

撤稿声明

《生物化学与生物物理进展》在此郑重宣布，撤销下列已发表研究论文：

石小川，沈超，聂巍，刘峰，孟小亮．非肌肉 II 型肌球蛋白在细胞骨架网络中动力学行为的图像分析．生物化学与生物物理进展，2016, 43(3)：244-255

现就有关问题严正声明如下．

(1) 该论文刊登于我刊 2016 年第 3 期，并于 2016-03-21 日在我刊网站全文发布．在刊登此撤稿声明的同时，该论文的印刷版和电子版将在我刊全部撤销．

(2) 撤稿原因是：该论文是对下列已在学术刊物公开发表论文中研究结果及其主要表述内容的重复发表：Nie W, Wei MT, Ou-yang HD, Jedlicka SS, Vavylonis D. Formation of contractile networks and fibers in the medial cell cortex through myosin-II turnover, contraction, and stress-stabilization. Cytoskeleton (Hoboken), 2015, 72(1): 29-46.

(3) 该论文作者在未获得原有作者和责任作者同意，并擅自改变作者组成和责任作者的情况下，重复发表研究成果，违反科学道德规范，也违背了我刊的诚信承诺．我们对这种学术不端行为表示严正谴责，并按照刊物规定，在今后 2 年内拒收论文作者的任何来稿．

《生物化学与生物物理进展》编委会

2016-06-15

Retraction

The Editorial Board of *Progress in Biochemistry and Biophysics* solemnly declare that the following article has been retracted from the journal *Progress in Biochemistry and Biophysics*

Shi X C, Shen C, Nie W, Liu F, Meng X L. Image analysis on the dynamical behavior of non-muscle myosin II in the cytoskeletal networks. Prog Biochem Biophys, 2016, 43(3): 244-255

The above article was published in Chinese with English abstract in Issue 3 of *Progress in Biochemistry and Biophysics* in 2016, and available online on the journal's website (<http://www.pibb.ac.cn>) on March 21, 2016. It was found recently that the results included in this article had been published in English in a previous paper (Nie W, Wei MT, Ou-yang HD, Jedlicka SS, Vavylonis D. Formation of contractile networks and fibers in the medial cell cortex through myosin-II turnover, contraction, and stress-stabilization. Cytoskeleton (Hoboken), 2015, 72(1): 29-46). As a peer-reviewed journal dedicated to reporting the latest achievements in life sciences, *Progress in Biochemistry and Biophysics* opposes duplicate publication of research results. Prior to the acceptance of their manuscript for publication by *Progress in Biochemistry and Biophysics*, all the authors of the above retracted paper submitted signed letter guaranteeing that the paper and its components had not been published elsewhere. We solemnly condemn this serious academic misconduct and dishonest behavior, and we will reject any manuscripts from these authors in the next two years, according to the provisions of the journal.

非肌肉 II 型肌球蛋白在细胞骨架网络中 动力学行为的图像分析*

石小川¹⁾ 沈超²⁾ 聂巍³⁾ 刘峰¹⁾ 孟小亮^{1)**}

(¹⁾ 武汉大学国际软件学院, 武汉 430079; (²⁾ 武汉大学生命科学学院, 武汉 430072; (³⁾ 美国宾夕法尼亚大学医学院, 费城 19104)

摘要 贴壁细胞的形状和弹性(硬度)与细胞骨架网络的形态以及纤维的交联方式密切相关, 而细胞骨架网络的形态和组成与细胞中的 II 型肌球蛋白的活动, 尤其是肌球蛋白组装成的肌球蛋白粗丝(minifilament)的活动有关. 细胞通过与其外部环境的机械传感(mechanosensing)来调节 II 型肌球蛋白的活动和肌球蛋白粗丝的相互作用, 从而实现对细胞骨架网络重组(remodeling)的控制. 当前对活体细胞内 II 型肌球蛋白的研究从实验测量到理论模型的建立之间还有不小距离, 主要是因为直接测量会对细胞结构和生理活动产生影响, 而间接测量不能得到肌球蛋白在细胞内活动的准确数据. 因此本文提出利用新的免疫荧光显微图像分析技术, 例如免疫荧光蛋白图像追踪和局部图像相关函数分析技术, 分析 HeLa 细胞体内肌球蛋白在细胞骨架网络中的动态分布, 总结出肌球蛋白主导的细胞骨架和张纤维组装与分解过程中的基本动力学规律. 图像分析结果说明: 肌球蛋白纤维在细胞骨架网络构建过程中依次动态处于组装与分解状态, 通过其粗丝相对旋转对齐与收缩产生张力以维持纤维束稳定, 并形成有不同肌球蛋白和粘着斑数量与分布形态的三类稳定性肌动球蛋白网络, 其稳定性和收缩力大小呈正相关、与所结合肌球蛋白数量密度成正比.

关键词 肌球蛋白, 肌球蛋白粗丝, 肌动球蛋白, 细胞骨架网络, 张力纤维, 图像相关函数, 绿色免疫荧光表达

学科分类号 Q6-33, Q61

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0274

贴壁细胞依赖于它们所贴附的支持物表面的生化成分和物理性质及结构来决定它们的物理特征(形态、硬度、移动等)和生理活动(生长、型变、分裂等), 而细胞的这些物理特征和生理活动具体是由粘着斑和化学通道从细胞外部传递到细胞骨架网络而影响的^[1-2]. 其中肌动蛋白纤维和肌球蛋白分子马达是连接细胞膜下骨架网络和粘着斑并调节细胞骨架网络张力的主要介质, 而这种细胞骨架网络上的张力反过来也决定了细胞的形状和弹性模量^[3-5]. 肌动球蛋白纤维结成的纤维束通常有一端或者两端通过粘着斑固定在支持物表面, 另一端通过交联蛋白和细胞核或细胞骨架网络连接, 这种结构对保持细胞的张力和贴附很重要^[6]. 其中典型的代表就是张力纤维, 张力纤维主要是由肌球蛋白组装成的粗丝, 由肌动蛋白组装成的细丝, 以及交联蛋白(如 α -actinin)结合而成. 张力纤维在细胞内不同部位可以通过不同的反应通道和物理机制组装成不同的结构和形态, 并对细胞骨架的生理和物理特性有关键

的影响^[7-10]. 近期的研究结果显示, 细胞表皮上的肌动球蛋白网络处于动态平衡中: 肌动蛋白纤维的聚合与解聚合的平衡; 肌动蛋白, 甲酸精(formin)和肌球蛋白聚合而成的焦点斑(foci)及其反转过程(turnover)的平衡, 这些动态过程被证明是对形成有规则图形的网络非常关键的^[11]. 例如在动物细胞和酵母菌细胞内都观察到肌动球蛋白聚合成的焦点斑(foci)形成块状、环状或者丝网状^[12]. 在细胞外实验中, 利用提纯后的肌动蛋白和肌球蛋白等分子组成的简单系统中也观察到类似具有细胞骨架网络性质的结构形成并具有类似的机械性质, 如弹性、塑性等. 除了以上提到的反转过程中的动态平衡, 还有其他重要的决定性因素, 例如外部机械力的刺激通

* 国家自然科学基金(41501441, 61572368)和中央高校基本科研业务费专项资金(410500028)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 027-68771236, E-mail: xmeng@whu.edu.cn

收稿日期: 2016-01-07, 接受日期: 2016-03-07

过细胞的机械敏感(mechanosensing)蛋白传递到细胞内, 激发一系列生化反应通道来帮助细胞完成对外界干扰的反应. 通过分析现有的研究结果, 我们猜想维持肌动球蛋白网络中的张力, 尤其是张力纤维上的张力(tension)对于保持肌球蛋白在网络中的密度分布非常关键. 直接的证据就是用毛细吸管在细胞表面产生局部较大的张力可导致更多的二型肌球蛋白(myosin II)和交联蛋白(α -actinin)聚集在张力最大的部位^[12-14]. 考虑到细胞内肌动球蛋白网络的复杂性是由许多相互影响的信号传递通道和化学反应通道决定的, 我们在本文并不期望能够提出一个方法来全面回答这个问题. 但是有大量的实验证据显示, 细胞的很多生理活动都与二型肌球蛋白的活动密切相关. 比如细胞分裂时形成收缩环(contractile ring)^[14-15]以及细胞的移动^[6], 实质上都是二型肌球蛋白参与的肌动球蛋白纤维或者网络的自组装和解聚的活动, 并且在这些活动中二型肌球蛋白提供了改变细胞骨架网络的形态和结构的主动动力(active force). 然而到目前为止, 并没有一个很好的方法去定量分析细胞内二型肌球蛋白怎样参与细胞机能活动(functional activity), 也缺少物理模型从整体上解释肌球蛋白粗丝怎样和肌动蛋白以及粘着斑的相互作用来决定细胞骨架网络的组装和动态活动. 目前有些模型是用来模拟在分子尺度上肌球蛋白怎样和肌动蛋白结合形成张力纤维的过程^[16-17], 有些模型是关于张力纤维和粘着斑之间的相互作用^[30], 但是据我们所知, 尚缺乏细胞尺度上的肌动球蛋白网络自组装的模型以及模拟. 因此在本文我们将通过实验结合荧光显微图像分析的方法获得关于细胞内肌球蛋白活动的重要参数, 希望利用这些参数建立肌动球蛋白网络自组装的物理模型并进行计算机模拟. 我们所用到的显微图像分析方法具有普遍的适用性, 因此可以被应用到对细胞内其他蛋白质分子的生理活动或者不同蛋白质分子间相互作用的定量分析和研究.

1 材料与方法

1.1 HeLa 细胞的培养和药物处理

表达绿色荧光(myosin regulatory light chain-green fluorescence protein, MRLC-GFP)的 HeLa 细胞是由合作方美国里海大学提供的. 细胞培养液包括以下主要成分: 500 ml dulbecco's modified eagle medium(DMEM)(购自英杰公司 Invitrogen: #11960-044); 6 ml 谷氨酸盐(Invitrogen #25030-081); 5 ml

碳酸氢钠(7.5%)(Sigma #S8761); 50 ml 胎牛血清(10%, Invitrogen #10082-147); 5 ml 青霉素(Invitrogen #15140-222). HeLa 细胞于 37℃ 5%CO₂ 的培养箱里培养, 每 3 天传代一次. 用于活体细胞显微拍摄的细胞需提前 48 h, 将适当数量的细胞接种到无菌盖玻片上培养.

用于抑制肌球蛋白活动的 blebbistatin (Sigma #B0560)用二甲亚砜(DMSO)(Sigma #C6296)配成 100 mmol/L 的溶液, -20℃ 保存. 处理细胞时, 将 blebbistatin 溶液用 DMEM 培养液稀释成 50 或 100 μ mol/L 的浓度. HeLa 细胞通常用 blebbistatin 处理 60 min, 然后固定, 对肌动蛋白或者粘着斑染色并照相, 或者直接拍摄活体细胞内的肌球蛋白图像. 在对照组中, 用正常 DMEM 培养液洗去 blebbistatin, 共 3 次, 然后用正常的 DMEM 培养 60 min 以后再对细胞染色或者拍照. 同时, 设定另一组对照来观察蓝色激光照射使 blebbistatin 失效对细胞肌动球蛋白网络的影响.

1.2 对肌动蛋白和粘着斑的免疫荧光染色

对 HeLa 细胞内的肌动蛋白纤维和粘着斑进行染色的步骤如下: a. 用 10%的福尔马林溶液固定细胞 10 min; b. 用磷酸盐缓冲盐水(PBS)冲洗 3 次, 每次 2 min; c. 用 0.1%的 Triton X-100 浸泡 15 min 以打开细胞膜; d. 用 1%的牛血清蛋白(BSA)封闭 30 min; e. 在 37℃ 下用 Rodaminephalloidin 和 Vinculin 一抗分别标记肌动蛋白和粘着斑蛋白(浓度为 1 : 100) 1 h(如需储藏过夜, 需要在 4℃ 下避光处), 然后用 PBS 洗 3 次, 每次 2 min; f. 用 Hoechst 染料细胞核染色, 0.002 g/L, 5 min; g. 用 PBS 冲洗掉多余的染色剂, 样品放在 PBS 溶液中保存(4℃, 避光).

1.3 获取显微图像及图像处理和析

利用 Olympus IX81 共聚焦显微镜获得 HeLa 细胞的定时荧光照片. 所用到的物镜是 UPLAN 100 $\times$ 的油镜(NA=1.3). 由于 HeLa 细胞是贴附在培养表面生长的, 其细胞中部的大多数肌球蛋白都集中在靠近贴附底层的平面内, 所以我们只对这一平面内的肌球蛋白做扫描拍照. 我们分别用 488 nm 光波激发观察红色的肌动蛋白荧光、绿色的肌球蛋白荧光和用 440 nm 激光激发蓝色荧光的细胞核, 并收集成像. 为了得到最好的信号、减少光致褪色以及便于比较不同细胞的样品, 所有图像都在统一的设定下获得(除非特别标注), 即: 扫描速度为 2 μ s/pixel, x - y 平面的分辨率为 62 nm/pixel, 使用

10% 最大强度的激光($HV=640$ V, offset=10).

在对获得荧光照片做定量分析之前必须对光致褪色效应作出修正. 首先要在原始图像的基础上减去背景讯号噪声, 然后对随时间变化的每一帧图像计算平均亮度 $I(t)$, 然后对 $I(t)$ 做简单的指数衰减函数的拟合: $I(t)=I_0\exp(-t/t_0)$. 最后利用拟合得到的参数 I_0 和 t_0 修正每一帧图像的亮度.

对静态细胞图像的分析包括细胞的贴附面积、细胞内肌球蛋白和肌动蛋白的数量(亮度), 以及粘着斑的数量. 主要是利用 ImageJ 图像分析软件以及里海大学物理系生物物理组开发的插件. 利用 JFilament2D 插件拟合细胞的边界并得到细胞的贴附面积^[18](图 1, 2). 为了测量粘着斑的数量和大小, 先对 Vinculin 荧光标记的图像做二值化(binary image), 然后用带通滤波选择合理大小的颗粒(粘着斑)并统计分析, (图 2 及图 S1)^[19].

1.4 利用局部图像相关函数分析过程中对背景白噪声的修正

对于定时图像分析, 基于空间时间图像相关函数发展了 ImageJ 的插件对肌动蛋白在细胞内的活动做定量分析.

$$r(\xi, \eta, \tau) = \frac{\langle \delta I(x, y, t) \delta I(x+\xi, y+\eta, t+\tau) \rangle}{\bar{I}(t)\bar{I}(t+\tau)} \quad (1)$$

$$r(\rho, \tau) = \frac{1}{2\pi\rho} \oint_{\rho} r(\xi, \eta, \tau) d\mathbf{l} \quad (2)$$

见公式(1)(2), 首先对原始图像做光致褪色效应修正, 然后选择细胞内部 100×100 个像素大小的局部作空间 - 时间图像相关图谱分析(STICS-spatial temporal image correlation spectroscopy). 具体的选择标准如下: a. 图像平均亮度的波动幅度小于 5%; b. 图像内只有肌动球蛋白聚合成的焦点(foci)而没有稳定的张力纤维束或者网络. $I(x, y, t)$ 是图像中每个像素坐标 (x, y) 上的亮度($t=10$ s, 20 s, $\dots$ 160 s). 对选中的图像局部做相关函数 $r(\xi, \eta, \tau)$ 分析. ξ, η, τ 分别是对应于 x, y, t 坐标上的相对距离, 因此公式(1)计算出被分析影像在不同时间间隔下的空间上的变化. 由于我们选择的图像中没有固定不变的纤维束, 也没有焦点斑集体的定向移动, 所以从公式(1)得到的空间 - 时间图像相关函数 $r(\xi, \eta, \tau)$ 在不同方向上数值基本相同, 所以可以用公式(2)算出 $r(\rho, \tau)$ ($\rho = \sqrt{\xi^2 + \eta^2}$). 注意到 $r(\rho, \tau)$ 在 $(0, 0)$ 有一个尖锐的峰值, 这是由于背景白噪声引起的^[19]. 为了对 $r(0, 0)$ 在附近的数据点进行修正,

相关我们用高斯函数对 $r(\rho, \tau)$, ($\rho > 0.18 \mu\text{m}$) 进行拟合并用拟合所得的函数外延到 $r(0, 0)$ 及其相邻的 2 个数据点($\rho \leq 0.18 \mu\text{m}$)^[20-21].

2 结 果

2.1 HeLa 细胞内表皮肌动球蛋白网络的三种状态

根据对 DMEM 培养液中生长 2 天后 HeLa 细胞皮层上的肌动蛋白、肌球蛋白以及粘着斑蛋白的荧光图像(见材料与方法)的观察显示: 在细胞的边缘(周边), 所有贴壁细胞都有由肌动蛋白和肌球蛋白构成的张力纤维束稳定地存在于粘着斑蛋白之间. 然而在细胞皮层的中部(图 1), 肌动球蛋白构成的网络在不同细胞内具有 3 种非常不同的型态. 第一类的细胞内部具有粗而长的纤维束(超过细胞长度的 1/2), 纤维束两端固定在成熟的粘着斑上; 第二类细胞中部只有短小的纤维束以及网状结构, 粘着斑比较多但是面积相对第一类来说很小; 第三类细胞中部几乎没有纤维束或粘着斑. 如图 1a, b 所示, 第一种(70%)的正常细胞内有显著长度的肌动球蛋白纤维束(长度超过细胞长度的 1/2), 成熟稳定的粘着斑可见于细胞的周围区域; 第二种(20%)细胞内, 没有长的肌动球蛋白纤维束, 而是只有网状结构, 同时在细胞周围和中部观察到粘着斑; 第三种(10%)细胞内, 基本上没有稳定的肌动球蛋白纤维或网络存在, 只有肌动球蛋白聚合成的焦点, 中部没有或者只有及少量的粘着斑.

进一步对 3 种细胞的肌球蛋白荧光图像分析, 3 种细胞的面积在统计意义上没有明显差别, 但是肌动蛋白和肌球蛋白在第一和第二类细胞内的平均亮度(数量)显著地多于第三类细胞. 为了消除免疫荧光在不同细胞内表达强度上的区别, 我们也定量比较了细胞内部(不包括边缘)平均亮度相对于全部细胞平均亮度的比值, 结果是相似的, 即第一和第二类细胞的比值显著地高于第三类细胞(图 1c).

定量分析细胞中部的粘着斑的数量密度和大小(见材料与方法), 显示类似于肌球蛋白的分布, 第一类细胞的粘着斑明显多于第三类细胞(图 1d), 虽然数据显示第一类细胞的粘着斑数量少于第二类, 但是这是因为我们分析方法的局限性: 由于在第二类细胞中的粘着斑非常小而且不稳定, 软件不能分辨真实的粘着斑和图像中的噪音杂讯, 从而记录了大量的非粘着斑. 用人工记录粘着斑的方法虽然可以部分解决这个问题, 但是最终需要在实验上和图像获取的方法上加以改进.

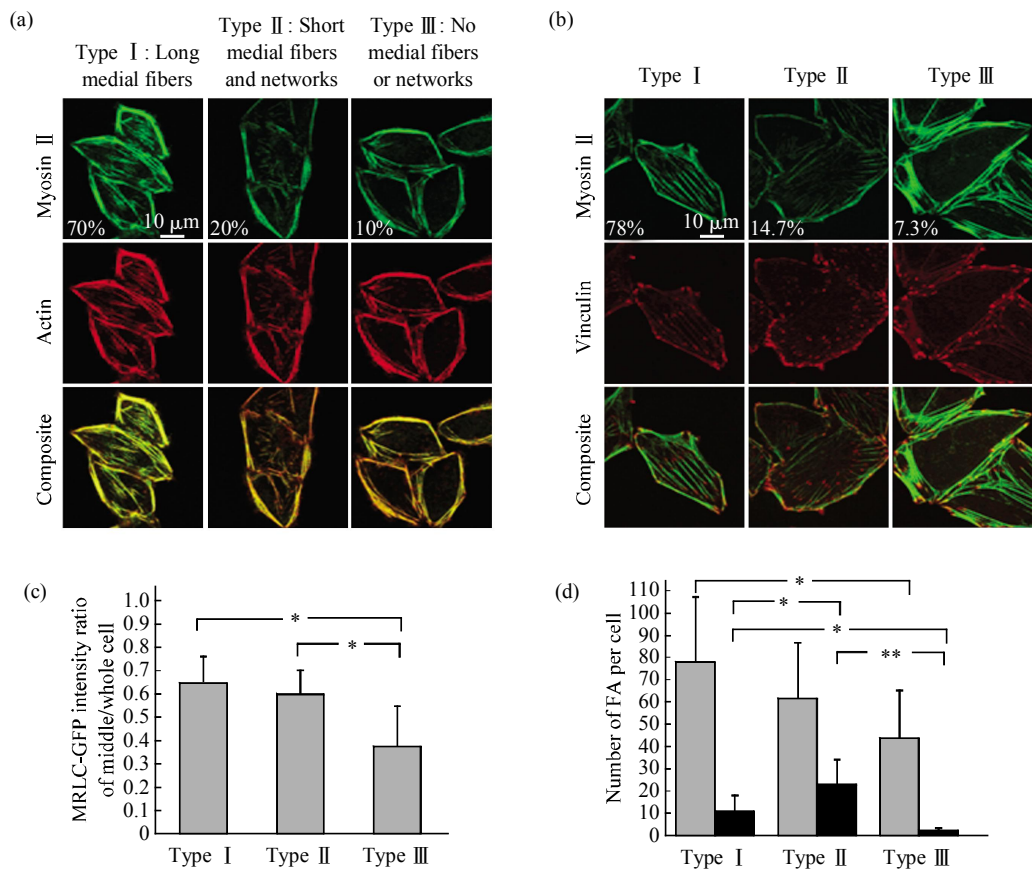


Fig. 1 Actomyosin fibers and network on cortex of HeLa cells

(a) Fluorescence microscopy images of control cells showing myosin labeled with MRLC-GFP (green) and actin filaments stained with rhodamine phalloidin (red). (b) Images of cells expressing MRLC-GFP (green) and focal adhesions stained with vinculin antibody (red). We classify cells into three types ($n=70$ cells for (a) and $n=41$ cells for (b) in regarding to the lengths of medial actomyosin fibers and the morphology of the networks. (c) Comparison of ratio between average MRLC-GFP intensity in cell middle and whole cell within a single confocal slice through the bottom part of the cell ($n=41$). Type I and Type II cells have a larger ratio compared to Type III. (d) Total number of focal adhesions of whole cells and in the medial regions of type I and II cells is significantly larger than in type III cells ($n=41$), and the number of medial focal adhesions in type III cells is close to zero. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$. ■: Whole cell; ■: Cell middle.

这些初步的分析结果显示所有 3 种细胞的中部区域的皮层上都有肌动蛋白和肌球蛋白存在, 但是细胞中部皮层上能否形成肌动球蛋白网络(或纤维束)是和细胞中部的粘着斑的生成和分布密切相关的.

2.2 HeLa 细胞内表皮肌动球蛋白网络中肌球蛋白的动态特征

我们主要观察细胞紧贴下部支持物表面的皮层上肌球蛋白的活动. 在显微观察的 30 min 内, 细胞周边的张力纤维基本上保持形状、位置以及亮度不变. 相较之下, 细胞中部皮层上的肌球蛋白活动

显得非常活跃(图 2). 将定时肌球蛋白荧光显微影像以蒙太奇的方式表现(图 2a~c), 可见在(第一类细胞)十分钟内肌动球蛋白焦点斑(actomyosin foci)组装成纤维以及之后纤维分解的过程. 同一过程用三维 kymograph(图 2d)表现可以更直接地观察到焦点斑的定向移动, 解体反转过程(turnover)以及相互间互相连接并在张力作用下收缩的过程. 肌动球蛋白在细胞中部皮层上的类似活动普遍出现在第一、二、三类细胞中.

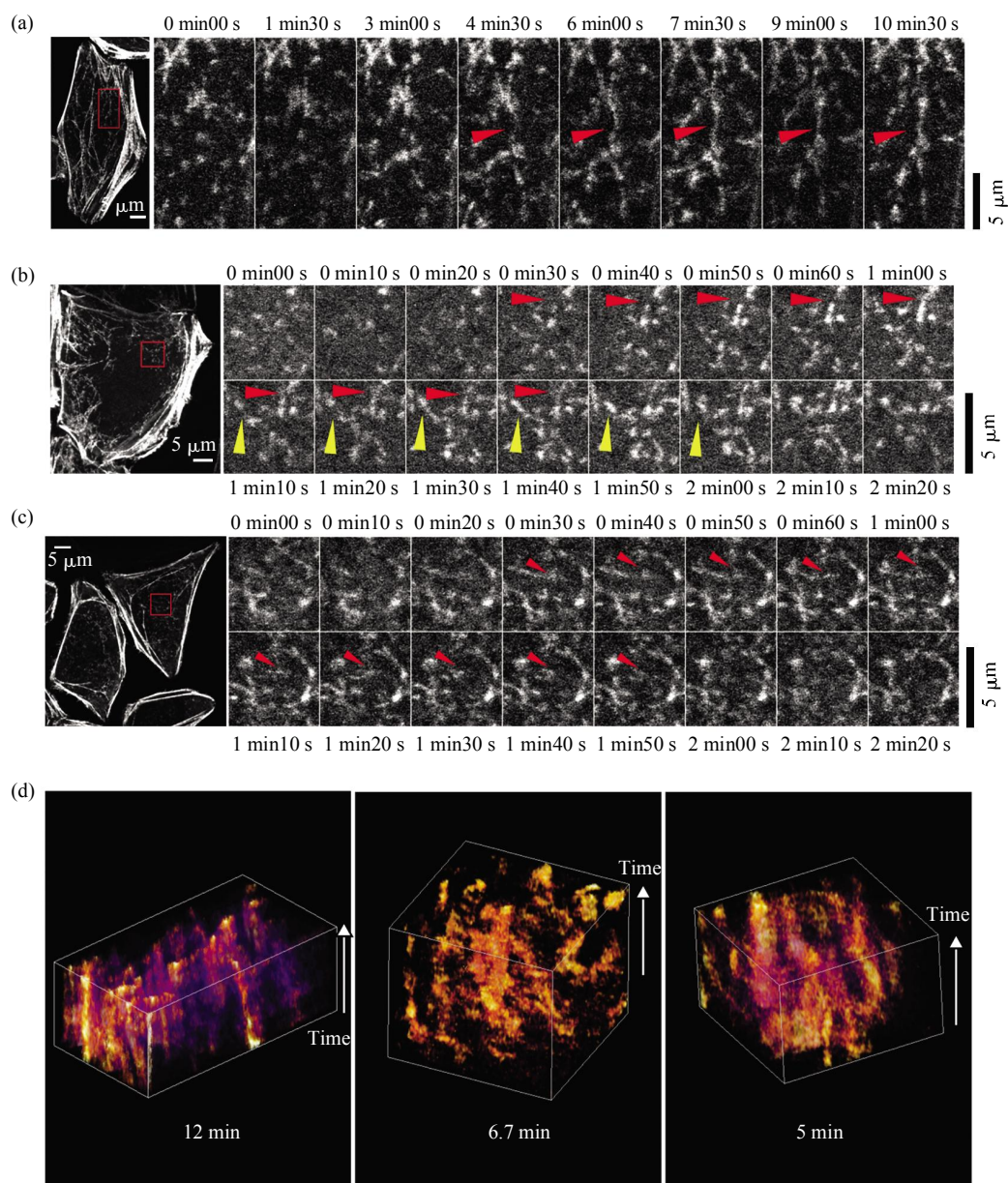


Fig. 2 Time-lapse fluorescence microscopy images of HeLa cells expressing MRLC-GFP reveal a dynamic activity of MRLC-GFP foci (formed by myosin minifilaments and actin filaments) on the cortical network

(a) MRLC-GFP foci in a Type I cell assemble into linear structures within 7 min (indicated by red arrow heads). (b) MRLC-GFP foci appearance/disappearance, making connection and contraction (red and yellow arrow heads) in a Type II cell. (c) MRLC-GFP foci appearance/disappearance (red arrow heads) and contraction in Type III cells. (d) 3D kymographs of montages of panels (a), (b) and (c). Foci appearance and disappearance are evident as bright spots. Contraction corresponds to diagonal features in the kymographs. Total time is indicated in each panel.

在正常细胞中不但肌球蛋白组成的粗丝是一直处于运动状态中, 包括张力纤维在内的肌动球蛋白纤维也是处于组装 - 分解的动态平衡中. 我们观察到(图 3)固定在粘着斑两端的肌动球蛋白纤维束在张力的作用下断开, 断裂的两端在张力作用下收缩, 分解(图 S2b, c), 这说明纤维束上的张力对于维持肌球蛋白与网络结合的稳定性的有很重要的作

用. Stachowiak 等在细胞外用肌球蛋白和肌动蛋白组成的肌动球蛋白网络中也观察到类似现象^[22-23].

值得一提的是, 我们所观察到的细胞中部皮层上肌动球蛋白的活动与迁移细胞(migrating cells)有相似之处但又不尽相同. 首先在移动的细胞内, 肌动球蛋白首先在移动的前端形成粘着斑和纤维, 同时 actomyosin foci 集体向细胞内部收缩, 而在尾部

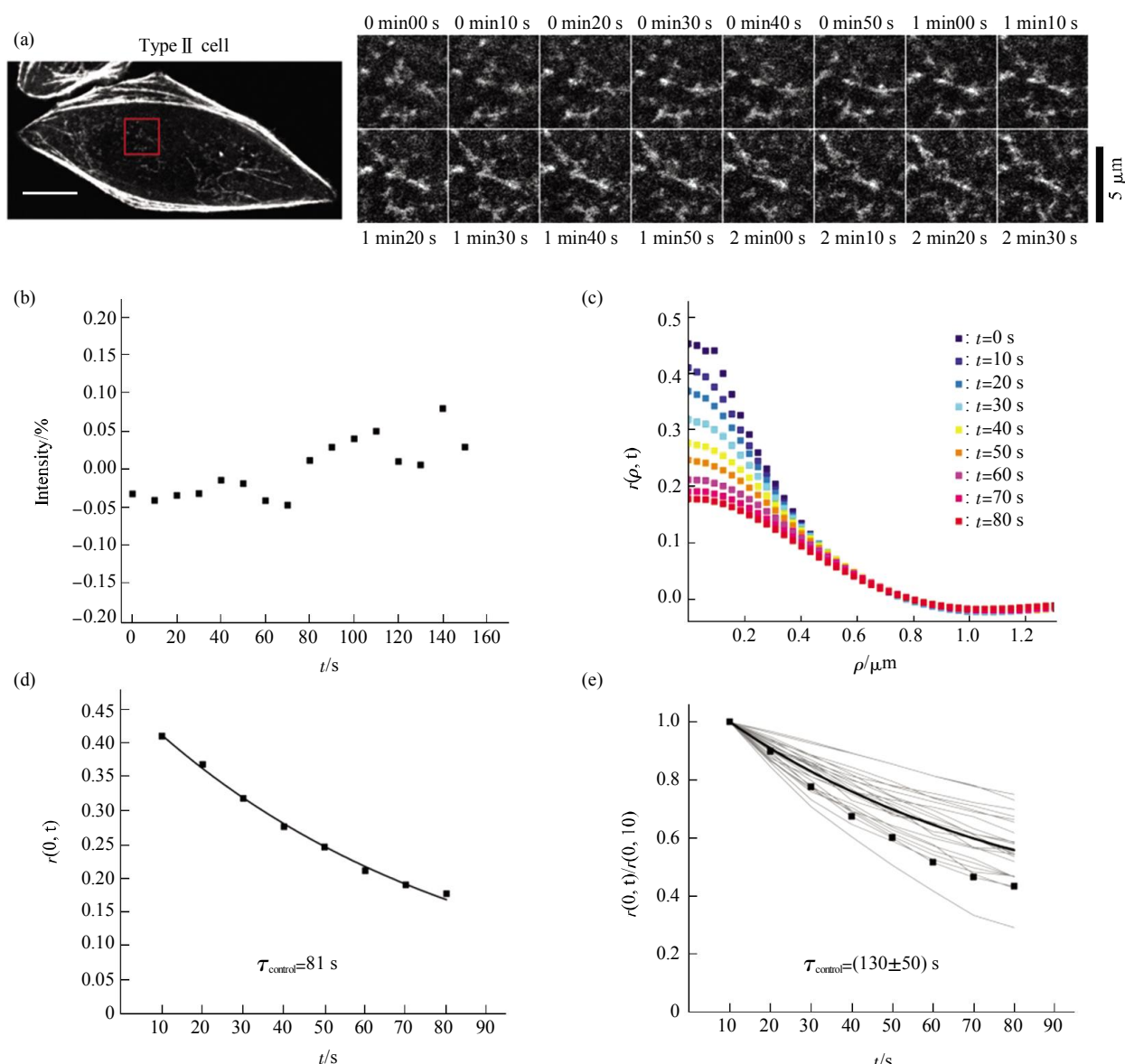


Fig. 3 STICS analysis of MRLC-GFP dynamics in control cells at a single confocal slice at cell bottom

(a) Montage picture (right) of selected region in the middle of a Type II HeLa cell (left). For analysis of steady state dynamics we selected regions of size 100 pixels $\times$ 100 pixels (1 pixel=0.6 mm) that lack stable fibers over 160 s and do not change in average intensity by more than 2%. (b) Percent change of intensity of selected region over time shows fluctuations within 0.05% of the average intensity. (c) Radially averaged spatial-temporal image correlation function of selected region as function of radial distance ρ and delay time. (d) Single exponential fit of the correlation function of panel (c) at $\rho=0$ gives a characteristic decay time 581 s. (e) Normalized decay curves (at $\rho=0$) in different control cells. The average decay time of individual exponential fits gives $\tau_{\text{control}}(130 \pm 50) \text{ s}$ (Mean $\pm$ SD, $n=25$).

的粘着斑和纤维束解体。我们观察到在贴附型细胞内部的 foci 没有集体向心移动, 而肌球蛋白纤维和网络处于动态平衡中。第一、二、三类细胞中的网络结构跟焦点斑和粘着斑的数量密度以及分布密切相关。肌球蛋白纤维束的一端或者两端固定在粘着斑上, 其余部分通过互相作用或者交联蛋白形成网络, 然后在张力作用下收缩并形成纤维束。这个过程类似于细胞外由肌动蛋白和肌球蛋白构成的

简单系统中所观察到的现象^[23-25], 在对成纤维细胞 (fibroblast) 的研究也有类似的报告^[5]。

2.3 利用局部图像相关函数对 HeLa 细胞内肌球蛋白免疫荧光图像分析

由于很难跟踪每一个肌球蛋白在细胞内的运动, 我们采用空间-时间图像相关图谱^[23]定量分析细胞中部皮层上肌球蛋白的动态(免疫荧光影像)。空间-时间图像相关函数本质上是比较图像中的

(荧光)光斑在时间 - 空间上的相关性, 从而获得有关光斑(即荧光标记的蛋白质分子)的扩散、移动, 以及出现 - 消失的频率等信息. 考虑到肌球蛋白 foci 的大小以及它们在细胞中活动的速度, 我们需要对大小为 100×100 像素的局部图像在长度为 160 s 的时间内(见材料与方法)做空间 - 时间相关函数计算(公式(1)(2)). 时间长度选定为 160 s, 是因为 160 s 对于计算肌球蛋白 foci 在细胞中活动的相关性已经足够长, 在 $\tau=160$ s 时间间隔的相关函数以及衰减为零. 对于第一、二、三类细胞中部皮层上的肌球蛋白 foci, 我们用同样标准选择局部图像(即图像内没有大的纤维束, 不靠近细胞边缘或细

胞核)做相关函数分析. 首先用公式(1)对选定的区域计算相关函数 $r(0, 0, 0)$, 然后以坐标 $(\xi, \eta)=(0, 0)$ 为中心, 计算 $r(\rho, 0)$ (以 $\rho=\sqrt{\xi^2+\eta^2}$) 的平均值, 并做 $r(\rho, \tau)$ 相对于 ρ 的曲线(图 4e). 对同一数值 τ , 曲线 $r(\rho, \tau)$ 是以高斯函数相对于 ρ 衰减, 说明肌球蛋白焦点斑在比较长距离上没有相互作用或集体定向运动. 用高斯函数拟合曲线后得到的半高全宽(full width half maximum, FWHM)(插入公式)为 $0.65 \mu\text{m}$, 有意思的是这个长度和肌球蛋白分子结合成粗丝(minifilament)的长度($0.8 \sim 1.0 \mu\text{m}$)的长度^[24-26]非常接近.

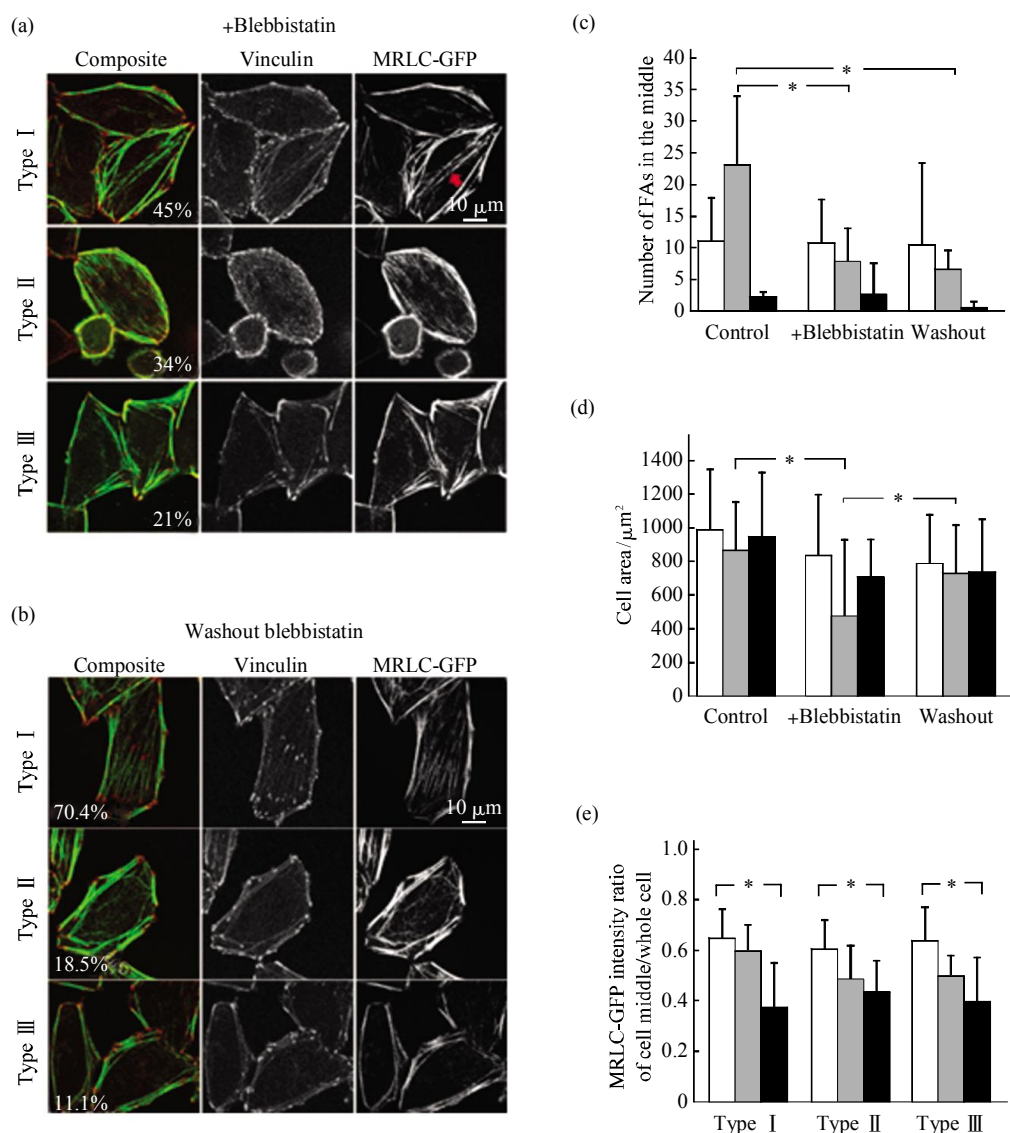


Fig. 4 Images of HeLa cells expressing MRCL-GFP (green) stained with vinculin (red) after treatment with blebbistatin

(a) Cells treated with 100 mmol/L blebbistatin for 60 min. Red arrow indicates fibers in Type I cells that remain after treatment. (b) Cells treated with 100 mmol/L blebbistatin for 60 min followed by washout with regular DMEM medium. Images were taken 60 min after the washout. The statistical data of focal adhesion number (c), cellular spreading area (d), and MRCL-GFP intensity in the middle of cells *vs.* in the whole cells (e) for type I, II, III cells under control condition, in blebbistatin, and after removing blebbistatin. □: type I; ■: type II; ■: type III.

在细胞中, 粗丝和肌动蛋白组成的细丝是组装成张力纤维和肌动球蛋白网络的基本组成部分. 粗丝之间通过细丝相互连接, 旋转并形成较长的纤维, 这一过程在图 1、2 中表现出来. 对同一数值 ρ , 曲线 $r(\rho, \tau)$ 相对 τ 以指数函数形式衰减, 这显示肌球蛋白之间的相关性由于肌球蛋白纤维的组装和解体而消失. 用指数衰减函数拟合曲线, 得到的衰减指数 τ_{control} 显示了图像里肌动球蛋白焦点斑(foci)运动的快慢和反转(turnover)的频率. 在不同的细胞中 τ_{control} 值差异很大, 在所分析的 25 个细胞中, $\tau_{\text{control}} = (130 \pm 50) \text{ s}$ (Mean $\pm$ SD, $n=25$). 对图像的分析表明肌动球蛋白焦点斑(foci)运动和反转对 τ_{control} 的值贡献相当. 为了进一步分析肌球蛋白的运动、相互拉伸, 以及反转对形成网络或者纤维的物理模型, 我们将利用肌球蛋白抑制药物(blebbistatin)对细胞皮层上的肌动球蛋白的活动进行观察和分析.

2.4 用肌球蛋白抑制药物(blebbistatin)处理后的肌动球蛋白网络的变化

Blebbistatin 是一种作用于二型肌球蛋白(myosin II)的 ATPase 的抑制剂, 它通过和肌球蛋白的头部结合从而阻断肌球蛋白和 ATP 的结合来阻止肌球蛋白的动力行程循环, 同时由于它和肌球蛋白结合的区域与肌球蛋白结合肌动蛋白的区域非常接近, 所以它同时也阻止了肌球蛋白与肌动蛋白组装成网络或纤维的通道. 如图 5a 所示, 经过 $100 \mu\text{mol/L}$ blebbistatin 处理 1 h 以后的 HeLa 细胞, 贴附面积明显减少, 细胞中部的粘着斑数量和面积减少, 同时细胞皮层上的肌球蛋白数量减少, 这导致一部分肌动球蛋白网络和纤维分解, 因此第一类细胞减少(从 70% 减少到 45%), 第二、三类细胞分别从 20% 和 10% 增加到 34% 和 21% (图 5a). Kymograph(图 6a, d)和对荧光蛋白的跟踪都显示在 blebbistatin 处理过的细胞里面肌球蛋白 foci 的反转(turnover)没有变化, 但是 foci 之间的相互作用几乎完全消失, 这些都说明肌球蛋白的活动完全被 blebbistatin 抑制了. 洗去 blebbistatin, 然后用 DMEM 培养液恢复细胞 60 min 后, 观察到第一类细胞恢复到 70.4%, 第二、三类细胞数量上所占比重减小到 18.5% 和 11.1%, 接近正常细胞. 更进一步的比较发现抑制肌球蛋白的活动对第二类细胞内皮层上的肌球蛋白和粘着斑的数量有明显影响(图 5 c, e). 同时只有第二类细胞的贴附面积在实验

过程中有明显变化. 这些都说明随着肌球蛋白的活动被抑制, 肌球蛋白不再稳定地结合在肌动球蛋白网络上, 有更多的肌球蛋白被转移到细胞边缘, 从而导致网络和粘着斑的分解. 这也说明在细胞中部维持一定数量肌球蛋白的活动对于形成和维持细胞骨架网络的稳定性非常重要. 对肌球蛋白的动态分析将在下一节中详细讨论.

我们也对另一种肌球蛋白抑制药物 ML-7 对细胞进行了实验. ML-7 是作用于二型肌球蛋白轻链上使轻链失去旋转的活性从而停止肌球蛋白活动的抑制剂, 但它并不阻止肌球蛋白与肌动蛋白结合. 在用 $50 \mu\text{mol/L}$ ML-7 的 DMEM 培养液中 1 h 以后的 HeLa 细胞中部皮层上的肌动球蛋白网络相对于 ML-7 处理之前并没有明显减少(图 S3), 但是细胞周边的纤维束的亮度, 即肌球蛋白数量有明显的减少, 但是粘着斑的数量没有明显减少. 这说明 ML-7 确实在短时间内不能对肌球蛋白与肌动蛋白以及细胞骨架网络的结合产生明显影响.

2.5 抑制药物处理的肌球蛋白免疫荧光图像局部相关函数分析

用 $50 \mu\text{mol/L}$ blebbistatin 处理绿色荧光标记肌球蛋白的 HeLa 细胞, 60 min 以后立刻对细胞定时拍摄荧光照片(见材料与方法), 注意不要过度用蓝光照射细胞避免使 blebbistatin 失效. 对于获得的显微影像用 2.3 相同的方法做局部图像相关分析. 正如 2.4 节所述, 由肌球蛋白聚合成的 foci 在细胞内皮层上的反转和扩散和在正常细胞中相同, 但是由于肌球蛋白的活动被抑制, 所以没有观察到 foci 之间的相对拉伸和收缩的运动, 这就导致所分析的局部图像之间的空间-时间相关性大幅降低(图 5a~c).

图 5b 显示相关函数 $r(0,0)$ 的数值和在正常细胞中(图 4)类似, 这代表着肌球蛋白的数量密度上没有变化, 但是相关函数 $r(\rho, \tau)$ 的衰减速度(即 τ_0)相对正常细胞明显慢很多($\tau_{\text{blebb}} = (240 \pm 90) \text{ s}$)(图 6a). 在洗去 blebbistatin 以后用培养液恢复肌球蛋白活动 60 min 以后的 MRLC-GFP 照片中, 焦点斑之间的相互作用得到了恢复, 所以相关函数 $r(0, 0)$ 的衰减速度也得到了一定的恢复. 如图 5c 中的细胞的相关函数 $r(0, 0)$ 的衰减时间 $\tau_0 = 130 \text{ s}$. 但是, 恢复后细胞的数据显示在不同的细胞内相关函数的波动幅度非常大($\tau_0 = (220 \pm 160) \text{ s}$, $n=23$)(图 6b). 这是因为有的细胞内的肌球蛋白的活动并没有得到恢复(可能有的细胞已经被 blebbistatin 破坏不能恢复).

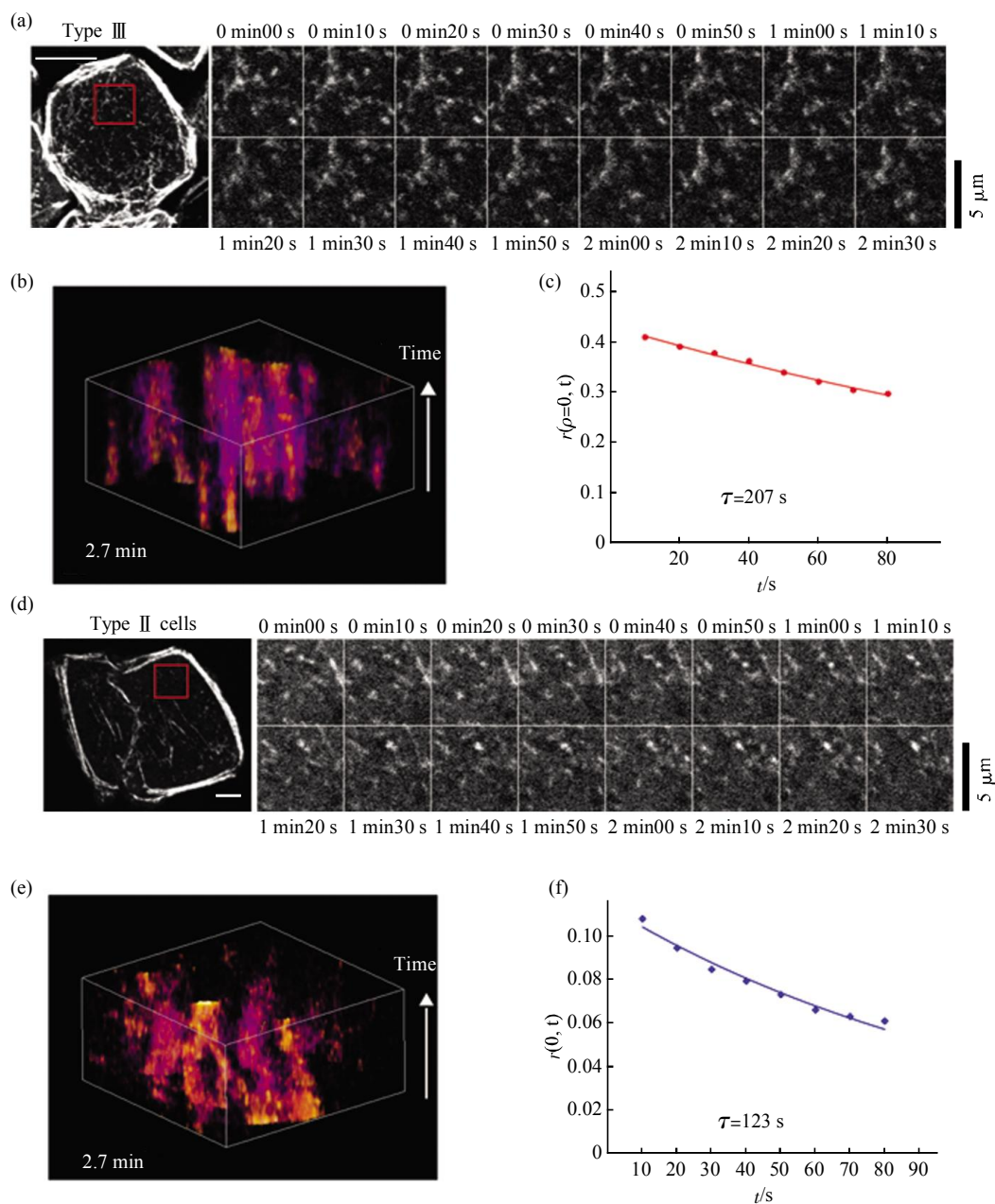


Fig. 5 STICS analysis of MRLC-GFP dynamics of cells treated with blebbistatin (a~c) and of cells recovering from blebbistatin (d~f)

(a) Left: Cell after treatment with 50 $\mu\text{mol/L}$ blebbistatin for 60 min. Right: montage of selected region. (b) 3D kymograph of montage of panel (a). Foci appearance and disappearance is observed but the near absence of diagonal features indicates less contraction compared to control cells. (c) Normalized decay curves (STICS function at $\rho=0$) in a blebbistatin-treated cell. (d) Left: MRLC-GFP image of a HeLa cell cultured in normal DMEM after washing out blebbistatin for 60 min. Right: montage of selected region. (e) 3D kymograph of montage of panel (d). The diagonal trajectories of foci indicate the contraction similar to control cells. (f) Normalized decay curves (STICS function at $\rho=0$) in a blebbistatin washed out cell.

综上所述, 我们证明了局部图像的时间 - 空间相关性, 并提供了量化分析细胞中蛋白质分子活动的一个有效工具, 即利用蛋白质分子免疫荧光图像

的时间 - 空间相关函数的衰减速度确定图像中蛋白质的扩散、出现、消失, 以及相互作用的速度。

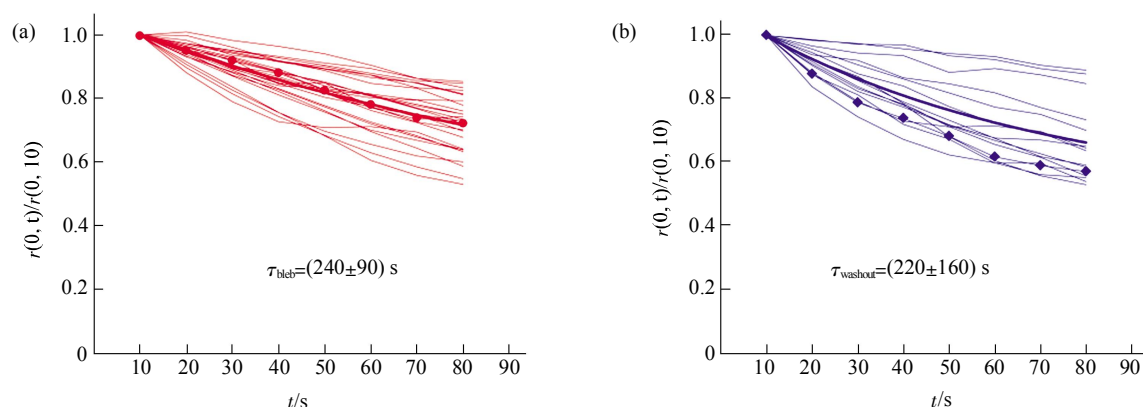


Fig. 6 Normalized decay curves (at $\rho = 0$) in different cells

(a) The decay curves of 24 cells in 50 $\mu\text{mol/L}$ blebbistatin for 60 min. ($\tau_{\text{bleb}} = (240 \pm 90)$ s). (b) The decay curves of 23 cells in DMEM medium after washing out blebbistatin for 60 min. ($\tau_{\text{washout}} = (220 \pm 160)$ s, Mean $\pm$ SD).

3 讨 论

由于有肌球蛋白产生的张力作用, 细胞骨架网络作为主动网络(active network)有别于普通高分子网络材料而具有很多特殊性质, 因此得到广泛重视并成为近些年的研究热点. 关于肌球蛋白, 对它们在细胞内的活动及其相关生化反应的信号通路研究得比较多, 但是它们参与到细胞骨架网络, 尤其是张力纤维自组装的物理机制则并没有得到很好的阐述. 在利用药物(化学方法)处理肌球蛋白的研究方面, 相对于我们讨论过的 blebbistatin 和 ML-7, Y27632 是最早发现的药物, 能全面封锁肌动球蛋白和粘着斑有关蛋白的 ATPase 活动的通道, 因此用 Y27632 (10~30 $\mu\text{mol/L}$) 处理的细胞内肌动球蛋白网络和粘着斑会分解和消失, 细胞贴附在基质上的面积也会减少甚至消失(图 S1), 细胞骨架网络, 包括细胞整体的基本物理性质, 如硬度、弹性、黏滞性都会随之而改变^[27-28]. 这其实并不利于我们观察肌球蛋白在参与细胞骨架网络组装中的作用和物理机制, 所以我们在实验中主要用 blebbistatin 和 ML-7 来进行研究. Shutova 等报告了利用电子显微镜观察在 blebbistatin 处理的 fibroblast 细胞中肌动球蛋白网络和张力纤维的解聚, 以及洗去药物后张力纤维的恢复^[26, 29]. 但是他们的方法是用电子显微镜观察剥去细胞膜以后的细胞, 这样他们的观察结果并不完全能反映正常细胞内的肌动球蛋白在参与肌动球蛋白网络组装的过程. 另外在对细胞内, 尤其是细胞骨架网络的物理性质的测量和研究, 普遍

采用的是 AFM 或者张力显微图像(traction force microscopy)从细胞外部进行测量^[3, 30], 然后建立模型内推到细胞内的网络. 这种方法并不直接, 而且在精度上有一定局限性. 近些年, 研究人员发展了用光钳(optical tweezers)或者磁钳来测量细胞内分子间相互作用以及细胞骨架网络的粘弹性^[31-32], 并结合物理模型来研究肌球蛋白等蛋白分子参与细胞骨架网络的组装以及动态平衡过程^[5, 33]. 除此之外, 还有将细胞培养在不同形状或者材料的基质上以观察细胞的生长以及活动的规律, 或者对细胞的基质或局部用外力改变形状(拉伸或者压缩), 观察细胞如何调节骨架网络来适应. 我们的研究通常需要将几种方法结合起来互为印证和补充(图 S4, S5).

我们的研究项目中制备了用于培养细胞的弹性高分子材料(polyacrylamide), 其杨氏模量介于 400Pa 到 60kPa 之间, 观察不同硬度上的贴附细胞内的肌球蛋白活动以及肌动球蛋白骨架, 并取得了初步数据(图 S3). 但本文主要着重介绍利用药物实验以及免疫荧光显微图像分析来定量研究细胞内皮层上的 II 型肌球蛋白的活动数据. 利用分析结果, 我们初步建立了肌球蛋白聚合成的焦点斑或微丝之间通过肌动蛋白细丝产生收缩牵引力的机械模型, 即肌球蛋白组合成的 minifilament 在细胞内随机运动, 当肌球蛋白粗丝和肌动蛋白微丝相结合并产生相对滑动和收缩, 收缩力的大小与结合在肌动蛋白上的肌球蛋白数量成正比. 我们发现 minifilament 与微丝结合的稳定性和收缩力的大小成正相关关系, 而链接在焦点斑之间的张力纤维由于足够的

minifilament 数量以及产生的张力使其保持稳定。这个模型可以用图 S6a~c 描述。其中 minifilament 从肌动球蛋白纤维上脱离的概率是 $k_d = k_{d0} \exp(-\frac{|F_c|}{F_{d0}})$ (图 S6c), F_c 是在 minifilament 上的张力。利用这个模型, 我们做了二维计算机模拟随机分布的肌球蛋白粗丝在粘着斑之间形成肌动球蛋白网络, 并在张力作用维持动态稳定的过程(图 S6d)。我们将在接下来的工作中完善和发展肌球蛋白微丝间相互作用的物理模型, 并通过进一步计算机模拟来解释和验证更多的实验现象和数据。

附件 图 S1~S6, 见本文网络版附录(<http://www.pibb.ac.cn>)

参 考 文 献

- [1] Zilman A G, Safran S A. Role of cross-links in bundle formation, phase separation and gelation of long filaments. *Europhysics Letters*, 2003, **63**(1): 139–145
- [2] Besser A, Schwarz U S. Coupling biochemistry and mechanics in cell adhesion: a model for inhomogeneous stress fiber contraction. *New Journal of Physics*, 2007, **9**(11): 427–451
- [3] Discher D E, Janmey P, Wang Y L. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*, 2005, **310**(18): 1139–1143
- [4] Yeung T, Georges P C, Flanagan L A, *et al.* Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 2005, **60**(1): 24–34
- [5] Shutova M, Yang C, Vasiliev J M, *et al.* Functions of nonmuscle myosin II in assembly of the cellular contractile system. *PLoS ONE*, 2012, **7**(7): e40814
- [6] Vicente-Manzanares M, Ma X, Horwitz A R. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, **10**(11): 778–790
- [7] Naumanen P, Lappalainen P, Hotulainen P. Mechanisms of actin stress fibre assembly. *Journal of Microscopy*, 2008, **231**(3): 446–454
- [8] Das M, Drake T, Wiley D J, *et al.* Oscillatory dynamics of Cdc42 GTPase in the control of polarized growth. *Science*, 2012, **337**(6091): 239–243
- [9] Burridge K, Wittchen E S. The tension mounts: Stress fibers as force-generating mechanotransducers. *Journal of Cell Biology*, 2013, **200**(1): 9–19
- [10] Vallenius T. Actin stress fibre subtypes in mesenchymal-migrating cells. *Open Biology*, 2013, **3**(1): 7–17
- [11] Luo T, Mohan K, Pablo A, *et al.* Molecular mechanisms of cellular mechanosensing. *Nature Materials*, 2013, **12**(11): 1064–1071
- [12] Laporte D, Ojic N, Vavynolis D, *et al.* α -Actinin and fimbrin cooperate with myosin II to organize actomyosin bundles during contractile-ring assembly. *Mol Biol Cell*, 2012, **23**(16): 3094–3110
- [13] Yang L, Effler J C, Kutscher B L, *et al.* Modeling cellular deformations using the level set formalism. *BMC Sys Biol*, 2008, **2**(1): 68–84
- [14] Luo T, Mohan K, Srivastava V, *et al.* Understanding the cooperative interaction between myosin II and actin cross-linkers mediated by actin filaments during mechanosensation. *Biophysical Journal*, 2012, **102**(2): 238–247
- [15] 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
- [16] Mikulich A, Kavaliauskiene S, Juzenas P. Blebbistatin, a myosin inhibitor, is phototoxic to human cancer cells under exposure to blue light. *Biochim Biophys Acta*, 2012, **1820**(7): 870–877
- [17] Sakamoto T, Limouze J, Combs C A, *et al.* Blebbistatin, a myosin II inhibitor, is photoinactivated by blue light. *Biochemistry*, 2005, **44**(2): 584–588
- [18] Smith, M B, Li H, Shen T, *et al.* Segmentation and tracking of cytoskeletal filaments using open active contours. *Cytoskeleton*, 2010, **67**(11): 693–705
- [19] Huang S, Sun Z, Li Z, *et al.* Modulation of microvascular smooth muscle adhesion and mechanotransduction by integrin-linked kinase. *Microcirculation*, 2010, **17**(2): 113–127
- [20] Wiseman P W, Squier J A, Ellisman L H, *et al.* Two-photon video rate image correlation spectroscopy (ICS) and image cross-correlation spectroscopy (ICCS). *Journal of Microscopy*, 2000, **200**(1): 14–25
- [21] Wiseman P W, Peterson N O. Image correlation spectroscopy II, optimization for ultrasensitive detection of preexisting platelet-derived growth factor- β receptor oligomers on intact cells. *Biophysical Journal*, 1999, **76**(2): 963–977
- [22] Stachowiak M R, McCall P M, Thoresen T, *et al.* Self-organization of myosin II in reconstituted actomyosin bundles. *Biophysics Journal*, 2012, **103**(6): 1265–1274
- [23] Gardel M L, Schneider I C, Aratyn-Schaus Y, *et al.* Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2010, **26**: 315–333
- [24] Kumar S, Maxwell I Z, Heisterkamp A, *et al.* Viscoelastic retraction of single living stress fibers and its impact on cell shape, cytoskeletal organization, and extracellular matrix mechanics. *Biophysical Journal*, 2006, **90**(10): 3762–3773
- [25] Kolin D L, Wiseman P W. Advances in image correlation spectroscopy: measuring number densities, aggregation states, and dynamics of fluorescently labeled macromolecules in cells. *Cell Biochem Biophys*, 2007, **49**(3): 141–164
- [26] Verkhovsky A B, Svitkina T M, Borisy G G. Self-polarization and directional motility of cytoplasm. *Curr Biol*, 1999, **9**(1): 11–20
- [27] Katoh K, Kano Y, Noda Y. Rho-associated kinase-dependent contraction of stress fibres and the organization of focal adhesions. *J R Soc Interface*, 2010, **8**(56): 305–311
- [28] Gardel M L, Shin J H, MacKintosh F C, *et al.* Elastic behavior of cross-linked and bundled actin networks. *Science*, 2004, **304**(5675): 1301–1305
- [29] Svitkina T M, Verkhovsky A B, McQuade K M, *et al.* Analysis of

- the actin-myosin II system in fish epidermal keratocytes: mechanism of cell body translocation. *J Cell Biol*, 1997, **139**(2): 397-415
- [30] Yamada S, Wirtz D, Kuo S C. Mechanics of living cells measured by laser tracking microrheology. *Biophysical Journal*, 2000, **78**(4): 1736-1747
- [31] Gardel M L, Valentine M T, Crocker J C, *et al.* Microrheology of entangled F-actin solutions. *Phys Rev Lett*, 2003, **91**(15): 158302
- [32] Walcott S, Sun S X. A mechanical model of actin stress fiber formation and substrate elasticity sensing in adherent cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(17): 7757-7762
- [33] Sun S X, Walcott S, Wolgemuth C W. Cytoskeletal cross-linking and bundling in motor-independent contraction. *Current Biology*, 2010, **20**(15): 649-654

Image Analysis on The Dynamical Behavior of Non-muscle Myosin II in The Cytoskeletal Networks*

SHI Xiao-Chuan¹⁾, SHEN Chao²⁾, NIE Wei³⁾, LIU Feng¹⁾, MENG Xiao-Liang^{1)**}

⁽¹⁾ International School of Software, Wuhan University, Wuhan 430079, China; ⁽²⁾ School of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China;

⁽³⁾ Peleman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104)

Abstract The morphology and elasticity of adhered cells is closely related to the structure of the cytoskeletal meshwork and the way that actomyosin fibers interact with each other to form the network, which is mediated by the activity of myosin II. Therefore the interaction between minifilaments (assembled by non-muscle myosin II) is important to the cell-level cytoskeletal remodeling through mechanosensing. However, at present it is still difficult to precisely obtain the experimental data of myosin II *in vivo* because the invasive measurement would disturb the cellular local structure and physiological activities, and the non-invasive measurement couldn't provide information about myosin II activity accurately. In this paper, we developed and applied new images analysis methods, such as protein fluorescent image tracking and image correlation spectroscopy, to quantify the kinetics of disassembly and reassembly of actomyosin networks and compared them to studies by other groups. This analysis suggested the following processes contribute to the assembly of cortical actomyosin and stress fibers: random myosin mini-filament assembly and disassembly along the cortex; myosin mini-filament aligning and contraction; stabilization of cortical myosin upon increasing contractile tension. We found that the number of myosin II and focal adhesions are very important to the formation and stability of the type I, II and III actomyosin network in HeLa cells, and the activity of myosin II, which determines the dynamics of the actomyosin network reorganization, can be quantified through STICS (spatial temporal image correlation spectroscopy). The formation of type I, II, and III actomyosin networks was explained through a mechanical model by adjusting the parameters of myosin II activities and number density. The STICS method used in this study can be applied to evaluate the activity of other proteins in live cells.

Key words myosin, minifilament, actomyosin, cytoskeletal network, stress fiber, image correlation spectroscopy (ICS), MRLC-GFP

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0274

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China(41501441, 61572368) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities(410500028).

**Corresponding author.

Tel: 86-27-68771236, E-mail: xmeng@whu.edu.cn

Received: January 7, 2016 Accepted: March 7, 2016

附录

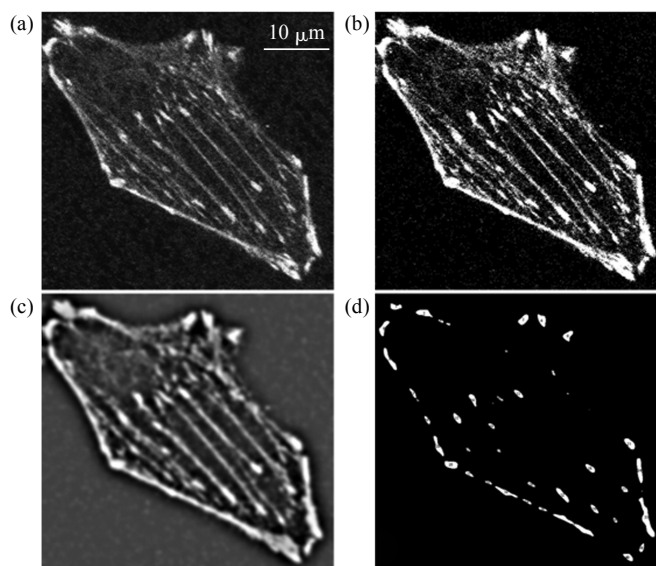


Fig. S1 Measuring numbers of focal adhesions in HeLa cells

(a) Images of cells expressing MRLC-GFP and focal adhesions stained with vinculin antibody. (b) Setting domain value and binaryzation of (a). (c) Setting bandwidth to filter out spots not fit the size requirements. (d) Using particle tracking plug-in tool in ImageJ to analyze the results after treatment.

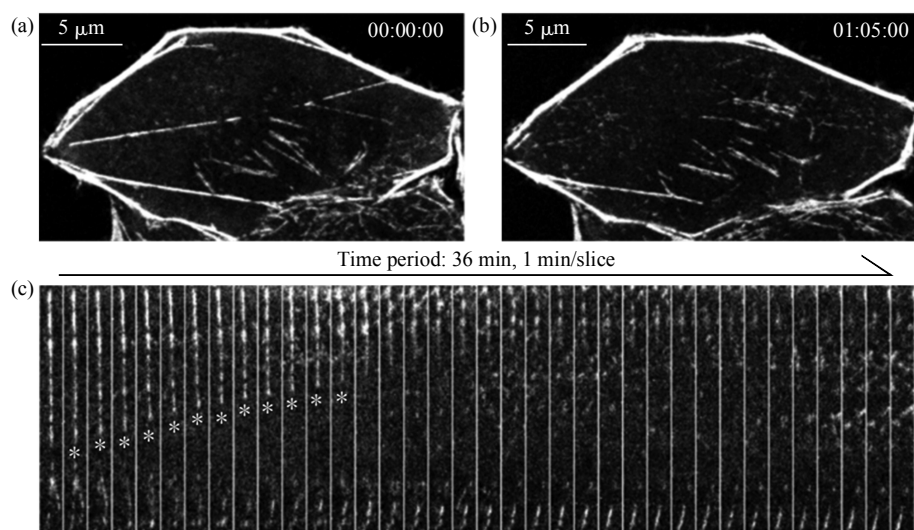


Fig. S2 Disassembly processes affected by actomyosin fibers in HeLa cells

It shows that the fiber stability related to the stress, by comparing the image of expressing MRLC-GFP before disassembly (a) and after (b). (c) shows the images of MRLC-GFP in a disassemble cell. The symbol * presents the contraction after disassembly.

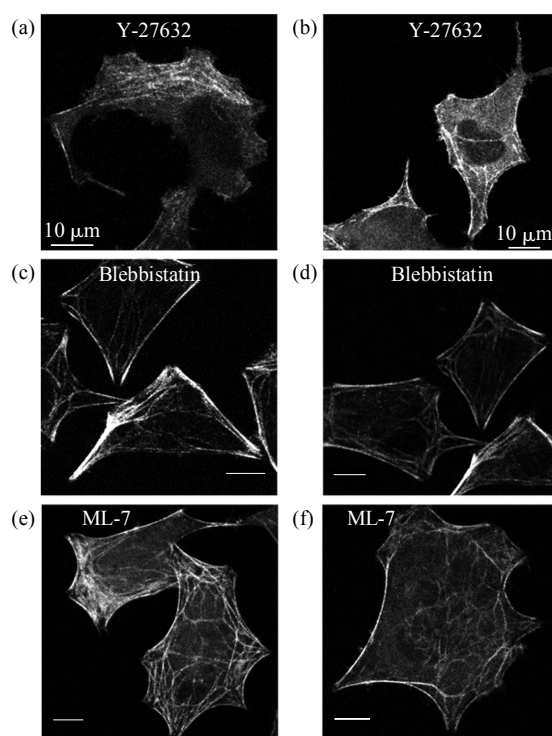


Fig. S3 MRLC-GFP microscopic images of HeLa cells grown on organic polymer materials

Cells were cultured on the surface hardness of 60 kPa (A-D) and 16kPa (E, F) surfaces for 48 h, and then were treated with drug. Cells were used for 10 $\mu\text{mol/L}$ Y-27632 (A, B) and 50 $\mu\text{mol/L}$ blebbistatin (C, D), and 20 $\mu\text{mol/L}$ ML-7 (E, F) after 30 min of processing MRLC-GFP.

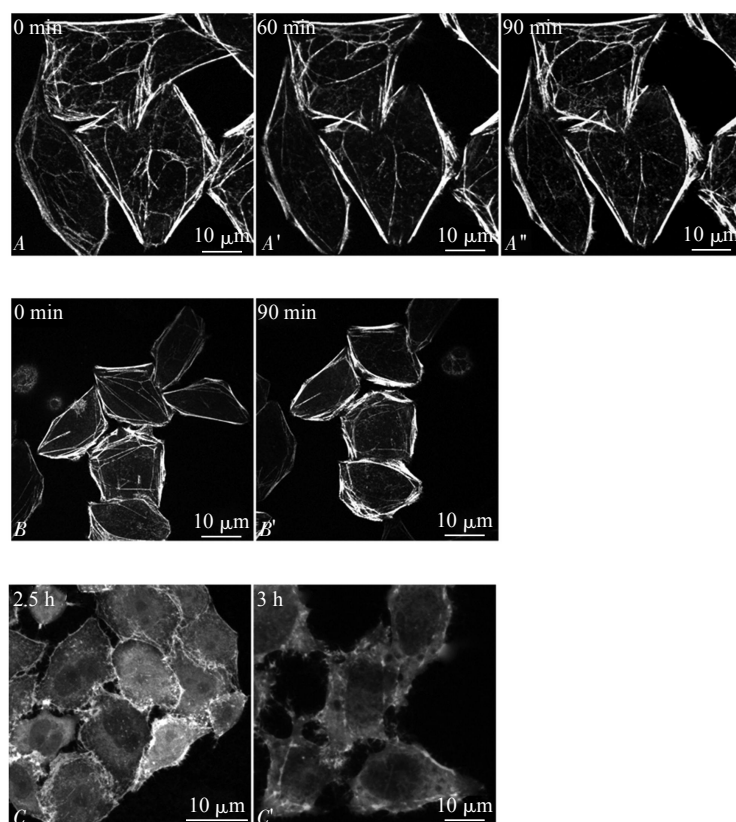


Fig. S4 Compared with 50 $\mu\text{mol/L}$ blebbistatin depolymerization under different time of HeLa cells in actomyosin network (A, A', A'', B, and B') are HeLa cells in the blebbistatin treatment (A, B), treatment 60 min (A') and 90 min later (A'', B') of the MRLC-GFP. Since C and C' visible processing time is more than two hours later, intracellular actomyosin fibers were almost exclusively depolymerization, and the cells begin to die.

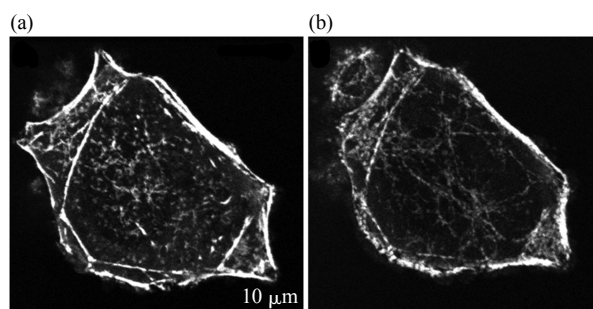


Fig. S5 HeLa cells within the actomyosin network in the treatment with blebbistatin and blebbistatin removal after the reassembly

(a) The image of cells expressing MRLC-GFP with 50 $\mu\text{mol/L}$ blebbistatin treatment after 60 min. (b) After the removal of blebbistatin with ordinary DMEM culture solution for 30 min.

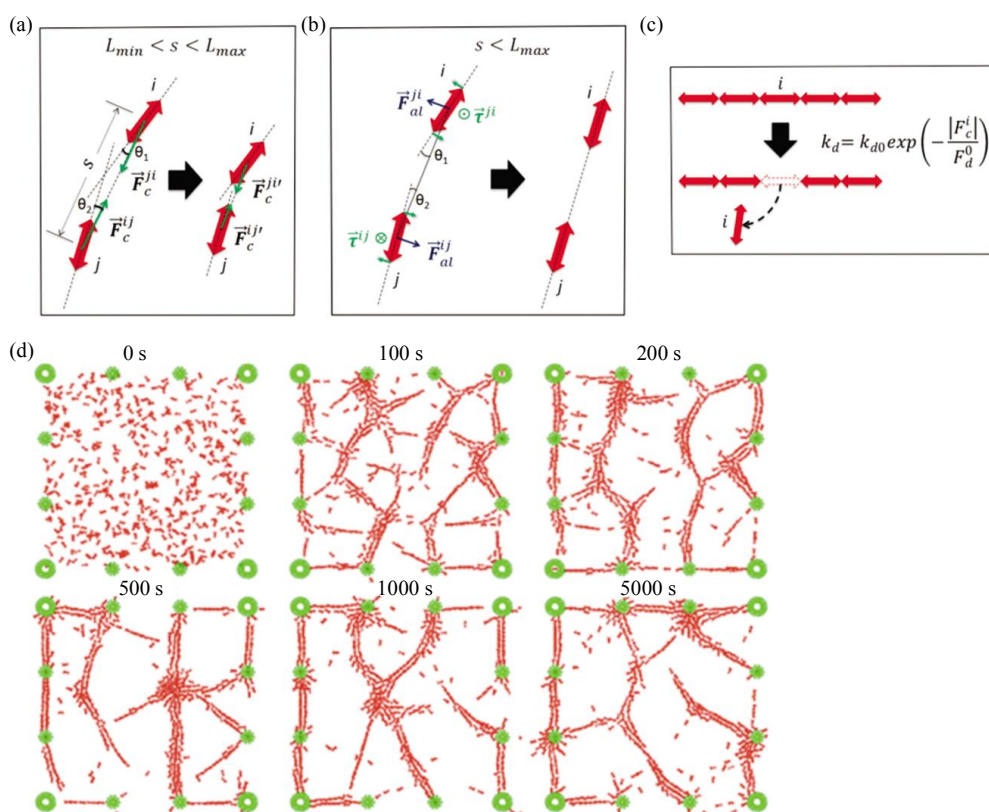


Fig. S6 The physical model and computer simulation of the interaction between myosin thick filaments and actin filament. When the distance between the two myosin filaments is within a certain range, the contraction (a) and the direction of rotation (b) are generated by actin. When the fiber bundle is formed, its stability is determined by the tension generated by the myosin thick filament. The probability that the filament of the filament is separated from the fiber bundle decreases with the increase of the tension, seeing the formula in (c). (d) in the space of $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ simulation myosin thick filaments self-assembly process of network formation. The red color representing myosin thick filaments, the green color represents the focal adhesions. Each thick filament length is $0.8\ \mu\text{m}$, a total number of 360.