



PIEZO1 影响 HaCaT 细胞的趋电性迁移*

张桂诚 龚 鹏 王一凡 赵三军**

(云南师范大学生命科学学院, 昆明 650500)

摘要 **目的** 伤口中心产生的内源性电场是指导细胞定向迁移促进伤口愈合的重要因子。PIEZO1 是机械门控阳离子通道家族成员之一, 它参与细胞迁移, 影响细胞的趋化迁移, 并且受到电压的调节, 在伤口愈合过程中发挥重要作用。但 PIEZO1 是否参与影响电场指导的细胞定向迁移过程尚不清晰, 本文以 HaCaT 细胞为模型探讨 PIEZO1 及其下游相关蛋白质对细胞趋电性迁移的影响。**方法** 应用活细胞工作站追踪 HaCaT 细胞在微直流电场中的迁移, 使用抑制剂及 RNAi 技术调控 PIEZO1 功能和表达, 研究 PIEZO1 对于细胞趋电性迁移的影响; 用蛋白质印迹 (Western blot) 检验细胞的整合素 (integrin) $\beta 1$ 与 FAK 磷酸化水平在电场作用下的变化情况, 探讨 PIEZO1 与 integrin $\beta 1$ 及 FAK 等对电场信号的响应及细胞趋电性迁移的影响。**结果** PIEZO1 广谱抑制剂钆红、GsMTx4 和 RNAi 处理显著抑制了 HaCaT 细胞向正极趋电性迁移的能力; 电场和 GsMTx4 单独作用升高 FAK 磷酸化和 integrin $\beta 1$ 表达, GsMTx4 阻止电场进一步升高 FAK 的磷酸化水平和 integrin $\beta 1$ 表达; siRNA 干扰 PIEZO1 表达后显著下调 FAK 的磷酸化水平, 并且电场对 FAK 磷酸化和 integrin $\beta 1$ 表达的促进作用受到抑制; Integrin $\beta 1$ 和 FAK 的抑制剂使 HaCaT 细胞的趋电性迁移能力均显著降低。**结论** PIEZO1 参与 HaCaT 细胞的趋电性迁移, 是影响 HaCaT 细胞趋电性迁移的重要分子之一; 抑制 integrin $\beta 1$ 和 FAK 会影响 HaCaT 细胞的电性迁移; 电场信号可能通过 PIEZO1 介导的信号通路调控 integrin $\beta 1$ 的表达和 FAK 的活化进而影响细胞趋电性迁移。

关键词 电场, 趋电性, 细胞迁移, HaCaT 细胞, PIEZO1, 整合素 $\beta 1$, FAK

中图分类号 Q26, Q27

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0218

创伤后修复是一个动态协调过程, 需要多基因共同调控程序的表达, 主要包括止血炎症、新组织的形成和组织重构或分解三个阶段, 在伤口愈合过程中细胞进行分裂分化和运动迁移, 而往往迁移要快于分裂分化过程, 优先对伤口处进行修复^[1]。研究发现, 伤口处皮肤屏障缺失导致的跨上皮电位短接会在伤口处产生内源性电场 (electric field, EF), 这种恒稳微直流电场能够指导细胞向伤口中心定向迁移, 在伤口愈合的过程中具有重要作用^[2-3]。

上皮损伤后发生机械感知的改变与上皮稳态的缺失, 在伤口处形成一定的空隙, 机械力环境发生改变, 研究表明, 此种活动可以通过机械感知离子通道发挥作用, 在生物体伤口愈合过程发挥作用^[4]。PIEZO1 是在哺乳动物中发现的一类广泛分布于包括皮肤在内的各组织器官中的机械敏感离子通道, 它能够对剪切应力做出响应, 并将机械力转换为生物信号, 参与流体压力感知、触摸感觉, 维持上皮细胞稳态等生物学过程。PIEZO1 参与介导了包括 Ca^{2+} 在内的多种金属离子的流动, 在细胞增

殖、分化和迁移过程中感受外界机械信号并在调节细胞运动方式中发挥不可或缺的作用^[5-6]。在细胞迁移过程中, PIEZO1 在细胞运动前端的片状伪足处积聚, 抑制 PIEZO1 通道可以促进细胞迁移^[7]。在盘基网柄菌中应用 siRNA 敲低 *Piezo1* 表达会导致其趋化性迁移的缺陷^[6]。研究发现, 内源性电场在伤口愈合过程中是重要的细胞迁移方向信号^[2], 在小鼠伤口愈合模型研究中发现, PIEZO1 参与伤口愈合、趋化性迁移和细胞运动^[5]的过程, 并且可以切换到纯电压门控模式^[8]。但是 PIEZO1 是否参与细胞的趋电性迁移尚不清楚。本研究以人角质形成细胞 HaCaT 为模型, 应用 PIEZO1 的抑制剂以及 siRNA 等方式调控 PIEZO1 活性及表达, 研究 PIEZO1 在细胞感知电信号并进行定向迁移中的作用, 并探讨 PIEZO1 下游相关分子黏着斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK) 及整合素 (integrin)

* 国家自然科学基金 (82060355, 81660519) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0871-65941366, E-mail: sanjunzhao@163.com

收稿日期: 2023-06-03, 接受日期: 2023-08-24

等蛋白质分子对细胞趋电性迁移的影响, 为研究细胞趋电性迁移的机理研究提供参考。

1 材 料

1.1 细胞

人永生化角质细胞 (HaCaT) 购自中国科学院昆明细胞库, 编号 KCB 200442YJ。

1.2 主要试剂

胎牛血清 (ExCell Bio), DMEM 高糖培养基 (上海培源), FNC coating MIX (Enzo, AES), Opti-MEM (Gibco), Lipofectamine™ 2000 (Thermo), 钌红 (ruthenium red, RuR)、GsMTx4、PF562271 均购自 MCE, BCA 蛋白质浓度测定试剂盒 (GlpBio), FAK、磷酸化 FAK、Akt、磷酸化 Akt、Integrin β 1 均为兔抗购自 CST 公司, PIEZO1 兔抗 (Affinity), GAPDH 兔抗 (上海翌圣), β -tubulin 兔抗 (Boster), HRP 偶联的山羊抗兔 IgG (华安生物), siRNA 由安徽通用生物技术公司合成, integrin β 1 的抗体抑制剂 P5D2 购自 Abcam 公司。

1.3 主要器材

CO₂ 细胞培养箱, 活细胞工作站 (Zeiss), 细胞培养皿 (LabServ), 蛋白质分离凝胶 (上海翌圣), 电泳仪 (Bio-Rad), 直流电源 (百晶)。

2 方 法

2.1 细胞培养

HaCaT 细胞复苏后培养于 DMEM 完全培养基 (89% DMEM 高糖培养基, 10% FBS, 1% 100 $\times$ 青霉素-链霉素), 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养, 每 2~3 d 胰酶消化传代 1 次, 待生长至对数期用于实验。

2.2 细胞趋电性迁移

趋电小室 (Boyden Chamber) 的制作参考 Zhao 等^[9] 的方法, 取直径为 100 mm 的细胞培养皿, 使用高真空密封脂将盖玻片 (长 22 mm、宽 10 mm、厚 0.13 mm) 固定于培养皿底部中央, 制作长为 22 mm、宽为 10 mm 的长方形趋电小室。

取对数期 HaCaT 细胞进行消化、离心、重悬、稀释至 (1~5) $\times 10^7$ /L 细胞密度并接种于 FNC 包被的趋电小室, 待细胞贴壁 2 h。根据实验需要采用钌红、GsMTx4、P5D2、PF562271 等孵育 1 h 后, 在小室两端施加稳定直流电场, 强度为 100 V/m, 置于活细胞工作站中拍摄细胞运动轨迹, 间隔 5 min 拍摄一次, 持续 2 h。每个处理选取 3~5 个视

野, 随机选取细胞合计 300 个左右, 应用 ImageJ 软件, 分析细胞的迁移路径, 以细胞迁移的方向性 (directedness ($\cos\theta$))、轨迹速度 (track speed)、位移速度 (displacement speed)、方向持续性 (euclidian persistence) 四个指标为参数, 计算细胞趋电性迁移的能力。

2.3 蛋白样品收集

取对数期 HaCaT 细胞调整密度, 将约 3×10^7 个细胞均匀接种于 4 cm $\times$ 3 cm 的小室, 放入 CO₂ 培养箱 37 $^{\circ}$ C 孵育至完全贴壁 (2~4 h), 设置 4 组实验处理。组 1: 无电场, 无药物处理; 组 2: 单独 100 V/m 电场处理; 组 3: 无电场, 单独药物处理; 组 4: 100 V/m 电场加药物处理。处理结束用预冷的 PBS 快速冲洗 3 遍, 置于冰上加入 200 μ l 配制好的裂解液, 裂解 5 min, 细胞刮板刮下转移至预冷离心管。涡旋振荡 2 s 后, 4 $^{\circ}$ C, 13 000 r/min, 11 min 离心后取上清, 置于冰上。

2.4 细胞转染

取对数期 HaCaT 细胞按照 (2~8) $\times 10^5$ /孔接种于 6 孔细胞培养皿, 置于 CO₂ 培养箱培养 24 h 后进行转染, 细胞融合度应为 30%~50%。DEPC 水分装 siRNA 干粉, Opti-MEM 稀释 siRNA 至 50 nmol/L, 250 μ l Opti-MEM 稀释 5 μ l Lipofectamine™ 2000。两者混匀静置 20 min 后加入 6 孔板, 补加培养基, 6 h 后更换新鲜培养基培养。转染 18~48 h 后收集蛋白质样品进行蛋白质印迹 (Western blot) 验证是否转染成功。

2.5 Western blot

蛋白质样品用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒进行蛋白质定量, 根据定量结果将蛋白质样品调整至相同浓度, 取 4%~20% 蛋白质分离凝胶, 组装电泳架。每孔 20 μ l 蛋白质样品, 恒压 80 V 电泳 20 min, 后续转恒压 100 V 继续电泳。甲醇激活 PVDF 膜, 组装“三明治”结构进行转膜, 条件: 电流 250 mA, 时间 120 min。取 PVDF 膜浸入预冷的 TBST (TBS with Tween-20) 缓冲液震荡 1 min 后, 脱脂奶粉封闭 60 min。根据蛋白质大小将目的蛋白条带切出, TBST 漂洗去封闭液, 置于一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育。取条带 TBST 漂洗 10 min, 洗 3 次, 二抗室温孵育 1 h, 取条带 TBST 漂洗 10 min, 再洗 3 次。将条带浸泡于新配制的发光液 1 min 后取出, 用化学成像系统 (Tanon 5500 Multi) 进行拍摄。

2.6 数据分析与处理

每个实验独立重复 3 次, 每次实验根据细胞数

量统计 3~5 个视野, 共 300 个细胞, 应用 Excel 2016 统计所有细胞实验原始坐标数据, 进行统计学分析, 数据结果表示为平均值±标准误 (Mean±SEM), 应用独立性 *t* 检验进行显著性分析, 较显著差异 **P*<0.05, 显著差异 ***P*<0.01, 极显著差异 ****P*<0.001, 应用 GraphPad Prism 8 绘图。

3 结 果

3.1 钌红显著抑制HaCaT细胞趋电性迁移

钌红是广谱阳离子通道抑制剂, 抑制包括 PIEZO1 在内的多种阳离子通道。从细胞迁移的轨

迹图可以看出, 未施加电场时 HaCaT 细胞呈现随机迁移, 在 100 V/m 的直流电场作用下 HaCaT 细胞向电场正极快速定向迁移, 钌红显著抑制了电场对于细胞迁移的促进和定向作用 (图 1a)。对细胞迁移各参数分析结果显示, 未施加电场时, HaCaT 细胞呈向各方向随机迁移, 迁移速度较慢, 电场作用下, HaCaT 细胞趋电性迁移的方向性、轨迹速度、位移速度和方向持续性显著升高 (图 1b~e)。钌红显著抑制了 HaCaT 细胞的趋电性迁移, 其迁移主要参数均显著降低: 迁移方向性由 (0.907±0.007) 显著降低至 (0.422±0.018) (*P*<0.001); 轨

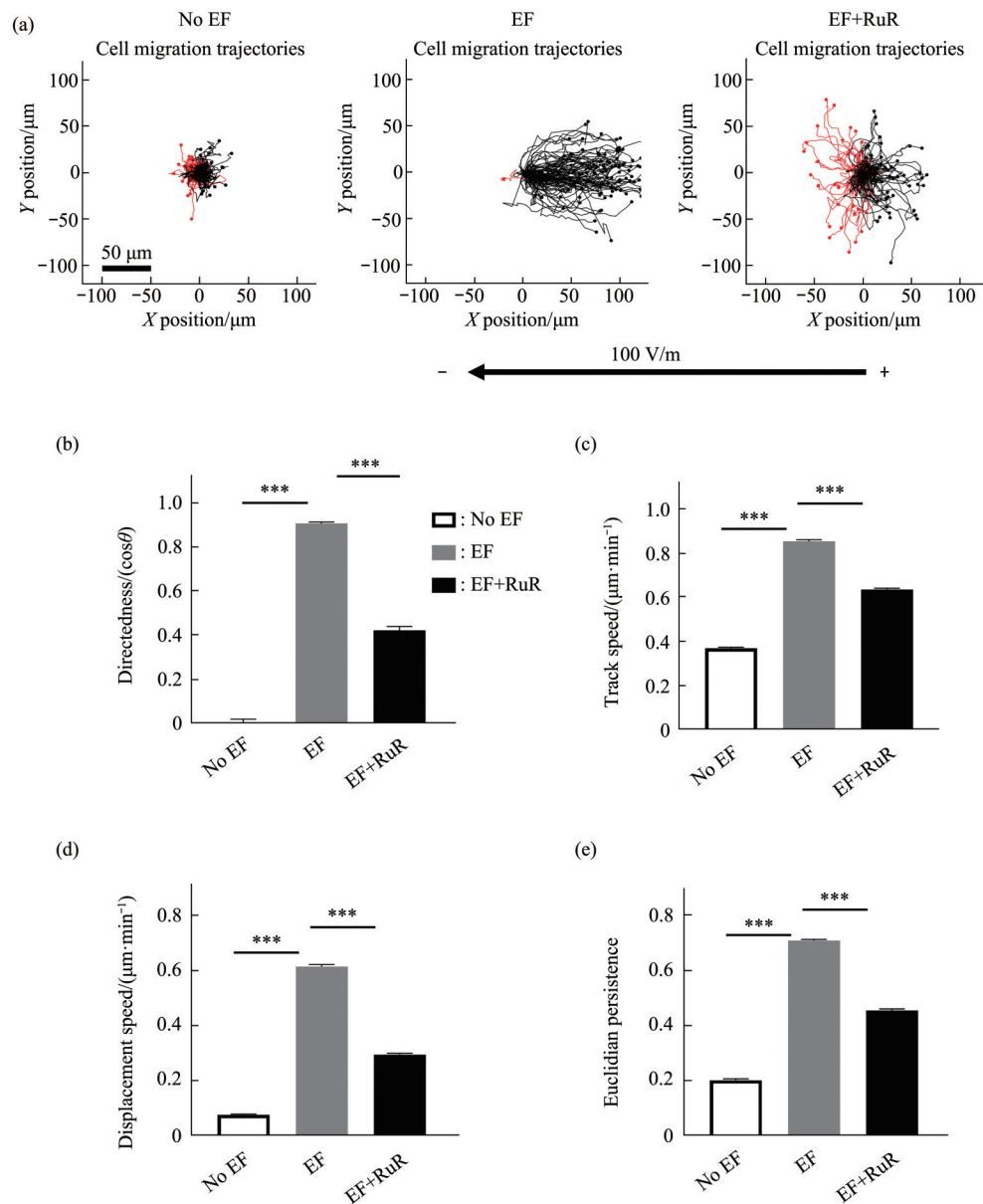


Fig. 1 Electrotaxis of HaCaT cells treated by ruthenium red

(a) Electrotaxis trajectories of HaCaT cells treated by ruthenium red; (b-e) the directedness, track speed, displacement speed, euclidian persistence of electrotaxis of HaCaT cells treated by ruthenium red (*n*=300, ****P*<0.001).

迹速度由 $(0.855 \pm 0.007) \mu\text{m}/\text{min}$ 显著降低至 $(0.636 \pm 0.007) \mu\text{m}/\text{min}$ ($P < 0.001$); 位移速度由 $(0.615 \pm 0.007) \mu\text{m}/\text{min}$ 显著降低至 $(0.296 \pm 0.005) \mu\text{m}/\text{min}$ ($P < 0.001$); 方向持续性也由 (0.708 ± 0.005) 降低至 (0.455 ± 0.006) ($P < 0.001$)。上述结果表明, 钅红显著抑制 HaCaT 细胞的趋电性迁移, 暗示包括 PIEZO1 在内的阳离子通道可能在细胞的趋电性迁移过程发挥重要作用。

3.2 GsMTx4显著降低HaCaT细胞趋电性迁移的轨迹速度和方向持续性

GsMTx4是一种蜘蛛毒液肽, 是特异性靶向阳

离子机械敏感离子通道 (mechanosensitive ion channels, MSC) 的抑制剂, 可以阻碍机械力刺激细胞引起的胞内电流^[10]。选用GsMTx4处理细胞, 调控PIEZO1通道功能, 追踪细胞趋电性迁移轨迹(图2a)。结果显示: 在未施加电场时, HaCaT细胞呈现出向各方向的随机迁移, 迁移速度较慢, 电场作用下, HaCaT细胞呈现向电场正极的定向迁移, 迁移速度显著增加; 用GsMTx4处理细胞抑制PIEZO1功能, HaCaT细胞向电场正极进行定向迁移的路径呈现更加分散(图2b)。统计分析显示, 与未用GsMTx4的对照相比, HaCaT细胞在电场作

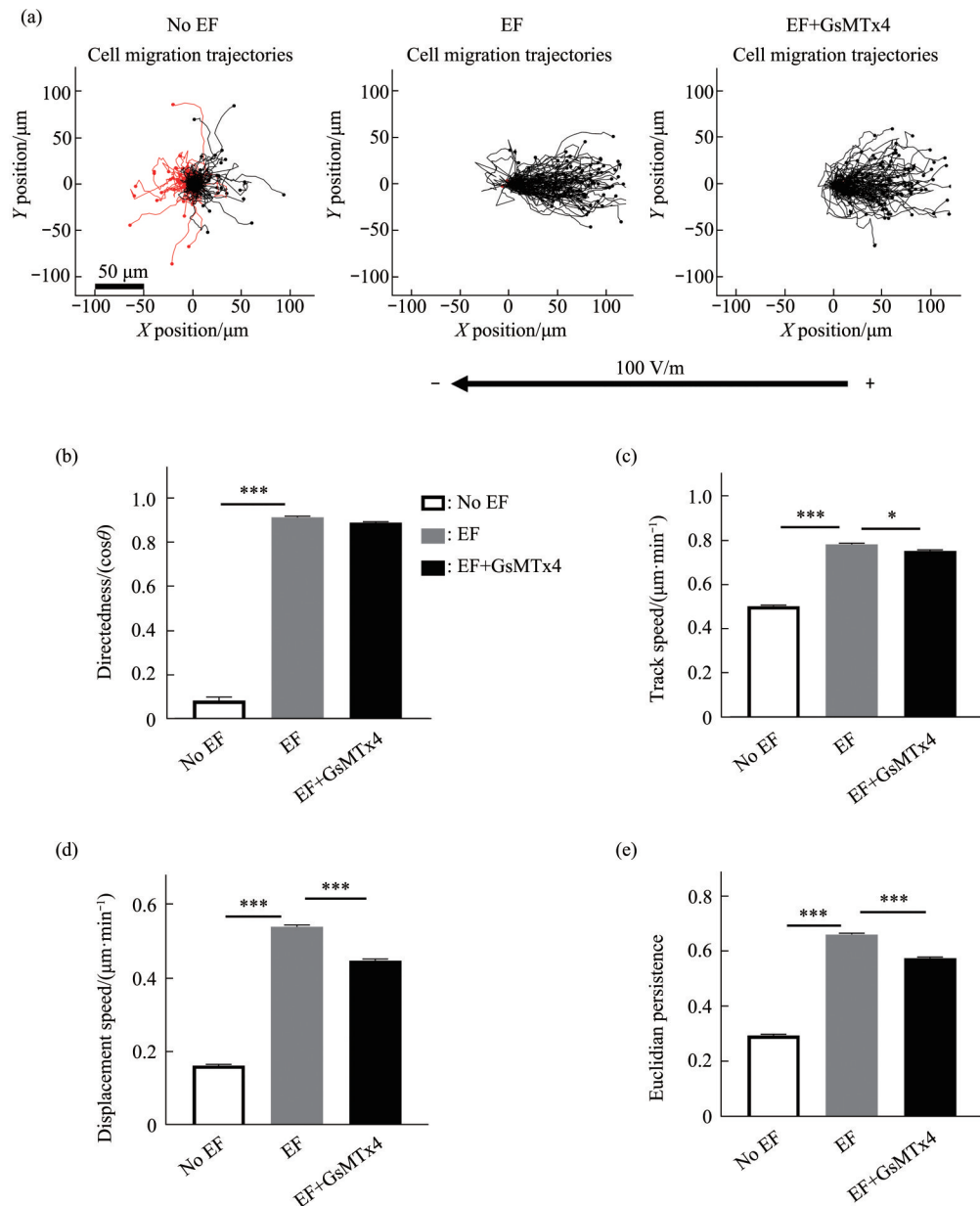


Fig. 2 Electrotaxis of HaCaT cells treated by GsMTx4

(a) Electrotaxis trajectories of HaCaT cells treated by GsMTx4; (b-e) the directedness, track speed, displacement speed, euclidian persistence of HaCaT cells treated by GsMTx4 ($n=300$, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$).

用下轨迹速度由 (0.782 ± 0.008) $\mu\text{m}/\text{min}$ 降低为 (0.741 ± 0.007) $\mu\text{m}/\text{min}$ ($n=300$, $P<0.05$), 位移速度由 (0.529 ± 0.007) $\mu\text{m}/\text{min}$ 降低至 (0.458 ± 0.006) ($P<0.001$), 细胞在沿电场方向迁移的持续性也由 (0.652 ± 0.006) 显著降低至 (0.594 ± 0.006) ($P<0.001$) (图2c~e)。

采用 Western blot 检测蛋白质的表达量以及磷酸化水平 (图3), 结果显示: 100 V/m 直流电场作用下, HaCaT 细胞的 Integrin $\beta 1$ 表达上调, Akt 和

FAK 的磷酸化水平也显著上调; GsMTx4 单独作用也同样使 HaCaT 细胞的 Akt 和 FAK 的磷酸化水平显著升高; 但 GsMTx4 和电场同时作用下, 未出现对 Akt 与 FAK 磷酸化水平以及 integrin $\beta 1$ 表达的叠加促进作用。以上结果表明, GsMTx4 作用于 HaCaT 细胞后, 在一定程度上抑制了其趋电性迁移, PIEZO1 可能在电场指导的细胞趋电性迁移过程中发挥作用。

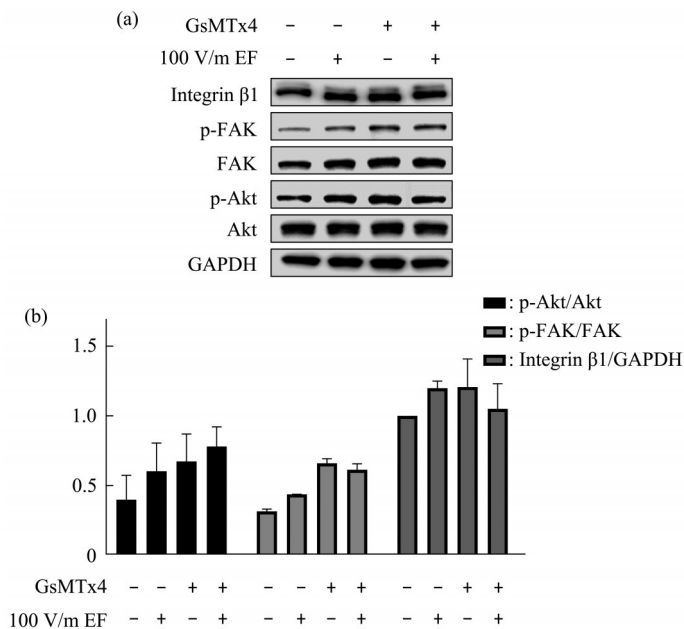


Fig. 3 Electric field and GsMTx4 treatment promote the phosphorylation of Akt, FAK and integrin $\beta 1$
(a) The expression and phosphorylation of Akt, FAK and integrin $\beta 1$ under EF treatment; (b) quantification of the expression and phosphorylation of Akt, FAK and integrin $\beta 1$ under EF treatment.

3.3 siRNA干扰PIEZO1表达显著降低HaCaT细胞趋电性方向性和方向持续性

研究进一步采取 siRNA 干扰 *Piezo1* mRNA 从而降低蛋白质的表达来验证 PIEZO1 对于细胞趋电性迁移中的作用。采用三对不同序列 siRNA 和与靶基因无同源性的序列作为阴性对照分别进行瞬时转染实验, PIEZO1 蛋白表达量如图 4 所示, 编码 4669 的序列显著降低了 PIEZO1 蛋白的表达量。细胞转染后接种于迁移小室 (图 4), siRNA 干扰后的细胞与阴性对照相比, 贴壁细胞状态, 呈现为均匀的片状伪足伸展。

细胞的趋电性迁移轨迹图 (图 5a), 在电场作

用下, 阴性对照组 HaCaT 细胞趋向正极进行定向迁移; siRNA 干扰 PIEZO1 后, HaCaT 细胞明显降低了向正极迁移的方向性, 且呈现出迁移的轨迹更加分散, 说明细胞迁移的方向性受到影响, 迁移的能力有所下降。统计结果显示: siRNA 干扰后, 细胞趋电方向性由 (0.805 ± 0.008) 显著降低至 (0.514 ± 0.014) ($P<0.001$), 方向持续性由 (0.606 ± 0.005) 降低到 (0.579 ± 0.005) , 存在较显著差异 ($P<0.05$); 而 siRNA 干扰细胞后, 细胞在电场中的迁移速度、位移速度都略微降低, 但与对照组相比都无统计学上显著差异存在 (图 5b~e)。

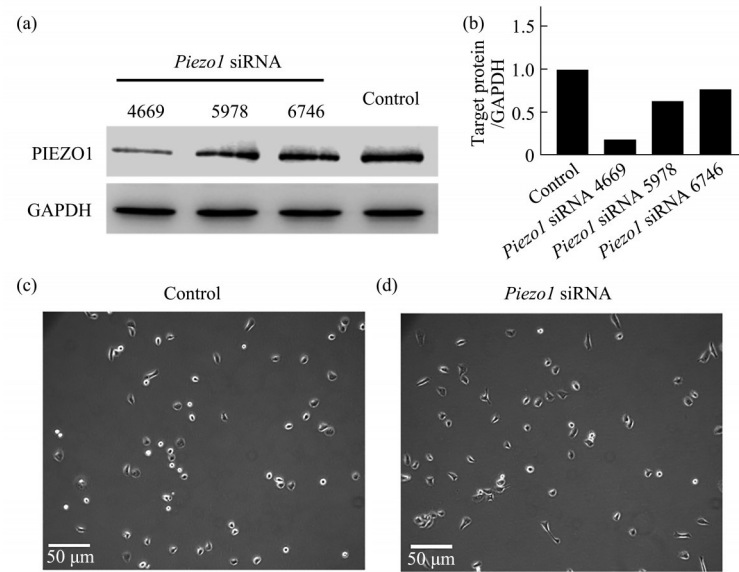


Fig. 4 Expression of PIEZO1 protein and morphological changes of cells after siRNA interference

(a) Western blot result of three pairs of siRNA primers on the expression of PIEZO1 protein; (b) quantification of the expression of PIEZO1 after RNAi; (c-d) Effect of control group and siRNA interference on the morphology of HaCaT cells.

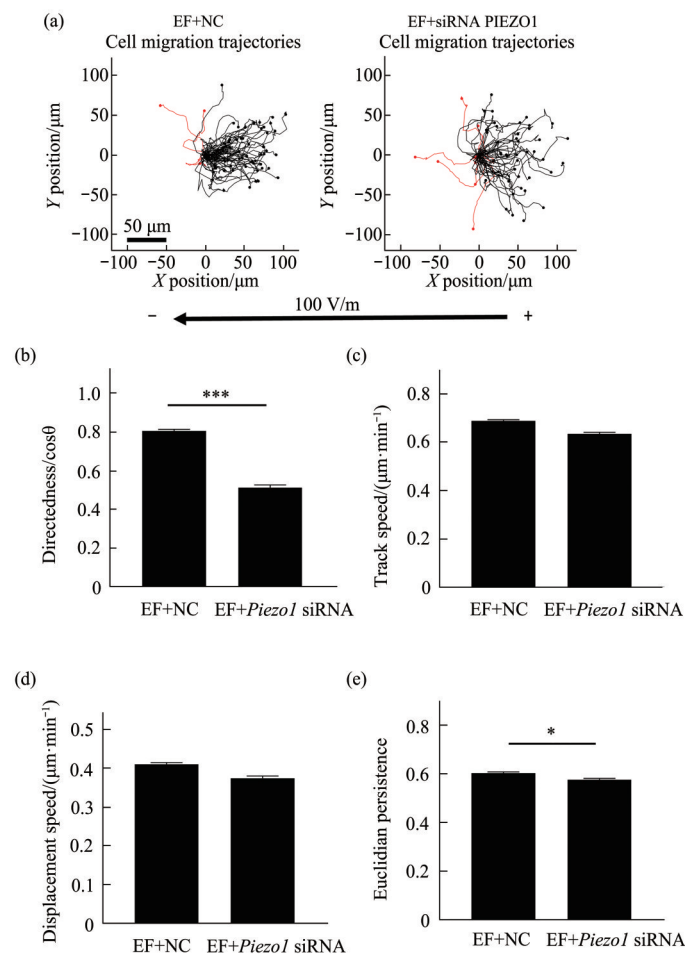


Fig. 5 Electrotaxis of HaCaT cells after siRNA interference with PIEZO1

(a) Electrotaxis trajectory of HaCaT cells after *Piezo1* siRNA knockdown; (b-e) The directedness, track speed, displacement speed, euclidian persistence of electrotaxis migration in HaCaT cells after *Piezo1* siRNA knockdown ($n=300$, * $P<0.05$, *** $P<0.001$).

Western blot结果显示, siRNA 干扰PIEZO1 表达后FAK 总蛋白未发生显著性改变, 但FAK 的磷酸化水平显著降低, 且在PIEZO1 表达被干扰后, 电场对FAK 的磷酸化的促进作用显著被抑制, 同时siRNA 干扰PIEZO1 表达后Akt 总蛋白无显著变化, 但使其磷酸化水平有小幅下降, PIEZO1 低表达也取消了电场对于Akt磷酸化的促进作用。与此同时电场作用下, 总integrin β 1 蛋白表达量明显升高, 而且siRNA 干扰PIEZO1 后, 在电场作用下其表达量未明显升高 (图6)。

PIEZO1 下调后细胞趋电性迁移的方向性受到显著影响, 暗示PIEZO1 可能参与细胞定向迁移过程中对方向信号的调控。同时, Akt 及FAK 的磷酸化水平受到显著抑制, siRNA 干扰PIEZO1 表达显著影响电场对Akt 及FAK 的活化, 以上结果暗示电场可能通过PIEZO1 调节Akt 及FAK 磷酸化水平调控细胞去电性迁移的方向性。而 siRNA 干扰PIEZO1 的作用对于电场对 Integrin β 1 表达的上调作用也有所抑制。

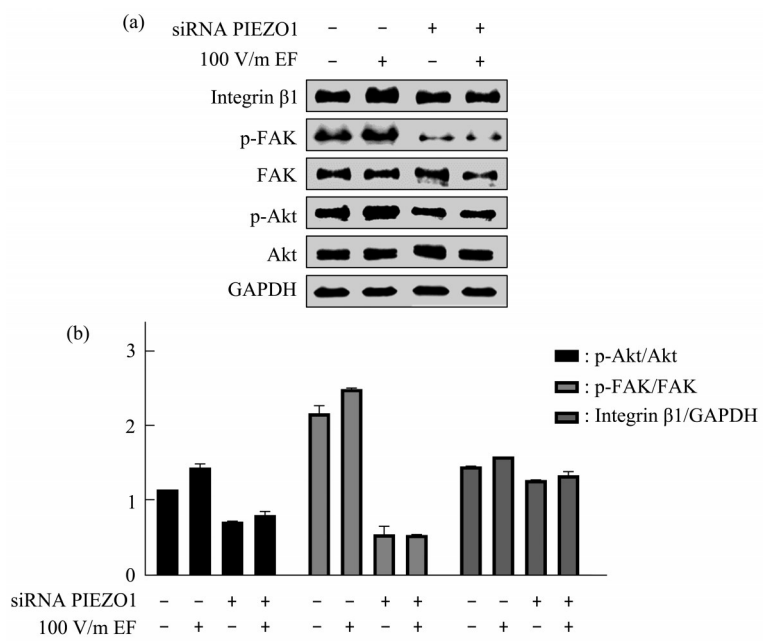


Fig. 6 The expression and phosphorylation of FAK, Akt and integrin β 1 under electric field after siRNA interfering PIEZO1 expression
(a) Western blot result of expression and phosphorylation of Akt ,FAK and integrin β 1 under EF treatment; (b) quantification of expression and phosphorylation of Akt ,FAK and integrin β 1 under EF treatment.

3.4 抑制integrin β 1或FAK影响HaCaT细胞趋电性迁移

在细胞的定向迁移过程中, 整合素在运动方向上呈高度极化状态, 细胞迁移过程中负责黏附的整合素经由内吞作用以及胞内转运进行循环周转受到FAK 和相关底物的控制^[11]。整合素和PIEZO1 在细胞外基质相互作用, 细胞感受机械刺激调节刚度增加需要整合素等相关通路信号的参与^[12]。P5D2 是一种特异性靶向 integrin β 1 的抗体抑制剂, 可用来阻断其功能^[13]。FAK 抑制剂 PF562271 (Synonyms) 是一种可逆的 ATP 竞争性的 FAK 和 Pyk2 抑制剂, 可以抑制 FAK Y397 的磷酸化

水平^[14]。轨迹图显示 (图 7a), 在 integrin β 1 抑制剂 P5D2 作用下, HaCaT 细胞在电场下的运动轨迹及范围显著缩小, 细胞呈现出运动能力的下降, 且沿电场方向上进行迁移的方向性降低, HaCaT 细胞趋电性迁移的四个参数均显著下降 (图 7b~e)。在 FAK 抑制剂 PF562271 的作用下, 细胞向正极方向的迁移轨迹范围有显著缩小, 说明其迁移能力有所下降, 但定向移动的方向性仍较好。统计结果显示: P5D2 作用后 HaCaT 细胞在电场中迁移的方向性显著下降, 与对照组相比, 细胞趋电性迁移的方向性由 (0.890 ± 0.004) 下降至

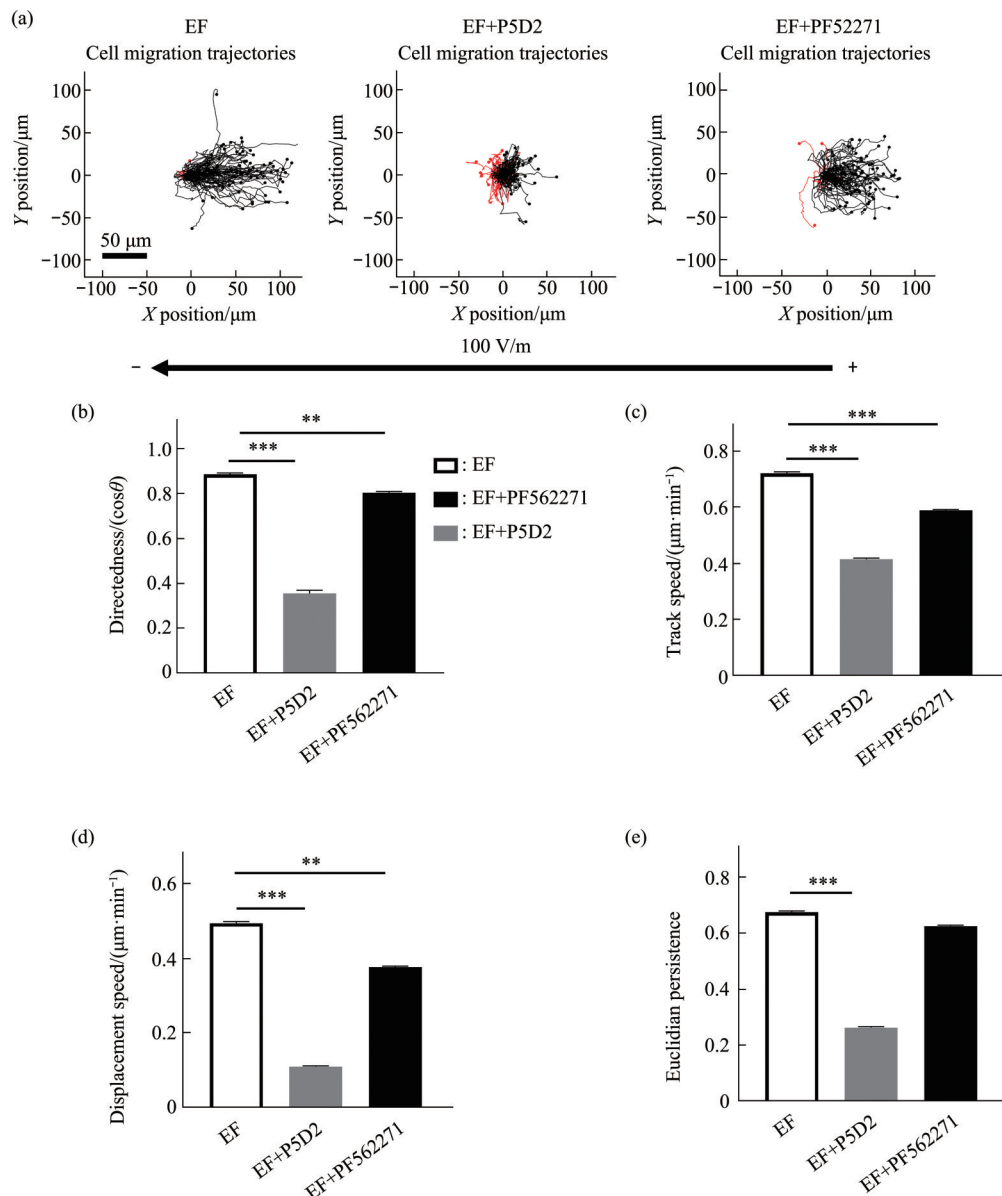


Fig. 7 The electrotaxis of HaCaT cells under the treatment of integrin $\beta 1$ antibody inhibitor P5D2 and FAK inhibitor PF562271

(a) The electrotaxis trajectory of HaCaT cells under the treatment of integrin $\beta 1$ antibody inhibitor P5D2 and FAK inhibitor PF562271; (b–e) the directedness, track speed, displacement speed, euclidian persistence of electrotaxis of HaCaT cells under the treatment of integrin $\beta 1$ antibody inhibitor P5D2 and FAK inhibitor PF562271 ($n=300$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$).

(0.357 ± 0.014) ($P<0.001$) 下降超过 59%。细胞轨迹速度从 (0.722 ± 0.005) $\mu\text{m}/\text{min}$, 显著下降到 (0.416 ± 0.004) $\mu\text{m}/\text{min}$ ($P<0.001$); 位移速度也呈现相同的差异降低, 从 (0.494 ± 0.004) $\mu\text{m}/\text{min}$ 下降为 (0.111 ± 0.002) $\mu\text{m}/\text{min}$ ($P<0.001$)。方向持续性从 (0.641 ± 0.003) 下降为 (0.264 ± 0.004), 对照组 EF 与 P5D2 处理存在极显著差异 ($P<0.001$)。

使用抑制剂抑制 FAK 后, 与对照组相比, 方向性降至 (0.805 ± 0.005) ($P<0.01$), 降幅为 9.5%, 趋

电性迁移轨迹速度降低至 (0.589 ± 0.004) $\mu\text{m}/\text{min}$, 降幅超过 18%, 有显著差异 ($P<0.001$), 位移速度显著降低至 (0.376 ± 0.003) $\mu\text{m}/\text{min}$ ($P<0.01$), 细胞趋电性迁移的方向持续性与对照组并无显著性差异。

由上述实验结果可得, P5D2 抑制 integrin $\beta 1$ 后显著抑制了 HaCaT 细胞的趋电性迁移, 其方向性和速度的抑制都较为明显。抑制 FAK 影响 HaCaT 细胞的趋电性迁移, 但影响幅度较小。

Western blot结果显示, P5D2抑制 integrin β 1后, FAK的磷酸化水平有所上调, 电场作用下其磷酸化水平一步上升(图8), 猜测电场作用下FAK的活化可能并不被 integrin β 1 功能抑制所阻碍, 仅被电信号引起的生理变化所激活。在 P5D2

的作用下, 磷酸化Akt的水平显著下降, 而且电场在 P5D2作用下并未改变磷酸化Akt的水平(图8), 说明在电信号作用下可以通过 integrin β 1 调控Akt的活化水平并参与细胞的趋电性迁移。

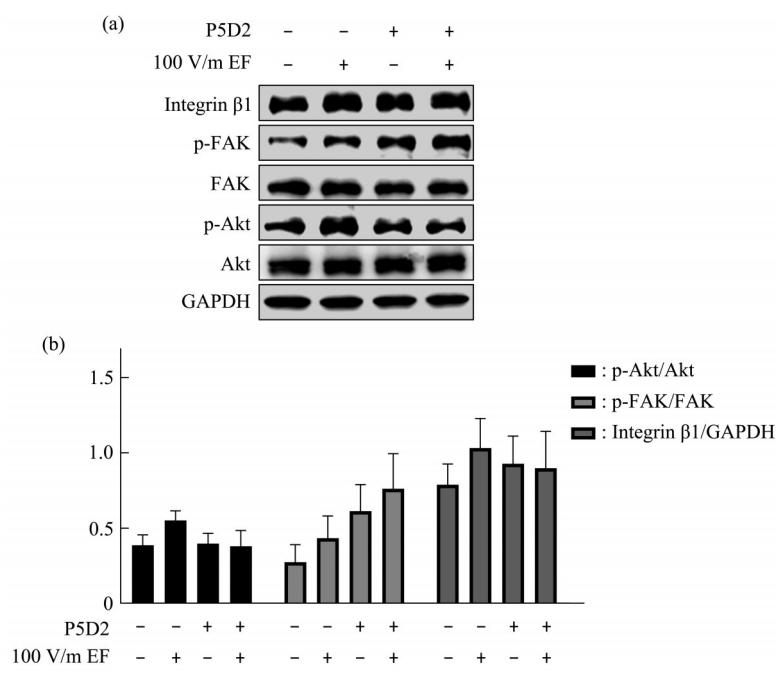


Fig. 8 Electrotaxis of HaCaT cells under treatment of integrin β 1 inhibitor P5D2

(a) Western blot result of expression and phosphorylation of Akt ,FAK and integrin β 1 treated with P5D2 in EF; (b) quantification of expression and phosphorylation of Akt , FAK and integrin β 1 treated with P5D2 in EF.

4 讨 论

在皮肤损伤实验模型发现, 在损伤产生的其他因子(如接触抑制释放、趋化因子释放等)同时存在的情况下, 伤口处产生的内源性电场, 是主导细胞向伤口中心定向迁移, 从而促进伤口愈合的重要信号^[2]。但细胞迁移过程中响应电信号的关键分子及信号通路尚不清晰。研究发现, PIEZO1可以影响细胞的趋化性迁移^[6], 参与细胞运动^[5, 15-17], 在伤口愈合过程中发挥重要作用^[4], 并且Piezo1可被电压门控调节^[8]。本研究以 HaCaT 细胞为模型研究 PIEZO1 在感知电信号与促进细胞定向迁移中的作用, 研究结果显示, 抑制或降低PIEZO1表达, HaCaT 细胞在电场中的定向迁移方向性参数以及速度参数受到不同程度的抑制。尤其是通过 RNAi 技术敲低 PIEZO1 后, 细胞趋电性迁移显著下降, 这与在盘基网柄菌中低表达Piezo1趋化性受到抑制的实验结果一致, 在方向信号 cAMP 的作用

下, Piezo1 参与调控细胞定向迁移的方向性, 而对迁移的速度影响甚微, 细胞在电场信号作用下有同样的结果。以上提示PIEZO1对细胞迁移方向性的重要性^[6]。因此, PIEZO1可能参与细胞感知外界电场信号影响细胞的趋电性迁移从而促进伤口愈合的过程。

本研究中所采用了两种抑制剂分别抑制PIEZO1的活性, 结果显示, 广谱抑制剂钆红作用下细胞趋电性迁移的速度、方向性及方向持续性等参数均呈现极显著下降, 而抑制剂GsMTx4作用下细胞趋电性迁移的速度及方向持续性有显著下降, 造成以上结果的原因可能是由于广谱抑制剂钆红作用主要阻断部分Ca²⁺、Na⁺通道^[18], 可以抑制包括PIEZO1介导Ca²⁺电流。而抑制剂GsMTx4是选择性地抑制PIEZO和TRP通道家族阳离子的机械敏感性通道, 还可阻断阳离子选择性的拉伸激活通道(SAC)^[19]。已有研究证明, Ca²⁺在细胞迁移过程中具有重要作用^[20], 广谱抑制剂钆红对细胞趋电性

迁移的显著抑制作用可能是通过阻断PIEZO1介导的Ca²⁺流发挥作用。

本研究结果显示, 电场显著促进HaCaT细胞integrin β 1的表达和FAK磷酸化水平的上升, 这与电场诱导升高integrin β 1的mRNA或蛋白质水平激活FAK的磷酸化进而促进人视网膜色素上皮细胞迁移^[21]和在晶状体上皮细胞的上皮-间充质转换^[22]的研究报道相符合。电场作用还可以活化上调PI3K/Akt途径启动细胞反应, 如迁移、增殖和分化^[23]。本研究应用GsMTx4抑制剂及RNAi方式敲低PIEZO1的表达均抑制电场对HaCaT细胞integrin β 1表达的促进, 这表明电场作用促进integrin β 1表达上调的过程是通过PIEZO1介导, 同时敲低PIEZO1也抑制了FAK磷酸化, 且FAK不能被电场进一步激活, 这显示电场对FAK的活化作用受到PIEZO1水平的调节。但PIEZO1响应电场的具体机制以及是否直接调节integrin β 1和FAK影响细胞趋电性迁移仍待进一步实验研究。

应用抗体抑制剂P5D2阻断integrin β 1的功能与抑制剂PF562271来抑制FAK的功能, PIEZO1下游的integrin β 1和FAK在不同程度上影响HaCaT细胞的趋电性迁移。暗示细胞对趋电性迁移方向的调控可能是通过PIEZO1影响FAK的磷酸化和integrin β 1表达来传递电场信号。

5 结 论

PIEZO1参与HaCaT细胞的趋电性迁移, 是影响HaCaT细胞趋电性迁移的重要分子之一; 抑制integrin β 1和FAK会影响HaCaT细胞的趋电性迁移过程, integrin β 1与FAK可能与PIEZO1介导细胞感应电场的信号通路有关, 电场信号可能通过PIEZO1介导参与integrin β 1和FAK的调控过程。

参 考 文 献

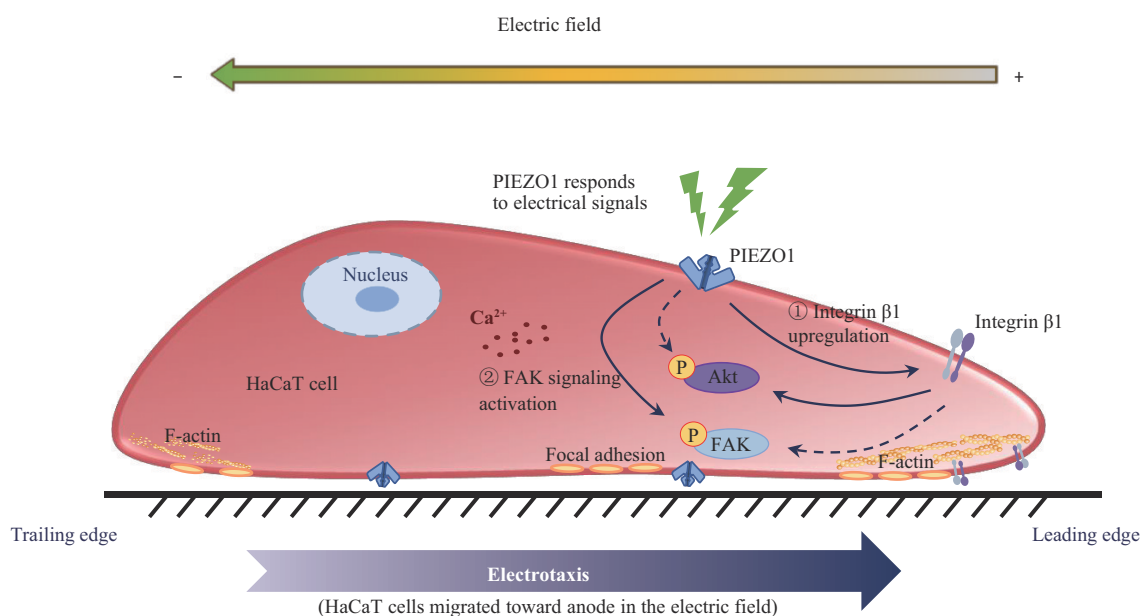
- [1] Reinke J M, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res*, 2012, **49**(1): 35-43
- [2] Zhao M. Electrical fields in wound healing—an overriding signal that directs cell migration. *Semin Cell Dev Biol*, 2009, **20**(6): 674-682
- [3] Zhao M, Song B, Pu J, *et al.* Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-gamma and PTEN. *Nature*, 2006, **442**(7101): 457-460
- [4] Holt J R, Zeng W Z, Evans E L, *et al.* Spatiotemporal dynamics of PIEZO1 localization controls keratinocyte migration during wound healing. *Elife*, 2021, **10**: e65415
- [5] Hung W C, Yang J R, Yankaskas C L, *et al.* Confinement sensing and signal optimization via Piezo1/PKA and myosin II pathways. *Cell Rep*, 2016, **15**(7): 1430-1441
- [6] Srivastava N, Traynor D, Piel M, *et al.* Pressure sensing through Piezo channels controls whether cells migrate with blebs or pseudopods. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, **117**(5): 2506-2512
- [7] Li J, Hou B, Tumova S, *et al.* Piezo1 integration of vascular architecture with physiological force. *Nature*, 2014, **515**(7526): 279-282
- [8] Moroni M, Servin-Vences MR, Fleischer R, *et al.* Voltage gating of mechanosensitive PIEZO channels. *Nat Commun*, 2018, **9**(1): 1096
- [9] McCaig C D, Rajnicek A M, Song B, *et al.* Controlling cell behavior electrically: current views and future potential. *Physiol Rev*, 2005, **85**(3): 943-978
- [10] Bae C, Sachs F, Gottlieb P A. The mechanosensitive ion channel Piezo1 is inhibited by the peptide GsMTx4. *Biochemistry*, 2011, **50**(29): 6295-6300
- [11] Schaller M D, Otey C A, Hildebrand J D, *et al.* Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. *J Cell Biol*, 1995, **130**(5): 1181-1187
- [12] Emig R, Knodt W, Krussig M J, *et al.* Piezo1 channels contribute to the regulation of human atrial fibroblast mechanical properties and matrix stiffness sensing. *Cells*, 2021, **10**(3): 663
- [13] Blaschke F, Stawowy P, Goetze S, *et al.* Hypoxia activates beta (1)-integrin via ERK 1/2 and p38 MAP kinase in human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **296**(4): 890-896
- [14] Hu C, Chen X, Wen J, *et al.* Antitumor effect of focal adhesion kinase inhibitor PF562271 against human osteosarcoma *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Sci*, 2017, **108**(7): 1347-1356
- [15] Huang Z, Sun Z, Zhang X, *et al.* Loss of stretch-activated channels, PIEZO1, accelerates non-small cell lung cancer progression and cell migration. *Biosci Rep*, 2019, **39**(3): BSR20181679
- [16] Patkunarajah A, Stear J H, Moroni M, *et al.* TMEM87a/Elkin1, a component of a novel mechanoelectrical transduction pathway, modulates melanoma adhesion and migration. *Elife*, 2020, **9**: e53308
- [17] Zhang J, Zhou Y, Huang T, *et al.* PIEZO1 functions as a potential oncogene by promoting cell proliferation and migration in gastric carcinogenesis. *Mol Carcinog*, 2018, **57**(9): 1144-1155
- [18] Malecot C O, Bito V, Argibay J A. Ruthenium red as an effective blocker of calcium and sodium currents in guinea-pig isolated ventricular heart cells. *Br J Pharmacol*, 1998, **124**(3): 465-472
- [19] Suchyna T M. Piezo channels and GsMTx4: two milestones in our understanding of excitatory mechanosensitive channels and their role in pathology. *Prog Biophys Mol Biol*, 2017, **130**(Pt B): 244-253
- [20] Wei C, Wang X, Chen M, *et al.* Calcium flickers steer cell migration. *Nature*, 2009, **457**(7231): 901-905
- [21] Zhu B, Nicholls M, Gu Y, *et al.* Electric signals regulate the directional migration of oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) via beta1 Integrin. *Int J Mol Sci*, 2016, **17**(11): 1948
- [22] Liu J, Yan X L, Zheng X L, *et al.* Electric field exposure promotes epithelial-mesenchymal transition in human lens epithelial cells via integrin beta1 FAK signaling. *Mol Med Rep*, 2017, **16**(4): 4008-4014
- [23] Meng X, Arocena M, Penninger J, *et al.* PI3K mediated electrotaxis of embryonic and adult neural progenitor cells in the presence of growth factors. *Exp Neurol*, 2011, **227**(1): 210-217

PIEZO1 Channel is Involved in Electric Field Guided Cell Migration*

ZHANG Gui-Cheng, GONG Peng, WANG Yi-Fan, ZHAO San-Jun**

(School of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming 650500, China)

Graphical abstract



Abstract Objective Disruption of epithelial layer may instantaneously induce the generation of endogenous electric fields, which was proved to play an important role in guiding the cell migration and promoting wound healing. PIEZO1 is a kind of mechanic sensitive channel, may be regulated by voltage, is proved to involve in chemotactic migration of cells and play an important role in the process of wound healing. In this paper, the role of PIEZO1 and its downstream proteins FAK and integrin $\beta 1$ in the electric field guided cell migration were investigated by HaCaT cells (human immortalized keratinocyte). **Methods** Cell migration was tracked by Living Cell Imaging System in directed current (DC) electric field (EF). Inhibitors and RNAi techniques were applied to study the function of PIEZO1 and other related proteins in electric fields. Western blot was used to detect the expression and phosphorylation levels of integrin $\beta 1$ and FAK in electric field guided migration under EF stimulation. **Results** *Piezo1* RNAi as well as Ruthenium red and GsMTx4 treatment all significantly inhibited the electrotaxis of HaCaT cells. Electric field stimulation with GsMTx4 treatment alone increased FAK

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (82060355, 81660519).

** Corresponding author.

Tel: 86-871-65941366, E-mail: sanjunzhao@163.com

Received: June 3, 2023 Accepted: August 24, 2023

phosphorylation level and the expression of integrin $\beta 1$. Electric field promoted the expression level of integrin $\beta 1$ and the phosphorylation level of FAK. Inhibiting the expression of PIEZO1 by RNAi significantly attenuated the phosphorylation level of FAK under EF stimulation. Inhibition of integrin $\beta 1$ and FAK by inhibitor significantly decrease the electric field guided cell migration. **Conclusion** PIEZO1 as well as integrin $\beta 1$ and FAK are involved in the electric field guided cell migration of HaCaT cells. Electric field signals regulate the expression of integrin $\beta 1$ and the activation of FAK through PIEZO1-mediated signal pathway to orchestrate cell migration.

Key words electric fields, electrotaxis, cell migration, HaCaT, PIEZO1, integrin $\beta 1$, FAK

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0218