

# 机械拉伸对血管平滑肌细胞粘附及生长的影响\*

王红兵\*\* 黄岂平 卢晓 秦建 王远亮 蔡绍哲

(重庆大学生物工程学院, 生物力学与组织工程教育部重点实验室, 重庆 400044)

**摘要** 通过自行研制的“四点弯曲梁”实验装置对血管平滑肌细胞 (VSMC) 加载培养, 并结合显微形态观察和计算机图像处理系统测量细胞铺展投影面积、微管吸吮实验系统检测细胞与表面的粘附力、 $\alpha$ -肌动蛋白 (actin) 免疫组化试验, 了解细胞骨架发育和排列取向、流式细胞仪检测细胞动力学以及细胞生长行为等认识 VSMC 对应变刺激响应。发现 VSMC 粘附铺展与实验时间正相关, 细胞粘附力、铺展面积、单位面积粘附力 4 h 后实验组与对照组无显著性差异。VSMC 内  $\alpha$ -actin 发育随加载时间延长呈增加趋势。细胞动力学检测实验组加载 24 h 后 VSMC 增殖活动受到抑制。VSMC 可能通过调节细胞铺展行为、胞内应力纤维发育等主动机制, 实现对机械拉伸的适应性改建。应变刺激有利于体外培养的 VSMC 维持收缩表型。

**关键词** 血管平滑肌细胞, 应变, 粘附铺展, 粘附力, 表型

**学科分类号** Q24, Q66

细胞粘附铺展及其生长、分化可受诸多理化因素的调控, 其中力学因素对细胞上述生物学行为的影响, 已有报道<sup>[1-3]</sup>。Ruoslahti<sup>[1]</sup>指出, 拉伸细胞膜及其表面的受体可引起细胞形态和核位置变化, 从而影响细胞的生长。Chen 等<sup>[2]</sup>的实验表明, 细胞形态、铺展程度可影响细胞的基因表达, 甚至决定细胞生死。Ingber 等<sup>[3]</sup>认为细胞生长通常需要锚定在能承受细胞拉力的基质上, 拉长胞体和核。细胞在体外培养时, 其粘附、铺展行为是启动细胞生长、增殖程序运行的关键环节, 细胞粘附、铺展的活跃程度可多方面影响细胞的诸如发育、分泌和表型维持等生物学行为。细胞在体外加载培养时其粘附、生长行为均有改变, 对这些行为在应力条件下的定量描述、以及细胞粘附与胞内应力纤维发育和细胞动力学间相互关系的探索, 对认识应力与生长的关系有重要意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 VSMC 原代培养

成年 Wistar 大鼠 (鼠龄 1 月, 体重 85~99 g, 雌雄不限), 麻醉后无菌条件下取胸主动脉, 剥离出血管中膜剪成 1 mm<sup>3</sup> 大小, 采用组织贴块法进行血管平滑肌细胞 (VSMC) 培养。培养基为 DMEM/F<sub>12</sub> (1:1) 加胎牛血清 10%~20%。4~5 d 后 VSMC 从组织块边缘运动迁移出来, 7~10 d 细胞融合生长 (峰谷状)、VSMC  $\alpha$ -actin 免疫组织染色呈阳性反应。选取 5~15 代用于实验。

### 1.2 细胞加载实验

采用四点弯曲梁基底应变加载技术

**1.2.1 装置:** 加载系统由控制电路、线性伺服电机传动装置、培养器皿固定支座 (自制), 可弯曲的弹性长方形板 (梁) 以及在该板中央制成的细胞培养小室 (处于伸张变形区域) 等部分构成 (图 1)。

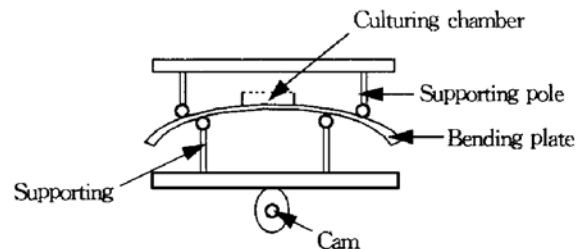


Fig. 1 Schematic diagram for four-point supporting bending system

该系统可以控制梁的弯曲变形, 并通过挠度变化使培养小室基底表面伸长变形, 牵张生长于器皿底部的细胞<sup>[4]</sup>, 使细胞处于周期性的牵张-回复作用中。由于四点弯曲梁结构的对称性, 板的两个作用点之间处于等弯区, 因此可保证细胞受到的牵张应变处处相等。其应变最大值的大小由下式给出:

\* 国家自然科学基金重点项目 (19732003)。

\*\* 通讯联系人。

Tel: 023-65102508, E-mail: bio@cqu.edu.cn

收稿日期: 2000-01-16, 接受日期: 2000-03-31

$$\epsilon_{\max} = \frac{tY}{s(L - 1.2s)}$$

式中  $t$  为梁的厚度,  $L$  为梁的长度,  $Y$  为梁的挠度,  $s$  为载荷作用点距梁支座处的距离.

**1.2.2 加载方法:** 根据实验需要预先调整计算好加载应变量, 该装置可实现 500  $\mu\epsilon$ 、1000  $\mu\epsilon$ 、1500  $\mu\epsilon$  三级加载. 板长 19 cm、厚 0.2 cm, 将 VSMC 悬液 ( $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ /ml) 接种于培养器皿内 (细胞小室直径 4 cm、高 0.5 cm), 2 h 后细胞粘附并部分铺展即可将培养器皿夹持于固定支座上进行加载实验. 本研究选择 500  $\mu\epsilon$  加载进行细胞与表面粘附力检测, 1500  $\mu\epsilon$  加载进行细胞动力学检测和  $\alpha$ -actin 免疫组化染色.

**1.3 细胞与表面粘附力测定**

**1.3.1 微管吸吮系统:** 微管吸吮实验系统<sup>[5,6]</sup>, 主要由显微镜 (Axiovert 35; Zeiss Co., 德国)、显微操作器 (MR5170; Eppendorf. Co., 德国)、时标发生器 (VTG-For A. Co., 日本)、录像机及监视器、图像处理仪 (Image Tool Vidas 21; Kontron Co., 德国)、负压吸吮系统 (包括水位瓶、微管零点调节器、步进电机、计算机等; 自制组成), 如图 2 所示. 实验用微管由内径 1.1 mm、长 100 mm 的玻璃毛细管在微管控制器 (P-87; Sutter Instrument Co., 美国) 上拉制成尖端管径 4~7  $\mu\text{m}$  大小的微管备用.

**1.3.2 测量粘附力的原理与方法:** 单微管测量细胞与基底间粘附力的原理是利用吸吮负压产生的牵引力与粘附力之间的平衡关系, 当牵引力等于粘附力时细胞与基底分离. 实验中首先将加载实验后的培养器皿固定在显微镜恒温载物台上确定待测细胞 (32x), 利用显微操作器把微管缓慢移向取定的 VSMC 表面与其轻轻接触, 然后产生一阶跃负压, 其大小约在  $10^{-10}\text{N}$  左右, 使细胞在微管内产生一个小幅度变形并封密管口, 以显微操作器缓慢侧向牵引细胞并逐步尝试加大吸吮负压, 直至细胞与粘附表面分离. 整个过程由录像机记录, 然后经图像处理系统测定几何参数 (图 2).

细胞在表面的粘附力由公式:  $F = \Delta P \times \pi(R_p)^2 \cos\theta$ , 计算其微管半径为  $R_p$ 、细胞与粘附表面分离的临界负压为  $\Delta P$ ,  $\theta = 15^\circ$ ,  $\cos\theta \approx 0.966$ .

**1.3.3 细胞铺展投影面积测量:** 采用计算机图像处理系统 (Image Tool, NIH) 测量细胞粘附投影面积. 即以灰度值为依据勾廓出粘附细胞的边界, 并由分析软件自动计算出投影面积, 从而可以计算

得到单位投影面积的粘附力.

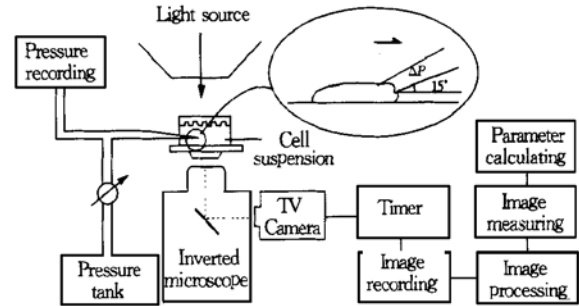


Fig. 2 Schematic diagram for micropipette aspirating system

**1.4  $\alpha$ -actin 免疫组化染色**

使用抗  $\alpha$ -actin 一抗 (mouse, Neomarkers, USA) 和二抗试剂盒 (LAB Vision corporation, USA). 具体操作见参考文献 [7].

**1.5 细胞动力学检测**

使用流式细胞仪 (FACS Calibur, Becton Dickinson Co., USA) 对细胞动力学进行检测. 每 50 万个细胞用 50 mg/L PI, 20 mg/L RNA 酶染液 0.5 ml 处理.

**2 实验结果**

**2.1 VSMC 粘附、铺展、单位面积粘附力时间的变化**

加载 1 h VSMC 加载组粘附力与对照组无显著差异, 而粘附面积明显小于对照组, 单位面积粘附力明显高于对照组; 加载 2 h 细胞粘附力增加, 同时铺展面积增大, 单位面积粘附下调; 加载 4 h VSMC 粘附力、铺展面积及单位面积粘附力与对照组均无显著差异. 实验结果表明 VSMC 粘附、铺展在 4 h 以后与加载时间正相关 (图 3a、b、c).

**2.2 VSMC 胞内  $\alpha$ -actin 发育随加载时间的变化**

从加载 24 h 到 96 h VSMC 胞内  $\alpha$ -actin 含量明显增加, 且较对照组发育快, 加载 96 h 后 VSMC 胞体明显小于对照组, 局部细胞取向趋于一致, 而对照组细胞排列呈无序状态  $20 \times$  (图 4a、b、c).

**2.3 加载时间对 VSMC 细胞动力学影响**

加载 24 h 实验组 G0-G1: 71.99%、G2-M: 17.71%, S: 10.30%, G2/G1: 1.88, 细胞分裂指数 0.39 (G2-M% + S%/G0-G1%). 对照组 G0-G1: 67.19%, G2-M: 15.24%, S: 17.57%, G2/G1: 1.92, 细胞分裂指数 0.48. 实验组细胞增殖略受抑制 (图 5a、b).

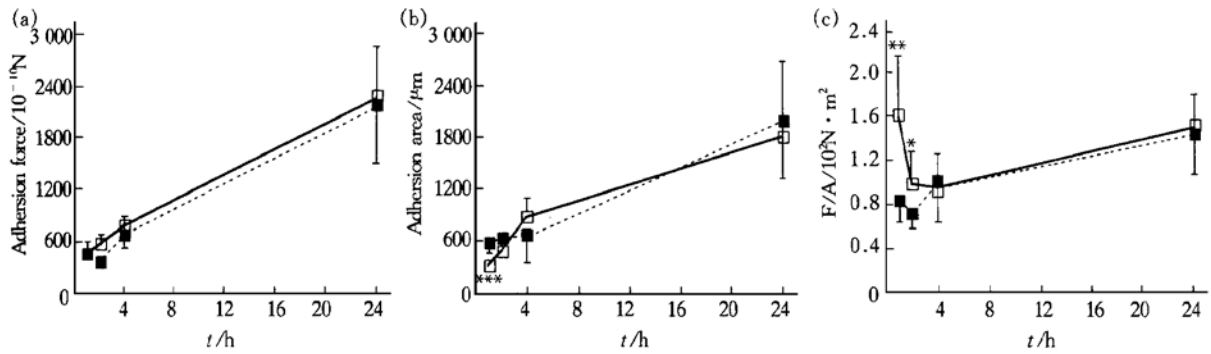


Fig. 3 Time dependence of adhesive force, adhesive projected area and adhesive force per projected area for VSMCs stretched by cyclic tension

□—□: Sample; ■—■: Control. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

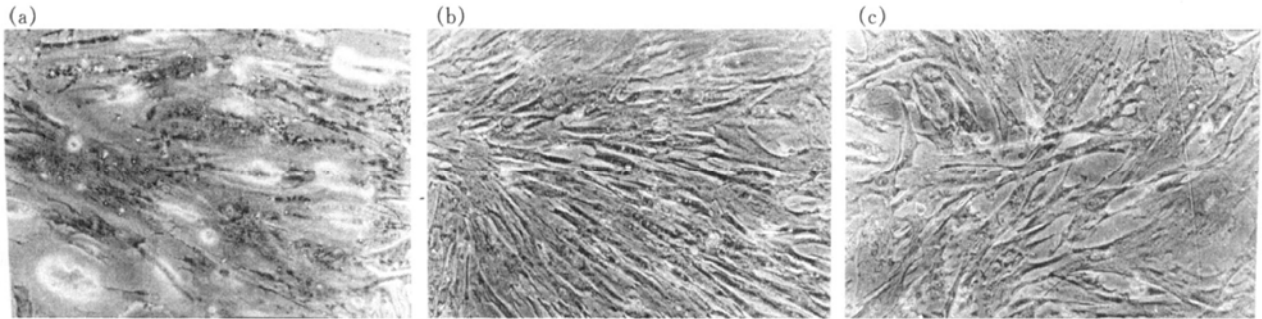


Fig. 4 Immunofluorescence of  $\alpha$  actin in stretched VSMC

(a) Stretched for 24 h; (b) Stretched for 96 h; (c) Control for 96 h. (300 $\times$ )

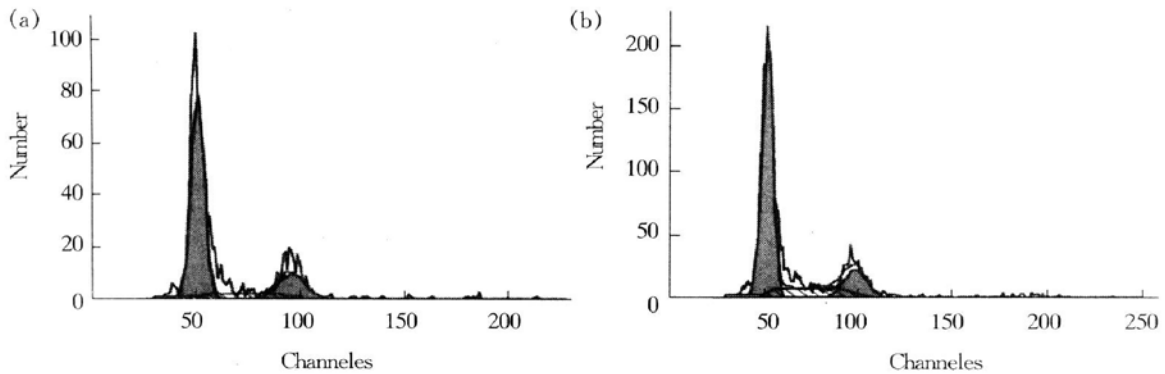


Fig. 5 FACS analysis for VSMCs without being stretched and for ones after being stretched for 24 hours

(a) Stretched for 24 h; (b) Control for 24 h.

### 3 讨 论

本实验装置实现的对 VSMC 应变刺激为 500~1 500  $\mu\epsilon$ , 在体 VSMC 受到的拉伸应变为 10%~12%, 我们选择较小的应变是为了考查 VSMC 粘附、铺展、生长、表型发育对机械拉伸刺激的敏感性及其早期的适应性反应过程。

细胞的粘附、铺展是一个相当复杂的过程, 需要细胞骨架、细胞膜和粘附系统的共同作用. 整合素蛋白<sup>[8]</sup> (integrin) 是介导细胞和细胞外基质粘

附的主要细胞表面受体家族, 整合素蛋白与胞外配体结合时形成粘着斑 (focal adhesion), 整合素本身易聚集在粘着斑部位, 同时将细胞外基质蛋白连接到胞内细胞骨架蛋白. 许多酶及能量转换和细胞生长的物质, 以物理方式被固定在细胞支架上, 粘着斑处包含大量信号传递的级联物质, 如酪氨酸激酶、蛋白激酶 C、 $Ca^{2+}$ -依赖性蛋白酶以及不同的原癌基因和癌基因的产物<sup>[9]</sup>. 由粘附系统连接细胞内外骨架形成的物质连接, 提供了分子水平上使力学和生物化学整合的可能. 研究表明, 加载 1

~ 4 h VSMC 表现出活跃的粘附铺展调整, 特别是加载初期 1 h 内, VSMC 粘附 (投影) 面积减小, 单位投影面积粘附力较对照组明显升高, 可能是由于局部粘附斑密度增加或局部粘附分子结合力增强所致, 但其确切机制还缺乏直接的实验证据. 加载 4 h 后 VSMC 粘附、铺展及单位面积粘附力与对照组均无显著差异, 表明细胞已对加载产生适应. VSMC 生长环境自始至终存在力学的影响, VSMC 通过一些主动机制响应应力应变刺激并达到一平衡状态, 符合生物体对外环境具备适应能力的普遍规律. 在体动物实验也证明血流量改变可引起动脉重建、半径随着血流量的增加而增大, 即产生适应性变化<sup>[10]</sup>.

加载 24 h 后细胞动力学检测表明, 细胞分裂指数加载组 (0.39) 小于对照组 (0.48) 预示出现一定程度的生长抑制. 文献报道, 拉伸 (基底膜伸长比 27%) 对动脉平滑肌细胞增殖无明显影响, 而可致静脉平滑肌细胞增殖加快<sup>[11]</sup>. Kulik 等<sup>[12]</sup>报道 0.33~ 0.5 Hz, 10%~ 20% 应变对羊肺动脉平滑肌细胞的增殖无影响. 压力超载下血管构型发生改建, 即出现 VSMC 增殖和 VSMC 重排<sup>[13]</sup>. 是否是超出生理范围的加载可致 VSMC 增殖, 小于生理范围的机械拉伸对 VSMC 生长抑制的影响, 还有待于进一步的实验验证. 但实验组在  $\alpha$ -actin 发育上表现出的明显变化, 说明 VSMC  $\alpha$ -actin 发育对机械拉伸刺激很敏感.  $\alpha$ -actin 为收缩表型平滑肌细胞的特征结构<sup>[14]</sup>, 其发育加快, 预示机械拉伸促使 VSMC 趋于成熟表型. Sumpio<sup>[4]</sup>对圆形培养板上生长的 VSMC 施以应变 24% 的交变刺激 3 d, 发现细胞取向在圆形培养板边缘呈周向排列即与应变方向垂直. 本研究发现实验组与对照组在 4 倍光镜下取向无倾向性. 但局部细胞 (细胞集落或相邻细胞群), 加载组  $\alpha$ -actin 取向较一致, 而对照组呈无序状态 (图 4a、b). 以生长灶为中心而发育起来的细胞集落或细胞群, 其  $\alpha$ -actin 发育、取向与它们共同的生长行为及细胞间的通讯联系可能存在某种关系.

**致谢** 在本文撰写和数据处理过程中得到了龙勉教授的悉心指导和帮助, 深表感谢.

## 参 考 文 献

- 1 Ruoslahti E. Stretching is good for a cell. *Science*, 1997, **276** (30): 1345~ 1346
- 2 Chen C S, Mrksich M, Huang S, *et al.* Geometric control of the life and death. *Science*, 1997, **276** (30): 1425~ 1428
- 3 Ingber D E. The structure of life. *Science*, 1998, **278** (1): 30~ 39
- 4 Sumpio B E, Banas A J. Response of porcine aortic smooth muscle cells to cyclic tensional deformation in culture. *J Surg Res*, 1988, **44** (6): 696~ 701
- 5 龙 勉, 吴泽志, 王红兵. 肝细胞粘弹性实验研究. *生物物理学报*, 1996, **12** (1): 169~ 173  
Long M, Wu Z Z, Wang H B. *Acta Biophysica Sinica*, 1996, **12** (1): 169~ 173
- 6 吴泽志, 邵开峰, 宋关斌. 肝癌细胞在 IV 型胶原被衬表面的粘附特性. *中华医学杂志*, 1999, **79** (5): 369~ 372  
Wu Z Z, Shao K F, Song G B. *Natl Med J China*, 1999, **79** (5): 369~ 372
- 7 Bochaton-piallat M L, Gabbiani F, Gabbiani G. Heterogeneity of rat aortic smooth muscle cell replication during development: Correlation with replicative activity after experimental endothelial denudation in adults. *J Submicro Cytol Pathol*, 1994, **26** (1): 1~ 8
- 8 傅 剑, 查锡良. 整合蛋白介导的信号转导研究进展. *生命的化学*, 1996, **16** (4): 23~ 26  
Fu J, Za X L. *Chemistry of life*, 1996, **16** (4): 23~ 26
- 9 Avri Ben-Zé ev. The relationship between gene expression and morphological change of animal cells. *Review of Biology*, 1991, **13** (5): 207~ 212
- 10 Kamiya A, Togawa T. Adaptive regulation of wall shear stress to flow change in the canine carotid artery. *Am J Physiol*, 1980, **239** (1): H19~ 21
- 11 Dethlefsen S M, shepro D, D'Amore P A. Comparison of the effects of mechanical stimulation on venous and arterial smooth muscle cells in vitro. *J Vasc Res*, 1996, **33**: 405~ 413
- 12 Kulik T J, Alvarado S. Effect of stretch on growth and collagen synthesis in cultured rat and lamb pulmonary arterial smooth muscle cell. *Journal of Cellular Physiol*, 1993, **157** (3): 615~ 624
- 13 Baumbach G L, Heistad D D. Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension. *Hypertension*, 1989, **13**: 968~ 972
- 14 宋 为. 血管平滑肌. 见: 韩启德, 文允镛主编. *血管生物学*. 北京: 北京医科大学和中国协和医科大学联合出版社, 1997. 6~ 17.  
Song W. *Vessel Smooth Muscle*. In: Han Q D, Wen Y Y, eds. *Vascular Biology*. Beijing: United Publication House of Beijing University of Medical Sciences & Chinese Union University of Medical Sciences, 1997. 6~ 17.

## The Effects of the Mechanical Stretch on the Adhesion and Growth of Vascular Smooth Muscle Cells *in vitro*\*

WANG Hong-Bing<sup>\*\*</sup>, HUANG Qi-Ping, LU Xiao, QIN Jian, WANG Yuan-Liang, CAI Shao-Xi  
(Bioengineering College at Chongqing University, Key Laboratory for Biomechanics and Tissue Engineering under Ministry of Education, Chongqing 400044, China)

**Abstract** An *in vitro* model was built for researching the effects of strain on vascular smooth muscle cells (VSMCs). The cultured VSMCs was stretched by four-support-bending-beam system, then the project area of cells was measured by computer-image-processing, the adhesion force was measured by micropipette-aspirating system, the  $\alpha$ -actin of VSMCs was distinguished by immunocytochemistry and the dynamic of VSMCs was determined by FCM. The results show that: (1) The adhesion force of VSMCs is positively related to time. The adhesion force of unit area is indistinct after stretched for four hour. (2) The amount of  $\alpha$ -actin increases with stretching time. (3) The proliferation of VSMCs is a little inhibited by stretched 24 h. These results suggest that the VSMCs *in vitro* could adjust their behaviours to adapt the tension.

**Key words** vascular smooth muscle cell, stress and strain, adhesion and spread, adhesion force, phenotype

\* This work was supported by a grant from National Natural Sciences Foundation of China (Stress-Growth Relationship of cells and Living Tissues, 19732003).

\*\* Corresponding author. Tel: 86-23-65102508, E-mail: bio@cqu.edu.cn

Received: January 16, 2000 Accepted: March 31, 2000

## “遗传与环境学术研讨会” 征文通知

为了探讨环境因素对遗传变异的影响及基因工程对环境的影响,改善人类生存质量,中国遗传学会《遗传》编辑部与广东省遗传学会将于2001年5月在人类最佳居住城市珠海举办“遗传与环境学术研讨会”。本次会议由广东省珠海市环保局、市教委协办,会议的主题是“生命·遗传·环境·教育”。欢迎遗传学、卫生学、环境科学及有关方面的教育工作者参加会议。

**1. 征文范围** (1) 遗传、环境与健康; (2) 转基因产品的安全性; (3) 基因工程在环保中的应用; (4) 环境因素对基因表达调控的影响; (5) 理化诱变育种; (6) 环境诱变因素的致癌、致畸、致突变作用; (7) 遗传学教育中涉及的遗传与环境问题; (8) 遗传与环境科学中的新技术、新方法; (9) 其他有关问题。

**2. 征文要求** 每篇征文稿件 3000~5000 字,题目要简明扼要,正文前附 300 字左右的摘要和 3~5 条关键词,可附图、表。请注明基金资助项目的名称、资助号以及第一作者简介,并在第 1 页左上角注明“征文”字样。请用 A4 纸打印,一式 2 份,免收审稿费。征文截止日期: 2001

年 4 月 1 日。

经审阅,优秀论文颁发证书,安排在大会和分组会上宣读。全部征文的摘要汇编成会议文集,部分论文推荐到《遗传》、《遗传学报》、《应用与环境生物学报》、《激光生物学报》、《癌变·畸变·突变》和《环境科学》等刊物选用。

**3. 会议费用** 会议日期为 2001 年 5 月上旬,会期 4 天,到会代表每人收会议费 400 元,住宿费每天 100 元左右。

**4. 报名办法** 有无论文均可报名参会,均需预交报名费 100 元,收款后即寄收据和第一轮通知,按报名顺序于 2001 年 4 月发出第二轮通知。公司参展费 3000 元,凡参会者赠送 2001 年度《遗传》杂志一套。征文及报名费请寄:

邮编: 100101; 地址: 北京市安外大屯路 917 大楼  
中国科学院遗传所《遗传》编辑部; 收件人: 李绍武。电话: 010-64889348

中国遗传学会《遗传》编辑部 广东省遗传学会