

研究论文

血清反应因子参与 RhoA 诱导的人血管内皮细胞肌动蛋白骨架重构

韩雅玲^{1,*}, 于海波¹, 闫承慧¹, 孟子敏¹, 张效林¹, 康 建¹, 李少华², 王士雯³

¹ 沈阳军区总医院全军心血管病研究所心内科, 沈阳 110016; ² Robert Wood Johnson 医学院病理实验科, 新泽西州 08854, 美国; ³ 解放军总医院老年心血管病研究所, 北京 100853

摘 要: 为进一步阐明 RhoA 调控人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)肌动蛋白骨架重构的分子机制, 用逆转录病毒感染并筛选出稳定表达持续活化型 RhoA (Q63LRhoA)和主导抑制型 RhoA (T19NRhoA)的 HUVECs。应用免疫组化和 Western blot 方法分析去血清前后 HUVECs 血清反应因子(serum response factor, SRF)的表达及定位, Rhodamine-Phalloidine 染色观察 F-actin 动态变化。结果显示, Q63LRhoA 组细胞核中 SRF 表达增加, F-actin 重排形成大量应力纤维; T19NRhoA 组中 SRF 表达较弱, F-actin 无明显改变, 无应力纤维形成。去血清后, 正常 HUVECs(对照组)和感染细胞中 SRF 的表达均显著增加, 但其亚细胞定位明显不同。对照组去血清培养 3 d, SRF 主要定位在细胞核, 去血清培养 5 d, SRF 出核转位入细胞浆。Q63LRhoA 组 SRF 发生核滞留, 不随去血清培养时间延长发生出核转位现象。T19NRhoA 组 SRF 的表达主要定位于细胞核周。对照组去血清培养 3 d, F-actin 表达增加, 同时形成大量应力纤维, 去血清培养 5 d, 细胞 F-actin 表达下调, 应力纤维解聚。Q63LRhoA 组 F-actin 重构持续发生并形成大量应力纤维, 但不随去血清培养时间延长发生明显解聚。而 T19NRhoA 组 F-actin 表达不随去血清时间延长而增加。上述结果提示, RhoA 介导 HUVECs F-actin 的重构与 SRF 的核转位现象密切相关。

关键词: 血清反应因子; RhoA; 肌动蛋白; 内皮细胞

中图分类号: Q291; Q461

Serum response factor participates in RhoA-induced endothelial cell F-actin rearrangements

HAN Ya-Ling^{1,*}, YU Hai-Bo¹, YAN Cheng-Hui¹, MENG Zi-Min¹, ZHANG Xiao-Lin¹, KANG Jian¹, LI Shao-Hua², WANG Shi-Wen³

¹Department of Cardiology, General Hospital of Shenyang, The Institute of Cardiovascular Research, PLA, Shenyang 110016, China;

²Department of Pathology, Robert Wood Johnson Medical School, New Jersey 08854, USA; ³Institute of Geriatric Cardiology, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

Abstract: RhoA is one of the main members of RhoGTPase family involved in cell morphology, smooth muscle contraction, cytoskeletal microfilaments and stress fiber formation. It has been demonstrated that RhoA modulates endothelial cell permeability by its effect on F-actin rearrangement, but the molecular mechanism of rearrangement of actin cytoskeleton remains unclear. Recent studies prove that RhoA/Rho kinase regulates smooth muscle specific actin dynamics by activating serum response factor (SRF)-dependent transcription. To further investigate the molecular mechanism of the rearrangement of vascular endothelial cell actin cytoskeleton, we explored the relationship between the activation of SRF and F-actin rearrangement induced by RhoA in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). HUVECs were infected with the constitutively active forms of RhoA (Q63LRhoA) or the dominant negative forms of RhoA (T19NRhoA) using retrovirus vector pLNCX-Q63LRhoA or pLNCX-T19NRhoA, the positive clone was obtained by G418 selection. The expression and distribution of SRF in normal and infected cells were evaluated by immunohistochemistry and Western blot in complete

Received 2004-10-14 Accepted 2004-12-01

This work was supported by the National Basic Research Priorities Programme of China (No. G2000057004).

*Corresponding author. Tel: +86-24-23056183; Fax: +86-24-23922184; E-mail:hanyal@mail.sy.ln.cn

medium and in serum-free medium. The effect of F-actin polymerization was detected by Rhodamine-Phalloidine staining. Infection of PLNCX-Q63LRhoA induced F-actin rearrangement and stress fiber formation in HUVECs, as well as enhanced the expression of SRF in the nuclei. In contrast, the cells infected with T19NRhoA showed no distinct changes. With serum deprivation, the expression of SRF increased obviously in both normal and infected HUVECs, but the subcellular localization of SRF was evidently different. In HUVECs, the localization of SRF was in the nuclei after 3 d with serum deprivation, but it was redistributed outside the nuclei after 5 d with serum deprivation. In cells infected with Q63LRhoA, the immunolocalization of SRF was always in the nuclei compared with HUVECs infected with T19NRhoA, which was almost always localized in the cytoplasm. In HUVECs, the rearrangement of F-actin and formation of stress fiber increased after 3 d with serum deprivation, but appeared decreased and unpolymerized after 5 d with serum deprivation. The polymerization of F-actin and the formation of stress fiber in HUVECs infected with Q63LRhoA kept during the period of serum-free culture, whereas the rearrangement of F-actin in cells infected with T19NRhoA was not found. These results suggest that RhoA influences endothelial F-actin rearrangement in part by regulating the expression and subcellular localization of SRF.

Key word: serum response factor; RhoA; F-actin; endothelial cell

RhoA 是 RhoGTPases 家族中一类重要的信号传递分子, 调控真核细胞许多重要的生命活动, 如膜交通、转录激活、细胞生长、内皮通透性改变和细胞周期调控等^[1]。血清反应因子 (serum response factor, SRF) 是高度保守的磷酸化 DNA 结合蛋白, 是重要的细胞转录调控因子。SRF 不仅可以广泛调控细胞增殖因子的转录, 而且特异性调控细胞肌动蛋白的转录^[2]。以往研究发现, RhoA 在纤维母细胞纤维状肌动蛋白 (F-actin) 重构中起着重要作用^[3], RhoGTPases 通过激活 SRF 参与对平滑肌细胞骨架的动态调控^[4]。迄今为止, RhoA 通过调控 SRF 引起内皮细胞 F-actin 骨架改变的分子机制尚不十分清楚。本研究通过逆转录病毒感染方法改变人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 中 RhoA 的活性, 并筛选出稳定表达持续活化型 RhoA (Q63LRhoA) 或主导抑制型 RhoA (T19NRhoA) 的 HUVECs, 同时观察去血清培养对 RhoA 活性与细胞内 SRF 表达、定位及 F-actin 重构的影响, 探讨 RhoA 调控 SRF 蛋白表达引起 F-actin 重构的分子机制。

1 材料与方

1.1 材料 HUVEC 株 (CRL-1730), Phoenix amphotropic 293 包装细胞 (CRL-12479) 均购自 American Type Culture Collection (ATCC)。持续活化 pLNCX-Q63LRhoA 和主导抑制的 pLNCX-T19NRhoA 逆转录病毒真核表达载体由本室闫承慧博士构建 (Q63LRhoA cDNA, T19NRhoA cDNA 购自 Upstate 生物公司, pLNCX 逆转录载体购自 Clontech 生物公司)。RhoGTPase pull down 分析试剂盒及 RhoA 抗

体购自 Cytoskeleton 公司, 抗 SRF 抗体购自 Santa Cruz 公司。Rhodamine-Phalloidine 购自 Molecular Probe 公司。细胞培养用胎牛血清 (FCS) 购于杭州四季青公司。DMEM 培养基购自 Gibco BRL 公司。ECL 试剂盒购于 Amersham 公司。

1.2 方法

1.2.1 内皮细胞培养 HUVECs 生长于含 10% FCS 的 DMEM 培养基中。37°C, 5% CO₂, 恒温培养箱培养。经间接免疫荧光法测定 VIII 因子相关抗原进行内皮细胞鉴定。

1.2.2 内皮细胞转染及筛选 用磷酸钙沉淀法分别转染 pLNCX-GFP、pLNCX-Q63LRhoA、pLNCX-T19NRhoA 质粒入 Phoenix amphotropic 293 包装细胞, 转染 48 h 收获病毒上清, 用 NIH3T3 细胞测定病毒滴度, 调整滴度至 5.0×10^5 cfu/ml。HUVECs 接种于六孔板上, 使细胞在感染当天达到 50% 融合, 将收获病毒及 8 µg/ml polybrene 感染 HUVECs 72 h 后, 培养基中加入 G418 (800 µg/ml) 进行抗性筛选, 挑出单克隆并传代得到稳定表达的感染细胞。

1.2.3 去血清培养 将感染前后 HUVECs 培养至对数生长期后, Hanks 液洗 3 次, 加入含 0.5% FCS 的 DMEM 培养基进行去血清培养。

1.2.4 Pull-down 分析 感染前后 HUVECs 生长至近融合时, PBS 洗 3 次, 加入 0.5 ml 冰冷的细胞裂解液 (50 mmol/L Tris、10 mmol/L MgCl₂、0.5 mol/L NaCl、1% Triton X-100), 4°C, 12 000 r/min 离心 10 min, 收集细胞, BCA 法测定蛋白质浓度。在细胞提取物中分别加入 50 µl GST-hRBD 融合蛋白, 4°C 涡旋孵育 1 h, 2 500 r/min 离心 3 min, 弃上清。沉淀用 500 µl wash buffer (25 mmol/L Tris

pH7.5、30 mmol/L EDTA、600 mmol/L $MgCl_2$)洗涤, 2000 r/min 离心 3 min, 弃上清。取沉淀行 12% SDS-PAGE 电泳, Western blot 检测活化 RhoA 的表达。

1.2.5 Western blot 按文献^[5]进行 SDS-PAGE、转膜、抗体结合及显色。分离胶浓度为 12% ; 一抗分别为抗 RhoA 单抗和抗 SRF 单抗。经辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗孵育后, 按 ECL 试剂盒说明书进行曝光。

1.2.6 免疫组化分析 细胞接种于盖玻片上至对数生长期, 用冷却的 PBS 洗 3 次, 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, 0.1% Triton X-100 通透细胞 15 min, PBS 洗 3 次, 5% 山羊血清封闭 30 min。加 RhoA 抗体或 SRF 抗体(1:100), 4°C 孵育过夜。PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 加入 HRP 标记二抗(1:100), 室温 2 h, PBS 洗涤细胞 3 次, 每次 5 min, DAB 显色 10 min。封片, 光镜观察, 不加一抗做阴性对照片。

1.2.7 F-actin 染色 细胞接种至盖玻片上, PBS 洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 20 min, 0.1% Triton X-

100 通透 30 min 后, 100 ng/ml Rhodamine-Phalloidin 染色 60 min, 30% 甘油 -PBS 封片, 荧光显微镜下观察 F-actin 分布。

2 结果

2.1 感染细胞稳定表达阳性克隆的筛选

分别用 pLNCX-GFP、pLNCX-Q63LRhoA、pLNCX-T19NRhoA 逆转录病毒感染 HUVECs, 荧光显微镜下观察, pLNCX-GFP 细胞感染效率大于 90%(图 1)。

经 G418 筛选得到稳定表达 Q63LRhoA 和 T19NRhoA 的阳性克隆(图 2)。

2.2 感染前后细胞中活化 RhoA 的表达分析

用 pull-down 分析感染前后 HUVECs 中可与 GTP 结合的活化 RhoA 表达, T19NRhoA 组 HUVECs 中活化 RhoA 表达下调, 而 Q63LRhoA 组细胞内活化 RhoA 明显增加($P < 0.05$)。感染前后各实验组细胞内 RhoA 总蛋白表达量基本一致。提示外源性 Q63LRhoA 或 T19NRhoA 的导入仅改变细胞内活化 RhoA 的表达,

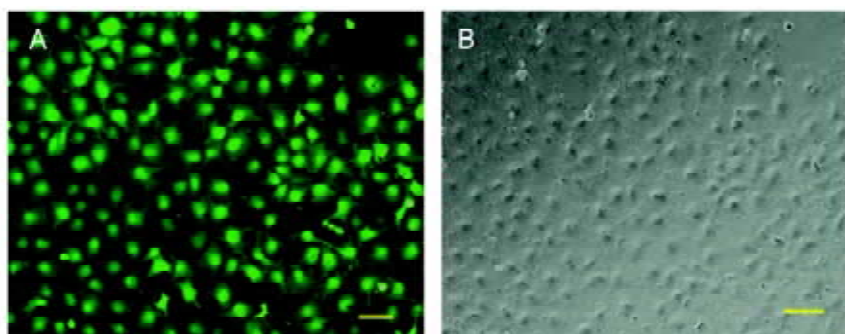


图 1. pLNCX-GFP 逆转录病毒载体感染效率检测

Fig. 1. Efficiency of HUVECs infected with pLNCX-GFP was evaluated with fluorescent microscopy. A: HUVECs infected with pLNCX-GFP were examined with fluorescent microscopy. B: HUVECs infected with pLNCX-GFP were investigated with phase-contrast photomicroscope. Scale bar, 10 μm .

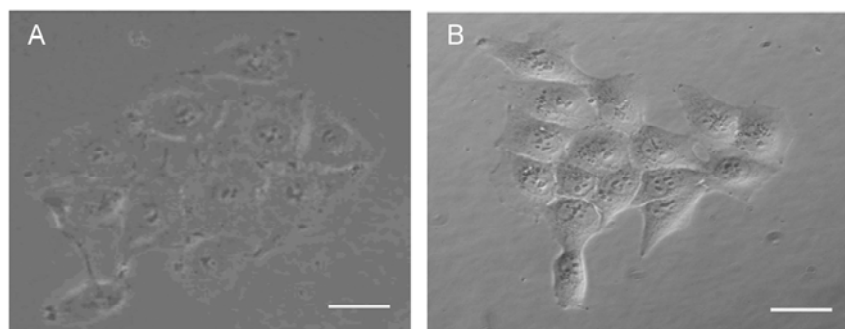


图 2. 感染细胞阳性表达克隆的筛选

Fig. 2. Positive clones infected with Q63LRhoA or T19NRhoA after G418 selection visualized by phase-contrast photomicrographs. A: HUVECs infected with pLNCX-Q63LRhoA. B: HUVECs infected with pLNCX-T19NRhoA. Scale bar, 10 μm .

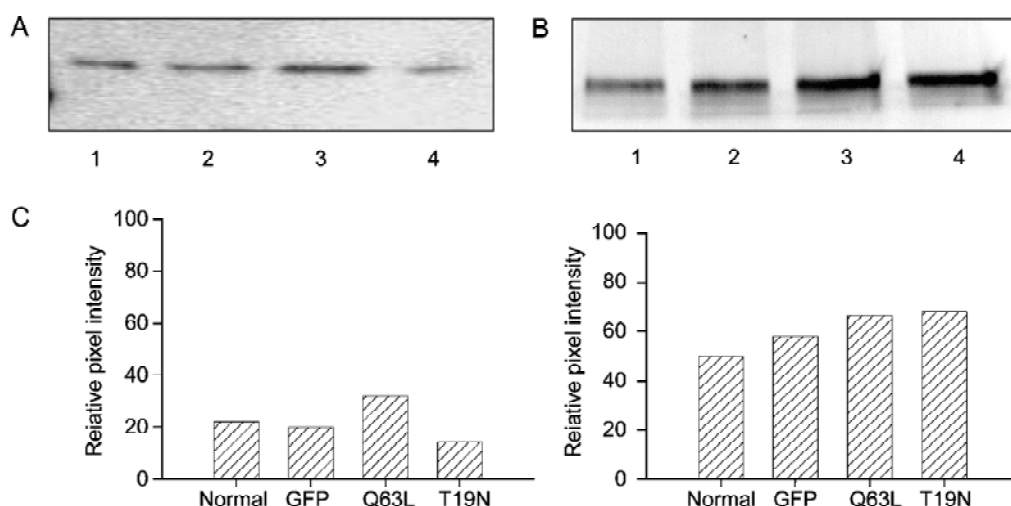


图 3. Pull-down 和 Western blot 分析检测感染前后细胞内活化 RhoA 的变化

Fig. 3. Expression of total or activated-RhoA in normal and infected HUVECs was detected by pull-down assay. A: Expression of activated-RhoA protein. B: Expression of total-RhoA protein. C: Blots were scanned on a densitometer and the bands intensity was quantified with image analysis software. 1, HUVECs; 2, HUVECs infected with pLNCX-GFP; 3, HUVECs infected with pLNCX-Q63LRhoA; 4, HUVECs infected with pLNCX-T19NRhoA.



图 4. 免疫组化分析检测感染前后细胞内 SRF 的表达及定位

Fig. 4. Immunolocalization and expression of SRF were analysed by immunohistochemistry. A: HUVECs. B: HUVECs infected with pLNCX-Q63LRhoA. C: HUVECs infected with pLNCX-T19NRhoA. Scale bar, 10 μ m.

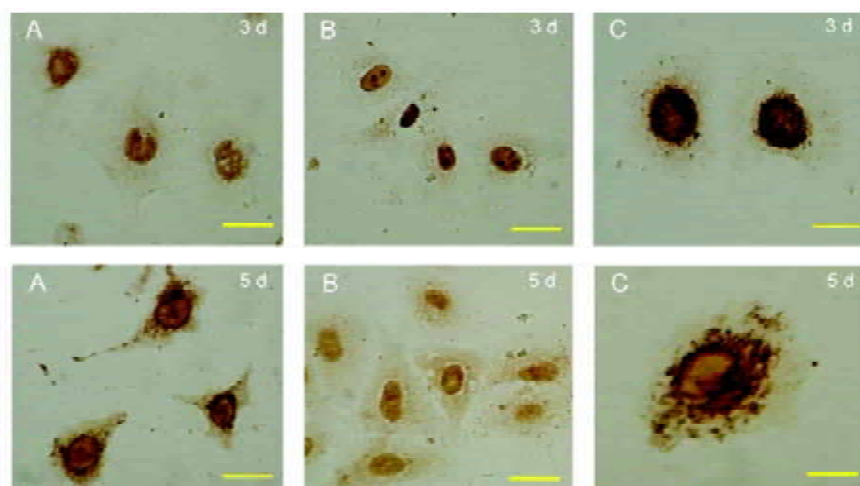


图 5. 免疫组化检测去血清培养细胞中 SRF 表达及定位

Fig. 5. Immunolocalization and expression of SRF with serum deprivation were analysed by immunohistochemistry. A: HUVECs. B: HUVECs infected with pLNCX-Q63LRhoA. C: HUVECs infected with pLNCX-T19NRhoA. Scale bar, 10 μ m.

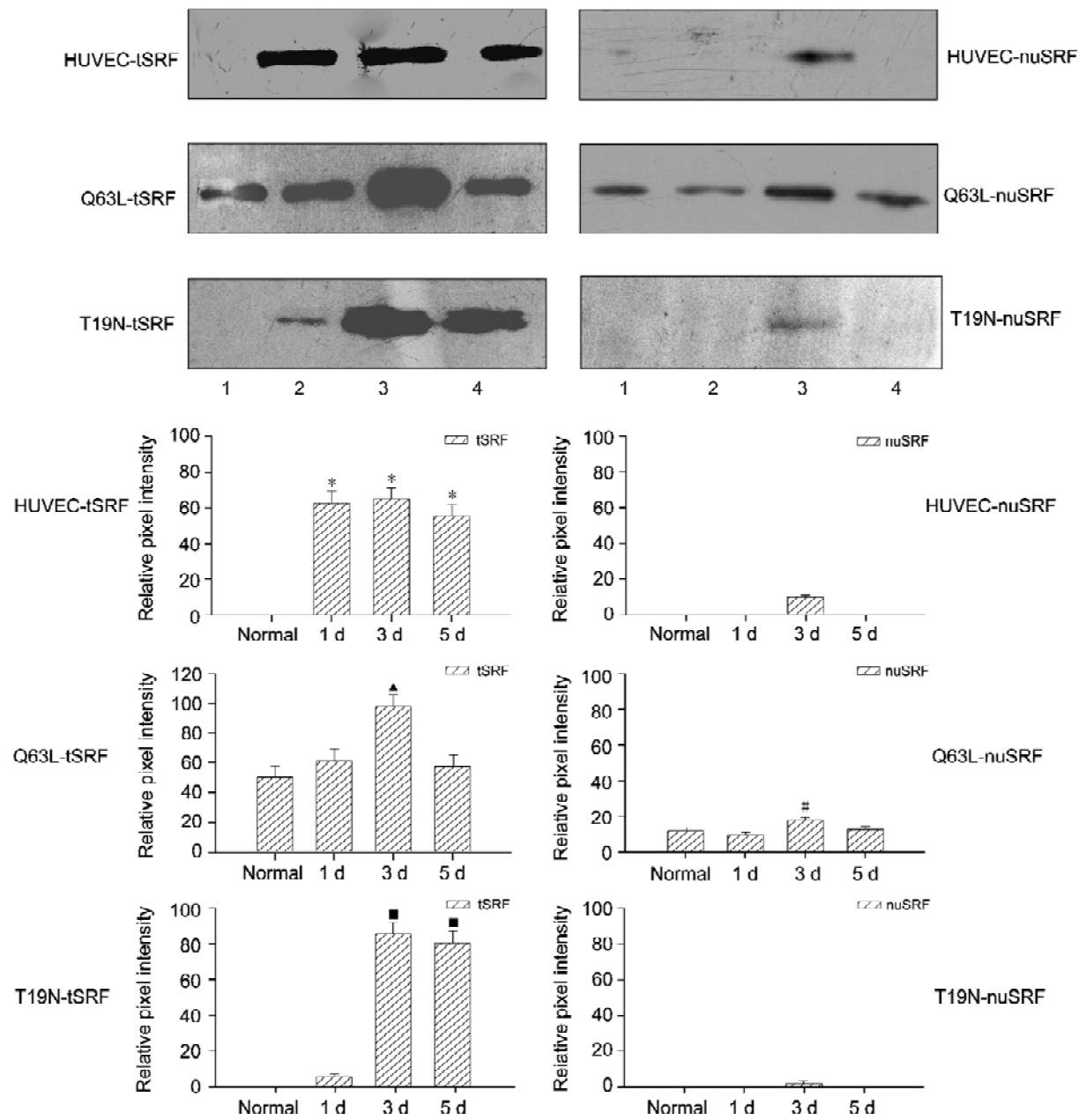


图 6. Western blot 分析感染前后各组细胞总蛋白和核蛋白中 SRF 表达

Fig. 6. Expression of SRF in nuclei protein (nuSRF) or total protein (tSRF) were detected by Western blot. Blots were scanned on a densitometer and the bands intensity was quantified with image analysis software. 1, HUVECs; 2, starved with serum deprivation for 1 d; 3, starved with serum deprivation for 3 d; 4, starved with serum deprivation for 5 d. * $P < 0.05$ vs HUVECs, ▲ $P < 0.05$ vs Q63L, # $P < 0.05$ vs Q63L, ■ $P < 0.05$ vs T19N.

而对细胞内 RhoA 总蛋白的表达无明显影响(图 3)。

2.3 感染前后细胞中 SRF 表达及定位分析

应用免疫组化分析 HUVECs (对照组) SRF 表达较弱, 主要定位于细胞核, 细胞浆中有少量表达。Q63LRhoA 组 SRF 表达增加, SRF 定位主要在细胞核上, 而 T19NRhoA 组 SRF 表达较对照组明显减少 (图 4)。

2.4 去血清培养感染前后 HUVECs 中 SRF 表达及定位分析

去血清培养诱导对照组、Q63LRhoA 组、T19NRhoA 组中 SRF 表达均明显上调。去血清培养 3 d, 3 组细胞中 SRF 表达均显著增加, 对照组和 Q63LRhoA 组细胞中 SRF 表达主要集中在核内。T19NRhoA 组细胞中 SRF 表达较对照组和 Q63LRhoA

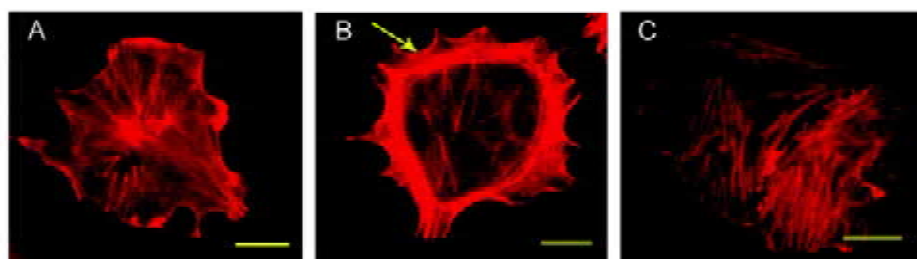


图 7. Rhodamine-Phalloidine 染色检测感染前后细胞中 F-actin 分布

Fig. 7. F-actin distribution in normal or infected HUVECs visualized by fluorescent microscopy with Rhodamine-Phalloidine staining. A: HUVECs. B: HUVECs infected with pLNCX-Q63LRhoA. C: HUVECs infected with pLNCX-T19NRhoA. Scale bar, 10 μ m.

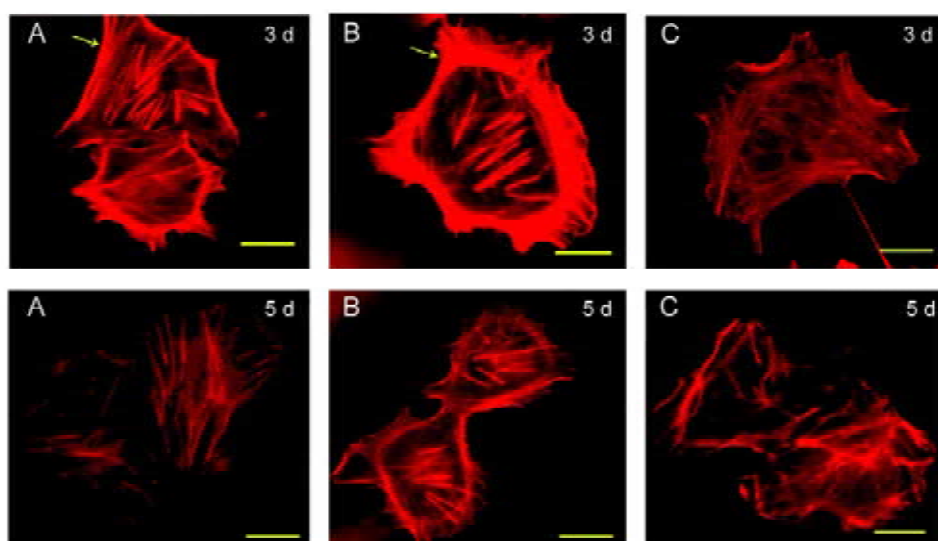


图 8. Rhodamine-Phalloidine 染色观察去血清培养细胞 F-actin 分布(箭头示应力纤维)

Fig. 8. F-actin distribution in normal or infected HUVECs with serum deprivation visualized by fluorescent microscopy with Rhodamine-Phalloidine staining. A: HUVECs. B: HUVECs infected with pLNCX-Q63LRhoA. C: HUVECs infected with pLNCX-T19NRhoA. Scale bar, 10 μ m (arrows show stress fiber).

组明显增加,但 SRF 定位主要集中在细胞核周,核内 SRF 表达较少。去血清培养 5 d,对照组细胞 SRF 表达持续增强并出现明显的核外移现象,SRF 定位由细胞核向细胞浆转移。Q63LRhoA 感染细胞中 SRF 表达无明显增加,SRF 定位仍在细胞核。T19NRhoA 转染细胞中 SRF 表达也持续增强,但 SRF 仍在细胞核周(图 5)。

进一步用 Western blot 分析感染前后各细胞中 SRF 的定位表达,去血清培养后,各感染细胞 SRF 总蛋白均明显增加。核蛋白 SRF 分析显示,对照组去血清培养 3 d,SRF 在细胞核大量表达;去血清培养 5 d,细胞核 SRF 表达则明显减少。这一结果与免疫组化分析相一致,提示随去血清时间延长,

细胞 SRF 发生明显的出核转位现象。Q63LRhoA 感染后,SRF 主要在胞核中表达,且不随去血清时间延长而减弱,而 T19NRhoA 感染后细胞核中 SRF 表达极少(图 6)。

2.5 感染前后细胞中 F-actin 重构分析

应用 Rhodamine-Phalloidine 染色观察感染前后各组细胞 F-actin 变化, Q63LRhoA 感染后细胞伴有 F-actin 重构,其细胞内及细胞周边形成较多应力纤维,而 T19NRhoA 感染后细胞 F-actin 排布无明显改变(图 7)。

2.6 去血清培养前后细胞 F-actin 重构分析

去血清培养 3 d,对照组和 Q63LRhoA 组 F-actin 表达均明显增加,胞内及细胞周边形成大量应力

纤维。T19NRhoA 组 F-actin 表达无明显改变。去血清培养 5 d, 对照组细胞 F-actin 表达明显降低, 胞内应力纤维解聚; Q63LRhoA 组细胞中 F-actin 表达无明显变化, 细胞周边仍有大量应力纤维聚集, T19NRhoA 组 F-actin 表达亦无明显改变(图 8)。

3 讨论

血管内皮细胞是血管内皮的主要屏障。其重要的功能是形成和实现血液与组织间的选择性物质传输。在病理条件下, 许多毒素、炎症和成血栓性介质均可以损伤内皮屏障功能, 导致通透性增高^[6]。血管内皮通透性增加不仅是血管内炎症反应的结果, 也是血管损伤如动脉粥样硬化的病理基础。细胞骨架蛋白 F-actin 是维持细胞形态与极性的基本骨架蛋白, F-actin 的重构是炎症反应和血管损伤引起血管内皮通透性增高的分子基础^[7]。

RhoA 是小 G 蛋白家族中的重要成员, 通常以 GTP 结合的活化型和 GDP 结合的非活化形式存在。目前研究表明, 炎症因子或外界刺激引起血管内皮损伤和通透性增高主要与 RhoA 活化有关^[8]。SRF 是调控细胞早期基因和特异性肌动蛋白基因表达的重要细胞转录因子。文献报道, 胚胎干细胞中 SRF 基因缺失可引起细胞形态和粘附能力改变^[9]。Mack 等发现 RhoA 可以激活 SRF 引起 actin 骨架重构^[10]。但迄今有关 RhoA 调控 SRF 引起细胞 F-actin 表达变化的机制尚不甚清楚。RhoA 介导内皮细胞 F-actin 重构的调控通路亦不十分明确。

本实验显示, Q63LRhoA 感染后, HUVECs 中 SRF 表达增加, 同时细胞骨架蛋白 F-actin 表达上调, 形成大量应力纤维。T19NRhoA 感染后, 细胞内 SRF 和 F-actin 表达均减少。提示 SRF 和 F-actin 表达与 RhoA 活性密切相关。进一步应用去血清培养改变细胞内 SRF 表达, 发现去血清培养后, 各实验组细胞 SRF 表达均较含血清培养时明显增加。其中 T19NRhoA 感染后, 细胞 SRF 表达增加最为显著。同时, 免疫组化和核蛋白 Western blot 分析显示, RhoA 活性的改变对 SRF 蛋白细胞核定位存在明显的影响。对照组细胞 SRF 的表达随去血清培养时间延长发生明显的核转位现象, 去血清培养 3 d, 细胞 SRF 主要定位于细胞核, 而去血清培养 5 d, SRF 定位则由细胞核向细胞浆转移。Q63LRhoA 感染细胞 SRF 表达随去血清培养时间延长明显增加且主要定位于细胞核, 无出核转位现象发生。而 T19NRhoA 感染细胞 SRF 表达增加虽然

更为明显, 但 SRF 定位主要集中在细胞核周, 细胞核内几乎无 SRF 表达, SRF 入核转位受到明显抑制。提示 RhoA 的活化能促进 SRF 入核并抑制其出核。通过抑制 RhoA 的活性则可阻断 SRF 入核转位。

作为特异性细胞骨架蛋白的转录调控因子, SRF 对 F-actin 骨架蛋白的调控功能早已被发现和阐明。本研究进一步探讨 SRF 的表达和转位与 F-actin 重构之间的关系, 表明 HUVECs 经去血清培养, 细胞核 SRF 表达增强, 同时 F-actin 表达也明显增加, 形成大量应力纤维。随去血清时间延长, 细胞核 SRF 发生出核转位现象, F-actin 表达亦随之逐渐下调。Q63LRhoA 感染细胞去血清后, 细胞核 SRF 表达持续上调, F-actin 表达明显增加, 伴有大量应力纤维形成, 细胞内 F-actin 重构现象不随去血清时间延长而减弱。T19NRhoA 感染细胞去血清培养后, 细胞核无 SRF 表达, 同时细胞内 F-actin 表达亦无明显变化。本实验结果揭示, 去血清培养前后各实验组细胞 F-actin 表达与细胞核 SRF 表达变化密切相关。

Rech 等证实, 人 SRF 蛋白第 95~100 氨基酸为核定位信号的保守序列, 此序列是 SRF 核定位必须的^[11]。同时, SRF 磷酸化也是 SRF 入核转移的必要反应步骤^[12]。有研究证实, 在平滑肌细胞 RhoA 与 SRF 核定位有关, 但内皮细胞中是否存在这种相关性尚未见报道。我们的研究结果提示, RhoA 活性改变引起内皮细胞肌动蛋白骨架重构与 SRF 核转移密切相关。RhoA 可能通过控制 SRF 的磷酸化或调控 SRF 核定位信号引起 SRF 的核转移发生, 其详细机制还需更深入的研究。

参考文献

- 1 Etienne-Manneville S, Hall A. RhoGTPase in cell biology. *Nature* 2002; 420(6916): 629-635.
- 2 Posern G, Sotiropoulos A, Treisman R. Mutant actins demonstrate a role for unpolymerized actin in control of transcription by serum response factor. *Mol Biol Cell* 2002; 13(12): 4167-4178.
- 3 Amano M, Chihara K, Kimura K, Fukata Y, Nakamura N, Matsuura Y, Kaibuchi K. Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science* 1997; 275(5304): 1308-1311.
- 4 Liu HW, Halayko AJ, Fernandes DJ, Harmon GS, McCauley JA, Kocieniewski P, McConville J, Fu Y, Forsythe SM, Kogut P, Bellam S, Dowell M, Churchill J, Lesso H, Kassiri K, Mitchell RW, Hershenson MB, Camoretti-Mercado B, Solway J. The RhoA/Rho kinase pathway regulates nuclear localization.

- tion of serum response factor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29(1): 39-47.
- 5 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Centennial 1989: 1860.
- 6 Wang X(王翔), Cai SX, Luo XD, Wang P, Luo Q, Liang GP, Yang ZC. Modification of membrane lipid of human umbilical vein endothelial cells after direct lipopolysaccharide injury. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2001; 53(6): 419-424 (Chinese, English abstract).
- 7 Wright K, Nwariaku F, Halaihel N, Schulman C, Yin HL, Turnage RH. Burn-activated neutrophils and tumor necrosis factor- α alter endothelial cell actin cytoskeleton and enhance monolayer permeability. *Surgery* 2000; 128(2): 259-265.
- 8 Wojciak-Stothard B, Potempa S, Eichholtz T, Ridley AJ. Rho and Rac but not Cdc42 regulate endothelial cell permeability. *J Cell Sci* 2001; 114(7): 1343-1355.
- 9 Schrat G, Philippart U, Berger J, Schwarz H, Heidenreich O, Nordheim A. Serum response factor is crucial for actin cytoskeletal organization and focal adhesion assembly in embryonic stem cells. *J Cell Biol* 2002; 156(4): 737-750.
- 10 Mack CP, Somlyo AV, Hautmann M, Somlyo AP, Owens GK. Smooth muscle differentiation marker gene expression is regulated by RhoA-mediated actin polymerization. *J Biol Chem* 2001; 276(1): 341-347.
- 11 Rech J, Barlat I, Veyrune JL, Vie A, Blanchard JM. Nuclear import of serum response factor (SRF) requires a short amino-terminal nuclear localization sequence and is independent of the casein kinase II phosphorylation site. *J Cell Sci* 1994; 107(11): 3029-3036.
- 12 Gauthier-Rouviere C, Vandromme M, Lautredou N, Cai QQ, Girard F, Fernandez A, Lamb N. The serum response factor nuclear localization signal: general implications for cyclic AMP-dependent protein kinase activity in control of nuclear translocation. *Mol Cell Biol* 1995; 15(1): 433-444.