

## 内毒素直接损伤血管内皮细胞的细胞生物力学机理

王翔<sup>1</sup>, 吴泽志<sup>1</sup>, 蔡绍哲<sup>1</sup>, 王晓军<sup>2</sup>, 罗向东<sup>2</sup>, 杨宗城<sup>2</sup>, 黎整<sup>2</sup>

1. 重庆大学生物工程研究院, 重庆 400044; 2. 第三军医大学西南医院烧伤研究所, 重庆 400038

**目的** 本文研究了当血管内皮细胞 HUVEC 被内毒素 LPS 直接激活损伤时, 血管内皮细胞 HUVEC 生物力学特性的变化。

**方法** 运用微管吸吮系统(micropipette aspiration system)、激光共聚焦(confocal)技术, 应用标准固体粘弹性模型研究内毒素 LPS 直接损伤血管内皮细胞 HUVEC 后, HUVEC 的弹性模量  $K_1$ 、 $K_2$  和粘性系数  $\mu$  的变化。

**结果** 实验中发现增加内毒素的浓度可使内皮细胞的弹性模量  $K_1$ 、 $K_2$  降低, 内毒素的浓度从 0.3125 变到 10 ( $\mu\text{g/ml}$ )  $K_1$  下降最显著下降了 42.4%,  $K_2$  下降了 14%; 内皮细胞的粘性系数  $\mu$  却随内毒素浓度的增加而增加了一倍。实验还发现内毒素作用的时间对内皮细胞  $K_1$ 、 $K_2$ 、 $\mu$  的影响, 随着作用时间的延长  $K_1$  的变化最大; 24 小时后,  $K_1$  的值下降了 67%;  $K_2$ 、 $\mu$  的变化相对来说要小些, 分别为 55.5% 和 61.4%。内毒素直接损伤内皮细胞后的细胞共聚焦图谱显示: 细胞的骨架蛋白重组, 胞核位移、脱落, 内毒素 LPS 浸润在整个细胞表面。

**结论** 实验结果从细胞生物力学的角度证实内毒素 LPS 可直接损伤血管内皮细胞 HUVEC。内毒素 LPS 直接损伤内皮细胞 HUVEC 导致 HUVEC 的生物力学特性(弹性模量  $K_1$ 、 $K_2$ 、粘性系数  $\mu$ ) 发生较大的变化; 均有显著的 LPS 浓度、LPS 作用时间依赖性。实验结果说明 LPS 作用于 HUVEC 后, 引起细胞内结构级组成的变化, 细胞的弹性模量  $K_1$ 、 $K_2$  与 HUVEC 中的微丝、微管等的含量及分布有关。粘性系数  $\mu$  的变化反应出 HUVEC 膜组成、结构及功能的变化。

## 肝癌细胞的粘附力学特性及其与细胞周期的关系

宋关斌, 刘保安, 秦建, 龙勉, 蔡绍哲

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

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, 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。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。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临床上肝癌的预防和治疗提供定量的参考依据。

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(hepatocellular carcinoma cells, HCC)与人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的粘附力学行为特征, 因此实验方法和实验模型是成立的。

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与脐静脉内皮细胞的粘附力学特性。结果表明: 未同步化肝癌细胞各周期时相的细胞百分比为 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期 53.51%、G<sub>2</sub>/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 G<sub>1</sub> 期和 S 期的

表 1 肝癌细胞与内皮细胞粘附的周期依赖性

Treatments	Adhesion forces ( $F \times 10^{-10} \text{N}$ )	n
General SMMC - 7721	281.26 ± 70.15	38
G1 phase SMMC - 7721	195.42 ± 60.72	31
S phase SMMC - 7721	307.65 ± 92.10	35

表 2 肝癌细胞与内皮细胞粘附的时间依赖性

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

肝癌细胞, 其平均同步率分别为 69.02% 和 96.50%; G<sub>1</sub> 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分钟内迅速增长,60分钟之后维持在较稳定的水平,即 $300(F \times 10^{-10}N)$ 左右(详见表1,2)。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;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。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。

## 内皮祖细胞诱导生物血管基质材料内皮化研究

朱楚洪, 应大君, 糜建红, 董世武, 张伟, 孙建森

第三军医大学解剖教研室, 重庆市生物力学实验室, 重庆 400038, E-mail: zhuch99@163.com

**目的** 了解骨髓干细胞诱导分化成内皮细胞及在生物材料进行种植的可行性, 为血管组织工程提供资料。

**方法** 取正常健康人(2~50岁)骨髓, 加淋巴细胞分离液, 经密度梯度离心后获得单核细胞, 再运用微磁珠和单抗筛选出CD45和GlyA都为阳性的细胞。用60%低渗DMEM, 40%MCDB-201(Sigma),  $1 \times$ 胰岛素铁传递蛋白,  $1 \times$ linoleic acid bovine serum albumin(BSA),  $10^{-9}M$ 地塞米松(Sigma), 和 $10^{-4}M$ 2-磷酸盐维生素C(Sigma), 100U青霉素, 和1000U链霉素(Gibco)培养。用无血清、EGF or PDGF, 含20 ng/mL VEGF-B骨髓干细胞培养液培养, 分化的细胞通过免疫荧光激光共聚焦检测KDR, vWF, CD34, 的表达, 以确定是否已分化成内皮细胞。无菌条件下取猪动脉, 先用含PMSF、抗生素低渗及高渗缓冲液处理, 再在保持37℃、5%CO<sub>2</sub>用酶去猪血管细胞, 组织学检测去细胞效果及基质骨架分布情况。在自行研制的血管细胞化生物反应器中, 培养已分化的内皮细胞注射到血管腔, 粘附90分钟后, 在三天内的内皮细胞种植培养过程中, 腔内流速逐渐增高从0.033~0.1ml/s。扫描电镜检测细胞化效果。

**结果** 培养细胞14天后, 细胞呈现内皮细胞形状, 经特异性抗体检测可见细胞有KDR, vWF, CD34的表达, 说明经过诱导, 骨髓中的多能成人祖细胞能分化成内皮细胞。经各种酶处理的血管基质去细胞完全, 基质纤维保持完整, 未见断裂, 扫描电镜可见分化培养的内皮细胞已在去细胞血管腔粘附生长, 成功进行了内皮化。

**结论** 运用骨髓干细胞诱导分化成内皮细胞可作为种子细胞, 各种酶处理的猪血管适合作为血管基质材料, 并成功构建了新的血管。

## Fast Growth of Eucommia Antifungal Protein (EAFP) Crystals Observed by Atomic Force Microscopy

Sheng WANG<sup>1,2,3</sup>, Ye XIANG<sup>3</sup>, Genpei LI<sup>2</sup>, Dacheng WANG<sup>2,3</sup>

1. Bioengineering Institute of Chongqing University, Chongqing 400044, China E-mail: wtscrytal@sina.com;

2. National Microgravity Laboratory, Institute of Mechanics, CAS, 15 Beisihuan Road, Beijing 100080, China;

3. Center for molecular biology, Institute of Biophysics, CAS, 15 Datun Road, Beijing 100101, China

The eucommia antifungal protein (briefly named as EAFP) is an antifungal protein extracted from the barks of the eucommia ulmoides Oliv<sup>[1]</sup>. It is involved in the defense mechanism of plants and plays an important role against the pathogenic attacks. EAFP has 41 residues distinctly with five disulfide bridges. It has been crystallized in a monoclinic form(P21) with the unit cell parameters  $a = 19.085$ ,  $b = 23.225$ ,  $c = 30.854$ ,  $\beta = 98.64$ <sup>[2]</sup>. EAFP crystals grow much faster than most of other macromolecular crystals. It takes only several hours to grow perfect crystals big enough for x-ray diffraction at very high resolution(about 0.8?). Therefore it is very interesting to know the mechanism of the fast growth process of EAFP crystals. Here we report step growth rates measured from images by in situ Atomic Force Microscopy(AFM).

By in situ AFM the dynamic topographic changes were observed on the {100} surface of several EAFP crystal and growth rates were measured at different supersaturations analyzed by Image Processing(IP2.1)<sup>[3]</sup>. The results of AFM experiments showed that the rates of EAFP step growth were related to supersaturations. At higher supersaturation( $\sigma = 1.78$ ) or above the EAFP crystals grew very fast so as to be difficult to measure the growth rates; at moderate supersaturation( $\sigma = 1.5$ ) the growth rates were 12 nm/s and 24.2 nm/s along the crystallographic axes  $b$  and  $c$  of the {100} surface respectively, which were evidently faster than that of lysozyme(6-7 nm/s)<sup>[4]</sup>; Even at lower supersaturation( $\sigma = 1.5$ ) the average growth rate was 6.5 nm/s which was almost as fast as other protein crystals grew. But at very low supersaturation( $\sigma = 0.32$ ), the growth rate of steps became very lower than 3nm/s.

The results of AFM image analysis indicated that the step growth rates of EAFP crystals spread much faster than most of oth-