

文章编号:1004-7220(2018)02-0150-07

流体剪应力作用下 E-选择素介导的中性粒细胞钙响应

张 力, 吴建华, 方 颖

(华南理工大学 生物科学与工程学院 生物力学所, 广州 510006)

摘要:目的 探讨流场下 E-选择素介导的中性粒细胞钙响应过程。方法 采用平行平板流动腔结合荧光显微镜, 在0~600 mPa流体剪应力 (fluid shear stress, FSS) 下, 实时观察中性粒细胞在不同浓度 E-选择素上的黏附及随后产生的钙响应。结果 在流场环境下 E-选择素可特异性介导中性粒细胞的稳定黏附和钙响应, 细胞的黏附数和激活比率随浓度的提高而逐渐增加。只有固定的 E-选择素才能传递力信号来有效触发细胞的钙响应, FSS 的增加不仅提高了细胞的激活比率 (从 23% 增至 70%), 增加了钙响应的强度 (从 0.92 增至 1.45), 而且大大缩短了细胞自黏附到钙响应启动的时间 (从 70 s 减为 27 s)。结论 FSS 和 E-选择素协同调控中性粒细胞的钙响应, FSS 对钙响应的速度和水平实行正向调节。研究结果可深化血流环境下白细胞免疫响应过程的理解。

关键词:中性粒细胞; E-选择素; 钙响应; 流体剪应力

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2018.02.010

E-Selectin Mediated-Calcium Response of Neutrophils under Fluid Shear Stresses

ZHANG Li, WU Jianhua, FANG Ying

(Institute of Biomechanics, School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: **Objective** To investigate the E-selectin mediated-calcium response of neutrophils under flow fields. **Methods** A parallel-plate flow chamber combined with a fluorescence microscope was used to observe the adhesion and subsequent calcium response of neutrophils on E-selectin at different concentrations under fluid shear stress (FSS) of 0-600 mPa. **Results** E-selectin could capture neutrophils from the flow to the chamber substrate and induce further intracellular calcium flux of firmly adhered cells. The arrested cell and activation ratio increased gradually as the concentration of E-selectin increased. Only immobilized E-selectin could conduct the external force-signal to trigger the calcium response of neutrophils effectively. By increasing FSS, not only was the activation ratio increased from 23% to 70%, but the calcium response intensity also increased from 0.92 to 1.45, while the delay time from cell adhesion to calcium response was greatly reduced from 70 s to 27 s. **Conclusions** FSS can modulate the calcium response of neutrophils in cooperation with E-selectin, and it positively regulates the activation rate and level of calcium response. This study may deepen the understanding of the immune response of leukocytes under a hemodynamic environment.

Key words: neutrophils; E-selectin; calcium response; fluid shear stress (FSS)

收稿日期:2017-06-06; 修回日期:2017-07-19

基金项目:国家自然科学基金项目(11432006, 11672109, 11272125, 31170887)

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

当炎症发生时,中性粒细胞会被募集到受损部位的血管壁,进而发生捕获、滚动、稳定黏附和变形迁移等行为^[1]。这一复杂的级联反应过程不仅涉及内皮细胞和中性粒细胞表面许多重要的黏附分子对,如选择素和配体、整合素和细胞间黏附分子-1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1),而且受周围血流环境的影响^[2]。因此,这些黏附分子如何介导中性粒细胞滚动黏附过程中的活化一直是初始免疫研究中的一个热点问题^[3],将有助于对于相关生理和病理过程的深入理解。

局部组织受外来细菌或病毒入侵时,会产生并释放 TNF-1、IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 等炎症因子^[4],这些炎症因子将诱导周围血管内皮细胞表面 E-选择素的上调,进而介导白细胞在血管壁的滚动黏附,并与 P-选择素共同介导白细胞募集到炎症部位^[5]。目前已知的 E-选择素配体有 P-选择素糖蛋白配体-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1, PSGL-1)、E-选择素配体蛋白-1 (E-selectin ligand-1, ESL-1)、CD44、L-选择素、CD43 等^[6]。PSGL-1 是在流场环境下参与白细胞初始黏附和滚动的重要分子^[7];体外实验证实,CD44 可以介导滚动白细胞上 E-选择素依赖的 L-选择素的重分布^[8-10];L-选择素同 E-选择素的结合也可以支持活化白细胞的滚动转运行为^[11]。但人类中性粒细胞上没有发现 ESL-1,故不能观察到其与 E-选择素的作用^[12]。

血流中的中性粒细胞被内皮细胞上的选择素捕获到血管壁,其后发生的活化过程对白细胞发挥其免疫功能至关重要^[13]。而胞内 Ca²⁺ 浓度的上升 (即钙响应) 往往是中性粒细胞活化早期的重要标志之一,胞内 Ca²⁺ 增加会激发细胞活化相关的超氧化物生成、激酶释放,肌动蛋白凝胶转运等下游信号和细胞响应^[14]。因此,胞内 Ca²⁺ 浓度作为一个重要的观察指标,被广泛应用于各种化学和物理信号刺激下细胞活化水平及相关信号通路的检测^[15]。例如,Huang 等^[13] 研究流动腔中 P-选择素介导的中性粒细胞和白血病细胞 HL-60 的钙响应,并证实钙响应主要来源于内钙的释放,其信号通路涉及 PSGL-1 胞质区、细胞骨架、moesin 蛋白和脾酪氨酸激酶 (Spleen tyrosine kinase, Syk) 等,并导致细胞膜上整合素的激活^[16]。Liu 等^[17] 采用微吸管实验研究 T 细胞抗原受体 (T cell receptor, TCR) 结合主要

组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 介导的 T 细胞钙响应,结果表明,外力对胞内 Ca²⁺ 水平的调控与 TCR/pMHC 的逆锁键机制有关;Schaff 等^[18] 研究发现,高剪切力可以显著增加 IL-8 和 E-选择素共存时胞内 Ca²⁺ 浓度,并推断其钙流可能源自膜上 Ca²⁺ 通道打开所引发的外钙内流。但至今为止,有关 E-选择素介导中性粒细胞钙响应的力学调控过程鲜有系统的报道。

本文利用平行平板流动腔系统结合荧光显微技术,实时观察流体剪应力 (fluid shear stress, FSS) 作用下 E-选择素介导的中性粒细胞的钙响应过程,并考察激活比率、相对钙峰强度、细胞从黏附到钙响应启动所需时间 (延迟时间) 等参数,揭示 FSS 下钙响应的强弱和快慢。结果表明,在流场环境下 E-选择素特异性的介导了中性粒细胞的稳定黏附和钙响应,并且随着 E-选择素浓度的提高而逐渐增强;同时,只有固定的 E-选择素且存在 FSS 时才能有效激活钙响应,而 FSS 的提高可以增强并加速这一过程。这些结果可以深化对白细胞在各种血流微环境下免疫响应过程的理解,为炎症过激反应和相关疾病的诊断和治疗提供依据。

1 材料与方 法

1.1 试剂

重组人 E-选择素/ CD62E Fc 嵌合蛋白 (R&D Systems 公司,美国),该分子属于二硫键联接的同源二聚体;PBS、Histopaque 1077 和 Histopaque 1119 (Gibco 公司,美国);荧光染料 Fluo 4-AM (Invitrogen 公司,美国);Ficoll (Sigma 公司,美国)。

1.2 人中性粒细胞的提取和纯化

从两周内未服用阿司匹林等药物的成年健康志愿者中抽取 5 mL 静脉血,采用密度梯度离心法提纯中性粒细胞^[19]。分离沉淀的中性粒细胞待用。

1.3 钙荧光染料的加载

将中性粒细胞重悬于加载液 (20 mmol/L HEPES, 20 mmol/L Glucose, 1% BSA) 中,并调整细胞浓度至 1×10^6 /mL。然后向细胞液加入 Fluo-4 AM 至终浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$ ^[16,20],避光于 37 °C 温箱中的垂直搅拌器上温柔地搅拌 30 min,接着 400 g 离心 10 min,弃上清。重悬细胞于不含染料的加载液中,避光清洗后的中性粒细胞待用。

1.4 平行平板流动腔实验

流动腔底板功能化及 E-选择素位点密度的检测方法参考文献[21-22]。使用负压泵(PHD 2000, Harvard Apparatus 公司, 美国)将已重悬浮于成像液(110 mmol/L NaCl, 10 mmol/L KCl, 10 mmol/L Glucose, 30 mmol/L HEPES, 1.5 mmol/L CaCl₂, 1% BSA 和 12% Ficoll, pH = 7.35)的细胞以不同 FSS (20 ~ 600 mPa) 灌注到底板功能化了的流动腔中, 20 倍镜下以 100 帧/s 录制近壁面中性粒细胞的黏附及黏附后的荧光强度变化^[16,23]。

1.5 细胞钙响应相关物理量的定义和测量

1.5.1 活化率 不同实验条件下, 采用 Fluo-4 AM 作为钙荧光指示剂, 若中性粒细胞活化产生钙响应, 胞内 Ca²⁺ 浓度高于未发生钙响应的中性粒细胞。因此, 统计黏附于流动腔底部发光的细胞数(激活事件数)及总黏附数(黏附事件数), 两者之比即为中性粒细胞的活化率:

$$\text{活化率} = \text{激活事件数} / \text{黏附事件数} \quad (1)$$

1.5.2 相对荧光强度 中性粒细胞激活后钙响应所导致的荧光强度的变化, 反映胞内 Ca²⁺ 浓度水平。为扣除背景噪声, 计算公式如下:

$$\text{相对荧光强度} = (\text{实际荧光强度} - \text{背景荧光强度}) / \text{背景荧光强度} \quad (2)$$

1.5.3 延迟时间 细胞从黏附下来到胞内 Ca²⁺ 浓度开始提高的这段平台期时间。

1.5.4 峰值强度 黏附细胞相对荧光强度的最大值与初始值之差。

1.6 数据统计分析

所有实验条件下均进行 3 组独立平行实验, 每次观察的细胞数不小于 15 个, 采用均值 ± 标准差表示; 当实验处理组数为 3 或以上时, 先采用单因素方差分析, 再进行 Newman-Keuls 检验; 当实验处理组数为 2 时, 直接采用 *t* 检验。 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义, *P* < 0.01 表示差异有高度统计学意义。

2 结果

2.1 中性粒细胞与底板 E-选择素的特异性黏附

为了鉴定中性粒细胞在流动腔底板上的黏附是由 E-选择素的特异性介导的, 特设下列对照实验。① 实验组: 按 1.4 节所述的方法, 底板铺有

20 μL E-选择素; ② 实验对照组: 底板仅用 1 mL 1% BSA 的 PBS 溶液填充, 温育 2 h 后倒去; ③ 空白对照组: 底板不做任何处理。将中性粒细胞分别灌注到 3 组不同底板的流动腔中, 在 200 mPa FSS 下, 观察并记录 5 min 内在底板上稳定黏附的中性粒细胞。定义在 1 min 之内移动不超过 10 μm (大约 1 个细胞直径) 的细胞为稳定黏附细胞。

200 mPa FSS 下, 空白对照组的黏附细胞数极显著高于 BSA 实验对照组 [见图 1(a)]; 而实验对照组又极显著低于实验组 [见图 1(b)], 提示 1% BSA 能够有效阻断中性粒细胞与底板之间的物理黏附, 但又不影响中性粒细胞与 E-选择素间的特异性相互作用。因此, 本研究设计的流动腔功能化方案, 可以保证中性粒细胞与底板上的黏附是由 E-选择素特异性介导的。同时, 实验结果表明, 随着包被在流动腔底部 E-选择素浓度的上升, 稳定黏附的细胞数显著增加, 提示中性粒细胞的黏附是 E-选择素浓度依赖性的。

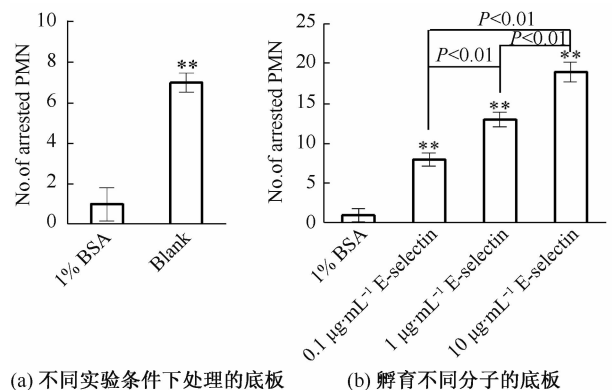


图 1 200 mPa FSS 下中性粒细胞与 E-选择素结合的特异性 (与 1% BSA 比较, ** *P* < 0.01)

Fig. 1 Binding specificity of neutrophils with E-selectin under 200 mPa FSS (a) Different treatment of flow chamber surface, (b) Incubation surface of different molecular

2.2 流场条件下 E-选择素可以激活中性粒细胞钙响应

为确定 10 mg/L E-选择素是否可以诱导中性粒细胞钙响应, 将加载有 Fluo-4 AM 的细胞以 200 mPa FSS 灌注到底面铺着 E-选择素的流动腔中, 实时检测黏附细胞荧光值并记录整个钙响应的的时间历程, 荧光的强弱反映胞内 Ca²⁺ 浓度的高低。实验结果表明, 黏附下来的细胞有产生钙响应的, 也有不产

生钙响应的,其实时荧光图像如图 2(a)所示。

一个典型的钙响应事件包含 3 个阶段:当随流细胞被捕获至流动腔底面,需要经过一段较为缓慢的等待(延迟时间),胞内 Ca^{2+} 浓度才有所增加;而一旦开始上升,荧光强度会迅速达到峰值;然后逐渐下降到初始黏附时的水平。若细胞不产生钙响应,则其荧光强度基本无变化。对于无钙响应及有

钙响应产生的细胞,它们对应的荧光强度的时间历程如图 2(b)所示,其中主要的特征观察指标为延迟时间和峰值强度,表征 E-选择素诱导嗜中性粒细胞钙响应所需的时间及胞内 Ca^{2+} 浓度上升的水平。该时间历程与 Schaff 等^[18]发现的存在趋化因子 IL-8 的条件下,中性粒细胞在 E-选择素上滚动黏附的钙响应过程较为类似。

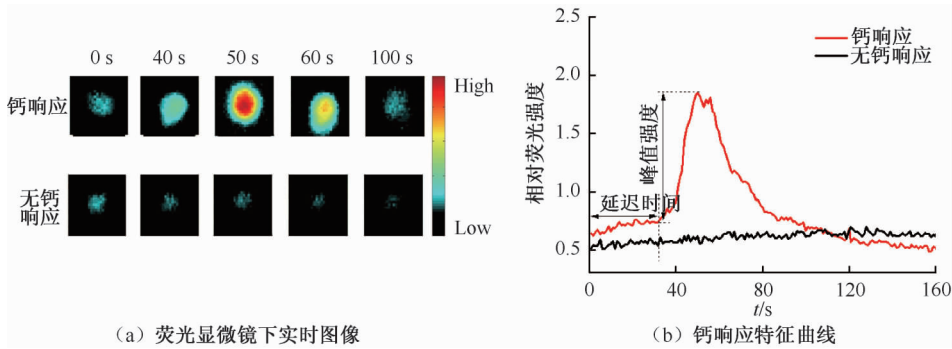


图 2 钙响应示意图

Fig. 2 Schematic diagram of calcium signaling (a) Real-time images under fluorescence microscope, (b) Characteristic curve of calcium signaling

2.3 外力是 E-选择素诱导中性粒细胞钙响应的启动开关

生理环境中趋化因子、选择素和 FSS 协同调控着中性粒细胞的黏附和活化,在炎症反应和免疫反应中发挥着重要作用^[16,18]。为探明 FSS 如何影响 E-选择素诱导的钙响应过程,特设定静止和流动两种情形下,分析比较中性粒细胞钙响应的差异。

首先,在成液液中加入不同浓度可溶性 E-选择素,静态下孵育中性粒细胞 10 min,在荧光显微镜下观察细胞的荧光变化。结果显示:当可溶性 E-选择素浓度从 0.02 mg/L 按 10 倍关系递增至 20 mg/L 时,产生钙响应的细胞比率即活化率均低于 20%,且与空白对照组(E-选择素浓度为 0 mg/L)比较无统计学差异[见图 3(a)]。然后,再将不同浓度(0.1 ~ 10 mg/L) E-选择素固定在流动腔底部,观察静止与 60 mPa 流场条件下细胞的黏附和钙响应,比较它们的活化率和钙响应过程。无流场情况下,当底板上 E-选择素浓度从 0.1 mg/L 按 10 倍关系递增至 10 mg/L 时,细胞产生钙响应的比率有上升趋势,但均处于很低的水平。但在 60 mPa 流场条件下,随着 E-选择素浓度的提高,黏附细胞的活化率明显上升,尤其在 1 和 10 mg/L 时,活化率极显著地高于静

止情形[见图 3(b)]。从流场和静态条件下细胞黏附在 10 mg/L E-选择素底面上典型的钙响应过程——荧光强度随时间的变化可知,两者之间存在明显的区别,FSS 为 60 mPa 时有更高的相对荧光强度和更短的延迟时间[见图 3(c)]。因此,这两种钙响应事件很容易区分,可将无力状态下荧光强度弱且延迟时间长(>120 s)的钙响应事件定义为“自响应”事件。上述结果说明:静态时,无论是可溶性还是固定在流动腔底板的 E-选择素,均不能有效激活中性粒细胞,其产生的钙响应也仅为非常缓慢、低强度的“自响应”事件;只有在流场环境下,E-选择素不仅捕获随流滚动的细胞,而且有效激活这些黏附细胞产生钙响应,激活比率呈现 E-选择素浓度梯度依赖性,即随 E-选择素浓度的增加而上升。因此,外力是 E-选择素诱发中性粒细胞钙响应的重要启动开关。

2.4 外力对 E-选择素诱导中性粒细胞钙响应的调控

为进一步探索外力对 E-选择素诱导的中性粒细胞钙响应的调控,设定 5 个不同 FSS(0、20、60、200 和 600 mPa),将细胞液流经包被 E-选择素的流动腔底部,观察和记录黏附细胞的钙响应过程。当

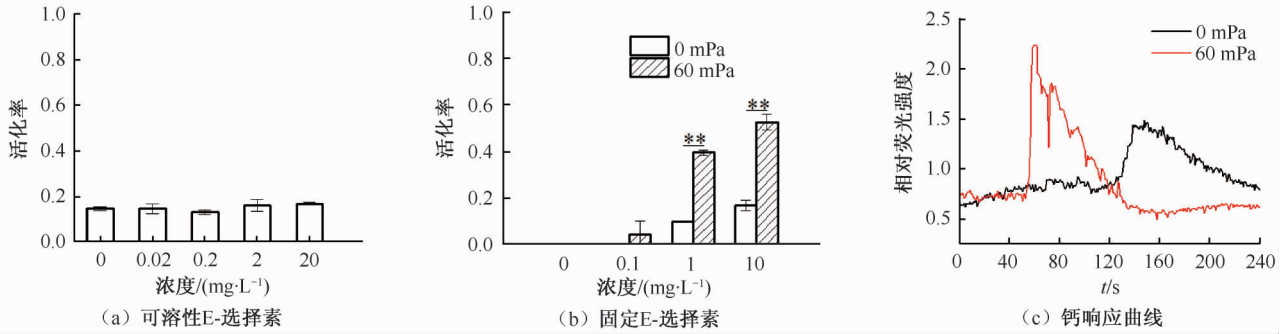


图3 中性粒细胞在不同条件底板和E-选择素作用钙响应(E-selectin = 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ** $P < 0.01$)

Fig. 3 Calcium signaling of neutrophils on various treated dishes with E-selectin (a) Static soluble E-selectin, (b) Immobilized E-selectin, (c) Calcium signaling curve

E-选择素浓度低于 10 mg/L (0.1 和 1 mg/L) 时,因细胞与底板之间的分子键太少不足以抵抗 200、600 mPa 流体的冲刷,细胞能稳定黏附下来并产生钙响应的数目极少;而浓度过高时黏附的细胞数太多,观察单细胞的 Ca^{2+} 荧光强度会相互干扰,故选择 E-选择素浓度为 10 mg/L。统计分析细胞活化率、峰值强度和延迟时间等关键参数。随着 FSS 的提高,黏附细胞的活化率逐渐增加,由 20 mPa 的 23% 左右逐渐提高到 600 mPa 的 70% 左右[见图 4(a)]。从黏附细胞的典型钙响应时间历程可以发现,当 FSS 从 0 逐渐增加至 600 mPa 时,伴随着钙峰的左移,峰值强度不断上升[见图 4(b)]。

从钙信号的特征曲线中,特提取钙响应的峰值强度和延迟时间,分析 FSS 对其影响。随着外力的提高,钙响应的峰值强度也逐渐变大,由 0 Pa 的 0.77、60 mPa 的 1.37 再到 600 mPa 的 1.5 左右,说明胞内 Ca^{2+} 浓度随 FSS 的增加而逐渐提高,但 600 mPa 以后 FSS 的增加对峰值强度已无显著影响[见图 4(c)]。从延迟时间看,随着 FSS 的提高,钙响应的激活速度越来越快,由 20 mPa 的 70 s 左右缩短到 600 mPa 的 27 s 左右,均远低于静态的 120 s[见图 4(d)]。这些结果说明,FSS 对 E-选择素介导的中性粒细胞的活化率实现正向调控,并正向调节钙响应的峰值强度,反向调节钙响应的延迟时间。

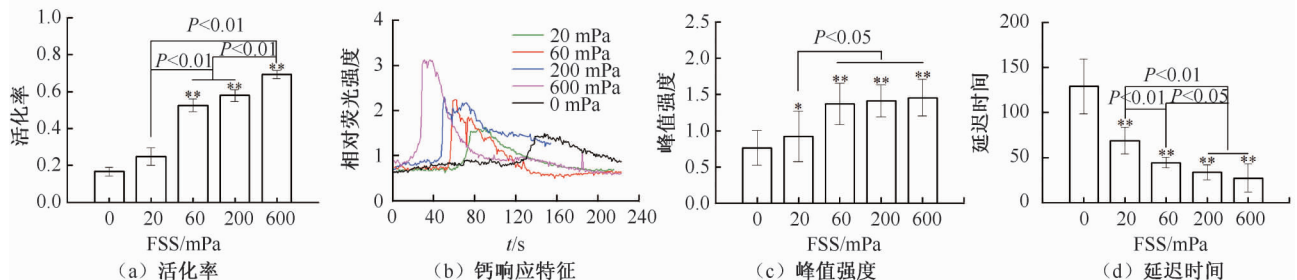


图4 中性粒细胞在不同 FSS 条件和 10 mg/L E-选择素作用钙响应(与 0 mPa 组比较, ** $P < 0.01$)

Fig. 4 Calcium signaling of neutrophils under different FSS with immobilized 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ E-selectin (a) Ratio of activation, (b) Calcium signal characteristic curve, (c) Peak intensity, (d) Delay time

3 讨论

E-选择素可以介导中性粒细胞的滚动黏附行为,并且该行为受 FSS 调控^[21]。然而,E-选择素诱导中性粒细胞钙响应的力学作用机制仍然未知。本文采用平行平板流动腔结合实时荧光显微镜的

检测手段,观察不同 FSS 环境下中性粒细胞在 E-选择素底板上黏附及随后发生的钙响应过程,并通过比较静止情形时可溶性 E-选择素或固定 E-选择素发现,E-选择素和 FSS 协同调控着中性粒细胞的钙响应。

实验结果表明:无流场条件下,无论可溶性或

固定的 E-选择素浓度有多高,均不能有效激活中性粒细胞产生钙响应;流场条件下,随着底板 E-选择素浓度的增加,细胞的黏附数及黏附后产生钙响应的比率(激活比率)也随之提高。这可能源于 E-选择素浓度增加时,底板 E-选择素位点密度提高,单位细胞接触面上形成更多的 E-选择素-配体复合物,更容易达到诱发钙信号所需要的刺激阈值。

与化学因子诱导的钙响应不同^[24-25], E-选择素诱导的中性粒细胞的钙响应不仅需要外力的存在,而且外力起着非常重要的调控作用。一方面只有固定在流动腔底部的 E-选择素才能有效感受力信号,与化学信号偶联并传递至下游信号;另一方面也可能源于 E-选择素与白细胞上配体的相互作用亦受外力调控,具有逆锁-滑移的力学性质,外力的适当提高可延长键的生存时间以充分启动下游信号^[22,26]。本研究结果表明:FSS 可通过固定在流动腔底部的 E-选择素有效、快速激发中性粒细胞的钙响应,激活比率随着 FSS 的增加而增加,同时正向调节钙响应的峰值水平和激活速率,大大缩短细胞的延迟时间。

在 200 mPa FSS 条件下,Huang 等^[23]得到同样浓度 P-选择素介导中性粒细胞钙响应的延迟时间为 75 s^[16],HL-60 细胞的延迟时间为 155 s,均高于本文得到的 E-选择素介导中性粒细胞钙响应的延迟时间 34 s,即同样条件下 E-选择素介导的细胞钙响应速度更快。这可能跟中性粒细胞膜上表达 PSGL-1、CD44、L-选择素、CD43 等多种 E-选择素配体有关,而 P-选择素的主要配体仅有 PSGL-1^[12]。Yago 等^[27]研究中性粒细胞滚动行为,结果发现,E-选择素可以通过 PSGL-1 和 CD44 激活下游相同的信号通路去诱导整合素 $\alpha_L\beta_2$ 依赖的慢速滚动。但是这些不同配体的功能及在炎症反应过程中各自的作用至今仍不清楚,它们之间是竞争还是协同作用关系,以及如何激活后续信号通路等问题,都有待进一步探索。

本研究结果有助于对血流环境中 E-选择素介导白细胞免疫响应过程的理解,为后续信号通路的研究和相关临床治疗药物的开发提供前期基础。

参考文献:

- [1] ZARBOCK A, LEY K. Neutrophil adhesion and activation under flow [J]. *Microcirculation*, 2009, 16(1): 31-42.
- [2] 童洁, 刘黎, 吴建华, 等. 力诱导循环血流中白细胞整合素 LFA-1 的激活机制[J]. *医用生物力学*, 2015, 30(1): 14-20. TONG J, LIU L, WU JH, et al. Mechanism of force-induced activation of integrin LFA-1 under circulating flows [J]. *J Med Biomech*, 2015, 30(1): 14-20.
- [3] ZARBOCK A, ABRAM CL, HUNDT M, et al. PSGL-1 engagement by E-selectin signals through Src kinase Fgr and ITAM adapters DAPI2 and FcR γ to induce slow leukocyte rolling [J]. *J Exp Med*, 2008, 205(10): 2339-2347.
- [4] 付雨梅, 孙青. E-选择素的研究进展[J]. *医学综述*, 2008, 14(2): 185-187.
- [5] YUAN SY, SHEN Q, RIGOR RR, et al. Neutrophil transmigration, focal adhesion kinase and endothelial barrier function [J]. *Microvasc Res*, 2012, 83(1): 82-88.
- [6] ZARBOCK A, LEY K, MCEVER RP, et al. Leukocyte ligands for endothelial selectins: Specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow [J]. *Blood*, 2011, 118(26): 6743-6751.
- [7] SIMON SI, HU Y, VESTWEBER D, et al. Neutrophil tethering on E-selectin activates beta 2 integrin binding to ICAM-1 through a mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway [J]. *J Immunol*, 2000, 164(8): 4348-4358.
- [8] ZARBOCK A, LOWELL CA, LEY K. Syk signaling is necessary for E-selectin-induced LFA-1-ICAM-1 association and rolling but not arrest [J]. *Immunity*, 2007, 26(6): 773-783.
- [9] HOGG N, PATZAK I, WILLENBROCK F. The insider's guide to leukocyte integrin signalling and function [J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(6): 416-426.
- [10] MUELLER H, STADTMANN A, AKEN HV, et al. Tyrosine kinase Btk regulates E-selectin-mediated integrin activation and neutrophil recruitment by controlling phospholipase C (PLC) γ_2 and PI3K γ pathways [J]. *Blood*, 2010, 115(15): 3118-3127.
- [11] STADTMANN A, GERMENA G, BLOCK H, et al. The PSGL-1-L-selectin signaling complex regulates neutrophil adhesion under flow [J]. *J Exp Med*, 2013, 210(11): 2171-2180.
- [12] HIDALGO A, PEIRED AJ, WILD MK, et al. Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44 [J]. *Immunity*, 2007, 26(4): 477-489.
- [13] 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.
- [14] MCEVER RP. Selectins: Initiators of leukocyte adhesion and signalling at the vascular wall [J]. *Cardiovasc Res*, 2015, 107(3): 331-339.
- [15] CLAPHAM DE. Calcium signaling [J]. *Cell*, 1995, 131(6):

1047-1058.

- [16] HUANG B, LING YC, LIN JG, *et al.* Force-dependent calcium signaling and its pathway of human neutrophils on P-selectin in flow [J]. *Protein Cell*, 2017, 8(2): 103-113.
- [17] LIU BY, CHEN W, Evavold BD, *et al.* Accumulation of dynamic catch bonds between TCR and agonist peptide-MHC triggers T cell signaling [J]. *Cell*, 2014, 157(2): 357-368.
- [18] SCHAFF UY, YAMAYOSHI I, TSE T, *et al.* Calcium flux in neutrophils synchronizes $\beta 2$ integrin adhesive and signaling events that guide inflammatory recruitment [J]. *Ann Biomed Eng*, 2008, 36(4): 632-646.
- [19] 展冬颖, 章燕, 龙勉. $\beta 2$ 整合素介导的人中性粒细胞在 ICAM-1 袂衬表面的铺展动力学 [J]. *医用生物力学*, 2011, 26(3): 205-210.
- ZHAN DY, ZHANG Y, LONG M. Spreading dynamics of $\beta 2$ integrin expressed human neutrophils onto ICAM-1-immobilized substrate [J]. *J Med Biomech*, 2011, 26(3): 205-210.
- [20] 李淑娜, 霍波. 细胞内钙离子指示剂的光致荧光增强 [J]. *医用生物力学*, 2015, 30(4): 291-298.
- LI SN, HUO B. Light-induced fluorescence enhancement in cells stained with Ca^{2+} indicators [J]. *J Med Biomech*, 2015, 30(4): 291-298.
- [21] LI QH, FANG Y, DING XR, *et al.* Force-dependent bond dissociation govern rolling of HL-60 cells through E-selectin [J]. *Exp Cell Res*, 2012, 318(14): 1649-1658.
- [22] LI QH, WAYMAN A, LIN JG, *et al.* Flow-enhanced stability of rolling adhesion through E-selectin [J]. *Biophys J*, 2016, 111(4): 686-699.
- [23] HUANG B, LING YC, LIN JG, *et al.* Mechanical regulation of calcium signaling of HL-60 on P-selectin under flow [J]. *Biomed Eng OnLine*, 2016, 15(2): 637-646.
- [24] ZEIHOFER HU, SCHORR W. Role of interleukin-8 in neutrophil signaling [J]. *Curr Opin Hematol*, 2000, 7(3): 178-182.
- [25] SCHORR W, SWANDULLA D, ZEIHOFER HU. Mechanisms of IL-8-induced Ca^{2+} signaling in human neutrophil granulocytes [J]. *Eur J Immunol*, 1999, 29(3): 897-904.
- [26] CHASE SD, MAGNANI JL, SIMON SI. E-selectin ligands as mechanosensitive receptors on neutrophils in health and disease [J]. *Ann Biomed Eng*, 2012, 40(4): 849-859.
- [27] YAGO T, SHAO B, MINER JJ, *et al.* E-selectin engages PSGL-1 and CD44 through a common signaling pathway to induce integrin $\alpha L\beta 2$ -mediated slow leukocyte rolling [J]. *Blood*, 2010, 116(3): 485-494.