

文章编号:1004-7220(2012)06-0661-07

基底硬度与细胞因子 TGF- β_1 协同作用 对肝细胞表型的影响

王红兵^a, 徐以娟^a, 徐秋华^a, 于光磊^b, 邹小兵^c, 杨力^a, 白洁^c, 杨雨^a, 张持^a
(重庆大学 a. 生物工程学院, 生物流变科学与技术教育部重点实验室; b. 数学与统计学院; c. 化学工程学院, 重庆 400044)

摘要: **目的** 通过建立与肝组织生理和病理硬度相当的体外培养模型,探讨基底硬度和 TGF- β_1 协同作用对肝细胞表型变化的影响。**方法** 采用免疫荧光显微观测技术及 Western Blotting 等试验方法,研究肝细胞在不同硬度梯度的聚丙烯酰胺基底膜上的细胞形态调整、运动变化特征、骨架构象以及整合素、E-钙粘素、白蛋白和 α -平滑肌动蛋白表达的差别,并通过图像分析软件对上述结果进行定量分析。**结果** 3.6 kPa 基底膜上单个分散细胞运动变形活跃,但群体细胞极化变小,肌动蛋白沿皮质下呈环状排列,E-钙粘素和白蛋白表达高,整合素和 α -平滑肌动蛋白的表达水平较低,加药组与对照组变化趋势一致;30 kPa 基底膜上细胞运动变形欠活跃,加药组与对照组相比,E-钙粘素和白蛋白表达均下调, α -平滑肌动蛋白表达上调;30 kPa 与 3.6 kPa 对照组相比,30 kPa 与 3.6 kPa 加药组相比,E-钙粘素及白蛋白表达均下调($P < 0.05$), α -平滑肌肌动蛋白的表达上调($P < 0.05$)。10 kPa 基底膜上对照组和加药组与 30 kPa 和 3.6 kPa 对照组和加药组相比,均无显著性差异。**结论** 基底硬度增加可诱导肝细胞表型转化,并促进 TGF- β_1 对肝细胞代谢行为的影响。

关键词: 基底硬度; 细胞表型; 协同作用; 体外培养; 细胞形态

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

Synergistic effects from substrate stiffness and cytokine TGF- β_1 on phenotypic transformation of hepatocytes

WANG Hong-bing^a, XU Yi-juan^a, XU Qiu-hua^a, YU Guang-lei^b, ZOU Xiao-bing^c,
YANG Li^a, BAI Jie^c, YANG Yu^a, ZHANG Chi^a (a. Key laboratory of Biological Rheological
Science and Technology, Ministry of Education, Bioengineering College; b. College of Mathematical and Statis-
tics; c. Chemistry and Chemical Engineering College, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract: Objective To explore the synergistic effects of substrate stiffness and cytokine TGF- β_1 on phenotypic transformation of hepatocytes by establishing an *in vitro* culture model with the substrate stiffness that is relevant to hepatic cells physiologically and pathologically. **Methods** Immunofluorescence and Western blotting were adopted to observe the morphological adjustment, motion characteristics, cytoskeleton arrangement of hepatocytes on polyacrylamide substrates with different stiffness, as well as the changes in expression of integrin and phenotypic markers E-cadherin, albumin and α -smooth muscle actin (α -SMA). Image analysis software was also used for quantitative study on the obtained data. **Results** On the 3.6 kPa substrates, the scattered single cells were actively deformed and relocated, but the bulk cell population had little change in polarization and microfilament organization. Muscle actin was assembled as cortical ring in cell periphery. There was more abundant expression of E-cadherin and albumin, but less expression of integrin and α -SMA in TGF- β_1 treated group as compared to the control group. On the 30 kPa substrates, the motion and deformation of cells were not so active,

收稿日期:2011-12-13; 修回日期:2012-02-17

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30870608),国家111计划资助项目(B0623)。

通讯作者:王红兵,副教授,E-mail: whbdzx@yahoo.com.cn。

and expression of both E-cadherin and albumin in TGF- β_1 treated group was decreased, while that of α -SMA was increased as compared to the control group. For 30 kPa and 3.6 kPa control groups and 30 kPa and 3.6 kPa TGF- β_1 treated groups, expression of both E-cadherin and albumin was reduced ($P < 0.05$), but that of α -SMA was increased ($P < 0.05$), while no significant differences were found in both 10 kPa control group and TGF- β_1 treated group, as well as in 30 kPa and 3.6 kPa control groups and TGF- β_1 treated groups. **Conclusions**

The increase of substrate stiffness can induce transformation of hepatocyte phenotype and promote the influence of TGF-beta 1 on behavior of hepatocyte metabolism.

Key words: Substrate stiffness; Cell phenotype; Synergistic effects; *In vitro* culture; Cell morphology

转化生长因子- β (transforming growth factor- β) 是一类具有广泛生物学活性的多肽,哺乳动物体内主要存在 TGF- $\beta_1 \sim \beta_3$ 三种形式,在肝脏中含量最高、生物活性最好的是 TGF- β_1 ^[1-2]。TGF- β_1 通过影响胞外基质的代谢平衡而参与纤维化病变过程,是目前公认的致纤维化作用最强的细胞因子^[3-4]。Kaimori 等^[5]在常规培养皿表面观察 TGF- β_1 对肝细胞表型变化的诱导作用发现,72 h 就可使肝细胞由上皮样表型变为成纤维样细胞表型,然而纤维化病变在体内需要经年累月的积累才可能发生。上述实验结果说明,该研究模型对于观察肝细胞表型改变过程存在很大缺陷。

细胞表型的维持与其生活环境的生态稳定性密切相关。细胞生活环境的生态结构应包含生物物理环境与生物化学环境两部分,在肝纤维化病变形成过程中不仅肝内生化环境发生了明显改变,如 TGF- β 分泌增多并在局部聚集^[6-7];与此同时,TGF- β 促进胞外基质的合成和堆积,从而引起肝组织进行性硬化,其中环境物理硬度的变化也对肝内细胞的生物学行为产生重要影响。研究发现,接种于不同硬度基底膜上的细胞集群表现出完全不同的行为,软基底上的细胞容易形成类似组织的三维集落;而硬基底上的细胞则比较分散,各自铺展^[8],表明细胞微环境的物理特性与细胞表型的形成和维持密切相关。

正常肝组织的硬度为 1.5 ~ 4.5 kPa,肝纤维化中后期和末期硬度分别为 4.1 ~ 12.9、16.3 ~ 48 kPa。然而,目前体外细胞培养使用的塑料培养皿其表面硬度为 1 ~ 10³ MPa,远远超过肝纤维化末期肝组织的硬度^[9],如此极端的生活条件必然导致细胞生物学行为的演变与在体内实际病理过程相差甚远。同时,TGF- β_1 虽然是公认的最强的致纤维化因子,但它在如胚胎发生、器官形成等生理学过程中作为生物活性物质发挥了正常的调控作用,那么究竟

是什么因素导致其作用功能改变的呢?显然,TGF- β_1 参与的炎症过程及其对胞外基质代谢平衡的影响造成局部组织状态的改变是最具病理意义的。Kaimori 等^[5]的实验结果与体内实际病程的巨大差异提示了这样的信息:基底的硬度变化可能会极大加快 TGF- β_1 对肝细胞表型变化的诱导作用。

因此,如何评估生物物理环境与生物化学环境改变的双重影响在肝纤维化病变发生发展过程中的作用,是研究其病理生理变化机制过程中不能回避的问题。本文拟通过建立与肝组织生理和病理硬度相当的体外培养模型,探索基底硬度和 TGF- β_1 协同作用对肝实质细胞生物学行为的影响,以加深协同作用对肝纤维化病变影响的认识。

1 材料与方法

1.1 细胞

人肝细胞株 (human liver cell, L02),购自上海细胞生物研究所。用添加 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基于 37 °C, 5% CO₂ 条件下培养。

1.2 基底膜的制备及力学特性测定

选定聚丙烯酰胺凝胶基底膜的硬度为 3.6、10、30 kPa,分别对应正常肝组织、肝纤维化中后期及末期的硬度。

聚丙烯酰胺凝胶基底的制备主要参照文献^[9]进行。将不同配比的水凝胶用旋转流变仪测定其复合模量,从而找出 3.6、10、30 kPa 所对应的配方。

1.3 基底膜上的细胞培养

实验分为用 10 ng/mL 的 TGF- β_1 处理组和对照组。将制备好的基底膜用紫外灯灭菌及 PBS 溶液洗涤后接种 (5×10^4 /mL),培养 12 h 后,对两组肝细胞进行形态学观察。72 h 后,对 E-钙粘素、白蛋白和 α -平滑肌动蛋白 (α -SMA) 进行免疫荧光染色及蛋白表达水平检测^[10]。肝细胞属上皮类细胞,

若细胞失去上皮样特征,则细胞连接分子 E-钙粘素表达会下调,肝细胞合成分泌的重要功能蛋白—白蛋白的表达也会发生改变;与此同时,若细胞获得间充质样的表型,则表现为 α -SMA 表达上调、骨架重组。TGF- β_1 通过影响细胞表型相关特征分子的表达,在诱导细胞表型转换中起着非常重要的作用。因此,本文选择以上相关蛋白的表达改变作为表征肝细胞表型变化的特征指标^[7]。

1.4 细胞几何形状变化分析

以铺展面积、长轴、短轴等几何参数描述细胞形状变化特征,采用 Image J 软件对细胞形态学参数进行连续跟踪测量。把细胞看成一个椭圆,作为一个形态标准(见图 1)。

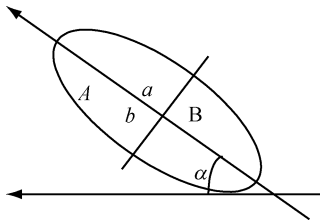


图 1 细胞形变指标示意图
 Fig.1 Schematic of cell deformation index

(1) 定义:长轴为 $(A+B)$,短轴为 $(a+b)$;方位角为 α ,代表细胞取向。以细胞轴率和铺展面积作为细胞形状变化的数值参考。

(2) 轴率 = 细胞长轴/细胞短轴 (L/S) 。 L 为细胞两端的最远距离 $(A+B)$, S 为与长轴垂直方向上细胞的最宽距离 $(a+b)$ 。

(3) 铺展投影面积测定:应用 Image J 软件,点击鼠标沿整个细胞外沿圈定,即可得到。

1.5 细胞运动行为表征

净迁移距离为观测初始时间细胞的几何中心与 60 min 后细胞几何中心之间的直线距离^[11]。用 Image J 测量每个时间点内细胞的几何中心二维坐标 (x,y) ,时间间隔为 5 min,每张图至少取 10 个细胞,重复 3 次。

1.6 统计分析

实验结果以均数 \pm 标准差表示,采用 t 检验,* $P < 0.05$ 表示有显著差异,** $P < 0.01$ 表示有极显著差异。

2 结果

2.1 水凝胶复合模量测定

通过旋转流变仪对不同配比的水凝胶复合模量的测定,得到 3.6、10、30 kPa 水凝胶所需的丙稀酰胺、N,N-甲叉双丙稀酰胺、双蒸水的量如表 1 所示。

表 1 不同硬度水凝胶的配方

Tab.1 Ingredient of hydrogel with different stiffness

水凝胶膜硬度/kPa	丙稀酰胺/mL	双丙稀酰胺/mL	双蒸水/mL
3.6	1.25	1	2.75
10	2	1.5	1.5
30	2.25	2.75	0

2.2 形态学观察

3.6 kPa 软膜上对照组和加药组较 30 kPa 硬膜上细胞的铺展面积小,但软膜上细胞铺展面积变化幅度较硬膜上大(见图 2)。

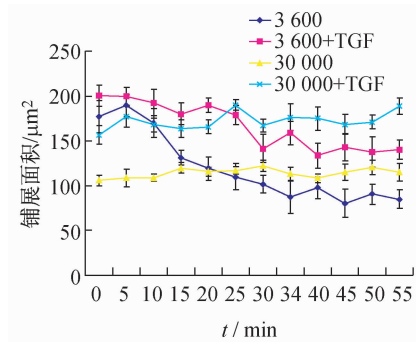


图 2 TGF- β_1 处理组与对照组不同基底硬度膜上肝细胞铺展面积随时间变化图

Fig.2 Variation of cell spreading area of hepatic cells on different substrates with time for TGF- β_1 treated and control groups

3.6 kPa 软膜上对照组和加药组细胞长短径比值随时间(形变伴随位移调整)推移均呈逐渐变小趋势,30 kPa 硬膜上对照组和加药组细胞长短径比值变化不明显(见图 3)。

3.6 kPa 软膜上对照组细胞迁移净位移随时间变化呈陡然变小趋势,其余 3 组变化均不明显。但 30 kPa 硬膜上加药组细胞较 3.6 kPa 软膜上加药组细胞迁移净位移大(见图 4)。

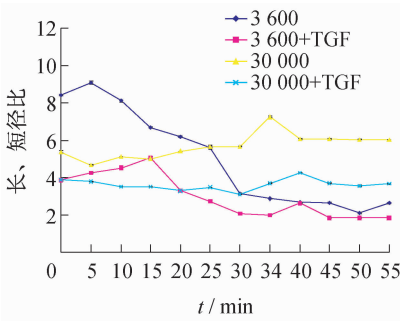


图3 TGF-β₁ 处理组与对照组不同基底硬度膜上肝细胞长径/短径比随时间变化图

Fig. 3 Variation of length to width ratio of hepatic cells on different substrates with time for TGF-β₁ treated and control groups

2.3 免疫荧光染色及蛋白表达水平检测 (Western Blotting)

3.6 kPa 软膜上加药组与对照组的细胞骨架构象均为皮质下环,且群体细胞极化变小,细胞间接触边界延长,但整合素荧光值较低。10 kPa 较硬和30 kPa硬膜上细胞极化逐渐变大,且较硬和硬膜加药组细胞较对照组分散,极化和张力进一步增加,整合素荧光值也明显升高(见图5、6)。

3.6 kPa 软膜上加药组与对照组 E-钙粘素荧光值相当,但明显高于10 kPa 较硬和30 kPa 硬膜上细胞的相对荧光值,加药组 E-钙粘素荧光值与基底硬

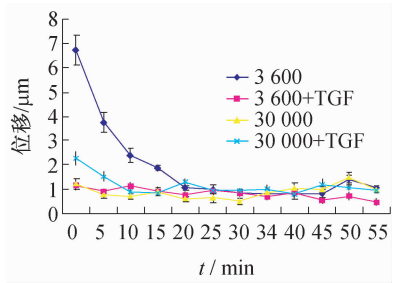


图4 TGF-β₁ 处理组与对照组肝细胞在不同硬度基底膜上每5 min 迁移净位移随时间变化图

Fig. 4 Variation of net distance of hepatic cells on different substrates in every 5 minutes with time for TGF-β₁ treated and control groups

度变化呈负相关(见图7)。

软膜上加药组与对照组白蛋白和 α-SMA 荧光值相当,白蛋白荧光值随着基底硬度的增加而下降,α-SMA 荧光值随着基底硬度的增加而上升,30 kPa 加药组更为明显(见图8、9)。

Western Blotting 结果表明,对照组 E-钙粘素和白蛋白的表达量随着基底硬度的增加而逐渐减少,但 α-SMA 的表达量却与之相反。在同一硬度的基底膜上,加药组与对照组相比 E-钙粘素和白蛋白表达均下调,α-SMA 表达上调(见图7~9)。

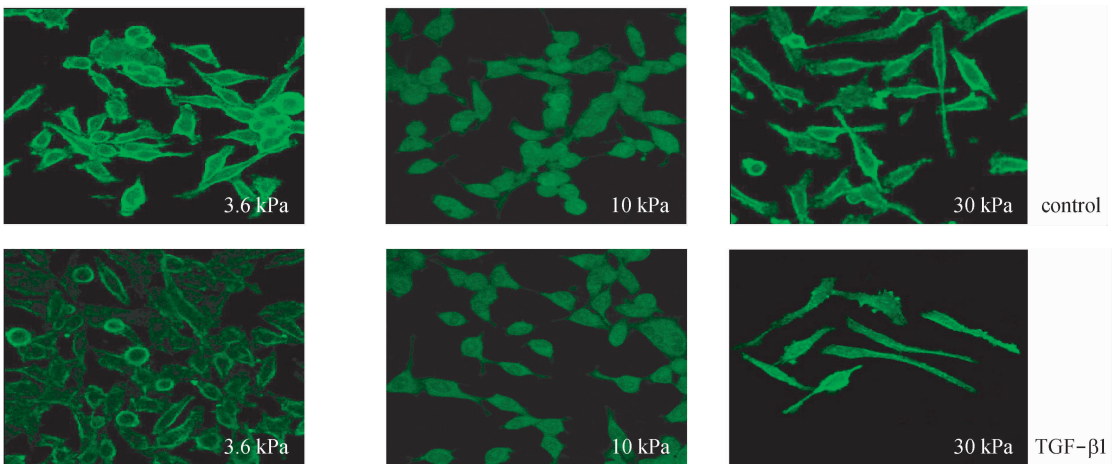


图5 肝细胞在不同硬度膜上用 TGF-β₁ 处理 72 h 后骨架构象变化

Fig. 5 Cytoskeleton arrangement of hepatic cells on different substrates treated with TGF-β₁ in 72 hours

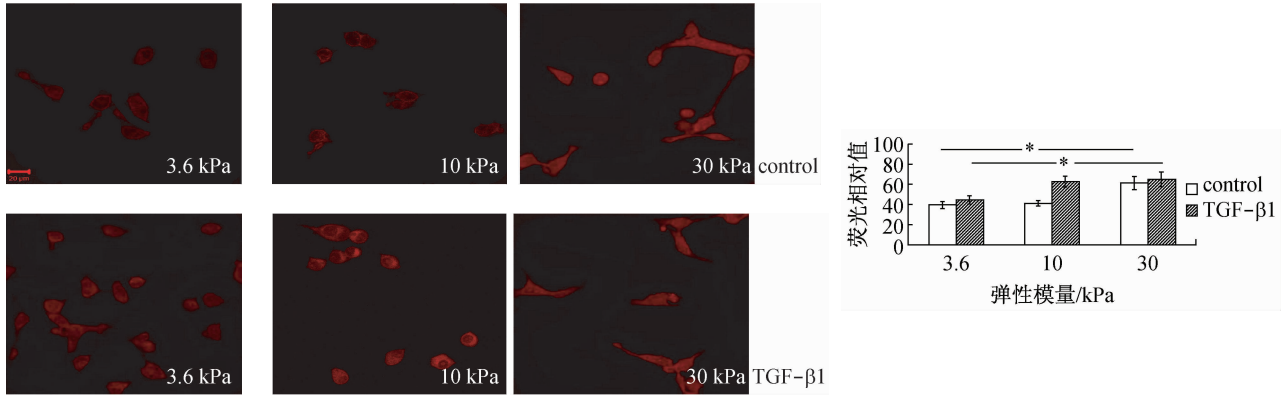


图 6 肝细胞在不同硬度膜上用 TGF- β_1 处理 72 h 后整合素的表达

Fig. 6 Integrin expression of hepatic cells on different substrates treated with TGF- β_1 in 72 hours

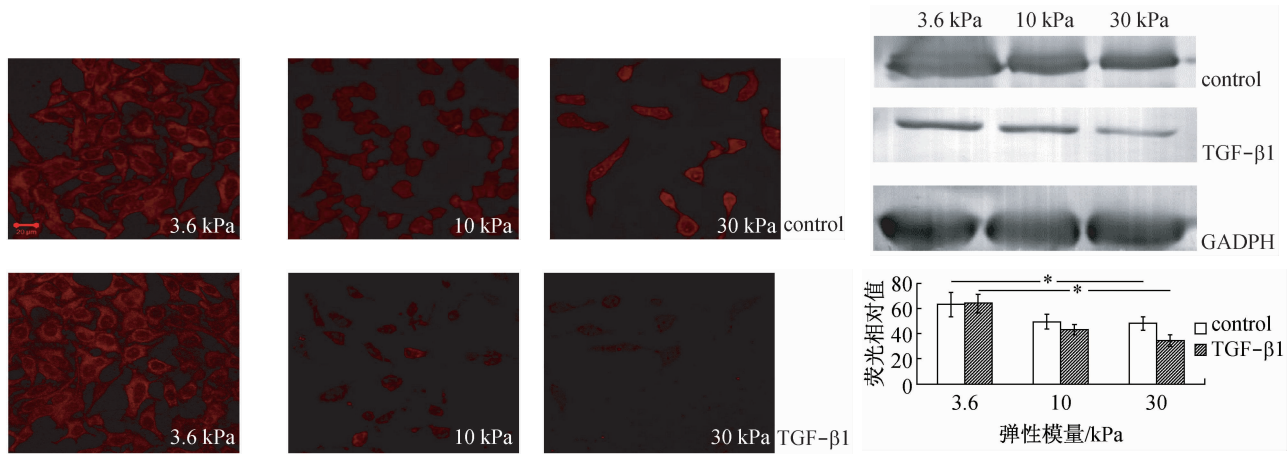


图 7 TGF- β_1 处理组与对照组肝细胞在不同硬度基底膜上 E-钙粘素表达的变化

Fig. 7 E-cadherin expression of hepatic cells for TGF- β_1 treated and control groups

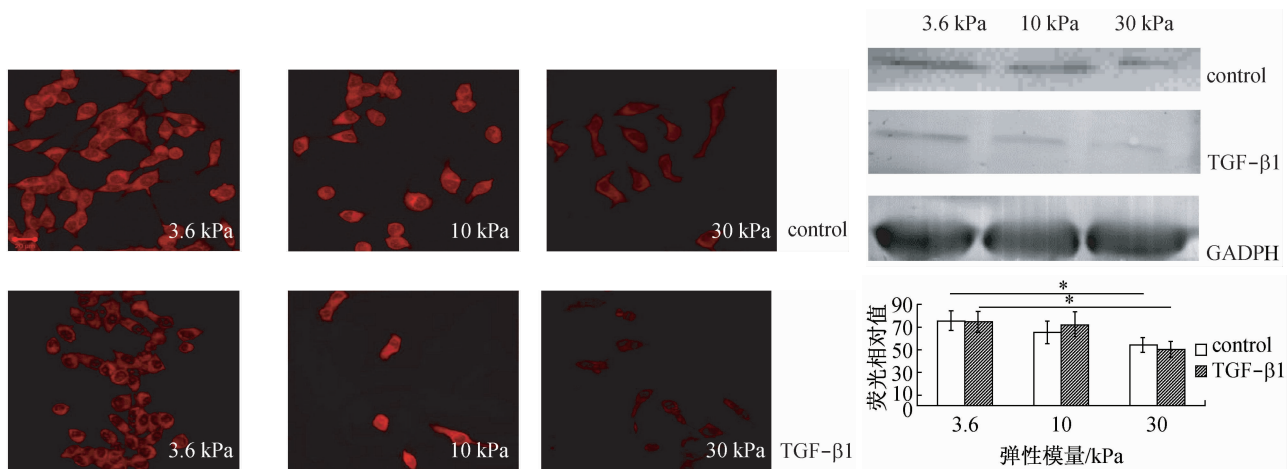


图 8 肝细胞在不同硬度基底膜上 TGF- β_1 处理组与对照组 albumin 表达的变化

Fig. 8 Albumin expression of hepatic cells for TGF- β_1 treated and control groups

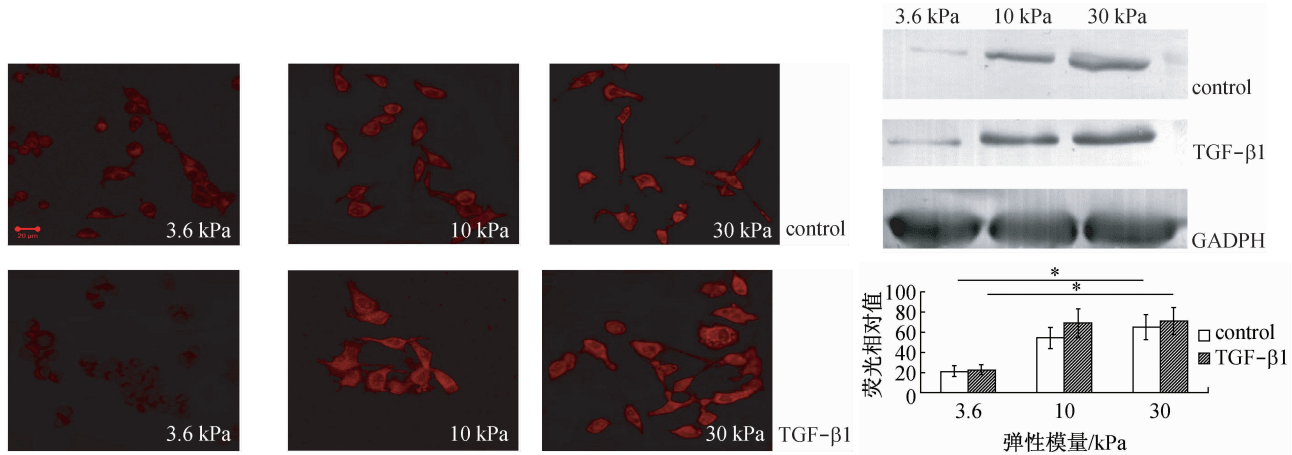


图9 肝细胞在不同硬度基底膜上 TGF- β_1 处理组与对照组 α -SMA 表达的变化

Fig.9 Alpha-SMA expression of hepatic cells on different substrates for TGF- β_1 treated and control groups

4 讨论

肝纤维化病变的中心环节是组织修复中的重构问题,其过程涉及细胞-细胞、细胞-基底相互作用的平衡调节,E-钙粘素介导细胞-细胞间黏附,整合素介导细胞-基底的黏附,两大黏附系统所介导的黏附具有拮抗作用。研究表明,肝细胞呈现融合生长,细胞-细胞间存在丰富的黏附连接,而黏附连接的形成依赖 E-钙粘素介导的黏附激活,然而在单细胞向多细胞融合过程中,细胞锚着基底的物理特性即硬度也会通过对整合素和钙粘素所介导的黏附拮抗的消长调节,参与对细胞形态和表型的影响。本文实验观测显示,在软、硬不同的基底膜上细胞与基底的相互作用关系呈现不同特征;软膜上细胞运动变形能力大于硬膜上生长的细胞,表现为变形调节活跃,而硬膜上细胞则铺展较为充分,基底黏附力大。Ni 等^[12]建立了一个数学模型来描述基底硬度怎样影响细胞的形态和运动,该模型假设在细胞和其锚着基底组成的体系中存在两种能,一种是细胞自身骨架收缩产生的应变能,一种是基底和细胞相互作用的界面能;应变能促使细胞变形和运动,界面能反应细胞与基底的黏附能力,细胞的形态变化由界面能和应变能竞争驱动。在软膜上,细胞长/短径变化与净迁移距离变化呈正相关,说明细胞形变迁移由其收缩调节驱动,此时细胞应变能占主导地位。在较硬的基底上细胞铺展面积比较基底上要大,但铺展面积和长短径比随时间的变化均不明显,其迁移净位移也较小,同时整合素荧光值明显却升高,提示硬

膜上细胞主要由界面能主导,此时细胞倾向于与基底连结。

进一步观测发现,在软基底上群体细胞极化变小,细胞间接触边界延长,并倾向聚集,整合素荧光值较低,而 E-钙粘素荧光值较高。融合状细胞比单个分散细胞极化变小的原因可能是由于在软膜上细胞铺展受限,但其变形又很活跃,因此控制细胞形变促使形态达到稳定状态的有效途径,只能是通过群体细胞相邻面形成连结来增大细胞间的界面能以抗衡应变能;而软基底上细胞间接触边界延长,加之 E-钙粘素增多,这些均有利于细胞连结的形成。细胞周边丰富的连结形成正是上皮样表型的典型特征,在上皮样细胞连接中,相邻细胞之间形成边界紧密接触的连接方式,细胞骨架的切向应力是维持这种连接的关键,它有助于增加细胞直接接触的面积;而在成纤维样细胞连接中,相邻细胞的骨架形成“桥式”对接,这种连接有赖于细胞骨架产生平行于细胞的收缩力,维持两种连接形式的关键在于细胞骨架构象和张力分布不同。以上结果表明,细胞骨架重塑和基底顺应性相平衡对控制细胞形状和连结至为重要。软的基质环境可通过调节细胞间连结来支持上皮样表型的维持,即生长于软质基底上的细胞其钙粘素所介导的黏附激活占优势。

另一方面,生长在硬基底上的细胞其与基底相互作用出现增胜趋势。本文实验结果提示,硬基底上细胞整合素所介导的黏附激活占优势。细胞通过整合素与胞外基质中的配体连结而黏附到基底,由于整合素跨膜受体连接胞内骨架,故细胞骨架产生

的张力会在细胞-基底界面产生牵拉作用,基底硬度增加时细胞-基底界面的牵引力也会增加。硬基底上整合素和 α -SMA 增多有利于牵引力的产生,硬膜上加药组迁移增快与硬基底支持其牵引力增加有利于运动有关。

本文在观测基底硬度变化对细胞铺展与形态调整的影响趋势后,进一步考查不同硬度基底上细胞形态调整及其骨架构象、细胞连结和基底黏附的关系。结果发现,在 3.6 kPa 软基底上,细胞肌动蛋白微丝在细胞周边装配成环状结构,细胞间形成边-边接触的上皮样连接;而在硬基底上,细胞肌动蛋白微丝则装配成沿细胞长轴取向的应力纤维,细胞间形成典型的辐射状连接方式。对不同硬度基底上的细胞 E-钙粘素和整合素蛋白表达水平测量显示,基底硬度增加,导致 E-钙粘素表达下调和整合素表达量升高,即细胞间黏附作用减弱而细胞与基底的黏附作用增强。这些行为与上皮样表型向间充质样细胞表型转化过程中细胞行为的改变相符,提示增加基底硬度可以诱导细胞表型转化。

比较软、硬不同基底对照和加药组细胞代谢行为提示,基底硬度增加不仅通过下调 E-钙粘素来削弱细胞间连结,使肝细胞部分丧失了分泌白蛋白的功能,而且还放大了肝细胞对生化因子 TGF- β_1 刺激的效应,使得肝细胞对 TGF- β_1 的刺激变得敏感起来。比较不同实验组之间细胞形态的差异发现,软膜上加药组与对照组的骨架均在皮脂下呈环状,而硬基底上细胞骨架沿其长轴取向,基底硬度决定其锚着细胞的预应力状态,进而决定了细胞骨架、细胞连接方式,从而塑造了细胞的群体结构。从这种意义上讲,相互作用的细胞群体与胞外基质环境共同形成了一个整体,即大骨架张力整合体系,其中胞外基质是细胞骨架的外在延伸。细胞骨架的状态决定着细胞的多种行为,正如实验中观察到的,形成皮质环状的细胞骨架支持边-边接触的细胞连接,装配成应力纤维的细胞骨架支持辐射状的细胞连接。细胞骨架的装配方式决定于基底的硬度,基底的硬度最终决定了细胞的行为,但是骨架构象的这些变化是否是基底硬度改变细胞因子作用性质的原因还需要进一步验证。

参考文献:

- [1] Zhou J, Zhong DW, Wang QW, *et al.* Paclitaxel ameliorates fibrosis in hepatic stellate cells via inhibition of TGF-beta/Smad activity [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(26): 3330-3334.
- [2] Nagashio Y, Ueno H, Imamura M, *et al.* Inhibition of transforming growth factor beta decreases pancreatic fibrosis and protects the pancreas against chronic injury in mice [J]. *Lab Invest*, 2004, 84(12): 1610-1618.
- [3] Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, *et al.* TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis [J]. *Nat Med*, 2007, 13(11): 1324-1332.
- [4] Yu SK, Kwon OS, Jung HS, *et al.* Influence of transforming growth factor-beta1 gene polymorphism at codon 10 on the development of cirrhosis in chronic hepatitis B virus carriers [J]. *J Korean Med Sci*, 2010, 25(4): 564-569.
- [5] Kaimori A, Potter J, Kaimori JY, *et al.* Transforming growth factor-beta 1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(30): 22089-22101.
- [6] Akhurst R. TGF-b signaling in epithelial-mesenchymal transition and invasion and metastasis. In: Derynck R, Miyazono K, eds. *The TGF-beta family* [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007: 939-964.
- [7] Liang TJ, Yuan JH, Tan YR, *et al.* Effect of ursodeoxycholic acid on TGF beta1/Smad signaling pathway in rat hepatic stellate cells [J]. *Chin Med J*, 2009, 122(10): 1209-1213.
- [8] 王红兵, 林雨. 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.
- [9] Martin-Belmonte F, Mostov K. Regulation of cell polarity during epithelia morphogenesis [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2008, 20(22): 227-234.
- [10] 黄朗献, 白玲, 王汉琴, 等. 切应力对与血管平滑肌细胞联合培养的内皮细胞微管骨架重构的影响[J]. *医用生物力学*, 2006, 21(4): 254-258.
Huang LX, Bai L, Wang HQ, *et al.* Flow-mediated regulation of endothelial cell microtubule cytoskeleton in a coculture system [J]. *J Med Biomech*, 2006, 21(4): 254-258.
- [11] 王红兵, 徐秋华, 刘艳鸣, 等. 整合素分布变化与肝癌细胞迁移取向调节的相关性[J]. *医用生物力学*, 2010, 25(4): 288-295.
Wang HB, Xu QH, Liu YM, *et al.* Study on the correlation of integrin distribution changes with directional migration of hepatoma cells [J]. *J Med Biomech*, 2010, 25(4): 288-295.
- [12] Ni Y, Chiang MYM. Cell morphology and migration linked to substrate rigidity [J]. *Soft Matter*, 2007, 10(3): 1285-1292.