

肝癌细胞与内皮细胞的粘附力学特性研究

宋关斌¹, 刘保安¹, 秦建¹, 龙勉², 蔡绍哲¹

(1. 重庆大学生物工程学院, 教育部生物力学及组织工程重点实验室, 重庆 400044; 2. 中国科学院力学研究所, 北京 100080)

摘要: 采用细胞同步技术和微管吸吮技术, 从细胞周期的角度研究不同细胞周期肝癌细胞 (hepatocellular carcinoma cells, HCC) 与脐静脉内皮细胞(HUVEC)的粘附力学特性。结果表明, 未同步化肝癌细胞各周期时相的细胞百分比为: G₁/G₁期, 53.51%; G₂/M期, 11.01%; S期, 35.48%。采用胸腺嘧啶脱氧核苷、秋水仙碱顺序阻断和胸腺嘧啶脱氧核苷双阻断后释放培养的方法可分别获得 G₁期和 S期的肝癌细胞, 其平均同步率分别为 69.02% 和 96.50%。G₁期肝癌细胞与人脐静脉内皮细胞的粘附力比 S期相应值明显降低 ($P < 0.01$), 与未同步化肝癌细胞组比较也得到同样结果, 而 S期与未同步化肝癌细胞组的粘附力值无明显差别。肝癌细胞与脐静脉内皮细胞的粘附力随着粘附时间的变化而变化, 在 30~60 min 内迅速增长, 60 min 之后维持在较稳定的水平, 即 300×10^{-10} N 左右。提示: 在肝癌细胞与内皮细胞的粘附过程中, S期细胞可能起的作用更大; 肝癌细胞和内皮细胞上粘附分子表达呈现时间效应, 从而体现出粘附和去粘附的行为特征。

关键词: 肝癌细胞; 内皮细胞; 粘附; 细胞周期; 微管吸吮

中图分类号: Q66 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6737(2003)01-0084-04

肿瘤细胞的血道转移是一个多环节、多步骤的复杂过程, 其中肿瘤细胞与血管内皮细胞的粘附是肿瘤转移的决定性步骤之一, 而粘附分子的表达则是决定细胞间粘附行为的重要因素^[1]。另一方面, 肿瘤的本质实际上是细胞周期紊乱、细胞失控性生长所致的一类疾病^[2]。但肝癌细胞与内皮细胞的粘附特性及其与细胞周期的关系, 尚未见详细文献报道。为此, 本文将细胞力学与细胞生物学有机结合, 利用微管吸吮技术从周期的角度定量测量不同细胞周期肝癌细胞与内皮细胞间的粘附力学行为特征, 为进一步阐明肝癌的血道转移机理和肝癌的临床预防和治疗提供定量的参考依据。

1 材料和方法

1.1 细胞及试剂

人肝癌细胞株 SMMC-7721, 购于上海第二军医大学, 在本院细胞培养室以 RPMI-1640 加 10% 小牛血清按常规方法传代培养。人脐静脉内皮细胞由中国科学院上海细胞生物学研究所提供, 于含 15% 胎牛血清的 M199 培养液内培养传代, 经形态学和 VIII 因子相关抗原鉴定证实为内皮细胞。

细胞培养试剂购自德国 Hyclone 公司, 秋水仙

碱 (colchicine) 为 Serva 公司进口分装, 胸腺嘧啶脱氧核苷 (thymidine) 购自重庆化学试剂公司。

1.2 方法

1.2.1 肝癌细胞的同步化

G₁期细胞采取胸腺嘧啶脱氧核苷和秋水仙碱顺序阻断后释放培养的方法获得^[3], 其简要步骤如下: 取对数生长期的细胞两瓶, 加入胸腺嘧啶脱氧核苷至其终浓度 2 mmol/L, 在 37°C、5% CO₂ 潮湿空气中培养 12 h, 弃培养液清洗后加入新鲜培养液和秋水仙碱至其终浓度 1 μg/ml, 继续培养 10 h, 横向轻摇培养瓶收集中期细胞, 800 rpm 离心 3 min, 收集细胞继续培养 3 h 和 7 h, 以 0.02% EDTA+0.25% 胰酶消化收集细胞, 用 50% 冷乙醇固定。

S期肝癌细胞采用胸腺嘧啶脱氧核苷双阻断后释放培养获得, 其简要操作步骤如下^[4,5]: 取对数生长期的细胞两瓶, 加入胸腺嘧啶脱氧核苷至其终浓度 2 mmol/L, 在 37°C、5% CO₂ 潮湿空气中培养

收稿日期: 2002-07-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(19972077)

作者简介: 宋关斌, 1968年生, 工学博士、副教授, 电话: (023)65102508, email: sgb68@163.net

12 h, 弃培养液清洗后加入新鲜培养液培养 10 h, 再次加入胸腺嘧啶脱氧核苷至其终浓度 2 mmol/L, 培养 12 h 弃培养液, 加入新鲜培养液培养 2 h 和 6 h, 同上消化收集、固定。

1.2.2 同步率检测

将收集固定的细胞分别以 pH7.4 PBS 液清洗, 碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染色 30 min, 根据周期时相细胞 DNA 含量不同, 利用流式细胞仪 (美国 BD 公司) 检测, 进行细胞周期性分析。

1.2.3 肝癌细胞与内皮细胞粘附力测量

采用微管吸吮实验技术^[6,7], 先在一特制的圆形小室 (chamber) 中培养单层内皮细胞, 然后加入适量的肝癌细胞, 相互作用 30 min 后开始实验。在显微镜下确定待测细胞后, 调节压力系统使此时的压力为零 (零压状态), 控制显微操作手将微管管口轻轻接触到待测细胞, 通过压力控制系统对微管施加一阶跃负压, 细胞会发生变形而有部份细胞膜被吸入微管内, 通过显微操作手水平向右方向缓慢移动微管, 调节负压的大小, 直至将待测细胞刚好拉掉为止, 此时的负压值即为将待测细胞拉掉的临界压力值。

1.2.4 实验数据处理

实验所测细胞粘附力 (F) 计算公式为: $F = \pi \times R_p^2 \times \Delta P \times \cos\theta$, 式中 R_p 为微管内半径 (本实验微管

内半径在 2.5~3.0 μm 之间), ΔP 为吸吮负压, θ 为微管与平面夹角。在实验过程中, 尽量控制微管与水平面的夹角 θ 在 10° 左右, 则 $\cos\theta \approx \cos 10^\circ = 0.985 \approx 1$, 这样粘附力 F 的计算公式可简化为: $F = \pi \times R_p^2 \times \Delta P$ 。

实验所测各组细胞粘附力值以 $\bar{x} \pm SD$ 表示, 进行两样本均值的 t 检验。

2 结 果

2.1 肝癌细胞的同步化

图 1 为未同步处理的 SMMC-7721 肝癌细胞的流式细胞仪检测结果, 细胞周期各时相的百分比为: G_0/G_1 期, 53.51%; G_2/M 期, 11.01%; S 期,

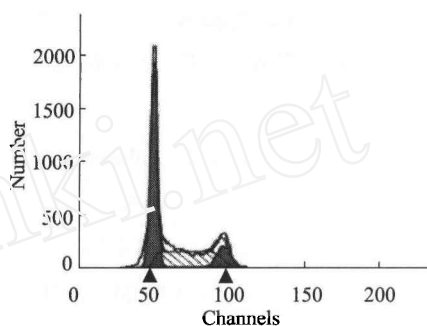


Fig.1 Flow cytometer diagram of general HCC cells

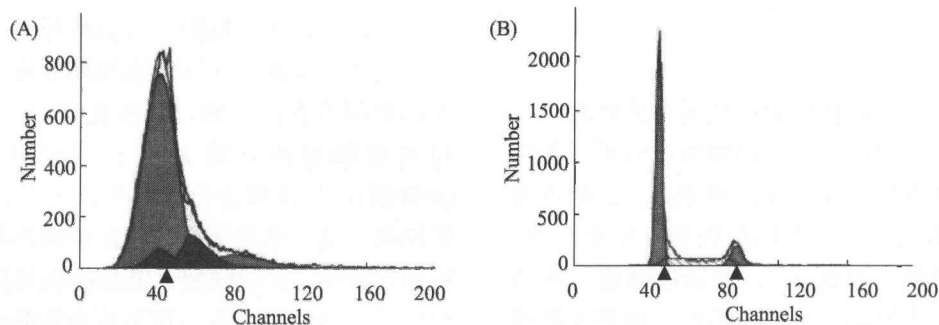


Fig.2 Flow cytometer diagram of G_1 phase HCC cell. (A) 3 hour; (B) 7 hour

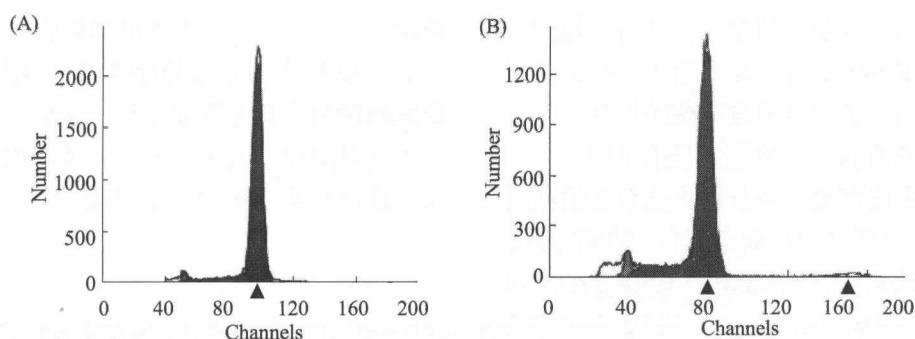


Fig.3 Flow cytometer diagram of S phase HCC cell. (A) 2 hour; (B) 6 hour

35.48%。图 2 中 A、B 分别为同步肝癌细胞于 G₁ 期后释放培养 3 h 和 7 h 的流式细胞仪检测结果, 同步率分别为 74.09% 和 63.94%, 平均为 69.02%; 图 3 中 A、B 为同步肝癌细胞于 S 期后释放培养 2 h 和 6 h 的流式细胞仪检测结果, 其同步率分别为 98.29% 和 94.70%, 平均为 96.50%。同步率在

4 h 内基本稳定维持, 能满足利用微管技术从周期角度研究肝癌细胞与内皮细胞粘附的实验要求。

2.2 肝癌细胞与内皮细胞粘附的时间依赖性

肝癌细胞与内皮细胞粘附的时间依赖性是在连续地测量肝癌细胞与内皮细胞粘附力过程中, 以不同的时间段来划分的, 结果见表 1。

Table 1 Time dependence on adhesion forces of hepatocellular carcinoma cells to HUVECs

Period of time(min)	Adhesion forces($\times 10^{-10}$ N)	<i>n</i>
0-30	39.98 \pm 25.77	16
30-60	297.32 \pm 82.35	20
60-90	336.49 \pm 73.51	18
90-120	301.09 \pm 62.04	21

2.3 肝癌细胞与内皮细胞粘附的周期依赖性

测定未同步化、G₁ 期和 S 期肝癌细胞与内皮细胞的粘附力, 结果见表 2。G₁ 期肝癌细胞与内皮

细胞的粘附力比 S 期相应值明显降低($P < 0.01$), 与未同步化实验组比较也明显降低($P < 0.01$)。

Table 2 Adhesion forces of different cell cycle HCC to HUVECs

Treatments	Adhesion forces($\times 10^{-10}$ N)	<i>n</i>
General SMMC-7721	281.26 \pm 70.15	38
G ₁ phase SMMC-7721	195.42 \pm 60.72 ^{1,2)}	31
S phase SMMC-7721	307.65 \pm 92.10	35

¹⁾Compared with general HCC, $P < 0.01$; ²⁾compared with S phase HCC, $P < 0.01$;

3 讨 论

肿瘤细胞与血管内皮细胞的粘附是肿瘤转移的决定性步骤之一。已经证明, 肿瘤细胞与不同部位血管的内皮细胞在粘附性上存在着差异, 这就意味着肿瘤细胞与不同血管内皮粘附程度不完全一致, 从而出现器官的特异性转移^[8], 但肿瘤细胞与不同内皮细胞相互作用时总有很多共通性。由于人脐静脉内皮细胞易于分离和培养, 因此人们把人脐静脉内皮细胞与肿瘤细胞的粘附作为研究肿瘤细胞与内皮细胞相互作用的“黄金”模型, 并且这一模型早已得到国内外学术界的认可。本实验即从周期角度研究人肝癌细胞与人脐静脉内皮细胞的粘附力行为特征, 因此实验方法和实验模型是成立的。

实验发现, 肝癌细胞与脐静脉内皮细胞的粘附力随着粘附时间的变化而变化, 粘附力在 30~60 min 内迅速增长, 60 min 之后维持在较稳定的水平, 即 300×10^{-10} N 左右。这可能是由于肝癌细胞和内皮细胞上粘附分子表达呈现时间效应, 从

而体现出粘附和去粘附的行为特征。

实验还发现, 不同细胞周期肝癌细胞与内皮细胞的粘附力存在差别, 同步化于 G₁ 期的肝癌细胞与内皮细胞的粘附力比 S 期相应值明显降低 ($P < 0.01$), 与未同步化的肝癌细胞组比较也得到同样结果。这一结果提示, 在肝癌细胞与内皮细胞的粘附过程中, S 期细胞可能起的作用更大。再与我们以前研究肝癌细胞与 IV 型胶原的粘附力结果结合起来^[9,10], 可推测: 在肝癌细胞经血道转移过程中, G₁ 期细胞可能在肝癌细胞与基底膜粘附时起主要作用, S 期细胞则可能在肝癌细胞与内皮细胞粘附时起主要作用。本实验中 S 期与未同步化肝癌细胞组的粘附力值无明显差别, 我们估计这也与细胞上不同粘附分子的表达差异有关, 但这些推测还需要大量的实验进一步加以验证。

参考文献:

- [1] Jurgen B. The role of cell adhesion molecules in cancer invasion and metastasis [J]. *Breast Cancer Research and Treatment*, 1993,24:175~184.
- [2] 张友会. 现代肿瘤学(基础部份)[M], 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1994. 182~183.
- [3] 蔡有余, 李淑华, 罗会元. 人体肝癌细胞株(7402)的细胞同步化和中期染色体分离方法[J]. *解剖学报*, 1984,15:77~80.
- [4] Galavazi G, Bootsma M. Synchronization of mammalian cells in vitro by inhibition of the DNA synthesis[J]. *Exp cell Res*, 1996,41:428~430.
- [5] 宋关斌, 俞为群, 龙勉, 等. 大鼠肝癌细胞株 HTC 细胞的同步化及其检测[J]. *重庆大学学报(自然科学版)*, 2000,23:80~82.
- [6] Sato M, Levesque MJ, Nerem RM. An application of the micropipet technique to the measurement of the mechanical properties of cultured bovine aortic endothelial cells [J]. *ASME J Biomech Engng*, 1987,109:27~34.
- [7] 俞为群, 宋关斌, 吴泽志, 等. 不同细胞周期大鼠肝实质细胞癌细胞粘弹性研究[J]. *生物物理学报*, 1999,15:431~435.
- [8] Nocolson GL. Tumor and host molecules important in the organ preference of metastasis[J]. *Sem Cancer Biol*, 1991,2:143~147.
- [9] 吴泽志, 邵开峰, 宋关斌, 等. 肝癌细胞在 IV 型胶原衬衬表面的粘附特性[J]. *中华医学杂志*, 1999,79:369~372.
- [10] 俞为群, 宋关斌, 龙勉, 等. 不同细胞周期肝癌细胞的粘附特性研究[J]. *中华肝脏病杂志*, 1999,7:153~155.

STUDIES ON THE ADHESIVE MECHANICAL PROPERTIES BETWEEN HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELLS AND ENDOTHELIAL CELLS

SONG Guan-bin¹, LIU Bao-an¹, QIN Jian¹, LONG Mian², CAI Shao-xi¹

(1. Key Laboratory for Biomechanics and Tissue Engineering of the State Ministry of Education, College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044; 2. Institute of Mechanics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract: The purpose of the study is to investigate the adhesive mechanical properties between hepatocellular carcinoma cells(HCC) in different cell cycle phase and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) by cellular biology and cellular mechanics, using micropipette aspiration and cell synchronization technique. It showed that the percentage of different phases of general HCC cells cycle are: G₀/G₁ phase 53.51%, G₂/M phase 11.01%, S phase 35.48%; the synchronous G₁ and S phase HCC cells were achieved through thymine-2-desoxyriboside, colchicines sequential blockage method and double thymine-2-desoxyriboside blockage method, the synchronous rates of G₁ and S phase amount to 69.02% and 96.50%, respectively. The adhesive forces changed with the variations of adhesive time and presented behavior characteristics of adhesion and de-adhesion; S phase SMMC-7721 cells have higher adhesion forces to HUVECs than G₁ phase cells($P < 0.01$), so it can be suggested S phase cells may play main roles in its adhesion to endothelial cells.

Key Words: Hepatocellular carcinoma cell; Endothelial cell; Adhesion; Cell cycle; Micropipette aspiration