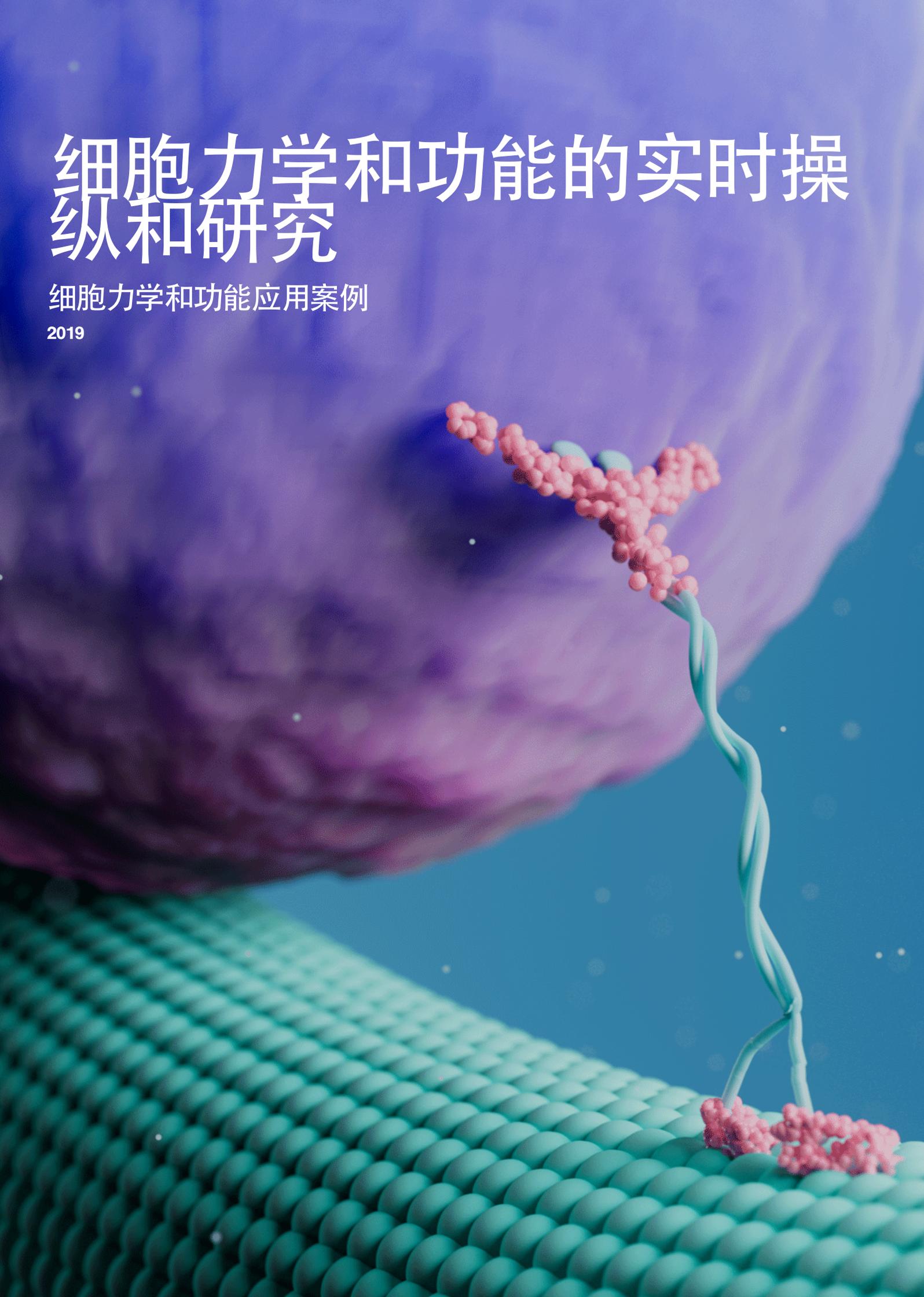


细胞力学和功能的实时操纵和研究

细胞力学和功能应用案例

2019



目录

摘要与简介	3
应用案例1：力学刺激和压力如何影响细胞膜受体的响应	4
研究背景	4
研究遇到的挑战	4
实验方案及结果	5
应用案例2：细胞伪足形成与功能相关的力学研究	6
研究背景	6
研究遇到的挑战	6
实验方案及结果	7
应用案例3：多细胞生物中液滴融合和微小细胞组分的研究	8
研究背景	8
研究遇到的挑战	8
实验方案及结果	9
总结	11
合作伙伴	11
参考文献	11

细胞力学和功能的实时操纵和研究

活细胞和组织中细胞响应的研究

细胞对来自细胞外部环境（例如受体激活和伪足形成）或者细胞内空间（小复合组织和转录）的响应具备很高的动态性能，因此研究起来非常复杂。然而，针对这些动态过程的详细理解对于旨在治疗异常细胞功能的方案的未来发展至关重要。

这些细胞过程的研究有助于我们加深对多种不同疾病的理解。例如，受损的膜受体会导致内分泌疾病，自身免疫性疾病甚至癌症[1-3]，另外一方面，对细胞外部环境的过度反应及随后的细胞迁移可以导致癌细胞转移[4]，最后细胞内或细胞外的复合物，如蛋白，可能会错误折叠形成蛋白聚集体，导致各种神经退行性疾病的发生[5]。

常规方法如荧光成像，免疫染色的常规实验及相关的量化方法可以测量细胞或细胞群之间的表型差异；然而，这些方法无法实时捕捉动态且非常短暂的细胞变化，同时测量或者施加与其生物过程相关的力学参数。

LUMICKS的光镊-共聚焦荧光&无标记显微集成系统C-Trap同时具备灵敏和动态测量两种特性，保证您能够以高时空分辨率和实时详细研究分子和细胞过程。我们的仪器具备以下三个方面的功能，使其成为力学生物学研究的理解方案：

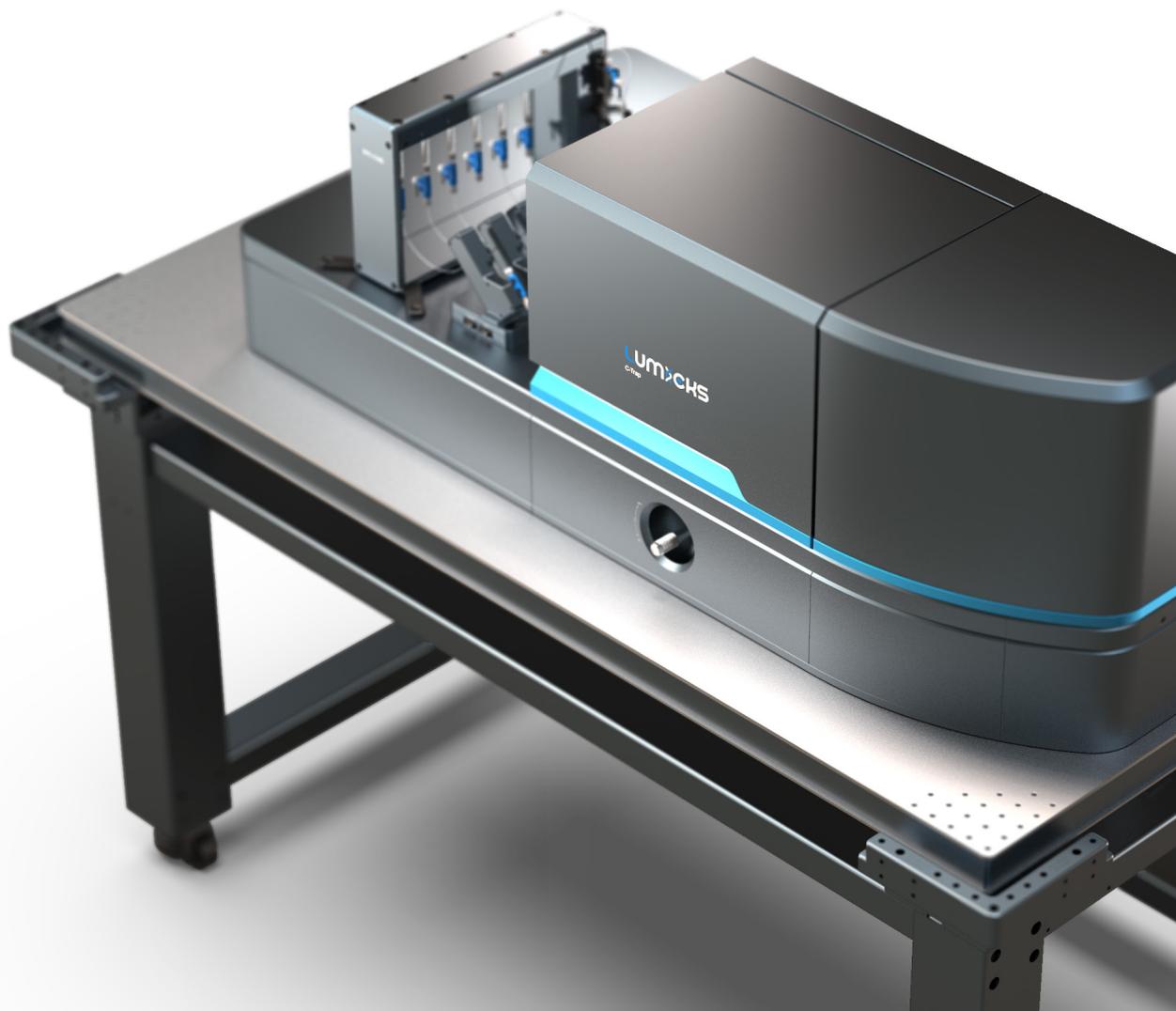
- 高性能光镊精确测量和操纵亚细胞结构的动态过程
- 高分辨多色荧光和无标记显微成像系统
- 先进的微流控系统加快实验流程

本篇应用案例主要内容

本篇应用案例为您展示在力学生物学相关的多个研究领域如何使用光镊-荧光&无标记显微集成系统，获得对细胞力学和功能的新理解。这里展示了三种不同的实验方案，在不同的体系中使用C-Trap分析细胞特性：

- 力学刺激或者压力如何影响受体的响应
- 细胞伪足的形成和功能
- 多细胞生物体中细胞液滴融合和微小细胞组分的研究

本应用案例报告是由LUMICKS与哥伦比亚大学，加州大学戴维斯分校和明尼苏达大学的实验室合作进行。



应用案例1：力学刺激和压力如何影响细胞膜受体的响应

案例背景

膜受体是一类特殊的蛋白质分子，他们通过诱导胞内信号调节下游信号通路和细胞反应（如基因转录）来响应细胞外部的变化或者信号。除抗原外，一些膜受体对力学信号非常敏感，如来自血流的剪切应力，细胞外基质的刚性或细胞间的接触（图1），这一类受体中比较典型的是Notch受体和T细胞受体[6,7]。

遇到的挑战

目前研究细胞对力学刺激响应的方法主要有两种：其一是在不同硬度的表面种植和培养细胞；其二是使用原子力显微镜、磁镊或光镊等技术进行力学原位操作。然而，大多数可用的技术都有其局限性，要求在力学刺激和来自于细胞响应的信号间找到平衡。

在不同硬度的表面种植和培养细胞，您可以模拟细胞外基质的变化，然而，细胞通常不仅仅被动的暴露于持续不断的力学刺激，它们还会承受动态和局部力学刺激。

以高度可控的力施加原位操纵的技术和方法正越来越多的用于力生物学的研究，这些技术保证研究人员能够直接的对细胞进行力学操控。然而原子力显微镜和磁镊等技术在进行力学操控时其施加力的大小及方向受到限制。

解决方案

C-Trap是具备多种功能的仪器，其将高性能光镊和多色共聚焦显微成像系统完美集成，C-Trap光镊可以在三个维度上对细胞施加力学刺激，力的范围大（0.1-1000pN），同时共聚焦显微系统能够实时探测细胞内的信号响应。因此，我们可以使用C-Trap对细胞施加较低的力学刺激，评估单个受体的响应（图2）；相反的，我们也可以施加较大的力（数百个pN）使细胞膜的曲率发生形变，这可能导致多个受体在特定位置发生聚集。

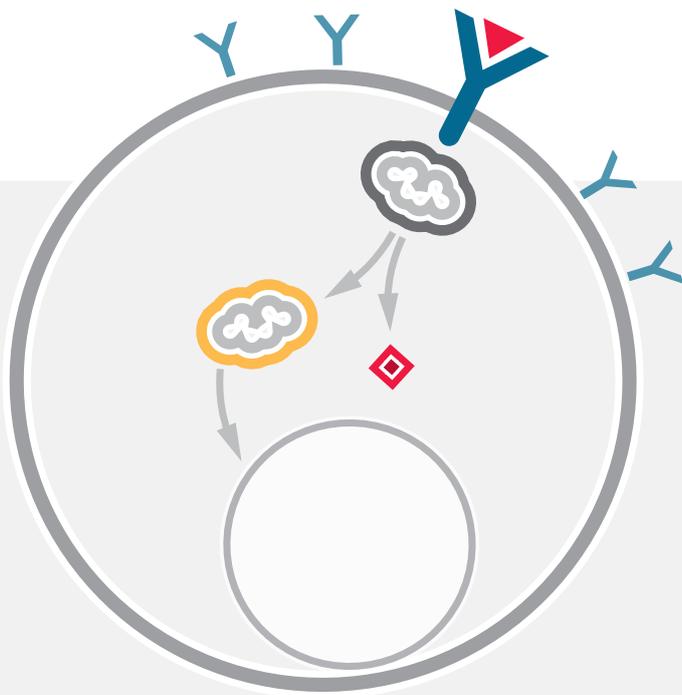


图1 力学刺激对受体蛋白影响的示意图，在免疫学、血管力学和发育生物学等领域越来越多的研究涉及到这个过程

膜受体是一类特殊的蛋白质分子，通过诱导细胞内信号对细胞外部变化做出反应，进而调节特定的细胞响应，如基因转录。

实验方案及结果

这个实验由LUMICKS和哥伦比亚大学的Javitch课题组合作共同完成。我们使用C-Trap来解析跨膜受体在力学激活后展示的特性，通过施加可控的力学刺激，实时监测细胞内反应和信号的激活。

我们使用C-Trap系统进行此次实验，首先用红外激光捕获尺寸为1.76微米、亲和素修饰的微球。之后，引导被捕获的微球靠近人HEK293细胞（图3插图1），此细胞已经事先标记了细胞质（图3中的红色信号）。

微球和细胞表面建立物理接触之后，通过施加操控力将微球从细胞表面移开（图3插图2-4）。共聚焦显微系统跟踪细胞膜和荧光信号的变化，同时我们通过测量了施加在细胞膜上的力的变化并确定了四种动态（对应于图3下图中的不同颜色）。

微球和细胞膜之间接触不会对微球产生大的力学变化，表明细胞没有推或者拉扯微球（图3中下图中的浅灰色），最初施加到微球的力不会导致受体

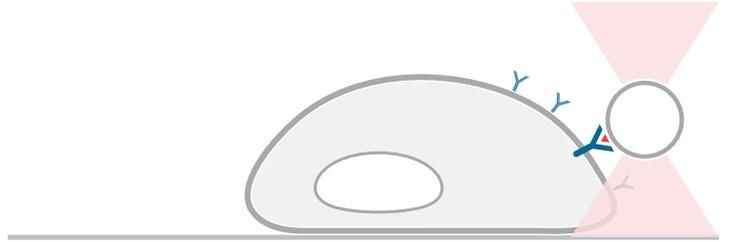


图2 光镊捕获的微球直接接触细胞及其膜受体示意图

相关的荧光信号发生显著变化（对应于图3下图中的浅蓝色）。

然而，经过多次实验，我们发现300pN以上的力（对应于图3下中的浅粉色）会导致细胞膜发生形变，并且蓝色信号在操控位点积累；随着拉伸的深入，对细胞膜施加最小作用力就足以拉出较厚的膜管（对应于图3下中的浅绿色）。

这些观察结果表明细胞膜形变与操控部位受体蛋白的局部累计存在关联性（图2-4中的蓝色信号）

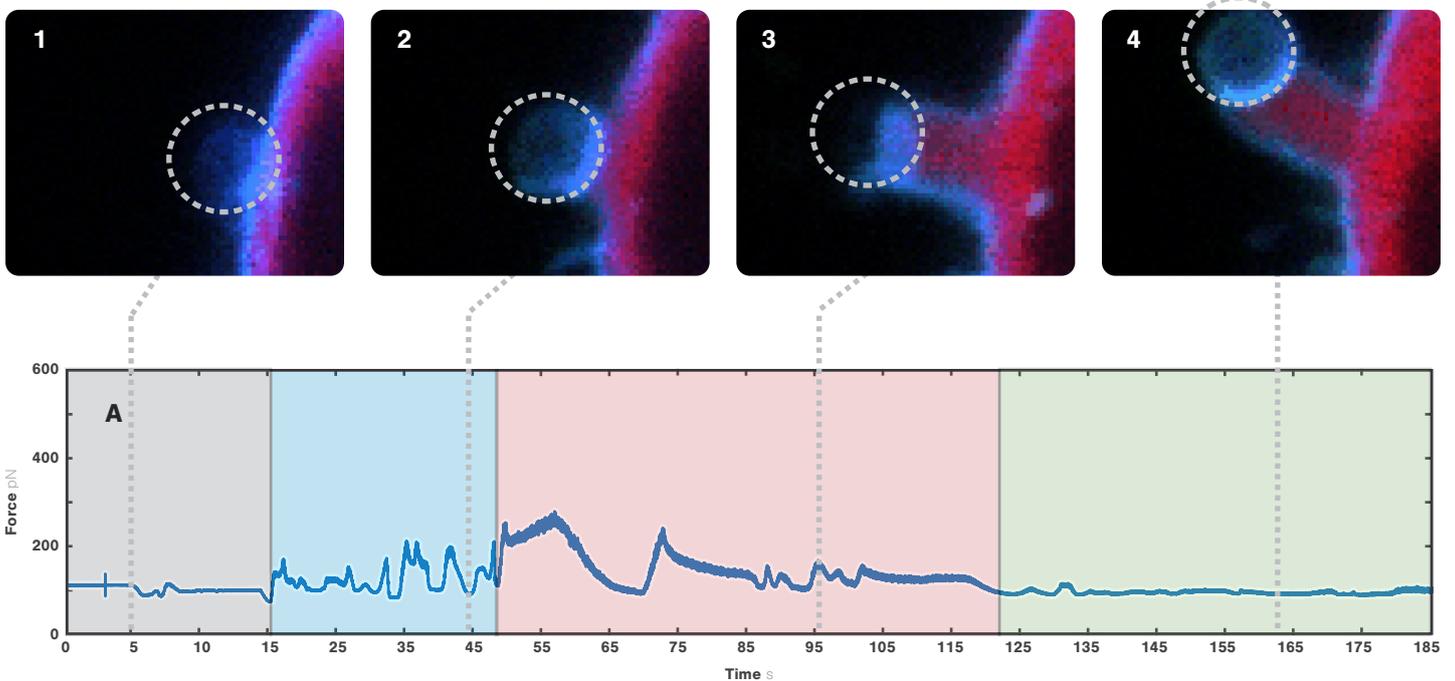


图3 活细胞力学刺激时操控位置处细胞膜的形变和受体累积。插图1-4，荧光标记的生物素化膜受体（蓝色）和细胞质标记物（红色）的共聚焦显微图像，结果显示用激光（灰色）操控PS微球后，细胞膜、受体和细胞质相关活性的变化（虚线画圈）；插图A，根据施加在细胞膜的力随时间的变化，力测量描绘了四种不同的状态

应用案例2：细胞伪足形成与功能的力学研究

案例背景

细胞伪足是某些细胞用来与其周围环境相互作用的细胞突起，细胞利用伪足通过外部和内部的拉力来感知、迁移以及与其他细胞交流（图4），突起通过肌动蛋白聚合生长，该过程有多种蛋白驱动，包括属于肌球蛋白超家族的肌动蛋白相关马达蛋白以及肌动蛋白聚合形成的蛋白质家族。

细胞伪足形成过程中产生的缺陷会改变细胞的铺展、粘附和运动。例如，细胞伪足或者伪足样突起的过度表达与转移性癌细胞的侵袭性增加密切相关。

为了进一步了解细胞伪足和伪足相关疾病的功能，我们需要研究参与突起形成的蛋白质的作用及其功能特征，例如结构的作用力。

遇到的挑战

时至今日，研究人员依然依靠着传统的光学显微镜和荧光显微镜的方法来研究细胞伪足，其常用的方法是实时跟踪细胞突起尖端的微球或蛋白质的动态行为来完成。然而，这些方法不能确定丝状伪足的形成和收缩产生的力信号的变化。考虑到细胞突起是高度动态的结构（例如，突起尖端的运动速度可以达到0.8-1 $\mu\text{m}/\text{秒}$ ）并且产生力的范围低至pN量级，因此，我们需要一种高度动态和高度灵敏的方法来满足这些实验中遇到的挑战。

解决方案

光镊与成像系统的集成，可以满足上述实验提出的要求，这是因为高性能的光镊可以在低pN范围内测量力信号的变化，同步的实时成像功能将建立力信号的变化与细胞过程的关联。该方法为我们提供了对其他难以捕捉的过程的实时测量。如细胞伪足的形成和特性。

我们可以将光镊与各种显微成像方法集成使用，例如用于抑制背景荧光的共聚焦和TIRF，用于高时间分辨的宽场成像以及无标记的成像技术IRM，由于样品操纵和成像在系统中无缝关联，我们在实时成像数据收集的同时实现最高的灵敏度、分辨率和稳定性。

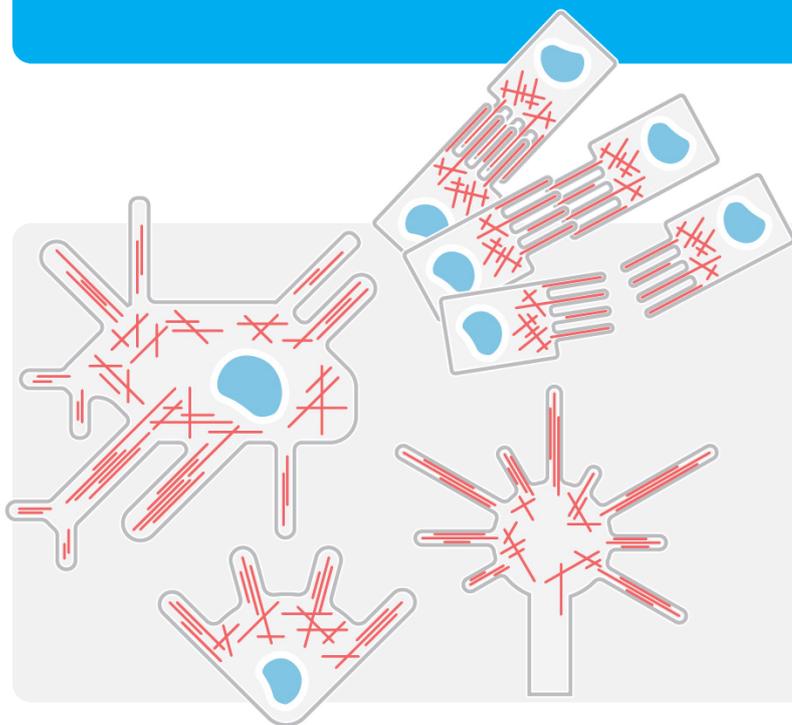


图4 细胞伪足结构及其通过肌动蛋白微丝（红色）的聚合与周围环境的相互作用示意图，显示的伪足包括：

迁移的神经元；上皮细胞层；迁移的细胞；神经元生长锥

¹全内反射荧光显微系统：仅仅激发距离界面200nm附近的荧光分子

²IRM 干涉反射显微系统，研究细胞在玻璃基底上迁移和粘附动力学的新型光学显微系统

实验方案和结果

此次实验重点介绍伪足及其形成相关的力学信号变化及其动力学过程。由LUMICKS和明尼苏达大学的Titus实验室合作完成。研究对象为盘基网柄菌细胞，一种常用于研究人类细胞过程的真核变形虫细胞和模型系统。

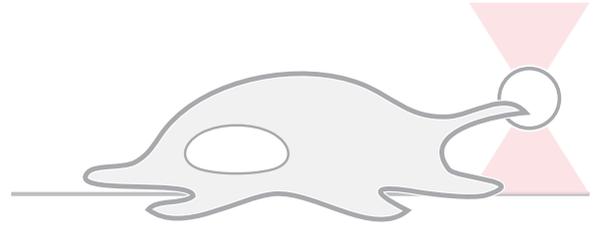


图5细胞通过细胞突起与光镊捕获的PS微球发生相互作用

首先，使用红外激光捕获尺寸为1.76微米亲水和素修饰的微球（图6，插图1-6）；第二步，移动此微球至*D. discoideum*细胞附近，异位表达的GFP标记的肌球蛋白7（蓝色）和RFP-lifeAct标记的肌动蛋白微丝（绿色信号，图6中的1-2）。荧光共聚焦的实时成像功能使我们能够观察伪足在搜索周围环境动态过程，在感知到微球的存在后，细胞向微球定向移动并伸出多个突起与其相互作用。

在追踪微球的力学信号变化（图6插图A）时，我们观察到了每次细胞吞没微球出现的特征信号（图6，插图5和6），有趣的是，我们还在微球被吞没之前发现了一个偶然出现的力学峰值（图6，插图3和4）。由于我们观察到了与微球接触的其中一个伪足的形成和回缩，我们认为该峰可能是由细胞突起和微球间的相互作用引起的。图中显示的力学信号的最大值（ ~ 20 pN，图6插图A）对应于单个突出施加在异物上的力。

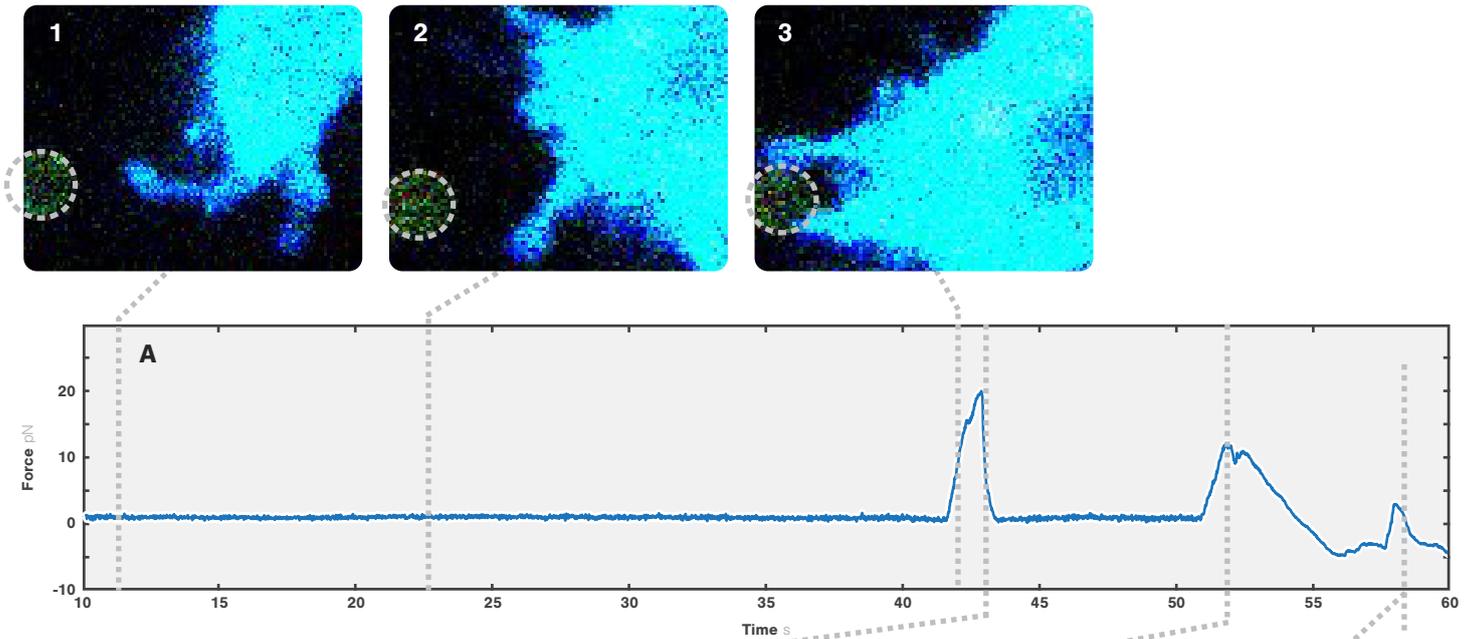
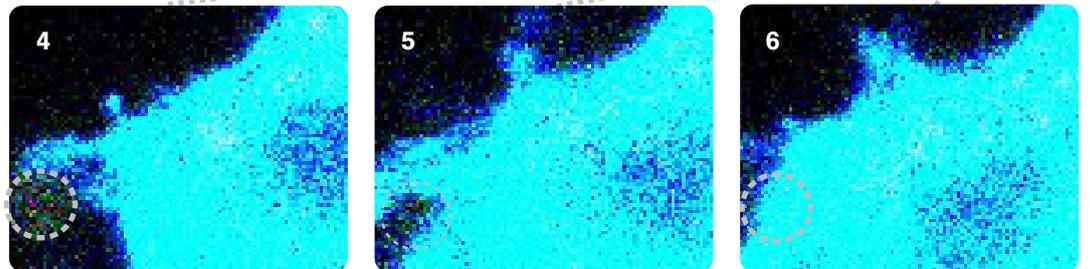


图6 光镊捕获的PS微球与细胞间的相互作用。上图和下图为细胞与微球相互作用过程中的荧光共聚焦图像，其中蓝色信号为GFP-Myosin，绿色信号为微丝标志物RFP-LifeAct 中间面板为响应的力谱曲线，描述了细胞突出作用到微球上的力随时间的变化关系。



应用案例3：多细胞生物中液滴融合和微小细胞组分的研究

课题背景

活细胞和生物体都是由细胞组分组成，细胞组分包含细胞内和细胞外空间的生物分子和结构。细胞组分需要进行必要的化学反应，包含遗传物质以及维持或发展细胞功能，因此它们对于正常的细胞功能非常重要。对细胞微小组分的操纵可以广泛了解他们在健康和疾病中的组织和特性。

我们可以通过外部操控研究液滴及其融合等微小细胞组分的，这为我们提供一种直接分析体内细胞脂肪储存的独特方法[9]，可以再不同的细胞区室中应用相同的分析其他细胞结构，如蛋白液滴，这可能有助于我们了解某些神经退行性疾病的潜在机理。

遇到的挑战

目前，有多种细胞生物学方法用于研究细胞组分，包括各种形式的细胞成像技术，免疫染色以及色谱法。这些技术可以识别、量化和定位感兴趣的组分，然而这些技术不能实时操纵及相应的可视化。

细胞组分的操纵，例如研究液滴融合，通常需要非侵入性工具，除了光镊，原子力显微镜（AFM）和磁镊等生物物理学技术都是最常用的原位力学操纵技术。然而，为了研究细胞内组分，这两种技术都有一定的局限性：

- AFM仅仅限于表面扫描，作为直接探测细胞膜的弹性响应或粘附特性的力学传感器
- 磁镊需要磁性结构，这意味着我们需要通过胞吞作用或显微注射在体内引入永磁体或可磁化物体，例如具有顺磁核的微球来研究分子。

解决方案

C-Trap是一种非侵入性、并且具备多种功能的综合性系统，可以在体内操纵细胞组分和过程，而无需引入异位成分。

借助于C-Trap系统，我们可以原位捕获细胞内的液滴，并使用明场或者各种荧光显微技术对其实时成像(图8)。我们也可以在温度可控的环境中及其他生理学相关条件中分析细胞。

C-Trap系统将高性能光镊和各种显微成像方法集成，例如用于背景抑制的共聚焦成像和TIRF，用于高时间分辨的宽场成像，用于无标记研究的IRM。由于样品操纵和可视化在集成系统中无缝关联，我们实现实时成像的同时实现了最高灵敏度、分辨率和稳定性的力学操控。

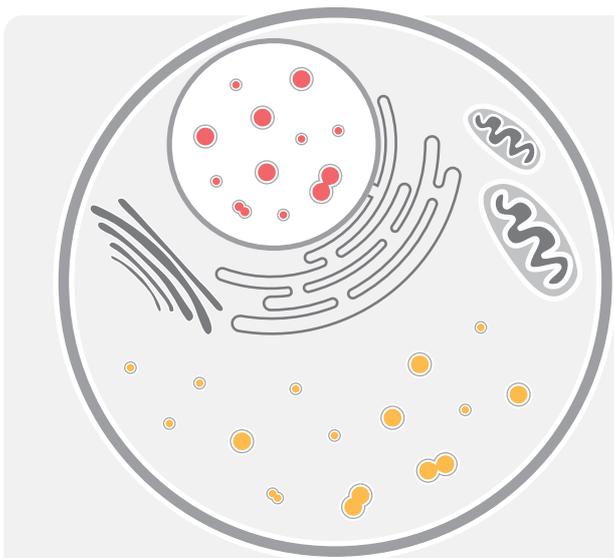


图7 含有分布在不同区室（细胞质和细胞核）的小细胞组分（红和黄）的细胞示意图。

实验方案和结果

本次实验由LUMICKS和加州大学戴维斯分校的Starr实验室合作完成。我们使用C-Trap中的光镊系统操纵细胞内的脂滴，研究活细胞和生物体（如新杆状线虫）内液滴融合。

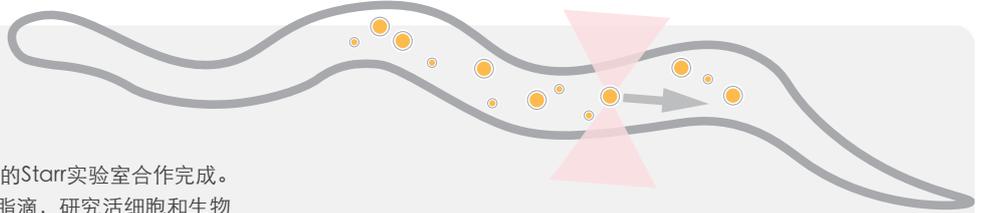


图8 线虫中的脂滴（黄色）示意图，捕获一个脂滴使其沿着线虫在体内移动

在本实验中，我们将线虫（晚期幼虫或成虫）固定在2%的琼脂糖上，并使用抗寄生虫剂四唑麻醉线虫。在明场成像下，可以清楚的定位生物体内的脂滴，红外光形成的光镊捕获此脂滴（图9）。为了避免捕获时带来的光损伤，我们使用较低的激光强度（红色圆圈）照射线虫。

C-Trap系统使用微米量级精度的载物台快速扫描整个样品，除此之外，纳米级精度的定位系统提供更精细的调控。基于这些特征，我们采用两种方式光学捕获脂滴：拖拉被捕获脂滴，使脂滴相互靠近；或者将他们保持在相同的位置，通过移动载物台将其他液滴带到被捕获脂滴的附近。

该方法使我们能够实时追踪体内的小细胞组分并评估其融合过程。

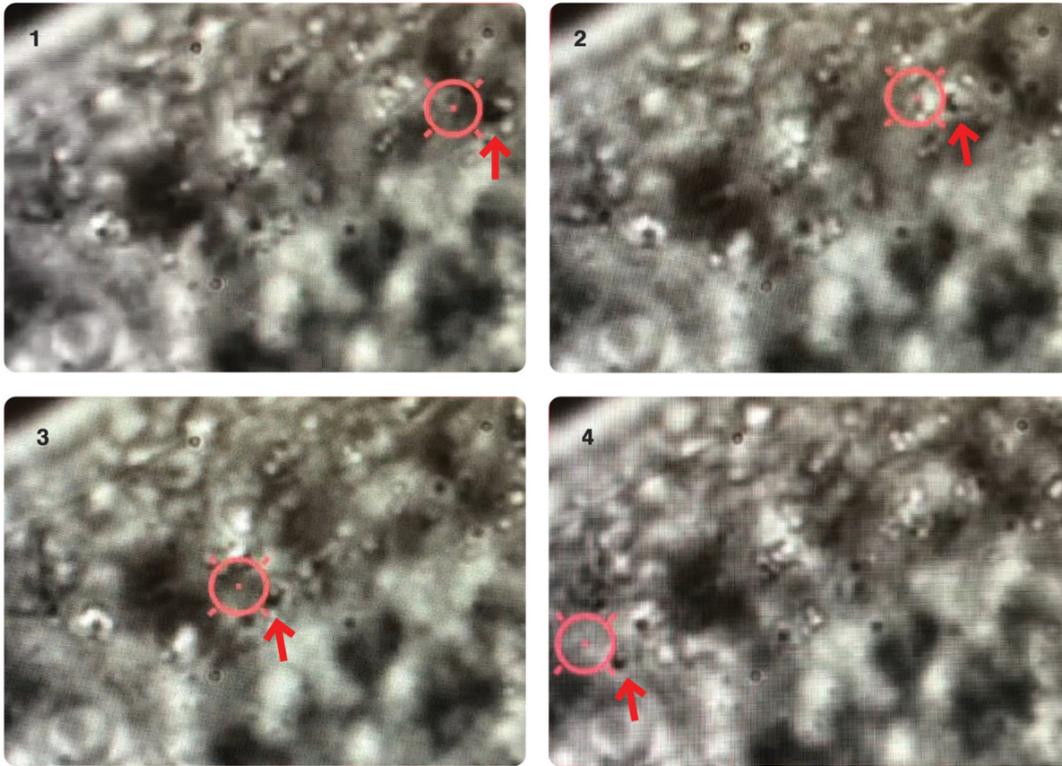
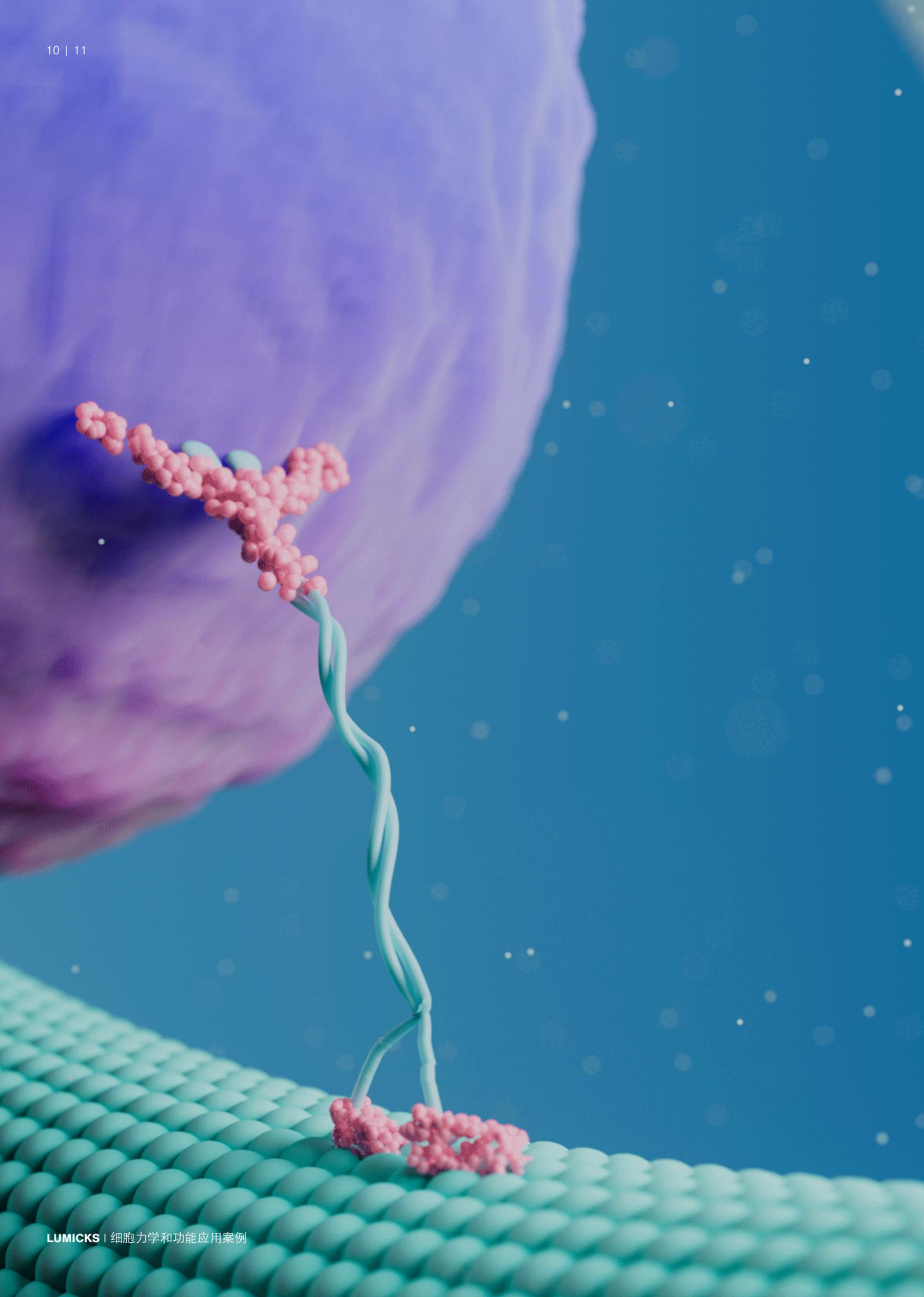


图9 线虫内部的明场成像及其体内的脂滴的定向操纵（红色箭头），激光聚焦于红色圆圈中心；



总结

在本篇应用案例报告中，我们着重介绍了使用C-Trap光镊-荧光&无标记显微成像集成系统研究细胞功能。该系统帮助您详细了解您想要评估的特定细胞过程和相互作用-无论是单细胞还是多细胞生物。

C-Trap系统将高动态和高灵敏的力学操控和测量与各种显微成像技术无缝集成。您可以在激光共聚焦显微成像，圈内反射荧光（TIRF）、无标记干涉反射显微系统和宽场显微成像系统之间任意选择，对细胞功能和相互作用直接成像。最重要的是，该系统最多可以支持三个荧光通道，使其可以研究和识别不同的蛋白质及他们在细胞中的共定位特性，最后，该系统帮助您那您在最佳环境温度下开展对活细胞和生物体的非侵入式研究。

C-Trap系统提供的高性能光镊和各类高分辨显微成像集成特性使其成为实时研究动态和力敏感细胞过程的强大工具。

合作课题组

美国哥伦比亚大学Jonathan A.Javitch教授课题组

美国明尼苏达双城分校Margaret A. Titus教授课题组

美国加州大学戴维斯分校 Dan Starr教授课题组

相关文献

1. Vassart G, Costagliola S. G protein-coupled receptors: mutations and endocrine diseases. *Nat Rev Endocrinol* 7(6):362-72. 2011
2. Mohammad Hosseini A, et al. Toll-Like Receptors in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases. *Adv Pharm Bull* 5 (Suppl 1):605-14. 2015
3. Katlinski KV, et al. Inactivation of Interferon Receptor Promotes the Establishment of Immune Privileged Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* 31(2):194-207. 2017
4. Arjonen A, Kaukonen R, Ivaska J. Filopodia and adhesion in cancer cell motility. *Cell Adh Migr* 5(5):421-30. 2011
5. Ross CA, Poirier MA. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat. Med.* 10 Suppl:S10-7. 2004
6. Feng Y, et al. Mechanosensing drives acuity of T-cell recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114(39):E8204-E8213. 2017
7. Loerakker S, et al. Mechanosensitivity of Jagged-Notch signaling can induce a switch-type behavior in vascular homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115(16):E3682-E3691. 2018
8. Mattila PK, Lappalainen P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9(6):446-54. 2008
9. Mak HY. Lipid droplets as fat storage organelles in *Caenorhabditis elegans*: Thematic Review Series: Lipid Droplet Synthesis and Metabolism: from Yeast to Man. *J. Lipid Res.* 53(1):28-33. 2012

info@lumicks.com

www.lumicks.com

Or find us on:



LUMICKS HQ

Pilotenstraat 41
1059 CH Amsterdam, The Netherlands
+31 (0)20 220 0817



LUMICKS Americas

800 South Street, Suite 100
Waltham, MA 02453, USA
+1 781 366 0380



LUMICKS 亚太

中国北京市朝阳区东三环中路20号 乐成
中心A座 577房间
电话: +86 (0)10 58783028

All content and images used in this document are owned or licensed by LUMICKS Technologies B.V and/or its subsidiaries (LUMICKS)!. Unauthorized use is prohibited. Any information provided herein by LUMICKS is made available "as is" and [you] understand and agree that such information is made available without any representation or warranty, express or implied, including any implied warranty of merchantability, satisfactory quality or fitness for any particular purpose or any warranty that the use of such information will not infringe or violate any patent or other proprietary rights of any third party.

For the latest product information please consult us directly. C-Trap®, m-Trap®, AFS®, u-Flux™, Bluelake™, z-Movi®, LUMICKS and the LUMICKS logo are registered trademarks of LUMICKS.

© LUMICKS. Amsterdam, The Netherlands.