

基础研究

黏着斑激酶酪氨酸磷酸化在牵拉依赖的
细胞形态改变中的作用王连荣¹, 王菊光², 吴伟康¹

(1. 中山大学中山医学院中西医结合研究所, 广东 广州 510089; 2. 名古屋大学生理学教研室, 日本 466-8550)

摘要: 【目的】探讨黏着斑激酶(FAK)397和925位酪氨酸残基(Y397, Y925)酪氨酸磷酸化在单轴周期性牵拉引起的细胞形态改变(垂直于牵拉轴方向排列和伸长)中的作用。【方法】用含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养大鼠成纤维细胞3Y1。利用PCR法从人的脐静脉内皮细胞获得FAK cDNA。通过直接点突变,利用重叠PCR制成突变的FAK(F397Y, F925Y)。将FAK突变转染到细胞内,使细胞遭受牵拉,牵拉0 min为对照组,牵拉5、10、20、30、60 min为牵拉组,实验重复3次,实验数据利用方差分析和多重比较进行分析。然后利用FAKY397和Y925磷酸化的特殊抗体进行了免疫印迹实验,采用信息分析程序(Mocha, Jandel Scientific)测定免疫印迹的密度,比较对照组与牵拉组,检测FAK酪氨酸磷酸化,分析细胞形态改变。【结果】在牵拉反应中,FAKY397和Y925的酪氨酸磷酸化水平比对照组明显增高($P < 0.05$),并且峰值分别在牵拉后5 min(2.75 ± 0.51 倍, $n = 3$)和20 min(2.98 ± 0.58 倍, $n = 3$)。另一方面,在突变FAK转染的细胞中,牵拉引起的细胞形态改变被有意义的阻滞了。【结论】牵拉引起的FAK酪氨酸磷酸化在牵拉依赖的细胞形态改变中起着重要作用。

关键词: 黏着斑激酶; 酪氨酸磷酸化; 细胞大小

中图分类号: R329.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2002)04-0241-04

Effects of Tyrosine Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase on Stretch-dependent Cell Morphological Changes

WANG Lian-Rong¹, WANG Ju-Guang², WU Wei-Kang¹. (1. Institute for Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510089, China; 2. Department of Physiology, Nagoya University, Japan 466-8550)

Abstract 【Objective】To examine the role of tyrosine phosphorylation of FAK(Y397, Y925) in the uniaxial cyclic stretch-induced morphological changes in rat 3Y1 fibroblasts such as alignment and elongation perpendicular to the stretch axis. 【Methods】Rat 3Y1 fibroblasts were cultured in DMEM supplemented with 100 mL/L FCS. FAK cDNA was PCR-cloned from human umbilical cord vein. The FAK mutants(F397Y, F925Y) were made using site-directed mutagenesis by overlapping PCR. The mutants FAK were transfected into 3Y1 fibroblasts and then the cells were subjected to stretch. The control group was stretched for 0 min, and the stretched groups were stretched for 5, 10, 20, 30, 60 min. The experiments were repeated for three times. The data was analyzed by analysis of variance and multiple comparison. The special antibodies of tyrosine phosphorylation of FAKY397 and Y925 were used for immunoblotting. The density of immunoblotting was measured and compared the control group to the stretched groups. Tyrosine phosphorylation of FAK and cell morphological changes were analyzed by immunoblotting and fluorescence microscope. 【Results】In response to uniaxial cyclic stretch, the levels of tyrosine phosphorylation of the Y397 and Y925 of FAK in the control cells dramatically increased ($P < 0.05$) and peaked at 5 min (2.75 ± 0.51 fold) and 20 min (2.98 ± 0.58 fold), respectively. On the other hand, in the mutant FAK-transfected cells, the stretch-induced morphological changes were blocked significantly. 【Conclusion】These results demonstrated that the stretch-induced tyrosine phosphorylation of FAK is important in the uniaxial cyclic stretch-induced cell morphological changes.

Key words: focal adhesion kinase; tyrosine phosphorylation; cells size

为了揭示血流动力在动脉硬化等血管性疾病形成过程中的作用,本研究采用体外单轴周期性牵拉系统模拟血流动力在垂直于血管走行方向上的侧压力,探讨牵拉引起的细胞形态和细胞内信息的

改变。据文献报道,在血管内皮细胞和大鼠成纤维细胞(3Y1)中,单轴周期性牵拉可使两种细胞都呈现出垂直于牵拉轴的伸长及排列^[1,2],提示在这两种细胞中,可能含有相似的细胞内信息传导通路。

收稿日期: 2001-12-29

基金项目: 留学回国人员科研启动基金资助项目(教外司留 2001-345)

作者简介: 王连荣(1963-),男,黑龙江哈尔滨人,博士后,课题负责人

由于 3Y1 细胞与血管内皮细胞相比较, 具有培养简单、增殖快以及在分子生物学实验中适合转染等优点, 所以利用 3Y1 细胞进行深层次的理论研究, 有助于揭示内皮细胞的信息传导机制。3Y1 细胞在受到单轴周期性牵拉时, 伴随着形态学改变, Src (sarcoma kinase) 被激活, 黏着斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK)、 p^{130} cas (Crk-associated substrate)、paxillin 等黏着斑蛋白发生酪氨酸磷酸化^[2], 黏着斑和 F-actin fibers 经历了动态的重新分布和垂直于牵拉轴排列。由于这样一个黏着斑和 F-actin fibers 的重新分布及垂直排列被认为与黏着斑蛋白酪氨酸磷酸化密切相关^[3], 因此我们重点观察 FAK, 特别是 FAK 酪氨酸磷酸化在牵拉依赖的细胞形态改变中的作用。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

将大鼠的成纤维细胞 3Y1 接种于添加了 100 kU/L 青霉素 G 钠盐、100 mg/L 硫酸链霉素和 250 mg/L 制霉菌素 B, 且含有 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 培养液中, 然后在孵箱内 (50 mL/L CO₂, 37 °C) 培养。

1.2 FAK 的构造

根据 FAK 的碱基排列顺序, 设计引物, 利用 PCR 克隆方法, 从人的脐静脉内皮细胞中获取 FAK cDNA。将 FAK cDNA 亚克隆到哺乳动物表达载体 pHM6 (Boehringer-Mannheim) 中, 结果在 FAK 的 N-末端附加了一个可识别的 HA (hemagglutinin) 标记物。然后通过重叠 PCR, 利用直接点突变获得突变的 FAK (F397Y 和 F925Y), 再将这些突变的 FAK 亚克隆到表达载体 pHM6 中, 使用 CEQ 2000XL DNA 序列分析仪 (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA), 通过双脱氧核苷酸链终止反应 (dideoxynucleotide chain-termination), 对突变后的 FAK 进行了序列分析。

1.3 瞬间转染

使用 Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Inc., Rockville, MD) 方法, 将各种 FAK cDNA 质粒分别与绿色荧光蛋白报道基因 pEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto, CA) 以 5:1 比例联合转染到 80% 融合的 3Y1 细胞中, 在孵箱中孵育 4 h。吸出药液, 用新鲜的 DMEM 培养液洗 1 次, 加入 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM, 在孵箱内过夜培养。然

后换成无胎牛血清的 DMEM 培养液, 饥饿 24 h, 再使细胞遭受牵拉或保持在静止状态。

1.4 牵拉装置

根据文献报道^[1,2], 利用 STRETCH NS-200 (Scholar Tech, Osaka, Japan) 系统, 使细胞遭受牵拉。用 0.1 mL/L EDTA-0.2 mL/L 胰蛋白酶处理细胞, 再将细胞移到已覆盖有 50 mg/L FN (fibronectin) 的 4 cm×4 cm 方形弹性硅膜装置中。装置的一端固定在固定杆上, 另一端联在移动杆上。移动杆又与一个运动驱动柄相接。牵拉的幅度和频率大小受一个微小计算机程序控制。当弹性硅膜装置受到 1 Hz、20% 延长牵拉时, 整个硅膜腔被均一牵拉, 膜的厚度变化不超过 1%。

1.5 牵拉方法

牵拉实验分为对照组和实验组, 对照组为 0 min, 牵拉组分别为 5、10、20、30、60 min。将 5 个牵拉组分别与对照组做比较, 实验重复 3 次。

1.6 免疫印记

根据文献报道^[2], 在牵拉反应后, 用冰冷的 1 mmol/L Na₃VO₄-PBS (137 mmol/L NaCl, 8.10 mmol/L Na₂HPO₄, 2.68 mmol/L KCl, 1.47 mmol/L KH₂PO₄, pH 7.40) 洗涤细胞 3 次, 加入样品缓冲液 (62 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8, 20 mL/L SDS, 0.2 mmol/L 2-巯基乙醇, 0.03 mL/L 溴酚蓝, 50 mL/L 甘油) 溶解细胞, 蛋白定量。取相同蛋白量细胞溶解物, 进行 SDS-PAGE (125 mL/L) 电泳分离。将凝胶上的蛋白质电转移到 PVDF 膜上 (Immobilon P, Millipore Corp, Bedford, MA), 用 50 mL/L BSA (bovine serum albumin)-PBS 封闭 PVDF 膜。将膜置于 PBS 稀释的多克隆 anti-phospho-Y397FAK (1:1 000), anti-phospho-Y925FAK (1:1 000), 或单克隆 anti-total-FAK (1:500) 抗体中, 室温摇晃反应 1 h。用辣根过氧化酶标记的山羊抗兔 IgG (1:2 000) 或山羊抗小鼠 IgG (1:2 000) 抗体探测抗原抗体复合物。最后用 ECL (Amersham Corp., Arlington Heights, IL) 盒曝光。采用信息分析程序 (Mocha, Jandel Scientific) 测定免疫印迹的密度, 比较对照组与牵拉组, 得出了倍数关系柱形图。

1.7 细胞形态分析

利用带有科学图像软件 IP Lab Spectrum 系统的 Hamamatsu Chilled CCD 照相机 (C5985) (Signal Analytics Corp., VA), 对发绿色荧光的细胞

(pEGFP-N1 阳性)进行拍照,然后在计算机上,使用图像分析程序将摄入的图像进行分析。

1.8 材料的来源

多克隆 anti-phospho-Y397FAK, anti-phospho-Y925FAK 或单克隆 anti-FAK 抗体购自 Biosorce International (Camarillo, CA)。单克隆 anti-total FAK 购自 Transduction Laboratory (Lexington, KY)。辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 和山羊抗小鼠 IgG 购自 Sigma (St. Louis, MO)。FN (Human plasma fibronectin) 按照 Regnault 等^[4]方法精取。

1.9 统计学处理

所有结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,先行方差分析,进一步做多重比较(Dunette 法)。

2 结果

2.1 单轴周期性牵拉引起了 FAK Y397 和 Y925 的酪氨酸磷酸化

利用抗磷酸化特殊抗体 (FAK_pY397 和 FAK_pY925) 调查 Y397 和 Y925 的酪氨酸磷酸化。在时间依赖的牵拉反应中, Y397 磷酸化水平较静止状态明显增高,牵拉至 5 min 达到峰值 (2.75 ± 0.51 倍, $n=3$), 随后逐渐降低 (图 1)。伴随着牵拉, Y925 磷酸化水平逐渐增高,且在 20 min 达到峰值 (2.98 ± 0.58 倍, $n=3$), 然后逐渐减弱 (图 1)。

2.2 FAK 的突变 (F397Y, F925Y) 减弱牵拉引起的形态改变

为了研究突变的 FAK 对牵拉引起的形态学影响,我们首先测定了在牵拉反应中细胞的配向排列 (图 2)。在已经设定的实验中,绿色荧光蛋白 (pEGFP-N1) 被同时分别与突变的 FAK (F397Y, F925Y) 联合转染到细胞中,40% ~ 50% 呈现 pEGFP 阳性。免疫荧光染色研究证明,多于 90% 的 pEGFP 阳性的细胞为 HA 标记物阳性 (数据没有展示),这就提示 FAK 是和 pEGFP 联合转染到细胞中的,因此 pEGFP 能够作为外源性 FAK 导入细胞内的标志。在对照组中 (pEGFP, pHM6/pEGFP, wildFAK/pEGFP), 牵拉引起了细胞伸长和配向排列,3 个对照组之间无有意义的差异。反之在突变的 FAK (F397Y/pEGFP, F925Y/pEGFP) 导入的细胞中,牵拉没能导致细胞垂直于牵拉轴排列和伸长。

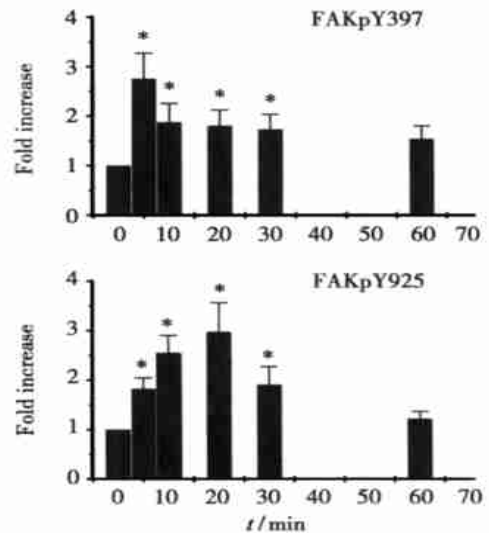


图 1 单轴周期性牵拉导致 FAK 酪氨酸磷酸化的时程变化

Fig 1 Time course of protein tyrosine phosphorylation of FAK from 3Y1 fibroblasts during cyclic stretch

* means significantly different ($P < 0.05$) from control (0 min)

3 讨论

FAK 是一个较广泛表达在黏着斑的非受体酪氨酸激酶,分子质量为 125 ku。FAK 含有 6 个可被磷酸化的酪氨酸残基,其中 FAK Y397 和 Y925 尤为重要。在许多黏着依赖的信息通路中,当细胞与细胞外基质 (例如 fibronectin) 接着时,能与许多细胞内信息蛋白结合,从而起始了一系列细胞内部信息反应^[5-6]。例如在整合素介导的刺激中, Y397 自动磷酸化, Src 与之结合,形成 FAK/Src 复合物, Src 进一步磷酸化 Y925, 产生一个 Grb2 结合点,从而 Grb2/Ras/MAPKs 信息通路被激活^[5]。由于 FAK 酪氨酸残基被点突变后,破坏了 FAK 的生物信息能力和它的激酶活性^[7-9], 所以 Src 与 FAK 的 Y397 结合形成 FAK/Src 复合物以及 Y925 的磷酸化,对于生物信息和控制生物反应起着关键作用。大量的研究已经提示在 FAK 介导的信息通路中,含有调节细胞骨骼和形态的通路。但是,在牵拉依赖的形态反应中, Y397 和 Y925 是否被磷酸化以及这两个残基的酪氨酸磷酸化的作用尚不清楚。本研究首先利用抗 FAK Y397 和 Y925 磷酸化特异抗体,探讨了 FAK 的酪氨酸磷酸化;其次将 FAK 397 和 925 位酪氨酸置换成苯丙氨酸 (F397Y, F925Y), 以阻止 FAK 酪氨酸磷酸化。然后把突变

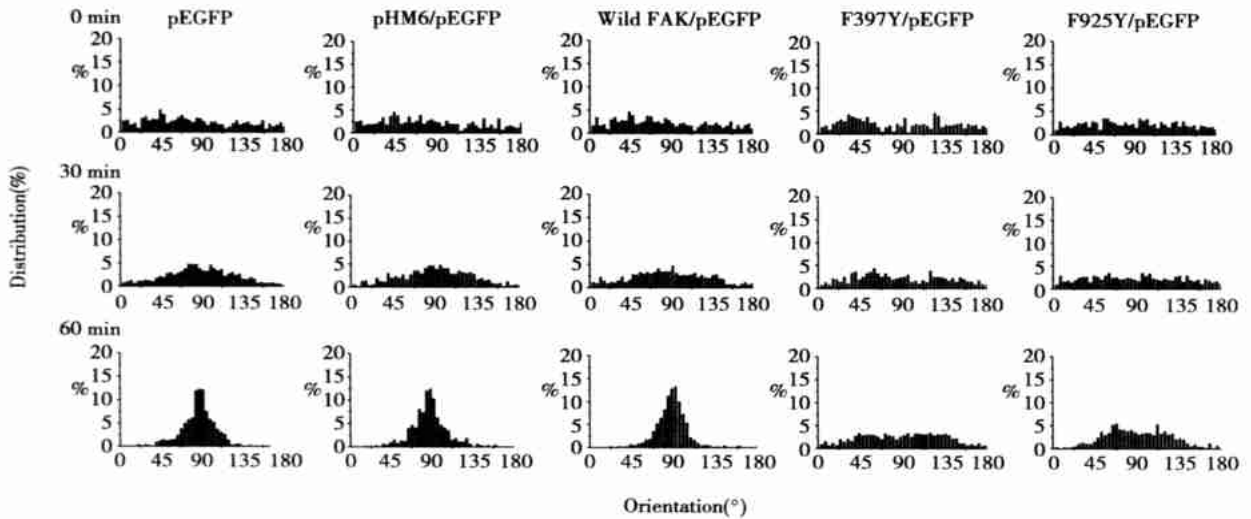


图 2 单轴周期性牵拉导致细胞排列的时程变化

Fig 2 Time course of the uniaxial cyclic stretch induced cell alignment

Each series of histograms showed time dependent change of 3Y1 fibroblasts transfected with various FAK in the percentage of cells plotted against the angle of individual long axis with respect to the stretch axis. The cyclic stretch axis was level. The control cells (pEGFP, pHM6/pEGFP, and wild FAK/pEGFP) began to orient perpendicularly to the stretch axis and the orientation of the vast majority of cells was close to 90° with respect to the stretch axis. On the other hand, the cells transfected with mutant FAK (F397Y/pEGFP, F925Y/pEGFP) did not show significant morphological changes. More than 600 cells from three independent experiments made up 100%

的 FAK 转染到大鼠的成纤维细胞 (3Y1) 内, 调查 FAK 突变对牵拉依赖的细胞形态改变的影响。结果表明, 牵拉引起了 FAKY397 和 Y925 的酪氨酸磷酸化; 突变的 FAK 导入细胞后, 阻止了牵拉引起的形态学改变。这说明 FAKY397 和 Y925 的酪氨酸磷酸化, 在牵拉引起的形态反应中起着重要作用。

在 3Y1 成纤维细胞中, 以前的研究已经证明, 牵拉首先激活细胞膜上的机械感受器 SA 通道 (stretch-activated channel), 引起钙的内流。由于钙的内流, 钙调磷酸酶 (calcineurin) 被活化, 从而激活 S_{rc} ^[2]。牵拉依赖的 FAKY397 酪氨酸磷酸化的重要性在于它的磷酸化产生了一个与 S_{rc} 家族 SH2 领域具有高亲和力的结合点, 结合后形成 FAK/ S_{rc} 复合物^[10]。 S_{rc} 进一步使 Y925 酪氨酸磷酸化, 产生一个 Grb2 结合点。由于 Grb2-Sos 在 Ras/MAPK 通路中是关键^[5, 11], 因此推测 FAK/Grb2/Ras/MAPK 信息通路可能与牵拉引起的形态学改变有关。另外, 牵拉依赖的 Y397 酪氨酸磷酸化是怎样发生的还不清楚, 有可能与整合素介导的信息相同, Y397 发生了自动磷酸化; 也有可能是其它原因导致了 Y397 的酪氨酸磷酸化。这些机制有待于进一步探讨。

参考文献:

- [1] Naruse K, Yamada T, Sokabe M. Involvement of SA channels in orienting response of cultured endothelial cells to cyclic stretch [J]. *Am J Physiol*. 1998, 274(5 Pt 2): H1532.
- [2] Sai X, Naruse K, Sokabe M. Activation of pp60(src) is critical for stretch-induced orienting response in fibroblasts [J]. *J Cell Sci*. 1999, 112(Pt 9): 1365.
- [3] Clark E A, Brugge J S. Integrins and signal transduction pathways: the road taken [J]. *Science*. 1995, 268(5208): 233.
- [4] Regnault V, Rivat C, Stoltz J F. Affinity purification of human plasma fibronectin on immobilized gelatin [J]. *J Chromatogr*. 1988, 432(18): 93.
- [5] Schlaepfer D D, Hanks S K, Hunter T, *et al*. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase [J]. *Nature*. 1994, 372(6508): 786.
- [6] Seko Y, Takahashi N, Tobe K, *et al*. Pulsatile stretch activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) family members and focal adhesion kinase (p125(FAK)) in cultured rat cardiac myocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999, 259(1): 8.
- [7] Richardson A, Malik R K, Hildebrand J D, *et al*. Inhibition of cell spreading by expression of the C-terminal domain of focal adhesion kinase (FAK) is rescued by coexpression of Src or catalytically inactive FAK: A role for paxillin tyrosine phosphorylation [J]. *Mol Cell Biol*. 1997, 17(12): 6906.
- [8] Schaller M D, Parsons J T. pp125FAK-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin creates a high-affinity binding site for Crk [J]. *Mol Cell Biol*. 1995, 15(5): 2635.

(下转第 247 页 to page 247)

现:与正常未孕妇女比较,妊娠中晚期孕妇外周血中,辅助/诱导性 T 淋巴细胞减少,杀伤/抑制性 T 淋巴细胞基本不变,CD4/CD8 比值下降,同时 NK 细胞也有不同程度的下降,提示妊娠期母体细胞免疫功能处于一定的免疫抑制状态;随着妊娠的发展,这种抑制有一定的下降。

从免疫学角度看,对分娩发动可作如下推理:妊娠期母体细胞免疫功能处于一定的抑制状态,使胎儿不受排斥。随着孕周的进展,这种抑制逐渐减弱,母体细胞免疫功能逐渐增强到一定程度,即可表现出对胎儿的排斥反应,分娩也随即发生。但这一推论并没有获得足够的证明。Akin 等^[7]报道,在自然分娩发动前,胎盘滋养叶组织中 IgG 抗体增加,而且在自然分娩胎盘中 IgG 含量较剖宫产者高,早产时则未见有这种变化,提示随着孕周发展,母体免疫系统对胎儿抗原的识别能力增强,并在分娩发动中起作用。在我们以前的研究中也发现正常孕妇外周血 T 淋巴细胞,辅助/诱导性 T 淋巴细胞和 CD4/CD8 比值随孕周逐渐上升,也支持这一理论。分娩发动后,外周血 T 淋巴细胞亚群和 NK 细胞的变化情况如何,目前尚无报道。

本研究中的足月临产组孕妇除均有宫缩或不规律宫缩,无胎膜早破,并于一天内分娩外,其余选择标准同足月未临产组。本研究表明孕妇出现临产后,外周血白细胞总数显著增加,其中粒细胞显著增加,淋巴细胞显著减少,单核细胞百分数显著减少,但绝对数差异无统计学意义;T 淋巴细胞、辅助/诱导性淋巴细胞显著减少,杀伤/抑制性淋巴细胞绝对数显著减少,但其百分数差异无统计学意义;CD4/CD8 比值下降,但无统计学意义;NK 细胞显著增加。按上述理论,分娩发动是母体细胞免疫

功能增强并对胎儿产生排斥反应的结果。但在本研究中,除 NK 细胞增多外,T 淋巴细胞亚群变化情况并不支持上述理论,提示分娩发动的免疫学机制是复杂的:母体细胞免疫功能的增强有可能不表现在外周血 T 淋巴细胞亚群的变化情况上;外周血 T 淋巴细胞减少的原因也可能与其在局部的富集或再分布有关,但有待进一步研究证实。需要注意的是本研究尚不能排除应激(如宫缩痛)对外周血 T 淋巴细胞亚群的影响。总之,分娩发动的免疫学机制十分复杂,有待进一步深入探讨。

参考文献:

- [1] Wegmann T G, Lin H, Guilbert L, *et al.* Bidirectional cytokines interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? [J]. *Immunol Today*, 1993, 14(7): 353.
- [2] Johnstone F D, Thong K J, Bird A G, *et al.* Lymphocyte subpopulations in early human pregnancy[J]. *Obstet Gynecol*, 1994, 83(6): 941.
- [3] Kuhnert M, Strohmeier R, Stegmüller M, *et al.* Changes in lymphocyte subsets during normal pregnancy[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1998, 76(2): 147.
- [4] 刘春兰,许怀英,刘颖,等.正常妊娠妇女外周血可溶性白细胞介素-2 受体及淋巴细胞亚群的变化[J].*中华妇产科杂志*, 1994, 29(9): 518.
- [5] Steinborn A, Kuhnert M, Hallerstadt E. Immunomodulating cytokines induce term and preterm parturition[J]. *J Perinat Med*, 1996, 24(4): 381.
- [6] Grammatopoulos D K, Hillhouse E W. Role of corticotropin-releasing hormone in onset of labour[J]. *Lancet*, 1999, 354(9189): 1546.
- [7] Akin J W, Conover W B, DePriest P D. Increasing quantity of maternal immunoglobulin G in trophoblast tissue before the onset of normal labor[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1990, 162(5): 1154.

(编辑 张恩健)

(上接第 244 页 from page 244)

- [9] Owen J D, Ruest P J, Fry D W, *et al.* 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[J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(7): 4806.
- [10] Schaller M D, Hildebrand J D, Shannon J D, *et al.* Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs

SH2-dependent binding of pp60src[J]. *Mol Cell Biol*, 1994, 14(3): 1680.

- [11] Schlaepfer D D, Hunter T. Evidence for in vivo phosphorylation of the Grb2 SH2-domain binding site on focal adhesion kinase by Src-family protein-tyrosine kinases[J]. *Mol Cell Biol*, 1996, 16(10): 5623.

(编辑 刘清海)