

封面文章

力信号对心肌细胞跳动的调控*

陈惠燕¹⁾ 李洛非¹⁾ 王炜¹⁾ 曹毅^{1)†} 雷海^{2)3)‡}

1) (南京大学物理学院, 固体微结构国家实验室, 南京 210093)

2) (浙江大学物理学院, 杭州 310027)

3) (浙江大学物理高等研究院, 杭州 310027)

(2024年1月15日收到; 2024年2月5日收到修改稿)

心肌细胞的机械行为对生命健康起至关重要的作用, 通常认为电信号和化学信号对心肌细胞的行为起调控作用. 近年来发现细胞微环境的物理因素能够调控细胞的增殖、铺展、迁移和分化等行为, 但其对心肌细胞机械行为的调控研究仍然缺乏. 本文制备具有不同杨氏模量的水凝胶以模拟心肌细胞力学微环境, 并通过加载力学刺激来探究细胞外基质中不同配体对心肌细胞的力学调控. 研究表明机械力信号可以通过基质-配体-细胞的信号通路来调控心肌细胞的跳动, 进而引起细胞间的耦合振荡实现心肌细胞的节律控制. 这种力信号调控受细胞微环境的杨氏模量、细胞黏附配体种类和密度、以及力信号的强弱和节律三者共同影响, 这为理解心率失调和心肌梗死后心力衰竭等疾病提供基础.

关键词: 心肌细胞, 水凝胶, 力学刺激, 细胞间相互作用

PACS: 87.18.Gh, 61.41.+e, 05.45.Xt, 87.16.Xa

DOI: 10.7498/aps.73.20240095

1 引言

根据世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 报道, 心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 是全球人口死亡的主要原因之一^[1,2]. 在 2019 年, 估计有 1790 万人死于 CVD, 占全球总死亡人数的 32%^[2]. 该疾病通常与心率变异性 (heart rate variability, HRV) 有很大关系^[3]. 心脏组织内数十亿个心肌细胞相互协作, 共同适应不断变化的生理环境, 维持生物体的生命健康^[4]. 作为心脏组织中的收缩细胞, 心肌细胞以一种良好协调的模式进行节律性收缩, 这个过程通常被认为是化学或电信号的调控作用^[5]. 在心脏组织内, 相邻心肌细胞间通过插入盘 (intercalated disc, ID) 相互连接^[6]. 间隙连接通道连接相邻细胞的细胞质,

使得一定大小的分子和离子能通过被动扩散, 进行细胞间化学信号通信^[7]. 同时间隙连接结构还能直接介导心肌细胞间电脉冲传播, 触发相连细胞的协调收缩^[8]. 当该复合体机械偶联产生缺陷时会出现致命性心律失常^[9].

近年, 大量研究发现细胞外基质中物理因素对细胞黏附扩散^[10-12]、迁移^[13-17]、增殖生长^[10,18,19]、分化^[20-23]等基本生命活动有很大的影响. 其中, 细胞外基质硬度和成分组成对细胞行为起着很重要的调控作用. 例如, 将人胶质母细胞瘤细胞培养在具有梯度硬度分布 (0.5—22 kPa) 的聚丙烯酰胺水凝胶上, 观察到细胞出现向中间硬度迁移聚集的趋势^[14]. 在包被了不同浓度纤连蛋白的培养皿中, 高黏附密度 (大于 500 ng/cm²) 促进细胞大面积铺展贴壁, 而低黏附密度 (小于 100 ng/cm²) 条件下的细胞普遍为圆形, 脱落和丧失活性^[24]. 随着对物

* 国家自然科学基金 (批准号: T2222019, T2225016, 11934008) 资助的课题.

† 通信作者. E-mail: caoyi@nju.edu.cn

‡ 通信作者. E-mail: leihai@zju.edu.cn

理微环境可调控细胞行为的深入认识, 研究发现相邻细胞可通过基质进行机械信号通信. 细胞可检测到由相邻一定距离的细胞牵引力产生的底物应变, 并对该力学信号进行响应, 且该响应依赖于基质刚度^[25]. 在不同杨氏模量的底物上, 两个单心肌细胞在 40 μm 内进行机械相互作用实现收缩耦合. 当底物硬度越大时, 能实现耦合的细胞距离和百分比越小且持续时间越短^[26]. 通过加载不同外部机械振荡可以实现对心肌细胞收缩频率的调控^[27,28]. 随着年龄增长和生活环境的长久影响, 心脏内细胞成分及细胞外基质组成都会发生相应的变化. 而目前的实验理论研究主要关注于影响心肌细胞自发跳动和成熟发育的物理机械因素^[29-32]或外部信号的振荡频率和振幅驱动心肌细胞收缩耦合^[27,28]. 尚未有综合考虑基质硬度、细胞外基质蛋白种类及浓度 3 种因素相互耦合影响心肌细胞机械通信的相关研究.

本文制备了 3 种不同杨氏模量的聚丙烯酰胺凝胶 (polyacrylamide gel, PA gel), 通过钨针在水凝胶中加载力信号模拟相邻心肌细胞收缩舒张形成的正弦机械力振荡, 探究心肌细胞在不同物理微环境中对外部机械振荡的响应行为. 实验发现 Laminin、Fibronectin 和 Collagen I 三种基质蛋白均介导心肌细胞对外界力振荡刺激的响应, 但其对机械力耦合的程度不同, 其中 Laminin 的响应比例最高, 也较为稳定. 进一步分析不同硬度下心肌细胞对机械振荡力的响应过程, 发现基质硬度、配体密度与力信号刺激强度三者存在复杂的耦合关系, 共同影响心肌细胞的机械力响应.

2 实验方法

2.1 聚丙烯酰胺水凝胶 (PA gel) 制备

准备 3 种含丙烯酰胺单体 (acrylamide, 上海沪试公司产品)、交联剂甲叉双丙烯酰胺 (N, N-methylene-bis-acrylamide, Aladdin 公司产品)、引发剂过硫酸铵 (ammonium persulphate, 上海沪试公司产品)、催化剂四甲基乙二胺 (N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine, Thermo Fisher 公司产品) 水凝胶前体溶液, 其中 acrylamide/bis-acrylamide 终浓度分别为 6%/0.06%, 10%/0.1% 和 20%/0.18%^[20]. 将 3 种混合溶液过滤后注入间隙为 0.75 mm 的无菌玻璃模具中. 经过 2 h 聚合

成胶后, 将聚丙烯酰胺水凝胶取下后放置 1X PBS 溶液 (pH 值为 7.2—7.4, 不含钙离子和镁离子) 中进行溶胀. 待溶胀过夜后分成大小适当的若干块, 置于 30 mm 直径的培养皿中备用. 在测量力场的实验中, 我们在水凝胶前体溶液中同时混入 0.02%, 0.2 μm 的 FluoSpheres™ 羧基修饰微球 (Thermo Fisher 公司产品).

2.2 水凝胶包被

为了将细胞外基质的配体蛋白牢固修饰在 PA gel 上, 我们利用具有异双功能的交联剂 sulfo-SANPAH (sulfosuccinimidyl-6-(4'-azido-2'-nitrophenylamino)-hexanoate, Thermo Fisher 公司产品) 作为中间体, 将细胞外基质蛋白通过化学交联的方式连接在聚丙烯酰胺水凝胶上. 将含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sulfo-SANPAH 的 HEPES 溶液 (pH 8.0, 20 mmol/L, Thermo Fisher 公司产品) 滴加在胶表面后, 进行紫外光活化硝基苯基肼, 利用无菌水反复冲洗后用 5, 20, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的细胞基质外蛋白 (Laminin/Fibronectin/Collagen I) 进行低温孵育过夜. 水凝胶表面的配体蛋白密度较难定量表征, 但与所加入的蛋白浓度正相关, 在本文中以所加的蛋白浓度表示表面黏附蛋白配体的密度.

2.3 新生大鼠心肌细胞提取^[33]

本实验中所提取的细胞均为出生 0—1 天的 SD 级乳大鼠 (购买于上海斯莱克实验动物有限责任公司) 的心肌细胞. 用 75% 乙醇对乳大鼠消毒杀菌后直接断颈致死, 迅速取出心脏置于无菌 HBSS (Thermo Fisher 公司产品) 溶液中进行反复清洗, 尽可能去除残留的血液及心包膜. 待清洗完毕后, 将心脏放置在 Isolation Medium (含 0.01% 胰酶的 HBSS 溶液) 中, 用弯头剪刀剪碎成 1 mm 左右的组织碎块. 放置于低温环境消化过夜 (约 16 h), 去除心脏外膜组织. 待消化过夜后, 将上清溶液去除后加入 Digestion Medium (含 0.5 mg/mL Collagenase/Dispase (Sigma 公司产品) 的 L-15 溶液 (Thermo Fisher 公司产品)), 经 1 min 空气氧化和 2 min/37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴后进行 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温消化. 在充分消化后, 将全部上清细胞悬液一同注入孔径为 70 μm 的细胞过滤网中, 进行反复过滤数次后得到均匀的单细胞悬液. 通过 5—10 min 转速为 100 $\times g$ 的离心后可得到心肌细胞沉淀. 用 Plating Medium (加有

20% M199 培养基、13% 马血清、7% 胎牛血清和 100 unit/mL 青霉素和 0.1 mg/mL 链霉素的高糖 DMEM 培养基, 均购买于为赛默飞) 重悬细胞沉淀后接种在 100 mm 直径的细胞培养皿中. 培养 1—2 h 后, 将未贴壁的心肌细胞进行计数, 加入 1 mmol/L CaCl_2 (Sigma) 和 0.05 mg/mL 5-BrdU (5-Bromo-2-deoxyUridine, Sigma 公司产品), 并以 10^6 个/ cm^2 的密度接种到水凝胶表面上. 通过差速贴壁方法将成纤维细胞和内皮细胞去除, 可提取到高纯度心肌细胞. 培养 36 h 后, 用 1X PBS 溶液尽可能洗掉未贴壁的心肌细胞, 并换成新鲜的 Plating Medium (含 1 mmol/L Ca^{2+}). 该动物研究均按照南京大学科学与技术伦理委员会的规定和指南进行, 并按照机构动物护理和使用委员会指南进行, 审批件编号为 IACUC-D2310006.

2.4 原子力显微镜 (AFM) 测量 PA gel 杨氏模量

本文所使用的原子力显微镜为 NanoWizard II (JPK, 德国), 所使用的探针为 MLCT (Bruker, 德国), 标定后悬臂的劲度系数约为 60 pN/nm. 下压速度设置为 1.0 $\mu\text{m}/\text{s}$. 测试样品放置在经铬酸处理过的自制玻璃凹槽中, 整个测量均在磷酸盐溶液中进行. 所测得的力曲线由 JPK SPM Data Processing 软件处理分析. 杨氏模量通过对下压曲线用 (1) 式赫兹模型 (Hertz model) 拟合获得,

$$F = \frac{4}{3} \frac{E}{(1 - \nu^2)} \sqrt{Rh}^{3/2}, \quad (1)$$

其中 F 表示下压力, h 表示探针下压深度, R 为针尖曲率半径, E 为杨氏模量, ν 是泊松比. 本计算中 ν 取 0.4.

2.5 心肌细胞成像及力学刺激加载

待心肌细胞在水凝胶上接种满 48 h 后, 将其置于荧光显微镜 (奥林巴斯, IX73) 中进行成像观察. 在该成像平台上自搭建了单细胞力学刺激装置 (如图 1 所示), 将刚性钨针 (TELAIMY, 直径 40 μm) 插入水凝胶中并利用精密电机 (SUTTER INSTRUMENT, MP-285) 控制钨针移动并拉伸水凝胶, 力信号通过弹性水凝胶传递到邻近心肌细胞, 从而模拟心肌细胞间的力学传导.

3 实验结果与讨论

3.1 水凝胶的力学表征

心外膜形成对心肌的正常发育至关重要. 随着年龄的增加和环境的长久影响, 心肌层会发生许多细胞和基质成分的变化^[34]. 而这些变化直接或间接改变了心肌细胞的细胞外基质硬度和基质多聚蛋白的含量. 除了心肌细胞之外, 其他细胞成分和心肌间质的形成是保证正常心脏功能的必要条件. Engler 等^[30]曾用 AFM 测量胚胎心肌组织表面的杨氏模量, 发现其杨氏模量直方图呈双峰型, 分别为 3—4 kPa 的较软峰值和 11—12 kPa 的刚性峰值. 较软峰会随着生长发育不断偏移, 11—12 kPa 的刚性峰基本保持不变且该硬度下的基质最适合

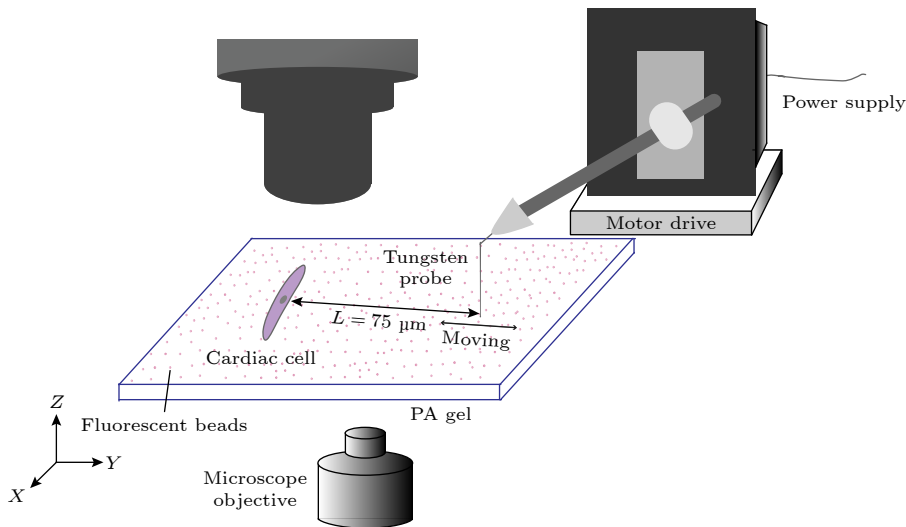


图 1 力学刺激加载平台示意图

Fig. 1. Diagram of mechanical loading platform.

心肌细胞的生长与成熟^[30,32]. 当发生心肌梗死时, 梗死区域的杨氏模量达到了 30—70 kPa^[35]. 因此, 我们制备了 3 种不同硬度的聚丙烯酰胺胶来模拟相应的机械力环境 (如图 2(a) 所示). 通过 AFM 表征, 三种水凝胶的杨氏模量分别为 (1.824 ± 0.111) kPa, (11.688 ± 0.493) kPa 和 (27.358 ± 2.331) kPa (如图 2(b)—(d) 所示). 扫描电子显微镜 (SEM) 展示了凝胶的网状结构 (如图 2(e)—(g) 所示). 这 3 种不同杨氏模量的聚丙烯酰胺胶可以分别模拟心肌组织微弹性双模量峰和心肌梗塞变硬后 3 种情况的基质硬度, 进而探索心肌细胞在 3 种不同弹性环境下受力刺激后的响应.

3.2 细胞成像

在制备好水凝胶后, 对其进行不同配体蛋白质分子包被, 包括层粘连蛋白 (Laminin)、纤连蛋白

(Fibronectin) 和胶原蛋白 (Collagen I). 将心肌细胞接种到水凝胶上培养 48 h 后, 用荧光显微镜观察心肌细胞在不同条件下的贴壁状态, 发现细胞贴壁数量随着配体浓度升高和基质硬度增强而增多直至成片生长 (详见补充材料图 S1 和图 S2 (online)). 虽然在不同配体的基质上, 心肌细胞贴壁数量有所差别, 但都呈梭形伸展开且具有很高的活性. 高细胞活性是后续加载力学振荡测试的前提. 在实验过程中, 发现当相邻细胞靠得较近时, 细胞间会出现一起跳动的情况, 这与先前的研究发现类似^[26], 也说明了所获得的细胞活性较高. 在测试过程中, 尽量选择“孤立” (周边 100 μm 范围内没有其他细胞) 心肌细胞进行力学刺激 (如图 3(a) 所示).

3.3 外界机械力振荡调控心肌细胞

为探索机械力信号对心肌细胞跳动行为的影

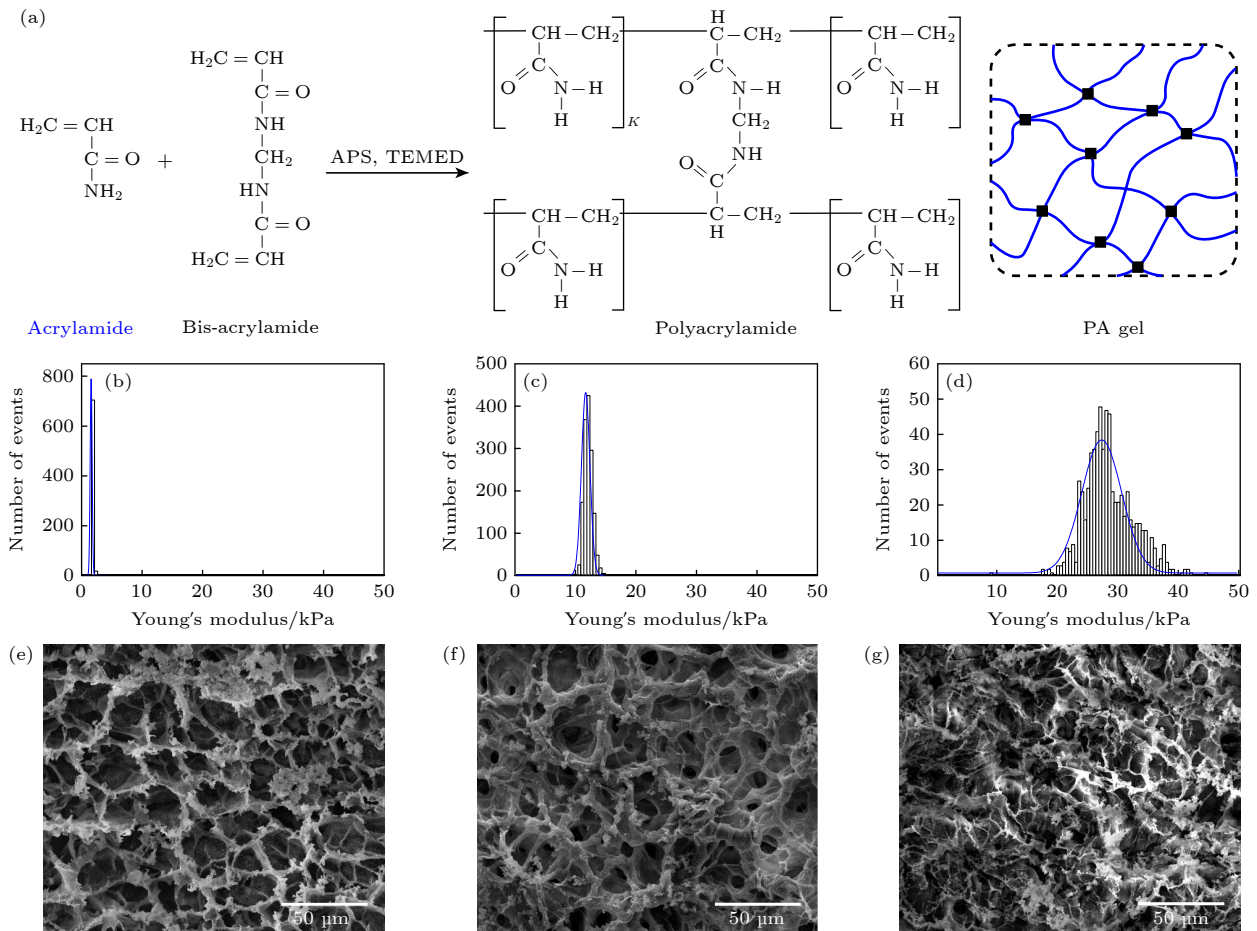


图 2 聚丙烯酰胺水凝胶的制备与表征 (a) 聚丙烯酰胺水凝胶的制备示意图; (b)—(d) 基于 AFM 的 3 种不同水凝胶的杨氏模量分布, 其杨氏模量分别为 (1.824 ± 0.111) kPa, (11.688 ± 0.493) kPa 和 (27.358 ± 2.331) kPa; (e)—(g) 对应 3 种水凝胶的 SEM 结果

Fig. 2. Preparation and characterization of PA gel: (a) Schematic illustration of the preparation of PA gel; (b)—(d) the Young's modulus distributions of three different of PA gel measured by AFM, which are (1.824 ± 0.111) kPa, (11.688 ± 0.493) kPa, and (27.358 ± 2.331) kPa, respectively; (e)—(g) SEM images of three different of PA gel.

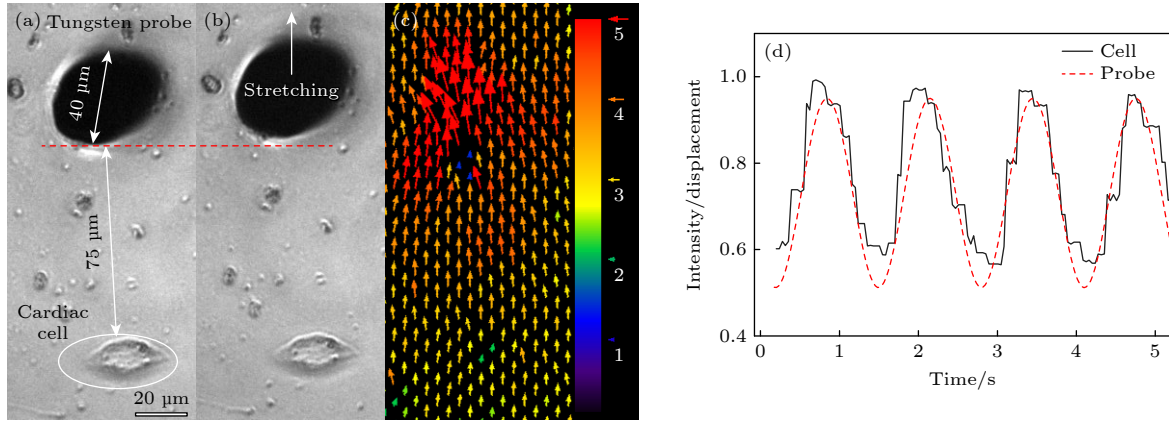


图3 力学刺激加载及荧光表征 (a), (b) 分别为对单个心肌细胞施加力学刺激前后的实物图; (c) 钨针运动到最大振幅时, PA gel 上各点的位移分布图 (单位为 μm); (d) 心肌细胞机械行为检测, 红色虚线为钨针输出的力振荡信号, 黑色实线是心肌细胞达到同频后 Fluo4 探针检测到的 Ca^{2+} 振荡信号

Fig. 3. Mechanical loading and fluorescence characterization: (a), (b) Phase-contrast images of individual cardiomyocyte before and after mechanical stimulation; (c) displacement distribution of each point on PA gel when the tungsten probe moves to the maximum amplitude (unit: μm); (d) mechanical behavior detection of cardiomyocytes, the red dotted line is the signal of mechanical oscillation output by tungsten probe, and the black solid line is the Ca^{2+} oscillation signal detected by Fluo4 probe after cardiomyocytes reach the same frequency with the tungsten probe.

响, 我们利用力学刺激加载平台对心肌细胞施加力学刺激, 且实时观察心肌细胞的跳动行为。如图 3(a) 所示, 在力学刺激过程中, 钨针与水凝胶接触的深度控制为 $10\ \mu\text{m}$, 钨针边缘与受力信号刺激的心肌细胞相距约 $75\ \mu\text{m}$ 。控制钨针以 $1\ \text{Hz}$ 的频率进行位移振荡, 振幅为 $2\text{--}4\ \mu\text{m}$, 拉伸方向与心肌细胞长轴垂直。心肌细胞收缩节律由 Ca^{2+} 钟控制, Ca^{2+} 瞬态变化与心肌细胞收缩同步^[27,28]。在心肌细胞动作电位期间出现钙离子引发的钙离子释放 (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release, CICR) 时, 细胞质中钙离子与肌节中的肌钙蛋白结合后, 肌钙蛋白构象发生变化最终导致肌节收缩^[36-38]。本研究利用钙离子探针 Fluo-4AM (Thermo Fisher 公司产品) 来指示钙离子振荡频率, 从而确定心肌细胞收缩变化 (如图 3(d) 所示)。在施加力学刺激前, 先观察单个心肌细胞在初始 $10\text{--}15\ \text{min}$ 内的跳动状态, 当心肌细胞在钨针输出正弦力学振荡的过程发生收缩行为 (频率、振幅) 变化时, 则认为心肌细胞对外部机械力产生响应。钨针加载的强振荡力信号不断影响细胞内的钙离子动力学, 最终使心肌细胞达到自身的本征跳动频率或者出现与钨针同频节律性振荡的现象。当心肌细胞与外界机械振荡产生耦合同频时, 则停止力学刺激。

首先探究了心肌细胞在相同基质但不同配体环境下的机械响应行为。选择杨氏模量为 $11\ \text{kPa}$ 的水凝胶为研究体系^[30,32], 包被不同种类和浓度的

配体蛋白。心肌细胞力学响应结果如图 4(a) 所示, 在没有修饰配体情况下, 心肌细胞基本没有力学响应, 而 3 种基质蛋白都具有不同程度的机械力耦合调控作用, 且随着配体浓度的增大, 出现了下降或持平的“饱和情况”, 其中修饰了 Laminin 的机械响应比例最高, 达到了 $41.94\%\text{--}56.25\%$ 。随着配体浓度的变化, Fibronectin 实验组的响应比例变化不大, 维持在 $21.88\%\text{--}27.27\%$ 。而对于 Collagen I 而言, 配体浓度对心肌细胞力学响应影响较大。当 Collagen I 浓度从 $5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 增加到 $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 心肌细胞的机械响应比例从 15.15% 上升到 45.00% 。对心肌细胞机械响应行为进行深入分析后, 发现心肌细胞在不同配体和浓度的情况下, 所需的力刺激时间不同, 且与外界振荡耦合状态的保持也不同, 均受配体蛋白调控。在包被不同浓度的 Laminin 组中, 心肌细胞响应所需要的力学刺激时间均较长且不受浓度影响, 表现“稳定”; 在 Fibronectin 组中, 与中浓度 ($20\ \mu\text{g}/\text{mL}$) 相比, 较低 ($5\ \mu\text{g}/\text{mL}$) 或较高浓度 ($100\ \mu\text{g}/\text{mL}$) 条件下的心肌细胞所需的力刺激时间很短; 而在 Collagen I 组中, 心肌细胞力刺激时间则与配体浓度有较强的相关性, 如图 4(b) 所示。在对心肌细胞达到同频所需的刺激时间和保持与钨针同频的时长进行综合分析 (图 4(c), (d)) 时, 发现在低浓度的 Laminin 基质中, 心肌细胞所需的力刺激时间较长且保持同频的时间也较长。Fibronectin 实验在中浓度配体

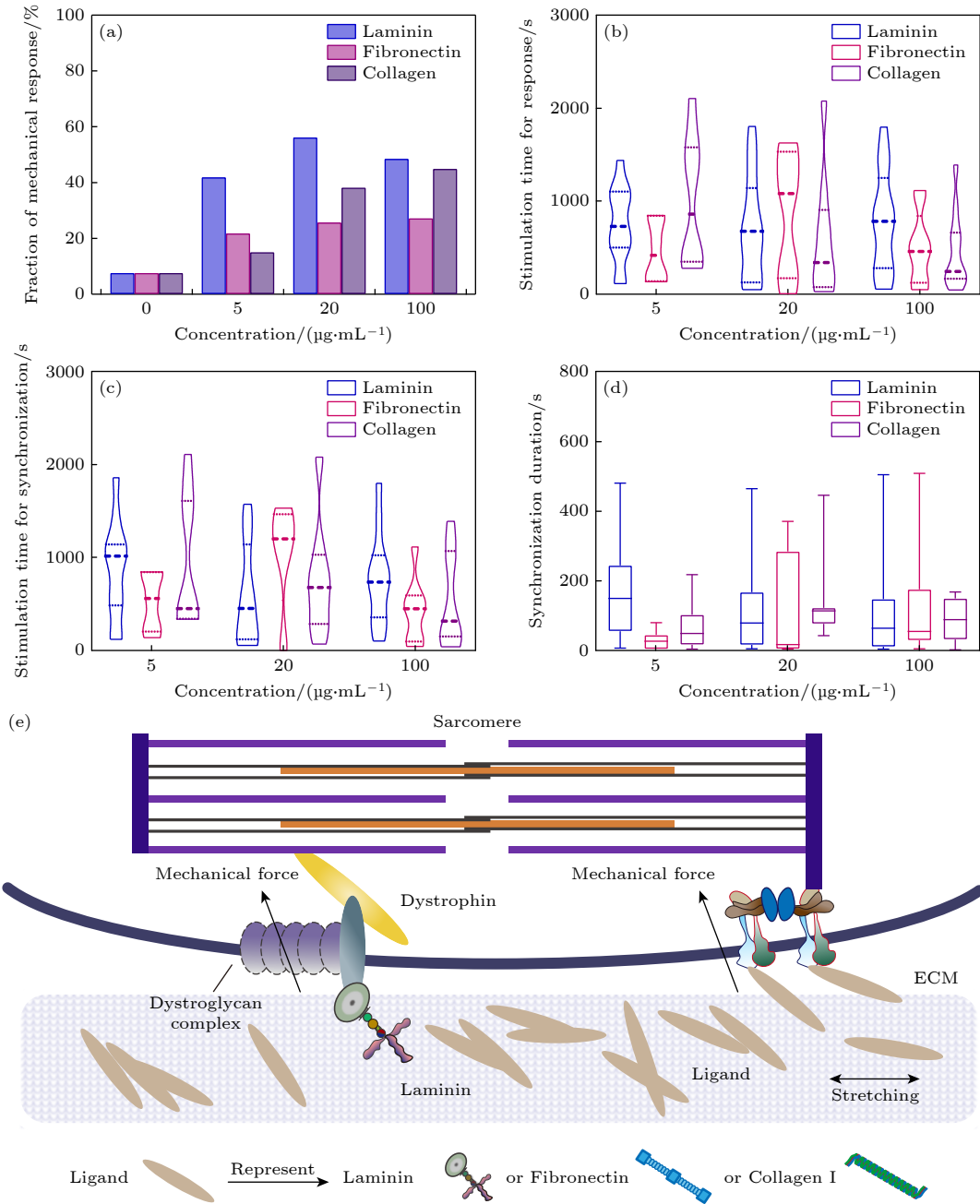


图 4 心肌细胞在不同种类及浓度配体的基质 ($E = 11 \text{ kPa}$) 上发生机械响应行为 (a) 心肌细胞机械响应百分比 ($n > 31$); (b) 心肌细胞产生响应所需的机械刺激时间 ($n > 7$); (c) 心肌细胞与钨针同频所需的机械刺激时间 ($n > 5$); (d) 心肌细胞同频持续时长 ($n > 5$); (e) 3 种不同配体 (Laminin / Fibronectin / Collagen I) 分别与心肌细胞膜受体结合示意图

Fig. 4. Mechanical response behavior of cardiomyocytes on the matrix ($E = 11 \text{ kPa}$) with different kinds and concentrations of ligands: (a) The fraction of mechanical response of cardiomyocytes ($n > 31$); (b) the mechanical stimulation time required for cardiomyocytes to respond the stimulation ($n > 7$); (c) the mechanical stimulation time required for cardiomyocytes to couple with the tungsten probe ($n > 5$); (d) duration of cardiomyocyte coupling with tungsten probe ($n > 5$); (e) schematics of three different ligands (Laminin/Fibronectin/Collagen I) binding to myocardial cell membrane receptors.

条件下, 心肌细胞达到同频振荡所需的力刺激时间最长. 与 Laminin 和 Collagen I 相比, 同配体浓度下的 Fibronectin 组心肌细胞保持同频的时间均为最短. 随着 Collagen I 浓度增大, 心肌细胞所需要的刺激时间变化不大, 中浓度条件下的心肌细胞所需刺激时间最久, 但也是与钨针保持同频时间最长

的一组.

心肌细胞的力响应不同, 可能跟力信号传导有关. 心肌细胞表达的整合素 α 类型有 $\alpha_1, \alpha_3, \alpha_5, \alpha_6, \alpha_7, \alpha_9, \alpha_{10}$, β 类型有 β_1, β_3 和 β_5 . 其中 $\alpha_3\beta_1$ 可与 Collagen I, Fibronectin 及 Laminin 结合; $\alpha_1\beta_1$ 可与 Collagen I 和 Laminin 结合; $\alpha_5\beta_1$ 可与 Fibro-

nectin 结合; $\alpha_7\beta_1, \alpha_6\beta_1$ 可与 Laminin 结合 [39,40]. Laminin 除了能与整合素结合外, 还可与连接抗肌萎缩蛋白复合体 (dystrophin glycoprotein complex, DGC) 连接 [41,42] (如图 4(e) 所示), 因而能同时通过两种途径将外界机械信号传递到细胞内, 耦合钙离子循环, 从而实现双通道调控, 提高了 Laminin 对外界机械力振荡的敏感度. 当心肌细胞通过较低浓度的 Laminin 与外界建立连接时, 虽然细胞在基质上锚定的面积有限, 但同时降低了细胞收缩跳动时拉伸外界基质所需的功 [43], 因此同频耦合后耗散得较慢. 在 3 种蛋白的综合比较下, 发现虽然 Fibronectin 在基质刚性感应方面比较敏感 [44-46], 但在动态力学振荡刺激中并不占优势, 耦合振荡耗散快. 随着配体浓度的增大, 细胞表面的机械传感器数量变多 [43], 但这种因机械传感器数量增多引起响应比例的增大在低浓度时才呈现出较为明显的现象 (从 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 到 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). 在低浓度或高浓度 Fibronectin 情况下, 心肌细胞所具有的力传感分子数量和收缩时需对外界做的功较

为匹配, 表现出响应所需的力刺激时间相对较短, 同频耦合持续时间较长. 而对 Collagen I 而言, 细胞机械响应方式可能与 Collagen I 的弹性结构有关 (见图 4(e) 配体示意图). Collagen I 在力信号传递中具有非线性响应特性 [47-49], 且在高浓度下易出现自组装现象. 这不仅增强了力信号强度, 并且可能改变了基质顺应性 [50], 表现出了力信号非线性增强和细胞收缩需做的功相互耦合影响产生的结果.

由于心肌细胞在包被了 Laminin 的基质上表现出较好的力学响应, 我们继续探究在不同硬度和 Laminin 配体浓度下, 心肌细胞的机械力响应行为. 如图 5(a) 所示, 我们发现不论是很软还是很硬的基质中, 随着配体浓度的增加, 心肌细胞响应的比例先上升后下降. 其中 1.8 kPa 条件下的变化幅度最大, 从 25% 增加到 64.52%, 再降到 36.67%. 而在 27 kPa 实验中, 低配体浓度条件下细胞响应就已经达到较高的比例, 且基本不受配体浓度增加的影响, 在 44.44%—53.33% 之间, 11 kPa 次之.

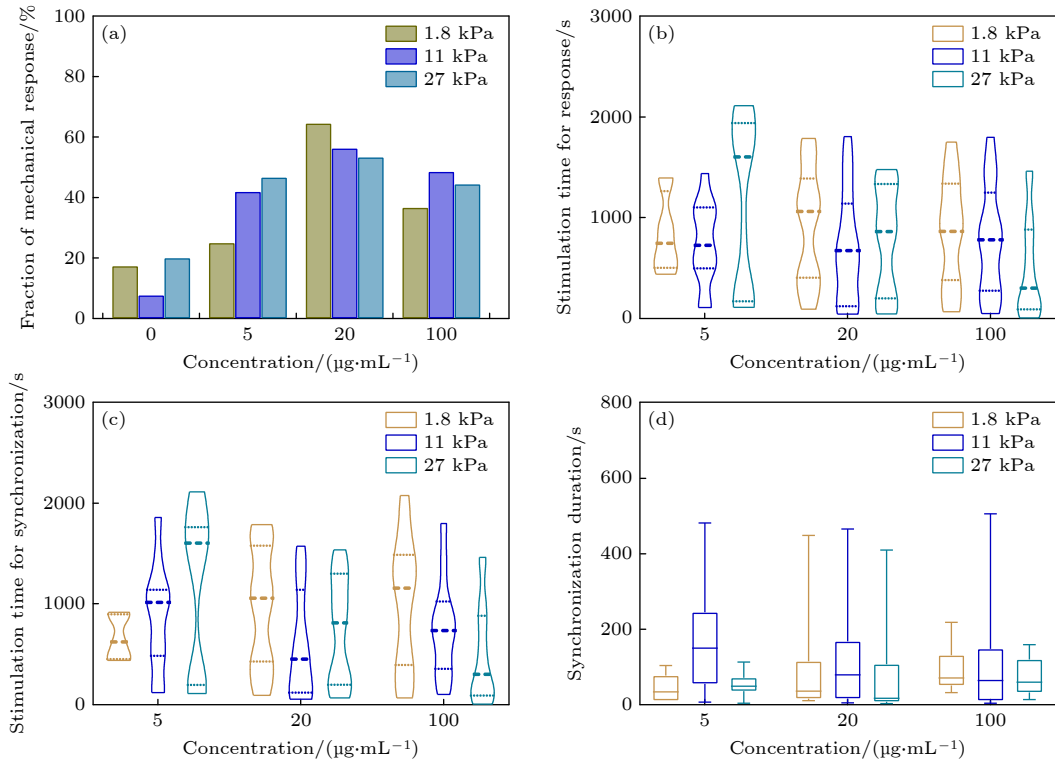


图 5 心肌细胞在不同 Laminin 浓度和基质硬度上的机械响应行为 (a) 心肌细胞机械响应百分比 ($n > 23$); (b) 心肌细胞产生响应所需的机械刺激时间 ($n > 8$); (c) 心肌细胞与钨针同频所需的机械刺激时间 ($n > 5$); (d) 心肌细胞同频持续时长 ($n > 5$)

Fig. 5. Mechanical response behavior of cardiomyocytes at different Laminin concentrations and matrix stiffness: (a) The fraction of mechanical response of cardiomyocytes ($n > 23$); (b) The mechanical stimulation time required for cardiomyocytes to respond the stimulation ($n > 8$); (c) The mechanical stimulation time required for cardiomyocytes to couple with the tungsten probe ($n > 5$); (d) Duration of cardiomyocytes coupling with tungsten probe ($n > 5$).

值得注意的是,在低配体浓度或高配体浓度的情况下,在 1.8 kPa 水凝胶上心肌细胞的响应比例都是低于较硬 (11 kPa) 和最硬 (27 kPa) 的水凝胶. 统计分析发现心肌细胞响应和同频行为在 1.8 kPa 与 27 kPa 水凝胶上均有相同的变化趋势(如图 5(b)–(d) 所示). 心肌细胞在 1.8 kPa 软水凝胶且低配体浓度的条件下响应所需的刺激时间较短,且同频振荡保持的时间相对较短. 在高配体浓度条件下,细胞同频保持的时间有明显增长. 而在 27 kPa 水凝胶中,随着配体浓度的增大,细胞响应达到同频所需的力刺激时间越短,且同频耦合后耗散得很快.

心肌细胞在不同硬度基质上的力学响应行为与力学信号传导有关. 钨针的机械运动使得心肌细胞所在的基质产生固定的形变位移,因此当水凝胶的杨氏模量越高时,心肌细胞能感受到的力信号刺激则越强. 配体浓度较低时,心肌细胞整合素与外界的连接数量有限,心肌细胞感应外界的力学刺激信号不够强^[43]. 而在较高配体浓度的情况下,虽然心肌细胞与外界连接的力信号感受器数量足够多,但由于此时心肌细胞与外界连接比较紧密^[51],细胞肌节收缩需要对外界做的功更大. 在很软的水凝胶上,低配体浓度使得心肌细胞收缩舒张过程中对外界所需要做的功较小^[30,31,42],力信号改变心肌细胞机械行为更加迅速,但衰减得很快,即保持同频时长最短. 随着配体浓度的增大,由于与外界连接更紧密,相应所需要的功变大,因此所需要的力信号刺激时间更长,同时这种耦合衰减也变得更慢. 当基质硬度较大时,心肌细胞所受的力信号较强的同时,心肌细胞收缩舒张所需做功也较大^[52],由于低配体浓度造成机械力信号感受器较少,因而所需要的刺激时间更长. 在高配体浓度下,心肌细胞能感受到的力信号强弱和收缩舒张所需做功共同影响,使得心肌细胞在最硬基质上所需要的刺激时间更短,但同时也衰减得很快. 基质硬度、配体浓度与力信号强弱三者存在复杂的耦合关系,共同影响心肌细胞的力响应.

4 总 结

本文通过探究心肌细胞在不同微环境下对外界机械力振荡信号的响应行为,发现外界加载的力信号能够通过微环境的力学传导不断影响细胞内的钙离子动力学,最终引入的强耦合使心肌细胞

达到自身的本征频率或者与所加载的力信号同频节律性振荡. 细胞外基质中的配体蛋白 Laminin, Fibronectin 和 Collagen I 蛋白具有不同程度的机械力耦合调控作用,其中心肌细胞对包被 Laminin 的水凝胶的力响应效果最好. 这可能是因为 Laminin 既能与整合素结合,还可与 DGC 连接,因而能通过两种通路将外界机械力信号传递到细胞内,耦合钙离子循环,从而实现双通道调控,这也导致其对力学刺激的响应较慢. Fibronectin 在基质刚性感应方面比较敏感,但在动态力学振荡刺激中并不占优势. Collagen I 具有应力硬化的机械特性,增强力学信号的同时还会改变细胞外基质硬度,因此表现出不一样的响应行为. 通过分析在不同基质硬度的心肌细胞的机械振荡力响应过程中发现基质硬度、细胞黏附配体密度和力信号强度存在复杂的耦合关系,共同影响心肌细胞对外界力学刺激的机械响应. 细胞间的机械交流已被证明在生理中扮演着很重要的角色,本研究加深了对心律不齐、心肌梗塞后产生心力衰竭等心血管疾病的理解,为病理研究和疾病治疗提供了基础.

参考文献

- [1] Dogan A, Parmaksız M, Elçin A E, Elçin Y M 2016 *Stem Cell Rev. Rep.* **12** 202
- [2] World Health Organization 2023. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- [3] Thayer J F, Yamamoto S S, Brosschot J F 2010 *Int. J. Cardiol.* **141** 122
- [4] Quinn T A, Kohl P 2021 *Physiol. Rev.* **101** 37
- [5] De Mello WC 1982 *Circ. Res.* **51** 1
- [6] McCain M L, Lee H, Aratyn-Schaus Y, Kléber A G, Parker K K 2012 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109** 9881
- [7] Kumar N M, Gilula N B 1996 *Cell* **84** 381
- [8] Barr L, Dewey M M, Berger W 1965 *J. Gen. Physiol.* **48** 797
- [9] Corrado D, Basso C, Thiene G, et al. 1997 *J. Am. Coll. Cardiol.* **30** 1512
- [10] Pelham R J, Wang Y L 1997 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94** 13661
- [11] Harris A 1973 *Exp. Cell Res.* **77** 285
- [12] Folkman J, Moscona A 1978 *Nature* **273** 345
- [13] Wang W Y, Davidson C D, Lin D, Baker B M 2019 *Nat. Commun.* **10** 1186
- [14] Isomursu A, Park K Y, Hou J, et al. 2022 *Nat. Mater.* **21** 1081
- [15] Adebowale K, Gong Z, Hou J C, Wisdom K M, Garbett D, Lee H P, Nam S, Meyer T, Odde D J, Shenoy V B, Chaudhuri O 2021 *Nat. Mater.* **20** 1290
- [16] Bera K, Kiepas A, Godet I, Li Y, Mehta P, Ifemembi B, Paul C D, Sen A, Serra S A, Stoletov K, Tao J, Shatkin G, Lee S J, Zhang Y, Boen A, Mistriotis P, Gilkes D M, Lewis J D, Fan C M, Feinberg A P, Valverde M A, Sun S X, Konstantopoulos K 2022 *Nature* **611** 365

- [17] Wang J, Yang G, Liu F 2015 *Acta Phys. Sin.* **64** 058707 (in Chinese) [王璟, 杨根, 刘峰 2015 物理学报 **64** 058707]
- [18] Lecuit T, Le Goff L 2007 *Nature* **450** 189
- [19] Assoian R K, Klein E A 2008 *Trends Cell Biol.* **18** 347
- [20] Wen J H, Vincent L G, Fuhrmann A, Choi Y S, Hribar K C, Taylor-Weiner H, Chen S, Engler A J 2014 *Nat. Mater.* **13** 979
- [21] Engler A J, Sen S, Sweeney H L, Discher D E 2006 *Cell* **126** 677
- [22] Zhang J S, Wong S H D, Wu X, Lei H, Qin M, Shi P, Wang W, Bian L, Cao Y 2021 *Adv. Mater.* **33** 2105765
- [23] Chowdhury F, Na S, Li D, Poh Y C, Tanaka T S, Wang F, Wang N 2010 *Nat. Mater.* **9** 82
- [24] Ingber D E, Folkman J 1989 *J. Cell Biol.* **109** 317
- [25] Reinhart-King C A, Dembo M, Hammer D A 2008 *Biophys. J.* **95** 6044
- [26] Tang X, Bajaj P, Bashir R, Saif T A 2011 *Soft Matter* **7** 6151
- [27] Nitsan I, Drori S, Lewis Y E, Cohen S, Tzvil S 2016 *Nature Phys.* **12** 472
- [28] Cohen O, Safran S A 2018 *Sci. Rep.* **8** 2237
- [29] Bick R J, Snuggs M B, Poindexter B J, Buja L M, Winkle W B V 1998 *Cell Adhes. Commun.* **6** 301
- [30] Engler A J, Carag-Krieger C, Johnson C P, Raab M, Tang H Y, Speicher D W, Sanger J W, Sanger J M, Discher D E 2008 *J. Cell Sci.* **121** 3794
- [31] Majkut S, Idema T, Swift J, Krieger C, Liu A, Discher D E 2013 *Curr. Biol.* **23** 2434
- [32] Jacot J G, McCulloch A D, Omens J H 2008 *Biophys. J.* **95** 3479
- [33] Ehler E, Moore-Morris T, Lange S 2013 *J. Vis. Exp.* e50154
- [34] Gittenberger-de Groot A C, Vrancken Peeters M P F M, Mentink M M T, Gourdie R G, Poelmann R E 1998 *Circ. Res.* **82** 1043
- [35] Berry M F, Engler A J, Woo Y J, Pirolli T J, Bish L T, Jayasankar V, Morine K J, Gardner T J, Discher D E, Sweeney H L 2006 *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **290** H2196
- [36] Eisner D A, Choi H S, Díaz M E, O'Neill S C, Trafford A W 2000 *Circ. Res.* **87** 1087
- [37] Bers D M 2002 *Nature* **415** 198
- [38] Bai Y Q, Tang A H, Wang S Q, Zhu X 2007 *Acta Phys. Sin.* **56** 3607 (in Chinese) [白永强, 唐爱辉, 王世强, 朱星 2007 物理学报 **56** 3607]
- [39] Ross R S, Borg T K 2001 *Circ. Res.* **88** 1112
- [40] Israeli-Rosenberg S, Manso A M, Okada H, Ross R S 2014 *Circ. Res.* **114** 572
- [41] Tan P M, Buchholz K S, Omens J H, McCulloch A D, Saucerman J J 2017 *PLOS Comput. Biol.* **13** e1005854
- [42] Harvey P A, Leinwand L A 2011 *J. of Cell Biol.* **194** 355
- [43] Chen-Izu Y, Izu L T 2017 *J. Physiol.* **595** 3949
- [44] Roca-Cusachs P, Gauthier N C, del Rio A, Sheetz M P 2009 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106** 16245
- [45] Kechagia J Z, Ivaska J, Roca-Cusachs P 2019 *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20** 457
- [46] Sun Z, Guo S S, Fässler R 2016 *J. Cell Biol.* **215** 445
- [47] Han Y L, Ronceray P, Xu G, Malandrino A, Kamm R D, Lenz M, Broedersz C P, Guo M 2018 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115** 4075
- [48] Hall M S, Alisafaei F, Ban E, Feng X, Hui C Y, Shenoy V B, Wu M 2016 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113** 14043
- [49] Sun B 2015 *Acta Phys. Sin.* **64** 058201 (in Chinese) [孙波 2015 物理学报 **64** 058201]
- [50] Hu J Y, Li J H, Jiang J, Wang L L, Roth J, McGuinness K N, Baum J, Dai W, Sun Y, Nanda V, Xu F 2022 *Nat. Commun.* **13** 6761
- [51] Discher D E, Janmey P, Wang Y L 2005 *Science* **310** 1139
- [52] Hersch N, Wolters B, Dreissen G, Springer R, Kirchgeßner N, Merkel R, Hoffmann B 2013 *Biol. Open* **2** 351

COVER ARTICLE

Regulation of mechanical force on cardiomyocytes beating*

Chen Hui-Yan¹⁾ Li Luo-Fei¹⁾ Wang Wei¹⁾ Cao Yi^{1)†} Lei Hai^{2)3)‡}

1) (National Laboratory of Solid State Microstructure, School of Physics, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

2) (School of Physics, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

3) (Institute for Advanced Study in Physics, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

(Received 15 January 2024; revised manuscript received 5 February 2024)

Abstract

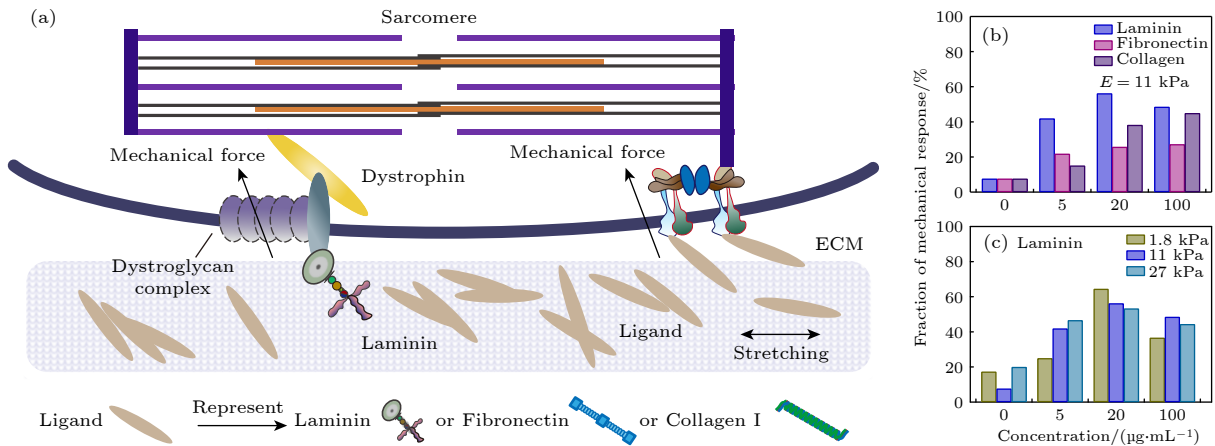
The mechanical behavior of cardiomyocytes plays an essential role in maintaining life and health. It is traditionally believed that both electrical signals and chemical signals modulate the cardiomyocytes behaviors. Recent discoveries have elucidated that the physical cues of microenvironment can regulate cell activities such

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. T2222019, T2225016, 11934008).

† Corresponding author. E-mail: caoyi@nju.edu.cn

‡ Corresponding author. E-mail: leihai@zju.edu.cn

as proliferation, spreading, migration, and differentiation. However, there is still limited research on regulating cardiomyocytes beating through mechanical force. Herein we prepare different polyacrylamide gels coated with different cell adhesion ligand proteins to simulate the physical microenvironment of cardiomyocytes. Then the mechanical loading forces are loaded by using a tungsten probe to stretch elastic hydrogels which can emulate the mechanical oscillations induced by the beating of adjacent cardiomyocytes. We investigate the responsive behavior of cardiomyocytes to external mechanical oscillations within various physical microenvironments. Firstly, we load 1 Hz mechanical oscillation on the matrix ($E = 11$ kPa) with different kinds and concentrations of ligands (0, 5, 20, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) to stimulate cardiomyocytes and observe their mechanical response behavior. Our findings indicate that all kinds of ligands including Laminin, Fibronectin and Collagen I, can mediate the cardiomyocytes response to extrinsic mechanical oscillatory stimuli, which might be due to distinct mechanisms of mechanical force coupling (Fig. (b)). This suggests that mechanical force signals can regulate the beating of cardiomyocytes through matrix-ligand-cell signaling pathway, thereby inducing intercellular coupled oscillations for rhythmic control of cardiomyocytes. Cardiomyocytes cultured on the matrix coated with 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Laminin show the highest and most stable response fraction. We hypothesize that there exist dual force transduction pathways for Laminin binding to integrin and dystrophin glycoprotein complex (DGC) (Fig. (a)). We further analyze the cardiomyocytes behaviors under mechanical oscillation with different values of substrate stiffness ($E = 1.8, 11, 27$ kPa) and concentrations of Laminin (0, 5, 20, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). We find that cardiomyocytes cultured on 1.8 kPa coated with 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Laminin show the highest response fraction (Fig. (c)). Our results demonstrate that the stiffness of substrate, the type and density of cell adhesion ligands, as well as the strength and rhythm of the mechanical signals can synergetically affect the cardiomyocytes responses to external mechanical stimulations, which provides the foundation for understanding the diseases such as cardiac arrhythmias and heart failure following myocardial infarction.



Keywords: cardiomyocyte, hydrogel, mechanical stimulation, intercellular interaction

PACS: 87.18.Gh, 61.41.+e, 05.45.Xt, 87.16.Xa

DOI: [10.7498/aps.73.20240095](https://doi.org/10.7498/aps.73.20240095)



力信号对心肌细胞跳动的调控

陈惠燕 李洛非 王炜 曹毅 雷海

Regulation of mechanical force on cardiomyocytes beating

Chen Hui-Yan Li Luo-Fei Wang Wei Cao Yi Lei Hai

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 73, 088701 (2024) DOI: 10.7498/aps.73.20240095

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7498/aps.73.20240095>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

软体机器人用多孔聚合物水凝胶的摩擦接触非线性行为

Nonlinear frictional contact behavior of porous polymer hydrogels for soft robot

物理学报. 2021, 70(12): 120201 <https://doi.org/10.7498/aps.70.20202134>

基于收缩高密度碳纳米管阵列的柔性固态超级电容器

Flexible solid-state supercapacitors based on shrunk high-density aligned carbon nanotube arrays

物理学报. 2018, 67(2): 028201 <https://doi.org/10.7498/aps.67.20171855>

两层老化心肌组织中螺旋波和时空混沌的控制

Control of spiral wave and spatiotemporal chaos in two-layer aging cardiac tissues

物理学报. 2021, 70(9): 098202 <https://doi.org/10.7498/aps.70.20201294>

零质量射流作用下红细胞在微管道中变形的数值模拟

Numerical simulation of red blood cells deformation in microchannel under zero-net-mass-flux jet

物理学报. 2020, 69(23): 234701 <https://doi.org/10.7498/aps.69.20200971>

气体-表面相互作用中动量和能量分量间转化机制的分子动力学研究

Molecular dynamics study on the conversion mechanism between momentum and energy components in gas-surface interaction

物理学报. 2021, 70(2): 024702 <https://doi.org/10.7498/aps.70.20201192>

带电纳米颗粒与相分离的带电生物膜之间相互作用的分子模拟

Molecular simulation of interaction between charged nanoparticles and phase-separated biomembranes containing charged lipids

物理学报. 2019, 68(2): 028701 <https://doi.org/10.7498/aps.68.20181891>