

# 利用原子力显微镜观察大肠癌细胞与癌旁正常组织细胞

陈金旭 韩英

**【摘要】**目的 利用原子力显微镜(AFM)观察大肠癌细胞与癌旁正常组织的细胞膜的纳米级超微结构,并进行对比,旨在为早期诊断大肠癌提供帮助。方法 选取大肠癌细胞及相应的癌旁正常组织细胞30例,每例随机选取10个细胞作为观察对象,应用原子力显微镜(轻敲模式)扫描并利用软件自动分析系统进行分析。结果 通过观察发现大肠癌细胞和癌旁正常组织细胞细胞膜存在明显差异,大肠癌细胞细胞膜表面平均粗糙度、平均峰高度及表面积差值均明显高于癌旁正常组织细胞( $P<0.05$ )。结论 实验证明原子力显微镜可以明显区别大肠癌细胞与癌旁正常组织细胞,为临床早期诊断大肠癌提供新的技术手段。

**【关键词】**大肠癌;癌旁正常组织;原子力显微镜

doi:10.3969/j.issn.1673-5552.2012.01.0009

**【中图分类号】**R574.6;R730.4

**【文献标识码】**A

**【文章编号】**1673-5552(2012)01-0017-02

Using atomic force microscopy colorectal cancer and adjacent normal tissue cells CHEN Jin-xu\*, HAN Ying.  
\*DePartment of Gastroenterology, Beijing Military General Hos Pital, Beijing 100700,China

**【Abstract】** Objective Using atomic force microscopy of colorectal cancer and adjacent normal tissue of nanoscale membrane ultrastructure, and compared to the early diagnosis of colorectal cancer for the help. Methods Select colorectal cancer and corresponding adjacent normal tissues, 30 cases were randomly selected every 10 cells as observed object, the application of atomic force microscopy(tapping mode) to use software to automatically scan and analysis system. Results The observation that colorectal cancer and adjacent normal tissue cells, the cell membrane there are significant differences in colorectal cancer cell surface average roughness, the difference between the average peak height and surface area were significantly higher than in adjacent normal tissues( $P<0.05$ ). Conclusion The experiments show that the AFM can clearly distinguish colorectal cancer and adjacent normal tissue cells for early diagnosis of colorectal cancer provides new techniques.

**【Keywords】** Colorectal cancer; Normal tissues; Atomic force microscope

大肠癌是发病率较高的恶性肿瘤之一,在世界最常见恶性肿瘤中列第四位<sup>[1]</sup>,死亡率已跃居恶性肿瘤第二位。大肠癌已成为威胁我国城乡居民、特别是70岁以上老年人的主要疾病,成为一个值得关注的公共卫生课题。目前,对于大肠癌的早期诊断,主要集中在利用分子生物学以及基因表达来检测肿瘤细胞中相关的分子,但目前正在使用的检测技术在敏感性及特异性方面均存在不足<sup>[2]</sup>,且对于这些检测的临床诊断机制目前尚未有统一论。因此,利用一种新的辅助方法来诊断早期大肠癌成为大家共同关注的焦点。

原子力显微镜(AFM)是一种具有纳米级分辨率、能对细胞的微观形貌进行精确成像的实验分析仪器。由于疾病在发展过程中常导致细胞形态和其力学性能的改变,因此原子力显微镜近年来逐渐被广泛应用于临床医学领域,特别是观察肿瘤细胞的机械性能与超微结构方面,应该会对大肠癌的早期诊断提供帮助。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

标本取自2010年9月-2011年10月北京军区总医院普通外科切除的大肠癌组织共30例,所有标本经HE染色后并由病理科医生做出明确诊断。2%甲醛溶液;Olympus CKX41倒置相差荧光显微镜;CSPM5500扫描探针显微镜;75%酒精等。

### 1.2 实验方法

细胞印片法制备AFM观察标本<sup>[4]</sup>:以大肠癌组织作为实验组,以癌旁正常组织细胞作为对照组。用手术刀片剖开组织,蒸馏水冲洗组织剖面多次,并用滤纸吸附,以便除去剖面上的残

留物、保持剖面洁净。从温箱中取出预处理好的载玻片,垂直适当用力按压于组织剖面处,不要平行拖拉,使剖面的细胞成分均匀地印在玻片上,每个组织选择4个切面,每个切面各印2张切片,蒸馏水轻轻冲洗细胞印片。将2组印片均浸泡于2%甲醛溶液15-30min,然后置于洁净空间内晾干,利用Olympus CKX41倒置相差荧光显微镜选择分散度较好的细胞区域观察印片效果,以备AFM扫描。在操作中选择轻敲模式,调整激光与针尖重合,将探测器的激光光斑置于中心圆点。在操作过程中进行自动调频,直至针尖接触到样品,开始扫描。此时计算机显示屏可出现细胞的相应图像。在扫描过程中,根据细胞的不同成像应随时调节扫描范围。每张样品扫描10个细胞,每个细胞的扫描范围为10-1 $\mu$ m,扫描顺序依次为单个细胞、细胞膜周边区域、细胞膜中央区域(周边和中央的各个区域按照随机的原则进行选取),扫描频率为0.5-2Hz,扫描后的图像存档以备分析。

### 1.3 统计学处理

整理扫描范围为1 $\mu$ m区域的测量结果,利用AFM图像分析系统对大肠癌及癌旁正常组织细胞的细胞膜表面平均粗糙度、平均峰高度及表面积差值进行定量测量,采用SPSS统计软件进行分析,采用独立样本t检验进行分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 实验结果 见表1。

## 3 讨论

原子力显微镜是近些年来发展起来并逐渐被广泛利用的观察细胞超微结构的强有力工具,它利用一个对微小作用力极为敏感探针的探测针尖与标本间的作用力来实现成像。因其具有观察标本的范围广泛、成像环境受影响较小、纳米级超高分辨率等诸多优势,已在医学的各个领域得到广泛应用。原子力显微镜作为一种高分辨率的观察细胞形貌表征的工具<sup>[5-7]</sup>,不仅能够探测细

作者单位:100700 北京,北京军区总医院消化内科(陈金旭、韩英);030001 太原,山西医科大学(陈金旭)

作者简介:陈金旭(1982-),男,硕士学历,医师。Email:bjjinxu@163.com

通讯作者:韩英。Email:yh721303@sina.com

胞表面的超微结构,还能够测量细胞的机械力学性质,如细胞硬度、粘附力等因素。近年来大肠癌的临床与基础研究已取得了令人振奋的进展,为大肠癌的早期诊断<sup>[8]</sup>、中晚期治疗及随访监测提供了大量的理论与实验依据。但是同其他肿瘤一样,由于基因表达模式多变以及分子生物学机制等尚有待于进一步探讨,尤其是早期阶段的发生机制尚不太清楚,造成了对其早期诊治困难。如今原子力显微镜的应用一定会在早期诊断大肠癌方面提供一个新的诊断手段,通过对细胞进行扫描,从细胞形态学方面进行肿瘤的早期及鉴别诊断。此方法更加便捷,诊断准确性及特异性进一步提高,对肿瘤细胞的进一步研究也有着重要意义。

confocal and atomic force microscopy images[J].J Neurosci Meth,2009,177(1):94-107.

[6]Pavese JM, Farmer RL, Bergan RC. Inhibition of cancer cell invasion and metastasis by genistein[J].Cancer Metastasis Rev,2010,29(3):465-482.

[7]Kinugasa T, Akagi Y, Yoshida T, et al. Increased claudin-1 protein expression contributes to tumorigenesis in ulcerative colitis-associated colorectal cancer[J].Anticancer Res,2010,30(8):3181-3186.

[8]Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, et al. Defective mismatch

表1 两组相关参数对比(n=300, ±s)

组别	直径(μm)	参数分析(nm)			
		平均粗糙度	平均峰高度	平均凹陷程度	表面积差值
大肠癌细胞组	12.031 ± 2.283*	20.021 ± 8.463**	35.573 ± 9.721**	-30.238 ± 12.064**	9.542 ± 3.724**
癌旁正常细胞组	11.482 ± 2.314	13.105 ± 9.307	27.827 ± 10.764	-18.837 ± 13.285	3.894 ± 2.351

\*P<0.05, \*\*P<0.01

实验中通过应用原子力显微镜观察大肠癌细胞及癌旁正常组织细胞,发现癌旁正常组织细胞在扫描范围为10μm时细胞形状开始清晰,近似圆形,直径范围为9-13μm,表面较光滑,分布较为均匀、形状规则,排列疏密适中,而大肠癌细胞形状呈不规则形状,比正常细胞直径略大,细胞膜表面较粗糙,但更加精细的结构在此范围内扫描不到。随着扫描范围逐渐缩小至5μm和1μm时,其分辨率逐渐增大,细胞膜表面的各种超微结构也随之呈现,癌旁正常细胞表面可见高低起伏的沟壑结构,而大肠癌细胞的膜表面变得粗糙,隆起物分布非常不均匀、形状极为不规整,沟壑结构比正常细胞更加明显,而且其宽度和高度均比正常细胞明显。最终经AFM软件分析测出的2组细胞膜表面平均粗糙度、平均峰高度、平均凹陷深度和表面积差值的参数比较均具有统计学意义(P<0.05或P<0.01)。

目前,国内外对于大肠肿瘤细胞分子生物学特征与细胞功能形态之间关系的研究尚未见报道,究竟细胞分子生物学改变对于细胞功能形态的影响究竟有多大以及能否根据能利用细胞功能形态推测其分子生物学特征尚不清楚<sup>[9,10]</sup>。在本次实验中我们是首次尝试应用原子力显微镜观测不同分子生物学特征的细胞功能形态有无差异。原子力显微镜在大肠癌方面的研究较少,尤其是直接使用人体大肠癌组织细胞作为样本的研究尚未见报道,本次实验在标本制作、观察范围等许多方面仍有许多不足之处,但却为研究大肠癌在纳米级水平上的定性定量分析以揭示细胞的生理病理状态提供了依据,揭示了AFM应用于临床诊断大肠癌的价值与潜力。

参考文献

[1]刘佳,白春梅.大肠癌早期诊断——筛查热点问题[J].癌症进展,2011,9(9):524-527.  
 [2]Kahi CJ, Imperiale TF, Juliar BE, et al. Effect of screening colonoscopy on colorectal cancer incidence and mortality[J].Clin Gastroenterol Hepatol,2009,7(7):770-775.  
 [3]高万峰,韩忠学,刘静,等.制备适合原子力显微镜观察甲状腺细胞标本方法的探讨[J].武警医学,2010,21(3):206-208.  
 [4]Ruchika KG, Singh S, Mamgain H, et al. Tumor suppressor protein SMAR1 modulates the roughness of cell surface: combined AFM and SEM study[J].BMC Cancer,2009,9:350.  
 [5]Kondra S, Laishaam J, Ban J, et al. Integration of

repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer[J].J Clin Oncol,2010,28(20):3219-3226.

[9]Doekhie FS, Mesker WE, Kuppen PJ, et al. Detailed examination of lymph nodes improves prognostication in colorectal cancer[J].Int J Cancer,2010,126(11):2644-2652.

[10]Beauchamp GB, Ellepola C, Beauchamp CL. Evidence-based medicine: The value of vision screening[J].Orthoptic Jnl,2010,60:23-27.

(收稿日期:2011-12-13)

(本文编辑:夏凯艳)

(上接P36)

不良反应比如肝肾功能损害、肌肉关节痛等较轻,患者均能耐受,且经过对症处理后患者很快恢复,不影响继续治疗。另外,为了对抗化疗过程中可能出现的过敏反应,同时预防体液滞留的发生,在应用多西紫杉醇治疗前均给予地塞米松,因此,本组无过敏反应及体液滞留综合征发生。

总之,多西紫杉醇联合顺铂治疗晚期非小细胞肺癌的疗效确切,明显提高了患者的生存质量,毒副反应较轻,多数患者均能耐受,值得临床借鉴。

参考文献

[1]张天泽.中国常见恶性肿瘤诊治(第九分册)[M].第2版.北京:北京医科大学,中国协和医科大学联合出版社,1991:15.  
 [2]杨莉,王亚非,王飞,等.多西紫杉醇联合顺铂治疗晚期非小细胞肺癌临床分析[J].现代肿瘤医学,2009,17(11):2124-2126.  
 [3]朱秀琪,刘新兰,王程.国产多西紫杉醇联合顺铂治疗晚期非小细胞肺癌的临床研究[J].第四军医大学学报,2007,28(17):1600-1602.  
 [4]刘爱国,刘璟.多西紫杉醇联合顺铂治疗晚期非小细胞肺癌65例临床疗效观察[J].吉林医学,2010,31(27):4727.  
 [5]白丽,姚玉华,赵瑞红.多西紫杉醇联合顺铂治疗晚期非小细胞肺癌32例[J].肿瘤研究与临床,2007,19(12):835-836.  
 [6]雷妍玮,李世栋.多西紫杉醇联合顺铂治疗晚期非小细胞肺癌30例临床分析[J].郑州大学学报(医学版),2005,40(4):783-784.

(收稿日期:2011-12-13)

(本文编辑:夏凯艳)