



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103460039 B

(45) 授权公告日 2015.12.02

(21) 申请号 201180067006.5

G01Q 60/24(2006.01)

(22) 申请日 2011.12.12

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

61/421,655 2010.12.10 US

W0 2005/003290 A2, 2005.01.13,

Marko Loparic et al. Micro- and

Nanomechanical Analysis of Articular

Cartilage by Indentation-Type

Atomic Force Microscopy:

Validation with a Gel-Microfiber

Composite. <NANOTECHNOLOGY>. 2010, 第 98 卷

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013.08.07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2011/072494 2011.12.12

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/076729 EN 2012.06.14

审查员 于园园

(73) 专利权人 巴塞尔大学

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 玛利亚·波罗蒂内克

马科·罗帕里克

罗德里克·YH·利马

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司

公司 11002

代理人 王朋飞 刘成春

(51) Int. Cl.

G01N 33/483(2006.01)

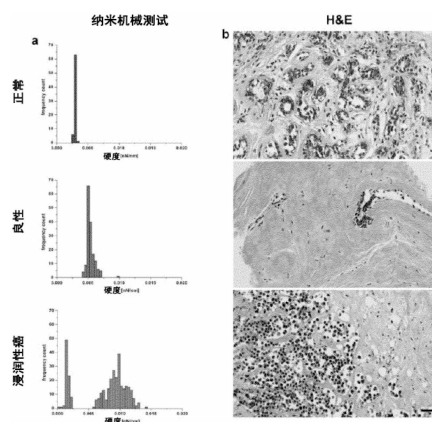
权利要求书1页 说明书24页 附图18页

(54) 发明名称

通过 AFM 将癌进展分期的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种将获自肿瘤的组织活检样本分类的方法,其包括通过用至少 100  $\mu\text{m}$  的空间分辨率测量样本上多个点来测定所述样本的多个硬度值,并确定样本是恶性的可能性。将显示出单峰硬度分布的样本归为非恶性的高可能性,而将显示至少双峰硬度分布的样本归为恶性的高可能性,其中所述硬度分布的特征在于,第一个峰呈现出比第二个峰高至少两倍的硬度值。本发明进一步涉及一种将肿瘤组织活检样本分类的系统。



1. 将肿瘤组织活检样本分类的系统,其包括:

- 装置 (100),用于以至少  $1\ \mu\text{m}$  的分辨力测定所述样本上多个点的硬度值,
- 程序化微处理器,

其中配备和指定所述程序化微处理器,以确定样本是恶性的可能性;

其中

- 将显示出至少双峰硬度分布的样本归为恶性的高可能性,其中所述至少双峰硬度分布的特征在于第一个峰呈现出比第二个峰高至少两倍的硬度值。

2. 根据权利要求 1 所述的系统,所述装置 (100) 是原子力显微镜。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的系统,其中所述装置 (100) 或原子力显微镜包括:- 探针 (2),其具有用于与所述样本 (4) 相互作用的尖端 (21),其中将所述探针 (2) 构造成将所述尖端 (21) 沿着第一方向 (R) 朝所述样本 (4) 移动,- 纳米扫描仪 (1),用于保持所述样本 (4) 或所述探针 (2),

其特征在于:

所述装置 (100) 包括用于监控压电元件沿着所述第一方向 (R) 伸展的器件,用于调节所述探针 (2) 沿着所述第一方向 (R) 的水平的致动器 (3) 和用于控制所述致动器 (3) 的控制器 (31),其中所述控制器 (31) 构造成控制所述致动器 (3),从而当所述纳米扫描仪 (1) 呈现出低于或高于阈值时,调节所述探针 (2) 的所述水平。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的系统,其中所述多个点排列为  $n_1$  乘以  $n_2$  个点的网格,所述网格限定了一个区域。

5. 根据权利要求 4 所述的系统,用所述系统测定相同样本的至少两个不同区域的所述硬度值,并且所述区域的几何中心之间的距离是空间分辨率的至少 10 倍。

6. 根据权利要求 1 或 2 所述的系统,其中将显示出单峰硬度分布的样本归为非恶性的高可能性。

7. 根据权利要求 1 或 2 所述的系统,其特征在于所述组织活检样本是直径为至少  $7\ \mu\text{m}$  的圆柱状或棱柱状活检样本。

8. 根据权利要求 1 或 2 所述的系统,其中所述肿瘤是人乳腺癌或淋巴结、肺、骨、肝或脑转移瘤。

9. 根据权利要求 1 或 2 所述的系统,其特征在于在生理条件下测定所述硬度值。

10. 根据权利要求 3 所述的系统,其中通过将所述探针 (2) 或所述样本 (4) 降低或抬升 10-30% 的所述纳米扫描仪 (1) 的最大伸展来调节所述水平。

11. 根据权利要求 10 所述的系统,其中当所述纳米扫描仪 (1) 呈现出低于 20% 或高于 80% 最大伸展时,调节所述水平。

12. 根据权利要求 10 或 11 所述的系统,其中通过将所述探针 (2) 或所述样本 (4) 降低或抬升 10-30% 的所述纳米扫描仪 (1) 的最大伸展来调节所述水平。

## 通过 AFM 将癌进展分期的方法

### [0001] 描述

[0002] 本发明涉及将肿瘤的癌进展分期的方法和系统。

[0003] 细胞骨架是由肌动蛋白丝、中间丝和微管组成的超分子网络,其在细胞粘附、迁移、增殖和分化过程中得到动态重塑。这些基本细胞过程中有许多是通过机械力调节的。相应地,由这些基本过程中的变化引起的肿瘤发生,其与生物机械学的变化相关。

[0004] 原子力显微镜 (AFM) 已经用于探测分离的癌细胞的机械性能。已经认为细胞弹性和变形性是恶性转化相关的细胞结构和粘附改变的表型结果的标志。然而,只在一个特定位点测量硬度,因此没有恰当地反映出细胞的结构异质性。此外,天然组织环境的不存在很可能对机械行为具有影响。

[0005] 与微环境的相互作用引起的力变化,在引发诱导肿瘤发生的遗传变化中起着重要作用。已经显示出活细胞的机械性能高度依赖于三维 (3D) 微环境中存在的许多因素。对 3D 乳腺细胞培养物和小鼠乳腺进行的研究已经表明,与 ECM 硬化一致的基质沉积和交联的增加促进了癌症的发展和进展。在这种情况下,通过完整乳腺的无侧限压缩实现了癌症检测。然而,这种方法只能考虑肿瘤的外周区域,而大部分的潜在癌症未能得到测试。

[0006] 与邻近的正常乳腺组织相比,外周肿瘤基质的相对硬化导致了普遍的假设:乳腺癌比正常的乳腺组织或良性病变硬。从培养物中的单独细胞和从原位组织获得的硬度数据的不一致性,强调了考虑测量方法但更要考虑 3D 组织范围中存在的其他微环境因素的重要性。

[0007] 此外,在组织内的肿瘤发展和进展过程中,产生了各种生物化学梯度。氧和 pH 被认为是肿瘤发展和生长及其对治疗的应答中的关键微环境因素。例如,缺氧,作为肿瘤细胞微环境的组成部分,是恶性肿瘤的突出特征,其改变了调控细胞增殖、血管生成和细胞死亡的途径。

[0008] 然而,癌细胞和组织的机械性能尚未在缺氧环境中得到评估。迄今所用的工具包括从原发性组织提取的癌细胞的机械测量或只测量的肿瘤外周,这提供的对肿瘤组织的结构和机械异质性的了解有限。

[0009] 本发明的目的在于提供将肿瘤的癌进展分期的方法和手段。

[0010] 在通过 AFM 评价肿瘤活体切片样本的纳米机械 (nanomechanical) 性能的研究过程中形成了本发明。令人惊讶地发现,人和鼠的癌组织从肿瘤外周 (胞外基质) 至核心 (癌细胞) 呈现出逐渐软化,同时肿瘤外周的基质组织比潜在肿瘤硬。另一个令人惊讶的发现是,该组织软化与肿瘤缺氧相关。

### [0011] 定义

[0012] 本发明意义中的硬度或弹性意思是组织样本或组织对所施加力引起的变形的抵抗力。以帕斯卡 (Pa) 来测量硬度或弹性,作为组织样本的弹性模量。软组织样本的特征在于硬度值低,而坚硬组织的特征在于硬度值升高。

[0013] 这样的变形力可以通过撞击组织样本或组织的触针 (例如,作为原子力显微镜的一部分) 来施加于组织样本或组织,其中触针或组织样本在相对于彼此垂直的方向移动。

为了测量样本上的多个点,触针或样本可以另外横向移动,其中在本发明意义中横向的意思是与垂直方向垂直的方向。

[0014] 触针可以是具有尖头的悬臂或作为探针的附着胶粒。本发明意义中的悬臂的意思是只在一端锚定的梁或臂。由样本表面和尖端之间的排斥力或吸引力引起的悬臂偏移可以进行光学检测,例如,通过干涉仪或通过聚焦于悬臂背面的激光仪来检测,并反映至分开的光电二极管上,其中光电二极管作为电压差记录悬臂的偏移,可以将这转化成纳米。或者,可以通过压电传感器来检测悬臂的偏移,其中将悬臂的张力转化成电荷。

[0015] 本发明意义中的面积指的是通过网格(测量)点限定的面积,其中每个点对应于如上所述的触针的压痕轨迹,并且每个点距离下一个点不超过  $100\text{ }\mu\text{m}$ ,优选  $50\text{ }\mu\text{m}$ 、 $20\text{ }\mu\text{m}$ 、 $10\text{ }\mu\text{m}$  或  $1\text{ }\mu\text{m}$ 。作为非限制性实例,面积的大小为  $25\text{ }\mu\text{m}^2$ 、 $50\text{ }\mu\text{m}^2$ 、 $100\text{ }\mu\text{m}^2$ 、 $200\text{ }\mu\text{m}^2$ 、 $300\text{ }\mu\text{m}^2$ 、 $400\text{ }\mu\text{m}^2$ 、 $500\text{ }\mu\text{m}^2$ 、 $600\text{ }\mu\text{m}^2$ 、 $750\text{ }\mu\text{m}^2$ 、 $1000\text{ }\mu\text{m}^2$ 、 $5000\text{ }\mu\text{m}^2$  或  $10,000\text{ }\mu\text{m}^2$ ,并且两个面积的几何中心点至少离开  $100\text{ }\mu\text{m}$ 、 $200\text{ }\mu\text{m}$ 、 $300\text{ }\mu\text{m}$ 、 $400\text{ }\mu\text{m}$ 、 $500\text{ }\mu\text{m}$  或  $1\text{mm}$ 。

[0016] 对于任何给定样本测量的力和压痕深度取决于悬臂弹簧常数和尖端半径。

[0017] 本发明意义中的空间分辨率意思是组织或组织样本上两个点之间的最小距离,通过其可以区分两个点的硬度。至少  $1\text{mm}$ ,优选  $100\text{ }\mu\text{m}$ 、 $10\text{ }\mu\text{m}$  或  $1\text{ }\mu\text{m}$  的空间分辨率,意思是仍然可以分辨两个点的最大距离是  $1\text{mm}$ ,优选  $100\text{ }\mu\text{m}$ 、 $10\text{ }\mu\text{m}$  或  $1\text{ }\mu\text{m}$ 。至少  $100\text{ }\mu\text{m}$ 、优选  $10\text{ }\mu\text{m}$  或  $1\text{ }\mu\text{m}$  的空间分辨率还包括更高的分辨率。高于  $1\text{ }\mu\text{m}$  的分辨率的意思是距离小于  $1\text{ }\mu\text{m}$  的两个点仍然可以分辨。高于  $100\text{ }\mu\text{m}$  的分辨率的实例是  $10\text{ }\mu\text{m}$  和  $1\text{ }\mu\text{m}$ 。高于  $1\text{ }\mu\text{m}$  的分辨率的实例是  $0.5\text{ }\mu\text{m}$ 、 $0.1\text{ }\mu\text{m}$  和  $10\text{nm}$ 。

[0018] 本发明意义中的组织活体样本指的是通过活检获得的并且包含相邻细胞和胞外基质的组织样本。

[0019] 本发明意义中的活检意思是取出组织部分或组织用于检查的方法。这样的活检可以是针吸活检、钻孔活检、真空辅助针芯活检、中心针刺活检或钳夹活检。可以借助合适的工具如空心针、圆形快刀或解剖刀来进行取出。另外可以通过内窥镜或内窥镜方法来获得组织活检样本。

[0020] 可以通过合适的方法,如超声波或 CT(X-射线计算机断层照相法),来指导活检,其中可以检测或定位肿瘤或明显的病变。

[0021] 本发明意义中的正常组织意思是具有相同生理功能的相邻细胞的整体,所述相邻细胞的特征在于正常的、受控的生长和正常的细胞功能。

[0022] 本发明意义中的肿瘤意思是通过瘤细胞的异常生长形成的瘤或病变。肿瘤可以是良性的、恶性前的或恶性的。

[0023] 来自人乳腺癌的组织活检样本的分类是优选的。本发明意义中的良性病变或肿瘤指的是缺少转移能力的肿瘤。

[0024] 本发明意义中的恶性或“恶性肿瘤”意思是肿瘤渗透基底膜、入侵邻近组织或通过身体扩散的能力。恶性肿瘤与恶性瘤或癌症同义,特别是与浸润性癌症同义。

[0025] 本发明意义中的硬度分布意思是从个体组织活体样本测定的不同硬度值的频率。测定的硬度分布还可以拟合高斯函数。单峰硬度分布是具有单个最大值的离散硬度值的分布,这表明了是具有均一硬度的样本。双峰分布函数具有两个最大值。这样的分布是由具有两个不同硬度部分的样本引起的,例如,软肿瘤核心和硬的外周。本发明意思中的三峰硬

度分布意思是特征在于三个局部最大值的分布。三峰分布表明了正常组织、特征在于硬基质的边区域和软的肿瘤核心提供了构成分布的值。至少双峰硬度分布的样本具有双峰、三峰或  $n$ -峰 ( $n$  为  $> 1$  的整数) 分布函数。

[0026] 本发明意思中的多个意思是至少 5、7、8、9、10、20、30、40、50、100、200、300、400、500 或 100 个值。

[0027] 根据本发明的第一个方面, 提供了将获自肿瘤的组织活检样本分类的体外方法, 其包括以下步骤:

[0028] - 通过用至少  $100\ \mu\text{m}$ , 优选  $50\ \mu\text{m}$ 、 $20\ \mu\text{m}$ 、 $10\ \mu\text{m}$  或  $1\ \mu\text{m}$  的空间分辨率测量样本上的多个点来测定肿瘤活检样本的多个硬度值, 和

[0029] - 确定样本是恶性的可能性。

[0030] 根据本发明的这个方面的一个可替换方案, 将获自肿瘤的组织活检样本分类的方法包括用至少  $100\ \mu\text{m}$ , 优选  $50\ \mu\text{m}$ 、 $20\ \mu\text{m}$ 、 $10\ \mu\text{m}$  或  $1\ \mu\text{m}$  的空间分辨率测定所述样本上多个点的硬度值, 产生硬度分布, 并基于这个硬度分布确定所述样本是恶性的可能性, 由此将显示出单峰硬度分布的样本归为正常或非恶性组织的高可能性, 而显示出至少双峰硬度分布的样本归为恶性组织的高可能性。

[0031] 根据本发明这第一个方面的另一个可替换方案, 提供了将获自肿瘤的组织活检样本分类的体外方法, 其包括以下步骤:

[0032] - 用至少  $100\ \mu\text{m}$ , 优选  $10\ \mu\text{m}$  或  $1\ \mu\text{m}$  空间分辨率测定一定区域内肿瘤活检样本多个点的多个硬度值, 所述点形成  $n_1$  乘  $n_2$  个点的网格 ( $n_1$  和  $n_2$  独立地是  $> 1$  的整数), 和

[0033] - 确定样本是恶性的可能性。

[0034] 根据这后一种替换方案的一个实施方案, 对于一个区域测量了 5 乘 5 个点 (获得 25 个点)、7 乘 7 个点、10 乘 10 个点、15 乘 15 个点、20 乘 20 个点、50 乘 50 个点或 100 乘 100 个点的网格。其中每个点距离下一个点间隔一定距离, 点的间距表示分辨率。根据一个实施方案, 分辨率是  $100\ \mu\text{m}$ ; 根据另一个实施方案, 分辨率是  $50\ \mu\text{m}$ 、 $20\ \mu\text{m}$ 、 $10\ \mu\text{m}$  或  $1\ \mu\text{m}$ 。例如, 在 50 乘 50 个点的网格中,  $1\ \mu\text{m}$  分辨率形成了  $2500\ \mu\text{m}^2$  的区域。

[0035] 根据另一个实施方案, 测量了两个、三个或四个这样的区域或网格, 每个网格或区域表示活检样本区域, 其中一个网格或区域的中心点或几何中心与另一个之间的距离为  $100\ \mu\text{m}$ 、 $250\ \mu\text{m}$ 、 $500\ \mu\text{m}$  或  $1\text{mm}$ 。在一个实施方案中, 一个网格的中心点与另一个之间的几何距离为网格中的点的空间分辨率的至少 10、25、50、100 或 250 倍。

[0036] 根据本发明的一个方面, 提供了将获自肿瘤的组织活检样本分类的方法, 其包括:

[0037] - 通过用至少  $100\ \mu\text{m}$ , 优选  $10\ \mu\text{m}$  或  $1\ \mu\text{m}$  的空间分辨率测量样本上的多个点来测定所述样本的多个硬度值, 和

[0038] - 确定样本是恶性的可能性,

[0039] 其中

[0040] - 将显示出单峰硬度分布的样本归为非恶性的高可能性, 和

[0041] - 将显示出至少双峰硬度分布的样本归为恶性的高可能性, 其中所述硬度分布的特征在于, 第一个峰呈现出比第二个峰高至少两倍的硬度值。

[0042] 为了用至少  $1\ \mu\text{m}$ 、 $2\ \mu\text{m}$ 、 $5\ \mu\text{m}$ 、 $7\ \mu\text{m}$ 、 $10\ \mu\text{m}$  或  $100\ \mu\text{m}$  的空间分辨率测定硬度值, 可

以在垂直和横向上以亚微米或微米精度移动触针或样本,这意味着步调不超过  $1\text{ }\mu\text{m}$ 、 $2\text{ }\mu\text{m}$ 、 $5\text{ }\mu\text{m}$ 、 $7\text{ }\mu\text{m}$ 、 $10\text{ }\mu\text{m}$  或  $100\text{ }\mu\text{m}$ 。在以下限定的本发明各个方面的一些实施方案中,将组织样本安置在样本支持物上,如可以以亚微米或微米精度垂直和横向移动的压电致动器。或者,将组织样本安置在诸如培养皿或载玻片的样本支持物上,其中将培养皿或载玻片安置在上述的压电元件上。

[0043] 可以通过测量将触针压入组织样本中以限定压痕深度需要的力来测定样本的硬度或弹性。或者,可以通过测量用限定力将触针压入组织样本中的压痕深度来测定硬度。

[0044] 根据一个实施方案,组织样本上的触针的压痕轨迹不超过  $1$ 、 $2$ 、 $9$ 、 $16$  或  $25\text{ }\mu\text{m}^2$ ,其中压痕轨迹对应于本发明上述方面中所述的多个点中的单个点。

[0045] 根据一个实施方案,悬臂的弹簧常数为  $0.01\text{Nm}^{-1}$ 、 $0.025\text{Nm}^{-1}$ 、 $0.05\text{Nm}^{-1}$ 、 $0.06\text{Nm}^{-1}$ 、 $0.075\text{Nm}^{-1}$ 、 $0.1\text{Nm}^{-1}$ 、 $0.15\text{Nm}^{-1}$ 、 $0.2\text{Nm}^{-1}$ 、 $0.25\text{Nm}^{-1}$ 、 $0.3\text{Nm}^{-1}$ 、 $0.5\text{Nm}^{-1}$ 、 $0.75\text{Nm}^{-1}$ 、 $1\text{Nm}^{-1}$  或  $10\text{Nm}^{-1}$ 。

[0046] 根据一个实施方案中,尖端的半径为  $0.01\text{ }\mu\text{m}$ 、 $0.02\text{ }\mu\text{m}$ 、 $0.05\text{ }\mu\text{m}$ 、 $0.07\text{ }\mu\text{m}$ 、 $0.1\text{ }\mu\text{m}$ 、 $0.5\text{ }\mu\text{m}$ 、 $1\text{ }\mu\text{m}$ 、 $1.5\text{ }\mu\text{m}$ 、 $2\text{ }\mu\text{m}$ 、 $2.5\text{ }\mu\text{m}$ 、 $3\text{ }\mu\text{m}$ 、 $3.5\text{ }\mu\text{m}$ 、 $4\text{ }\mu\text{m}$ 、 $4.5\text{ }\mu\text{m}$  或  $5\text{ }\mu\text{m}$ 。

[0047] 在一个实施方案中,悬臂弹簧常数  $k$ ,和样本的硬度具有相似的量级。这导致了最佳的灵敏度。

[0048] 根据一个实施方案,施加于组织样本的力的值为  $0.05\text{nN}$ 、 $0.1\text{nN}$ 、 $1\text{nN}$ 、 $2\text{nN}$ 、 $3\text{nN}$ 、 $4\text{nN}$ 、 $5\text{nN}$ 、 $6\text{nN}$ 、 $7\text{nN}$ 、 $8\text{nN}$ 、 $9\text{nN}$ 、 $10\text{nN}$ 、 $100\text{nN}$ 、 $1000\text{nN}$ 、 $10,000\text{nN}$ 、 $100,000\text{nN}$ ,并且施用于组织样本的压痕深度为  $100\text{nm}$ 、 $300\text{nm}$ 、 $500\text{nm}$ 、 $700\text{nm}$ 、 $1000\text{nm}$ 、 $1300\text{nm}$ 、 $1500\text{nm}$ 、 $1700\text{nm}$ 、 $2000\text{nm}$ 、 $2200\text{nm}$ 、 $2500\text{nm}$ 、 $2700\text{nm}$ 、 $3000\text{nm}$ 、 $3200\text{nm}$ 、 $3500\text{nm}$ 、 $3700\text{nm}$ 、 $4000\text{nm}$ 、 $4500\text{nm}$ 、 $5000\text{nm}$ 、 $5500\text{nm}$  或  $6000\text{nm}$ 。

[0049] 根据一个实施方案,从力-位移曲线的斜率计算硬度,其中以限定的力将悬臂压入样本表面中并缩回一次或几次,并且根据尖端-样本距离测定所得到的悬臂的偏移。

[0050] 根据本发明的某些实施方案,将显示出单峰硬度分布的样本归为非恶性的高可能性,并且将显示出至少双峰硬度分布的样本归为恶性的高可能性。

[0051] 换句话说,可以将特征在于单峰硬度分布的样本归为表示恶性肿瘤的低可能性,然而,为了评估这样的样本是否表示正常组织或癌前病变,必须考虑样本的绝对硬度。与正常组织相比,良性病变通常显示出更高的硬度。在一个实施方案中,表示良性病变的单峰分布具有相同组织来源正常组织峰值的约  $1.3$  至  $2$  倍的峰值(表示分布函数中测量点的最高值)。

[0052] 双峰硬度分布很可能表示恶性肿瘤,其中软的区域赋予大量低硬度值,而坚硬的外周的硬度值大于正常组织。显示出三峰或更高模态硬度分布的样本可以归为表示恶性肿瘤或正常组织、良性病变和/或恶性肿瘤混合物的高可能性。

[0053] 根据本发明的一个实施方案,活检组织样本获自人乳腺癌或淋巴结、肺的转移瘤、肝转移瘤、脑转移瘤或其他乳腺癌转移瘤相关的组织。

[0054] 根据本发明的一个实施方案,将显示出至少双峰硬度分布的样本归为恶性的高可能性,其中所述硬度分布的特征在于,第一个峰呈现出比第二个峰高至少两倍的硬度值。

[0055] 根据一个实施方案,将多个点排列为  $n_1$  乘  $n_2$  点的网格,该网格限定了一个区域, $n_1$  和  $n_2$  独立地是  $> 1$  的整数。

[0056] 根据一个实施方案,肿瘤是人乳腺癌或淋巴结、肺、骨或脑转移瘤。

[0057] 根据一个实施方案,对于一个区域,测量了 5 乘 5 个点(获得 25 个点)、7 乘 7 个点、10 乘 10 个点、15 乘 15 个点、20 乘 20 个点、50 乘 50 个点或 100 乘 100 个点的网格。在一个优选的实施方案中,该区域限定为具有  $400\text{ }\mu\text{m}^2$  大小的  $24\times 24$  的网格。

[0058] 根据一个实施方案,测定了相同样本的至少两个不同区域的硬度值,并且所述区域的几何中心之间的距离是空间分辨率的倍数,所述倍数是空间分辨率的至少 10 倍。根据优选的实施方案,倍数是 20、30 或 50。

[0059] 根据本发明的一个实施方案,活检组织样本是直径或厚度  $> 5\text{ }\mu\text{m}$  的活检样本,并且可以通过用中空针收集活检样本来获得。根据一个实施方案,活检组织样本是直径为至少 0.5mm 的圆柱状或棱柱状活检组织样本。在一个实施方案中,活检样本是表示上述肿瘤至少一半的横切面并从肿瘤的核心至外周呈现出不同方向的圆柱状或棱柱状活检样本,并且活检样本的区域位于沿着样本纵轴在 1mm、2mm、3mm、4mm、5mm、6mm、7mm、8mm、9mm、10mm、15mm 或 20mm 距离内的样本表面上。

[0060] 更优选,收集后保持了所获得样本的三维完整性和异质性,并且组织样本从肿瘤的核心至外周呈现出不同的方向。

[0061] 根据本发明的另一个实施方案,在生理条件下进行硬度值的测定。

[0062] 本发明意义中的生理条件指的是保持活检组织样本的结构完整性和机械性能所需的条件,通过任何化学或物理试剂来维持组织的生活力,并且特别包括在收集后,将样本储存在生理缓冲液中,如磷酸盐缓冲盐水或林格氏(Ringer)溶液,并且在 20、25、30 或  $37^{\circ}\text{C}$  下进行硬度测定。林格氏溶液可以进一步补充有葡萄糖和蛋白酶混合物。此外,可以在收集后 1h、2h、6h、12h、24h、48h 或 72h 内进行活检样本组织的硬度测定,而没有改变样本的机械性能。“生理条件”特别不包括冷冻组织或融化组织,或石蜡包埋的样本。

[0063] 根据本发明的另一个优选实施方案,测定了乳腺活检样本的硬度,并且

[0064] - 将显示出特征在于峰介于 1.1kPa 至 1.85kPa 之间的硬度分布的样本归为正常乳腺组织的高可能性,

[0065] - 将显示出特征在于峰介于 1.9kPa 至 3.7kPa 之间的硬度分布的样本归为良性病变的高可能性,

[0066] - 将显示出特征在于峰介于 0.31kPa 至 0.75kPa 之间和位于大于 1.2kPa 的值处的硬度分布的样本归为恶性肿瘤的高可能性。

[0067] 根据一个实施方案,将显示出特征在于峰位于 0.31kPa 至 0.75kPa 以及 1.2kPa 至 2.0kPa 的硬度分布的样本归为恶性肿瘤的高可能性。

[0068] 本发明意义中的峰指的是硬度值分布中的局部最大值,并且表示样本内或直接邻近值内频率最高的硬度值。

[0069] 根据一个实施方案,通过测量活检样本的至少 5 个区域、10 个区域、15 个区域、20 个区域或 30 个区域来进行多个硬度值的测定,其中所述区域如上述所定义。例如,可以通过如上所列的一串区域来表示样本的纵轴。

[0070] 对于粗糙的样本,当扫描区域上样本表面的皱褶(样本在 z-轴不平整)大于 z-轴中给定的纳米扫描仪的范围(使用通用的设定,通常为  $5\text{ }\mu\text{m}$  至  $100\text{ }\mu\text{m}$ ) 时,将会出现问题。如果皱褶太大,压电元件将完全伸出或缩回。如果压电元件完全伸出但样本表面仍然下降,探针或悬臂将失去接触。另一方面,如果压电元件已经完全缩回,但样本表面仍然上升,悬

臂的力将增加而超过给定的力最大值。然后悬臂尖端被完全压入样本表面中。在两种情况中,将不再维持上述恒定的尖端-样本力。

[0071] 根据一个实施方案,通过扫描探针显微镜测定硬度值。该装置具有探针或悬臂(2),其具有用于与所述样本(4)相互作用的尖端(21),并且另外包含纳米扫描仪(1),用于保持所述样本(4)或所述探针或悬臂(2)。监控所述纳米扫描仪(1)沿着第一方向(R)的伸展,所述尖端(21)沿着所述第一方向朝所述样本(4)移动。当所述纳米扫描仪(1)呈现出低于或高于阈值的伸展时,通过另外的致动器(3)调节所述探针或悬臂(2)沿着所述第一方向(R)的水平。

[0072] 根据一个实施方案,扫描探针显微镜的分辨力为至少 $1\mu\text{m}$ 。本发明意义中的分辨力指的是点之间的最小距离,通过所述最小距离,扫描探针显微镜仍能够就样本上两个点的探测特征如电荷、磁化或机械性能区分所述两个点。至少 $1\mu\text{m}$ 的分辨力意思是显微镜能够区分开不超过 $1\mu\text{m}$ 的两个点。至少 $1\mu\text{m}$ 的分辨力还包括更高的分辨力。高于 $1\mu\text{m}$ 的分辨力意思是,显微镜可以区分距离小于 $1\mu\text{m}$ 的两个点。高于 $1\mu\text{m}$ 的分辨力的实例是 $0.5\mu\text{m}$ 、 $0.1\mu\text{m}$ 、 $10\text{nm}$ 和 $1\text{nm}$ 。

[0073] 对探针沿着第一方向的水平的调节进行设定,以防止探针的尖端离样本太近或离样本太远。可以通过沿着第一方向降低或抬升探针或降低或抬升样本来进行调节。

[0074] 本发明意义中的纳米扫描仪指的是以亚微米或至少微米精度沿着上述第一方向移动样本或探针的装置。这样的纳米扫描仪可以是压电元件或线性电动机,如音圈电动机。

[0075] 本发明意义中的压电元件指的是由通过施加电流可变形的压电材料组成的主体。这样的压电元件是沿着至少一个方向可伸展和可缩回的。此外,压电元件可以由合适的材料制得,如晶体或陶瓷,例如石英、钛酸钡、钛酸铅、钨酸钠、铌酸钠、锆钛酸铅或铁酸铋,并且可以在 $5$ 、 $10$ 、 $15$ 、 $20$ 、 $25$ 、 $30$ 、 $35$ 、 $40$ 、 $50$ 、 $60$ 、 $70$ 、 $80$ 、 $90$ 或 $100\mu\text{m}$ 范围内伸展或缩回。

[0076] 本发明意义中的音圈电动机指的是包含彼此可移动的磁外壳和电磁线圈的电动机。这样的磁外壳可以在由铁构成的外壳中包含永久磁铁。这样的电磁线圈包含围绕核心的导电线绕。音圈电动机可以另外包括弯曲的铰链结构,其可以用作探针和外壳之间的弹簧。穿过电动机的末端施加的电压使电动机朝一个方向移动,同时逆转所施加电压的极性将使电动机朝相反方向移动。本发明意义中的音圈电动机的伸展指的是其行程(stroke)或抬升,其中最大伸展指的是最大行程或抬升,而最小伸展是指零行程或抬升。

[0077] 此外,纳米扫描仪可以直接连接探针或探针组件(TOP-DOWN装备,参见图16)。或者,纳米扫描仪可以直接连接样本或样本支架(BOTTOM-UP装备,参见图17)。本发明意义中的直接连接指的是纳米扫描仪和探针、探针组件、样本或样本支架之间的物理连接,其中将物理连接设定成能够使纳米扫描仪以上述的至少第一方向移动探针、探针组件、样本或样本支架。纳米扫描仪可以进一步设定成以上述的第二和第三方向移动探针、探针组件、样本或样本支架。

[0078] 根据纳米扫描仪的构造、设计或所用材料,阈值对应于纳米扫描仪(特别是压电元件)的最佳工作范围。特别地,阈值可以对应于纳米扫描仪的最佳工作范围的上限和下限。

[0079] 本发明意义中的致动器意思是用于移动或控制不同于上述压电元件的机械或系的装置,并且其将能量转化成运动。这样的致动器可以通过如电流、液压机液压或气压这样

的能源来运行。致动器的实例是,但不限于,气动致动器、液压致动器、压电致动器、梳状驱动器、线性致动器或电动机、电活性聚合物或电动机,如伺服电动机、步进电动机或音圈电动机。

[0080] 根据一个实施方案,针对其伸展,将纳米扫描仪设计成维持恒定的探针尖端-样本相互作用力。以上已经描述了这样的力。

[0081] 根据另一个实施方案,将纳米扫描仪的伸展设定为维持恒定的探针尖端-样本距离。

[0082] 根据另一个实施方案中,将纳米扫描仪的伸展设定为维持探针尖端进入样本中的恒定压痕深度。

[0083] 根据一个实施方案,实时监控根据本发明的方面和实施方案的纳米扫描仪的伸展。本发明意义中的实时意思是纳米扫描仪的伸展之间消逝的时间,并且伸展的记录不大于 1s、0.1s、10  $\mu$ s 或 1  $\mu$ s。实时监控能够实时调节探针的水平,其中压电元件伸展和调节探针水平之间消逝的时间不大于 1  $\mu$ s、10  $\mu$ s、100  $\mu$ s、1s 或 5s。

[0084] 根据一个实施方案,通过降低或抬升探针或降低或抬升样本来进行根据本发明以上方面和实施方案的调节探针水平。

[0085] 根据另一个实施方案,自动进行根据本发明以上方面和实施方案的调节探针水平。可以通过上述的致动器或设计成运行根据本发明任一个方面或实施方案的方法的程序化微处理器来进行这样的自动调节。

[0086] 根据另一个实施方案,这样的编程微处理器构造成监控压电元件的伸展,并且当达到限定的伸展极限时自动启动致动器来调节探针或样本的水平。进一步将微处理器构造成当沿着第一方向达到特定的降低或抬升距离时,自动停止致动器。

[0087] 根据另一个实施方案,当纳米扫描仪呈现出低于 5、10、15 或 20% 或高于 80、85、90 或 95% 最大伸展时,调节探针的水平。这样的实施方案提供了将纳米扫描仪的伸展保持在最大伸展的 5、10、15 或 20% 和 80、85、90 或 95% 的最佳工作范围内的优势。在 0% 的最大伸展时,纳米扫描仪是最大的缩回。

[0088] 本发明意义中的最大伸展意思是通过施加电流纳米扫描仪可以伸展的纳米扫描仪的最大长度。同样,本发明意义中的最小伸展或最大缩回指的是通过施加电流纳米扫描仪可以缩回的纳米扫描仪的最小长度。

[0089] 根据另一个实施方案,通过将探针或样本降低或抬升 5 至 30% 的纳米扫描仪的最大伸展来调节探针水平。这样的实施方案提供了恢复压电元件最佳工作范围的优势。

[0090] 根据优选的实施方案,通过将探针或样本降低或抬升 20% 压电元件的最大伸展来调节探针的水平。

[0091] 根据另一个实施方案,当纳米扫描仪呈现出最大伸展前的 50nm、100nm、200nm、500nm、700nm、1  $\mu$  或 2  $\mu$ m 或最大缩回前的 50nm、100nm、200nm、500nm、700nm、1  $\mu$ m 或 2  $\mu$ m 的伸展时,调节探针的水平。这样的实施方案提供了将纳米扫描仪的伸展保持在最佳工作的优势。

[0092] 根据另一个实施方案,通过将探针或样本降低或抬升至少 50nm 来调节探针的水平。

[0093] 根据优选的实施方案,通过将探针或样本降低或抬升 3  $\mu$ m 来调节探针的水平。这

样的实施方案提供了恢复压电元件最佳工作范围的优势。

[0094] 无论参考以上哪一个本发明的实施方案,并且这样的实施方案只涉及本发明的一个特征,其意图是这样的实施方案可以组合涉及不同特征的任何其他实施方案。例如,可以使用 10nm 半径的尖端测量 50 乘 50 个点的 15 个区域。

[0095] 根据本发明的另一个方面,提供了将肿瘤组织样本分类的系统,包括

[0096] - 装置,用于以至少 1mm,优选 100  $\mu\text{m}$ 、10  $\mu\text{m}$  或 1  $\mu\text{m}$  的空间分辨率测定硬度值,

[0097] - 程序化微处理器,

[0098] 其中配备和指定程序化微处理器,以运行根据本发明以上方面或实施方案的方法。

[0099] 这样的装置可以包括触针、样品支持物和用于记录触针移动的器件,其中触针可以在垂直方向(z-轴)上移动,并且触针或样本支持物可以横向(x-或y-轴)移动,或触针或样本支持物可以在垂直和横向两个方向上移动。

[0100] 这样的触针可以是具有尖端的悬臂,其中悬臂的弹簧常数为 0.01、0.025、0.05、0.06、0.075、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.5、0.75、1 或  $10\text{Nm}^{-1}$  以及尖端的半径为 0.01、0.02、0.05、0.07、0.1、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5 或 5  $\mu\text{m}$ 。

[0101] 用于记录触针移动的这样的器件可以是包括激光仪和分开的二极管的光学系统,其中激光仪聚焦于悬臂的背部并反射至分开的二极管上,并且通过二极管上的反射激光变化的位置来记录悬臂的偏移,或干涉仪,其中两个光束的干涉可以用于偏移测量。或者,悬臂可以包括压电元件,其中通过悬臂的偏移产生电荷。

[0102] 可以将这样的程序化微处理器整合至之前段落中所述的装置中,或可以是用于运行所述装置的控制单元或计算机的一部分。根据优选的实施方案,用于测定硬度的装置是原子力显微镜。

[0103] 根据优选的实施方案,装置(100)是原子力显微镜,其包括具有用于与样本(4)相互作用的尖端(21)的探针(2),和用于保持所述样本(4)或所述探针(2)的纳米扫描仪(1),其中所述探针(2)被构造成将所述尖端(21)沿着第一方向(R)朝所述样本(4)移动。装置(100)包括用于监控所述压电元件沿着所述第一方向(R)伸展的器件,用于调节所述探针(2)沿着所述第一方向(R)的水平的致动器(3),和用于控制所述致动器(3)的控制器(31),其中将所述控制器(31)构造成控制所述致动器(3),从而当所述纳米扫描仪(1)呈现出低于或高于阈值时,调节所述探针(2)的所述水平。

[0104] 将这样的致动器构造成降低或抬升样本或探针,以防止探针的尖端离样本太近或离样本太远。

[0105] 用于监控纳米扫描仪伸展的这样的器件可以是包括激光仪或干涉仪、压电传感器(其记录作为电荷的压电元件的移动)或传感器(其不仅监控所用的电压而且监控随后的实时伸展,以确保伸展的高精确性)的光学系统。

[0106] 或者,用于监控移动的这样的器件可以阅读施加于纳米扫描仪的电压或电流,这是沿着第一方向移动纳米扫描仪必需的,或特别是,是维持尖端和样本之间的恒力必需的。例如,每个压电具有特定的灵敏度  $\text{-nm/V}$ ,其用于将施加的电压转化成压电距离/移动。当所施加的电压或电流以及所得到的纳米扫描仪伸展达到特定水平时,那么启动上述探针水平的调节。

[0107] 本发明意义中的控制器指的是连接至致动器的控制单元。这样的控制器可以是微处理器或计算机。

[0108] 纳米扫描仪可以直接连接探针或样本。在探针是探针组件一部分的情况中,或者,纳米扫描仪可以直接连接探针组件。

[0109] 根据本发明以上方面的一个实施方案,将纳米扫描仪构造成维持恒定的探针尖端-样本相互作用力。以上已经描述了这样的力。

[0110] 根据本发明以上方面的另一个实施方案,将纳米扫描仪构造成维持探针尖端进入样本的恒定压痕深度。

[0111] 根据本发明的一个实施方案,纳米扫描仪是压电元件。术语压电元件具有如上所述的相同意思。

[0112] 根据本发明的一个方面,探针是悬臂。术语悬臂具有如上所述的相同意思。

[0113] 根据本发明以上方面的一个实施方案,纳米扫描仪在第二方向是可移动的,所述第二方向与上述的所述第一方向垂直伸展。

[0114] 根据本发明以上方面的一个实施方案,装置还包括用于保持样本的样本支架。术语样本支架具有如上所述的相同意思。在样本通过样本支架保持的情况中,纳米扫描仪可以直接连接样本支架。

[0115] 通过以下附图和实施例来进一步表征本发明,从其可以衍生更多的本发明的特征、优点和实施方案:

#### 附图说明

[0116] 图 1 显示了纳米机械 AFM 测试活检中的实验方法的图示(比例尺=500  $\mu\text{m}$ )。

[0117] 图 2 显示了固定于培养皿的人乳腺活检样本和活检样本的组织学评估。

[0118] 图 3 显示了在样本的 AFM 测量和 AFM 硬度测定后,通过样本的组织病理学分析评估的与浸润性癌症相比的良性病变的结构特性。

[0119] 图 4 显示了人乳腺组织的纳米机械信号(硬度分布)和组织病理学评估(比例尺=100  $\mu\text{m}$ )。

[0120] 图 5 显示了用乳腺组织样本的组织病理学分析和硬度分布评估的绝经前和绝经后患者的活检样本之间的组织学和纳米机械差异。

[0121] 图 6 显示了用硬度分布和组织学分析,在 MMTV-PyMT 小鼠乳腺组织中纳米机械应答与组织学的相关性(比例尺=50  $\mu\text{m}$ )。

[0122] 图 7 显示了组织样本的免疫标记的组织切片和硬度分布中,MMTV-PyMT 小鼠的浸润性乳腺癌中的缺氧相关硬度异质性(比例尺=50  $\mu\text{m}$ )。

[0123] 图 8 显示了正常乳腺组织(a)、纤维腺瘤(良性)病变(b)和浸润性乳腺癌(c)的代表性高分辨率硬度图谱、硬度分布和组织学评估的人乳腺组织的纳米机械信号(比例尺=200  $\mu\text{m}$ )。

[0124] 图 9 显示了本发明中涉及的 21 个人活检样本的相关杨氏模量(Young's moduli)的个体全局直方图。

[0125] 图 10 显示了来自健康组织活检和癌症活检的两个代表性整体拟合(global fit)的比较。

[0126] 图 11 显示了 MMTV-PyMT 小鼠中纳米机械应答和肿瘤进展的相关性 (比例尺 = 200  $\mu\text{m}$ )。

[0127] 图 12 还显示了区分脂肪和癌侵袭组织的结构和纳米机械标记 (比例尺 = 20  $\mu\text{m}$ )。

[0128] 图 13 显示了 MMTV-PyMT 小鼠中晚期癌症的硬度图谱、硬度分布和免疫组织学评估 (比例尺 = 200  $\mu\text{m}$ )。

[0129] 图 14 显示了来自 MMTV-PyMT 小鼠的癌细胞的原位纳米机械特征描述。

[0130] 图 15 显示了 MMTV-PyMT 小鼠中健康肺 (a) 和肺转移 (b) 的硬度图谱、硬度分布和组织学评估 (比例尺 = 20  $\mu\text{m}$ )。

[0131] 图 16 显示了 AFM TOP-DOWN 装置和垂直直线排列构件的图解。

[0132] 图 17 显示了 AFM BOTTOM-UP 装置和垂直直线排列构件的图解。

[0133] 图 18 显示了压电垂直移动的图解。

## 实施例

### [0134] 材料和方法

#### [0135] 来自 MMTV-PyMT 小鼠的乳腺组织样本和肺组织样本

[0136] 为了获得对于 PyMT 转基因是杂合的雌性小鼠, 将 C3H / B6 $\times$ FVB-C3H / B6 背景的雄性 PyMT 小鼠与缺乏 PyMT 转基因的 C3H / B6 雌性随机饲养。小鼠每周触诊两次, 以确定乳腺肿瘤发作。按照宽度  $\times$  长度  $\times$  0.4, 根据卡钳测量, 计算了肿瘤体积。通过 CO<sub>2</sub> 吸入将小鼠安乐死。

[0137] MMTV-PyMT 转基因小鼠呈现出多个肿瘤位点, 并且取出了几个腺。将它们立即置于冰冷的补充了蛋白酶抑制剂混合物的无菌林格氏溶液中 (1000ml 注射用水中 6.00g NaCl, 0.40g KCl, 50g 无水葡萄糖, 0.27g CaCl<sub>2</sub>, 3.20g 乳酸) (Complete)。对于纳米机械 AFM 测试, 通过内径为 2mm 的活检打孔机获得了代表完整肿瘤横切面的圆柱状样本。在活检后 1h 内开始硬度图谱作图, 并持续长达两天。乳腺组织样本的机械性能在该时间段中保持不变。

#### [0138] 原位测量缺氧

[0139] 给带有肿瘤的小鼠腹膜内注射 0.9% 无菌盐溶液中 100mg / ml 的盐酸哌莫硝唑 (120mg / kg, 缺氧探针 (hypoxypore-1), HPI)。90 分钟后, 处死小鼠, 并如上所述获取用于纳米机械测试的活检样本。随后, 通过哌莫硝唑结合的免疫组织化学分析来评估缺氧。

#### [0140] 人活检样本

[0141] 直接从巴塞尔大学妇科医院乳腺治疗中心 (Breast Treatment Center of the Basel University Women's Hospital) 获得取出后的人活检样本。根据伦理要求进行患者募集和硬度分析, 并且没有之前的临床数据知识。明显病变的超声波指导的核心活检, 取出了直径约 2mm- 的放射状、长度为 0.2 至 1cm 的圆柱状样本, 将其直接转移至含有补充了葡萄糖和蛋白酶抑制剂混合物的冰冷无菌林格氏溶液 (Complete) 的小瓶中。至于小鼠组织, 在活检后 1h 内开始 AFM 测试。在该时间段过程中, 样本的机械性能没有变化。将样本保持在 4°C, 直至 AFM 测量, 以使组织降解最小化。在不晚于取出后三天进行了 AFM 分析, 以避免样本上的自溶影响 (即组织自体降解)。

#### [0142] 纳米机械 AFM 测试

[0143] 在数据获取过程中, 通过一组定制的算法来调控自动化校准, 以校正组织的天然

不平整。以系统的方式来检测每个样本,从一边至另一边,以说明可能的异质性。在扫描区域之间保持大约  $500\text{ }\mu\text{m}$  的规则距离,其中两个悬臂之间的距离作为参照(图 1)。根据总的活检样本长度,这大致形成了 10 至 15 个 FV 图谱/样本。鉴于从小鼠乳腺和肺获得的样本不是像人活检样本那样的圆柱状,因此选择扫描区域,以确保样本全部被覆盖。

[0144] 为了通过 AFM 分析乳腺组织样本,使用 2-成分胶将活检样本粘在圆形特富龙盘上,或用 5-分钟快干环氧胶固定在培养皿中。2 分钟的预干步骤后(以避免环氧树脂和样本缓冲液的混合),将样本平铺,以优化压痕角,并避免来自外部成分(例如,悬臂支架)的影响。将作为“斜面”的移液管吸头直接置于每个样本的不平整片段下,以维持高度均一性。在样本操作过程的所有时间,最小化过度力的使用(例如,撕拉或拉伸)。在补充了蛋白酶抑制剂的无菌缓冲液环境中进行了所有制备性步骤,以防止污染和确保样本保持在接近天然(close-to-native)的状态。将制作好的样本保持在冰冷的林格氏溶液中,直至纳米机械测试,其在室温或  $37^{\circ}\text{C}$  进行。

[0145] 对于尖锐的锥形尖端(200- $\mu\text{m}$ -长氮化硅悬臂,名义上的悬臂弹簧常数  $k=0.06\text{Nm}^{-1}$ ,共振频率[空气]=18kHz)。在每次实验之前,用热调法测定精确的悬臂弹簧常数  $k$ ,同时使用固体玻璃基质作为无限硬度参照材料来测定偏移灵敏度。

[0146] 如下产生了活检样本的硬度(弹性模量,  $E$ ) 测量:在负荷和未负荷过程中,以定向方式记录给定位点的负荷-位移曲线,也称为力压痕曲线。在扫描区域之间保持大约  $500\text{ }\mu\text{m}$  的规则距离,其中两个悬臂之间的距离作为参照。单独的数据集由 1,024 个负荷-偏移曲线组成,以 1.5Hz 的取样速率。这大致形成了 15 至 20 个力体积图谱/样本。可能时,在  $24\times 24$  点网格上形成力-体积图谱(FV),扫描大小为  $20\times 20\text{ }\mu\text{m}$ ,速率大约为 0.8 个负荷/未负荷循环/秒。每个负荷-偏移曲线由 512 个数据点组成,而根据所分析区域的特性,将  $Z$  长度设定为  $5\text{ }\mu\text{m}$  至  $8\text{ }\mu\text{m}$ 。将每个 FV 图谱设定为  $20\times 20\text{ }\mu\text{m}^2$ ,从而 (i) 优化实验时间,以及 (ii) 提供足够大的区域来整合组织内的所有组分(例如,细胞和细胞外基质)。将最大使用的负荷力设定为 1.8nN,并且压痕深度大约为 150 至 3000。获得了另外的  $72\times 72$  FV 图谱(5184 力-偏移曲线/图谱和 277nm 的像素大小),以提高目标关键区域的空间分辨率。

#### [0147] AFM 数据分析

[0148] 使用之前所述的方法(Oparic, et al., Biophysical Journal, .98(11): p. 2731-40, 2010, Plodinec, et al., Journal of Structural Biology, .174(3): p. 476-484, 2011), 分析了力压痕曲线。简而言之,在 LABVIEW 研发了用于自动化分析 FV 数据的软件。基于公开的算法(Lin, et al., Journal of Biomechanical Engineering-Transactions of the Asme, 129(6): p. 904-912, 2007), 通过将多项式拟合应用于原始力曲线来确定接触点。通过压痕  $h$  获得了力曲线,压痕  $h$  对应于压电位移和悬臂偏移之间的差异,并且通过将悬臂偏移  $d$  乘以弹簧常数  $k$  来获得负荷  $F$ 。通过进行对上面 50% 的力曲线的线性拟合来分析未负荷力曲线,这限定了最大负荷  $F=1.8\text{nN}$  和最小负荷  $0.9\text{nN}$  之间的硬度。通过这个程序可以避免对力曲线的外来影响,如粘附。将泊松比设定为 0.5。根据 Oliver 和 Pharr 法(Oliver, et al., Journal of Materials Research, 7(6), 1564-1583, 1992), 测定了杨氏模量。将斜率值按照空间作图,以在 Igor Pro6.22 中产生色码硬度图。在 2D 硬度图谱上进行了 2D 二度样条内插,使得数据的视觉显示变得平滑。

#### [0149] 免疫组织化学分析

[0150] AFM 后,根据标准组织学,取回所有样本,甲醛固定和石蜡包埋。切成大约 5  $\mu\text{m}$  厚的切片,并转移至载波片上。连续切片的第一片和最后一块按常规用苏木精和曙红 (H&E) 染色。随后的组织病理学检测包括测定病变的类型 (浸润性导管癌、DCIS、纤维腺瘤等) 和各种标准组织病理学标记 (肿瘤浸润、纤维化、坏死和淋巴细胞浸润的程度)。对于人乳腺组织剩余切片的免疫组织化学分析 (IHC),使用了以下抗体:抗胶原蛋白 I (1:80;Biologo C02111,USA)、抗层粘连蛋白 (1:25;Thermo RB-082-A,Thermo Scientific,USA)、抗波形蛋白 (预先稀释的,Ventana790-2917,Roche Diagnostics,CH)、抗肌间线蛋白 (预先稀释的,Ventana760-2513,Roche Diagnostics,CH)。以用于人切片的相同方式,进行了用于层粘连蛋白、肌间线蛋白和波形蛋白的小鼠组织切片的 IHC 分析。此外,用抗  $\beta 1$  整联蛋白 (1:50,Abcam, ab52971, USA) 和抗小鼠胶原蛋白 I (1:800, Abcam, ab34710, USA) 染色鼠切片。在一些情况中,为了回收抗原,通过热,或用 10mM Tris 缓冲液、pH9.0 的 1mM EDTA 和 pH6.0 的柠檬酸盐缓冲液处理切片。为了进行人活检样本的胶原蛋白染色,用胃蛋白酶将切片在室温下预先处理 30 分钟。将抗生物素蛋白 / 生物素用于阻断一抗的非特异性结合。对于免疫标记,用 100  $\mu\text{l}$  抗体孵育切片,所述抗体在 pH7.6 的 10mM PBS 和 0.1% 叠氮化钠中相应地稀释。用辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合的二抗 (DakoCytomation, 丹麦) 来显现染色。用竖式光学显微镜 (Carl Zeiss, 德国) 在所示的放大倍数下检查切片。

#### [0151] 统计学分析

[0152] 在本发明中分析了来自 20 名不同患者的 21 个人活检样本 (参见表 1)。此外,分析了获自 16 只 MMTV-PyMT 小鼠的 32 个乳腺和 6 个肺。在 6 个肺中,三个是健康的,三个呈现出转移性病变。所有个体硬度值概括于 OriginPro8.5 中,以获得每个样品的硬度分布 (后文称为全局直方图)。对于所有乳腺样本,将筐宽 (bin width) 设定为 200Pa,并且对于小鼠肺,设定为 500Pa。根据每个样本的数据点的总量,将计数标准化。首先通过使用 OriginPro 峰分析应用定位分布峰,并且随后将多峰拟合应用于硬度分布,以进行数据拟合。

[0153] 所有数据以平均  $\pm$  标准偏差 (s. d.) 来给出。在 Origin7.5 中,用配对斯氏 t 检验 (Student's t test) 测定了平均值差异的统计学显著性。

#### [0154] 实施例 1:通过 AFM 对软组织活检样本进行纳米机械测试

[0155] 在生理缓冲液条件下通过 AFM 测定了来自 MMTV-PyMT 转基因小鼠和来自人患者的软乳腺组织活检样本的纳米机械性能。从乳腺切除向心圆柱状活检样本用作 AFM 测试样本 (图 1a)。典型的圆柱状组织样本从核心至外周呈现出不同的方向。如图 1d 中所示,以定向方式使用生物相容性胶将新鲜组织样本稳定地粘附在固体特富龙支持物上。在这些样本中,保存了 3D 组织完整性和异质性,并且在 2D 平面中将整个完整样本中的相应的结构和纳米机械信息呈现给 AFM 探针 (图 2)。这使得可以定向方式测量纳米机械应答。在所有时间下都将样本保存在林格氏溶液中。

#### [0156] 实施例 2:人乳腺活检样本的纳米机械信号

[0157] 进行了新鲜人乳腺活检样本的 AFM 硬度测量,以阐明人乳腺癌中纳米机械组织性能的诊断和预后潜能。

[0158] AFM 测量后样本的组织病理学分析揭示了良性或恶性组织表型 (图 3a)。从诊断为纤维腺瘤的 34-岁女性患者获取上图中所示的数据。下图数据源自患有浸润性导管癌的 69 岁女性患者。良性病变揭示了纤维组织的强烈均一分布,而浸润性癌显示出组织化的

含有肿瘤细胞和纤维化肿瘤基质的混合物。在较高的放大倍数下这些特性更明显（图 3b），并且与（图 3b）中黑方块表示区域中通过 AFM 获取的硬度图谱非常一致（图 3c）。

[0159] 正常的乳腺组织 ( $n=4$ ) 呈现出狭窄范围的硬度值, 具有  $E=1.83\pm0.69\text{kPa}$  的峰（图 4a, 上图）。来自相同样本的切片的 H&E 染色揭示了来自年轻女性的健康乳腺组织的典型组织学。在小叶结构中, 腺泡由被少量结缔组织分开的均一上皮细胞组成（图 4b）。通过 AFM 测量的狭窄硬度分布与均匀的组织形态学外观高度相关。然而, 由于患者年纪轻和绝经前状态, 可能这种特定的纳米机械信号不是所有正常乳腺组织的特征。在证明是良性病变的样本中还发现了相当窄的硬度范围, 尽管  $E=4.07\pm1.39\text{kPa}$  表示所测试的 20 个样本中与正常乳腺相比硬度增加。与该纳米机械特征一致, 来自 60 岁老年患者的良性病变的组织学检测证明了相当均一的、主要是纤维化的组织, 具有纤维腺瘤典型的零星小叶（图 4a, 中图）。良性肿瘤主要呈现出纤维腺瘤典型的纤维组织的均匀增生（图 4b, 中图）。

[0160] 通过 AFM 探测的多个人活体样本 ( $n=12$ ) 显示出明显较宽的硬度值范围, 具有如图 4a 的下图中所示的两个不同的峰。AFM 测量后该活检样本的组织学检测证实了浸润性导管癌, 其表示女性中最常见的乳腺癌类型, 如对于 70 岁患者所示（图 4b, 下图）。其中, 在中心区域, 主要为以索样模式浸润肿瘤外周的密实纤维组织的肿瘤细胞。浸润性导管乳腺癌显示出已经引起密集纤维组织应答的癌细胞的浸润巢。通过将 AFM 测量与组织学相关联, 将来自肿瘤内部区域的癌细胞鉴定为具有  $E=0.87\pm0.65\text{kPa}$  的软峰的主要贡献者。特征在于具有  $E=11.26\pm1.90\text{kPa}$  峰的提高硬度的区域主要位于肿瘤外周, 从而对应于纤维基质。

[0161] 在整体硬度中具有少量提高的略宽但单峰硬度分布对良性病变而言是典型的（图 4a, 中图）。相反, 癌组织呈现出双峰硬度分布, 具有表示肿瘤软的和相对硬的区域的两个峰（图 4a, 下图）。图 4b 显示了 AFM 测试后组织样本的组织病理学评估。组织学揭示了正常乳腺的末端导管小叶部分被间隙纤维结缔组织和更多远处的脂肪组织包围（图 4b, 上图）。

[0162] 组织病理学分析揭示了获自绝经前 34 岁患者的样本中仍然存在大量细胞, 而获自绝经后 69 岁患者的样本主要呈现为密实的纤维组织（图 5, 左图）。在两者的硬度测量中都可以观察到单峰硬度分布（图 5, 右图），然而硬度值和分布宽度有显著变化。

[0163] 对于朝向绝经前患者测得的较软峰的转移与绝经前样本中提高的细胞密度完全相关（图 5）。重要的是, 对人乳腺体活检样本获得的数据, 提供了组织活检样本的纳米机械性能可以用作检测人患者中恶性转化和肿瘤进展的可靠标记的证据。

[0164] 实施例 3: 将组织病理学发现与 MMTV-PyMT 小鼠模型中的纳米机械应答相关联

[0165] 在不同的肿瘤阶段取出 MMTV-PyMT 转基因小鼠乳腺的组织样本, 以评估与肿瘤进展相关的纳米机械变化。显示来自 AFM 测量的硬度值频率分布的直方图描述于图 6a 中。正常小鼠乳腺 ( $n=3$ ) 的 AFM 测量揭示了硬度的均匀分布（均一-高斯型曲线），具有弹性模量  $E=1.28\pm0.12\text{kPa}$ （图 6a, 上图）。样本的相关组织学检测证实了正常的、健康乳腺组织外观, 具有大量最可能有助于低硬度值的脂肪组织（图 6b, 上图）。在癌前病变中 ( $n=3$ ), 硬度分布较宽, 但仍然保持单峰高斯型曲线（图 6a, 中图），但硬度提高至  $E=4.38\pm0.55\text{kPa}$ 。组织学揭示了密集聚集的、高增殖的乳腺上皮, 其与提高的组织硬度完全一致（图 6b, 中图）。然而, 在癌性病变中, 丧失了均一的硬度分布 ( $n=8$ ), 并且反而, 癌在位呈现出双峰硬度分布（图 6a, 下图），表示两个不同的机械表型。在这些早期的肿瘤发展中, 核心区域

的  $E=0.54 \pm 0.13 \text{ kPa}$  比良性病变的低 8 倍,比正常组织硬度低 3 倍。软的核心围绕有明显较硬的  $E=16.97 \pm 6.89 \text{ kPa}$  的区域。尽管原位癌的双峰硬度分布表明了肿瘤中两种不同的细胞群,但组织切片的组织学外观没有揭示有助于双峰硬度分布的癌细胞中的任何显著形态学差异(图 6b,下图)。在原位癌中,个体导管内组织的组织结构化的丧失和癌细胞的存在明显可见。然而,癌细胞在细胞学上看上去是相似的。值得注意的是在原位癌中,与肌上皮相比,周围的基质似乎未改变。

[0166] 总之,AFM 硬度测量与组织学的相关比较使得可以在小鼠乳腺组织的纳米机械应答和恶性转化之间建立联系;组织形态学没有为双峰硬度分布和原发性癌病变的软核心区域提供外观解释。

#### [0167] 实施例 4:MMTV-PyMT 乳腺癌中缺氧诱发的组织软化

[0168] 已经对各种实体肿瘤描述了由血管形成低效引起的肿瘤缺氧。这与放疗、化疗和外科手术后的预后差相关。随着发现缺氧调节改变细胞行为并导致更恶性的肿瘤表型的许多基因,对肿瘤缺氧状态的关注进一步提高。因为缺氧核心被认为是侵略性癌进展的决定性特征,因此检测了从原发性癌病变的外周至核心观察到的双峰硬度分布是否与降低的氧合作用相关。为了将缺氧与分期的肿瘤样本中的组织硬度直接关联,在肿瘤切除前,给 MMTVPyMT 小鼠注射选择性地结合氧-缺乏细胞的哌莫硝唑剂,随后,通过 AFM 测试了组织样本的纳米机械性能,并且之后将组织进行处理,用于缺氧评估。免疫组织化学染色揭示了正常的腺和良性病变对于缺氧是阴性的,而原发性肿瘤在核心呈现出明显的缺氧,这与硬度显著降低非常相关。

[0169] 在恶性进展至浸润性转移期时(图 7),发生了明显的缺氧扩散。除了核心中大范围的缺氧(图 7a,放大,右图),该期的特征在于缺氧癌细胞(染色的深灰色)朝周围组织的渐进性散布。特别地,血管排满了缺氧细胞(图 7a,放大,中图),表明在远距离部位的内渗和最终入侵和缺氧细胞扩散至外周肿瘤基质(图 8a,放大,右图)。相应的 AFM 测量显示,浸润性癌不再呈现出两个不同的硬度峰,而是宽的硬度分布,从核心至肿瘤外周逐渐加硬。核心区域的软度和硬度分布的整体加宽(图 7b)与免疫组织缺氧评估相一致,这表明缺氧细胞从核心散布至外周/和缺氧细胞在外周。这一发现表明,缺氧确实与浸润性、更有侵略性的癌表型相关。

[0170] 在低放大倍数下,来自哌莫硝唑处理的小鼠的浸润性乳腺癌的免疫标记的组织切片显示出不同的缺氧区域(图 7a,深灰色信号)。放大显示出更详细的视图。缺氧细胞富集在肿瘤的核心区域中(左图),朝向肿瘤血管流动(中图),并且已经散布至肿瘤外周(右图,通过虚线来标记)。比例尺各自是  $200 \mu\text{m}$  和  $50 \mu\text{m}$ 。展示硬度测量的直方图呈现出双峰分布(图 7b)。从核心至外周存在硬度增加,其中硬度值宽泛分布。

[0171] AFM 硬度测量表明,机械特征是有价值的用于癌症进展的标记。基于相应的缺氧评估,我们得出结论肿瘤.....

#### [0172] 实施例 5. 人乳腺活检样本的其他纳米机械测试

[0173] 用 AFM 在生理缓冲液条件下离体检查乳腺组织(图 8)。特别是,阐明和关联了正常、良性和恶性活检样本中病理组织学发现的各自纳米机械特征(图 8)。图 8a 显示了正常乳腺组织的代表性 FV 图谱。绘制整个样本的全局直方揭示了  $1.13 \pm 0.78 \text{ kPa}$  的单峰硬度分布(图 8a,中)。作图样本的 H&E 染色切片中的组织学外观通过健康导管来限定

(图 8a, 右), 所述健康导管通过两层上皮细胞来划定界限, 所述上皮细胞通过其圆形的核和最小染色的细胞质可以区别。良性纤维腺瘤病变显示出提高的硬度,  $3.68 \pm 1.92 \text{ kPa}$  (图 8b, 中)。硬度图谱内较软的特征 (低于  $2 \text{ kPa}$ ) 看起来划分了纤维基质中包埋的单独成纤维细胞的界线 (图 8b, 左)。这通过组织学检查得到了证实, 其中成纤维细胞是良性病变内主要的细胞类型 (图 8b, 右)。比较起来, 癌活检样本通常呈现出双峰硬度分布, 在  $0.61 \pm 0.21 \text{ kPa}$  (“主”) 和  $1.54 \pm 0.30 \text{ kPa}$  (“次”) 具有两个突出的峰 (图 8c, 中)。在比  $2 \text{ kPa}$  硬的值, 分布加宽, 这反映出整个样本内显著的异质性。代表性的 FV 图谱 (图 8c, 左) 揭示了显性的、软的峰对被较硬的基质围绕的癌细胞而言是典型的。H&E 染色证实了以索样模式浸润基质的肿瘤细胞的显性 (图 8c, 右)。

[0174] 代表性的高分辨率 AFM 硬度图谱 ( $24 \times 24$  像素) 显示出呈现单峰硬度分布 (图 8a, 中) 的正常乳腺组织 (图 8a, 左)。组织学揭示了箭头标记的间隙纤维结缔组织围绕的正常乳腺的末端导管小叶单位 (D) (右)。纤维腺瘤 (良性) 病变的高分辨率 AFM 硬度图谱揭示了与成纤维细胞 (F) 混合的纤维基质 (S) (图 8b, 左)。硬度提高的较宽但单峰的硬度分布对良性病变而言是典型的 (图 8b, 中)。箭头指出了通常在纤维腺瘤改变的组织中发现的胞外基质 (S) 和成纤维细胞 (F) (图 8b, 右)。相反, 癌组织的硬度图谱显示出包埋在肿瘤基质 (S) 的细胞外基质 (ECM) 中的癌细胞 (C) (图 8c, 左)。双峰硬度分布揭示了表示软细胞和相对硬的外周基质的两个峰 (图 8c, 中)。这与浸润性乳腺癌的组织病理学评估相一致。箭头指向已经引起密实纤维组织应答 (S) 的癌细胞 (C) 的浸润巢。

[0175] 从怀疑带有病变的患者取出的超声波指导的活检的图示显示于图 1a 中。具有呈现典型圆柱状乳腺活检尺寸样本的活检工具的绘图描绘于图 1b 中。从核心至外周呈现出不同方向的代表性圆柱状组织样本显示于图 1c 中。将新鲜组织样本在所有时间都保存在林格氏溶液中, 并且以定向方式用生物相容性胶稳定地粘附在固体特富龙支持物上 (图 1d)。

[0176] 所检查的全部 21 个人活检样本 (即, 6 个健康, 5 个良性和 10 个癌性样本) 的全局硬度分布呈现于图 9 中 (还可以参见表 I)。所有健康乳腺组织呈现出单峰分布, 其特征性硬度为  $1.13$  至  $1.83 \text{ kPa}$ 。在四个良性病变 (纤维腺瘤) 病例 (病例 8-11) 中发现了均一但较宽的硬度分布。与健康活检样本相比, 硬度值范围为  $1.91$  至  $3.68 \text{ kPa}$ , 并且因此表明纤维腺瘤中较硬的表型。在病例 8 中, 在纤维组织块中成纤维细胞的丰度高, 在较低的硬度值中反映出这一情况 ( $1.914$ - $0.99$ )。在一个病例 (7) 中, 全局分布显示出两个峰, 一个 ( $1.33 \pm 0.32 \text{ kPa}$ ) 对应于正常乳腺组织的硬度值, 第二个峰为  $2.63 \pm 2.06 \text{ kPa}$ 。病理组织学诊断分别一致显示出导管增生和纤维腺瘤的两个不同部分。

[0177] 所有十一个恶性活检样本都具有  $0.31$  至  $0.75 \text{ kPa}$  主峰的硬度特征图, 与健康乳腺的硬度相比, 明显较软 ( $P < 0.0001$ )。此外, 癌硬度特征图包括  $1.54$  至  $1.99 \text{ kPa}$  的第二个峰, 这是所有样本共有的。恶性活检样本的另一个典型特征是剩余值宽泛地分布至  $\sim 20 \text{ kPa}$ 。这种分布显示了作为癌进展的结果: 乳腺结构全部失去、肿瘤血管形成和浸润, 以及入侵影响的外周 ECM 的变化。令人感兴趣的是, 观察到几个癌活检样本中明显的最小值 ( $\sim 1.1$  至  $1.5 \text{ kPa}$ ) 位于主峰和次峰之间。这看起来与健康组织的平均硬度值成逆相关 (图 10), 这是由健康上皮的恶性转化引起的。健康和癌活检样本的全局分布揭示了相反的硬度相关性。健康组织呈现出  $1.13 \pm 0.78 \text{ kPa}$  的峰, 而在癌活检样本内, 在该硬度范围内存在最

小值（图 10）。

[0178] 实施例 6：追踪乳腺癌 MMTV-PyMT 小鼠模型中与肿瘤进展相关的纳米机械变生

[0179] 由于人患者的遗传和流行病学的多样性，选择 MMTV-PyMT 小鼠模型来系统地阐明肿瘤进展和转移的纳米机械足迹。根据病理组织学分类，MMTV-PyMT 中的早期增生表示正常的人乳腺，而限制于基底膜内的广泛上皮增生类似人的恶性前肿瘤。早期癌症之后的阶段在形态学上与人原位导管癌相当。

[0180] 在正常小鼠乳腺的代表性 FV 图谱中，可以通过  $1.07 \pm 0.76 \text{ kPa}$  的平均硬度来辨别圆形细胞结构。在健康腺体中，清晰的基底膜勾画出密集聚集的上皮细胞的良好组织化排列（图 11a，右），全局直方图显示出单峰硬度分布，具有跨过整个样本的特征性峰（图 11a，中）。正常小鼠乳腺发现的单峰硬度特征图与正常的人乳房一致。然而，与人乳腺组织相反，健康的小鼠乳腺呈现出过量的脂肪组织（70-80%），其特征在于平均值为  $0.31 \pm 0.13 \text{ kPa}$  的特定的窄峰。

[0181] 恶性前组织的 FV 图谱揭示了软和适度较硬特征的模式（图 2b，左），这与 H&E 染色切片中增殖细胞块周围的基质成分的增加相关（图 11b，右）。因此，全局直方图显示出较宽的分布，峰值移动至  $1.51 \pm 0.91 \text{ kPa}$ （图 11b，中）。尽管如此，峰分析软件能够分别鉴定出分别位于  $1.15$  和  $1.55 \text{ kPa}$  的两个峰，这表明双峰硬度分布的发生。

[0182] 这种趋势在早期癌症中更明显，其导致截然不同的软和硬的区域（图 13c，左）。全局直方图中位于  $0.51 \pm 0.11$  和  $1.63 \pm 0.71 \text{ kPa}$  的峰提供了双峰硬度分布的明显证据（图 13c，中）。因此，不同区域的密集聚集的癌细胞和早期基质入侵在 H&E 染色的切片中是明显的（图 13c，右）。对于所有检查的小鼠乳腺和肺计算了硬度值，并呈现于表 2 中。此外，作为鼠乳腺组成的主要贡献者的脂肪组织可能被误认为癌细胞簇。因此，需要脂肪组织的对照实验来区分这两种细胞类型。通常，基于它们在 H&E 染色切片中均一的形态学外观，可以将脂肪细胞区与其他细胞类型区别开来。脂肪细胞缺乏任何独特的结构，并且与癌细胞相比通常尺寸较大。这些特征与 FV 图谱中观察到的相一致。所获得的脂肪组织的相应硬度值为  $0.31-4-0.13 \text{ kPa}$ 。比较起来，对癌细胞的代表性测量产生了位于  $0.75+0.25 \text{ kPa}$  的主软峰，这与来自图 8c 的分析相一致。重要的是，数据显示出脂肪组织 (i) 比恶性细胞软大约三分之一，(ii) 表现出对尖端更强的粘附（数据未显示），和 (iii) 呈现出更高的耗散属性（如通过接近和缩回 AFM 力曲线之间的大滞后现象所表征的）（数据未显示）。

[0183] 代表性的高分辨率 AFM 硬度图谱（ $72 \times 72$  像素）显示出正常腺体的导管 (D)（图 11a，左），其呈现出单高斯型分布（图 11a，中）。小鼠组织切片的 AFM 后组织学显示出非哺乳乳腺，导管 (D) 被箭头指出的基质和脂肪组织围绕（图 11a，右）。在恶性前病变中，显示了增殖的上皮 (E) 和邻近基质 (S)（图 11b，左）。恶性前增生的硬度分布（图 11b，中）较宽，具有双峰性的迹象（图 11b，中）。相同组织的 H&E 切片显现出被基质成分 (S) 围绕的上皮细胞 (E) 的大增殖（图 11b，右）。早期癌症病变的硬度图谱揭示了受基质组织 (S) 限制的单独癌细胞 (C)（图 11c，左）。因此，双峰硬度分布区分了软癌症细胞表型和硬化的基质（图 11c，中）。在 H&E 切片中，箭头指向非典型细胞形态 (C) 和邻近基质 (S) 中的早期入侵（图 11c，右）。

[0184] 接近区域的脂肪组织上的 H&E 染色显示于图 12a 中（左），其中记录了相应的力图谱。在力图谱内，脂肪细胞看上去是同质的（图 12a，中）。相应的直方图表示脂肪组织的

硬度分布和计算的平均值（图 12a, 右）。另一方面, 癌组织（图 12b, 左）呈现出特定的结构, 其显示了包埋在 ECM 中的单独癌细胞（图 12b, 分别为左和中）。由浸润性癌细胞构成的组织呈现出较硬和更异质的纳米机械特征（图 12b, 右）。

[0185] 在从正常乳腺转变成早期癌症时发生的乳腺结构的最明显结构变化中是围绕正常和恶性前腺体的基底膜降解和改变的胶原蛋白 I 的表达和组织化。在肿瘤进展的后期, 基质贡献越来越多地改变癌症行为。例如, ECM 的主要成分胶原蛋白 I 已经与癌症硬化相关联。因此, 检查了晚期 MMTV-PyMT 癌症中的局部机械性能特征与 ECM 结构的关联, 晚期 MMTV-PyMT 癌症对应于人的浸润性导管癌。连续 FV 图谱证明了从核心至外周的逐渐硬化（图 13a）, 峰值从核心中的  $0.74 \pm 0.26 \text{ kPa}$  移动到外周的  $5.51 \pm 1.70 \text{ kPa}$ 。同时, 组织异质性提高（图 13b）并且在外周最大（图 13b, 右）。这些变化看来与 ECM 中的明显变化相关, 如通过相关的 IHC 分析所揭示的（图 13c）。

[0186] 跨越样本的连续硬度图谱证明了从核心至外周硬度和结构异质性明显增加（图 13a, 各自从左至右）, 如相应的硬度分布中所说明的（图 13b）。IHC 分析（深灰色染色）揭示了胶原蛋白 I（图 13c, 上）和层粘连蛋白（图 13c, 下）从箭头所指的核心至外周的基础结构和形态变化。

[0187] 例如, 在软的核心中没有检测到胶原蛋白 I, 但在朝向外周时逐渐增加（图 13c, 上）。此外, 在核心实质上不存在晚期癌症中所预期的层粘连蛋白 I 表达（图 13c, 左下）, 其中基底膜已经分解。然而, 中部和外周区域增加的血管生成导致了血管基底膜的层粘连蛋白染色（图 13c, 中下和右下）。核心区域中层粘连蛋白和胶原蛋白 I 的不存在有助于癌细胞的软表型。另一方面, 朝向外周染色的增加标志着与各自区域硬化相关的基质入侵的增加。此外, 免疫染色清楚地显示出在肿瘤晚期存在相当大的组织异质性, 这在宽范围的硬度值中反映出来。

[0188] 实施例 7: 小鼠模型中软和缺氧的细胞表型有利于肺转移

[0189] 接着, 检测了最软的癌表型与远距离部位转移能力（特别是转移至肺）之间的关联。健康的鼠肺含有大量胶原蛋白 IV 和层粘连蛋白, 并且因此与乳腺相比, 呈现出较硬的表型。AFM 揭示了健康肺组织的平均硬度值为  $11.01 \pm 5.19 \text{ kPa}$ （图 15a, 左, 中间代表性的 AFM 硬度图谱, 表 3）, 健康的肺组织由扩张的肺泡和支气管结构以及血管组成（图 15a, 右）。在肿瘤进展的晚期, MMTV-PyMT 小鼠产生了肺转移。一致地, 晚期癌症小鼠的肺的硬度测量证明了健康肺中不存在的  $0.61 \pm 0.41 \text{ kPa}$  的非常软的峰 ( $P < 0.0001$ )（图 15b, 左, 灰条, 中间代表性的 AFM 硬度图谱, 表 3）。AFM 后的组织学染色证实了存在多个转移病变。令人感兴趣的是, 与健康肺相比较, 围绕转移的肺组织显示出更平坦的硬度分布, 平均硬度为  $8.19 \pm 4.94 \text{ kPa}$ 。肿瘤晚期中大范围的缺氧改变了肺中的胶原蛋白交联。可以想象到, 转移肺的 ECM 中的变化是造成邻近转移的肺组织硬度局部变化的原因。

[0190] 肺中的转移性乳腺癌细胞呈现出与原发肿瘤相似的软表型（图 15a）, 如通过健康肺的代表性 AFM 硬度图谱和全局硬度特征所示的（图 15a, 中）。随后的组织学染色揭示了由肺泡结构和支气管组成的正常上皮形态（图 15a, 右）。肺（图 15b, 左）代表性的 AFM 硬度图谱和全局硬度特征（中）呈现出转移病变。组织病理学分析揭示了转移簇和看起来为正常肺泡结构的周围肺的位置（图 15b, 右）。

[0191] 一个区域的代表性 AFM 硬度图谱 ( $24 \times 24$ ) 揭示了癌细胞的机械性能异质性（图

14a)。来自癌症活检细胞区域的硬度分布揭示了两个峰,第一个在  $0.45 \pm 0.15 \text{ kPa}$ ,第二个在  $1.26 \pm 0.43 \text{ kPa}$ ,表示了癌细胞两个不同的软亚群(图 14b)。

[0192] 通过癌细胞中的肌间线蛋白和 / 或波形蛋白表达所显示的差的分化,是侵略性的另一个特点。与正常和恶性前腺体相反,其中波形蛋白和肌间线蛋白染色是组织特异性的,早期癌症阶段呈现出其中波形蛋白和肌间线蛋白都在上皮癌细胞中表达的区域。最后,在晚期癌症中,对于围绕和入侵血管的软癌细胞观察到了波形蛋白和肌间线蛋白的不同表达和分布,这与肺中软的转移细胞簇的形成密切相关(图 15b,左)。

#### [0193] 实施例 8

[0194] 图 16 显示了本发明的一个实施方案,其中压电元件 1 直接与悬臂 2 连接。在压电元件 1 沿着第一方向 R 最大伸展并且悬臂尖端 21 和样本 4 表面之间的接触松散的情况中,控制器 31 启动外部电动机 3(致动器),以将悬臂尖端 21 沿着第一方向 R 降低,进入表面中,直至达到所需的压电元件 1 的伸展。在压电元件 1 最大缩回并且悬臂尖端 21 以非所要求的力压入样本表面 4 中的情况中,控制器 31 启动外部电动机 3,将悬臂 2 沿着第一方向 R 抬升,以将压电元件 1 恢复所需的伸展。

#### [0195] 实施例 9

[0196] 图 17 显示了本发明的另一个实施方案,其中压电元件直接与样本支架 41 连接,而悬臂 2 连接悬臂支架 25。

#### [0197] 实施例 10

[0198] 图 18 显示了沿着第一方向 R 的垂直压电移动的图解。压电元件的特征在于最大伸展 12 和最大缩回 11。在这些状态之间,存在可以分成最佳工作范围 13 和非最佳工作范围的压电元件的工作范围。第一阈值 15 位于最大缩回 11 一侧的最佳工作范围 13 和非最佳工作范围 14 之间的边界。第二阈值 16 位于最大伸展 12 一侧的最佳工作范围 13 和非最佳工作范围 14 之间的边界。

[0199] 当样本太高并且压电元件 1 缩回阈值 15 时,例如,小于其最大伸展范围的 20% 或从其最大伸展范围小于  $2 \mu\text{m}$ ,控制器会激活电动机。电动机将朝上移动,并且恢复压电的最大工作距离 13(例如,最大伸展的 20% 至 80% 之间,或在最大伸展的最初  $2 \mu\text{m}$  至最后  $2 \mu\text{m}$  之间)(图 18)。如果压电在阈值 16 伸展超过全伸展范围的 80% 或最后  $2 \mu\text{m}$ ,控制器会再次启动电动机,但这次它们会向下移动,以恢复最佳压电工作距离 13(图 18)。通常,如果使用  $15 \mu\text{m}$  全伸展范围的压电元件工作,悬臂降低或抬升例如  $3 \mu\text{m}$ 。可以通过使用者针对给定的 AFM 和电动机组合来调节该值。

#### [0200] 概念和证据

[0201] 癌细胞对于改善用于检测和分析疾病的生物标志的复杂性。本发明对于使用纳米机械性能作为用于判断和评价可以翻译成临床背景的天然肿瘤组织变化的新生物标志具有重要的含义。

[0202] 本发明的方法清楚地区分了正常组织、良性病变(如,纤维腺瘤)和癌组织。尽管两种类型的组织通常呈现出与各自同质形态学外观一致的均一硬度,但良性病变的硬度明显高于正常乳腺组织的。这种明显的硬化最可能是由纤维囊性增生引起的,纤维囊性增生导致高含量的纤维组织,其伸展至导管肌上皮中并改变导管肌上皮。相反,获自 MMTV-PyMT 小鼠和人活检样本的乳腺组织样本的纳米机械 AFM 测试证明了恶性病变的特征不在于特

定的硬度,而在于与侵略性的恶性表型相关的放射状硬度梯度。

[0203] 文献中关于肿瘤硬度评价的报道是有分歧的。通过传统流变学对组织活检样本进行的测量形成了广泛接受的概念,即癌组织通常比其周围物更硬。同样,无侧限压缩测试已经描述了肿瘤比正常组织硬。此外,最近的研究表明,由胶原蛋白交联诱发的组织纤维化、调节的整联蛋白活性和升高的焦点粘连促进了肿瘤基质的硬化。相反,使用不同单细胞体外生物机械试验的多个研究报道了,具有递增转移效率的分离的癌细胞硬度降低。例如,最近表明了从癌症患者分离的转移细胞呈现出比同样样本中的正常细胞的硬度低 70%。然而分离和 / 或培养的细胞缺少组织中出现的复杂细胞 - 细胞和细胞 - 基质相互作用。

[0204] 通过测试新鲜组织样本,同时保留了组织结构和 ECM 结构。此外,所进行的测量代表了完整肿瘤横切面的取样,并且因此说明了肿瘤典型的异质性。因此,AFM 硬度数据部分地解决了这些矛盾,因为它们表示的不是单个硬度,而是不同的纳米机械信号。例如,与通过无侧限压缩测量的提高的硬度相似,AFM 测试也揭示了外周的基质肿瘤组织相对硬;然而,底层的肿瘤明显较软。因为就细胞形态和生物化学而言,癌症是非常多样化的,因此很难预期用于所有肿瘤区域的共同硬度模量。在此呈现的数据提供了新的范例,用于理解癌症硬度和侵略性表型怎样受到肿瘤细胞异质性的影响。

[0205] 缺氧是其中的微环境条件,其通过改变有助于癌细胞在缺氧环境中存活和扩大的各种基因产物的表达来影响肿瘤进展。这些过程包括血管生成、细胞凋亡、糖酵解、细胞周期控制和最令人感兴趣的迁移。MMTV-PyMT 乳腺组织的 AFM 测量提供了证据,即缺氧还调节癌组织的纳米机械性能。特别是,缺氧相关的软化似乎促进了侵略性的转移表型。所得到的发现支持新兴的概念,即肿瘤微环境在细胞和 / 或组织水平调节生物物理性能。在肿瘤乳腺上皮细胞的情况中,所得到的下游细胞应答导致细胞软化,这与转移潜能提高相一致。一致地,从浸润性癌组织的核心扩散至外周的具有缺氧表型的细胞形成了相应的硬度分布移动。尽管没有直接在人样本中测量缺氧,但核心的柔软性表明了这些区域也是缺氧的。

[0206] 最近,已经提出通过赖氨酰基氧化酶 (LOX) 介导的胶原蛋白交联诱发的 ECM 硬化中肿瘤微环境的改变,促进肿瘤浸润性和转移。缺氧上调 LOX 表达,并且最重要的是,上调 LOX 的催化活性,这导致胶原蛋白降解并驱使浸润性差的乳腺癌细胞朝向侵略性更大的表型。之前已经报道了,缺氧通过 ECM 和细胞骨架的重塑影响细胞硬度,并且这些硬度变化促进细胞入侵和转移。在大量癌细胞丰度高的区域中观察到明显的胶原蛋白和纤连蛋白降解,而不是纤丝状胶原蛋白的增加。同样,已经报道了 MMP- 依赖性 ECM 降解伴随癌症进展。数据表明浸润性癌中缺氧、胶原蛋白降解和组织软化之间强烈的关联性,尽管在邻近缺氧细胞的肿瘤基质中测得 ~ 15 倍的硬度增加。能够想象是缺氧相关的组织软化而不是 ECM 硬化促进了肿瘤进展。保留其缺氧表型的 MMTV-PyMT 小鼠中肺转移的存在给这个观点提供了更多支持。

[0207] 众所周知,缺氧通过化学以及可能的机械信号诱导肿瘤血管生成。同时,缺氧提高肿瘤细胞浸润性,这需要细胞在进出血管的过程中穿过内皮基底膜。从原位转变成至浸润性癌时,通过显微镜观察到基底膜的结构降解,这与肿瘤细胞入侵相一致。作为肿瘤扩散前的“最后一道防线”的基底膜的破裂,最可能引起区域性组织软化的另外增加,并且促进整体硬度异质性。一致地,根据特征性异质硬度模式,不仅在浸润性癌的核心检测到缺氧细胞,而且在浸润性癌的血管附近也检测到缺氧细胞。

[0208] 通过使最初分层的上皮细胞的行为像能动性成纤维细胞那样,上皮间质转化(EMT)和间质标记的超表达是肿瘤进展中的关键要素。在MMTV-PyMT和人活检样本中,随着肿瘤进展,波形蛋白和肌间线蛋白的表达剧烈增加,由此有助于异质硬度表型。波形蛋白和肌间线蛋白的共同表达表明细胞去分化,其可有助于适应缺氧。另一方面,EMT过程中这些标记的表达和行为受到缺氧的影响。这可能解释了侵略性缺氧表型是怎样维持的,即使在充分氧化的环境中,如血管和肺中。

#### [0209] 结论

[0210] 本发明的数据提供了软表型在癌症进展中发挥关键作用的证据。人组织样本的纳米机械特征与相应的组织病理学诊断的比较,证明了软区域对比硬区域的高比例是更具侵略性表型的标志。

[0211] 其他免疫组织化学数据(未显示)表明,ECM成分的降解和空间识别与肿瘤进展相关。同时,局部原发性肿瘤内的SM-肌动蛋白、波形蛋白和肌间线蛋白的结构变化表明细胞结构的显著变化。随着肿瘤进展,结构异质性进一步提高,显然ECM组织化和细胞结构的变化影响细胞的纳米机械应答,并且因此肿瘤进展的特征在于硬度异质性的提高。

[0212] 这与通过AFM测量的癌中的双峰硬度分布非常一致。此外,层粘连蛋白明显去组织化,并且揭示了上皮极性的丧失与恶性和浸润性相一致。

[0213]

[0214]

表 1

病例编号	年龄/性别	AFM 硬度值±SD [kPa]		峰 1	峰 2	峰 3/其他	相应的组织病理学诊断	级别 (g)
1	20/女性	1.19±0.82	-	-	-	-	健康	-
2	31/女性	1.13±0.78	-	-	-	-	健康	-
3	34/女性	1.17±0.67	-	-	-	-	健康	-
4	50/女性	1.23±0.24	-	-	-	-	健康	-
5	53/女性	1.31±0.76	-	-	-	-	健康	-
6	55/女性	1.83±1.13	-	-	-	-	健康	-
7	61/女性	1.33±0.32	2.63±2.06	-	-	-	具有导管增生的纤维腺瘤	-
8	47/女性	-	1.91±0.99	-	-	-	纤维腺瘤	-
9	48/女性	-	3.94±1.49	-	-	-	纤维腺瘤	-
10	49/女性	-	3.41±1.97	-	-	-	纤维腺瘤	-
11	56/女性	-	3.68±1.92	-	-	-	纤维腺瘤	-
12	63/女性	0.56±0.24	1.82±0.96	7.71±4.55	-	-	浸润性导管癌	3
13	44/女性	0.61±0.21	1.54±0.30	-	-	-	嗜酸细胞入侵性癌	2
14	45/女性	0.46±0.21	1.19±0.84	-	-	-	浸润性导管-小叶癌	2
15	61/女性	0.75±0.22	1.64±0.78	不确定的指数下降	-	-	浸润性导管癌	2
16	73/女性	0.73±0.34	1.47±1.67	-	-	-	具有小叶生长模式的浸润性导管癌	2
17	83/女性	0.63±0.50	-	不确定的指数下降	-	-	大汗腺癌	2
18	61/女性	0.57±0.16	1.99±0.73	5.75±1.62	-	-	浸润性导管癌	1
19	69/女性	0.66±0.31	1.71±1.41	-	-	-	浸润性导管癌	1
20	79/女性	0.53±0.23	1.81±0.42	7.41±2.49	-	-	浸润性导管癌	1
21	95/女性	0.31±0.12	-	8.45±1.77	-	-	浸润性导管癌	1

表 2

小鼠（样本编号）	AFM 硬度值[kPa]±SD		相应的组织病理学诊断
	峰 1	峰 2	
<b>1</b>	1.148±0.482	-	正常
<b>2</b>	1.075±0.622	-	正常
<b>3</b>	1.021±0.524	-	正常
<b>4</b>	0.983±0.860	-	正常
<b>5</b>	1.149±1.275	-	正常
<b>6</b>	0.959±0.931	-	正常
<b>7</b>	0.956±0.260	-	正常
<b>8</b>	1.124±0.503	-	正常
[0215]	<b>1</b>	1.023±0.054	1.449±0.693 恶性前
	<b>2</b>	-	2.437±0.844 恶性前
	<b>3</b>	1.012±0.434	2.046±0.679 恶性前
	<b>4</b>	1.265±0.549	1.963±1.382 恶性前
	<b>5</b>	1.612±0.244	2.166±1.042 恶性前
	<b>6</b>	1.579±0.973	- 恶性前
	<b>7</b>	1.568±0.648	- 恶性前
	<b>1</b>	0.591±0.178	1.404±0.556 早期癌症
	<b>2</b>	0.467±0.158	1.496±0.748 早期癌症
	<b>3</b>	0.721±0.068	4.195±2.837 早期癌症
	<b>4</b>	0.443±0.112	1.069±0.512 早期癌症
	<b>5</b>	0.771±0.152	1.446±0.879 早期癌症
	<b>6</b>	0.498±0.192	1.554±0.895 早期癌症
	<b>7</b>	0.521±0.180	1.414±0.812 早期癌症
	<b>1</b>	0.625±0.197	3.171±2.312 晚期癌症
	<b>2</b>	0.723±0.277	2.422±0.701 晚期癌症
	<b>3</b>	0.503±0.032	5.081±2.746 晚期癌症
	<b>4</b>	0.650±0.131	5.279±3.1 晚期癌症

[0216]	5	0.767±0.041	22 4.493±3.0	晚期癌症
	6	0.567±0.223	60 2.636±1.4	晚期癌症
	7	0.744±0.301	49 3.451±1.7	晚期癌症
	8	0.699±0.155	01 4.404±1.0	晚期癌症

[0217] 表 3

[0218]

小鼠（肺编号）	AFM 硬度值[kPa]±SD		
	正常	转移	围绕
1	9.917±4.753		
2	11.302±5.246		
3	11.334±5.808		
4		0.776±0.689	9.723±5.215
5		0.588±0.377	10.685±6.763
6		0.777±0.880	8.354±4.548

[0219] 参照元件列表

[0220]

100	本发明的原子力显微镜
1	压电元件
11	最大缩回
12	最大伸展
13	最佳工作范围
14	非最佳工作范围
15	抬升悬臂的阈值
16	降低悬臂的阈值
2	悬臂
21	悬臂尖端

[0221]

22	激光器
----	-----

23	镜子
24	光电二极管
25	悬臂支架
3	电动机
31	控制器
4	样本
41	样本支架
R	第一方向

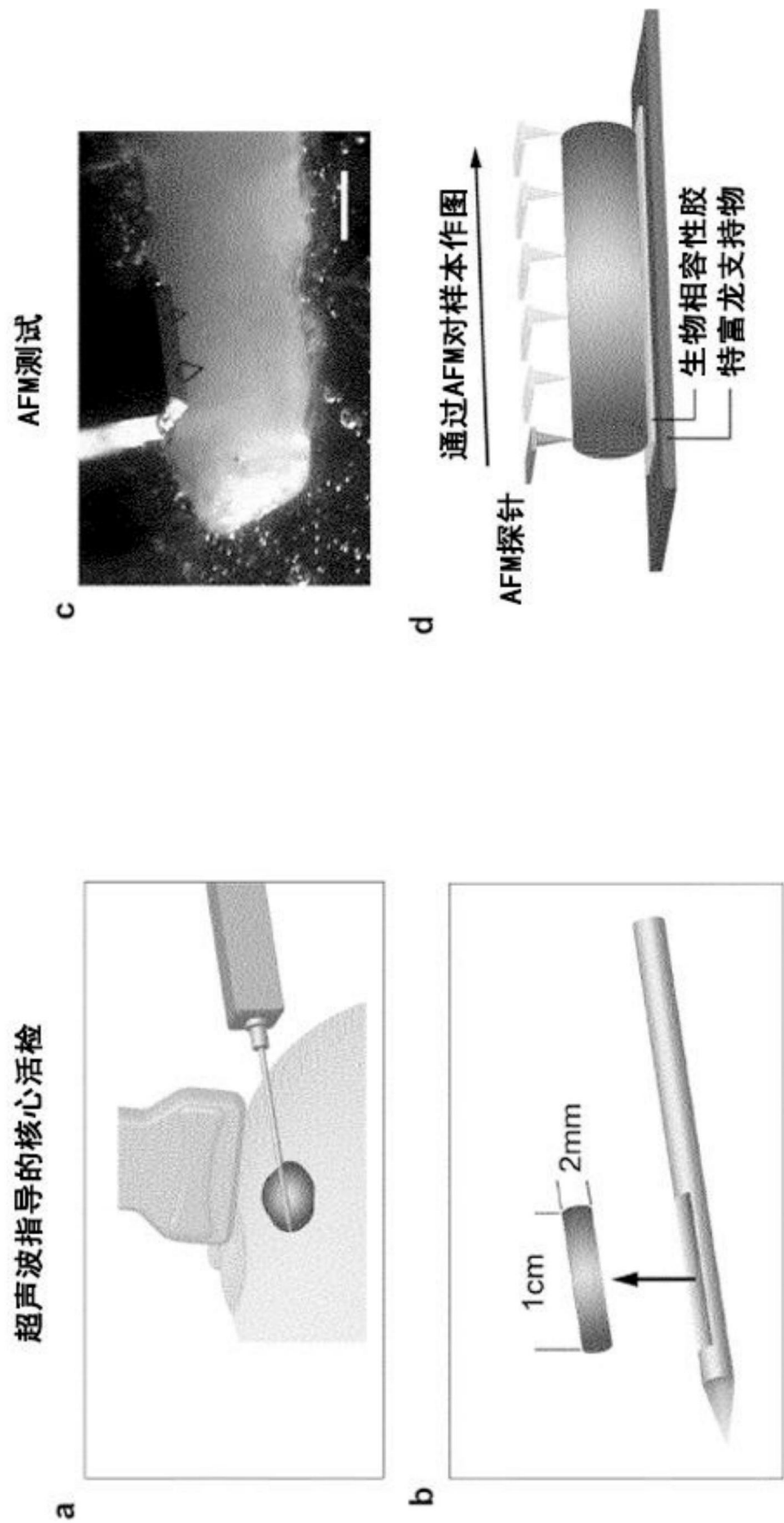


图 1

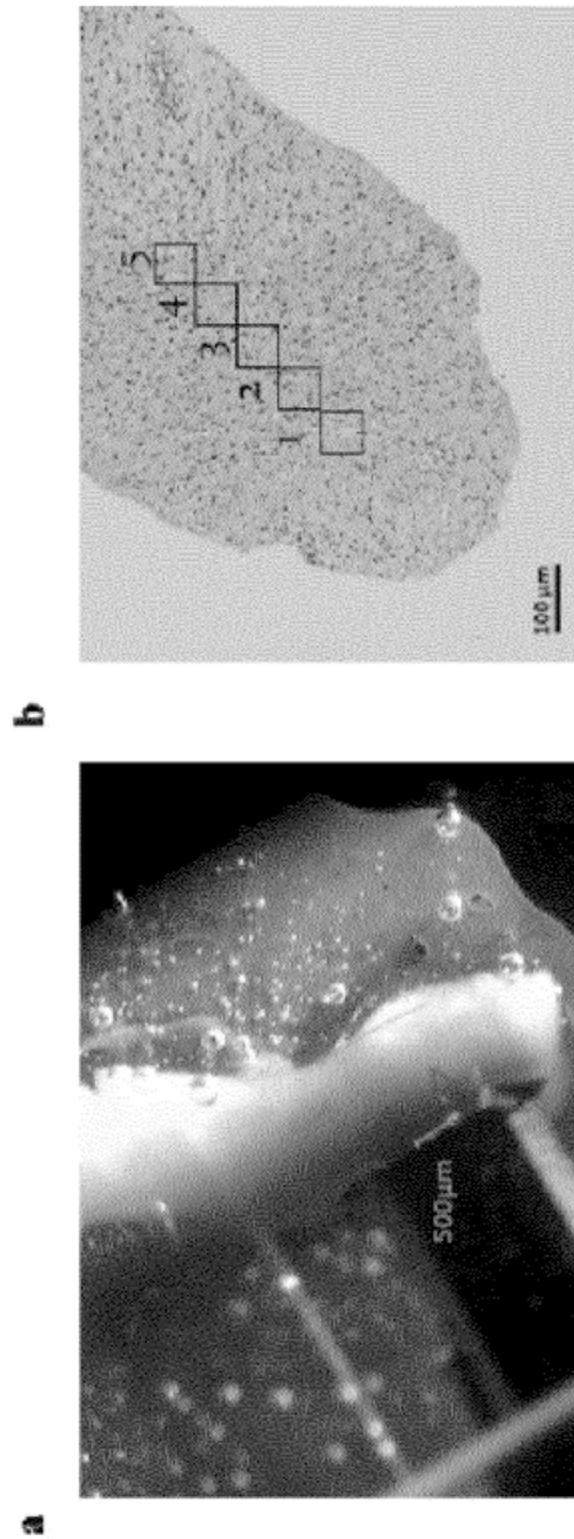


图 2

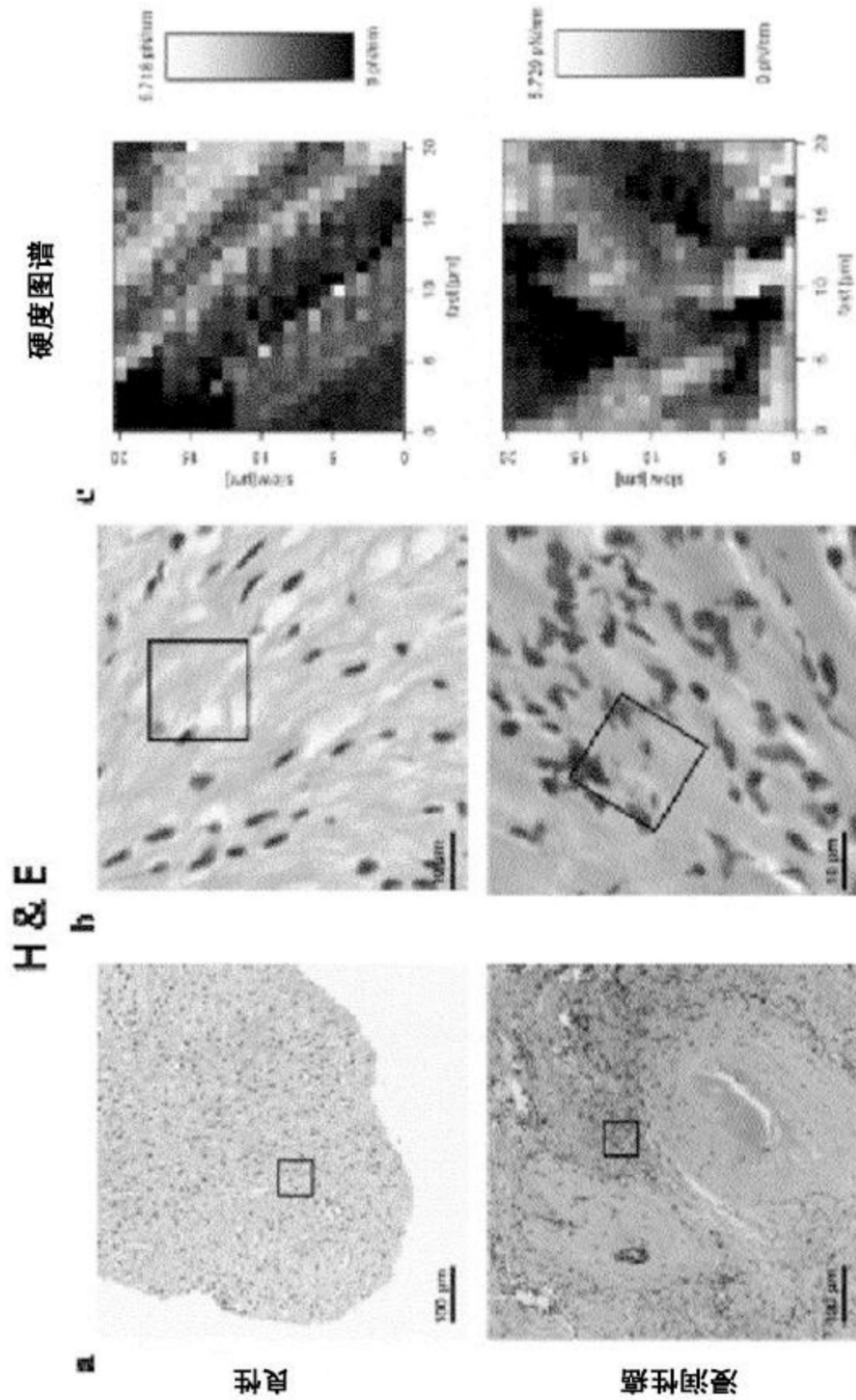


图 3

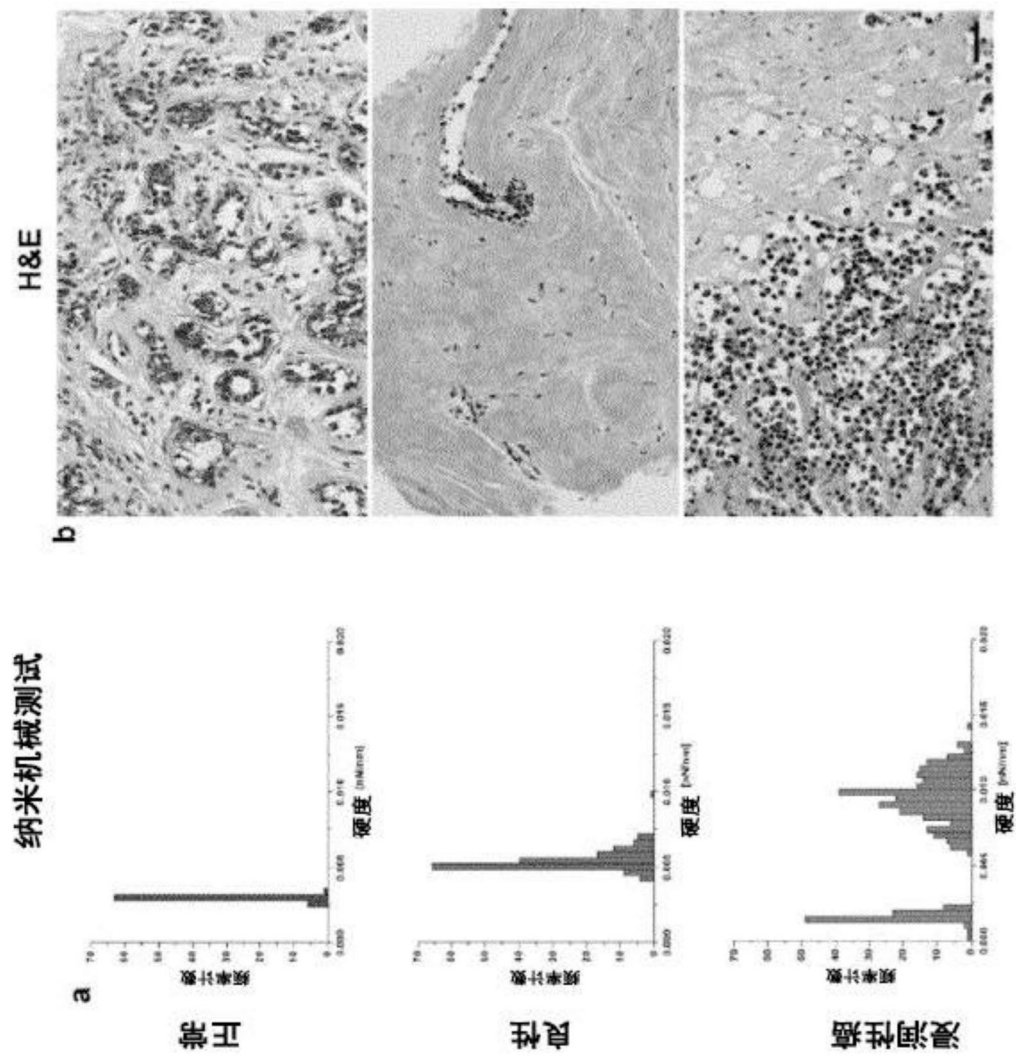


图 4

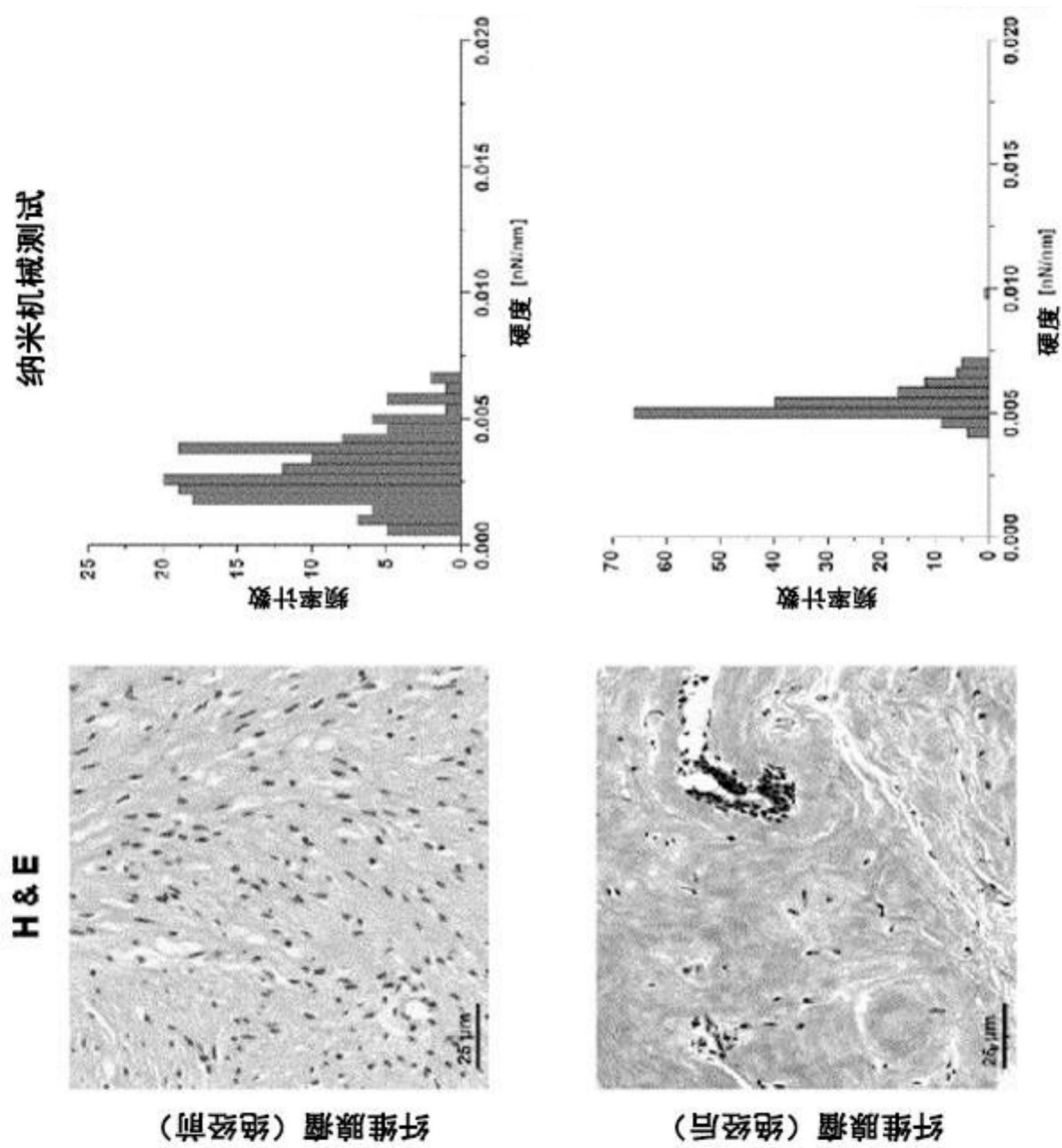


图 5

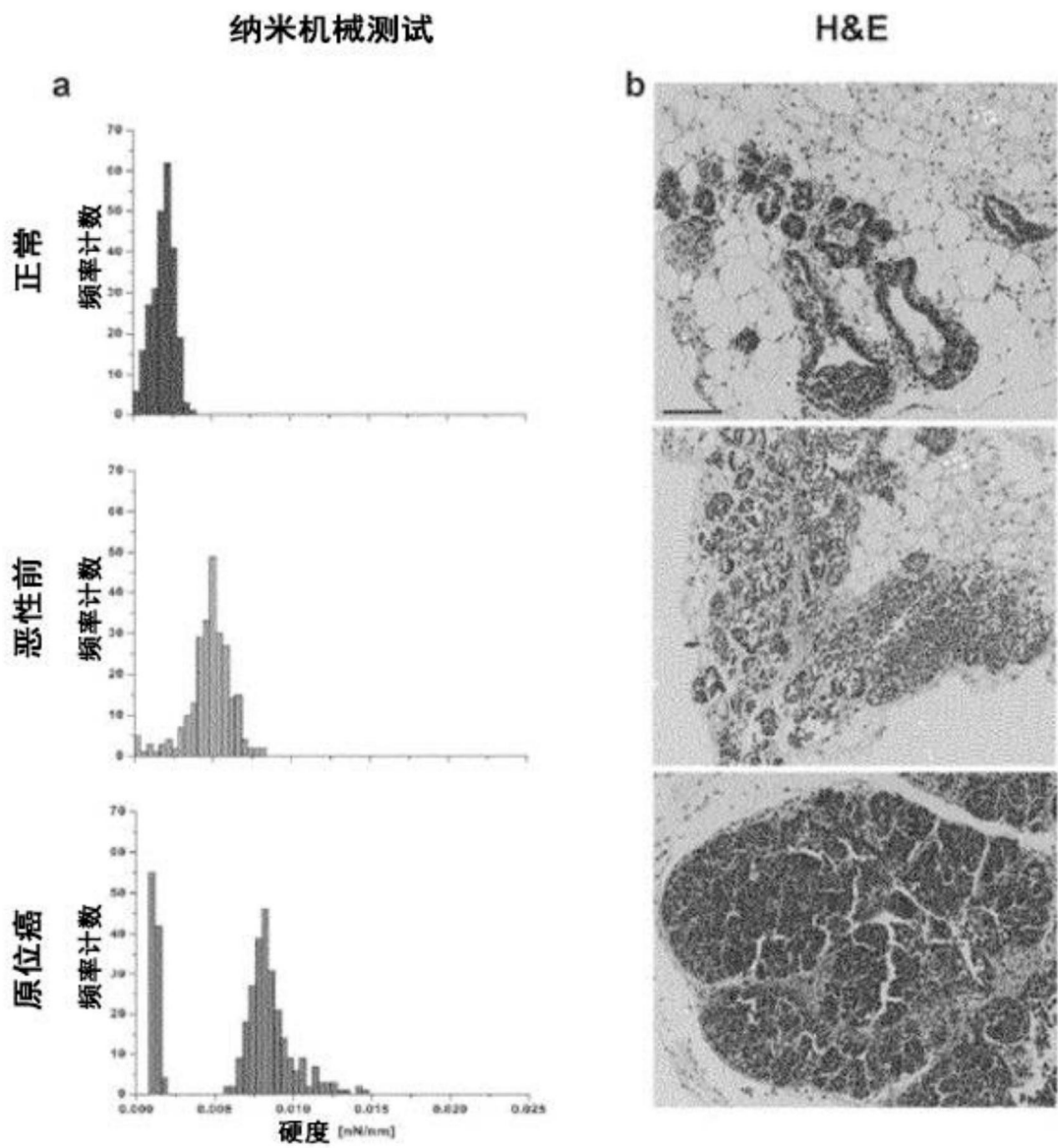


图 6

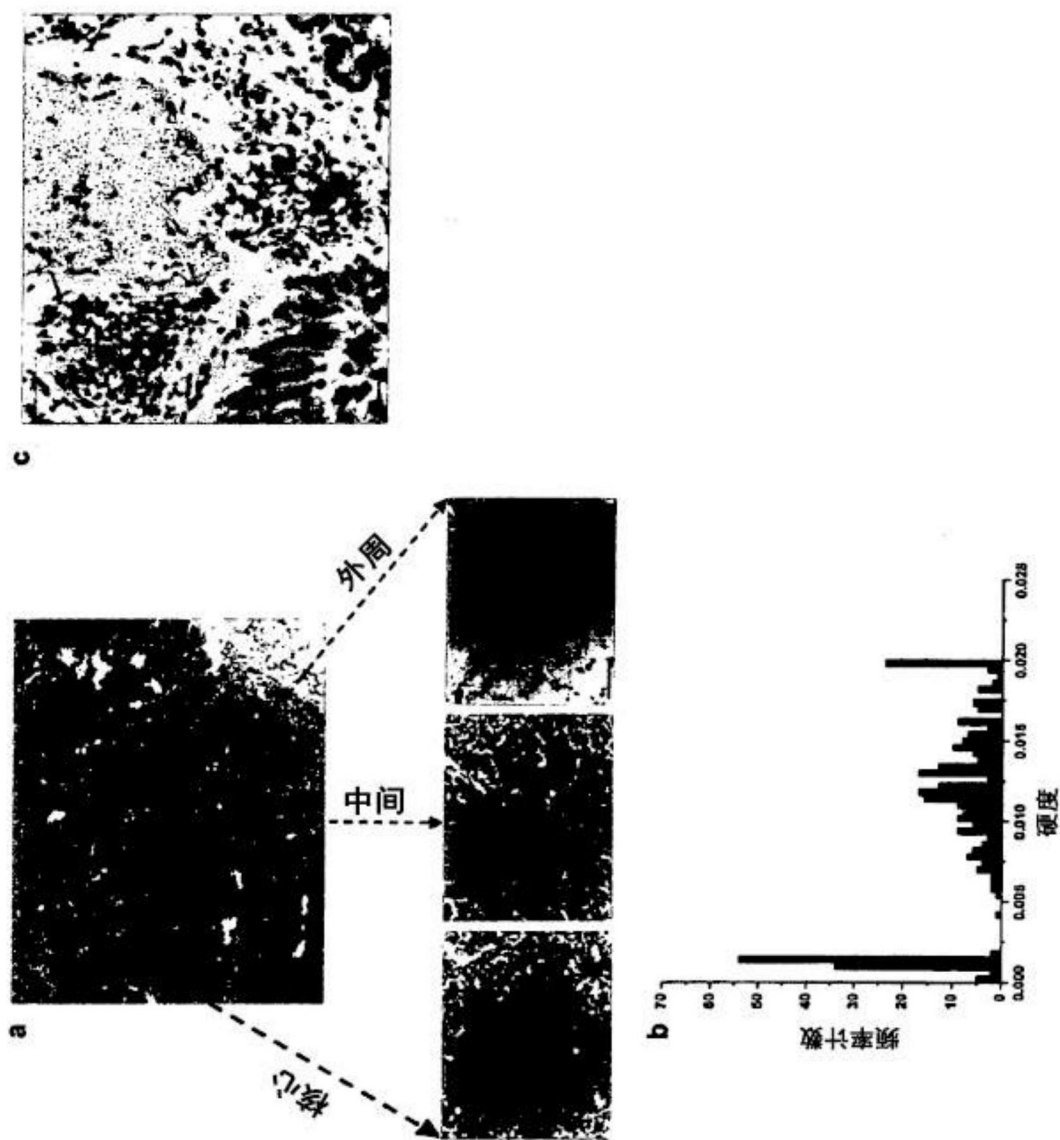


图 7

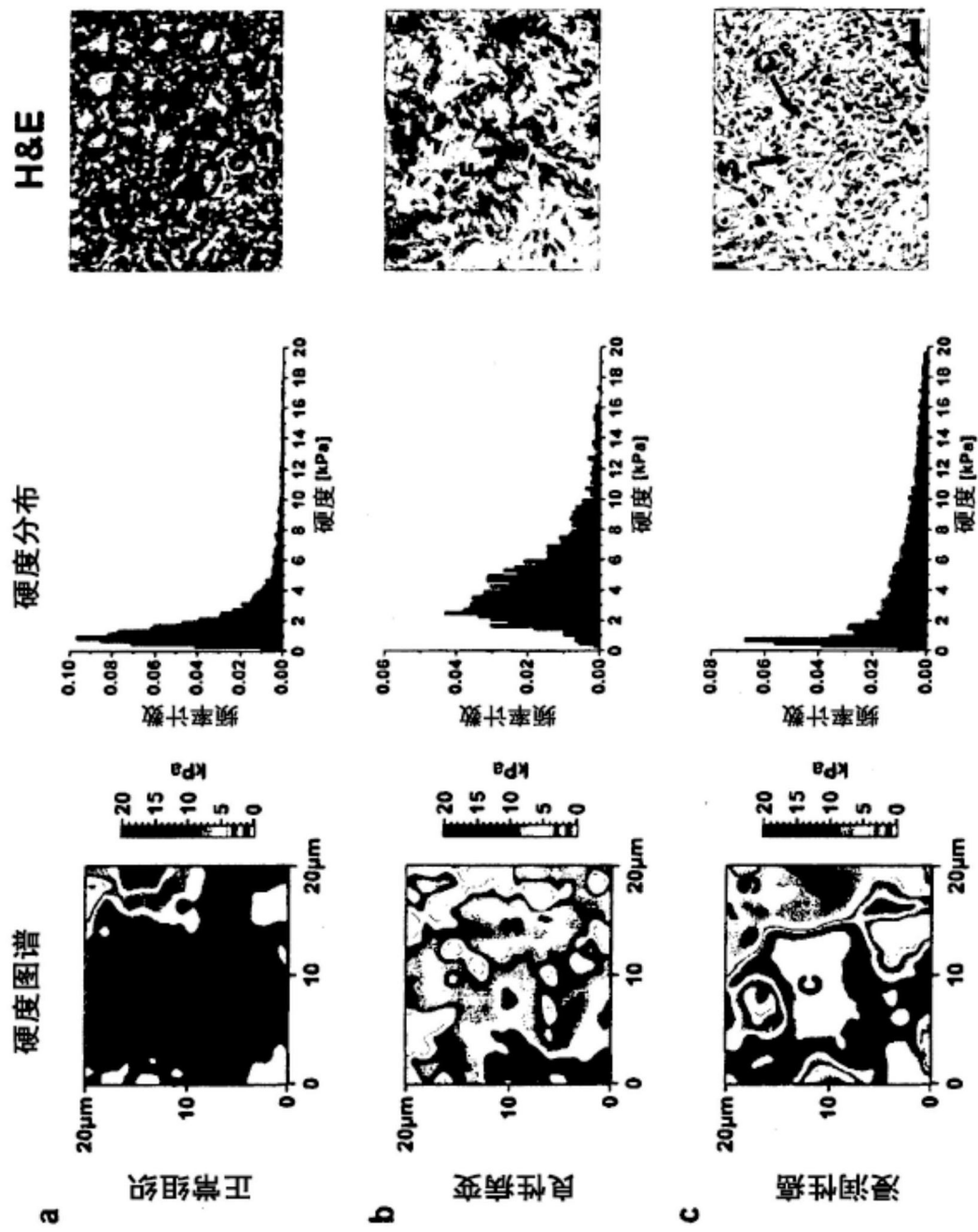


图 8

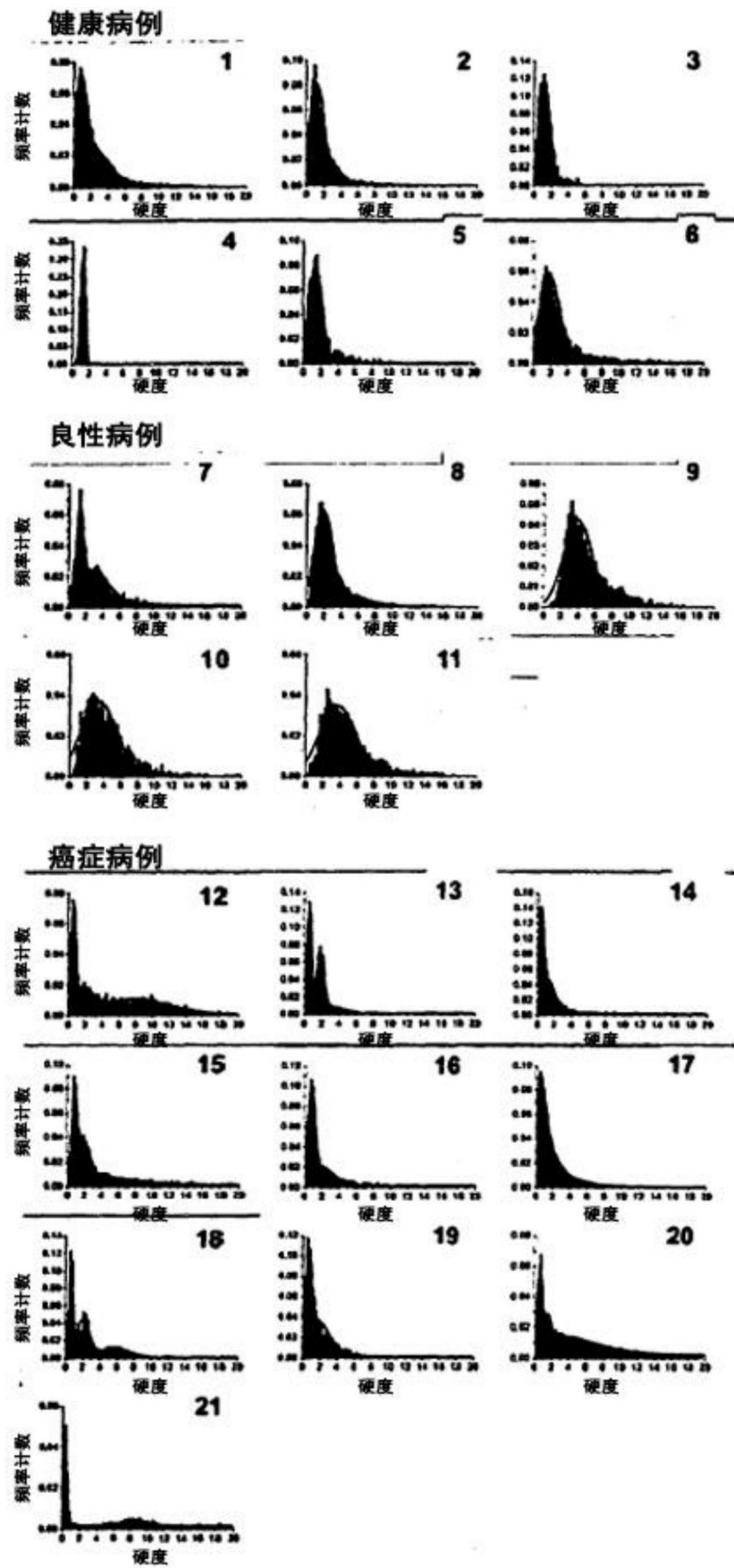


图 9

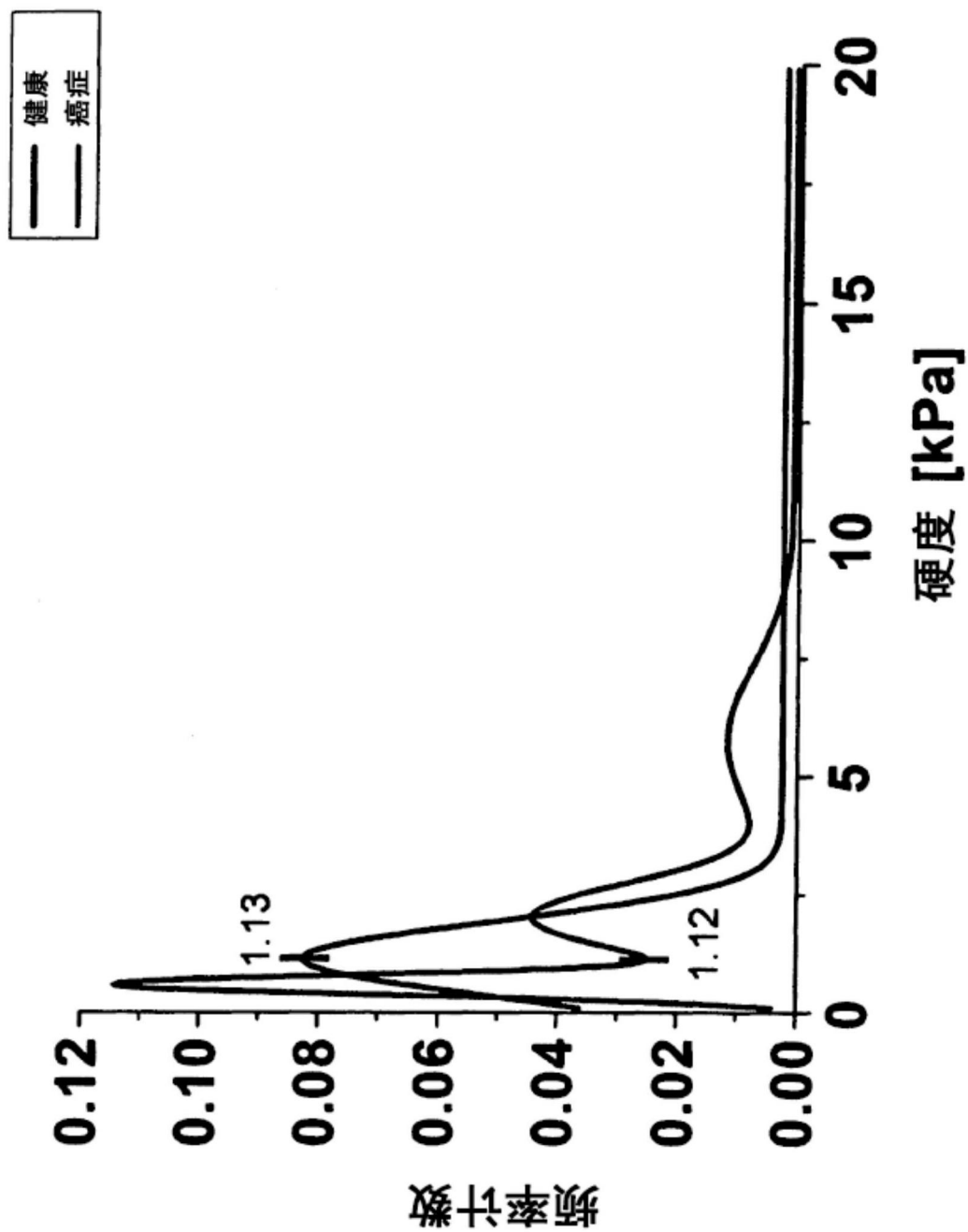


图 10

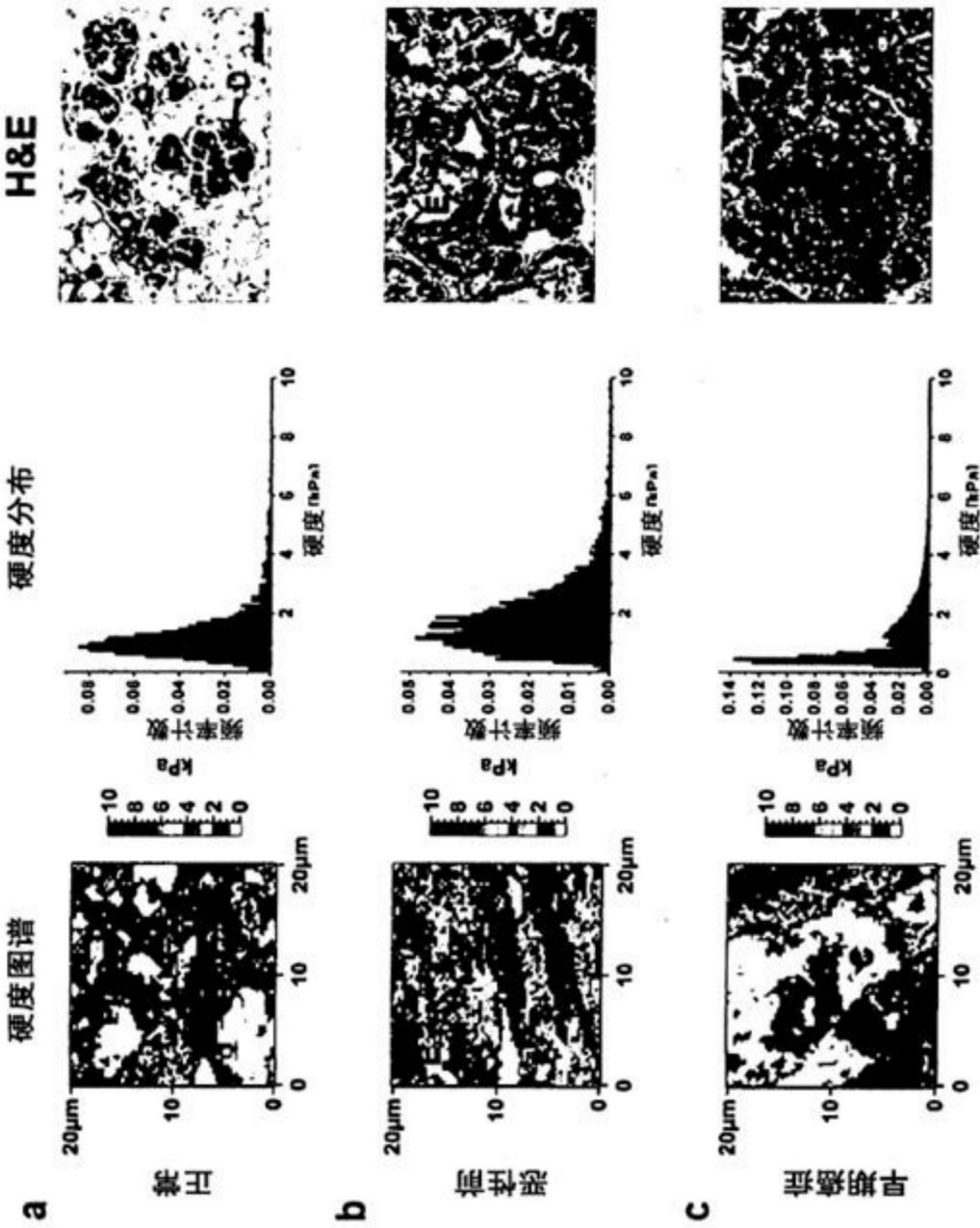


图 11

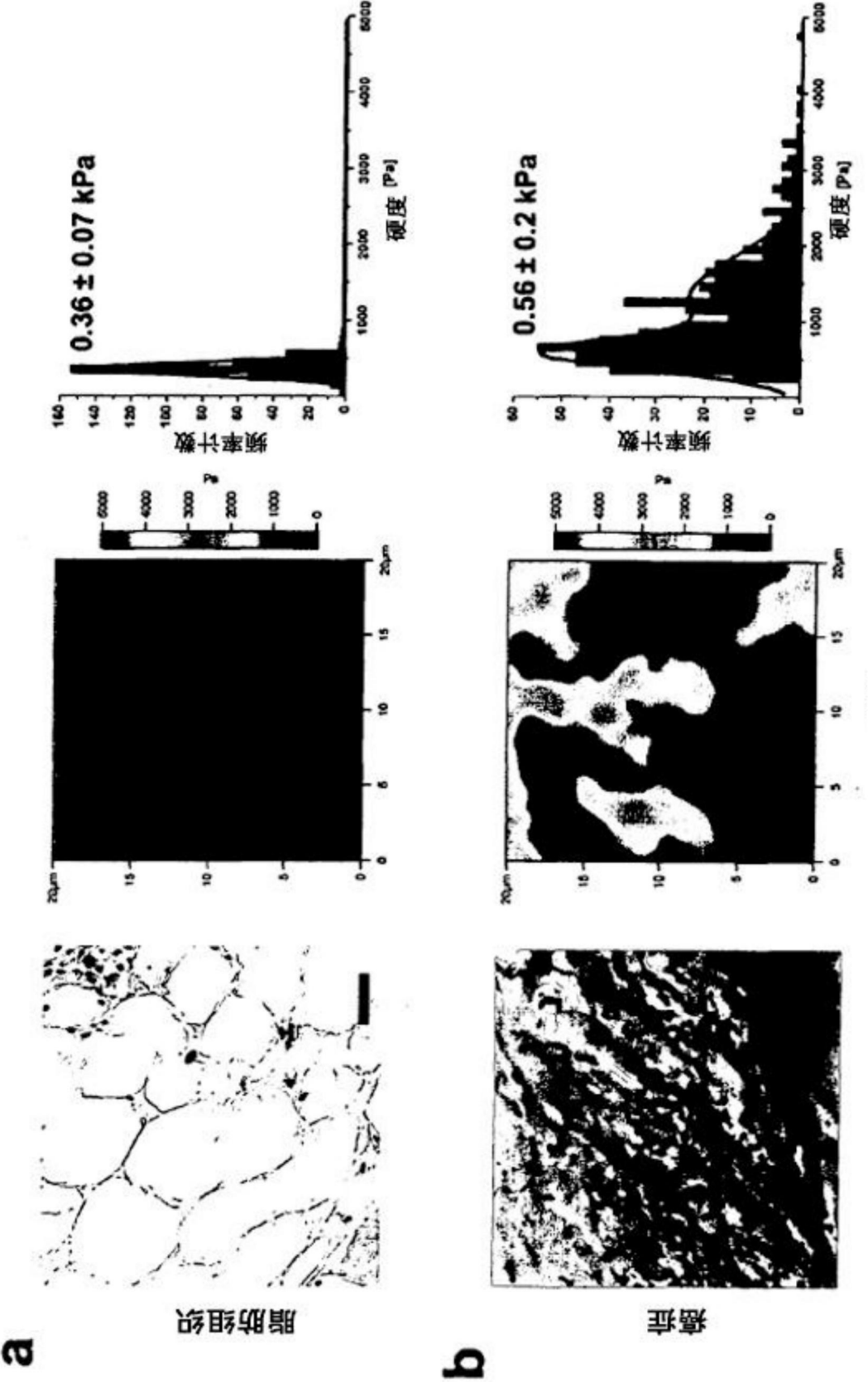
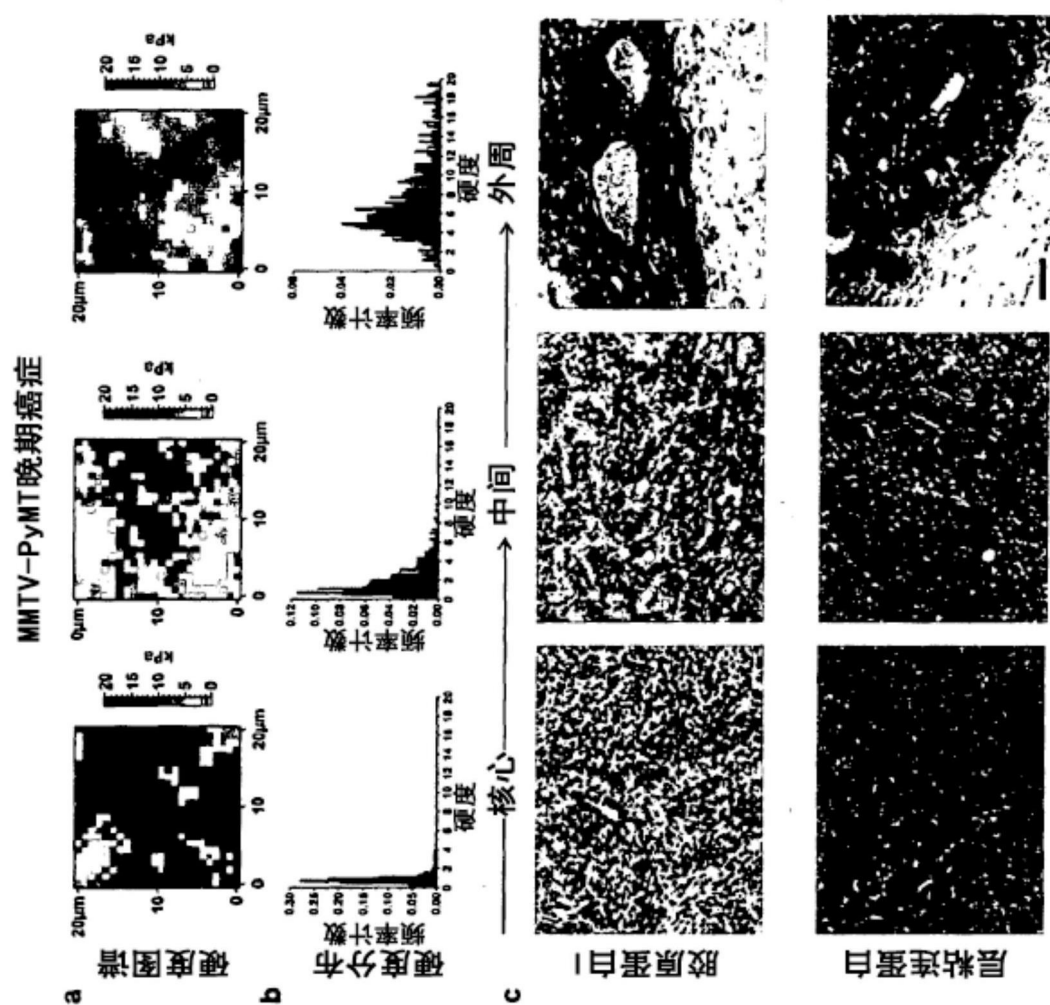


图 12



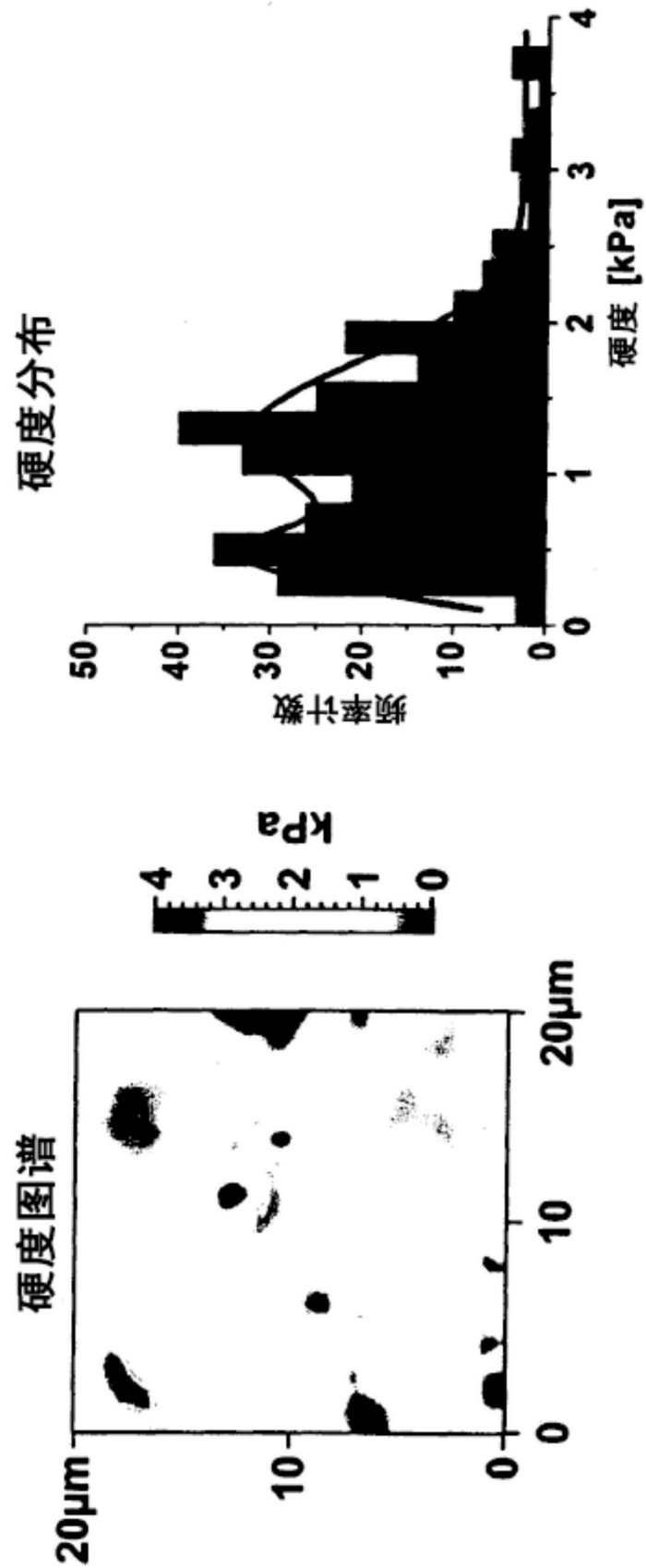


图 14

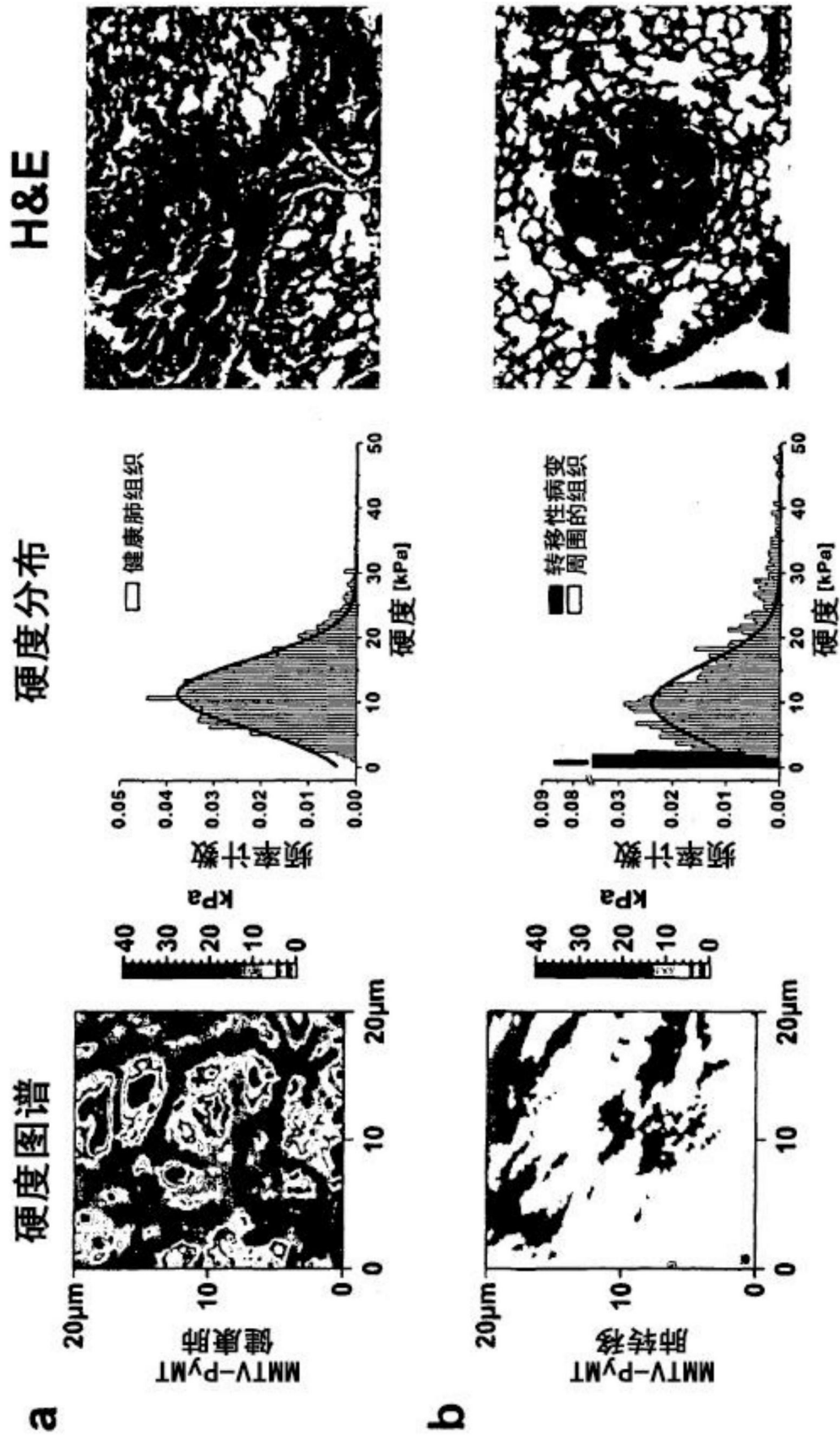


图 15

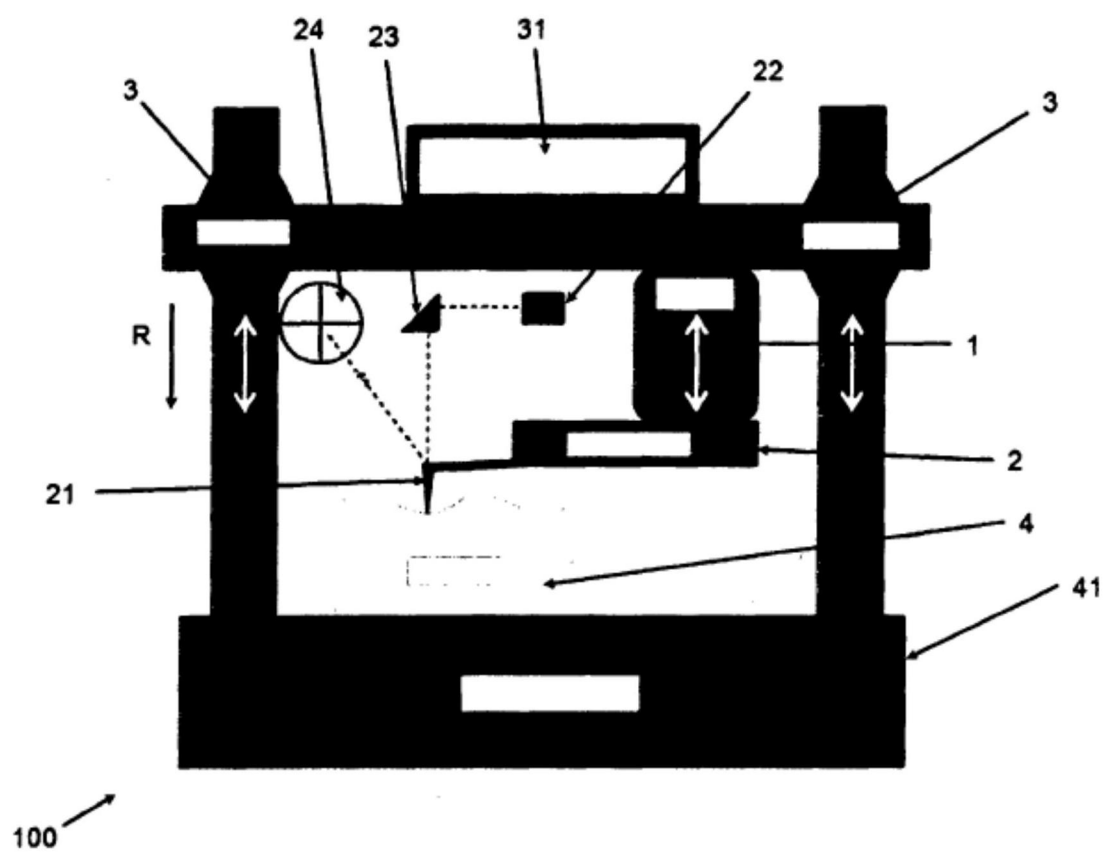


图 16



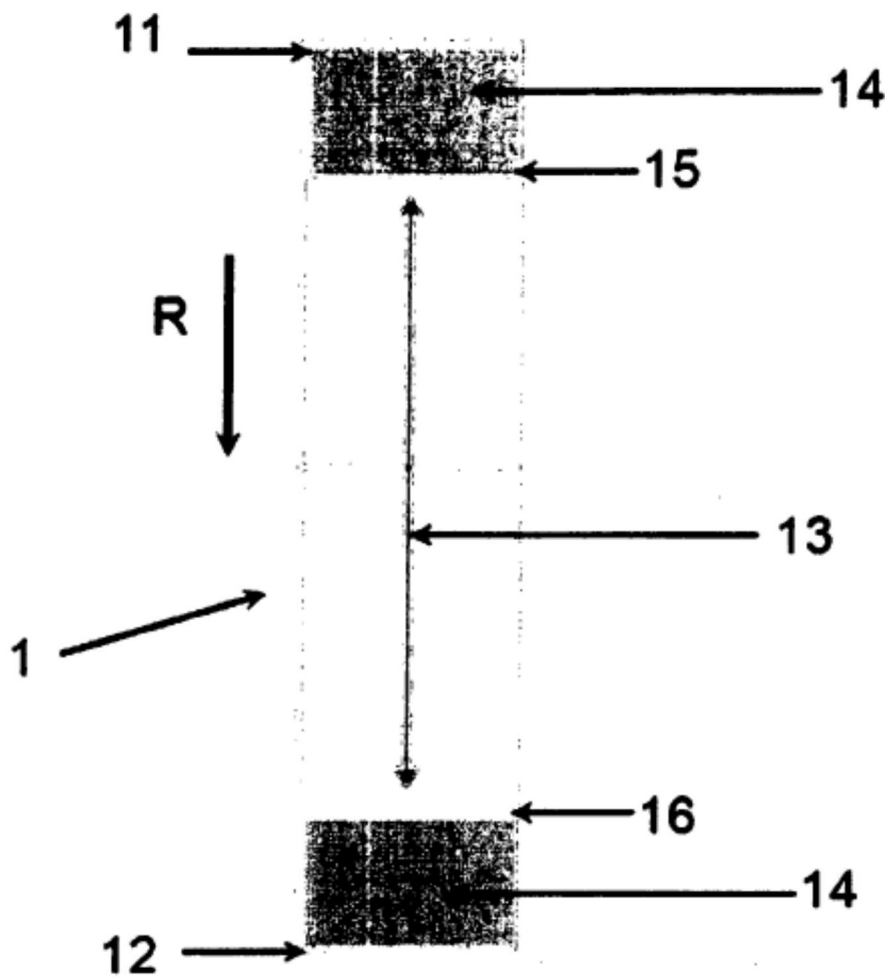


图 18