

突然扩张流槽中血管内皮细胞表面粘附蛋白表达的研究

胡江, 胡嘉, 李涛, 高宇欣, 陶祖莱
(中国科学院力学研究所国家微重力实验室, 北京 100080)

摘要: 动脉粥样硬化的非随机分布与当地的血流动力环境有关, 为了研究复杂的流体动力学条件对血管内皮细胞生理功能的影响, 构建了平行板式平直流槽和突然扩张流槽, 通过数值模拟分析了流型的特征, 并探讨流型改变对人脐静脉血管内皮细胞表面粘附蛋白表达的影响, 发现突然扩张流槽中流动的空间变化使得总体细胞表面粘附蛋白 ICAM-1 的表达显著高于平直流槽中的均匀定常剪切作用, 表明局部流动空间变化的性质可以影响血管内皮细胞的功能。

关键词: 流型; 内皮细胞; 表面粘附蛋白

中图分类号: Q6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6737(2003)01-0097-04

动脉粥样硬化多发于大动脉血管的分支、分叉和弯曲处, 这些位置的流动通常表现出低剪应力、扰动、流体分离的特征, 与之相比, 动脉树中大部分血管区域受到较均一的层流剪切作用, 这些区域通常不发生粥样硬化, 表明当地的流体力学环境与粥样硬化的发生有相关性^[1]。为了阐明流体动力是如何作用于血管内皮细胞, 并由此找到动脉粥样硬化发生的机理和治疗办法, 首要的是模拟血流动力条件, 在可控的条件下对培养的内皮细胞进行流体动力作用^[2]。已有的体外实验研究主要利用平行板式矩形腔流槽^[3], 提供均一的剪应力作用, 研究流动剪应力的大小对血管内皮细胞功能的影响, 发现剪应力可在多个方面影响内皮细胞的功能^[4], 并试图在细胞的力学感受机理上阐明其信号转导途径^[5]。然而由于血管树几何形状的变化, 血管壁上的内皮细胞受到复杂的流体动力作用, 并非只受到单一的均匀的剪应力作用^[6], 而且动脉粥样硬化常发生在流动急剧变化的区域, 表明存在复杂的流体动力效应。近年来的研究也表明剪应力的梯度是影响内皮细胞功能的重要因素^[7,8], 血管功能活性的变化并不单纯取决于剪应力的大小。为了研究复杂的流型对内皮细胞的可能作用, 我们在体外研究中构建了平行板式平直流槽和突然扩张流槽, 研究流场

发生变化的条件下血管内皮细胞应答的差异。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

原代分离培养人脐静脉血管内皮细胞, 所用细胞为同一供体来源的 4~7 代细胞。培养基为 M199, 添加 10%胎牛血清、1%的谷氨酰胺、双抗 (Hyclone 公司)、肝素钠和内皮细胞生长因子 (Roche 公司), CO₂ 培养箱中培养。所用培养基底均用 1%的明胶 (Sigma 公司) 预处理。

1.2 流动系统

平行板式流槽的尺寸如图 1 所示。平直流槽为常用的矩形流动腔设计^[3], 突然扩张流槽在流动经过平直段后发生突然扩张。流槽的底板用医用级聚碳酸酯加工, 垫片决定流槽的形状, 材料为 0.52 mm 的聚四氟乙烯膜, 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。灌注系统在 37°C、5% CO₂-95% 空气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)。对流场进行数值模拟, 所用软件为 FLUENT5.5, 方法为有限体积法。得出不同入口 Re 数下的流线和壁面

收稿日期: 2002-03-31

基金项目: 国家自然科学基金项目(19732003)

作者简介: 胡江, 博士生, 1973 年生, 电话: (010)62558142, E-mail: hujohn@sina.com

剪应力分布图, 并计算细胞生长区域的平均剪应力大小。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, 开启平流泵, 进行流体动力加载。灌注液成分同培养基, 总体积为 35 ml。对照组细胞培养在相同面积的玻片上。

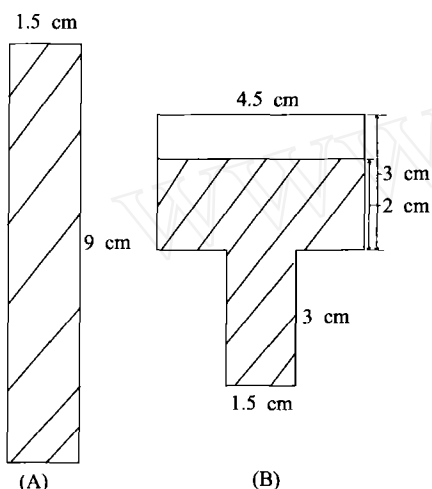


Fig.1 The sizes of parallel plate flow chamber. The projected areas showed cell culture area (area=13.5 cm²). (A) Rectangle flow chamber; (B) Sudden-expansion flow chamber

1.3 表面粘附蛋白表达的分析

流动作用 8 h 后, 10 mmol/L EDTA 消化细胞置备单细胞悬液, 10 mg/L 一抗 (鼠抗人 ICAM-1 单抗, R&D 公司; E-Selectin 单抗, Oklahoma 医学中心 McEver R P 教授赠送) 孵育 30 min, PBS 洗后 FITC 标记的羊抗鼠二抗 (中山公司) 孵育 30 min, PBS 洗后离心收集细胞, 重悬于 1% 的多聚甲醛中, 流式细胞术测定细胞表面平均荧光强度。所用仪器为 FACSCalibur (BD 公司)。

1.4 统计

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

2 结 果

2.1 流场的数值模拟和分析

定义 $Re = \frac{2\rho WHU}{\mu(W+H)}$, 流体的密度 $\rho = 1$ g/ml, 流体的粘度 $\mu = 0.011$ P, 流室的高度 $H = 0.052$ cm, 宽

度 $W = 1.5$ cm, U 为入口速度 (cm/s), 通过改变流量来控制入口 Re 数。对于平直流槽, 对应于 Re 数 37.2, 计算所得的壁面剪应力大小为 9.30×10^{-5} N/cm², 且壁面剪应力呈均匀分布。对于突然扩张流槽, 在相同的入口 Re 数条件下, 分析其流动特征。流线图表明流动发生了偏转和扩张, 并且流动存在死水区。从壁面剪应力等值面图 (图 2) 可以看到, 流体从左侧入口进入流槽, 在平直段流动充分发展后, 剪应力保持一个恒定值。在平直段末端的两个角点处, 由于流线偏转, 速度变化剧烈, 剪应力的变化达到极大值。在外侧的两个角点处, 剪应力为零。随着流动的发展, 剪应力在出口区再次达到均值。舍去出口区未接种细胞的区域, 计算所得细胞接种区域的平均剪应力大小为 5.39×10^{-5} N/cm²。

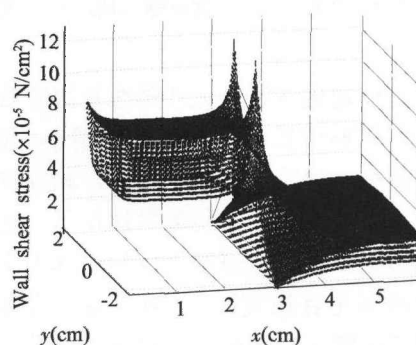


Fig.2 Contours of wall shear stress in sudden-expansion flow chamber

2.2 不同流场下血管内皮细胞表面粘附蛋白表达的差异

分析内皮细胞表面粘附蛋白 ICAM-1 和 E-Selectin 表达的变化。结果表明, 对于平直流槽, 均匀的定常剪切作用可诱导表面粘附蛋白 ICAM-1 表达的升高 (图 3), 9.30×10^{-5} N/cm² 剪切作用 8 h 后, ICAM-1 表达为对照组的 3.45 倍。而对于相同入口条件 (入口 Re 数为 37.2) 下的突然扩张流槽, ICAM-1 的诱导与平直流槽有极显著差异 (平直流槽 9.30×10^{-5} N/cm² 剪切下 71.46 ± 9.08 , 突然扩张流槽 112.90 ± 12.75 , $P < 0.01$)。基于在此 Re 数为下突然扩张流槽的壁面平均剪应力为 5.39×10^{-5} N/cm², 改变平直流槽的流量和入口 Re 数, 使其壁面剪应力的大小也为 5.39×10^{-5} N/cm², 流动作用 8 h 后, 与突然扩张流槽进行比较, 在壁面平均剪应力相同的条件下, 平直流槽中细胞表面 ICAM-1 表达的平均荧光强度为 59.87 ± 4.54 , 和突然扩张流槽之间差异也极显著 ($P < 0.01$)。说明存在

流动扩张和大的剪应力空间分布的流型下,其流动作用不同于对应的相同平均剪应力的均匀剪切作用。对于表面粘附蛋白 E-Selectin 的表达,在入口 Re 数为 37.2 的条件下,平直流槽和突然扩张流槽中均未能引起其表达的变化(平均荧光强度对照组 13.19 ± 0.68 ,平直流槽 12.72 ± 1.41 ,突然扩张流槽 13.82 ± 1.71 ,各组间均无差异),表明定常流动条件下其表达不受流型改变的影响。

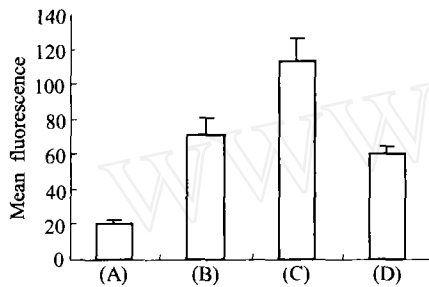


Fig.3 The expression of surface adhesion protein ICAM-1 in different flow fields. (A) Control; (B) 9.30×10^{-5} N/cm² shear stress for 8 h in rectangle flow chamber; (C) Flow at Re number 37.2 for 8 h in sudden-expansion flow chamber; (D) 5.39×10^{-5} N/cm² shear stress for 8 h in rectangle flow chamber

3 讨 论

动脉粥样硬化常发于大血管的分支、分叉和弯曲处,而这些区域的流动特征不同于动脉树的平直段。以往的研究采用均匀剪切的平行板式流槽,发现剪切作用可以影响内皮细胞的生长,然而不能完全解释动脉粥样硬化高发于流动复杂区域的现象^[1]。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。复杂流动特征包括流动的脉动性和血管几何尺寸变化造成的局部血流动力的急剧变化。对于流动随时间变化的流动系统已有较多的研究^[2],而在体外研究随空间变化的流场效应受到流型设计和实验方法的限制。复杂的三维血管支架的制作与均匀的内皮化技术尚不成熟^[10]。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流槽,模拟复杂的流动特性,解决了内皮细胞种植形成完整内皮层的问题,同时可对内皮细胞进行整体代谢分析和原位的观察。为了与平直流槽进行比较,通过框架限制细胞的生长范围,去除了下游的均匀低剪应力区,生长区域均为

13.5 cm^2 ,这样在相同的灌注液体积下,消除了由于细胞个数的差异引起的旁分泌因子的相互作用的差异。在我们构建的流型模拟系统中,数值模拟表明,由于流动的扩张、流线的偏转,改变了壁面剪应力的分布。已往平直流槽均匀剪切的研究表明,剪切作用可诱导 ICAM-1 的表达并与作用时间相关。通常均匀剪切实验采用 $8 \times 10^{-5} \sim 12 \times 10^{-5}$ N/cm² 作为正常生理剪应力^[9]。我们以 9.30×10^{-5} N/cm² 的剪应力作为对照,实验研究发现,与平直流槽相比,在相同的入口条件下或同样的平均剪应力作用下,表面粘附蛋白 ICAM-1 的表达均有极显著的差异,表明流动沿空间的变化可以引起血管内皮细胞表面粘附特性的改变,其表达模式不同于均匀的定常剪切作用,这种变化在血管功能的局部调节和动脉粥样硬化的发生中有重要意义。与之相比, E-Selectin 的表达并未发生改变。以往的研究表明低剪切震荡流动作用可诱导 E-Selectin 表达,而均匀的定常剪切作用无影响^[11],可见其诱导表达与流动的非正常性有关,定常条件下流型的改变对其无影响。基于细胞粘附在动脉粥样硬化发生过程具有重要作用,表面粘附蛋白表达模式的差异提示动脉粥样硬化发生的区域分布与特定的流场条件有关。我们设计的异型流槽为探讨复杂流动效应提供了方法。

参考文献:

- [1] Gimbrone MA. Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis[J]. *Am J Pathol*, 1999,155:1-5.
- [2] Fisher AB, Chien S, Barakat AI, et al. Endothelial cellular response to altered shear stress[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001,281:L529-533.
- [3] Levesque MJ, Nerem RM. The elongation and orientation of cultured endothelial cells in response to shear stress [J]. *J Biomech Eng*, 1985,107:341-347.
- [4] Chien S, Li S, Shyy YJ. Effects of mechanical forces on signal transduction and gene expression in endothelial cells[J]. *Hypertension*, 1998,31:162-169.
- [5] Barakat AI, Davies PF. Mechanisms of shear stress transmission and transduction in endothelial cells[J]. *Chest*, 1998,114: 58S-63S.
- [6] Zarins CK, Giddens DP, Bharadvaj BK, et al. Carotid bifurcation atherosclerosis. Quantitative correlation of plaque localization with flow velocity profiles and wall shear stress [J]. *Circ Res*, 1983,53:502-514.

- [7] Phelps JE, DePaola N. Spatial variations in endothelial barrier function in disturbed flows in vitro[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000,278:H469-476.
- [8] Nagel T, Resnick N, Dewey CF Jr, et al. Vascular endothelial cells respond to spatial gradients in fluid shear stress by enhanced activation of transcription factors [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999,19:1825-1834.
- [9] Nerem RM, Alexander RW, Chappell DC, et al. The study of the influence of flow on vascular endothelial biology[J]. *Am J Med Sci*, 1998,316:169-175.
- [10] Terada S, Sato M, Sevy A, et al. Tissue engineering in the twenty-first century[J]. *Yonsei Med J*, 2000,41:685-691.
- [11] Chappell DC, Varner SE, Nerem RM, et al. Oscillatory shear stress stimulates adhesion molecule expression in cultured human endothelium[J]. *Circ Res*, 1998,82:532-539.

EXPRESSION OF SURFACE ADHESION PROTEINS ON CULTURED VASCULAR ENDOTHELIAL CELLS IN SUDDEN-EXPANSION FLOW CHAMBER

HU Jiang, HU Jia, LI Tao, GAO Yu-xin, TAO Zu-lai

(National Microgravity Laboratory, Institute of Mechanics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: The non-random distribution of atherosclerosis was related to local hemodynamic environment. Parallel plate rectangle and sudden-expansion flow chamber were constructed in our studies and the flow characteristics in these chambers were analyzed using finite-volume models. The effect of flow pattern on expression of surface adhesion proteins on cultured HUVEC was studied. It was shown that at the same entrance Re number or the mean shear stress condition, the expression of ICAM-1 was higher in sudden-expansion flow chamber than in rectangle flow chamber. There was no effect on E-Selectin expression. In conclusion, the spatial characteristic of fluid flow would influence local function of vascular endothelial cells.

Key Words: Flow pattern; Endothelial cells; Surface adhesion proteins