

# 脂双层流动性促进 CD40L 介导的细胞接触面形成

马金辉<sup>1</sup>, 冯晶晶<sup>1</sup>, 蒋笑嫣<sup>1</sup>, 董晓婷<sup>1</sup>, 孙小夕<sup>2</sup>, 林蒋国<sup>2</sup>, 方颖<sup>1\*</sup>, 吴建华<sup>1\*</sup>

(1. 华南理工大学 生物科学与工程学院, 生物力学研究所, 广州 510006;

2. 广东省人民医院(广东省医学科学院) 医学研究中心, 广州 510080)

**摘要:**目的 研究脂双层流动性对  $\beta 1$  整合素-CD40L 相互作用及所介导的癌细胞接触面形成的调节机制。方法 通过调节含有 N-二硫代乙酰胺修饰的二油酰基甘油酰胺(DGS-NTA)含量, 制备具不同流动性支撑脂双层膜。膜的功能化通过在膜上锚定具荧光标记的 CD40L 来实现。通过共聚焦显微成像与荧光恢复后光漂白实验, 观察 PC9 细胞与功能化脂双层间的接触面形成, 利用 Zhu-Golan 散点图提取黏附分子二维动力学数据。结果 DGS-NTA 含量与扩散系数呈负相关, 膜的高流动性促进 CD40L 在接触面内聚集, 扩大接触面积。对应于具有高、中、低流动性的 3 种脂双层而言,  $\beta 1$  整合素-CD40L 复合物的二维解离常数 ( $2D K_d$ ) 分别约为 13、31、65 molecules/ $\mu\text{m}^2$ 。结论 高脂双层膜流动性促进游离 CD40L 分子扩散并聚集到细胞接触面内, 导致  $\beta 1$  整合素-CD40L 相互作用及其介导的细胞接触面稳定性增强。

**关键词:** 脂双层膜; 流动性;  $\beta 1$  整合素; 细胞接触面; 二维解离动力学

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2025.05.029

## Lipid Bilayer Fluidity Regulates CD40L-Mediated Cell Contact Interface Formation

MA Jinhui<sup>1</sup>, FENG Jingjing<sup>1</sup>, JIANG Xiaoyan<sup>1</sup>, DONG Xiaoting<sup>1</sup>, SUN Xiaoxi<sup>2</sup>, LIN Jiangguo<sup>2</sup>, FANG Ying<sup>1\*</sup>, WU Jianhua<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Biomechanics, School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China; 2. Research Department of Medical Sciences, Guangdong Provincial People's Hospital(Guangdong Academy of Medical Sciences), Guangzhou 510080, China)

**Abstract: Objective** To study how lipid bilayer fluidity modulates the interaction between  $\beta 1$  integrin and CD40L, as well as the formation of CD40L-mediated tumor cell contact interfaces. **Methods** Supported lipid bilayers (SLB) with different fluidities were prepared through adjusting the 1, 2-dioleoyl-sn-glycero-3-[N-(5-amino-1-carboxypentyl) iminodiacetic acid] succinyl nickel salt (DGS-NTA) content. The functionalization of lipid bilayers was achieved by anchoring fluorescently labeled CD40L molecules onto the membrane surface. The contact interface formation of PC9 cells on the functionalized lipid bilayers was observed through confocal fluorescence imaging and fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments, and data of two dimensional (2D) reaction kinetics of  $\beta 1$  integrin and CD40L were extracted from Zhu-Golan plots. **Results** The diffusion coefficient

收稿日期: 2025-05-18; 修回日期: 2025-06-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(12172137, 12072117)

通信作者: 方颖, 副教授, E-mail: yfang@scut.edu.cn; 吴建华, 教授, E-mail: wujianhua@scut.edu.cn

\* 为共同通信作者

of molecules in lipid bilayer was negatively correlated with DGS-NTA content. High fluidity of lipid bilayer promoted CD40L accumulation at cell contact interface and expanded the cell contact area. The 2D dissociation constants (2D  $K_d$ ) of  $\beta 1$  integrin-CD40L complexes were approximately 13, 31 and 65 molecules/ $\mu\text{m}^2$  for the three lipid bilayers with high, moderate and low fluidities, respectively. **Conclusions** High fluidity of lipid bilayers significantly facilitates diffusion and aggregation of CD40L to the cell contact interface, thus enhancing  $\beta 1$  integrin-CD40L interaction and the stability of cell contact interfaces.

**Key words:** lipid bilayer; fluidity;  $\beta 1$  integrin; cell contact area; two-dimensional (2D) dissociation kinetics

肿瘤细胞在体内逃避免疫清除是其实现长期生存和远端转移的关键策略,胞间接触引发的分子识别与黏附过程是免疫逃逸发生的早期事件<sup>[1-2]</sup>。研究表明,血小板在肿瘤转移的早期阶段可能发挥了保护伞作用,通过与循环中的肿瘤细胞形成稳固聚团结构,阻止自然杀伤细胞和巨噬细胞等识别攻击<sup>[3-4]</sup>。在这一过程中,血小板高表达的 CD40L 被认为是介导细胞黏附和胞间信号传导的关键分子,通过与多种肿瘤细胞表面的整合素家族成员(尤其是  $\beta 1$  整合素)结合,形成稳定的胞间结构,协助肿瘤细胞“披上”免疫屏障,影响肿瘤进程<sup>[5-7]</sup>。

$\beta 1$  整合素是一类跨膜黏附受体,在多种实体瘤中表达升高,与侵袭性、耐药性和差预后密切相关,参与调控细胞与细胞外基质的黏附、迁移和信号转导等过程<sup>[8-9]</sup>。作为经典的免疫调节因子,CD40L 在激活的血小板上高表达,它除了在 T 细胞与抗原提呈细胞相互作用过程中发挥免疫协同作用外,还被发现与肿瘤相关的黏附行为密切相关<sup>[10-11]</sup>。然而,目前关于 CD40L 与  $\beta 1$  整合素在二维细胞接触面上的结合亲和力及其调控机制的研究还较少报道。体外模拟这一分子结合事件的理想平台是支撑脂双层膜(supported lipid bilayer, SLB)模型。该模型能够模拟细胞膜的基本结构特征,具有横向流动性好、表面可修饰性强等优点,广泛应用于研究膜蛋白行为、分子识别以及细胞黏附等领域<sup>[12-13]</sup>。细胞膜的物理属性(尤其是膜脂流动性)对蛋白质结合动力学具有显著影响,高流动性环境有助于配体向受体富集区域的快速迁移,从而提高配体-受体的有效结合效率<sup>[14-15]</sup>。此外,为了定量评估配体与受体的二维结合特性,Zhu-Golan 图分析法被提出并广泛应用于细胞-表面界面中的亲和力测定,该方法基于荧光信号反推出结合/游离配体密度,以获取二维解离常数(two-dimensional dissociation

constant, 2D  $K_d$ )<sup>[16-17]</sup>。

本文应用所制备的具有不同流动性、功能化(或锚定荧光标记 CD40L 蛋白)SLB 模型,在不同膜流动性条件下,研究加载到 SLB 上、高表达  $\beta 1$  整合素的肺腺癌细胞 PC9 细胞接触面形成及其动力学机制,通过模拟肿瘤细胞-血小板之间的初始黏附事件,揭示脂双层流动性对受体-配体相互作用及其所介导的细胞接触面形成的调节功能,为理解肿瘤免疫逃逸中的黏附机制提供新见解与方法学支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、蛋白与试剂

富含  $\beta 1$  整合素的 PC9 细胞(人肺腺癌细胞株)购自中国科学院细胞库,培养于含 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(Bioexplorer 公司,美国)及 5% 青链霉素(PS,北京索莱宝科技有限公司)的高糖 DMEM 培养基(Gibco 公司,美国),37 °C、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中。1,2-油-锡-磷脂-3-卵磷脂(DOPC)与镍盐修饰脂(DGS-NTA-Ni)购自美国 Avanti Polar Lipids 公司,Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 蛋白标记试剂盒、PBS 缓冲液购自美国 Life Technologies 公司,His 标签重组人源 CD40L 蛋白购自北京义翘神州科技股份有限公司,单克隆抗体 Anti-Integrin  $\beta 1$  购自美国 BioLegend 公司,载玻片购自美国 Warner Instruments 公司。

### 1.2 SLB 构建、功能化及流动性检测

按照摩尔比 98 : 2、91 : 9、84 : 16 混合 DOPC 与 DGS-NTA,制成脂质溶液并真空旋蒸成膜。干膜经磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)重悬并超声处理制得小单层囊泡(small unilamellar vesicle, SUV),离心去除杂质后,滴加于经硫酸清洗处理的玻璃表面,37 °C 静置 5 min 形成 SLB。为阻断非特异性结合,膜表面以 2% 牛血清白蛋白

(bovine serum albumin, BSA) 封闭。随后,向 SLB 中添加 25、50、75 nmol/L 的 Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 标记 CD40L,依靠 His-Ni 系统实现蛋白锚定,锚定完成后以 PBS 清洗去除游离蛋白。功能化(或锚定 CD40L)脂双层的流动性或扩散系数通过荧光淬灭后恢复(fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)实验来检测。

### 1.3 细胞接触面形成实验

将对数生长期 PC9 细胞经胰酶消化后重悬于 PBS 中,制备细胞悬浮液( $1 \times 10^4$ /mL)。将细胞滴加至已锚定 CD40L 的 SLB 表面。利用 TCS SP8 共聚焦激光扫描显微镜(Leica 公司,德国),记录脂双层膜焦平面处荧光信号,观察细胞接触面区域面积与荧光强度随时间的演化。实验在不同脂双层流动性与不同 CD40L 分子浓度条件下进行。

### 1.4 二维亲和力分析与 Zhu-Golan 图绘制

结合前期建立的荧光位点换算公式<sup>[14-15]</sup>,分别计算结合配体密度( $B$ )、游离配体密度( $F$ )与接触面积占比  $p$  ( $p = \text{细胞接触面积}/\text{细胞截面积}$ ),构建以  $B \times p$  为横轴、 $B/F$  为纵轴的 Zhu-Golan 图。经线性回归后取斜率的负倒数,得出二维解离常数( $2D K_d$ ),用于表征  $\beta 1$  整合素-CD40L 的结合亲和力。

### 1.5 图像采集与数据处理

荧光图像采集在激光共聚焦显微镜下进行,使用 100 $\times$ 油镜记录细胞接触面荧光图。所有成像参数保持一致,以确保数据可比性。图像分析采用 ImageJ 软件测量荧光强度与接触面积,计算接触面荧光信号与接触面积占比等关键指标。荧光强度与 CD40L 浓度的线性关系用于后续二维亲和力计算,所有实验数据取 3 次独立重复的平均值。

### 1.6 数据统计分析

实验重复 3 次以上,所有数据以(平均值 $\pm$ 标准差)表示。组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),多组间采用 Tukey 检验,双组数据比较使用双尾  $t$  检验。荧光恢复曲线拟合与  $2D K_d$  计算均在 GraphPad Prism 9.0 中完成。

## 2 结果

### 2.1 3 种功能化(或锚定有 50 nmol/L 蛋白 CD40L)脂双层的扩散系数具有显著差异

SLB 因其结构稳定且具备良好的横向分子流动

性,已被广泛应用于模拟细胞膜微环境、研究膜蛋白锚定与扩散行为等领域<sup>[18]</sup>。本文成功构建了 3 种功能化 SLB(DOPC 与 DGS-NTA 摩尔比分别为 98:2、91:9 和 84:16)。FRAP 实验结果显示,功能化或锚定有 50 nmol/L 荧光标记 CD40L 脂双层的荧光恢复能力随 DGS-NTA 含量上升而下降,高流动性组(2% DGS-NTA)恢复速率快;最大恢复率高,达到了( $92.16 \pm 2.83$ )%;扩散系数最大,为( $1.6 \pm 0.11$ )  $\mu\text{m}^2/\text{s}$ 。而低流动性组(16% DGS-NTA)扩散显著减缓,荧光恢复率仅为( $66.17 \pm 4.34$ )%。无流动性对照组(经空气氧化处理的脂双层组)几乎无恢复,扩散系数仅为( $0.18 \pm 0.02$ )  $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ,这与流动性越强扩散能力越大的预期一致[见图 1(a)、(b)]。组间比较结果进一步证实,各实验组与无流动性组在未恢复荧光比例和扩散系数方面的显著性差异( $P < 0.001$ ) [见图 1(c)、(d)]。上述结果提示,本文所构建的功能化的脂双层具有显著不同的流动性或扩散能力,可以用以模拟具有不同流动性的细胞膜上配(受)体介导的细胞生物学过程。

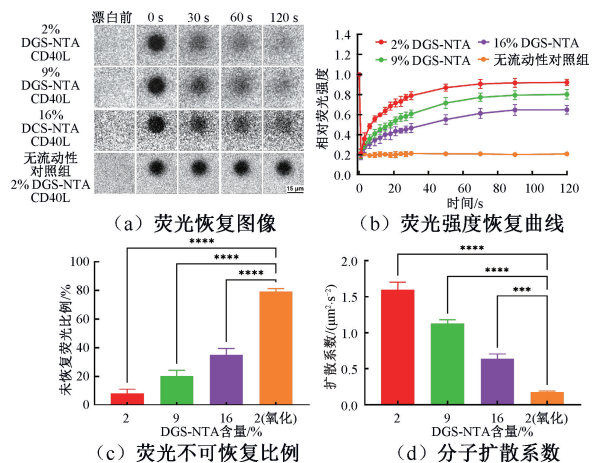


图 1 不同 DGS-NTA 含量脂双层膜流动性对荧光特征的影响

Fig. 1 Effects of SLB fluidity under different DGS-NTA contents on fluorescence characteristics (a) Fluorescence recovery images, (b) Fluorescence recovery curves, (c) Unrecovered fluorescence ratios, (d) Diffusion coefficients

注:\*\*\*\* $P \leq 0.0001$ ,\*\*\* $P \leq 0.001$ (下同)。

### 2.2 脂双层流动性促进 CD40L 介导的细胞接触面形成和稳定

经由受体-配体相互作用的介导的细胞接触面的形成,不仅和跨膜配体表达水平密切相关,而且

受到细胞膜物理特性的调控<sup>[19]</sup>。细胞接触面通常受到黏附分子结合亲和力的调控,亦与细胞接触面稳定性密切相关<sup>[20]</sup>。为揭示细胞膜流动性对肿瘤细胞接触面形成及其稳定性的影响,本文观测了分别锚定有 25、50 和 75 nmol/L 荧光标记 CD40L 的功能化脂双层与 PC9 细胞之间接触面的形成演化。

结果表明,当 PC9 细胞接触到锚定有 50 nmol/L 荧光标记 CD40L 的功能化脂双层之后,它将迅速形成自己的细胞接触面(荧光区域),该接触面先快速后平缓地增加,直至稳定为止,需要 5~6 min;当对经  $\beta 1$  整合素抗体预处理后的 PC9 或经空气氧化处理的脂双层而言,细胞接触面上的荧光团无法形成,提示 CD40L 通过特异地与  $\beta 1$  整合素结合,介导 PC9 的黏附和稳定细胞接触面的形成。同时,脂双层的流动性,对 CD40L 聚集到细胞接触面并导致稳定的细胞接触面形成,是必不可少的;另一方面,随着脂双层 DGS-NTA 含量减低或脂双层流动性(扩散系数)增大,细胞接触面内的荧光影像变得越大越明亮,提示脂双层流动性促进 CD40L 积聚到细胞接触面之内,促进稳定细胞接触面的形成[见图 2(a)、(b)]。

本文发现,相对荧光强度和细胞接触面积占比随脂双层 DGS-NTA 含量降低或随 CD40L 浓度上升而增加,提示 CD40L 介导的 PC9 细胞接触面及其稳定性,不但呈现流动性增强型特征,而且受到脂双层 CD40L 水平的正向调控[见图 2(c)、(d)]。本文推测,良好的流动性有助于接触面外的游离(未结合受体的)CD40L 分子进入细胞接触面,获得与受体结合的机会,而高的游离 CD40L 分子密度,有助于形成更多的黏附分子键,导致更稳固和更大的细胞接触面的形成。

### 2.3 脂双层膜流动性调节 $\beta 1$ 整合素-CD40L 二维结合亲和力

为揭示脂双层膜流动性对  $\beta 1$  整合素-CD40L 复合物二维结合亲和力的影响,采用基于 Zhu-Golan 图的二维结合动力学模型,分析在不同荧光标记蛋白 CD40L 浓度(10、25、50、75、100 nmol/L)条件下所获得的细胞在 3 种具有不同流动性功能化脂双层上的细胞接触面积与细胞强度的测量值。结果表明,在流动性不变的情况下,功能化脂双层的荧光强度随 CD40L 浓度的增加而线性增加;流动性的

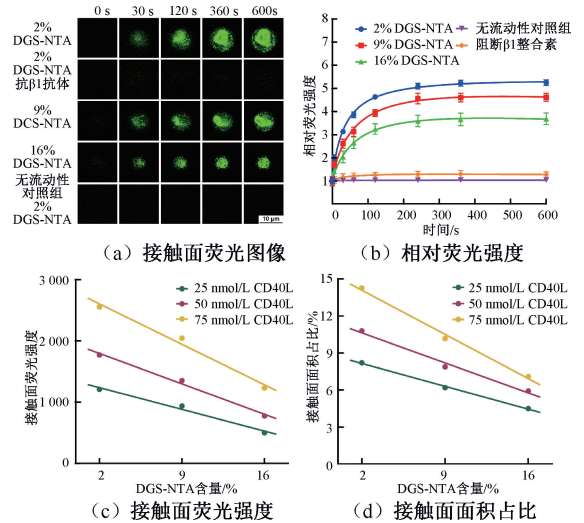


图 2 脂双层膜流动性对细胞接触面的影响

Fig. 2 Effects of SLB fluidity on cell contact interface

(a) Fluorescence images, (b) Relative fluorescence intensity, (c) Contact fluorescence intensity, (d) Contact area ratio

注:图 2(a)、(b)所示为不同流动性脂双层(锚定 50 nmol/L CD40L)上 PC9 细胞接触面荧光图像和对应荧光强度随时间变化曲线。

增加,会提高 SLB 荧光强度的水平,但不会改变 SLB 荧光强度与游离 CD40L 浓度的线性依赖关系[见图 3(a)]。该结果提示,在 25~100 nmol/L 的 CD40L 浓度范围内,功能化的脂双层具有良好的流动性/扩散能力。同时,通过利用游离配体密度( $F$ )、接触面区域结合配体密度( $B$ )和接触面面积占比( $p$ )等数据,构建基于 Zhu-Golan 图的  $\beta 1$  整合素-CD40L 的二维动力学模型[见图 3(b)],得到复合物解离常数( $2D K_d$ )的信息。结果表明,高、中和低脂双层流动性分别对应的  $\beta 1$  整合素-CD40L 复合物的  $2D K_d$  值分别为( $13.25 \pm 1.4$ )、( $30.64 \pm 2.65$ )、( $64.93 \pm 13.24$ ) molecules/ $\mu\text{m}^2$ 。本文认为,脂双层流动性越高, $2D K_d$  值越小,复合物更稳定而不易解离,具有更高的结合亲和力[见图 3(c)]。

## 3 讨论

作为重要调控因素,细胞膜流动性介导了跨膜物资运输,促进细胞识别、融合与跨膜信号传导等系列细胞生物学过程。CD40L 介导的血小板-癌细胞接触面的形成,是癌细胞免疫逃逸过程中的重要事件,不但受到  $\beta 1$  整合素-CD40L 二维反应动力学

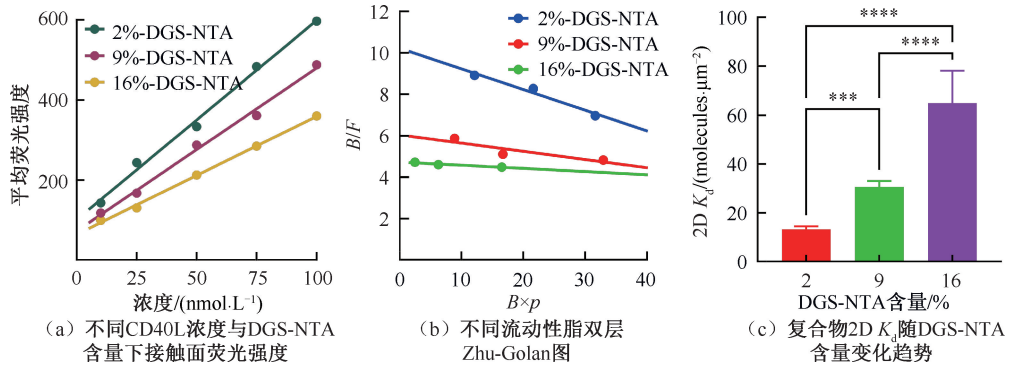


图3 脂双层膜流动性对  $\beta 1$  整合素-CD40L 复合物二维解离常数 ( $2D K_d$ ) 的影响

**Fig. 3** Effects of SLB fluidity on 2D dissociation constant ( $2D K_d$ ) of  $\beta 1$  integrin-CD40L complex (a) Contact fluorescence intensities under different CD40L concentrations and different DGS-NTA contents, (b) Zhu-Golan plots of SLB with different fluidity, (c)  $2D K_d$  values versus DGS-NTA content

的调控,而且与细胞膜流动性密切相关。作为研究受体-配体二维反应动力学的体外技术平台,已被广泛应用于许多分子系统,如 T 细胞受体/pMHC 和 CD2/CD58<sup>[21-22]</sup>。为查明尚不明晰的流动性对  $\beta 1$  整合素-CD40L 复合物二维结合亲和力的调控机制,本文通过构建并应用支撑性脂双层膜模型,结合共聚焦成像、FRAP 分析与 Zhu-Golan 图等方法,较深入地观测和分析了膜面流动性对 CD40L 介导的 PC9 细胞接触面形成及其动力学机制,发现  $\beta 1$  整合素-CD40L 相互作用具有显著的脂双层流动性增强型特征。值得说明的是,本文中构建的功能化脂双层膜模型主要用于模拟血小板膜上 CD40L 分子的横向扩散行为,而非反映 PC9 细胞自身膜流动性状态。PC9 细胞在实验中作为  $\beta 1$  整合素阳性受体细胞,其膜性质在各实验组保持一致,因此脂双层流动性变化可被视为唯一变量,便于解析其对受体-配体相互作用的直接影响。

本文结果表明,对 3 种具有不同流动性的功能化脂双层而言,流动性越高,接触面外游离的 CD40L 聚集到细胞接触面内的能力越强,促进  $\beta 1$  整合素-CD40L 复合物的形成和聚集的效果越显著,形成的细胞接触面越大、越稳定。这一结果与以往研究中关于膜面分子扩散促进结合亲和力的观点相吻合<sup>[23-24]</sup>,展现了膜物理性质在细胞信号调控中的重要地位。可以猜想,作为 CD40L 的主要受体, $\beta 1$  整合素构象转变可能是流动性增强型细胞接触面形成的另一个分子调控机制。自由的或静息

的整合素分子,通常处于弯曲的低亲和力状态,它与配体结合后,受到力化学信号刺激而激活成高亲和力构象,促进细胞稳定黏附与下游跨膜信号转导<sup>[25-26]</sup>。膜的流动性环境,增加了 CD40L 遭遇、识别并激活  $\beta 1$  整合素的机会,而激活了的  $\beta 1$  整合素将具有更高的与 CD40L 结合的亲和力,形成更稳定的细胞接触面与跨膜通讯。需要指出的是,尽管体外实验结果显示脂双层流动性越高越有利于细胞接触面的形成,但在真实的体内环境中,膜流动性可能存在一个最适区间。过高的流动性可能导致受体配体解离率升高,反而不利于黏附稳定性,这提示未来应在更复杂的仿生微环境中进一步探讨该调控机制的生理适应性。

本文结果表明,基于功能化脂双层与 FRAP 实验技术的研究黏附分子二维反应动力学的技术研究路线是可行的。但是,不仅在体外构建的脂双层与细胞膜之间,而且在体外实验环境与肿瘤生理病理微环境之间的差异,均有显著差异,这将导致本文所展示结果的局限性。此外,由于本文聚焦于建立基础模型并验证  $\beta 1$  整合素-CD40L 黏附机制,因此仅选用 PC9 细胞作为代表性高表达  $\beta 1$  整合素的肿瘤模型。未来可考虑引入膜流动性差异更显著的其他肿瘤细胞(如胶质瘤、乳腺癌细胞等)进行横向验证,以拓展该机制的通用性和生理适应性。最后,膜的黏度、膜张力及细胞所处血流力学微环境等,均可能影响黏附分子的二维反应动力学行为<sup>[27-28]</sup>。因此,考虑复杂肿瘤细胞与血小板力学微

环境、基于功能化脂双层模型的二维反应动力学处理技术的发展,具有十分重要意义。

## 4 结论

血小板 CD40L 介导的细胞接触面的形成,是癌细胞免疫逃逸过程中的关键早期事件。基于所构建的、可调控流动性的功能化脂双层膜模型和 FRAP 实验技术,本文发现,高的脂双层流动性将导致细胞接触面外的游离 CD40L 扩散并聚集到细胞接触面内、促进  $\beta 1$  整合素和 CD40L 的结合,更易形成稳定的细胞接触面,并可测得  $\beta 1$  整合素-CD40L 复合物的二维解离常数( $2D K_d$ )。这一工作将有助于更深入理解血小板介导的癌细胞免疫逃逸的动力学机制,促进力学免疫学的发展。

利益冲突声明:无

作者贡献声明:马金辉负责实验设计、数据分析和论文撰写;冯晶晶、蒋笑嫣、董晓婷、孙小夕协助实验实施与数据采集;林蒋国参与实验材料准备及数据整理;方颖、吴建华负责研究的整体设计思路、论文指导与修订。

## 参考文献:

- [ 1 ] CHEN L, ZHU C, PAN F, *et al.* Platelets in the tumor microenvironment and their biological effects on cancer hallmarks [J]. *Front Oncol*, 2023(13): 1121401.
- [ 2 ] EMENS LA, ROMERO PJ, ANDERSON AC, *et al.* Challenges and opportunities in cancer immunotherapy: A Society for Immunotherapy of Cancer (SITC) strategic vision [J]. *J Immunother Cancer*, 2024, 12(6): 10654.
- [ 3 ] GAUTAM D, CLARKE EM, ROWETH HG, *et al.* Platelets and circulating (tumor) cells: Partners in promoting metastatic cancer [J]. *Curr Opin Hematol*, 2025, 32(1): 52-60.
- [ 4 ] 潘雨平, 冯晶晶, 蒋笑嫣, 等. 流体动力学环境中嗜中性粒细胞在固定血小板上的滚动黏附[J]. *医用生物力学*, 2020, 35(S1): 43-48.
- [ 5 ] MICHEL NA, ZIRLIK A, WOLF D. CD40L and its receptors in atherothrombosis—An update [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2017, 4: 40.
- [ 6 ] MORALES-PACHECO M, VALENZUELA-MAYEN M, GONZALEZ-ALATRISTE AM, *et al.* The role of platelets in cancer: From their influence on tumor progression to their potential use in liquid biopsy [J]. *Biomark Res*, 2025, 13(1): 27.
- [ 7 ] ELGUETA R, BENSON MJ, DE VRIES VC, *et al.* Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system [J]. *Immunol Rev*, 2009, 229(1): 152-172.
- [ 8 ] BLANDIN AF, RENNER G, LEHMANN M, *et al.*  $\beta 1$  integrins as therapeutic targets to disrupt hallmarks of cancer [J]. *Front Pharmacol*, 2015(6): 279.
- [ 9 ] HAMIDI H, IVASKA J. Every step of the way: Integrins in cancer progression and metastasis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(9): 533-548.
- [ 10 ] LIEVENS D, ZERNECKE A, SEIJKENS T, *et al.* Platelet CD40L mediates thrombotic and inflammatory processes in atherosclerosis [J]. *Blood*, 2010, 116(20): 4317-4327.
- [ 11 ] KARNELL JL, RIEDER SA, ETTINGER R, *et al.* Targeting the CD40-CD40L pathway in autoimmune diseases: Humoral immunity and beyond [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2019(141): 92-103.
- [ 12 ] JACKMAN JA, CHO NJ. Supported lipid bilayer formation: Beyond vesicle fusion [J]. *Langmuir*, 2020, 36(6): 1387-1400.
- [ 13 ] SACKMANN E. Supported membranes: Scientific and practical applications [J]. *Science*, 1996, 271(5245): 43-48.
- [ 14 ] SEZGIN E, LEVENTAL I, MAYOR S, *et al.* The mystery of membrane organization: Composition, regulation and roles of lipid rafts [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(6): 361-374.
- [ 15 ] 邹卉, 吴建华, 方颖. 支撑脂双层膜的制备及其功能化研究 [J]. *生物医学工程学杂志*, 2019, 36(1): 85-93.
- [ 16 ] ZHU DM, DUSTIN ML, CAIRO CW, *et al.* Analysis of two-dimensional dissociation constant of laterally mobile cell adhesion molecules [J]. *Biophys J*, 2007, 92(3): 1022-1034.
- [ 17 ] DUSTIN ML, GROVES JT. Receptor signaling clusters in the immune synapse [J]. *Annu Rev Biophys*, 2012(41): 543-556.
- [ 18 ] RICHTER RP, BÉRAT R, BRISSON AR. Formation of solid-supported lipid bilayers: An integrated view [J]. *Langmuir*, 2006, 22(8): 3497-3505.
- [ 19 ] POKORNA S, VENTURA AE, SANTOS TCB, *et al.* Laurdan in live cell imaging: effect of acquisition settings, cell culture conditions and data analysis on generalized polarization measurements [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2022(228): 112404.
- [ 20 ] DUSTIN ML. The immunological synapse [J]. *Cancer Immunol Res*, 2014, 2(11): 1023-1033.
- [ 21 ] HUPPA JB, AXMANN M, MÖRTELMAIER MA, *et al.* TCR-peptide-MHC interactions in situ show accelerated

- Advances in Information, Electronic and Electrical Engineering (AIEEE). Kyiv: IEEE, 2017; 1754210.
- [18] 张晓燕. 基于 BP 神经网络的肺音识别与诊断研究 [J]. 电子测试, 2016(7): 3.
- [19] BARDOU D, ZHANG K, AHMAD S, *et al.* Lung sounds classification using convolutional neural networks [J]. *Artif Intell Med*, 2018(88): 58-69.
- [20] CHEN Q, ZHANG W, XIANG T, *et al.* Automatic heart and lung sounds classification using convolutional neural networks [C]//Proceedings of Signal & Information Processing Association Summit & Conference (APSIPA). Jeju: IEEE, 2016; 1-4.
- [21] LIN L, XU W, HONG Q, *et al.* Classification between normal and adventitious lung sounds using deep neural network [C]// Proceedings of the 2016 10<sup>th</sup> International Symposium on Chinese Spoken Language Processing (ISCSLP). Tianjin: IEEE, 2016; 1-5.
- [22] GEMMEKE JF, ELLIS DPW, FREEDMAN D, *et al.* Audio set: An ontology and human-labeled dataset for audio events [C]// Proceedings of 2017–2017 IEEE International Conference on Acoustics, Speech and Signal Processing (ICASSP). New Orleans: IEEE, 2017; 776-780.
- [23] 张志超, 李晓燕. 基于 VGGish 网络的音频信息情感智能识别算法 [J]. 电子设计工程, 2022, 30(4): 26-30.
- [24] 廖辉强. 基于语音帧自动标注和领域知识迁移的语音情感识别研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2020.
- [25] SIMONYAN K, ZISSERMAN A. Very deep convolutional networks for large-scale image recognition [C]// Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Conference on Learning Representations (ICLR 2015). Computational and Biological Learning Society, 2015; 1-14.
- [26] CINYOL F, BAYSAL U, KÖKSAL D, *et al.* Incorporating support vector machine to the classification of respiratory sounds by convolutional neural network [J]. *Biomed Signal Process Control*, 2023, 79(1): 104093.
- [27] 孙艳丽, 杨娜, 张正涛, 等. 基于核主元分析和支持向量机的结构损伤识别研究 [J]. 应用基础与工程科学学报, 2018, 26(4): 888-900.
- [28] VAPNIK VN. The nature of statistical learning theory [M]. New York: Wiley, 1998.

(上接第 1308 页)

- kinetics and increased affinity [J]. *Nature*, 2010, 463(7283): 963-967.
- [22] TOLENTINO TP, WU J, ZARNITSYNA VI, *et al.* Measuring diffusion and binding kinetics by contact area FRAP [J]. *Biophys J*, 2008, 95(2): 920-930.
- [23] TANAKA KA, SUZUKI KG, SHIRAI YM, *et al.* Membrane molecules mobile even after chemical fixation [J]. *Nat Methods*, 2010, 7(11): 865-866.
- [24] CAI E, MARCHUK K, BEEMILLER P, *et al.* Visualizing dynamic microvillar search and stabilization during ligand detection by T cells [J]. *Science*, 2017, 356(6338): 546-550.
- [25] SPRINGER TA, DUSTIN ML. Integrin inside-out signaling and the immunological synapse [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2012, 24(1): 107-115.
- [26] LUO BH, CARMAN CV, SPRINGER TA. Structural basis of integrin regulation and signaling [J]. *Annu Rev Immunol*, 2007(25): 619-647.
- [27] LÜCHTEFELD I, PIVKIN IV, GARDINI L, *et al.* Dissecting cell membrane tension dynamics and its effect on Piezo1-mediated cellular mechanosensitivity using force-controlled nanopipettes [J]. *Nat Methods*, 2024, 21(6): 1063-1073.
- [28] KOMIYA M, KATO M, TADAKI D, *et al.* Advances in artificial cell membrane systems as a platform for reconstituting ion channels [J]. *Chem Rec*, 2020, 20(7): 730-742.