

[文章编号] 1007-3949(2009)17-07-0589-02

• 研究论文摘要 •

PKA 介导的血管扩张刺激磷蛋白磷酸化对 细胞迁移的影响及其调控机制

张德玲, 欧阳静萍, 张亚辉, 张叶敏

(武汉大学医学院病理生理学教研室, 湖北省武汉市 430071)

[关键词] 细胞迁移; 激酶 A 锚定蛋白; PKA; 血管扩张刺激磷蛋白; ECV304

目的 血管扩张刺激磷蛋白 (VASP) 是 PKA 的重要作用底物, 它参与调节肌动蛋白丝的组装和集聚, 但血管扩张刺激磷蛋白

磷酸化在细胞移动中的确切作用及 PKA 如何将细胞外信号特异性传递到血管扩张刺激磷蛋白进而引起细胞迁移的具体调控机制尚不明确。本研究探讨激酶 A 锚定蛋白 (AKAPs) 对 PKA 信号转导的特异性调节作用, 并观察激酶 A 锚定蛋白家族成员 WAVE-1 对 PKA-VASP 通路的调控, 旨在明确血管扩张刺激磷蛋白对细胞迁移的确切机制。方法 建立血小板源性生长因子诱导 ECV304 细胞株迁移模型, 采用划痕迁移和跨膜迁移实验观察; 采用非放射性酶法和 western blot 检测各蛋白表达; 采用免疫荧光检测细胞内肌动蛋白骨架和 PKA、血管扩张刺激磷蛋白分布。血管扩张刺激磷蛋白 Ser157 磷酸化位点突变质粒及人 WAVE-1 基因重组质粒分别用脂质体转染 ECV304 细胞。经 G418 筛选, 建立人 WAVE-1 基因稳定过表达细胞株 (WAVE-1+)。结果 血小板源性生长因子诱导 ECV304 细胞发生明显迁移, 迁移细胞内 PKA 催化活性增强、血管扩张刺激磷蛋白 Ser157 磷酸化水平增高。将血管扩张刺激磷蛋白 Ser157 磷酸化位点突变后, 细胞迁移能力减弱; 使用 PKA 催化活性抑制剂 H-89 能显著降低 PKA 活性、减少血管扩张刺激磷蛋白 Ser157 磷酸化表达、抑制血小板源性生长因子诱导的细胞迁移。使用 AKAP-PKA 特异性结合抑制剂 St-H131 能阻断血小板源性生长因子诱导的 PKA 亚细胞定位改变, 也可降低 PKA 活性、血管扩张刺激磷蛋白 Ser157 磷酸化表达、抑制细胞迁移。此外, 血小板源性生长因子刺激细胞沿迁移方向伸出宽大片状伪足, 血管扩张刺激磷蛋白表达量增多, 聚集在片状伪足前缘。预先用 St-H131 处理后再用血小板源性生长因子刺激细胞, 细胞内没有片状伪足形成, 血管扩张刺激磷蛋白呈现散在分布。(2) WAVE-1+ 细胞株内 PKA 活性和血管扩张刺激磷蛋白磷酸化水平皆对应高于对照细胞, 使用 St-H131 后则使两者表达量都明显降低; WAVE-1+ 细胞内 PKA 亚细胞定位发生明显改变, PKA 由广泛性散在分布转为普遍聚集在核膜周围, 呈现明显的“指环状”分布。结论 PKA 介导的血管扩张刺激磷蛋白 Ser157 磷酸化正向调控 ECV304 细胞迁移; AKAP 通过对 PKA 的结合调节 PKA 活性和血管扩张刺激磷蛋白磷酸化, 从而调控细胞迁移。其中, WAVE-1 过度表达增强 PKA 活性和血管扩张刺激磷蛋白磷酸化、改变 PKA 亚细胞定位, WAVE-1 可能是调节 PKA-血管扩张刺激磷蛋白信号通路的关键蛋白。

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (30470680) 及 (30270531)

[作者简介] 张德玲, 博士, 主要从事心血管分子病理生理学研究。通讯作者欧阳静萍, 教授, 主要从事糖尿病及心血管病理生理研究, 联系电话为 027-68759846。

(此文编辑 李小玲)