

细胞外基质弹性通过 FAK-Raf 信号通路 负反馈调控 Integrin 的活性*

杜婧 祖岩 徐越 杨春**

(清华大学航天航空学院, 北京 100084)

摘要 细胞外基质弹性对细胞的迁移、周期、增殖、分化等功能均具有重要影响, 尤其是对干细胞的命运具有重要调控作用. 迄今为止, 人们对这一现象背后的机理还远未认识清楚. 整合素(integrin)作为细胞黏附分子, 被认为是位于多种力学信号转导通路起点的力学传感器. 本实验室在之前的工作中观察到细胞外基质弹性显著改变了 $\beta 1$ integrin 的活化状态、亚细胞定位等. 然而, 细胞外基质弹性对 $\beta 1$ integrin 活化水平的调节机制还不清楚. 本文利用特异性识别 $\beta 1$ integrin 活性构象的单克隆抗体观察到: a. 与硬基底相比, 较软的细胞外基质能够诱导骨髓间充质干细胞中活化的 $\beta 1$ integrin 水平升高; b. 较硬的细胞外基质能明显上调 FAK-Raf-MEK-ERK 通路的活性; c. 抑制 FAK-Raf 信号通路能挽救较硬细胞外基质上较低的 $\beta 1$ integrin 活化水平. 这些结果提示, 较硬的细胞外基质可能通过激活 FAK-Raf 信号通路负反馈调控 integrin 的活性. 综上所述, 本文发现了一种细胞外基质弹性对 integrin 活化水平及其下游信号的调控方式, 为理解细胞对基质弹性的感知机理提供了一个新的线索.

关键词 细胞外基质弹性, 干细胞分化, 整合素, 黏着斑激酶, 负反馈

学科分类号 Q2, Q66

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00406

越来越多的证据表明, 哺乳动物体内的各种组织均具有其“特征弹性”, 组织中的细胞与其所在组织的弹性相适应^[1]. 细胞外基质弹性作为一个重要的细胞力学刺激因素, 对细胞多种行为(如迁移、周期、分化等)具有广泛的调控作用^[2-6]. 2006年以来, 在干细胞研究领域, 人们普遍认识到细胞外基质弹性是调控干细胞命运的重要决定因素^[7]. 迄今为止, 人们对上述现象背后的机理还远未认识清楚. 细胞外基质弹性作为一种持续存在的力学环境, 已经被观测到对黏着斑的合成具有重要影响. 黏着斑由一系列分子构成, 它以跨膜蛋白黏附分子整合素(integrin)为核心, 胞外区与细胞外基质蛋白黏附, 胞内区通过募集一系列蛋白质分子(包括 Src、Cas、Vinculin、Talin 等)形成蛋白质复合物^[8-13], 与细胞微丝骨架相连. 这些分子在力学刺激作用下可产生构象变化, 从而触发激酶活化、信号分子胞内运输以及受体-配体结合强度改变等一系列信号传递事件^[14-21], 共同构成力学信号转导的传感器.

在这些信号分子中, integrin 在已知的多数力学信号感知过程中都起到关键作用, 是力学信号转导通路的起点之一^[22]. 因此, integrin 在细胞感知胞外基质弹性的过程中很可能起到重要作用, 研究细胞外基质弹性调控 integrin 功能的机理, 对深入理解细胞的弹性感知机理具有重要意义.

本研究组在之前的研究中发现, 较软的细胞外基质在细胞发生黏附 2 h 后即能够促进干细胞中 $\beta 1$ 整合素 ($\beta 1$ integrin) 活化, 并促使其内吞, 使骨形态蛋白受体 (bone morphogenesis protein receptor, BMPR) 亚细胞定位发生改变, 从而抑制了 BMP-Smad 通路, 使骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs) 向成神

* 国家自然科学基金(31170885, 31000418, 30870602)资助项目.

** 通讯联系人.

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

收稿日期: 2014-03-18, 接受日期: 2014-08-11

经系分化^[2]。上述研究提示, $\beta 1$ integrin 的功能调控是细胞感知胞外基质弹性的一个关键因素。为什么较软的基质弹性能够促进 $\beta 1$ integrin 活化? $\beta 1$ integrin 活化水平的改变是不是细胞响应胞外基质弹性的早期信号? 这些问题在上述前期研究中并未得到解答。

研究细胞黏附早期 $\beta 1$ integrin 的功能调控有助于理解细胞感知胞外基质弹性的机理。本文发现较软的细胞外基质在 30 min 以内即能明显上调 integrin 的活化水平, 说明这一现象反映了细胞外基质弹性对细胞较为直接和早期的影响。在此基础上, 本文进一步探索了较软细胞外基质促进骨髓间充质干细胞 integrin 活化的机制, 以及不同细胞外基质弹性对骨髓间充质干细胞中 integrin 下游信号的影响。

1 材料与方法

1.1 原代大鼠骨髓间充质干细胞培养

断颈法处死 120 g SD 大鼠(约 4 周龄, 购自北京大学医学部实验动物中心), 浸泡于 75%乙醇中消毒 15 min 后移入超净台。小心剥离股骨和胫骨, 去除多余脂肪肌肉组织, 注意保留骨端部不受损。浸泡于无菌 PBS 中。用手术剪剪开骨两端, 露出骨髓腔。用无菌注射器抽取 PBS (含 50 U/ml 肝素) 反复冲洗骨髓腔, 直至将腔内骨髓血冲洗干净, 骨髓腔变白为止。收集骨髓液, 用 200 目滤网过滤后 1 500 r/min 离心 10 min。弃上清, 沉淀用 DMEM-F12 (含 10% FBS) 4 ml 重悬, 小心加到等体积 1.073 g/L 淋巴细胞分离液上, 密度梯度 2 500 r/min 离心 25~30 min。弃去表面透明培养液, 小心吸取分层部白膜层单核细胞。用 5 倍体积的 PBS 漂洗, 1 500 r/min 离心 5 min。弃上清, 沉淀用 5 ml PBS 重悬, 1 500 r/min 离心 5 min。弃上清, 沉淀用 DMEM-F12(含 10% FBS, 100 U/ml 青霉素, 100 mg/L 链霉素) 重悬, 以 1×10^6 /ml ~ 6×10^6 /ml 的密度接种到培养皿中, 37°C 含 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。

1.2 不同弹性的细胞外基质的制备

直径 3.3 cm 的盖玻片用乙醇清洗干净。将少量(约 200 μ l)0.1 mol/L NaOH 溶液均匀涂抹在盖玻片上, 将盖玻片放入 60°C 烘箱烘烤焙干, 在盖玻片表面形成一层 NaOH 薄膜, 完成盖玻片表面的羟基化。向 NaOH 薄膜上滴加亲和硅烷, 静置 20 min。用三蒸水将盖玻片清洗 2 遍, 之后加入

0.5%的戊二醛溶液, 静置 30~45 min。向 100 μ l 的离心管内加入 12.5 μ l Tris, 再添加 ammonium persulfate (AP), 0.06(或 0.04) μ l TEMED, 再加三蒸水, 漩涡混合, 立即用移液枪吸取 8~10 μ l 的溶液, 滴到事先均匀涂抹剥离硅烷(3-(trimethoxysilyl) propyl methacrylate) 的玻璃片上, 然后再将盖玻片倒扣在液体上, 使盖玻片和玻璃之间保留一层液层, 静置。当丙烯酰胺聚合化之后(2.5~3 h), 用镊子小心移走的盖玻片。PBS 清洗 2 遍后, 换用 HEPES 清洗 1 遍。将聚丙烯酰胺凝胶表面的液体排干净。用移液枪小心吸取 100 μ l 的 1 mmol/L Sulfo-SANPAH, 置于凝胶表面。将凝胶放在离一台 30 W 的杀菌灯 6 英寸远处, 用紫外线照射表面 5 min。去除变黑的 Sulfo-SANPAH (Pierce, USA) 溶液, 然后重复上述物相活化步骤。将聚丙烯酰胺凝胶用 pH 8.5 的 50 mmol/L HEPES 洗 2 遍, 放在摇床上, 每次 15 min。加入 0.2 g/L 的 Type I 胶原蛋白(invitrogen, USA), 4°C 环境下置于摇床上, 反应过夜; 或者温箱孵育 2.5~3 h。种植细胞之前, 在 37°C 环境下使凝胶在细胞培养基中浸泡 30~45 min。

1.3 蛋白质印迹(Western blot)分析

细胞样品用 TEN-T 溶液 4°C 裂解 30 min, 或 RIPA 细胞裂解液 4°C 裂解 10 min, 12 000 g 15 min 离心得上清。总蛋白质水平用 BCA 法测定后, 取每个泳道 50 μ g 的上样量进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。向蛋白质溶液中加入 6 \times 上样缓冲液(1/5 样品体积), 煮沸 4 min。采用 7.5%~10% 的分离胶和 4% 的浓缩胶, 电泳条件为 60 V, 12 mA, 2~2.5 h。接着转移到 PVDF 膜上, 转膜条件为恒压 110 V、1.5 h 或者恒压 30 V、12 h。经过含 5% (w/v) 脱脂奶粉的 TBST(50 mmol/L Tris/HCl pH 7.4, 0.5 mol/L NaCl, 0.05% Tween 20) 室温封闭 2 h 后, 膜和相应一抗于 4°C 孵育过夜。TBST 洗 3 次, 每次 15 min。然后用辣根过氧化物酶偶联的二抗孵育 2 h。TBST 洗 3 次, 每次 15 min。在膜上加免疫印迹化学发光试剂, 反应 1 min, 暗室显影, 曝光于胶片上(Kodak X-Omatradiograph film)。胶片用显影液曝光, 并用 Quantity One 软件进行灰度分析。所用一抗有 rabbit anti- $\beta 1$ integrin 单克隆抗体(Abcam, USA), mouse anti-GAPDH 单克隆抗体(Santa Cruze Biotechnology, USA), mouse anti-activated $\beta 1$ integrin 单克隆抗体(LSBio, USA)。辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠二抗和辣根过氧化物酶标记的

山羊抗兔二抗均购自北京中杉金桥公司。

1.4 免疫细胞化学检测

间充质干细胞生长于不同弹性的丙烯酰胺凝胶包被的盖玻片上。PBS 洗 3 次后, 4% 多聚甲醛室温固定 30 min。PBS 洗 3 次后, 0.1% Triton X-100, 室温下破膜 3~5 min。PBS 洗 3 次后, 细胞用含 1% BSA 的封闭液在室温封闭 1 h。滴加特异性一抗, 4℃ 过夜或 37℃ 孵育 30 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min。滴加荧光素标记二抗, 37℃ 避光孵育 1 h, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min。DAPI 复染细胞核 5~10 min。甘油磷酸缓冲液封片, 激光共聚焦显微镜(Leica, Germany)观察。所用一抗有 rabbit anti- $\beta 1$ integrin 单克隆抗体 (Abcam, USA), mouse anti-activated $\beta 1$ integrin 单克隆抗体 (LSBio, USA)。荧光素 FITC 和 TRITC 标记的山羊抗小鼠二抗和山羊抗兔二抗均购自北京中杉金桥公司。

1.5 Raf-1 活性检测实验

利用 Millipore 公司的 Raf 活性检测试剂盒。主要步骤是: 细胞裂解液中加入 Magnesium/ATP cocktail 和非活化的 MEK1, 30℃ 反应 30 min。随后加入还原性上样缓冲液煮 5 min。通过 Western blot 检测磷酸化 MEK-1 的水平。

1.6 统计学分析

所有数据均表示为(至少 3 次独立试验) $\bar{x} \pm s$ 。ANOVA (One-way analysis of variance) 或 t -test 方差分析被用来分析各组样品间的显著性差异。最小显著性差异水平被定为 $P < 0.05$ 。

2 实验结果

2.1 骨髓间充质细胞中 integrin 的活性受细胞外基质弹性的调节

骨髓间充质干细胞接种于 I 型胶原包被的不同弹性(杨氏模量: E_{soft} 约为 0.1~1 kPa, E_{stiff} 约为 50~100 kPa)的细胞外基质上 2 h 后, 采用一个特异性识别 $\beta 1$ integrin 活化构象的抗体(克隆号: HUTS-4)通过 Western blot 和免疫细胞化学方法检测 $\beta 1$ integrin 的活化程度。该抗体特异性地识别 $\beta 1$ integrin 的杂交区结构域(355~425 区域), 该位点的表达量与 $\beta 1$ integrin 的黏附功能呈正相关^[24-26]。通过外加 Mn^{2+} 激活 $\beta 1$ integrin 可以显著上调这个抗体检测到的活化的 $\beta 1$ integrin 水平(图 1), 进一步说明该抗体可以特异性地识别处于活化状态的 $\beta 1$ integrin。

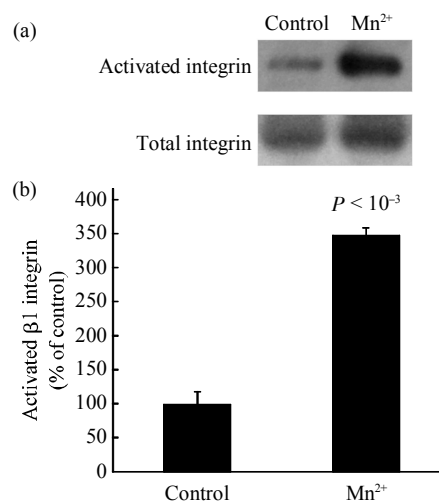


Fig. 1 Mn^{2+} stimulated the level of activated $\beta 1$ integrin

(a) BMMSCs cultured on plastic plates were lysed in the presence of Mn^{2+} or not (control), followed by Western blotting analysis of activated $\beta 1$ integrin levels using HUTS-4 antibody (Chemicon) and total $\beta 1$ integrin. Data represent one experiment (of three conducted). (b) Statistical analysis of the results in (a). P values indicate statistical differences from the control cells ($\bar{x} \pm s$; $n = 3$).

如图 2 中 Western blotting 结果显示, 自细胞接种 30 min 开始, 活化的 $\beta 1$ integrin 含量在软基

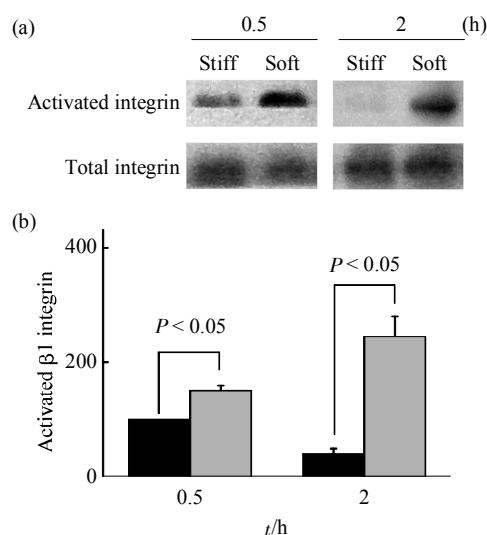


Fig. 2 Activated $\beta 1$ integrin was upregulated on soft substrate

(a) Activated and total $\beta 1$ integrin levels in BMMSCs 0.5 or 2 h after seeding on stiff or soft substrate analyzed by Western blotting. Gels are representative of three experiments. (b) Statistical analysis of results in (a). P values are for differences in $\beta 1$ integrin levels normalized with total $\beta 1$ integrin between stiff and soft substrates ($\bar{x} \pm s$; $n = 3$). ■: Stiff; □: Soft.

底上明显高于硬基底, 而总的 $\beta 1$ integrin (即活化加非活化的 $\beta 1$ integrin) 水平并没有明显改变. 这些结果提示, 细胞外基质弹性在细胞贴壁的初期即可调节细胞中 $\beta 1$ integrin 的活化水平.

另一方面, 免疫细胞化学方法同样观察到了类似的现象, 即活化的 $\beta 1$ integrin 在软基底上含量明显高于硬基底(图 3).

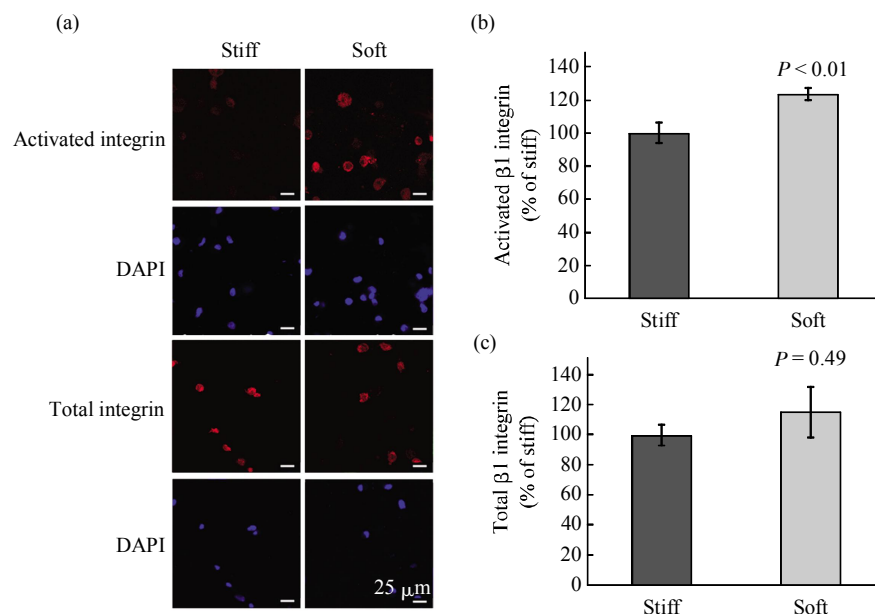


Fig. 3 Activated $\beta 1$ integrin was upregulated on soft substrate as early as 0.5 h after seeding

(a) Immunocytochemical staining of activated and total $\beta 1$ integrin levels in BMMSCs 0.5 h after seeding on stiff or soft substrate. Microphotographs are representative of six experiments. (b, c) Fluorescence intensity of $\beta 1$ integrin quantified using ImageJ software. Statistical analysis of results in (a) is shown. P values are for differences in $\beta 1$ integrin levels between stiff and soft substrates ($\bar{x} \pm s$; $n = 6$).

2.2 黏着斑激酶的活性受细胞外基质弹性的调节

由于已有文献报道, 较硬的基底更有利于黏着斑的合成^[7]. 这个结果似乎与本文观测到的较软细胞外基质上调活化 $\beta 1$ integrin 水平有矛盾之处. 因此, 我们采用 Western blotting 检测不同弹性的细胞外基质上的细胞中黏着斑组装的水平. 黏着斑开始组装时, 一系列蛋白募集于 Integrin 胞内端, 其中包括黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK), FAK 聚集于黏着斑后可发生自磷酸化. 因此, FAK 的磷酸化水平可以反映黏着斑的组装水平. Western blotting 表明(图 4), 较硬的细胞外基质上, 细胞中的 FAK 磷酸化水平明显高于较软基底, 而总的 FAK 水平并没有明显的改变.

2.3 骨髓间充质细胞中 FAK-Raf-MEK-ERK 通路的活性受细胞外基质弹性的调节

FAK 的磷酸化可以启动一系列下游信号通路, 因此, 我们进一步检测了 FAK 下游信号通路

Raf-MEK-ERK 的活性. 采用底物催化反应来检测 Raf-1 作为磷酸化激酶的活性表征. 如图 5 所示, 硬基底上的细胞中 Raf-1 磷酸化激活底物 MEK1 的能力远高于软基底上的细胞. 而接下来 Western blotting 实验结果进一步证明了硬基底能显著上调 Raf 下游 ERK 的磷酸化程度(图 6).

这些结果表明, 较硬的细胞外基质能明显上调 FAK-Raf-MEK-ERK 通路的活性.

2.4 较硬基底通过 FAK-Raf 通路负反馈调节 integrin 活性

如前文所述, 我们发现较硬的细胞外基质能明显上调 FAK-Raf-MEK-ERK 通路的活性, 但是会降低活化的 integrin 水平. 根据文献报道, FAK-Raf 信号通路能够负反馈性调控 integrin 活性^[27]. 因此, 我们推测硬基底上较高的 FAK-Raf 信号通路活性负反馈抑制了 $\beta 1$ integrin 的活性. 用 FAK 的特异性抑制剂 PF573228 处理, 能显著降低软硬

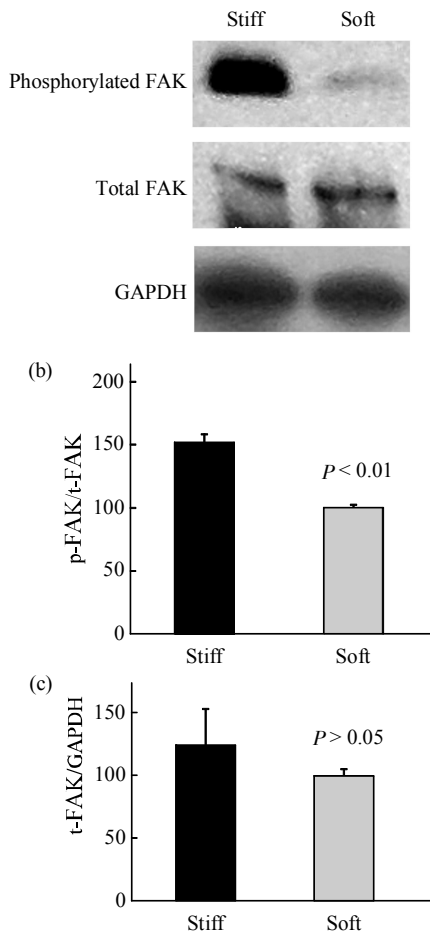


Fig. 4 FAK phosphorylation was induced on stiff substrate

(a) Phosphorylated and total FAK levels in BMMSCs 2 h after seeding on stiff or soft substrate analyzed by Western blotting. Gels are representative of three experiments. (b, c) Statistical analysis of results in (a). *P* values are for differences in phosphorylated FAK or total FAK normalized with GAPDH between stiff and soft substrates ($\bar{x} \pm s$; *n* = 3).

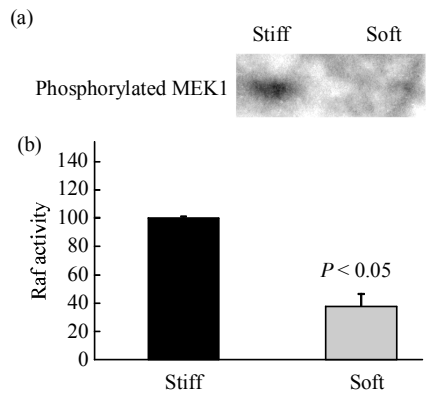


Fig. 5 Raf-1 activity was induced on stiff substrate

(a) Raf-1 activity in cells growing on stiff or soft substrate was determined by the ability of MEK1 phosphorylation by cell lysates. Gels are representative of three experiments. (b) Statistical analysis of results in (a). *P* values are for Raf-1 activity between stiff and soft substrates ($\bar{x} \pm s$; *n* = 3).

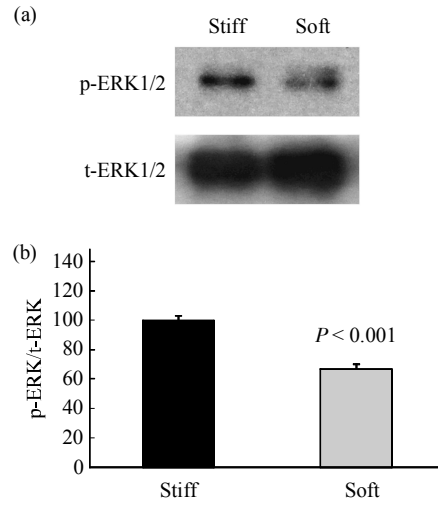


Fig. 6 ERK1/2 phosphorylation was induced on stiff substrate

(a) Phosphorylated and total ERK1/2 levels in BMMSCs 2 h after seeding on stiff or soft substrate were analyzed by Western blotting. Gels are representative of three experiments. (b) Statistical analysis of results in (a). *P* values are for differences in phosphorylated ERK normalized by total ERK between stiff and soft substrates ($\bar{x} \pm s$; *n* = 3).

基底上的细胞活化 $\beta 1$ integrin 水平的差别(图 7). 这些结果提示, 细胞外基质弹性通过 FAK-Raf 信号通路活性负反馈调控 $\beta 1$ integrin 的活性.

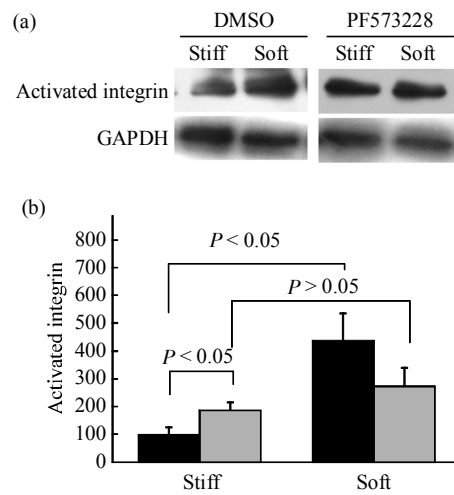


Fig. 7 The difference in activated $\beta 1$ integrin level between stiff and soft substrate was blocked by FAK inhibitor

(a) Activated $\beta 1$ integrin levels in BMMSCs 2 h after seeding on stiff or soft substrate in the presence of PF573228 or DMSO were analyzed by Western blotting. Gels are representative of three experiments. (b) Statistical analysis of results in (a). *P* values are for differences in $\beta 1$ integrin levels normalized with GAPDH between stiff and soft substrates ($\bar{x} \pm s$; *n* = 3). ■: DMSO; □: PF573228.

3 讨 论

力学刺激如何影响细胞行为是一个非常引人关注的话题。细胞如何感受细胞外力学刺激是这个领域中的一个核心问题：即通过何种信号传导方式将细胞外力学刺激传递到细胞内并且转化成生物化学信号。本文对于细胞外基质弹性调节整合素活性的机理进行了探讨。我们首先发现细胞外基质弹性在细胞贴壁早期即能调控 $\beta 1$ integrin 的活化水平。即便在细胞贴壁 30 min 内，软基底上细胞中活化的 $\beta 1$ integrin 含量明显高于硬基底上的细胞。其次，我们发现较硬的细胞外基质能明显上调 FAK-Raf-MEK-ERK 通路的活性。细胞外基质弹性通过 FAK-Raf 信号通路活性负反馈调控 integrin 的活性。

细胞外基质弹性对干细胞分化命运的调节是近几年来发现的一个新现象^[28-30]。关于这个现象背后的细胞分子生物学机制，对干细胞的定向诱导分化及其潜在的临床应用前景具有重要意义。近年来，一系列力学信号转导方式逐渐被揭示。Shih 等^[31]发现 $\beta 2$ integrin 及其下游信号通路，在较硬细胞外基质诱导间充质干细胞成骨分化中起重要作用。本课题组之前的研究发现，较软细胞外基质促进 $\beta 1$ integrin 发生内吞作用，从而抑制 BMP-SMAD 通路，引起间充质干细胞向成神经细胞方向分化^[23]。综上所述，多种证据表明，integrin 相关信号通路在细胞外基质调控干细胞分化以及细胞的弹性感知中起关键作用。

Integrin 的功能具有丰富而微妙的调控方式。单分子水平的力学实验表明，integrin 具有逆锁键 (catch-bond) 的性质^[32]，即：力学刺激可以提升 integrin 与配体的结合强度及其所形成复合物的寿命，并进一步激活下游信号通路。Friedland 等^[33]也在细胞中证实：力学刺激较弱时，integrin 仅通过 β 亚基与配体相结合，而在较强的力学刺激下 integrin 的 α 和 β 亚基均与胞外配体结合，从而激活下游信号；他们同时证明了较软的细胞外基质上 Integrin 主要以 β 亚基与胞外配体结合(较弱结合)，较硬的胞外基质上则主要由 α 和 β 亚基同时与胞外配体结合(较强结合)。而本文发现，较软的细胞外基质能够显著促进 integrin 活化，且该活化过程受到 FAK-Raf-MEK-ERK 通路的调控；这些结果提示，在基质弹性影响 integrin 功能的问题中，可能存在与已知的逆锁键调控不同的调控方式。文献

表明，integrin 被蛋白激酶磷酸化后其活性会受到抑制^[34-35]；在较硬的细胞外基质上，FAK-Raf-MEK-ERK 通路是 integrin 的重要下游信号通路^[36-39]，可能通过蛋白激酶磷酸化 integrin 抑制其活性，从而形成一个负反馈调控模式。然而，integrin 活化过程的机理复杂，磷酸化对 integrin 的活性和它在细胞中定位的影响还未充分揭示。深入研究这一课题可能为理解力学环境诱导的干细胞分化和细胞对胞外力学信号的响应提供新的视角。

参 考 文 献

- [1] Butcher D T, Alliston T, Weaver V M. A tense situation: forcing tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2009, **9**(2): 108-122
- [2] Discher D E, Janmey P, Wang Y L. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*, 2005, **310**(5751): 1139-1143
- [3] Zajac A L, Discher D E. Cell differentiation through tissue elasticity-coupled, myosin-driven remodeling. *Curr Opin Cell Biol*, 2008, **20**(6): 609-615
- [4] Wells R G. The role of matrix stiffness in regulating cell behavior. *Hepatology*, 2008, **47**(4): 1394-1400
- [5] Paszek M J, Zahir N, Johnson K R, *et al.* Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell*, 2005, **8**(3): 241-254
- [6] Pelham R J, Jr., Wang Y. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(25): 13661-13665
- [7] Engler A J, Sen S, Sweeney H L, *et al.* Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 2006, **126**(4): 677-689
- [8] William I. Weis. Cell biology: how to build a cell junction. *Nature*, 2004, **430**(6999): 513-514
- [9] Lo S H. Focal adhesions: what's new inside. *Developmental Biology*, 2006, **294**(2): 280-291
- [10] Mitra S K, Hanson D A, Schlaepfer D D. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2005, **6**(1): 56-68
- [11] Nayal A, Webb D J, Horwitz A. Talin: an emerging focal point of adhesion dynamics. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, **16**(1): 94-98
- [12] Carragher N O, Frame M C. Focal adhesion and actin dynamics: a place where kinases and proteases meet to promote invasion. *Trends in Cell Biology*, 2004, **14**(5): 241-249
- [13] Ziegler W H, Liddington R C, Critchley D R. The structure and regulation of vinculin. *Trends in Cell Biology*, 2006, **16**(9): 453-460
- [14] Okuda M, Takahashi M, Suero J, *et al.* Shear stress stimulation of p130 (cas) tyrosine phosphorylation requires calcium-dependent c-Src activation. *J Biol Chem*, 1999, **274**(38): 26803-26809
- [15] Moalli M R, Wang S, Caldwell N J, *et al.* Mechanical stimulation induces pp125(FAK) and pp60(src) activity in an *in vivo* model of trabecular bone formation. *J Appl Physiol*, 2001, **91**(2): 912-918
- [16] Tzima E, Del Pozo M A, Kiosses W B, *et al.* Activation of Rac1 by

- shear stress in endothelial cells mediates both cytoskeletal reorganization and effects on gene expression. *EMBO J*, 2002, **21**(24): 6791–6800
- [17] Shikata Y, Rios A, Kawkitinarong K, *et al.* Differential effects of shear stress and cyclic stretch on focal adhesion remodeling, site-specific FAK phosphorylation, and small GTPases in human lung endothelial cells. *Exp Cell Res*, 2005, **304**(1): 40–49
- [18] Brown A E, Discher D E. Conformational changes and signaling in cell and matrix physics. *Curr Biol*, 2009, **19**(17): R781–789
- [19] Riveline D, Zamir E, Balaban N Q, *et al.* Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol*, 2001, **153**(6): 1175–1186
- [20] Sawada Y, Tamada M, Dubin-Thaler B J, *et al.* Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell*, 2006, **127**(5): 1015–1026
- [21] Na S, Collin O, Chowdhury F, *et al.* Rapid signal transduction in living cells is a unique feature of mechanotransduction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(18): 6626–6631
- [22] Friedland J C, Lee M H, Boettiger D. Mechanically activated integrin switch controls alpha5beta1 function. *Science*, 2009, **323**(5914): 642–644
- [23] Du J, Chen X, Liang X, *et al.* Integrin activation and internalization on soft ECM as a mechanism of induction of stem cell differentiation by ECM elasticity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, **108**(23): 9466–9471
- [24] Luque A, Gómez M, Puzon W, *et al.* Activated conformations of very late activation integrins detected by a group of antibodies (HUTS) specific for a novel regulatory region (355-425) of the common beta 1 chain. *J Biol Chem*, 1996, **271**(19): 11067–11075
- [25] Berger B W, Kulp D W, Span L M, *et al.* Consensus motif for integrin transmembrane helix association. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(2): 703–708
- [26] Askari J A, Tynan C J, Webb S E, *et al.* Focal adhesions are sites of integrin extension. *J Cell Biol*, 2010, **188**(6): 891–903
- [27] Hughes P E, Renshaw M W, Pfaff M, *et al.* Suppression of integrin activation: a novel function of a Ras/Raf-initiated MAP kinase pathway. *Cell*, 1997, **88**(4): 521–530
- [28] Chowdhury F, Na S, Li D, *et al.* Material properties of the cell dictate stress-induced spreading and differentiation in embryonic stem cells. *Nat Mater*, 2010, **9**(1): 82–88
- [29] Teixeira A, Ilkhanizadeh S, Wigenius J A, *et al.* The promotion of neuronal maturation on soft substrates. *Biomaterials*, 2009, **30**(27): 4567–4572
- [30] Huebsch N, Arany P R, Mao A S, *et al.* Harnessing traction-mediated manipulation of the cell/matrix interface to control stem-cell fate. *Nat Mater*, 2010, **9**(6): 518–526
- [31] Shih Y R, Tseng K F, Lai H Y, *et al.* Matrix stiffness regulation of integrin-mediated mechanotransduction during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2011, **27**(4): 730–738
- [32] Kong F, García A J, Mould A P, *et al.* Demonstration of catch bonds between an integrin and its ligand. *J Cell Biol*, 2009, **185**(7): 1275–1284
- [33] Friedland J C, Lee M H, Boettiger D, *et al.* Mechanically activated integrin switch controls $\alpha 5 \beta 1$ function. *Science*, 2009, **323**(5914): 642–644
- [34] Datta A, Huber F, Boettiger D, *et al.* Phosphorylation of $\beta 3$ integrin controls ligand binding strength. *J Biol Chem*, 2002, **277** (6): 3943–3949
- [35] Tapley P, Horwitz A, Buck C, *et al.* Integrins isolated from Rous sarcoma virus-transformed chicken embryo fibroblasts. *Oncogene*, 1989, **4**(3): 325–333
- [36] Salasnyk R M, Klees R F, Williams W A, *et al.* Focal adhesion kinase signaling pathways regulate the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res*, 2007, **313**(1): 22–37
- [37] Bouchard V, Harnois C, Demers M J, *et al.* B1 integrin/Fak/Src signaling in intestinal epithelial crypt cell survival: integration of complex regulatory mechanisms. *Apoptosis*, 2008, **13**(4): 531–542
- [38] Sawai H, Okada Y, Funahashi H, *et al.* Activation of focal adhesion kinase enhances the adhesion and invasion of pancreatic cancer cells *via* extracellular signal-regulated kinase-1/2 signaling pathway activation. *Molecular Cancer*, 2005, **4**: 37
- [39] Steelman L S, Chappell W H, Abrams S L, *et al.* Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *AGING*, 2011, **3**(3): 192–222

ECM Stiffness Regulates Integrin Activity *via* FAK-Raf Pathway in a Negative Feedback Manner*

DU Jing, ZU Yan, XU Yue, YANG Chun**

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

Abstract ECM stiffness has profound effects on cell migration, cell cycle, proliferation, differentiation, especially stem cell fate dictation. The underlying mechanism has not been elucidated so far. As a cell-adhesive protein, integrin is known as a mechanosensor positioned at the beginning of mechanotransduction. Our previous work demonstrates that ECM stiffness regulates the activity level and subcellular distribution of $\beta 1$ integrin. However, the mechanism of $\beta 1$ integrin activity regulation by ECM stiffness is still unclear. In the present paper, by using a monoclonal antibody specifically recognizing the active conformation of $\beta 1$ integrin, we observed that soft ECM significantly enhanced the level of active $\beta 1$ integrin in comparison of stiff ECM. Meanwhile, the activity of FAK-Raf-MEK-ERK was markedly promoted by stiff ECM. The inhibition of FAK-Raf pathway rescued the low activity level of $\beta 1$ integrin on stiff ECM, indicating that stiff ECM may inhibits $\beta 1$ integrin activity by FAK-Raf pathway in a negative feedback manner. In summary, we found a mechanism of the regulation of $\beta 1$ integrin activity and downstream signal by ECM stiffness and provide a cue for understanding the mechanosensing of ECM stiffness by cells.

Key words ECM stiffness, stem cell differentiation, integrin, FAK, negative feedback

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00406

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China(31170885, 31000418, 30870602).

**Corresponding author.

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

Received: March 18, 2014 Accepted: August 11, 2014