

文章编号:1004-7220(2011)06-0560-06

# 不同基底静态加载方式对兔肌成纤维细胞(前体)表达 $\alpha$ -SMA 的影响

黄岂平, 陈国宝, 方咸平  
(重庆大学 生物工程学院, 重庆 400030)

**摘要:** **目的** 通过对不同分化阶段的兔肌成纤维细胞及前体施加不同的基底应变刺激,研究此过程中细胞表达  $\alpha$ -SMA 的时间剂量关系。**方法** 选取异体蛋白植入法获得 5 d 和 7 d 的肌成纤维细胞(前体),培养于弹性膜上;利用基底静态拉伸对其分别施以应变从 0% ~ 3% 和 3% ~ 6% 的分段载荷及 0% ~ 6% 的阶跃式载荷。**结果** 3 d 阶段的肌成纤维细胞(前体)没有表达  $\alpha$ -SMA;5 ~ 7 d 阶段可以监测到  $\alpha$ -SMA 的表达;在 10 ~ 15 d 阶段则表达显著增强 ( $P < 0.01$ )。两种加载方式下,  $\alpha$ -SMA 的表达量均显著增加;分段加载作用下 SMA 的表达量更高。**结论** 肌成纤维细胞(前体)  $\alpha$ -SMA 受基底静态拉伸后表达增加,且对不同的加载方式能做出不同的响应,提示在肌成纤维细胞的分化和愈合反应过程中,力学因素扮演着十分重要的角色。

**关键词:** 肌成纤维细胞; 基底; 载荷; 应变; 蛋白表达; 分化

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

## Effect of different substrate static loading on $\alpha$ -SMA expression of rabbit myofibroblasts (protomyofibroblasts)

HUANG Qi-ping, CHEN Guo-bao, FANG Xian-ping (Bioengineering College, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

**Abstract:** **Objective** To exert different substrate strain stimulation on rabbit myofibroblasts (MFs) (proto-) at different differentiation stages so as to study the variation of  $\alpha$ -SMA expression. **Methods** By implanting heterologous protein into rabbits' peritoneal cavity, 5 d and 7 d MFs (proto-) were obtained and cultured on the elastic substrates. Strain of 0%-3% and 3%-6% as well as strain of 0%-6% were applied by substrate static stretch. **Results**  $\alpha$ -SMA expression was not found in 3 d MFs (proto-), while  $\alpha$ -SMA expression could be detected in 5-7 d MFs (proto-), and  $\alpha$ -SMA expression was significantly enhanced in 10-15 d MFs (proto-) ( $P < 0.01$ ). Under the two loading modes,  $\alpha$ -SMA expression was both significantly improved, and higher  $\alpha$ -SMA expression was presented under sectioned loading. **Conclusions**  $\alpha$ -SMA expression of MFs(proto-) is increased after the substrate static stretch in response to different loading modes, which suggests that mechanical factors can play an important role in the process of MFs differentiation and wound-healing response.

**Key words:** Myofibroblast(MF); Substrates; Loads; Strain; Protein expression; Differentiation

肌成纤维细胞(myofibroblast, MF)在伤口愈合和各种组织纤维化中发挥着重要作用<sup>[1-2]</sup>。MF在完成正常的创伤修复后,仍持续存在并分泌过量细

胞外基质,最终导致组织的修复失控<sup>[3-4]</sup>。体内多种细胞都具有分化或去分化成为 MF 的潜力,如肝星状细胞、血管平滑肌细胞、内皮细胞等<sup>[1,5-6]</sup>。MF 具

收稿日期:2011-03-01; 修回日期:2011-07-28

基金项目:重庆市自然科学基金计划项目(CSTC,2008BB5057),高等学校学科创新引智计划资助(B06023)。

通讯作者:黄岂平,副教授,E-mail:huangqp@cqu.edu.cn。

有成纤维细胞和平滑肌细胞的特征和功能。在皮肤伤口愈合过程中的肉芽组织中, MF 表达平滑肌肌动蛋白  $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -smooth muscle actin) 具有收缩和迁移的能力, 是该细胞产生高细胞收缩力的原因<sup>[7-8]</sup>。越来越多的研究表明, 胞外基质硬度和细胞骨架的收缩力在 MF 分化过程中起着十分关键的调控作用<sup>[3,4,9-10]</sup>。在 MF 分化过程中有大量的生长因子和抑制因子参与其中, 而 TGF- $\beta$ 1、fibronectin 的 ED-A 剪接变体和胞外基质的高应力状态被认为是诱导产生  $\alpha$ -SMA 阳性 MF 的重要因素<sup>[3,4,9]</sup>。近年来的研究表明, 在损伤修复过程中施加机械应力对 MF 的分化和形成有一定的影响。Sakata 等<sup>[11]</sup>通过对肝星状细胞进行机械拉伸后发现, 力学应力促进了 TGF- $\beta$ 1 的合成表达。Hinz 等<sup>[9]</sup>研究发现, MF 在不同的细胞基底硬度下,  $\alpha$ -SMA 的阳性表达量不同。Junker 等<sup>[12]</sup>在人体疤痕组织中通过力学拉伸促进了成纤维细胞向 MF 的跨分化能力,  $\alpha$ -SMA 的表达量也随着时间增长有显著的增加(1~6 d)。上述研究表明, MF 的分化与其生长的力学环境密切。而对于多数组织而言, 在损伤发生后, 都会由于原有的预应力环境被破坏而对 MF 的前体细胞产生不同程度静态的拉伸或放松。因此, 本文运用动物模型获得 MF, 研究其在不同基底拉伸应变条件下分化行为的变化特点, 为研究组织器官纤维化的发生以及愈伤反应修复提供相关的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

$\alpha$ -SMA、Tubulin- $\alpha$ Ab-2 (Clone DM1A) 抗体均购

自 Thermo 公司; FITC 标记山羊抗小鼠 IgG、Dapin、DAB 显色液、鼠尾胶原蛋白均购自北京中杉; 细胞裂解液购自 Pierce 公司。

### 1.2 实验动物

实验动物选择体重为 1.5 kg 新西兰兔来进行。每个分化阶段选用 8~10 只动物作为一组进行原代细胞提取。

### 1.3 不同分化阶段 MF 的获得

采用澳大利亚昆士兰血管生物学研究中心建立的一套成熟的获得 MF 的动物模型, 获得实验所需细胞<sup>[13-14]</sup>。将外源蛋白植入动物腹腔, 利用动物自身产生的免疫反应, 使动物的巨噬细胞包裹外源蛋白, 然后间皮细胞进一步包裹在外层, 从而形成一层被间皮细胞包裹的 MF。分组饲养植入外源蛋白的实验兔, 植入蛋白 3、5、7、10、15 d 后用静脉注射法杀死动物, 在无菌条件下取出腹腔内植入的蛋白。用 0.25% 的 II 型胶原酶 (Gibico) 消化并离心收集细胞, 以含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 1:1 培养基在 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 下培养 48 h 后用于实验。

### 1.4 力学加载方式

将所得 5 d 和 7 d 细胞按要求接种在硅胶膜上, 使用本实验室自主研发的细胞基底单轴拉伸装置 (专利号: 200720123317) 分别施加 0%~3%~6% 和 0%~6% 的静态拉伸。对 0%~3%~6% 组处理为: 先通过拉伸弹性膜至 3% 应变 (按柯西应变公式), 维持该应变加载 2 h, 然后将基底应变提高到 6% 再加载 2 h。0%~6% 组直接施加 6% 的应变 4 h, 如图 1 所示。以 5 d 和 7 d 阶段种植在硅胶膜上未拉伸细胞作为对照。处理细胞进行免疫荧光法染色, 检测  $\alpha$ -SMA 表达量的变化情况。

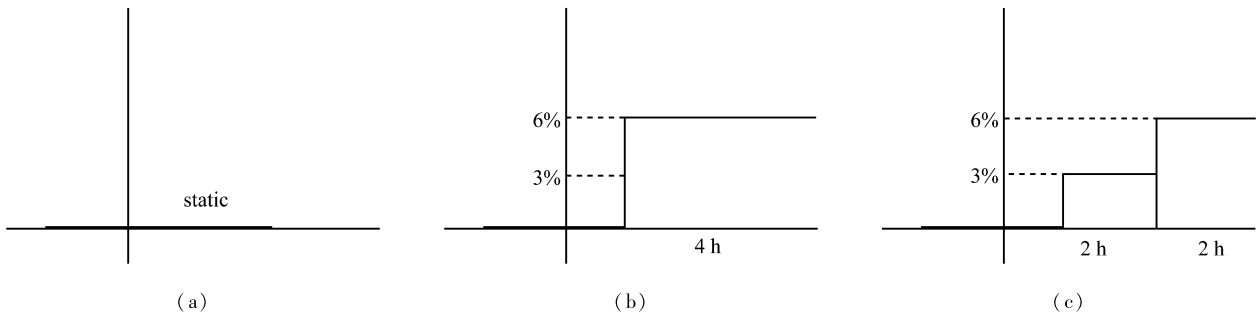


图1 力学加载方式 (a) 静态未拉伸(对照), (b) 0%~6% 拉伸, (c) 0%~3%~6% 拉伸

Fig.1 Mode of mechanical loading (a) Static with no stretch (control), (b) 0%-6% stretch, (c) 0%-3%-6% stretch

### 1.5 成肌纤维细胞(前体) $\alpha$ -SMA 免疫荧光检测

采用抗  $\alpha$ -SMA 抗体, FITC 标记的抗小鼠 IgG (北京中杉金桥) 标记不同处理后的细胞  $\alpha$ -SMA, 在激光共聚焦显微镜下观察绿色荧光。分别以内皮细胞和平滑肌细胞作为阴性和阳性对照组。实验重复 3 次以上。

### 1.6 $\alpha$ -SMA 蛋白水平测定

采用 Western blot 蛋白印迹法。将不同处理的细胞用蛋白裂解液裂解细胞, 测定细胞的总蛋白, 以 10SDS-PAGE 分离, 电转移蛋白至 NC 膜上, 5% 无脂奶粉封闭, 与抗  $\alpha$ -SMA 抗体 4  $^{\circ}$ C 孵育杂交过夜, 辣根过氧化物酶标记的抗小鼠二抗孵育, 最后用 DAB 显色。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。实验重复 3 次以上。

### 1.7 数据分析

实验结果以均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。运用  $t$  检验, 以  $P < 0.05$  为显著差异,  $P < 0.01$  为极显著差异, 有统计学意义。

## 2 实验结果

### 2.1 MF 的鉴定

2.1.1 运用免疫荧光法对细胞进行鉴定 通过免疫荧光法对所得的细胞做荧光鉴定。用内皮细胞和平滑肌细胞作对照, 结果表明内皮细胞中没有  $\alpha$ -SMA, 所以没有荧光产生; 而平滑肌细胞中因含有  $\alpha$ -SMA, 所以表现出特别强的荧光。本实验通过模型获得的细胞产生了较强的荧光, 如图 2 所示。

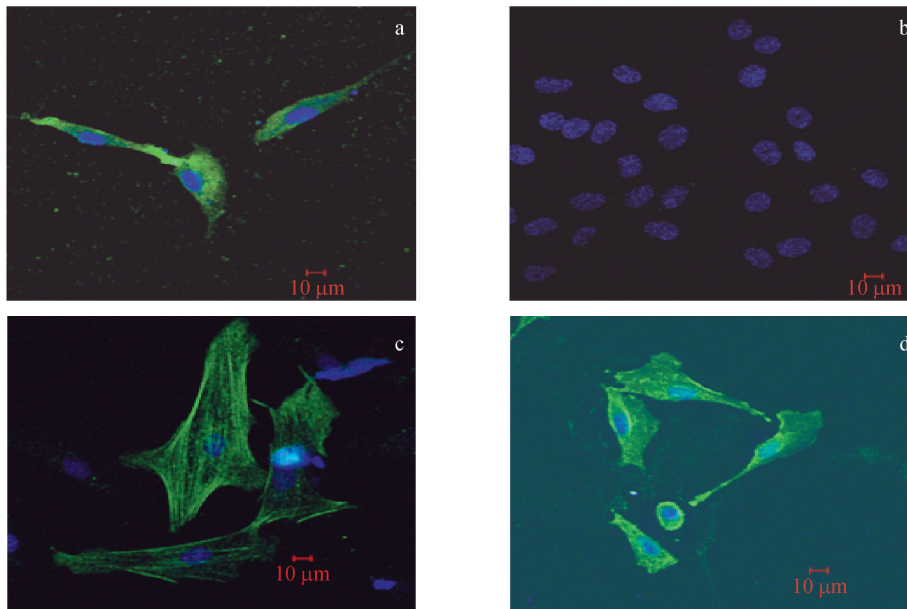


图2 不同阶段肌成纤维细胞鉴定( $\alpha$ -SMA 免疫荧光, FITC 标记, 绿色) (a) 平滑肌细胞(阳性对照), (b) 内皮细胞(阴性对照), (c) 肌成纤维细胞(10 d), (d) 肌成纤维细胞(15 d)

Fig.2 Identification of myofibroblast (MF) at different stages ( $\alpha$ -SMA FITC-labeled immunofluorescence, green) (a) Smooth muscle cells (positive control), (b) Endothelial cells (negative control), (c) MF (10 days), (d) MF (15 days)

2.1.2 蛋白印迹法对细胞进行鉴定 将所得细胞、平滑肌细胞、内皮细胞分别用蛋白裂解液裂解后, 进行蛋白印迹, 所得结果如图 3 所示。

通过 DAB 显色表明, 肌成纤维细胞均表达  $\alpha$ -SMA 而显出特有的条带, 阳性对照细胞也表达出较强的显色条带, 而阴性对照细胞因不表达  $\alpha$ -SMA 不产生条带。这有力地证明本实验组通过模型所获得的细胞是 MF, 为后续试验细胞来源提供了有力的保障。

### 2.2 不同分化阶段 MF 的鉴定

将硅胶膜上的细胞进行多次取样, 运用免疫荧光法确定 MF 分化的起始阶段。在激光共聚焦显微镜下, 观察到细胞随时间增加表达的  $\alpha$ -SMA 荧光强度增加, 但细胞在 3 d 阶段没有分化表达  $\alpha$ -SMA (见图 4)。利用图像处理软件 Quantity One 检测细胞内的  $\alpha$ -SMA 荧光强度值, 以同批次染色的平滑肌细胞  $\alpha$ -SMA 荧光强度值进行归一化处理, 得出不同阶段 MF 的相对荧光强度。5 d 时有  $\alpha$ -SMA 荧光值出现,

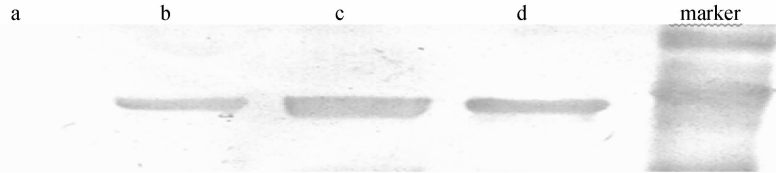


图3 不同阶段肌成纤维细胞鉴定( $\alpha$ -SMA 蛋白印迹) (a)平滑肌细胞(阳性对照), (b)肌成纤维细胞(15 d), (c)肌成纤维细胞(10 d), (d)内皮细胞(阴性对照)

Fig.3 Identification of MF at different stage ( $\alpha$ -SMA Western blot) (a) Smooth muscle cells (positive control), (b) MF (15 days), (c) MF (10 days), (d) Endothelial cells (negative control)

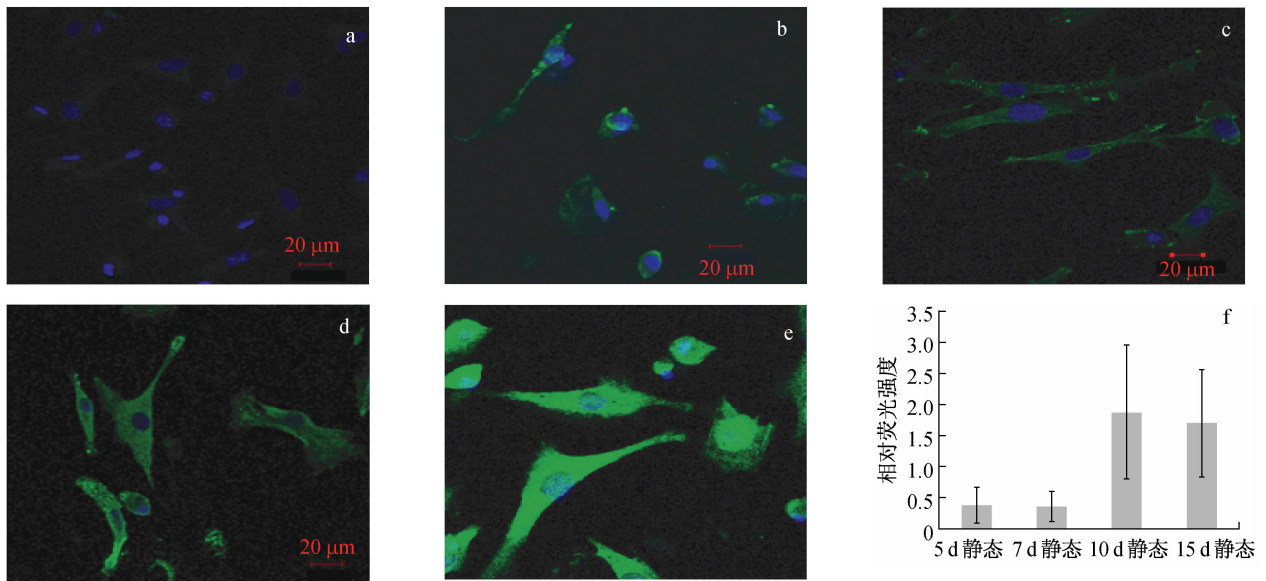


图4 肌成纤维细胞在3 d(a)、5 d(b)、10 d(c)、15 d(d)不同阶段的激光共聚焦显像图片及相对荧光强度(f) (绿色荧光:FITC 标记的  $\alpha$ -SMA; 蓝色荧光:DAPI 染的细胞核)

Fig.4 Confocal microscopic images for differentiation of MF at 3 d(a), 5 d(b), 10 d(c), 15 d(d), respectively, and the total fluorescence intensity (f) (green fluorescence FITC labeled for  $\alpha$ -SMA, blue for DAPI staining of nuclei)

且略大于7 d的荧光值;但经 *t* 检验,发现两者没有显著差异。10 d、15 d组的  $\alpha$ -SMA 荧光强度均显著高于7 d组( $P < 0.01$ ),表明7~10 d  $\alpha$ -SMA 表达有明显的增加,但10~15 d无显著差异( $P > 0.1$ )。

### 2.3 基底静态拉伸对 MF 分化的影响

**2.3.1 免疫荧光法检测 MF 的分化** 选取异体蛋白植入后,对5 d和7 d阶段的细胞分别施加0%~3%~6%和0%~6%的静态处理。在共聚焦显微镜下检测的细胞荧光照片如图5所示。

如图6所示,将各实验组的荧光强度与同一批次的对照组做归一化处理得到其相对荧光强度。对比5 d静态、5 d 0%~3%~6%、5 d 0%~6%的相对荧光强度均值,以5 d静态为对照进行计算,0%

~3%~6%拉伸后增加了61.63%;0%~6%拉伸后增加了48.96%。表明静态拉伸对5 d阶段的肌成纤维细胞的分化具有促进作用;而经过0%~3%~6%分段载荷处理的细胞分化作用更加明显,经 *t* 检验,发现拉伸后相对荧光强度显著增加( $P < 0.05$ )。比较7 d静态、7 d 0%~3%~6%、7 d 0%~6%的荧光强度均值,以7 d静态为对比进行计算,发现0%~3%~6%拉伸后相比较增加了56.73%;0%~6%拉伸后相比较增加了18.29%。表明静态拉伸对7 d阶段MF的分化具有促进作用;而经过7 d 0%~3%~6%处理的细胞的分化作用明显,经 *t* 检验,发现拉伸后相对荧光强度显著增加( $P < 0.05$ )。

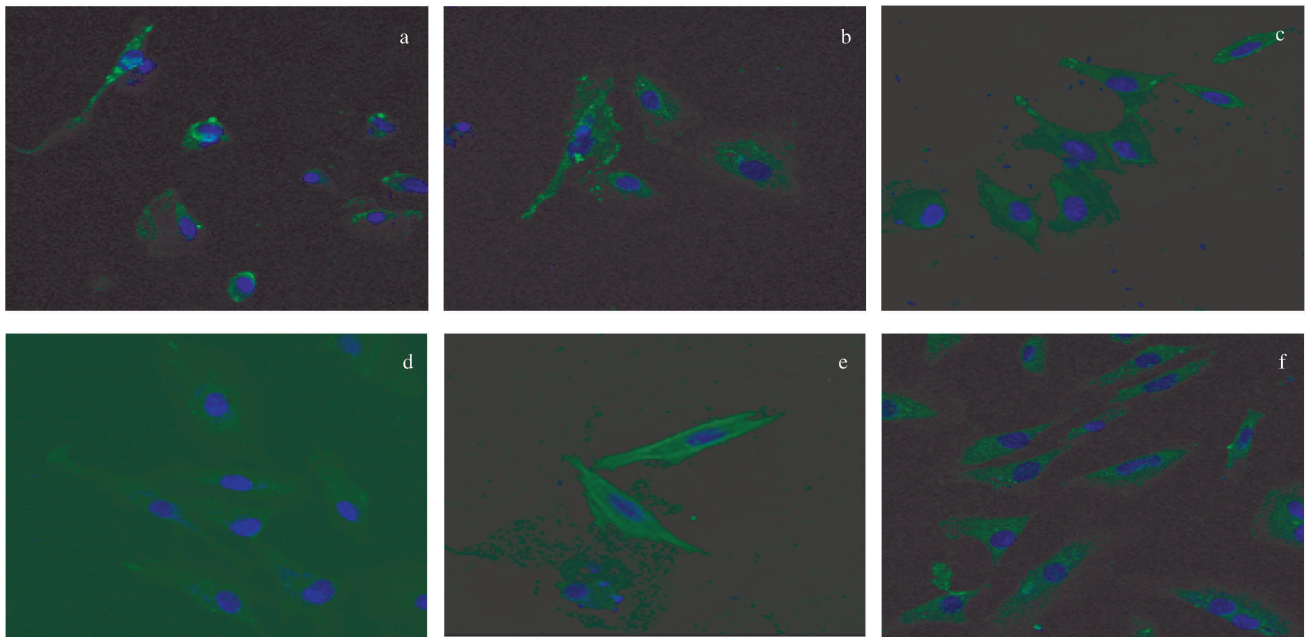


图5 不同阶段不同处理后肌成纤维细胞共聚焦图片(绿色荧光:FITC标记的 $\alpha$ -SMA;蓝色荧光:DAPI染的细胞核) (a) 5 d 静态膜上的肌成纤维细胞(对照组), (b) 5 d 经过0%~3%~6%拉伸的肌成纤维细胞, (c) 5 d 经过0%~6%拉伸的肌成纤维细胞, (d) 7 d 静态膜上的肌成纤维细胞(对照), (e) 7 d 经过0%~3%~6%拉伸的肌成纤维细胞, (f) 7 d 经过0%~6%拉伸的肌成纤维细胞

Fig.5 Immunofluorescence confocal images of MF at different stages with different treatment (green fluorescein FITC labeled for  $\alpha$ -SMA, blue for DAPI staining of nuclei) (a) MF on static membrane at 5 d (control) (b) MF with 0%-3%-6% stretch at 5 d, (c) MF with 0%-6% stretch at 5 d, (d) MF on static membrane at 7 d (control), (e) MF with 0%-3%-6% stretch at 7 d, (f) MF with 0%-6% stretch at 7 d

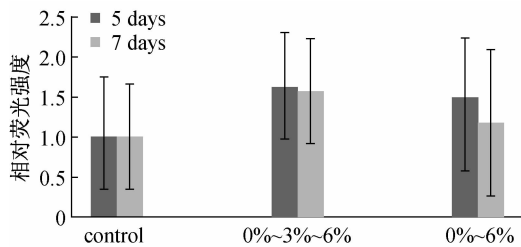


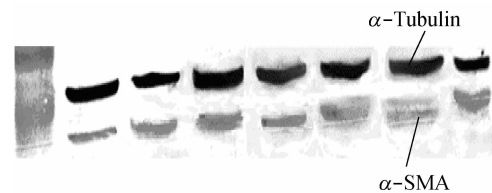
图6 不同处理下5 d和7 d的肌成纤维细胞FITC标记的 $\alpha$ -SMA相对荧光强度值

Fig.6 Fluorescence intensity of FITC-labeled  $\alpha$ -SMA with different treatment at 5, 7 d, respectively

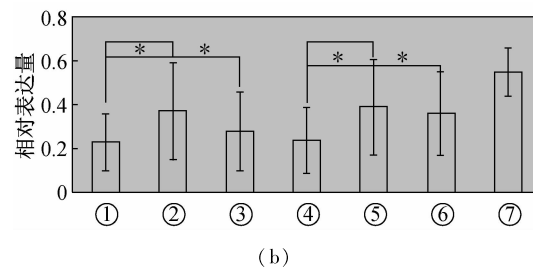
**2.3.2 Western印迹法检测MF分化** 实验分别对c-5、cs-5-0%~3%~6%、cs-5-0%~6%、c-7、cs-7-0%~3%~6%、cs-7-0%~6%处理的细胞进行裂解,然后进行western blot。实验结果如图7所示。

为了定量检测出 $\alpha$ -SMA的量,采用微管蛋白作为内参,以阳性对照细胞中 $\alpha$ -SMA与 $\alpha$ -Tubulin的比值对其他组进行归一化的处理。

对5 d的MF试验所得结果表明,经过静态拉伸的MF分化指标 $\alpha$ -SMA明显增加;对5 d 0%~



(a)



(b)

图7 不同阶段不同处理的肌成纤维细胞蛋白印迹图(a)及相对表达量(b)

Fig.7 Western blot (a) of MF at different stages with different treatment and relative expression (b) (① 7 d 静态膜上的肌成纤维细胞(对照组), ② 7 d 经过0%~3%~6%拉伸的肌成纤维细胞, ③ 7 d 经过0%~6%拉伸的肌成纤维细胞, ④ 5 d 静态膜上的肌成纤维细胞, ⑤ 5 d 经过0%~3%~6%的肌成纤维细胞, ⑥ 5 d 经过0%~6%拉伸的肌成纤维细胞, ⑦ 阳性对照(平滑肌细胞))

3%~6%与5 d 静态  $t$  检验,  $P < 0.05$ ; 对5 d 0%~3%与5 d 静态  $t$  检验,  $P < 0.05$ , 说明拉伸后均有显著差异。

对7 d 的 MF 试验所得结果表明, 经过静态拉伸的 MF 分化指标  $\alpha$ -SMA 明显增加; 对7 d 0%~3%~6%与7 d 静态  $t$  检验,  $P < 0.05$ ; 对7 d 0%~3%与7 d 静态  $t$  检验,  $P < 0.05$ , 说明拉伸后均有显著差异。

### 3 讨论

力学微环境的改变和细胞基底硬度的变化对 MF 的分化起到了调控作用<sup>[15]</sup>。而  $\alpha$ -SMA 作为 MF 分化程度的标志, 具备收缩迁移的能力, 能够从分化及转分化部位到达其发挥作用的间质部位, 并使细胞外基质收缩变形; 这样的迁移和收缩引起组织器官内结构和机械力环境的改变, 是组织纤维化、组织黏连、疤痕组织形成的基础。

本文对不同分化阶段的 MF 施加一定的基底静态拉伸应变, 改变了其力学微环境。基底拉伸应变情况下, 整联蛋白(integrin)因基底应变变化而发生位移, 细胞骨架做出相应的调整; 按 Ingber 等<sup>[16]</sup>提出的张力整合模型, 应力纤维受拉伸而引起其等长张力升高, 细胞形态也做出相应的改变。本文认为, 由于  $\alpha$ -SMA 能够产生更高的细胞收缩力<sup>[7-8]</sup>, 故  $\alpha$ -SMA 的表达是细胞感受到细胞骨架张力提高后所作出回馈。当基底应变引起应力纤维的等长张力提高后, 原来细胞内的肌动蛋白不足以维持这样的高张力状态而面临解聚, 于是细胞必然启动能够产生高收缩力  $\alpha$ -SMA 表达以期建立新的平衡。同时,  $\alpha$ -SMA 可以作为一种力学传导器, 连接力学传感因子并且增加其在应力诱导下的表达<sup>[17]</sup>。因此,  $\alpha$ -SMA 的表达将表现出一个正反馈的调节。当细胞启动其表达之后,  $\alpha$ -SMA 出现在细胞的应力纤维中, 使得细胞对力刺激更加敏感; 于是细胞进一步加强  $\alpha$ -SMA 的表达, 促进细胞向肌成纤维细胞分化。

本实验结果表明, 基底的静态拉伸应变对 MF 分化具有明显的促进作用。而不同形式的力学拉伸, 即相同分化阶段的 MF, 拉伸 0%~3%~6% 比 0%~6%  $\alpha$ -SMA 的表达量更明显。该结果更进一步表明,  $\alpha$ -SMA 的表达存在对力刺激正反馈的机制, 3% 的应变刺激起到了某种预激活的作用, 使得细胞对基底应变刺激更敏感, 从而表现出高于直接

加载到 6% 所产生的效果。当然也有可能细胞在 6% 的应变范围内, 是对应变加载次数响应而非应变大小响应, 需要进一步实验的验证。

基底应变对 MF(前体)分化的影响, 首先是 MF(前体)对应变的感知、传递与传导过程, 而这一过程与细胞的信号通路有着密切的关系。力学信号和化学信号在此过程中如何相互作用是一个值得关注的问题<sup>[18-19]</sup>。Wipff 等<sup>[20]</sup>发现, 在弹性系数较大的基底上, 肌成纤维细胞的收缩可以引起胞外基质中结合的潜在的 TGF- $\beta$ 1 因子的释放; 而在较软基底上, 由于细胞收缩力引起的变形在细胞和胞外基质之间分配的变化, 则不能引起 TGF- $\beta$ 1 因子的响应, 这个过程不依赖蛋白酶的活性而与应力纤维和细胞收缩行为有关。结合本文的结果, 认为  $\alpha$ -SMA 的高收缩力状态, 可能是力化学信号“串话”的一个体现, 希望能进一步研究探讨。

### 参考文献:

- [1] Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases [J]. *J Pathol*, 2003, 200(4): 500-503.
- [2] Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair [J]. *J Invest Dermatol*, 2007, 127(3): 526-537.
- [3] Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, *et al.* The myofibroblast: One function, multiple origins [J]. *Am J Pathol*, 2007, 170(6): 1807-1816.
- [4] PharmD AD, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast [J]. *Wound Repair Regen*, 2005, 13(1): 7-12.
- [5] Shen H, Fan JH, Minuk G, *et al.* Apoptotic and survival signals in hepatic stellate cells [J]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2007, 32(5): 726-734.
- [6] Hinz B, Gabbiani G. Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, 14(5): 538-546.
- [7] Tomasek JJ, Vaughan MB, Kropp BP, *et al.* Contraction of myofibroblasts in granulation tissue is dependent on Rho/Rho kinase/myosin light chain phosphatase activity [J]. *Wound Repair Regen*, 2006, 14(3): 313-320.
- [8] Goffin JM, Pittet P, Csucs G, *et al.* Focal adhesion size controls tension-dependent recruitment of alpha-smooth muscle actin to stress fibers [J]. *J Cell Biol*, 2006, 172(2): 259-268.
- [9] Hinz B. Masters and servants of the force: the role of matrix adhesions in myofibroblast force perception and transmission [J]. *Eur J Cell Biol*, 2006, 85(3-4): 175-181.