

ANLN缺失后Hela细胞的力学特性与骨架蛋白变化分析

徐丽萌, 罗文字, 张书伟, 王立(太原理工大学生物医学工程学院, 山西省太原市 030024)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1875

ORCID: 0000-0002-3501-4467(徐丽萌)

文章快速阅读:

文章特点一

- (1)ANLN 作为胞内重要的脚手架蛋白, 其作用机制和形式目前已较为明确, 但其所能引起的细胞力学特性改变却鲜有报道;
- (2)实验采用原子力显微镜技术分析 ANLN 敲降细胞与正常细胞表面弹性模量分布以及细胞膜破坏力的差异, 并比较肌动蛋白纤维的分布特征, 为细胞铺展、细胞间相互作用的认识和调控, 以及癌变组织微环境的研究提供支持。

准备 Hela 细胞以及制备 ANLN 敲降的 Hela 细胞株

原子力显微镜测试细胞力学性能

肌动蛋白纤维荧光染色样本制备

细胞表面弹性模量

细胞边缘区域破膜力

激光共聚焦显微镜观察

结果与结论:

- (1)敲降 ANLN 的 Hela 细胞表面弹性模量明显高于未经处理的正常 Hela 细胞; 正常细胞的弹性模量更倾向于极性分布(两极间逐步降低);
- (2)敲降 ANLN 的 Hela 细胞对边缘区域影响最大, 增大了细胞边缘区域的重构, 细胞需要聚集更多的骨架蛋白及其结合蛋白来稳定细胞状态, 导致了更高的弹性模量

徐丽萌, 女, 1993 年生, 河北省平乡县人, 汉族, 太原理工大学在读硕士, 主要从事细胞力学方面的研究。

通讯作者: 王立, 博士, 讲师, 太原理工大学生物医学工程学院, 山西省太原市 030024

文献标识码: B

来稿日期: 2019-03-06

送审日期: 2019-03-15

采用日期: 2019-04-15

在线日期: 2019-09-26



文题释义:

Anillin 蛋白(ANLN): 最早是以 F-actin 的绑定蛋白被发现的, 后经研究表明其与细胞骨架的肌动蛋白纤维和肌球蛋白等主要组分相互作用, 是一种高度保守的脚手架蛋白, 在胞质分裂中稳定收缩环。在细胞分裂间期中维持正常的细胞-细胞连接和细胞形态。

原子力显微镜: 利用探针与测量样本之间的各种相互作用力, 再通过激光束反射放大微悬臂形变的信号, 能够以极高分辨率(纳米级)检测样本表面并成像, 同时可对样本进行力学性能测试, 获得样本表面特定点的力-距离曲线, 再通过曲线分析获得精确的力学特性, 是近期运用最为广泛的工具之一。

摘要

背景: 目前关于 ANLN 蛋白在细胞分裂间期调节细胞形态、细胞-细胞间接完整性以及胞质分裂中稳定收缩环的作用已经明确, 但其对细胞力学性能和骨架蛋白的影响还鲜有报道。

目的: 探讨 ANLN 缺失对分裂间期细胞力学特性与骨架蛋白的影响。

方法: 通过原子力显微镜分别测量正常 Hela 细胞与 siRNA 敲降 ANLN 的 Hela 细胞的表面弹性模量和破膜力; 采用激光共聚焦显微镜观察正常 Hela 细胞与 siRNA 敲降 ANLN 的 Hela 细胞的肌球蛋白 II A 以及肌动蛋白纤维分布特征。

结果与结论: ①敲降 ANLN 的 Hela 细胞的表面弹性模量明显高于未经处理的正常 Hela 细胞, 与敲降 ANLN 的细胞相比, 正常细胞的表面弹性模量更倾向于极性分布(两极间逐步降低), 但两组细胞长轴边缘区域的破膜力并没有明显差别; ②ANLN 敲降组细胞在边缘位置有较低的肌球蛋白 II A 分布; ③ANLN 敲降组近底层细胞-细胞连接区域的肌动蛋白纤维趋向更散乱, 并且细胞内纤维束沿长轴排列不明显, 中层有细胞间隙变大的倾向; ④结果说明, 敲降 ANLN 对细胞的边缘区域影响最大, ANLN 的缺失会导致细胞边缘区域更频繁的重构, 细胞需要聚集更多的骨架蛋白及其结合蛋白来稳定细胞状态, 导致了更高的表面弹性模量。

关键词:

ANLN 蛋白; 细胞铺展; 原子力显微镜; 力曲线; 表面弹性模量; 破膜力; 细胞骨架; 肌动蛋白纤维; 国家自然科学基金

中图分类号: R459.9; R394.2; R318

基金资助:

国家自然科学基金(青年)(31300771), 项目负责人: 王立

Xu Limeng, Master candidate, College of Biomedical Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, Shanxi Province, China

Corresponding author: Wang Li, MD, Lecturer, College of Biomedical Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, Shanxi Province, China

Mechanical properties and cytoskeletal protein changes after ANLN deficiency

Xu Limeng, Luo Wenyu, Zhang Shuwei, Wang Li (College of Biomedical Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, Shanxi Province, China)

Abstract

BACKGROUND: To date, ANLN has definite roles in altering cell shape, regulating cell-cell junction integrity in interphase and stabilizing actomyosin contractile rings in cytokinesis, but its effects on cell mechanical properties and on cytoskeletal proteins have rarely been reported.

OBJECTIVE: To investigate the effect of ANLN deletion on the mechanical properties and cytoskeleton of interphase *Hela* cells.

METHODS: Surface elastic modulus and membrane rupture force of normal untreated *Hela* cells and ANLN RNA stably knocked down *Hela* cells were measured by atomic force microscopy. We screened for the cells that stably expressed mCherry-Myosin II A, and observed the distribution characteristics of cytoskeletal proteins by laser scanning confocal microscopy.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The elastic modulus of *Hela* cells with ANLN stably knocked down was significantly higher than that of normal *Hela* cells, and the elastic modulus of normal cells were more prone to polar distribution (gradually decreasing between the two poles) than that of ANLN knockdown *Hela* cells. However, there was no significant difference in the membrane rupture force at the long-axis edge region between the two groups. (2) Myosin IIA lowly expressed in the marginal region of ANLN knockdown cells. (3) The actin fibers tended to be scattered in the near-bottom cell-cell junction region of the ANLN knockdown group, and there were no obvious intracellular fibers bundles arranging along the long axis. The cell gap tended to enlarge in the middle layer. To conclude, ANLN knockdown cells have the greatest impact in the marginal region, the deficiency of ANLN leads to a more frequent remodeling in the cell marginal region, and the cells need to accumulate more cytoskeletal proteins and binding proteins to stabilize the cell state, resulting in higher modulus of elastics.

Key words: ANLN protein; cell spreading; atomic force microscopy; force curve; surface elastic modulus; membrane rupture force; cytoskeleton; actin fiber; National Natural Science Foundation of China

Funding: the National Natural Science Foundation of China (Youth Program), No. 31300771 (to WL)

0 引言 Introduction

Anillin(ANLN)是一种高度保守的多结构域蛋白, ANLN与Rho激酶、肌动蛋白纤维和肌球蛋白细胞骨架主要组分相互作用,在胞质分裂时负责稳定收缩环^[1-8]。ANLN在细胞-细胞连接中同样发挥关键作用,敲降ANLN会破坏紧密的胞间连接,导致细胞形态变化并增大细胞间的间隙^[9-10];同时会引起细胞间连接处的Rho激酶、肌动蛋白纤维和肌球蛋白异常,胞质分裂期甚至会导致分裂失败^[4-7, 11]。ANLN作为胞内重要的脚手架蛋白,其作用机制和形式目前已较为明确,但其所能引起的细胞力学特性改变却鲜有报道。细胞的力学特性在细胞的形态维持、运动和迁移、细胞间连接的形成以及细胞与细胞外基质的作用中均发挥重要作用^[12-13]。细胞的表面弹性模量是细胞力学的重要参数,与细胞结构和功能密切相关,一般认为由细胞骨架来决定细胞表面弹性模量,其中肌动蛋白纤维起主要作用,肌球蛋白和中间纤维等也较为重要^[14-17],而ANLN作为细胞骨架中重要的脚手架蛋白,其缺失可能对细胞的力学性能有很大影响,因此实验探讨ANLN缺失对细胞力学特性和骨架蛋白的影响。

原子力显微镜以其高精度、可进行活细胞操作被视为测量细胞的主要手段^[18-20],可测量形貌和表面弹性模量等特征^[15-16, 21]。实验采用原子力显微镜技术分析ANLN敲降细胞与正常细胞表面弹性模量分布以及细胞膜破坏力的差异,并比较肌动蛋白纤维的分布特征,为细胞铺展、细胞间相互作用的认识和调控,以及癌变组织微环境的研究提供支持。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学实验。

1.2 时间及地点 于2017年4月至2018年12月在太原理工大学生物医学工程学院完成。

1.3 材料

1.3.1 细胞株 *Hela*细胞(人宫颈癌细胞株)购于美国菌种保藏中心。

1.3.2 实验试剂与仪器 HEK293V细胞(人胚肾细胞)(美国菌种保藏中心,美国);PEG慢病毒纯化试剂盒(英茂盛业公司,中国);*Bam*H I、*Eco*R I内切酶、Fermentas T₄ DNA连接酶、大肠杆菌感受态细胞(DH5 α)(大连宝生物Takara,中国);pCMV-mCherry-MHC-IIA质粒(35687, Addgene,美国);Trizol RNA提取试剂(Omega公司,日本);Plasmid Plus Mini Kit质粒提取试剂盒(Qiagen公司,德国);低糖DMEM培养液(Hyclone公司,美国);胎牛血清(Gibco公司,美国);Phalloidin-Tetramethylrhodamine B isothiocyanate(p1951, Sigma公司,美国);35 mm培养皿(NEST公司,中国);CO₂细胞培养箱(Thermo Fisher公司,美国);实时荧光定量PCR仪(ABI公司,德国);CCD图像采集系统(DP73,奥林巴斯公司,日本);加热环(自制);激光共聚焦显微镜(FV1000,奥林巴斯公司,日本);原子力显微镜(BioScope Catalyst,布鲁克公司,美国)。

1.4 实验方法

1.4.1 ANLN敲降细胞株的获取 人工设计的寡核苷酸片段要插入载体中特定的酶切位点中^[17, 22]。导向目标基因ANLN mRNA而设计的19 nt的干扰片段,包含于寡核苷酸。化学合成正向和反向两条寡核苷酸,正、反向寡核苷酸退火后与载体连接,插入*Bam*H I、*Eco*R I位点之间,见表1。

连接线性化pLVshRNA-EGFP(2A)Puro载体并用连接后产物转化大肠杆菌感受态细胞(DH5 α),采用Qiagen Plasmid Plus Midi Kit质粒提取试剂盒提取;将ANLN RNA

表 1 干扰靶点与插入序列

Table 1 Interference targets and insertion sequences

载体名称	插入序列(5'-3')	靶点
pLVshRNA-ANLN-1	GGA TCA ATA GCA GCA GTG TTT CAA GAG AAC ACT GCT GCT ATT GAT CCT TTT TT	GGA TCA ATA GCA GCA GTG T
pLVshRNA-ANLN-2	GGC TGA ACT CAA GAT TGG ATT CAA GAG ATC CAA TCT TGA GTT CAG CCT TTT TT	GGC TGA ACT CAA GAT TGG A
pLVshRNA-ANLN-3	GCA GGA AGC TAC ATT CTG TTT CAA GAG AAC AGA ATG TAG CTT CCT GCT TTT TT	GCA GGA AGC TAC ATT CTG T
pLVshRNA-ANLN-4	GCC TCA ATT TCC AGC TCT GTT TCA AGA GAA CAG AGC TGG AAA TTG AGG TTT TTT	CCT CAA TTT CCA GCT CTG T
pLVshRNA-Control	ATC GAC TAG CCA CTT AGA CTT CAA GAG GTC TAA GTG GCT AGT CGA TTT TTT TT	ATC GAC TAG CCA CTT AGA C

干扰慢病毒载体及空白慢病毒载体与pH1、pH2共转染293V细胞，包装ANLN RNA干扰慢病毒及对照慢病毒，用PEG慢病毒纯化试剂盒纯化病毒。利用得到的慢病毒载体感染Hela细胞，并挑选具有抗性的单克隆细胞株进行鉴定。目的基因引物：ANLN-F：GCT GAT GAT GCG TCT TTG GT；ANLN-R：CTC CCT TGG ATG GAA CTG TCT；内参引物：GAPDH(H)-F：CAA GGG CAT CCT GGG CTA CAC T；GAPDH(H)-R：CTC TCT CTT CCT CTT GTG CTC TTG C。得到ANLN敲降率约90%的单克隆Hela细胞株。

1.4.2 细胞实验准备 细胞培养于37 °C，体积分数5%的CO₂细胞培养箱中。待测细胞经胰酶消化重新接种于35 mm培养皿，生长48 h后进行原子力显微镜测量、肌动蛋白纤维荧光染色、激光共聚焦显微镜分析等。

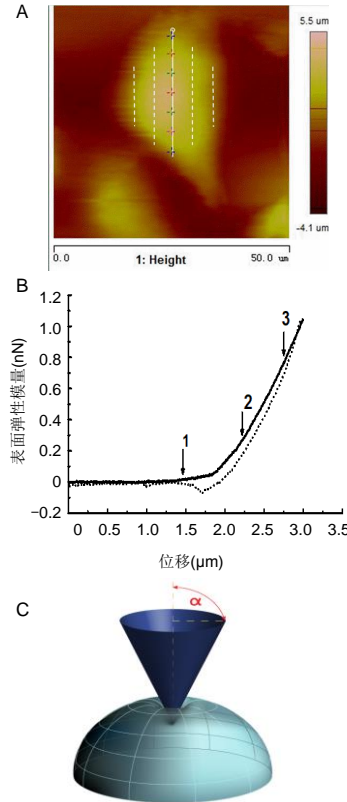
1.4.3 原子力显微镜测定细胞的表面弹性模量 通过原子力显微镜对正常Hela细胞以及敲降ANLN的Hela细胞进行形貌扫描后，将细胞长轴均匀划分为8份，对称选取7个点，在长轴两侧各取两条平行长轴的线，分别对称且均匀的取5个和3个点，见图1A。将作用力控制为1 nN，每个测量点获取3条力曲线，可获得力-距离曲线，见图1B，通过拟合力曲线得到表面弹性模量，可分析得出细胞表面力学特性分布。

图1B为典型的贴壁细胞力曲线，曲线从左至第1个箭头处呈水平直线，力基本不变，表示微悬臂还未发生偏转，说明针尖还未与细胞接触；当针尖下压至第1个箭头处时，力曲线呈非线性，表明针尖开始接触细胞表面并逐渐下压细胞，悬臂发生偏转，细胞呈非均质弹性体；针尖继续下压到第2个箭头处，力曲线开始表现为拟线性状态，可近似将细胞看为一种均质弹性体^[8, 23]。通过拟合第2个箭头至第3个箭头间曲线的斜率可大致推断近似弹性体状态下的细胞表面弹性模量。

表面弹性模量由Hertz's模型来计算，见图1C，其中E为所求的表面弹性模量，δ为切入的深度，F为所施加的力。

α是探针半张角为18°，ν为泊松比，假定为0.5。表面弹性模量求解公式为：

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



图注：图中 A 为细胞表面弹性模量测定的位置选取示意图，大小为 50 μm×50 μm；B 为力曲线示意图，横坐标为针尖下压距离，纵坐标为所测细胞表面力，实线为进针曲线，虚线为退针曲线，1 点代表探针与细胞接触点，2，3 点之间的曲线表现为拟线性状态，是细胞表面弹性模量的计算选取区域；C 为细胞的 Hertz's 按压模型，α 为探针半张角

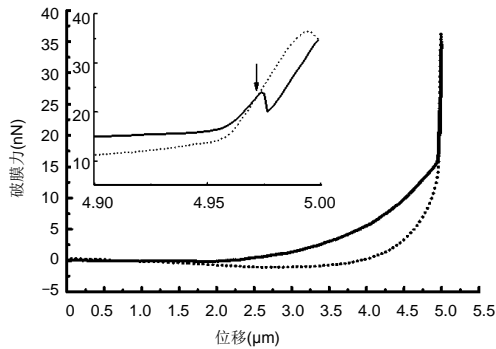
图 1 HeLa 细胞表面弹性模量测试位置选取、力曲线以及 Hertz's 模型压痕实验示意图

Figure 1 Position and force curve of surface elastic modulus testing in HeLa cells and Hertz's indentation mode

1.4.4 原子力显微镜测定细胞破膜力^[24] 使用原子力显微镜对正常以及敲降ANLN的Hela细胞进行形貌扫描后选取细胞长轴边缘区域(1.5–2.5 μm)进行破膜实验，即逐渐增大施加于细胞表面的力，直到细胞膜破裂为止，根据产生的力-距离曲线读取并记录破膜力，见图2。

1.4.5 肌动蛋白纤维与肌球蛋白 II A 的分布 实验分别测定正常和敲降ANLN的Hela细胞株的肌动蛋白纤维与肌球蛋白 II A 的分布，其中肌动蛋白纤维分布采用罗丹明鬼笔环肽对肌动蛋白染色，肌球蛋白 II A 分布采用 pCMV-mCherry-MHC-IIA 转染后筛选得到的能稳定表达荧光肌球蛋白 II A 的细胞株。

1.5 主要观察指标 ①原子力显微镜得到的力曲线及其表面弹性模量、破膜力；②肌球蛋白 II A 在活细胞内沿长轴的荧光强度分布；③肌动蛋白纤维的固定荧光染色结果。



图注: 实线为进针曲线, 虚线为退针曲线, 内置图为局部曲线放大图, 箭头所指为破膜标志

图 2 *Hela* 细胞破膜力曲线示意图

Figure 2 Typical force curve of membrane rupture

1.6 统计学分析 使用SPSS 13.0统计软件, 采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

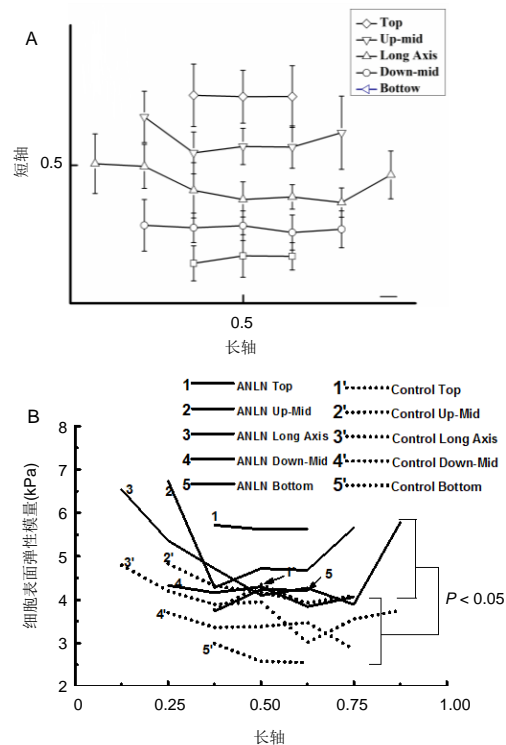
2 结果 Results

2.1 ANLN敲降细胞的表面弹性模量分布 实验数据预处理方法为各点数据除去一个最大值和一个最小值, 近中心短轴(Up-mid或Down-mid位置)扩大50%(或者缩小25%); 短轴末端(Top或Bottom位置)扩大100%(或缩小50%), 通过Origin 8.1软件绘制ANLN敲降组的方差分布图, 正常组、敲降组的均值对比图, 见图3。从图3中可见, 正常组与ANLN敲降组细胞长轴、短轴的表面弹性模量分布都不对称; 敲降组的表面模量明显高于正常组, 在平行长轴的一组相应数据中, 1-1', 2-2', 3-3', 4-4', 5-5'组间差异均有显著性意义($P < 0.05$); 正常组细胞的模量更倾向于两极间逐步降低, ANLN敲降组的两极表面弹性模量高于中心区域。

2.2 长轴末端的ANLN敲降细胞的破膜力分布 图4为ANLN敲降组和正常细胞长轴边缘区域(1.5-2.5 μm)内的破膜力对比图, 其中星点代表正常细胞组, 方块代表ANLN敲降组, 在长轴边缘区域, 两组细胞的破膜力并没有明显差别, 且破膜力均表现出随细胞高度增加而增加的趋势。

2.3 肌球蛋白IIA在细胞内的分布特征 以核区最小值为基准值进行荧光强度归一化, 以总轴长为基准值进行轴长归一化, 取得方差曲线后进行平滑处理, 见图5A, 并对末端区域的荧光强度做了对比, 见图5B, 可见ANLN敲降组细胞在边缘位置有较低的肌球蛋白IIA分布, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。

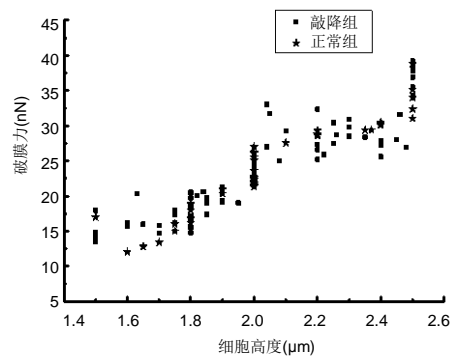
2.4 肌动蛋白纤维在细胞内的分布特征 图6为ANLN敲降*Hela*细胞与正常*Hela*细胞的肌动蛋白纤维分布差异对比图, 从图6中可以看出, ANLN敲降组与正常组细胞的肌动蛋白纤维分布主要差异在于: ANLN敲降组近底层细胞-细胞连接区域的肌动蛋白纤维趋向更散乱, 并且细胞内纤维束沿长轴排列不明显。在中层确实有细胞间隙变大的倾向, 但是中层的肌动蛋白纤维在两组间并未出现显著不同。



图注: 图中 A 为 ANLN 敲降组表面弹性模量方差图, 图中右下角为方差标尺, 代表 1 kPa; B 为正常组、敲降组细胞表面弹性模量对比图, 其中实线(1-5)代表敲降组, 虚线(1'-5')代表正常对照组

图 3 ANLN 敲降组的表面弹性模量方差分布图及两组细胞表面弹性模量分布对比图

Figure 3 The elastic modulus variance distribution of the ANLN knockdown group and the comparison of surface elastic modulus distribution between two groups



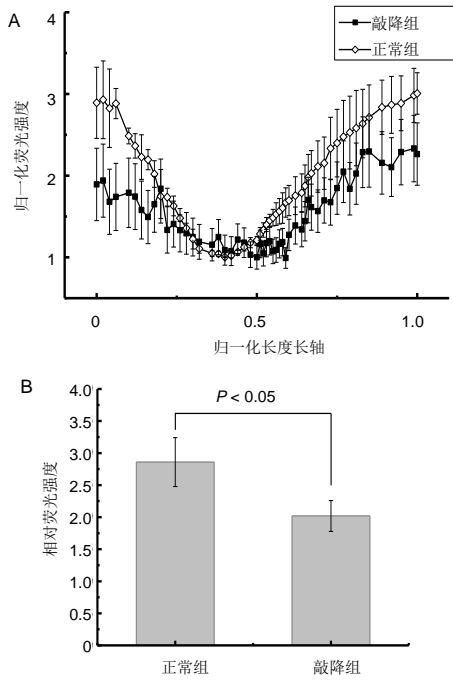
图注: ANLN 敲降组和正常细胞长轴边缘区域(1.5-2.5 μm)内的破膜力对比图, 其中星点代表正常细胞组, 方块代表 ANLN 敲降组, 在长轴边缘区域, 两组细胞的破膜力并没有明显差别, 且破膜力均表现出随细胞高度增加而增加的趋势

图 4 ANLN 敲降 *Hela* 细胞与正常 *Hela* 细胞的破膜力对比图

Figure 4 Comparison of membrane rupture force between ANLN knockdown cells and normal cells

3 讨论 Discussion

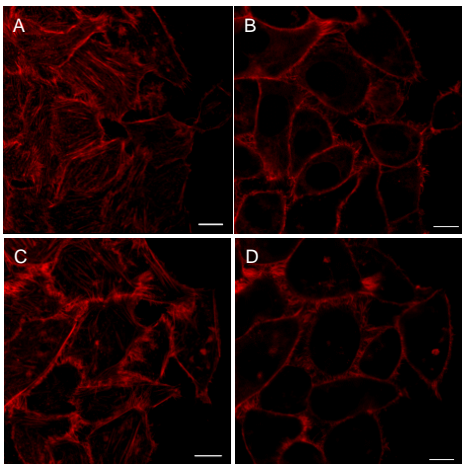
一直以来, 细胞的表面弹性模量被认为区别正常细胞和癌细胞的重要指标之一^[14, 16], 表面弹性模量也是细胞力学性能的重要指标。鉴于ANLN是细胞骨架的重要调控和组成成分, 作者针对细胞的表面弹性模量进行了测量, 判断ANLN蛋白对细胞表面弹性模量的影响。ANLN RNA稳



图注：图中 A 为 ANLN 敲降组以及正常组 HeLa 细胞长轴的肌动蛋白 IIA 归一化荧光强度的分布；B 为两组细胞长轴末端的肌动蛋白 IIA 相对荧光强度的分布

图 5 ANLN 敲降 HeLa 细胞与正常 HeLa 细胞的肌球蛋白 IIA 沿长轴末端的荧光强度对比图

Figure 5 The fluorescence intensity of myosin IIA along the long axis of ANLN knockdown cells and normal cells



图注：图中 A 为正常组近底层的肌动蛋白纤维分布；B-D 分别为正常组中层、ANLN 敲降组近底层、ANLN 敲降组中层的肌动蛋白纤维分布图，标尺 10 μm

图 6 ANLN 敲降 HeLa 细胞与正常 HeLa 细胞的肌动蛋白纤维分布差异

Figure 6 The distribution of actin fibers in ANLN knockdown cells and normal cells

定敲降的 HeLa 细胞表面弹性模量明显高于未经处理的正常 HeLa 细胞，以往研究表明癌细胞表面弹性模量要比正常细胞低的多^[25-26]，而癌变细胞中 ANLN 的含量高于正常细胞^[27]，因此可以认为敲降 ANLN 后 HeLa 细胞的表面弹性模量增大是合理的，并且发现在细胞内肌动蛋白纤维和肌球蛋白 II A 分布减少，这是 ANLN 不足导致的^[9]，作者推测

ANLN 的不足促进了细胞骨架的重组，敲降细胞需要聚集更多贡献表面弹性模量的其他骨架蛋白及其结合蛋白来稳定细胞状态，导致了更高的表面弹性模量。敲降细胞骨架的重构尤其是细胞边缘区域的重构更为明显，具体表现为敲降细胞边缘区域表面弹性模量差异和方差更大，细胞边缘聚集的肌动蛋白纤维更多，虽然肌球蛋白 II A 聚集少于正常细胞，更加说明在细胞表面弹性模量的众多影响因素中，肌动蛋白纤维占首要位置^[14-17]。

ANLN 蛋白的影响甚广，不仅严重影响着细胞的表面弹性模量，更是通过 Rho 激酶、肌动蛋白纤维等相互作用，影响细胞间连接的完整性^[9-10]，敲降 ANLN 的细胞边缘区域的肌动蛋白纤维排布散乱，导致细胞间连接不再完整，直接体现在细胞间隙变大。有研究表明 ANLN 在胞质分裂期还可通过纺锤体微管连接收缩环从而促进细胞极性的确立和正常分裂^[11]，从荧光染色结果可看出细胞内纤维束沿长轴排列不明显，这表明严重缺乏 ANLN 的细胞在极性建立上较差，而正常细胞的表面弹性模量更趋于极化(两极间逐步降低)也再次支持了这个结果。此外，ANLN 还可通过影响隔膜蛋白的定位来控制细胞膜的完整性^[2, 28]，因此实验对比了两组细胞长轴边缘区域的破膜力，但并未有明显差异，破膜力与以往研究中的增长趋势相同^[29-30]，推测原因可能是 ANLN 虽然对细胞膜的完整性有影响，但影响较小或可忽略不计，也可能是因为边缘区域更为明显的重构聚集了大量隔膜从而保证了细胞膜的完整性，具体的原因和机制还有待更深入研究。

综上所述，ANLN 对 HeLa 细胞的力学特性有显著性影响，尤其是对细胞表面刚度的影响，ANLN 的匮乏使得细胞表面弹性模量增大，同时也导致细胞间连接变弱，有可能影响着癌变组织的聚集和转移能力，目前存在很多针对力学特性对肿瘤微环境、生物组织影响的研究^[12, 31-32]，因此 ANLN 的缺失对细胞层面的基础研究是必要且有意义的，可为癌变组织的检测以及治疗提供有力参考依据。

致谢：感谢国家自然科学基金(31300771)的支持；感谢王立老师在课题提出和设计上的启发和帮助；感谢安美文、王立等老师在实验方案上给予的指导；感谢张书伟和罗文字同学的帮助。

作者贡献：实验设计为第一作者和通讯作者，实验实施为第一作者，实验评估为通讯作者，资料收集为全体作者。

经费支持：该文章接受了“国家自然科学基金(31300771)”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题：研究用细胞的实验方案符合相关伦理学要求。

写作指南：该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重：文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审：文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明：文章统计学方法已经通过太原理工大学生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容进行编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] LIU J, FAIRN GD, CECCARELLI DF, et al. Cleavage furrow organization requires PIP(2)-mediated recruitment of anillin. *Curr Biol.* 2012;22(1):64-69.
- [2] FIELD CM, ALBERTS BM. Anillin, a contractile ring protein that cycles from the nucleus to the cell cortex. *J Cell Biol.* 1995;131(1):165-178.
- [3] STRAIGHT AF, FIELD CM, MITCHISON TJ. Anillin binds nonmuscle myosin II and regulates the contractile ring. *Mol Biol Cell.* 2005;16(1):193-201.
- [4] OEGEMA K, SAVOIAN MS, MITCHISON TJ, et al. Functional analysis of a human homologue of the *Drosophila* actin binding protein anillin suggests a role in cytokinesis. *J Cell Biol.* 2000;150(3):539-552.
- [5] D'AVINO PP, TAKEDA T, CAPALBO L, et al. Interaction between Anillin and RacGAP50C connects the actomyosin contractile ring with spindle microtubules at the cell division site. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 8):1151-1158.
- [6] GREGORY SL, EBRAHIMI S, MILVERTON J, et al. Cell division requires a direct link between microtubule-bound RacGAP and Anillin in the contractile ring. *Curr Biol.* 2008;18(1):25-29.
- [7] PIEKNY AJ, GLOTZER M. Anillin is a scaffold protein that links RhoA, actin, and myosin during cytokinesis. *Curr Biol.* 2008;18(1):30-36.
- [8] TRACHE A, MEININGER GA. Atomic force microscopy (AFM). *Curr Protoc Microbiol.* 2008;Chapter 2:Unit 2C.2.
- [9] REYES CC, JIN M, BREZNAU EB, et al. Anillin regulates cell-cell junction integrity by organizing junctional accumulation of Rho-GTP and actomyosin. *Curr Biol.* 2014;24(11):1263-1270.
- [10] WANG D, CHADHA GK, FEYGIN A, et al. F-actin binding protein, anillin, regulates integrity of intercellular junctions in human epithelial cells. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72(16):3185-3200.
- [11] FRENETTE P, HAINES E, LOLOYAN M, et al. An anillin-Ect2 complex stabilizes central spindle microtubules at the cortex during cytokinesis. *PLoS One.* 2012;7(4):e34888.
- [12] MCKENZIE AJ, HICKS SR, SVEC KV, et al. The mechanical microenvironment regulates ovarian cancer cell morphology, migration, and spheroid disaggregation. *Sci Rep.* 2018;8(1):7228.
- [13] SCHIFFHAUER ES, ROBINSON DN. Mechanochemical Signaling Directs Cell-Shape Change. *Biophys J.* 2017;112(2):207-214.
- [14] PILLET F, CHOPINET L, FORMOSA C, et al. Atomic Force Microscopy and pharmacology: from microbiology to cancerology. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840(3):1028-1050.
- [15] JINSCHKEK JR, HELVEG S. Image resolution and sensitivity in an environmental transmission electron microscope. *Micron.* 2012;43(11):1156-1168.
- [16] GUO Q, XIA Y, SANDIG M, et al. Characterization of cell elasticity correlated with cell morphology by atomic force microscope. *J Biomech.* 2012;45(2):304-309.
- [17] LEKKA M, GIL D, POGODA K, et al. Cancer cell detection in tissue sections using AFM. *Arch Biochem Biophys.* 2012;518(2):151-156.
- [18] ZEMŁA J, DANILKIEWICZ J, ORZECZOWSKA B, et al. Atomic force microscopy as a tool for assessing the cellular elasticity and adhesiveness to identify cancer cells and tissues. *Semin Cell Dev Biol.* 2018;73:115-124.
- [19] NI Y, QIN Y, FANG Z, et al. ROCK Inhibitor Y-27632 Promotes Human Retinal Pigment Epithelium Survival by Altering Cellular Biomechanical Properties. *Curr Mol Med.* 2017;17(9):637-646.
- [20] CASCIONE M, DE MATTEIS V, RINALDI R, et al. Atomic force microscopy combined with optical microscopy for cells investigation. *Microsc Res Tech.* 2017;80(1):109-123.
- [21] SMITH JR, TSIBOUKLIS J, NEVELL TG, et al. AFM friction and adhesion mapping of the substructures of human hair cuticles. *Applied Surface Science.* 2013; 285(Part B):638-644.
- [22] MILLER KG, ALBERTS BM. F-actin affinity chromatography: technique for isolating previously unidentified actin-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(13):4808-4812.
- [23] CAPPELLA B, DIETLER G. Force-distance curves by atomic force microscopy. *Surf Sci Rep.* 1999;34(1-3):1-3,5-104.
- [24] SIRGHI L, BRETIGNOL F, MORNET S, et al. Atomic force microscopy characterization of the chemical contrast of nanoscale patterns fabricated by electron beam lithography on polyethylene glycol oxide thin films. *Ultramicroscopy.* 2009;109(3):222-229.
- [25] LI QS, LEE GY, ONG CN, et al. AFM indentation study of breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;374(4):609-613.
- [26] CROSS SE, JIN YS, RAO J, et al. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nat Nanotechnol.* 2007;2(12):780-783.
- [27] ZHOU W, WANG Z, SHEN N, et al. Knockdown of ANLN by lentivirus inhibits cell growth and migration in human breast cancer. *Mol Cell Biochem.* 2015;398(1-2):11-19.
- [28] FIELD CM, COUGHLIN M, DOBERSTEIN S, et al. Characterization of anillin mutants reveals essential roles in septin localization and plasma membrane integrity. *Development.* 2005;132(12):2849-2860.
- [29] ATILLA-GOKCUMEN GE, MURO E, RELAT-GOBERNA J, et al. Dividing cells regulate their lipid composition and localization. *Cell.* 2014;156(3):428-439.
- [30] YOKOKAWA M, TAKEYASU K, YOSHIMURA SH. Mechanical properties of plasma membrane and nuclear envelope measured by scanning probe microscope. *J Microsc.* 2008;232(1):82-90.
- [31] 李海涛,梁婷,邵毅杰,等. 针刺与异常机械应力对大鼠椎间盘纤维环纳米级生物力学特性影响的对比[J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(34):5510-5517.
- [32] TOMAR S, PLOTNIK JP, HALEY J, et al. ETS1 induction by the microenvironment promotes ovarian cancer metastasis through focal adhesion kinase. *Cancer Lett.* 2018;414:190-204.