

K562 细胞转 p16 基因前后流变学特性的改变

姚伟娟¹, 梁玉², 陈凯¹, 谢利德¹, 孙大公¹, 王新娟², 文宗曜^{1*}

(北京大学医学部 1. 基础医学院物理教研室; 2. 生化与分子生物学系, 北京 100083)

摘要: 将 p16 抑癌基因转入 p16 阴性的人红白血病细胞株 K562, 采用微吸管技术并配合某些生物物理技术, 研究 K562 细胞在转基因前后生物物理特性的改变。结果表明, p16 基因的引入使 K562 细胞表面电荷密度增加, 抗渗透破碎能力变差。用标准固体粘弹性模型拟合微吸管实验结果后, 发现表征细胞最大变形能力的弹性系数 K_1 增加, 而另一弹性系数 K_2 粘性系数 μ 无明显改变, 说明 p16 使 K562 细胞刚性增大。这些结论将加深对 p16 基因抑制肿瘤转移和基因治疗理论和实验的认识。

关键词: K562 细胞; p16 基因; 微吸管; 生物流变特性

中图分类号: Q66 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6737(2001)02-0356-07

到目前为止,人们对红细胞的生物力学特性已经了解和研究得非常透彻,对白细胞和肿瘤细胞生物物理特性的研究也越来越多。这是因为,白细胞具有独特的形态和粘附特性,这使得它在微循环中产生比红细胞大得多的阻力。在人体的病理部位,如低流速的毛细血管网络中,白细胞的这一特性很容易被扩大^[1], O. Linderkamp 等^[2,3]就发现患败血症的新生儿的未成熟和活化中性粒细胞被动变形能力下降,这会损害微循环,增加他们器官受损的危险。同样,中性粒细胞的变形性下降,会使新诊断出的但未加以控制的胰岛素依赖的糖尿病儿童患急性心血管并发症的危险增加。可见白细胞或肿瘤细胞在血管灌注中具有非常重要的作用。同时,白细胞或肿瘤细胞可以在某些部位受到因子的刺激而活化,跨过血管内皮而进行转移^[4],执行特定的生理功能或生成新的肿瘤。因此,研究白细胞及肿瘤细胞的生物流变特性对于解释与之相关的生理现象有重要意义。八十年代初,人们使用微吸管(micropipette)研究了白细胞的流变特性^[5],提出了用标准固体粘弹性模型来描述白细胞在发生小应变时的变形,从而为进一步研究健康和病人的白细胞的流变特性提供了基础。Sung K-L P. 等^[6]研究了细胞毒 T 淋巴细胞介导的杀伤过程中淋巴细胞与靶细胞粘弹性的变化。龙勉等^[7]发现肝实质瘤细胞较胎肝细胞更容易变形,所以易发生转移。用具有诱导分化作用的苦参碱作用人红白血病细胞 K562 后, K562 的粘弹性发生变化^[8]。

近年来,分子生物学用基因疗法治疗肿瘤取得了长足的进步,例如,在 2000 年, Delgado 等^[9]研究了某些基因对白血病细胞增殖的抑制作用。另外,我们已经知道 p16 基因是一种重要的抑癌基因,它的缺失、突变可造成多种肿瘤的恶性增生。K562 细胞就是 p16 阴性的一种异常的分化不完全的血细胞,仅能提供胚胎期和胎儿期红系细胞环境^[10]。许多学者发现 p16 基

收稿日期: 2000-09-04

基金项目: 国家自然科学基金(编号 39770203)和博士点基金(编号 9729)资助 * 责任作者

作者简介: 姚伟娟, 1975 年生, 博士, 电话: (010)62092419, E-mail: ywj@mail.bjmu.edu.cn.

因可以抑制 K562 细胞的增殖^[11,12],并认为 p16 也许是对病人进行基因治疗的合适基因。所以研究 p16 引起的 K562 细胞生物学特性和生物流变学特性对于探讨基因治疗是有益的,但是人们研究前者较多,而后一方面的工作还未见过报道。本文将使用微吸管技术,并配合某些生物物理测量技术对 K562 细胞转 p16 前后的生物物理特性进行比较,以探讨 p16 抑癌作用和肿瘤转移的机理。

1 材料和方法

1.1 转 p16 基因的 K562 细胞的制备^[13]

方法简述如下:K562 为本室冻存,p16 表达载体 pBABE-puro-p16 由美国 NIH 提供,全长 6.1kb,带有原核筛选标记 Amp 和真核筛选标记 Puro。用 FuGene6 介导 p16 表达载体转染 K562 细胞,进行耐药株筛选,获得转基因 K562(K562-p16)。经过 RT-PCR、流式细胞计和细胞生长曲线的实验检测证明,K562-p16 细胞中 p16 基因存在和表达,其生长受到明显抑制,G₁ 期细胞分布增加,凋亡细胞数增加。

1.2 K562 和 K562-p16 的细胞培养

RPMI1640 培养液加 10% 小牛血清和双抗,K562 细胞 1-2 天传代,K562-p16 细胞 2-3 天传代。在细胞的对数生长期收集细胞,进行各项实验。

1.3 细胞电泳率的测定

用 9% (w/v) 蔗糖溶液将细胞配成 2×10^6 /ml 的悬液,在细胞电泳仪(LIANG-100,上海医科大学生产)测定其电泳率(电压 40V,30°C),选取 10 个细胞进行测量,求平均值。

1.4 细胞渗透脆性的测定

用 PBS(pH7.4,295mOsm/kg) 和蒸馏水以不同比例混合,配成 12 种不同渗透压的 PBS 溶液,渗透压范围在 7-295mOsm/kg 之间。将细胞配成 2×10^6 /ml 的悬液,将悬液以每份

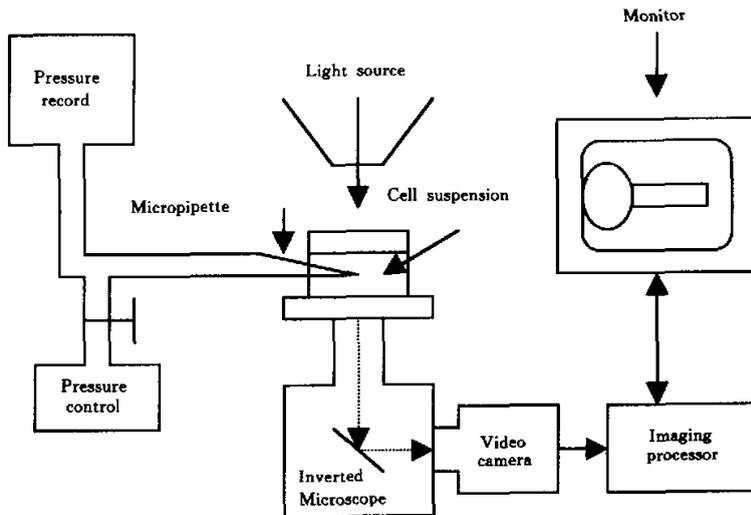


Fig.1 Schematic diagram of a micropipette system

100 μ l 分别置于 E_p 管中,离心(1000r/min, 5min)后弃上清,再分别加入 500 μ l 不同渗透压的 PBS 溶液,充分混匀。用细胞计数板计各管中的完整细胞数,以 295mOsm/kg 管的细胞数为标准,其它管中的细胞数除以标准细胞数,得到各种渗透压下的未破碎细胞百分数,绘制渗透脆性曲线。

1.5 细胞粘弹性的测定^[7]

微吸管系统由倒置显微镜(重庆光学仪器厂生产)、显微操作仪、图象处理器、压力控制记录系统和微管等部分组成,如图 1 所示。将 0.5ml 细胞悬液(1×10^6 /ml)注入特定小室内,置于倒置显微镜载物台上。采用内直径为 2.41-3.13 μ m 的微吸管,利用显微操作仪控制微吸管尖端靠近细胞表面,打开压力控制与记录系统并通过微管给细胞施以一定的阶跃负压,使细胞的一小部分吸入微管内。利用图象记录仪每隔 120ms 记录一帧图象,从而可测量到不同时间内细胞被吸入管内的变形值。实验在室温(30 $^{\circ}$ C)下进行。采用标准固体粘弹性模型(如图 2)来拟合实验结果,其方程如下^[5]:

$$\sigma + (\mu/K_2)\partial\sigma/\partial t = K_1\epsilon + \mu(1 + K_1/K_2)\partial\epsilon/\partial t \quad (1)$$

其中 σ 和 ϵ 为应力和应变, $\partial\sigma/\partial t$ 、 $\partial\epsilon/\partial t$ 分别为应力和应变对时间的偏导数。 K_1 、 K_2 为弹性系数, μ 为粘性系数。

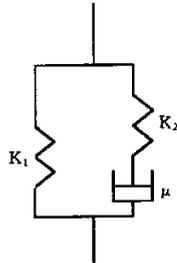


Fig.2 Schematic drawing showing the three viscoelastic elements used to model the rheological properties of K562 cells. K_1 and K_2 are elastic elements, and μ is a viscous element

2 结 果

2.1 细胞电泳率

转基因前的 K562 细胞、转空载体的 K562 细胞和 K562-p16 的电泳率如图 1 所示。可见,未转 p16 的和转空载体的 K562 细胞具有相近的电泳率,而 K562-p16 的电泳率则明显增高($p < 0.05$)。说明转基因后,K562 细胞表面电荷显著增多。

Table 1 The electrophoretic mobility for K562, K562 with vacant vector and K562-p16. ($\bar{x} \pm SD$)

(n=10)	K562	K562 with vacant vector	K562-p16
Electrophoretic mobility(μ m/s/V/cm)	0.76 \pm 0.02	0.79 \pm 0.11*	0.92 \pm 0.07**

Compared with K562: * $p > 0.1$, ** $p < 0.05$

2.2 细胞渗透脆性

转基因前后 K562 细胞的渗透脆性曲线如图 3 所示,两条曲线的形状有较大差异。当溶液

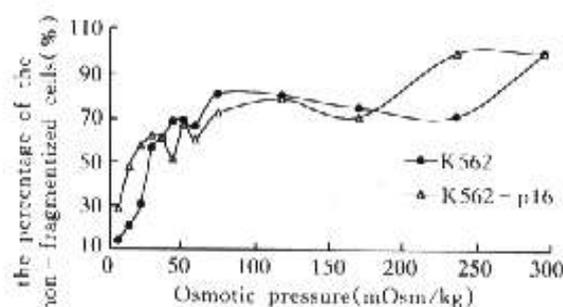


Fig.3 The osmotic fragility curves of the K562 and K562-p16 cells

2.3 细胞的粘弹性

K562-p16 细胞在 196N/m^2 的阶跃负压作用下,开始有一个快速响应,然后随着时间的增加,其在微吸管内的部分缓慢伸长(如图 4 所示),K562 也显示出相同的反应。图 5 给出了两种细胞在管内的长度 $L(t)$ 随时间的变化情况。根据标准固体粘弹性模型,细胞的初始变形程度与弹性系数 K_1 、 K_2 有关,并随 $[(1/K_1) + (1/K_2)]$ 变化,粘性系数 μ 则反映了细胞变形对时间的依赖性。将测得的实验结果用方程(1)进行拟合,得到 K562 细胞在转基因前后的粘弹性系数(列于表 2)。可见,p16 基因使 K562 细胞的一个弹性元 K_1 显著增加($p < 0.05$),而另一个弹性元 K_2 和粘性系数 μ 则没有明显变化。

Table 2 Viscoelastic elements of different cells. ($x \pm SD$)

	K562(n=28)	K562-p16(n=30)	Erythrocytes ^[14]	Leukocytes ^[15]
K_1 (dyn/cm ²)	199 ± 128	$247 \pm 109^{**}$	6×10^{-3}	275 ± 119
K_2 (dyn/cm ²)	169 ± 187	140 ± 84	-	737 ± 346
μ (dyn·s/cm ²)	94 ± 74	85 ± 56	$(6-8) \times 10^{-4}$	130 ± 54

**Compared with K562: $p < 0.05$

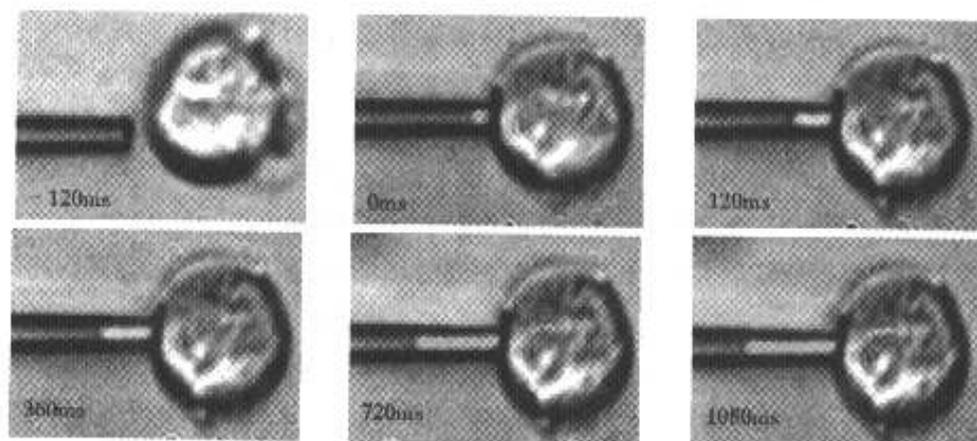


Fig.4 Sequence of photographs showing the progressive deformation of the K562-p16 cell (resting stage) at the indicated times after the cell was contacted with the pipette (0 ms). The aspiration pressure was 196N/m^2

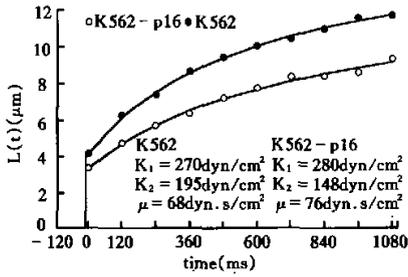


Fig.5 The length in the pipette, $L(t)$, as a function of time. The continuous lines are the theoretical curves obtained by using the best-fit coefficient K_1 , K_2 and μ based on the standard solid viscoelastic model

3 讨 论

治疗肿瘤的关键是防止肿瘤的转移和控制肿瘤的恶性增生,这也是基因治疗的目的。p16基因是一种抑癌基因,目前不少学者已发现p16可明显抑制肿瘤的增殖,这一点也被我们的实验所证实^[13]。那么p16基因是否可以通过改变肿瘤细胞的流变学特性,以达到抑制其转移的效果呢?这是我们比较关心的一个问题。我们知道,肿瘤转移有四个环节,(1)癌细胞脱离原发位置,这是肿瘤转移的关键;(2)癌细胞浸润间质及侵入血管;(3)癌细胞在血管中移行,在血流中癌细胞大部分死亡,少部分依靠与血管内皮细胞粘附迁移并脱离血管。癌细胞在血行中与内皮细胞、中性粒细胞等粘附可能更有助于它们转移;(4)癌

细胞游离出血管并在转移处增生。如果p16基因可以影响其中的某一个环节,就可以有效地抑制肿瘤转移。为了研究这个问题,我们选用p16阴性的人红白血病细胞K562,初步观察了转入p16基因后K562细胞的流变学、生物力学特性的改变。

首先,细胞电泳实验表明,转基因后,K562细胞表面电荷显著增加。由于血管内皮细胞也带有负电荷,所以K562-p16与内皮细胞之间的斥力会增加,这就提示我们,p16基因也许通过影响细胞周期而影响细胞表面电荷,进而抑制肿瘤细胞与血管内皮细胞的粘附。

第二,从渗透脆性实验我们看到,虽然K562-p16在正常渗透压范围内能保持较完整的形态,但在渗透压有较大变化时,细胞的存活能力不及未转基因的K562。这说明K562细胞作为肿瘤细胞更容易适应较恶劣的环境,而外源p16基因的引入使K562细胞向容易被破坏的方向转化。

第三,K562-p16细胞的粘弹性与K562相比其弹性模量 K_1 明显增加, K_2 与 μ 无明显变化。由于细胞的最大变形值正比于 $1/K_1$, K_1 的增加说明细胞的最大变形能力变差,这一方面使细胞转移较为困难,另一方面又使它在血流中被破坏的几率增大,可见p16有助于抑制癌细胞的转移。将K562和K562-p16与正常白细胞相比较,发现两者的 K_2 、 μ 都较正常白细胞小很多,而K562-p16的 K_1 与白细胞的 K_1 非常接近。这些差异说明,转基因的K562-p16变得不像癌细胞那样易于变形、滚动及穿过内皮细胞扩大转移范围了。由于K562是人红白血病细胞,是异常停留在胚胎期和胎儿期的红细胞来源的肿瘤细胞,所以我们也将其与红细胞的粘弹性系数作比较,两者差5个数量级(见表2),这是与二者所处的不同发育阶段以及不同的细胞结构相关联的。另外,我们还注意到,与宋关斌等^[8]对同一细胞株K562所测得的弹性系数相比,本文的结果在数量级上是相同的,但绝对值低两倍,这可能是实验条件不同造成的差异。本文所使用的微吸管直径为 $2\sim 3\mu\text{m}$,而宋关斌等使用的直径为 $5\mu\text{m}$ 左右。当施加相同的负压时,在直径小的管口处产生的作用力大,细胞的变形就大(图4),反之亦然,所以由测量的变形值确定的弹性系数偏小,不过这并不妨碍转基因前后K562细胞粘弹性的比较。但是,使

用管径小的微吸管有一定的弊端,因为管径小时,吸入管内的部分将主要是细胞膜上的成分,此时所得的结果主要反映细胞骨架和膜脂的变形能力。而使用较大的管径时,细胞的较大一部分被吸入,核也可能参与变形,这样更能反映细胞整体的变形特性,更符合本文所使用的标准固体弹性模型中将细胞看作均质球体的假设^[5]。这一点是我们应该加以考虑和改进的。

细胞的表面电荷、渗透脆性与其细胞的粘弹性的改变都与细胞膜上的骨架蛋白、膜蛋白、膜脂的组成和分子结构有密切关系,对转基因 K562 细胞的这三方面的研究提示我们, p16 基因可能会引起 K562 细胞膜上某些成分的改变,这种改变势必造成细胞本身流变学特性及生物力学特性的改变。K562 细胞的粘性系数 μ 和弹性系数 K_2 无明显变化,说明 p16 基因是通过改变细胞的生长而间接使细胞膜上的某种特定的结构发生改变,而不能象秋水仙素^[7]、苦参碱^[8]等药物那样对膜结构产生全面而剧烈的影响。总之,上述事实证明了引入外源 p16 基因对癌细胞的治疗作用。当然也不能排除这种改变是由于 p16 基因通过影响细胞周期,而不同周期细胞之间存在上述差异的可能。但不管怎样,这个工作将加深我们对 p16 基因治疗肿瘤的理论

参考文献:

- [1] Schmid-Schönbein GW. *Leukocyte kinetics in the microcirculation*[J]. *Biorheology*, 1987,24:139-151.
- [2] Linderkamp O, Ruef P, Brenner B, et al. *Passive deformability of mature, immature and active neutrophils in healthy and septicemic neonates*[J]. *Pediatric Research*, 1998,44(6):946-950.
- [3] Linderkamp O, Ruef P, Zilow EP, Hoffmann GF. *Impaired deformability of erythrocytes and neutrophils in children with newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus*[J]. *Diabetologia*, 1999,42:865-869.
- [4] Imhof BA, Dunon D. *Leukocyte migration and adhesion*[J]. *Advances in Immunology*, 1995,58:345-416.
- [5] Schmid-Schönbein GW, Sung K-L P, Tozeren H, et al. *Passive mechanical properties of human leukocytes*[J]. *Biophysical Journal*, 1981,36:243-256.
- [6] Sung K-L P, Sung LA, Crimmins M, et al. *Dynamic changes in viscoelastic properties in cytotoxic T-lymphocyte-mediated killing*[J]. *Journal of Cell Science*, 1988,91:179-189.
- [7] 龙勉,吴泽志,王红兵,等. 肝细胞粘弹性研究[J]. *生物物理学报*,1996,12(3):169-173.
- [8] 宋关斌,俞为群,许相儒,等. 人类红白血病细胞株 K562 细胞粘弹性的实验研究[J]. *中国医学物理学杂志*,1999,16(2):115-116.
- [9] Delgado MD, Vaqué JP, Arozarena I, et al. *H-, K- and N-Ras inhibit myeloid leukemia cell proliferation by a p21WAF1-dependent mechanism*[J]. *Oncogene*, 2000,19(6):783-790.
- [10] Rutherford TR, Clegg JB, Weatherall DJ. *K562 human leukaemic cells synthesise embryonic haemoglobin in response to haemin*[J]. *Nature*, 1979,280:164.
- [11] Quesnel B, Preudhomme C, Lepelletier P, et al. *Transfer of p16^{INK4}/CDKN2 gene in leukaemic cell lines inhibits cell proliferation*[J]. *British Journal of Haematology*, 1996,95(2):291-298.
- [12] Gombart AF, Yang R, Campbell MJ, et al. *Inhibition of growth of human leukemia cell lines by retrovirally expressed wild-type p16^{INK4A}*[J]. *Leukemia*, 1997,11(10):1673-1680.
- [13] 王新娟,张勇,梁玉,等. p16 基因抑癌作用的体外实验[J], *中国学术期刊文摘(科技快报)*,2001,7(3):372-375.
- [14] Hochmuth RM, Worthy PR, and Evans EA. *Red cell extensional recovery and the determination of membrane viscosity*[J]. *Biophysical Journal*, 1979,26:101-114.
- [15] 陈槐卿. *血液流变学原理及其临床应用*[M]. 成都:四川教育出版社,1989. 149.

**CHANGES OF BIORHEOLOGICAL BEHAVIOR OF K562 CELLS
AFTER p16 GENE TRANSFER**

YAO Wei-juan¹, LIANG Yu², CHEN Kai¹, XIE Li-de², SUN Da-gong¹,
WANG Xin-juan², WEN Zong-yao¹

(1. Hemorheology Center, Department of Biophysics; 2. Department of Biochemical and Molecular
Biology, School of Basic Medical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract: p16 gene was transferred into human erythroleukemia cell line K562 with p16 deletion. The changes of biophysical behavior of K562 cells after gene transfer were studied with micropipette and some biophysical techniques. The results showed that p16 gene increased the surface charge and impaired the osmotic fragility of K562 cells. A standard solid viscoelastic model was employed to fit the data obtained by micropipette method. The elastic element K_1 , which is inversely proportional to the maximum deformation for long period of time, was found increased while the viscous element μ and another elastic element K_2 were unchanged. This indicated that K562 cells became more rigid after p16 transfer. This study deepened our knowledge of the suppression effect of p16 gene on tumor metastasis and gene therapy.

Key Words: K562 cells; p16 gene; Micropipette; Biorheological characteristics