

21世纪

学术研究文库

大连理工大学 生物医学工程 学术论文集

Proceedings on the Biomedical Engineering of
Dalian University of Technology

〔第3卷〕

邱天爽◎主编



大连理工大学出版社

Dalian University of Technology Press

大连理工大学生物医学工程学术论文集

(第 3 卷)

Proceedings on the Biomedical Engineering of Dalian
University of Technology
(Vol. 3)

主 编 邱天爽

副主编 贾凌云 刘 波 洪 昕
苏志勋 刘 惠 唐一源
钟明军 刘天庆 覃开蓉

大连理工大学出版社
2013 年 11 月

图书在版编目(CIP)数据

大连理工大学生物医学工程学术论文集. 第3卷 / 邱天爽主编. — 大连: 大连理工大学出版社, 2013. 12
ISBN 978-7-5611-8254-3

I. ①大… II. ①邱… III. ①生物工程—医学工程—文集 IV. ①R318-53

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 233208 号

大连理工大学出版社出版

地址: 大连市软件园路 80 号 邮政编码: 116023

发行: 0411-84708842 邮购: 0411-84703636 传真: 0411-84701466

E-mail: dutp@dutp. cn URL: <http://www.dutp. cn>

大连理工印刷有限公司印刷

大连理工大学出版社发行

幅面尺寸: 210mm×290mm
2013 年 12 月第 1 版

印张: 27.5 字数: 766 千字
2013 年 12 月第 1 次印刷

责任编辑: 于建辉

责任校对: 李 慧

封面设计: 季 强

ISBN 978-7-5611-8254-3

定 价: 158.00 元

序

进入 21 世纪以来,随着社会和经济的飞速发展,大规模的污染和掠夺性的资源开发造成的严重恶果,直接威胁着人类自身的健康。生物医学工程是生命科学的重要支柱,是综合生物学、医学和工程学的理论和方法而发展起来的交叉学科,其主要任务是发展和运用工程技术手段,研究和干预人体系统的状态变化。该学科自诞生以来为促进生物医学发展、保障人类健康甚至促进人类进步都作出了不可磨灭的贡献。

大连理工大学生物医学工程学科是 2002 年整合与发展起来的。该学科于 2003 年获得生物医学工程一级学科博士学位授予权和硕士学位授予权;2007 年建立生物医学工程系,并获批设立生物医学工程博士后科研流动站;2008 年获得生物医学工程辽宁省一级重点学科,2009 年获得辽宁省核心竞争力(高水平)学科。目前,该学科共有院士、长江学者、杰青、教授、副教授约 40 人,已形成“生命与医学信息技术”和“生物医用材料与康复工程”两大主要研究平台。该学科面向社会发展和国民经济建设,承担和完成了大量科学研究和技术开发课题,并取得了令人瞩目的研究成果。大连理工大学生物医学工程学科正成长为环渤海和东北地区生物医学工程领域人才培养和科学研究的重要基地。

《大连理工大学生物医学工程学术论文集》已分别于 2003 年和 2005 年出版第 1 卷和第 2 卷,这次出版的第 3 卷精选了近年来大连理工大学生物医学工程学科在生物力学与康复工程、生物医学材料、生物医学成像与图像处理、生物医学系统建模与仿真、生物医学信息检测与处理五个方向的主要研究成果和学术论文。该论文集内容覆盖面广,能够代表我国东北地区生物医学工程领域的最新进展和学术水平,其中,部分研究成果已达到国内和国际先进水平。

《大连理工大学生物医学工程学术论文集》的出版对促进大连理工大学生物医学工程学科的学术创新、学术交流和学术积累,以及我国东北地区大学生物医学工程学科的繁荣与交流,将产生非常深远和积极的影响。

申公雨

2013 年 9 月

目 录

· 生物力学与康复工程 ·

全文收录:

- FRET 技术在应力信号转导研究中的应用 刘 波, 覃开蓉(3~9)
- 年龄因素对人体常速步态踝关节动力学特征的影响研究
..... 刘海斌, 元文学, 王杰群, 曹厚文(10~17)
- Fluid-structure interaction modeling of upper airways before and after nasal surgery for obstructive sleep apnea WANG Ying, WANG Jie, LIU Ying-xi, et al. (18~38)
- Induced pluripotent stem cells generated from human adipose-derived stem cells using a non-viral polycistronic plasmid in feeder-free conditions
..... QU Xin-jian, LIU Tian-qing, JIANG Li-li, GUO Wen-hua, et al. (39~52)
- Transportation of dynamic biochemical signals in non-reversing oscillatory flows in blood vessels ZHU Yong, LI Yi-zeng, QIN Kai-Rong, TANG Hong, et al. (53~61)
- 急性无氧功率自行车运动对颈总动脉弹性模量和局部血液动力学的影响
..... 朱 勇, 侯 杰, 刘 波, 朱亚冰, 邱天爽, 覃开蓉(62~71)
- 冠脉支架优化设计方法的研究..... 李红霞, 王希诚(72~79)
- 基于实时评测的自适应步行康复训练模式研究
..... 朱林剑, 吴海帆, 包海涛, 郑志超, 周志阳(80~85)
- 股骨内固定系统的力学分析..... 朱祎国, 刘春晓(86~92)
- 基于倾角的跌倒检测方法与系统研究..... 朱 勇, 张 研, 宋 佳, 邱天爽(93~99)

摘要收录:

- 一种三维压电晶体测力平台静态标定方法 刘海斌, 元文学, 王正树, 何志强(100)
- Enhancement of Adipose-Derived Stem Cell Differentiation in Scaffolds with IGF-I Gene Impregnation Under Dynamic Microenvironment
..... ZHU Yan-xia, LIU Tian-qing, GUO Wen-hua, JIANG Li-li, et al. (101)
- Comparison of mesenchymal stem cells released from Poly(N-isopropylacrylamide) copolymer film and by trypsinization YANG Lei, LIU Tian-qing, JIANG Li-li, et al. (102)
- 胶原-壳聚糖复合支架体外三维培养神经干细胞
..... 关 水, 刘天庆, 葛 丹, 陆瑞欣, 马学虎, 崔占峰(103)
- 壳聚糖-明胶-透明质酸-硫酸肝素复合支架的制备及性能评价
..... 林小敏, 关 水, 葛 丹, 刘天庆, 马学虎, 崔占峰(104)
- 神经干细胞体外三维培养模型的构建 ... 关 水, 葛 丹, 陆瑞欣, 刘天庆, 马学虎, 崔占峰(105)
- 耳鼻咽喉器官生物力学模型研究进展 刘迎曦, 孙秀珍, 于 申(106)
- 基于神经网络的人中耳内边界参数识别 刘迎曦, 李 生, 孙秀珍(107)

人内耳前庭系统膜迷路流固耦合数值模拟	沈 双,刘迎曦,孙秀珍(108)
影响药物洗脱支架药物释放的主要因素	张艺浩,王希诚(109)
偏瘫康复方法研究与康复仪研制	朱林剑,周志阳(110)
基于双轴角度传感器的足下垂功能电刺激系统	朱 勇,商云晶,宋 佳,邱天爽(111)

· 生物医学材料 ·

全文收录:

基于可见光波段的 L3 光子晶体谐振腔集成微流槽折射率生物传感器	曹 瞰,覃开蓉,闫卫平(115~120)
Amelioration of Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis Rats by Blood Purification Treatment using 4-Mercaptoethylpyridine Based Adsorbent	REN Jun, BAI Ying, HAO Lan, DONG Yan, PI Zhi-qian, et al. (121~131)
A bio-inspired micropump based on stomatal transpiration in plants	LI Jing-min, LIU Chong, XU Zheng, WANG Li-ding(132~138)
Tissue Induction, the Relationship between Biomaterial's Microenvironment and Mesenchymal Stem Cell Differentiation	XU Wen-feng, LIAO Xiao-ling, Zhang Ling, LIU Bo(139~147)
X 光显影聚合物的合成及应用	桑 琳,王光硕,魏志勇,齐 民(148~153)
Fabrication and Evaluation of a Sustained-Release Chitosan-based Scaffold Embedded with PLGA microspheres	SONG Ke-dong, LIU Ying-chao, et al. (154~166)

摘要收录:

Blood Purification Techniques	REN Jun, WEI Hou-liang, XU Li, JIA Ling-yun(167)
Directional cell migration through cell-cell interaction on polyelectrolyte multilayers with swelling gradients	HAN Lu-lu, MAO Zheng-wei, WU Jin-dan, et al. (168)
Influences of surface chemistry and swelling of salt-treated polyelectrolyte multilayers on migration of smooth muscle cells	HAN Lu-lu, MAO Zheng-wei, WU Jin-dan, GAO Chang-you, et al. (169)
Organic Silicone Sol-gel Polymer as a Non-covalent Carrier of Receptor Proteins for Label-free Optical Biosensor Application	REN Jun, WANG Ling-hua, HAN Xiu-you, CHENG Jian-fang, et al. (170)
荧光共振能量转移技术在细胞离子研究中的应用	刘 波,邵 帅,谢 飞,河 川(171)
A multilayer microdevice for cell-based high throughput drug screening	LIU Chong, WANG Lei, XU Zheng, LI Jing-min, Wang Li-ding(172)
A polydimethylsiloxane electrophoresis microchip with a thickness controllable insulating layer for capacitatively coupled contactless conductivity detection	LIU Jun-shan, XU Fei, WANG Si-feng, CHEN Zuan-guang, et al. (173)
Monolithic integration of three-material microelectrodes for electrochemical detection on PM-MA substrates	LIU Jun-shan, QIN Jun, LI Jing, LI Dong-yue, et al. (174)
PCL/Fe ₃ O ₄ @GO 纳米复合材料的合成及性能研究	王光硕,桑 琳,魏志勇,齐 民(175)
聚乳酸/聚 3-羟基丁酸酯 4-羟基丁酸酯复合支架的降解行为研究	王新辉,桑 琳,齐 民(176)

Investigation of co-culture of human adipose-derived stem cells and mature adipocytes	SONG Ke-dong, LI Wen-fang, LIU Tian-qing(177)
Numerical Simulation of Fluid Field and In Vitro Three-dimensional Fabrication of Tissue-Engineered Bones in a Rotating Bioreactor and In Vivo Implantation for repairing segmental bone defects	SONG Ke-dong, WANG Hai, ZHANG Bo-wen, et al. (178)

• 生物医学成像与图像处理 •

全文收录:

Semi-blind Spatial ICA of fMRI Using Spatial Constraints	LIN Qiu-hua, LIU Jing-yu, ZHENG Yong-rui, et al. (181~199)
Cirrhosis Classification based on MRI with duplicative-feature Support Vector Machine (DFSVM)	LIU Hui, GUO Dong-mei, LIU Xiang(200~213)
乳腺计算机辅助诊断中 DCE-MRI 图像特征的选择与分析	李珂, 刘惠(214~221)
Image Features Extraction and Fusion Based on Joint Sparse Representation	YU Nan-nan, Qiu Tian-shuang, Bi Feng, Wang Ai-qi(222~234)
基于医学图像的复杂曲面重建	刘洋, 苏志勋, 栗志扬, 曹俊杰(235~242)

• 生物医学系统建模与仿真 •

全文收录:

Protein Inference and Protein Quantification: Two Sides of Same Coin	HUANG Ting, ZHU Pei-jun, HE Zeng-you(245~257)
基于组合核的蛋白质交互关系抽取	李丽双, 刘洋, 黄德根, 张盼盼(258~267)
基于本体属性网络的蛋白质复合物预测	张益嘉, 林鸿飞, 杨志豪(268~280)
A system for individualized prosthetic modeling of the femoral head	LIU Bin, JIA Xian-yong, HUANG Zhi-huan, YUE Zong-ge(281~293)
Hysteresis modeling for calcium-mediated ciliary beat frequency in airway epithelial cells	QIN Kai-rong, XIANG Cheng(294~306)
Effect and mechanism of penetration enhancement of organic base and alcohol on Glycyrrhetic acid in vitro	HAO Jia-jia, SUN Yu-ming, WANG Qing, et al. (307~318)
蚊子腿表面多级微纳结构的超疏水特性	孔祥清, 吴承伟(319~325)

摘要收录:

Data construction for phosphorylation site prediction	GONG Hai-peng, LIU Xiao-qing, WU Jun, HE Zeng-you(326)
基于哈希子图对核方法的蛋白质关系抽取研究	张益嘉, 林鸿飞, 杨志豪 327)
An improved system for 3D individualized modeling of the artificial femoral head	LIU Bin, JIA Xian-yong, HUANG Zhi-huan, LI Hao-jie(328)
Effect of cationic cyclopeptides on transdermal and transmembrane delivery of insulin	CHANG Ming-ming, LI Xiao-hui, SUN Yu-ming, CHENG Fang, et al. (329)
基于组合分类器的一个新的数据整合方法	钟明军(330)

· 生物医学信息检测与处理 ·

全文收录:

- Contribution of Gold Nanoparticles to the Signal Amplification in Surface Plasmon Resonance
..... HONG Xin, Elizabeth AH Hall(333~343)
- A Support Vector Machine-Recursive Feature Elimination Feature Selection Method based on Artificial Contrast Variables and Mutual Information
..... LIN Xiao-hui, YANG Fu-fang, ZHOU Li-na, YIN Pei-yuan, et al. (344~355)
- Effects of High Frequency Electrical Stimulation on Nerve's Conduction of Action Potentials
..... LIU Hai-long, ZHU Lin-lin, TANG Hong, QIU Tian-shuang(356~361)
- Auditory Feedback and Sensory Substitution during Teleoperated Navigation
..... Liu Rong, WANG Yong-xuan(362~372)
- Integrate silver colloids with silicon nanowire arrays for surface-enhanced Raman scattering
..... WU Yong-kuan, LIU Kun, LI Xu-feng, PAN Shi(373~379)
- 近红外激光与生物组织热相互作用的细胞电生理实验研究
..... 关魁文, 李新宇, 刘 佳, 孙长森(380~389)
- 第二心音主动脉瓣分量和肺动脉瓣分量的提取方法
..... 高 佼, 唐 洪, 邱天爽, 于 勤(390~399)
- Quantitative Assessment of Dual Gait Analysis Based on Inertial Sensors with Body Sensor Network WANG Zhe-long, QIU Sen, CAO Zhong-kai(400~413)
- Light-emitting-diode-induced fluorescence detection of fluorescent dyes for capillary electrophoresis microchip with cross-polarization method
..... YANG Xiao-bo, YAN Wei-ping, LIU Zhi-huan, LV Hong-feng(414~422)

摘要收录:

- 基于高频双向电流的神经选择性兴奋 朱林林, 刘海龙, 李 林, 盛书磊, 邱天爽(423)
- 运动想象 EEG 的自适应小波基动态分类方法 ... 李春月, 王永轩, 王媛媛, 李 响, 刘 蓉(424)
- Preparation of porous monolayer film by immersing the stearic acid Langmuir-Blodgett monolayer on mica in salt solution
..... WANG Shuo, LI Yin-li, ZHAO Hui-ling, LIANG Hao, LIU Bo, PAN Shi(425)
- Three Powerful Research Tools from Single Cells into Single Molecules: AFM, Laser Tweezers, and Raman Spectroscopy
..... WU Yong-kuan, LIU Kun, SONG Ke-dong, PAN Shi(426)
- 非高斯脉冲噪声下基于径向基神经网络的诱发电位韧性自适应估计方法
..... 毕 峰, 邱天爽(427)
- A Pilot Study on Evaluating Recovery of the Post-operative Based on Acceleration and sEMG
..... WANG Zhe-long, JIANG Ming, ZHAO Hong-yu(428)
- Signal Detection of Multi-Channel Capillary Electrophoresis Chip Based on CCD
..... LV Hong-feng, YAN Wei-ping, YANG Xiao-bo, LI Jie-chao, et al. (429)

生物力学与康复工程

Biomechanics and
Rehabilitation Engineering

FRET 技术在应力信号转导研究中的应用*

刘 波, 覃开蓉

(大连理工大学 生物医学工程系, 大连 116024)

摘 要: 机械应力对细胞增殖、迁移、分化等行为存在显著影响, 其应力信号转导的机制是力学生物学研究的热点之一。荧光共振能量转移技术 (Fluorescence resonance energy transfer, FRET) 实现了在活细胞内实时动态观察信号蛋白的活性变化, 为应力信号转导的深入研究提供了有力工具。本文综述了 FRET 技术的原理及其在应力信号转导研究领域中的应用进展。

关键词: 无氧运动; 功率自行车; 动脉弹性模量; 血液动力学; 颈总动脉

中图分类号: R318.08

文献标识码: A

Applications of FRET technology in the study of mechanotransduction

LIU Bo, QIN Kai-rong

(Department of Biomedical Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: Mechanical force has essential effects on cellular behaviors such as proliferation, migration and differentiation, and the mechanism of mechanotransduction is still one of the hot spots in mechanobiology study. Traditional methods could not provide accurate evaluation of the signal protein activation upon mechanical stress application. The development of fluorescence protein technology greatly promoted the understanding of mechanotransduction. In particular, genetically-encoded biosensors based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) technique has achieved a real-time dynamic observation of living cell signal protein activity, which provides a powerful tool for the in-depth study of biomechanics. In this paper, we will provide an overview on the recent progress of FRET application in biomechanics. The FRET technology will be introduced first, and then we summarized three methods to integrate the mechanical stimulation with the FRET imaging system on cell experiments. After that, the important progress of biomechanical research on signal pathway made by FRET technology, such as cytoskeleton, Rho family, calcium and cellular physical stress visualization, will be also discussed. Finally, we will point out the bottleneck of the future development in FRET technology, and also make the prospect of the application of FRET in mechanotransduction. In summary, FRET technology provides a powerful tool for the studies of mechanotransduction, which will advance our systematic understanding on the molecular mechanisms about how cells respond to mechanical stimulation.

Key words: Mechanotransduction; Mechanobiology; FRET

机体内的细胞不仅可以感知外环境各种化学因素的刺激, 其自身也处在各种机械环境中, 如低渗性牵张、静水压力、机械拉伸及剪应力 (shear stress) 等, 调节着细胞的结构、功能和转归^[1-2]。以往许多关于应力转导 (mechanotransduction) 或力学生物学 (mechanobiology) 知识的获得都是将细胞裂解后, 采用生物化学技术或者将细胞固定, 然后使用免疫共沉淀等方法观察检测获得。细胞裂解后有可能造成某些信息的改变或丢失; 将细胞固定后免疫染

* 本论文已被《生物医学工程学杂志》接收, 文稿号 201209052

基金项目: 国家自然科学基金 (10972139), 中央高校基本科研业务费项目 (1306-852004)

色来观察细胞力学条件下的变化,容易因为抗体的非特异结合造成一些假阳性现象,而且不能实现同一个活细胞内的动态观察。荧光蛋白和显微成像术的快速发展和应用弥补了以往研究方法的不足之处。而且将荧光蛋白和基因编码的生物探针联合应用的荧光共振能量转移技术(Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)技术,就可以实现在活细胞内连续动态观察信号蛋白活性在时空水平的信号级联反应,为阐明活细胞的应力转导和力学生物学反应提供了可能性。

1 荧光蛋白及荧光共振能量转移技术

自从绿色荧光蛋白(GFP)被发现后,就被广泛用于各种生命科学的研究中。因为它不需要其它辅助因子的存在,就可以和几乎所有的目标分子相结合并共同转移到胞内,在活体内达到实时监测的目的。GFP经过改造后,获得了一系列的衍生体,如蓝色荧光蛋白(BFP)、青色荧光蛋白(CFP)、黄色荧光蛋白(YFP)等^[3]。上述各种荧光蛋白经过遗传改造后,在荧光颜色、荧光亮度、光敏感性、成熟速度、对外环境敏感性/耐受性(如PH值、温度、离子浓度等)、聚集状态等各方面都得到了不同程度的优化,使它们更适于用作活体观察的标记分子,已经广泛用于检测目标蛋白在细胞内的分布与转位。

在此基础上逐步发展起来许多依赖荧光蛋白的影像技术,在力学生物学的应力信号转导研究中,目前最常应用的是FRET。做为FRET供体荧光蛋白的发射波长域覆盖做为受体荧光蛋白的激发波长域,当供体与受体在合适的方向彼此靠近($<10\text{nm}$)时,供体的激发波长可以使能量向受体转移。二者之间的距离和方向可以影响FRET的效率^[3]。做为供受体的荧光蛋白可以共价偶联不同的目标分子成为一个大融合分子发挥作用,如果目标蛋白活性改变影响了荧光蛋白对之间的距离和方向,就可以通过观察FRET效率的改变间接检测目标蛋白的活性。此技术在亚细胞水平观察应力转导对活细胞的影响时,具有很强的时空特异性。基于以上的原理,已经构建了许多的单分子FRET生物探针。如Rho家族成员RhoA^[4] Rac1^[5] Cdc42^[6]、cAMP^[7]、MT1-MMP^[8]等等。

2 力学加载系统与FRET技术的结合

作为可以实现在活细胞动态观察细胞活性的FRET技术,在使用时必须包括以下几个部分:FRET生物探针、FRET荧光显微成像系统以及荧光图像分析方法。这就要求在实验过程中,必须获得持续高清晰的荧光图像。在力学生物学的实验中,由于力学条件的动态加载,给荧光成像带来了一定的困难。目前力学加载与活细胞动态成像成功结合的实验系统主要包括以下几种:

2.1 基质硬度

因为培养细胞的基质硬度(substrate stiffness)会影响细胞的应力平衡,所以基质硬度对诸如细胞铺展和干细胞分化等细胞功能的调节至关重要。采用水凝胶做为培养细胞的基质,通过改变凝胶组份之间的摩尔比率以调整其机械刚度,并通过测量凝胶的压缩弹性系数进行校准,这样透明且硬度可控的水凝胶为FRET技术提供了很好的基质材料^[9]。并且由于基质硬度对细胞的作用只是一个静态的持续加载过程,可以保证在荧光显微镜下获得稳定清晰的FRET图像。运用这种方法,人们结合FRET技术对基质硬度对干细胞功能的影响进行了深入研究,发现不同硬度基质上的干细胞分化存在很大差异^[10]。其信号传递,如钙离子振荡^[11]、基因的转录与表达^[12]等,也存在显著区别。目前这是为细胞提供应力学条件并进行FRET检测最简便有效的方式。

2.2 剪应力

血流剪应力是血管重建和动脉粥样化形成的重要因素。利用经典平行平板流动腔系统能精准地控制剪应力。为了利用荧光显微镜观察到活细胞中FRET生物探针的变化,细胞须种植在透光性优良的玻璃盖玻片上^[13-14]。利用这种结合了荧光显微成像的剪应力系统,已经发现Rac在剪应力作用下的活化存在极化分布^[15-16]。使用对构象敏感的GPCR FRET生物探针,证明流体剪应力对细胞膜的机械干扰可使GPCR直接发生构象转变而不需配体参与,这表明GPCRs可能与内皮细胞中的力传导有关^[13]。Zhang等研制出了一种基于FRET的PTH1R探针,运用该系统在MC3T3-E1细胞发现流体剪应力的刺激会导致PTH1R构象平衡的明显改变^[17]。Rachel Jones等结合FRET的双分子探针杂交技术检测了流体剪应力作用下内皮一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)的mRNA及3'-端的多腺苷酸化水平^[18]。同样在此系统下,Liu等利用Ca²⁺的FRET生物探针研究了高剪应力作用下牛主动脉内皮细胞(BAECs)胞内钙离子浓度增高的阶段性特征及其不同的来源^[14]。此外,Deepika Verma和Jason Rahimzadeh等所在小组,运用微流控芯片技术制作的PDMS微型平行平板流动腔系统^[19],采用FRET观察流体剪应力作用下细胞骨架相关蛋白actinin等的应力变化^[20-21]。这些研究显示FRET技术已经与剪应力系统成功结合,成为研究血管生物学等领域研究的有力工具。

2.3 牵张力

因为显微成像聚焦的问题,对活细胞整体进行周期性牵拉并且同时检测荧光蛋白很困难。然而在周期性拉伸的间隙,可以暂时性获得稳定图像。Goldyn等在聚二甲硅氧烷的弹性膜上培养NIH3T3细胞,在周期性牵拉弹性膜的间隙检测到了Rac, RhoA和Cdc42生物探针的FRET变化^[22]。而采用持续的静态牵张的方法,Andrea Maria Pereira等观察了转染有dJun-FRET生物探针的S2R+细胞在牵张力作用下的JNK活性变化^[23]。此外,对细胞施加短暂的牵拉(1 min),然后再观察细胞内FRET生物探针的变化,也能部分实现FRET技术与细胞牵拉研究的结合^[24]。相对而言,对细胞局部进行拉伸更容易一些,可采用激光镊或者磁镊得以顺利实现。利用光镊系统聚焦激光束产生的辐射压力可在微粒上产生pN级的力,激光束捕获附着在细胞表面的微珠,便可对细胞局部进行拉伸^[25]。通过光钳系统对纤维蛋白包被的磁珠施加牵引力,观察到在力的作用点Src被快速激活,同时Src的活化以一种缓慢的波浪形式向远离力作用点的方向传播^[25]。Ning Wang小组发展出了磁镊,使用一个强力的磁场梯度给磁珠提供力的来源。通过调整磁体相对于磁珠的位置,可以改变力的大小,可以使磁珠旋转,从而方便地使磁珠粘附部位的细胞局部产生牵拉,此技术成功运用到对细胞施加机械牵张力上^[26]。此外,显微操作微管吮吸也可在保持FRET图像稳定清晰的前提下为细胞提供局部牵张力。通过此方法,Nicolas Borghi等对细胞施加局部牵张力,使用FRET探针成功观察到了Cadherin/catenin复合体的应力传递^[27]。Klotzsch等对fibronectin纤维施加牵张,发现其可以延伸8倍长度^[28]。这些研究表明,结合FRET的牵张力对细胞功能影响的研究技术已经日益成熟。

3 FRET 在力学生物学研究中的应用

应力信号能以传输和转导两种模式调节细胞功能。前者主要是基于细胞骨架系统将胞外信号传递到细胞内,后者是将机械信号转化为生物信号。各种应力可以激活位于胞膜、脂筏和其它亚细胞部位的一系列信号分子,经由细胞骨架依赖性或非依赖性途径将感知到的机械信息传导到胞内,并激发胞内信号分子的级联反应。因为在活细胞蛋白活性检测方面独特的技术优势,FRET技术已经逐渐运用到应力信号传导的各个层次的研究中,并已证明是在亚细胞水平上研究活细胞内不同应力信号转导的有效工具。

3.1 细胞骨架及其相关分子介导的信号传递

细胞骨架(包括微管、微丝以及中间纤维)为细胞提供了机械支持,维持了细胞形态,同时也参与细胞感受胞外应力作用并传递至胞内的信号转导过程。当细胞暴露在剪应力之下时,它们将改组肌动蛋白骨架和黏着点,并随后在流体方向上排成一行^[29-30],这一过程涉及到一系列的信号转导,运用FRET技术大大促进了此方面的研究。例如,PECAM-1和VE-cadherin连同VEGF受体能够在剪应力作用下刺激磷脂酰肌醇3激酶^[31-32],继而激活并促进整合素 β 1和 β 2与细胞基底面的连接^[33]。在细胞流动的下流, Rac1被激活以促进板状伪足的形成^[16]。细胞中可以观察到RhoA活性短暂降低,微丝解聚,紧接着RhoA持久性激活,流动方向上应力纤维重新出现^[33]。当细胞受到机械牵张力作用时,胞内细胞骨架相关分子的动态变化也可采用FRET技术来观察。利用FRET技术, Na等证明,局部牵张力迅速地诱发了细胞远端Src的活化,这一变化依赖于细胞骨架的预应力,并主要通过微管完成^[26]。这些运用荧光蛋白及FRET技术的研究,有力地支持了细胞骨架在介导机械牵张对细胞功能的影响时发挥着重要的作用。

3.2 力学信号敏感的膜受体和相关的下游信号分子

位于质膜上的受体大多为蛋白质分子,在外界力学信号的作用下,受体的构象或者活性发生改变,随即引发的级联反应,导致细胞的生理功能和基因表达的改变。例如, ECFP和EYFP分别与人类缓激肽受体B2、G蛋白偶联受体(GPCR)构建成重组体以研究GPCR的激活情况,研究结果表明在受到剪应力作用时,胞膜上的B2缓激肽受体具有感受剪应力的作用^[13]。最近构建的Src FRET生物探针,具有磷酸化氨基酸酸性结合结构域和一个Src特异性基底多肽(P130Cas的衍生体),分别与ECFP和Citrine(EYFP的衍生体)构建成重组体。而Src生物探针经过改造后,可锚定在胞浆膜的內侧面。将具有膜锚定特性的Src生物探针转染到人脐带静脉内皮细胞(HUVECs),同时将纤连蛋白包被磁珠通过整合素配体偶联到细胞表面的细胞骨架上^[29],然后对细胞施加局部牵引力,观察到Src被快速激活并向细胞远端传播^[25]。

在剪应力作用下,细胞的受力反应呈现不对称性,说明这种细胞膜信号蛋白及其相关分子在剪应力条件下的活性变化在细胞不同部位应当存在差异,这种活性差异可能正是应力条件下细胞极性排列以及定向迁移的原因。运用FRET技术可以很方便地实现在亚细胞水平观察剪应力条件下的细胞膜受体及其相关信号蛋白的非对称活性变化。Matsuda小组和Hahn小组分别发明了基于FRET的Rac、Cdc42以及RhoA探针^[34],运用这些FRET生物探针监测剪应力条件下的Rho家族活性变化^[5],发现剪应力在BAECs细胞远端明显增强了Rac活性^[5, 16],而应用ECFP和Venus作为供受体构建的Rac FRET生物探针观察到在PAECs细胞,面对血流侧受到的剪应力却抑制Rac的激活^[15]。应用EGFP-Cdc42和Alexa 568-PBD构建的FRET探针证实,在剪应力的作用下,小G蛋白Cdc42在血流侧和非血流侧的激活也呈现出两极分化的状态^[35]。而RhoA虽然能在5分钟的剪应力刺激之内被激活,却并未发现其极性分布^[36-37]。

3.3 钙离子

钙离子是最重要的生物信号之一。已有许多研究证实,在应力条件刺激下,细胞膜上的钙离子通道开放,胞浆内钙离子浓度增高,在应力信号转导中同样起着重要作用。Tsien实验室发明了一种非常成功的钙离子FRET生物探针,包括了钙调蛋白CaM, CaM结合蛋白和荧光蛋白对^[38]。当钙离子附在CaM上的结合位点时, CaM与结合蛋白相互结合,造成两个荧光蛋白间距离减小并由此提高FRET的效率。在此基础上, Wang的实验室采用ECFP和YPet荧光蛋白对对其进行了改良,大幅度提高了FRET效率的动态范围,使其更适合观测细胞内钙的振幅。将此探针连接到内质网上,使其能特异显示胞内钙库的钙离子浓度变化,从而实现不同钙离子来源的连续动态检测。使用这种改进的钙离子FRET生物探针发现,降低基质硬度可以同时抑制人平滑肌细胞质钙离子震荡的大小和频率^[11]。笔者研究发现,在

65 dyn/cm² 高切应力作用下, BAECs 内的钙离子浓度增高分为两个阶段, 每个阶段的钙离子来源并不相同^[14]。Nishitani 设计一个新的装置对基质胶施加局部振动, 观察到基质胶上的人脐静脉内皮细胞胞浆内钙离子浓度快速增高, 这一过程同样可以分为不同来源的两个阶段^[39]。由此可见, FRET 技术使我们对应力条件下的钙信号变化有了更深入全面的认识。

3.4 应力物理传递的检测

机械应力在细胞内的物理传递及胞内的应力状态是细胞应力反应的重要组成部分, 但仅停留在假设与推论, 如何直接观察检测这些应力的分布, 仍然是一个难题。可喜的是, 最近几年出现了一批运用 FRET 技术观察细胞内应力状态的报道。Schwartz 实验室将 mTFP1/venus 荧光蛋白对中间用一段分子弹簧相连, 构建出应力检测单元 TSMoD, 两端再分别连接 vinculin 的两个结构域。分子弹簧来源于蜘蛛丝蛋白的一段富含 α 螺旋的序列 (GPGGA)₈, 当 vinculin 分子内张应力改变时, 分子弹簧相应长度改变, 荧光蛋白对之间的距离相应变化, 通过检测 FRET 的效率改变就可以间接观察 vinculin 分子内张应力的变化。结果发现, 细胞定向迁移过程中, vinculin 分子在粘着斑生成和增大的细胞前端区域受到张力较大, 而在粘着斑解聚和滑动的尾端受力较小^[40]。在此基础上, Nicolas Borghi 等构建了 E-cadherin 的 FRET 探针 EcadTSMoD, 将 TSMoD 插入到 E-cadherin 分子的跨膜结构域以及 catenin 结合结构域之间, 这样的 FRET 生物探针可以测量从 E-cadherin 跨膜结构域到 catenin 结合结构域的 pN 级别的应力传递^[27]。Meng 等设计了一种叫 stFRET 的生物探针, 使用 Cerulean/Venus 两种蛋白作为 FRET 荧光蛋白对, 通过另一个稳定的 α 螺旋蛋白序列结构连接起来, 可以插入到活细胞内部的结构蛋白中, 如 collagen-19、 α -actinin、filamin A 等等。它的 FRET 信号也可因力的大小而改变, 因而也能适时检测细胞内部机械张力的大小^[41-42]。运用改进的 actinin-sstFRET 生物探针, Rahimzadeh J 和 Verma D 已经观察了 actinin 在切应力条件下的应力变化^[20-21]。这些研究为在活细胞内实现力的可见提供了可能。

4 结论与展望

FRET 技术和基因编码的生物探针为研究力传导提供了有力工具。把 FRET 生物探针转入细胞以及在亚细胞水平分区域进行监测都很容易地得以实现。利用这些已有的 FRET 生物探针工具, 已经在应力信号转导的分子机制研究上取得了重要进展, 增加了我们对活细胞应力转导的时空特性的认识。但总体而言, FRET 在力学生物学领域运用目前仍处于起步阶段, 其主要瓶颈还是在于所需的 FRET 探针。迄今为止, 国际上较为成熟的 FRET 生物探针只有几十种, 远不能满足力学生物学特别是应力信号传导研究的全部需求; FRET 生物探针的动态范围普遍较小, 对较弱的应力信号刺激反应并不灵敏, 同时也很难用这些传感器进行精细探测; 所有 FRET 探针都只能在细胞层次使用, 还没有一种 FRET 探针可以实现器官或在体的实时动态观察; 此外, 由于波长范围的重叠问题, 探针的荧光颜色受到限制, 这将阻碍在同一细胞中对多个信号分子的形象化。随着越来越多的荧光蛋白被发现和改造, 将会出现更多改进的 FRET 荧光蛋白对, 也将出现穿透力强、能够实现在体观察的远红外 FRET 荧光蛋白对。更多针对各种信号通路的 FRET 生物探针不断涌现, 必将有力推动应力信号转导领域的研究进程。

参考文献

- [1] Chien S. Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 292 (3):H1209-24.

- [2] Chien S, Li S, Shiu YT, et al. Molecular basis of mechanical modulation of endothelial cell migration[J]. *Front Biosci*, 2005,10:1985-2000.
- [3] Wang Y, Shyy JY, Chien S. Fluorescence proteins, live-cell imaging, and mechanobiology: seeing is believing[J]. *Annu Rev Biomed Eng* 2008,10:1-38.
- [4] Pertz O, Hodgson L, Klemke RL, et al. Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells[J]. *Nature* 2006, 440 (7087):1069-72.
- [5] Kraynov VS, Chamberlain C, Bokoch GM, et al. Localized Rac activation dynamics visualized in living cells[J]. *Science* 2000, 290 (5490):333-7.
- [6] Nalbant P, Hodgson L, Kraynov V, et al. Activation of endogenous Cdc42 visualized in living cells[J]. *Science* 2004, 305 (5690):1615-9.
- [7] DiPilato LM, Cheng X, Zhang J. Fluorescent indicators of cAMP and Epac activation reveal differential dynamics of cAMP signaling within discrete subcellular compartments[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004,101 (47):16513-8.
- [8] Ouyang M, Huang H, Shaner NC, et al. Simultaneous visualization of protumorigenic Src and MT1-MMP activities with fluorescence resonance energy transfer[J]. *Cancer Res* 2010,70 (6):2204-12.
- [9] Kong HJ, Polte TR, Alsberg E, et al. FRET measurements of cell-traction forces and nano-scale clustering of adhesion ligands varied by substrate stiffness[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005,102 (12):4300-5.
- [10] Chowdhury F, Na S, Li D, et al. Material properties of the cell dictate stress-induced spreading and differentiation in embryonic stem cells[J]. *Nat Mater* 2010,9 (1):82-8.
- [11] Kim TJ, Seong J, Ouyang M, et al. Substrate rigidity regulates Ca²⁺ oscillation via RhoA pathway in stem cells[J]. *J Cell Physiol* 2009,218 (2):285-93.
- [12] Kong HJ, Liu J, Riddle K, et al. Non-viral gene delivery regulated by stiffness of cell adhesion substrates[J]. *Nat Mater* 2005,4 (6):460-4.
- [13] Chachisvilis M, Zhang YL, Frangos JA. G protein-coupled receptors sense fluid shear stress in endothelial cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006,103 (42):15463-8.
- [14] Liu B, Lu S, Zheng S, et al. Two distinct phases of calcium signalling under flow[J]. *Cardiovasc Res* 2011,91 (1):124-33.
- [15] Zaidel-Bar R, Kam Z, Geiger B. Polarized downregulation of the paxillin-p130CAS-Rac1 pathway induced by shear flow[J]. *J Cell Sci* 2005,118 (Pt 17):3997-4007.
- [16] Tzima E, Del Pozo MA, Kiosses WB, et al. Activation of Rac1 by shear stress in endothelial cells mediates both cytoskeletal reorganization and effects on gene expression[J]. *Embo J* 2002,21 (24):6791-800.
- [17] Zhang YL, Frangos JA, Chachisvilis M. Mechanical stimulus alters conformation of type 1 parathyroid hormone receptor in bone cells[J]. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009,296 (6):C1391-9.
- [18] Jones R, Baker MB, Weber M, et al. Molecular beacons can assess changes in expression and 3'-polyadenylation of human eNOS mRNA[J]. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009,296 (3):C498-504.
- [19] Wang J, Heo J, Hua SZ. Spatially resolved shear distribution in microfluidic chip for studying force transduction mechanisms in cells[J]. *Lab Chip* 2010,10 (2):235-9.
- [20] Verma D, Ye N, Meng F, et al. Interplay between Cytoskeletal Stresses and Cell Adaptation under Chronic Flow[J]. *PLoS One* 2012,7 (9):e44167.
- [21] Rahimzadeh J, Meng F, Sachs F, et al. Real-time observation of flow-induced cytoskeletal stress in living cells[J]. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011, 301 (3):C646-52.
- [22] Goldyn AM, Rioja BA, Spatz JP, et al. Force-induced cell polarisation is linked to RhoA-driven microtubule-independent focal-adhesion sliding[J]. *J Cell Sci* 2009,122 (Pt 20):3644-51.
- [23] Pereira AM, Tudor C, Kanger JS, et al. Integrin-dependent activation of the JNK signaling pathway by mechanical stress[J]. *PLoS One* 2011, 6 (12):e26182.
- [24] Gervasio OL, Phillips WD, Cole L, et al. Caveolae respond to cell stretch and contribute to stretch-induced signaling[J]. *J Cell Sci* 2011, 124 (Pt 21):3581-90.
- [25] Wang Y, Botvinick EL, Zhao Y, et al. Visualizing the mechanical activation of Src[J]. *Nature* 2005, 434 (7036):1040-5.

- [26] 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 U S A* 2008, 105 (18):6626-31.
- [27] Borghi N, Sorokina M, Shcherbakova OG, et al. E-cadherin is under constitutive actomyosin-generated tension that is increased at cell-cell contacts upon externally applied stretch[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, 109 (31):12568-73.
- [28] Klotzsch E, Smith ML, Kubow KE, et al. Fibronectin forms the most extensible biological fibers displaying switchable force-exposed cryptic binding sites[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106 (43):18267-72.
- [29] Katsumi A, Orr AW, Tzima E, et al. Integrins in mechanotransduction[J]. *J Biol Chem* 2004; 279 (13):12001-4.
- [30] Tzima E. Role of small GTPases in endothelial cytoskeletal dynamics and the shear stress response[J]. *Circ Res* 2006, 98 (2):176-85.
- [31] Chen Z, Tzima E. PECAM-1 is necessary for flow-induced vascular remodeling[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009, 29 (7):1067-73.
- [32] Tzima E, Irani-Tehrani M, Kiosses WB, et al. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress[J]. *Nature* 2005, 437 (7057):426-31.
- [33] Tzima E, del Pozo MA, Shattil SJ, et al. Activation of integrins in endothelial cells by fluid shear stress mediates Rho-dependent cytoskeletal alignment[J]. *Embo J* 2001, 20 (17):4639-47.
- [34] Itoh RE, Kurokawa K, Ohba Y, et al. Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells[J]. *Mol Cell Biol* 2002, 22 (18):6582-91.
- [35] Tzima E, Kiosses WB, del Pozo MA, et al. Localized cdc42 activation, detected using a novel assay, mediates microtubule organizing center positioning in endothelial cells in response to fluid shear stress[J]. *J Biol Chem* 2003; 278 (33):31020-3.
- [36] Wojciak-Stothard B, Ridley AJ. Shear stress-induced endothelial cell polarization is mediated by Rho and Rac but not Cdc42 or PI 3-kinases[J]. *J Cell Biol* 2003; 161 (2):429-39.
- [37] Hamamura K, Swarnkar G, Tanjung N, et al. RhoA-mediated signaling in mechanotransduction of osteoblasts[J]. *Connect Tissue Res* 2012; 53 (5):398-406.
- [38] Palmer AE, Tsien RY. Measuring calcium signaling using genetically targetable fluorescent indicators[J]. *Nat Protoc* 2006; 1 (3):1057-65.
- [39] Nishitani WS, Saif TA, Wang Y. Calcium signaling in live cells on elastic gels under mechanical vibration at subcellular levels[J]. *PLoS One* 2011; 6 (10):e26181.
- [40] Grashoff C, Hoffman BD, Brenner MD, et al. Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics[J]. *Nature* 2010; 466 (7303):263-6.
- [41] Meng F, Suchyna TM, Sachs F. A fluorescence energy transfer-based mechanical stress sensor for specific proteins in situ[J]. *Febs J* 2008; 275 (12):3072-87.
- [42] Meng F, Suchyna TM, Lazakovitch E, et al. Real Time FRET Based Detection of Mechanical Stress in Cytoskeletal and Extracellular Matrix Proteins[J]. *Cell Mol Bioeng* 2011; 4 (2):148-59.