

力的调节?相应的力-化学信号通路为何?利用钙流作为活化指标对上述科学问题进行探索,这将有助于更深入地了解循环白细胞炎症响应免疫应答过程。方法:将检测活细胞钙离子水平的荧光染料(Fluo-4 AM)转入到新鲜提取的人PMN中。使这些PMN(1×10^6 /mL)溶液以不同的流体剪应力($0.2 \sim 6 \text{ dyn/cm}^2$)流经铺有单独的P-选择素($10 \mu\text{g/mL}$),P-选择素($10 \mu\text{g/mL}$)混合ICAM-1($5 \mu\text{g/mL}$)或者单独的ICAM-1($5 \mu\text{g/mL}$)的流动腔,或以静息孵育的方式放置于上述流动腔,然后通过荧光摄像机实时记录(20 fps)黏附下来的嗜中性粒细胞的荧光强度随时间的变化。其中单独ICAM-1实验组的PMN事先用10 mM Mg 离子预激活整合素。首先通过对比1%BSA或者空白底面的结果进行特异性实验证明。然后在不同的控制条件中分别加入了细胞骨架松弛剂和酯伐破坏剂,并已排除了DMSO对实验结果的影响。结果:只有当存在流体剪切力时,PMN黏附在P-选择素,P-选择素混合ICAM-1或者ICAM-1才会发生明显的钙响应,并且相对于静息条件钙响应的激活时间大大缩短,峰值强度和激活概率明显提高。并且这些钙响应属于特异性的由黏附分子介导产生的。通过对比钙响应激活时间发现,P-选择素激活PMN钙响应需要(78 ± 3) s,明显长于P-选择素混合ICAM-1介导的(50 ± 2) s,以及ICAM-1介导的(48 ± 4) s,这说明P-选择素混合ICAM-1介导的PMN钙响应来自于P-选择素先快速激活整合素,然后整合素结合ICAM-1导致的。通过加入不同的抑制剂发现,细胞骨架的抑制使黏附在P-选择素混合ICAM-1上的PMN的钙响应激活时间发生了明显延长,峰值强度和激活概率发生了明显下降。而酯伐的破坏并没有影响黏附在P-选择素混合ICAM-1上PMN钙响应的激活时间,峰值强度以及激活概率。结论:流体剪切力是PMN黏附到P-选择素,P-选择素混合ICAM-1或者ICAM-1产生特异性钙响应的重要开关。P-选择素通过细胞骨架快速激活PMN上整合素,这一传导途径不依赖于脂筏。(国家自然科学基金资助项目,Nos.31170887,11272125,11432006)

β_2 整合素 I domain 构象稳定性的微观结构基础

张 潇,毛德斌,吕守芹,李 宁,章 燕,龙 勉*

中国科学院微重力重点实验室,中国科学院力学研究所生物力学与生物工程中心,
中国科学院力学研究所工程化构建与力学生物学北京市重点实验室,北京 100190

* E-mail: mlong@imech. ac. cn; Tel: 010-82544131

整合素分子是由 α 、 β 两亚基构成的异源二聚体细胞黏附分子,其中表达在白细胞表面的 β_2 整合素家族成员LFA-1、Mac-1与 $\alpha_x\beta_2$ 在炎症反应过程中参与介导白细胞在血管内皮细胞的滚动、黏附与爬行。该3种分子 β 亚基相同, α 亚基高度同源,均可通过其头部的I domain与共同配体ICAM-1结合,然而其结合能力存在差异,并且介导炎症级联反应的不同阶段。结构决定功能,鉴于3种不同 β_2 整合素不同生物学功能的微观结构基础尚不清楚,有必要深入认识它们之间的结构差异。

基于此,采用分子动力学模拟手段,针对LFA-1、Mac-1、 $\alpha_x\beta_2$ 分子I domain进行平衡及拉伸分子动力学模拟,考察三者之间的稳定性差异及相应结构基础。结果表明:(1)三者之间存在稳定性差异,稳定性从低到高顺序依次为LFA-1 > Mac-1 > $\alpha_x\beta_2$,其稳定性主要表现在I domain α_7 螺旋的变构难易程度。在平衡模拟过程中LFA-1可在短时间内自发地由低亲合态(LA)向中间亲合态(IA)变构,Mac-1发生变构的频率和程度均低于LFA-1,而 $\alpha_x\beta_2$ 则在模拟时间内没有发生变构。在力致变构过程中,同样外力作用下, α_7 螺旋发生变构所需要的时间同样反映其稳定性,结果显示和平衡过程一致的趋势。而且,在力致变构过程中, α_7 螺旋自身的去折叠程度也呈现和稳定性一致的趋势。(2)通过进一步结构分析,发现三种分子体系均通过两对盐桥相互作用对其 α_7 螺旋进行约束,而LFA-1体系的盐桥相互作用最弱,与其变构难易程度成正比。另外,通过序列比对,发现对于308、309位氨基酸LFA-1与Mac-1、 $\alpha_x\beta_2$ 之间存在位点差别。(3)相应氨基酸突变模拟结果显示,盐桥相应氨基酸突变将进一步降低LFA-1的 α_7 螺旋的稳定性,对Mac-1和 $\alpha_x\beta_2$ 无明显影响。而308、309位氨基酸的互换将一定程度上增强LFA-1 α_7 螺旋的稳定性,同时降低Mac-1 α_7 螺旋的稳定性。本文工作将从微观结构模拟角度为深入理解 β_2 整合素的生

物学功能提供基础。(国家自然科学基金资助项目, Nos. 31230027, 11372332; 国家重点基础研究发展计划项目, No. 2011CB710904; 中国科学院科研装备项目, No. Y2010030)

基底硬度和黏附分子的协同作用对 dHL-60 细胞胞内钙响应的影响

徐艳红, 龚一心, 刘晓锋, 章燕, 龙勉*

中国科学院微重力重点实验室, 中国科学院力学研究所生物力学与生物工程中心,
中国科学院力学研究所工程化构建与力学生物学北京市重点实验室, 北京 100190

* E-mail: mlong@imech.ac.cn; Tel: 010-82544131

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种常见的血管疾病,它由脂质和复合糖类积聚、出血及血栓形成开始,伴有炎性细胞募集、纤维组织增生和钙质沉着等现象,最终导致动脉弹性减低、管腔变窄甚至阻塞动脉腔,严重危害人体健康。动脉粥样硬化等心血管疾病常伴随着血管内皮硬度的变化和炎症反应的加剧。基底硬度或黏附分子不同表达会影响炎症反应中白细胞的跨内皮迁移过程,而且整个跨内皮迁移过程中都伴随着白细胞和内皮细胞内钙响应。但是,对于基底硬度和黏附分子的协同作用对 PMN 内钙响应的研究很少。

本文重点关注力学环境对心血管疾病发生发展的作用,利用先进的生物材料和生物探针技术研究不同基底硬度和黏附分子的协同作用对中性粒细胞胞内钙响应的影响。基于所制备的 0.87、5.00、34.88 kPa 3 种不同硬度的 PA 胶,分别包被黏附分子 E-selectin、ICAM-1、E-selectin + ICAM-1,考察基底硬度和黏附分子的协同作用对于 DMSO 促分化的中性粒细胞(dHL60)内钙响应的影响。实验获得的 dHL60 细胞中钙响应的数据采用奇异谱分析(singular spectrum analysis, SSA)和快速傅里叶变换(fast fourier transform, FFT)的方法进行分析。结果显示:软基底和硬基底对于细胞内钙响应的影响显著不同,硬基底上的钙响应频率更高,响应更强烈。此外,表面黏附分子 E-选择素和 ICAM-1 在细胞感受基底硬度发生钙振荡过程中存在协同促进作用。本文工作对于从细胞水平和分子水平揭示心血管疾病(特别是动脉粥样硬化)发生的本质原因,寻找心血管疾病潜在的药物靶标有重要意义。(国家自然科学基金资助项目, Nos. 31230027, 31270994; 国家重点基础研究发展计划, No. 2011CB710904; 中国科学院先导专项, No. XDA01030604; 国家高技术研究发展计划, No. 2011AA020109)

miR-206-3p 在正压力的作用下通过靶基因 Cebpz 调控肝星状细胞的活化增殖迁移功能

齐峰, 沈思, 朱樑*

上海长征医院, 上海 200003

* E-mail: zhuliangcz@126.com

目的:由多种因素导致肝纤维化,狄氏间隙胶原沉积致肝窦变窄,及肝窦发生毛细血管化等因素,导致肝窦内阻力增高、压力增高,使肝窦的肝星状细胞在增高的正压力作用下活化、增殖与迁移能力增强,后者正是肝纤维化发展到肝硬化、门脉高压症逐步形成的关键因素。可见,肝星状细胞的力学生物学的研究尤为重要。选择 miRNA (一类非编码的小 RNA),通过筛选正压力作用下肝星状细胞表达显著的 miRNAs 并研究其功能,为寻找肝硬化门脉高压发生发展可能的标记物或治疗靶点提供依据。方法:分离原代大鼠肝星状细胞,培养 14 d 加载 10 mmHg 的压力 1 h,通过高通量芯片技术检测出 miR-206-3p 高表达,real-time PCR 的方法验证 miR-206-3p 和 Cebpz 的表达。大鼠 CCL4 造模肝硬化 8 周及门脉压力测定,real-time PCR 的方法检测 miR-206-3p 和 Cebpz 在肝硬化门