

研究论文

小鼠正常肺细胞和肺癌细胞之间的力学特性比较研究

牛庆元 张晶晶 纪珍玲 李建亭 马德顺*

(沈阳大学生命科学与工程学院, 沈阳 110044)

摘要 该实验通过鬼笔环肽染色技术观察并比较了小鼠正常肺细胞和肺癌细胞的微丝差异, 利用荧光抗体染色技术测定了小鼠单个正常肺细胞和肺癌细胞的 α -SMA蛋白含量变化, 以及利用CTFM法测定了小鼠正常肺细胞和肺癌细胞的牵引力变化。结果发现, 小鼠肺细胞癌变后, 细胞内微丝骨架发生了变化, 影响了细胞的形态; α -SMA蛋白含量明显下降并且变得分散; 细胞投影面积显著减少, 大约减少27%, 细胞牵引力也显著减小, 均方根值大约减少49%。这说明细胞骨架、细胞的形态、 α -SMA蛋白和细胞牵引力均与细胞的癌变过程密切相关。

关键词 小鼠肺细胞; 小鼠肺癌细胞; 细胞微丝; 细胞牵引力

Comparative Study on the Mechanical Characteristics of the Mice Lung Cells and Lewis Lung Carcinoma

Niu Qingyuan, Zhang Jingjing, Ji Zhenling, Li Jianting, Ma Deshun*

(College of Life Science and Engineering of Shenyang University, Shenyang 110044, China)

Abstract In this article, we observed and compared the microfilament differences with phalloidin staining technology, determined the α -SMA protein changes of single cell with fluorescent antibody staining technology, and researched the changes of the cell traction force with CTFM (Cell Traction Force Microscopy) method between the mice lung cells and lewis lung carcinoma. The results showed that the microfilament in lewis lung carcinoma changed, and the cell morphology was also affected. α -SMA protein was significantly decreased and dispersed; The cell projection area was significantly reduced by roughly 27%, and the cell traction force was significantly reduced (RMS was reduced by roughly 49%) in lewis lung carcinoma. These results suggest that the cell skeleton, cell morphology, α -SMA protein and cell traction force are closely related to the process of canceration.

Key words mice lung cells; lewis lung carcinoma; microfilament; cell traction force

细胞内存在力学调控机制^[1], 在细胞的生长和发育过程中, 在细胞内肌球蛋白的相互作用和肌动蛋白的聚合作用下产生应力^[2-4], 并通过黏着斑施加给细胞外基质^[5-7], 对细胞外基质产生一个作用力,

即牵引力。它对细胞的伸展、拖曳、移动及信号传导具有重要影响^[8-10]。研究发现, α -SMA是细胞牵引力的重要调节因子, 它的表达可调节细胞牵引力的变化^[11-12], α -SMA表达水平和细胞牵引力大小之间

收稿日期: 2013-09-13 接受日期: 2013-11-28

沈阳市引智计划(批准号: D20102101006)资助的课题

*通讯作者。Tel: 024-62269936, E-mail: 1328068930@qq.com

Received: September 13, 2013 Accepted: November 28, 2013

This work was supported by the Programme of Introducing Talents of Discipline of Shenyang (Grant No.D20102101006)

*Corresponding author. Tel: +86-24-62269936, E-mail: 1328068930@qq.com

网络出版时间: 2014-03-03 12:16

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.03.0297.html>

存在正相关性^[13]。细胞的癌变和转移与牵引力也有关系, Wottawah等^[14]在研究中发现细胞牵引力在肿瘤诊断方面具有重要意义, 康奈尔大学的学者也发现在癌细胞转移前后牵引力有明显的变化^[15], 马德顺等^[16]发现人的干细胞经过分化后牵引力将减小, 不同种类、不同形态、不同发育阶段的细胞其牵引力也不同^[10,17]。目前, 该领域正逐步成为生物力学研究的热点^[16,18-20], 现在学者们对于细胞牵引力的研究已经有了很大进展, 但对于单个细胞的 α -SMA蛋白和微丝等因素在癌变前后的观察还未见报道。

肺癌是常见的死亡率最高的恶性肿瘤之一, 其中非小细胞肺癌(non small cell lung cancer)占80%以上^[21]。而肺泡II型上皮细胞在肺发育和肺功能调节中起重要作用, 它与肺纤维化和肺癌等疾病的发生发展有密切联系, 所以本实验采取鬼笔环肽染色技术和荧光抗体染色技术观察了小鼠正常肺细胞(以下均指肺泡II型上皮细胞)和肺癌细胞的内部构象及 α -SMA蛋白含量变化, 并用CTFM(Cell Traction Force Microscopy)法^[3]测定了小鼠正常肺细胞和肺癌细胞的细胞牵引力变化, 旨在探讨癌变对小鼠肺细胞的力学特性和细胞内部构象及 α -SMA的影响。

1 材料与方法

1.1 Lewis肺癌细胞株和实验材料

Lewis肺腺癌细胞株(LLC, 来源于C57BL/6小鼠的肺腺癌细胞)由中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心提供; C57BL/6小鼠(6-8周龄)购自沈阳医学院动物实验中心; 实验条件符合SPF要求, 所有物品均经高压灭菌。DMEM培养液购于Invitrogen公司, 犊牛血清购于德国Biochrom公司, 抗体及鬼笔环肽购于Sigma公司。

1.2 细胞培养

1.2.1 小鼠肺肿瘤细胞的建模与培养 取Lewis肺癌细胞株, 制备细胞浓度为 5×10^6 /mL的细胞悬液备用, 按0.2 mL(5×10^6 /mL)的量接种于C57BL/6小鼠前肢部皮下。待成瘤后取注射的小鼠脱臼致死, 无菌条件下分离瘤体, 磷酸盐缓冲液冲洗后剪碎, 用0.25%的胰酶溶液清洗一次, 然后继续用0.25%的胰酶在37 °C下搅动消化10~20 min, 用等量的含10% FBS的DMEM培养基终止消化, 200目筛网过滤后, 1 500 r/min低温离心5 min, 去上清, 加入培养基吹打, 接种于培养瓶, 置于5% CO₂、37 °C培养箱中培养。

培养前10 d细胞缓慢增殖, 每3 d半量换液, 在第20 d时观察到有小的细胞集落, 34 d时集落明显增多, 42 d时传第一代, 以后每3~4 d传代一次^[21-24], 备用。

1.2.2 正常肺细胞培养 取出小鼠正常肺组织, 在预冷的PBS液中尽量除去气管、支气管、血管组织, 将小鼠肺组织上面的血污用PBS清洗后, 剪成1 mm³小块, 用0.25%的胰酶溶液清洗一次, 继续用0.25%的胰酶在37 °C下搅动消化10~20 min。之后加入等量的含有10% FBS的DMEM培养基终止消化, 200目筛网过滤后, 1 500 r/min低温离心5 min, 去上清, 再将沉淀加入0.1% I型胶原酶在37 °C下消化10~20 min, 加入含有10% FBS的DMEM培养基终止消化, 1 000 r/min离心5 min。将细胞悬液接种于培养瓶中, 置37 °C、5% CO₂的培养箱中培育40 min, 此时贴壁的为成纤维细胞, 悬浮的多数为肺泡II型上皮细胞和其他杂细胞。将培养液吸出置于另一瓶中, 继续在培养箱中培育40 min, 反复2~3次, 最后吸出培养液, 800 r/min离心5 min, 去上清, 用含10% FBS的DMEM培养基重悬沉淀细胞。接种于培养瓶置37 °C、5% CO₂的培养箱中培育, 留少量细胞做免疫化学实验, 用鼠抗SP-C为一抗, Alexa Fluor 594标记的山羊抗小鼠IgG为二抗, 确认为肺泡II型上皮细胞后备用^[25]。

1.3 鬼笔环肽染色

细胞在盖玻片培养至密度达70%~80%后取出, 用PBS轻柔洗涤。3.7%的甲醛-PEMD固定10 min, PBS洗去固定液, 略干燥后滴0.1% TritonX-100处理10 min, PBS稍洗, 加入20 μ L 5 μ g/mL鬼笔环肽染液到清洁载玻片上, 将盖玻片上细胞样品反扣其上, 避光染色40 min。取出后用PBS和蒸馏水冲洗, 显微镜下观察。

1.4 荧光抗体染色技术检测蛋白

细胞在盖玻片培养至密度达70%~80%后取出, 用PBS清洗细胞3次。用3.7%的甲醛-PEMD固定10 min, PBS洗去固定液, 用0.1% TritonX-100对细胞进行通透10 min, PBS洗涤。使用山羊血清对细胞进行封闭30 min。一抗结合, 一抗选用鼠抗 α -SMA特异蛋白。放入冰箱中过夜, 取出用PBS清洗。二抗选用 Alexa Fluor 594标记山羊抗小鼠IgG, 避光的室温条件下培养2 h。分别用PBS清洗三次和蒸馏水洗一次。用缓冲甘油进行封片, 显微镜下观察。

1.5 细胞牵引力测算

1.5.1 CTFM技术 CTFM即显微镜追踪法测定细

胞牵引力技术,其基本原理是根据细胞基质弹性表面形变程度来测算细胞牵引力的一种技术。其简要操作步骤如下:制备相应硬度的弹性基质,掺入荧光微珠,先用普通光源拍摄细胞,再用绿色荧光拍摄有细胞的基质图片,加入2滴1 mol/L氢氧化钠杀死细胞后再拍摄一张基质图片,分别进行编号以进行分析。详见参考文献[3]。

1.5.2 细胞种植 取预测细胞,用胰酶处理后获得悬浮细胞,经离心弃胰酶溶液后加入新培养液,取50 μ L细胞液,约含1 500~2 000个细胞,种在弹性基质上,待细胞贴壁后补充3 mL培养液,培养6 h左右,测定细胞牵引力。详见参考文献[3]。

1.5.3 图像信息的分析处理 用MATLAB7.0软件运行专用程序对图片进行比较分析,测算出各个细胞的牵引力及其相关参数。将实验数据用SPSS软件进行分析求出平均值和标准方差,并用*k-s*检验和*t*检验功能对数据进行验证。详见参考文献[3]。

2 结果

2.1 微丝的变化

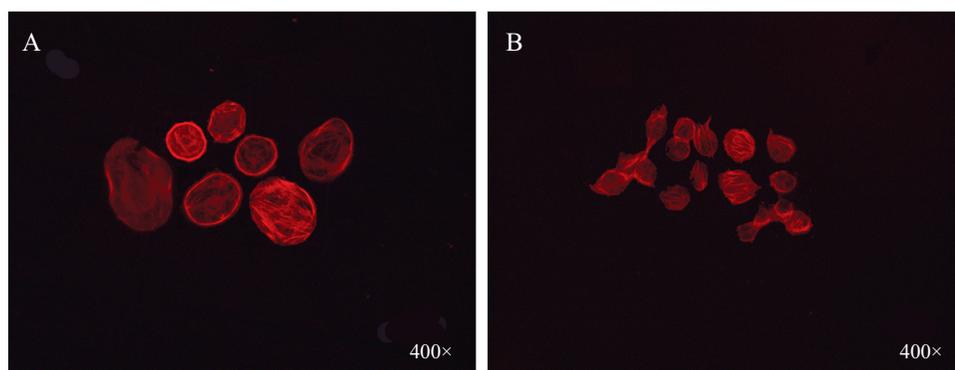
在本实验中利用鬼笔环肽对小鼠正常肺细胞和肺癌细胞进行染色,发现小鼠肺癌细胞较正常肺细胞的微丝明显变粗(图1),并呈现不规则的排布。

2.2 α -SMA蛋白的变化

利用荧光抗体技术,应用间接荧光染色法对小鼠正常肺细胞和肺癌细胞的 α -SMA蛋白含量进行测定,用荧光倒置显微镜对小鼠正常肺细胞和肺癌细胞的蛋白含量的表达进行观察,可以看到图片中红色荧光部分即为小鼠正常肺细胞和肺癌细胞蛋白的表达,发现正常小鼠肺细胞的蛋白表达比较密集,而肺癌细胞的蛋白变得分散,且 α -SMA蛋白含量明显少于正常肺细胞(图2)。

2.3 细胞牵引力的变化

采用CTFM法对小鼠正常肺细胞和肺癌细胞的牵引力进行测量。测得小鼠肺癌细胞的牵引力较正

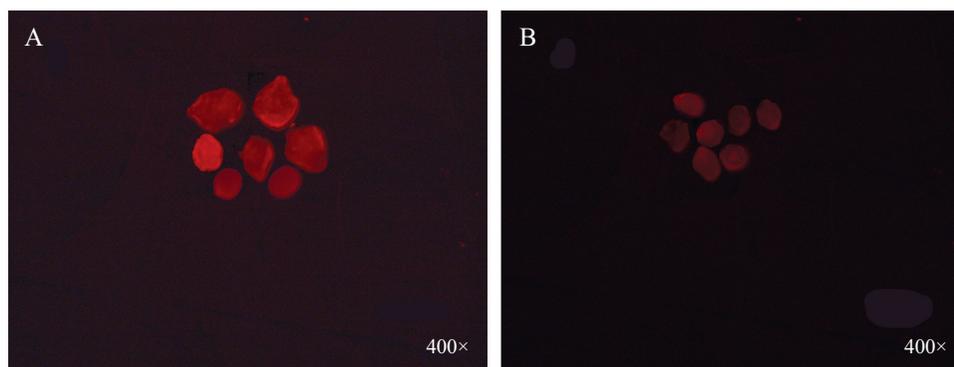


A: 小鼠正常肺细胞; B: 小鼠肺癌细胞。

A: mice lung cells; B: lewis lung carcinoma.

图1 小鼠正常肺细胞和肺癌细胞的微丝变化

Fig.1 The microfilament changes between the mice lung cells and lewis lung carcinoma



A: 小鼠正常肺细胞; B: 小鼠肺癌细胞。

A: mice lung cells; B: lewis lung carcinoma.

图2 小鼠正常肺细胞和肺癌细胞中 α -SMA蛋白的表达变化

Fig.2 The α -SMA protein changes between the mice lung cells and lewis lung carcinoma

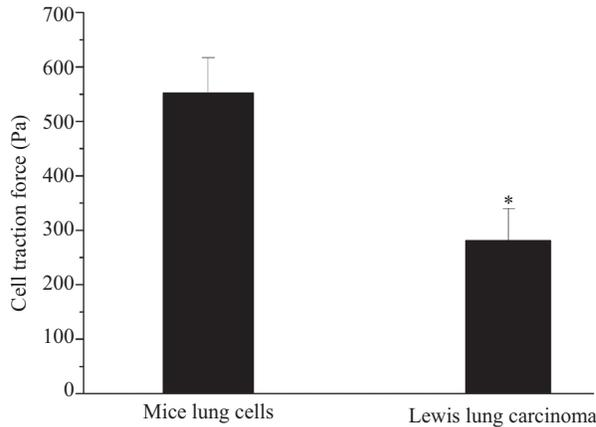


图3 小鼠正常肺细胞和肺癌细胞的牵引力变化比较($n=50$, $*P<0.05$)

Fig.3 The comparison of cell traction force generated between the mice lung cells and lewis lung carcinoma ($n=50$, $*P<0.05$)

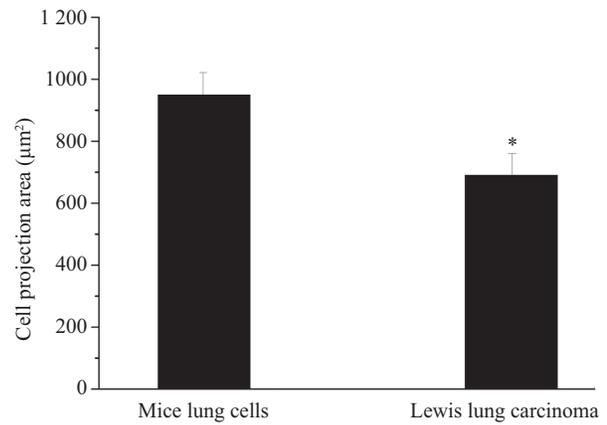
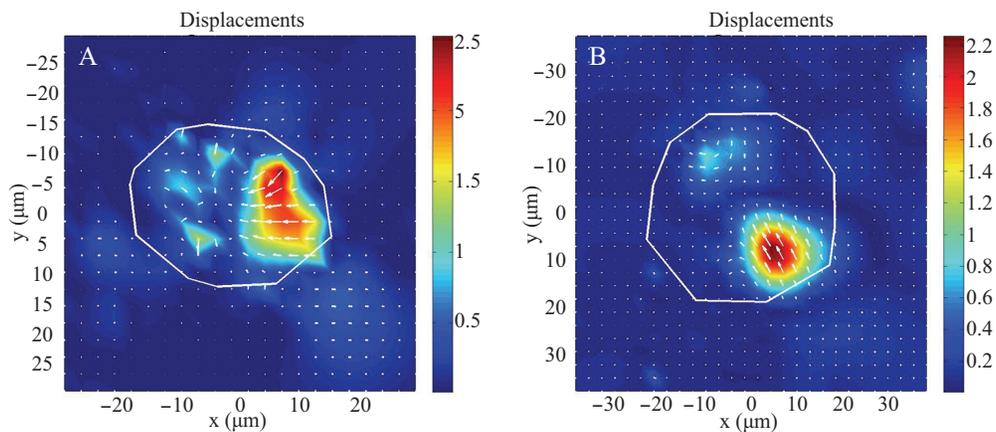


图4 小鼠正常肺细胞和肺癌细胞的投影面积变化比较($n=50$, $*P<0.05$)

Fig.4 The comparison of projected area generated between the mice lung cells and lewis lung carcinoma ($n=50$, $*P<0.05$)



A: 小鼠正常肺细胞; B: 小鼠肺癌细胞。

A: mice lung cells; B: lewis lung carcinoma.

图5 小鼠正常肺细胞和肺癌细胞在基质上的位移变化

Fig.5 The comparison of displacements generated between the mice lung cells and lewis lung carcinoma

常肺细胞变小, 平均值由552 Pa减少到281 Pa, 大约减少49%(图3), 经测算细胞投影表面积平均值由950 μm^2 减少到691 μm^2 , 大约减少27%左右(图4)。细胞在基质上产生的最大位移由2.5 μm 减少为2.2 μm (图5)。

3 讨论

细胞牵引力是由细胞内的肌球蛋白的相互作用和肌动蛋白的聚合作用产生的力^[2-4], 小鼠的肺癌细胞较正常肺细胞, 细胞内部的微丝骨架明显发生了改变, 说明微丝的变化导致了细胞外在形态的改变, 而形态的改变使癌细胞形成一个新的张力平衡, 即构成微丝、微管和中间纤维的蛋白的收缩程度也会发生变化, 进而导致了小鼠正常肺细胞和肺癌细胞的细胞牵引力的变化。而用荧光抗体染色技

术测定的 α -SMA蛋白含量, 小鼠的肺癌细胞较正常肺细胞的 α -SMA蛋白含量表达下降, 在细胞中的位置变得分散, 而且对应得出的小鼠肺癌细胞的细胞牵引力也在减少, 说明平滑肌肌动蛋白的表达影响了细胞牵引力, 和此前学者^[26]利用小鼠骨髓干细胞得出的 α -SMA蛋白减弱是导致细胞牵引力减弱的原因的结论相符, 也验证了 α -SMA蛋白的表达和细胞牵引力存在线性关系, 而 α -SMA蛋白表达量下降的原因还有待于进一步研究。综上所述, 小鼠的肺细胞癌变后, 细胞微丝、骨架和 α -SMA蛋白的表达都会受到影响, 进而会影响细胞牵引力的分布和大小, 这说明 α -SMA蛋白、细胞牵引力以及细胞微丝和骨架与细胞的癌变有着密切关系。下一步将对 α -SMA的调控基因与癌变的关系进行研究。

参考文献 (References)

- 1 Ananthkrishnan R, Ehrlicher A. The forces behind cell movement. *Int J Biol Sci* 2007; 3(5): 303-17.
- 2 Moustakas A, Souchelnyskiy S, Heldin CH. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci* 2001; 114(Pt 24): 4359-69.
- 3 Wang JH, Lin JS. Cell traction force and measurement methods. *Biomech Model Mechanobiol* 2007; 6(6): 361-71.
- 4 Munevar S, Wang Y, Dembo M. Traction force microscopy of migrating normal and H-ras transformed 3T3 fibroblasts. *Biophys J* 2001; 80(4): 1744-57.
- 5 Balaban NQ, Schwarz US, Riveline D, Goichberg P, Tzur G, Sabanay I, *et al*. Force and focal adhesion assembly: A close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol* 2001; 3(5): 466-72.
- 6 Beningo KA, Dembo M, Kaverina I, Small JV, Wang YL. Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts. *J Cell Biol* 2001; 153(4): 881-8.
- 7 Geiger B, Bershadsky A. Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13(5): 584-92.
- 8 Galbraith CG, Yamada KM, Sheetz MP. The relationship between force and focal complex development. *J Cell Biol* 2002; 159(4): 695-705.
- 9 Chen J, Li H, SundarRaj N, Wang JH. Alpha-smooth muscle actin expression enhances cell traction force. *Cell Motil Cytoskeleton* 2007; 64(4): 248-57.
- 10 Goffin JM, Pittet P, Csucs G, Lussi JW, Meister JJ, Hinz B. Focal adhesion size controls tension-dependent recruitment of alpha-smooth muscle actin to stress fibers. *J Cell Biol* 2006; 172(2): 259-68.
- 11 Hinz B, Dugina V, Ballestrem C, Wehrle-Haller B, Chaponnier C. Alpha-smooth muscle actin is crucial for focal adhesion maturation in myofibroblasts. *Mol Biol cell* 2003; 14(6): 2508-19.
- 12 Oliver T, Dembo M, Jacobson K. Traction forces in locomoting cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 1995; 31(3): 225-40.
- 13 Kong HJ, Polte TR, Alsberg E, Mooney DJ. FRET measurements of cell-traction forces and nano-scale clustering of adhesion ligands varied by substrate stiffness. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(12): 4300-5.
- 14 Wottawah F, Dietrich J, Schinkinger S, Lincoln B, Remmerbach T, Guck J. Mechanical properties of cells as diagnostic marker for oral cancer. *J Biomech* 2006; 39(0): 233.
- 15 Bogatkevich GS, Tourkina E, Abrams CS, Harley RA, Silver RM, Ludwicka-Bradley A. Contractile activity and smooth muscle alpha-actin organization in thrombin-induced human lung myofibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 285(2): 334-43.
- 16 马德顺, 高淑云, 路春霞, 易正鑫. 前交叉韧带干细胞分化后其牵引力的变化. *中国细胞生物学学报*(Ma Deshun, Gao Shuyun, Lu Chunxi, Yi Zhengxin. Variation in cell traction force of anterior cruciate ligament stem cells before and after differentiation. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2010; 32(4): 141-4.
- 17 Kawai-Kowase K, Sato H, Oyama Y, Kanai H, Sato M, Doi H, *et al*. Basic fibroblast growth factor antagonizes transforming growth factor-beta1-induced smooth muscle gene expression through extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathway activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(8): 1384-90.
- 18 周治国, 刘志文, 范哲意. 微悬臂阵列在细胞牵引力测量中的应用. *生物医学工程研究*(Zhou Zhiguo, Liu Zhiwen, Fan Zheyi. The application of microcantilever array for cell traction force measurement. *Journal of Biomedical Engineering Research*) 2009; 28(1): 121-4.
- 19 Zhang YH, Zhao CQ, Jiang LS, Dai LY. Substrate stiffness regulates apoptosis and the mRNA expression of extracellular matrix regulatory genes in the rat annular cells. *Matrix Biol* 2011; 30(2): 135-44.
- 20 Li B, James H-C Wang. Application of sensing techniques to cellular force measurement. *Sensors* 2010; 10(11): 9948-62.
- 21 Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, *et al*. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 2005; 55(1): 10-30.
- 22 陆燕蓉, 林苹, 张洁, 黄孝忠. 小鼠Lewis肺癌细胞株L3-8的建立及生物学特征. *实用癌症杂志*(Lu Yanrong, Lin Ping, Zhang Jie, Huang Xiaozhong. Establishment of C57BL mice lewis lung carcinoma cell line (L3-8) and its cellbiology character. *The Practical Journal of Cancer*) 1998; 13(3): 161-3.
- 23 刘馨, 伍治平, 左曙光, 周永春, 陈艳, 王熙才. 小鼠Lewis肺癌原位模型的构建. *中国肺癌杂志*(Liu Xin, Wu Zhiping, Zuo Shuguang, Zhou Yongchun, Chen Yan, Wang Xicai. Establishment of orthotopic lewis lung cancer model in mouse. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*) 2010; 13: 42-7.
- 24 彭鹏, 杜秀平, 宋玉华. 小鼠Lewis肺癌胸腔移植模型的建立. *东南大学学报*(Peng Peng, Du Xiuping, Song Yuhua. Study on establishing mice model of advanced lung cancer bearing lewis lung carcinoma. *J Southeast Univ (Med Sci Edi)*) 2008; 27(5): 340-3.
- 25 郑金旭, 黄振杰, 汤艳, 丁明. 构建原代分离培养与鉴定小鼠肺泡II型上皮细胞的方法及模型. *中国组织工程研究与临床康复*(Zheng Jinxu, Huang Zhenjie, Tang Yan, Ding Ming. Isolation, of type II alveolar epithelial cells from mice. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*) 2010; 14(15): 2761-4.
- 26 周历. 小鼠髌腱干细胞分化过程中的力学特性研究(硕士论文). 沈阳大学(Zhou Li. The study on mechanical characteristics of the process of patella tendon stem cell differentiation. *Shenyang University*) 2012.