

## 抑制 Rac1 蛋白活化阻碍胚胎发育早期血管新生\*

张 剑<sup>1)</sup> 韩雅玲<sup>1)\*\*</sup> 康 建<sup>1)</sup> 张效林<sup>1)</sup> 齐岩梅<sup>1)</sup> 闫承慧<sup>1)</sup> 李少华<sup>2)</sup>

(<sup>1)</sup>沈阳军区总医院全军心血管病研究所心血管内科, 沈阳 110016;

<sup>2)</sup>Department of Pathology and Laboratory Medicine, Robert Wood Johnson Medical School, New Jersey 08854, USA)

**摘要** 小 G 蛋白 Rac1 在胚胎发育早期血管形成尤其是内皮发生过程中的作用尚不清楚. 采用胚胎干细胞(ESCs)为模型, 建立稳定表达持续表达型 Rac1(G12V)和显性失活型 Rac1(T17N)编码序列的小鼠 ESCs 并制备胚胎小体(EBs), 诱导分化后观察 Rac1(G12V)和 Rac1(T17N)对内皮细胞分化和迁移功能的影响. 采用相差显微镜观察 EBs 发育和分化特征, Pull down 分析 Rac1 表达变化, 免疫荧光染色和 Western blot 分析内皮分化标志物, Matrigel 凝胶实验观察血管索形成. 结果表明, 无论过表达或抑制 Rac1 的活化, 并不影响 EBs 发育, 均可形成典型的 EBs 胚层结构. 抑制 Rac1 活化对内皮细胞系的发育无影响, 但分化的内皮细胞不能连接成血管网. 活化的 Rac1 表达减少, 细胞迁移受到明显抑制. 抑制 Rac1 活化导致细胞骨架 F-actin 排布紊乱. 以上结果提示, Rac1 影响胚胎早期血管发育的因素是抑制细胞游走, 后者可能是通过 F-actin 机制所介导.

**关键词** 胚胎干细胞, Rac1, 分化, 血管发育

**学科分类号** Q954.4, R329.2, Q813

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2008.00685

近年的研究发现, 动脉粥样硬化斑块内常出现病理性新生血管, 它们可以促进粥样硬化病变的发展甚至诱发斑块内出血和斑块破裂及其并发症的发生. 因此, 抑制斑块内血管新生可能成为增强斑块稳定性、防治急性冠脉综合征的新靶点. 然而, 治疗性血管新生又利用了其有益的一面, 即通过某些干预, 在缺血心肌上调促进血管生长的细胞因子或受体, 促进新的小血管生长, 建立有效的侧支循环, 达到恢复血供的目的. 因此, 血管新生的调控及其机制的研究日益引起重视. 血管新生过程受多种细胞因子的调控, Rac1 作为 Rho GTP 酶的成员之一, 参与真核细胞许多重要生命活动的调节, 既往研究主要针对其参与肌动蛋白细胞骨架的调控及其在细胞外基质的作用<sup>[1]</sup>, 而有关 Rac1 在胚胎早期发育过程调控成血管细胞分化的作用还知之甚少. 本研究采用转染 pPGK-Rac1 持续表达和显性失活两种调控型质粒的胚胎干细胞(ESCs)株制备的胚胎小体(EBs)模型, 以期探讨血管发育早期 Rac1 在成血管细胞起源及其血管形成过程中的调控作用.

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞培养

小鼠 ESCs 细胞株 R1(ATCC, SCRC-1011™)培养于丝裂霉素(10 mg/L, 2 h)处理后的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF, 由本室取孕 13~14 天的昆明小鼠制备)或小鼠成纤维细胞株(STO, ATCC, CRL-1503™)上<sup>[2]</sup>. 细胞培养液成分包括: DMEM (Gibco 公司)、15% ESC 血清 (Gibco 公司)、0.1 mmol/L 非必需氨基酸(Sigma 公司)、0.1 mmol/L β- 巯基乙醇(Sigma 公司)、1 mmol/L 丙酮酸钠 (Sigma 公司)、100 mg/L 青霉素、100 mg/L 链霉素及 1 000 U/ml 白血病抑制因子(LIF, Chemicon 公司). ESCs 生长到亚融合状态时传代, 每天换液以维持其未分化状态.

### 1.2 载体来源及构建

持续表达型 Rac1(G12V)(结构域第 12 位甘氨酸

\* 国家自然科学基金资助项目(面上课题 30770793, 30800465).

\*\* 通讯联系人.

Tel: 024-23056123, Fax: 024-23911006, E-mail: hanyal@mail.sy.ln.cn

收稿日期: 2008-10-07, 接受日期: 2009-02-24

酸被缬氨酸替换)、显性失活型 Rac1(T17N)(结构域第 17 位苏氨酸被天冬酰胺替换)以及 pPGK-EGFP-C1 质粒由李少华教授馈赠。将 pcDNA3.1-Rac1(G12V)、pcDNA3.1-Rac1(T17N)与 pPGK-EGFP-C1 质粒分别行 *Kpn* I /*Apa* I 双酶切,将 pPGK-EGFP-C1 载体中的 PGK 启动子片段分别亚克隆至 pcDNA3.1- Rac1(G12V)和 pcDNA3.1- Rac1(T17N)载体中,构建 pPGK- Rac1(G12V)/EGFP 和 pPGK- Rac1(T17N)/EGFP 质粒,双酶切鉴定并测序。

### 1.3 ESCs 的转染

用 Lipofectamine 2000 转染试剂将线性化载体 pPGK-Rac1(G12V)/EGFP、pPGK-Rac1(T17N)/EGFP 和 pPGK-EGFP-C1 分别转染至 R1,将转染后的 R1 在含 G418 500 mg/L 的选择性培养液中筛选 10 天后,于荧光显微镜下用 Pasteur 枪头挑取 EGFP 阳性细胞克隆进一步扩增培养。

### 1.4 ESC 来源的胚胎小体(EBs)贴壁分化和三维成血管模型制备

EBs 培养方法参照文献[3, 4]。将胰酶消化的 R1 细胞接种于组织培养皿中,37℃,5% CO<sub>2</sub> 培养 3 h 剔出贴壁滋养层细胞后,取含有 ESCs 上清,接种到细菌培养皿中,使悬浮培养的 ESCs 分化为 EBs。悬浮培养 6 天的 EBs 接种于 0.1%明胶包被的细胞培养皿中,观察 EBs 贴壁后的细胞分化。三维成血管模型:悬浮培养 6 天的 EBs 与预冷的基质胶(Matrigel)混合后,以 50~100 μl 接种于 24 孔板内的圆形玻片上,37℃,20 min 待 Matrigel 胶凝固后,每孔加入 EBs 培养液 500 μl,观察三维血管网的形成。

### 1.5 免疫荧光染色

贴壁分化的 EBs 经 4%多聚甲醛固定后,在含 0.25% Triton X-100 的 PBS 中通透 20 min,5%山羊血清室温封闭 1 h,与抗 CD31 和抗 Flk-1 稀释液孵育 2 h。四甲基异硫氰酸罗丹明标记的二抗稀释液孵育 1 h,荧光显微镜下观察细胞染色。

### 1.6 RT-PCR 鉴定转染细胞中载体标志基因

收集阳性克隆 ESCs,Trizol 法提取总 RNA,分别取 RNA 1 μg 反转录合成 cDNA 第一链。对载体目的基因行 RT-PCR 分析。所扩增片段新霉素(neomycin)上游引物 5' ACAACAGACAATCGGCT-GCTC 3',下游引物 5' CCATGGGTCACGACGA-GATC 3',退火 59℃,产物 500 bp。GAPDH 上游引物 5' AGAAGGCTGGGGCTCATTTG 3',下游引物 5' AGGGGCCATCCACAGTCTTC 3',退火 55℃,

产物 258 bp。

### 1.7 Pull down 分析活化的 Rac1 蛋白活性

收集 ESCs 和悬浮培养 6 天的 EBs, PBS 洗 3 次,加入预冷的蛋白质提取液(50 mmol/L Tris, 10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100) 0.5 ml, 4℃, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, BCA 法测定总蛋白浓度。在细胞悬液中分别加入 PAK-PBD 珠 20 μl 与 GTP-Rac1 结合, 4℃ 旋转孵育 1 h, 2 500 r/min 离心 3 min, 沉淀用 500 μl 洗涤缓冲液(25 mmol/L Tris pH 7.5, 30 mmol/L EDTA, 600 mmol/L MgCl<sub>2</sub>)洗涤后, 2 000 r/min 离心 3 min, 活化的 GTP-Rac1 用抗 Rac1 抗体行 Western blot 分析。

### 1.8 Western blot 分析

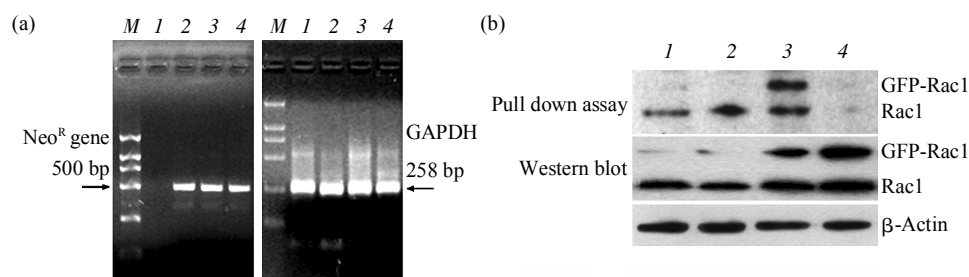
收集样品分别行 12% SDS-PAGE, 然后将样品转至 PVDF 膜上。PVDF 膜经 5 %脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加 1:2 000 稀释的一抗 4℃ 孵育过夜, 次日用 TBS-T 洗膜后加 1:2 000 HRP 标记二抗室温培育 2 h, 按 ECL 化学发光试剂盒说明行曝光、显影。

## 2 结 果

### 2.1 质粒载体鉴定与细胞转染

pPGK-Rac1(G12V)/EGFP 和 pPGK-Rac1(T17N)/EGFP 经 *Kpn* I /*Apa* I 双酶切鉴定载体片段和目的片段,大小分别为 4.3 kb 和 666 bp。测序结果显示 pPGK-Rac1(G12V)/EGFP 和 pPGK-Rac1(T17N)/EGFP 中插入的 PGK 启动子片段序列与原载体一致。

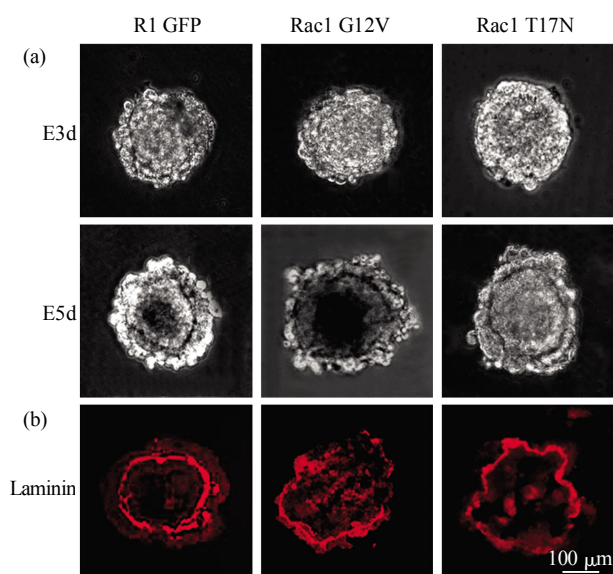
脂质体转染上述载体至 R1 细胞 24 h 后, 荧光显微镜下可以观察到转染阳性细胞中表达 GFP, 经 G418 筛选后, 获得稳定表达 GFP 的阳性转染克隆, 分别命名为 R1 GFP (对照)、Rac1(G12V)和 Rac1(T17N)。应用 RT-PCR 分别对不同转染组细胞实施耐药基因 Neomycin 检测, 其目的基因扩增片段大小为 500 bp。为进一步比较不同转染组细胞 Rac1 活化水平变化, 用 Pull down 分析活化 Rac1 蛋白水平, 结果显示, Rac1(G12V)细胞活化 Rac1 水平(含内源性和外源性)明显增加, 由于 GFP-Rac1 融合蛋白其分子质量较大其泳动速度较内源性 Rac1 慢, Rac1(T17N)则抑制了 Rac1 活化。Western blot 分析 Rac1 总含量作对照, 各组内源性 Rac1 含量水平无明显差异, 仅 Rac1(G12V)和 Rac1(T17N)表达 GFP-Rac1 融合蛋白(图 1)。



**Fig. 1 Stable expression of constitutively active (Rac1 G12V) and dominant negative Rac1 (Rac1 T17N) in mouse ES cells**  
ES cell clones stably expressing Rac1 G12V, Rac1 T17N or GFP alone (pPGK-EGFP-C1) were selected with 500 mg/L G418 and expanded after transfection with Lipofectamine 2000. (a) RT-PCR analysis demonstrated the expression of the antibiotic resistant neomycin gene. (b) Pull-down assay revealed that the activity of Rac1 G12V significantly increased Rac1 activity while the expression of Rac1 T17N suppressed Rac1 activation in ES cells. *I*: R1; 2: R1 GFP; 3: Rac1 G12V; 4: Rac1 T17N; *M*: Marker.

## 2.2 Rac 信号转导途径不影响 EBs 分化

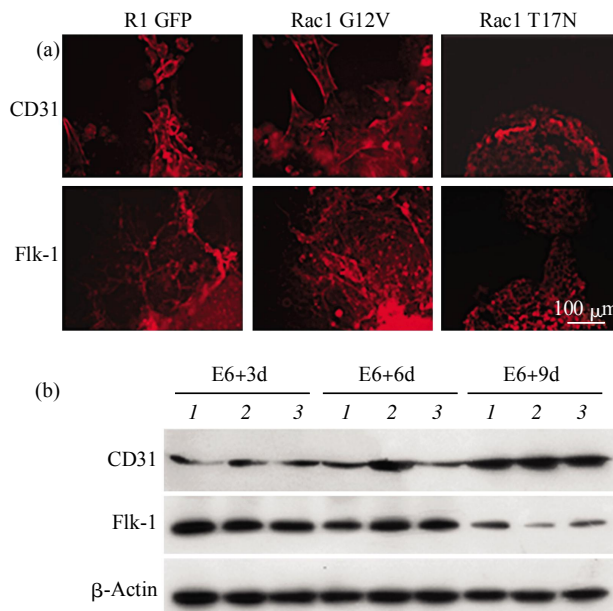
分别悬浮培养 R1 GFP、Rac1(G12V)和 Rac1(T17N)细胞向 EBs 分化, 上述 3 种细胞在去除 LIF 和滋养层细胞, 悬浮培养 3 天可见细胞体积明显增大, 悬浮 5~10 天后逐渐形成胚层结构, 镜下可见 EBs 中心凋亡及原始外胚层细胞极化(图 2a). 免疫荧光染色可见基底膜 Laminin-1 沉积(图 2b).



**Fig. 2 Expression of constitutively active or dominant negative Rac1 did not affect embryoid body differentiation**  
ES cell clusters were cultured in suspension to allow embryoid body formations. After 3~5 days, the EBs were fixed and cryosections prepared. (a) Phase contrast micrographs showed the formation of endoderm and primitive ectoderm that encompassed a central cavity in all 3 groups, suggesting that neither increase nor suppression of Rac1 activity significantly affected the differentiation of the primitive germ layers. (b) Five-day EBs were immunostained for the basement membrane component laminin showing no change in basement membrane assembly after expression of either constitutively active or dominant negative Rac1.

## 2.3 Rac 信号转导途径不影响 EBs 向内皮细胞定向分化

对贴壁培养的 EBs(E6+9d)行抗 -CD31 和抗 -Flk1 免疫荧光染色, 结果显示 R1 GFP、Rac1(G12V)和 Rac1(T17N) EBs 周围分别可见分化的血管内皮细胞表达 CD31 和 Flk-1. 随着培养时间延长, R1GFP 和 Rac1(G12V)组的血管内皮细胞逐渐向 EBs 外围迁移, 而 Rac1(T17N)组的血管内皮细胞游走明显受抑, 聚集于 EBs 周围(图 3a). 用 Western blot 分



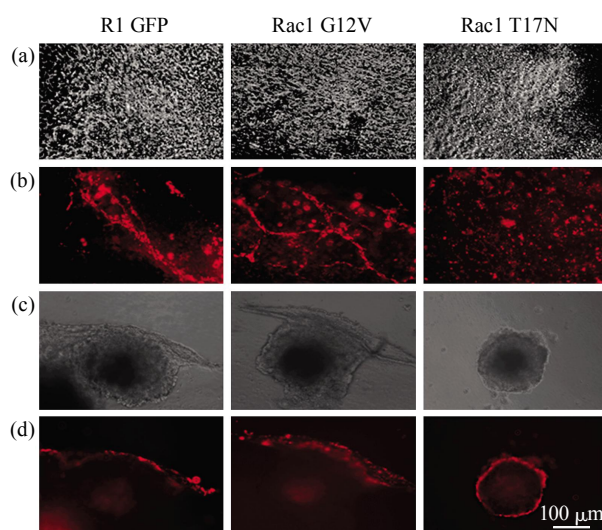
**Fig. 3 Overexpression of constitutively active or dominant negative Rac1 did not affect endothelial lineage commitment**  
EBs were cultured in suspension for 6 days and then allowed to attach and differentiate for additional 3~9 days. (a) Immunostaining for the endothelial cell lineage markers CD31 and Flk-1 showed that endothelial lineage commitment is unaffected by either increase or suppression of Rac1 activity. (b) Western blot analysis confirmed our immunofluorescence results except that CD31 expression level was slightly decreased in Rac1 T17N EBs(6 and 9 day) and increased in Rac1 G12V EBs(6 and 9 day), suggesting that Rac1 activity is largely dispensable for endothelial cell differentiation from ES cells. *I*: R1 GFP; 2: Rac1 G12V; 3: Rac1 T17N.

析不同时相及转染细胞来源 EBs 中 CD31 和 Flk-1 的表达, 显示 CD31 和 Flk-1 在转染 3 种表达载体的 EBs 中均有表达, 其中 Flk-1 在 3 天时表达上调, 而 CD31 在 3~9 天表达呈逐渐增多趋势(图 3b).

## 2.4 抑制 Rac1 蛋白活性阻碍内皮细胞血管网状结构形成

将 R1GFP、Rac1 (G12V) 和 Rac1 (T17N) 组的 EBs 继续贴壁培养至 14 天后, 行 DiI-Ac-LDL 吞噬实验, 镜下可见 R1GFP 和 Rac1(G12V)组的细胞摄入 DiI-Ac-LDL 后形成二维索状结构, 而 Rac1 (T17N)组的细胞摄入 DiI-Ac-LDL 后呈点式分布在 EBs 周围, 未见索状结构形成(图 4a, b).

进一步将悬浮培养 6 天的 EBs 接种于 Matrigel 凝胶内实施三维成血管分析, 细胞分化生长至 9 天后, 镜下可见 R1GFP 和 Rac1(G12V)EBs 边缘形成出芽生长的管状结构, 而 Rac1(T17N)EBs 中未见出芽生长的管状结构. 行 DiI-Ac-LDL 摄入实验证实出芽生长的管状结构细胞能吞噬 DiI-Ac-LDL, 表明管状结构含内皮细胞(图 4c, d). 上述结果提示: 显性失活型 Rac1 虽然不影响 EBs 向血管内皮细胞分化, 但抑制内皮血管索的形成.

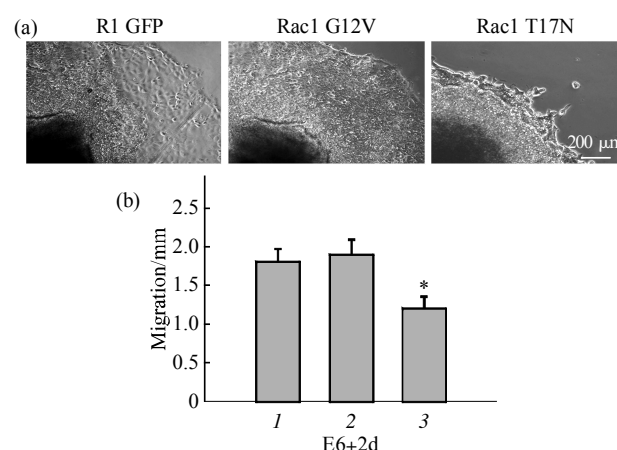


**Fig. 4 Expression of dominant negative Rac1 completely blocked the assembly of endothelial vascular networks during EB vasculogenesis**

Six-day EBs were further differentiated in attached cultures(a, b) or in Matrigel(c, d) for 14 days or for 5 days. The assembly of endothelial network was identified by the uptake of DiI-Ac-LDL into endothelial cells. Expression of constitutively active Rac1 did not significantly enhance the formation of endothelial networks. However, expression level of dominant negative Rac1 completely blocked the assembly, indicating that Rac1 activity is essential for EB vasculogenesis, possibly by regulating endothelial cell migration.

## 2.5 显性失活型 Rac 通过黏着斑激酶(FAK)激活和应力纤维形成抑制 EBs 细胞迁移

鉴于 Rac1 可以影响细胞的生长和运动能力, 为进一步探讨细胞移行与血管网形成间的关系, 采用相差显微镜观察 R1 GFP、Rac1 (G12V) 和 Rac1 (T17N) 组的 EBs 贴壁分化细胞迁移变化, 结果显示, Rac1(G12V)和 R1 GFP 细胞逐渐向 EBs 外迁移能力基本相似, 而转染 Rac1(T17N)细胞则明显受到抑制(图 5).



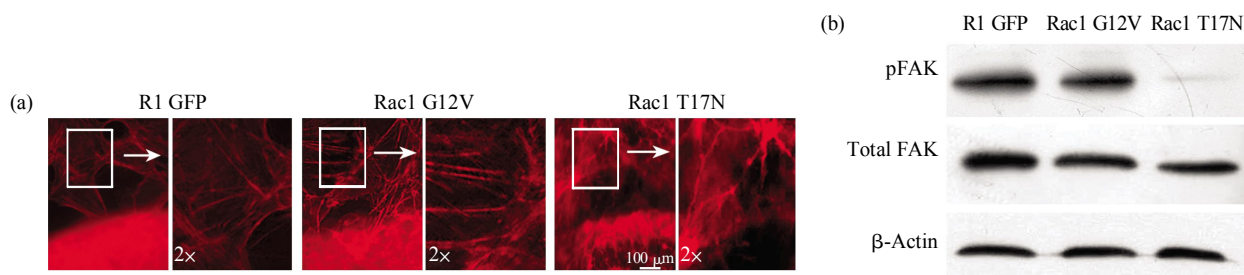
**Fig. 5 Cell migration was severely compromised in EBs expressing dominant negative Rac1**

After 6 days of culturing in suspension, EBs were allowed to attach on plastic to examine the migration of endoderm/ectoderm cells. (a) Phase contrast micrographs showed that expression level of constitutively active Rac1 had not apparent effect on cell migration. In contrast, expression level of dominant negative Rac1 significantly inhibited cell migration. In the differentiation system EBs of R1 GFP and Rac1 G12V showed active differentiation and migration. However, EBs of Rac1 T17N had hindered differentiation and migration. (b) The migration distance of the endoderm/ectoderm cells of Rac1 T17N EBs was significantly shorter than that of R1 GFP or Rac1 G12V EBs (\*Rac1 T17N vs R1 GFP or Rac1 G12V,  $P < 0.05$ ). 1: R1 GFP; 2: Rac1 G12V; 3: Rac1 T17N.

由于细胞迁移过程中片状伪足通过黏着斑与细胞外基质发生黏着, 而活化的黏着斑激酶(FAK)作为分子支架招募胞浆中的多种蛋白质形成黏着斑复合体, 为了验证 FAK 可能参与细胞的移行, 将上述各转染细胞来源的 EBs 贴壁培养至 14 天后, 对分化的细胞行鬼笔碱染色以观察细胞骨架 F-actin 排布, 结果显示, Rac1(G12V)细胞骨架 F-actin 呈聚合状态, 形成较多应力纤维, 而 Rac1(T17N)细胞中 F-actin 呈解聚状态, 无应力纤维形成(图 6a).

进一步用 Western blot 分析细胞总 FAK 和磷酸化 FAK 的水平, 提示 3 种转染细胞总 FAK 的水平无明显差异, 而 Rac1(T17N)磷酸化 FAK 的水平较 R1 GFP 和 Rac1(G12V)明显下调(图 6b).





**Fig. 6 Expression of dominant negative Rac1 disrupted actin stress fibers and inhibited the activation of focal adhesion kinase**

Six-day EBs were further differentiated in attached cultures for 6 days. (a) Actin stress fibers were examined by staining with rhodamine-labeled phalloidin. Actin stress fibers were observed in cells migrated out from the attached R1GFP EBs and their assembly was slightly increased in Rac1 G12V EBs. In contrast, actin stress fibers were largely absent in Rac1 T17N-expressing cells. F-actin was detected in the cell process and in the cytoplasm as aggregates, suggesting that the assembly of actin stress fibers is inhibited. (b) FAK activation was evaluated with anti-phospho-FAK. Expression of dominant negative Rac1 inhibited FAK activation.

### 3 讨 论

Rac1 是真核细胞内重要的一类信号传递分子, 在细胞信号传递过程中发挥着分子开关作用. 当 Rac1 与 GTP 结合时, 它具有信号转导活性, 可与下游的效应分子结合, 当水解 GTP 及处于与 GDP 结合状态时, 即丧失信号转导活性. Rho GTP 酶家族的成员 RhoA、Rac1 和 Cdc42 均可通过调节细胞肌动蛋白骨架的重新分布和构建, 影响细胞的游走功能. 显性失活型 Rac1(T17N)能阻断与 GTP 结合的亲和性, Rac1 始终处于无核苷酸结合的游离状态或与 GDP 结合呈无活性状态. 而持续表达型 Rac1(G12V)阻断了内源性 GTP 酶激活蛋白诱导活性, 使 Rac1 总是处于与 GTP 结合的活化状态<sup>[5]</sup>. 本研究结果表明, 在 ESCs 中表达 Rac1(T17N), 能明显抑制细胞迁移, 在表达 Rac1(G12V)细胞观察到细胞迁移的作用不受影响, 提示 Rac1 是介导细胞迁移的信号转导分子.

巨细胞病毒(CMV)启动子曾被广泛应用于外源基因转染的基因调控, 但新近报道, CMV 启动子用于 ESCs 外源基因转染时, 时常发生无表达现象<sup>[6]</sup>. 为了改善载体表达效率, 采用 PGK 启动子替换 CMV 启动子构建 pPGK-EGFP-C1 质粒, 使后者在 Rac1 两种调控型质粒中均能够持续表达. R1 GFP、Rac1 (G12V) 和 Rac1 (T17N) 均能表达 GFP, 表明载体构建正确, GFP 在细胞中折叠良好. Pull down 分析提示 Rac1(T17N)能下调 Rac1 表达, 进一步证实构建的载体在转染的细胞中具有显性失活功能.

已知细胞移行时片状伪足通过黏着斑与细胞外

基质发生黏着, Rac1 的激活可以导致细胞产生片状伪足和膜褶皱样运动<sup>[7~9]</sup>. 抑制 Rac1 活化干扰 EBs 分化细胞中 F-actin 应力纤维的正常排布, 呈解聚状态, 并伴有无黏着斑和片状伪足形成.

有关从干细胞分化到内皮细胞, 以至形成初步原始血管网的血管新生工作尚未见报道. 本研究通过持续表达和显性失活 Rac1 转染 ESCs 分化模型模拟胚胎发育早期血管新生实验, 首次发现: a. 抑制 Rac1 活化并不影响 EBs 发育, 仍然可形成内胚层和原始外胚层, 而且内胚层可以沉积细胞外基质. 既往认为在离体培养条件下, 培养的单细胞小 G 蛋白可通过细胞骨架影响外基质组装, 不同的外基质成分可以影响细胞分化, 但从本模型上证实, 无论过表达或抑制 Rac1 的活化, 从组织层面上未见 Rac1 对细胞分化产生明显影响. b. 抑制 Rac1 活化对内皮细胞系的发育无影响. 从多能干细胞发育成体细胞, 主要是影响细胞游走, 包括内皮细胞, 其表现是细胞不能移行出 EBs, 即使能分化形成内皮细胞, 而且是多点发生的, 但仍然不能连接成血管网. 根据 EBs 发育形成血管网过程中, 影响细胞游走的因素包括两个方面, 一是细胞自身, 另一因素是外基质, 细胞的趋化性与趋触性迁移依赖于细胞外基质. 基于悬浮培养 EBs 能够形成内、外胚层, 表达层粘连蛋白. 因此, 抑制 Rac1 活化不是影响外基质, 而是抑制了细胞游走. c. 在贴壁培养条件下, 抑制了 Rac1 的活化导致细胞骨架排布紊乱而引起 F-actin 解聚, 完整的细胞骨架是细胞迁移的物质基础, 小 G 蛋白是调节细胞骨架动力学的重要分子开关. 因此, 细胞游走受抑可能是 Rac1 通过 F-actin 机制介导.

尽管以上结果表明, Rac1 在胚胎发育早期可调控血管内皮游走进而影响血管发育, 但有关血管新生与细胞游走和外基质间的相互作用关系还需进一步深入探讨。

### 参 考 文 献

- 1 Bishop A L, Hall A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J*, 2000, **348**(2): 241~255
- 2 韩雅玲, 徐 凯, 康 建, 等. 胚胎干细胞 SM22 $\alpha$ -EGFP 表达克隆的建立及平滑肌细胞体外发育的动态观察. *生物化学与生物物理进展*, 2006, **33**(4): 343~349  
Han Y L, Xu K, Kang J, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2006, **33**(4): 343~349
- 3 Ng Y S, Ramsauer M, Loureiro R M, *et al.* Identification of genes involved in VEGF-mediated vascular morphogenesis using embryonic stem cell-derived cystic embryoid bodies. *Lab Invest*, 2004, **84**(9): 1209~1217
- 4 Li S, Harrison D, Carbonetto S, *et al.* Matrix assembly, regulation, and survival functions of laminin and its receptors in embryonic stem cell differentiation. *J Cell Biol*, 2002, **157**(7): 1279~1290
- 5 Price L S, Lenz J, Schwartz M A, *et al.* Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading. *Mol Biol Cell*, 1998, **9**(7): 1863~1871
- 6 Chung S, Andersson T, Sonntag Kai-C, *et al.* Analysis of different promoter systems for efficient transgene expression in mouse embryonic stem cell lines. *Stem Cells*, 2002, **20**(2): 139~145
- 7 Yee H F Jr, Melton A C, Tran B N. RhoA/rho-associated kinase mediates fibroblast contractile force generation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **280**(5): 1340~1345
- 8 Wilde C, Genth H, Aktories K, *et al.* Recognition of RhoA by clostridium botulinum C3 exoenzyme. *J Biol Chem*, 2000, **275**(22): 16478~16483
- 9 Ridley A J, Hall A. The small GTP-binding protein Rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, 1992, **70**(3): 389~399

## Inhibition of Rac1 Activity Hinders Vasculogenesis During Early Embryonic Development\*

ZHANG Jian<sup>1)</sup>, HAN Ya-Ling<sup>1)\*\*</sup>, KANG Jian<sup>1)</sup>, ZHANG Xiao-Lin<sup>1)</sup>,  
QI Yan-Mei<sup>1)</sup>, YAN Cheng-Hui<sup>1)</sup>, LI Shao-Hua<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Cardiology, Shenyang General Hospital, Cardiovascular Research Institute of PLA, Shenyang 110016, China;

<sup>2)</sup>Department of Pathology and Laboratory Medicine, Rebert Wood Johnson Medical School, Piscataway, NJ 08854, USA)

**Abstract** Whether small G protein Rac1 plays a role in regulating blood vessel formation especially endothelial cells(ECs) differentiation during early embryonic vascular development remains unclear. Murine embryonic stem cells (ESCs) lines stably expressing the constitutively active Rac1 mutant (Rac1G12V) or dominant negative Rac1 mutant (Rac1T17N) and the resulting embryoid bodies (EBs) were established as models, to observe the effects of Rac1 on the differentiation and migration of ECs. Using contrast phase microscope to observe the development and differentiation features of EBs; pull-down assay to analyze the expression of Rac1 activity; immunofluorescence staining and Western blot to inspect the differentiation markers of ECs; matrigel model to observe the assembly of endothelial network. It showed that neither increase nor suppression of Rac1 activity significantly affect the differentiation of EBs to form the typical primitive germ layers. Expression of dominant negative Rac1 did not affect ECs differentiation, but it significantly inhibited cell migration, furthermore completely blocked the assembly of vessel network. Actin stress fibers were largely absent in Rac1T17N-expressing cells. Expression of Rac1T17N inhibited FAK activity while Rac1G12V did not affect it compared with control group. These results indicated that the effect factor of Rac1 on the vasculogenesis of EBs was to inhibit cell migration which probably mediated by F-actin mechanism.

**Key words** embryonic stem cell, Rac1, differentiation, blood vessel development

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2008.00685

\*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30770793, 30800465).

\*\*Corresponding author. Tel: 86-24-23056123, Fax: 86-24-23911006, E-mail: hanyal@mail.sy.ln.cn

Received: October 7, 2008 Accepted: February 24, 2009