

流体剪切力作用下无间隙连接 成骨细胞阵列内的钙响应

胡漫¹, 李平^{1,2}, 高宇欣¹, 吕东媛¹, 孙树津¹, 龙勉¹, 郭向东³, 霍波¹

(1. 中国科学院力学研究所 微重力重点实验室 生物力学和生物工程中心, 北京 100190;

2. 中国医学科学院 北京协和医院, 北京 100730; 3. 哥伦比亚大学 生物医学工程系, 纽约, 美国)

摘要: 目的 研究间隙连接和 ATP 在力致胞间钙传递过程中各自的作用。方法 首先应用微模式化方法建立无间隙连接的成骨细胞阵列, 再利用流动腔对细胞施加流体剪切力, 观察并分析细胞的钙响应特征参数。结果 细胞间无物理连接时, 仍会出现多个钙响应峰, 但第 1 峰的响应时间与有间隙连接时相比明显加长。除去胞外或胞内钙时, 只有约 40% 的细胞发生钙响应, 且单峰与多峰约各占一半。阻断胞外 ATP 通路后, 只有约 20% 的细胞有钙响应, 且大多为单峰。结论 细胞间的间隙连接不存在时, ATP 是介导细胞间钙传递的主要途径, 说明间隙连接不是细胞间力致钙响应的必需途径。

关键词: 成骨细胞; 流体剪切力; 钙响应; 间隙连接; 信号传导; 生物力学

中图分类号: R 3 文献标志码: A

Calcium response in osteoblastic pattern without gap junction under flow shear stress

HU Man¹, LI Ping^{1,2}, GAO Yu-xin¹, LÜ Dong-yuan¹, SUN Shu-jin¹, LONG Mian¹, GUO X. Edward³, HUO Bo¹ (1. Key Laboratory of Microgravity & Center for Biomechanics and Bioengineering, Institute of Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China; 2. Peking Union Medical College Hospital, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China; 3. Department of Biomedical Engineering, Columbia University, New York, USA)

Abstract: Objective To investigate the specific roles of gap junction and ATP in mechanical stimulation induced-calcium transfer in osteoblasts. Methods The isolated osteoblastic pattern without gap junctions was established by using the micropatterning method. Then fluid shear stress was applied on cells using the flow chamber to observe and analyze the characteristic parameters of calcium response. Results Multiple calcium response still occurred in osteoblastic pattern without gap junction, but the response time to the first responsive peak was much longer than that with gap junction. When the intracellular and extracellular calcium ions were removed, only 40% cells responded to the mechanical stimulation, with single peak and multiple peaks accounting for 50%, respectively. If ATP pathway was blocked, only 20% cells responded, most of which showed single peak. Conclusions ATP was the major pathway mediating intercellular calcium transfer, while the gap junction was not the necessary one.

Key words: Osteoblasts; Flow shear stress; Calcium response; Gap junction; Signal transduction; Biomechanics

收稿日期: 2011-09-01; 修回日期: 2011-09-20

基金项目: 国家自然科学基金委面上项目(30970707) 科技部国家高技术研究发展计划(863 计划) 项目(2009AA02Z407) 国家重点基础研究发展计划(973 计划) 项目(2011CB710904) 中国科学院知识创新工程项目(KJXC2-YW-L08)。

通讯作者: 霍波, Tel: (010) 82544132; E-mail: huobo@imech.ac.cn。

成骨细胞位于骨小梁的表面,可在狭小的空间内形成间隙连接,构成成骨细胞网络^[1]。骨小梁所组成的网状结构的孔隙内充满了液体,当人们活动身体时,来自肌肉的收缩力以及重力会使骨发生变形,从而造成其中的液体流动,进而在细胞表面引起剪切应变^[2-3]。流体剪切力会在成骨细胞上引起包括钙响应在内的诸多生物学响应,最终调控细胞的增殖、凋亡和分化^[4]。

力致钙响应是指施加力学刺激后胞浆内钙离子浓度升高,进入胞浆的钙离子主要来源于细胞内质网(ER)和胞外溶液^[5-6]。胞浆中钙离子浓度约为50 nmol/L^[7],远低于ER(100~700 μ mol/L)^[8]和胞外溶液(α -MEM培养基中约为2 mmol/L)中的钙离子浓度。三磷酸肌醇(IP₃)与ER膜上受体结合会促使ER中的钙离子释放进入胞浆中。当胞浆中钙离子浓度升高到一定程度后,钙离子将回到胞内钙池中直到下一次钙释放。胞外钙可通过膜上离子通道进入胞浆,成骨细胞膜上钙离子通道主要是力学敏感性钙离子通道(MSCC)和L型电压敏感性钙离子通道(L-VSCC)。

力致细胞间钙传递的途径主要是间隙连接和三磷酸腺苷(ATP)。间隙连接是细胞间的连接通道,由两个相邻细胞膜上的连接蛋白半通道对接形成,中心的孔道可直接连通相邻细胞的胞质,该孔道允许分子量小于约1 kD的小分子在细胞间快速(毫秒量级)传递^[9]。当一个骨细胞受力刺激时,间隙连接半通道激活后会引起ATP由胞浆进入胞外溶液^[10-11];进而胞外ATP会通过扩散到达周围细胞,并与细胞膜上的P2能受体结合,激活胞内的IP₃通路,IP₃与ER膜上受体结合,引起胞内ER中钙离子的释放^[12]。

本课题组在此前的研究中利用自组装分子单层技术(SAMs)成功建立了具有功能化间隙连接的成骨细胞系MC3T3-E1的网络,并利用流动腔技术对其施加流体剪切刺激^[13]以及利用原子力显微镜(AFM)的探针对单细胞施加压力刺激^[14-15]。该研究表明,间隙连接和ATP扩散都是流体剪切刺激导致的钙信号传导的途径,但ATP的扩散对力致钙信号在成骨细胞间的传递更为关键。应用试剂18 α -GA(18 α -glycyrrhetic acid)来阻断间隙连接所主导的成骨细胞间钙信号的传导,这种GA的衍生

物可与细胞膜蛋白结合来发挥其阻断作用^[16]。但受力刺激细胞内的ATP可经由细胞膜上的半通道(还可与相邻细胞膜上的半通道组成间隙连接)释放进入胞外溶液,而有研究表明18 α -GA亦可阻断ATP的释放^[17];因此,使用18 α -GA阻断间隙连接时有可能也同时阻断了ATP的释放,实际上耦合了ATP传导途径。为了更清晰地证明间隙连接在成骨细胞间钙传递过程的作用,本文构建了无直接物理连接的成骨细胞阵列。如果此时细胞间力致钙信号传递的时空特性与有功能化间隙连接的细胞网络一致,则证明间隙连接是非必需的;进一步在无直接连接的成骨细胞阵列内阻断ATP,如果仍不能观察到钙传递,则可证明ATP为成骨细胞间力致钙信号传递的唯一途径。

1 材料与方法

1.1 成骨细胞阵列

首先将十八硫醇分子和HS-C11-EG3硫醇分子利用微模式化方法以及自组装分子单层技术在镀金玻片表面构建可黏附和不可黏附蛋白的区域。具体方法可参见本课题组此前的论文^[13]。可黏附蛋白的区域为具有4个矩形枝条的圆岛,枝条宽度为2 μ m,长度为15 μ m,圆岛直径为15.7 μ m,圆心之间距离为95.7 μ m(见图1(a))。将成骨样细胞MC3T3-E1接种于此模式化表面,细胞会在有枝条的圆岛上铺展生长(见图1(b))。由于非黏附性硫醇分子的限制,细胞间将不能形成物理连接,即间隙连接。细胞培养液为含10% FBS和1% P/S的 α -MEM,接种后培养24 h再进行下一步的钙染色实验。

1.2 胞内钙的染色及力致钙响应测量

利用绿色荧光染料Fluo-4 AM标记胞浆中的钙离子,具体方法是将已经接种成骨细胞的玻片与5 μ mol/L Fluo-4 AM常温下孵育2 h,然后用培养液清洗3遍。将玻片置于一个自制流动腔内,设置蠕动泵以使平板流动腔内的细胞表面产生2 Pa的稳定流体剪切力。利用倒置显微镜(OLYMPUS IX71)和CCD相机进行实时录像,记录细胞内钙信号的动态变化过程。整个操作过程中动作尽量轻柔以避免细胞内发生钙响应,并且录像前将流动腔在显微镜下静置20 min以使胞内钙离子水平达到稳定平衡

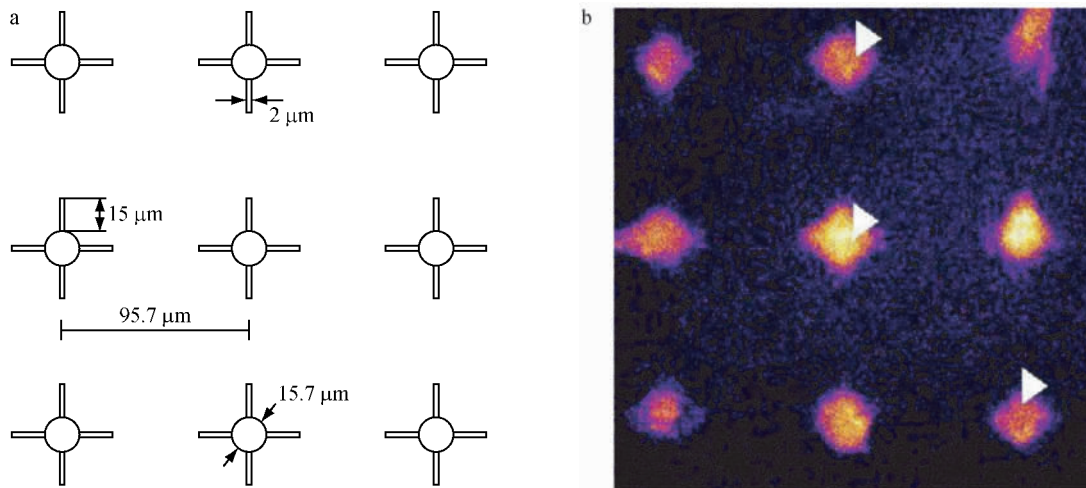


图1 细胞阵列的设计与钙响应 (a) 可黏附细胞区域的几何尺寸 (b) 流体剪切力作用下成骨细胞阵列内钙响应的荧光图(伪彩), 箭头所示为正在发生钙响应的细胞

Fig.1 Design of a pattern in osteoblasts and calcium response (a) Geometric parameters of the islands capable of adhering cells, (b) Fluorescent images in pseudo-color of calcium response in osteoblastic pattern without physical connections under flow shear stress, in which the arrowheads highlight the responding cells

状态。录像 1 min 后施加剪切力 9 min, 每 3 s 拍摄 1 张图片。然后将每一时刻某个细胞的荧光强度除以未加剪切时荧光强度的平均值, 从而得到胞浆内钙离子浓度的相对比值, 绘出钙响应曲线后对相应参数进行后续的分析。

1.3 实验组

为了确定细胞间力致钙响应和传递的钙源及传递途径, 利用不同化学试剂设计如下实验组来加以研究: (1) 对照组不加入任何化学试剂 (Untreated); (2) 应用无钙细胞培养液 (Invitrogen 公司) 除去胞外溶液中的钙 (Ca-free); (3) 利用 $1 \mu\text{mol/L}$ thapsigargin (TG, Sigma-Aldrich 公司) 耗尽胞内钙源——内质网 (ER) 内的钙离子 (TG); (4) $100 \mu\text{mol/L}$ suramin (Sigma-Aldrich 公司) 被用来阻断胞外溶液中的 ATP 分子与细胞表面 P2 能受体的结合, 从而抑制 ATP 对细胞钙响应的影响。在细胞与 Fluo-4 孵育时加入以上试剂共同作用 2 h, 清洗玻片和进行流体刺激时也分别包含上述试剂。

1.4 实验数据的统计分析

所有数据采用平均值 \pm 标准误差来表示。采用单因素方差分析 (ANOVA) 检验不同实验组间平均值的差异, 以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

由连续拍摄的荧光照片的荧光强度的变化可以测量得到胞浆中钙离子浓度的变化。对于未加化学试剂的实验组 (见图 1(b)), 接种于无物理连接小岛上的成骨细胞受到流体剪切力刺激后, 多数细胞胞浆中的钙离子浓度升高, 到达一个峰值后衰减。如升高或衰减的幅值大于未加剪切力时钙离子浓度平均变化幅值的 5 倍, 则认为形成一个钙响应峰。有些细胞可以响应多次 (见图 1(b) 中箭头所示细胞) 表现在钙响应曲线上是形成多个钙响应峰 (见图 2(a))。由典型钙响应曲线还可看到, 加入无钙培养基、TG (除去胞内钙) 和 Suramin (阻断 ATP) 后, 发生钙响应的细胞明显减少, 但也有细胞可发生单峰或多峰钙响应 (图 2(b) ~ (d))。

发生钙响应细胞的百分比和分布分别如图 3(a) 和 (b) 所示。可以看到不加任何阻断剂时, 约有 80% 的细胞会发生钙响应, 且有 60% 会出现多个钙响应峰。除去胞外或胞内钙时, 只有约 40% 的细胞发生钙响应, 其中单峰与多峰各占一半左右。阻断胞外 ATP 通路后, 只有约 20% 的细胞有钙响应, 且基本为单峰响应。如果将未发生钙响应细胞的响应峰数目计为 0, 则所有细胞的平均钙响应峰数目反

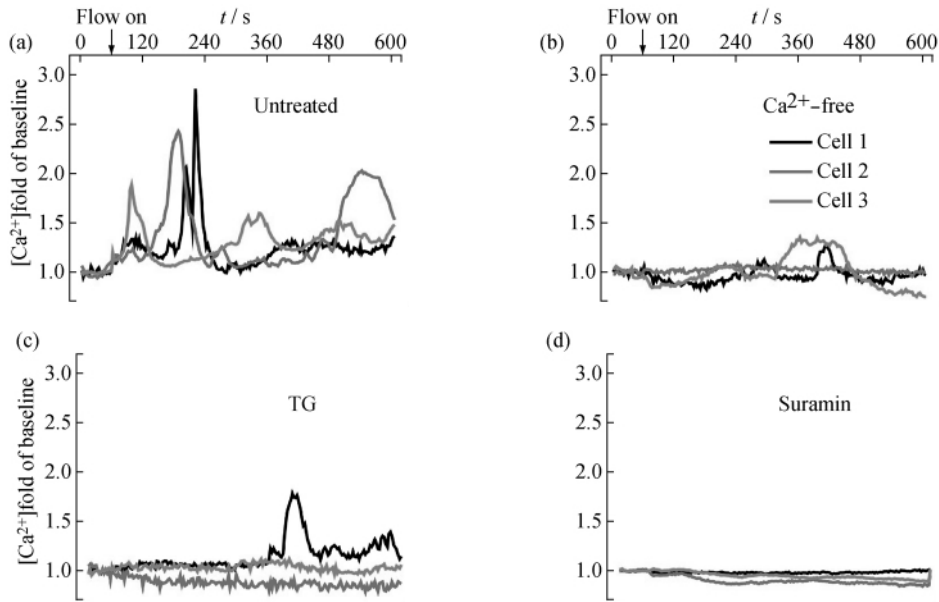


图2 不同实验组的典型钙响应曲线 (a) 对照组 (b) 无钙培养液组 (c) Thapsigargin 组 (d) Suramin 组
 Fig.2 The typical calcium response curves of different groups (a) Untreated control group , (b) Calcium-free medium group , (c) Thapsigargin group ,(d) Suramin group

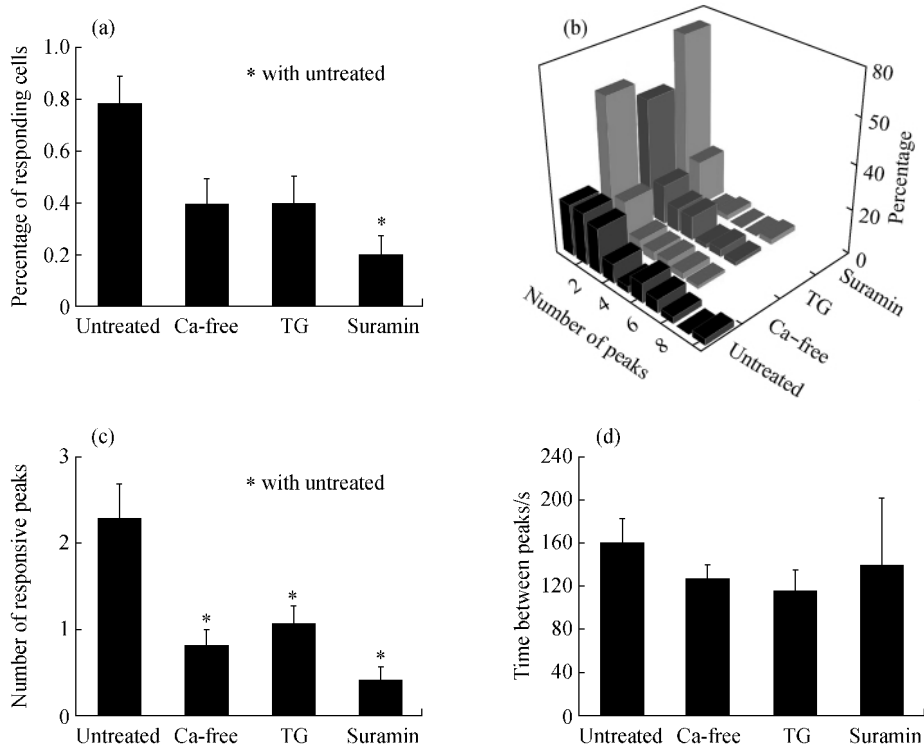


图3 细胞的力致钙振荡特性 (a) 不同实验组发生钙响应细胞的百分比 ,(b) 响应峰数目的分布 ,(c) 平均响应峰数目 ,(d) 多峰情况 (≥ 2) 下峰间平均时间间隔
 Fig.3 The property of mechanically induced-calcium oscillation in osteoblasts (a) The percentage of responding cells ,(b) The distribution of responsive peaks ,(c) The average number of responsive peaks ,(d) The time intervals between multiple peaks (≥ 2) for different groups

映了力致钙振荡特性(见图3(c))。未加化学试剂时细胞的平均钙振荡次数大于2次,耗尽胞内钙池后约为1次,而除去胞外钙或阻断ATP时低于1次。对于出现2次以上钙响应峰的峰间时间进行统计分析发现各组间无显著差异,时间范围在120~160s左右(见图3(d))。

不加化学试剂时,本文中无间隙连接情况下第

1个钙响应峰的反应时间约为100s,除去胞外和胞内钙后第1峰反应时间分别为136s和181s,但阻断ATP后反应时间为241s,与未加试剂组相比具有显著差异(见图4(a))。各实验组的第1峰的衰减时间无显著差异,变化范围29~86s(见图4(b))。第1峰的幅值各组间也无显著差异,都低于1.5(见图4(c))。

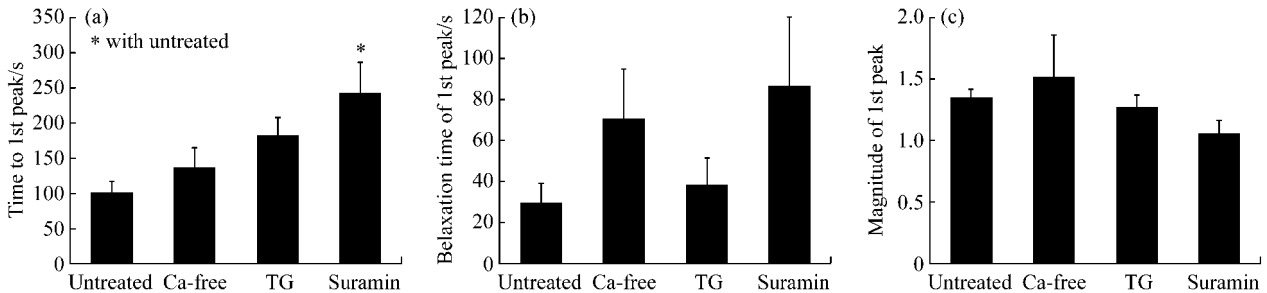


图4 细胞钙响应对力学刺激的敏感性 (a) 不同实验组的第1个钙响应峰的反应时间 (b) 衰减到50%的时间 (c) 峰值
Fig. 4 Sensitivity of osteoblasts to mechanical stimulation (a) Time to the first peak, (b) Time to 50% relaxation point of the first peak, (c) Magnitude of the first peak for different groups

3 讨论

本文利用自组装分子单层方法构建了无间隙连接的成骨细胞阵列。细胞接种于带有矩形长枝条的圆岛上,枝条之间的边-边距离为50 μm ,岛间的非蛋白黏附分子区域可保证细胞间不会形成直接的物理接触。选用带有枝条形状的小岛是为了保证黏附于其上的细胞维持其正常细胞表型。本课题组另外一项工作已经证明随机培养的细胞凋亡率仅为8%,接种于面积为314 μm^2 的圆形小岛上的细胞在接种24h后会有一半进入凋亡,而接种于同样面积的带有枝条的小岛上的细胞只有20%的细胞会进入凋亡。有意思的是,本文中不加任何化学试剂时有80%的细胞会发生力致钙响应,可能说明未进入凋亡的细胞都可以对力学刺激产生响应。

本文结果显示成骨细胞间无间隙连接时钙响应仍有明显的多峰现象,加入Suramin阻断胞外溶液中ATP与膜上受体的结合后只有20%的细胞发生钙响应且多为单峰,说明钙响应多峰的主要机制是由ATP在胞外溶液中扩散并进而引起胞内钙释放,而间隙连接对细胞间钙传递是非必需的。这与本课题组此前的一系列工作的结果是一致的^[13-15]。

Hung等的结果表明,当使用新霉素(neomycin)抑制 IP_3 的生成时^[6],流体剪切力在成骨细胞内的钙响应被完全抑制。因为 IP_3 是ATP引起胞内钙释放的信号途径上的必需分子,进一步证明本文结果中Suramin确实阻断了ATP介导的钙响应。而约20%的细胞出现单峰可能是剪切力引起细胞膜变形,进而激活膜上MSCC通道导致一部分胞外钙直接流入胞浆,最终产生钙响应(见图5)。

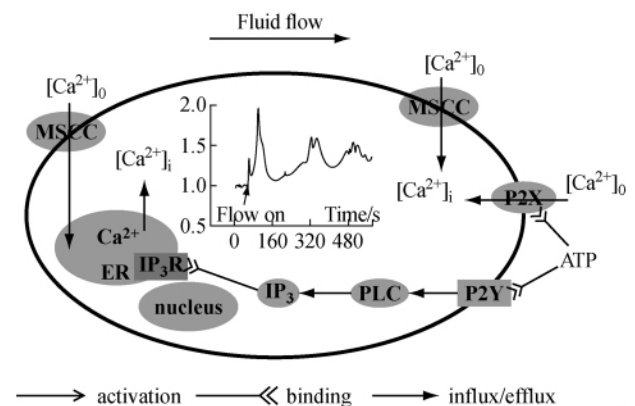


图5 流体剪切力引起成骨细胞胞内钙响应的信号传导示意图
Fig. 5 Schematic diagram of signaling transduction of calcium response in an osteoblast under fluid shear stress

本课题组^[13] 研究结果显示,有间隙连接细胞的第1峰响应时间约为40 s,第2峰距第1峰的时间约为110 s。而本文显示无间隙连接时,第1峰的响应时间长达100 s,说明间隙连接存在时钙响应速度要快得多。这种响应速度的差异的可能原因之一是有间隙连接时胞浆中钙离子会经由间隙连接传递到周围细胞。但是由于未加剪切时胞浆中的钙离子浓度很低,所以更可能的原因是有间隙连接时细胞铺展较好,导致膜上钙离子通道在力学刺激下更易激活,从而引起快速的胞外钙内流。而无物理连接时,未充分铺展的细胞形态可能影响膜表面钙离子通道,导致胞外钙不易流入,进而造成钙响应变慢,响应时间增长。使用无钙培养基时,由于胞内钙和ATP仍存在,故仍会发生单峰或多峰的钙响应。但一些工作已经证明^[12-13] 胞外钙可能是成骨细胞中力致钙响应的触发源,没有胞外钙的进入,胞内钙池的钙也不能释放进入胞浆;文献[10]中研究表明,胞外钙内流是ATP释放的必要条件,进而可以影响细胞间的钙传递。因此,这可能是使用无钙培养基时约60%细胞不发生响应的原因。当利用TG提前耗尽ER中的钙时,本文结果显示无间隙连接的细胞仍有约40%发生响应,其中单峰和多峰各占一半。如前所述,Suramin组中一部分胞外钙可直接进入胞浆,进而导致仍有20%的细胞有单峰响应,故可能说明TG组中一部分钙响应峰(特别是单峰)可能来自直接流入胞浆的胞外钙,具体途径可能是剪切力激活膜上MSCC通道和ATP与P2X7作用分别引起的直接钙内流^[18];而另外一部分钙响应峰(特别是多峰)可能是胞外钙流入ER,补充ER中的钙离子,后者在ATP的作用下再释放进入胞浆,从而产生多个响应峰(见图5)。

参考文献:

- [1] Civitelli R. Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2008, 473(2): 188-192.
- [2] McGarry JG, Klein-Nulend J, Mullender MG, et al. A comparison of strain and fluid shear stress in stimulating bone cell responses—A computational and experimental study [J]. *FASEB J*, 2005, 19(3): 482-484.
- [3] Weinbaum S, Cowin SC, Zeng Y. A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses [J]. *J Biomech*, 1994, 27(3): 339-360.
- [4] Zayzafoon M. Calcium/calmodulin signaling controls osteoblast growth and differentiation [J]. *J Cell Biochem*, 2006, 97(1): 56-70.
- [5] Chen NX, Ryder KD, Pavalko FM, et al. Ca(2+) regulates fluid shear-induced cytoskeletal reorganization and gene expression in osteoblasts [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000, 278(5): C989-997.
- [6] 霍波, 康英永, 胡漫, 等. 成骨细胞力致钙响应和钙传递的研究进展 [J]. *医用生物力学*, 2011, 26(4): 382-388.
Huo B, Kang YY, Hu M, et al. Advances of mechanical stimulation induced calcium response and transfer in osteoblasts [J]. *J Med Biomech*, 2011, 26(4): 382-388.
- [7] Godin LM, Suzuki S, Jacobs CR, et al. Mechanically induced intracellular calcium waves in osteoblasts demonstrate calcium fingerprints in bone cell mechanotransduction [J]. *Biomech Model Mechanobiol*, 2007, 6(6): 391-398.
- [8] Foskett JK, White C, Cheung KH, et al. Inositol trisphosphate receptor Ca²⁺ release channels [J]. *Physiol Rev*, 2007, 87(2): 593-658.
- [9] Shapiro F. Variable conformation of GAP junctions linking bone cells: A transmission electron microscopic study of linear, stacked linear, curvilinear, oval, and annular junctions [J]. *Calcif Tissue Int*, 1997, 61(4): 285-293.
- [10] Genetos DC, Geist DJ, Liu D, et al. Fluid shear-induced ATP secretion mediates prostaglandin release in MC3T3-E1 osteoblasts [J]. *J Bone Miner Res*, 2005, 20(1): 41-49.
- [11] Genetos DC, Kephart CJ, Zhang Y, et al. Oscillating fluid flow activation of gap junction hemichannels induces ATP release from MLO-Y4 osteocytes [J]. *J Cell Physiol*, 2007, 212(1): 207-214.
- [12] Hung CT, Allen FD, Mansfield KD, et al. Extracellular ATP modulates [Ca²⁺]_i in retinoic acid-treated embryonic chondrocytes [J]. *Am J Physiol*, 1997, 272(5 Pt 1): C1611-1617.
- [13] Huo B, Lu XL, Hung CT, et al. Fluid flow induced calcium response in bone cell network [J]. *Cell Mol Bioeng*, 2008, 1(1): 58-66.
- [14] Huo B, Lu XL, Costa KD, et al. An ATP-dependent mechanism mediates intercellular calcium signaling in bone cell network under single cell nanoindentation [J]. *Cell Calcium*, 2010, 47(3): 234-241.
- [15] Huo B, Lu XL, Guo XE. Intercellular calcium wave propagation in linear and circuit-like bone cell networks [J]. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci*, 2010, 368(1912): 617-633.
- [16] Guo Y, Martinez-Williams C, Gilbert KA, et al. Inhibition of gap junction communication in alveolar epithelial cells by 18alpha-glycyrrhetic acid [J]. *Am J Physiol*, 1999, 276(6 Pt 1): L1018-1026.
- [17] Riddle RC, Taylor AF, Rogers JR, et al. ATP release mediates fluid flow-induced proliferation of human bone marrow stromal cells [J]. *J Bone Miner Res*, 2007, 22(4): 589-600.
- [18] Naemsch LN, Dixon SJ, Sims SM. Activity-dependent development of P2X7 current and Ca²⁺ entry in rabbit osteoclasts [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(42): 39107-39114.