



华南理工大学  
South China University of Technology

# 专业学位硕士学位论文

铌酸钾钠压电材料在乳腺癌细胞增殖、迁移  
和侵袭中的作用及机制

作者姓名	郝玲
学位类别	工程硕士
指导教师	戚穗坚 讲师 易长青 副教授
所在学院	食品科学与工程学院
论文提交日期	2021年4月

**The Effects of Potassium Sodium Niobate Piezoelectric  
Materials on the Proliferation, Migration and Invasion of  
Breast Cancer Cells and the Possible Mechanisms**

A Dissertation Submitted for the Degree of Master

**Candidate: Hao Ling**

**Supervisor: Qi Suijian**

**Yi Changqing**

South China University of Technology

Guangzhou, China

分类号：Q274

学校代号：10561

学 号：201821025432

华南理工大学硕士学位论文

铌酸钾钠压电材料在乳腺癌细胞增殖、迁移  
和侵袭中的作用及机制

作者姓名：郝玲

指导教师姓名、职称：戚穗坚 讲师、易长青 副教授

申请学位级别：工程硕士

学科专业名称：食品工程

研究方向：生物医药工程

论文提交日期：2021 年 4 月 20 日

论文答辩日期：2021 年 6 月 5 日

学位授予单位：华南理工大学

学位授予日期： 年 月 日

答辩委员会成员：

主席：陈新文

委员：万成松、姜建国、朴金花、戚穗坚



# 摘要

乳腺癌是全球发病率最高的癌症，也是女性癌症患者死亡最常见的原因。对于乳腺癌患者而言，转移才是其发生发展中最难以控制的阶段，也是造成 90% 以上乳腺癌患者死于实体瘤的主要原因。对乳腺癌运动能力的抑制以及有效的抗乳腺癌方法将大大缓解乳腺癌带来的经济与社会负担。因此，基于材料表面带电特性对细胞行为调控的重要作用及现阶段电刺激用于肿瘤治疗的局限性，本文利用具有稳定可调表面带电特性的铌酸钾钠(KNN)块体压电陶瓷研究材料表面电势对乳腺癌细胞迁移侵袭行为的影响及机制；并利用超声促进极化 KNN 压电纳米颗粒产生无源、可控的电刺激，研究对乳腺癌细胞活性抑制作用及机制。主要研究内容如下：

1. KNN 表面电势会影响乳腺癌细胞的运动行为并对骨架系统产生影响。利用 KNN 块体陶瓷良好的铁电性能，通过可控的极化手段获取具有不同表面电势，但表面形貌、成分及化学结构未发生改变的 KNN 样品，并以此为模型探究材料表面带电差异对细胞运动行为的影响。实验发现与未极化的 KNN 样品相比，极化使材料具有更高的表面电势时对正常细胞的运动潜能具有轻微的促进趋势，但对癌细胞具有抑制作用，尤其是极化后压电常数为 80 pC/N 的高表面电势 80KNN 样品能够极其显著的抑制 2 种乳腺癌细胞的迁移、侵袭能力；进一步通过免疫荧光染色及实时定量聚合酶链式反应（PCR）发现可能的原因是材料表面高电势抑制乳腺癌细胞极化，改变微管聚集状态，促进细胞扁平状形态结构的形成和强黏附的形成。

2. 超声辅助极化 KNN 压电纳米颗粒共同作用于乳腺癌细胞可以达到良好的抑制癌细胞活性的作用。实验使用具有良好压电性能的极化 KNN 纳米颗粒，配置不同浓度后与 BMSC 共培养，选用对 BMSC 具有良好生物相容性且浓度较高的 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的极化 KNN 进一步实验。将超声和极化 KNN 颗粒共同作用于乳腺癌细胞后，对其进行存活率检测、死活染色和形态观察。结果表明当两者共同作用 24 h 时，高转移性的三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 存活率低至 30% 左右，低转移性的非三阴性乳腺癌细胞 MCF-7 存活率低至 35% 左右，并且 2 种癌细胞的骨架结构遭到完全破坏，运动能力完全丧失。实验进一步表明可能的机制是其作用于乳腺癌细胞时，会造成氧化还原失衡，过量活性氧（ROS）产生并促进癌细胞的凋亡与坏死。

**关键词：**铌酸钾钠；电信号；乳腺癌；迁移侵袭；细胞活性

# Abstract

Breast cancer has become the most commonly diagnosed cancer in the world and the most common cause of death among female cancer patients. For breast cancer patients, metastasis is the most difficult and dangerous stage in the occurrence and evolution of malignant tumors, and it also accounts for more than 90% breast cancer patients to die from solid tumors. Inhibition of breast cancer motility and effective anti-breast cancer methods will greatly alleviate breast cancer burden. Hence, based on the importance of the regulatory effects of material surface potentials on cell behaviors and the limitations of electric stimulation for tumor therapy, potassium sodium niobate (KNN) piezoceramics with stable and adjustable surface charges were used to study the effects of surface potentials on the migration and invasion behaviors of breast cancer and their mechanisms. The effects and mechanisms of polarized KNN nanoparticles with ultrasound (US) generating wireless, controllable electric stimulation on breast cancer cell viability were also studied. The main research contents and conclusions are as follows:

1. KNN surface potentials could affect breast cancer cell motility and cytoskeleton. Taking advantage of the excellent ferroelectric properties of KNN piezoceramics, KNN samples with different surface potentials but the familiar surface morphologies, compositions, and chemical structures were obtained by controllable polarization methods, and they were applied as model materials to investigate the effects of charges on breast cancer cell movements. It was found that compared with unpolarized KNN samples, polarized KNN samples with higher surface potentials had the tendency to promote normal cell movements and inhibit cancer cell movements. The polarized one with a piezoelectric constant of 80 pC/N could significantly inhibit the migration and invasion of breast cancer cells. Further, immunofluorescence staining and real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) showed that the possible reasons were the inhibition of breast cancer cell polarization, change of microtubule aggregation state, the formation of flat cell morphology and strong adhesion.

2. Breast cancer cells subjected to polarized KNN piezoelectric nanoparticles stimulated by US could well inhibit cancer cell viability. Polarized KNN nanoparticles with good piezoelectric properties were used to co-culture with BMSC at different concentrations, and

400 µg/mL polarized KNN with good biocompatibility to BMSC was selected for further experiments. The breast cancer cells were treated with US and polarized KNN particles to detect cell viability, conduct cell dead and alive stain and morphological observation. The results indicated that when the two acted together for 24 h, the cell viability of highly metastatic, triple negative breast cancer (NTBC) MDA-MB-231 reduced to 30%; non-NTBC MCF-7 reduced to 35% and the cytoskeletal structures were completely destroyed; the movement abilities were completely lost. The experiments also showed that breast cancer cells subjected to the polarized KNN nanoparticles and US could cause redox imbalance, excessive reactive oxygen species (ROS) and promote cancer cells apoptosis.

**Keywords:** potassium sodium niobate; electric signal; breast cancer; migration and invasion; cell viability

## 缩略词对照表

英文简写	英文名称	中文名称
SEM	scanning electron microscopy	扫描电子显微镜
AFM	atom force microscopy	原子力显微镜
CLSM	confocal laser scanning microscope	激光共聚焦显微镜
XRD	X-ray diffraction	X 射线衍射仪
EDS	energy dispersive spectra	能谱仪
DLS	dynamic light scattering	动态光散射仪
KNN	potassium sodium niobate	铌酸钾钠
P-KNN	polarized potassium sodium niobate	极化铌酸钾钠
PBS	phosphate buffer solution	磷酸盐缓冲液
CCK-8	cell counting kit-8	CCK-8 试剂盒
DMEM	dulbecco's modified eagle medium	杜氏改良培养基
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
PI	propidium iodide	碘化丙啶
DCFH-DA	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate	2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐
ROS	reactive oxygen species	活性氧
FA	focal adhesion	黏着斑
FAK	focal adhesion kinase	黏着斑激酶
PDI	particle dispersion index	多分散指数
NTBC	triple negative breast cancer	三阴性乳腺癌
US	ultrasound	超声
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应

# 目 录

摘 要 .....	I
Abstract .....	II
缩略词对照表 .....	IV
第一章 绪论 .....	1
1.1 乳腺癌概述及治疗现状 .....	1
1.2 肿瘤迁移侵袭及骨架调控 .....	3
1.2.1 肿瘤迁移侵袭 .....	3
1.2.2 骨架调控 .....	5
1.3 压电材料在肿瘤治疗方面的应用 .....	6
1.3.1 压电材料简介 .....	6
1.3.2 铌酸钾钠基压电材料 .....	7
1.3.3 压电材料的电刺激作用用于肿瘤治疗 .....	8
1.3.4 超声辅助压电纳米材料用于肿瘤治疗 .....	10
1.4 本文研究意义及研究内容 .....	12
第二章 铌酸钾钠陶瓷表面电势对乳腺癌细胞迁移侵袭的影响及机制 .....	14
2.1 引言 .....	14
2.2 材料与实验方法 .....	15
2.2.1 主要实验试剂 .....	15
2.2.2 主要实验仪器 .....	16
2.2.3 铌酸钾钠压电陶瓷块体的制备 .....	17
2.2.4 样品理化性能表征 .....	17
2.2.5 细胞培养及材料表面的接种 .....	18
2.2.6 细胞初始黏附速率及增殖活性检测 .....	18
2.2.7 细胞迁移及侵袭检测 .....	19
2.2.8 细胞骨架及黏着斑荧光检测 .....	20
2.2.9 基因表达的检测 .....	21
2.2.10 统计学分析 .....	22
2.3 结果与讨论 .....	23
2.3.1 不同压电常数铌酸钾钠陶瓷理化性能表征 .....	23
2.3.2 初始黏附速率分析 .....	25
2.3.3 抑制乳腺癌细胞迁移侵袭行为分析 .....	27

2.3.4 骨架系统影响分析.....	30
2.3.5 基因表达分析.....	34
2.4 小结.....	35
第三章 超声辅助铌酸钾钠压电纳米颗粒抑制乳腺癌细胞活性及机制研究.....	37
3.1 引言.....	37
3.2 材料与实验方法.....	38
3.2.1 主要实验试剂.....	38
3.2.2 主要实验仪器.....	38
3.2.3 铌酸钾钠压电颗粒的制备.....	38
3.2.4 样品理化性能表征.....	39
3.2.5 细胞培养及乳腺癌增殖活性检测.....	39
3.2.6 细胞骨架染色.....	40
3.2.7 细胞迁移及侵袭检测.....	41
3.2.8 活性氧（ROS）检测.....	41
3.2.9 细胞凋亡与坏死检测.....	41
3.2.10 生物相容性检测.....	42
3.2.11 统计学分析.....	42
3.3 结果与讨论.....	42
3.3.1 铌酸钾钠颗粒理化性能表征.....	42
3.3.2 抑制乳腺癌细胞活性分析.....	43
3.3.3 乳腺癌细胞迁移侵袭能力分析.....	47
3.3.4 生物相容性分析.....	50
3.4 小结.....	52
结论.....	53
论文创新性.....	55
工作展望.....	56
参考文献.....	57
攻读硕士学位期间取得的研究成果.....	69
致谢.....	70

# 第一章 绪论

## 1.1 乳腺癌概述及治疗现状

肿瘤是指机体在各种致癌因子作用下，局部组织细胞增生所形成的新生物；而癌症是指起源于上皮组织的恶性肿瘤，是恶性肿瘤中最常见的一类，是一组可影响身体任何部位的多种疾病的通称，在全世界范围内，已经成为居民死亡的主要原因以及提高居民寿命的主要障碍。在 100 多个国家中，癌症是造成 70 岁以下居民死亡的第一或第二大原因（图 1-1）；此外，根据世界卫生组织国际癌症研究协会报道，在 2020 年，乳腺癌已经超过肺癌成为全球发病率最高的癌症，也是女性癌症患者死亡的最常见原因<sup>[1]</sup>。乳腺癌在我国居民群体中的发病率也是呈现逐年上升的趋势，尤其对于女性而言，是威胁健康的最大风险因素之一，也是我国重点防治的肿瘤之一<sup>[2]</sup>。对于肿瘤而言，转移才是恶性肿瘤发生和发展过程中最难控制的阶段，也是大多数患者死于实体瘤的主要原因<sup>[3]</sup>。由图 1-2 可以发现，当乳腺癌患者肿瘤只是原位生长或是发生局部转移，5 年的存活率都能保持在 80% 以上；但一旦该肿瘤发生远端转移，5 年的存活率将下降至 20% 左右<sup>[4]</sup>。由于乳腺癌患者早期大多无症状，晚期乳腺癌则通常伴随着转移的发生，对肿瘤转移的控制将大大缓解乳腺癌带来的经济与社会负担。

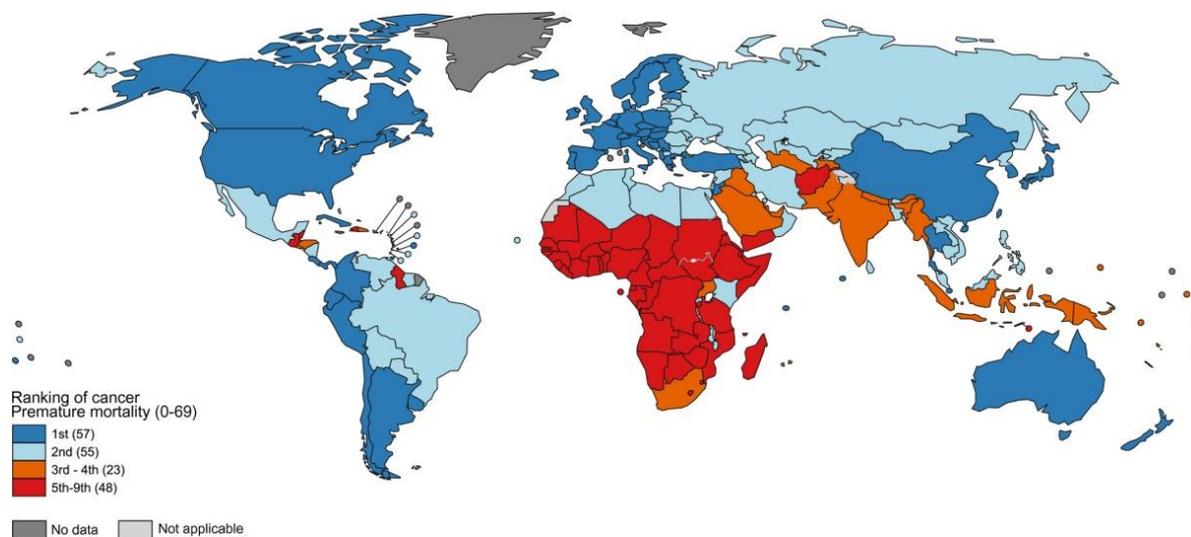


图 1-1 2019 年在不同国家，癌症为 70 岁以下人口死亡原因排名<sup>[1]</sup>

Figure 1-1 National ranking of cancer as a cause of death at ages <70 years in 2019<sup>[1]</sup>

临床上目前用于乳腺癌治疗的主要方法有外科手术治疗、放射治疗、化学治疗；在实际应用中，根据临床分期、患者身体状况及患者意愿，选用多种治疗方法进行整体和

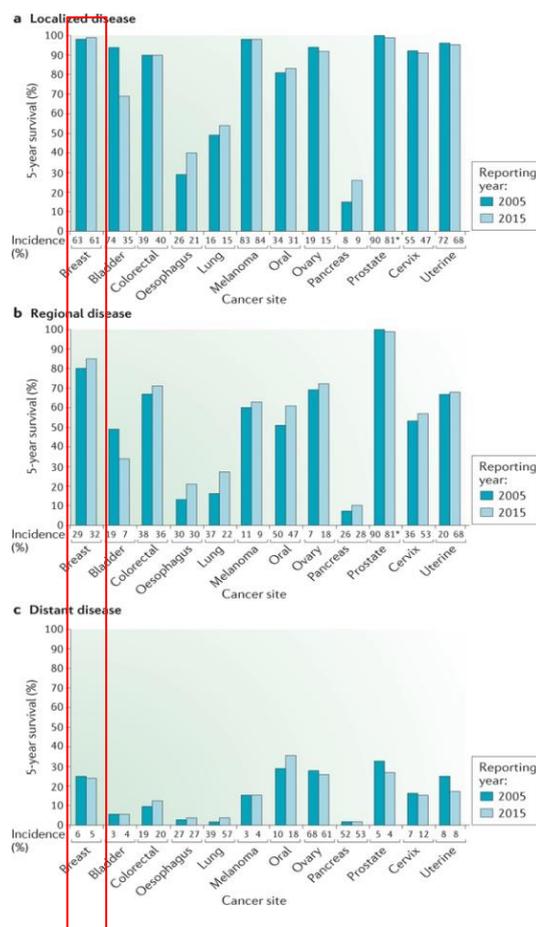


图 1-2 不同癌症患者 5 年生存率<sup>[4]</sup>

Figure 1-2 5-year survival rates of patients suffering from different cancers<sup>[4]</sup>

局部的综合治疗。对于早期的乳腺癌患者（I 或 II 期），最常用的治疗方法就是手术治疗（大多是乳房保留）并辅以放射疗法；对于晚期的乳腺癌患者（III 期），采用乳房切除的手术治疗并辅以化疗；此类未发生转移的乳腺癌治疗目的在于消除肿瘤并防止复发；对于已发生转移的晚期乳腺癌患者（IV 期），只能接受放疗、化疗或是激素治疗，用以延长寿命、减轻症状<sup>[5-8]</sup>。尽管这些治疗方法已经得到广泛的应用和极大的发展，对乳腺癌的治愈率有了较大的提高，但由于这些肿瘤治疗方法本身存在着缺陷，即使联合治疗也很难完全满足对乳腺癌治疗效果及良好预后的需求。外科手术治疗是通过外科手术把癌变部位切除，但这种治疗方法容易导致二次损伤，带来一系列并发症，如疼痛、感染等，且难以切除干净。对于女性乳腺癌患者来讲，乳房切除的手术治疗还会对其心理产生一定的不良影响<sup>[9]</sup>。放疗是利用电离辐射来进行肿瘤治疗，但这种治疗方法无可避免的会对正常的组织细胞产生影响从而产生一系列的副作用，如乳腺癌采用放射疗法可能使心脏受到一定量的照射而对心脏组织产生副作用<sup>[8]</sup>。化疗是利用化学药物用于癌症治疗，Waks 等对用于乳腺癌治疗的有关化疗药物进行了总结<sup>[5]</sup>。研究表明化疗容易引发

多药抗性而削减自身及其他治疗方法的治疗效果，并且具有很强的毒副作用，能够对器官、心血管系统、神经系统等造成损伤，且难以对肿瘤复发和转移进行控制，甚至某些情况下促进转移的发生<sup>[11, 12]</sup>。例如，有研究表明与未经过化疗药物处理的乳腺癌细胞相比，经过化疗药物处理的癌细胞具有更强的肿瘤侵袭潜能<sup>[12]</sup>。此外，其他的肿瘤治疗方法如靶向治疗、免疫治疗、基因治疗、内分泌治疗等在乳腺癌治疗中也得到了极大的发展<sup>[13-17]</sup>。近年来，物理刺激用于肿瘤治疗得到了研究者的极大关注，声、光、电、热、磁等物理作用方式也被广泛用于肿瘤治疗并由此进行有关光动力、声动力等一系列动力疗法及综合的肿瘤治疗方法<sup>[18, 19]</sup>。

## 1.2 肿瘤迁移侵袭及骨架调控

肿瘤的恶性转化通常伴随着运动能力的异常增强，如肿瘤细胞的迁移侵袭。细胞的迁移过程是细胞整体的不断前移，是细胞前端不断向前方延伸，尾部收缩的循环。细胞骨架是细胞运动过程的主要参与者，Rho GTP 酶中的 Rho, Rac 以及 Cdc42 亚家族则是细胞骨架的主要调控者，在多种恶性肿瘤的发生以及肿瘤向恶性转化的过程中都伴随着 Rho, Rac 以及 Cdc42 亚家族中蛋白表达水平及活性的异常增强。

### 1.2.1 肿瘤迁移侵袭

肿瘤转移是 90% 以上肿瘤患者死于实体瘤的主要原因，由一系列生物学过程组成，最终使得肿瘤从原发部位转移到远端组织或器官<sup>[20, 21]</sup>。加强对肿瘤转移过程的了解，才便于对肿瘤治疗提出更有效的策略<sup>[22]</sup>。肿瘤转移主要经历如下步骤：肿瘤细胞间黏附减弱、变的松散，肿瘤细胞易脱离原发肿瘤，迁移侵袭通过细胞外基质；降解血管基底膜并穿过细胞，内渗进入循环系统；在循环系统中经受住极强的剪切力并在严密的免疫监控条件下生存下来，随循环系统到达远端组织；在循环系统中与血管内皮细胞选择性黏附并穿过微血管的内皮细胞外渗到达其他组织，并再次经过迁移侵袭增殖在其他部位定殖<sup>[3, 22-24]</sup>。

在肿瘤细胞整个转移的过程中，从原发部位的脱离到定殖于远端组织器官，涉及一系列的迁移侵袭过程，肿瘤细胞运动能力的异常增强也是肿瘤细胞向恶性转化的典型特征<sup>[25]</sup>。细胞迁移是指细胞在迁移信号的引导下而产生的移动；细胞侵袭则需要在细胞迁移的基础上再突破基底膜，此过程需要分泌基质金属蛋白酶、组织蛋白酶或是乙酰肝素酶等降解细胞外的基质。细胞整体的移动过程包括细胞头部向前方延伸，极性伪足的形

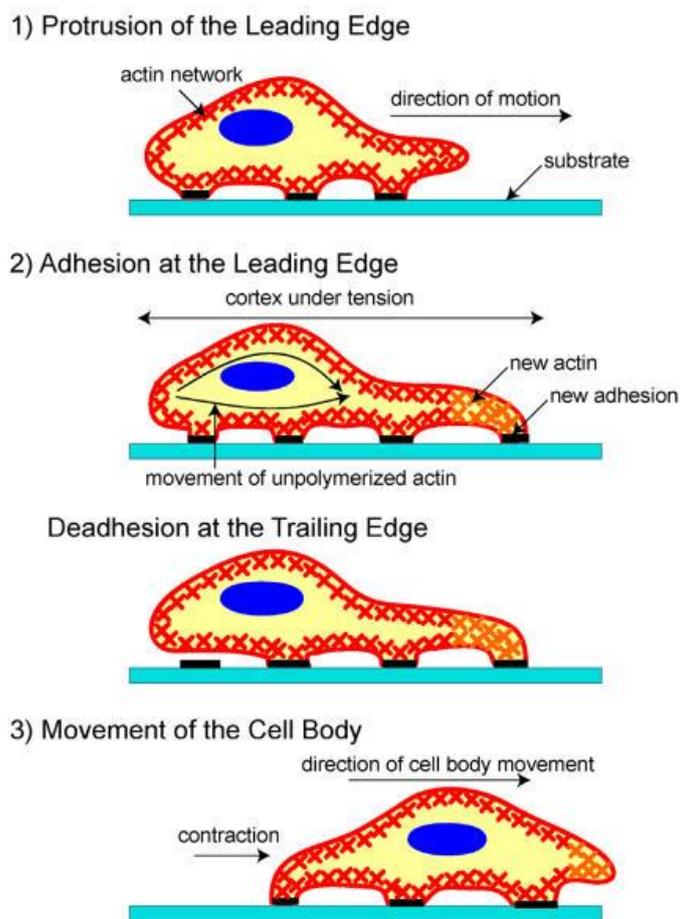


图 1-3 细胞迁移过程的示意图<sup>[27]</sup>

Figure 1-3 A schematic of stages of cell migration<sup>[27]</sup>

成；与基底黏附；细胞前移、尾部收缩这一系列不断循环重复的过程<sup>[26, 27]</sup>（图 1-3）。

向远方伸出伪足是由于细胞整体极化所致，细胞在接受到前移的信号后会导致细胞内出现细胞质的极性流动，物质膜泡的运输以及分子离子的不对称分布，决定了细胞迁移的方向；伸出的伪足与基底的黏附提供了附着力，牵引细胞整体前移；最终需要细胞的尾部与基底解黏附、收回从而实现细胞的整体前移<sup>[28]</sup>。细胞与基底的黏附会形成一种黏着斑（FA）结构，它是由整合蛋白（integrins）将细胞肌动蛋白的微丝束与细胞外基质相互连接而形成的黏附结构。由图 1-3 中细胞整个向前移动的过程中可以看到，细胞需要这样的 FA 结构提供向前的牵引力，但这种 FA 结构连接过于紧密则不利于细胞尾部与基底的解离，从而抑制细胞整体的前移。因此，在细胞整个迁移的过程中，细胞需要与基底保持适度的黏附，过紧或是过松的黏附都不利于细胞的迁移。黏着斑激酶（FAK）是肿瘤细胞 FA 结构动态变化的重要调控者，促使细胞不断地发生黏附与解黏附的作用从而实现细胞的整体移动<sup>[29, 30]</sup>。此外，FAK 还能影响细胞骨架的重构与基质金属蛋白酶

的表达, 随着癌症向恶性进展及转移的发生, FAK 的表达和活性升高<sup>[31, 32]</sup>。Qiao 等人研究发现, FAK 表达水平的提高与乳腺癌患者总体生存期的下降相联系, 并且可以影响乳腺癌部位雌激素受体、孕激素受体、人表皮生长因子受体 2 等乳腺癌受体的表达<sup>[33]</sup>。

### 1.2.2 骨架调控

细胞骨架是细胞迁移的物质基础, 是细胞运动的主要参与者; 细胞骨架系统主要包括微丝、微管和中间纤维<sup>[34, 35]</sup>。微丝是由肌动蛋白组成的纤维状结构, 包含细胞内部的应力纤维以及细胞边缘的一些突起, 如片状、丝状和侵袭性伪足。微管是一种中空的管状结构, 也属于具有极性的细胞骨架结构。微管主要参与细胞的物质运输, 产生细胞运动的牵引力并且与肌动蛋白、黏附和极化的形貌相联系<sup>[36, 37]</sup>, 有研究表明在运动的细胞中, 微管可以促进细胞前端生成短束状微丝从而促进板状伪足的形成<sup>[38]</sup>。中间纤维是主要起支撑作用的细胞骨架结构。细胞骨架的重构及其动态变化是细胞迁移侵袭运动的基础, Rho GTPase 酶家族是对骨架进行调控的关键因子, 肿瘤细胞运动能力的改变通常伴随着该家族相关蛋白表达及活性的改变<sup>[39-41]</sup>。

Rho GTP 酶家族包含有不同的亚家族, 主要参与细胞运动时骨架调控的是其中的 3 个亚家族<sup>[42]</sup>。Rho 亚家族主要参与应力纤维的形成, 包含 RhoA, RhoB, RhoC。细胞在迁移的过程中, 细胞前端需要不断的形成伪足与基底黏附以提供细胞运动的锚着力, 细胞的后端则需要不断的解黏附使细胞尾部收缩完成整体前移, 这种黏附的形成和解离都依赖于 RhoA 蛋白的调节<sup>[43]</sup>。Rho 相关蛋白激酶 (ROCK1/2) 是 RhoA 下游的效应子, 可以磷酸化下游位点, 调节肌球蛋白轻链 II 的活性最终影响细胞的收缩及细胞的运动<sup>[44]</sup>。Rac1 是 Rac 亚家族的一员, 主要是促进板状伪足和膜褶皱的形成<sup>[45]</sup>。Cdc42 亚家族中的 Cdc42 主要促进丝状伪足的形成。Rac1 和 Cdc42 通过诱导细胞前缘骨架的重排, 促进伪足的形成, 为细胞的运动提供向前的牵引力<sup>[46]</sup>。Olson 等人将与细胞运动相关的骨架调节蛋白及其影响细胞运动的分子调节机制及结构等进行总结, 发现 Rho GTP 酶以及与其相关的上游下游信号通路对骨架的调控在多种细胞及实验研究中被证明<sup>[47]</sup>。此外, 目前许多研究都证实了 Rho GTP 酶在肿瘤向恶性进展过程中的重要作用, 并且在多种恶性肿瘤的发生中都伴随着 Rho GTP 酶的高表达<sup>[48, 49]</sup>。Gerhard 等人研究肠、乳腺、以及肺部肿瘤细胞与相应正常组织中 Rho GTP 酶的表达, 发现 RhoA 的表达在所有肿瘤细胞中表达量均是正常细胞的 3 倍。在乳腺癌中, RhoA, Rac 以及 Cdc42 蛋白均具有很高水平的表达, 但在相应的正常组织中, 表达量很少甚至不表达<sup>[50]</sup>; 并且, 通过对 I 到

III 不同分期的乳腺癌细胞进行分别检测，发现分期越靠后的乳腺癌患者通常都伴随着 RhoA 表达含量的增高；此外，研究也表明 RhoA 的高表达通常可以促进肿瘤的转移<sup>[50, 51]</sup>。Fritz 等人也得出了相类似的结果。通过分析相同个体乳腺肿瘤部位与正常组织部位中 RhoA, RhoB, Rac1 以及 Cdc42 的表达，发现这些蛋白的表达随着乳腺癌的发生发展得到了明显的提高<sup>[52]</sup>；与未发生癌变部位相比，RhoA, ROCK1/2, Rac1 以及 Cdc42 在睾丸癌、肺癌等癌变部位中的高表达也得到了证实<sup>[39, 53]</sup>。

### 1.3 压电材料在肿瘤治疗方面的应用

压电材料能够实现力电的相互转换，响应机械力的刺激产生电信号。最常用的压电材料通常还具有铁电性能，在外加电场存在下极化并且在电场撤离后还具有剩余电荷使其表面带电，并且该带电特性稳定可调。由于肿瘤细胞的微环境中也存在电稳态，压电材料的带电特性可实现对肿瘤的电刺激破坏其电稳态以及细胞结构，从而影响肿瘤细胞的增殖迁移侵袭等行为。此外，压电材料能够响应超声的刺激，进一步增强对肿瘤部位的电刺激并且在超声辅助的条件下能够实现更好的抑制肿瘤增殖的目的。

#### 1.3.1 压电材料简介

压电材料是指一类具有压电效应的材料。1880 年居里兄弟在石英晶体中首先发现正压电效应，并在随后的实验中验证了逆压电效应的存在。正压电效应是指材料在受到压力或是拉伸力时会在两端面间产生电压；逆压电效应则是指在外电场作用下材料会产生形变，正、逆压电效应的示意图如 1-4 所示<sup>[54]</sup>。

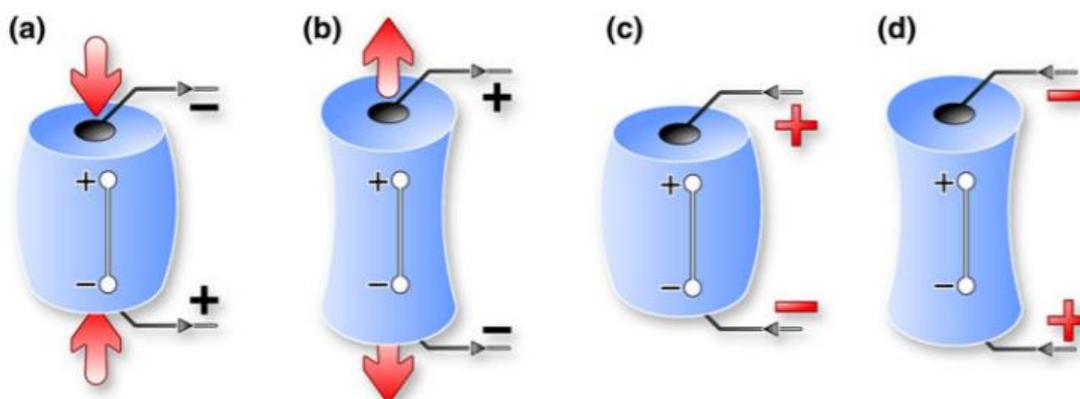


图 1-4 压电效应示意图。(a, b) 正压电效应，(c, d) 逆压电效应<sup>[54]</sup>

Figure 1-4 The schematic diagram of piezoelectric behaviors. (a, b) Direct piezoelectric effects, (c, d) inverse piezoelectric effects<sup>[54]</sup>

材料是否具有力电耦合的压电效应取决于材料内部的晶体结构。只有具备不对称中心的晶体才会在压力作用下正负电荷分离而产生电压。根据对称性原则将晶体分为 32 种晶族, 有 21 种是没有对称中心的, 其中 10 种具有自发极化的能力并且自发极化的强度会随着温度改变, 称为热释电体。在热释电体中, 自发极化的方向能在外电场的作用下重新取向的称为铁电体。目前对压电材料的研究主要是以铁电材料为主。

压电材料主要分为无机压电材料和有机压电材料。无机压电材料主要有压电单晶和压电多晶。压电单晶是指晶体按照空间点阵有序生长的晶体, 主要包括石英晶体、镓酸锂、锆酸锂、锆酸钛等。通过烧结制得的陶瓷是多晶压电材料。压电陶瓷由很多随机取向的晶粒组成, 宏观表现为各向同性, 不显示压电性能; 通过极化后表现为各向异性, 显示出压电性能。最早发现的压电陶瓷为钛酸钡陶瓷。1955 年以锆钛酸铅二元系压电陶瓷发现为基础进行了大量有关铅基压电陶瓷的研究及应用, 此类压电陶瓷具备优异的压电性能, 被广泛用于传感器、致动器器件和多层电容器<sup>[55]</sup>。然而, 由于此类含铅压电材料对环境和人体的健康存在很大的危害, 以  $\text{BaTiO}_3$  基、 $(\text{Bi}_{0.5}\text{Na}_{0.5})\text{TiO}_3$  基、 $(\text{K},\text{Na})\text{NbO}_3$  基以及铋层结构为代表的无铅压电陶瓷受到了目前更为广泛的关注与研究<sup>[56]</sup>。有机压电材料是以聚偏氟乙烯(PVDF)为代表的压电薄膜材料, 该类压电材料具备良好的柔韧性, 在压电薄膜器件的设计制备中表现出巨大的应用潜力。

### 1.3.2 铌酸钾钠基压电材料

铌酸钾钠陶瓷 ( $\text{K}_{0.5}\text{Na}_{0.5}\text{NbO}_3$ , KNN, 具有该类陶瓷的最佳电学性能) 是一种典型的钙钛矿型 ( $\text{ABO}_3$ ) 结构的压电陶瓷, 具有工艺简单, 烧结温度低等绿色环保的制备过程, 并且其压电性能良好, 具有较高的居里温度 ( $420\text{ }^\circ\text{C}$ ) 以及较好的机械品质因素, 受到了广泛的关注及应用<sup>[57]</sup>。KNN 的物相会随着温度的改变而改变, 温度从低一高时, KNN 会经历三方相 $\rightarrow$ 正交相 $\rightarrow$ 四方相 $\rightarrow$ 立方相的转变; KNN 的压电性能由正交相和四方相决定, 当两相共存时, KNN 材料表现出最优的压电性能<sup>[58, 59]</sup>。

KNN 是由两种人体必需的金属元素 K, Na, 具有生物安全性的金属元素 Nb 以及 O 组成, 对人体不会造成伤害, KNN 的生物相容性此前通过实验也已经证实。将人牙龈成纤维细胞 (HGF) 与 KNN 陶瓷共培养, 观察细胞的形态及增殖能力, 并与传统的修复材料聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA) 以及空白对照组对比, 结果表明细胞形态无变化, 增殖能力没有显著性差异<sup>[60]</sup>。此外, 极化的 KNN 被证明具有更强的蛋白吸附作用以及促进小鼠胚胎成骨细胞前体细胞 (MC3T3-E1) 以及骨髓间充质干细胞 (BMSC) 增殖

的作用<sup>[61, 62]</sup>。具有良好生物相容性的 KNN 目前在生物医学领域已经开展了广泛的研究。KNN 压电陶瓷是多晶压电材料，对外不显示压电性能。通过外加电场的极化作用，材料内部正负电荷会发生分离而沿着电场方向聚集在陶瓷的两个相对表面上，最终使 KNN 陶瓷的两面带有电量相等、符号相反的电荷；并且由于剩余极化的存在，在电场撤离后仍然会存在这样的带电特性（图 1-5）<sup>[54, 63, 64]</sup>。

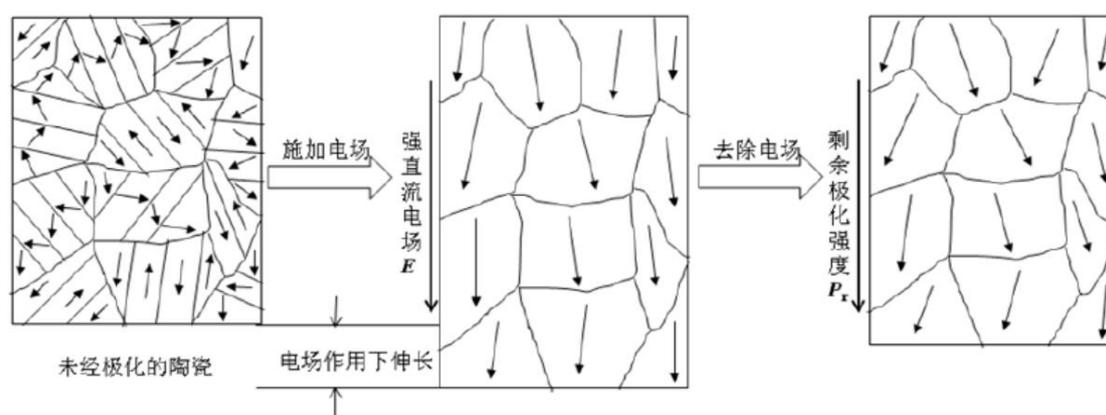


图 1-5 压电陶瓷在外加电场作用下极化示意图<sup>[63]</sup>

Figure 1-5 Diagram of polarization of piezoceramics under external electric fields<sup>[63]</sup>

### 1.3.3 压电材料的电刺激作用用于肿瘤治疗

电刺激抗肿瘤是一种新型的物理治疗手段，不同参数、性质的电刺激通过不同方式及原理用于抗肿瘤已有较广泛的研究。肿瘤治疗电场是一种新型的肿瘤治疗方法并且在 2011 年被美国食品药品监督管理局批准用于脑胶质瘤的治疗<sup>[65]</sup>。它采用一种低强度及适中频率的（100-300 kHz）交变电场，破坏有丝分裂期间微管的聚合作用从而抑制肿瘤细胞生长；由于肿瘤细胞本身具有无限增殖的特性，它可以杀灭肿瘤细胞但对正常的细胞没有毒害作用<sup>[66-68]</sup>。肿瘤治疗电场与化疗药物的同时作用也可以提高化疗药物的治疗效率，促进化疗药物对多药抗性肿瘤细胞的杀灭作用<sup>[69, 70]</sup>。此外，肿瘤治疗电场也被证明能够有效的抑制肿瘤转移。Kirson 等学者在小鼠和白兔中构建动物转移模型用以研究肿瘤治疗电场对实体瘤转移的影响，结果证明了该电场对癌转移的抑制作用<sup>[68]</sup>。Oh 等人通过细胞体外实验发现在转移性的骨肉瘤中，肿瘤治疗电场的施加会抑制肿瘤细胞的迁移侵袭能力，对转移和成血管相关蛋白的表达也进行了抑制<sup>[71]</sup>。肿瘤治疗电场在恶性胶质瘤迁移侵袭和成血管中的抑制作用也被 Kim 等人证明，并且说明可能的影响机制是对 MAPK 与 PI3K/AKT 信号通路的作用<sup>[72]</sup>。

细胞膜上具有用于离子和物质运输的小孔，使细胞维持动态的平衡。施加电脉冲并且在电极上提高电压击穿细胞膜，造成可逆的电穿孔，导致细胞膜对离子的通透性增强，给药效率提高，可以提高化疗药物治疗肿瘤的效率。纳秒级的电穿孔具有更高的电场强度和更高的脉冲宽度，可以导致不可逆的电穿孔，使细胞膜功能丧失而造成肿瘤细胞死亡<sup>[73]</sup>。体内体外实验均证明脉冲电场的施加对于控制肿瘤进展，抑制肿瘤转移具有很明显的作<sup>[74]</sup>。

电场化学治疗直接将电极插入肿瘤部位，在直流电场的作用下导致癌细胞的死亡。电极插入部位周围 pH 的剧烈改变是杀死肿瘤的主要原因；此外，还会在电极周围产生活性氧（ROS）（破坏脂质、蛋白和 DNA）从而达到杀灭肿瘤的效果<sup>[75]</sup>。这种方法相较于其他的方法，可以针对肿瘤部位产生局域破坏，副作用更少，并且可以与化疗、免疫疗法等结合来增强肿瘤治疗的效果<sup>[76, 77]</sup>。但这种方法有效面积有限，当肿瘤部位的面积较大时，可能需要植入两个以上的电极。复杂的电极装置，阻碍了电化学疗法的应用；并且它不是选择性的肿瘤治疗方法，对肿瘤部位的正常细胞也有杀害作用<sup>[77]</sup>。

从先前研究可以发现，电刺激在肿瘤治疗的应用中，外源性电极的插入易造成感染或是患者的二次损伤；采用外源性电源装置直接施加电场则存在穿透性、有效性、选择性差的问题，无法对肿瘤部位进行精确的电刺激调控。为了更好的达到肿瘤治疗以及良好预后的目的，研究者们近年来开始探索无需外接电极的无线电刺激方式用于肿瘤研究。具备压电性能的生物材料由于自身的带电特性，无需外接装置即可对细胞提供稳定可控电刺激。先前有研究将压电陶瓷与成纤维细胞、成骨细胞等共培养，发现其产生的电刺激会对其增殖、黏附、分化等行为产生影响。近年来，对肿瘤细胞电稳态的作用成为肿瘤治疗的新靶点，生物相容性良好的无铅压电陶瓷开始被探索用作新的电刺激施加方式作用于肿瘤，通过对肿瘤细胞的电稳态与细胞代谢、细胞膜的通透性等作用，对细胞活性以及细胞的转移能力产生影响，并且促进化疗药物的肿瘤治疗效果。

有研究表明，铌酸钾钠陶瓷正极化面的高表面电势在与骨肉瘤细胞培养 7 d 后可达到 50% 的增殖抑制效果，肿瘤细胞无法良好黏附，甚至出现死亡。进一步研究表明高表面电势的电学环境给予肿瘤细胞持续的电刺激，造成了肿瘤细胞膜的损伤，氧化—还原平衡失衡从而导致大量 ROS 的产生，继而造成细胞的死亡；并且进一步对压电纳米颗粒的研究也证明了同样的抗肿瘤作用<sup>[78]</sup>。阿霉素是一种极其常用的化疗药物，其在应用中最大的问题就是毒副作用。降低化疗药物的用量，提高其杀灭肿瘤的效率将会大大的减轻化疗药物的毒副作用。将化疗药物阿霉素与纳米压电陶瓷材料钛酸钡通过超分子络

合，压电材料促进化疗药物的递送以及肿瘤细胞对阿霉素的内化吸收，可以显著的提高阿霉素对癌细胞的杀伤作用及效率<sup>[79]</sup>。也有研究者将具有显著抗肿瘤效果的微量元素，如硒、铜等与压电材料复合，通过材料的本征电刺激促进带电粒子的运输实现对肿瘤细胞的电刺激以及化学元素对肿瘤杀灭作用相结合，达到良好的肿瘤治疗效果<sup>[80, 81]</sup>。

除了直接对肿瘤细胞产生电刺激达到抗肿瘤的效果，Yoon 等人发现压电纳米材料可以作为敏化剂，促进具有肿瘤治疗电场抗性的癌细胞对电场治疗的敏度。实验发现当对具有电场抗性的 MCF-7 乳腺癌细胞加入钛酸钡压电纳米粒子共培养后，在电场刺激下该纳米粒子在肿瘤细胞胞质积累，与电场单独作用相比，可明显增强对 MCF-7 乳腺癌细胞的杀灭作用；并且当钛酸钡纳米粒子的粒径为 200 nm 时，在电刺激下的抗癌效果更明显，说明纳米粒子的粒径也会影响电场作用下的抗肿瘤效果<sup>[82]</sup>。钛酸钡压电纳米粒子除了作为响应电场治疗的敏化剂，也可以用作基因治疗的传递者以及用于生物成像。Dempsey 等将聚乙烯亚胺包裹在钛酸钡表面，该复合物可以显著的促进细胞对钛酸钡纳米粒子的摄取并且由于聚乙烯亚胺是最有效的非病毒基因传递剂之一，该复合物可以实现高效的基因传递用于肿瘤基因治疗。此外，钛酸钡压电纳米粒子作为二次谐波的纳米探针可以用于生物成像，因此包裹了聚乙烯亚胺的钛酸钡纳米粒子可以实现肿瘤成像与肿瘤治疗一体<sup>[83]</sup>。

基于压电材料本身的电学特性提供电刺激用于肿瘤治疗，目前研究较少，且大多都只是在肿瘤杀灭方面的作用，缺乏对肿瘤转移相关的研究。上述研究已经表明肿瘤治疗电场、电脉冲等电刺激可以通过多种信号通路、对骨架的改变等对肿瘤的迁移侵袭血管形成等转移行为抑制，说明电刺激在肿瘤转移中具有调控作用，探究压电材料对肿瘤细胞转移的作用将促进其在肿瘤治疗方面的应用。

#### 1.3.4 超声辅助压电纳米材料用于肿瘤治疗

压电效应的发现是在 100 多年前，但对微纳米尺寸压电效应的发现研究却是在近些年，其主要用于纳米发电机和纳米自供电系统<sup>[84]</sup>。压电纳米材料的尺寸小、比表面积大，可以加载机械刺激，对肿瘤细胞进行无线的、非侵入性并且具有选择性的电刺激用于肿瘤的治疗。超声是一种机械声波，周期性振动频率高于人的听力（20 kHz），其作用可控、具有很深的组织穿透力，对正常组织器官安全。Marino 等人利用功能化的钛酸钡纳米粒子靶向脑胶质瘤，其压电特性使其在超声刺激下远程提供电刺激，显著提高化疗药物的治疗效率；并且电刺激可以扰乱肿瘤细胞的  $\text{Ca}^{2+}$  稳态，显著促进肿瘤的凋亡，抑制

肿瘤的增殖<sup>[85]</sup>。

压电纳米材料响应超声作用除了可以对肿瘤细胞产生无线电刺激，还可以作为声动力敏化剂的来源<sup>[64]</sup>。近年来对微纳米尺寸的压电效应研究发现，机械振动作用会导致微纳米尺寸的压电材料发生形变从而产生正负电荷，导致内部的电子和空穴发生分离并向相反的方向迁移，分别富集于材料的导带和价带进而产生电压；当其超过一定值时（导带边缘电势低于  $O_2/O_2^-$  氧化还原电势；价带边缘电势低于  $H_2O/OH^-$ ），将能够有效的催化氧化还原反应并生成 ROS，即产生压电催化作用杀灭肿瘤细胞（图 1-6）<sup>[86-88]</sup>。对于  $BiFeO_3$ ，虽然导带边缘的电势比氧化还原的电势高，但足够强的压电场导致其导带倾斜从而促使氧化还原反应的产生。在超声辅助作用下压电纳米粒子导致肿瘤细胞内 ROS 的过量产生，引起细胞内蛋白、细胞器以及 DNA 等相关生物结构的破坏进而引起细胞的凋亡甚至死亡。

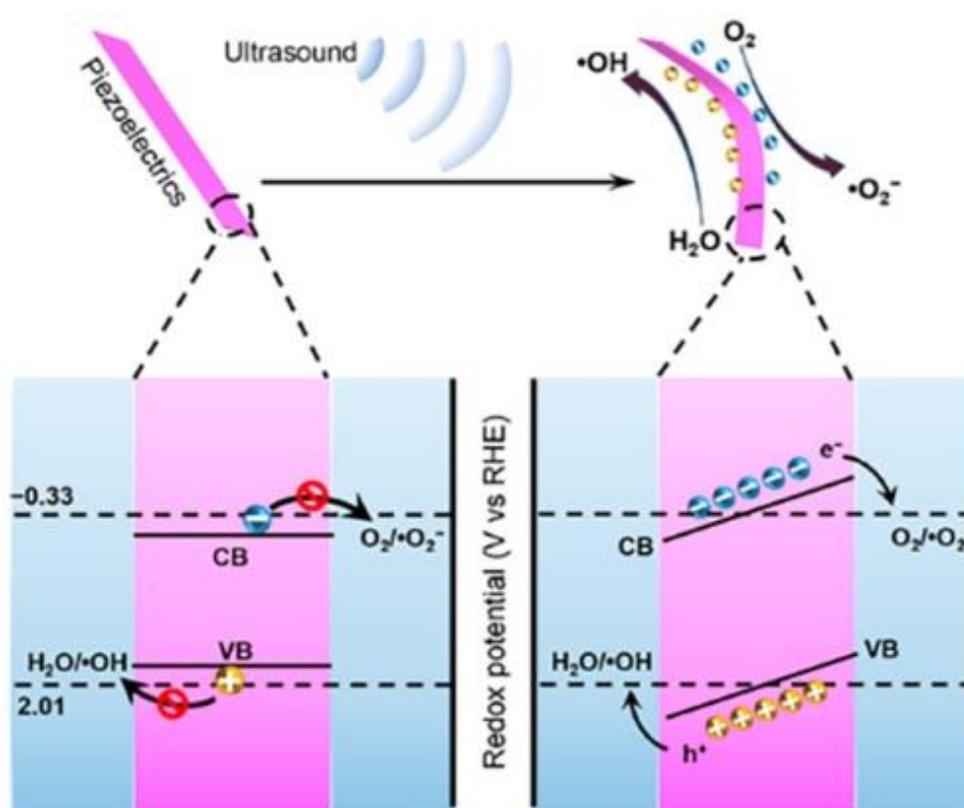


图 1-6 压电材料在超声状态下极化并进一步产生压电催化作用的示意图（在水相中主要为  $O_2/O_2^-$  和  $H_2O/OH^-$ ）<sup>[87]</sup>

Figure 1-6 A schematic diagram of the ultrasound-induced piezoelectric polarization of piezoelectric materials and further piezocatalysis (mainly  $O_2/O_2^-$  and  $H_2O/OH^-$  in aqueous phase)<sup>[87]</sup>

在高强度聚焦超声的作用下纳米粒子则可以增强超声的吸收以及热效应的产生，在短时间内产生 70-100°C 的高温，造成组织过热从而达到细胞杀死作用。此外，压电纳米粒子的存在也可以促进超声产生的空化效应。在空化作用中，液体中的气泡一直处于压缩和去压缩的循环当中，促进微射流和微声流的产生，对周围的细胞膜产生破坏作用，可使细胞膜产生暂时性的、可逆的、相对无害的穿孔，这些小孔致使细胞膜的通透性提高，可以用于药物递送<sup>[89-91]</sup>。当处于超声作用下的气泡快速崩塌，释放出很高的能量及温度则会造成细胞的坏死。空化微气泡的坍塌也会造成很强的冲击波，导致细胞的机械损伤及破坏。空化作用通过促进水的热解离则会促进 ROS 的产生。由于超声具有组织穿透力深、作用可控的优势，因此超声辅助压电材料用于抗肿瘤在临床上将具有很大的应用潜能。

光催化抗肿瘤是通过光辐射使电子和空穴发生分离成为激发态与氧分子发生化学反应产生 ROS；但在光催化抗肿瘤中产生的电子和空穴会在催化反应发生之前，大部分重新结合从而抑制 ROS 的产生。大多压电材料在具有压电性的同时具有很好的光敏特性，将超声刺激下的压电催化与光催化相耦合，在压电极化电场存在下可以诱导压电纳米粒子电荷分离和还原活性位点的增加，促进电子和空穴的分离以及向表面的迁移，抑制电子和空穴的重新结合，可以实现高效的光催化作用<sup>[92]</sup>。

## 1.4 本文研究意义及研究内容

随着功能性生物材料的发展以及对细胞运动在生理病理过程中重要作用的认识，材料表面特性对细胞运动的调节作用受到了广泛的关注。目前，大量研究已经表明材料表面硬度、形貌、化学结构、密度、粗糙度等对细胞的运动具有调节作用，但材料表面带电特性对细胞运动行为的影响却少有研究<sup>[93-96]</sup>。对于肿瘤细胞而言，其运动能力的异常改变是肿瘤向恶性转化的重要标志，抑制肿瘤运动能力对肿瘤治疗具有重要的意义。因此，本研究构建表面具有不同带电特性的模型研究材料表面带电差异对细胞运动行为的影响。值得注意的是，当材料具有更高的表面电势时，对正常细胞的运动潜能具有促进作用却对肿瘤细胞具有抑制作用。基于抑制肿瘤细胞运动在肿瘤治疗中的重大意义，本研究进一步讨论了材料表面带电特性差异对肿瘤细胞迁移侵袭能力的影响及机制。

另一方面，乳腺癌现已成为全球发病率最高的癌症，但常用的治疗手段不仅容易引起一系列的并发症及副作用，如疼痛、感染、对其他正常组织的不良影响等问题；并且治疗效果有限甚至会促进肿瘤转移的发生。由于肿瘤组织内部存在电稳态，对其破坏将

是肿瘤治疗的新靶点。基于 KNN 压电纳米颗粒所具备的本征电学特性及压电特性，提出通过将 KNN 纳米颗粒与乳腺癌细胞共培养时辅以超声刺激，利用纳米颗粒的电学特性以及响应超声的作用实现高效的抑制乳腺癌细胞活性的目的。

具体的研究内容如下：

(1) 通过传统的固相烧结法制备具有良好压电性能的 KNN 陶瓷块体，调整极化参数获取具有不同表面电势，但成分、结构、表面形貌一致的 KNN 样品。将 4 种正常细胞及 2 种乳腺癌细胞与不同表面电势的样品共培养，获取材料表面电势对细胞的初始黏附速率即细胞运动潜能、细胞增殖能力的影响规律。实验发现与未极化 KNN 相比，随着极化后 KNN 材料表面电势的升高，乳腺癌细胞的运动潜能下降，但是正常细胞却呈现上升趋势，且在极化常数为 80 pC/N 时对癌细胞运动能力具有最强的抑制作用，表明调节材料表面电势用以抑制乳腺癌转移的可行性。因此，实验选取未极化的 KNN 陶瓷块体作为对照组，极化后压电常数达到 80 pC/N 的块体作为实验组，通过划痕实验、transwell 实验探究带电特性对乳腺癌细胞迁移、侵袭能力的影响；通过免疫荧光染色探究对乳腺癌细胞骨架系统及 FA 结构的影响；通过 PCR 实验进一步探讨这种带电特性的差异是否会对与骨架调控及 FA 调控相关基因的表达产生影响。

(2) 研究不同浓度极化 KNN 压电纳米颗粒对正常细胞的毒性，经过初步筛选，发现浓度在 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下时 BMSC 的存活率都能高达 75% 以上。为了能够同时具备良好的抗肿瘤特性，实验选取 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的极化 KNN 颗粒进一步实验，探讨在超声刺激下极化 KNN 纳米颗粒，对高转移性的三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和非三阴性乳腺癌细胞 MCF-7 在 24 h, 48 h, 72 h 时存活率的影响，并对细胞骨架形态的变化、细胞迁移侵袭能力的改变进行研究。从电刺激及压电催化造成细胞代谢失衡的角度出发，对 ROS 的产生、细胞凋亡与坏死的情况进行了分析。最后将超声刺激下具有良好抑制乳腺癌细胞活性的 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的极化 KNN 颗粒作用于人正常乳腺细胞 MCF-10A 用以评估该抗肿瘤方式的生物相容性。

## 第二章 铌酸钾钠陶瓷表面电势对乳腺癌细胞迁移侵袭的影响及机制

### 2.1 引言

随着功能性生物材料的发展及细胞运动在生理病理过程中重要作用的认识,材料表面性质对细胞运动行为的调控受到越来越广泛的关注,目前大多数的研究主要集中于材料的硬度、表面形貌、粗糙度、化学结构及密度等<sup>[93-98]</sup>。近年来,材料表面的带电特性被证明是调节细胞行为的最为关键因素之一,大量研究者开始关注材料表面的带电性质对生物行为的影响规律,但研究的主要方向始终集中于材料表面电荷对蛋白质吸附行为的影响;材料表面带电对内皮细胞、成纤维细胞以及间充质干细胞增殖、分化的影响;研究的主要目的是为了调节材料表面的带电特性用于组织修复<sup>[99-103]</sup>。

目前,具有良好生物相容性的压电材料也开始用于肿瘤治疗,Asati 等人利用聚合物包覆的氧化铈纳米粒子研究不同表面电荷对肿瘤细胞增殖的影响,但其主要关注材料的带电性对内吞及其在细胞定位中产生的影响,并由此对肿瘤细胞产生的毒性作用,未研究带电表面对肿瘤细胞行为的直接影响<sup>[104]</sup>。利用生物材料对肿瘤细胞产生电刺激可以避免传统电刺激作用于肿瘤时存在的外接电极导致的感染、或是穿透性、选择性差等问题,Li 等人用压电陶瓷生物材料产生这种无线电刺激作用于骨肉瘤细胞,研究电刺激与化疗结合作用的抗肿瘤效果<sup>[80]</sup>。但该研究以及与此相关的研究始终缺乏电刺激的作用对肿瘤细胞运动行为的影响。肿瘤细胞运动能力的改变与肿瘤转移相关,而肿瘤转移又是造成大多数患者死于实体瘤的主要原因。认识了解材料表面带电特性对肿瘤细胞转移相关行为的影响,通过调控生物材料表面的带电性质来控制肿瘤转移,将极大促进生物材料在肿瘤方面的应用。

因此,本章实验通过传统的固相烧结法以及可控的极化装置构建表面带有稳定、不同电势的 KNN 块体陶瓷模型材料,研究对 2 种乳腺癌细胞及 4 种正常细胞运动潜能及增殖特性的影响,重点关注对肿瘤细胞运动行为的调节作用,并通过骨架、黏附相关研究,探究材料表面带电特性对肿瘤细胞迁移侵袭行为影响的机制。

## 2.2 材料与实验方法

### 2.2.1 主要实验试剂

本章实验所用主要实验试剂如表 2-1 所示。

表 2-1 主要实验试剂

Table 2-1 List of experiment materials and reagents

试剂	规格	厂商
五氧化二铌 ( $\text{Nb}_2\text{O}_5$ )	AR	上海阿拉丁生化试剂有限公司
无水碳酸钾 ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ )	AR	上海阿拉丁生化试剂有限公司
无水碳酸钠 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	AR	上海阿拉丁生化试剂有限公司
无水乙醇	AR	上海阿拉丁生化试剂有限公司
1799 型聚乙烯醇	AR	上海阿拉丁生化试剂有限公司
胰蛋白酶	100 mL	美国 Gibco 公司
胎牛血清 (FBS)	500 mL	美国 Gibco 公司
DMEM(H)培养基	500 mL	美国 Gibco 公司
双抗 (青/链霉素)	100 mL	美国 Gibco 公司
MCF-10A 细胞专用培养基	600 mL	武汉普诺赛生命科技有限公司
磷酸缓冲盐溶液 (PBS)	500 mL	武汉塞维尔生物科技有限公司
CCK-8 试剂盒	5 mL	日本 Dojindo 公司
钙黄绿素 (Am)	--	日本 Dojindo 公司
碘化丙啶 (PI)	--	日本 Dojindo 公司
4%多聚甲醛固定液	500 mL	天津市百世化工有限公司
结晶紫染色液	100 mL	碧云天生物科技有限公司
Actin-Tracker Green-488	200 $\mu\text{L}$	碧云天生物科技有限公司
DAPI 染色液	50 mL	碧云天生物科技有限公司
VCL/Vinculin Rabbit Polyclonal Antibody	50 $\mu\text{L}$	碧云天生物科技有限公司
山羊抗兔 IgG	100 $\mu\text{L}$	北京博奥龙免疫技术有限公司
Tubulin-Tracker Red	40 $\mu\text{L}$	碧云天生物科技有限公司

表 2-1 主要实验试剂（续）

Table 2-1 List of experiment materials and reagents (cont.)

TB Green® Premix Ex Taq™	200 Rxns	日本 TaKaRa 生物公司
RT 逆转录试剂盒	--	加拿大 Fermentas 公司

## 2.2.2 主要实验仪器

本章实验所用主要实验仪器如表 2-2 所示。

表 2-2 主要实验仪器

Table 2-2 List of experimental apparatuses

实验仪器	型号	制造商
行星式球磨机	QM-3SP2	南京南大仪器厂
冷等静压机	LDJ100/320-300I	四川航空工业川西机器厂
极化装置	HYJH-3-4	咸阳惠远自动化设备有限公司
d <sub>33</sub> 测量仪	YE2730A	无锡裕天科技有限公司
鼓风干燥箱	DHG-9140A	上海慧泰仪器制造有限公司
高温箱式电炉	SSJ-E	洛阳市涧西耐火材料实验室
超声波震荡清洗器	BTX600-2D	广州予华公司
分析电子天平	FA2004B	上海佑科公司
扫描电子显微镜	Merlin	德国 Zeiss 公司
原子力显微镜	Multimode 8	德国 Bruker 公司
显微拉曼光谱仪	Lab RAM Aramis	法国 HJY 公司
X 射线衍射仪	D8 advance	德国 Bruker 公司
倒置荧光显微镜	Eclipse Ti-U	日本尼康公司
多功能酶标仪	Thermo3001	美国 Thermo 公司
CO <sub>2</sub> 恒温培养箱	HERAcell240i	美国 Thermo Scientific 公司
超净工作台	AIR TECH	安泰空气技术有限公司
激光共聚焦显微镜	TCS-SP8	德国 Leica 公司
NANODROP	ND-ONE	美国 Thermo Scientific 公司
倒置生物显微	Olympus ekx41	日本 Olympus 公司

### 2.2.3 铌酸钾钠压电陶瓷块体的制备

本章通过传统的固相烧结法制备 KNN 压电块体陶瓷，并通过外源性极化装置获取具有不同表面电势的 KNN 材料。具体制备工艺如下所示：

1. 将 250 g 玛瑙球置于清洗干净并烘干的四氟乙烯球磨罐中，加入一单位测量好的预混物（五氧化二铌 34.262 g，碳酸钾 6.831 g，碳酸钠 8.907 g，无水乙醇 200 mL）；

2. 将加好样的球磨罐固定在行星式球磨机上，通过球磨法混匀预混物。球磨机转速设置为 250 r/min，球磨时间为 8 h；

3. 将球磨制得的混合液取出置于 80 °C 烘箱至完全烘干（一般为 12 h）。烘干后的样品转移至坩埚，放入马弗炉中以 750 °C 煅烧 2 h，初步制得 KNN 颗粒；

4. 将 1799 型聚乙烯醇和去离子水在 90 °C 水浴锅中水浴加热、搅拌 4 h，制得粘结剂。将上述 750 °C 煅烧初步制得的 KNN 颗粒与粘结剂混合后，研磨，过筛，完成 KNN 的造粒；

5. 将造粒完成后的样品在空气中放置整晚，然后用自制的九孔模具进行压片。在模具的每孔中加入 0.7 g 颗粒后把模具放入手动压片机中，在 20 MPa 压强下压制 3 min，初步制得圆片样的陶瓷生坯；将其密封后放入冷等静压机中，在 200 MPa 压强下冷等静压 10 min，得到坚实的陶瓷圆片；

6. 将圆片样的陶瓷坯体转移至坩埚并用氧化铝陶瓷粉末包埋，在高温烧结炉中逐步升温至 1080 °C，烧结 2 h 制得厚度约为 2 mm，直径为 10 mm 的 KNN 陶瓷圆片；

7. 将制得的陶瓷圆片用 1000 目、3000 目、5000 目的砂纸依次进行打磨，使每个 KNN 陶瓷片具有相一致的平整表面；

8. 为得到具有不同表面电势的 KNN 样品，对制得的陶瓷样进行极化处理。在 120 °C 下分别在外加直流电压强度为 0, 1.5, 2.5 kV/cm 的强度下极化 30 min 得到压电常数分别为 0, 40, 80 pC/N 的 KNN 样品，将其标记为 KNN, 40KNN, 80KNN；

9. 将上述得到的具有不同压电常数的 KNN 样品用去离子水超声清洗，烘干，分别保存备用。

### 2.2.4 样品理化性能表征

1. 使用扫描电子显微镜（SEM）观察具有不同压电常数 KNN 块体的表面形貌，用以确定极化是否会影响材料的表面形貌。在观察之前将样品磨平清洗干净之后放在烘箱

烘干并保持干燥，将 KNN 样品通过导电胶粘在样品台上之后需要再用导电胶将陶瓷样品的顶部和样品台连接形成通路。由于 KNN 材料本身不导电，还需对其进行喷金处理，喷金时间为 60 s，用以满足电镜观察时对样品导电的需求。观察样品时采用的加速电压为 10 kV，工作距离为 8 mm。采用扫描电子显微镜配套的能谱仪（EDS）对样品进行元素分析，此时采用的加速电压为 20 kV，工作距离为 12 mm。

2. 采用 X 射线衍射仪（XRD）对不同压电常数的 KNN 块体进行物相分析，其中衍射步长设置为  $0.02^\circ$ ，检测范围为  $2\theta: 5-90^\circ$ 。

3. 采用拉曼光谱仪（Raman）对具有不同压电常数 KNN 样品的化学结构进行分析，分析范围为  $0-900\text{ cm}^{-1}$ 。

4. 不同组 KNN 样品通过  $d_{33}$  测定压电常数。

5. 通过原子力显微镜（AFM）对样品表面电势进行测定分析。在用 AFM 测定之前，要对 KNN 样品进行仔细的打磨，保证圆片足够平整，之后在 KNN 样品表面随机选取  $5\text{ }\mu\text{m}\times 5\text{ }\mu\text{m}$  的范围进行测量。

## 2.2.5 细胞培养及材料表面的接种

本实验使用 2 种乳腺癌细胞，具有高侵袭性的三阴性乳腺癌细胞株 MDA-MB-231；低转移性、非三阴性乳腺癌细胞株 MCF-7；人正常乳腺上皮细胞 MCF-10A、成纤维细胞 L929、人脐静脉内皮细胞 HUVEC、巨噬细胞 RAW264.7。MCF-10A 细胞利用 MCF-10A 细胞专用培养基进行培养，剩余的 2 种乳腺癌细胞以及 3 种正常细胞培养在 DMEM(H) 完全培养基中（10%胎牛血清，1%双抗（青霉素/链霉素），89%DMEM（H））。细胞培养时将细胞置于  $5\%\text{CO}_2$ ， $37^\circ\text{C}$  的恒温培养箱中。当细胞密度达到 80%时，用 0.25%胰蛋白酶消化细胞后进行传代培养或是种板。不同压电常数的 KNN 通过  $d_{33}$  仪测定区分后于高温高压灭菌锅中灭菌处理，然后将其置于 48 孔板中，实验时将合适密度的细胞接种于样品表面。

## 2.2.6 细胞初始黏附速率及增殖活性检测

通过 CCK-8 法对不同压电常数 KNN 样品表面培养 1 h 时的黏附细胞量及 48 h 时的细胞存活率进行检测。在测定细胞 1 h 的黏附量时，种板密度为  $1.5\times 10^5$  个/mL；在培养 48 h 测定细胞的存活率时，种板密度为  $2\times 10^4$  个/mL。种板完成后将其置于恒温培养箱中培养。1 h 后取出孔板，吸弃孔板中的完全培养基后用 PBS 溶液清洗 2 次，加入 CCK-8

工作液（避光条件下，细胞培养基：CCK-8 试剂=10:1），在恒温培养箱中避光孵育 2 h，使用多功能酶标仪在 450 nm 下检测吸光度。在 48 h 后取出孔板使用同样的 CCK-8 法测定不同压电常数 KNN 块体表面细胞的吸光度。每组设置 4 个平行。细胞存活率的计算公式为：

$$\text{细胞存活率 (\%)} = \frac{OD_{\text{实验}}}{OD_{\text{对照}}} \times 100\%$$

其中， $OD_{\text{实验}}$ 指实验组即极化后具有更高表面电势的 KNN 样品组(40KNN, 80KNN)的吸光度， $OD_{\text{对照}}$ 指空白对照组即未极化的 KNN 样品组所测吸光度。

## 2.2.7 细胞迁移及侵袭检测

### 1. 划痕实验

使用划痕实验对材料表面带电差异对肿瘤细胞迁移速率的影响进行检测。将细胞种板于材料表面后进行培养，待细胞的融合度达到 90% 以上时，取出并吸弃孔板中的培养基，采用 10  $\mu\text{L}$  的灭菌枪头对孔板中的单层细胞进行划痕处理，获取面积一致的单层细胞伤口；之后使用 PBS 溶液清洗 5 次，用以洗涤细胞碎片。每组选取 3 个平行用于初始划痕面积（细胞迁移前）的测定。将剩余的孔板加入培养基后继续置于恒温培养箱中培养，培养结束后取出孔板记录细胞迁移后的划痕面积。KNN 块体表面的肿瘤细胞迁移前后图片需要经过染色观察，在此研究中将需要观察的样品采用活细胞染色后在激光共聚焦显微镜下观察，具体的方法为：将 KNN 样品利用 PBS 溶液清洗 2 次后添加活细胞染色工作液（浓度为 1 mg/mL 的钙黄绿素用 PBS 溶液稀释至 2  $\mu\text{g/mL}$ ），于 5% $\text{CO}_2$ , 37  $^\circ\text{C}$  的恒温培养箱中避光孵育 20 min。待反应结束后，吸弃染料并用 PBS 溶液清洗 2 次，在激光共聚焦显微镜下观察并拍照记录。利用 Image J 测定划痕面积，并利用初始值作为对照计算不同组的相对划痕面积。

### 2. Transwell 迁移侵袭实验

Transwell 实验可以用于检测细胞的迁移侵袭能力。将 KNN 块体在砂纸下打磨到适当的高度后清洗干净并烘干，于高温高压灭菌锅中进行灭菌处理。灭菌处理好的 KNN 块体放置于 24 孔板中并用琼脂将其固定在 24 孔板的中间，添加 600  $\mu\text{L}$  细胞培养基。将 transwell 小室（孔径为 8  $\mu\text{m}$ ）用紫外灭菌的镊子轻轻的放置于上述添加材料与培养基的 24 孔板中（注意不要产生气泡），将细胞接种于 transwell 上室，12 h 后对迁移侵袭至 transwell 小室下层膜的细胞进行观察。在 transwell 进行乳腺癌细胞侵袭实验时，提

前将解冻的 matrigel 基底胶用不含血清的 DMEM (H) 基础培养基以 matrigel: DMEM (H) =1:3 的比例稀释, 在 transwell 上室加入 60  $\mu$ L, 置于 37  $^{\circ}$ C 培养箱中放置 1 h 用于成胶, 成胶后取出将 transwell 小室上层液态培养基丢弃, 随后用于侵袭实验。待细胞迁移侵袭 12 h 后, 将 transwell 小室取出, PBS 溶液清洗 2 次, 加入 600  $\mu$ L 4% 多聚甲醛固定 10 min; 固定结束后 PBS 溶液清洗 2 次, 采用结晶紫染色试剂染色 20 min; PBS 溶液清洗并用棉棒将 transwell 小室内侧的细胞擦掉。每组设置 3 个平行, 通过倒置荧光显微镜明场观察过膜的细胞数量并随机选定区域进行拍照。

## 2.2.8 细胞骨架及黏着斑荧光检测

### 1. 细胞微丝骨架和黏着斑免疫荧光染色

通过荧光染色对细胞的微丝、微管及 FA 进行观察。将密度为  $3 \times 10^4$  个/mL 的 2 种乳腺癌细胞接种在 KNN 块体上, 培养 24 h 后进行染色观察。免疫荧光染色 FA 并利用 F-actin 与 DAPI 对细胞微丝及核进行复染的操作步骤如下:

- (1) 吸弃孔板中的培养基后用 PBS 溶液清洗 2 次, 4% 多聚甲醛固定 10 min;
  - (2) 固定结束后用 0.1% Triton X-100 PBS 溶液洗涤细胞 3 次, 每次 5 min;
  - (3) 然后用 3% BSA 的 PBS 溶液封闭 1 h, 随后用 PBS 溶液清洗 4 次, 每次 5 min;
  - (4) 用含 1% BSA 的 PBS 溶液将黏着斑蛋白 (Vinculin) 一抗稀释 100 倍后添加, 4  $^{\circ}$ C 下避光孵育过夜; 第二天用 PBS 溶液清洗 4 次, 每次 5 min;
  - (5) 将带有荧光标记的二抗用 1% BSA 的 PBS 溶液稀释 200 倍后添加, 在室温中避光孵育 30 min, 然后用 PBS 溶液清洗 4 次, 每次 5 min;
  - (6) 将 F-actin 试剂用 3% BSA、0.1% Triton X-100 PBS 溶液稀释 100 倍后加入对细胞微丝骨架进行复染, 染色时间为 30 min; 染色结束后 PBS 溶液清洗 4 次, 每次 5 min;
  - (7) 最后添加 DAPI 染液 3 min 对细胞核进行复染, PBS 溶液洗 4 次, 每次 5 min。
- 染色结束后置于激光共聚焦显微镜下进行观察并拍照记录。

### 2. 细胞微管荧光染色

荧光染色微管并利用 DAPI 对细胞核进行复染的操作步骤如下:

- (1) 吸弃孔板中的培养基后用 PBS 溶液洗涤 2 次, 随后用 4% 多聚甲醛固定 10 min;
- (2) 用 0.1% Triton X-100 PBS 溶液洗涤细胞 3 次, 每次 5 min;
- (3) 避光将微管蛋白 (Tubulin) 试剂用 3% BSA、0.1% Triton X-100 PBS 溶液按 1:75 稀释后加入, 在室温下避光染色 30 min; 染色结束后用 PBS 溶液洗涤细胞 4 次, 每次 5

min;

(4) 加入 DAPI 染液对细胞核复染 3 min; 然后用 PBS 溶液清洗, 置于激光共聚焦显微镜下进行观察拍照。

每组设置 3 个平行, 利用 LAS AF Lite 软件对不同组所获得的图片进行定量, 测定细胞的极性 (细胞质量中心与细胞核之间的距离)、FA 的面积、FA 的荧光强度以及微管的荧光强度。

### 2.2.9 基因表达的检测

使用实时定量聚合酶链式反应 (PCR) 对细胞骨架和 FA 调控相关基因的表达进行测定。将密度为  $1 \times 10^5$  个/mL 的 MCF-7 与 MDA-MB-231 乳腺癌细胞接种在具有不同表面电势的 KNN 样品上, 作用 24 h 后进行 PCR 实验。

采用柱提法提取细胞总 RNA, 具体操作步骤为:

(1) 将孔板中培养基吸弃后用 PBS 溶液清洗 2 次, 在每孔加入 100  $\mu$ L RL Buffer, 用枪吹打使细胞脱落后收集裂解液;

(2) 把 gDNA Filter Micro Column 装在 2 mL 收集管, 随后把细胞裂解液转移至 gDNA 柱中, 在转移的过程中将 3 个平行孔转移至一个柱子中, 12000 r/min 离心 1 min;

(3) 丢弃 gDNA 过滤柱, 在收集管中加入 300  $\mu$ L 70%乙醇 (用 DEPC 水稀释无水乙醇), 用枪吹打 5 次混匀;

(4) 将 HiPure RNA Micro Column 装在 2 mL 的收集管中, 将混合液转移至上层柱子, 8000 r/min 离心 1 min;

(5) 把收集管中的液体倒出后重新装回 RNA 柱, 在柱子中添加 600  $\mu$ L Buffer RW1, 8000 r/min 离心 1 min;

(6) 把收集管中的液体倒出后重新装回 RNA 柱, 在柱子中添加 600  $\mu$ L 已用无水乙醇稀释的 Buffer RW2, 10000 r/min 离心 1 min;

(7) 把收集管中的液体倒出后重新装回 RNA 柱, 在柱子中第二次添加 600  $\mu$ L 已用无水乙醇稀释的 Buffer RW2, 8000 r/min 离心 1 min;

(8) 把收集管中的液体倒出后重新装回 RNA 柱, 13000 r/min 离心空柱 3 min;

(9) 将柱子转移至 1.5 mL 离心管中, 滴加 10  $\mu$ L 的 DEPC 水, 静置 2 min 后 13000 r/min 离心 1 min 即可将 RNA 柱中收集到的 RNA 溶解后转移至 1.5 mL 的离心管中。

(10) 用 nanodrop 测定提取 RNA 的浓度并记录  $OD_{260}/OD_{280}$ , 当其比值在 1.8-2.2

表示所得的 RNA 质量比较好。

由于 RNA 易遭受破坏而难以长期保存，需将其逆转录成 cDNA 后进行实验测定或是置于-80 °C的冰箱中进行保存，逆转录的具体步骤如下：先在无菌无核酸的 PCR 管中添加 12 μL 的体系：1 μg (x μL) RNA+1 μL Random Hexamer primer + (11-x) μL DEPC 水。将该 12 μL 的体系混匀后加入 8 μL 的逆转录组件。逆转录组件按照以下的顺序添加后混匀：5X Reaction Buffer: RiboLock RNase Inhibitor: 10 mM dNTP Mix: RevertAid M-MuLV RT=4:1:2:1。添加完毕后将该 20 μL 体系混匀离心后进行 cDNA 产物的合成，逆转录的程序为：在 42 °C 孵育 60 分钟后 70°C 加热 5 分钟终止反应。

PCR 测定 mRNA 的表达水平：先配置好 20 μL PCR 体系后进行 PCR 扩增实验。PCR 体系为：10 μL SYBR Premix Ex Taq II+2 μL cDNA+0.8 μL F-Primer+0.8 μL R-Primer+0.4 μL ROX Reference Dye (50×)+6 μL DEPC 水。将该 20 μL PCR 体系进行 34 个循环后利用  $\Delta\Delta C_t$  法测定每种基因的相对表达量。实验所使用的引物及其序列见表 2-3。

表 2-3 本章实验所用引物序列

Table 2-3 Primer sequences used in this study

Primer	Forward	Reverse
RhoA	5'-TGGAAAGACATGCTTGCTCAT-3'	5'-GCCTCAGGCGATCATAATCTTC-3'
ROCK1	5'-AACATGCTGCTGGATAAATCTGG-3'	5'-TGTATCACATCGTACCATGCCT-3'
ROCK2	5'-CGCTGATCCGAGACCCT-3'	5'-TTGTTTTTCCTCAAAGCAGGA-3'
Rac1	5'-TCTGCCAATGTTATGGTAGATG-3'	5'-AGGACTCACAAGGGAAAAGC-3'
FAK	5'-TGGTGCAATGGAGCGAGTATT-3'	5'-CAGTGAACCTCCTCTGACCG-3'
$\beta$ 1-integrin	5'-GGATTCTCCAGAAGGTGGTTTCG-3'	5'-TGCCACCAAGTTTCCCATCTCC-3'
GAPDH	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

## 2.2.10 统计学分析

实验中所有数据均以均值  $\pm$  标准差来表示，实验中独立样本间的显著性差异采用双尾 t 检验，P < 0.05 表示存在统计学差异，\*表示；P < 0.01 表示存在显著的统计学差异，\*\*表示；P < 0.001 表示存在极其显著的统计学差异，\*\*\*表示。

## 2.3 结果与讨论

### 2.3.1 不同压电常数铌酸钾钠陶瓷理化性能表征

为了构建材料表面具有不同带电特性的模型材料用以研究电信号对细胞运动行为的影响，本实验利用传统固相法制备并压制成 KNN 陶瓷片，通过调整极化参数获取不同压电常数的 KNN 样品。由于材料表面形貌对细胞运动行为具有调控作用，为了验证 KNN 极化是否会对形貌产生影响，通过 SEM 对不同 KNN 陶瓷样品表面形貌进行表征，结果如图 2-1 (a-c) 所示。样品表面呈现均匀的微孔结构，不同压电常数的 KNN 样品具有相似的表面形貌，表明极化没有对材料表面形貌产生影响。能谱分析表明制备的样品元素组成为氧，钠，铌，钾，且极化没有对 KNN 块体的元素组成产生影响（图 2-1 (d)）。利用拉曼分析块体的化学结构，不同带电特性的 KNN 块体在  $265\text{ cm}^{-1}$  位置及  $621\text{ cm}^{-1}$  位置均有 KNN 特征振动峰出现（图 2-1 (e)）。通过 XRD 分析 KNN 块体的晶体结构，实验结果如图 2-1 (f) 所示。KNN 样品为  $ABO_3$  型钙钛矿结构，在  $45^\circ$  角附近出现 (002) 与 (200) 双峰，表明四方相与正交相共存，具有良好的压电性；但极化使得  $45^\circ$  角附近的 (002) / (200) 峰强之比发生改变，表明具有压电性能的 KNN 陶

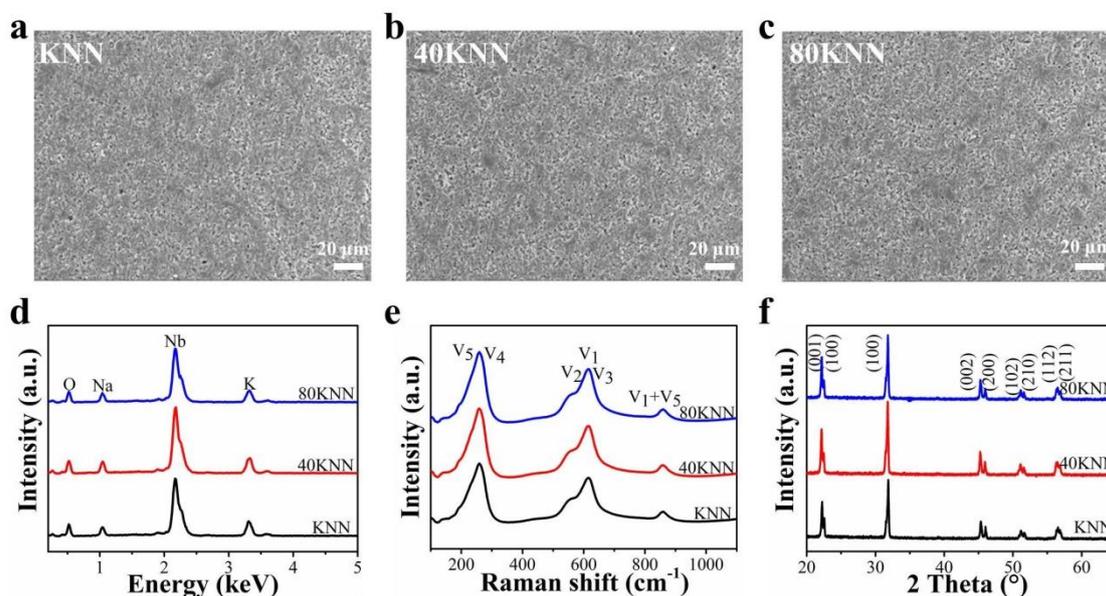


图 2-1 不同压电常数 KNN 块体理化性能表征。(a-c) 扫描电子显微镜图片，(d) 能谱，(e) 拉曼图谱，(f) X 射线衍射图谱

Figure 2-1 Characterization of KNN piezoceramics with different piezoelectric constants.

(a-c) SEM images, (d) EDS analyses, (e) Raman spectra and (f) XRD patterns

瓷，极化使其晶体结构压缩从而导致正交相比比例下降，四方相比比例上升，造成 XRD 图谱的差异以及压电常数的改变<sup>[105-107]</sup>。

KNN 陶瓷是多晶压电材料，对外不显示压电性能。极化使得晶体结构压缩，材料内部正负电荷分离而使 KNN 陶瓷的两个相对面带有电量相等、符号相反的电荷。利用  $d_{33}$  测量仪对通过调整极化参数获取的 KNN 样品压电常数进行测定，KNN，40KNN，80KNN 样品组中压电常数分别为 0，40，80 pC/N（图 2-2（a））；先前有研究将其置于细胞培养基中一段时间后，KNN 压电常数还能基本保持稳定，表明极化的 KNN 块体压电陶瓷表面带电特性稳定可调<sup>[80]</sup>。利用 AFM 测定 KNN，40KNN，80KNN 材料表面电势，结果如图 2-2（b-d）所示，压电常数越高，材料的表面电势越高。由于极化导致晶体内部正负电荷分离而使材料表面带有束缚电荷。80KNN 表面具有最多的正电荷，显示最高的表面电势，大小约为 550 mV（图 2-2（b））；40KNN 次之，其表面电势大小约为 390 mV（图 2-2（c））；KNN 由于没有极化，不显示压电性能，没有带电性，其表面电势最低，其值大小约为 250 mV（图 2-2（d））。

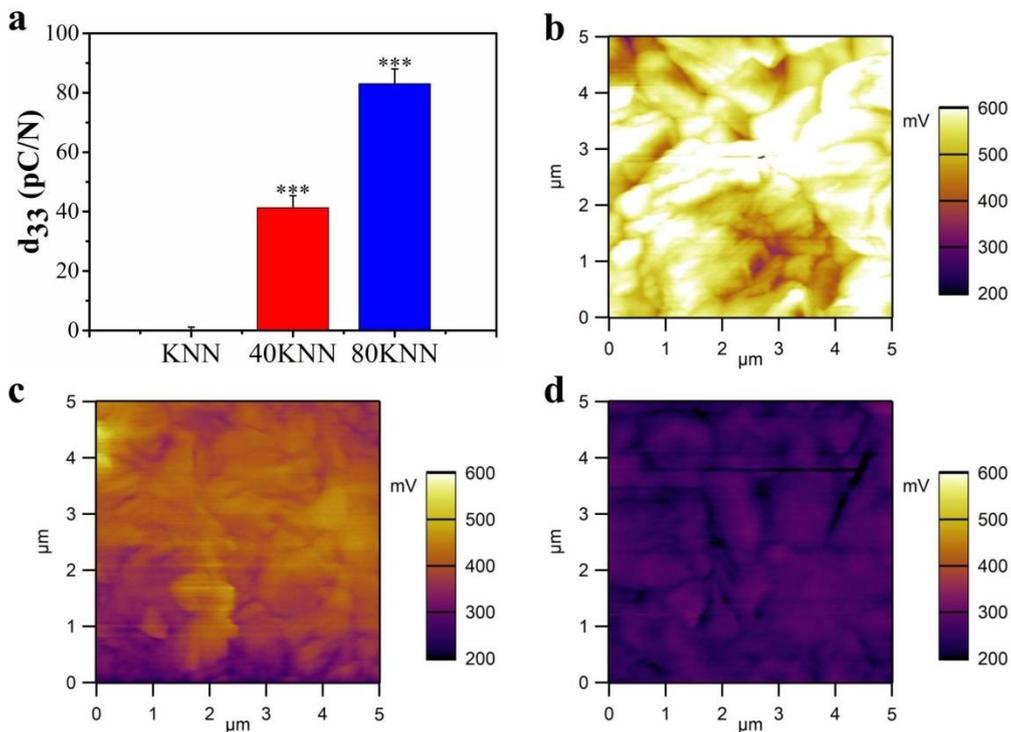


图 2-2 (a)  $d_{33}$  测量仪对 KNN 块体样品的压电常数测定值；原子力显微镜测定样品表面电势，(b) 80KNN，(c) 40KNN，(d) KNN

Figure 2-2 (a) The piezoelectric constants of KNN samples; the AFM images of (b) 80KNN, (c) 40KNN, (d) KNN samples indicating surface potentials

## 2.3.2 初始黏附速率分析

Hu 等人发现在前列腺癌细胞中，鞘脂激活蛋白原的下调会导致肿瘤细胞在初始阶段向基底黏附速率降低，抑制肿瘤细胞极化的形成以及铺展、膜突触的形成，并进一步抑制肿瘤细胞迁移、侵袭的能力<sup>[108]</sup>。该研究表明细胞初始黏附速率的改变与其之后的运动潜能相关。因此为了快速评估材料表面带电特性对细胞运动增殖潜能的影响，本文将调整极化参数后获取的表面带有不同正电荷的 KNN 样品与细胞培养，通过 CCK-8 实验测定初始黏附速率及细胞存活率。首先将 2 种乳腺癌细胞，MDA-MB-231 与 MCF-7 与不同带电样品共培养 1 h 与 48 h 后用 CCK-8 实验测定，实验结果如图 2-3 所示。当材料表面电势不同时，会对 2 种乳腺癌细胞的初始黏附速率及增殖活性产生影响。与未极化 KNN 相比，通过极化得到具有高表面电势的 40KNN 与 80KNN 样品，会有抑制 2 种乳腺癌细胞初始黏附速率的作用，尤其是具有最高表面电势的 80KNN 样品，会显著抑制 2 种乳腺癌细胞的初始黏附速率。同样的，对细胞与材料共培养 48 h 的增殖活性测定显示一致的作用效果，极化带电的 KNN 抑制 2 种乳腺癌细胞的存活率。

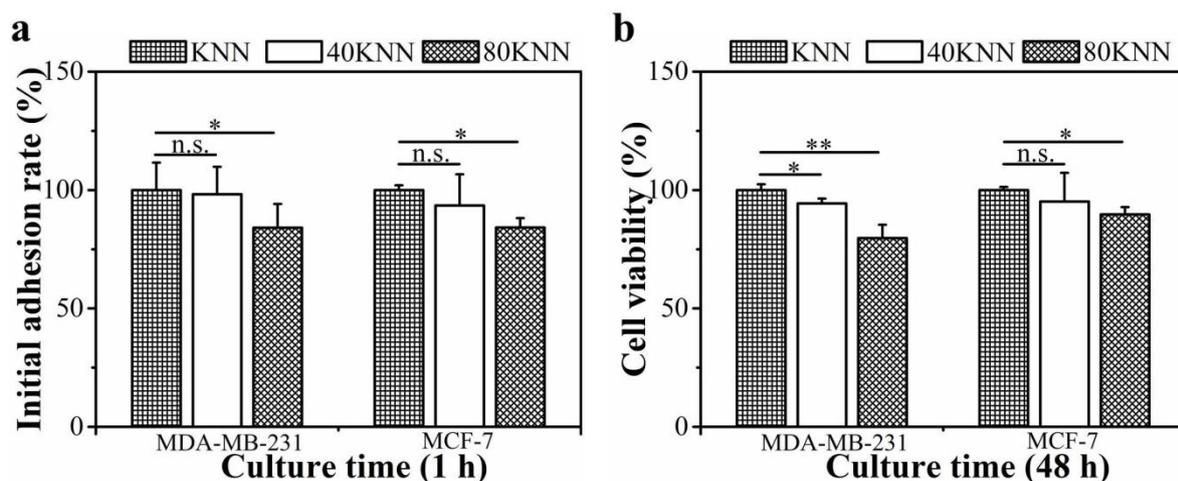


图 2-3 不同表面电势 KNN 块体对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 MCF-7 (a) 初始黏附速率与 (b) 48 h 细胞存活率的影响

Figure 2-3 Effects of KNN piezoceramics with different surface potentials on (a) initial adhesion rate and (b) cell viability of breast cancer cells MDA-MB-231 and MCF-7

极化使材料表面带有更多的正电荷对于乳腺癌细胞的运动潜能具有抑制的效果，表明可以通过调控材料表面的带电特性对肿瘤细胞的转移行为进行抑制，但生物材料用作体内仍需要考虑其对正常细胞的作用效果。HUVEC 的迁移能力与血管形成相联系；L929 通常作为研究细胞行为的标准细胞；MCF-10A 作为正常乳腺上皮细胞，在乳腺癌研究

中通常用作对照；免疫细胞的运动能力则是其免疫功能发挥的前提，例如向炎症部位的聚集；先前乳腺癌细胞运动相关研究中会选用 HUVEC, L929, MCF-10A, RAW264.7 细胞作为正常细胞用来对照<sup>[109-112]</sup>。因此，本实验也选用这 4 种正常细胞与不同表面电势的 KNN 样品进行共培养，实验结果如图 2-4 所示。KNN 表面电势差异对 4 种正常细胞行为的影响与癌细胞相反，表面电势的增高对于正常细胞的黏附速率及增殖活性都有促进的趋势。对于 HUVEC, L929, MCF-10A 这三种正常细胞，在压电常数为 40 pC/N 时，与未极化的 KNN 相比，初始黏附速率及增殖效果促进作用明显，具有统计学的差异。对 2 种乳腺癌细胞具有显著抑制效果的 80KNN 样品对 4 种正常的细胞，也都是促进的趋势，只是与 KNN 相比，该促进作用没有统计学的差异。

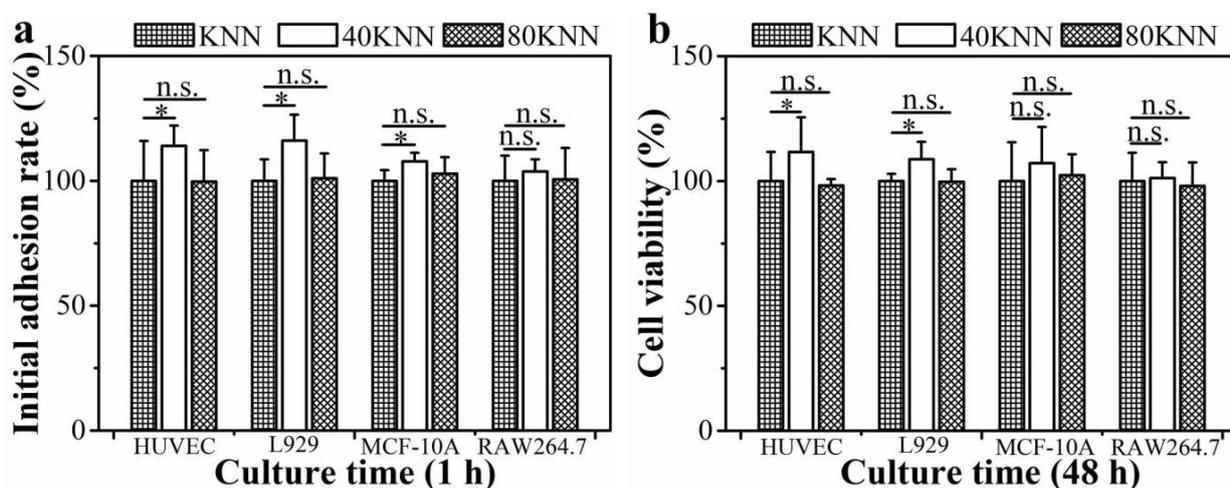


图 2-4 不同表面电势 KNN 块体对正常细胞 HUVEC, L929, MCF-10A, RAW 264.7

(a) 初始黏附速率与 (b) 48 h 细胞存活率的影响

Figure 2-4 Effects of KNN piezoceramics with different surface potentials on (a) initial adhesion rate and (b) cell viability of HUVEC, L929, MCF-10A and RAW 264.7 cells

通过将具有不同表面电势的 KNN 样品与 2 种乳腺癌和 4 种正常细胞共培养，发现材料表面的带电情况确实会对细胞的运动行为产生调控作用。值得注意的是，80KNN 样品表面的高电势会显著的抑制乳腺癌细胞的运动潜能，降低存活率，对正常的细胞却有轻微的促进趋势，表明该样品对正常细胞仍具有良好的生物相容性。乳腺癌转移是大多数乳腺癌患者死于实体瘤的主要原因，有效的抑制乳腺癌细胞运动（迁移、侵袭等）对于乳腺癌治疗具有极其重要的意义。因此，为了进一步证实材料表面高电势对肿瘤细胞迁移侵袭能力的抑制作用，实验选取未极化的 KNN 作为对照组，极化后具有高表面电势的 80KNN 作为实验组，以 2 种乳腺癌细胞为研究对象进一步实验。

### 2.3.3 抑制乳腺癌细胞迁移侵袭行为分析

#### 1. 迁移抑制分析

为了进一步证明 KNN 材料表面高电势确实对乳腺癌细胞的迁移能力产生抑制，利用划痕实验通过观察在不同样品表面培养的 2 种乳腺癌细胞在迁移一定时间后的相对划痕面积，用以判断肿瘤细胞迁移速度的快慢。划痕实验结果如图 2-5 所示，其中左图为 MDA-MB-231 (2-5 (a))，右图为 MCF-7 (2-5 (b))，在乳腺癌细胞长满时采用枪头划痕后获取迁移前的划痕面积图片，此时在 KNN 与 80KNN 样品表面具有相同的划痕面积；而在细胞迁移过后，与未极化的 KNN 对照组相比，具有高电势的 80KNN 表面，2 种乳腺癌细胞虽然都有一定的迁移，但迁移的速率较慢，剩余划痕面积还很大。图 2-6 中定量统计了迁移后 2 种乳腺癌细胞在不同带电特性的 KNN 样品表面与初始值相比的相对划痕面积，结果表明对于 2 种乳腺癌细胞，迁移过后 80KNN 样品表面癌细胞的剩余划痕面积为 KNN 样品表面的 2 倍，进一步证实带有最多正电荷的 80KNN 表面会对 MCF-7 和 MDA-MB-231 乳腺癌细胞产生电刺激，抑制 2 种乳腺癌细胞的迁移行为。

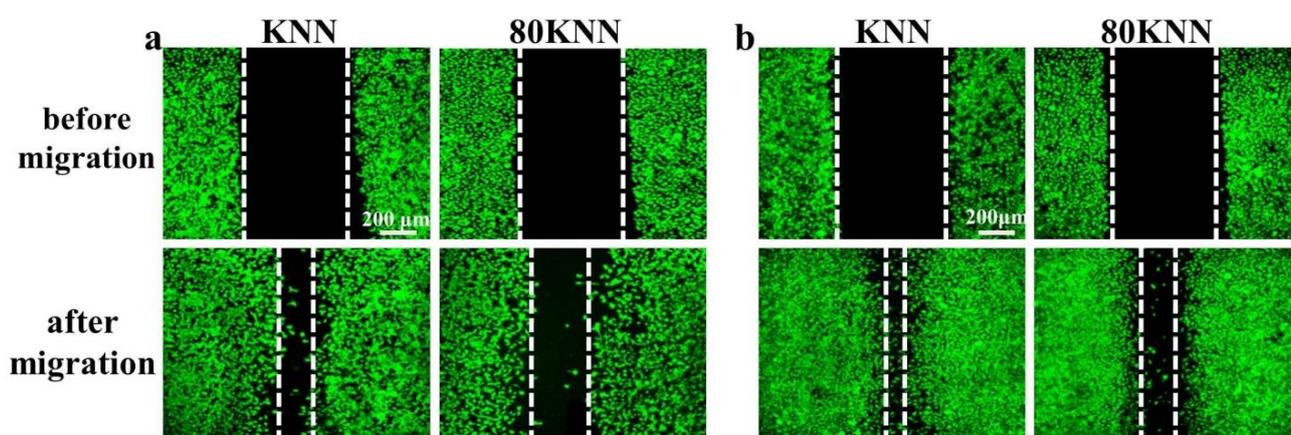


图 2-5 划痕实验对 KNN 与 80KNN 表面乳腺癌细胞迁移行为的表征。(a) MDA-MB-231 与 (b) MCF-7 细胞迁移前后的荧光图像

Figure 2-5 Characterization of breast cancer cell migration behaviors. Fluorescence images of (a) MDA-MB-231 and (b) MCF-7 cells before and after migration

Transwell 迁移实验通过观察过膜细胞数量来判断 2 种乳腺癌细胞迁移速率的快慢，迁移速度快的组会有更多的癌细胞迁移至 transwell 小室下层膜，实验结果如图 2-7 所示。图 2-7 (a) 中显示带有最多正电荷的 80KNN 表面会对乳腺癌细胞产生电刺激，对细胞的迁移产生抑制，所以迁移至 transwell 小室下层膜中细胞的数量更少。对照组及实验组

中迁移细胞数量统计结果在图 2-7 (b) 中显示。对于具有不同转移能力的 2 种乳腺癌细胞，电刺激对于其迁移行为的影响效果一致，高表面电势组细胞迁移能力被显著抑制，过膜细胞数量显著减少。

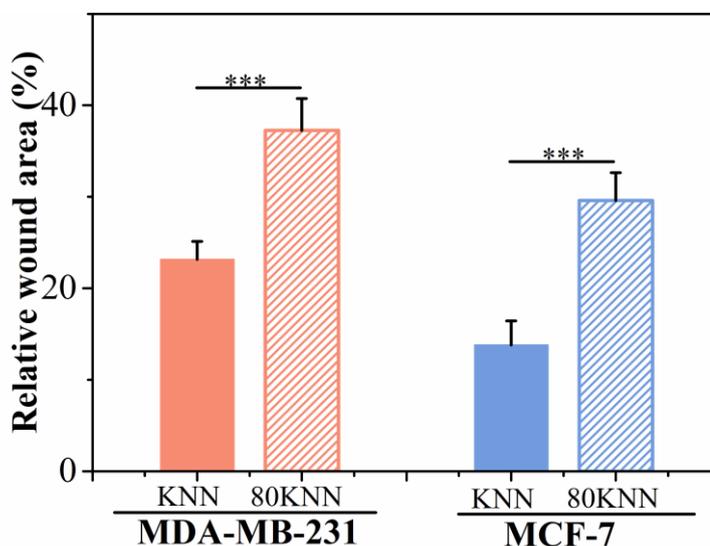


图 2-6 乳腺癌细胞 MDA-MB-231 与 MCF-7 培养在 KNN, 80KNN 表面，待细胞迁移完毕后相对划痕面积的定量统计

Figure 2-6 The relative wound area of MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells cultured on KNN, 80KNN sample surfaces after migrating

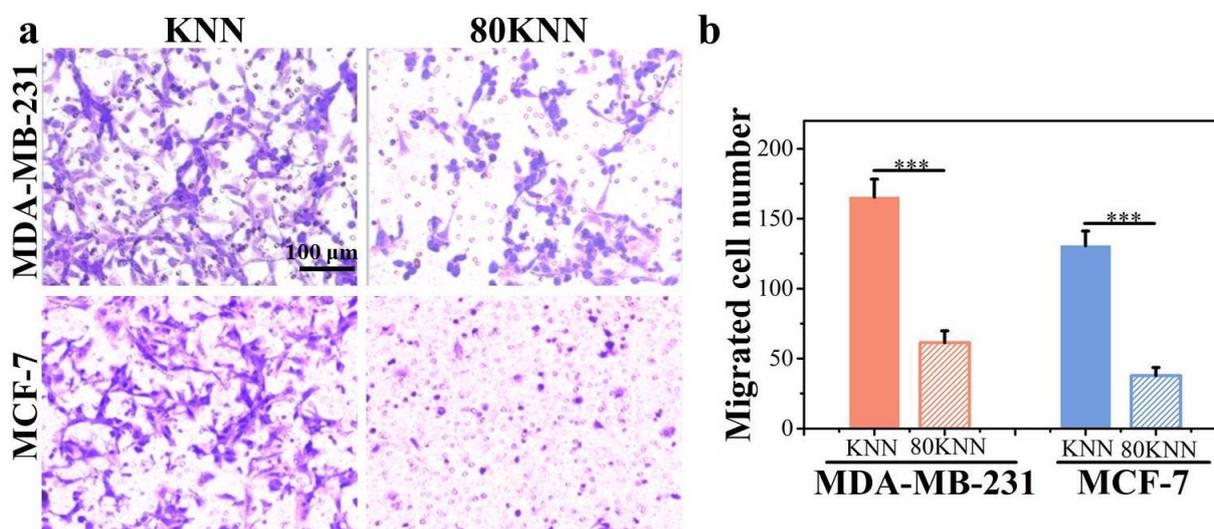


图 2-7 Transwell 实验测定 2 种乳腺癌细胞迁移速率。(a) 迁移细胞的图片，MDA-MB-231 (上) 与 MCF-7 (下)，(b) 2 种乳腺癌细胞迁移数量的定量统计

Figure 2-7 Transwell assay to test migrated cancer cells. (a) Images of MDA-MB-231 (above) and MCF-7 (below), (b) quantitative analyses of migrated breast cancer cells

## 2. 侵袭抑制分析

采用 transwell 侵袭实验对 KNN 材料表面带电特性对肿瘤细胞转移的另一重要阶段—侵袭行为进行研究, 实验结果如图 2-8 所示。与迁移实验结果一致, 带有最多正电荷的高表面电势 80KNN 组侵袭至 transwell 小室下层膜中细胞的数量比未极化 KNN 组中少。每一组随机选取 4 个区域对侵袭至下层膜中的细胞进行拍照并对细胞数量进行统计, 定量结果如图 2-8 (b) 所示, 对于 2 种乳腺癌细胞 MDA-MB-231 与 MCF-7, 80KNN 组中侵袭的细胞数量更少, 说明 80KNN 抑制了 2 种乳腺癌细胞的侵袭行为。

通过划痕实验和 transwell 迁移侵袭实验均再次证明对于乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 MCF-7, 极化后具有高表面电势的 80KNN 会对其迁移侵袭行为产生抑制。由 2.3.1 所述可知, 对照组 KNN 与实验组 80KNN 材料表面的形貌、成分、化学结构均相同, 但材料表面的电学性质存在差异, 由此可以说明材料具有更高表面电势时可以抑制乳腺癌细胞的迁移侵袭行为。此研究结果与用于肿瘤治疗的电场对恶性胶质瘤、骨肉瘤、结肠癌等迁移侵袭转移行为的抑制作用结论相一致, 表明材料表面产生的电刺激对肿瘤细胞转移行为可产生与传统的电场治疗相类似的抑制作用<sup>[68, 71, 72, 113, 114]</sup>。

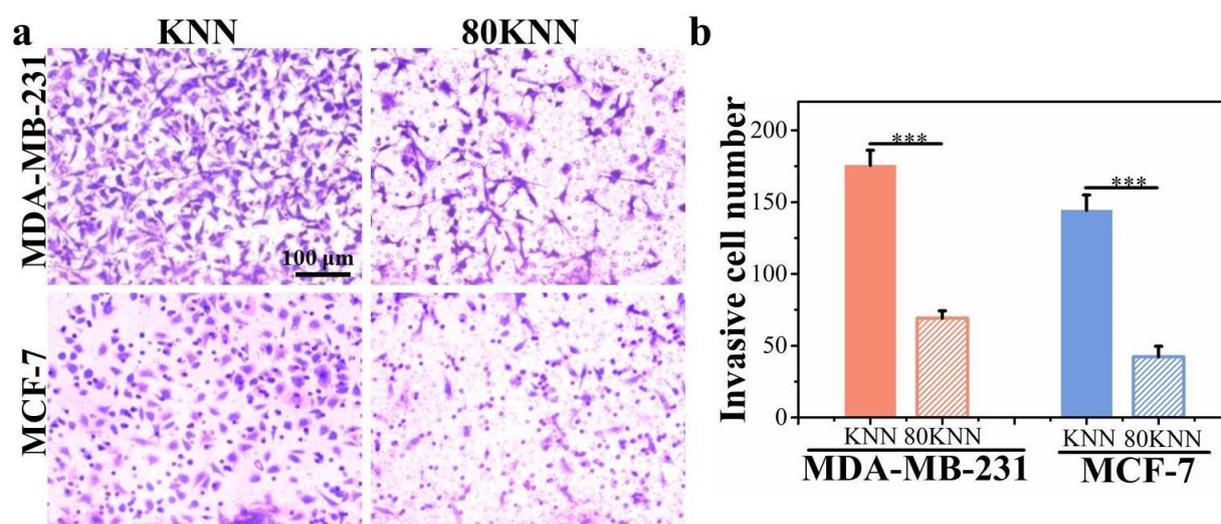


图 2-8 Transwell 实验测定 2 种乳腺癌细胞侵袭速率。(a) 侵袭细胞的图片, MDA-MB-231 (上) 与 MCF-7 (下), (b) 2 种乳腺癌细胞侵袭数量的定量统计

Figure 2-8 Transwell assay to test invasive cancer cells. (a) Images of MDA-MB-231 (above) and MCF-7 (below), (b) quantitative analyses of invasive cancer cells

## 3. 对正常乳腺上皮细胞迁移行为研究

在 2.3.2 中对细胞的初始黏附速率与增殖实验发现, 与未极化的 KNN 相比, 80KNN 样品会显著的对 2 种乳腺癌细胞进行抑制, 但是对正常乳腺上皮细胞具有略微促进的趋

势，但没有统计学差异。由于采用生物材料植入提供电刺激用于肿瘤治疗，将会对周围的正常乳腺上皮细胞产生影响，因此，采用 transwell 迁移实验进一步评估这种带电差异对正常乳腺细胞迁移行为的影响。图 2-9 (a) 中显示迁移的细胞图片，极化后具有高表面电势的 80KNN 组与未极化的 KNN 组相比，迁移细胞的数量没有明显的差异。对迁移细胞进行定量统计并进行统计学分析，同样表明两者之间没有统计学差异。

上述实验结果说明极化后具有更高表面电势的 KNN 材料与细胞培养时产生的电刺激虽然会对乳腺癌细胞的迁移侵袭能力产生明显的抑制，但对正常的乳腺细胞基本没有作用。这种差异的产生可能与正常细胞与癌细胞的带电特性与生物学性能差异相关，先前就有研究表明癌细胞具有高浓度的负电荷而正常细胞保持电中性或是带有稍许的正电荷；而细胞癌变的过程中生物分子的表达更是发生了很大的变化；此外肿瘤细胞与正常细胞增殖特性、形态特点等细胞行为也存在极大的差异<sup>[115-118]</sup>。

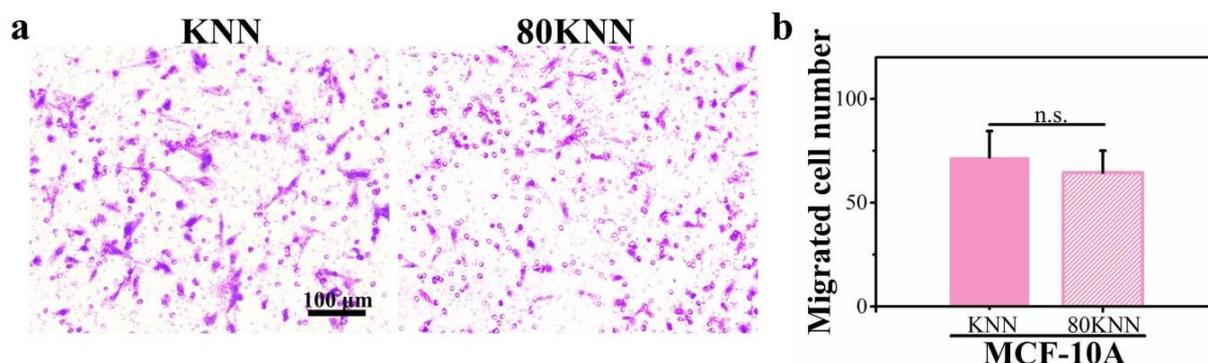


图 2-9 Transwell 实验测定人正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 迁移速率。(a) 迁移细胞的图片，(b) 迁移细胞数量的定量统计

Figure 2-9 Transwell assay to determine migrated normal epithelial breast cells MCF-10A.

(a) Images of the migrated cells, (b) quantitative analyses of migrated cells

### 2.3.4 骨架系统影响分析

#### 1. 微丝骨架和黏着斑 (FA) 分析

细胞骨架结构和黏附成分是细胞感知外界刺激并作出响应的主要成分，也是细胞运动的主要参与者<sup>[119, 120]</sup>。上述实验证明 80KNN 样品可以对乳腺癌细胞的运动能力产生抑制，为了进一步表面这种抑制作用产生的原因，对细胞的骨架和 FA 进行染色分析，评估 KNN 材料表面对 2 种乳腺癌细胞的电刺激是否会引起细胞骨架及黏附结构的变化。实验通过免疫荧光对 2 种乳腺癌细胞的黏着斑蛋白染色，并用细胞微丝骨架荧光染料 F-actin 和核染色试剂 DAPI 进行复染，染色结果如图 2-10 (a, b) 所示。80KNN 组乳

腺癌细胞呈现大的，圆形的扁平状细胞结构，细胞正常的骨架结构遭到了一定的破坏，在细胞的边缘具有比较密集的网络状结构，促进细胞迁移的一种标志物—板状伪足在 80KNN 组具有明显的降低。运动的细胞具有明显的细胞前后极性，实验将细胞核与细胞体积中心的距离定义为细胞的极性进行定量统计，结果表明 80KNN 组细胞极性具有明显的降低（图 2-10（c））。染色图片显示相较于对照组 KNN，80KNN 组黏着斑蛋白的荧光强度具有明显的增强。对黏着斑蛋白的相对荧光强度与黏着斑蛋白与乳腺癌细胞面积比值进行定量统计，结果表明具有更高表面电势的 80KNN 组，细胞 FA 的荧光强度具有明显的增强，FA 与细胞的相对面积也更大，FA 基本占据了整个细胞，表明 80KNN 组细胞与基底具有很强的黏附作用（图 2-10（d, e））。与 80KNN 表面 2 种乳腺癌细胞的迁移侵袭抑制行为一致，80KNN 表面高电势对 2 种乳腺癌细胞的黏附行为及骨架结构破坏的作用效果也一致，说明 2 种转移能力不同的乳腺癌细胞对材料表面的高电势具有相一致的响应。在实验的最开始，发现 80KNN 组表面乳腺癌细胞的初始黏附速率被抑制，但此处证明对癌细胞黏附力的大小却具有增强的作用。以往的研究表明黏附力太大与太小都不易于细胞的运动；黏附力太强，细胞的尾端难以与基底脱黏附从而抑制细胞移动；黏附力太弱，细胞与基底难以形成连接从而产生足够的运动牵引力。在一个施加外部电刺激的类似研究中，肿瘤细胞在电刺激的作用下细胞面积收缩，存活率降低，骨架结构遭到破坏，但电刺激会促进 FA 的聚集并增强与基底脱黏附的力<sup>[121]</sup>。在本研究中，80KNN 组表面高电势对肿瘤细胞产生电刺激致使肿瘤细胞的骨架结构受到破坏，并与基底形成极强的黏附而造成运动能力的降低；在对照的 KNN 组，由于细胞骨架具有完整的结构与很好的极性，它们运动能力较强，FA 则处于动态的变化，致使细胞与基底的黏附没有 80KNN 组中强。Fuhrmann 等人也对具有同样转移能力的乳腺癌细胞进行研究，发现当细胞具有很强的黏附行为时，细胞也呈现出更差的迁移能力<sup>[122]</sup>。

## 2. 微管荧光染色分析

微管也是细胞骨架系统的一部分，可以产生细胞运动的动力并与细胞的微丝骨架、黏附、极性结构相联系从而控制细胞的运动<sup>[36, 37, 123-125]</sup>。利用微管荧光蛋白可以对肿瘤细胞的微管进行染色并对相对荧光强度进行定量。由图 2-11 可知，在对照组 KNN 表面，2 种乳腺癌细胞的微管结构均匀分布在细胞核周围的细胞质中，细胞质骨架呈现明显的微管蛋白网状结构。具有高表面电势的 80KNN 样片表面细胞的微管结构遭到破坏，微管的聚集状态发生改变，肿瘤细胞的微管紧密的结合在细胞核的周围。对 2 种乳腺癌细胞的微管荧光强度定量结果表明，在 KNN 表面的癌细胞呈现更强的荧光强度。先前有

研究表明肿瘤治疗电场对癌细胞迁移能力的抑制也是通过对微管结构的影响；此外，微管结构的破坏也是化疗药物用于抑制癌细胞运动的机制<sup>[66, 126]</sup>。本文研究同样表明高表面电势的 80KNN 样品对 2 种乳腺癌细胞迁移侵袭能力的抑制是通过对微管结构的破坏。

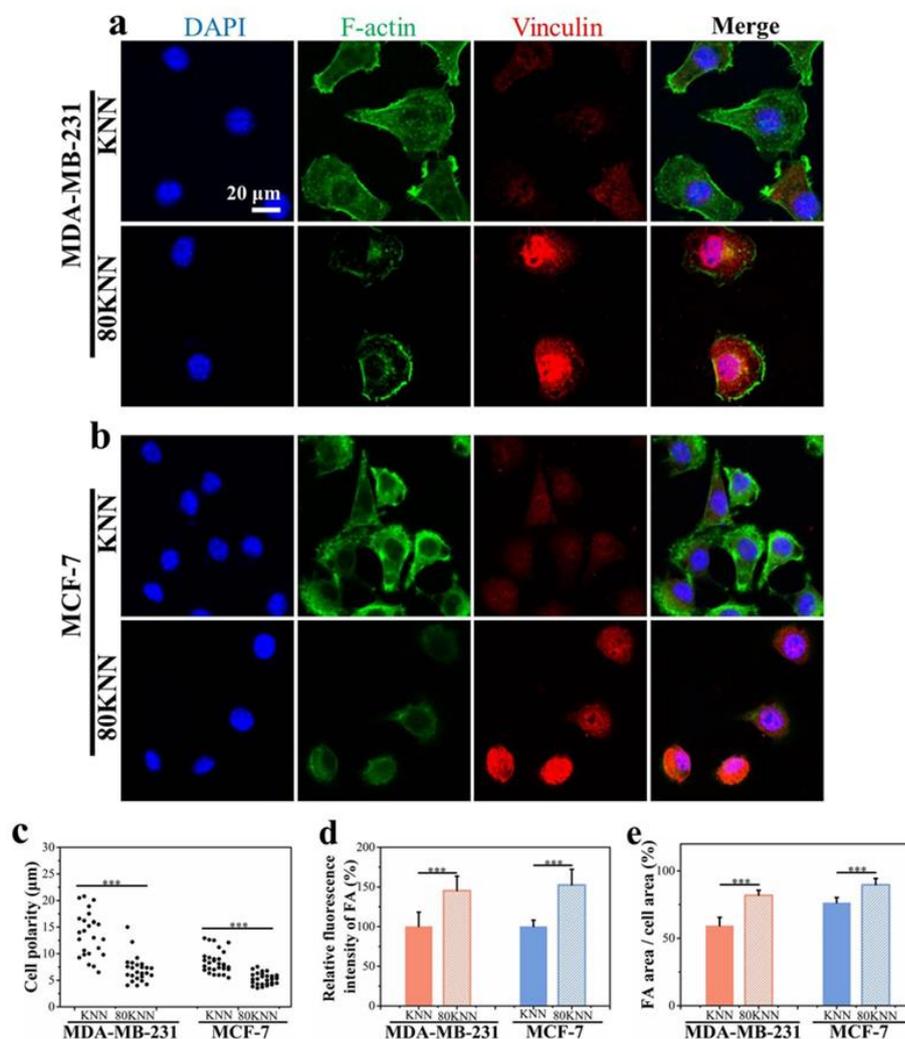


图 2-10 人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 与 MCF-7 在 KNN, 80KNN 表面培养 24 h 后细胞骨架与黏着斑结构。(a) MDA-MB-231, (b) MCF-7 细胞的荧光染色图；蓝色，DAPI 染的核；绿色，F-actin 染的微丝骨架；红色，黏着斑蛋白 vinculin。c-e, 荧光染色的定量分析，(c) 细胞极性分析，(d) 黏着斑的相对荧光强度，(e) 黏着斑面积与细胞面积的比值

Figure 2-10 The cytoskeletal and FA structures of breast cancer cells MDA-MB-231 and MCF-7 incubated on the surfaces of KNN, 80KNN samples for 24 h. The fluorescence images of (a) MDA-MB-231, (b) MCF-7; Blue, DAPI-stained nuclei; Green, F-actin; Red, vinculin. c-e, Quantitative data of fluorescence images, (c) analysis of cell polarity, (d) analysis of the relative fluorescence intensity of FA, (e) the ratio of FA area to cell area

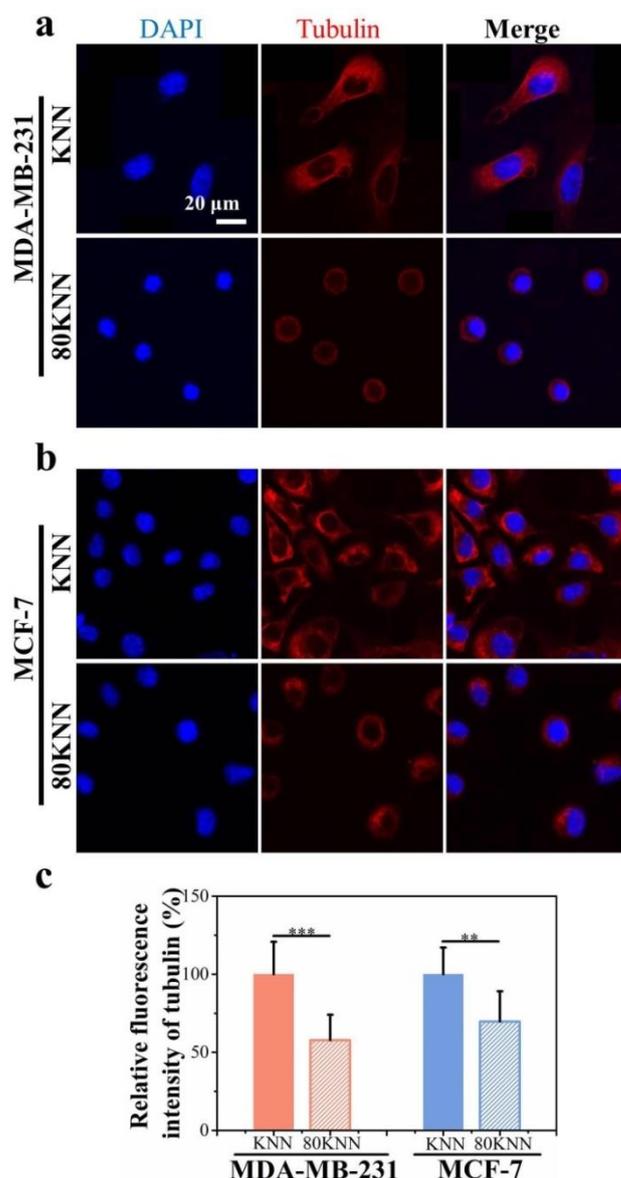


图 2-11 人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 与 MCF-7 在 KNN, 80KNN 表面培养 24 h 后微管染色图。(a) MDA-MB-231, (b) MCF-7 细胞的微管荧光染色图; 蓝色, DAPI 染的核; 红色, 微管蛋白 Tubulin。(c) 2 种乳腺癌细胞微管的相对荧光强度

Figure 2-11 The microtubule of human breast cancer cells MDA-MB-231 and MCF-7 incubated on the surfaces of KNN, 80KNN samples for 24 h. The fluorescence images of (a) MDA-MB-231, (b) MCF-7; Blue, DAPI-stained nuclei; Red, Tubulin.

(c) Quantitative data of fluorescence images

通过此处的研究我们发现, 在具有高表面电势与更多正电荷量的 80KNN 样品表面培养的 2 种乳腺癌细胞, 骨架结构遭到了破坏, 板状伪足形成受到抑制, 形成圆的、扁平的细胞结构, 细胞极性降低, 微管的表达及聚集状态遭到了破坏, 但肿瘤细胞与基底的黏附作用增强。这可能是导致乳腺癌细胞迁移侵袭能力降低的原因。MDA-MB-231

与 MCF-7 乳腺癌细胞的运动能力存在差异,但 80KNN 表面的电刺激能够对其产生同样的骨架破坏和黏附行为改变的作用效果。

### 2.3.5 基因表达分析

荧光染色实验表明极化 KNN 表面电刺激对乳腺癌细胞的骨架结构和黏附行为产生了明显的影响,所以采用 PCR 实验进一步验证 80KNN 对骨架结构的破坏及黏附行为的影响。在 1.2.2 中对骨架调控相关研究表明, Rho GTP 酶家族可以影响细胞的极性,骨架的重构、黏附等,是细胞运动的主要调控者,其中 RhoA、ROCK1/2、Rac1 在肿瘤恶性转化、转移增强的过程中都有一定量的高表达;同样的,对其表达的抑制或是活性的降低,都伴随着肿瘤细胞运动能力的降低。在此研究中将 MDA-MB-231 与 MCF-7 细胞在 KNN 与 80KNN 样品表面培养 24 h 后对这些基因的表达进行测定,实验结果如图 2-12 (a-d) 中所示。与未极化 KNN 相比,在 80KNN 样品表面培养的乳腺癌细胞这 4 种基因表达都受到明显的抑制。并且 80KNN 表面培养的 MDA-MB-231 细胞, RhoA、ROCK1/2 这 3 种基因的抑制效果高于 MCF-7 细胞, Rac1 基因的抑制水平与 MCF-7 细胞相当,说明 80KNN 表面高电势产生的电刺激对 MDA-MB-231 细胞的 RhoA 及其下游信号通路产生的影响强于 MCF-7,表明电刺激对 2 种乳腺癌细胞的运动能力虽然都能产生类似的抑制作用,但由于细胞的异质性,其抑制的作用机制会有所不同。

FAK 调控 FA 的动态变化,还能影响细胞骨架重构与基质金属蛋白酶的表达,对肿瘤向恶性进展具有促进作用。FAK 抑制剂已经成为抑制肿瘤转移、提高乳腺癌疗效的有效方法<sup>[127-129]</sup>。图 2-12 (e) 中表明, FAK 在 2 种乳腺癌细胞中都具有相当水平的抑制,该结论也与上述 FA 染色结果相一致。在 80KNN 表面的乳腺癌细胞 FAK 表达减少,使得肿瘤细胞与基底紧密连接,形成的 FA 结构稳定存在,细胞难以脱黏附从而抑制其运动。整合蛋白 (Integrins) 能够感知外界物理刺激的变化,它介导的黏附可以调节微管结构的稳定性、影响细胞骨架并促进一系列信号的激活,包括 FAK<sup>[130]</sup>。研究表明  $\beta 1$ -integrin 表达的改变会对增殖、迁移行为产生影响,并影响下游 FAK-Src 相关信号的表达,该蛋白通常在癌细胞中高表达并与乳腺癌细胞的转移相联系<sup>[131, 132]</sup>。图 2-12 (f) 表明,具有高表面电势的 80KNN 样品抑制了乳腺癌细胞  $\beta 1$ -integrin 基因的表达,并且 MCF-7 细胞的抑制效果更明显。

通过 PCR 实验发现,与 2 种乳腺癌细胞的骨架系统及黏附染色结果相一致,与对照组 KNN 相比,具有高表面电势的 80KNN 对细胞骨架及黏附相关的促转移基因表达

都具有明显的抑制，但在 MDA-MB-231 与 MCF-7 乳腺癌细胞中不同基因表达的差异存在不同，说明不同类型肿瘤细胞之间存在异质性，导致造成迁移侵袭抑制效果的原因存在差异性；但又同时作为肿瘤细胞区别于正常细胞，对于 80KNN 表面产生的电刺激又能够作出同样的响应。

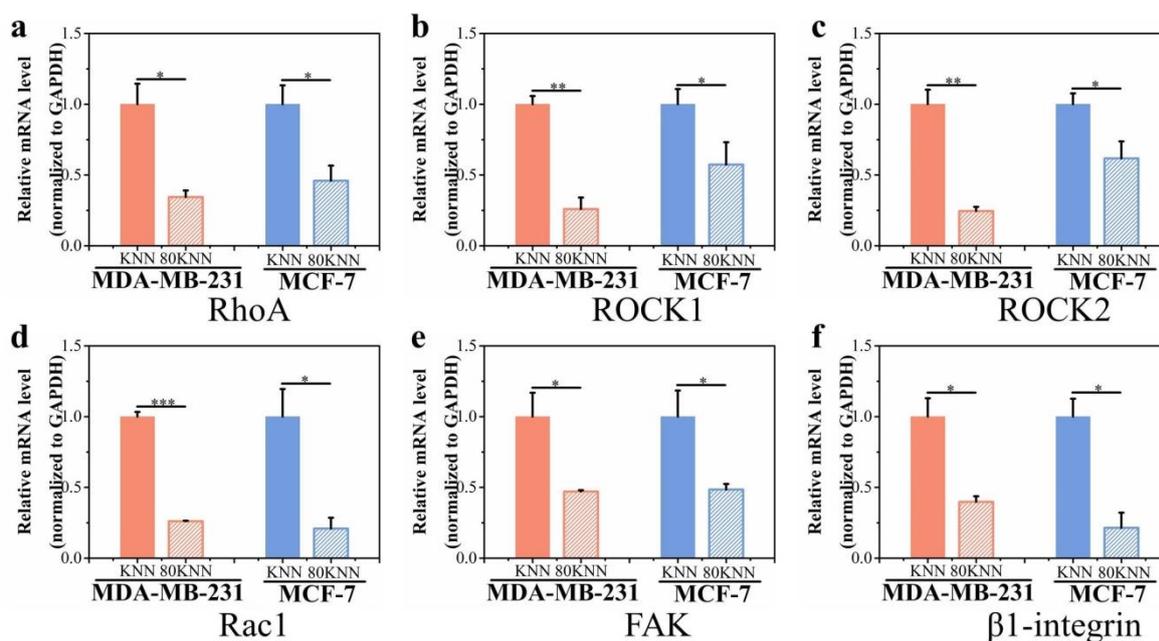


图 2-12 人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 与 MCF-7 在 KNN, 80KNN 样品表面培养 24 h 后与细胞黏附和骨架相联系的促转移基因的表达。(a) RhoA, (b) ROCK1, (c) ROCK2, (d) Rac1, (e) FAK, (f)  $\beta$ 1-integrin

Figure 2-12 The mRNA expression of adhesion- and cytoskeleton- related pro-metastatic genes of MDA-MB-231 and MCF-7 incubated on the surfaces of KNN, 80KNN samples for 24 h. (a) RhoA, (b) ROCK1, (c) ROCK2, (d) Rac1, (e) FAK, (f)  $\beta$ 1-integrin

## 2.4 小结

本章实验利用传统固相法成功制备了具有良好压电性能的 KNN 块体陶瓷，通过调整极化参数获取了具有不同压电常数和表面电势，但具有相似表面形貌、成分及结构的 KNN 样品，并以此作为研究材料表面带电差异对细胞运动行为影响的模型。通过将不同表面电势的 KNN 样品与 2 种乳腺癌和 4 种正常细胞共培养，发现具有高表面电势的 80KNN 样品会显著的抑制乳腺癌细胞的运动潜能，降低存活率，但对正常细胞会产生相反的作用，具有轻微的促进趋势。由于乳腺癌转移是大多数乳腺癌患者死于实体瘤的主要原因，有效的抑制乳腺癌细胞的运动（迁移、侵袭）具有重要的意义。因此，实验

采用 80KNN 作为实验组, KNN 作为对照组, 采用 transwell 实验和划痕实验进一步证实了具有高表面电势的 80KNN 产生的电信号对 2 种乳腺癌细胞迁移侵袭行为的抑制作用。通过荧光染色, 发现 80KNN 样品组会破坏癌细胞的骨架结构及极性的形成, 抑制微管结构及聚集状态, 增强与基底的黏附。通过 PCR 实验测定与这些行为紧密相连的促转移基因的表达, 同样发现与未极化 KNN 样品相比, 80KNN 表面乳腺癌细胞促转移基因的表达会受到抑制。2 种乳腺癌细胞对于 80KNN 表面产生的电刺激能够作出同样的响应, 但异质性的存在, 导致造成迁移侵袭抑制效果的原因存在差异, 不同基因的抑制效果存在差异。实验证明了调控材料表面带电性质, 产生稳定的电刺激用于控制肿瘤转移的可行性。

## 第三章 超声辅助铌酸钾钠压电纳米颗粒抑制乳腺癌细胞活性及机制研究

### 3.1 引言

乳腺癌现已成为全球发病率最高的癌症，也是女性癌症患者死亡最常见的原因<sup>[1]</sup>。临床会根据乳腺癌患者的分期选取不同的治疗方案，传统的手段对于早期乳腺癌患者具有比较好的治疗效果，但也存在许多弊端。手术治疗容易造成二次损伤及感染，其中乳房切除术则会对患者的后续生活带来其他心理生理影响<sup>[9]</sup>。放疗则会对其他正常部位如心脏产生影响<sup>[8]</sup>。化疗容易引发多药抗性及很强的副作用，且难以控制肿瘤的复发和转移<sup>[11]</sup>。而在实际生活中，癌症早期几乎无症状，确诊的乳腺癌患者大多已是中晚期，对这些治疗手段大都存在抗性。因此，乳腺癌的治疗方式仍需要不断的探索。

近年来，声、光、电、热、磁等物理作用方式也被用于肿瘤治疗<sup>[18, 19]</sup>。随着人体生物电的发现，利用电刺激抗肿瘤得到了较为广泛的应用。通过电刺激会导致肿瘤细胞代谢紊乱、细胞结构破坏等影响肿瘤细胞的活性。但传统的电刺激由于具有侵入性或是有效性较差的问题而应用受到限制。压电纳米粒子由于较小的粒径及较大的比表面积，在肿瘤治疗中被广泛应用于基因治疗、化疗等辅助手段<sup>[79-81]</sup>。近年来，随着对新型电刺激的探索，压电纳米粒子由于可以提供无线、可调控的电刺激而受到关注<sup>[133]</sup>。

在上一章节中发现 KNN 陶瓷的极化会促进其压电性能，增强对肿瘤细胞的电刺激。因此，本章提出利用极化 KNN (P-KNN) 压电纳米颗粒与乳腺癌细胞共培养来用于乳腺癌治疗。同时，KNN 压电颗粒由于具有力电耦合的性能，可以响应外界的机械力促进电信号的产生。超声由于作用可控、组织穿透力深并且对正常组织安全，被用作机械力的施加手段来辅助 P-KNN 颗粒实现对乳腺癌的治疗。此外，研究表明压电纳米粒子是超声敏化剂的新来源，超声作用下压电材料产生的内建电场可以触发超声催化作用<sup>[87]</sup>。采用超声辅助 P-KNN 压电纳米颗粒作用于具有高侵袭性的三阴性乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 与低转移性、非三阴性细胞株 MCF-7，实现高强度的无源、可控电刺激与压电催化共同作用抑制癌细胞活性。通过破坏乳腺癌细胞内氧化还原平衡和细胞的形态结构，促进过量 ROS 的产生以及乳腺癌细胞的凋亡与坏死，可以达到很好的抑制乳腺癌细胞活性的目的。

## 3.2 材料与实验方法

### 3.2.1 主要实验试剂

本章所使用的部分实验试剂如表 3-1 所示，其余如 2.2.1 章节中的表 2-1 所示。

表 3-1 主要实验试剂

Table 3-1 List of experiment materials and reagents

试剂	规格	厂商
细胞凋亡与坏死检测试剂盒	--	碧云天生物科技公司
活性氧检测试剂盒	--	南京凯基生物科技有限公司

### 3.2.2 主要实验仪器

本章所使用的部分实验仪器如表 3-2 所示，其余如 2.2.2 章节中的表 2-2 所示。

表 3-2 主要实验仪器

Table 3-2 List of experimental apparatuses

实验仪器	型号	制造商
颗粒极化模具	--	自制
动态光散射仪	Szetasizer Nano ZS	英国 Malvern 公司
超声波治疗仪	HB810A	好博医疗器械

### 3.2.3 铌酸钾钠压电颗粒的制备

本章通过传统的固相烧结法制备出 KNN 纳米颗粒后，通过水热处理得到实验中使用的材料，具体的实验操作步骤如下：

1. 初步制得 KNN 颗粒的步骤参照 2.2.3 章节中步骤 1-3 所示；
2. 称取 0.02 mol 初步制得的 KNN 颗粒，加入 50 mL 去离子水并搅拌 30 min，转移至 100 mL 聚四氟乙烯密封的高压反应釜中，于 210 °C 下反应 24 h；
3. 取出反应釜充分冷却后取出管内的混合物；
4. 静置 12 h 后倒掉上层的水溶液；将下层混合液添加到 50 mL 离心管中，密封好后在 9000 r/min 的转速下离心 5 min；
5. 将上清液倒掉后加入 30 mL 的无水乙醇，将密封好的离心管放入超声清洗机中

分散 5 min, 随后将其放入离心机中以同样的条件再次离心。离心结束后倒掉上层无水乙醇后依次加入去离子水、无水乙醇进行同样的操作;

6. 将最终使用无水乙醇离心后所得样品放入 80 °C烘箱烘干即为水热处理的 KNN 陶瓷颗粒;

7. 将 KNN 颗粒放入自制的模具中对其进行极化处理。120 °C下, 在外加直流电压强度为 2.5 kV/cm 的条件下极化 30 min 得到实验中所使用的极化 KNN 颗粒 (P-KNN)。

### 3.2.4 样品理化性能表征

1. 使用扫描电子显微镜 (SEM) 观察 P-KNN 颗粒表面形貌, 观察所用颗粒制备过程如下: 称取 5 mg P-KNN 颗粒添加到 5mL 无水乙醇, 超声分散 10 min 得到 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 P-KNN 悬液; 吸取分散混匀的 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的颗粒悬液 1 mL 至 9 mL 的无水乙醇中, 超声分散 10 min 得到 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的颗粒悬液; 分别将这两种超声分散混匀的悬液用 200  $\mu\text{L}$  的枪添加至已粘贴在样品台上的导电胶, 在空气中放置至无水乙醇全部挥发后进行喷金处理, 喷金时间为 60 s。观察样品时采用的加速电压为 10 kV, 工作距离为 8 mm。采用扫描电子显微镜配套的能谱仪 (EDS) 对样品进行元素分析, 此时采用的加速电压为 20 kV, 工作距离为 12 mm。

2. 采用动态光散射仪 (DLS) 对 P-KNN 颗粒的粒径进行分析。测试过程中采用超纯水按上述步骤稀释制定浓度为 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  与 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的颗粒悬液。将不同浓度的颗粒悬液转移至粒度测定专用样品池后进行测定。两种浓度的样品各 2 个平行样, 每个样检测三次, 每次测定采用 10 个循环。

3. 采用 X 射线衍射分析仪 (XRD) 对颗粒进行物相分析, X 射线的衍射步长设置为 0.02°, 检测范围为 2 $\theta$ : 5-90°。

4. 利用拉曼 (Raman) 对化学结构进行分析, 分析范围为 0-900  $\text{cm}^{-1}$ 。

### 3.2.5 细胞培养及乳腺癌增殖活性检测

#### 1. 细胞培养

本章实验使用具有高侵袭性的三阴性乳腺癌细胞株 MDA-MB-231; 低转移性、非三阴性细胞株 MCF-7; 人正常的乳腺上皮细胞 MCF-10A 以及骨髓间充质干细胞 BMSC。BMSC 也是使用 DMEM (H) 完全培养基进行培养, 细胞培养的具体培养过程参考 2.2.5 中细胞培养操作。

## 2. 细胞活性检测

采用 CCK-8 实验以及细胞死活染色对细胞活性进行检测，通过活性分析评估对乳腺癌细胞活性抑制作用。将细胞接种于孔板后培养 12 h，此时细胞已完全贴于孔板，向孔板添加 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ （或是采用梯度稀释的其他浓度）的 P-KNN 颗粒（由完全培养基稀释）进行共培养。此后每隔 12 h 进行超声处理并于材料加入后 24 h, 48 h, 72 h 进行 CCK-8 检测。超声功率为 1.75  $\text{w}/\text{cm}^2$ ，超声时间为每次 2 min，每组 6 个平行。CCK-8 测定时吸出孔板中的培养基并加入 CCK-8 工作液（避光稀释，细胞培养基：CCK-8 试剂 =10:1），在 5%  $\text{CO}_2$ ，37  $^\circ\text{C}$  的恒温培养箱中避光孵育 2 h 后取出检测吸光度。细胞存活率的计算公式为：

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{OD_{\text{实验}} - OD_{\text{实验空白}}}{OD_{\text{对照}} - OD_{\text{对照空白}}} \times 100\%$$

其中， $OD_{\text{实验}}$  指实验组即具有细胞的孔板中加入 P-KNN 颗粒或是施加超声刺激组的吸光度； $OD_{\text{实验空白}}$  指加入 P-KNN 颗粒或是施加超声刺激但没有细胞的组； $OD_{\text{对照}}$  指仅加入细胞而不采取其他处理的空白对照组； $OD_{\text{对照空白}}$  指仅加入培养基的组。

材料与细胞共培养 24 h 后进行死活染色。将浓度均为 1  $\text{mg}/\text{mL}$  的钙黄绿素和碘化丙啶用 PBS 溶液稀释至 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  与 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，得到死活染色的工作液。吸弃孔板中的培养基后用 PBS 溶液清洗 2 次，加入死活染色工作液，于 5%  $\text{CO}_2$ ，37  $^\circ\text{C}$  的恒温培养箱中避光孵育 20 min。待反应结束后，吸弃染料并用 PBS 溶液清洗 2 次。将孔板置于倒置荧光显微镜下进行细胞死活染色观察，在同一位置观察发绿色荧光的活细胞与红色荧光的死细胞并进行拍照，所得同一位置的图片采用 Image J 软件进行处理，每组设置 3 个平行。

### 3.2.6 细胞骨架染色

使用细胞骨架（F-actin）和核（DAPI）染色对 P-KNN 颗粒及超声作用对细胞形态的影响进行观察。将细胞接种于激光共聚焦皿中，12 h 待细胞完全贴附后加入 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 P-KNN 颗粒进行共培养，材料加入 12 h 后进行超声处理并于 24 h 后进行染色观察。染色操作步骤如下：

- （1）采用 4% 多聚甲醛对 PBS 溶液清洗过的细胞固定 10 min；
- （2）固定结束后用 0.1% Triton X-100 PBS 溶液洗涤细胞 3 次，每次 5 min；

(3)避光将 F-actin 试剂用 3%BSA、0.1%Triton X-100 PBS 溶液稀释 100 倍后加入，在室温下避光染色 30 min；染色结束后用 PBS 溶液洗涤细胞 3 次，每次 5 min；

(4)加入 DAPI 染液对细胞核复染 3 min；最后用 PBS 溶液清洗完毕后置于激光共聚焦显微镜下进行观察并拍照，每组设置 3 个平行。

### 3.2.7 细胞迁移及侵袭检测

采用 transwell 实验来测定细胞运动能力的改变。在 24 孔板中加入对应组的溶液 (DMEM (H) 完全培养基；400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 P-KNN 颗粒) 600 mL，将细胞接种于 transwell 小室上层并放置在 24 孔板中；2 h 后对超声组进行超声处理，12 h 后进行迁移侵袭细胞观察。在 transwell 侵袭实验进行之前，将解冻的 matrigel 基底胶用不含血清的 DMEM (H) 培养基以 matrigel:DMEM (H)=1:3 的比例稀释，在 transwell 上室中每孔加入 60  $\mu\text{L}$ ，随后置于 37  $^{\circ}\text{C}$  放置 1 h 用于成胶，成胶后取出将 transwell 小室上层液态培养基丢弃。待细胞迁移侵袭完毕后，将 transwell 小室取出，PBS 溶液清洗 2 次后加入 600  $\mu\text{L}$  4% 多聚甲醛固定 10 min；固定结束后用 PBS 溶液清洗 2 次，采用结晶紫试剂对固定好的细胞染色 20 min；染色结束后采用 PBS 溶液清洗并用棉棒擦掉 transwell 小室内侧细胞。通过倒置荧光显微镜明场对 transwell 小室过膜细胞进行观察、拍照、计数，每组设置 3 个平行。

### 3.2.8 活性氧 (ROS) 检测

使用 ROS 检测试剂盒对孔板中乳腺癌细胞的 ROS 水平进行测定。将 2 种乳腺癌细胞接种于孔板中，12 h 待细胞完全贴附于孔板后加入 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 P-KNN 颗粒进行共培养；6 h 后将培养基吸出，PBS 溶液对孔板清洗 2 遍，对肿瘤细胞装载使用不含血清的 DMEM (H) 基础培养基稀释 1000 倍的 DCFH-DA 探针；在 37  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 30 min，随后使用不含血清的 DMEM (H) 基础培养基清洗孔板 2 次并在细胞中加入 200  $\mu\text{L}$  的基础培养基；对超声组进行处理后将孔板放入多功能酶标仪，以 488 nm 作为激发光波长，525 nm 作为发射光波长检测荧光强度。

### 3.2.9 细胞凋亡与坏死检测

使用细胞凋亡与坏死检测试剂盒对孔板中乳腺癌细胞凋亡与坏死行为进行检测。将浓度均为 1  $\text{mg}/\text{mL}$  的 Hoechst 33342 和碘化丙啶用配套的凋亡检测稀释液稀释至 5

$\mu\text{g/mL}$ , 得到细胞凋亡与坏死检测试剂的工作液; 在材料加入 24 h 后吸弃孔板中培养基, 利用 PBS 溶液清洗 2 次后加入细胞凋亡与坏死检测试剂的工作液, 在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  避光孵育 30 min。染色完成后用 PBS 溶液清洗 2 次, 随后将孔板置于倒置荧光显微镜下观察细胞凋亡与坏死, 在同一位置观察发蓝色荧光的活细胞与早期凋亡细胞, 红色荧光的晚期凋亡细胞与死细胞并进行拍照, 所得同一位置的图片采用 Image J 软件进行处理, 每组设置 3 个平行。

### 3.2.10 生物相容性检测

使用 CCK-8 试剂及细胞死活染色对人正常乳腺细胞 MCF-10A 与 P-KNN 颗粒共培养 48 h 后进行生物相容性检测。具体操作步骤如 3.2.5 测定细胞活性所描述。

### 3.2.11 统计学分析

实验中所有数据均以均值  $\pm$  标准差来表示, 实验中独立样本间的显著性差异采用双尾 t 检验,  $P < 0.05$  表示存在统计学差异, \*表示;  $P < 0.01$  表示存在显著的统计学差异, \*\*表示;  $P < 0.001$  表示存在极其显著的统计学差异, 符号为\*\*\*。

## 3.3 结果与讨论

### 3.3.1 铌酸钾钠颗粒理化性能表征

在第二章节中发现, 极化能使材料表面电势增高, 压电性能增强, 在先前相关研究中也证实了极化的压电颗粒具有更强的电信号输出性能<sup>[81]</sup>。因此, 在本章实验中选用 P-KNN 压电颗粒作为研究对象。利用传统固相法制备并用水热处理的 KNN 颗粒采用外加直流电压极化得到具有压电性的 P-KNN 颗粒。能谱分析表明制备的样品主要成分为 O、Na、Nb、K 元素 (图 3-1 (a))。利用拉曼分析颗粒的化学结构, 在  $265\text{ cm}^{-1}$  及  $621\text{ cm}^{-1}$  位置均有 KNN 特征振动峰的出现 (图 3-1 (b))。通过 XRD 分析 P-KNN 颗粒的晶体结构, 如图 3-1 (c) 所示, 制得的样品为  $\text{ABO}_3$  型钙钛矿结构, 在  $45$  度角附近出现 (002) 与 (200) 双峰, 表明四方相与正交相同时存在, 制备的颗粒具有良好的压电性。

分别利用 SEM、DLS 对颗粒的形貌以及粒径大小进行分析。从图 3-2 可以发现, P-KNN 呈现颗粒状, 具有较好的分散性, 不同颗粒大小较为均一。通过粒径分析表明 P-KNN 颗粒大小在  $457.4\text{ nm}$  左右, 分布系数 (PDI) 为 0.422 (结果中未显示), 表明制

得的样品粒径分布较窄，具有良好的分散性，并且粒径的大小与 SEM 图中呈现的大小较为一致。

根据上述结果表明通过固相法制备并用水热、极化处理制得的样品为具有良好压电特性的 P-KNN 陶瓷颗粒，且其粒径大小为微纳米级、分散性良好。由于 P-KNN 颗粒本身具有带电性，与肿瘤细胞共培养时可以产生电刺激的作用，并且由于压电特性的存在能够响应超声的刺激促进电信号的输出<sup>[81]</sup>。

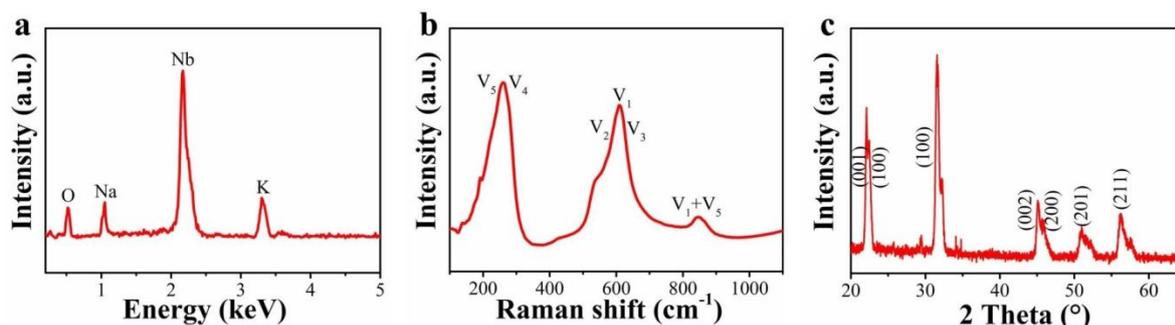


图 3-1 P-KNN 颗粒理化性能表征。(a) 能谱，(b) 拉曼图谱，(c) X 射线衍射图谱

Figure 3-1 Characterication of P-KNN nanoparticles. (a) EDS analysis, (b) Raman spectra and (c) XRD image

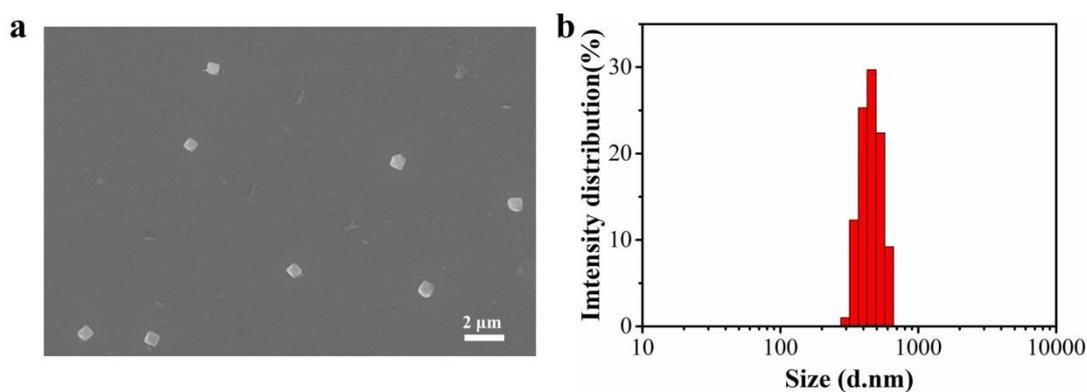


图 3-2 P-KNN 颗粒形貌和粒径表征。(a) 扫描电子显微镜图片，(b) 纳米粒度分析

Figure 3-2 Characterization of morphology and size distribution of P-KNN nanoparticles.

(a) SEM image and (b) DLS analysis

### 3.3.2 抑制乳腺癌细胞活性分析

为了验证超声辅助 P-KNN 压电颗粒作用于细胞时的体外毒性作用，选用 BMSC 与不同浓度的 P-KNN 共培养 48 h 后利用 CCK-8 法对细胞的存活率进行测定。从图 3-3 可以发现，随着 P-KNN 压电颗粒浓度的升高，对 BMSC 的毒性增大。当 P-KNN 浓度低

于 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，BMSC 的存活率基本能够保持在 75% 以上，毒性较小；当颗粒的浓度进一步升高到 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时，对正常细胞活性抑制作用比较明显，BMSC 的存活率低至 65%。选用该材料用作抗肿瘤，虽然更低的浓度对正常细胞毒性更小，但纳米材料在较高的浓度时才能达到抗肿瘤的效果<sup>[87, 134]</sup>。因此，为了实现抗肿瘤效果以及较小的毒副作用，实验采取 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的颗粒浓度进一步探究对乳腺癌细胞活性的作用效果。

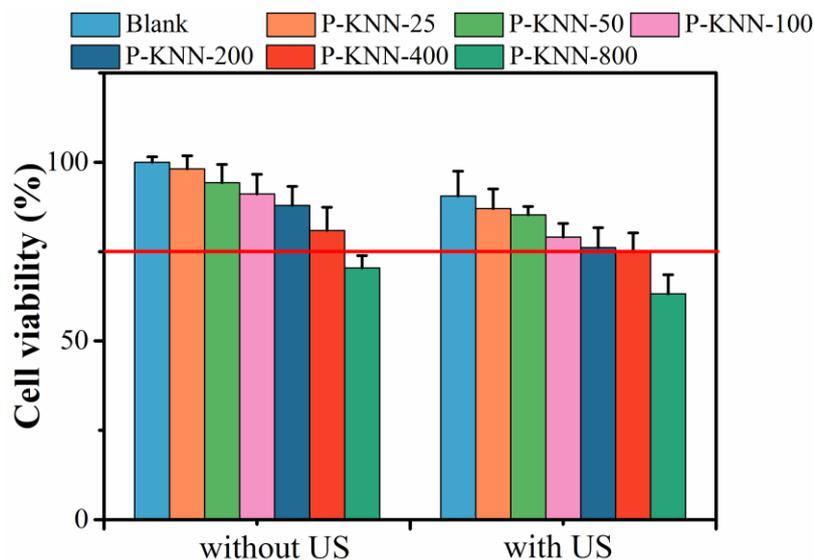


图 3-3 在超声存在或不存在条件下，不同浓度的 P-KNN 作用于 BMSC 细胞 48 h 后的细胞存活率（红色线为存活率为 75% 的线）

Figure 3-3 The BMSC cell viability co-cultured with differentiation concentrations of P-KNN nanoparticles for 48 h, with ultrasound (US) or without US (the red line as a representation of 75% cell viability)

为了探讨 P-KNN 压电纳米颗粒在超声刺激下对乳腺癌细胞的作用效果，采用细胞体外实验，通过分析超声刺激下 P-KNN 对乳腺癌细胞活力、细胞损伤坏死、骨架损伤等情况来评价该方法对乳腺癌细胞的作用效果。

在材料加入后每隔 12 h 超声一次，采用 CCK-8 实验在材料加入后 24 h，48 h，72 h 对 2 种乳腺癌细胞活性进行检测。由图 3-4 (a) 可知，没有超声作用时，400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 P-KNN 颗粒对 MDA-MB-231 的活性具有抑制的作用，且比 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时对癌细胞活性抑制效果更强，证实了高浓度的颗粒对癌细胞作用效果更强<sup>[87, 134]</sup>。超声单独作用时，MDA-MB-231 细胞的存活率低至 70% 左右；但当 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 P-KNN 颗粒在超声刺激下作用于癌细胞时，对 MDA-MB-231 细胞的活性抑制作用最强，24 h 时，MDA-MB-231 细胞的存活率下降至 30% 左右。当对 MDA-MB-231 细胞继续进行培养至 48 h，72 h 时再次测定细胞存活率，结果表明每个组的细胞活性都得到了进一步的抑制。P-KNN 颗

粒对 MCF-7 乳腺癌细胞的作用与对 MDA-MB-231 的作用效果一致，但单独加超声处理对细胞活性的抑制效果没有 MDA-MB-231 效果显著；400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 P-KNN 颗粒加超声处理时，MCF-7 细胞的活性下降没有 MDA-MB-231 明显，24 h 时 MCF-7 细胞的存活率约为 35%。CCK-8 实验表明在超声刺激下 P-KNN 颗粒可以对 2 种乳腺癌细胞产生电刺激实现抑制癌细胞活性的效果，该实验结果与先前研究超声作用于压电材料，促进纳米电场产生或是促进压电催化作用，从而抑制肿瘤增殖实验结果一致<sup>[81, 135, 136]</sup>。此外，乳腺癌细胞的活性抑制效果在颗粒浓度为 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时更强，因此，本研究采用 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 P-KNN 颗粒进一步研究对 MDA-MB-231 和 MCF-7 乳腺癌细胞的作用效果。

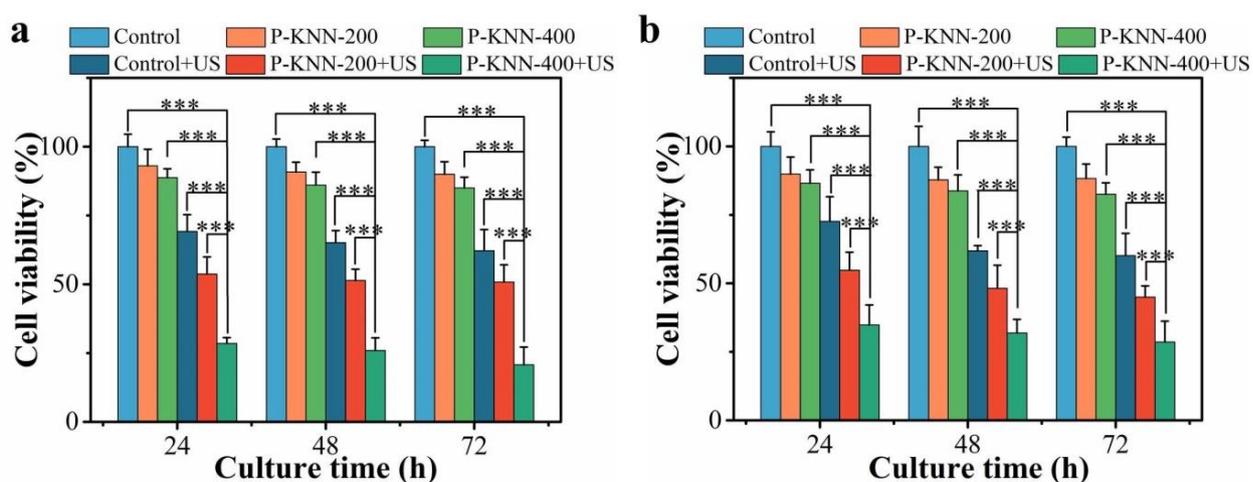


图 3-4 人乳腺癌细胞(a)MDA-MB-231 与(b)MCF-7 在超声及不超声的条件下与 P-KNN 颗粒共培养 24 h, 48 h, 72 h 后细胞存活率。其中颗粒浓度分别为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、400  $\mu\text{g}/\text{mL}$

Figure 3-4 The cell viability of (a) MDA-MB-231 and (b) MCF-7 co-cultured with P-KNN nanoparticles for 24 h, 48 h, 72 h, with US or without US. The particle concentrations were 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively

采用细胞死活染色进一步探究压电颗粒 P-KNN 对 MDA-MB-231 和 MCF-7 乳腺癌细胞的损伤坏死作用。在材料加入 12 h 后对超声组进行超声处理，24 h 后对细胞进行死活染色，活细胞呈现绿色荧光而死细胞呈现红色荧光。实验结果如图 3-5 所示，对于 2 种乳腺癌细胞，在不加材料不加超声处理的空白对照组，均为活细胞（绿色荧光）。当 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 P-KNN 颗粒加入或是单独超声处理，肿瘤细胞的整体存活状态良好，只有少量死细胞（红色荧光）出现，并且细胞的密度也没有明显的降低。超声刺激 P-KNN 颗粒（图 3-5 (b1) (d1) 组）作用于乳腺癌细胞导致大量的死细胞出现，且细胞的密度也有明显的降低。(b1) 组中死细胞的量多于 (d1) 组，表明 P-KNN 颗粒加超声共同处

理, 相较于 MCF-7 细胞, 会造成更多的 MDA-MB-231 细胞死亡。以上结果表明 P-KNN 颗粒及超声处理均能达到一定的杀死乳腺癌细胞的作用, 但效果有限。当超声刺激 P-KNN 颗粒作用于乳腺癌细胞时具有很强的杀死乳腺癌细胞的作用, 此结果也与上述 CCK-8 实验结果一致。超声辅助 P-KNN 压电纳米粒子作用于 2 种乳腺癌, 都显示了很好的活性抑制作用, 对 MDA-MB-231 的作用效果更为明显。MDA-MB-231 是一种三阴性乳腺癌细胞, 具有更强的复发和转移性能, 目前常用的靶向治疗与内分泌治疗对三阴性乳腺癌患者治疗无效, 导致对三阴性乳腺癌患者的肿瘤治疗手段与效果有限<sup>[137]</sup>。本研究提出的方法对三阴性癌细胞显示更强的活性抑制作用, 或许可以成为有效治疗三阴性乳腺癌的手段。

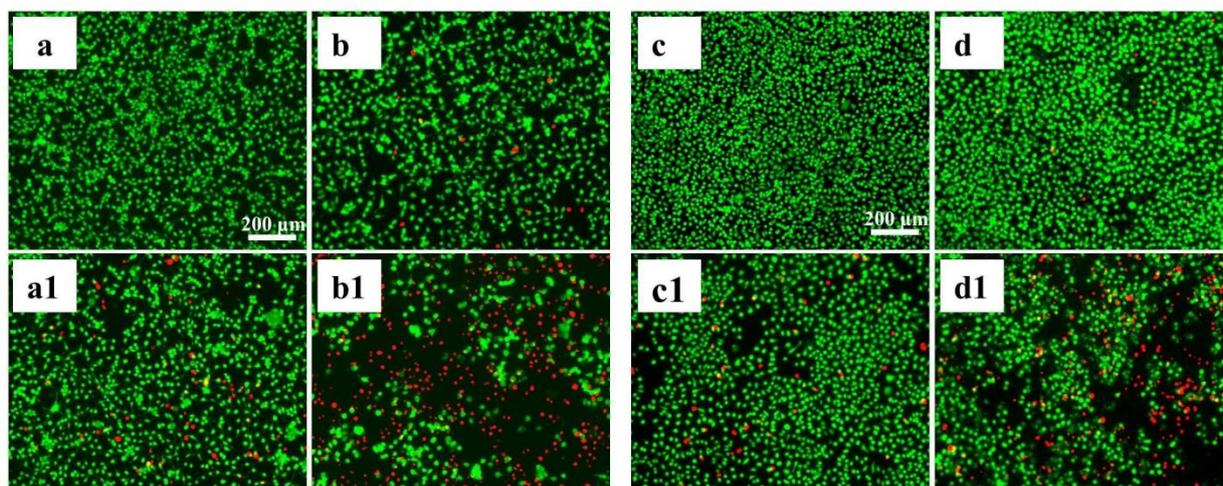


图 3-5 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 P-KNN 颗粒 (P-KNN-400) 在超声和不超声的条件下作用于人乳腺癌 (a, b) MDA-MB-231 与 (c, d) MCF-7 细胞 24 h 的死活染色图。(a) (c) 对照组, (a1) (c1) 超声组, (b) (d) P-KNN-400, (b1) (d1) P-KNN-400+超声组

Figure 3-5 Cell dead and alive stain of human breast cancer cells (a, b) MDA-MB-231 and (c, d) MCF-7 treated with P-KNN-400 nanoparticles for 24 h, with US or without US.

(a) (c) Control, (a1) (c1) Control+US, (b) (d) P-KNN-400, (b1) (d1) P-KNN-400+US

为了进一步探究细胞损伤情况及细胞形态变化, 采用 F-actin 染色观察 2 种乳腺癌细胞的骨架铺展情况。实验结果如图 3-6 所示, 在空白对照组生长的 2 种乳腺癌细胞均呈现良好的铺展状态, 细胞的前端有较多的伪足生成, 细胞呈现较强的极性; 细胞骨架轮廓清晰, 微丝骨架含量丰富, 呈现很强的荧光强度。当 P-KNN 加入或是施加超声刺激, 细胞长条形的铺展状态受到了抑制, 细胞的形态趋近于圆形, 但细胞整个骨架系统还是比较完整, 荧光强度略微降低, 推测细胞的整体活性并没有受到明显抑制。当浓度为 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 P-KNN 颗粒加入并施加超声刺激后, 细胞的整个形态发生变化, 生长

发育受阻，细胞呈现圆形，并且细胞的整个骨架荧光强度很低，细胞的骨架系统很小，说明细胞的整体活性很差。该结果与之前 CCK-8 活性检测及死活染色结果一致，当超声刺激 P-KNN 颗粒作用于乳腺癌细胞时具有很强的肿瘤活性抑制作用。

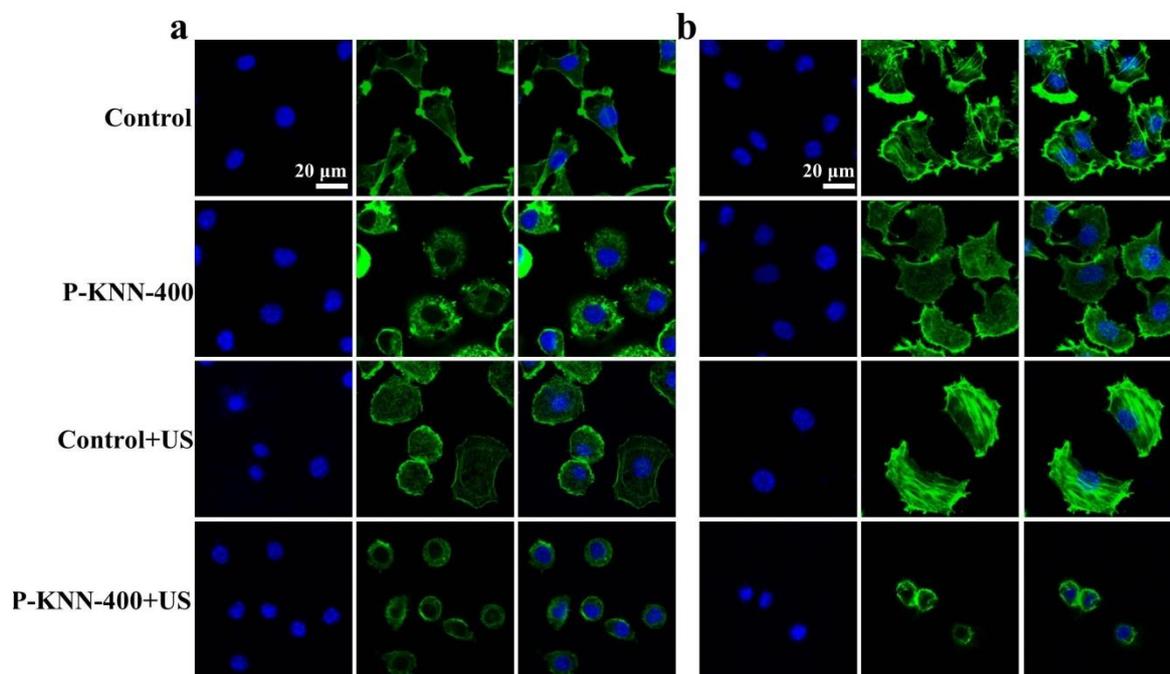


图 3-6 人乳腺癌细胞 (a) MDA-MB-231 与 (b) MCF-7 在超声及不超声的条件下与 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 P-KNN 颗粒 (P-KNN-400) 共培养 24 h 后细胞骨架染色图

Figure 3-6 The cytoskeletal images of human breast cancer cells (a) MDA-MB-231 and (b) MCF-7 co-cultured with P-KNN-400 nanoparticles for 24 h, with US or without US

### 3.3.3 乳腺癌细胞迁移侵袭能力分析

上述结果发现材料加入及超声的刺激会对细胞形态产生影响，对骨架产生很明显的破坏作用，而细胞的骨架是细胞运动的主要参与者，因此采用 transwell 实验讨论这种作用对乳腺癌细胞运动行为的影响。结果如图 3-7 所示，超声的刺激与材料的加入都能够极其显著的抑制乳腺癌细胞的迁移、侵袭能力，这与之前观察到的细胞铺展状态变圆，细胞极性降低相关。在材料存在的情况下同时施加超声刺激，乳腺癌细胞的运动能力完全丧失，推测一方面的原因是由于材料加超声的共同作用会造成肿瘤细胞本身的大量死亡，另一方面存活的细胞由于其本身的形态及骨架结构已经发生严重的改变甚至破坏，细胞也基本丧失了运动的能力。先前研究表明，电刺激在肿瘤治疗过程中对细胞活性的抑制通常都会伴随着细胞骨架结构的变化，从而抑制肿瘤转移的能力<sup>[66]</sup>。本实验对乳腺

癌细胞迁移侵袭行为的研究同样证实了超声辅助 P-KNN 纳米颗粒可以对其运动行为进行抑制。

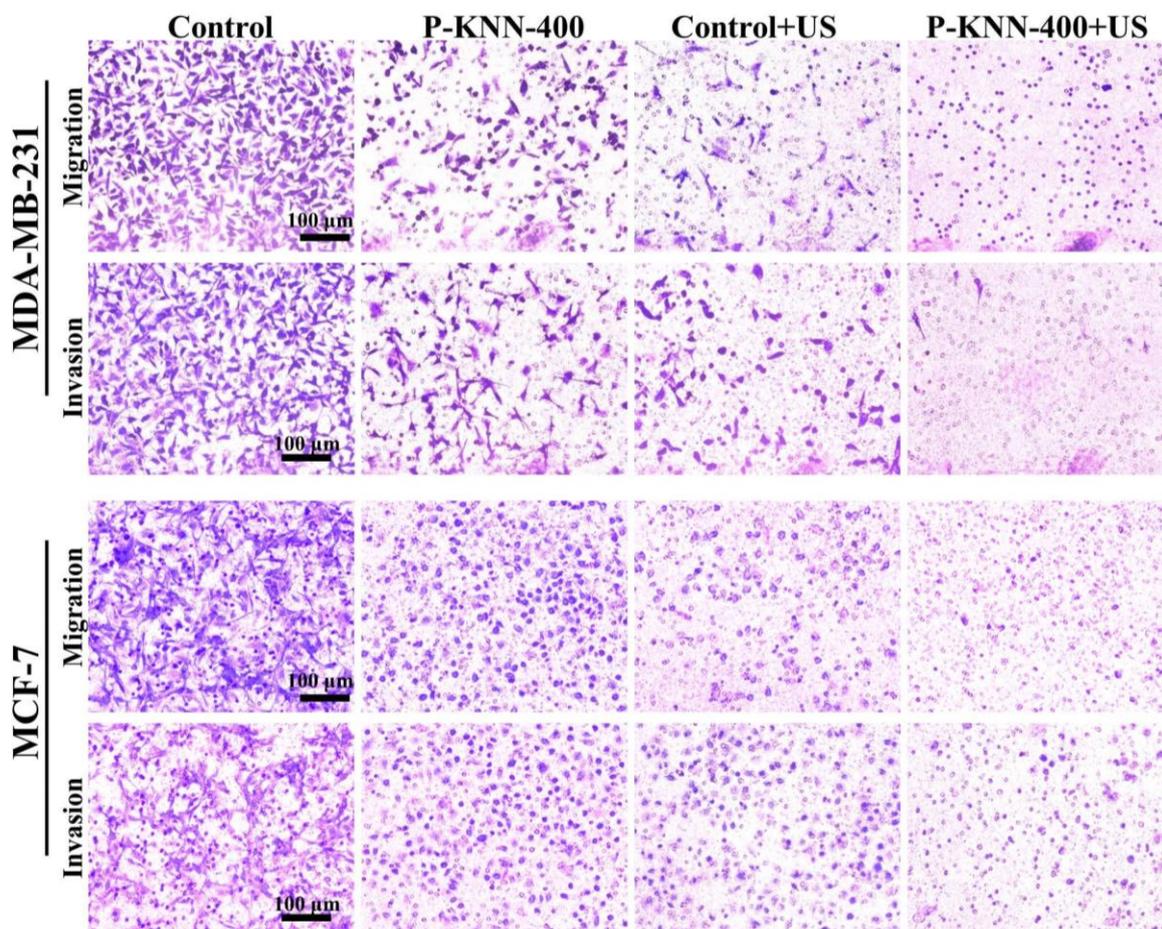


图 3-7 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 P-KNN 颗粒 (P-KNN-400) 在超声和不超声的条件下作用于人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 与 MCF-7 后细胞的迁移侵袭图片

Figure 3-7 The migrated and invasive images of human breast cancer cells MDA-MB-231 and MCF-7, with or without P-KNN-400 nanoparticles, with US or without US

细胞代谢的紊乱会对细胞活性产生影响, 其中氧化应激状态的产生是细胞内部氧化—还原态失衡, 可以促进 ROS 的过量产生从而抑制肿瘤细胞活性, 是多种抗癌手段的机理。研究表明电刺激肿瘤细胞会对肿瘤自身的电稳态产生影响, 从而进一步影响细胞的代谢, 对 ROS 的产生具有促进的作用; 脉冲电场促进 ROS 的产生则已在多个研究中得到证明; 压电纳米粒子响应超声刺激促进电信号的产生, 也可以触发压电催化作用产生 ROS<sup>[80, 87, 138-140]</sup>。所以本研究将继续探讨超声作用下 P-KNN 颗粒抑制乳腺癌细胞活性是否也是通过促进过量 ROS 的产生。

实验采用 ROS 检测试剂盒对 MDA-MB-231 与 MCF-7 乳腺癌细胞在 P-KNN 及超声

刺激下 ROS 产生的情况进行分析。如图 3-8 所示, 在没有超声的条件下, 相较于空白对照组, P-KNN 会促进少量的 ROS 产生; 当施加超声刺激时, 即使没有材料细胞也能产生相当量的 ROS, 与超声的刺激即能引起部分乳腺癌细胞死亡的结论相一致; 当 P-KNN 与乳腺癌细胞共培养后超声的加入能够极其显著的促进 ROS 的产生, 这一结论也与其能够非常显著的抑制乳腺癌细胞活性的结论一致。以上结果说明, 超声刺激 P-KNN 压电纳米颗粒, 当其作用于 2 种乳腺癌细胞时会导致肿瘤细胞内氧化还原失衡, 产生过量的 ROS, 引起细胞活性的下降及死亡。

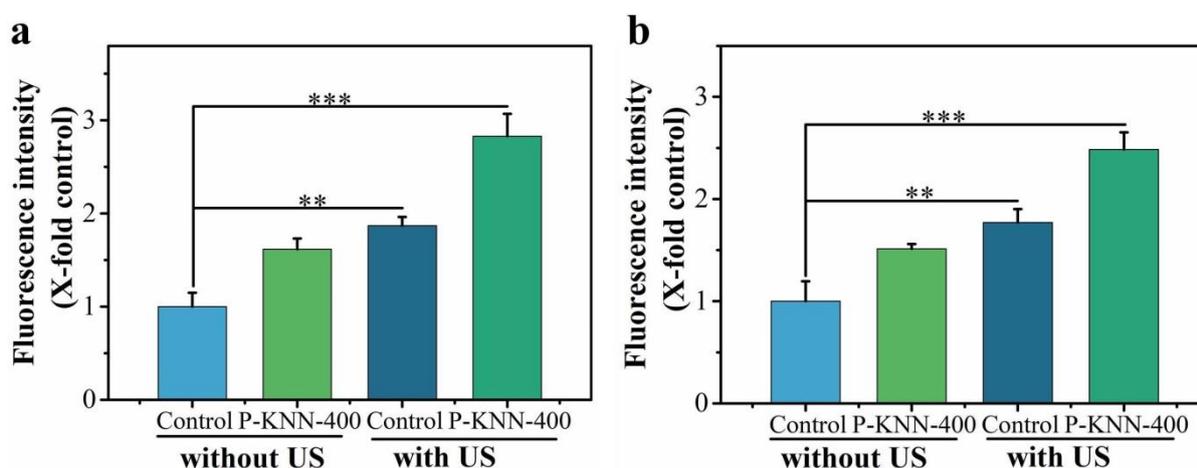


图 3-8 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 P-KNN 颗粒 (P-KNN-400) 在超声和不超声的条件下作用于人乳腺癌细胞 (a) MDA-MB-231 与 (b) MCF-7 后与空白对照组相比 ROS 的相对荧光强度

Figure 3-8 The relative ROS fluorescence intensity of human breast cancer cells (a) MDA-MB-231 and (b) MCF-7, with or without P-KNN-400 particles, with US or without US

先前研究表明肿瘤细胞内 ROS 的过量产生会导致促凋亡与抗凋亡相关蛋白表达水平的变化, 激活凋亡通路并最终导致肿瘤的凋亡与坏死<sup>[141, 142]</sup>。上述实验结果发现 P-KNN 颗粒与超声与共同作用会导致过量 ROS 的产生, 为了探索是否会进一步促进肿瘤细胞的凋亡与坏死, 采用 Hoechst 33342 和碘化丙啶试剂对乳腺癌细胞进行双染, Hoechst 33342 可以穿透细胞膜, 具有完整细胞膜的活细胞与早期凋亡细胞呈现蓝色荧光; 碘化丙啶不能穿透细胞膜, 但对于晚期凋亡细胞及坏死细胞, 细胞膜的完整性丧失, 所以坏死细胞可以呈现红色荧光和蓝色荧光。图 3-9 染色结果表明, 在空白对照组、只添加 P-KNN、或是只施加超声刺激的组 (图 3-9 a-d, a1, d1), 能观察到大量的蓝色细胞而几乎没有红色细胞或是少量红色细胞的出现, 表明此时细胞活性良好; 当对与 P-KNN 共培养的乳腺癌细胞施加超声刺激, 有大量的红色细胞出现 (图 3-9 b1, d1)。2 种乳腺

癌细胞，MDA-MB-231 与 MCF-7 呈现相一致的趋势，只是 P-KNN 共培养并施加超声刺激的组中 MCF-7（图 3-9 d1）凋亡与坏死的细胞没有 MDA-MB-231（图 3-9 b1）多，这也与之前的活性检测结果相一致，表明此种用于乳腺癌治疗的方式对 MDA-MB-231 的作用效果比 MCF-7 细胞效果更加显著。

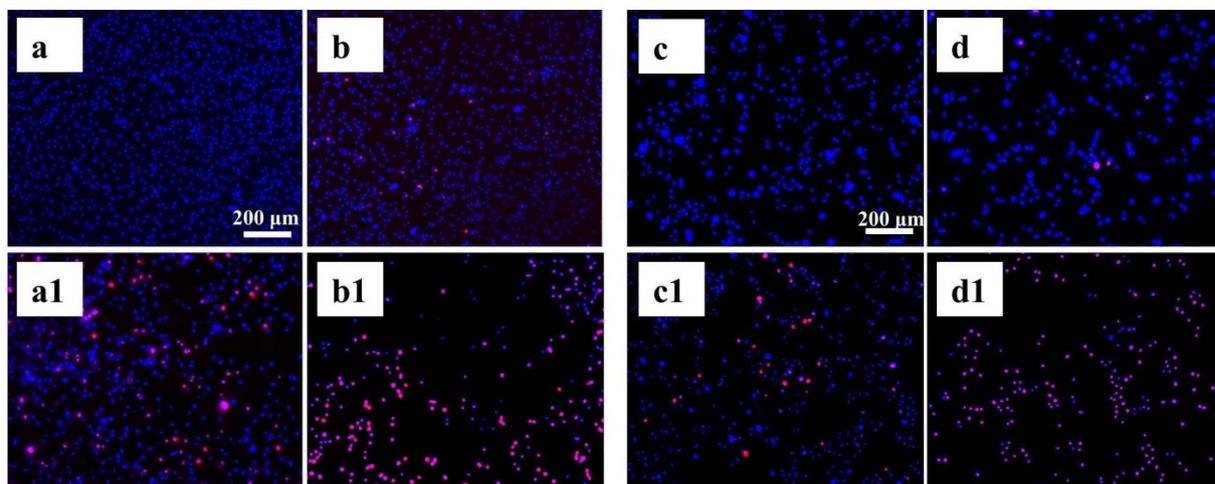


图 3-9 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 P-KNN 颗粒 (P-KNN-400) 在超声和不超声条件下作用于人乳腺癌 (a, b) MDA-MB-231 与 (c, d) MCF-7 细胞 24 h 的细胞凋亡与坏死染色图。(a) (c) 对照组, (a1) (c1) 超声组, (b) (d) P-KNN-400, (b1) (d1) P-KNN-400+超声组

Figure 3-9 Cell apoptosis and necrosis stain of breast cancer cells (a, b) MDA-MB-231, (c, d) MCF-7 cultured for 24 h, with or without P-KNN-400 nanoparticles, with US or without US.

(a) (c) Control, (a1) (c1) Control+US, (b) (d) P-KNN-400, (b1) (d1) P-KNN-400+US

以上结果表明在超声刺激下的 P-KNN 压电纳米颗粒作用于乳腺癌细胞，可以导致氧化还原的失衡，ROS 的过量产生，促进乳腺癌细胞的凋亡与坏死，达到良好的抑制癌细胞活性的作用。结合先前的研究推测，这种抗肿瘤机制的产生一方面在于纳米颗粒在超声辅助下增强的电刺激作用于乳腺癌细胞导致其电稳态的改变、细胞代谢的紊乱；另一方面在于 P-KNN 材料的良好压电性使其在超声作用下产生的内建电场导致了压电催化的产生。由于目前肿瘤治疗向综合性治疗发展，超声辅助 P-KNN 压电纳米颗粒作用可以远程、无线、精确的对肿瘤部位进行电刺激调控，将对肿瘤治疗的发展具有显著促进的作用。

### 3.3.4 生物相容性分析

作为肿瘤治疗的手段，在达到良好的抑制肿瘤细胞活性的同时必须对相应正常细胞

的活性进行评估。在 3.3.2 中发现材料浓度为 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时，即使施加了超声的刺激，BMSC 的细胞活性还能达到 75%，在此利用与乳腺癌相对应的人正常乳腺上皮细胞再次评估 P-KNN 颗粒本身以及在超声的刺激下对正常细胞的生物相容性作用。实验将 P-KNN-400 压电颗粒与 MCF-10A 细胞共培养 48 h，利用 CCK-8 实验与细胞死活染色进行生物相容性检测。CCK-8 结果表明（图 3-10 (a)），在没有超声的刺激下，P-KNN 颗粒作用后，细胞的存活率能够达到 93%，表明 P-KNN 颗粒生物相容性很好，对细胞不会产生明显的活性抑制作用。与之前的研究类似，此结论也再次证明了无铅压电陶瓷良好的生物相容性<sup>[60-62]</sup>。在施加超声刺激后，细胞的存活率有降低，对乳腺癌细胞有很强肿瘤抑制效果的超声刺激与 P-KNN 同时作用的组，MCF-10A 的细胞存活率仍能够达到 75% 以上。

细胞死活染色（图 3-10 (b)）结果与 CCK-8 定量结果一致。在没有超声刺激下，与 P-KNN 颗粒共培养后乳腺上皮细胞 MCF-10A 基本都显示良好的细胞活性，很少有死细胞出现；当施加超声刺激后，红色的死细胞出现，但死细胞的数量不多且细胞的整体密度与空白对照组相比也没有明显的降低，表明超声刺激下 P-KNN 的作用对正常乳腺细胞的毒性作用不大。

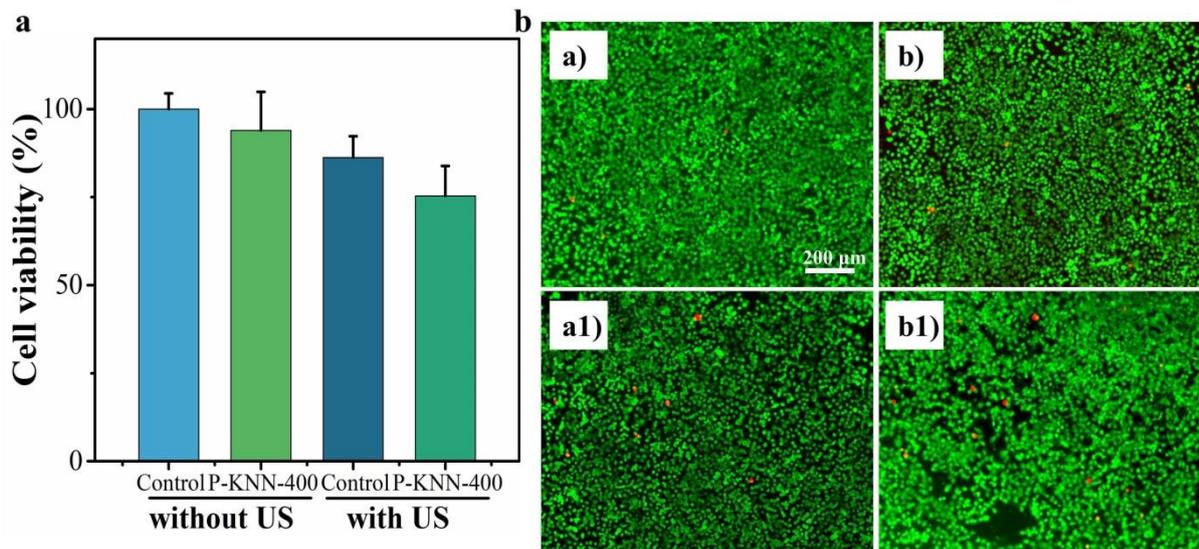


图 3-10 人正常乳腺上皮细胞(MCF-10A)在超声存在和不存在下与 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 P-KNN 颗粒 (P-KNN-400) 共培养 48 h 的 (a) CCK-8 存活率分析, (b) 死活染色分析; 其中 a) 对照组, a1) 超声组, b) P-KNN-400, b1) P-KNN-400+超声组

Figure 3-10 (a) The CCK-8 assay and (b) cell dead and alive stain of MCF-10A co-cultured with P-KNN-400 nanoparticles for 48 h, with US or without US. For cell dead and alive stain, a) Control, a1) Control+US, b) P-KNN-400, b1) P-KNN-400+US

综合上述结果可以说明 P-KNN 颗粒具有良好的生物相容性, 超声刺激 P-KNN 颗粒作用于正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 时, 其存活率仍然在 75% 以上, 但 2 种乳腺癌细胞的活性则已低至 30% 左右, 表明利用超声刺激 P-KNN 压电颗粒作用于乳腺癌, 实现乳腺癌的治疗具有很大的可行性; 尤其是对高转移性的三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 活性抑制效果更明显, 为对多种治疗手段具有抗性的三阴性乳腺癌患者治疗提供新的策略。

### 3.4 小结

本章实验对通过固相烧结法制备并水热处理制得的样品形貌、物相、化学结构进行表征, 表明成功制备了具有良好压电性能的 P-KNN 压电纳米颗粒, 并通过电镜及粒径分析表明该 P-KNN 颗粒具有 450 nm 左右的粒径及良好的分散性。通过细胞活性检测发现在超声刺激下, 浓度为 400  $\mu\text{g/mL}$  的 P-KNN 颗粒在作用 24 h 时能够达到对 MDA-MB-231 细胞 70%, MCF-7 细胞 65% 的活性抑制作用。细胞骨架染色及 transwell 实验发现, P-KNN 压电颗粒、超声单独作用对乳腺癌细胞骨架形态结构、聚集状态产生影响并抑制了癌细胞迁移侵袭的能力, 但对癌细胞整体活性影响不大; 在 P-KNN 压电颗粒与超声共同作用下, 乳腺癌细胞的形态结构被显著破坏, 细胞的生长、骨架的发展受到了极其显著的抑制, 导致了细胞活性的丧失以及整个运动能力的破坏。进一步机制研究发现超声与材料共同作用于乳腺癌细胞能够导致癌细胞内 ROS 过量产生并促进细胞的凋亡与坏死。生物相容性分析发现, 该种抗乳腺癌的手段对正常乳腺细胞的活性抑制作用仅在 20% 左右。本章实验结果表明, 超声辅助 P-KNN 压电纳米颗粒作用于乳腺癌细胞可以实现很好的活性抑制效果, 尤其是对三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231, 但对正常细胞生物相容性良好, 有望作为新的肿瘤治疗手段。

## 结论

癌症是现代社会居民健康的最大威胁之一，乳腺癌是全球发病率最高的癌症，转移造成大多数乳腺癌实体瘤患者的死亡，因此，杀灭乳腺癌、控制乳腺癌转移对缓解乳腺癌带来的经济社会负担具有极其重要的意义。材料表面带电特性是调节细胞行为最为关键的因素之一，了解材料表面带电特性对肿瘤细胞转移相关行为的影响将会极大促进生物材料在肿瘤方面的应用。因此本实验通过构建具有不同表面带电特性的生物模型，探究材料表面电势差异对乳腺癌细胞运动行为的影响规律及机制；此外，由于 KNN 压电纳米颗粒能够响应超声刺激促进电信号的输出以及产生压电催化作用，可以作为新的电刺激方式用于肿瘤治疗，本文对超声刺激下极化 KNN 压电颗粒对乳腺癌细胞活性的影响及机制进行了研究。主要实验结论如下：

(1) 当 KNN 块体陶瓷的压电常数为 80 pC/N 时，乳腺癌细胞的迁移侵袭能力得到显著抑制，骨架系统遭到明显破坏。

利用传统的固相烧结法制备具有良好压电性能的 KNN 陶瓷块体并通过设置极化的时间、强度得到了具有不同表面电势、相似的表面形貌、成分、化学结构的陶瓷样品。将 2 种乳腺癌细胞与 4 种正常细胞共培养，发现与未极化 KNN 样品相比，极化后具有高表面电势的 80KNN 样品对 2 种乳腺癌细胞运动潜能具有显著的抑制，但对 80KNN 表面培养的正常细胞却没有抑制的作用，指示调节材料表面的带电特性用于控制肿瘤转移具有可行性。为了进一步直接证明极化后的高表面电势对乳腺癌细胞的运动抑制作用，进行划痕实验以及 transwell 迁移侵袭实验。结果发现与未极化 KNN 相比，具有高表面电势的 80KNN 能够显著的抑制乳腺癌细胞的迁移侵袭；通过对细胞的微丝及微管骨架染色和黏着斑蛋白染色，发现 80KNN 样品表面的高电势对乳腺癌细胞产生的电刺激能够促进细胞形成大的扁平形貌并与基底紧密相连，促进黏着斑蛋白的表达；微管的聚集状态发生改变、表达受到抑制。为了进一步证实这样的结论，采用 PCR 实验测定 RhoA, ROCK1/2, Rac1, FAK,  $\beta$ 1-integrin 的 mRNA 表达，结果表明 80KNN 表面促转移基因的表达均有下降。实验通过构建表面具有不同带电特性的模型，探究材料表面电势的差异对乳腺癌细胞运动行为的影响规律及影响机制，以期促进能够提供无线、选择性电刺激的压电生物材料在肿瘤方面的应用。通过调节材料的表面电荷来控制肿瘤转移，为肿瘤治疗提供一个新的策略。

(2) 超声辅助极化 KNN 压电纳米颗粒共同作用于乳腺癌细胞可以达到良好的癌细

胞活性抑制效果。

电刺激抗肿瘤是一种肿瘤治疗的新手段，但传统的电刺激由于具有侵入性或是有效性不足的问题而应用受到限制。本实验利用超声刺激极化 KNN 压电纳米颗粒提供无线可调控的电刺激用于乳腺癌治疗；并且在超声刺激下极化 KNN 压电纳米颗粒产生的内建电场可以触发超声催化作用进一步抑制乳腺癌细胞活性。实验通过固相烧结法结合水热处理并通过外接直流电源极化得到极化颗粒，通过对成分、物相、化学结构、电镜及粒径分析表明成功制备了具有良好压电性能的 KNN 纳米颗粒，其具有 450 nm 左右的粒径及良好的分散性。通过 CCK-8 实验及细胞死活染色发现 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的极化 KNN 颗粒在超声作用下能够达到很好的抑制 MDA-MB-231 与 MCF-7 乳腺癌细胞活性的效果，并且对于三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的抑制作用更强。细胞骨架染色发现极化 KNN 压电颗粒与超声共同作用时，乳腺癌细胞的形态结构被明显破坏，细胞的骨架发展受到了极其显著的抑制，导致细胞活性的丧失，存活的肿瘤细胞骨架结构很小以致于整个运动能力受到了明显的破坏。进一步机制分析表明与肿瘤细胞共培养的极化 KNN 颗粒在施加超声刺激后可以显著的提高 ROS 的产生，促进乳腺癌细胞的凋亡与坏死。最后将 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的极化 KNN 颗粒与超声作用于正常乳腺细胞 MCF-10A，发现这种肿瘤治疗方式对正常细胞的毒性作用不大。本研究通过超声对压电纳米颗粒采用远程无需侵入式触发，具有极大的应用价值及前景，该研究也为解决传统电刺激用于肿瘤治疗的缺陷提供了新的思路。并且，本实验中所使用的超声辅助极化 KNN 的作用方式对三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 活性抑制效果更明显，指示这种细胞对电刺激治疗可能更敏感，为解决临床上三阴性乳腺癌患者缺乏合适的治疗手段提供新的思路。

## 论文创新性

1. 随着功能性生物材料的发展，材料表面性质对细胞行为调控作用受到广泛关注，材料表面的带电特性被认为是调节细胞行为最关键的因素之一，但却缺乏相关的研究，尤其是对运动行为的影响。KNN 陶瓷块体具有良好的生物相容性，其表面的带电特性稳定可调但对成分结构形貌等不产生影响。因此，本研究提出用表面带有不同电势的 KNN 样品作为模型材料，研究材料表面带电性质对细胞运动行为的影响。

2. 通过调整极化参数得到具有不同表面电势的 KNN 陶瓷块体材料，实验发现材料表面的带电性质对不同细胞的运动行为会产生不同的影响，为电活性生物材料在实际应用过程中表面带电特性的选择提供一定的参考。

3. 研究表明高表面电势的 80KNN 样品会抑制乳腺癌细胞的迁移侵袭能力但对正常细胞的运动能力没有抑制，表明调节植入材料表面带电性质，产生稳定的电刺激用于控制肿瘤转移的可行性，为实现良好的肿瘤治疗以及良好的预后提供一个新策略。

4. 利用超声辅助 KNN 压电纳米颗粒实现良好的乳腺癌活性抑制效果。该治疗方法无需外接电极，无线、可控的对肿瘤细胞产生电刺激，解决传统的电刺激由于具有侵入性或是有效性差而应用受到限制问题，为肿瘤治疗提供新的电刺激方式。并且极化 KNN 压电颗粒在响应超声刺激时，可以增强电信号的输出，导致压电催化作用的产生，与电刺激共同作用于肿瘤细胞，达到更好的肿瘤活性抑制效果。

## 工作展望

本实验以 KNN 陶瓷块体和颗粒为研究主体, 利用其带电特性及力电耦合特性开展对乳腺癌细胞运动能力、乳腺癌细胞活性抑制等相关研究工作。通过初始黏附速率实验已经初步证明材料表面带电特性对细胞的运动行为会产生不同的影响, 证实极化后具有更高表面电势的样品可以明显的抑制乳腺癌细胞的迁移侵袭, 但材料带电差异对其他细胞运动行为的不同影响还需要进一步证实, 对其原因进一步深入研究。超声刺激极化 KNN 颗粒作用于乳腺癌细胞, 对其增殖抑制及代谢活性的影响也已证实, 但具体影响的机制, 包括细胞电稳态的改变、基因蛋白信号通路的改变缺乏研究。此外, 实验局限于体外细胞实验, 需要构建合适的动物模型对该治疗方法进行验证。因此, 鉴于已有的工作基础, 为后续相关研究提供以下研究思路:

(1) 构建表面具有不同带电特性模型进一步证实对不同细胞运动行为的差异, 探寻对不同细胞运动行为产生差异的原因。极化后带有更高电势的样品与未极化的样品相比可以明显的抑制乳腺癌细胞的迁移侵袭, 但该电信号的具体传递机制及对细胞骨架破坏的具体原因仍需进一步说明。具有不同转移性能的乳腺癌细胞, 虽然其迁移侵袭行为都受到了抑制, 但异质性的存在使电刺激抑制的机理不同, 具体差异产生的原因也需要进一步的探索。希望通过深入研究最终能够清楚的解释材料表面带电情况对细胞运动行为的具体影响机制及差异产生的原因; 并可以反向判断, 为了使细胞达到一定的运动能力去怎样有选择的控制材料表面的带电情况。

(2) 对于 KNN 颗粒和超声刺激共同作用抗乳腺癌的效果需要构建合适的动物模型进行验证, 从而实现该种治疗方法真正在临床上的使用。超声刺激促进极化 KNN 电信号的输出以及产生的压电催化对乳腺癌杀灭的具体影响机制, 各自通过怎样的信号通路, 多大程度的影响需要进一步去探索, 以期为抗肿瘤纳米压电材料的发展以及在临床上的应用提供更好的参考。此外, 不同肿瘤细胞存在异质性, 因此需要对多种肿瘤细胞进行评估, 筛选对该种治疗方法具有敏感性与抗性的肿瘤, 才能够在实际应用中更具有针对性。

## 参考文献

- [1] Sung H., Frelay J., Siegel R.L., et al. Global cancer statistics 2020: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 21.
- [2] 杨玲, 李连弟, 陈育德, 等. 中国 2000 年及 2005 年恶性肿瘤发病死亡的估计与预测[J]. 中国卫生统计, 2005, 22(4): 218-221.
- [3] Weinberg R.A., Chaffer C.L. A perspective on cancer cell metastasis[J]. Science, 2011, 331(6024): 1559-1564.
- [4] Steeg P.S. Targeting metastasis[J]. Nat Rev Cancer, 2016, 16: 201-218.
- [5] Miller K.D., Nogueira L., Mariotto A.B., et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(5): 363-385.
- [6] Waks A.G., Winer E.P. Breast cancer treatment: A review[J]. Jama-J Am Med Assoc, 2019, 321(3): 288-300.
- [7] Runowicz C.D., Leach C.R., Henry N.L., et al. American cancer society/American society of clinical oncology breast cancer survivorship care guideline[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1): 43-73.
- [8] Berry D.A., Cronin K.A., Plevritis S.K., et al. Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer[J]. New Engl J Med, 2005, 353(17): 1784-1792.
- [9] Longacre C.F., Neprash H.T., Shippee N.D., et al. Travel, treatment choice, and survival among breast cancer patients: A population-based analysis[J]. Womens Health Rep (New Rochelle), 2021, 2(1): 1-10.
- [10] Gkantaifi A., Papadopoulos C., Spyropoulou D., et al. Breast radiotherapy and early adverse cardiac effects. The role of serum biomarkers and strain echocardiography[J]. Anticancer res, 2019, 39(4): 1667-1673.
- [11] Chung N.C., Walker A.K., Dhillon H.M., et al. Mechanisms and treatment for cancer- and chemotherapy-related cognitive impairment in survivors of non-CNS malignancies[J]. Oncology (Williston Park), 2018, 32: 591-598.
- [12] Nelson E.R., Li S., Kennedy M., et al. Chemotherapy enriches for an invasive triple-negative breast tumor cell subpopulation expressing a precursor form of N-cadherin on

- the cell surface[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(51): 84030-84042.
- [13] Blackley E.F., Loi S. Targeting immune pathways in breast cancer: Review of the prognostic utility of TILs in early stage triple negative breast cancer (TNBC)[J]. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, 2019, 48 Suppl 1: S44-S48.
- [14] Kono M., Fujii T., Lim B., et al. Androgen receptor function and androgen receptor-targeted therapies in breast cancer: A review[J]. *Jama Oncology*, 2017, 3: 1266-1273.
- [15] Denduluri N., Chavez-MacGregor M., Telli M.L., et al. Selection of optimal adjuvant chemotherapy and targeted therapy for early breast cancer: Asco clinical practice guideline focused update[J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36: 2433-2443.
- [16] Kurian A.W., Ward K.C., Abrahamse P., et al. Association of germline genetic testing results with locoregional and systemic therapy in patients with breast cancer[J]. *JAMA Oncol*, 2020, 6: e196400.
- [17] Venigalla S., Carmona R., Guttmann D.M., et al. Use and effectiveness of adjuvant endocrine therapy for hormone receptor-positive breast cancer in men[J]. *JAMA Oncol*, 2018, 4: e181114.
- [18] Yue C., Yang Y., Zhang C., et al. ROS-responsive mitochondria-targeting blended nanoparticles: Chemo- and photodynamic synergistic therapy for lung cancer with on-demand drug release upon irradiation with a single light source[J]. *Theranostics*, 2016, 6(13): 2352-2366.
- [19] Zheng R., Wang S., Tian Y., et al. Polydopamine-coated magnetic composite particles with an enhanced photothermal effect[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7: 15876-15884.
- [20] Ganesh K., Massagué J. Targeting metastatic cancer[J]. *Nature Medicine*, 2021, 27(1): 34-44.
- [21] Valastyan S., Weinberg R. Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms[J]. *Cell*, 2011, 147(2): 275-292.
- [22] Mina L.A., Sledge G.W. Rethinking the metastatic cascade as a therapeutic target[J]. *NAT REV CLIN ONCOL*, 2011, 8(6): 325-332.
- [23] Steeg P.S. Tumor metastasis: Mechanistic insights and clinical challenges[J]. *Nat Med*, 2006, 12: 895-904.
- [24] Kiberstis P.A. Metastasis: An evolving story[J]. *Science*, 2016, 352: 162-163.

- [25] Wirtz D., Konstantopoulos K., Searson P.C. The physics of cancer: The role of physical interactions and mechanical forces in metastasis[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(7): 512-522.
- [26] Friedl P., Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms[J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3: 362-374.
- [27] Ananthakrishnan R., Ehrlicher A. The forces behind cell movement[J]. *Int J Biol Sci*, 2007, 3: 303-317.
- [28] Devi S.S., Yadav R., Arya R. Altered actin dynamics in cell migration of gne mutant cells[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 603742.
- [29] Dusko I., Yasuhide F., Satoshi K. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice[J]. *Nature*, 1995, 377(6549): 539-544.
- [30] Dawson J.C., Serrels A., Stupack D.G., et al. Targeting FAK in anticancer combination therapies[J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 24: 1-12.
- [31] Sulzmaier F.J., Jean C., Schlaepfer D.D. FAK in cancer: Mechanistic findings and clinical applications[J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(9): 598-610.
- [32] Schaller M.D. Cellular functions of FAK kinases: Insight into molecular mechanisms and novel functions[J]. *J Cell Sci*, 2010, 123: 1007-1013.
- [33] Qiao W., Wang W., Liu H., et al. Prognostic and clinical significance of focal adhesion kinase expression in breast cancer: A systematic review and meta-analysis[J]. *Transl Oncol*, 2020, 13: 100835.
- [34] Pellegrino L., Stebbing J., Braga V.M., et al. MiR-23b regulates cytoskeletal remodeling, motility and metastasis by directly targeting multiple transcripts[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: 5400-5412.
- [35] Hu X., Guo J., Zheng L., et al. The heterochronic microRNA let-7 inhibits cell motility by regulating the genes in the actin cytoskeleton pathway in breast cancer[J]. *Mol Cancer Res*, 2013, 11: 240-250.
- [36] Garcin C., Straube A. Microtubules in cell migration[J]. *Essays Biochem*, 2019, 63: 509-520.
- [37] Müller-Deku A., Meiring J.C.M., Loy K., et al. Photoswitchable paclitaxel-based microtubule stabilisers allow optical control over the microtubule cytoskeleton[J]. *Nat Commun*, 2020, 11: 4640.

- [38] Wang Y., Hu L., Ji P., et al. MIIP remodels Rac1-mediated cytoskeleton structure in suppression of endometrial cancer metastasis[J]. *J Hematol Oncol*, 2016, 9: 112.
- [39] Kamai T., Yamanishi T., Shirataki H., et al. Overexpression of RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases is associated with progression in testicular cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10: 4799-4805.
- [40] Santos M.F., McCormack S.A., Guo Z., et al. Rho proteins play a critical role in cell migration during the early phase of mucosal restitution[J]. *J Clin Invest*, 1997, 100: 216-225.
- [41] Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton (cover story)[J]. *Science*, 1998, 279(5350): 509-514.
- [42] Azzarelli R., Kerloch T., Pacary E. Regulation of cerebral cortex development by Rho GTPases: Insights from in vivo studies[J]. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8: 445.
- [43] Tseliou M., Al-Qahtani A., Alarifi S., et al. The role of RhoA, RhoB and RhoC GTPases in cell morphology, proliferation and migration in human cytomegalovirus (HCMV) infected glioblastoma cells[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 38: 94-109.
- [44] Prudnikova T.Y., Rawat S.J., Chernoff J. Molecular pathways: Targeting the kinase effectors of RHO-family GTPases[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(7): 1772-1772.
- [45] Durand-Onaylı V., Haslauer T., Härzschel A., et al. Rac GTPases in hematological malignancies[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19.
- [46] He Y., Li D., Cook S.L., et al. Mammalian target of rapamycin and rictor control neutrophil chemotaxis by regulating Rac/Cdc42 activity and the actin cytoskeleton[J]. *Mol Biol Cell*, 2013, 24: 3369-3380.
- [47] Olson M.F., Sahai E. The actin cytoskeleton in cancer cell motility[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2009, 26: 273-287.
- [48] Matos P. Small GTPases in cancer: Still signaling the way[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13.
- [49] Wu D., Asiedu M., Wei Q. Myosin-interacting guanine exchange factor (MyoGEF) regulates the invasion activity of MDA-MB-231 breast cancer cells through activation of RhoA and RhoC[J]. *Oncogene*, 2009, 28: 2219-2230.
- [50] Fritz G., Just I., Kaina B. Rho GTPases are over-expressed in human tumors[J]. *Int J Cancer*, 1999, 81: 682-687.
- [51] Struckhoff A.P., Rana M.K., WorthyLake R.A. RhoA can lead the way in tumor cell

- invasion and metastasis[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2011, 16: 1915-1926.
- [52] Fritz G., Brachetti C., Bahlmann F., et al. Rho GTPases in human breast tumours: Expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters[J]. *Br J Cancer*, 2002, 87: 635-644.
- [53] Liu Y., Wang Y., Zhang Y., et al. Abnormal expression of p120-catenin, E-cadherin, and small GTPases is significantly associated with malignant phenotype of human lung cancer[J]. *Lung Cancer*, 2009, 63: 375-382.
- [54] Baxter F.R., Bowen C.R., Turner I.G., et al. Electrically active bioceramics: A review of interfacial responses[J]. *Ann Biomed Eng*, 2010, 38: 2079-2092.
- [55] Sahoo B., Panda P.K. Dielectric, ferroelectric and piezoelectric properties of  $(1-x)[\text{Pb}_{0.91}\text{La}_{0.09}(\text{Zr}_{0.60}\text{Ti}_{0.40})\text{O}_3]-x[\text{Pb}(\text{Mg}_{1/3}\text{Nb}_{2/3})\text{O}_3]$ ,  $0 \leq x \leq 1$  [J]. *J Mater Sci*, 2007, 42(12): 4270-4275.
- [56] Panda P.K. Review: Environmental friendly lead-free piezoelectric materials[J]. *J Mater Sci*, 2009, 44(19): 5049-5062.
- [57] Jaffe B., Cook W.R., Jaffe H. *Piezoelectric ceramics*[J]. Academic, 1971.
- [58] Li J., Wang K., Zhu F., et al. (K, Na)NbO<sub>3</sub>-based lead - free piezoceramics: Fundamental aspects, processing technologies, and remaining challenges[J]. *J Am Ceram Soc*, 2013, 96(12): 3677-3696.
- [59] Egerton L., Dillon D.M. Piezoelectric and dielectric properties of ceramics in the system potassium—sodium niobate[J]. *J Am Ceram Soc*, 2010, 42(9): 438-442.
- [60] 黄燕飞. 两种压电陶瓷对人牙龈成纤维细胞增殖影响的实验研究[D]. 四川大学, 2007.
- [61] Chen W., Yu Z., Pang J., et al. Fabrication of biocompatible potassium sodium niobate piezoelectric ceramic as an electroactive implant[J]. *Materials (Basel)*, 2017, 10(4).
- [62] Yao T., Chen J., Wang Z., et al. The antibacterial effect of potassium-sodium niobate ceramics based on controlling piezoelectric properties[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019, 175: 463-468.
- [63] 郭菲菲. Bi<sub>(0.5)</sub>Na<sub>(0.5)</sub>TiO<sub>3</sub> 基无铅压电材料的结构及物性研究[D]. 哈尔滨工业大学, 2015.
- [64] Starr M.B., Wang X. Coupling of piezoelectric effect with electrochemical processes[J].

Nano Energy, 2015, 14: 296-311.

[65] Rehman A.A., Elmore K.B., Mattei T.A. The effects of alternating electric fields in glioblastoma: Current evidence on therapeutic mechanisms and clinical outcomes[J]. Neurosurgical Focus, 2015, 38(3): E14.

[66] Voloshin T., Schneiderman R.S., Volodin A., et al. Tumor treating fields (TTFields) hinder cancer cell motility through regulation of microtubule and actin dynamics[J]. Cancers (Basel), 2020, 12(10).

[67] Kirson E.D., Gurvich Z., Schneiderman R., et al. Disruption of cancer cell replication by alternating electric fields[J]. Cancer Res, 2004, 64: 3288-3295.

[68] Kirson E.D., Giladi M., Gurvich Z., et al. Alternating electric fields (TTFields) inhibit metastatic spread of solid tumors to the lungs[J]. Clin Exp Metastasis, 2009, 26: 633-640.

[69] Schneiderman R.S., Shmueli E., Kirson E.D., et al. TTFields alone and in combination with chemotherapeutic agents effectively reduce the viability of MDR cell sub-lines that over-express ABC transporters[J]. BMC Cancer, 2010, 10: 229.

[70] Giladi M., Weinberg U., Schneiderman R.S., et al. Alternating electric fields (tumor-treating fields therapy) can improve chemotherapy treatment efficacy in non-small cell lung cancer both in vitro and in vivo[J]. Semin Oncol, 2014, 41(6): S35-S41.

[71] Oh J.Y., Lee Y.J., Kim E.H. Tumor-treating fields inhibit the metastatic potential of osteosarcoma cells[J]. Technol Cancer Res Treat, 2020, 19: 1533033820947481.

[72] Kim E.H., Song H.S., Yoo S.H., et al. Tumor treating fields inhibit glioblastoma cell migration, invasion and angiogenesis[J]. Oncotarget, 2016, 7: 65125-65136.

[73] Boukany P.E., Morss A., Liao W.C., et al. Nanochannel electroporation delivers precise amounts of biomolecules into living cells[J]. Nat Nanotechnol, 2011, 6: 747-754.

[74] Yin S., Chen X., Hu C., et al. Nanosecond pulsed electric field (nsPEF) treatment for hepatocellular carcinoma: A novel locoregional ablation decreasing lung metastasis[J]. Cancer Lett, 2014, 346: 285-291.

[75] Breton M., Mir L.M. Microsecond and nanosecond electric pulses in cancer treatments[J]. Bioelectromagnetics, 2012, 33: 106-123.

[76] Miklavcic D., An D., Belehradek J., et al. Host's immune response in electrotherapy of murine tumors by direct current[J]. Eur Cytokine Netw, 1997, 8: 275-279.

- [77] Pirc E., Federici C., Bošnjak M., et al. Early cost-effectiveness analysis of electrochemotherapy as a prospect treatment modality for skin melanoma[J]. *Clin Ther*, 2020, 42: 1535-1548.
- [78] 陈俊祺. 铌酸钾钠压电活性材料的制备及其对肿瘤细胞活性的影响规律研究[D]. 华南理工大学, 2018.
- [79] Ciofani G., Danti S., D'Alessandro D., et al. Barium titanate nanoparticles: Highly cytocompatible dispersions in glycol-chitosan and doxorubicin complexes for cancer therapy[J]. *Nanoscale Res Lett*, 2010, 5: 1093-1101.
- [80] Li C., Li Y., Yao T., et al. Wireless electrochemotherapy by selenium-doped piezoelectric biomaterials to enhance cancer cell apoptosis[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12: 34505-34513.
- [81] 翟锦霞. 电信号响应性铌酸钾钠基植入材料及其生物学性能研究[D]. 华南理工大学, 2020.
- [82] Yoon Y.N., Lee D.S., Park H.J., et al. Barium titanate nanoparticles sensitise treatment-resistant breast cancer cells to the antitumor action of tumour-treating fields[J]. *Sci Rep*, 2020, 10: 2560.
- [83] Dempsey C., Lee I., Cowan K.R., et al. Coating barium titanate nanoparticles with polyethylenimine improves cellular uptake and allows for coupled imaging and gene delivery[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2013, 112: 108-112.
- [84] Wang Z.L., Song J. Piezoelectric nanogenerators based on zinc oxide nanowire arrays[J]. *Science*, 2006, 312: 242-246.
- [85] Marino A., Almici E., Migliorin S., et al. Piezoelectric barium titanate nanostimulators for the treatment of glioblastoma multiforme[J]. *J Colloid Interface Sci*, 2019, 538: 449-461.
- [86] You H., Wu Z., Zhang L., et al. Harvesting the vibration energy of bifeo nanosheets for hydrogen evolution[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019, 58: 11779-11784.
- [87] Li Z., Zhang T., Fan F., et al. Piezoelectric materials as sonodynamic sensitizers to safely ablate tumors: A case study using black phosphorus[J]. *J Phys Chem Lett*, 2020, 11: 1228-1238.
- [88] Starr M.B., Shi J., Wang X. Piezopotential-driven redox reactions at the surface of piezoelectric materials[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, 51: 5962-5966.

- [89] Schoellhammer C.M., Traverso G. Low-frequency ultrasound for drug delivery in the gastrointestinal tract[J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2016, 13: 1045-1048.
- [90] Deckers R., Moonen C.T.W. Ultrasound triggered, image guided, local drug delivery[J]. *J Control Release*, 2010, 148: 25-33.
- [91] Sneider A., VanDyke D., Paliwal S., et al. Remotely triggered nano-theranostics for cancer applications[J]. *Nanotheranostics*, 2017, 1: 1-22.
- [92] Xue X., Zang W., Deng P., et al. Piezo-potential enhanced photocatalytic degradation of organic dye using ZnO nanowires[J]. *Nano Energy*, 2015, 13: 414-422.
- [93] Akalin O.B., Bayraktar H. Alteration of cell motility dynamics through collagen fiber density in photopolymerized polyethylene glycol hydrogels[J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 157: 414-423.
- [94] Łopacińska J.M., Grădinaru C., Wierzbicki R., et al. Cell motility, morphology, viability and proliferation in response to nanotopography on silicon black[J]. *Nanoscale*, 2012, 4: 3739-3745.
- [95] Ross A.M., Jiang Z., Bastmeyer M., et al. Physical aspects of cell culture substrates: Topography, roughness, and elasticity[J]. *Small*, 2012, 8: 336-355.
- [96] Kaivosoja E., Barreto G., Levón K., et al. Chemical and physical properties of regenerative medicine materials controlling stem cell fate[J]. *Ann Med*, 2012, 44: 635-650.
- [97] Chen C.C., Hsieh C.H., Wang G.M., et al. The influence of surface morphology and rigidity of the substrata on cell motility[J]. *Mater Lett*, 2009, 63(21): 1872-1875.
- [98] Kostic A., Lynch C.D., Sheetz M.P. Differential matrix rigidity response in breast cancer cell lines correlates with the tissue tropism[J]. *PLoS One*, 2009, 4: e6361.
- [99] Metwally S., Stachewicz U. Surface potential and charges impact on cell responses on biomaterials interfaces for medical applications[J]. *Mat Sci Eng C-Mater*, 2019, 104: 109883.
- [100] Zhang K., Xing J., Chen J., et al. A spatially varying charge model for regulating site-selective protein adsorption and cell behaviors[J]. *Biomater Sci*, 2019, 7: 876-888.
- [101] Ribeiro S., Puckert C., Ribeiro C., et al. Surface charge-mediated cell-surface interaction on piezoelectric materials[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12: 191-199.
- [102] Chen S., Guo Y., Liu R., et al. Tuning surface properties of bone biomaterials to manipulate osteoblastic cell adhesion and the signaling pathways for the enhancement of early

- osseointegration[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2018, 164: 58-69.
- [103] Marques S.M., Rico P., Carvalho I., et al. MC3T3-E1 cell response to Ti<sub>1-x</sub>Ag<sub>x</sub> and Ag-TiN<sub>x</sub> electrodes deposited on piezoelectric poly(vinylidene fluoride) substrates for sensor applications[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8: 4199-4207.
- [104] Asati A., Santra S., Kaittanis C., et al. Surface-charge-dependent cell localization and cytotoxicity of cerium oxide nanoparticles[J]. *ACS Nano*, 2010, 4: 5321-5331.
- [105] Wang K., Li J.F. Analysis of crystallographic evolution in (Na,K)NbO<sub>3</sub>-based lead-free piezoceramics by x-ray diffraction[J]. *Appl Phys Lett*, 2007, 91(26): 135-181.
- [106] Wang K., Yao F., Jo W., et al. Temperature-insensitive (K,Na)NbO<sub>3</sub>-based lead - free piezoactuator ceramics[J]. *Adv Funct Mater*, 2013, 23(33): 4079-4086.
- [107] Yao F.Z., Zhang M.H., Wang K., et al. Refreshing piezoelectrics: Distinctive role of manganese in lead-free perovskites[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10: 37298-37306.
- [108] Hu S., Delorme N., Liu Z., et al. Prosaposin down-modulation decreases metastatic prostate cancer cell adhesion, migration, and invasion[J]. *Mol Cancer*, 2010, 9: 30.
- [109] Graminha A.E., Honorato J., Dulcey L.L., et al. Evaluation of the biological potential of ruthenium(II) complexes with cinnamic acid[J]. *J Inorg Biochem*, 2020, 206: 111021.
- [110] Zakłós-Szyda M., Budryn G. The effects of trifolium pratense L. sprouts' phenolic compounds on cell growth and migration of MDA-MB-231, MCF-7 and HUVEC cells[J]. *Nutrients*, 2020, 12: 257.
- [111] Liu X., Tian X. Long noncoding RNA tcons\_00068220 promotes breast cancer progression by regulating epithelial-mesenchymal transition marker E-cadherin[J]. *Med Sci Monit*, 2021, 27: e929832.
- [112] Lin C.W., Shen S.C., Ko C.H., et al. Reciprocal activation of macrophages and breast carcinoma cells by nitric oxide and colony-stimulating factor-1[J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31: 2039-2048.
- [113] Ghiaseddin A.P., Shin D., Melnick K., et al. Tumor treating fields in the management of patients with malignant gliomas[J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2020, 21: 76.
- [114] Lee Y.J., Cho J.M., Sai S., et al. 5-Fluorouracil as a tumor-treating field-sensitizer in colon cancer therapy[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11: 1999.
- [115] Wang Y., Han X., Cui Z., et al. Bioelectricity, its fundamentals, characterization

methodology, and applications in nano - bioprobing and cancer diagnosis[J]. *Adv Biosyst*, 2019, 3(10).

[116] Lin L., Mahner S., Jeschke U., et al. The distinct roles of transcriptional factor KLF11 in normal cell growth regulation and cancer as a mediator of TGF- $\beta$  signaling pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21.

[117] Cheng Y.Q., Wang S.B., Liu J.H., et al. Modifying the tumour microenvironment and reverting tumour cells: New strategies for treating malignant tumours[J]. *Cell Prolif*, 2020, 53: e12865.

[118] Li J., Eu J.Q., Kong L.R., et al. Targeting metabolism in cancer cells and the tumour microenvironment for cancer therapy[J]. *Molecules*, 2020, 25(20): 4831.

[119] Du Y., Jiang B., Song S., et al. Metadherin regulates actin cytoskeletal remodeling and enhances human gastric cancer metastasis via epithelial-mesenchymal transition[J]. *Int J Oncol*, 2017, 51: 63-74.

[120] Rudzka D.A., Spennati G., McGarry D.J., et al. Migration through physical constraints is enabled by MAPK-induced cell softening via actin cytoskeleton re-organization[J]. *J Cell Sci*, 2019, 132.

[121] Jaatinen L., Young E., Hyttinen J., et al. Quantifying the effect of electric current on cell adhesion studied by single-cell force spectroscopy[J]. *Biointerphases*, 2016, 11: 011004.

[122] Fuhrmann A., Banisadr A., Beri P., et al. Metastatic state of cancer cells may be indicated by adhesion strength[J]. *Biophys J*, 2017, 112: 736-745.

[123] Kapoor S., Panda D. Kinetic stabilization of microtubule dynamics by indanocine perturbs EB1 localization, induces defects in cell polarity and inhibits migration of MDA-MB-231 cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 83: 1495-1506.

[124] Mikhailov A., Gundersen G.G. Relationship between microtubule dynamics and lamellipodium formation revealed by direct imaging of microtubules in cells treated with nocodazole or taxol[J]. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1998, 41: 325-340.

[125] Srivastava S., Panda D. A centrosomal protein FOR20 regulates microtubule assembly dynamics and plays a role in cell migration[J]. *BIOCHEM J*, 2017, 474(16): BCJ20170303.

[126] Berges R., Balzeau J., Peterson A.C., et al. A tubulin binding peptide targets glioma cells disrupting their microtubules, blocking migration, and inducing apoptosis[J]. *Mol Ther*,

---

2012, 20: 1367-1377.

[127] Sulzmaier F.J., Jean C., Schlaepfer D.D. FAK in cancer: Mechanistic findings and clinical applications[J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14: 598-610.

[128] Lark A.L., Livasy C.A., Dressler L., et al. High focal adhesion kinase expression in invasive breast carcinomas is associated with an aggressive phenotype[J]. *Mod Pathol*, 2005, 18: 1289-1294.

[129] Rigracciolo D.C., Cirillo F., Talia M., et al. Focal adhesion kinase fine tunes multifaced signals toward breast cancer progression[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13: 645.

[130] Huvenciers S., Danen E.H.J. Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho[J]. *J Cell Sci*, 2009, 122: 1059-1069.

[131] Meijer D., Agthoven T.V., Bosma P.T., et al. Functional screen for genes responsible for tamoxifen resistance in human breast cancer cells[J]. *Mol Cancer Res*, 2006, 4: 379-386.

[132] Mo W., Wu J., Qiu Q., et al. Platelet-rich plasma inhibits osteoblast apoptosis and actin cytoskeleton disruption induced by gingipains through upregulating integrin  $\beta 1$ [J]. *Cell Biol Int*, 2020, 44: 2120-2130.

[133] Ciofani G. Piezoelectric effects of materials on bio-interfaces[J]. *Acs Appl Mater Inter*, 2017, 9(21): 17663-17680.

[134] Zhang D., Lin Z., Zheng Y., et al. Ultrasound-driven biomimetic nanosystem suppresses tumor growth and metastasis through sonodynamic therapy, co-therapy, and indoleamine 2,3-dioxygenase inhibition[J]. *ACS Nano*, 2020, 14: 8985-8999.

[135] Marino A., Arai S., Hou Y., et al. Piezoelectric nanoparticle-assisted wireless neuronal stimulation[J]. *ACS Nano*, 2015, 9: 7678-7689.

[136] Rojas C., Tedesco M., Massobrio P., et al. Acoustic stimulation can induce a selective neural network response mediated by piezoelectric nanoparticles[J]. *J Neural Eng*, 2018, 15: 036016.

[137] O'Reilly E.A., Gubbins L., Sharma S., et al. The fate of chemoresistance in triple negative breast cancer (TNBC)[J]. *BBA Clin*, 2015, 3: 257-275.

[138] Hamada Y., Furumoto Y., Izutani A., et al. Nanosecond pulsed electric fields induce the integrated stress response via reactive oxygen species-mediated heme-regulated inhibitor (HRI) activation[J]. *PLoS One*, 2020, 15: e0229948.

[139] Pandit S., Shanbhag S., Mauter M., et al. Influence of electric fields on biofouling of carbonaceous electrodes[J]. *Environ Sci Technol*, 2017, 51: 10022-10030.

[140] Boda S.K., Bajpai I., Basu B. Inhibitory effect of direct electric field and HA-ZnO composites on *S. aureus* biofilm formation[J]. *J BIOMED MATER RES B*, 2016, 104(6): 1064-1075.

[141] Klaunig J.E. Oxidative stress and cancer[J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 24: 4771-4778.

[142] Hayes J.D., Dinkova-Kostova A.T., Tew K.D. Oxidative stress in cancer[J]. *Cancer Cell*, 2020, 38(2): 167-197.

## 攻读硕士学位期间取得的研究成果

序号	作者（全体作者，按顺序排列）	题 目	发表或投稿刊物名称、级别	发表的卷期、年月、页码	相当于学位论文的哪一部分（章、节）	被索引收情况
1	戚穗坚，李秋锦，郝玲	一种祛除苦涩味的高活性浓度青橄榄汁及其制备方法	专利	2019.2.19 (CN109349465A)		
2	郝玲，戚穗坚	超声辅助铌酸钾钠压电颗粒的制备及其抑制乳腺癌的研究	广州化工	录用待发表	第三章	CA

## 致谢

三年硕士生活匆匆而逝，还没来得及走完校园的每一条小路、还没去完饭堂的每一个窗口、还没和每个人好好的说一声珍重，却又到了如今这个必须又要说再见的日子。在硕士生活即将结束之际，我要向一路给予陪伴与帮助的家人朋友导师同学表达我最为真挚的感谢。

感谢我的导师戚穗坚老师，本论文的研究工作就是在戚老师的悉心指导下完成的。戚老师温暖细致，在我刚刚踏入研究生生活满是不适时，给我的学习、生活给予了很多的指导、关心与鼓励；戚老师认真专业，在我课题的开展、尤其是遇到困难时给了我很多建议与帮助；戚老师更是充满着自己的人格魅力，在研究课题上，给我极大的空间，让我的思维、能力得到锻炼；在生活中，她真诚而随和，让我可以毫无压力的和她交流沟通，让我快速的对她信任与依靠。与老师相处的三年，是对科研能力的锻炼与学习，也是一段轻松快乐的研究生生活。

感谢宁成云教授，于鹏老师与谭帼馨教授。一直都很开心，也很荣幸加入电话性生物材料课题组。感谢老师们提供的平台，在这里，我有了机会去了解并对这方面的内容进行研究；有机会去进行更多的对外学习、交流。感谢各位老师对自己研究课题方向的展开、课题内容等各方面的指导与建议。三年硕士生活深受老师们严谨治学、谦虚处事的作风所感染，这对我的学习、生活都大有裨益。

感谢课题组的每一位小伙伴。感谢你们的真诚与温暖，让我这个很慢热的人能够快速融入这里、自在的学习生活；感谢你们的善良，让我在科研中遇到不懂的问题时都可以寻求到帮助；感谢你们的耐心，一次次被我打扰仍然给我关心帮助鼓励；感谢你们的优秀与阳光，给了我很多前进的方向和力量；感谢你们的幽默和快乐，让平淡的生活多了好多欢笑，些许暗淡的日子多了好多明媚、轻松和惬意。李扬帆、王珍高、翟锦霞、周正南、周蕾、范磊、邢君、付如民、肖才榕、黎昌昊、黄晓、杨虹、刘广宇、冉合迎、李秋锦、李晓君、罗义安、詹莉珍、张欢、李玮、林坚、钟新香、邓伟成、杨法邦、张哲琨、黄怡萱、黎莞杏、管幼钧、康新昌、田雨以及已经毕业的师兄师姐们，一路陪伴，一路成长，遇见你们真好！

感谢华南理工大学，感谢食品科学与工程学院及遇到的每一位老师，让我有能够继续学习的机会；感谢中山大学易长青副教授和深圳瑞赛生物技术有限公司的张恒董事长，在我专业实践过程中提供的支持与指导；感谢每一位朋友，无论是快乐

还是悲伤，有你们一起分享就很好；感谢我的三任室友，我们共同把宿舍打造成第二个家，很温暖；感谢每一位也曾给了我温暖帮助的陌生人，是你们让我感受美好，相信善良。

最后感谢我的父母和亲人们。所有失意、困难、沮丧、灰暗的时光，都因为你们，我才有了去突破和改变的勇气，有了去努力和坚持的力量。我知道你们一直与我同在，感谢你们！

感谢大家！感恩生活！

### 3.答辩委员会对论文的评语

(主要内容包括: 1.对论文的综合评价; 2.对论文主要工作和创造性成果的简要介绍; 3.对作者掌握基础理论、专业知识程度、独立从事科研工作能力以及在答辩中表现的评价; 4.存在的不足之处和建议; 5.答辩委员会结论意见等)

该研究利用具有稳定可调表面带电特性的铌酸钾钠(KNN)块体压电陶瓷研究材料表面电势对乳腺癌细胞迁移侵袭行为的影响及机制,并利用超声促进极化KNN压电纳米颗粒产生无源、可控的电刺激,研究对乳腺癌细胞活性抑制作用及机制。选题为电刺激用于抗肿瘤研究提供一种新型选择。

论文构建带电模型探究材料表面带电差异对细胞运动行为的影响,表明高表面电势80KNN样品能够极其显著的抑制2种乳腺癌细胞的迁移、侵袭能力;进一步通过免疫荧光染色及PCR发现可能的原因是材料表面高电势抑制乳腺癌细胞极化,改变微管聚集状态,促进细胞扁平状形态结构的形成和强黏附的形成。同时将超声和400  $\mu\text{g/mL}$ 的极化KNN颗粒共同作用于乳腺癌细胞,发现能够显著抑制2种乳腺癌的活性,并且2种癌细胞的骨架结构遭到破坏,运动能力丧失。进一步表明可能的机制是过量活性氧的产生及癌细胞的凋亡与坏死。

论文文献综述全面,撰写规范,逻辑性强;实验设计合理,工作量充足,表明作者具有熟练的实验技能,扎实的基础知识和一定的独立科研能力;答辩中能正确回答问题,表明对研究内容的充分了解认识。

答辩委员会认为该论文已达到硕士学位论文水平,一致同意该论文通过答辩,建议授予工程硕士学位。

论文答辩日期: 2021年6月5日

答辩委员会委员 5 人

表决票数: 同意毕业及授予学位 (5) 票

同意毕业,但不同意授予学位 ( ) 票

不同意毕业 ( ) 票

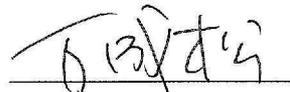
表决结果(打“√”): 同意毕业及授予学位 (√)

同意毕业,但不同意授予学位 ( )

不同意毕业 ( )

答辩成员  
签名

 (主席)  


答辩秘书  
签名

