

文章编号:1004-7220(2010)02-0143-05

抑制骨架蛋白对正常大鼠肾细胞力学性能的影响

王立, 安美文, 李晓娜, 刘阳

(太原理工大学 应用力学与生物医学工程研究所, 太原 030024)

摘要: 目的 确定正常大鼠肾细胞内骨架蛋白的变化对细胞力学性能的影响。方法 通过微管吸吮技术对正常大鼠肾细胞用细胞松弛素 D、秋水仙素和 blebbistatin 进行处理, 然后分析细胞的杨氏模量和黏弹性的变化。结果 经过骨架蛋白抑制剂的处理, 细胞的弹性模量表现出显著的下降; 与对照组相比, 秋水仙素处理后细胞的黏弹性没有显著变化, 而细胞松弛素 D 和 blebbistatin 处理后细胞的黏弹性显著降低。结论 Blebbistatin 对正常大鼠肾细胞力学特性的影响不依赖于细胞骨架的改变; 抑制肌动蛋白聚合或抑制肌球蛋白 II ATP 酶的活性能够大幅降低细胞杨氏模量和黏弹性, 微管蛋白是否正常聚合与细胞杨氏模量相关而对细胞黏弹性没有显著影响。

关键词: 微管吸吮; 细胞骨架; 杨氏模量; 黏弹性

中图分类号: Q66 **文献标志码:** A

Effect of inhibiting cytoskeleton on the mechanical properties of normal rat kidney cells

WANG Li, AN Mei-Wen, LI Xiao-Na, LIU Yang (*Institute of Applied Mechanics and Biomedical Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, China*)

Abstract: **Objective** To determine whether the alteration of cytoskeleton interfere with the mechanical properties of normal rat kidney cells (NRKCs). **Method** NRKCs were treated with cytochalasin D, colchicine and blebbistatin using micropipette aspiration technique, and the changes in Young's modulus and viscoelasticity of NRKCs were assessed. **Results** The Young's modulus of is significantly decreased after treated with all cytoskeleton inhibitors. Compared to the control, the viscoelasticity is significantly decreased in NRKCs treated with cytochalasin D and blebbistatin, but in not in colchicines-treated cells. **Conclusions** The effect of blebbistatin on NRKCs mechanical properties is independent of cytoskeleton. Inhibition of assembling of actin meshwork or the activity of myosin II ATPase will reduce cell's Young's modulus and viscoelasticity. In addition, microtubule assembling is correlated with Young's modulus rather than viscoelasticity.

Key words: Micropipette aspiration; Cytoskeleton; Young's modulus; Viscoelasticity

正常哺乳动物细胞力学特性的研究为病理状态下的细胞力学-生物学联系提供了基本数据和框架。细胞骨架是由不同类型生物大分子(微丝、微管和中间纤维等)构成的分子网架, 这些分子网架控制着力传导以及细胞对机械应力的响应。生化变化与

应力刺激共同调节细胞骨架结构控制着细胞力学特性, 一系列疾病^[1]往往伴随着细胞力学特性的异常。

微丝和微管蛋白调节细胞预应力从而强烈地影响着细胞的力学特性和功能^[2], 在流体诱导的机械

收稿日期:2009-12-21; 修回日期:2010-03-10

基金项目:国家自然科学基金资助项目(10672114), 山西省自然科学基金资助项目(2007011011)

作者简介:王立(1981-), 男, 研究方向:生物力学。

通讯作者:安美文, Tel: 13068046412, E-mail: meiwen_an@163.com。

应力对肾细胞影响的体内和体外研究中发现^[3],小管流体影响肾脏上皮细胞表型,流体对纤溶酶原活化物表达的抑制作用可以通过阻止肌动蛋白骨架重组来缓解。表明细胞骨架的改变与正常和病理情况下肾上皮细胞关系密切。肌球蛋白 II 作为细胞骨架的分子马达,是非肌细胞中细胞骨架的组成成分,与细胞的变形性密切相关^[4]。本实验分别测定了骨架蛋白微丝、微管聚合的抑制剂,以及肌球蛋白 II ATP 酶的活性抑制剂作用下各组细胞的弹性模量和黏弹性参数。通过对比正常组细胞与单一细胞骨架蛋白受抑制之间的差异,获得了单一骨架蛋白对细胞弹性和黏弹性特性的影响。肾脏细胞力学特性研究工作可以为肾脏病的病因、发病机制提供更充实的理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与药物处理

实验所采用的正常大鼠肾上皮细胞 (Normal rat kidney epithelial cells, 以下简称 NRK) 购于中国科学院上海细胞库,培养于 DMEM 培养基中(高糖,含 10% 胎牛血清),CO₂ 含量 5%,温度 37 °C 培养至对数生长期待用。

实验用细胞经过 0.25% 胰酶消化 5 min 后,轻轻吹打至悬浮。分别采用抑制肌动蛋白聚合的 2 μmol/L 细胞松弛素 D,抑制微管蛋白聚合的 20 μg/mL 的秋水仙素,抑制肌球蛋白 II ATP 酶活性的 30 μmol/L blebbistatin 处理细胞 15 min。利用没有加入骨架蛋白抑制剂的细胞作为对照组。

1.2 细胞弹性模量和黏弹性参数测定

实验采用微管吸吮方法测定 NRK 细胞弹性模量和黏弹性参数^[5],在测量小室内加入新鲜培养液以保持细胞的活性,所有实验细胞的测量在 4 min 内完成。细胞在实验条件下的变形可以在释放后自行恢复,如果细胞发生破裂,则结果不计入实验数据。

测量弹性模量实验中,首先给单个 NRK 细胞施加约 0.01 kPa 的负压,使细胞发生弹性响应产生微小位移与管口密封,持续时间 20 s,以此作为初始状态。随后,调节压力逐步施加幅值为 0.02 kPa 的阶跃负压,每次经 20 s 平衡细胞达到稳态后,记录细胞被吸入长度和相应的负压。依细胞差异调节施加

负压范围,使吸入长度小于微管内径,保证细胞变形在弹性范围内。

弹性模量由以下方程得出:

$$E = \frac{3a\Delta p}{2\pi L}\Phi(\eta) \quad (1)$$

$\Phi(\eta)$ 是壁函数。当给定压力差 Δp 和细胞在微管内部相应的吸入长度 L ,以及微管的内径 a ,就可以确定细胞的弹性模量 E 。

利用 Kelvin 标准线性黏弹性模型描述 NRK 细胞的黏弹性力学响应。吸入长度 (L) 与时间 (t) 的关系用下述方程描述:

$$\left. \begin{aligned} L(t) &= \frac{2a\Delta p}{\pi E_\infty} \left[1 + \left(\frac{k_1}{k_1 + k_2} - 1 \right) \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right] \\ \tau &= \frac{\mu(k_1 + k_2)}{k_1 k_2}, E_0 = \frac{3}{2}(k_1 + k_2), E_\infty = \frac{3}{2}k_1 \end{aligned} \right\} \quad (2)$$

式中: E_0 为瞬态弹性模量; E_∞ 为平衡弹性模量; τ 为常力作用下的变形松弛时间; k_1 和 k_2 为弹性常数; μ 为黏性常数。根据实验数据利用 OriginPro 8.0 拟合出吸入长度与时间的指数增长曲线,依据获得曲线计算细胞的黏弹性参数。

1.3 数据采集与统计学分析

通过冷 CCD (DP71, Olympus, 1 000 ×) 进行图像采集,间隔 4 s 取像,采用图像处理软件 (Image Pro 5.1, Olympus) 进行形态学测量。利用 OriginPro 8.0 拟合吸入长度与时间的指数增长曲线并计算各组数据均值,以均数标准差表示。不同细胞组的数据利用 SPSS 13.0 统计分析软件比较组间差异, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞的弹性模量变化

通过微管吸吮技术,在细胞弹性变形范围内进行测量。根据公式(1)计算细胞弹性模量 E 。经过统计学处理,各组实验结果如表 1,其中 n 为各实验组测量细胞的总个数,各组细胞的弹性模量 E 经过 OriginPro 8.0 统计,结果以均数 ± 标准偏差表示。对处理组与对照组细胞 E 进行 t 检验,经过相关性统计分析均有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.2 细胞在吸入负压作用下的黏弹性响应

在相同实验条件下分别测定 4 组细胞的黏弹性

表1 正常及处理组细胞的弹性模量值 ($\bar{x} \pm sd$)

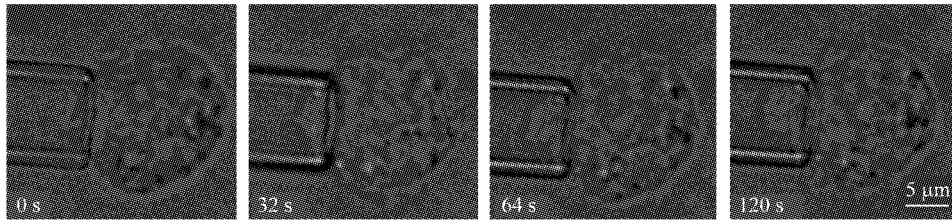
Tab.1 The Young's modulus of NRK cells ($\bar{x} \pm sd$)

对照组 (n=15)	2 $\mu\text{mol/L}$ CD 处理组 (n=15)	20 $\mu\text{g/mL}$ 秋水素处理组 (n=14)	30 $\mu\text{mol/L}$ blebbistatin 处理组 (n=14)	
E/Pa	101.37 \pm 35.81	23.61 \pm 6.1	67.17 \pm 17.87	54.76 \pm 15.72

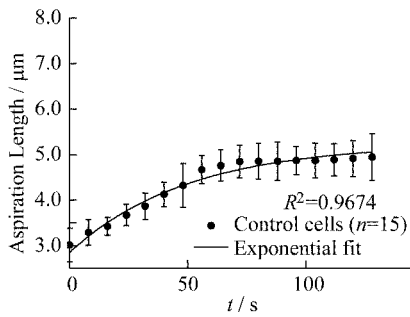
力学响应,利用 OriginPro 8.0 拟合出吸入长度与时间的指数增长曲线,得到给定负压下平均吸入长度随时间变化曲线(见图1)。利用式(2)计算得出各组细胞的黏弹性参数(见表2),其中 n 为各实验组

测量细胞的总个数,结果经过 OriginPro 8.0 统计,以均数 \pm 标准偏差表示。各实验细胞在吸入时间 100 s 附近达到稳态。

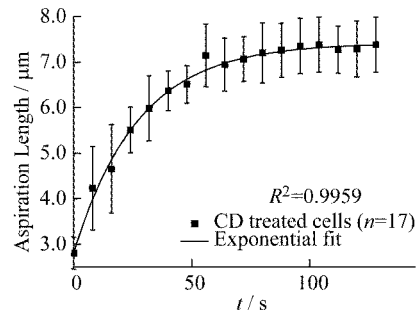
处理组与对照组细胞各项黏弹性参数进行 t 检验,经过相关性统计分析显示:经过 CD 和 blebbistatin 处理后的细胞黏性常数 μ 均有显著性差异 ($P < 0.05$),而经过秋水仙素处理后的细胞与对照组无显著性差异 ($P > 0.05$);各处理组的平衡弹性模量和瞬态弹性模量与对照组均有显著性差异 ($P < 0.05$)。



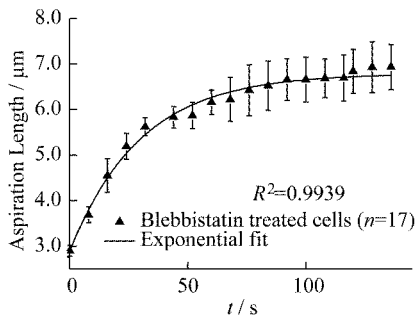
(a)



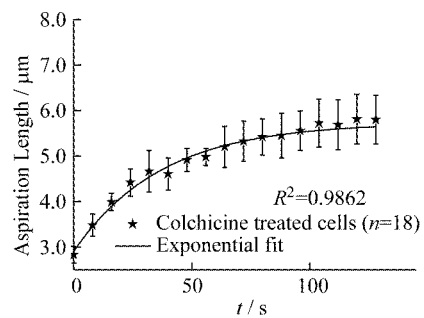
(b)



(d)



(c)



(e)

图1 NRK 细胞在给定阶跃负压下的黏弹性蠕变响应 (a) 单个 NRK 细胞在阶跃负压作用下的黏弹性蠕变响应;(b) 对照组,235 Pa 阶跃负压;(c) CD 处理组,78 Pa;(d) blebbistatin 处理组,78 Pa;(e) 秋水仙素处理组,137 Pa

Fig.1 Viscoelastic creep response of NRK cells to step pressure

表2 不同处理组 NRK 细胞黏弹性参数比较 ($\bar{x} \pm sd$)Tab.2 Comparison of viscoelastic parameters under different treatment of NRK cells ($\bar{x} \pm sd$)

	对照组 (n = 15)	2 $\mu\text{mol/L}$ CD 处理组 (n = 17)	30 $\mu\text{mol/L}$ blebbistatin 处理组 (n = 17)	20 $\mu\text{g/mL}$ 秋水仙素处理组 (n = 18)
$\mu / (\text{Pa} \cdot \text{s})$	1101.9 \pm 299.7	348.3 \pm 128.0	390.6 \pm 120.4	944.7 \pm 264.0
E_{∞} / Pa	126.3 \pm 15.8	26.5 \pm 4.7	43.3 \pm 9.6	64.6 \pm 10.0
E_0 / Pa	184.0 \pm 18.3	74.7 \pm 13.7	60.4 \pm 13.9	123.2 \pm 19.8

3 讨论

3.1 骨架蛋白的异常对细胞弹性和黏弹性行为的影响

实验结果显示不同, 细胞骨架蛋白抑制剂对细胞弹性模量和细胞黏弹性行为有显著影响。处理组细胞弹性模量较对照组显著降低, 其中经过 CD 处

理后的细胞弹性模量下降幅度最大, 较对照组降低近 80%, 显示肌动蛋白是细胞抵抗变形的最主要因素。黏弹性方面, CD 和 blebbistatin 处理组细胞的黏弹性参数 μ 显著小于正常组细胞, 而经过秋水仙素处理后的细胞, 其黏性系数与对照组没有明显差异 (见图 2)。

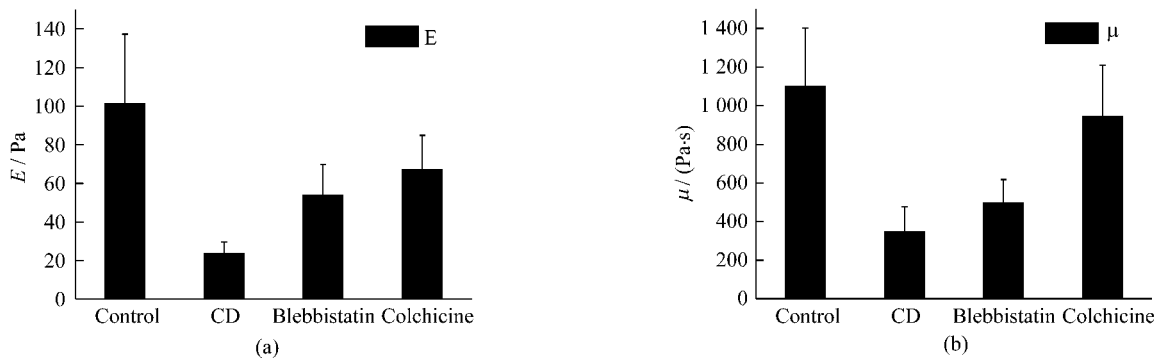


图2 对照组及处理组细胞弹性模量和黏弹性参数比较 (a) 对照组、CD 处理组、blebbistatin 处理组和秋水仙素处理组细胞的弹性模量 E 柱状图; (b) 各组细胞黏弹性参数 μ 柱状图。

Fig.2 Comparison of the Young's modulus and viscoelastic parameters of NRK cells under different treatment

3.2 不同骨架蛋白对细胞力学特性的贡献

从实验结果能够得出抑制单一骨架蛋白对细胞力学性质的影响:

(1) 利用 CD 抑制肌动蛋白合成的会大幅降低细胞的弹性模量和细胞黏性, 即大幅降低细胞抵抗变形的能力和变形性。说明肌动蛋白骨架的正常组装对细胞的变形能力有着决定性的作用。

(2) 利用 blebbistatin 抑制肌球蛋白 II ATP 酶的活性同样显著改变了细胞的变形能力但是其弹性模量和黏性大约是 CD 处理组的 2 倍, 显示肌球蛋白 II 作为马达蛋白对细胞的力学特性影响可能主要体现在肌球蛋白 II 与其他骨架蛋白的局部交联上。最近的研究^[6]认为, 细胞感受和传递力学信号的主要通过肌球蛋白 II 与肌动蛋白交联蛋白 Corte-

xillin I 的相互作用。另一方面, 对海胆卵细胞刚度测定的实验^[7]显示, 肌球蛋白 II 和肌动蛋白是细胞刚度的主要提供者, 并且抑制两者造成细胞刚度的降低程度相似, 此处的差异有可能是因为本实验施加的 blebbistatin 只能抑制约 90% 的肌球蛋白 II ATP 酶的活性^[8], 但笔者认为, 黏附生长的高等哺乳动物细胞的骨架蛋白网络更为复杂, 相应的调节力学特性的范围也会更大。

(3) 对于采用秋水仙素抑制微管蛋白聚合的实验组细胞, 其弹性模量较正常组下降约 34%, 而黏性系数 μ 值并没有出现显著下降。结果显示单独抑制微管蛋白聚合对细胞整体力学特性的改变不明显, 说明微管骨架蛋白网络对细胞整体力学特性的维持贡献较小。

在肾脏细胞的生物力学机械转导研究中, Francis 等^[9]认为, 损坏细胞微管微丝、改变细胞骨架力平衡和干预微管极化可以缓解切应力的刺激。表明机械转导受到细胞整体的机械信号控制, 包括整个细胞骨架预应力。从本实验的结论可以看出, 单一细胞骨架蛋白受抑制虽然可以改变细胞力学特性, 但是与病理情况下的一些实验数据^[5]比较而言却有一定差距, 比如骨性关节炎患者的软骨细胞与正常软骨细胞的弹性模量相似而黏性系数却只有正常软骨细胞的约 6%。这说明病理情况下, 细胞的力学特性的改变不仅限于本实验所述的 3 种骨架蛋白, 更可能是细胞骨架蛋白网络整体结构上的改变引起。总之, 本实验得到的哺乳动物细胞单一骨架蛋白受抑制条件下细胞力学特性的差异, 数据化了不同骨架蛋白对细胞力学特性的影响, 为研究正常和细胞骨架蛋白异常的哺乳动物细胞力学特性提供了基础数据。

参考文献:

- [1] Ingber DE, Tensegrity II. How structural networks influence cellular information-processing networks [J]. *J Cell Sci*, 2003, 116: 1397-1408.
- [2] Rosenblatt N, Hu S, Chen J, *et al.* Distending stress of the cytoskeleton is a key determinant of cell rheological behavior [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 321:617-622.
- [3] Essig M, Friedlander G. Tubular shear stress and phenotype of renal proximal tubular cells [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14:33-35.
- [4] Reichl EM, Ren Y, Morphew MK, *et al.* Interactions between myosin and actin crosslinkers control cytokinesis contractility dynamics and mechanics [J]. *Curr Biol*, 2008, 18 (7):471-480.
- [5] Zhang QY, Wang XH, Wei XC, *et al.* Characterization of viscoelastic properties of normal and osteoarthritic chondrocytes in experimental rabbit model [J]. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2008, 16: 837-840.
- [6] Ren Y, Effler JC, Norstrom M, *et al.* Mechanosensing through Cooperative Interactions between Myosin II and the Actin Crosslinker Cortexillin I [J]. *Curr Biol*, 2009, 19(17): 1421-1428.
- [7] Miyoshi H, Satoh SK, Yamada E, *et al.* Temporal change in local forces and total force all over the surface of the sea urchin egg during cytokinesis [J]. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2006, 63(4):208-221.
- [8] Straight AF, Cheung A, Limouze J, *et al.* Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II Inhibitor [J]. *Science*, 2003, 299(5613):1743-1747.
- [9] Francis JA, Surya MN, Robert K, *et al.* Global cytoskeletal control of mechanotransduction in kidney epithelial cells [J]. *Experimental Cell Research*, 2004, 301:23-30.