

## 研究论文

# VEGF通过调节黏着斑促进间充质干细胞的黏附及铺展

王惠荟 吕静雅 胡雅楠 徐晓静 张焕相\*

(苏州大学医学部细胞生物学系, 江苏省干细胞研究重点实验室, 苏州 215123)

**摘要** 间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有多向分化潜能并能在体外趋化剂或细胞因子的作用下进行定向迁移, 体内移植后可趋向迁移至脑瘤病灶区。细胞黏附是细胞迁移的首要条件, 了解细胞黏附及其调控有助于细胞迁移机制的研究。细胞黏附及铺展涉及到黏着斑(focal adhesions, FAs)的动态变化以及细胞骨架的重排。细胞铺展面积在黏附过程中逐渐增大, 黏附初期形成的小的黏着复合物逐渐成熟, 聚集在一起形成较大的FAs。肌动蛋白(F-actin)聚集形成的螺旋圈样微丝结构逐渐被应力纤维代替, 细胞也由圆形变为具有极性的梭形或多角形。黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)和桩蛋白(paxillin)具有调节FAs聚合及骨架重排的作用, 其中, Y397-FAK和Y31/Y118-paxillin的磷酸化活性在细胞铺展过程中不断变化。FAs组装时, Y397-FAK的磷酸化活性升高; FAs成熟后, Y397-FAK的磷酸化活性下降。活化的FAK能够磷酸化Y31/Y118-paxillin, 激活的paxillin参与调节细胞骨架的形成和排列。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)诱导的MSCs黏附过程中, 细胞面积变大, 完全铺展的时间缩短, 黏着斑及细胞骨架的形成均提前。另外, VEGF诱导的细胞铺展过程中形成的FAs形态细长, 数量较多。该研究表明, VEGF通过调节黏着斑和细胞骨架促进MSCs的黏附与铺展, 提示VEGF可以通过调节黏着斑进而调控MSCs的定向迁移, 为细胞迁移行为的研究提供理论基础。

**关键词** 间充质干细胞; VEGF; 黏着斑; 细胞黏附; 细胞铺展

神经系统疾病包括脊髓损伤、帕金森病、恶性神经胶质瘤及中枢和外周神经损伤等, 目前缺乏有效的治疗方法, 严重影响着人类的生命质量和生活质量。干细胞移植为治疗这些疾病带来了希望。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有获取容易和体外扩增快的特点, 对供体伤害小、免疫原性弱、便于移植, 无伦理问题的困扰, 且能够在脑内扩增及迁移<sup>[1]</sup>, 这些特征使得MSCs具有相当大的潜力成为应用于组织工程修复受损组织的种子细胞。

MSCs成功移植的关键在于其能定向迁移。它能够向胶质瘤进行趋化性迁移已在很多实验中得以证明<sup>[2-4]</sup>, 胶质瘤分泌的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)促进了MSCs的趋化性迁移<sup>[5]</sup>。系统地了解MSCs定向迁移的机制, 通过调控相关的信号通路提高MSCs趋向病灶区迁移的

能力, 才能更好地在临床上应用MSCs治疗胶质瘤及神经系统疾病。

细胞的迁移首先需要细胞黏附于细胞外基质, 而黏着斑(focal adhesions, FAs)是细胞与周围环境的接触点, 其组装和解聚影响着细胞的形状、伪足形成的部位和方向, 最终通过细胞外和细胞内的信号协同调节黏着斑的形成、分布等从而影响细胞的迁移。细胞的黏附铺展主要包括细胞突起向细胞的前方伸展、与细胞外基质之间形成黏着连接等。在这个过程中, 相关的细胞骨架蛋白有序表达, 其过程包括: 肌动蛋白及辅肌动蛋白在板状伪足内即将形成黏着连接的部位集聚<sup>[6]</sup>; 新的黏着斑复合物(focal

收稿日期: 2012-05-05 接受日期: 2012-07-04

国家自然科学基金(No.30870642, No.31071220)资助项目

\*通讯作者。Tel: 0512-65880277, E-mail: hzhang@suda.edu.cn

complexes, FXs)和FAs的形成,其中有整联蛋白、黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)、桩蛋白(paxillin)、纽蛋白、踝蛋白等的参与。

FAK作为FAs的主要构成蛋白,是一类胞质非受体蛋白酪氨酸激酶,它既可以传递整联蛋白激活的信号,也可以介导生长因子与其受体结合传递的信号,从而激活胞内的MAPK、PI3K、JNK等信号通路,调节细胞生长、细胞周期、细胞黏附和迁移等<sup>[7]</sup>。Paxillin不仅参与了整联蛋白介导的信号转导和FAs的组装,在细胞黏附和迁移过程中也发挥了重要作用。当细胞与细胞外基质蛋白结合时,整联蛋白聚集导致其胞质区构象发生改变,进而促进FAK的N末端与整联蛋白的尾部结合,暴露FAK的Y397位点,直接激活FAK<sup>[8]</sup>。活化的FAK促使与其相结合的paxillin也发生酪氨酸磷酸化<sup>[9]</sup>。Paxillin的酪氨酸磷酸化产生了SH2结合结构域,调节蛋白质的相互作用,其中Y31和Y118是最主要的磷酸化位点,其磷酸化作用与细胞黏附及细胞迁移相关<sup>[10]</sup>。

本实验采用Percoll分离法成功地在体外培养并扩增了大鼠源的MSCs;利用免疫荧光染色检测了MSCs黏附过程中FAs和细胞骨架的形成特点、FAs的大小及数量变化;应用蛋白印迹技术检测了MSCs黏附过程中黏着斑蛋白FAK和paxillin的磷酸化形式及总蛋白的表达变化;观察了VEGF诱导下FAs及骨架的形成及稳定,探讨了VEGF对MSCs的黏附及铺展的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

低糖DMEM(L-DMEM)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自Gibco公司;胰酶(Trypsin)、L-谷氨酰胺、L-型多聚赖氨酸(poly-L-lysine, PLL)购自Sigma公司;VEGF购自Pepro Tech Inc.公司。Rabbit mAb anti-phospho-FAK(Y397)、rabbit mAb anti-FAK、rabbit Ab anti-phospho-paxillin(Y31/Y118)、rabbit Ab anti-paxillin、mouse mAb anti-vinculin购自Santa Cruz公司;Fluorescent phalloidin conjugate solution(Phalloidin-TRITC)购自Sigma公司;HRP-山羊抗鼠二抗、HRP-山羊抗兔二抗、FITC-山羊抗鼠二抗、FITC-山羊抗兔二抗购自PTGLAB公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养 Sprague Dawley(SD)清洁级

大鼠购自苏州大学实验动物中心,大鼠体重控制在100~150 g。本研究动物实验依照《中华人民共和国实验动物管理条例》和《苏州大学实验动物管理办法》实施执行。SD大鼠用颈椎脱臼法处死。75%的酒精浸泡消毒5 min,分离后肢皮下组织,眼科剪剥离股骨、胫骨周围肌肉和韧带,取出股骨、胫骨,75%酒精消毒后,移入超净台。剪断股骨、胫骨骨干两端,注射器吸取L-DMEM反复冲洗骨髓腔,缓慢吹打成均匀的细胞悬液。将细胞悬液加于Percoll™分离液液面上,20 °C、3 000 r/min离心30 min。去上清,吸取白膜层,PBS洗2遍,20 °C、1 800 r/min离心10 min。用含10% FBS的L-DMEM培养基悬浮细胞,计数,将细胞密度调至 $2 \times 10^6$ /mL,接种于25 cm<sup>2</sup>培养瓶中。置于细胞培养箱中,37 °C、5% CO<sub>2</sub>条件下培养,每隔3 d换液一次。两周左右,原代细胞长至80%~90%汇合时,将培养瓶中的原培养基吸出,加入少量PBS以清洗掉死细胞和残留的培养基。加入2 mL 0.25%的胰酶,37 °C消化,显微镜下观察到80%~90%的细胞回缩成圆形、少量细胞脱离瓶底时,加入2 mL含10% FBS的L-DMEM培养基终止消化。用吸管反复吹打瓶底,使所有细胞完全脱离瓶底,1 000 r/min离心10 min,弃上清,加入含10% FBS的L-DMEM培养基重新悬浮,按1:2比例传代接种培养。

1.2.2 免疫荧光检测 将MSCs以 $1 \times 10^5$ /mL的密度接种到PLL包被的盖玻片上,37 °C、5% CO<sub>2</sub>条件下在35 mm培养皿中培养。分别在5, 15, 30, 60 min和2, 5, 7 h的时间点加入4%的多聚甲醛,4 °C固定细胞过夜。然后吸出固定液,PBS洗3次,每次5 min。滴加用PBS、0.02% NaN<sub>3</sub>、3% BSA、0.2% Triton X-100稀释的rabbit anti-paxillin IgG(1:50),室温下孵育1.5 h后PBS洗3次,每次5 min;加入用PBS、0.02% NaN<sub>3</sub>、3% BSA稀释的FITC标志物山羊抗兔二抗,室温孵育1 h后PBS洗三次,每次5 min;然后进行细胞骨架F-actin染色,加入用含0.1% Triton X-100的PBS稀释的Phalloidin-TRITC(1:2 000),室温孵育30 min;PBS洗3次,每次5 min,最后用80%缓冲甘油(PBS配制)封片,进行荧光显微镜观察拍照,分析黏附过程中黏着斑形成的部位、数量、大小变化以及F-actin聚集成细胞骨架的变化。VEGF刺激下MSCs黏附形成的黏着斑及骨架的染色与细胞正常黏附操作类似,低糖培养基中添加5 ng/mL VEGF,接种时间

设为5, 15, 30, 60 min和2, 5, 7 h。

**1.2.3 免疫印迹Western blot检测** 细胞接种不同时间后, 用液氮迅速处理细胞, 随后加入含有磷酸酶和蛋白酶抑制剂的细胞裂解液(25 mmol/L Tris-HCl(pH7.2)、150 mmol/L NaCl、1% Triton X-100、1% sodium deoxycholate、1 mmol/L EDTA、0.1% SDS、1% PMSF和1 mmol/L NaVO<sub>3</sub>)将处理的细胞进行裂解。收集细胞裂解液, 4 °C条件下12 000 r/min离心5 min收集上清, 利用BCA试剂盒测量蛋白的浓度。将含蛋白的上清液与4×上样缓冲液混合, 100 °C加热5 min, 置于冰上冷却, -80 °C保存。分别配置10%的分离胶和4%的浓缩胶, 每孔上样20~30 μg的总蛋白, 待电泳完成后, 用刀片切下带有目的蛋白的分离胶, 将滤纸和硝酸纤维素膜剪成与胶同样大小, 一起放入转移缓冲液中平衡约15 min, 然后在2.5 mA/cm<sup>2</sup>的条件下进行半干印记转移约30 min。5%脱脂奶粉中封闭过夜, TBST洗3次, 每次10 min, 然后一抗[rabbit mAb anti-phospho-FAK(pY397)、rabbit mAb anti-FAK、rabbit Ab anti-phospho-paxillin(pY31/118)、rabbit Ab anti-paxillin、mouse mAb anti-vinculin]孵

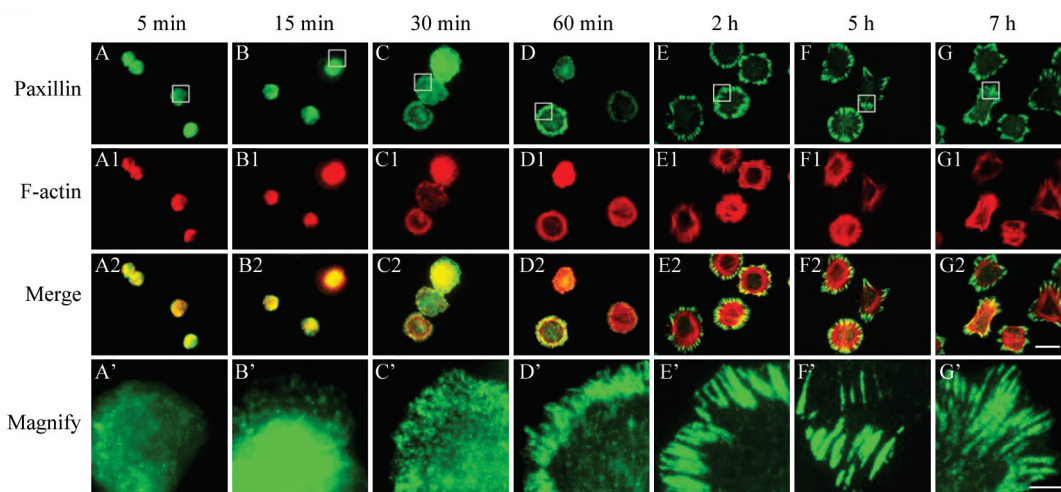
育过夜(用TBST 1:1 000稀释抗体)。TBST洗3次, 每次10 min。室温孵育HRP标记山羊抗兔或抗鼠二抗1 h, TBST洗3次, 每次10 min, 然后在含有转移蛋白的硝酸纤维素膜上滴加ECL, 利用与一抗发生特异性结合的二抗标记物HRP与ECL中的化学物质发生反应产生的荧光, 应用化学发光凝聚成像系统曝光得到条带, 检测蛋白的表达情况。

**1.2.4 统计分析** 应用Image J软件对导入的免疫图片进行数据统计, 采用SPSS 11.0统计软件对实验数据进行统计处理, 计量资料以均数±标准误(mean±S.E.)表示。

## 2 结果

### 2.1 MSCs黏附过程中FAs和细胞骨架的形成

细胞接种到PLL包被的盖玻片上5 min后, 胞体底部贴壁, 局部伸出丝状的伪足, 没有明显的黏着斑点形成, 说明相应的黏着斑蛋白还散布在胞体内, 还未募集到细胞黏着处(图1A-图1A')。贴壁15 min后, 细胞胞体开始向外放射性铺展, 伸出小的片状伪足, 胞体面积变大, 小的FXs定位于片状伪足处(图1B-图



将MSCs接种至PLL包被的盖玻片上, 正常培养基培养, 分别在黏附5, 15, 30, 60 min和2, 5, 7 h时进行Paxillin和TRITC-phalloidin的免疫荧光染色。在细胞黏附5 min和15 min时, 还未出现明显的FAs和细胞骨架结构; 铺展30 min后, 细胞周边形成小的FXs和F-actin的聚集; 细胞铺展60 min后形成较多稳定的FAs; 在铺展2 h至7 h内, F-actin骨架蛋白由原来的螺旋线圈样转变为纤维样, 细胞也由圆形变为有极性的多角形或梭形。A'-G'是A-G白框部分的放大图; A-G2: 标尺=25 μm; A'-G': 标尺=5 μm。

Immunocytochemical characterization of MSCs plated on PLL coated coverslips for 5, 15, 30, 60 min and 2, 5, 7 h, respectively. Cells were detected by staining of Paxillin and TRITC-phalloidin. There was no significant FAs formation and cytoskeletal organization at 5 min and 15 min. Small transient focal complexes and F-actin scaffolds were formed at the cell's periphery after 30 min of spreading. More stable FAs were formed after plated exceeding 60 min. Adhering from 2 h to 7 h, F-actins were first accumulated to form circular bundles that made the cell round shape, then stress fibers formed and spanned across the central region of the cell that made the cell polygonal and polar. A'-G' were the magnify images of the boxes corresponding in A-G. A-G2: bar=25 μm; A'-G': bar=5 μm.

图1 MSCs黏附过程中FAs和细胞骨架的形成及变化

Fig.1 The formation of FAs and F-actin cytoskeletons remodeling of MSCs during the early adherence stage

1B'); 贴壁30 min后, 细胞铺展呈圆形, 边缘有稍微大点的FAs形成, 片状伪足边缘有F-actin聚集并形成波纹型的骨架结构(图1C-图1C'); 60 min后, 片状伪足处的FAs呈细长形, 斑点清晰, 紧密排布在细胞边缘一周, 胞体中央还分布有细丝样的FAs, 细胞周边的F-actin聚集形成线圈样的骨架结构, 而胞体内还未出现排列明显的骨架(图1D-图1D'); 2 h后, 细胞开始具有极性, 呈多边形或梭形, FAs斑点变大、清晰, 并分布在细胞边缘, 胞体内有排布杂乱的纤维样微丝骨架(图1E-图1E'); 5 h后, 细胞边缘的FAs呈片状, 胞体内也形成明显的微丝骨架, 并且部分细胞骨架排列整齐(图1F-图1F'); 7 h后, 细胞形态呈梭形, 边缘的FAs更为清晰, FAs和细胞骨架随着细胞贴壁时间的延长, 逐渐形成并稳定, 而且微丝的末端与FAs相连(图1G-图1G')。

## 2.2 MSCs黏附过程中黏着斑蛋白的活性变化

通过免疫荧光结果, 我们观察到MSCs黏附过程中FAs及细胞骨架的形成和成熟, 随后我们利用Western blot检测MSCs黏附过程中黏着斑蛋白(FAK、paxillin)的酪氨酸磷酸化活性变化情况, 分析黏着斑蛋白的活性与FAs形成的关系。

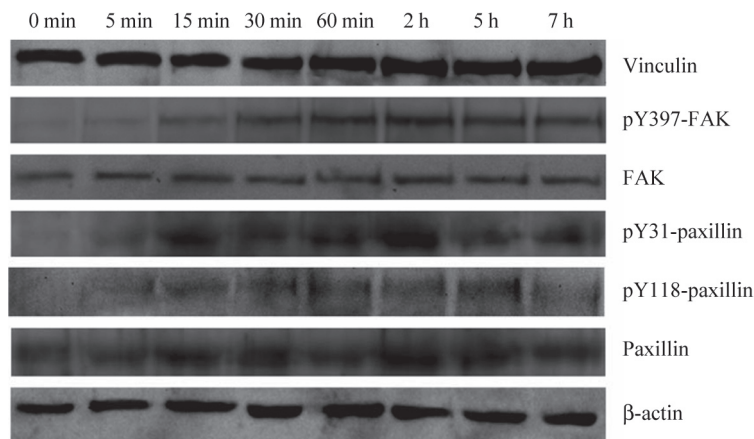
贴壁不同时间的黏着斑蛋白检测结果显示(图2), FAK的Y397位点(Y397-FAK)的磷酸化水平随着贴壁时间的延长逐渐升高, 在贴壁2 h时磷酸化水平

达到最高峰。对应的免疫染色结果显示, 贴壁2 h时很多小的黏着复合物聚集形成大的清晰的FAs。Y397-FAK磷酸化之后, FAK的其他酪氨酸位点陆续发生磷酸化, FAK被激活, 并募集其他黏着斑相关的蛋白, 进行FAs的组装工作。Y31-paxillin的磷酸化水平从无到有, 在15 min和2 h时磷酸化水平较高, 2 h达到最高峰, 而Y118-paxillin在贴壁60 min和5 h的磷酸化水平明显高于其他时间点。在细胞黏附过程中, 我们还检测了另一种黏着斑蛋白——vinculin, 它是一种高度保守的细胞骨架蛋白, 在FAs形成的过程中没有显著变化。

细胞在铺展过程中, Y397-FAK首先发生磷酸化, 随后Y31-paxillin和Y118-paxillin在不同阶段发生不同程度的磷酸化, 黏着斑蛋白募集到细胞膜下并组装形成FAs。在细胞不断铺展时, 已经合成的FAs解聚, 外周新的FAs继续合成, 这个过程中paxillin的酪氨酸位点的磷酸化与去磷酸化交替进行, 因此, 蛋白检测结果显示Y31/118-paxillin的磷酸化水平相应地呈现出升高、降低、升高的波浪式变化趋势。

## 2.3 MSCs黏附过程中黏着斑的数量及大小

在细胞铺展早期, 随着胞体向外扩展FAs的数目相应增多, 此时细胞内新生FAs的特点是单个斑点面积小、总数量多。在铺展60 min时, FAs数量最多。随着细胞的进一步铺展, 多个小的FXs聚集成较



细胞黏附不同时间后将其裂解并进行免疫沉淀检测, 观察FAK、paxillin和vinculin的磷酸化形式和总蛋白的变化。FAK的磷酸化活性随着铺展时间的延长而升高, 在2 h时达到最高峰。Y31/Y118-paxillin的磷酸化在不同的时间点具有不同程度的变化。

Cells were lysed and immunoprecipitated with primary antibodies for phospho- or nonphospho-protein kinases(FAK, paxillin, vinculin). The phosphorylation of FAK was increased with the spreading time elongated and received a peak at 2 h. The phosphorylation of paxillin on Y31 and Y118 increased at different time points and in different degrees.

图2 Western blot检测FAK和paxillin的酪氨酸磷酸化变化

Fig.2 Western blot showed the tyrosine phosphorylation changes of FAK and paxillin

大的、成熟的FAs<sup>[11]</sup>, 因此, 直至贴壁5 h时FAs的数量都是相应地变少的。随后在铺展7 h时, 因为细胞总面积有所扩大, FAs数目又相应有所升高(图3A)。FAs的大小在细胞铺展过程中直线上升, 由小的新生FXs(30 min)聚集形成大的成熟FAs(7 h), 其大小约3~10  $\mu\text{m}$ (图3B)。

#### 2.4 VEGF促进MSCs的铺展和FAs、细胞骨架的形成

有研究证实, 生长因子能促进细胞的生长和铺展<sup>[12-13]</sup>、促进细胞膜褶皱的形成和应力纤维的组装<sup>[14]</sup>。因此, 本实验进一步检测MSCs早期黏附过程中, VEGF对细胞铺展和FAs、骨架形成的影响。预实验发现, VEGF刺激下的细胞铺展变快, 与细胞正常黏附组相比, 细胞完全铺展的时间变短, 所以细胞接种时间设为5, 15, 30, 60 min和2, 4, 6 h。通过免疫荧光染色分析了黏附过程中FAs形成的部位、数量、大小变化及F-actin聚集成细胞骨架的变化与FAs形成的关系。

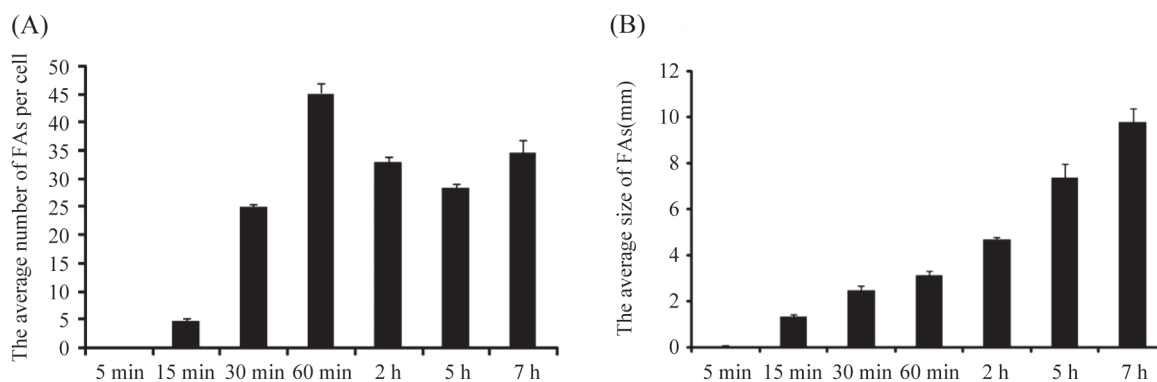
如图4所示, 5 ng/mL VEGF刺激下, 细胞的铺展变快, 在接种起始的5 min内就显示出与基质之间很好的黏着, 细胞胞体局部伸出小的片状伪足, 伪足的周边有小的FXs形成(图4A-图4A'); 贴壁15 min后, 细胞胞体向四周铺展, 伪足边缘呈波浪形(图4B-图4B'); 贴壁30 min后, 细胞铺展呈圆形, FAs长度增加, 绕细胞边缘紧密排列, F-actin在细胞周边聚集成细

密的线圈样的骨架结构(图4C-图4C'); 60 min后, 形成的FAs没有明显变化, 横穿胞体的纤维样的微丝骨架两端分别连接附近的FAs(图4D-图4D'); 铺展2 h时, FAs斑点变大、清晰, 整齐地排列在细胞边缘, 胞体中央也有零散的FAs, 纤维样的细胞骨架清晰明显, 交叉排布在胞体内(图4E-图4E'); 铺展4 h后, 细胞边缘形成较粗较长的FAs, 胞体内的微丝骨架也变得粗壮(图4F-图4F'); 6 h后, 细胞内的FAs聚集成大斑点, 不仅分布在周边, 在胞体中央同样形成了大的成熟的FAs, 微丝整齐排列成束, 从胞体伸向片状伪足, 且微丝末端与周边的FAs相连(图4G-图4G')。

#### 2.5 VEGF诱导的MSCs中黏着斑的数量及大小

5 ng/mL VEGF刺激条件下, 细胞在接种5 min后即有FAs的形成, 其数量随贴壁时间的延长不断增多, 在贴壁2 h时黏着斑数量达到最大值, 随后FAs聚集变大, 数量变少; 随着细胞的完全铺展, FAs的数量又稍有增多(图5)。VEGF处理组每一时间点黏着斑的数量与对照组(正常细胞铺展)相比, 均有显著差异。黏着斑的大小在VEGF刺激铺展1 h后有显著的差异。VEGF刺激细胞黏附的过程中, FAs的数量变化趋势与未用VEGF刺激的正常细胞黏附过程中的变化相似; 不同的是, VEGF刺激下细胞形成的FAs形态细长、数量多。

VEGF刺激细胞黏附的整个过程中, 细胞的铺展面积随贴壁时间的延长而不断扩大, 而且比细胞



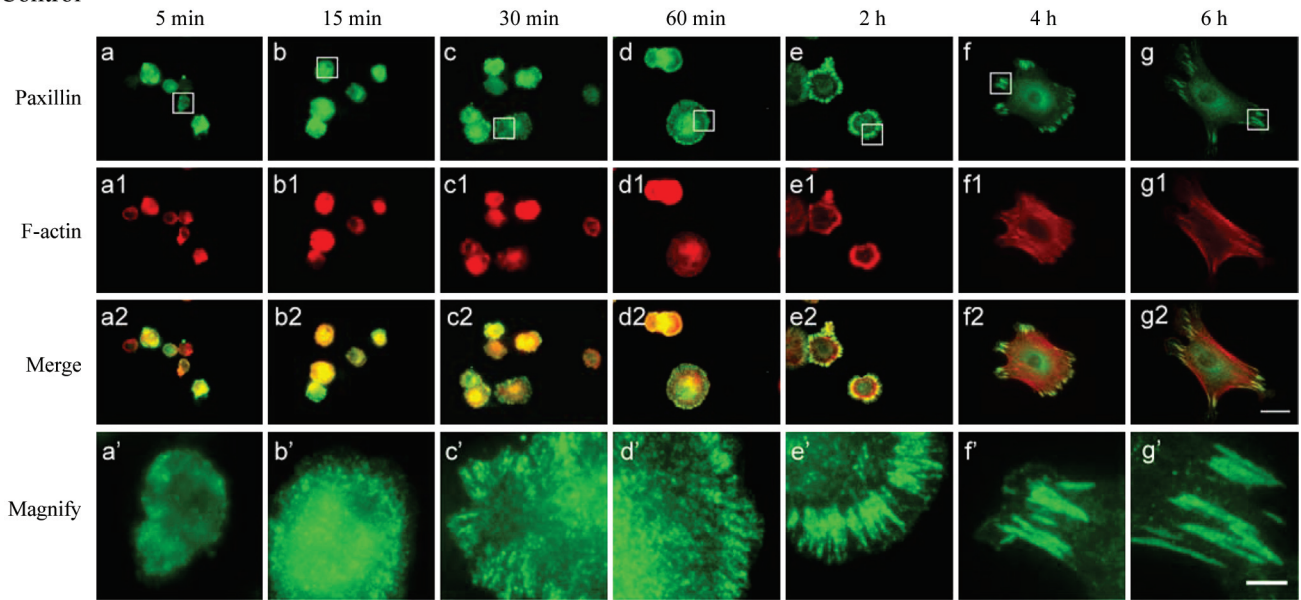
A: MSCs黏附过程中形成的黏着斑的数量。随着贴壁时间的延长, FAs的数量不断增多, 在贴壁60 min时最多, 随后开始下降, 在铺展7 h时又有所上升; B: MSCs黏附过程中形成的黏着斑的大小。细胞铺展早期形成的FXs逐渐汇合形成大的稳定的FAs, 所以FAs的长度随细胞铺展持续增长, 在细胞完全铺展时(7 h)达到最大值, 约10  $\mu\text{m}$ 。

A: along with the plated time, the numbers of the FAs increased and had a peak at 60 min, then decreased from 2 h until 5 h. The numbers increased again after plated for 7 h; B: the sizes of the FAs increased constantly with the plated time elongation. The small transient FXs, which were the initial sites of cell adhesion, converged to form larger stable FAs. The size of FAs was about 10  $\mu\text{m}$  after 7 h plating.

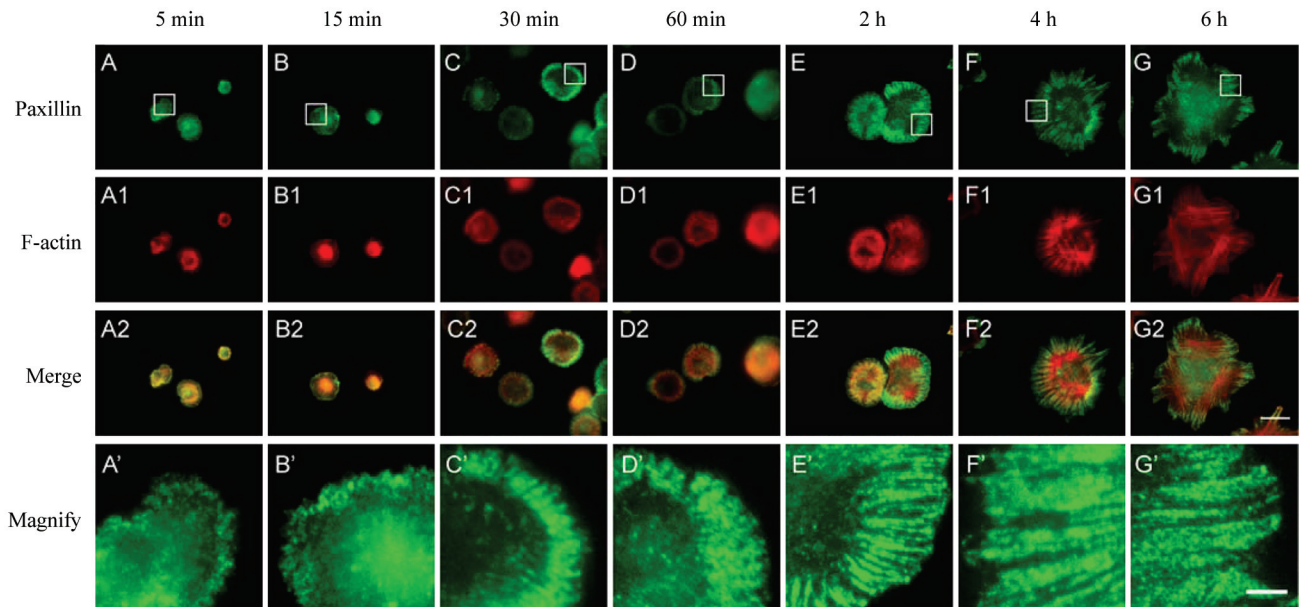
图3 MSCs黏附过程中形成的黏着斑数量及大小

Fig.3 The number and size of FAs in MSCs during the early adherence stage

## Control



## VEGF

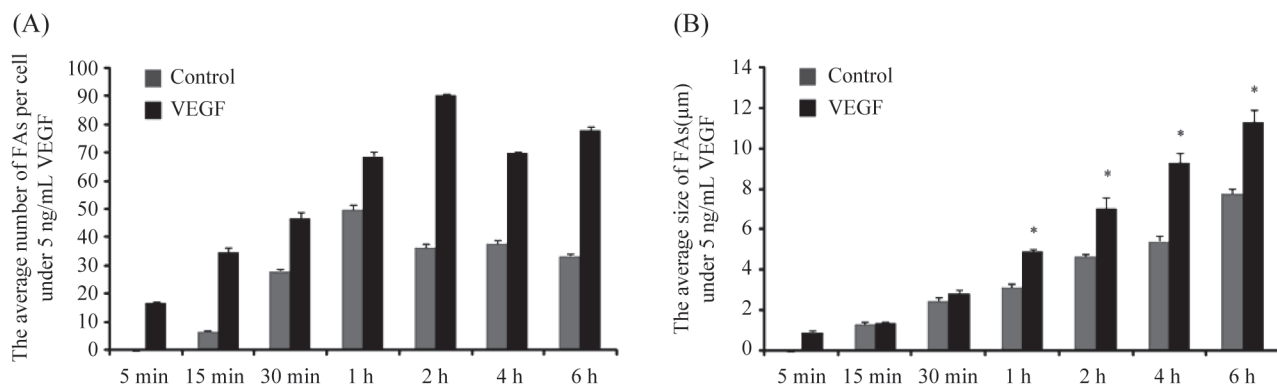


将MSCs接种至PLL包被的盖玻片上,使用正常培养基或含5 ng/mL VEGF的培养基培养,分别在黏附5, 15, 30, 60 min和2, 4, 6 h时进行paxillin和TRITC-phalloidin的免疫荧光染色。VEGF诱导的细胞5 min时就出现小的细胞黏附; 15 min时, 胞体铺展形成明显的片状伪足, 小的FXs分布在细胞周边; 铺展30 min后, 细胞周边形成的FAs变大, F-actin聚集形成螺旋线团样; 细胞铺展60 min后 FAs变多变大, 有纤维样的F-actin骨架蛋白横穿胞体; 铺展2 h以上的细胞内的FAs变清晰, 长度增加, 细胞由圆形变为有极性的多角形或梭形。a'-g'是a-g白框部分的放大图, a-g2: 标尺=25  $\mu\text{m}$ , a'-g': 标尺=5  $\mu\text{m}$ 。A'-G'是A-G白框部分的放大图, A-G2: 标尺=25  $\mu\text{m}$ , A'-G': 标尺=5  $\mu\text{m}$ 。

Immunocytochemical characterization of VEGF induced MSCs plated on PLL coated coverslips for 5, 15, 30, 60 min and 2, 4, 6 h, respectively. Cells were detected by staining of paxillin and TRITC-phalloidin. There were a few FAs forming in VEGF induced cells at 5 min. Cells stretched out lamellipodia at 15 min and the cell bodies became larger. Small transient FXs were formed at the cell's periphery. After 30 min of spreading, more FAs and circular bundles of F-actin were formed. When the cells were plated for 60 min, more and larger FAs arrived at the periphery of the cell. After the cells were spreading above 2 h, clear FAs were formed and stress fibers spanned across the central region of cells that made the cells polygonal and polar. a'-g' were the magnify images of the boxes corresponding in a-g. a-g2: bar=25  $\mu\text{m}$ , a'-g': bar=5  $\mu\text{m}$ . A'-G' were the magnify images of the boxes corresponding in A-G. A-G2: bar=25  $\mu\text{m}$ , A'-G': bar=5  $\mu\text{m}$ .

图4 VEGF促进MSCs的铺展及黏着斑、细胞骨架的形成

Fig.4 VEGF promotes the MSCs spreading and the formation of FAs, F-actin cytoskeleton remodeling



A: VEGF诱导的MSCs黏附过程中形成的黏着斑的数量。随着贴壁时间的延长, FAs的数量不断增多, 在贴壁2 h时最多, 4 h下降, 在6 h时又有所上升; B: VEGF诱导的MSCs黏附过程中形成的黏着斑的大小。细胞铺展早期形成的FXs逐渐汇合形成大的稳定的FAs, 所以FAs的长度随细胞铺展持续增长, 在VEGF诱导的细胞完全铺展时(6 h)达到最大值, 约11.3  $\mu\text{m}$ 。

A: along with the plated time, the numbers of the FAs in VEGF induced cells increased and had a peak at 2 h, then decreased at 4 h. The numbers increased again after plated for 6 h; B: the sizes of FAs in VEGF induced cells increased constantly with the plated time elongation. The small transient FXs, which were the initial sites of cell adhesion, converged to form larger stable FAs. The size of FAs in VEGF induced cells was about 11.3  $\mu\text{m}$  after 6 h plating.

图5 VEGF诱导的MSCs黏附形成的黏着斑数量及大小

Fig.5 The number and size of FAs in VEGF-induced MSCs during the early adherence stage

正常黏附时更为铺展。随着细胞的黏附和铺展, FAs和细胞骨架组装形成并逐渐稳定, 两者的起始形成与成熟的时间都要比正常贴壁时提前。贴壁过程中FAs的数量也是经历了先升高后下降再升高的趋势, 不同的是, VEGF刺激的细胞中形成的FAs数量多, FAs形态呈细长样而不是片状的斑点。

### 3 讨论

本实验首先研究了MSCs黏附铺展过程中FAs和细胞骨架的形成及黏着斑蛋白FAK和paxillin的磷酸化活性。FAK广泛表达于很多不同类型的细胞中, 其酪氨酸位点的磷酸化伴随着FAs的形成。Paxillin具有四个酪氨酸磷酸化位点, 其中Y31和Y118位点与细胞黏附和细胞迁移密切相关<sup>[10]</sup>。由于paxillin较早地出现在黏着位点, 所以我们选用paxillin指示FXs和FAs<sup>[15]</sup>。细胞接种在纤连蛋白、胶原蛋白IV或者层黏连蛋白包被的基质上都会诱导FAK的酪氨酸磷酸化, 而PLL未发现有该作用<sup>[16]</sup>。所以, 在本研究中, 消化的细胞接种在PLL包被的盖玻片上, 排除了细胞外基质引起的黏着斑蛋白活化的干扰。

细胞铺展过程中, 活化的Y397-FAK和Y31/Y118-paxillin促进细胞周边小的FXs的形成和微丝骨架的排列。铺展起始没有出现应力纤维, 在铺展1 h的细胞中形成的是螺线圈样的微丝结构(图1D2)。Y397-

FAK的磷酸化活性在接种后2 h达到最高峰, 这时小的圆点样的黏着复合物开始汇聚成大的成熟的FAs, 以致FAs的数量降低(图1E和图3A)。随着铺展时间的延长, FAK和paxillin的磷酸化活性逐渐降低(图2)。细胞黏附后期因有少量新生FAs的形成促使细胞完全铺展, 所以FAs的数量又有所增加。此时, 胞体内出现长的纤维样的微丝, 从细胞前端至尾端贯穿胞体排列, 使得细胞形成具有极性的多边形(图1E1)<sup>[17]</sup>。另外, 我们检测到paxillin的总蛋白有所增加, 可能是胞体内游离的paxillin上调<sup>[18]</sup>, 使得可用的并能有效地掺入到动态的骨架复合物中的paxillin增加, 继而驱动细胞随后的铺展。Vinculin作为一种保守的肌动蛋白结合蛋白集中于FAs和细胞连接处<sup>[19]</sup>, 在细胞铺展过程中并没有明显的变化。

MSCs黏附过程中FAs及应力纤维的形成与Swiss 3T3成纤维细胞类似<sup>[20]</sup>, 只是MSCs完全铺展需要的时间较长(7 h左右)。虽然不同类型的细胞所用的铺展时间不一样, 但铺展的步骤相同, 都需要FAs的合成, 胞体从圆变为扁平, 最后形成极性。随着细胞的铺展, 具有螺线圈样骨架的细胞逐渐减少, 而具有成束排列的纤维丝的细胞增多, 并且纤维丝的末端与周边FAs结合。另外, F-actin微丝束的形状决定了细胞的形态与大小: 具有螺线圈样微丝骨架的细胞呈圆形; 具有应力纤维丝的细胞呈多边形。VEGF

促进MSCs黏附过程中细胞的铺展, FAs和细胞骨架形成的时间均提前。VEGF诱导的细胞铺展过程与细胞正常铺展类似, 大的成熟的FAs也是由小的不稳定的FXs聚集而成, 细胞骨架也有线圈样和纤维样两种类型, 控制细胞的形态和极性。与细胞正常铺展不同的是, VEGF诱导下的细胞铺展面积较大, 而且完全铺展所需的时间缩短, 最终形成的FAs较细长(图4E'、图4F'和图4G'), 数量也较多(图5A)。有文献报道, VEGF能够显著提高FAK和paxillin的酪氨酸磷酸化水平, 并能募集这些磷酸化的黏着斑蛋白至新生黏着斑处, 加快了黏着斑的组装及成熟<sup>[21-22]</sup>。VEGF促进片状伪足的铺展及伪足边缘新生黏着斑的形成, 因此黏着斑的数量增多; 相反, 通过抑制FAK的活性降低FAK的磷酸化水平, 致使细胞形成的黏着斑面积较大, 数量减少<sup>[23]</sup>。另外, VEGF可通过其受体激活其他信号通路<sup>[24]</sup>, 包括胞外信号调节激酶和细胞骨架元件等, 诱导actin聚合形成应力纤维及胞体腹侧面黏着斑的快速形成, 促成黏着斑及细胞骨架的形成提前, 最终影响细胞的黏附及铺展<sup>[25-26]</sup>。

应用MSCs移植进行神经疾病治疗, 其趋向病灶区定向迁移的能力是移植成功的关键<sup>[3]</sup>。另外, 生长因子或趋化因子等能够诱导MSCs的趋化迁移<sup>[5]</sup>。本实验描述了MSCs黏附过程中FAs和细胞骨架的形成与稳定, 也证实了VEGF能够通过调节FAs和细胞骨架的形成促进细胞铺展, 缩短细胞完全铺展所需时间。细胞铺展是细胞迁移的首要条件, VEGF促进FAs的组装成熟使得MSCs贴壁过程缩短, 更快地完成细胞迁移的前提步骤, 为细胞迁移做好准备。本实验为研究MSCs的迁移机制提供了参考资料, 我们还需要更多深入的研究来探讨VEGF诱导的迁移细胞中FAs的差异及调控迁移的细胞和分子机制, 为临床应用MSCs治疗疾病提供理论依据。

### 参考文献 (References)

- 1 Arnhold S, Klein H, Klinz FJ, Absenger Y, Schmidt A, Schinkothe T, *et al.* Human bone marrow stroma cells display certain neural characteristics and integrate in the subventricular compartment after injection into the liquor system. *Eur J Cell Biol* 2006; 85(6): 551-65.
- 2 Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA. Control of synapse number by glia. *Science* 2001; 291(5504): 657-61.
- 3 Nakamizo A, Marini F, Amano T, Khan A, Studeny M, Gumin J, *et al.* Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res* 2005; 65(8): 3307-18.
- 4 Nakamura K, Ito Y, Kawano Y, Kurozumi K, Kobune M, Tsuda H, *et al.* Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Ther* 2004; 11(14): 1155-64.
- 5 Schichor C, Birnbaum T, Etminan N, Schnell O, Grau S, Miebach S, *et al.* Vascular endothelial growth factor A contributes to glioma-induced migration of human marrow stromal cells (hMSC). *Exp Neurol* 2006; 199(2): 301-10.
- 6 Carragher NO, Frame MC. Focal adhesion and actin dynamics: A place where kinases and proteases meet to promote invasion. *Trends Cell Biol* 2004; 14(5): 241-9.
- 7 Lechertier T, Hodivala-Dilke K. Focal adhesion kinase and tumour angiogenesis. *J Pathol* 2012; 226(2): 404-12.
- 8 Owen JD, Ruest PJ, Fry DW, Hanks SK. Induced focal adhesion kinase (FAK) expression in FAK-null cells enhances cell spreading and migration requiring both auto- and activation loop phosphorylation sites and inhibits adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Pyk2. *Mol Cell Biol* 1999; 19(7): 4806-18.
- 9 Roy S, Ruest PJ, Hanks SK. FAK regulates tyrosine phosphorylation of CAS, paxillin, and PYK2 in cells expressing v-Src, but is not a critical determinant of v-Src transformation. *J Cell Biochem* 2002; 84(2): 377-88.
- 10 Tsubouchi A, Sakakura J, Yagi R, Mazaki Y, Schaefer E, Yano H, *et al.* Localized suppression of RhoA activity by Tyr31/118-phosphorylated paxillin in cell adhesion and migration. *J Cell Biol* 2002; 159(4): 673-83.
- 11 Partridge MA, Marcantonio EE. Initiation of attachment and generation of mature focal adhesions by integrin-containing filopodia in cell spreading. *Mol Biol Cell* 2006; 17(10): 4237-48.
- 12 Hansson E, Zugner R. Can chronic pain and spreading of pain be induced via glial mechanisms? New hypotheses on the generators maintaining protracted pain conditions. *Lakartidningen* 2005; 102(47): 3552, 3555-6, 3558.
- 13 Zhang Y, Hu X, Tian R, Wei W, Hu W, Chen X, *et al.* Angiopoietin-related growth factor (AGF) supports adhesion, spreading, and migration of keratinocytes, fibroblasts, and endothelial cells through interaction with RGD-binding integrins. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 347(1): 100-8.
- 14 Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 1992; 70(3): 389-99.
- 15 Webb DJ, Parsons JT, Horwitz AF. Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells—over and over and over again. *Nat Cell Biol* 2002; 4(4): E97-100.
- 16 Kornberg L, Earp HS, Parsons JT, Schaller M, Juliano RL. Cell adhesion or integrin clustering increases phosphorylation of a focal adhesion-associated tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1992; 267(33): 23439-42.
- 17 Zimerman B, Volberg T, Geiger B. Early molecular events in the assembly of the focal adhesion-stress fiber complex during fibroblast spreading. *Cell Motil Cytoskeleton* 2004; 58(3): 143-59.
- 18 Hopkins AM, Bruewer M, Brown GT, Pineda AA, Ha JJ, Winfree LM, *et al.* Epithelial cell spreading induced by hepatocyte growth factor influences paxillin protein synthesis and posttranslational modification. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287(4): G886-98.



- 19 Zhang Z, Izaguirre G, Lin SY, Lee HY, Schaefer E, Haimovich B. The phosphorylation of vinculin on tyrosine residues 100 and 1065, mediated by SRC kinases, affects cell spreading. *Mol Biol Cell* 2004; 15(9): 4234-47.
- 20 Senju Y, Miyata H. The role of actomyosin contractility in the formation and dynamics of actin bundles during fibroblast spreading. *J Biochem* 2009; 145(2): 137-50.
- 21 Abedi H, Zachary I. Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. *J Biol Chem* 1997; 272(24): 15442-51.
- 22 Takahashi N, Seko Y, Noiri E, Tobe K, Kadowaki T, Sabe H, *et al.* Vascular endothelial growth factor induces activation and subcellular translocation of focal adhesion kinase (p125FAK) in cultured rat cardiac myocytes. *Circ Res* 1999; 84(10): 1194-202.
- 23 Slack-Davis JK, Martin KH, Tilghman RW, Iwanicki M, Ung EJ, Autry C, *et al.* Cellular characterization of a novel focal adhesion kinase inhibitor. *J Biol Chem* 2007; 282(20): 14845-52.
- 24 Rousseau S, Houle F, Kotanides H, Witte L, Waltenberger J, Landry J, *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF)-driven actin-based motility is mediated by VEGFR2 and requires concerted activation of stress-activated protein kinase 2 (SAPK2/p38) and geldanamycin-sensitive phosphorylation of focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 2000; 275(14): 10661-72.
- 25 Munshi N, Groopman JE, Gill PS, Ganju RK. c-Src mediates mitogenic signals and associates with cytoskeletal proteins upon vascular endothelial growth factor stimulation in Kaposi's sarcoma cells. *J Immunol* 2000; 164(3): 1169-74.
- 26 Cezar-de-Mello PF, Nascimento-Silva V, Villela CG, Fierro IM. Aspirin-triggered Lipoxin A4 inhibition of VEGF-induced endothelial cell migration involves actin polymerization and focal adhesion assembly. *Oncogene* 2006; 25(1): 122-9.

## Vascular Endothelial Growth Factor Promotes Mesenchymal Stem Cells Adhering and Spreading

Wang Huihui, Lü Jingya, Hu Yanan, Xu Xiaojing, Zhang Huanxiang\*

(Medical College of Soochow University, Department of Cell Biology, Jiangsu Key Laboratory of Stem Cell Research, Suzhou 215123, China)

**Abstract** Mesenchymal stem cells (MSCs), which have the pluripotent ability, can migrate directionally toward chemotactic agents and cytokines *in vitro* or show a tropism to injured brain or gliomas. Cell adhering is the first step for cell migration and the understanding of cell adhesion could be helpful for the study of cell migration. The assembly and distribution of focal adhesions (FAs) and the arrangement of F-actin cytoskeletons are involved in the process of cell adhesion. With the plating time extended, the adhering cells became spreading and formed small focal complexes (FXs) to mature big FAs. F-actin assembled as circular bundles at the early stage and then formed stress fibres that made the cells possess polarity. The tyrosine phosphorylation activation of Y397-FAK and Y31/Y118-paxillin (both proteins could regulate the assembly of FAs and the arrangement of F-actin cytoskeletons) changed during the spreading. The activation of Y397-FAK increased while the FAs were assembling; then the activation decreased when the FAs were mature. Activated FAK could phosphorylate Y31/Y118-paxillin which participates in regulating the remodelling of F-actin cytoskeleton. Under the treatment of VEGF, cells formed adhesions faster and were more spreading. The maturation of FAs and cytoskeletons needs less time. Otherwise, the FAs were slender and with more quantity. Collectively, these results demonstrated that VEGF could regulate MSCs adhesion and spreading including the formation of FAs and the arrangement of F-actin cytoskeletons. This suggests that VEGF may regulate the migration of MSCs through modulating the FAs and cytoskeletons. And our research provides rationale for the study of cell migration.

**Key words** mesenchymal stem cells; vascular endothelial growth factor; focal adhesions; cell adhering; cell spreading

Received: May 5, 2012 Accepted: July 4, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30870642, No.31071220)

\*Corresponding author. Tel: 86-512-65880277, E-mail: hzhang@suda.edu.cn