

成梯度增加的流体流动剪切力促进明胶基底上人脐静脉内皮细胞粘附*

覃素华 潘君** 吴科达 王远亮 夏之宁 邓小燕 张伟 郝丽娜

(重庆大学生物工程学院 教育部生物力学与组织工程重点实验室 400044)

摘要 采用脉动平板流动腔(flow chamber)系统,研究了的单水平流动剪应力加载,和从5或7.5 dyne/cm^2 开始的成梯度增加至10或15 dyne/cm^2 的流动剪应力加载,在5h、10h、24h对生长在明胶基底上的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)粘附性的影响,探讨了梯度增加的流动剪切力加载对细胞粘附能力的促进作用。实验结果表明:与7.5 dyne/cm^2 的单一水平的加载相比,成梯度增加的流动剪切力可明显提高HUVEC在明胶基底上的粘附,增加HUVEC对流动剪应力的耐受程度,有利于引起HUVEC转变成与在体相同的形态和排列。

关键词 成梯度增加 流体流动剪应力 人脐静脉内皮细胞 粘附 平板流动腔

内皮细胞(endothelial cell, EC)粘附性的研究对心血管疾病的治疗具有重要的意义^[1,2]。在血管组织工程领域,EC与其生长基质之间具有良好的粘附性是成功构建组织工程血管的关键。研究表明,直接作用于血管内皮细胞层的流动剪切力与EC的粘附能力紧密相关,流动剪切力通过对细胞的形态、增殖、应力纤维的形成以及对其生理活动的影响来调节EC的粘附能力,一定水平的流动剪切力可以提高内皮细胞的粘附能力^[3,4]。本研究采用脉动平板流动培养系统对培养于明胶基质上的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)施加流动剪切力,探讨不同的剪切力对内皮细胞粘附的作用,期望寻找到可促进内皮细胞粘附的剪应力加载方式和水平,以便将来在血管组织工程研究中利用生物力学的手段,促进血管材料内皮层的形成,从而减少移植后血栓的发生率,提高血管移植物的远期通畅率。

1 材料和方法

1.1 流动培养系统的建立

流动培养系统由蠕动泵,灌注导管,储液瓶和流室组成,流室呈矩形,长(l)4.5cm,宽(w)1.5cm,高(h)0.02cm。流动剪切力(τ_w)计算公式^[5]:

$$\tau_w = (6\eta Q)/(h^2 w) \quad (w/h = 75 \gg 1),$$

其中 Q 为流动腔内的液体流量(ml/s),由蠕动泵转速及灌注管内径决定。 η 为液体粘度,本研究中 $\eta = 0.012 \text{ dyne/cm}^2$ (Low-Shear 30型粘度计测定)。

1.2 在明胶基质上种植人脐静脉内皮细胞

按文献[6]方法分离培养人脐静脉内皮细胞(Human umbilical vein endothelial cell, HUVEC), VIII因子染色鉴定。将2~3代的HUVEC约1ml接种到流室(预铺0.1%明胶约0.5ml)内硅胶垫片的中空部位(细胞浓度为 1×10^6 个/ml),并使之分布均匀,将流室置于培养箱内37℃、5% CO_2 下培养约3~5天,待细胞融合成单层,即进行加载实验。

1.3 流动剪切力加载

加载于人脐静脉内皮细胞的流动剪切力的大小通过蠕动泵的转速来调节。加载流动剪切力按照以下方案进行(每组重复3次):

(1)单一加载组(对照组):剪切力为7.5 dyne/cm^2 ,而加载的时间分别为5h、10h、24h。

(2)梯度加载组

A组:5 dyne/cm^2 加载5h后,将剪切力调至7.5 dyne/cm^2 加载10h,再将剪切力调至10 dyne/cm^2 加载24h。

B组:7.5 dyne/cm^2 加载10h后,将剪切力调至10 dyne/cm^2 加载24h,再将剪切力调至15 dyne/cm^2 加载5h。

收稿日期:2004-06-29 修回日期:2004-08-16

* 国家自然科学基金资助项目(3030084)

** 通讯作者,电子邮箱:panjunqu@163.com

C 组: 5 dyne/cm^2 加载 5h 后, 将剪切力调至 7.5 dyne/cm^2 加载 10h, 再将剪切力调至 10 dyne/cm^2 加载 24h, 最后将剪切力调至 15 dyne/cm^2 加载 5h。

1.4 实验结果观察和检测

(1) 结果观察: 剪切力加载一定时间后(如 7.5 dyne/cm^2 5h 后), 暂停蠕动泵的工作, 从培养箱内取出流动腔, 将其置于倒置相差显微镜下观察, 拍照记录细胞形态变化。

(2) 细胞粘附性测定: 采用计算细胞残留百分比的方法来测定细胞在流动剪切力作用之后的粘附能力。将流动腔置于倒置相差显微镜下, 用 20 倍物镜观察一个视野下的细胞, 进行细胞计数, 每个部位计数 3 次取其平均值, 随机取 5 个视野作为每组样本, 计算细胞的残留百分比:

$$\text{细胞残留百分比} \% =$$

$$\frac{\text{流动剪切作用后的平均细胞数}}{\text{流动剪切作用前的平均细胞数}} \times 100\%$$

1.5 统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件进行统计学分析, 多因素方差分析, 组间单因素两两均数比较, 采用 Student *t* 检验。

2 结果与讨论

研究探讨了不同水平和不同时间加载流动剪切力对 HUVEC 在明胶基质上粘附能力的影响。实验结果如表 1 和图 1 显示。从表和图上可总结出:

(1) 成梯度增加的流动剪切力加载能显著提高 HUVEC 在明胶基质上的粘附能力。如表 1 和图 1 所示, 与单一水平 7.5 dyne/cm^2 的加载相比, 在加载时间相同时, 梯度增加的加载方式都明显地增加了细胞的残留率。

(2) 不同剪切力起始点和不同加载时间的梯度增加的流动剪切力对细胞的残留率的影响不同。梯度加载的 C 组从 5 dyne/cm^2 开始加载, 5h 后细胞残留率为 84.61%, 基本与相同加载时间和水平的 A 组结果相同; 然后增加至 7.5 dyne/cm^2 加载 10h 后, 细胞残留率为 70.95%, 与相同加载水平的 B 组相比, 细胞残留率明显提高; 将剪切力增加至 10 dyne/cm^2 作用 24h 后, 细胞残留率为 44.87%, 与相同加载水平的 A 组 26.74% 和 B 组 25.12% 的细胞残留率相比有了明显提高; 而最后加载 15 dyne/cm^2 5h 后的结果也显示, C 组的加载方式下细胞的残留率 11.02% 比相同加载水平的 B 组 5.94% 要明显的高。

(3) 梯度加载的流动剪切力引起了 EC 的形态改变。采用实验 C 组的加载方式加载 10 dyne/cm^2 24h, 大部分残留细胞的形态和排列方向发生了改变(图 2), 细胞形态变成了规则的长梭型, 排列方向与流动剪切方向相同。

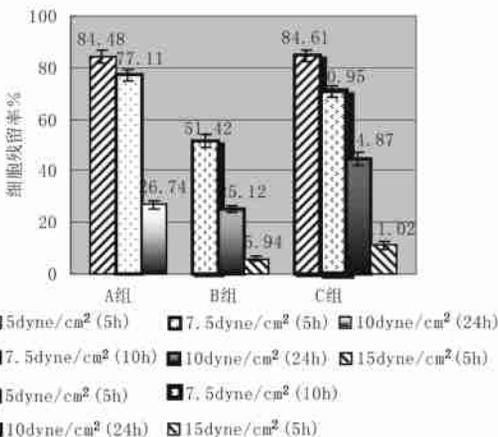


图 1 不同方式的成梯度增加的流动剪切力对细胞残留率的影响

Fig. 1 Reliquis rate of HUVEC loaded with different stepwise increased flow shear stress

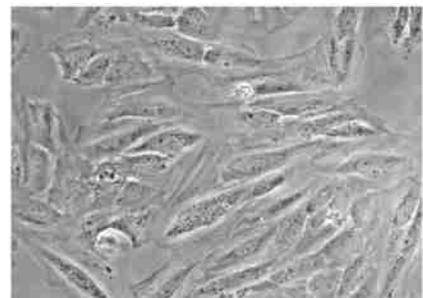


图 2 成梯度增加的剪切力加载 24h 后的 HUVEC 形态 (5 dyne/cm^2 , 5h, 然后 7.5 dyne/cm^2 10h, 10 dyne/cm^2 24h) (20 \times)

Fig. 2 The shape of HUVEC loaded by stepwise increased shear stress

(5 dyne/cm^2 , 5h, then 7.5 dyne/cm^2 10h, 10 dyne/cm^2 24h) (20 \times)

许多研究^[7-9]表明, 流体剪应力对体外培养的血管内皮细胞粘附性的影响与加载水平和时间有很大关系。本研究结果提示采用适当的流动剪切力加载方式而不是单一控制的加载时间和加载水平, 对提高内皮细胞对剪切力的耐受有着重要的意义。此外研究发现梯度加载的 C 组细胞在形态和排列

表1 不同方式的成梯度增加的流动剪切力(dyn/cm^2)和时间(h)对细胞残留率(%)的影响

组别		单一加载组(对照组)								
剪切力(dyn/cm^2), 时间(h)		7.5, 5h			7.5, 10h			7.5, 24h		
细胞残留率(%)		57.16 \pm 2.45			50.27 \pm 3.64			11.1 \pm 2.79		
组别	梯度加载 A 组			梯度加载 B 组			梯度加载 C 组			
剪切力, 时间(h)	5, 5h	7.5, 5h	10, 10h	7.5, 5h	10, 24h	15, 5h	5, 5h	7.5, 10h	10, 24h	15, 5h
细胞残留率(%)	84.48 \pm 2.46	77.11 \pm 2.35	26.74 \pm 1.79	51.42 \pm 2.50	25.12 \pm 1.23	5.94 \pm 1.17	84.61 \pm 2.17	70.95 \pm 2.12	44.87 \pm 2.59	11.02 \pm 1.78

注: (1) 单一加载组、梯度加载各组间相比 $P < 0.05$; (2) 梯度加载 A 组、C 组各剪切力水平与 B 组各水平相比 $P < 0.05$

上发生了与在体生理状态相同的转变, 在生理范围内 EC 形态发生改变必须具备两个条件^[10]: a 剪切力 $> 8 \text{ dyne/cm}^2$; b 作用时间 $> 24 \text{ h}$, 我们推断本研究中梯度加载至 10 dyne/cm^2 作用 24h 后细胞内已经发生了应力纤维的形成和重排现象^[11], 参与了内皮细胞的形态学改变及 EC 与基底(基质)粘附功能的调节, 增加了 EC 与基底的粘附性, 维持了 EC 的完整性, 当然这需要进一步研究。流体剪切力这一物理性刺激因素是如何传入细胞的, 并引发细胞的应力纤维的形成及形态学改变的机理目前仍不清楚。

提高血管移植材料的内皮化程度, 增强内皮细胞对血流的耐受是成功构建血管移植物的关键因素之一。我们的研究为提高内皮细胞在基质材料上的粘附性提供了新的思路, 并有望为血管材料的完全内皮化开辟新的途径。同时, 本研究也为更深入地研究流体切应力对血管内皮细胞的生物学作用, 阐明心血管疾病的发病机理提供了有效手段。

参考文献

[1] Chen X, Xia Z F, Wei D, et al. Expression and regulation of vascular cell adhesion molecule 1 in human umbilical vein

- endothelial cells induced by sera from severely burned patients. Crit Care Med, 2004, 32(1): 77~ 82
- [2] Mansoor M A, Seljelot I, Arnesen H, et al. Endothelial cell adhesion molecules in healthy adults during acute hyperhomocysteinemia and mild hypertriglyceridemia. Clin Biochem, 2004, 37(5): 408~ 414
- [3] Ott M J, Ballemann B J. Shear stress conditioned, endothelial cell seeded vascular grafts: Improved cell adherence in response to in vitro shear stress. Surgery, 1995, 117: 334~ 339
- [4] 李玉泉, 姜宗来. 切应力对与血管平滑肌细胞联合培养的内皮细胞细胞外基质构筑及含量的影响. 生物医学工程学杂志, 2002, 19(1): 45~ 47.
- [5] DePaola N, Gimbrone M A, Davies P F, et al. Vascular endothelium responds to fluid shear stress gradients. Arteriosclerosis and Thrombos, 1992, 12(11): 1254~ 1257
- [6] Jaffe E A. Culture of human endothelial cells derived from umbilical cord veins: Identification by morphologic and immunologic criteria. J Clin Invest, 1973, 52: 2745~ 2756
- [7] Yoshida K, Sugimoto K. Morphological and cytoskeletal changes in endothelial cells of vein grafts under arterial hemodynamic conditions in vivo. J Electron Microsc, 1996, 45: 428~ 435
- [8] Resnick N, Yahav H, Shay salit A, et al. Fluid shear stress and the vascular endothelium: for better and for worse. Progress in Biophysics & Molecular Biology, 2003, 81: 177~ 199
- [9] 丛兴忠, 李玉泉, 姜宗来. 流体切应力对血管内皮细胞的生物学作用. 医用生物力学, 2003, 18(2): 107~ 113
- [10] Davies P F. Flow mediated endothelial mechanotransduction. Physiol Rev, 1995, 75(3): 519~ 560
- [11] 陈槐卿. 流体切应力对内皮细胞功能的调节. 医用生物力学, 2003, 18(增刊): 3~ 4

The Effects of Stepwise Increased Flow Shear Stress on the Adhesion of Human Umbilical Vein Endothelial Cells on Glutin Surface

QIN Si hua PAN Jun WU Ke da WANG Yuan liang XIA Zhi ning

DENG Xiao yan ZHANG Wei HAO Li na

(Department of Biology Engineering, Chongqing University,

Key Lab of Biomechanics and Tissue Engineering under Education Ministry Chongqing 400044, China)

Abstract A flow chamber was used to investigate the effects of flow shear stress on the adhesion of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) on glutin coated surface. Different time (5h, 10h, 24h) and level (5, 7.5, 10, 15 dyne/cm^2) of flow shear stress was used here. The result showed that the stepwise increased shear stress from 5 dyne/cm^2 to 7.5 dyne/cm^2 and then to 10 dyne/cm^2 , 15 dyne/cm^2 has improved the adhesion of HUVECs and their abiding of shear stress significantly compared with the single level of 7.5 dyne/cm^2 at the same time. And the stepwise increased shear stress has introduced the changes of cell shape and arrangement which was like that *in vivo*.

Key words Stepwise increased Flow shear stress HUVEC Adhesion Flow chamber