

Rho 激酶在烧伤大鼠血清诱导的血管内皮细胞骨架变化中的作用

郑惠珍 赵克森 黄巧冰

【摘要】 目的 观察烧伤血清刺激下血管内皮细胞骨架的变化及 Rho 信号转导通路所起的作用。方法 常规培养人脐静脉血管内皮细胞系 ECV304, 随机分为空白对照组、实验对照组、烧伤组、Y-27632 组、烧伤 + Y-27632 组、Y-27632 + 烧伤组、溶血磷脂酸(LPA)组和 LPA + Y-27632 组, 分别用正常大鼠血清、烧伤大鼠血清、30 $\mu\text{mol/L}$ Rho 激酶抑制剂 Y-27632、13 $\mu\text{mol/L}$ RhoA 激动剂 LPA 单独刺激或联合刺激。采用 HE 染色于光镜下观察各组内皮细胞形态。于荧光倒置相差显微镜下观察内皮细胞骨架变化, 除 Y-27632 组外, 各组均在刺激后 6、7、8 h 3 个时相点进行观察。用流式细胞仪检测实验对照组、烧伤组、Y-27632 组、烧伤 + Y-27632 组、LPA 组和 LPA + Y-27632 组刺激 6 h 的肌动蛋白含量。结果 空白对照组、实验对照组细胞呈梭形或多边形, 生长良好; 丝状肌动蛋白主要分布在细胞周边, 形成周边肌动蛋白丝带, 细胞生长融合为单层后呈网状结构; 球状肌动蛋白集中在细胞中央。烧伤组烧伤血清刺激 6 h, 细胞贴壁差, 丝状肌动蛋白重组, 应力纤维形成, 周边肌动蛋白丝带模糊; 球状肌动蛋白松散, 胞浆中可见散在分布的絮状球状肌动蛋白, 且这些反应随着刺激时间延长而增强。烧伤 + Y-27632 组或 Y-27632 + 烧伤组细胞生长、贴壁良好, 丝状肌动蛋白的分布与空白对照组、实验对照组相似, 应力纤维明显减少或消失; 球状肌动蛋白结构紧密。LPA 组的细胞骨架变化与烧伤组相似, LPA + Y-27632 组及 Y-27632 组细胞骨架无明显变化。烧伤组刺激后 6 h 丝状肌动蛋白含量为 0.63 ± 0.07 , 低于实验对照组 0.75 ± 0.08 ; 球状肌动蛋白含量为 1.28 ± 0.27 , 高于实验对照组 1.16 ± 0.16 , 但组间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 烧伤血清能诱导内皮细胞肌动蛋白骨架重组, 与 LPA 的作用相似。Y-27632 能逆转这一作用。

【关键词】 溶血磷脂素类; 内皮细胞; 肌动蛋白类; 烧伤血清; Rho 激酶

Role of Rho kinase in reorganization of the vascular endothelial cytoskeleton induced by rat burn serum

ZHENG Hui-zhen, ZHAO Ke-sen, HUANG Qiao-bing. Department of Pathophysiology, Key Laboratory for Shock and Microcirculation of PLA, The South Medical University, Guangzhou 510515, P. R. China

Corresponding author: ZHAO Ke-sen, Email: zhaoks@fimmu.com, Tel: 020-61648232

【Abstract】 Objective To investigate the changes in endothelial cytoskeletal reorganization and the role of Rho in the signal transduction pathway. Methods ECV304 cells were cultured and randomly divided into following groups: i. e. sham (with normal rat serum treatment), burn (with burn rat serum treatment), Y (with 30 $\mu\text{mol/L}$ Rho kinase inhibitor Y-27632 treatment), burn plus Y (pretreatment of cells with burn serum before treated with 30 $\mu\text{mol/L}$ Y-27632), Y plus burn (pretreatment of cells with Y-27632 for 1 hour before treated with burn serum), LPA (with normal rat serum and 13 $\mu\text{mol/L}$ LPA), and LPA plus Y (pretreatment of cells with LPA before treated with Y-27632) groups. The indices were examined at 6, 7 and 8 posttreatment hours (PTH) in all groups except in Y group. The endothelial morphology was observed with HE staining. Endothelial cytoskeleton was observed by dual-fluorescence labeling of filamentous actin (F) with Rhodamine-phalloidin and monomer (G) with oregon green labeled DNAase. The actin content in the cells in all groups was measured with flow cytometry. Results In sham and control group, the cells were in fusiform or polygonal shape, with satisfactory growth; filamentous actin (F-actin) was mainly distributed in the peripheral site of the cytoplasm and formed peripheral filamentous band. The cells became confluent to form a single layer with reticular structure. Globular actin (G-actin) was concentrated in the nucleus and perinucleus. In burn group, after 6 hours of burn serum treatment, the ability of cells to adhere to vessel wall was weakened, and a striking reorganization of the actin cytoskeleton and the formation of the stress fibers were found. Furthermore, the fluorescent intensity of the peripheral filamentous bands was weakened, and dispersed actin monomers were seen in the cytoplasm. This reaction was enhanced along with elapse of stimulation time. In burn plus Y or Y plus burn group, the cells grew and adhered well to the wall of culture vessel. The distribution of the filamentous actin was the same as the sham group, while the stress

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目(G2000057004、G1999054202);国家自然科学基金海外青年学者合作研究资助项目(30028008)

作者单位:510515 广州,南方医科大学病理生理学教研室(郑惠珍现在广东医学院生理科学实验室,524023)

通信(讯)作者:赵克森, Email: zhaoks@fimmu.com, 电话:020-61648232

fiber decreased in amount obviously. The structure of globular actin was condensed with little G-actin in the cytoplasm. The changes in actin cytoskeleton in LPA group was similar to that in burn group. The effects of LPA on actin reorganization could also be reversed by Y-27632. The content of F-actin in burn group at 6 PTH (0.63 ± 0.07) was lower than that in sham group (0.75 ± 0.08), while the content of G-actin in burn group (1.28 ± 0.27) was higher than that in sham group (1.16 ± 0.16 , $P > 0.05$). **Conclusion** Burn serum induces vascular endothelial actin cytoskeleton reorganization in endothelial cells via the Rho-dependent signal pathway. Similar to the effect of LPA, this effect could be reversed by Y-27632.

[Key words] Lysophospholipids; Endothelial cell; Actin cytoskeleton; Burn serum; Rho kinase

烧伤引起内皮屏障功能损害和血管通透性增强,最终导致低血容量性休克和多器官功能损害,其发病机制尚未充分阐明。近年研究表明,血管通透性调节涉及细胞骨架重组,黏附连接、紧密连接结构与功能改变^[1]。小 G 蛋白 Rho 信号转导通路是细胞外信号导致细胞骨架重组的分子开关,参与内皮屏障功能调节^[2,3]。从烧伤皮肤游离的微静脉实验中观察到,烧伤后用 Rho 激酶抑制剂 Y-27632 可以逆转细胞骨架改变及减轻通透性增强^[4],笔者以烧伤血清刺激人脐静脉血管内皮细胞系 ECV304 为实验模型,观察烧伤对内皮细胞骨架的影响及 Rho 信号转导通路的作用。

材 料 与 方 法

一、主要材料和仪器

1. DMEM 干粉培养基、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司),小牛血清(杭州四季青研究所),罗丹明-鬼笔毒环肽、俄勒冈绿-DNA 酶 I(美国 Molecular Probes 公司),Y-27632(德国 MERCK 公司),溶血磷脂酸(LPA,美国 Sigma 公司)。TE300 型荧光倒置相差显微镜(日本 Nikon 公司),Elite 型流式细胞仪(美国 Coulter 公司)。

2. 血清的制备:8 只健康 SD 雄性大鼠(南方医科大学南方医院实验动物中心),体重 350~450 g,将其中 4 只参照文献[5]方法制作烧伤大鼠血清;余下 4 只制备正常大鼠血清。

二、细胞培养与实验分组

1. 细胞培养:将人脐静脉血管内皮细胞系 ECV304(中国科学院上海细胞所)置于基础培养基[含 DMEM, 1×10^5 U/L 青霉素、100 mg/L 硫酸链霉素、 2.5×10^5 U/L 肝素钠、4.76 g/L N-2-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)]中,并加入体积分数 10% 小牛血清,于 37℃、体积分数 5% CO₂ 孵箱中培养,隔天换液 1 次。采用 2.5 g/L 胰蛋白酶按 1:4 消化传代。采用无血清培养基培养 24—48 h,使细胞进入静止期后进行实验。

2. 实验分组:(1)空白对照组:细胞采用含体积分数 15% 小牛血清的培养基孵育。(2)实验对照组:细胞用含体积分数 15% 正常大鼠血清的培养基孵育。(3)烧伤组:细胞采用含体积分数 15% 烧伤大鼠血清的培养基孵育 6、7、8 h。(4)Y-27632 组:细胞用含体积分数 15% 的正常大鼠血清 + 30 μmol/L Y-27632 的培养基孵育 1 h。(5)烧伤 + Y-27632 组:同烧伤组处理,之后加入 30 μmol/L Y-27632 继续孵育 45 min。(6)Y-27632 + 烧伤组:同 Y-27632 组处理后,更换为含体积分数 15% 烧伤大鼠血清的培养基继续孵育 6、7、8 h。(7)LPA 组:细胞用含体积分数 15% 的正常大鼠血清 + 13 μmol/L LPA 的培养基孵育 6、7、8 h。(8)LPA + Y-27632 组:同 LPA 组处理后,加入 30 μmol/L Y-27632 继续孵育 45 min。

三、检测指标

1. 细胞形态学观察:将密度为 1×10^5 /ml 的 ECV304 细胞接种于盖玻片上,生长至融合后,分为空白对照组、实验对照组、烧伤组、烧伤 + Y-27632 组、Y-27632 + 烧伤组进行处理。取出盖玻片,常规 HE 染色,于普通光镜下观察。

2. 肌动蛋白形态学观察:将 ECV304 细胞以 1×10^5 /ml 接种于微孔小皿中,培养至完全融合或亚融合,按分组情况加入刺激因素处理后,用 40 g/L 多聚甲醛固定 30 min,体积分数 0.5% Triton X-100 透化处理 20 min,加入罗丹明-鬼笔毒环肽(3 U/ml)和俄勒冈绿-DNA 酶 I(18 U/ml)各 30 μl 避光孵育 45 min,分别对丝状肌动蛋白和球状肌动蛋白进行荧光染色。以上步骤均在室温下进行,每一步骤结束后用磷酸盐缓冲液漂洗 2 min,共 3 次。于荧光倒置相差显微镜下进行观察、照相。

3. 肌动蛋白定量测定:同上方法接种,待 ECV304 细胞生长融合为单层后,分为实验对照组、烧伤组、Y-27632 组、烧伤 + Y-27632 组、LPA 组和 LPA + Y-27632 组,加入各刺激因素刺激 6 h。经消化、洗涤后,分别加入 100 μl 罗丹明-鬼笔毒环肽(3 U/ml)和俄勒冈绿-DNA 酶 I(18 U/ml)染色,采用流式细胞仪检测细胞荧光强度,激发光波长分别为 540、496 nm,发射光波长分别为 566、524 nm。以平均

荧光强度代表丝状肌动蛋白和球状肌动蛋白的相对含量,每个样品检测 3 000 个细胞,每组 5 个样品。

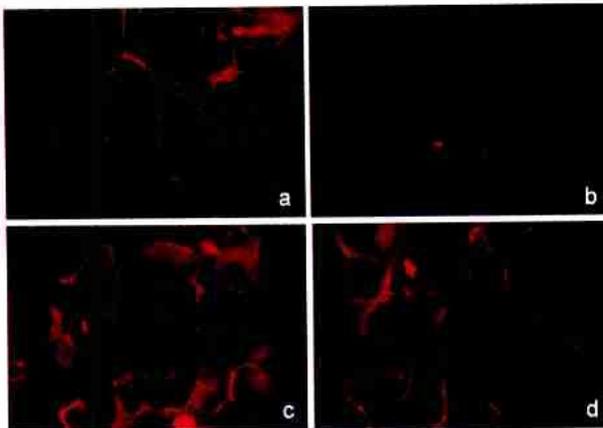
四、统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 软件包行 *F* 检验。

结 果

1. 空白对照组及实验对照组单细胞呈梭形或多边形,生长良好;细胞生长融合为单层后,呈鹅卵石样排列。烧伤组细胞贴壁差,在 HE 染色处理过程中大片脱落。烧伤 + Y-27632 组及 Y-27632 + 烧伤组细胞生长良好,与空白对照组结果相似。

2. 空白对照组、实验对照组 ECV304 细胞丝状肌动蛋白主要分布在细胞周边,在细胞与细胞接触处呈束状相互连接,形成周边肌动蛋白丝带,细胞生长融合为单层后呈网状(图 1a)。烧伤组血清刺激 6 h,丝状肌动蛋白重组,丝状和板状伪足形成,少数细胞出现少量应力纤维,周边肌动蛋白丝带模糊(图 1b)。烧伤组血清刺激 7 h,大多数细胞有应力纤维形成,细胞间束状结构被丝状结构代替,在细胞单层的周边部,部分区域细胞间缝隙明显;刺激时间延长至 8 h,应力纤维进一步增加,周边肌动蛋白丝带消失。烧伤 + Y-27632 组细胞周边肌动蛋白丝带完整、清晰,应力纤维消失,其形态与空白对照组相似(图 1c),刺激后 6、7、8 h 3 个时相点的表现一致。Y-27632 组细胞骨架无明显变化。Y-27632 + 烧伤组细胞骨架形态与空白对照组相似(图 1d)。LPA 组的反应同烧伤组,即出现丝状、板状伪足和应力纤维,周边肌动蛋白丝带模糊,此反应在 LPA + Y-27632 组完全消失。

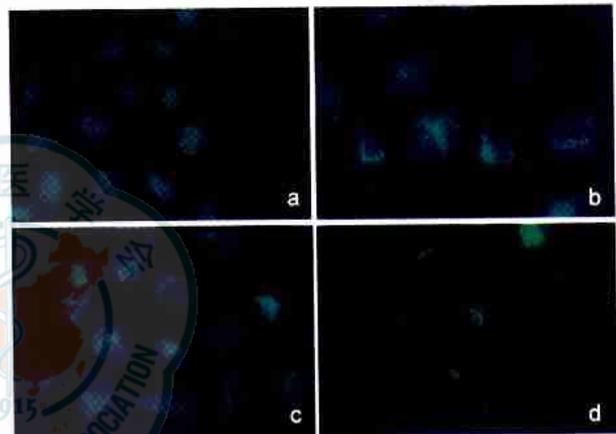


注: a. 实验对照组细胞丝状肌动蛋白分布在细胞周边,呈束状; b. 烧伤组细胞有应力纤维形成; c. 烧伤 + Y-27632 组以及 d. Y-27632 + 烧伤组应力纤维消失

图 1 各组 ECV304 细胞丝状肌动蛋白荧光染色图像 荧光倒置相差显微镜 $\times 1\ 000$

Fig 1 Image of F-actin fluorescent staining in ECV304 cells in each group Fluorescent inverted discrepant microscope $\times 1\ 000$

3. 空白对照组、实验对照组 ECV304 细胞球状肌动蛋白聚集在细胞中央,呈球形或梭形,棉絮状,中央部染色较淡,周边部着色稍深(图 2a)。烧伤组血清刺激 6 h,球状肌动蛋白结构松散,分布面积增大,向细胞周边移行,胞浆中可见散在分布的絮状球状肌动蛋白(图 2b);烧伤血清刺激 7、8 h 时,上述反应增强。烧伤 + Y-27632 组胞浆中仅见少量散在分布的球状肌动蛋白(图 2c)。Y-27632 + 烧伤组球状肌动蛋白结构紧密,胞浆中仅有少量散在分布球状肌动蛋白(图 2d)。LPA 组球状肌动蛋白松散,向周边移行,其变化与烧伤组相似。LPA 对球状肌动蛋白的作用能被 Y-27632 完全逆转。



注: a. 实验对照组细胞球状肌动蛋白聚集在细胞中央; b. 烧伤组细胞球状肌动蛋白的结构松散; c. 烧伤 + Y-27632 组以及 d. Y-27632 + 烧伤组胞浆中仅见少量散在分布的球状肌动蛋白 图 2 各组 ECV304 细胞球状肌动蛋白荧光染色图像 荧光倒置相差显微镜 $\times 1\ 000$

Fig 2 Image of G-actin fluorescent staining in ECV304 cells in each group Fluorescent inverted discrepant microscope $\times 1\ 000$

4. 与实验对照组比较,烧伤组血清刺激 6 h 时 ECV304 细胞丝状肌动蛋白含量略有减少,球状肌动蛋白含量略有增加,但组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 烧伤血清刺激 6 h 各组 ECV304 细胞的肌动蛋白含量 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The actin content in endothelial cells in each group 6 hours after the stimulation ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	丝状肌动蛋白	球状肌动蛋白
实验对照组	5	0.75 \pm 0.08	1.16 \pm 0.16
烧伤组	5	0.63 \pm 0.07	1.28 \pm 0.27
Y-27632 组	5	0.60 \pm 0.06	0.73 \pm 0.05
烧伤 + Y-27632 组	5	0.67 \pm 0.10	1.45 \pm 0.48
LPA 组	5	0.67 \pm 0.09	1.29 \pm 0.45
LPA + Y-27632 组	5	0.65 \pm 0.10	1.22 \pm 0.43

讨 论

目前认为,ECV304 细胞株在形态学、免疫学方面及其某些基因均具有内皮细胞特性,同时也存在

T24/83 细胞的遗传学特性,它是研究通过多种 G 蛋白偶联受体的信号转导途径的较理想工具^[6,7]。烧伤血清含肿瘤坏死因子(TNF) α 和内毒素/脂多糖(LPS)等多种细胞因子和炎症介质,是引起机体病理改变的因素。笔者观察到,在烧伤大鼠血清作用下,ECV304 细胞贴壁差,易脱落;细胞骨架发生重组,细胞内丝状、板状伪足及应力纤维形成;球状肌动蛋白松散,由胞核向胞浆移行。此结果与文献报道的 TNF- α 、LPS 诱导内皮细胞骨架改变一致^[8,9]。本研究表明,烧伤大鼠血清作用下,ECV304 细胞的丝状肌动蛋白含量略有减少,而球状肌动蛋白含量稍有增加。这可能是由于丝状肌动蛋白发生解聚、重组,部分丝状肌动蛋白转变为球状肌动蛋白,同时,球状肌动蛋白向细胞周边移行,为丝状肌动蛋白的重新聚集提供原料。正常内皮细胞间存在紧密连接和黏附连接,细胞与基质间存在黏附连接,细胞骨架丝状肌动蛋白在紧密连接和黏附连接中起枢纽作用。在烧伤血清作用下,丝状肌动蛋白解聚、重组,导致细胞收缩进而增加细胞圈合力,使细胞间连接和细胞与基质间的连接松散,细胞间缝隙增宽甚至脱落,为大分子蛋白质通过细胞单层提供了形态学基础。

Rho 激酶为小 G 蛋白 Rho 家族 RhoA 的下游效应器,是 Rho 信号转导通路的关键酶^[2]。在成纤维细胞、平滑肌细胞以及血管内皮细胞中,Rho 激酶通过磷酸化肌球蛋白磷酸酶,继而使肌球蛋白轻链磷酸化,导致肌动-肌球蛋白收缩,细胞骨架重组,应力纤维形成。Rho 激酶的活化也通过 LIM 激酶而使 Cofilin 磷酸化,继而抑制丝状肌动蛋白解聚,稳定已经形成的应力纤维。烧伤血清对细胞骨架的作用是否也通过 Rho 信号转导通路尚鲜见报道。本实验观察到 Y-27632 可逆转烧伤血清诱导的细胞骨架改变。烧伤血清中 TNF- α 、LPS 等作用于细胞膜上相应的 G 蛋白偶联受体,可激活 Rho 激酶;或使 Rho 激酶活性升高;或蛋白表达增强,使肌球蛋白轻链磷酸化,肌动蛋白重组,应力纤维形成。Y-27632 可抑制 Rho 激酶活性,中断 Rho 信号转导通路,阻断肌球蛋白轻链磷酸化,逆转细胞骨架的改变,对内皮屏障起保护作用^[10]。

LPA 是 RhoA 激动剂,通过激活 RhoA 而激活 Rho 信号转导通路^[11]。本实验观察到,LPA 刺激细胞骨架重组,其作用被 Y-27632 完全逆转,此结果与文献报道一致^[12]。烧伤血清对细胞骨架的作用与 LPA 相似,但 Y-27632 不能完全逆转烧伤血清的作

用,表明烧伤血清引起的细胞骨架改变除 Rho 信号转导通路外,还存在其他信号转导通路的作用。有研究表明,一氧化氮、蛋白激酶 C 等信号转导通路均参与烧伤血清诱导的内皮细胞骨架改变和屏障功能衰竭^[13,14]。因此,烧伤血清诱导的内皮细胞骨架改变的机制是多方面的,而 Rho 信号转导通路是不容忽视的重要机制之一。

参 考 文 献

- 1 Michel CC, Neal CR. Openings through endothelial cells associated with increased microvascular permeability. *Microcirculation*, 1999, 6: 45 - 54.
- 2 Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*, 2001, 81: 153 - 208.
- 3 Adamson RH, Curry FE, Adamson G, et al. Rho and rho kinase modulation of barrier properties: cultured endothelial cells and intact microvessels of rats and mice. *J Physiol*, 2002, 539:295 - 308.
- 4 Zheng HZ, Zhao KS, Zhou BY, et al. Role of Rho kinase and actin filament in the increased vascular permeability of skin venule in rat after scalding. *Burns*, 2003, 29:820 - 827.
- 5 杨滔,黄巧冰,金春华. 烧伤刺激诱导内皮细胞蛋白激酶 C 的转位. *中国危重病急救医学*, 2001, 13:427 - 430.
- 6 Kiessling F, Kartenbeck J, Haller C. Cell-cell contacts in the human cell line ECV 304 exhibit both endothelial and epithelial characteristics. *Cell Tissue Res*, 1999, 297:131 - 140.
- 7 Brown J, Reading SJ, Jones S, et al. Critical evaluation of ECV304 as a human endothelial cell model defined by genetic analysis and functional responses: a comparison with the human bladder cancer derived epithelial cell line T24/83. *Lab Invest*, 2000, 80:37 - 45.
- 8 Beata WS, Alan E, Ritu G, et al. Regulation of TNF- α -Induced reorganization of the actin cytoskeleton and cell-cell junctions by Rho, Rac, and Cdc42 in human endothelial cells. *J Cell Physiol*, 1998, 176:150 - 165.
- 9 Wright K, Nwariaku F, Halaihel N, et al. Burn-activated neutrophils and tumor necrosis factor- α alter endothelial cell actin cytoskeleton and enhance monolayer permeability. *Surgery*, 2000, 128: 259 - 265.
- 10 Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, et al. Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of Rho-associated kinase. *Mol Pharmacol*, 2000, 57: 976 - 983.
- 11 Gohla A, Harhammer R, Schultz G. The G-protein G₁₃ but not G₁₂ mediates signaling from lysophosphatidic acid receptor via epidermal growth factor receptor to Rho. *J Biol Chem*, 1998, 273:4653 - 4659.
- 12 Van Nieuw Amerongen GP, Vermeer MA, van Hinsbergh VW. Role of RhoA and Rho kinase in lysophosphatidic acid-induced endothelial barrier dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20: 127 - 133.
- 13 Soejima K, Traber LD, Schmalstieg FC, et al. Role of nitric oxide in vascular permeability after combined burns and smoke inhalation injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163: 745 - 752.
- 14 Wang YC, Hsieh YS, Tang YW, et al. Protein kinase C isoforms in the epidermal tissues of normal and postburn human skin. *Biochem Mol Biol Int*, 1999, 47: 673 - 679.

(收稿日期:2004-03-03)

(本文编辑:莫 愚)