

细胞粘附的生物力学研究进展*

张景 曾衍钧

北京工业大学生物力学和医学信息研究所, 北京 100022

摘要 介绍了细胞粘附的生物力学领域的进展和基本概念, 对生物力学中这一新领域的研究进行了评价. 同时对力学分析方法和试验方法给予评论, 而这些方法表明: 细胞粘附的生物力学研究趋势是从细胞力学至分子力学, 而在不久将来将进入微观力学范畴.

关键词 粘附接触力, 粘附能量密度, 分子键, 单键力, 细胞力学

1 引言

细胞粘附在许多不同的生命形式中起重要作用, 诸如: 分裂后的分裂球间粘附、连续的胚胎发育、单个细胞的运动、病原体侵入机体、免疫应答、肿瘤细胞侵入等. 细胞粘附过程中发生的胞间粘附和变化研究可用于发现病变过程是否主要依赖于粘附和它的控制. 相互粘附作用的研究已在生命过程的三个主要阶段开展, 它们是发育、炎症和转移阶段. 胚胎发育的标志之一是在整个发育过程中细胞或细胞群形态发育均受严格调控. 这些行为的发生, 是由于细胞表面分子与胞外分子的识别以及与其它细胞表面分子的识别而产生的. 类似的, 愈合和血栓形成都有赖于受伤组织的细胞与循环细胞间的信息物质交流和粘附. 免疫系统中的细胞既要象非粘附细胞那样在血液和淋巴中循环, 又要象粘附细胞那样在组织间移动. 白血球、内皮细胞表面存在的粘附分子不仅控制着胞间相互作用, 而且在细胞迁移调节过程中起重要作用. 肿瘤侵袭和转移过程象修复损伤组织那样, 需要正常细胞间、细胞和底物间相互间复杂的作用. 因此, 肿瘤上的粘附分子是重要的. 在肿瘤发育的不同时期, 恶性肿瘤细胞在不断地变化着它的粘附性, 时而增强, 时而减弱.

现已通过不同的方法研究了细胞粘附理论的各种观点, 众多的研究集中在特异性受体和配体间的识别和它们各自的特性方面, 正是这些特异性受体和配体相互作用介导了粘附作用. 粘附分子的作用和它们的调控可通过基于物体粘附强度的定量化的功能测定来表现出来. 现代生物工程技术的发展提供更精确的手段来测量细胞粘附功能的各个方面, 这些促进了细胞粘附的研究. 毛细管技术是其中一种很有特点的方法. 它能测量一对细胞间的粘附.

细胞粘附研究目的, 以卡波济氏肉瘤(KS)为一例子. KS是一种间质性肿瘤, 它在患爱滋病的男性同性恋患者中发病率很高. KS细胞的粘附性可能影响KS损伤过程中白细胞的数

收稿日期: 1997-09-15, 修回日期: 1998-03-02

*北京市教委资助项目

量和类型。这些炎症浸润细胞会释放出一类生物活性分子，并能刺激 KS 细胞的增殖和生长。当浸润细胞与 KS 细胞间距较近时，带有浸润细胞分裂物的 KS 细胞的刺激作用会很明显。因此，了解 KS 和浸润细胞间的相互作用会揭示 KS 致病机理并最终利用抗粘附方法作为治疗这与爱滋病相关疾病的方法。KS 细胞粘附强度可被定量，使用 HL₆₀ 作为代表性浸润细胞与其它类型细胞粘附强度进行比较，使用了几种测量方法在不同条件下评估几种因子对 KS 细胞粘附性的影响效果。

目前人们对于细胞粘附的研究主要集中在两个方面：一方面是研究它的生物化学机制，以粘附分子的研究为代表^[1~3]，近年来这方面取得了很大成绩并已逐渐成为生物学界的热点之一；另一方面是细胞粘附的生物物理性质和机理的研究，与前一方面相比则略为逊色。细胞粘附的一个基本物理问题是粘附的力学强度问题，这里的力学强度既包括细胞间的粘附强度又包括粘附分子间的分子键强度^[4]。这个问题的难度在于涉及到细胞分子这些微观领域的事物，比较新，不为人们所熟悉。但它的解决不仅有助于我们对细胞粘附的物理本质的理解，而且可以使我们能够更精确地分析和比较受体配体参与作用的生化反应的效果。

本文从基本概念，理论分析及实验研究三个方面对细胞粘附的生物力学研究进展作一简要的总结。

2 细胞粘附的基本力学概念

从力学观点，粘附的力学强度既可以用力来定义也可以用能量来定义。从相对宏观和微观的角度看，细胞的粘附强度可以在细胞和分子两个水平上表达，即一个是单个的细胞对水平，一个是单个的分子键水平。在细胞水平，粘附在一起的两个细胞在被分离的瞬间所受到的分离力被定义成它们粘附时的接触力。细胞表面的粘附能量密度被定义为要分离接触面积为一个单位的细胞对所需作的功。在分子水平，单键强度被定义为一个分子键所能承受的最大的力。键能则是指断开一个分子键所需的能量。

3 细胞粘附的力学分析和理论模型

对于单个细胞的力学性质目前已经有了较多的了解。红细胞研究得最早也最深入^[4]。通过运用一个不可压缩的粘弹性模型，中性粒细胞^[5]，淋巴细胞^[6]及内皮细胞^[7]的力学性质也已基本确定下来。这些为细胞粘附的力学研究奠定了基础。下面考虑一对不可压缩的粘弹性球形细胞的粘附情况，Schmid-Schonbein 等认为对于小位移的变形历史的基本性质可以用标准固体粘弹性 (Kelvin) 模型来近似^[6]，如图 1 所示。

单纯从力学上看，细胞粘附面内的接触力分布为

$$\sigma = \frac{8G}{\pi R} \left(\frac{a^2 - Rh}{2\sqrt{a^2 - r^2}} - \sqrt{a^2 - r^2} \right)$$

其中， h 是两细胞开始接触到互相粘附的相对位移。 a 是接触圈的半径。 r 是粘附平面的极坐标。 $G = 0.5k_1k_2/(k_1 + k_2)$ ， k_1, k_2 分别是两细胞的弹性系数。 $R = R_1R_2/(R_1 + R_2)$ ，其中 R_1, R_2 分别是两细胞的半径。应注意的是，接触压力的分布在粘附区中心处是可压缩的。

总的粘附力为： $F = \iint \sigma dA = 8Ga(a \times a/3R - h)$ 。其中， A 是粘附区的面积。

粘附的能量密度为

$$\gamma = \frac{1}{16\pi Ga^3} \left(F + \frac{16Ga^3}{3R} \right)^2$$

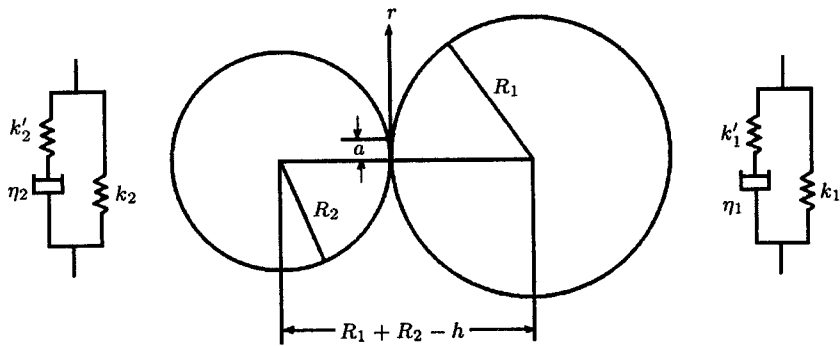


图 1 细胞粘附的模式图：两细胞的力学性质以不可压缩的粘弹性体为模型

如果要得到更精确的粘附能量密度，那么就必须考虑到细胞接触面内粘附分子的相互作用。这里的分子力包括两种：由粘附分子导致的特异性相互作用，以及其他因素造成的非特异性相互作用。

在纳米量级，与粘附有关的非特异性相互作用包括静电斥力，范德瓦耳斯力和空间平衡力^[8]。静电斥力是由覆盖在细胞表面糖萼层的负电基团造成的^[9]。由于粘附在一起的两细胞之间最短仍有大约 20nm 的距离（见图 2），所以静电斥力是可以计算的^[10]。范德瓦耳斯力是由自由活动的带极性基团的相互吸引而产生的^[8]。已知在 nm 量级，范德瓦耳斯力比静电斥力要小大约两个数量级。空间平衡力产生于两细胞表面糖萼的大分子集合物间的相互作用。这种力只有在两细胞靠近到其表面糖萼层交织在一起了才出现，它的大小取决于细胞彼此间的间距并且通常比范德瓦耳斯力大一个数量级。除此之外，氢键^[11]，高价离子键^[12]也可能与细胞粘附有关。

另外，需加以说明的是模型的发展状况，最初白血球被动特性是以标准粘弹性 (Kelvin) 材料组成的各向同性球为模型。该模型是能拟合最初几秒钟小变形时的实验吸入数据。但是后来发现：与当白血球从大微量吸管排出时长时恢复的实验观察相比，小变形标准粘弹性模型的预测，则只给出较短的恢复历史。据此提出了一个新模型（图 2），它既能表示微吸管中吸入白血球时短时小变形实验数据，也能表示大变形后的慢恢复相。新模型由包括 Maxwell 粘弹性流体的皮质壳组成。皮质壳表示近于细胞表面的富肌纤蛋白层，而且认为是在预张应力作用之下，预张应力将使细胞在大变形后恢复至它的球形形状^[13]。

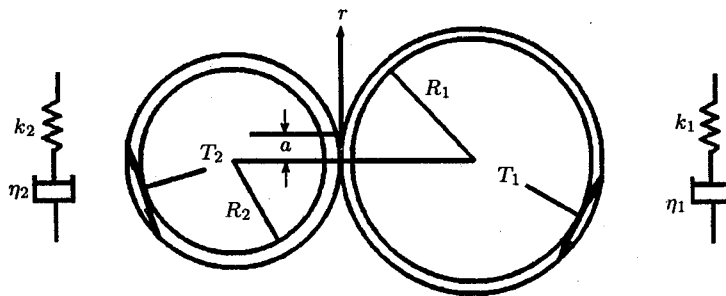


图 2 含细胞膜分子层的粘附模型示意图
 T_1, T_2 为膜表面的张应力，胞间距最短 20 nm

Bell 等给出了一个简单的公式以代表所有的非特异性斥力作用^[14]:

$$\sigma_r = -\left(\frac{1}{z} + \frac{1}{d}\right) \frac{e}{z} \exp\left(-\frac{z}{d}\right)$$

这里, d 是 Debye 长, e 是可压缩系数, z 是两细胞间的最小间距.

只有当胞间亲和力大于相互间的斥力时, 粘附才发生. 胞间亲和力是由细胞间特异的粘附分子对的结合力产生的. 每一对粘附分子的特异结合形成分子键, 其单键力 f_j 和键的拉伸成正比, 即 $f_j = k_j(z - z_{0j})$. 从分子水平考虑, 细胞粘附时总的接触力应是结合力与斥力的总和^[15]:

$$\sigma = \sigma_b + \sigma_r = \sum_{j=1}^J n_{bj} k_j (z - z_{0j}) - \left(\frac{1}{z} + \frac{1}{d}\right) \frac{e}{z} \exp\left(-\frac{z}{d}\right)$$

相应的能量密度为上式的积分. 其中, 斥力部分的能量密度为

$$\gamma_r = \int_z^{\infty} \sigma_r dz = -(e/z) \exp(-z/d)$$

以上的分析虽然考虑了分子力的作用, 但是影响细胞粘附的因素还很多, 比如白细胞表面不光滑, 有皱折^[5], 又如有些细胞的表面有微绒毛^[16], 这些都不可避免地会影响到细胞的粘附行为. 所以上面的理论模型只有通过实验来检验并且不断完善.

4 细胞粘附的实验研究

生物力学中用于研究细胞粘附的实验技术主要有流动小室技术, 微吸管技术, 离心技术及 AFM 技术. 流动小室技术是用某细胞悬液 (如淋巴细胞液) 冲过流动小室底部培养的细胞层 (如内皮细胞层) 或包被的粘附分子层 (如 ICAM-1 层), 最后计算粘附的细胞对数的方法. 离心方法是在 96 孔板上培养细胞或包被粘附分子层, 然后用白细胞悬液与之共同孵育, 最后离心, 清洗, 计数. 这两种方法由于简便易行, 广为生物学界采用, 但是它们有不够精确的缺点.

AFM 技术和微吸管技术则克服了这一点. AFM 技术是用专用设备 AFM 进行原子力测量的技术. 运用它可以测量受体配体之间的单键力. 简言之, 首先把亲和素夹在包被了生物素的 AFM 尖与包被了生物素的聚合物珠之间从而使亲和素与生物素共价地结合, 然后让受体配体分别与 AFM 尖和聚合物珠相连. 最后拉开受体配体端, 测量力的值. 由于共价键的强度远远高于其它分子键的强度, 所以拉开时的断裂点必然在受体或配体一端. 由此可以通过测量该断裂力, 得知受体配体间的粘附力.

微吸管技术是利用微吸管中的负压对细胞进行直接操作的技术. 60 年代, Rand 和 Burton 首次用此方法测定红细胞的变形性. Sung 等从 70 年代开始将它用于白细胞粘附的研究^[6,16]. 他们用微吸管吸住某一种细胞, 让它去接触另一种细胞或一粘附分子层, 接触一段时间后, 操作微吸管并调节负压使粘附的细胞与细胞或细胞与粘附分子层分离. 粘附的强度用下面的公式计算:

$$F_c = P_c \times \pi (R_p)^2$$

其中, P_c 是临界的负压值, R_p 是微吸管管口的内径. Sung 等用此方法成功地研究了淋巴细胞^[16~18] 和成纤维细胞中与粘附有关的问题. 80 年代, Evans 对细胞粘附和微吸管技术作了大量研究^[19,20], 并在 90 年代对微吸管技术进行了重要革新^[21~23], 使之不仅能够测量胞间粘附力, 而且能够测量分子键的单键力. 他用化学上固定过的红细胞作为力学的传感器, 让另一

细胞与之进行十分短暂的点接触(即接触面极小的接触),通过传感器的变形看粘附的情况(见图3).每一次实验往往进行30次点接触以得出统计效果.

由于细胞接触时间极短(一般几秒钟)且接触面积积极小(大约 $1\mu\text{m}^2$),Evans经过理论计算和荧光实验证明,在这种接触条件下,所测得的粘附强度是一个或几个粘附分子键的强度,基本属于单键力的范围.

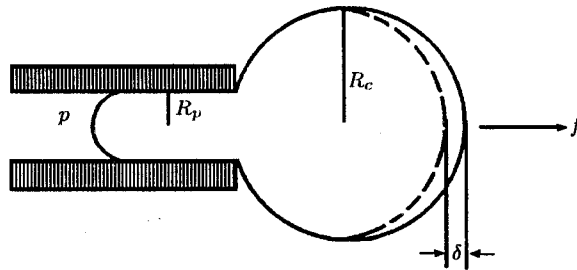


图3 微吸管实验中 Evans 通过红细胞的变形进行力学分析的示意图

与此同时,其他实验室也开展了一些微吸管实验,把它的应用领域拓宽到肿瘤细胞粘附及与爱滋病有关的研究.利用不经过固定的红细胞作为力学传感器,Cheng Zhu 不仅突破了他自己的理论模型^[24],而且继承并发展了 Evans 的单键力理论和实验方法^[25].他采用化学包被的方法^[26,27]在红细胞表面包被上研究所需要的粘附分子,用它与表面自然表达粘附分子的另一细胞作粘附实验.更进一步,他引入了统计学方法对粘附的频率进行了分析,并改进了单键力计算公式使之更为简明确:

$$f = \delta/c$$

其中, δ 为单键力作用下细胞顶部的变形

$$c = \ln \left[\left(1 + \sqrt{1 - \bar{R}_p^2} \right) / \left(\bar{R}_p \sqrt{2\alpha \bar{B}} \right) \right] - \frac{(1 - \alpha)^2}{4}$$

$$\bar{R}_p = R_p/R_c, \quad \alpha = 0.6573, \quad \bar{B} = B/(T * R_c^2), \quad T = -0.5P(R_p^{-1} - R_c^{-1})$$

B 为弯矩与弯曲变形之间模量^[28].

5 细胞粘附力学研究的评论与展望

近20年来,细胞粘附的力学研究发展迅速.在细胞水平,细胞粘附问题的力学模型已经建立起来,并且与初步的实验结果符合^[29].但是,也存在一些问题.比如忽略了在有些细胞表面的皱折和微绒毛等情况;而细胞表面的这些情况对于细胞粘附会有很大的影响.其影响范围究竟有多大,或者说,已有的模型与实际的偏差有多少,还需要从大量的实验中得知.另外,实验数据的缺乏也使得方程中的一些系数不能确定下来.所以,实验数据的积累在当前是十分需要的.

在分子水平,运用物理和化学变量以及数学方程已经在描述粘附分子的力学特性方面迈出了重要的一步^[14,30].不仅如此,在运用流动小室,微吸管等技术研究不同类型的粘附分子(如免疫球蛋白家族,选择素家族和整合素家族)之间的功能差异方面也取得了一些进展^[28,31~35].但是,在这一微观领域中,许多问题还都是未知的.一些基本方程和变量仍有不确定的地方.而用微吸管技术测量单键力还有不少疑问.此外,实验的技术和方法仍需要不断革新以适应研究分子领域事物的需要.

总之, 尽管存在上述一些问题, 但是生物力学向微观领域发展的势头是不可阻挡的, 特别是在描述介导粘附的分子事件方面开辟了一个新的领域. 在我国, 细胞粘附的力学理论和实验研究刚刚开始, 尽管有不少困难, 可是已经有了良好的开端^[36], 相信细胞粘附的生物力学研究必将会在我国蓬勃发展起来的.

参 考 文 献

- 1 Springer T A. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*, 1990, 346: 425~434
- 2 Michael P Bevilacqua. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol*, 1993, 11: 767~804
- 3 Springer T A. Traffic signal on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol*, 1995, 57: 827~872
- 4 Evans E A. Minimum energy analysis of membrane deformation applied to pipet aspiration and surface adhesion of red blood cells. *Biophys J*, 1980, 30: 265~284
- 5 Schmid Schonbein G W, Sung K L P, Tozern H, Skalak R, Chien S. Passive mechanical properties of human leukocytes. *Biophys J*, 1981, 36: 243~256
- 6 Sung K L P, Sung L A, Crimmins M, Burakoff S J, Chien S. Dynamic changes in viscoelastic properties in cytotoxic T-lymphocyte mediated killing. *J Cell Sci*, 1988, 91: 179~189
- 7 Sato M, Theret D P, Wheeler L T, Ohshima N, Nerem R M. Application of the micropipette technique to the measurement of cultured porcine aortic endothelial cell viscoelastic properties. *J Biomech Eng*, 1990, 112: 263~268
- 8 Bongrand P, Capo C, Depieds R. Physics of cell adhesion. *Prog Surface Sci*, 1982, 12: 217~285
- 9 Jan K M, Chien S. Role of surface electric charge in red blood cell interactions. *J Gen Physiol*, 1973, 61: 638~654
- 10 Ohsima H, Makino K, Kondo T. Electrostatic interaction of two parallel plates with surface charge layers. *J Colloid Interface Sci*, 1987, 116: 196~210
- 11 Jan K M. Role of hydrogen bonding in red cell aggregation. *J Cell Physiol*, 1979, 101: 49~55
- 12 Evans E A. Force between surfaces that confine a polymer solution: derivation from self-consistent field theories. *Macromolecules*, 1989, 22: 2277~2286
- 13 Cheng D, Skalak R, Sung K L P, et al. Passive deformation analysis of human leukocytes. *Journal of Biomechanical Engineering*, 1988, 110: 27~35
- 14 Bell G I, Dembo M, Bongrand P. Cell adhesion: Competition between nonspecific repulsion and specific bonding. *Biophys J*, 1984, 45: 1051~1064
- 15 Torney D C, Dembo M, Bell G I. Thermodynamics of cell adhesion: II Freely mobile repellers. *Biophys J*, 1986, 49: 501~507
- 16 Sung K L Paul, Peter Kuhlman, Fausto Maldonado, Bridget A Lollo, Shu Chien, Adrienne A. Brain force contribution of the LFA-1/ICAM-1 complex to T cell adhesion. *J Cell Science*, 1992, 103: 259~266
- 17 Sung K L P, Sung L A, Crimmins M, Burakoff S J, Chien S. Determination of junction avidity of cytolytic T cell and target cell. *Science*, 1986, 234: 1405~1408
- 18 Aydin Tozeren, Sung K L P, Sung LA, Dustin LM, Chan PY, Springer T A, Chien S. Micromanipulation of adhesion of a Jurkat cell to a planar bilayer membrane containing lymphocyte function antigen 3 molecules. *J Cell Biol*, 1992, 116: 997~1006
- 19 Evans E A. Detailed mechanics of membrane-membrane adhesion and separation: I Continuum of molecular cross-bridges. *Biophys J*, 1985, 48: 175~183
- 20 Evans E A. Detailed mechanics of membrane-membrane adhesion and separation: II Discrete kinetically trapped molecular cross-bridges. *Biophys J*, 1985, 48: 185~192
- 21 Evans E A, Derk D, Leung A. Detachment of agglutinin bonded red blood cells: I Forces to rupture molecular-point attachment. *Biophysics J*, 1991, 59: 838~848
- 22 Evans E A, Derk D, Leung A. Detachment of agglutinin bonded red blood cells: II Detachment with large contact area. *Biophysics J*, 1991, 59: 849~860
- 23 Evans E A, Derk D, Leung A. Detachment of agglutinin bonded red blood cells: III Detachment with large contact area. *Biophysics J*, 1991, 59: 861~869
- 24 Zhu C. A model of transient processes in cell adhesion. *FASEB J*, 1991, 5: 1639(A652)
- 25 Zhu C, Chesla S E, Selvaraji P. Separation forces and detachment mechanisms of CD16(Fc γ RIII) isoforms from ligands at the single bond level. *BED bol*, 1995, 29: 455~461

- 26 James W Goding. The chromic chloride method of coupling antigens to erythrocytes: definition of some important parameters. *J Immunol Methods*, 1976, 10: 61~66
- 27 Kofler R, Wick G. Some methodologic aspects of the chromium chloride method for coupling antigen to erythrocytes. *J Immunol Method*, 1977, 16: 201~209
- 28 Shimizu Y, Van Seventer G A, Ennis E, Newman W, Horgan K J, Shaw S. Crosslinking of the T cell-specific accessory molecules CD7 and CD28 modulates T cell adhesion. *J Exp Med*, 1992, 175: 577~579
- 29 Tozeren A. Cell-cell, cell-substrate adhesion: theoretical and experimental considerations. *J Biomech Eng*, 1990, 112: 311~321
- 30 Axelrod D. Lateral motion of membrane proteins and biological function. *J Membr Biol*, 1983, 75: 1~10
- 31 Smith C W, Marlin S D, Rothlein R, Toman C, Anderson D C. Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. *J Clin Invest*, 1989, 83: 2008~2017
- 32 Diamond M S, Staunton D E, Deffougerolles A R, Stacker S A, Garcia-Aguilar J, Hibbs M L, Springer T A. A counter-receptor for Mac-1(CD11b/CD18). *J Cell Biol*, 1990, 111: 3129~3139
- 33 Debra M Meyer, Michael L Dustin, Christopher P Carron. Characterization of intercellular adhesion molecule-1 ectodomain(sICAM-1) as inhibitor of lymphocyte function-associated molecule-1 interaction with ICAM-1. *J Immunol*, 1995, 155: 3578~3584
- 34 Umberto Dianzani, Fabio Malavasi. Lymphocyte adhesion to endothelium. *Critical Rev Immunol*, 1995, 15(2): 167~200
- 35 Seth R, Raymond F D, Makgoba M W. Circulation ICAM-1 isoforms: diagnostic prospects for inflammatory and immune disorders. *Lancet*, 1991, 338: 83~84
- 36 Zhang Jing, Zeng Y J. A Preliminary study of non-adhesive state of LFA-1 at a single bond level. In: Annals of Biomedical Engineering, 1997 Annual Fall Meeting, San Diego, Oct, 1997. Blackwell Science Inc, 1997. 274

ADVANCES IN BIOMECHANICAL RESEARCH OF CELL ADEHESION

Zhang Jing Zeng Yanjun

Biomechanics and Medical Information Institute, Beijing Polytechnic University, Beijing 100022, China

Abstract This paper reviews a new research area in biomechanics—the biomechanical research of cell adhesion, including some basic concepts, the mechanical analysis methods and experimental methods. It is shown that the trend of biomechanical research on cell adhesion is from cellular mechanics to molecular mechanics and will go deep into microscopic mechanics in a near future.

Keywords adhesion contact stress, adhesion energy density, molecular bond, single bond strength, cell-mechanics