

周期性单轴拉伸力学刺激对哺乳动物细胞有丝分裂方向影响的研究*

赵磊¹⁾ 桑晨¹⁾ 杨春^{2)**} 庄逢源¹⁾

(¹⁾北京航空航天大学生物与医学工程学院, 北京 100191; ²⁾清华大学航天航空学院, 北京 100084)

摘要 哺乳动物细胞的有丝分裂过程与细胞的增殖、分化以及生物体发育、组织器官形成、损伤组织的修复和疾病的发生有关。广泛存在的力学刺激能否对细胞有丝分裂方向产生影响, 以及其影响有丝分裂定向的途径尚未完全阐明。采用小鼠成纤维细胞作为模型, 研究周期性单轴拉伸力学刺激对细胞应力纤维排布和有丝分裂方向的影响。结果表明, 周期性单轴拉伸诱导细胞有丝分裂与应力纤维垂直于拉伸方向排布, 而阻断应力纤维的两种基本组成成分(微丝和肌球蛋白 II), 会造成在周期性单轴拉伸条件下的应力纤维和有丝分裂方向重排。特别是, Y27632 (10 $\mu\text{mol/L}$) 和低浓度的 ML7 (50 $\mu\text{mol/L}$)、Blebbistatin (50 $\mu\text{mol/L}$) 可以诱导细胞有丝分裂与应力纤维平行于拉伸方向排布。统计结果表明, 在不同实验条件下, 应力纤维排布和有丝分裂方向均具有高度相关性。Western blot 实验表明, 肌球蛋白轻链磷酸化水平与周期性单轴拉伸刺激下的应力纤维排布和有丝分裂方向密切相关。上述结果提示: 周期性单轴拉伸力学刺激通过诱导应力纤维的排布, 决定了细胞的有丝分裂方向。

关键词 有丝分裂, 应力纤维, 周期性单轴拉伸, 肌球蛋白 II, 成纤维细胞

学科分类号 Q2, Q66

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00210

动物细胞的增殖、分化以及胚胎发育、组织器官形成和损伤组织的修复等都与细胞的有丝分裂过程密切相关。有丝分裂过程不仅具有增殖细胞数量的功能, 其方向性也具有重要意义。例如: 通过控制有丝分裂方向, 干细胞实现不对称分化, 从而决定了子代细胞的命运^[1-3]; 有丝分裂方向的调控对表皮形态生成素(epimorphin)诱导管腔样结构的发生也具有重要意义^[4]。因此, 近年来, 对于有丝分裂定向的研究受到越来越多的关注。研究表明, 有丝分裂纺锤体的定位过程受到细胞外微环境和胞内因素的影响。Théry 等^[5]证实, 细胞外基质的空间分布可以影响有丝分裂方向的确定, 表明物理因素参与了细胞有丝分裂定向的调控过程。整合素和应力纤维(微丝和肌球蛋白)与细胞感知力学环境的通路密切相关, 它们已被证实参与了有丝分裂定向的过程^[6-7]。这些现象提示力学环境对细胞有丝分裂的定向可能产生影响。

力学刺激广泛而普遍地存在于动物体内, 并影响细胞的多种基本功能, 例如: 细胞增殖、分化、

黏附和迁移等。力学刺激能否对细胞有丝分裂方向产生影响, 继而影响组织形态的发生和损伤修复过程? 阐明该问题有助于深入理解力学刺激在胚胎发育、组织修复、干细胞分化等过程中的影响。周期性单轴拉伸刺激是动物体内常见的力学刺激, 它通常作用于血管、肌肉和韧带上。这种力学刺激可影响细胞的形态并导致骨架重排^[8-9], 而细胞骨架的分布则有可能影响有丝分裂的定向。因此, 我们推测周期性单轴拉伸力学刺激很可能通过影响细胞应力纤维的排布进而影响有丝分裂的方向。

在哺乳动物体内, 成纤维细胞在组织形成和损伤修复的过程中具有重要作用, 它同时也是一类重要的感受力学信号的细胞, 其将细胞外基质中的力学信号转换为胞内一系列生物学事件, 如基因、蛋

* 国家自然科学基金资助项目(30870602, 30671098)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-62788113, E-mail: yangchun@tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2011-05-18, 接受日期: 2011-06-28

白质表达和信号通路传导等^[10]. 本文采用小鼠成纤维细胞(murine 3T3 fibroblasts)作为模型来研究在周期性单轴拉伸力学刺激下, 细胞应力纤维排布和有丝分裂定向, 以期深入理解三者之间的关系.

1 材料与方法

1.1 周期性单轴拉伸装置

本实验所采用的拉伸装置是在 Paul Sung 等提供的等双轴拉伸装置^[12]基础上改造而来(图 1a)^[11]. 该装置由细胞拉伸室(culture well)、推进头(indenter)、弹性硅胶膜(silicone membrane)、橡胶圈(O-ring)、旋转凸轮和电机等组成. 选用细条状硅胶膜(silicone

strip, 0.6 cm)衬于拉伸装置原有的整块弹性硅胶膜之上, 并通过橡胶圈固定于拉伸室底部. 凸轮在电机驱动下, 带动推进头作用于硅胶膜上. 此时, 整块硅胶膜上会产生等双轴应变, 而细条状硅胶膜上则会产生单轴应变. 实验时施加应变之后应保证细条状硅胶膜与整块硅胶膜之间有相对滑移, 以避免由于两块膜粘连造成的细条状硅胶膜的侧向应变. 条状硅胶膜的应变状态通过实验测量得出: 在条状硅胶膜上均匀撒若干橡胶小珠, 由于亲和力很强, 橡胶小珠和硅胶膜粘在了一起, 通过显微成像测量施加应变前后 3 个小珠的位移得到条状硅胶膜的实际应变(图 1b).

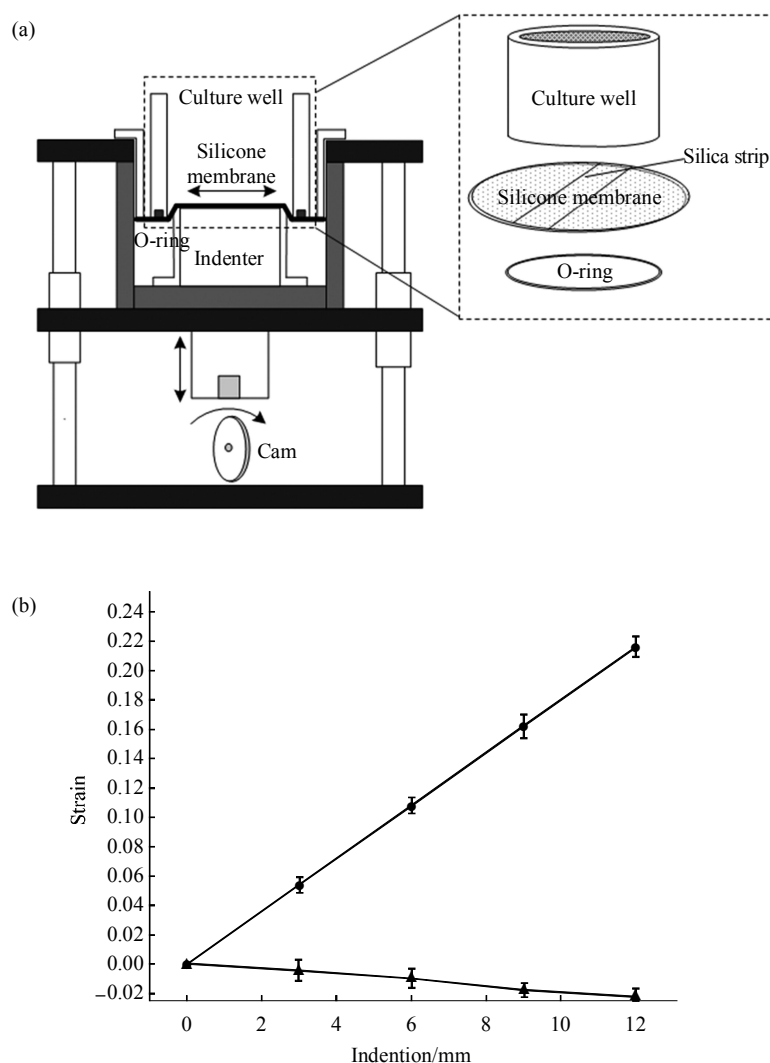


Fig. 1 Application of cyclic uniaxial stretch

(a) Schematic drawing of the cyclic uniaxial stretch device used in this study. This device consisted of a static uniaxial stretching well and a cam/rotator system. The sinusoidal cyclic uniaxial strain was produced in the strip by the displacement of the indenter, which was driven by the motor system. (b) The strain measured in the silicone strip. The longitudinal strain was detected as the indenter moved forward, while the lateral strain was negligible. These results indicated that the apparatus produced a uniaxial strain in the silicone strip during cyclic stretching. ●—●: The vertical strain; ▲—▲: The lateral strain.

1.2 药品、试剂和设备

高糖 DMEM 培养基和胎牛血清(Gibco 公司); 牛血清白蛋白、胰蛋白酶和 DAPI(Sigma 公司); Latrunculin-A、Blebbistatin、ML7、Y27632(Sigma 公司); 罗丹明 - 鬼笔环肽(Rhodamin-phalloidin, Molecular Probes 公司); 100 μm 硅胶微珠(Solohill 公司); 倒置荧光显微镜(日本 Olympus 71X); 激光共聚焦显微镜(德国 Leica TCS SP5).

1.3 细胞培养及处理

小鼠成纤维细胞系(Murine 3T3 fibroblasts)购自中国协和医科大学细胞中心. 实验中, 细胞按 $5 \times 10^4/\text{ml}$ 的密度接种于经高压灭菌的拉伸装置上. 细胞贴壁后对硅胶膜施加单轴拉伸应变. 根据之前的研究和哺乳动物体内生理参数, 选取拉伸应变量为 10%, 频率为 1 Hz. 分别观察 6、12、24 h 后, 细胞应力纤维排布及有丝分裂方向. 由于应力纤维与有丝分裂方向会受到细胞与胞外基质之间及细胞之间相互作用的影响, 因此在培养细胞过程中, 细胞接种密度尽量低, 以便选取独立生长的细胞进行观察和统计.

1.4 免疫荧光染色

将细胞放入 4% 多聚甲醛(Sigma 公司)作用 20 min, 而后加入 0.1% Triton X-100 中作用 10 min. 用 PBS 冲洗 2 次后, 用 1% BSA 封闭 1 h. 加入小鼠 Tubulin- α 抗体(Neomarkers, Fremont, Cal, USA) 1:100 稀释后 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜. 采用 FITC 标记的抗鼠 IGG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pennsylvania, USA) 和罗丹明鬼笔环肽 (Invitrogen, Grand Island, NY USA) 按照 1:50 稀释, 避光反应 30 min. 细胞核通过 DAPI(Sigma 公司)染色.

1.5 Western blot

采用标准的 RIPA 缓冲液, 同时加入蛋白酶抑制剂(leupeptin, pepstatin A, aprotinin and PMSF)孵育过夜, 从细胞中提取蛋白质. 经 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶梯度电泳将蛋白质分开, 随后在 25V 电压下 30 min 将其转到聚氟乙烯膜上(Millipore, Bedford, Massachusetts, USA). 用 TBST 冲洗, 并加入 5% 的脱脂牛奶, 封闭 2 h 后, 加入肌球蛋白轻链磷酸化(Myosin Light Chain, MLC)的抗体(1:100, Santa Cruz Biochemistry) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜. 采用 HRP 标记的二抗(1:1000, Jackson ImmunoResearch)反应 1 h, 其中每步过程中均要用 TBST 冲洗 3 次. 所有的条带均根据 GAPDH

(36 ku, Jackson ImmunoResearch) 进行归一化处理. 通过化学发光标记试剂盒进行显影.

1.6 图像处理和统计

选取独立生长的细胞进行细胞骨架微丝和细胞核的观测, 以有丝分裂中期至末期的细胞核连心线或者赤道板的中垂线确定细胞有丝分裂方向. 使用 AutoCAD 的免费软件测量出有丝分裂方向、应力纤维方向和参考方向(单轴拉伸应变方向)的夹角. 采用 Th  ry 等^[9]的方法, 在极坐标系中绘制柱状图.

根据实验结果, 统计应力纤维与拉伸方向夹角以及有丝分裂方向与拉伸方向夹角的算数平均值, 统计数据均以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示. 为了简便, 在统计计算时我们将所有的夹角值均映射到 0 $^{\circ}$ ~90 $^{\circ}$ 范围内(即只考虑锐角). 对于角度数据, 采用 Rayleigh 和 Watson U^2 检验, 而其余数据采用 ANOVA 和 Student-Neumann-Keuls 检验. 所有实验数据均至少重复 3 次以上.

2 结 果

2.1 周期性单轴拉伸刺激诱导细胞有丝分裂与应力纤维垂直于拉伸方向排布

小鼠成纤维细胞按 $5 \times 10^4/\text{ml}$ 接种于经高压灭菌的拉伸装置上. 待贴壁后施加周期性单轴拉伸刺激(应变量为 10%, 频率为 1 Hz), 分别观察拉伸 6、12、24 h 后细胞有丝分裂方向. 由于有丝分裂方向会受到细胞与胞外基质及细胞之间的相互作用影响, 因此在培养细胞过程中, 其接种密度尽量低, 以便选取独立生长的细胞进行观察和统计. 统计结果显示, 在拉伸 6、12、24 h 后, 分别有 30%、35.1% 和 37% 的细胞有丝分裂方向与拉伸应变之间的夹角在垂直于拉伸方向的 $\pm 10^{\circ}$ 之内(图 2a~c). 这一有趣的现象表明周期性应变的作用下, 细胞的有丝分裂方向倾向于与拉伸方向垂直排布.

已有文献证明, 在内皮细胞和成纤维细胞中^[13-14], 周期性单轴拉伸可以使应力纤维垂直于拉伸方向排布, 并且这一趋势会受到拉伸的强度^[15]和频率^[16]的调控. 在我们的实验结果中, 细胞在周期性单轴拉伸作用 6、12 和 24 h 之后, 分别有 34.24%、37.3% 和 38.9% 的细胞其应力纤维排布在垂直于拉伸方向的 $\pm 10^{\circ}$ 之内(图 2a~c).

施加 10% 的周期性单轴拉伸刺激 12 h 后, 停止拉伸, 保持硅胶膜表面不承受张力 2 h, 此时统计细胞应力纤维排布和有丝分裂方向. 结果表明,

应力纤维和有丝分裂方向垂直于拉伸方向的趋势并没有改变(图 2d)。考虑到有丝分裂过程应在 2 h 内完成, 因此上述结果提示, 有丝分裂方向的确定不

是受到外加力学作用的直接影响, 而是很可能受到应力纤维排布方向的控制。

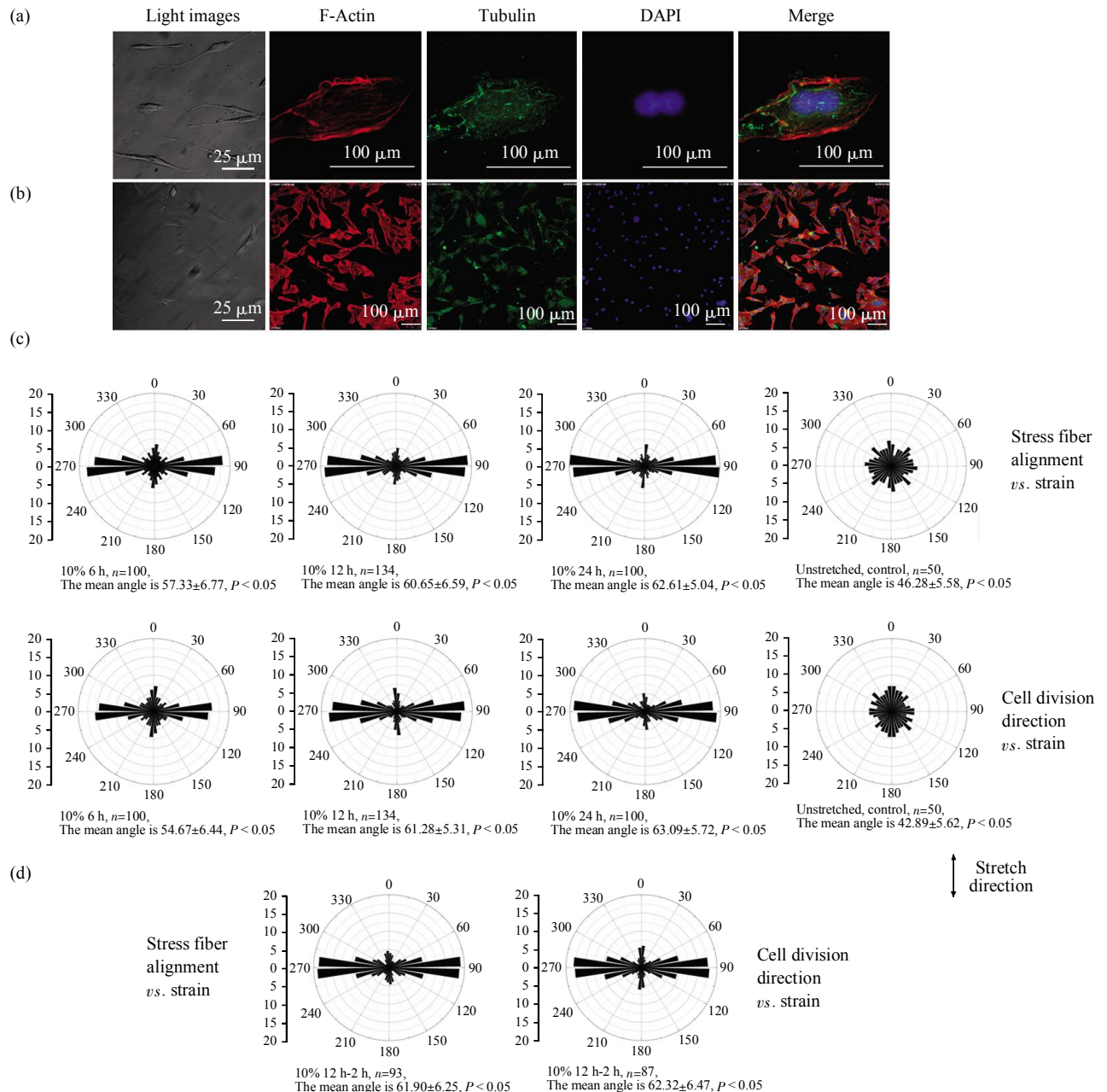


Fig. 2 Cyclic uniaxial stretch induced both stress fiber alignment and cell division direction perpendicularly to the stretch direction

(a) Cyclic stretch. Representative images of murine 3T3 fibroblasts that underwent cyclic uniaxial stretch. Cells were subjected to 6, 12, and 24 h of cyclic stretch (10% linear stretch, 1 Hz), and were stained with tubulin, F-actin, and DAPI respectively. We determined the cell division direction by the line connecting the nuclei centers or the perpendicular line of the equatorial plate. (b) Unstretched control. Images of unstretched murine 3T3 fibroblasts were kept as controls. (c) Statistical analyses. Statistical analyses of stress fiber alignment and cell division direction. The polar coordinates charts showed the distribution of stress fiber and cell division. (d) Deprived after stretched for 12 h. The stress fiber alignment and cell division direction did not change even after the uniaxial stretch was deprived for 2 h after they had been stretched for 12 h previously. The number of cells, n , present in each case was labeled under each chart. The arrowhead indicated the stretch direction.

2.2 Latrunculin-A 干扰周期性单轴拉伸对细胞有丝分裂与应力纤维排布方向的影响

人们从很早就开始关注细胞分裂轴定向的问题。19 世纪, Hertwig^[17]提出了早期的关于细胞分裂轴定向的假说(被称为 Rules of Sachs and Hertwig), 认为细胞总是倾向于沿着长轴分裂, 从而等分为两部分。根据这个假说, 人们很容易认为周期性单轴拉伸刺激诱导细胞的长轴垂直于拉伸方向排布, 从而导致了有丝分裂方向也呈现上述排布特点。但是最近几年, 随着人们对这一问题的认识逐渐深入, Hertwig 的理论受到了越来越多的质疑^[5, 18-19]。Théry 等用 Micropattern 技术控制细胞的几何形状及黏附

位置, 发现细胞有丝分裂方向并非由几何形状决定, 他们推测影响有丝分裂方向的因素很可能是应力纤维。

为此, 我们设计了应力纤维的阻断实验, 来证实其对周期性单轴拉伸诱导的有丝分裂方向的影响。Latrunculin-A 可以阻断 G-actin 装配成 F-actin, 从而破坏细胞骨架微丝的结构^[20]。采用 Latrunculin-A 阻断应力纤维的聚合之后, 我们统计了细胞的有丝分裂方向。统计结果表明, 细胞的有丝分裂方向呈随机分布, 不再受周期性单轴拉伸的影响(图 3)。这些实验结果提示, 应力纤维排布方向在有丝分裂定向过程中起重要作用。

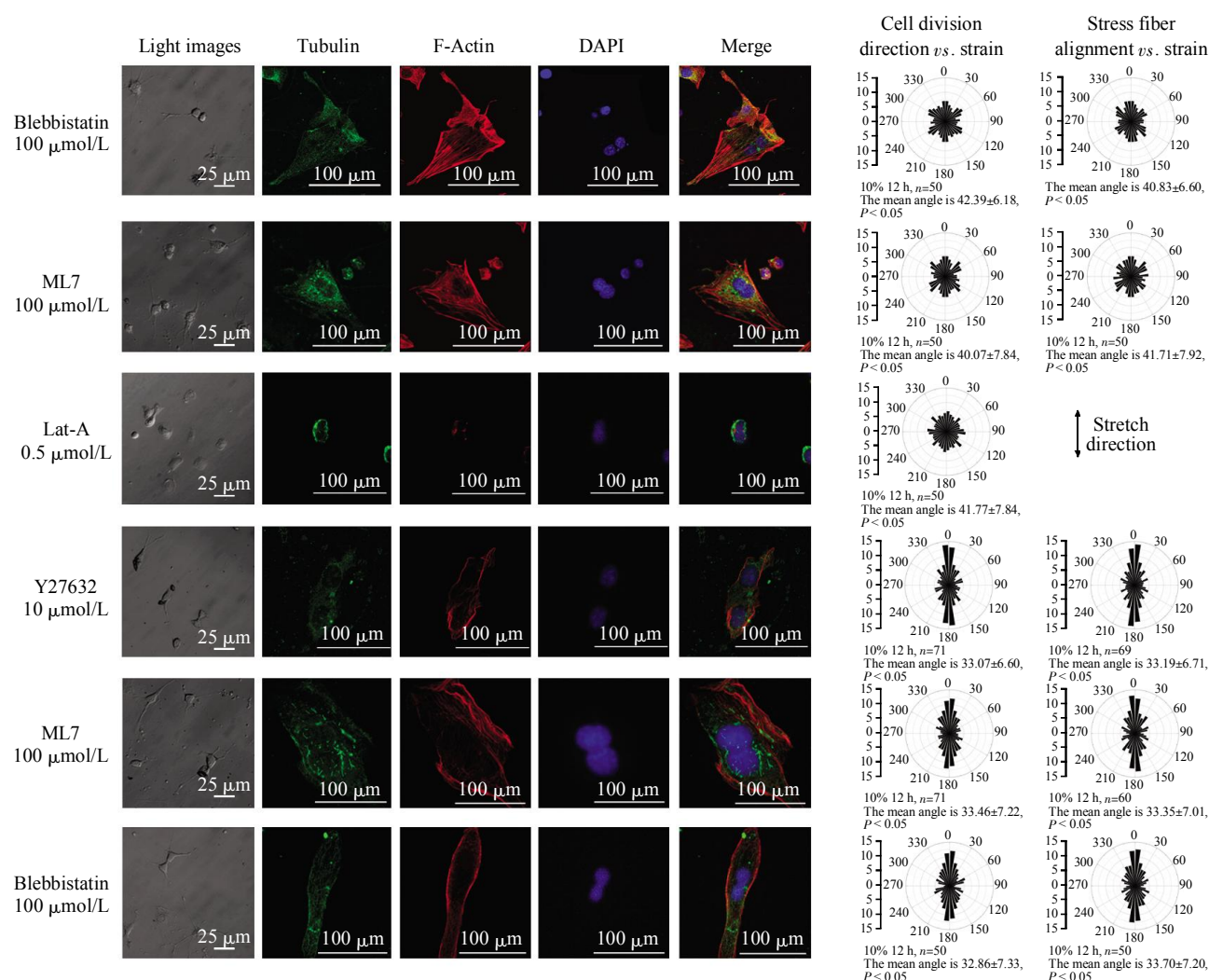


Fig. 3 Blocking of actin and myosin II interrupted the stretch-induced stress fiber alignment and cell division direction

Observations and analyses of stress fiber alignment and cell division direction of cells under cyclic uniaxial stretch in the block experiment. Cells were stained for tubulin, F-actin, and DAPI respectively. The polar coordinates charts showed the distribution of stress fiber and cell division. Number of cells, n , was labeled under each chart. The arrowhead indicates the stretch direction.

2.3 肌球蛋白 II 和 Rho/ROCK 通路参与了周期性单轴拉伸对细胞有丝分裂与应力纤维排布方向的影响

我们继续关注应力纤维的另一种重要组成部分——肌球蛋白 II (myosin II). Rosenblatt 等^[6]发现, 由肌球蛋白 II 决定的质膜运动对于哺乳动物细胞中心粒向两侧分开, 以及最终纺锤体组装和定位都非常重要. 本文中, 采用 ML7 和 Blebbistatin 来间接(阻断肌球蛋白轻链激酶活性, MLCK)^[21]或者直接阻断肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC)^[22]的磷酸化, 以检测周期性单轴拉伸条件下, 肌球蛋白 II 的活性对有丝分裂定向和应力纤维排布的影响. 实验结果显示, 在经过 12 h 的周期性拉伸之后, 阻断剂处理过的细胞中, 应力纤维和有丝分裂方向均呈随机排布. 值得注意的是, 在周期性拉伸作用下, 当 Blebbistatin 和 ML7 剂量(50 $\mu\text{mol/L}$)较低时, 细胞的应力纤维和有丝分裂方向并非随机排布, 而是平行于拉伸方向排布(图 3).

已有的报道表明, Rho/ROCK 通路 with 周期性单轴拉伸诱导的应力纤维排布密切相关. 因此我们研究了在周期性拉伸刺激下, 该通路对细胞有丝分裂定向的影响. 在细胞贴壁后, 加入 Y27632 以特异性阻断 ROCK 的活性^[23], 并对细胞施加拉伸刺激 12 h, 随后统计细胞的应力纤维和有丝分裂定向. 结果表明, 应力纤维和有丝分裂方向均沿着平行于拉伸的方向排布(图 3).

Rho/ROCK 通路及 MLCK 通路通过不同方式均可影响 MLC 磷酸化^[24-25], 因此我们用 Western blot 检测了肌球蛋白轻链(MLC)的磷酸化水平. 结果表明, 周期性单轴拉伸刺激可以增加 MLC 的磷酸化水平. 而 Y27632、Blebbistatin 和 ML7 则可使处理过的细胞中 MLC 磷酸化水平下降, 同时伴随着应力纤维和有丝分裂方向的重新排布(图 4). 这些现象提示, MLC 的磷酸化与应力纤维(和有丝分裂方向)的排布方式之间存在着密切的关系.

2.4 周期性单轴拉伸刺激下, 应力纤维的排布方式决定了有丝分裂的定向

在不同周期性单轴拉伸刺激和试剂处理条件下, 我们均观测到应力纤维排布和有丝分裂方向之间具有密切的相关性. 统计应力纤维与拉伸方向夹角以及有丝分裂方向与拉伸方向夹角的算数平均值, 并绘制于图 5 中. 结果表明, 二者具有明显的线性相关性. 值得注意的是, 图 5 中的数据来源于多组细胞在不同药物作用下观测到的结果. 这些结

果中有丝分裂与应力纤维的角度均较好地符合线性关系, 提示我们在应力纤维排布和有丝分裂方向之间的相关性与实验中的外源性因素(药物刺激)无关.

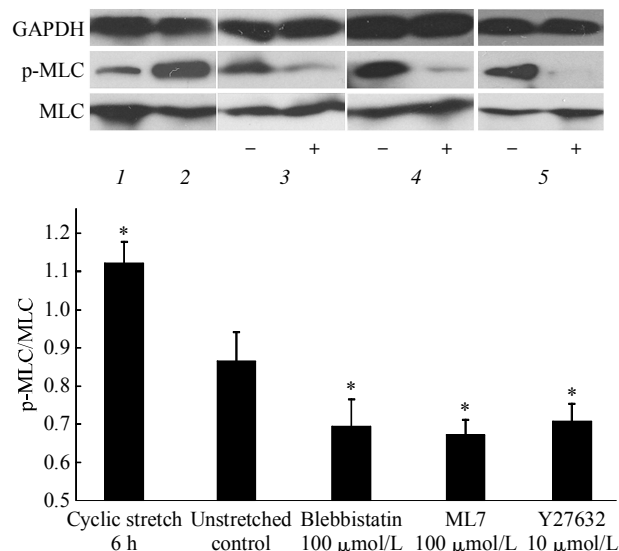


Fig. 4 Western blotting assay of phosphorylation of myosin light chain under cyclic uniaxial stretch and the drug-treated experiment

GAPDH (36 ku) was used as an internal control. Histograms showed the ratio of the phosphorylated myosin light chain to the total myosin light chain (p-MLC/MLC) under each condition ($\bar{x} \pm s$; $n = 3$), $*P < 0.05$. 1: Unstretched control; 2: Cyclic stretch 6 h; 3: With(+) or without (-) ML7, 100 $\mu\text{mol/L}$ 10%, 6 h; 4: With(+) or without (-) Blebbistatin, 100 $\mu\text{mol/L}$ 10%, 6 h; 5: With(+) or without (-) Y27632, 10 $\mu\text{mol/L}$ 10%, 6 h.

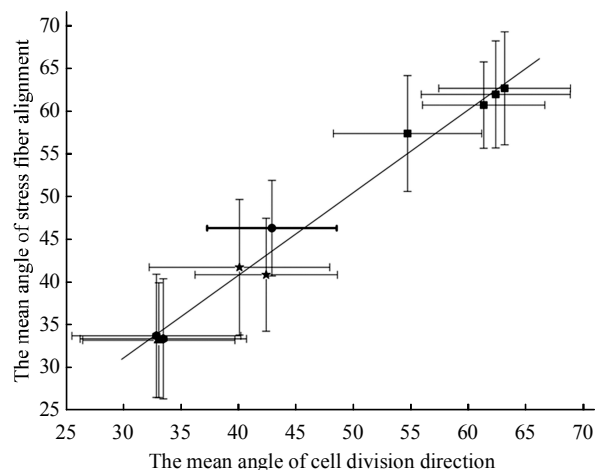


Fig. 5 Correlation between cell division direction and stress fiber alignment

The mean angles of cell division direction and stress fiber alignment were first calculated based on the data of the percentage of cells in each angle interval, and then were combined and cross-plotted to determine the correlation between cell division direction and stress fiber alignment. The lines were fitted with the linear curve, and spots represent the corresponding experimental data ($\bar{x} \pm s$; $n=3$). ●: Unstretch control; ■: Cyclic stretch; ▲: Stretch+Y27632(10 $\mu\text{mol/L}$); ★: Stretch+Blebbistatin or ML7(100 $\mu\text{mol/L}$); ●: Stretch+Blebbistatin or ML7(50 $\mu\text{mol/L}$); —: Linear fit of data, $R=0.9915$, $P < 0.01$.

综上所述,可以得到这样的推论:a. 应力纤维的排布和有丝分裂方向的确定具有高度的一致性;b. Rho/ROCK 及 MLCK 通路均会影响 MLC 磷酸化水平,并可能通过 MLC 磷酸化水平调控了周期性单轴拉伸刺激诱导的应力纤维排布和有丝分裂定向。

3 讨 论

大量研究表明,广泛存在的力学刺激对于生物体的发育、器官形成和某些疾病的形成都具有重要作用^[10,26]。力学刺激影响细胞基本功能,如:细胞增殖、分化、迁移以及基因表达、蛋白质合成等等。但是力学刺激对于细胞有丝分裂纺锤体定位的影响尚待研究。本文中,采用周期性单轴拉伸力学模型,证实了单轴拉伸对有丝分裂定向有重要作用,这一作用通过诱导应力纤维的排布实现。支持我们假说的证据如下:a. 在不同的实验条件下,有丝分裂方向均与应力纤维排布保持一致,或垂直或平行于拉伸方向;b. 微丝和肌球蛋白 II 是应力纤维的两种基本组分,对它们的阻断会同时造成在周期性单轴拉伸条件下的应力纤维和有丝分裂方向的改变;c. 在周期性单轴拉伸作用后,撤去拉伸 2 h,应力纤维和有丝分裂方向并不改变,这一现象说明力学信号不是直接影响了有丝分裂定向。

上述推论不仅对于周期性单轴拉伸诱导的有丝分裂定向有效,在静态单轴拉伸刺激下该结论也同样成立。本研究组之前的研究表明,在小鼠成纤维细胞和大鼠肝卵原细胞两种不同细胞模型下,应力纤维的排布方向均与细胞有丝分裂方向具有高度的相关性,二者均与静态单轴拉伸方向保持一致。而分别对微丝和肌球蛋白 II 进行阻断之后,也都会发现应力纤维和有丝分裂方向的混乱排布^[27]。这些结果也再次说明,细胞应力纤维的排布方式决定了有丝分裂的方向,并且二者与外加的力学刺激方式密切相关。

人们很早就发现力学刺激可影响细胞的形态改变和细胞骨架重排,比如周期性单轴拉伸会诱导应力纤维垂直于拉伸方向排布。这样一个令人费解的现象吸引了很多研究人员的注意。Kaunas 和 Chien 等^[28]对这一问题进行了深入的实验研究。他们发现,当施加周期性单轴拉伸时,血管内皮细胞的应力纤维会沿着垂直于拉伸方向排布,而阻断 Rho/ROCK 通路会使应力纤维沿着平行于拉伸方向排布。他们因此认为周期性拉伸诱导的应力纤维排

布是一个 Rho/ROCK 信号传导通路和拉伸强度共同起作用的过程。Wang 等^[29]的研究表明,在使用 BDM(2, 3 butanedione monoxime)药物阻断内皮细胞肌球蛋白 II 的活化(MLC 磷酸化)之后,周期性单轴拉伸下的应力纤维排布会发生混乱。对内皮和成纤维细胞的研究表明,Rho/ROCK 和 MLCK 是调控 MLC 磷酸化的两条主要信号传导通路^[24-25]。我们的阻断实验表明,MLC 磷酸化在周期性单轴拉伸介导的应力纤维排布和有丝分裂定向过程中发挥了重要作用。MLC 的磷酸化水平被广泛认为是细胞内应力产生的重要步骤,因此,我们可以推测应力纤维中的内应力很可能参与了周期性力学刺激对应力纤维和有丝分裂方向的调控过程。但迄今为止,还没有找到在动态拉伸条件下监控细胞内应力的有效方法。因此,内应力在周期性力学刺激诱导应力纤维排布和有丝分裂定向过程中的作用仍需要进一步的研究。

综上所述,在哺乳动物中,作为保持细胞形状和承受外力的重要结构,应力纤维终结于黏着斑,通过黏着斑与细胞外基质相连。应力纤维的排布方式为细胞有丝分裂中心粒的分离、定位提供了轨道,最终影响纺锤体和有丝分裂的定向。而胞外微环境中的各种物理生化因素(细胞外基质、细胞黏附、力学刺激等)通过黏着斑(整合素, Integrin)、钙离子等传感器的作用,引起胞内蛋白质因子的变化、细胞骨架的重排和信号通路的激活,最终对细胞有丝分裂纺锤体的定位产生影响。但是我们仍然不清楚,在哺乳动物细胞中纺锤体通过何种方式与应力纤维轨道相连,又是通过什么机制被牵引而沿着应力纤维轨道滑动最终完成有丝分裂定向的。这些问题都有待于进一步的实验研究,而找到连接微丝和微管的蛋白质或蛋白质复合物应是努力的主要方向。

参 考 文 献

- [1] Kusch J, Liakopoulos D, Barral Y. Spindle asymmetry: A compass for the cell. *Trend Cell Biol*, 2003, **13**(11): 562-569
- [2] Yamashita Y M, Jones D L, Fuller M T. Orientation of asymmetric stem cell division by the APC tumor suppressor and centrosome. *Science*, 2003, **301**(5639): 1547-1550
- [3] Gonzalez C. Spindle orientation, asymmetric division, and tumour suppression in *Drosophila* stem cells. *Nat Rev Genet*, 2007, **8**(6): 462-472
- [4] Junnian Z, Lei Z, Lipeng Q, et al. Epimorphin regulates bile duct formation via effects on mitosis orientation in rat liver epithelial stem-like cells. *PLoS ONE*, 2010, **5**(3): e9732

- [5] Théry M, Racine V, Pépin A, *et al.* The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nat Cell Biol*, 2005, **7**(10): 947–953
- [6] Rosenblatt J, Cramer L P, Baum B, *et al.* Myosin II -dependent cortical movement is required for centrosome separation and positioning during mitotic spindle assembly. *Cell*, 2004, **117**(3): 361–372
- [7] Woolner S, O'Brien L L, Wiese C, *et al.* Myosin-10 and actin filaments are essential for mitotic spindle function. *J Cell Biol*, 2008, **182**(1): 77–88
- [8] Takemasa T, Sugimoto K, Yamashita K. Amplitude-dependent stress fiber reorientation in early response to cyclic strain. *Exp Cell Res*, 1997, **230**(2): 407–410
- [9] Hayakawa K, Sato N, Obinata T. Dynamic reorientation of cultured cells and stress fibers under mechanical stress from periodic stretching. *Exper Cell Res*, 2001, **268**(1): 104–114
- [10] Wang J H, Thampatty B P. An introductory review of cell mechanobiology. *Biomech Model Mechanobiol*, 2006, **5**(1): 1–16
- [11] Lee A A, Delhaas T, Waldman L K, *et al.* An equibiaxial strain system for cultured cells. *Am J Physiol*, 1996, **271**(4 Pt 1): C1400–1408
- [12] Hsieh A H, Tsai C M, Ma Q J, *et al.* Time-dependent increases in type-III collagen gene expression in medical collateral ligament fibroblasts under cyclic strains. *J Orthop Res*, 2000, **18**(2): 220–227
- [13] Wang J H, Yang G, Li Z, *et al.* Fibroblast responses to cyclic mechanical stretching depend on cell orientation to the stretching direction. *J Biomech*, 2004, **37**(4): 573–576
- [14] Wang J H, Goldschmidt-Clermont P, Wille J, *et al.* Specificity of endothelial cell reorientation in response to cyclic mechanical stretching. *J Biomech*, 2001, **34**(12): 1563–1572
- [15] Birukov K G, Jacobson J R, Flores A A, *et al.* Magnitude-dependent regulation of pulmonary endothelial cell barrier function by cyclic stretch. *Am J Physiol*, 2003, **285**(4): L785–L797
- [16] Liu B, Qu M J, Qin K R, *et al.* Role of cyclic strain frequency in regulating the alignment of vascular smooth muscle cells *in vitro*. *Biophys J*, 2008, **94**(4): 1497–1507
- [17] Hertwig O. Das problem der befruchtung und der Isotropie des eies, eine theorie der vererbung. *Jenaische Zeitschrift*, 1884, **18**: 21–23
- [18] Théry M, Bornens M. Cell shape and cell division. *Curr Opin Cell Biol*, 2006, **18**(6): 648–657
- [19] Toyoshima F, Nishida E. Integrin-mediated adhesion orients the spindle parallel to the substratum in an EB1- and myosin X-dependent manner. *EMBO J*, 2007, **26**(6): 1487–1498
- [20] Yarmola E G, Somasundaram T, Boring T A, *et al.* Actin-latrunculin A structure and function. Differential modulation of actin-binding protein function by latrunculin A. *J Biol Chem*, 2000, **275**(36): 28120–28127
- [21] Makishima M, Honma Y, Hozumi M, *et al.* Induction of differentiation of human leukemia cells by inhibitors of myosin light chain kinase. *FEBS Lett*, 1991, **287**(1–2): 175–177
- [22] Straight A F, Cheung A, Limouze J, *et al.* Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II inhibitor. *Science*, 2003, **299**(5613): 1743–1747
- [23] Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, *et al.* Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science*, 1999, **285**(5429): 895–898
- [24] Kamm K E, Stull J T. Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions. *J Biol Chem*, 2001, **276**(7): 4527–4530
- [25] Emmert D A, Fee J A, Goeckeler Z M, *et al.* Rho-kinase-mediated Ca²⁺-independent contraction in rat embryo fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, **286**(1): C8–21
- [26] Orr A W, Helmke B P, Blackman B R, *et al.* Mechanisms of mechanotransduction. *Dev Cell*, 2006, **10**(1): 11–20
- [27] 王 婧, 胡青华, 米 强, 等. 静态单轴拉伸应变刺激对细胞有丝分裂方向的影响. *生物化学与生物物理进展*, 2008, **35**(3): 297–303
- Wang J, Hu Q H, Mi Q, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2008, **35**(3): 297–303
- [28] Kaunas R, Nguyen P, Chien S, *et al.* Cooperative effects of Rho and mechanical stretch on stress fiber organization. *Proc Natl Acad Sci*, 2005, **102**(44): 15895–15900
- [29] Wang J H, Goldschmidt-Clermont P, Yin F C. Contractility affects stress fiber remodeling and reorientation of endothelial cells subjected to cyclic mechanical stretching. *Ann Biomed Eng*, 2000, **28**(10): 1165–1171

Effects of Cyclic Uniaxial Stretch on Mammalian Cell Division Direction*

ZHAO Lei¹⁾, SANG Chen¹⁾, YANG Chun^{2)**}, ZHUANG Feng-Yuan¹⁾

¹⁾ School of Biological Science and Medical Engineering, Beihang University, Beijing 100191, China;

²⁾ Institute of Biomechanics and Medical Engineering, Engineering Mechanics Department,
School of Aerospace, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract Mechanical forces are widely involved in regulating basic cellular functions, including proliferation, differentiation, adhesion, and migration. However, few studies show how the mechanical forces impact cell division direction, a crucial process in development, differentiation, embryogenesis and recovery of tissues. It has been documented that cell division direction is guided by stress fibers, which are cortical cues perpendicular to exogenous cyclic uniaxial stretch. In our study, we used the murine 3T3 fibroblasts as a model, to investigate the effect of uniaxial stretch on stress fiber alignment and cell division direction with custom-made stretch devices. We found that cyclic uniaxial stretch induced stress fiber alignment and cell division direction perpendicularly to the stretch direction. The blockage of actin assembly and myosin II, two basic components of stress fibers, resulted in a disoriented cell division under uniaxial stretch, which suggested that the cell division direction was secondary to the stress fiber alignment. Our data suggested that Rho/Rho-kinase/MLC (Myosin Light Chain) and MLCK/MLC pathways were involved in the process of stretch-induced stress fiber alignment and cell division direction. Taken together, the present work demonstrated an important effect of uniaxial stretch on cell division direction *via* affecting the stress fibers alignment.

Key words cell division, stress fiber, cyclic uniaxial stretch, myosin II, fibroblast

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00210

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China(30870602, 30671098).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-62788113, E-mail: yangchun@tsinghua.edu.cn

Received: May 18, 2011 Accepted: June 28, 2011