

文章编号: 1004-7220(2013)04-0472-05

# 细胞力感受蛋白协同 TNTs 介导 BMSCs 分化中力学信号转导的研究进展

于 研, 陈 雷, 程黎明

(同济大学附属同济医院 脊柱外科, 上海 200065)

**摘要:** 力学微环境作为诱导骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)分化的重要调控因素,逐步使干细胞研究体系在细胞生物力学层面进行深入拓展,导致对细胞生物力学特性、力学基础结构单元、细胞间力学网络架构的研究成为热点。本文通过综述 BMSCs 力学特性分析、整合素和钙粘蛋白的力学分子基础研究,结合隧道纳米管的内部骨架结构和力学几何性质,推测并构建了网络力学调控的主体框架,且探讨了力学网络微环境中上述重要力学结构协同作用的可能性。

**关键词:** 力学微环境; 骨髓间充质干细胞; 整合素; 钙粘蛋白; 隧道纳米管

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

## Progress of mechanotransduction in differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells mediated by cellular mechanosensor and TNTs

YU Yan, CHEN Lei, CHENG Li-ming (*Department of Spine Surgery, Tongji Hospital of Tongji University, Shanghai 200065, China*)

**Abstract:** With the regulation of mechanical microenvironment being realized as an important role in the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs), the systematic researches on stem cells are gradually deepened into the extended cellular biomechanical field, which lead to a hot research focus on cellular biomechanical properties, basic mechanical structure units and network-like mechanical architecture among cells. In this paper the analysis on mechanical properties of BMSCs and mechanical molecular basic research on integrins and cadherins are reviewed, and the main frame of network like mechanical regulation is speculated and constructed, combined with the internal skeleton and mechanical geometric properties of the tunneling nanotubes (TNTs). The possibility of synergistic effect among the above important mechanical structures in the network-like mechanical microenvironment is also investigated.

**Key words:** Mechanical microenvironment; Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs); Integrins; Cadherins; Tunneling nanotubes (TNTs)

自从干细胞诱导分化研究的“宏体系”中引入了“微环境”的概念后,对其中可溶性因子的关注一直占据着实验研究的主导地位。而如今大多学者意

识到,在微环境中力学因素对干细胞分化、迁移及增殖的影响已成为不可忽视的关键所在<sup>[1]</sup>。干细胞凭借整体预应力结构,能够将细胞膜感受到的机械

收稿日期:2012-07-29; 修回日期:2012-09-06

基金项目:上海市卫生局青年科研项目(20124Y158)。

通信作者:程黎明,主任医师,教授,博士研究生导师, Tel:(021)66111283; E-mail: chlm.d@163.com。

应力向内部传递,如重力、压力、张力、流体剪切力等;也可藉此改变细胞骨架及外形结构产生表面张力,通过细胞间的网络联结等效影响到周围的细胞群,并将之转化为生物化学信号行使细胞自身的生理活动<sup>[2]</sup>。细胞群间传递的应力能够激活各细胞表面的力敏感离子通道、异三聚体 G 蛋白、蛋白酶及一些与细胞膜相关的信号转导分子,这些触发因子能够启动下游的信号级联反应,从而改变部分与应力刺激相关的基因表达<sup>[3]</sup>。

骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 作为目前干细胞研究的热点,具有取材方便、易分离培养、扩增快、多向分化、稳定表达相关组织细胞表面、体外易被各类载体转染、可被输送至全身相关解剖部位、低免疫原性、低致瘤性等特点<sup>[4]</sup>。根据培养时所处的微环境, BMSCs 可被诱导分化成具有特定功能的组织,如骨、软骨、血管平滑肌、心肌和神经细胞等,以治疗骨缺损、成骨不全、退变性疾病、脑梗死、脊髓损伤等临床疾患,具有良好的应用前景。但体外诱导 BMSCs 分化受到多重因素的影响,如何高效地调控该过程仍是目前干细胞研究的难点问题。近年研究表明,除了可溶性因子之外,制约 BMSCs 分化的另一重要因素是细胞所处的力学环境<sup>[5-6]</sup>,且在对比胞内信号的传导时效时,证实应力传递的速度是可溶性因子的 40 倍<sup>[7]</sup>,可见通过力学因素调控 BMSCs 诱导分化的效率将远远高于可溶性因子。而且据推测力学因素在作用干细胞分化时,内源性可溶性因子可能不会对邻近细胞造成影响, Wang 等<sup>[8]</sup>利用半透膜隔离共培养 MSCs 和心肌细胞时发现,干细胞并未受到心肌细胞分泌的诱导因子影响而进行分化。

力学方式调控 BMSCs 诱导分化基于细胞间应力传导的媒介,它是力信号感受及传递结构所构建的力学网络,目前较明确的构成单元是感受细胞外基质 (extra cellular matrix, ECM) 物理特性的整合素 (integrins)<sup>[9]</sup>和细胞间黏附并相互传递力学信息的钙粘蛋白 (cadherins)<sup>[10]</sup> (见图 1),但相关研究不多。同时, integrins 和 cadherins 作为细胞单体感受表面应力刺激的蛋白结构,仅能解释邻近细胞间的力学影响,而细胞群作为相对宏观的整体,如何通过力学网络的全面覆盖进行统一的分化调控仍无法诠释。故此, BMSCs 诱导分化中是否存在力学网络不

同尺度间协同调控的机制? 细胞间是否存在着利于微米级远距离传导的天然介质? 这些都是 BMSCs 诱导分化力学因素中亟待解决的难题,其中包含了 BMSCs 的细胞力学特性、细胞间不同尺度间力学耦合的桥梁结构和分子基础。

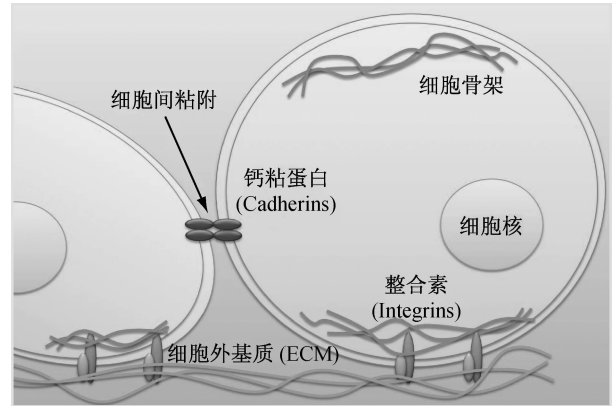


图 1 细胞间力学网络中的整合素和钙粘蛋白

Fig. 1 Integrins and cadherins in network-like mechanical environment among cells

## 1 BMSCs 的细胞力学特性

BMSCs 细胞骨架包含 3 种承受应力的成分:肌动蛋白丝、微管及中间丝。在引入了建筑师 Fuller 的“结构型建筑”理念后,细胞结构模型被定义为一组维持结构整体性的预应力结构。该结构由弹性元件 (肌动蛋白丝 + 中间丝) 和压缩元件 (微管 + 十字交叉的粗肌动蛋白束) 产生预应力以维系细胞骨架的整体性和稳定性<sup>[11]</sup>,其中的关键结构是被  $\alpha$ -辅肌动蛋白捆绑的 F-肌动蛋白,它通过分子马达——肌球蛋白 II 的紧致产生预应力。同样,细胞核内的肌动蛋白和肌球蛋白也可组成核内骨架,它产生的细胞核预应力可调控基因的定位和表达<sup>[12]</sup>,从而将细胞骨架力学在分子层面与生物化学联系起来,以控制 BMSCs 的分化、增殖、分泌等生理活动。Hu 等<sup>[13]</sup>干扰细胞骨架的肌动蛋白以撤除预应力,发现力化学信号的转变机制明显抑制了 Src 蛋白表达。同时综合细胞胞浆的物理性质,细胞整体呈现出固体-流体双相混合的连续特性,这种能够产生预应力且具有各向异性的结构,应力传导的速度远远高于不能产生预应力且各向同性的结构<sup>[14]</sup>。

## 2 Integrins 感受细胞外基质调控 BMSCs 分化的力学分子基础

Integrins 作为感受 ECM 物理性质的膜受体,通过纽蛋白(vinculin)和踝蛋白(talin)与细胞骨架相连,将细胞外力学信号传导至细胞内,启动调节相关基因蛋白表达的分布。目前已知有 24 种整合素异二聚体,由 18 种  $\alpha$  亚型和 6 种  $\beta$  亚型组成,其中  $\beta 1$  整合素是 BMSCs 诱导分化中重点关注的类型<sup>[15]</sup>,它能感知不同弹性系数的 ECM 而向不同方向分化。Engler 等<sup>[16]</sup>通过调整 MSCs 培养基与相应组织的弹性系数一致后,发现 MSCs 定向分化为相对应的组织,如模拟脑组织弹性系数为(0.1 ~ 1 kPa)时 MSCs 分化成神经元细胞。整合素目前已知的力学分子基础主要体现在以下 3 方面:(1)导致细胞骨架重排、改变蛋白微丝构象,最终影响核内染色体的基因表达而改变细胞的生理功能;(2)调节细胞膜钙离子通道并活化磷脂酶 C 介导的 IP<sub>3</sub>,协同作用以增高胞内钙离子浓度;(3)基于 FAK/SOS/Ras 等通道磷酸化 MEK1、ERK1/2 等,以活化转录因子 Runx2 (Cbfa1)<sup>[17]</sup>和 AP-1 家族。

## 3 Cadherins 介导细胞间纳米级应力传导的力学分子基础

Cadherins 是一类细胞与细胞间彼此相连的跨膜蛋白,它通过连环蛋白(catenins)与胞膜上的纽蛋白相连,从而桥接细胞之间的骨架结构,是力学网络中介导短程力传导的重要结构<sup>[18]</sup>。Chowdhury 等<sup>[19]</sup>发现在培养单个干细胞时改变培养基的弹性系数,细胞基底与顶端出现应力不同步的现象,而多个细胞培养时则表现出应力同步分布。这种细胞间的力感应能力则归因于 cadherins,它通过细胞侧方黏附形成的力学偶联平衡了整体骨架的稳定性。根据所处位置的不同,cadherins 家族包括上皮(E-)、神经(N-)、胎盘(P-)相关的各种亚型。Emily 等<sup>[20]</sup>曾通过诱导 N-cadherins 的产生促进 MSCs 向成骨细胞分化。Lin 等<sup>[21]</sup>通过 PCR 扩增出 C 末端缺少 105bps 的缺陷 cDNA 片段,编码缺陷 N-钙粘蛋白,导入细胞后对正常 N-cadherins 机械力感应的信号通路进行显性负调节,进而影响细胞分化。由此可证实 cadherins 介导细胞间纳米级应力传导的可能

性及其诱导 BMSCs 成骨分化的可能性,但相关研究不多。

## 4 隧道纳米管 ( tunneling nanotubes, TNTs) 介导细胞间微米级应力传导的力学分子基础

TNTs 是近年发现的特化细胞质微小网络系统,与植物体细胞间的胞间联丝作用类似,维系着细胞间物质和信号的长距流通,被认为是细胞间相互联系的直接纽带。TNTs 这种奇特的纳米级纤细长管,最先于 2004 年由 Rustom 等<sup>[22]</sup>在大鼠嗜铬细胞瘤 PC12 细胞间发现,随后人们陆续发现免疫细胞、肿瘤细胞、内皮细胞和肌肉细胞中都有这种物理性质的连接<sup>[23-25]</sup>,表明 TNTs 很可能是动物细胞间一种普遍存在的相互作用。TNTs 的长度在几个  $\mu\text{m}$  到 100 多  $\mu\text{m}$  之间,直径变化可以从几十 nm 开始一直到 1 个  $\mu\text{m}$  以上,它是细胞间质膜的连续结构,能够经过细胞外空间连接远距离的细胞。研究表明 TNTs 可输送成形成素(morphogen)<sup>[26]</sup>、组织相容性抗原、病毒<sup>[22]</sup>、肿瘤诱导成份<sup>[27]</sup>,参与发育、免疫、肿瘤等生理活动,相连细胞间物质的运输必然推进了信息的传递,提供了可供信息分子传播的结构,并具有运输的功能,那么理论上 TNTs 就可以作为细胞间的一种通讯途径。长距离传递生物学信息比可溶因子被动扩散具有更多优势:复杂、靶向、强度、网络。然而这种运输也是有选择性的,400 Da 大小的可溶性染料分子钙黄绿素不能在隧道纳米管内流动,可能是由于质膜紧密包裹着的纤维形肌动蛋白束阻塞了小分子的被动扩散<sup>[22]</sup>。同时,TNTs 的分子形成基础与 M-Sec 密切相关,Koji 等<sup>[28]</sup>通过 RNAi 干扰 M-Sec 使内源性隧道纳米管的形成显著减少,且还阐明了 M-Sec 是依赖 Ral-胞外复合体通路调控 TNTs 成形的重要调节因子。

目前研究大多聚焦在 TNTs 对化学物质的沟通及分子信息的交流,而对其是否参与细胞群力学网络的架构尚无研究。TNTs 一个重要的结构特征是其内始终贯穿着 F-肌动蛋白束,较粗的纳米管中还可可见微管蛋白的存在,它直接桥接着细胞间的结构骨架<sup>[29]</sup>。而且,TNTs 形成的网络结构在达到平衡态时,总表现出具有 120° 的对称性和拓扑不变性,Yin 等<sup>[30]</sup>通过微积分几何对称性、能量极值原理和

Steiner 树诠释了 TNTs 在生物学结构上的完美统一。由此推测,天然形成的 TNTs 极大可能是跨越式传导的关键载体,它稳定的力学几何结构维系着细胞团的整体张力和动态平衡,与之相连的细胞如同发布力学信号的“基站”,最大限度地减少信号衰减,并将应力刺激快速、稳定地通过钙粘蛋白传递给周边细胞,以保证网络内的每一个细胞个体接受到高精度低延迟的力学调控(见图2)。

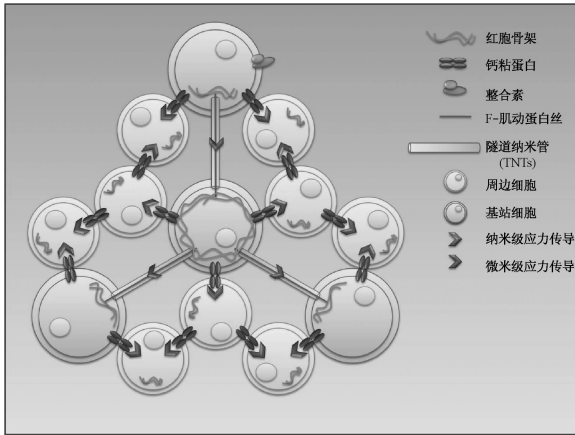


图2 力学网络架构假象图

Fig.2 Diagram of network-like mechanical architecture

## 5 结论

BMSCs 力学诱导分化的相关研究中,大多关注单纯外界应力刺激对整体细胞群的影响<sup>[31-32]</sup>,而对于其内部是否存在不同尺度的力学信号转导结构,以及构建网络式同步调控的力学物质基础的相关研究甚少。

本文基于 BMSCs 的生物力学特性,结合 integrins 和 cadherins 的生物力学研究进展,同时综述了 TNTs 的内部骨架结构和力学几何性质的科学发现,推测并构建了网络力学调控的主体框架。Integrins 作为力学网络激活的“扳机点”,cadherins 和 TNTs 分别作为 nm、 $\mu\text{m}$  级应力传导的媒介。然而,如何验证 BMSCs 诱导分化力学网络存在的合理性,需要通过对细胞群中部分细胞加载应力刺激,以观察未加载部分的细胞是否表现出细胞骨架的变形,甚至是分化的趋势,以往用于单细胞力加载的磁力扭转装置是最佳选择。磁力扭转装置是基于磁式细胞分选的原理,将抗  $\beta 1$  整合素抗体结合的磁珠制成免

疫磁珠,再与细胞表面的整合素受体相结合,在磁场的作用下对细胞进行磁力加载。Annika 等<sup>[33]</sup>利用  $2.8 \mu\text{m}$  的免疫磁珠与 MSCs 相结合,短时加载  $0.015 \text{ T}$  的磁场扭力  $15 \text{ min}$ ,出现了细胞局部表面结构的扭曲,并诱导激活了成骨细胞分化中 Erk 和 Akt 的表达,还导致了胞外钙离子的内流,从而影响局部黏附分子复合体的激活。同时,细胞骨架相关信号分子的变化也被观察到。由此可见,磁力扭转加载与整合素相连的免疫磁珠,可影响与之相连细胞的骨架结构及基因表达,实现了期望加载部分 BMSCs 以证实细胞间力学网络存在的技术要求。

未来研究方向应继续深入验证 TNTs 协同 cadherins 介导 BMSCs 诱导分化中力学网络调控的可能性以及两者之间的差异性,并为 BMSCs 分化中力学微环境的相关研究提供新的理论体系。

## 参考文献:

- [1] Dong L, Zhou JX, Chowdhury F, *et al.* Role of mechanical factors in fate decisions of stem cells [J]. *Regen Med*, 2011, 6 (2): 229-224.
- [2] Janmey PA, McCulloch CA. Cell mechanics: Integrating cell responses to mechanical stimuli [J]. *Ann Rev Biomed Eng*, 2007, 9: 1-34.
- [3] Hahn C, Schwartz MA. Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(1): 53-62.
- [4] Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, *et al.* Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro [J]. *Exp Neurol*, 2000, 164(2): 247-256.
- [5] Pouille PA, Ahmadi P, Brunet AC, *et al.* Mechanical signals trigger Myosin II redistribution and mesoderm invagination in *Drosophila* embryos [J]. *Sci Signal*, 2009, 2(66): ra16.
- [6] Krieg M, Arboleda-Estudillo Y, Puech PH, *et al.* Tensile forces govern germ-layer organization in zebrafish [J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(4): 429-436.
- [7] Na S, Collin O, Chowdhury F, *et al.* Rapid signal transduction in living cells is a unique feature of mechanotransduction [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2008, 105 (18): 6626-6631.
- [8] Wang T, Xu Z, Jiang W, *et al.* Cell-to-cell contact induces mesenchymal stem cell to differentiate into cardiomyocyte and smooth muscle cell [J]. *Cardiology*, 2006, 109(1): 74-81.

- [9] Friedland JC, Lee MH, Boettiger D. Mechanically activated integrin switch controls alpha5beta1 function [J]. *Science*, 2009, 323(5914): 642-644.
- [10] Shewan AM, Maddugoda M, Kraemer A, *et al.* Myosin 2 is a key Rho kinase target necessary for the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts [J]. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(10): 4531-4542.
- [11] Ingber DE. Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology [J]. *Cell Sci*, 2003, 116 ( Pt7 ): 1157-1173.
- [12] De Lanerolle P, Johnson T, Hofmann WA. Actin and myosin I in the nucleus: What next [J]. *Nature Struct Mol Biol*, 2005, 12(9): 742-746.
- [13] Hu S, Chen J, Butler JP, *et al.* Prestress mediates force propagation into the nucleus [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 329(2): 423-428.
- [14] Wang N, Suo Z. Long-distance propagation of forces in a cell [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 328(4): 1133-1138.
- [15] Ip JE, Wu Y, Huang J, *et al.* Mesenchymal stem cells use integrin beta1 not CXCR4 chemokine receptor 4 for myocardial migration and engraftment [J]. *Mol Biol Cell*, 2007, 18(8): 2873-2882.
- [16] Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, *et al.* Matrix elasticity directs stem cell lineage specification [J]. *Cell*, 2006, 126(4): 677-689.
- [17] Franceschi RT, Xiao G. Regulation of the osteoblast-specific transduction pathways [J]. *J Cell Biochem*, 2003, 88(3): 446-454.
- [18] Gumbiner BM. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis [J]. *Nature Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(8): 622-634.
- [19] Chowdhury F, Li Y, Poh YC, *et al.* Soft substrates promote homogeneous self-renewal of embryonic stem cells via downregulating cell-matrix traction [J]. *PLoS One*, 2010, 5(12): e15655.
- [20] Arnsdorf EJ, Tummala P, Jacobs CR. Non-canonical wnt signaling and N-cadherin related  $\beta$ -catenin signaling play a role in mechanically induced osteogenic cell fate [J]. *PLoS One*, 2009, 4(4): e5388.
- [21] Gao L, Mvbeath R, Chen CS. Stem cell shape regulates a chondrogenic versus myogenic fate through Rac1 and N-cadherin [J]. *Stem cell*, 2010, 28(3): 564-572.
- [22] Rustom A, Saffrich R, Markovic I, *et al.* Nanotubular highways for intercellular organelle transport [J]. *Science*, 2004, 303(5660): 1007-1010.
- [23] Onfelt B, Nedvetzki S, Yanagi K, *et al.* Cutting edge: Membrane nanotubes connect immune cells [J]. *J Immunol*, 2004, 173(3): 1511-1513.
- [24] Vidulescu C, Clejan S, O'Connor KC. Vesicle traffic through intercellular bridges in DU 145 human prostate cancer cells [J]. *J Cell Mol*, 2004, 8(3): 388-396.
- [25] Koyanagi M, Brandes RP, Haendeler J, *et al.* Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes; A novel mechanism for cell fate changes [J]. *Circ Res*, 2005, 96(10): 1039-1041.
- [26] Demontis F. Nanotubes make big science [J]. *PLoS Biol*, 2004, 2(7): E215.
- [27] Ambudkar SV, Sauna ZE, Gottesman MM, *et al.* A novel way to spread drug resistance in tumor cells: Functional intercellular transfer of P-glycoprotein ( ABCB1 ) [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2005, 26(8): 385-387.
- [28] Hase K, Kimura S, Takatsu H, *et al.* M-Sec promotes membrane nanotube formation by interacting with Ral and the exocyst complex [J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(12): 1427-1432.
- [29] Watkins SC, Salter RD. Functional connectivity between immune cells mediated by tunneling nanotubules [J]. *Immunity*, 2005, 23(3): 309-318.
- [30] Yin Y, Yin J. Geometrical conservation law for cells or vesicles with membrane nanotubes or singular points [J]. *J Nanobiotechnol*, 2006, 4: 6.
- [31] 何学令, 姚晓玲, 冯贤, 等. 力学刺激和成骨化学诱导剂对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化能力的影响 [J]. *医用生物力学*, 2011, 26(2): 116-120.
- [32] 张鹏, 江凌勇, 吴玉琼, 等. 持续张应力对骨髓基质干细胞增殖及骨向分化的影响 [J]. *医用生物力学*, 2012, 27(2): 239-244.
- [33] He XL, Yao XL, Feng X, *et al.* Effects from mechanical stimulation and osteogenic chemical inductor on osteoblastic differentiation of rat bone mesenchymal stem cells [J]. *J Med Biomech*, 2011, 26(2): 116-120.
- [32] Zhang P, Jiang LY, Wu YQ, *et al.* Effect of continuous strain on proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells [J]. *J Med Biomech*, 2012, 27(2): 239-244.
- [33] Kasten A, Müller P, Bulnheim U, *et al.* Mechanical integrin stress and magnetic forces induce biological responses in mesenchymal stem cells which depend on environmental factors [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 111(6): 1586-1597.