

QCM与光学显微镜共同应用于研究细胞-细胞相互作用对细胞-基质黏附的影响

黄靓圆^{1,2} 周铁安^{1,2*} 谭成方^{1,2} 潘炜松^{1,2} 李文蔚^{1,2}

(¹湖南农业大学细胞力学与生物传感研究所, 长沙 410128; ²湖南农业大学生物科学技术学院, 长沙 410128)

摘要 细胞-基质黏附是一个动态而复杂的过程。在细胞培养与伤口愈合等细胞集体迁移过程中, 细胞不同密度或细胞-细胞间不同相互作用势必影响细胞-基质间黏附, 可有关这种影响的动态研究尚少。石英晶体微天平技术以细胞群为研究对象, 能够实时监测细胞与传感元件表面之间的黏附相互作用及细胞黏弹性变化。该文通过培养不同细胞数目以模拟细胞-细胞间不同相互作用, 将QCM技术与光学显微镜技术共同应用于研究人脐静脉内皮细胞细胞-细胞相互作用对细胞-基质间黏附的影响。结果显示, 细胞-细胞间相互作用对细胞黏附的影响不具有单调性, 需分强度范围讨论。当细胞-细胞间相互作用处于较弱范围时, 细胞-细胞间相互作用可促进细胞铺展和细胞黏着斑的形成, 最终强化细胞黏附, 而强劲细胞-细胞间相互作用会约束细胞铺展, 减小黏着斑面积, 细胞黏附因此减弱。

关键词 石英晶体微天平; 光学显微镜; 细胞-细胞相互作用; 细胞-基质黏附; 人脐静脉内皮细胞

Study on Effect of Cell-Cell Interaction on Cell-Substrate Adhesion Using QCM and Optical Microscope

HUANG Jingyuan^{1,2}, ZHOU Tian^{1,2*}, TAN Chengfang^{1,2}, PAN Weisong^{1,2}, LI Wenwei^{1,2}

(¹Cell Mechanics and Biosensing Institute, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

²College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract Cell-substrate adhesion is a dynamic and complex process. During normal cell culture and in the process of collective cell migration such as wound healing, different cell density or cell-cell interactions would affect cell-substrate adhesion, but there are few studies on this dynamic effect. Quartz crystal microbalance (QCM) is an efficient tool that can monitor the adhesion interaction between cells and the sensor surface and the dynamic change in cells' viscoelasticity. In this paper, by culturing different cell numbers to simulate different cell-cell interactions, QCM technology and optical microscopy were used together to study the effect of cell-cell interaction on cell-matrix adhesion in human umbilical vein endothelial cells. The results show that the effect of cell-cell interactions on cell adhesion is not monotonic and should to be discussed in terms of the degrees of cell-cell interactions. When cell-cell interactions are in a weaker range (10 000 to 40 000 cells), cell-cell interactions promote cell spreading and the formation of focal adhesion, ultimately enhance cell adhesion; while strong cell-cells inter-interactions

收稿日期: 2019-04-04 接受日期: 2019-06-10

国家自然科学基金(批准号: 21275048、31741045)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0731-84635087, E-mail: tieanzhou@hunau.edu.cn

Received: April 4, 2019 Accepted: June 10, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.21275048, 31741045)

*Corresponding author. Tel: +86-731-84635087, E-mail: tieanzhou@hunau.edu.cn

网络出版时间: 2019-09-30 12:11:12 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190930.1131.018.html>

(60 000 to 80 000 cells) restrain cell spreading, reduce the area of focal adhesions, and thus weaken cell-substrate adhesion.

Keywords quartz crystal microbalance; optical microscope; cell-cell interaction; cell-substrate adhesion; human umbilical vein endothelial cells

细胞-基质黏附是一个动态的过程。首先细胞与基质接触,松散附着于基质表面,接着细胞开始铺展,同时与基质表面形成黏着斑,细胞-基质间相互作用开始发挥作用,最后细胞形成黏着斑复合体(focal adhesion complexes, FAs),这一复合体连接了细胞外基质(extracellular matrix, ECM)和胞内肌动蛋白丝,细胞通过该结构固定于基质表面^[1]。同时细胞在基质上的黏附、铺展行为又是一个复杂的过程^[2]。由于细胞并非单独存在,其往往形成细胞群,甚至细胞单层,因此细胞与基质之间的黏附不仅受细胞-基质相互作用的影响,同时还可能有细胞-细胞间相互作用对其产生效果。有研究表明,单细胞和细胞单层在基质上的黏附表现不同,单细胞由于仅受细胞-基质相互作用的影响而黏附更为自由,而单层细胞则受到细胞-细胞相互作用及细胞-基质相互作用共同约束^[3]。细胞-细胞间相互作用与细胞-基质间相互作用可能存在竞争关系。有研究表明,细胞单层形成的黏着斑面积更小,细胞-基质相互作用更弱,而其细胞-细胞间联接更为紧密,因此细胞-细胞间相互作用更强^[4]。

在细胞培养与伤口愈合等细胞集体迁移过程中,细胞既与基质耦合,也跟相邻细胞联接^[5],因此了解细胞-细胞间相互作用与细胞-基质间相互作用的关系也应视为细胞黏附研究中至关重要的一环。目前关于细胞-细胞间相互作用如何动态影响细胞-基质间黏附研究尚少。石英晶体微天平技术(quartz crystal microbalance, QCM)主要以细胞群为研究对象,是一种无损的细胞传感器,既能实时监测细胞与传感元件表面之间的黏附相互作用^[1],也能用于研究细胞-细胞间相互作用。Sauerbrey^[6]提出, QCM频率变化(即频移)与质量成正比,在此基础上Wegener等^[7]认为, QCM可应用于细胞黏附和铺展过程的监测和定量,并表示QCM频移与细胞种类有关。有大量的研究聚焦于QCM研究细胞-基质黏附。Redepenning等^[8]研究了新生大鼠颅骨成骨细胞的黏附,认为晶体表面覆盖率与其频率变化存在线性关系。Li等^[9]研究了人皮肤成纤维细胞的黏附,并提出

晶体的电阻变化可能与肌动蛋白骨架的破坏有关。Tan等^[10]研究了细胞黏附过程表面应力的产生及晶体表面粗糙度及对细胞黏附的影响,结果表明,粗糙表面更利于细胞黏附和生长,且基于QCM的表面应力测量能够显示肝正常细胞和肝癌细胞之间的黏附性能差异,此外正常肝细胞引起的表面应力也明显高于细胞附着期肝癌细胞引起的应力。Zhou等^[11]研究了癌细胞在QCM的黏附,并提出细胞黏弹性指数(cell viscoelastic index, CVI)用于描述细胞黏弹性状态。Zhou等^[12]还实时监测了大鼠心肌细胞在QCM上的黏附及其收缩特性。以上研究均利用了传感器的特性来检测液体中的质量变化及生物层黏弹性差异,并提供细胞行为的实时信息^[13]。Marx等^[14]发现, QCM的频移及动态电阻响应可能与黏附细胞的数目存在一定的定量关系,而Chen等^[15]的最新研究也证明,接种细胞的数目越多, QCM-D的耗散响应越大。鲍冬芹等^[16]发现,细胞密度不同,细胞黏弹性也有所不同。以上研究均说明了QCM用于研究细胞-细胞间相互作用的可行性。

本文通过培养不同细胞数目以模拟不同细胞-细胞间相互作用,将QCM技术与光学显微镜技术共同应用于研究不同细胞-细胞相互作用对细胞-基质间黏附的影响,以期细胞-基质间黏附的力学性能研究提供一定的可靠依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

人脐静脉内皮细胞HUVVEC购自上海奥陆生物科技有限公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国Gibco公司;DMEM培养基购自Hyclone公司;磷酸缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)购自Sangon Biotech(上海)公司;青-链霉素混合液(100×)和胰蛋白酶购自美国Solarbio公司;浓硫酸、双氧水、无水乙醇(分析纯)均购自国药集团化学试剂有限公司;实验用水为Millipore Milli-Q超纯水;纤连蛋白(fibronectin, FN)、三乙二醇单-11-巯基十一烷基醚(triethylene glycol mono-11-mercaptoundecyl

ether, TGME)、3-巯基丙酸(1-mercaptopropionic acid, MPA)、*N*-羟基丁二酰亚胺(*N*-hydroxysuccinimide, NHS)、*N*-(3-二甲基氨基丙基)-*N'*-乙基碳二亚胺盐酸盐 [*N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC)]购自美国Sigma公司。

QCA922八通道石英晶体微天平及被金电极(电极直径5.0 mm) 9 MHz石英晶体购自Seiko-EG&G公司。CO₂恒温培养箱购自德国Binder公司。CountessTM自动计数仪购自美国Invitrogen公司。Lumascop720荧光显微镜购自美国Etaluma公司。Millipore Milli-Q Reference超纯水系统购自美国Millipore公司。DL-120超声清洗仪购自洁康公司。细胞面积通过ImageJ软件计算获得。

1.2 金(Au)电极的预处理

将金电极先用无水乙醇、去离子水清洗,氮气吹干;然后用Piranha溶液(30% H₂O₂:H₂SO₄=1:3, V/V, 80 °C)处理30 s;再用去离子水、无水乙醇清洗,氮气吹干;重复3次。将无水乙醇滴到金电极上静置几分钟,用灭菌水冲洗,氮气吹干,备用。

FN-MPA/TGME/Au传感界面的制备:传感界面的优化是QCM细胞传感器的关键所在。修饰细胞黏附分子于界面上可提高细胞与界面之间的黏附程度,其中FN是常用的细胞黏附分子^[17]。物理吸附和化学修饰是两种常用的界面优化手段。Kandel等^[18]认为,在化学修饰下的FN(chemFN)比物理吸附的FN(physFN)更为稳定。本文在Veiseh等^[19]研究成果的基础上稍作修改,构建一种以QCM金电极为

基质的选择性细胞黏附界面。

FN可与细胞膜表面的整合素发生特异性结合,而含寡乙二醇的TGME可抑制细胞非特异性吸附,将两者结合修饰于界面上即可保证界面变化仅由具选择性黏附的细胞决定,从而进行更为精准的定量分析。TGME含有巯基(-SH),可通过自组装方式直接移接至金电极上,而FN作为一种蛋白并不能直接化学修饰于金电极界面,因此需先将含有巯基的MPA自组装于金电极表面,随后将MPA的羧基(-COOH)与FN上的氨基(-NH₂)结合形成酰胺键,以此达到化学修饰FN的目的(图1)。

FN-MPA/TGME/Au传感界面的制备在常温(20±5) °C下进行。将预处理过的金电极石英晶体组装到Teflon井型池中,清洗的一面与Teflon井型池底部形成一空气室。连接QCM922通道,置于20 mmol/L MPA+1 mmol/L TGME(无水乙醇为溶剂)的混合溶液中,避光修饰过夜(>15 h)后吸出溶液,依次使用无水乙醇、去离子水清洗,氮气吹干。将150 mmol/L EDC+30 mmol/L NHS(pH5.5)PBS混合溶液加入池中,避光活化约30 min后依次用PBS缓冲液(pH5.5)、去离子水清洗,氮气吹干。向池中加75%乙醇溶液,灭菌15 min。加入20 μg/mL的FN溶液(pH8.2, FN溶于PBS缓冲溶液),避光修饰4 h后吸出溶液,分别用灭菌后的PBS(pH=8.2)、无菌水冲洗,即得到FN-MPA/TGME/Au传感界面。

1.3 HUVEC在QCM上的黏附

实验前,细胞预先培养于含有10% FBS及1%青-链霉素混合液的DMEM培养基中,培养条件为5% CO₂、37 °C。实验当天,取400 μL含1% FBS及1%青-链霉素混合液的DMEM培养基,加入QCM测试池中,QCM采集数据4 h。之后移去200 μL培养基,加入200 μL细胞数目分别为10 000、20 000、40 000、60 000、80 000个的细胞悬浮液,QCM连续监测15 h以上。实验过程环境条件为5% CO₂、37 °C。

1.4 细胞铺展面积获取及计算

将生长状态良好的细胞接种至48孔板中,选取五孔(孔直径为5.1 mm)分别加入细胞数目为10 000、20 000、40 000、60 000、80 000个的细胞悬浮液,加入含10% FBS及1%青-链霉素混合液的DMEM培养基培养,培养条件为5% CO₂、37 °C。Lumascop720每隔0.5 h采集一次细胞形貌图像,动态采

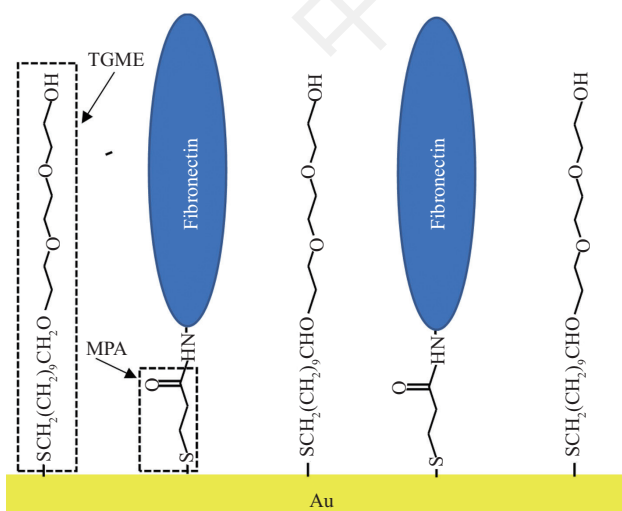


图1 FN-MPA/TGME/Au传感界面示意图

Fig.1 Illustration of the FN-MPA/TGME/Au sensing interface

集15 h以上。ImageJ处理细胞形貌图像, 首先将图片格式调整为8 bit, 接着在软件中输入标尺真实尺寸 (scale bar=50 μm), 之后调整图片阈值使图片转化为仅有黑白两色的黑白图, 设置斑点最小尺寸为100 nm以过滤过小的斑点。以上步骤设置完毕后即可通过ImageJ获得细胞铺展面积大小。

1.5 细胞黏弹性指数的计算

Marx^[20]指出就纯弹性质量而言, 其在QCM上的行为可引起频率下降而无耗散变化, 就纯牛顿液体而言, 频率与耗散变化分别符合Kanazawa方程^[21]和Muramatsu方程^[22], 两者均与黏密度呈线性关系。此时对9 MHz晶体, 溶液黏密度引起的频移(Δf)与动态电阻变化(ΔR)的比值为常数, 其值为 $10.1^{[10]}$ 。值得指出的是, 细胞作为一种黏弹性材料, 其黏附过程的 ΔR 与 Δf 关系并非简单介于纯弹性与纯牛顿液体之间^[23]。目前仍无一种基于QCM技术描述细胞力学行为的完整理论模型。Zhou等^[11]研究了多种癌细胞在QCM金涂层界面上的黏附, 并提出细胞黏弹性指数(CVI)用于描述细胞黏弹性状态。其计算公式如下:

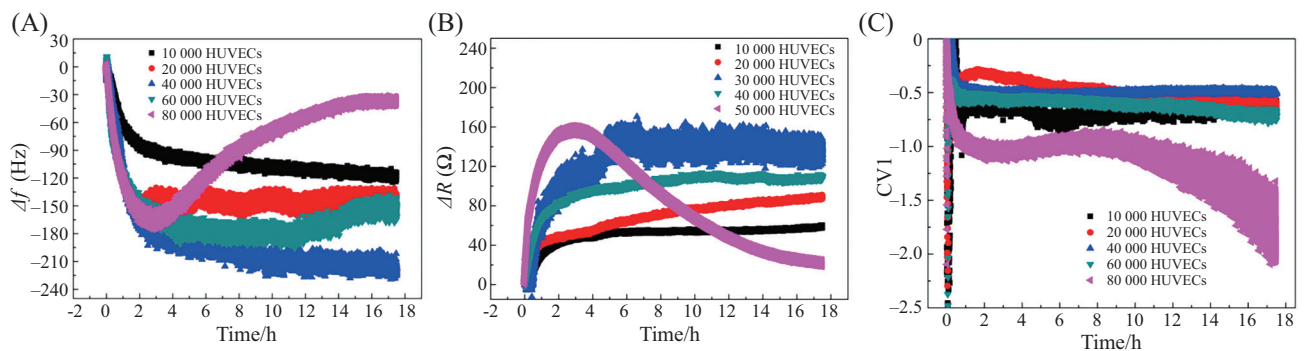
$$\text{CVI} = \frac{\Delta R}{f} \quad (1)$$

Δf 为每一时间点频率(f_t)相对于初始频率(f)的差值, ΔR 为每一时间点(R_t)相对于初始动态电阻(R)的差值。 Δf 与材料质量成正比, 而 R 与表面耗散能有关, 因此CVI可看成每单位质量的耗散能变化。细胞在QCM上的黏附常引起负频移(即符号为负), 所以其CVI符号为负。CVI数值愈小, 细胞弹性愈小(或其胞内结构愈松散), 细胞越软。本文采用CVI对细胞黏弹性进行半定量表征。

2 结果

图2A和图2B展示了各浓度HUVECs黏附于QCM上引起的频移(f)和动态电阻变化(R)。如图所示, 各数目HUVEC在QCM上的铺展黏附行为均引起晶体频率下降, 动态电阻上升, 并最终趋于平稳, 但各数目引起的变化情况仍有所不同: (1)在10 000至40 000范围内, 随着细胞数目的增加而增加, 最终 Δf 值分别为 -117.7 ± 2.3 Hz、 -151.1 ± 2.6 Hz、 -216.1 ± 3.6 Hz, 最终 ΔR 值分别为 58.2 ± 2.5 Ω 、 89.1 ± 4.1 Ω 、 137.3 ± 2.1 Ω ; (2)当细胞数目为60 000和80 000时, 频率在3 h内迅速下降至最低, 动态电阻也在同时段内迅速上升至最大值, 然而在保持一定动态稳定阶段后, 二者逐渐回缩, 且回缩程度随细胞数目增加而增加, 80 000开始回缩时间最早, 最终 f 值分别为 -152.9 ± 5.1 Hz、 -38.6 ± 4.2 Hz, 最终 R 值分别为 109.4 ± 2.5 Ω 、 19.1 ± 3.1 Ω 。图1C展示了各数目HUVECs黏附过程中CVI的变化情况。在10 000至40 000范围内, CVI迅速向0靠近并趋于稳定, 而且细胞数目越多, CVI越靠近0, CVI的最终值分别为 -0.64 ± 0.11 、 -0.59 ± 0.12 、 -0.49 ± 0.12 , 这说明整个黏附过程中, 细胞总体趋势为变硬, 且存在较弱的细胞-细胞相互作用对细胞有促进变硬的趋势。而当细胞数目为60 000时, CVI在保持了一段时间稳定后开始下降, CVI最终值为 -0.71 ± 0.14 , 而细胞数目为80 000个时, CVI保持了将近6 h的稳定, 而后CVI又继续远离0, CVI的最终值分别为 -2.03 ± 0.21 , 这说明细胞维持一段时间后逐渐变软。

图3A~图3E展示了各数目细胞黏附15 h后的细胞形态。如图所示, 10 000至40 000范围内, 细



A: 不同细胞数目对 f 的影响; B: 不同细胞数目对 R 的影响; C: 不同细胞数目对CVI的影响。

A: effect of different cell numbers on f ; B: effect of different cell numbers on R ; C: effect of different cell numbers on CVI.

图2 不同细胞数目对QCM原始响应(f 和 R)与CVI的影响

Fig.2 Effect of different cell numbers on QCM responses (f , R) and CVI

胞与细胞之间间隙较大,此时细胞-细胞相互作用是较弱,而60 000和80 000时,细胞与细胞之间排列紧凑,此时细胞-细胞相互作用较强。本文通过ImageJ获取整个过程各数目的细胞铺展面积变化情况(图3F)。在10 000至40 000内,细胞在前期0~3 h内面积逐渐增大,而后期则无明显增大或减小的趋势,各数目细胞的铺展面积最终变化值分别为 $3\,618.0\pm 20.3\ \mu\text{m}^2$ ($N=128$)、 $4\,013.0\pm 10.2\ \mu\text{m}^2$ ($N=156$)、 $4\,302.0\pm 16.2\ \mu\text{m}^2$ ($N=178$)。当细胞数目为60 000时,细胞铺展面积在前期迅速铺展,至12 h时又有所收缩,最终面积为 $3\,425.0\pm 13.4\ \mu\text{m}^2$ ($N=210$)。当细胞数目为80 000时,细胞铺展面积先是连续增加,而后在5 h时细胞面积开始减小,至14 h后面积无明显变化,铺展面积最终变化值为 $3\,211.0\pm 23.1\ \mu\text{m}^2$ ($N=259$)。

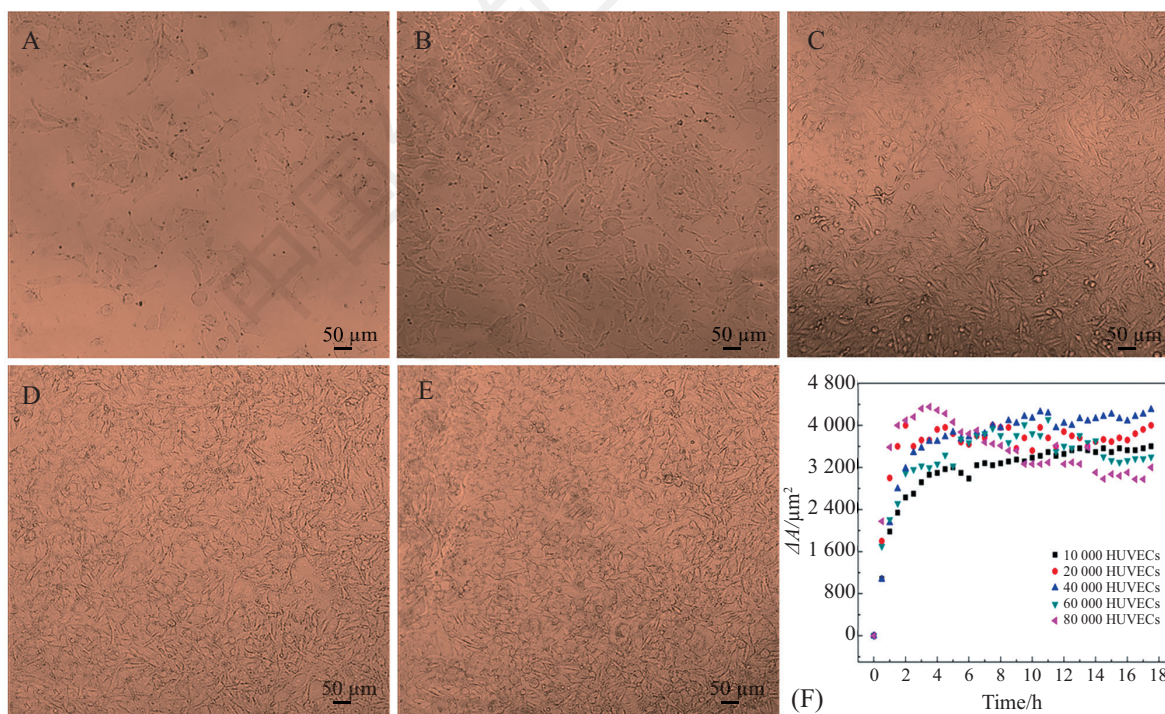
图4A~图4E展示了各数目(A: 10 000; B: 20 000; C: 40 000; D: 60 000; E: 80 000) HUVECs的 Δf 与 ΔA 间关系。有文献指出材料引起的频移与其铺展面积之间存在一定相关性^[7-8,24-27],本文统计了各数目 Δf 与 ΔA ,并通过线性拟合出各曲线的斜率。如图所示,各数目的 Δf 与 ΔA 之间存在明显的线性关系,10 000至

80 000范围内的线性斜率分别为0.033、0.038、0.050、0.043、0.042。

3 讨论

细胞-基质黏附是一种力学过程,细胞在基质上的黏附最主要的驱动力来自细胞-基质间相互作用,而细胞-细胞间相互作用可与其竞争,从而影响细胞-基质黏附。本文培养不同细胞数目以模拟不同细胞-细胞间相互作用,将QCM技术与光学显微镜技术共同应用于研究不同细胞-细胞相互作用对细胞-基质间黏附的影响。

本文 f 可用于反应细胞黏附程度, f 数值越大说明细胞-基质间黏附程度越紧密。从图2A结果来看,细胞-细胞间相互作用对细胞黏附的影响取决于细胞数目,当细胞数目 $\leq 40\,000$ 、细胞-细胞间相互作用处于较弱范围时,细胞-基质间黏附作用增强, f 数值也相应增加;而当细胞数目 $\geq 40\,000$ 、细胞-细胞间相互作用处于强而有力的范围时, f 数值反而随作用增强而减小。有文献指出,细胞-细胞间相互作用在细胞铺展和黏附的初期表现出协同作用^[14]。结合

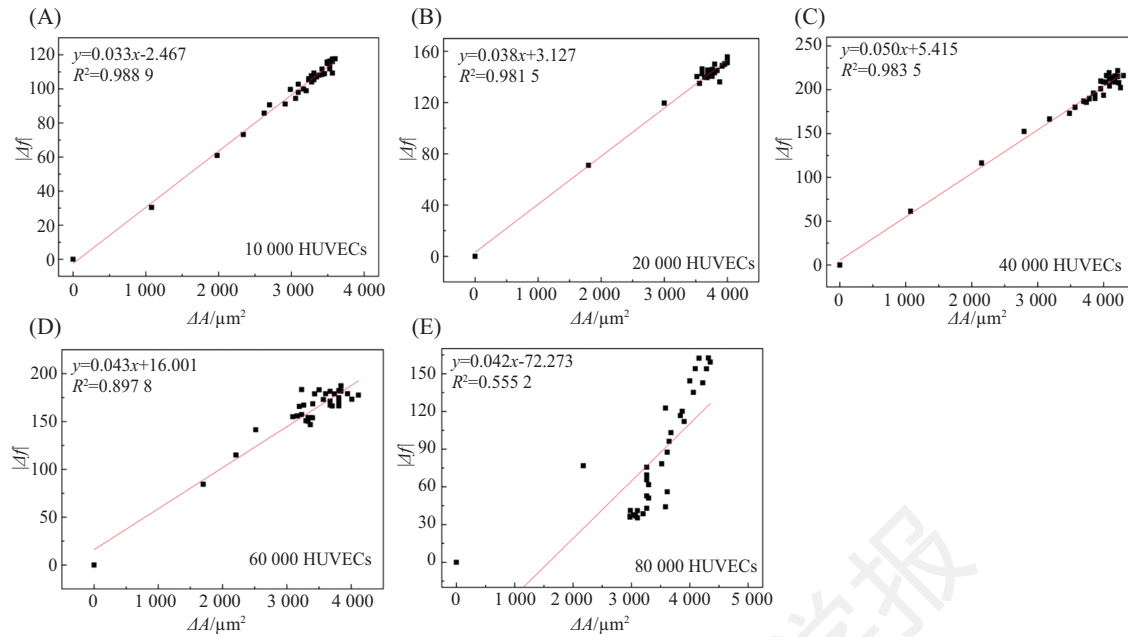


A: 10 000 HUVECs; B: 20 000 HUVECs; C: 40 000 HUVECs; D: 60 000 HUVECs; E: 80 000 HUVECs; F: 细胞铺展面积变化曲线图。

A: 10 000 HUVECs; B: 20 000 HUVECs; C: 40 000 HUVECs; D: 60 000 HUVECs; E: 80 000 HUVECs; F: dynamic changes of cell spreading area under different cell numbers.

图3 不同细胞数目下细胞铺展面积变化

Fig.3 Changes of cell spreading area under different cell numbers



A: 10 000 HUVECs; B: 20 000 HUVECs; C: 40 000 HUVECs; D: 60 000 HUVECs; E: 80 000 HUVECs.

图4 不同细胞数目下 Δf - ΔA 线性拟合图

Fig. 4 Relationships between Δf and ΔA with different cell numbers

本文结果, 我们认为图2A可能是因为较弱的细胞-细胞间相互作用可促进细胞的向外铺展, 从而刺激细胞黏着斑的形成, 最终增强细胞黏附, 而强劲的细胞-细胞间相互作用会约束细胞铺展, 减小黏着斑面积, 细胞黏附因此减弱。

有文献指出, 当细胞形成小群体但未形成单层时, 细胞与基底所形成的黏着斑加强、细胞变硬, 即此时细胞-细胞黏附对细胞-基底黏附影响很小。而细胞单层由于强的细胞-细胞黏附而将削弱细胞与基底之间的黏附, 细胞变软^[4]。Schierbaum等^[28]发现, 当MCF10A细胞从稀疏密度向成簇密度转变时, 其黏弹性行为的变化反映了肌动蛋白细胞骨架重塑成厚应力纤维束, 排列紧密的正常细胞硬度更大, 流动性更低。CVI能跟踪细胞骨架的聚合与解聚, 黏着斑的动态变化, 因而能用于研究细胞-基质和细胞-细胞两种相互作用, 同时也能衡量表征细胞软硬程度。图2C说明, 在10 000至40 000范围内, CVI在1 h内迅速向0靠近, 细胞CVI的最终值随着细胞数目的增加而逐渐靠近0, 这说明较弱的细胞-细胞相互作用对细胞有促进变硬的可能性。而当细胞数目为60 000和80 000个时, CVI最终值随着数目的增加而远离0, 这说明过强的细胞-细胞间相互作用可导致细胞变软。细胞的黏弹性与细胞-

基质黏附时的细胞骨架结构有关, 以上CVI变化结果说明较强的细胞-细胞间相互作用可能促使细胞骨架结构发生改变, 因而影响到细胞黏附时的黏弹性。

细胞-细胞间相互作用对细胞铺展面积也有影响。本文图3结果表明, 细胞-细胞间相互作用处于较弱范围时, 铺展面积随着作用增强而增加, 而细胞-细胞间相互作用特别强时, 铺展面积反而受其束缚。有文献报导, 处于单层的细胞铺展面积小于单个细胞, 而处于群体中的细胞面积则处于两者之间^[29,4], 本文结果与之一致。

为更好地定量比较细胞-细胞间相互作用对细胞黏附的影响, 本文用A与f作图, 并拟合曲线斜率, 斜率结果显示细胞-细胞间相互作用不同, 斜率也有明显不同。细胞在QCM上引起的频移与其铺展面积之间存在正比关系, 曲线斜率与细胞黏附程度有关。本文结果表明, 10 000至40 000范围内, 斜率随细胞数目增加而增大, 而细胞数目增至60 000后斜率反而减小, 这可能是因为细胞-细胞间相互作用影响细胞铺展面积和黏着斑。

综上所述, 细胞-细胞间相互作用对细胞黏附的影响不具有单调性, 需分强度范围讨论。当细胞-细胞间相互作用处于较弱范围(10 000~40 000)时,

细胞-细胞间相互作用可促进细胞铺展和细胞黏着斑的形成, 最终强化细胞黏附, 而强劲细胞-细胞间相互作用(60 000~80 000)会约束细胞铺展, 减小黏着斑面积, 细胞黏附因此减弱。了解细胞-细胞间相互作用与细胞-基质黏附两者之间的关系在生物学领域中具有重要意义, 诸如伤口愈合、血管屏障和细胞团迁移等功能和过程均涉及到两者间的动态相互影响, 本文结果对上述生物学现象的研究具有积极的推动意义。

参考文献 (References)

- Chen JY, Penn LS, Xi J. Quartz crystal microbalance: sensing cell-substrate adhesion and beyond. *Biosens. Bioelectron* 2018; 99: 593-602.
- Janshoff A, Kunze A, Michaelis S, Heitmann V, Reiss B, Wegener J. Cell adhesion monitoring using substrate-integrated sensors. *J Adhes Sci Technol* 2010; 24(13/14): 2079-104.
- Lauffenburger DA, Griffith LG. Who's got pull around here? Cell organization in development and tissue engineering. *Proc. Natl Acad Sci* 2001; 98(8): 4282-4.
- Stroka KM, Aranda-Espinoza H. Effects of morphology vs. cell-cell interactions on endothelial cell stiffness. *Cell Mol Bioeng* 2011; 4(1): 9-27.
- Maruthamuthu V, Sabass B, Schwarz US, Gardel ML. Cell-ECM traction force modulates endogenous tension at cell-cell contacts. *Proc. Natl Acad Sci USA* 2011; 108(12): 4708-13.
- Sauerbrey GZ. The use of quartz oscillators for weighing thin layers and for microweighing. *Z Phys A* 1959; 155: 206-22.
- Wegener J, Janshoff A, Galla HJ. Cell adhesion monitoring using a quartz crystal microbalance: comparative analysis of different mammalian cell lines. *Eur Biophys J* 1998; 28(1): 26-37.
- Redepenning J, Schlesinger TK, Mechalke EJ, Puleo DA, Bizios R. Osteoblast attachment monitored with a quartz crystal microbalance. *Anal Chem* 1993; 65(23): 3378-81.
- Li F, Wang HC, Wang QM. Monitoring cell adhesion by using thickness shear mode acoustic wave sensors. *Biosens Bioelectron* 2007; 23(1): 42-50.
- Tan L, Xie QJ, Jia XE, Guo M, Zhang Y, Tang H, *et al.* Dynamic measurement of the surface stress induced by the attachment and growth of cells on Au electrode with a quartz crystal microbalance. *Biosens Bioelectron* 2009; 24(6): 1603-9.
- Zhou T, Marx KA, Dewilde AH, McIntosh D, Brauhn SJ. Dynamic cell adhesion and viscoelastic signatures distinguish normal from malignant human mammary cells using quartz crystal microbalance. *Anal Biochem* 2011; 421(1): 164-71.
- Zhou T, Zhou Z, Zhou S, Huang F. Real-time monitoring of contractile properties of H9C2 cardiomyoblasts by using a quartz crystal microbalance. *Anal Methods* 2016; 8(3): 488-95.
- Saitakis M, Gizeli E. Acoustic sensors as a biophysical tool for probing cell attachment and cell/surface interactions. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69(3): 357-71.
- Marx KA, Zhou T, Warren M, Brauhn SJ. Quartz crystal microbalance study of endothelial cell number dependent differences in initial adhesion and steady-state behavior: evidence for cell-cell cooperativity in initial adhesion and spreading. *Biotechnol Prog* 2003; 19(3): 987-99.
- Chen JY, Pan Y, Collins TJ, Penn L, Xi N, Xi J. Examining the feasibility of a "top-down" approach to enhancing the keratinocyte-implant adhesion. *Exp Cell Res* 2019; 376: 105-13.
- 鲍冬芹, 潘炜松, 谭成方, 沈海波, 周铁安. ITO石英晶体电极上不同内皮细胞浓度的黏弹性研究及药物作用评估. *激光生物学报*(Bao Dongqin, Pan Wersong, Tan Chengfang, Shen haibo, Zhou tian. Real time monitoring of viscoelasticity of different human umbilical vein endothelial cell concentrations on ITO quartz crystal electrode and evaluation of cell-drug interactions using quartz crystal microbalance. *Acta Laser Biology Sinica* 2017; 26(3): 217-23.
- Pankov R. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* 2002; 115(20): 3861-63.
- Kandel J, Lee HS, Sobolewski P, Tomczyk N, Composto RJ, Eckmann DM. Chemically grafted fibronectin for use in QCM-D cell studies. *Biosens Bioelectron* 2014; 58: 249-57.
- Veisoh M, Veisoh O, Martin MC, Asphahani F, Zhang M. Short peptides enhance single cell adhesion and viability on microarrays. *Langmuir* 2007; 23(8): 4472-79.
- Marx KA. Quartz crystal microbalance: a useful tool for studying thin polymer films and complex biomolecular systems at the solution-surface interface. *Biomacromolecules* 2003; 4(5): 1099-120.
- Kanazawa KK, Gordon II JG. The oscillation frequency of a quartz resonator in contact with liquid. *Anal Chim Acta* 1985; 175(C): 99-105.
- Muramatsu H, Tamiya E, Karube I. Computation of equivalent circuit parameters of quartz crystals in contact with liquids and study of liquid properties. *Anal Chem* 1988; 60(19): 2142-46.
- Zhou T, Marx KA, Warren M, Warren M, Schulze H, Brauhn SJ. The quartz crystal microbalance as a continuous monitoring tool for the study of endothelial cell surface attachment and growth. *Biotechnol Prog* 2000; 16(2): 268-77.
- Gryte DM, Ward MD, Hu WS. Real-time measurement of anchorage-dependent cell adhesion using a quartz crystal microbalance. *Biotechnol Prog* 1993; 9(1): 105-8.
- Wegener J. Analysis of the composite response of shear wave resonators to the attachment of mammalian cells. *Biophys J* 2000; 78(6): 2821-33.
- Lord MS, Modin C, Foss M, Duch M, Simmons A, Pedersen FS, *et al.* Monitoring cell adhesion on tantalum and oxidised polystyrene using a quartz crystal microbalance with dissipation. *Biomaterials* 2006; 27(26): 4529-37.
- Modin C, Stranne AL, Foss M, Duch M, Justesen J, Chevallier J, *et al.* QCM-D studies of attachment and differential spreading of pre-osteoblastic cells on Ta and Cr surfaces. *Biomaterials* 2006; 27(8): 1346-54.
- Schierbaum N, Rheinlaender J, Schäffer TE. Viscoelastic properties of normal and cancerous human breast cells are affected differently by contact to adjacent cells. *Acta Biomater* 2017; 55: 239-48.
- Nelson CM. Vascular endothelial-cadherin regulates cytoskeletal tension, cell spreading, and focal adhesions by stimulating RhoA. *Mol Biol Cell* 2004; 15(6): 2943-53.