

# 流动剪切和不同流型对血管内皮细胞增殖的影响\*

胡江 胡嘉 高宇欣 李涛 陶祖莱

(中科院力学所 微重力室, 北京 100080)

**摘要** 动脉粥样硬化的非随机分布与局部的血流动力环境有关, 而内皮细胞增殖引起的内皮层失稳与动脉粥样硬化早期发生过程有关。本文比较了不同大小的切应力对内皮细胞增殖的影响, 发现切应力抑制细胞增殖并与切应力大小相关。同时构建了平行板式突然扩张流槽, 探讨流型改变对细胞增殖的影响, 发现扩张效应和流线偏转效应使得这种剪切抑制作用被减弱。

**关键词** 切应力 流型 内皮细胞 增殖 细胞周期

## The Effect of Shear Stress and Flow Pattern on Proliferation of Vascular Endothelial Cells

Hu Jiang Hu Jia Gao Yuxin Li Tao Tao Zulai

(Lab of Microgravity, Institute of Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100800)

**Abstract** The non-random distribution of atherosclerosis was related to local hemodynamic environment. The stabilization of endothelium was important in this process. We studied the effect of magnitude of shear stress on proliferation of endothelial cells. It was shown the proliferation of endothelial cells was inhibited by shear stress, and was related to the magnitude of shear stress. A parallel plate sudden-expansion flow chamber was constructed, and the effect of flow pattern was also studied. It was shown the inhibition effect produced by shear stress was decreased in this chamber.

**Key words** Shear stress Flow pattern Endothelial cells Proliferation Cell cycle

### 1 前言

动脉粥样硬化多发于大动脉血管的分支、分叉和弯曲处, 而这些位置的流动通常表现出低切应力、扰动、流体分离的特征, 表明局部的流体力学环境与粥样硬化的发生有相关性<sup>[1]</sup>。而内皮层的稳定性对于防止粥样硬化的早期过程具有重要意义。因此, 有必要研究在特定的流型条件下细胞增殖的变化。为此, 我们在体外研究中构建了平行板式平直流槽和突然扩张式流槽, 研究在切应力大小和流型发生变化的条件下血管内皮细胞增殖的变化。

### 2 材料与方方法

#### 2.1 流动系统

平行板式流槽的尺寸如图 1 所示, 阴影区域为细胞实际培养区域。平直流槽和扩张式流槽的高度均为 0.52 mm。流槽的底板用医用级聚碳酸酯加工, 垫片为聚四氟乙烯膜, 流室上板为培养有细胞的

玻片。通过不锈钢的盖板与流槽底板用螺丝固定, 封闭流室。系统在 37℃、5%CO<sub>2</sub>、95%Air 的条件下进行流动作用。流槽和硅胶管路消毒采用高压灭菌(垫片用 75%乙醇浸泡灭菌)。

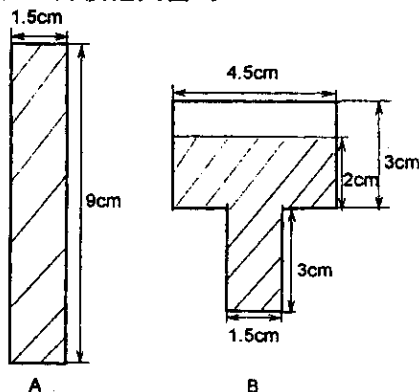


图 1 流槽和细胞培养区域的几何尺寸

A-平直流槽; B-突然扩张式流槽; 阴影区为细胞培养区域

Fig 1 The dimension of flow chamber and cell culture area

A-Rectangle flow chamber; B-Sudden-expansion flow chamber; The cell culture area being obliquely lined

#### 2.2 细胞培养

原代分离培养新生牛主动脉血管内皮细胞, 所

万方数据

\* 国家自然科学基金重点资助项目(19732003)

用细胞为同一供体来源的5~11代细胞。培养基为1640、10%胎牛血清、添加1%的谷氨酰胺和双抗(均购自Hyclone公司),CO<sub>2</sub>培养箱中培养。所用培养基基底均用0.1%的明胶(Sigma公司)预处理。

### 2.3 流场数值模拟

对流场进行数值模拟,所用软件为FLUENT5.5,得出一定入口Re数下的流线图,并计算细胞生长区域的平均切应力大小。

### 2.4 流动作用

细胞种植在1.5 mm厚的玻片上,硅胶膜(Sylgard 184, Dow Corning公司)框架限制其生长区域,与图1中的阴影区域一致。细胞汇合后,去掉框架,无菌条件下安装成流动系统,并通过旁路去气泡,进行流体动力加载。灌注液成分同培养基。

### 2.5 流式细胞术测定细胞周期

流体动力作用12 h后,胰酶消化细胞,按试剂盒(细胞周期分析试剂盒, BD公司)说明书对细胞DNA进行染色,流式细胞仪(FACSCalibur, BD公司)测定细胞周期分布,所用拟合软件为ModFit LT(BD公司)。对照组细胞同样接种在相同区域的玻片上,换等体积的新鲜灌注液12 h后测定细胞周期。每组实验做3次。

### 2.6 统计

结果表示为 $\bar{x} \pm s$ ,显著性检验用Student's *t*-test方法。

## 3 结果

### 3.1 流场的数值模拟

流体的密度 $\rho=1$  g/ml,流体的动力粘性系数 $\mu=0.011$  P,流室的高度为 $H=0.052$  cm,宽度 $W=1.5$  cm,  $Re = \frac{2\rho WHU}{\mu(W+H)}$ 。对于平直流槽,对应于入口Re数11.2、37.2和74.4,计算所得的壁面切应力大小分别为2.79、9.30、18.61 dyne/cm<sup>2</sup>。对于扩张流槽,在入口Re数为37.2的条件下,分析其流动特征(见图2)。表明流线发生了偏转,流动存在扩张效应,并存在死水区。

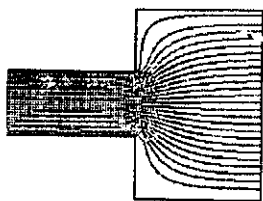


图2 突然扩张流槽的流线(Re数37.2)

Fig 2 Flow streamlines in the sudden-expansion chamber at Re number 37.2

### 3.2 切应力大小对细胞增殖的影响

用S+G<sub>2</sub>/M期之和表征增殖指数。对于平直流槽,不同大小的切应力作用下,细胞的增殖不同。与对照相比,2.79 dyne/cm<sup>2</sup>的切应力作用12 h未引起细胞周期分布的改变(对照组35.64%±3.20%, 2.79 dyne/cm<sup>2</sup>剪切组35.87%±2.00%),表明低剪切作用对细胞增殖无作用。而分别在9.30、18.61 dyne/cm<sup>2</sup>的切应力作用下,细胞增殖被明显抑制(9.30 dyne/cm<sup>2</sup>剪切组17.04%±1.52%, 18.61 dyne/cm<sup>2</sup>剪切组14.30%±3.87%,与对照相比 $P < 0.05$ ),表明一定大小的切应力作用可抑制细胞增殖,较低的切应力作用并无影响(见图3)。

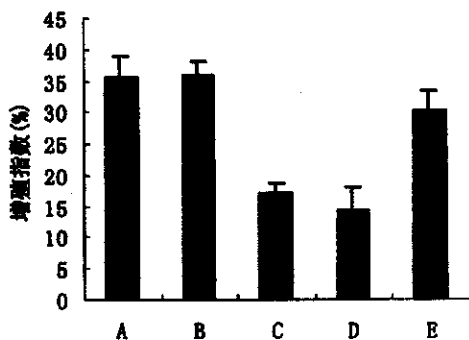


图3 流动剪切和流型对内皮细胞生长的影响

A-对照组细胞;B-2.79 dyne/cm<sup>2</sup>剪切12 h;C-9.30 dyne/cm<sup>2</sup>剪切12 h;D-18.61 dyne/cm<sup>2</sup>剪切12 h;E-突然扩张流槽,入口Re数37.2

Fig 3 The effect of fluid shear stress and flow pattern on proliferation of endothelial cells

A-Control group;B-2.79 dyne/cm<sup>2</sup> shear stress for 12h;C-9.30 dyne/cm<sup>2</sup> shear stress for 12h;D-18.61 dyne/cm<sup>2</sup> shear stress for 12h;E-Sudden-expansion flow chamber with Re 37.2

### 3.3 不同流型对细胞增殖的影响

在相同的入口Re数(Re=37.2)条件下,对于突然扩张式流槽,与平直流槽相比,其细胞增殖指数有明显差异(平直流槽17.04%±1.52%,扩张流槽30.13%±3.23%, $P < 0.05$ )(图3)。表明对于同样的入口条件,扩张流槽的流动扩张、流线偏转效应使得流动剪切作用不能有效地抑制细胞增殖。

## 4 讨论

已有的研究表明,剪切作用可以抑制大血管来源的内皮细胞的增殖,并研究了这种作用可能的分子机理。在此基础上,我们比较了这种抑制作用和切应力大小的相关性,表明低切应力无影响,这与Lin等所观察到的在分子水平上较低切应力对细胞内抑

制周期经过检验点的分子 P53 表达无影响的结果是一致的<sup>[2]</sup>。

动脉粥样硬化常发于大血管的分支、分叉处,体内实验也表明这些区域的 DNA 合成较旺盛<sup>[3]</sup>。由于细胞分裂会破坏内皮层的稳定,增加通透性,维持内皮层的稳定性对于减少血栓形成和硬化过程有重要意义。基于体内实验研究的困难,有必要在体外构建流型系统来研究特定流型的影响。对于流动随时间的变化的流动系统已有较多的研究<sup>[4]</sup>,而在体外研究随空间变化的流场效应较少。而复杂的三维血管支架的制作与均匀的内皮化技术尚在发展之中<sup>[5]</sup>。我们在常用的平行板式流槽的基础上,发展了平行板突然扩张式流槽,解决了内皮细胞种植形成完整内皮层的问题。数值模拟表明,流线在角点处发生了偏转,且流动存在扩张效应。为了与平直流槽进行比较,通过框架限制细胞的生长范围,生长区域均为  $13.5 \text{ cm}^2$ 。对于扩张式流槽,由于感兴趣的是流线偏转区域,因此去除了下游的部分低切应力区。在我们构建的流型模拟系统中,由于流动的扩张和流线的偏转,改变了壁面切应力的分布,发现剪切抑制细胞增殖作用被减弱(与相同入口条件的平直流槽相比),是一个研究可计算的流型作用下细胞生长的理想模型,进一步的研究有待于通过原位区域的 Br-dU 掺入法分析这种变化的空间分布与流动原位特征的相关性<sup>[6]</sup>。另一方面,在细胞水平上这种流动的变化是如何被内皮细胞感受到的仍不清楚,牵张整和力<sup>[7]</sup>和细胞形状微模式<sup>[8]</sup>研究有助于解决这一

问题。

## 5 结 论

剪切抑制牛主动脉血管内皮细胞的增殖并与切应力大小相关,扩张和流线偏转效应使得这种剪切抑制作用被减弱,表明剪切作用的空间分布对内皮细胞生长的影响不同于均一的定常层流剪切作用。

## 参 考 文 献

- 1 Gimbrone MA. Vascular endothelium, hemodynamic forces and atherogenesis. *Am J Pathol*, 1999; 155 (1) : 1
- 2 Lin K, Hsu PP, Chen BP, *et al.* Molecular mechanism of endothelial growth arrest by laminar shear stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000; 97(17) : 9385
- 3 Wright HP. Mitosis patterns in aortic endothelium. *Atherosclerosis*, 1972; 15(1) : 93
- 4 Nerem RM, Alexander RW, Chappell DC, *et al.* The study of the influence of flow on vascular endothelial biology. *Am J Med Sci*, 1998; 316(3) : 169
- 5 Terada S, Sato M, Sevy A, *et al.* Tissue engineering in the twenty-first century. *Yonsei med J*, 2000; 41(6) : 685
- 6 DePaola N, Gimbrone MA, Davies PF, *et al.* Vascular endothelium responds to fluid shear stress gradients. *Arterioscler Thromb*, 1992; 12(11) : 1254
- 7 Ingber DE. Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction. *Annu Rev Physiol*, 1997; 59 : 575
- 8 Blawas AS, Reichert WM. Protein Patterning. *Biomaterials*, 1998; 19(7-9) : 595

(收稿:2002-03-26 修回:2002-05-22)