DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.14.014
第25卷第14期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 14
1254 2003年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)14-1254-04

机械拉伸下人肺上皮细胞增殖及整联蛋白再分布

张惠静[1],杨 力[2],蔡绍皙[3],卢 晓[3],王远亮[3] ([1]第三军医大学医学检验系分析化学教研室,重庆 400038;[2]Department of Bioengineering and Orthopedics, University of Califomia, San Diego, CA 92093-0656, USA;[3]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)

提 要:目的 探讨机械拉伸应变对人肺上皮细胞增殖及其膜受体——整联蛋白α_5、β_1再分布的调控作用。方法 建立体外周期性拉伸装置,应用流式细胞术测定细胞的增殖活性,激光共聚焦显微镜分析整联蛋白α_5、β_1再分布。结果 在应变为15%,频率为20次/min、40次/min的拉伸刺激下,24 h后,细胞的增殖活性指数明显降低,H727细胞的DNA合成受到显著抑制。在40次/min的拉伸频率下,整联蛋白α_5、β_1的分布发生重组并向基底层转移,形成局部粘附连接。结论 整联蛋白α_5、β_1可能在肺上皮细胞感应机械应力过程中起了重要的作用。

关键词:机械应力;人肺上皮细胞;整联蛋白;粘着斑
中图法分类号:R318.01;R322.35;R329.2 文献标识码:A

Effects of mechanical strain on the proliferation of human pulmonary epithelial cells and reorganization of integrins

ZHANG Hui-jing, YANG Li, CAI Shao-xi, LU Xiao, WANG Yuan-liang (Department of Laboratory Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effects of mechanical strain on the proliferation of the human pulmonary epithelial cell and the redistribution of its membrane receptors, integrins α_5 and β_1. Methods A cyclic strain unit *in vitro* was designed. The cellular proliferative index was measured by flow cytometry and the redistribution of α_5 and β_1 integrins was analyzed in human pulmonary epithelial cell line H727 by laser confocal microscopy. Results The cellular proliferative index reduced significantly after cells were subjected to 15% elongation at frequencies of 20 cycles/min or 40 cycles/min for 24 h. In human pulmonary epithelial H727 cells, α_5 and β_1 integrins transferred from the apical layer to the basal layer and formed an adhesion plaque after 24 h exposure to 15% elongation at frequency of 40 cycles/min. Conclusion The results suggest that α_5 and β_1 integrins in pulmonary epithelial cells may play an important role in the transduction of mechanical stress.

Key words: mechanical stress; human pulmonary epithelial cell; integrin; focal adhesion

机械应力的生物学效应和它们的作用机制目前已在许多细胞类型和组织中开始研究,这些研究结果已使人们对它们在细胞分化、基因表达、细胞和组织生长以及伤口愈合的修复和功能整合中所起的作用,引起了重视[1,2]。在呼吸系统,伴随肺的膨胀和回缩,力学因素对肺组织的影响贯穿了生命的整个过程[3,4],然而,对于机械应力是如何被细胞感受并传递至细胞内,最终导致细胞发生一系列生物学效应的,其确切机制尚不清楚。因此,本研究应用体外细胞加载装置,从细胞层次上的应力——生长关系着手,对周期性拉伸作用下人肺上皮细胞的增殖行为以及细胞表面整联蛋白分布的变化进行了研究,为揭示机械力学因素在细胞生理与病理状况下的作用作一些前期性的探讨工作。

1 材料与方法

1.1 细胞培养和试剂

人支气管上皮细胞株H727购于American Type Culture Collection(USA),培养于含有5%胎牛血清的RPMI1640培养基中,于37℃,5% CO_2条件下常规培养。羊多抗α_5(SC-6593)、抗β_1(SC-6622)整联蛋白,驴抗羊IgG-FITC(SC-2024)二抗均购于Santa Cruz公司;牛血清白蛋白(BSA)、纤粘连蛋白(Fn)购于Sigma公司。

1.2 实验装置

周期性机械拉伸装置由控制电路、液压动力系统、培养槽3个部分组成,如图1所示。液压动力系统工作时,将储液瓶中的水泵出,经过管道流向三通,然后流入培养槽乳胶管中,此

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(19732003),高等学校重点实验室访问学者基金资助项目(2002)
作者简介:张惠静(1963-),女,重庆市人,博士,副教授,主要从事生物大分子的分离分析方面的研究,电话:(023)68752306
收稿日期:2003-02-26;修回日期:2003-04-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

时，液体经过三通流过控制系统内的电磁阀，由电磁阀来控制培养槽中水囊的舒张，从而使紧贴在乳胶管水囊上的弹性硅橡胶膜膨胀，拉伸生长在膜上的细胞。膜的伸长比由电磁阀频率和恒流泵转速来控制。

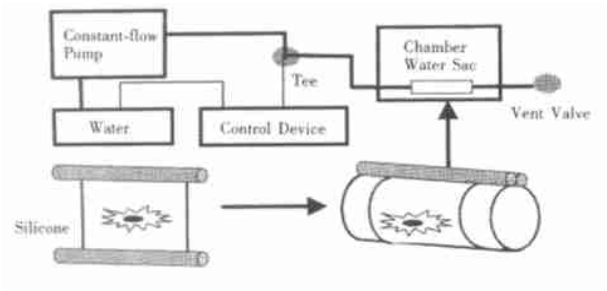


图 1　周期性机械拉伸应变装置

Fig 1　Cyclic mechanical strain unit

弹性膜的伸长比 $\lambda=(D_{max}/D_0)$　　(1)

D_{max}：拉伸至最大时的管径；D_0：静态时的管径

应变 $\varepsilon=(\lambda-1)\times 100\%$　　(2)

1.3　周期性拉伸应变对 H727 细胞增殖行为的影响

将生长于 25 ml 塑料瓶中的 H727 细胞用 0.25 % 胰蛋白酶 +0.02 % EDTA 消化，用培养液制成单细胞悬液，计数（5×10^5/ml）接种于弹性硅橡胶膜（1.2 cm× 1.6 cm）上，继续培养 24 h，细胞贴壁并融合生长后，分别施加 24、48、72 h，应变为 15%，频率为 20 次/min、40 次/min 的拉伸刺激，同时做静态对照实验。加载完毕，将收集的样本用 PBS 液清洗，碘化丙啶（PI）染色 30 min，用流式细胞仪（Becton-Dickinson）进行检测。应用细胞周期拟合软件，计算各样品 DNA 含量及细胞周期变化。细胞增殖活性以增殖指数（Proliferative index，PI）表示。

1.4　机械拉伸对 H727 细胞 α_5、β_1 整联蛋白再分布的影响

将 5×10^4 个/ml 的单细胞悬液接种于纤粘连蛋白衬衬（5 $\mu g/cm^2$）后的硅橡胶膜上，细胞贴壁并融合生长后，施加应变为 15 %，频率为 40 次/min 的拉伸刺激 24 h，应用间接免疫荧光法染色。首先用 3% 的多聚甲醛固定 30 min，在 37 ℃于 1% 的 BSA 预温育 1 h，PBS 洗涤 3 次。加入一抗（稀释比 1∶200）于 37 ℃温育 2 h，PBS 洗涤 3 次。加入二抗（稀释比 1∶200）于 37 ℃温育 2 h，PBS 洗涤 3 次，用无菌三蒸水洗涤后，加入缓冲甘油封片。激光共聚焦显微镜（TCSNT 型，Leica，德国）扫描测试，由基底至上断层扫描，步进 2.0 μm，共扫 32 层，每层重复扫描 10 次，取平均荧光强度值，比较对照组和实验组 α_5 和 β_1 整联蛋白分布状况。

1.5　统计学分析

实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，作组间 t 检验。

2　结果

2.1　周期性机械拉伸抑制 H727 细胞的增殖

为了确定机械拉伸对人肺上皮细胞增殖行为的影响，H727 细胞遭受到应变为 15%，频率为 20 次/min、40 次/min 的拉伸刺激 24、48、72 h，经流式细胞仪 DNA 分析后，得各组的细胞增殖指数，其结果见图 2。与其对照组相比，拉伸后，在 24 h，两种频率下的细胞周期即发生了明显的变化，增殖指数随加载时间延续逐渐减小，差异有统计学意义（$P<0.01$）。表明：在 15% 的拉伸应变下，周期性机械拉伸对正常人肺上皮细胞 H727 的生长起抑制作用，并且，随着拉伸时间的延长，这种抑制作用越强。

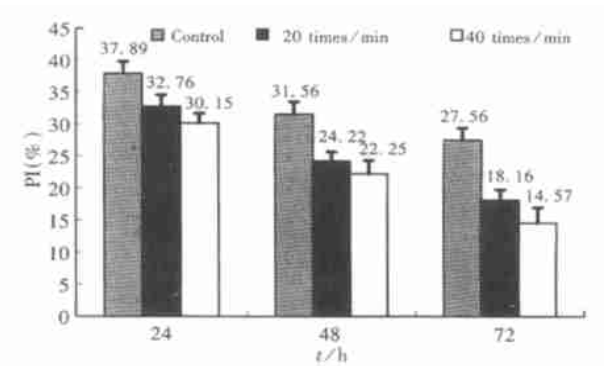
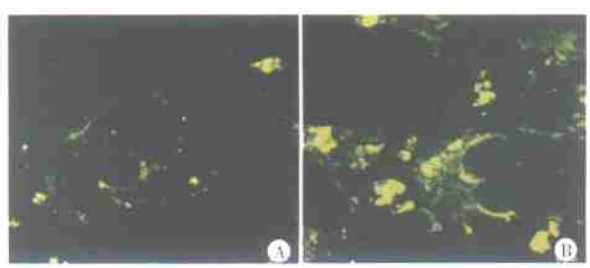


图 2　周期性机械拉伸对 H727 细胞的增殖指数的影响

Fig 2　Effect of cyclic mechanical strain on the proliferative index of H727 cells

2.2　机械拉伸诱导了 H727 细胞表面 α_5 和 β_1 整联蛋白的再分布

实验和对照细胞经荧光抗体染色后，共聚焦显微镜下断层扫描结果见图 3。图 3(A) 为静态条件下 α_5 整联蛋白的分布示意图，其分布相对于实验组图 3(B) 呈弥散状斑点分布，强度也较弱。加载后，α_5 整联蛋白的分布比对照组分布更集中并且荧光强度更强，形成了较大的局部粘附区域，且有局部粘附斑块出现。



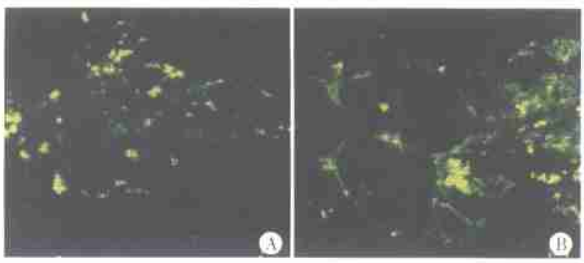
Cells are seeded on fibronectin coated membrane and are subjected to cyclic strain for 24 h(B) or kept in stationary culture conditions(A)

图 3　H727 细胞生长在纤粘连蛋白上的 α_5 整联蛋白分布图

Fig 3　Spatial redistribution of α_5 integrin induced by mechanical strain

图 4 分别为加载 24 h 后，实验组(B) 与其静态对照组(A) β_1 整联蛋白的分布示意图，由图 4(B) 可见：加载后 β_1 整联蛋白同 α_5 整联蛋白一样，也发生了分布的重组，分布较之对照组更集中，也有局部粘附斑块出现，表达强度也更强。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



Cells are seeded on fibronectin coated membrane and are subjected to cyclic strain for 24 h(B) or kept in stationary culture conditions(A)

图 4 H727 细胞生长在纤粘连蛋白上的β_1整联蛋白分布图

Fig 4 Spatial redistribution of β_1 integrin induced by mechanical strain

图 5 中的(A)、(B)分别为α_5、β_1整联蛋白由基底层至上层的平均荧光强度分布图，由图可见，与其静态对照组相比，加载后，α_5、β_1整联蛋白的分布发生了改变，由上至基底层发生了转移，通过组间 t 检验，呈现显著性差异($P<0.01$)。结合图 3、图 4 提示：机械拉伸可诱导人肺上皮细胞 H727 表面α_5、β_1整联蛋白的激活，导致α_5、β_1整联蛋白的分布发生重组，向基底层转移，形成局部粘附连接。

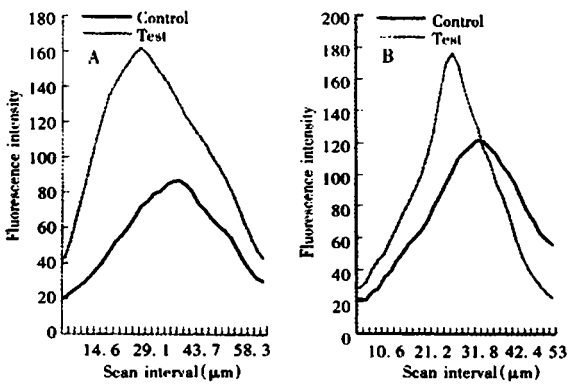


图 5 H727 细胞由基底层至上层的α_5(A)和β_1(B)整联蛋白荧光强度分布图

Fig 5 Fluorescence intensity distribution of α_5(A) and β_1 integrins (B) from H727 cellular basal layers to aptical layers

3 讨论

目前，针对机械应力对肺上皮细胞生长以及与应力/应变诱导的细胞生长相关事件的了解很少，肺上皮细胞在机械应力作用下增殖情况的研究报道不多，且颇有争议。Chess 等[5]应用 Flexercell Strain Unit 对人肺上皮细胞株 H441 施加频率为 60 次/min，20% 的机械拉伸应变 24 h，细胞数目呈现有统计学意义的增加。Savla 等[6]应用相同的加载装置对人肺上皮细胞株 Calu-3 施加 20% 的机械拉伸应变发现：当拉伸频率为 10 次/min 时，加载 48 h，实验组与对照组相比，细胞数目无显著性差异；但拉伸频率增至 30 次/min 时，加载 48 h，实验组细胞数目明显减少，应变诱导的细胞增殖行为受到明显的抑制。Vlahakis 等[7]应用 Flexercell 2000 系统对人肺上皮细胞株 A549 施加频率为 20 次/min，30% 的机械拉伸，也未发现细胞数目有明显的差异。以上学者均采用的是细胞计数法来检测细胞增殖情况，本研究采用流式细胞技术，在细胞水平上检测其 DNA 合成状况，对正常人支气管上皮细胞株 H727 施加频率为 20 次/min、40 次/min 的 15% 拉伸应变，与其对照组相比，在 24 h，细胞 DNA 合成就受到明显抑制，细胞增殖活性降低，且随着拉伸时间的增加，抑制作用越强。这说明人肺上皮细胞 DNA 的合成和增殖指数不仅与所受的拉伸刺激方式有关，而且还受到不同加载装置、接种数量、培养介质、细胞种类，检测方法等因素的影响。

本研究结果显示，机械拉伸对人肺上皮细胞 H727 的增殖有抑制作用，那么细胞是如何感应机械应力，并将这种机械刺激转化成生化信号，导致一系列生化反应，引起代谢的改变，造成对生长改建的影响？其确切机制尚不清楚。从以往的研究来看，在受到剪切的血管内皮细胞，或受牵拉的心肌细胞、血管平滑肌细胞中，都存在机械感受器，在对这些力作出反应时，细胞均可被活化并导致一系列的生物学响应，而细胞粘附分子-整联蛋白是发挥这种作用的很好候选者[8]。但是，迄今为止，在肺上皮细胞体系中，对机械拉伸敏感的机械感受器尚待确定。因此，在此，我们针对肺上皮细胞体系，研究了 H727 细胞表面α_5、β_1整联蛋白对机械拉伸应变的响应。结果表明：在 H727 细胞中，α_5、β_1整联蛋白是对拉伸应变敏感的膜受体，周期性机械拉伸刺激可诱导α_5、β_1整联蛋白的激活，导致它们的分布发生聚集重组，并向基底转移，形成局部粘附连接。从我们的实验结果可以看出，在静止条件下，整联蛋白与其配体的亲和能力较低，然而在受到拉伸刺激后，整联蛋白与其配体即具有高的亲和力，推测整联蛋白与胞外基质蛋白结合能力的提高可能阻止了整联蛋白的内在化作用，促使其停留在细胞表面，通过与胞外配体结合能力的亲和调节，形成局部粘附连接。由于局部粘附部位含有许多骨架和骨架调控蛋白，这些蛋白可调控肌动蛋白单体聚合并形成应力纤维，同时向聚焦粘附部位靠拢，在基底-整联蛋白-细胞骨架之间形成一个完整的结构序列，我们推测这种结构序列的形成与整联蛋白空间分布的重组关系更大。那么，这种结构的形成，是否会引发整联蛋白介导的下游信号事件的级联反应，从而对细胞铺展、生长、迁移等生物学行

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

为产生影响？因此，针对应力/应变诱导的人肺上皮细胞整联蛋白分布重组的研究，对于我们进一步探讨该类细胞在肺的生长发育、功能发挥以及伤愈修复和功能整合等病理、生理过程中的作用具有重要的价值。

我们的研究证实，在人肺上皮细胞 H727 中，α_5、β_1 整联蛋白是对拉伸应变敏感的膜受体，周期性机械拉伸可引起其 α_5、β_1 整联蛋白的分布发生重组，推测此现象是细胞响应机械应力起始，可能通过骨架的进一步重组，将应力通过骨架传递至胞内，通过力-化学信号的偶合或张力整合的形式，最终对细胞的生物学行为产生影响。

参考文献：

[1] Davis M J, Wu X, Nurkiewicz T R, *et al*. Integrins and mechanotransduction of the vascular myogenic response[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001, 280(4): H1427—H1433.

[2] Chen K D, Li y S, Kim M, *et al*. Mechanotransduction in response to shear stress. Rde of receptor tyrosine kinase, integrins and shc[J]. J Biol Chem, 1999, 274(26): 18393—18400.

[3] Wirtz H R, Dobbs L G. The effects of mechanical forces on lung functions [J]. Respir Physiol, 2000, 119(1): 1—17.

[4] Waters Christopher M, Sporn Peter H S, Liu M, *et al*. Cellular biomechanics in the lung[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002, 283(3): L503—L509.

[5] Chess P R, Toia L, Finkelstein J N. Mechanical strain-induced proliferation and signaling in pulmonary epithelial H441 cells[J]. Am J Physiol, 2000, 279(1): L43—L51.

[6] Savla U, Waters C M. Mechanical strain inhibits repair of airway epithelium *in vitro*[J]. Am J Physiol, 1998, 274(6 Pt 1): L883—L892.

[7] Vlahakis N E, Schroeder M A, Limper A H, *et al*. Stretch induces cytokine release by alveolar epithelial cell *in vitro*[J]. Am J Physiol, 1999, 277(1 Pt 1): L167—L173.

[8] 张惠静，蔡绍皙，卢 晓. 整合素在细胞响应机械应力中的作用[J]. 生物化学与生物物理进展，2002, 29(3): 359—361.

（编辑 陈聪连）

文章编号：1000-5404(2003)14-1257-01

个案与短篇

间变性大细胞性淋巴瘤 3 例

Anaplastic large cell lymphoma: a report of 3 cases

刘 红，陈幸华，王庆余，孔佩艳，刘 林，张 曦 （第三军医大学附属新桥医院血液内科，重庆 400037）

间变性大细胞性淋巴瘤（Anaplastic large cell lymphoma, ALCL）是一种近几年才报道的较少见的非霍奇金淋巴瘤（Non-Hodgkin lymphoma, NHL），既往对 ALCL 缺乏认识或研究不够，常将其误诊为其他类型的肿瘤。我院自 1999 年 12 月年以来共确诊 3 例，现报告如下。

1 病例介绍

例 1：男，73 岁。左腋下包块 4 个月，声嘶 1 个月入院。病初腋下包块 2 cm×1 cm，无伴随症状，随后全身多处出现包块，逐渐长大，近 1 个月出现声嘶。患银屑病 10 多年。查体：体温 38.0 ℃，面色红润，全身皮肤粗糙，散在红色斑片状皮疹，呈苔藓样；左颈部、右锁骨上、双腹股沟淋巴结 2 cm×3 cm 数个，左腋下 6 cm×5 cm×10 cm，肝、脾未及。血常规：HGB 120 g/L，WBC 6.9×10^9，PLT 100×10^9；X 线胸片正常；腹部 B 超：肝脾不大，腹腔、腹膜后淋巴结无肿大；肝、肾功、蛋白电泳正常；血沉 35 mm/h；骨髓涂片正常；左颈部淋巴结活检：瘤细胞胞体较大，异型性明显，呈窦性浸润，CD30(＋)、EMA(＋)、LCA(＋)，CD20、CD15、CD45RO、CK 均(－)，病理诊断间变性大细胞淋巴瘤。CTOP、CEOP、CMOP 三次方案化疗结束后，病情较稳定，淋巴结无明显缩小，血象正常。第四次化疗前全身浅表淋巴结均肿大至（1.0～3.0）cm×（1.5～4.0）cm，发热，进食少；LDH 558 U/L，HGB79 g/L，骨髓正常，肌酐 383 μmol/l，尿素氮 22.24 mmol/L。用 CEOP 方案化疗 3 d 全身衰竭死亡。从确诊到死亡共生存 9 个月。

例 2：女，27 岁。腹胀 4 个月入院，伴乏力，夜晚出汗，无恶心、呕吐，腹泻，下肢水肿，在当地按腹膜炎医治效果不佳。查体：体温 39.2℃，左锁骨上淋巴结 1 cm×2 cm，余浅表淋巴结不肿大；腹部膨隆，移动性浊音(＋)。LDH 1 288 U/L。X 线胸片、血常规正常；腹部 B 超：在胰腺周围，肝门附近多个 1.5 cm×8.25 cm 包块，腹腔内有液性暗区。骨髓检查正常。左锁骨上淋巴结活检：瘤细胞体积较大，散在，异形性明显，可见双核和核仁，CD30(＋)，CD15(－)，LCA(＋)，CD20(－)，CK(－)，CD45RO(－)，EMA(－)；病理诊断：间变性大细胞性淋巴瘤。腹腔抽出黄绿色腹水，浑浊，李凡他试验(＋)，蛋白定量 34.5 g/L，比重 1.019，细胞数 40×10^6/L，培养(－)。入院后持续高热，给 CTOP 方案化疗病情有改善，要求自动出院。门诊随访 2 月后死亡。

例 3：男，7 岁。因反复发热 7 个月，右膝关节、腰骶部痛 5 个月入院。病初体温 38.0～40.0 ℃，呈不规则热型，无伴随症状。经抗感染、降温等处理可使体温暂时下降。2 个月后感右膝关节、腰骶部疼痛，严重时跛行。X 线片示：左骼骨及右股骨病变。考虑组织细胞增生症，不排除其他恶性骨转移性病变。右大腿病灶活检为：“炎性肉芽组织”。临床诊断为：多发性低毒

（下转 1261 页）

作者简介：刘 红(1960－)，女，河南省新乡市人，副主任医师，主要从事白血病发病机制方面的研究，发表论文 16 篇。电话：(023)68755609

收稿日期：2002-05-07；修回日期：2002-09-30

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net