

[文章编号] 1007-3949(2010)18-10-0795-04

• 实验研究 •

盐酸法舒地尔对血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 诱导的人脐静脉内皮细胞骨架损伤的保护作用

王高频, 杨雪佳, 王继红, 马海芳, 刘国奎

(辽宁医学院附属第一医院心血管内科, 辽宁省锦州市 121001)

[关键词] 动脉粥样硬化; 血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$; 人脐静脉内皮细胞; 细胞骨架; Rho激酶

[摘要] 目的 探讨盐酸法舒地尔对血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 诱导的人脐静脉内皮细胞 Rho激酶和肌球蛋白轻链磷酸化表达的影响。方法 体外培养人脐静脉内皮细胞, 并将其分为对照组、血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 组、特异性阻断剂组(Y-27632)和盐酸法舒地尔组, MTT法观察血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 对细胞活力的影响; 免疫荧光法观察各组细胞骨架肌动蛋白 F-actin 形态及分布的变化, Western Blotting 法测定内皮细胞 Rho激酶和磷酸化肌球蛋白轻链的表达。结果 与对照组相比, 血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 对内皮细胞活力有明显抑制作用($P < 0.01$), Rho激酶特异性阻断剂和盐酸法舒地尔能明显减弱血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 对内皮细胞活力的抑制作用($P < 0.01$)。与对照组相比, 血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 组内皮细胞 F-actin 形态学发生明显的改变, 细胞间裂隙增大。与血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 组比较, Rho激酶阻断剂和盐酸法舒地尔组均可使 Rho激酶蛋白表达降低($P < 0.01$), 但仍高于对照组($P < 0.01$)。结论 盐酸法舒地尔对血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 诱导的人脐静脉内皮细胞的保护作用是通过抑制 Rho/Rho激酶信号通路中 Rho激酶和磷酸化肌球蛋白轻链蛋白的表达, 以减弱血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 对内皮细胞骨架的损伤。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Protective Effect of Fasudil Hydrochloride on Cytoskeleton of Human Umbilical Vein Endothelial Cells Injury Induced by Angiotensin $\text{Ang}(\text{I})$ in Vitro

WANG Gao-Pin, YANG Xue-Jia, WANG Ji-Hong, MA Hai-Fang and LIU Guo-Luan

(Department of Cardiovascular Disease, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Angiotensin $\text{Ang}(\text{I})$; Human Umbilical Vein Endothelial Cells; Cytoskeleton; Rho-associated Coiled-Coil Threonine Kinase

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of fasudil hydrochloride on the injury of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) induced by angiotensin $\text{Ang}(\text{I})$ ($\text{Ang}(\text{I})$) which influence on the expression of Rho associated kinase (ROCK) and phosphomyosin light chain (P-MLC). **Methods** HUVEC were incubated in vitro and treated with $\text{Ang}(\text{I})$, $\text{Ang}(\text{I})$ + specific blocker (Y-27632), $\text{Ang}(\text{I})$ + fasudil hydrochloride for different time. Cell activities were detected by MTT method. Morphous and distribution changes of F-actin were observed by immunofluorescence, expression of ROCK and P-MLC were measured by Western Blotting. **Results** Compared with control group, $\text{Ang}(\text{I})$ had significant inhibitory effect on endothelial cells vigor ($P < 0.01$), furthermore, these effects were dose-dependent ($P < 0.01$) in the other three groups. Morphous and distribution changes of F-actin by immunofluorescence compared with control group, the rupture of stress fibers constructed by F-actin, deformation and digitation of HUVEC were exhibited. Compared with $\text{Ang}(\text{I})$ group, expression of ROCK and P-MLC in the specific blocker group and the drug group were remarkably restrained ($P < 0.01$), but higher than the control group ($P < 0.01$). **Conclusion** Fasudil hydrochloride can protect the cytoskeletal of HUVEC which were induced by $\text{Ang}(\text{I})$, through obviously controlling the expression of ROCK and P-MLC in the Rho/Rho kinase signaling pathways, thus weakened the damage in cytoskeletal.

动脉粥样硬化 (As) 发生机制十分复杂, 现有多种学说, 而内皮的损伤几乎贯穿各个学说之中, 被认为是 As 发生的始动环节。血管内皮细胞 (endothelial cell, EC) 功能的发挥依赖于完整的细胞骨架。当外源性因子作用于内皮细胞骨架, 引起内皮细胞

收缩, 细胞表面黏附分子表达减少, 内皮屏障功能降低, 血液内大分子物质渗入内皮下间隙, 导致 As 发生^[1]。Rho 是一种小分子 G 蛋白, 在细胞的信号转导通路中作为信号转换器或分子开关, 在细胞骨架调节、细胞形态维持、细胞迁移、平滑肌细胞收缩等细胞活动中有重要作用。盐酸法舒地尔是一种 Rho 激酶抑制剂, 在临床研究中许多心血管疾病有效, 如脑动脉和冠状动脉痉挛、心绞痛等, 且具有可靠的安全性^[2]。本研究拟观察盐酸法舒地尔对血管紧

[收稿日期] 2010-08-25 [修回日期] 2010-10-16

[作者简介] 王高频, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化的防治及心律失常诊治的研究。杨雪佳, 硕士, 主要从事动脉粥样硬化的研究, E-mail: yangxuejia2781938@163.com。

张素 \oplus (Ang \oplus)诱导的人脐静脉内皮细胞(HU-VEC)各组细胞骨架肌动蛋白形态及分布的变化,以及Rho激酶(Rho-associated coiled-coil threonine kinase, ROCK)和磷酸化肌球蛋白轻链(phosphomyosin light chain, PMLC)蛋白表达的影响。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及药品

健康产妇正常分娩新生儿脐带,标本取自锦州妇婴医院产科(征得患者同意);DMEM/F12(1:1)培养基(Hyclone公司);胶原酶 \oplus 型、胰酶、EDTA、Ang \oplus 和Y-27632(Sigma公司);盐酸法舒地尔(天津红日药业有限公司);进口血清(Hyclone);细胞生长因子(PEPROTECH公司);MTT(大连宝生物公司);DM SO (Solarbio公司);Rho激酶鼠抗人抗体(上海晶天); α 因子鼠抗人抗体、 β -actin鼠抗人单克隆抗体和PMLC单克隆抗体(Cell Signaling公司)。

1.2 原代人脐静脉内皮细胞培养、传代

无菌条件下,取新生儿脐带,剪去钳痕、血肿、凝血块阻塞部分,用37℃预热的10倍双抗的PBS将静脉内残余血冲洗干净。注入0.2%胶原酶 \oplus 充分消化脐静脉内皮,置37℃培养箱中孵育15 min,收集脐静脉内的消化液,然后注入含10%胎牛血清的DMEM/F12(1:1)培养基终止消化再次冲洗管腔,将消化液与冲洗液一并收集于离心管,1 000 r/min离心10 min,弃上清,加入完全培养液,用吹打管吹打均匀,按 1×10^6 个接种于培养瓶,置于5% CO₂、37℃培养箱中培养。待1周左右,细胞生长成单层细胞后,弃去培养瓶中的培养液,然后加入0.25%胰蛋白酶-0.02% EDTA混合消化液消化、传代培养,经 α 因子抗体免疫组织化学鉴定为血管内皮细胞后3~5代用于实验。

1.3 实验分组与处理

收集对数生长期的内皮细胞,以每孔 5×10^5 个细胞接种于放盖玻片的6孔板爬片,每组6个复孔,将培养板移入CO₂培养箱中,培养2天后,进行实验。实验分:对照组:培养液中加入等量的培养基,不加任何其他试剂;④Ang \oplus 组:培养液中加入终浓度为 10^{-7} mol/L的Ang \oplus 培养12 h;④Rho激酶阻断剂组:培养液中加入Rho激酶阻断剂Y-27632(使其终浓度为30 μ mol/L)培养8 h,然后再在培养液中加入终浓度为 10^{-7} mol/L的Ang \oplus 培养12 h;盐酸法舒地尔组:培养液中加入盐酸法舒地尔(使

其终浓度为50 μ mol/L)培养8 h,然后再在培养液中加入终浓度为 10^{-7} mol/L的Ang \oplus 培养12 h。

1.4 MTT法测定内皮细胞活力

取对数生长期细胞,用胰酶消化,完全培养基配制成细胞悬液后,待细胞生长贴壁80%~90%后,分组处理细胞[每组8个复孔,同时设对照孔(细胞、完全培养基和溶解Ang \oplus 的溶剂)和调零孔(无细胞,完全培养基)],再培养12 h。将所有孔中的上清液去掉,用PBS轻轻清洗,重新放入100 μ L不含胎牛血清的培养基,对细胞进行饥饿4 h。弃掉培养基,用PBS清洗,然后每孔加入(5 g/L) MTT磷酸缓冲液20 μ L,同样条件下继续培养4 h,终止培养然后弃去培养板孔内的MTT,每孔加入150 μ L DM-SO,震荡10 min,使紫色晶体充分溶解,于酶标仪检测490 nm处吸光度值。

1.5 免疫荧光法观察细胞骨架肌动蛋白形态及分布的变化

用4%多聚甲醛磷酸缓冲液固定30 min, PBS冲洗3次,3% Triton X-100通透15 min, PBS冲洗3次,加入0.3% BSA封闭1 h,用1:200的罗丹明标记的毒伞素对细胞骨架进行染色,置暗处反应15 min,蒸馏水冲洗3次,甘油封片,在荧光倒置显微镜下观察内皮细胞肌动蛋白细胞骨架的分布变化。F-actin激发波波长543 nm,发射波波长565 nm。

1.6 Western Blotting法测定内皮细胞Rho激酶和磷酸化肌球蛋白轻链蛋白表达

细胞去培养液,用温PBS冲洗2~3遍,加入适量的预冷裂解液置于冰上裂解15 min,用细胞刮刮下细胞,收集于EP管内,超声(200 W)3 s \times 2次裂解细胞,再4℃1 000 g离心2 min。采用考马斯亮蓝法,测定上清蛋白浓度,将所有蛋白样品调至等浓度上样(上样前100℃水浴3 min),以80 V电压常规SDS-PAGE电泳后转移到硝酸纤维膜上,用封闭液(1 \times TBST, 5%脱脂奶粉)4℃封闭过夜,再用抗体稀释液(1 \times TBST, 1%脱脂奶粉)1:250稀释一抗,与经封闭液处理的PVDF膜置于小封口塑料袋内37℃孵育2 h。1 \times TBST液洗膜3次,每次20 min。然后,以同样方法,1:4 500稀释二抗,37℃孵育1 h,1 \times TBST液洗膜30 min \times 3次。将膜置于含BCIP(33 μ L)/NBT(66 μ L)的染色液10 mL,于室温下轻轻摇晃,使蛋白条带逐渐显影、定影,胶片洗涤干燥,利用Kodak电泳图像分析系统对图片各电泳条带亮度进行扫描, β -actin为对照。

1.7 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样

本 t 检验, 多组间及不同浓度间比较采用单因素方差分析, 对照组与处理组间比较采用 LSD 检验。

2 结果

2.1 内皮细胞的鉴定

内皮细胞爬片后, 免疫细胞化学法测定培养的正常内皮细胞胞膜 (11) 因子相关抗原, 发现阳性胞浆内出现大量棕色颗粒积聚、浓染 (图 1A)。细胞铺满培养瓶底时, 倒置显微镜观察, 融合的内皮细胞为扁平、多角形及短梭形, 胞核明显, 呈鹅卵石样紧密排列, 无重叠生长现象 (图 1B)。

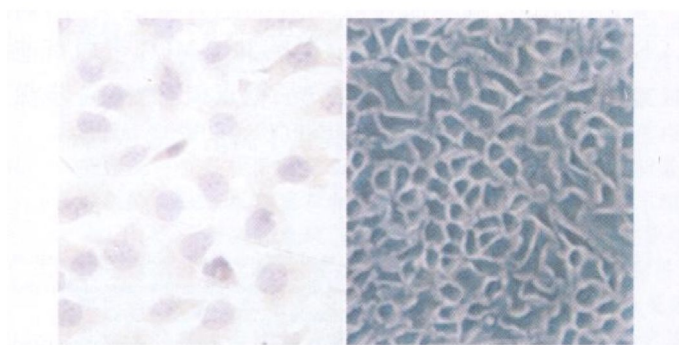


图 1 内皮细胞的鉴定

2.2 盐酸法舒地尔和 Rho 激酶阻断剂对血管紧张素 $\text{Ang} \text{II}$ 诱导的对内皮细胞活力的影响

$\text{Ang} \text{II}$ 能明显抑制内皮细胞的活力 ($P < 0.01$), Rho 激酶阻断剂组和盐酸法舒地尔能显著减弱 $\text{Ang} \text{II}$ 对内皮细胞活力的抑制作用 ($P < 0.01$), 但 Rho 激酶阻断剂组与盐酸法舒地尔组间差异无显著性 ($P > 0.05$, 表 1)。

表 1 各组内皮细胞活力 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

分 组	OD _{490 nm}	生长抑制率
对照组	0.720 \pm 0.031	
$\text{Ang} \text{II}$ 组	0.361 \pm 0.038 ^a	49.84%
Rho 激酶阻断剂组	0.578 \pm 0.026 ^b	19.72%
盐酸法舒地尔组	0.554 \pm 0.028 ^b	23.05%

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 $\text{Ang} \text{II}$ 组比较。

2.3 F-actin 细胞骨架的变化

对照组 F-actin 分布均匀, 呈网状有序排列, 在细胞周边形成明显的外周致密带, 胞质内可见呈纤维状排列的应力纤维; 细胞相互融合, 连接紧密。 $\text{Ang} \text{II}$ 组内皮细胞 F-actin 形态学发生明显改变, 胞质内由极性单行排列的 F-actin 丝组成的应力纤维

呈逐渐增多趋势, 且应力纤维增粗, 粗而长的应力纤维相互交错, 外周致密带明显断裂, 并出现与细胞表面垂直的棘状结构, 胞质内应力纤维断裂, 呈弥散分布, 细胞周边出现“绒毛状”短的指状突起, “空洞状”裂隙增大, 有的细胞近似脱落状态。Rho 激酶阻断剂组 F-actin 分布和排列与对照组细胞无明显差别, 外周致密带变细, 融合成单层的细胞间“空洞状”裂隙变小, 细胞形态明显好于 $\text{Ang} \text{II}$ 组。盐酸法舒地尔组与对照组近似 (图 2)。

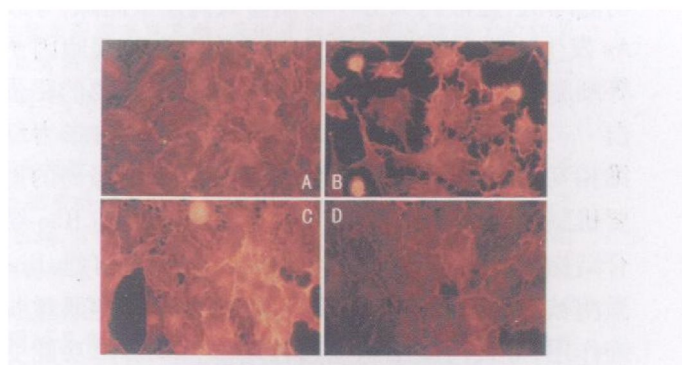


图 2 F-actin 细胞骨架的变化 ($\times 400$) A 为对照组, B 为 $\text{Ang} \text{II}$ 组, C 为 Rho 激酶阻断剂组, D 为盐酸法舒地尔组。

2.4 内皮细胞 Rho 激酶和 P-MLC 蛋白表达水平

与 $\text{Ang} \text{II}$ 组比, Rho 激酶阻断剂组和盐酸法舒地尔组均可明显抑制 Rho 激酶蛋白和 P-MLC 蛋白的表达 ($P < 0.01$), 但仍高于对照组 ($P < 0.01$); Rho 激酶阻断剂组与盐酸法舒地尔组蛋白表达差异无显著性 ($P > 0.05$, 表 2 和图 3)。

表 2 Rho 激酶和 P-MLC 蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

分 组	Rho 激酶	P-MLC
对照组	0.231% \pm 0.251%	0.461% \pm 0.232%
$\text{Ang} \text{II}$ 组	1.374% \pm 0.218% ^a	1.339% \pm 0.451% ^a
Rho 激酶阻断剂组	0.538% \pm 0.283% ^{ab}	0.599% \pm 0.361% ^{ab}
盐酸法舒地尔组	0.529% \pm 0.107% ^{ab}	0.608% \pm 0.249% ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 $\text{Ang} \text{II}$ 组比较。

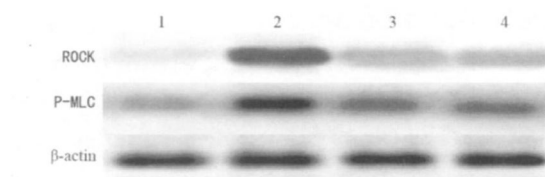


图 3 Western blotting 法检测 Rho 激酶蛋白和 P-MLC 蛋白的表达水平 1 为对照组, 2 为 $\text{Ang} \text{II}$ 组, 3 为 Rho 激酶阻断剂组, 4 为盐酸法舒地尔组。

3 讨论

As是由单核/淋巴细胞黏附并激活 EC 而开启的一种由多种原因导致慢性复杂性的疾病^[3]。大量实验发现内皮损伤在 As 的发生、发展过程中具有十分重要的作用^[4-6]。细胞骨架是胞浆中一组由纤维状结构组成的网架,主要由肌动蛋白组成。当外源性因子作用于内皮细胞骨架[大部分是通过引起 EC 纤维状肌动蛋白(F-actin)细胞骨架的改变],引起 EC 收缩,细胞表面黏附分子表达减少,内皮屏障功能降低,血液内大分子物质渗入内皮下间隙,导致 As 发生。肌动蛋白细胞骨架已被认为是细胞因子等细胞外信号启动和调节细胞内信号时首要的靶蛋白^[7]。血管内皮细胞肌球蛋白与肌动蛋白张力纤维相互作用,导致内皮细胞收缩、屏障功能障碍的重要机制是 PMLC^[8-9]。当激活状态的 Rho 与 Rho 结合结构域相互作用时改变了 Rho 激酶的构型, Rho 激酶被激活可以将 PMLC 生成增加,而发生肌丝收缩作用,导致内皮细胞通透性增加, EC 屏障功能受损。有研究提示 Rho 蛋白可引起细胞内肌动肌球蛋白微丝功能变化,同时介导以整合蛋白为主导的细胞与基底膜之间的附着斑复合物的形成,并参与调节细胞间紧密连接功能的调节,参与细胞间钙黏蛋白介导的黏附连接的组成^[10-11],还有研究发现 Rho 激酶在晚期糖基化终产物诱导内皮细胞紧密连接形态改变从而导致血管通透性升高中发挥重要作用^[12],且有实验已从形态学角度检测了 RhoA 和磷酸化 Rho 激酶在内皮细胞分布的变化^[13]。盐酸法舒地尔对 Rho 激酶具有特异的抑制效应。在临床上对包括心绞痛、高血压、冠状动脉血管痉挛、冠状动脉再通手术后再狭窄和 As 在内的心血管疾病均有较好的治疗作用^[14],但其对 As 的具体防治作用机制不太清楚。本实验通过探讨盐酸法舒地尔对 Ang^②诱导的 HUVEC 活力、细胞形态及 Rho 激酶和 PMLC 表达的影响,来探讨盐酸法舒地尔对 As 防治机制是否与 Rho/Rho 激酶信号通路有关,及是否通过改善内皮细胞骨架以对内皮细胞产生保护作用,从而抑制 As 的进展。

本实验通过免疫荧光观察内皮细胞的形态,结果发现 Ang^②组内皮细胞 F-actin 形态学发生明显改变,而 Rho 激酶阻断剂组(Y-27632)和盐酸法舒地尔组 F-actin 分布、排列与对照组细胞无明显差别,且 Rho 激酶阻断剂和盐酸法舒地尔都可使受损内皮细胞外周致密带变细,融合成单层的细胞间“空洞状”裂隙变小,细胞形态明显好于 Ang^②组。

MTT 法证实 Ang^②可以明显抑制 EC 活力,而 Rho 激酶阻断剂和盐酸法舒地尔可以明显减弱 Ang^②对内皮细胞活力的抑制作用。Western Blotting 法测定内皮细胞 Rho 激酶和 PMLC 蛋白的表达,发现与 Ang^②组比, Rho 激酶阻断剂组和盐酸法舒地尔组均可使 Rho 激酶和 PMLC 蛋白表达降低,但仍高于对照组;且 Rho 激酶阻断剂组与盐酸法舒地尔组之间差异无显著性($P > 0.05$)。表明盐酸法舒地尔对 EC 骨架有很好的保护作用,可以明显抑制 Rho 激酶的表达,减少细胞 PMLC 的含量。

综上所述,本研究显示,盐酸法舒地尔可以通过抑制 Rho 信号转导通路中 Rho 激酶及下游 PMLC 蛋白的表达,减弱肌丝收缩对细胞骨架的破坏,对 EC 有保护作用,提示 Rho 激酶和 PMLC 蛋白可能成为 EC 屏障功能保护的分子靶点,也为进一步探讨盐酸法舒地尔防治 As 提供了新的实验依据。

[参考文献]

- [1] Pozo M, de Nicolas R, Egido J, et al. Simvastatin inhibits the migration and adhesion of monocytic cells and disorganizes the cytoskeleton of activated endothelial cells [J]. *Eur J Pharmacol* 2006; **548**: 53-63.
- [2] Shimokawa H, Takeshita A. Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; **25** (9): 1767-775.
- [3] Libby P. Inflammation in atherosclerosis [J]. *Nature* 2002; **420** (6917): 868-874.
- [4] Keaney JF Jr. Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction [J]. *Mol Aspects Med* 2000; **21** (4-5): 99-166.
- [5] Dart AM, Chin-Dusting JPF. Lipids and the endothelium [J]. *Cardiovasc Res* 1999; **43** (2): 308-322.
- [6] 黎健. 血脂异常导致血管内皮细胞的氧化损伤 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007; **15** (7): 524.
- [7] Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology [J]. *Nature* 2002; **420** (6916): 629-635.
- [8] 赵克森, 黄巧冰. 血管通透性增高的基本机制 [J]. *中国病理生理杂志*, 2003; **19** (4): 549-553.
- [9] Dudek SM, Garcia JC. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability [J]. *Appl Physiol* 2001; **91** (4): 1487-500.
- [10] Lampugnani MG, Zanetti A, Breviario F, et al. VE-cadherin regulates endothelial actin activating Rac and increasing membrane association of Tram [J]. *Mol Biol Cell* 2002; **13** (4): 1175-189.
- [11] Seebach J, Milder H, Wojciak-Stothard R, et al. Tyrosine phosphorylation and the small GTPase Rac cross-talk in regulation of endothelial barrier function [J]. *Thromb Haemost* 2005; **94** (3): 620-629.
- [12] 王占华, 郭晓华, 刘湘兰, 等. 晚期糖基化终产物诱导内皮细胞黏附连接改变及其机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008; **16** (7): 505-509.
- [13] 王吉萍, 陈波, 李强, 等. 晚期糖基化终产物引起的 RhoA 和 ROCK 在人皮肤微血管内皮细胞的分布变化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010; **18** (5): 341-344.
- [14] Hirakawa Y, Shimokawa H. Therapeutic potential of Rho-kinase inhibitors in cardiovascular diseases [J]. *Am J Cardiovasc Drugs* 2005; **5**: 31-39.

(此文编辑 许雪梅)