

悬浮态上皮细胞粘附的力学-化学耦合模型及数值模拟¹⁾

冯世亮^{*,2)} 周吕文^{*} 吕守芹^{†,**} 龙勉^{†,**}

^{*}(宁波大学机械工程与力学学院, 浙江宁波 315211)

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

^{**}(中国科学院大学工程科学学院, 北京 100049)

摘要 上皮细胞通过局部募集上皮性钙粘附蛋白 (E-cadherin) 建立胞间粘着连接, 实验证实该过程受到肌球蛋白皮层张力的调控. 为了从系统层面阐明粘着连接形成动力学过程, 本文考察皮层张力调控肌动蛋白 (F-actin) 解聚从而参与 E-cadherin 级联转导, 同时以马达-离合器机制模拟两细胞相互作用, 据此构建可反映悬浮态细胞粘附的力学-化学耦合数学模型; 对整体包含随机点源的非线性反应-扩散方程组与平衡微分方程耦合系统采取了自行发展的格子 Boltzmann-粒子法与蒙特-卡洛法数值求解. 数值模拟表明, 由收缩性肌球蛋白 (myosin-II) 拉动胞间 E-cadherin 成键可提升皮层张力, 进而降低 F-actin 解聚速率、锚定更多的 E-cadherin; 所构成的力学反馈回路展现出时空效应, 可帮助 E-cadherin 在接触区建立初始极性; E-cadherin 形成顺式二聚体则将初始极性放大, 导致接触区 E-cadherin 展现起始、快速增长及慢速增长的积聚动力学特征. 皮层呈松散结构时刚度较小, 可通过延长胞间 E-cadherin 成键寿命提升张力, 而接触区弧度适中时 (≈ 1.2 rad) E-cadherin 峰值最高; 两者可分别作为启动力学反馈回路及调控粘着连接成熟度的有效手段.

关键词 粘着连接, 数学模型, 格子玻尔兹曼

中图分类号: Q615 文献标识码: A doi: 10.6052/0459-1879-20-011

MECHANOCHEMICAL COUPLING MODEL AND NUMERICAL SIMULATION FOR CELL-CELL ADHESION IN SUSPENDED EPITHELIAL CELLS¹⁾

Feng Shiliang^{*,2)} Zhou Lüwen^{*} Lü Shouqin^{†,**} Long Mian^{†,**}

^{*}(Ningbo University College of Mechanical Engineering and Mechanics, Ningbo 315211, Zhejiang, China)

[†](Center of Biomechanics and Bioengineering, Key Laboratory of Microgravity (National Microgravity Laboratory), and Beijing Key Laboratory of Engineered Construction and Mechanobiology, Institute of Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

^{**}(School of Engineering Science, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Epithelial cells develop adherens junctions via local recruitment of a transmembrane receptor, named E-cadherin, whose activity is dependent on Ca^{2+} signal. Growing evidences indicate the importance of tensile forces within actomyosin cortex, yet a system-level understanding for the mechanosensitive responses of cell-cell contacts remains

2020-01-10 收稿, 2020-02-27 录用, 2020-02-28 网络版发表.

1) 国家自然科学基金资助项目 (11502272, 11972200).

2) 冯世亮, 讲师, 研究方向: 细胞-分子力学, 植物力学. E-mail: fengshiliang@nbu.edu.cn

引用格式: 冯世亮, 周吕文, 吕守芹, 龙勉. 悬浮态上皮细胞粘附的力学-化学耦合模型及数值模拟. 力学学报, 2020, 52(3): 854-863
Feng Shiliang, Zhou Lüwen, Lü Shouqin, Long Mian. Mechanochemical coupling model and numerical simulation for cell-cell adhesion in suspended epithelial cells. *Chinese Journal of Theoretical and Applied Mechanics*, 2020, 52(3): 854-863

unclear. Here, we constructed a mechanochemical coupling model, in which the tensile forces presented at adherens junctions participated in the interactions between myosin contractility, actin dynamics and local E-cadherin recruitment, which together, formed a mechanical feedback loop (MFL). The mechanical interactions between a pair of epithelial cells were treated by a motor-clutch mechanism. The in-house developed lattice-Boltzmann particle (LBP)-D1Q3 method, which had been embedded with a simple Monte-Carlo method, was adopted to solve the coupled nonlinear reaction-diffusion equations, which had stochastic reaction terms, and were coupled with the equilibrium differential equation. The numerical simulation results indicate that the spatiotemporal effects of MFL may arise an initial anisotropy in the distribution pattern of E-cadherin, which could be further amplified by “cis” interactions between E-cadherins from the same cell surface. The model thus confirms three distinct phases in the profile of E-cadherin accumulation at the center of contact zone, which are initial, rapid increase, and slowly increase, as observed experimentally. Furthermore, local recruitment of E-cadherin can be mechanically regulated by either the elastic modulus of actomyosin cortex or the extent of cell-cell contact, whereupon the highest E-cadherin density takes place at 1.2 rad. Accordingly, decreasing the elastic modulus of actomyosin cortex may thus act as a triggering mechanism for MFL while the length of cell-cell contact is denoted as a controller of the maturity of adherens junctions.

Key words adherens junctions, mathematical model, lattice Boltzmann

引言

上皮细胞 (epithelial cells) 彼此借助粘着连接 (adherens junctions, AJs) 形成连续上皮组织, 由此发挥屏障、增殖调控等生理功能^[1-2]. 上皮性钙粘附蛋白 (E-cadherin, E-cad) 作为一种跨膜蛋白, 是调控 AJs 形成的核心分子机制^[3]. 一方面, E-cad 胞外结构域在 Ca^{2+} 参与下, 在胞间或同一细胞表面分别形成反式/顺式二聚体 (trans-/cis-dimerization)^[4], 其胞质结构域则借助 α , β 连环蛋白 (α -, β -catenin) 与肌动蛋白 (F-actin) 锚定^[5]; 另一方面, 胞间 E-cad 成键引起 Rac, Cdc42 等 Rho 家族小 G 蛋白 (Rho GTPase) 激活^[6], 进而激活下游 F-actin 结合蛋白 (例如: Arp2/3, myosin-II, α -actinin), 调控肌球蛋白皮层 (actomyosin cortex) 动态重组^[7-9], 由此将更多 E-cad 募集至细胞接触区域, 促使 AJs 成熟^[10].

近年来, 随着体外重构 (*in vitro* reconstitution)、活细胞成像等实验手段的广泛应用, 研究者愈渐认识到皮层张力对于 AJs 建成起整合性调控作用. Murrell 等^[11] 将 F-actin 积簇于脂质双层膜表面, 再加入 α -actinin、myosin-II, 由此可体外重构出 actomyosin 皮层结构; 该实验借助改变 F-actin 结合蛋白的密度控制皮层流变属性, 通过检测 F-actin 持续长度论证了 F-actin 屈曲及皮层松散结构可有效增强收缩应变. Wu 等^[12] 对 AJs 上粘着小带 (zonula adherens, ZA) 及侧边区域 (lateral junctions) 进行激光烧灼, 观测到前者

回缩速率明显高于后者, 说明 ZA 区域维持着较高张力. Leerberg 等^[9] 将 myosin 常规轻链基因 (MRLC-DD) 转入 Caco-2 细胞, 使之表达 myosin-II 磷酸化突变体以提升皮层张力, 最终通过靶向实验验证了以 α -catenin 受力打开 VH2 结构域、从而募集 vinculin 为主体的张力敏感型 F-actin 聚合机制. Engl 等^[13] 将悬浮态 S-180 细胞置入非粘附微井 (microwell) 之中, 采取 3D 成像观测细胞接触区域 E-cad 募集, 同时以 F-actin 解聚/稳定试剂 (Latrunculin/Jasplakinolide) 处理细胞进行对照组实验; 观测到两类经处理细胞均呈现低张力状态, Jasplakinolide 对照组依然发生 E-cad 局部募集, 说明张力通过降低 F-actin 解聚速率调控 E-cad.

综合上述实验, E-cad 胞间成键使细胞皮层局部张力增强, 进而降低 F-actin 解聚速率 (亦或提高局部 F-actin 聚合速率). 考虑到 F-actin 局部积聚能锚定更多 E-cad, 那么由 “E-cad \rightarrow 张力 \rightarrow F-actin” 力学反馈回路所展现出的时空效应是否驱动了 E-cad 局部积聚, 进而调控 AJs 形成动力学? 为此, 本文构建了悬浮态上皮细胞粘附的力学-化学耦合模型, 并采用格子 Boltzmann-粒子 (LBP) 法开展数值模拟. 模拟获得了悬浮态细胞相互挤压时的 E-cad, F-actin 等分子时空调控特征并与 Chu 等^[14] 实验对比, 继而探讨了细胞局部力学属性、细胞间挤压程度对于 AJs 的调控作用.

1 模型和方法

整体计算模型如图 1(a) 所示. 考虑细胞为环状结构, 圆环代表细胞膜 (指质膜及皮层紧密贴合体), 内部为胞质区域, 忽略细胞核等胞内细胞器; 将细胞膜划分为非接触及接触区域, 前者直接设定为由黏壶与弹簧并联的黏弹性单元, 后者需额外考察细胞间相互作用. 为考察分子沿可变形的细胞膜运输引入了自适应性 D1Q3 单元, 其长度与力学单元动态匹配. 胞质内分子浓度均一, 可由质量守恒定律直接获得. 图 1(b) 展示皮层张力调控 F-actin 解聚, 而 F-actin 通过锚定 E-cad 参与级联转导, 由此循环往复构成了力学反馈回路. 图 1(c) 展示采用马达-离合器 (motor-clutch) 机制^[15] 考察细胞在相互接触区的力学作用. 整体数学模型由 3 个模块构成: 细胞力学模块、E-cad/E-cad* 调控模块 (* 号表明已与 F-actin 锚定) 及 F-actin 聚合/解聚模块. 各模块的基本假设及控制方程如下.

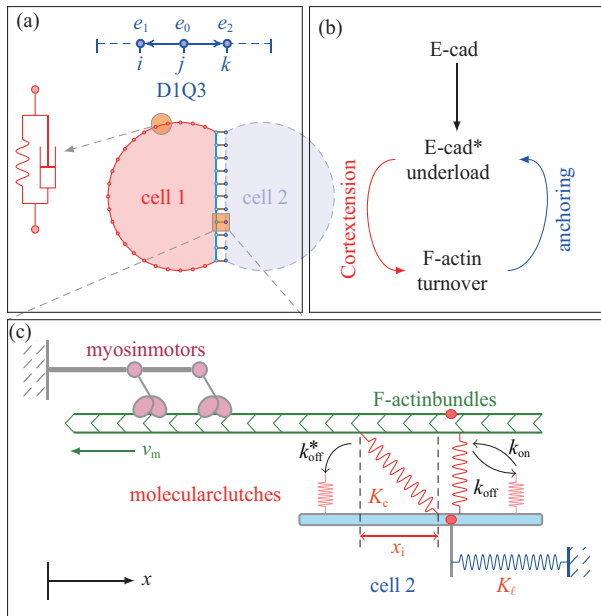


图 1 (a) 细胞离散模型. 黏弹性单元与 D1Q3 单元 (1 维 LBM 单元, 包含 3 个速度分量) 动态匹配. (b) 力学反馈回路示意图. (c) 马达-离合器机制^[15]

Fig. 1 (a) Discrete cell model. Each visco-elastic element is co-localized with a D1Q3 element (a 1D LBM element with 3 discrete velocity components). (b) Schematic of mechanical feedback loop.

(c) Motor-clutch mechanism^[15]

1.1 细胞力学模块

考察悬浮态上皮细胞具有均匀的力学属性, 离散细胞模型上任意单元节点 i 的受力满足以下平衡

微分方程

$$\frac{\partial(E_1 + E_b + E_s)}{\partial x} + F_{\text{vis},i} + F_{\text{drag},i} + F_{\text{ext},i} = 0 \quad (1)$$

上式中, 第一项是保守力, 由能量函数 (E_v) 对位置坐标 (X) 求偏导获得

$$E_1 = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \left(\frac{l_i - l_0}{l} \right)^2 \quad (2a)$$

$$E_b = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n K_b \tan^2 \left(\frac{\theta_i - \theta_0}{2} \right)^2 \quad (2b)$$

$$E_s = \frac{1}{2} K_s \left(\frac{s - s_e}{s_e} \right)^2 \quad (2c)$$

式 (2a) 计算拉伸势能 (E_1), l_i 是 i 单元实际长度, l_0 是平衡长度, K_1 是弹簧刚度系数; 式 (2b) 计算弯曲势能 (E_b), θ_i 是第 i 个弹簧角度, θ_0 是平衡角度, K_b 是弹簧弯曲刚度; 式 (2c) 计算面积约束势能 (E_s), s 和 s_e 分别是细胞当前面积及平衡面积, K_s 是罚系数 (penalty coefficient), 取 $K_s \gg \max(K_1, K_b)$, 将细胞面积变化控制在 1%. 第二项考察单元节点 i 和 j 受到与节点相对速度相反的黏性力, $F_{\text{vis},i} = -\gamma(v_i - v_j)$, γ 是黏性系数. 第三项是细胞接触区摩擦阻力, $F_{\text{drag},i} = -\mu v_i$, μ 为动摩擦系数, 第四项即为外力项.

1.2 E-cad/E-cad* 调控模块

E-cad (E_m) 沿细胞膜扩散并借助 F-actin 锚定为 E-cad* (E_1), E-cad* 又可局部形成顺式二聚体. 该过程可通过非线性反应-扩散方程组描述为

$$\frac{\partial E_1}{\partial t} = D_1 \nabla^2 E_1 + (\alpha w E_m - \beta E_1) + \frac{\partial E_1^2}{K_E^2 + E_1^2} E_m \quad (3a)$$

$$\frac{\partial E_m}{\partial t} = D_m \nabla^2 E_m - (\alpha w E_m - \beta E_1) - \frac{\partial E_1^2}{K_E^2 + E_1^2} E_m \quad (3b)$$

式 (3a) 中, 右侧第一项是扩散项, D_1 是 E-cad* 在细胞膜上扩散系数; 第二项体现 F-actin 介导 E-cad、E-cad* 相互转化源项, w 是 F-actin 密度, α 及 β 分别为 E-cad 与 F-actin 结合及 E-cad* 还原成 E-cad 速率; 第三项体现 E-cad* 通过形成顺式二聚体对自身密度反馈, θ 是反馈速率, K_E 是饱和系数. 式 (3b) 中, D_m 是 E-cad 扩散系数 ($D_m > D_1$), 后两项与式 (3a) 符号相反是基于 E-cad* 与 E-cad 总质量守恒. E-cad* 在胞间成键可采用受体-配体结合方程予以描述.

$$R + L \xrightleftharpoons[k_-]{k_+} RL \quad (4)$$

式中, R 和 L 分别代表受体、配体, RL 为受配体复合物.

依据马达-离合器机制^[15], 单个马达分子与 F-actin 结合可施加的力为 F_m , 驱动 F-actin 以速率 v_m 回缩, 同时引起 E-cad* 成键受拉. t_0 时刻, 假设节点 j 上有 $n_{c,j}$ 个 E-cad* 成键、 $n_{m,j}$ 个与 F-actin 结合的 myosin-II, 该节点所受力 $F_{C,j}$ 满足

$$F_{C,j} = \sum_{i=0}^{n_{c,j}} F_{c,i} = K_c \sum_{i=1}^{n_{c,j}} x_{c,j} = k_1 x_{s,j} \quad (5)$$

式中, $F_{c,i}$ 是第 i 个键上的拉伸力, 等于该键净拉伸量 (x_i) 与键刚度 (K_c) 乘积; $F_{C,j}$ 与此处皮层张力平衡, 可由节点位移 $x_{s,j}$ 、皮层刚度 K_1 计算. $t_0 + 1$ 时刻, 根据 Bell 模型更新第 i 个键的解离系数

$$k_{\text{off}}^{t_0+1} = k_{\text{off}}^0 \exp\left(\frac{F_{c,i}}{F_b}\right) \quad (6)$$

式中, F_b 是特征断裂力, k_{off}^0 是 0 载荷时的解离系数. 随后依据力-速度 (force-velocity) 关系^[15] 更新回缩速率

$$v_{m,j}^{t_0+1} = v_m \left(1 - \frac{F_{C,j}}{n_{m,j} F_m}\right) \quad (7)$$

1.3 F-actin 聚合/解聚模块

单根 F-actin 在刺端 (pointed end) 解聚为单体 G-actin, 用以供给钩端 (barbed end) 聚合, 从而以“踏车”(treadmilling) 的方式更新^[16-17]. 细胞接触区域 Rac 信号增强, 通过激活 Arp2/3 产生新的钩端, 使得接触区 F-actin 聚合速率加快, 由此将单根 F-actin 的“踏车”行为扩展至全局. 简便起见, 将活性态 Rac 信号 (\tilde{R}) 考虑为以接触中心 (Ct) 起始, 呈指数衰减函数, 即

$$\tilde{R}(i) = R_r + \frac{R_h - R_r}{e} e^{1+5x_i} \quad (8)$$

式中, R_h, R_r 分别为细胞前端、后部 Rac 活性系数, x_i 为 i 节点到细胞前部水平距离.

F-actin (w)、钩端 (B) 密度随时空调控可描述为

$$\frac{dw}{dt} = D_1 \nabla^2 w + v g B - d_F w \quad (9a)$$

$$\frac{dB}{dt} = D_1 \nabla^2 B + \tilde{R} a_m + k_b - c B \quad (9b)$$

式 (9a) 中, 右侧第一项表征 F-actin 在细胞膜上缓慢扩散, 第二项为 F-actin 聚合反应项, v 是单个钩端聚合 G-actin (密度为 g) 速率; 第三项是受张力调控 F-actin 解聚, 取 $d_F = d_{\text{max}} - d_\tau \left(\frac{F_\tau}{F_{\text{half}}^2 + F_\tau^2}\right)$, d_{max} 为最大解聚速率. $F_\tau \approx 0$ 时, $d_F \approx d_{\text{max}}$; $F_\tau \gg F_{\text{half}}$ 时, $d_F \approx d_{\text{max}} - d_\tau$.

式 (9b) 中, a_m 是细胞膜上 Arp2/3 密度, $\tilde{R} a_m$ 即表征由 Rac 调控钩端生成. a_m 与胞质游离态 Arp2/3 (a_c) 相互转化过程由式 (4) 描述, 即: a_m, B, a_c 分别对应于 RL, R, L . 后两项中, k_b, c 分别是钩端生成及移除的基准速率.

2 数值方法

整体数学模型由平衡微分方程及反应-扩散方程组构成, 属于力学-化学耦合问题, 可采取 LBP 法求解^[18]. LBP 是将 LBM 与粒子 (particle) 法耦合, 其中 LBM 程序计算的基本内容是令“迁移”和“碰撞”两个步骤交替循环进行.

(1) 碰撞

$$f'_{v,\alpha}(x, t) - f_{v,\alpha}(x, t) = \Omega \quad (10a)$$

(2) 迁移

$$f_{v,\alpha}(x + e_\alpha \Delta t, t + \Delta t) = f'_{v,\alpha}(x, t) \quad (10b)$$

式 (10) 中, $f_{v,\alpha}(x, t)$ 是定义在离散速度方向集 $\{e_\alpha\}$ 上的瞬时粒子分布函数; D1Q3 单元的 e_α 取为

$$e_\alpha = \begin{cases} 0, & i = 0 \\ \cos(i\pi - \pi), & i = 1, 2 \end{cases} \quad (11)$$

Ω 是碰撞算符, 由反应项 (Ω^R) 及非反应项 (Ω^{NR}) 构成, 即: $\Omega = \Omega^R + \Omega^{\text{NR}}$. Ω^{NR} 采用单松驰模型

$$\Omega^{\text{NR}} = -\frac{\Delta t}{\tau} [f_{v,\alpha}(x, t) - f_{v,\alpha}^{\text{eq}}(x, t)] \quad (12)$$

$f_{v,\alpha}^{\text{eq}}(x, t)$ 是平衡函数

$$f_{v,\alpha}^{\text{eq}}(x, t) = w_\alpha \rho_v \quad (13)$$

式中, ρ_v 是宏观密度, w_α 是粒子速度权重系数.

LBM 具有格式简单、便于并行计算、处理几何边界灵活等优点, 适合求解固定边界下的反应-扩散方程组^[19-20], 前期工作是在计算反应源项时调用 Monte-Carlo (MC) 法, 从而保留系统噪音^[21]. LBP-D1Q3 将 D1Q3 单元与力学单元动态匹配, 即由欧拉法获取粒子位移以更新单元长度, 之后对 $f_{v,\alpha}(\{x_i + e_\alpha \Delta t, t + \Delta t\})$ 在网格节点 $\{x_i\}$ 上进行 3 次样条插值, 由此获得 $f_{v,\alpha}(\{x_i, t + \Delta t\})$. 为保证插值前、后总量守恒, 设定分布函数为

$$f_{v,\alpha}(x_i, t + \Delta t) = f_{v,\alpha}(x_i, t + \Delta t) \cdot \frac{\sum \rho_v(t + \Delta t) \Delta x_i(t + \Delta t)}{\sum \rho_v(t) \Delta x_i(t)} \quad (14)$$

3 结 果

3.1 AJs 形成动力学

考察两悬浮态细胞接触后 E-cad*, F-actin 在接触区域募集的时空动力学, 以此表征 AJs 形成. 此前 Bangasser 等针对马达-离合器机制开展参数分析 [22], 本文据此将“马达”参数设定为: $F_m = 2 \text{ pN}$, $v_m = 120 \text{ nm/s}$, “离合器”参数为: $k_- = 0.1 \text{ s}^{-1}$, $k_+ = 0.3 \text{ s}^{-1}$. 钩端、E-cad* 及 Arp2/3 初始值设定为: $B = 50 \text{ } \mu\text{m}^{-1}$ [17], $E_1 = 32 \text{ } \mu\text{m}^{-1}$ [17], $[\text{Arp2/3}] = 0.05 \text{ } \mu\text{M}$ [23]. 细胞力学及 F-actin 聚合/解聚模块参数见表 1.

表 1 模型参数

Table 1 Model parameters

Parameters	Values	Refs.
K_b	$50 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}$	assumed
K_s	$5.0 \times 10^5 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}$	[24]
γ	$0.5 \text{ Pa} \cdot \text{s}$	[24]
μ	$0.07 \text{ } \mu\text{N} \cdot \text{min} / \mu\text{m}$	assumed
D_m	$1 \text{ } \mu\text{m}^2 / \text{s}$	[24]
D_1	$0.1 \text{ } \mu\text{m}^2 / \text{s}$	[25]
v	$0.5 \text{ } \mu\text{m} / \text{s}$	[17]
d_{max}	0.03 s^{-1}	[26]
d_τ	0.02 s^{-1}	assumed
A	2.8 s^{-1}	[26]
k_b	$100 \text{ s}^{-1} \cdot \mu\text{m}^{-1}$	[17]

图 2(a) 是 $t = 20$ (上)、 50 s (下) 时细胞形态及 E-cad* 分布图. 两细胞在 $t = 0 \text{ s}$ 接触, 此时 E-cad* 均匀分布; 至 $t = 20 \text{ s}$, 两细胞因受到外力 ($F_{\text{ext},i}$) 发生显著挤压, 接触区域 Rac 梯度信号令 Arp2/3 局部激活进而产生少量钩端, F-actin 聚合速率提升即将少量 E-cad* 锚定于此; 至 $t = 50 \text{ s}$, 细胞已到达平衡位置, 观察到 E-cad* 积聚在接触区域, 而 Ct 点 E-cad* 密度由初始约 $0.3 \text{ } \mu\text{M}$ 提升至约 $0.8 \text{ } \mu\text{M}$. 由于扩散速率低 ($D_1 = 0.1 \text{ } \mu\text{m}^2 / \text{s}$), E-cad* 在接触/非接触交界区呈现陡峭梯度.

图 2(b) 是 E-cad* 时空调控图, $[-\pi/3, \pi/3]$ 是平衡时细胞接触区域. 观察到 50 s 后 E-cad* 依然持续募集至该区域, 直至约 6 min 达到稳态. E-cad* 募集与两细胞接触后产生的动态张力信号密切相关, 即由 myosin-II 持续地驱动 F-actin 负向尾流 (retrograde flow) 引起胞间 E-cad* 成键受拉、传导皮层张力. 张

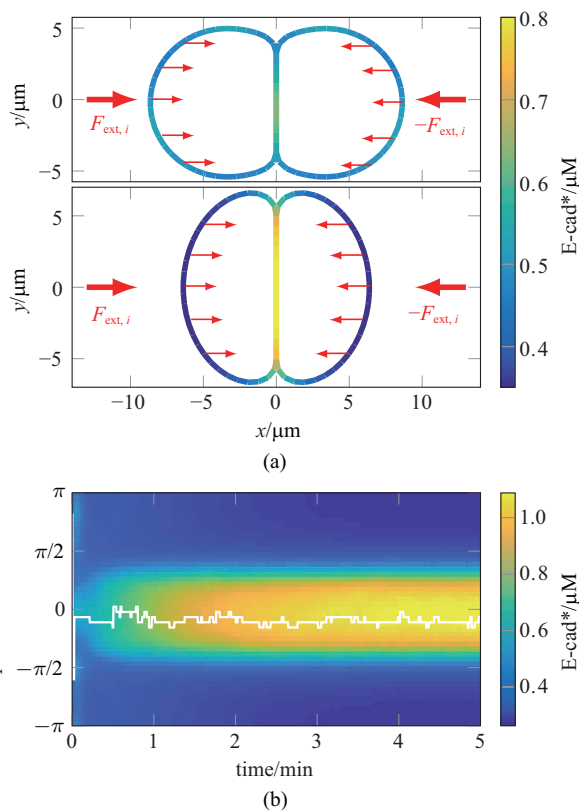


图 2 (a) $t = 20$ 、 50 s 时细胞形变及 E-cad* 分布. $F_{\text{ext},i}$ 是沿水平方向施加的节点外力. (b) E-cad* 时空调控图. 纵坐标 0 点是细胞相互接触中心位置

Fig. 2 (a) Snapshots of cell shape and the distribution patterns of E-cad* at $t = 20$ and 50 s . $F_{\text{ext},i}$ is the external nodal force exerted alone horizontal direction. (b) Spatiotemporal regulation of E-cad*. Point 0 indicates the position of contact center

力随着 E-cad* 成键数增多而增强, 继续通过减慢 F-actin 解聚锚定 E-cad*, 直至 E-cad* 与 E-cad 相互转化速率动态平衡.

图 3(a) 是 Ct 点处 F-actin 密度时程曲线图. 观察到正常情况下 (ctrl 组), 活性态 Rac 梯度促进 F-actin 聚合同时张力抑制 F-actin 解聚, 由此产生互补效果即将 F-actin 密度提高至约 $16 \text{ } \mu\text{M}$, 接近初始时 2 倍. 在 force⁻ 对照组中, 令 $d_\tau = 0 \text{ s}^{-1}$ 以消除张力对 F-actin 调控, 观察到由 Rac 梯度单独作用仅使得 F-actin 积聚密度为约 $12 \text{ } \mu\text{M}$; 在 cis⁻ 对照组中, 令 $\theta = 0 \text{ s}^{-1}$ 以取消 E-cad* 的成束效应, 此时 F-actin 借助少量 E-cad* 介导的张力信号将自身稳态密度恢复到约 $14 \text{ } \mu\text{M}$.

图 3(b) 是相应的 E-cad* 密度时程曲线图. 观察到, ctrl 组中 E-cad* 在 F-actin 锚定及自身成束的双重反馈下产生积聚, 其密度增长曲线呈现起始 (0~30 s)、快速增长 (0.5~5 min) 及缓慢增长 (5~8 min) 三阶段.

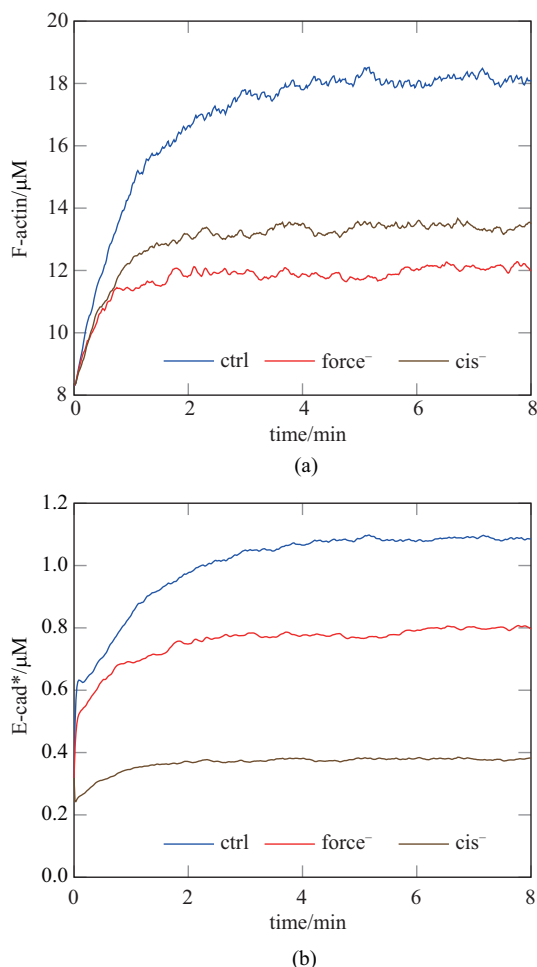


图 3 Ct 点处 F-actin (a) 和 E-cad* (b) 时程曲线图

Fig. 3 Temporal evolutions of F-actin (a) and E-cad* (b) at Ct point

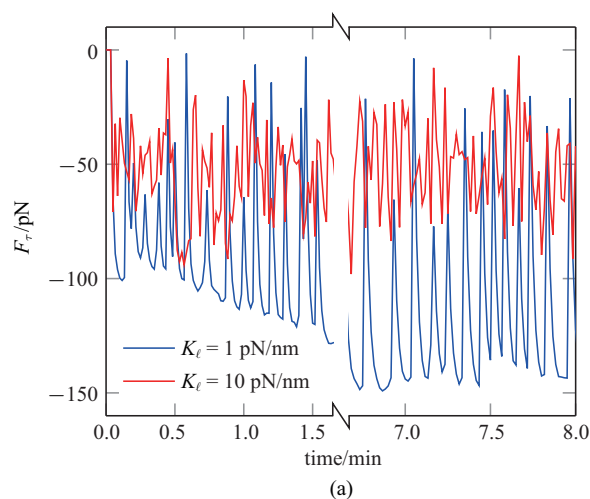
在 $force^-$ 组中, F-actin 密度最低, 因此对 E-cad* 锚定量最少, E-cad* 依靠成束将 F-actin 赋予的初始极性放大, 最终达到约 $0.6 \mu\text{M}$; 在 cis^- 组中, E-cad* 仅依赖与 F-actin 锚定产生积聚, 稳态时仅为约 $0.3 \mu\text{M}$.

综上所述并参考迄今少有争议的真核细胞极化理论^[27-30], 针对悬浮态细胞粘附的动力学过程亦可分为“方向感知”与“极化”. 细胞接触初期, 接触区域 Rac 活性及皮层张力的提升为 E-cad* 募集指明方向. 两类信号的起效方式不同: Rac 信号受制于 Arp2/3 总量, 它从起效到饱和的周期短, 而张力信号受制于 E-cad* 密度, 初始较弱但借助力学反馈回路持续增强. E-cad* 初始极性分布改变了顺式二聚体成束的局部速率, 后者即为“极化”机制, 可引起 E-cad 向 E-cad* 加速转化, 直至 E-cad 大量消耗而达到稳态. 为量化两类信号对 AJs 的调控作用, 后续将改变模型初始条件 (Rac 活性或皮层张力) 考察最终 E-cad* 信号输出.

3.2 细胞皮层力学属性调控粘着连接形成

此前, 尽管 Murrell 等^[11] 观测到皮层呈现松散的非肌节元 (nonsarcomeric) 结构可大幅提高马达分子收缩应变, 但并未阐述皮层力学属性将如何调控 AJs 建成. 本节即着眼于力学反馈回路启动机制, 继续探究这一问题.

首先取消 Rac 梯度 (即设定 $R_h = R_r = 0.1$), 考察单独由张力各向异性是否可引起 E-cad* 局部积聚. 图 4(a) 是取 $K_1 = 1, 10 \text{ pN/nm}$ 时获得的 Ct 点处 F_τ 时程曲线图. $K_1 = 10 \text{ pN/nm}$ 时表征皮层呈紧密结构, 观察到起始阶段 (0~100 s), 皮层张力 (F_τ) 峰值始终较低 (约 75 pN). 这是由于 K_1 过大导致 E-cad* 键力 ($F_{c,i}$) 快速增长, 键的最概然寿命仅为约 1 s (图 4(b)), 同时由于键的反复形成与断裂造成 F_τ 波动. $K_c = 1 \text{ pN/nm}$ 时可指皮层呈松散结构. 较小的 K_1 使 $F_{c,i}$ 增长较慢, 键的最概然寿命延长为约 3 s (图 4(b)), 观察到 F_τ 峰值为约 100 pN . 由马达分子持续收缩引起 E-cad* 成键受拉使得 $F_{c,i}$ 逐渐增大, 直至断裂后由其它键分担, 造成键的连锁断裂, 观察到 F_τ 呈现出周期性“加载-失效” (load-and-fail) 现象^[15]. 随着模拟持续, 400~500 s 阶段“ $K_1 = 10 \text{ pN/nm}$ ”与初期相比未发生显著变化, “ $K_1 = 1 \text{ pN/nm}$ ”则呈现阶梯式上升, F_τ 峰值约为 150 pN . 由此可见, 皮层为松散结构更加有利于提升皮层张力, 并由此启动力学反馈回路驱动 E-cad* 积聚, 最终形成 AJs.

图 4 (a) K_1 取 1, 10 pN/nm 时的 Ct 点张力时程曲线图. (b) E-cad* 成键最概然寿命直方图. (c) 单独张力调控下 E-cad* 时空调控图Fig. 4 (a) Time courses of the tension at Point Ct at $K_1 = 1$ and 10 pN/nm . (b) Distribution patterns of the lifetimes of E-cad* bonds. (c) Spatiotemporal regulation of E-cad* in the presence of the tension alone

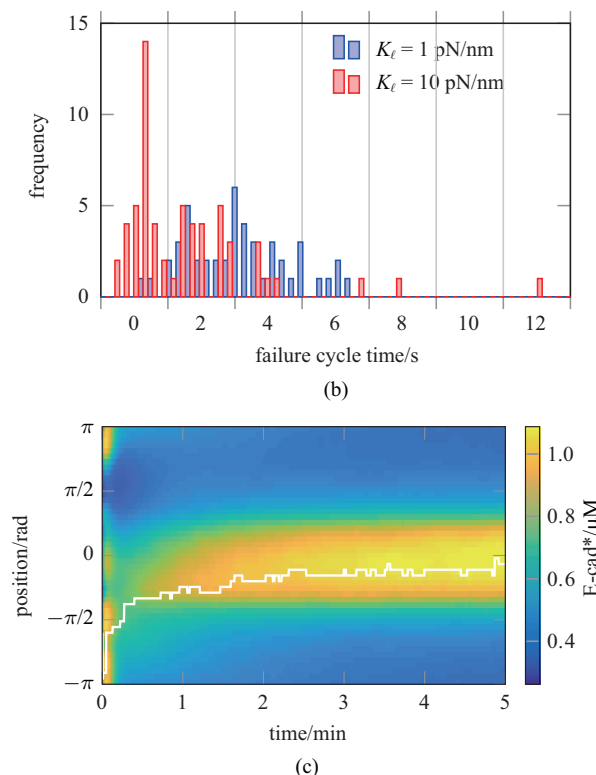


图 4 (a) K_1 取 1, 10 pN/nm 时的 Ct 点张力时程曲线图. (b) E-cad* 成键最概然寿命直方图. (c) 单独张力调控下 E-cad* 时空调控图 (续)

Fig. 4 (a) Time courses of the tension at Point Ct at $K_1 = 1$ and 10 pN/nm. (b) Distribution patterns of the lifetimes of E-cad* bonds. (c) Spatiotemporal regulation of E-cad* in the presence of the tension alone (continued)

图 4(c) 是 $K_1 = 1$ pN/nm 时 E-cad* 时空调控图. 与图 2(b) 对比, 由于缺少活性态 Rac 梯度, E-cad* 的初始积聚位置并不位于接触中心. 这是由于该阶段张力各向异性程度较低, 不具有明确的 E-cad* 积聚信号, E-cad* 通过自身成束效应制造了随机高点. 随着模拟时间推进, 力学反馈回路逐渐开启, E-cad* 积聚方位逐渐向接触中心偏移 (图中白色线).

3.3 细胞接触长度调控 AJs 形成

实验中通过调节双微吸管间距来控制细胞挤压程度^[14], 模拟时施加不同挤压力 ($F_{ext,i}$) 即可达到相同效果. 图 5(a) 即考察缺少 Rac 梯度时, 细接触区弧度由 $2\pi/9$ 扩大至 $8\pi/9$ 时获得的稳态 E-cad* 分布. 随着接触区扩大, 细胞后部的 E-cad* 密度降低. 弧度为 $2\pi/5$ 时, E-cad* 峰值最高 (达到约 $0.90 \mu\text{M}$), 说明中等长度的接触区促进 AJs 成熟. 接触区过小时输入的张力信号较弱, 从而限制整体力学反馈回路强度; 接触区过大时高密度 E-cad* 分配范围过大导致峰值降低,

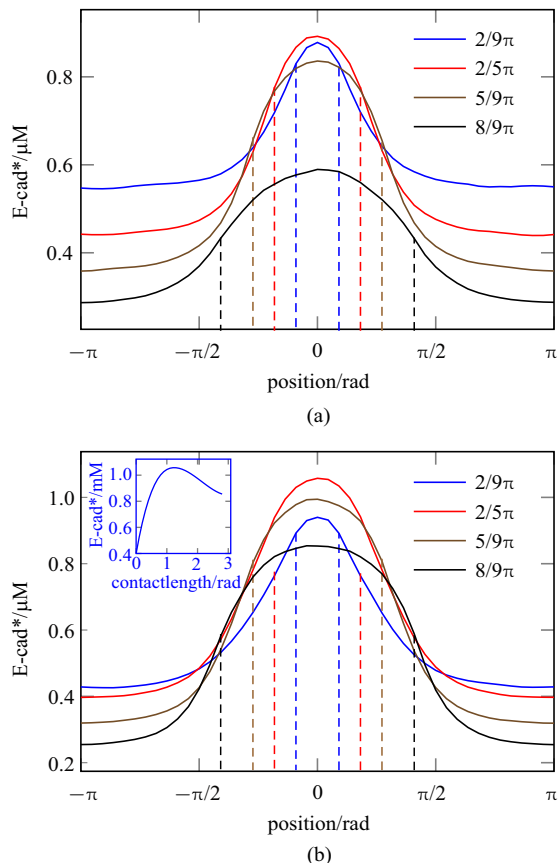


图 5 $R_h = 0.1$ (a) 或 0.3 (b) 时不同接触长度下的 E-cad* 稳态分布图. (b) 中的插图显示 E-cad* 峰值浓度随接触区长度呈双相性变化
Fig. 5 Profiles of E-cad* at $R_h = 0.1$ (a) and 0.3 (b) upon different extrusion deformations. Inserted panel in (b) shows the dependence of maximum E-cad* concentration with the contact length

同样会限制 AJs 成熟. 图 5(b) 是加入 Rac 梯度信号 ($R_h = 0.3$) 后的 E-cad* 分布. 与图 5(a) 对比, 细胞前、后部密度与接触区弧度关系依然存在, 但分布更为陡峭. 图 5(b) 插图是令接触区在 $[0, 2.7]$ 弧度变化时获得的 Ct 点处 E-cad* 峰值浓度曲线图. 观察到该曲线呈现双相性, E-cad* 最高峰值浓度发生在 1.2 接触弧度附近.

图 6 是将 R_h 和 K_1 进行参数组合获得的 E-cad* 稳态分布. 取 $K_1 = 1, 5, 10$ pN/nm, 同时取 $R_h = 0.1, 0.3, 0.5$, 由此获得 9 组 (K_1, R_h). 由于 $F_{ext,i}$ 为常量, 细胞挤压程度由 K_1 控制, K_1 越大则挤压程度越低. 观察到 (1, 0.5) 组合下 E-cad* 呈现显著积聚, 这是由于 Rac 梯度信号最强, 而 K_1 低可引起接触区扩大、E-cad* 成键寿命延长; 相反取 (10, 0.1) 时, 力学、化学信号均最弱, 使得 E-cad* 积聚程度最低. 取 (1, 0.1)、(10, 0.5) 时, E-cad* 积聚程度接近, 说明当张力信号较弱时可由增强局部 Rac 信号予以补偿, 反之亦然.

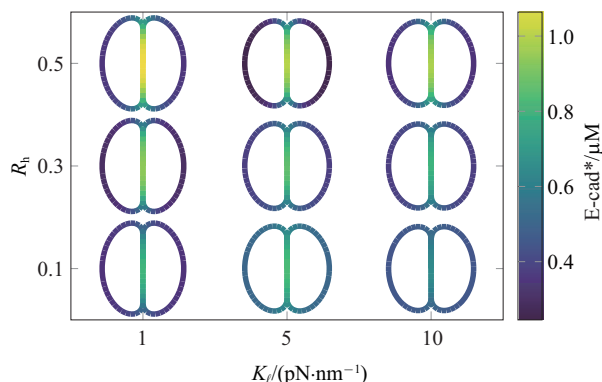


图 6 K_1 与 R_h 进行参数组合所获得的 E-cad* 稳态分布图
Fig. 6 Stable distribution patterns of E-cad* derived from different combinations of K_1 and R_h

4 讨论

生物化学学者开展悬浮态细胞粘附实验往往配合分子抑制/过表达对照组实验。分子间级联转导如何调控分子在细胞局部积聚动力学? 对于这一细胞-分子“跨尺度”问题需要借助构建力学-化学耦合模型予以回答。此前 Chu 等^[14]采用转染 E-cad 的悬浮态 S180 细胞开展粘附实验, 通过控制两细胞接触时间并测算分离力(与 E-cad* 积聚程度正相关)将 AJs 的建立过程划分为: 起始、快速增长及缓慢增长阶段。本文数值模拟获得 E-cad* 调控空间分布特征及演化趋势与该实验一致, 但达到稳态所需时间较 Chu 实验快(约 5 min vs. 约 30 min), 原因之一是忽略了 G-actin 自身调控, 即 G-actin 主要以 ADP 结合态存在, 需要与捕获蛋白 ADF/cofilin, profilin, Thymosin 发生交换成为 ATP 结合态方能供给钩端聚合^[17]。Chu 等^[14]所开展的对照组实验包括有: (1) 采用 Latrunculin 抑制 F-actin 聚合后, 观测到 AJs 无法形成; (2) 表达 Rac 显性失活突变体后, AJs 成熟度降低了 35%。参照本文图 6 可对上述观测结果作如下解读: 尽管 F-actin, Rac 都参与 E-cad 力学反馈回路, 但 Rac 位于 F-actin 上游, 其促进 F-actin 聚合的作用可由张力降低 F-actin 解聚予以补偿, 因而 Rac 失活只会削弱但并不阻止 AJs 建成。

本文为构建整体数学模型采取了必要的假设及简化, 今后可继续开展以下工作。

首先, 模型假设 Rac 活性系数由细胞接触区以指数形式衰减, 未引入 Rac 自身调控机制。此前 Mori 等针对 Rac (或 Cdc42) 调控提出了波桩 (wave-pinning)

模型^[31], 即考察 Rac 失活/活性态转化, 活性态 Rac 扩散较慢并正向调控自身生成, 由此造成了其在一侧激活即以波的形式向对侧传播, 最终受到失活/活性态总体质量守恒限制达到稳定的极性分布。已证实 E-cad 与整合素 (integrin) 通过 Rho GTPase 发生交互式调控^[32-33], 继续引入 Rho GTPase 调控模块可将悬浮态细胞粘附模型拓展至贴壁细胞^[34]。

其次, 模型对 E-cad, F-actin 力学传导结构是采取“最弱结合点”假设^[15], 将胞间 E-cad* 成键作为一系列“串联弹簧”的失效点, 将其考虑为滑移键 (slip bond)。此前原子力显微镜、光镊等单分子实验证实了 cadherin-catenin 复合体与 F-actin 或是胞间 E-cad* 成键均存在逆锁键 (catch bond)^[35-36]。基于本文力学-化学耦合体系, 后续可从力学反馈回路的启动机制出发, 探讨逆锁键对 AJs 的调控作用。

最后, 本文通过 LBP 法求解包含级联信号转导的细胞力学问题, 未考察细胞与环境流体间相互作用。此前 Dallon 等^[25]基于浸入式边界法 (immersed boundary method, IBM) 构建了悬浮态细胞粘附的流体-固体耦合模型; Tanaka 等^[37]将 IBM 与 LBM 结合并应用于组织形态发生 (morphogen) 领域。受此启发, 今后可发展 IB-LBP 法。

5 结论

本文考察胞间 E-cad* 成键介导 actomyosin 皮层上的 Rac 活性及张力信号反作用于 E-cad 级联转导, 由此构建了悬浮态上皮细胞粘附的力学-化学耦合模型, 并通过自行发展的 LBP-D1Q3 法予以数值求解。正常组数值模拟首先重现了细胞粘附实验中观测到 E-cad* 和 F-actin 在细胞接触区持续募集的现象, 继而结合对照组获得了以下 3 方面主要结论。

(1) 局部活性态 Rac、张力信号分别调控 F-actin 聚合、解聚, 由此发挥互补效应造成 F-actin 在细胞接触区域富集, 通过锚定作用帮助 E-cad* 建立初始极性; E-cad* 通过形成顺式二聚体将初始极性放大, 由此 E-cad* 时程曲线呈现起始、快速增长及缓慢增长阶段。

(2) 单独张力各向异性经“E-cad → 张力 → F-actin”力学反馈回路放大即可造成 E-cad* 积聚; 在马达分子拉动下, E-cad* 成键寿命与皮层刚度相关, 而松散的皮层结构具有较小刚度, E-cad* 成键寿命延

长、张力提升,有利于力学反馈回路的启动。

(3) 细胞接触区长度适中时,整体张力输入信号经力学反馈回路放大使得 E-cad* 局部积聚最为显著,因此接触区长度可作为控制粘着连接成熟度的有效手段。

致谢 感谢宁波大学王骥教授、杜建科教授在本文撰写过程中给予的建议。

参 考 文 献

- Manibog K, Li H, Rakshit S, et al. Resolving the molecular mechanism of cadherin catch bond formation. *Nature Communications*, 2014, 5: 1-11
- Pan Y, Heemskerck I, Ibar C, et al. Differential growth triggers mechanical feedback that elevates Hippo signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113(45): E6974
- Braga V. Spatial integration of E-cadherin adhesion, signalling and the epithelial cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology*, 2016, 42: 138-145
- Wu Y, Jin X, Harrison O, et al. Cooperativity between trans and cis interactions in cadherin-mediated junction formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(41): 17592-17597
- Dufour S, Mège RM, Thiery JP. α -catenin, vinculin, and F-actin in strengthening E-cadherin cell-cell adhesions and mechanosensing. *Cell Adhesion & Migration*, 2013, 7(4): 345-350
- Mccormack J, Welsh NJ, Braga VMM. Cycling around cell-cell adhesion with Rho GTPase regulators. *Journal of Cell Science*, 2013, 126(2): 379-391
- Yamada S, Nelson WJ. Localized zones of Rho and Rac activities drive initiation and expansion of epithelial cell cell adhesion. *The Journal of Cell Biology*, 2007, 178(3): 517-527
- Liang X, Gomez GA, Yap SY. Current perspectives on cadherin-cytoskeleton interactions and dynamics. *Cell Health and Cytoskeleton*, 2015, 7: 11-24
- Leerberg J, Gomez G, Verma S, et al. Tension-sensitive actin assembly supports contractility at the epithelial zonula adherens. *Current Biology*, 2014, 24(15): 1689-1699
- Lecuit T, Yap AS. E-cadherin junctions as active mechanical integrators in tissue dynamics. *Nature Cell Biology*, 2015, 17(5): 533-539
- Murrell MP, Gardel ML. F-actin buckling coordinates contractility and severing in a biomimetic actomyosin cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(51): 20820-20825
- Wu SK, Gomez GA, Michael M, et al. Cortical F-actin stabilization generates apical-lateral patterns of junctional contractility that integrate cells into epithelia. *Nature Cell Biology*, 2014, 16(2): 167-178
- Engl W, Arasi B, Yap LL, et al. Actin dynamics modulate mechanosensitive immobilization of E-cadherin at adherens junctions. *Nature Cell Biology*, 2014, 16(6): 587-594
- Chu YS, William A, Thomas WA, et al. Force measurements in E-cadherin-mediated cell doublets reveal rapid adhesion strengthened by actin cytoskeleton remodeling through Rac and Cdc42. *The Journal of Cell Biology*, 2004, 167(6): 1183-1194
- Chan CE, Odde DJ. Traction dynamics of filopodia on compliant substrates. *Science*, 2008, 322(5908): 1687-1691
- Carlier MF, Shekhar S. Global treadmilling coordinates actin turnover and controls the size of actin networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2017, 18: 389-401
- Mogilner A, Edelstein-Keshet L. Regulation of actin dynamics in rapidly moving cells: A quantitative analysis. *Biophysical Journal*, 2002, 83(3): 1237-1258
- Feng SL, Zhou LW, Yan Z, et al. Mechanochemical modeling of neutrophil migration based on four signaling layers, integrin dynamics, and substrate stiffness. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 2018, 17(6): 1611-1630
- Pal TK, Soni RS, Datta D. Lattice Boltzmann simulation to study reaction diffusion processes in geological media. *Barc Newsletter*, 2015: 6-13
- Feng SL, Zhu WP. Bidirectional molecular transport shapes cell polarization in a two-dimensional model of eukaryotic chemotaxis. *Journal of Theoretical Biology*, 2014, 363: 235-246
- Feng SL, Zhou LW, Zhang Y, et al. Dynamic seesaw model for rapid signaling responses in eukaryotic chemotaxis. *Physical Biology*, 2018, 15(5): 1478-3967
- Bangasser B, Rosenfeld S, Odde D. Determinants of maximal force transmission in a motor-clutch model of cell traction in a compliant microenvironment. *Biophysical Journal*, 2013, 105(3): 581-592
- Postma M, Haastert PJMV. A diffusion-translocation model for gradient sensing by chemotactic cells. *Biophysical Journal*, 2001, 81(3): 1314-1323
- Wu T, Feng J. Modeling the mechanosensitivity of neutrophils passing through a narrow channel. *Biophysical Journal*, 2015, 109(11): 2235-2245
- Dallon JC, Newren E, Hansen MDH. Using a mathematical model of cadherin-based adhesion to understand the function of the actin cytoskeleton. *Physical Review E*, 2009, 79(3): 031918
- Marée AFM, Grieneisen VA, Edelstein-Keshet L. How cells integrate complex stimuli: The effect of feedback from phosphoinositides and cell shape on cell polarization and motility. *PLoS Computational Biology*, 2012, 8(3): e1002402
- Rappel WJ, Loomis WF. Eukaryotic chemotaxis. *Wiley Interdisciplinary Reviews Systems Biology and Medicine*, 2009, 1(1): 141-149
- Parent CA. A cell's sense of direction. *Science*, 1999, 284(5415): 765-770
- 冯世亮, 朱卫平. 基于信号分子双向运输的运动细胞极性反转模拟. *力学学报*, 2015, 47(2): 337-345 (Feng Shiliang, Zhu Weiping. Simulation for reversal of cell polarity based on bidirectional transport of signaling molecules. *Chinese Journal of Theoretical and Applied Mechanics*, 2015, 47(2): 337-345 (in Chinese))
- 冯世亮, 朱卫平. 运动细胞初始极化阶段胞内信号分子双向积聚的分子机制及动态数值模拟. *中国科学: 物理学 力学 天文学*, 2012(9): 973-986 (Feng Shiliang, Zhu Weiping. Molecular mechanisms and dynamic simulations of bipolarization of chemotactic cells. *Sci Sin-Phys Mech Astron*, 2012, 42(9): 973-986 (in Chinese))
- Mori Y, Jilkine A, Edelstein-Keshet L. Wave-pinning and cell polarity from a bistable reaction-diffusion system. *Biophysical Journal*, 2008, 94(9): 3684-3697

- 32 De Pascalis C, Etienne-Manneville S, Weaver VM. Single and collective cell migration: the mechanics of adhesions. *Molecular Biology of the Cell*, 2017, 28(14): 1833-1846
- 33 Collins C, Nelson WJ. Running with neighbors: coordinating cell migration and cell-cell adhesion. *Current Opinion in Cell Biology*, 2015, 36: 62-70
- 34 吕杰, 曹金凤, 许世雄等. 基于自然增长的细胞群粘附数值模拟. 力学学报, 2010, 42(4): 733-739 (Lü Jie, Cao Jinfeng, Xu Shixiong, et al. A numerical simulation of cells adhesion based on the natural growth. *Chinese Journal of Theoretical and Applied Mechanics*, 2010, 42(4): 733-739 (in Chinese))
- 35 Buckley CD, Tan J, Anderson KL, et al. The minimal cadherin-catenin complex binds to actin filaments under force. *Science*, 2014, 346(6209): 1254211-1254211
- 36 Marshall BT, Long M, Piper JW, et al. Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules. *Nature*, 2003, 423(6936): 190-193
- 37 Tanaka S, Sichau D, Iber D. LBIBCell: A cell-based simulation environment for morphogenetic problems. *Bioinformatics*, 2015, 31(14): 2340-2347