

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2018)26-02-0152-05

SET8-shRNA 抑制血管平滑肌细胞增殖和迁移

张东雪, 张胜雷, 张璐, 李同妙

(河北医科大学第四医院肾内科, 河北省石家庄市 050011)

[关键词] 赖氨酸甲基转移酶; 血管平滑肌细胞; 细胞增殖; 细胞迁移

[摘要] 目的 探讨赖氨酸甲基转移酶 SET8 对大鼠血管平滑肌细胞(VSMC)增殖和迁移的影响。方法 体外分离培养大鼠 VSMC, 将 VSMC 随机分为正常对照组、空质粒组、SET8-shRNA 组。应用 RT-PCR、Western blot 检测 SET8 和钙黏附蛋白 E-cadherin mRNA 和蛋白的表达, 应用 MTT 法检测细胞增殖能力, 应用 Transwell 实验检测细胞迁移能力。结果 SET8-shRNA 组与正常对照组和空质粒组比较 SET8 表达水平降低($P<0.05$)。MTT 结果显示, 第 12 h、24 h、36 h、48 h, SET8-shRNA 组细胞增殖活性较正常对照组和空质粒组明显减弱($P<0.05$)。Transwell 实验显示, SET8-shRNA 组细胞迁移能力减弱($P<0.05$)。SET8-shRNA 组 E-cadherin mRNA 和蛋白的表达较正常对照组和空质粒组明显增强($P<0.05$)。结论 干扰 SET8 基因表达能够促进 E-cadherin 的表达, 抑制大鼠 VSMC 增殖、迁移能力。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

SET8-shRNA inhibited proliferation and migration of vascular smooth muscle cells

ZHANG Dong-Xue, ZHANG Sheng-Lei, ZHANG Lu, LI Tong-Miao

(Department of Nephrology, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[KEY WORDS] Lysine methyltransferase; Vascular smooth muscle cell; Cell proliferation; Cell migration

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of lysine methyltransferase SET8 on proliferation and migration of rat vascular smooth muscle cells (VSMC). **Methods** Vascular smooth muscle cells were obtained from rat thoracic aorta, and then randomly divided into control group, empty plasmid group and SET8-shRNA group. The expression of SET8, E-cadherin was detected by RT-PCR and Western blot, cell proliferation was measured by MTT assay, cell migration was measured by transwell assay. **Results** The expression of SET8 in SET8-shRNA group was lower than that in normal control group and empty plasmid group ($P<0.05$). MTT results showed that the proliferation activity of 12 h, 24 h, 36 h and 48 h in SET8-shRNA group was significantly lower than that in normal control group and empty plasmid group ($P<0.05$). The Transwell assay showed that the cell migration ability in SET8-shRNA group was decreased ($P<0.05$). The expression of E-cadherin mRNA and protein in SET8-shRNA group was significantly higher than that in normal control group and empty plasmid group ($P<0.05$). **Conclusion** Interference with SET8 gene expression could promote the expression of E-cadherin and inhibit the proliferation and migration of rat vascular smooth muscle cells.

动脉粥样硬化是导致心血管疾病发生和患者死亡的关键因素^[1]。作为血管中膜主要组成成分的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)具有低增殖、低迁移的特征,起收缩作用,并维持血管的正常形态^[2];但受到不同外界因素(高磷、酸碱波动)刺激时,VSMC可去分化为高增殖、高迁移特性的分泌型细胞,导致管腔重塑和狭窄,发生动脉粥样硬化导致心血管疾病的发生^[3-5],因此抑制 VSMC 增殖迁移是降低心血管疾病发生的方法之一。SET8 是现今发现的唯一能够特异性单甲基

化组蛋白 H4 赖氨酸 20 位(H4K20)的赖氨酸甲基转移酶,可甲基化 TWIST、Wnt 等非组蛋白,参与调控细胞增殖、细胞迁移与分化等^[6]。鉴于此,本研究拟通过大鼠胸主动脉 VSMC 来观察 SET8 对其增殖迁移能力的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选取 4 周龄健康雄性 SD 大鼠 10 只,体重 80~

[收稿日期] 2017-07-17

[修回日期] 2017-09-21

[作者简介] 张东雪,研究方向为慢性肾脏疾病的血管钙化及其机制,E-mail 为 zhangdx009@163.com。

120 g, 饲养于河北医科大学动物实验中心, 合格证号: 1305090。

1.2 实验试剂与仪器

胎牛血清和 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司), 脂质体 LipofectamineTM2000 (美国 Invitrogen 公司), SET8-shRNA 质粒(广州复能基因有限公司), Transwell 小室(美国 Corning 公司), BD Matrigel 基质胶(上海浩洋生物科技有限公司), MTT 粉(美国 Sigma 公司), RT-PCR 试剂盒、增强型 ECL 试剂盒(美国 Thermo 公司), PCR 引物(上海捷瑞生物工程有限公司), GAPDH 抗体(美国 Bioworld 公司), SET8 抗体和 E-cadherin 抗体(英国 Abcam 公司), 二抗(美国 KPL 公司)。倒置相差显微镜(日本 OLYMPUS 公司), 细胞培养箱(美国 Sheldon 公司), 蛋白电泳仪(美国 Bio-Rad 公司), 凝胶成像系统(美国 Proteinsimple 公司), RT-PCR 仪(美国 ABI 公司), 酶标仪(美国 Biotek 公司)。

1.3 实验模型的制备及分组

取原代大鼠胸主动脉, 采用组织块贴壁法培养原代 VSMC, 传代培养至第 3 代, 将细胞接种于适宜孔板中, 汇合率达 80% 时给予干预。实验分组: ①正常对照组: 使用含 10% 牛血清 DMEM 完全培养基换液培养; ②空质粒组: NS-shRNA 浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、LipofectamineTM2000 为 4 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 转染 VSMC; ③ SET8-shRNA 组: SET8-shRNA 浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、LipofectamineTM2000 为 4 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 转染 VSMC。

1.4 MTT 法测定细胞增殖

取第 3 代 VSMC 以适当浓度接种于 96 孔板, 生长至汇合率达 60%~70% 时分别转染 2 $\mu\text{g}/\text{L}$ SET8-shRNA 和 2 $\mu\text{g}/\text{L}$ NS-shRNA, 每组设 3 个复孔。检测前 4 h 每孔加入 5 g/L MTT 20 μL , 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、CO₂ 培养箱中继续培养 4 h, 弃培养液, 每孔加入 150 μL 二甲基亚砷, 室温充分震荡 10 min。酶标仪 490 nm 波长处检测吸光度值, 记录结果, 实验重复 3 次。

1.5 Transwell 实验检测细胞迁移能力

VSMC 转染 24 h 后, 基质胶与冷的无牛血清的 DMEM 培养基以 1:8 比例混合, 每孔加入 50 μL 混合液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育 5 h, 基质胶凝固, 吸去多余培养基。之后用胰酶消化细胞并收集细胞, 用双无 DMEM 培养基重悬细胞, 细胞密度调整为 1×10^9 个/L, 取 100 μL 细胞悬液加入上室, 下室加入 500 μL 完全培养基。置于 CO₂ 培养箱中继续培养 24 h, PBS 洗 2 遍, 甲醇固定 30 min, 加入 0.1% 结晶紫染色 20 min, PBS 洗 2 遍, 用棉签小心擦去多余细胞, 显微镜下照相并计数迁移至下室的细胞数, 实

验重复 3 次。

1.6 RT-PCR 和 Western blot 分别检测 SET8、E-cadherin mRNA 和蛋白的表达

RT-PCR 引物序列: SET8 上游为 5'-AAA GAC GCC AGG AAA GGT CC-3', 下游为 5'-TTC CAC CAC AAA GTC ACC CC-3', 扩增片段 384 bp; E-cadherin 上游为 5'-TGC TCT TGC TGT TTC TTC GG-3', 下游为 5'-TGC CCC ATT CGT TCA AGT AG-3', 扩增片段 423 bp; GAPDH 上游为 5'-CAA GGT CAT CCA TGA CAA CTT TG-3', 下游为 5'-GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA G-3', 扩增片段 496 bp。反应体系 20 μL , 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 目的基因 SET8 于 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, E-cadherin 于 52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 均为 38 个循环, 内参基因 GAPDH 于 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s, 28 个循环。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后进行图像采集与分析。Western blot 检测: 提取的细胞蛋白质采用凝胶电泳进行分离、转膜、5% 牛奶封闭, 加入一抗(GAPDH 为 1:10000, SET8 为 1:500, E-cadherin 为 1:5000) 稀释液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。洗膜, 放入二抗稀释液(1:10000), 室温下孵育 1 h, ECL 显色并进行图像采集和分析, 实验重复 3 次。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 Student-Newman-Keuls 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SET8-shRNA 对 VSMC SET8 表达的影响

RT-PCR 和 Western blot 结果显示, 与正常对照组和空质粒组比较, SET8-shRNA 组 VSMC SET8 mRNA 和蛋白的表达水平明显降低($P < 0.05$); 正常对照组 SET8 mRNA 和蛋白的表达与空质粒组比较无统计学差异($P > 0.05$; 图 1)。

2.2 SET8-shRNA 对 VSMC 增殖能力的影响

MTT 法检测结果显示, VSMC 转染质粒后 0 h、12 h、24 h、36 h、48 h, 正常对照组 OD 值分别为 0.36 \pm 0.11、0.84 \pm 0.04、0.99 \pm 0.12、1.33 \pm 0.08、1.58 \pm 0.07, 空质粒组 OD 值分别为 0.35 \pm 0.03、0.72 \pm 0.16、0.85 \pm 0.11、1.21 \pm 0.13、1.49 \pm 0.02, SET8-shRNA 组 OD 值分别为 0.30 \pm 0.02、0.33 \pm 0.04、0.47 \pm 0.06、0.92 \pm 0.04、1.09 \pm 0.08, SET8-shRNA 组 VSMC 增殖能力较正常对照组和空质粒组显著降低($P < 0.05$; 图 2)。

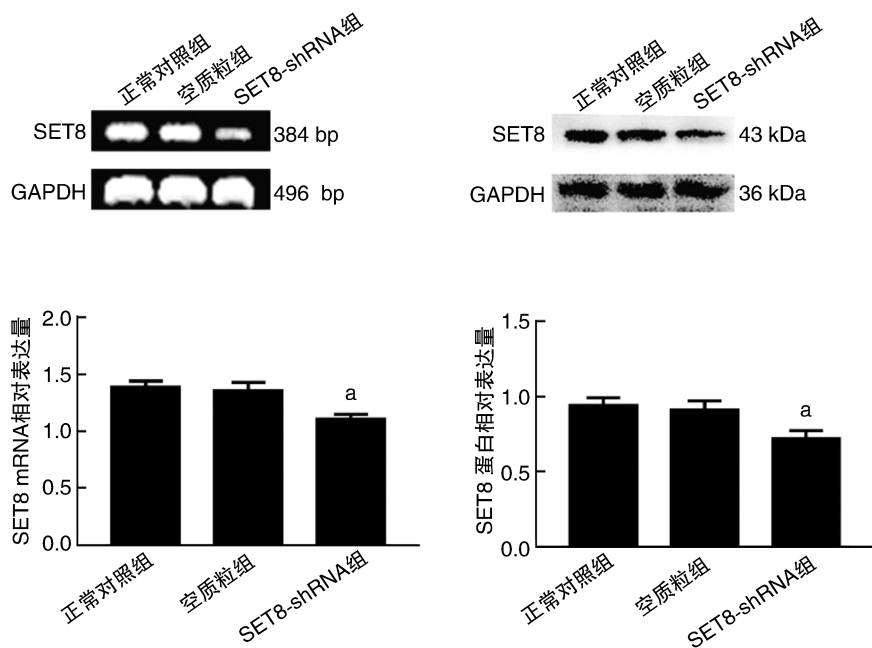


图 1. SET8-shRNA 对 VSMC SET8 表达的影响 (n=3) a 为 P<0.05, 与正常对照组和空质粒组比较。

Figure 1. The effect of SET8-shRNA on the expression of VSMC SET8 (n=3)

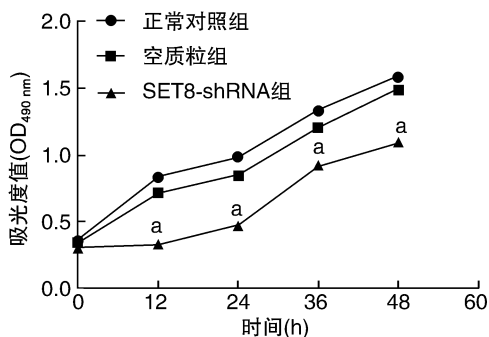


图 2. MTT 法检测 VSMC 增殖能力 (n=3) a 为 P<0.05, 与正常对照组和空质粒组比较。

Figure 2. MTT method detected the proliferation of VSMC

2.3 SET8-shRNA 对 VSMC 迁移能力的影响

Transwell 实验结果显示, 正常对照组、空质粒组、SET8-shRNA 组 VSMC 迁移能力分别为 170.00 ± 29.31 、 164.00 ± 31.18 、 52.33 ± 15.63 ($F = 19.05$, $P = 0.003$), SET8-shRNA 组 VSMC 迁移能力显著降低 ($P < 0.05$; 图 3)。

2.4 SET8-shRNA 对 VSMC E-cadherin 表达的影响

与正常对照组和空质粒组比较, SET8-shRNA 组 E-cadherin mRNA 和蛋白的相对表达量明显升高 ($P < 0.05$; 图 4)。

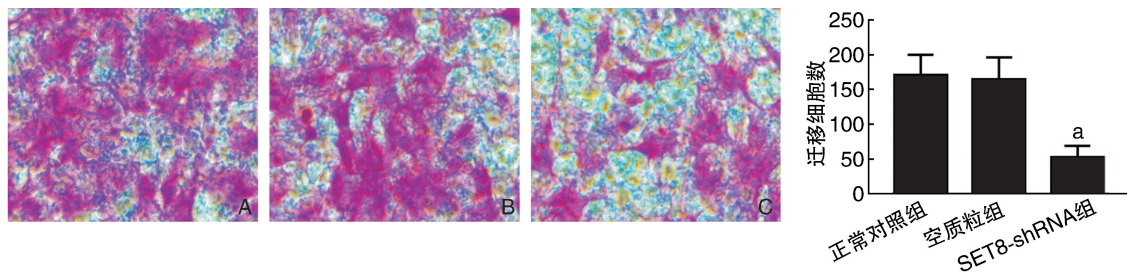


图 3. Transwell 实验检测 VSMC 迁移能力 ($\times 400$, n=3) A 为正常对照组, B 为空质粒组, C 为 SET8-shRNA 组。a 为 P<0.05, 与正常对照组和空质粒组比较。

Figure 3. Transwell assay measured the migration of VSMC ($\times 400$, n=3)

3 讨论

动脉粥样硬化与心血管事件的发生密切相

关^[7-8]。而动脉血管出现狭窄主要与中膜 VSMC 增殖和迁移有关, 最近 Schwartz 等^[9]研究发现动脉粥样硬化斑块中存在 VSMC 形状的细胞, 且该细胞出

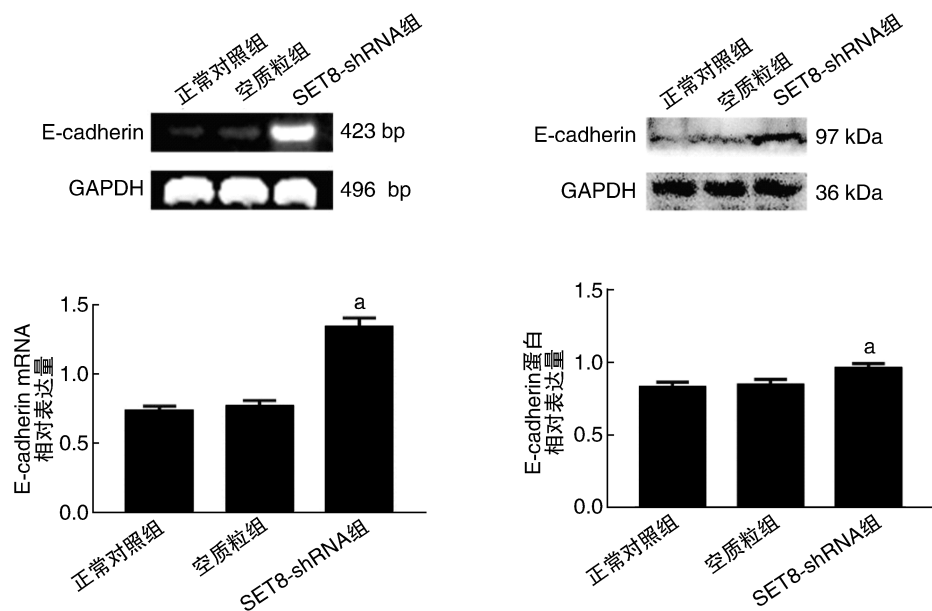


图 4. SET8-shRNA 对 VSMC E-cadherin 表达的影响 ($n=3$)

a 为 $P<0.05$, 与正常对照组和空质粒组比较。

Figure 4. The effect of SET8-shRNA on the expression of VSMC E-cadherin ($n=3$)

现于动脉中膜向内膜下间隙迁移的过程中,间接证明了斑块中的 VSMC 来源于动脉中膜层的观点。因此,抑制 VSMC 过度增殖与迁移是减少动脉粥样硬化斑块形成和动脉狭窄的关键环节。

赖氨酸甲基转移酶 SET8 能够特异性单甲基化组蛋白 H4K20,其编码基因位于染色体 12q24.31,由于组蛋白 H4 位于 DNA 与核小体的交界处,H4K20me1 修饰可影响染色体高级结构,促进细胞间期中染色体的固缩,还能招募特异的调节蛋白。在细胞内 SET8 具有调控组蛋白修饰、调节染色质结构和基因转录、调控细胞周期的作用,因此 SET8 参与细胞增殖、细胞转移分化等多种细胞生理功能^[10]。有研究显示敲除 SET8 可有效抑制肿瘤细胞的增殖与迁移^[11-12]。本研究中,MTT 法和 Transwell 实验结果显示,干扰 SET8 基因表达后,VSMC 增殖、迁移能力较正常对照组和空质粒组明显降低。提示干扰 SET8 能够抑制 VSMC 的增殖与迁移。

钙粘蛋白家族重要成员之一 E-cadherin,为上皮蛋白标志物,是维持上皮细胞结构极性和完整性的糖蛋白,对于维持细胞与细胞间的黏附能力非常重要,其作用主要参与细胞间黏附,与细胞的侵袭、转移和分化密切相关^[13]。在肿瘤细胞中,E-cadherin 表达缺失或减弱,肿瘤细胞的侵袭迁移能力则会增强,E-cadherin 是肿瘤进展和预后的重要标志物之一^[14]。Ping 等^[15]研究发现在 VSMC 中下调 E-cadherin 表达,VSMC 的增殖与迁移能力增强。研究发现 SET8 可以通过催化 H4K20 单甲基化来调

控 TWIST 的靶基因 E-cadherin 的转录,介导 E-cadherin 表达,进而参与调控细胞的侵袭、转移^[16-18]。本研究结果发现,与正常对照组和空质粒组比较,SET8-shRNA 组 E-cadherin 表达水平明显上调,表明干扰 SET8 促进 E-cadherin 表达,使细胞间黏附作用增强,从而抑制了 VSMC 增殖与迁移。

综上所述,本研究发现抑制 SET8 表达后,E-cadherin 表达水平明显上调,促使大鼠 VSMC 间黏附作用增强,使细胞的增殖与迁移能力受到抑制。本研究仅在细胞实验中观察到干扰 SET8 能促进 E-cadherin 表达,从而抑制 VSMC 的增殖与迁移,具体 SET8 是通过何种机制来影响 E-cadherin 表达进而影响 VSMC 的增殖与迁移能力仍需进一步验证,为预防和治疗动脉粥样硬化提供依据。

[参考文献]

- [1] Lanzer P, Boehm M, Sorribas V, et al. Medial vascular calcification revisited: review and perspectives [J]. Eur Heart J, 2014, 35(23): 1 515-525.
- [2] Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis [J]. Acta Physiol, 2015, 214: 33-50.
- [3] Liu R, Leslie KL, Martin KA. Epigenetic regulation of smooth muscle cell plasticity [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1849: 448-453.
- [4] Cui L, Bai Y, Zhang J, et al. Effects of extracellular acid stimulation on rat vascular smooth muscle cell in Gas6/Axl or PI3K/Akt signaling pathway [J]. Clin Exp Hypertens,

- 2016, 38(5): 451-456.
- [5] 张胜雷, 徐金升, 郭利萍, 等. 酸性环境对慢性肾功能衰竭大鼠血管中膜钙化的影响及其机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2016, 24(12): 1 201-206.
- [6] 徐金升, 王 静, 张俊霞, 等. 赖氨酸甲基转移酶 SET8 基因沉默通过 Wnt 信号通路抑制肾透明细胞癌 786-O 细胞增殖转移[J]. 中华实验外科杂志, 2016, 33(6): 1 684-685.
- [7] Bai Y, Zhang J, Xu J, et al. Alteration of type I collagen in the radial artery of patients with end-stage renal disease [J]. *Am J Med Sci*, 2015, 349(4): 292-297.
- [8] 郑 玉, 张颖贤, 李晓辉, 等. Siglec 家族与动脉粥样硬化相关性免疫细胞关系的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2017, 25(7): 732-736.
- [9] Schwartz SM, Virmani R, Rosenfeld ME. The good smooth muscle cells in atherosclerosis[J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2000, 2: 422-429.
- [10] Linscott J, Kapilashrami K, Wang Z, et al. Kinetic isotope effects reveal early transition state of protein lysine methyltransferase SET8[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(52): E8 369-378.
- [11] Hou L, Li Q, Yu Y, et al. SET8 induces epithelial-mesenchymal transition and enhances prostate cancer cell metastasis by cooperating with ZEB1 [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(2): 1 681-688.
- [12] Liu B, Zhang X, Song F, et al. MiR-502/SET8 regulatory circuit in pathobiology of breast cancer[J]. *Cancer Lett*, 2016, 376(2): 259-267.
- [13] Higashi K, Ueda Y, Shimasaki M, et al. High FDG uptake on PET is associated with negative cell-to-cell adhesion molecule E-cadherin expression in lung adenocarcinoma[J]. *Ann Nucl Med*, 2017, doi:10.1007/s12149-017-1187-y.
- [14] Choi JE, Bae JS, Kang MJ, et al. Expression of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell markers in colorectal adenocarcinoma: Clinicopathological significance [J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(3): 1 695-705.
- [15] Ping S, Yanhong Z, Kathleen AC, et al. AMPK α 2 deficiency promotes vascular smooth muscle cell migration via Skp2 upregulation and E-cadherin downregulation[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(12): 2 800-809.
- [16] Yang F, Sun L, Li Q, et al. SET8 promotes epithelial-mesenchymal transition and confers TWIST dual transcriptional activities[J]. *EMBO J*, 2012, 31(1): 110-123.
- [17] 刘 奔, 张熙凝, 陈可欣. 组蛋白赖氨酸甲基转移酶 SET8 对蛋白的甲基化修饰及与肿瘤相关性的研究进展[J]. 中国肿瘤临床, 2015, 42(15): 765-769.
- [18] Abdelrahman AE, Arafa SA, Ahmed RA. Prognostic value of Twist-1, E-cadherin and EZH2 in prostate cancer: An immunohistochemical study[J]. *Turk Patoloji Derg*, 2017, 1(1): 198-210.
- (此文编辑 文玉珊)