

平滑肌细胞骨架结构及其信号调节途径

程云会 韩梅* 温进坤

(河北医科大学基础医学研究所, 河北省医学生物技术重点实验室, 石家庄 050017)

摘要 平滑肌细胞骨架是一个复杂的动态性网络, 是细胞生命活动不可缺少的细胞结构。Rho通过活化其下游靶分子促进应力纤维的形成, 其中Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK)和Dial在该过程中起关键作用; PKC通过在细胞内不同定位的亚型使细胞骨架蛋白磷酸化, 发挥其调节细胞骨架重构的作用。两条信号转导途径通过Src途径相互联系, 共同参与细胞骨架动力学的调节。

关键词 细胞骨架; 平滑肌细胞; Rho小G蛋白酶; 蛋白激酶C

细胞骨架是由多种结构蛋白和收缩蛋白按照特定的模式有机组装而形成的一种立体网格结构, 是保持特定细胞形态和行使收缩功能的重要物质基础。细胞骨架包括微丝、微管和中间纤维3种形式, 其中由肌动蛋白及其结合蛋白组成的微丝是平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)中最主要的细胞骨架。微丝本身是一种复杂的动态性网络结构, 可随着细胞表型、收缩、迁移和增殖等功能的改变而发生可逆性聚合和解聚, 即微丝重建。近年发现, Rho(Ras homology)和蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)等可通过介导蛋白质磷酸化而在SMC微丝重建中起重要的调节作用, 进而影响细胞生物学行为。因此, 探明这些信号转导途径如何参与调节微丝重建以及后者在心血管疾病发生发展中的病理生理学意义将有助于深入理解该类疾病发病的分子机制。

1 平滑肌细胞骨架结构

平滑肌分布广泛、多样, 胚胎起源复杂, 加之通常用于骨骼肌研究的组织固定方法和处理技术常引起平滑肌结构的改变, 使得人们对其超微结构的认识晚于心肌和骨骼肌。近年, 随着细胞生物学和分子生物学技术的飞速发展, 使人们对SMC的结构有了较详细的认识。Small等^[1]将微丝(肌动蛋白纤维)分为两类。一类微丝不与丝蛋白(fibroin)结合, 因与粗肌丝(肌球蛋白纤维)直接相邻, 故称为细肌丝。细肌丝所在的部位称为肌动球蛋白区(actomyosin domain)或收缩区带(contractile region)。另一类微丝能与丝蛋白结合, 其细胞分布与中间纤

维相一致, 称为细胞骨架微丝, 所在的部位为肌动蛋白-中间纤维区或细胞骨架区带。两种区带各成网架, 在细胞内交织排列, 并通过致密体或致密斑发生交联。致密斑是细胞内骨架与细胞外基质相连接的一种复合物结构, 其结构和组成与体外培养细胞中的黏着斑类似。致密斑以一定的间隔呈肋骨样排列于细胞膜的内侧, 与相邻细胞的类似结构相对, 且两层细胞膜也在此处连结甚紧, 因而共同组成了一种机械性偶联——黏附连接(adheren junction), 藉以完成细胞间张力的传递。这样, 由固定于致密体和致密斑的不同种类纤维形成的相互交联的网络结构就形成了完整的细胞骨架, 并通过黏附连接与胞外基质或相邻细胞相连接。SMC骨架的这种立体几何排列方式可以保证收缩张力从细胞到细胞外基质均一地分布。

细胞运动需要胞体内不同亚区的微丝协调一致地解聚、聚合和收缩, 但对该过程的分子机制尚不十分清楚。Burgstaller等^[2]最近发现, 在A7r5细胞周边部位存在的一种不连续的肌动蛋白微功能区在细胞的迁移运动中起重要作用。肌动蛋白微功能区位于应力纤维-黏着斑界面之间, 含有不被鬼笔环肽染色的变构型肌动蛋白。该微功能区可特异性募集核肌动蛋白(coractin)和p190Rho GAP (GTPase-

收稿日期: 2004-04-05 接受日期: 2004-07-28

国家自然科学基金(No.30270499)和河北省自然科学基金(No.303454)资助项目

* 通讯作者。Tel: 0311-6265563, Fax: 0311-6047450, E-mail: hanmei@hebm.edu.cn

activating protein)。前者具有稳定肌动蛋白聚合的作用,后者通过拮抗 RhoA 的活性而抑制收缩。另外,二者还可通过排除该区域的肌球蛋白来抑制收缩。用佛波酯(phorbol esters, PKC 特异性激动剂)刺激细胞产生的收缩在该区域被局部性抑制,这种局部持续性的收缩丢失有利于该区域细胞骨架发生重构,出现黏着斑倒转、podosomes 小体(一种包含肌动蛋白、 α -辅肌动蛋白和黏着斑蛋白的圆柱样结构)形成等特征性改变。这种肌动蛋白微功能区的存在使细胞骨架在不影响其整体结构的前提下发生局部重构、形成伪足,为细胞的迁移运动提供必要的支撑。

2 Rho 相关小 G 蛋白调节应力纤维的形成

Rho 因属于小 G 蛋白酶中的 Ras 超家族蛋白而得名。现在已发现的 Rho 蛋白家族成员有 Rho (RhoA、RhoB 和 RhoC)、Rac (Rac1、Rac2 和 Rac3/Rac1B/RhoG)、Cdc42 (Cdc42Hs、Chp、G25K 和 TC10)、Rnd (Rnd3/RhoE、Rnd1/Rho6 和 Rnd2/Rho7)、RhoD 和 RhoH。目前对 Rho、Rac 和 Cdc42 这 3 种蛋白质的功能了解最多,它们在细胞骨架调节中起着枢纽作用^[3]。这 3 种蛋白质都参与含整合素的黏着斑的组装,其中 Rho 诱导应力纤维(stress fiber, SF)的形成;Rac 参与片层伪足(lamellipodium)的产生;Cdc42 参与细胞表面丝状伪足(filopodium)的形成。Rnd 与 Rho 和 Rac 拮抗。

RhoA 是介导应力纤维形成最主要的途径,它既可直接调节收缩蛋白参与微丝骨架的重构,又可通过改变血清效应因子(serum response factor, SRF)活性调节不同收缩蛋白基因的表达,从而长期调整微丝骨架(图 1)。应力纤维是由微丝与肌球蛋白组装成的一种不稳定性收缩束。RhoA 诱导的应力纤维包括捆绑成束的微丝和肌球蛋白纤维两部分,大致与细胞长轴平行分布。在 SMC 和成纤维细胞中,应力纤维还包括许多与平滑肌收缩装置相关的蛋白质,如 SM22 α 、aldesmon、tropomyosin 和 calponin 等。

目前,对 RhoA 诱导应力纤维形成的分子机制已有了较深入的认识^[4],发现了许多 RhoA 下游的靶分子,如 ROCK(Rho-associated coiled-coil kinase)、rhotekin (teki 即日语“靶”之意)、rhophilin(一种与 GTP-Rho 特异性结合的蛋白)、PRK2(protein kinase C related kinase 2)和枸橼蛋白(citron)等。其中 ROCK 是一种丝/苏氨酸激酶,也称为 Rho 激酶或

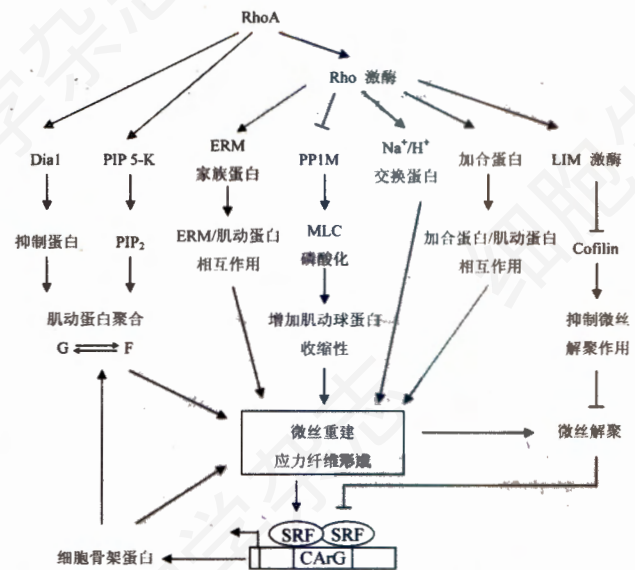


图 1 RhoA 调节应力纤维形成的示意图^[4,7]

PIP 5-K: 磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸酶; PIP₂: 磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸; PP1M: I 型肌球蛋白磷酸酶; MLC: 肌球蛋白轻链; G: 肌动蛋白单体; F: 肌动蛋白纤维; CARG: SRF 结合的顺式作用元件; ↓: 激活作用; ⊥: 抑制作用。

ROCK, 其诱导的肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC)磷酸化是调节 SMC 粗肌丝聚合的分子机制之一,在应力纤维形成中起重要作用。ROCK 可抑制肌球蛋白轻链磷酸酶(myosin light-chain phosphatase, MLCP/PP1M)中肌球蛋白结合亚基的活性,通过破坏肌球蛋白轻链激酶(myosin light-chain kinase, MLCK)和 MLCP 间的平衡,提高 MLCK 的活性,最终导致 MLC 非 Ca²⁺ 依赖的磷酸化水平增加。MLC 的磷酸化可促进肌球蛋白纤维组装和肌动蛋白依赖的肌球蛋白 ATP 酶活性,诱导肌动蛋白纤维成束和产生张力。电镜研究提示,在肌细胞中,有一个肌球蛋白单体储存池,在 MLC 被磷酸化的收缩激活过程中,池中的单体肌球蛋白被重新募集到粗肌丝上,导致纤维密度的增加。

Rho 激酶可使 LIM(一类富含半胱氨酸且分子结构中具有一个或多个锌指结构的蛋白质家族)激酶磷酸化, LIM 激酶通过灭活 cofilin(一种微丝解聚因子),抑制肌动蛋白纤维解聚,间接促进应力纤维的形成。然而,Edwards 等^[5]发现 LIM 激酶也可被 Pak1 激酶活化,使得该途径变得更加复杂,这提示 LIM 激酶也参与由 Rac 和 Cdc42 诱导的肌动蛋白纤维形成。Rho 激酶可使 ERM(微丝骨架和跨膜受体间的一类接头分子)家族蛋白磷酸化,促进该类蛋白质与肌动蛋白和跨膜受体间的相互作用,和应力

表1 PKC 的分类及特性

类别	分子结构	包含亚型	激动剂
经典 PKC	4 个保守区(C1~C4)和 5 个可变区(V1~V5)	PKC α 、PKC β_1 、PKC β_2 和 PKC γ	Ca ²⁺ 、PS、DG 和佛波酯
新 PKC	缺失 C2 区	PKC δ 、PKC η 、PKC θ 、PKC ϵ 和 PKC μ	PS、DG 和佛波酯
非典型 PKC	缺失 C2 区和 DG 结合位点	PKC λ 、PKC ζ 和 PKC τ	PS

纤维的形成。另外, Rho 激酶介导的加合蛋白(Adducin)和 Na⁺/H⁺ 交换蛋白的磷酸化也对应力纤维的形成有促进作用(图 1)。

除 Rho 激酶外, RhoA 的其他靶分子也参与应力纤维形成的调节。在成纤维细胞中, 转染持续活化的 RhoA 可诱导形成粗大、平行的应力纤维; 而单独转染持续活化的 ROCK 仅能诱导形成星状的应力纤维。这提示, 对“正常”的应力纤维形成来讲, ROCK 不是 RhoA 唯一的靶蛋白(图 1)。最近发现的 Dial(含 Formin 同源区 FH₁ 和 FH₂ 的家族蛋白成员之一)可能是 RhoA 诱导形成正常功能型应力纤维所必需的另一靶分子。抑制蛋白(profilin)是一种普遍存在的肌动蛋白单体结合蛋白, 通过促使肌动蛋白-ATP 单体与肌动蛋白组装位点结合来加速肌动蛋白聚合。Dial 可与抑制蛋白相互作用, 结合于抑制蛋白分子中的 RhoA 活化位点, 只含 FH₁ 和 FH₂ (profilin 结合功能域)的 Dial 仍具有诱导应力纤维形成的能力。RhoA/Dial/profilin 复合物介导肌动蛋白纤维的聚合, 随后肌动蛋白纤维与粗肌丝结合, 从而形成完整的应力纤维。单独转染持续活化的 Dial 形成平行状应力纤维的数量较少, 如果调整 ROCK 和 Dial 活性的表达于适当比例时, 可诱导形成粗大、平行的应力纤维。此外, RhoA 可通过活化磷脂酰肌醇-4, 5-二磷酸激酶(PIP 5-K)导致胞内磷脂酰肌醇二磷酸(PIP₂)水平升高, 后者具有促进肌动蛋白聚合的作用。

RhoA 还通过调节 SRF 的活性来影响细胞骨架蛋白的表达(图 1), 使微丝骨架结构与其功能相适应。这是由微丝动力学介导、以 SRF 为核心的一种反馈性调控过程^[6,7]。微丝动力学调节 SRF 活性的分子机制为: (1)调节胞浆和胞核中 SRF 的分布^[8]。(2)调节阴阳因子(YY1)对 SRF 的抑制作用^[9]。(3)通过改变 SRF 协同因子 MAL(megakaryocytic acute leukemia)细胞内的亚定位而调节 SRF 的活性^[10]。

3 PKC 对微丝骨架重构的调节

PKC 属肌醇磷脂依赖性丝/苏氨酸激酶家族。目前该家族已发现了 12 种亚型, 根据分子结构和功

能的不同分为 3 类(表 1): (1)经典 PKC。包括 PKC α 、PKC β_1 、PKC β_2 和 PKC γ , 该类 PKC 分子中均含有 4 个保守区(C1~C4)和 5 个可变区(V1~V5), 可被 Ca²⁺、磷脂酰丝氨酸(PS)、二酰基甘油(DG)和佛波酯所激活。(2)新 PKC。包括 PKC δ 、PKC η 、PKC θ 、PKC ϵ 和 PKC μ , 其分子特征是 C2 区缺失, 可被 PS、DG 和佛波酯激活, 但不需要 Ca²⁺。(3)非典型 PKC。包括 PKC λ 、PKC ζ 和 PKC τ , 其分子中缺失 C2 区和 DG 结合位点, 仅被 PS 激活。PKC 各亚型具有功能和组织分布的特异性, 通过引起多种底物蛋白(如膜蛋白、骨架蛋白、酶蛋白)的磷酸化而发挥作用。大量研究证实, PKC 是细胞骨架的重要调节因素, 该通路与以细胞骨架重构为基础的细胞收缩、迁移、增殖和分化等多种生物学行为关系密切^[11]。

PKC 的不同亚型及其在细胞内的不同定位决定其在细胞骨架调节中的不同作用。原代培养的牛血管 SMC 中表达 PKC α 、PKC β_1 、PKC ϵ 、PKC η 、PKC θ 、PKC ζ 和 PKC λ 等多种 PKC 亚型。用胰岛素样生长因子(IGF-I)刺激处于静止状态的细胞时, 胞浆中 PKC β_1 的活性升高, PKC ϵ 则反之; 胞膜中 PKC η 和 PKC ζ 的活性升高。说明这些 PKC 亚型参与了 IGF-I 诱导 SMC 增殖、迁移和基因表达的过程^[12]。PKC δ 基因缺失 SMC 的细胞骨架结构异常。机械刺激时, 张力诱导的桩蛋白(paxillin)、黏着斑激酶和黏着斑蛋白(vinculin)的磷酸化水平低于正常水平, 导致机械刺激诱导的 SMC 迁移性降低, 说明 PKC δ 在机械刺激诱导 SMC 迁移过程中起关键作用^[13]。PKC α 参与鼠巨噬细胞的肌动蛋白细胞骨架重构和其后血小板前体的形成^[14]。在内皮素诱导心肌肥大过程中, PKC ϵ 介导黏着斑激酶的磷酸化^[15]。

许多细胞骨架结合与调节蛋白如黏着斑蛋白、尾蛋白(talin)、 α -辅肌动蛋白(α -actinin)、MARCKS(myristoylated alanine-rich C kinase substrate)、普列克底物蛋白(pleckstrin)、微绒毛蛋白(ezrin)、fascin(一种 58 kDa 的肌动蛋白交联蛋白)和膜突蛋白(moesin)等都是 PKC 作用的靶。PKC 可直接引起该类蛋白质的磷酸化, 从而调节细胞骨架重建^[16]。如 MARCKS 是一种重要的膜-骨架交联蛋白, 也是

PKC的直接底物。当MARCKS被PKC磷酸化后,它从膜中脱离,进入胞浆;被去磷酸化后又重新将膜和骨架蛋白交联^[17]。

黏着斑对维持细胞骨架的稳定性具有重要作用,该结构中包含许多信号分子,如整合素、尾蛋白、 α -辅肌动蛋白和桩蛋白等,这些骨架蛋白的磷酸化影响着黏着斑的结构。PKC α 、PKC δ 和PKC ϵ 等亚型都存在于黏着斑结构中,并可以磷酸化这些信号分子,导致黏着斑断裂;另一方面,活化的PKC可通过增加黏着斑激酶的活性、促进整合素的碱性化及调节其他蛋白质的功能而促进黏着斑形成^[18]。

在细胞骨架重建调控过程中,PKC和Rho信号转导途径间有相互制约、相互平衡的关系,共同调节细胞骨架动力学。佛波酯处理的SMC中,其显著效应是破坏应力纤维、产生皱褶。对其分子机制的研究证实,PKC可通过多种途径活化Src激酶,活化的Src使酪氨酸磷酸化,进而激活p190RhoGAP,后者使RhoGTPase活化并水解Rho-GTP、使Rho失活,最终导致肌动蛋白应力纤维的解聚^[16]。另外,PKC通过磷酸化Rho-鸟嘌呤分离抑制因子(GDI),诱导胞浆中的Rac活化并转位至胞膜,从而调节片层伪足的生成^[19]。在神经细胞中,过表达PKC δ 和PKC ϵ 的调节功能域导致应力纤维的解聚、轴突的形成,而RhoA的活化可抑制PKC的这种效应^[20]。

4 小结

The Cytoskeleton and Its Signal Regulation in Smooth Muscle Cells

Yun-Hui Cheng, Mei Han*, Jin-Kun Wen

(Hebei Laboratory of Medical Biotechnology, Institute of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract The cytoskeleton of smooth muscle cells (SMC) is a complex and dynamic network, which is an essential cellular structure for cell survive. Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) and Dial, as the downstream targets of Rho, induce the formation of the stress fibres. Protein kinase C plays a key role during the reorganization of cytoskeleton by different isoforms on subcellular location. The Rho and PKC develop cross-talk through Src signal pathway, regulating the cytoskeleton of SMC.

Key words cytoskeleton; smooth muscle cell; Rho-like small GTPase; protein kinase C

Received: April 5, 2004 Accepted: July 28, 2004

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30270499) and the Natural Science Foundation of Hebei Province (No. 303454)

*Corresponding author. Tel: 86-311-6265563, Fax: 86-311-6047450, E-mail: hanmei@hebmu.edu.cn

细胞骨架是构成SMC收缩器的主要部分,也是细胞生命活动不可缺少的细胞结构。以细胞骨架重建为基础的SMC收缩、迁移和增殖在许多心血管疾病过程中具有重要的生理、病理意义。目前对SMC细胞骨架异常重建在这些疾病中的确切作用还不十分了解,仅对该过程的诱发因素、信号调节途径有了一定认识。研究参与SMC细胞骨架重建调节的信号蛋白的特征及细节有助于研发治疗心血管病的高特异性药物。

参考文献 (References)

- [1] Small JV *et al. Acta Physiol Scand*, 1998, **164**: 341
- [2] Burgstaller G *et al. J Cell Sci*, 2004, **117**: 223
- [3] Suetsugu S *et al. Int Rev Cytol*, 2003, **229**: 245
- [4] van Nieuw Amerongen GP *et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21**: 300
- [5] Edwards DC *et al. Nat Cell Biol*, 1999, **1**: 253
- [6] Patel K *et al. J Cell Physiol*, 2003, **195**: 435
- [7] Schrott G *et al. J Cell Biol*, 2002, **156**: 737
- [8] Camoretti-mercado B *et al. J Biol Chem*, 2000, **275**: 30387
- [9] Ellis PD *et al. Biochem J*, 2002, **364**: 547
- [10] Miralles F *et al. Cell*, 2003, **113**: 329
- [11] Keenan C *et al. Cell Signal*, 1998, **10**: 225
- [12] Yano K *et al. Endocrinology*, 1999, **140**: 4622
- [13] Li C *et al. FASEB J*, 2003, **17**: 2106
- [14] Romanova LY *et al. J Cell Physiol*, 1999, **179**: 157
- [15] Heidkamp MC *et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, **285**: H1684
- [16] Brandt D *et al. J Biol Chem*, 2002, **277**: 20903
- [17] Dedieu S *et al. Biol Cell*, 2003, **95**: 615
- [18] Yuan SY *et al. Vascul Pharmacol*, 2002, **39**: 213
- [19] Price LS *et al. J Biol Chem*, 2003, **278**: 39413
- [20] Ling M *et al. Exp Cell Res*, 2004, **292**: 135