

# 周期性拉伸应力与人永生化角质形成细胞的黏附和铺展

刘 琨, 安美文, 王 立, 黄晶晶(太原理工大学, 山西省太原市 030024)

## 文章亮点:

1 HaCaT 细胞是由成人表皮细胞自发转化而来的细胞系, 具有永生性和与角质形成细胞相似的增殖、分化特性, 遗传特性稳定, 不具有成瘤性, 可作为组织工程皮肤的种子细胞的理想候选者, 与上皮损伤修复等医学问题联系紧密。

2 采用 FX-4000 柔性基底加载系统对贴壁培养的 HaCaT 细胞施加各项同性的持续性周期性拉伸应力作用, 结果显示控制合理的力学刺激时间, 能够在保持角质形成细胞正常铺展形态的前提下促进其增殖。由于这种促进增殖的方式不会明显改变细胞的铺展形态, 对细胞行使正常生理活动的影响更小, 因此在对实践的指导中具有积极意义。

## 关键词:

干细胞; 培养; 周期性拉伸; 应力; 人永生化角质形成细胞; HaCaT; 铺展; 纽蛋白; 增殖; 黏附; 国家自然科学基金

## 主题词:

生物力学; 应力; 物理; 细胞粘附; 细胞增殖

## 基金资助:

国家自然科学基金支持(10672114); 山西省自然科学基金支持(2007011011)

## 摘要

背景: 皮肤组织所处的力学环境以及上皮细胞的铺展状态与伤口愈合和瘢痕形成过程关系密切。

目的: 分析胞外力学刺激对细胞铺展的作用, 并检测细胞的增殖状态进一步分析铺展形态对细胞增殖等生理活动的影响。

方法: 通过 FX-4000 柔性基底加载系统对人永生化角质形成细胞(HaCaT)进行周期性拉伸应力正弦波加载, 加载程式 0.2 Hz, 10%拉伸幅度。在 0, 24, 48 h 对细胞的铺展形态进行对比, 利用流式细胞仪检测分析细胞的增殖, 并利用免疫荧光染色方法对比分析纽蛋白在细胞内的分布。

结果与结论: HaCaT 细胞在加载 24 h 后分裂期细胞较多, 铺展形态无明显变化; 加载 48 h 后 HaCaT 细胞形态发生较为明显的变化, 分裂期细胞较静态对照组略有减少; 拉伸应力作用下纽蛋白的分布由细胞核周围的膜区域向细胞边缘集中。结果表明: 适度的力学加载能够在保持细胞铺展和黏附状态下, 促进细胞增殖; 周期性持续拉伸应力的作用时间是 HaCaT 细胞铺展形态和与基底黏附位点的重要影响因素。

刘琨, 安美文, 王立, 黄晶晶. 周期性拉伸应力与人永生化角质形成细胞的黏附和铺展[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(1):119-123.

## Cyclic mechanical stretch influences cell adhesion and spreading of immortalized human keratinocytes

Liu Kun, An Mei-wen, Wang Li, Huang Jing-jing (Taiyuan Univeristy of Technology, Taiyuan 030024, Shanxi Province, China)

## Abstract

**BACKGROUND:** The mechanical environment of skin tissue and spreading state of epithelial cells are closely related with the wound healing and scar formation process.

**OBJECTIVE:** To analyze the effect of extracellular mechanical stimulation on cell spreading, to test the cell proliferation in order to analyze the effect of spreading form on cell proliferation and other physiological activities.

**METHODS:** Cyclic sine wave mechanical stretching was exerted on immortalized human keratinocyte by using FX-4000 flexible substrate loading system, on the condition of 0.2 Hz and at frequency of 10% amplitudes. The spreading form was compared at 0, 24 and 48 hours, the cell proliferation was analyzed with flow cytometry, and the distribution of vinculin was analyzed with immunofluorescence staining.

**RESULTS AND CONCLUSION:** human keratinocyte would keep the spreading state and could induce more cell proliferation by 24 hours mechanical stretching stimulation. Conversely, after stimulated for 48 hours, the morphology of the human keratinocyte was significantly changed, and the number of human keratinocyte in the division stage was larger than that in the static control group; under tensile stress, the distribution of vinculin was transformed from the surrounding nucleus membrane area to the cell edge. The results indicate that proper mechanical stimulate can increase cell proliferation with keeping cell spreading and adhesion state; the stimulating time of continuous cyclic stretching is the major factor to determine cell spreading morphology and

刘琨, 男, 1986 年生, 河北省保定市人, 汉族, 2011 年太原理工大学毕业, 硕士, 主要从事细胞力学研究。

通讯作者: 安美文, 教授, 博士生导师, 太原理工大学, 山西省太原市 030024

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.

2015.01.021

[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2015)01-00119-05

稿件接受: 2014-10-10

Liu Kun, Master, Taiyuan Univeristy of Technology, Taiyuan 030024, Shanxi Province, China

Corresponding author: An Mei-wen, Professor, Doctoral supervisor, Taiyuan Univeristy of Technology, Taiyuan 030024, Shanxi Province, China

Accepted: 2014-10-10

adhesion regions of immortalized human keratinocyte.

**Subject headings:** Biomechanics; Stress, Mechanical; Cell Adhesion; Cell Proliferation

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No. 10672114; the Natural Science Foundation of Shanxi Province, No. 2007011011

Liu K, An MW, Wang L, Huang JJ. Cyclic mechanical stretch influences cell adhesion and spreading of immortalized human keratinocytes. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(1):119-123.

## 0 引言 Introduction

应用基底变形技术将机械应力作用于培养的细胞, 研究力学刺激对细胞增殖、凋亡、分化、细胞力学特性及基因和蛋白表达等的影响, 是目前较常用的生物力学研究方法。近年来机械刺激的生物学效应及它们的作用机制已在多种细胞和组织中开展。体内的表皮组织处于预拉伸应力状态, 在拉伸应力环境中进行生理活动, 因而对正常皮肤机制以及不同病因导致的皮肤疾病和损伤治疗的研究有必要将拉伸应力做为主要力学因子。已有报道表明, 间歇性的周期性拉伸应力刺激能够影响人角质形成细胞增殖、凋亡、分化、基质内蛋白的合成、生长因子的表达及分布等<sup>[1-2]</sup>。

HaCaT细胞是由成人表皮细胞自发转化而来的细胞系, 具有永生性和与角质形成细胞相似的增殖、分化特性, 遗传特性稳定, 不具有成瘤性<sup>[3]</sup>, 可作为组织工程皮肤的种子细胞的理想候选者, 与上皮损伤修复等医学问题联系紧密。

贴壁细胞铺展状态下细胞膜上会形成黏着斑结构介导细胞与细胞外基质间的黏附, 束状肌动蛋白聚合成的应力纤维附着于黏着斑上, 依靠纽蛋白将肌动蛋白连接于细胞膜, 与黏着斑一起参与细胞的生物学行为<sup>[4-5]</sup>。

细胞外力学信号向内传导, 需要肌动蛋白、纽蛋白、膜表面整合素的参与。整合素通常定位于黏着斑, 其胞外侧可与胞外基质结合, 胞内侧连接细胞骨架, 这一结构为细胞内外侧信号的传导提供了基础。研究表明, 整合素家族的膜表面受体能够感知力学信号刺激并将其转化为生化信号<sup>[6]</sup>, 拉伸应力能够通过受体 $\beta 1$ 激活胞外信号调节激酶(ERK1/2)从而激活丝裂原活化蛋白激酶信号传导途径, 参与细胞增殖和分化<sup>[7]</sup>。Takei等<sup>[1]</sup>的报道证实周期性的拉伸应力能够促进角质形成细胞的增殖。另一方面, 拉伸应力还可以通过抑制细胞凋亡信号, 从而增加细胞数量, 例如整合素 $\beta 1$ 能够激活胞内信号刺激蛋白激酶B(PKB/Akt)磷酸化从而抑制凋亡<sup>[8]</sup>。可见, 细胞的铺展、黏附与细胞增殖、分裂在细胞信号传递通路中关系密切。细胞增殖等生理活动受到细胞与胞外基质相互作用的调节, 反映着细胞铺展和黏附的状态。

实验主要采用FX-4000柔性基底加载系统对贴壁培养的HaCaT细胞施加各项同性的持续性周期性拉伸应力作用, 通过对比不同加载方式下HaCaT细胞铺展形态和与黏附相关的纽蛋白分布, 分析胞外力学刺激对细胞铺展的作

用, 并检测细胞的增殖状态进一步分析铺展形态对细胞增殖等生理活动的影响。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**设计:** 细胞学体外实验。

**材料:**

周期性拉伸应力与人永生角质形成细胞的黏附和铺展实验用试剂和仪器:

试剂及仪器	来源
人角质形成细胞HaCaT	中南大学湘雅医学院
细胞柔性基底加载装置	美国Flexercell公司
流式细胞仪(Epics XL)	Citer公司, 美国
鼠抗人纽蛋白单克隆抗体, TRITC标记的羊抗鼠IgG	Sigma公司, 美国
荧光倒置显微镜(IX70)	日本Olympus

**实验方法:**

**HaCaT细胞的培养:** 人角质形成细胞HaCaT培养于RPMI-1640培养基中(含体积分数15%小牛血清, 100 U/mL庆大霉素, 100 U/mL青霉素), 在37 °C, 体积分数5%CO<sub>2</sub>、恒温恒湿的培养箱中培养。一般传代后贴壁生长两三天至对数生长期, 待用。

**周期性正弦波拉伸应力加载和显微镜观测:** 将培养瓶中对数生长期的HaCaT细胞经0.25%胰酶(含0.02%EDTA)消化5 min收集, 加PBS, 800 r/min, 离心清洗5 min, 2次。换入新鲜培养液, 制成细胞悬液, 适量接种于Collagen I六孔拉伸板上, 于培养箱内培养24 h后换液, 待用。

将准备好的六孔培养板进行周期性正弦波拉伸加载, 实验采用美国Flexercell公司生产的细胞柔性基底加载装置进行加载, 该装置通过真空泵抽吸特制的柔性细胞培养膜, 形成负压而使培养膜产生拉伸应变, 从而使贴壁生长的细胞受到张力的作用。细胞所受力的的大小正比于培养膜的牵拉幅度即应变率(%), 整个加载装置放置于CO<sub>2</sub>培养箱内。

加载程序由FX-4000计算机软件自动控制。加载程式设置为加载正弦波, 拉伸幅度10%, 频率为0.2 Hz, 加载时间分别设为0, 24和48 h。加载完成后卸载六孔培养板, 进行相关检测。

流式细胞仪检测细胞周期: 收集加载后的HaCaT细胞制备单细胞悬液, 调整细胞浓度为 $5 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ ; 放入带有刻

度的离心管中, 拉伸组和静态对照组各取3组样本; 加入相同容量的PBS, 离心1 000 r/min, 5 min, 去上清液, 再次加入PBS轻轻吹打, 离心重复2次后, 去掉上清液, 加入4 ℃体积分数为70%的冷乙醇固定, 置4 ℃环境中; 检测前用PBS冲洗, 离心1 000 r/min, 5 min, 重复操作2次后, 制备成细胞悬液, 加入100 μL碘化丙啶(PI)工作液, 避光0.5 h; 利用流式细胞仪进行细胞周期检测。

通过HaCaT细胞周期情况计算细胞增殖, 应用细胞周期拟合软件, 计算各样品DNA含量及细胞周期变化。再根据细胞增殖指数 $I_p$ (Proliferation Index)的计算公式计算得到各组HaCaT细胞增殖指数。

$$I_p = \frac{S + (G_2/M)}{(G_0/G_1) + S + (G_2/M)} \times 100\%$$

**纽蛋白(Vinculin)免疫荧光染色:** 对拉伸刺激后的HaCaT细胞分别进行纽蛋白免疫荧光染色, 同时做静态对照组。实验采用的一抗为鼠抗人纽蛋白单克隆抗体, 二抗为TRITC标记的羊抗鼠IgG。

免疫荧光标记纽蛋白染色的基本过程为: 取代染色的细胞玻璃片或基底膜, 用PBS冲洗2次, 体积分数4%的甲醛溶液室温静置30 min固定细胞, PBS冲洗3次, 5 min/次。0.2%的Triton X-100溶液室温静置5 min透膜, PBS冲洗3次, 5 min/次。加入5%的BSA封闭液, 室温静置30 min后PBS冲洗3次, 5 min/次。避光下滴加一抗30 μL(0.1 mg/L), 放入孵箱内静置1 h后PBS冲洗3次, 5 min/次。避光下滴加二抗30 μL(0.1 mg/L), 放入孵箱内静置1 h后PBS冲洗3次, 5 min/次。水封固, 荧光倒置显微镜40倍镜头, 单通道绿色荧光激发, 即可观察到纽蛋白阳性表达, 呈红色荧光。

**主要观察指标:** ①周期性拉伸应力对HaCaT细胞铺展形态的影响。②周期性力学刺激对于HaCaT细胞内纽蛋白表达的影响。③周期性正弦波拉伸对HaCaT细胞增殖的影响。

**数据采集和分析:** 柔性基底的中央区域受到各向均等的拉伸应力作用, 而边缘区域的受力接近于单向拉伸, 实验对细胞的观测都针对于培养于柔性拉伸基底中心区域的细胞。利用冷CCD对细胞进行取像, 采用Image Pro5.1软件对图像进行处理分析。

## 2 结果 Results

**2.1 周期性拉伸应力对 HaCaT 细胞铺展形态的影响** 正常培养的对数生长期 HaCaT 细胞呈典型上皮细胞铺路石样特征, 细胞三角形或不规则形状, 排列紧密, 轮廓清楚折光性好(图 1A)。

经过周期性正弦波拉伸刺激后 24 h, 绝大多数细胞铺展形态没有明显的变化, 有个别细胞在拉伸刺激作用下, 形态发生的变化, 呈现出梭形或者其他不规则形状(图 1B)。

拉伸 48 h 后的细胞与对照组对比, 形态近梭形、长条

形等的细胞明显增多, 有的细胞延伸出很长的突触, HaCaT 细胞的铺展方式随着拉伸应力作用时间的延长在发生改变(图 1C)。

**2.2 周期性力学刺激对于 HaCaT 细胞内纽蛋白表达的影响** 通过免疫荧光标记技术, 观察纽蛋白在静态对照组和拉伸应力作用下的分布, 见图 2。

图 2A 是静态对照 HaCaT 细胞的纽蛋白分布, 可以看出纽蛋白主要分布在核以外的胞质区域, 而且纽蛋白在细胞的铺展边缘并没有明显分布。

拉伸应力作用 24 h 后, 纽蛋白的分布区域与静态组相似。拉伸应力作用 48 h 后, 可以看出随着细胞铺展形态的改变和细胞突出的延伸, 纽蛋白在细胞的异常突出部分有明显分布(图 C, 箭头所示)。

纽蛋白主要存在于细胞与基底发生粘着的部位, 也是应力纤维形成的区域, 其分布的改变表明细胞的整体黏附方式发生改变。可以看到, 由于不是单周拉伸作用, 48 h 处理组细胞的延伸方向并不相同, 细胞隆起, 与基底的黏附面积减少并形成明显的极性, 纽蛋白向细胞边缘和细胞突出延伸部分的重分布表示细胞在改变自身黏附以适应力学环境的改变。这种因为力学因素引起的细胞形态改变和黏附相关因子的重分布也许会影响细胞增殖、分化等生理活动。

**2.3 周期性正弦波拉伸对 HaCaT 细胞增殖的影响** 为了进一步研究力学刺激作用于细胞铺展和黏附, 进而对细胞正常生理活动造成的影响, 测定了力学加载下分裂期细胞的含量。流式细胞仪检测得到 24, 48 h 拉伸组和静态对照组  $G_0/G_1$ , S,  $G_2/M$  各期细胞的百分率见图 3。从图中可看出  $G_2/M$  期细胞所对应的横坐标值大约是  $G_0/G_1$  期细胞对应的横坐标值的 2 倍, 可以看出, 24 h 拉伸组比 24 h 静态对照组 S 期 DNA 含量明显增多; 而 48 h 拉伸组比 48 h 静态对照组 S 期 DNA 含量略有降低。

静态对照组 HaCaT 细胞 24, 48 h 增殖指数分别为 44.63%, 56.58%; 拉伸组 HaCaT 细胞 24, 48 h 增殖指数分别为 60.89%, 51.69%。

从以上结果看出, 24 h 周期性拉伸应力作用下的 HaCaT 细胞较静态对照组增殖明显增加, 经过 48 h 的拉伸刺激之后, 处于分裂期的细胞较 48 h 静态对照组和 24 h 拉伸应力处理组均有减少。因此认为力学刺激在幅度 10%, 频率 0.2 Hz 的周期性拉伸应力作用下, 合理的加载时间能够促进细胞增殖, 过长的加载时间会引起细胞增殖降低或者导致细胞凋亡增多。与上述铺展和黏附的观测结果相比较来看, 细胞在外界力学刺激作用下能够维持其正常的黏附和铺展状态的时间内, 会使细胞增殖更为明显。可见 HaCaT 能够响应一定的外界力学刺激, 对自身铺展和增殖做出适应性改变, 但是时间过长的力学刺激会引起细胞生理活动的根本性改变。适度的力学刺激和合理的应力作用时间能够促进皮肤细胞更迅速的增殖。

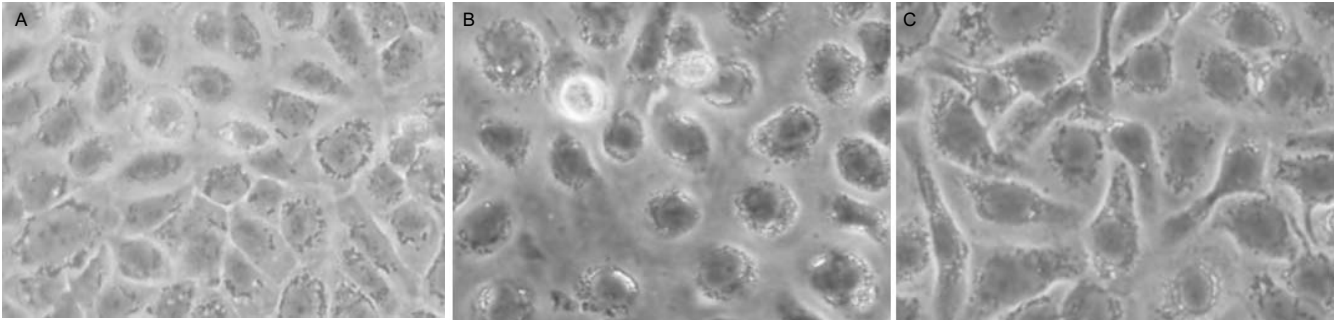


图 1 不同拉伸应力刺激作用下的人角质形成细胞 HaCaT 细胞铺展形态

Figure 1 Spreading shape of immortalized human keratinocytes under different mechanical stretch simulations

图注: 图中 A 为静态对照组; B 为拉伸幅度 10%, 频率 0.2 Hz 的正弦波加载 24 h; C 为拉伸幅度 10%, 频率 0.2 Hz 的正弦波加载 48 h; HaCaT 细胞的铺展方式随着拉伸应力作用时间的延长在发生改变, 细胞形状由三角形或不规则形变为近菱形、长条形, 有的细胞延伸出很长的突触。

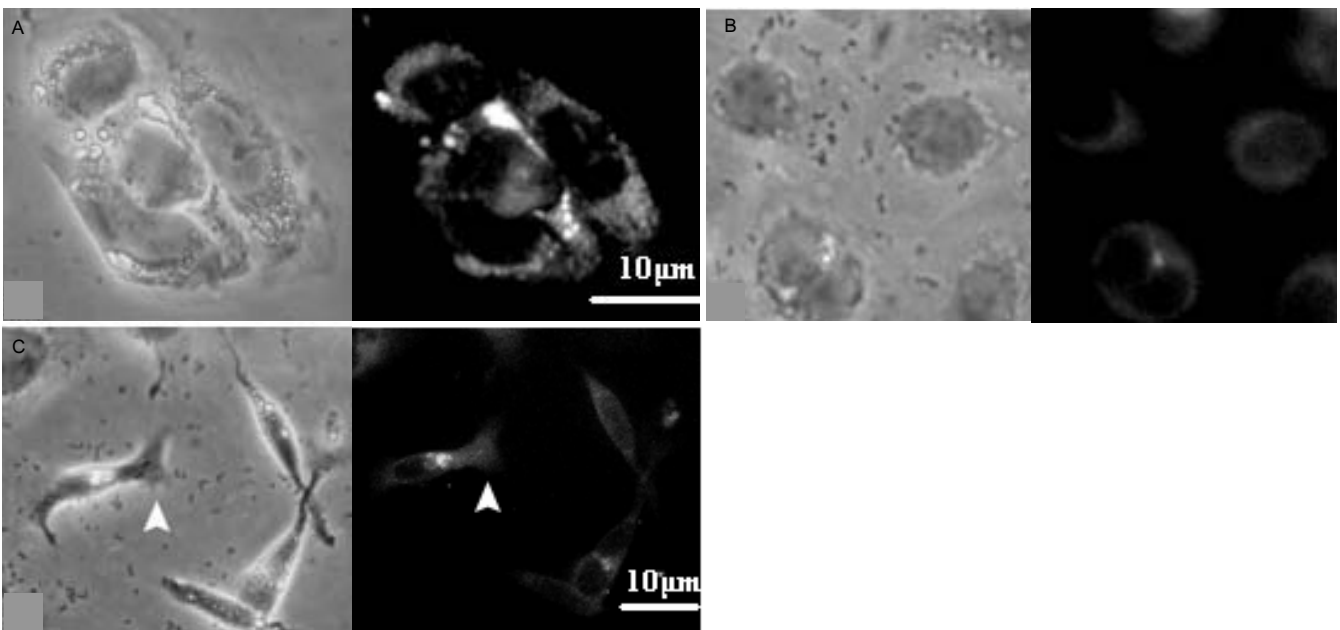


图 2 拉伸应力刺激作用下人角质形成细胞 HaCaT 细胞纽蛋白的分布(免疫荧光染色)

Figure 2 Distribution of vinculin in the immortalized human keratinocytes under different stretch simulations (immunofluorescence staining)

图注: 图中 A 为静态对照组; B 为拉伸幅度 10%, 频率 0.2 Hz 的正弦波加载 24 h; C 为拉伸幅度 10%, 频率 0.2 Hz 的正弦波加载 48 h。随着细胞铺展形态的改变和细胞突出的延伸, 纽蛋白在细胞的异常突出部分有明显分布(图 C, 箭头所示), 这表示细胞在改变自身黏附以适应力学环境的改变。

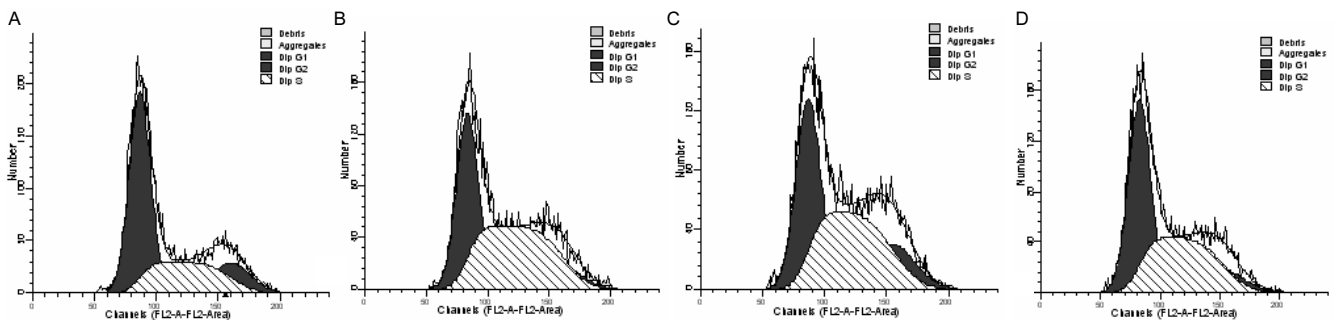


图 3 流式细胞仪检测拉伸应力作用下 HaCaT 细胞在不同分裂期的分布。

Figure 3 Distribution of immortalized human keratinocytes in different division stages under cyclic mechanical stretch simulation detected with flow cytometry

图注: 图中 A, B 为 24, 48 h 静态对照组; C, D 为拉伸幅度 10%, 频率 0.2 Hz 的正弦波加载 24, 48 h 拉伸组。在细胞周期分析图中, 横坐标表示单个细胞的 DNA 含量, 纵坐标表示细胞内 DNA 含量为某一值时所对应的细胞数。图中第 1 峰为 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞, 第 2 峰为 G<sub>2</sub>/M 期细胞, 两者之间的移行部分为 S 期细胞。从图中可看出 G<sub>2</sub>/M 期细胞大约是 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞的 2 倍, 24 h 拉伸组比 24 h 静态对照组 S 期 DNA 含量明显增多; 而 48 h 拉伸组比 48 h 静态对照组 S 期 DNA 含量略有降低。

### 3 讨论 Discussion

基底周期性拉伸应力刺激与上皮组织进行生理活动中所处环境类似。在上皮伤口愈合过程中, 当皮肤伤口小于某个阈值时, 皮肤会自动愈合且不留瘢痕; 当大于某一尺寸时, 伤口会越来越大; 在这二者之间, 伤口可自行愈合但会留下瘢痕。Bush 等<sup>[9]</sup>的研究说明在创伤部位的表皮细胞受到额外的张力作用, 伤口尺寸影响着伤口处的应力分布。伤口愈合时形成的瘢痕是由于缝合时局部应力集中产生的细胞异常增殖和分化, 如果有必要采用皮肤代用品时, 还需要同时解决离体状态下细胞在胶原网架上的黏附、铺展和增殖状态, 这些又都胞内感受和传递力学信号、介导黏附的生物大分子<sup>[10]</sup>。实验证实张力的增加会增强表皮中相关细胞的增殖能力, 外来力学环境的改变会引起表皮生长因子受体(EGFR)变化、细胞骨架分布改变进而激活蛋白激酶 B<sup>[11]</sup>, 同时促进了角质形成细胞的增殖。力学因子的这种作用预示着力学刺激能提供一种特定的控制表皮细胞增殖的方法, 结合细胞在体内的力学环境, 给出力学刺激通过调节细胞骨架的分布和装配影响表皮细胞增殖、铺展形态的作用机制, 为制定相应的皮肤疾病治疗方案提供理论基础。

实验结果认为, 在较低强度的拉伸应力刺激下(0.2 Hz, 10%拉伸幅度), 作用时间是影响细胞铺展和黏附状态的主要因素。在持续性各向同性的力学刺激下, 24 h 可见HaCaT细胞的明显增殖, 特别是在此情况下, 细胞的铺展和黏附状态保持较好。但是作者发现, 当持续性应力刺激达到48 h之后, 细胞不仅发生了铺展和黏附形态上的变化, 而且增殖率较静态对照细胞也出现了一定幅度的下降。显示出当力学刺激时间过长, 细胞会逐步的调节自身以适应新的力学环境, 而这种转变的积累能够影响细胞的正常生理活动。以往的实验主要利用单轴间歇性的拉伸针对HaCaT增殖进行研究<sup>[1, 12]</sup>, 结果显示约4 d内的拉伸应力刺激都会表现出明显的增殖, 同样发现超过细胞的适宜力学加载条件后, 细胞增殖就会降低, 这个过程涉及到大量与基底相互作用的蛋白因子<sup>[2]</sup>, 仍无法清晰描述。单周拉伸存在的问题是细胞的整体形态和铺展方式会发生转变, 这种改变会对细胞其他的生理活性产生何种影响仍不清晰。本文中各向同性的持续性周期拉伸结果显示控制合理的力学刺激时间, 能够在保持角质形成细胞正常铺展形态的前提下促进其增殖。由于这种促进增殖的方式不会明显改变细胞的铺展形态, 对细胞行使正常生理活动的影响更小, 因此在对实践的指导中具有积极意义。

细胞的铺展和黏附状态是细胞与外界交流方式的表现, 过度的力学刺激或者外界力学环境的较大改变会逐步改变上皮细胞的生理活动。在总结和积累实验数据的基础上, 将胞外力学刺激引起的生理转变逐步与细胞信号转导相结合, 是进一步深入研究的重点。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理要求:** 未涉及相关伦理学内容。

**学术术语:** 细胞铺展—一般是指在体外实验中, 处于悬浮状态的球形细胞与基底相接触, 进而形成黏附的过程。这一过程中细胞形状随时间发生变化, 最终达到稳定的贴壁状态。细胞铺展的动力学过程是细胞与细胞外基质相互作用的第一步, 在细胞迁移、细胞生长及组织形成等重要生理过程中起着关键的作用。

**作者声明:** 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

### 4 参考文献 References

- [1] Takei T, Rivas-Gotz C, Delling CA, et al. Effect of strain on human keratinocytes in vitro. *J Cell Physiol.* 1997;173(1): 64-72.
- [2] Görmär FE, Bernd A, Bereiter-Hahn J, et al. A new model of epidermal differentiation: induction by mechanical stimulation. *Arch Dermatol Res.* 1990;282(1):22-32.
- [3] Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, et al. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol.* 1988;106(3):761-771.
- [4] Amano M, Chihara K, Kimura K, et al. Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science.* 1997;275(5304):1308-1311.
- [5] Palazzo AF, Eng CH, Schlaepfer DD, et al. Localized stabilization of microtubules by integrin- and FAK-facilitated Rho signaling. *Science.* 2004;303(5659):836-839.
- [6] Ingber D. Integrins as mechanochemical transducers. *Curr Opin Cell Biol.* 1991;3(5):841-848.
- [7] Kippenberger S, Loitsch S, Müller J, et al. Melanocytes respond to mechanical stretch by activation of mitogen-activated protein kinases (MAPK). *Pigment Cell Res.* 2000;13(4):278-280.
- [8] Fornaro M, Steger CA, Bennett AM, et al. Differential role of beta(1C) and beta(1A) integrin cytoplasmic variants in modulating focal adhesion kinase, protein kinase B/AKT, and Ras/Mitogen-activated protein kinase pathways. *Mol Biol Cell.* 2000;11(7):2235-2249.
- [9] Bush JA, Ferguson MW, Mason T, et al. Skin tension or skin compression? Small circular wounds are likely to shrink, not gape. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2008;61(5):529-534.
- [10] Reichelt J. Mechanotransduction of keratinocytes in culture and in the epidermis. *Eur J Cell Biol.* 2007;86(11-12):807-816.
- [11] Khwaja A, Rodriguez-Viciano P, Wennström S, et al. Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *EMBO J.* 1997;16(10):2783-2793.
- [12] Renò F, Traina V, Cannas M. Mechanical stretching modulates growth direction and MMP-9 release in human keratinocyte monolayer. *Cell Adh Migr.* 2009;3(3):239-242.