

文章编号:1004-7220(2015)05-0392-05

细胞浓度比对剪切流中肿瘤细胞黏附的影响

傅 怡¹, 王 洋², 白 帆¹, 吴 洁¹, 孙 仁¹, 丁祖荣¹, 董 澄^{1,3}

(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. 复旦大学 附属上海市第五人民医院, 泌尿外科, 上海 200240;

3. Department of Biomedical Engineering, the Pennsylvania State University, PA 16802, USA)

摘要: **目的** 研究不同白细胞与肿瘤细胞浓度比对剪切流环境中肿瘤细胞在内皮细胞上黏附过程的影响。**方法** 在平行平板流动腔中加入不同浓度比的白细胞和肿瘤细胞,分析不同剪切率下(50、100、200 s⁻¹)肿瘤细胞在内皮细胞上瞬时黏附和累积黏附的变化。**结果** 细胞浓度比为3:1时,肿瘤细胞在内皮细胞上的瞬时黏附和累积黏附均比细胞浓度比为1:1时有显著提升,且在高剪切率(100、200 s⁻¹)下更为明显。在观察的5 min内,随着剪切率的增加,细胞浓度比增大对肿瘤细胞黏附产生影响的时间点有所提前。**结论** 在剪切流中白细胞浓度增加对肿瘤细胞在内皮细胞上的黏附起到促进作用,结果为研究肿瘤在血管中转移和靶向治疗提供有意义的探索。

关键词: 浓度比; 内皮细胞; 白细胞; 肿瘤细胞; 剪切率; 细胞黏附

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.3871/j.1004-7220.2015.05.392

The effect of concentration ratio on tumor cell adhesion in shear flow

FU Yi¹, WANG Yang², BAI Fan¹, WU Jie¹, SUN Ren¹, DING Zu-rong¹, DONG Cheng^{1,3}

(1. MOE Key Laboratory of Hydrodynamics, School of Naval Architecture, Ocean and Civil Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China; 2. Department of Urology, the Fifth People's Hospital of Shanghai, Fudan University, Shanghai 200240, China; 3. Department of Biomedical Engineering, the Pennsylvania State University, PA 16802, USA)

Abstract: **Objective** To study the different effects from different concentration ratios of polymorphonuclear neutrophil (PMN) to tumor cell (TC) on the process of tumor cell adhesion to endothelial cell (EC) in shear flow. **Methods** PMNs and TCs with different concentration ratios (PMN-TC ratio) were added into the parallel plate flow chamber, and changes in the numbers of transient and accumulative adhered TCs on ECs at different shear rates (50 s⁻¹, 100 s⁻¹, 200 s⁻¹) were analyzed. **Results** The transient and accumulative adhesion of TCs on ECs at PMN-TC ratio of 3:1 significantly increased as compared to that at PMN-TC ratio of 1:1, especially under high shear flow condition (100 s⁻¹ and 200 s⁻¹). Moreover, in the 5 minute-observation period, the effect of PMN-TC ratio on TC adhered to ECs occurred earlier when the shear rate increased. **Conclusions** The increase of PMN-TC concentration ratio can promote TC adhesion to ECs in shear flow, and the research findings provide significant references for studying TC metastasis in blood vessels and the target therapy of tumors.

Key words: Concentration ratio; Endothelial cells (ECs); Polymorphonuclear neutrophils (PMNs); Tumor cells (TCs); Shear rate; Cell adhesion

收稿日期:2015-01-15; 修回日期:2015-03-09

基金项目:国家自然科学基金项目(11302129)。

通信作者:傅怡, E-mail: yifubiomech@outlook.com。

肿瘤细胞从原发部位的转移是一个非常复杂的过程,最终将导致继发肿瘤的形成,并威胁生命^[1-2]。肿瘤细胞的扩散有多种途径,例如肿瘤细胞从血管系统或淋巴系统外渗到达附近的组织器官^[3]。Dong 等^[4]对黑色素瘤细胞从血管外渗到继发肿瘤部位这一过程进行详细研究,探求肿瘤细胞在血流环境中是如何黏附到内皮细胞上,并突破内皮细胞这一壁垒发生迁移,以及炎症微环境对整个过程的影响;其研究表明,白细胞能够促进黑色素瘤细胞的外渗,即栓缚在内皮细胞上的白细胞能够捕获黑色素瘤细胞并使其在内皮细胞上稳定黏附^[5]。这一“两步黏附机制(two-step theory)”由表达在黑色素瘤细胞和内皮细胞表面的细胞间黏附分子1(inter-cellular adhesion molecule-1, ICAM-1)以及表达在白细胞表面的 β_2 整合素之间的黏附键所介导,并受到肿瘤诱导炎症细胞因子白介素8(interleukin-8, IL-8)、纤维蛋白原(fibrinogen, Fg)、纤维蛋白(Fibrin, Fn)和血流剪切率的影响^[6-8]。同时,血管上皮钙黏素(VE-cadherin)粘着连接受到丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinases, MAPK)的调控,对肿瘤细胞在内皮细胞上的黏附及IL-8等肿瘤微环境中可溶性信号蛋白做出响应^[9]。这些研究为微循环中局部水动力环境、蛋白信号转导异型细胞黏附和转移肿瘤细胞在内皮细胞上黏附及外渗过程中所起的共同作用提供实验依据,有助于肿瘤治疗的跨学科研究^[4, 10-11]。

为了充分研究不同因素,如局部水动力微环境和各种蛋白分子等对肿瘤细胞在内皮细胞上黏附外渗的影响,在以往的实验过程中,白细胞和肿瘤细胞的浓度常设为相同值。本课题组前期研究发现,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^[12]。既然其他血细胞的存在对于白细胞介导肿瘤细胞在内皮细胞上黏附这一过程的影响不可忽略,而微循环中循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)的浓度实际上要远低于血液中的白细胞,作为在“两步黏附机制”中担任重要角色的白细胞,它的数量变化是否也会影响肿瘤细胞在内皮细胞上的稳定黏附呢?为此,本文采用平行平板流动腔实验,在体外模拟含有不同浓度比白细胞和肿瘤细胞的血流环境,初步探讨细胞浓度比变化对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

肿瘤细胞(tumor cell, TC)选取美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC)来源的人黑色素瘤细胞株A375,置于含有10%胎牛血清(FBS)和1%青霉素-链霉素的DMEM培养基中,在37℃、5%CO₂细胞培养箱中培养。人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)置于含有低血清生长添加剂(LSGS)的M200培养基中,在37℃、5%CO₂细胞培养箱中培养。显微镜下观察肿瘤细胞和内皮细胞均匀铺培养皿底部70%以上时即可传代或用于实验。白细胞(polymorphonuclear neutrophil, PMN)从健康志愿者的新鲜血液中获得,采用Histopaque-1077和Histopaque-1119分离液提取。600g离心力离心30min后,从分离层中提取白细胞层,用含有0.1%牛血清蛋白(BSA)的磷酸盐缓冲液(DPBS)洗涤并重悬,加入红细胞裂解液去除混入的少量红细胞后,再次用含有0.1%BSA的DPBS洗涤并重悬,放置在4℃冰箱中的低速振荡器上待用。

1.2 流动腔实验设计

细胞黏附实验在放置在Nikon倒置显微镜上的平行平板流动腔(GlycoTech公司,美国)中进行。白细胞用1mol/L N-甲酰甲硫氨酰-亮氨酰-苯丙氨酸(N-formylmethionyl-leucyl-phenyl-alanine, fMLP)预先激活1min后,与肿瘤细胞悬浮液按照比例混合,肿瘤细胞浓度固定为 5×10^6 /mL,通过调整白细胞的浓度来改变白细胞与肿瘤细胞浓度比(简称细胞浓度比,分别设定为1:1和3:1)。首先采用注射泵(Harvard Apparatus公司,美国)将实验缓冲液灌注到底部为内皮细胞的流动腔中,在 40 s^{-1} 剪切率下使其流动2~3min达到平衡状态,然后将细胞悬浮液灌注到流动腔中,让白细胞和肿瘤细胞与内皮细胞在 20 s^{-1} 剪切率下接触2min后调整为实验所需剪切率(50、100、200 s^{-1}),在10倍物镜下以20帧/s的录像速度记录5min,离线分析录像。

1.3 实验数据定量分析

整个视频长度为5min。对观测区域每分钟末时间点(1、2、3、4、5min)黏附在内皮细胞上的肿瘤细胞数量进行计数,定义为瞬时黏附(transient

adhesion),对从0时刻开始到记录时间点这一时间段内黏附在内皮细胞上的肿瘤细胞数量进行计数,定义为累积黏附(accumulative adhesion),比较不同剪切率条件下改变细胞浓度比对黏附肿瘤细胞数量的影响。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,当 $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 白细胞增加肿瘤细胞在内皮细胞上的黏附

当没有白细胞存在时,肿瘤细胞在剪切率较低(50 s^{-1})的环境中能够与内皮细胞形成一定数量的黏附。而当剪切率增加时,黏附着的肿瘤细胞数量呈急剧下降趋势;当剪切率达到 200 s^{-1} 时,肿瘤细胞几乎无法与内皮细胞形成稳定的黏附(见图1)。当在溶液中加入1:1细胞比例的白细胞时,肿瘤细胞在内皮细胞上的黏附得到明显的提升,再次验证“两步黏附机制”中白细胞存在能够促进肿瘤细胞在内皮细胞上黏附的观点。

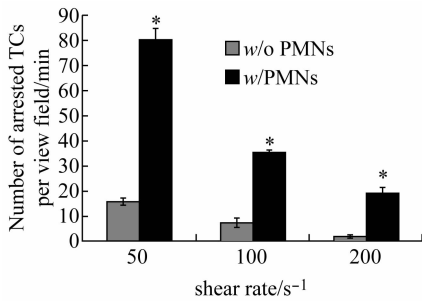


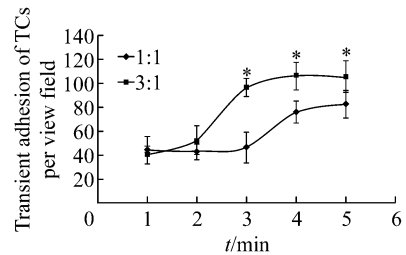
图1 白细胞对黏附肿瘤细胞的影响(* $P < 0.05$)

Fig.1 Effects of PMNs on adhesion of TCs

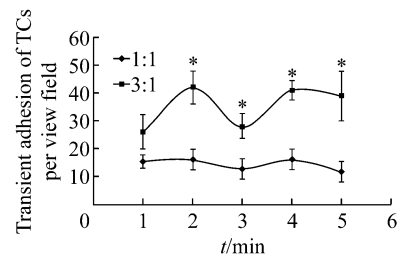
2.2 细胞浓度比对肿瘤细胞瞬时黏附的影响

在不同的细胞浓度比条件下,当剪切率较低时,肿瘤细胞在内皮细胞上的瞬时黏附随着时间的增加逐渐上升;当剪切率较高时,肿瘤细胞在内皮细胞上的瞬时黏附并未随着时间的增加有明显的变化趋势,而是在一定范围内波动。观察不同剪切流环境中细胞浓度比对肿瘤细胞在内皮细胞上瞬时黏附的影响发现,当剪切率为 50 s^{-1} 时,在初始2 min,细胞浓度比的增大并未增加肿瘤细胞的瞬时黏附,而从第3 min开始,肿瘤细胞的黏附呈现出显著差异,当细胞浓度比从1:1增大到3:1时,肿瘤细胞在第3、4、

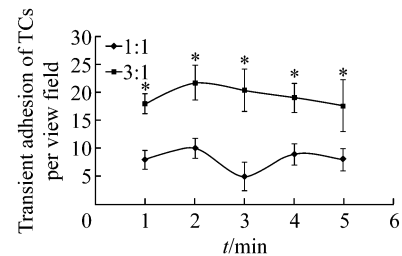
5 min的瞬时黏附数量分别提高了106.43%、39.91%和27.42% [见图2(a)]。当剪切率提升到 100 s^{-1} 时,由于流速增加,肿瘤细胞在内皮细胞上的瞬时黏附有明显下降。当细胞浓度比为1:1时,肿瘤细胞的瞬时黏附数量为10~20个。当细胞浓度比提高到3:1时,从第2 min开始,肿瘤细胞的瞬时黏附大幅提升,第2、3、4、5 min分别提高了162.50%、121.05%、156.25和234.29% [见图2(b)]。当剪切率继续提高到 200 s^{-1} ,细胞浓度比为1:1时,肿瘤细胞的瞬时黏附数量继续下降,均不超过10个。而此时从第1 min开始,细胞浓度比的增大即对肿瘤细胞的瞬时黏附产生显著影响,使得肿瘤细胞的瞬时黏附数量增幅均超过100% [见图2(c)]。



(a) 50 s^{-1}



(b) 100 s^{-1}



(c) 200 s^{-1}

图2 不同剪切率下细胞浓度比对肿瘤细胞瞬时黏附的影响(* $P < 0.05$)

Fig.2 Effects of PMN-TC ratio on transient adhesion of TCs at different shear rates

2.3 细胞浓度比对肿瘤细胞累积黏附的影响

随着时间的增加,肿瘤细胞在内皮细胞上的累

积黏附呈现出类似线性的增长趋势,并且当细胞浓度比从1:1增大到3:1时,其增长幅度更大。在低剪切率条件下,细胞浓度比的增大在第3 min开始对肿瘤细胞的累积黏附数量有较为明显提升,增幅约为40% [见图3(a)]。随着剪切率的升高,细胞浓

度比的增大对肿瘤细胞的累积黏附数量的影响提前到第2 min,增幅为110%~150% [见图3(b)]。而当剪切率再次提升,细胞浓度比的增大对肿瘤细胞累积黏附数量的影响从第1 min就开始呈现,增幅为120%~160% [见图3(c)]。

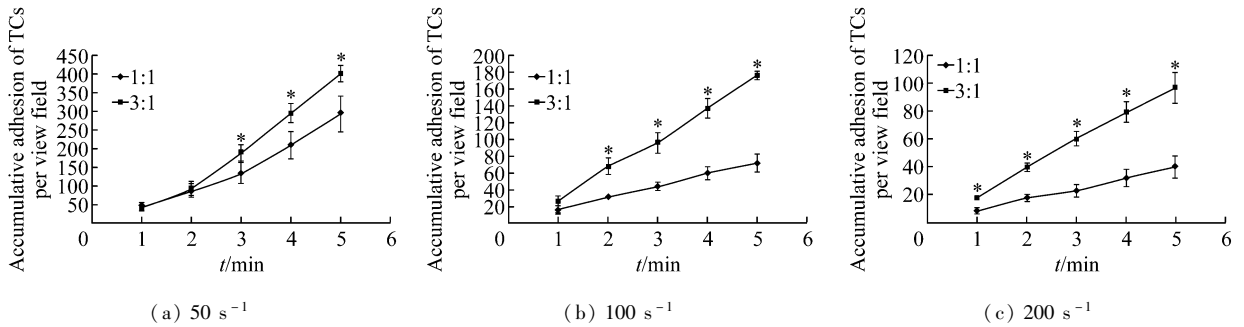


图3 不同剪切率下细胞浓度比对肿瘤细胞累积黏附的影响 (* $P < 0.05$)

Fig.3 Effects of PMN-TC ratio on accumulative adhesion of TCs at different shear rates

3 讨论

黑色素瘤细胞具有高转移性,但是它并不像白细胞一样表达有大量的内皮细胞选择素 (endothelial selectin, E-selectin) 或 β_2 整合素,不能在血流剪切环境中与内皮细胞上的 ICAM-1 形成足够稳定的黏附分子键来牢牢黏附在内皮细胞上,也不会像白细胞一样在内皮细胞上滚动^[7]。而像其他肿瘤细胞一样,黑色素瘤细胞与内皮细胞的黏附是其穿越内皮细胞屏障前不可缺失的一步。在“两步黏附机制”中,白细胞充当了桥梁的作用,帮助并促进黑色素瘤细胞在内皮细胞上的稳定黏附。作为人体内的免疫细胞,白细胞在血液中大量存在^[13],而血液中肿瘤细胞的含量相对白细胞来说则很少^[14-15]。这两种细胞在血液中的含量相差几个数量级,白细胞在血液中的含量为 $(4 \sim 11) \times 10^6/\text{mL}$,而 Danila 等^[14]报道循环肿瘤细胞含量为每毫升几个到几十个。由于这两种细胞在病人体内的含量差异太大,无法完全按照相关的生理或病理条件来设定。在本实验过程中,综合考虑选取 1:1 和 3:1 两种细胞浓度进行比较。本课题组也试图观察更大的细胞浓度比对肿瘤细胞黏附的影响,选用 6:1 的细胞浓度比,虽然此浓度比更接近真实情况,但在如此高的细胞浓度下 (细胞总浓度达到 $3.5 \times 10^6/\text{mL}$),整个观察视野几乎被细胞占满,尤其是在低剪切率环境中,无法

分辨肿瘤细胞是否与内皮细胞形成黏附。如果改进分析方法后能够对录像进行分析统计,将比较 6:1 和 3:1 细胞浓度比对白细胞介导黑色素瘤细胞在内皮细胞上黏附这一过程的影响。本课题组也尝试过将剪切率提高到 300 s^{-1} ,但随后的数据统计分析发现,在如此高的剪切率下,即使有大量白细胞的帮助,肿瘤细胞在内皮细胞上的黏附数量也相当少,故最终选定 50 、 100 和 200 s^{-1} 这三种剪切率,对应的剪切力分别为 50 、 100 和 200 mPa ,符合生理条件下微血管中的血流剪切力范围^[16]。

本实验结果表明,在较低剪切率下 (50 s^{-1}),细胞浓度比的增大并非从一开始就影响肿瘤细胞的瞬时黏附,而当剪切率逐步提升时,细胞浓度比增大对肿瘤细胞瞬时黏附的影响有所提前。推测有如下几种原因:① 在较低剪切率下,在初始阶段,近壁面的细胞速度不高,1:1 细胞溶液中的白细胞已经有大量黏附到内皮细胞上,故白细胞浓度变化对其在内皮细胞上黏附的影响不明显,而随着时间增加,3:1 细胞溶液中白细胞黏附到内皮细胞上的数量增加远超过相同情况下的 1:1 细胞溶液,导致内皮细胞上黏附的白细胞数量大大增加,从而使得近壁面的肿瘤细胞与已栓缚的白细胞有更多碰撞的机会,促进肿瘤细胞的瞬时黏附;② 当剪切率逐步提高时,近壁面的细胞速度随之增加,加大肿瘤细胞在内皮细胞上黏附的难度,初始阶段黏附在内皮细胞上的白细

胞数量有所下降,此时白细胞浓度变化产生的影响不可忽略,对肿瘤细胞黏附的影响也更为显著。从时间节点上来看,细胞浓度比对肿瘤细胞累积黏附的影响也与对其瞬时黏附的影响保持一致,即影响随着剪切率增大而提前。在细胞浓度比为1:1时,与细胞浓度比为3:1的曲线相比,肿瘤细胞的累积黏附随着时间增加较为缓慢,随着剪切率的升高,这两条曲线之间的距离随着时间变化愈发明显。在观看实验录像进行分析统计时发现,在1:1的细胞溶液中,1个肿瘤细胞上可能黏附有1~2个白细胞;而当细胞浓度提高到3:1时,1个肿瘤细胞上黏附的白细胞往往在2个以上,这样的肿瘤细胞在以较低速度和内皮细胞发生碰撞时,会有更多的机率在多个白细胞帮助下与内皮细胞形成稳定的黏附,尤其是在较高剪切率下。

对于白细胞介导肿瘤细胞在内皮细胞上的黏附这一过程,白细胞浓度的增加不但提高肿瘤细胞与黏附在内皮细胞上的白细胞的碰撞频率,也增加细胞溶液中黏附到单个肿瘤细胞上的白细胞数量,从而大幅度提高在内皮细胞上肿瘤细胞的瞬时黏附和累积黏附,而这一现象在高剪切率下尤为明显。本实验结果对“两步黏附机制”起到补充,使其更为完善,并为研究肿瘤在血管中转移和靶向治疗提供有意义的探索。

参考文献:

- [1] Chambers AF, Groom AC, Macdonald IC. Metastasis: Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(8): 563-572.
- [2] Gupta GP, Massagué J. Cancer metastasis: Building a framework [J]. *Cell*, 2006, 127(4): 679-695.
- [3] Steeg PS. Tumor metastasis: Mechanistic insights and clinical challenges [J]. *Nat Med*, 2006, 12(8): 895-904.
- [4] Dong C. Adhesion and signaling of tumor cells to leukocytes and endothelium in cancer metastasis[M]//Cellular and Biomolecular Mechanics and Mechanobiology. USA: Springer, 2011: 477-521.
- [5] Dong C, Slattery M, Liang S. Micromechanics of tumor cell adhesion and migration under dynamic flow conditions [J]. *Front Biosci*, 2005, 10: 379-384.
- [6] Liang S, Hoskins M, Dong C. Tumor cell extravasation mediated by leukocyte adhesion is shear rate dependent on IL-8 signaling [J]. *Mol Cell Biomech*, 2009, 7(2): 77.
- [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] Ozdemir T, Gaddes E, Wang Y, et al. Perspectives: Interplay between melanoma regulated fibrin and receptor mediated adhesion under shear flow [J]. *Cell Mol Bioeng*, 2015, 8(1): 86-95.
- [9] Khanna P, Yunkunis T, Muddana HS, et al. p38 MAP kinase is necessary for melanoma-mediated regulation of VE-cadherin disassembly [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010, 298(5): C1140-C1150.
- [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] Ozdemir T, Zhang P, Fu C, et al. Fibrin serves as a divalent ligand that regulates neutrophil-mediated melanoma cells adhesion to endothelium under shear conditions [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2012, 302(8): C1189-C1201.
- [12] 傅怡, 吴洁, 孙仁, 等. 造影红细胞对剪切流中肿瘤细胞黏附的影响 [J]. *医用生物力学*, 2015, 30(2): 99-103.
Fu Y, Wu J, Sun R, et al. Effects of ghost red blood cells on tumor cell adhesion in shear flow [J]. *J Med Biomech*, 2015, 30(2): 99-103.
- [13] Friedman GD, Klatsky AL, Siegelau A. The leukocyte count as a predictor of myocardial infarction [J]. *N Engl J Med*, 1974, 290(23): 1275-1278.
- [14] Danila DC, Heller G, Gignac GA, et al. Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(23): 7053-7058.
- [15] Williams SC. Circulating tumor cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(13): 4861-4861.
- [16] Lipowsky HH. Shear stress in the circulation [M]//Bevan JA, Kaley G, Rubanyi GM, eds. Flow-dependent regulation of vascular function. USA: Oxford University Press, 1995: 28-45.