

物理学在肿瘤细胞的极性及迁移研究中的应用

王璟 杨根 刘峰

Application of physics in the study of cell polarity during tumor cell migration

Wang Jing Yang Gen Liu Feng

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 64, 058707 (2015) DOI: 10.7498/aps.64.058707

在线阅读 View online: <http://dx.doi.org/10.7498/aps.64.058707>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn/CN/Y2015/V64/I5>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

系统规模对群体行为的效果

[Effects of system size on population behavior](#)

物理学报.2013, 62(11): 118701 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.62.118701>

专题: 癌症生物物理

物理学在肿瘤细胞的极性及其迁移研究中的应用*

王璟¹⁾ 杨根¹⁾ 刘峰^{1)2)†}

1)(北京大学物理学院, 核物理与核技术国家重点实验室, 北京 100871)

2)(北京大学定量生物中心, 北京 100871)

(2014年12月2日收到; 2015年2月6日收到修改稿)

肿瘤细胞和所处微环境的物理性质, 以及它们之间的相互物理作用对于肿瘤的产生、发展与转移都有极大的影响, 这使得从物理学角度探索肿瘤研究成为了必然趋势. 肿瘤转移是癌症致死的最大因素, 而肿瘤细胞迁移中的极化是肿瘤转移的重要一步. 本文总结了物理学实验和模型在揭示细胞迁移和极化机理方面的贡献. 实验上应用最新的微流控芯片技术与表面微模型化技术等手段, 研究空间维度、黏附行为、机械力等物理信号对于细胞极性的建立与保持以及细胞迁移行为的影响后, 发现物理信号与生化反应之间的相互耦合对于细胞迁移有着至关重要的作用; 理论上基于扩散反应方程, 已经建立了一系列表征细胞极化的模型. 今后的研究将结合物理实验建立肿瘤细胞迁移中的极化模型, 进而发展针对肿瘤细胞感知物理信号的新的治疗肿瘤转移方法.

关键词: 肿瘤转移, 细胞迁移, 细胞极性

PACS: 87.19.xj, 87.17.Jj, 87.17.Rt

DOI: 10.7498/aps.64.058707

1 引言

世界卫生组织(World Health Organization, WHO)发表的《全球癌症报告2014》指出癌症是人类死亡的首要原因. 虽然随着科学技术的飞速发展, 在肿瘤诊断与治疗领域已经取得了长足的进步, 但癌症患者与死亡病例在全球范围内尤其是在中国仍然以惊人的速度增加. 因此解决癌症这个长久以来困扰着人类的问题的需求无疑正变得愈加迫切. 而与癌症相关的死亡病例中大约有90%都是由肿瘤的转移所造成^[1,2]. 目前癌症研究的关键之一是搞清肿瘤转移(metastasis)的机理.

肿瘤转移过程可以分解成多个步骤, 包括了肿瘤细胞从原发部位脱离、迁移浸润周围组织、内渗进入血管成为循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)、经血液运输后黏附在远处血管、外渗出血管以及在远处器官形成转移瘤等等(图1^[1-3]).

在转移过程中, 例如从原发部位到血管中以及出血管到远处器官等步骤里, 都存在着细胞通过胞体形变进行的定向移动, 或者称之为细胞迁移. 而细胞极性的建立, 或者称之为细胞极化, 正是细胞迁移的开端. 因此, 要更加了解肿瘤转移的整个过程并进一步发展出新的诊断与治疗手段, 对肿瘤细胞的极性及其迁移进行透彻的研究是必不可少的.

虽然传统的生物学研究已经揭示了调控肿瘤细胞迁移的诸多分子及其信号通路, 但是越来越多的研究表明, 借助物理学的定量研究的思想、测量手段以及模型, 将极大的推动我们对肿瘤细胞迁移的理解. 首先, 肿瘤是环境畸变导致基因突变而造成细胞内信号通路畸变等原因引发的. 不仅仅是生化因素, 肿瘤细胞所处微环境以及肿瘤细胞本身的物理与机械性质对于肿瘤的产生、发展和转移都具有巨大的影响. 在肿瘤的转移过程中, 当肿瘤细胞离开原发灶、进入血管或淋巴管、顺着血液循环、出血管或是侵袭远处组织时都会受到物理力的作

* 国家自然科学基金(批准号: 11434001)和科技部重大仪器专项(批准号: 2012YQ030142)资助的课题.

† 通信作者. E-mail: liufeng-phy@pku.edu.cn

用, 并且肿瘤细胞所经历的微环境的空间维度、拓扑学结构、几何形状以及硬度等等物理参数都在发生着巨大的变化, 因此我们需要引入物理学思想对这一过程进行分析. 其次, 肿瘤细胞迁移过程也绝不是某一个基因或是信号通路就可以完全解释的, 为了将这个庞大而复杂的系统有机地联合起来, 需要引入量化的数学模型, 同时将流体力学、非平衡态统计物理等理论融入原有的生物学模型. 最后, 先进的物理学测量技术与实验方法提供了肿瘤研究的新手段. 在观察与测量方面, 利用双光子显微镜以及远场超分辨随机光重建显微镜 (stochastic optical reconstruction microscopy, STORM) 等等, 在更高的时空尺度上观测细胞的各种行为与细胞

内的各种信号传导通路; 利用原子力显微镜、牵拉力显微镜等开展细胞的趋硬性分析^[4-7], 对细胞的杨氏模量和表面张力等等物理参数的测量^[8]以及癌细胞侵袭潜力与黏附力之间的关系^[9]等等研究; 采用光镊技术与磁镊技术等操纵肿瘤的单细胞与单分子; 使用微细加工技术 (例如微流控芯片) 来鉴别、分离与俘获 CTCs^[10-12] 或肿瘤干细胞 (cancer stem cell, CSC) 以及解析信号通路, 模拟体内环境研究癌细胞的迁移等^[13,14] (更具体的介绍参见同期综述). 总之, 在结合多种技术的基础之上, 我们将把从分子到细胞到组织等多个尺度的认知结合在一起, 实现在肿瘤研究上的突破.

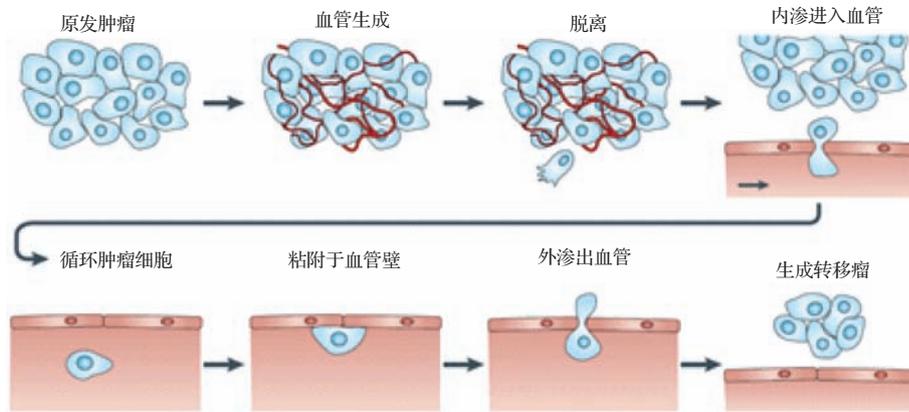


图1 肿瘤细胞转移过程^[3]

2 肿瘤细胞的迁移

2.1 不同细胞类型的细胞迁移模式

与肿瘤细胞迁移密切相关的生物学过程是上皮层细胞 (epithelial cell) 到间充质细胞 (mesenchymal cell) 的转化, 这一过程被简称为 EMT (epithelial-mesenchymal transition)^[15]. 这是因为不同类型的细胞迁移能力有所不同, 间充质细胞比上皮层类型的细胞迁移能力更强. 这两类细胞的主要差别是上皮层细胞有较多的 E-钙联蛋白, 因此细胞之间保持着较强的黏附. 而间充质细胞 E-钙联蛋白的表达量下调, 细胞之间的黏附消退, 迁移能力提高. 通常这两种类型的细胞被认为是肿瘤细胞态的双稳态, 两者之间存在相互转化. 不过目前的实验证据表明两态之间还存在一个过渡态^[16,17]. 即细胞仍然保留了一部分 E-钙联蛋白, 但是具有较强的迁移能力.

一般而言细胞迁移可以被分类为三种主要模式: 似变形虫 (amoeboid) 型 (比如白细胞), 延展型 (典型代表比如间充质细胞), 和联合型 (比如介于上皮层细胞和间充质细胞的过渡态细胞)^[14]. 某些细胞会在不同的环境下, 可能采用不同的迁移策略等, 在不同的模式之间转换. 单个细胞延展型迁移是一个周期性的过程. 通常由以下几步组成: 最开始是当细胞受到某种刺激后建立极性确定方向, 然后形成头部伪足并延伸出去, 接着伪足与细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 接触并形成新的黏着斑, 在肌动球蛋白的作用下细胞整体向前移动, 最后收回尾部. 以上的过程周而复始, 细胞便得以不断向前移动.

2.2 不同维度下的细胞迁移

细胞迁移受到许多因素调控, 其中物理信号有着举足轻重的作用, 比如细胞所处微环境的空间维度、基质硬度以及物理限制, 都对细胞的迁移速度

乃至迁移方式拥有巨大影响. 在肿瘤细胞出血管到远处组织的过程中, 既有存在于结缔组织与肌肉等的基底膜之间的一维通道^[14], 也有各种组织上的二维平面, 还有在纤维间质组织的相邻胶原纤维束之间的三维通道^[14]. 通过的各个通道的横截面积也大相径庭, 分布于 $10 \mu\text{m}^2$ 至大于 $300 \mu\text{m}^2$ ^[18], 因此可以说肿瘤细胞在迁移途中把各种各样的物理限制都经历过了.

为了将这些相互作用研究清楚, 研究人员进行了各种体外实验, 也得到了不少成果. 如图 2 所示^[19], 通过构建各种微环境以模拟肿瘤细胞转移过程中所处微环境具有的特定物理性质, 我们对于细胞在转移过程中如何响应各种物理信号有了更多了解. 迁移过程中细胞会伸出大而扁的片状伪足黏附在基质上并靠此移动, 然而这一模式主要是出现在二维基质平面上^[20,21]. 通过更进一步的实验发现, 当细胞部分进入三维基质中以后, 黏着斑变小并且其组成结构也与二维情形有所不同^[22-24]. 甚至当细胞完全进入三维基质之后, 黏着斑就难以检测到了, 这说明在三维基质中迁移时细胞对周围基质的黏附的作用减弱了^[24,25]. 在另一个关于细胞迁移潜力与细胞在基质上的黏附力大小的关系的研究中发现, 在二维基底上黏附力最弱但转移性最强的细胞的迁移速度最慢, 而在三维基质中高转移性的细胞没有黏附却能拥有最快的迁移速度^[9]. 由此可以看出, 黏附对于细胞迁移的影响是对维度敏感的. 此外, 细胞迁移的模式也是会随着所处基质的维度而改变的. 例如纤维肉瘤细胞在三维基质中耗尽斑联蛋白(一种可以在很多可动细胞的黏着斑、张力纤维以及头部发现的蛋白)后会采用非常规则的周期振荡模式来迁移^[26], 而在二维基底上细胞即便将斑联蛋白耗尽后也不会出现这种振荡模式, 基于表面微模型化(micropattern)技术的一维实验却可以重现这种振荡. 这不仅说明了斑联蛋白可以确保细胞在三维基质中进行随机迁移, 也说明了细胞在一维和三维情形下有相似的迁移表现, 二维情形和三维情形却不太相似. 这一细胞迁移的空间维度规律在其他的研究中也得到了印证. 在 NIH3T3 成纤维细胞的迁移研究中发现, 细胞在一维与三维情形中进行快速的单轴迁移, 独立于细胞外基质中的配体密度, 这与二维情况形成了鲜明的对比, 并且这两个维度下的迁移都比二维情况更依赖于微管的聚合^[27,28]. 此外, 成纤维细胞在一维线形基底上的黏附斑是微小的点且呈极性分

布^[27,28], 这也与三维情形相类似. 从以上种种可以看出, 空间维度信号可以明显地改变细胞的黏附与迁移表现. 通过进行微环境的空间维度、硬度、物理限制等物理参数以及细胞自身的物理性质对细胞迁移的影响的研究, 我们得到了关于肿瘤细胞本身及其迁移过程的许多信息, 这无疑使得我们向更行之有效的转移性肿瘤的诊断与治疗方法又迈出了

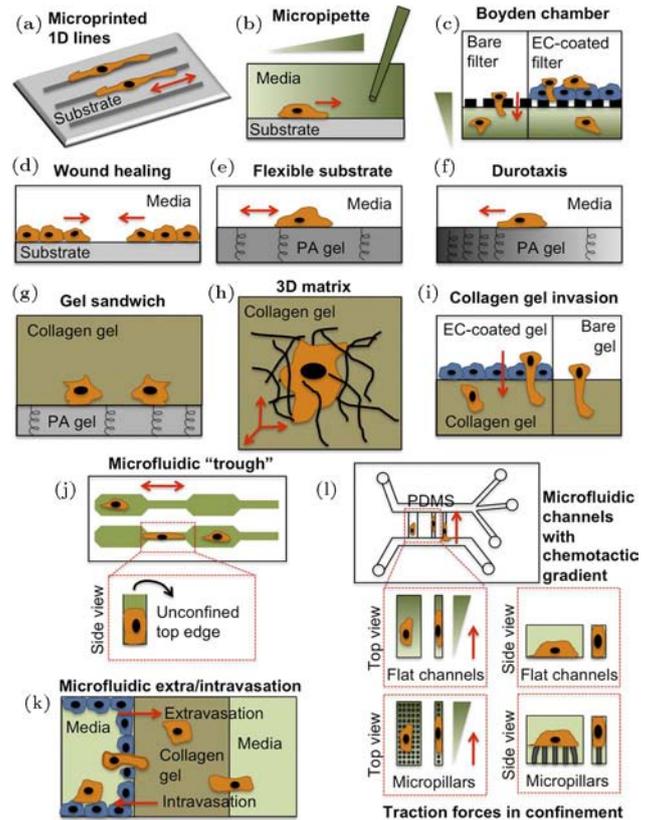


图 2 研究物理与生物信号对细胞迁移影响的各种体外实验^[19]

3 细胞极化的基础

3.1 细胞极化的相关物质

细胞迁移的方向通常由细胞的趋化性决定. 由于肿瘤细胞环境中的化学物质比如氧气、养分、或者抑制药物等的分布存在不均匀性, 细胞表面的受体可以感知这些化学物质的梯度, 并且根据所受的刺激而沿梯度方向迁移. 除了化学趋化性, 还有接收基底上难溶物质发出的信号而极化迁移的趋触性以及基底硬度信号引发的趋硬性等等, 都是确定细胞迁移方向的性质. 显然趋化性对于肿瘤细胞究竟会转移到哪里去有着极大的影响. 而细胞极化是细胞趋化性的基础. 因此细胞为什么会极化以及细

胞如何保持极化等等问题的答案对于研究细胞迁移是非常重要的。

极化这个概念其实在物理学中用得比较多,例如电介质的极化,就是在外电场的作用下,电介质由中性而显现出一端为正而另一端为负的电性。而细胞极化可以说是与之相类似的:对于未极化的细胞,其内部物质的分布其实是较为随机均匀的中性状态;而细胞在受到某一空间不均匀的刺激以后,经细胞内信号通路的传导放大,使得与迁移相关的物质分子重新分布,出现一端少一端多的极性分布,细胞也就出现了头与尾,可以确定前进的方向了。

对于细胞极性究竟是如何建立与保持的,已经进行了不少研究。我们对极化过程中涉及到的许多化学物质及信号通路都拥有了一定的认识^[29]。简单而言,细胞极化是由涉及到Rho家族蛋白、胞内磷脂酰肌醇激酶(PI3Ks)、整合素、微管以及囊泡运输等的一系列相互关联的正负反馈回路而实现的^[29]。Rho家族蛋白是细胞极性建立中的一类重要的核心枢纽调控分子。Rho全称为Ras同源物(Ras是大鼠肉瘤的英文缩写),分子量为20—30 kD,属于小分子量G蛋白,具有GTP酶(GTPase)活性,因此习惯被称为Rho GTPase。Rho GTPases是肌动蛋白和黏附结构的关键调控因子,而且可以控制片状伪足与丝状伪足的形成。当Rho GTPases和GTP相结合时处于激活状态,可以作用于它们的下游效应分子,包括蛋白激酶、脂酶以及Arp2/3复合物(Arp是肌动蛋白相关蛋白的英文缩写)的激活子等^[30]。Rho GTPases和GDP结合时则处于失活状态。鸟苷交换因子(GEFs)可以使GDP从Rho GTPases上释放出来而让GTP取而代之,使得Rho GTPases被激活,而GTPases激活蛋白(GAPs)则可以催化GTP水解,使Rho GTPases失活。鸟苷酸解离抑制因子(GDIs)能够稳定Rho-GDP复合物,并与其结合后定位于胞质,以抑制GDP/GTP交换。在Rho家族中,Rac,Cdc42和RhoG对于形成片状伪足与丝状伪足都是不可或缺的。Cdc42是真核生物中细胞极性的主要调控因子,高活性的Cdc42分布在迁移细胞的前端^[31],对其进行抑制或是在整个细胞内激活都会破坏迁移的方向性^[30]。Cdc42通过限制片状伪足形成的位置^[32]或使细胞核-微管组织中心(MTOC)-高尔基体连线指向迁移前端来调控极性。这一指向的限制将有助于利用微管与囊泡将形成

突起所需的物质输送到细胞前沿^[30]。因此,在细胞极性的研究中,关注各种信号对于Cdc42的影响是一个重要的方向,将其作为直接的标志物或是为其他假设提供印证都是一个不错的选择。除此之外,Rac在前进端活性增高,Rho亚家族蛋白在尾端活性较高,且Rac/Cdc42与Rho相互拮抗,因此这两个也是常用的标志物。简单地说,弄清楚外界信号是如何在细胞膜的某一局部通过表面受体激活这些极性标志物质的正反馈或是负反馈回路,使其活性单单在这一局部增高或降低,也就把细胞极化如何发生的弄清楚大半了。

细胞极化的形成与肌动蛋白聚合形成的微丝是密不可分的,细胞极化必须将所受的刺激信号通过信号通路的级联放大转变成这些直接调节微丝聚合与解聚的物质的浓度的极性分布才能实现。因此很有必要先来了解一下关于微丝的聚合和解聚的动力学。微丝是两条由肌动蛋白单体一个连一个而形成的链互相缠绕扭曲而成的,早在20世纪70年代,人们便已经发现在微丝的两端肌动蛋白单体添加或解离的速率不同,使得微丝拥有生长速度快的生长端与生长速度慢的非生长端^[33]。实验上也已观察到达到平衡态时生长端伸长而非生长端以同样的速率缩短^[34],这种现象称之为踏车。正是这种固有的极性产生了细胞膜上的突起。微丝的聚合与解聚受到多种蛋白的调控。在片状伪足中,微丝形成一个分岔的树枝状网络,此时肌动蛋白的聚合是由Arp2/3复合物来调节的,它们不仅能激活微丝成核还可以结合到已经存在的微丝的侧面或顶端并诱导新的微丝分支形成^[35,36]。Arp2/3复合物的活性则受到WASP/WAVE家族蛋白的调控,当未激活的WASP蛋白作用到Arp2/3复合物上,其活性被抑制,而WASP蛋白会在某一处由上游信号决定的细胞膜上被激活,因此就将Arp2/3复合物的活性局限在该处细胞膜附近^[35],使得微丝不断向某一特定方向伸长。因为当微丝的一端抵住细胞膜后肌动蛋白单体将无法再添加上去,所以突起的形成其实还要依赖于弹性布朗棘轮机理,也就是热能会使新形成的较短微丝弯曲,在存储弹性势能的同时单体也得到了加入的机会,然后伸长了的微丝将会伸直,如同鞭子般打在细胞膜上,数量众多的微丝的鞭打也就是突起的驱动力来源^[36]。从以上的生物学过程中可以看出,Arp2/3复合物是一种重要的极性标志分子,实际上,在极化后的细胞中它也的确呈现前多后少的分布。除了Arp2/3复

合物, 还有其他调节微丝聚合的蛋白. 前纤维蛋白可以通过与肌动蛋白单体结合后阻止微丝的自成核来促进微丝的聚合, 而丝切蛋白可以结合到微丝上促进其解聚, 盖帽蛋白则是结合到微丝的一端阻止其解聚或聚合^[36,37].

3.2 细胞极化的数学模型

3.2.1 细胞极化的特点

细胞极化涉及到极性分子的空间分布与它们之间的相互反应, 因此基于反应扩散方程, 已经建立了一系列的细胞极化的模型. 几乎所有的模型都是基于局域自激活和长程抑制的思想, 但是不同的模型在动态行为, 分岔行为, 以及相应的鲁棒性、灵敏度等物理性质上呈现出巨大的差异. 为了更好的评价这些模型, 首先需要总结一下多种细胞共有的极化特点^[38]: 1) 在一个很大的浓度区间内, 细胞既能感受到梯度陡峭的刺激信号, 也能感受到梯度非常平缓的刺激信号(信号在细胞头尾差别可以小至1%—2%); 2) 极化后的细胞仍能感受到新的刺激, 随着刺激梯度方向而改变方向; 3) 自维持性: 触发极化的刺激信号消失后, 很多细胞仍能保持极性; 4) 有些细胞会在没有明显外加刺激时发生自发极化; 5) 有些种类的细胞会在空间均匀的刺激信号随时间变化时表现出瞬时响应的适应性; 6) 对于多种刺激同时作用, 有些细胞会产生多个前端, 而其他细胞则会迅速解决矛盾而只生成惟一的极性. 这些特点一般来说是较为普遍的, 但并非所有细胞都会表现出所有这些特点, 而且某些特定的细胞还会拥有其他的特点. 下面将介绍几类典型的基于扩散机理的细胞极化的数学模型, 为了研究的方便, 这些模型都选择了建立在参与物质种类较少的却可以表现出细胞极化特点的简单网络之上.

3.2.2 图灵斑图模型

图灵失稳是指在同时存在生物化学反应与随机扩散的体系中, 在适当的条件下, 由于体系内在的反应扩散特性, 空间均匀态会失稳而导致对称性破缺, 从而自组织出一些空间定态图纹, 这些图纹就是图灵斑图^[39]. 鉴于细胞极化也是由均匀态变为不对称态, 图灵失稳有可能是其背后机理的一种. 实际上, 通过模拟, 已经证明了存在局部自我放大与长程抑制的化学体系可以产生生物真实存在的斑图^[40]. 那么, 假设细胞内存在图灵不稳定

性, 任意的空间变化刺激就可以使得未极化的细胞发生对称性破缺并形成一个化学斑图.

为了实现存在局部激活与长程抑制, 在两种成分的简单细胞极化模型中, 往往假定一种结合在细胞膜上的扩散缓慢的可以自催化的大分子激活子与存在于细胞质中的快速扩散的小分子抑制子, 如图3(a)所示^[38]. 或者也可以将抑制子替换为对底物的消耗, 这同样也可以成为激活子增长的阻尼, 如图3(b)所示. 当然, 还有着其他与之等效的变体, 这里就不一一列举了. 除了两种成分的系统, 三种成分的系统也能实现图灵不稳定性, 例如其中包含两种相互抑制的局部激活子与由它们所促进合成的快速扩散的反过来抑制它们的抑制子^[41], 如图3(c)所示.

图灵斑图模型的通用方程如下所示:

$$\begin{aligned}\frac{\partial A}{\partial t} &= D_A \nabla^2 A + f(A, I), \\ \frac{\partial I}{\partial t} &= D_I \nabla^2 I + g(A, I),\end{aligned}\quad (1)$$

式中 A 和 I 分别代表激活子和抑制子, D_A 和 D_I 分别代表两类分子的扩散系数, 而且 $D_A < D_I$, $f(A, I)$ 和 $g(A, I)$ 分别代表激活子和抑制子相互作用的函数.

图灵斑图模型有着许多优点, 比如能够解释自发极化、对刺激信号的放大以及在信号消失后保持极性. 但是图灵模型也存在一些问题, 比如在合适的参数条件下会产生多处峰值, 而细胞极化通常只有一处最大值. 尽管有些细胞会出现瞬间伸出多个伪足的情形, 然而这些伪足之间的间隔并没有规律性, 这与图灵模型的结果也不太一致. 图灵模型也不能解释某些未受刺激的细胞会存在休眠状态, 因为在图灵模型中不管刺激多小都会发生极化. 最后, 在图灵机制下形成的极性也不会响应新的刺激而变化.

3.2.3 梯度感应模型

在图灵模型中, 并不强调刺激信号的梯度, 也因此不会随梯度方向改变而改变极性, 而针对这一点所设计的一类模型, 就是梯度感应模型. Levchenko 和 Iglesias 提出的局部激励、全局抑制 (LEGI) 模型^[42] 就是梯度感应模型的一种. 这个模型包含有一种快速作用的局域激活子和一种缓慢作用的全局抑制子, 两者都会被外部的时空刺激成比例的激活, 如图3(d)所示. 在细胞表现出的反应取决于这两者的同一下游效应分子, 也就是取决于

激活子与抑制子浓度之比的假设之下, 该模型很好地实现了细胞对于均匀刺激的适应, 极化强度随梯度增强而变大以及极性随梯度方向反转而反转. 在LEGI模型的一个变体——平衡失活模型^[42]中, 将抑制子改为膜结合且快速作用的, 而激活子则相反, 并加入了下游效应分子对抑制子的消耗, 如图3(e)所示. 这些修改使得细胞可以对于外部梯度进行开关式的响应.

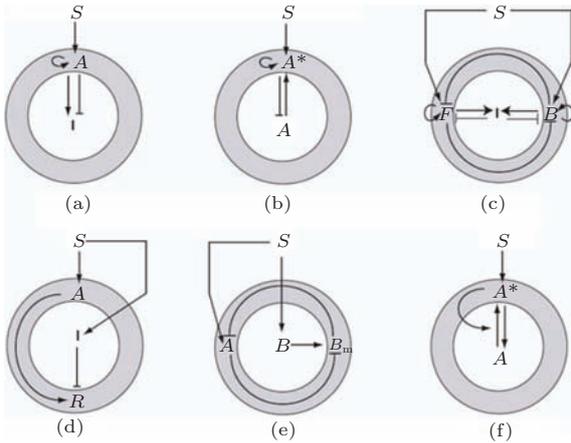


图3 细胞极化机理示意图^[38] (细胞被分为细胞膜(灰色)和细胞内部. S 代表外界刺激, A , B 和 F 代表激活子, I 代表抑制子, R 代表下游反应子. 下标 m 代表细胞膜)

LEGI模型的数学形式如下:

$$\begin{aligned} \frac{\partial A}{\partial t} &= k_A S(t, x) - k_{-A} A, \\ \frac{\partial I}{\partial t} &= D \nabla^2 I + k_I S(t, x) - k_{-I} I, \\ \frac{\partial R}{\partial t} &= k_R A (R_T - R) - k_{-R} I R, \end{aligned} \quad (2)$$

式中 A 和 I 分别代表激活子和抑制子, R 代表反应子(R_T 是其浓度常量), D 代表抑制子的扩散系数, $S(t, x)$ 表征随时间 t 和空间坐标 x 变化的外界刺激, k_i 和 k_{-i} 分别代表相应分子的生成率和降解率($i = A, I$ 或者 R).

LEGI模型有着许多符合细胞极化特点的地方, 但也存在着局限性. 首先, LEGI模型并不会明显放大梯度信号. 此外, 这一模型也无法保证极性的持久性, 在梯度信号消失后, 极性也随之消失. 最后, 在LEGI模型中也无法出现自发极化.

3.2.4 波模型

所谓波模型, 即是将活化作用作为一种波来解释细胞极化产生的模型. 在实验中曾观察到在膜上没有受体, 因此也不会有信号输入的情况下, PIP3与肌动蛋白活性仍会在局部不断涌现高浓度再消

失的现象^[43], 这种像波一样的行为对于这种观点无疑是很好的支持. 实际上, 在一个由快速传播的激活子与缓慢传播的抑制子组成的系统中, 一个局部的激发将会像波一样传遍整个细胞^[44,45]. 为了形成极性, 也就是使波被激发的一端与其相对的一端存在宏观的活化水平差异, 必须使产生的波停留在这一局域, 或者说把波钉死, 由这一思想产生的就是波钉(wave pinning, WP)模型.

WP模型只考虑细胞极化反应中的一个关键分子Rho蛋白, 它在细胞膜上时处于激活态 a , 其扩散速率 D_a 远小于它在细胞质中的非活化态 b 的其扩散速率 D_b ; Rho蛋白在此两态之间相互转化, 模型假设 a 到 b 的转化速率常数 $k_{ab} = \delta$, 而它的激活有一个正反馈回路, 此正反馈在从 b 到 a 的转化速率 k_{ba} 中表现为希尔方程项, 即 $k_{ba} = k_0 + (\gamma a^2)/(K^2 + a^2)$, 其中 k_0 是本底转化速率, γ 和 K 分别代表希尔方程的最大反应速率和饱和常数. 注意到希尔常数 $n = 2$ 可以保证模型得到激活态的双稳态的解. 最后描述体系的方程如下:

$$\begin{aligned} \frac{\partial a}{\partial t} &= D_a \nabla^2 a + f(a, b), \\ \frac{\partial b}{\partial t} &= D_b \nabla^2 b - f(a, b), \\ f(a, b) &= \left(k_0 + \frac{\gamma a^2}{K^2 + a^2} \right) b - \delta a. \end{aligned} \quad (3)$$

WP模型有许多好性质. 其一, 它拥有对于小幅刺激稳定的休眠状态; 其二, 当刺激信号幅度一旦超过某一阈值, 它将快速响应, 而不像图灵模型那样在小扰动下是缓慢响应的; 其三, 在极性形成后, 只要新刺激信号足够强, 极性就会随之变化. 然而WP模型同样有着自己的不足. 首先, WP模型的响应强度与刺激强度并不成正比. 其次, 从由于相互竞争的刺激信号或是噪声产生的不稳定多峰状态到确定方向会花费较长的时间.

3.2.5 对模型的总结

综上所述, 细胞极化存在着多种多样的模型, 这其实正来源于细胞种类的多样性. 不同的模型有着各自的优缺点, 同时也并非每种细胞的极化特点都一样, 不同种类的细胞的极化机理很可能存在较大的差异, 因此需要用不同的模型来处理. 此外, 上面所介绍的模型其实都是最为基本的概念性模型, 在这些模型的基础上, 添加额外的机理或者将不同的模型结合起来可以使之更为符合细胞极化应有的特点, 所以得到完全符合某种细胞的极化特

点的模型也许不是难事. 然而, 尽管模型能够与实际细胞极化的特点相符, 有些模型, 例如LEGI模型, 其实还没有确定其假设的反应物所实际对应的生化成分, 而且模型所需的参数也仍有不少尚未测量得到, 因此模型的完善还需要更多的实验支持, 将模型投入应用更是还有一段长路要走.

4 物理信号与细胞极性

4.1 关于物理信号与细胞极性的实验研究

除了化学引诱物, 基底的硬度、基底与细胞间以及细胞与细胞间的黏附力、细胞受到的流体切应力等物理信号也可以影响甚至控制细胞的极性, 而在这一方面对肿瘤细胞以外的其他细胞也已经有了不少的研究, 下面将展示两个实验上的例子来帮助理解这一点.

在实验一中^[46], 大鼠血管平滑肌(VSM)细胞被接种在覆盖有胶原蛋白的硅膜之上, 通过特殊的设备对硅膜进行等双轴拉伸直至细胞增大到预先设定好的面积, 在5 min后观察到细胞伸出的伪足数量明显减少. 再通过蛋白质印迹法(Western blotting)来检测Rac与Rho后发现, 等双轴拉伸使活性Rac减少, 而且拉伸幅度越大, 减少越明显, 但Rho的活性却没有受到明显影响. 这说明了通过等双轴拉伸增大细胞所受的应力可以抑制Rac, 从而使伪足减少. 进一步的实验对细胞施加了单轴拉伸, 发现拉伸后的短时间内, 沿拉伸方向细胞会继续延伸, 而在垂直于拉伸方向细胞则会持续收缩. 通过荧光共振能量转移(Fluorescence resonance energy transfer, FRET)来观察活性Rac, 发现单轴拉伸后, 拉伸方向的细胞两端Rac活性上升而侧面活性下降. 这一实验揭示了力学过程的确会影响细胞的极性分布.

在实验二中^[47], 应用表面微模型化技术, 用纤连蛋白(fibronectin)制作的细胞可黏附区域在基底上被设计为独特的形状, 例如图4中所示的图案^[47], 再令人类视网膜色素上皮(RPE)细胞在基底上扩散, 待细胞形成黏附后进行观察. 实验中观察到存在于细胞边缘的黏附位点刺激了肌动蛋白在细胞膜突起中的聚合, 并且使得有黏附的笔直细胞边缘形成了薄的应力纤维, 在没有黏附的笔直细胞边缘形成厚的应力纤维, 而在有黏附的弯曲细胞边缘没有应力纤维生成. 由此可以看出细胞的黏附

行为的确会影响细胞的极性, 更进一步的, 黏附的形状也能控制细胞极性的分布.

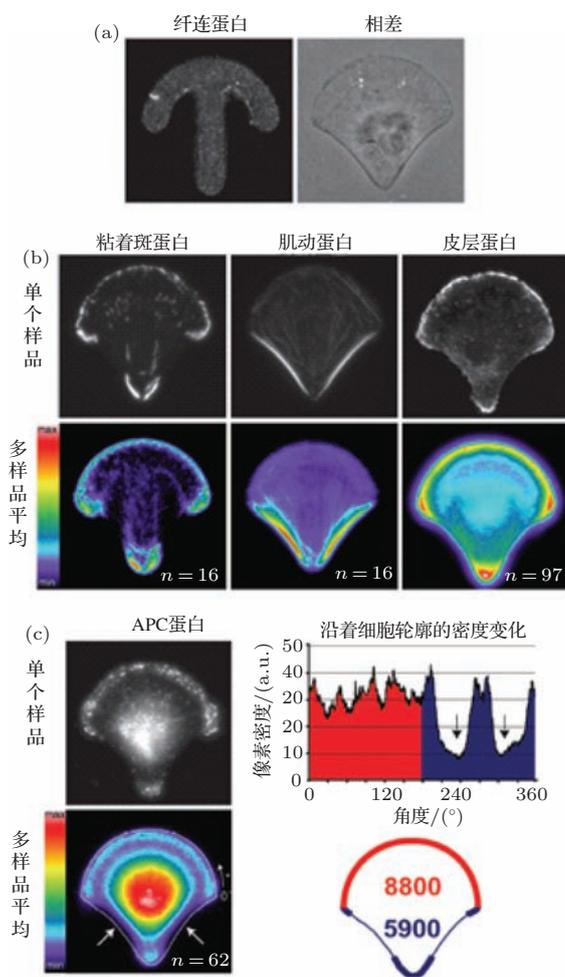


图4 在特定形状的可黏附基底上的细胞极性^[47]

在观察到物理信号可以控制细胞极性之后, 自然而然想到的问题就是, 物理信号是如何影响细胞极性的? 鉴于细胞极性必须经过多重化学反应最终通过极性分子的分布而体现出来的, 了解物理信号是如何转导为化学信号就是最为关键的一步. 具体到模型方面, 只要将力学信号转化为可以输入到已有模型中的刺激分子信号并考虑到物理形变对于扩散的影响, 物理信号引发细胞极化的模型就可以构建出来. 因此, 必须了解细胞的机械力感受与转导机理.

4.2 整合素介导的细胞黏附

无论是细胞与细胞之间的黏附, 还是细胞与细胞外基质间的黏附, 都不是细胞膜直接与细胞膜或基质相接触, 而是通过细胞膜上的特定跨膜分子与

其配体相结合来实现的。而整合素就是介导细胞与细胞外基质间黏附的重要物质。整合素几乎存在于所有细胞表面,是多种细胞外基质成分的受体,整合素的胞外区与细胞外基质相连,胞内区则与细胞骨架相连,像一座桥梁般介导细胞内外信息的传递,因此通过整合素将细胞外基质承载的信号转入细胞内是机械力转导的主要途径。整合素是由 α 和 β 两个亚单位形成的异二聚体,本身是没有激酶活性的。当整合素与细胞外基质上的配体(例如纤连蛋白等)相结合后,就会引发整合素在有配体处聚集,并在细胞内招募黏着斑,而它所首先招募的黏着斑激酶(FAK)则发挥脚手架的功能,开启多个下游通路^[48]。FAK结合到整合素复合物上之后,将被磷酸化而激活,从而显露出可以与Src, PI3K, SFKs以及桩蛋白(paxilin)等相结合的位点,而这些物质在结合到FAK上后也将被激活。通过例如FAK-paxilin-Crk-Rho等途径,信号被传递到下游的MAPK和Rho GTPases,最终导致细胞骨架的动态变化,调节细胞的极性与迁移。

整合素的结构类似于一个头连着两只脚,其中头位于细胞外,而脚位于细胞内。整合素与细胞外配体之间的亲和力是由整合素的构象所决定的。如图5(a), (c)及(f)所示^[49],当整合素的头朝向细胞膜方向而且两腿并列紧靠时,整合素与细胞外配体之间的亲和力较弱;而如图5(b), (d)及(e)所示,当整合素的头垂直于细胞膜而朝向细胞外基质并且两腿间有很大空隙时,整合素与细胞外配体之间的亲和力较强。通过拉伸分子动力学模拟发现,从(a)状态或(d)状态开始,如果施加(b), (e)中箭头所示的作用力,(a)状态将变为(b)状态,而(d)状态将变为(e)状态,这说明通常由应力纤维收缩提供的施加在整合素 β 亚基上的侧向作用力将整合素导向高亲和力态;如果施加(c), (f)中箭头所示的作用力,(a)状态将变为(c)状态,(d)状态将变为(f)状态,这说明只存在沿配体方向拉伸整合素的张力会将整合素导向低亲和力态。由此可见,整合素与细胞骨架之间的连接除了使得细胞外基质上的配体密度分布可以通过细胞黏附调节细胞极性,也使得作用在细胞其他部位的力可以经由细胞骨架传递到黏附位点改变整合素亲和力,导致局部活性整合素的密度发生变化,从而影响细胞极性。此外,当细胞外基质产生较大的位移而细胞膜无法发生同步的形变时,整合素与配体间的结合可能会断开,从而对下游信号通路产生影响,这也可能是物

理作用影响细胞极性的一种方式。

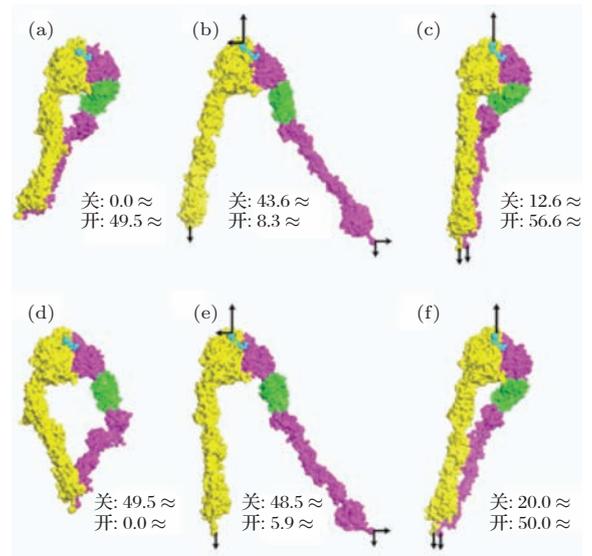


图5 拉伸力对整合素构象的调节^[49]

4.3 机械敏感性离子通道与细胞极性

在细胞膜表面存在着许许多多的离子通道,有由膜电位控制的电压敏感性离子通道,也有由配体-受体结合控制的化学敏感性离子通道,还有着由膜上张力所控制的机械敏感性离子通道,而这最后一种通道就可以将机械信号转换为化学信号,从而控制细胞极性。具体地说,机械敏感性离子通道是一类细胞膜张力的变化可以激活并增加其开放概率的通道。这类通道既有随张力增大而激活的,也有随张力增大而失活的;既有选择某一电性或某一种离子才能通过的,也有没有选择性的。

在对钙闪烁的研究中发现,迁移细胞的前端存在丰富的、微米尺度的、瞬时的高钙信号,也就是钙闪烁,并发现钙闪烁依赖于细胞膜表面TRPM7机械敏感性离子通道的激活^[50]。进一步的实验发现,在迁移细胞的垂直方向设置趋化因子梯度后,朝向高浓度方向的细胞前端有更强更密集的钙闪烁信号,引导细胞转向这一方向,这说明钙闪烁伴随细胞极性的改变。因此,机械力改变细胞膜上的张力,从而激活机械敏感性离子通道,导致钙离子涌入,也可能是力学信号改变细胞极性的方式。

4.4 细胞膜张力与极性保持

在前面关于物理作用与细胞极性的讨论中,我们提到更多的是物理信号是如何改变细胞的极性,

最后就让我们来看一看细胞膜张力这一物理作用是如何保持细胞极性的。

正如在第三章理论模型部分中所提到的, 要保证细胞进行有效的迁移, 就不能让 Rac 的活性在整个细胞内均匀分布, 而必须保证将 Rac 的活性限制在细胞的前进端。只有这样, 才不会让细胞形成多个前进端而无法定向迁移。为此所必需的就是一个用于阻止 Rac 活性扩散的长程抑制因子, 而细胞膜张力恰好也可以担当这样一个角色。在一个研究细胞极性保持机制的实验^[51]中, 如图 6 所示, 研究者使细胞主体与其伪足间形成了一个细长的脖子并将之切断后发现, 细胞主体会重新形成极性, 这说明了伪足的存在的确抑制了细胞其他部位伪足的产生。而进一步对于未切断脖子状态下细胞内物质扩散速率的研究发现, 这一形态会严重削弱细胞内扩散以至于仅仅依靠扩散机理来进行长程抑制是不够的, 因此存在着更快的抑制机理。而机械力的传播并不受到这一形态的限制, 同时力信号的传播比扩散快得多, 而且实验也证明了伪足出现后细胞膜上的张力会明显增加。接下来, 研究者使用微量吸管 (micropipette) 增加细胞膜上张力, 发现细胞前进端的 Rac 活性与伪足均被抑制, 而且这一过程是可逆的。以上种种都说明了, 细胞膜张力的增加起到了长程抑制因子的作用, 从而参与到了保持细胞极性的过程中。

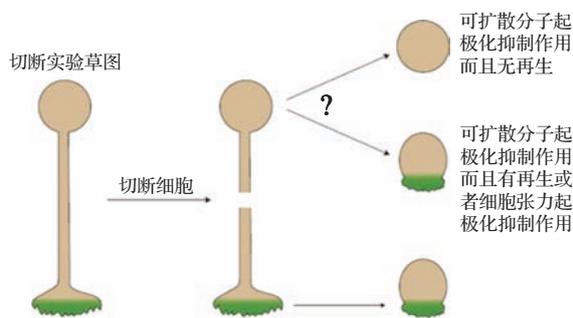


图 6 通过切断细胞研究细胞极性的实验示意图^[51]

5 结论与展望

迄今为止, 还原论一直是自然科学领域最为基本的研究方法, 我们将事物的性质按物理、化学、生物等等领域加以区分并割裂开来研究, 得到了许许多多的成果。然而, 随着研究的越加深入, 我们发现这条路越来越难走, 因为我们研究的事物越来越复杂, 也越来越难以分割, 肿瘤等疾病就是一个

最好的例子, 而各种交叉学科的兴起也印证了这一点。在对细胞迁移与极性进行研究的过程中, 我们可以清晰地看到, 物理行为会影响生化过程, 而生化过程又会反过来调节物理行为, 所谓牵一发而动全身正是如此。因此单独的性质很可能被复杂的环境所吞没, 我们需要以更加整体的眼光来看待肿瘤的研究。将物理学应用在肿瘤研究中并不是将肿瘤细胞拿到物理实验室中来实验就可以的, 而是需要将物理学的知识和思维方式与长久以来积累的研究肿瘤的经验相融合, 孕育出新的仪器、新的方法、新的理论并结合在一起, 创造出能够在不伤害肿瘤细胞的情况下, 模拟体内环境, 可以定量地观察到任意多种条件相耦合作用后细胞的响应的系统。

有关肿瘤细胞迁移中细胞极化是肿瘤转移中的关键一步, 结合物理和生物的系统定量研究对这一过程的研究将极大地推动我们对肿瘤转移地理解。不过目前有关地研究还是比较缺乏, 根据已有的有关研究, 特别是借鉴已有的对其他细胞迁移和极化的研究, 在未来的研究中有如下重点值得注意的方向。

首先, 我们需要建立三维肿瘤细胞体系。肿瘤细胞的迁移研究已经表明迁移的模式和维度高度相关^[14]。传统的肿瘤研究样品通常是二维细胞培养或者是小鼠等动物模型, 通常前者比较容易准备和对细胞进行操作, 适合做高通量的定量测量; 后者则更加接近与实际生理和病理条件, 但是做定量测量则十分困难。体外三维肿瘤细胞体系可以更好的模拟体内环境, 并且更加适合做定量测量^[52]。不过, 为了实现三维体系的单细胞水平地测量, 我们需要进一步地发展三维成像技术。目前已有的点扫描双光子显微镜与共聚焦显微镜相比, 可以将成像深度从几十微米提高到几百乃至上千微米^[53]。但是它们的成像速度有限, 对样品的光毒性也比较大。最近发展的光面显微镜采用特殊的光路设计^[54,55]。它通过一条微米尺度的光面来选择性地激发所观测面的荧光分子, 然后通过高分辨的 CCD 摄像镜头在与激发面垂直的方向收集荧光对整个激发面成像, 从而降低了成像的噪声并且提高了成像速度。不过由于光面的有效观测范围有限, 对于样品观测室的设计通常都存在非常严苛的空间限制。设计适合光面显微镜观测的三维肿瘤体系仍然存在一定的挑战。

其次, 我们需要结合实验建立肿瘤细胞的极化模型来理解肿瘤细胞的迁移。目前还没有针对肿瘤

细胞极化的模型, 而且有关肿瘤细胞极化的实验仍然相对缺乏, 我们需要通过系统的实验确定肿瘤细胞极化的特点. 值得注意的是, 肿瘤的一大特点是通常包含不同种类的细胞, 其中有代表性的比如肿瘤类干细胞和肿瘤非干细胞^[56,57]. 肿瘤类干细胞与胚胎干细胞类似, 有自我复制和分化成其他类型细胞的能力, 植入动物体直接成瘤的能力很强. 这类肿瘤细胞同时也具有较强的抗辐照和化疗的能力, 被认为是治疗后肿瘤复发的关键^[57]. 通常认为肿瘤治疗的关键是有效地消除肿瘤类干细胞, 不过最近的研究使得情况更为复杂, 因为肿瘤类干细胞和肿瘤非干细胞之间存在相互之间的转化^[58,59]. 实验表明肿瘤类干细胞比肿瘤非干细胞迁移能力更强, 可能是肿瘤转移的关键因素. 因此研究表征这两类有代表性的肿瘤细胞的迁移特性以及探索产生差异的机理对于理解肿瘤细胞转移具有重要意义. 其中一个值得注意的研究方向是细胞膜的张力对细胞极化的影响. 一方面肿瘤类干细胞也更具可塑性^[60], 微丝表达量减少一半左右^[7], 因此其细胞膜的张力会较小. 另一方面而细胞膜的张力被认为对极化有抑制作用^[51]. 我们预计肿瘤类干细胞的极化对外界信号的响应会更快, 在实验上验证以及在模型上解释这一现象将有助于我们理解肿瘤细胞转移, 进一步发展出针对肿瘤细胞的极化过程中对外界物理刺激的机械感知的新的癌症转移治疗方法.

展望未来, 为了进一步将物理学应用在肿瘤研究上, 我们需要更多的物理学家投入到这一领域中; 而随着物理、化学、生物、工程等领域的研究者越加通力协作, 相信癌症也终有一天会被攻克.

参考文献

- [1] Weigelt B, Peterse J L, van't Veer L J 2005 *Nat. Rev. Cancer.* **5** 591
- [2] Chaffer C L, Weinberg R A 2011 *Science* **331** 1559
- [3] Wirtz D, Konstantopoulos K, Searson P C 2011 *Nat. Rev. Cancer.* **11** 512
- [4] Lo C M, Wang H B, Dembo M, Wang Y L 2000 *Biophys. J.* **79** 144
- [5] Bryan A K, Goranov A, Amon A, Manalis S R 2010 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107** 999
- [6] Byun S, Son S, Amodei D, Cermak N, Shaw J, Kang J H, Hecht V C, Winslow M M, Jacks T, Mallick P, Manalis S R 2013 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110** 7580
- [7] Guck J, Schinkinger S, Lincoln B, Wottawah F, Ebert S, Romeyke M, Lenz D, Erickson H M, Ananthakrishnan R, Mitchell D, Kas J, Ulvick S, Bilby C 2005 *Biophys. J.* **88** 3689
- [8] Agus D B, Alexander J F, Arap W, Ashili S, Aslan J E, Austin R H, Backman V, Bethel K J, Bonneau R, Chen W C, Chen-Tanyolac C, Choi N C, Curley S A, Dallas M, Damania D, Davies P C, Decuzzi P, Dickinson L, Estevez-Salmeron L, Estrella V, Ferrari M, Fischbach C, Foo J, Fraley S I, Frantz C, Fuhrmann A, Gascard P, Gatenby R A, Geng Y, Gerecht S, Gillies R J, Godin B, Grady W M, Greenfield A, Hemphill C, Hempstead B L, Hielscher A, Hillis W D, Holland E C, Ibrahim-Hashim A, Jacks T, Johnson R H, Joo A, Katz J E, Kelbauskas L, Kesselman C, King M R, Konstantopoulos K, Kraning-Rush C M, Kuhn P, Kung K, Kwee B, Lakins J N, Lambert G, Liao D, Licht J D, Liphardt J T, Liu L, Lloyd M C, Lyubimova A, Mallick P, Marko J, McCarty O J, Meldrum D R, Michor F, Mumenthaler S M, Nandakumar V, O'Halloran T V, Oh S, Pasqualini R, Paszek M J, Philips K G, Poultney C S, Rana K, Reinhart-King C A, Ros R, Semenza G L, Senechal P, Shuler M L, Srinivasan S, Staunton J R, Stypula Y, Subramanian H, Tlsty T D, Tormoen G W, Tseng Y, van Oudenaarden A, Verbridge S S, Wan J C, Weaver V M, Widom J, Will C, Wirtz D, Wojtkowiak J, Wu P H 2013 *Sci. Rep.* **3** 1449
- [9] Indra I, Undyala V, Kandow C, Thirumurthi U, Dembo M, Beningo K A 2011 *Phys. Biol.* **8** 015015
- [10] Nagrath S, Sequist L V, Maheswaran S, Bell D W, Irimia D, Ulkus L, Smith M R, Kwak E L, Digumarthy S, Muzikansky A, Ryan P, Balis U J, Tompkins R G, Haber D A, Toner M 2007 *Nature* **450** 1235
- [11] Ozkumur E, Shah A M, Ciciliano J C, Emmink B L, Miyamoto D T, Brachtel E, Yu M, Chen P I, Morgan B, Trautwein J, Kimura A, Sengupta S, Stott S L, Karabacak N M, Barber T A, Walsh J R, Smith K, Spuhler P S, Sullivan J P, Lee R J, Ting D T, Luo X, Shaw A T, Bardia A, Sequist L V, Louis D N, Maheswaran S, Kapur R, Haber D A, Toner M 2013 *Sci. Transl. Med.* **5** 179ra47
- [12] Stott S L, Hsu C H, Tsukrov D I, Yu M, Miyamoto D T, Waltman B A, Rothenberg S M, Shah A M, Smas M E, Korir G K, Floyd F P Jr, Gilman A J, Lord J B, Winokur D, Springer S, Irimia D, Nagrath S, Sequist L V, Lee R J, Isselbacher K J, Maheswaran S, Haber D A, Toner M 2010 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107** 18392
- [13] Liu L, Sun B, Pedersen J N, Yong K-M A, Getzenberg R H, Stone H A, Austin R H 2011 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108** 6853
- [14] Friedl P, Alexander S 2011 *Cell* **147** 992
- [15] Tsai J H, Yang J 2013 *Genes. Dev.* **27** 2192
- [16] Zhang J, Tian X J, Zhang H, Teng Y, Li R, Bai F, Elankumaran S, Xing J 2014 *Sci. Signal.* **7** ra91
- [17] Lu M, Jolly M K, Onuchic J, Ben-Jacob E 2014 *Cancer. Res.* **74** 4574

- [18] Wolf K, Alexander S, Schacht V, Coussens LM, Andrian von UH, van Rheenen J, Deryugina E, Friedl P 2009 *Semin. Cell. Dev. Biol.* **20** 931
- [19] Stroka K M, Konstantopoulos K 2014 *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **306** C98
- [20] Gilmore A P, Burridge K 1996 *Nature* **381** 531
- [21] Miyamoto S, Teramoto H, Coso O A, Gutkind J S, Burbelo P D, Akiyama S K, Yamada K M 1995 *J. Cell. Biol.* **131** 791
- [22] Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM 2001 *Science* **294** 1708
- [23] Cukierman E, Pankov R, Yamada K M 2002 *Curr. Opin. Cell. Biol.* **14** 633
- [24] Fraley S I, Feng Y, Krishnamurthy R, Kim D H, Celdon A, Longmore G D, Wirtz D 2010 *Nat. Cell. Biol.* **12** 598
- [25] Petroll W M, Ma L, Jester J V 2003 *J. Cell. Sci.* **116** 1481
- [26] Fraley S I, Feng Y, Giri A, Longmore G D, Wirtz D 2012 *Nat. Commun.* **3** 719
- [27] Chang S S, Guo W H, Kim Y, Wang Y L 2013 *Biophys. J.* **104** 313
- [28] Doyle A D, Wang F W, Matsumoto K, Yamada K M 2009 *J. Cell. Biol.* **184** 481
- [29] Yamaguchi H, Condeelis J 2007 *Biochim. Biophys. Acta.* **1773** 642
- [30] Etienne-Manneville S, Hall A 2002 *Nature* **420** 629
- [31] Itoh R E, Kurokawa K, Ohba Y, Yoshizaki H, Mochizuki N, Matsuda M 2002 *Mol. Cell. Biol.* **22** 6582
- [32] Srinivasan S, Wang F, Glavas S, Ott A, Hofmann F, Aktories K, Kalman D, Bourne H R 2003 *J. Cell. Biol.* **160** 375
- [33] Wegner A 1976 *J. Mol. Biol.* **108** 139
- [34] Fujiwara I, Takahashi S, Tadakuma H, Funatsu T, Ishiwata S 2002 *Nat. Cell. Biol.* **4** 666
- [35] Welch M D, Mullins R D 2002 *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **18** 247
- [36] Pollard T D, Borisy G G 2003 *Cell* **112** 453
- [37] Remedios dos C G, Chhabra D, Kekic M, Dedova I V, Tsubakihara M, Berry D A, Nosworthy N J 2003 *Physiol. Rev.* **83** 433
- [38] Jilkine A, Edelstein-Keshet L 2011 *PLoS. Comput. Biol.* **7** e1001121
- [39] Turing A M 1952 *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **2** 37
- [40] Gierer A, Meinhardt H 1972 *Kybernetik* **12** 30
- [41] Narang A 2006 *J Theor. Biol.* **240** 538
- [42] Levine H, Kessler D A, Rappel W J 2006 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103** 9761
- [43] Sasaki A T, Janetopoulos C, Lee S, Charest P G, Takeda K, Sundheimer L W, Meili R, Devreotes P N, Firtel R A 2007 *J. Cell. Biol.* **178** 185
- [44] Weiner O D, Marganski W A, Wu L F, Altschuler S J, Kirschner M W 2007 *PloS. Biol.* **5** e221
- [45] Arai Y, Shibata T, Matsuoka S, Sato MJ, Yanagida T, Ueda M 2010 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **107** 12399
- [46] Katsumi A, Milanini J, Kiosses W B, del Pozo M A, Kaunas R, Chien S, Hahn K M, Schwartz M A 2002 *J. Cell. Biol.* **158** 153
- [47] Théry M, Racine V, Piel M, Péin A, Dimitrov A, Chen Y, Sibarita J B, Bornens M 2006 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103** 19771
- [48] Huttenlocher A, Horwitz A R 2011 *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.* **3** a005074
- [49] Zhu J, Luo B H, Xiao T, Zhang C, Nishida N, Springer T A 2008 *Mol. Cell.* **32** 849
- [50] Wei C, Wang X, Chen M, Ouyang K, Song LS, Cheng H 2009 *Nature* **457** 901
- [51] Houk A R, Jilkine A, Mejean C O, Boltyskiy R, Dufresne E R, Angenent S B, Altschuler S J, Wu L F, Weiner O D 2012 *Cell* **148** 175
- [52] Yamada K M, Cukierman E 2007 *Cell* **130** 601
- [53] Truong T V, Supatto W, Koos D S, Choi J M, Fraser S E 2011 *Nat. Methods.* **8** 757
- [54] Gao L, Shao L, Chen B C, Betzig E 2014 *Nat. Protoc.* **9** 1083
- [55] Mahou P, Vermot J, Beaurepaire E, Supatto W 2014 *Nat. Methods.* **11** 600
- [56] Hanahan D, Weinberg R A 2011 *Cell* **144** 646
- [57] Kreso A, Dick J E 2014 *Cell. Stem. Cell.* **14** 275
- [58] Yang G, Quan Y, Wang W, Fu Q, Wu J, Mei T, Li J, Tang Y, Luo C, Ouyang Q, Chen S, Wu L, Hei T K, Wang Y 2012 *Br. J. Cancer.* **106** 1512
- [59] Gupta P B, Fillmore C M, Jiang G, Shapira S D, Tao K, Kuperwasser C, Lander E S 2011 *Cell* **146** 633
- [60] Suresh S 2007 *Acta. Materialia.* **55** 3989

SPECIAL ISSUE — Cancer biophysics

Application of physics in the study of cell polarity during tumor cell migration*

Wang Jing¹⁾ Yang Gen¹⁾ Liu Feng^{1)2)†}

1) (State Key Laboratory of Nuclear Physics and Technology, School of Physics, Peking University, Beijing 100871, China)

2) (Center for Quantitative Biology, Peking University, Beijing 100871, China)

(Received 2 December 2014; revised manuscript received 6 February 2015)

Abstract

Investigation of tumors from a physics perspective has attracted more and more attention since the initiation, development, and metastasis of tumors are strongly influenced by the physical interactions between the tumor cells and their microenvironments. As tumor metastasis accounts for more than 90% of cancer-associated death, one of the focuses is to understand its underlying mechanism, especially how tumor cells polarize during their migration. Cell polarization directs tumor-cell migration in response to a spatial stimulus, e.g., the gradient of chemokine or oxygen molecules. It forms the front and back edges of cells by establishing asymmetric distributions of cell polarity proteins such as the Rho family GTPases and organelles such as Golgi. This paper reviews how the experimental and theoretical studies combining physics with biology reveal the underlying mechanisms of cell migration and cell polarity. Experimental results demonstrate that the physics clues including extracellular matrix's mechanical properties, dimensionality, and topography are strongly coupled with the biochemical reactions to establish and maintain the cell polarity and direct cell migration. The cell migration mode in a more physiological three-dimensional (3D) matrix is different from that in a two-dimensional (2D) system. Moreover, the membrane tension is suggested to maintain cell polarity by inhibiting polarization processes outside the front edge. On the other hand, a series of reaction diffusion models have been developed to characterize cell polarity. Representative examples including "Turing-type" model, local-excitation and global-inhibition (LEGI) model, and wave-pinning model can capture certain features of cell polarization, however none of them takes the physical factors, such as the membrane tension, into account hence fails to explain previous published experimental results showing the regulation of cell polarity by the membrane tension. To further improve our understanding of the mechanism of cell polarity, in the future study it is experimentally important to establish 3D tumor systems and study the gene regulation network that can control cell polarization by advanced microscope; theoretically it is of importance to build mathematical models for the chemical reaction diffusion systems coupled with the mechanical factors such as membrane tension. These studies will reveal the molecular mechanism of cell polarization and cell migration under a more physiological relevant condition. They may also help us understand how the higher deformation ability of cancer stem cells provides the higher migration capability compared with the normal cancer cells. Ultimately, they will facilitate developing new therapeutic strategy against tumor metastasis by targeting the signaling of tumor cells in response of physical stimuli.

Keywords: tumor metastasis, cell migration, cell polarity**PACS:** 87.19.xj, 87.17.Jj, 87.17.Rt**DOI:** 10.7498/aps.64.058707

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 11434001), and the Department of Science of China (Grant No. 2012YQ030142).

† Corresponding author. E-mail: liufeng-phy@pku.edu.cn

胶原纤维网络和癌细胞的力学微环境

孙波

Collagen network and the mechanical microenvironment of cancer cells

Sun Bo

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 64, 058201 (2015) DOI: 10.7498/aps.64.058201

在线阅读 View online: <http://dx.doi.org/10.7498/aps.64.058201>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn/CN/Y2015/V64/I5>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

物理学在肿瘤细胞的极性及迁移研究中的应用

[Application of physics in the study of cell polarity during tumor cell migration](#)

物理学报.2015, 64(5): 058707 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.64.058707>

重力场作用下微管自组装过程中向列相取向的空间模式的形成

[Nematic ordering pattern formation in the process of self-organization of microtubules in a gravitational field](#)

物理学报.2014, 63(7): 078201 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.63.078201>

专题: 癌症生物物理

编者按 目前全球每年约有700万人死于癌症,到2030年将可能超过1310万.在过去的几十年里尽管癌症研究不断出现新进展,但研究成果不甚显著,最直接的证明便是死亡率无明显下降.癌症研究进展迟缓,可以说依然处于探索时期.这让越来越多的研究人员开始怀疑,用经典的生物学或医学思路研究癌症是否存在策略和方法上的缺陷?

近几年世界的科研人员积极从物理、工程、数学、信息联合生物和医学跨领域地对癌症一系列问题进行系统性研究.虽然他们遭遇跨领域研究重大疾病问题缺乏理解和支持的尴尬局面,但最近一系列成功也引起了国际上的关注.而由于中国癌症发病的特点,特别是当今肺癌、直肠癌的高发病率和致死率,尤其使中国的科学家意识到了肿瘤物理研究的重要性和必要性.同时中国的癌症发病带来了数目极为巨大的临床样本,也使得国际上一流的研究机构和大学迫切地希望与中国跨学科进行肿瘤研究的研究人员进行系统性的深度合作.这种在癌症这一重大疾病上国际层面上的跨学科的协同研究,已经成为当今国际学术界乃至社会所关注的要点.

本刊组织的“癌症生物物理”专题,是从先进物理实验手段、理论模型、物理与生物交叉等领域对近几年内癌症的内在机理、检测手段以及新型研究方法等方面创新性研究的系统性介绍.这一专题将讨论现今癌症研究中的关键问题,瓶颈以及物理交叉研究所带来的崭新格局;并且希望能够将物理的认识和技术上的创新应用于癌症医学领域,在某程度上帮助病人及其家属,减轻癌症这一恶疾对他们带来的痛苦.

(客座编辑:中国科学院物理研究所 刘雳宇)

胶原纤维网络和癌细胞的力学微环境

孙波[†]

(俄勒冈州立大学物理系, 美国俄勒冈州科瓦利斯市 97331)

(2015年1月16日收到; 2015年2月14日收到修改稿)

文章以第一类胶原纤维网络为例,着重分析了癌细胞三维微环境的多尺度结构及力学特征.对于细胞与细胞外介质结合的蛋白集团、单个细胞以及细胞群体,分别由单个纤维(或亚纤维)、纤维集束以及纤维网络整体来决定相应的力学环境.文章同时也讨论了胶原纤维(及其类似材料)的局限性.

关键词: 癌细胞, 弹性模量, 胶原蛋白, 微环境

PACS: 82.35.Pq, 87.14.em, 87.19.xj, 87.16.dm

DOI: 10.7498/aps.64.058201

1 引言

癌细胞的微环境是近年来肿瘤研究的热点方向.越来越多的证据表明,肿瘤的形成、发展和扩散并不是癌细胞独立的行为^[1-4].细胞外介质中的各种可溶性生长因子^[5],其他细胞分泌释放的物质(例如微RNA^[6,7]),以及其他种类的细胞^[8,9]都起着直接或间接的作用.而区别于这些生物化学

因素的是细胞外介质的力学特性^[10,11].机体力学特性的变化是肿瘤的常见表征之一.以乳腺癌为例,癌变组织的弹性模量可以达到正常乳房的10倍以上^[12].这种变化的影响是双向的.一方面,癌细胞力学微环境特性会影响肿瘤的生理学,增加癌细胞的运动和生长速率,甚至于促进癌细胞转变为更加危险的表型(phenotype)^[13-15].另一方面,肿瘤的发展通常主动伴随着其力学微环境的改变.仍以乳

[†] 通信作者. E-mail: sunb@physics.oregonstate.edu

癌为例,与癌细胞密切相关的TGF- β 生长因子可以激活fibroblast细胞分泌过多的胶原纤维,导致乳房密度和硬度的增加^[16].

癌细胞与其力学微环境的相互作用来自于细胞中大量的力敏蛋白(mechanosensitive proteins)^[17-19].根据其功能和位置,我们大致可以区分三类不同的力敏蛋白.第一类位于细胞膜与细胞外基质的交界处,主要的作用是形成细胞与外界的附着点并且把力学信号传递到细胞膜的另一侧.这类蛋白主要包括integrin, vinculin等^[20-23].它们在细胞的运动过程中不断的形成功能集团,又同时不断的分解、回收、重复利用.值得注意的是基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)的产生同样也和细胞的力学微环境密切相关.MMP能够分解细胞外介质(如胶原蛋白纤维).通常认为其作用有助于肿瘤的发展^[24-26].第二类是细胞的骨架结构,它们起到在整个细胞内传递,承担受力的作用.这类蛋白主要包括聚合后形成网络结构的actin, microtubule^[27-30],以及辅助这些网络动态更新的 α -actinin, tubulin^[29,31,32]等.在某些情况下,actin聚合产生的推力可以成为癌细胞突破细胞外介质的主要动力.这种运动模式称为阿米巴(amoeboid)模式^[33],它与另一模式即间质(mesenchymal)模式是癌细胞在机体组织中扩散的主要方式^[34,35].有趣的是,这两种不同的表型可以通过调节癌细胞的力学微环境来交换^[36].第三类是细胞中的分子马达,它们与细胞的骨架结合产生动态的收缩力.这种收缩力是癌细胞能够运动,扩散的直接动力,最典型的例子就是myosin^[37-39].Myosin不仅产生细胞收缩力,同时也会根据自身的受力状态而改变其化学活性^[40].这三类力敏蛋白在细胞中通过动态的力学和生物化学机制结合在一起,将癌细胞外的力学微环境转换为化学信号进而影响癌细胞的生理活动.与此同时,它们也将细胞内产生的收缩力传至细胞外介质并由此影响其他细胞^[41].在机体的三维环境中,由力学传导调节的癌细胞群体行为是目前肿瘤物理的热点研究方向之一^[42-44].

许多研究表明,只有在真正的三维环境中癌细胞的表现才会接近其真实的生理学特征(于此相对的,大部分培养皿只提供二维的表面环境)^[45].考虑到直接在动物体内进行定量研究的困难,胶原蛋白,尤其是一类胶原蛋白(Type I collagen)自组装形成的网络结构是目前最广泛应用的非活体细胞外基质的模型^[46].胶原蛋白是哺乳动物缔结组

织的主要成分,大约占到人体的脱水质量的四分之一^[47].许多种类的癌细胞在其生长周期及扩散的过程中都需要与细胞外介质中的胶原蛋白网络相互作用.正因如此,在过去的十年间胶原蛋白网络成功的被应用于癌症研究,特别是研究癌细胞在三维环境中的表现^[48,49].下面我们从物理学的角度介绍一下胶原纤维网络所提供的力学微环境.

2 胶原纤维网络的多尺度自组装结构

胶原纤维网络是一种复杂的多尺度自组装结构^[50,51].在合适的温度(一般在4°C到40°C之间)和酸碱浓度(PH = 7.4)下,溶于水的单分子胶原蛋白可以线型连接成为单链.三条相同的单链进而互相缠绕组成三螺旋结构的纤维单元(tropocollagen).如图1所示:这些纤维单元的长度一般在300 nm左右,直径在1.5 nm左右;纤维单元继而横向组合为直径6 nm左右的微纤维,以及直径25 nm左右的压纤维;这两种次级结构可以横向或纵向组合成为直径达到几百纳米,长度超过一微米的胶原蛋白纤维;胶原纤维最终互相缠绕而成为网络结构.

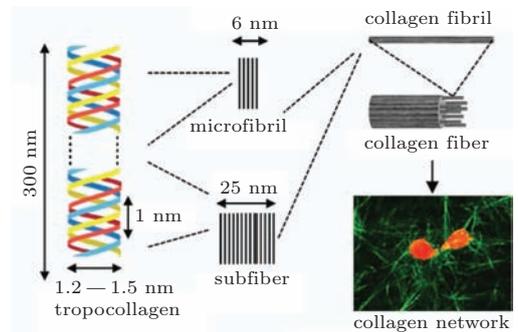


图1 胶原纤维网络的多尺度结构

胶原纤维网络是一种多孔洞的材料^[52,53].在常用的胶原浓度下(例如2 mg/mL),99%以上的质量来自于填充孔洞的水分子.

这使得胶原纤维网络在保持三维固态骨架的同时拥有非常好的渗透性及透光性,因而非常适合于细胞的培养和观察.与此同时,这样的成分也另导致胶原蛋白网络具有很低的硬度.一般通过流变仪测得的杨氏模量在几十到几百帕斯卡之间^[46].

研究胶原纤维网络的多尺度结构需要结合各种成像手段.对于微纤维及更小的结构,扫描电子显微镜几乎是惟一的选择^[54].对于亚纤维、单个胶

原纤维以及局部的胶原纤维网络, 原子力显微镜可以清晰的重现对应的结构信息^[55]. 但是这两种成像方法对于样品的制备有特殊的要求, 并且只能得到样品表面的结构特征. 与此对应的, 通过激光共聚焦显微镜^[56,57]或者双光子显微镜^[58,59], 可以分辨单个胶原纤维以及大量胶原纤维的交联. 这两种成像方法尽管丢失了亚微米尺度的信息, 却可以精确描绘胶原纤维网络的三维原始结构, 以下我们就以激光共聚焦显微技术为例, 定量分析一下胶原纤维网络的结构特征.

通过自组装形成的胶原纤维网络结构很多变, 而温度和溶液离子含量的影响尤其重要. 例如在同样的离子浓度下, 室温中形成的网络具有很大的空间不均匀性. 若干胶原纤维会集中在一起形成扇形的集束, 而在这些集束之间是大小不一的孔洞. 于此形成对比, 当温度升至37°左右, 更加的短而细的胶原纤维自组装成为均匀和致密的网络^[60]. 我们通过激光共聚焦显微技术还原胶原纤维网络的三维结构, 并且对其进行了定量的图像分析(见图2). 尽管出于成像技术的局限以及理论分析的简便, 我们只考虑了胶原纤维网络的二维截面. 但是整个材料在统计意义上的各向同性保证了我们得到的结论是完整的.

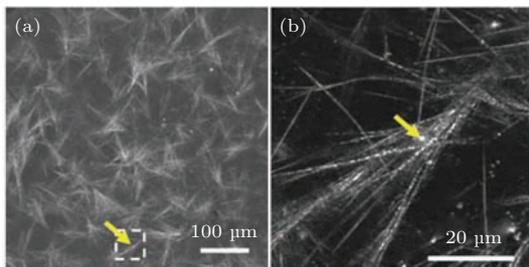


图2 胶原纤维网络中的纤维集束造成的结构不均匀性. (a) 胶原纤维网络的激光共聚焦成像二维截面, 其中白色方框区域在(b)中被进一步放大. 黄色箭头指向在胶原纤维网络中混入的少量塑料微粒

为了从共聚焦图像中得到胶原纤维网络的定量结构信息, 我们可以计算密度两点关联函数.

$$g(r) = \frac{1}{\langle \delta I^2(\rho) \rangle} \langle \delta I(\rho) \delta I(\rho + \mathbf{r}) \rangle_{\rho, |\mathbf{r}|=r},$$

其中 $\delta I(\rho) = I(\rho) - \langle I(\rho) \rangle$, $I(\rho)$ 表示在点 ρ 处的图像(8位灰度)亮度. 当 $g(r) = 1$ 时, 表示距离为 r 的两点胶原纤维密度完全正相关. 当 $g(r) = 0$ 时, 则表示这两点的密度分布统计上完全无关.

从图3可见, 密度两点关联函数可以很好地区分不同温度下形成的网络结构. 温度更高时, 相应

的关联函数下降得越快, 说明胶原纤维网络在更短的距离内趋近于随机分布. 密度两点关联函数可以近似为 $g(r) = a_1 e^{-l_1 r} + a_2 e^{-l_2 r}$, 其中 l_1, l_2 分别决定于纤维的直径以及纤维集束的大小. 可见图3(c)和图3(d)网络的定性结构是一致的.

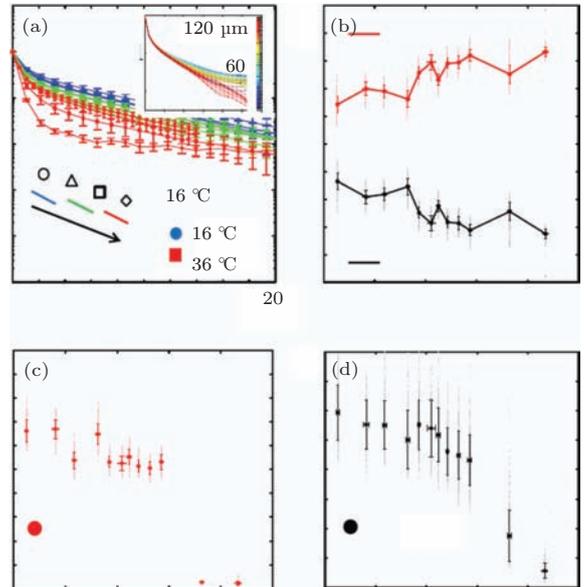


图3 胶原纤维网络结构随温度的变化可以通过密度关联函数 $g(r)$ 来描述. (a) 在给定浓度(2 mg/mL), 不同温度下形成胶原纤维网络的. 按照蓝, 绿, 红的数据颜色顺序, 圆圈, 三角, 正方, 菱形图标分别表示 16, 19, 21, 23°C, 24, 25, 26, 27°C; 28, 29, 33, 36 °C. 插图为 $g(r)$ 随着成像深度的变化. (b)—(d) 对 $g(r)$ 进行双指数拟合的结果

由于纤维集束中的单个纤维具有相近的指向, 我们推测在低温下形成的胶原纤维网络具有更高的指向序参数. 另外注意到胶原纤维不分头尾, 所以我们可以借用液晶体学的概念, 定义二维向列场 $\mathbf{s}(\mathbf{r}) = \langle e^{2i\theta(\mathbf{r})} \rangle$, 其中 $\theta(\mathbf{r})$ 代表着通过位置 \mathbf{r} 的纤维取向. 如果有多个纤维相交于 \mathbf{r} , $\langle e^{2i\theta(\mathbf{r})} \rangle$ 取它们的平均值. 为了从激光共聚焦成像中定量分析序参量场 $\mathbf{s}(\mathbf{r})$, 我们发展了一套类似于视网膜成像的图像处理的方法. 首先我们把原始图像分成大小为 $2.5 \mu\text{m} \times 2.5 \mu\text{m}$ 的网格(每一个网格包含 8×8 像素点). 对每一个网格, 我们把它和一系列的参考图像对比. 每一个参考图像都仅包含一条直线. 在以参考图像中心为原点的坐标上, 这条直线可以表示为 $x \sin \theta - y \cos \theta = b$. 不同的参考图像 $D_{b,\theta}$ 对应着不同的直线位置(b)和取向(θ). 我们定义参考图像 $D_{b,\theta}$ 中任一像素点的取值为 e^{-d^2/σ^2} , 其中 d 表示该像素与直线 $x \sin \theta - y \cos \theta = b$ 的距离, σ 表示直线的宽度. 对应于我们的成像系统, σ 取值为 0.5.

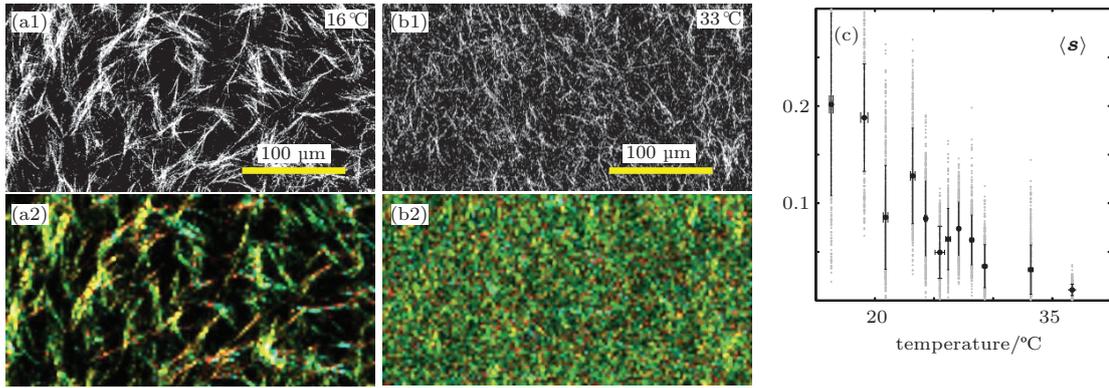


图4 胶原纤维网络结构随温度的变化可以通过向列序参量来描述. (a1) 在 16 °C 下形成的胶原纤维网络中的某一激光共聚焦成像截面. (a2): 对应 (a1) 的向列序参量场 $\mathbf{s}(\mathbf{r})$. 其中颜色使用 HSV 编码. \mathbf{H} 通道正比于 $\mathbf{s}(\mathbf{r})$ 的复角度, \mathbf{V} 通道正比于 $\mathbf{s}(\mathbf{r})$ 的绝对值 (b1-b2) 与 (a1-a2) 类似, 但胶原纤维在 33 °C 下形成. (c) 整体向列序参量 $\langle s \rangle$ 随温度的变化

定义了由 $[b, \theta]$ 决定的参考图像后, 我们可以计算每一个网格对应的序参量值如下:

$$R(b, \theta) = \frac{D_{b, \theta} * \mathbf{T}}{\mathbf{I} * \mathbf{T}}, \quad s = \sum_{b, \theta} R(b, \theta) e^{2i\theta},$$

其中, \mathbf{T} 表示任一网格对应的 8×8 图像, \mathbf{I} 是一个全为一的 8×8 矩阵, $*$ 表示对两个矩阵相应元素相乘后求和. 我们看到这个定义实际上是对可能的线元素加权求和.

通过这样的方式, 我们可以得到粗粒化的序参量场 $\mathbf{s}(\mathbf{r})$ (分辨率为 $2.5 \mu\text{m}$), 并且计算整个胶原蛋白网络的平均序参量 $\langle s \rangle$. 从图 4 可见, $\langle s \rangle$ 随着温度的升高而减小, 这说明在温度升高时, 胶原纤维的趋向更加随机. 和密度关联函数一起, 我们可以认识到温度对于胶原纤维网络的结构具有直接的影响. 而从热力学角度来看, 可以认为这是熵和能量竞争的结果. 胶原纤维的密度和取向越随机, 则整个网络的熵越大. 而与此同时更长更集中的纤维会降低化学势能. 因此胶原蛋白网络的形成也可以用经典的成核理论来描述. 实际上, 我们通过对比实验结果和 Monte-Carlo 模拟可以更加清晰的验证这一点. 有兴趣的读者可以参考文献 [60]. 同时我们注意到胶原纤维网络的自组装实际上代表了很大一类生物高分子网络的形成. 这其中包括细胞内介质 (如 actin, microtubule) 和细胞外介质 (如 fibronectin), 都可以用如上的方法来量化其结构. 很多研究表明, 这些生物高分子网络的结构可以直接影响细胞的生理表现 [61–63].

3 胶原蛋白网络的多尺度力学特性

胶原蛋白网络的多尺度结构特性决定了它的力学特性也是随着尺度变化的. 在远大于网络孔洞

的尺度上 (约为 $1\text{--}10 \mu\text{m}$), 胶原蛋白网络可以近似视为均匀弹性固体. 通过流变仪 (或微流变技术) 测量胶原蛋白网络的流变特性可以发现这种材料有着非线性的力学特性 [57,64]. 随着形变增加, 胶原蛋白网络的整体弹性模量也会增加. 这一现象在定性上可以从单个胶原纤维的弹性特点来理解. 胶原纤维的伸缩弹性模量远大于弯曲弹性 (如果近似每一根胶原纤维为一个弹性杆, 当杆长远大于直径时同样的力可以造成的弯曲变形要远大于伸缩变形). 在整体形变很小时, 纤维的弯曲起着主要的作用. 随着整体形变的增加, 越来越多的纤维被拉伸, 导致所需的力也越大, 而对应的弹性模量也会增加. 这一定性图像可以从通过模拟模型精确的验证 [65].

许多近期的肿瘤生物学研究都注意到细胞外基质的力学模量会直接影响癌细胞的分裂、转移和扩散. 巧合的是, 单个细胞的大小与胶原蛋白网络的孔洞是在同一数量级的. 这意味着癌细胞所感受到的力学环境与流变仪测量到的整体材料特性可能并不相同. 为了验证这一点, 我们在胶原纤维网络中混入直径为 $3 \mu\text{m}$ 的玻璃小球, 并且通过全息光镊 [66] 施加的光场力来分析在此微小尺度上胶原纤维网络的力学微环境. 我们发现在细胞尺度上, 胶原纤维网络的微力学特征在以下几方面与材料的整体弹性行为形成巨大反差.

1) 角度偏移. 如图 5 所示, 当光镊的中心位于玻璃微粒初始位置 $+\hat{x}$ 方向 $1.5 \mu\text{m}$ 处时, 玻璃微粒的位移偏移 $+\hat{x}$ 方向 θ_r 角 (偏轴角). 换言之, 当玻璃微粒受力时, 它的位移会产生和受力方向垂直的分量.

2) 微力学的各向异性. 如图 5 所示, 当同样的光场势能施于不同的方向时, 玻璃微粒的位移并不相同. 甚至于光镊在 $+\hat{x}$ 和 $-\hat{x}$ 方向时产生的微粒

位移也不是镜面对称的。

3) 微力学随空间分布不均匀. 当对同一样品的其他玻璃微粒进行如图5的测量, 每一微粒的表现都有不同, 并且呈现出明显的空间不均匀性. 如果对所有的偏轴角做统计会发现它们的分布较高斯分布有更大的频率出现极端值(大于 45°).

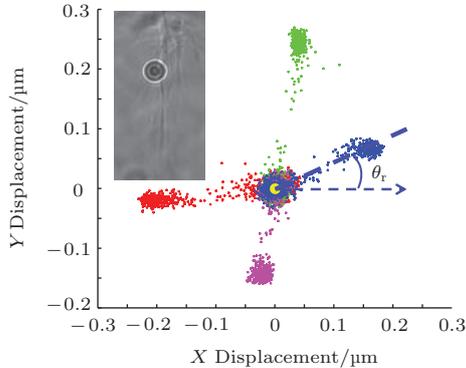


图5 利用全息光镊以及玻璃微粒的受力位移分析胶原纤维网络的微力学. 以玻璃微粒的初始位置为原点, 光镊分别置于距原点 $1.5 \mu\text{m}$ 的 $+\hat{x}$, $-\hat{x}$, $+\hat{y}$, $-\hat{y}$ 四个方向, 并且以 1 Hz 的频率开关激光光路. 同时, 玻璃微粒的全息投影(以 60 Hz 记录)被用于分析其精确的位移. 图中不同颜色的点用于区分光镊所在的方向

上面列举的例子说明在单个细胞尺度下, 胶原纤维网络的力学特性与线型或非线性弹性介值理论相悖. 因此我们必须放弃连续介质的假设转而从非连续的网络结构入手. 这方面的理论和数值模拟是一个活跃的研究方向. 有兴趣的读者可以参考近期的综述如文献 [67].

当我们进一步放大视野, 单个胶原纤维的力学行为又有不同. 由于胶原纤维的直径可以有很大的自由度, 通常更加可靠的是测量胶原亚纤维的模量. 相对于整体材料的流变测量, 这方面的实验还处在初始阶段. 目前较为成熟的方法是利用原子力显微镜测量单个悬浮纤维的力学模量. 在这个尺度上可以发现即使单个纤维也具有空间不均匀的结构(D-period)和硬度, 并且有类似玻璃的非弹性行为 [68,69]. 研究单个亚纤维在不同条件下(诸如温度, 离子浓度)的力学特性, 是我们理解癌细胞力学微环境的重要一环. 有兴趣的读者可以参考文献 [51,70—72].

4 结论及展望

我们在本文中以广泛应用与癌症研究的胶原蛋白网络为例探讨了癌细胞的力学微环境. 由于胶原蛋白网络的多尺度自组装特性, 它所提供的力

学环境也是与测量尺度紧密相关的. 对应于纳米、微米、毫米级别, 我们观察到的是单个纤维(或亚纤维)、纤维集束以及纤维网络整体的力学表征. 用细胞来衡量, 它们又分别对应着细胞细胞外介质结合的蛋白集团、单个细胞以及细胞群体. 如何理解跨尺度的细胞力学及其微环境, 是肿瘤物理学急需填补的空白.

最后我们同样也要注意胶原纤维蛋白网络仍然有着很大的局限性. 首先, 在机体中的胶原纤维通常会形成非常致密的网络, 其密度远大于我们在实验室中合成的胶状固体. 实际上, 本文中提到的胶原纤维网络中, 质量的95%以上是水分子, 这与真实的结缔组织有很大的区别. 第二, 体外合成的胶原纤维网络缺少纤维之间的化学交联, 这一区别有可能影响胶原纤维网络的硬度, 以及癌细胞与细胞外间质的具体相互作用, 特别是胶原水解酶MMP的活性. 第三, 尽管胶原蛋白是机体中细胞外间质的主要成分, 其他的成分, 诸如纤粘蛋白(fibronectin), 也是癌细胞力学微环境中的一员. 事实上, 胶原蛋白和纤粘蛋白分别与细胞外不同的受体结合, 从而激活各自对应的下游信号传递. 因此, 胶原蛋白网络无法完全模拟真实机体中的复杂性. 当然, 作为以定量研究为目的的肿瘤物理学来说, 简化细胞微环境通常是必要的. 最后, 胶原蛋白需要从动物身体上提取并提纯, 这就意味着不可避免地掺杂其他物质以及难以控制的每只动物之间的区别. 所以使用体外合成胶原纤维网络的实验实际上是不可能精确重复的. 面对这些问题, 用人工合成的细胞外介质取代动物提取材料是近年来生物工程的一大热点. 例如通过蛋白质编程在肽链中嵌入合适的序列, 可以可控的激活不同种类的细胞外蛋白集团(例如 integrin), 同时调节肽链交联的强度以形成固态的网络结构. 关于这方面的详细介绍超出本文范围, 有兴趣的读者可以参考相关综述, 例如文献 [73—75].

参考文献

- [1] Balkwill F, Capasso M, Hagemann T 2012 *J. Cell Science* **125** 5591
- [2] Allinen M et al. 2004 *Cancer Cell* **6** 17
- [3] Friedl P, Alexander S 2011 *Cell* **147** 992
- [4] Hanahan D, Weinberg R 2000 *Cell* **100** 57
- [5] Bierie B, Moses H 2006 *Nature Reviews Cancer* **6** 506
- [6] Muhammad S 2014 *World Journal of Gastroenterology* **20** 17011

- [7] Soon P, Kiaris, H 2013 *Endocrine-Related Cancer* **20** 257
- [8] Zigrino P, Loffek S, Mauch C 2005 *Biochimie* **87** 321
- [9] Hua Y, Korty M, Pardoll D 2007 *Nature Reviews Immunology* **7** 41
- [10] Ulrich T, Pardo E, Kumar S 2009 *Cancer Research* **69**
- [11] Yeung T et al. 2005 *Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure and adhesion. Cell Motility and the Cytoskeleton*, p60
- [12] Lopez J, You I, McDonald D, Weaver V 2011 *Integrative Biology* **3** 910
- [13] Dingal P, Discher D 2014 *Biophysical Journal* **107** 2734
- [14] Seewaldt V 2014 *Nature Medicine* **20** 332
- [15] Bordeleau F, Alcoser T, Reinhart-King C 2014 *American Journal of Physiology: Cell Physiology* **306** C110
- [16] Barcellos-Hoff M, Ravani S 2000 *Cancer Research* **60** 1254
- [17] Luo T, Mohan K, Robinson D 2013 *Nature Materials* **12** 1064
- [18] Silver F, Siperko L 2003 *Critical Review of Biomedical Engineering* **31** 255
- [19] Dufort C, Paszek M, Weaver V 2011 *Nature Review Molecular Cell Biology* **12** 308
- [20] Desgrosellier J, Cheresch D 2010 *Nature Review Cancer* **10** 9
- [21] Varner J, Cheresch D 1996 *Current Opinion in Cell Biology* **8** 724
- [22] Juliano R, Varner J 2004 *Current Opinion in Cell Biology* **5** 812
- [23] Mierke C et al 2010 *The Journal of Biological Chemistry* **285** 13121
- [24] Egeblad M, Werb Z 2002 *Nature Reviews Cancer* **2** 161
- [25] Itoh Y, Nagase H 2002 *Essays Biochemistry* **38** 21
- [26] Gialeli C, Achilleas D 2011 *The FEBS Journal* **278** 16
- [27] Yamazaki D, Kurisu S, Takenawa T 2005 *Cancer Science* **96** 379
- [28] Olson M, Sahai E 2009 *Clinical Experimental Metastasis* **26** 273
- [29] Parker A, Kavallaris M, McCarroll J 2014 *Microtubules and their role in cellular stress in cancer. Frontiers in Oncology*, p00153
- [30] Shtil A et al. 1999 *Oncogene* **18** 377
- [31] Tseng Y, Wirtz D 2001 *Biophysical Journal* **81** 1643
- [32] Courson D, Rock R 2010 *The Journal of Biological Chemistry* **285** 26350
- [33] Wyckoff J et al. 2006 *Current Biology* **16** 1515
- [34] Sabeh F, Shimizu-Hirota R, Weiss S 2009 *Journal of Cell Biology* **185** 11
- [35] Friedl P, Wolf K 2003 *Nature Reviews Cancer* **3** 362
- [36] Aung A et al. 2014 *Biophysical Journal* **107** 2528
- [37] Reichl E et al. 2008 *Current Biology* **18** 471
- [38] Robinson D, Spudich J 2004 *Current Opinions in Cell Biology* **16** 182
- [39] Cao R et al. 2014 *British Journal of Cancer* **111** 539
- [40] Laakso J, Lewis J, Shuman H, Ostap E 2008 *Science* **321** 133
- [41] Pruitt B, Dunn A, Weis W, Nelson W 2014 *PLoS Biology* **12** e1001996
- [42] Suresh S 2007 *Acta Biomaterial* **3** 413
- [43] Hao J et al. 2013 *Cell Biology International* **37** 888
- [44] Liu L et al. 2013 *Proceedings of the National Academy of Science* **110** 1686
- [45] Anon 2006 *Nature Reviews Molecular Biology* **7** 211
- [46] Brown R 2013 *Experimental Cell Research* **319** 2460
- [47] Lodish H et al. 2000 *Molecular Cell Biology* (4th Ed.) (New York: W. H. Freeman)
- [48] Paszek M et al. 2005 *Cancer Cell* **8** 241
- [49] Petrie R, Yamada K 2012 *Journal of Cell Science* **125** 5917
- [50] Schmitt F, Hall C, Jakus M 2005 *Journal of Cellular Physiology* **20** 11
- [51] Shoulders M, Raines R 2009 *Annual Review of Biochemistry* **78** 929
- [52] Yang Y, Motte S, LJ K 2010 *Biomaterials* **31** 5678
- [53] Lang N et al. 2013 *Biophysical Journal* **105** 1967
- [54] Raspanti M, Alessandrini A, Gobbi P, Ruggeri A 1996 *Microscopy Research Techniques* **35** 87
- [55] Raspanti M, Alessandrini A, Ottani V, Ruggeri A 1997 *Journal of Structure Biology* **119** 118
- [56] Brightman A et al. 2000 *Biopolymers* **54** 222
- [57] Yang Y, Kaufman L 2009 *Biophysics Journal* **96** 1566
- [58] Williams R, Zipfel W, Webb W 2005 *Biophysics Journal* **88** 1377
- [59] Cox G et al. 2003 *Journal of Structural Biology* **141** 53
- [60] Jones C et al. 2014 *Soft Matter* **10** 8855
- [61] Reymann A et al. 2012 *Science* **336** 6086
- [62] Etienne-Manneville S 2013 *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **29** 471
- [63] Singh P, Carraher C, Schwarzbauer J 2010 *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **26** 397
- [64] Shayegan M, Forde N 2013 *PLoS One* **8** e70590
- [65] Stein A, Vader D, Weitz D, Sander L 2011 *Complexity* **16** 22
- [66] Curtis J, Koss B, Grier D 2002 *Optics Communications* **207** 169
- [67] Broedersz C M M 2014 *Rev. Mod. Phys* **86**
- [68] Baldwin S J 2014 *Biophysical Journal* **107** 1794
- [69] Gautieri A S 2011 *Nano Letters* **11** 757
- [70] Orgel J, Irving T A M, Wess T 2006 *Proceedings of National Academy of Sciences America* **103** 9001
- [71] Apel-Sarid L et al. 2010 *Journal of Neurosurgical Pediatrics* **6** 38
- [72] Provenzano P et al. 2006 *BMC Medicine* **4** 38
- [73] Li Y, Yu S 2013 *Current Opinions in Chemical Biology* **17** 968
- [74] Silva E A, Mooney D J 2004 *Current Topics in Development Biology* **64** 181
- [75] Lutolf M, Hubbell J 2005 *Nature Biotechnology* **23** 47

SPECIAL ISSUE—Cancer biophysics

Collagen network and the mechanical microenvironment of cancer cells

Sun Bo[†]

(Department of Physics, Oregon State University Corvallis, OR, 97331)

(Received 16 January 2015; revised manuscript received 14 February 2015)

Abstract

Mechanical interaction between cancer cells and their microenvironment plays a central role in the progression of tumors. *In vitro* models based on biopolymer networks have been successfully employed to simulate the 3D extracellular matrix (ECM) of tumors. In this review, we focus on type I collagen gel. We describe the hierarchical structural and mechanical properties of type I collagen ECM. We demonstrate that corresponding to the scales of adhesion sites, single cells and cell colonies, the mechanics of the ECM is dominated by single fibers, fiber clusters and rheology of the whole fiber network. In the end, we discuss the limitations of reconstituted type I collagen as *in vitro* ECM.

Keywords: cancer cell, elastic modulus, collagen, microenvironment

PACS: 82.35.Pq, 87.14.em, 87.19.xj, 87.16.dm

DOI: [10.7498/aps.64.058201](https://doi.org/10.7498/aps.64.058201)

[†] Corresponding author. E-mail: sunb@physics.oregonstate.edu

三维微纳米制造技术在癌症生物物理研究中的应用

鲁金蕾 王晓晨 容晓晖 刘雳宇

3D micro/nano fabrication and its application in cancer biophysics

Lu Jin-Lei Wang Xiao-Chen Rong Xiao-Hui Liu Li-Yu

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 64, 058705 (2015) DOI: 10.7498/aps.64.058705

在线阅读 View online: <http://dx.doi.org/10.7498/aps.64.058705>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn/CN/Y2015/V64/I5>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

心率变异性分析在新生儿疼痛检测中的应用

[Application of heart rate variability analysis to pain detection for newborns](#)

物理学报.2014, 63(20): 208704 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.63.208704>

心磁信号广义S变换域奇异值分解滤波方法

[A method for magnetocardiograms filtering based on singular value decomposition and S-transform](#)

物理学报.2013, 62(14): 148702 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.62.148702>

专题: 癌症生物物理

三维微纳米制造技术在癌症生物物理研究中的应用*

鲁金蕾 王晓晨 容晓晖 刘雳宇†

(中国科学院物理研究所, 软物质重点实验室, 北京 100190)

(2014年11月18日收到; 2014年12月16日收到修改稿)

癌症致命的主要原因是癌细胞在临床上的转移性. 癌细胞的侵袭和转移是一个非常复杂的三维过程, 但现有的癌症研究在活体上有诸多观测和操作上的困难. 而体外实验又通常在培养皿中进行, 其二维的生长环境已完全不能满足对癌细胞空间转移性的深入研究, 故在活体外构建出癌细胞侵袭和转移的三维物理模型具有十分重要的意义. 然而如何在体外尽可能真实地模拟体内癌细胞的生长微环境一直是困扰科学家的难题. 本文系统介绍了三维微纳米制造的几种主流技术, 探讨了它们在癌症生物物理研究中的应用和发展. 在此基础上为了在未来实现对体外三维模型的制造、观测和精确操作, 文章还创新性地提出了一种结合紫外线固化生物型水凝胶的三维成型技术、光片三维成像技术以及微纳米探针控制技术的一体化研究平台. 这些先进的技术和理念, 势必会逐步升级现有传统的癌症研究手段, 为未来理解和治疗癌症揭开全新的篇章.

关键词: 三维微纳米制造技术, 3D生物打印, 体内微环境, 生物物理

PACS: 87.19.xj, 87.80.-y, 87.85.J-, 87.18.Gh

DOI: 10.7498/aps.64.058705

1 引言

癌症已逐渐成为21世纪对人类健康最具威胁的疾病^[1]. 相比于其他疾病癌症的致死率很高, 其致命的主要原因是癌细胞具有很强的转移性. 调查显示, 90%的癌症患者死亡都是源于癌细胞的侵袭和转移. 侵袭是指肿瘤发展到一定程度后, 癌细胞脱离原来的肿瘤位置, 入侵和破坏周围细胞外间质组织 (extracellular matrix, ECM) 的过程. 转移是指它们穿破血管壁或淋巴壁, 随血液或淋巴液迁移到身体其他部位继续繁殖, 破坏更多的人体器官和组织, 最终造成病人死亡的过程. 由于癌细胞转移的部位异常随机和分散并且牵涉血管、淋巴管以及多个组织, 故手术、化疗或药物等方法都很难达到良好的治疗效果, 因此癌症一旦转移就很难治愈.

癌细胞侵袭是癌症扩散的第一步和标志. 当肿

瘤完整还没有发生侵袭时是可以通过手术成功切除且基本不会威胁生命的. 但是受当今医疗资源的限制, 加上人们对自身健康的不重视, 癌症通常都是在癌细胞脱离肿瘤发生侵袭后才被发现. 而此时由于细胞侵袭组织的多向性及广泛性, 手术治疗已基本不可能, 病人只能接受药物、放疗等治疗方法, 进入向死亡接近的道路. 可以说, 侵袭是癌症从不致命转向致命的分界线. 那么研究侵袭中癌细胞侵袭的路径、模式、速度、细胞变化 (及癌细胞) 与侵袭环境关联等规律在发生侵袭后的癌症临床治疗中就显得尤为重要.

纯生物和医学的领域通常关注的是癌细胞的内部调控 (包括基因的变异, 蛋白分子机理的调控, 染色体变化) 对细胞的影响, 或者是癌症在临床上的表现和治疗. 而癌细胞的侵袭是生物层面上典型的集体行为, 侵袭的路径、模式、速度、细胞变化及其与侵袭环境的关联是大于癌细胞尺度的研究, 是

* 国家重点基础研究发展计划 (批准号: 2013CB837200) 和国家自然科学基金 (批准号: 11474345) 资助的课题.

† 通信作者. E-mail: liu@iphy.ac.cn

生物和医学研究所不涉及的领域. 所以应用物理的手段研究癌细胞在侵袭过程中的动态行为, 以及其在微环境的刺激(如药物, 生长因子)下自身侵袭模式的变化非常有必要. 另外, 癌细胞的变异具有很强的个体性差异, 只有建立模型去统计和定量地认识、研究癌细胞的特性才可以得到具备一定普适性的结论.

在传统的癌症研究中研究人员通常只能用小白鼠做实验, 肿瘤及癌症的发展状况需要通过活体切片才能了解. 这不仅费时费力, 最重要的是切片为静态结果, 并不能反推得到细胞侵袭过程中各种模式的成因和发展. 另外广泛使用于传统意义癌细胞研究中的培养皿, 始终存在不能模拟人体内癌细胞生长的三维环境的缺陷. 肿瘤的产生、癌细胞的转移以及细胞外间质组织中成纤维细胞的繁殖都是在三维空间中发生的, 研究已经证实细胞在二维和三维空间中, 在生物行为和细胞形态上通常存在巨大的差异^[2]. 根据上述讨论, 要研究肿瘤细胞的侵袭行为最好可以通过在体外建立物理模型, 模拟人体内癌细胞侵袭的微环境^[3], 在微米尺度对细胞群侵袭的方式、形态和空间位置进行连续观测, 定量研究细胞集体行为和侵袭机理. 并且最好可以对微环境进行实时监测和控制, 研究环境改变对于侵袭的影响^[4]. 这项重任可以由三维微纳米制造技术结合三维生物成像来担当和实现.

三维制造技术是一种以数字模型文件为基础, 运用可粘合材料在三维空间上将模型实体化的技术, 过去其常被用于模具制造、工业设计等生产加工阶段, 后来随着技术的成熟可以被用来直接制造成品. 而三维打印技术(又称3D打印)作为三维制造技术的一种, 是采用分层加工、叠加成型的方式逐层增加材料来生成三维实体的方法^[5-7], 现正被广泛用于各个领域. 生物物理学家们通过优化三维制造技术或3D打印技术在体外初步建立起可以模拟体内微环境的三维微纳米结构, 研究了细胞群的生长方式^[8]、相互作用以及迁移特点^[4]并取得了阶段性成果. 优化后的这些技术更适合用于生物医学领域, 帮助人们在体外建立三维微纳米结构模拟体内微环境, 在微米尺度对细胞群的侵袭方式、侵袭机理进行研究, 同时也为深入了解癌症的致命机理, 开辟癌症治疗的新思路打下基础.

2 三维微纳米制造技术

以下介绍几种现阶段广泛用于生物物理领域的三维微纳米制造技术, 并举例说明其制造出的三维微纳米结构在研究微流体、细胞的转移、细胞间相互作用以及细胞-环境间相互作用中的应用, 并在此基础上分析其在癌症生物物理研究中的应用前景.

2.1 PDMS 模塑法

首先, 最简单直接的也是人们最早想出来的方法是利用模具来加工三维结构. 较早期, 研究人员使用刻蚀了的玻璃和硅片作为模具, 然后经过倒模形成简单的三维结构用于微流体芯片的制作和微流体系统的研究. 微流体系统是指特征尺寸在10到100 μm 之间可控制液体或气体流动的装置, 多数用于化学分析、生物医学等研究领域. 经过20多年的研究和发展, 微流体芯片的加工工艺已经发展得较为成熟. 现在实验室中常用到的加工材料是聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS). PDMS原本是一种黏稠透明状液体, 在与适量助凝剂混合之后便可凝固成形, 这些性质使得PDMS具有加工快、成本低、易封装等特点, 除此之外它还具有良好的透气性和生物兼容性. 近些年随着3D打印技术的发展更可以将模具直接打印出来, 进一步简化了PDMS芯片的制作工序. 图1介绍了Germán Comina等人(2013年)使用商业化3D打印机在20 min之内打印出精度大约为50 μm 的模板, 经PDMS倒模制成液体混合芯片, 用以研究不同结构的混合通道对液体的混合效果^[9]. 该技术所使用的3D模板平均每个仅0.48美元, 并且可以重复使用, 制作出的微流体管道也能够充分保留原有的设计细节. 因此, Germán Comina等人的研究为快速加工更为复杂的PDMS芯片或结构提供了一种很好的思路.

另外, 由于PDMS具有良好的生物兼容性, 微流体芯片又具有与细胞大小(10 μm 量级)相近的特征尺寸(10 μm 到100 μm), 这就使得PDMS芯片非常适合用于细胞生物学研究领域. 在这方面已经有研究人员利用PDMS在体外构建出特殊的三维微结构用于癌细胞在这些结构中的运动及生长特性的研究. 图2显示Kuo等人使用三维

PDMS 芯片研究人乳腺癌细胞 (MCF-7) 在特定趋化因子分布下的三维转移特性^[10]. 首先他们在芯片底部的胶原蛋白中成功实现细胞生长因子(epidermal growth factor, EGF, 能促进细胞的增殖分化)浓度的线性分布, 随后将细胞团置入到带有纳米小孔阵列的薄膜上层使其处于 EGF

浓度梯度下, 连续观察6天的结果表明在三维结构中 MCF-7 在细胞 EGF 浓度梯度的作用下表现出一种明显的定向迁徙的特点. 基于该三维转移芯片可以在光学显微镜下很方便地研究不同种肿瘤细胞在不同细胞趋化因子的作用下的迁徙特点.

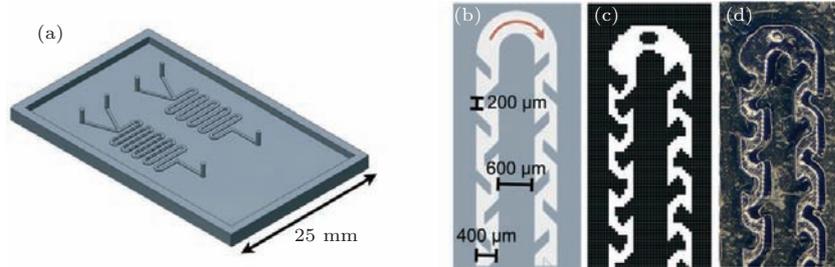


图1 (a) 用于制作混合通道的模板的3D打印效果图; (b), (c), (d) 分别是模板设计图的细节、用于打印时模板位图的细节和打印出的模板细节

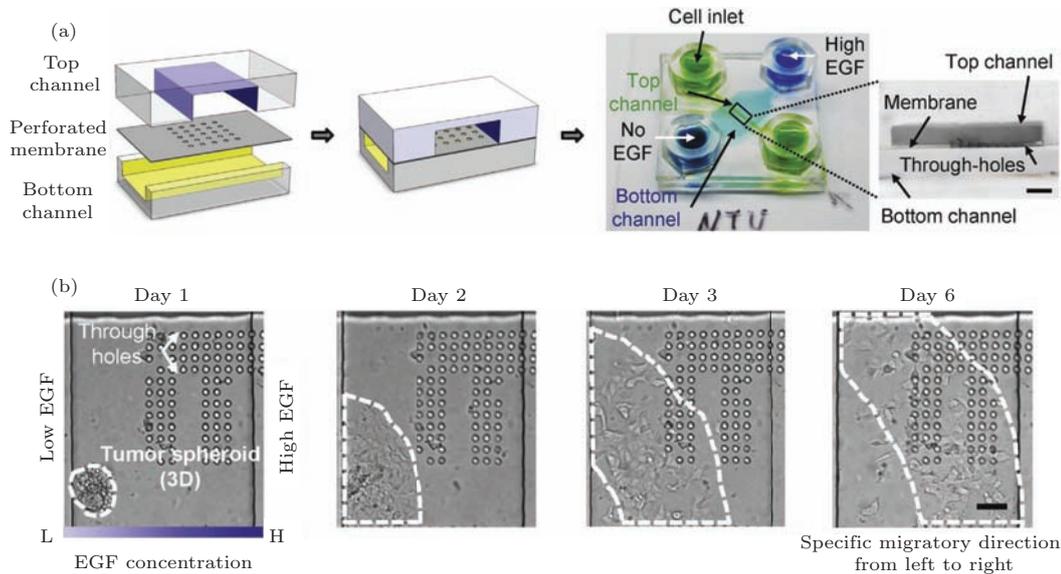


图2 (a) PDMS 芯片结构示意图和 PDMS 芯片实物图. 绿色的“井”是细胞的出入口, 蓝色的“井”被用来产生 EGF 梯度; (b) 人乳腺癌细胞 MCF-7 的细胞团在 EGF 的浓度梯度 (20 ng/(ml·mm)) 作用下沿着梯度方向扩散, 白色曲线内是细胞群所在位置

虽然现阶段研究人员已经在所建立的微结构中研究并记录了肿瘤细胞不同于在二维结构中的迁徙行为, 然而上述研究中使用的传统微结构加工技术所制作出的三维微结构多是由准三维结构(具有三维特征的二维结构)组合而成, 尚不能做到体内组织真实三维结构的重现. 本文笔者所在的研究组在这个方面做了尝试, 结合现有的快速精准的3-D打印技术和成熟的模塑法, 基于一个真实病例在体外重构出一个具有真实血管三维微结构的PDMS芯片. 研究组首先使用计算机三维辅助设计软件(computer aided design, CAD)在血管造影

图的基础上重建出血管的三维结构(如图3(a)), 之后使用3D打印机(美国3D Systems公司的Projet HD3500喷墨式3D打印机)将血管的模型打印出来(如图3(b)), 模型的材料选择的是一种特殊的蜡质(VisiJet M3 Hi-Cast). 将蜡基模型浸入PDMS中抽除气泡并固定, 放置于室温待PDMS固化, 接着使用正己烷溶液经多次超声溶解去除蜡基模型, 最后将其洗净干燥获得具有真实三维结构的PDMS芯片.(如图3(c)).

研究组使用的HD3500为当今世界上最高精度3D打印机之一, 其精度可达 16 μm. 图4(b)是

PDMS 芯片的通道内表面的扫描电镜照片, 从图中已经可以看到真实还原的血管的三维形貌, 但是管道内壁较为粗糙. 虽然打印机的加工精度为 $16\ \mu\text{m}$, 但是脱模之后得到的粗糙度却大约为 $50\ \mu\text{m}$, 对于细胞 ($10\ \mu\text{m}$ 量级) 来说这个精度还不够高. 综上所述, 研究组目前已经能够制作具有真实体内结构的 PDMS 芯片, 用来研究毫米尺度的肿瘤细胞在血流带动下的分流特点. 但是由于受制作工艺的限制, 芯片结构精度还不够高而且管道为不可侵入的 PDMS 材质, 故还不能满足未来细胞尺度的特异性研究需求, 如不同肿瘤细胞粘附血管内皮的能力和微观机理、肿瘤细胞在血流中贴附血管内壁之后穿过血管向组织内部继续侵袭的特点等. 所以该工艺还有望从结构加工精度和结构材质两个方面重点加以改进.

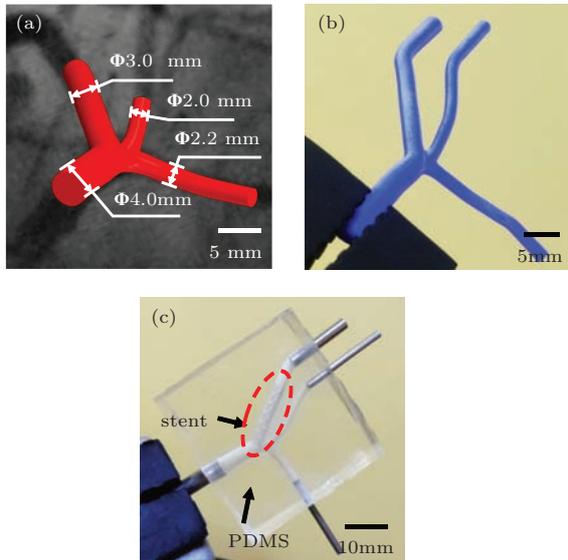


图3 (a) 计算机辅助设计软件重建出的真实病例的血管三维模型; (b) 使用3D打印机打印出的三维蜡基血管模型; (c) 使用(b)中所示的蜡基血管模型脱模制作成的具有真实三维结构的PDMS芯片

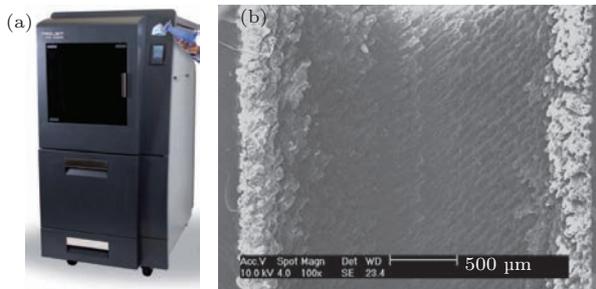


图4 (a) 3D Systems 公司的 Project HD3500 型号喷墨3D打印机; (b) 扫描电子显微镜 (SEM) 拍摄的 PDMS 芯片管道内表面, 该粗糙内表面为加工精度 ($16\ \mu\text{m}$) 和脱模工艺所造成

2.2 飞秒双光子三维激光直写技术

相较于传统的 PDMS 模塑法, 飞秒双光子三维激光直写技术在加工精度方面就有了很明显的优势. 飞秒双光子三维激光直写技术的核心是双光子聚合的化学反应. 光引发剂吸收双光子 (或与光敏剂配合吸收光子) 引发聚合物单体链式聚合反应, 实现三维微纳米结构制造. 具体来说就是固定装置物镜焦点不变通过控制样品台的移动精确地控制位移, 光敏材料被激光照射到的点吸收光子 (双光子的吸收遵循非线性光学理论, 即吸收率正比于光强的平方) 发生聚合反应逐点固化, 进而在三维空间上实现聚合形成三维结构, 从而精确控制材料的三维加工. 也正是这种逐点加工的特点使飞秒双光子激光直写技术拥有更高的打印精度 (二维特征尺度可达到 $100\ \text{nm}$, 三维特征尺度也可以小于 $150\ \text{nm}$), 为制造出更精细更具仿生性的细胞微环境结构提供了可能.

2.2.1 光刻胶生物支架

目前最常用的光敏材料为光刻胶, 它的主要成分是光敏化剂、光引发剂、有机溶剂和溶解抑制剂. 现阶段在生物物理研究中被广泛使用的光刻胶包括: SU-8, Ormocomp 等.

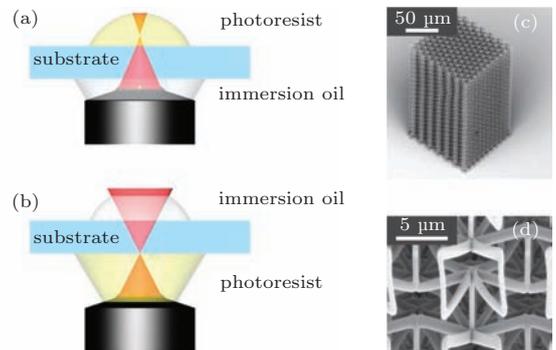


图5 (a) 传统三维激光直写技术原理图; (b) 浸入式激光直写技术原理图; (c) 利用浸入式三维激光直写技术加工出的具有六重轴的三维微结构; (d) 为(c)结构最顶层结构的放大图

Tiemo Bückmann 等人就利用光刻胶作原材料, 用浸入式三维激光直写技术制造出了可调节泊松比、具有各向异性的蝴蝶结状功能性原件^[11], 如图5, 该元件形状特别同时精度较高有望在骨组织研究领域或生物体外细胞培养中得到应用. 制造所使用的浸入式三维激光直写技术实际上是在传统三维激光直写技术的基础上做了改进, 通过将光刻

胶置于物镜与玻璃衬底之间,有效降低传统技术中与深度有关的光学畸变,从而在保留结构亚微米级特征尺寸的同时,还能将总体结构的打印高度提升至毫米级.这一微结构在高度尺寸上的突破也有望用于满足研究癌细胞的细胞群或整体组织的移动、侵袭及细胞间交互作用时的需求.

当三维激光直写技术实现了高精度三维结构制造这第一步,科学家们就开始寄希望于在设计制作的特定结构中培养细胞,来实现体外的细胞行为观察及病理学、药理学研究,同时也希望能够通过控制微结构运动,推进药物目标传递、体内标记、活体组织检查、细胞控制、短距离放射治疗等方向的发展^[12].因此 Franziska Klein 等人就使用生物

兼容性光刻胶 Ormocomp 作为材料,用飞秒双光子激光直写技术制造出三维结构来测量细胞的作用力^[13].如图 6 所示,该结构中的柱体高度为 15 μm ,连接横梁直径为 0.6 μm ,这也再次证明了激光直写技术具有非常高的加工精度.该研究组通过在结构上添加一层纤维连接蛋白来使心肌细胞附着在生物支架上,并记录心肌组织收缩使横梁产生的位移量,测量支架的弹性系数,最后计算出心肌细胞收缩力.由此可见,飞秒双光子激光直写技术实现的精细结构的设计制造,有助于检验细胞生长、运动相关理论,了解相关物理参量,同时也为研究癌细胞侵袭过程中细胞间相互作用打下基础.

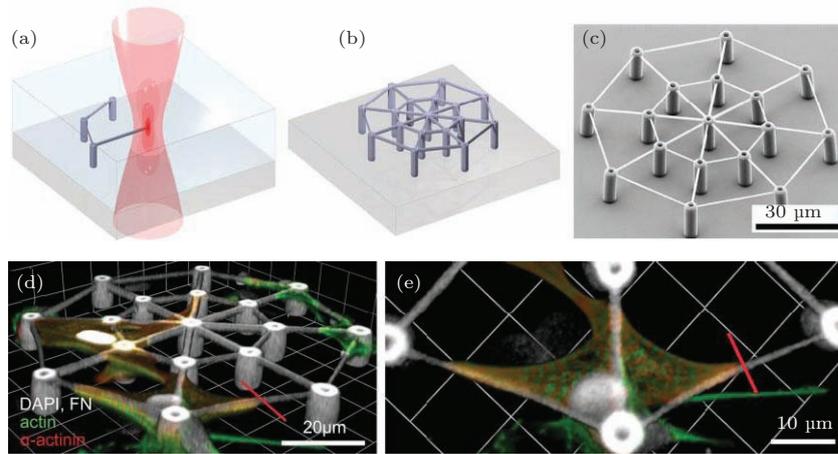


图 6 (a), (b) 飞秒双光子三维激光直写技术的加工原理图及三维生物支架的模型图; (c) 三维支架的 SEM 照片; (d), (e) 支架共聚焦显微照片的三维重构, 鸡心肌细胞附着在由生物兼容性光刻胶 Ormocomp 制造的支架上, 连接横梁的直径为 0.6 μm (侧视图 (d) 俯视图 (e))

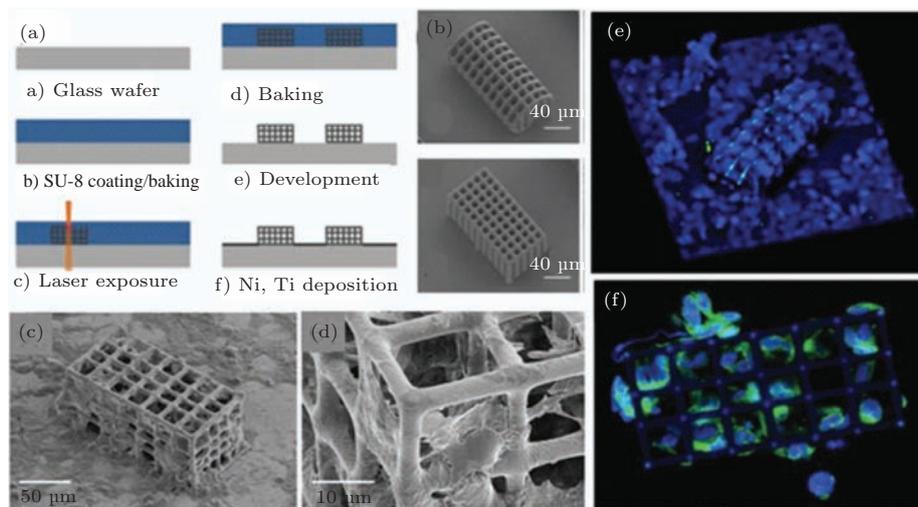


图 7 (a) 磁控微型机器人的制备过程; (b) 不同种类微型机器人的 SEM 照片, 分别为圆柱体和六面体; (c) 附着细胞的六面体微型机器人的 SEM 图; (d) SEM 局部细节图可清晰显示丝状伪足; (e), (f) 共聚焦显微镜下附着荧光染色细胞的圆柱体微型机器人, 六面体微型机器人

基于上述结果, Sangwon Kim 等人同样使用这种方法制造出了可以磁驱动的微型机器人^[14], 以实现三维细胞培养和定向运输(如图7所示). 该研究组利用光刻胶SU-8作为材料, 通过调试扫描速率、激光能量、薄层间距离等参数值, 应用三维激光直写技术制造了具有六面体和圆柱体多孔结构的两种微型机器人. 更重要的意义在于, 该研究用蒸镀的方式在微型机器人结构表面沉积上一层镍以实现磁控制, 沉积一层钛以提升生物兼容性, 一举实现了微结构的磁驱动和人胚肾细胞(HEK293)在其上的培养. 证明了机器人使用的材料不仅对细胞没有毒性, 而且还能够实现细胞的黏着、增殖与迁移. 此项研究的成果日后很有希望用于微结构中癌细胞的培养、多细胞群体在血管中的定点控制和药物传递.

2.2.2 胶原蛋白、明胶生物支架

上述的两个研究都是采用在光刻胶制造的结构上附着了一层生物兼容性材料(如纤维连接蛋白、金属钛等)的方法来三维结构表面的生物兼容性. 但是这种方法使制造工艺变得繁琐, 且将研究范围局限在三维结构表面, 无法研究癌细胞侵入三维结构内部的过程. 而胶原蛋白以及明胶类材料不但本身具有优良的生物兼容性, 其良好的表面活性也利于细胞吸附, 有研究者把细胞、细菌等直接和胶原蛋白、明胶混合, 采用模塑法或双光子聚合

将混合后的液态材料制成三维微结构.

这里所说的模塑法是先利用PDMS等制作模板, 再将胶原蛋白注入模板中成型、组装, 并利用化学方法和物理方法使胶原蛋白发生交联反应, 进而形成三维结构. 图8为Ying Zhang 等人在胶原蛋白生物芯片中, 通过观察分析内表皮细胞的生长、内表皮细胞与血管周细胞的相互作用以及内表皮细胞与血液成分的相互作用, 研究血管再生术和血栓症^[15]. 而在癌症生物物理研究中, 癌细胞的侵袭和转移也需要探究其进入血管血液中和从血液中重新粘附血管进入组织的过程. 相信该模型会为癌细胞在血管中移动或黏附、细胞-环境交互作用对侵袭的行为影响、药物对癌细胞的行为影响等众多方面研究提供新的思路.

Connell 等人将光敏分子混入明胶、牛血清蛋白等中成功配制出能有效提升细胞存活率的优良生物兼容性光刻胶, 如图9所示, 并将不同细菌混合在光刻胶中制备出虽然具有物理间隔, 兼备化学交互作用的结构, 在体外研究了不同种细菌群落的相互作用^[16]. 可见, 相比上文提到的利用模塑法制造成的胶原蛋白矩形血管网络, 飞秒双光子激光直写技术加工的三维高精度复杂血管构造和其他组织, 显然在结构的仿生性上向前迈进了一大步, 对升级现有微流体芯片制造技术, 开拓崭新的癌症生物物理研究方向非常重要.

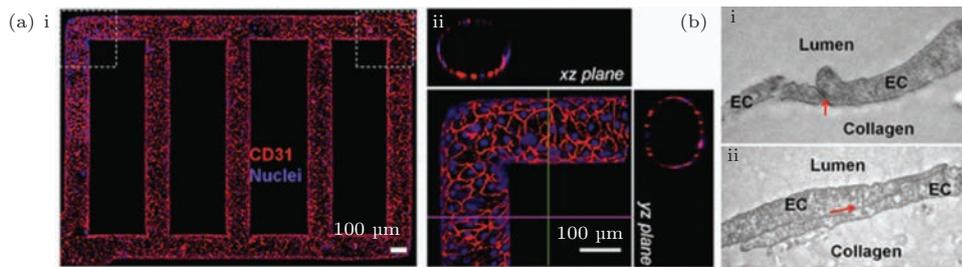


图8 (a) (i) 共聚焦显微镜下的内皮细胞微流体通道, (ii) 虚线框部位的放大图(红色为血小板内皮细胞黏附分子, 蓝色为细胞核); (b) 内皮细胞交合处的透射电子显微镜照片 (i) 点接触 (ii) 部分重叠

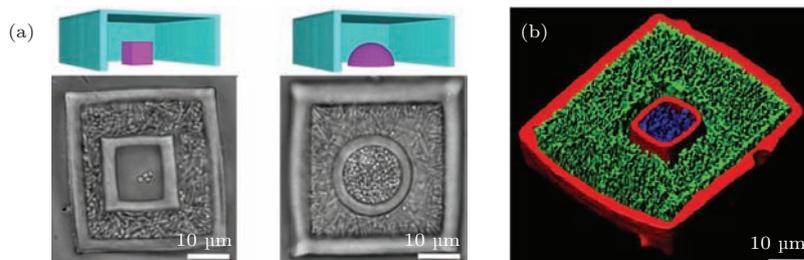


图9 (a) 三维复合结构模具的截面图(上图)以及明场下具有低密度金黄色葡萄球菌的复合结构(下图); (b) 荧光共聚焦显微镜下的复合结构截面图, 可显示金黄色葡萄球菌(蓝色部分)与绿脓杆菌(绿色部分)完全阻隔

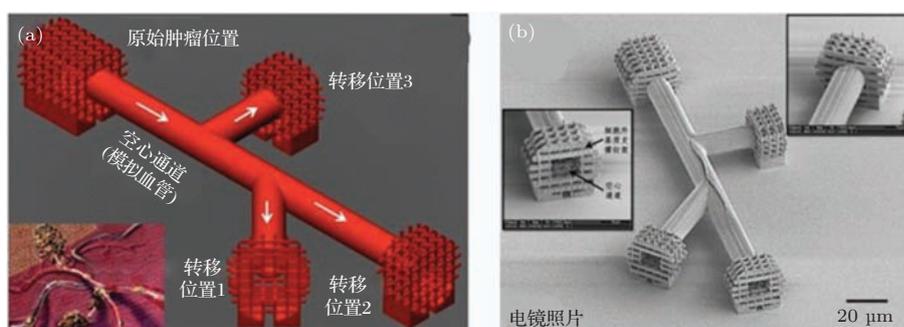


图 10 仿血管微结构 (a) 计算机辅助设计出的癌细胞转移模型支架; (b) SEM 照片显示出由飞秒激光三维直写系统加工出的由生物相容性光刻胶构成的三维模型具备很高的精度 (研究组工作)

自 2013 年初, 笔者所在研究组开始使用飞秒双光子三维激光直写系统设计并制备可用于细胞研究的三维微纳米生物相容性结构. 研究组通过用 CAD 设计出可直接被激光直写系统识别的三维微纳米结构, 在活体外建立肿瘤细胞的三维转移模型, 并研究细胞转移机理. 图 10 (a) 是肿瘤细胞发生多点转移的示意图, 肿瘤细胞脱离原发位置通过血管流向不同的远端组织并进行转移. 通过 CAD 的方法可以构建图示的三维结构, 其中衍架结构 (包括一处原始肿瘤位置, 三处细胞转移位置) 用于支撑和固定细胞外基质, 而其余中间空心管道用于模拟血管, 连接原始肿瘤位置及转移位置. 图 10 (b) 的 SEM 照片显示的是通过激光直写系统加工出的转移模型图像, 再一次证明了飞秒双光子三维激光直写系统具备较高加工精度, 能够用于制造非常精细的三维结构, 满足癌细胞三维体外研究精度的需求. 进一步的工作正在进行当中.

上述研究表明与模塑法相比利用光为媒介的飞秒激光三维直写技术可以将打印精度大大提高, 并且可以选择多种高分子材料及生物相容性材料作为加工基底. 但从上述多个研究中也看出使用这种制造技术制造的三维结构尺寸多局限在毫米级以内, 而单个细胞尺寸就达到 $10\ \mu\text{m}$, 如果用此方法大量建造研究癌细胞所需的三维生物结构, 那么所需要的时间将以天数计算, 而且还会对激光器造成极大的损耗.

2.3 紫外线照射固化水凝胶成型技术

为了能在确保打印精度的同时提高打印速度, 科学家们用紫外光 (ultra violet, UV) 照射固化水凝胶 (hydrogel) 的方法进行了新的尝试. 水凝胶是一种高含水量的亲水或双亲性聚合物材料, 其具有与人体软组织相似的力学性质且具有很好的生物

兼容性, 因此被广泛用于组织工程中. 传统的水凝胶固化方法是利用高分子键间的化学作用或者物理作用使分子交联成网络, 这个过程很难人为地精确调控, 因此也无法实现对水凝胶固化所形成的结构进行设计. 有一种改进的方案是用化学修饰的方法在水凝胶中透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 的高分子侧链上引入甲基丙烯酸基团, 得到可以在紫外光照射下产生交联的水凝胶, 即被紫外光照射到的部分会固化成型, 而没有被紫外光照射到的部分依然呈液态, 这样通过控制曝光就可以实现对材料外部和内部结构的精确调控.

基于以上基础所设计的紫外光照射固化水凝胶的 3D 打印平台原理如图 11, UV 光源①通过冷光镜过滤、透镜聚焦后均匀照射到数字微镜芯片 (digital micro mirror device, DMD)③上. 由计算机控制的 DMD 接收 CAD 三维结构断层切片图像数据, 偏转芯片上面的几百万个微反射镜阵列将 UV 图像点阵反射到曝光平台 [8], 精密投影镜头④把 UV 图像点阵聚焦在焦平面上, 使焦平面上的水凝胶单体薄层曝光固化 [5-7]. 电动平台⑤的位移通过计算机编程控制 [3,8,17].

其中 DMD 芯片③作为平台的核心部件, 可以精准地控制材料成型确保打印平台的打印精度, 其主要原因是 DMD 芯片能将计算机输入的 CAD 图像数据转化成高分辨率、大尺度、动态的数字掩模. 以德州仪器公司的 DLP 9500 DMD 芯片为例, 它上面载有 1920×1080 个 $10.8\ \mu\text{m} \times 10.8\ \mu\text{m}$ 大小的铝镜微阵列, 每个微镜都可通过寻址对应 0/1 开关通断独立控制偏转 $\pm 12^\circ$ 的倾斜角, 使其对应的像素点光束朝向或偏离光路, 而开关速率可高达 23 kHz, 这样其产生的高分辨率动态掩模图形就可以确保打印过程中较好的打印精度 ($\sim 1-10\ \mu\text{m}$). 另外整个过程中水凝胶薄层的厚度是通过石英玻

璃片和平台表面之间注入的水凝胶单体的体积来控制. 一般每10 s左右就可以完成一个薄层的曝光, 然后由计算机控制的电动平台自动下移一段距离, 注入新的单体, 在已经固化的结构上面继续曝光上一层. 这样通过多层叠加就可以快速重构出完整的任意三维复杂水凝胶结构, 相较于飞秒双光子三维激光直写技术逐点固化成型的加工方式, 该技术大大缩短了复杂三维微纳米结构的加工时间, 实现了省时省力的目标. 根据研究需要将细胞种植到3D打印的水凝胶支架上, 可以进行必要的细胞生物物理体外研究.

在实际研究应用中科学家们一般还会在透明质酸分子骨架引入细胞黏附肽、肝素等生物分子或是改性透明质酸的参数来调节水凝胶材料的性质, 分析不同情况下细胞的存活率和黏附性能, 调控细胞在水凝胶3D支架上的生长行为^[7,18], 以得到最优化的3D打印的材料, 实现最大限度模拟体内微

环境的目的^[3].

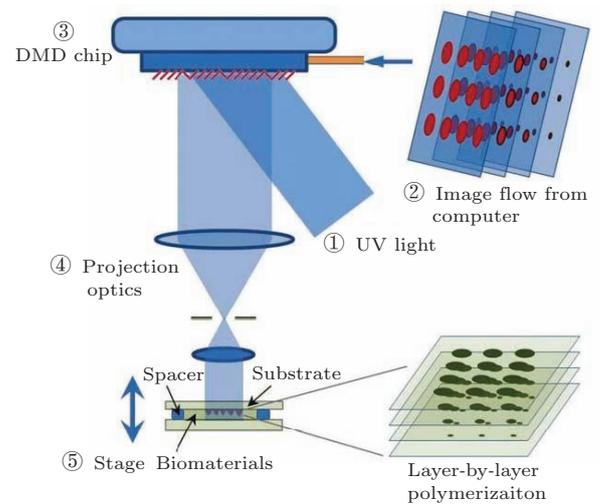


图11 紫外光照射固化水凝胶的3D打印平台的示意图, ①紫外光源, ②计算机控制部分, ③数字微反射镜器件DMD, ④投影光学系统, ⑤电动移动平台; 计算机协调控制③数字微镜阵列, 持续注射水凝胶, ⑤电动移动平台下移, 一层一层叠加打印出整个3D结构

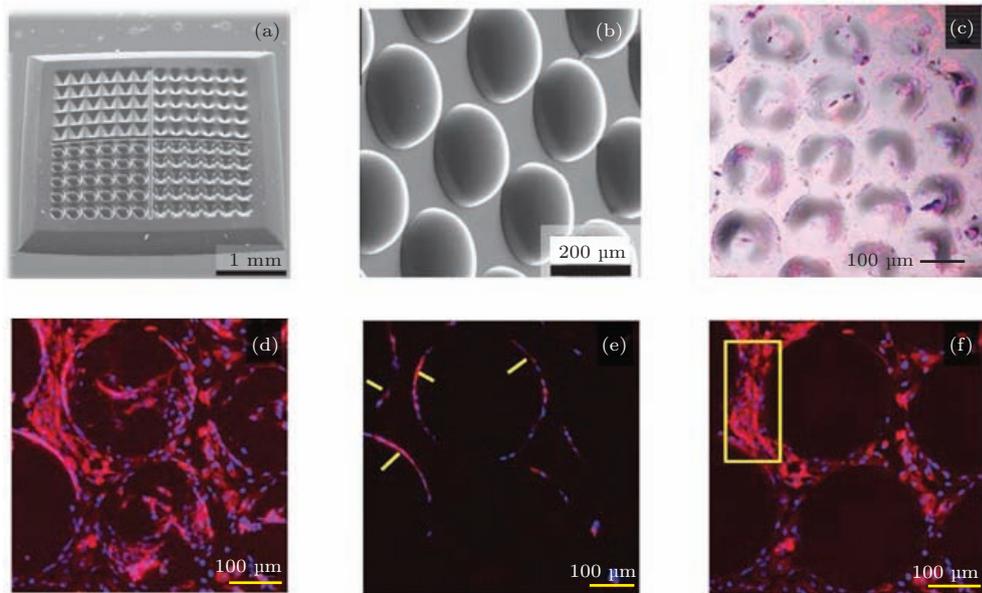


图12 (a) 多种三维微结构组成的结构芯片的扫描电镜照片, 结构的材料是100%的聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA); (b) 半球式结构的电镜照片; (c) 共聚焦显微镜下结构俯视图, 显示出HUVEC在含有15%GelMA的结构上培养四天后的生长梯度; (d) 更高放大倍率的俯视图, 显示出半球结构上HUVEC的多细胞组织; (e) 半球式结构底部的圆周沿Z方向的截面图, 黄色箭头所指的是细胞群在支架上表现出的索状形态; (f) 半球式结构底部沿Z方向的截面图, 显示出在半球结构间隙细胞群表现出的形态

Zhang 等人就利用这种UV照射固化水凝胶的技术设计打印出一系列特定的三维微纳米结构^[8]. 图12(a)是一种半球式结构的扫描电镜照片, 可以看出其结构非常规则且表面十分光滑. 证明了这种打印技术加工精度较高而且比较适合用于加工较软的生物材料, 因此可以用作加工复杂的细胞外间质结构. 之后他们又在这种半球式结构(材料含

有15%的甲基丙烯酸明胶GelMA)上种植脐静脉内皮细胞(HUVEC), 培养4天后用共聚焦显微镜观察, 如图12(a)—(d)可以看出在接近结构底部平面上(类似于二维培养皿)的细胞群和半球球面上的细胞群表现出不同的形态特征, 细胞仿佛能识别这种几何架构. 日后的研究或许可以通过设计三维支架, 也就是给细胞不同的几何线索, 来操纵

HUVEC 细胞群组成不同的组织形态. 这种细胞与环境交互作用的研究也为探究癌细胞侵袭过程中与环境交互作用的机理提供了很好的思路.

除此之外, Huang 等人也利用这种技术打印出如图 13 的蜂窝状结构^[18]. 通过设计三种不同的结构宽度, 种入具有转移性的宫颈癌细胞 (Hala) 或没有转移性的胚胎间充质干细胞 (10T1/2), 研究两种细胞在不同宽度的三维结构中的生长情况

和移动速率. 其研究数据显示三维结构的宽度对 Hala 有影响, 随结构宽度的增加 Hala 的体积减小迁移速率也减小, 但是 10T1/2 的生长和移动却没有明显地受到结构宽度的影响. 这个结论也解释了 10T1/2 迁移过程中对几何线索相对不敏感的特性. 也就是说癌变细胞对几何线索比非癌变细胞更敏感, 这种差异的背后机制很可能是潜在的癌症治疗策略.

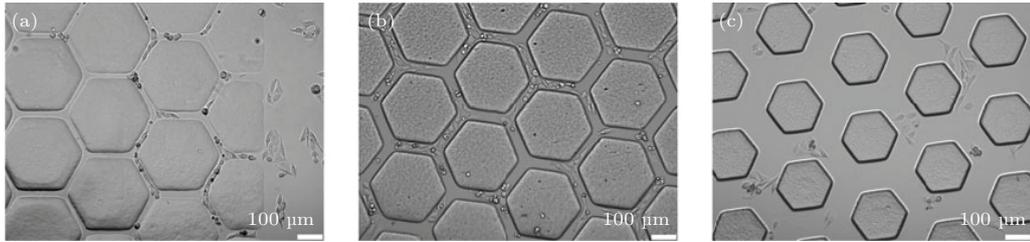


图 13 光学显微镜下 Hala 细胞在宽度不同的三维结构 (材料为 PEGDA) 中的图像 (a) 25 μm 宽的结构; (b) 45 μm 的结构; (c) 120 μm 的结构

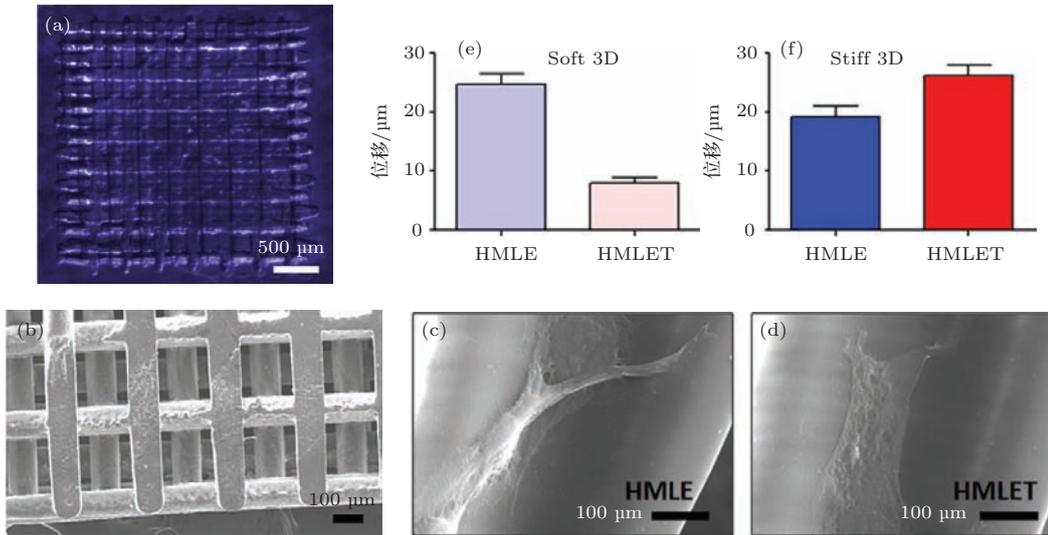


图 14 (a) 用 DMD-PP 方法打印出 3D 条状层叠结构 (材料是 PEGDA) 俯视图, 几乎是光学透明的, 三维层叠结构共五层, 高度为 0.5 mm, 每一层厚度为 0.1 mm; (b) 扫描隧道显微镜下的结构俯视图; (c), (d) HMLE 和 HMLET 在三维立体条状层叠结构上迁移的 SEM 图; (e), (f) 实验数据直方图

在 UV 数字投影 (DMD-PP) 固化水凝胶的核心技术的支持下, Pranav Soman 等人得到如图 14 的条状层叠结构, 用来研究细胞在不同软硬程度 (弹性系数不同) 的三维结构上的迁移表现^[4]. 大多数实体瘤或是体内结构都表现出柔软和弹性, 癌细胞在面对软硬不同的三维微环境所表现出来的侵袭特性也很有可能是不同的. 因此他们用分别用含 19% 和 95% 的 PEGDA 材料打印出软硬程度不同的两类三维支架, 其中较硬三维支架的压缩模量 (~ 5.5 MPa) 约是较软支架 (~ 0.9 MPa) 的

6 倍左右. 人正常乳腺癌细胞 (HMLE) 与转移性乳腺癌细胞 (HMLET) 被种植在这些结构上, 经过相同的时间观察其生长特性如图 14 (c), (d) 他们的实验数据证实了在面对较软的结构时转移性癌细胞和非转移性癌细胞的迁移表现出比较明显的差异性, 而在面对较硬的结构时这种差异则不明显. 如图 14 (e), (f) 这样的实验结果肯定了我们在体外还原体内复杂微环境的必要性, 也就是说用传统坚硬的结构来研究癌细胞的迁移行为是存在缺陷的. 所以进一步的研究就需要探究能高度还原癌细胞生

长微环境材料的参数。

Linetal 则用这种技术做出如下一种实心结构和一种多孔的结构。脂肪干细胞被封装在结构内部, 结构的主要材料是聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 和锂苯基-2, 4, 6-三甲基苯甲酰基膦酸酯, 培养几天后用力学测试与模拟 MTS (mechanical testing & simulation) 实验分析不同孔隙率结构中的细胞活性^[19], 如图 15 (b)。可以看出, 24 h 以内两种结构中的细胞活性基本相同, 但在第三天和第七天两种结构上的细胞活性表现出明显差异 (第三天 $p < 0.01(**)$, 第七天 $p < 0.05(*)$), 细胞在带有孔隙的三维结构中比在实心的三维结构中有更高的生物活性。带有孔隙的结构能提供给细胞生存代谢更多的氧气, 他们的工作再一次证明了细胞

在面对结构特性不同的三维结构时所做出的反应是不同的。

由此可见, 紫外光照射固化水凝胶的方法已经能打印出一系列的体外三维微结构用于细胞生物物理的研究, 并且取得了一些阶段性成果。这种方法相较于模塑法和激光直写技术具有两个明显的优点: 一是它的材料本身有着良好的生物兼容性, 无论是在力学性能或是化学通透性方面都能够较好的模拟体内环境, 更适合还原细胞生长的外在条件; 二是它可以在实现较高精度 ($\sim 1-10 \mu\text{m}$) 的同时在短的时间内打印出一些较大的器件, 所以用这种方法来建造研究癌细胞相关性性质和侵袭机理所需尺度的三维生物结构比较合适。

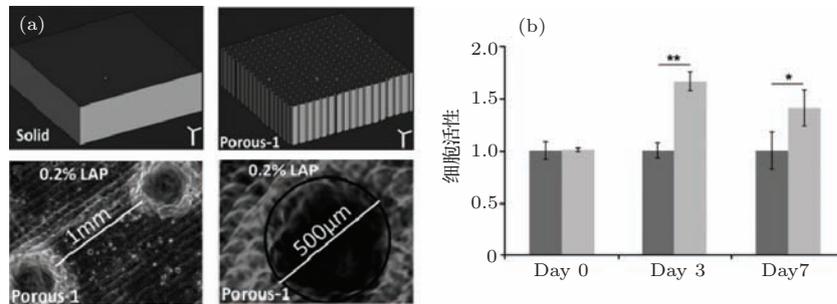


图 15 (a) DMD-PP 方法打印出的实心结构 (Solid) 和多孔 (Porous-1) 的结构; (b) 分别在实体结构和多孔结构中使用 MTS 实验检测细胞活性, 根据统计学显著性检验方法得到的 p 值

3 三维微生态仿真系统的展望

虽然癌细胞生物物理研究已经取得了很多突破性进展, 发现侵袭同细胞与细胞间相互作用, 细胞收缩性以及细胞与基底的粘附等因素密切相关, 并且对癌细胞侵袭的方式有了较完整的总结。但是如何真实地模拟癌细胞体内生长环境进一步研究癌细胞侵袭背后的机理仍然是一个难题。为了解决这个难题, 国内外研究人员结合当今最前沿的 3D 打印、3D 微加工的技术和理念, 利用 PDMS 模塑法、胶原蛋白/明胶成形、三维激光直写、紫外照射固化水凝胶等方法已经构建了各具特点的三维微结构。然而由于细胞及组织器官的复杂性, 以及其对加工精度和加工尺度的特殊要求, 现今的三维微纳米制造技术虽然进行了一系列的尝试在某些方面进行改进但仍不能完全实现对细胞微环境的真实重现, 而且对于建立的三维微环境的全面观测和对其的精确操作依然是空白。

所以根据多年研究经验和深刻思考, 笔者研

究组计划建立一套创新性的三维微生态仿真系统 (3D micro-ecology simulation system, 3D MESS 系统)。该系统将以发展紫外光照射固化水凝胶打印平台为核心, 集成光片成像系统 (light sheet imaging), 三轴微纳米吸管 (micro/nano pipette), 活细胞培养装置等一系列自主创新模块, 目的在于利用 3D 打印的理念加工出具有微米级别精度的复杂三维微结构, 在此基础上实现对细胞分布的精确控制。该技术将打破当前生物医学研究的技术瓶颈, 为现今生物医学实验手段和系统带来革命性的改变。

图 16 所示的是 3D MESS 系统的所使用的四个主要技术: 生物兼容性紫外固化水凝胶的制备及注入、数字微反射镜投射式 3D 打印、光片照明成像、三轴微纳米吸管控制、实时监控式活细胞培养。

配制适用于 3D MESS 系统使用的紫外固化水凝胶是最基础也是最关键的技术之一, 如果 3D 打

印所使用的高分子材料当中有有毒性的游离单体或者降解物,将会影响到细胞生存率甚至细胞的生长特性,这将使细胞体外生长的研究无从开展.同时传统用于3D打印的高分子材料,无法模拟体内微环境的力学性能和化学通透性. 研究组将自行合

成在紫外光源下能够精确成形、透明且具有良好的生物兼容性的水凝胶. 并使用微机械泵编程控制的光敏水凝胶单体注入系统将这种高透明、高生物兼容水凝胶材料注入,使其经UV固化后形成设计的三维微结构.

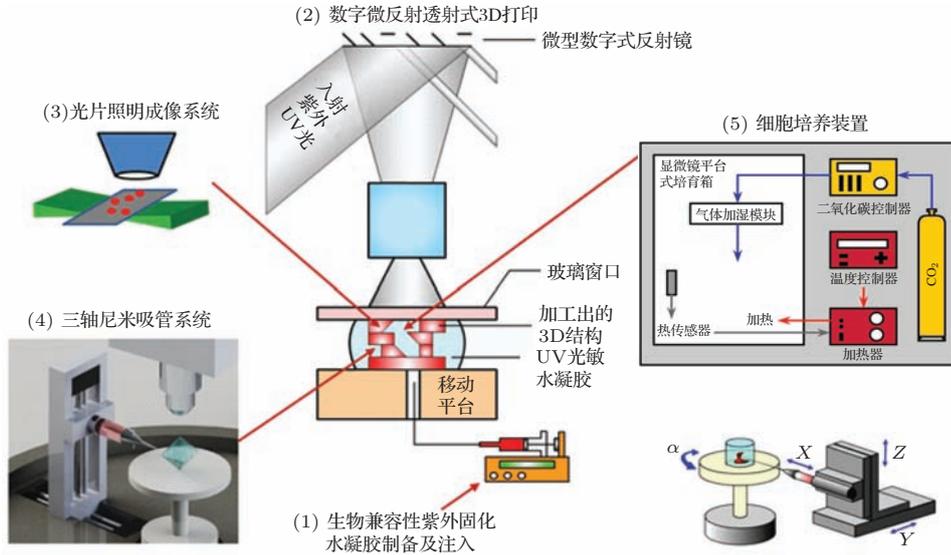


图16 活细胞生物结构3D紫外打印成像实验系统的简略结构图及组成部分

多方位光片照明成像系统的原理是激光经过片层光学元件变成小于 $10\ \mu\text{m}$ 的薄片状光束照射样品,至少同时从左右两个方向照射样品(减少样品内部结构本身的吸收或散射造成样品内部的照射不均匀性). 探测光路与照射薄层平面互相垂直,得到断层截面的图像,通过 Z 方向扫描,重构出三维图像. 该光片成像系统可以对厚度达毫米级别的样品成像,能大大扩大研究范围,最后实现高速、大视野、高景深的整体组织3D成像.

架设在微操纵三轴定位装置上的微纳米吸管可以实现纳米管径针头的精确定位,结合数控微泵可以在三维微结构中指定位置精确放置特定数目的细胞,甚至还可以寻找芯片中特定的细胞并且将其样本吸出做分子分析(图17即为一个正在往侧面穿透三维水凝胶结构并吸取细胞内含物做活检的纳米吸管). 由于微纳米针尖可选管径仅为 $40\ \text{nm}$ 到 $1\ \mu\text{m}$ 左右,所以在插入芯片水凝胶结构时仅造成微洞,在水凝胶表面张力的作用下,该微洞会在微纳米探针拔出后迅速愈合,不会造成显著的微结构改变. 因此微纳米吸管技术可以随时插入芯片的指定位置,对细胞操作后再取出而不对系统造成任何影响,实现微生态系统的并行运行和抽样

分析的随时进行. 而现有的技术仅将活细胞和胶原蛋白或者水凝胶混合一起,注入结构较为简单的三维结构中培养以观察其生物特性,并不能做到细胞初始生长位置的精确定位. 活细胞培养装置可实现活细胞在显微镜载物台上的培养,从而可以在显微镜底下实时观察细胞生长状态.

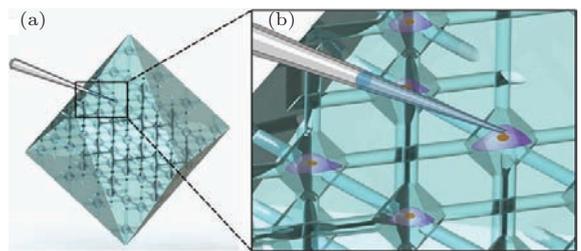


图17 (a) 三轴纳米吸管插入3D MESS打印出的三维水凝胶微结构内部(概念图); (b) 放大图显示微米吸管可以穿透芯片水凝胶结构,对当中细胞进行精确排布及其他操作

3D MESS系统的建立将促进新型生物兼容性材料的研制,新型3D生物材料打印平台的建立,通过光学成像技术对三维结构及其中的活体细胞等进行观测和研究,还会促进使用三轴微纳米吸管装置对实验目标和结构进行紧密调控的原创技术的

开发. 3D MESS将为在三维微结构中的肿瘤转移模型及分子研究带来新的局面, 在将来, 生物学家和医学工作者可以利用该系统任意设计和打印3D细胞培养结构, 模拟体内环境进行相关实验, 实现打印、培养、实验、观测、记录分析的操作一体化.

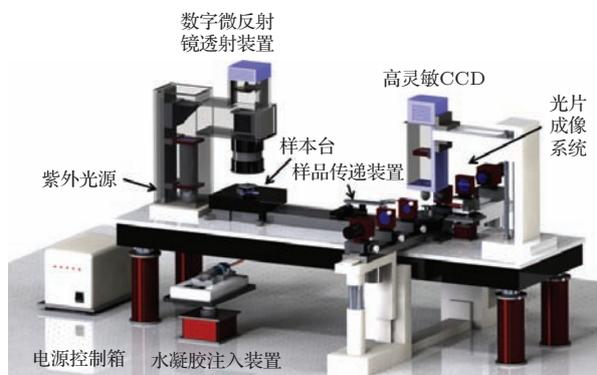


图 18 3D MESS 系统效果图

4 结 论

虽然癌细胞生物物理在体外三维微纳米结构中的研究才刚刚起步, 但是已经展露出了巨大的研究价值和应用潜力. 本文系统回顾了现有在生物领域广泛应用的多种三维微纳米结构加工技术, 如PDMS模塑、胶原蛋白/明胶成形、三维激光直写、紫外照射固化水凝胶等. 在此基础上, 介绍了笔者所在研究组设计的3D MESS系统, 该系统不仅能加工出三维微纳米结构, 同时还有望实现打印、培养、实验、观测、记录分析的一体化. 希望该系统的成功搭建能帮助科学家们更深入地研究癌细胞的转移机制理解癌症的致命机理, 最终为探索新的癌

症治疗手段做出贡献.

参考文献

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun M J 2009 *Ca-Cancer J. Clin.* **59** 225
- [2] Wolgemuth C W 2011 *Physics* **4**
- [3] Tay C Y, Irvine S A, Boey F Y C, Tan L P, Venkatraman S 2011 *Small* **7** 1361
- [4] Pranav Soman, Jonathan Kelber A, Jin Woo Lee 2012 *Biomaterials* **33** 7064
- [5] Lu Y, Mapili G, Suhali G, Chen S, Roy K, J. A 2006 *Biomed. Mater. Res.* **77A** 396
- [6] Wang S, Foo C W P, Warriar A, Poo M M, Heilshorn S C, Zhang X 2009 *Biomed. Microdevices.* **11** 1127
- [7] Hoffman-Kim D, Mitchel J A, Bellamkonda R V 2010 *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **12** 203
- [8] Zhang A P, Qu X, Soman P 2012 *Adv. Mater.* **24** 4266
- [9] Germán Comina, Anke Suskaa, Daniel Filippini 2014 *Lab. Chip* **14** 424
- [10] Kuo C T, Kuo C T, Chiang C L, Chang C H, Liu H K, Huang G S, Ruby Yun-Ju Huang, Leec H, Huang C S, Wo A M 2014 *Biomaterials* **35** 1562
- [11] Tiemo Bückmann, Nicolas Stenger 2012 *Advanced Materials* **24** 2710
- [12] Nelson B J, Kaliakatsos I K, Abbott J J, Annu 2010 *Rev. Biomed. Eng.* **12** 55
- [13] Klein F, Striebel T, Fischer J, Jiang Z, Franz C M, Freymann G, Wegener M, Bastmeyer M 2010 *Adv. Mater.* **22** 868
- [14] Sangwon Kim, Famin Qiu 2013 *Adv. Mater.* **25** 5863
- [15] Ying Zhang, Junmei Chen 2012 *PNAS* **109** 24
- [16] Connell J L, Ritschdorff E T 2013 *PNAS* **110** 46
- [17] Anselme K, Bigerelle M 2011 *Int. Mater. Rev.* **56** 243
- [18] Tina Qing Huang, Qu X, Justin Liu, Shaochen Chen 2014 *Biomed Microdevices* **16** 127
- [19] Kolin Hribar C, Pranav Soman, John Warner 2014 *Lab. Chip* **14** 268

SPECIAL ISSUE — Cancer biophysics

3D micro/nano fabrication and its application in cancer biophysics*

Lu Jin-Lei Wang Xiao-Chen Rong Xiao-Hui Liu Li-Yu[†]

(Laboratory of Soft matter, Institute of Physics Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

(Received 18 November 2014; revised manuscript received 16 December 2014)

Abstract

The major reason why cancer kills is its metastatic potentials. Metastasis is an extremely complex three-dimensional (3D) process. Currently, routine *in vivo* cancer research still experiences bottlenecks in observation and manipulation, while *in vitro* research mainly stays in petri-dish levels that limit cell environment with two-dimensional confinements. Therefore, it is in urgent needs to construct 3D *in vitro* models to deepen the studies in cancer invasion and metastasis. However “how to carry out” is a big question that harasses scientists for decades. In this report, we will systematically discuss several popular technologies for 3D microfabrication and their applications in bio and cancer research. Besides, we will demonstrate our efforts to construct an all-in-one 3D micro ecology simulation system (3D MESS) which highly integrates a UV bio-compatible hydrogel printer, a light-sheet imaging system, and a nano pipette operation system. This novel system will create a brand-new method to fabricate, observe and controls the 3D structures and the cells inside. We believe that these advanced technology and ambitions will definitely update the current cancer research methods and bring promising hopes for future deeper understandings and more efficient treatment of cancer.

Keywords: three-dimensional micro/nano fabrication, cancer, cancer biophysics, *in vivo* microenvironment

PACS: 87.19.xj, 87.80.-y, 87.85.J-, 87.18.Gh

DOI: 10.7498/aps.64.058705

* Project supported by the State Key Development Program for Basic Research of China (Grant No. 2013CB837200), and the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 11474345).

† Corresponding author. E-mail: liu@iphy.ac.cn

微环境促进的侵袭性肿瘤生长的元胞自动机模拟

梁龙 焦阳

Microenvironment-enhanced invasive tumor growth via cellular automaton simulations

Liang Long Jiao Yang

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 64, 058706 (2015) DOI: 10.7498/aps.64.058706

在线阅读 View online: <http://dx.doi.org/10.7498/aps.64.058706>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn/CN/Y2015/V64/I5>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

推荐重要节点部署防御策略的优化模型

Recommendation of important nodes in deployment optimization model of defense strategy

物理学报.2015, 64(5): 050502 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.64.050502>

一种基于用户相对权重的在线社交网络信息传播模型

An information spreading model based on relative weight in social network

物理学报.2015, 64(5): 050501 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.64.050501>

基于平均场理论的微博传播网络模型

Microblog propagation network model based on mean-field theory

物理学报.2014, 63(24): 240501 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.63.240501>

Frenkel-Kontorova 模型中基底势振动的影响

Effect of the oscillation of substrate potential in driven Frenkel-Kontorova chains

物理学报.2014, 63(22): 220502 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.63.220502>

带有层级结构的复杂网络级联失效模型

A cascading failure model of complex network with hierarchy structure

物理学报.2014, 63(22): 220501 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.63.220501>

专题: 癌症生物物理

微环境促进的侵袭性肿瘤生长的元胞自动机模拟

梁龙¹⁾ 焦阳^{1)2)†}

1) (亚利桑那州立大学物理系, 坦佩 85287, 美国)

2) (亚利桑那州立大学材料与科学系, 坦佩 85287, 美国)

(2014年12月1日收到; 2015年1月20日收到修改稿)

肿瘤的侵袭和转移行为, 常常是导致病人的死亡的原因. 而人们对这些由复杂的肿瘤-宿主以及肿瘤细胞与细胞之间相互作用而产生的群体性行为知之甚少. 对这一过程了解的加深, 需要多学科间的合作. 在本篇文章中, 作者将简要回顾肿瘤物理领域的一种新手段, 即近年来由作者参与的通过元胞自动机 (CA) 模型来研究微环境促进的实体瘤侵袭性生长的研究, 该模型整合了一系列微观的肿瘤宿主相互作用, 包含了肿瘤细胞对细胞外基质的降解, 肿瘤细胞趋向养分的迁移, 肿瘤生长导致的局部组织压力累积以及该压力对局部的肿瘤-宿主界面稳定性的影响, 并且, 肿瘤生长时细胞间的粘连也被明确地考虑进来. 该元胞自动机模型能成功地重现出一系列的标志性的肿瘤侵袭行为, 这有力地表明出该模型的有效性和预测能力. 这一模型, 如果能与临床数据结合, 理论上能够拓展从医学数据中得到的现有结论, 帮助设计新的实验, 检验假说, 并且在实验难以检测到的情形下, 预测肿瘤的行为, 协助癌症的早期诊断和预后, 并针对不同病人, 提出最优的个性化治疗方案.

关键词: 异质微环境, 肿瘤侵袭, 元胞自动机模拟, 涌现行为

PACS: 87.15.A-, 87.16.A-, 05.10.-a

DOI: 10.7498/aps.64.058706

1 引言

癌症生物学中的一个重大问题是肿瘤宿主和肿瘤细胞间的相互作用, 以及这些相互作用如何导致肿瘤的各种涌现行为的产生, 如侵袭和扩散^[1], 即肿瘤细胞脱离瘤体, 入侵到周边组织中. 当这些侵袭性细胞进入循环系统, 在其他器官安营扎寨, 这时, 继发性肿瘤就发生了. 这些侵袭性细胞难以用手术摘除, 并常常在手术摘除原发性肿瘤后的化疗时获得耐药性. 正是这种侵袭和扩散的行为, 使肿瘤常常危及患者的生命. 因而, 研究者在探索恶性肿瘤细胞侵袭性生长^[2-9], 以及相应的治疗方案^[10]上下了大功夫. 一个广为接受的机理是, 肿瘤的侵袭行为包含了多个步骤: 同型细胞分离, 细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的酶分解, 整合素介导的异型细胞间粘连, 和主动导向

性的以及随机的游走^[4,11]. 侵袭性肿瘤的一个突出的结构特性是, 从母瘤伸出的, 由一串肿瘤细胞组成的树突状的侵袭枝 (见图 1 (a)).

来自宿主的微环境, 能够显著改变肿瘤的形态和表型演化, 甚至触发更加恶性的侵袭行为^[2,3,12,13]. 如果肿瘤在狭小封闭的空间里生长 (譬如颅骨内), 实体瘤会压迫周边的微环境, 也同时会受到来自微环境的压力. 在该种情况下, 有证据表明, 这种压力, 可以显著地改变肿瘤生长的“动力学”^[14-27]. 比如, 生长在坚硬微环境中的肿瘤, 会长出带突起的粗糙表面 (见图 1 (b))^[20,26]. 在突起表面的侵袭性细胞, 由于邻近细胞的数量相比光滑瘤体表面的细胞少, 细胞-细胞间粘连较弱. 因而尽管从瘤体脱离是个包含了细胞间信号转导, 细胞膜上的粘连接构的重组等步骤的复杂过程, 我们仍有足够理由假定, 邻近细胞数量较少的细胞更容易从瘤体脱落, 迁移到周边微环境中.

† 通信作者. E-mail: yang.jiao.2@asu.edu

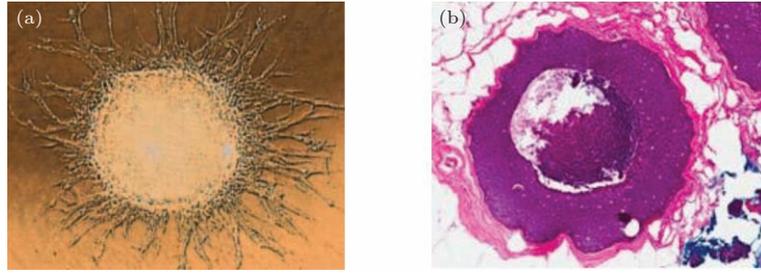


图1 (a) 在恶性程度最高的脑部肿瘤 (glioblastoma multiforme, 多形性胶质母细胞瘤, GBM) 样本中观察到的从瘤体伸出的由肿瘤细胞构成的树突状侵袭枝 (图片引用自文献 [12]); (b) 实体瘤 (原位导管癌) 的粗糙表面, 这些突起可能导致进一步的侵袭行为 (图片由 Robert A. Gatenby 教授馈赠, 来自文献 [13])

如果联系实验和临床数据, 整合了多种不同肿瘤生长的理论/计算机癌症模型将为理解癌症的侵袭和演化提供一种有效的途径 [15,17–19,27]. 肿瘤系统, 更一般地说, 任何生命系统, 都源于大量的在不同时空尺度发生的非平衡态过程 [28]. 某类特定计算机模型常常仅用于模拟特定的空间(时间)尺度上发生的过程. 在这里, 我们将常用的用来模拟细胞水平的模型分成两类: 亚细胞层面的模拟以及细胞层面的模拟. 亚细胞层面的模拟常常专注于细胞内的生物物理学过程, 比如肌动蛋白纤维的多聚化, 以及还需要肌球蛋白参与的收缩 [29,30], 细胞骨架的动力学变化 [31–33], 质膜的动态变化 [34], 以及细胞骨架和质膜的动态耦合 [35–37], 是这些亚细胞层面的动态过程, 导致到了突起和黏着斑的形成. 相应地, 人们常用分子动力学 (molecular dynamics) [33,38], 动态蒙特卡罗 (kinetic Monte Carlo) [32] 以及耗散性粒子动力学方法 (dissipative particle dynamics) [39] 的方法来模拟上面提到的亚细胞过程. 另一方面, 细胞层面的方法则专注于个体细胞的增殖 [40], 迁移 [41–43], 细胞-细胞间信号转导 [44] 以及一系列源自细胞间相互作用以及信号沟通的群体性多细胞行为. 相关的模拟方法包括了多态 Potts 模型 (multi-state Potts model) [45,46], 基点模型 [47], 粒子堆积模型 (particle packing model) [48], 活动粒子模型 (active particle model) [49,50], 元胞自动机模型 (cellular automaton, CA 模型) [27], 以及基于偏微分方程的连续模型 (continuum model) [2,14,51,52]. 关于这些方法的回顾, 有兴趣的读者可以参考文献 [17]. 我们注意到, 尽管已经存在不少关于异质性微环境, 尤其是基于胶原蛋白的 ECM 的理论/计算模型, 有关微环境 [53] 促成的细胞-细胞间通讯及协同性和群体性细胞迁移的模拟研究还为数甚少. 关于肿瘤模拟, 大多数研究者专注的是系统水平的肿瘤进展, 尤其是关于肿瘤的预后和演变. 尽管研究

者们目前已经提出了有许多关于非侵袭性肿瘤生长 [14,23,24,51,54–66] 的数学模型, 整合了肿瘤宿主, 肿瘤细胞-细胞间相互作用, 并且包含了宿主微环境促进的肿瘤侵袭模型还很少 [2,3,6,51,67–69].

本综述将集中讨论 CA 模型在侵袭性肿瘤生长中的应用. CA 的概念, 在上世纪 40 年代末由 Stanislaw Ulam 和 John von Neumann 提出, 后来在 70 年代时通过美籍英国数学家 John. H. Conway 经由他的“生命游戏 (Game of Life)”得到普及 [70]. 生命游戏让人们见识到, 一群“细胞”, 遵循少量简单的游戏规则, 经过演化, 也能在系统中产生极其复杂的行为和模式. 这一模型, 后来被广泛运用到了物理和材料科学中 [71]. 2000 年, Torquato 与其合作者开发了第一个能在多尺度下模拟少数肿瘤细胞在没有无血管生成的情况下增殖成 1cm 大小的多形性胶质母细胞瘤 (简称 GBM) 的 CA [23]. 这触发了一些用 CA 模型模拟在不同条件下实体瘤细胞增殖的研究, 其中有包含了血管的微环境, 整合了血管生成机制的实体瘤生长 [57], 或者在空间有限的情形下, 肿瘤增殖造成局部压力累积的情形 [58,59]. 甚至还有针对具体病例, 用 CA 模型模拟来优化治疗策略的案例 [23,54]. 有兴趣的读者可以参考文献 [27] 这篇关于应用 CA 模型模拟增殖性肿瘤生长的综述.

最近, 我们开发了一个能在 2D [12,13] 和 3D [72] 中有效模拟侵袭性肿瘤在异质性的宿主微环境中生长的 CA 模型. 在该模型里我们考虑到了一系列微观的肿瘤宿主相互作用, 包括恶性肿瘤细胞对 ECM (ECM) 的降解, 营养物梯度驱动的细胞迁移, 由肿瘤增殖造成微环境形变导致的局部压强增高, 以及增高的压强对肿瘤-宿主界面稳定性的影响. 我们的 CA 模型成功地重现了一系列无血管生长的肿瘤的形态特征, 生长动态以及涌现行为. 特别地, 我们的 CA 模型还成功地再现了侵袭性肿瘤的一些重要特性, 包括从瘤体伸出的树突状的侵袭枝 [12]

和在坚硬环境中, 瘤体表面伸出的指状突起^[12], 以及观测到的侵袭性细胞迁移机理, 比如沿阻力最小的路径迁移, 和同型细胞吸引. 该篇综述中, 我们将回顾关于异质性环境促进的侵袭性肿瘤生长的最新的元胞自动机模拟技术. 特别是为了处理这类肿瘤系统而新提出的CA规则, 以及相关的生物物理假设.

接下来本文的组织结构如下: 在第2节中, 我们会为之前没有接触过CA模型的读者, 先简要回顾一下通用的CA模型. 在第3节中, 我们会讨论该模型用于肿瘤模拟的生物物理理论基础, 并详细介绍我们使用的CA规则. 在第4节中, 我们具体描述用于模拟侵袭性肿瘤生长的CA规则. 在第5节和第6节中, 我们将分别用CA模型模拟无血管肿瘤在二维(2D)和三维(3D)不同微环境中的增殖和侵袭性生长. 并在第6节中, 给出一个基于模拟结果, 有关肿瘤恶性程度的“相图”. 在第7节中, 我们会讨论CA模型在癌症诊断, 预后和治疗中的意义, 并展望的未来的研究方向.

2 CA模型简介

CA模型是一种用于离散数学, 物理, 材料科学和生物学的离散模型^[73]. 在一般的阐释中, CA是一个由细胞(或元胞)组成的规则网格, 每格有有限多种状态(比如, 生物细胞的生存, 死亡; 磁性系统的自旋方向: 上或下). 规则网格可以在任何维度, 可以有任何几何和拓扑结构. 每一个格点与一个重复单元联系(通常是正多面体), 叫做自动机元胞, 简称元胞. 这个元胞是CA模型的结构单元, 与被模拟的生物的细胞不同(虽然英文都称cell). 基于网格结构, 每一个元胞的所有邻居都是清楚固定的.

一开始, 每个元胞的初始状态是指定好的. 每个元胞接下来的状态则由其当前状态, 以及所有邻居的当前状态, 根据制定的规则决定. 通常, 这一规则适用于每一个元胞, 并且不随时间改变. 这使得系统得以从其初始状态, 根据规则逐步演化. 这一规则通常反映的是元胞之间的物理相互作用, 而元胞, 则可以是真实的生物细胞, 或材料的物态.

2.1 著名例子: Conway 生命游戏

为了更好地理解CA模型的工作机理, 我们先来考察Conway的生命游戏. 在这个例子中, 我们

在一个没有边界的方格网上进行我们的模拟. 在这个网络上, 每一个CA元胞可能被一个生物细胞占据或不被占据. 被占据的CA元胞处在“活”的状态, 无细胞占据的CA元胞处在“死”的状态. “活”的细胞的状态根据“存活的”邻居的数量一代代变化, 即

- 1) 仅有少于2个存活邻居的细胞将因孤独而死去;
- 2) 有超过3个存活邻居的细胞会因为过于拥挤而死去;
- 3) 细胞当且仅当有2或3个邻居的时候, 才能存活到下一代;
- 4) 死去的细胞, 在刚好有3个邻居的时候能复活(重生);
- 5) 所有的死亡和出生同时发生.

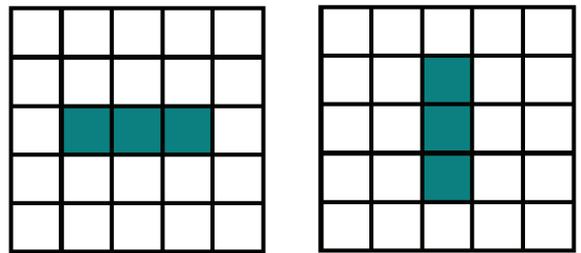


图2 一种根据文中的CA规则生成的以二代为周期的重复模式

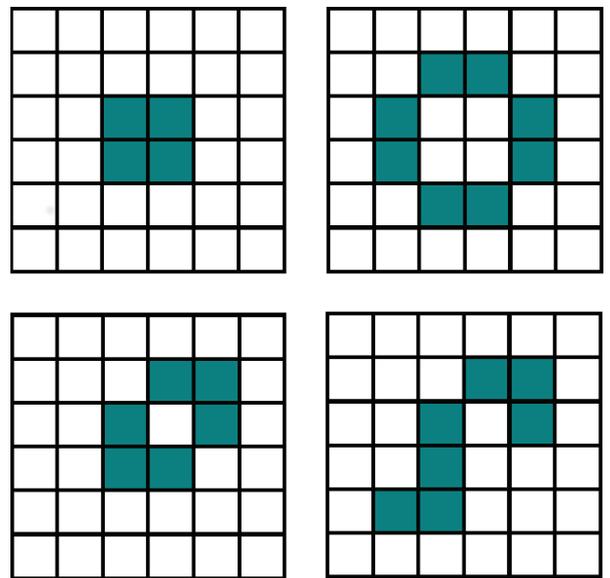


图3 一些根据文章中的CA规则生成的处于稳定模式细胞构型的例子

用前文描述的CA规则, 可以生成许多不同的进化模式. 比如, 图2表示了一种以二代为周期的周期性模式. 具体来说, 从一行3个细胞开始, 顶上和底下的细胞会因为孤独死去, 只有中间的细胞能

活下来. 此外, 在中间细胞左右会有新的细胞重生, 因为这些格点周围有刚好 3 个邻居. 所有这些事件导致的结果是, 第二代是一纵行三个细胞, 紧接着变成第三代的一横行三个细胞, 并如此循环往复, 永不停歇. 而图 3 所示的细胞构型, 因为其特殊的邻居分布 (通常十分对称), 而达到静止的模式: 活的细胞会一直处于活着的状态, 死的细胞将永远死去.

3 CA 模型的生物物理机理

在本节中, 我们将总结侵袭性 CA 模型主要的生物物理学机理, 以及这样的机理是怎样整合进 CA 规则, 并通过 CA 模拟实现的. 我们考虑的肿瘤细胞与肿瘤细胞间, 和肿瘤细胞与 ECM 间的相互作用包括: 细胞表型的确定; ECM 的降解; 局部组织压力的升高; 瘤体表面的不稳定性以及细胞-细胞间的粘连.

3.1 异质性的微环境

我们使用了由小球随机顺序加入 (random sequential addition, RSA) 填充而生成的 Voronoi 分割来模拟肿瘤细胞和宿主微环境, 见图 4 (b). 不重

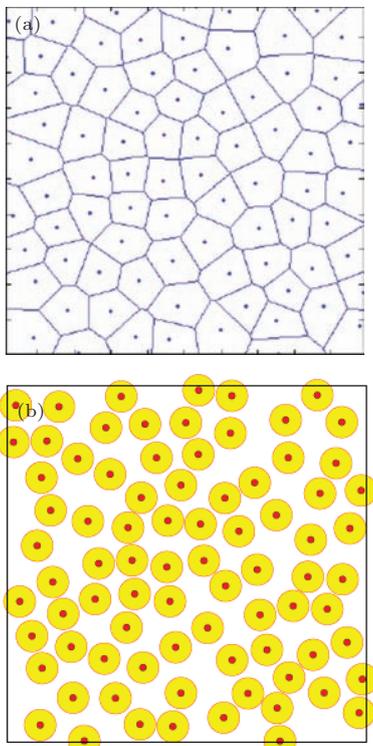


图 4 二维 Voronoi 分割极其相关的点阵排布 (a) 由 Voronoi 分割将二维平面分隔成我们元胞自动机模型的元胞; (b) 通过在指定区域内随机添加刚性圆盘构成的点阵分布 [74]

叠的球被挨个儿加入一个事先准备好的 3D 空间中 (即一个立方体的模拟盒子), 直到没有空间再容纳更多球. 接着, 按照哪个点离哪个球心比较近就将它归入该球心所在的区域中的原则将盒子划分成多面体. 这样得到的 Voronoi 多面体就成为了我们的元胞. 我们的模型中, 每个自动机元胞要么代表一个肿瘤细胞 (直径约 15—20 μm), 要么代表一块大小与细胞相近的宿主微环境. 这使得我们能够得将肿瘤与其周边的微环境同时考虑进来.

肿瘤的异质性宿主微环境由不同的基质细胞以及 ECM 构成. ECM 则由为组织提供机械支持 (比如胶原蛋白) 的和与细胞间粘连及细胞运动相关 (比如层粘连蛋白和纤维连接蛋白) 的蛋白质组成 [2,75,76]. 在当前的模型中, 我们只明确考虑了 ECM 生物大分子的密度, ECM 被恶性肿瘤细胞的降解, 以及 ECM 形变导致的对瘤体生长造成的压迫. 因而, 我们将把宿主微环境统统简称为 ECM. 我们将与每个元胞相对应的 ECM 的密度赋值为 ρ_{ECM} , 表示元胞中 ECM 分子的密度. 肿瘤细胞只能占据 $\rho_{\text{ECM}} = 0$ 的元胞, 这表示元胞中的 ECM 可以被降解, 或者被生长的肿瘤推向一边.

3.2 细胞表型和 ECM 降解

侵袭性 CA 模型中, 肿瘤细胞有两种表型 [12,13]: 侵袭性的和非侵袭性的. 非侵袭性的细胞滞留在瘤体 (primary tumor) 中, 根据它们的营养供应, 可以是增殖性的, 静息性的或坏死的. 对于无血管的肿瘤 (本文的关注点), 肿瘤细胞的营养, 完全依靠从瘤体表面扩散进去的养分. 随着瘤体长大, 养分供应随着表面积增加, 将逐渐满足不了随瘤体体积增长而增加细胞数量, 这将导致静息性细胞和坏死性细胞的出现. 非侵袭性细胞的状态, 由其到瘤体表面 (即, 养分的来源) 的距离决定. 比方说, 离表面距离达到 δ_n 的静息性细胞将步入坏死阶段 (细节请见下节). 养分有效扩散距离 δ_n 的值 (存活肿瘤细胞层的特征性厚度), 取决于瘤体的大小.

随着增殖性的细胞分裂, 它的子细胞推开或降解周围的 ECM, 并占据 ECM 所处的元胞 [77-79]. ECM 的密度越小 (即软 ECM 区域), 其所处的元胞越容易被肿瘤细胞占据, 从而, ECM 的异质性通过局部的机械相互作用 (物理接触) 影响肿瘤的生长. 如果增殖性细胞周围一定距离内的空间被子细胞完全占据, 没法再容纳新的子细胞, 增殖性细胞将进入静息状态.

侵袭性细胞, 作为增殖性细胞的突变的子细胞^[80], 能获得不同程度的ECM降解能力(通过各种基质降解酶), 并且它们的机动性使得它们能够离开瘤体, 侵入周边的微环境中^[81], 我们认为, 侵袭性细胞仅当目标元胞里的ECM被完全降解后($\rho_{\text{ECM}} = 0$)才能迁移至目标元胞. 细胞的每一次侵袭性移动, 都包含了邻近元胞的ECM降解, 并只在降解完全后才能迁移至其中. 另外注意到, ECM的降解实际上是一个动态过程, 而在这里我们将其作为一个等效效果来考虑. 因为我们的CA模型在时间上是离散的, 即两个时间点所对应的系统状态间隔为24 h (见下文具体说明). 在这24 h内发生的动态过程的细节无须在模型中考虑, 而只需要根据这些过程对系统产生影响的等效效果对系统状态进行更新即可. 具体来说, 虽然ECM既包含降解也包含合成, 而经过24 h以后的等效效果是降解. 因而本模型中只考虑了等效降解. 营养物的梯度是侵袭性细胞远离瘤体迁移的驱动力之一^[82], 它们在侵袭中消耗了大多数的营养物. 另外, 我们假定在迁移途中, 侵袭性细胞不会分裂.

3.3 窄小空间里压力的积聚

在狭小封闭的空间里生长的肿瘤能让周边的ECM发生形变, 这反过来又导致肿瘤受到来自外界的压迫^[21,77,78]. 根据文献^[13], 在与ECM相比肿瘤是刚性的这一假定下, 我们明确地考虑了在ECM压缩导致的压强对肿瘤生长的影响^[13]. 压缩的ECM密度增加, 假定这一密度与压强水平成正比^[13]. 如文献^[13]所述, 肿瘤细胞分裂的可能性由于压缩导致的ECM密度增加而减少, 即

$$p_{\text{div}} \sim [1 - \omega^*(\xi - 1)], \quad (1)$$

其中 ω 是ECM的硬度, 与ECM的体积模量成正比, ξ 是ECM的压缩系数, 由以下公式决定:

$$\xi = \frac{M - \chi_0 \sum_i^n \rho_{\text{ECM}}(i) v(i) V}{V - \sum_i^n v(i) M}, \quad (2)$$

其中, M 和 V 分别是ECM的初始质量和体积; n 是被新的肿瘤细胞占据的ECM元胞数量, $\rho_{\text{ECM}}(i)$ 和 $v(i)$ 分别是第 i 个元胞中的大分子密度和体积. χ_0 是增殖细胞降解ECM的能力参数. 换句话说, 方程(2)意味着原先由ECM大分子占据的空间被生长的肿瘤占据, 这些大分子并未降解, 而是被挤进更狭小的空间里, 这会导致ECM的密度(以及硬度)增加. 这些剩余的ECM所处的第 j 个元胞中的

大分子所的密度由公式

$$\rho_{\text{ECM}}(j) = \xi \rho_{\text{ECM}}^0(j) \quad (3)$$

给出. 即ECM的密度增加与原密度成正比, 需要了解更详细的方程(1), (2), (3)推导的读者请参考相关文献^[13].

3.4 肿瘤宿主界面的稳定性

当肿瘤在刚性的微环境里生长时, 局部光滑的肿瘤表面会导致很强的压力积聚, 这对肿瘤十分不利. 另一方面, 肿瘤表面可以通过伸出的小突起释放压力^[20], 小突起因而获得生长优势, 得以侵入周边的ECM. 通过考虑小突起局部的几何性质, 这些效应得以整合进我们的模型中. 具体说来, 突起顶端的宽度 w 被设为元胞的大小, 突起的长度则由

$$l = |x_c - x_i| - |x_c - \bar{x}| \quad (4)$$

给出, 其中 x_c 是肿瘤的几何中心, x_i 是突起顶部元胞的位置,

$$\bar{x} = \sum_i^M x_i / M$$

是突起处周边肿瘤细胞的平均位置, 突起顶部细胞的生长优势则与 $\xi l/w$ 成正比这导致了以下细胞分裂概率的表达式的出现:

$$p_{\text{div}} \sim (1 + \xi l/w), \quad (5)$$

其中 ξ 是由方程(2)给出的ECM密度, 我们注意到, l 可以是正或者负, 取决于生长尖端的曲率. 另外值得说明的是, (1)和(5)式所给出的细胞分裂概率分别反映了压力积聚以及肿瘤粗糙表面突起对生长动态的影响. 目前这些公式还没有实验验证.

3.5 细胞-细胞间粘连

突变的侵袭性细胞要侵入周围的ECM, 首先得断开和自己周围的非侵袭性细胞的粘连. 如果粘连过强, 突变的细胞将无法与周边细胞脱离, 它们只能待在瘤体中, 和非侵袭性细胞一样正常生长代谢. 为明确考虑细胞-细胞间粘连, 我们采用了与Anderson^[2]相似的方法: 每个突变细胞有个固有的粘连数 A_i , 即保持其在瘤体原位需要的邻近细胞的数量. 换句话说, 如果与该细胞相邻的细胞数量 A_N 小于 A_i , 该突变细胞将能离开瘤体. 如果突变细胞无法离开瘤体, 则会变为增殖细胞. 注意到在文献^[2,3]中, 他们使用了另一种细胞迁移的标准. A_i 的值越大, 需要将突变细胞留在原位所需的邻居

细胞越多,说明细胞-细胞间粘连越弱. 同样地, A_i 值越小, 细胞-细胞间粘连越强. 尽管我们用到的方法只是一种细胞-细胞间粘连的粗浅近似, 正如文献 [2] 中提到的那样, 但它的确反映了细胞间粘连的显著特征, 并使得真实的侵袭性肿瘤形态得以在我们的模型中重现 [2].

4 侵袭性肿瘤生长的元胞自动机规则

我们现在根据前面提到的肿瘤侵袭模型的生物物理机理来指定模型的 CA 规则. 在用 Voronoi 分割生成了自动机元胞后, 每个生长区域内的元胞的 ECM 密度 ρ_{ECM} 被随机赋值成一个介于 0 到 1 之间的随机数, 这个生长区域是在模拟中, 肿瘤能够生长的空间, 我们认为其外边界是刚性的. 随机数的使用体现了宿主微环境的异质性. 然后, 我们将一个或多个自动机元胞指定为增殖的肿瘤细胞. 并把时间单位离散, 一个单位代表一天, 在每一步 (天) 中:

1) 检查每一个自动机元胞的类型: 侵袭性, 增殖性, 静息性, 坏死性或 ECM. 侵袭性细胞降解并侵入周边包围在生长的肿瘤外部的 ECM. 增殖性细胞是活跃分裂的肿瘤细胞, 静息性细胞是那些仍活着, 但没有足够营养物质来支持生长与分裂的细胞, 坏死细胞则是死去的癌细胞.

2) 所有坏死肿瘤细胞均为惰性 (即它们的细胞类型不会变化).

3) 离肿瘤界面一定距离 δ_n 之外的静息细胞会坏死. ECM 和肿瘤边界, 由包围肿瘤体的 ECM 元胞组成, 是瘤体氧气和营养物的来源. 静息到坏死的临界距离 δ_n 由以下公式计算:

$$\delta_n = aL_t^{(d-1)/d}, \quad (6)$$

其中 a 是一个提前设定好的参数 (见表 1), d 是欧几里得空间维度, L_t 是瘤体的几何中心 x_c ($x_c = \sum_i^N x_i / N$, 其中 N 是瘤体中细胞的数量), 到我们考虑的离静息细胞最近的瘤体边界细胞之间的距离.

4) 增殖细胞能在离母细胞距离 δ_p 的地方分裂产生子细胞, δ_p 由以下公式给出:

$$\delta_p = bL_t^{(d-1)/d},$$

其中 b 是个营养参数 (见表 1), d 是空间维度, L_t 是瘤体的几何中心 x_c . 和我们考虑的离增殖细胞最近的瘤体边界细胞之间的距离. 另外, 综合以上

分析, 我们认为细胞分裂概率 p_{div} 取决于局部的 ECM 密度 [12,13], ECM 施加的压力 [见方程 (1)], 以及肿瘤-宿主界面的局部几何形态 [见方程 (5)], 即

$$p_{\text{div}} = p_0 [1 - \rho_{\text{ECM}} - \omega^*(\xi - 1) + \xi l / \omega]. \quad (7)$$

当空间不能在 δ_p 范围内容纳更多子细胞的时候, 增殖细胞会进入静息状态.

5) 增殖细胞分裂中, 有可能产生具有侵袭性的突变子细胞. 发生这一事件的概率是 γ (即突变率). 而产生的侵袭性细胞具有 ECM 降解能力值 χ_i 以及移动能力值 μ . 这使得侵袭性细胞能脱离瘤体, 进入到周边的 ECM 中. 与突变细胞相关的规则由下面的 6), 7) 小点给出. 如果子细胞是非侵袭性的, 它们将被指定为新的增殖细胞.

6) 每一个具有侵袭性的突变细胞 i , 会被分配一个粘连值 A_i (见表 1). 如果该粘连值大于突变细胞的非侵袭性相邻细胞 (元胞与该细胞的元胞共面) 的数量, 即 $A_i \geq A_N$, 该突变细胞就会被指定为侵袭性细胞, 否则, 会被指定为增殖性细胞 (因粘连过大而无法离开瘤体).

表 1 CA 模型中使用的参数和物理量

时间依赖的量	
L_t	局部肿瘤半径 (随细胞位置变化)
L_{max}	局部肿瘤的最大范围
δ_p	增殖环的特征性厚度
δ_n	存活细胞层特征性厚度 (决定坏死细胞的比例)
p_{div}	细胞分裂概率 (随细胞位置变化)
ρ_{ECM}	ECM 的密度 (随 ECM 的压缩程度和位置变化)
ξ	当前 ECM 密度与初始 ECM 密度的比值
ω^*	衡量 p_{div} 随压强增大而减小的参数, 数值为 $2\rho_{\text{ECM}}^0$
生长参数	
p_0	基础细胞分裂概率, 与细胞倍增时间有关 (0.192)
a	基础坏死细胞厚度, 受营养需求控制 ($0.58 \text{ mm}^{1/2}$)
b	基础增殖细胞层厚度, 受营养需求控制 ($0.30 \text{ mm}^{1/2}$)
l	局部突起的长度
w	局部突起的宽度
χ_0	增殖细胞 ECM 降解能力 (0.15)
侵袭参数	
γ	突变率 (决定侵袭性细胞的数量, 值为 0.05)
χ_1	侵袭性细胞的 ECM 降解能力 (0.95)
μ	细胞运动能力, 移动性 (细胞从一个元胞“跳”到另一元胞的次数, 2)
A_i	细胞间粘连值 (将细胞维持原位的最少邻近细胞数量, 2—8)

7) 侵袭性细胞能降解周围的 ECM (位于相邻的元胞中的 ECM), 从而在 ECM 完全降解后该细

胞能从一个元胞移动到另一个元胞. 一个移动能力值为 μ , ECM降解能力值为 χ_1 的细胞会对周边元胞中的ECM发动 m 次尝试性降解, 其中 m 可以是0到 μ 的任意整数. 每次尝试性降解时, 周围的ECM密度 ρ_{ECM} 会降低 $\delta\rho$, 其中 $\delta\rho$ 是0到 χ_1 之间的随机值. 用随机数来表征ECM降解能力和细胞移动能力体现了侵袭过程的随机性. 如果有不止一个相邻的ECM元胞被完全降解 (即 $\rho_{\text{ECM}} = 0$), 侵袭性细胞将沿着让养分和氧气最大化的方向移动. 在这里, 我们假定迁移细胞不会分裂. 降解的ECM元胞的空间分布可以展示出肿瘤的侵袭路径.

8) 剩余ECM元胞的密度根据方程 (3) 来更新.

图5展示了CA模型中肿瘤增殖和侵袭的主要规则. 以上提到的重要参数总结在表1中. 如果没有另外说明, 我们将在之后模拟中使用表中的参数值. 虽然我们在这里考虑的是球形的生长区域, 其他形状的生长区域也很容易考虑. 在接下来的章节中, 我们将会给出CA模型在恶性肿瘤的生长和形态模拟中的应用的各示例, 并分二维和三维两种情况分别讨论.

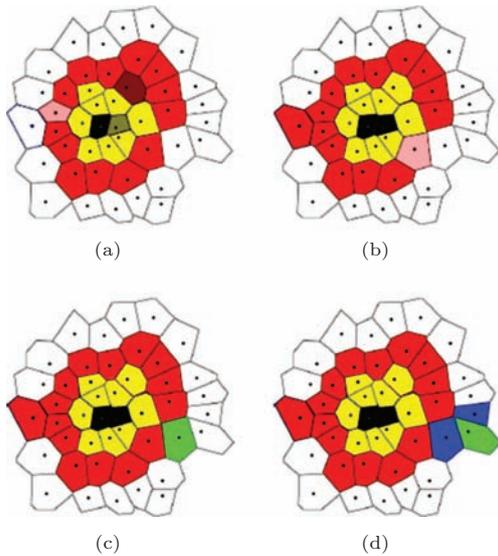


图5 元胞自动机规则展示 (黑色的是坏死细胞, 黄色的是静息细胞, 红色的是增殖细胞, 绿色的是侵袭细胞, 白色的是ECM相关的元胞, 蓝色是被降解的ECM元胞) (a) 中, 增殖性细胞 (暗红色) 因离肿瘤边界太远得不到足够的养分和氧气而变成 (b) 中黄色的静息性细胞, 静息性细胞 (暗黄色) 因离肿瘤边界太远, 将在 (b) 中成为坏死细胞; (b), (a) 中的深红色的增殖细胞和深黄的静息性细胞在 (b) 中分别变成静息性和坏死细胞; (a) 中的淡红色的增殖性细胞产生了一个子细胞, 另一个增殖细胞 (淡红色) 将产生一个突变的侵袭性子细胞; (c), (b) 中的淡红色的增殖性细胞产生了一个侵袭性细胞; (d) 侵袭性细胞降解了周围的ECM, 迁移到之前ECM占据的元胞中, 留下蓝色的降解了的ECM

表中总结的是肿瘤生长和侵袭参数的定义, 以及其他所有模拟所需的量, 括号中的数字表示的是参数值或者相关参数的取值范围. 这些参数的选择, 是为了重现医学报道过的GBM的生长动态数据.

5 CA模型的应用: 二维模拟

在该节中, 我们用CA模型来模拟在二维(2D)异质性微环境中无血管生成的实体瘤侵袭性生长. 尽管2D模型与临床实际相去甚远, 2D的研究仍然能够揭示许多肿瘤侵袭的机理, 以用来证实我们CA规则的可靠性和预测能力. 在接下来的2D模拟结果的图示中, 我们使用以下着色方案: 红色代表增殖细胞, 黄色代表静息细胞 (因为缺氧), 黑色代表坏死细胞, 绿色代表侵袭细胞. 白色代表ECM元胞, 蓝色代表被降解的ECM元胞, 被降解的ECM可以显示侵袭性细胞的迁移路径, 灰色的部分是没有细胞占领的生长区域.

5.1 模型验证

为了验证模型的正确性, 容错性和预测能力, 我们先用其来定量地重现体外GBM的多细胞肿瘤球状体 (GBM multicellular tumor spheroid, MTS) 的生长过程 [3]. 特别地, 我们认为生长的肿瘤能从生长区获得氧气和养分. 从生长区域的边界开始, 我们生成一个径向对称 (即旋转对称) 的养分/氧气梯度, 以边界处的浓度最高. 该假设最早在文献 [12] 中给出, 并根据 Anderson 等人 (见文献 [2,3]) 对真实营养物质/氧气浓度随肿瘤生长的变化模拟结果而简化得到. 当考虑到营养物质/氧气真实空间分布时, Anderson 等人发现侵袭枝的空间分布呈现出某种与营养物质/氧气浓度分布对应的各向异性. 在我们的模型中, 由于营养物质/氧气浓度场是径向对称的, 所以没有出现这样的各向异性.

最初始, 在生长区中央的均匀ECM中引入近250个增殖性细胞, 并让其开始分裂. 这对应于直径 $D_{\text{DMT}} = 310 \mu\text{m}$ 的MTS, 与体外实验的设定相符合 [4]. 以下是我们使用的生长和侵袭参数: $p_0 = 0.384$, $a = 0.58 \text{ mm}^{1/2}$, $b = 0.30 \text{ mm}^{1/2}$, $\gamma = 0.05$, $\chi = 0.55$, $\mu = 3$. 其中, p_0 的值对应于细胞倍增时间40 h, 这与报道的实验上的数据符合 [3]. 我们采用了较小的ECM密度 $\rho_{\text{ECM}} = 0.15$, 来反映实验中使用的软性DMEM培养基.

图 6(a) 和 (b) 分别显示了模拟的 MTS 和它的侵袭枝的放大图像. 根据图像显示, 越靠近增殖中心, 侵袭枝越宽. 特别地, 我们可以看见在这些侵袭枝中细胞排列成链状^[4] (见图 1). 这与实验观察非常符合. 该结构的出现, 是因为由“先锋”侵袭细胞通过降解 ECM 形成了已有的侵袭路径, 其他细胞倾向于一个接一个地 (即同型吸引), 沿着已开辟的侵袭路径迁移. 换句话说, 侵袭性细胞倾向于沿着最小阻力的路径迁徙. 我们注意到, 并没有任何 CA 规则规定细胞的这种行为, 这些结果是我们模拟中涌现出来的新性质.

我们比较了从模拟中算出的侵袭面积与瘤体面积之比 $\beta = A_I/A_T$ 随时间变化的函数与实验得到的数据 (见图 6(c)). 从图中我们可以清晰地看到模拟的结果和实验符合得很好. 并且, $\beta(t)$ 偏离 t 的线性函数表明瘤体的生长和侵袭枝的延伸存在强耦合的关系^[4]. 除此之外, 我们还在开始生长 24 h 后, 计算了其他的描述肿瘤侵袭枝的参量, 比如侵袭枝表面的比表面积 s , 瘤体的球度 α 以及角度各向异性标度 ψ . 这些值与实验测量符合很好^[12]. 因而, 我们的结果表明, 在选择合适的参数后, 我们的 CA 模型的正确性和可靠性都令人满意.

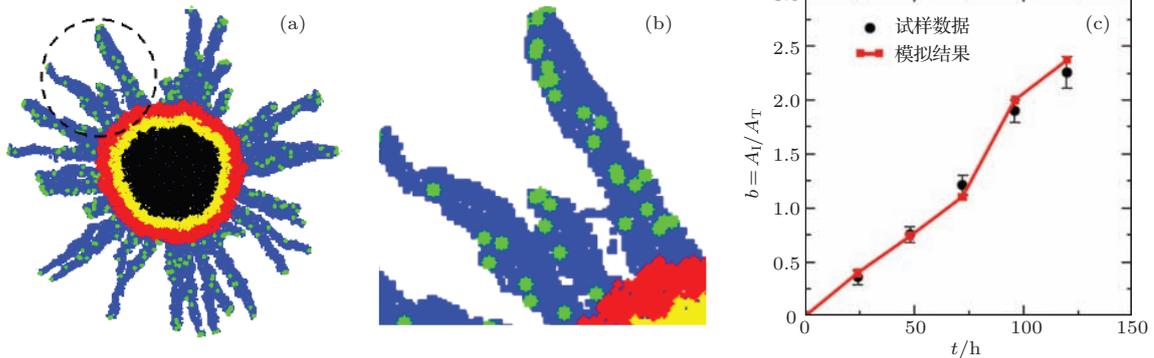


图 6 模拟的体外 MTS 侵袭性生长 (a) 模拟生长 24 h 后的 MTS, 圆形区域中放大的区域见 (b); (b) 为 (a) 图中圆形区域处的放大, 从图上可以看出, 在枝状侵袭分枝里, 侵袭性细胞 (绿色) 呈现一个接一个的分布, 这与实验里观察到的分布情况一致^[4]; (c) 模拟的 MTS 与实验观察结果的几何参数 $\beta = A_I/A_T$ 随时间的变化^[3] 比较

5.2 在异质性的微环境中模拟的侵袭性生长

我们已经验证了 CA 模型的正确性和可靠性, 现在我们来系统性地研究在三种不同的 ECM 密度分布 (即均匀分布, 随机分布和类正弦分布) 的情形下, 宿主微环境对侵袭性肿瘤生长的影响. 不同的 ECM 密度能更好地代表着肿瘤生长时真实的宿主微环境 (关于这三种 ECM 的细节, 请见下文). 与上节相同, 我们认为肿瘤生长区域边界有血管生成, 并提供的指向瘤体中心成放射状分布的营养

物/氧气梯度. 我们注意到, 虽然活体内营养物质/氧气的浓度分布比这里考虑的对称梯度更复杂, 有前人的数值研究表明, 营养物质/氧气浓度朝向瘤体中心逐渐衰减^[2,3]. 考虑到细胞的迁移是沿着营养物质/氧气的梯度方向, 我们简单的梯度近似是合理的.

在模拟的初期, 我们在生长区的中心, 引入一个增殖细胞, 并让肿瘤开始生长. 各项生长参数与表 1 所列相同. 侵袭性参数和 ECM 密度是我们的控制变量, 将会单独指定. CA 模型中的生长参数值根据医学文献中 GBM 的数据^[13] 选取. 具体地,

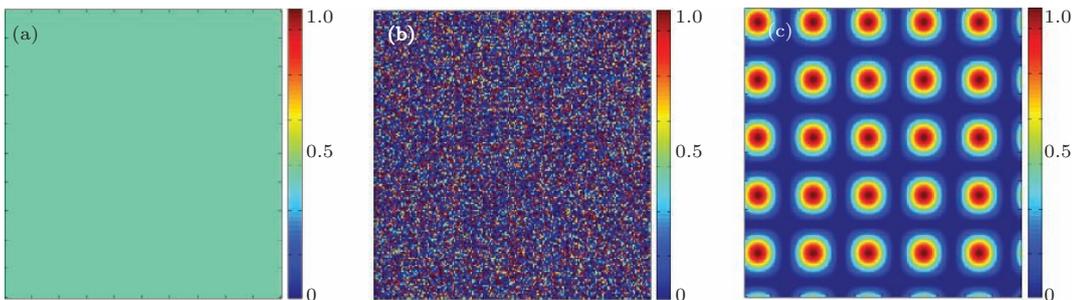


图 7 ECM 密度的不同分布 (a) 均匀分布; (b) 随机分布, 即每个元胞中 ρ_{ECM} 都与其他元胞的 ρ_{ECM} 无关 (独立); (c) 类正弦的 ECM 密度分布, 由 (3) 式定义, 以模拟肿瘤生长遇到的阻碍

基础分裂率是 $p_0 = 0.192$, 这对应于细胞倍增时间 4 天. 由于我们 CA 模型考虑的是一般情况下的肿瘤宿主相互作用的情形, 我们认为模型所预测的生长动力学和涌现出来的行为对其他实体瘤同样适用.

5.2.1 细胞移动性对肿瘤侵袭的影响

我们先在密度为 $\rho_{ECM} = 0.45$ 的均匀 ECM 内模拟侵袭性不同的恶性肿瘤的生长. 特别地, 我们考虑了三种突变率均为 $\gamma = 0.05$, ECM 降解能力均为 $\chi = 0.9$, 但细胞移动性分别为 $\mu = 1, 2, 3$ 的不同肿瘤. 作为对照, 我们同时考虑了非侵袭性肿瘤 ($\mu = 0$) 在同种微环境 ($\rho_{ECM} = 0.45$) 中生长的情况.

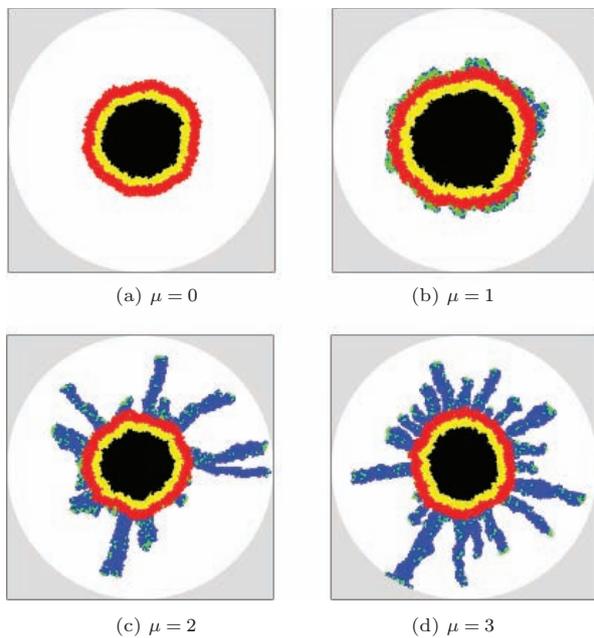


图 8 肿瘤在 $\rho_{ECM} = 0.45$ 的 ECM 里生长的模拟: 第 100 天 (侵袭性生长的突变率 $\gamma = 0.05$, ECM 降解能力 $\chi = 0.9$) (a) 非侵袭性肿瘤细胞, 即 $\mu = 0$; (b) 细胞运动能力 $\mu = 1$ 的侵袭性肿瘤; (c) 细胞运动能力 $\mu = 2$ 的侵袭性肿瘤; (d) 细胞运动能力 $\mu = 3$ 的侵袭性肿瘤 (我们注意到有由侵袭性细胞形成的同心圆壳状结构促进生长的瘤体 (b) 比其他情况下瘤体大得多. 运动能力强的侵袭性细胞会导致更多枝状侵袭枝的形成. 另外, 尽管我们考虑的生长区域是球形, 我们的肿瘤生长模型能够整合任意形状的生长区域)

图 8 显示的是在肿瘤生长了 100 天后情形. 侵袭性和非侵袭性肿瘤的瘤体均产生坏死和静息的区域 (见图 8 (b), (c) 和 (d)). 对于侵袭性的肿瘤 (图 8 (a)), 在细胞的移动性较低 ($\mu = 1$) 的情况下侵袭性的细胞未能形成树突状的侵袭枝, 而是在增殖环外缘形成了包块, 形成了凹凸不平的侵袭性同心圆状的壳, 且比表面积较小 (如第 100 天时,

$s = 1.09$). 不过, 这些侵袭性细胞显著增强了瘤体的生长. 图 8 (b) 中的瘤体大小远大于图 8 (a) (c) 和 (d) 中的肿瘤.

当细胞移动性增大时 (例如, 当 $\mu = 3$ 时), 瘤体更容易长出细长的侵袭枝. 我们还观察到, 在侵袭枝内部, 细胞迁徙时一个连着另一个, 成为一串. 这个现象和之前文献 [3] 报道的实验观察非常符合. 要注意, 在我们 CA 规则里, 没有让细胞一个挨一个的要求. 这种同型吸引完全来自侵袭性细胞之间和侵袭性细胞与 ECM 之间的相互作用, 即, 一旦一个“先锋”侵袭性细胞通过降解 ECM, 开拓出一条侵袭路径, 其他侵袭性细胞只需要沿着这条阻力最小的侵袭路径迁移. 而且我们可以看到, 细胞移动性 (肿瘤恶性) 越强, 形成的侵袭枝越多 (见图 8 (c) 和 (d)). 这会导致侵袭性肿瘤具有更大的比表面积, 从而获得更大的生长优势.

5.2.2 ECM 的硬度对肿瘤侵袭的影响

在低密度均匀 ECM 中, 具有不同 ECM 降解能力的侵袭性肿瘤细胞体系能形成各种各向同性的瘤体形状和侵袭模式. 然而, 真实情况下, 鲜见有各向同性的肿瘤. 这与宿主的微环境的软硬程度有关. 在本小节中, 我们将具体研究这种情况.

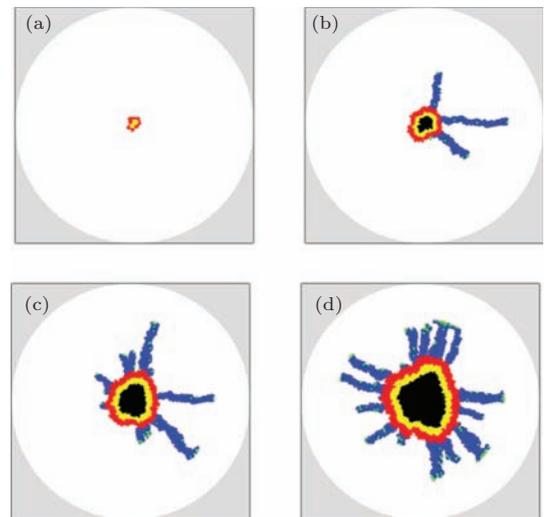


图 9 肿瘤在 $\rho_{ECM} = 0.85$ 的 ECM 里生长的模拟 (该组中, 突变率 $\gamma = 0.05$, ECM 降解能力 $\chi = 0.9$, 细胞移动性 $\mu = 3$) (a) 长到第 50 天的肿瘤; (b) 长到第 80 天的肿瘤; (c) 长到第 100 天的肿瘤; (d) 长到第 120 天的肿瘤 (我们注意到尽管 ECM 是各向同性的, 由于较高的硬度, 瘤体上伸出的侵袭枝生成的突起会导致瘤体的形状成非各向同性. 另外, 我们注意到侵袭性细胞往往集中在某些侵袭枝的顶端, 这也是由 ECM 的硬度导致的. 尽管我们考虑的生长区域是球形, 我们的肿瘤生长模型能够整合任意形状的生长区域)

现在来考虑侵袭性细胞在比之前更硬的ECM中生长情况, 即 $\rho_{\text{ECM}} = 0.85$. 侵袭性参数为 $\gamma = 0.05$, $\chi = 0.9$, $\mu = 3$. 图9展示了肿瘤生长的不同阶段. 从图中我们可以清楚地看到瘤体的大小和侵袭枝的伸展程度都远远小于长在较软的ECM的肿瘤(见图8). 重要的是, 尽管ECM仍然是各向同性的, 瘤体却因为侵袭枝的形成, 在增殖层处长出突起而形成非各向同性的外观. 侵袭性细胞沿着侵袭枝迁移, 全部或部分地降解了沿途的ECM, 随后而来的瘤体中增殖细胞更容易占据这些薄弱区域, 而不必自己去推开较硬的ECM. 我们再次强调, 细胞的这些行为, 都不是我们强加在CA规则里, 而完全来自肿瘤和宿主间的相互作用, 以及侵袭性细胞和非侵袭性细胞之间的生长耦合 [83].

5.2.3 异质性ECM的影响: 随机分布的ECM密度

真正的肿瘤微环境远不是同质性这么简单. 为了搞清ECM的异质性怎样影响肿瘤的生长, 我们首先使用随机分布的ECM密度, 即每个ECM相关元胞的密度 ρ_{ECM} 被赋值为一个0到1之间的随机数(见图7(b)). 我们设定肿瘤的侵袭性参数分别是 $\gamma = 0.05$, $\chi = 0.9$, $\mu = 3$. 肿瘤的不同生长阶段见图10. 在肿瘤生长的早期, 我们能看见瘤体表面

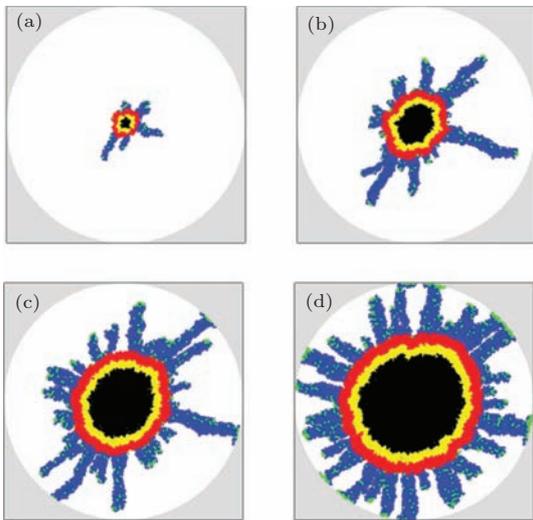


图10 肿瘤在密度随机分布ECM里生长的模拟(突变率 $\gamma = 0.05$, ECM降解能力 $\chi = 0.9$, 细胞移动性 $\mu = 3$) (a)长到第50天的肿瘤; (b)长到第80天的肿瘤; (c)长到第100天的肿瘤; (d)长到第120天的肿瘤(注意, 在生长早期, 瘤体和侵袭模式都受到影响(即, 变得不再各向同性), 同时注意, 和图6(b)不同, 侵袭性细胞全都因为到达生长区的边界, 而集中在侵袭枝尖端, 尽管这里考虑的是球形的生长区, 我们的模拟可以集成任意形状的生长区)

开始变得粗糙, 形状有少许各向异性. 这种生长模式反映了ECM的异质性(图10(a)和(b)). 随着时间推移, 由于各向异性ECM的特征长度与细胞的大小相当, 随着肿瘤越来越大(图10(c)和(d)), 各向异性的效果便越来越不显著. 换句话说, 在大尺度下, 密度随机分布的ECM仍然可以认为是等效均匀的. 然而, 尽管瘤体基本保持各向同性的形状, 在侵袭模式里, 各向异性(即, 从瘤体伸出的侵袭枝向不同方向)仍然存在.

5.2.4 异质性ECM的影响: 类正弦分布的ECM密度

为了表征大尺度下的ECM异质性, 我们使用类正弦的EMC密度分布, 即对于每个中心点在 (x_1, x_2, \dots, x_d) 的元胞, 相关的ECM密度由以下公式给出:

$$\rho_{\text{ECM}}(x_1, x_2, \dots, x_d) = \frac{1}{2^d} \left[\sin\left(\frac{2\pi x_1}{L}\right) + 1 \right] \left[\sin\left(\frac{2\pi x_2}{L}\right) + 1 \right] \dots \times \left[\sin\left(\frac{2\pi x_d}{L}\right) + 1 \right], \quad (8)$$

其中 d 是空间维度, L 是该 d 维立方体的边长, 2维的正弦样密度分布见图7(c). 红色区域表示 ρ_{ECM} 的值较高, 对应于刚性的ECM, 它们可被视作是肿瘤生长的等效障碍(如颅腔中的脑室).

图11(a), (b), (c)和(d)展示了侵袭性肿瘤在这种ECM里生长了80天和120天情况. 两种肿瘤的侵袭性参数分别为 $\gamma = 0.05$, $\mu = 1$ 与 $\chi = 0.9$ 和 $\gamma = 0.05$, $\mu = 3$ 与 $\chi = 0.9$. 我们能看到, 在早期阶段, 两种情况下的瘤体形态和侵袭模式都因ECM异质性不同而受到显著影响. 尤其是, 瘤体形状呈现出很高的各向异性, 侵袭枝也明显倾向于向两个垂直的, 密度较低的方向伸展. 对于细胞运动性较强的肿瘤, 各向异性随着肿瘤生长而逐渐消失. 而细胞运动性较差的肿瘤, 其形态和侵袭模式始终保持着较高的各向异性. 并且我们再次看到, 运动性较差的侵袭性细胞显著地促进了瘤体的生长. 然而, 与在均质的ECM中生成瘤体的粗糙的同心圆壳不同, 侵袭性细胞组成大的侵袭锥, 伸入周围的ECM中. 这些侵袭锥末端是红色的增殖环形成小突起, 这导致瘤体有粗糙的表面. 这些复杂的结构仅在异质性的ECM中出现, 这突出了了解ECM的物理异质性在肿瘤研究中的重要作用.

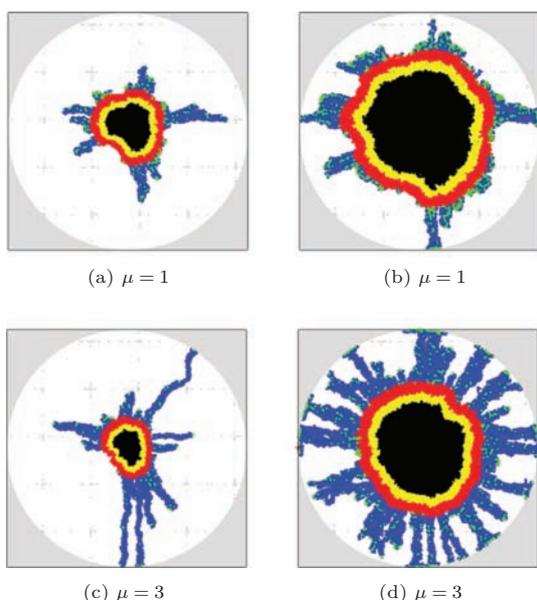


图 11 在类正弦密度分布的 ECM 里模拟不同运动能力的肿瘤细胞的生长 ($\mu = 1, 3, \gamma = 0.05, \text{ECM 降解能力 } \chi = 0.9$) (a) $\mu = 1$ 时, 细胞在第 80 天的生长情况; (b) $\mu = 1$ 时, 细胞在第 120 天的生长情况; (c) $\mu = 3$ 时, 细胞在第 80 天的生长情况; (d) $\mu = 3$ 的时, 细胞在第 120 天的生长情况 (注意到瘤体和侵袭模式都被 ECM 的异质性所影响, 即在生长初期, 瘤体各向同性十分低. 侵袭枝明显偏好两个 ECM 密度较低的方向. 另外, 请注意尽管我们这儿只考虑了球状的生长区, 我们的模型可以模拟任何形状的生长区)

6 CA 模型的应用: 三维模拟

在本节中, 我们使用 CA 模型系统地研究在三维空间中, 微环境对恶性肿瘤侵袭行为的促进性作用. 这相比于二维模型, 计算量显著增大 [13,14]. 特别地, 在我们的 Dell 工作站 (Precision T3600) 上, 模拟 2D 肿瘤从几个细胞增殖至肉眼可见的 $\sim 10^4$ 个细胞, 仅需几分钟, 而在 3D 模型中, 生长至同等大小的肿瘤 ($\sim 10^6$) 却需要几个小时. 如果我们对肿瘤生长的微环境有足够的了解, 3D 模型能让我们更精确的重现瘤体和侵袭枝形态, 这对于肿瘤的诊断, 预后和治疗, 都有重要的意义.

为了正确地抓住肿瘤侵袭的显著特征, 比如产生的树枝状侵袭枝, 生长区至少需要 1000000 个自动机元胞 (该数目远大于二维的情况), 这相当于一个 1 mm^3 的组织. 最初, 中心一小部分元胞被指定为增殖性细胞, 而后, 我们让这原初肿瘤根据制定 CA 规则生长并迁移. 瘤体的统计信息 (如, 体积, 半径, 不同种类的细胞数量) 和形态信息 (即, 肿瘤细胞的几何中心, 以及降解掉的 ECM 元胞) 每 T_c 天收集一次.

为体现肿瘤生长微环境的异质性, ECM 的

密度被如上随机赋值. 即第 i 个元胞的密度为 $\rho_{\text{ECM}}^i = 2\bar{\rho}_{\text{average}} * z$, 其中 z 是 0 和 1 之间的随机数, $\bar{\rho}_{\text{average}}$ 是指定的 ECM 平均密度. 另外, 我们认为生长的肿瘤能从生长区域的边界源源不断获得养分. 在接下来的模拟中, 我们仍然认为养分的浓度梯度在生长区域内成径向对称, 以靠近血管壁的边界处浓度最高.

我们仍然使用比表面积 s , 即肿瘤表面积与体积的比值 [13], 作为描述肿瘤的瘤体表面粗糙程度和“指状突起”程度的指标. 在三维情况中, 我们使用了比表面积与 $3/R$ (即球体的比表面积) 的比值来表征瘤体表面的粗糙程度. 比值越接近于 1, 肿瘤就越近似球形. 否则, 我们就认为瘤体有一个粗糙的表面. 因而, 我们这儿使用 $s/(3/R_T)$ 作为有效半径为 R_T (肿瘤内部到边界的平均距离) 的任意形状肿瘤的比表面积. 另外, 我们也记录了肿瘤体积 V_T 以生长区的容积 V_0 为参照归一化后, 随时间变化的图像.

在图示肿瘤生长结果时, 我们只展示了瘤体最外层的增值性细胞 (红色) 和由被降解的 ECM 组成的侵袭枝结构 (蓝色). 由于三维体系的复杂性, 我们无法在三维里清楚地展现所有细胞. 因此, 坏死细胞, 静息性细胞和侵袭性细胞没法像在二维情况中一样在图示中展示出来. 我们将给出细胞类型的数量随时间的变化来定量反映肿瘤的生长情况.

6.1 增殖性肿瘤生长模拟

同 2D 情形一样, 我们先来考虑一下在柔软的 ECM 中的增殖性肿瘤生长. 这种情形已经被前人广泛地研究过 [2,14,23,24,54,57-66]. 肿瘤的生长的遵循 Gompertzian 动力学: 刚开始的速率很低并且为线性增殖, 然后中期进入指数增长阶段, 最后以平台期告终 [24].

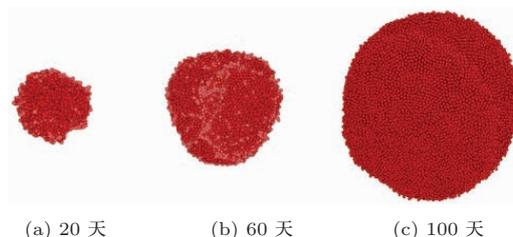


图 12 3D 肿瘤在 $\rho_{\text{ECM}} = 0.15$ 的柔软 ECM 中增殖性生长的不同阶段

图 12 展示了在柔软的 ECM ($\rho_{\text{ECM}} = 0.15$) 中模拟肿瘤生长的不同阶段. 从图中我们可以清楚地

看到肿瘤基本呈现出对称的球形. 这一点也从较小的比表面积中反映出来(见图 13(a)). 肿瘤体积(与细胞数成正比) 随时间变化的情况见图 13(b). 该图清楚地显示出肿瘤的 Gompertzian 生长^[23]. 尽管 ECM 最初很柔软, 而肿瘤在有限空间内的生长无可避免地导致积聚的压力升高. 尤其在生长的后期, 由于肿瘤对 ECM 的压缩导致肿瘤受到很大压力, 肿瘤能通过表面形成突起释放局部压力, 同时导致比表面积的增加(见图 13(a), 注意到这里的比表面积是以半径为 R_T 的球体比表面积, 即 $3/R_T$ 进行归一化处理的).

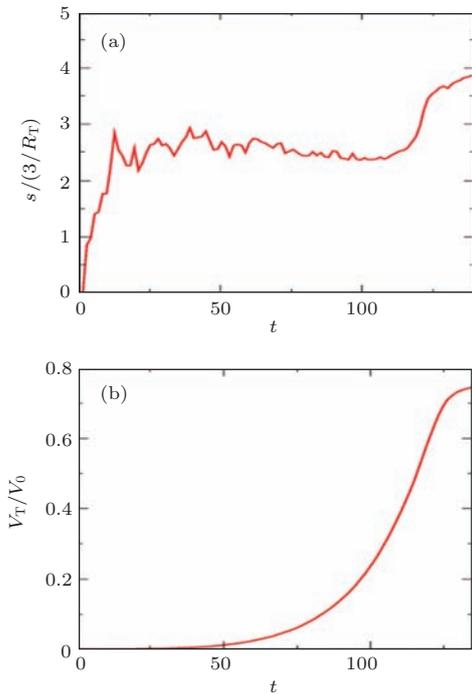


图 13 图 12 中的 3D 肿瘤在 $\rho_{ECM} = 0.15$ 的柔软 ECM 中的增殖性生长中的统计数据 (a) 比表面积随时间的变化, 其中 R_T 是肿瘤的有效半径; (b) 与 V_0 归一化后, 生长区域中肿瘤体积 V_T 随时间的变化

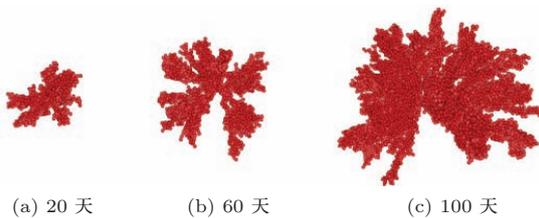


图 14 3D 肿瘤在 $\rho_{ECM} = 0.65$ 的坚硬 ECM 中增殖性生长的不同阶段

我们现在来考虑肿瘤在密度为 $\rho_{ECM} = 0.65$ 的坚硬的 ECM 中的生长. 我们讨论过, 肿瘤生长过程中对坚硬的 ECM 的压缩会导致瘤体受到很高

的压力. 因而, 局部突起的肿瘤表面在突起处能够释放局部压力并且接触到更远处的 ECM(更多营养物质)而获得生长优势. 这些优势会导致肿瘤表面突起的持续生长. 如图 14 所示, 在肿瘤早期, 我们就观察到表面伸出的指状突起. 与之相关的比表面积随着肿瘤生长而单调增加. 这一结果来源于突起的出现, 也反映了肿瘤体表面的不稳定性(见图 15(a)).

在生长时间相同的情况下, 较硬 ECM 里生长的肿瘤的实际体积显著小于生长在较软 ECM 里的肿瘤; 而其有效体积(即, 能将整个肿瘤完全包含在内的最小的球体体积)却与长在软 ECM 里的肿瘤相当(见图 14 与图 12). 另外, 从图 15(b) 里能看到, 在模拟结束(生长的第 15 天)的时候, 在较硬 ECM 里生长的肿瘤仍旧处于线性增长区, 而在软 ECM 里的肿瘤却已经到达生长的平台期. 这些结果反映出, 在较硬 ECM 里(即, 更加不利的微环境里), 肿瘤的有效体积可能远超过在较软 ECM 里生长的肿瘤. 该效应可以大大增加了肿瘤的侵袭性.

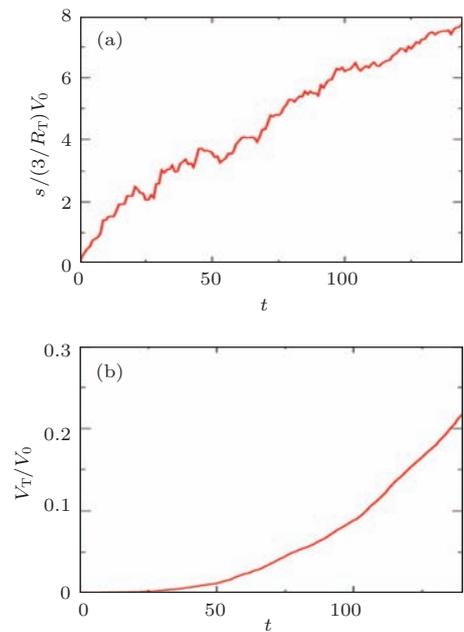


图 15 图 14 中的 3D 肿瘤在 $\rho_{ECM} = 0.65$ 的坚硬 ECM 中的增殖性生长中的统计数据 (a) 比表面积随时间的变化, 其中 R_T 是肿瘤的有效半径; (b) 与 V_0 相比, 生长区域中归一化的肿瘤体积 V_T 随时间的变化

6.2 侵袭性肿瘤生长模拟: ECM 硬度与细胞-细胞间粘连的影响

在本节中, 我们来考虑侵袭性肿瘤的生长过程, 包括子细胞从瘤体脱落并迁移至周围的 ECM 中. 具体来说, 我们将着重探讨 ECM 硬度(即微

环境的恶劣程度)以及细胞-细胞间粘连对肿瘤生长动力学以及形态的影响. 我们注意到, 细胞-细胞间粘连在之前二维CA模型的讨论中并未涉及 [54,59,84,85].

我们先来考虑肿瘤在密度为 $\rho_{ECM} = 0.15$ 的柔软ECM中的生长情况. 我们观察到当细胞细胞间仅有较弱的粘连 (即 $A_i = 8$) 时, 瘤体表面光滑紧凑 (见图 16). 之前我们提过, A_i 表示把侵袭性的肿瘤细胞固定在原位所需要的最少的邻近细胞数目. 因而, A_i 值越大, 说明细胞-细胞间粘连越弱, 因为这样需要有更多的相邻的细胞, 才能将突

变的细胞控制在原位.

在我们的模拟中, 肿瘤的瘤体表面出现线状侵袭枝伸出表面. 最开始, 这些侵袭枝均匀地分布在肿瘤表面. 在细胞间粘连很强的时候 (即 $A_i = 2$ 时), 表面的侵袭枝数量比起较弱粘连的情况急剧减少 (见图 17). 尽管两种情况的突变率相当, 因为强大的细胞间粘连, 从瘤体分离并侵入周边组织的细胞数目要少得多. 这能从图 16(b) 和图 17(b) 的比较中看出来. 这些结果显示, 当细胞间粘连很强时, 在柔软的组织中生长的侵袭性肿瘤的恶性程度会降低.

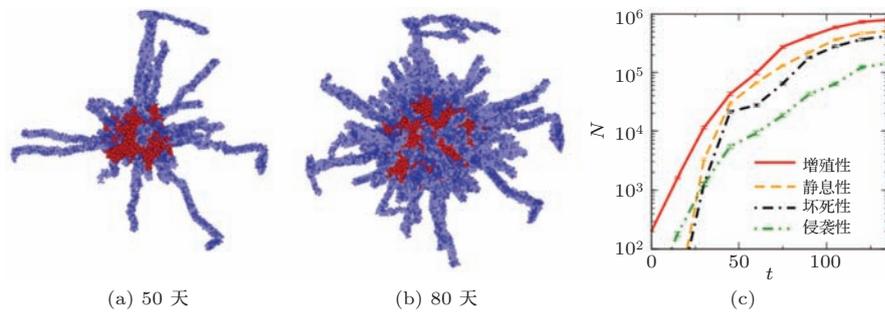


图 16 在低密度 $\rho_{ECM} = 0.15$ 柔软的 ECM 中具有较弱的细胞-细胞间粘连的肿瘤 ($A_i = 8$) 生长情况以及统计数据 (瘤体中伸出线状的侵袭枝, 在肿瘤表面均匀摊开); (c) 不同类型细胞的数量随时间变化的统计数据

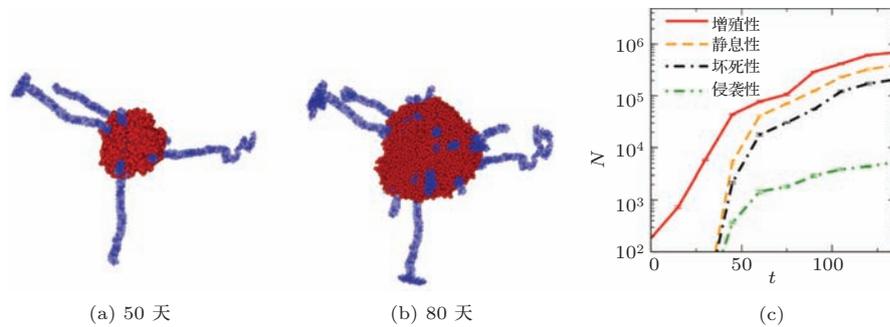


图 17 在低密度 $\rho_{ECM} = 0.15$ 柔软的 ECM 中具有较强细胞-细胞间粘连的肿瘤 ($A_i=2$) 时的生长情况以及统计数据 (瘤体中伸出的侵袭枝数量远远小于较弱细胞间粘连的肿瘤); (c) 不同类型细胞的数量随时间变化的统计数据

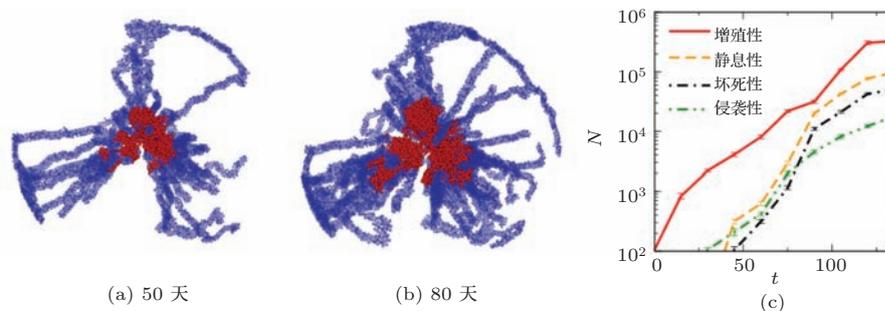


图 18 在高密度 $\rho_{ECM} = 0.65$ 坚硬的 ECM 中具有较弱细胞间粘连的肿瘤 ($A_i = 8$) 的生长情况以及统计数据. 线状的侵袭枝从瘤体表面的突起处冒出 (注: 虽然图中未必能看清, 侵袭枝从突起顶部冒出, 我们是转动 3D 模型, 经过仔细检查后才得出了这样的结论); (c) 不同类型细胞数量随时间变化的统计数据

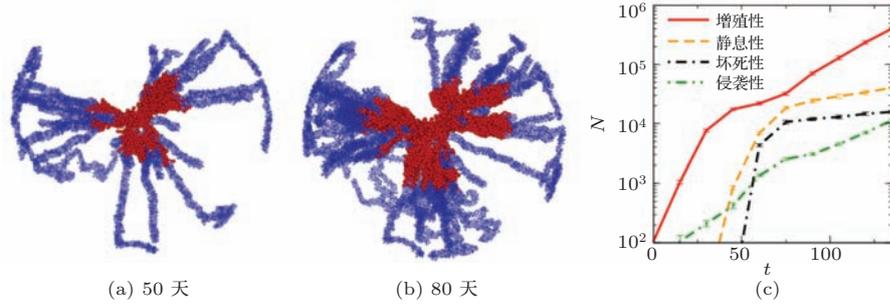


图19 在高密度 $\rho_{ECM} = 0.65$ 的坚硬ECM中具有较强细胞间粘连的肿瘤 ($A_i = 2$) 的生长情况以及统计数据. 突起尖端处伸出的侵袭枝数量与弱粘连的情况相当(见图18)(注: 虽然图中未必能看见侵袭枝从突起顶部冒出, 我们是转动3D模型, 经过仔细检查才得出了这样的结论的); (c) 不同类型细胞数量随时间变化的统计数据

如前一节所述, 在较硬ECM ($\rho_{ECM} = 0.65$) 里生长的肿瘤瘤体表面会出现指状突起, 以应对对压缩的ECM带来的升高的局部压力. 在指状突起顶端的细胞, 由于邻近细胞量少, 而更容易从瘤体上脱离. 图18和图19分别显示了在较硬ECM中, 侵袭性肿瘤在细胞细胞间粘连 ($A_i = 8$) 较弱和细胞-细胞间粘连 ($A_i = 2$) 较强的两种情况下生长的不同阶段以及相关统计数据. 从图中可以清楚地看到, 侵袭的程度(侵袭枝和侵袭性细胞的数量)并未受到细胞间粘连强弱的显著影响, 侵袭行为在两种情况下都很显著. 这与在较软的ECM中肿瘤的生长情况呈现出鲜明的对比. 这暗示着恶劣的微环境(较硬)能显著增加侵袭性肿瘤的恶性程度.

6.3 表征肿瘤恶性行为的相图

我们的模拟结果表明, ECM的硬度增加会加剧肿瘤的恶性程度, 而细胞-细胞间粘连增加的影响则与之相反, 即会减弱肿瘤的恶性程度. 这两种因素互相制衡, 导致恶性程度不同的机理可以用一个定性的相图来描述, 见图20. 相图的纵轴代表ECM的硬度(即环境的恶劣程度), 横轴代表细胞-细胞间粘连的强度. 相图中的实曲线将侵袭性和非侵袭性行为分隔开来. 这样我们就可以划定非侵袭性到侵袭性的“相变”[27].

我们还发现, 对于很微弱的细胞间粘连, 即便在ECM硬度很高的情况下, 任何有侵袭性表型的突变细胞都能离开瘤体进而侵入周边组织. 这对应于相图上的低细胞-细胞间黏性-侵袭性区域(即相图的左边部分). 随着粘连性的增加, 我们的模拟表明, 只有相邻的细胞较少的细胞(肿瘤表面指状突起内的细胞)才能离开瘤体. 这部分中等粘度(与相图中部的区域对应)的细胞才会发生从非侵袭性到侵袭性的“相变”. 而该相变对ECM的硬度相对敏感. 在黏度很强的情况下, 侵袭行为对ECM硬度

(即密度)的敏感程度下降, 但仍能被较硬的ECM增强这对应于相图中高粘度的区域(相图右侧).

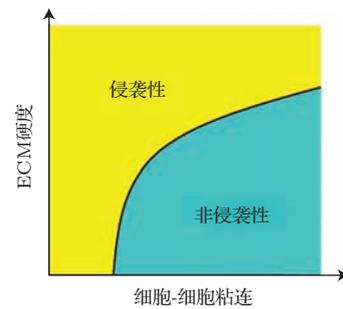


图20 描述肿瘤恶性程度的定性相图, 相图的纵轴代表ECM的硬度(即环境的恶劣程度), 横轴代表细胞-细胞间粘连的强度, 相图中的实曲线将侵袭性和非侵袭性行为分隔开来(肿瘤恶性程度随ECM硬度增加而增加, 却随细胞-细胞间粘连的增强而减弱. 两种因素的协同作用, 形成了相图中区分侵袭性和非侵袭性行为的实线)

上面的相图表明, 当一个肿瘤以一定的细胞-细胞间粘连强度在一个封闭的柔软微环境中生长时, 最初可能是非侵袭性的. 随着肿瘤体积增大, 从而压缩周围的ECM, 这使得微环境越来越硬. 这有可能最终导致侵袭性行为的出现. 以上提到的过程, 对应于相图中的一根竖线, 即从非侵袭相始, 最终穿过相图上的分隔线而进入侵袭性区间的过程.

最后, 我们注意到, 目前三维CA模型只能让我们探寻相图上有限的区域. 例如, 从理论上讲, 在ECM密度非常高的情况下, 侵袭性应该会有一个上限, 即肿瘤在极硬的ECM很难以于侵袭周边组织. 而目前我们的模拟还无法研究这一区域. 我们期望今后的研究这能让我们绘制出更量化更接近于真实情况的相图.

7 结 论

本文中, 我们简要回顾了一种近年来开发的用于模拟侵袭性肿瘤在复杂微环境中生长的元胞自

动机(CA)模型. 该CA模型整合了一系列的微观的肿瘤宿主相互作用, 包括恶性肿瘤细胞对ECM的降解, 营养物驱动的细胞迁移, ECM压缩造成的压力增加以及其对局部肿瘤宿主界面稳定性的影响, 以及细胞-细胞间粘连对侵袭性肿瘤生长的影响. 文中给出了该模型在不同二维和三维ECM中肿瘤生长以及侵袭情况中的应用实例. 这些实例一方面肯定了CA模型的准确性和预测能力, 另一方面加深了我们对肿瘤侵袭机制的认识. 例如, CA模拟研究发现, 很强的细胞-细胞间粘连能够显著抑制肿瘤在柔软ECM中生长时的侵袭性行为. 相反地, 肿瘤的恶性程度能被坚硬的ECM强化, 导致瘤体表面指状突起的形成. 而这些突起协助了突变的侵袭性细胞脱离瘤体, 扩散到周边组织中. 这些结果凸显了了解复杂的肿瘤宿主相互作用在癌症基础研究和临床实践中的重大作用.

此外, 我们从模拟的结果中推断出通过ECM硬度和细胞-细胞间粘连程度来预测肿瘤恶性程度的定性的相图. 该相图阐明, 当肿瘤在有限的空间里生长(实体瘤通常都是这种情况)时, 即便开始的时候ECM较软, 随着肿瘤体积的增大仍不可避免地产生局部高压. 这种情形下, 本来恶性程度较低的肿瘤可能产生高恶性程度的侵袭性行为. 这提示我们, 如果能调整肿瘤微环境的参数, 或许能让肿瘤保持在低恶性程度的非侵袭性相里. 这样的话, 针对宿主微环境的靶向治疗, 或许比针对肿瘤本身的治疗更有益于病人的康复.

尽管目前的CA模型模拟的是体外肿瘤的生长, 我们认为, 从体外情形得出的结论仍然定性地适用于体内的情况. 为了定量地预测临床情况中肿瘤的发展, 我们需要考虑更符合实际情况的宿主微环境模型. 比如在模型中加入成纤维细胞, 血管和淋巴管等组分, 这些都是临床肿瘤的重要因素, 还有更多的相关机理(如, 肿瘤与正常细胞表型的可塑性和免疫反应). 这样一个高仿真模型将使我们能够在虚拟的3D水平, 在统计上重现从组织学切片上观察到的肿瘤细胞群的空间构型^[86], 使得癌症的诊断更加精确, 治疗更加有效. 这种能够量化ECM运输和力学特性的微观模型的提出, 阐释了ECM在传输生物力学/生物化学信号, 调控细胞运动性, 增殖, 分化和凋亡等关键步骤中的重要作用, 是癌症研究中的里程碑. 此外, 逼真, 容错性高的肿瘤模型将使得人们能够有效地设计, 测试和优化针对患者的个性化肿瘤治疗方案^[54,84,85,87].

作者感谢普林斯顿大学陈杜宇同学与作者的讨论和提出的建议.

参考文献

- [1] Coffey D S 1998 *Nat. Med.* **4** 882
- [2] Anderson A R A 2005 *Math. Med. Biol.* **22** 163
- [3] Anderson A R A, Weaver A M, Cummings P T, Quaranta V 2006 *Cell* **127** 905
- [4] Deisboeck T S, Berens M E, Kansal A R, Torquato S, Stemmer-Rachamimov A O, Chiocca E A 2001 *Cell Prolif.* **34** 115
- [5] Fidler I J 2003 *Nat. Rev. Cancer* **3** 453
- [6] Frieboes H B, Zheng X, Sun C-H, Tromberg B, Gatenby R, Cristini V 2006 *Cancer Res.* **66** 1597
- [7] Hanahan D, Weinberg R A 2000 *Cell* **100** 57
- [8] Kerbel R S 1990 *Adv. Cancer Res.*, edited by George F. Vande Woude and George Klein (Waltham, Massachusetts: Academic Press) pp87--132
- [9] Liotta L A, Kohn E C 2003 *Nat. Genet.* **33** 10
- [10] Gatenby R A 1996 *Eur. J. Cancer* **32A** 722
- [11] Fearon E R, Vogelstein B 1990 *Cell* **61** 759
- [12] Jiao Y, Torquato S 2011 *PLoS Comput. Biol.* **7** e1002314
- [13] Jiao Y, Torquato S 2012 *AIP Adv.* **2** 011003
- [14] Anderson A R A, Chaplain M a J 1998 *Bull. Math. Biol.* **60** 857
- [15] Anderson A R A, Quaranta V 2008 *Nat. Rev. Cancer* **8** 227
- [16] Brú A, Casero D 2006 *J. Theor. Biol.* **243** 171
- [17] Byrne H M 2010 *Nat. Rev. Cancer* **10** 221
- [18] Byrne H M, Alarcon T, Owen M R, Webb S D, Maini P K 2006 *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Math. Phys. Eng. Sci.* **364** 1563
- [19] Gatenby R A, Maini P K 2003 *Nature* **421** 321
- [20] Guiot C, Pugno N, Delsanto P P, Deisboeck T S 2007 *Phys. Biol.* **4** P1
- [21] Helmlinger G, Netti P A, Lichtenbeld H C, Melder R J, Jain R K 1997 *Nat. Biotechnol.* **15** 778
- [22] Hogan M C, Lee A, Solberg L A, Thomé S D 2002 *Am. J. Hematol.* **70** 55
- [23] Kansal A R, Torquato S, Harsh IV G R, Chiocca E A, Deisboeck T S 2000 *J. Theor. Biol.* **203** 367
- [24] Kansal A R, Torquato S, Chiocca E A, Deisboeck T S 2000 *J. Theor. Biol.* **207** 431
- [25] T P Padera, Kadambi A, Di Tomaso E, Carreira C M, Brown E B, Boucher Y, Choi N C, Mathisen D, Wain J, Mark E J, Munn L L, Jain R K 2002 *Science* **296** 1883
- [26] Paszek M J, Zahir N, Johnson K R, Lakins J N, Rozenberg G I, Gefen A, Reinhart-King C A, Margulies S S, Dembo M, Boettiger D, Hammer D A, Weaver V M 2005 *Cancer Cell* **8** 241
- [27] Torquato S 2011 *Phys. Biol.* **8** 015017
- [28] Schrödinger E 1992 *What Is Life?: With Mind and Matter and Autobiographical Sketches* (Cambridge, UK: Cambridge University Press)

- [29] Fernandez-Gonzalez R, Simoes S de M, Röper J-C, Eaton S, Zallen J A 2009 *Dev. Cell* **17** 736
- [30] Wozniak M A, Chen C S 2009 *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10** 34
- [31] Boey S K, Boal D H, Discher D E 1998 *Biophys. J.* **75** 1573
- [32] Coughlin M F, Stamenović D 2003 *Biophys. J.* **84** 1328
- [33] Gordon D, Bernheim-Groswasser A, Keasar C, Farago O 2012 *Phys. Biol.* **9** 026005
- [34] Totsukawa G, Wu Y, Sasaki Y, Hartshorne D J, Yamakita Y, Yamashiro S, Matsumura F 2004 *J. Cell Biol.* **164** 427
- [35] Friedl P, Bröcker E-B 2000 *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **57** 41
- [36] Grinnell F, Petroll W M 2010 *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **26** 335
- [37] Vaziri A, Gopinath A 2008 *Nat. Mater.* **7** 15
- [38] Carlsson A E 2006 *Biophys. J.* **90** 413
- [39] Yamaoka H, Matsushita S, Shimada Y, Adachi T 2012 *Biomech. Model. Mechanobiol.* **11** 291
- [40] Lecuit T, Lenne P-F, Munro E 2011 *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27** 157
- [41] Carlsson A E 2011 *New J. Phys.* **13** 073009
- [42] Buenemann M, Levine H, Rappel W J, Sander L M 2010 *Biophys. J.* **99** 50
- [43] Zaman M H, Kamm R D, Matsudaira P, Lauffenburger D A 2005 *Biophys. J.* **89** 1389
- [44] Cirit M, Krajcovic M, Choi C K, Welf E S, Horwitz A F, Haugh J M 2010 *PLoS Comput Biol* **6** e1000688
- [45] Kabla A J, 2011 arXiv11084286 Phys. Q-Bio.
- [46] Sun L, Chang Y F 2003 *Journal of Huazhong Normal University: Natural Sciences* **37** 491 (in Chinese) [孙亮, 常云峰 2003 华中师范大学学报:自然科学版 **37** 491]
- [47] Manning M L, Foty R A, Steinberg M S, Schoetz E-M 2010 *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107** 12517
- [48] Drasdo D, Höhne S 2005 *Phys. Biol.* **2** 133
- [49] Szabó B, Szöllösi G J, Gönci B, Jurányi Z, Selmecei D, Vicsek T 2006 *Phys. Rev. E* **74** 061908
- [50] Yang X, Manning M L, Marchetti M C 2014 *Soft Matter* **10** 6477
- [51] Gatenby R A, Gawlinski E T 1996 *Cancer Res.* **56** 5745
- [52] Owen M R, Byrne H M, Lewis C E 2004 *J. Theor. Biol.* **226** 377
- [53] Zhou Y 2012 *Ph. D. Thesis* (Shanghai: Fudan University) (in Chinese) [周瑜 2012 博士学位论文 (上海: 复旦大学)]
- [54] Schmitz J E, Kansal A R, Torquato S 2002 *Comput. Math. Methods Med.* **4** 223
- [55] Alarcón T, Byrne H M, Maini P K 2004 *J. Theor. Biol.* **229** 395
- [56] Gavaghan D J, Brady J M, Behrenbruch C P, Highnam R P, Maini P K 2002 *Comput. Math. Methods Med.* **4** 3
- [57] Gevertz J L, Torquato S 2006 *J. Theor. Biol.* **243** 517
- [58] Gevertz J L, Gillies G T, Torquato S 2008 *Phys. Biol.* **5** 036010
- [59] Gevertz J, Torquato S 2009 *Phys. Rev. E* **80** 051910
- [60] Bellomo N, Preziosi L 2000 *Math. Comput. Model.* **32** 413
- [61] Scalerandi M, Sansone B C, Condat C A 2001 *Phys. Rev. E* **65** 011902
- [62] Scalerandi M, Sansone B C 2002 *Phys. Rev. Lett.* **89** 218101
- [63] Kim Y, Friedman A 2010 *Bull. Math. Biol.* **72** 1029
- [64] McElwain D L S, Pettet G J 1993 *Bull. Math. Biol.* **55** 655
- [65] Chen C Y, Byrne H M, King J R 2001 *J. Math. Biol.* **43** 191
- [66] Roose T, Netti P A, Munn L L, Boucher Y, Jain R K 2003 *Microvasc. Res.* **66** 204
- [67] Gatenby R A, Gawlinski E T, Gmitro A F, Kaylor B, Gillies R J 2006 *Cancer Res.* **66** 5216
- [68] Gerisch A, Chaplain M A J 2008 *J. Theor. Biol.* **250** 684
- [69] Macklin P, Lowengrub J 2007 *J. Theor. Biol.* **245** 677
- [70] Gardner M 1970 *Sci. Am.* **223** 120
- [71] Raabe D 1998 in *Comput. Mater. Sci.* (Weinheim Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA) pp201–224
- [72] Jiao Y, Torquato S 2013 *Phys. Rev. E* **87** 052707
- [73] Wolfram S 1983 *Rev. Mod. Phys.* **55** 601
- [74] Torquato S 2002 *Random Heterogeneous Materials: Microstructure and Macroscopic Properties* (Berlin, Heidelberg: Springer Science & Business Media) pp189–192
- [75] Gevertz J L, Torquato S 2008 *PLoS Comput Biol* **4** e1000152
- [76] Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M 1996 *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12** 463
- [77] Sarntinoranont M, Rooney F, Ferrari M 2003 *Ann. Biomed. Eng.* **31** 327
- [78] Gordon V D, Valentine M T, Gardel M L, Andor-Ardó D, Dennison S, Bogdanov A A, Weitz D A, Deisboeck T S 2003 *Exp. Cell Res.* **289** 58
- [79] La L, Cn R, Sh B 1983 *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **49** 636
- [80] Boyle J O, Hakim J, Koch W, van der Riet P, Hruban R H, Roa R A, Correo R, Eby Y J, Ruppert J M, Sidransky D 1993 *Cancer Res.* **53** 4477
- [81] Stetler-Stevenson W G, Aznavoorian S, Liotta L A 1993 *Annu. Rev. Cell Biol.* **9** 541
- [82] Lawrence J A, Steeg P S 1996 *World J. Urol.* **14** 124
- [83] Cai Y 2011 *Ph. D. Thesis* (Shanghai: Fudan University) (in Chinese) [蔡彦 2011 博士学位论文 (上海: 复旦大学)]
- [84] Gevertz J L 2011 *Comput. Math. Methods Med.* **2011** e830515
- [85] Enderling H, Chaplain M A J, Anderson A R A, Vaidya J S 2007 *J. Theor. Biol.* **246** 245
- [86] Jiao Y, Berman H, Kiehl T-R, Torquato S 2011 *PLoS One* **6** e27323
- [87] Gevertz J 2012 *Phys. Rev. E* **85** 041914

SPECIAL ISSUE—Cancer biophysics

Microenvironment-enhanced invasive tumor growth via cellular automaton simulations

Liang Long¹⁾ Jiao Yang^{1)2)†}1) (*Department of Physics, Arizona State University, AZ 85287, USA*)2) (*Materials Science and Engineering, Arizona State University, AZ 85287, USA*)

(Received 1 December 2014; revised manuscript received 20 January 2015)

Abstract

Emergence of invasive and metastatic behavior in malignant tumors can often lead to fatal outcomes for patients. The collective malignant tumor behavior resulting from the complex tumor-host interactions and the interactions between the tumor cells are currently poorly understood. Progress towards such an understanding necessarily requires an interdisciplinary and collaborative effort. In this paper, we review a state-of-art simulation technique, i.e., a cellular automaton (CA) model which has been developed by the authors over the past few years to investigate microenvironment-enhanced invasive growth of avascular solid tumors. This CA model incorporates a variety of microscopic-scale tumor-host interactions, including the degradation of the extracellular matrix by the malignant cells, nutrient-driven cell migration, pressure build-up due to the deformation of the microenvironment by the growing tumor and its effect on the local tumor-host interface stability. Moreover, the effects of cell-cell adhesion on tumor growth are also explicitly taken into account. A number of bench-mark collective invasion behaviors have been successfully reproduced via the CA model, including the emergence of elongated invasion branches characterized by homotype attraction and least resistance path, development of rough tumor surface in a high-pressure confined environment, as well as reduced invasion due to strong cell-cell adhesion. Such simulated bench-mark behaviors strongly indicate the validity and predictive power of the CA model. In addition, the CA model allows one to investigate the role of various different microenvironment factors in the progression of the neoplasm, in particular, the promotion and enhancement of tumor malignancy. As an example, a “phase diagram” that summarizes the dependency of tumor invasive behavior on extracellular matrix (ECM) rigidity (density) and strength of cell-cell adhesion is constructed based on comprehensive simulations. In this simple phase diagram, a clear transition from non-invasive to invasive behaviors of the tumor can be achieved by increasing ECM rigidity and/or decreasing the strength of cell-cell adhesion. This model, when properly combined with clinical data, in principle enables one to broaden the conclusions drawn from existing medical data, suggest new experiments, test hypotheses, predict behavior in experimentally unobservable situations, be employed for early detection and prognosis, and to suggest optimized treatment strategy for individual patient.

Keywords: heterogeneous microenvironment, invasive solid tumor, cellular automaton, emergent behavior

PACS: 87.15.A–, 87.16.A–, 05.10.–a

DOI: 10.7498/aps.64.058706

† Corresponding author. E-mail: yang.jiao.2@asu.edu