论著

文章编号:1000-5404(2013)22-2426-04

缺氧微环境下微管相关蛋白4在人表皮细胞中的表达变化及对细胞迁移能力的影响

陈 鑫[1],张一鸣[1],石小花[1],邱 欣[2],樊东力[1] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院整形美容外科[1];610207 四川 泸州,泸州医学院临床系烧伤整形科[2])

[摘要] **目的** 在缺氧微环境下观察微管相关蛋白4(microtubule-associated protein 4,MAP4)在人永生化角质形成细胞株(HaCaT细胞株)中的表达变化及对细胞迁移能力的影响。**方法** 利用Western blot检测早期缺氧后(1% O_2,缺氧时间分别为0.5、1、3 h) MAP4在HaCaT细胞中的表达变化;设立正常细胞组、干扰MAP4组及阴性对照组(空病毒转染),采用免疫荧光、体外细胞划痕实验观察各组细胞缺氧后(1% O_2)其细胞骨架的主要成分α-微管蛋白(α-tubulin)的变化情况以及细胞迁移能力的变化。**结果** ①缺氧0.5 h,细胞中MAP4的表达会升高,随着缺氧时间延长(缺氧1、3 h),表达又迅速降低;②早期缺氧后各组细胞的微管动力学均发生变化,细胞骨架趋于松散解聚以利于迁移;③缺氧24 h后正常细胞组和阴性对照组的迁移能力较常氧24 h明显增强($P<0.05$);常氧状态下,干扰MAP4组细胞的迁移能力比正常细胞组和阴性对照组细胞明显减弱($P<0.01$),缺氧后细胞迁移能力未见明显增强。**结论** 缺氧微环境调控了HaCaT细胞MAP4的表达,进而影响了细胞微管动力学的变化,增强了细胞的迁移能力。

[关键词] 缺氧;表皮细胞;迁移;微管相关蛋白4
[中图法分类号] R322.991;R341;R364.4 [文献标志码] A

Expression of MAP4 in epidermal cells and its effect on cell migration under hypoxic microenvironment

Chen Xin[1], Zhang Yiming[1], Shi Xiaohua[1], Qiu Xin[2], Fan Dongli[1] ([1]Department of Plastic and Cosmetic Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [2]Department of Burn and Plastic Surgey, Faculty of Clinical Medicine, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan Province, 610207, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the expression of microtubule-associated protein 4 (MAP4) in epidermal cell line (HaCaT cells), and the effect of MAP4 on cell migration under hypoxic microenvironment. **Methods** All experiment samples were divided into 3 groups: HaCaT cell group, RNAi-MAP4 cell group and con-RNAi-HaCaT cell group. We detected the expression of MAP4 in HaCaT Cells under different hypoxic microenvironment (1% O_2 for 0.5, 1 and 3 h, respectively) by Western blotting. Besides, we observed the expression of α-tubulin, an important component of cytoskeleton by fluorescence immunoassay. In addition, the migration of HaCaT cells was observed by *in vitro* cell scratch experiment. **Results** (1) The expression of MAP4 in HaCaT cells was increased after hypoxia (0.5 h) and decreased rapidly with the duration of hypoxia (1 h and 3 h). (2) In the early period of hypoxia, microtubule dynamics of different cells in each group was changed. The cytoskeleton became depolymerized, showing a tendency to migrate. (3) The migration ability of normal HaCaT cells and con-RNAi-HaCaT cells significantly increased after 24 h under hypoxic microenvironment ($P<0.05$). Under normoxia, the migration of RNAi-HaCaT cell was poorer than that of HaCaT cells and con-RNAi-HaCaT cells ($P<0.01$), and not increased after hypoxia. **Conclusion** The hypoxic microenvironment can enhance the migration ability of HaCaT cells by regulating MAP4 expression.

[**Key words**] hypoxic; epidermal cells; migration; microtubule-associated protein 4

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81101436). Corresponding author: Fan Dongli, Tel: 86-23-68774647, E-mail: fdltmmu@sina.com

创面愈合是烧创伤的基本问题,如何促进皮肤创面的修复是烧伤治疗的主要任务。皮肤创伤后的自然愈合过程主要包括肉芽组织形成和创面再上皮化,而创面再上皮化过程中表皮细胞的迁移被认为是决定创

[基金项目] 国家自然科学基金(81101436)
[通信作者] 樊东力,电话:(023)68774647,E-mail:fdltmmu@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130807.1142.004.html(2013-08-07)

面愈合的关键步骤,也是目前创面愈合研究的焦点。目前研究认为,皮肤在急性损伤后会使创面处于缺氧状态,缺氧微环境可以促进表皮细胞的迁移,来完成创面愈合,体外实验也证实了缺氧微环境下表皮细胞的迁移增强[1],但具体机制不详。

表皮细胞的迁移涉及表皮细胞与细胞外基质的相互作用,细胞骨架的重组及细胞的非对称性分裂增殖等[2],而在细胞迁移的每一个步骤中,都包含着细胞骨架尤其是微管动力学的变化[3],需要一系列的生化级联反应来对微管动力学进行调控,以保证细胞迁移速度和方向的有效性和可控性。有研究证实缺氧可以调控微管动力学[4]。本研究就缺氧后微管相关蛋白4(microtubule-associated protein 4, MAP4)在表皮细胞中的表达变化及对细胞迁移能力的影响进行观察分析,建立细胞缺氧模型,采用体外细胞划痕实验、免疫荧光染色及Western blot技术观察HaCaT细胞在缺氧后细胞骨架的变化情况,以及MAP4在HaCaT细胞中的表达变化及其对细胞迁移能力的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料及仪器

HaCaT细胞株,购自上海中科院细胞研究所;MAP4的低表达载体及阴性对照构建,由上海吉凯基因化学技术有限公司提供;二氧化碳培养箱(Forma公司,美国);PMIRB荧光倒置显微镜(Leica公司,德国);Heraeus全能型高速冷冻离心机(Thermo公司,德国);Sonics vcx-750超声破碎仪(Sonics公司,美国)激光共聚焦(Leica公司,德国);垂直电泳仪(Bio-Rad公司,美国);蛋白转印仪(Bio-Rad公司,美国);Chemilmager 5500型自动电泳凝胶成像分析仪(Alpha Innotech公司,美国);干燥器;真空泵;电热恒温培养箱。

1.2 方法

1.2.1 缺氧细胞模型的建立 建立缺氧条件的表皮细胞(HaCaT细胞)培养模型。混合气体配方为:94% N_2,5% CO_2,1% O_2,由重庆朝阳气体有限公司配制。缺氧处理时间分别为:0.5、1、3 h及24 h。

1.2.2 细胞培养 实验分为3个组:正常细胞组、干扰MAP4组及阴性对照组(空病毒转染)。各组细胞均培养在含8%标准胎牛血清的1640培养液中,放置于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养,72 h左右传代1次,各组细胞实验时均分成常氧组(21% O_2)和缺氧组(1% O_2)。

1.2.3 MAP4低表达载体构建 MAP4低表达慢病毒载体的构建由上海吉凯基因化学技术有限公司完成。

1.2.4 体外细胞划痕实验 用Ⅰ型胶原(购自碧云天公司,中国)包被12孔细胞培养板,以细胞浓度大约1×10^5/孔接种于12孔板中,待细胞生长至90%以上融合后,加入丝裂霉素(mitomycin)C(购自碧云天公司,中国)至终浓度为1 μg/mL,作用2 h,PBS洗3遍,应用100 μL枪头在培养板底部中间位置行"1"划痕,PBS洗涤干净,加入无血清1640培养基,每组细胞设3个复孔,常氧(21% O_2)及缺氧(1% O_2)培养24 h后显微照相,测量划痕宽度,计算迁移率。

1.2.5 免疫荧光 当培养在细胞培养瓶中的各组细胞生长至80% ~90%时,用含0.1% EDTA的0.25%胰酶(购自碧云天公司,中国)消化,爬片于放置在6孔细胞培养板内的无菌盖玻片上,细胞密度长至50% ~70%时,分别缺氧(1% O_2)0.5、1 h及3 h,对照组为常氧(21% O_2),取出爬片,PBS洗尽培养液,随后依次4%多聚甲醛固定20 ~30 min,Triton X-100打孔30 min及10%山羊血清封闭0.5 h,孵育一抗放入4 ℃冰箱过夜(α-tubulin抗体1∶1 000,Abcam公司,美国;MAP抗体1∶500,Santa Cruz公司,美国),37 ℃孵育Cy3标记山羊抗小鼠二抗(1∶500,碧云天公司,中国)1 h,Hoechest 33342(1∶1 000,碧云天公司,中国)室温下染核5 min,50%甘油封片在激光共聚焦下观察细胞微管变化。

1.2.6 Western blot检测 将6孔板内培养好的各组细胞进行常氧(21% O_2)和缺氧(1% O_2)处理,缺氧时间为0.5、1、3 h及24 h。每孔加入200 μL含0.1% PMSF的RIPA细胞裂解液(北京鼎国公司,中国)提取细胞总蛋白(所有操作都在冰上进行),BCA法测定蛋白浓度,等量50 μg上样后经8%聚丙烯酰胺凝胶电泳约90 min,转膜(Millipore公司,美国)后经5%脱脂奶粉封闭2 h,一抗4 ℃过夜:小鼠抗人MAP4抗体(1∶800,Abcam公司,美国),鼠抗人GAPDH抗体(1∶5 000,Santa Cruz公司,美国)。二抗室温孵育2 h;MAP4抗体用辣根过氧化物酶HRP标记山羊抗小鼠(1∶1 000,碧云天公司,中国),GAPDH使用辣根过氧化物酶HRP标记山羊抗兔(1∶1 000,碧云天公司,中国);采用ECL显色试剂盒(碧云天公司,中国)于凝胶成像仪中显色观察蛋白表达情况。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用SPSS 20.0统计软件进行单因素方差分析,组间比较行 t 检验。

2 结果

2.1 各实验组细胞在常氧及缺氧条件下迁移能力的变化

用100倍倒置相差显微镜照相后下利用Photoshop CS2软件测量各组细胞划痕两侧未迁移的平均间距显示:正常细胞组和阴性对照组细胞在缺氧培养后,细胞迁移能力明显增强($P<0.05$)。常氧状态下,干扰MAP4组细胞的迁移能力比正常细胞组和干扰阴性对照组细胞明显减弱($P<0.05$),缺氧后细胞迁移能力未见明显增强。见图1、2。鉴于迁移实验已证实构建的阴性对照组细胞与正常组细胞无异,说明空病毒转染没有影响细胞正常功能,后续实验不再引用阴性对照组。

2.2 缺氧培养后各组细胞的微管动力学变化

在激光共聚焦显微镜下放大1 200倍观察细胞骨架显示,随着早期缺氧时间的延长(缺氧0.5、1 h及3 h),正常细胞组细胞的骨架主要蛋白α-tubulin(见红色荧光)开始解聚向四周聚集,核周荧光密度降低,整个细胞骨架变得疏松,细胞形态开始呈现多形性;干扰MAP4组在早期缺氧后,细胞骨架变化不明显,骨架主要蛋白α-tubulin未见明显的边集化趋势,细胞迁移能力受到明显抑制。见图3。

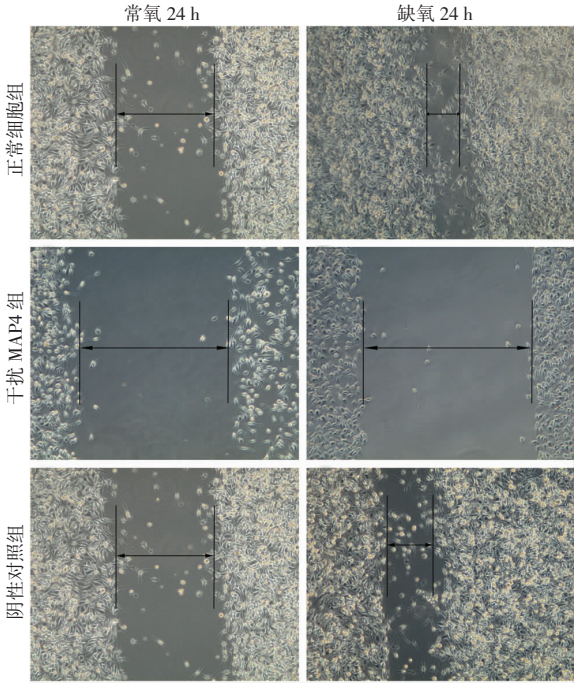
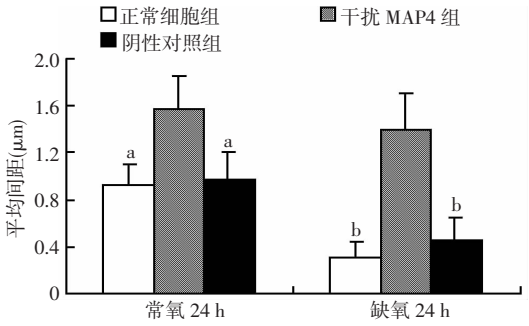


图1 各组细胞常氧和缺氧培养24 h后细胞划痕实验结果

（倒置相差显微镜 ×100）

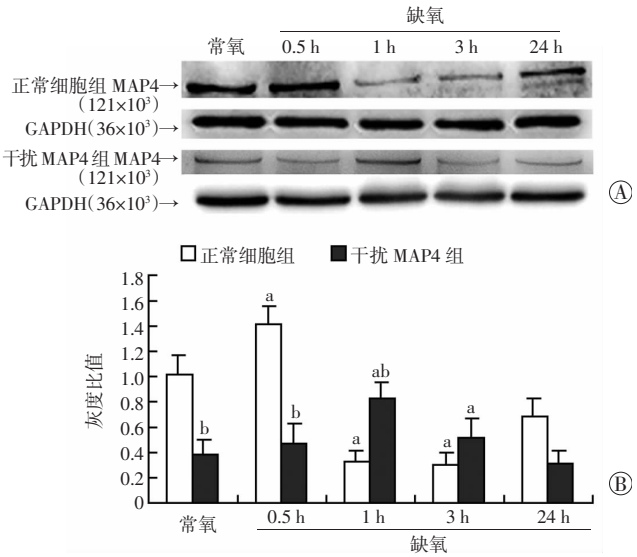


a：$P<0.05$，与干扰 MAP4 组比较；b：$P<0.05$，与常氧 24 h 比较

图2 常氧与缺氧培养下各组细胞迁移能力的比较

2.3 Western blot 检测缺氧后 HaCaT 细胞中 MAP4 蛋白的表达

采用凝胶成像仪成像后，以 GAPDH 作为内参观察 MAP4 的表达变化。结果显示，与常氧培养相比，正常细胞组在早期缺氧后（缺氧 0.5 h），MAP4 的表达会升高，随着缺氧时间的延长（缺氧 1 h 以上），表达会迅速降低（$P<0.05$），到缺氧达到 24 h 时，MAP4 的表达会慢慢恢复至常氧培养状态。常氧培养下，干扰 MAP4 组细胞 MAP4 的表达明显低于正常细胞组（$P<0.05$），相比常氧培养，缺氧 1 h 后，干扰 MAP4 组 MAP4 的表达稍升高（$P<0.05$），随缺氧时间的延长，表达随即降低（$P<0.05$）。相比正常细胞组，干扰 MAP4 组 MAP4 的表达变化程度有所减少。见图4。



A：Western blot 检测结果；B：半定量分析结果 a：$P<0.05$，与常氧比较；b：$P<0.05$，与正常细胞组比较

图4 缺氧后 MAP4 在正常细胞组及干扰 MAP4 组中的表达

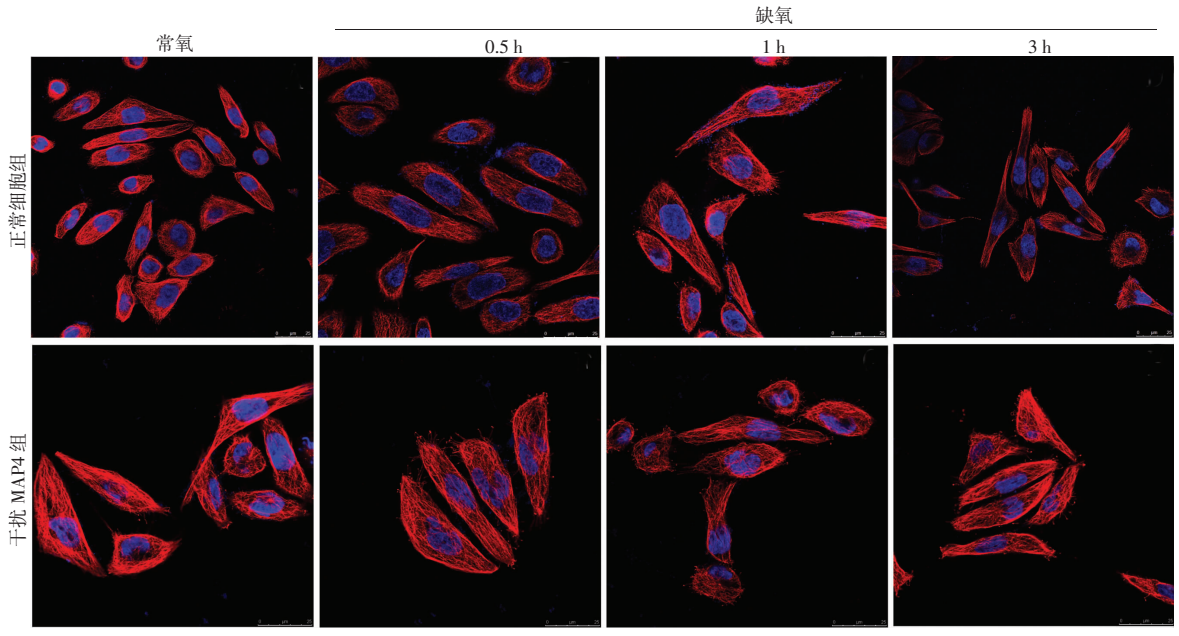


图3 激光共聚焦显微镜观察 HaCaT 细胞的微管动力学变化 （ ×1 200）

3 讨论

皮肤创伤后局部缺氧微环境调控表皮细胞迁移介导创面再上皮化,是影响创面愈合的重要因素,但分子调节机制不明。有研究表明,缺氧可以使表皮细胞的微管动力学发生变化,并增强细胞迁移能力[1],说明有特定分子参与了缺氧微环境调控表皮细胞的微管动力学变化并影响细胞迁移。

在已知的与微管动力学相关的分子中有可稳定微管的微管相关蛋白(microtuble-associated proteins, MAPs)[5-6],以及促进微管解聚的蛋白包括动力蛋白Kinesin、Stathmin和Katanin蛋白家族[7],微管稳定和微管解聚相关蛋白通过对微管动力学产生影响,发挥了包括细胞迁移在内的多种生物学功能。其中MAPs能与微管特意地结合在一起,扩展微管蛋白的生化功能。MAPs具有两个结构域:一个是碱性的微管蛋白结合结构域,另一个是酸性的外伸结构域。根据序列特点,可将MAPs分成两个主要的类型:Ⅰ型和Ⅱ型,其分布具有种属和细胞特异性。

本研究中MAP4属于Ⅱ型,有可与微管蛋白结合的18氨基酸重复序列,能提高微管的稳定性。MAP4主要在非神经细胞中表达,也是构成非神经细胞骨架中主要的微管相关蛋白之一[8]。MAP4包被在微管外部时,微管蛋白亚单位不能脱离微管末端,可稳定微管[9]。过度表达MAP4可刺激细胞微管蛋白二聚体总量增加,使细胞内动态不平衡的微管聚合/解聚反应朝向聚合态微管增多的方向进行[10]。有研究证实:MAP1、MAP2和tau等亚型主要在神经细胞中表达,并且与神经细胞迁移、微管动力学变化密切相关[5,11-12]。而缺氧时表皮细胞(HaCaT细胞)的微管动力学会发生变化且细胞迁移增强[2-3]。在本研究中,我们证实了缺氧(1% O_2)后HaCaT细胞的微管动力学会发生变化(图3),且细胞迁移能力明显增强(图1)。而缺氧后HaCaT细胞中MAP4的表达也发生明显改变(图4),说明缺氧微环境可以调控HaCaT细胞的微管动力学变化,使细胞骨架解聚/聚合的动态平衡被打破,开始朝解聚方向移动,以利于细胞迁移,MAP4参与了这一过程,并有可能在其中起着重要作用。进一步的研究证实了我们这一想法。常氧状态下,干扰HaCaT细胞中的MAP4后,细胞迁移能力明显降低,且缺氧后细胞迁移能力也未见明显增强,说明缺氧微环境调控了MAP4的表达,进而影响HaCaT细胞的微管动力学以及细胞迁移。而细胞迁移需要微管介导的细胞体的收缩、伸展等一系列复杂的过程,MAP4与微管的聚合和解聚状态相关,并不直接驱动微管等细胞骨架运动,因此,MAP4可能与微管动力学直接相关的蛋白分子存在相互作用关系,进而来影响HaCaT细胞的迁移,这需要在下一步的研究中来加以证实,以进一步明确其作用的分子机制。

综上所述,本研究证实了缺氧微环境可以调控人表皮细胞(HaCaT细胞)的微管动力学,使其细胞迁移能力得到加强,同时发现缺氧后MAP4的表达会发生变化。结合文献分析,我们考虑是缺氧微环境调控了MAP4的表达或者活性,来影响HaCaT细胞的微管动力学以及细胞迁移,并在实验中得到了证实,但在缺氧微环境中,表皮细胞通过MAP4来调控细胞迁移能力的具体作用机制还有待进一步研究。

参考文献:

[1] Schreml S, Szeimies R M, Prantl L, *et al*. Oxygen in acute and chronic wound healing[J]. Br J Dermatol, 2010, 163(2): 257-268.
[2] Gurtner G C, Werner S, Barrandon Y, *et al*. Wound repair and regeneration[J]. Nature, 2008, 453(7193): 314-321.
[3] van-Haren J, Draegestein K, Keijzer N, *et al*. Mammalian Navigators are microtubule plus-end tracking proteins that can reorganize the cytoskeleton to induce neurite-like extensions[J]. Cell Motil Cytoskeleton, 2009, 66(10): 824-838.
[4] Yoshie M, Miyajima E, Kyo S, *et al*. Stathmin, a microtubule regulatory protein, is associated with hypoxia-inducible factor-1alpha levels in human endometrial and endothelial cells[J]. Endocrinology, 2009, 150(5): 2413-2418.
[5] Gong C X, Iqbal K. Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau: a promising therapeutic target for alzheimer disease[J]. Curr Med Chem, 2008, 15(23): 2321-2328.
[6] Montenegro-Venegas C, Tortosa E, Rosso S, *et al*. MAP1B regulates axonal development by modulating Rho-GTPase Rac1 activity[J]. Mol Biol Cell, 2010, 21(20): 3518-3528.
[7] Hirokawa N, Noda Y, Yanaka Y, *et al*. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009, 10(10): 682-696.
[8] Webster D R, Bratcher J M. Developmental regulation of cardiac MAP4 protein expression[J]. Cell Motil Cytoskeleton, 2006, 63(8): 512-522.
[9] Holmfedt P, Brattsand G, Gullberg M. Interphase and monoastral-mitotic phenotypes of overexpressed MAP4 are modulated by free tubulin in concentrations[J]. J Cell Sci, 2003, 116(Pt 18): 3701-3711.
[10] Hu J Y, Chu Z G, Han J, *et al*. The p38/MAPK pathway regulates microtubule polymerization through phosphrylation of MAP4 and Op18 in hypoxic cells[J]. Cell Mol Life Sci, 2010, 67(2): 321-333.
[11] Utreras E, Jimenez-Mateos E M, Contreras-Vallejos E, *et al* Microtubule-associated protein 1B interaction with tubulin tyrosine ligase contributes to the control of microtubule tyrosination[J]. Dev Neurosci, 2008, 30(1/3): 200-210.
[12] Krishnan C, Higgins J P, West R B, *et al*. Microtubule-associated protein-2 is a sensitive marker of primary and metastatic neuroblastoma[J]. Am J Surg Pathol, 2009, 33(11): 1695-1704.

(**收稿**:2013-05-09;**修回**:2013-07-24)
(编辑 王小寒)