

【实验研究】

P38MAPK 通路在内皮细胞 F-actin 蛋白表达中的作用及通络药物的影响*

高怀林^{1,2}, 王玲玲², 贾振华², 朱慧明², 刘克剑², 王宏涛², 吴以岭^{2,Δ}

(1. 河北医科大学附属以岭医院, 河北 石家庄 050091;

2. 国家中医药管理局重点研究室(心脑血管络病), 河北 石家庄 050035)

摘要: 目的:探讨 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)通路在络气虚滞型血管内皮功能障碍模型大鼠血清诱导的内皮细胞纤维状肌动蛋白(F-actin)表达中的作用及通络药物保护血管内皮,防治血管病变的作用机制。方法:首先建立络气虚滞型血管内皮功能障碍(VED)大鼠模型,用模型大鼠血清体外培养人脐静脉内皮细胞(HUVEC)细胞株,实验分为空白对照组、正常血清组、模型血清组、通心络(TXL)组、SB203580组5组。采用Western blot技术检测各组中F-actin、p38、磷酸化p38(phospho-p38)蛋白表达的变化。结果:与空白对照组和正常血清组比较,模型血清组F-actin的蛋白表达明显下调($P < 0.05$),phospho-p38蛋白表达明显升高($P < 0.01$, $P < 0.05$);与模型血清组比较,通心络组和SB203580组F-actin的蛋白表达明显升高($P < 0.01$),phospho-p38蛋白表达明显下调($P < 0.05$)。结论:p38 MAPK信号通路的激活可能参与了络气虚滞型血管内皮功能障碍模型大鼠血清诱导的F-actin蛋白表达的变化及通心络可能通过抑制p38 MAPK信号通路而对内皮功能起保护作用的,这可能是通心络防治血管病变的机制之一。

关键词: 丝裂原活化蛋白激酶;模型大鼠血清;络气虚滞;细胞骨架;纤维状肌动蛋白;通心络

中图分类号: R543 文献标识码: B 文章编号: 1006-3250(2010)09-0769-03

Role of Pathway of p38 Mitogen-activated Protein Kinase in F-actin Protein Expression of Vascular Endothelial Cells and the Effect of Collateral-Dredging Herbs

GAO Huai-lin^{1,2}, WANG Ling-ling², JIA Zhen-hua², ZHU Hui-ming², LIU Ke-jian², WANG Hong-tao², WU Yi-ling^{2,Δ}

(1. Yiling Hospital Affiliated to Hebei Medical University, ShiJiaZhuang 050091, China;

2. Key Laboratory of State Administration of TCM of China (diseases of the cerebrum and blood vessel collateral disease), ShiJiaZhuang 050035, China)

Abstract: Objective: To test the hypotheses that p38 Mitogen-activated protein kinase (P38 MAPK) pathway is involved in the induction of filamentous-actin (F-actin) stimulated by the serum of model rat with vascular endothelial dysfunction of "collateral-QI deficiency" in the vascular endothelial cells and that Tongxinluo capsules (TXL) improve vascular endothelial function and prevent vascular lesion through p38 MAPK pathway. Methods: (1) the construction of animal model of collateral-QI deficiency type with vascular endothelial dysfunction; (2) the culture of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) in different rat serums; (3) Grouping: normal rat serum group, model serum control group, model plus TXL group, model plus SB203580 group. (4) The western blotting for the detection of F-actin, p38, and phospho-p38 protein in HUVEC cells. Results: The expression of F-actin protein was significantly down-regulated in model serum group ($P < 0.05$), and phospho-p38 significantly increased relative to the control group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the expression of F-actin protein of the TXL group and SB203580 group were increased significantly ($P < 0.01$), while the expression of phospho-p38 protein of TXL group and SB203580 group were decreased significantly ($P < 0.05$). Conclusions: P38 MAPK signaling pathway may be involved in the pathological process of the changes of protein expression, and the protective effects of TXL on endothelial cells may be through inhibiting p38 MAPK signaling pathway, which maybe provide one of the mechanisms of TXL treatment of vascular lesion.

Key words: Mitogen-activated protein kinase; serum of model rat; collateral-QI deficiency; filamentous-actin; Tongxinluo capsule

血管内皮功能障碍是血管病变的始动因素且贯穿整个血管病变的始终,所以开展对血管内皮功能障碍的研究,将对血管病变的防治具有积极意义。

血管内皮细胞衬于血管壁内表面,是血管壁与血液间的分界细胞,其形态结构受损或功能改变导致血管内皮屏障功能的损害,促进血管疾病的发生、发展^[1,2]。有研究发现,内皮细胞骨架与血管内皮通透性的调节密切相关,对于维持内皮细胞的屏障功能有重要意义^[3]。纤维状肌动蛋白(filamentous-actin, F-actin)是细胞骨架中的主要收缩蛋白,其含

*基金项目:国家重点基础研究发展计划(国家973计划)项目(2005CB523301);国家十一五“重大新药创制项目”络病理论指导药物开发集成创新技术平台建设项目(2009ZX09313-003)

量减少,可以使内皮细胞单层的通透性增加,导致血管屏障功能的损害,其中 p38 MAPK 通路与内皮细胞损伤和血管通透性关系密切^[4,5]。但是,在病证复合模型大鼠血清诱导内皮细胞骨架的变化、内皮通透性增高的过程中,p38 MAPK 通路的作用如何,目前尚未见研究报道。另外通心络能改善血管内皮功能,对血管性疾病有很好的防治作用^[6,7],但其改善内皮功能是否与改善 p38 MAPK 通路的活性有关?本研究使用络气虚滞型血管内皮功能障碍病证复合模型大鼠血清培养 HUVEC,观察其对细胞骨架蛋白 F-actin 的影响,并探讨 p38 MAPK 信号转导通路是否在该过程中发挥作用及通心络改善血管内皮功能的可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

健康雄性 Wistar 大鼠,体重 220g ~ 250g,购于北京维通利华实验动物中心(许可证号 SCXK(京)2007-0001);HUVEC 细胞株(ATCC 编号 CRL-1730);人脐静脉内皮细胞株购于中国典型培养物保藏中心(武汉大学保藏中心);F12K 培养基购于 Gibco 公司;SB203580,美国 biosource 公司;RIPA 蛋白裂解液,北京 Solarbio 公司;抗人 F-actin 抗体,英国 abcam 公司;抗人 p38 MAPK 单克隆抗体,美国 Cell Signaling 公司;磷酸化 p38 MAPK 单克隆抗体,美国 Cell Signaling 公司;通心络由石家庄以岭药业股份有限公司提供;凝胶成像分析仪,美国 Biorad 公司;DYY-8C 型电泳仪,北京市六一仪器厂;Minispin 离心机,德国 eppendorf 公司。

1.2 大鼠血清的制备

络气虚滞型血管内皮功能障碍模型的建立^[8]:连续喂养雄性 Wistar 大鼠 3% 高蛋白饲料(不限食)4 周后,施加力竭游泳因素,每只造模大鼠在给予 5% 的上述饲料条件下在 25℃ ~ 27℃ 水温的自制游泳缸(60cm × 40cm × 100cm)中,每日强迫负重(按每只造模大鼠自身体重的 5% 计算)游泳,采取 2 次游泳法,前后相差 10min,游泳至力竭为止,以最大限度耗竭动物体力(力竭标准^[9,10]:游泳范围逐渐缩小,动作明显失调、慌张,鼻部在水面上下浮动,头部没入水面下 10s 不能上浮为力竭标准),连续游泳训练 14d。络气虚滞型内皮功能障碍模型建立(表现为精神萎靡,眼睑下垂,反应迟钝;全身毛发枯槁,竖立,皮肤松弛,皮下少有脂肪,甚至抓之触骨;鼻尾颜色可见苍白等)。

正常大鼠和络气虚滞型内皮功能障碍模型大鼠分别取血后离心并收集血清,56℃ 灭活 30min,而后进行过滤除菌,-20℃ 保存备用。

1.3 细胞实验分组

实验分 5 组:(1)空白对照组:无血清培养基(F12K)中加入终浓度为 20% 的胎牛血清;(2)正常血清组:无血清培养基(F12K)中加入终浓度为 20% 的正常大鼠血清;(3)模型血清组:无血清培养

基(F12K)中加入终浓度为 20% 的模型大鼠血清;(4)通心络组:无血清培养基(F12K)中先加入终浓度为 1μg/ml 通心络预处理 6h,然后加入终浓度为 20% 的模型大鼠血清;(5)SB203580 组:于无血清培养基(F12K)中先加入 SB203580(p38 阻断剂,终浓度:25μmol/L)孵育 1h 后加入 20% 模型大鼠血清。各项观察与检测均在血清作用后 6h 进行。

1.4 Western blot 技术检测 HUVEC 中的蛋白表达

Western blot 技术检测 HUVEC 细胞骨架蛋白 F-actin、p38、P-p38 蛋白的含量。按照实验设计刺激 HUVEC 后,加入 0.1ml RIPA 裂解液冰上裂解 30min,4℃ 3000r/min,离心 20min 吸取上清,BCA 法测定总蛋白浓度,用样品缓冲液稀释至 5μg/μl。取 100μg 的蛋白样品于 12% 的 SDS-PAGE 凝胶中进行电泳,待目的蛋白接近凝胶底部时停止电泳,4℃ 120V 恒压电转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 1h。分别加入 1:1000 稀释的 p38 MAPK、phospho-p38 MAPK、F-actin 一抗和 1:500 稀释的 β-actin(内参)一抗,4℃ 孵育过夜,TBST 洗膜 10min × 3 次,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1000)室温孵育 1h,TBST 洗膜 5min × 3 次。ECL 发光显色,凝胶成像系统照相,实验结果采用 quantity one 软件分析,扫描光密度(OD)值,以目的蛋白与内参 β-actin 的比值表示。

1.5 数据统计

统计分析采用 SPSS13.0 软件。数据用均数 ± 标准差来表示($\bar{x} \pm SD$),组间差异用单因素方差分析 One-Way ANOVA 程序进行分析处理,有显著差异者进一步用最小显著差异法行两两之间比较,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞骨架蛋白 F-actin、p38 和 phospho-p38 蛋白表达的变化

与对照组及正常血清组比较,模型血清组 F-actin 蛋白相对表达量显著下调($P < 0.05$),phospho-p38 蛋白相对表达量显著上调($P < 0.01$, $P < 0.05$),p38 蛋白表达无明显变化($P > 0.05$)。与模型血清组相比,通心络组和 SB203580 组 F-actin 蛋白相对表达量显著上调($P < 0.01$),phospho-p38 蛋白相对表达量显著下调($P < 0.05$) (图 1、表 1)。这提示 F-actin 蛋白表达的变化可能与 p38 MAPK 信号通路激活有关,且通心络可能通过抑制 p38 MAPK 信号通路参与了这一病变过程。

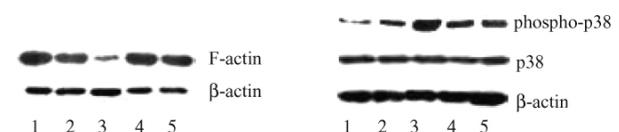


图 1 F-actin、p38 和 phospho-p38 蛋白表达

1. 空白对照组;2. 正常血清组;3. 模型血清组;
4. 通心络组;5. SB203580 组

表1 F-actin、p38和phospho-p38蛋白表达($\bar{x} \pm s$)

Group	n	F-actin	p38	phospho-p38
空白对照组	3	1.97 ± 0.71	1.20 ± 0.44	0.32 ± 0.17
正常血清组	3	1.74 ± 0.44	1.13 ± 0.20	0.99 ± 0.31
模型血清组	3	0.68 ± 0.20**	1.05 ± 0.17	2.24 ± 0.92**
通心络组	3	1.87 ± 0.17▲▲	1.25 ± 0.54	1.18 ± 0.16▲
SB203580组	3	1.59 ± 0.41▲▲	1.43 ± 0.07	1.20 ± 0.47▲

注:vs空白对照组:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;vs正常血清组:# $P < 0.05$;
vs模型血清组:▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$

3 讨论

中医证候如何在离体水平研究一直是中医证候研究的难点,目前尚缺乏在离体细胞水平施加病证复合因素的细胞模型,严重阻碍了证候的病理生理学机制的深入研究。

本实验以HUVEC为实验材料,以络气虚滞型血管内皮功能障碍病证复合模型大鼠血清作为损伤因素,建立了反映人类血管内皮功能障碍病证特点的较为理想的细胞模型。这一模型,无需对病因模拟,提供了理想的体现“病”、“证”结合特点的实验细胞模型,为更深入的实验研究打下了基础,同时也为中医病证复合细胞模型的建立提供了方法学上的借鉴,具有深远的科研价值。

细胞骨架是维持细胞正常形态与功能的重要结构,F-actin是细胞骨架中的重要部分,其基本结构单位是纤维状肌动蛋白(F-actin),F-actin的完整对于维持内皮细胞的正常功能是必须的。F-actin是细胞骨架中的主要收缩蛋白,它的含量减少,可以导致细胞紧密连接结构不能维持,从而使内皮细胞单层的通透性增加,导致血管屏障功能的损害,使血液中的脂质等生物大分子物质更易通过内皮细胞进一步形成泡沫细胞,促进动脉粥样硬化的形成。

MAPK是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是多种信号转导通路的交汇点,细胞运用这一系统把细胞外刺激传递到胞核,介导细胞反应,在调控内皮细胞屏障中起重要作用^[11]。哺乳动物MAPK传导通路主要有5条,其中p38MAPK通路与内皮细胞损伤和血管通透性关系密切^[12]。目前已知p38有 α 、 β 、 γ 、 δ 4种亚型,内皮细胞主要表达p38 α 、 β ,且SB203580是特异的p38 α 和P38 β 的阻滞剂,因具有选择性高、效力强大等特点,故国内外大都用其研究p38MAPK通路。

本研究结果显示,在干预6h时间点,western blot检测结果,与对照组及正常血清组比较,复合模型血清组F-actin蛋白相对表达量显著降低($P < 0.05$),SB203580组能够显著上调F-actin蛋白的表达($P < 0.01$);与复合模型血清组比较,通心络组和B203580组phospho-p38的蛋白表达明显降低($P < 0.05$),而p38在各组中均无明显变化($P > 0.05$)。上述结果提示,在干预组中总的p38在干预前后并无变化,只是phospho-p38发生了变化,说明p38

MAPK信号通路的激活参与了络气虚滞型血管内皮功能障碍模型大鼠血清诱导的F-actin含量的变化,及通心络可能通过抑制p38MAPK信号通路而对内皮细胞屏障功能起保护作用的。其原因可能是通心络通过p38MAPK信号通路增加F-actin的含量,使细胞间隙缩小,进而降低血管内皮通透性,维持机体内环境的稳定而发挥对内皮细胞的屏障保护作用,进而保护血管。

总之,用病证复合模型大鼠血清培养细胞是一种全新的尝试,将为病证复合细胞模型的建立,为证候在细胞、分子水平的研究提供新思路与方法,将对中医证候的深入研究有所裨益、有所启发。

参考文献:

- [1] Hirsch AT. Vascular disease, hypertension and prevention "from endothelium to clinical events" [J]. JACC, 2003, 42(2): 377-379.
- [2] 王海涛, 嵇克刚, 王霞. 改善血管内皮功能在心血管疾病中的研究进展[J]. 光明中医, 2009, 24(6): 1193-1195.
- [3] Park JH, Okayama N, Gute D, et al. Hypoxia/alycemia increase endothelial permeability: Role of second messengers and cytoskeleton [J]. Am J Physiol, 1999, 277(6pt): C1066-1074.
- [4] Tinsley JH, Teasdale NR, Yuan SY. Myosin light chain phosphorylation and pulmonary endothelial cell hyperpermeability in burns [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004, 286(4): L841-847.
- [5] 朱艳军, 李强, 陈波, 等. P38MAPK激活在高血糖致大鼠微血管通透性增高过程中的作用[J]. 基础医学与临床, 2006, 26(9): 947-951.
- [6] 吴以岭, 袁国强, 游佳华, 等. 通心络超微粉对高脂饮食兔主动脉内皮保护机制的实验研究[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(4): 629-633.
- [7] 郝颖, 周京敏, 王克强, 等. 通心络对血管紧张素II致大鼠内皮损伤的保护作用[J]. 中华中医药杂志, 2009, 2(7): 855-858.
- [8] 梁俊清, 孙士然, 吴以岭, 等. 络气虚滞型血管内皮功能障碍病证结合动物模型的建立及通络方药干预研究[J]. 山东中医药大学学报, 2008, 32(1): 52-57.
- [9] Tanaka M, Makamura F, Mizokawa S, et al. Establishment and assessment of a rat of fatigue [J]. Neurosci-Lett, 2003, 352(3): 159-162.
- [10] Fitts R H, Booth F W, Winder W W, et al. Skeletal muscle respiratory capacity, endurance, and glycogen utilization [J]. Am J Physiol, 1975, 228: 1029-1033.
- [11] Schoenwelder SM, Burridge K. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins [J]. Curr Opin Cell Biol, 1999, 11: 274-286.
- [12] Tinsley JH, Teasdale NR, Yuan SY. Myosin light chain phosphorylation and pulmonary endothelial cell hyperpermeability in burns [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004, 286(4): L841-847.

收稿日期:2010-01-27

作者简介:高怀林(1965-),男,河南安阳人,主任医师,医学博士,从事糖尿病和络病的理论与临床研究。

△通讯作者:吴以岭,院士,教授,博士研究生导师,从事络病理论与临床研究。Tel: 0311-85901553, E-mail: ghl650810@sina.com。