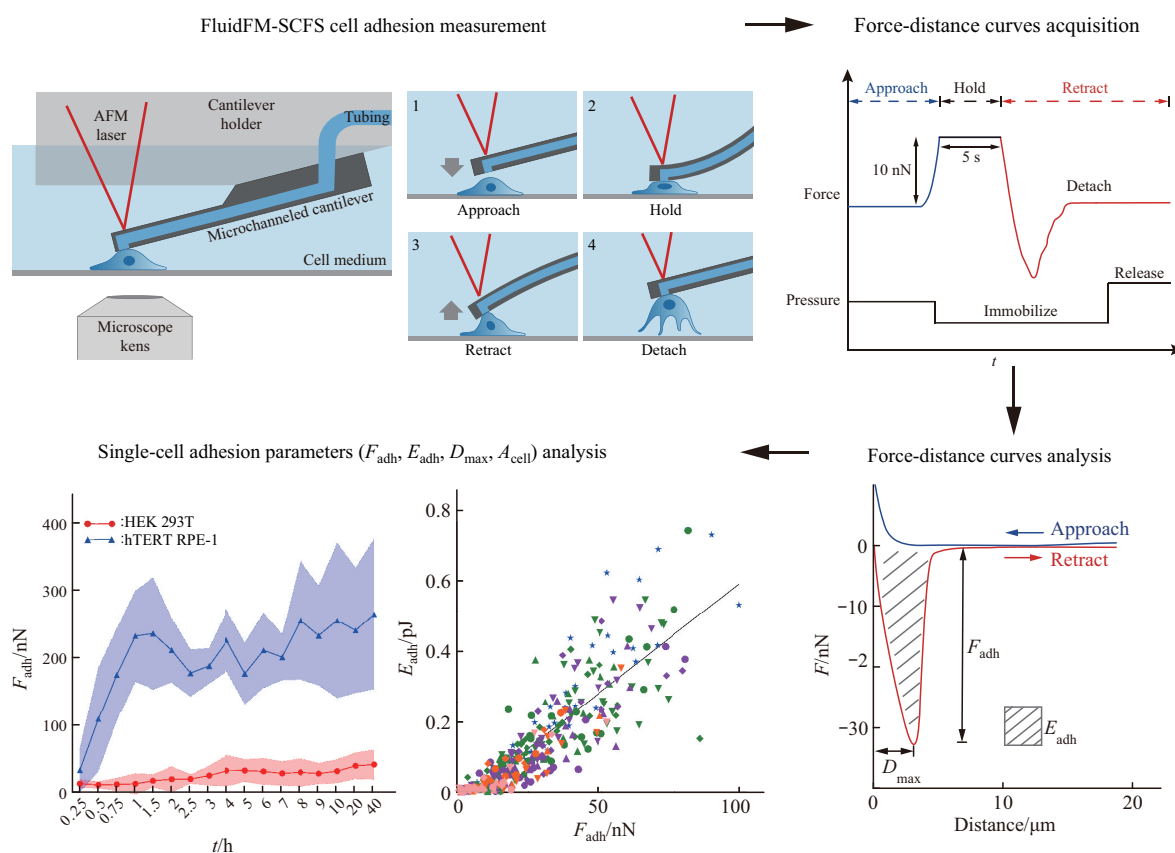
QIN Si-Ying^{1,2)**}, YOU Tian-Qi¹⁾, XU Tao^{1,2)}, LUO Yan^{1,2)}, HU Xi³⁾

¹⁾School of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China;

²⁾National Center for Protein Sciences (Beijing) at Peking University, Beijing 100871, China;

³⁾Quantum Design China (Beijing), Beijing 100015, China)

Graphical abstract



Abstract Objective Cell adhesion is a critical process that regulates cellular physiological functions. Quantitative characterization of adhesion dynamics is essential for elucidating the intrinsic mechanical mechanisms underlying cellular activities. Although atomic force microscopy-based single-cell force spectroscopy is widely used for single-cell adhesion measurements, it requires complex chemical modifications for preparation of live-cell probes, leading to limitations such as cumbersome operation, low throughput, and potential impacts on

* This work was supported by a grant from Beijing Municipal Science and Technology Plan Project (Z251100006925026).

** Corresponding author.

Tel: 86-10-62751853, E-mail: qinsiying@pku.edu.cn

Received: March 30, 2026 Accepted: June 16, 2026

cell viability. Fluidic force microscopy, which combines atomic force microscopy with microfluidic probes, is a technique allowing the operation of force-controlled nanopipettes in aqueous environments. By applying negative or positive pressure *via* a pressure controller, a single living cell can be captured onto or released from the cantilever under physiological conditions. This procedure offers a simple workflow and high assay throughput for single-cell adhesion measurements without the need for chemical functionalization. In this study, fluidic force microscopy-based single-cell force spectroscopy was adopted to achieve long-term quantitative characterization of single-cell adhesion dynamics in a simpler and more efficient manner, comparing the dynamic differences in adhesion establishment between two cell lines with different differentiation levels. **Methods** HEK 293T and hTERT RPE-1 cells were non-invasively captured on the cantilever of a fluidic force microscope *via* its integrated microfluidic system during 40 h of adhesion culture. Cell-substrate detachment assays were performed, and force-distance curves were recorded to extract key mechanical adhesion parameters, including adhesion force, adhesion energy, and maximum detachment distance. These measurements were combined with real-time monitoring of cell spreading area to systematically characterize the dynamic evolution of single-cell adhesion. **Results** hTERT RPE-1 cells rapidly entered a stable adhesion phase within 1 h after seeding, with both area-normalized adhesion force and area-normalized adhesion energy reaching peak values. In contrast, HEK 293T cells required 4 h to achieve stable adhesion. Subsequently, the adhesion force, adhesion energy and maximum detachment distance of hTERT RPE-1 and HEK 293T cells stabilized at approximately 240 nN *vs.* 30 nN, 2.2 pJ *vs.* 0.12 pJ and 6 μ m *vs.* 4 μ m, respectively. hTERT RPE-1 cells reached the peak of area-normalized adhesion parameters earlier than HEK 293T cells, with their peak area-normalized adhesion force and area-normalized adhesion energy being substantially elevated relative to HEK 293T cells. HEK 293T cells presented stronger linear correlations among adhesion energy, maximum detachment distance and adhesion force compared with hTERT RPE-1 cells. For both cell lines, cell spreading area exhibited a weak correlation with adhesion force. Whereas the area-normalized adhesion parameters of HEK 293T cells remained relatively constant throughout the adhesion process, hTERT RPE-1 cells exhibited elevated values in the early phase, followed by a gradual decline. These results indicated distinct dynamic adhesion patterns between the two cell types, with hTERT RPE-1 cells exhibiting stronger adhesion strength and higher adhesion efficiency. **Conclusion** In this study, fluidic force microscopy-based single-cell force spectroscopy was successfully applied to perform long-term *in situ* quantitative measurement of the adhesion dynamics in single adherent cells. The approach revealed divergent adhesion patterns between HEK 293T and hTERT RPE-1 cells, suggesting a close association between cell differentiation and adhesion behaviors. These findings provide quantitative mechanical evidence for further understanding the underlying mechanisms of cell adhesion.

Key words fluidic force microscopy, single-cell force spectroscopy, cell adhesion, force-distance curve, cell mechanics

DOI: 10.3724/j.pibb.2026.0159

CSTR: 32369.14.pibb.20260159