DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.10.019
第23卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 10
2001年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2001

文章编号:1000-5404(2001)10-1173-04

论著

血管紧张素Ⅱ对血管平滑肌细胞粘着斑及肌动蛋白细胞骨架组装的影响及意义

景 涛[1],何国祥[1],刘建平[1],王 耿[1],吴 昊[1],王海东[2] (第三军医大学附属西南医院:[1]心血管内科;[2]胸心外科;重庆 400038)

提 要:目的 旨在探讨血管紧张素Ⅱ(Ang Ⅱ)及其受体(ATR)在血管平滑肌细胞(VSMC)迁移中的作用及其细胞生物学机制。方法 以体外培养VSMC为基础,采用免疫细胞化学和荧光细胞化学的方法,观察AngⅡ干预后,VSMC中粘着斑(FA)组装和肌动蛋白纤维丝(F-actin)形成的动态改变,同时观测AT_1R拮抗剂、AT_2R拮抗剂对上述观测指标的影响。结果 AngⅡ刺激后30 min,VSMC中FA体积增大、数量增加($P<0.01$),VSMC内F-actin数量明显增加,纵向平行排列。AngⅡ干预VSMC后24 h,上述结构变化持续存在,表达进一步增强。AT_1R拮抗剂CV-11974明显抑制这一生物学效应($P<0.01$),AT_2R拮抗剂PD123319对此无明显的增强或抑制作用。同时给予CV-11974和PD123319干预VSMC与单独给予CV-11974时比较无显著性差异($P>0.05$)。结论 AngⅡ通过AT_1R介导调节VSMC内FA动态组装和F-actin形成,进而改变VSMC的迁移能力,并可能由此参与VSMC迁移的调控。

关键词:血管紧张素Ⅱ;受体;血管平滑肌细胞;细胞骨架
中图法分类号:R322.12;R329.24;R977 文献标识码:A

Effects of angiotensin Ⅱ on reorganization of focal adhesion and actin cytoskeleton in vascular smooth muscle cells

JING Tao, HE Guo-xiang, LIU Jian-ping, WANG Geng, WU Hao, Wang Hai-dong (Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the role and cytobiologic mechanisms of Angiotensin Ⅱ (AngⅡ) and its receptors in the migration of rat smooth muscle cells. Methods VSMCs isolated from aortic media of Wistar rats and cultured by the modified explant method were adopted. The dynamic assemble and disassemble of focal adhesion (FA) and reorganization of the actin cytoskeleton of VSMCs were studied by immunocytochemistry and fluorocytochemistry techniques after treated with AngⅡ. The effects of both AT_1R antagonist (CV-11974) and AT_2R antagonist (PD123319) on the same parameters were also observed. Results Treatment with AngⅡ for 30 min resulted in a substantial increase in the number of stress fibers and rearrangement of these structures into ordered parallel arrays ($P<0.01$). There was a corresponding increase in the number and size of vinculin-positive FA associated with the ends of actin filaments. These structural changes were retained and further enhanced in the cells treated with angiotensin Ⅱ for 24 hours. Reorganization of FA and actin cytoskeleton were significantly inhibited in CV-11974 pretreated group ($P<0.01$). No significant change was found in the PD123319 group. There was no significant difference between addition of CV-11974 and PD123319 and addition of CV-11974 alone ($p>0.05$). Conclusion The dynamic assemble and disassemble of FA and reorganization of actin cytoskeleton may be involved in AngⅡ-induced VSMC migration, and mediated by AT_1R.

Key words: angiotensin Ⅱ; receptor; vascular smooth muscle cells; cytoskeleton

血管平滑肌细胞(Vascular smooth muscle cells, VSMC)从血管中膜向内膜下迁移是高血压、动脉粥样硬化、血管成形术后再狭窄及冠状动脉旁路术后移植血管再狭窄等血管疾病共同的病理生理性改变,严重制约着这些疾病的疗效和预后[1]。既往发病机制的研究多集中在VSMC增殖及血管重塑上[2],对VSMC迁移机制的研究很少,对在上述血管病变发生过程中起重要作用的血管紧张素Ⅱ(Angiotensin Ⅱ, Ang Ⅱ)在VSMC迁移中的作用所知更少。已知细胞运动与粘着斑(Focal adhesion, FA)及肌动蛋白丝(Filamentous actin, F-actin)的动态组装有密切关系。最近研究发现[3],FA除经典的粘附功能外,FA蛋白如桩蛋白、粘着斑激酶(Focal adhesion kinase, FAK)在多种细胞因子及血管活性物质的作用下可发生酪氨酸磷酸化。本实验观测AngⅡ对VSMC内FA及肌动蛋白细胞骨架动态组装的影响,旨在探讨AngⅡ及其受体在VSMC迁移中的作用及其细胞生物学机制。

1 材料与方法

1.1 材料

鼠抗人α-SM-actin单克隆抗体(福建迈新生物技术公司),鼠抗人纽带蛋白单克隆抗体(美国Sigma公司),TRITC荧光标记鬼笔环肽(Sigma公司),AngⅡ(Sigma公司),CV-11974(日本Takeda制药有限公司,Dr. Yoshio Kozai, Ph. D.惠赠),PD123319(美国Emory大学,赵志清博士惠赠)。

1.2 大鼠VSMC培养及鉴定

健康Wistar大鼠,体重150~180g。断颈法处死后,无菌

作者简介:景 涛(1972-),女,四川省成都市人,博士研究生,医师,主要从事冠心病防治方面的研究,发表论文5篇,电话:(023)68754118

收稿日期:2001-08-08;修回日期:2001-10-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

条件下迅速取下主动脉，游离动脉中层，采用组织贴壁法培养VSMC。细胞呈VSMC特征性"峰""谷"状生长；特异性鼠抗人α-平滑肌肌动蛋白免疫组织化学染色证实为VSMC。实验用生长旺盛的第2~5代VSMC。

1.3 实验分组

①对照组，②AngⅡ 10^{-7} mol/L组，③AngⅡ 10^{-7} mol/L+10^{-7} mol/L CV-11974组，④AngⅡ 10^{-7} mol/L+PD123319 10^{-7} mol/L组，⑤AngⅡ 10^{-7} mol/L+CV-11974 10^{-7} mol/L+PD123319 10^{-7} mol/L组，⑥AngⅡ 10^{-7} mol/L+Genistein 40 μmol/L组。

1.4 纽带蛋白免疫细胞化学检测

待细胞生长至80%~90%融汇时，减少FBS浓度为0.4%继续培养48 h，使VSMC生长静止。分组干预30 min及24 h后PBS漂洗，4%多聚甲醛固定10 min，细胞爬片用于免疫细胞化学检测(High-SABC法)，一抗工作浓度为1∶200，结果经彩色图像分析系统处理，表达水平用平均光密度值(AOD)表示。

1.5 应力纤维丝表达检测

细胞爬片准备同"1.4"，PBS漂洗，滴加TRITC-鬼笔环肽(1∶50)，避光置于37 ℃孵箱内3 h，PBS漂洗后50%甘油/PBS封片，激光共聚焦显微镜(TCS-NT型，德国)下观察。

1.6 统计处理

实验结果以$\bar{x}\pm s$表示，用t检验比较组间差异性。

2 结果

2.1 AngⅡ对VSMC中FA组装的作用

实验结果表明，基础状态下VSMC内也存在FA(用抗纽带蛋白单克隆抗体标记)，该种FA体积小、数量少，散在分布。给予AngⅡ 10^{-7} mol/L刺激30 min后，VSMC的FA体积增大、纽带蛋白表达增强，纽带蛋白阳性表达FA的数量也增加($P<0.01$)。AngⅡ 10^{-7}mol/L干预VSMC 24 h后，上述结构变化持续存在，并且表达进一步增强。见表1，图1A。

表1 AngⅡ、CV-11974、PD123319、Genistein对VSMC内FA表达的影响($\bar{x}\pm s$，$n=10$)

Tab 1 Effect of AngⅡ, CV-11974, PD123319 and Genistein on the expression of FA in VSMC($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

	Control	AngⅡ 30 min					AngⅡ 24 h
		AngⅡ	CV-11974	CV-11974+PD123319	PD123319	Genistein	
FA	0.024±0.018	0.153±0.039**	0.048±0.017▲▲	0.047±0.013▲▲	0.154±0.0250**	0.060±0.018▲▲**	0.218±0.069▲**

**: $P<0.01$ *vs* control; ▲: $P<0.05$; ▲▲: $P<0.01$ *vs* AngⅡ 10^{-7} mol/L 30 min group

2.2 AT_1R拮抗剂和AT_2R拮抗剂对VSMC中FA和应力纤维组装的影响

AngⅡ 10^{-7} mol/L干预VSMC后可明显增强FA的组装和应力纤维丝形成，AngⅡ介导的这一生物学效应可被预先加入AT_1R拮抗剂CV-11974 10^{-7} mol/L明显抑制，结果导致VSMC内FA数量减少，纽带蛋白表达强度减弱($P<0.01$)。与此同时，应力纤维丝消失或仅存在少量排列紊乱的F-actin在细胞内散在分布，见图1B。

AT_2R拮抗剂PD123319 10^{-7} mol/L对AngⅡ介导的VSMC内FA和应力纤维丝组装无明显的增强或抑制效应。

同时给予CV-11974 10^{-7} mol/L和PD123319 10^{-7} mol/L干预VSMC后，FA和应力纤维丝的表达情况与单独给予CV-11974 10^{-7} mol/L时比较无显著性差异($P>0.05$)，见表1。

2.3 Genistein对VSMC中FA和应力纤维组装的影响

用特异性的酪氨酸激酶抑制剂Genistein预处理VSMC 48 h后，再给予AngⅡ 10^{-7} mol/L处理VSMC，结果表明Genistein 40 μmol/L可明显阻抑AngⅡ刺激VSMC后产生的FA组装和应力纤维丝形成。该实验中FA的数量及纽带蛋白的表达强度较对照组略高($P<0.01$)；与AngⅡ组相比较，则显著减弱($P<0.01$)，见表1。

2.4 AngⅡ及其受体对VSMC中应力纤维形成的作用

对照组VSMC内无明显的F-actin存在或仅存在少许无规则、散在分布的F-actin；AngⅡ 10^{-7}mol/L刺激后30 min，VSMC内F-actin数量明显增加，纵向平行排列；AngⅡ 10^{-7} mol/L刺激后24 h，F-actin数量进一步增加，纵向平行排列，形成整齐的应力纤维丝，贯穿VSMC长轴，见图2A，B。

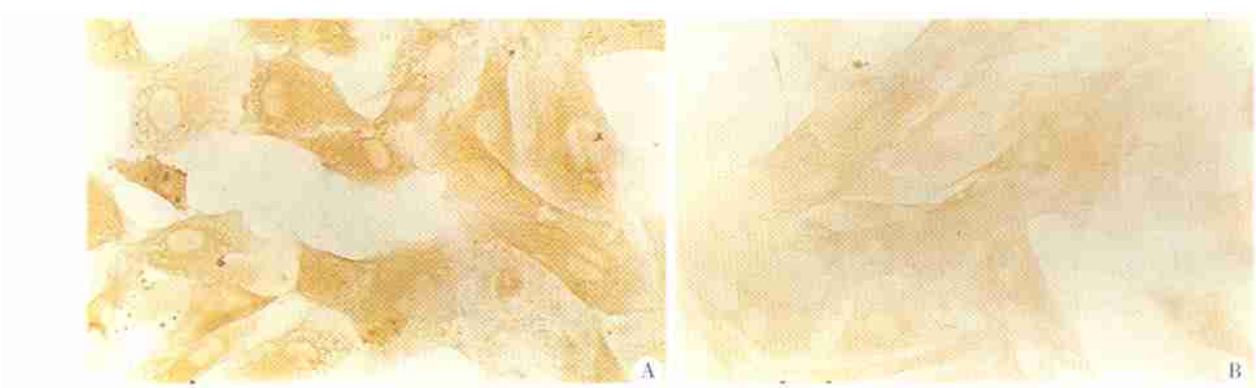


图1 VSMC内纽带蛋白阳性粘着斑表达 (SABC×400)

A：AngⅡ(10^{-7}mol/L) 24 h组胞浆内可见强阳性颗粒状着色；B：CV-11974(10^{-7}mol/L)组胞浆内颗粒状着色强度减弱，数量减少

Fig 1 Expression of vinculin-positive FA in VSMCs (SABC×400)

A: AngⅡ (10^{-7} mol/L) 24 h group. Intense granular stainning of vinculin-positive FA in cytoplasm; B: CV-11974(10^{-7} mol/L) group. Granular stainning of vinculin-positive FA decreased in intensity and quantity in cytoplasm

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

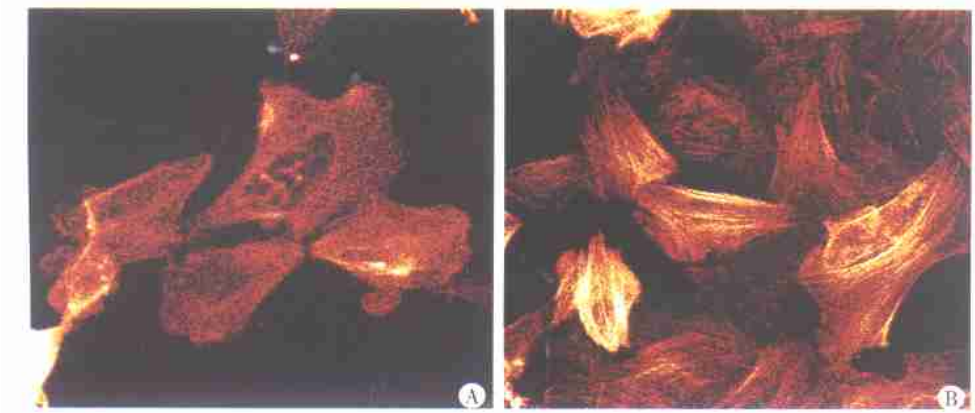


图 2　VSMC 内 F-actin 荧光染色

A: 正常对照组细胞内未见明显的 F-actin 存在; B: AngⅡ(10^{-7}mol/L)30 min 组细胞内 F-actin 数量增加, 呈纵向平行排列

Fig 2　Fluorocytochemical staining of F-actin in VSMC

A: Control. No distinct filamentous actin(F-actin) in cell; B: AngⅡ(10^{-7}mol/L) 30 min group. Increased in number of F-actin in cells and rearrangement of these structures into parallel arrays

3　讨论

VSMC 从血管中膜向内膜下迁移是血管损伤性病变形成过程中最具特征性的细胞生物学事件之一。迁移进入内膜下层的VSMC 有一半可以进一步分化、增殖成为内膜下层的主要细胞, 另一半则不再增殖[4]。由此可以推断: VSMC 的增殖和迁移是两个相对独立而又相互关联的过程。细胞迁移与细胞骨架有关。肌动蛋白细胞骨架由 F-actin 和特异性的肌动蛋白结合蛋白组成, F-actin 通过 FA、整合素与细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)连接; FA[5] 是连接 ECM 与细胞骨架的跨膜结构, 纽带蛋白(Vinculin)是其结构成分之一。肌动蛋白细胞骨架除提供维持细胞形状和细胞极性所需的结构网架外, 其具有的动力学特征尚可提供细胞移动所需的趋动力[6], 整个细胞迁移的过程受着细胞内信号转导系统的精密调控。

国内外研究已证实血管成形术后, 损伤的血管壁局部 AngⅡ基因表达及蛋白合成均增加; AngⅡ以自分泌、旁分泌的形式在血管局部发挥作用, 促进 VSMC 的增殖和肥大并参与血管重塑[7]。现有研究对 AngⅡ是否参与 VSMC 迁移过程的调控尚无满意的回答, 为探索这一问题, 本研究对体外培养的 VSMC 加入一定浓度的 AngⅡ, 然后采用细胞生物学的方法, 检测与细胞迁移有关的 FA 组装、F-actin 的形成, 以了解 AngⅡ对 VSMC 迁移的影响及其机制。我们在研究中发现: 对照组 VSMC 内 FA 体积小、数量少, 在细胞中散在分布; 细胞内无明显的 F-actin 存在或仅存在少许无规则、散在分布的 F-actin。给予 AngⅡ刺激 30 min 后, VSMC 的 FA 体积增大、表达增强, VSMC 内 F-actin 数量也明显增加, 形成整齐的应力纤维丝, 纵向平行排列, 贯穿 VSMC 全长。上述结构变化于 AngⅡ作用 VSMC 24 h 后仍持续存在, 并且表达进一步增强。阻断 AT_1R 显著抑制这一生物学效应; 阻断 AT_2R 对此无明显的影响; 同时阻断 AT_1R 和 AT_2R 与单独阻断 AT_1R 时无显著性差异。结果提示: AngⅡ在 AT_1R 的介导下通过调节 VSMC 内 FA 和 F-actin 微丝的动态组装, 进而改变 VSMC 的迁移能力, 从而发挥其介导 VSMC 迁移的生物学效应。

近年来研究表明, FA 不仅为细胞骨架提供结构支持, 而且在细胞迁移的信号转导过程中也起重要作用。有实验证明: 抑制内膜损伤局部的酪氨酸激酶活性可以显著抑制新生内膜的肥厚[8]。由于 FA 与细胞运动的高度相关性, 本实验特选用特异性酪氨酸激酶抑制剂 Genistein 预处理 VSMC, 以期阐明酪氨酸激酶活性变化在 VSMC 迁移的信号转导中的地位和作用。实验结果证明 Genistein 可明显阻抑 AngⅡ刺激 VSMC 产生的 FA 动态组装和应力纤维形成, 这提示酪氨酸激酶的激活可能参与了 VSMC 迁移的信号转导过程。

关于调控 VSMC 迁移的信号转导机制目前尚不清楚, 可能与以下因素有关: ① AT_1受体 与 PTKs 受体、整合素协同作用, AngⅡ介导的信号转导部分由 PDGF(EGF)受体执行[9]。② 整合素介导的信号转导途径[10]。③粘着斑激酶和 Rho 家族GTP 酶(Rho family of GTPases)参与的信号转导途径[11]。另外, 本实验结果同时显示酪氨酸激酶抑制剂不能完全抑制由 AngⅡ刺激产生的 VSMC 中 FA 的组装和应力纤维丝形成, 也说明了尚有其它的信号转导途径参与 VSMC 迁移过程的调控。由于影响血管损伤后 VSMC 迁移的因素众多, AngⅡ介导 VSMC 迁移的调控机制有待进一步明晰。

参考文献:

[1] Rubin P, Williams J P, Riggs P N, *et al*. Cellular and molecular mechanisms of radiation inhibition of restenosis. Part I: role of the macrophage and platelet-derived growth factor [see comments] [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1998, 40(4): 929－941.

[2] Wilcox J N, Cipolla G D, Martin F H, *et al*. Contribution of adventitial myofibroblasts to vascular remodeling and lesion formation after experimental angioplasty in pig coronary arteries[J]. Ann N Y Acad Sci, 1997, 811(4): 437－447.

[3] Eguchi S, Iwasaki H, Inagami T, *et al*. Involvement of PYK2 in angiotensin Ⅱ signaling of vascular smooth muscle cells[J]. Hypertension,

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

1999, 33(1 Pt 2): 201-206.
[4] Kumar A, Hoover J L, Simmons C A, *et al*. Remodeling and neointimal formation in the carotid artery of normal and P-selectin-deficient mice[J]. Circulation, 1997, 96(12): 4 333-4 342.
[5] Cary L A, Guan J L. Focal adhesion kinase in integrin-mediated signaling [J]. Front Biosci, 1999, 4(3): D102-113.
[6] Castellano F, Montcourrier P, Guillemot J C, *et al*. Inducible recruitment of Cdc42 or WASP to a cell-surface receptor triggers actin polymerization and filopodium formation [J]. Curr Biol, 1999, 9(7): 351-360.
[7] Deblois D, Vidwanathan M, Su J E, *et al*. Smooth muscle DNA replication in response to angiotension II is regulated differently in the neointima media at different times after balloon injury in the rat carotid artery[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996, 16(6): 1 130-1 137.
[8] Schoenwaelder S M, Burridge K. Signaling between the cytoskeleton and integrins[J]. Curr Opin Cell Biol, 1999, 11(2): 274-286.
[9] Huynh T, Davies M G, Barber L, *et al*. Local inhibition of tyrosine kinase activity markedly attenuates the development of intimal hyperplasia in experimental vein grafts[J]. J Surg Res, 1998, 77(2): 104-111.
[10] Schoenwaelder S M, Burridge K. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins[J]. Curr Opin Cell Biol, 1999, 11(2): 274-286.
[11] Shikata Y, Shikata K, Matsuda M, *et al*. Signaling transduction pathway of angiotensin II in human mesangial cells: mediation of focal adhesion and GTPase activating proteins[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 257(1): 234-238.

(编辑 潘式文)

(上接1172页)

1.2.2.1 纠正模糊认识 患者多认为瘫痪就应卧床,产生一切都应由别人照顾的依赖心理。让患者了解脑出血的相关知识,相信自理活动训练的好坏直接影响到自身机能的恢复,予以心理康复促进其功能康复。

1.2.2.2 肢体功能锻炼 患者生命体征平稳,指导患者肢体功能锻炼,以防止瘫痪肢体的挛缩畸形、关节强直。每日锻炼2~3次,每次20~30 min。首先是床上体位的转换(翻身→起卧);接着搀扶下床站立;膝和踝关节运动:屈伸、内旋、外翻、蹲下、站起;步行训练:遵循循序渐进的原则,从完全依靠到部分依靠,从短时间到长时间,逐渐过度到独立步行。应注意克服患者急于求成或过于消极的情绪。

1.2.2.3 日常生活技能训练 日常生活中贯穿着许多自理活动;同时,个体的自理能力从每日的生活中得以发展。学习用患手将物品提起放下,练习捏握动作;进而学习使用汤匙、梳子、牙刷,尽可能独立完成穿衣等日常生活中最重要也是最基本的动作。给患者足够的时间,反复练习,耐心指导和支持患者,为患者回归家庭和社会打下良好基础。

1.2.3 恢复期 要求患者主动锻炼,每日锻炼3~4次,每次30 min以上。患者在躯体症状得以控制、生活自理能力明显提高以后,多主动要求出院回家休养。选择辅助教育系统,指导患者出院后家庭的功能锻炼,介绍有关预防脑出血复发的相关知识,避免因知识不足而采取无效甚至错误的自理行为,克服自理的局限性。

1.2.3.1 严格控制高血压 在医生指导下用药,避免血压大幅度升降。

1.2.3.2 合理安排饮食结构 少食肥肉、动物内脏,吃清淡易消化饮食,多食新鲜蔬菜、水果,保持大便通畅。

1.2.3.3 生活规律,保证充足的睡眠,每日定时功能锻炼。保持情绪稳定。

1.3 结果

患者住院25~40 d,门诊随访2个月。观察结束时对两组再次进行Barthel评分,采用χ^2检验。结果显示:出院时常规护理组与自护理组均显著或非常显著优于入院时($P<0.05$, $P<0.01$);自护理组非常显著优于常规护理组($P<0.05$),见表1。

表1 两组病人入院和出院**Barthel**评分变化

	常规护理组($n=20$)	自护理组($n=51$)
入院	64.3±12.1	62.6±11.7
出院	80.1±14.5*	88.1±9.6**△

*: $P<0.05$, ** $P<0.01$ 与入院比较;△: $P<0.05$ 与常规护理组比较

2 讨论

Orem认为:护理是克服或预防自理缺陷发展的活动,或为不能满足自理需求的个体提供帮助,护理活动随着个体健康状况的恢复或当个体已学会如何通过自我照顾时,个体对护理的需求也就逐渐减少直至消失。

脑出血的常规护理程序通常以"替代护理"为主,即病人始终被动接受护理。包括翻身、拍背、皮肤的干燥清洁,预防褥疮、肺部感染和泌尿道感染,瘫痪肢体保持功能位,给予适当的按摩和被动运动等。而采用Orem自护理论的方法护理,是根据脑出血的不同阶段,根据患者不同的自理需求、自理能力,补偿自理的不足。通过耐心的引导、鼓励、帮助和训练,让病人充分发挥自己最大的潜能来自我照顾,部分或完全"自我护理"。Orem认为护理的目标就是发挥病人最大的自理潜能,以便能够自我照顾。必要的护理介入只是为了帮助人们提高自我照顾的能力。此外,Orem自护理论包括身、心两方面的护理,即更重视患者的心理护理,让患者了解自己的病情,了解自护理的重要性,把患者作为主体,充分调动病人的主观能动性。

本研究运用Orem自护理论,在51例脑出血患者疾病的不同阶段,根据患者不同的自理需求、自理能力,采用相应的护理程序,补偿其自理的不足,收到了较好的效果。本研究一位54岁男性患者,因突然头痛伴左侧肢体偏瘫3 d以脑出血入院。入院时左侧上、下肢肌力Ⅱ级。头颅CT扫描示"右侧大脑顶叶血肿(约30 ml)"。给予脱水、补液、改善脑代谢等治疗,3 d后病情稳定。采用Orem自护理论的方法予以护理,4周后左侧肢体肌力恢复到Ⅳ$^-$级出院。8周后复诊,左侧肢体肌力恢复到Ⅴ$^-$级,生活自理,能够从事办公室工作。

关键词:Orem自护理论;脑出血;偏瘫
中图法分类号:R473.74 文献标识码:B

参考文献:

[1] 计惠民,徐归英.慢性疾病患者的自我护理[J].国外医学:护理分册,1994,13(6):254.
[2] Horsburgh M E. Self-care of well adult Canadians and adult Canadians with end stage renal disease[J]. Int J Nurs Stud, 1999, 36(6): 443-444.

(编辑 谢义霞)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net