

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.02.008

文章编号: 1005-8982(2016)02-0038-05

论著

原子力显微镜对雌激素受体表达的 乳腺癌细胞形态特征的观察

姚文莲, 纪小龙

(辽宁医学院武警总医院, 北京 100039)

摘要:目的 原子力显微镜(AFM)观察雌激素受体(ER)表达的乳腺癌细胞膜的表面形态变化,为亚细胞水平下探索肿瘤发生机制、发展过程和细胞水平诊断和早期诊断提供新方法,并为探索肿瘤的治疗新途径提供依据。**方法** 利用原子力显微镜分别观察雌激素受体抗体阳性表达和阴性表达的乳腺癌细胞膜表面形态特征并对特征参数平均粗糙度、平均峰高度、平均凹陷深度和表面积差值进行定量测量,采用统计学方法进行差异性分析。**结果** 雌激素受体抗体阳性表达组的乳腺癌细胞形态和阴性表达组相比具有明显的不同,阳性表达组乳腺癌细胞膜表面凹凸不平,可见“细密尖锐”的“麦芒样”隆起,而阴性表达组的乳腺癌细胞膜呈“粗大饱满”的“沟渠样”隆起。两组细胞在平均粗糙度、平均峰高度、平均凹陷深度和表面积差值方面有明显差异($P < 0.05$)。**结论** 细胞膜表面结构因细胞的功能状态的不同而不相同。相同肿瘤细胞在不同功能状态下,其细胞膜在形态结构上存在很大的差异,这为探讨肿瘤的发生机制、发展过程和早期诊断及细胞诊断提供依据。

关键词: 原子力显微镜;乳腺癌;受体;细胞膜;形态特征

中图分类号: R730.5;R737.9

文献标识码: A

Morphological characteristics of breast cancer cells with estrogen receptor expression under atomic force microscope

Wen-lian Yao, Xiao-long Ji

(General Hospital of Armed Police Force, Liaoning Medical University,
Beijing 100039, China)

Abstract: Objective To observe the surface morphological changes of breast cancer cell membrane with different expression of estrogen receptor (ER) under atomic force microscope (AFM), explore the mechanism of occurrence and development of breast cancer, as well as provide new ideas for early diagnosis of tumor on early sub-cellular level basis and possible evidence for advanced tumor therapy modalities. **Methods** The breast cancer cells were divided into two groups based on the level of ER expression: positive group and negative group. And then the surface morphology of cell membrane was observed under AFM. In both groups the characteristic morphological parameters were quantitatively measured for each cell, which included average roughness, mean peak height, average maximum depth and surface area difference. Then the results were statistically analyzed. **Results** There were significant differences between the two groups in cellular morphology. The surface of ER-positive cell membrane was rough and uneven: sharp tuberositas was similar to the awn of wheat; while in the ER-negative group, the tuberositas was crassitude and plump, just as the ditch. There were significant differences in the average roughness, mean peak height, average maximum depth and surface area difference between the cells of both groups ($P < 0.05$). **Conclusions** The surface structure of breast cancer cell membrane varies with different functional state. This may provide us with an insight into the mechanism of actions of the cancer, its development process, and early diagnosis at pathological and clinical levels.

Keywords: atomic force microscope; breast cancer; estrogen receptor; cell membrane; morphological characteristic

伴随着肿瘤发病率的提高,对癌症的早期诊断和有效治疗提出更严峻的挑战。研究证实,细胞的形态变化反应肿瘤的生物行为,细胞只有保持正常的形态结构才能维持机体的正常运转。一旦形态结构发生改变就会改变细胞的原有功能,机体将会发生病态改变。但是由于细胞结构的复杂和微细,观察其形态结构的条件不足,针对这方面的研究甚少。本研究利用原子力学显微镜这一新技术手段,从分析研究细胞形态特征入手,观察乳腺癌细胞在不同雌激素受体(estrogen receptor, ER)表达下的细胞膜形态及其参数,为其早期诊断和单细胞诊断提供亚细胞水平依据,为更好的认识癌症、治疗癌症提供新的思维途径。

原子力显微镜(atomic force microscopy, AFM)是 20 世纪 80 年代发展起来的一项新技术,与传统的扫描电子显微镜比较,具有样品制备简单,横向和纵向分辨率均非常高(观察单位达到纳米级别依旧很清晰)等优点,可以精细清楚的观察细胞乃至细胞膜的结构形态,成功的获取细胞膜的形态并测量其相关特征参数。利用原子力显微镜观察受体以及受体和配体相互作用的研究已经被证实其可能行及可操作性^[1]。1999 年,Lehenkari 等^[2]用 AFM 对位于破骨细胞表面的整合素受体与其配体的结合力进行了测量。2003 年, Lee 等^[3]采用 AFM 在生理条件下对血纤维蛋白原与血小板受体 α II b β 3 之间的相互作用进行研究。2008 年的中国化学会第 26 届学术年会纳米化学分会上,师晓丽等^[4]做 AFM 单分子力谱研究活细胞表面受体与配体相互作用的报告,正式将 AFM 这一工具带入到医学实践实验中。

尽管利用 AFM 进行受体和配体的相关研究已经在进行,但是针对乳腺癌雌激素受体的研究尚未见明确报告。本研究利用 AFM 的这一特点,可以很好地实现在亚细胞水平上对雌激素受体表达的乳腺癌细胞形态的观察和相关数据测量,以达到实验的目的,填补该受体研究的空白,同时为将来的继续研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 一般材料

选取 2013 年 11 月 -2014 年 7 月辽宁医学院武

警总医院切除的新鲜活体浸润性乳腺癌组织,共收集 30 例。其中,男 1 例,女 29 例,年龄 23 ~ 72 岁(平均 48.7 岁)。所有标本均经 HE 和免疫组织化学一步法染色并由 3 位以上高年资病理医生做出明确诊断。

1.2 主要仪器及规格

①倒置相差显微镜(Nikoneclipse 2000-U,购自日本 NIKON 公司),②Nanoscope a 型原子力显微镜(购自 Digital Instruments Inc, Santa Barbara 公司, CA)(悬臂:氮化硅, Si_3N_4 ; 针尖: NSC- II 型, 曲率半径为 20 ~ 30 nm; Tapping 扫描模式,即轻敲模式)。实验条件:空气湿度 60%左右,温度 25℃左右。

1.3 方法

1.3.1 AFM 观察样品的制备(细胞印片法) 将收集的新鲜乳腺癌组织用洁净锋利刀片剖开,反复冲洗剖面并用滤纸吸去残留血液和组织液,将预处理好的载玻片轻柔均匀地按压于组织剖面处,使细胞均匀地印在玻片上(每个组织选择 3 个切面,每个切面各印 3 张切片)。将制备好的细胞印片放置于洁净空间晾干,分组,准备扫描。

1.3.2 实验分组 根据常规免疫组织化学染色雌激素受体抗体表达的结果,将病例分为两组:阳性组和阴性组。其中,常规组织切片雌激素表达(---)为阴性组,表达(++~+++)为阳性组。判断方法如下:以肿瘤细胞的细胞核呈棕黄色染色为阳性。阴性:无细胞核呈棕黄染色或少于 5%的肿瘤细胞细胞核较弱棕黄染色;1+:5%~20%的肿瘤细胞细胞核弱棕黄染色,仅个别可中到强着色;2+:20%~60%的肿瘤细胞细胞核较弱到中度棕黄着色,个别可强着色;3+:多于 60%的肿瘤细胞细胞核中到强棕黄着色,个别可弱着色。所有免疫组织化学染色的结果均经由 3 位主治医师以上的病理医生复核。

1.3.3 AFM 扫描各组细胞样品 样本置于 AFM 载物台上,利用 Nikon 倒置显微镜选取分散度较好、呈点状分布的细胞区域,调整激光光斑、自动调频、下针接触到样本并开始扫描。动态观察显示屏出现的细胞图像并随时调节扫描范围。每张样品选取 10 个细胞,每个细胞依次按照扫描范围从大到小(35 μm ~500 nm)的顺序扫描单个完整细胞和细胞膜并获取图像。按照扫描需求在 0.5~2.0 Hz 之间调

节扫描频率。扫描完成的细胞和获取的相应图像进行特殊定位和标记,以备后续免疫组织化学染色进一步确认分组的准确性和目标细胞的正确性。扫描图像保存后用 AFM 分析软件进一步分析,分别观察 ER 阳性组和阴性组细胞的细胞膜形态并对细胞膜形态参数(表面平均粗糙度、平均峰高度、平均凹陷深度和表面积差值)进行定量测量。

1.3.4 免疫组织化学染色复核 将扫描完成的乳腺癌印片细胞进行雌激素受体的免疫组织化学染色,由 3 位主治以上的病理医生读片确认病例分组的准确性,并且根据定位,确认每个扫描细胞的雌激素受体着色分组无误。

1.3.5 细胞膜表面参数定量分析 整理扫描范围为 $1\mu\text{m}$ 区域的测量结果,利用 AFM 图像分析系统对两组细胞的细胞膜形态参数进行定量测量。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AFM 扫描细胞膜成像结果

各组细胞膜表面纳米级超微结构成像清晰。乳腺癌细胞在扫描范围 $30\mu\text{m}$ 时形状呈圆形 / 类圆形,雌激素受体抗体阳性组和阴性组细胞形态差异在此分辨率下无明显差异。随着扫描范围缩小至 $5\mu\text{m}$ 和 $1\mu\text{m}$ 时,其分辨率增大,细胞膜表面的超微结构也随之清晰呈现,乳腺癌细胞膜表面凹凸不平,呈现不同程度的隆起。但是,激素表达状态不同,隆起的形状有差异。雌激素受体抗体阳性表达的乳腺癌细胞膜可见“麦芒样”隆起,特点是隆起物分布较细密“尖锐”且不均匀,形状欠规则,粗糙程度较一般,平均裂间隙较浅(见图 1);雌激素受体抗体阴性表达的乳腺癌细胞也呈现隆起,但隆起物与阳性组比较明显变稀疏“饱满”,呈“沟渠样”隆起,粗糙度较阳性组高,平均裂间隙较深(见图 2。因 $1\mu\text{m}$ 时仅能显示一个隆起而不能显示沟渠特征,故选用 $5\mu\text{m}$ 时图像)。

2.2 膜表面重要参数测量结果

经 AFM 软件自动分析系统测出的 2 组细胞膜形态参数比较结果见附表。2 组在 4 个参数(表面平均粗糙度、平均峰高度、平均凹陷深度和表面积差值)的比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

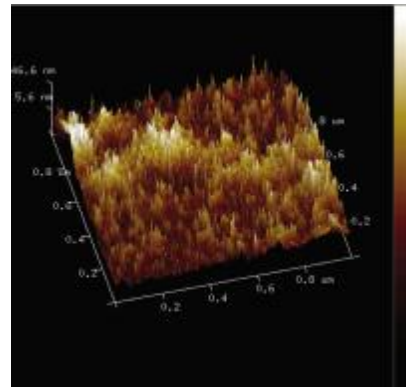


图 1 乳腺癌细胞膜“麦芒样”隆起 ($1\mu\text{m}$)

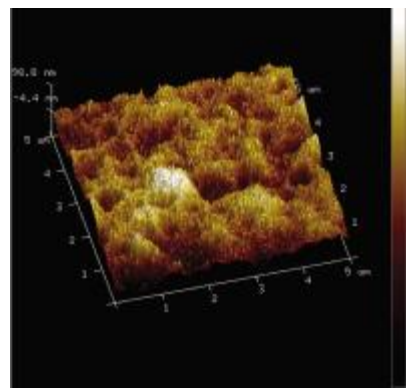


图 2 乳腺癌细胞膜“沟渠样”隆起 ($5\mu\text{m}$)

附表 不同激素状态乳腺癌细胞膜表面峰高度、粗糙度、表面积差值和凹陷度 ($n=600, \text{nm}, \bar{x} \pm s$)

组别	峰高度	粗糙度	表面积差值	凹陷度
ER(-)	45.93 ± 1.29	31.87 ± 6.46	16.35 ± 1.03	35.09 ± 6.36
ER(+)	18.15 ± 1.89	20.65 ± 4.03	5.69 ± 1.33	18.28 ± 2.15
P 值	0.000	0.001	0.000	0.001

3 讨论

机体的正常生命活动都依附于细胞的功能。细胞膜不单是细胞的物理屏障,还与细胞的各种生命活动如细胞的识别黏附、运动迁移、免疫应答、物质运输、信息传导、细胞分裂、细胞分化、衰老及病变、癌变等有着密切的关系^[6],而细胞膜的正常形态是其行使功能的基础。一旦细胞膜表面形态发生改变,细胞的功能必将出现异常。研究证明^[6],正常细胞在发展为肿瘤的过程中,其膜表面蛋白的数量和形态发生改变,从而导致细胞膜形态结构发生改变。同一种细胞,在不同的生理、生态和功能条件下,其形态结构也会不同^[6]。因此,通过观察肿瘤细胞膜的形态变化,可以预测肿瘤组织细胞中特定成分如核酸

的含量、相应激素受体数量及其位点的变化,为探索肿瘤的发生机制、预测肿瘤的发展和预后提供可靠的亚细胞学和形态学证据。Radmache^[7]、Kaul-Ghanekar 等^[8]利用原子力学显微镜观察肿瘤细胞形态变化就证实了这一点。

众所周知,乳腺癌是一种激素依赖性肿瘤,其发生、发展和预后都与雌激素的表达有着密切的联系。有文献报道^[9],在内源性或外源性雌激素诱导下,乳腺细胞增殖速度加快,导致发生错误复制的几率增加(乳腺癌的发病机制之一:过量激素的长期刺激)。有数据证明^[10],当体内的雌二醇水平持续高于 10³ pmol/L 时,可以促进乳腺正常和新生上皮细胞的增殖,而过量的雌激素又通过刺激乳腺癌细胞的生长和抑制其凋亡,从而增加乳腺癌的发病率及复发率,促进其发生和发展。另外,体外研究表明^[11],雌激素还可促进乳腺细胞的转化和增加乳腺肿瘤细胞的侵蚀性。雌激素发挥这以上所有作用均依赖于它是一种受体激素,其发挥生物学效应需要与细胞膜表面的受体结合来实现。因此,当乳腺细胞发生癌变时,乳腺细胞膜结构形态及功能会发生变化,其上的受体也会发生变化;同时不同形态及受体数量的细胞膜也预示癌细胞具有不同的肿瘤生物学行为。

近年来,随着 AFM 技术的发展,促进其在细胞生物学领域的应用发展,国内外对一些疾病的研究,也多致力于借助 AFM 的优势(AFM 的优势之一是可以直接应用于活体组织的实时观察)进行相关疾病培养的活细胞的实时扫描和观察^[12-14]和在分子蛋白水平上对一些肿瘤发病机制进行探索^[15]。单就乳腺癌的细胞学研究方面,2009 年,Tiwari 等人^[16]利用 AFM 观察人乳腺癌细胞结合表皮生长因子抗体(Her-2)后细胞表面的形态,结合荧光成像发现癌细胞的细胞膜在粗糙程度等方面有明显的变化并获得立体图像。2012 年 Plodinec 等^[17]在对乳腺癌细胞的纳米力学特性的研究中发现,正常与良性病变的人类乳腺细胞以及乳腺癌细胞的细胞膜表面形态表现大有不同。但是目前国内对人体一些肿瘤组织细胞的 AFM 形态观察研究刚刚起步。谢飞跃在 2008 年和腾艳群在 2012 年都曾针对乳腺癌细胞进行过研究,得出和 Plodinec 等相近的结论。2012 年 Jin 等人^[18]利用 AFM 发现骨形成蛋白(BMP2)通过改变细胞的支架和降低细胞的黏附来促进乳腺癌细胞的迁移和侵袭。在本实验的前期预实验阶段,本研究证实正常乳腺细胞、良性病变乳腺细胞和乳

腺癌细胞形态差异较大,其细胞膜表面平均粗糙度随病变依次逐渐增大:正常乳腺组(9.214 ± 1.983)、乳腺增生症组(15.943 ± 3.730)和乳腺癌组(24.021 ± 5.859),与既往研究一致^[5,19]。

借助 AFM 观察细胞形态的优势,本研究发现,不同雌激素受体表达的乳腺癌细胞膜形态之间差异有统计学意义($P < 0.05$):雌激素受体抗体高表达的乳腺癌细胞膜表面存在更多的小“凸起”(即受体抗体结合位点),并且这些“凸起”较为平和,尚且具有一定的结合能力。因此,雌激素可以作用于此而调控肿瘤的发展。基于此,临床治疗中,笔者可以选择雌激素受体拮抗剂(内分泌治疗),阻断这些受体与雌激素的结合从而抑制肿瘤的发生发展。相反,不表达雌激素的乳腺癌,其细胞膜表面的“凸起”发生变异,与激素的结合能力丧失,从而使激素在其生物学进程中的作用微小,故内分泌治疗对于该类患者效果甚微。这进一步充分体现细胞结构与功能之间的密切关系,为探索癌症的发生机制、指导临床治疗方案的实施提供更为可靠严谨的亚细胞学水平的依据。

综上所述,AFM 的发明与应用为人类对于细胞形态学的研究提供有力的工具。虽然目前受某些因素的制约,其在医疗实践中的作用未能得到充分的发挥,相关研究的数据很少,形态图尚不完善。但是这掩盖不了其未来在医学中的应用价值。在医学预防大于医学治疗的进展前景下,纳米医学、纳米诊断和纳米治疗将会占有不可忽视的地位和作用。

参 考 文 献:

- [1] 王莉娟,张英鸽.用原子力显微技术研究受体-配体间的相互作用[J].生物技术通讯,2005,16(6):336-339.
- [2] Lehenkari PP, Horton MA. Single integrin molecule adhesion forces in intact cells measured by atomic force microscopy[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 1(7): 259-645.
- [3] Lee I, Marchant RE. Molecular interaction studies of hemostasis: fibrinogen ligand-human platelet receptor interactions[J]. Ultramicroscopy, 2003, 97(1): 341.
- [4] 师晓丽,等. AFM 单分子力谱研究活细胞表面受体与配体的相互作用[M]. 中国化学会第 26 届学术年会纳米化学分会场论文集, 2008.
- [5] 舒清明,等.原子力显微镜下几种癌细胞形态特征的共性分析[J].南方医科大学学报,2011,31(2):205-209.
- [6] 董敏,马义德.基于乳腺肿瘤细胞形态特征参数的乳腺癌诊断发展研究[J].中华临床医师杂志,2013,7(11):5023-5026.
- [7] Radmache M. Studying the mechanics of cellular processes by

- atomic force microscopy[J]. *Methods Cell Biol*, 2007, 83(11): 347-372.
- [8] Kaul-Ghanekar R, Singh S, Mangain H, et al. Tumor suppressor protein SMAR1 modulates the roughness of cell surface:combined AFM and SEM study[J]. *BMC Cancer*, 2009, 9(3): 350-351.
- [9] Yager JD, Davidson NE. Estrogen carcinogenesis in breast cancer[J]. *N Eng Med*, 2006, 354(6): 270-282.
- [10] 李治, 等. 雌二醇对不同性质的乳腺原代细胞增殖影响的体外研究[J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2007, 5(3): 258.
- [11] 王文静, 等. 雌激素 Fak 与乳腺癌关系的研究进展[J]. *实用癌症杂志*, 2008, 1(23): 102.
- [12] Sun YX, Lin DY, Rui YF, et al. Three-dimensional structural changes in living hippocampal neurons imaged using magnetic AC mode atomic force microscopy[J]. *Electron Microsc*, 2006, 55(7): 165-172.
- [13] Ge GL, Han D, Lin DY, et al. MAC mode atomic force microscopy studies of living samples, ranging from cells to fresh tissue[J]. *Ul-tramicroscopy*, 2007, 107(10): 299-307.
- [14] Wildling L, Hinterdorfer P, Kusche Vihrog K, et al. Aldosterone receptor sites on plasma membrane of human vascular endothelium detected by a mechanical nanosensor [J]. *Pflugers Arch*, 2009, 458(2): 223-230.
- [15] Griner EM, Kazanietz MG. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(3): 281-294.
- [16] Tiwari DK, Tanaka S, Inouye Y, et al. Synthesis and characterization of Anti-HER2 antibody conjugated CdSe / CdZnS quantum dots for fluorescence imaging of breast cancer cell[J]. *Sensors (Basel)*, 2009, 9(11): 9332-9364.
- [17] Plodinec M, Loparic M, Monnier CA, et al. The nanomechanical signature of breast cancer[J]. *Nanotechnol*, 2012, 7(11): 757-765.
- [18] Jin H, Pi J, Huang F, et al. BMP2 promotes migration and invasion of breast cancer cells via cytoskeletal reorganization and adhesion decrease: an AFM investigation [J]. *Appl-Microbiol-Biotechnol*, 2012, 2(934): 1715-1723.
- [19] 陈勇, 蔡继业. AFM 对人乳腺癌细胞外纤连蛋白原纤维的形态学观察[J]. *生物化学与生物物理学报*, 2003, 35(8): 752-755.

(张蕾 编辑)