

文章编号:1004-7220(2011)01-0087-05

· 综 述 ·

机械刺激对成骨细胞骨架的影响

张 鹏, 房 兵, 江凌勇

(上海交通大学医学院附属第九人民医院 正颌正畸治疗中心, 上海市口腔医学重点实验室, 上海 200011)

摘要: 机械刺激在骨组织的正常代谢和重建过程中起着十分重要的作用。机械刺激作用于骨组织后可以通过包括成骨细胞在内的多种应力感受细胞,感知并传导力学信号。细胞骨架作为贯穿细胞整体的纤维网状支架结构,与细胞外基质及整合素构成一个整体,是力学信号传递的关键环节之一。力学刺激可引起骨架纤维重排并可借助第二信使将力学信号传递并转换,最终调节基因的表达。该信号通路涉及的分子主要包括 Rho 家族、蛋白激酶 C 以及黏附斑激酶。本文将就近几年关于机械刺激下成骨细胞骨架的改变及作用机制的研究进展进行综述。

关键词: 机械刺激; 成骨细胞; 细胞骨架; 信号转导

中图分类号: R 782.2.3 **文献标志码:** A

Effect of mechanical stimulation on osteoblast cytoskeleton

ZHANG Peng, FANG Bing, JIANG Ling-yong (*Center of Craniofacial Orthodontics, Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai Key Laboratory of Stomatology, Shanghai 200011, China*)

Abstract: Mechanical stimulation plays an important role in the normal metabolism and reorganization of bone. Many kinds of stress-sensitive cells, including osteoblasts, can perceive and transduce the mechanical signals. As the fibrous framework throughout a cell, cytoskeleton as well as extracellular matrix and integrin is one of the critical components in mechanotransduction. Mechanical stimulation can induce the rearrangement of the cytoskeleton, and the signals are transduced and transformed by the second messengers, finally resulting in the changes of gene expression. The family of Rho, protein kinase C and focal adhesion kinase are the main messages involved in this process. This paper summarizes the recent advances about the effects and possible mechanism of mechanical stimulation on osteoblast cytoskeleton.

Key words : Mechanical stimulation; Osteoblasts; Cytoskeleton; Signal transduction

骨组织改建、正畸治疗及牵张成骨等过程都离不开机械刺激,机械刺激能够调节细胞的生长和基因表达过程,在骨骼的发育、形成、改建中起重要的作用。细胞受到机械刺激后,只有将其转变成相应化学信号传入胞内,才能引起一系列下游反应。在整个复杂的信号传导过程中,作为贯穿整个细胞网架的骨架系统在力学信号的感受及传导中发挥着重要的作用,通过细胞外基质-整合素-细胞骨架复合体的相互作用,完成机械信号的细胞内传导。研究

力学刺激下细胞骨架系统的改变及相应分子机制,对于揭示骨组织在机械力下代谢和改建具有重要意义。

1 细胞骨架的组成及功能

细胞骨架(cytoskeleton, CSK)是位于细胞膜内侧面的蛋白质纤维网架系统。细胞骨架由微管、微丝及中间纤维共同构成。微管是中空圆柱状具有极性的细胞器,由微管蛋白及微管结合蛋白组成。微

收稿日期:2010-11-17; 修回日期:2010-12-21

通讯作者:房兵, Tel: (021)23271699-5339; E-mail: braces_dr@hotmail.com。

管蛋白与G蛋白具有明显的同源性,具有G蛋白的功能特征。微丝是由肌动蛋白的亚单位组成的螺旋状结构。肌动蛋白以两种形态存在,即有活性的聚合态纤维肌动蛋白(F-actin)及无活性的可溶性球状肌动蛋白(G-actin),两者含量之间存在动态平衡。中间纤维是一种直径介于微丝与微管之间的纤维状蛋白,从核纤层通过细胞质延伸,在胞质中形成网架结构。

3种纤维成分在形态、结构和功能上虽有差异,但他们之间彼此联系,构成贯穿整个细胞的复杂骨架系统,决定了细胞的形态和刚性。此外还与细胞生长分化、迁移、凋亡、细胞内信息传递、核内基因表达等多种重要生命活动有关。

2 骨架相关结构——整合素

作为一种关键的细胞膜黏附分子,整合素与细胞骨架关系密切。他由 α 和 β 两个亚单位组成,胞外区通过识别特异的多肽位点RGD(Arg-Gly-Asp)与细胞外基质相连,胞内区与肌动蛋白束连接形成局部黏附斑。黏附斑是细胞与胞外基质黏附的特异位点,含有多种连接蛋白,如辅肌动蛋白、黏附斑激酶及黏附斑蛋白等。许多研究均证实,机械力作用于整合素将引起细胞骨架结构的改变及信号传导的激活。同时,细胞骨架产生的原张力也是通过整合素传导到局部黏附斑,进而对整合素的黏附产生影响^[1]。

整合素有两种存在形式,一种与细胞外基质有低亲和性(无活性状态),一种与细胞外基质有高亲和性(活性状态)。细胞在感知其周围环境力学刺激后,首先被激活的整合素与细胞外基质连结,随后很快引发整合素与细胞骨架的连结。力学刺激还可以促进整合素由低亲和状态向高亲和状态转变,并进而引发一系列下游信号通路^[2]。细胞外基质-整合素-细胞骨架形成一个完整的网架系统,细胞内外的机械力信号便可沿此途径进行传导和逐级放大。

3 细胞骨架在力学信号传递中的作用

细胞骨架作为整个信号网络的关键,主要是通过两种方式进行力学信号传导。首先,外力可以引起细胞骨架内张力的再分布,进而引起骨架纤维束的重排。该过程中细胞骨架主要发挥物理传导作

用;此外,作为力学化学信号的转换器,骨架结构的适应性改变可使与之偶联的离子通道的通透性和部分受体的活性增加,借助第二信使最终把力学信号传递到细胞核,调节相关基因的表达。这两种方式彼此协调,共同完成外界力学刺激的传递和转换^[3]。

4 力学刺激对成骨细胞骨架的影响

4.1 对细胞形态及结构的影响

戚孟春等^[4]对大鼠颅骨成骨细胞施加0.5 Hz, 2 000 $\mu\epsilon$ 的持续张应力,12 h后形态学观察加力前成骨细胞荧光染色强,分布均匀;肌动蛋白呈束状排列,纤维粗大;细胞中央可见轮廓清晰的胞核。随受力时间的延长,细胞体积明显减小,形态变得不规则,荧光强度逐渐减弱且分布不均;肌动蛋白束变细,排列稀疏,方向性差;胞核轮廓模糊,部分染色质开始浓聚或破碎成颗粒状。上述结果表明,在周期性牵张力下细胞骨架蛋白发生了改建,肌动蛋白解聚并重排,进而触发了一系列信号反应,并诱发部分细胞发生凋亡。

Matthews等^[5]将被覆细胞外基质的微磁珠(磁珠附于细胞表面特异整合素受体)置于磁场中,结果显示细胞可在外力施加部位组装形成黏附斑,以加强自身刚性。且黏附斑大小、位置及组成的改变发生在外力作用的最初数秒或数分钟内^[6-7]。

4.2 对骨架交联蛋白的影响

细胞骨架交联蛋白,如踝蛋白、细丝蛋白、波形蛋白、辅肌动蛋白等,是细胞骨架的重要组成部分,他决定着骨架的形成、机械性能及其相互联系。在外力作用过程中,交联蛋白的成分也会发生相应改变。Jackson等^[8]对大鼠成骨样细胞系MC3T3-E1施加2 Pa的稳定流体剪切力2 h,随后对骨架交联蛋白含量进行测定。结果显示,加力后骨架微丝蛋白含量没有发生改变,而辅肌动蛋白、细丝蛋白及波形蛋白含量分别较对照组提高了29%、18%、15%。提示机械应力导致的细胞结构及整体机械特性的改变可能是由交联蛋白而非微丝蛋白的改变所引起。

5 常见影响细胞骨架改变的力学参数

已知力学刺激包含多种参数设置,不同的参数设置对于成骨细胞骨架会产生不同的影响。常见的

影响参数有以下几种:

5.1 机械刺激强度及时间

Liu 等^[9]对大鼠成骨样细胞施加不同强度的流体剪切力 1.2、1.6 及 1.9 Pa, 1 h 后观察发现 1.6 和 1.9 Pa 组细胞形态有呈纺锤状的倾向。进一步对细胞相关形态指数进行定量分析的结果也提示, 细胞整体形态在适宜剪切力作用下可沿其长轴伸展, 其排列方向也由最初的随机到统一的定位。

Li 等^[10]使用四点弯曲加力系统对于大鼠成骨样细胞 UMR106 分别施加强度 1 000、4 000 $\mu\epsilon$, 频率 0.5 Hz 的压应力, 观察不同时间点细胞骨架及 c-fos 基因 mRNA 的表达情况。激光共聚焦显微镜观察可见, 微丝蛋白在应力施加后 15 min 解聚排列紊乱, 但 1 h 后又逐渐重新聚合。1 000 $\mu\epsilon$ strain 组, c-fos mRNA 表达量在 15 min 时增加 1 倍, 很快在 1 h 达到最高峰, 此后数小时逐渐恢复至正常水平。4 000 $\mu\epsilon$ 应力组 c-fos mRNA 变化趋势与前者基本一致, 仅表达量稍低。而细胞松弛素处理组 c-fos mRNA 表达明显受到抑制。由于 c-fos 基因是骨生长及矿化过程中许多关键基因如骨钙素、碱性磷酸酶及 I 型胶原的转录因子, 调控下游基因转录活性^[110], 故由此可以推断细胞骨架在成骨细胞机械信号传导过程中发挥重要作用。

5.2 刺激方式

Tzima 等^[12]研究发现, 当外界机械刺激为单一方向的持续应力时, 细胞会发生完全的再定位; 当外界刺激为无方向性的流体剪切力时, 细胞长轴会与外力方向保持一致, 该过程中主要发生依赖 Rac1 和 RhoA 的肌动蛋白骨架重组。由此可以推测, 单一矢状方向的应力可以使该方向上的黏附斑及附着的应力纤维得以稳定, 而循环应力会导致应力纤维的中断、消失甚至正压力的产生。

6 骨架相关力学信号通路

6.1 Rho 家族

Rho 蛋白属于小 G 蛋白超家族成员, 根据结构和功能不同, 大致分为 5 个亚家族。(1) Rho 亚家族: 主要参与张力纤维形成和黏附斑复合体组装; (2) Rac 亚家族: 促进层状伪足和胞膜皱褶形成; (3) Cdc42 亚家族: 参与丝状伪足形成; (4) Rnd 亚家族: 可拮抗 Rho 信号通路; (5) Rho BTB 亚家族:

具体功能尚不清楚。在所有家族成员中, Rac1 和 RhoA 是目前研究最多的 Rho GTP 酶。

6.1.1 Rho

大量实验表明, Rho 在细胞应力纤维装配和黏附斑信号传导过程中处于中心地位。其中最为关键的两个下游效应蛋白分子为 Rho 相关激酶 ROCK 及形成素相关蛋白 mDia^[13]。前者在应力纤维的组装中起主要作用, 而后者可以促进非肌球蛋白 II 驱使下的肌动蛋白的收缩^[14-15]。

ROCK 激活会在细胞中央产生典型星状的粗大应力纤维, 而 mDia 的过度表达则产生彼此平行的纤细应力纤维, 后者能够使得肌动蛋白聚合成核^[16]。mDia 还可参与调节微管的组装和动态平衡, 表达高活性 mDia 的细胞, 其微管的正负两端均处于稳固状态, 且正极与黏附斑的锚定得以加强, 该过程可能导致黏附斑的下调^[17]。

活化的 ROCK 一方面可以通过抑制肌球蛋白轻链 (myosin light chain, MLC) 磷酸酶的作用从而提高 MLC 磷酸化水平, 激活肌球蛋白^[18]。还可以直接发挥 MLC 激酶的功能, 磷酸化 MLC 进而激活肌球蛋白^[19], 且其作用的发挥不依赖于 Ca^{2+} / 钙调蛋白^[20]。另一方面活化的 ROCK 可以导致 LIM 激酶的磷酸化。而后者能够磷酸化 cofilin (一种肌动蛋白结合蛋白, 可以促进 F-肌动蛋白的解聚), 磷酸化后的 cofilin 作用被抑制, 从而使得肌动蛋白的聚合状态得以维持^[21]。以上均提示活化的 Rho 是通过肌球蛋白的收缩驱使应力纤维及黏附斑的形成。

6.1.2 Rac

Rac 的下游效应蛋白之一为蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA), PAK 是一类分子质量为 60 ~ 70 kD 保守的丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶。激活的 PAK 可以通过抑制 MLC 激酶的活性降低 MLC 磷酸化水平进而导致应力纤维及黏着斑的丢失^[22]。

有研究已证实 Rac 和 Rho 两者功能间相互拮抗, 故对某一个细胞而言, 在给定的某个时间点, 其不同的部位功能活动各异。一些区域的活动表现为移动性及舒张性, 而另一些区域则表现为黏附性与收缩性^[23]。

6.2 蛋白激酶 C

蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 属于多功能丝氨酸 / 苏氨酸激酶, 目前共发现有 12 种亚型, 不同

的亚型有各自不同的激活方式,典型亚型的激活需要二酰基甘油(diacyl glycerol, DAG)及细胞内 Ca^{2+} 水平的增高,造成 PKC 构象的改变,参与整合素的运输和分布,使更多的整合素 $\beta 1$ 出现在细胞表面。有研究表明, RhoA-鸟嘌呤核苷酸交换因子(guanine nucleotide exchange factor, GEF, 可通过调节 G 蛋白的 GDP/GTP 交换,从而活化 Rho 的一类调节蛋白)可以作为 PKC 的底物被激活,继而导致细胞骨架的重排和力学信号的传导^[24]。

6.3 黏附斑激酶

黏附斑激酶(focal adhesion kinase, KAK)是一个分子量为 125 kD 的酪氨酸激酶,作用蛋白质常有的 SH2 和 SH3 结构域,瞬间 Ca^{2+} 浓度升高及 PKC 活性升高也可协助 FAK 磷酸化而活化,进一步诱导下游整合素介导的信号通路^[25]。酪氨酸的磷酸化过程在钙离子螯合剂或细胞松弛素 D 存在情况下受到明显抑制,从而也间接证明了细胞内钙离子在传导力学信号方面的作用^[26]。众所周知, Ca^{2+} 作为重要的第二信使参与细胞多种重要的生命活动,发挥信号转导的作用。成骨细胞在受到外力后的早期反应之一便是细胞内 Ca^{2+} 浓度的迅速增高。刺激所致的成骨细胞骨架重组及相关基因表达的增高主要依赖三磷酸肌醇介导的细胞内 Ca^{2+} 的释放而非胞外 Ca^{2+} 经离子通道的内流^[27]。

力学刺激可以通过不同的感受器及复杂的信号传导通路引起成骨细胞骨架的重排,进而调控下游基因的表达,使得细胞能够适应这种功能性改变,并使自身形态和功能达到力学刺激的最佳要求。但如何选择最佳力学参数以及细胞骨架以及如何将机械刺激转变为生物信号进而指导体内骨形成和改建的机制,仍有待进一步研究,以便为进行骨科相关疾病的新治疗提供更有力的理论指导。

参考文献:

- [1] Ingber DE. Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology [J]. J Cell Sci, 2003, 116 (Pt 7): 1157-1173.
- [2] Puklin-Faucher E, Gao M, Schulten K, et al. How the headpiece hinge angle is opened: New insights into the dynamics of integrin activation [J]. J Cell Biol, 2006, 175 (2): 349-360.
- [3] Charras GT, Horton MA. Single cell mechanotransduction and its modulation analyzed by atomic force microscope indentation [J]. Biophys J, 2002, 82(6): 2970-81.
- [4] 戚孟春,胡静,邹淑娟,等. 大鼠骨髓间充质干细胞和颅骨成骨细胞在张应力下细胞骨架的改变[J]. 华西口腔医学杂志, 2005, 23(2), 110-112.
- [5] Matthews BD, Overby DR, Alenghat FJ, et al. Mechanical properties of individual focal adhesions probed with a magnetic microneedle [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 313(3): 758-764.
- [6] Riveline D, Zamir E, Balaban NQ, et al. Focal contacts as mechanosensors: Externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism [J]. J Cell Biol, 2001, 153(6): 1175-1186.
- [7] 王立,安美文,李晓娜,等. 抑制骨架蛋白对正常大鼠肾细胞力学性能的影响[J]. 医用生物力学, 2010, 25(2): 143-147. Wang L, An MW, Li XN, et al. Effect of inhibiting cytoskeleton on the mechanical properties of normal rat kidney cells [J]. Journal of Medical Biomechanics, 2010, 25(2): 143-147.
- [8] Jackson WM, Jaasma MJ, Tang RY, et al. Mechanical loading by fluid shear is sufficient to alter the cytoskeletal composition of osteoblastic cell [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2008, 295(4): 1007-1015.
- [9] Liu X, Zhang X, Lee I. A quantitative study on morphological responses of osteoblastic cells to fluid shear stress [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2010, 42(3): 195-201.
- [10] Li J, Chen G, Zheng L, et al. Osteoblast cytoskeletal modulation in response to compressive stress at physiological levels [J]. Mol Cell Biochem, 2007, 304(1-2): 45-52.
- [11] Wagner EF, Eferl R. Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system [J]. Immunol Rev, 2005, 208(1): 126-140.
- [12] Tzima E, Irani-Tehrani M, Kiosses WB, et al. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress [J]. Nature, 2005, 437(7057): 426-431.
- [13] Nakano K, Takaishi K, Kodama A, et al. Distinct actions and cooperative roles of ROCK and mDia in Rho small G protein-induced reorganization of the actin cytoskeleton in Madin-Darby canine kidney cells [J]. Mol Biol Cell, 1999, 10(8): 2481-2491.
- [14] Young KG, Copeland JW. Formins in cell signaling [J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1803(2): 183-90.
- [15] 李良,陈槐卿. 细胞核结构与力学生物学[J]. 医用生物力学, 2009, 24(1): 1-5. Li L, Chen HQ. The nucleus structure and mechanotransduction [J]. Journal of Medical Biomechanics, 2009, 24(1): 1-5.

- [16] Hotulainen P, Lappalainen P. Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells [J]. *J Cell Biol*,2006,173(3):383-94.
- [17] Ballestrem C, Hinz B, Imhof BA, *et al.* Marching at the front and dragging behind: Differential alphaVbeta3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior [J]. *J Cell Biol*, 2001, 155(7): 1319-32.
- [18] Kimura K, Ito M, Amano M, *et al.* Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase) [J]. *Science*,1996,273(5272):245-248.
- [19] Amano M, Ito M, Kimura K, *et al.* Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase) [J]. *J Biol Chem*,1996,271(34): 20246-20249.
- [20] Kaunas R, Nguyen P, Usami S, *et al.* Cooperative effects of Rho and mechanical stretch on stress fiber organization [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2005,102(44):895-900.
- [21] Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, *et al.* Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase [J]. *Science*,1999,285(5429):895-898.
- [22] Manser E, Huang HY, Loo TH, *et al.* Expression of constitutively active alpha-PAK reveals effects of the kinase on actin and focal complexes [J]. *Mol Cell Biol*, 1997,17(3): 1129-1143.
- [23] Burridge K, Wennerberg K. Rho and Rac take center stage [J]. *Cell*,2004,116(2):167-179.
- [24] Holinstat M, Mehta D, Kozasa T, *et al.* Protein kinase Calpha -Induced p115RhoGEF phosphorylation signals endothelial cytoskeletal rearrangement [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(31):28793-28798.
- [25] Sieg DJ, Hauck CR, Schlaepfer DD. Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration [J]. *J Cell Sci*,1999(Pt 16),112:2677-2691.
- [26] Pommerenke H, Schmidt C, Dürr F, *et al.* The Mode of Mechanical Integrin Stressing Controls Intracellular Signaling in osteoblasts [J]. *J Bone Miner Res*,2002,17(4): 603-611.
- [27] Chen NX, Ryder KD, Pavalko FM, *et al.* Ca(2+) regulates fluid shear-induced cytoskeletal reorganization and gene expression in osteoblasts [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*,2000,278(5): 989-997.