

文章编号: 1004-7220(2021)03-0448-05

液态介质环境对乳腺癌细胞弹性模量的影响

孙伟皓, 马建立, 于洁, 吴承伟, 张伟

(大连理工大学 工程力学系, 工业装备结构分析国家重点实验室, 辽宁 大连 116024)

摘要:目的 研究体外细胞实验中常用3种液态培养介质环境对乳腺癌细胞弹性模量的影响,为研发基于力学原理的肿瘤诊疗新方法提供参考。**方法** 通过原子力显微镜技术,测试乳腺癌细胞 MCF7 在 PBS 缓冲液、DMEM 培养液和 DMEM+10% FBS 培养液中的弹性模量和细胞对探针的黏附力。**结果** 乳腺癌细胞在3种介质中的弹性模量分别为 2.59、2.11、1.59 kPa,存在显著差异。3种介质中细胞黏附力分别为 63.81、66.09、121.97 pN,在 DMEM+10% FBS 培养液中的细胞黏附力与另外两种介质存在显著差异。**结论** 乳腺癌细胞在3种介质中的弹性模量差异明显,DMEM 和 DMEM+10% FBS 培养液中的差异可能是由介质中血清蛋白引起的黏附力不同所致,DMEM 和 PBS 缓冲液中的差异可能是由介质的 pH 差异所致。

关键词: 乳腺癌细胞; 弹性模量; 黏附力; 液态介质环境

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2021.03.024

Effects of Liquid Medium Environment on Elastic Modulus of Breast Cancer Cells

SUN Weihao, MA Jianli, YU Jie, WU Chengwei, ZHANG Wei

(State Key Laboratory of Structural Analysis for Industrial Equipment, Department of Engineering Mechanics, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, China)

Abstract: Objective To study the effect of three kinds of commonly used liquid culture media for *in vitro* cell experiments on elastic modulus of breast cancer cells, so as to provide references for developing novel diagnosis and treatment approach of tumour based on mechanics principles. **Methods** The elastic modulus and adhesion force of breast cancer cells MCF7 to atomic force microscopy (AFM) probes in phosphate buffered solution (PBS), Dulbecco's modified eagle media (DMEM) and DMEM+10% fetal bovine serum (FBS) were measured using AFM technology. **Results** The elastic moduli of breast cancer cells in PBS, DMEM and DMEM+10% FBS were 2.59, 2.11 and 1.59 kPa, respectively. The cell adhesion forces in the above three kinds of liquid medium environment were 63.81, 66.09 and 121.97 pN, respectively. Cell adhesion force in DMEM+10% FBS was significantly different from that of the other two kinds of liquid media. **Conclusions** There are significant differences in elastic modulus of breast cancer cells in three kinds of liquid media. The difference between DMEM and DMEM+10% FBS might be caused by the different adhesion force caused by serum proteins in the media, and the difference between DMEM and PBS might be attributed to the difference in pH of the media.

Key words: breast cancer cells; elastic modulus; adhesion force; liquid medium environment

收稿日期: 2020-06-18; 修回日期: 2020-08-08

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFA0704103, 2018YFA0704104), 辽宁省自然科学基金项目(2019-KF-02-01), 中央高校基本科研业务费项目(DUT18ZD302)

通信作者: 张伟, 教授, 博士生导师, E-mail: wei.zhang@dlut.edu.cn

随着细胞力学的发展,人们对细胞力学性能与细胞病变之间的关联性认识不断深化,并以此研发癌症诊疗的新方法^[1-2]。一方面,通过检测细胞力学性能的变化,可用于诊断癌变的发生及其所处的阶段。研究表明,健康乳腺细胞的弹性模量是乳腺癌细胞弹性模量的2倍以上^[3],良性乳腺肿瘤细胞的弹性模量是恶性乳腺癌细胞弹性模量的1.4~1.8倍^[4-5],癌变乳腺和宫颈细胞的膜弯曲刚度要小于健康乳腺和宫颈细胞^[6]。另一方面,通过调控细胞的力学性能,可调控细胞与纳米材料等的交互作用,为靶向治疗提供基础。研究表明,细胞膜的膜张力和弯曲刚度对细胞内吞纳米颗粒有显著影响,较小的细胞膜张力和弯曲刚度有利于细胞对纳米颗粒的内吞^[7-8]。

乳腺癌的新发病率目前位居女性恶性肿瘤发病率之首,急需研发新的诊疗方法。诊疗新方法的研发一般包括体外细胞实验、动物实验、临床试验等几个阶段。显然,体外细胞实验是研发中关键的一环,其结果将对后续研究产生重要甚至颠覆性的影响。体外细胞实验中需要采用液态介质为细胞提供营养物质和吸收代谢产物。液态介质环境对乳腺癌细胞力学性能的影响不仅影响细胞力学性能参数测量的准确性,还会直接影响后续诊疗技术的研发。然而目前人们在使用液态介质时,通常不加以区分。如果忽略液态介质对细胞弹性模量等力学性能的影响,将直接影响细胞力学性能参数的确定以及后续诊疗方法的研发,这也可能在一定程度上解释了很多体外模拟实验结果难以在活体实验再现的原因。

本文研究常用细胞培养的液态介质——磷酸盐(phosphate buffer saline, PBS)缓冲液、DMEM培养液和DMEM+10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)培养液对人乳腺癌细胞MCF7弹性模量的影响,以期对乳腺细胞力学性能的精准确试和研发靶向治疗方法提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与传代

人乳腺癌细胞MCF7(上海中乔新舟生物科技有限公司)在由89%DMEM、10%FBS和1%青链霉素组成的培养基中生长。实验前48h,收集细胞并

种植在直径12mm细胞爬片上。为了避免爬片上的细胞过分堆叠或者过于稀疏,在种植细胞之前,将收集的细胞悬液密度调节为 3.13×10^5 个/mL。选取细胞培养常用的渗透压接近正常人血浆渗透压^[9]的3种等渗溶液,6.7mmol/L PBS缓冲液(pH=6.7)、DMEM培养液(pH=7.3)和DMEM+10%FBS培养液(pH=7.3)。细胞爬片用与液态介质相同的培养液轻轻冲洗并浸没在不同的液态介质中,安装在原子力显微镜(atomic force microscopy, AFM)下进行力学性能测试。所有的培养液均购自美国Hyclone公司。

1.2 AFM测试

细胞的弹性模量由AFM(Multimode IIIA, Bruker公司,美国)测量。氮化硅悬臂梁(Bruker公司,美国)的弹簧常数在液相下用热波动法校准^[10]。用AFM测量形态正常的孤立细胞,避开远离细胞核的区域。为了获取稳定的力-位移曲线,并减小细胞黏弹性对测量结果的影响,悬臂以 $3 \mu\text{m/s}$ 速度靠近细胞,直到达到500pN触发力,然后悬臂收回^[11]。为了减小玻璃爬片的基底效应影响,选取500nm以内(10%~15%平均细胞厚度)的压入曲线进行数据拟合。获得的力-位移曲线用Sneddon模型拟合^[12-13]:

$$F = \frac{2}{\pi} \delta^2 \frac{E}{1-\nu^2} \tan \alpha$$

式中: F 为加载力; δ 为压入深度; ν 为细胞泊松比; α 为氮化硅悬臂上锥形探针的半角; E 为细胞弹性模量。细胞作为最常见的生物材料,取 $\nu=0.5$ ^[14]。用标准最小二乘算法拟合Sneddon模型和实验力曲线得到细胞的弹性模量。悬臂收回时的回针曲线反向偏离力曲线水平段的大小为细胞对AFM探针的黏附力(见图1)。计算细胞在各种液体介质下的平均弹性模量和黏附力,并在0.05水平下进行 t 检验。

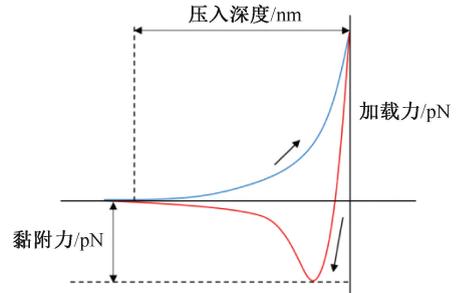


图1 力-距离曲线

Fig.1 Force-distance curve

2 结果

2.1 乳腺癌细胞的弹性模量

采用 AFM 测试并比较不同液态介质中乳腺癌细胞(MCF7)的弹性模量(见图2)。PBS 缓冲液、DMEM 培养液、DMEM+10% FBS 培养液中乳腺癌细胞弹性模量分别为 (2.59 ± 0.66) 、 (2.11 ± 0.69) 、 (1.59 ± 0.79) kPa。每一种液态介质环境下至少测试 45 个细胞的弹性模量,结果表明,3 种液态介质中人乳腺癌细胞弹性模量存在显著性差异 ($P < 0.001$)。

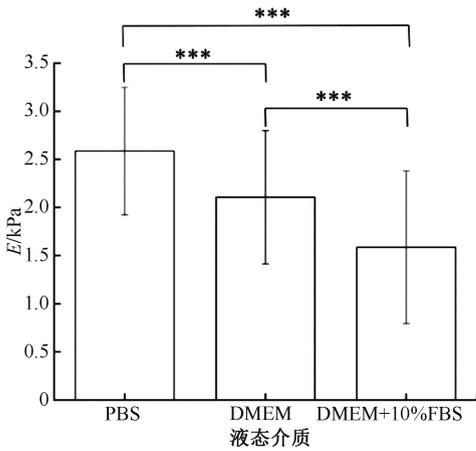


图2 不同液态介质环境中人乳腺癌细胞弹性模量比较 (***) $P < 0.001$)

Fig.2 Comparison of elastic modulus in different liquid media environment

比较 3 种液态介质下弹性模量分布百分比可知,PBS 缓冲液中,约有 90% 的人乳腺癌细胞弹性模量数据在 1.5~3.5 kPa 区间内,并且分布较为均匀,不存在 1 kPa 以下的弹性模量数据;在 DMEM 培养液中,细胞弹性模量则有 5% 在 0.5~1.0 kPa 区间内,峰值出现在 2.0~2.5 kPa;在 DMEM+10% FBS 培养液中,细胞弹性模量则出现了少量 0.5 kPa 以下的数据,约 30% 的弹性模量数据集中在 0.5~1.0 kPa 之间(见图3)。

2.2 乳腺癌细胞与探针间黏附力

为了更全面地描述液态介质对细胞力学性能带来的影响,并探索液态介质对乳腺癌细胞弹性模量影响的机制,测试并比较 3 种液态介质中人乳腺癌细胞的黏附力(见图4)。PBS 缓冲液、DMEM 培养液、DMEM+10% FBS 培养液中乳腺癌细胞的黏附

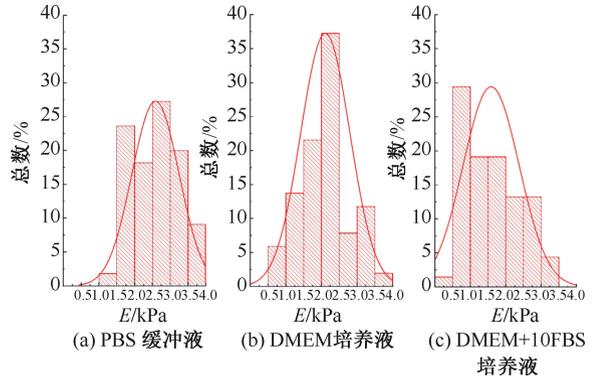


图3 不同液态介质环境中细胞弹性模量分布百分比

Fig.3 Comparison of elastic modulus distribution percentage of cells in different liquid medium environment (a) PBS, (b) DMEM, (c) DMEM+10% FBS

力分别为 (63.81 ± 24.50) 、 (66.09 ± 26.41) 、 (121.97 ± 43.99) pN。每一种液态介质环境下至少测试 45 个细胞的黏附力,经过差异性分析,DMEM+10% FBS 培养液与另外两种液态介质环境中乳腺癌细胞的黏附力存在显著差异 ($P < 0.001$),PBS 缓冲液和 DMEM 培养液中乳腺癌细胞的黏附力无显著性差异 ($P > 0.05$)。

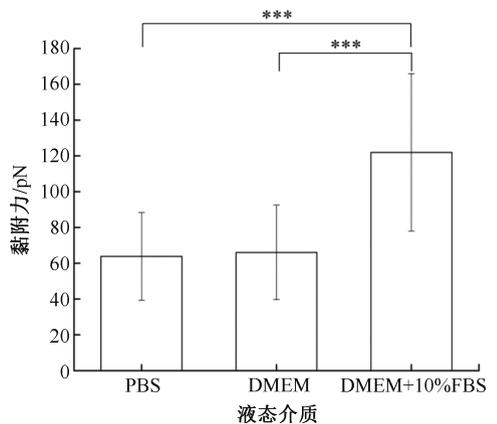


图4 不同液态介质环境中黏附力对比 (***) $P < 0.001$)

Fig.4 Comparison of adhesion force in different liquid media environment

2.3 乳腺癌细胞的压入深度

采用 AFM 测试并比较在加载力相同的情况下不同液态介质中乳腺癌细胞(MCF7)的压入深度(见图5)。PBS 缓冲液、DMEM 培养液、DMEM+10% FBS 培养液中乳腺癌细胞的压入深度分别为 (770.85 ± 131.26) 、 (910.51 ± 189.16) 、 (1137.66 ± 308.81) nm。每一种液态介质环境下至少测试

45 个细胞的压入深度,经过差异性分析,3 种液态介质中人乳腺癌细胞的压入深度存在显著性差异 ($P < 0.001$)。

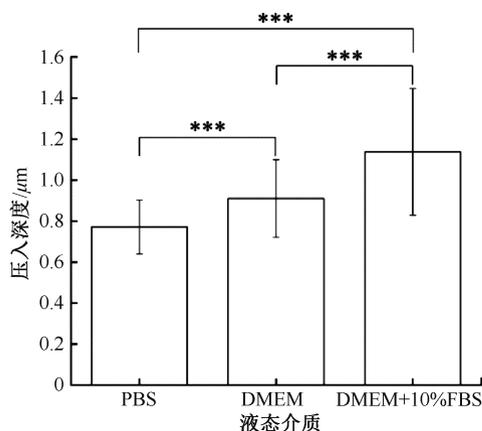


图5 不同液态介质环境中压入深度对比 (***) $P < 0.001$

Fig.5 Comparison of indentation in different liquid medium environment

3 讨论

乳腺癌细胞弹性模量的准确测量将直接影响乳腺癌诊疗新技术的发展,然而常用细胞培养介质环境对细胞力学性能的影响还鲜有报道。本研究表明,在不同液态介质中,人乳腺癌细胞的弹性模量和黏附力有明显差异。细胞在 DMEM+10% FBS 培养液中的黏附力要远远大于另外两种介质(PBS 缓冲液和 DMEM 培养液)。细胞在 PBS 缓冲液中的弹性模量是在 DMEM+10% FBS 培养液中弹性模量的 1.63 倍,这个差异甚至接近 PBS 缓冲液中健康乳腺细胞和癌变乳腺细胞的差异^[3]。显然,如果忽略液态介质对细胞弹性模量的影响,将对细胞力学性能参数的确定以及后续诊疗方法的研发带来极大的不确定性,甚至产生相反的结果。

黏附力是乳腺癌细胞膜与 AFM 探针针尖之间相互作用的结果,Sun 等^[15]通过研究 AFM 探针针尖与细胞之间的黏附力发现,黏附是细胞膜上支架分子对探针针尖表面的物理吸附导致,这个现象普遍存在于 AFM 细胞实验中。因此,对于 PBS 缓冲液或 DMEM 培养液,乳腺癌细胞对 AFM 探针针尖黏附力是细胞膜表面分子与探针表面的短程相互作用的结果。DMEM+10% FBS 培养液中包含多种血清蛋白,这是另外两种液态介质所不具有的。研

究表明,FBS 中含有 3 000 多种不同的血清蛋白,这使得当头部曲率半径只有几十纳米的探针浸入 DMEM+10% FBS 培养液中时,就像纳米颗粒进入生理环境后马上被血清蛋白包裹一样,探针的表面也会迅速吸附一层血清中的蛋白质^[16]。此时,探针表面的血清蛋白层可能含有可以被细胞膜表面受体识别的蛋白质,当该蛋白接触到细胞膜后,它会被细胞识别,与细胞发生特异性的相互作用,使细胞膜对探针针尖表现出强的吸引力,细胞骨架也会产生相应的局部改变和重排,以响应细胞膜发出的内吞的信号^[17]。本文认为,上述结果导致了细胞在 DMEM+10% FBS 培养液中对 AFM 探针的黏附力大于另外两种溶液。由于较大的黏附力,导致 AFM 探针针尖受到细胞膜的吸引力而下陷,探针悬臂向下弯折,然而为了达到预设的触发力,需要让探针悬臂向上偏折,这使得在触发力相同时,AFM 会让探针针尖压入细胞更深。这导致在 DMEM+10% FBS 培养液中会得到更大的压入深度,从而得到更小的弹性模量。

对于黏附力没有明显差异的两种液态介质 PBS 缓冲液和 DMEM 培养液,弹性模量的差异可能是由于 pH 不同造成。PBS 缓冲液 pH 为 6.7,DMEM 培养液 pH 为 7.3。研究表明,贴壁细胞的细胞膜在 pH=7.35~7.45 环境中是粗糙褶皱的状态^[18]。因此,在 DMEM 培养液中,粗糙褶皱的细胞膜在针尖压入后可能没有受到明显的拉伸,故不会体现出明显的弹力。根据不同酸碱度下细胞膜的研究结果可知,细胞膜的弯曲弹性模量和剪切弹性模量在 5.6~7.4 的 pH 范围内会随着 pH 降低而增大^[18-20]。因此,在 pH=7.3 的 DMEM 培养液中,细胞膜对于由力-距离曲线实验获取的细胞弹性模量的贡献很小,探针针尖压入细胞过程中细胞弹性响应主要是由生理环境状态下的细胞骨架引起。而在 pH=6.7 的 PBS 缓冲液中,细胞膜弹性变形的弹力对于探针针尖压入细胞过程中细胞的弹性响应较大。另外,研究表明,在生理水平的液态介质环境中,细胞骨架最外层的微丝提供一个向内收缩的力,而微管和中间纤维提供一个向外扩张的力,两者相互作用达到平衡,维持了细胞形态的稳定^[21];但是酸性的液态介质环境使微丝皮层发生一定程度的解聚,向内收缩的压力减小,促使细胞骨架出现向外的张力。

因此,在偏酸性的 PBS 缓冲液中,细胞形态相对于生理状态下较为充盈肿胀,细胞膜由于存在预张力,其对于由力-距离曲线实验获取的细胞弹性模量的贡献不可忽略,细胞骨架微丝皮层一定程度的解聚也使得细胞骨架出现了向外的张力。这些都会使得在给定加载力情况下,所得到的压入深度更小,故所得到的细胞弹性模量会相对偏大。

4 结论

体外培养介质环境将显著影响通过 AFM 技术测得的乳腺癌细胞弹性模量。在 DMEM+10% FBS 培养液中,乳腺癌细胞因为和 AFM 探针上的血清蛋白相互作用,导致相对另外两种液态介质具有更大的黏附力,进而导致测得的弹性模量最小。乳腺癌细胞在 PBS 缓冲液中因为偏酸性的 pH 值导致测得的弹性模量最大。在测量乳腺癌细胞弹性模量时,考虑液态介质环境的影响,对细胞力学性能研究和细胞内靶向治疗技术研发具有重要的意义。

参考文献:

[1] 秦翔,吕晓莹,李顺,等. 基质刚度通过调节 YAP 活化控制乳腺癌细胞的耐药性[J]. 医用生物力学,2019, 34(2): 121-126.
QIN X, LV XY, LI S, *et al.* Matrix Stiffness regulates drug resistance of breast cancer cells through YAP activation [J]. J Med Biomech, 2019, 34(2): 121-126.

[2] 冯西桥. 肿瘤生物力学新进展[J]. 医用生物力学, 2019, 34(2): 115-120.
FENG XQ. Advances in tumor biomechanics [J]. J Med Biomech, 2019, 34(2): 115-120.

[3] 滕艳群. 基于原子力显微镜的乳腺癌细胞的弹性研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2012.

[4] CROSS SE, JIN YS, RAO J, *et al.* Nanomechanical analysis of cells from cancer patients[J]. Nat Nanotech, 2007. 2(12): 780-783.

[5] LI Q, LEE G, ONG CN, *ET al.* AFM indentation study of breast cancer cells[J]. Biochem Bioph Res Co, 2008, 374(4): 609-613.

[6] HÄNDEL C, SCHMIDT B, SCHILLER J, *et al.* Cell membrane softening in human breast and cervical cancer cells [J]. New J Phys, 2015, 17(8): 083008.

[7] ZHANG S, GAO H, BAO G. Physical principles of

nanoparticle cellular endocytosis [J]. ACS Nano, 2015, 9(9): 8655-8671.

[8] YI X, SHI X, GAO H. A universal law for cell uptake of one-dimensional nanomaterials [J]. Nano Lett, 2014, 14(2): 1049-1055.

[9] 魏祖其. 基础化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 15-20.

[10] HUTTER JL, BECHHOEFER J. Calibration of atomic-force microscope tips [J]. Rev Sci Instrum, 1993, 64(7): 1868-1873.

[11] TITUSHKIN I, CHO M. Modulation of cellular mechanics during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells [J]. Biophys J, 2007, 93(10): 3693-3702.

[12] SVALDO LT, CAVALLERI O, KROL S, *et al.* Mechanical properties of single living cells encapsulated in polyelectrolyte matrixes [J]. J Biotechnol, 2006, 124(4): 723-731.

[13] SNEDDON IN. The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile [J]. Int J Eng Sci, 1965, 3(1): 47-57.

[14] RADMACHER M. Measuring the elastic properties of living cells by the atomic force microscope [J]. Method Cell Biol, 2002, 68: 67-90.

[15] SHAMIK S, SHYAMSUNDAR S, DENNIS ED. Indentation and adhesive probing of a cell membrane with AFM: Theoretical model and experiments [J]. Biophys J, 2005, 89(5): 3203-3213.

[16] SHAN Y, WANG H. The structure and function of cell membranes examined by atomic force microscopy and single-molecule force spectroscopy [J]. Chem Soc Rev, 2015, 44(11): 3617-3638.

[17] ROUNSEVELL R, FORMAN R, CLARKE J. Atomic force microscopy: Mechanical unfolding of proteins [J]. Methods, 2004, 34(1): 100-111.

[18] LIPOWSKY R, SACKMANN E. Structure and dynamics of membranes [M]. Amsterdam: Elsevier, 1995: 521-602.

[19] 阮萍, 黄耀熊, 屠美, 等. 红细胞膜在不同 pH 值下动力学特性与携氧能力的变化[J]. 医学争鸣, 2003, 24(23): 2119-2121.

[20] DROR Y, SORKIN R, BRAND G, *et al.* The effect of the serum corona on interactions between a single nano-object and a living cell [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 45-58.

[21] LI S, XIONG N, PENG Y, *et al.* Acidic pHe regulates cytoskeletal dynamics through conformational integrin $\beta 1$ activation and promotes membrane protrusion [J]. Mol Basis Dis, 2018, 1864(7): 2395-2408.