论著

文章编号:1000-5404(2006)11-1212-03

周期性张应变对椎间盘纤维环细胞内游离钙离子浓度的影响

郭志良,周 跃,成 敏,李华壮,曹国永,张 伟,李兴鑫 (第三军医大学新桥医院骨科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨周期性张应变对培养的大鼠椎间盘纤维环细胞内 Ca^{2+} 浓度([Ca^{2+}])的影响及其可能机制。**方法** 采用激光扫描共聚焦显微镜和 Fluo-3/AM 荧光探针标记技术,测定周期性张应变对纤维环细胞内[Ca^{2+}]的影响,并分析了 EGTA、维拉帕米和氯化钆预处理对此作用的影响。**结果** 应变为 10%、频率为 1 Hz 的周期性张应变 1 min 使细胞内[Ca^{2+}]增加 1.13 倍;EGTA 可以阻断此作用;而维拉帕米和氯化钆仅可部分阻断。**结论** 周期性张应变使纤维环细胞内[Ca^{2+}]升高,细胞外钙内流起主要作用,且有不同的钙离子通道参与。

关键词:周期性张应变;纤维环细胞;细胞内钙;激光扫描共聚焦显微镜

中图法分类号:R323.4;R329-33;R329.26 **文献标识码**:A

Effect of cyclic tensile strain on intracellular calcium concentration in cells of fibrous ring of intervertebral disk

GUO Zhi-liang, ZHOU Yue, CHENG Min, LI Hua-zhuang, CAO Guo-yong, ZHANG Wei, LI Xing-xin (Department of Orthopedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the influence of cyclic tensile strain (CTS) on intracellular calcium concentration in the cells of fibrous ring of intervertebral disk and the mechanism. **Methods** The cells of fibrous ring of intervertebral disk were divided into 6 groups according to different treatment: negative control group; Two CTS groups receiving 10%, 1 Hz CTS for 1 or 5 min; EGTA + CTS group treated with 5 mmol/L EGTA for 5 min before one-minute CTS; Verapamil + CTS group treated with 10 μmol/L verapamil for 15 min before one-minute CTS; Gadolinium chloride + CTS group treated with 10 μmol/L gadolinium chloride for 15 min before one-minute CTS. Laser scanning confocal microscope and Fluo-3/AM were used to investigate the changes of intracellular calcium concentration when the cells responded to cyclic tensile strain. **Results** The cyclic tensile strain increased the intracellular calcium concentration. EGTA inhibited the increase of intracellular calcium, but verapamil and gadolinium chloride partially blocked the effects. **Conclusion** Cyclic tensile strain induces the increase of intracellular calcium concentration, in which the influx of extracellular calcium plays an important role. Different calcium channels are involved in the process.

Key words: cyclic tensile strain; fibrous ring cell; intracellular calcium; laser scanning confocal microscope

细胞内 Ca^{2+} 是一种重要的第二信使分子,参与细胞的多种生理活动,对于维持细胞的多种代谢活动具有极其重要的作用。细胞外 Ca^{2+} 的内流和细胞内 Ca^{2+} 的释放可能在力学信号转导中起一定作用[1,2]。已有研究表明,流体切应力使单层培养的椎间盘纤维环细胞内 Ca^{2+} 浓度([Ca^{2+}])升高[3]。周期性张应变(cyclic tensile strain,CTS)是否影响纤维环细胞内游离 Ca^{2+} 浓度,目前尚缺乏直接的证据。本实验应用激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope,LSCM)和 Fluo-3/AM 荧光探针标记技术,检测了 CTS 对单层培养大鼠椎间盘纤维环细胞内[Ca^{2+}]的影响,并分析了细胞外钙内流在其中的作用,对了解纤维环细胞力学信号转导过程具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 1月龄 Sprague-Dawley 大鼠由本院实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM 培养基和Ⅱ型胶原酶为 Gibco 公司产品,胎牛血清为 PAA 公司产品,Fluo-3/AM 和 Pluronic F-127 购自 Molecular Probe 公司,纤维连接素为 Roche 公

作者简介:郭志良(1975-),男,山东省微山县人,博士研究生,主要从事椎间盘退变机制方面的研究。电话:13594130487,E-mail:drzlguo@163.com

通讯作者:周 跃,电话:(023)68755608,E-mail:Happyzhou@vip.163.com

收稿日期:2005-09-13;修回日期:2006-02-23

司产品，氯化钆、EGTA 为 Sigma 产品，维拉帕米为 Wako 产品。硅橡胶膜为 Dow Corning 公司产品，LSCM 型号为 Leica TCS-NT。

1.2　大鼠纤维环细胞培养

大鼠处死后，常规消毒，无菌条件下取下脊椎，立即置入盛有 PBS 液的培养皿中，去除椎间盘周围的软组织，将椎间盘从中间切开，小心刮除髓核组织，然后用尖刀片将纤维环仔细取下，于 PBS 液中漂洗 3 遍，然后用眼科剪剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm的小块，置0. 25 % 胰蛋白酶中，37 ℃下消化 10 min，加入含血清培养基终止消化，用 PBS 液清洗去除胰蛋白酶，将组织块置 0.1 % 的Ⅱ型胶原酶溶液中，37 ℃下消化 2 h ，200 目滤网过滤，细胞悬液 1 000 r/min 离心 5 min，得细胞团，PBS 液清洗细胞 3 次，清洗后的细胞以 DMEM（含 10 % 的胎牛血清）悬浮，接种于培养瓶中，置 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。待细胞生长汇合时，用 0.25% 胰蛋白酶消化，传代细胞以 2×10^5/ ml 的密度接种于自制的细胞培养槽中，于接种 24 h 后进行 CTS 处理。

1.3　实验装置

周期性张应变装置由变频器、直流低速电动机、传动系统和细胞培养槽 4 部分组成。由变频器控制电机的转速，从而控制 CTS 的频率。电机的转动通过传动系统变为球冠的上下运动。由于细胞培养槽的底部大小恒定，故球冠的高度就决定了应变的大小。细胞培养槽的底部由硅橡胶膜制成，并且包被有纤维连接素（5 μg/cm^2）。在本实验中，细胞所受应变为 10%，频率为 1 Hz，1/3 周期无应变，2/3 周期加载应变。

1.4　$[Ca^{2+}]i$ 的测定

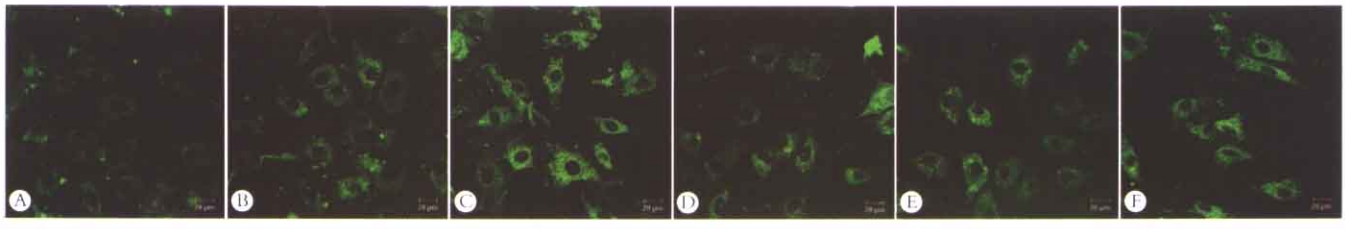
单层生长于硅橡胶膜上的细胞，用 HBSS（0. 135 mol/L NaCl，1. 8 mmol/L $CaCl_2$，5 mmol/L KCl，1 mmol/L $MgCl_2$，20 mmol/L Hepes，5 mmol/L 葡萄糖，pH 7.4）洗涤 3 次，然后加入终浓度为 4 μmol/L 的 Fluo-3/AM 和 0.1% Pluronic F-127，在 37 ℃、5% CO_2 培养箱中孵育细胞 30 min，而后用 HBSS 清洗，洗去未负载的荧光探针。负载后的细胞在培养箱中继续孵育 15 min，以便细胞内的酯酶脱去 AM 酯。然后对细胞进行不同的处理：①无应变组：对细胞不做处理；②CTS 1 min 组：对细胞施加 10% 、1 Hz CTS1 min；③CTS 5 min 组：对细胞施加 10% 、1 Hz CTS 5 min；④EGTA + CTS 组：5 mmol/L EGTA 预处理 5 min，再施加 10% 、1Hz CTS 1 min；⑤维拉帕米 + CTS 组：10 μmol/L 维拉帕米预处理 15 min，再施加 10% 、1 Hz CTS 1 min；⑥氯化钆 + CTS：组：10 μmol/L 氯化钆预处理 15 min，再施加 10% 、1 Hz CTS 1 min。细胞 CTS 处理后，即刻进行 LSCM 检测，荧光激发波长为 488 nm，发射波长为 525 nm，记录细胞最佳切面的荧光强度以及荧光的分布情况。用 Quantify software 软件对细胞的荧光值进行定量分析。

1.5　统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用 SPSS 10.0 软件进行单因素方差分析。

2　结果

Fluo-3 成功负载培养于硅橡胶膜上的纤维环细胞，染色主要在细胞质靠细胞核的部分，细胞核无染色（图 1）。



A：无应变组；B：CTS 1 min 组；C：CTS 5 min 组；D：EGTA + CTS 组；E：氯化钆 + CTS 组；F：维拉帕米 + CTS 组

图 1　LSCM 记录不同处理组细胞内钙离子情况　（荧光显微镜）

对纤维环细胞施加应变为 10%，频率为 1 Hz 的 CTS 1 min，荧光强度比无应变组增加 1. 13 倍，CTS 5 min 增加1.24 倍，但是 CTS 1 min 和 CTS 5 min 两者对细胞内荧光强度的影响无显著性差异［细胞内荧光强度分别为（104. 72 ± 19. 47）和（109. 96 ± 26. 14）］（$P > 0.05$）。经 EGTA 预处理的细胞，给予同样 CTS 1 min 刺激后，细胞内荧光强度增高不显著，与无应变组比较无显著性差异［荧光强度分别为（55. 03 ± 14. 40）和（49. 15 ± 14. 24）］。而维拉帕米和氯化钆预处理组，CTS 1 min 后细胞内荧光强度增加不如单纯 CTS 组明显［荧光强度分别为（90. 48 ± 18. 69）和（67. 74 ± 13. 95）］，抑制率分别为 26% 和 66%。

3　讨论

椎间盘退变可以引起一系列的脊柱病变和继发病变，如椎间盘突出、脊柱节段不稳和椎管狭窄等，但其确切发病机制目前仍不清楚。纤维环位于椎间盘周围，由多层同心圆排列的纤维板层构筑而成，纤维环细胞存在于胶原纤维束之间，其纵轴基本与胶原纤维束平行。在椎间盘运动过程中，张应力是纤维环主要的载荷形式。对培养的纤维环细胞施加周期性张应力，可以使蛋白多糖的合成降低[4]。至于纤维环细胞是如何将机械应力信号转化成为细胞化学信号，目前对其过程了解不多。

单层培养的纤维环细胞施加流体切应力，可以使细胞内［Ca^{2+}］升高[3]。在其他类型的细胞中，力学刺激也可以引起细胞内［Ca^{2+}］升高[5,6]。在体外对成骨细胞施加应力刺激，细胞内［Ca^{2+}］即刻在短时间内大

幅度升高，此反应各自独立，不能叠加，而且与反应细胞的百分比有关，而与细胞的平均[Ca^{2+}]无关，说明此反应是“全或无”式的[7]。本实验结果也表明，对单层生长的椎间盘纤维环细胞施加应变为10%、频率为1 Hz的CTS 1 min，可以使细胞内[Ca^{2+}]升高1.13倍；CTS 5 min增加1.24倍，但是CTS 1 min和CTS 5 min两者对细胞内[Ca^{2+}]影响无差异。我们推测，细胞内Ca^{2+}作为一种第二信使分子，可能参与纤维环细胞将力学信号转变为生化响应的过程。所以在后续实验中我们选择CTS 1 min作为刺激因素，进行阻断剂实验。

细胞内[Ca^{2+}]的升高主要依靠2条途径：一是细胞内储存钙的释放；二是细胞外钙内流。在本实验中我们采用Ca^{2+}螯合剂EGTA，可以阻断细胞内[Ca^{2+}]的升高。此结果说明，在CTS引起纤维环细胞内[Ca^{2+}]升高的过程中，细胞外钙内流更为重要。然而钙离子阻断剂维拉帕米仅能部分抑制由CTS引起的细胞内[Ca^{2+}]升高，其抑制率不高的原因，可能是因为还有其他类型的离子通道参与。氯化钆是细胞膜牵拉激活离子通道阻断剂[8,9]，其对由CTS引起的细胞内[Ca^{2+}]升高的抑制作用比维拉帕米强，说明在CTS引起的细胞内[Ca^{2+}]升高的过程中，牵拉激活离子通道发挥了更大的作用。当然，也可能是这二者的作用分工不同，例如在鸡软骨细胞，5% CTS促进细胞的增殖和成熟，牵拉激活离子通道参与调节其增殖过程；而钙离子通道参与增殖和成熟2个过程[8]。但是二者皆不能使细胞内[Ca^{2+}]达到无应变时的水平，提示除此以外，还有其他的离子通道参与。在成骨细胞，施加生理水平的周期性拉伸刺激，细胞内[Ca^{2+}]的升高部分来源于细胞外钙内流，部分来源于细胞内钙库的释放，其中细胞外钙内流起主要作用[10]。与我们实验结果不同的原因，可能是因为细胞种类、检测方法不同所致。至于周期性张应变引起细胞离子通道开放的机制，目前并未完全清楚，作为第一信使的细胞膜电位可能具有一定的作用。机械刺激导致细胞膜电位发生变化，膜电位的变化引起细胞离子通道状态的改变和/或细胞内Ca^{2+}动员，从而影响细胞内[Ca^{2+}]。已有研究结果表明，流体切应力可以使内皮细胞膜电位发生改变，膜电位的变化影响细胞膜对Ca^{2+}的转运，从而对细胞内[Ca^{2+}]的进行调节[11,12]。大鼠巨核细胞膜电位的去极化可以使细胞内“钙库”释放Ca^{2+}，引起细胞内Ca^{2+}振荡[13]。

我们在本实验中仅是对CTS引起的细胞内[Ca^{2+}]升高进行了观察，至于其下游事件，将是我们进一步研究的方向。由于实验装置的限制，我们仅检测细胞在CTS后的静态钙水平，未能对CTS过程中细胞内[Ca^{2+}]的动态变化进行监测，为本实验的不足之处。通过采用磁球技术，或许能够实现对CTS过程中细胞内[Ca^{2+}]的动态变化进行监测。

（致谢：感谢重庆医科大学第二附属医院肝胆外科龚建平主任和刘作金博士的支持！）

参考文献：

[1] WANG N, BUTLER J P, INGBER D E. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton[J]. Science, 1993, 260(5111): 1124-1127.

[2] LI Y S, HAGA J H, CHIEN S. Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells[J]. J Biomech, 2005, 38(10): 1949-1971.

[3] ELFERVIG M K, MINCHEW J T, FRANCKE E, *et al*. IL-1 beta sensitizes intervertebral disc annulus cells to fluid-induced shear stress [J]. J Cell Biochem, 2001, 82(2): 290-298.

[4] ISHIHARA H, MCNALLY D S, URBAN J P, *et al*. Effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis in different regions of the intervertebral disk[J]. J Appl Physiol, 1996, 80(3): 839-846.

[5] LABRADOR V, CHEN K D, LI Y S, *et al*. Interactions of mechanotransduction pathways [J]. Biorheology, 2003, 40(1-3): 47-52.

[6] 刘 颖，周 征，郑 翼，等. 机械压力对体外培养的成骨样细胞内Ca^{2+}浓度影响的研究[J]. 口腔正畸学，2004，1(1增刊)：19-20.

[7] YOU J, YELLOWLEY C E, DONAHUE H J, *et al*. Substrate deformation levels associated with routine physical activity are less stimulatory to bone cells relative to loading-induced oscillatory fluid flow [J]. J Biomech Eng, 2000, 122(4): 387-393.

[8] WU Q Q, CHEN Q. Mechanoregulation of chondrocyte proliferation, maturation, and hypertrophy: ion-channel dependent transduction of matrix deformation signals [J]. Exp Cell Res, 2000, 256(2): 383-391.

[9] MARTINAC B. Mechanosensitive ion channels: molecules of mechanotransduction[J]. J Cell Sci, 2004, 117(Pt 12): 2449-2460.

[10] 唐丽灵，王远亮，谷 俐，等. 成骨细胞对周期性拉伸刺激的生理响应和胞内Ca^{2+}浓度的变化[J]. 科学通报，2003，48(2)：149-153.

[11] LIEU D K, PAPPONE P A, BARAKAT A I. Differential membrane potential and ion current responses to different types of shear stress in vascular endothelial cells[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2004, 286(6): C1367-C1375.

[12] QIU W P, HU Q, PAOLOCCI N, *et al*. Differential effects of pulsatile versus steady flow on coronary endothelial membrane potential [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 285(1): H341-H346.

[13] MASON M J, HUSSAIN J F, MAHAUT-SMITH M P. A novel role for membrane potential in the modulation of intracellular Ca^{2+} oscillations in rat megakaryocytes[J]. J Physiol, 2000, 524(Pt 2): 437-446.

（编辑 张大春）