

研究论文

Rac1 蛋白活化加速缺氧诱导的人血管内皮细胞衰老

韩雅玲^{1*}, 于海波¹, 闫承慧¹, 康 建¹, 孟子敏¹, 张效林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 美国 Robert Wood Johnson 医学院病理实验科, 新泽西州 08854; ³ 解放军总医院老年心血管病研究所, 北京 100853

摘 要: 为阐明 Rac1 蛋白在人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)衰老中的作用及分子机制, 我们采用持续缺氧的方法诱导内皮细胞衰老, 检测缺氧前后内皮细胞衰老标志基因 SA- β -Gal 和 PAI-1 的表达、细胞周期分布和细胞增殖情况, 同时分析缺氧前后细胞内 Rac1 蛋白的表达。结果显示, 持续缺氧 96 h 后, HUVECs 体积变大, 细胞浆内颗粒和空泡增多, SA- β -Gal 活性明显增加, PAI-1 基因表达升高, 细胞发生 G₁ 期阻滞, 细胞增殖受抑, 活化型 Rac1 蛋白表达上调, 提示持续缺氧诱导的内皮细胞衰老可能与 Rac1 蛋白的活化有关。为进一步明确内皮细胞衰老与 Rac1 蛋白的关系, 应用逆转录病毒将持续活化型 Rac1 (V12Rac1)和主导抑制型 Rac1 (N17Rac1)基因分别瞬时感染 HUVECs, 比较三种 HUVECs (HUVECs, V12Rac1-HUVECs, N17Rac1-HUVECs)缺氧后的衰老变化, 并分析其下游调控分子——血清反应因子(serum response factor, SRF)的表达和定位变化。研究发现, 缺氧培养 V12Rac1-HUVECs 48 h 即可引起细胞衰老, 表现为 SA- β -Gal 活性明显增加, PAI-1 基因表达升高, 细胞出现明显的 G₁ 期阻滞并且细胞增殖受抑, 其改变与缺氧 96 h 的 HUVECs 相似; 而 N17Rac1 明显抑制缺氧引起的内皮细胞衰老发生。上述结果说明, Rac1 蛋白活化可以加速缺氧诱导的内皮细胞衰老, 而抑制 Rac1 蛋白的活性则可抑制缺氧诱导的内皮细胞衰老。为进一步研究 Rac1 蛋白引起内皮细胞衰老的机制, 通过免疫荧光染色及 Western blot 分析检测三种细胞缺氧处理后 SRF 的表达, 发现: 与 HUVECs 细胞比较, V12Rac1 引起缺氧 48 h HUVECs 核蛋白中 SRF 的表达明显下降, SRF 入核转位受到明显抑制; 而 N17Rac1 感染后, 缺氧 HUVECs 细胞核蛋白中 SRF 表达明显增多。上述结果提示: 缺氧状态下 Rac1 蛋白活化能够明显加速 HUVECs 衰老, 而抑制 Rac1 蛋白活性则明显抑制缺氧诱导的 HUVECs 衰老, SRF 蛋白的核转位活化参与了 Rac1 蛋白调控 HUVECs 衰老的发生。

关键词: Rac1; 缺氧; 内皮细胞; 衰老

中图分类号: Q255; Q291

Rac1 accelerates endothelial cell senescence induced by hypoxia *in vitro*

HAN Ya-Ling^{1*}, YU Hai-Bo¹, YAN Cheng-Hui¹, KANG Jian¹, MENG Zi-Min¹, ZHANG Xiao-Lin¹, 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: To investigate the role and mechanism of Rac1 protein in the process of the human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) senescence, we used hypoxia as a model for modulating HUVECs entering replicative senescence *in vitro*. Premature senescence of HUVECs was evidenced by detecting the SA- β -Gal activity and PAI-1 expression. Meanwhile, cell cycle distribution and cell proliferation rate were investigated by flow cytometry assay and BrdU staining. The results indicated that the HUVECs became enlarged and flattened, both SA- β -Gal activity and PAI-1 expression increased obviously, while cell proliferation was inhibited and G₁ phase cell cycle arresting occurred when HUVECs were treated with continued hypoxia for 96 h. Accompanied with these changes, the expression of activated Rac1 increased obviously in cells after hypoxia. All these observations suggested that endothelial senescence could be induced by continued hypoxia and it might correlate with the activity of Rac1. To further define the relationship between Rac1 and HUVEC senescence, HUVECs were transiently infected with the constitutively active form of Rac1 (V12Rac1) or dominant negative

Received 2005-11-14 Accepted 2006-04-09

This work was supported by the Major State Basic Research Development Program (No. G2000057004).

*Corresponding author. Tel: +86-24-23056123; Fax: +86-24-23922184. E-mail: hanyal@mail.sy.ln.cn

form of Rac1 (N17Rac1) using retrovirus vector pLNCX-V12Rac1 or pLNCX-N17Rac1. We observed the changes of these three kinds of HUVECs (HUVECs, N17Rac1-HUVECs, V12Rac1-HUVECs) after hypoxia for 48 h and 96 h, the expression and localization of serum response factor (SRF), which is one of the downstream signal molecules of Rac1, were also investigated. The results obtained indicated that after continued hypoxia for 48 h, HUVECs infected by V12Rac1 showed obvious senescence accompanied with SA- β -Gal activation, PAI-1 expression increase, G₁ phase arrest and cell proliferation inhibition which were similar to HUVECs after continued 96-hour hypoxia treatment, while the senescence of HUVECs infected by N17Rac1 was significantly inhibited even if the cells were exposed to hypoxia for more than 96 h. All the results identified that the activation of Rac1 might accelerate HUVEC senescence induced by hypoxia and that inactivation of Rac1 could partly block the cell senescence. To further investigate the mechanism of HUVEC senescence induced by Rac1, we detected the expression of total SRF (tSRF) and nuclear SRF (nSRF) in these three kinds of HUVECs by immunofluorescent analysis and Western blot assay after hypoxia. The results showed that the expression of nSRF decreased obviously and the nuclear translocation of SRF was inhibited in HUVECs infected by V12Rac1 compared with those in the normal HUVECs. In contrast, the expression of nSRF increased obviously in the HUVECs infected by N17Rac1. These results suggest that activation of Rac1 accelerates endothelial cell senescence and inhibition of Rac1 activity prevents HUVECs from entering senescence induced by hypoxia, while the nuclear translocation of SRF regulated by Rac1 might play an important role in the process of senescence.

Key words: Rac1; hypoxia; endothelial cell; senescence

衰老是多细胞生物体机能退行性改变的生理过程。细胞的衰老决定了整个生物体的最终老化并造成一系列的功能丧失和疾病发生。目前认为血管内皮细胞的进行性衰老是动脉粥样硬化发生的病理生理机制之一^[1]。因此,阐明血管内皮细胞衰老的分子机制对动脉粥样硬化等血管疾病的诊治具有重要意义。

Rac1 是小 G 蛋白家族的重要成员之一,在多种类型细胞骨架蛋白重构和特异性基因表达中起调控作用。Rac1 蛋白活化不仅可以调控血管内皮细胞骨架蛋白形成,影响细胞的趋化、粘附功能^[2],近期研究还发现 Rac1 蛋白通过特异性调控内皮细胞 NADPH 氧化酶基因的表达,刺激内源性活性氧(reactive oxidative species, ROS)产生,参与细胞毒性改变和进行性衰老的发生^[3]。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,已有研究发现,SRF 在多种细胞衰老中呈现不同表达变化^[4,5]。但作为 Rac1 蛋白的下游信号分子,SRF 在 Rac1 活化诱导的细胞衰老病理过程中的表达变化国内外尚未见研究报道。本研究以体外培养的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)为研究对象,探讨 Rac1 蛋白在持续缺氧诱导的人血管内皮细胞衰老中的作用及其相关的调控机制。

1 材料与方

1.1 材料 HUVECs 株(CRL-1730), Phoenix amphotropic 293 包装细胞(CRL-12479)均购自 Ameri-

can Type Culture Collection (ATCC)。持续活化型 pLNCX-V12Rac1 和主导抑制型 pLNCX-N17Rac1 逆转录病毒真核表达载体由本室闫承慧博士构建。Rac1 pull down 试剂盒及抗 Rac1 抗体购自 Cell Cytoskeleton 公司。抗 SRF 抗体购自 Santa Cruz 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。TRIzol 试剂盒购于 Invitrogen 公司, ECL 试剂盒购于 Amersham 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HUVECs 生长于含 10% 胎牛血清和 0.05% 内皮细胞生长因子的 DMEM 培养基中。37℃, 5% CO₂, 恒温培养。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 内皮细胞的瞬时转染 用磷酸钙沉淀法分别转染 pLNCX-GFP、pLNCX-V12Rac1, pLNCX-N17Rac1 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 6 孔板上,使细胞在感染当天达到 50% 融合,将所获病毒及 8 μ g/ml polybrene 感染 HUVECs 48 h 后,收获细胞进行研究。

1.2.3 Pull down 分析 感染前后 HUVECs 生长至融合时, 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℃, 12 000 r/min 离心 10 min, 收获细胞, BCA 法测定蛋白浓度。在上述细胞提取物中分别加入 50 μ l 结合在 Glutathione Sepharose 4B 凝胶柱上的 GST-hPBD 融合蛋白, 4℃

涡旋孵育 1 h, 2 500 r/min 离心 3 min, 弃上清。沉淀用 wash buffer (25 mmol/L Tris, pH 7.5、30 mmol/L EDTA、600 mmol/L MgCl₂) 500 μ l 洗涤, 2 000 r/min 离心 3 min, 弃上清。取沉淀行 12% SDS-PAGE 电泳, Western blot 检测活性 Rac1 的表达。

1.2.4 细胞缺氧 细胞缺氧条件参照文献^[6], 将感染前后的细胞置于 5% O₂、5% CO₂ 及 90% N₂ 的三气培养箱中培养(HERAcell 150, 德国), 分别于缺氧后 48、96 h 收获细胞, 观察细胞衰老情况。

1.2.5 β -半乳糖苷酶(SA- β -Gal)活性分析 SA- β -Gal 阳性衰老细胞的鉴定依据参考文献^[7]。缺氧后 48、96 h 细胞用含有 0.5% 戊二醛的 PBS (pH 7.2) 固定 5 min, 然后用 PBS 洗 1 次, 在新鲜配置的 X-gal (1 mg 5-bromo-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranoside, 5 mmol/L K₄[Fe(CN)₆], 2 mmol/L MgCl₂, pH 6.0) 染液中, 37℃ 孵育过夜。相差显微镜下计数胞浆蓝染细胞数目, 每种细胞计数四个视野, 每个视野至少 100 个细胞, 计算细胞染色阳性率。

1.2.6 Northern blot 收集缺氧后 48、96 h 的内皮细胞, TRIzol 试剂盒提取细胞总 RNA。按文献^[8]甲醛变性胶电泳 2 h, 转移至尼龙膜, 与 ³²P 标记的 PAI-1 或 GAPDH cDNA 探针杂交, 分析 PAI-1 的表达变化。

1.2.7 细胞周期分析 细胞贴壁生长至 70%~80% 融合后, 去血清培养 24 h, 继续缺氧培养 48 h 或 96 h, PBS 洗涤细胞三次, 胰酶消化, 1 000 r/min 离心 10 min, 收获细胞, 70% 乙醇固定, 流式细胞术(FCM, FACSCalibur, 美国)检测缺氧前后各组细胞周期分布。

1.2.8 BrdU 掺入实验分析细胞增殖 6 孔板中每孔分别接种 1 $\times$ 10⁴ 感染前后细胞, 每组细胞平行做两复孔。缺氧培养 48 h 或 96 h 后, 加入 10 mg/ml BrdU, 37℃ 孵育 2 h, Hanks 液洗 3 次, 进行常规免疫组化, DAB 染色后, 显微镜下观察细胞核着色情况。每孔计数 10 个视野, 计算着色细胞比例。

1.2.9 Western blot 按文献^[9]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 Rac1 单抗和抗 SRF 抗体。经 HRP 标记的二抗孵育后, 按 ECL 试剂盒说明书曝光处理。

1.2.10 免疫荧光分析 收集接种于盖玻片上缺氧后 48、96 h 的细胞, 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 SRF 抗体(1:100), 4℃ 孵育过夜。PBS 洗

涤 3 次, 每次 5 min, 加入 FITC 标记的二抗(1:100), 室温 2 h, PBS 洗涤细胞 3 次, 每次 5 min。10 μ g/ml DAPI 复染后立即封片, 荧光显微镜下观察, 不加一抗做为阴性对照片。

1.3 统计学处理 结果以 mean $\pm$ SD 表示, 利用 SPSS10.0 软件进行分析, 组间比较采用方差分析, $P<0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 持续慢性缺氧诱导 HUVECs 衰老和 Rac1 蛋白活化

将体外培养的 HUVECs 放置于 5% O₂、5% CO₂ 及 90% N₂ 的三气培养箱中培养 96 h 后, 细胞生长缓慢, 呈扁平状, 细胞浆内有大量的颗粒沉积, 细胞呈典型的衰老状态(图 1)。用 X-gal 染色观察 SA- β -Gal 活性, 发现缺氧 96 h 后, X-gal 蓝染细胞显著增多, 提示缺氧诱导内皮细胞进入衰老状态(图 2)。用 Northern blot 分析另一衰老标志基因 PAI-1 的表达, 发现缺氧 96 h 的 HUVECs 中 PAI-1 的表达明显升高(图 3)。进一步应用 FCM 检测细胞周期分布, 发现缺氧细胞出现明显的 G₁ 期阻滞(图 4), 同时 BrdU 细胞染色分析发现随着缺氧时间延长, 细胞增殖能力下降(图 5)。

上述结果均证实, 长期持续缺氧诱导体外培养的 HUVECs 衰老。为了观察 Rac1 蛋白在细胞衰老中的作用, 我们应用 pull down 分析细胞内活化的 Rac1 蛋白表达情况。结果发现, 缺氧 96 h 后, HUVECs 中总 Rac1 蛋白表达无明显差异, 但活化型 Rac1 蛋白表达明显增加(图 6)。

2.2 外源性持续活化型和主导抑制型 Rac1 感染 HUVECs

以 pLNCX-GFP 为对照组, 瞬时转染 HUVECs 抑制型 Rac1 (pLNCX-N17Rac1) 和活化型 Rac1 (pLNCX-V12Rac1) 表达载体, 荧光显微镜下观察感染效率约为 90% (图 7)。Pull down 分析发现与 HUVECs 和 GFP 对照组比较, Rac1 总蛋白无明显变化, 感染 N17Rac1 的细胞中活化 Rac1 蛋白明显减少, 而感染 V12Rac1 的细胞中活化 Rac1 蛋白增多, 证实感染 HUVECs 成功(图 8)。

2.3 活化型 Rac1 加速缺氧诱导 HUVECs 衰老

将活化型 Rac1 内皮细胞(V12Rac1-HUVECs)和抑制型 Rac1 内皮细胞(N17Rac1-HUVECs)分别缺氧培养 96 h, 与正常 HUVECs 比较, V12Rac1-HUVECs



图 1. 缺氧后 HUVECs 形态学改变

Fig.1. The morphological change in HUVECs after hypoxia with phase contrast microscope (X-gal staining). Scale bar, 10 μ m.

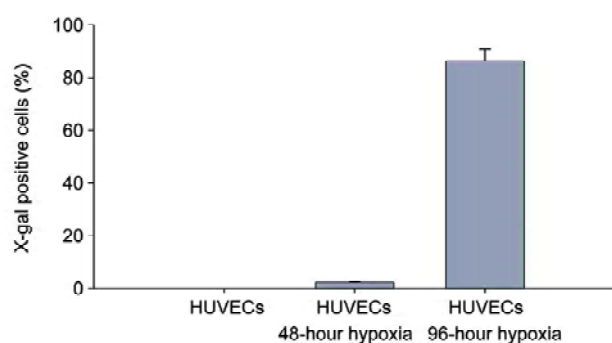
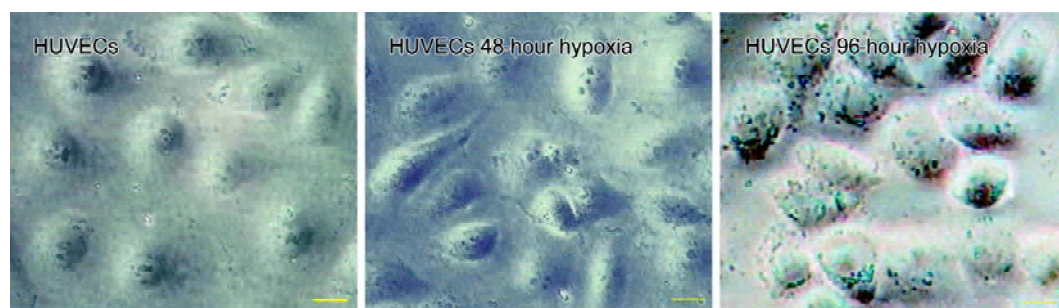


图 2. 缺氧后 HUVECs SA-β-Gal 活性分析

Fig.2. The assay of SA-β-Gal activity in HUVECs after hypoxia with phase contrast microscope (X-gal staining). Scale bar, 10 μ m.

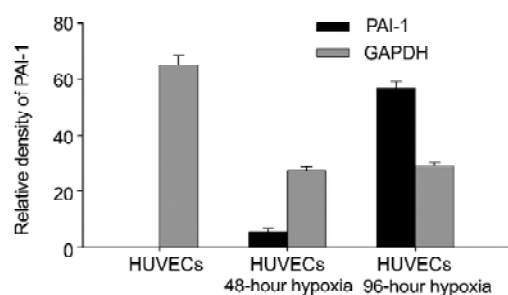
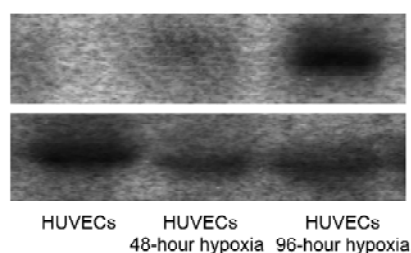


图 3. Northern blot 杂交检测缺氧后 HUVECs PAI-1 基因表达变化

Fig.3. The expression of PAI-1 in HUVECs after hypoxia was detected by Northern blot. Blots were scanned on a densitometer and the band intensity was quantified with image analysis software.

缺氧处理 48 h 后即表现出明显的衰老特征: X-gal 染色阳性细胞比例明显增加, 细胞内 PAI-1 基因表达明显增加, 细胞出现 G_1 期阻滞现象, 同时细胞内 BrdU 阳性细胞减少。相反, N17Rac1-HVUECs 缺氧 96 h 未见明显的细胞衰老现象发生, 即 PAI-1

基因表达较 HUVECs 组缺氧细胞明显下调, 细胞周期检测未出现 G_1 期阻滞及 BrdU 染色细胞减少现象。上述结果说明 Rac1 的活化可以加速 HUVECs 衰老, 而抑制 Rac1 活性可以抑制缺氧诱导的 HUVECs 衰老 (图 9~12)。

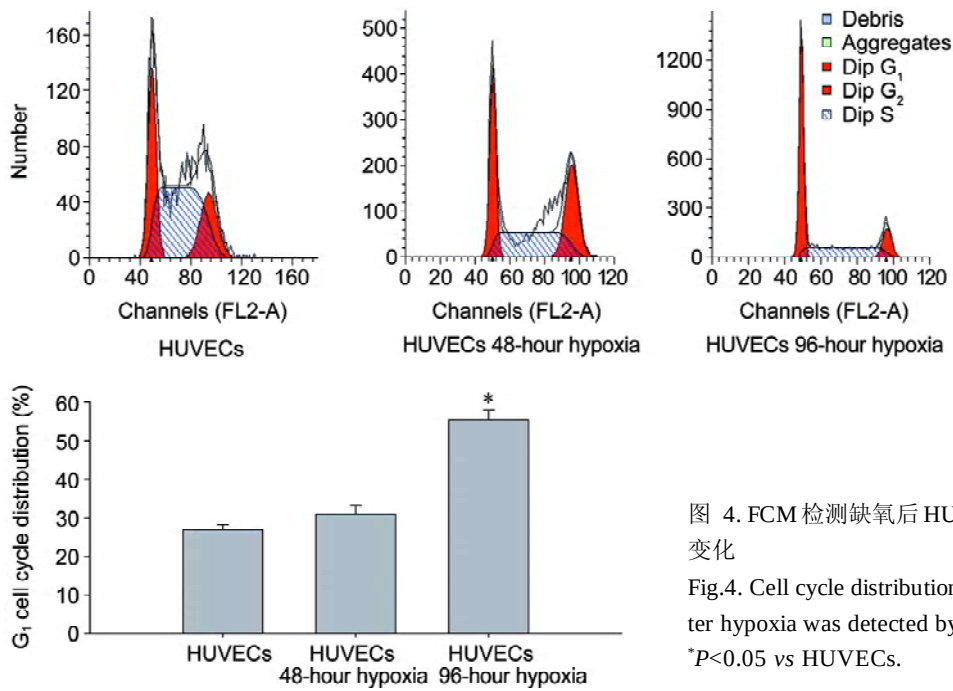


图 4. FCM 检测缺氧后 HUVECs 细胞周期变化

Fig.4. Cell cycle distribution in HUVECs after hypoxia was detected by flow cytometry. * $P < 0.05$ vs HUVECs.

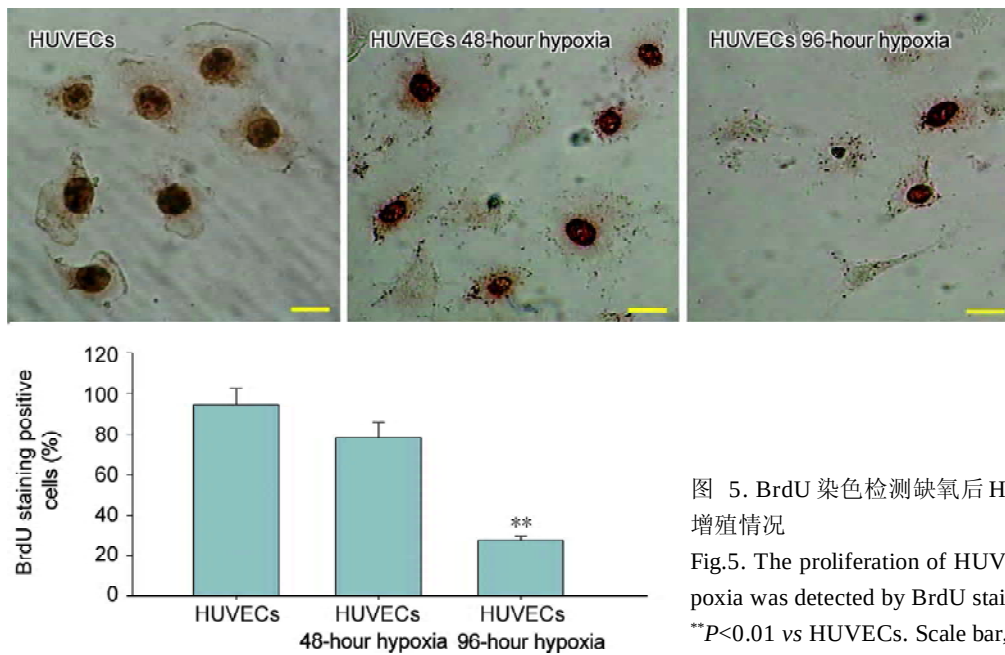


图 5. BrdU 染色检测缺氧后 HUVECs 细胞增殖情况

Fig.5. The proliferation of HUVECs after hypoxia was detected by BrdU staining analysis. ** $P < 0.01$ vs HUVECs. Scale bar, 10 μ m.

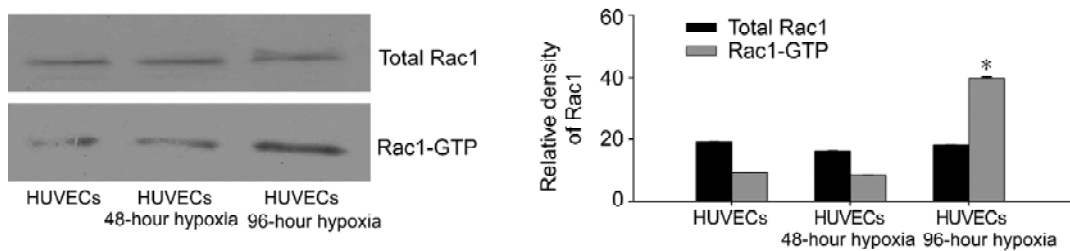


图 6. Pull down 和 Western blot 分析缺氧后 HUVECs 总 Rac1 及活化 Rac1 蛋白的表达

Fig.6. The expressions of total and activated Rac1 in HUVECs after hypoxia were detected by pull down assay and Western blot. * $P < 0.05$ vs HUVECs.

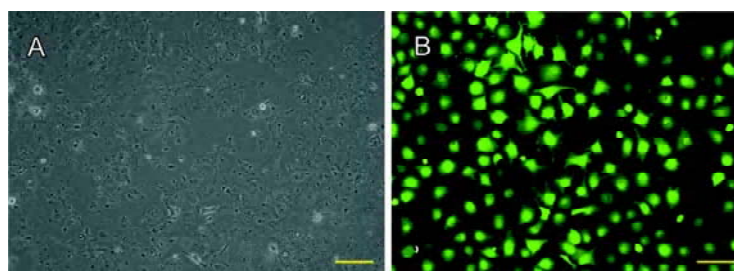


图 7. pLNCX-GFP 逆转录病毒载体感染效率检测

Fig.7. The efficiency of HUVECs infected with pLNCX-GFP was evaluated with fluorescent microscopy. A: HUVECs infected with pLNCX-GFP were investigated with phase contrast photomicroscope. B: HUVECs infected with pLNCX-GFP were examined with fluorescent microscopy. Scale bar, 20 μ m.

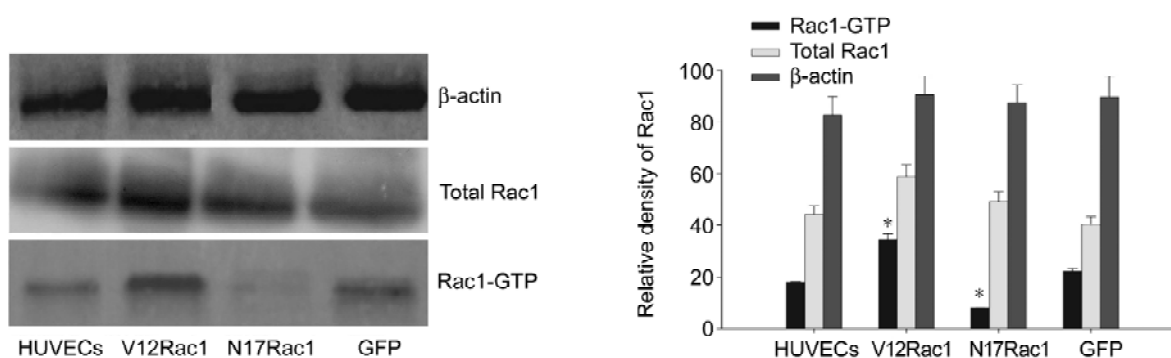


图 8. Pull down 和 Western blot 分析感染前后 HUVECs 总 Rac1 及活化 Rac1 蛋白的表达

Fig.8. The expressions of total and activated-Rac1 in normal and infected HUVECs were detected by pull down assay and Western blot. * $P < 0.05$ vs HUVECs.

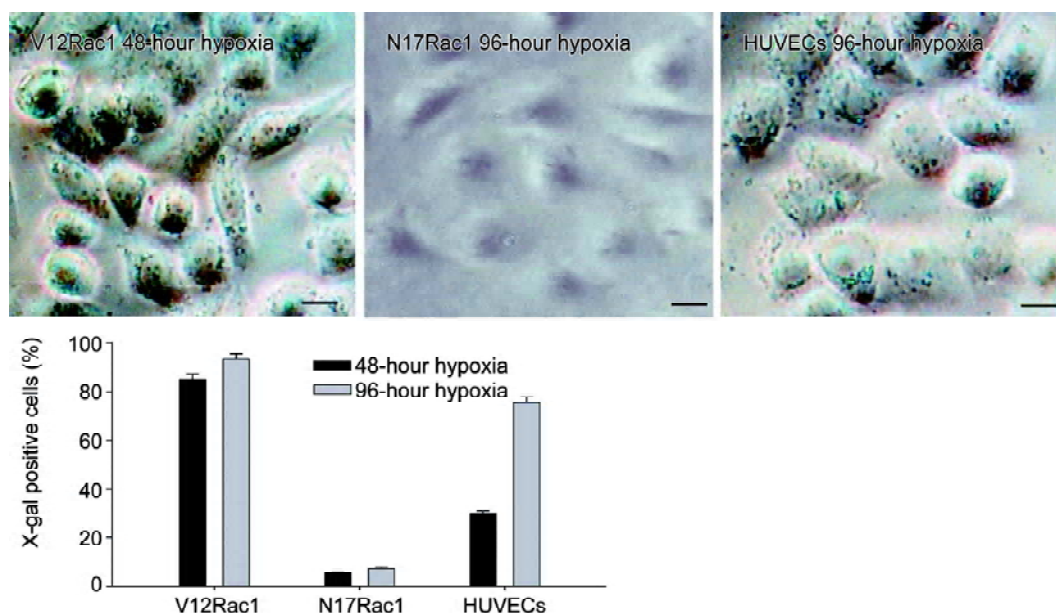


图 9. 缺氧培养下感染前后 HUVECs 的 SA-β-Gal 活性分析

Fig.9. The assay of SA-β-Gal activity in normal and infected HUVECs after hypoxia with phase contrast microscope (X-gal staining). Scale bar, 10 μ m.

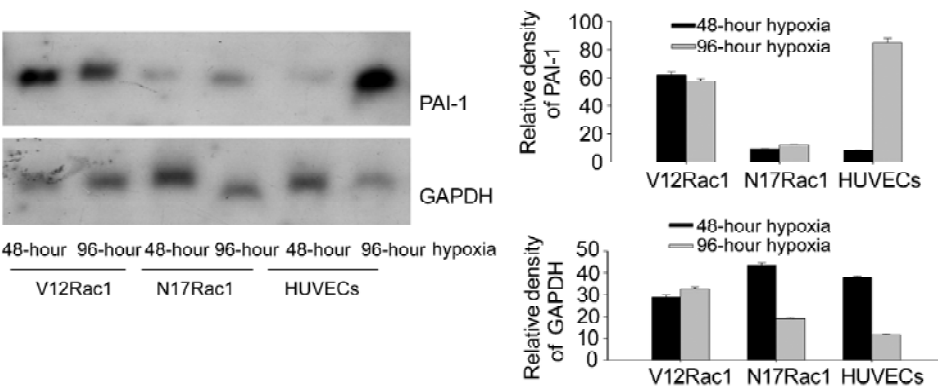


图 10. Northern blot 杂交检测缺氧培养下感染前后 HUVECs PAI-1 基因表达变化

Fig.10. The expressions of PAI-1 in normal and infected HUVECs after hypoxia were detected by Northern blot. Blots were scanned on a densitometer and the band intensity was quantified with image analysis software.

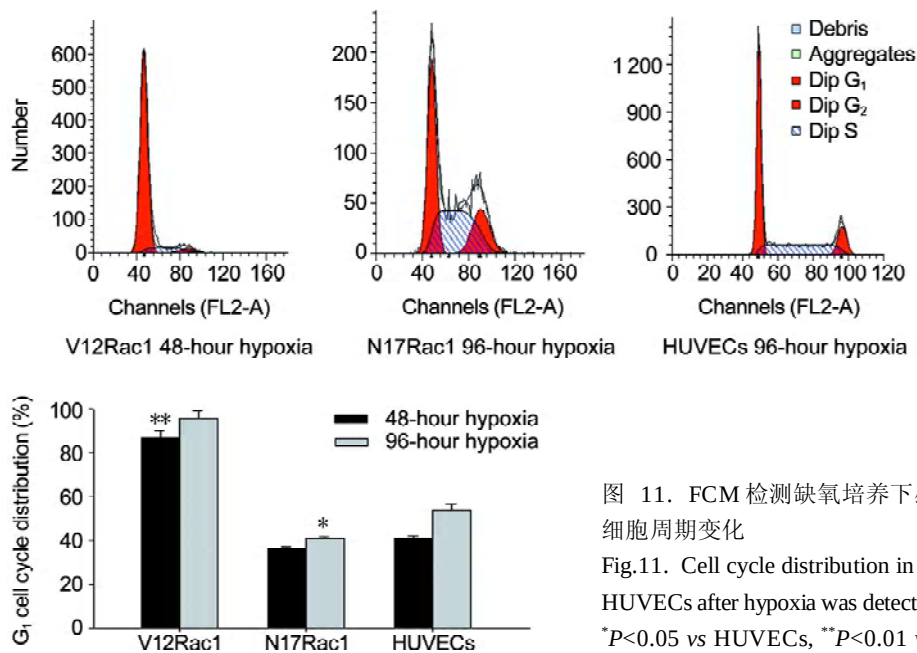


图 11. FCM 检测缺氧培养下感染前后 HUVECs 细胞周期变化

Fig.11. Cell cycle distribution in normal and infected HUVECs after hypoxia was detected by flow cytometry. * $P < 0.05$ vs HUVECs, ** $P < 0.01$ vs HUVECs.

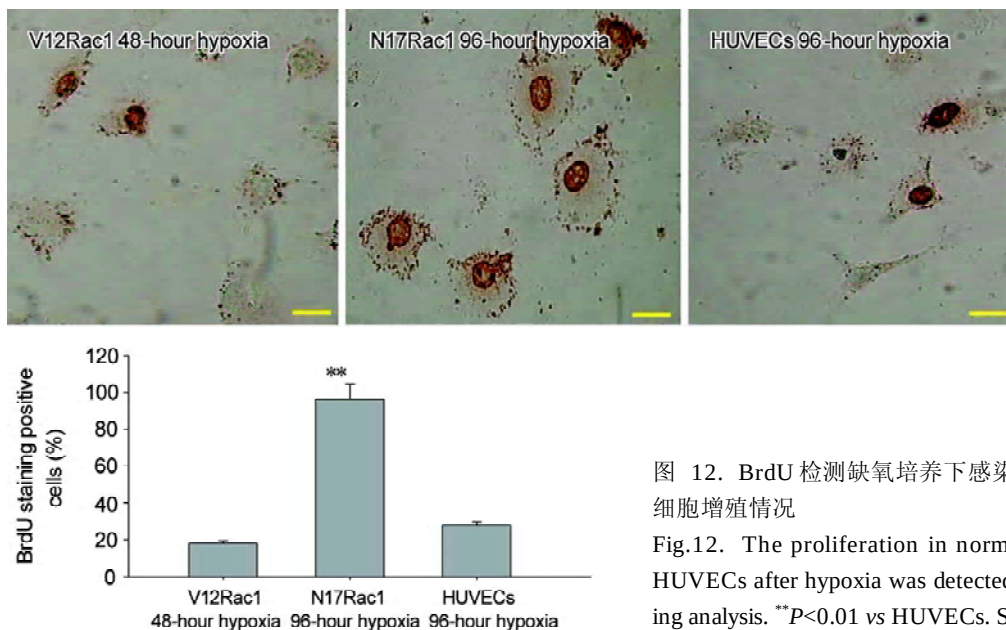


图 12. BrdU 检测缺氧培养下感染前后 HUVECs 细胞增殖情况

Fig.12. The proliferation in normal and infected HUVECs after hypoxia was detected by BrdU staining analysis. ** $P < 0.01$ vs HUVECs. Scale bar, 10 μ m.

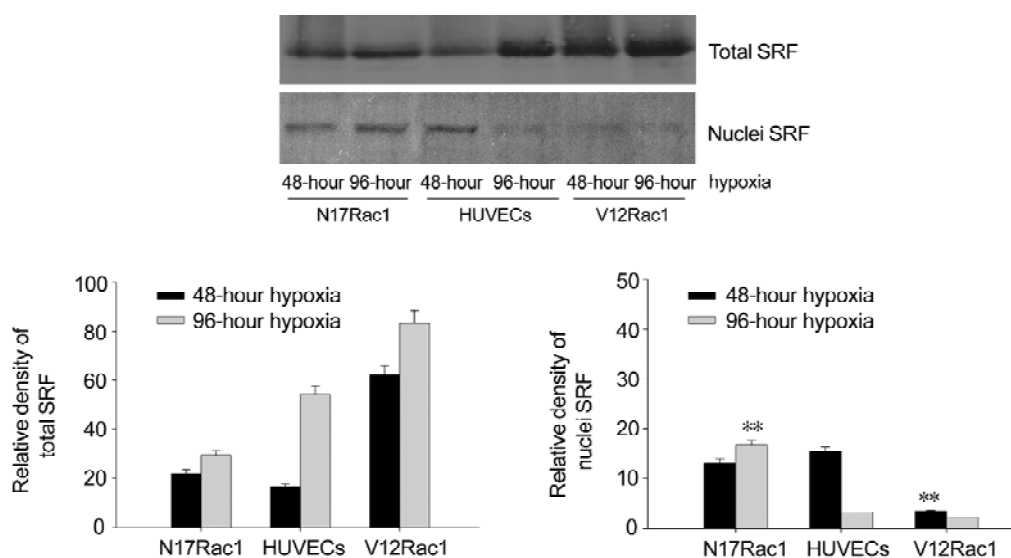


图 13. Western blot 分析缺氧培养下感染前后 HUVECs 总蛋白及核蛋白 SRF 表达

Fig.13. The expressions of SRF in nuclei protein and total protein in normal and infected HUVECs after hypoxia were detected by Western blot. Blots were scanned on a densitometer and the band intensity was quantified with image analysis software. ** $P < 0.01$ vs HUVECs.

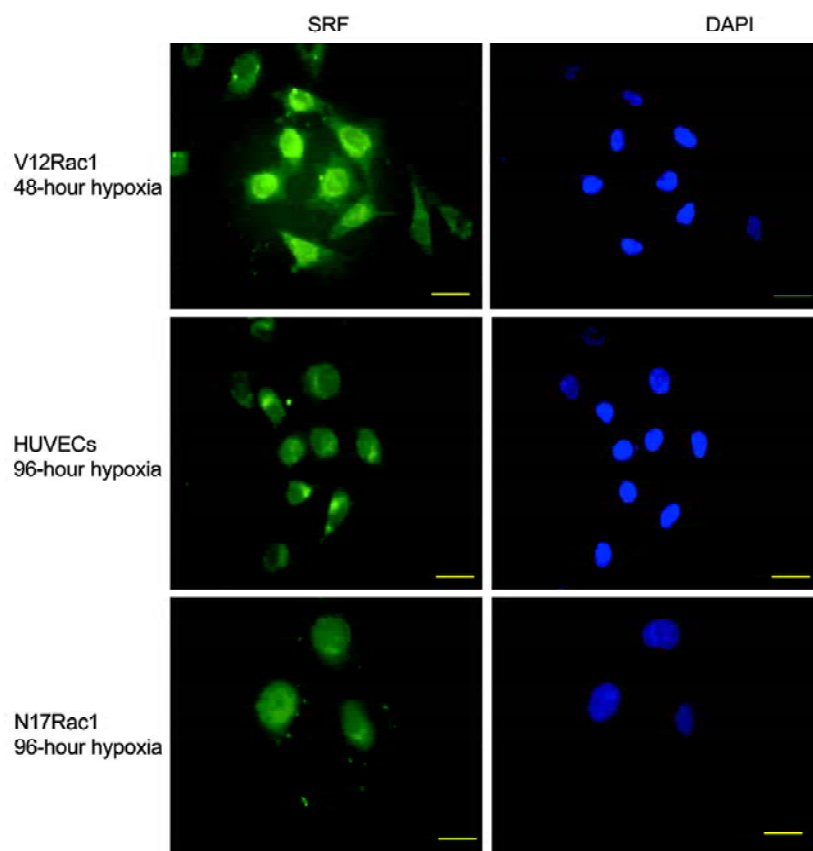


图 14. 免疫荧光检测分析缺氧培养下感染前后 HUVECs SRF 的定位变化

Fig.14. The immunolocalization and expression of SRF were analyzed in normal and infected HUVECs after hypoxia by fluorescent microscopy. Scale bar, 10 μm .

2.4 Rac1 蛋白活化诱导的 HUVECs 衰老与 SRF 核转位有关

用 Western blot 检测缺氧处理后 Rac1 基因下游调控分子 SRF 的表达发现, 与正常 HUVECs 比较, 缺氧 48 h 的 V12Rac1-HUVECs 即出现明显衰老状态, 同时伴随核蛋白中 SRF 表达明显减少, 而 N17Rac1-HUVECs 核蛋白中 SRF 表达无明显变化: 缺氧 96 h, HUVECs 出现明显衰老状态时核蛋白中 SRF 表达也呈明显下调。相反, 缺氧 96 h 的 N17Rac1-HUVECs 核蛋白中 SRF 的表达则明显增多(图 13)。

应用免疫荧光进行 SRF 定位分析发现, 缺氧 48 h V12Rac1-HUVECs 中 SRF 蛋白在细胞核周大量表达, SRF 呈出核转位现象。而 N17Rac1-HUVECs 中 SRF 蛋白在持续缺氧状态下始终在核内高表达(图 14)。上述研究提示: 缺氧状态下, SRF 蛋白可能通过出/入核转位活化参与了 Rac1 基因调控的 HUVECs 衰老的发生。

3 讨论

衰老的发生机制有多种假说, 目前研究较多的是端粒酶及氧化应激^[10,11], 已发现 Rac1 蛋白活化能够诱导血管内皮细胞分泌内源型 ROS, 引起细胞衰老的发生, 并推测其对细胞衰老的调控与 NADPH 及 ROS 基因的表达有关, 但具体的分子机制尚不明确。

为进一步阐明 Rac1 蛋白与内皮细胞衰老的关系, 本研究分别建立了逆转录病毒载体介导的持续活化型 Rac1 和主导抑制型 Rac1 表达细胞。在缺氧状态下, 观察不同时间点各组细胞的形态学改变并进行相关细胞衰老指标的检测。结果发现, Rac1 蛋白活化可以明显加速缺氧诱导的人血管内皮细胞衰老。Rac1 蛋白活化组细胞 V12Rac1-HUVECs 在缺氧 48 h 即出现明显的细胞衰老特征: SA- β -Gal 染色阳性, PAI-1 基因表达增加和明显的细胞增殖抑制现象。相反, 抑制了 Rac1 蛋白活性后, 缺氧诱导的细胞衰老现象受到明显抑制。

分析 Rac1 蛋白活化加速细胞衰老的分子机制发现, 缺氧状态下, Rac1 蛋白活性改变调控其下游信号转导分子 SRF 的表达定位。SRF 是小 G 蛋白家族成员 Rho GTPase 的下游调控因子, 在 cdc42/Rac1/RhoA 介导的内皮细胞骨架蛋白重构中起重要作用^[12]。目前大量研究证实, 作为 Rac1 蛋白的重要下游调控分子, SRF 参与了 Rac1 蛋白对细胞多种生理功能的调控^[13,14]。同时, SRF 还是细胞早期生长

相关基因 *c-fos* 和 *egr-1* 的直接调控因子, 在细胞增殖和胚胎发育方面起重要调控作用^[15]。近期部分研究证实 SRF 参与多种细胞衰老的调控^[16]。但作为 Rac1 蛋白的下游信号分子, 其在 Rac1 活化诱导的细胞衰老中的表达变化尚未见报道。

本研究分别应用 Western blot 和免疫荧光染色进行 SRF 的表达及定位分析发现, SRF 的表达和定位与细胞衰老的发生密切相关。V12Rac1-HUVECs 缺氧 48 h 即出现明显的细胞衰老特征, 同时细胞核蛋白中 SRF 表达明显减少。而在正常 HUVECs 中, SRF 核蛋白表达的减少发生在缺氧 96 h, 但 N17Rac1-HUVECs 缺氧后核蛋白中 SRF 的表达却显著增加。这一结果与 SRF 免疫荧光染色结果完全一致, 提示 SRF 蛋白表达即核转位参与了细胞衰老的发生, 并且 Rac1 蛋白活化引起 HUVECs 衰老可能与其抑制 SRF 蛋白的入核转位调控有关。

已有研究证实, 一旦细胞发生衰老, 细胞内多种分化和增殖调控基因表达即发生改变, 细胞呈现终末分化状态, 增殖能力下降, G₁ 细胞周期阻滞发生^[14]。其中细胞早期增殖基因 *c-fos* 和 *egr-1* 是 SRF 的直接转录调控基因, SRF 入核转位可以调控它们的持续表达。因此, 我们推测, 活化 Rac1 蛋白可能通过抑制 SRF 入核转位间接抑制了部分细胞增殖相关基因的表达, 从而抑制了细胞的增殖。同时, SRF 入核转位受抑也可导致细胞中衰老基因 PAI-1 的表达明显升高, 这与 Ding 等的报道一致^[5], 提示 Rac1 蛋白活化可能通过抑制 SRF 入核转位启动细胞衰老的发生, 更深入的调控机制尚有待进一步探讨。

总之, Rac1 蛋白活化加速缺氧诱导内皮细胞衰老机制的深入研究, 将为动脉粥样硬化等内皮衰老相关疾病的诊治提供新的研究思路。

参考文献

- 1 Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, Ishida Y, Yoshida H, Komuro I. Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation* 2002; 105: 1541-1544.
- 2 Manneville SE, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002; 420(6916): 629-635.
- 3 Deshpande SS, Qi B, Park YC, Irani K. Constitutive activation of rac1 results in mitochondrial oxidative stress and induces premature endothelial cell senescence. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: e1-e6.
- 4 Zhang X, Azhar G, Furr MC, Zhong Y, Wei JY. Model of functional cardiac aging: young adult mice with mild overex-

- pression of serum response factor. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 285(3): R552-R560.
- 5 Ding W, Gao S, Scott RE. Senescence represses the nuclear localization of the serum response factor and differentiation regulates its nuclear localization with lineage specificity. *J Cell Sci* 2001; 114(Pt 5): 1011-1018.
 - 6 Kim H, Lee DK, Choi JW, Kim JS, Park SC, Youn HD. Analysis of the effect of aging on the response to hypoxia by cDNA microarray. *Mech Ageing Dev* 2003; 124(8-9): 941-949.
 - 7 Magalhaes JP, Migeot V, Mainfroid V, de Longueville F, Remacle J, Toussaint O. No increase in senescence-associated beta-galactosidase activity in Werner syndrome fibroblasts after exposure to H₂O₂. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1019: 375-378.
 - 8 Noris E, Zannetti C, Demurtas A, Sinclair J, De Andrea M, Gariglio M, Landolfo S. Cell cycle arrest by human cytomegalovirus 86-kDa IE2 protein resembles premature senescence. *J Virol* 2002; 76(23): 12135-12148.
 - 9 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Centennial, 1989, 1860.
 - 10 Campisi J, Kim SH, Lim CS, Rubio M. Cellular senescence, cancer and aging: the telomere connection. *Exp Gerontol* 2001; 36(10): 1619-1637.
 - 11 Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Trivier E, Akhmedov A, Erusalimsky JD. Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. *J Cell Sci* 2004; 117(Pt 11): 2417-2426.
 - 12 Han YL (韩雅玲), Yu HB, Yan CH, Meng ZM, Zhang XL, Kang J, Li SH, Wang SW. Serum response factor participates in RhoA-induced endothelial cell F-actin rearrangements. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2005; 57(3): 295-302 (Chinese, English abstract).
 - 13 Hill CS, Wynne J, Treisman R. The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* 1995; 81(7): 1159-1170.
 - 14 Westwick JK, Lambert QT, Clark GJ, Symons M, Van Aelst L, Pestell RG, Der CJ. Rac regulation of transformation, gene expression, and actin organization by multiple, PAK-independent pathways. *Mol Cell Biol* 1997; 17(3): 1324-1335.
 - 15 Bertolotto C, Ricci JE, Luciano F, Mari B, Chambard JC, Auberger P. Cleavage of the serum response factor during death receptor-induced apoptosis results in an inhibition of the c-FOS promoter transcriptional activity. *J Biol Chem* 2000; 275(17): 12941-12947.
 - 16 Hong SH, Hong BI, Kim DC, Rho MS, Park JI, Rha SH, Jun HS, Jeong JS. Involvement of mitogen-activated protein kinases and p21/Waf1 in hydroxyurea-induced G₁ arrest and senescence of McA-RH7777 rat hepatoma cell line. *Exp Mol Med* 2004; 36(5): 493-498.