



基于原子力显微镜的溶液流动环境下癌细胞力学特性测量研究*

魏佳佳^{1,2,3)} 李 密^{1,2,3)**} 冯雅琦^{1,2,3)} 刘连庆^{1,2,3)}

⁽¹⁾ 中国科学院沈阳自动化研究所, 机器人学国家重点实验室, 沈阳 110016;

²⁾ 中国科学院机器人与智能制造创新研究院, 沈阳 110169; ³⁾ 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要 目的 细胞力学特性在细胞生理病理活动过程中起着重要的调控作用, 开展细胞力学特性研究对于揭示生命活动在规律具有重要意义。原子力显微镜 (AFM) 的发明为单细胞力学特性表征提供了新的强大工具, 基于 AFM 压痕分析的细胞力学特性探测已成为生命科学领域的重要研究方法, 为单细胞行为研究带来了大量新认识。然而, 现有基于 AFM 的细胞力学特性研究主要集中在静态溶液环境, 而癌细胞在体内转移过程中处于脉管系统的动态液流环境下, 因此现有的测量结果无法完全反映溶液流动环境下的癌细胞真实生理行为, 特别是目前对于肿瘤转移过程中液流环境与癌细胞之间相互作用的力学机制的认知还十分有限。本文通过将 AFM 与液流控制技术结合建立了溶液流动环境下的细胞力学特性测量方法。

方法 基于两侧开口培养皿并结合注射泵/抽取泵液流控制搭建细胞培养基动态液流系统, 并将其分别与 AFM 及光学倒置显微镜进行集成。选取 MCF-7 (人乳腺癌细胞) 和 HGC-27 (人未分化胃癌细胞) 两种癌细胞进行实验。利用细胞培养基动态液流系统培养细胞并分析溶液流速以及流动时间对细胞生长及力学特性的影响。在光学显微镜引导下控制 AFM 对培养基静态/流动环境下生长的细胞进行压痕实验以获取力曲线, 并利用 Hertz-Sneddon 模型对力曲线进行分析得到细胞杨氏模量。利用荧光染色试剂分析溶液流动环境对细胞活性及细胞骨架蛋白的影响。**结果** 首先分析了溶液流动环境对细胞生长的影响, 实验结果表明, 与静态培养环境相比, 培养基动态液流环境可更好地促进细胞生长。随后分别对静态和流动环境下生长的癌细胞力学特性进行了测量, 结果表明当癌细胞生长环境由静态变为动态后细胞的杨氏模量显著减小, 且溶液流动环境会导致细胞骨架结构的变化, 显示了溶液流动环境对癌细胞力学特性的显著影响。**结论** 将 AFM 与液流控制技术结合可对溶液流动环境下的单细胞力学特性进行探测, 为研究溶液流动环境与癌细胞之间的相互作用提供了新的方法和思路。

关键词 原子力显微镜, 溶液流动环境, 癌症转移, 细胞, 力学特性, 杨氏模量

中图分类号 Q27, Q66

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0397

开展溶液流动环境下的细胞力学特性研究对于揭示癌症等重大疾病的内在机制具有重要科学意义。最新的统计数据显示 2020 年全球癌症新发病例 1 930 万, 死亡病例 1 000 万^[1], 其中中国癌症新增病例数 (457 万) 和死亡病例数 (300 万) 均位居全球第一^[2]。癌症已成为人类生命健康的重要威胁, 阐明癌症发生发展及演变过程的内在机理对于癌症的临床诊疗及防控具有关键性的作用。转移是导致癌症患者死亡的最主要原因 (>90%)^[3]。过去的数十年中, 研究人员针对转移癌症的发病机制及其临床治疗开展了大量研究, 如肿瘤转移分子机制^[4]、上皮间质转化^[5]、癌症相关成纤维细

胞^[6]、肿瘤基质^[7]、转移癌症靶向治疗^[8]等, 增加了人们对转移癌症的认识, 但整体而言目前人们对癌症转移内在机理的了解, 特别是在癌细胞与体液流动环境之间的相互作用方面, 仍然极其有限。体液流动环境及其力学特性在肿瘤的生长、进展、转移及治疗过程中起着重要的调控作用^[9]。在癌症转移过程中, 癌细胞处于多种不同类型的体液微

* 国家自然科学基金 (62273330, 61922081, 61873258), 中国科学院前沿科学重点研究计划 (ZDBS-LY-JSC043) 和辽宁省“兴辽英才计划” (XLYC1907072) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 024-23970203, E-mail: limi@sia.cn

收稿日期: 2021-12-23, 接受日期: 2022-02-17

环境中(如癌细胞在细胞外基质中运动时处于组织液微环境中,癌细胞在血管/淋巴管中运动时处于血液/淋巴液微环境中^[10]),癌细胞与体液微环境之间的相互作用对于癌细胞的最终转移及增殖具有重要影响^[11]。特别是,近年来对肿瘤发生及转移过程中癌细胞力学特性进行的研究结果表明了正常细胞与良性肿瘤细胞及侵袭性肿瘤细胞之间力学特性的显著差异^[12-15],显示了细胞力学特性对癌细胞生理行为的重要指示作用。因此,对溶液流动环境下的细胞力学特性进行研究有助于揭示肿瘤转移过程中癌细胞与体液微环境之间相互作用的力学机制。

原子力显微镜(AFM)的发明为细胞力学特性研究提供了新的强大工具。AFM可以直接在溶液环境下以前所未有的时空分辨率(纳米级空间分辨率、毫秒级时间分辨率)^[16]对活体状态生物样本的表面形貌结构进行免标记成像。特别是,通过控制AFM探针在细胞表面进行压痕实验并对压痕实验过程中获取的力曲线进行分析,AFM可以对细胞力学特性进行定量探测^[17]。此外,近年来还出现了基于力曲线的AFM峰值力轻敲(PFT)多参数成像模式,可以同步快速获取单个活细胞的形貌图和力学特性图^[18-21],极大地提升了AFM在细胞力学特性探测方面的能力。与光镊、磁镊等其他单细胞力学特性探测方法相比,AFM具有独特的优势。光镊导致的介质热效应会对细胞生理活动造成损伤,磁镊则需要预先对细胞进行磁性颗粒标记^[22]。与光镊、磁镊相比,AFM无需预先对细胞进行任何处理且可以在生理环境下对活体状态的细胞进行无损探测,因此AFM已成为微纳尺度生物样本力学特性探测与表征的标准方法之一^[23-25],在生命科学域得到了广泛应用,为细胞和分子生物学带来了大量新的认识^[26]。过去的数十年中,研究人员利用AFM对癌细胞的力学特性开展了广泛的研究^[13-14, 27-31],极大地增加了人们对癌细胞生理行为的认识。然而需要指出的是,现有基于AFM的癌细胞力学特性研究集中在静态溶液环境^[13-14, 27-31],忽略了溶液流动环境对癌细胞力学特性的影响,测量结果无法完全反映癌细胞转移过程中的力学特性。

针对上述问题,本文通过将液流控制技术和AFM结合,实现了溶液流动环境下的细胞力学特性测量。基于液流控制技术构建了细胞培养基动态液流系统并实现了溶液流动环境下的细胞培养,在

此基础上通过将培养基动态液流系统和AFM结合实现了溶液流动环境下的细胞力学特性测量,实验结果揭示了溶液流动环境对癌细胞力学特性的显著影响。研究结果为研究肿瘤转移过程中癌细胞与体液微环境之间的相互作用提供了新的方法和思路,对于生命科学领域具有广泛的基础意义。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

实验所用的MCF-7(人乳腺癌细胞)和HGC-27(人未分化胃癌细胞)购自中国科学院细胞库(上海)。细胞培养基(DMEM高糖培养液、RPMI-1640)以及磷酸盐缓冲液(PBS)购自上海典瑞生物科技有限公司,胎牛血清购自美国Thermo Fisher公司,青霉素-链霉素溶液购自美国Hyclone公司,多聚赖氨酸、抗荧光衰减封片剂购自北京索莱宝科技有限公司。细胞荧光染色相关试剂,包括钙黄绿素(Calcein-AM)、碘化丙啶(propidium iodide, PI)、肌动蛋白红色荧光探针(Actin-Tracker Red-555)、4%多聚甲醛固定液等,均购自上海碧云天生物技术有限公司。MCF-7细胞在含有10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素溶液的DMEM培养基中培养,HGC-27细胞在含有10%的胎牛血清和1%的青霉素-链霉素溶液的RPMI-1640培养。所有细胞均接种在培养皿中,并置于细胞培养箱(美国Thermo Fisher公司)中培养(37℃, 5% CO₂, 95%空气)。

1.2 样本制作

利用去离子水(德国Milli-Q)将多聚赖氨酸原液稀释10倍,随后将干净的盖玻片置于稀释后的多聚赖氨酸溶液中室温孵育30 min。孵育完成后将盖玻片置于生物安全柜(美国Thermo Fisher公司)内并利用生物安全柜的紫外灯对盖玻片进行杀菌处理24 h。将灭菌处理后的盖玻片置于培养皿中,随后在细胞传代时将细胞悬浮液滴至盖玻片上并静置5 min。随后往培养皿中加入培养基,并将培养皿置于细胞培养箱中培养。当细胞在盖玻片表面贴壁生长至80%~90%时即可将盖玻片置于动态液流细胞培养装置(图1a)进行实验。

1.3 培养基动态液流细胞培养装置搭建

溶液流动环境下的细胞力学特性测量系统(图1b)由AFM(Dimension Icon, 美国Bruker公司)和培养基动态液流细胞培养装置构成。利用液流控制技术搭建培养基动态液流细胞培养装置,主要包

括注射泵 (F6 双道微量注射泵, 浙江史密斯医学仪器有限公司)、抽取泵 (LSP02-1B, 兰格恒流泵有限公司)、医用注射器 (50 ml)、医用微量泵延长管 (直径 2 mm)、加温器 (深圳博远太和科技有限公司)、三通旋塞、侧面开孔的培养皿 (底面直径 30 mm, 高 3 mm) 和盖玻片 (长 20 mm, 宽 20 mm, 厚 0.2 mm) 等。侧面开孔培养皿通过在培养皿对称两侧利用电烙铁穿孔 (孔径为 2 mm) 制作而成, 随后将侧面开孔培养皿与微量泵延长管通过橡胶黏合剂连接。与注射泵相连的微量泵延长管置于加温器的卡槽中, 加温器的作用是对微量泵延长管中的细胞培养基进行预热。三通旋塞的作用是

使双通道注射泵实现连续注射。注射泵以一定的流速 (0.1~1 200 ml/h) 向侧面开孔培养皿内注入 DMEM 或者 RPMI-1640 培养基, 与此同时抽取泵以相同的流速在侧面开孔培养皿的另一侧抽取培养基, 使侧面开孔培养皿中形成连续稳定的培养基动态液流环境, 以此来模拟细胞所处的液流环境。为了研究培养基动态流动环境对细胞生长的影响, 将培养基动态液流细胞培养装置搭建在光学倒置显微镜 (Eclipse Ti, 日本 Nikon 公司) 上 (图 1c) 并对细胞生长情况进行连续观测。该显微镜拥有加热板可对侧面开孔培养皿进行加热以维持细胞生长所需的 37℃ 环境。

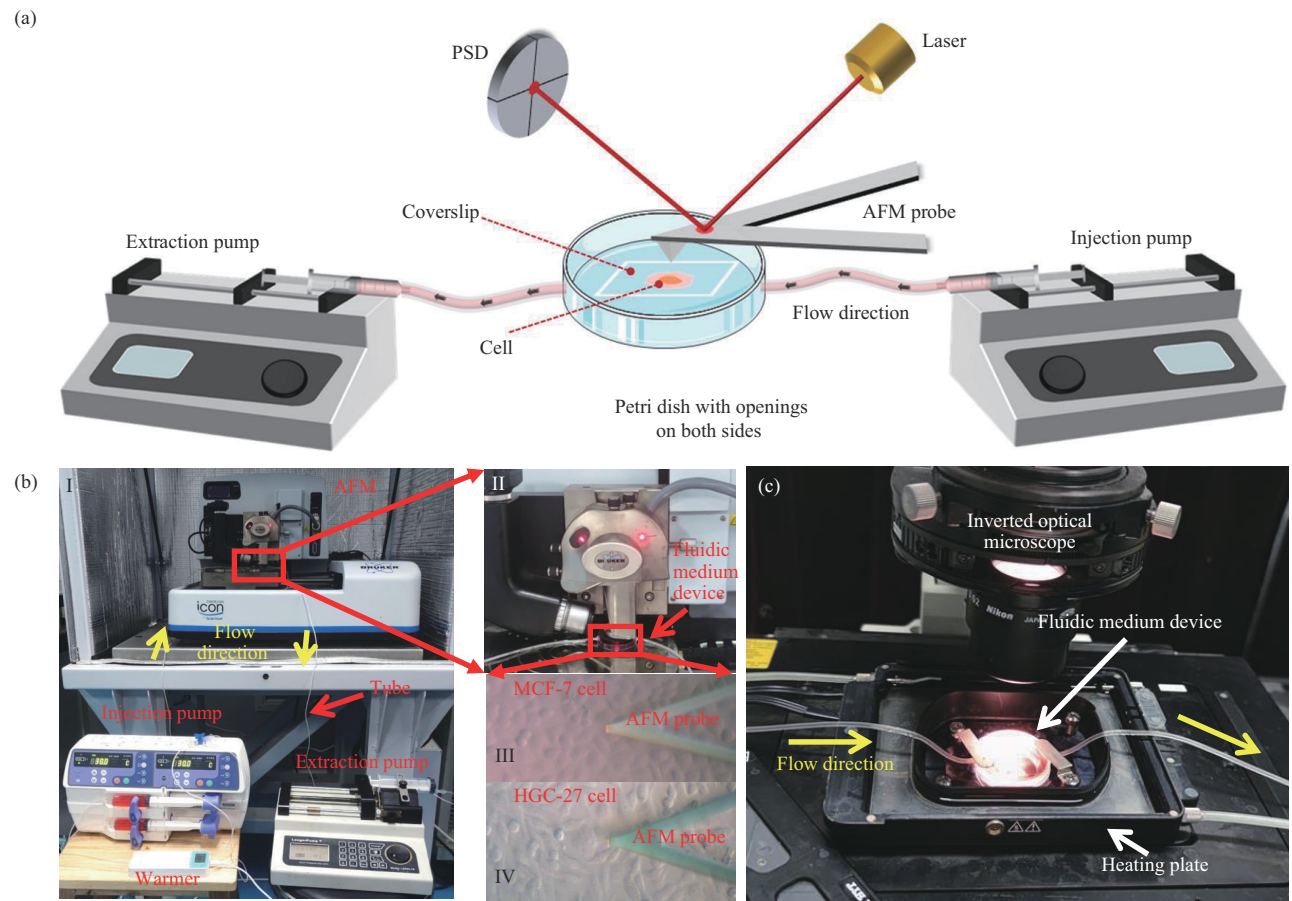


Fig. 1 Experimental platform of measuring cell mechanics in fluidic environments based on AFM

(a) Schematic of measuring the mechanical properties of cells in fluidic environments. (b) Actual photograph of the experimental platform. (I) Whole system. (II) Local optical image showing the combination of AFM and fluidic medium device. (III, IV) AFM probe is controlled to measure single living MCF-7 cells (III) or HGC-27 cells (IV) under the guidance of optical microscope. (c) The fluidic medium device set up on an inverted optical microscope.

1.4 溶液流动环境下AFM细胞力学特性测量

利用 AFM 对培养基动态液流环境下培养下的细胞的力学特性进行测量。所采用的 AFM 探针

(图 1bIII, IV) 型号为 MLCT-C (美国 Bruker 公司), 探针悬臂梁的标准弹簧系数为 0.01 N/m, 探针材料为氮化硅, 针尖曲率半径为 20 nm。在光学

显微镜引导下控制 AFM 探针移动到细胞进行压痕实验并在细胞表面获取力曲线。为保证测量数据之间的可比性,力曲线采集时的所有参数保持一致:力曲线范围为 2 μm ,探针逼近速度为 4 $\mu\text{m/s}$,力曲线采样点数为 256。在细胞表面获取力曲线之前,通过控制 AFM 探针在盖玻片空白区域获取力曲线来校准探针悬臂梁的偏转灵敏度并通过 AFM 的热噪声模块校准精确悬臂梁的弹簧系数。

测量动态液流条件下的细胞力学特性时,首先将接种有细胞的盖玻片置于动态培养装置中,在光学显微镜引导下控制 AFM 探针在盖玻片中心附近的 10 个细胞进行测量并获取力曲线 (0 h),在每个细胞表面获取 20 条力曲线。测量完成之后,启动注射泵和抽取泵以使培养液以一定的流速 (30、60、120 ml/h) 持续流经盖玻片一定时间 (1、2、3、4 h) 后停止溶液流动。随后控制 AFM 探针再次对盖玻片中心附近的 10 个细胞进行测量并获取力曲线 (每个细胞表面获取 20 条力曲线)。

作为对照组,利用 AFM 对静态溶液培养下的细胞力学特性进行测量。将接种有细胞的盖玻片置于普通培养皿中并控制 AFM 探针在盖玻片中心附近对 10 个细胞进行测量以获取力曲线 (0 h)。随后将含有细胞的普通培养皿置于光学倒置显微镜的加热板中静态培养一定时间 (1、2、3、4 h)。培养结束后将培养皿置于 AFM 样本台,利用 AFM 再次对盖玻片中心附近的 10 个细胞进行测量获取力曲线。

1.5 数据分析

通过对 AFM 压痕实验过程中获取的力曲线进行分析以提取细胞杨氏模量。原始力曲线包括逼近曲线和回退曲线 (图 2a)。通常对逼近曲线分析得到细胞杨氏模量^[32],而回退曲线则主要用于分析细胞黏附特性。首先需要确定逼近曲线的接触点。在逼近曲线上,接触区域内的方差将比非接触区域内的方差大得多,因此可通过遍历逼近曲线上所有的点的右侧小间隔 N 上的方差与左侧小间隔 N 上方差的比值 (ROV) 来确定接触点,即 ROV 取最大值的点^[33]:

$$ROV_i = \frac{\text{var}(d_{i+1}:d_{i+N})}{\text{var}(d_{i-N}:d_{i-1})} \quad (1)$$

本文通过编写 Matlab (美国 Mathworks 公司) 程序实现接触点自动选择 (N 值设为 10) 并同时与人工识别结合以确定接触点。根据接触点 (图 2b) 将逼近曲线转化为压痕曲线 (图 2c) 后 (压痕深

度等于探针垂直方向位置变化量减去探针悬臂梁形变量),利用 Hertz-Sneddon 模型对压痕曲线进行拟合 (图 2d) 即可得到细胞杨氏模量 (Hertz 模型适用于球形针尖而 Sneddon 模型适用于锥形针尖)^[31]:

$$F_{\text{Hertz}} = \frac{4ER^{1/2}\delta^{1.5}}{3(1-\nu^2)} \quad (2)$$

$$F_{\text{Sneddon}} = \frac{2E\delta^2 \tan\theta}{\pi(1-\nu^2)} \quad (3)$$

式中 F 为探针加载力, E 为样本的杨氏模量, R 为球形针尖半径, θ 为锥形针尖半开角, δ 为压痕深度, ν 为被测样本的泊松比 (一般认为活细胞为不可压缩材料,因此活细胞的泊松比为 0.5)。本文使用的探针针尖形状为锥形,因此采用 Sneddon 模型公式对力曲线进行分析。根据胡克定律计算探针加载力:

$$F = kx \quad (4)$$

式中 k 为探针悬臂梁的弹性系数,通过 AFM 热噪声模块校正得到, x 为探针悬臂梁的形变量,从获取的力曲线得到。对压痕曲线的 Hertz-Sneddon 拟合过程通过编写的 Matlab 程序实现。

使用数据统计分析软件 GraphPad Prism (美国 GraphPad Software 公司) 对初始状态 (0 h) 以及在培养基动态液流环境下生长一定时间 (1、2、3、4 h) 后的细胞杨氏模量数据进行 t 检验分析以评估两组数据之间的显著性差异, P 值 < 0.05 即说明数据之间具有显著性差异。

1.6 荧光显微成像

利用细胞活性荧光检测试剂 (Calcein 对活细胞进行染色, PI 对死细胞进行染色) 分析动态液流环境对细胞生长增殖的影响。对于动态液流环境下生长 8 h 后的细胞 (细胞生长在载玻片表面), 首先利用 PBS 清洗细胞, 随后将含有 Calcein 和 PI 的染色液滴加至细胞并于室温下避光孵育 20 min。孵育完成后将载玻片置于光学倒置显微镜 (Eclipse Ti, 日本 Nikon 公司) 上获取细胞荧光图像。作为对照, 利用 Calcein 和 PI 染色液对静态环境下生长 8 h 的细胞进行荧光染色成像。

利用细胞骨架染色试剂并结合共聚焦荧光显微镜分析动态液流环境对细胞结构的影响, 实验步骤如下: a. 利用 PBS 溶液洗涤盖玻片细胞样本 2 次, 随后向样品中加入多聚甲醛固定液对细胞进行化学固定 20 min; b. 化学固定完毕后再次利用 PBS 溶液洗涤细胞样本 3 次 (5 min/次); c. 取 5 μl 细胞骨架

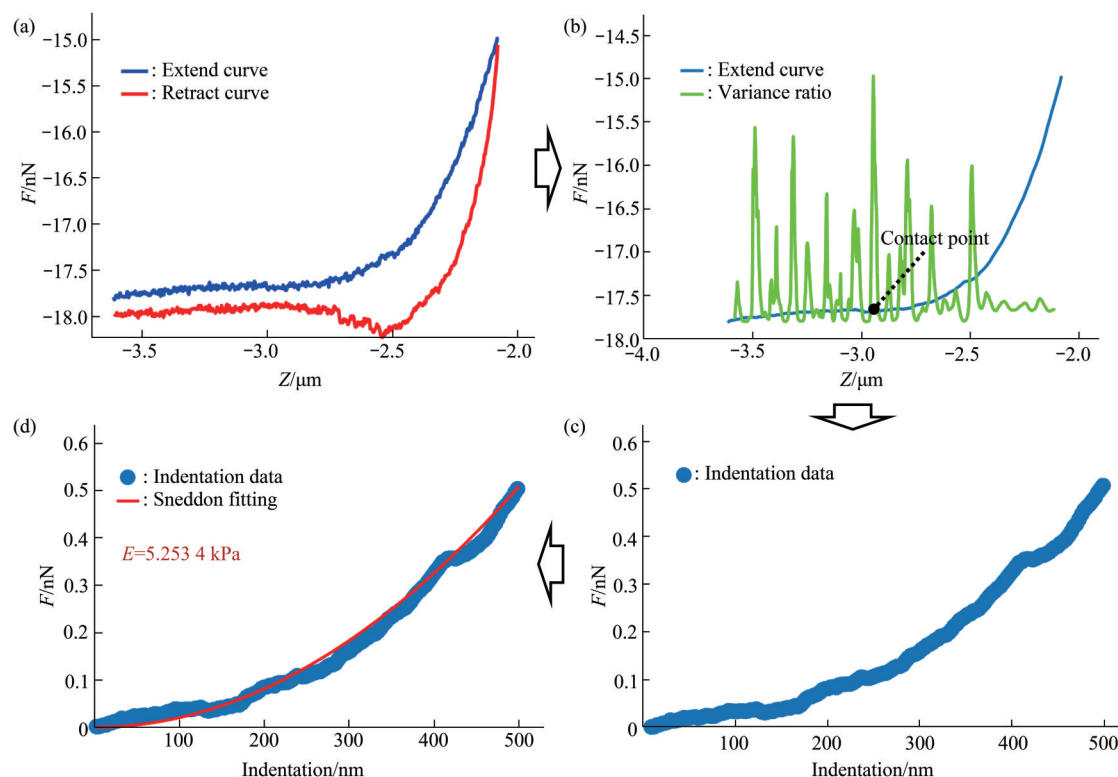


Fig. 2 AFM probe is controlled to perform indentation assay on a MCF-7 cell to record force curves for measuring cellular Young's modulus

(a) A typical force curve recorded on the cell during AFM indentation assay. (b) Automatically identifying the contact point in the approach curve by calculating the ratio of variances (ROV) of the points in the approach curve. (c) Converting the approach curve into the indentation curve according to the contact point. (d) Fitting the indentation curve with Sneddon model gives the cellular Young's modulus.

荧光试剂 (Actin-Tracker Red-555) 并利用 1 ml PBS 对其进行稀释; d. 取稀释后的荧光试剂溶液对化学固定后的细胞进行染色, 并置于室温下避光孵育 60 min; e. 使用抗荧光衰减封片剂将细胞盖玻片与干净载玻片黏结在一起, 随后将细胞样本置于转盘共聚焦显微镜 (日本 Nikon 公司) 样本台并利用 60 倍油镜对细胞骨架结构进行观察成像。

2 结果与讨论

首先构建了培养基动态液流系统并分析了溶液流动环境对细胞生长的影响。为了测试所搭建的培养基动态液流系统 (图 1b), 将 1.5 ml 黑色墨水 (得力集团有限公司) 添加至动态液流装置的培养皿中并将 PBS 加入至注射泵, 设定不同流速启动注射泵和抽取泵后对培养皿内的溶液进行连续成像 (图 3)。可以看到初始状态时 (0 min) 培养皿中的溶液为黑色, 而当启动注射泵和抽取泵后, 注射泵中无色透明的 PBS 被快速注入到培养皿中 (黄色

箭头指示), 与此同时培养皿中的黑色溶液逐步被转运至抽取泵中 (蓝色箭头指示)。当流速为 30 ml/h 时, 注射泵和抽取泵运行 10 min 后, 培养皿中的黑色溶液残留非常微弱 (图 3a)。当流速增加时, 则将培养皿中黑色溶液排尽所需的时间随之显著缩短 (图 3b, c), 显示了所搭建动态液流系统的有效性。随后将生长有 MCF-7 细胞的盖玻片置于干净灭菌的培养基动态液流系统的培养皿中, 在 30 ml/h 流速下生长 8 h。作为对照, 将 MCF-7 细胞盖玻片置于光学倒置显微镜加热板 (图 1c) 在静态培养基条件下培养 8 h。可以看到静态培养 8 h 后, 细胞数量显著减少 (图 4a), 而动态液流环境下生长的细胞数量显著增加 (图 4b)。进一步利用荧光试剂分别对培养基静态环境下和培养基动态环境下 (30 ml/h 流速) 生长 8 h 后的 MCF-7 细胞活性进行检测分析 (图 5)。可以看到培养基动态环境下生长 8 h 后细胞具有活性 (绿色荧光指示活细胞), 与此同时培养基静态环境下生长 8 h 后的死细胞

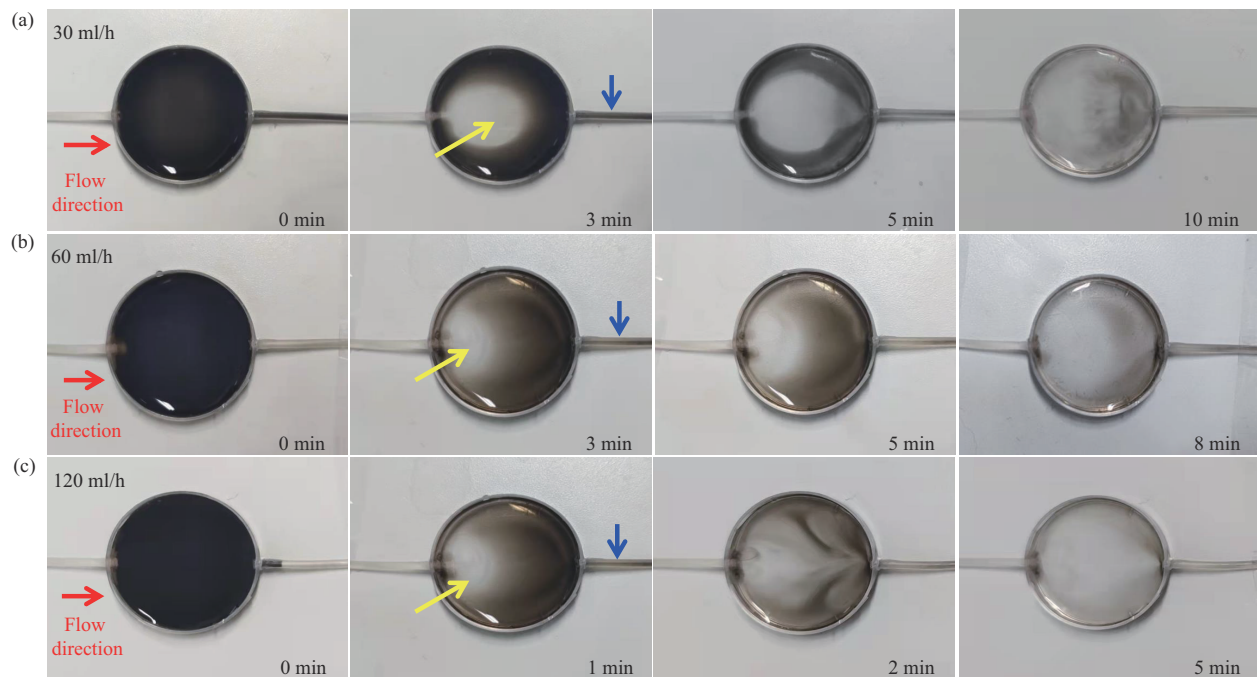


Fig. 3 Dynamic optical imaging of the fluidic medium device with different flow rates

PBS is injected into the dish which is previously filled with black ink. (a) Flow rate 30 ml/h. (b) Flow rate 60 ml/h. (c) Flow rate 120 ml/h.

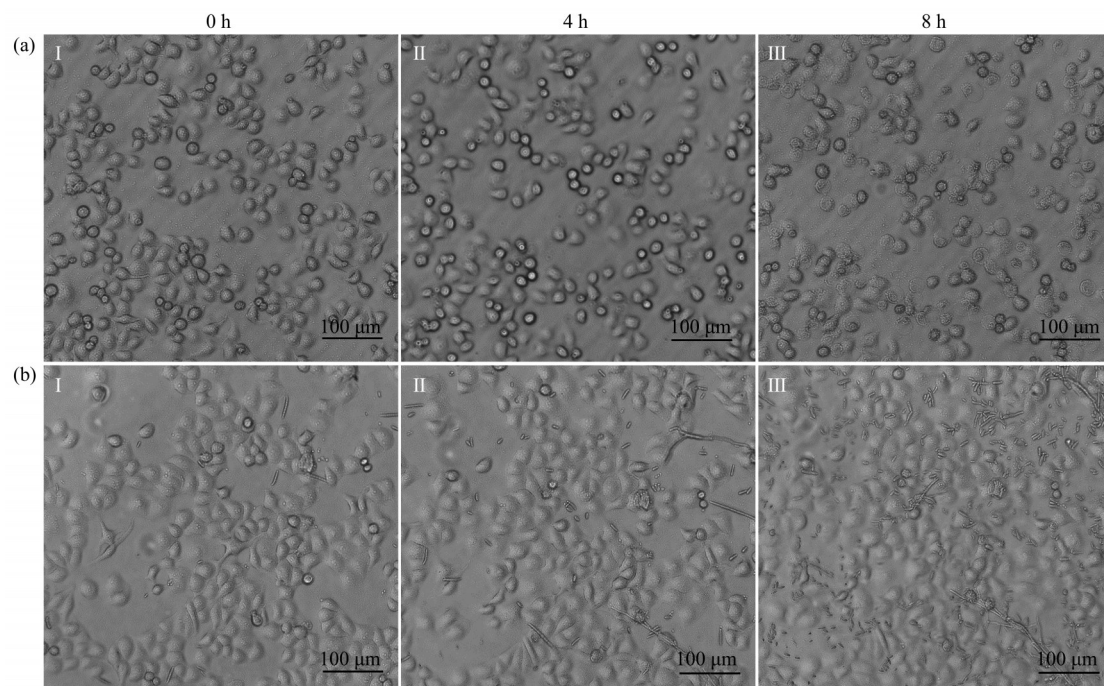


Fig. 4 Comparison of MCF-7 cells grown in static culture medium and in fluidic culture medium respectively

Successive images of cells grown in static or fluidic culture medium are recorded by optical microscopy. (a) MCF-7 cells grown in static culture medium. (b) MCF-7 cells grown in fluidic culture medium (the flow rate is 30 ml/h). (I) Initial states (0 h) of cells; (II) 4 h after cell growth; (III) 8 h after cell growth.

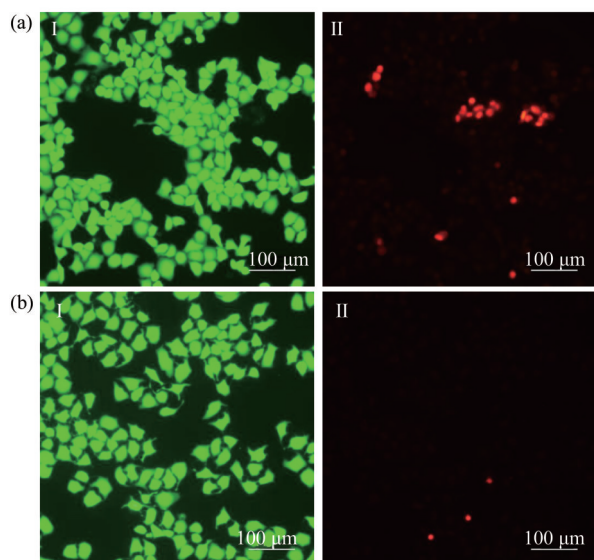


Fig. 5 Detecting the viability of MCF-7 cells grown in static culture medium and in fluidic culture medium respectively

- (a) Staining results of cells grown in static culture medium for 8 h.
 (b) Staining results of cells grown in fluidic culture medium (the flow rate is 30 ml/h) for 8 h. (I) Living cell stained by Calcein fluorescein.
 (II) Dead cell stained by PI fluorescein.

胞数量显著多于培养基动态环境下生长的死细胞数量（红色荧光指示死细胞）。图4和图5的实验结果表明了培养基动态环境更有助于细胞生长增殖。分析其原因，动态液流环境能够将细胞生长过程中产生的代谢物及时排出并可提供持续的细胞生长所需的营养条件，因此更能促进细胞生长。

随后将培养基动态液流系统和AFM结合建立了溶液流动环境下的细胞力学特性测量流程。通过将培养基动态液流系统搭建在AFM样品台上（图1b），控制AFM探针对两侧开孔培养皿中的细胞进行压痕实验（图1bIII, IV）并获取力曲线，应用理论模型对获取的力曲线进行分析即可得到细胞杨氏模量（图2）。需要指出的是，除了Hertz-Sneddon模型，还有多种模型可以从力曲线中提取细胞杨氏模量，如Johnson-Kendall-Roberts (JKR)模型和Derjaguin-Muller-Toporov (DMT)模型，但在实际中Hertz-Sneddon模型是应用得最广泛的

模型^[34-35]。需要指出的是，Hertz-Sneddon模型基于一系列对被探测样本的假设，包括各向同性、均质、无限厚等^[36]。尽管活细胞并不符合Hertz-Sneddon模型的假设条件，但研究表明当压痕深度小于细胞厚度10%时，Hertz-Sneddon模型仍然适用^[37-38]。利用Sneddon模型对压痕曲线进行拟合的结果（图2d）显示，实验压痕曲线和Sneddon理论压痕曲线吻合，表明了Sneddon模型的有效性。目前AFM压痕分析方法已经被广泛应用于探测细胞力学特性，但现有利用AFM对细胞力学特性进行的研究还集中在静态溶液环境^[39-41]，利用AFM对溶液流动环境下的细胞力学特性进行探测的研究还不多见。本文通过将培养基动态液流系统与AFM结合实现了对溶液流动环境下细胞力学特性的探测，为液流环境下的单细胞力学行为研究提供了新的可能。

基于所建立的方法揭示了溶液流动环境对癌细胞力学特性的影响。首先对培养基静态环境下生长4 h的MCF-7细胞的杨氏模量进行连续测量（图6）。图6（a~e）分别为0、1、2、3、4 h在MCF-7细胞表面获取的典型力曲线及Sneddon拟合结果，图6f为细胞杨氏模量变化统计结果。可以看到MCF-7细胞在静态环境下生长时细胞杨氏模量首先呈现上升的趋势（0~2 h），当细胞生长3 h时细胞杨氏模量下降，而当细胞生长4 h时细胞杨氏模量再次上升。与初始状态（0 h）相比，在静态环境下生长4 h的MCF-7细胞杨氏模量显著增加。随后对培养基溶液流动环境下生长的MCF-7细胞杨氏模量变化进行探测，分别对不同流速（30、60、120 ml/h）下生长的MCF-7细胞进行测量（图7）。为了消除细胞传代批次差异对测量结果的影响，进行了12组独立实验。对于每组实验，在将生长有MCF-7细胞的盖玻片置于培养基动态流动装置中时，首先对MCF-7细胞的杨氏模量进行测量（0 h），随后启动注射泵和抽取泵，并在一定的流速（30、60、120 ml/h）下培养一定时间后（1、2、3、4 h）再次对MCF-7细胞的杨氏模量进行测量。从图7可以看到在培养基溶液流动环境下培养的MCF-7细胞的杨氏模量均呈现下降的趋势，

特别是当流速增加时,细胞杨氏模量下降的趋势更为明显。考虑到细胞骨架在细胞机械方面起着重要的调控作用^[42],通过对细胞肌动蛋白进行染色分析溶液流动环境对细胞结构的影响(图8)。可以看到初始状态时(图8a)细胞微丝骨架分布不规则,而当在溶液流动环境下生长4 h后细胞的微丝骨架呈现线性分布(图8b),表明了溶液流动环境对细胞骨架排列的影响。进一步利用所建立的方法分别对静态环境和流动环境下生长的HGC-27细胞

杨氏模量变化情况进行测量(图9)。可以看到,静态条件下生长的HGC-27细胞杨氏模量首先呈现下降的趋势(0~3 h),而当细胞生长4 h时细胞杨氏模量显著增加(图9a)。与初始状态(0 h)相比,在静态环境下生长4 h的HGC-27细胞杨氏模量无明显差异。当HGC-27细胞在溶液流动环境下生长时,细胞杨氏模量均呈现明显下降的趋势(图9b~e)。综合图6、7、9的实验结果,可以看到当癌细胞在静态环境下生长时,不同类型的癌细胞的

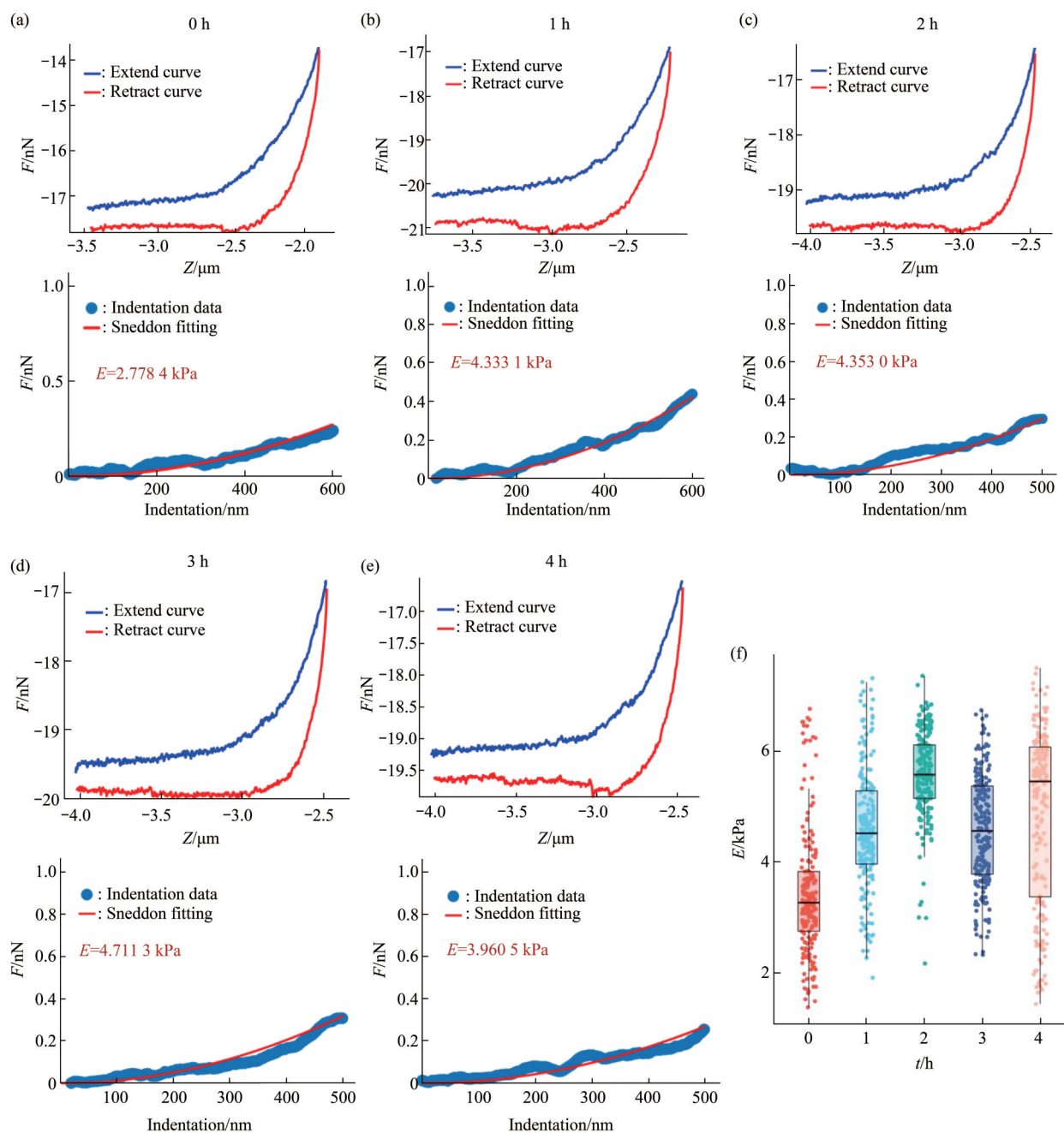


Fig. 6 Successive measurements of the Young's modulus of MCF-7 cells grown in static culture medium by AFM

(a-e) Typical force curves and corresponding Sneddon fitting curves obtained at different time points (0 h (a), 1 h (b), 2 h (c), 3 h (d), 4 h (e)) within 4 h of cell growth. (f) Statistical results.

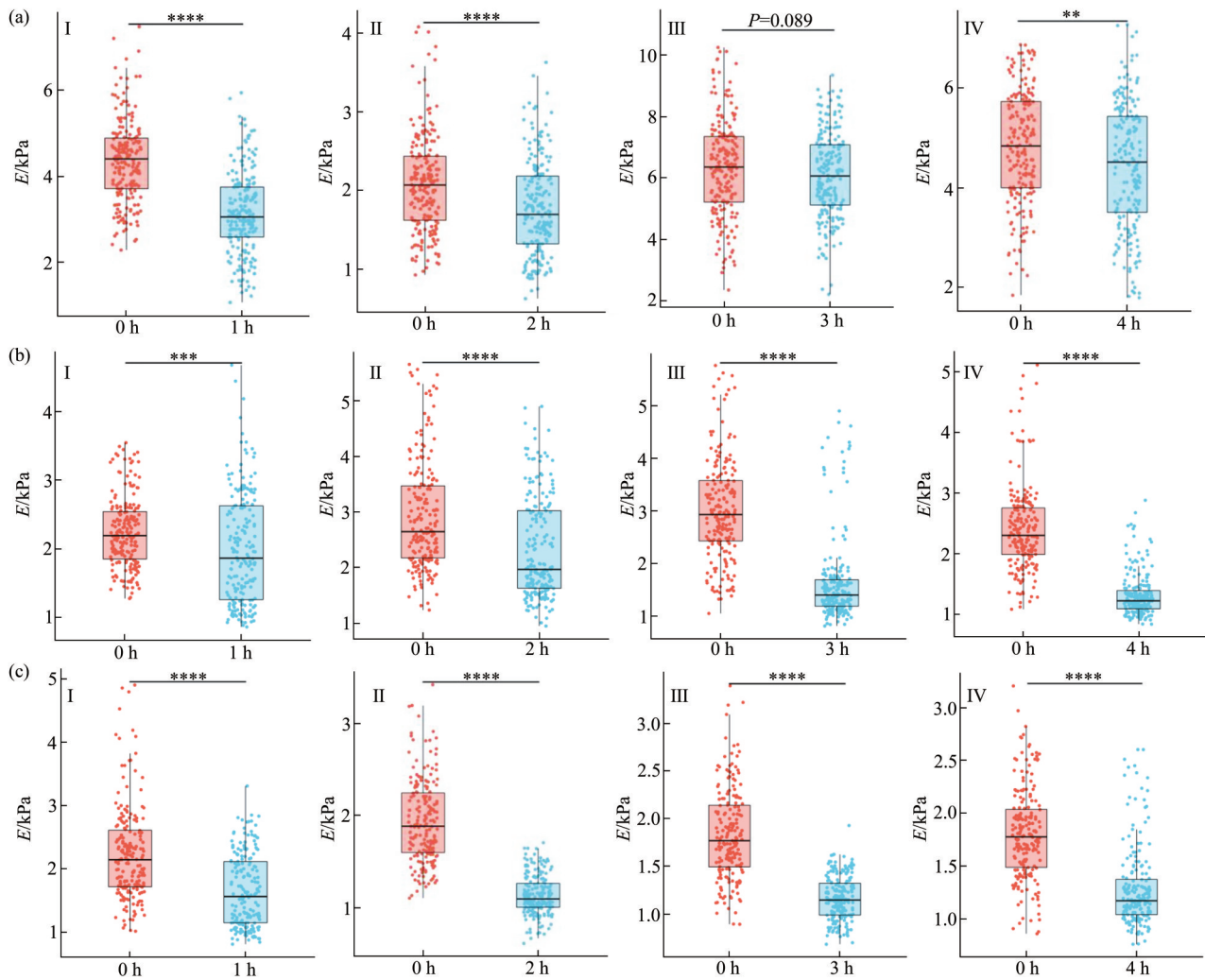


Fig. 7 Measuring the Young's modulus of MCF-7 cells grown in fluidic culture medium by AFM
MCF-7 cells were grown at different medium flow rates (30 ml/h (a), 60 ml/h (b), 120 ml/h (c)) for a period of time (1 h (I), 2 h (II), 3 h (III), 4 h (IV)), and then the cellular Young's modulus values before and after growth were measured ($n=10$, $**P<0.01$; $***P<0.001$; $****P<0.0001$).

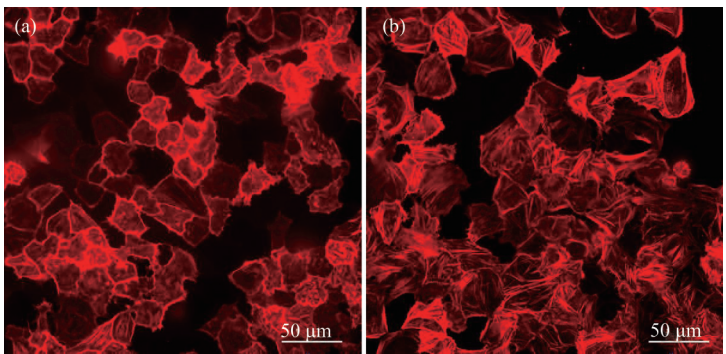


Fig. 8 Confocal fluorescence microscopy images showing the actin organization changes of MCF-7 cells during growth for 4 h in fluidic culture medium (the flow rate is 30 ml/h)
(a) Initial states (0 h) of cells. (b) Cells after growth in fluidic culture medium for 4 h.

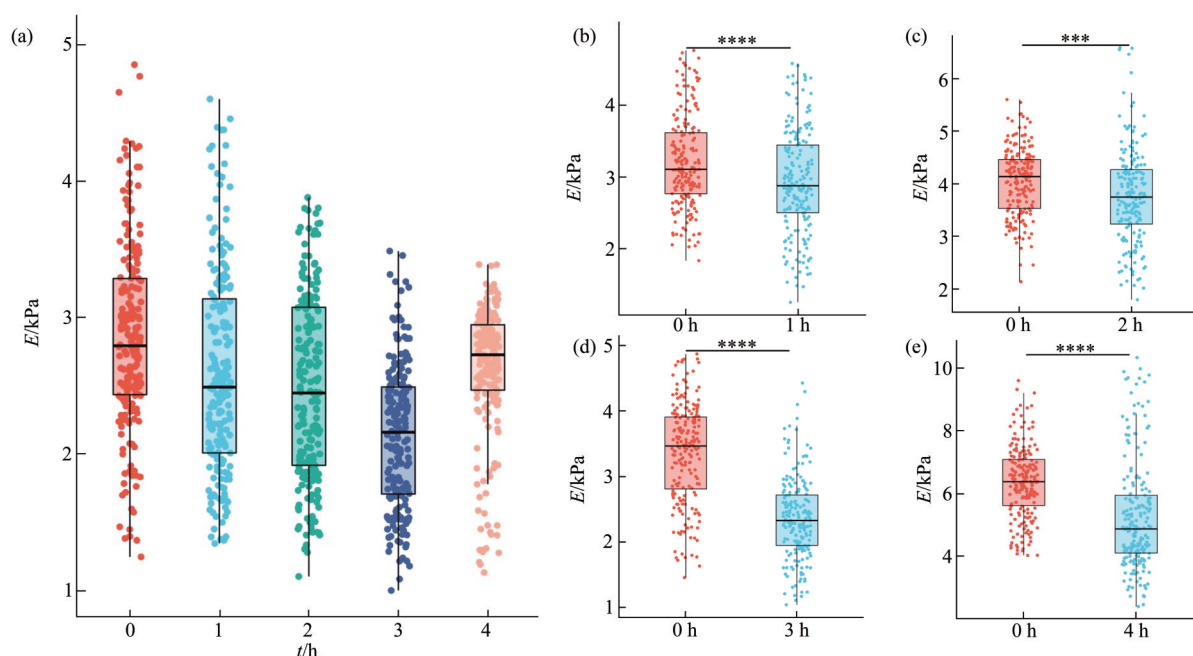


Fig. 9 Measuring the Young's modulus of HGC-27 cells grown in static or fluidic culture medium by AFM

(a) Young's modulus changes of cells grown in static culture medium for 4 h. (b-e) Young's modulus changes of cells grown in fluidic culture medium (the flow rate is 30 ml/h) for different time periods (1 h (b), 2 h (c), 3 h (d), 4 h (e)). ($n=10$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$).

杨氏模量变化具有差异性，而当癌细胞在动态环境下生长时，细胞杨氏模量均呈现显著下降的趋势，且溶液流速增加会导致细胞杨氏模量变化更明显。

在肿瘤转移过程中，从原发灶部位脱离的癌细胞需要穿过细胞外基质进入血管或者淋巴管，随着血液或者淋巴液到达转移部位，并需要在血液或淋巴液的液流环境下生存下来以便最终穿出血管或者淋巴管进入转移部位进行增殖^[43]。脉管系统体液流动微环境在癌细胞的转移过程中起着重要的调控作用^[11]，然而由于缺乏合适的观测工具，目前对于溶液流动环境下的细胞力学特性行为的认知还十分有限。事实上研究人员利用AFM对不同侵袭能力癌细胞的力学特性进行测量的结果表明侵袭性癌细胞的杨氏模量要明显小于惰性癌细胞的杨氏模量^[14, 44-45]。本文的测量结果（图6、7、9）显示，当癌细胞置于培养基流动环境下生长时，癌细胞的杨氏模量会明显下降，显示了液流环境对癌细胞力学特性的显著影响。2017年Oliveira等^[46]利用开放式微流控芯片技术研究了培养基溶液流动环境（流速范围为30~180 ml/h）下的成肌细胞（C2C12）生长分化情况，显示了溶液流动环境对细胞分化的影响。本文通过构建细胞培养基动态液流系统并与AFM结合探测了不同培养基流速下

（30、60、120 ml/h）的癌细胞杨氏模量变化情况，实验结果（图6、7、9）显示了溶液流动环境对细胞杨氏模量的显著影响。与此同时，对溶液流动环境下生长的细胞骨架蛋白进行共聚焦成像，结果显示在溶液流动环境下生长的细胞微丝骨架呈现明显的线性分布（图8），显示了溶液流动环境对细胞骨架的影响。以往的研究^[47-48]表明，微丝骨架对于细胞力学特性具有重要影响，微丝骨架的重排会导致细胞力学特性的相应变化。本文的研究显示当癌细胞在培养基流动环境下生长时，其细胞骨架和力学特性均会发生显著变化，显示了溶液流动环境与细胞结构及力学特性之间的关联，为液流环境下癌细胞的力学行为提供了新的认识。

基于AFM的溶液流动环境下细胞力学特性探测将对于生命科学领域具有广泛的积极意义。体液流动微环境在肿瘤的发生发展及演变和临床治疗过程中（如肿瘤血管生成^[49]、肿瘤药物递送^[50]、肿瘤内部血流时间变化^[51]、血脑屏障以及血肿瘤屏障^[52]等）起着重要的作用，研究溶液流动环境与癌细胞之间的相互作用对于揭示肿瘤活动内在机制具有重要意义。AFM目前被广泛应用于单细胞力学特性研究，但利用AFM对溶液流动环境下的细胞力学特性进行探测的研究还未见报道。本文利用

注射泵/抽取泵液流控制技术构建了培养基动态液流系统并将其与AFM集成, 实现了溶液流动环境下细胞力学特性的定量测量, 对静态和动态环境下生长的癌细胞进行探测的实验结果显示了培养基溶液流动环境会显著影响细胞力学特性和骨架结构, 证明了AFM探测溶液流动环境下细胞力学特性的能力, 为溶液流动环境下细胞力学行为研究提供了新的方法。体液循环系统在人体生命活动过程中起着重要作用, 如血液将氧气、营养物质、激素等运送到全身各处组织器官以维持生命活动运转^[53]。特别是细胞在生命活动过程中会分泌各种物质(如外泌体)至体液中循环以调节生理病理活动过程^[54]。因此本文所发展的溶液流动环境下细胞力学特性探测方法不仅有助于研究癌细胞流变力学行为, 还可广泛应用于生命科学领域相关科学问题的研究。

3 结 论

本文提出了基于AFM的溶液流动环境下细胞力学特性测量方法, 揭示了溶液流动环境对癌细胞力学特性的显著影响, 为单细胞流变力学行为研究提供了新的方法, 对于探索发现生命活动内在奥秘机制具有广泛积极意义。

参 考 文 献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2021, **71**(3): 209-249
- [2] Cao W, Chen H D, Yu Y W, *et al.* Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020. *Chin Med J*, 2021, **134**(7): 783-791
- [3] Chaffer C L, Weinberg R A. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*, 2011, **331**(6024): 1559-1564
- [4] Valastyan S, Weinberg R A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 2011, **147**(2): 275-292
- [5] Mittal V. Epithelial mesenchymal transition in tumor metastasis. *Annu Rev Pathol Mech Dis*, 2018, **13**: 395-412
- [6] Sahai E, Astsaturov I, Cukierman E, *et al.* A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer*, 2020, **20**(3): 174-186
- [7] Cox T R. The matrix in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2021, **21**(4): 217-238
- [8] Ganesh K, Massague J. Targeting metastatic cancer. *Nat Med*, 2021, **27**(1): 34-44
- [9] Koumoutsakos P, Pivkin I, Milde F. The fluid mechanics of cancer and its therapy. *Annu Rev Fluid Mech*, 2013, **45**: 325-355
- [10] Wirtz D, Konstantopoulos K, Searson P C. The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nat Rev Cancer*, 2011, **11**(7): 512-522
- [11] Follain G, Herrmann D, Harlepp S, *et al.* Fluids and their mechanics in tumor transit: shaping metastasis. *Nat Rev Cancer*, 2020, **20**(2): 107-124
- [12] Suresh S. Biomechanics and biophysics of cancer cells. *Acta Biomater*, 2007, **3**(4): 413-438
- [13] Cross S E, Jin Y S, Rao J, *et al.* Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nat Nanotechnol*, 2007, **2**(12): 780-783
- [14] Plodinec M, Loparic M, Monnier C A, *et al.* The nanomechanical signature of breast cancer. *Nat Nanotechnol*, 2012, **7**(11): 757-765
- [15] Alibert C, Goud B, Manneville J B. Are cancer cells really softer than normal cells?. *Biol Cell*, 2017, **109**(5): 167-189
- [16] Li M, Xi N, Wang Y, *et al.* Advances in atomic force microscopy for single-cell analysis. *Nano Res*, 2019, **12**(4): 703-718
- [17] Krieg M, Flaschner G, Alsteens D, *et al.* Atomic force microscopy-based mechanobiology. *Nat Rev Phys*, 2019, **1**(1): 41-57
- [18] Calzado-Martin A, Encinar M, Tamayo J, *et al.* Effect of actin organization on the stiffness of living breast cancer cells revealed by peak-force modulation atomic force microscopy. *ACS Nano*, 2016, **10**(3): 3365-3374
- [19] 李密, 席宁, 王越超, 等. 基于多参数成像AFM的细胞及分子力学特性探测研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2018, **45**(11): 1106-1114
Li M, Xi N, Wang Y C, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2018, **45**(11): 1106-1114
- [20] Dumitru A C, Mohammed D, Maja M, *et al.* Label-free imaging of cholesterol assemblies reveals hidden nanomechanics of breast cancer cells. *Adv Sci*, 2020, **7**(22): 2002643
- [21] Li M, Xi N, Liu L. Peak force tapping atomic force microscopy for advancing cell and molecular biology. *Nanoscale*, 2021, **13**(18): 8358-8375
- [22] Neuman K C, Nagy A. Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nat Methods*, 2008, **5**(6): 491-505
- [23] Garcia R. Nanomechanical mapping of soft materials with the atomic force microscope: methods, theory and applications. *Chem Soc Rev*, 2020, **49**(16): 5850-5884
- [24] Viljoen A, Mathelie-Guinlet M, Ray A, *et al.* Force spectroscopy of single cells using atomic force microscopy. *Nat Rev Methods Primers*, 2021, **1**: 63
- [25] Li M, Xi N, Wang Y, *et al.* Atomic force microscopy for revealing micro/nanoscale mechanics in tumor metastasis: from single cells to microenvironmental cues. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, **42**(3): 323-339
- [26] Dufrene Y F, Ando T, Garcia R, *et al.* Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology. *Nat Nanotechnol*, 2017, **12**(4): 295-307
- [27] Radmacher M. Measuring the elastic properties of living cells by the atomic force microscope. *Methods Cell Biol*, 2002, **68**: 67-90
- [28] Li Q S, Lee G Y H, Ong C N, *et al.* AFM indentation study of breast

- cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, **374**(4): 609-613
- [29] Kirmizis D, Logothetidis S. Atomic force microscopy probing in the measurement of cell mechanics. *Int J Nanomed*, 2010, **5**: 137-145
- [30] Schierbaum N, Rheinlaender J, Schaffer T E. Viscoelastic properties of normal and cancerous human breast cells are affected differently by contrast to adjacent cells. *Acta Biomater*, 2017, **55**: 239-248
- [31] Li M, Xi N, Wang Y, *et al.* Atomic force microscopy in probing tumor physics for nanomedicine. *IEEE Trans Nanotechnol*, 2019, **18**: 83-113
- [32] Li M, Xu X N, Xi N, *et al.* Nanostructures and mechanics of living exosomes probed by atomic force microscopy. *Prog Biochem Biophys*, 2021, **48**(1): 100-110
- [33] Gavara N. Combined strategies for optimal detection of the contact point in AFM force-indentation curves obtained on thin samples and adherent cells. *Sci Rep*, 2016, **6**: 21267
- [34] Radmacher M. Measuring the elastic properties of living cells by the atomic force microscope. *Methods Cell Biol*, 2002, **68**: 67-90
- [35] Kasas S, Longo G, Dietler G. Mechanical properties of biological specimens explored by atomic force microscopy. *J Phys D Appl Phys*, 2013, **46**(13): 133001
- [36] Li M, Liu L, Xi N, *et al.* Nanoscale monitoring of drug actions on cell membrane using atomic force microscopy. *Acta Pharmacol Sin*, 2015, **36**(7): 769-782
- [37] Gavara N, Chadwick R S. Determination of the elastic moduli of thin samples and adherent cells using conical atomic force microscope tips. *Nat Nanotechnol*, 2012, **7**(11): 733-736
- [38] Rotsch C, Jacobson K, Radmacher M. Dimensional and mechanical dynamics of active and stable edges in motile fibroblasts investigated by using atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(3): 921-926
- [39] García P D, Guerrero C R, García R. Nanorheology of living cells measured by AFM-based force-distance curves. *Nanoscale*, 2020, **12**(16): 9133-9143
- [40] Yen M H, Chen Y H, Liu Y S, *et al.* Alteration of Young's modulus in mesenchymal stromal cells during osteogenesis measured by atomic force microscopy. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, **526**(3): 827-832
- [41] Wang K, Qin Y, Chen Y. In situ AFM detection of the stiffness of the in situ exposed cell nucleus. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2021, **1868**(5): 118985
- [42] Fletcher D A, Mullins R D. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 2010, **463**(7280): 485-492
- [43] Kiberstis P A. Metastasis: an evolving story. *Science*, 2016, **352**(6282): 162-163
- [44] Li M, Liu L, Xi N, *et al.* Atomic force microscopy imaging and mechanical properties measurement of red blood cells and aggressive cancer cells. *Sci China Life Sci*, 2012, **55**(11): 968-973
- [45] Xu W, Mezencev R, Kim B, *et al.* Cell stiffness is a biomarker of the metastatic potential of ovarian cancer cells. *PLoS One*, 2012, **7**(10): e46609
- [46] Oliveira N M, Reis R L, Mano J F. Open fluidics: a cell culture flow system developed over wettability contrast-based chips. *Adv Healthc Mater*, 2017, **6**(24): 1700638
- [47] Rotsch C, Radmacher M. Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an atomic force microscopy study. *Biophys J*, 2000, **78**(1): 520-535
- [48] Luo Q, Kuang D, Zhang B, *et al.* Cell stiffness determined by atomic force microscopy and its correlation with cell motility. *Biochim Biophys Acta*, 2016, **1860**(9): 1953-1960
- [49] De Palma M, Biziato D, Petrova T V. Microenvironmental regulation of tumor angiogenesis. *Nat Rev Cancer*, 2017, **17**(8): 457-474
- [50] Dewhirst M W, Secomb T W. Transport of drugs from blood vessels to tumor tissue. *Nat Rev Cancer*, 2017, **17**(12): 738-750
- [51] Gillies R J, Brown J S, Anderson A R A, *et al.* Eco-evolutionary causes and consequences of temporal changes in intratumoural blood flow. *Nat Rev Cancer*, 2018, **18**(9): 576-585
- [52] Arvanitis C D, Ferraro G B, Jain R K. The blood-brain barrier and blood-tumor barrier in brain tumors and metastases. *Nat Rev Cancer*, 2020, **20**(1): 26-41
- [53] Alitalo K, Tammela T, Petrova T V. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature*, 2005, **438**(7070): 946-953
- [54] Shah R, Patel T, Freedman J E. Circulating extracellular vesicles in human disease. *N Engl J Med*, 2018, **379**(10): 958-966

Measuring The Mechanical Properties of Cancerous Cells in Fluidic Environments by Atomic Force Microscopy*

WEI Jia-Jia^{1,2,3)}, LI Mi^{1,2,3)**}, FENG Ya-Qi^{1,2,3)}, LIU Lian-Qing^{1,2,3)}

⁽¹⁾State Key Laboratory of Robotics, Shenyang Institute of Automation, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China;

⁽²⁾Institutes for Robotics and Intelligent Manufacturing, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110169, China;

⁽³⁾University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Objective Cell mechanics plays an important role in regulating cellular physiological and pathological processes and investigating cell mechanics is meaningful for revealing the underlying mechanisms guiding life activities. The advent of atomic force microscopy (AFM) provides a novel powerful tool for single-cell studies and AFM-based indentation assay has become an important method for characterizing cell mechanics in the field of life sciences, yielding numerous new insights into single-cell behaviors. However, current studies of cell mechanics by AFM are commonly performed in static environment, while cancerous cells are in flow environment of vascular fluids during tumor metastasis, and thus the results obtained in static environment cannot completely reflect the real behaviors of cancerous cells in fluidic condition. Particularly, so far knowledge of the mechanical mechanisms guiding the interactions between fluidic microenvironment and cancerous cells in the process of tumor metastasis is still limited. Here, based on AFM, a method allowing measuring the mechanical properties of single cells in fluidic environments is developed. **Methods** A fluidic cell culture medium device was established on a petri dish with openings on both sides with the use of an injection pump and an extraction pump. The fluidic cell culture medium device was integrated with AFM to measure the mechanical properties of cells in fluidic environments. The fluidic cell culture medium device was also integrated with inverted optical microscope which had a heating plate to observe the growth states of cells in fluidic environments. MCF-7 cells (human breast cancer cell) and HGC-27 cells (human gastric undifferentiated carcinoma cell) were used for the experiments. The fluidic cell culture medium device was used to grow cells to examine the effects of medium flow rate and flow time on cell proliferation and cell mechanics. Under the guidance of optical microscopy, AFM probe was moved to cells grown in static culture medium or fluidic culture medium to perform indentation assay to record force curves, and then Hertz-Sneddon model was applied to analyze the force curves to obtain the Young's modulus of cells. Calcein fluorescein was used to stain live cells and PI fluorescein was used to stain dead cells. The cytoskeleton changes of MCF-7 cells after growth in fluidic culture medium were observed by confocal fluorescence microscopy. **Results** The effects of fluidic culture medium on the growth of cells were firstly analyzed. Experimental results on cell growth show that cell culture medium fluidic environment could better promote cell growth and proliferation compared with cell culture medium static environment. Then the mechanical properties of cells grown in static culture medium and fluidic culture medium were measured respectively. Experimental results show that, when the growth condition of cancerous cells changed from static to fluidic, the Young's modulus of cancerous cells decreased significantly and cytoskeletons reorganized, indicating the influence of fluidic environment on the mechanics of cancerous cells. **Conclusion** Combining AFM with fluidic control techniques allows detecting the mechanical properties of single cells grown in fluidic environments, providing a novel way to investigate the mechanical cues involved in the interactions between fluidic microenvironments and cancerous cells during tumor metastasis.

Key words atomic force microscopy, fluidic environment, tumor metastasis, cell, mechanical properties, Young's modulus

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0397

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (62273330, 61922081, 61873258), the Key Research Program of Frontier Sciences CAS (ZDBS-LY-JSC043), and the Liaoning Revitalization Talents Program (XLYC1907072).

** Corresponding author.

Tel: 86-24-23970203, E-mail: limi@sia.cn

Received: December 23, 2021 Accepted: February 17, 2022