

文章编号:1004-7220(2011)02-0128-05

粘着斑激酶在血管内皮细胞黏附和迁移中的作用

沈 阳¹, 沈 楠¹, 刘文辉¹, 赖 怡¹, 李 良¹, 康 敏¹, 付 强¹, 刘肖珩^{1,2}

(1. 四川大学 华西基础医学与法医学院, 生物医学工程研究室, 成都 610041;

2. 西藏大学 医学院, 拉萨 850002)

摘要:目的 采用粘着斑激酶(focal adhesion kinases, FAK)抑制剂抑制 FAK 在 Y397 位点的酪氨酸磷酸化, 测定不同浓度的 FAK 抑制剂的对内皮细胞黏附、迁移及下游信号 Rac1 蛋白表达的影响, 探索粘着斑激酶在内皮细胞黏附和迁移中的作用。**方法** 运用内皮损伤模型(划痕法)测定 FAK 抑制剂在 2、4、8、24 h 各时间点对 EA.hy 926 细胞迁移的影响。Western blot 结合免疫荧光测定不同浓度的 0~250 nmol/mL 的 FAK 抑制剂的加入对 Rac1 蛋白分布和表达的影响。**结果** 随着 FAK 抑制剂浓度的增加, 细胞迁移距离减少, Rac1 蛋白表达逐渐减弱。**结论** 抑制 FAK 的磷酸化将抑制内皮细胞的黏附和迁移的生物学行为, 下游 Rac1 蛋白表达降低。内皮细胞的黏附和迁移与 FAK-Rho GTPases 信号轴相关。

关键词: 粘着斑激酶; 内皮细胞; 蛋白表达; 细胞黏附; 细胞迁移

中图分类号: R 3 文献标志码: A

Role of focal adhesion kinases in adhesion and migration of endothelial cells

SHEN Yang¹, SHEN Nan¹, LIU Wen-hui¹, LAI Yi¹, LI Liang¹, KANG Min¹, FU Qiang¹, LIU Xiao-heng^{1,2} (1. Institute of Biomedical Engineering, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Medical College, Tibet University, Lasa 850002, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of focal adhesion kinases (FAK) inhibitor with different concentration on the adhesion and migration of endothelial cells (ECs) and the expression of downstream Rac1 protein, and to explore the role of FAK in adhesion and migration of ECs by using FAK inhibitor to inhibit the phosphorylation of Y397 site of FAK. **Method** Scratch wound migration assay was performed to examine the effect of FAK inhibitor with different concentration (from 0 nmol/mL to 250 nmol/mL) on ECs migration at 2, 4, 8 and 24 h, respectively. Western blot combined with immunofluorescence analysis were performed to determine the effect of FAK inhibitor with different concentration on distribution and expression of Rac1 protein. **Results** With the concentration of FAK inhibitor increased, ECs migration distance and the Rac1 protein expression decreased. **Conclusions** The inhibition of FAK phosphorylation could inhibit cell adhesion and migration with the decrease in downstream Rac1 protein, and ECs adhesion/migration was related to FAK-Rho GTPases signaling pathways.

Key words: Focal adhesion kinases (FAK); Endothelial cells (ECs); Protein expression; Cell adhesion; Cell migration

血管内皮细胞(vascular endothelial cells, VECs) 的黏附和迁移行为在血管生理、病理活动中扮演着

收稿日期:2010-09-28; 修回日期:2010-12-03

基金项目:国家自然科学基金资助项目(10972148), 中国博士后科学基金面上资助项目(20090461340), 第三批中国博士后基金特别资助项目(201003702)。

通讯作者:刘肖珩, 教授, 博士研究生导师, E-mail: liuxiaohg@scu.edu.cn。

极为重要的角色^[1]。临床观察证明,血管外科手术引起的伤口愈合、内皮损伤区的再内皮化都伴随着 VECs 向伤口处的迁移^[2]。对于一些植入物材料来说,植入后邻近的 VECs 迁移是其表面再内皮化所需细胞的主要来源。VEC 迁移是一种复杂的细胞力学生物学行为。在持续力学刺激下,单个细胞迁移至少包括以下力学生物学事件:(1)细胞前沿板状伪足和丝状伪足形成、延长并与细胞外基质黏附形成粘着斑与新的牵拉点;(2)由 actin-myosin 细胞骨架产生收缩力使细胞体前移;(3)细胞后沿与基底形成黏附斑的解离。上述每一个步骤都离不开细胞骨架的变化,尤其是微丝和微管的动态变化^[3]。

细胞在迁移过程中,细胞骨架蛋白的动态组装、细胞和细胞外基质之间黏着的动态变化、周围基质的重塑等以及这些反应在迁移过程中的协调涉及复杂的信号调节^[4]。最近的研究表明,黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)等在细胞的迁移中发挥重要作用^[5]。FAK 是非受体酪氨酸激酶,其上有 6 个酪氨酸磷酸化位点。FAK 的激活需要 Tyr397 残基的自磷酸化,激活后 FAK 产生能与含有 SH2 区域的蛋白结合的位点,而 FAK 的 C 端有能与含有 SH2 区域的蛋白结合的结构。FAK 作为一个支架蛋白招募如 PI3K 的 p85 亚基, SFKs、Paxillin 等具有 SH2 或 SH3 区域的蛋白与之结合,将信号传递给下游的 MAPK 和 Rho GTPases,最终导致细胞骨架的动态变化和黏着斑的解离。FAK 的 C-端区的脯氨酸序列是 FAK 相关的 GTPases 调节因子的高亲和力结合位点。与 FAK 结合的 Graf 可以作为小 G 蛋白 Rho GTPases 的负性调节因子,影响肌动蛋白张力纤维和黏着斑的聚集过程,最终调节细胞的黏附和迁移^[6]。

小 G 蛋白 Rho GTPases 通过整合胞外信号,精确调控细胞骨架的组装,其主要成员包括 RhoA、Rac1 和 Cdc42。Rho 信号通路在联系细胞膜表面受体和细胞内各种反应中起关键作用,主要是通过肌动蛋白细胞骨架发挥调节细胞迁移的作用。研究表明,激活的 RhoA 可使细胞形成微丝束和黏着斑, Rac1 控制片状伪足和细胞膜褶皱的形成,而 Cdc42 激活后触发丝状伪足的形成。RhoA、Rac1 和 Cdc42 在细胞迁移的过程中起着非常重要的作用^[7]。

本文采用 Golubovskaya 等^[8]在 2008 年筛选的

FAK 抑制剂 1,2,4,5-苯四胺四盐酸盐(1,2,4,5-Benzenetetraamine Tetrahydrochloride)抑制 FAK 在 Y397 位点的酪氨酸磷酸化,测定不同浓度的 FAK 抑制剂的对血管内皮细胞黏附、迁移及下游小 G 蛋白 Rac1 表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

实验采用人脐静脉内皮细胞(HUVECs)株 EA.hy926 为本实验室保存;1640 培养基和胰蛋白酶购自 Invitrogen 公司;FAK 抑制剂购自 Sigma 公司;Rac1 兔多克隆抗体(sc-59)购自 Santa Cruz 技术有限公司。

1.2 细胞培养

EA. Hy926 细胞的鉴定由本实验室前期工作完成。细胞培养选用含 10% 胎牛血清和 2% HAT 的 1640 培养基,置于 37 °C、5% CO₂ 的孵育箱中,饱和湿度条件下静置培养。待细胞铺满瓶底后,用 0.25% 胰酶消化吹散成单个细胞,取对数生长期细胞进行实验。

1.3 不同浓度 FAK 抑制剂的对细胞黏附的影响

以 1×10^6 /孔接种 EA. Hy926 细胞于 6 孔细胞培养板 24 h 后,PBS 清洗,各孔加入 2 mL 含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基。采用新鲜配置初始浓度为 1 $\mu\text{mol/mL}$ 的 FAK 抑制剂,各孔依次加入不同量的 FAK 抑制剂,使各孔终浓度分别为 0 nmol/mL (对照)、50 nmol/mL、100 nmol/mL、150 nmol/mL、200 nmol/mL、250 nmol/mL。4 h 后观察,拍照。

1.4 划痕法测定不同浓度 FAK 抑制剂的对细胞迁移的影响

采用划痕法检测 FAK 抑制剂对内皮细胞的迁移的影响。以 1×10^6 /孔接种 EA. Hy926 细胞于 6 孔细胞培养板,用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液培养。待细胞生长面积达 90% 后,改用无血清 RPMI 1640 培养液饥饿 8 h,并加入工作浓度为 5 $\mu\text{mol/mL}$ 的羟基脲抑制细胞增殖。用细胞刮子垂直刮出损伤区,并用 PBS 将刮掉的细胞冲洗干净后加入无血清培养液,并依次在每空中加入不同浓度的 FAK 抑制剂。在各时间点(0、2、4、8、24 h)拍照获得细胞迁移的图片。重复该实验 3 次,采用 Image J 图像分析软件测量划痕两侧的细胞迁移距离。并对所得数据进行统计学分析。

1.5 不同浓度 FAK 抑制剂的对 Rac1 表达的影响

1.5.1 免疫荧光

如 1.3 将不同浓度的 FAK 抑制剂加入 6 孔板 4 h 后,将待染样本用 PBS 冲洗 2 次,用 4% 多聚甲醛固定液在室温下固定 15 min, PBS 冲洗 3 次,洗去固定液后用 1% Triton X-100 处理样本 5 min,增强细胞膜的通透性。用 PBS 洗去 Triton X-100 后,1% BSA 封闭 15 min。均采用 1% BSA 为稀释液,1:500 稀释 Rac1 一抗(sc-95, Santa 公司,美国),加入待测样本后,37 °C 孵育 2 h, PBS 洗涤 3 次,加入 PE 标记羊抗兔二抗(1:100 稀释)和 DAPI(1:800 稀释)避光孵育 1 h。用 PBS 洗去二抗,甘油封片后使用荧光倒置相差显微镜进行荧光镜检。

1.5.2 Western blot 分析

如 1.3 将不同浓度的 FAK 抑制剂加入 6 孔板 4 h 后,将待染样本用 PBS 冲洗 3 次。各孔加入含 PMSF 的 RAPI 裂解液 200 μ L,收集蛋白,冷冻离心,

加入 loading buffer 煮沸 5 min 使蛋白充分变性。采用 BCA 蛋白定量试剂盒,在分光光度剂(DU 800, Beckman Coulter, Inc., CA, 美国)下对各样品蛋白定量,确保上样量的一致。经 Western blot 跑胶、转膜、一二抗孵育等各步骤后, ECL 显色。

2 结果与讨论

2.1 FAK 抑制剂在室温下的反应

本研究采用 Golubovskaya 等在 2008 年筛选的 FAK 抑制剂 1,2,4,5-苯四胺四盐酸盐(1,2,4,5-Benzenetetraamine Tetrahydrochloride)。该抑制剂在室温下 24 h 具有明显的颜色变化(见图 1),这是由于苯胺中氮原子上未共用电子对与苯环的 π 电子组成共轭体系,发生电子的离域,使氮原子上的电子云密度部分移向苯环,形成大共轭键,溶液颜色逐渐加深。所发生的反应见图 1 所示。因此,在本文的研究中,均采用新鲜配置的 FAK 抑制剂溶液。

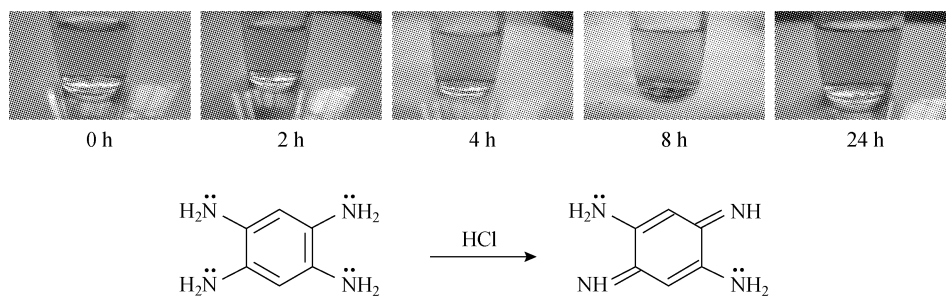


图 1 不同时间点 FAK 抑制剂溶液颜色的变化及其发生的化学反应方程式

Fig.1 The color change of FAK inhibitor exposed in the air at different time and its corresponding chemical equation

2.2 不同 FAK 抑制剂对内皮细胞黏附的影响

FAK 抑制剂对内皮细胞处理 4 h 后,细胞形态发生了明显的变化(见图 2)。对照组细胞生长状态良好,呈现内皮细胞所特有的明显的铺路石状。随着 FAK 抑制剂浓度的增加,可明显观察到细胞铺展面积减小,伪足收缩,胞核突出。至 200 ~ 250 nmol/mL 浓度时,胞间连接被明显抑制。结果证明:FAK 抑制剂能明显地抑制血管内皮细胞的黏附。

2.3 不同 FAK 抑制剂对内皮细胞迁移的影响

图 3 所示在 2、4、8、24 h 各时间点,FAK 抑制剂

对内皮细胞迁移的影响。由图 3 可见,2 h 时,对照组以及 50 和 100 nmol/mL 组的细胞迁移距离与其余各处理组(150、200 和 250 nmol/mL)比较呈显著性差异($P < 0.05$);4 h 时,对照组与 50 和 100 nmol/mL 的迁移距离呈显著性差异,且 50 和 100 nmol/mL 组与其余各处理组之间也呈显著性差异。24 h 时各组之间细胞迁移距离的统计学比较与 8 h 相同。实验结果证明 FAK 抑制剂的加入对细胞迁移作用明显,且呈浓度依赖性。随着 FAK 抑制剂浓度的增加,细胞迁移距离逐渐减少。FAK 抑制剂明显地抑制了血管内皮细胞迁移的生物学行为。

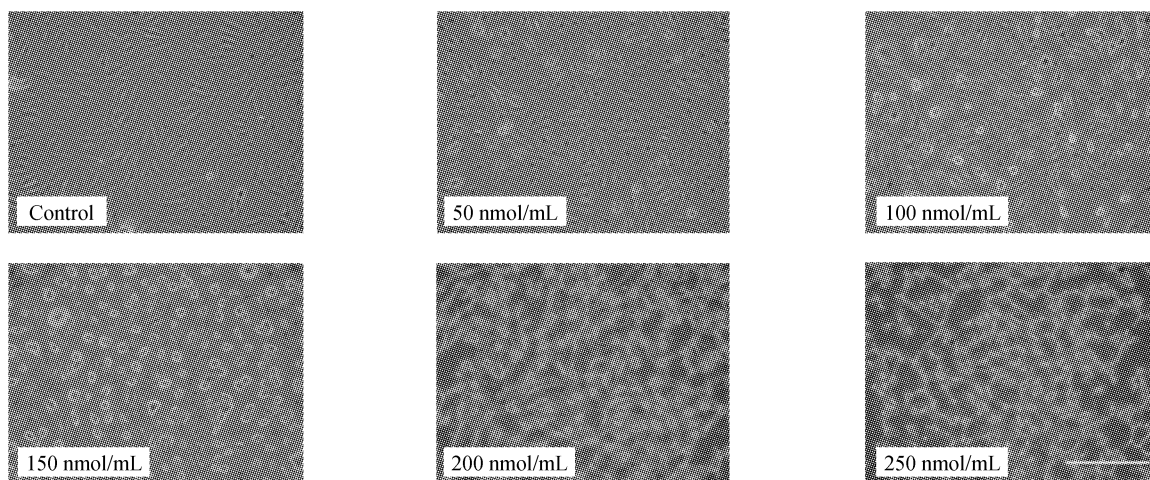


图2 在4 h作用时间,不同浓度的FAK抑制剂对EA.hy 926细胞黏附的影响
 Fig.2 Effects of FAK inhibitor with different concentration on the adhesion of EA.hy 926 cells at 4 h

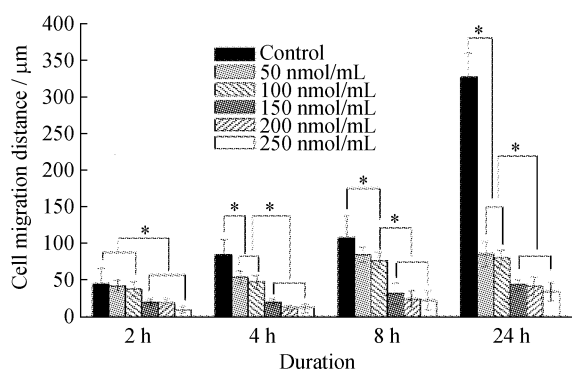
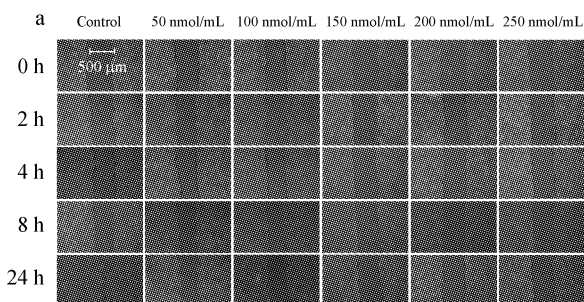


图3 不同浓度的FAK抑制剂对EA.hy 926细胞迁移的影响(0、2、4、8、24 h) (a)各时间点细胞迁移的图像,(b)根据迁移图像计算各时间点细胞迁移的距离。*表示样本间呈显著性差异($P < 0.05$)
 Fig.3 Effects of FAK inhibitor with different concentration on the migration of EA.hy 926 cells at 0, 2, 4, 8 and 24 h, respectively (a) Pictures of scratch wound migration at different hour, (b) The average of cell migration distance. * Statistically significant difference with $P < 0.05$

2.4 不同浓度的FAK抑制剂对内皮细胞Rac1蛋白表达的影响

分别采用免疫荧光和 Western blot 对不同浓度的FAK抑制剂对内皮细胞中小G蛋白Rac1的表达影响进行测定(见图4)。免疫荧光结果表明,Rac1主要在细胞的胞浆内表达。随着FAK抑制剂浓度的增加,Rac1蛋白表达逐渐减弱。证明了FAK抑制剂对FAK在397位点的酪氨酸磷酸化的抑制作用,是通过FAK-Rho GTPases信号途径对下游小G蛋白的表达影响,从而抑制内皮细胞的黏附和迁移生物学行为。内皮细胞的黏附和迁移与FAK-Rho GTPases信号轴相关。

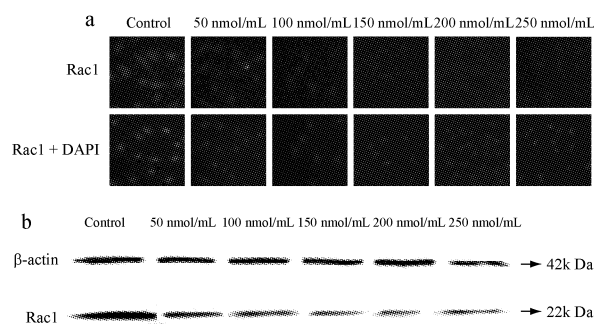


图4 不同浓度的FAK抑制剂对EA.hy 926细胞中Rac1蛋白表达的影响 (a)免疫荧光显示不同浓度的FAK抑制剂下Rac1蛋白的表达强度,(b)Western blotting测定Rac1蛋白的表达
 Fig.4 Rac1 expression of EA.hy 926 cells treated by FAK inhibitor with different concentration (a) Rac1 expression of FAK inhibitor with different concentration by immunofluorescence images, (b) Rac1 expression of EA.hy 926 cells by Western blotting

3 结语

FAK 在血管内皮细胞黏附和迁移中的作用起着重要的作用。FAK 磷酸化的抑制使内皮细胞铺展面积减小,伪足收缩,胞间连接被打断,细胞易脱黏附。而 FAK 抑制剂的加入使内皮细胞迁移行为被明显抑制,FAK 抑制剂浓度越大,细胞迁移距离越小。随着 FAK 抑制浓度的增加,Rac1 蛋白表达逐渐减弱。证明了内皮细胞的黏附和迁移与 FAK-Rho GTPases 信号轴相关。

参考文献:

- [1] Vicente Manzanares M, Webb DJ, Horwitz AR. Cell migration at a glance[J]. J Cell Sci, 2005,118(21):4917-4919.
- [2] Lamalice L, Le Boeuf F, Huot J. Endothelial cell migration during angiogenesis[J]. Circ Res, 2007, 100(6):782-794.
- [3] Li S, Guan JL, Chien S. Biochemistry and biomechanics of cell motility[J]. Annu Rev Biomed Eng, 2005,7:105-150.
- [4] Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, et al. Cell migration: Integrating signals from front to back[J]. Science, 2003, 302(5651):1704-1709.
- [5] Wozniak MA, Modzelewska K, Kwong L, et al. Focal adhesion regulation of cell behavior[J]. Bba-Mol Cell Res, 2004,1692(2-3):103-119.
- [6] Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD. Focal adhesion kinase: In command and control of cell motility[J]. Nat Rev Mol Cell Bio, 2005, 6(1):56-68.
- [7] Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases: Biochemistry and biology[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2005,21:247-269.
- [8] Golubovskaya VM, Nyberg C, Zheng M, et al. A small molecule inhibitor, 1,2,4,5-benzenetetraamine tetrahydrochloride, targeting the y397 site of focal adhesion kinase decreases tumor growth[J]. J Med Chem, 2008, 51(23):7405-7416.