文章编号:1000-5404(2013)20-2181-06

论著

基底硬度对肝细胞胞间粘附复合物稳定性的影响

王红兵[1],张 持[1],杨 力[1], 邹小兵[2],于光磊[3],刘美霞[2],许 蓉[1],林 雨[1] (400044 重庆,重庆大学:生物工程学院[1],化学工程学院[2],数理工程学院[3])

[摘要] **目的** 通过比较汇合生长肝细胞(L02)对不同硬度基底(3.6、10 kPa和30 kPa)的响应,探查细胞间粘附复合物稳定性差异的成因。**方法** 运用实时显微拍摄观察L02细胞在不同硬度基底上的形态特征;采用免疫荧光染色技术检测细胞肌动蛋白骨架构象和β-连环蛋白表达分布;应用Western blot方法检测β-连环蛋白的表达及其磷酸化水平。**结果** ①不同硬度基底上汇合生长L02细胞间粘附复合物稳定性不同,在乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)作用下随基底硬度增加,细胞分离时间缩短;②汇合生长L02细胞在软基质上肌动蛋白骨架成皮质下环,β-连环蛋白分布于细胞连接处。随着基底硬度增大,细胞骨架环变得不完整,胞内骨架呈放射状分布,β-连环蛋白弥散分布于细胞质中;③随基底硬度增加L02细胞膜上β-连环蛋白表达显著降低($P<0.01$),细胞质中磷酸化的p-β-连环蛋白(Tyr654)的表达量显著增加($P<0.01$)。**结论** 基底硬度影响肝细胞粘附复合物稳定性,基底硬度越大复合物稳定性越差,这与基底硬度增加导致的p-β-连环蛋白(Tyr654)表达量增高有关。

[关键词] 肝细胞;基底硬度;粘附复合物;β-连环蛋白
[中图法分类号] R318;R322.41;R341 [文献标志码] A

Effects of substrate stiffness on stability of adhesion complexes of hepatic cells

Wang Hongbing[1], Zhang Chi[1], Yang Li[1], Zou Xiaobing[2], Yu Guanglei[3], Liu Meixia[2], Xu Rong[1], Lin Yu[1] ([1]College of Bioengineering, [2]College of Chemistry and Chemical Engineering, [3]College of Mathematical Engineering, Chongqing University, Chongqing, 400044, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of substrate stiffness on the stability of adhesion complexes of confluent hepatic (L02) cells cultured on substrates with different stiffness (3.6, 10, and 30 kPa). **Methods** Real-time photomicrography was applied to record the morphology of L02 cells. Immunofluorescence staining was used to test the distribution of F-actin and β-catenin. Western blotting was applied to detect the expression of β-catenin and its phosphorylation. **Results** Adhesion complexes of confluent L02 cells exhibited different stability when these cells were cultured on substrates with different stiffness. When treated with EDTA, L02 cells on rigid substrate separated more quickly than those on soft substrate. F-actin of confluent L02 cells formed a ring-like conformation under the cortical, and β-catenin located at the cell-cell contact sites on soft substrate. With the increase of substrate stiffness, the ring-like cytoskeleton reduced and more F-actin distributed in cytoplasm, and β-catenin exhibited a similar distribution. As the substrate stiffness increased, the expression of β-catenin on membrane decreased ($P<0.01$) while that of phosphorylated β-catenin (p-β-catenin, Tyr654) in cytoplasm increased significantly ($P<0.01$). **Conclusion** Substrate stiffness affects the stability of adhesion complexes of confluent L02 cells observably. The cells on rigid substrate show weaker adhesion, which may be induced by up-regulation of p-β-catenin (Tyr654) expression.

[**Key words**] hepatic cells; substrate stiffness; adhesion complexes; β-catenin

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China(31270990) and the Innovation and Attracting Talents Program for College and University("111" Project) (B06023). Corresponding author: Wang Hongbing, E-mail: whbdzx@yahoo.com.cn

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31270990);国家111计划资助项目(B0623)
[通信作者] 王红兵,E-mail: whbdzx@yahoo.com.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130619.1517.005.html(2013-06-19)

细胞连接在有机体内的组织形成、发育过程中起着重要作用,特别对上皮和内皮细胞层的形成和功能维持具有重要意义[1]。在上皮细胞中,细胞间的连接主要包括紧密连接、粘附连接和间隙连接3种类型[2]。其中粘附连接是上皮细胞间连接中最为重要的连接方式,它的稳定性直接决定了细胞间连接的完整性[3]。

细胞间粘附连接的基础是钙黏素/连环蛋白复合物,其中β-连环蛋白担当了极其重要的作用,一方面它的C端连接E-钙黏素,另一方面N端通过α-连环蛋白连接至细胞骨架[4],因此它在一定程度上决定了细胞连接复合物的稳定性。有研究指出β-连环蛋白酪氨酸残基654(Tyr654)与E-钙黏素和β-连环蛋白亲和性有密切关系,这一位点通过Src酪氨酸激酶磷酸化,导致β-连环蛋白与E-钙黏素解离,削弱细胞连接[5-6]。

组织内的细胞不仅与毗邻细胞相互连接,它们与胞外基质同样具有粘附作用。对于汇合生长的细胞,由于细胞之间也同时存在着粘附作用,而使整个组织(汇合细胞)通过细胞骨架与胞外基底形成统一的力学作用结构,即广义的大骨架张力整合体系。在这一体系中,细胞骨架是结构基础,是力的直接承受者和传递者,细胞之间的连接作用与细胞和基底的粘附作用存在着特定的平衡关系。因此,对于细胞粘附作用具有重要影响的基底物理特性,特别是基底硬度,也必将对细胞间连接产生重要的调控作用[7]。本研究拟通过比较分析不同硬度基底上肝细胞胞间连接的特征及细胞间连接位点分布变化和相关调节分子活性,探索肝细胞胞间粘附复合物稳定性的成因,加深对细胞连接本质特征的认识。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人源正常肝细胞株(L02)购于中国科学院上海细胞库。用添加10%胎牛血清的RPMI1640培养基(HyClone)于37 ℃,5% CO_2条件下培养。

1.2 聚乙烯醇水凝胶的制备及力学特性测定

正常肝组织的硬度为2.5~5 kPa,肝纤维化中后期和末期硬度分别为6.3~13.9、16.3~48 kPa[8-9],因此我们选定聚乙烯醇水凝胶基底的硬度为3.6、10、30 kPa分别对应模拟正常肝组织、肝纤维化中后期及末期的硬度。

聚乙烯醇水凝胶具有较高的含水率,以及与人体内高含水大分子化合物材料的相似性,因此具备良好的亲水性和生物相容性,并且安全无毒,硬度可控。聚乙烯醇水凝胶基底的制备主要参照文献[10]进行。将聚乙烯醇、戊二醛、浓盐酸按不同配比制成的水凝胶用拉伸法测定其弹性模量,从而找出3.6、10、30 kPa所对应的配方;HEPES溶液浸泡冲洗,1 mmol/L sulfosuccinimidyl-6-[4-azido-2-nitrophenylamIno] -vhexanoate(Sulfo-SANPAH)活化膜表面,裱衬10 μg/mL人纤连蛋白(fibronectin,FN),4 ℃过夜,接种细胞前用PBS漂洗,培养至细胞汇合。

1.3 汇合细胞形态观察

使用奥林巴斯CKX41显微镜和奥林巴斯C-5060 Wide Zoom数码照相机,对汇合生长的L02细胞进行显微观察和拍摄。本研究用细胞球形指数(cell conform factor,CF)表征汇合细胞形态特征:

$$CF = C^2/(4\pi S)$$

式中C代表细胞周长(μm),S代表细胞面积(μm^2),π取3.14。用Image J测定C和S,每组随机选取60个细胞,数据测量重复3次。计算CF,并绘出CF的对比图。

1.4 汇合细胞粘附连接稳定性的检测

将L02细胞分别接种于3.6、10 kPa和30 kPa基底上培养48 h,至细胞长成汇合状态。将细胞培养液换为含0.2 g/L[参照胰蛋白酶细胞消化液中乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)的浓度]的RPMI1640培养基继续培养,并置于相差显微镜下观察,采用奥林巴斯C-5060 Wide Zoom数码照相机定点拍照记录细胞形态(每5 min拍摄1张)直至细胞与细胞明显分离。用Image J对细胞周长和细胞面积进行测量,并计算缩小比。

1.5 汇合细胞肌动蛋白骨架、β-连环蛋白的激光共聚焦显微镜检测

培养L02细胞呈汇合生长。5%戊二醛固定60 min,0.5% Triton X-100透化处理10 min,5%山羊血清封闭1 h,加rabbit anti-Human β-catenin(proteintech group, 1/100)和TRITC-phalloidin(Sigma,1/100),4 ℃过夜,加FITC-goat anti-rabbit二抗(康为世纪,1/100)37 ℃ 2 h,甘油/PBS(体积比=1/1)封片。所有图像均通过Nikon Eclipse TE300显微镜的BioRad Radiance 2000激光聚焦系统获得。

1.6 Western blot测定汇合细胞膜上β-连环蛋白和细胞质中β-连环蛋白(phosphor Tyr654)表达水平

分别收集3.6、10 kPa和30 kPa基底上汇合生长的L02细胞,用膜蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒(凯基生物)分别提取细胞膜蛋白和细胞质蛋白,BCA法定量。常规制胶、上样,进行转膜,剪取相应分子量的PDVF膜分别加入rabbit anti-Human β-catenin(proteintech group,1/500)单克隆抗体和rabbit anti-Human β-catenin(phosphor Tyr654)单克隆抗体(Sigma,1/500),4 ℃摇床孵育过夜。TBST漂洗后再分别加入HRP-goat anti-rabbit IgG(联科生物,1/500)于37 ℃摇床温育1 h。最后用DAB显色,GS-800标准光密度仪照相,Quantity one定量分析。

1.7 统计学分析

计量资料以$\bar{x} \pm s$表示,两组数据间的差异性比较采用

SPSS 13.0 统计软件做 t 检验。

2 结果

2.1 聚乙烯醇水凝胶复合模量测定

图1显示交联剂戊二醛与聚乙烯醇不同物质的量比与弹性模量的相互关系,其弹性模量的范围可控制在2~30 kPa之间。通过拉伸法对不同配比的水凝胶弹性模量的测定,得到3.6、10、30 kPa水凝胶所需的交联剂戊二醛及催化剂HCl配方如表1所示。

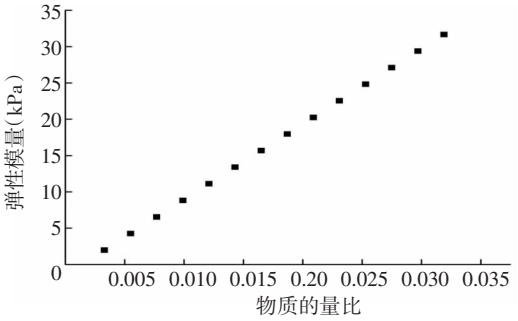


图1 聚乙烯醇水凝胶弹性模量与聚乙烯醇/交联剂戊二醛不同物质的量比的关系

表1 聚乙烯醇水凝胶基底配方

聚乙烯醇凝胶硬度(kPa)	聚乙烯醇(g)	戊二醛(μL)	HCl(μL)
3.6	33.333	45	120
10	33.333	110	80
30	33.333	300	70

2.2 基底硬度对汇合生长L02细胞形态的影响

在3.6、10、30 kPa基底上接种L02细胞培养48 h,直至细胞生长成为汇合状态,观察细胞形态特征。图2显示L02细胞在3.6、10 kPa和30 kPa基底上汇合生长后的细胞形态。每个硬度上随机选取60个细胞,用Image J测定在这些不同硬度上的细胞球形指数。在3.6 kPa基底上,细胞球形指数集中在1.0~1.2(1.091±0.050),10 kPa基底上细胞球形指数主要集中于1.1~1.5(1.368±0.233),而30 kPa基底上,球形指数主要集中于1.3~1.8(1.519±0.226),基底硬度增加细胞球形指数增大,组间存在显著性差异($P<0.01$)。

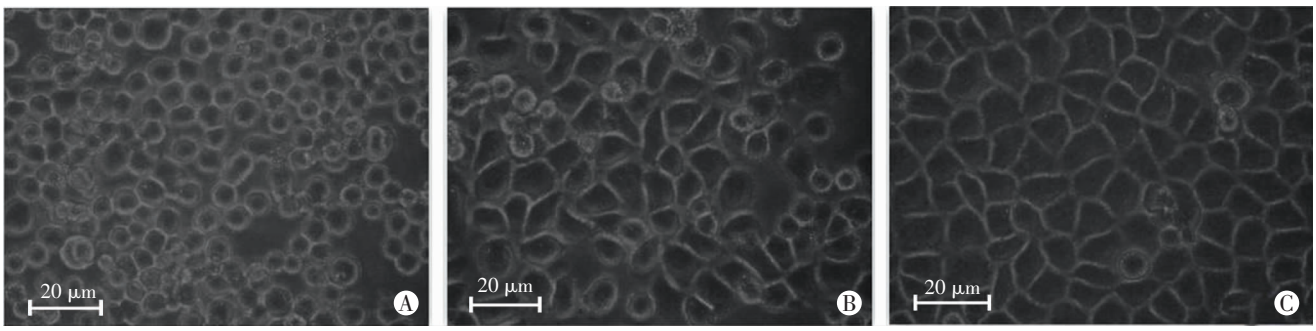
2.3 基底硬度对汇合生长L02细胞间连接稳定性的影响

定点连续观察细胞形态随EDTA作用时间的变化趋势显示:L02细胞在3.6 kPa基底上由汇合状态到细胞-细胞间连接破坏这一阶段需要60 min,在10 kPa基底上需要30 min,在30 kPa基底上只需要20 min。在3种硬度基底上生长的汇合状细胞有呈现出多边形的形态特征,EDTA作用后先出现变圆即多角形逐渐丧失,后出现铺展面积缩小而逐渐分离(图3)。前者可以用细胞周长的变化来表征细胞直径的变化,由于细胞间发生分离,而产生细胞间隙,后者可以通过细胞间隙的面积(即细胞缩小的面积)来衡量细胞分离的程度。本研究中通过细胞面积缩小比率和细胞周长缩短比率来描述EDTA对细胞连接破坏的程度。

如图4所示,在上述3个不同硬度的基底上细胞的铺展面积和周长随时间的延续而减小,但比较3种硬度基底上,细胞面积和周长减小速率不同,基底硬度越硬时间越短,亦即面积和周长减小相同的比例所需时间随基底硬度增加而减少。结果显示,在3.6、10、30 kPa硬度基底上,细胞周长缩小比率和时间分别为80.46%,60 min;80.02%,30 min;70.37%,20 min,面积缩小比率和时间分别为71.02%,60 min;69.58%,30 min;70.33%,20 min,($n=60$)。细胞铺展面积和周长减小所需时间反映细胞间连接稳定性的强弱,实验结果说明L02细胞在软质基底上细胞连接稳定性较强,并随基底硬度增加而减弱。

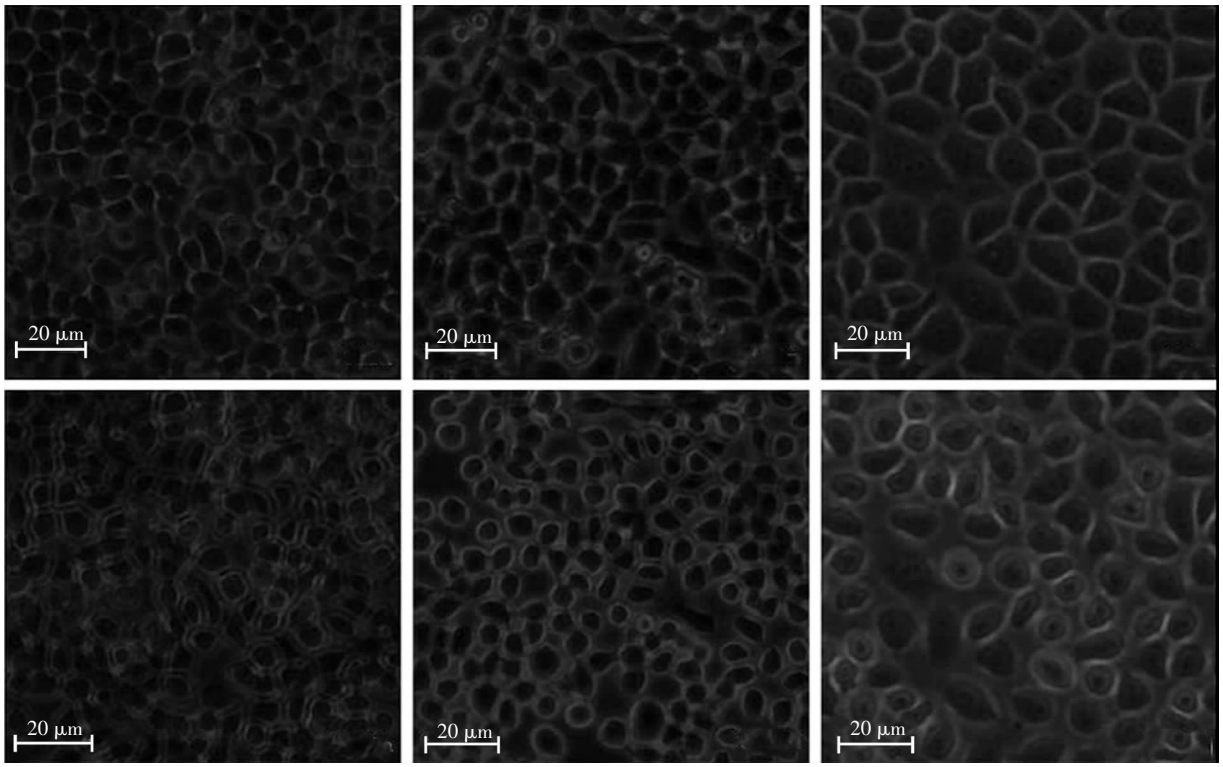
2.4 基底硬度对汇合生长L02细胞中肌动蛋白骨架构象及β-连环蛋白分布的影响

L02在3.6、10 kPa水凝胶基底上均可形成镶嵌联结,皮质下有环状肌动蛋白骨架出现,但在30 kPa基底上L02肌动蛋白骨架皮质下环不完整,呈丝状分布,荧光减弱。图中也显示出汇合生长的L02细胞在3.6、10 kPa和30 kPa基底上β-连环蛋白的分布,结果发现,β-连环蛋白与细胞肌动蛋白骨架分布特征相似,但在不同硬度基底上表现不同。在软质基底上,细胞肌动蛋白骨架装配成皮质下环,β-连环蛋白荧光强度相对较强。随着基底硬度的增加,细胞骨架在细胞膜处较为松散、胞质内亦有分布,β-连环蛋白在膜周围的荧光强度也明显减弱(图5)。



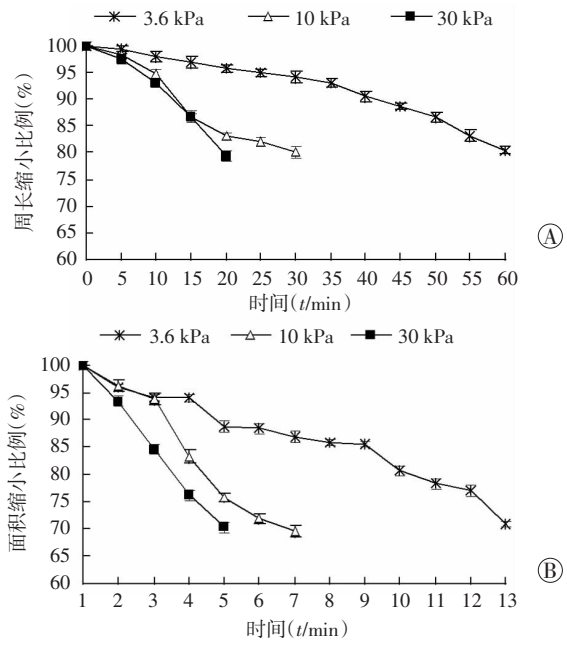
A:3.6 kPa;B:10 kPa;C:30 kPa

图2 相差显微镜观察不同基底硬度对汇合生长L02细胞形态的变化



A、D：分别表示细胞培养在3.6 kPa上未加和加入EDTA 60 min；B、E：分别表示细胞培养在10 kPa上未加和加入EDTA 30 min；C、F：分别表示细胞培养在30 kPa上未加和加入EDTA 20 min

图3 相差显微镜观察不同硬度基底上细胞对乙二胺四乙酸的响应

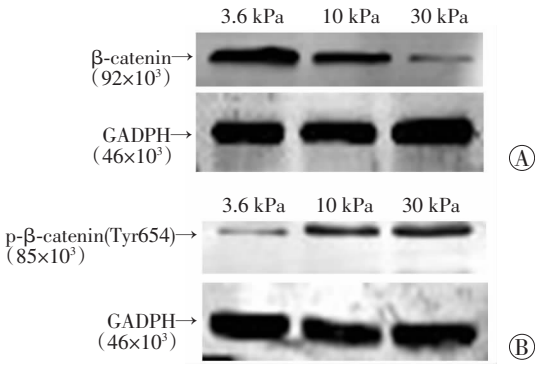


A：细胞周长缩小比例；B：细胞面积缩小比例

图4 不同基底硬度对汇合生长LO2细胞间连接稳定性的影响 ($n=60$, $\bar{x}\pm s$)

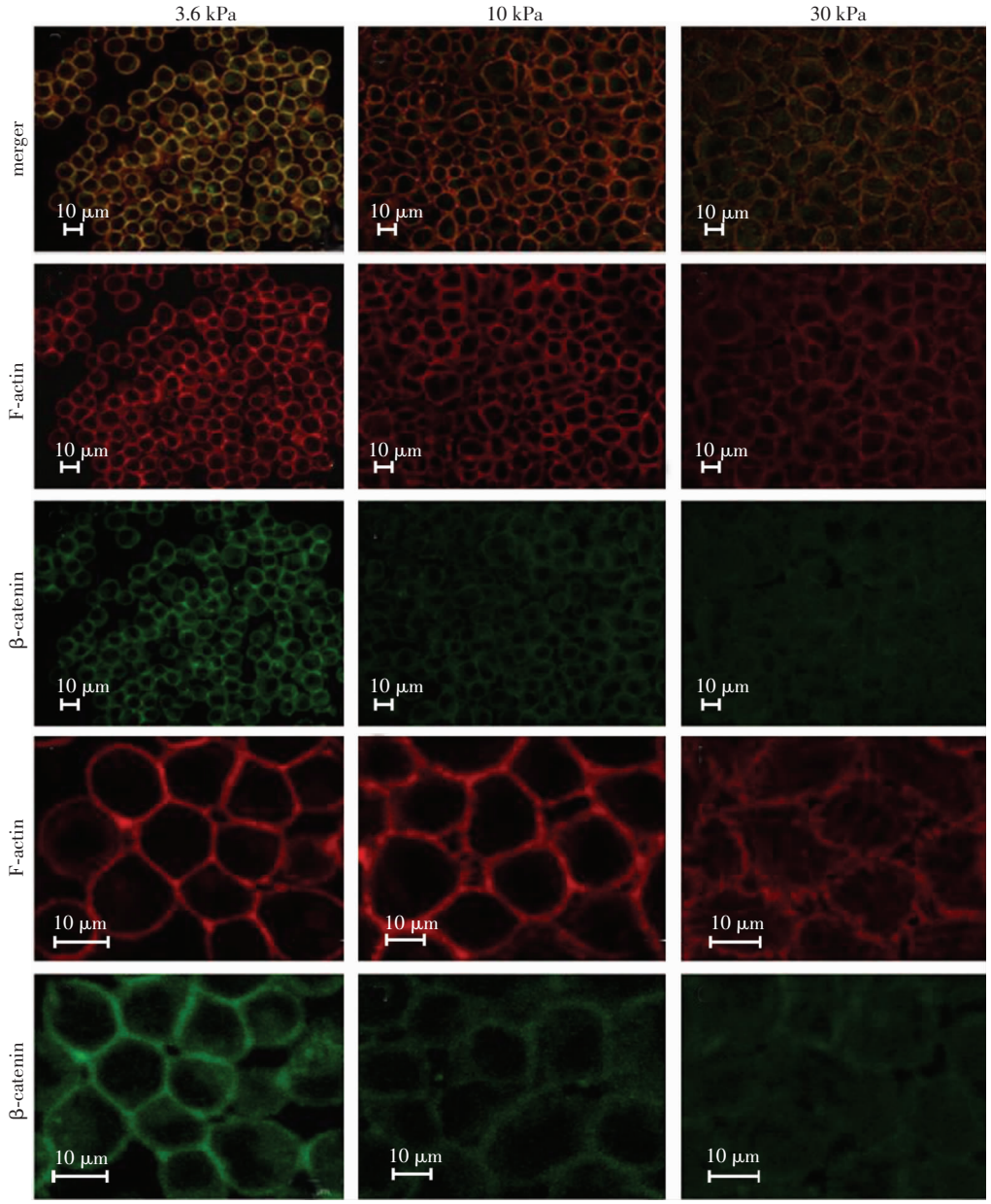
2.5 基底硬度对汇合生长L02细胞膜上β-连环蛋白和细胞质中磷酸化的p-β-连环蛋白(Tyr654)表达水平的影响

图6所示不同基底硬度上汇合生长L02细胞膜上β-连环蛋白的表达与细胞质中p-β-连环蛋白(Tyr654)表达水平的比较，结果显示随基底硬度增加，L02细胞膜上β-连环蛋白表达量降低，10 kPa基底上细胞β-连环蛋白表达量较3.6 kPa基底上低30%；30 kPa基底上细胞β-连环蛋白较10 kPa基底上低72%。细胞质中β-连环蛋白酪氨酸654的磷酸化水平上调，10 kPa基底上细胞β-连环蛋白酪氨酸654磷酸化水平较3.6 kPa基底上高110%；30 kPa基底上β-连环蛋白酪氨酸654磷酸化水平较10 kPa基底上高33%，组间存在显著差异($P<0.01$)。



A：不同硬度下细胞膜上β-catenin的Western blot结果；B：不同硬度下细胞质中p-β-catenin(Tyr654)的Western blot结果

图6 不同基底硬度对汇合生长L02细胞膜上β-catenin和细胞质中p-β-catenin(Tyr654)表达水平的影响



绿色荧光示β-连环蛋白,红色荧光示肌动蛋白骨架

图5 激光共聚焦显微镜观察基底硬度对汇合生长L02细胞β-连环蛋白分布和细胞骨架的影响

3 讨论

细胞生长的物理环境对其生物学行为的影响不容忽视,其中基底硬度对细胞具有广泛的影响。本课题着重研究了基底硬度对细胞连接粘附复合物稳定性的影响,并对其可能原因进行了探讨。实验数据表明:正常肝细胞在较软(3.6 kPa)、较硬(10 kPa)和硬基质(30 kPa)3种基底上均可形成汇合生长,但在软基底上多为圆形,在硬基底上细胞呈多边形,考查其形态学特征随基质硬度的变化发现:细胞球形指数受基底硬度调控,球形指数随基底硬度的增加而升高,越软的基底上细胞越趋近于圆形。在汇合细胞中加入EDTA后,细胞-细胞间的连接逐渐被破坏,细胞逐渐分离。不同硬度上的细胞对EDTA的响应不同,随着基质硬度的增加,细胞从汇合状态到细胞-细胞间连接的破坏所需的时间也相应地缩短,表明在不同硬度的基底上细胞连接复合物稳定性有显著差异。

30 kPa基底上的细胞-细胞间连接稳定性显著低于3.6 kPa基底上的细胞。通过对细胞免疫荧光染色发现:在较软基底上汇合细胞有紧密的细胞连接,还可见相邻细胞间接触处β-连环蛋白分布丰富,肌动蛋白骨架沿皮质下呈环状排列,使细胞形成稳定的胞间连

接。而在硬基质基底上,相邻细胞间的β-连环蛋白向胞内弥散分布,肌动蛋白骨架倾向于形成应力纤维,皮质下环不完整,呈现有接触连接少的状态。Western blot结果显示,不同基底硬度上汇合生长细胞膜上β-连环蛋白的表达随基底硬度增加而降低,细胞质中p-β-连环蛋白磷酸化(Tyr654)表达水平随基底硬度增加而升高。本课题组前期的研究工作显示[11],随着基底硬度的增加,L02细胞E-钙黏素表达量降低,Src激酶活性增高,这与本研究结果非常相符。β-连环蛋白和E-钙黏素作为粘附连接钙黏素/连环蛋白复合物的重要组成分子,其分布和表达具有很大程度上的相似性。此外二者的亲和力与β-连环蛋白酪氨酸残基654位点(Tyr654)的磷酸化水平有关,而这一位点磷酸化的上游事件是Src激酶的激活[7]。Src激酶涉及的信号通路很多,因此其相关信号通路与力-化学信号转导的关系还有待进一步研究,但可以推测,本研究中基底硬度升高导致的细胞连接弱化与Src活化引起的β-连环蛋白磷酸化水平升高有关,并且这一过程受到基底硬度影响的细胞骨架构象变化调控。

生物物理信号如何转化为生物化学信号是生物力学的研究热点之一,目前还没有发现明确的相关信号通路。一般认为,在体内或者体外培养的细胞都需要与周围的物体粘附,形成稳定的定位。一方面形成黏着斑(或粘附复合物)与基底粘附[12];另一方面通过细胞连接与毗邻的细胞粘附,由于细胞能承受的约束力是有限的,因此这两种粘附作用存在着特定的平衡关系,此消彼长。细胞骨架作为两种粘附作用力的主要承受者,维持着这种平衡关系。在不同的力学环境下,细胞骨架具有不同的装配方式,从结构基础上调整细胞形态、胞间连接方式等细胞行为。同时,细胞骨架的分布和装配形式的差别也将影响其附近多种酶的活性,通过磷酸化与去磷酸化作用使这些力学信号转化为生物学信号,并逐级传递下去[13]。

对于组织或体外培养的群体细胞,细胞连接和骨架构象对于其表型和功能的维持具有极其重要的意义。在肝纤维化病变过程中,早期的损伤与炎性反应是病变发生的主要成因。而在病理进程中,基质硬度的增加很可能是病变恶化的重要推手。本研究发现,随着基底硬度的增加,细胞形态发生改变,细胞间连接弱化。同样,纤维化病变中基质逐渐硬化,也必将导致细胞表型的改变和细胞连接的破坏,进而导致整个组织功能的丧失和稳定性的破坏。这种情况通常会激发病理重建,而不断的病理重建的结果往往是组织进一步硬化,使病变不断恶化,难以逆转。因此在纤维化病变中组织的硬化程度不仅是疾病诊断的重要依据,也可能是重要的治疗靶点。

参考文献:

[1] Morton P E, Parsons M. Dissecting cell adhesion architecture using advanced imaging techniques[J]. Cell Adh Migr, 2011, 5(4): 351-359.

[2] Giepmans B N, van-Ijzendoorn S C. Epithelial cell-cell junctions and plasma membrane domains[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1788(4): 820-831.

[3] Hartsock A, Nelson W J. Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton[J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1778(3): 660-669.

[4] Feng Y, Sun X, Yang H, *et al*. Dissociation of E-cadherin and beta-catenin in a mouse model of total parenteral nutrition: a mechanism for the loss of epithelial cell proliferation and villus atrophy[J]. J Physiol, 2009, 587(Pt 3): 641-654.

[5] Tian X, Liu Z, Niu B, *et al*. E-cadherin/β-catenin complex and the epithelial barrier[J]. J Biomed Biotechnol, 2011, 2011: 567305.

[6] Taurin S, Sandbo N, Qin Y, *et al*. Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase[J]. J Biol Chem, 2006, 281(15): 9971-9976.

[7] 王红兵,林雨,杨力,等. 基底硬度和表面形貌对细胞生物学行为的影响[J]. 细胞生物学杂志, 2009, 31(5): 608-614.

[8] Masuzaki R, Tateishi R, Yoshida H, *et al*. Assessing liver tumor stiffness by transient elastography [J]. Hepatol Int, 2007, 1(3): 394-397.

[9] Saito H, Tada S, Nakamoto N, *et al*. Efficacy of non-invasive elastometry on staging of hepatic fibrosis [J]. Hepatol Res, 2004, 29(2): 97-103.

[10] Zhang D, Duan J, Wang D, *et al*. Effect of preparation methods on mechanical properties of PVA/HA composite hydrogel[J]. Journal of Bionic Engineering, 2010, 7(3): 235-243.

[11] 张荣, 王红兵, 杨本艳姿, 等. 基底硬度对肝细胞和肝癌细胞融合生长的影响[J]. 医用生物力学, 2013, 28(1): 91-96.

(**收稿**:2013-03-27;**修回**:2013-04-27)

(编辑 张 维)