

核仁素在血管紧张素 II 诱导的血管平滑肌细胞表型转化中的作用*

方立[△], 黄钦, 张银妆, 黄芳, 苑聪, 刘伟伟
(长沙市第一医院心血管内科二病区, 湖南长沙 410005)

[摘要] **目的:** 探讨核仁素在血管紧张素 II (Ang II) 诱导的血管平滑肌细胞 (VSMCs) 表型转化中的作用。**方法:** 以 Ang II 诱导大鼠 VSMCs 表型转化为模型, 观察 Ang II 对 VSMCs 表型转化标志物 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、钙调蛋白 (calponin)、平滑肌蛋白 22 α (SM22 α) 和骨桥蛋白 (OPN) mRNA 和蛋白表达的影响, 并观察 VSMCs 表型转化时核仁素 mRNA 和蛋白的时空表达模式; 进一步采用核仁素基因转染及 RNA 干扰技术观察核仁素对上述 VSMCs 表型转化标志物 mRNA 和蛋白表达的影响。**结果:** 不同浓度的 Ang II 刺激 VSMCs 不同时间后, VSMCs 收缩表型标志物 α -SMA、calponin 和 SM22 α 的 mRNA 和蛋白表达逐渐减少, 而合成表型标志物 OPN 的 mRNA 和蛋白表达逐渐增加 ($P < 0.05$); 不同浓度 Ang II 刺激 VSMCs 不同时间后, 随着时间和剂量增加, 核仁素的 mRNA 和蛋白表达在一定程度上逐渐升高; Ang II 可诱导核仁素从细胞核向细胞浆移位; 核仁素过表达可促进 Ang II 诱导的 VSMCs 表型转化, 核仁素表达下调后, 其促进表型转化作用被解除。**结论:** 核仁素具有促进 Ang II 诱导的 VSMCs 表型转化的作用, 核仁素的表达上调和移位参与 Ang II 诱导的 VSMCs 表型转化。

[关键词] 核仁素; 血管紧张素 II; 血管平滑肌细胞; 表型转化

[中图分类号] R363; R329.2⁺5 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.10.004

Role of nucleolin in Ang II-induced phenotypic transformation of vascular smooth muscle cells

FANG Li, HUANG Qing, Zhang Yin-zhuang, HUANG Fang, YUAN Cong, LIU Wei-wei
(The Second Department of Cardiology, The First Hospital of Changsha, Changsha 410005, China. E-mail: 527384528@qq.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the effect of nucleolin on angiotensin II (Ang II)-induced phenotypic transformation of vascular smooth muscle cells (VSMCs). **METHODS:** Ang II was used to induce the phenotypic transformation of VSMCs. The spatial and temporal expression patterns of nucleolin, and the effects of Ang II on the expression of VSMC phenotypic transformation markers α -smooth muscle actin (α -SMA), calponin, smooth muscle protein 22 α (SM22 α) and osteopontin (OPN) were investigated. The techniques of gene over-expression and RNA interference were used to assess the effect of nucleolin on the expression of Ang II-mediated VSMC phenotypic transformation markers. **RESULTS:** The expression of α -SMA, SM22 α and calponin at the mRNA and protein levels was gradually decreased by Ang II stimulation, while the expression of OPN at mRNA and protein levels was gradually increased. The expression of nucleolin was gradually up-regulated in the VSMCs treated with Ang II at different concentrations for various duration ($P < 0.05$). Ang II induced nucleolin translocation from the nucleus to cytoplasm. Over-expression of nucleolin promoted the VSMC phenotypic transformation induced by Ang II. Down-regulation of nucleolin suppressed the promotion of phenotypic transformation. **CONCLUSION:** Nucleolin promotes Ang II-induced phenotypic transformation of VSMCs, and its mechanism may be related to its function of cytoplasmic translocation.

[KEY WORDS] Nucleolin; Angiotensin II; Vascular smooth muscle cells; Phenotypic transformation

研究表明血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 表型转化是高血压、动脉粥样硬化

[收稿日期] 2019-03-15 [修回日期] 2019-05-17

* [基金项目] 湖南省自然科学基金资助项目 (No. 2018JJ6127); 湖南省卫生计生委科研计划资助项目 (No. B20180471); 长沙市科技局科技计划资助项目 (No. Kq1701007)

[△]通讯作者 Tel: 13874989644; E-mail: 527384528@qq.com

和血管成形术后再狭窄等心血管病 VSMCs 增殖和迁移的关键性起始步骤,也是该类疾病的共同发病基础^[1-2],因此,如何控制和逆转 VSMCs 表型转化是控制 VSMCs 异常增殖的关键性措施。核仁素 (nucleolin) 是细胞核仁中含量最多的一种 RNA 结合蛋白,其主要功能涉及核糖体 RNA 合成、核糖体装配等的调控^[3]。近期的研究表明核仁素还参与细胞生长、增殖、凋亡和炎症免疫等生理病理过程^[4]。研究表明核仁素的 RNA 结合特性是赋予核仁素具有多种生物学功能的重要特性,其特异的核酸结合元件为“(T/G)CCCG(A/G)”^[5-7]。核仁素在不同类型或者同一类型细胞的不同状态之间具有穿梭的特点,在大多数细胞中以细胞核表达为主,也可以糖基化或磷酸化的形式存在于细胞膜或细胞浆^[8]。核仁素的表达水平与细胞分裂的速率呈正相关,在肿瘤以及其它快速分裂的细胞中核仁素的表达量相当高,而在非分裂细胞中却非常低,因此核仁素常被用来衡量细胞增殖的程度,这些均充分提示 RNA 结合蛋白核仁素可能在调节细胞的增殖或表型转化方面发挥重要作用,并且核仁素的细胞穿梭功能参与了上述生物学过程。核仁素是否具有调节 VSMCs 表型转化及如何发挥作用,目前尚不清楚。

本研究拟采用血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 诱导 VSMCs 表型转化为细胞模型,观察 VSMCs 表型转化时核仁素 mRNA 和蛋白的时空表达模式;采用基因过表达及 RNA 干扰技术从正反两方面观察细胞内核仁素对 Ang II 介导的 VSMCs 表型转化的影响,旨在探讨核仁素在 VSMCs 表型转化中的作用,并初步探讨其促表型转化机制。

材 料 和 方 法

1 细胞培养

VSMCs 购于上海天呈生物信息科技有限公司 (ATCC 来源,货号 CRL-1476TM)。正常生长培养基为 DMEM (高糖) + 10% 胎牛血清,细胞呈梭形,贴壁生长。放于 CO₂ 浓度为 5%、温度为 37 °C 的细胞培养箱中。根据实验设计的要求,将 Ang II 稀释成 10⁻⁵ mmol/L、10⁻⁶ mmol/L、10⁻⁷ mmol/L 和 10⁻⁸ mmol/L 不同浓度,分别刺激血管平滑肌细胞 48 h。10⁻⁵ mmol/L Ang II 分别诱导培养 VSMCs 不同时间。

2 主要试剂

兔抗鼠核仁素多克隆抗体购自 Sigma-Aldrich; 鼠抗 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 单克隆抗体购自武汉博士德生物技术有限公司;兔抗鼠平滑肌蛋白 22 α (smooth muscle protein

22 α , SM22 α) 多克隆抗体、鼠抗钙调理蛋白 (calponin) 单克隆抗体、鼠抗 β -肌动蛋白 (β -actin) 单克隆抗体和兔抗鼠 β -微管蛋白 (β -tubulin) 多克隆抗体均购自 Abcam; 鼠抗骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 单克隆抗体和山羊抗兔或抗小鼠 IgG 购自 Santa Cruz; 小鼠抗增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 单克隆抗体购自 BD Biosciences; BCA 蛋白浓度测定试剂盒和 BeyoECL Plus 化学发光试剂盒购自碧云天生物技术研究; 总 RNA 提取试剂盒和质粒提取试剂盒购自北京博大泰克生物技术有限公司; 实时荧光定量 PCR 试剂盒购自 TaKaRa; MegaTran 1.0 试剂盒购自 OriGene。

3 方法

3.1 细胞核蛋白、胞浆蛋白的分离以及细胞总蛋白的提取 细胞处理后采用 NE-PERTM 细胞核和细胞浆提取试剂盒收集细胞浆和核蛋白质成分,在 -70 °C 下储存。细胞总蛋白的提取过程: VSMCs 经相应处理后,用 4 °C 预冷的 PBS 洗涤 3 次,根据细胞浓度,每瓶细胞加 50 ~ 80 μ L 12 \times SDS 裂解液 (100 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8; 200 mmol/L DTT; 40 g/L SDS; 20% 甘油) 裂解细胞。裂解完毕后,用加样枪将细胞碎片和裂解液转移至 1.5 mL 离心管中,100 °C 煮沸变性 10 min,于 4 °C 下 12 000 \times g 离心 10 min。将离心后的上清分装转移到 0.5 mL 的离心管中放于 -70 °C 保存,使用 Bicinchoninic Acid Protein Assay 试剂盒测定蛋白质浓度。

3.2 细胞总 RNA 的提取,逆转录和 RT-qPCR 分析

细胞处理后使用 RNeasy 试剂盒提取细胞总 RNA。根据目的基因设计特异性引物,由上海生工生物工程股份有限公司合成。 α -SMA 的上游引物序列为 5'-ACTGGGACGACATGGAAAAG-3',下游引物序列为 5'-CATCTCCAGAGTCCAGCAC-3'; calponin 的上游引物序列为 5'-ACTTCATGGATGGCCTCAAG-3',下游引物序列为 5'-GTGCCAGTTCTGGGTTGACT-3'; SM22 α 的上游引物序列为 5'-TTCTGCCTCAACATGGCCAAC-3',下游引物序列为 5'-CACCTTCACTGGCTTGGATC-3'; OPN 的上游引物序列为 5'-ATGGCTTTCATTGGAGTTGC-3',下游引物序列为 5'-CCTCGCCTTTGCCGATCC-3'; β -actin 的上游引物序列为 5'-CCTCGCCTTTGCCGATCC-3',下游引物序列为 5'-GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC-3'; nucleolin 的上游引物序列为 5'-CAATCAGGCTGGAGTTGCAAG-3',下游引物序列为 5'-TGGCCAGTCAAGTAACCT-3'。提取的总 RNA 经微量紫外分光光度计测量浓度后按 TaKaRa 逆转录试剂盒推荐

步骤进行逆转录, 逆转录为 cDNA 后, 进行 real-time PCR 扩增。反应体系 5 μL : cDNA 2 μL , 正、反引物 (10 pmol/L) 各 0.2 μL , Dye II 0.2 μL , 加蒸馏水补充至 10 μL 。扩增条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s 预变性; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s 变性, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 退火延伸, 扩增 40 个循环。反应和数据处理均在 Applied Biosystems 7500 Real-time PCR System 上进行。用循环阈值 (cycle threshold, Ct) 来计算样本中目的基因的 mRNA 表达量。每个目的基因均重复 3 次, Ct 值取均值进行比较和统计分析。采用相对表达量计算法 ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) 计算各基因表达量的差异, 设对照组基因表达量为 1, 并选择 β -actin 作为内参照。

3.3 间接细胞免疫荧光检测核仁素的定位 消化 VSMCs 后, 接种在放置有无菌盖玻片的 6 孔板中; 细胞长满约 80% 后, 吸尽培养液, 用 PBS 洗涤 3 次, 各孔加入 1 mL 4% 多聚甲醛固定 20 min; 用 PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 去固定液; 0.5% Triton X-100 孵育 10 min; PBS 洗涤后用 2% BSA 室温封闭 60 min; 去封闭液, 分别在盖玻片上加入 1:100 稀释的抗核仁素抗体 (50 μL) 作用 60 min; 用 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 去除未结合的 I 抗; 然后再加入 1:100 稀释的 FITC 标记荧光 II 抗 (50 μL) 作用 60 min; 用 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 去除未结合 II 抗; 加入 Hoechst 33258 孵育 20 min, 抗荧光淬灭液封片, 置于倒置荧光显微镜下观察拍照。

3.4 Western blot 实验 按照实验室常规方法进行, 各处理组细胞经相应处理后移去培养液, 用 4 $^{\circ}\text{C}$ PBS 洗涤 2 次; 加入 100 μL 2 \times SDS 蛋白裂解液裂解细胞, 将裂解液转移至 Eppendorf 管, 超声 10~15 s, 12 000 r/min 离心 5 min, 将上清液转移到另一干净 Eppendorf 管; 用 BCA 法测定蛋白浓度; 将 20 μg 蛋白与 2 \times SDS 加样缓冲液混合, 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 5 min; 样品经 10% SDS-PAGE 分离后, 电转移法转移到硝酸纤维素膜上; 室温下封闭 4 h 后, 分别加入兔抗鼠核仁素多克隆抗体、鼠抗 calponin 单克隆抗体、兔抗鼠 SM22 α 多克隆抗体、鼠抗 osteopontin 单克隆抗体、鼠抗 α -SMA 单克隆抗体和鼠抗 β -actin 单克隆抗体 (均为 1:1 000 稀释), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 洗去 I 抗后, 加入辣根过氧化物酶偶联的相应 II 抗, 反应 2 h, 化学发光法显色, 扫描结果。

3.5 pcDNA3.1-Nuc/siRNA-Nuc 重组质粒的扩增和提取 pcDNA3.1-Nuc/siRNA-Nuc 重组质粒由中南大学湘雅医学院病理生理学教研室王慷慨教授惠赠。将核仁素过表达质粒 pcDNA3.1-Nuc 或核仁素干扰 RNA 片段 (siRNA-Nuc; 5'-ACCTGCCTTCGCA-

GCTCACCAT-3') ; siRNA; 5'-CATGGTGAAGCTCG-CGAAGGCAGGT-3') 转入到感受态细胞中, 之后挑取单克隆菌落放于含相应抗生素的 5 mL LB 培养基中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的摇床上, 250 r/min 培养过夜, 之后转移到含相应抗生素的 200 mL LB 培养基中扩大培养, 浑浊度达到标准后收集细菌用于质粒的抽提, 摇动 14~16 h。按质粒提取试剂盒说明书提取 siRNA-Nuc/pcDNA3.1-Nuc 质粒, 基本步骤为将大肠杆菌菌液分装入 EP 管, 离心获得细菌沉渣, 循序加入 solution 试剂提取出 质粒, Wash buffer 清洗, 无菌超纯水 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育后洗脱, 获得质粒。提取出的质粒分光光度计测定 DNA 浓度, 分装冻存于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

3.6 细胞的瞬时转染 按照 MegaTran 1.0 转染试剂操作说明书进行。转染前给融合度为 70%~90% (具体根据处理因素及处理时间) 的 VSMCs 培养板换液。转染时 (以 6 孔板为例) 每孔取 2 μg 质粒, 将其溶解在 200 μL 无血清 DMEM 培养基中, 再将 6 μL 的 MegaTran 1.0 加入上述混合物中, 混匀后室温放置约 10 min, 将混合液加入 6 孔板中, 轻轻混匀后, 将 6 孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中, 24 h 后进行下一步实验。

4 统计学处理

采用 SPSS 12.0 统计学软件进行数据处理分析。数据以均数 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示, 根据资料性质采用合适的统计学方法, 两组间比较采用独立样本 t 检验, 多组间采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 Ang II 对 VSMCs 表型转化的影响

不同浓度 Ang II 刺激 48 h 后, VSMCs 收缩表型标志物 α -SMA、calponin 和 SM22 α 的 mRNA 和蛋白表达逐渐减少, 而合成表型标志基因 *OPN* mRNA 和蛋白表达逐渐增加, 其中 Ang II 的浓度为 10^{-5} mmol/L 时效果最明显, 见图 1A、C。 10^{-5} mmol/L Ang II 处理 VSMCs 不同时间后, VSMCs 收缩表型标志物 α -SMA、calponin 和 SM22 α 的 mRNA 和蛋白表达逐渐减少, 而合成表型标志物 *OPN* 的 mRNA 和蛋白表达逐渐增加, 其中 72 h 时的效果最明显 ($P < 0.05$), 见图 1B、D。上述结果证实 Ang II 有明显的促进 VSMCs 表型转化的作用。

2 Ang II 对血管平滑肌细胞中核仁素表达的影响

不同浓度 Ang II 刺激 48 h 后, VSMCs 中核仁素 mRNA 和蛋白的表达在一定程度上逐渐升高, 10^{-6} mmol/L Ang II 能明显上调核仁素 mRNA 和蛋白的表

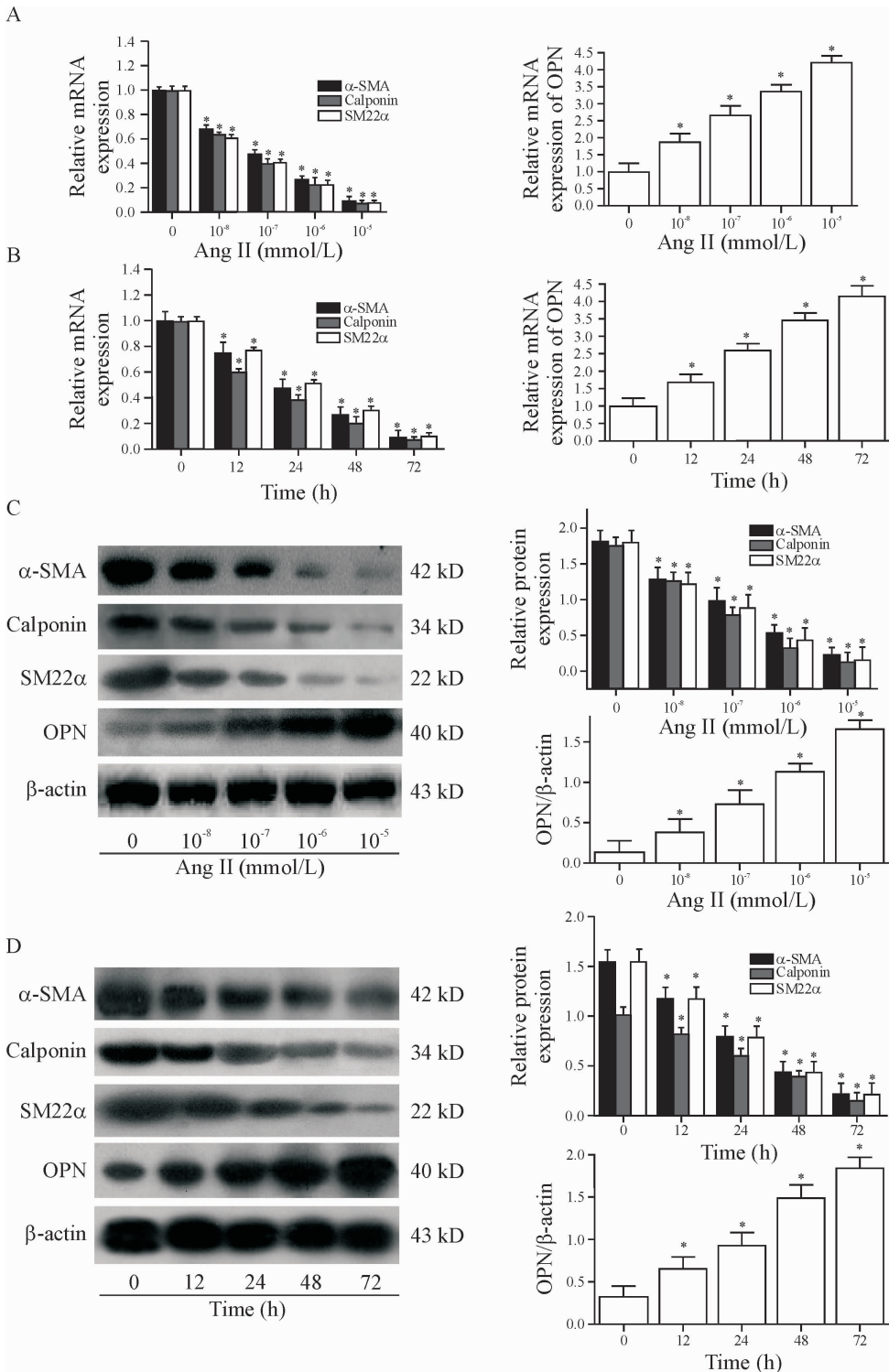


Figure 1. RT-qPCR (A, B) and Western blot (C, D) were used to determine the effect of different concentrations (A, C) of Ang II for various time (B, D) on the expression of VSMC phenotypic transformation markers α -SMA, calponin, SM22 α and OPN. Mean \pm SD. $n = 5$. * $P < 0.05$ vs 0 mmol/L group.

图1 RT-qPCR 和 Western blot 检测 Ang II 对 VSMCs 表型转化标志物 α -SMA、calponin、SM22 α 和 OPN mRNA 和蛋白的影响

达($P < 0.05$)。10⁻⁶ mmol/L Ang II 处理 VSMCs 不同时间后,核仁素 mRNA 和蛋白的表达也在一定程度上逐渐升高,在 48 h Ang II 能明显上调核仁素 mRNA 和蛋白的表达,并持续至将近 72 h ($P <$

0.05),见图 2A、B。利用 10⁻⁶ mmol/L Ang II 处理 VSMCs 12、24、48 和 72 h,细胞成分分离后提取细胞核蛋白和细胞浆蛋白,采用 Western blot 分析核仁素蛋白的表达,结果显示正常情况下,绝大部分的核仁

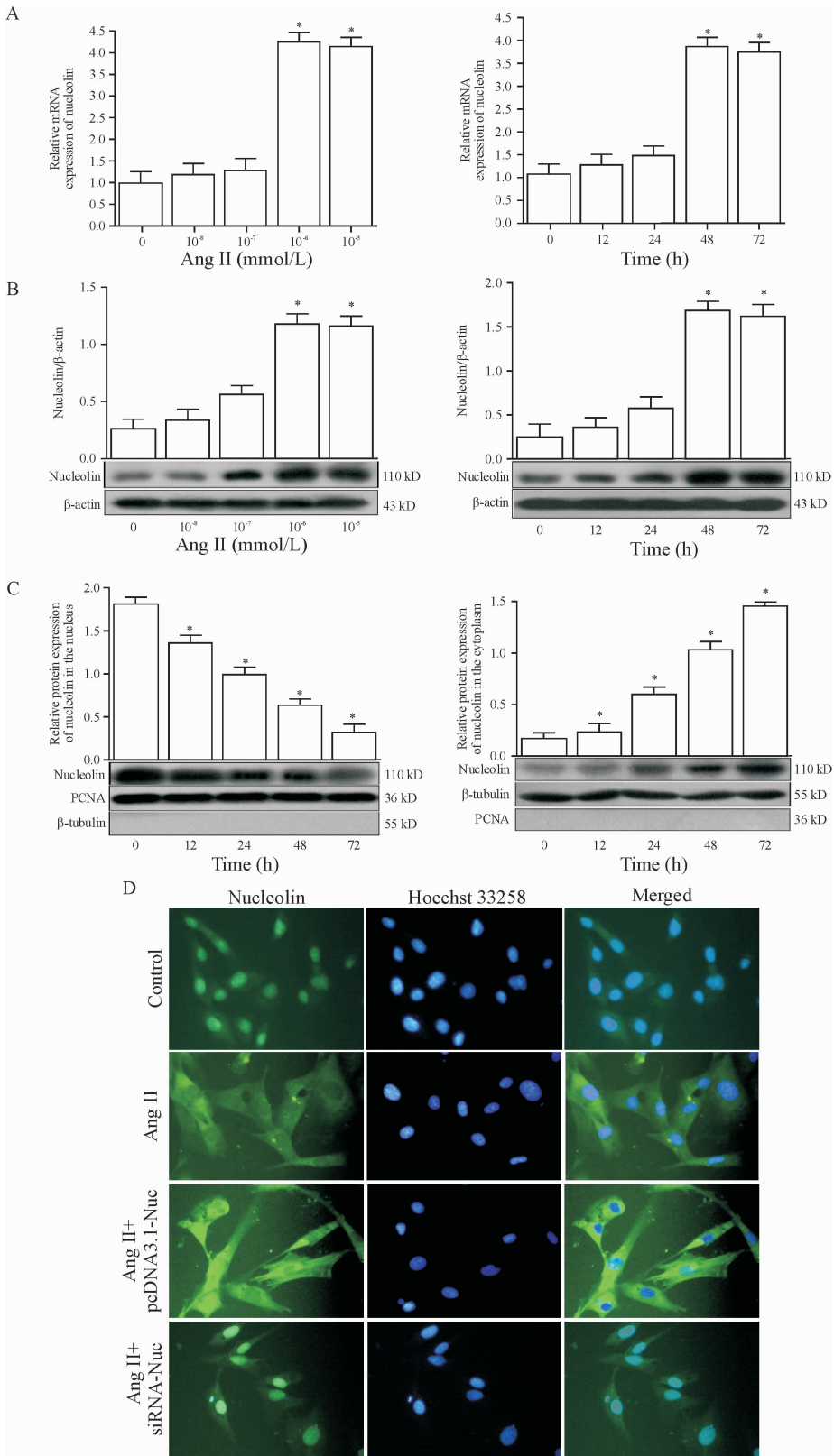


Figure 2. The effect of Ang II on the expression and subcellular localization of nucleolin in the VSMCs. A and B; RT-qPCR and Western blot were used to determine the effect of Ang II on the mRNA and protein expression of nucleolin in the VSMCs; C and D; Western blot and indirect immunofluorescence were used to observe the subcellular localization of nucleolin. β-tubulin and PCNA were used as the internal controls of cytoplasmic protein and nuclear protein, respectively. Nucleolin was detected with fluorescein isothiocyanate-labeled antibody (green), and nuclei were counterstained with Hoechst 33258 (violet). The magnification of the images in D was ×400. Mean ± SD. n = 5. * P < 0.05 vs control group.

图2 Ang II对VSMCs中核仁素表达及亚细胞移位的影响

素位于细胞核中,胞浆中含量较少,而 Ang II 处理后,可见胞浆中的核仁素的含量逐渐增多,细胞核内的核仁素的含量逐渐减少 ($P < 0.05$),见图 2C。β-tubulin 和 PCNA 分别为胞浆蛋白和胞核蛋白的内参照,提示成分之间无明显污染。进一步采用间接免疫荧光证实,正常情况下绝大部分核仁素(绿色荧光物质)位于细胞核中,细胞浆中的含量较少;而 10^{-6} mmol/L Ang II 处理 VSMCs 48 h 后,细胞浆中的核仁素(绿色荧光物质)明显增多,而细胞核中的核仁素(绿色荧光物质)明显减少,见图 2D,提示 Ang II 可诱导核仁素从细胞核向细胞浆移位。核仁素过表达能增加核仁素在细胞核和细胞浆的表达及其胞浆移位;核仁素干扰后则细胞核和细胞浆表达量及其胞浆移位减少,见图 2D。

3 核仁素过表达对 Ang II 诱导的 VSMCs 表型转化的影响

与正常对照细胞相比,转染 pcDNA3.1-Nuc 质粒

后,VSMCs 中核仁素的蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$),见图 3A。给予 10^{-6} mmol/L Ang II 处理 48 h,结果显示单纯 Ang II 处理组及转空载体的对照细胞经 Ang II 处理后核仁素蛋白的表达明显上调,而转染核仁素基因的 VSMCs 经过 Ang II 处理后核仁素蛋白的表达上调更为明显 ($P < 0.05$),见图 3B。同时,Western blot 检测结果显示,单纯 Ang II 处理和转空载体的对照细胞经 Ang II 处理后,OPN 蛋白的表达明显上调,而转染核仁素基因的 VSMCs 经过 Ang II 处理后 OPN 蛋白的表达上调更为明显 ($P < 0.05$);与此相反,单纯 Ang II 处理和转染空载体的对照细胞经 Ang II 处理后 α-SMA、calponin 和 SM22a 表达下调,而转染核仁素基因的 VSMCs 经过 Ang II 处理后 α-SMA、calponin 和 SM22a 蛋白的表达下调更为明显 ($P < 0.05$),见图 3C。这些结果提示核仁素过表达可促进 Ang II 诱导的 VSMCs 表型转化。

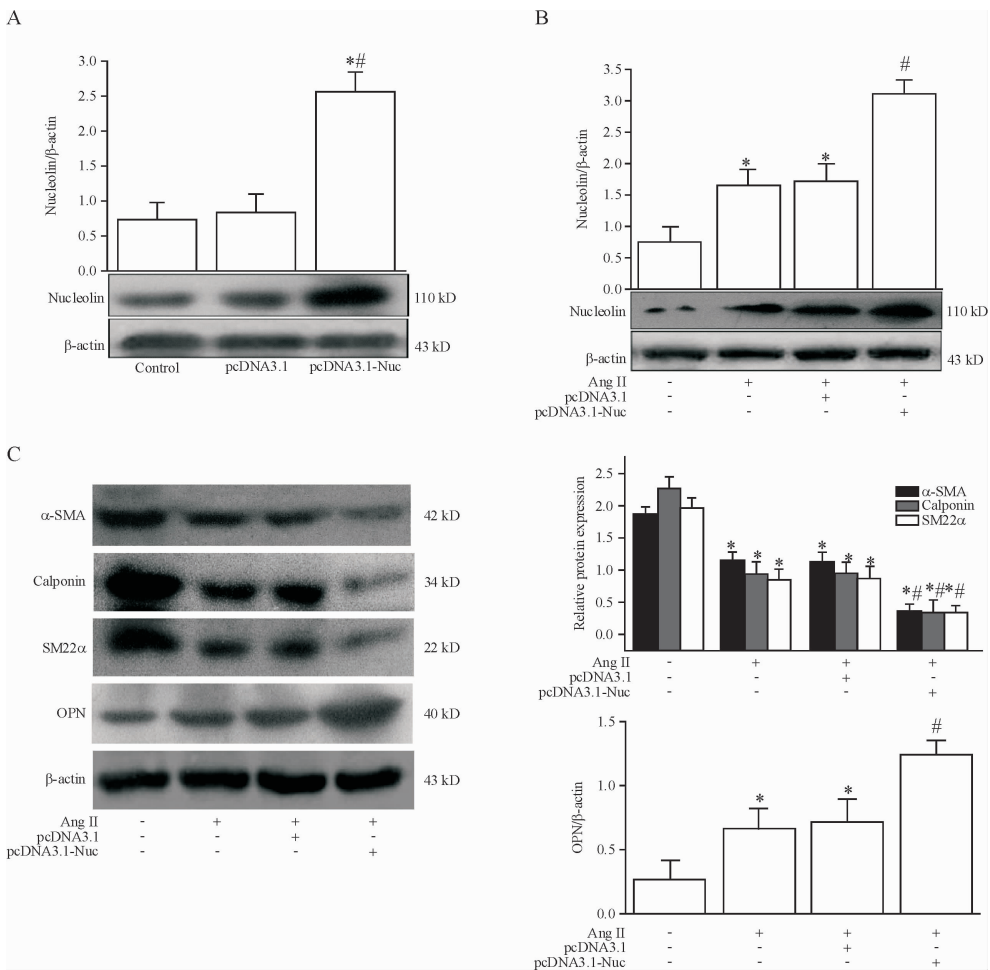


Figure 3. The effect of nucleolin over-expression on Ang II-induced phenotypic transformation of VSMCs. A: the effect of nucleolin over-expression on the expression of nucleolin in VSMCs; B: the effect of nucleolin over-expression on Ang II-induced expression of nucleolin in VSMCs; C: the effect of nucleolin over-expression on Ang II-induced expression of VSMC phenotypic transformation markers α-SMA, calponin, SM22α and OPN. Mean ± SD. $n = 5$. * $P < 0.05$ vs control group (without treatment); # $P < 0.05$ vs pcDNA3.1 group, Ang II group or Ang II + pcDNA 3.1 group.

图 3 Nucleolin 过表达对 Ang II 诱导的 VSMCs 表型转化的影响

4 敲减核仁素表达对 Ang II 诱导的 VSMCs 表型转化的影响

与正常 VSMCs 相比,转染核仁素的 RNA 干扰载体 siRNA-Nuc 质粒 48 h 后,VSMCs 中核仁素蛋白的表达明显受到抑制 ($P < 0.05$),见图 4A。再给予 10^{-6} mmol/L Ang II 处理 48 h 后,单纯 Ang II 处理组及转染对照质粒的细胞经过 Ang II 处理后,核仁素蛋白的表达明显上调,而转染 siRNA-Nuc 的 VSMCs 经过 Ang II 处理后核仁素蛋白的表达明显下降 ($P < 0.05$),见图 4B。单纯 Ang II 处理和转染空载体的

对照细胞经 Ang II 处理后,OPN 蛋白的表达明显上调,而转染核仁素 RNA 干扰载体后 OPN 蛋白的表达上调受到明显抑制 ($P < 0.05$);与此相反,单纯 Ang II 处理和转染空载体的对照细胞经 Ang II 处理后 α -SMA、calponin 和 SM22 α 的表达下调,而转染核仁素 RNA 干扰载体后 α -SMA、calponin 和 SM22 α 蛋白的表达下调受到明显抑制 ($P < 0.05$),见图 4C。这些结果提示核仁素表达下调后,其促进表型转化作用被解除。

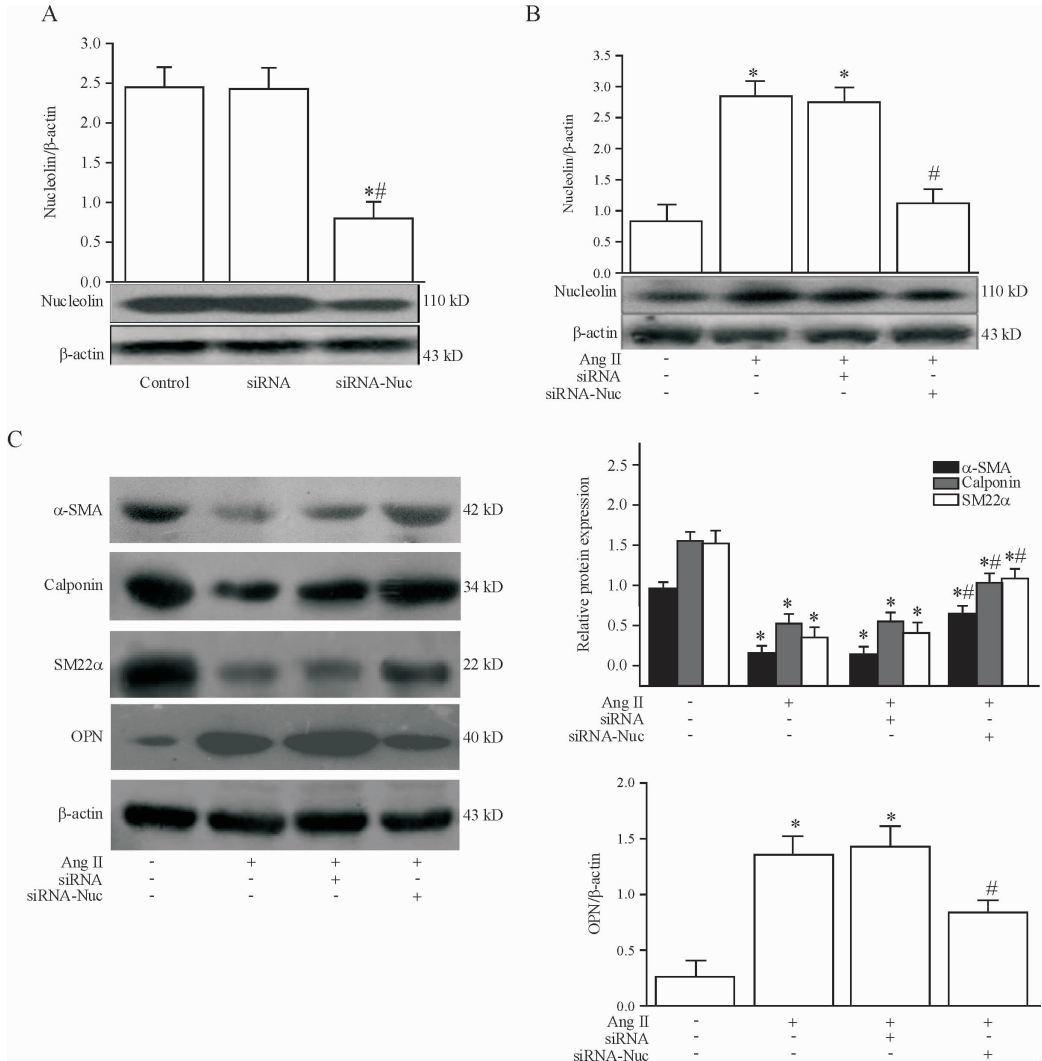


Figure 4. The effect of nucleolin silencing on Ang II-induced phenotypic transformation of VSMCs. A: the effect of silencing of nucleolin on expression of nucleolin in VSMCs; B: the effect of silencing of nucleolin on Ang II-induced expression of nucleolin in VSMCs; C: the effect of silencing of nucleolin on Ang II-induced expression of VSMC phenotypic transformation markers α -SMA, calponin, SM22 α and OPN. Mean \pm SD. $n = 5$. * $P < 0.05$ vs control group (without treatment); # $P < 0.05$ vs siRNA group, Ang II group or Ang II + siRNA group.

图 4 Nucleolin 低表达对 Ang II 诱导的 VSMCs 表型转化的影响

讨 论

当血管受到损伤或体外培养的 VSMCs 受到生

长因子刺激时,VSMCs 从分化型转化为去分化型并获得增殖能力,这个过程称为表型转化。目前在 VSMCs 表型转化机制研究中取得较大的进展,普遍

认为机体内存在内源性活性物质对 VSMCs 的增殖或表型转化起着自发的调控作用,因此,寻找并研究介导 VSMCs 表型转化新的内源性调控蛋白是阐明其作用机制的关键。尽管现已证实多种细胞因子、生长因子和血管活性物质参与 VSMCs 表型转化,然而 VSMCs 表型转化中究竟何种物质起关键作用,如何起作用以及多种调控因子之间存在怎样的相互作用,尚缺乏系统研究。核仁素是目前发现的 271 种核仁蛋白质中含量最多的一种,约占核仁蛋白质总量的 10%,是真核细胞核仁中最主要的一种磷酸蛋白质。核仁素的重要功能之一是调控核糖体的生物合成与成熟,调控细胞增殖、生长、调控胚胎发生、胞质分裂、染色质复制与核仁的发生等过程^[9]。大量研究表明核仁素高表达于增殖较快的组织和细胞,包括干细胞和肿瘤细胞,并能促进干细胞的更新和肿瘤细胞的生长^[10]。核仁素的表达水平与细胞分裂的速率呈正相关。在肿瘤以及其它快速分裂的细胞中核仁素的表达量相当高,而在非分裂细胞中却非常低,因此作为一种有效的标记,核仁素常被用来衡量细胞增殖的程度^[11],上述研究结果提示,在病理条件下核仁素可能具有调节血管平滑肌细胞表型转化的作用,而核仁素是否具有调节 VSMCs 表型转化,目前尚不清楚。

为了明确核仁素在 VSMCs 表型转化中的作用,本研究首先以 Ang II 刺激 VSMCs 诱导其发生表型转化,发现不同浓度和作用时间的 Ang II 刺激 VSMCs 后,VSMCs 收缩表型标志物 α -SMA、calponin 和 SM22 α 的 mRNA 和蛋白表达逐渐减少,而合成表型标志物 OPN 的 mRNA 和蛋白表达逐渐增加,上述结果证实 Ang II 有明显的促进 VSMCs 表型转化作用。为了证明 Ang II 刺激 VSMCs 表型转化与核仁素表达水平的关系,本研究采用 RT-qPCR 及 Western blot 检测发现,不同浓度和不同作用时间的 Ang II 刺激 VSMCs 后,核仁素的 mRNA 和蛋白的表达也在一定程度上逐渐升高。核仁素的表达改变是 VSMCs 表型转化中的伴随现象,还是核仁素在 VSMCs 表型转化中发挥了重要作用目前还不清楚。根据核仁素的表达模式分析,我们假定核仁素的表达上调在 Ang II 诱导的 VSMCs 表型转化发挥了作用。Ang II 刺激可促进核仁素表达上调,其机制是什么呢?研究发现丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路的活化,也可使核仁素的表达上调,而多项研究亦证实 Ang II 诱导的 VSMCs 增殖和表型转化与 MAPK 信号通路成员细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular signal regulated kinase, ERK1/

2)、氨基末端激酶(Jun NH2 terminal kinase, JNK)、p38 和核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)的激活有关^[12-13]。因此,Ang II 可能通过激活 MAPK 和 NF- κ B 等信号通路,进而使核仁素表达上调,但其具体机制还有待于进一步探讨。

核仁素含有氨基端、中心区和羧基端 3 个主要的功能结构域,其中心区含有 4 个较为保守的序列一致型 RNA 结合结构域(consensus sequence type RNA binding domain, CS-RBD)。目前认为,核仁素氨基端的核定位信号(nuclear localization signal, NLS)、中心区的 RNA 结合结构域以及羧基端的甘氨酸富集区不但决定着核仁素的核仁定位,还赋予了核仁素在细胞浆和细胞核之间进行双向移位的特性^[14]。由此可见,核仁素的细胞穿梭功能参与调节细胞的增殖与生长和凋亡等生物学过程。本研究也发现,在正常情况下,核仁素大部分位于血管平滑肌细胞核中,而 Ang II 可诱导核仁素从细胞核向细胞浆移位,提示核仁素可能在 Ang II 诱导的 VSMCs 表型转化中也起作用,而且其作用机制可能有赖于它的胞浆定位功能。有研究表明核仁素向细胞浆的移位取决于 Cdc2 激酶诱导其氨基端苏氨酸的磷酸化,相反去磷酸化则促进其向核转位^[15]。因此,Ang II 可能通过激活某些激酶,导致核仁素的移位,从而发挥调节 VSMCs 表型转化作用,上述问题有待于进一步研究阐明。为了探讨核仁素在 VSMCs 表型转化中的作用,我们采用了核仁素过表达和 RNA 干扰策略观察核仁素在 VSMCs 表型转化中的作用,结果显示核仁素过表达可明显促进 Ang II 诱导的 VSMCs 表型转化,而核仁素表达下调后其促进表型转化作用被解除。上述研究在国内外首次证明了核仁素的表达上调及其胞浆移位在 Ang II 所致 VSMCs 表型转化作用中起着关键的作用。

有文献报道,核仁素的 RNA 结合结构域 CS-RBD 即“(T/G)CCCG(A/G)”是其参与 rRNA 原初转录本剪接和成熟调节的结构基础^[6-7]。除此之外,大量研究表明,这一结构还介导了核仁素对某些基因表达的转录后调节(调控靶基因 mRNA 稳定性),如核仁素与 IL-2 mRNA 的 5'-非翻译区(5'-untranslated region, 5'-UTR)结合^[16]、GADD45 α (growth arrest and DNA damage inducible gene 45 α)mRNA 编码区^[17]结合,通过调控这些靶基因 mRNA 的稳定性来调节靶基因蛋白质的表达。核仁素的 RBD 结构域可与 *bcl-2*、*AKT1* 和 *p53* 等多种凋亡相关基因 mRNA 的 5'-和 3'-UTR 结合,使相应的 mRNA 稳定或去稳定,从而发挥促细胞增殖和抗细胞凋亡作用^[18]。核

仁素通过其第4个RNA结合域与端粒酶RNA组分人类端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)结合,调节端粒酶的细胞核及核仁定位,从而调节细胞的生长与增殖^[19]。最近研究还表明核仁素通过增强 ABCA1 的 mRNA 稳定性,随后增加胆固醇流出,抑制泡沫细胞的形成^[20]。上述研究表明,核仁素的 RNA 结合特性,是其调节细胞的生长与增殖等多种生物学功能的关键。做为 RNA 结合蛋白,核仁素是否通过 RNA 结合域与表型转化相关基因的 mRNA 相结合,调控他们的稳定性及表达,进而在 Ang II 所致 VSMCs 表型转化作用中起作用呢? 这些均需要进一步研究。

本研究初步证实了核仁素在 Ang II 所致 VSMCs 表型转化中发挥重要作用,而核仁素的表达上调和移位可能参与 Ang II 诱导的 VSMCs 表型转化。VSMCs 表型转化过程极其复杂,我们的研究很可能为 VSMCs 表型转化的调节机制研究提供了一个新的视角,根据目前结果结合相关文献推测核仁素可能通过其胞浆定位功能参与介导 VSMCs 表型转化相关基因的调控,影响相关基因表达,进而发挥促进表型转化作用。因此,核仁素也很有可能成为高血压、动脉粥样硬化和血管成形术后再狭窄等心血管病治疗的一个新的药物治疗靶点。

[参 考 文 献]

- [1] Rzuicidlo EM, Martin KA, Powell RJ. Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation[J]. J Vasc Surg, 2007, 45(Suppl A): A25-A32.
- [2] Dong N, Wang W, Tian J, et al. MicroRNA-182 prevents vascular smooth muscle cell dedifferentiation via FGF9/PDGFR β signaling[J]. Int J Mol Med, 2017, 39(4): 791-798.
- [3] Chen Z, Xu X. Roles of nucleolin. Focus on cancer and anti-cancer therapy[J]. Saudi Med J, 2016, 37(12): 1312-1318.
- [4] Huang F, Wu Y, Tan H, et al. Phosphorylation of nucleolin is indispensable to its involvement in the proliferation and migration of non-small cell lung cancer cells[J]. Oncol Rep, 2019, 41(1): 590-598.
- [5] Huang Y, Shi H, Zhou H, et al. The angiogenic function of nucleolin is mediated by vascular endothelial growth factor and nonmuscle myosin [J]. Blood, 2006, 107(9): 3564-3571.
- [6] Wang K, Deng G, Chen G, et al. Heat shock protein 70 inhibits hydrogen peroxide-induced nucleolar fragmentation via suppressing cleavage and down-regulation of nucleolin [J]. Cell Stress Chaperones, 2012, 17(1): 121-130.
- [7] Jiang B, Liang P, Wang K. Nucleolin involved in myocardial ischaemic preconditioning via post-transcriptional control of HSPA1A expression [J]. Cardiovasc Res, 2014, 102(1): 56-67.
- [8] Mosafar J, Mokhtarzadeh A. Cell surface nucleolin as a promising receptor for effective ASI411 aptamer-mediated targeted drug delivery into cancer cells[J]. Curr Drug Deliv, 2018, 15(9): 1323-1329.
- [9] Andersen JS, Lyon CE, Fox AH, et al. Directed proteomic analysis of the human nucleolus [J]. Curr Biol, 2002, 12(1): 1-11.
- [10] Li Y, Jiang B, Liang P, et al. Nucleolin protects macrophages from oxLDL-induced foam cell formation through up-regulating ABCA1 expression [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 486(2): 364-371.
- [11] Galande S. Chromatin (dis)organization and cancer: BUR-binding proteins as biomarkers for cancer[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2002, 2(2): 157-190.
- [12] Chen T, Deng S, Lin R. The inhibitory effect of Isoliquiritigenin on the proliferation of human arterial smooth muscle cell[J]. BMC Pharmacol Toxicol, 2017, 18(1): 57.
- [13] Yu XH, Zheng XL, Tang CK. Nuclear factor- κ B activation as a pathological mechanism of lipid metabolism and atherosclerosis[J]. Adv Clin Chem, 2015, 70: 1-30.
- [14] Iliakis G, Krieg T, Guan J, et al. Evidence for an S-phase checkpoint regulating DNA replication after heat shock: a review[J]. Int J Hyperthermia, 2004, 20(2): 240-249.
- [15] Webster KA, Discher DJ, Bishopric NH. Cardioprotection in an *in vitro* model of hypoxic preconditioning[J]. J Mol Cell Cardiol, 1995, 27(1): 453-458.
- [16] Chen CY, Gherzi R, Andersen JS, et al. Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation [J]. Genes Dev, 2000, 14(10): 1236-1248.
- [17] Zhang Y, Bhatia D, Xia H, et al. Nucleolin links to arsenic-induced stabilization of GADD45 α mRNA [J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(2): 485-495.
- [18] Cheng Y, Zhao G, Zhang S, et al. ASI411-induced growth inhibition of glioma cells by up-regulation of p53 and down-regulation of Bcl-2 and Akt1 via nucleolin[J]. PLoS One, 2016, 11(12): e0167094.
- [19] Khurts S, Masutomi K, Delgermaa L, et al. Nucleolin interacts with telomerase [J]. J Biol Chem, 2004, 279(49): 51508-51515.
- [20] Huang S. Building an efficient factory: where is pre-rRNA synthesized in the nucleolus? [J]. J Cell Biol, 2002, 157(5): 739-741.