

细胞力学作用对 MDCK 细胞系微组织形态发生的影响

曹煜^{1,2}, 吴当¹, 欧阳明星¹, 邓林红¹<https://doi.org/10.12307/2024.725>

投稿日期: 2023-09-09

采用日期: 2023-11-01

修回日期: 2023-12-04

在线日期: 2023-12-19

中图分类号:

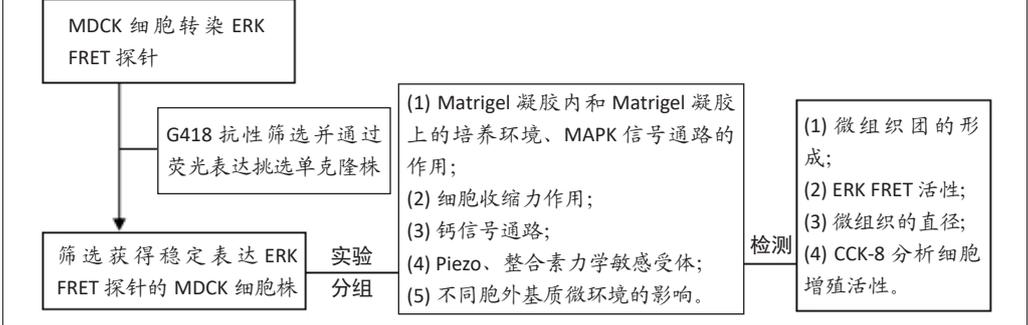
R459.9; R318; Q28

文章编号:

2095-4344(2024)31-05003-07

文献标识码: B

文章快速阅读: 细胞和微环境中的机械信号在 MDCK 上皮微组织发生中的作用及分子机制



文题释义:

荧光共振能量转移技术: 是指能量从一种受激发的荧光基团转移到另一种荧光基团的物理现象。前者称为供体, 后者称为受体, 当2个荧光染料足够靠近时(2个分子相互作用时)发生荧光共振能量转移, 激发态的供体以非辐射的方式将部分能量转移到受体, 使受体被激发发射荧光。荧光共振能量转移的产生须具备2个条件, 一是供体的发射光谱和受体的激发(或吸收)光谱部分重叠; 另外供体和受体之间的距离必须足够小(一般小于10 nm), 受空间排布影响。

MDCK细胞系: 由Madin和Darby于1958年从美国Cocker Spaniel母曲架犬的肾脏组织分离培育建立, 通常是以贴壁方式生长的上皮样细胞。

摘要

背景: 体内组织器官的发生是一个精确而自主调控的过程, 生物力学因素在该宏观尺度上的功能是值得探索的基础科学问题。

目的: 探讨细胞力学作用对3D Madin-Darby犬肾(MDCK)上皮微组织形态发生的影响。

方法: 利用荧光共振能量转移技术观测MDCK上皮微组织的形成, 检验不同的细胞力学信号和胞外基质环境对微组织发生的影响以及相应的ERK活性变化。

结果与结论: ①抑制ERK信号通路对MDCK上皮微组织的生长有抑制作用; ②抑制细胞收缩力信号如ROCK通路和肌球蛋白Myosin II活性, ERK活性降低, 微组织变小; ③选择性地抑制质膜和内质网上的钙离子通道导致ERK活性和微组织生长受到抑制; ④通过抑制细胞膜上力学敏感受体Piezo离子通道或整合素信号, 分别导致微组织变小或不能有效生成组织形态; ⑤不同的细胞外基质组分影响微组织的形态发生, Matrigel胶中添加I型胶原使微组织从微球形向长体形转变; ⑥该研究结果初步显示细胞和细胞外基质环境中的机械力学信号在MDCK上皮微组织发生中具有重要作用, 并提供了部分的分子机制理解。

关键词: ERK激酶; MDCK微组织; 荧光共振能量转移; 细胞力学; 细胞外基质

Effect of cell mechanics on morphogenesis of MDCK lobular organoid

Cao Yu^{1,2}, Wu Dang¹, Ouyang Mingxing¹, Deng Linhong¹

¹Institute of Biomedical Engineering and Health Sciences, School of Medical and Health Engineering, ²School of Pharmacy & School of Biological and Food Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, Jiangsu Province, China

Cao Yu, Master candidate, Institute of Biomedical Engineering and Health Sciences, School of Medical and Health Engineering, and School of Pharmacy & School of Biological and Food Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Deng Linhong, PhD, Professor, Institute of Biomedical Engineering and Health Sciences, School of Medical and Health Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, Jiangsu Province, China

Co-corresponding authors: Ouyang Mingxing, PhD, Professor, Institute of Biomedical Engineering and Health Sciences, School of Medical and Health Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, Jiangsu Province, China

Abstract

BACKGROUND: The development of tissues and organs in the body is a precise and autonomously regulated process, and the function of biomechanical factors at this macroscale is a basic scientific question worth exploring.

OBJECTIVE: To investigate the roles of cell mechanics in morphogenesis of the lobular organoid of 3D Madin-Darby canine kidney (MDCK).

常州大学, ¹医学与健康工程学院生物医学工程与健康科学研究院, ²药学院生物与食品工程学院, 江苏省常州市 213164

第一作者: 曹煜, 女, 1999年生, 江苏省南通市人, 汉族, 常州大学在读硕士, 主要从事细胞分子生物学和生物力学的研究。

通讯作者: 邓林红, 博士, 教授, 常州大学医学与健康工程学院生物医学工程与健康科学研究院, 江苏省常州市 213164

共同通讯作者: 欧阳明星, 博士, 教授, 常州大学医学与健康工程学院生物医学工程与健康科学研究院, 江苏省常州市 213164

<https://orcid.org/0000-0002-2910-0713> (欧阳明星); <https://orcid.org/0000-0003-1970-8239> (邓林红)

基金资助: 国家自然科学基金项目(NSFC12372312, NSFC11872129), 项目负责人: 欧阳明星; 国家自然科学基金项目(11532003),

项目负责人: 邓林红

引用本文: 曹煜, 吴当, 欧阳明星, 邓林红. 细胞力学作用对 MDCK 细胞系微组织形态发生的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(31):5003-5009.



METHODS: The formation of MDCK lobular organoid was visualized by fluorescence resonance energy transfer technology, and the influence of different cellular mechanical signals and extracellular matrix environment on lobular organoid formation and corresponding changes in extracellular regulated protein kinases (ERK) activity were examined.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Inhibition of ERK signaling pathway can inhibit the growth of MDCK lobular organoid. (2) Inhibition of cell contractile force signals such as ROCK pathway and Myosin II activity, reduced ERK activity and lobular organoid size. (3) Selective inhibition of calcium channels in plasma membrane and endoplasmic reticulum led to reduced ERK activity and lobular organoid growth. (4) By inhibiting the mechanically-sensitive receptor Piezo ion channel or integrin signal on the cell membrane, the lobular organoid became smaller or MDCK cells could not generate tissue morphology. (5) Extracellular matrix compositions affected the morphogenesis of lobular organoid. The addition of type I collagen in Matrigel changed the lobular organoid to elongated shape. (6) The results of this study preliminarily show that mechanical signals in the cells and extracellular matrix environment play an important role in culturing MDCK lobular organoid, and provides certain molecular mechanisms.

Key words: ERK kinase; MDCK lobular organoid; fluorescence resonance energy transfer; cell mechanics; extracellular matrix

Funding: National Natural Science Foundation of China, No. NSFC12372312, No. NSFC11872129 (to OYMX); National Natural Science Foundation of China, No. 11532003 (to DLH)

How to cite this article: CAO Y, WU D, OUYANG MX, DENG LH. Effect of cell mechanics on morphogenesis of MDCK lobular organoid. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(31):5003-5009.

0 引言 Introduction

在哺乳动物的肾、肺、唾液和乳腺中，上皮器官形成了由导管和腺泡组成的复杂结构，导管末端为高度分支的小叶单元，由多个单独的腺泡组成，每个腺泡含有一个中央腔，一层被肌上皮细胞包围的极化管腔和一个基底膜^[1-2]。生物体内，细胞存在于一个复杂且丰富的微环境中，其中包含多种细胞外基质成分以及细胞分泌因子，细胞和多细胞结构可以在细胞外基质环境中机械地排列和集中，并且可以通过分化、分支或紊乱来感知和响应机械力学信号^[3-4]。课题组近期对上皮形态发生的研究证明了细胞-细胞黏附和细胞-细胞外基质相互作用的重要性^[5]。3D Madin-Darby 犬肾 (MDCK) 细胞培养系统是研究肾上皮分支形态发生和肾小管生成的常用模型^[5]，将单个细胞嵌入 Matrigel 胶中会形成类似于简单立方体上皮组织的空心腺泡^[6]。MDCK 腺泡也常被用于研究细胞极性、生物分子的分泌^[7]。目前，国内的研究人员利用该腺泡实验模型来深入研究细胞内部分泌和分泌通路，并将这些研究应用于疾病诊断和治疗^[8-9]。

在生理、病理条件下，力学因素在组织、器官、机体等较宏观水平上存在作用，例如胚胎发育过程中血管、心脏、肺、肾脏等组织器官的形成。目前生物力学在组织器官层次上的作用已成为一个重要的研究方向^[10-11]。研究已证明机械力如细胞骨架张力、细胞间黏附、细胞-细胞外基质黏附对 MDCK 微组织结构形成与维持起重要作用^[12-13]。

钙信号是将机械刺激转化为生化信号的力学敏感成分，也是细胞增殖的关键调节因子，在肾脏生理学和各种肾脏疾病发病机制中起重要作用^[14-15]。抑制 Rho-Rock-肌球蛋白途径会消除管腔扩张，肾小管组织结构减小^[16-17]。细胞膜上力学敏感离子通道 Piezo 在各种组织中表达，例如肾脏、皮肤和肺^[18-19]，拉伸 MDCK 会使 Piezo1 触发钙电流，通过丝裂原活化的细胞外信号调节激酶 (mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase, MEK)1/2 激活细胞外信号调节激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK)1/2 来促进细胞周期蛋白转录并启动有丝分裂^[20]，而 Piezo 在 MDCK 组织形成中的作用尚不明确。整合素是一类细胞表面受体，不仅促进生长因子受体信号传导，而且在模拟体内的三维培养中发挥着多种作用，抑制 $\beta 1$ 整合素会导致 MDCK 腺泡缺失中央腔，

生长成缺乏组织形态的细胞簇^[21]。有研究发现，随着基质刚度的增加，在 I 型胶原凝胶中培养的 MDCK 腺泡会因缺乏流腔形态而形成扁平的单层集落^[22-24]。

荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 技术已被广泛应用于研究活细胞中的蛋白质间互作、细胞信号传导、蛋白质构象和活性变化等^[25-26]。在国内 FRET 也被应用于药物筛选、分子诊断和疾病研究，有助于提高生物医学研究的水平和质量^[27-28]。ERK 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶，在调节分化、上皮细胞分裂和组织稳态上起重要作用^[29-30]。ERK/ 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路已被证明对于 MDCK 肾小管组织生成起必要作用^[31]。基于 FRET 的 EKAREV-NLS 生物传感器有助于组织中的细胞特异性读出，并且通过结构域之间的相互磷酸化作用将 ERK 活性转变为 FRET 变化^[32]。

该研究结合 FRET 技术探测力学因素对 MDCK 微组织形成的影响，主要研究内容包括：① ERK 信号通路和细胞收缩力信号对 MDCK 上皮微组织生长的作用；② 质膜和内质网上的钙离子通道对细胞中 ERK 活性和微组织生长的影响；③ 细胞膜上力学敏感受体 Piezo 离子通道和整合素信号、细胞培养的基质成分对微组织形态发生的调节作用。通过 FRET 探针可视化 MDCK 上皮微组织发生和 ERK 活性变化，探索不同的细胞力学和环境物理因素对其生长的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 利用 FRET 技术在细胞水平上探测力学作用对 MDCK 微组织形态发生的影响。

1.2 时间及地点 实验于 2022 年 6 月至 2023 年 6 月在常州大学生物医学工程与健康科学研究院实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 细胞种类与来源 MDCK 细胞购自北京贝纳科技有限公司，将细胞培养在含有体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中，于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 的加湿培养箱中培养。待细胞完全贴壁后，可对其进行传代处理或取对数生长期的细胞进行实验。

1.3.2 实验试剂及仪器 DMEM 高糖培养基、Opti-MEM 培养基、胎牛血清、0.25% 蛋白酶、转染试剂盒 Lipofectamine

3000 均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Matrigel 胶购自 BD Biotechnology 公司; I 型胶原购自 Advanced Biomatrix 公司。实验中使用的抑制剂: 2-氨基乙氧基二苯硼酸盐 (2-APB, 一种具有细胞渗透性的 IP₃R 钙通道抑制剂, 使用浓度为 10 μmol/L)、硝苯地平 (质膜 L 型钙通道抑制剂, 使用浓度为 10 μmol/L)、Blebbistatin (肌凝蛋白 II ATP 酶抑制剂, 使用浓度为 40 μmol/L) 均购自 Sigma 公司; ML-7 (MLCK 抑制剂, 使用浓度为 40 μmol/L)、Y27632 (ROCK 抑制剂, 使用浓度为 40 μmol/L)、毒胡萝卜素 (Thapsigargin, 内质网上 SERCA 钙泵抑制剂, 使用浓度为 10 μmol/L)、GsMTx4 (Piezo 阳离子的机械敏感性通道抑制剂, 使用浓度为 5 μmol/L)、GdCl₃ (力学敏感型钙离子通道阻滞剂, 使用浓度为 25 μmol/L)、PD98059 (MEK 抑制剂, 使用浓度为 10 μmol/L) 均购自 MCE 公司; Sorafenib (RAF 抑制剂, 使用浓度为 5 μmol/L)、CCK-8 细胞增殖试剂盒购自上海碧云天生物有限公司; AIB2 (ITGB1 抑制型抗体, 使用质量浓度为 2 μg/mL) 购自 DSHB 公司; CO₂ 细胞培养箱购自日本三洋公司; 倒置显微镜 (Primo Vert)、倒置活细胞荧光显微镜 (cell observer) 购自德国 Zeiss 公司。

1.4 实验方法

1.4.1 构建稳定表达 ERK FRET 探针的 MDCK 细胞株 为了阐明形成 MDCK 组织内在的力学生理功能和分子信号机制, 将细胞核定位的 ERK FRET 探针 EKAREV-NLS 导入 MDCK 细胞内, 结合抗性和荧光表达筛选稳定细胞株^[33]。用 Lipofectamine 3000 试剂将 EKAREV-NLS 表达质粒转染进入 MDCK 细胞, 约 48 h 后加入质量浓度为 300 μg/mL 的 G418 抗生素进行筛选, 每 3 d 更换 1 次含 G418 的培养基。2 周后在显微镜下观察, 将长成荧光簇的细胞团挑选到 96 孔板中进行单克隆培养, 筛选出 100% 荧光转染率的细胞株。

1.4.2 实验模型的制备 由于 Matrigel 基质胶价格较昂贵, 该研究设计了聚二甲基硅氧烷 (polydimethylsiloxane, PDMS) 模具, 可减少实验中基质胶用量, 同时方便定量控制细胞接种密度和基质胶表面积。制备模具时, 将 PDMS 碱与交联剂 (Sylgard 184 kit, Dow Corning) 以 10 : 1 的质量比充分混合, 倒入一个大皿中, 抽真空后 70 °C 固化 4 h, 然后打孔得到高度 1 cm、直径 0.5 cm 的 PDMS 圆形腔室。将制好的 PDMS 圆形腔室进行等离子清洗处理 1 min, 使其具有一定的疏水性能够与共聚焦皿底部贴合, 超声清洗 5 min, 体积分数 70% 乙醇浸泡, 然后用无菌的镊子贴于共聚焦皿底部, 组装成 PDMS 模具。

1.4.3 在 Matrigel 基质胶上进行细胞培养 在 PDMS 模具里铺上 30 μL 100% Matrigel 溶液, 在 37 °C 下放置 15 min; 将 MDCK 细胞 (2×10⁴ 个/cm²) 接种在水凝胶上; 使用含有 2% Matrigel 的 DMEM 高糖培养基进行培养, 每 2 d 更换 1 次培养基。

1.4.4 FRET 荧光显微镜成像 FRET 显微镜系统配置有多点定位和自动调焦功能, 以及维持温度和体积分数 5% CO₂ 条

件的细胞培养盒。显微镜上增强型青色荧光蛋白 (enhanced cyan fluorescent protein, ECFP) 成像通道的荧光滤片参数为激发 (436±10) nm、分光 455 nm、发射 (480±20) nm; FRET 成像通道的荧光滤片参数为激发 (436±10) nm、分光 455 nm、发射 (535±15) nm。FRET 成像时选择 20 倍物镜, 并使用 Zeiss 软件自动快速切换 ECFP 和 FRET 成像通道, 实现双通道图像的实时采集。单个实验跨度为 9 d, 分别在第 3、9 天通过显微镜成像观测 MDCK 组织生长直径和 FRET 活性。

1.4.5 CCK-8 法分析各种抑制剂对 MDCK 细胞增殖的影响 以每孔 1 000–2 000 个细胞的密度将 MDCK 细胞接种于 96 孔板中, 待细胞贴壁伸展后, 加入对应的抑制剂, 每组有六七个重复组合。培养 3 d 后, 向每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 放入培养箱孵育 4 h, 酶标仪测定 450 nm 波长处吸光度值。

1.5 主要观察指标 MDCK 培养第 9 天的形成图、基于 FRET 数据处理的 ERK 活性、MDCK 组织直径大小、MDCK 细胞的增殖活性。

1.6 统计学分析 采用 Graphpad Prism 6 软件完成数据处理和统计分析, 每次选择 30–40 个为一组, 手动沿细胞团画圈, 取细胞团周边一圈的区域测量其 FRET 均值。通过图像分析软件 Fluocell 6.0.0 进行数据分析^[34], 减去背景信号后, 测量 ECFP 和 FRET 图像的荧光信号, 并以空间像素对像素的方式校准 2 个通道的比值, 定量的 FRET 数据以散点表示。

在细胞微组织的培养分析中, 用 Image J 软件对细胞团荧光图像进行处理, “Set Scale” 设定比例尺, “Ctrl M 键” 手动跟踪每个细胞团的直径, 并将 Result 窗口中的数据保存为 Excel, 然后使用 Graphpad Prism 6 进行统计分析, 数据以散点表示。在 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖的结果分析中, 将酶标仪测量的吸光度值保存为 Excel 进行统计分析, 数据以柱状图表示。

采用 Graphpad Prism 8 软件比较不同实验组间的统计学差异, 针对不同实验条件进行多次 t 检验分析显著性差异。所有描述的实验都在不同时间进行了 3 次独立重复, 得出相似的结论, 并根据不同时间获得的数据进行统计量化。

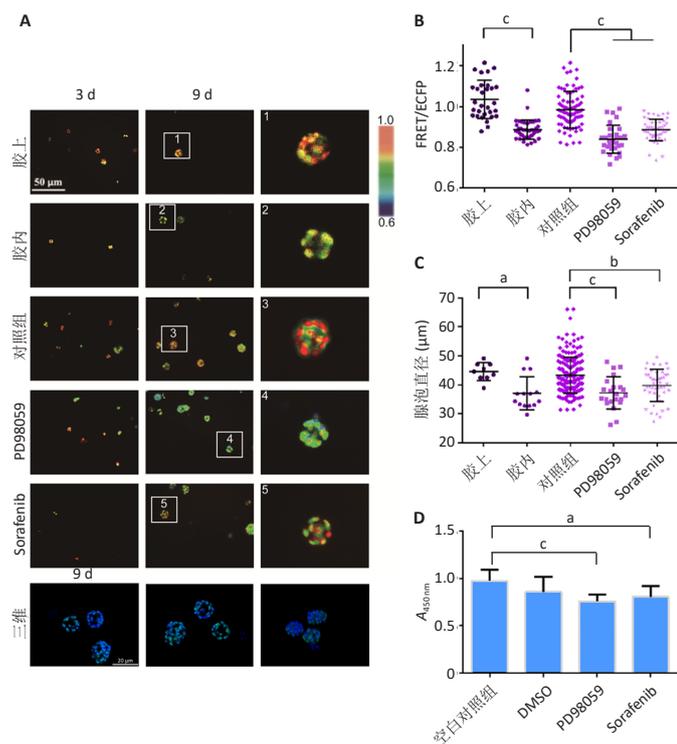
文章统计学方法已经通过常州大学生物医学工程与健康科学研究院统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 通过 FRET 成像显示 MDCK 上皮微组织的形成 MDCK 细胞是一种常用的研究上皮形态发生的模型细胞系, 由 Rab GTP 酶调控顶基底极性的形成^[35]。基于 FRET 技术可视化观测 MDCK 微组织发生和 ERK 活性变化, 构建了稳定表达 ERK FRET 探针的细胞株。将细胞培养在 100% Matrigel 凝胶上 (模拟基底膜)、包埋在 Matrigel 凝胶中, 以及培养基含有 MEK 抑制剂 (PD98059, 10 μmol/L)、RAF 抑制剂 (Sorafenib, 5 μmol/L) 的凝胶上。这 2 种抑制剂均是 ERK 上游信号分子特异性抑制剂, 对照组为添加溶剂二甲基亚砜。使用含 2% Matrigel 的 DMEM 高糖培养基进行培养, 每隔 2 d 更换 1 次

培养基。在生长的第3, 9天进行活细胞 FRET 成像 (20 倍物镜), 通过 FluoCell 软件程序分析 FRET 荧光比值 (FRET/ECFP), 以及 Image J 软件计算细胞团的直径。其中, MDCK 微组织的颜色代表 FRET/ECFP 的相对荧光比值, 从蓝到红代表 ERK 活性从低到高的分布。

培养第9天之后, 与包埋在 Matrigel 凝胶中相比, 在 Matrigel 凝胶上生长的微组织 FRET 比值更高, 代表了更高的 ERK 活性 (图 1A, B), 细胞团的直径更大 (图 1C), 提示改变培养的基质环境对 MDCK 微组织的形态发生有重要影响。用共聚焦显微镜拍摄培养第9天后的微组织图片, 证明已形成了类似三维组织结构。使用 PD98059、Sorafenib 处理的 MDCK 微组织与对照组相比, ERK 活性降低 (图 1A, B), 直径更小 (图 1C); 通过 CCK-8 实验分析, 这2种抑制剂对 MDCK 细胞增殖有一定抑制作用 (图 1D)。这些结果表明 ERK 活性对 MDCK 上皮微组织的生长有重要调控作用。



图注: 图 A 为不同基质下的 MDCK FRET 成像, 从蓝到红代表 ERK 活性从低到高的分布; B 为 ERK 活性分析; C 为腺泡直径分析; D 为 MDCK 细胞增殖分析。FRET: 荧光共振能量转移; ERK: 细胞外信号调节激酶。^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.001$, ^c $P < 0.0001$ 。

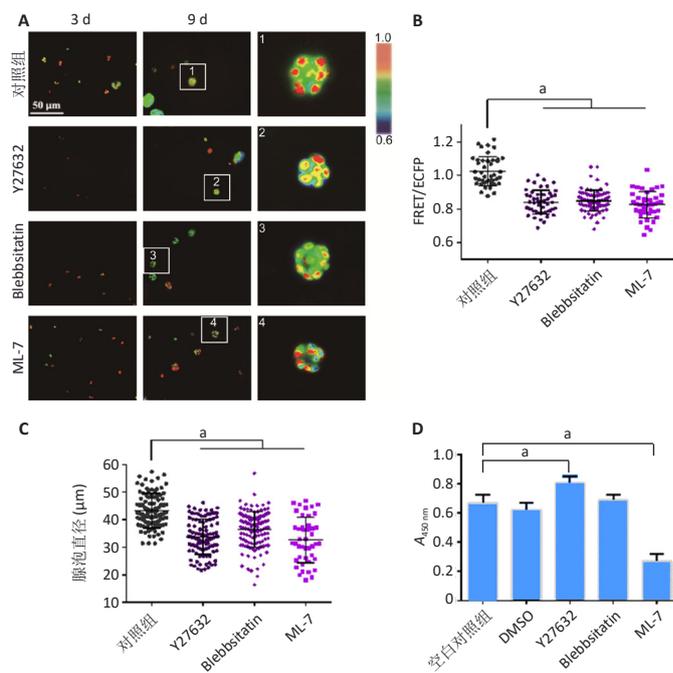
图 1 | FRET 成像显示不同基质条件或 ERK 活性下 MDCK 上皮微组织的形成

Figure 1 | Fluorescence resonance energy transfer (FRET) images show MDCK lobular organoids cultured at different conditional Matrigel or extracellular regulated protein kinase (ERK) activities

2.2 细胞收缩力调节 MDCK 上皮微组织的形成 基于以上实验, 进一步检测细胞肌动蛋白收缩力是否参与调节 MDCK 微组织的形成。Y27632 抑制 Rho 下游的 ROCK 信号通路^[36], Blebbistatin 和 ML-7 分别抑制非肌肉肌球蛋白 II 型 ATP 酶和肌球蛋白 II 轻链激酶 (MLCK), 从而抑制细胞中的收缩力作

用^[37-38]。将 MDCK 细胞分别培养在含二甲基亚砜 (0.1%)、Y27632 (40 $\mu\text{mol/L}$)、Blebbistatin (40 $\mu\text{mol/L}$)、ML-7 (40 $\mu\text{mol/L}$) 的培养基中, 每隔 2 d 更换 1 次培养基 (含 2% Matrigel)。

培养第9天后, 均形成了 MDCK 微组织 (图 2A), 与对照组 (二甲基亚砜) 相比, 加入 3 种抑制剂之后 ERK 活性降低 (图 2A, B), 细胞团变小 (图 2C)。通过 CCK-8 实验检测细胞增殖活性, 发现 Y27632 对细胞增殖有一定促进作用、Blebbistatin 对细胞没有影响、ML-7 对细胞增殖有一定抑制作用 (图 2D)。这些结果表明, 抑制细胞内收缩力后, ERK 活性降低, 微组织体积变小, 显示细胞收缩力作用是该微组织正常生长的必要条件。



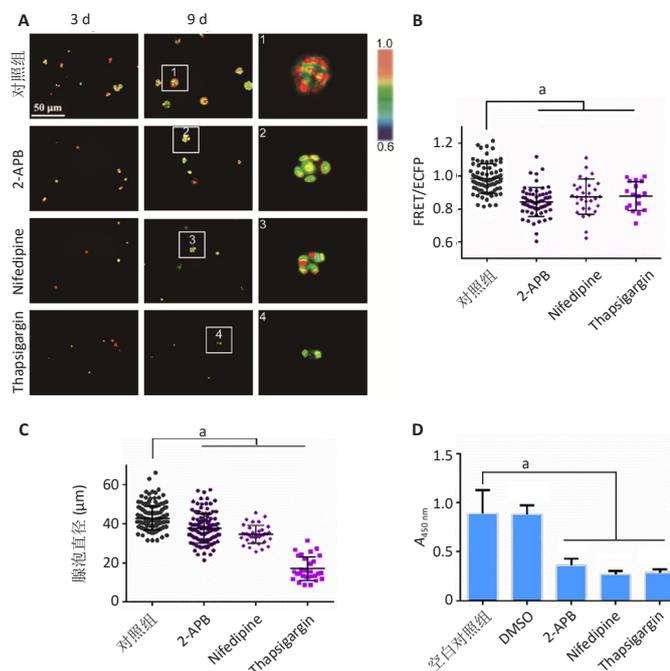
图注: 图 A 为细胞收缩力介导的 MDCK FRET 成像, 从蓝到红代表 ERK 活性从低到高的分布; B 为 ERK 活性分析; C 为腺泡直径分析; D 为 MDCK 细胞增殖分析。FRET: 荧光共振能量转移; ERK: 细胞外信号调节激酶。^a $P < 0.0001$ 。

图 2 | FRET 成像检测细胞收缩力作用对 MDCK 微组织形成的影响
Figure 2 | Effect of cell contractility on the formation of MDCK lobular organoid examined by fluorescence resonance energy transfer (FRET)

2.3 钙离子通道对 MDCK 微组织发生的调节作用 细胞钙信号常见于力学信号转导过程^[39], 课题组近期工作表明内质网膜上的钙通道在细胞-细胞力学通讯中至关重要^[40]。该研究通过使用多种阻滞剂来研究 Ca^{2+} 通道是否参与调控 MDCK 微组织的形成。2-APB 能够选择性地抑制内质网上 IP_3R Ca^{2+} 通道, 硝苯地平 (Nifedipine) 能够抑制质膜上 L 型 Ca^{2+} 通道, Thapsigargin 选择性地抑制内质网上的 SERCA 钙泵。将 MDCK 细胞分别培养在含二甲基亚砜 (0.1%)、2-APB (10 $\mu\text{mol/L}$)、Nifedipine (10 $\mu\text{mol/L}$)、Thapsigargin (10 $\mu\text{mol/L}$) 的培养基中, 每隔 2 d 更换 1 次培养基 (含 2% Matrigel)。

培养第9天之后, 用 2-APB 和 Nifedipine 处理的细胞能够形成微组织形态, 而 Thapsigargin 处理的细胞没有组织形态的发生 (图 3A)。与对照组 (二甲基亚砜) 相比, 2-APB 和

Nifedipine 处理后 ERK 活性和细胞团大小显著下降 (图 3B, C)。CCK-8 实验显示这 3 种抑制剂对细胞增殖都有明显抑制作用 (图 3D)。该结果显示选择性抑制 IP_3R Ca^{2+} 通道和质膜上 L 型 Ca^{2+} 通道导致 MDCK 微组织变小, 而 Thapsigargin 对细胞的毒性较大, 影响微组织的正常形态发生。



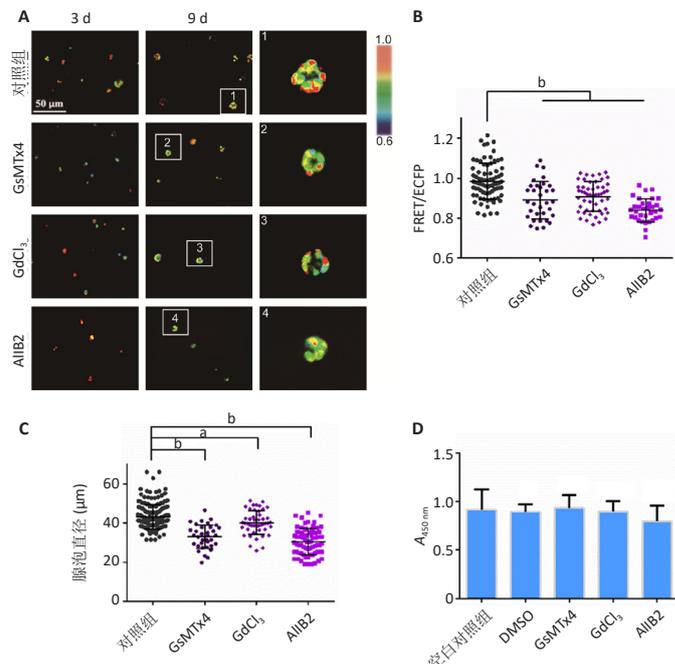
图注: 图 A 为钙离子通道介导的 MDCK FRET 成像, 从蓝到红代表 ERK 活性从低到高的分布; B 为 ERK 活性分析; C 为腺泡直径分析; D 为 MDCK 细胞增殖分析。FRET: 荧光共振能量转移; ERK: 细胞外信号调节激酶。^a $P < 0.0001$ 。

图 3 | FRET 成像检测钙离子通道对 MDCK 微组织形成的影响
Figure 3 | Roles of calcium ion channels in culturing MDCK lobular organoid detected by fluorescence resonance energy transfer (FRET)

2.4 机械敏感离子通道 Piezo 与整合素信号调控 MDCK 上皮微组织的生长 Piezo 是细胞膜上的一种机械敏感离子通道, 可以将机械信号转化为生物信号, 并导致多种细胞反应^[41]。整合素是由亚基 α 和 β 组成的二聚体, 作为细胞膜上的受体与胞外基质配体相互作用, 调节多种动态细胞过程, 如细胞迁移、吞噬作用以及生长和发育的细胞内分子信号^[42]。该研究进一步检测细胞质膜上机械敏感受体分子 Piezo 和整合素对 MDCK 微组织发生的影响。GsMTx4 可以选择性抑制 Piezo, $GdCl_3$ 是力学敏感型钙离子通道阻滞剂; AIB2 抗体可以作用于整合素代表型 $\beta 1$ 亚基, 起到一定的阻滞作用。将 MDCK 细胞分别培养在含二甲基亚砜 (0.1%)、GsMTx4 (5 $\mu mol/L$)、 $GdCl_3$ (25 $\mu mol/L$)、AIB2 (2 $\mu g/mL$) 的 DMEM 高糖培养基中, 每隔 2 d 更换 1 次培养基 (含 2% Matrigel)。

培养第 9 天后, 与对照组 (二甲基亚砜) 相比, 加入 Piezo 抑制剂的实验组 ERK 活性更低 (图 4A, B)、直径更小 (图 4C)。CCK-8 实验分析显示该抑制剂对细胞增殖没有显著影响 (图 4D)。这些结果初步表明 Piezo1 力敏感通道对 MDCK 细胞中的 ERK 活性和组织形态大小发挥有效调控作用。加入 AIB2 抗体后, 实验组中仅形成没有完整组织形态的细胞簇,

CCK-8 实验分析表明 AIB2 对 MDCK 细胞增殖没有显著影响 (图 4A-D), 这些结果证实整合素在该组织形态发生中具有重要作用。



图注: 图 A 为 Piezo 机械敏感通道与整合素介导的 MDCK FRET 成像, 从蓝到红代表 ERK 活性从低到高的分布; B 为 ERK 活性分析; C 为腺泡直径分析; D 为 MDCK 细胞增殖分析。FRET: 荧光共振能量转移; ERK: 细胞外信号调节激酶。^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.0001$ 。

图 4 | FRET 成像显示 Piezo 与整合素信号对 MDCK 微组织形成的调节作用

Figure 4 | Modulating effect of Piezo and integrin signals on MDCK lobular organoid formation revealed by fluorescence resonance energy transfer (FRET)

2.5 不同细胞外基质环境介导的肾小管形成 基于以上细胞力感受体的作用, 该研究进一步检测不同胞外基质环境对 MDCK 微组织生长的影响。将细胞分别培养在 100% Matrigel 凝胶、用 PBS 稀释过 1 倍的 50% Matrigel 凝胶、50% Matrigel 基质胶 + I 型胶原 (0.5 mg/mL)、50% Matrigel 基质胶 + I 型胶原 (1 mg/mL) 和 50% Matrigel 基质胶 + I 型胶原 (2 mg/mL) 上。

培养第 9 天后, 与 100% Matrigel 凝胶相比, 50% Matrigel 凝胶上 MDCK 微组织的 ERK 活性和直径没有显著性差异 (图 5A-C)。在基质中加入不同质量浓度 I 型胶原后, 对 MDCK 微组织形态发生有显著影响, 生成长形的细胞团 (图 5A)。与 50% Matrigel 凝胶条件比较, 添加 I 型胶原的各 ERK 活性没有显著变化 (图 5B)。通过测量长轴方向的大小, 发现 I 型胶原质量浓度越高, 形成的细胞团长度越长 (图 5D)。这些结果表明胞外基质胶的组成对 MDCK 的形态发生有重要影响。

3 讨论 Discussion

三维培养能在一定程度上模拟体内环境, 又具有直观的

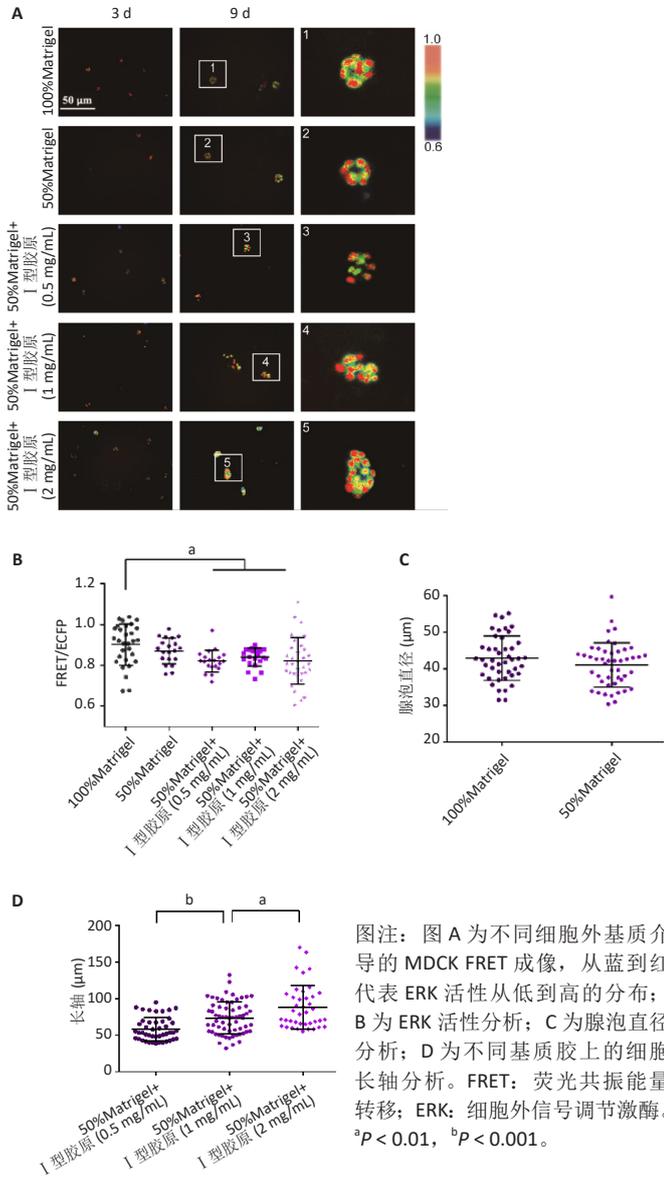


图5 | FRET 成像显示不同细胞外基质环境影响 MDCK 的形态发生
Figure 5 | Morphogenesis of MDCK organoids cultured under different extracellular matrix microenvironments revealed by fluorescence resonance energy transfer (FRET)

细胞培养及条件可控的优势^[43]。MDCK 细胞培养系统可用于研究上皮分支形态发生模型^[5, 44]，将细胞在三维胶原基质中培养 10 d 能够形成类似上皮结构的空心单克隆微组织^[45]。课题组已经展示生理环境下 MDCK 细胞与可溶性细胞外基质的相互作用可组装成球形和管状组织形态^[3]。

该研究利用 FRET 技术可视化检测不同力学因素对 ERK 活性、MDCK 微组织生长的影响。培养过程中使用 MAPK 信号通路抑制剂对 ERK 活性、组织培养大小都有下调作用，显示 MAPK 信号通路可以通过 ERK 活性调节 MDCK 上皮微组织模型的生长。通过抑制肌动蛋白收缩力信号，结果显示 ERK 活性和细胞生长速度下降，微组织变小，因此细胞收缩力对该微组织生长有关键的调节作用。钙离子是细胞内重要的力学信号转导成分，抑制质膜和内质网膜上的钙离子通道也明显降低了 ERK 活性、细胞生长速度和微组织的体积，而内质

网钙泵抑制剂 Thapsigargin 对细胞生长的毒性较大，细胞培养未能有效地形成微组织。这些结果表明细胞收缩力和钙信号调节 MDCK 上皮微组织的生长。

Piezo 是细胞膜上的一种机械敏感成分，可以将机械信号转换为电化学信号^[46]；整合素和胞外基质相互作用，调节局部黏附能力传递细胞力学信号。该研究检测力学敏感的 Piezo 和整合素在 MDCK 上皮微组织模型发生中的作用，实验结果显示抑制 Piezo 下调了 ERK 活性和微组织大小，而应用抗体抑制整合素后，ERK 活性降低，细胞不能生长成微组织形态。该研究进一步采用不同的细胞外基质组成来改变细胞培养的物理微环境，当细胞培养在 50% Matrigel 和 100% Matrigel 凝胶上时，微组织的大小没有显著性差异；加入一定质量浓度的 I 型胶原 (0.5, 1.0, 2.0 mg/mL) 后，微组织的形态由显微镜视野下的圆形变成了不太规则的长形，并且随胶原质量浓度增加而进一步延长。这些检测证实 MDCK 上皮微组织的发生受到细胞膜上力学敏感受体和基质成分的调控，尤其整合素与基质互作影响显著。该研究初步探究了这几种力学因素对 MDCK 细胞微组织生长的影响，尚未研究具体的细胞力学信号转导机制以及如何调控微组织生长过程。

总之，该研究通过 FRET 探针技术可视化观测 MDCK 上皮微组织的形成和 ERK 活性变化，结果初步显示细胞力学和微环境中的机械信号在微组织发生中具有关键作用，为体内组织结构发生的力学生物学机制提供初步的理论依据，对上皮细胞如何在体内组织尺度上发育以及开展体外上皮组织工程增加了生物力学方面的理解。

作者贡献：实验设计和实验评估为欧阳明星、邓林红，实验实施和数据分析为曹煜，吴当辅助部分实验的操作。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权声明：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》；文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次文字和图表查重；文章经小同行外审专家双盲审稿，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] TANNER K, MORI H, MROUE R, et al. Coherent angular motion in the establishment of multicellular architecture of glandular tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(6):1973-1978.
- [2] NARAYANAN V, SCHAPPELL LE, MAYER CR, et al. Osmotic Gradients in Epithelial Acini Increase Mechanical Tension across E-cadherin, Drive Morphogenesis, and Maintain Homeostasis. *Curr Biol*. 2020;30(4):624-633.e4.
- [3] OUYANG M, YU JY, CHEN Y, et al. Cell-extracellular matrix interactions in the fluidic phase direct the topology and polarity of self-organized epithelial structures. *Cell Prolif*. 2021;54(4):e13014.
- [4] CHAN CH, LIN P, YANG TY, et al. Epithelial polarization in the 3D matrix requires MST3 signaling to regulate ZO-1 position. *PLoS One*. 2023;18(5):e0285217.

- [5] ZEGERS MM, O'BRIEN LE, YU W, et al. Epithelial polarity and tubulogenesis in vitro. *Trends Cell Biol.* 2003;13(4):169-176.
- [6] FESSENDEN TB, BECKHAM Y, PEREZ-NEUT M, et al. Dia1-dependent adhesions are required by epithelial tissues to initiate invasion. *J Cell Biol.* 2018;217(4):1485-1502.
- [7] ZUO T, FENG X, ZHANG N, et al. Establishment of a functional secretory IgA transcytosis model system in vitro for functional food screening. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015;99(13):5535-5545.
- [8] 关业茂, 王庆江, 刘静, 等. 纳米细菌纤维素复合物支架用于MDCK细胞三维培养的研究 [J]. *生物学杂志*, 2020, 37(5):30-34.
- [9] 蔡国徽, 韩云竹, 唐富山, 等. Matrigel 三维培养下卵巢癌细胞生长状况观察 [J]. *江苏大学学报 (医学版)*, 2015, 25(1):14-18.
- [10] MAMMOTO T, MAMMOTO A, INGBER DE. Mechanobiology and developmental control. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2013;29:27-61.
- [11] PEI B, WANG W, FAN Y, et al. Fiber-reinforced scaffolds in soft tissue engineering. *Regen Biomater.* 2017;4(4):257-268.
- [12] ROIGNOT J, PENG X, MOSTOV K. Polarity in mammalian epithelial morphogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(2):a013789.
- [13] KHAN LA, JAFARI G, ZHANG N, et al. A tensile trilayered cytoskeletal endotube drives capillary-like lumenogenesis. *J Cell Biol.* 2019;218(7):2403-2424.
- [14] MONTEITH GR, PREVARSKAYA N, ROBERTS-THOMSON SJ. The calcium-cancer signalling nexus. *Nat Rev Cancer.* 2017;17(6):367-380.
- [15] PEPPIATT-WILDMAN CM, CRAWFORD C, HALL AM. Fluorescence imaging of intracellular calcium signals in intact kidney tissue. *Nephron Exp Nephrol.* 2012;121(1-2):e49-e58.
- [16] DEBNATH J, BRUGGE JS. Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(9):675-688.
- [17] SEIFERT A, POSERN G. Tightly controlled MRTF-A activity regulates epithelial differentiation during formation of mammary acini. *Breast Cancer Res.* 2017;19(1):68.
- [18] COX CD, BAE C, ZIEGLER L, et al. Removal of the mechanoprotective influence of the cytoskeleton reveals PIEZO1 is gated by bilayer tension. *Nat Commun.* 2016;7:10366.
- [19] DALGHI MG, CLAYTON DR, RUIZ WG, et al. Expression and distribution of PIEZO1 in the mouse urinary tract. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2019;317(2):F303-F321.
- [20] GUDIPATY SA, LINDBLOM J, LOFTUS PD, et al. Mechanical stretch triggers rapid epithelial cell division through Piezo1. *Nature.* 2017;543(7643):118-121.
- [21] MYLLYMÄKI SM, TERÄVÄINEN TP, MANNINEN A. Two distinct integrin-mediated mechanisms contribute to apical lumen formation in epithelial cells. *PLoS One.* 2011;6(5):e19453.
- [22] MARTÍNEZ-ARA G, TABERNER N, TAKAYAMA M, et al. Optogenetic control of apical constriction induces synthetic morphogenesis in mammalian tissues. *Nat Commun.* 2022;13(1):5400.
- [23] CAMACHO-GÓMEZ D, GARCÍA-AZNAZ JM, GÓMEZ-BENITO MJ. A 3D multi-agent-based model for lumen morphogenesis: the role of the biophysical properties of the extracellular matrix. *Eng Comput.* 2022;38(5):4135-4149.
- [24] CUKIERMAN E, BASSI DE. Physico-mechanical aspects of extracellular matrix influences on tumorigenic behaviors. *Semin Cancer Biol.* 2010;20(3):139-145.
- [25] LIPUT DJ, NGUYEN TA, AUGUSTIN SM, et al. A Guide to Fluorescence Lifetime Microscopy and Förster's Resonance Energy Transfer in Neuroscience. *Curr Protoc Neurosci.* 2020;94(1):e108.
- [26] YEHW HW, AI HW. Development and Applications of Bioluminescent and Chemiluminescent Reporters and Biosensors. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif).* 2019;12(1):129-150.
- [27] 包昆鹭, 许琪, 曹宏梅, 等. 基于共振能量转移的生物传感器在食品安全检测中的应用研究进展 [J]. *分析测试学报*, 2021, 40(5):656-661.
- [28] 马廷政, 曹平平, 汪徐春, 等. 利用 FRET 技术检测膜受体与胞外配体相互作用的优化策略 [J]. *南京医科大学学报 (自然科学版)*, 2022, 42(8):1049-1054.
- [29] KASHIMATA M, SAYEED S, KA A, et al. The ERK-1/2 signaling pathway is involved in the stimulation of branching morphogenesis of fetal mouse submandibular glands by EGF. *Dev Biol.* 2000;220(2):183-196.
- [30] KOMATSU N, AOKI K, YAMADA M, et al. Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases. *Mol Biol Cell.* 2011;22(23):4647-4656.
- [31] SUGIURA R, SATOH R, TAKASAKI T. ERK: A Double-Edged Sword in Cancer. ERK-Dependent Apoptosis as a Potential Therapeutic Strategy for Cancer. *Cells.* 2021;10(10):2509.
- [32] PONSIOEN B, POST JB, BUISSANT DES AMORIE JR, et al. Quantifying single-cell ERK dynamics in colorectal cancer organoids reveals EGFR as an amplifier of oncogenic MAPK pathway signalling. *Nat Cell Biol.* 2021;23(4):377-390.
- [33] HINO N, MATSUDA K, JIKKO Y, et al. A feedback loop between lamellipodial extension and HGF-ERK signaling specifies leader cells during collective cell migration. *Dev Cell.* 2022;57(19):2290-2304. e7.
- [34] QIN Q, LAUB S, SHI Y, et al. Fluocell for Ratiometric and High-Throughput Live-Cell Image Visualization and Quantitation. *Front Phys.* 2019;7:154.
- [35] MROZOWSKA PS, FUKUDA M. Regulation of podocalyxin trafficking by Rab small GTPases in 2D and 3D epithelial cell cultures. *J Cell Biol.* 2016;213(3):355-369.
- [36] TANG L, DAI F, LIU Y, et al. RhoA/ROCK signaling regulates smooth muscle phenotypic modulation and vascular remodeling via the JNK pathway and vimentin cytoskeleton. *Pharmacol Res.* 2018;133:201-212.
- [37] SHI J, TAKAHASHI S, JIN XH, et al. Myosin light chain kinase-independent inhibition by ML-9 of murine TRPC6 channels expressed in HEK293 cells. *Br J Pharmacol.* 2007;152(1):122-131.
- [38] LIMOUZE J, STRAIGHT AF, MITCHISON T, et al. Specificity of blebbistatin, an inhibitor of myosin II. *J Muscle Res Cell Motil.* 2004;25(4-5):337-341.
- [39] DE FELICE D, ALAIMO A. Mechanosensitive Piezo Channels in Cancer: Focus on altered Calcium Signaling in Cancer Cells and in Tumor Progression. *Cancers (Basel).* 2020;12(7):1780.
- [40] OUYANG M, ZHU Y, WANG J, et al. Mechanical communication-associated cell directional migration and branching connections mediated by calcium channels, integrin β 1, and N-cadherin. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:942058.
- [41] LAI A, COX CD, CHANDRA SEKAR N, et al. Mechanosensing by Piezo1 and its implications for physiology and various pathologies. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2022;97(2):604-614.
- [42] XU S, ZHANG T, CAO Z, et al. Integrin- α 9 β 1 as a Novel Therapeutic Target for Refractory Diseases: Recent Progress and Insights. *Front Immunol.* 2021;12:638400.
- [43] 张斌斌, 高全文, 李冰, 等. 骨髓间充质干细胞在 Matrigel 凝胶支架上的生长与变化 [J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(13):1993-1998.
- [44] MONTESANO R, MATSUMOTO K, NAKAMURA T, et al. Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. *Cell.* 1991;67(5):901-908.
- [45] LIU Z, GRECO AJ, HELLMAN NE, et al. Intracellular signaling via ERK/MAPK completes the pathway for tubulogenic fibronectin in MDCK cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;353(3):793-798.
- [46] TANG H, ZENG R, HE E, et al. Piezo-Type Mechanosensitive Ion Channel Component 1 (Piezo1): A Promising Therapeutic Target and Its Modulators. *J Med Chem.* 2022;65(9):6441-6453.

(责任编辑: ZM, MZH, ZN, QY)