

CX3CL1介导人脐静脉内皮细胞骨架改变的功能研究

邹丽婷 谢树钦 钟 玲*

(重庆医科大学附属第二医院肾内科, 重庆 400010)

摘要 该研究探讨了趋化因子CX3CL1对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)骨架的影响及其作用机制。CX3CL1刺激HUVECs后, 采用免疫荧光染色技术检测细胞骨架蛋白纤维状肌动蛋白(F-actin)的分布和形态改变, 采用Western blot技术检测胞质内F-actin和磷酸化促分裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinases, MAPKs)的三种亚型[p38、细胞外调节蛋白激酶1/2(extracellular regulated protein kinase 1/2, ERK1/2)和c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)]的表达水平。结果显示, 10 nmol/L CX3CL1刺激HUVECs 30 min后, 细胞的致密外周带逐渐被破坏, 胞质内有应力纤维形成; 120 min后, 外周带消失, 胞质内有大量的致密应力纤维形成; 180 min后, 胞质内应力纤维减少, 少数细胞可见致密外周带。10 nmol/L CX3CL1刺激HUVECs 30 min后, F-actin的表达水平逐渐升高, 并于120 min后达峰值; 10 nmol/L CX3CL1刺激HUVECs 1 min后, 磷酸化p38、ERK1/2和JNK表达水平升高, 5 min后三者的表达水平达峰值; 5 μ g/mL抗CX3CR1抗体抑制10 nmol/L CX3CL1刺激HUVECs后, 磷酸化p38、ERK1/2和JNK的表达水平降低; 30 μ mol/L p38的特异性抑制剂SB203580和ERK1/2的特异性抑制剂PD98059抑制10 nmol/L CX3CL1刺激HUVECs后, 胞质内应力纤维减少, 应力纤维变短, F-actin的表达水平降低。以上研究结果表明, CX3CL1能通过p38和ERK1/2信号通路以时间依赖方式介导HUVECs细胞骨架的重构。

关键词 CX3CL1; 人脐静脉内皮细胞; 促分裂原活化蛋白激酶; F-actin; 应力纤维

Functional Characterization of CX3CL1 in Altering the Cytoskeleton of Human Umbilical Vein Endothelial Cells

Zou Liting, Xie Shuqin, Zhong Ling*

(Department of Nephrology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract This research investigated the effect of CX3CL1 on cytoskeleton in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), and evaluated some possible mechanisms. HUVECs were stimulated with CX3CL1. Immunofluorescence staining technique was used to test changes in distribution and formation of F-actin in HUVECs. Western blot was used to detect expressions of cytoplasmic F-actin and phosphorylated mitogen-activated protein kinases (MAPKs): p38, extracellular regulated protein kinase (ERK1/2) and c-Jun N-terminal kinase (JNK). After 30 min stimulation with 10 nmol/L of CX3CL1 in HUVECs, dense peripheral band began to be destroyed and cytoplasmic stress fiber began to form. After 120 min stimulation with 10 nmol/L of CX3CL1 in HUVECs, peripheral band disappeared and massive cytoplasmic intense stress fiber formed. After

收稿日期: 2015-01-25 接受日期: 2015-04-08

重庆市卫生局医学科研项目(批准号: 2012-1-034)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-63693080, E-mail: lzhi92@sina.com

Received: January 25, 2015

Accepted: April 8, 2015

This work was supported by Medical Research Project of Health Bureau of Chongqing (Grant No.2012-1-034)

*Corresponding author. Tel: +86-23-63693080, E-mail: lzhi92@sina.com

网络出版时间: 2015-06-03 16:21

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150603.1621.001.html>

180 min stimulation with 10 nmol/L of CX3CL1 in HUVECs, cytoplasmic stress fiber decreased, and peripheral band could be seen in some cells. The prominent enhancement of cytoplasmic F-actin was detected starting after 30 min and peaking after 120 min of stimulation with 10 nmol/L of CX3CL1 in HUVECs. The prominent enhancements of phosphorylated p38, ERK1/2 and JNK were detected starting after 1 min and peaking after 5 min of stimulation with 10 nmol/L of CX3CL1 in HUVECs. The up-regulation of phosphorylated p38, ERK1/2 and JNK induced by 10 nmol/L of CX3CL1 could be decreased by 5 μ g/mL of anti-CX3CR1 antibody in HUVECs. The reconstruction of F-actin, the formation of stress fiber and the up-regulation of cytoplasmic F-actin induced by CX3CL1 could be decreased by 30 μ mol/L of SB203580 and PD98059 in HUVECs. SB203580 was used as standard inhibitor for p38. PD98059 was used as standard inhibitor for ERK1/2. In conclusion, CX3CL1 might induce a time-dependent reconstruction of the cytoskeleton through p38 and ERK1/2 signaling pathways in HUVECs.

Keywords CX3CL1; human umbilical vein endothelial cells; mitogen-activated protein kinases; F-actin; stress fiber

抗中性粒细胞胞质抗体(anti-neutrophil cytoplasmic antibody, ANCA)相关性血管炎是一组以小血管壁的炎症和纤维素样坏死、血清中存在针对靶抗原蛋白酶3(protease 3, PR3)或髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)的ANCA为主要特征的系统性自身免疫性疾病,肾、肺和皮肤为主要累及部位^[1],它包括肉芽肿性多血管炎(granulomatosis with polyangiitis, GPA)、显微镜下多血管炎(microscopic polyangiitis, MPA)和嗜酸性肉芽肿性多血管炎(eosinophilic granulomatosis with polyangiitis, EGPA)^[1]。在血管壁炎症期间,内皮细胞作为直接受损的靶器官,发生纤维化、坏死,导致血管壁处肉芽肿形成;同时作为效应细胞被肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素- γ (interleukin- γ , INF- γ)和白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)等炎症因子激活,表达细胞因子,细胞因子促进内皮细胞骨架重构,继而其通透性增高,白细胞和大分子物质跨越内皮细胞迁移至炎症靶部位^[2]。趋化因子CX3CL1是内皮细胞表达的具有黏附和趋化的双重活性的细胞因子。越来越多的研究表明,ANCA-相关性血管炎患者血清中CX3CL1表达水平与伯明翰血管炎活动性分数、C反应蛋白、红细胞沉降率和血清免疫复合物等疾病活动性指标呈正相关^[3-5]。但目前对CX3CL1在ANCA相关性血管炎活动期的具体作用机制尚不清楚,因此本实验用CX3CL1刺激内皮细胞后,观察细胞骨架蛋白F-actin的改变和检测磷酸化MAPKs的表达水平,从而初步探讨CX3CL1在ANCA相关性血管炎活动期的作用及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与细胞

人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)由重庆医科大学附属第二医院病毒性肝炎研究所提供与保存。高糖达尔伯克氏改良伊格尔氏培养基(dulbecco's modified eagle's medium, DMEM)购自Hyclone公司;胎牛血清购自Gibco公司,人重组CX3CL1购自PeproTech公司,抗CX3CR1抗体购自R&D Systems公司,磷酸化蛋白提取试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司,BCA法蛋白定量试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司,SDS-PAGE凝胶配制试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,加强型ECL检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司,抗P-p38、p38、P-ERK1/2、ERK1/2、P-SAPK/JNK和SAPK/JNK抗体购自Cell Signaling Technology公司,抗F-actin抗体购自Gene Tex公司,抗GAPDH抗体购自华安生物药业有限公司,goat anti rabbit IgG HRP购自北京索莱宝科技有限公司,SB203580、PD98059、SP600125购自Millipore公司,AF488[®]-phalloidin购自Invitrogen公司,Hoechst 33342购自Sigma公司。

1.2 细胞培养

HUVECs在含有10%胎牛血清、100 μ g/mL链霉素和100 U/mL青霉素的高糖DMEM培养基中,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂条件下常规培养。细胞长至90%融合时进行传代。

1.3 FITC标记的鬼笔环肽检测HUVECs骨架蛋白的变化

HUVECs以 5×10^4 /孔的密度接种于24孔板,待细

胞融合率达90%后, 无血清高糖DMEM培养基继续培养12 h, 使细胞同步生长并处于静止期。10 nmol/L CX3CL1分别刺激HUVECs 0, 30, 60, 120, 180 min后, 预热的磷酸盐缓冲液盐水(phosphate buffered saline, PBS)洗涤细胞三次, 4%多聚甲醛室温下孵育15 min, PBS洗涤细胞两次, 加入5 U/mL FITC标记的鬼笔环肽(Alexa fluor® 488 phalloidin), 室温下避光孵育1 h, 染色完毕后, PBS漂洗两次, 加入Hoechst 33342(10 µg/mL), 室温下避光孵育20 min, 染色完毕后, PBS漂洗两次。最后24孔板直接置于荧光显微镜上, 观察细胞骨架蛋白F-actin的分布与形态学改变并拍照。

30 µmol/L SB203580(p38的特异性抑制剂)、PD98059(ERK1/2的特异性抑制剂)和SP600125(JNK的特异性抑制剂)提前干预60 min, 10 nmol/L CX3CL1刺激HUVECs 120 min后, 按照上述方法对细胞进行荧光染色, 显微镜下观察F-actin的变化并拍照。

1.4 Western blot检测HUVECs中MAPKs磷酸化和F-actin的表达水平

HUVECs以 5×10^4 /孔的密度接种于24孔板, 待细胞融合率达90%后, 无血清DMEM培养基继续培养12 h, 使细胞同步生长并处于静止期。10 nmol/L CX3CL1分别刺激HUVECs 0, 1, 5, 15, 30 min后, 冷的PBS洗涤细胞两次, 胰酶消化细胞, 再次用冷的PBS洗涤细胞两次, 加入裂解液, 4 °C摇床上缓慢震荡15 min, 4 °C下14 000 r/min离心15 min, 取上清, 按照BCA法蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度后, 往蛋白上清中加入等量1×蛋白上样缓冲液, 沸水中煮5 min使蛋白变性, 取上清分装于EP管中并置于-20 °C保存。取20 µg蛋白, 用5%积层胶和8%分离胶以80 V恒压于室温下电泳3 h, 电泳结束后, 以360 mA恒电流于冰上转膜60 min, 转膜完毕后, 5%牛血清蛋白封闭液于4 °C摇床上封闭1.5 h, 加入抗phospho-p38、p38、phospho-ERK1/2、ERK1/2、phospho-SAPK/JNK和SAPK/JNK抗体(抗体浓度按照说明书稀释), 4 °C孵育过夜。次日, 用含0.1%吐温-20(Tween-20)的三乙醇胺缓冲盐(triethanolamine-buffered saline, TBS)漂洗三次, 每次10 min, 加入辣根过氧化物酶偶联的二抗(1:5 000), 室温下孵育1 h, TBST漂洗三次, 每次10 min, 用加强型ECL检测试剂盒显影, 图像使用Quantity One 4.0软件进行条带灰度分析。

5 µg/mL的anti-CX3CR1抗体封闭CX3CR1 60 min后, 10 nmol/L CX3CL1分别刺激细胞1 min和5 min, 按照上述方法提取总蛋白, 检测p38、ERK1/2和JNK磷酸化蛋白和总蛋白的表达水平。

10 nmol/L CX3CL1分别刺激HUVECs 0, 30, 60, 120, 180 min后, 裂解细胞, 漩涡震荡30 s后, 置于冰上1 min, 反复五次, 4 °C下3 000 r/min离心10 min, 取上清, 即胞质蛋白, BCA法测定蛋白浓度, 蛋白变性, 分转后, -20 °C保存, 检测胞质内F-actin和GAPDH的表达水平。

用30 µmol/L的SB203580、PD98059和SP600125分别提前干预60 min, 10 nmol/L CX3CL1刺激HUVECs 120 min后, 按照上述方法提取胞质蛋白, 检测F-actin和GAPDH的表达水平。

1.5 统计方法

所有实验都重复三次, 数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用SPSS 17.0软件对实验数据进行统计分析, 组间采用单向方差分析(One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

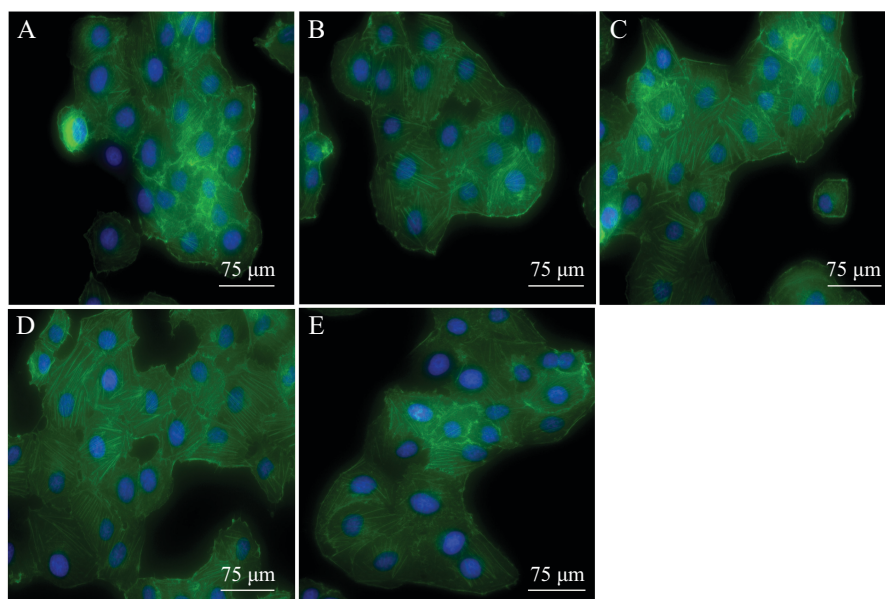
2 结果

2.1 CX3CL1介导HUVECs骨架蛋白F-actin的重构

在荧光倒置显微镜下观察F-actin的染色结果发现, 空白对照的内皮细胞的F-actin(绿色荧光)主要分布于细胞周边, 形成连续而光滑的外周致密带, 细胞呈现出典型“鹅卵石样”外观。少数内皮细胞的胞质内纤细的F-actin隐约可见(图1A)。在10 nmol/L CX3CL1的刺激下, 细胞内的F-actin的分布和形态发生改变, 且呈时间依赖性。10 nmol/L CX3CL1刺激HUVECs 30 min后, 胞质内出现少量应力纤维, 细胞外周的F-actin成锯齿状, 形成的外周致密带被破坏(图1B); 60 min后, 细胞质内出现细长的应力纤维, 细胞变形, 总体上失去“鹅卵石样”外观(图1C), 120 min后, 外周致密带消失, 细胞质内出现大量密集的应力纤维, 且应力纤维贯穿整个细胞(图1D), 180 min后在胞质内应力纤维减少, 少数细胞可见外周致密带(图1E)。

2.2 CX3CL1对HUVECs胞质内F-actin表达的影响

10 nmol/L CX3CL1刺激HUVECs后, Western blot结果发现, CX3CL1以时间依赖方式上调HUVECs胞质内F-actin的表达水平, 与空白对照组相比有显著性差异($P < 0.05$)。空白对照组的细胞能检测到胞质内F-actin的基础水平, 10 nmol/L

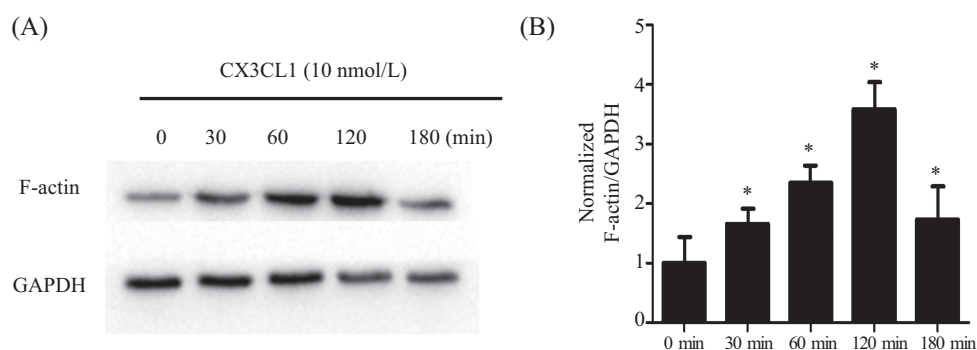


A: 空白对照; B~E: 10 nmol/L CX3CL1分别刺激HUVECs 30, 60, 120, 180 min。

A: the blank control; B~E: HUVECs were stimulated with 10 nmol/L of CX3CL1 for 30, 60, 120, 180 min, respectively.

图1 CX3CL1对HUVECs的F-actin的影响

Fig.1 Effects of CX3CL1 on F-actin in HUVECs



A: 10 nmol/L CX3CL1分别刺激HUVECs 0, 30, 60, 120, 180 min后, 胞质内F-actin的表达水平; B: F-actin和GAPDH的比值。* $P < 0.05$, 与空白对照组(0 min组)比较。

A: the expression of cytoplasmic F-actin in HUVECs stimulated with 10 nmol/L of CX3CL1 for 0, 30, 60, 120, 180 min, respectively; B: the ratio of F-actin to GAPDH. * $P < 0.05$ vs the blank control group (0 min group).

图2 CX3CL1刺激HUVECs后胞质内F-actin的表达水平

Fig.2 Expression of cytoplasmic F-actin in HUVECs stimulated with CX3CL1

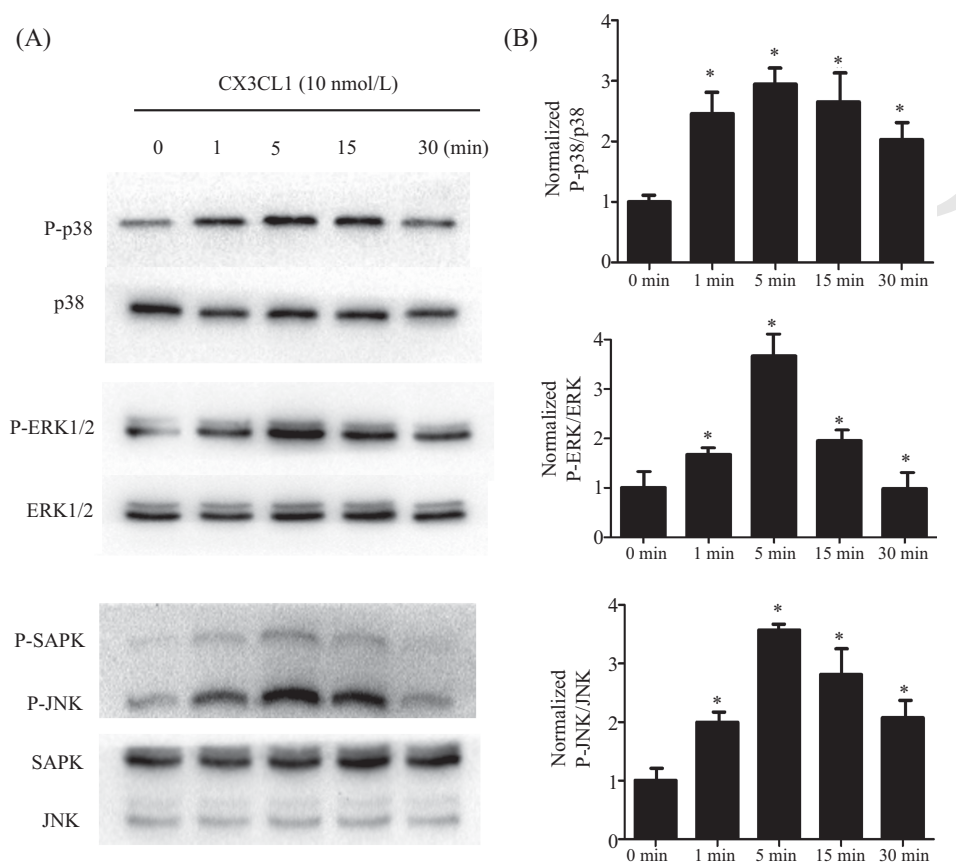
CX3CL1刺激HUVECs 30 min后, 胞质内F-actin的表达水平升高; 当作用时间延长至60, 120, 180 min, F-actin的表达水平在120 min达峰值, 随后逐渐降低; 但180 min时, 仍高于基础水平(图2)。

2.3 CX3CL1对HUVECs中MAPKs磷酸化的影响

10 nmol/L CX3CL1刺激HUVECs后, Western blot结果发现, CX3CL1以时间依赖方式上调HUVECs中的MAPKs磷酸化p38、ERK1/2和JNK的表达水平, 与空白对照组的细胞相比均有显著差异($P < 0.05$)。空白对照组的HUVECs能检测到磷酸化p38、ERK1/2、JNK的基础水平; 10 nmol/L CX3CL1

刺激HUVECs 1 min后, 磷酸化p38、ERK1/2、JNK的表达水平均升高, 当作用时间延长至5, 15, 30 min, 磷酸化p38、ERK1/2和JNK的表达水平在5 min后达最高峰, 随后三者的表达水平均逐渐降低, 但在30 min时, 三者的表达水平仍高于其基础水平(图3)。实验中, 我们检测到HUVECs磷酸化p38和JNK的表达水平在120 min后达基础水平, 而磷酸化ERK1/2的表达水平在60 min后达基础水平(未显示数据)。

5 μ g/mL抗CX3CR1抗体明显抑制由10 nmol/L CX3CL1分别刺激HUVECs 1 min和5 min后引起的p38、ERK1/2和JNK磷酸化蛋白表达水平的升高(图4)。



A: 10 nmol/L CX3CL1分别刺激HUVECs 0, 1, 5, 15, 30 min后, 磷酸化MAPKs(P-p38、P-ERK1/2和P-JNK)的表达水平; B: 磷酸化MAPKs(P-p38、P-ERK1/2和P-JNK)和总MAPKs(p38、ERK1/2和JNK)的比值。* $P < 0.05$, 与空白对照组比较(0 min组)。

A: the expressions of phosphorylated p38、ERK1/2 and JNK in HUVECs stimulation with 10 nmol/L of CX3CL1 for 0, 1, 5, 15, 30 min, respectively; B: the ratio of the phosphorylated MAPKs (P-p38、P-ERK1/2 and P-JNK) to total MAPKs (p38、ERK1/2 and JNK). * $P < 0.05$ vs the blank control group (0 min group).

图3 CX3CL1对HUVECs的MAPKs磷酸化水平的影响

Fig.3 Effects of CX3CL1 on MAPKs phosphorylation in HUVECs

2.4 CX3CL1通过p38和ERK1/2信号通路介导F-actin的重构

如图5所示, 空白对照组HUVECs的F-actin(绿色荧光)主要分布于细胞周边, 形成外周致密带, 少数细胞的胞质内纤细的F-actin隐约可见, 细胞核周围见有少量F-actin纤维(图5A), 10 nmol/L CX3CL1刺激HUVECs 120 min后, 外周致密带消失, 胞质内有大量的致密应力纤维形成(图5B)。30 μ mol/L SB203580和PD98059分别提前干预60 min, 10 nmol/L CX3CL1刺激HUVECs 120 min后, 胞质内应力纤维减少, 应力纤维变短(图5C和图5D); 而30 μ mol/L SP600125对10 nmol/L CX3CL1刺激HUVECs后, F-actin的重排和胞质内应力纤维的形成无明显影响(图5E)。

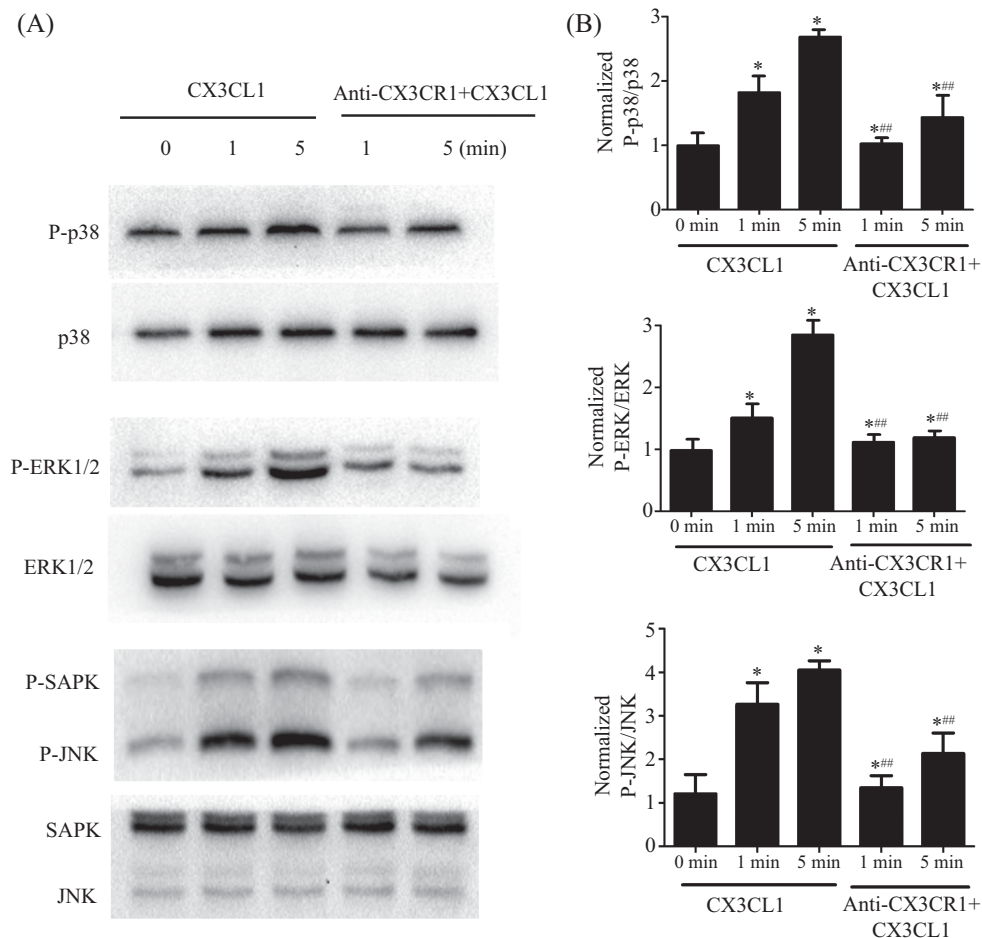
2.5 CX3CL1通过p38和ERK1/2信号通路促进F-actin的表达

如图6所示, 10 nmol/L CX3CL1刺激了HUVECs

120 min后, 胞质内F-actin的表达水平显著升高($P < 0.05$); 而30 μ mol/L SB203580和PD98059明显抑制10 nmol/L CX3CL1刺激HUVECs 120 min后引起的胞质内F-actin表达水平的升高。但SP600125对CX3CL1刺激HUVECs 120 min后, 胞质内F-actin的表达量无明显变化($P > 0.05$)。

3 讨论

在ANCA相关性血管炎的发生与发展过程中, 细胞因子激活中性粒细胞, 被激活的中性粒细胞脱颗粒释放蛋白酶3(protease 3, PR3)和氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)等抗原至细胞表面与ANCA发生交联免疫反应, 致使中性粒细胞进入脱颗粒和氧爆发状态, 释放大量的蛋白水解酶和活性氧, 导致内皮细胞凋亡和坏死, 血管壁发生纤维样坏死^[7]。Guillevin等^[8]对ANCA相关性血管炎患者肾



A: 5 $\mu\text{g/mL}$ 抗CX3CR1抗体提前刺激细胞30 min, 10 nmol/L CX3CL1刺激细胞0, 1, 5 min后磷酸化MAPKs(P-p38、P-ERK1/2和P-JNK)的表达水平; B: 磷酸化MAPKs(P-p38、P-ERK1/2和P-JNK)和总MAPKs(p38、ERK1/2和JNK)的比值。* $P<0.05$, 与空白对照组比较; # $P<0.01$, 与对应的CX3CL1组比较。

A: the expressions of phosphorylated p38, ERK1/2 and JNK induced by CX3CL1 within 0, 1, 5 min respectively in HUVECs pretreated with 5 $\mu\text{g/mL}$ of anti-CX3CR1 antibody for 30 min; B: the ratio of the phosphorylated MAPKs (P-p38, P-ERK1/2 and P-JNK) to total MAPKs (p38, ERK1/2 and JNK). * $P<0.05$ vs the blank control group; # $P<0.01$ vs the counterpart of CX3CL1 group.

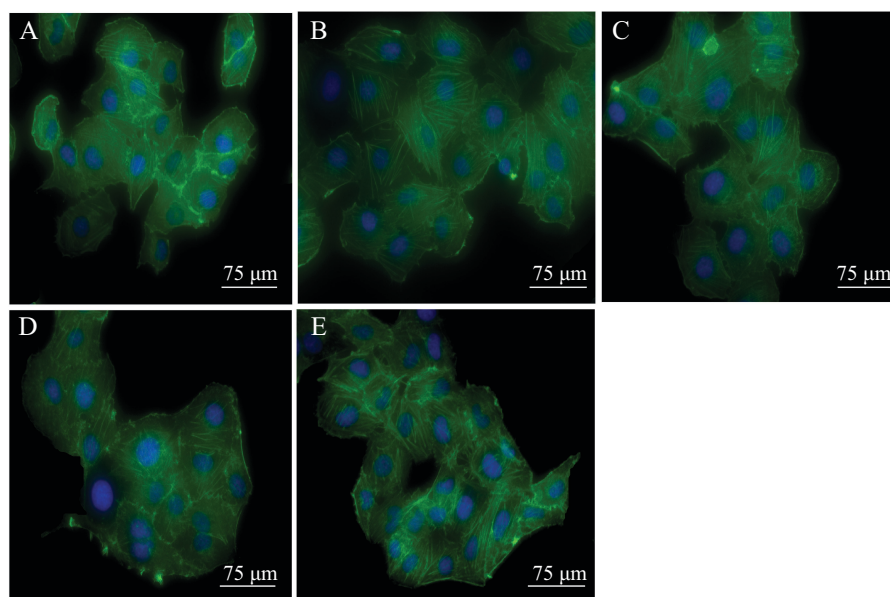
图4 封闭CX3CR1后, CX3CL1对内皮细胞MAPKs磷酸化的作用

Fig.4 Effects of blocking CX3CR1 on MAPKs phosphorylation in HUVECs stimulated with CX3CL1

进行穿刺活检的结果显示, 在患者病变微小血管周围和肾组织内, 存在大量与疾病的严重程度正相关的激活状态的中性粒细胞。CX3CL1具有独特的黏蛋白样杆状结构, 该结构特点决定了CX3CL1具有游离型和膜结合型两种存在方式, 兼有黏附和趋化的双重活性^[9]。在免疫性疾病的发生和发展过程中, CX3CL1参与中性粒细胞的黏附与趋化, 促进中性粒细胞跨过内皮细胞迁移至靶部位^[9]。有研究表明, ANCA相关性血管炎患者血清中CX3CL1表达水平与疾病的活动程度呈正相关^[3-5]。Bjerkeli等^[4]研究发现, CX3CL1与抗凝血酶III、纤维二聚体和血浆血栓调节蛋白等内皮细胞损伤标记物的水平正相关。因此, CX3CL1在ANCA相关性血管炎的疾病活动期起

着重要作用。

细胞骨架是真核细胞中的蛋白纤维网络结构, 是由微管、微丝和中间纤维三种成分构成的复杂网状结构, 决定细胞形态并与多种细胞功能有关。微丝, 又称肌动蛋白纤维, 由真核细胞内含量极为丰富的肌动蛋白组成。肌动蛋白以两种形式存在, 即单体和多聚体。单体的肌动蛋白是由一条多肽链构成的球形分子, 又称球状肌动蛋白(globular actin, G-actin)。多聚体的肌动蛋白形成肌动蛋白丝, 称为纤维状肌动蛋白(F-actin)^[10-11]。F-actin是维持内皮细胞形态与功能的基本骨架蛋白, 显微镜下呈现致密外周带、应力纤维和中央短纤维三种形态, 它们之间可以相互转化。外周致密带所介导

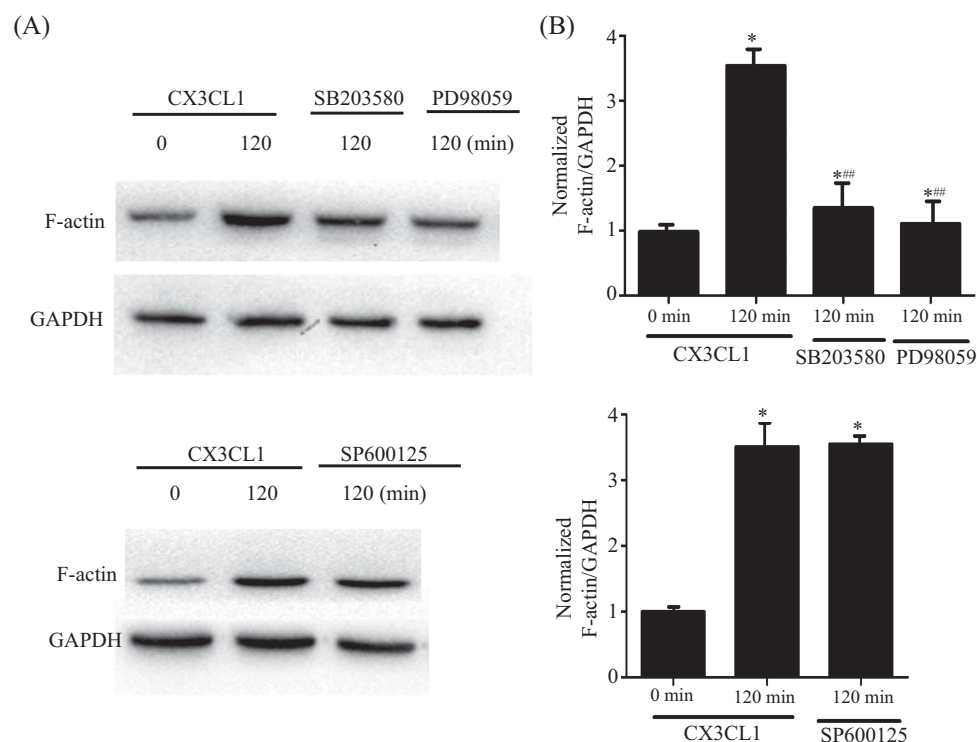


A: 空白对照组; B: 10 nmol/L CX3CL1; C: 30 μmol/L SB203580+10 nmol/L CX3CL1; D: 30 μmol/L PD98059+10 nmol/L CX3CL1; E: 30 μmol/L SP600125+10 nmol/L CX3CL1。

A: the blank control group; B: 10 nmol/L of CX3CL1 HUVECs; C: 30 μmol/L of SB203580+10 nmol/L of CX3CL1; D: 30 μmol/L of PD98059+10 nmol/L of CX3CL1; E: 30 μmol/L of SP600125+10 nmol/L of CX3CL1.

图5 MAPKs的特异性抑制剂对CX3CL1介导HUVECs的F-actin重构的影响

Fig.5 Effects of specific inhibitors for MAPKs on reconstitution of F-actin in HUVECs stimulated with CX3CL1



A: 30 μmol/L SB202580、PD98059和SP600125分别提前干预60 min, 10 nmol/L的CX3CL刺激HUVECs 120 min后, 胞质内F-actin的表达水平; B: F-actin和GAPDH的比值。* $P<0.05$, 与空白对照组比较; ** $P<0.01$, 与对应的CX3CL1组比较。

A: the expression of cytoplasmic F-actin induced by 10 nmol/L of CX3CL1 within 120 min in HUVECs pretreated with 30 μmol/L of SB203580, PD98059 and SP600125 for 60 min, respectively; B: the ratio of F-actin to GAPDH. * $P<0.05$ vs the blank control group; ** $P<0.01$ vs the counterpart of CX3CL1 group.

图6 MAPKs抑制剂对CX3CL1介导HUVECs胞质内F-actin表达的影响

Fig.6 Effects of inhibitors for MAPKs on cytoplasmic F-actin in HUVECs stimulated with CX3CL1

的拴缚力和应力纤维所介导的中心张力是一对维持内皮细胞间隙和通透性正常的方向相反的作用力。当内皮细胞受到外界刺激时, F-actin发生重排, 应力纤维形成, 中心张力增加, 细胞间隙增大, 细胞屏障功能受损, 继而炎症细胞和炎症因子跨过血管内皮细胞迁移至靶部位, 促进免疫性疾病的发生与发展^[12-13]。因此在本实验中, 我们用CX3CL1刺激HUVECs后, 观察F-actin的改变。结果显示, 细胞周边由F-actin组成的外周致密带在30 min开始逐渐崩解, 至120 min时完全消失; 细胞质内在30 min开始出现少量的应力纤维, 120 min时出现大量的贯穿整个细胞的致密应力纤维。在本实验的预实验中, 我们发现10 nmol/L CX3CL1是引起HUVECs骨架重构的最适浓度。CX3CL1的特异性受体CX3CR1是一种7次跨膜的G蛋白偶联受体, 主要表达于白细胞和内皮细胞表面^[14-16]。CX3CL1与CX3CR1结合后, 可以激发许多蛋白激酶, 例如酪氨酸蛋白激酶、蛋白激酶B和MAPKs等^[17-18]。MAPKs是一组丝氨酸/苏氨酸特异性蛋白激酶, 是多种信号转导通路的交汇点, 几乎表达于所有细胞; 在哺乳动物中MAPKs被分为7类, 即p38、ERK1/2、JNK、ERK5、ERK3/4、ERK7和Nemo样激酶(Nemo like kinase, NLK)^[19]。至今为止, 研究最多的MAPKs是p38、ERK1/2和JNK。为了解CX3CL1是否能激活HUVECs的MAPK信号通路, 我们采用Western blot检测了CX3CL1不同时间点对HUVECs的磷酸化p38、ERK1/2和JNK表达水平的影响。结果表明, CX3CL1刺激HUVECs 1 min后, 磷酸化p38、ERK1/2和JNK表达水平升高; 5 min后, 三者的表达水平达峰值。Cambien等^[20]研究发现, CX3CL1体外刺激单核细胞可以促进p38、ERK1/2和JNK的磷酸化; Park等^[21]研究发现, CX3CL1可以促进肾脏系膜细胞p38和ERK1/2的磷酸化; Nevo等^[22]研究发现, CX3CL1以ERK1/2依赖的方式增加神经母细胞瘤细胞迁移和侵袭力^[20]; 这些文献支持本实验的结果。在该实验中, 我们用抗CX3CR1抗体封闭CX3CR1, 然后检测CX3CL1刺激HUVEC后, 磷酸化MAPKs的表达水平。实验结果显示, CX3CL1刺激HUVECs后, 磷酸化p38、ERK1/2和JNK表达水平的上调被抗CX3CR1抗体明显抑制。这进一步说明了CX3CL1能通过与CX3CR1结合促进HUVECs磷酸化MAPKs的表达水平。

Klosowska等^[23]研究发现, 在纤维母细胞中, CX3CL1上调p38、ERK1/2和JNK的磷酸化水平, 导致纤维母细胞的F-actin重排, 促进纤维母细胞的迁移。Maciejewski-Lenoir等^[24]研究发现, 在小胶质细胞中, CX3CL1以时间和剂量依赖方式激活ERK1/2, 促进细胞增殖、迁移、细胞骨架蛋白重排和细胞变形。但目前CX3CL1引起的MAPK信号通路的激活是否参与其介导的内皮细胞骨架蛋白重构还未有报道。因此在本实验中, 我们采用MAPKs特异性抑制剂分别进行干预, 观察CX3CL1刺激HUVECs后细胞骨架蛋白的变化。结果表明, p38的特异性抑制剂SB203580和ERK1/2的特异性抑制剂PD98059能够抑制CX3CL1介导的HUVECs骨架重构, 而JNK的特异性抑制剂SP600125对CX3CL1介导的细胞骨架重构无明显影响。MAPKs的三种亚型(p38、ERK1/2和JNK)可以被不同的细胞外刺激激活, 并且它们的下游作用靶点也不完全相同, 因此它们在细胞反应中有着不同的作用。Wu等^[25]研究发现, 在烧伤血清介导的内皮细胞F-actin重排和应力纤维形成过程中, p38发挥了关键作用, ERK1/2部分参与其中; Lu等^[18]和Mohammad等^[26]研究发现, p38和ERK1/2参与内皮细胞形态改变和通透性增加。本实验结果与上述文献的报道相符。在本实验中, 我们还发现, 10 nmol/L CX3CL1能以时间依赖性促进HUVECs胞质内F-actin的表达, 而该效应被p38的特异性抑制剂SB203580和ERK1/2的特异性抑制剂PD98059抑制。肌动蛋白由单体的G-actin和多聚体的F-actin组成, 而且肌动蛋白仅存在于细胞质中^[10-11]。因此, 我们推测CX3CL1刺激内皮细胞后, 胞质内G-actin可能通过p38和ERK1/2信号通路聚合形成F-actin。在本实验中还发现, CX3CL1能引起JNK磷酸化水平增高, 但JNK信号通路却并未参与HUVECs骨架的重排, 这提示除了破坏内皮细胞屏障功能外, CX3CL1可能还介导了其他功能的改变, 我们将在以后的研究中对其进行进一步的探讨。

CX3CL1能通过激活p38和ERK1/2信号通路以时间依赖方式介导HUVECs骨架蛋白重构: 细胞致密外周带破坏和胞质内应力纤维形成。CX3CL与ANCA相关性血管炎的各项疾病活动指标呈正相关。本实验研究为进一步研究ANCA相关性血管炎及其并发症的发生机制提供实验基础, 可能为治疗ANCA相关性血管炎提供新的靶点。

参考文献 (References)

- 1 Pepper RJ, Hamour S, Chavele KM, Todd SK, Rasmussen N, Flint S, *et al.* Leukocyte and serum S100A8/S100A9 expression reflects disease activity in ANCA-associated vasculitis and glomerulonephritis. *Kidney Int* 2013; 83(6): 1150-8.
- 2 Mantovani A, Dejana E. Cytokines as communication signals between leukocytes and endothelial cells. *Immunol Today* 1989; 10(11): 370-5.
- 3 Matsunawa M, Odai T, Wakabayashi K, Isozaki T, Yajima N, Miwa Y, *et al.* Elevated serum levels of soluble CX3CL1 in patients with microscopic polyangiitis. *Clin Exp Rheumatol* 2009; 27(1): 72.
- 4 Bjerkeli V, Damås JK, Fevang B, Holter JC, Aukrust P, Frøland SS. Increased expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, in Wegener's granulomatosis—possible role in vascular inflammation. *Rheumatology (Oxford)* 2007; 46(9): 1422-7.
- 5 Matsunawa M, Isozaki T, Odai T, Yajima N, Takeuchi HT, Negishi M, *et al.* Increased serum levels of soluble fractalkine (CX3CL1) correlate with disease activity in rheumatoid vasculitis. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 3408-16.
- 6 Kallenberg CG. Pathophysiology of ANCA-associated small vessel vasculitis. *Curr Rheumatol Rep* 2010; 12(6): 399-405.
- 7 Guillevin L. Treatment of ANCA associated systemic necrotizing vasculitides. *Bull Acad Natl Med* 2007; 192(6): 1175-87.
- 8 White GE, Greaves DR. Fractalkine: A survivor's guide chemokines as antiapoptotic mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32(3): 589-94.
- 9 Janmey PA. The cytoskeleton and cell signaling: Component localization and mechanical coupling. *Physiol Rev* 1998; 78(3): 763-81.
- 10 徐国恒. 细胞骨架-肌动蛋白纤维. 生物学通报(Xu Guoheng. Cytoskeleton-actin filaments. *Bulletin of Biology*) 2005; 40(2): 43.
- 11 Windoffer R, Beil M, Magin TM, Leube RE. Cytoskeleton in motion: the dynamics of keratin intermediate filaments in epithelia. *J Cell Biol* 2011; 194(5): 669-78.
- 12 Baldwin AL, Thurston G. Changes in endothelial actin cytoskeleton in venules with time after histamine treatment. *Am J Physiol* 1995; 269(5): H1528-37.
- 13 Rivero F, Köppel B, Peracino B, Bozzaro S, Siegert F, Weijer CJ, *et al.* The role of the cortical cytoskeleton: F-actin crosslinking proteins protect against osmotic stress, ensure cell size, cell shape and motility, and contribute to phagocytosis and development. *J Cell Sci* 1996; 109(11): 2679-91.
- 14 Zhu W, Meng L, Jiang C, He X, Hou W, Xu P, *et al.* Arthritis is associated with T-cell-induced upregulation of Toll-like receptor 3 on synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther* 2011; 13(3): R103.
- 15 Zhang Q, Shimoya K, Temma K, Kimura T, Tsujie T, Shioji M, *et al.* Expression of fractalkine in the Fallopian tube and of CX3CR1 in sperm. *Hum Reprod* 2004; 19(2): 409-14.
- 16 Foussat A, Coulomb-L'Hermine A, Gosling J, Krzysiek R, Durand-Gasselin I, Schall T, *et al.* Fractalkine receptor expression by T lymphocyte subpopulations and *in vivo* production of fractalkine in human. *Eur J Immunol* 2000; 30(1): 87-97.
- 17 White GE, Greaves DR. Fractalkine: A survivor's guide chemokines as antiapoptotic mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32(3): 589-94.
- 18 Lu Y, Zhu X, Liang GX, Cui RR, Liu Y, Wu SS, *et al.* Apelin-APJ induces ICAM-1, VCAM-1 and MCP-1 expression via NF- κ B/JNK signal pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Amino Acids* 2012; 43(5): 2125-36.
- 19 Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: A 10-year update. *Physiol Rev* 2012; 92(2): 689-737.
- 20 Cambien B, Pomeranz M, Schmid-Antomarchi H, Millet MA, Breitmayer V, Rossi B, *et al.* Signal transduction pathways involved in soluble fractalkine-induced monocytic cell adhesion. *Blood* 2001; 97(7): 2031-7.
- 21 Park J, Song KH, Ha H. Fractalkine increases mesangial cell proliferation through reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinases. *Transplant Proc* 2012; 44(4): 1026-8.
- 22 Nevo I, Sagi-Assif O, Meshel T, Ben-Baruch A, Jöhrer K, Greil R, *et al.* The involvement of the fractalkine receptor in the transmigration of neuroblastoma cells through bone-marrow endothelial cells. *Cancer Lett* 2009; 273(1): 127-39.
- 23 Klosowska K, Volin MV, Huynh N, Chong KK, Halloran MM, Woods JM. Fractalkine functions as a chemoattractant for osteoarthritis synovial fibroblasts and stimulates phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and Akt. *Clin Exp Immunol* 2009; 156(2): 312-9.
- 24 Maciejewski-Lenoir D, Chen S, Feng L, Maki R, KB. Characterization of fractalkine in rat brain cells: Migratory and activation signals for CX3CR-1-expressing microglia. *J Immunol* 1999; 163(3): 1628-35.
- 25 Wu W, Huang Q, He F, Xiao M, Pang S, Guo X, *et al.* Roles of mitogen-activated protein kinases in the modulation of endothelial cell function following thermal injury. *Shock* 2011; 35(6): 618-25.
- 26 Mohammad G, Siddiquei MM, Othman A, Al-Shabrawey M, Abu El-Asrar AM. High-mobility group box-1 protein activates inflammatory signaling pathway components and disrupts retinal vascular-barrier in the diabetic retina. *Exp Eye Res* 2013; 107: 101-9.