

文章编号:1004-7220(2013)01-0091-06

基底硬度对肝细胞和肝癌细胞融合生长的影响

张 荣, 王红兵, 杨本艳姿, 谭乔燕, 杨 力

(重庆大学 生物工程学院, 重庆 400044)

摘要: **目的** 通过比较融合生长肝细胞(L02)与肝癌细胞(HCCLM3)对不同硬度基底(0.5、4 kPa 和玻璃)的响应, 探查两类细胞融合生长差异的成因。**方法** 运用实时显微摄影技术、免疫荧光染色、流式细胞技术及 Western Blotting 等试验方法分别检测融合生长 L02 和 HCCLM3 细胞在不同硬度基底上的形态特征、骨架构象、E-cad 和 Integrin β 1 表达分布, 以及 Src 激酶活性水平的变化。**结果** (1)融合生长 L02 细胞呈圆形或立方形, HCCLM3 细胞呈多角形, 铺展和极化更为明显; 随基底硬度增加, L02 细胞圆度随时间变化幅度较小, HCCLM3 细胞变化幅度较大。(2)融合生长的 L02 细胞皮质下呈现环形骨架, E-cad 定位于细胞-细胞接触处, HCCLM3 中皮质骨架环不完整, 胞内骨架沿基底呈放射状分布, E-cad 呈弥散分布于细胞质中。(3)随基底硬度增加, L02 和 HCCLM3 细胞中 E-cad 表达显著降低 ($P < 0.01$), 而 p-Src 和 Integrin β 1 的表达量则显著增加 ($P < 0.01$), HCCLM3 较 L02 细胞变化明显。**结论** 皮质下环形骨架装配与 E-cad 在细胞-细胞定位呈正相关, 基底硬度对肝癌细胞钙黏素与整合素黏附系统平衡调节的影响较对肝细胞的影响明显。

关键词: 肝细胞; 肝癌细胞; 基底硬度; E-cad 分布; Src 激酶活性

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

Effects of substrate stiffness on confluent growth of hepatic and hepatoma carcinoma cells

ZHANG Rong, WANG Hong-bing, YANG BEN Yan-zi, TAN Qiao-yan, YANG Li

(College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract: **Objective** To investigate the cause of differences in confluent growth between hepatic(L02) and hepatoma carcinoma(HCCLM3) cells by comparing responses of the two cells to different substrate stiffness (0.5, 4 kPa and glass). **Methods** The real-time photomicrography, immunofluorescence staining, flow cytometry, and Western Blotting techniques were respectively employed to observe the morphological characteristics, the cytoskeleton conformation and the distribution of E-cad of confluent L02 and HCCLM3 cells on different substrates, and test the changes in expression of E-cad, Integrin β 1 and p-Src. **Results** (1) Confluent L02 cells displayed a round or cubic shape, while HCCLM3 cells showed a polygon shape. The morphology of HCCLM3 cells were spread and polarized more obviously than that of L02 cells. With the increase of substrate stiffness, the variation of L02 cells with time was smaller than that of HCCLM3 cells. (2) The cytoskeleton of confluent L02 cells showed a ring-like conformation under the cortex, and E-cad was located at the cell-cell contact sites. However, the ring-like cytoskeleton of HCCLM3 cells was incomplete and distributed radially along the basement, while E-cad was dispersed in cytoplasm. (3) As the substrate stiffness increased, expression of E-cadherin in both L02 and HCCLM3 cells was significantly decreased ($P < 0.01$), while the level of p-Src and integrin β 1 was increased significantly, with greater changes in HCCLM3 cells than in L02 cells. **Conclusions** The assembling of cortical ring-like cytoskeleton was positively correlated with the location of E-cad at the cell-cell contact sites. The substrate stiffness showed a more obvious impact on the balanced regulation between cadherin and integrin mediated adhesion system of hepatocarcinoma cells than that of hepatic cells.

Key words: Hepatic cells; Hepatoma carcinoma cells; Substrate stiffness; E-cadherin distribution; Src kinase activity

收稿日期:2012-03-09; 修回日期:2012-04-26

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30870608), 国家 111 计划资助项目(B0623)。

通信作者:王红兵, 副教授, E-mail: whbdzx@yahoo.com.cn。

融合生长形成过程包含钙黏素 (cadherin) 介导的细胞-细胞间黏附^[1]与整合素 (integrin) 介导的细胞-基底间黏附。胞间黏附的结构基础是相邻细胞间以 E-钙黏素 (epithelial cadherin, E-cad) 为核心与连环素 (catenin) α 、 β 、 γ 及 p120 等形成的跨膜连结复合物^[2]; 细胞-基底黏附的结构基础是整合素与配体分子结合后募集形成多聚体在细胞与基底接触位点所形成的黏着斑 (focal adhesion, FA)^[3-5]。研究指出, 整合素黏附系统激活后可通过激活黏着斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK) 和非受体酪氨酸激酶 Src, 通过 FAK-Src 途径调节 E-cad/catenin 复合物的稳定性, 并使 E-cad/catenin 复合物从细胞-细胞接触位点脱离, 而钙黏素介导的细胞间连结可阻止细胞接触过程中整合素的募集和激活^[6]。

在细胞融合形成时, E-cad 在胞间定位是复合物装配的前提, 通过与肌动蛋白骨架相连来维持其稳定性。上皮细胞连结形成时, 其皮质下骨架构象调整与复合物的装配是偶联进行的^[7], 复合物装配所涉及组份的定向运动和组装依靠骨架活动进行精确调控, 最终与环形骨架为互容互摄的结构功能统一体。肿瘤细胞与正常细胞的重要区别是胞间连结普遍缺失而出现接触抑制丧失和多细胞群体易于解体, 肿瘤细胞骨架发育存在缺陷, 对各组份间相互作用的调节力度不够, 胞间连结不完整, 相邻细胞只有接触但实无骨架有序重构。正常肝细胞和肝癌细胞融合生长差异可能是由骨架调节能力不同所引起的, 对于锚着依赖生长的细胞, 其锚着基底的物理硬度变化将极大地激发出细胞骨架调节能力的释放。因此, 本文将通过比较正常肝细胞和肝癌细胞在不同硬度基底上骨架构象及 E-cad 分布和表达的变化, 以及 FAK-Src 家族激酶途径在 E-cad 定位变化条件下的激活情况, 并对融合生长条件下两类细胞迁移潜能进行表征, 了解细胞迁移激活与细胞连结变化的相关性, 加深对肿瘤细胞顽固浸润转移行为的认识。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人源性高转移肝癌细胞株 (HCCLM3) 和正常肝细胞株 (L02) 购于中国科学院上海细胞库。用添加 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基 (HyClone) 于

37 °C, 5% CO₂ 条件下培养。

1.2 聚丙烯酰胺水凝胶的制备及融合细胞弹性模量的测定

聚丙烯酰胺凝胶基底膜的制备主要参照文献 [8-9] 进行。基底膜制作完毕后加 1 mmol/L sulfosuccinimidyl-6-[4-azido-2-nitrophenylamino] hexanoate (Sulfo-SANPAH) 活化膜表面, 裱衬 10 μ g/mL 人纤连蛋白 (fibronectin, FN), 4 °C 过夜, 接种细胞前用 PBS 漂洗, 培养至融合, 原子力显微镜金字塔形针、半面角、17.5°、泊松比 0.5。

1.3 融合细胞形态观察

使用奥林巴斯 CKX41 显微镜和奥林巴斯 C-5060 Wide Zoom 数码照相机, 对融合生长的 L02 和 HCCLM3 细胞进行定点、连续显微观察和拍摄。用细胞圆度 (cell conform factor, CF) 变化程度表征融合细胞形态的稳定性: $CF = C^2 / (4\pi S)$, 其中: C 为细胞周长; S 为细胞面积; $\pi = 3.14$ 。用 Image J 测定 C 和 S , 计算 CF , 并绘出 CF 随时间变化的趋势图。

1.4 融合细胞骨架、E-cad 检测

培养 L02 和 HCCLM3 细胞呈融合生长后通过 Nikon Eclipse TE300 显微镜的 BioRad Radiance 2000 激光聚焦系统获得图像。

1.5 融合细胞中 E-cad 和 Src 磷酸化水平的测定

分别收集 0.5、4 kPa 和玻璃 (glass) 基底膜上融合生长的 L02 和 HCCLM3 细胞, 利用 Western Blotting 检测细胞中 E-cad 和 Src 磷酸化水平。

1.6 流式细胞仪对 Integrin β 1 表达的测定

取融合生长的 L02 和 HCCLM3 细胞, 利用流式细胞仪检测 Integrin β 1 表达。

1.7 统计分析

实验结果做组间 t 检验, * 代表 $P < 0.05$, ** 代表 $P < 0.01$ 。

2 结果

2.1 不同硬度基底上融合生长 L02 和 HCCLM3 细胞弹性模量的测定

聚丙烯酰胺水凝胶因透气性、生物兼容性好且软硬度可调, 适宜在上面培养细胞, 基底膜的剪切模量可受不同浓度丙烯酰胺单体和双丙烯酰胺交联剂的影响, 水凝胶基底膜的硬度范围可控制在 0.5 ~ 12 kPa (见图 1(a))^[10]。肝细胞的硬度范围是 3 ~

10 kPa^[11-12]。在极软(0.5 kPa), 较软(4 kPa)和极硬(glass)3种基底膜上, 对培养至融合生长的 L02 和 HCCLM3 细胞用原子力显微镜测定其弹性模量发现, 癌变组织的细胞相比邻近正常组织的细胞要软 70% 左右, 在 0.5 kPa 和 glass 基底上有显著性差异 ($P < 0.05$), 在 4 kPa 基底上无显著性差异 ($P > 0.05$) (见图 1(b)), 故本研究选择接近生理条件硬度的 4 kPa 水凝胶基底膜模拟在体内环境, 软基底 0.5 kPa 与玻璃基底作为对照做后续实验。

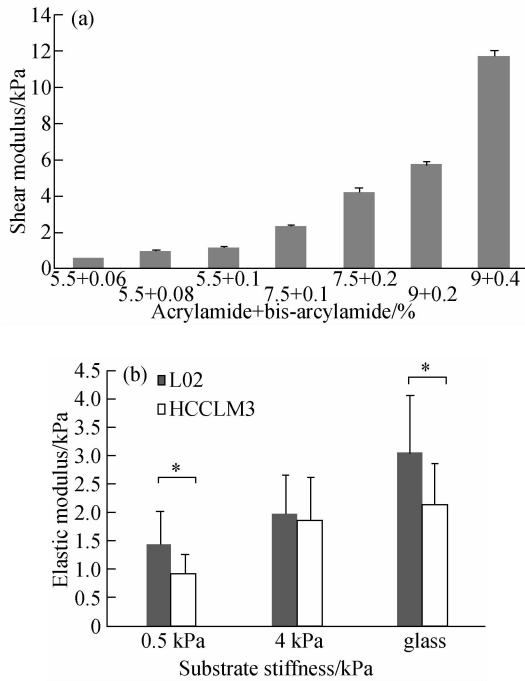


图 1 聚丙烯酰胺水凝胶的力学特征 (a) 和不同基底上融合生长 L02 和 HCCLM3 细胞弹性模量的测定 (b)
 Fig. 1 Mechanical properties of polyacrylamide substrates (a) and measurement of the elastic modulus for confluent L02 and HCCLM3 cells on different substrates (b)

2.2 基底硬度对融合生长 L02 与 HCCLM3 细胞形态的影响

在 0.5、4 kPa 和 glass 基底上分别接种 L02 与 HCCLM3 细胞培养, 5 h 后实时观察融合状细胞的形态变化, 每 20 min 拍一次。L02 与 HCCLM3 细胞在 0.5、4 kPa 和 glass 基底上融合生长后 0 和 3 h 时的细胞形态图如图 2 (a) 所示。随机选取 10 个细

胞, 用 Image J 测定每个细胞在不同时间点的细胞圆度值并求平均值, 得到细胞圆度值随时间的变化趋势图 (见图 2 (b))。结果显示, 随时间推移, 基底硬度增加细胞圆度变化幅度增大, 且 HCCLM3 细胞形态的变化幅度比 L02 细胞更为剧烈。

2.3 基底硬度对融合生长 L02 与 HCCLM3 细胞骨架构象的影响

如图 3 所示, L02 在 0.5、4 kPa 水凝胶及玻璃基底上均可形成镶嵌连结, 皮质下有环状骨架出现, 但玻璃基底上 L02 皮质环状骨架荧光减弱。HCCLM3 形态不规则, 在 0.5、4 kPa 基底上皮质下骨架环不完整, glass 基底上细胞铺展扩大, 边界模糊, 细胞-基底面有丝状纤维。

2.4 基底硬度对融合生长 L02 和 HCCLM3 细胞中 E-cad 分布的影响

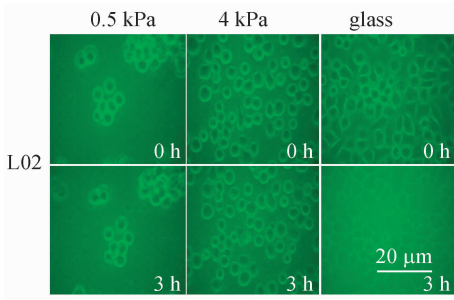
图 4 所示为融合生长的 L02 与 HCCLM3 细胞在 0.5、4 kPa 和 glass 基底上 E-cad 的分布以及与骨架的相关性, 其中绿色代表 FITC 标记的 E-cad, 黄色代表 E-cad 与骨架的合并。结果发现, 随基底硬度增加 E-cad 的荧光强度减弱, L02 中 E-cad 分布于细胞-细胞连结面, 而 HCCLM3 细胞的 E-cad 在整个细胞质中呈弥散分布 (见图 4 (a)), 通过复染发现 E-cad 与细胞骨架呈共定位分布, 具有正相关性 (见图 4 (b))。

2.5 基底硬度对融合生长 L02 与 HCCLM3 细胞 E-cad 表达和 Src 磷酸化水平的影响

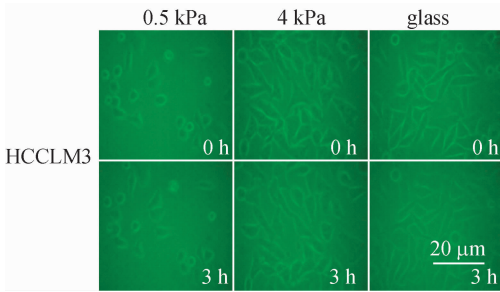
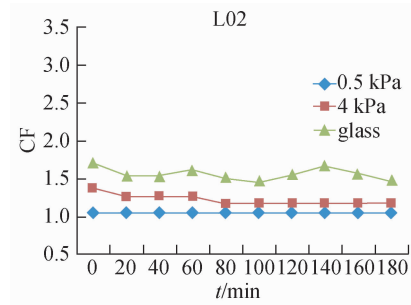
图 5 所示为不同基底硬度上融合生长 L02 和 HCCLM3 细胞中 E-cad 的表达与 Src 激酶活性水平的比较。结果显示, 随基底硬度增加, L02 和 HCCLM3 细胞中 E-cad 表达量降低, Src 激酶的磷酸化水平上调, HCCLM3 较 L02 细胞明显。

2.6 基底硬度对融合生长 L02 与 HCCLM3 细胞 Integrinβ1 表达的影响

图 6 (a) 为不同硬度上 L02 和 HCCLM3 细胞 Integrinβ1 表达荧光图, 其中绿色代表阴性对照, 蓝色代表 L02 细胞, 红色代表 HCCLM3 细胞。对其定量分析发现 (见图 6 (b)), L02 和 HCCLM3 细胞表



(a) L02 细胞形态显微观察与细胞圆度随时间的变化



(b) HCCLM3 细胞形态显微观察与细胞圆度随时间的变化

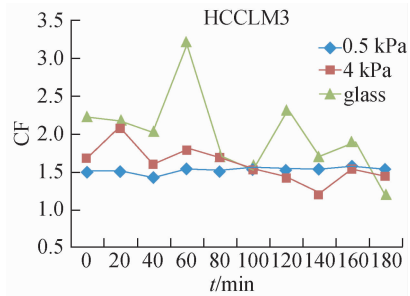


图2 基底硬度对融合生长 L02 和 HCCLM3 细胞形态的影响

Fig.2 Effects of substrate stiffness on the morphology of confluent L02 and HCCLM3 cells (a) Microscopic observation and variation of cell conform factor with time for L02 cells, (b) Microscopic observation and variation of cell conform factor with time of HCCLM3 cells

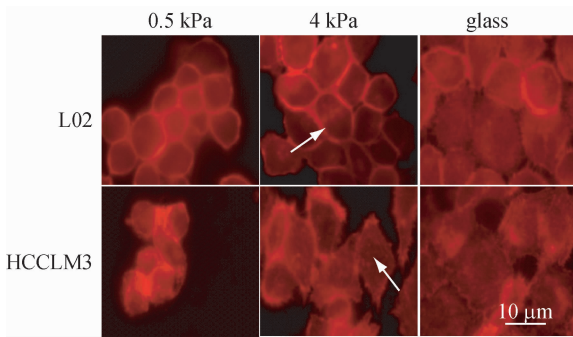
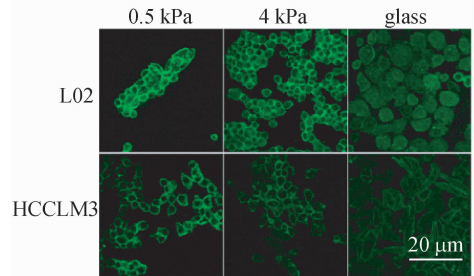


图3 基底硬度对融合生长 L02 与 HCCLM3 细胞骨架的影响

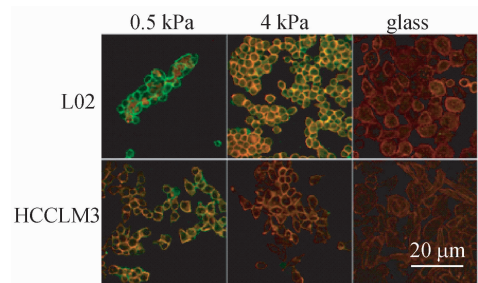
Fig.3 Effects of substrate stiffness on the cytoskeleton of confluent L02 and HCCLM3 cells

红色代表 TRITC-鬼笔环肽标记的肌动蛋白骨架,实心箭头指骨架环,空心箭头指丝状纤维

达 Integrinβ1 的量随基底硬度增加而增加,0.5 kPa 基底上两种细胞 Integrinβ1 表达的荧光强度(Δmf)无显著性差异;4 kPa 基底上 HCCLM3 细胞 Integrinβ1 的荧光强度显著高于 L02 细胞中 Integrinβ1 的荧光强度,glass 基底上 HCCLM3 细胞 Integrinβ1 的荧光强度显著低于 L02 细胞 Integrinβ1 的荧光强度。



(a) E-cad 的分布(绿色)



(b) E-cad 与骨架的共定位(黄色)

图4 基底硬度对融合生长 L02 与 HCCLM3 细胞 E-cad 分布及与骨架相关性的影响

Fig.4 Effects of substrate stiffness on the distribution of E-cadherin and correlation of cytoskeleton for confluent L02 and HCCLM3 cells (a) Distribution of E-cad (green), (b) Colocalization of E-cad and cytoskeleton

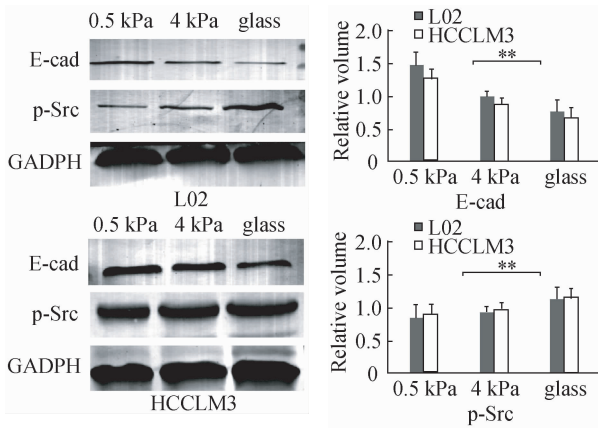


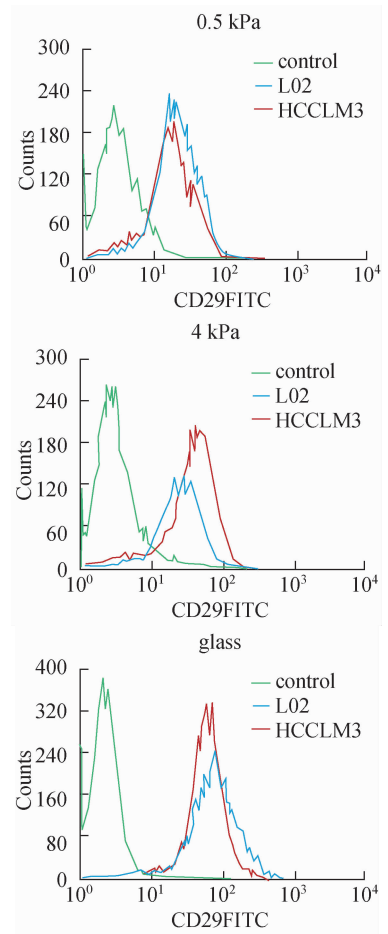
图5 基底硬度对融合生长 L02 与 HCCLM3 细胞 E-cad 和 Src 磷酸化水平的影响

Fig.5 Effects of substrate stiffness on the expression of E-cadherin and phosphorylated Src for confluent L02 and HCCLM3 cells

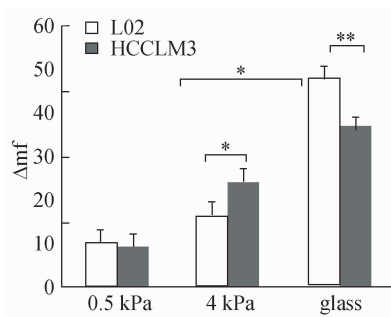
3 讨论

正常肝细胞在极软(0.5 kPa)、较软(4 kPa)和极硬(glass)3种基底上均可形成融合生长,在软基底上多为圆形,并有丰富的胞间连结形成;在硬基底上呈多角形(见图2(a));在较软和极硬基底上,细胞从分散的铺展状态到彼此接触成融合态后,即可见骨架沿皮质下呈环状排列,相邻细胞接触处 E-cad 分布增多(见图3、4)。考查其形态随时间的变化发现,细胞形变因子和铺展面积随时间变化幅度较小,无显著性差异(见图2(b)),表明胞间连结形成的约束使其运动潜能大为下降。E-cad 在胞间的定位是细胞间黏附形成的起始步骤,而骨架沿皮质下呈环状排列关系 E-cad/catenin 复合物胞内锚着基础建立和稳定性维持,以上两个阶段均与骨架重组高度相关。E-cad 定位及与之匹配的胞内锚着骨架构象的形成,直接反映了细胞骨架的调节能力,说明融合生长过程中肝细胞骨架重组调节能力可支持钙黏素黏附功能。图3显示,融合生长肝细胞的皮质下有环形骨架排列,说明整合素和钙黏素两大黏附系统的拮抗作用可能对骨架构象调整存在依赖,即细胞形态和细胞间连结改变可受骨架构象调整的影响。

肝癌细胞在以上3种基底膜上均不能形成融合生长,在较软基底上圆形细胞比例增多,较肝细胞铺展投影面积增大,在硬基底上单个细胞和群体细胞



(a) 荧光图



(b) 定量分析

图6 基底硬度对融合生长 L02 与 HCCLM3 细胞 Integrinβ1 表达的影响

Fig.6 Effects of substrate stiffness on the expression of Integrinβ1 of confluent L02 and HCCLM3 cells (a) Fluorescence figure, (b) Quantitative analysis

多呈不规则形,边缘粗糙且周边伪足丰富,较少形成胞间连结(见图2(a)),细胞形变因子随时间变化幅度较大,有显著性差异(见图2(b))。相对于肝

细胞通过丰富的胞间连结来形成一体化组织的重构特点,肝癌细胞则呈现出多细胞群体联系松散并易于解体的倾向,这些改变可能正是癌细胞在原位和腔体表面容易播散和转移的基础。E-cad 在胞间的定位及跨膜连结复合物稳定性的维持均需骨架的精确调控,肝癌细胞骨架发育存在缺陷,骨架异常可能是其细胞间黏附连结形成障碍的重要原因。肝癌群体细胞皮质骨架残缺已透射出其胞间连结不完善的信息,同时也可成为骨架调节功能异常的支持性证据,肝癌细胞与基底附着面出现应力纤维,特别是在较软和极硬基底膜上,肝癌细胞多呈分散的铺展状,相邻细胞接触位点 E-cad 分布较少(见图 3、4),而此时其整合素表达上调(见图 6),细胞与基底相互作用活跃,说明胞间连结破坏将通过整合素相关信号通路激活细胞与基底相互作用。

在融合生长形成中,正常肝细胞的细胞连结面和细胞与基底连结面可通过 E-cad 复合物与胞内骨架的锚着连结和整合素去聚集而处于相对静息状态,其中涉及的一个重要调节分子 Src 激酶可诱使 E-cad 从细胞-细胞接触处脱离,这一过程依赖整合素-ECM 黏附的激活。肝细胞在极软(0.5 kPa)、较软(4 kPa)和极硬(glass)3 种基底膜上 Src 激酶磷酸化水平依次增高,而 E-cad 表达则呈相反变化趋势,同时在胞间的分布和皮质下环形骨架纤维又随基底硬度增加而减少(见图 4、5)。这说明 E-cad 在细胞-细胞接触处的定位会抑制 Src 的激活,皮质下环形骨架与 E-cad 在胞间定位呈正相关,而与 Src 激酶磷酸化水平呈负相关。肝癌细胞在极软(0.5 kPa)、较软(4 kPa)和极硬(glass)3 种水凝胶基底膜上 Src 激酶磷酸化水平较肝细胞增高,E-cad 表达降低,胞间分布明显减少,肝癌细胞骨架紊乱无完整皮质下环形成,表明骨架调节异常不能有效引发 E-cad 分布并定位于胞间;同时,肝癌细胞骨架异常使单体 E-cad 不能募集 Rac 和 PI3K 到新的黏附连结处形成稳定的黏附复合物^[13],黏附连结形成障碍,将通过启动细胞-基底黏附信号通路,激活酪氨酸激酶 Src 以及黏着斑激酶 FAK,促使板状伪足的形成,从而起始细胞运动。

参考文献:

- [1] Drees F, Nelson WJ. Cadherin-mediated cell-cell adhesion [J]. *Encyclopedia Biol Chem*, 2004, 1: 205-211.
- [2] 王红兵,徐秋华,杨本艳姿,等. 细胞密度对肝细胞和肝癌细胞钙粘素表达、分布及细胞运动的不同影响[J]. *生物医学工程杂志*, 2010, 27(6): 1256-1260.
- [3] 王红兵,徐秋华,刘艳鸣,等. 整合素分布变化与肝癌细胞迁移取向调节的相关性[J]. *医用生物力学*, 2008, 25(4): 288-295.
Wang HB, Xu QH, Liu YM, *et al.* Study on the correlation of integrin distribution changes with directional migration of hepatoma cells [J]. *J Med Biomech*, 2010, 25(4): 288-295.
- [4] Hartsock A, Nelson WJ. Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1778(3): 660-669.
- [5] Shapiro L, Weis WI. Structure and biochemistry of cadherins and catenins [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009, 1(3): a003053.
- [6] Chen X, Gumbiner B. Crosstalk between different adhesion molecules [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2006, 18(5): 572-578.
- [7] Weber G. F, Bjerke MA, DeSimone DW. Integrins and cadherins join forces to form adhesive networks [J]. *J Cell Sci*, 2011, 124(8): 1183-1193.
- [8] Yeung T, Georges PC, Flanagan LA, *et al.* Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion [J]. *Cell Motil Cytoskel*, 2005, 60(1): 24-34.
- [9] Chiang YN, Martin YM. Cell morphology and migration linked to substrate rigidity [J]. *Soft Matter*, 2007, 3(10): 1285-1292.
- [10] 谭乔燕,王红兵,杨本艳姿,等. 基底硬度对肝细胞与肝癌细胞迁移行为的影响[J]. *医用生物力学*, 2011, 26(6): 566-573.
Tan QY, Wang HB, Yangben YZ, *et al.* Effects of substrate stiffness on the migration of hepatic and hepatoma carcinoma cells [J]. *J Med Biomech*, 2011, 26(6): 566-573.
- [11] Cross SE, Jin YS, James K, *et al.* Nanomechanical analysis of cells from cancer patients [J]. *Nat Nanotechnol*, 2007, 2(12): 780-783.
- [12] Nicolas A, Besser A, Safran SA. Dynamics of cellular focal adhesions on deformable substrates: Consequences for cell force microscopy [J]. *Biophys J*, 2008, 95(2): 527-539.
- [13] Yamada S, Nelson WJ. Localized zones of Rho and Rac activities drive initiation and expansion of epithelial cell-cell adhesion [J]. *J Cell Biol*, 2007, 178(3): 517-527.
- [1] Drees F, Nelson WJ. Cadherin-mediated cell-cell adhesion