

佛波酯诱导大鼠滑膜细胞骨架改变的研究*

潘雷霆¹⁾ 孙文武²⁾ 齐继伟¹⁾ 吴限¹⁾ 宋昆¹⁾ 胡芬¹⁾ 张心正¹⁾ 许京军^{1)**}

¹⁾南开大学泰达应用物理学院, 弱光非线性光子学教育部重点实验室, 天津 300457; ²⁾沈阳军区总医院呼吸内科, 沈阳 110016)

摘要 以体外培养的大鼠关节炎模型的滑膜细胞为研究对象, 用蛋白激酶 C(PKC)激活剂佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)刺激细胞模拟炎症过程, 应用原子力显微成像技术研究了大鼠滑膜细胞在 PKC 活化后细胞骨架变化情况。结果表明, 利用原子力显微镜成像可以较好地表征 PMA 刺激引起滑膜细胞骨架的收缩隆起及细胞表面质地的变化, 并揭示了 PKC 活化可能是引起滑膜细胞骨架改变的重要原因。这些结果为加深了解类风湿关节炎的发生机制提供了实验基础。

关键词 滑膜细胞, 细胞骨架, 佛波酯(PMA), 蛋白激酶 C, 原子力显微镜

学科分类号 Q245, TN16

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00336

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以慢性关节炎为主要表现的自身免疫疾病, 其显著特征是滑膜组织增生并向关节浸润生长, 导致关节和关节软骨破坏。滑膜细胞增生是类风湿关节炎标志性病理改变^[1], 其在关节炎中的病理意义在于细胞增殖能力强于凋亡能力^[2,3], 细胞活化释放细胞因子^[4], 产生基质蛋白酶参与软骨破坏^[5]等。先前研究表明, 蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC)可能参与了滑膜细胞的增生^[6], 因此研究滑膜细胞病变情况将有助于认识该疾病和发现新的治疗靶点。

研究表明, 炎症和肿瘤发生过程中细胞的多种病理改变, 如细胞增殖^[7], 浸润生长^[8]等与细胞骨架的变化有密切关系。据了解, 目前对于类风湿关节炎病理条件下类肿瘤细胞样生长的滑膜细胞的细胞骨架变化情况尚无相关研究报道。由于胶原诱导的大鼠关节炎模型与人类类风湿关节炎患者有相似的病理改变, 因此该模型是国际公认的类风湿疾病的研究模型^[9]。原子力显微镜(AFM)显微成像术对样品制备要求简单, 具有真空、空气和液相环境下工作的优点, 近些年来在生物领域(如细胞质膜动态过程研究^[10], 细胞膜表面张力研究^[11], 细胞超微结构的研究^[12], 细胞之间^[13]及细胞与基底间^[14]相互作用, 以及各类细胞骨架的研究^[15~17]等方面)的应用日益广泛, 并有了长足的发展。我们应用原子力显微镜(atmotic force microsocpe, AFM)研究了体外培养的大鼠关节炎模型的滑膜细胞, 在 PKC 激活剂佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)和

PKC 抑制剂 GF 109203X 刺激下细胞骨架变化情况, 揭示 PKC 在此信号传导通路中所起的重要作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

体重为 150~250 g 的雄性 Wistar 大鼠 10 只, 由军事医学科学院卫生学环境医学研究所提供; Axio Observer D1 型倒置荧光微分干涉差成像显微镜(德国 Zeiss 公司), NanoScope III a 型原子力显微镜(美国 Veeco 公司), 3111 型 CO₂ 孵箱(美国 Thermo Electron 公司); II 型胶原酶、胰酶、胎牛血清(FBS)、DMEM 培养基均购自 Invitrogen 公司。佛波酯(PMA)、PKC 抑制剂 GF 109203X(3-[1-[3-(Dimethylamino)propyl]-1H-indol-3-yl]-4-(1Hindol-3-yl)-1H-pyrrole-2, 5dione)购自 Sigma 公司。Hank's buffer salt solution (HBSS) 缓冲液参考 Brough 等^[18]方法配制: 150 mmol/L NaCl, 5.4 mmol/L KCl, 2 mmol/L CaCl₂, 1 mmol/L MgCl₂·6H₂O, 10 mmol/L HEPES/NaOH, 10 mmol/L 葡萄糖, 配制所需药品

* 国家重点基础研究发展计划(2007CB307002), 国际科技合作重点项目计划(2005DFA10170)和高等学校学科创新引智计划(B07013)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 022-23501743, E-mail: jjxu@nankai.edu.cn

收稿日期: 2008-05-08, 接受日期: 2008-07-21

购自 Sigma 公司. 其他为国产(分析纯)试剂.

1.2 胶原诱导大鼠关节炎模型的构建和滑膜细胞的培养

构建大鼠关节炎模型是参考 Shou 等^[19]所描述的方法进行. 提取滑膜细胞按如下步骤: 将已经确定关节炎病变的大鼠麻醉后, 分离病变关节, 打开关节腔, 将分离的滑膜组织迅速置于 HBSS 溶液, 剪碎后放入含 II 型胶原酶的无血清 DMEM 溶液中, 在 37°C 环境放置 3 h. 尼龙网过滤后以 800 r/min 速度离心 10 min, 倒出上层溶液加入含 10%胎牛血清的培养基, 在 37°C, 5% CO₂ 环境的孵箱中培养. 传 6 代以后, 可得到形态性状稳定的成纤维样的滑膜细胞^[20].

1.3 样品制备

在六孔板中放入厚度为 0.17 mm, 直径为 25 mm 的无菌德国 Menzel-glaser 圆形盖玻片, 经胰酶消化脱壁处理的滑膜细胞吹散打匀移至六孔板中, 在 CO₂ 孵箱中培养 48~72 h, 待细胞舒展贴壁后即可实验, 细胞密度约为 200 个/mm². 一般活细胞表面比较柔软, 较难以牢固地固定于基底, 会使待测细胞变形及漂移, 导致 AFM 成像质量下降, 或甚至不能成像, 因此我们把细胞固定处理后 AFM 成像. 使用同一种固定方法来研究 PMA 作用前后细胞骨架的改变, 在比较实验中可以排除固定剂对细胞的影响. 用 2 μmol/L PMA 室温下刺激滑膜细胞 30 min, 接着用 HBSS 溶液漂洗 2 次, 立刻滴入 PBS 配置的 0.5% Triton X-100 和 1%戊二醛室温固定 30 min. 为防止盖玻片在晾干后表面析出盐结晶引起噪声, 保证原子力显微镜成像质量, 将固定后的样品用超纯水小心漂洗 2 次, 在百级净化超

净室晾干. 把晾干后盖玻片用玻璃刀切成大小合适的小片, 置于原子力显微镜特定样品架上进行检测. 为了研究 PKC 在 PMA 诱导的细胞骨架变化过程中的作用, 我们用 5 μmol/L GF 109203X 孵育滑膜细胞 30 min, 再加上 2 μmol/L PMA 作用 30 min, 而后采用上述相同方法处理细胞. 此外, 未加任何刺激的正常滑膜细胞以同样方法处理作为实验对照组.

1.4 AFM 成像及成像分析

一般来说生物材料比较柔软, 在 AFM 接触模式(contact mode)成像过程中易受横向力影响, 容易被刮伤, 导致图像失真^[21]. 为此, 所有 AFM 图像是用轻敲模式(tapping mode)获得的. 所用探针型号为 RTESP7, 材质为掺磷单晶硅, 微悬梁弹性系数为 20~80 N/m, 工作频率 300~343 kHz. 图像分辨率为 256×256 像素, 扫描频率为 0.4 Hz, 高度成像(height imaging)扫描速度为 80 μm/s, 相位成像(phase imaging)扫描速度为 1.6 μm/s. 图像分析用 Nanoscope V5.30r3 软件完成.

2 结果与分析

2.1 PMA 刺激引起滑膜细胞的隆起

利用 AFM 显微成像对 PMA 刺激前后滑膜细胞的整体形态进行了观察, 发现刺激前细胞形态舒展(图 1a), 刺激后细胞形态发生了明显的隆起收缩(图 1b). 图 1 表示大鼠滑膜细胞 AFM 显微成像所得高度图: 图像的左侧图为细胞高度的灰度图, 右上方图为灰度标尺, 右下方图为左侧高度图对应的三维立体图.

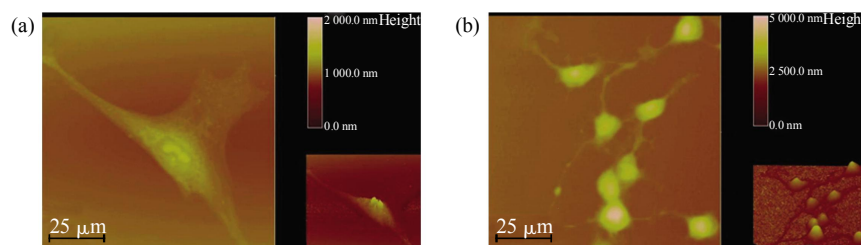


Fig. 1 Tapping mode AFM height image of rat synoviocytes with 100 μm×100 μm scanning range

(a) Control cell. (b) Cells stimulated by 2 μmol/L PMA for 30 min at room temperature.

2.2 PMA 和 GF 109203X 刺激引起滑膜细胞隆起的高度变化

为了确定 PKC 激活剂与抑制剂对滑膜细胞骨架隆起的影响, 对细胞隆起程度进行定量化计算. 为了更好地说明细胞的隆起是一个体向变化,

而不只是某些微小局部的变化, 采用两种高度统计方法. 一种是峰值高度(peak height)——细胞最高点到基底的距离, 另一种是有效高度(effective height)——细胞的总体积与底面积之比. 正常舒展状态细胞表面是凸凹不平, 甚至某些局部区域峰值

高度起伏很大，如图 1a 所示的细胞核区域，因此峰值高度并不能完全说明细胞隆起情况。为了避免这样的影响，我们利用每个细胞总体积与底面积比值得出有效高度来进一步对细胞体向的隆起情况进行定量描述。

两种统计方法的结果表明，只在 PMA 刺激下滑膜细胞明显隆起：2 μmol/L PMA 刺激后滑膜细胞的峰值高度(1 634.6 ± 138.7) nm (n=20)约是对照组细胞(679.6 ± 126.8) nm (n=20)的 2.4 倍，有效高度(722.3 ± 79.2) nm 约是对照组细胞的 3.3 倍，说明滑膜细胞在 PMA 的作用下发生明显收缩隆起，与对照组有显著性差异(P < 0.01)(图 2)。

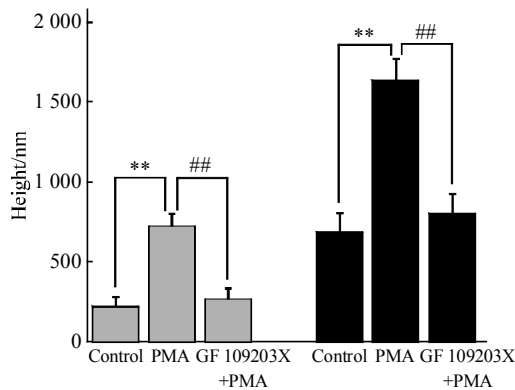


Fig. 2 Statistical results of height to control cells, PMA stimulated cells and GF 109203X+PMA stimulated cells
 $\bar{x} \pm s, n=20$. **P < 0.01, compared with control; ##P < 0.01, compared with PMA. ■: Effective height; ■: Peak height.

PKC 特异性抑制剂 GF 109203X 作用细胞 30 min 后施加 PMA 刺激，结果表明，细胞并未发生明显的隆起，如图 2 所示：加 PKC 抑制剂的滑膜细胞实验组的峰值高度(799.7 ± 125.5) nm (n=20)与对照组细胞(679.6 ± 126.8) nm 的组间差异性不明显，P > 0.05，其有效高度(265.7 ± 69.4) nm 与对照组(216.8 ± 64.5) nm 的组间差异性也同样不明显，P > 0.05。此外，同是 PMA 刺激条件下，未加抑制剂组峰值高度约是加抑制剂组的 2 倍，有效高度约为 2.7 倍，组间差异性明显，P < 0.01。由此可说明 PKC 特异性抑制剂 GF 109203X 可以显著地抑制 PMA 刺激引起滑膜细胞的隆起效应。

2.3 PMA 刺激引起滑膜细胞表面形态变化

相位成像技术有利于克服由于细胞发生较强的隆起而给探测局部高度形貌带来的困难。为了确定 PMA 对细胞骨架的影响，我们用该技术来检测 PMA 处理前后细胞表面的局部形态。实验结果表明：经过 PMA 处理后，由于细胞骨架的变化，引起细胞表面质地发生较强的变化。图 3a 和 3b 为 PMA 刺激前后单个细胞膜的局部相位成像图。通过在相位图上的一维相位曲线，可计算出两者的相位起伏(图 3c 和 d)：正常细胞相位差约为 6.2° ± 0.4° (n=8)，而 PMA 刺激后的相位差约为 28.7° ± 1.2° (n=8)，两者有显著差别，P < 0.01。这些结果说明 PKC 激活剂 PMA 可能通过 PKC 活化引起细胞骨架收缩，进而影响细胞表面的质地。

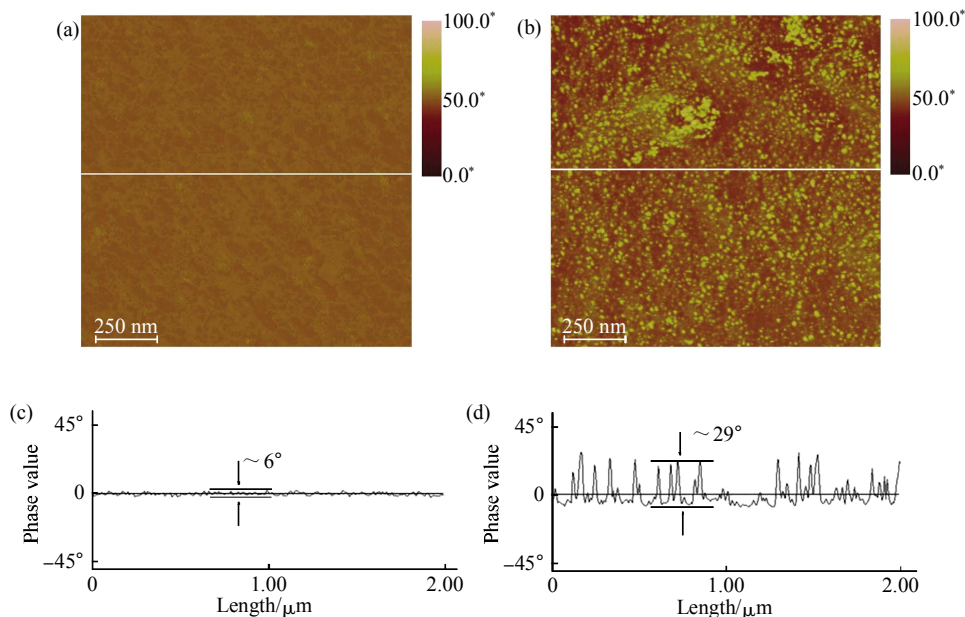


Fig. 3 Phase image of AFM of rat synoviocytes with 2 μm×2 μm scanning range

(a) Phase imaging of one typical control cell. (b) Phase imaging of one typical cell stimulated by PMA. (c, d) Section lines corresponding to the white lines in (a) and (b).

3 讨 论

PMA 是促肿瘤剂, 结构与二酰基甘油(DG)相似, 可以活化 PKC. PKC 是一类钙和磷脂依赖性激酶, 具有广泛的作用底物, 通过催化底物蛋白质的 Ser/Thr 磷酸化, 调节多种生理过程, 如细胞分泌, 细胞增殖等过程以及细胞骨架的改变^[22]. PKC 在肿瘤细胞中含量较多, 可介导肿瘤细胞的运动, 侵袭和转移^[23], 而这些行为的产生会涉及细胞骨架的变化. Vääräniemi 等^[24]报道 PMA 可通过诱导活化肾上皮细胞 PKC 信号通路来调节细胞骨架形态. 病变组织的滑膜细胞是一种类肿瘤细胞, 其 PKC 处于活化状态^[9]. 利用 PMA 刺激体外培养的滑膜细胞激活 PKC 信号通路来模拟炎症过程, 发现细胞有明显的收缩隆起现象. 这一现象被 PKC 特异性抑制剂 GF 109203X 有效地抑制(图 2), 这揭示了 PMA 刺激的滑膜细胞细胞骨架改变是有 PKC 依赖性的. 从相位成像实验结果也可发现, 正常细胞表面的相位变化平缓, 起伏不明显(图 3c), 说明细胞表面质地比较均匀, 而 PMA 刺激后细胞相位起伏较正常细胞剧烈得多(图 3d), 即细胞表面局部硬度、黏度等等变化, 使质地不均匀, 其可能的原因是 PMA 刺激引起细胞骨架收缩导致的. 从以上观察的结果可推测: PMA 与细胞作用后, 胞浆中游离的 PKC 转移到细胞膜上活化, 使细胞骨架蛋白磷酸化, 由此引起细胞骨架收缩, 导致细胞表面质地变化.

虽然在其他细胞中已经证实 PKC 活化是细胞骨架改变的原因, 但在类风湿关节炎中的滑膜细胞是否有类似情况, 尚未见相关报道. PMA 刺激滑膜细胞模拟炎症过程, 应用原子力显微镜定量地表征了细胞骨架改变, 并证实 PKC 被活化可引起细胞骨架改变. 由此推测, 若能抑制炎症中的滑膜细胞骨架改变, 将有利于阻止该类细胞浸润性生长和分泌炎症因子等作用. 这一结果可能有益于正确认识和搞清该疾病发作机制, 又为寻找有效地应对该疾病提供一定的实验依据.

参 考 文 献

- 1 Firestein G S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, 2003, **423**(6937): 356~361
- 2 Pap T, Müller-Ladner U, Gay R E, *et al.* Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*, 2000, **2**(5): 361~367
- 3 Buckley C D, Pilling D, Lord J M, *et al.* Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. *Trends Immunol*, 2001, **22**(4): 199~204
- 4 Chan A, Filer A, Parsonage G, *et al.* Mediation of the proinflammatory cytokine response in rheumatoid arthritis and spondylarthritis by interactions between fibroblast-like synoviocytes and natural killer cells. *Arthritis Rheum*, 2008, **58**(3): 707~717
- 5 Wernicke D, Seyfert C, Gromnica-Ihle E, *et al.* The expression of collagenase 3 (MMP-13) mRNA in the synovial tissue is associated with histopathologic type II synovitis in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity*, 2006, **39**(4): 307~313
- 6 Ahmed S, Pakozdi A, Koch A E. Regulation of interleukin-1beta-induced chemokine production and matrix metalloproteinase 2 activation by epigallocatechin-3-gallate in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*, 2006, **54**(8): 2393~2401
- 7 Latonen L, Järvinen P M, Laiho M. Cytoskeleton-interacting LIM-domain protein CRP1 suppresses cell proliferation and protects from stress-induced cell death. *Exp Cell Res*, 2008, **314**(4): 738~747
- 8 Hatziaepostolou M, Polyarchou C, Panutsopoulos D. Proteinase-activated receptor-1-triggered activation of tumor progression locus-2 promotes actin cytoskeleton reorganization and cell migration. *Cancer Res*, 2008, **68**(6): 1851~1861
- 9 Sekine C. Collagen-induced arthritis (CIA). *Nippon Rinsho*, 2005, **63**(1): 35~39
- 10 Oberleithner H, Giebisch G, Geibel J. Imaging the lamellipodium of migrating epithelial *in vivo* by atomic force microscopy. *Pflügers Arch*, 1993, **425**(5~6): 506~510
- 11 Alina Hategan, Richard Law, Samuel Kahn, *et al.* Adhesively-tensed cell membranes: lysis kinetics and atomic force microscopy probing. *Biophys J*, 2003, **85**(4): 2746~2759
- 12 Chen B, Wang Q, Han L. Using the atomic force microscope to observe and study the ultrastructure of the living BIU-87 cells of the human bladder cancer. *Scanning*, 2004, **26**(4): 162~166
- 13 Thie M, Röspeil R, Dettmann W, *et al.* Interactions between trophoblast and uterine epithelium: monitoring of adhesive forces. *Hum Reprod*, 1998, **13**(11): 3211~3219
- 14 Ma J, Liu B F, Xu Q Y, *et al.* AFM study of hippocampal cells cultured on silicon wafers with nano-scale surface topograph. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2005, **44**(2~3): 152~157
- 15 Henderson E, Haydon P G, Sakaguchi D S. Actin filament dynamics in living glial cells imaged by atomic force microscopy. *Science*, 1992, **257**(5078): 1944~1946
- 16 Santacroce M, Orsini F, Perego C, *et al.* Atomic force microscopy imaging of actin cortical cytoskeleton of *Xenopus laevis* oocyte. *J Microsc*, 2006, **223**(Pt 1): 57~65
- 17 Liu F, Mizukami H, Sarnaik S, *et al.* Calcium-dependent human erythrocyte cytoskeleton stability analysis through atomic force microscopy. *J Struct Biol*, 2005, **150**(2): 200~210
- 18 Brough D, Le Feuvre R A, Wheeler R D, *et al.* Ca²⁺ stores and Ca²⁺ entry differentially contribute to the release of IL-1 beta and IL-1 alpha from murine macrophages. *J Immunol*, 2003, **170**(6): 3029~3036

- 19 Shou J, Bull C M, Li L, *et al.* Identification of blood biomarkers of rheumatoid arthritis by transcript profiling of peripheral blood mononuclear cells from the rat collagen-induced arthritis model. <http://arthritis-research.com/content/8/1/R28>, 2006-01-10
- 20 Sun W W, Hu F, Yang W X. Heat and hyposmotic stimulation increase in $[Ca^{2+}]_i$ by Ca^{2+} influx in rat synoviocytes. *Chin Sci Bull*, 2008, **53**(4): 548~554
- 21 Wada H, Kimura K, Gomi T, *et al.* Imaging of the cortical cytoskeleton of guinea pig outer hair cells using atomic force microscopy. *Hear Res*, 2004, **187**(1~2): 51~62
- 22 Larsson C. Protein kinase C and the regulation of the actin cytoskeleton. *Cell Signal*, 2006, **18**(3): 276~284
- 23 Isakov N, Gopas J, Priel E, *et al.* Effect of protein kinase C activating tumor promoters on metastases formation by fibrosarcoma cells. *Invasion Metastasis*, 1991, **11**(1): 14~24
- 24 Vääräniemi J, Palovuori R, Lehto V P, *et al.* Translocation of MARCKS and reorganization of the cytoskeleton by PMA correlates with the ion selectivity, the confluence, and transformation state of kidney epithelial cell lines. *J Cell Physiol*, 1999, **181**(1): 83~95

Study of Cytoskeleton Change in Rat Synoviocytes Induced by PMA*

PAN Lei-Ting¹⁾, SUN Wen-Wu²⁾, QI Ji-Wei¹⁾, WU Xian¹⁾, SONG Kun¹⁾,
HU Fen¹⁾, ZHANG Xin-Zheng¹⁾, XU Jing-Jun^{1)**}

¹⁾ The Key Laboratory of Weak-light Nonlinear Photonics, Ministry of Education and TEDA Applied Physical School,
Nankai University, Tianjin 300457, China;

²⁾ Department of Respiratory, General Hospital of Shenyang Military Area Command, Shenyang 110016, China)

Abstract Rat synoviocytes were cultured *in vitro* and the changing of cellular cytoskeleton induced by PMA was investigated with atomic force microscopy. PMA is usually used to stimulate PKC signal transduction pathway in synoviocytes and to simulate process of inflammation. The results presented here show that synoviocyte cytoskeleton has changed significantly after PKC activation by using the imaging of atomic force microscopy. The results also indicate that the activation of PKC might play crucial role in cytoskeleton changing of synoviocytes, which, to some extent, provides some experiments and ideas on understanding the mechanism underlying rheumatoid arthritis (RA).

Key words synoviocytes, cytoskeleton, PMA, PKC, atomic force microscopy

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2007CB307002), Key International S&T Cooperation Project of China (2005DFA10170) and the Programme of Introducing Talents of Discipline to Universities (B07013).

**Corresponding author. Tel: 86-21-23501743, E-mail:jjxu@nankai.edu.cn

Received: May 8, 2008 Accepted: July 21, 2008