

文章编号: 1004-7220(2020)03-0331-07

流体剪切力下趋化因子 CXCL12 诱导 Jurkat T 细胞的钙响应机制

胡 兵, 吴建华, 凌颖琛, 方 颖

(华南理工大学 生物科学与工程学院, 生物力学研究所, 广州 510006)

摘要:目的 探究流体剪切力(fluid shear stress, FSS)条件下趋化因子诱导 Jurkat T 细胞钙响应的力-化学耦合调控机制。方法 通过流动腔系统与荧光显微镜结合,在静止或流场条件下,观察分析有或无胞外 Ca^{2+} 时固定化趋化因子 CXCL12 诱导的 Jurkat T 细胞钙响应过程,提取相应特征参数。结果 CXCL12 可以介导 Jurkat T 细胞的稳定黏附且呈现浓度依赖性;力是细胞钙响应的开关,当 FSS 从 0 提高到 20 mPa 时,钙响应激活比率从约 4% 提高到约 75%;在 20 mPa FSS 下,胞外 Ca^{2+} 可以通过缩短延迟时间(缩短约 23 s)加快钙响应,增加爬坡时间(约 7 s)和半衰期(约 20 s)提高钙响应强度。结论 FSS 和胞外 Ca^{2+} 协同作用,加快、加强 CXCL12 介导的 Jurkat T 细胞钙响应,提示一条依赖机械敏感钙离子通道的“外钙内流-内质网钙库释放”的快速通路。研究结果有助于深入理解 T 细胞的活化过程,为相应病理和药物研究提供参考。

关键词: 流体剪切力; Jurkat T 细胞; 钙响应

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2020.03.011

Chemokine CXCL12-Induced Calcium Response of Jurkat T Cells under Fluid Shear Stress

HU Bing, WU Jianhua, LING Yinchen, FANG Ying

(*Institute of Biomechanics, School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China*)

Abstract; Objective To investigate the mechanism of mechano-chemical coregulation in chemokine-induced calcium response of Jurkat T cells under fluid shear stress (FSS). **Methods** By using parallel-plate flow chamber combined with fluorescence microscope, the calcium response of Jurkat T cells on CXCL12 was observed to extract the corresponding characteristic parameters under static or flow state, with or without extracellular Ca^{2+} , respectively. **Results** Immobilized CXCL12 could induce firm adhesion of the circulating Jurkat T cells, and the arrested cells increased with the increase of CXCL12 concentration. Force could trigger the calcium response of Jurkat T cells and sharply raised the activation ratio from 4% up to 75% when the FSS increased from 0 to 20 mPa. Under 20 mPa FSS, extracellular Ca^{2+} could stimulate quickly the calcium response by shortening the delay time (about 23 s), and enhance calcium intensity by prolonging the climbing time (about 7 s) and half time (about 20 s). **Conclusions** The cooperation between FSS and extracellular Ca^{2+} would accelerate and enhance CXCL12-mediated-calcium response of Jurkat T cells, which indicated a fast mechanosensitive pathway through ‘extracellular calcium influx-intracellular calcium store release’. The research results would contribute to understanding the process of T cells activation and providing the clue for relevant pathological and drug research.

Key words: fluid shear stress (FSS); Jurkat T cell; calcium response

收稿日期: 2019-04-08; 修回日期: 2019-06-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(11672109, 11702100, 11432006, 11272125)

通信作者: 方颖, 副教授, E-mail: yfang@scut.edu.cn

当机体受到病毒或细菌等病原体入侵时,被感染组织释放趋化因子,并以浓度梯度的形式向周围扩散,其中一部分被附近血管壁内皮细胞上的糖萼捕获而固定^[1]。选择素和趋化因子联合介导血液中的白细胞栓缚至血管壁发生滚动,并随着整合素“由内而外”及“由外而内”信号通路激活至高亲和力状态,从而实现稳定黏附以及之后的跨膜迁移和穿过中间组织进入感染部位,最终发挥其免疫功能^[2-4]。淋巴细胞归巢同样具有类似过程^[5]。在这个多步的级联反应过程中,趋化因子起着导向和活化作用^[6-8],而流体剪切力(fluid shear stress, FSS)也是重要的调控因素^[9-13]。

当胞外信号通过受体传递至胞内,白细胞的激活对其功能的正常发挥至关重要^[14]。白细胞激活的早期标志事件主要有整合素的激活和胞质 Ca^{2+} 浓度提高(钙响应),前者涉及白细胞的稳定黏附和T细胞免疫突触的形成^[4,15];而后者作为重要的第2信使,可广泛激活胞内 Ca^{2+} 依赖型的信号分子以及激酶的活化^[16]。Alon等^[17]研究表明,只有固定的趋化因子才能传递力信号,使循环T淋巴细胞的 β_2 整合素构象伸展,从而可以与内皮细胞上细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)结合,介导细胞的稳定黏附。本课题组前期工作进一步探明,流场下,固定的趋化因子CXCL12可在0.2 s内快速激活Jurkat细胞上的整合素LFA-1,大大延长细胞的栓缚时间,而且该过程受到FSS正向调控^[18]。

一般认为,趋化因子通过结合白细胞膜上的G蛋白耦联受体(G protein coupled receptor, GPCR)激活磷脂酶C(phospholipase C, PLC)^[4,14,9],PLC可以分解膜磷脂产生肌醇三磷酸(inositol-1, 4, 5 triphosphate, IP_3), IP_3 游离到胞质区与内质网膜上的 IP_3 受体结合,激活内质网 Ca^{2+} 通道,快速释放钙库中 Ca^{2+} ^[5];而内质网内 Ca^{2+} 浓度降低使其膜上的 Ca^{2+} 浓度感受分子STIM1寡聚化,寡聚STIM1分子结合并活化质膜 Ca^{2+} 通道Orai1,导致外钙内流^[20-21]。研究表明,FSS激发选择素所介导的嗜中性粒细胞钙响应,并随着FSS增加,发生钙响应细胞的比率上升、启动时间缩短,受到一条涉及力敏感信号通路的调控^[22-23]。但是,趋化因子和选择素对应的白细胞膜受体不同,FSS是否在趋化因子介

导的T细胞钙响应中扮演同样重要的角色?胞内钙库释放与胞外 Ca^{2+} 内流究竟存在怎样的关系?这些问题至今尚未探明。

本文结合平行平板流动腔系统、荧光显微镜和高速摄影仪,以Fluo-4 AM作为钙荧光指示剂,实时观察记录FSS作用下趋化因子CXCL12介导的Jurkat T细胞钙响应过程。通过对比分析,揭示FSS以及胞外 Ca^{2+} 对细胞激活比率、钙响应启动速度和强弱的影响。研究结果可深化对血流环境中免疫响应过程的理解。

1 材料与方法

1.1 试剂和细胞

重组人CXCL12/SDF-1 α 购于美国R&D公司;Fluo-4 AM购于美国Invitrogen公司;磷酸盐缓冲液(PBS)、RPMI1640培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、青链霉素(penicillin-streptomycin, P/S)、HEPES(N-2-Hydroxyethylpiperazine-N-2-Ethane Sulfonic Acid)购于美国Gibco公司;无血清细胞冻存液CELLSAVINGTM购自苏州新赛美生物科技有限公司;牛血清蛋白(BSA)购于美国Calbiochem公司;EGTA、Ficoll购于美国Sigma公司。Jurkat T细胞购于中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection, CCTCC)。

1.2 流动腔底板功能化

流动腔工作区长、宽、高分别5、2.5、0.127 mm。流动腔底板的功能化参考文献[13],即将20 μ L CXCL12(2 μ g/mL)滴加到底板工作区,4 $^{\circ}$ C下孵育12 h,用2% BSA的PBS溶液冲洗3次,再加入1 mL 2% BSA的PBS溶液,室温孵育2 h即可。

1.3 Ca^{2+} 荧光染料的加载及平行平板流动腔实验

Jurkat T细胞加载 Ca^{2+} 荧光染料方法及平行平板流动腔实验见文献[23]。加载荧光染料Fluo-4 AM的Jurkat T细胞分别用含1.5 mmol/L Ca^{2+} 或不含 Ca^{2+} (但含有1 mmol/L EGTA)的成像液重悬细胞至浓度约为 1×10^6 个/mL,将细胞悬液滴加到底板功能区或以20 mPa FSS将其灌注到流动腔中,通过荧光显微镜记录功能区黏附的细胞荧光强度变化。

1.4 细胞钙响应相关物理量的定义和测量

钙响应相关参数通过尼康NIS-Elements AR软件进行提取,包括活化率(activation ratio)、延迟时

间(delay time)、爬坡时间(climbing time)、半衰期(half time)、相对荧光强度(relative intensity)和峰值强度(peak intensity)。具体定义如下:① 活化率,即黏附于流动腔底部发光的细胞数(激活事件数)与总黏附数(黏附事件数)之比。② 延迟时间,即从细胞稳定黏附下来到胞内荧光强度开始提升的时间段。③ 爬坡时间,即细胞荧光强度自提升至到达峰值的时间段。④ 半衰期,即细胞荧光强度从峰值下降到一半所用的时间。⑤ 相对荧光强度,即 Jurkat T 细胞激活后钙响应所导致的荧光强度的变化,反映胞内 Ca^{2+} 浓度水平。为扣除背景噪声,相对荧光强度 = (实际荧光强度 - 背景荧光强度) / 背景荧光强度。⑥ 峰值强度,即黏附细胞相对荧光强度的最大值。

1.5 数据统计分析

所有实验至少有 3 组独立平行实验,每组观察的细胞数至少 15 个,数据采用均值 \pm 标准差表示。单因素实验,当处理组数大于或等于 3 时,先采用单因素方差分析,再进行 Newman-Keuls 检验;当处理组数为 2 时采用 *t* 检验。对于 2 \times 2 板因设计,采用二因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义, $P < 0.01$ 表示显著性差异, $P < 0.001$ 表示有极显著差异。

2 结果

2.1 趋化因子 CXCL12 介导 Jurkat T 细胞的特异性黏附

在流动腔实验过程中,随流的 Jurkat T 细胞也

可能因重力沉降和静电吸附而黏附、停留在流动腔底部。为了排除底板非特异性物理吸附,保证黏附的 Jurkat T 细胞是由 CXCL12 特异性介导,设置如下实验:① 空白对照组,底板不做处理;② 实验对照组,底板用 2% BSA 的 PBS 溶液孵育;③ 实验组,底板不同浓度 CXCL12 的 PBS 溶液孵育 + 2% BSA。

由于 CXCL12 与 Jurkat T 细胞上受体 CXCR4 的结合不是 Ca^{2+} 依赖,用 1 mmol/L EGTA 螯合细胞悬液中 Ca^{2+} , Jurkat T 细胞在 20 mPa FSS 下被灌注到各组底板的流动腔中,在 10 倍镜下观察,并记录 6 min 内稳定黏附的细胞数。定义 1 min 内细胞的位移不大于 12 μm (约等于细胞直径)为稳定黏附。

结果显示,20 mPa FSS 下,实验对照组的稳定黏附细胞数极显著低于空白对照组,说明 2% BSA 的 PBS 溶液可以有效阻断 Jurkat T 细胞的非特异性黏附。而实验组均极显著高于实验对照组,并随着 CXCL12 浓度提高,黏附的细胞数逐渐增加;当浓度达到 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,黏附数开始趋于稳定。上述结果表明,CXCL12 可以介导 Jurkat T 细胞发生稳定黏附,且黏附具有浓度依赖性(见图 1)。CXCL12 浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$,细胞的黏附已达到峰值,故后续实验均采用该浓度。

2.2 无外钙时,外力启动 CXCL12 诱导的 Jurkat T 细胞钙响应

固定化 CXCL12 虽然可以介导 Jurkat T 细胞黏附于底板,但能否有效激活细胞产生钙响应,及 FSS 在这一过程中的角色仍有待探索。为排除外钙的影响,本文仅研究 CXCL12-CXCR4 诱导的胞内钙库

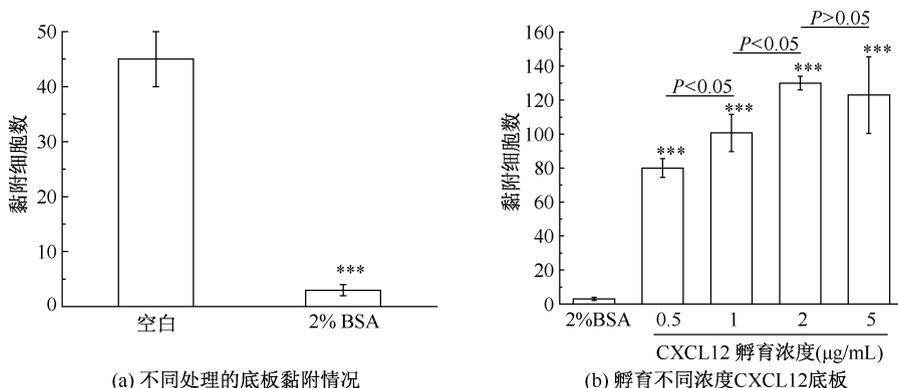


图 1 20 mPa FSS 下 CXCL12 介导的 Jurkat T 细胞特异性结合 (***) $P < 0.001$

Fig.1 Specific firm adhesion of Jurkat T cells mediated by immobilized CXCL12 under 20 mPa FSS

(a) Different treatment of flow chamber substrate, (b) Incubation of CXCL12 with different concentration

释放,并特设 FSS 为 0 和 20 mPa 两种情形,对比分析钙响应特征值的差异。为此,将加载有荧光染料 Fluo-4 AM 的 Jurkat T 细胞在用无 Ca^{2+} 成像液(含 1 mmol/L EGTA)重悬之后,分别滴加在 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CXCL12 功能化的底板上或者以 20 mPa FSS 灌注到同样功能化底板的流动腔中,通过荧光显微镜实时监测,并记录每个稳定黏附细胞的荧光强度变化。

无论静止还是流场下,在观察时间内有些黏附的细胞产生钙响应,而有些则无钙响应,荧光显微镜下观察到的钙响应过程如图 2(a)所示。在 20 mPa 流场中,CXCL12 诱导的 Jurkat T 细胞发生钙响应的典型曲线可分为 3 个阶段:① 延迟时间,对应图 2(a) A~B 之间,长度约 1 min,该时间段内胞内 Ca^{2+} 浓度不变;② 快速上升期,即爬坡期,对应

图 2(a) B~C 之间,小于 10 s,此短暂时间内胞内 Ca^{2+} 浓度大大提高;③ 衰减期,对应图 2(a) C~E 之间,长度 60~80 s 不等,该时间段内胞质中的 Ca^{2+} 被慢慢回收回到内质网中[见图 2(b)]。静止条件下的钙响应尽管也经历了类似的 3 个阶段,但特征值则显示有极大差异,不仅钙响应强度大大减弱,而且延迟时间也从 1 min 延长至 2.5 min。此外,对细胞的激活比率进行统计分析。结果表明,静止条件下,CXCL12 介导产生钙响应的比率仅为 3.86%;20 mPa FSS 可以极大地将激活比率提高至 76.19% [见图 2(c)]。FSS 不仅有效地激活了 CXCL12 介导的 Jurkat T 细胞的活化,而且大大加快了钙响应的启动,大幅度地提高了钙响应的强度。因此,本文认为,FSS 是触发 CXCL12 诱导 Jurkat T 细胞发生钙响应的扳机。

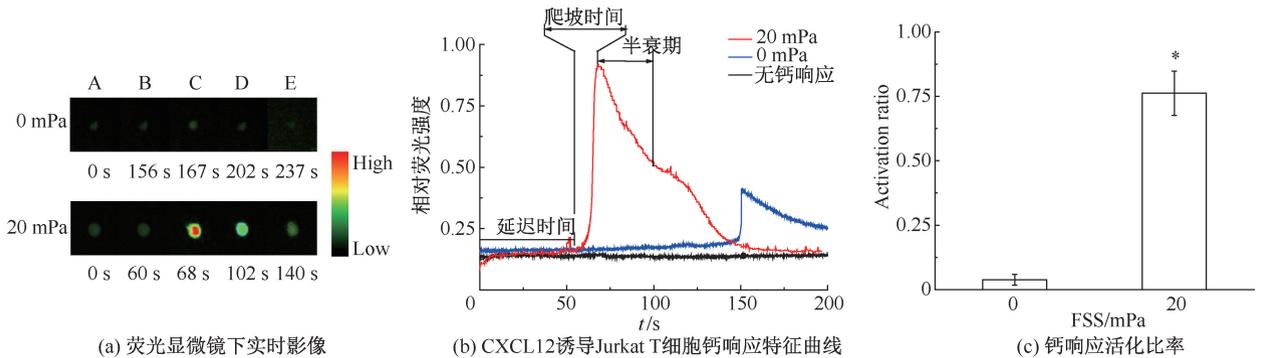


图 2 无外钙时细胞钙响应示意图(* $P < 0.05$)

Fig.2 Schematic diagram of calcium signaling without extracellular calcium ions (a) Real-time images under fluorescence microscope, (b) Characteristic curve of calcium response of Jurkat T cells induced by CXCL12, (c) Activation ratio of calcium response

2.3 流场下有外钙时 CXCL12 诱导的 Jurkat T 细胞钙响应

在人体内环境中,细胞周围遍布着 Ca^{2+} ,且 Ca^{2+} 浓度远高于细胞静息时胞质 Ca^{2+} 浓度^[20]。为了更贴近真实生理条件,研究 CXCL12-力协同调控的 Jurkat T 细胞钙响应,特在加载荧光染料后的 Jurkat T 细胞重悬液中添加 1.5 mmol/L 的 Ca^{2+} ,观察胞内外 Ca^{2+} 共存时细胞的钙响应过程。

首先,为探明溶液中 Ca^{2+} 存在是否对 CXCL12 介导的细胞黏附有影响,特设细胞悬液中分别加 Ca^{2+} 和 EGTA 两组实验。在 CXCL12 浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、FSS 为 20 mPa 时,观察 6 min 中细胞的黏附数,结果表明,两者非常接近,不存在统计学差异,即外钙的存在并不影响 Jurkat T 细胞在固定化 CXCL12 上

的黏附[见图 3(a)]。

另外,由 Jurkat T 细胞产生钙响应的比率即活化率可知,无论静止还是流场情形,外钙的加入尽管些微增加了细胞的活化率(静止时从 3.86% 到 4.12%,流场时从 76.19% 到 78.4%),但两者同样不存在统计学差异[见图 3(b)]。双因素方差分析结果表明,外钙和 FSS 两个因素中,FSS 在激活细胞钙响应中发挥关键作用。

通过对 20 mPa FSS 实验组钙响应历程的细致观察发现,有外钙时 CXCL12 诱导的 Jurkat T 细胞的钙响应相对复杂。经聚类后,可以分为 3 种类型:① 类型 1,与无外钙时相似,具有典型平台期即明显长的延迟时间,爬坡时间长度小于 10 s;② 类型 2,有典型的平台期,延迟时间较类型 1 短,但上

升速度相对较慢,爬坡时间大于 10 s;③ 类型 3,没有典型的平台期,爬坡时间更长,表现为荧光强度的缓慢上升。对 3 次独立平行实验总计 153 个细胞的钙响应分类统计,类型 1、2、3 占比分别为 12.5%、68.8% 和 18.7%;而无外钙时仅有类型 1、2 两种,其占比分别为 90%、10% [见图 3(c)]。

上述结果表明,外钙并不影响 Jurkat T 细胞在

固定化 CXCL12 上的黏附以及细胞钙响应的活化率,无论胞外是否存在 Ca^{2+} ,力同样是开启细胞钙响应的开关。但有外钙时,细胞钙响应的时间历程更加多样,出现了大量无平台期或延迟时间大大变短而爬坡时间相应延长的事件该结果提示,细胞一旦黏附或黏附后不久,便能快速引发胞外 Ca^{2+} 内流。

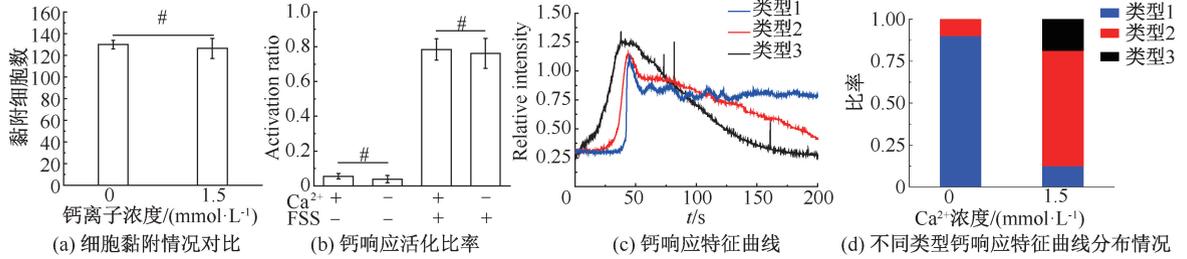


图 3 有外钙时,静止或 FSS 下细胞钙响应示意图 (* $P>0.05$)

Fig.3 Schematic diagram of calcium response with extracellular calcium ions (a) Comparison of cell adhesion, (b) Activation ratio of calcium response, (c) Characteristic curve of calcium signaling, (d) Distribution of characteristic curves of different types of calcium responses

2.4 外钙加速细胞钙响应进程

细胞静息时,胞质中 Ca^{2+} 浓度维持在 100 nmol/L,而胞外 Ca^{2+} 浓度在 1~2 mmol/L,相差 4 个数量级^[20]。为进一步探明溶液中 Ca^{2+} 对 CXCL12 介导 Jurkat T 细胞钙响应特征参数的

影响,采用 FSS 为 0 和 20 mPa、胞外 Ca^{2+} 浓度为 0 和 1.5 mmol/L 的 2×2 板因设计,研究静止及流场条件下外钙对钙响应的延迟时间、爬坡时间、半衰期以及峰值强度的影响(见图 4)。

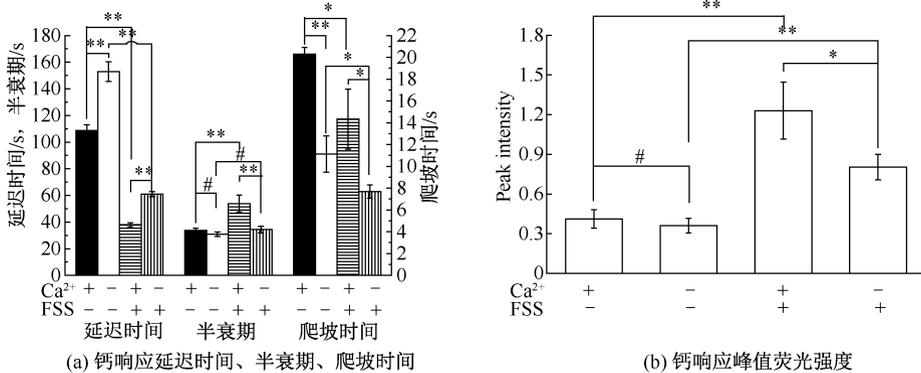


图 4 有、无胞外 Ca^{2+} 时细胞钙响应 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$, # $P>0.05$)

Fig.4 Calcium response with or without extracellular calcium ions (a) Delay time, half time, climbing time, (b) Peak Intensity

为比较力和外钙以及它们对细胞钙响应的协同影响,对实验数据进行双因素方差分析。延迟时间、半衰期、峰值荧光强度等均受到力、 Ca^{2+} 以及两者交互作用的影响。爬坡时间方面,力和外钙具有极显著影响,但两者交互作用的影响不具有统计学意义。

对细胞钙响应延迟时间而言:与静息情况比较,在胞外 Ca^{2+} 浓度为 0 和 1.5 mmol/L 时,20 mPa FSS 可分别将前者从 153.0 s 降至 61.0 s,后者从 108.6 s 降至 38.0 s;无论静息还是流场情况,外钙均加快了钙响应的产生,前者从 153.0 s 提前至

108.6 s,后者从61.0 s提前到38.0 s。当胞外 Ca^{2+} 浓度为0时,FSS对细胞钙响应的半衰期没有影响;只有胞外存在 Ca^{2+} 时,FSS才能显著将半衰期从34.3 s延长到54.0 s。与延迟时间类似,FSS可显著降低爬坡时间,将无钙时的11.1 s降至7.7 s,有钙时的20.2 s降低至14.3 s;但是外钙则显著延长了爬坡时间,将静止时的11.1 s延至20.2 s,20 mPa时的7.7 s延至14.3 s。

另外,静息时无论胞外是否有 Ca^{2+} ,不仅细胞钙响应的激活比率极低,且钙信号的荧光峰值也极弱;只有FSS才能提高细胞的钙响应激活比率和钙响应峰值强度,而外钙的流入则进一步增加了胞质中的 Ca^{2+} 浓度,使峰值强度从0.8提高到1.2水平。

综上所述,无外钙时,FSS通过缩短延迟时间加快细胞内钙库的释放,提高钙响应速度;而胞外 Ca^{2+} 的流入则缩短了延迟时间,但延长了爬坡时间和半衰期,从而进一步提高了细胞钙响应的强度。因此,外力和外钙均可以加快细胞内钙水平的提高。

3 讨论与结论

趋化因子CXCL12通过结合T淋巴细胞上的CXCR4激活G蛋白,从而启动下游信号级联反应,是一条关系T细胞功能的重要信号通路。本文模拟血流环境中CXCL12如何诱导Jurkat T细胞胞质 Ca^{2+} 浓度的变化,正如选择素诱导的粒细胞系,力同样是触发胞内钙响应的扳机,FSS不仅增加钙响应的激活比率和钙响应强度,而且加快钙响应的启动。当FSS为20 mPa时,文献[22-23]中获得10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ P-选择素和E-选择素诱导的嗜中性粒细胞钙响应的延迟时间分别为120 s和70 s,同等浓度的P-选择素在HL60细胞则大于150 s;而本文在2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CXCL12诱导的Jurkat T细胞中得到的延迟时间约为61 s(胞外无 Ca^{2+})和38 s(胞外有 Ca^{2+})。这意味着力信号可协同化学信号加快、加强细胞的钙响应,但协同能力的大小或强弱会因化学信号、细胞的不同而有所差异。

另外,本文发现,胞外远高于胞内的 Ca^{2+} 环境也对力-化学信号协同调控的钙响应过程发挥重要作用。Jafarnejad等^[24]采用微流控装置在人真皮淋巴内皮细胞上多次间断性加载流场,发现外钙离子可以提高第1次钙响应的峰值强度并主导第2次钙

响应;Schorr等^[25]研究表明,白介素8(interleukin-8, IL-8)诱导的嗜中性粒细胞钙响应过程包括两个阶段,不依赖于外钙的初始钙瞬变阶段和依赖于外钙的缓慢的外钙内流阶段。由于选择素与其配体的结合是 Ca^{2+} 依赖性,研究发现,选择素介导嗜中性粒细胞和HL-60细胞钙响应时未能在无外 Ca^{2+} 情形下操作,仅通过膜上 Ca^{2+} 通道抑制剂和内质网 IP_3R 抑制剂对照,胞内 Ca^{2+} 浓度的提高主要源于内钙释放^[22-23,26]。因此,目前主流的观点是胞质 Ca^{2+} 浓度提高首先并主要源于内质网钙库的释放,而后才是钙库操纵的、通过细胞膜钙释放活化钙通道(calcium release-activated calcium channel, CRAC)的外钙内流^[16,20-21,27]。本文对CXCL12介导的Jurkat T细胞钙响应过程的细致分析和比较,揭示在流场条件下外 Ca^{2+} 可以通过缩短钙响应的延迟时间(从61.0 s降至38.0 s)、延长爬坡时间(从7.7 s升至14.03 s)和半衰期(从34.3 s升至54.0 s)加快钙响应启动、加强钙响应幅度。

近年来研究者陆续发现若干细胞膜表面存在许多机械敏感离子通道(mechanosensitive, MS)。例如,T细胞膜上的TRPV2和Piezo1通道蛋白均可在局部拉力的作用下介导外钙内流,提高胞内 Ca^{2+} 浓度^[28]。本文实验数据表明,随流的Jurkat T细胞一旦被固定的CXCL12捕获,键合的膜受体CXCR4即受到机械力的作用,从而打开附近的MS通道,导致局部、少量的外钙内流,进而极快激活周边的 Ca^{2+} 依赖型信号分子,该时间尺度应该接近固定的CXCL12激活整合素LFA-1所需的0.2 s,最终加快内质网钙库的释放;这种持续的外钙内流同时也解释了钙响应爬坡时间、半衰期和峰值强度的提高。因此,流场情况下很可能存在一条与传统通路“化学信号-内质网钙库释放-钙库操纵的外钙内流”相反的钙响应快速通路:力-化学信号-MS通道开启外钙内流-内质网钙库释放。有多少MS蛋白及MS离子通道,有哪些信号分子涉及该快速通路,这些问题有待进一步探索。

综上所述,本文的研究结果有助于对血流环境中CXCL12介导T细胞免疫响应过程的理解,同时为非兴奋细胞外钙内流模式提供新的思路,为后续信号通路的研究和相关临床治疗药物的开发提供前期基础。

参考文献:

- [1] KIM E, SCHUELLER O, SWEETNAM PM. Targeting the leukocyte activation cascade: Getting to the site of inflammation using microfabricated assays [J]. *Lab Chip*, 2012, 12(12): 2255-2264.
- [2] ROLLINS BJ. Chemokines [J]. *Blood*, 1997, 90(3): 909-928.
- [3] SCHAEERLI P, MOSER B. Chemokines [J]. *Immunol Res*, 2005, 31(1): 57-74.
- [4] DIXIT N, SIMON SI. Chemokines, selectins and intracellular calcium flux: Temporal and spatial cues for leukocyte arrest [J]. *Front Immunol*, 2012, 3(188): 1-9.
- [5] KINASHI T. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes [J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(7): 546-559.
- [6] BAGGIOLINI M. Chemokines and leukocyte traffic [J]. *Nature*, 1998, 392(6676): 565-568.
- [7] SALLUSTO F, BAGGIOLINI M. Chemokines and leukocyte traffic [J]. *Nat Immunol*, 2008, 9(9): 949-952.
- [8] KUCIA M, JANKOWSKI K, RECA R, *et al.* CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion [J]. *J Mol Histol*, 2004, 35(3): 233-245.
- [9] ALON R, Feigelson SW. Chemokine-triggered leukocyte arrest: Force-regulated bi-directional integrin activation in quantal adhesive contacts [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2012, 24(5): 670-676.
- [10] CHEN W, LOU J, ZHU C. Forcing switch from short- to intermediate- and long-lived states of the alphaA domain generates LFA-1/ICAM-1 catch bonds [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(46): 35967-35978.
- [11] ALON R, DUSTIN ML. Force as a facilitator of integrin conformational changes during leukocyte arrest on blood vessels and antigen-presenting cells [J]. *Immunity*, 2007, 26(1): 17-27.
- [12] MCEVER RP, ZHU C. Rolling cell adhesion [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2010, 26: 363-396.
- [13] 童洁, 刘黎, 吴建华, 等. 力诱导循环血流中白细胞整合素 LFA-1 的激活机制 [J]. *医用生物力学*, 2015, 30(1): 14-20.
- TONG J, LIU L, WU JH, *et al.* Mechanism of force-induced activation of integrin LFA-1 under circulating flows [J]. *J Med Biomech*, 2015, 30(1): 14-20.
- [14] LEY K, LAUDANNA C, CYBULSKY MI, *et al.* Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(9): 678-689.
- [15] SPRINGER TA, DUSTIN ML. Integrin inside-out signaling and the immunological synapse [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2012, 24(1): 107-115.
- [16] LEWIS RS. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes [J]. *Annu Rev Immunol*, 2001, 19(1): 497-521.
- [17] SHAMRI R, GRABOVSKY V, GAUGUET JM, *et al.* Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines [J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(5): 497-506.
- [18] 陈岱琳, 吴建华, 方颖. 流体剪应力作用下趋化因子 CXCL12 诱导的白细胞整合素 LFA-1 的激活 [J]. *医用生物力学*, 2017, 32(6): 548-554.
- CHEN DL, WU JH, FANG Y. Shear force-induced activation of integrin LFA-1 by chemokine CXCL12 under flows [J]. *J Med Biomech*, 2017, 32(6): 548-554.
- [19] OH-HORA M, RAO A. Calcium signaling in lymphocytes [J]. *Curr Opin Immunol*, 2008, 20(3): 250-258.
- [20] HOGAN PG, LEWIS RS, RAO A. Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI [J]. *Annu Rev Immunol*, 2010, 28(1): 491-533.
- [21] CLEMENS RA, LOWELL CA. Store-operated calcium signaling in neutrophils [J]. *J Leukoc Biol*, 2015, 98(4): 497-502.
- [22] HUANG B, LING Y, LIN J, *et al.* Force-dependent calcium signaling and its pathway of human neutrophils on P-selectin in flow [J]. *Protein Cell*, 2017, 8(2): 103-113.
- [23] 张力, 吴建华, 方颖. 流体剪应力作用下 E-选择素介导的中性粒细胞钙响应 [J]. *医用生物力学*, 2018, 33(2): 150-156.
- ZHANG L, WU JH, FANG Y. E-selectin mediated-calcium response of neutrophils under fluid shear stresses [J]. *J Med Biomech*, 2018, 33(2): 150-156.
- [24] JAFARNEJAD M, CROMER WE, KAUNAS RR, *et al.* Measurement of shear stress-mediated intracellular calcium dynamics in human dermal lymphatic endothelial cells [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015, 308(7): H697-706.
- [25] SCHORR W, SWANDULLA D, ZEILHOFER HU. Mechanisms of IL-8-induced Ca²⁺ signaling in human neutrophil granulocytes [J]. *Eur J Immunol*, 1999, 29(3): 897-904.
- [26] HUANG B, LING Y, LIN J, *et al.* Mechanical regulation of calcium signaling of HL-60 on P-selectin under flow [J]. *Biomed Eng Online*, 2016, 15(2): 637-646.
- [27] PAREKH AB, PUTNEY JW. Store-operated calcium channels [J]. *Physiol Rev*, 2005, 85(2): 757-810.
- [28] KIYOSHIMA D, KAWAKAMI K, HAYAKAWA K, *et al.* Force-and Ca²⁺-dependent internalization of integrins in cultured endothelial cells [J]. *J Cell Sci*, 2011, 124(22): 3859-3870.