

文章编号: 1004-7220(2023)05-0924-07

利用 FRET 技术检测不同力学条件下 T 细胞中 ERK 活性的脉冲现象

盛会^{a,b#}, 李亚芹^{a,b#}, 邢雨洁^{a,b#}, 邓林红^{a*}, 欧阳明星^{a*}

(常州大学 a. 医学与健康工程学院, 生物医学工程与健康科学研究院; b. 药学院 生物与食品工程学院, 江苏 常州 213164)

摘要:目的 探索 Jurkat T 细胞中胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)活性动力学以及基质刚度对 ERK 活性的影响。方法 利用荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)技术实时观测 Jurkat 细胞中 ERK 活性的变化,或细胞处于 I 型胶原基质胶中检测其影响。结果 部分 Jurkat 细胞中存在 ERK 活性脉冲现象,频率约为 3 次/h, FRET 振幅变化约为 20%。在抗体激活 T 细胞抗原受体(T-cell receptor, TCR)的条件下, ERK 脉冲依然存在,频率和振幅无显著变化。当细胞处于 I 型胶原水凝胶中,随着胶基质刚度增加,脉冲频率有所下调。结论 Jurkat T 细胞中存在自发的 ERK 活性脉冲现象,初步实验显示其频率受基质刚度影响。而该信号波动的生理意义和分子机制仍有待探索。

关键词: T 细胞; 胞外调节蛋白激酶; 荧光共振能量转移; 信号脉冲; 基质刚度

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2023.05.012

Detection of Pulsating ERK Activity in T Cells under Biomechanical Conditions by FRET Imaging

SHENG Hui^{a,b#}, LI Yaqin^{a,b#}, XING Yujie^{a,b#}, DENG Linhong^{a*}, OUYANG Mingxing^{a*}

(a. Institute of Biomedical Engineering and Health Sciences, School of Medical and Health Engineering; b. School of Pharmacy & School of Biological and Food Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, Jiangsu, China)

Abstract: Objective To study kinetics of extracellular regulated protein kinase (ERK) activity in Jurkat T cells and the effect of matrix stiffness on ERK activity. **Methods** ERK activity in cells was visualized by fluorescence resonance energy transfer (FRET) biosensor, and the cells were embedded into type I collagen (COL) hydrogel to detect the biomechanical effect. **Results** Pulsation of ERK activity was found in a sub-group of Jurkat cells, the frequency was about three times per hour, and the average change in oscillating magnitude was about 20%. Under the condition of T-cell receptor (TCR) activation with antibodies, ERK pulse still existed, but the frequency and amplitude did not change significantly. ERK showed a decreased frequency of pulsation in COL hydrogel with an increased matrix stiffness. **Conclusions** ERK has autonomous pulsating activity in Jurkat T cells, and preliminary experiments show that the frequency is regulated by matrix stiffness. The physiological implication of ERK oscillation and the underlying molecular mechanism need further study.

Key words: T cell; extracellular regulated protein kinases (ERK); fluorescence resonance energy transfer (FRET); signal pulsation; matrix stiffness

收稿日期: 2022-12-14; 修回日期: 2023-01-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(11872129, 11532003), 江苏省科技厅自然科学基金项目(BK20181464)

通信作者: 邓林红, 教授, E-mail: dlh@cczu.edu.cn; 欧阳明星, 教授, E-mail: mxouyang@cczu.edu.cn

#为共同第一作者, *为共同通信作者

T 淋巴细胞(T lymphocyte)简称 T 细胞,在胸腺发育完成后,通过淋巴系统和血液循环分布到全身的免疫器官和组织中发挥免疫功能^[1]。T 细胞免疫是机体防御肿瘤细胞和病原生物的屏障,其功能对人类抵御疾病至关重要^[2]。

胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)信号传递遵循丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族蛋白的三级酶促级联反应,即 Ras-Raf-MEK-ERK 途径^[3]。研究表明, Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路不仅参与细胞的增殖、分化、凋亡和转移等过程,而且在大部分肿瘤细胞中,该信号通路有相应的表达上升^[4]。MAPK 信号传输通路在控制细胞的多种生理过程中起重要作用,其中 ERK 参与细胞生长、发育和分裂相关的调节作用^[5-6]。ERK 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是一种传递有丝分裂原信号的信号转导蛋白^[7]。两个同位蛋白 ERK1/2 位于细胞质中,激活后 ERK1/2 部分转移到细胞核,并通过磷酸化作用调节多种转录因子的活性,从而调节细胞代谢和功能,影响细胞的特定生物学效应^[8-10]。

近期的活细胞成像研究显示 ERK 活性具有波动和传播特征,例如在小鼠的表皮层中, ERK 活性可呈波浪状传播到邻近细胞^[11]; MCF-10A 乳腺上皮细胞在稳态条件下, ERK 活性的脉冲频率和持续时间受到高于生理范围的 EGF 浓度调节^[12]; 大鼠肾上皮细胞(NRK-52E)的延时荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)成像显示,在培养基中存在 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的情况下,细胞表现随机 ERK 活性脉冲^[13]。

本文通过 FRET 分子探针可视化观测,证实 Jurkat T 细胞中存在自发的 ERK 活性脉冲现象^[14-15]。研究发现, ERK 活性的脉冲现象已存在于不同种类细胞中,包括 HeLa 细胞、COS7 细胞和小鼠胚胎肝细胞、Madin-Darby 犬肾(Madin-Darby canine kidney, MDCK)细胞、人乳腺上皮细胞等^[11, 13, 16], 普遍的脉冲频率为 1.5~2.0 次/h。T 细胞抗原受体(T cell receptor, TCR)信号是 T 细胞免疫激活中的关键通路^[17]。本研究使用分子簇 3(CD3)和 T 细胞表面共刺激受体 CD28 抗体激活 TCR 信号的方法^[18], 检测该信号是否影响 ERK 活

性脉冲现象。此外, ERK 活性也受基质刚度调控,并且已证明基质刚度会影响 T 细胞的活性^[19]。本文还初步探讨了不同力学微环境下的 ERK 活性脉冲。

1 材料与方法

1.1 材料

人 T 淋巴白血病细胞(Jurkat, Clone E6-1 细胞)购自北纳创联生物科技有限公司; FBS、RPMI-1640 培养基购自美国 Gibco 公司; 多聚赖氨酸(PL)购自上海麦克林生化科技股份有限公司; CD3 抗体购自 Biologend(北京)生物科技有限公司; Collagen I 购自美国 Advanced BioMatrix 公司; 激光共聚焦培养皿(直径 20 mm)购自无锡耐思生物科技有限公司; CD28 抗体、电转仪(Neon, 0.5~2.5 kV)及相关试剂购自美国 Thermo 公司; FRET 显微镜平台和倒置显微镜 Primo Vert 购自德国 Zeiss 公司。

1.2 方法

1.2.1 Jurkat 细胞转染 FRET 探针 采用电转方法将 ERK FRET 探针转染进入 Jurkat 细胞中,具体操作如下:①在 24 孔细胞培养板中,用移液枪在每个孔加入 500 μ L RPMI-1640 培养液(10% FBS),置于细胞培养箱中预热;②每孔接种 2×10^5 个细胞,通过计数取适量细胞悬液离心(1 000 r/min, 3 min),用磷酸盐缓冲液(pHosphate buffered solution, PBS)清洗细胞两次;③用电转缓冲液重悬细胞,加入 ERK 质粒并混匀,用电转移液枪吸 10 μ L 细胞悬液(注意无气泡);④将移液枪插入电转仪中,设置电压为 1 325 V,时间为 10 ms,冲击数为 3 次;⑤电转结束后,将细胞液体转入预热的培养基中,于 37 $^{\circ}$ C 继续培养。

1.2.2 不同浓度 I 型胶原(collagen, COL)水凝胶包埋 Jurkat 细胞 在冰上将 45 μ L 不同浓度 COL 分别和 5 μ L 中和液于 300 μ L EP 管内混合,然后加入 Jurkat 细胞混匀, COL 终浓度分别为 1、4 mg/mL。用移液枪将细胞混合液转移至共聚焦皿中,置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中 15 min 成胶后,加入 1 mL 培养基进行显微镜成像。

1.2.3 原子力显微镜检测胶原弹性模量

(1) PDMS 模具制备:称取 10 g PDMS 胶于 10 mL 小烧杯中,加入 1 g 胶对应的交联剂,混合搅拌

15 min, 随后将其放于真空抽吸仪中除去气泡, 倒入内径为 9 cm 大皿内铺展, 然后置于烘箱内成胶, 最终得到 PDMS 膜。将 PDMS 膜用小刀制作成多个中空小方框模具, 泡于酒精中除菌待用。

(2) 胶原弹性模量测量: 由于胶原价格昂贵, 为保证基质胶均匀形成, 把 PDMS 模具置于洁净载玻片上, 将基质胶在冰上混匀后铺于 PDMS 框中, 于 37 °C 培养箱中成胶 15 min 后, 去除 PDMS 模具。选择测量样品合适的探头安装于原子力显微镜上, 样品上机前滴加三蒸水, 使样品处于湿润状态。设置好各项参数后, 在原子力显微镜下检测样品的弹性模量。

1.2.4 抗体激活 Jurkat 细胞 TCR 实验 抗体激活 TCR 实验条件包括以下情况: 共聚焦皿包被非特异性吸附的抗体 IgG (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 或者包被 CD3 抗体 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 并在培养基中加入 CD28 抗体 (CD3/CD28); 然后将转染 ERK FRET 的 Jurkat T 细胞接种在皿底上, 进行 FRET 成像。

1.2.5 FRET 显微镜采集 Jurkat 细胞图像 将 ERK FRET 质粒电转入 Jurkat 细胞, 培养在含 10% FBS 的 1640 培养基中。转染 48 h 后, 吸取 100 ~ 200 μL 细胞悬液置于共聚焦皿上, 用 FRET 显微镜进行荧光成像。通过多点定位功能选择细胞群体进行延时 FRET 成像, 每个拍摄循环间隔 2 ~ 3 min, 采用 FluoCell 软件分析获得 FRET 荧光比值 (FRET/ECFP) 和代表比值高低的细胞彩图。FRET 显微镜 ECFP 成像通道的荧光滤片参数为激发 436/20 nm、分光 455 nm、发射 480/40 nm; FRET 成像通道的荧光滤片参数为激发 436/20 nm、分光 455 nm、发射 535/30 nm。

1.2.6 FRET 图像数据统计分析 通过软件 FluoCell 对 FRET 图像进行数据分析。采用软件 Origin 和 GraphPad Prism 6 进行统计处理, 实验定量数据以平均值 \pm 标准差表示。采用 *t* 检验分析显著性差异, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

本研究中, 以 ERK FRET 变化幅度超过 10% 定义为 1 个有效脉冲, 虽然可能会忽略小的脉冲变化, 但有助于统计中消除实验系统误差所引起的 FRET 波动, 并比较不同实验条件下的脉冲变化。脉冲分析包括上升或下降的变化, 依据平均 1 h 内变化数计算脉冲频率。

2 结果

2.1 FRET 成像显示随机的 ERK 活性脉冲

本研究使用一种高度灵敏的 ERK FRET 生物传感器 EKAREV, 用以测量单细胞中的 ERK 活性^[20-21]。转染 ERK FRET 质粒的 Jurkat 细胞接种在 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ IgG 抗体包被的共聚焦皿上 (抗体球蛋白增加细胞非特异性黏附), 进行延时 FRET 成像, 通过软件计算分析 FRET 荧光比值 (FRET/CFP)。结果发现, 一部分 Jurkat 细胞中 (占比 20% ~ 30%), ERK 活性呈现自发的上升和下降波动现象 [见图 1(a)]。其中, 细胞的颜色代表 FRET/CFP 的荧光比值变化, 从蓝到红代表 ERK 活性从低到高的分布。在同一观测视野中, 细胞有明显的 FRET 变化, 也有细胞保持相对稳定, 其作为参照有助于证实 ERK 活性脉冲的客观性。本文以“FRET 变化幅度超过 10%”定义为 1 个有效脉冲变化, 以消除实验系统误差引起的波动。在量化分析的细胞样品中, 反映 ERK 活性脉冲的 FRET 比值变化区间主要位于 1.5 ~ 2.5 之间 [见图 1(b)]。此前有研究报道了单个原代人类新生儿角质形成细胞 (human normal keratinocyte, HNK) 中的 ERK 活性进行实时成像, 脉冲频率范围为 0 ~ 4.5 个/h, 其 ERK 活性脉冲的 FRET 变化区间主要位于 1.0 ~ 1.5^[22]。Jurkat 细胞中的 ERK 脉冲频率呈类似现象, 活性变化 1 ~ 5 次/h, 平均变化幅度约为 20% [见图 1(c)]。同时, 也注意到所观测的细胞样品中, 总体上 ERK 活性呈现一种下降趋势 [见图 1(d)、(e)]。

2.2 TCR 激活作用下 Jurkat T 细胞中 ERK 活性脉冲现象

接下来探索不同物理或化学作用条件下, Jurkat T 细胞中是否存在 ERK 活性脉冲现象。首先初步检测 TCR 信号是否与 ERK 活性脉冲有相关性。TCR 接合时产生的信号在 T 淋巴细胞功能的调节中至关重要。TCR 信号转导经由数种酪氨酸激酶在胞内侧介导, 其协同作用激活多种信号分子^[23-24]。这些下游效应物中包括磷脂酶 C- γ 1 (phospholipase C gamma 1, PLC γ 1) 和 ERK, 两者需要被激活才能使 TCR 参与导致 T 细胞活化。CD3 和 CD28 是 T 细胞免疫活化的激活因子^[25-26]。将转染 ERK FRET 的 Jurkat T 细胞接种在 CD3 抗体包

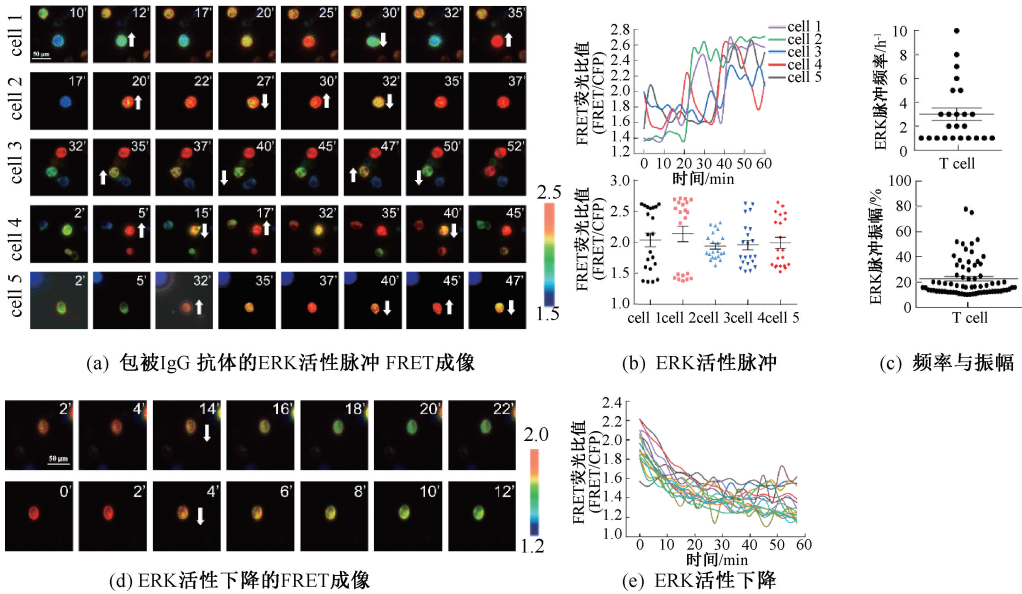


图 1 FRET 检测 Jurkat T 细胞内 ERK 活性脉冲现象

Fig. 1 Pulsation of ERK activity in Jurkat T cells by FRET detection (a) FRET imaging of ERK pulsations on IgG-coated glass, (b) ERK activity pulsations, (c) Frequency and magnitude, (d) FRET imaging with decreasing activity, (e) Decreasing ERK activity

注: 图 1(a) 右上角为成像的时间点 (min); 箭头指示 FRET 比值的上升或下降趋势。

被的培养皿上, 培养基中加入 CD28 抗体 (CD3/CD28), CD3 抗体浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CD28 抗体浓度

为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 进行 FRET 成像。结果表明, T 细胞中 ERK 仍呈现了活性脉冲现象 (见图 2)。

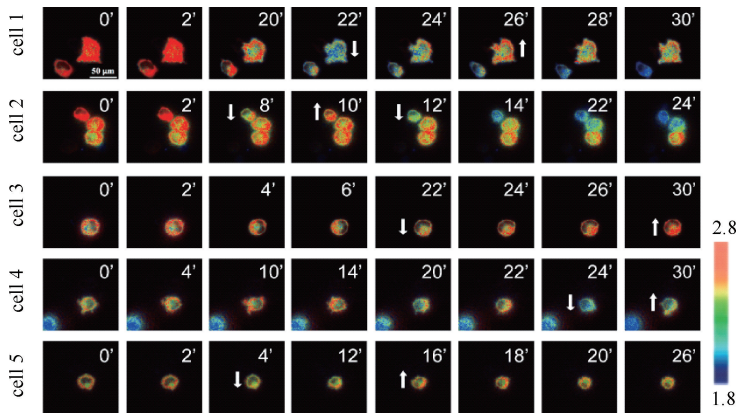


图 2 FRET 检测 Jurkat T 细胞内 TCR 激活后的 ERK 活性脉冲现象

Fig. 2 ERK activity pulsations detected by FRET after TCR activation in Jurkat T cells

注: 从蓝到红代表 ERK 活性从低到高的分布。

同时, 本文发现, FRET 比值的波动范围也主要位于 2.5~2.8 之间 [见图 3(a)]。在抗体刺激的作用下, T 细胞中 ERK 活性有上调, 与之前报道相似, 即 CD3 抗体刺激使 Jurkat 细胞中 ERK 激活^[27-28]。因此, 在 TCR 通过抗体激活作用下, ERK 活性脉冲的

现象仍然存在, 而且和非特异性 IgG 抗体包被的共聚焦皿上的细胞相比, 其脉冲频率变化没有显著性变化 [见图 3(b)], 其脉冲的振幅变化 (平均 20%) 无显著性差异 [见图 3(c)]。该结果提示, Jurkat 细胞中 ERK 活性的自发脉冲频率不受 TCR 信号的直接调控。

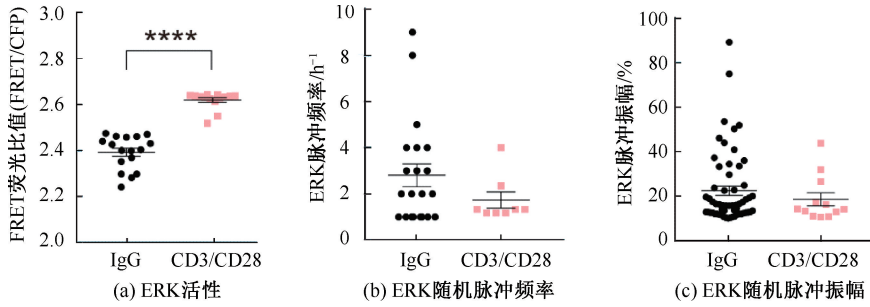


图3 CD3、CD28 共刺激对 ERK 脉冲的影响

Fig. 3 Effects of CD3 and CD28 co-stimulation on ERK pulsations (a) ERK activity, (b) Frequency of ERK pulsations, (c) Magnitude of ERK pulsations

注: **** $P < 0.0001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.1$ 。

2.3 胶原水凝胶中的 ERK 活性脉冲现象

细胞周围基质刚度的变化同样也会影响细胞生化信号^[29-30],故进一步检测在胶原基质胶中的 ERK 活性是否有脉冲现象。将转染 ERK FRET 的 Jurkat 细胞分别包埋于 1、4 mg/mL I 型胶原 (collagen I) 中,于 37 °C 培养箱中成胶 15 min 后,进行显微镜成像。结果表明,细胞在溶液中或包埋在不同浓度的胶原水凝胶中(0、1、4 mg/mL),ERK 活性脉冲现象仍然存在(见图 4)。在溶液或胶原水凝胶中的同一个成像视

野下,有的细胞出现明显 FRET 上升或下降,有的细胞保持 FRET 相对稳定,从而为脉冲变化的细胞提供了同一观察条件下的对照,显示了 ERK 活性脉冲的客观存在。

测量水凝胶刚度,随着胶原浓度增加,水凝胶的刚度升高[见图 5(a)],该结果和文献报道相似^[31-32]。进一步定量分析发现,与溶液态中的细胞相比较,在胶原水凝胶中的细胞 ERK 活性脉冲频率出现下调,并且随刚度增加呈下降趋势[见图 5(b)],而对脉冲振幅的影响没有明显的规律

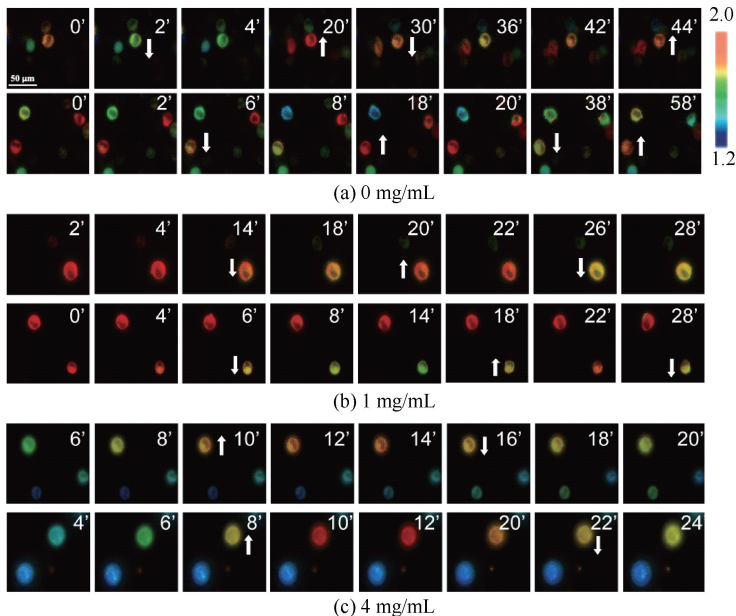


图4 在不同浓度 I 型胶原水凝胶中 ERK FRET 脉冲变化

Fig. 4 ERK FRET pulsations within different concentrations of type I collagen hydrogels (a) 0 mg/mL, (b) 1mg/mL, (c) 4 mg/mL

注:从蓝到红代表 ERK 活性从低到高的分布。

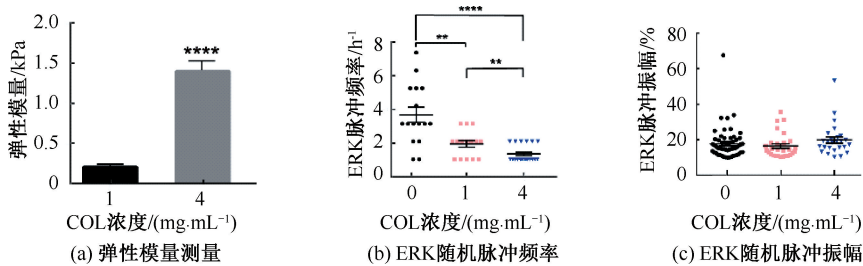


图 5 刚度胶原水凝胶对 ERK 脉冲的影响

Fig. 5 Effects of collagen hydrogel stiffness on ERK pulsations (a) Elastic modulus, (b) Frequency of ERK pulsations, (c) Magnitude of ERK pulsations

注: **** $P < 0.0001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.1$ 。

性变化[见图 5(c)]。这些结果初步显示,细胞基质刚度环境对 ERK 脉冲现象具有调节作用,其中的力学信号机制有待进一步的深入探索。

3 讨论

体内 T 细胞正常活化是实现机体免疫功能的基本要求,具体表现为 T 细胞增殖、分化、分泌免疫因子等,其中 ERK 激酶参与调控 T 细胞的生长和分化^[33]。研究发现,ERK 脉冲与细胞增殖和组织形态发生有关,如生长因子 EGF 刺激上皮细胞产生的 ERK 活性脉冲^[22]、贴壁培养的上皮干细胞在分化过程中的 ERK 活性振荡^[22]。本文利用 FRET 技术发现 Jurkat T 细胞中存在自发的 ERK 活性脉冲,并证实这个现象在不同的培养条件下仍然存在,并且可能受力学微环境的影响。

本文初步探索了 Jurkat 细胞中产生 ERK 活性脉冲的影响因素,如激活 TCR 信号、包埋在胶原基质中以改变细胞微环境刚度。T 细胞能够通过 T 细胞抗原受体 TCR 辅助受体 CD3 和 CD28 使 ERK 激活,CD28 是细胞激活的共刺激信号^[26]。实验结果表明,使用 CD3 和 CD28 抗体激活 TCR 后,ERK 活性上调且仍存在 ERK 活性脉冲,与非特异性的对照抗体相比,脉冲频率和振幅没有显著性变化。该结果初步提示,TCR 信号不直接参与 ERK 活性脉冲频率的调控。

胶原纤维是动物细胞外基质中的主要机械成分,为组织提供稳定的构架。研究表明,胶原蛋白促进 Jurkat T 细胞的增殖和存活能力提升,细胞内信号通路观测显示黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)和 ERK 活性增加^[34]。本文使用胶原

基质包埋技术改变细胞的物理微环境,结果表明,与培养液中的细胞相比,在水凝胶中的脉冲频率明显下调。该结果提示,力学微环境可能参与调节 Jurkat T 细胞中的 ERK 活性脉冲现象。考虑基质刚度影响多个细胞内信号通路,如肌丝骨架聚合、黏着斑和收缩力相关的信号^[35],胶原水凝胶刚度如何调控 ERK 脉冲的力学信号转导途径,还有待进一步阐明。

细胞信号通路的波动越来越被认为是组织发育的关键决定因素,这些波动的多方面特征,如频率和幅度,在细胞命运方面提供了潜在的不同输出效果。通过 FRET 成像观测,本研究发现 T 细胞中的 ERK 活性存在自发波动现象,其生理意义和分子调控机制仍有待探索。

参考文献:

- [1] 孙君重,肖文华,于力. CD4+T 淋巴细胞功能研究新进展[J]. 中国实验血液学杂志, 2010, 18(2): 544-548.
- [2] MICHALEK RD, RATHMELL JC. The metabolic life and times of a T-cell [J]. Immunol Rev, 2010, 236: 190-202.
- [3] DEIRMENCI U, MEI W, HU J. Targeting aberrant RAS/RAF/MEK/ERK signaling for cancer therapy [J]. Cells, 2020, 9(1): 198.
- [4] ROSKOSKI R. ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation [J]. Pharmacol Res, 2012, 66(2): 105-143.
- [5] CARGNELLO M, ROUX PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2011, 75(1): 50-83.
- [6] GUO YJ, PAN WW, LIU SB, et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis [J]. Exp Ther Med, 2020, 19(3): 1997-2007.
- [7] SUN Y, LIU WZ, LIU T, et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis [J]. J Recept Signal Transduct

- Res, 2015, 35(6): 600-604.
- [8] IROEGBU JD, IJOMONE OK, FEMI-AKINLOSOTU OM, *et al.* ERK/MAPK signalling in the developing brain: Perturbations and consequences [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2021, 131: 792-805.
- [9] FANG JY, RICHARDSON BC. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer [J]. *Lancet Oncol*, 2005, 6(5): 322-7.
- [10] WU PK, BECKER A, PARK JI. Growth inhibitory signaling of the Raf/MEK/ERK Pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(15): 5436.
- [11] RAINA D, FABRIS F, MORELLI L G, *et al.* Intermittent ERK oscillations downstream of FGF in mouse embryonic stem cells [J]. *Development*, 2022, 149(4): dev199710.
- [12] SPARTA B, PARGETT M, MINGUET M, *et al.* Receptor level mechanisms are required for epidermal growth factor (EGF)-stimulated extracellular signal-regulated kinase (ERK) activity pulses [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(41): 24784-24792.
- [13] AOKI K, KUMAGAI Y, SAKURAI A, *et al.* Stochastic ERK activation induced by noise and cell-to-cell propagation regulates cell density-dependent proliferation [J]. *Mol Cell*, 2013, 52(4): 529-540.
- [14] 王英晓. 力传导中亚细胞水平的分子 FRET 成像 [J]. *医用生物力学*, 2016, 31(4): 308-318.
WANG YX. FRET imaging of molecular hierarchy at subcellular levels in mechanotransduction [J]. *J Med Biomech*, 2016, 31(4): 308-318.
- [15] HARVEY CD, EHRHARDT AG, CELLURALE C, *et al.* A genetically encoded fluorescent sensor of ERK activity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(49): 19264-19269.
- [16] SHANKARAN H, IPPOLITO DL, CHRISLER WB, *et al.* Rapid and sustained nuclear-cytoplasmic ERK oscillations induced by epidermal growth factor [J]. *Mol Syst Biol*, 2014, 5: 332.
- [17] ZHONG S, MALECEK K, PEREZ-GARCIA A, *et al.* Retroviral transduction of T-cell receptors in mouse T-cells [J]. *J Vis Exp*, 2010, (44): 2307.
- [18] CALIANESE D, KREISS T, KASIKARA C, *et al.* Phosphatidylserine-targeting monoclonal antibodies exhibit distinct biochemical and cellular effects on anti-CD3/CD28-stimulated T cell IFN- γ and TNF- α production [J]. *J Immunol*, 2021, 207(2): 436-448.
- [19] JUDOKUSUMO E, TABDANOV E, KUMARI S, *et al.* Mechanosensing in T lymphocyte activation [J]. *Biophys J*, 2012, 102(2): L5-7.
- [20] AOKI K, KONDO Y, NAOKI H, *et al.* Propagating wave of ERK activation orients collective cell migration [J]. *Dev Cell*, 2017, 43(3): 305-317.
- [21] AOKI K, KOMATSU N, HIRATA E, *et al.* Stable expression of FRET biosensors: A new light in cancer research [J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(4): 614-619.
- [22] HIRATSUKA T, BORDEU I, PRUESSNER G, *et al.* Regulation of ERK basal and pulsatile activity control proliferation and exit from the stem cell compartment in mammalian epidermis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(30): 17796-17807.
- [23] ZHANG W, SAMELSON LE. The role of membrane-associated adaptors in T cell receptor signalling [J]. *Semin Immunol*, 2000, 12(1): 35-41.
- [24] CLEMENTS JL, BOERTH NJ, LEE JR, *et al.* Integration of T cell receptor-dependent signaling pathways by adapter proteins [J]. *Annu Rev Immunol*, 1999, 17: 89-108.
- [25] NGUYEN TD, CARRASCAL M, VIDAL-CORTES O, *et al.* The phosphoproteome of human Jurkat T cell clones upon costimulation with anti-CD3/anti-CD28 antibodies [J]. *J Proteomics*, 2016, 131: 190-198.
- [26] BASHOUR KT, GONDARENKO A, CHEN H, *et al.* CD28 and CD3 have complementary roles in T-cell traction forces [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(6): 2241-2246.
- [27] CHAU LA, BLUESTONE JA, MADRENAS J. Dissociation of intracellular signaling pathways in response to partial agonist ligands of the T cell receptor [J]. *J Exp Med*, 1998, 187(10): 1699-709.
- [28] SHAN X, BALAKIR R, CRIADO G, *et al.* Zap-70-independent Ca²⁺ mobilization and Erk activation in Jurkat T cells in response to T-cell antigen receptor ligation [J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(21): 7137-7149.
- [29] CHIRIVI M, MAIULLARI F, MILAN M, *et al.* Tumor extracellular matrix stiffness promptly modulates the phenotype and gene expression of infiltrating T lymphocytes [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11): 5862.
- [30] 秦翔, 吕晓莹, 李顺, 等. 基质刚度通过调节 YAP 活化控制乳腺癌细胞的耐药性 [J]. *医用生物力学*, 2019, 34(2): 121-126.
QIN X, LV XY, LI S, *et al.* Matrix stiffness modulates YAP activation to control the drug resistance of breast cancer cells [J]. *J Med Biomech*, 2019, 34(2): 121-126.
- [31] 叶群芳. 基于微流控模型初探细胞外基质粘弹性对 HepG2 癌细胞转移过程的影响 [D]. 重庆: 重庆大学, 2012.
- [32] MIRON-MENDOZA M, SEEMANN J, GRINNELL F. The differential regulation of cell motile activity through matrix stiffness and porosity in three dimensional collagen matrices [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(25): 6425-6435.
- [33] TEIXEIRO E, DANIELS MA. ERK and cell death: ERK location and T cell selection [J]. *FEBS J*, 2010, 277(1): 30-38.
- [34] BIJIAN K, ZHANG L, SHEN SH. Collagen-mediated survival signaling is modulated by CD45 in Jurkat T cells [J]. *Mol Immunol*, 2007, 44(15): 3682-3690.
- [35] MARTINO F, PERESTRELO A R, VINARSKY V, *et al.* Cellular mechanotransduction: From tension to function [J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 824.