



论文

利用 AFM 探测淋巴瘤细胞表面 CD20 抗原 与其抗体的相互作用

李密^{①③⑥}, 刘连庆^{①*}, 席宁^{①②*}, 王越超^①, 董再励^①, 李广勇^{①③}, 肖秀斌^④,
张伟京^{④*}

① 中国科学院沈阳自动化研究所, 机器人学国家重点实验室, 沈阳 110016;

② Department of Electrical and Computer Engineering, Michigan State University, East Lansing 48824, USA;

③ Department of Electrical and Computer Engineering, University of Pittsburgh, Pittsburgh 15261, USA;

④ 军事医学科学院附属医院, 北京 100071;

⑤ 中国科学院研究生院, 北京 100049;

⑥ 中国科学院上海药物研究所, 新药研究国家重点实验室, 上海 201203

* 联系人, E-mail: lqliu@sia.cn; xin@egr.msu.edu; zhangwj3072@163.com

收稿日期: 2010-04-06; 接受日期: 2010-07-31

国家自然科学基金(批准号: 60904095, 60635040)、国家高技术研究发展计划(批准号: 2009AA03Z316)、中国科学院、国家外国专家局创新团队国际合作伙伴计划和新药研究国家重点实验室开放基金资助项目

摘要 在分子水平阐明细胞生理活动深层次的机制是当前生命科学的重要研究课题. AFM 的发明为揭示细胞生理活动的分子本质提供了新的技术手段. 利用 AFM 单分子力谱技术在近生理环境下对 B 淋巴瘤细胞表面的 CD20 抗原与其抗体 Rituximab 之间的特异性结合反应进行了探索性的研究, 通过对探针进行功能化, 测量了 CD20 抗原与 Rituximab 之间的特异性结合力, 同时观察了 CD20 抗原在 B 淋巴瘤细胞表面的分布, 并分析了在外部拉力作用下, CD20-Rituximab 复合物的分子内力与伸长量的关系. 实验结果为深入研究 Rituximab 的作用机制奠定了基础.

关键词

原子力显微术
单分子力谱
CD20 抗原
Rituximab

目前, 有关细胞内生理活动化学过程的结论, 大多是通过在试管中进行的集群平均实验获得的^[1,2], 反映了来自许多细胞的大量分子活动的平均结果^[3]. 集群平均结果给人们带来了有关细胞内化学过程的丰富资料, 是人们认识细胞活动的重要基础^[4], 但集群平均同时也掩盖了单个分子的活动状态, 单个分子的个性与不同被淹没于整体之中^[5]. 越来越多的证据表明, 在试管内研究得到的结果并非完全反应了

活体内的真实情况. 因此, 为了更深入地揭示生命活动中分子活动的过程和本质, 有必要开展单分子水平的科学实验研究^[6], 通过观测单个分子的活动状态, 加深人们在分子水平对细胞生理活动机制的认识, 进而揭示集群平均方法所掩盖的单分子活动特点, 为传统集群平均方法提供有意义的信息.

单分子技术主要包括荧光技术和力测量技术两大类 20 余种方法, 其中原子力显微术(atomic force

microscopy, AFM)是唯一能对分布于细胞上的蛋白分子进行检测、定位和操作的工具^[5], 其能在生理环境下工作的独特优势使人们可以动态观测活体细胞的生理活动^[7]. 此外, AFM 还具备纳米级分辨率^[8]、可控性好、对被测样品损伤小^[9]以及样品制作快速简单^[10]等特点. 这些特点使 AFM 被广泛应用于细胞生理活动的研究中, 为细胞分子水平的生命活动带来了新的认识^[11], 为重大疾病的分子机制理解^[12]提供了新的思路, 并对新生物标记^[13]的发现以及新药研发^[14]产生了重要的影响.

AFM 进行单分子研究的主要手段是通过单分子力谱(single-molecule force spectroscopy, SMFS)^[15]方式进行, 即将配体分子连接到 AFM 针尖上, 控制 AFM 探针使得该配体分子与样品表面的受体分子相结合, 从而实现受体-配体间分子间相互作用力的测量. 利用 SMFS 测量分子间结合力最早可追溯到 20 世纪 90 年代中期. 1994 年, Florin 等人^[16]测量了生物素-亲合素之间的结合力; 1996 年, Hinterdorfer 等人^[17]测量了人血清白蛋白与其抗体之间的结合力, 此后许多学者利用 SMFS 对不同分子组合的特异性结合反应进行了研究, 并且研究趋势已经从对固定到基底的受体^[18]转变到直接对话细胞表面的受体^[11,12,19-22]进行特异性结合的探测. 利用 SMFS 技术来探测细胞表面受体-配体间特异性识别反应, 对于了解受体-配体结合与解离过程中的分子动力学^[8]以及受体在细胞表面的分布^[15,22,23]具有重要意义, 并有望对重大疾病的个体化治疗产生重要影响.

近年来, 在 B 细胞淋巴瘤的临床 Rituximab 靶向治疗中发现, 不同亚型淋巴瘤的 Rituximab 疗效有着明显的差异. AFM 为揭示 Rituximab 疗效差异的分子本质提供了新的技术手段. 本文利用 AFM 在近生理环境下对 B 淋巴瘤细胞表面分布的 CD20 抗原与其抗体 Rituximab 间的特异性识别反应进行了探索性的研究, 介绍了基于 AFM 探针功能化的分子力检测及细胞表面抗原分布可视化的方法, 为深入开展癌症等重大疾病靶向治疗中疗效差异分子机制的研究提供了有益的方法和技术.

1 CD20 与 Rituximab 的作用机制

非霍奇金淋巴瘤是一类常见的恶性肿瘤, 其发病率占肿瘤发病率的 4%~5%^[24], 这其中大约 85% 的非霍奇金淋巴瘤为 B 细胞淋巴瘤^[25]. 1997 年, 美国食

品和药物管理局(food and drug administration, FDA)批准上市的单克隆抗体靶向药 Rituximab 为 B 细胞淋巴瘤的治疗带来了革命性的影响. Rituximab 通过与淋巴瘤细胞表面的 CD20 抗原特异性结合清除靶细胞. Rituximab 靶向治疗与传统化疗/放疗相结合可显著提高淋巴瘤患者的存活率^[26], 其已成为 B 细胞淋巴瘤的主流治疗方案.

CD20 抗原(图 1)属于白细胞分化抗原分化群(cluster of differentiation, CD)家族, 为 4 次跨膜分子, 由 297 个氨基酸残基组成, 其 N 端和 C 端均在细胞内, 分子量为 33~35 kD^[27]. 除了以跨膜蛋白的形式存在外, 在某些白血病人体内, CD20 还以可溶形式存在于血浆中^[28]. 由于 CD20 在大于 90% 的 B 细胞淋巴瘤上大量表达而在造血干细胞和浆细胞上不表达^[29], 且与抗体结合后, 不会从细胞表面脱落或者内化^[28], 因此是治疗 B 细胞淋巴瘤的理想作用靶点^[30].

Rituximab 由 2B8(鼠源抗 CD20 单抗)的可变区与人 IgG1 恒定区嵌合而成^[31]. 体外实验证据表明, Rituximab 与 CD20 结合清除靶细胞的可能机制(图 1)包括: ① 抗体依赖细胞介导的细胞毒性作用(antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC): Rituximab 与 CD20 结合后, 其 Fc 段与体内的自然杀伤细胞的 Fc 受体结合, 进而触发自然杀伤细胞释放细胞毒物质来杀死靶细胞^[32]; ② 补体依赖的细胞毒作用(complement dependent cytotoxicity, CDC): Rituximab 与 CD20 结合后激活补体系统, 在靶细胞表面形成膜攻击复合物

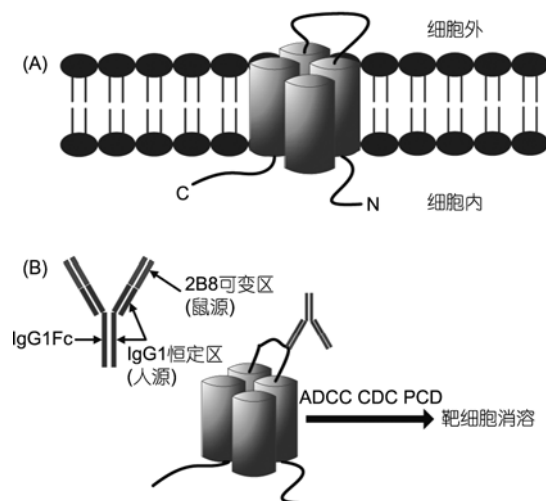


图 1 CD20 抗原与 Rituximab 结合后导致靶细胞溶解
(A) CD20 抗原结构; (B) Rituximab 结构及与 CD20 结合后清除靶细胞的可能机制

(Membrane Attack Complex, MAC), 导致靶细胞溶解^[33]; ③ Rituximab 与 CD20 结合后还能诱导靶细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD)^[28]. 作为第一代抗 CD20 单抗靶向药, Rituximab 的成功极大地促进了抗 CD20 单抗靶向药的发展. 第二代抗 CD20 单抗通过抗体人源化降低抗体的免疫原性, 而第三代抗 CD20 单抗则在第二代抗 CD20 单抗基础上通过基因工程对抗体的 Fc 端进行改进来提高治疗效果^[26].

2 材料与方法

2.1 样本制作

实验细胞取自 Burkitt 淋巴瘤 Raji 细胞系, 并在 37°C (5%CO₂) 含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中培养. 在液体环境下对细胞进行 AFM 成像时, 为了避免探针在扫描过程中引起的细胞运动^[34], 需要将细胞牢固地绑定到基底上^[35]. 目前, 主要有两种方法用于将细胞绑定到基底上, 多聚赖氨酸静电吸附法和微孔滤膜机械固定法^[36]. 本文利用多聚赖氨酸将淋巴瘤细胞吸附到玻璃基底上, 并采用戊二醛^[37]对细胞进行化学固定.

2.2 AFM 成像

实验采用的 AFM 为美国 Veeco 公司生产的 Dimension 3100 型 AFM(图 2(A)). 采用的探针为 Veeco 公司的 DNP-S 型接触模式探针(图 2(B)). 该探针的针尖曲率半径为 10 nm. 探针悬臂梁的长, 宽, 厚分别为 205, 25 和 0.6 μm . 悬臂梁的弹性系数为 0.06 N/m(使用 Veeco 公司的热调谐适配器校正). 实验在室温下磷酸盐缓冲液(PBS)中进行. 样本置于含

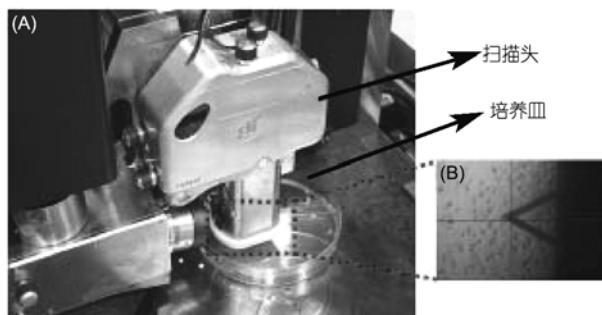


图 2 实验仪器

(A) Dimension 3100 AFM, 培养皿中盛有 PBS 溶液; (B) 接触模式探针

PBS 的培养皿中. 利用 AFM 的光学显微镜系统将探针定位到细胞上. 首先进行大范围扫描, 找到细胞后通过设置 AFM 界面操作软件 Nanoscope(V6.13)的参数对细胞进行精确扫描成像. 扫描频率为 1 Hz, 扫描线设为 256, 扫描线上的采样点设为 256, 扫描力设为 50 pN.

2.3 二抗标记荧光显微术

通过羊抗人 IgG 抗体和 Rituximab 检测 CD20 在淋巴瘤细胞表面的分布. ① 将细胞溶液滴至覆盖了多聚赖氨酸的载玻片上, 并将载玻片置于含 PBS 的培养皿中; ② 往培养皿中加入 Rituximab 溶液, 反应 1 h; ③ 用 PBS 清洗样本以去除残留的 Rituximab 并往培养皿中加入新鲜的 PBS; ④ 加入标记有 FITC 的羊抗人 IgG 溶液, 反应 1 h; ⑤ 用 PBS 清洗样本后将样本置于 Nikon Ti-U-FL 荧光显微镜下观察.

2.4 探针功能化方法

如图 3 所示, 通过两端分别连有 NHS 基团和 MAL

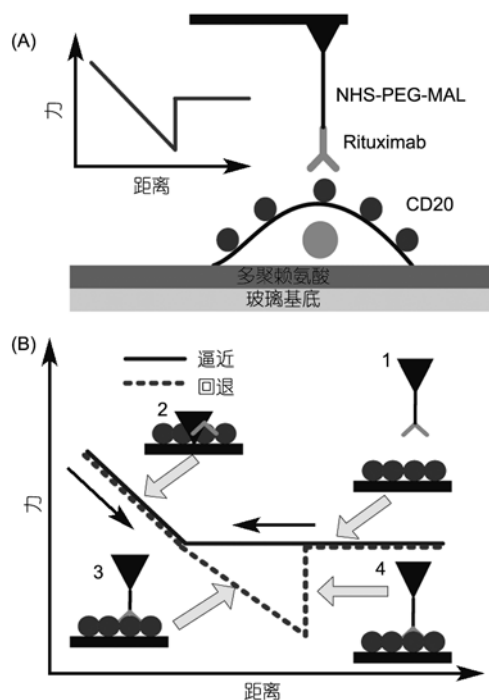


图 3 SMFS 检测 CD20-Rituximab 结合力原理

(A) 利用 NHS-PEG-MAL 将 Rituximab 连接到 AFM 针尖, 在淋巴瘤细胞表面获取力曲线检测 CD20 与 Rituximab 之间的结合力; (B) 连接了配体的 AFM 针尖在逐步逼近受体并与受体结合后回退的过程中, 如发生受体配体结合反应, 则在回退曲线上会出现突变峰

基团的聚乙二醇(PEG)分子 NHS-PEG-MAL^[21,38,39]将 Rituximab 连接到 AFM 针尖上. 在 AFM 针尖表面覆盖一层氨基, 并对 Rituximab 进行 SATP 修饰以使 Rituximab 产生氢硫基, 这样 NHS-PEG-MAL 分子的 NHS 基与 AFM 针尖表面的氨基形成稳定的氨基化合物, 而 MAL 基则与 Rituximab 的氢硫基形成二硫键^[39], 从而将 Rituximab 连接到 AFM 针尖. Rituximab 由军事医学科学院附属医院提供, 探针功能化所需的试剂从 Sigma-Aldrich 公司购买, 根据文献[40]中的探针功能化步骤通过一系列化学反应将 Rituximab 连接到 AFM 针尖上.

2.5 分子间结合力检测

利用修饰了 Rituximab 的探针来探测 B 淋巴瘤细胞表面 CD20 抗原与 Rituximab 之间的特异性结合反应. 具体方法是利用修饰了 Rituximab 的探针在淋巴瘤细胞表面获取力曲线, 当 CD20 与 Rituximab 结合时, 力曲线上会出现一个明显的突变峰(图 3(A)), 这个峰反应了 CD20 与 Rituximab 的特异性结合. 由于这种分子间特异性结合反应是一个概率事件, 有一定的成键几率(通常小于 30%)^[21,41], 因此在一次测量中往往需要获取数百条(500~1000)^[19]力曲线. 通过阻断实验(blocking experiment)^[8]来证明测量得到的 CD20-Rituximab 结合力的特异性, 即通过加入充足的抗体来屏蔽细胞表面 CD20 抗原分子的结合位点, 然后再次用功能化后的探针进行 CD20-Rituximab 结合力的测量.

利用功能化探针获取的力曲线上的突变峰个数可能不止一个^[21,42], 这是因为在探针的一个逼近-回退过程中, 可能形成多对受体-配体复合物, 从而会在力曲线上出现多个突变峰. 为了从获取的力曲线中计算出单对受体-配体的结合力, Stevens 等人^[43]提出了泊松分析法:

$$\frac{\sigma^2}{\mu} = F, \quad (1)$$

根据泊松分析法(公式①), 在一次测量过程中, 计算测量值的方差 σ^2 和平均值 μ , 即可计算出单对受体-配体的结合力 F . 如果在同一加载速度下进行多次测量, 则对多次测量结果的 $\sigma^2-\mu$ 进行直线拟合, 所得直线的斜率即为单对受体-配体的结合力.

3 结果与分析

3.1 AFM 细胞成像

AFM 是目前为止仅有的能够在高分辨率条件下对活细胞实时成像并测量分析的单分子技术^[44], 利用 AFM 对活体细胞进行成像取得了重要进展, 然而迄今为止能利用 AFM 在生理条件下进行活体高质量成像的细胞种类还不多^[45], 主要集中在微生物细胞^[7,11]和贴壁动物细胞^[19]等较硬的细胞. 微生物细胞具有相对比较坚硬的细胞壁, 因而不需要对其进行化学固定即可得到高质量 AFM 图像, 而贴壁动物细胞因为能在基底表面生长(为了增加细胞的贴壁能力, 可以在基底表面覆盖多聚赖氨酸), 待细胞牢固贴壁后通过微小力(小于 100 pN)接触模式^[19]也可获取高质量 AFM 图像. 而悬浮动物细胞很难贴壁生长, 同时其表面十分柔软, 因而对活体悬浮动物细胞进行高分辨率 AFM 成像还存在巨大挑战, 且成像质量仍有待提高. 图 4 为在 PBS 溶液中采用戊二醛对淋巴瘤细胞进行化学固定后的 AFM 接触模式扫描图像.

3.2 二抗荧光标记显微镜

采用二抗荧光标记法, 利用荧光显微镜分别检测经戊二醛化学固定的淋巴瘤细胞和未经化学固定的活淋巴瘤细胞上 CD20 抗原的分布(图 5). 经过戊二醛化学固定后, 整个细胞都呈现明亮的绿色荧光, 而未经戊二醛化学固定的细胞表面的绿色荧光则较为微弱且荧光主要分布在细胞的周围.

3.3 单分子结合力测量

如图 6(A)所示, 当发生 CD20 与 Rituximab 特异性结合时, 力曲线上可能有一个或多个突变峰, 对于有多个突变峰的力曲线, 选取最后一个峰用于计算分析^[42]. 往溶液中加入 Rituximab 抗体后, 再次用功能化的探针在细胞表面获取力曲线, 此时发现获取的力曲线上没有明显的突变峰, 同时采用没有功能化的探针在细胞表面获取力曲线, 发现也没有明显的突变峰(图 6(B)). 这就证明了所测量的 CD20 与 Rituximab 结合力的特异性. 在加载速度 1.4×10^6 pN/s 下进行 4 次测量, 每次获取 100 条力曲线, 对这些力曲线进行统计分析, 其直方图如图 6(C)所示. 对直方图进行高斯拟合的结果表明, CD20 与 Rituximab 结合力为 320 pN, 反映了多对 CD20 与 Rituximab 之间的

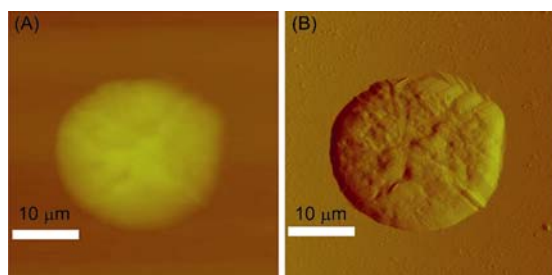


图 4 淋巴瘤细胞的接触模式 AFM 图像

(A) 高度图像; (B) 偏差图像

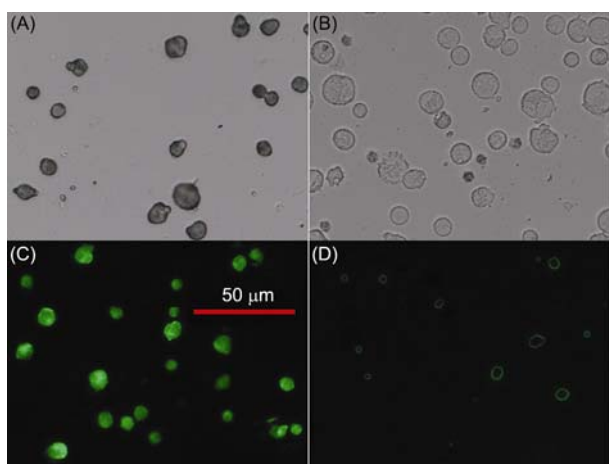


图 5 采用二抗标记法检测 CD20 与 Rituximab 的结合

(A) 固定细胞明场光学图像; (B) 活细胞明场光学图像; (C) 固定细胞 FITC 标记荧光图像; (D) 活细胞 FITC 标记荧光图像

结合力. 为了计算单对 CD20 与 Rituximab 结合力, 统计 4 次测量得到的 CD20 与 Rituximab 结合力的均值和方差(4 次测量的均值和方差分别为 0.2567, 0.0038; 0.3487, 0.0059; 0.6193, 0.041; 0.8628, 0.0472), 对均值方差数据采用泊松分析法进行分析, 计算得到加载速度 1.4×10^6 pN/s 下单对 CD20 与 Rituximab 结合力为 79 pN(图 6(D)).

分子间结合力反映了化学反应, 生物反应和物理反应之间复杂的相互作用^[46]. 利用 AFM 单分子力谱技术在单分子水平研究分子间结合力可对分子的生物学功能提供新的认识^[18,21]. 对单链抗体的研究表明, CD20 与其抗体之间的结合力与连接肽有着密切的关系^[47]. 将单分子力学定量实验研究与计算机辅助工程抗体设计理论预测相结合, 可了解工程抗体的结构基础及其与抗原之间的结合功能, 对制药工业具有重要意义^[47].

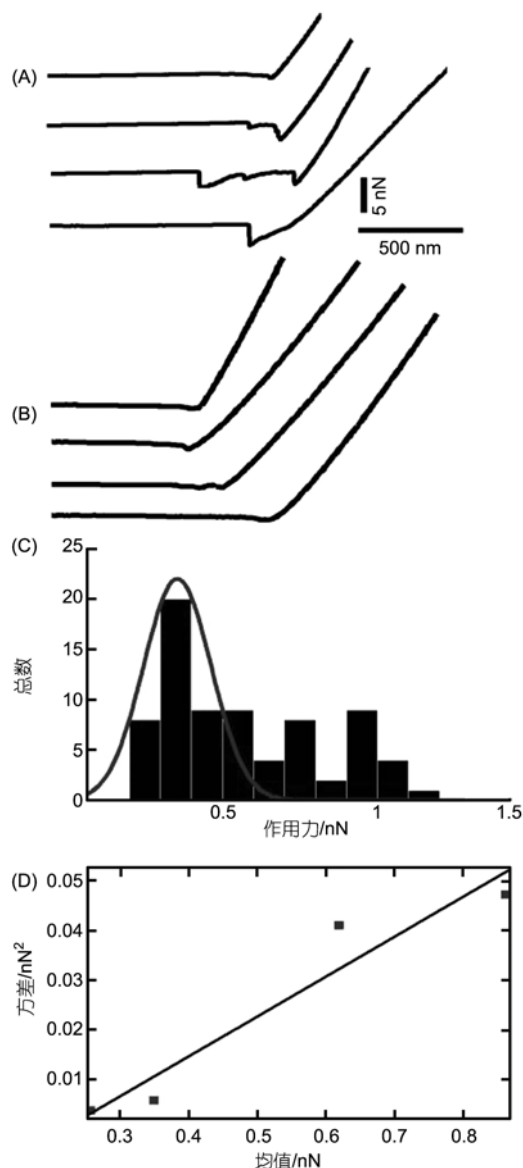


图 6 利用功能化探针测量 CD20 与 Rituximab 之间的分子结合力

(A) 利用修饰了 Rituximab 的探针在 B 淋巴瘤细胞表面获取的力曲线. 当发生 CD20 与 Rituximab 结合时, 在力曲线上有一个或多个突变峰; (B) 利用没有修饰 Rituximab 的探针在 B 淋巴瘤细胞表面获取的力曲线; (C) 加载速度 1.4×10^6 pN/s 下, CD20 与 Rituximab 之间的结合力的统计直方图; (D) 采用泊松分析法计算单对 CD20-Rituximab 结合力. 拟合直线的斜率(0.079)显示, 单对 CD20-Rituximab 结合力为 79 pN

3.4 CD20 分子在淋巴瘤细胞表面的分布

利用修饰了 Rituximab 的探针在抬高模式(lift mode)下对淋巴瘤细胞表面 CD20 的分布进行了可视

化观察(图 7). 在抬高模式下, AFM 首先进行主扫描, 以获取细胞的表面形貌信息, 然后抬高探针进行抬高扫描. 抬高扫描沿着主扫描线进行, 这样就消除了细胞表面形貌信息对抬高扫描的影响, 使得抬高扫描只受到 CD20 与 Rituximab 之间特异性结合影响. 抬高扫描的高度等于主扫描线与抬高扫描线之间的距离. 当使用未修饰 Rituximab 的探针在抬高模式下对淋巴瘤细胞进行扫描时, 获取的细胞相位三维图像上没有明显的峰, 而使用修饰了 Rituximab 的探针在抬高模式下对淋巴瘤细胞进行扫描时, 获取的细胞相位三维图像上出现明显的峰, 这些峰反应了 CD20 在细胞表面的分布.

Verbelen 和 Dufrene^[22]及 Dupres 等人^[23]利用功能化探针在细胞表面的局部区域(400 nm×400 nm)获取力曲线数组(16×16), 将从力曲线上计算得到的分子力映射成二维灰度图, 灰度图反映了细胞表面分子的分布. 相比力曲线灰度映射法, 抬高模式扫描法更直观, 能通过三维图像直观显示细胞表面分子的分布.

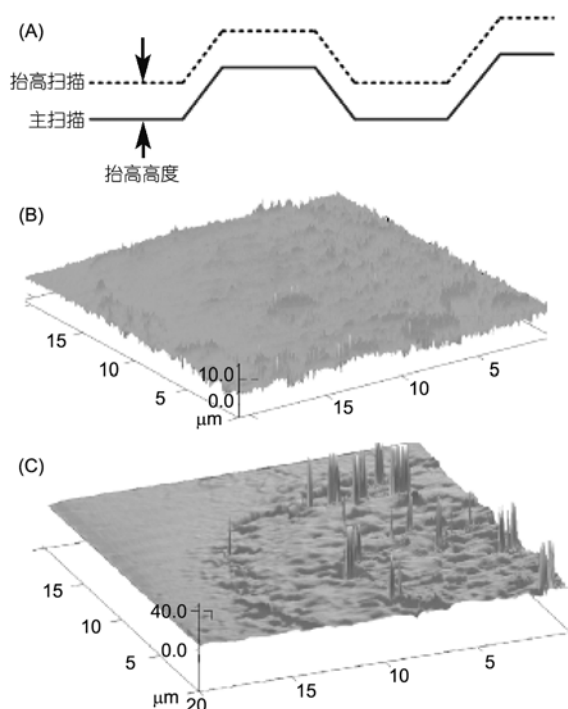


图 7 利用抬高模式可视化 CD20 的分布

(A) 抬高模式扫描; (B) 利用未修饰 Rituximab 的探针在淋巴瘤细胞表面获取的相位三维图像没有明显的峰; (C) 利用修饰了 Rituximab 的探针在淋巴瘤细胞表面获取的相位三维图像有明显的突变峰

3.5 受体-配体复合物内力与伸长量关系测量

测量了在外部拉力作用下, CD20-Rituximab 复合物的分子内力^[48]与伸长量的关系(图 8). 根据功能化探针获取的力曲线, 将发生突变前的曲线部分的 Z 点位置变化量减去悬臂的偏转量即可得到 CD20-Rituximab 复合物的伸长量, 后根据胡克定律将悬臂偏转量转化为力值, 即可得到分子内力与伸长量的关系.

由图 8 可见, CD20-Rituximab 复合物在断裂前分子伸长量与分子内力呈现出线性弹簧关系. 研究表明, L 和 P 选择素^[49]及酵母菌细胞表面 Wsc1 蛋白^[11]在外部拉力作用下均呈现出线性弹簧性质. 在 AFM 探针分子对分子复合物进行拉伸的过程中, 复合物的子单元在外部拉伸作用下从折叠态转变为伸长态^[50], 使得复合物不断伸长. 当伸长量达到极限值时, CD20 与 Rituximab 断开, AFM 悬臂偏转量变为 0.

4 结论

AFM 的发明为在细胞分子水平认识细胞生理活动的机制提供了新的技术手段. 本文利用基于 AFM 的单分子力谱技术对淋巴瘤细胞表面的 CD20 抗原分子与其抗体 Rituximab 之间的特异性结合反应进行了探索性的研究, 测量了 CD20 与 Rituximab 之间的结合力, 可视化观察了 CD20 在细胞表面的分布, 分析了在外部拉力作用下 CD20-Rituximab 复合物呈现的线性弹簧性质. 这些结果为深入了解导致淋巴瘤临床靶向治疗疗效差异的分子机制奠定了基础.

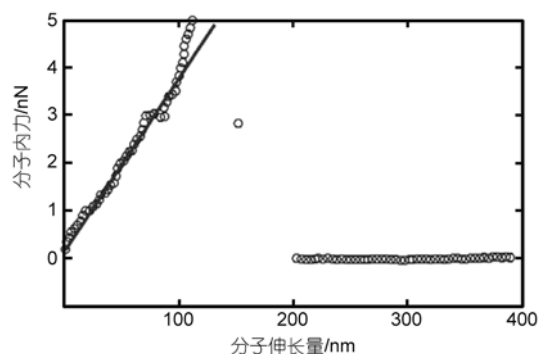


图 8 外部拉力作用下 CD20-Rituximab 复合物呈现线性弹簧性质

参考文献

- 1 Zhuang X, Bartley L E, Babcock H P, et al. A single-molecule study of RNA catalysis and folding. *Science*, 2000, 288: 2048—2051
- 2 Xie X S, Yu J, Yang W Y. Living cells as test tubes. *Sciences*, 2006, 312: 228—230
- 3 Dufrene Y F. Atomic force microscopy: a powerful molecular toolkit in nanoproteomics. *Proteomics*, 2009, 9: 5400—5405
- 4 陈宜张. 活细胞单分子实时视见研究. *生命科学*, 2003, 15: 79—82
- 5 Dupres V, Alsteens D, Andre G, et al. Fishing single molecules on live cells. *Nano Today*, 2009, 4: 262—268
- 6 陈宜张. 近年细胞单分子研究的重要进展. *生命科学*, 2008, 20: 1—2
- 7 Dague E, Alsteens D, Latge J P, et al. High-resolution cell surface dynamics of germinating *aspergillus fumigatus* conidia. *Biophys J*, 2008, 94: 656—660
- 8 Hinterdorfer P, Dufrene Y F. Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy. *Nat Methods*, 2006, 3: 347—355
- 9 孙德兰, 陈建敏, 宋艳梅, 等. 细胞膜的形貌结构及其功能信息. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2008, 38: 101—108
- 10 Neuman K C, Nagy A. Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nat Methods*, 2008, 5: 491—505
- 11 Dupres V, Alsteens D, Wilk S, et al. The yeast *wsc1* cell surface sensor behaves like a nanospring *in vivo*. *Nat Chem Biol*, 2009, 5: 857—862
- 12 Pfister G, Stroh C M, Perschinka H, et al. Detection of HSP60 on the membrane surface of stressed human endothelial cells by atomic force and confocal microscopy. *J Cell Sci*, 2005, 118: 1587—1594
- 13 Cross S E, Jin Y S, Rao J Y, et al. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nat Nanotechnol*, 2007, 2: 780—783
- 14 Edwardson J M, Henderson R M. Atomic force microscopy and drug discovery. *Drug Discov Today*, 2004, 9: 64—71
- 15 Muller D J, Krieg M, Alsteens D, et al. New frontiers in atomic force microscopy: analyzing interactions from single-molecules to cells. *Curr Opin Biotechnol*, 2009, 20: 4—13
- 16 Florin E L, Moy V T, Gaub H E. Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. *Science*, 1994, 264: 415—417
- 17 Hinterdorfer P, Baumgartner W, Gruber H J, et al. Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 3477—3481
- 18 Zhang X, Bogorin D F, Moy V T. Molecular basis of the dynamic strength of the sialyl Lewis X-selectin interaction. *Chem Phys Chem*, 2004, 5: 175—182
- 19 Puntheeranurak T, Wildling L, Gruber H J, et al. Ligands on the string: single-molecule AFM studies on the interaction of antibodies and substrates with the Na⁺-glucose co-transporter SGLT1 in living cells. *J Cell Sci*, 2006, 119: 2960—2967
- 20 Lee S, Mandic J, Vliet K J V. Chemomechanical mapping of ligand-receptor binding kinetics on cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 9609—9614
- 21 Shi X, Xu L, Yu J, et al. Study of inhibition effect of Herceptin on interaction between Heregulin and ErbB receptors HER3/HER2 by single-molecule force spectroscopy. *Exp Cell Res*, 2009, 315: 2847—2855
- 22 Verbelen C, Dufrene Y F. Direct measurement of Mycobacterium-fibronectin interactions. *Integr Biol*, 2009, 1: 296—300
- 23 Dupres V, Menozzi F D, Loch C, et al. Nanoscale mapping and functional analysis of individual adhesions on living bacteria. *Nat Methods*, 2005, 2: 515—520
- 24 Jemal A, Siegel R, Ward Elizabeth, et al. Cancer statistics, 2009. *CA-Cancer J Clin*, 2009, 59: 225—249
- 25 Cheson B D, Leonard J P. Monoclonal antibody therapy for B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*, 2008, 359: 613—626
- 26 Lim S H, Beers S A, French R R, et al. Anti-CD20 monoclonal antibodies: historical and future perspectives. *Haematologica*, 2010, 95: 135—143
- 27 Deans J P, Li H, Polyak M J. CD20-mediated apoptosis: signaling through lipid rafts. *Immunology*, 2002, 107: 176—182
- 28 Cartron G, Watier H, Golay J, et al. From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood*, 2004, 104: 2635—2642
- 29 Carter P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer*, 2001, 1: 118—129
- 30 Teeling J L, Mackus W J M, Wiegman L J J M, et al. The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. *J Immunol*, 2006, 177: 362—371
- 31 Smith M R. Rituximab(monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene*, 2003, 22: 7359—7368
- 32 Nimmerjahn F, Ravetch J V. Antibodies, Fc receptors and cancer. *Curr Opin Immunol*, 2007, 19: 239—245
- 33 Adams G P, Weiner L M. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol*, 2005, 23: 1147—1157
- 34 Matzke R, Jacobson K, Radmacher M. Direct, high-resolution measurement of furrow stiffening during division of adherent cells. *Nat Cell*

- Biol, 2001, 3: 607—610
- 35 Kada G, Kienberger F, Hinterdorfer P. Atomic force microscopy in bionanotechnology. *Nano Today*, 2008, 3: 12—19
- 36 Dufrene Y F. Atomic force microscopy and chemical force microscopy of microbial cells. *Nat Protoc*, 2008, 3: 1132—1138
- 37 Nowakowski R, Luckham P, Winlove P. Imaging erythrocytes under physiological conditions by atomic force microscopy. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1514: 170—176
- 38 Yu J, Wang Q, Shi X, et al. Single-molecule force spectroscopy study of interaction between transforming growth factor β 1 and its receptor in living cells. *J Phys Chem B*, 2007, 111: 13619—13625
- 39 Ebner A, Wildling L, Kamruzzahan A S M, et al. A new, simple method for linking of antibodies to atomic force microscopy tips. *Bioconjugate Chem*, 2007, 18: 1176—1184
- 40 Stroh C, Wang H, Bash R, et al. Single-molecule recognition imaging microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 12503—12507
- 41 徐永春, 师晓丽, 方晓红. 原子力显微镜单分子力谱研究生物分子间相互作用. *生命科学*, 2008, 20: 39—45
- 42 Bustanji Y, Arciola C R, Conti M, et al. Dynamics of the interaction between a fibronectin molecule and a living bacterium under mechanical force. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 13292—13297
- 43 Stevens F, Lo Y S, Harris J M, et al. Computer modeling of atomic force microscopy force measurements: comparisons of Poisson, histogram, and continuum methods. *Langmuir*, 1999, 15: 207—213
- 44 杨谦, 孙润广. 红细胞膜弹性特性的 AFM 力曲线测量. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2008, 38: 1013—1027
- 45 陈佩佩, 董宏涛, 陈龙, 等. 原子力显微术应用于活细胞及新鲜组织成像的新进展. *科学通报*, 2009, 54: 2027—2032
- 46 Muller D J, Helenius J, Alsteens D, et al. Force probing surfaces of living cells to molecular resolution. *Nat Chem Biol*, 2009, 5: 383—390
- 47 Gu X, Jia X, Feng J, et al. Molecular modeling and affinity determination of scFv antibody: proper linker peptide enhances its activity. *Ann Biomed Eng*, 2010, 38: 537—549
- 48 Fritz J, Katopodis A G, Kolbinger F, et al. Force-mediated kinetics of single P-selectin/ligand complexes observed by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 12283—12288
- 49 Marshall B T, Sarangapani K K, Wu J, et al. Measuring molecular elasticity by atomic force microscope cantilever fluctuations. *Biophys J*, 2006, 90: 681—692
- 50 Janshoff A, Neitzert M, Oberdorfer Y, et al. Force spectroscopy of molecular systems-single molecule spectroscopy of polymers and biomolecules. *Angew Chem Int Edit*, 2000, 39: 3212—3237