

不同强度流体剪切力对MC3T3-E1成骨细胞内Piezo1蛋白表达的影响

何良志,姜金,刘众成,张成俊,路凡,滕飞,耿彬,夏亚一
兰州大学第二医院骨科/甘肃省骨与关节疾病重点实验室,甘肃 兰州 730000

【摘要】目的:研究在不同强度的流体剪切力作用下,MC3T3-E1成骨细胞内Piezo1蛋白的表达差异。**方法:**对载玻片上贴附的MC3T3-E1成骨细胞加载不同强度(0、3、6、9、12、15、18 dyne/cm²)流体剪切力45 min,通过免疫荧光和Western Blot分别观察MC3T3-E1成骨细胞内Piezo1蛋白的表达。**结果:**免疫荧光及Western Blot结果显示,随着流体剪切力强度的增加,MC3T3-E1成骨细胞内Piezo1蛋白表达量逐渐递增,6 dyne/cm²时达顶峰,此后逐渐下降,15、18 dyne/cm²时与空白组水平相当,显微镜下可观察到细胞结构破坏,细胞被冲散。**结论:**流体剪切力可促进MC3T3-E1成骨细胞内Piezo1蛋白表达;加力6 dyne/cm²时,Piezo1表达最高;较大的流体剪切力非但不能促进MC3T3-E1成骨细胞内Piezo1蛋白的表达,反而对细胞起破坏作用。

【关键词】流体剪切力;MC3T3-E1;成骨细胞;Piezo1;蛋白表达

【中图分类号】R318;R329.2

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2020)12-1579-04

Effect of different fluid shear stress intensities on expression of Piezo1 protein in MC3T3-E1 osteoblasts

HE Liangzhi, JIANG Jin, LIU Zhongcheng, ZHANG Chengjun, LU Fan, TENG Fei, GENG Bin, XIA Yayi

Department of Orthopaedics, Second Hospital of Lanzhou University; Key Laboratory of Bone and Joint Diseases of Gansu Province, Lanzhou 730000, china

Abstract: Objective To investigate the expression differences of Piezo1 protein in MC3T3-E1 osteoblasts under different fluid shear stress intensities. **Methods** The MC3T3-E1 osteoblasts attached to the slides were subjected to different fluid shear stress (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 dyne/cm²) for 45 minutes, and then the expression of Piezo1 protein in MC3T3-E1 osteoblasts was respectively observed by immunofluorescence and Western Blot. **Results** The results from immunofluorescence and Western Blot showed that with the increase of shear stress, the Piezo1 protein expression in MC3T3-E1 osteoblasts increased accordingly, but at 6 dyne/cm², the expression reached its highest and then decreased gradually, and at 15 or 18 dyne/cm², the expression kept the same with the blank group, in which the cells were found destroyed and dispersed. **Conclusion** The increase of fluid shear stress can improve the expression of Piezo1 protein, and when the stress is added to 6 dyne/cm², the expression reaches its highest point, but a stress greater than that cannot promote the expression of Piezo1 protein in MC3T3-E1 osteoblasts any more, and instead it damages the cells.

Keywords: fluid shear stress; osteoblasts; Piezo1; protein expression

【收稿日期】2020-05-20

【基金项目】国家自然科学基金(8187401, 81960403, 82060405);甘肃省中医药管理局科研项目(GZK-2017-51);甘肃省青年科技基金计划(17JR5RA226);兰州大学第二医院“萃英科技创新”计划(CY2017-ZD02, CY2017-QN11, CY2017-QN12);兰州市科技计划项目(2016-3-121, 2019-ZD-58);“中央高校基本科研业务费专项资金”重点研究基地建设项目(lzujbky-2020-kb17)

【作者简介】何良志,硕士研究生,研究方向:细胞生物力学、关节外科,E-mail: 976620652@qq.com;姜金,博士,研究方向:细胞生物力学、关节与运动医学,E-mail: jiangjin2007@163.com(何良志和姜金为共同第一作者)

【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: xiayayi123@136.com

前言

骨骼是伴随体质量、运动和重力相关的机械负荷变化的重要器官,这种机械负荷引起的骨重塑过程是通过促进成骨的MC3T3-E1成骨细胞和骨吸收的破骨细胞之间的平衡实现的^[1]。当这种平衡被打破,特别是大量骨流失时,会出现骨质疏松的相关症状,而长期卧床或运动量少的人更容易患骨质疏松症,MC3T3-E1成骨细胞功能受损则是骨流失的关键因素。然而,在骨骼的形成过程中,对相应的机械机制和潜在的分子机制知之甚少。

Piezo1蛋白是通过外界刺激激活的可渗透性Ca²⁺

跨膜阳离子通道,由3个阳离子孔单元组成^[2]。目前研究表明,机械敏感性Piezo1通道介导了多种细胞类型的机械反应,其可以感知血管内皮细胞和红细胞接受的流体剪切力,从而调节血压^[3]和红细胞体积^[4],机械激活的Piezo1通道是淋巴管形成的关键调节剂^[5]。而Piezo1的敲除会导致小鼠血管发育缺陷,造成胚胎期死亡^[6]。体外研究发现,流体流动引起的机械应力和剪切应力会通过激活Ca²⁺机械敏感通道来激活成骨细胞中细胞内Ca²⁺水平,促进细胞内基因表达,从而促进成骨细胞分化^[7]。先前研究发现,加载不同时间流体剪切力后,MC3T3-E1成骨细胞内Piezo1蛋白表达发生改变^[8],本实验通过对MC3T3-E1成骨细胞加载不同强度流体剪切力,应用免疫荧光和Western Blot方法,分别从细胞和蛋白层面,观察流体剪切力强度对MC3T3-E1成骨细胞内Piezo1蛋白表达的影响。

1 实验方法

1.1 主要实验材料与仪器

MC3T3-E1成骨细胞(国家生物医学实验细胞资源库,北京); α -MEM基础培养基(Gibco,美国);胎牛血清(FBS)(PAN-Biotech公司,德国);青-链霉素、RIPA裂解液、PMSF、T-riton(碧云天生物,中国);0.25%胰蛋白酶消化液(赛业生物科技,中国);磷酸盐缓冲液(PBS)(Hyclone,美国);4X蛋白上样缓冲液、山羊血清、DAPI(Solarbio,中国);PVDF膜(Millipore,美国);ECL发光液(Biosharp,中国);Piezo1兔源单克隆抗体(Proteintech,中国); β -actin、山羊抗兔Ig二抗、山羊抗鼠Ig二抗、山羊抗兔荧光二抗(中山金桥,中国)。细胞培养箱(赛默飞世尔科技,中国);蛋白电泳仪、电转仪(Bio-Rad,美国);BX51荧光显微镜(Olympus,日本)。

1.2 细胞培养

本实验细胞采用MC3T3-E1成骨细胞,购自国家生物医学实验细胞资源库, α -MEM基础培养基、胎牛血清及青-链霉素以90:10:1比例配为完全培养基,细胞培养瓶内加入4 mL完全培养基于37℃、5% CO₂培养箱内培养,每2~3 d细胞换液1次,当细胞生长贴壁至80%~90%时,PBS清洗2遍,加300 μ L胰蛋白酶消化细胞后,以1:2进行传代。

1.3 细胞爬片及加载流体剪切力

细胞生长至80%~90%,PBS清洗2遍,加入300 μ L胰蛋白酶消化细胞,血球计数板计数后以 1×10^6 /mL的密度接种至(2 \times 4) cm²盖玻片上,盖玻片置于(10 \times 10) cm²培养皿内过夜,次日待细胞贴壁牢固后,取出盖玻片,采用本实验室自主研发设计的流体剪切力

加载装置(图1),将载有细胞的盖玻片细胞面向上置于加载装置凹槽内,加载装置内液体为基础培养基,分别以不同强度循环流体剪切力加载45 min后取出盖玻片,进行下一步操作。



图1 本实验室自主研发设计的流体剪切力加载装置

Fig.1 Loading device of fluid shear stress independently developed and designed by the laboratory

1.4 免疫荧光

流体剪切力处理后的细胞,置于(10 \times 10) cm²培养皿内,加入4%多聚甲醛固定30 min,冷PBS洗3遍,每遍5 min,0.4%T-riton通透20 min,冷PBS洗3遍,每遍5 min,37℃水浴锅内10%山羊血清封闭30 min,1:300配比Piezo1单克隆抗体,细胞孵育一抗过夜,加入冷PBS在摇床上洗净未结合的一抗,加入1:300配制的荧光二抗,37℃水浴锅内避光孵育1 h取出,冷PBS摇床上清洗3遍,避光加DAPA孵育10 min再次清洗3遍,吸净载玻片表面液体,加甘油封片后在荧光显微镜下观察。

1.5 Western Blot

加载完流体剪切力的细胞,4℃预冷的PBS冲洗细胞2遍,RIPA和PMSF以100:1配为裂解液后,每盖玻片加裂解液200 μ L冰上裂解细胞,细胞刮刀轻刮盖玻片收集裂解液,12 000 r/min离心20 min后取上清,考马斯亮蓝测定总蛋白浓度,加上样缓冲液煮沸10 min后备用。蛋白在8% SDS-PAGE电泳(浓缩胶80 V、分离胶120 V),350 mA恒流转膜4 h,封闭2 h后加一抗4℃摇床上孵育过夜;TBST摇床上洗膜10 min、3次,二抗孵育1 h,TBST洗膜10 min、3次。滴加ECL发光液,曝光。

2 结果

加载不同强度循环流体剪切力45 min后,15 dyne/cm²组、18 dyne/cm²组细胞发生形变,部分贴壁细胞破裂或被流水冲走,而其余各组细胞形态较加力之前无明显改变,这表明流体剪切力强度过大时,会影响细胞生长、

甚至对其有致死作用(图2)。免疫荧光及结果显示(图3),与空白组相比,加力(3、6、9、12 dyne/cm²)后的MC3T3-E1成骨细胞内Piezo1蛋白表达量明显增加,加载6 dyne/cm²力时,Piezo1表达增加最为明显,此后,荧光强度随流体剪切力强度增加而逐渐下降,但仍比空白组高,Western Blot结果(图4)佐证了上述结论,而当流体剪切力加载到15、18 dyne/cm²时,Piezo1蛋白表达量下降,与未加力组持平,这可能与细胞破坏有关。

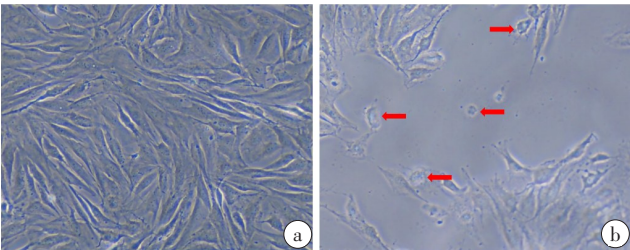


图2 加载6 dyne/cm²(a)和18 dyne/cm²(b)流体剪切力45 min后的细胞形态(×100)

Fig.2 Cell morphology when fluid shear force added to 6 dyne/cm² (a) and 18 dyne/cm² (b) for 45 mins (×100)

3 讨论

机械负荷作用于成骨细胞刺激骨骼形成并增强骨骼强度,但目前对其作用机制了解甚少。成骨细胞存在于骨质内,参与感知机械负荷的变化,并产生可以促进成骨细胞形成的信号。在这个反应中,Piezo1机械敏感性离子通道是必不可少的,Piezo1通道是由2 547个氨基酸构成的三聚体螺旋桨状结构,目前鉴定出9个重复单元,每个单元由4个跨膜螺旋构成,组装出高度弯曲的叶片状结构。最后一个跨膜螺旋包裹着一个疏水孔,随后是3个细胞内开窗位点和侧门,包含确定孔属性的残基。中心区域形成90Å长的细胞内束状结构,经历杠杆运动后通过C末端结构域锚类似结构域和外螺旋的界面将THU连接到孔^[2,9]。

以往的研究表明,Piezo1通道可在多种细胞、脏器和组织内表达,包括膀胱、肾、肺、内皮细胞、红细胞、牙周韧带细胞、软骨细胞和成骨细胞^[8]。而Sun等^[10]发现,Piezo1蛋白在小鼠骨与肺中的表达明显高于其他各脏器,敲除掉小鼠成骨细胞内Piezo1后,出现小鼠颅骨未闭合、

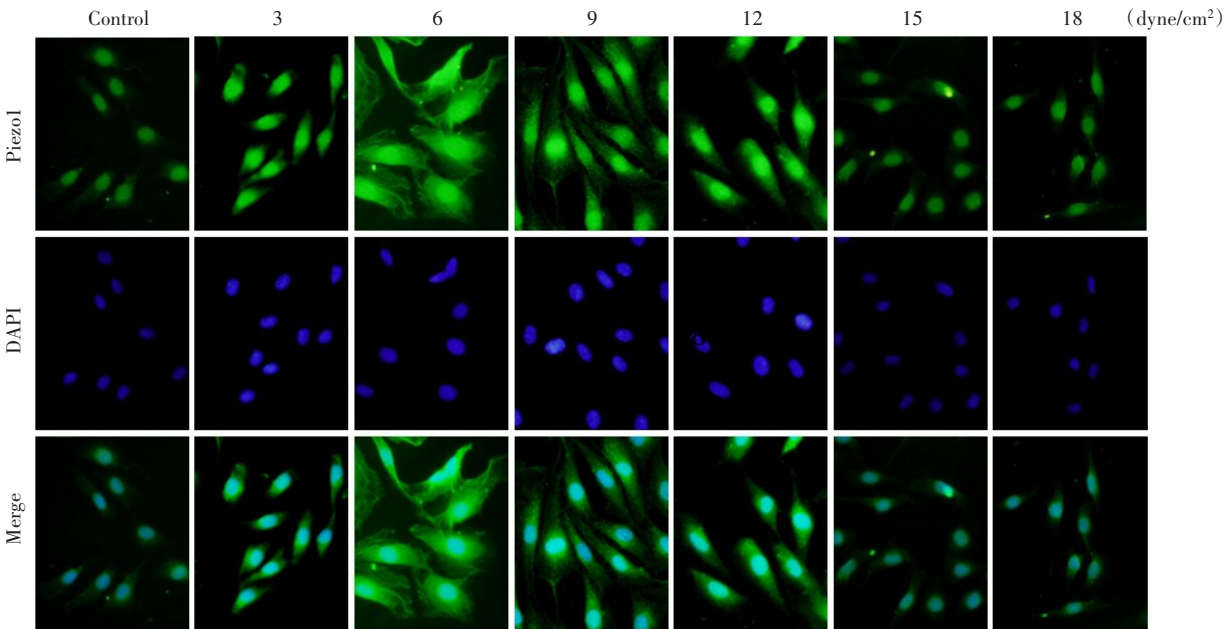


图3 加载不同强度流体剪切力45 min后,免疫荧光结果显示Piezo1蛋白表达(×200)

Fig.3 The expression of Piezo1 protein in the immunofluorescence results after 45 min's different fluid shear stress (×200)

身材矮小、肢体短缩等表现,这表明Piezo1蛋白在骨生成过程中不可或缺,而对Piezo1的过表达则显示出促进成骨细胞增殖和促骨形成的作用。笔者之前的研究发现,流体剪切力可以促进成骨细胞内Piezo1蛋白的表达,且在作用45 min时表达量最高,这里笔者探索了最佳强度流体剪切力对成骨细胞内Piezo1蛋白表达的影响,发现随着剪切力强度的升高,其表达也随之升高,而6 dyne/cm²时为最适合作用强度,这进一步完善了流

体力学在骨生成方面的研究,从而为对抗骨质疏松提供新的研究方向。

虽然对成骨细胞加载流体剪切力可以促进细胞内Piezo1的表达,但是笔者也发现,当加载力增加到15 dyne/cm²以后,细胞骨架开始破碎,部分细胞被流体小室内液体冲掉,而Western Blot及免疫荧光的结果同样证实,在高强度流体剪切力作用下细胞内Piezo1表达并没有提升,这表明高强度的流体剪切力对骨形成起

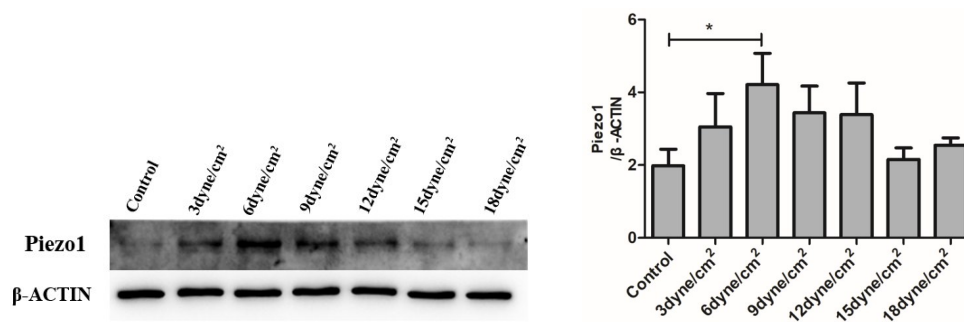


图4 Western Blot检测不同强度流体剪切力下Piezo1蛋白的表达(* $P<0.05$)

Fig.4 The expression of Piezo1 protein in Western Blot under different fluid shear forces (* $P<0.05$)

抑制作用。结合之前的研究,笔者证实对成骨细胞加载6 dyne/cm²流体剪切力45 min的情况下,成骨细胞内Piezo1蛋白表达最高。然而,不同细胞对流体剪切力作用后的反应不同,对血管内皮细胞加载流体剪切力后,Piezo1蛋白表达较未加力时下降,且在4.14 dyne/cm²时下降最明显,由于正常动脉分叉处流体剪切力为 ± 4 dyne/cm²,而较高强度流体剪切力可以对抗动脉粥样硬化^[11],所以赵一蔚等^[12]认为Piezo1蛋白参与低剪切应力诱导的动脉粥样硬化过程。不同于血流较快的血管,骨小梁间室内液体流动缓慢,提升间室内液体流速后,刺激成骨细胞内Piezo1蛋白表达,从而促进成骨细胞增殖和骨生成。

尽管如此,人们对于流体剪切力如何通过Piezo1通道影响成骨细胞增殖知之甚少。最近,Zhou等^[13]发现流体剪切力作用下,Piezo1表达升高可激活Ca²⁺内流,刺激钙调神经磷酸酶,后者通过诱导NFATc1/YAP1/β-catenin复合物的去磷酸化以及NFATc1/YAP1/β-catenin复合物的形成来促进NFATc1,YAP1和β-catenin转录因子的协同激活,从而促进骨生成。激动剂Yoda1对Piezo1的刺激足以复制流体对骨细胞的影响,敲除Piezo1的成骨细胞明显降低了小鼠的骨量和强度^[14]。这个观点被Yoneda等^[15]在成骨细胞内验证。最近一项研究发现,流体剪切力可以增加成骨细胞内Runx-2表达^[16]。

除成骨细胞外,Piezo1的研究还出现在软骨细胞、骨髓间充质干细胞、骨细胞内。敲除掉软骨细胞内Piezo1的小鼠快速出现了骨质疏松及自发性骨折^[17]。抑制骨髓间充质干细胞内Piezo1促进其成骨分化,而抑制成脂分化^[18]。此外,Piezo1激动剂Yoda1增加了骨细胞内钙动员,降低了骨细胞内Sost基因的表达^[19]。对于不同细胞的研究,进一步丰富了Piezo1蛋白在骨骼发育中的理论解释。

对于其他通路的研究目前未见报道,这些研究的进行将会更加全面的揭示流体力学在骨骼形成过程中发挥的作用,并为临床治疗骨质疏松以及相关药物研发提供理论依据。

【参考文献】

[1] IWANIEC U T, TURNER R T. Influence of body weight on bone

mass, architecture and turnover [J]. J Endocrinol, 2016, 230(3): R115-130.

[2] GE J P, LI W Q, ZHAO Q C, et al. Architecture of the mammalian mechanosensitive Piezo1 channel [J]. Nature, 2015, 527(7576): 64-69.

[3] RODE B, SHI J, FNDESH N, et al. Piezo1 channels sense whole body physical activity to reset cardiovascular homeostasis and enhance performance [J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 350.

[4] CAHALAN S M, LUKACS V, RANADE S S, et al. Piezo1 links mechanical stress to red blood cell volume [J]. Elife, 2015, 4: e07370.

[5] NONOMURA K, LUKACS V, SWEET D T, et al. Mechanically activated ion channel Piezo1 is required for lymphatic valve formation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(50): 12817-12822.

[6] RANADE S S, QIU Z Z, WOO S H, et al. Piezo1, a mechanically activated ion channel, is required for vascular development in mice [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(28): 10347-10352.

[7] SUZUKI T, NOTOMI T, MIYAJIMA D, et al. Osteoblastic differentiation enhances expression of TRPV4 that is required for calcium oscillation induced by mechanical stress [J]. Bone, 2013, 54(1): 172-178.

[8] 闫亮, 姜金, 张小辉, 等. 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 [J]. 中国医学物理学杂志, 2018, 35(7): 839-842.

YAN L, JIANG J, ZHANG X H, et al. The effect of fluid shear force at different load times on the expression of Piezo1 mechanosensitive protein in osteoblasts [J]. Chinese Journal of Medical Physics, 2018, 35(7): 839-842.

[9] ZHAO Q C, ZHOU H, CHI S P, et al. Structure and mechanogating mechanism of the Piezo1 channel [J]. Nature, 2018, 554(7693): 487-492.

[10] SUN W J, CHI S P, LI Y H, et al. The mechanosensitive Piezo1 channel is required for bone formation [J]. Elife, 2019, 8: e47454.

[11] CHIU J J, CHEN L J, CHEN C N, et al. A model for studying the effect of shear stress on interactions between vascular endothelial cells and smooth muscle cells [J]. J Biomech, 2004, 37(4): 531-539.

[12] 赵一蔚, 任培培, 于凤旭, 等. 剪切应力强度对内皮细胞Piezo1表达的影响 [J]. 中国医学物理学杂志, 2019, 36(4): 474-478.

ZHAO Y W, REN P L, YU F X, et al. The influence of shear stress intensity on the expression of Piezo1 in endothelial cells [J]. Chinese Journal of Medical Physics, 2019, 36(4): 474-478.

[13] ZHOU T F, GAO B, FAN Y, et al. Piezo1/2 mediate mechanotransduction essential for bone formation through concerted activation of NFAT-YAP1-β-catenin [J]. Elife, 2020, 9: e52779.

[14] LI X, HAN L, NOOKAEW I, et al. Stimulation of Piezo1 by mechanical signals promotes bone anabolism [J]. Elife, 2019, 8: e49631.

[15] YONEDA M, SUZUKI H, HATANO N, et al. Piezo1 and TRPV4, which are distinct mechano-sensors in the osteoblastic MC3T3-E1 cells, modify cell-proliferation [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(19): 4960.

[16] SONG J, LIU L, LÜ L, et al. Fluid shear stress induces Runx-2 expression via upregulation of Piezo1 in MC3T3-E1 cells [J]. Cell Biol Int, 2020, 44(7): 1491-1502.

[17] HENDRICKX G, FISCHER V, LIEDERT A, et al. Piezo1 inactivation in chondrocytes impairs trabecular bone formation [J]. J Bone Miner Res, 2020. doi: 10.1002/jbmr.4198.

[18] SUGIMOTO A, MIYAZAKI A, KAWARABAYASHI K, et al. Piezo type mechanosensitive ion channel component 1 functions as a regulator of the cell fate determination of mesenchymal stem cells [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 17696.

[19] SASAKI F, HAYASHI M, MOURI Y, et al. Mechanotransduction via the Piezo1-Akt pathway underlies Sost suppression in osteocytes [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 521(3): 806-813.

(编辑:薛泽玲)