

# DAPI 染色对 A549 肺癌细胞弹性模量的影响

叶志义\* 张丽 范霞

(重庆大学, 生物工程学院, “生物流变科学与技术”教育部重点实验室(重庆大学), 重庆 400044)

**摘要** 原子力显微镜(AFM)能测量活细胞的力学性质。DAPI 染色 A549 肺癌细胞核后用 AFM 测量细胞的弹性模量, 分析 DAPI 染色对细胞力学性质的影响。通过 Hertz 模型拟合 AFM 测量压痕细胞的力-压痕曲线, 得到细胞的弹性模量。实验结果: 用 DAPI 染色细胞后其弹性模量为  $3.66 \pm 2.08$  kPa, 而对照组未染色的细胞弹性模量为  $3.21 \pm 1.73$  kPa, 数据比较显示, DAPI 染色对 A549 肺癌细胞弹性模量没有显著性影响。

**关键词** 原子力显微镜; 弹性模量; DAPI 染色

细胞的弹性性质是细胞力学重要的参数, 细胞的结构与功能与细胞弹性性质密切相关。在不同的生理条件下, 细胞的生长、粘附以及受到不同外界环境(剪切力, 应力等)影响的情况下, 细胞的弹性性质都会存在差异。而细胞的弹性与细胞内部的细胞骨架结构和分布相关, 细胞骨架是真核细胞中的蛋白纤维网架体系, 它的动态行为能够使细胞发生迁移、分化或维持自身的形状, 它也是影响细胞弹性性质的一个重要因素。自原子力显微镜(atomic force microscopy, AFM)问世以来<sup>[1]</sup>, AFM 以其高分辨率、超灵敏等功能, 成为细胞力学研究的一个十分有利的工具, 它不仅能够反映细胞表面的形态特征, 而且能够定量测定细胞膜蛋白分子与配体分子间的相互作用以及细胞弹性模量等力学性质<sup>[2-6]</sup>, 因此 AFM 已成为细胞力学研究中的一种应用广泛的技术。Rotsch 等<sup>[7]</sup>用 AFM 研究药物(细胞松弛素等)作用于纤维原细胞, 发现细胞经细胞松弛素作用后, 细胞的弹性模量减少了 2.9 倍, Barbee 等<sup>[8]</sup>利用 AFM 研究流动剪切力对动脉内皮细胞的结构以及力学行为的影响, 发现动脉内皮细胞在剪切力的作用下细胞表面的弹性从  $0.83 \pm 0.23$  Kpa 增加到  $1.75 \pm 0.43$  Kpa。也有文献报道用 AFM 对肿瘤细胞以及药物处理肿瘤细胞后的细胞骨架及细胞弹性的研究。Lekka 等<sup>[9]</sup>用 AFM 研究正常细胞株与肿瘤细胞株细胞弹性, 正常细胞较肿瘤细胞高一个数量级, 这种差异与其细胞骨架结构不同有关。Li 等<sup>[10]</sup>用 AFM 结合荧光观察人乳腺癌细胞(MCF-7)和人正常乳腺上皮细胞(MCF-10A), 发现恶性肿瘤细胞弹性显著低于人正常乳腺上皮细胞 1.4~1.8 倍, 荧光观察和 AFM 扫描图像显示这两种细胞的肌动蛋白结构明显不同。

Cross 等<sup>[11]</sup>利用 AFM 技术成功从患有癌症的病人体内分辨出正常细胞和癌细胞。由于癌细胞都具有转移特性, 发生转移时细胞弹性会有所改变, 所以

利用此特点提取癌症病人体内的积液, 并对其中的细胞进行力学分析, 结果发现转移性癌细胞比良性细胞的弹性模量要小 70%, 这种新颖的诊断方法要比传统的组织化学、形态学法准确得多, 因为正常的内皮细胞往往会出现癌细胞的形态, 或是由于体外培养技术, 正常细胞在形态上有时会与癌细胞混淆而出现假阳性, 但是弹性上的差异不会改变, 因此为癌细胞的诊断提供了一条更准确的途径。

在临床肿瘤诊断研究中临床样本存在正常细胞和肿瘤细胞, 一般光学显微镜下很难区分这两种细胞。目前的方法是通过特异标记物来标记细胞并在显微镜下用 AFM 的探针压痕标记的细胞, 但问题是特异标记物少且过程繁琐。通常肿瘤细胞的细胞核较正常细胞要大, 通过 4', 6-二巯基-2-苯基吡啶 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 着色后, 可通过区分图像中细胞核的大小来初步辨别正常细胞和癌细胞, 然后用探针有针对性地压痕细胞。但 DAPI 染色细胞核是否影响细胞的弹性是本文研究主要目的也是为用 AFM 快速诊断肿瘤细胞的临床研究提供基础数据和方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

实验药品: DEME 培养基, 10% 胎牛血清, 1% 青霉素和链霉素, DAPI 染液等购自 Sigma 公司。

实验细胞: A549 肺癌细胞。A549 肺癌细胞的培养: 将细胞培养在培养皿中并置于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中温育, DMEM 培养基另外再加上 10% 胎牛血清、1% 青霉素和链霉素, 在 AFM 实验前, 细胞

收稿日期: 2009-11-09 接受日期: 2010-01-25

国家自然科学基金项目(No.30570453), 高等学校学科创新引智计划(“111”) (B06023)资助

\* 通讯作者。Tel: 023-65112452, E-mail: zybioafm@163.com

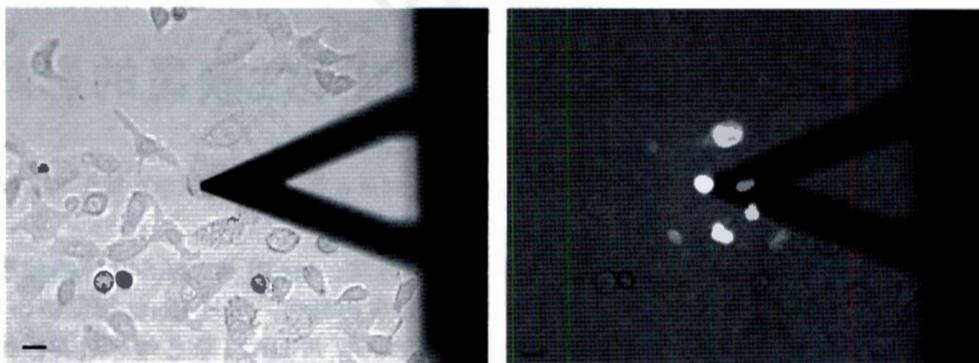


Fig.1 Optical images of A549 cells cytological sample. The AFM tip pressed the center of A549 cell (Scale bars=20  $\mu\text{m}$ )

的生长密度达到 80% 左右。用 DAPI 染液染色培养皿中的 A549 肺癌细胞, 然后加入 PBS 于培养皿, 同样在 AFM 作未染色的细胞实验时用 PBS 替换 DMEM 培养基。

### 1.2 AFM 实验

利用 Veeco 公司的 Nanoscope IV Bioscope 型 AFM, 其配有倒置显微镜, 通过此显微镜可以在大的视野范围内寻找到需要检测的细胞, 在本实验中主要是利用此功能将探针移到细胞的胞核区域进行力曲线操作。所选用的探针为氮化硅材质的锥形探针, 半开角为  $36^\circ$ , 弹性系数为 20 PN/nm, 每次实验开始前需要通过热振动的方法对探针的弹性系数进行校正<sup>[12,13]</sup>。力模式下探针在压入细胞以及从细胞回拉过程中可以得到作用力与压电陶瓷 Z 方向位移的力-距离曲线关系, 通过分析其中的进针曲线可获取细胞表面的弹性模量。探针压痕细胞大概深度为 1.5  $\mu\text{m}$ , 细胞承受的最大力度为 25 nN。

### 1.3 数据分析

利用赫兹模型<sup>[14,15]</sup>模拟实验所得到的力曲线, 选取进针曲线中 400 nm 压痕以内的数据, 利用的公式如下:

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

其中  $F$  为施加在探针上的作用力(nN),  $E$  为需要被检测细胞的弹性模量(kPa),  $\nu$  为泊松比,  $\alpha$  为锥形探针的半开角,  $\delta$  为压痕深度( $\mu\text{m}$ ), 本实验中将泊松比定为 0.5。

## 2 结果

图 1 中所示, 在光学显微镜下经 DAPI 染色的 A549 细胞形状, AFM 探针压痕培养在培养皿中的单个细胞上, 同一细胞置于荧光显微镜下用 359 nm 激发光观察结果: DAPI 染色的细胞其细胞核呈白色荧光且清晰可见。

图 2 中所示, AFM 探针以 1 Hz 频率压痕细胞, 得到进针曲线(approach curve)和回针曲线(retract curve)。进针过程中未与细胞接触时, 探针未发生形变, 力为零, 当探针与细胞表面接触, 探针变形产生力, 并随压痕深度增加力增大。探针与细胞表面接触点的确定非常重要, 在本研究中通过对进针曲线线性和非线性拟合, 确定曲线线性和非线性的拐点, 即接触点。然后以接触点为起点分析探针压痕细胞 400 nm 范围进行模型拟合。

本实验以每个培养皿的细胞群为一个样本, 每一样本随机选取 18 个细胞, 从第一个细胞到第 18 个细胞每个细胞作 10 条连续力曲线, 通过模型拟合得到细胞的弹性模量, 数据平均后得每个细胞的平均弹性模量。图 3 中所示, DAPI 染色 A549 细胞弹性模量在  $0.91 \pm 0.3$  至  $8.37 \pm 1.21$  之间, 同样对照 A549 细胞弹性模量变化范围  $1.48 \pm 1.06$  至  $7.27 \pm 0.31$ , 每组 18 个细胞所用时间为 60 min 左右, 从分布图所见, 所测细胞随测量时间其弹性模量呈随机分布。

18 个细胞的弹性模量平均即为这组细胞弹性模量, 图 4 中所示, DAPI 染色的弹性模量为  $3.66 \pm 2.08$  kPa 而对照的非染色 A549 细胞的弹性模量为  $3.21 \pm$

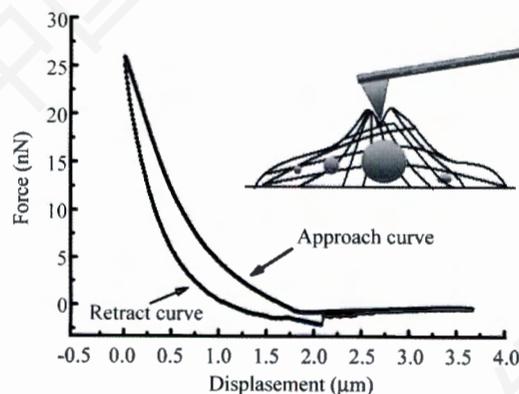


Fig.2 Typical force curve obtained from AFM probe (at a rate of 1 Hz) such that it approaches, indents, retracts, and releases from cell's surface

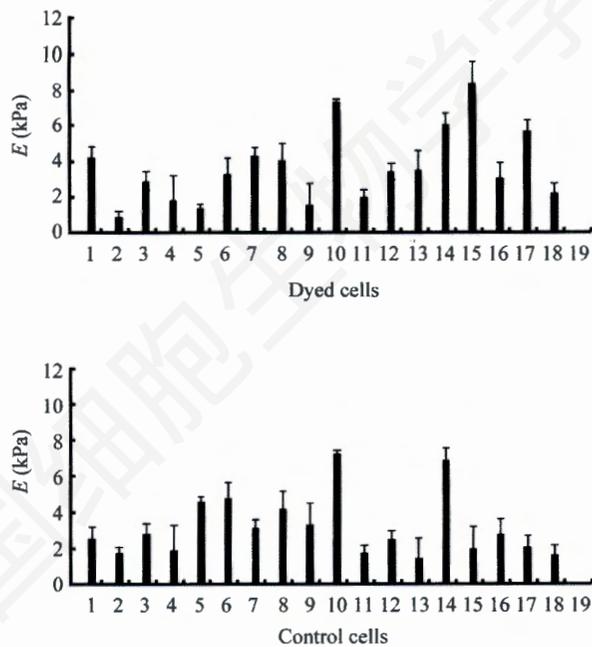


Fig.3 Each bar shows the Young's modulus of an individual cell based on 10 consecutive AFM indentations (mean $\pm$ SD)

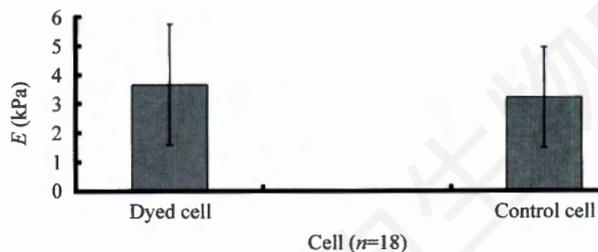


Fig.4 The elastic properties of A549 cells and dyed cells were measured

These average Young's Modulus ( $E$ ) values (mean $\pm$ SD) for all A549 control cells and dyed cells were found to be  $3.21\pm 1.73$  kPa and  $3.66\pm 2.08$  kPa, respectively.

1.73 kPa, 发现 DAPI 作用后, 与对照细胞比较没有显著的差异(Control,  $n=18$ ,  $P>0.05$ )。

### 3 讨论

近年来国内外有不少关于利用 AFM 技术测量细胞弹性性质的报道, AFM 在不造成损伤的前提下可以对活细胞在液态环境下进行原位测量<sup>[16]</sup>。AFM 测量细胞弹性的原理是用一个探头压细胞, 测量所加载的力, 然后用适当的模型分析力-压痕曲线, 从而得到弹性模量。目前分析数据的方法是利用经典的赫兹模型, 计算出细胞的弹性模量。赫兹模型作了一些假设, 比如: 表面是连续的、光滑的, 变形是相对很小的。对于细胞而言, 虽然并不完全符合以上的假设, 但是, 赫兹模型对于研究细胞的弹性仍然是非常

有用的<sup>[17]</sup>。

DAPI 是一种能够与 DNA 强力结合的荧光染料, 它能粘附在 DNA 双螺旋的小沟区。DAPI 作为一种能与 DNA 分子特异结合的荧光染料, 无明显细胞毒性, 可以穿透活细胞膜。因为 DAPI 可以透过完整的细胞膜, 所以它可以用于活细胞和固定细胞的染色。DAPI 标记细胞由于操作简便, 被标记细胞的生命活动无明显影响, 可以直接观察, 费用低廉, 因此得到广泛使用。本实验结果发现 DAPI 染色细胞和对照细胞弹性模量没有显著性差别, 与 DAPI 未导致细胞死亡和没有破坏细胞骨架结构有关, 如果 DAPI 染色导致细胞凋亡, 那么细胞的弹性模量会有较大的改变, 如 Lam 等<sup>[18]</sup>研究发现凋亡的细胞弹性较活细胞要大数倍。细胞的弹性模量的变化受各种生理、病理以及外界物理、化学、生物等因子刺激的影响, 其中细胞骨架结构动力学变化以及骨架重排对细胞弹性影响最显著。DAPI 穿透活细胞膜与 DNA 特异结合没有影响细胞的骨架结构, 所以 DAPI 染色对细胞的弹性模量没有影响, 同时可通过 DAPI 的染色初步区分出细胞核大小, 并为利用探针压痕细胞提供指针。本实验过程中测量细胞(18 个)一般需近 60 min, 是否会因测量时间导致细胞弹性呈规律性变化(或增大, 或减小), 图 3 中分布图所示, 所测细胞随时间细胞弹性呈随机变化, 这与其他实验和文章报道是一致的<sup>[19]</sup>。用 DAPI 染色的细胞同样随时间是呈随机分布, 也说明 DAPI 对细胞的弹性没有影响。所以 AFM 实验过程不会导致细胞弹性随时间而变化。本实验数据分析所得弹性模量用平均值表征, 因为所测细胞为同一培养皿的细胞其环境条件是一样的, 且研究的目的是比较在相同实验条件, 相同分析方法下两种细胞的弹性模量是否有差异, Sokolov 等<sup>[20]</sup>也是用同样的分析方法来比较药物处理和对照细胞的弹性模量。

目前 AFM 用于临床医学研究还处于初始阶段。尤其在肿瘤临床研究中, 临床样本存在正常细胞和肿瘤细胞, 一般光学显微镜下很难区分这两种细胞。如膀胱癌细胞的检测中对脱落细胞弹性进行测定, 其中脱落细胞中既有癌细胞, 又有正常细胞, 但光学显微镜很难辨别。目前的方法是通过特异标记物来标记细胞并在显微镜下用 AFM 的探针压痕标记的细胞。同样肿瘤细胞的细胞核较正常细胞要大, 通过 DAPI 着色后, 可通过区分图像中细胞核的大小来初步区分正常细胞和癌细胞, 然后用探针有针对性地压痕细胞。通过对细胞染色初步区分正常细胞和癌变细胞并用 AFM 探针测定细胞的弹性, 可以定量分析

正常细胞和癌变细胞弹性模量的差异。

### 参考文献(References)

- 1 Binnig G, Quate CF, Gerber C. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett* 1986; 56(9): 930-3.
- 2 Henderson E, Haydon PG, Sakaguchi DS. Actin filament dynamics in living glial cells imaged by atomic force microscopy. *Science* 1992; 257(5078): 1944-6.
- 3 Moy VT, Florin EL, Gaub HE. Intermolecular forces and energies between ligands and receptors. *Science* 1994; 266(5183): 257-9.
- 4 Dammer U, Hegner M, Anselmetti D, Wagner P, Dreier M, Huber W, *et al.* Specific antigen/antibody interactions measured by force microscopy. *Biophys J* 1996; 70(5): 2437-41.
- 5 Radmacher M, Fritz M, Kacher CM, Cleveland JP, Hansma PK. Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope. *Biophys J* 1996; 70(1): 556-67.
- 6 Solon J, Levental I, Sengupta K, Georges PC, Janmey PA. Fibroblast adaptation and stiffness matching to soft elastic substrates. *Biophys J* 2007; 93(12): 4453-61.
- 7 Rotsch C, Radmacher M. Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an atomic force microscopy study. *Biophys J* 2000; 78(1): 520-35.
- 8 Barbee KA, Davies PF, Lal R. Shear stress-induced reorganization of the surface topography of living endothelial cells imaged by atomic force microscopy. *Circ Res* 1994; 74(1): 163-71.
- 9 Lekka M, Laidler P, Gil D, Lekki J, Stachura Z, Hryniewicz AZ. Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy. *Eur Biophys J* 1999; 28(4): 312-6.
- 10 Li QS, Lee GY, Ong CN, Lim CT. AFM indentation study of breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 374(4): 609-13.
- 11 Cross SE, Jin YS, Rao J, Gimzewski JK. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nat Nanotechnol* 2007; 2(12): 780-3.
- 12 Burnham NA, Chen X, Hodges CS, Matei GA, Thoreson EJ, Roberts CJ, *et al.* Comparison of calibration methods for atomic-force microscopy cantilevers. *Nanotechnology* 2003; 14(1): 1-6.
- 13 Sader JE, Larson I, Mulvaney P, White LR. Method for the calibration of atomic-force microscope cantilevers. *Rev Sci Instrum* 1995; 66(7): 3789-98.
- 14 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): 921-6.
- 15 Dimitriadis EK, Horkay F, Maresca J, Kachar B, Chadwick RS. Determination of elastic moduli of thin layers of soft material using the atomic force microscope. *Biophys J* 2002; 82(5): 2798-810.
- 16 Costa KD, Sim AJ, Yin FC. Non-Hertzian approach to analyzing mechanical properties of endothelial cells probed by atomic force microscopy. *J Biomech Eng* 2006; 128(2): 176-84.
- 17 Carl P, Schillers H. Elasticity measurement of living cells with an atomic force microscope: data acquisition and processing. *Pflugers Arch* 2008; 457(2): 551-9.
- 18 Lam WA, Rosenbluth MJ, Fletcher DA. Chemotherapy exposure increases leukemia cell stiffness. *Blood* 2007; 109(8): 3505-8.
- 19 Na S, Trache A, Trzeciakowski J, Sun Z, Meininger GA, Humphrey JD. Time-dependent changes in smooth muscle cell stiffness and focal adhesion area in response to cyclic equibiaxial stretch. *Ann Biomed Eng* 2008; 36(3): 369-80.
- 20 Sokolov I, Iyer S, Woodworth CD. Recovery of elasticity of aged human epithelial cells *in vitro*. *Nanomedicine* 2006; 2(1): 31-6.

## Effect of DAPI Stain on Elastic Properties of A549 Cells

Zhi-Yi Ye\*, Li Zhang, Xia Fan

(Key Laboratory of Biorheological Science and Technology (Chongqing University), Ministry of Education, Bioengineering College, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

**Abstract** Mechanical properties of living cell can be determined by using atomic force microscopy (AFM). In this study, the A549 cells line and A549 cell line which was dyed by DAPI were measured by AFM. Here we report the effect of DAPI on the A549 cell mechanical properties. Cells were incubated with DAPI, and individual cell stiffness was tracked with AFM. We used AFM to measure quantitatively the local mechanical properties of A549 cells. To get quantitative information on sample elasticity, forces vs. indentation curves were got. The curves were then fitted with the Hertz model, yielding Young's modulus values of  $3.21 \pm 1.73$  kPa and  $3.66 \pm 2.08$  kPa for the A549 cell and similar cell dyed by DAPI, respectively. There was no significant difference between the A549 cell and the similar cell dyed by DAPI stain. These observations suggest that DAPI will not lead to the change of cell's stiffness.

**Key words** atomic force microscopy; Young's modulus; DAPI stain

Received: November 9, 2009 Accepted: January 25, 2010

This work was supported by the Natural Science Foundations of China (No.30570453), the Program of Introducing Talents of Discipline to Universities "111" Project (B06023)

\*Corresponding author. Tel: 86-23-65112452, E-mail: zzybioafm@163.com