

基底硬度对人正常肝细胞生物力学特性的影响

夏婷婷, 周 惠, 王红兵, 杨 力*

重庆大学 生物工程学院, “生物流变科学与技术”教育部重点实验室, 国家“111 计划”基地, 重庆 400044

* E-mail: yanglibme@cqu.edu.cn; Tel: 023-65111802

目的:肝纤维化是慢性肝病病变晚期的组织学变化, 是一种在创伤因子持续作用下渐变的病理过程。在肝纤维化的发生发展过程中, 肝脏的硬度随纤维化程度的加剧而逐步增大。目前对肝纤维化病理机制的基础研究, 很多着重于生化环境的改变及其影响, 忽略了这一过程中环境物理硬度的改变, 因而构建一个可以模拟肝纤维化进程中肝脏组织硬度变化的体外细胞培养模型, 对于研究肝纤维化的机制尤为重要。基底硬度可以改变细胞增殖、迁移、分化等特性。目前, 对肝纤维化进程中细胞力学性能改变与肝纤维化机制的研究尚未深入。探究基底硬度的变化对人正常肝细胞的生物学及力学特性的影响, 以进一步研究肝细胞力学特性与肝纤维化进程的关系。**方法:**以聚乙烯醇水凝胶 (polyvinyl alcohol hydrogel, PVA hydrogel) 为基底, 构建与正常肝组织、肝纤维化早、中后期肝脏组织硬度相当的体外培养模型, 培养人正常肝细胞 (human normal liver cell, L02)。流式细胞术检测不同硬度水凝胶基底对细胞生长周期、凋亡的影响, 免疫荧光和 Western-Blot 检测肝细胞骨架及 Integrin- $\beta 1$, β -Catenin 蛋白的定位与表达情况, 原子力检测细胞杨氏模量变化。**结果:**构建了硬度可控的不同硬度的聚乙烯醇水凝胶体外培养模型; 不同硬度基底上细胞的凋亡率均低于 10%, 且随着硬度的增加, 细胞凋亡程度下降, 证明 PVA 水凝胶具有优良的生物学相容性, 适用于 L02 细胞体外培养。细胞变形指数 (cell deform factor, $CF = C^2/4\pi S$; C -细胞周长, S -细胞面积) 随基底硬度的增加变大, 基底硬度增强了细胞的形变能力。免疫荧光结果显示, 生长于软基底上的细胞呈多边形, 胞间微丝连接密切, 伪足呈片状; 而较硬基底上的细胞骨架被拉长, 胞间连接削弱, 伪足呈丝状; 软基底上 Integrin- $\beta 1$ 主要分布于细胞胞间连接处, 硬基底上主要分布于细胞与基底连接处, 说明硬基底削弱了细胞与细胞的胞间连接, 增强了细胞与基底的连接; 原子力显微镜检测细胞杨氏模量, 发现细胞模量随基底硬度增加有所变化。**结论:**基底硬度变化影响了 L02 细胞的生物学及力学特性, 这提示 L02 细胞力学特性改变可能与肝纤维化机制有密切联系。(国家自然科学基金面上项目, No. 31270990; 高等学校学科创新引智计划 (“111 计划”), No. B06023; 重庆大学大型仪器设备开放基金)

人胚胎干细胞力学应答机制的研究

王家文, 吕东媛, 张 帆, 龙 勉*

中国科学院微重力重点实验室, 中国科学院力学研究所生物力学与生物工程中心;
中国科学院力学研究所工程化构建与力学生物学北京市重点实验室, 北京 100190

* E-mail: mlong@imech.ac.cn; Tel: 010-82544131

目的:胚胎干细胞 ESC 具有自我更新能力并能分化为内胚层、中胚层和外胚层细胞, 可用作研究胚胎和原肠形成等发育过程的模型, 而且在再生医学、药物研发和体外毒理学的研究过程具有重要的作用。在胚胎发生时, 除了生化因素外, 细胞还会受到流体剪切、拉伸、压缩等各种力学的作用, 且力学刺激具有不同的振幅、频率、时间、模态等参数。上述力学因素与生化因素协同作用, 可调控单个 ESC 细胞形成原肠, 最终转化为具有内胚层、中胚层和外胚层结构的胚胎。现已知细胞形状、RhoA 信号通路和骨架张力能使 ESC 对力学刺激做出应答, 但尚不清

这些调控因素是否会收敛于单个力学敏感的细胞结构或分子,对其力学应答的整体规律也不清楚。基于此前提出的“力学组学”思想,尽可能在体外重现细胞受到的生理力学刺激,从系统角度重点回答 ESC 对力学刺激应答机制的科学问题。方法:采用平板流动腔和 Flexcell 细胞张应变加载系统对人胚胎干细胞 H1 施加力学刺激(流体剪切振幅为 0.1、1.1 Pa,频率为 0、1 Hz,时间为 1、24 h,拉伸振幅为 20%,模态为连续拉伸和间歇拉伸,时间为 1、12 h),iTRAQ 蛋白质组学技术检测不同刺激下的蛋白质组变化。Western 及生物信息学方法对 iTRAQ 数据进行验证和分析。形态学观察法确定细胞表型变化。结果:iTRAQ 实验具有很好的技术重复性和生物学重复性,与 Western 结果一致性为 70%;在分子水平上,16 种刺激条件下共同鉴定到了 1 178 种蛋白质,其中有 60 种可同时对流体剪切和力学拉伸做出应答,且在基因组上分布均匀,刺激类型的影响最大;在细胞水平上 H1 集落在各种流体剪切下均呈现出面向来流的极性。结论:在分子水平上,ESC 细胞可以对不同拉伸刺激和流体剪切刺激做出共同应答,在细胞水平上可对不同模态流体剪切刺激做出应答,提示 ESC 中可能存在保守的力学信号转导通路、收敛于某些蛋白质分子,并表现出相应的表型。(国家自然科学基金资助项目, Nos. 31110103918, 31230027, 31470907;国家重点基础研究发展计划, No. 2011CB710904;中国科学院先导专项, No. XDA01030604;国家高技术研究发展计划, No. 2011AA020109)

白细胞表面 L-选择素实时水解动力学理论与实验研究

彭爽, 吕守芹, 龙勉*

中国科学院微重力重点实验室,中国科学院力学研究所生物力学与生物工程中心,
中国科学院力学研究所工程化构建与力学生物学北京市重点实验室,北京 100190

* E-mail: mlong@imech.ac.cn; Tel: 010-82544131

炎症反应过程中,血流下白细胞的跨内皮细胞转移过程主要由选择素、整合素与其配体之间的相互作用协同介导。其中,选择素-配体相互作用主要介导白细胞的捕获和滚动。作为选择素家族成员之一,表达在白细胞表面的 L-选择素一方面介导白细胞滚动,同时由于炎症因子导致的白细胞激活而引发其水解,进而调控其生物学功能。虽然已有研究考察了完全水解后 L-选择素-配体的相互作用,然而 L-选择素水解动力学过程如何,其在水解过程中如何调控与配体相互作用的反应动力学等尚不明确;另外,由于水解作用,生理环境中存在膜表达与可溶性两种 L-选择素,两者之间存在竞争,但内在竞争机制研究较少。

基于此,采用实验与理论相结合,对 L-selectin 实时水解对其与配体相互作用反应动力学特征进行研究。在实验方面,分别基于 Jurkat 细胞系与实时分离人源 PMN 两种细胞体系,针对 PMA 与 FMLP 两种不同水解刺激剂,首先采用流式细胞仪技术定量测量了不同刺激剂条件下,L-选择素水解的时间和浓度依赖性。然后采用微管吸吮技术(MAT),测量了在三维可溶性 L-选择素竞争条件下,Jurkat 或 PMN 膜表面表达的 L-选择素与配体 PSGL-1 的相互作用反应动力学,并考察了不同接触时间的调控规律。在理论方面,基于已有二维三维竞争理论模型,耦合实时水解作用对 L-选择素表达的影响,对 MAT 的实验结果进行数值拟合计算,获得 L-选择素与其配体随水解作用时间变化的反应动力学参数。结果显示,L-选择素-PSGL-1 相互作用的零力负反应率最初随水解时间而升高,然后达到平台,初步验证了二三维竞争理论模型的正确性和适用性。本文工作一方面为深入理解 L-选择素水解的机制及生物学功能提供基础数据,另一方面为认识其他细胞黏附分子的水解机制提供参考。(国家自然科学基金资助项目, No. 31230027;国家重点基础研究发展计划项目, No. 2011CB710904;中国科学院科研装备项目, No. Y2010030)