

不同加载时间流体剪切力对成骨细胞中 piezo1 机械敏感型蛋白表达的影响

闫亮^{1,2,3}, 姜金^{1,2,3}, 张小辉^{1,2,3}, 万浪^{1,2,3}, 马崇文^{1,2,3}, 李睿^{1,2,3}, 夏亚一^{1,2,3}

1. 兰州大学, 甘肃 兰州 730000; 2. 兰州大学第二医院骨科, 甘肃 兰州 730000; 3. 甘肃省骨与关节疾病重点实验室, 甘肃 兰州 730000

【摘要】目的:研究加载不同时间流体剪切力(FSS)对MC3T3-E1成骨细胞piezo1机械敏感型离子蛋白表达的影响。**方法:**利用自行设计的平行平板FSS加载装置,对MC3T3-E1成骨细胞施加12 dyn/cm² FSS 0、15、30、45、60、90 min,采用免疫荧光染色实验检测piezo1机械敏感型离子蛋白的表达水平。**结果:**piezo1明显表达于成骨细胞细胞质及细胞核,细胞质尤为明显。对体外培养的MC3T3-E1细胞加载12 dyn/cm² FSS,随着加载时间的延长,piezo1蛋白表达上调,在45 min左右达到高峰。**结论:**加载不同时间的12 dyn/cm² FSS能够上调MC3T3-E1成骨细胞piezo1机械敏感型离子蛋白,加载45 min最合适。

【关键词】流体剪切力;MC3T3-E1细胞;piezo1蛋白;成骨细胞;机械敏感型离子通道

【中图分类号】R318;R336

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2018)07-0839-04

Effects of loading time of fluid shear stress on expression of piezo1 mechanosensitive protein in osteoblasts

YAN Liang^{1,2,3}, JIANG Jin^{1,2,3}, ZHANG Xiaohui^{1,2,3}, WAN Lang^{1,2,3}, MA Chongwen^{1,2,3}, LI Rui^{1,2,3}, XIA Yayi^{1,2,3}

1. Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 2. Department of Orthopedics, Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 3. Gansu Key Laboratory of Orthopaedics, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective To discuss the variations of the expression of piezo1 mechanosensitive ion protein in MC3T3-E1 osteoblasts with the increasing loading time of fluid shear stress (FSS). **Methods** With the use of a self-designed parallel plate flow system, FSS (12 dyn/cm²) was acted on MC3T3-E1 osteoblasts for 0, 15, 30, 45, 60, 90 min. The expression level of piezo1 mechanosensitive ion protein was detected by immunofluorescence. **Results** Piezo1 was obviously expressed in the cytoplasm and nucleus of osteoblasts, especially in the cytoplasm. FSS of 12 dyn/cm² was acted on MC3T3-E1 cells cultured *in vitro*. With the increase of loading time, the expression of piezo1 protein was upregulated. At 45 minutes after loading, the expression of piezo1 protein reached the maximum. **Conclusion** Loading 12 dyn/cm² FSS can upgrade the expression of piezo1 mechanosensitive ion protein in MC3T3-E1 osteoblasts, and the optimal loading time of FSS is 45 minutes.

Keywords: fluid shear stress; MC3T3-E1 cell; piezo1 protein; osteoblasts; mechanosensitive ion channel

前言

当前认为,骨组织感受机械应力刺激的应答过程是一个复杂而精密的过程,可分为多个连续的过

程。其中第一个阶段就是机械刺激信号感受阶段:机械应力可以活化骨细胞表面的跨膜受体如机械敏感离子通道(Mechanosensitive Channels, MSC)^[1]等,这些受体或者蛋白能够将细胞外的物理信号转化为生物化学信号并传递至骨细胞内。而piezo非选择性离子通道是MSC家族中至关重要的一份子,在机械应力的传导中起到重要作用。

piezo通道蛋白是2010年Coste等^[2]将RNA干扰技术作用于小鼠的Neuro2A细胞系而发现的一种新型MSC,自发现以来迅速引起各个领域学者的广泛关注。国内外现有报道显示piezo1主要表达于非感

【收稿日期】2018-04-15

【基金项目】国家自然科学基金(81071478,81450042,81672207);甘肃省青年科技研究基金(17JR5RA226);兰州大学第二医院萃英科技创新计划(CY2017-QN11)

【作者简介】闫亮,硕士研究生,研究方向:生物材料、细胞生物力学、关节外科,E-mail: yanliang0608@163.com

【通信作者】夏亚一,博士,主任医师,教授,博士生导师,研究方向:关节外科、生物材料、细胞生物力学,E-mail: xiayayi@126.com

觉组织和非神经元细胞,如膀胱、肾、肺、内皮细胞,红细胞、牙周韧带细胞和软骨细胞,而piezo2主要在感觉组织中表达,如背根神经节(Dorsal Root Ganglion, DRG)神经元和Merkel细胞等^[3]。piezo离子通道在各种生理过程中发挥作用,例如在调节红细胞体积以及在触觉传递中起很大作用^[4]。此外,很多研究发现piezo1缺陷型小鼠在血管重构缺陷的血液灌注和胚胎致死率方面表现明显,这表明piezo1在血管构造和胚胎发育的控制中起关键作用^[5]。然而piezo非选择性离子通道在骨与关节领域的研究少之又少,piezo蛋白在骨组织及成骨细胞内是如何表达?怎样起到传递机械应力作用的呢?其与下游信号通路间到底又是何种关系?

与此同时机械应力刺激可引起骨组织微管内液体的流动,形成流体剪切应力(Fluid Shear Stress, FSS),FSS是一种存在广泛、研究较为充分的机械应力,只有处于生理范围内适宜的机械应力刺激才能有效地促进成骨,有利于骨组织的生长和重构^[6]。笔者研究加载不同时间FSS对成骨细胞piezo1蛋白表达的影响,对于了解骨组织重建的机制是非常重要的,可能为临床治疗骨质疏松和骨折等疾病提供新的方向和思路。本实验通过对MC3T3-E1细胞加载不同时间12 dyn/cm²的FSS,观察piezo1蛋白的表达水平,有助于了解FSS作用下骨组织重建的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

实验细胞为MC3T3-E1细胞(中国医学科学院)。试剂有胎牛血清(PAN-Biotech,德国); α -MEM培养基(Hyclone公司,美国);磷酸盐缓冲液PBS(中杉金桥,中国);胰蛋白酶(Sigma公司,美国);青霉素-链霉素双抗(武汉博士德生物工程公司,中国);piezo1一抗(novus公司,美国);多聚甲醛(碧云天生物技术有限公司,中国);TritonX-100;山羊血清(碧云天生物技术有限公司,中国);488山羊抗兔荧光二抗(PTG公司,美国);DAPI(索莱宝公司,中国);甘油(碧云天生物技术有限公司,中国)。实验仪器有细胞培养箱(上海力申科学仪器有限公司,中国);倒置相差显微镜(Olympus,日本)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

小鼠成骨MC3T3-E1细胞株购于中国医学科学院细胞库,将细胞接种到无菌培养瓶中, α -MEM培养基中添加10%胎牛血清和100 U/mL青链霉素制成完全培养基,在温度37℃、CO₂饱和度5%的培养箱中孵育细胞,每隔2~3 d换液1次,待细胞融合至80%~

90%时,用0.25%胰酶消化,接种至25 cm²培养瓶中继续传代培养。

1.2.2 加载FSS 在倒置相差显微镜下观察培养瓶中的成骨细胞生长情况,选择生长达80%~90%以上融合的成骨细胞,将细胞培养瓶中的成骨细胞用胰酶作用后,加入完全培养基轻轻吹打成细胞悬液。将吹打好的细胞悬液(浓度约为 4×10^3 个/mL)接种于20 mm×50 mm无菌盖玻片(置于培养皿中)上,静置约1 h待细胞完全贴壁后在盖玻片周围加入完全培养基使其没过盖玻片,继续培养1~2 d。待细胞融合至80%~90%后,先使用未加胎牛血清的 α -MEM培养基静置约4 h后,放置盖玻片到密闭加力小室中,组装层流流体小室,并将其连接到储液柱和蠕动泵上。向储液柱中加入200~250 mL预热(37℃)的 α -MEM基础培养基,以蠕动泵为动力,加载大小为12 dyn/cm²的FSS,分别加载FSS作用0、15、30、45、60、90 min。

1.2.3 免疫荧光染色 将细胞分为未加力组和加载FSS组。收集不同组载有细胞的盖玻片,用PBS洗涤3遍,多聚甲醛固定30 min,PBS洗涤3遍,TritonX-100通透20 min,PBS洗涤3遍,滴加山羊封闭血清,37℃下封闭30 min,然后吸净封闭液,勿洗,加入一抗piezo1(1:100),玻片置于湿盒中,于4℃冰箱中孵育过夜。PBS洗涤3遍,每次5 min,避光下加山羊抗兔荧光二抗(1:300),37℃温箱中避光孵育90 min,PBS洗涤3遍,每次5 min,避光下附加DAPI染核,室温孵育20 min,PBS洗涤3遍,甘油封片。荧光显微镜下观察piezo1蛋白的定位表达情况。

2 结果

如图1所示,可发现piezo1明显表达于成骨细胞细胞质及细胞核,细胞质尤为明显。且其表达变化呈现时间依赖性。piezo1表达量从15 min开始逐渐增加,在45 min达到高峰,60 min开始下降,但仍然高于空白对照组,随后不再增加,到90 min时细胞形态已发生明显变化,不适合继续加力。这说明在MC3T3-E1成骨细胞中,随着FSS加载时间的延长,FSS可以上调piezo1的表达,加载45 min作用最明显。

3 讨论

成骨细胞是重要的感受和效应细胞,有研究表明,机械应力可以刺激成骨细胞,介导成骨细胞的增殖与分化,因此成骨细胞缺乏机械应力刺激时,其细胞功能及生物学特性将受到影响,进而导致机体产生相应的病理症状,如长期卧床的患者可导致骨质

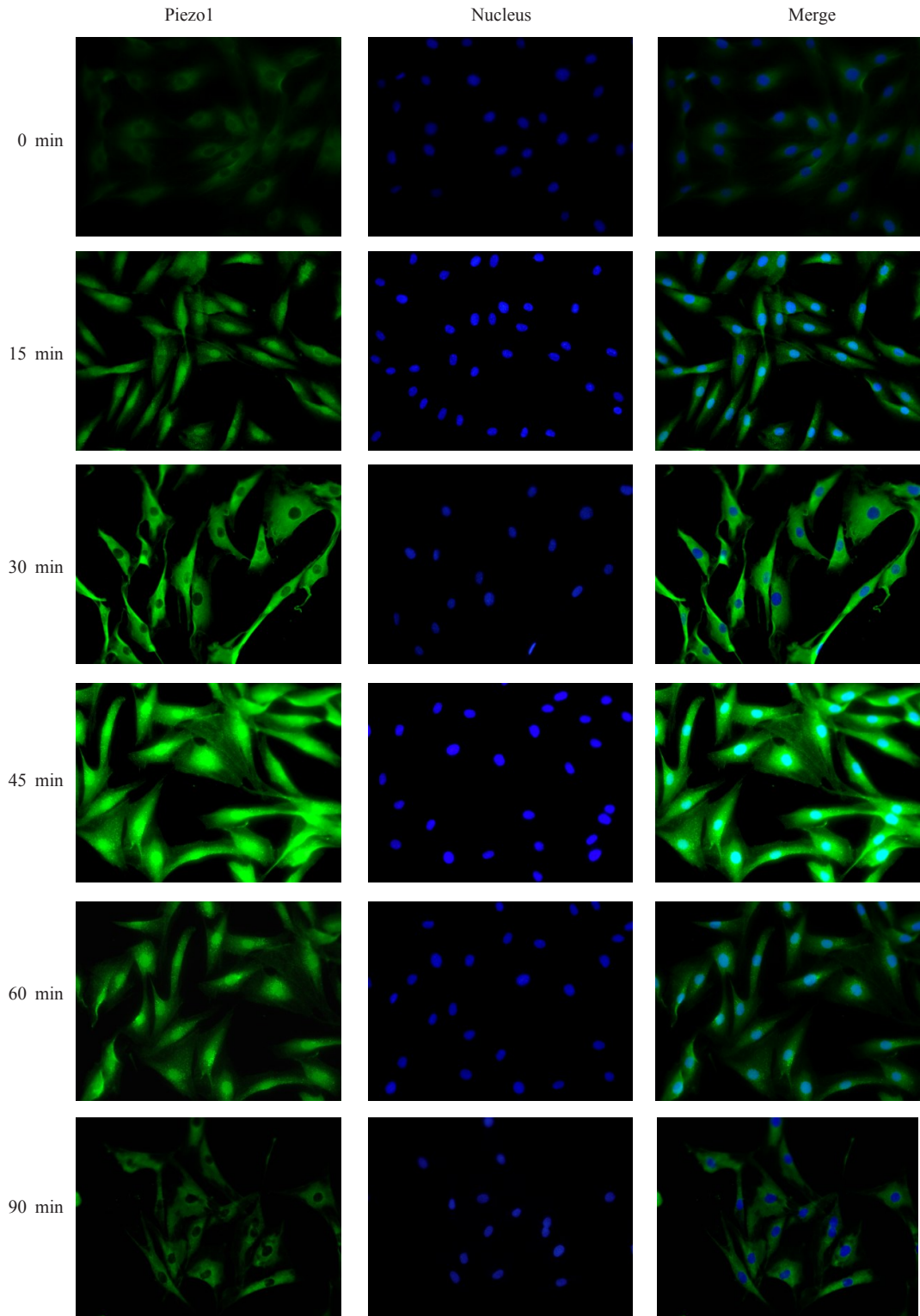


图1 FSS对成骨细胞内的piezo1蛋白表达的影响(×200)

Fig.1 Effect of fluid shear stress (FSS) on the expression of piezo1 protein in osteoblasts (×200)

疏松的发生^[7-8],只有处于生理范围内适宜的机械应力刺激才能有效地产生成骨作用,介导骨组织的重建^[9]。

目前的研究发现,骨骼细胞感受到的机械应力,主要包括压应力、牵张力和FSS等多种机械应力模式。Basso等^[10]研究了体内各种机械应力刺激模式,最终发现FSS是得到理论支持最多的一种,是调控成骨细胞代

谢的主要应力模式。本课题组前期实验表明^[11-13],FSS可以促进成骨细胞的增殖分化以及抑制成骨细胞的凋亡,然而具体机制仍需要进一步研究。Lee等^[14]结果揭示了piezo1和piezo2在软骨细胞的力学环境中是高表达的,同时使用piezo通道抑制剂GsMTx4作用后可降低软骨细胞的凋亡率。Rocio等^[15]使用高速压力钳方法发现piezo1能够介导牵张力激发的软骨细胞内电流,

进一步证实了piezo1在软骨细胞的机械应力信号转导中的作用。正如前文所说,piezo通道蛋白在多种细胞和组织上均有其表达,然而成骨细胞作为骨组织中能够感受机械应力刺激的主要细胞之一,piezo通道蛋白在成骨细胞中的表达以及功能的研究非常少,目前尚不清楚piezo通道蛋白在成骨细胞力学信号转导中所起的作用。

在本研究中,根据笔者前期的研究,对MC3T3-E1成骨细胞施加12 dyn/cm²的FSS是对成骨细胞最适宜的刺激^[16]。加载12 dyn/cm²的FSS分别作用0、15、30、45、60、90 min,piezo1蛋白的变化随着加载时间而变化。piezo1从15 min开始逐渐增加,在45 min达到高峰,60 min开始下降,表现出明显的时间依赖性。这说明,piezo通道蛋白表达于成骨细胞中,此外,FSS可以促进piezo1蛋白的表达,且45 min最为合适,不宜过久,但piezo通道蛋白在成骨细胞力学信号转导中是如何发挥作用的呢?

我们前期研究发现,FSS可以促进成骨细胞力学敏感分子COX-2和PGE-2的表达^[12],那么piezo离子通道蛋白是否在FSS调控成骨细胞力学敏感分子COX-2的表达中发挥作用呢?目前尚未得知。MAPK信号通路在成骨细胞的增殖、分化以及凋亡中都发挥着重要作用^[17]。MAPK家族主要包括4个成员:ERK1/2、p38、JNK以及ERK5^[18]。其中,ERK1/2和ERK5是在成骨细胞中研究较多的成员,尤其是在力学转导机制中发挥重要作用。本课题组的研究结果表明^[11-13,19],FSS可以刺激成骨细胞中ERK5的活化,活化后的ERK5进一步在成骨细胞的增殖、分化、凋亡中发挥调节作用。但是其在成骨细胞的上游信号通路的研究仍然不十分清楚。那么根据我们前期的实验结果,我们猜想:piezo离子通道是否可以促进下游ERK1/2和ERK5信号分子的磷酸化,磷酸化后ERK1/2和ERK5进入成骨细胞核,核内的ERK1/2和ERK5再促进相关转录因子如AP-1、CREB等磷酸化,进一步调节成骨细胞力学敏感基因转录,最终促进成骨细胞的力学信号转导,从而产生一系列细胞生理效应呢?因此,研究piezo离子通道在骨质疏松发病机制以及骨折治疗中的作用非常重要,尤其是随着人们对各种piezo离子通道抑制剂GsTMx4和激活剂Yoda1的了解,它有可能成为研发抗骨质疏松药物的新靶点。

【参考文献】

[1] XIAO Z, QUARLES L D. Physiological mechanisms and therapeutic

potential of bone mechanosensing[J]. Rev Endocr Metab Disord, 2015, 16(2): 115-129.

- [2] COSTE B, MATHUR J, SCHMIDT M, et al. piezo1 and piezo2 are essential components of distinct mechanically-activated cation channels[J]. Science, 2010, 330(6000): 55-60.
- [3] WU J, LEWIS A, GRANDL J. Touch, tension, and transduction-the function and regulation of piezo ion channels[J]. Trends Biochem Sci, 2017, 42(1): 57-71.
- [4] BAGRIANTSEV S N, GRACHEVA E O, GALLAGHER P G. piezo proteins: regulators of mechanosensation and other cellular processes. [J]. J Biol Chem, 2014, 289(46): 31673-31681.
- [5] LI J, HOU B, TUMOVA S, et al. piezo1 integration of vascular architecture with physiological force[J]. Nature, 2014, 515(7526): 279-282.
- [6] PRICE C, ZHOU X, LI W, et al. Real-time measurement of solute transport within the lacunar-canalicular system of mechanically loaded bone: direct evidence for load-induced fluid flow[J]. J Bone Miner Res, 2011, 26(2): 277-285.
- [7] LEBLANC A, SHACKELFORD L, SCHNEIDER V. Future human bone research in space[J]. Bone, 1998, 22(5 Suppl): 113S.
- [8] VICO L, COLLET P, GUIGNANDON A, et al. Effects of long-term microgravity exposure on cancellous and cortical weight-bearing bones of cosmonauts[J]. Lancet, 2000, 355(9215): 1607-1611.
- [9] ZHANG M, ISHIKAWA S, INAGAWA T, et al. Influence of mechanical force on bone matrix proteins in ovariectomised mice and osteoblast-like MC3T3-E1 cells[J]. In Vivo, 2017, 31(1): 87-95.
- [10] BASSO N, HEERSCHKE J N. Characteristics of *in vitro* osteoblastic cell loading models[J]. Bone, 2002, 30(2): 347-351.
- [11] BIN G, BO Z, JING W, et al. Fluid shear stress suppresses TNF- α -induced apoptosis in MC3T3-E1 cells: involvement of ERK5-AKT-FoxO3a-Bim/FasL signaling pathways[J]. Exp Cell Res, 2016, 343(2): 208-217.
- [12] JIANG J, ZHAO L G, TENG Y J, et al. ERK5 signalling pathway is essential for fluid shear stress-induced COX-2 gene expression in MC3T3-E1 osteoblast[J]. Mol Cell Biochem, 2015, 406(1-2): 237-243.
- [13] LI P, MA Y C, SHENG X Y, et al. Cyclic fluid shear stress promotes osteoblastic cells proliferation through ERK5 signaling pathway[J]. Mol Cell Biochem, 2012, 364(1-2): 321-327.
- [14] LEE W, LEDDY H A, CHEN Y, et al. Synergy between piezo1 and piezo2 channels confers high-strain mechanosensitivity to articular cartilage[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(47): E5114.
- [15] ROCIO S M, MORONI M, LEWIN G R, et al. Direct measurement of TRPV4 and PIEZO1 activity reveals multiple mechanotransduction pathways in chondrocytes[J]. Elife, 2017, 6: e21074.
- [16] 张波, 杨利娟, 丁宁, 等. 震荡流体剪切力通过ERK5信号通路促进成骨细胞增殖[J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(10): 1237-1240.
- [17] ZHANG B, YANG L J, DING N, et al. Oscillatory shear stress promotes MC3T3-E1 cells proliferation via ERK5 signaling pathway[J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 2016, 22(10): 1237-1240.
- [18] GREENBLATT M B, SHIM J H, GLIMCHER L H. Mitogen-activated protein kinase pathways in osteoblasts[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2013, 29(1): 63-79.
- [19] TURJANSKI A G, VAQUÉ J P, GUTKIND J S. MAP kinases and the control of nuclear events[J]. Oncogene, 2007, 26(22): 3240-3253.
- [19] LI P, MA Y C, SHEN H L, et al. Cytoskeletal reorganization mediates fluid shear stress-induced ERK5 activation in osteoblastic cells[J]. Cell Biol Int, 2012, 36(3): 229-236.

(编辑:薛泽玲)