

基底硬度对巨噬细胞血流动力学的调控

孟亚军¹, 郭丽娜², 王文君³, 谢利德¹, 姚伟娟²

摘要 目的 探讨基底硬度对巨噬细胞血流动力学方面的调控作用。方法 用聚丙烯酰胺制备基质凝胶,将小鼠巨噬细胞系 Raw264.7 接种在分别为 2 kPa 和 20 kPa 不同硬度的聚丙烯酰胺基质凝胶上培养,利用纳米压痕仪测量不同硬度的基质胶的弹性模量;利用荧光显微镜检测巨噬细胞在不同硬度基质上的黏附和黏着斑数量;利用共聚焦显微镜检测不同基质凝胶上生长的巨噬细胞的伸展面积大小。结果 两种基质胶的硬度分别为 (2.00 ± 1.78) kPa 和 (20.00 ± 4.00) kPa,与目标硬度一致。在 2 kPa 基质胶上,巨噬细胞的黏附为 (23 ± 15) 个,而 20 kPa 基质胶上细胞的黏附 (32 ± 5) 个,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 2 kPa 的基质胶 (32 ± 5) 个比较,巨噬细胞在 20 kPa 基质胶 (42 ± 8) 个上黏着斑也增加 ($P < 0.05$),巨噬细胞在 20 kPa 基质胶生长的伸展面积增加 ($P < 0.05$)。结论 较高的基底硬度时能促进巨噬细胞的黏附并改变细胞的生物力学特性。

关键词 基底刚度;巨噬细胞;生物力学性质

中图分类号 R 331.3

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2020)11 - 1681 - 04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2020.11.007

早在 20 世纪,生物学家就意识到了力学在生物学中的作用,近几十年,人们更关注的是细胞的分子机制和信号通路的探索,从而揭示细胞功能和病理过程,但是对于细胞本身以及细胞外基质的研究并不多且不够深入。巨噬细胞力学性质的变化是动脉粥样硬化发展的起始步骤也是关键步骤^[1]。巨噬细胞力学性质和功能的改变都依赖于它与细胞外基质之间的相互作用^[2]。研究^[3]证明细胞外基质的硬度已经成为影响巨噬细胞行为的一个重要的调节因子。硬化后的血管更容易促进巨噬细胞黏附、伸

展和迁移,进而加快动脉粥样硬化进程^[4]。该研究利用聚丙烯酰胺凝胶模拟正常和高血管硬度,从基底硬度的方向来研究巨噬细胞力学性质的变化,可以为探讨基底与细胞伸展、迁移等方面的关系和机制奠定基础,同时为防止动脉粥样硬化以及疾病的治疗提供了新的视角。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 Raw264.7 细胞来源广泛、易贴壁易成活,而且当前在关于泡沫细胞形成通路的研究中,大多实验均以巨噬细胞 Raw264.7 作为研究对象。小鼠巨噬细胞系 Raw264.7 (中科院北京细胞库)用 10% 胎牛血清(北京荣夏生物科技有限公司),DMEM 培养基(北京 Macgene 公司),在 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱(日本 Sanyo 公司)中常规培养。

1.2 不同硬度基质凝胶的制备和包被 用丙烯酸胺、甲双叉丙烯酰胺(北京普利莱基因技术有限公司)制备聚丙烯酰胺基质凝胶^[5]。将 200 μl 40% 的丙烯酰胺分别与 24 μl 和 132 μl 的 2% 的甲双叉丙烯酰胺充分混合,分别加入 776 μl 和 668 μl 的去离子水,充分混合后加入的 9.8 μl 过硫酸铵(北京化学试剂公司)和 5 μl TEMED(美国 Sigma 公司)。将 40 μl 上述混合液滴在载玻片上,并覆盖一片盖玻片。将载玻片放到超净台进行紫外杀菌 1 ~ 2 h,移除盖玻片,用 PBS 进行冲洗。然后利用光交联剂 crosslinker(1 mmol/L,100 μl)加在胶的表面,将胶放置在紫外灯下 15 min 共 2 次,PBS 洗去没有交联的 crosslinker,然后在胶上加入 800 μl 0.2 mg/ml I 型胶原,在 37 °C 温箱里孵育 1 h,去除未结合的基质蛋白。

1.3 纳米压痕仪检测基质胶的弹性模量 用纳米压痕仪(荷兰 Optics11 公司)测定聚丙烯酰胺凝胶的基底硬度。将低糖培养基并没过载玻片的培养皿放置在原子力显微镜(重庆光学仪器厂)上,连接电脑以及探针(荷兰 Optics11 公司)、干涉仪。实验使用标准的锥形氮化硅悬臂,球形探针硬度为 0.045 N/m,半径为 5 μm,影像分辨率为 256 × 256 像素。

2020 - 03 - 04 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:31570938)

作者单位:¹承德医学院基础医学院,承德 067000

²北大医学部血液流变学研究中心,北京 100083

³河北东方学院基础医学院,廊坊 065000

作者简介:孟亚军,女,硕士研究生;

谢利德,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: xielide65@163.com;

姚伟娟,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: weijuanyao@bjmu.edu.cn

悬臂震动的频率为 7 ~ 12 kHz。配置好参数后,让探针找到基质胶的表面进行数据测量。随机选择并测量每个样品的 15 个点。每个矩阵随机测量 3 次。结果用 Nanoscope Analysis 1.8 分析。

1.4 细胞黏附 在不同基质硬度的胶上培养巨噬细胞系 Raw264.7 细胞 30 min,等到细胞完全贴壁后,PBS 轻轻冲掉未完全贴壁的细胞,4% 多聚甲醛(天津福晨化学试剂厂)固定 1 h,用含有 0.1% Triton X-100(北京冰达生物有限公司) /2% BSA(武汉博士德生物工程有限公司)的封闭液孵育 30 min。PBS 洗 3 次,每次 1 min;避光条件下加入 DAPI(北京碧云天生物技术研究所)染色 5 min,PBS 洗 3 次,每次 1 min;进行封片,用抗淬灭剂将盖玻片封在载玻片上,在共聚焦显微镜(德国 TCP SP8 Leica 公司)下观察随机选择 20 个视野,获取贴壁的细胞数量。

1.5 相差显微镜检测细胞伸展面积 在不同基质硬度的胶上培养巨噬细胞系 Raw264.7 细胞 2 h 和 6 h,PBS 轻轻冲掉未完全贴壁的细胞,4% 多聚甲醛固定 1 h,用含有 0.1% Triton X-100/2% BSA 的封闭液孵育 30 min,PBS 洗 3 次,每次 1 min;用鬼笔环肽染液(2.5 μl) /细胞悬液(200 μl)染色,室温下避光静置 20 min,PBS 洗 3 次,每次 1 min;避光条件下加入 DAPI 染色 5 min,PBS 洗 3 次,每次 1 min;进行封片,用抗淬灭剂将盖玻片封在载玻片上,在相差显微镜(德国 TCP SP8 Leica 公司)和共聚焦显微镜下观察巨噬细胞的伸展情况。

1.6 黏着斑免疫荧光染色 在不同基质硬度的胶上培养巨噬细胞系 Raw264.7 细胞 24 h,用 PBS 轻轻冲掉未完全贴壁的细胞,将不同基质硬度下培养的巨噬细胞系 Raw264.7 细胞用 4% 多聚甲醛固定 1 h,用含有 0.1% Triton X-100/2% BSA 的封闭液孵育 30 min,PBS 洗 3 遍,每次 1 min;加入含有 Vinculin 抗体(1 : 200, Sigma 公司)的封闭液中,4 °C 条件下孵育过夜。PBS 洗 3 次,每次 1 min;避光条件下加入 DAPI 进行染色 5 min,PBS 洗 3 次,每次 1 min;用抗淬灭剂将盖玻片封在载玻片上,在激光共聚焦显微镜下观察 Vinculin 的分布数量。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析。进行方差齐性检验,正态性检验。计量资料

实验数据以 Mean ± SEM 的形式表示。单变量两组资料之间的比较采用 *t* 检验;多组资料之间的比较采用单因素方差分析;方差不齐则采用非参数检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基质胶的制备和硬度测定 使用具有独立调节硬度的聚丙烯酰胺水凝胶作为细胞微环境的模拟物。通过改变 40% 丙烯酰胺和 2% 甲双叉丙烯酰胺以及去离子水的比例调整基质胶的硬度,制成了两种具有不同硬度值的基质凝胶来模拟细胞不同硬度的外基质(表 1)。然后用纳米压痕仪在基质表面随机选取 20 个点测得基质胶的硬度(图 1),结果显示两种胶的弹性模量分别为(2.00 ± 1.78) kPa 和(20.00 ± 4.00) kPa,均符合目标基质硬度,并且两种胶的硬度差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

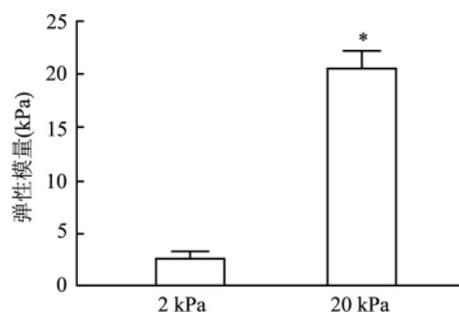


图 1 基质胶的制备与弹性模量测定
与 2 kPa 基质胶组比较: * *P* < 0.05

2.2 基质硬度对巨噬细胞黏附的影响 巨噬细胞迁移的过程涉及细胞与基质的黏附、细胞变形等过程。首先检测了基质硬度下对巨噬细胞黏附的影响。将一定数量的小鼠巨噬细胞 Raw264.7 细胞接种在硬度为 2 kPa 和 20 kPa 的基质胶上 2 h,在荧光显微镜下计数不同视野中所黏附的细胞数量。结果(图 2)显示,在 2 kPa 的基质胶上,每个视野黏附的细胞数量为(23 ± 15) 个,而在 20 kPa 的基质胶上,每个视野黏附的细胞数量为(32 ± 5) 个,与 2 kPa 基质胶组比较差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

2.3 基质硬度对巨噬细胞伸展面积的影响 细胞的伸展和黏附是密切相关的,基质硬度的改变对细胞黏附有显著的力学调控作用,对于细胞伸展应该

表 1 不同硬度值的基质胶的制备

制备方法	40% 丙烯酰胺(μl)	2% 甲双叉丙烯酰胺(μl)	去离子水(μl)	过硫酸铵(μl)	TEMED(μl)	目标基质硬度(kPa)
1	200	24	776	9.8	5	2
2	200	132	668	9.8	5	20

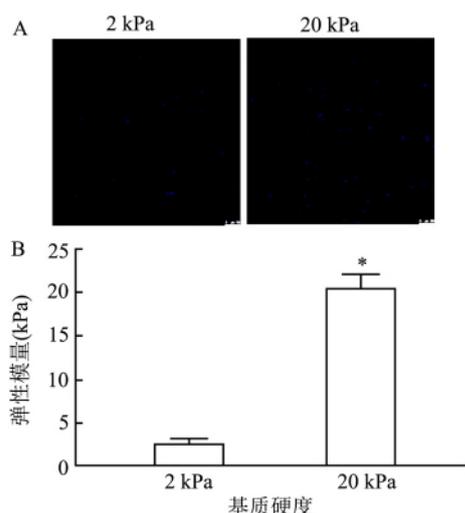


图2 基质刚度调节巨噬细胞的黏附

A: 共聚焦显微镜下计数黏附的细胞数 $\times 20$; B: 巨噬细胞黏附在不同基质刚度上的统计分析; 与 2 kPa 基质胶组比较: * $P < 0.05$

也有一定的影响,为了印证这一假说,用相差显微镜和共聚焦显微镜对比巨噬细胞系 Raw264.7 细胞分别在不同硬度的基质胶上种植 2 h 和 6 h 伸展面积的大小。结果显示在 20 kPa 基质胶上生长的巨噬细胞的伸展面积大于在 2 kPa 基质胶上生长的巨噬细胞的伸展面积,而且伸出的伪足更多(图3)。

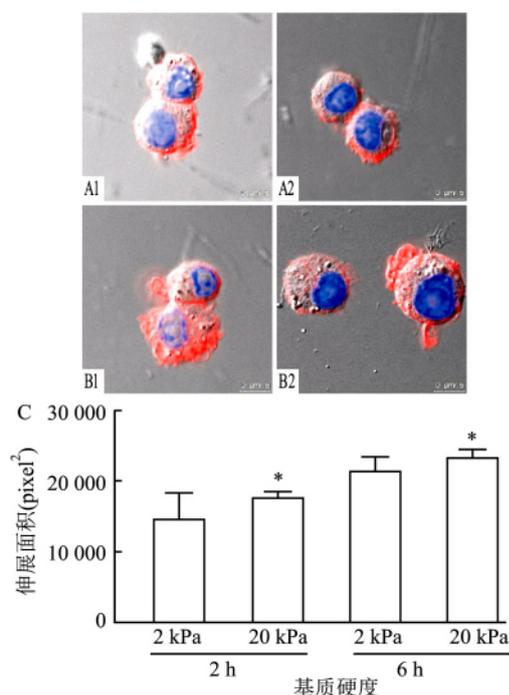
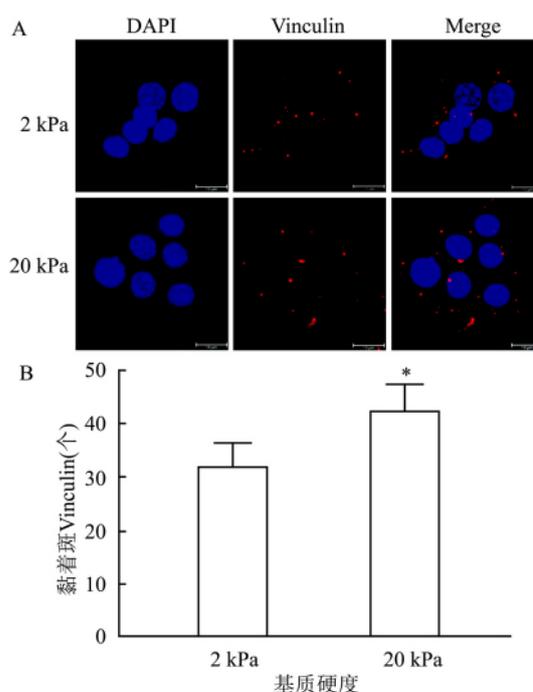


图3 基质刚度调节巨噬细胞伸展面积

A: Raw264.7 细胞在基质胶上种植 2 h 的伸展情况 $\times 60$; B: Raw264.7 细胞在基质胶上种植 6 h 的伸展面积 $\times 60$; 1: 20 kPa; 2: 2 kPa; C: 巨噬细胞在不同基质刚度上伸展面积的统计分析; 与 2 kPa 基质胶组比较: * $P < 0.05$

2.4 基质刚度对巨噬细胞黏着斑 Vinculin 的影响

Vinculin 是黏着斑蛋白家族中的重要成员,它是细胞收到力学刺激的感应器,它存在于细胞与基底之间,与细胞张力的产生有密切的关系。本研究中我们将 Raw264.7 细胞接种到不同硬度的基质上生长 48 h 后,利用免疫荧光染色分析基质硬度对细胞 Vinculin 表达的影响(图4)。结果表明,与 2 kPa 的基质胶(32 \pm 5) 个比较,巨噬细胞在 20 kPa 基质胶上黏着斑(42 \pm 8) 个增加且差异有统计学意义($P < 0.05$)。

图4 基质刚度对巨噬细胞黏着斑 Vinculin 的影响 $\times 60$

A: 不同基质刚度下 Vinculin 的免疫荧光表达; B: 巨噬细胞 Raw264.7 在不同基质刚度上 Vinculin 表达量的统计分析; 与 2 kPa 基质胶组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

血管壁在病变过程中会有血管的弹性蛋白下降,硬度增加等生物力学的性质的改变,巨噬细胞在面对不同基质硬度血管时作出反应和变化也不同^[6]。在动脉粥样硬化早期阶段,血管基质硬度的增加是导致巨噬细胞力学性质改变的重要因素之一^[7]。细胞微环境的血流动力学性质对于细胞黏附和伸展等生物学行为的影响与动脉粥样硬化的发生和发展密切相关^[8]。尽管许多研究都涉及基质硬度在介导各种细胞行为中的作用,但对基质硬度与细胞黏附、黏着斑和伸展面积的了解还很少。在本研究中,用聚丙烯酰胺凝胶模拟了不同硬度的细

胞外基质,并且用纳米压痕仪检测了它的弹性模量。结果表明,与软基质相比,硬基质促进了巨噬细胞系 Raw264.7 的黏附,增加了它的伸展面积。同时基质硬度对巨噬细胞的黏着斑进行调控,当细胞收到外界基底硬度改变的时候,通过 Integrin 将这种力学刺激传递到细胞内,改变着黏着斑的成分和含量,进而影响其的大小、数量等各方面指标的变化,最终会改变细胞在基底表面的黏附等行为^[9-10]。

本研究中,细胞培养模型无法完全概括体内微环境的复杂性,为了更好地模拟细胞在体内的环境,今后的工作建议用 3D 矩阵的硬度来克服这一不足。并且基质硬度通过哪些分子机制对细胞的力学性质进行调控还尚不清楚,需要进一步探索。本研究的意义在于制备不同硬度的基质胶,体外模拟生理病理情况下两种血管的硬度,了解基质硬度与细胞黏附、伸展、迁移等力学方面的关系,为探讨基质与细胞伸展、迁移等方面的关系和机制的奠定了基础,同时为防止动脉粥样硬化以及疾病的治疗提供了新的视角。

参考文献

- [1] García-González V, Delgado-Coello B, Pérez-Torres A, et al. Re-ality of a vaccine in the prevention and treatment of atherosclerosis [J]. *Arch Med Res*, 2015, 46(5): 427-37.
- [2] Kureel S K, Mogha P, Khadpekar A, et al. Soft substrate main-

- tains proliferative and adipogenic differentiation potential of human mesenchymal stem cells on long-term expansion by delaying senescence [J]. *Biol Open*, 2019, 8(4): bio039453.
- [3] Watanabe T, Lawson R P, Walldén Y S E, et al. A neuroanatomical substrate linking perceptual stability to cognitive rigidity in autism [J]. *J Neuro Sci*, 2019, 39(33): 6540-54.
- [4] Marzban B, Yi X, Yuan H. A minimal mechanics model for mechanosensing of substrate rigidity gradient in durotaxis [J]. *Biochem Med Metab Biol*, 2018, 17(3): 915-22.
- [5] Wang G, Nola S, Bovio S, et al. Biomechanical control of lysosomal secretion via the VAMP7 hub: a tug-of-war between VARP and LRRK1 [J]. *I Sci*, 2018, 4: 127-43.
- [6] Murrey M W, Steer J H, Greenland E L, et al. Adhesion, motility and matrix degrading gene expression changes in CSF-1-induced mouse macrophage differentiation [J]. *J Cell Sci*, 2020, 133(5): jcs232405.
- [7] Xia S, Lim Y B, Zhang Z, et al. Nanoscale architecture of the cortical actin cytoskeleton in embryonic stem cells [J]. *Cell Res*, 2019, 28(5): 1251-67.
- [8] Xu X, Ma L, Wu Y, et al. Micropillar-based culture platform induces epithelial-mesenchymal transition in the alveolar epithelial cell line [J]. *Biomed Mater Res*, 2018, 106(12): 3165-74.
- [9] Hsieh J Y, Keating M T, Smith T D, et al. Matrix crosslinking enhances macrophage adhesion, migration, and inflammatory activation [J]. *APL Bioeng*, 2019, doi: 10.1063/1.5067301.
- [10] Liu Z, Bun P, Audugé N, et al. Vinculin head-tail interaction defines multiple early mechanisms for cell substrate rigidity sensing [J]. *Integr Biol*, 2016, 8(6): 693-703.

Regulation of basal hardness on hemodynamics of macrophages

Meng Yajun¹, Guo Lina², Wang Wenjun³, et al

(¹Dept of Basic Medical School, Chengde Medical University, Chengde 067000; ²Dept of Hemorheology Center, Peking University, Beijing 100083; ³Dept of Basic Medical School, Hebei Oriental University, Langfang 065000)

Abstract Objective To investigate the regulation effect of matrix hardness on hemodynamics of macrophages. **Methods** A matrix gel was prepared using polyacrylamide. The mouse macrophage cell line Raw264.7 was inoculated on 2 kPa and 20 kPa polyacrylamide matrix gels with different hardness, and the elastic modulus of the matrix gels with different hardness was measured using a nanoindenter. Fluorescence microscopy was used to detect the number of macrophages adhered to the matrix with different hardness and the number of focal spots. Confocal microscopy was used to detect the extension area of macrophages grown on different matrix gels. **Results** It was found that the hardness of the two matrices was (2.00 ± 1.78) kPa and (20.00 ± 4.0) kPa, respectively, which was consistent with the target hardness. On 2 kPa matrigel, the adhesion of macrophages was (23 ± 15), while cell adhesion on 20 kPa matrigel increased significantly (32 ± 5, *P* < 0.05). Compared with 2 kPa matrigel (32 ± 5), the adhesion spots of macrophages on 20 kPa matrigel (42 ± 8) also increased (*P* < 0.05), and the expansion area of macrophages on 20 kPa matrigel significantly increased (*P* < 0.05). **Conclusion** Higher matrix hardness can promote the adhesion of macrophages and change the biomechanical characteristics of the cells.

Key words matrix stiffness; macrophages; biomechanical properties