

文章编号:1004-7220(2012)05-0548-08

细胞骨架 F-actin 在层流剪切应力诱导 EPCs 内皮分化中的作用

崔晓栋, 官秀梅*, 张晓芸, 李宏, 李鑫, 王建英, 成敏
(潍坊医学院 基础医学院, 山东 潍坊 261053)

摘要: **目的** 探讨细胞骨架 F-actin 在层流剪切应力促内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)向内皮分化中的作用。**方法** 对大鼠骨髓来源的 EPCs 施以层流剪切应力(1.2 Pa),以荧光定量 RT-PCR 及流式细胞术检测特异性内皮细胞标记分子 vWF、CD31 mRNA 及蛋白的表达来反映 EPCs 分化程度;以免疫荧光染色观测 F-actin 的排列情况;应用 Ras GTPase Pull-Down 方法检测 Ras 活性。**结果** 层流剪切力处理后, EPCs 分化标记 vWF 及 CD31 的基因及蛋白表达较静止组明显升高($P < 0.05$),细胞骨架 F-actin 发生重排, Ras 活性明显增高。细胞骨架稳定剂 Jasplakinolide (JAS) 及细胞骨架松弛剂 Cytochalasin D (CytoD) 预处理均不同程度地抑制了层流剪切应力所致的细胞骨架的重排、Ras 活性的上调及 EPCs 分化效应($P < 0.05$),而过表达 Ras 则对层流剪切应力诱导的 EPCs 分化有明显促进作用($P < 0.05$)。**结论** 一定大小的层流剪切应力可促进 EPCs 向内皮细胞分化,其机制可能与层流剪切应力重塑细胞骨架 F-actin,进而影响 Ras 活性有关;这对于揭示受损血管内皮修复的具体机制、阐明动脉粥样硬化等心血管疾病的发病机理及临床防治此类疾病具有一定的意义。

关键词: 层流剪切应力; 内皮祖细胞; 细胞骨架; 细胞培养; 细胞分化
中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

Role of F-actin cytoskeleton in differentiation of endothelial progenitor cells induced by laminar shear stress

CUI Xiao-dong, GUAN Xiu-mei*, ZHANG Xiao-yun, LI Hong, LI Xin, WANG Jian-ying, CHENG Min (School of Basic Medical Sciences, Weifang Medical College, Weifang 261053, Shandong, China)

Abstract: **Objective** To investigate effects of F-actin cytoskeleton on differentiation of endothelial progenitor cells (EPCs) under laminar shear stress. **Methods** EPCs isolated from rat bone marrow were treated with laminar shear stress (1.2 Pa). Then the gene and protein expressions of the endothelial cell differentiation markers, such as vWF and CD31, were assayed with real time RT-PCR and Flow Cytometry. The effects of laminar shear stress on F-actin cytoskeleton and Ras activity were investigated by immunofluorescence technique and Pull-down assay. **Results** Compared with the untreated group, the expressions of vWF and CD31 were obviously increased in the group treated with laminar shear stress ($P < 0.05$). Moreover, exposure of EPCs to laminar shear stress led to the reorganization of cytoskeleton and enhanced the activity of Ras in EPCs. The treatment to EPCs with either F-actin stabilizer jasplakinolide or depolymerizers cytochalasin D inhibited the cytoskeleton reorganization induced with laminar shear stress, the activity of Ras and the up-regulation of the vWF and CD31 genes. However, over-expression of Ras augmented the up-regulation of the vWF and CD31 genes induced by laminar

收稿日期:2012-03-29; 修回日期:2012-06-07

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30900290),山东省自然科学基金资助项目(ZR2009CQ027),国家教育部“新世纪优秀人才计划”资助项目(NCET-10-0922)。

通讯作者:成敏, Tel: (0536) 8462463; E-mail: chengmin1976@wfm.c.edu.cn.

* 共同第一作者

shear stress in EPCs. Conclusions The mechanism that laminar shear stress accelerates the differentiation of EPCs may be related with the laminar shear stress-induced cytoskeleton rearrangement and Ras activation. This study is of significance in revealing the mechanism of vascular endothelial repair which could be useful for the prevention and treatment of atherosclerosis.

Key words: Laminar shear stress; Endothelial progenitor cells(EPCs); Cytoskeleton; Cell culture; Cell differentiation

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)所致的心脑血管疾病是当今严重危害人类生命健康的疾病之一,其发病率和死亡率均居各种疾病之首,故研究其病因、病理、预防及治疗已成为医学界、生物学界所面临的重要任务。研究表明,内皮损伤是 AS 的始动过程。但内皮损伤本身为可逆的病变,每个人都经历着内皮细胞的损伤和修复过程。AS 的发生往往是由于动脉血管的损伤和修复失衡造成的,在 AS 的防治过程中,加强受损血管内皮的修复尤其重要^[1]。传统观点认为,损伤周边的内皮细胞可通过迁移、增殖来修复内皮缺损。但成熟内皮细胞是终末分化细胞,其增殖潜能有限,修复能力并不理想^[2]。

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是内皮细胞的前体细胞,存在骨髓和外周血中,可进一步分化形成血管内皮细胞,是出生后血管发生和血管损伤后的修复极其重要的细胞^[3]。因此,促进 EPCs 向内皮细胞分化,加速对受损血管的修复是一种新的有效防治 AS 的重要策略。Yamamoto 等^[4]研究发现,血液流动产生的层流剪切应力可以促进 EPCs 分化,但具体机制不清。本研究拟利用层流剪切应力加载装置,验证层流剪切应力对 EPCs 向内皮分化的影响,进而深入探讨细胞骨架 F-actin 和 Ras 信号分子在其中的作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和设备

SD 大鼠(200 ~ 250g,雌雄不限)由解放军八十九医院动物实验中心提供,荧光定量 PCR(Bio-Rad IQ5);流式细胞检测仪(BD),5% CO₂ 培养箱(Thermo);M199(Gibco),胎牛血清(Hyclone),纤维连接蛋白(Fibronectin, FN, Roche), TRIzol 试剂, LipofectamineTM 2000(Invitrogen), SYBR[®] PrimeScript[®] RT-PCR Kit II 及相关引物设计合成(大连宝生物公司),活化的 Ras Pull-Down 和检测试剂盒(Ther-

mo), vWF-FITC 抗体(Abcam), CD31 抗体(Millipore), FITC-Phalloidin、jasplakinolide(Enzo Life Sciences), pCMV-RasV12(Clontech), Cytochalasin D 及 Histopaque-1083 购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 EPCs 的培养及鉴定^[5] 采用梯度离心法分离大鼠骨髓单核细胞,培养于 EGM-2MV 培养基。细胞行 Dil-ac-LDL 及 FITC-UEA-1 染色,双阳性者为内皮型细胞,流式细胞术检测 CD133、VEGFR2、vWF 及 VE-Cadherin 等细胞标记。

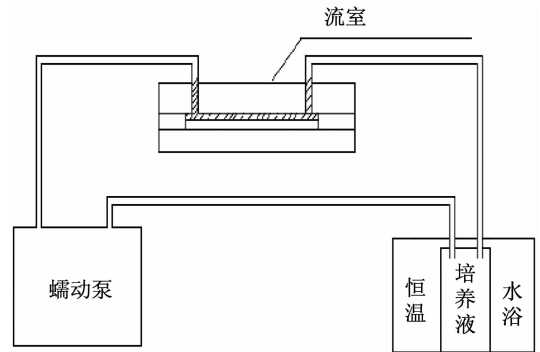


图1 层流剪切应力加载装置图

Fig.1 Schematic diagram of the flow chamber system for laminar shear stress

1.2.2 pCMV-RasV12 转染 待细胞生长融合达 60% ~ 70% 后,按 Lipofectamine 2000 说明书行 pCMV-RasV12(Ras 突变体,可致 Ras 在细胞内过表达)转染,转染 24 h 后 Western-blot 检测 Ras 表达情况。

1.2.3 层流剪切应力加载^[6-7] 层流剪切应力加载装置由蠕动泵、储液瓶、管道及平行板流室组成。将 4 ~ 6 代 EPCs 消化传代后,接种于 FN 打底处理的载玻片上。给予细胞施加 1.2 Pa 的力学刺激。当探讨层流剪切应力对 EPCs 分化及细胞骨架的影响时,干预时间为 3、6 及 12 h;当研究层流剪切应力对 EPCs Ras 活性的影响时,干预时间为 5、10、30、60

及 300 s^[8-9] (由于干预时间较短,需精确控制层流剪切应力处理时间,层流剪切应力作用后迅速将细胞取出,置于冰上,提取蛋白);当探讨 F-actin 及 Ras 在层流剪切应力促 EPCs 分化中的作用时,根据所需解决问题的不同下设预处理组及单纯层流剪切应力作用组:①JAS 预处理组:JAS (100 nmol/L) 孵育 1 h 后行层流剪切应力处理 (3 h);②Cyto D 预处理组: Cyto D (1 μmol/L) 孵育 30 min 后行层流剪切应力处理 (3 h);③Ras 过表达组: pCMV-RasV12 转染 EPCs 24 h 后行层流剪切应力处理 (3 h)。

1.2.4 细胞总 RNA 提取、vWF 及 CD31 的荧光定量 RT-PCR 分析 按 TRIzol 试剂说明书提取总 RNA,溶于 DEPC 处理的去离子水中, -80 °C 保存备用。荧光定量 RT-PCR 根据说明书操作。反应引物均委托宝生物设计合成,引物序列见表 1。反应条件为 95 °C 30 s, 1 cycle, 95 °C 30 s, 60 °C 30 s; 40 cycles。实验中以超纯水 (PCR 级,无 RNase) 作为阴性对照。根据 Ct 值,利用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算出相对表达量^[10]。

表 1 相关基因引物序列
Tab.1 Real-time PCR primers

基因	引物序列
GAPDH	上游 GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG
	下游 ATGGTGG TGAAGACGCCAGTA
vWF	上游 CGCTGGCAGCTGGTAGAGTA
	下游 GGAGATA GCGGCTGAAATA
CD31	上游 GACAGCCAAGGCAGATGCAC
	下游 ATTGGAT GGCTTGGCCCTGAA

1.2.5 EPCs 细胞骨架 F-actin 荧光标记染色 EPCs 用预温的 PBS 清洗后,用 4% 多聚甲醛固定 10 min, PBS 洗 3 次; FITC-Phalloidin (5 μg/mL) 37 °C 染色 30 min, PBS 洗 3 次后加荧光封片剂封片,用荧光显微镜观察拍照。

1.2.6 Ras 活性检测 将经层流剪切应力处理不同时间的 EPCs 按比例加入裂解液,收集蛋白,检测蛋白浓度。将样品加入离心杯中,按照说明书迅速加入 GST-RAF1-RBD, 4 °C 孵育 1 h, 离心,再加入洗脱液 50 mL, 6 kg 离心 2 min, 流出液即是有活性的 Ras GTPase。使用试剂盒中提供的抗-Ras 的小鼠单

克隆抗体用 Western blot 方法检测 Ras 活性并以 Gel-pro Analyzer 4.5 软件分析结果。

1.3 统计学分析

所有实验至少重复 3 次。采用 SPSS 10.0 统计学软件处理,多组之间采用单因素方差分析。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 有统计学差异。

2 结果

2.1 层流剪切应力对 EPCs 内皮分化标志分子 vWF 及 CD31 表达的影响

1.2 Pa 层流剪切应力作用于 EPCs 3、6 和 12 h 后, EPCs 内皮分化标志分子 vWF、CD31 的表达均显著高于静止组。层流剪切应力处理 3 h 组, vWF、CD31 mRNA 的表达量分别为静止组的 3.06 ± 0.01 倍、 2.40 ± 0.01 倍 ($P < 0.01$, 见图 2); 层流剪切应力处理 12 h 组, vWF 及 CD31 蛋白表达为静止组的 3.41 ± 0.59 倍、 2.91 ± 0.68 倍 ($P < 0.01$, 见图 3)。

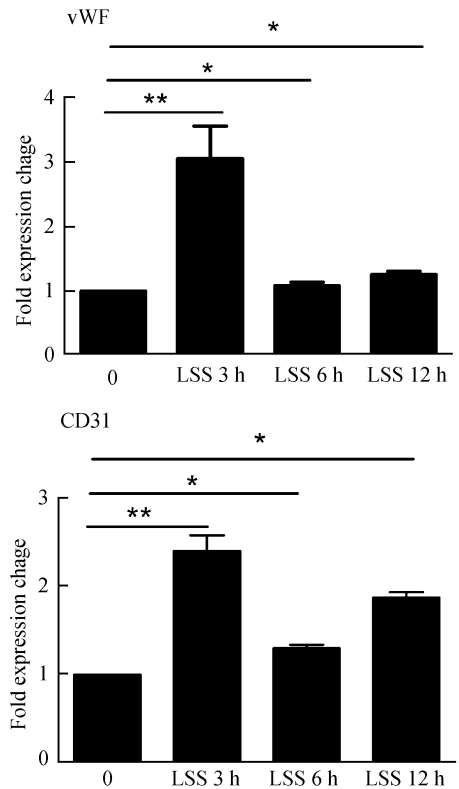


图 2 层流剪切应力对 EPCs vWF、CD31 mRNA 表达的影响 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Fig.2 Effects of laminar shear stress (LSS) on expressions of vWF and CD31 mRNA in EPCs

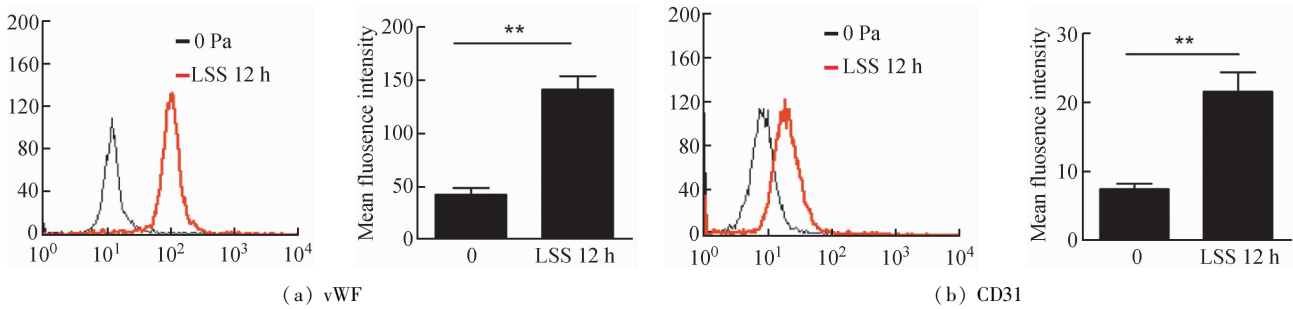


图3 层流剪切应力对 EPCs vWF、CD31 蛋白表达的影响 (** $P < 0.01$)

Fig.3 Effects of laminar shear stress on expression of vWF and CD31 proteins in EPCs

2.2 层流剪切应力对 EPCs 细胞骨架 F-actin 的影响

F-actin 是细胞骨架最主要的成分之一, 静止状态的 EPCs, F-actin 主要分布在细胞的周边和细胞核周, 肌丝细小短促, 界线不清, 排列没有明显的方向性 (见图 4(a)); 1.2 Pa 层流剪切应力作用 EPCs 后, 随着层流剪切应力作用时间的延长, 其 F-actin 肌丝逐渐增粗, 出现沿剪切力作用方向排列的应力纤维, 以 12 h 处理组为著 (见图 4(b) ~ (d))。JAS 和 Cyto D 分别为细胞骨架 F-actin 的稳定剂及松弛

剂。JAS 作用 EPCs 后 F-actin 肌丝增粗, 层流剪切应力处理进一步增粗 F-actin 肌丝, 但缺乏明显的沿剪切力作用方向排列的应力纤维 (见图 4(e) ~ (h))。CytoD 作用 EPCs 后 F-actin 肌丝破坏明显, 几乎看不到完整的细胞骨架 (见图 4(i))。层流剪切应力处理有助于 F-actin 的形成, 在层流剪切应力作用下, F-actin 有聚集成“束”, 沿剪切力作用方向排列的趋势, 但出现时间明显延迟 (见图 4(j) ~ (l))。

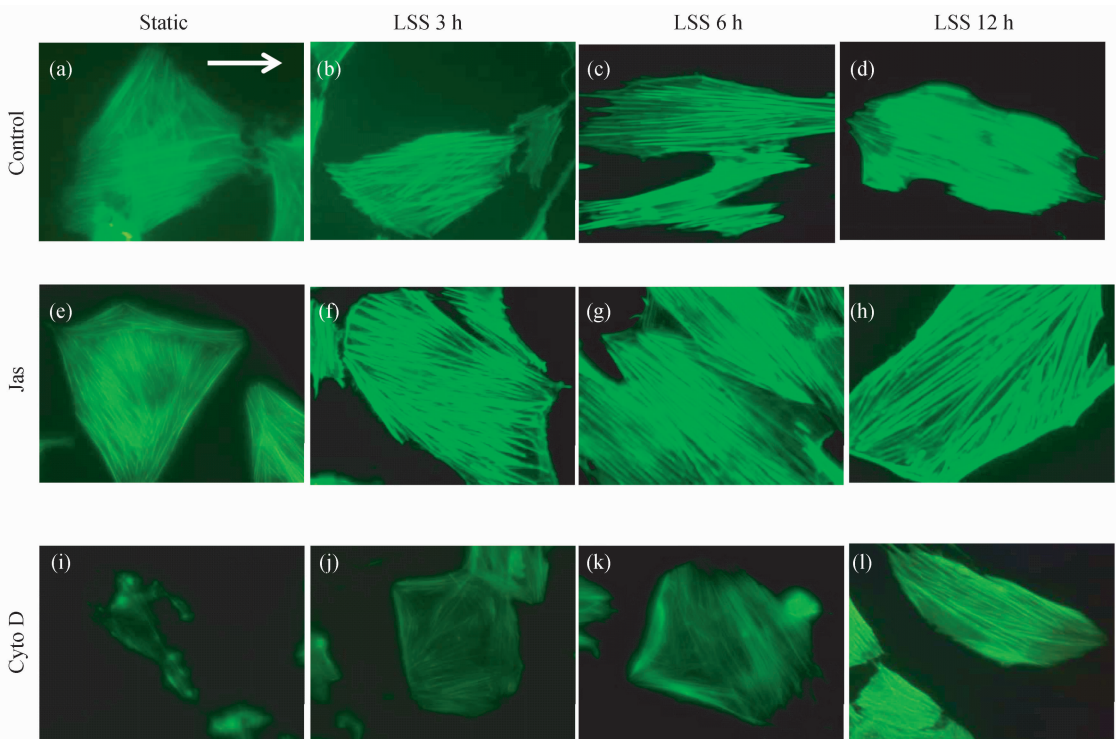


图4 层流剪切应力对 EPCs 细胞骨架 F-actin 的影响 (×400 倍)

Fig.4 Effect of laminar shear stress on the F-actin in EPCs

2.3 层流剪切应力对 EPCs Ras 活性的影响

层流剪切应力处理可引起 EPCs Ras 活性上调,其表达与层流剪切应力作用时间有关,具有快速、双向性的特点:在刺激 10 s 时达到高峰,5 min 左右降至未刺激水平(见图 5)。JAS 或 CytoD 预处理均明显抑制层流剪切应力激活的 Ras 活性(见图 6)。

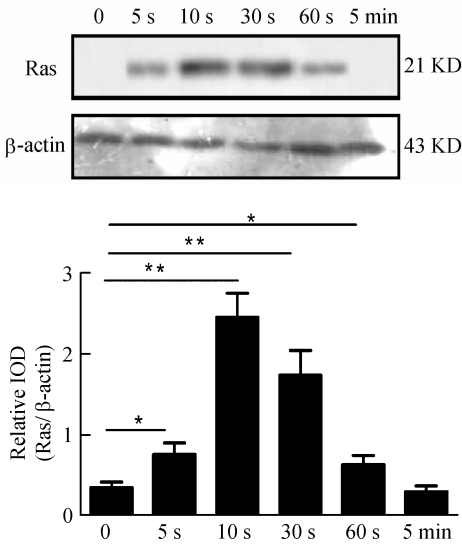


图 5 层流剪切应力对 EPCs Ras 活性的影响

(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Fig. 5 Effects of laminar shear stress on the Ras activity in EPCs

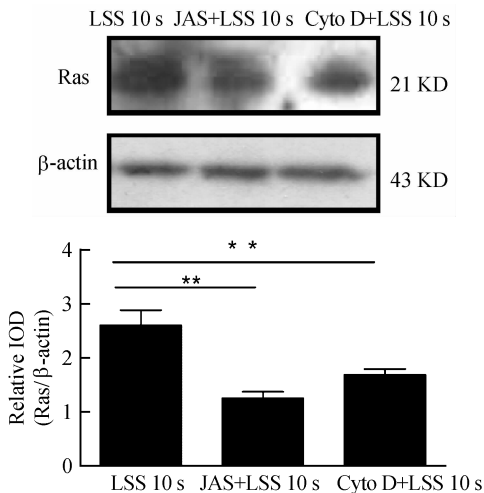


图 6 JAS、CytoD 对层流剪切应力激活的 Ras 活性的影响

(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Fig. 6 Effects of JAS and Cyto D on the Ras activity induced by shear stress

2.4 F-actin 在层流剪切应力促 EPCs vWF、CD31 mRNA 表达中的作用

如图 7 所示,与单纯层流剪切应力组相比, JAS 及 Cyto D 预处理均不同程度地降低了层流剪切应力所致的 vWF、CD31 mRNA 表达。但 JAS 或 CytoD 干预后经层流剪切应力处理组, vWF、CD31 mRNA 的表达均高于静止组。

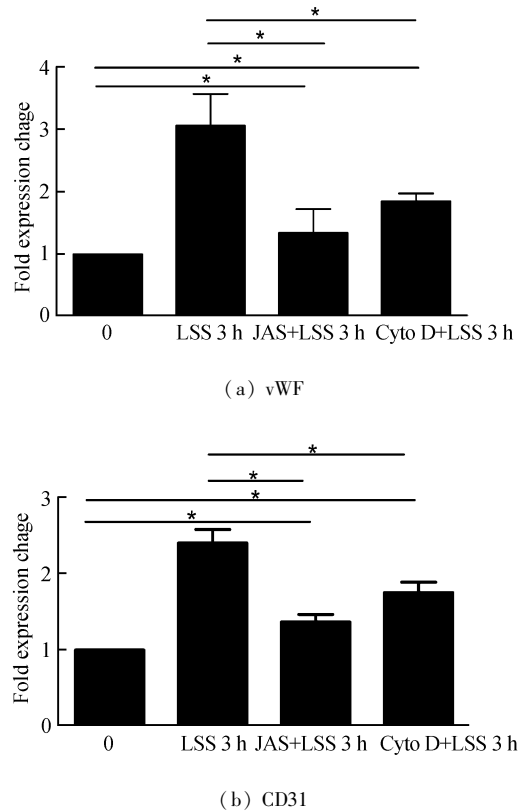


图 7 JAS、CytoD 对剪应力诱导的 EPCs vWF、CD31 mRNA 表达影响 (* $P < 0.05$)

Fig. 7 Effects of JAS and Cyto D on expressions of vWF and CD31 mRNA induced by laminar shear stress

2.5 Ras 在层流剪切应力促 EPCs vWF、CD31 mRNA 表达中的作用

将 pCMV-RasV12 转染至 EPCs 24 h 后, Western blot 显示 Ras 的表达明显增加(见图 8), 过表达 Ras 在静止状态下对 EPCs 向内皮分化无明显影响(见图 9); 但 Ras 过表达可明显促进层流剪切应力所致的 EPCs 向内皮细胞分化效应, 即过表达 Ras 的 EPCs 经层流剪切应力处理后 vWF、CD31 mRNA 的表达明显高于单纯层流剪切应力处理的 EPCs(见图 10)。

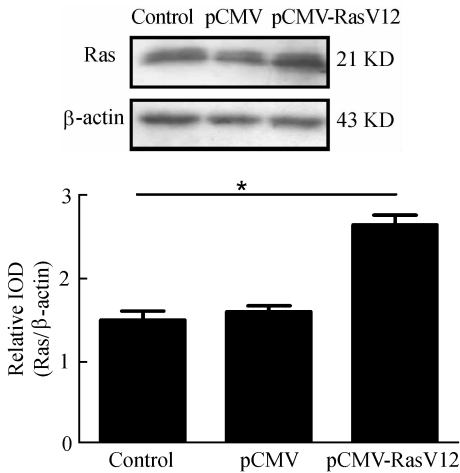


图8 pCMV-RasV12 上调 EPCs Ras 的表达 (* $P < 0.05$)
 Fig.8 pCMV-RasV12 up-regulated Ras expression

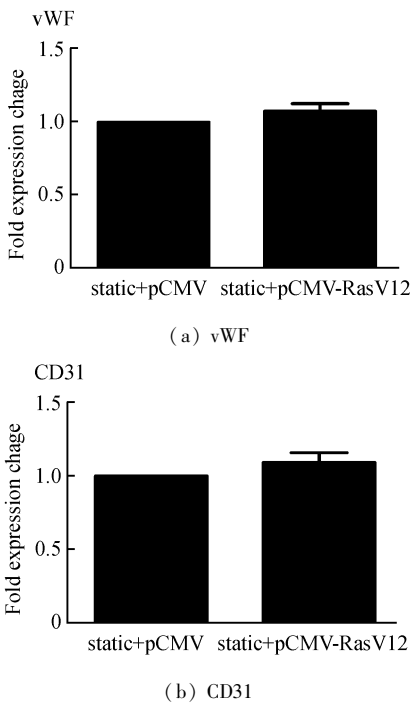


图9 Ras 对静止状态下 EPCs vWF、CD31 mRNA 表达影响
 Fig.9 Effects of Ras on expressions of vWF and CD31 mRNA in static group

3 讨论

EPCs 可参与动脉粥样硬化、心肌缺血以及肢体缺血侧支循环重建等过程,是血管修复及出生后新生血管形成的关键细胞。研究显示,血流产生的层流剪切应力可促进 EPCs 分化,有助于受损内皮的

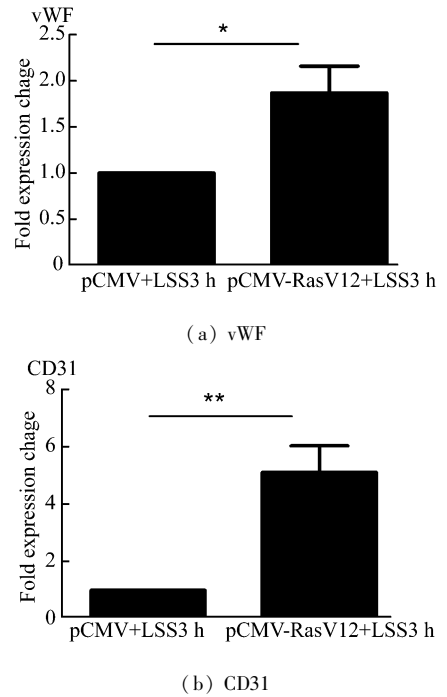


图10 Ras 对层流剪切应力诱导的 EPCs vWF、CD31 mRNA 表达影响 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)
 Fig.10 Effects of Ras on expressions of vWF and CD31 mRNA induced by laminar shear stress

修复及新生血管形成^[11-12]。然而生理状态下动脉血管的血流层流剪切应力范围波动较大,例如在直血管处,其层流剪切应力可达 1 ~ 7 Pa,而 AS 好发部位—动脉分支开口处外侧壁及动脉弯曲处,血流层流剪切应力明显降低(一般在 0.4 Pa 左右)^[13-14]。那么多大的层流剪切应力可调控 EPCs 的分化? Yamamoto 等^[4] 研究显示,1.2 Pa 层流剪切应力对 EPCs 的分化有明显的促进作用;本研究的前期预实验亦证实,低层流剪切应力(0.2 Pa)对 EPCs 的分化没有明显的影响,而 0.6 及 1.2 Pa 均可促进 EPCs 向内皮细胞分化。本研究进一步证实 EPCs 经 1.2 Pa 层流剪切应力干预后,其内皮细胞分子标记 vWF 及 CD31 mRNA 及蛋白均明显上调。

尽管力学信号转化为细胞内生物化学信号,调控细胞的生理或病理反应的机制还不清楚,但细胞骨架可参与跨膜信号的传递已被研究者达成共识。研究显示,层流剪切应力可以通过包括细胞骨架在内的一系列变化引起复杂的胞内信号转导而导致细胞生物特性如形态、增殖、凋亡、物质转运、基因表达

和分化等多种生物学效应^[15-18]。一定的机械力可通过引起细胞骨架 F-actin 的改变,进而借助胞内信号转导途径诱导间质干细胞定向分化^[11, 19]。本文结果显示,与以往在成熟内皮细胞上观察到的现象类似^[20],剪切应力作用于 EPCs 后,随着剪切应力作用时间的延长,其 F-actin 肌丝逐渐增粗,出现沿流体方向排列的应力纤维,提示层流剪切应力亦可改变 EPCs 细胞骨架的排列。进一步研究发现,F-actin 稳定剂 JAS(抑制 F-actin 解聚,促进其聚合)或 CytoD(促进 F-actin 解聚,抑制细胞骨架重排)预处理均影响层流剪切应力导致的 EPCs 细胞骨架的重排,阻碍应力纤维的形成。与此同时,JAS 和 CytoD 预处理均不同程度地抑制层流剪切应力对 EPCs vWF、CD31 mRNA 的上调作用。提示层流剪切应力诱导的细胞骨架重排有助于 EPCs 向内皮细胞分化。

细胞骨架与细胞膜上的特殊结构如黏附斑、细胞间连接等相互联系,并与细胞核的支架系统相互作用,从而成为细胞运动、细胞形态维持和跨膜信息传递的基础。用高压电镜、组化、冰冻蚀刻等技术发现了一些 mRNA、多聚核糖体及蛋白质转译延伸因子在细胞骨架的定位,提示细胞骨架与基因表达有关。因而在层流剪切应力诱导的 EPCs 细胞骨架重排过程中,势必会导致细胞内信号分子的相互接触,进而激活 vWF、CD31 的上游信号分子,诱导 vWF、CD31 mRNA 的表达。

小 G 蛋白 Ras 是一种信号传递蛋白,可调节细胞的增殖、分化等生物学功能^[21]。研究显示,Ras 是层流剪切应力与下游信号转导级联间的重要链接:层流剪切应力可快速激活 Ras,引起下游众多信号如丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路的开放或关闭,进而诱导基因的转录,故有学者将 Ras 称为“分子开关”^[19]。本研究发现,层流剪切应力处理可引起 EPCs Ras 活性上调,其表达与层流剪切应力作用时间有关,具有快速、双向性的特点:在刺激 10 s 时达到高峰,5 min 左右降至未刺激水平。而 JAS 或 CytoD 预处理均明显抑制层流剪切应力激活的 Ras 活性,提示 JAS 或 CytoD 处理有可能通过阻抑应力纤维的形成而导致 Ras 活性下降,进而引起相应信号通路异常,抑制层流剪切应力促 EPCs 的内皮分化效应。进一步研究显示,过表达 Ras 则可增强层流剪切应力促 EPCs 的分化效应。

综上所述,层流剪切应力可以促进 EPCs 向内皮细胞分化,涉及到的机制可能是层流剪切应力对细胞骨架 F-actin 产生影响,进而导致 Ras 活性改变所致。但细胞骨架与多种细胞成分(如整合素、G 蛋白、细胞核等)相连,又可直接将应力以细胞张力的形式传布到各个细胞成分;因此,层流剪切应力促进 EPCs 向内皮细胞分化的信号转导过程远非如此简单,尚需深入研究。

参考文献:

- [1] Mannarino E, Pirro M. Endothelial injury and repair: A novel theory for atherosclerosis [J]. *Angiology*, 2008, 59(2 Suppl): 69-72.
- [2] Al Mheid I, Quyyumi AA. Cell therapy in peripheral arterial disease [J]. *Angiology*, 2008, 59(6): 705-716.
- [3] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. *Science*, 1997, 275(5302): 964-967.
- [4] Yamamoto K, Takahashi T, Asahara T, *et al.* Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress [J]. *J Appl Physiol*, 2003, 95(5): 2081-2088.
- [5] 李岩,唐可欣,李宏,等.高糖对大鼠晚期内皮祖细胞增殖、迁移、黏附及分泌功能的影响[J].*中国病理生理杂志*,2011(12): 2296-2301.
- [6] Cheng M, Wu J, Liu X, *et al.* Low shear stress-induced interleukin-8 mRNA expression in endothelial cells is mechanotransduced by integrins and the cytoskeleton [J]. *Endothelium*, 2007, 14(6): 265-273.
- [7] Cheng M, Wu J, Li Y, *et al.* Activation of MAPK participates in low shear stress-induced IL-8 gene expression in endothelial cells [J]. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*, 2008, 23(Suppl 1): 96-103.
- [8] Gudi S, Huvar I, White CR, *et al.* Rapid activation of Ras by fluid flow is mediated by G α (q) and G β gamma subunits of heterotrimeric G proteins in human endothelial cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(6): 994-1000.
- [9] Gudi SR, Clark CB, Frangos JA. Fluid flow rapidly activates G proteins in human endothelial cells. Involvement of G proteins in mechanochemical signal transduction [J]. *Circ Res*, 1996, 79(4): 834-839.
- [10] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(9): e45.
- [11] Patwari P, Lee RT. Mechanical control of tissue morpho-