

p38 在机械张应力诱导皮肤成纤维细胞运动中的作用

黄文, 赵建武

(重庆医科大学附属第一医院血管外科, 重庆 400013)

[摘要] 目的:观察 p38 在周期性张应力诱导皮肤成纤维细胞运动中的作用,探讨机械张应力诱导成纤维细胞运动的信号转导机制。方法:将成纤维细胞培养于预敷胶原蛋白基质的 6 孔柔性培养板,对柔性培养孔施加 10 次/min 的负压(-135 mmHg)。以倒置显微镜观察细胞旋转角度以及 p38 抑制剂 SB203580 处理后的细胞运动,免疫印迹观察细胞内 p38 磷酸化。结果:机械张应力刺激成纤维细胞 4 h 后,80% 的细胞垂直于张应力方向旋转 60°~90°。张应力刺激 5 min 后,细胞内 p38 磷酸化达到峰值,p38 抑制剂 SB203580 部分抑制成纤维细胞运动。结论:机械张应力通过诱导 p38 磷酸化调控皮肤成纤维细胞运动。

[关键词] 周期性张应力; 细胞运动; p38

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2011.04.016

Role of p38 in cyclic strain induced fibroblast orientation

HUANG Wen, ZHAO Jianwu

(Department of Surgery, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400013, China)

Abstract: **Objective** To assess the role of p38 in fibroblast orientation and to explore the cell signal transduction mechanism of cyclic strain induced cell orientation. **Methods** Fibroblasts were seeded onto collagen coated flexible membranes. Membranes were then deformed at 10 cycles per minute under 135 mmHg subatmospheric pressure. Orientation angles of cells treated with or without SB203580 were measured with inverted microscope. P38 phosphorylation was analyzed with Western blot. **Results** Eighty percent cyclic strain induced cells rotated from 60° to 90° perpendicular to stretch direction after 4 h strain exposure. P38 phosphorylation reached the peak at 5 min. Fibroblast orientation was inhibited after SB203580 treatment. **Conclusion** Fibroblast orientation in response to cyclic strain is mediated by p38 phosphorylation.

Key words: cyclic strain; cell migration; p38

皮肤成纤维细胞(dermal fibroblast)和所有细胞一样,生存于有各种机械张应力的生理环境,例如肺组织成纤维细胞可感受肺扩展的张应力,皮肤组织成纤维细胞感受肢体运动所致的张应力,而一些治疗手段如皮肤扩张器对细胞施加更大强度的机械应力。有报道^[1],一种新的伤口治疗仪器伤口负压治疗仪(vacuum assisted closure, VAC)可促进伤口愈合

加快,但其具体机制尚不清楚。成纤维细胞在伤口愈合过程中的作用非常重要,成纤维细胞由伤口周围向创面移动、增生;而体外培养同样发现机械应力影响成纤维细胞迁移、增生、蛋白合成和基因表达^[2]。机械应力调控成纤维细胞运动的机制尚不明。

丝裂素活化蛋白激酶(mitogen activated protein

收稿日期(Date of reception) 2010-11-14

作者简介(Biography) 黄文,硕士,副教授,副主任医师,主要从事细胞力学研究。

通信作者(Corresponding author) 黄文, E-mail: dhuangwen@hotmail.com

kinase, MAPK)属于丝蛋白/苏氨酸激酶,是一类将胞外刺激信号转换至细胞核内的重要分子,其家族成员包括 JNK, p38 和 ERK 蛋白,具有参与基因表达调控、细胞增殖和死亡的重要机制,在多种受体信号转导途径中均具有关键性作用。研究^[3,4]报道该蛋白家族与细胞运动有密切关系;但何种蛋白介导细胞运动还不清楚。在不同细胞类型以及细胞外基质中, JNK, p38 和 ERK 扮演的作用不同^[3], p38 参与血管平滑肌细胞的迁移,却与内皮细胞迁移无关^[4]。p38 在机械张应力诱导的人皮肤成纤维细胞运动中的作用还不十分清楚。本实验拟研究周期性机械张应力(cyclic strain, CS)对人皮肤成纤维细胞运动的影响,旨在探讨 p38 在人皮肤成纤维细胞运动中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料

细胞为正常人体包皮成纤维细胞(human forehead dermal fibroblast, HFF), DMEM 细胞培养液为美国 Gibco-BRL 公司产品、胎牛血清为美国 Gemini 公司产品。免疫印迹实验兔抗人 p38 抗体和二抗为羊抗兔辣根过氧化物酶 IgG 抗体为美国 Cell Signaling 公司产品; SB203580 为美国 Calbiochem 公司产品; 细胞培养板为 6 孔柔性细胞培养板, 系美国 Flexcell 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

人体包皮成纤维细胞经过原代培养、传代, 实验采用 6~10 代细胞。实验细胞转种于 I 型胶原蛋白预处理的 6 孔柔性细胞培养板, 实验细胞密度为 70%~80%。

1.2.2 周期性应变施加

Flexcell 负压仪(X-4000; Flexcell 公司)对柔性培养孔施加周期性负压(-135 mmHg, 10 次/min)。由于柔性培养孔的物理特性, 培养孔具有恒定张应力变化曲线, 培养孔中心没有张应力, 最大张应力位于培养孔外周, 外周细胞被施以 10%~24% 幅度张应力^[5]。

1.2.3 细胞旋转角度测量

预实验显示细胞在 4 h 张应力暴露后出现明显旋转, 故将细胞张应力暴露时间点设为 0, 4 h。部分 4 h 张应力暴露组细胞用 p38 抑制剂 SB203580 预处理(30 $\mu\text{mol/L}$, 4 h), 观察 SB203580 对细胞旋转的影响。采用丙酮固定细胞, 姬姆萨细胞染色。以倒

置显微镜拍摄细胞于培养孔中央无张力处和外周张应力最大处(24% 张应力, 距中央 9.7 mm)。用 Scion Image 软件测量细胞角度, 每张照片测量 70~100 个细胞, 由于预实验显示多数细胞在张应力作用下作垂直张应力方向旋转约 60°~90°, 故设定细胞长轴与张应力方向平行的细胞角度为 0°, 细胞长轴垂直于张应力方向为 90°; 将 0°~29° 定义为无旋转, 30°~59° 定义为 I° 旋转, 60°~90° 定义为 II° 旋转, 计算不同旋转幅度细胞数的构成比。

1.2.4 p38 磷酸化免疫印迹

根据预实验结果和文献^[6], 张应力暴露时间点为 0, 15 s, 1 min, 5 min, 30 min。静止时间点细胞的 p38 磷酸化作为背景对照。以冰 PBS 冲洗细胞, 细胞裂解液溶解细胞, 收集上清液, 等量上样(38 $\mu\text{g/孔}$), 10% SDS-PAGE 凝胶电泳, 醋酸纤维膜转膜, 1% BSA 封闭 1 h, TBST 洗涤, 分别以一抗兔抗人 p-p38 抗体(1:500)孵育(4 °C、过夜), 羊抗兔辣根过氧化物酶 IgG 二抗(1:1 000)孵育(37 °C, 1 h), X 光片放射自显影。其中总 p38 为上样对照, 条带灰度以图像软件 Image-J 处理分析。

1.3 统计学处理

细胞旋转资料分析采用 χ^2 检验。对 p38 免疫印迹采用 ANOVA 分析, 均数比较采用 *t* 检验。所有分析采用 JMP 软件(SAS Institute, Inc., Cary, NC)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 张应力诱导成纤维细胞旋转

4 h 张应力暴露后, 培养孔 24% 张应力区域(9.2~10.7 mm) 80% 细胞角度为 60°~90°(II° 旋转), 24% 张应力区域与 0 张应力区域(0~1.7 mm) 比较, 其细胞角度差异有统计学意义($P < 0.05$, 图 1)。

2.2 p38 抑制剂 SB203580 阻断张应力诱导的细胞旋转

张应力暴露组予以 SB203580 预处理, 细胞暴露周期性张应力 4 h, 发现在 24% 张应力区域(9.7 mm) 仅 59% 的细胞角度为 60°~90°(II° 旋转); 而无 SB203580 应力暴露组 80% 细胞角度为 60°~90°(II° 旋转), 二者比较差异有统计学意义($P < 0.05$, 图 2)。经 SB203580 处理的静止对照组和未经 SB203580 处理的静止对照组细胞角度变化没有差别(实验结果未附)。

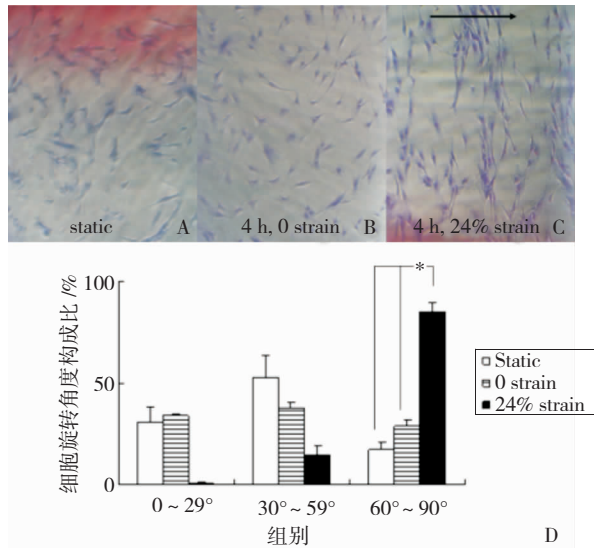


图 1 10 次/min 张应力作用 4 h 诱导成纤维细胞旋转。A: 静止对照组 (姬姆萨染色, $\times 100$); B: 0 张应力区域 ($\times 100$); C: 24% 张应力区域, 箭头示张应力方向 ($\times 100$); D: 24% 张应力细胞 $60^\circ \sim 90^\circ$ 旋转的构成比与静止对照、0 张应力比较差异有统计学意义 ($* P < 0.05$)。

Fig. 1 Fibroblast rotation induced by 10 cpm cyclic strain for 4 h. A: Static group (Gemsa staining, $\times 100$); B: 0 cyclic strain ($\times 100$); C: 24% cyclic strain. Arrow indicates strain direction ($\times 100$); D: Statistic difference between 24% cyclic strain and static or 0 cyclic strain ($* P < 0.05$).

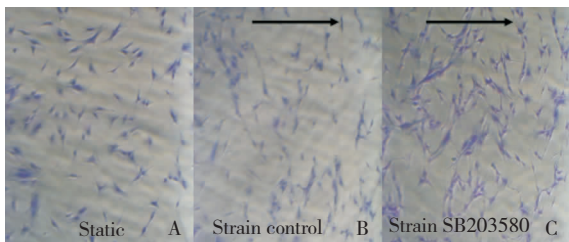


图 2 SB203580 预处理后细胞旋转角度变化。A: 静止对照组 ($\times 100$); B: 张应力对照组 ($\times 100$); C: SB203580 预处理张应力暴露组 ($\times 100$), 箭头示张应力作用方向; D: SB203580 预处理组细胞 $60^\circ \sim 90^\circ$ 旋转的构成比明显低于张应力对照组 ($* P < 0.05$)。

Fig. 2 Cell rotation after SB203580 treatment. A: Static group ($\times 100$); B: Cyclic strain control group ($\times 100$); C: Cyclic strain and SB203580 exposure group; D: Proportion of cells rotated from 60° to 90° in SB203580 treated group had a statistic decrease compared with the strain control ($* P < 0.05$).

2.3 张应力诱导成纤维细胞内 p38 磷酸化水平升高

免疫印迹显示实验组细胞 p38 磷酸化水平在张应力暴露 5 min 时达峰值, 5 min 和 10 min 组明显高于静止细胞 p38 磷酸化水平 ($P < 0.05$, 图 3)。

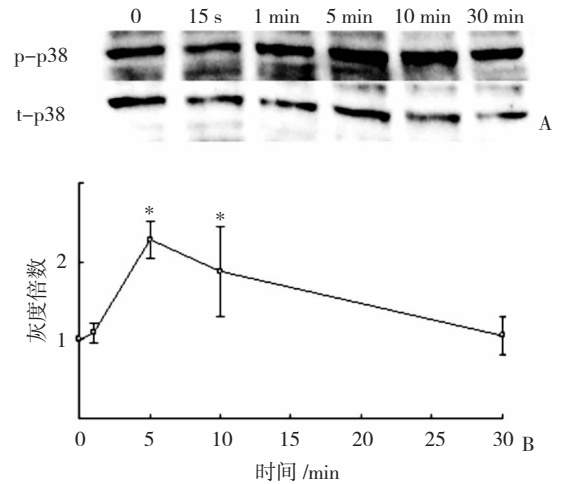


图 3 10 次/min 张应力刺激皮肤成纤维细胞 p-p38 水平的变化。A: 不同张应力作用时间点的细胞 p-p38 免疫印迹条带, t-p38 免疫印迹条带为上样控制; B: 细胞 p-p38 水平在张应力暴露 5 min 和 10 min 时有明显升高 ($* P < 0.05$)。

Fig. 3 Phosphorylation of p38 in cells exposed to 10 cpm cyclic strain. A: Immunoblot of p-p38 at different time point, and blot of t-p38 as loading control; B: Phosphorylation of p38 was significantly increased in cells exposed to cyclic strain for 5 min and 10 min ($* P < 0.05$).

3 讨 论

细胞运动是由于细胞表面运动方向一侧细胞膜伸出板状伪足 (lamellepodia) 所致, 板状伪足上黏着斑形成明显增多, 与细胞外基质相互作用, 黏着增强; 而细胞其他部位的黏着斑 (focal adhesions) 与细胞外基质黏附减弱^[7]; 在细胞内, 黏着斑与细胞骨架连接, 细胞骨架的收缩和重组导致细胞运动^[8]。细胞运动迁移在炎症、组织修复重建以及肿瘤侵袭等病理生理过程扮演重要角色。细胞的理化环境的改变可以诱导细胞迁移运动, 比如生长因子、趋化因子的作用。很多研究^[9-10]发现机械张力同样诱导细胞运动迁移, 在二维培养基质上的细胞接受周期性机械力刺激后, 细胞垂直旋转于作用力方向, 其细胞内骨架在 15 min 内发生重排列, 而细胞重排列发生于 12 ~ 48 h。该现象可见于多种类型的细胞: 牛血管平滑肌细胞和内皮细胞、人脐静脉内皮细胞以及人牙周成纤维细胞。本实验将成纤维细胞培养在预敷胶

原蛋白的柔性培养孔上,对成纤维细胞施加频率为10次/min的周期性张应力,结果显示与施加张应力前细胞形态比较,静息状态的成纤维细胞随机分布;而张应力施加4h后,80%的成纤维细胞旋转垂直于牵引方向。提示机械张应力同样引起人皮肤成纤维细胞运动。

不同外界因素诱导细胞运动的信号转导途径完全不同,例如血小板释放生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)是通过细胞表面PDGF受体发挥作用。研究^[11-13]发现机械力信号通过细胞表面受体整合素(integrin)转导,激活Rho以及致密斑激酶FAK,然后激活下游蛋白MAPK家族蛋白。MAPK家族成员在信号转导途径中的作用不同,3种蛋白何种蛋白介导的细胞运动也与细胞种类及细胞基质有关^[3],Kito等^[14]报道机械张应力刺激牛肺动脉内皮细胞p38蛋白磷酸化升高,p38抑制剂不能抑制细胞的运动,提示p38与牛肺动脉内皮细胞迁移无关。但是Qi等^[13]报道发现机械张应力诱导的大鼠血管平滑肌细胞迁移p38磷酸化升高,抑制p38的磷酸化即可抑制细胞运动。本研究发现10次/min周期性张应力刺激皮肤成纤维细胞后,细胞内p38磷酸化水平在5min时达到峰值,p38抑制剂SB203580可以部分抑制细胞的重排列,提示p38的磷酸化和人皮肤成纤维细胞运动有关。而p38磷酸化后激活下游底物MAPK激活蛋白激酶2(MK2),然后激活热休克蛋白27(heat shock protein 27, HSP27),通过热休克蛋白介导细胞骨架重建而影响细胞运动^[3]。

本研究同时发现皮肤成纤维细胞旋转仅能被SB203580部分抑制,提示张应力信号的转导也许存在其他途径。Boccafosci等^[15]报道成纤维细胞既激活Rho,也激活Akt,抑制Akt蛋白表达时,则在机械力诱导的致密斑形成出现障碍,而致密斑的形成是细胞运动的关键环节,因而Akt可能也参与调控张应力诱导细胞运动。

本研究表明机械张应力诱导成纤维细胞垂直于张应力方向旋转;p38部分调控张应力诱导的皮肤成纤维细胞运动。

参考文献:

[1] Saxena V, Hwang C W, Huang S, et al. Vacuum-assisted closure; microdeformations of wounds and cell proliferation [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2004, 114(5): 1086-1098.

[2] Webb K, Li W, Hitchcock R W, et al. Cyclic strain increases fibroblast proliferation, matrix accumulation, and elastic modu-

lus of fibroblast-seeded polyurethane constructs [J]. *J Biomech*, 2006, 39(6): 1136-1144.

- [3] Huang C, Jacobson K, Schaller M D, et al. MAP kinases and cell migration [J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt 20): 4619-4628.
- [4] Li W, Chen Q, Mills I, et al. Involvement of S6 kinase and p38 mitogen activated protein kinase pathways in strain-induced alignment and proliferation of bovine aortic smooth muscle cells [J]. *J Cell Physiol*, 2003, 195(2): 202-209.
- [5] Gilbert J A, Weinhold P S, Banes A J, et al. Strain profiles for circular cell culture plates containing flexible surfaces employed to mechanically deform cells in vitro [J]. *J Biomech*, 1994, 27(9): 1169-1177.
- [6] Yano Y, Geibel J, Sumpio B E, et al. Cyclic strain induces reorganization of integrin alpha 5 beta 1 and alpha 2 beta 1 in human umbilical vein endothelial cells [J]. *J Cell Biochem*, 1997, 64(3): 505-513.
- [7] Palecek S P, Schmidt C E, Lauffenburger D A, et al. Integrin dynamics on the tail region of migrating fibroblasts [J]. *J Cell Sci*, 1996, 109(Pt 5): 941-952.
- [8] Hu K, Ji L, Applegate K T, et al. Differential transmission of actin motion within focal adhesions [J]. *Science*, 2007, 315(5808): 111-115.
- [9] Kakisis J D, Liapis C D, Sumpio B E. Effects of cyclic strain on vascular cells [J]. *Endothelium*, 2004, 11(1): 17-28.
- [10] 朱庆党, 巢永烈, 陈新民. 应力对人牙周膜成纤维细胞I型胶原和纤连蛋白mRNA表达的影响 [J]. *中华口腔医学杂志*, 2008, 43(7): 434-436.
- ZHU Qingdang, CHAO Yonglie, CHEN Xinmin. Regulation of collagen type I and fibronectin mRNA expression by mechanical stress in cultured human periodontal ligament fibroblasts [J]. *Chinese Journal of Stomatology*, 2008, 43(7): 434-436.
- [11] Yano Y, Geibe J, Sumpio B E. Cyclic strain induces reorganization of integrin alpha 5 beta 1 and alpha 2 beta 1 in human umbilical vein endothelial cells [J]. *J Cell Biochem*, 1997, 64(3): 505-513.
- [12] Wen H, Blume P A, Sumpio B E. Role of integrins and focal adhesion kinase in the orientation of dermal fibroblasts exposed to cyclic strain [J]. *Int Wound J*, 2009, 6(2): 149-158.
- [13] Qi Y X, Qu M J, Yan Z Q, et al. Cyclic strain modulates migration and proliferation of vascular smooth muscle cells via Rho-GDIalpha, Rac1, and p38 pathway [J]. *J Cell Biochem*, 109(5): 906-914.
- [14] Kito H, Chen E L, Wang X J, et al. Role of mitogen-activated protein kinases in pulmonary endothelial cells exposed to cyclic strain [J]. *J Appl Physiol*, 2000, 89(6): 2391-2400.
- [15] Boccafosci F, Bosetti M, Sandra P M, et al. Effects of mechanical stress on cell adhesion; a possible mechanism for morphological changes [J]. *Cell Adh Migr*, 2010, 4(1): 19-25.