

文章编号:1004-7220(2011)06-0566-08

基底硬度对肝细胞与肝癌细胞迁移行为的影响

谭乔燕^a, 王红兵^a, 杨本艳^a, 邹小兵^b, 杨力^a

(重庆大学 a. 生物工程学院; b. 化学化工学院, 重庆 400044)

摘要: **目的** 通过比较不同硬度基底对肝细胞和肝癌细胞迁移特征的影响,研究肿瘤细胞迁移行为变化的成因。**方法** 运用免疫荧光染色、形态学分析法和 Transwell 侵袭实验,观察不同硬度基底上 HCCLM3 和 L02 细胞的形态特征及对细胞运动能力进行检测和定量分析。**结果** (1)相对于极软(0.5 kPa)和极硬(玻璃)基底,HCCLM3 和 L02 细胞在较软基底(4 kPa)上具有较高的迁移速率和迁移净距离,且 L02 细胞表现出高的迁移效率。(2) HCCLM3 和 L02 细胞在不同硬度基底上均方位移趋势一致,较软基底上 L02 细胞具有较高的方向持续能力。(3) 0.5 和 1 mg/mL 三维胶原基质中, HCCLM3 细胞穿透基底膜的个数分别显著多于 L02 细胞穿透基底膜的个数;加入 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 水解酶抑制剂 GM6001 后, HCCLM3 细胞穿透基底膜的个数显著增加,而 L02 细胞穿透基底膜的个数显著减少。**结论** (1)二维较软基底上,L02 细胞因有较高的方向持续能力而表现出高的迁移效率。(2)三维胶原基质中,HCCLM3 细胞以不同迁移模式适应周围环境,从而表现出更大的侵袭能力。

关键词: 肝细胞; 肝癌细胞; 基底; 硬度; 细胞迁移; 位移

中图分类号: Q 27, Q 291

文献标志码: A

Effects of substrate stiffness on the migration of hepatic and hepatoma carcinoma cells

TAN Qiao-yan^a, WANG Hong-bing^a, YANG BEN Yan-zi^a, ZOU Xiao-bing^b, YANG Li^a

(a. College of Bioengineering; b. College of Chemistry, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract: **Objective** To investigate the cause of tumor cell migration by comparing the effect of substrate stiffness on hepatic and hepatoma carcinoma cell migration so as to understand the invasive characteristics of tumor cells. **Methods** Immunofluorescence staining, morphological analysis and transwell were employed to observe the morphological characteristics of HCCLM3 and L02 cells on different substrates and test their migration characteristics with the quantitative analysis. **Results** (1) The migration rate and net translocation of HCCLM3 and L02 cells on 4 kPa substrate was higher than those both on 0.5 kPa (most soft one) and on glass (the hardest one) substrates, and L02 cells also displayed higher migration efficiency than HCCLM3 cells on such substrates. (2) The mean-squared displacement of HCCLM3 and L02 cells on different substrates showed consistent tendency, and the directional persistence of L02 cells on the softer substrate was significantly higher than that of HCCLM3 cells. (3) In 0.5 and 1 mg/mL three-dimensional collagen environment, the number of invasive cells of HCCLM3 was remarkably more than that of L02 cells. After adding MMPs inhibitor GM6001 (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$), the number of invasive cells was notably increased in HCCLM3 cells, but notably decreased in L02 cells. **Conclusions** (1) In two-dimensional comparatively soft environment, L02 cells displayed an efficient migration due to its higher directional persistence. (2) In three-dimensional collagen environment, the invasion efficiency of HCCLM3 cells was significantly higher due to the various modes of migration adaptation to the microenvironment.

Key words: Hepatic cells; Hepatoma carcinoma cells; Substrates; Stiffness; Cell migration; Displacement

收稿日期:2011-03-03; 修回日期:2011-03-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(10472137, 30870608), 高等学校学科创新引智计划(国家“111 计划”)资助项目(B06023), 重庆大学“211 工程”三期创新人才培养计划建设项目(S-09104)。

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

迁移运动是细胞进行很多重要生理活动的基础,同时也是炎症反应和肿瘤发生等病理过程的重要步骤和关键环节。肿瘤细胞能够通过自身运动在组织中浸润转移,这不仅是肿瘤恶性特征的主要表现形式,也是癌症致死的主要原因之一。因此,对临床治疗而言,如何有效抑制肿瘤细胞的浸润转移始终是治疗策略的核心目标。

肿瘤细胞浸润转移是一个涉及多环节多步骤的复杂过程,既涉及肿瘤细胞从原发灶向周边扩散,又涉及肿瘤细胞穿过血管内皮和趋化性通过邻近胞外基质等一系列连续过程^[1],这些体内微环境具有不同的力学特征。力学信号的传感来自黏附斑内的力学感受器即跨膜受体整合素的功能,整合素使细胞锚着于胞外基质(extracellular matrix, ECM)上,在细胞内又与可收缩的肌动蛋白骨架相连接,整合素激活可由骨架收缩和基质形变的耦联驱动,他将启动黏附斑装配从而引发细胞进行形态和位置调整,其相互作用过程既受细胞收缩元件即骨架的调节,也受黏附基底变形性的影响。

Wang等^[2-3]的实验发现培养在软、硬不同基底上的细胞其形态特征和运动能力明显不同。之后Ni等^[4]提出一个数学模型来描述基底硬度怎样影响细胞形态和运动改变:细胞形态的变化是总自由能的两个部分即界面能和应变能竞争的结果。细胞和基底间的界面能稳定细胞形态,而来自胞内和胞外的应变能使细胞失稳。界面能和应变能竞争形成一个共同的区域:在硬度比范围内,细胞通过与基底的相互作用而彼此适应,当细胞硬度大于基质硬度时,细胞-基底系统的应变能起决定作用,细胞频繁出现形态转变;当细胞硬度小于基质硬度时,细胞和基底之间的界面能决定了总自由能的变化,细胞形态变得稳定;如果周围的化学成分相同,只有当细胞硬度与基质硬度相当时,细胞活性最好。

文献[5]显示发生恶变组织的细胞比邻近正常细胞大约软70%。肿瘤细胞普遍变软,与其骨架结构和功能活动异常有关;同时肿瘤细胞的黏附调节能力下降,这些改变无疑将影响肿瘤细胞界面能和应变能的竞争过程,进而影响整合细胞-基底系统的黏附斑装配/去装配过程。因此,正常细胞与肿瘤细胞对基质硬度变化转化为细胞形态调整及迁移行为变化的过程及结果必然存在差异,这些差异信息

的定量表征对解析肿瘤细胞运动特性至为重要。

本文拟通过比较分析不同硬度基底膜上肝细胞与肝癌细胞的迁移特征及其细胞周边黏附位点分布变化和调节分子活性,探索肿瘤细胞迁移行为变化的成因,加深对肿瘤细胞侵袭生长本质特征的认识。

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(LO2)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℃、5%CO₂条件下培养。

1.2 聚丙烯酰胺凝胶的制备及剪切模量测定

聚丙烯酰胺凝胶基底膜的制备主要参照文献[6-7]进行。除有特殊说明外所有的化学试剂均购自Sigma Aldrich(St. Louis)。旋转流变仪(TA instruments, AR2000ex)测定充分溶胀的模量,参数设置为37℃,振荡频率0.2 Hz,切应力为1%最大幅度。

1.3 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数码照相机对细胞进行连续、定点显微观察和拍摄记录。轴率=细胞长轴/细胞短轴(length to width ratio, L/S);细胞分支定义为零个分支(apolar),一个分支(unipolar),两个分支(bipolar),多个分支(multipolar);细胞迁移过程中周边伪足动态变化轨迹:红色表示脱落黏附位点,绿色表示新生黏附位点。

1.4 细胞运动能力分析

用Image J测量每个时间点内细胞的几何中心二维坐标(x, y),时间间隔为5 min,每张图至少取10个细胞,重复3次。迁移速率为细胞60 min内的迁移总距离/时间;迁移净距离指细胞从起始时间到60 min后移动的直线距离;均方位移(mean-squared displacement, MSD)为

$$\text{MSD} = (x_n - x_1) \cdot (x_n - x_1) + (y_n - y_1) \cdot (y_n - y_1)$$

$$r^2 = 4D[t - \tau(1 - e^{-t/\tau})]$$

其中: r^2 代表MSD, t 为时间, τ 为持续时间, D 为随机运动频率,用简化公式 $r^2 = 4Dt$ 求得 D 值^[8];转向角为细胞在初始和60 min后的角度取向;方向

持续性 (directional persistence, D/T) = 迁移净距离/迁移总距离。

1.5 细胞骨架的激光共聚焦检测

将培养好的细胞用 PBS 洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 15 min, 0.5% TritonX-100 透膜 15 min, 5% 血清封闭 2h; 吸干封闭液, 加入 FITC-phalloidin (Sigma, 1:100), 4 °C 过夜, 甘油/PBS (V/V = 9/1) 封片。所有图像均通过 Nikon Eclipse TE300 显微镜的 BioRad Radiance 2000 激光共聚焦系统获得。

1.6 胶原侵袭实验

按 BD 公司提供的胶原 (100 mg/mL, BD Biosciences) 和步聚制备 0.5、1、3 mg/mL 的三维胶。将 50 μ L 混合液加入 Transwell (8 μ m 孔径, Costar) 上室, 37 °C 孵育 4~5 h 至凝固。将 200 μ L 无血清细胞悬液和添加 40 μ g/mL 水解酶抑制剂 GM6001 (1 mg, Calbiochem) 的无血清细胞悬液分别在上室, 下室各加入 200 μ L 含有 20% 血清的培养基, 37 °C 5% CO₂ 培养 16 h。取出 Transwell 用湿棉签轻轻擦去胶原凝胶和膜上表面的细胞, 结晶紫 (0.1%) 室温染色 30 min, PBS 洗 2 遍, 风干, 显微镜下分别计数上、中、下、左和右 5 个视野的细胞数, 并计算其平均数。

1.7 统计分析

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 作 t 检验, * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$ 。

2 结果

2.1 不同硬度水凝胶基底膜剪切模量 (G') 的测定

聚丙烯酰胺水凝胶由于其亲水性强、无色透明、软硬度可调, 以及良好的透气性和生物兼容性, 适合作为细胞培养^[9-10]。如图 1 所示: 当单体浓度和交联剂浓度分别为 5.5%、7.5%、9%、12% 和 0.06%、0.08%、0.1%、0.2%、0.3% 时, 水凝胶基底膜的硬度范围可控制在 0.5~12 kPa。肝细胞的硬度范围是 3~10 kPa^[14], 而癌变组织的细胞比邻近正常细胞大约软 70%^[5]; 因此, 选择接近生理条件硬度的 4 kPa 水凝胶基底膜做后续实验, 并用 0.5 kPa 和 glass 基底做对照。

2.2 不同硬度水凝胶基底膜上细胞形态特征观测

图 2(a) 显示: 0.5 kPa 基底上, 细胞趋近于圆形, 微丝集中在细胞周边呈环状排列; 4 kPa 基底

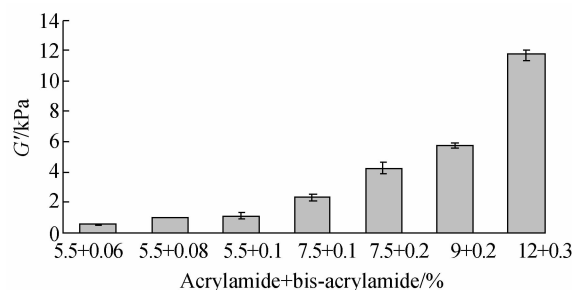


图 1 聚丙烯酰胺水凝胶的力学特征

Fig. 1 Mechanical properties of polyacrylamide substrates

上, 细胞多呈梭形, 极化明显; glass 基底上, 细胞铺展面积增大, 应力纤维发育完善。图 2(b)~(c) 统计细胞的 L/S 和分支数发现: 0.5 kPa 基底上, HCCLM3 和 L02 细胞的 L/S 分别为 (1.29 ± 0.34) 和 (1.72 ± 0.5) , 细胞圆度比较高; 4 kPa 基底上, HCCLM3 和 L02 细胞的 L/S 分别为 (3.51 ± 1.99) 和 (2 ± 0.47) , 细胞极化明显, 且 HCCLM3 细胞的极化水平高; glass 基底上, 两种细胞的极化程度均有一定程度的下降。对于细胞分支数而言, 无论是 HCCLM3 还是 L02 细胞, 在 0.5 kPa 基底上都为 $apolar > unipolar > bipolar > multipolar$ (53.5%, 20.5%, 15.8%, 10.1%; 37%, 23.6%, 21.2%, 18.2%); 在 glass 基底上则刚好相反, 为 $multipolar > bioplar > unipolar > apolar$ (44.1%, 27.4%, 18.6%, 9.8%; 60.8%, 22.7%, 11.9%, 4.6%)。值得注意的是, 在 4 kPa 基底上, HCCLM3 细胞中 unipolar 和 biopolar 的数目大致相当, 而 L02 细胞中 bipolar 要高于 unipolar。

2.3 不同硬度水凝胶基底膜上细胞运动能力分析

2.3.1 基底硬度对细胞迁移能力的影响 图 3(a) 为相差显微镜获取的不同硬度基底上 HCCLM3 和 L02 细胞分别在初始和 60 min 的照片及净迁移距离图。图 3(b) 定量分析细胞的迁移速率和迁移净距离显示: 在 4 kPa 基底上, HCCLM3 和 L02 细胞的迁移速率为 $(0.189 \pm 0.04) \mu\text{m}/\text{min}$ 和 $(0.21 \pm 0.016) \mu\text{m}/\text{min}$, 迁移净距离为 $(4.65 \pm 0.48) \mu\text{m}$ 和 $(7.33 \pm 1.82) \mu\text{m}$, 都分别显著高于 0.5 kPa 和 glass 基底上细胞迁移速率 ($(0.07 \pm 0.01) \mu\text{m}/\text{min}$, $(0.06 \pm 0.02) \mu\text{m}/\text{min}$; $(0.07 \pm 0.01) \mu\text{m}/\text{min}$, $(0.09 \pm 0.03) \mu\text{m}/\text{min}$) 和迁移净距离 ($(1.61 \pm 0.07) \mu\text{m}$, $(1.49 \pm 0.14) \mu\text{m}$);

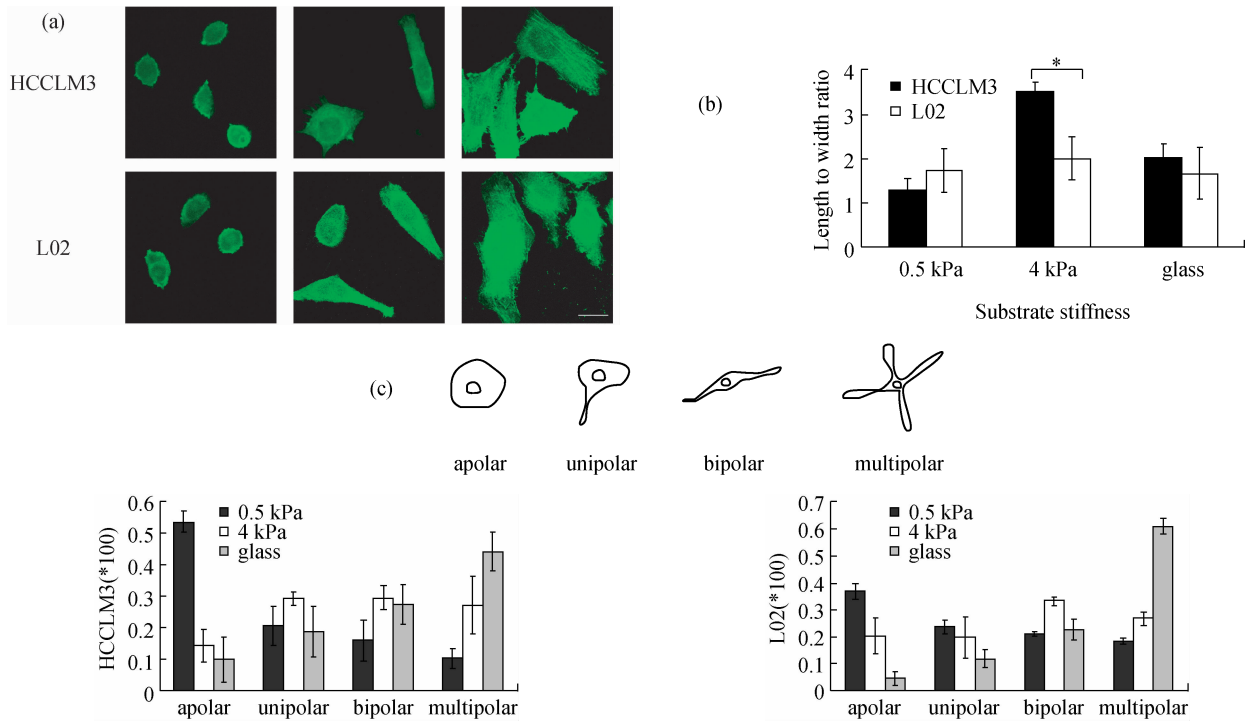


图2 基底硬度对细胞形态的影响 (a) FITC-鬼笔环肽免疫荧光标记的 HCCLM3 和 L02 细胞肌动蛋白骨架, Bar = 20 μm , (b) HCCLM3 和 L02 细胞的长短径之比, (c) 简图^[8]: 细胞分支分类, 细胞分支百分比

Fig.2 Effect of substrate stiffness on the cell morphology (a) Immunofluorescence of HCCLM3 and L02 cells, F-actin were stained with FITC-phalloidin, Bar = 20 μm , (b) L/S of HCCLM3 and L02 cells, (c) Cartoon^[8]: branch of cells, presented as percentage of total cells scored

(1.43 ± 0.02) μm , (1.52 ± 0.33) μm), 与不同硬度基底上 MSD 值的趋势一致(见图 3(c)), 且 4 kPa 基底上 L02 细胞的迁移净距离 (7.33 ± 1.82) μm 显著高于 HCCLM3 细胞的迁移净距离 (4.65 ± 0.48) μm (见图 3(b))。另外, 不同硬度基底上 L02 细胞的 D 值(0.037 ± 0.01 , 0.27 ± 0.03 , 0.02 ± 0.001) 都分别高于 HCCLM3 细胞的 D 值(0.02 ± 0.001 , 0.11 ± 0.02 , 0.01 ± 0.004) (见图 3(d))。显然在 4 kPa 基底上 L02 细胞与 HCCLM3 细胞的运动效率有显著性差异, 那么这种差异与细胞运动过程中的哪些行为相关呢?

2.3.2 基底硬度对细胞方向持续性的影响 图 4(a) 中以两侧半圆中直线的对称性及长度表征细胞取向分布变化。左、右半圆分别表示细胞初始和 60 min 后取向角度的分布。每个半圆从 $0^\circ \sim 180^\circ$ 每 20° 分为一个区, 从内到外每一个环代表不同取向角细胞所占的百分率。结果显示: 4 kPa 基底膜上, HCCLM3 和 L02 细胞初始的角度取向与 60 min 后

的角度取向没有显著性差异; 图 4(b) 定量分析 HCCLM3 和 L02 细胞的方向持续性, 4 kPa 基底上 L02 细胞对运动方向的维持能力较 HCCLM3 细胞高, D/T 值分别为 0.61 ± 0.1 和 0.47 ± 0.05 。图 4(c) 为 60 min 内 HCCLM3 和 L02 细胞边缘伪足伸缩轨迹。

2.4 不同浓度胶原对细胞侵袭的影响

二维基底上肝细胞表现出比肝癌细胞更大的运动活性和运动效率, 以上结果不能解释肿瘤细胞在在体环境中的活跃侵袭行为。进一步分析发现, 肝细胞在 4 kPa 较软基底上其运动效率明显增大, 这主要与细胞对运动方向的维持能力较强有关。方向性运动为黏附依赖的运动模型, 在在体环境中大多数正常组织细胞均以该运动模式迁移, 而文献显示肿瘤细胞在三维环境中可进行非黏附依赖的迁移运动。那么以上结果与肿瘤细胞在在体环境中的活跃侵袭不符是否为其非黏附依赖的迁移运动未能展开有关? 设计三维胶原侵袭实验并诱导细胞进行非黏

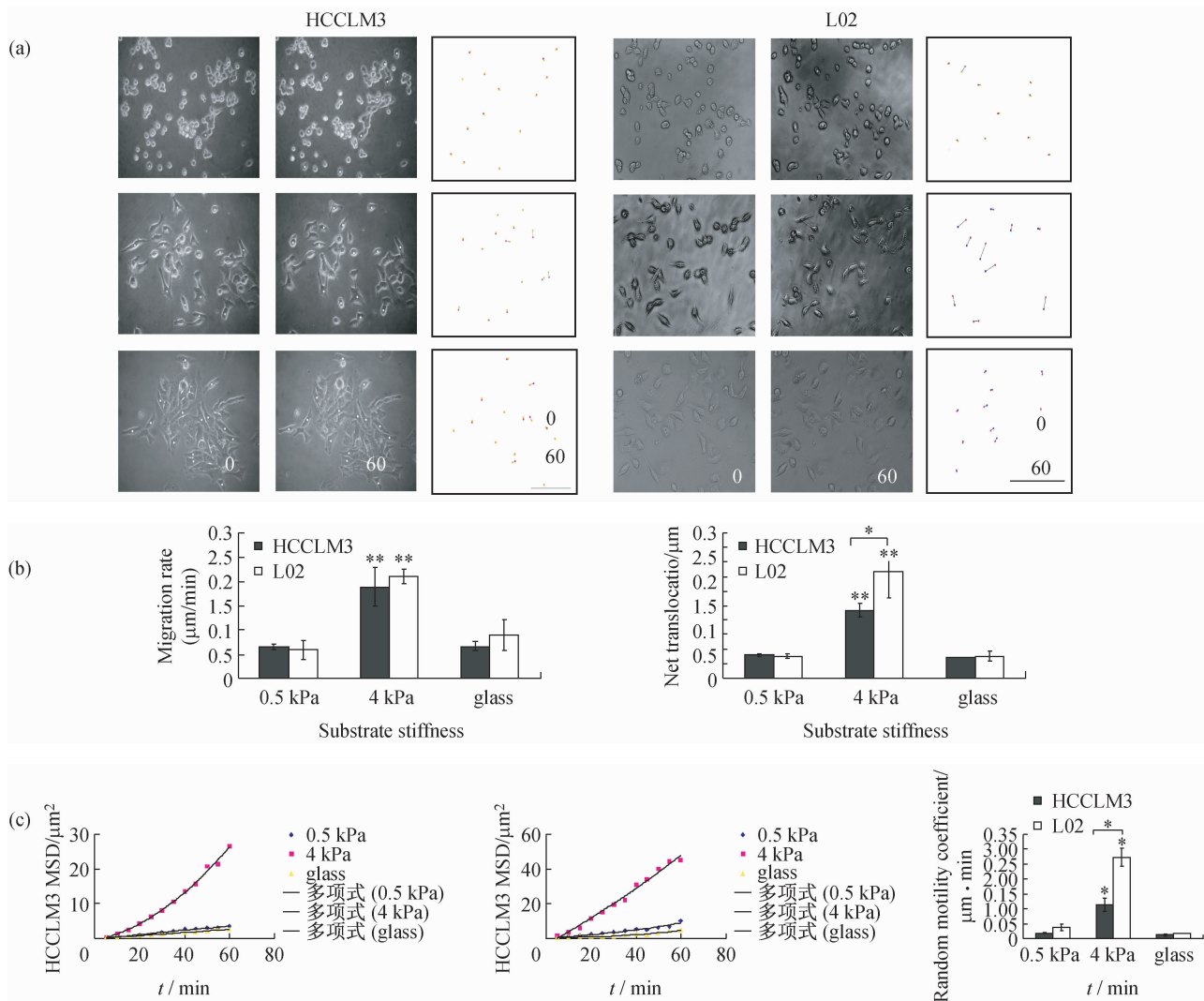


图3 基底硬度对细胞迁移能力的影响 (a)相差实时显微拍摄, Bar = 100 μm , (b)定量细胞的迁移速率和迁移净距离, (c)不同硬度基底上 HCCLM3 和 L02 细胞的均方位移, (d)随机运动频率

Fig. 3 Effect of substrate stiffness on the migration of cells (a) Phase-contrast, time-lapse video microscopy. Bar = 100 μm , (b) Quantification of the rates of migration and net translocation, (c) MSD, (d) Random motility coefficient for HCCLM3 and L02 cells migrating on substrates with varying stiffness

附依赖运动。

制备 0.5、1、3 mg/mL 的三维胶原, 由于细胞在 3 mg/mL 胶原中不能有效侵袭, HCCLM3 和 L02 细胞穿透基底膜的个数分别为 (18 ± 2.78), (8 ± 1.84), 以下实验均采用 0.5 和 1 mg/mL 的胶原浓度。Transwell 胶原侵袭实验显示 (见图 5 (a) ~ (b)): 当胶原浓度为 0.5 mg/mL 时, HCCLM3 细胞穿透基底膜的个数 (292 ± 20) 显著多于 L02 细胞穿

透基底膜的个数 (224 ± 11), 当胶原浓度增加到 1 mg/mL 时, HCCLM3 和 L02 细胞穿透基底膜的个数 (142 ± 39 , 31 ± 9) 显著减少, 但 HCCLM3 细胞的侵袭能力仍然显著高于 L02 细胞; 在浓度为 0.5 和 1 mg/mL 的胶原中分别加入 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 水解酶抑制剂 GM6001 后, HCCLM3 细胞穿透基底膜的个数 (489 ± 11 , 267 ± 19) 显著增加, 而 L02 细胞穿透基底膜的个数 (43 ± 7 , 7 ± 3) 显著减少。

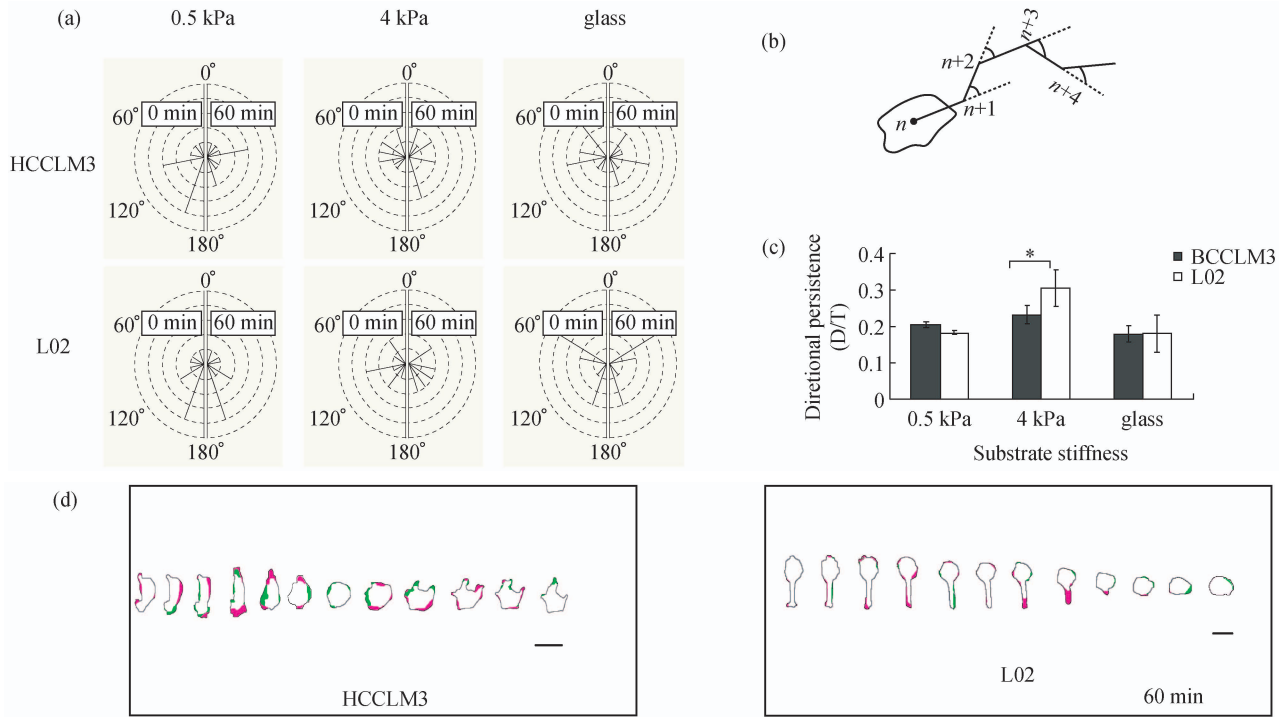


图4 基底硬度对细胞方向持续性的影响 (a) 半圆直方图表征细胞取向角度分布, (b) 简图^[8]; 定量细胞取向的方法, (c) HCCLM3 和 L02 细胞的方向持续性, (d) 细胞迁移过程中周边伪足动态变化轨迹(红色和绿色分别表示缩回和伸出位点)
 Fig.4 Effects of substrate stiffness on cell directional persistence (a) Semicircular histograms showing the distribution of turn angles, (b) Cartoon^[8]; quantification method for the turning frequency of cells, (c) Directional persistence of HCCLM3 and L02 cells, (d) Perimeter plots shown as the shapes of the cells during cell migration (red and green sector of each cell show the retractions and protrusions, respectively)

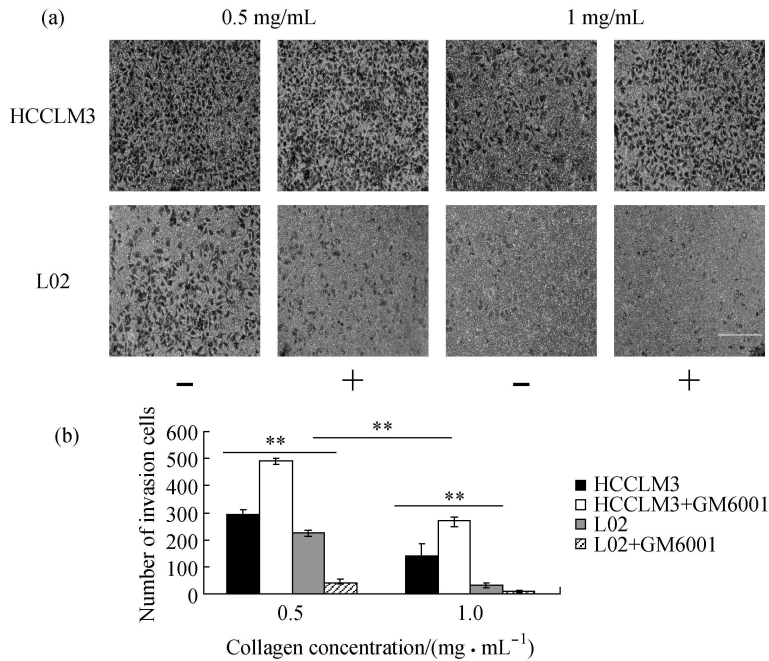


图5 不同浓度胶原对细胞侵袭的影响 (a) HCCLM3 和 L02 细胞分别接种在胶原上, 一组加入水解酶抑制剂 GM6001 (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 培养 16 h, 结晶紫染色并进行相差显微拍摄, (b) 穿透基底膜的细胞个数
 Fig.5 Effect of collagen with different concentration on the cell invasion (a) HCCLM3 and L02 cells were seeded on top of a collagen and 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MMPs inhibitor GM6001 were added. After 16 h, crystal violet staining and phase-contrast microscopy were conducted, (b) The number of invasive cells

3 讨论

细胞生长的力学环境对其生物学行为的影响不容忽视^[12-13],其中细胞形态和迁移运动在很大程度上受到基底力学特性如硬度的影响。实验数据表明:在极软基底(0.5 kPa)和极硬基底(glass)上细胞形态都偏向于圆形(见图2(a)),在较软基底(4 kPa)上细胞多呈梭形,HCCLM3细胞极化程度比L02细胞高(见图2(b)),且两种细胞都表现出较大的运动活性(见图3(b)~(c))。因为在极软基底上细胞附着基底柔软,不能支持等张收缩,骨架和粘着斑装配都不够完善,细胞倾向呈圆形;而极硬基底上利于整合素聚集,黏附斑成熟和应力纤维发育,导致黏附斑翻转频率下降,这些因素共同限制了细胞在极软和极硬基底上的迁移运动能力。在较软基底上如前所述,细胞-基底系统的总自由能等于界面能和应变能之和,且总自由能是基底硬度与细胞硬度比值的函数^[4],任何系统都倾向于自由能最小,故当在细胞硬度和基底硬度相近时总自由能趋于最小值,此时细胞活性最好,实验结果符合预期设计。

4 kPa基底上HCCLM3细胞的迁移净距离显著低于L02细胞的迁移净距离(见图3(b))。进一步观测发现:迁移过程中,HCCLM3细胞伪足回缩及细胞边缘脱黏附位点分布离散,L02细胞形变调整随时间变化呈现尾部沿细胞长轴方向持续脱黏附的特征,黏附位点脱落伴随着骨架收缩和位移(见图4(c))。通过比较发现L02细胞迁移方向持续性显著高于HCCLM3细胞(见图4(b))。细胞在持续方向上迁移需要形成占显著优势的伪足和相同取向的可收缩纤维,其关键环节是骨架收缩与黏附调节的有效整合,而黏附调节需要水解酶的激活^[14-15],因此推测骨架收缩过程中其张力分布变化可能调控水解酶激活及整合素定向定位聚集。对于正常细胞而言,细胞骨架活动对运动过程中细胞两端的黏附-脱黏附可有效统摄,即水解酶按照一定的时空顺序激活,表现为间充质式的高方向性迁移;肿瘤细胞由于骨架结构和信号转导异常^[16-17],可能对参与方向性运动的各组份间相互作用关系的调控能力下降,导致水解酶的时空激活紊乱,黏附-脱黏附配合失

序,因而表现出低的迁移效率。

相对正常细胞高效及定位和取向明确等迁移运动特征,肿瘤细胞迁移轨迹离散,故迁移效率远低于正常细胞。但在在体环境中肿瘤细胞表现出顽固多变的侵袭性运动倾向又是由什么决定的呢?细胞运动特征及其变化主要受细胞自身状况和微环境二方面的影响。在三维基质中,由于基质纤维的存在,细胞要想迁移运动就必须克服这一障碍,这时细胞的柔顺性和收缩驱动力将是影响这一过程的决定因素。文献表明肿瘤细胞在在体环境中可进行阿米巴式迁移运动。以阿米巴模式侵袭的细胞通过ROCK(Rho associated kinase)激活高肌动-球蛋白的收缩水平挤压自身变形,以一种不依赖水解酶的机制突破胞外基质屏障的束缚,细胞呈现低黏附、无方向和高速率(15 $\mu\text{m}/\text{min}$)的变形运动。正常组织细胞多进行间充质式迁移,然而肿瘤细胞在迁移过程中其运动模式可随肿瘤细胞的自身状态和微环境变化而改变^[18]。通过三维胶原侵袭实验发现(见图5):随着胶原浓度增加,HCCLM3和L02细胞穿透基底膜的个数减少,但不同浓度胶原中HCCLM3细胞的侵袭能力还是显著高于L02细胞,为了进一步验证三维培养环境中HCCLM3细胞侵袭能力高于L02细胞是由其阿米巴样运动所致,进行经典的阿米巴运动诱导实验^[18],即加入水解酶抑制剂GM6001,结果显示:HCCLM3细胞穿透基底膜的个数显著增加,L02细胞穿透基底膜的个数显著减少,说明肿瘤细胞具有迁移模式转换的能力,从而表现出更大的侵袭能力。现有研究证实不同类型肿瘤细胞都表现出相似的低硬度值^[5],恶性转化细胞的骨架发育存在不同程度的缺陷,且黏附蛋白的磷酸化水平普遍较低^[19-20],由于骨架结构和黏附调节异常均可影响细胞骨架张力,导致受骨架张力影响的细胞硬度偏低。那么,肿瘤细胞这一特质究竟会对其运动行为产生什么影响呢?本文认为其影响可能包括两个方面:一是骨架对参与细胞运动的各组份间相互作用关系的调控能力下降,故当其进行间充质式迁移时,也极易丢失间充质式迁移特征,转而进行阿米巴样运动;二是柔韧性改变使他们更容易挤过组织间隙,利于癌细胞浸润转移。

参考文献:

- [1] Tian B, Li Y, Ji XN, *et al.* Basement membrane proteins play an active role in the invasive process of human hepatocellular carcinoma cells with high metastasis potential [J]. *J Cancer Res Clin*, 2005, 131(2): 80-86.
- [2] Wang N, Ingber DE. Control of cytoskeletal mechanics by extracellular-matrix, cell-shape, and mechanical tension [J]. *Biophys J*, 1994, 66(6): 2181-2189.
- [3] Yeung T, Georges PC, Flanagan L A, *et al.* Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion [J]. *Cell Motol Cytoskel*, 2005, 60(1): 24-34.
- [4] Ni Y, Chiang MYM. Cell morphology and migration linked to substrate rigidity [J]. *Soft Matter*, 2007, 10(3): 1285-1292.
- [5] Cross SE, Jin YS, Rao J, *et al.* Nanomechanical analysis of cells from cancer patients [J]. *Nat Nanotechnol*, 2007, 2(12): 780-783.
- [6] Wang N, Tolic-Norrellykke IM, Chen JX, *et al.* Cell prestress. I. Stiffness and prestress are closely associated in adherent contractile cells [J]. *Am Jm Physiol-Cell Ph*, 2002, 282(3): 606-616.
- [7] Dembo M, Wang YL. Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts [J]. *Biophys J*, 1999, 76(4): 2307-2316.
- [8] Stroka K M, Aranda-Espinoza H. Neutrophils display biphasic relationship between migration and substrate stiffness [J]. *Cell Motil Cytoskel*, 2009, 66(6): 328-341.
- [9] Reinhart-King CA, Dembo M, Hammer DA. Cell-cell mechanical communication through compliant substrates [J]. *Biophys J*, 2008, 95(12): 6044-6051.
- [10] Solon J, Levental I, Sengupta K, *et al.* Fibroblast adaptation and stiffness matching to soft elastic substrates [J]. *Biophys J*, 2007, 93(12): 4453-4461.
- [11] Ziol M, Handra-Luca A, Kettaneh A, *et al.* Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C [J]. *Hepatology*, 2005, 41(1): 48-54.
- [12] 朱好, 严志强, 沈宝荣, 等. 机械张应变诱导蛋白激酶 B 活化对血管平滑肌细胞迁移的影响 [J]. *医用生物力学*, 2006, 21(4): 259-261.
- Zhu Y, Yan ZQ, Shen BR, *et al.* Effect of Akt/PKB activation on mechanical strain-induced vascular smooth muscle cell migration [J]. *J Med Biomech*, 2006, 21(4): 259-261.
- [13] 徐百耀, 宋关斌. 力学刺激诱导骨髓间充质干细胞选择分化的研究进展 [J]. *医用生物力学*, 2007, 22(1): 104-108.
- Xu BY, Song GB. Advances in selective differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells induced by mechanical stimulation [J]. *J Med Biomech*, 2007, 22(1): 104-108.
- [14] Puklin-Faucher E, Sheetz MP. The mechanical integrin cycle [J]. *J Cell Sci*, 2009, 122(2): 179-186.
- [15] Caswell PT, Norman JC. Integrin trafficking and the control of cell migration [J]. *Traffic*, 2006, 7(1): 14-21.
- [16] Powelka AM, Sun JL, Li J, *et al.* Stimulation-dependent recycling of integrin beta 1 regulated by ARF6 and Rab11 [J]. *Traffic*, 2004, 5(1): 20-36.
- [17] Broussard JA, Webb DJ, Kaverina I. Asymmetric focal adhesion disassembly in motile cells [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2008, 20(1): 85-90.
- [18] Wolf K, Mazo I, Leung H, *et al.* Compensation mechanism in tumor cell migration: Mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis [J]. *J Cell Bio*, 2003, 160(2): 267-277.
- [19] McCarthy JB, Skubitz AP, Iida J, *et al.* Tumor cell adhesive mechanisms and their relationship to metastasis [J]. *Semin Cancer Biol*, 1991, 2(3): 155-167.
- [20] Suresh S. Biomechanics and biophysics of cancer cells [J]. *Acta Bio Mater*, 2007, 3(4): 413-438.