

造影红细胞对剪切流中肿瘤细胞黏附的影响

傅 怡¹, 吴 洁¹, 孙 仁¹, 丁祖荣¹, 董 澄^{1,2}

(1. 上海交通大学 船舶海洋与建筑工程学院, 水动力学教育部重点实验室, 上海 200240;

2. Department of Bioengineering, the Pennsylvania State University, PA 16802, USA)

摘要: **目的** 研究造影红细胞对剪切流环境中白细胞介导肿瘤细胞在内皮细胞上黏附的影响。**方法** 在平行平板流动腔中加入 20% 比容的造影红细胞, 分析不同剪切率 (62.5 、 100 、 200 s^{-1}) 下内皮细胞上黏附白细胞数目、肿瘤细胞与黏附白细胞的碰撞事件以及稳定黏附肿瘤细胞数目的变化。**结果** 造影红细胞促进白细胞在内皮细胞上黏附, 增加肿瘤细胞与黏附白细胞的碰撞频率, 并最终促进肿瘤细胞在内皮细胞上的黏附, 且这一现象在高剪切率 (200 s^{-1}) 下更为明显; 但造影红细胞对肿瘤细胞的黏附效率并无显著影响。**结论** 剪切流中造影红细胞的存在对肿瘤细胞在内皮细胞上的黏附起到促进作用, 研究结果为探索癌症治疗方法提供理论基础。

关键词: 造影红细胞; 内皮细胞; 白细胞; 肿瘤细胞; 剪切流; 细胞黏附

中图分类号: R 318.01 **文献标志码:** A

DOI: 10.3871/j.1004-7220.2015.02.099

Effects of ghost red blood cells on tumor cell adhesion in shear flow

FU Yi¹, WU Jie¹, SUN Ren¹, DING Zu-rong¹, DONG Cheng^{1,2} (1. MOE Key Laboratory of Hydrodynamics, School of Naval Architecture, Ocean and Civil Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China; 2. Department of Bioengineering, the Pennsylvania State University, PA 16802, USA)

Abstract: **Objective** To study the effect of ghost red blood cells (GRBCs) on white blood cell (WBC)-mediated adhesion of tumor cells (TCs) on endothelial cells (ECs) in shear flow. **Methods** GRBCs with hematocrit (Hct) of 20% were added in the parallel plate flow chamber to observe changes in the number of tethered WBCs on ECs, the collision between TCs and adhesive WBCs, and the number of firmly adhered TCs at different shear rates of 62.5 , 100 , 200 s^{-1} , respectively. **Results** GRBCs could increase the number of adhered WBCs on ECs and the collision between TCs and adhesive WBCs, and finally enhance the adhesion of TCs on ECs, especially at high shear rate (200 s^{-1}). However, the adhesion efficiency of TCs was not significantly influenced by GRBCs. **Conclusions** GRBCs in shear flow can promote TC adhesion on ECs, and the research finding will provide a theoretical basis for cancer therapy.

Key words: Ghost red blood cells (GRBCs); Endothelial cells (ECs); White blood cells (WBCs); Tumor cells (TCs); Shear flow; Cell adhesion

约 90% 的恶性肿瘤死亡病例可归结于肿瘤细胞转移^[1]。肿瘤细胞转移是一个非常复杂的过程, 包含细胞黏附和细胞在血管中外渗等力学行为, 还

与许多化学因子及蛋白因子相关^[2-5]。美国宾州州立大学董澄教授实验室对黑色素瘤细胞黏附的系列研究表明, 白细胞能够作为肿瘤细胞和内皮细胞间

收稿日期:2014-06-17; 修回日期:2014-07-23

基金项目:国家自然科学基金项目(11302129), 美国国立卫生研究院(NIH)资助项目(CA-125707), 美国国家科学基金会(NSF)资助项目(CBET-0729091)。

通信作者:傅怡, E-mail: yifubiomech@outlook.com; 董澄, E-mail: cxd23@psu.edu。

的桥梁,促进其在血流环境下在内皮细胞上的黏附;该过程可归结为“两步观点(two-step theory)”,即白细胞先黏附到内皮细胞上,随后黑色素瘤细胞再黏附到白细胞上^[6-7];在没有白细胞存在时,流动状态下的黑色素瘤细胞黏附数量要远远低于静止状态下;而当加入白细胞时,其黏附数量迅速提高,并随流动的强弱而变化^[8]。白细胞和内皮细胞的黏附随剪切力和剪切速率的增加而下降;而在剪切率不变情况下改变溶液黏度,白细胞在内皮细胞上的黏附则随着剪切力增加而升高,该结果揭示了流动环境中肿瘤细胞的靶向结合在肿瘤细胞转移过程中的重要意义^[9]。同时,他们还结合侧视显微粒子成像测速技术,利用计算流体力学方法模拟研究在这一过程中血管近壁面局部流动环境的变化,以及白细胞介导肿瘤细胞在内皮细胞上的黏附行为^[10]。

在以往观察近壁面细胞黏附行为的实验中,为了简化实验,通常忽略血流中红细胞因素的存在。实际上,人体血管中红细胞在微循环血液中的体积比例为30%~40%,它不但决定了血液的黏度,还对其他细胞在血液中的运动产生影响。因此,本课题组采用平行平板流动腔实验,在体外模拟含有红细胞的血流环境,探讨红细胞的存在对白细胞介导肿瘤细胞在内皮细胞上黏附的影响。

1 材料与方法

1.1 实验所需细胞准备

EI细胞为转染的L成纤维细胞系(L-fibroblast),由美国加利福尼亚大学戴维斯分校Dr. Scott Simon提供,稳定表达E选择素(E-selectin)和细胞间黏附分子-1(intracellular adhesion molecule-1, ICAM-1)用来作为细胞黏附实验的内皮细胞底层。肿瘤细胞选取人类黑色素瘤细胞Lu1205,由美国宾州州立大学Dr. Gavin Robertson提供,表达ICAM-1、 $\alpha_3\beta_3$ 整合素、CD44等细胞黏附分子。EI细胞和Lu1205细胞均为贴壁细胞,放在各自的培养液中,置于37℃、5%CO₂培养箱中培养2~3d后,显微镜下观察细胞均匀铺在培养皿底部70%以上时即可传代或用于实验。

人嗜中性粒细胞(polymorpho-nuclear neutrophils, PMN)和造影红细胞(ghost red blood cell, GRBC)从健康志愿者提供的新鲜血液中提取,其中

PMN主要表达 β_2 整合素(β_2 -integrin)和P选择素糖蛋白配体-1(P-selectin glycoprotein ligand-1, PSGL)等细胞黏附分子。PMN采用Histopaque-1077和Histopaque-1119分离液提取^[6-7]。由于红细胞含有大量的血红蛋白,在溶液中加入红细胞后,整个观察视野将全部呈现红色,除非采用荧光显微技术并标记相关细胞,将无法观测实验现象。对于白细胞介导肿瘤细胞在内皮细胞上黏附这一过程,由于涉及3种细胞,荧光标记将使实验操作和观测变得尤为复杂,故采取的方式是将红细胞内部的血红蛋白释放出来,形成造影红细胞,再进行实验。红细胞的力学特性主要由其细胞膜决定,在制备造影红细胞时尽可能保证细胞膜的完整性,不破坏其功能。为此在制备造影红细胞的方法上,参考前期的研究^[11-12]并加以改进,选取合适的高渗和低渗缓冲液,首先使得红细胞膨胀释放出血红蛋白,然后再将其重新封装,得到造影红细胞。

1.2 流动腔实验设计

往35 mm培养皿中加入1 mL 2%胶原,37℃放置30 min后吸去溶液,并用缓冲液DPBS冲洗1遍。然后在培养皿中加入2 mL浓度为(0.5~3.0)×10⁵个/mL EI细胞溶液,放入37℃、5%CO₂培养箱1~2 d,直至细胞铺满培养皿底部。采用平行平板流动腔(Glycotech公司,美国)观察和定量分析不同剪切率条件下造影红细胞对白细胞介导肿瘤细胞Lu1205在内皮细胞上黏附的影响。白细胞和肿瘤细胞悬浮液按照1:1比例混合(总浓度1×10⁶个/mL),加入20%比容的造影红细胞,采用注射泵(Harvard Apparatus公司,美国)灌注到流动腔中,并在10 s⁻¹剪切率下使其流动2~3 min。然后调整为实验所需剪切率,在10倍物镜下以30帧/s的录像速度记录5 min,观测区域大小为800 μm×600 μm,离线分析录像。为了与之前一系列实验保持一致,本文中剪切率设定为62.5、100和200 s⁻¹^[7-8]。

1.3 实验数据定量分析

通过对观测区域5 min录像的细胞计数,统计以下数据:①黏附在内皮细胞单层上的白细胞数目(包括滚动和抓住的白细胞);②靠近内皮细胞单层处流动的溶液中与黏附着的白细胞发生碰撞的肿瘤细胞数目;③内皮细胞单层上最终形成的稳定黏附的肿瘤细胞-白细胞聚集体数目。其中,被肿瘤细

胞-白细胞聚集体抓住的白细胞统计为黏附白细胞, 对于少量稳定黏附的肿瘤细胞-白细胞聚集体中有单个白细胞和多个肿瘤细胞情况, 统计为多个稳定黏附的肿瘤细胞-白细胞聚集体。

白细胞黏附频率 (PMN tethering frequency) 定义为单位时间单位面积黏附在内皮细胞单层的白细胞数目。为消除不同剪切率下通过相同区域的细胞浓度不同这一差异, 参考文献进行归一化处理^[13-14]。本文将肿瘤细胞黏附效率 (TC adhesion efficiency) 定义为:

$$f = \frac{n_{\text{arrested TC}}}{n_{\text{TC-PMN collision}}}$$

式中: $n_{\text{arrested TC}}$ 为黏附在内皮单层细胞上的白细胞发生碰撞并最终稳定黏附在内皮细胞单层上的肿瘤细胞数目, $n_{\text{TC-PMN collision}}$ 为靠近内皮细胞单层处流动的溶液中与黏附着的白细胞发生碰撞的肿瘤细胞数目。各项实验数据均源于 3 次平行实验的计数分析, 并采用 t 检验进行统计分析。

2 实验结果

2.1 造影红细胞使白细胞黏附频率增加

当溶液中加入 20% 比容的造影红细胞时, 白细胞的黏附频率在 62.5、100 和 200 s^{-1} 剪切率条件下均有显著性提高, 分别提升 20.4%、23.3% 和 33.3%。随着剪切率的升高, 造影红细胞对 PMN 黏附的促进作用愈发明显 (见图 1)。

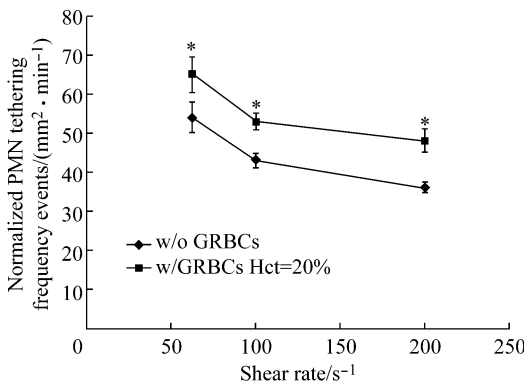


图 1 造影红细胞对白细胞黏附影响 (* $P < 0.05$)
 Fig. 1 The effect of GRBCs on PMN tethering

2.2 造影红细胞提高肿瘤细胞与黏附白细胞的碰撞概率

通过统计观测区域 5 min 内发生的肿瘤细胞和

白细胞碰撞事件发现, 无论是在低还是高剪切率条件下, 加入 20% 比容的造影红细胞后与没有造影红细胞相比, 碰撞概率提高 20% ~ 30%, 并在高剪切率 (200 s^{-1}) 条件下尤为明显, 增长率达到 29.7% (见图 2)。

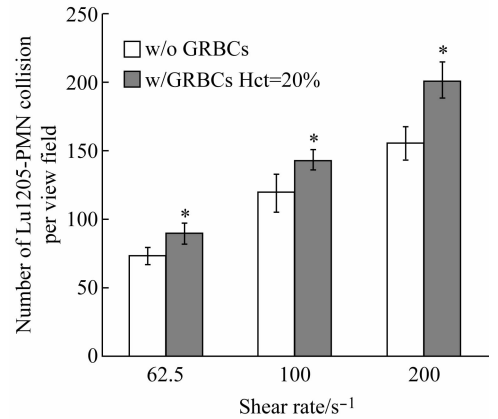


图 2 造影红细胞对肿瘤细胞与白细胞碰撞的影响 (* $P < 0.05$)
 Fig. 2 The effect of GRBCs on the collision between TCs and PMNs

2.3 造影红细胞对肿瘤细胞黏附的影响

上述结果表明, 造影红细胞的存在对白细胞黏附和肿瘤细胞与黏附白细胞的碰撞均有促进。而通过统计观测区域 5 min 内肿瘤细胞黏附数目发现, 形成稳定黏附的肿瘤细胞数目随造影红细胞的参与得到显著提高, 同样也是在高剪切率 (200 s^{-1}) 条件下增加最多, 增长率达到 33% (见图 3)。

将整个 5 min 的观察时间分为 5 个时间点, 统计每个时间点累积的肿瘤细胞黏附效率, 以考察肿

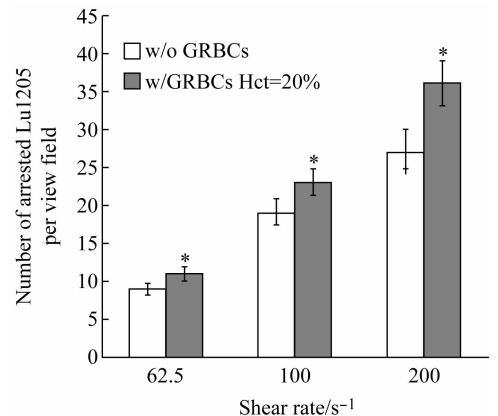


图 3 造影红细胞对黏附肿瘤细胞的影响 (* $P < 0.05$)
 Fig. 3 The effect of GRBCs on TC adhesion

瘤细胞黏附效率随时间变化的影响。无论是否有造影红细胞的参与,0~3 min,肿瘤细胞的累积黏附效

率随时间逐渐升高;3~5 min,累积黏附效率趋于稳定(见图4)。

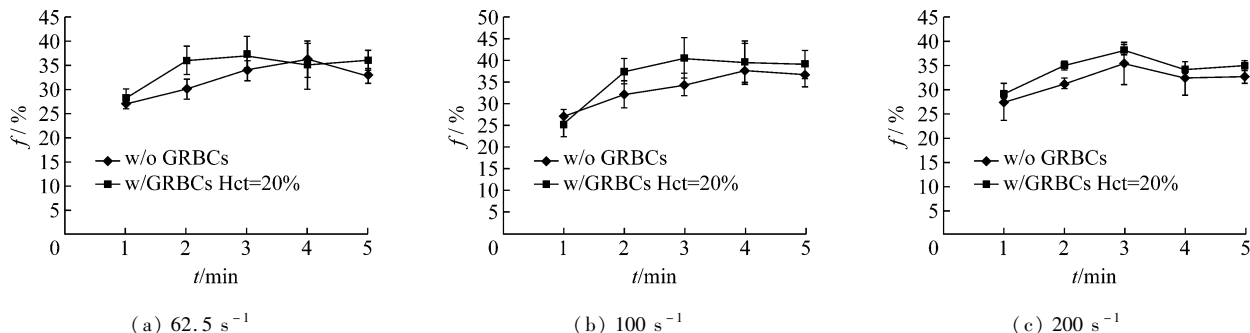


图4 不同剪切率下造影红细胞对肿瘤细胞黏附效率的影响

Fig. 4 The effect of GRBCs on TC adhesion efficiency at different shear rates

3 讨论

本实验中采用的造影红细胞比容为20%,主要是在造影红细胞的制备过程中各项步骤中均有红细胞数量损失,使得最终得到的血影红细胞浓度不能达到最初的红细胞溶液浓度。Lipowsky等^[15]研究表明,受到Fahraeus效应影响,相比全身红细胞比容(平均值为33.8%),微血管中红细胞比容有明显减小,微静脉和微动脉中红细胞比容平均值分别为17.3%和15.9%。而本文研究的白细胞介导肿瘤细胞在内皮细胞上的黏附正是模拟微血管中的剪切流,故20%造影红细胞比容的选取是较为合理的。以后将进一步完善实验,考察不同浓度造影红细胞溶液对结果的影响。

Munn等^[16]通过研究红细胞对白细胞-内皮细胞相互作用的影响发现,血液流变性的改变增加白细胞所受的法向力和轴向力以及白细胞与血管壁的碰撞频率,从而影响循环白细胞的黏附;同时红细胞运动促进白细胞分散分布和法向黏附接触,增加其与壁面的碰撞和黏附频率,并降低滚动速度,这些都助于白细胞和内皮细胞的黏附。本实验结果也同样表明,造影红细胞的加入可以提高白细胞黏附效率。

对于白细胞介导肿瘤细胞在内皮细胞上黏附这一过程,由于造影红细胞的存在,促进白细胞在内皮细胞上的黏附以及肿瘤细胞与黏附白细胞的碰撞频率,从而大幅度提高在内皮细胞上黏附的肿瘤细胞数目,而这一现象在高剪切率下尤为明显。与没有

造影红细胞的流动腔实验相比,由于红细胞的运动特性,可能有更多的白细胞和中性粒细胞向近壁面运动,再加上红细胞对溶液黏度的影响,都最终促进肿瘤细胞在内皮细胞上的黏附。本研究在白细胞介导肿瘤细胞与内皮细胞黏附过程中观察红细胞这一因素对肿瘤细胞黏附的影响,发现20%比容的造影红细胞对肿瘤细胞在内皮细胞上黏附起到促进作用,这一实验结果补充了白细胞先黏附到内皮细胞上,随后黑色素瘤细胞再黏附到白细胞上的“两步观点”^[6-7],为“两步观点”的发展完善提供依据,并为探索癌症治疗方法提供理论基础。

参考文献:

- [1] Steeg PS. Tumor metastasis: Mechanistic insights and clinical challenges [J]. Nat Med, 2006, 12(8): 895-904.
- [2] Chambers AF, Groom AC, Macdonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites [J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(8): 563-572.
- [3] Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer [J]. Nature, 2002, 420(6917): 860-867.
- [4] Gupta GP, Massagué J. Cancer metastasis: Building a framework [J]. Cell, 2006, 127(4): 679-695.
- [5] 刘万钱, 马萍萍, 杨力. 肿瘤细胞靶器官特异性捕获和黏附行为的研究进展 [J]. 医用生物力学, 2010, 25(6): 479-484.
Liu WQ, Ma PP, Yang L. Advances in the study on organ specific arrest and adhesion of metastatic tumor cells [J]. J Med Biomech, 2010, 25(6): 479-484.
- [6] Dong C, Slattery M, Liang S. Micromechanics of tumor cell adhesion and migration under dynamic flow conditions

- [J]. *Front Biosci*, 2005, 10: 379-384.
- [7] Liang S, Slattery MJ, Wagner D, *et al.* Hydrodynamic shear rate regulates melanoma-leukocyte aggregation, melanoma adhesion to the endothelium, and subsequent extravasation [J]. *Ann Biomed Eng*, 2008, 36 (4): 661-671.
- [8] Liang S, Slattery MJ, Dong C. Shear stress and shear rate differentially affect the multi-step process of leukocyte-facilitated melanoma adhesion [J]. *Exp Cell Res*, 2005, 310(2): 282-292.
- [9] Huh SJ, Liang S, Sharma A, *et al.* Transiently entrapped circulating tumor cells interact with neutrophils to facilitate lung metastasis development [J]. *Cancer Res*, 2010, 70 (14): 6071-6082.
- [10] Fu Y, Kunz R, Wu J, *et al.* Study of local hydrodynamic environment in cell-substrate adhesion using side-view μ PIV technology [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(2): e30721.
- [11] Bratton DL. Polyamine inhibition of transbilayer movement of plasma membrane phospholipids in the erythrocyte ghost [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(36): 22517-22523.
- [12] Wood PG. Preparation of white resealable erythrocyte ghosts [J]. *Methods Enzymol*, 1986, 149: 271-280.
- [13] Rinker KD, Prabhakar V, Truskey GA. Effect of contact time and force on monocyte adhesion to vascular endothelium [J]. *Biophys J*, 2001, 80(4): 1722-1732.
- [14] Munn LL, Melder RJ, Jain RK. Analysis of cell flux in the parallel plate flow chamber; Implications for cell capture studies [J]. *Biophys J*, 1994, 67(2): 889-895.
- [15] 邓林红, 吴云鹏, 李仁师, 等. 狭窄流道中 Fahraeus 效应研究进展[J]. *力学进展*, 1990, 20(1): 57-68.
- [16] Munn LL, Melder RJ, Jain RK. Role of erythrocytes in leukocyte-endothelial interactions: Mathematical model and experimental validation [J]. *Biophys J*, 1996, 71(1): 466-478.

《医用生物力学》杂志征稿、征订启事

《医用生物力学》杂志由中华人民共和国教育部主管、上海交通大学主办,是国内唯一一本公开发行,以积极反映生物力学基础研究与应用研究成果,推动国内外学术交流,促进医、生、理、工各学科相互了解和合作为目的的学术性刊物。报道内容主要包括生物力学领域中有关力学生物学、器官-组织生物力学、细胞-亚细胞-分子生物力学、感觉系统生物力学、骨骼肌肉系统生物力学、航空航天生物力学、颌面口腔生物力学、呼吸系统生物力学、康复工程生物力学、心血管系统生物力学、血液流变学、医用材料生物力学、运动医学生物力学等的研究论文。本刊为中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊);美国《化学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、荷兰《文摘与引文数据库》来源期刊;2012年入选北京大学图书馆《中文核心期刊要目总览》(2011年版)。

本刊为双月刊,每双月25日出版,16开本,96页,国内统一连续出版物号CN 31-1624/R,国际标准连续出版物号ISSN 1004-7220;定价每期15.00元,全年90.00元,由邮局向全国征订发行,邮发代号4-633。读者可在附近邮局订阅或通过邮政“11185”客户服务中心电话订阅。欢迎广大读者、作者订阅本刊,踊跃来稿。

地址:上海市制造局路639号200011

电话:(021)53315397;传真:(021)63137020;电子信箱:shengwulixue@163.com

网址:www.medbiomechanics.com, www.mechanobiology.cn