

文章编号:1004-7220(2019)03-0277-06

模拟微重力效应对骨细胞 SOC 通道功能的影响

杜婉婷, 杨肖, 樊瑜波, 孙联文

(北京航空航天大学 生物与医学工程学院, 生物力学与力生物学教育部重点实验室, 生物医学工程高精尖创新中心, 北京 100083)

摘要:目的 探究模拟微重力效应下骨细胞钙池操纵 Ca^{2+} 通道 (store-operated calcium channels, SOC) 的活性变化及其可能机制, 阐明失重性骨丢失的发生机制。方法 以小鼠骨细胞 (MLO-Y4) 为对象, 分为回转模拟微重力效应组 (simulated microgravity, SM) 和正常重力组 (control, CON)。分别旋转培养 24、48 h 后, 激光共聚焦显微镜检测毒胡萝卜素引发细胞内质网钙库耗竭后胞内 Ca^{2+} 浓度水平, 以反映 SOC 通道的活性; 免疫荧光染色法观察膜骨架 spectrin 和内质网膜蛋白 IP_3R 的分布情况, 研究 SOC 通道功能变化的可能机制。结果 在内质网钙库释放 Ca^{2+} 时期, 24、48 h SM 组的胞内 Ca^{2+} 浓度水平与 CON 组相比均无显著差异, 而在胞外 Ca^{2+} 经 SOC 通道内流时期, 24 h SM 组只在前 4 min 比 CON 组有显著性下降, 48 h SM 组在整个时期均比 CON 组有显著性下降。与 CON 组相比, SM 组膜骨架 spectrin 向细胞边缘聚集, 而 ER 膜蛋白 IP_3R 则向 ER 核被膜区域聚集, 且 48 h 组更为显著。结论 模拟微重力效应可抑制骨细胞 SOC 通道活性。骨细胞膜骨架 spectrin 以及内质网膜上蛋白 IP_3R 位置分布变化, 可能影响 SOC 通道激活过程中蛋白间的构象耦合, 进而降低骨细胞 SOC 通道的活性。

关键词: 微重力; 骨细胞; SOC 通道

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2019.03.009

Effects of Simulated Microgravity on Function of SOC Channels in Osteocytes MLO-Y4

DU Wanting, YANG Xiao, FAN Yubo, SUN Lianwen

(Beijing Advanced Innovation Center for Biomedical Engineering, Key laboratory for Biomechanics and Mechanobiology of Ministry of Education, School of Biological Science and Medical Engineering, Beihang University, Beijing 100083, China)

Abstract: Objective To study the effect of simulated microgravity on activity of the store-operated calcium (SOC) channels in osteocytes and its possible mechanism, so as to elucidate the potential mechanism of weightlessness bone loss. **Methods** Osteocytes (MLO-Y4) as the experimental subjects were divided into simulated microgravity (SM) group and normal gravity group (CON). After rotating for 24 h and 48 h, confocal microscope was used to detect the intracellular calcium ion concentration level to reflect activity of the SOC channels after thapsigargin (TG)-induced endoplasmic reticulum (ER) depletion. Immunofluorescence staining was used to observe the distribution of ER membrane protein IP_3R and spectrin membrane skeleton, in order to preliminarily explore the possible mechanism of functional changes of SOC channels. **Results** During the period of calcium release from ER, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ had no significant difference between SM group and CON group for 24 h

收稿日期:2018-04-24; 修回日期:2018-07-01

基金项目:国家自然科学基金项目(11472033)

通信作者:孙联文,教授, E-mail:sunlw@buaa.edu.cn

and 48 h; while during the period of extracellular calcium influx by SOC channels, $[Ca^{2+}]_i$ of SM group had significant differences in the first 4 minutes for 24 h, as well as in the whole time for 48 h. Compared with CON group, the spectrin membrane skeleton of SM group was gathered at the rim of membrane, while ER membrane protein IP_3R of SM group was gathered at the nuclear envelope of ER. These two tendencies were more obvious for 48 h. **Conclusions** The stimulated microgravity could inhibit activity of SOC channels in osteocytes. Changes in the distribution of the spectrin membrane skeleton and ER membrane protein IP_3R under the simulated microgravity might reduce the activity of SOC channels by affecting the conformation coupling process between the membrane and ER.

Key words: simulated microgravity; osteocytes; store-operated calcium (SOC) channels

航天员在长期失重环境下会产生严重的骨质丢失,这是人类在太空飞行中遇到的最主要生理性障碍之一,其发生机制尚不清楚^[1-3]。骨组织中的骨细胞可以感知外界的机械力刺激,进而调节骨组织中成骨细胞和破骨细胞的功能和活动,在骨重建过程中起到重要作用^[4-11]。本课题组前期研究发现,模拟微重力效应下骨细胞的力学敏感性降低^[12],其机制还有待进一步探究。

细胞内钙离子(Ca^{2+})浓度升高是骨细胞对机械力刺激的最初响应之一。胞内 Ca^{2+} 最初来源途径之一是 IP_3 与细胞内质网(endoplasmic reticulum, ER)膜上 IP_3 受体(IP_3R)结合引发的胞内钙库释放,而ER钙库的耗竭会再激活细胞膜上的钙池操纵 Ca^{2+} 通道(store-operated calcium channel, SOC),胞外 Ca^{2+} 经由SOC内流,使胞内 Ca^{2+} 浓度持续升高^[13]。

“构象耦合”模型是目前被广泛认可的一种由ER钙库耗竭引发的SOC通道活化模型^[14]。即ER钙库耗竭后,细胞骨架牵引ER膜向细胞膜移动,使ER膜上的 IP_3R 与SOC通道耦合,进而激活SOC通道,引发胞外 Ca^{2+} 内流^[15-16]。由此可知,细胞骨架是SOC通道活化的“构象耦合”模型中的重要一环。研究表明,破坏膜骨架血影蛋白(spectrin)可以降低SOC通道活性,提示膜骨架spectrin在调控SOC通道中的重要作用^[17]。

本文使用毒胡萝卜素(thapsigargin, TG)引发细胞ER钙库耗竭,通过检测不同阶段胞内 Ca^{2+} 浓度水平,研究模拟微重力效应对骨细胞SOC通道功能的影响。同时观察spectrin和 IP_3R 在细胞中的分布情况,探究模拟微重力效应对骨细胞中SOC通道功能影响的可能机制,以期阐明微重力导致骨细胞

力学响应变化的原因。

1 方法

1.1 材料和试剂

小鼠骨细胞系(MLO-Y4),由美国密苏里州大学Lynda F. Bonewald教授提供; α -MEM培养基(Gibco公司,美国); Ca^{2+} 染色剂Fluo-3 AM(碧云天公司,中国);Spectrin β II小鼠单克隆抗体(Santa Cruz公司,美国); IP_3R 兔多克隆抗体(博奥森公司,中国);羊抗鼠Alexa Fluor 488、羊抗兔Alexa Fluor 488、ER-Tracker Red(碧云天公司,中国)。

1.2 细胞培养

细胞以 $(1 \sim 3) \times 10^4/cm^2$ 密度接种在培养皿(Nest公司,中国)上,37℃、5% CO_2 培养24 h。之后分为旋转模拟微重力效应组(simulated microgravity, SM)和对照组(control, CON);SM组15 r/min旋转培养24、48 h;CON组静置培养。

1.3 Fluo-3 AM染色检测胞内 Ca^{2+} 浓度水平

分别于实验24、48 h, HBSS缓冲液(无 Ca^{2+})清洗细胞3次,加入2 $\mu mol/L$ Fluo-3 AM, 37℃、5% CO_2 避光孵育30 min。激光共聚焦显微镜(TCS SPE, Leica公司,德国)观察并记录 $[Ca^{2+}]_i$ 荧光强度;第1阶段(0~2 min),不添加任何试剂;第2阶段(2~14 min),向外液中添加2 $\mu mol/L$ TG;第3阶段(14~26 min),向外液中添加2 $\mu mol/L$ $CaCl_2$ 。

1.4 免疫荧光染色检测膜骨架spectrin和 IP_3R 在细胞中的分布变化

1.4.1 膜骨架spectrin染色 4%多聚甲醛溶液固定细胞15 min, 0.1% Triton-X破膜5 min, 4% BSA室温封闭30 min。之后加入Spectrin β II抗体(1:150), 4℃孵育过夜;加入二抗(1:400), 室温孵育

2 h;加入 DAPI,室温孵育 5 min,激光共聚焦显微镜观察。

1.4.2 IP₃R 染色 加入 1:2 000 ER-Tracker Red 工作液,37 ℃、5% CO₂ 避光孵育 30 min;按 1.4.1 节中的步骤进行免疫荧光染色,IP₃R 抗体浓度为 1:150,二抗浓度为 1:400。激光共聚焦显微镜观察。

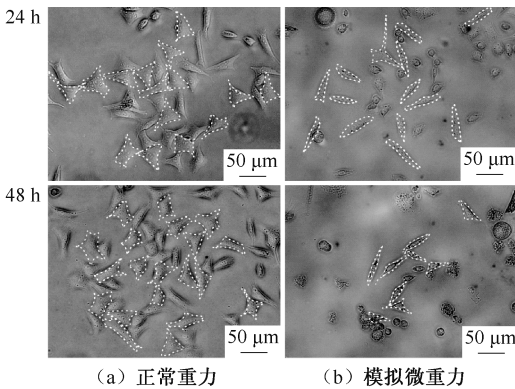
1.5 数据分析

所有数据以均数±标准差表示。使用 SPSS 软件对数据进行成组 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义;使用 GraphPad Prim 5 软件对数据进行曲线下面积(area under the curve, AUC)处理,并进行成组 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨细胞 MLO-Y4 形态

使用倒置显微镜拍摄的骨细胞 MLO-Y4 在正常重力和模拟微重力效应下培养 24、48 h 后的细胞形态如图 1 所示。在正常重力下,CON 组细胞铺展较好,形态比较肥大,呈现为梭型或四边形。模拟微重力效应下,SM 组生长的细胞与 CON 组相比,铺展的较小,多呈现为长条形或细瘦的三角形。



(a) 正常重力

(b) 模拟微重力

图 1 不同重力效应下骨细胞 MLO-Y4 形态(20×)

Fig.1 Morphology of osteocytes MLO-Y4 under different gravity effects (a) Under normal gravity, (b) Under simulated microgravity

2.2 胞内 Ca²⁺ 浓度检测

MLO-Y4 骨细胞分别在正常重力环境和模拟微重力效应环境下培养 24、48 h 后,使用激光共聚焦显微镜对 [Ca²⁺]_i 荧光强度检测。[Ca²⁺]_i 荧光强

度的变化如下:第 1 阶段(0~2 min),细胞外液中不添加任何试剂,记录原始的 [Ca²⁺]_i 荧光强度;第 2 阶段(2~14 min),细胞外液中只存在 TG,由于细胞的外环境中无 Ca²⁺ 存在,故此时 [Ca²⁺]_i 荧光强度的升高仅来源于细胞中内质网钙库 Ca²⁺ 释放;第 3 阶段(14~26 min),细胞外液中同时存在着 TG 和 Ca²⁺,此时胞外 Ca²⁺ 通过细胞膜上的 SOC 通道内流进细胞质,可能是 [Ca²⁺]_i 荧光强度升高的主要来源。

在第 1、2 阶段(0~14 min),24、48 h 的 CON 组以及 SM 组之间无显著性差异。在第 3 阶段(14~26 min),24 h 的 CON 组和 SM 组在前 4 min(14~18 min)内存在着显著性差异,而在后 8 min(18~26 min)24 h 的 CON 组与 SM 组 [Ca²⁺]_i 荧光强度达到了平衡状态;而 48 h 的 CON 组和 SM 组在第 3 阶段期间一直存在着显著性差异[见图 2(a)]。

使用 AUC 对第 2、3 阶段 [Ca²⁺]_i 荧光强度变化曲线进行计算及分析。在第 2 阶段,即胞内钙库释放 Ca²⁺ 期间,24、48 h 的 CON 组和 SM 组之间无显著性差异;而第 3 阶段,即 TG 诱导的通过 SOC 的胞外 Ca²⁺ 内流期间,24、48 h 的 CON 组和 SM 组之间存在着显著性差异[见图 2(b)]。

2.3 膜骨架 spectrin 分布情况

MLO-Y4 骨细胞分别在正常重力和模拟微重力下培养 24、48 h 后,使用 Alexa 488 (绿)和 DAPI (蓝)对膜骨架 spectrin 和核进行免疫荧光染色,并使用激光共聚焦显微镜观察发现,正常重力环境下,膜骨架 spectrin 在细胞中均匀分布;在微重力效应环境下,SM 组膜骨架 spectrin 的均匀分布消失,向细胞膜边缘聚集(见图 3)。

2.4 IP₃R 分布情况

IP₃R 是存在于细胞内质网上的 IP₃ 受体蛋白。MLO-Y4 骨细胞分别在正常重力和模拟微重力下培养 24、48 h 后,使用 ER tracker 对内质网进行染色,使用 Alexa 488(绿)和 DAPI(蓝)对 IP₃R 和核进行免疫荧光染色,并使用激光共聚焦显微镜观察发现:正常重力环境下,IP₃R 在细胞的内质网膜上均匀分布;在微重力效应环境下,IP₃R 均匀分布消失,向内质网 ER 上的核被膜结构聚集,且 48 h 更显著(见图 4)。

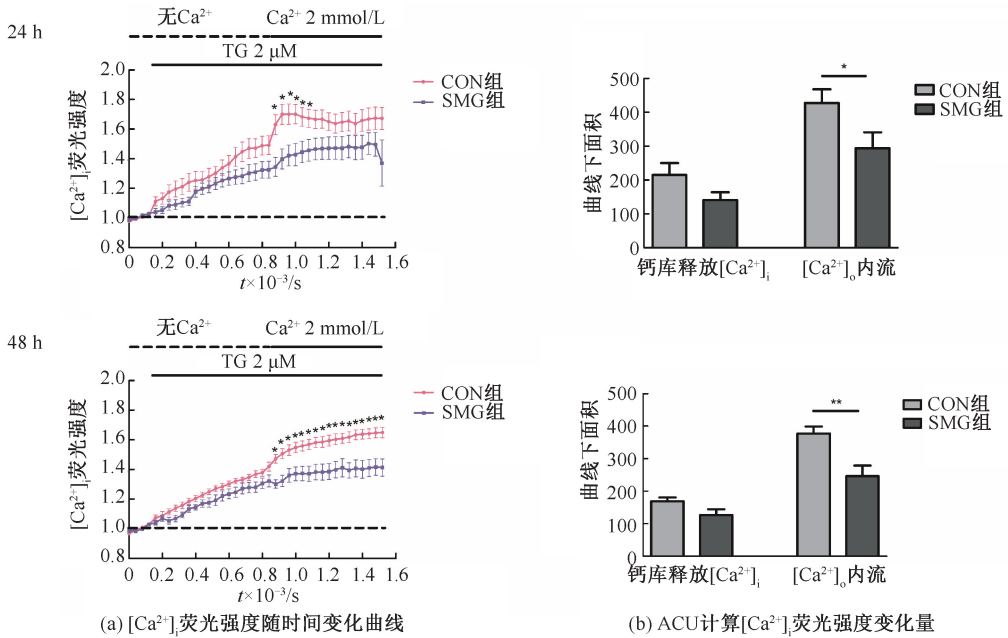


图2 骨细胞 MLO-Y4 的胞内 Ca^{2+} 浓度水平 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Fig.2 Intracellular Ca^{2+} concentration levels of osteocytes MLO-Y4 (a) $[Ca^{2+}]_i$ fluorescence intensity curve with time, (b) $[Ca^{2+}]_i$ fluorescence intensity variation calculated by ACU

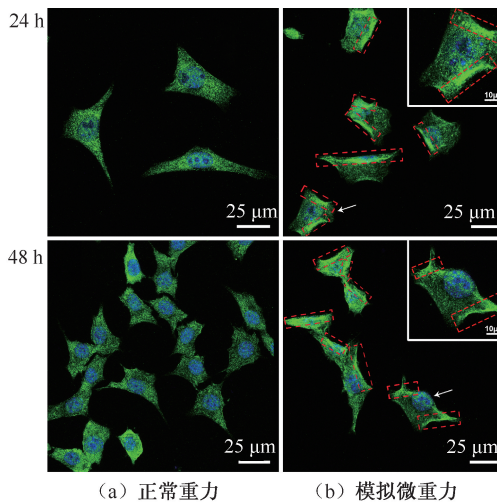


图3 不同重力效应下骨细胞 MLO-Y4 膜骨架 spectrin 分布 (63 \times)

Fig.3 Spectrin membrane skeleton distribution in osteocytes MLO-Y4 under different gravity effects (a) Under normal gravity, (b) Under simulated microgravity

3 讨论

骨细胞可以感受外界液体流动以及骨基质的挤压作用,进而激活力学传导通路,将力学刺激转

化为生化信号^[9]。胞内 Ca^{2+} 是细胞重要的第 2 信使,主要来源于细胞膜上 SOC 通道^[18]。本研究发现,ER 钙库释放 Ca^{2+} 时期,24、48 h 的 SM 组胞内 Ca^{2+} 浓度与对照组均无显著差异;而在胞外 Ca^{2+} 经 SOC 通道内流期,24 h 的 SM 组只在在前 4 min 比 CON 组有显著性下降,48 h 的 SM 组在整个时期均比 CON 组显著性下降。模拟微重力效应降低了骨细胞膜上 SOC 通道的活性,且模拟微重力效应作用时间越长,抑制越明显。

膜骨架 spectrin 不仅参与维持细胞膜形态、参与细胞的力学传导,也在 SOC 通道激活中也起到了重要作用^[17, 19-21]。IP₃R 存在于 ER 膜上,是 SOC 通道激活过程中的关键蛋白。ER 钙库耗竭可使 IP₃R 在细胞骨架/spectrin 的牵引下向细胞膜上移动,与 SOC 通道蛋白发生构象耦合从而激活 SOC 通道^[14-15, 22]。本研究发现,SM 组膜骨架 spectrin 向细胞边缘聚集,而 ER 膜蛋白 IP₃R 向 ER 的核被膜区域聚集,且 48 h 比 24 h 更为显著,这也与上述不同作用时间的胞内 Ca^{2+} 水平变化相一致。模拟微重力效应下细胞骨架牵拉 IP₃R 向细胞膜移动的构象耦合过程受阻,从而抑制了 SOC 通道功能。

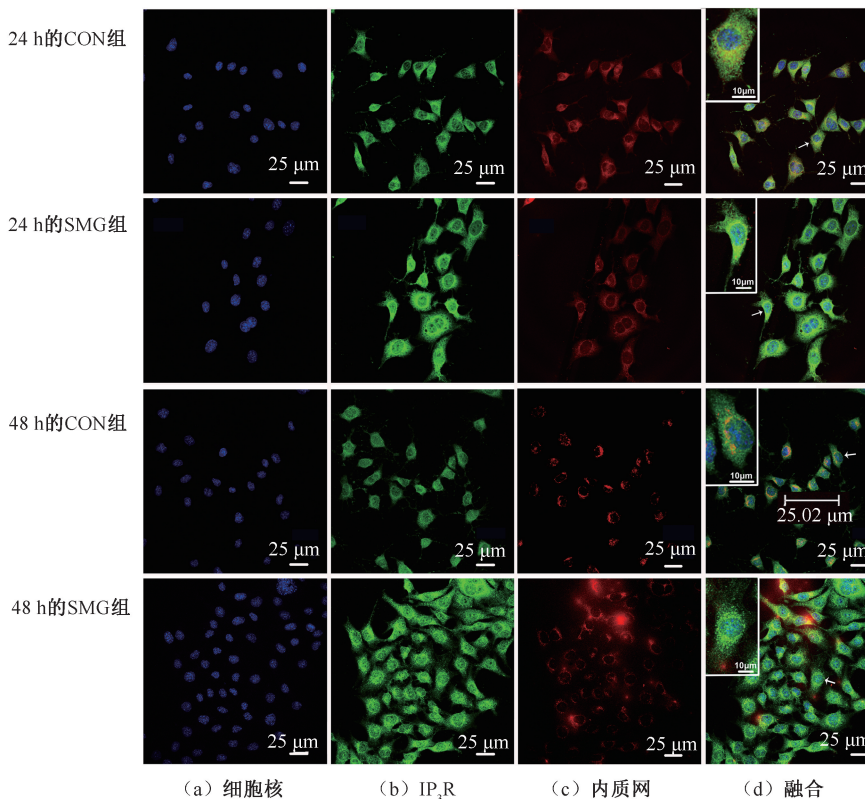


图 4 骨细胞 MLO-Y4 内质网上 IP₃R 分布(40×)

Fig.4 IP₃R distributions of ER in osteocytes MLO-Y4 (a) Nuclear, (b) IP₃R, (c) ER, (d) Merge

综上所述, SOC 通道在骨细胞对力学刺激响应中起着重要作用, 微重力下骨细胞 SOC 通道变化及其可能机制还有待进一步的深入研究。

参考文献:

- [1] LEBLANC A, SHACKELFORD L, SCHNEIDER V. Future human bone research in space [J]. *Bone*, 1998, 22 (S5): 113s-116s.
- [2] LANG T, LEBLANC A, EVANS H, *et al.* Cortical and trabecular bone mineral loss from the spine and hip in long-duration spaceflight [J]. *J Bone Miner Res*, 2004, 19(6): 1006-1012.
- [3] ZAYZAFON M, MEYERS VE, MCDONALD JM. Microgravity: The immune response and bone [J]. *Immunol Rev*, 2005, 208: 267-280.
- [4] VEZERIDIS PS, SEMEINS CM, CHEN Q, *et al.* Osteocytes subjected to pulsating fluid flow regulate osteoblast proliferation and differentiation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 348(3): 1082-1088.
- [5] TAN SD, VRIES TJ, KUIJPERS-JAGTMAN AM, *et al.* Osteocytes subjected to fluid flow inhibit osteoclast forma-

tion and bone resorption [J]. *Bone*, 2007, 41(5): 745-751.

- [6] TAYLOR AF, SAUNDERS MM, SHINGLE DL, *et al.* Mechanically stimulated osteocytes regulate osteoblastic activity via gap junctions [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 292(1): C545-552.
- [7] YOU L, TEMIYASATHIT S, LEE P, *et al.* Osteocytes as mechanosensors in the inhibition of bone resorption due to mechanical loading [J]. *Bone*, 2008, 42(1): 172-179.
- [8] LAU E, AL-DUJAILI S, GUENTHER A, *et al.* Effect of low-magnitude, high-frequency vibration on osteocytes in the regulation of osteoclasts [J]. *Bone*, 2010, 46(6): 1508-1515.
- [9] BONEWALD LF. The amazing osteocyte [J]. *J Bone Miner Res*, 2011, 26(2): 229-238.
- [10] 何子豪, 于志峰. Notch 信号通路在骨重建中的作用 [J]. *医用生物力学*, 2018, 33(1): 89-94.
- [11] HE ZH, YU ZF. The role of Notch signaling in bone remodeling [J]. *J Med Biomech*, 2018, 33(1): 89-94.
- [11] 张西正. 骨重建的力学生物学研究 [J]. *医用生物力学*, 2016, 31(4): 356-361.
- ZHENG XZ. The research on mechanobiology mechanism

- of bone remodeling [J]. J Med Biomech, 2016, 31(4): 356-361.
- [12] YANG X, SUN LW, WU XD, *et al.* Effect of simulated microgravity on osteocytes responding to fluid shear stress [J]. Acta Astronautica, 2013, 84(3): 237-243.
- [13] PRAKRIYA M, LEWIS RS. Store-operated calcium channels [J]. Physiol Rev, 2015, 95(4): 1383-1436.
- [14] PUTNEY JW, BROAD LM, BRAUN FJ, *et al.* Mechanisms of capacitative calcium entry [J]. J Cell Sci, 2001, 114(Pt 12): 2223-2239.
- [15] ROSADO JA, SAGE SO. Coupling between inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and human transient receptor potential channel 1 when intracellular Ca²⁺ stores are depleted [J]. Biochem J, 2000, 350 (Pt 3): 631-635.
- [16] BROWNLOW SL, SAGE SO. Rapid agonist-evoked coupling of type II Ins(1,4,5)P₃ receptor with human transient receptor potential (hTRPC1) channels in human platelets [J]. Biochem J, 2003, 375(Pt 3): 697-704.
- [17] WU S, SANGERMAN J, LI M, *et al.* Essential control of an endothelial cell ISOC by the spectrin membrane skeleton [J]. J Cell Biol, 2001, 154(6): 1225-1233.
- [18] CLAPHAM DE. Calcium signaling [J]. Cell, 2007, 131(6): 1047-1058.
- [19] MACHNICKA B, GROCHOWALSKA R, BOGUSŁAWSKA DM, *et al.* Spectrin-based skeleton as an actor in cell signaling [J]. Cell Mol Life Sci, 2012, 69(2): 191-201.
- [20] XU K, ZHONG G, ZHUANG X. Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons [J]. Science, 2013, 339(6118): 452-456.
- [21] MACHNICKA B, CZOGALLA A, HRYNIEWICZ-JANKOWSKA A, *et al.* Spectrins: A structural platform for stabilization and activation of membrane channels, receptors and transporters [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1838(2): 620-634.
- [22] ROSADO JA, REDONDO PC, SAGE SO, *et al.* Store-operated Ca²⁺ entry: Vesicle fusion or reversible trafficking and de novo conformational coupling? [J]. J Cell Physiol, 2005, 205(2): 262-269.