

[文章编号] 1007-3949(2010)18-02-0117-04

• 实验研究 •

# 血管紧张素Ⅱ对血管内皮细胞骨架的损伤作用

刘敬, 杨丹, 李汇华

(中国医学科学院基础医学研究所 北京协和医学院基础学院, 北京市 100005)

[关键词] 血管紧张素Ⅱ 纤维状肌动蛋白; 丝裂原活化蛋白激酶

[摘要] 目的 探讨血管紧张素Ⅱ对内皮细胞肌动蛋白骨架的影响及其作用机制。方法 血管紧张素Ⅱ( $10^{-6}$  mol/L)处理人脐静脉内皮细胞不同时间(0、5、15、30及60 min)。激光共聚焦显微镜下观察细胞纤维状肌动蛋白骨架的形态学变化。Western blotting检测丝裂原活化蛋白激酶磷酸化水平。结果 正常组内皮细胞的纤维状肌动蛋白主要富集于细胞膜周边, 分布均匀。血管紧张素Ⅱ处理组细胞膜周边的纤维状肌动蛋白消失, 胞浆中出现密集的应力纤维, 细胞间隙形成, 且呈明显的时间依赖性。血管紧张素Ⅱ上调 p38丝裂原活化蛋白激酶、c-Jun氨基末端激酶和热休克蛋白 27的磷酸化水平, 但对细胞外信号调节激酶无明显影响。p38丝裂原活化蛋白激酶特异性抑制剂 SB203580阻断血管紧张素Ⅱ引起的纤维状肌动蛋白重排和细胞间隙形成。c-Jun氨基末端激酶特异性抑制剂 SP600125则无明显作用。结论 血管紧张素Ⅱ通过激活 p38丝裂原活化蛋白激酶/热休克蛋白 27信号通路引起内皮细胞的纤维状肌动蛋白重排, 导致细胞骨架损伤。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## The Destructive Effect of Angiotensin Ⅱ on Cytoskeleton of Vascular Endothelial Cells

LIU Jing, YANG Dan, and LI Hu Hua

(Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences &amp; Peking Union Medical College, Beijing 100005, China)

[KEY WORDS] Angiotensin Ⅱ; Filamentous Actin; Mitogen-Activated Protein Kinase

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of angiotensin Ⅱ (Ang Ⅱ) on cytoskeleton rearrangement of endothelial cells and the mechanisms within it. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were treated with Ang Ⅱ ( $10^{-6}$  mol/L) for different time points. The morphological images of filamentous actin (F-actin) cytoskeleton were observed with confocal laser scanning microscope. The phosphorylated protein expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK) was tested by Western blotting. **Results** F-actin was mainly enriched along the cell membrane, and well distributed in normal HUVEC. After treatment with Ang Ⅱ, most of the peripheral fibers disappeared, dense stress fibers were observed in the cytoplasm and paracellular gaps formed in a time-dependent manner. Ang Ⅱ increased the phosphorylation of p38 MAPK, JNK1/2 and HSP27, but not ERK1/2. Furthermore, SB203580 (a p38 MAPK specific inhibitor) completely attenuated Ang Ⅱ-induced formation of actin stress fibers and paracellular gaps. In contrast, SP600125 (a JNK1/2 specific inhibitor) had no effect on these responses. **Conclusion** Ang Ⅱ induces F-actin rearrangement in HUVEC through the activation of p38 MAPK/HSP27 pathway, which results in cytoskeletal damage.

内皮细胞在维持正常的血管屏障功能中起着重要的作用, 细胞纤维状肌动蛋白 (filamentous actin, F-actin) 骨架的重排与病理性血管通透性增加密切相关<sup>[1]</sup>。血管紧张素Ⅱ (angiotensin Ⅱ, Ang Ⅱ) 是肾素-血管紧张素系统中具有显著缩血管功能的生长因子, 对内皮细胞具有多种效应, 如促使其产生活性氧, 激活凋亡信号通路以及增加内皮通透性, 这在破坏内皮屏障功能中具有重要作用<sup>[2, 3]</sup>。丝裂原

活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 主要包括 p38丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK)、细胞外信号调节激酶 (extracellular signal regulated protein kinase, ERK1/2) 和 c-Jun氨基末端激酶 (c-Jun aminoterminal kinase, JNK1/2)。其中 p38 MAPK 通路对内皮细胞损伤和血管通透性关系密切<sup>[4]</sup>。已证实热休克蛋白 27 (heat shock protein 27, HSP27) 是应力纤维形成的重要调节因子<sup>[5]</sup>。Ang Ⅱ调节内皮细胞 F-actin 重排, 导致应力纤维形成的分子机制尚未明确。本研究探讨 MAPK 信号通路在 Ang Ⅱ引起内皮细胞 F-actin 重排中的作用, 为有效保护血管内皮屏障功能提供理论依据。

[收稿日期] 2009-12-29 [修回日期] 2010-02-05

[作者简介] 刘敬, 硕士, 主要研究方向为动脉粥样硬化的发病机制及防治, E-mail为 liujing\_dina@163.com。杨丹, 博士, 主要研究方向为动脉粥样硬化发病机制的研究, E-mail为 yangdan0226@yahoo.com.cn。李汇华, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为心肌梗死和动脉粥样硬化的发病机制及防治, E-mail为 hhlil935@yahoo.cn。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂

Ang $\text{①}$ 和 SP600125 (Sigma 公司); SB203580 (Calbiochem 公司); F-actin Visualization Biochem Kit<sup>TM</sup> (Cytoskeleton 公司); DAPI 染色剂 (碧云天公司); antiERK1/2, anti-phospho-ERK1/2, anti-p38, anti-phospho-p38, anti-JNK1/2, anti-phospho-JNK1/2, antiHSP27, anti-phospho-HSP27, anti- $\beta$ -actin 和 HRP 标记抗鼠、兔 IgG (Cell Signaling Technology 公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒和 Western 发光试剂盒 (Pierce 公司)。

### 1.2 细胞培养和处理方法

人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 购于 Sciencell 公司, 在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养于 ECM 完全培养基中, 胰酶消化传代<sup>[6]</sup>, 取第 3~6 代细胞用于实验。采用无血清 ECM 培养基培养 12 h 使细胞进入静止期后进行实验。Ang $\text{①}$ 处理组用 Ang $\text{①}$  (10<sup>-6</sup> mol/L) 刺激 5、15、30 及 60 min, 抑制剂组分别用 p38 MAPK 特异性抑制剂 SB203580 (10  $\mu$ mol/L)、JNK1/2 特异性抑制剂 SP600125 (20  $\mu$ mol/L) 预处理细胞 30 min 后, 再用 Ang $\text{①}$  (10<sup>-6</sup> mol/L) 刺激细胞 15 min, 以不加任何刺激的 ECM 培养为正常对照组。

### 1.3 细胞骨架纤维状肌动蛋白的荧光染色

参照 F-actin 荧光染色试剂盒说明, HUVEC 接种于 12 × 12 mm<sup>2</sup> 无菌盖玻片上, 对处理后的细胞进行固定、穿透、罗丹明标记的鬼笔环肽避光染色, 最后 DAPI 复染细胞核, 在激光共聚焦显微镜下观察。每高倍视野 (×400) 下, 取 3~5 个视野进行观察。

### 1.4 Western blotting 检测丝裂原活化蛋白激酶和热休克蛋白 27 蛋白表达水平

弃去 ECM 培养基后, 用 PBS 洗细胞 2 遍, 然后每培养皿加入适量细胞裂解缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 1% NP-40, 150 mmol/L 氯化钠, 1 mmol/L PMSF 和蛋白酶抑制剂), 冰上裂解 30 min 后收集蛋白。采用 BCA 法测定细胞裂解液中蛋白浓度。每个样本取等量的总蛋白, 加入适量的 5 × 上样缓冲液, 进行 10% SDS-PAGE 电泳, 将蛋白电转到硝基纤维素膜上, 然后分别用合适的一抗和二抗杂交, ECL 发光法检测, 使用 Alpha FluorChem SP 化学发光成像仪 (美国 Alpha Innotech 公司) 记录实验结果<sup>[7]</sup>。Gelpro 4.5 软件分析蛋白条带。

### 1.5 图像分析

经罗丹明染色的内皮细胞单层在物镜 40/1.25

的激光共聚焦显微镜下观察。16 位图像应用 MetaVue 4.6 软件进行分析, 基于图像灰度水平, 图像被分割成细胞间裂隙的暗区以及分布有细胞的亮区。细胞间裂隙面积占图像总面积的比值用于比较组间细胞间裂隙形成的差异<sup>[8]</sup>。

### 1.6 统计学分析

数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间均数比较用 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 血管紧张素 ①对内皮细胞骨架纤维状肌动蛋白的影响

对照组 HUVEC 的 F-actin 主要富集于细胞膜的周边, 胞浆中未见密集的应力纤维; Ang $\text{①}$ 处理后细胞膜周边的 F-actin 逐渐消失, 胞浆中逐渐出现密集、紊乱的应力纤维, 细胞间隙增加, 呈时间依赖性 (图 1 和表 1)。

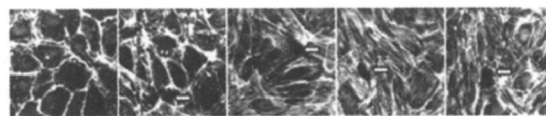


图 1 荧光染色观察血管紧张素 ①对纤维状肌动蛋白的影响 (×200) 从左至右分别为 0、5、15、30 及 60 min。

表 1 细胞间裂隙面积占图像总面积的比值 ( $\bar{x} \pm s$ , *n* = 5)

Ang $\text{①}$ 处理时间 (min)	细胞间裂隙面积 占图像总面积的比值
0	0.54% $\pm$ 0.01%
5	5.13% $\pm$ 0.12%
15	12.55% $\pm$ 0.14% <sup>a</sup>
30	13.67% $\pm$ 0.12% <sup>a</sup>
60	16.78% $\pm$ 0.09% <sup>a</sup>

<sup>a</sup>为 *P* < 0.05 与对照组 (0 min) 比较。

### 2.2 血管紧张素 ①对丝裂原活化蛋白激酶通路蛋白磷酸化水平的影响

Ang $\text{①}$ 处理组中 p38 MAPK、JNK1/2 和 HSP27 的磷酸化水平上调, 其中 p38 和 HSP27 在刺激 15 min 时其磷酸化水平达最大值, 并且维持到 60 min, 而 JNK1/2 的磷酸化水平在 15 min 达到峰值后随即下降到基础水平。但是, Ang $\text{①}$ 对 ERK1/2 的磷酸化水平则无显著影响 (图 2 和表 2)。

表 2 血管紧张素Ⅱ刺激后丝裂原活化蛋白激酶和热休克蛋白 27 的蛋白表达水平 ( $\bar{x} \pm s$   $n=5$ )

AngⅡ 处理 (min)	p-p38 MAPK	p38 MAPK	p-JNK 1/2	JNK 1/2	p-ERK 1/2	ERK 1/2	p-HSP27	HSP27
0	18.32 ± 0.11	67.64 ± 0.12	19.14 ± 0.10	66.76 ± 0.13	60.03 ± 0.14	102.23 ± 0.15	23.87 ± 0.14	64.47 ± 0.12
5	34.06 ± 0.04	67.78 ± 0.09	35.13 ± 0.12	67.11 ± 0.11	58.83 ± 0.12	105.14 ± 0.09	42.44 ± 0.09	64.33 ± 0.09
15	48.89 ± 0.12 <sup>a</sup>	69.34 ± 0.12	49.56 ± 0.10 <sup>a</sup>	65.12 ± 0.18	59.32 ± 0.13	99.08 ± 0.18	60.12 ± 0.12 <sup>a</sup>	62.18 ± 0.12
30	46.56 ± 0.11 <sup>a</sup>	65.25 ± 0.08	19.03 ± 0.17	68.12 ± 0.06	60.82 ± 0.09	103.87 ± 0.14	61.09 ± 0.13 <sup>a</sup>	65.09 ± 0.14
60	43.24 ± 0.12 <sup>a</sup>	66.31 ± 0.15	19.55 ± 0.11	69.01 ± 0.09	63.09 ± 0.14	100.02 ± 0.12	59.07 ± 0.12 <sup>a</sup>	62.18 ± 0.13

a为  $P < 0.05$  与对照组 (0 min) 比较。

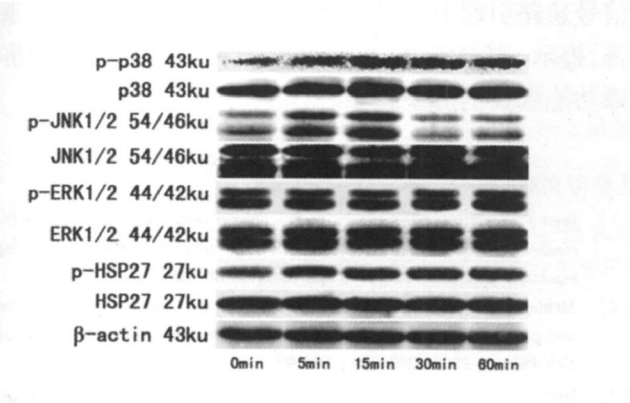


图 2 Western blotting检测血管紧张素Ⅱ刺激后丝裂原活化蛋白激酶和热休克蛋白 27 的蛋白表达水平

2.3 丝裂原活化蛋白激酶通路在血管紧张素Ⅱ诱导纤维状肌动蛋白细胞骨架改变中的作用

SB203580抑制剂组细胞内未见明显的应力纤维以及细胞间隙 (图 3C 和表 3); p38 MAPK 和 HSP27 磷酸化水平较 AngⅡ组下调 (图 4 和表 4)。SP600125抑制剂组仍可见细胞内应力纤维和细胞间隙 (图 3D 和表 3); JNK 1/2 磷酸化水平较 AngⅡ组下调, 而 HSP27 磷酸化水平与 AngⅡ组相比无显

著差异 (图 5 和表 5)。

表 3 细胞间隙面积占图像总面积的比值 ( $\bar{x} \pm s$   $n=5$ )

分组	细胞间隙面积 占图像总面积的比值
对照组	0.49% ± 0.09%
AngⅡ组	12.98% ± 0.13% <sup>a</sup>
SB203580 + AngⅡ组	1.63% ± 0.19% <sup>b</sup>
SP600125 + AngⅡ组	12.25% ± 0.15%

a为  $P < 0.05$  与对照组比较; b为  $P < 0.05$  与 AngⅡ组比较。

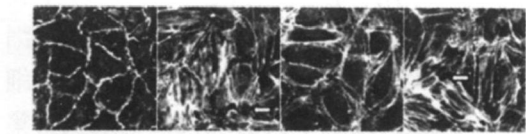


图 3 SB203580 和 SP600125 对血管紧张素Ⅱ诱导纤维状肌动蛋白骨架重排的影响 ( $\times 200$ ) 从左至右分别为对照组、AngⅡ组、SB203580 + AngⅡ组和 SP600125 + AngⅡ组。

表 4 SB203580 对血管紧张素Ⅱ诱导的 p38 丝裂原活化蛋白激酶和热休克蛋白 27 磷酸化水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$   $n=5$ )

分组	p-p38 MAPK	p38 MAPK	p-HSP27	HSP27
对照组	10.47 ± 0.19	52.28 ± 0.11	15.88 ± 0.16	63.29 ± 0.13
AngⅡ组	31.57 ± 0.12 <sup>a</sup>	54.22 ± 0.09	45.28 ± 0.14 <sup>a</sup>	65.39 ± 0.08
SB203580 + AngⅡ组	14.50 ± 0.17 <sup>b</sup>	50.78 ± 0.14	16.58 ± 0.13 <sup>b</sup>	60.19 ± 0.18

a为  $P < 0.05$  与对照组比较; b为  $P < 0.05$  与 AngⅡ组比较。

表 5 SP600125 对血管紧张素Ⅱ诱导的 c-Jun 氨基末端激酶和热休克蛋白 27 磷酸化水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$   $n=5$ )

分组	p-JNK 1/2	JNK 1/2	p-HSP27	HSP27
对照组	17.26 ± 0.14	55.78 ± 0.12	18.45 ± 0.11	56.19 ± 0.09
AngⅡ组	49.58 ± 0.11 <sup>a</sup>	57.29 ± 0.10	53.98 ± 0.09 <sup>a</sup>	55.91 ± 0.15
SP600125 + AngⅡ组	17.99 ± 0.13 <sup>b</sup>	56.29 ± 0.16	52.96 ± 0.11	54.15 ± 0.12

a为  $P < 0.05$  与对照组比较; b为  $P < 0.05$  与 AngⅡ组比较。

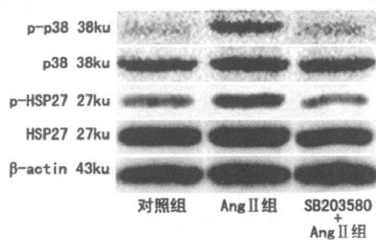


图 4. SB203580 对血管紧张素 II 诱导的 p38 丝裂原活化蛋白激酶和热休克蛋白 27 磷酸化水平的影响

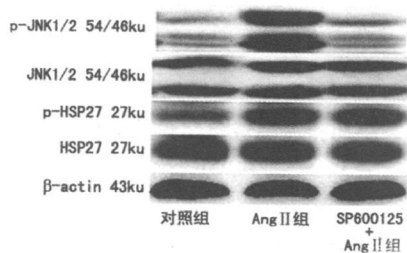


图 5. SP600125 对血管紧张素 II 诱导的 c-Jun 氨基末端激酶和热休克蛋白 27 磷酸化水平的影响

### 3 讨论

内皮细胞骨架在维持细胞的正常形态以及完整性方面起着重要作用。在生理状态下, F-actin 主要分布于细胞外周, 维持着细胞的正常形态; 当内皮细胞受到各种刺激时, F-actin 发生重组和再分布, 细胞周边 actin 环断裂, 细胞中央出现大量呈束状密集排列的应力纤维, 这时细胞中心张力增加使细胞逐渐收缩, 细胞间隙增大、增多, 最终导致血管通透性升高<sup>[9-11]</sup>。本研究发现, Ang<sup>⊕</sup>刺激后, 细胞周边的 F-actin 逐渐消失, 胞浆中出现密集的束状应力纤维, 细胞间隙也随之增加。

MAPK 是细胞中的一类丝/苏氨酸蛋白激酶, 是多种信号转导通路的交汇点, 调控多种生物学功能。据报道, 百日咳毒素和 TNF- $\alpha$  可通过激活内皮细胞 p38 MAPK 活性, 促进应力纤维形成, 导致血管通透性增加<sup>[12-14]</sup>。本研究结果发现, Ang<sup>⊕</sup>可磷酸化激活 p38 MAPK 和 JNK1/2 在 15 min 时磷酸化水平达最大值, 值得注意的是, HSP27 磷酸化激活过程与 p38 MAPK 相同, 也在 15 min 时达最大水平, 且持续到 60 min。已经证实在应激条件下活化的 p38 MAPK 能够磷酸化激活 HSP27。HSP27 是应力纤维形成的重要调节因子, 磷酸化的 HSP27 稳定 F-actin, 促进肌动蛋白多聚化, 进而导致应力纤维形

成<sup>[13]</sup>。本研究中, Ang<sup>⊕</sup>诱导的应力纤维形成可被 SB203580 阻断, 并且 SB203580 也有效抑制 Ang<sup>⊕</sup>引起的 p38 MAPK 及 HSP27 磷酸化水平增加; 而 JNK1/2 特异性抑制剂 SP600125 虽有效抑制 Ang<sup>⊕</sup>引起的 JNK1/2 磷酸化水平的增加, 但并未改变 HSP27 的磷酸化水平, 也没有阻断应力纤维的形成。提示 p38 MAPK 和 HSP27 的激活是 Ang<sup>⊕</sup>诱导 HU-VEC 细胞骨架 F-actin 重排所必需的。

综上所述, Ang<sup>⊕</sup>通过激活 p38 MAPK/HSP27 信号通路引起 HUVEC 细胞骨架肌动蛋白 F-actin 重排, 提示 p38 MAPK 和 HSP27 可能成为内皮细胞屏障功能保护的分子靶点。

### [参考文献]

- [1] Brett J, Gerlach H, Nawroth P, et al. Tumor necrosis factor/cachectin increases permeability of endothelial cell monolayers by a mechanism involving regulatory G proteins [J]. *J Exp Med* 1989; **169** (6): 1977-991.
- [2] Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin  $\text{⊕}$  cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system [J]. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; **292** (1): C82-97.
- [3] Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, et al. Inflammation and angiotensin  $\text{⊕}$  [J]. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; **35** (6): 881-900.
- [4] Elion EA. Routing MAP kinase cascades [J]. *Science* 1998; **281** (5383): 1625-626.
- [5] Landry J, Huot J. Modulation of actin dynamics during stress and physiological stimulation by a signaling pathway involving p38 MAP kinase and heat-shock protein 27 [J]. *Biochem Cell Biol* 1995; **73** (9-10): 703-707.
- [6] Yang D, Guo S, Zhang T, et al. Hypothermia attenuates ischemia/reperfusion-induced endothelial cell apoptosis via alterations in apoptotic pathways and JNK signaling [J]. *FEBS Lett* 2009; **583** (15): 2500-506.
- [7] 范永娜, 谢平, 张华, 等. 佛波酯通过抑制蛋白激酶 B 活性诱导血管平滑肌细胞凋亡 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008; **16** (11): 853-856.
- [8] Binkova AA, Alekseeva E, Cokic I, et al. Cross talk between paxillin and Rac is critical for mediation of barrier-protective effects by oxidized phospholipids [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; **295** (4): L593-602.
- [9] 徐国恒. 细胞骨架-肌动蛋白纤维 [J]. *生物学通报*, 2005; **40** (2): 43.
- [10] Fleming JR, Fisslthaler B, Busse R. Calcium signaling in endothelial cells involves activation of tyrosine kinases and leads to activation of mitogen-activated protein kinase [J]. *Circ Res* 1995; **76**: 522-529.
- [11] Dudek SM, Garcia JN. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability [J]. *J Appl Physiol* 2001; **91**: 1487-500.
- [12] Garcia JG, Wang P, Schaphorst KL, et al. Critical involvement of p38 MAP kinase in pertussis toxin-induced cytoskeletal reorganization and lung permeability [J]. *FASEB J* 2002; **16** (9): 1064-076.
- [13] Kiemer AK, Weber NC, Furst R, et al. Inhibition of p38 MAPK activation via induction of MKP-1: atrial natriuretic peptide reduces TNF- $\alpha$ -induced actin polymerization and endothelial permeability [J]. *Circ Res* 2002; **90** (8): 874-881.
- [14] Petrache I, Binkova A, Ramirez SI, et al. The role of the microtubules in tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced endothelial cell permeability [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; **28** (5): 574-581.

(此文编辑 文玉珊)