

## 细胞骨架结构改变对软骨细胞表型的影响

黄术, 杨君君, 吴江怡, 周益昭, 夏铎, 刘仁峰, 刘宝荣  
湖南省人民医院(湖南师范大学第一附属医院)关节外科, 湖南 长沙 410005

**【摘要】目的:**分析细胞骨架结构改变对软骨细胞表型的影响。**方法:**二维及三维微团培养兔膝关节软骨细胞,分别破坏软骨细胞骨架的微管、肌动蛋白及波形蛋白,分析细胞骨架改变引起软骨细胞表型改变的关系。**结果:**破坏软骨细胞骨架的波形蛋白,可引起Ⅱ型胶原蛋白及蛋白聚糖表达下降,且三维微团培养较二维培养下降更明显,而Ⅰ型胶原蛋白表达则无明显改变;破坏软骨细胞骨架的微管,不引起Ⅰ型胶原蛋白、Ⅱ型胶原蛋白及蛋白聚糖表达的改变;破坏软骨细胞骨架的肌动蛋白,在二维培养条件下可促进Ⅱ型胶原蛋白的表达,而在三维微团培养条件下,Ⅱ型胶原蛋白表达则无明显改变。**结论:**波形蛋白对维持正常软骨细胞表型起重要作用。

**【关键词】**软骨细胞;细胞骨架;二维培养;微团培养;软骨表型

**【中图分类号】**R318

**【文献标志码】**A

**【文章编号】**1005-202X(2017)12-1287-06

## Effects of cytoskeleton changes on chondrocyte phenotype

HUANG Shu, YANG Junjun, WU Jiangyi, ZHOU Yizhao, XIA Duo, LIU Renfeng, LIU Baorong

Department of Joint Surgery, Hunan Provincial People's Hospital (the First Affiliated Hospital of Hunan Normal University), Changsha 410005, China

**Abstract: Objective** To investigate the effects of the changes of cytoskeleton on chondrocyte phenotype. **Methods** Rabbit articular chondrocytes were cultures in two-dimensional (2D) monolayer and three-dimensional (3D) pellet. We disrupted the tubulin, actin and vimentin of the cytoskeleton of chondrocyte for analyzing the relationship between cytoskeleton changes and chondrocyte phenotype. **Results** The vimentin disruption of chondrocyte didn't cause any significant changes in the expression of type I collagen, but resulted in the decreased expression of type II collagen and aggrecan, and the decrease was greater for chondrocytes in 3D pellet culture than that in 2D monolayer culture. The tubulin disruption of chondrocyte showed little effects on the expression of type I collagen, type II collagen and aggrecan. The actin disruption of chondrocyte promoted the expression of type II collagen in chondrocyte in 2D monolayer culture not that in chondrocyte in 3D pellet culture. **Conclusion** Vimentin plays an important role in maintaining normal chondrocyte phenotype.

**Keywords:** chondrocyte; cytoskeleton; two-dimensional monolayer culture; pellet culture; chondrocyte phenotype

## 前言

关节软骨无血管及神经分布,细胞密度及代谢活性低,因此极小的损伤也不能自我修复,通常需要

外科手术进行干预<sup>[1-2]</sup>。细胞治疗是应用间充质干细胞(MSCs)或软骨细胞移植到缺损部位,从而产生功能性修复<sup>[3]</sup>。然而,这两种细胞的来源都有局限性:MSCs需要长时间的体外以获得足够数量的细胞,且在相同培养条件下较软骨细胞分泌更少的软骨基质;软骨细胞比MSCs在临床应用更广泛,但在体外扩增过程中去分化明显,失去正常软骨细胞表型,形成较差的纤维软骨<sup>[4-8]</sup>。因此,维持正常软骨细胞表型在很大程度上决定了植入细胞的修复功效<sup>[9]</sup>。有研究发现,软骨细胞在二维培养过程中会逐渐丧失正常软骨细胞表型,这是因为硬材料表面的二维培养促使细胞分散和增加肌动蛋白应力纤维的表达,使正常软骨细胞分化为成纤维细胞样软骨细胞<sup>[10]</sup>。

**【收稿日期】**2017-08-14

**【基金项目】**湖南省科技厅社会发展支撑计划(2015SK2047-1);长沙市科技计划项目(kq1701058);湖南师范大学临床医学院仁术科研发展基金(2015-15);重庆市博士后科研项目特别资助(Xm2016052)

**【作者简介】**黄术,博士,主治医师,研究方向:膝关节镜微创治疗、髌、膝人工关节置换,膝关节运动损伤基础及临床研究,E-mail: 9258024@qq.com

**【通信作者】**刘宝荣,教授,主任医师,研究方向:髌膝关节置换术、关节镜微创技术及肩关节外科等各类骨科疾病的治疗,E-mail: lbr9391@163.com

然而这种效应是可逆的,用细胞松弛素破坏肌动蛋白,可恢复软骨细胞的正常表型,这表明肌动蛋白在维持正常软骨细胞表型中起重要作用<sup>[11-12]</sup>。为了抑制软骨细胞增值中肌动蛋白应力纤维的形成,可采用其他的培养方法,包括高密度微团培养及细胞-水凝胶混合培养<sup>[13-14]</sup>。除了肌动蛋白,另一个主要的细胞骨架组分是波形蛋白中间丝,体外培养的软骨细胞在破坏波形蛋白后可导致II型胶原蛋白(COLII)和蛋白聚糖(GAG)合成减少,并且在原位的人和大鼠的骨关节炎软骨细胞中也观察到了波形蛋白水平的改变<sup>[15-17]</sup>。所有的这些研究表明细胞骨架与软骨细胞表型密切相关。然而,对单一的细胞骨架结构进行研究,很难分析每个主要细胞骨架组件(肌动蛋白、波形蛋白和微管蛋白)在相同培养条件下对软骨细胞表型的影响,因此需要在相同培养条件下系统分析细胞骨架结构改变对软骨细胞表型的影响。在本研究中,我们选择兔膝关节软骨细胞进行二维和三维微团培养,加入丙烯酰胺、秋水仙碱和细胞松弛素B分别破坏波形蛋白中间丝,微管蛋白微管和肌动蛋白微丝,通过组织学、免疫染色和RT-PCR分析软骨形成标志物GAG和COLII及纤维化标志物I型胶原蛋白(COLI)的表达差异,为软骨组织工程中的细胞修复提供思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 软骨细胞分离

软骨样品取自2月龄新西兰大白兔膝关节,所有操作由湖南省人民医院动物伦理委员会批准。取股骨髁软骨,1%青霉素/链霉素(P/S, Beyotime)的PBS洗3次,0.25%链霉蛋白酶E(Sigma)消化1 h,0.025%II型胶原酶(Sigma)消化9 h,40  $\mu$ m细胞过滤器(BD Falcon)过滤,离心后收集细胞重悬于10%胎牛血清(FBS, Hyclone)和1% P/S的高糖DMEM培养基(Hyclone)中,37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>孵箱培养,每2 d换液直至细胞长满90%后传代,以第1代(P1)软骨细胞为种子细胞。

### 1.2 软骨细胞二维及三维微团培养

二维培养:将 $1 \times 10^5$ 个P1软骨细胞用软骨诱导培养基重悬后接种在24孔板上;三维微团培养:将 $2.5 \times 10^5$ 个P1软骨细胞用软骨诱导培养基重悬加入15 mL离心管中,1 000 r/min离心5 min,拧松管盖。软骨诱导培养基含2% FBS、1% P/S、10 ng/mL TGF- $\beta$ 1(Peprotech)、100 nmol/L地塞米松(Sigma)、0.1 mmol/L抗坏血酸2-磷酸盐(Sigma)和1% ITS(Gibco)。将软骨细胞放于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>孵箱中培养,每3 d更换软骨诱导培养基。

### 1.3 药物处理

软骨诱导培养基培养7 d后,以后每隔2 d将10  $\mu$ mol/L细胞松弛素B(Sigma)或4 mmol/L 丙烯酰胺(Amresco)或2  $\mu$ mol/L秋水仙碱(Sigma)加入培养基中破坏波形蛋白中间丝、微管蛋白微管或肌动蛋白微丝。这些试剂及剂量来源参考文献,并通过细胞骨架荧光染色证实。药物处理7 d后,收集细胞用于后续分析,将药物处理后的波形蛋白、微管蛋白和肌动蛋白3组列为处理组,并与无药物处理的对照组进行比较。

### 1.4 组织学、免疫组织化学染色

H&E染色:按一般方案进行。阿尔辛蓝染色:3%冰醋酸平衡30 min,0.1%阿尔新蓝溶液(3%冰醋酸配制)染色30 min,3%冰醋酸洗3次,每次30 min。免疫组织化学染色:5%牛血清白蛋白(BSA, Sigma)封闭30 min,加入COL I或COL II(Bioss)多克隆一抗,4  $^{\circ}$ C孵育过夜,加入生物素化的二抗(Bioss)孵育30 min,再加入链霉亲和素-辣根过氧化物酶缀合物(Bioss)孵育30 min,DAB试剂盒(Bioss)中显色,Olympus BH2显微镜进行摄影。分别使用丙烯酰胺、秋水仙碱及细胞松弛素B处理波形蛋白、微管蛋白及肌动蛋白,并将未加入任何药物的组设为对照组。

### 1.5 RT-PCR

根据说明书用TRIzol(Invitrogen)提取总RNA,按逆转录试剂盒(QIAGEN)要求将RNA逆转录成cDNA。GAPDH作为内参,靶基因引物设计如下:COL1A1,正向:5'-GAGAAAGAGGCTTCCCTGGT-3,反向:5'-AGGAGAACCATCTCGTCCAG-3;COL2A1,正向:5'-ACACTGCCAACGTCCAGATC-3,反向:5'-GTGATGTTCTGGGAGCCCTC-3;聚集蛋白聚糖,正向:5'-ACTTCCGCTGGTCAGATGGA-3,反向:5'-TCTCGTGCCAGATCATCACC-3;GAPDH,正向:5'-GGTGAAGGTCGGAGTGAACG-3,反向:5'-AGTTAAAAGCAGCCCTGGTGA-3。使用QuantiTect SYBR Green PCR试剂盒(QIAGEN)在25  $\mu$ L反应体积中进行实时PCR。每个样本重复3次,用DDC<sub>T</sub>方法将mRNA水平标准化为GAPDH。对3组不同药物干扰组和空白对照组的COLI、COLII和GAG mRNA相对表达量进行比较。

### 1.6 统计学方法

所有数据表示为均数 $\pm$ 标准差,使用SPSS 18.0软件进行统计分析,非配对 $t$ 检验分析两组之间的差异, $P < 0.05$ 为具有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 细胞骨架免疫荧光染色

为了证实选择试剂及剂量对细胞骨架调节的有效性,二维培养的软骨细胞分别用药物处理3 d,使用免疫荧光染色分别显现3种细胞骨架组分波形蛋白、微管蛋白和肌动蛋白。与对照组相比,处理组中的细胞骨架组分较对照组显示出较弱染色强度(图1)。

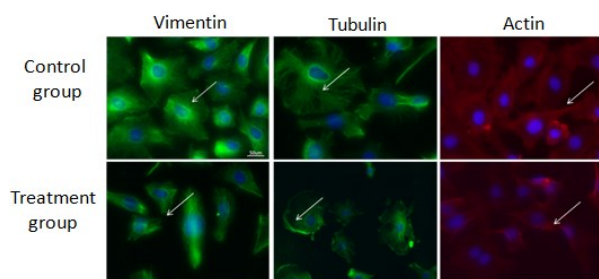


图1 软骨细胞组分免疫荧光染色(标尺:50  $\mu\text{m}$ )

Fig.1 Immunofluorescence staining of chondrocytes (scale bars: 50  $\mu\text{m}$ )

## 2.2 H&E染色和阿尔新蓝染色

在二维培养中,H&E染色结果显示,除了在丙烯酸酰胺处理组中细胞大小和细胞密度较低外,处理组具有与对照组相似的细胞形状和细胞分布。阿尔新蓝染色结果显示细胞松弛素B处理组中GAG的含量接近对照组,而丙烯酸酰胺处理组和秋水仙素处理组中的GAG含量较少(图2)。在三维微团培养中,H&E染色显示秋水仙碱处理组和细胞松弛素B处理组的细胞分布和基质沉积类似对照组,而丙烯酸酰胺处理组中观察到较少的细胞核和基质;阿尔新蓝染色显示与其他组相比,丙烯酸酰胺处理组中GAG含量较少(图3)。

## 2.3 免疫染色结果

在二维培养中,所有组的COLI染色较浅,COLII染色较深,而对照组和细胞松弛素B处理组的COLII

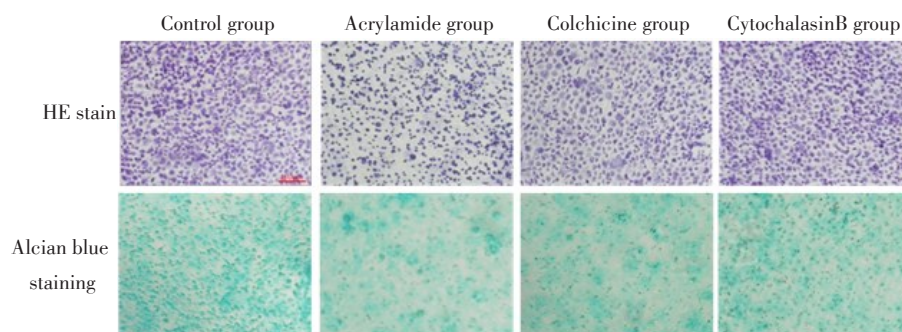


图2 二维培养各组软骨细胞H&E、阿尔新蓝染色(标尺:100  $\mu\text{m}$ )

Fig.2 HE staining and Alcian blue staining of chondrocytes in two-dimensional (2D) monolayer culture (scale bars: 100  $\mu\text{m}$ )

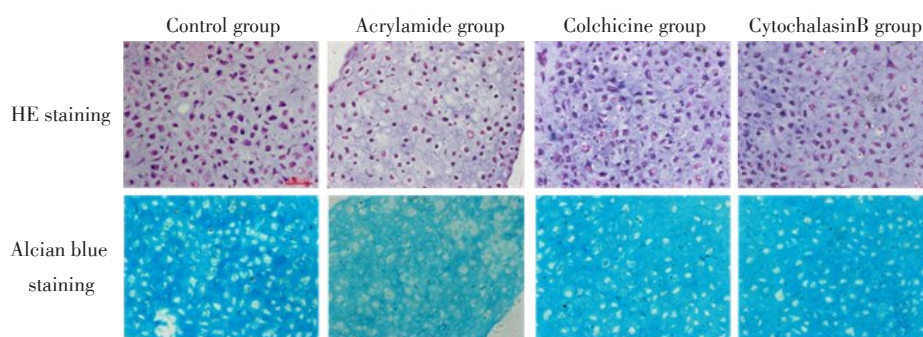


图3 三维微团培养各组软骨细胞H&E、阿尔新蓝染色(标尺:100  $\mu\text{m}$ )

Fig.3 HE staining and Alcian blue staining of chondrocytes in three-dimensional (3D) pellet culture (scale bars: 100  $\mu\text{m}$ )

染色比丙烯酸酰胺处理组和秋水仙碱处理组的更均匀(图4)。在三维微团培养中,所有组的COLI染色较浅,COLII染色较深,而丙烯酸酰胺处理组较其他组显示出较稀疏的COLII网络,染色较浅(图5)。

## 2.4 RT-PCR结果

在二维培养中,细胞松弛素B处理组COL1A1表

达下调,为 $(79 \pm 10)\%$  ( $P < 0.05$ ),而丙烯酸酰胺处理的COL2A1及ACAN的表达均出现下调,分别为 $(64 \pm 9)\%$ 及 $(75 \pm 13)\%$  ( $P < 0.05$ ),见图6;在三维微团培养中,则仅仅出现丙烯酸酰胺处理组中COL2A1下调,为 $(40 \pm 7)\%$  ( $P < 0.05$ ),见图7。



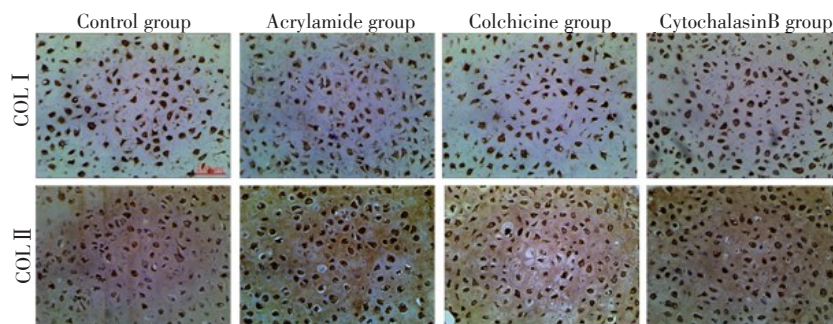
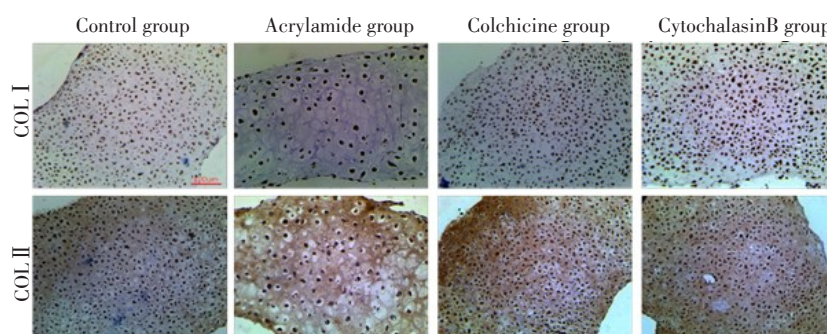
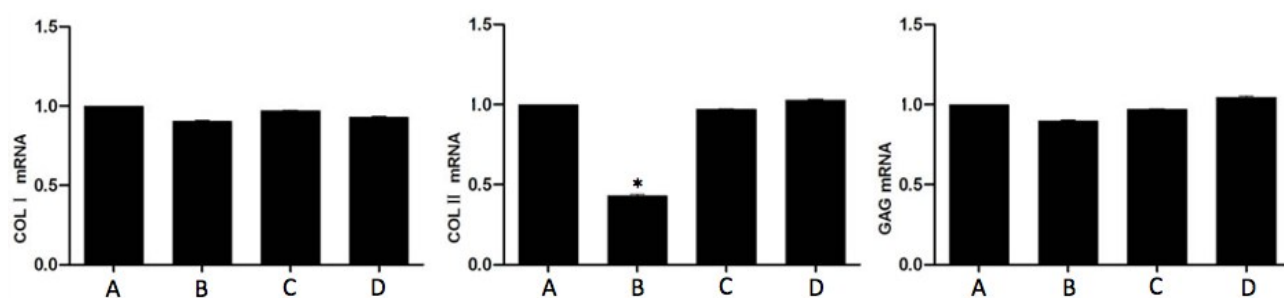
图4 二维培养各组软骨细胞免疫组化染色(标尺:100  $\mu\text{m}$ )Fig.4 Immunohistochemical staining of chondrocytes in 2D monolayer culture (scale bars: 100  $\mu\text{m}$ )图5 三维微团培养各组软骨细胞免疫组化染色(标尺:100  $\mu\text{m}$ )Fig.5 Immunohistochemical staining of chondrocytes in 3D pellet culture (scale bars: 100  $\mu\text{m}$ )A: Control group; B: Acrylamide group; C: Colchicine group; D: Cytochalasin B group; \*: Compared with control group,  $P < 0.05$ .

图6 二维培养各组软骨细胞 mRNA 表达

Fig.6 Expression of mRNA in chondrocytes in 2D monolayer culture

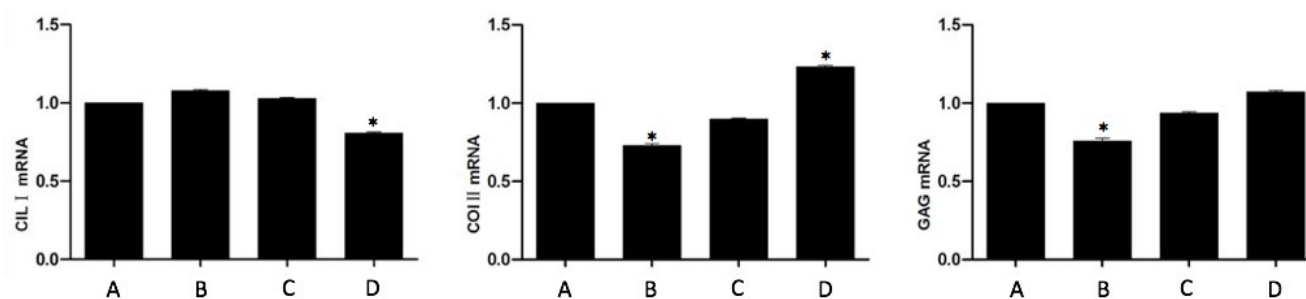
A: Control group; B: Acrylamide group; C: Colchicine group; D: Cytochalasin B group. \*: Compared with control group,  $P < 0.05$ .

图7 三维微团培养各组软骨细胞 mRNA 表达

Fig.7 Expression of mRNA in chondrocytes in 3D pellet culture

### 3 讨论

目前,损伤软骨组织的修复仍面临巨大的挑战。软骨细胞作为关节软骨内唯一的细胞,负责信号转导及维持软骨基质平衡<sup>[18]</sup>。因此,软骨细胞功能障碍会导致软骨基质的降解,诱发软骨退变<sup>[19-20]</sup>。细胞骨架在调节关节软骨细胞的机械性能以及生物学功能中起重要作用。有研究显示肌动蛋白微丝或波形蛋白中间丝的破坏会降低软骨细胞的刚度,而微管蛋白的破坏则不影响软骨细胞的刚度<sup>[21-22]</sup>。然而,细胞骨架改变对软骨细胞生物学功能,特别是对软骨基质合成的影响仍不清楚。早期研究表明破坏肌动蛋白或微管蛋白可导致COL II和GAG合成和分泌减少,破坏肌动蛋白应力纤维可导致COL II和GAG合成和分泌增加<sup>[23-26]</sup>。我们的研究发现破坏波形蛋白可引起COL II和GAG的合成减少,且三维微团培养比二维培养下降更明显;破坏微管蛋白,则对软骨细胞表型不产生影响;破坏肌动蛋白,抑制了COL I的表达,在二维培养中可促进COL II的表达,在三维微团培养中则无明显影响。

在本研究中,我们分别选取了丙烯酰胺、秋水仙碱和细胞松弛素B用于调节波形蛋白、微管蛋白和肌动蛋白细胞骨架,这些都是破坏特定细胞骨架组分而不影响其他细胞骨架组织的典型试剂,这些试剂的剂量是根据文献确定的<sup>[27-28]</sup>。在处理7 d后,与未处理的细胞相比,除了丙烯酰胺处理组的软骨细胞数目减少外,其他各组软骨细胞在形态和细胞数目没有表现出大的差异,这种现象与以前的研究一致,主要考虑为功能性波形蛋白网络的缺乏引起细胞的凋亡反应。H&E染色结果进一步证实,与其他各组中的软骨细胞相比,丙烯酰胺处理组的软骨细胞更圆,细胞与细胞之间缺乏连接。值得注意的是,在阿尔新蓝染色中,三维微团培养的细胞比二维培养的细胞染色强,表明三维微团培养更有利于GAG的形成。

为了评价软骨细胞去分化程度,我们进行了COL I(纤维化软骨的标记)及COL II(透明软骨的标记)的免疫组织化学染色。有趣的是,在所有组中均观察到类似的染色结果:细胞主要表达COL II而不是COL I,表明在软骨诱导培养基条件下,并没有引起软骨细胞去分化现象。此外,在三维微团培养中,各组COL II表达形成胶原网络,而在二维培养中,各组COL II表达彼此不连接,表明三维微团培养更有利于COL II的形成。

PT-PCR结果显示,COL1A1 mRNA表达下降仅

在二维培养中的细胞松弛素B处理组出现,这可能与二维培养中软骨细胞的应激纤维破坏有关。而在丙烯酰胺处理组中,COL2A1 mRNA表达出现了下降,且在三维微团培养中下降更明显,这可能是因为三维微团培养的软骨细胞中的波形蛋白网络更易受丙烯酰胺处理的影响。为证实这种猜测,需进一步研究波形蛋白结构的显微镜。GAG的表达,除了二维培养中丙烯酰胺处理组中的表达下降外,其他药物处理组与对照组之间并没有差异,这表明与胶原表达相比,细胞骨架的化学破坏对GAG的表达具有相对较小的影响。

综上所述,在软骨形成培养中,破坏波形蛋白可显著降低COL II表达,破坏微管蛋白则不影响软骨细胞表型,破坏肌动蛋白,在二维培养中可促进COL II表达及抑制COL I表达,而不影响三维微团培养中COL II及COL I表达。本研究结果表明完整的波形蛋白网络在维持软骨细胞表型方面发挥关键作用。

### 【参考文献】

- [1] HUBER M, TRATTNIG S, LINTNER F. Anatomy, biochemistry, and physiology of articular cartilage [J]. Invest Radiol, 2000, 35 (10): 573-580.
- [2] BROWNE J E, BRANCH T P. Surgical alternatives for treatment of articular cartilage lesions [J]. J Am Acad Orthop Surg, 2000, 8(3): 180-189.
- [3] MADEIRA C. Advanced cell therapies for articular cartilage regeneration [J]. Trends Biotechnol, 2015, 33(1): 35-42.
- [4] FREYRIA A M, MALLEIN-GERIN F. Chondrocytes or adult stem cells for cartilage repair: the indisputable role of growth factors [J]. Injury, 2012, 43(3): 259-265.
- [5] MAUCK R L, YUAN X, TUAN R S. Chondrogenic differentiation and functional maturation of bovine mesenchymal stem cells in long-term agarose culture [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2006, 14(2): 179-189.
- [6] HOLTZER H, ABBOTT J, LASH J, et al. The loss of phenotypic traits by differentiated cells *in vitro*, i. dedifferentiation of cartilage cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1960, 46(12): 1533-1542.
- [7] DARLING E M, ATHANASIOU K A. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations [J]. J Orthop Res, 2005, 23(2): 425-432.
- [8] DELL'ACCIO F, DE BARI C, LUYTEN F P. Molecular markers predictive of the capacity of expanded human articular chondrocytes to form stable cartilage *in vivo* [J]. Arthritis Rheum, 2001, 44(7): 1608-1619.
- [9] HUBKA K M. Enhancing chondrogenic phenotype for cartilage tissue engineering: monoculture and coculture of articular chondrocytes and mesenchymal stem cells [J]. Tissue Eng Part B Rev, 2014, 20(6): 641-654.
- [10] MALLEIN-GERIN F, GARRONE R, VAN DER REST M. Proteoglycan and collagen synthesis are correlated with actin organization in dedifferentiating chondrocytes [J]. Eur J Cell Biol, 1991, 56(2): 364-373.
- [11] BENYA P D, BROWN P D, PADILLA S R, et al. Microfilament

- modification by dihydrocytochalasin B causes retinoic acid-modulated chondrocytes to reexpress the differentiated collagen phenotype without a change in shape[J]. *J Cell Biol*, 1988, 106(1): 161-170.
- [12] LOTY S, FOREST N, BOULEKBACHE H, et al. Cytochalasin D induces changes in cell shape and promotes *in vitro* chondrogenesis: a morphological study[J]. *Biol Cell*, 1995, 83(2-3): 149-161.
- [13] GRECO K V, IQBAL A J, RATTAZZI L, et al. High density micromass cultures of a human chondrocyte cell line: a reliable assay system to reveal the modulatory functions of pharmacological agents [J]. *Biochem Pharmacol*, 2011, 82(12): 1919-1929.
- [14] SRIDHAR B V, BROCK J L, SILVER J S, et al. Development of a cellularly degradable PEG hydrogel to promote articular cartilage extracellular matrix deposition[J]. *Adv Healthc Mater*, 2015, 4(5): 702-713.
- [15] BLAIN E J, GILBERT S J, HAYES A J, et al. Disassembly of the vimentin cytoskeleton disrupts articular cartilage chondrocyte homeostasis[J]. *Matrix Biol*, 2006, 25(7): 398-408.
- [16] LAMBRECHT S, VERBRUGGEN G, VERDONK P C, et al. Differential proteome analysis of normal and osteoarthritic chondrocytes reveals distortion of vimentin network in osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008, 16(2): 163-173.
- [17] CAPIN-GUTIERREZ N, TALAMÁS-ROHANA P, GONZÁLEZ-ROBLES A, et al. Cytoskeleton disruption in chondrocytes from a rat osteoarthrosic (OA)-induced model: its potential role in OA pathogenesis[J]. *Histol Histopathol*, 2004, 19(4): 1125-1132.
- [18] CHEN C, TAMBE D T, DENG L, et al. Biomechanical properties and mechanobiology of the articular chondrocyte[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2013, 305(12): C1202-C1208.
- [19] BLAIN E J. Involvement of the cytoskeletal elements in articular cartilage homeostasis and pathology[J]. *Int J Exp Pathol*, 2009, 90(1): 1-15.
- [20] DURRANT L A, ARCHER C W, BENJAMIN M, et al. Organisation of the chondrocyte cytoskeleton and its response to changing mechanical conditions in organ culture[J]. *J Anat*, 1999, 194 (Pt 3): 343-353.
- [21] HAUDENSCHILD D R, CHEN J, PANG N, et al. Vimentin contributes to changes in chondrocyte stiffness in osteoarthritis[J]. *J Orthop Res*, 2011, 29(1): 20-25.
- [22] TRICKEY W R, VAIL T P, GUILAK F, et al. The role of the cytoskeleton in the viscoelastic properties of human articular chondrocytes[J]. *J Orthop Res*, 2004, 22(1): 131-139.
- [23] BODO M, CARINCI P, BARONI T, et al. Collagen synthesis and cell growth in chick embryo fibroblasts: influence of colchicine, cytochalasin B and concanavalin A[J]. *Cell Biol Int*, 1996, 20(3): 177-185.
- [24] LOHMANDER S, MADSEN K, HINEK A, et al. Secretion of proteoglycans by chondrocytes. Influence of colchicine, cytochalasin B, and beta-D-xyloside[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1979, 192(1): 148-157.
- [25] BENYA P D, PADILLA S R. Dihydrocytochalasin B enhances transforming growth factor-beta-induced reexpression of the differentiated chondrocyte phenotype without stimulation of collagen synthesis[J]. *Exp Cell Res*, 1993, 204(2): 268-277.
- [26] BROWN P D, BENYA P D. Alterations in chondrocyte cytoskeletal architecture during phenotypic modulation by retinoic acid and dihydrocytochalasin B-induced reexpression[J]. *J Cell Biol*, 1988, 106 (1): 171-179.
- [27] OFEK G, WILTZ D C, ATHANASIOU K A, et al. Contribution of the cytoskeleton to the compressive properties and recovery behavior of single cells[J]. *Biophys J*, 2009, 97(7): 1873-1882.
- [28] IRIGOYEN J P, BESSER D, NAGAMINE Y, et al. Cytoskeleton reorganization induces the urokinase-type plasminogen activator gene *via* the Ras/extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(3): 1904-1909.

(编辑:黄开颜)