

## 流体剪切力通过Piezo1调控MG-63骨肉瘤细胞的凋亡

马宏武<sup>1,2</sup>, 马成华<sup>1,2</sup>, 张宇<sup>1,2</sup>, 李培武<sup>1,2</sup>

1. 兰州大学第二医院急救中心, 甘肃 兰州 730000; 2. 兰州大学第二医院急诊外科, 甘肃 兰州 730000

**【摘要】目的:**探讨流体剪切力(FSS)对Piezo1的影响以及调控MG-63细胞凋亡的机制。**方法:**首先分两组Control和FSS组,FSS组施加FSS,Control组不干预,使用Western Blot检测两组caspase3和Piezo1的表达。再将细胞分为Control组、FSS组、GsMTx4组和FSS+GsMTx4组,FSS组加载FSS,GsMTx4组给予GsMTx4处理,FSS+GsMTx4组先给予GsMTx4处理后再加载FSS,检测各组凋亡相关蛋白caspase3、caspase9、BAD和Bax的表达水平。**结果:**60 min 12 dyn/cm<sup>2</sup>的FSS可上调MG-63细胞caspase3和Piezo1的表达,此外,FSS可通过上调Piezo1的水平从而促进caspase3、caspase9、BAD和Bax的表达水平。**结论:**FSS可通过Piezo1机械敏感离子通道促进MG-63人骨肉瘤细胞的凋亡,Piezo1可能是一种治疗骨肉瘤的新型分子靶点。

**【关键词】**流体剪切力;离子通道;骨肉瘤;凋亡

**【中图分类号】**R34

**【文献标志码】**A

**【文章编号】**1005-202X(2021)08-1013-05

## Fluid shear stress regulates apoptosis of MG-63 osteosarcoma cells through Piezo1

MA Hongwu<sup>1,2</sup>, MA Chenghua<sup>1,2</sup>, ZHANG Yu<sup>1,2</sup>, LI Peiwu<sup>1,2</sup>

1. Emergency Center, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730000, China; 2. Department of Emergency Surgery, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730000, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect of fluid shear stress (FSS) on Piezo1 and the mechanism of FSS regulating the apoptosis of MG-63 cells. **Methods** Cells were firstly divided into two groups, namely control group and FSS group. The expressions of caspase3 and Piezo1 were detected by Western Blot after interventions were applied to each group. Then the cells were divided into control group, FSS group, GsMTx4 group and FSS+GsMTx4 group. In FSS+GsMTx4 group, cells were intervened with GsMTx4 first and FSS second. The expression levels of caspase3, caspase9, BAD and Bax were detected after different interventions. **Results** FSS at 12 dyn/cm<sup>2</sup> for 60 min could up-regulate the expression of caspase3 and Piezo1 in MG-63 cells. Besides, FSS could promote the expression levels of caspase3, caspase9, BAD and Bax by up-regulating the expression of Piezo1. **Conclusion** FSS can promote the apoptosis of MG-63 human osteosarcoma cells through Piezo1 mechanosensitive ion channels. Piezo1 may be a new molecular target for the treatment of osteosarcoma.

**Keywords:** fluid shear stress; ion channel; osteosarcoma; apoptosis

### 前言

骨肉瘤(Osteosarcoma, OS)是最常见的恶性骨肿瘤,发病人群以儿童和青少年居多,通常表现为长骨干骺端的实体瘤<sup>[1]</sup>。尽管OS的发生率较低,约为每年每百万人4.4例,但它仍是与癌症相关儿童死亡的

最常见原因之一<sup>[2-3]</sup>。当前的疗法包括外科手术和全身化疗,手术以切除病灶为主,常造成肢体缺损,严重影响患者的心理健康和生活质量。尽管化学疗法增加了局部OS的总体生存率,但生存率仍然较低,约为50%~60%<sup>[4]</sup>,只有30%的转移性OS患者可以实现长期生存,且因耐药问题日益突出,在过去30~40年中OS生存率无明显提升<sup>[5]</sup>。因此,研究OS发展的相关机制和信号通路,寻找潜在的分子靶点对提升OS患者的生存期和生活质量至关重要。

机械敏感(Mechanosensitive, MS)离子通道是完整的膜蛋白,在活细胞的机械信号转导过程中起着至关重要的作用<sup>[6]</sup>。最近,Coste等<sup>[7-8]</sup>发现了一种新型的MS阳离子通道,即Piezo1蛋白,之后又通过同

**【收稿日期】**2021-03-19

**【基金项目】**国家自然科学基金(81672207)

**【作者简介】**马宏武,主治医师,从事创伤骨科研究, E-mail: mahongwu2019@sina.com

**【通信作者】**李培武,主任医师,从事创伤骨科研究, E-mail: lipei-wu2019@sohu.com

源性序列发现了Piezo2,这两种MS阳离子通道分别由FAM38A和FAM38B基因编码。它们是与细胞骨架密切相关的参与机械信号转导的阳离子通道蛋白,是进化过程中保守离子通道家族的一部分。Piezo1和Piezo2都在空腔器官的组织中广泛表达,例如胃、肺、膀胱、肠和血管内皮细胞<sup>[9]</sup>。MS离子通道功能异常会导致多种遗传疾病的发生,Piezo1的敲除会致死小鼠胚胎<sup>[10]</sup>,其功能获得性突变会导致遗传性干细胞增多症<sup>[11-12]</sup>,而功能丧失性突变会导致淋巴发育不良<sup>[13-14]</sup>。最近的研究发现Piezo1在OS细胞中高表达,在给予拉伸应力后OS细胞的Piezo1蛋白表达水平高于对照组,且会促进凋亡蛋白Bax、BAD、caspase 3和caspase 9的表达,提示Piezo1会促进OS细胞的凋亡<sup>[15]</sup>。

流体剪切力(Fluid Shear Stress, FSS)是骨骼组织中常见的机械应力,它可由肌肉收缩挤压间质液流经哈弗氏管及骨骼陷窝表面的细胞而产生<sup>[16]</sup>。在肿瘤微环境中OS细胞同样会受到间质液的刺激而产生FSS<sup>[17]</sup>。最近的研究表明,0.5~12.0 dyn/cm<sup>2</sup>的FSS可以诱导MG-63人骨肉瘤细胞的凋亡<sup>[18]</sup>。Sagar也报道了高FSS(60 dyn/cm<sup>2</sup>)消除的肿瘤细胞多于低FSS(15 dyn/cm<sup>2</sup>),而高FSS可以在4 h内消除90%以上的肿瘤细胞,FSS终止后16~24 h,肿瘤细胞的凋亡仍持续<sup>[19]</sup>。可见FSS会通过相关信号通路调控OS细胞的凋亡。

综上所述,Piezo1可调控OS细胞的凋亡,而作为Piezo1离子通道机械刺激之一的FSS也可促进OS细胞凋亡,因此,我们认为FSS可通过上调OS细胞Piezo1的表达,进而促进OS细胞的凋亡。为了验证这一科学假设,我们将给OS细胞加载60 min 12 dyn/cm<sup>2</sup>的FSS,检测Piezo1的表达情况,以及使用Piezo1的抑制剂GsMTx4进而明确FSS是否可通过Piezo1调控OS细胞的凋亡。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂和仪器

实验细胞:MG-63人骨肉瘤细胞购自中国科学院细胞库。实验试剂: $\alpha$ -MEM培养基(Hyclone,美国)、胎牛血清、胰蛋白酶、PBS结晶粉末(北京中衫金桥,中国)、RIPA裂解液、PMSF、甘氨酸、十二烷基硫酸钠、10% SDS、APS、TEMED、Marker、30%丙烯酰胺、Tris pH=8.8、Tris pH=6.8、BCA试剂盒、4×上样缓冲液、PVDF膜、封闭液、一抗稀释液、二抗稀释液、10×TBST Beta-actin一抗(Abcam,英国)、caspase3一抗(Abcam,英国)、caspase9一抗(Abcam,英国)、BAD一抗(Abcam,英国)、Bax一抗(Abcam,英国)、

Piezo1一抗(Abcam,英国)、山羊抗鼠二抗(Abcam,英国)、山羊抗兔二抗(Abcam,英国)、ECL化学发光液。主要仪器如下:生物安全柜(BIOBASE,中国)、细胞培养箱(Thermo,美国)、超高速离心机、磁力搅拌器、显微镜、冰箱(海尔,中国)、制冰机(雪科,中国)。

### 1.2 细胞培养

将购买的MG-63细胞解冻后吸出置于细胞培养瓶中,再加入4 mL由 $\alpha$ -MEM培养基、10%胎牛血清和青霉素-链霉素制成的完全培养基,吹打混匀后放入37℃、5%浓度二氧化碳的细胞培养箱中培养,每3 d换液一次。待细胞长满瓶底90%的区域时可进行细胞传代与冻存。

### 1.3 细胞爬片

在培养皿中不同区域滴入两滴培养基后将消毒的盖玻片放于培养基上(用于固定盖玻片),将消化好的细胞悬液向每个玻片上滴加600  $\mu$ L(注意不要滴到玻片以外的皿底区域),平稳置于培养箱中培养,3 h后待细胞完全贴于玻片上时再小心向各玻片上滴加5 mL培养基,再置于培养箱中培养,等待加载FSS。

### 1.4 加载FSS

第一部分实验分组为Control组和FSS组,将两组细胞玻片从皿底小心取出置于FSS加载装置流体小室中,组装好管路后,向储液罐中加入300 mL培养基,设定FSS大小为12 dyn/cm<sup>2</sup>,加载时长为60 min,启动装置开始加载FSS。第二部分实验分组为Control组、FSS组、GsMTx4组和FSS+GsMTx4组,其中GsMTx4组的细胞在加载FSS前使用10  $\mu$ mol/L的Piezo1的抑制剂GsMTx4处理,FSS+GsMTx4组的细胞使用10  $\mu$ mol/L的Piezo1的抑制剂GsMTx4处理后加载FSS,FSS的大小和加载时间与第一部分相同。

### 1.5 Western Blot检测

FSS加载完毕后,使用预冷PBS洗涤玻片3次,向玻片上加入配制好的裂解液在冰上裂解,用刮刀刮玻片收集裂解液,在12 000 rpm的超高速离心机中离心20 min后取上清,标记好样本名和体积后使用BCA试剂盒测定各组的蛋白浓度以确定上样量,再加入上样缓冲液,置于沸水中煮5 min,置于冰箱中备用。配胶、制胶后按照各组蛋白上样量向孔中加入样本,电泳结束后,使用PVDF膜进行转膜,电转结束后封闭液封闭1 h,再使用一抗摇床孵育1 h后过夜,10×TBST洗涤后二抗孵育1 h,再次洗涤后曝光。

### 1.6 统计学分析

使用SPSS20软件进行数据分析,所有实验数据均重复3次,计量资料以均数±标准差表示,使用 $t$ 检

验和单因素方差分析进行统计分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 FSS促进MG-63细胞的凋亡

对FSS组的MG-63细胞加载60 min 12 dyn/cm<sup>2</sup>的FSS后检测两组(Control组和FSS组)凋亡蛋白caspase3的表达情况。Western Blot检测结果见图1a。如图1b所示,FSS组的caspase3蛋白表达水平显

著高于对照组( $P<0.001$ ),这说明FSS可促进MG-63细胞的凋亡。

### 2.2 FSS促进MG-63细胞Piezo1的表达

使用Western Blot检测两组Piezo1的表达情况,结果见图1a。如图1c所示,FSS组Piezo1的表达水平较Control组显著升高( $P<0.001$ ),提示FSS可上调MG-63细胞机械敏感离子通道Piezo1的表达,这与FSS调控caspase3的表达呈同向变化。

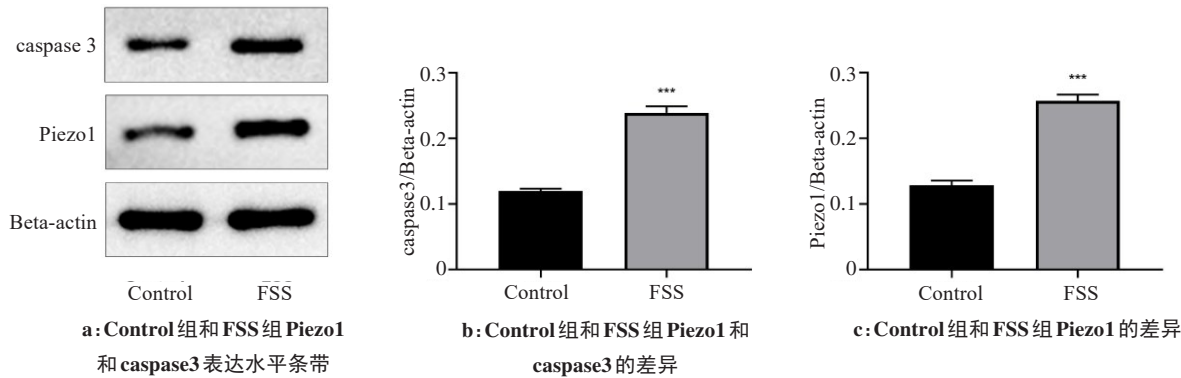


图1 Western Blot检测FSS组和Control组的caspase3和Piezo1的表达情况(\*\*\* $P<0.001$ )  
Fig.1 Expression levels of caspase3 and Piezo1 in FSS group and control group detected by Western Blot (\*\*\* $P<0.001$ )

### 2.3 FSS通过Piezo1促进MG-63细胞的凋亡

为了明确FSS是否可通过Piezo1离子通道调控MG-63细胞的凋亡,实验分组分为Control组、FSS组、GsMTx4组和FSS+GsMTx4组,依次给予各组对应的干预措施后检测凋亡相关蛋白caspase3、caspase9、BAD和Bax的表达。Western Blot结果见图2a。如图2b所示,FSS组的caspase3较Control组显著升高( $P<0.001$ ),而FSS+GsMTx4组的caspase3较FSS组显著降低( $P<0.001$ ),这表明FSS可通过Piezo1上调caspase3的表达。如图2c所示,FSS组caspase9的表达较Control组显著提高,FSS+GsMTx4组的caspase9较FSS组显著下降( $P<0.001$ ),说明FSS可通过Piezo1促进MG-63细胞caspase9的表达。如图2d所示,FSS显著提高了MG-63细胞凋亡蛋白BAD的表达( $P<0.001$ ),FSS+GsMTx4显著抑制了凋亡蛋白BAD的表达( $P<0.001$ ),提示FSS可通过Piezo1促进MG-63细胞凋亡蛋白BAD的表达。如图2e所示,FSS组的Bax表达水平较Control组明显升高( $P<0.001$ ),FSS+GsMTx4组Bax表达水平较FSS组明显下降,说明FSS是通过上调Piezo1离子通道的表达来提高Bax的表达水平。综上所述,FSS可通过上调Piezo1机械敏感离子通道的表达来上调凋亡相关蛋白的表达,进而促进MG-63细胞的凋亡。

## 3 讨论

Piezo1离子通道是一种新型的机械敏感离子通道,目前的研究大都集中在Piezo1蛋白的结构解析方面。本研究首次阐述了FSS通过Piezo1调控MG-63人骨肉瘤细胞的凋亡,实验过程中,我们使用了Piezo1的特异性抑制剂GsMTx4,确保在抑制Piezo1离子通道的同时不影响其他离子通道,相关蛋白在FSS组和FSS+GsMTx4组的表达差异足以说明FSS是通过Piezo1而非其他离子通道发挥作用,最终的结果表明FSS可上调机械敏感离子通道Piezo1的表达,进而上调凋亡相关蛋白caspase3、caspase9、BAD和Bax的表达,促进MG-63细胞的凋亡。

在肿瘤微环境中,间质液会流经OS细胞表面产生FSS,FSS的机械信号会经细胞膜和细胞内的信号传导抵达相关效应靶点,进而引起相应的细胞反应<sup>[20-22]</sup>。FSS可通过激活ERK5-AKT-FoxO3a信号通路下调FasL和Bim的表达进而抑制caspase3的激活,抑制成骨细胞的凋亡<sup>[16]</sup>。FSS不仅与成骨细胞的凋亡相关,最新的研究发现,FSS可上调Hep3B肝癌细胞、MG63骨肉瘤细胞、SCC25口腔鳞状细胞癌和A549癌性肺泡基底膜上皮细胞caspase3、caspase8和caspase9的表达并促进这些细胞的凋亡<sup>[23-24]</sup>。这说明



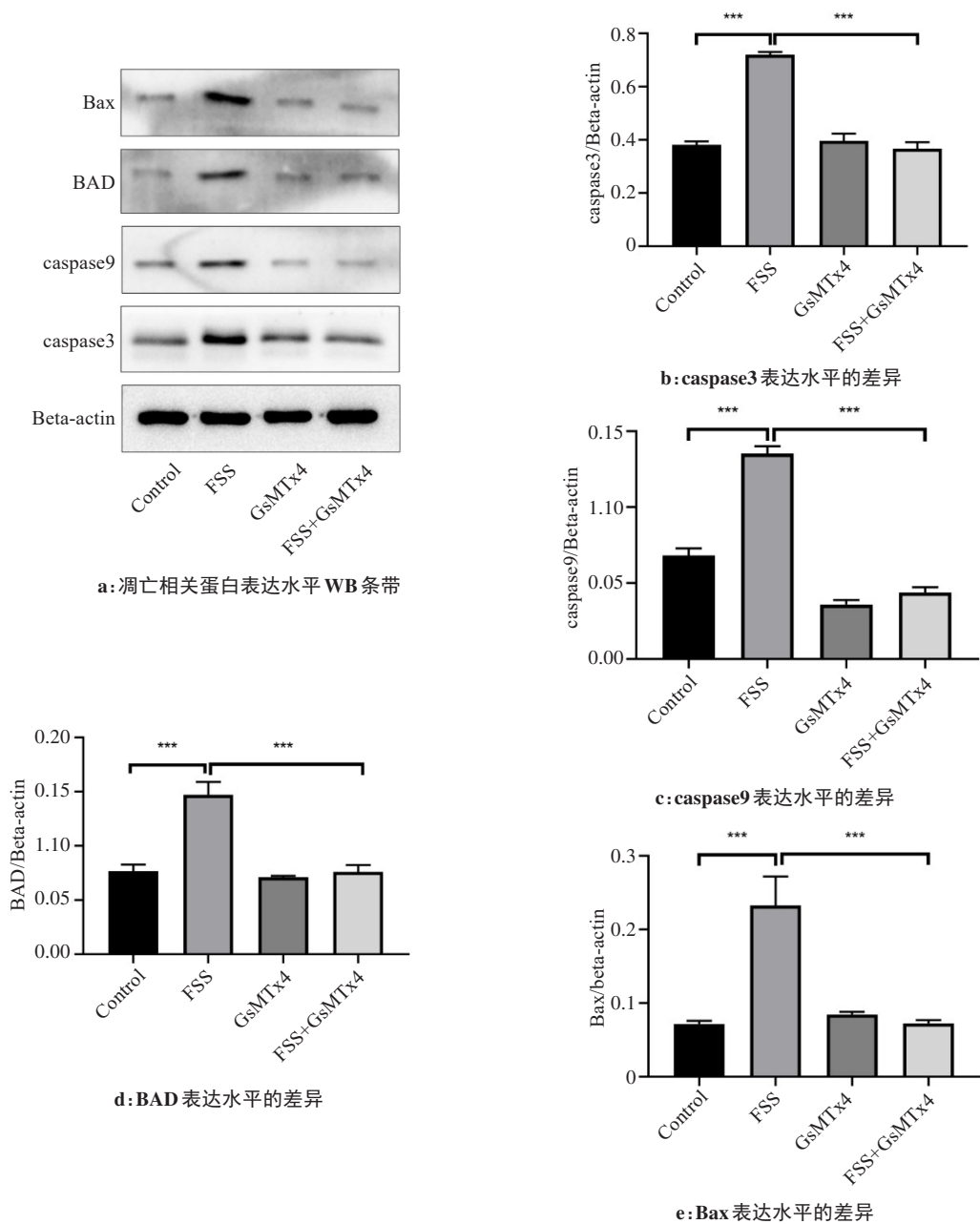


图 2 Western Blot 检测 Control 组、FSS 组、GsMTx4 组和 FSS+GsMTx4 组凋亡相关蛋白的表达情况(\*\*\* $P<0.001$ )

Fig.2 Expression levels of apoptosis-related proteins in control group, FSS group, GsMTx4 group and FSS+GsMTx4 group detected by Western Blot (\*\*\* $P<0.001$ )

FSS 与肿瘤细胞的凋亡密切相关,本实验中我们发现 FSS 可促进 caspase3、caspase9、BAD 和 Bax 等凋亡相关蛋白的表达,促进 MG-63 细胞的凋亡。有意思的是,Bin 等<sup>[16]</sup>研究提示 FSS 抑制了 caspase3 的表达,这与本研究的结果截然相反,这可能是细胞种系、细胞状态和加载的 FSS 大小时间不同所致。最近有研究关注了 FSS 将机械信号传递至细胞内的机制,发现 FSS 激活 ERK 呈双相,早期阶段不依赖于  $\text{Ca}^{2+}$ 、PI3-K 和 Rho 激酶,但需要 RAF 活性,而后期却依赖于  $\text{Ca}^{2+}$ ,不依赖 RAF 活性<sup>[25]</sup>。这说明 FSS 作用于细胞产生特定的细胞反应依赖于  $\text{Ca}^{2+}$ ,而  $\text{Ca}^{2+}$ 是通过相关离子通道进入细胞的。本研究中我们所关注的 Piezo1 机械

敏感离子通道就是一种阳离子通道,可允许包括  $\text{Ca}^{2+}$  在内的许多阳离子进入细胞,引起膜电位的变化,进而引起特定的细胞反应<sup>[26-27]</sup>。最近,有研究发现 Piezo1 在人 OS 细胞中高表达,给予拉伸应力后 Piezo1 在 MG-63 和 U2OS 细胞系的表达水平会明显升高,且凋亡相关蛋白 Bax、BAD、caspase3 和 caspase9 的表达也随之升高<sup>[15]</sup>,可见这种拉伸应力可增加 Piezo1 机械敏感离子通道的数量,促进更多的阳离子进入细胞,引起细胞的凋亡。本研究加载的外力是 OS 微环境中最常见的 FSS,它也是通过增加 Piezo1 机械敏感离子通道的数量,进而促进 MG-63 细胞凋亡的。除了外力不同,我们的研究仅纳入了 MG-63 这一种

细胞系,而没有研究U2OS和143B等细胞系,但研究结论高度一致。这也从侧面证实了细胞外应力的确可促进OS细胞的凋亡。

本研究揭示了Piezo1机械敏感离子通道是一个治疗OS的潜在靶点。临床中我们无法掌控FSS的大小,也无法通过某种设备将其应用于OS患者,但是我们可以促进肌肉活动以上调OS细胞表面Piezo1机械敏感离子通道的数量,进而促进OS细胞的凋亡。此外,通过Piezo1这一分子靶点研发新的药物可为临床治疗OS提供一种全新的选择。

本研究首次证实FSS可通过Piezo1机械敏感离子通道调控MG-3骨肉瘤细胞的凋亡。3这一种骨肉瘤细胞,而没有纳入U2OS和143B等细胞系,研究结论的可靠性有待验证。仅使用抑制剂GsMTx4来阻断Piezo1机械敏感离子通道,而没有使用小干扰RNA沉默Piezo1的表达,这可能影响实验结果的准确性。此外,仅采用Western Blot这一实验手段进行细胞凋亡的检测,而没有采用流式细胞仪和TUNEL法分析细胞的凋亡。

综上所述,FSS可通过Piezo1机械敏感离子通道促进MG-63人骨肉瘤细胞的凋亡,Piezo1可能是一种治疗骨肉瘤的新型分子靶点。

## 【参考文献】

- [1] GILL J, AHLUWALIA M K, GELLER D, et al. New targets and approaches in osteosarcoma[J]. *Pharmacol Ther*, 2013, 137(1): 89-99.
- [2] HILLER C, WEGLER J L, FOREST C P. Osteosarcoma: Accurately diagnosing this bone-chilling disease[J]. *Jaapa*, 2016, 29(12): 29-35.
- [3] OTTAVIANI G, JAFFE N. The epidemiology of osteosarcoma[J]. *Cancer Treat Res*, 2009, 152: 3-13.
- [4] LONGHI A, ERRANI C, DE PAOLIS M, et al. Primary bone osteosarcoma in the pediatric age: state of the art[J]. *Cancer Treat Rev*, 2006, 32(6): 423-436.
- [5] JAFFE N, PURI A, GELDERBLUM H. Osteosarcoma: evolution of treatment paradigms[J]. *Sarcoma*, 2013, 137: 203-213.
- [6] RIDONE P, VASSALLI M, MARTINAC B. Piezo1 mechanosensitive channels: what are they and why are they important[J]. *Biophys Rev*, 2019, 11(5): 795-805.
- [7] 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.
- [8] COSTE B, XIAO B, SANTOS J S, et al. Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels[J]. *Nature*, 2012, 483(7388): 176-181.
- [9] MARTINAC B, COX C D. Mechanosensory transduction: focus on ion channels[M]. Amsterdam: Elsevier, 2016.
- [10] LI J, HOU B, TUMOVA S, et al. Piezo1 integration of vascular

- architecture with physiological force[J]. *Nature*, 2014, 515(7526): 279-282.
- [11] BAE C, GNANASAMBANDAM R, NICOLAI C, et al. Xerocytosis is caused by mutations that alter the kinetics of the mechanosensitive channel PIEZO1[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(12): E1162-E1168.
- [12] GOTTLIEB P A, SACHS F. Piezo1: properties of a cation selective mechanical channel[J]. *Channels (Austin)*, 2012, 6(4): 214-219.
- [13] FOTIOU E, MARTIN-ALMEDINA S, SIMPSON M A, et al. Novel mutations in Piezo1 cause an autosomal recessive generalized lymphatic dysplasia with non-immune hydrops fetalis[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 80-85.
- [14] LUKACS V, MATHUR J, MAO R, et al. Impaired Piezo1 function in patients with a novel autosomal recessive congenital lymphatic dysplasia[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 23-29.
- [15] JIANG L, ZHAO Y D, CHEN W X. The function of the novel mechanical activated ion channel Piezo1 in the human osteosarcoma cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 23: 5070-5082.
- [16] BIN G, BO Z, JING W, et al. Fluid shear stress suppresses TNF-alpha-induced apoptosis in MC3T3-E1 cells: involvement of ERK5-AKT-FoxO3a-Bim/FasL signaling pathways[J]. *Exp Cell Res*, 2016, 343(2): 208-217.
- [17] CHIVUKULA V K, KROG B L, NAUSEEF J T, et al. Alterations in cancer cell mechanical properties after fluid shear stress exposure: a micropipette aspiration study[J]. *Cell Health Cytoskeleton*, 2015, 7: 25-35.
- [18] LIEN S C, CHANG S F, LEE P L, et al. Mechanical regulation of cancer cell apoptosis and autophagy: roles of bone morphogenetic protein receptor, Smad1/5, and p38 MAPK[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833(12): 3124-3133.
- [19] REGMI S, FU A, LUO K Q. High shear stresses under exercise condition destroy circulating tumor cells in a microfluidic system[J]. *Scienti Repor*, 2017, 7: 69-75.
- [20] DING N, GENG B, LI Z, et al. Fluid shear stress promotes osteoblast proliferation through the NFATc1-ERK5 pathway[J]. *Connect Tissue Res*, 2019, 60(2): 107-116.
- [21] MA C, GENG B, ZHANG X, et al. Fluid shear stress suppresses osteoclast differentiation in RAW264.7 cells through extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5) signaling pathway[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 26: 318-370.
- [22] ZHANG B, AN L, GENG B, et al. ERK5 negatively regulates Kruppel-like factor 4 and promotes osteogenic lineage cell proliferation in response to MEK5 overexpression or fluid shear stress[J]. *Connect Tissue Res*, 2019, 9: 1-12.
- [23] DIXON J B, GREINER S T, GASHEV A A, et al. Lymph flow, shear stress, and lymphocyte velocity in rat mesenteric prenodal lymphatics[J]. *Microcirculation*, 2006, 13(7): 597-610.
- [24] KAWAI Y, KAIDOH M, YOKOYAMA Y, et al. Pivotal roles of shear stress in the microenvironmental changes that occur within sentinel lymph nodes[J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(7): 1245-1252.
- [25] FUKADA T, SAKAJIRI H, KUROMA M, et al. Fluid shear stress applied by orbital shaking induces MG-63 osteosarcoma cells to activate ERK in two phases through distinct signaling pathways[J]. *Biochem Biophys Rep*, 2017, 9: 257-265.
- [26] WANG L, ZHOU H, ZHANG M, et al. Structure and mechanogating of the mammalian tactile channel Piezo2[J]. *Nature*, 2019, 573(7773): 225-229.
- [27] LIN Y C, GUO Y R, MIYAGI A, et al. Force-induced conformational changes in Piezo1[J]. *Nature*, 2019, 573(7773): 230-234.

(编辑:陈丽霞)