

细胞力学调控中肌动蛋白与肌球蛋白 II 的作用

https://doi.org/10.12307/2022.406

范佳玉, 徐丽萌, 刘阳, 王立

投稿日期: 2021-03-12

采用日期: 2021-04-15

修回日期: 2021-08-09

在线日期: 2021-08-24

中图分类号:

R459.9; R394.2; R318

文章编号:

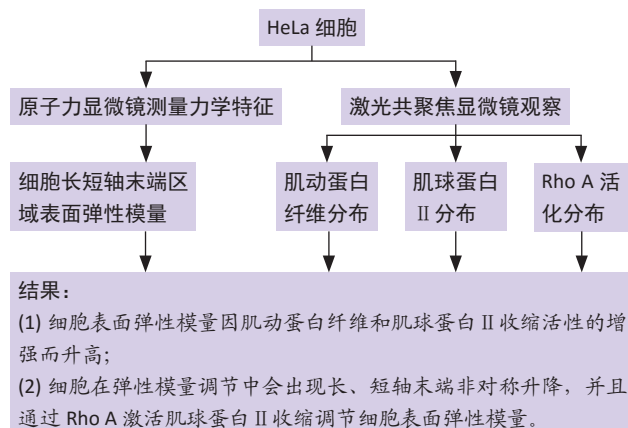
2095-4344(2022)25-04004-06

文献标识码: B

文章快速阅读:

文章特点一

△采用原子力显微镜技术分析肌动蛋白纤维、肌球蛋白 II 受抑制后细胞边缘表面弹性模量随时间的变化, 并进一步分析肌动蛋白、肌球蛋白以及 Rho A 影响弹性模量的可能机制, 为认识和合理分析细胞骨架蛋白调节细胞力学性能的作用方式, 以及辅助组织工程中细胞行为控制提供实验基础。



文题释义:

细胞力学: 在多种疾病中, 细胞会动态调节细胞骨架蛋白等内部结构来改变自身各区域的力学性能, 如细胞弹性系数和黏附力等, 以适应细胞与微环境的相互作用。同时, 肌动蛋白和肌球蛋白在细胞力学调控中起至关重要的作用。细胞力学研究具有很大的潜力, 可以为病理学和经典生物学研究提供新视野。

原子力显微镜: 自原子力显微镜诞生以来, 细胞力学研究取得长足的进步。原子力显微镜是通过针尖与样品之间的相互作用力使悬臂发生变形, 并利用悬臂的弹性系数, 将悬臂的弯曲转化为力。原子力显微镜可以在生理环境下进行超高分辨率成像以及力学性能测量, 是近期研究细胞力学最热门的工具之一。

摘要

背景: 目前, 肌动蛋白与肌球蛋白 II 这两种重要细胞骨架蛋白的作用已被广泛研究, 但其在细胞力学调控中的作用尚不完善。

目的: 阐明肌动蛋白与肌球蛋白 II 在细胞力学性能调节中的作用。

方法: 用原子力显微镜测量 HeLa 细胞长、短轴末端区域的表面弹性模量随时间的改变, 通过肌动蛋白纤维抑制剂 Cytochalasin D、肌球蛋白 II 的 ATP 酶活性抑制剂 blebbistatin 以及肌球蛋白 II 收缩活性增强剂 Calyculin A 处理 HeLa 细胞, 利用共聚焦显微镜测量 HeLa 细胞内肌动蛋白纤维、肌球蛋白 II 的聚集区域改变以及 Rho A 活化特征。

结果与结论: ①各处理组 HeLa 细胞长、短轴末端的表面弹性模量会出现趋势性变化, 并且对侧末端模量变化不一致; ②肌动蛋白纤维聚合受抑制会降低表面弹性模量, 但肌球蛋白 II 收缩活性增强会显著增加表面弹性模量; ③ HeLa 细胞表面弹性模量随肌动蛋白聚集增强, 受到 Rho A 活化的调节, 但不随肌球蛋白 II 的聚集改变; ④结果表明, HeLa 细胞因肌动蛋白、肌球蛋白 II 引起的细胞力学性能改变不仅表现为数值改变, 还体现在细胞力学性能的非对称升降, 这些改变受到肌动蛋白纤维的分布区域以及肌球蛋白 II 收缩活性的调节。

关键词: 细胞表面; 弹性模量; 细胞长轴; 肌动蛋白纤维; 肌球蛋白 II; Rho A 蛋白; 细胞力学; 原子力显微镜

Roles of F-actin and myosin II in the regulation of cell mechanics

Fan Jiayu, Xu Limeng, Liu Yang, Wang Li

College of Biomedical Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, Shanxi Province, China

Fan Jiayu, Master candidate, College of Biomedical Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, Shanxi Province, China

Corresponding author: Wang Li, MD, Lecturer, College of Biomedical Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, Shanxi Province, China

Abstract

BACKGROUND: At present, the roles of actin and myosin II, two important cytoskeletal proteins, have been widely studied, but their roles in the regulation of cell mechanics are still incomplete.

OBJECTIVE: To elucidate the roles of actin and myosin in the regulation of cell mechanical properties.

METHODS: The surface elastic modulus of the long axis and short axis terminal regions of the HeLa cells over time was measured by atomic force microscopy.

太原理工大学生物医学工程学院, 山西省太原市 030024

第一作者: 范佳玉, 女, 1995 年生, 吉林省舒兰市人, 满族, 太原理工大学在读硕士, 主要从事细胞力学方面研究。

通讯作者: 王立, 博士, 讲师, 太原理工大学生物医学工程学院, 山西省太原市 030024

https://orcid.org/0000-0002-9793-0225 (范佳玉)

基金资助: 国家自然科学基金(青年)(12002232), 项目负责人: 刘阳; 国家自然科学基金(青年)(31300771), 项目负责人: 王立

引用本文: 范佳玉, 徐丽萌, 刘阳, 王立. 细胞力学调控中肌动蛋白与肌球蛋白 II 的作用 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(25):4004-4009.



The Cytochalasin D (inhibitor of actin polymerization), blebbistatin (inhibitor of ATPase of myosin II) and Calysulin A (enhancer of the myosin II contractive activity) were used to treat HeLa cells. The F-actin, myosin II and activation characteristics of Rho A in HeLa cells were analyzed by confocal microscope.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) In the inhibitor treatment group, the surface elastic modulus at the long axis and short axis terminal regions showed a trend changes, and the change of opposite terminal regions modulus was inconsistent. (2) Inhibition of F-actin polymerization decreased the surface elastic modulus, but the enhancement of myosin II contraction activity significantly increased the surface elastic modulus. (3) The surface elastic modulus increased with F-actin aggregation, and regulated by Rho A activation, but it did not change with the aggregation of myosin. (4) The results showed that the changes of mechanical properties of cells caused by actin and myosin II were not only numerical changes, but also asymmetric changes of mechanical properties. These changes were regulated by the distribution of actin fibers and the contractile activity of myosin II.

Key words: cell surface; elastic modulus; cell long axis; F-actin; myosin II; Rho A; cell mechanics; atomic force microscope

Funding: the National Natural Science Foundation of China (Youth Program), No. 12002232 (to LY); the National Natural Science Foundation of China (Youth Program), No. 31300771 (to WL)

How to cite this article: FAN JY, XU LM, LIU Y, WANG L. Roles of F-actin and myosin II in the regulation of cell mechanics. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(25):4004-4009.

0 引言 Introduction

在组织工程、损伤修复及多种疾病中,细胞会动态调节细胞骨架蛋白等内部结构来改变自身各区域的力学性能,以适应细胞与微环境的相互作用^[1]。同时,细胞骨架以及力学性能也是研究细胞行为非常重要的标志物。研究表明,细胞硬化可能是肿瘤的标志,表现为恶性癌细胞比正常细胞具有更低的表面弹性模量^[2];在心血管和高血压等相关疾病研究中发现患者的红细胞表面弹性模量比正常人要高的多,且与年龄有很大相关性^[3-4]。研究细胞骨架以及力学性能为诊断疾病提供新视野。

肌动蛋白-肌球蛋白体系 (cellular actin-myosin system) 被认为是多种细胞在细胞结构和力学调节中的关键作用元件,在近年来受到广泛关注^[5]。YAM等^[6]研究认为肌动蛋白-肌球蛋白网络在促进细胞极化方面具有重要作用;VAN HAASTERT等^[7]研究细胞伪足形成中肌动蛋白-肌球蛋白网络的主要作用区域;最近的报道聚焦肌动蛋白-肌球蛋白体系的调节功能^[8],并对细胞边缘的收缩力调节与细胞极化的关系进行研究。

目前,针对细胞力学性能及调控的研究主要集中在细胞骨架及调控途径方面。原子力显微镜在生理环境下以其超高分辨率成像和力学性能检测功能,成为细胞力学领域重要研究工具。BRÜCKNER等^[9]和CASCIONE等^[10]分别采用原子力显微镜技术分析不同肌动蛋白纤维聚合抑制剂对细胞的影响和抑制剂ROCK(Rho相关蛋白激酶,能够磷酸化大量的下游靶点,从而影响细胞收缩力、迁移及形态)作用下细胞表面弹性模量和细胞形貌改变的特征;SCHILLERS等^[11]以及VARGA等^[12]也分别研究细胞自身及肌球蛋白活性受抑制时表面模量的动态改变,分析骨架蛋白和测量深度的作用效果;作者之前也分析骨架蛋白结合蛋白对细胞表面弹性模量分布的影响^[13]。目前,研究表面弹性模量改变一般只统计细胞某一点或两点,存在明显局限性,所以有必要对细胞不同区域的表面弹性模量改变进行比较,观测其是否具有 consistency。

原子力技术能提供整体模量分布但是却无法做到跟踪监测,表面弹性模量随时间变化的研究鲜有报道。该实验分析肌动蛋白纤维、肌球蛋白II受抑制后细胞边缘表面弹性模量随时间的变化,并进一步分析肌动蛋白、肌球蛋白以及Rho A影响弹性模量的可能机制,研究结果为认识和合理分析细胞骨架蛋白调节细胞力学性能的作用方式,以及辅助组织工程中细胞行为控制提供实验基础。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 正常 HeLa 细胞与抑制剂处理的 HeLa 细胞的对比,组间比较采用单因素方差分析。

1.2 时间及地点 实验于 2019 年 4 月至 2020 年 12 月在太原理工大学生物医学工程学院完成。

1.3 材料

1.3.1 细胞株 HeLa 细胞(人宫颈癌细胞株)购于美国菌种保藏中心。

1.3.2 实验试剂 二甲基亚砜(索莱宝,中国);罗丹明鬼笔环肽 B(Sigma 公司,美国);肌动蛋白纤维聚合抑制剂 Cytochalasin D(Sigma 公司,美国);肌球蛋白 II 的 ATP 酶活性抑制剂 blebbistatin(Sigma 公司,美国);肌球蛋白 II 收缩活性增强剂 Calysulin A(Merck 公司,德国);pTriEx-RhoA FLARE.sc Biosensor 质粒(Addgene, #12150^[14],美国);pCMV-mCherry-MHC-IIA 质粒(Addgene, #35687^[15],美国);Lipofectamine 3000 试剂(Sigma,美国)。

1.3.3 实验仪器与耗材 CO₂ 细胞培养箱(Thermo Fisher 公司,美国);CCD 图像采集系统(DP70,奥林巴斯公司,日本);加热环(自制);激光共聚焦显微镜(FV1000,奥林巴斯公司,日本);原子力显微镜(BioScope Catalyst, Bruker 公司,美国);35 mm 共聚焦培养皿(NEST 公司,中国)。

1.4 实验方法

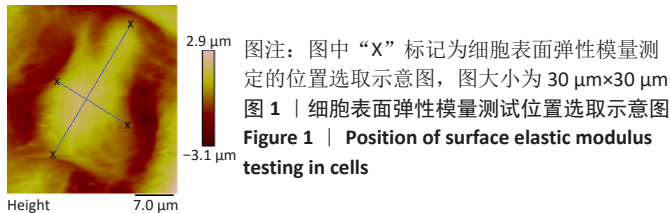
1.4.1 细胞准备 HeLa 细胞培养于 37 °C,体积分数 5% 的 CO₂ 细胞培养箱中。将待测细胞经 0.25% 胰蛋白酶消化,以 1×10⁸ L⁻¹ 细胞浓度重新接种于 35 mm 共聚焦培养皿,生长至 48 h (70%–80% 融合) 进行后续实验。

1.4.2 原子力显微镜检测细胞的表面弹性模量 通过原子力显微镜对正常 HeLa 细胞以及抑制剂处理 HeLa 细胞进行表面弹性模量测量,如之前报道所述^[13, 16]。先测正常 HeLa 细胞力曲线作为对照,然后直接在正常 HeLa 细胞中加入肌动蛋白纤维聚合抑制剂 Cytochalasin D (2.0 μmol/L)、肌球蛋白 II 的 ATP 酶活性抑制剂 blebbistatin (80 μmol/L) 和肌球蛋白 II 收缩活性增强剂 Calysulin A (20 nmol/L),剂量均为 1 mL,作用时间为 60 min,进行表面弹性模量测量。简略过程:将培养皿放于样品台上,保持 37 °C 温度,用原子力显微镜进行形貌扫描后,取细胞高度图中最大值区域中心位置为基准点。定义长轴与短轴:长轴为过细胞中心点(最大高度位置)并

且具有细胞最大尺寸的直线段；短轴为过中心点且与长轴垂直的最长直线段。分别取长、短轴末端的图 1 中“X”区域为原子力显微镜测量区域。将作用力控制为 1 nN，每个测量点获取 3 条力曲线，通过拟合力-距离曲线得到表面弹性模量，分析得出细胞表面力学特性分布。表面弹性模量由 Hertz's 模型来计算，表面弹性模量求解公式为：

$$F = \frac{2}{\pi} \frac{E}{1-\nu^2} \tan(\alpha) \delta^2$$

其中 E 为所求的表面弹性模量， δ 为切入的深度， F 为所施加的力， α 为探针半张角 18° ， ν 为泊松比，假定为 0.5。



图注：图中“X”标记为细胞表面弹性模量测定的位置选取示意图，图大小为 $30 \mu\text{m} \times 30 \mu\text{m}$
Figure 1 | Position of surface elastic modulus testing in cells

1.4.3 肌动蛋白纤维与肌球蛋白 II A 的分布 实验分别测定正常 HeLa 细胞以及抑制剂处理 HeLa 细胞的肌动蛋白纤维与肌球蛋白 II A 的分布。肌动蛋白纤维分布采用罗丹明鬼笔环肽对肌动蛋白染色，将细胞用 PBS 清洗两三次，2.5% 戊二醛固定，PBS 清洗 3 次，500 μL 鬼笔环肽孵育 30 min，PBS 清洗 3-5 次后采用激光共聚焦显微镜观察肌动蛋白纤维分布。以 0.02% 二甲基亚砜处理的正常 HeLa 细胞为空白对照组，抑制剂处理组是正常 HeLa 细胞先用 1 mL 肌动蛋白纤维聚合抑制剂 Cytochalasin D(2.0 $\mu\text{mol/L}$)、1 mL 肌球蛋白 II 的 ATP 酶活性抑制剂 blebbistatin(80 $\mu\text{mol/L}$) 或 1 mL 肌球蛋白 II 收缩活性增强剂 Calyculin A (20 nmol/L) 处理 60 min，再进行上述染色步骤。肌球蛋白 II A 分布采用能稳定表达荧光肌球蛋白 II A 的细胞株，首先利用 pCMV-mCherry-MHC-II A 转染正常 HeLa 细胞 (依据 Lipofectamine 3000 试剂操作说明进行操作)，用 G418 进行多次荧光筛选，最终得到能稳定表达荧光肌球蛋白 II A 的 HeLa 细胞株，采用激光共聚焦显微镜观察肌球蛋白 II A 分布。抑制剂处理组是稳定表达荧光肌球蛋白 II A 的 HeLa 细胞株加入 1 mL 肌动蛋白纤维聚合抑制剂 Cytochalasin D(2.0 $\mu\text{mol/L}$)、1 mL 肌球蛋白 II 的 ATP 酶活性抑制剂 blebbistatin(80 $\mu\text{mol/L}$) 或 1 mL 肌球蛋白 II 收缩活性增强剂 Calyculin A (20 nmol/L)，作用 60 min 后立即拍摄，拍摄时长为 60 min。

1.4.4 Rho A 活化的荧光共振能量转移检测 如之前报道^[14]，简略过程：采用 pTriEx-RhoA FLARE.sc Biosensor 质粒转染 HeLa 细胞，经 G418 多次荧光筛选，得到能稳定表达构造荧光基团的细胞株。采用 Olympus FV1000 共聚焦显微镜分别扫描青绿色荧光蛋白与黄色荧光蛋白通道的适合激发与采集通道，设置荧光共振能量转移效率采集，阈值设置细胞以外区域为零，得到荧光共振能量转移效率随时间的变化。抑制剂处理组是 HeLa 细胞株分别用 1 mL 肌动蛋白纤维聚合抑制剂

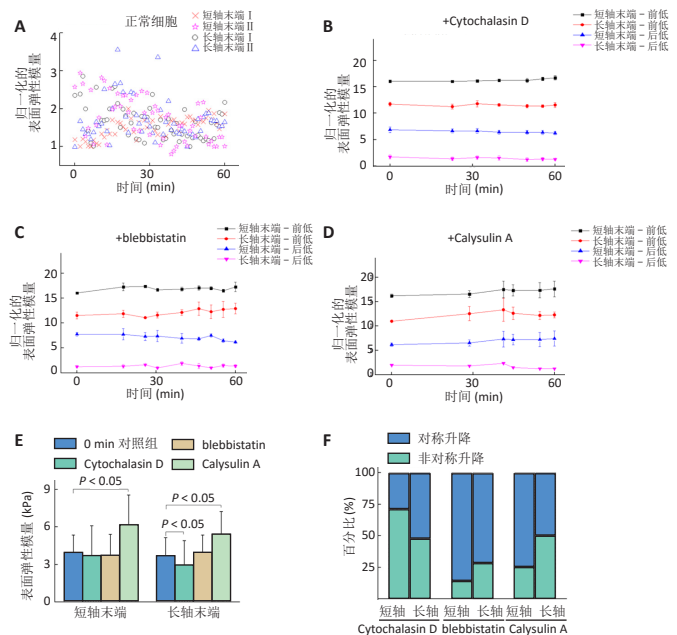
Cytochalasin D (2.0 $\mu\text{mol/L}$)、1 mL 肌球蛋白 II 的 ATP 酶活性抑制剂 blebbistatin (80 $\mu\text{mol/L}$) 或 1 mL 肌球蛋白 II 收缩活性增强剂 Calyculin A (20 nmol/L) 处理，作用时间均为 60 min。

1.5 主要观察指标 ①原子力显微镜得到的力曲线及其表面弹性模量；②肌动蛋白纤维的固定荧光染色和肌球蛋白 II A 在活细胞内的荧光分布；③ Rho A 在活细胞内的活化效率与分布区域。

1.6 统计学分析 使用 SPSS 13.0 统计软件，采用单因素方差分析， $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 细胞长、短轴末端的模量分布特征，肌动蛋白、肌球蛋白 II 异常引起细胞表面弹性模量的非对称升降 采用原子力显微镜测量平面基底上细胞长轴末端与短轴末端的表面弹性模量，测量时间跨度为 60 min。将测量结果中各序列最低点的模量值设置为 1，所得某一个细胞的极区弹性模量随时间的变化结果如图 2 所示，可以看出，正常贴壁生长的细胞长、短轴末端的表面弹性模量均在一定范围内波动，且波动的范围较大。如图 2A 所示，细胞表面弹性模量波动比例大致分布在最低值的两至三倍 (以最低值为 1)，但是均属于随机涨落，没有明显的数值变化方向。这与 VARGA 等^[12]的报道一致。



图注：图 A 为正常 HeLa 细胞两侧短轴末端、长轴末端的表面弹性模量随时间变化数据：纵坐标为以各序列最低点为 1，其他序列数据除以最低值后获得的归一化数据，每个符号代表 1 个数据点；B-D 分别为 Cytochalasin D、blebbistatin、Calyculin A 处理 60 min 内 HeLa 细胞长、短轴末端表面弹性模量的变化值，纵坐标与之前一致，同样是以各序列最低点为 1 后得到的归一化的表面弹性模量数据，各组数据按纵坐标等差值 5 间隔排列；E 为初始与抑制剂作用 60 min 后 HeLa 细胞长、短轴表面弹性模量统计结果， $P < 0.05$ 为差异有显著性意义；F 为抑制剂作用下长、短轴末端各自两极表面弹性模量一致性的百分比统计结果，每组百分比合计 100%

图 2 | HeLa 细胞长、短轴末端表面弹性模量随时间变化
Figure 2 | Changes of the surface elastic modulus of long axis and short axis terminal regions in HeLa cells

采用肌动蛋白纤维聚合抑制剂 Cytochalasin D(2.0 $\mu\text{mol/L}$)、肌球蛋白 II 的 ATP 酶活性抑制剂 blebbistatin(80 $\mu\text{mol/L}$) 以及肌球蛋白 II 收缩活性增强剂 Calyculin A (20 nmol/L) 分别作用于 HeLa 细胞。Calyculin A 是 1 型和 2A 型蛋白磷酸酶抑制剂, 能抑制肌球蛋白 II 的去磷酸化从而提高其活性^[17-18], 测量开始作用后 60 min 的极区表面弹性模量变化。以各组模量的最低值为基准 1。由于测量结果中的模量最低点出现位置不统一, 将 30 min 前出现最低点的情况归为一组, 命名为“前低”, 将 30 min 及之后出现低点的情况归为一组, 命名为“后低”。为便于对比并显示统计方差结果, 将各点的结果按等差值分布于纵坐标排列, 所得结果如图 2B-D 所示。

与正常组相比具有 2 个重要的特征差异: ①抑制剂处理组使细胞的长轴与短轴末端模量变化趋势与正常组不同; ②各抑制剂处理组均出现对侧末端模量最低点分布相反以及模量值升高/降低方向相反的情况, 作者认为这种长、短轴末端的模量变化差异可以理解为细胞在骨架功能受限状态下的普遍调节机制。

此外, 抑制剂处理组结果显示, 细胞在肌动蛋白纤维受抑制情况下, 细胞极区末端模量会显著下降, 但是仍有部分细胞的单侧短轴末端的模量随时间上升。与之相反, 肌球蛋白 II 收缩活性增强组表现为极区末端模量上升(其中在统计中仅有一侧长轴末端出现下降)。肌球蛋白 II 收缩活性抑制剂极区末端模量结果与肌动蛋白更为类似, 只是有一侧长轴的统计数据没有明显趋势。

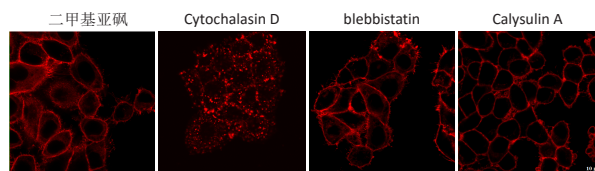
抑制剂处理前后细胞长、短轴末端表面弹性模量值, 如图 2E 所示, Cytochalasin D 抑制肌动蛋白纤维聚合使细胞表面弹性模量下降, 长轴末端的表面弹性模量较正常细胞下降显著($P < 0.05$); blebbistatin 抑制肌球蛋白 II 的 ATP 酶活性分别使细胞长轴末端模量上升和细胞短轴末端模量下降, 但作用效果不显著($P > 0.05$); Calyculin A 增强肌球蛋白 II 收缩活性使长、短轴末端模量显著上升($P < 0.05$)。与图 2B-D 的结果对比可知, Calyculin A 增强肌球蛋白 II 收缩的作用效果是显著增强表面弹性模量, 而 blebbistatin 抑制肌球蛋白 II 收缩功能对表面弹性模量整体影响较小; Cytochalasin D 抑制肌动蛋白纤维使模量整体降低, 但短轴末端模量在这一过程中却明显升高, 只抑制肌动蛋白聚合并不能全面降低细胞的表面弹性模量。

细胞对应两侧极区模量变化的一致性百分比, 将对侧两端模量最终同向升高/降低定义为对称升降, 对侧两端模量最终出现反向升高/降低定义非对称升降, 如图 2F 所示, blebbistatin 抑制肌球蛋白 II 收缩活性组对称升降最好, 而 Cytochalasin D 抑制肌动蛋白纤维组的对称升降最差, 表明当肌动蛋白纤维聚合受限制, 细胞通常会出现在对应两侧力学性能非对称调节, 这与图 2B-D 的分析一致。

从模量的变化值来看, 作者认为细胞的弹性模量降低会导致细胞更倾向于通过调节自身结构和蛋白的方式增强极区的模量以稳定自身结构和功能, 导致更多的细胞出现明显的力学性能非对称升降。而细胞的弹性模量变化不大或升高时,

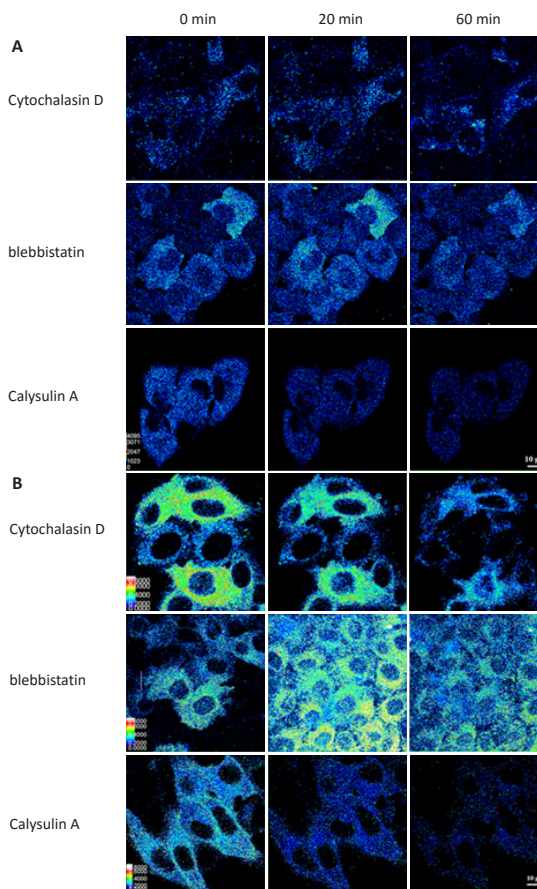
多数细胞则不需要以力学性能非对称升降做为调节方式。

2.2 肌动蛋白与肌球蛋白 II 在细胞内的分布与活化特征 为进一步阐明此调节对肌动蛋白、肌球蛋白 II 骨架的依赖方式, 对这两种蛋白以及调节肌球蛋白 II 的 Rho A 进行分析。RhoA 活化是通过 ROCK 促进肌球蛋白轻链磷酸化, 从而促进细胞的收缩^[19-20]。由于实验关注的细胞长、短轴末端位于细胞边缘, 所以选取细胞中间层的光学切面进行蛋白分布与活化检测, 以更好地展示细胞边缘特征, 如图 3, 4 所示。



图注: 以 0.02% 二甲基亚砷为空白对照组, 二甲基亚砷与 Cytochalasin D、blebbistatin、Calyculin A 分别处理细胞 60 min 后采用罗丹明鬼笔环肽 B 染色肌动蛋白纤维, 图中红色荧光显示肌动蛋白纤维排列
图 3 | 抑制剂处理 60 min 后 HeLa 细胞的肌动蛋白纤维荧光染色 (标尺 10 μm)

Figure 3 | Fluorescence staining of F-actin in HeLa cells after 60 minutes of inhibitor treatment (scale bar: 10 μm)



图注: 图 A 为抑制剂处理后的肌球蛋白 II A 荧光图, 图中荧光以灰度值表示, 白、红色为肌球蛋白 II A 聚集最密集区域; B 为抑制剂处理后 Rho A 活化效果的荧光共振能量转移图, 图中白、红色为 Rho A 活化程度最高的区域

图 4 | 抑制剂处理后 HeLa 细胞的肌球蛋白 II A 聚集以及 Rho A 活化区域图 (标尺 10 μm)

Figure 4 | Myosin IIA and activated Rho A map of the HeLa cells treated with inhibitor (scale bars: 10 μm)

图3为肌动蛋白纤维在抑制剂处理60 min后的结果, Cytochalasin D的作用效果导致细胞肌动蛋白呈区域状分布, 没有明显纤维状结构, 其他各组在细胞边缘均有纤维状排列的肌动蛋白丝, 但Calysulin A处理组不同于空白对照组和blebbistatin处理组, 表现为肌动蛋白纤维全部集中在细胞外轮廓。结合之前的数据, 作者认为肌动蛋白纤维异常集中于边缘轮廓导致细胞表面弹性模量显著升高。

图4A展示肌球蛋白II A分布密度, Cytochalasin D、blebbistatin以及Calysulin A处理组的聚集区域随时间产生的改变均不显著, 但是Cytochalasin D处理组60 min时在细胞边缘及长短轴末端仍出现聚集区域。Calysulin A的处理结果认为增强细胞表面弹性模量的是肌球蛋白II收缩活性, 而非肌球蛋白II的聚集, 因为Calysulin A处理组没有发生肌球蛋白II聚集的改变。从结果反而推测肌球蛋白II A的聚集有可能会降低表面弹性模量, 这需要今后实验的辨别。

进一步测量Rho A的活化分布, 分析细胞对肌球蛋白II A的调节可能产生的影响, 如图4B所示, Cytochalasin D处理组的Rho A活化减弱, 最终Rho A仅在细胞边缘区域有低水平的活化; blebbistatin处理组出现Rho A活化先显著增强(背景位置细胞的显著活化), 后随时间延长而再次减弱, 但活化区域没有改变; Calysulin A处理组的Rho A活化整体显著降低, 但没有区域性改变。由此作者认为, Rho A活化增强肌球蛋白II收缩的调节功能是细胞维持自身模量的一种重要手段。当模量升高时(Calysulin A处理组), 细胞会显著降低Rho A活化以降低肌球蛋白II收缩活性抵抗过高的模量出现, 这是一种负反馈调节机制; 对于blebbistatin处理组, Rho A主动抵抗肌球蛋白II的收缩活性降低而表现出高度活化, 可能正是这种负反馈机制导致细胞在blebbistatin作用下没有出现模量的显著下降。当模量降低时(Cytochalasin D处理组), Rho A并未表现出剧烈的活化, 只是维持了细胞边缘区域的少量活化, 表明在抵抗低模量时, 细胞不是通过Rho A调节肌球蛋白II收缩活性。

总之, 荧光分析实验结果显示, 肌动蛋白向细胞边缘明显聚集, 会显著增强细胞表面弹性模量, 肌球蛋白II影响表面弹性模量的方式不是通过区域性聚集, 而是通过肌球蛋白II的收缩活性来调节。

3 讨论 Discussion

肌动蛋白纤维与肌球蛋白II的收缩活性被广泛认为与细胞力学调节、适应微环境等密切相关。该研究通过实验对比, 分析这两种蛋白在调节细胞力学性质中的特征和差异。

首先, 实验结果表明: 肌动蛋白纤维的形成和聚集、肌球蛋白II的收缩是主要增强细胞表面弹性模量的因素。细胞肌动蛋白纤维的形成受到抑制会降低细胞的表面弹性模量, 这已经被许多实验所证实, BRÜCKNER等^[9]对比不同的肌动蛋白纤维抑制剂的效果, 结果表明肌动蛋白纤维受抑制会导致细胞表面弹性模量降低, 但是这种对比是建

立在测量细胞中心(核顶部区域)以及细胞长轴一侧的基础上, 而该研究作者的力学测量实验主要对比细胞力学性能趋势性改变情况下细胞自身可能的力学调节机制, 因此在整体水平上符合广泛实验结果的认可。其次, 实验结果显示其他诸多相关实验忽略的现象: 肌动蛋白纤维受抑制导致细胞模量剧烈下降时, 仍然会出现一定比例的细胞通过升高对侧模量来维持自身的结构和力学性能, 在Rho A活化实验中也显示细胞边缘位置的Rho A活化使收缩增强从而提高模量。类似的实验结果在EVEN等^[21]探究Desmin蛋白对细胞表面弹性模量影响的报道中也有体现, 这个实验表明细胞整体表面弹性模量分布是不对称的, 但是整体表面弹性模量分布图难以给出随时间的变化结果, 而该研究作者的结果对这类实验在时间序列上加以补充和确认。最后, 该研究提供的肌动蛋白纤维、肌球蛋白以及Rho A的分布及活化随时间的改变结果, 在细胞骨架蛋白层面给予细胞模量调节机制解释: 细胞会通过Rho A提供的肌球蛋白II收缩活性去平衡因肌动蛋白和肌球蛋白引起的模量趋势性改变, 即当模量升高时, 细胞会降低Rho A活性, 当模量降低时, 细胞则活化自身Rho A, 并在肌动蛋白纤维合成受抑制时维持边缘Rho A的活化。实验结果与KOPFER等^[22]的模型以及FODOR等^[23]对上皮层细胞调节中Rho A的作用有一致性, RhoA响应外部信号被激活, 并调节肌球蛋白, 实验在单个细胞层面均反映这种调控方式。

综上所述, 肌动蛋白与肌球蛋白II这两种重要细胞骨架蛋白在细胞力学性能调节中有显著作用, 主要表现在对细胞表面弹性模量的调节, 肌动蛋白纤维和肌球蛋白II收缩活性的增强使细胞表面弹性模量升高。鉴于肌动蛋白与肌球蛋白II影响疾病的范围和数量极广, 因此, 了解肌动蛋白与肌球蛋白II在细胞力学调节中的作用至关重要, 可为疾病诊断和治疗提供新手段。

致谢: 感谢国家自然科学基金(12002232, 31300771)的支持; 感谢王立、刘阳老师在实验方案上的指导, 在数据分析上的建议; 感谢徐丽萌的实验技术指导和帮助。

作者贡献: 实验设计为第一作者和通讯作者, 实验实施为第一作者, 实验评估为通讯作者, 资料收集为全体作者。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金(青年)(12002232, 31300771)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验用Hela细胞购自美国菌种保藏中心, 该研究为体外细胞基础实验, 未涉及伦理学问题。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过太原理工大学生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] 姚依村, 梁伟国, 叶冬平. 细胞骨架与力学信号传导 [J]. 中国组织工程研究, 2014,18(7):1109-1114.
- [2] CROSS SE, JIN YS, RAO J, et al. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nat Nanotechnol.* 2007;2(12):780-783.
- [3] DULIŃSKA I, TARGOSZ M, STROJNY W, et al. Stiffness of normal and pathological erythrocytes studied by means of atomic force microscopy. *J Biochem Biophys Methods.* 2006;66(1-3):1-11.
- [4] JIN H, XING X, ZHAO H, et al. Detection of erythrocytes influenced by aging and type 2 diabetes using atomic force microscope. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;391(4):1698-1702.
- [5] URAY K, MAJOR E, LONTAY B. MicroRNA Regulatory Pathways in the Control of the Actin-Myosin Cytoskeleton. *Cells.* 2020;9(7):1649.
- [6] YAM PT, WILSON CA, JI L, et al. Actin-myosin network reorganization breaks symmetry at the cell rear to spontaneously initiate polarized cell motility. *J Cell Biol.* 2007;178(7):1207-1221.
- [7] VAN HAASTERT PJM. Unified control of amoeboid pseudopod extension in multiple organisms by branched F-actin in the front and parallel F-actin/myosin in the cortex. *PLoS One.* 2020;15(12):e0243442.
- [8] MESSI Z, BORNERT A, RAYNAUD F, et al. Traction Forces Control Cell-Edge Dynamics and Mediate Distance Sensitivity during Cell Polarization. *Curr Biol.* 2020;30(9):1762-1769.e5.
- [9] BRÜCKNER BR, NÖDING H, SKAMRAHL M, et al. Mechanical and morphological response of confluent epithelial cell layers to reinforcement and dissolution of the F-actin cytoskeleton. *Prog Biophys Mol Biol.* 2019;144:77-90.
- [10] CASCIONE M, DE MATTEIS V, TOMA CC, et al. Morphomechanical and structural changes induced by ROCK inhibitor in breast cancer cells. *Exp Cell Res.* 2017;360(2):303-309.
- [11] SCHILLERS H, WÄLTE M, URBANOVA K, et al. Real-time monitoring of cell elasticity reveals oscillating myosin activity. *Biophys J.* 2010;99(11):3639-3646.
- [12] VARGA B, FAZAKAS C, WILHELM I, et al. Elasto-mechanical properties of living cells. *Biochem Biophys Rep.* 2016;7:303-308.
- [13] 徐丽萌, 罗文字, 张书伟, 等. ANLN 缺失后 Hela 细胞的力学特性与骨架蛋白变化分析 [J]. 中国组织工程研究, 2020,24(1):87-92.
- [14] PERTZ O, HODGSON L, KLEMKE RL, et al. Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature.* 2006;440(7087):1069-1072.
- [15] DULYANINOVA NG, HOUSE RP, BETAPUDI V, et al. Myosin-IIA heavy-chain phosphorylation regulates the motility of MDA-MB-231 carcinoma cells. *Mol Biol Cell.* 2007;18(8):3144-3155.
- [16] 王润生, 刘义灏, 毛克亚. 磁性纳米颗粒细胞内吞评价方法研究及进展 [J]. 中国组织工程研究, 2018,22(18):2921-2926.
- [17] ISHIHARA H, MARTIN BL, BRAUTIGAN DL, et al. Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;159(3):871-877.
- [18] LIU YJ, LE BERRE M, LAUTENSCHLAEGER F, et al. Confinement and low adhesion induce fast amoeboid migration of slow mesenchymal cells. *Cell.* 2015;160(4):659-672.
- [19] BURRIDGE K, WENNERBERG K. Rho and Rac take center stage. *Cell.* 2004;116(2):167-179.
- [20] 刘晓晨, 王改凤. 运动预适应与力竭运动大鼠心肌损伤: Rho/ROCK 信号通路的作用 [J]. 中国组织工程研究, 2020,24(11):1714-1719.
- [21] EVEN C, ABRAMOVICI G, DELORT F, et al. Mutation in the Core Structure of Desmin Intermediate Filaments Affects Myoblast Elasticity. *Biophys J.* 2017;113(3):627-636.
- [22] KOPFER KH, JÄGER W, MATTHÄUS F. A mechanochemical model for rho GTPase mediated cell polarization. *J Theor Biol.* 2020;504:110386.
- [23] FODOR É, MEHANDIA V, COMELLES J, et al. Spatial Fluctuations at Vertices of Epithelial Layers: Quantification of Regulation by Rho Pathway. *Biophys J.* 2018;114(4):939-946.

(责任编辑: MZH, ZN, ZH)