癌症个体精准化诊治的挑战和癌细胞纳米生物力学研究的应用前景

饶建宇^{①②*}, 张悦^④, 余微波^②, 冯建涛^①, 卞修武^③, 赫捷^①

① 中国医学科学院肿瘤医院/肿瘤研究所, 北京 100021;

② 美国加州大学洛杉矶分校病理与医学检验学系, 洛杉矶 90095;

③ 第三军医大学西南医院病理学研究所/西南癌症中心, 重庆 400038;

④ 三捷生物科技(北京)有限公司, 北京 100027

* 联系人, E-mail: JRao@mednet.ucla.edu

2015-11-26 收稿, 2016-01-25 修回, 2016-01-26 接受, 2016-04-14 网络版发表

Impact Grant, Jonsson Comprehensive Cancer Centerh 和三捷生物科技(北京)有限公司资助

摘要 中国癌症负担日益加重的今天, 临床上急需可以实现癌症早诊早治的方法以及可以在癌症各阶段对患者预后进行精确评估的手段. 目前的癌症诊断金标准——病理学诊断对预后的评估能力有限, 难以满足临床个体化治疗的要求. 即使使用二代测序等先进的基因分析技术, 所得的信息也往往是间接和局部的, 无法在单细胞水平上对癌细胞的生物学行为, 尤其是侵袭或转移的能力进行准确的判断. 得益于近年来纳米和微流控技术的发展, 研究人员在少量的细胞与组织样品上即可进行细胞生物力学性质与肿瘤微环境的定量分析, 进而预测癌细胞的侵袭转移能力, 对患者的预后进行快速精准评估. 同时, 也有研究发现, 通过检测肿瘤细胞的生物力学性质, 可以评估肿瘤细胞的耐药性和治疗反应. 为应对目前临床对肿瘤诊断与治疗的新要求, 本文阐述了癌细胞生物力学的分子机制基础研究与其在癌症诊治中可能的应用与展望.

关键词 肿瘤, 个体精准化诊治, 细胞生物力学, 纳米技术

1 癌症诊疗的现状与挑战

随着中国社会及经济的飞速发展, 人口老龄化及生活方式的改变等诸多因素的影响, 中国疾病发生与死亡原因也在不断地发生变迁. 根据卫生部发布的《2013中国卫生统计年鉴》, 2012年城市居民死亡原因中, 癌症以26.8%占据第一位, 这一数字在近10年内一直不断增长. 美国的相关流行病学调查报告显示, 2015年美国因癌症死亡的人数估计为589430人, 1975~1990年美国癌症发病率与死亡率呈上升趋势, 而1991~2011年呈总体缓慢下降趋势^[1]. 即便如

此, 癌症依然是世界范围内最亟待解决的重要疾病之一.

在过去100多年来, 人类在预防癌症方面做出了巨大的努力, 特别是最近几十年来对癌症的认识有了突飞猛进的发展^[2]. 极大的人力与财力被投入到了针对分子靶标的靶向药物开发. 但由于癌症存在不同人群、个体、组织、细胞以及分子水平的异质性^[3,4], 分子靶向药物可应用的人群有限, 并且耐药的问题显著^[5]. 这种异质性在晚期转移癌尤其明显, 使得针对单一基因变化的靶向药物很难起到根本的治疗效果. 迄今为止, 癌症防控最成功的典范是对宫颈癌的

引用格式: 饶建宇, 张悦, 余微波, 等. 癌症个体精准化诊治的挑战和癌细胞纳米生物力学研究的应用前景. 科学通报, 2016, 61: 1551–1559

Rao J Y, Zhang Y, Yu W B, et al. Challenges of cancer precision medicine and prospective application of cancer cell nanomechanotypical analysis (in Chinese). Chin Sci Bull, 2016, 61: 1551–1559, doi: 10.1360/N972015-00793

筛查与治疗,利用巴氏涂片对宫颈早期病变进行筛查、结合相应的阴道镜活检诊断技术与针对癌前病变的处理方法,使宫颈癌在发达国家的发病率及死亡率显著降低,已由常见恶性肿瘤变成为极为少见的肿瘤^[1].因此,在癌症早期,尤其是侵袭和转移前进行积极有效的预防、诊断与控制可以有效地降低癌症的死亡率已在相关领域达成共识.

以形态学为基础的病理学检查作为目前癌症诊断的金标准有着许多局限性.除了标本获取不准确、病变组织不典型、医师水平不同等因素导致的漏诊、误诊外,病变组织形态本身不能提供癌细胞侵袭或转移潜能的生物学信息,对指导个体精准化治疗的价值有限.即使使用最新的基因分析技术,所能进行的也是间接、片面且不准确的癌细胞行为评估.因此,临床医生需要一个可以在单细胞水平直接、快速而且准确地判断癌细胞生物学行为的检测方法,为个体化治疗的成功实施提供更丰富、更有意义的指导.

2 癌细胞生物力学的分子生物学基础

利用纳米技术可以对肿瘤细胞或组织的生物力学性质进行量化的表征,在纳米尺度上研究生物组织或细胞生物力学行为及其分子生物学机制的学术领域可以称之为纳米生物力学.为对癌细胞的生物力学特性进行分析,需要对癌细胞的生物力学变化的分子基础有所了解.细胞骨架蛋白在细胞的生物力学行为中发挥了重要的作用,其中,微管与微丝的作用最重要,其共同参与了细胞的分裂与迁移等生理活动^[6].无限增殖与转移是癌细胞的生物学行为特征,因此对微丝、微管的研究可以为直接探索癌细胞生物力学行为提供依据.研究发现,癌细胞的大部分形态抑或功能表型都与微丝肌动蛋白的重构相关,例如,核浆比增高,核膜与细胞膜的不规则化,细胞黏附性丢失,移动能力、侵袭能力及转移能力增强等^[7-9].微丝肌动蛋白可分为单体球状肌动蛋白与多聚体纤维状肌动蛋白,Rao等人^[10]的研究表明,球状肌动蛋白聚合为纤维状肌动蛋白的变化与细胞分化有密切的关系,而从纤维状肌动蛋白分离解聚为球状肌动蛋白的变化则是癌症早期发生的标志^[11].这个过程会受到一系列肌动蛋白结合蛋白的调控.简单地说,肌动蛋白调控蛋白多为癌基因家族,如Ras, Src等,其结合蛋白如凝溶胶蛋白(gelsolin),黏着斑蛋白(vinculin)等又多为抑癌蛋白^[12-16].但癌细胞生

理活动中这种变化并非单向的.在从正常细胞发展为早期原位癌的变化中肌动蛋白多表现为解聚(从纤维状肌动蛋白到球状肌动蛋白),但癌细胞进入侵袭期则肌动蛋白转向发生聚合(从球状肌动蛋白到纤维状肌动蛋白),同时伴有肌动蛋白分布失常,出现细胞反向分化及上皮间质转化,细胞侵袭转移能力得到增强^[17].Hemstreet等人^[18]的研究结果证实,这种双向变化使得以肌动蛋白作为癌症的标志物具有很大的困难.

肿瘤的纳米生物力学也可以拓展至肿瘤的微环境,肿瘤微环境中突出的生物力学因素是肿瘤组织的刚度.研究证实,癌前病变组织的刚度大于正常组织的刚度,肿瘤组织的刚度大于癌前病变组织的刚度,这是由于肿瘤微环境活化之后赖氨酰氧化酶介导的胶原蛋白交联以及神经纤毛蛋白(neuropilin-1)介导的纤维连接蛋白过度组装造成的^[19,20].一方面,细胞为适应其周围微环境力学性质的改变,其自身黏附能力、迁移能力以及骨架状态等都会发生相应变化,从而使自身的力学性质也发生了改变^[21,22].Byfield等人^[23]将内皮细胞分别培养在了软I型胶原蛋白凝胶(202 ± 27 Pa)以及硬I型胶原蛋白凝胶(502 ± 48 Pa)内,结果发现,软胶内细胞的可变形性比硬胶内细胞增加了1.9倍,同时硬胶内细胞应力纤维的数量比软胶内细胞增加了1.5倍.另一方面,肿瘤细胞周围微环境力学性质可以调控细胞自身的增殖能力.Paszek等人^[24]利用胶原蛋白凝胶制备了体外三维细胞培养材料,并分别模拟了乳腺组织、癌前病变组织以及乳腺癌组织的刚度,发现基质刚度增加之所以能够通过整联蛋白(integrin)促进肿瘤细胞的恶性增殖,是因为激活了整联蛋白下游的Rho以及细胞外调节蛋白激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)信号通路,从而使黏着斑蛋白的表达增加.作为力学调节通路的一个重要环节,Rho与ERK蛋白可以将胞外基质的力学信号与胞内的增殖甚至分化相关的分子信号通路偶联在一起.此外,研究发现,增加肿瘤微环境中的应力可以诱导正常细胞中肿瘤相关的 β -链蛋白(β -catenin)以及Ret信号通路激活,提示微环境的应力在肿瘤的起始过程中发挥了非常关键的作用^[25].

有大量工作研究细胞骨架蛋白的变化与癌发生发展的关系,认为肌动蛋白重构调控多种癌症表型及生物力学变化,这是一种受多种分子生物学通道

调控的动态过程。但仅基于单细胞肌动蛋白重构的生物化学分析很难提供有意义的精准临床价值。因此需要寻找一种方法可以对癌细胞生物力学表型进行直接定量测定,以便更准确地判断癌细胞的行为特征尤其是与预后和治疗反应的关系。

3 癌细胞生物力学在癌症诊断与干预治疗中的研究现状

癌症的标志物可以被分类为易感性标志物、暴露标志物与生物效应标志物^[26]。在癌症发展过程中癌细胞的刚度与黏弹性等生物力学性质会产生相应的改变,因此检测细胞的生物力学性质或许可以用于评估癌细胞的恶性程度,作为癌细胞转移能力强弱的替代标志物。人体内生物力学作用过程与体外环境共同影响的致癌生化因素可导致细胞膜、细胞骨架、胞质溶胶的变化,改变细胞形状、形态以及变形能力。最终,与癌细胞转移相关的细胞运动能力、细胞活力都会随之而产生变化。Suresh^[27]与Yallapu等人^[28]指出细胞的刚度、弹性、黏弹变形能力发生变化是常见的转移癌细胞表型特征。其他研究小组利用不同方法对不同来源的癌细胞进行生物力学性质的研究结果显示,癌细胞与正常细胞的生物力学性质有明显的差异(表1)。上述研究为基于纳米技术的癌细胞生物力学性质检测在癌症诊断领域的应用提供了强有力的证据,也为相关检测手段进一步的开发与临床研究提供了有效的支持。

原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)是目前科研人员研究细胞生物力学性质的最主要工具之一(图1(a))。Cross等人^[29,53]收集了7名不同类型癌症患者的胸腔积液样本,以同时存在的良性细胞为对照,利用AFM测试每个细胞的杨氏模量,结果显示,胸腔积液中恶性细胞的刚度小于正常细胞的刚度,以此分辨出形态上与正常细胞类似但分子表型鉴定为肿瘤细胞的样本,因此利用细胞样品的纳米生物力学特征可以辅助诊断恶性肿瘤的存在,从而弥补形态学诊断中容易出现假阳性或假阴性的缺陷。利用AFM对包括膀胱癌、黑色素瘤、乳腺癌、前列腺癌、结肠癌等多种不同来源的临床癌细胞样本进行细胞刚度的研究,结果同样证明,AFM可以在细胞形态未发生明显改变的时候,就可以检测到恶性细胞生物力学性质的变化,提示在人体肿瘤组织中正常与恶性细胞共存情况下生物力学检测对癌细胞的识

表1 癌细胞与正常细胞的细胞生物力学比较研究

Table 1 Comparison study of cellular mechanotypical featur of cancer and non-cancer cells

组织来源	基于细胞系的研究	基于临床样品的研究
乳腺	AFM ^[29,30,31]	AFM ^[32,33,34]
	微流控 ^[35]	压痕器 ^[36]
	光镊 ^[37]	
膀胱/泌尿上皮	AFM ^[38,39]	AFM ^[32]
		微管抽吸 ^[40]
宫颈/卵巢/子宫	AFM ^[41,42]	AFM ^[34,43]
	磁镊 ^[44]	磁镊 ^[44]
结肠	AFM ^[45]	AFM ^[32]
肾脏	AFM ^[21]	
白血病	AFM ^[22]	光镊 ^[46]
		AFM ^[47]
肺	AFM ^[48]	
黑色素瘤	AFM ^[49,50]	AFM ^[32]
		微流控 ^[51,52]
胸腔积液		AFM ^[53]
		微量过滤法 ^[55]
		AFM ^[32]
前列腺	AFM ^[54]	压痕器 ^[56,57]
红细胞	光镊 ^[58]	

别具有很大的应用空间^[32]。Palmieri等人^[45]以2种具有不同侵袭倾向亚群的结肠癌细胞系为样品,利用AFM分析2种不同亚群的细胞生物力学性质,发现2种亚群在细胞刚度上表现出差异,而在黏附力上无明显差异,随后的研究表明,转移能力强的细胞比转移能力弱的细胞更软^[59]。另外有研究发现,黑色素瘤从非侵袭型转变为侵袭型时癌细胞的刚度会逐渐减小,但同时,随着侵袭的发展,癌细胞的刚度可能会增加,并获得根据环境黏附特性而调整刚度的能力。Weder等人^[49]认为,肿瘤细胞的这种刚度可塑性可以作为黑色素瘤恶变的标志。研究表明,在利用AFM以脉冲的形式反复对乳腺细胞施力后,非转移性乳腺上皮细胞系会逐渐提高自身刚度以对抗外界对其施加的形变,而具有转移潜能的乳腺上皮癌细胞则出现轻微的刚度降低现象^[60]。这种对外界压力表现出不同的生物力学性质的反馈,或许也可以成为区分良性细胞与恶性细胞的标志物之一。

除了AFM外,微流控技术也被应用于细胞生物力学检测。与AFM相比,微流控技术具有高通量,体

图1 细胞生物力学性质检测的主要方法. (a) AFM检测原理示意图; (b) 图示细胞形变仪中细胞在初始位置测量直径, 随后被输送至拉伸液流交汇处被拉伸成椭圆并测量长短径; (c) 细胞形变仪观测图及测量示意图; (d) 细胞形变仪标准细胞特征示意图: (1) 未激活外周单核细胞, (2) 未激活粒细胞, (3) 激活的单核细胞, (4) 间皮细胞, (5) 疑似恶性细胞; (e) 恶性细胞样品检测结果; (f) 慢性炎症胸腔积液样品检测结果. 本图经Dino Di Carlo授权, BCDEF引用自其已发表的论文.

Figure 1 Devices for detecting cell biomechanics. (a) Principle of AFM; (b) A schematic of the deformation of a cell delivered to the center of an extensional flow by being previously aligned at an inertial focusing position; (c) Definitions of the shape parameters extracted from images; (d) Locations of cell populations found in pleural fluids on a size-deformability map: (1) nonactivated mononuclear cells, (2) nonactivated leukocytes, (3) activated mononuclear cells, (4) mesothelial cells, (5) suspicious cells; (e) Pooled profiles of malignant outcomes; (f) chronic inflammation outcomes.

积小的优势. Di Carlo教授领导的团队^[51,52]开发了一套细胞生物力学测定的装置即细胞形变仪, 细胞形变仪借助于相反方向的液体流动使细胞被拉伸变形, 通过分析高速摄像机捕获细胞变形前后的图像获得细胞的长短径比, 以此评估细胞的变形性. 胸腔积液中不同细胞类型在以细胞直径与长径比为坐标轴画出的散点图上均有其特征性的分布, 通过与标准特征图对比可以帮助临床医生快速地分析出胸腔积液类型(图1(b)~(d)). Hou等人^[35]利用一段直径为10 μm 的微流

道, 通过计算待测细胞进入微流道的时间以及通过速度, 评估乳腺癌细胞系的顺应性, 实验结果显示, 恶性乳腺癌细胞系比正常乳腺上皮细胞的进入时间更短, 通过速度更快, 说明恶性乳腺癌细胞更易于发生变形, 其结果与AFM相关研究相吻合. Shojaei-Baghini等人^[40]使用微针抽吸尿液中的上皮细胞, 利用真空强度与抽取细胞部分体积的关系计算出杨氏模量, 可以区分普通细胞与恶性细胞. Lee和Liu^[61]将抽吸孔排列于微流道中(图1(b)), 实现高通量快速抽吸, 结合图像分

析技术,可以明显提高细胞刚度检测的速度。

同时,也有其他方法可以检测癌细胞的生物力学性质。Guck等人^[37]首先报道了利用光镊结合微流控技术捕获细胞并对其施加力,以检测细胞变形性的方法。Runge等人^[62]将这种方法应用于口腔鳞状上皮癌的研究中,发现口腔鳞状上皮癌患者的口腔脱落细胞顺应性显著高于正常口腔鳞状上皮。Swaminathan等人^[44]利用磁镊证实侵袭性卵巢癌细胞刚度仅为正常卵巢上皮细胞的1/5。

另一系列的研究表明,细胞的纳米力学分析还可以为抗肿瘤药物的疗效进行评估。绿茶提取物(green tea extract, GTE)是潜在的抗肿瘤药物,该药物对正常细胞毒性较弱,虽然具体的作用机制并非十分明确,但一般认为其具有抗氧化与调控甲基化的能力,可以影响骨架蛋白和结合蛋白的功能,进而起到抗肿瘤的作用^[63]。利用原子力显微镜分别对经过GTE处理的临床肿瘤细胞与正常间质细胞进行力学响应的表征,发现肿瘤细胞经GTE处理后刚度显著增加至正常细胞类似的水平,而正常的间质细胞经GTE处理后,刚度却没有发生显著改变。免疫荧光结果证实,GTE处理后肿瘤细胞的肌动蛋白纤维显著增加,与正常细胞类似^[64]。通过体外基于细胞系的siRNA实验证实,GTE导致的肿瘤细胞力学特性变化与annexin-I表达相关^[65]。类似的研究表明,纳米生物力学的分析还可以对卵巢癌细胞的药物敏感性进行评估。卵巢癌细胞对铂类药物产生耐药性的分子机制还不是十分明确,也没有良好的分子标记物展示卵巢癌细胞对铂类药物的抗药性。Sharma等人^[41,66]通过构建耐顺铂卵巢癌细胞株以及原子力显微镜力学分析,发现顺铂可以调节卵巢癌细胞的力学特性,药物敏感细胞株刚度的变化与药物浓度呈现相关性,而耐药细胞株的刚度却不因药物浓度而发生变化。高分辨荧光成像技术表明,与顺铂相关的卵巢癌细胞的力学特性变化与肌动蛋白纤维的重构是相关的。因此,肿瘤细胞的纳米生物力学特性检测有可能作为抗肿瘤药物敏感性的力学指标。

4 癌细胞生物力学在癌症临床诊治应用中面临的挑战与展望

对于几乎所有实体恶性肿瘤来讲,肿瘤细胞的生物力学性质都是影响转移过程的重要因素。所有的肿瘤均有过度生长、侵袭、转移等3个过程。因此,

生物力学性质的改变或许是癌细胞共有的分子变化的表现形式。癌细胞的刚度减小而更加易于变形,这种高变形能力允许癌细胞脱离原位病灶,通过有限的空间。癌细胞穿过基质、血管内皮,进入循环系统成为外周循环血肿瘤细胞,经循环系统运输,在适宜的组织器官富集,生长为转移癌灶。尽管癌细胞刚度变化的确切机制尚未完全研究透彻,但以刚度与黏弹性为代表的细胞生物力学性质已经可以作为评估癌细胞转移倾向的一个理想的标志物,为现在肿瘤诊断相关形态学以及分子生物学分析方法提供了有益的补充,帮助临床医生做出更精准的预后评估,成为临床诊断及治疗方案选择的重要依据。

现有的大多数细胞生物力学性质研究使用的是纯化的细胞系或经过预选择的临床细胞样品。因此,为了将细胞生物力学性质检测应用于实际的癌症诊断,更多的临床相关研究是必不可少的。目前,将细胞生物力学性质检测应用于临床尚有一些前提工作需要进行。(i)目前对纳米尺度的细胞生物力学性质测量并没有可以作为评价检测结果是否可靠的金标准。(ii)现有的细胞生物力学性质检测技术均不能很好地在临床中直接应用,科研中最常使用的AFM非常笨重且昂贵,极低的检测效率离临床应用的要求相距甚远;微流控技术的应用虽然解决了一部分设备体积与检测通量的问题,但是目前现有的微流控芯片不能获得检测样品生物力学性质的准确定量,而通常以顺应性、变形性等定性描述为检测结果,这种定性的描述不能与其他细胞生物力学性质设备的检测结果相互印证,不利于在临床实验中获得统一的检验标准。(iii)细胞生物力学检测样品的制备方法是另一个待解决的问题,实体肿瘤早期组织样本通常为正常细胞、癌细胞、细胞基质共存的状态,如何在保持细胞生物力学性质不发生改变的情况下将待测组织制备成为单细胞状态是病理学家们正面临的问题;Plodinec等人^[33]在获得乳腺针刺取样的组织标本后直接利用AFM检测组织生物力学性质的研究或许指出了另一个可能的前进方向。(iv)现在的所有检测方法均是基于实验室水平的,如何将设备扩大化生产以满足大量的检测需求是需要科研人员、临床医院与设备制造商多方合作才能解决的问题。

针对肿瘤细胞、微环境以及癌前病变细胞深入的生物力学及分子基础的研究,一方面可能为靶向药物的开发找出新的分子靶点,另一方面也将帮助开

发新的、简单的、针对细胞生物力学性质的快速检测技术. 经过严密的临床试验研究后, 细胞生物力学性质检测将可能成为一个癌症诊断的新依据. 将传统细胞形态学、分子生物学以及生物力学3种方法得到的信息综合分析并运用, 以此形成一个新的学科, 即纳米细胞诊断学, 进而推动癌症的快速精准诊断、

个体化的预后评估、个体化的药物敏感性评估及治疗效果监测, 实现癌症个体化精准治疗. 可以预见, 将这样的诊断技术和纳米颗粒靶向药物结合起来, 将可能为癌症防控提供一个全新的平台. 这一全新的技术平台将在不久的将来被开发出来并用于临床为患者服务, 最终在癌症的个体化精准防控中起重要作用.

参考文献

- 1 Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *Ca Cancer J Clin*, 2015, 65: 5–29
- 2 Lippman S M, Hawk E T. Cancer prevention: From 1727 to milestones of the past 100 years. *Cancer Res*, 2009, 69: 5269–5284
- 3 Burrell R A, McGranahan N, Bartek J, et al. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature*, 2013, 501: 338–345
- 4 Meacham C E, Morrison S J. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*, 2013, 501: 328–337
- 5 Zhang S, Huang W C, Li P, et al. Combating trastuzumab resistance by targeting SRC, a common node downstream of multiple resistance pathways. *Nat Med*, 2011, 17: 461–469
- 6 Akhshi T K, Wernike D, Piekny A. Microtubules and actin crosstalk in cell migration and division. *Cytoskeleton*, 2014, 71: 1–23
- 7 Pollard T D, Cooper J A. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science*, 2009, 326: 1208–1212
- 8 Vasioukhin V, Bauer C, Yin M, et al. Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell*, 2000, 100: 209–219
- 9 Yamaguchi H, Condeelis J. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1773: 642–652
- 10 Rao J Y, Hurst R E, Bales W D, et al. Cellular F-actin levels as a marker for cellular transformation: Relationship to cell division and differentiation. *Cancer Res*, 1990, 50: 2215–2220
- 11 Rao J Y, Hemstreet G P, Hurst R E, et al. Alterations in phenotypic biochemical markers in bladder epithelium during tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 8287–8291
- 12 Nobes C D, Hall A. Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, 1995, 81: 53–62
- 13 Edwards D C, Sanders L C, Bokoch G M, et al. Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol*, 1999, 1: 253–259
- 14 Huang C, Ni Y, Wang T, et al. Down-regulation of the filamentous actin cross-linking activity of cortactin by Src-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*, 1997, 272: 13911–13915
- 15 Rao J, Seligson D, Visapaa H, et al. Tissue microarray analysis of cytoskeletal actin-associated biomarkers gelsolin and E-cadherin in urothelial carcinoma. *Cancer*, 2002, 95: 1247–1257
- 16 Rodriguez Fernandez J L, Geiger B, Salomon D, et al. Suppression of tumorigenicity in transformed cells after transfection with vinculin cDNA. *J Cell Biol*, 1992, 119: 427–438
- 17 Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15: 178–196
- 18 Hemstreet G P, Yin S N, Ma Z Z, et al. Biomarker risk assessment and bladder cancer detection in a cohort exposed to benzidine. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93: 427–436
- 19 Levental K R, Yu H M, Kass L, et al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*, 2009, 139: 891–906
- 20 Yaqoob U, Cao S, Shergill U, et al. Neuropilin-1 stimulates tumor growth by increasing fibronectin fibril assembly in the tumor microenvironment. *Cancer Res*, 2012, 72: 4047–4059
- 21 Discher D E, Janmey P, Wang Y L. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*, 2005, 310: 1139–1143
- 22 Plotnikov S V, Pasapera A M, Sabass B, et al. Force fluctuations within focal adhesions mediate ECM-rigidity sensing to guide directed cell migration. *Cell*, 2012, 151: 1513–1527
- 23 Byfield F J, Reen R K, Shentu T P, et al. Endothelial actin and cell stiffness is modulated by substrate stiffness in 2D and 3D. *J Biomech*, 2009, 42: 1114–1119
- 24 Paszek M J, Zahir N, Johnson K R, et al. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell*, 2005, 8: 241–254

- 25 Fernández-Sánchez M E, Barbier S, Whitehead J, et al. Mechanical induction of the tumorigenic β -catenin pathway by tumour growth pressure. *Nature*, 2015, 523: 92–95
- 26 Kelloff G J, Lippman S M, Dannenberg A J, et al. Progress in chemoprevention drug development: The promise of molecular biomarkers for prevention of intraepithelial neoplasia and cancer—a plan to move forward. *Clin Cancer Res*, 2006, 12: 3661–3697
- 27 Suresh S. Biomechanics and biophysics of cancer cells. *Acta Biomater*, 2007, 3: 413–438
- 28 Yallapu M M, Katti K S, Katti D R, et al. The roles of cellular nanomechanics in cancer. *Med Res Rev*, 2015, 35: 198–223
- 29 Cross S E, Jin Y S, Rao J, et al. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nat Nanotechnol*, 2007, 2: 780–783
- 30 Li Q S, Lee G Y, Ong C N, et al. AFM indentation study of breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 374: 609–613
- 31 Corbin E A, Kong F, Lim C T, et al. Biophysical properties of human breast cancer cells measured using silicon MEMS resonators and atomic force microscopy. *Lab Chip*, 2015, 15: 839–847
- 32 Lekka M, Pogoda K, Gostek J, et al. Cancer cell recognition-mechanical phenotype. *Micron*, 2012, 43: 1259–1266
- 33 Plodinec M, Loparic M, Monnier C A, et al. The nanomechanical signature of breast cancer. *Nat Nanotechnol*, 2012, 7: 757–765
- 34 Lekka M, Gil D, Pogoda K, et al. Cancer cell detection in tissue sections using AFM. *Arch Biochem Biophys*, 2012, 518: 151–156
- 35 Hou H W, Li Q S, Lee G Y, et al. Deformability study of breast cancer cells using microfluidics. *Biomed Microdevices*, 2009, 11: 557–564
- 36 Samani A, Plewes D. A method to measure the hyperelastic parameters of *ex vivo* breast tissue samples. *Phys Med Biol*, 2004, 49: 4395–4405
- 37 Guck J, Schinkinger S, Lincoln B, et al. Optical deformability as an inherent cell marker for testing malignant transformation and metastatic competence. *Biophys J*, 2005, 88: 3689–3698
- 38 Lekka M, Laidler P, Gil D, et al. Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy. *Eur Biophys J*, 1999, 28: 312–316
- 39 Canetta E, Riches A, Borger E, et al. Discrimination of bladder cancer cells from normal urothelial cells with high specificity and sensitivity: Combined application of atomic force microscopy and modulated Raman spectroscopy. *Acta Biomater*, 2014, 10: 2043–2055
- 40 Shojaei-Baghini E, Zheng Y, Michael A S, et al. Mechanical characterization of benign and malignant urothelial cells from voided urine. *Appl Phys Lett*, 2013, 102: 123704
- 41 Sharma S, Santiskulvong C, Bentolila L A, et al. Correlative nanomechanical profiling with super-resolution F-actin imaging reveals novel insights into mechanisms of cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Nanomedicine*, 2012, 8: 757–766
- 42 Xu W, Mezencev R, Kim B, et al. Cell stiffness is a biomarker of the metastatic potential of ovarian cancer cells. *PLoS One*, 2012, 7: e46609
- 43 Ding Y X, Cheng Y, Sun Q M, et al. Mechanical characterization of cervical squamous carcinoma cells by atomic force microscopy at nanoscale. *Med Oncol*, 2015, 32: 71
- 44 Swaminathan V, Mythreye K, O'Brien E T, et al. Mechanical stiffness grades metastatic potential in patient tumor cells and in cancer cell lines. *Cancer Res*, 2011, 71: 5075–5080
- 45 Palmieri V, Lucchetti D, Maiorana A, et al. Biomechanical investigation of colorectal cancer cells. *Appl Phys Lett*, 2014, 105: 123701
- 46 Tan Y H, Fung T K, Wan H X, et al. Biophysical characterization of hematopoietic cells from normal and leukemic sources with distinct primitiveness. *Appl Phys Lett*, 2011, 99: 083702
- 47 Zheng Y, Wen J, Nguyen J, et al. Decreased deformability of lymphocytes in chronic lymphocytic leukemia. *Sci Rep*, 2015, 5: 7613
- 48 Takahashi A, Watanabe T, Mondal A, et al. Mechanism-based inhibition of cancer metastasis with (–)-epigallocatechin gallate. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 443: 1–6
- 49 Weder G, Hendriks-Balk M C, Smajda R, et al. Increased plasticity of the stiffness of melanoma cells correlates with their acquisition of metastatic properties. *Nanomedicine*, 2014, 10: 141–148
- 50 Watanabe T, Kuramochi H, Takahashi A, et al. Higher cell stiffness indicating lower metastatic potential in B16 melanoma cell variants and in (–)-epigallocatechin gallate-treated cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012, 138: 859–866
- 51 Gossett D R, Tse H T, Lee S A, et al. Hydrodynamic stretching of single cells for large population mechanical phenotyping. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 7630–7635
- 52 Tse H T, Gossett D R, Moon Y S, et al. Quantitative diagnosis of malignant pleural effusions by single-cell mechanophenotyping. *Sci Transl Med*, 2013, 5: 212ra163
- 53 Cross S E, Jin Y S, Tondre J, et al. AFM-based analysis of human metastatic cancer cells. *Nanotechnology*, 2008, 19: 384003
- 54 Faria E C, Ma N, Gazi E, et al. Measurement of elastic properties of prostate cancer cells using AFM. *Analyst*, 2008, 133: 1498–1500
- 55 Chen C L, Mahalingam D, Osmulski P, et al. Single-cell analysis of circulating tumor cells identifies cumulative expression patterns of EMT-related genes in metastatic prostate cancer. *Prostate*, 2013, 73: 813–826

- 56 Ahn B M, Kim J, Ian L, et al. Mechanical property characterization of prostate cancer using a minimally motorized indenter in an *ex vivo* indentation experiment. *Urology*, 2010, 76: 1007–1011
- 57 Shin T Y, Kim Y J, Lim S K, et al. Robotic mechanical localization of prostate cancer correlates with magnetic resonance imaging scans. *Yonsei Med J*, 2013, 54: 907–911
- 58 Tan Y H, Sun D. Apply robot-tweezers manipulation to cell stretching for biomechanical characterization. In: Mavroidis C, Ferrerira A, eds. *Nanorobotics: Current Approaches and Techniques*. New York: Springer, 2013. 223–239
- 59 Palmieri V, Lucchetti D, Maiorana A, et al. Mechanical and structural comparison between primary tumor and lymph node metastasis cells in colorectal cancer. *Soft Matter*, 2015, 11: 5719–5726
- 60 Babahosseini H, Strobl J S, Aqah M. Single cell metastatic phenotyping using pulsed nanomechanical indentations. *Nanotechnology*, 2015, 26: 354004
- 61 Lee L M, Liu A P. A microfluidic pipette array for mechanophenotyping of cancer cells and mechanical gating of mechanosensitive channels. *Lab Chip*, 2015, 15: 264–273
- 62 Runge J, Reichert T E, Fritsch A, et al. Evaluation of single-cell biomechanics as potential marker for oral squamous cell carcinomas: A pilot study. *Oral Dis*, 2014, 20: e120–e127
- 63 Fujiki H, Suganuma M. Green tea: An effective synergist with anticancer drugs for tertiary cancer prevention. *Cancer Lett*, 2012, 324: 119–125
- 64 Lu Q Y, Jin Y S, Pantuck A, et al. Green tea extract modulates actin remodeling via Rho activity in an *in vitro* multistep carcinogenic model. *Clin Cancer Res*, 2005, 11: 1675–1683
- 65 Lu Q Y, Jin Y S, Zhang Z F, et al. Green tea induces annexin-I expression in human lung adenocarcinoma A549 cells: Involvement of annexin-I in actin remodeling. *Lab Invest*, 2007, 87: 456–465
- 66 Sharma S, Santiskulvong C, Rao J, et al. The role of Rho GTPase in cell stiffness and cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Integr Biol*, 2014, 6: 611–617

Challenges of cancer precision medicine and prospective application of cancer cell nanomechanotypical analysis

RAO JianYu^{1,2}, ZHANG Yue⁴, YU WeiBo², FENG JianTao¹, BIAN XiuWu³ & HE Jie¹

¹ Cancer Institute and Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China;

² Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of California, Los Angeles CA 90095, USA;

³ Institute of Pathology and Southwest Cancer Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;

⁴ 3J Biotechnology (Beijing) Co., Ltd, Beijing 100027, China

As the cancer burden is increasing rapidly in China today, there is an urgent need to develop robust new technologies for cancer early detection, management, as well as methods that can be used for accurate prognostic prediction.

The hallmark of cancer is the invasive and metastatic nature of the disease. Pathological examination, though considered currently as the gold standard for cancer diagnosis, may have limited utility especially in prognostic prediction. Even armed with exciting technologies such as next generation sequencing, information obtained from conventional tissue-level analysis may be limited by the indirect, partial, and fragmented nature of the data, whereas precise determination of cancer cell biological behavior such as invasion or metastasis on single cell level is difficult if not impossible. Cancer cell invasion and metastasis are partly regulated by altered cytoskeletal machinery and so called “epithelial mesenchymal transition (EMT)” that result from the complex interplay of activation/inactivation of multiple signaling pathways regulating these cellular events, which can occur at either the genetic or epigenetic level. However, some studies have demonstrated that the dynamic nature of cytoskeletal changes such as actin remodeling makes it difficult to utilize cytoskeletal changes or EMT per se as a biomarker for cancer. Even more challenge is the management of disease, especially premalignant lesions that by definition may or may not progress to invasive cancer. Drugs tailored toward specific molecular targets and immune-check points may be effective in late stage cancers, but the benefit towards patients with premalignant lesions remains to be seen. While there may be many reasons for the limited success of current cancer treatment modalities for improving patient’s overall survival, the most important factor is the heterogeneous nature of cancer.

Recently we and others showed that cancer cell mechanical properties, such as cell elasticity, stiffness, adhesion force, motion and motility, deformability, etc, can be directly measured by state of the art, label-free nanotechnologies and microfluidic technologies at the single cell level. These technologies include Atomic Force Microscope (AFM), deformability cytometer, parallel membrane filtration, and magnetic tweezers, among others. These mechanical properties as the end result of a complex interplay of alterations of cellular genetic, epigenetic, and tissue microenvironment are intimately related to cancer cell behaviors including growth, invasion, metastasis, and drug response. Thus, measurement of cellular mechanical properties may eventually be used on one hand to grade individual tumor cell’s invasive and metastatic potential, and determining cancer cell’s sensitivity for a particular drug treatment on the other. It is foreseeable that an approach combining mechanotypic profiling with morphological and molecular analyses, a process called “Nanocytology” may be developed for not only as a new cancer diagnostic platform with improved diagnostic accuracy, but also as a marker for the risk of cancer progression and selecting appropriate drugs for treatment, development and progression. This review will provide a narrative for the current status of studies of cancer cell biomechanical properties, focusing on the underlying molecular mechanisms and its possible application in cancer detection and management.

cancer, precision and personalized medicine, cellular biomechanical, nanotechnology

doi: 10.1360/N972015-00793