

· 基础研究 ·

穹窿主体蛋白通过上调干扰素调节因子2抑制动脉内皮细胞凋亡

薛佳佳¹, 王艺颖^{1,2}, 胡成秀¹, 孙崇秀^{1*}¹南京医科大学心血管疾病转化医学协同创新中心, 江苏 南京 211166; ²江苏卫生健康职业学院药学院基础化学教研室, 江苏 南京 211800

[摘要] **目的:**探究穹窿主体蛋白(major vault protein, MVP)对动脉内皮细胞(endothelial cell, EC)增殖的作用,揭示 MVP 对动脉 EC 发挥保护作用的潜在机制。**方法:**以人主动脉 EC(human aortic EC, HAEC)为细胞模型,感染慢病毒以抑制或过表达 MVP。使用 CCK-8 实验和流式细胞术检测细胞增殖活性和死亡。使用凋亡抑制剂 Z-VAD 和坏死性凋亡抑制剂 Nec-1 确定细胞死亡方式。以流式细胞术检测 Annexin V 结合阳性率和 Caspase 3 活性,以 Western blot 检测 Caspase 剪切体蛋白表达以评价细胞凋亡。以荧光定量 PCR 和 Western blot 技术鉴定靶分子,并明确 MVP 与靶分子之间的调控关系。**结果:**敲降 MVP 抑制 HAEC 增殖,促进 HAEC 死亡,过表达 MVP 结果则相反。Z-VAD 逆转 MVP 敲降引起的死亡,而 Nec-1 无此作用。过表达 MVP 抑制 TNF- α 诱导的 HAEC 凋亡,敲降 MVP 时作用相反。MVP 通过上调干扰素调节因子 2(interferon regulatory factor 2, IRF2)促进凋亡抑制蛋白 1(cellular inhibitor of apoptosis protein 1, cIAP1)的转录。敲降 IRF2 逆转 MVP 过表达引起的 cIAP1 表达增多和凋亡抑制。**结论:**MVP 通过上调 IRF2 蛋白促进 cIAP1 转录表达从而抑制 TNF- α 诱导的 HAEC 凋亡,发挥对 EC 的保护作用。

[关键词] 穹窿主体蛋白;动脉内皮细胞;细胞增殖;细胞凋亡;凋亡抑制蛋白 1**[中图分类号]** R329.25**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2023)08-1076-09**doi:** 10.7655/NYDXBNS20230806

Major vault protein inhibits apoptosis of aortic endothelial cells through upregulating interferon regulatory factor 2

XUE Jiajia¹, WANG Yiyi^{1,2}, HU Chengxiu¹, SUN Chongxiu^{1*}¹Key Laboratory of Targeted Intervention of Cardiovascular Disease, Collaborative Innovation Center for Cardiovascular Disease Translational Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 211166; ²Department of General Chemistry, School of Pharmacy, Jiangsu Health Vocational College, Nanjing 211800, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects and the underlying mechanism of major vault protein (MVP) on the proliferation of arterial endothelial cells. **Methods:** Human aortic endothelial cell (HAEC) were infected with lentivirus to inhibit or overexpress MVP. Cell proliferation and death were detected with CCK-8 assay and flow cytometry. Apoptosis inhibitor Z-VAD and necroptosis inhibitor Nec-1 were used to distinguish the mode of cell death. Annexin V binding and Caspase 3 activity were detected by flow cytometry, and cleaved Caspase was examined by Western blot. Real time PCR and Western blot were performed to investigate target molecules and the regulatory relationship. **Results:** Knockdown of MVP inhibited the proliferation activity of HAEC and promoted the HAEC cell death. Overexpression of MVP resulted in the opposite results. Treatment with Z-VAD reversed HAEC death caused by MVP knockdown, while Nec-1 did not. Consistently, TNF- α -induced HAEC apoptosis was inhibited by MVP overexpression and exaggerated by MVP knocked down. MVP promoted the transcriptional expression of cellular inhibitor of apoptosis proteins 1 (cIAP1) by up-regulating interferon regulatory factor 2 (IRF2) protein expression. IRF2 knockdown reversed the increase in cIAP1 expression and the decrease in apoptosis caused by MVP overexpression. **Conclusion:** MVP promoted cIAP1 transcription by up-regulating IRF2 protein expression, thereby inhibiting TNF- α -induced apoptosis and promoting the proliferation of arterial EC.

[Key words] major vault protein; aortic endothelial cells; cell proliferation; cell apoptosis; cIAP1

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(08): 1076-1084]

[基金项目] 国家自然科学基金(81870355, 82170465)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: cxsun@njmu.edu.cn

内皮细胞(endothelial cell, EC)是位于血管壁表面一层连续的扁平细胞,充当着血流与血管壁之间的结构屏障,在血管稳态的维持上起着重要作用。由于所处位置的特殊性,EC经常受到一些危险因素的刺激,如肿瘤坏死因子(TNF- α)、氧化低密度脂蛋白(oxLDL)等炎症因子或血流剪切力,均可打破EC增殖与死亡动态平衡,导致EC功能失调。EC过度死亡后,内皮完整性不复存在,血管壁结构和通透性显著改变,血流动力学改变,可促进oxLDL以及单核细胞黏附并浸润到血管壁,导致动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)斑块及其他血管性疾病^[1-2]。

穹窿体是一种在真核生物体内高度保守的核糖核蛋白复合物,许多研究表明穹窿体参与广泛的细胞功能,包括核质运输、药物耐受、感染免疫、细胞信号传导、mRNA定位和核孔装配等^[3-4]。穹窿主体蛋白(major vault protein, MVP)是细胞内构成穹窿体的主要成分之一。MVP因最早在肺耐药相关研究中被鉴定,因此又称为肺耐药相关蛋白(lung resistant associated protein, LRP)。后续研究发现MVP与肿瘤细胞的增殖凋亡密切相关,通过PI3K-AKT、Ras/Raf/MEK信号通路调控细胞活性^[5]。近年来发现,MVP可调控血管平滑肌细胞增殖活性^[6],巨噬细胞中的MVP对动脉粥样硬化、肥胖有抑制作用^[7],而EC中的MVP相关研究仍未见报道。血管壁稳态在AS等心血管疾病进展中至关重要,探究MVP在人主动脉内皮细胞(human aortic endothelial cell, HAEC)中发挥的作用及机制,可为心血管疾病的防治提供思路。

1 材料和方法

1.1 材料

HAEC (Catalog No. PCS - 100 - 011, Lot No. 63233442, Manassas, VA)购自美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection, ATCC)。EC培养基EGM-2(Lonza公司,瑞士),胎牛血清FBS、胰蛋白酶(Gibco公司,美国),青/链霉素混合液(双抗)(Thermo公司,美国),rh-TNF- α (R&D Systems,美国),脂质体转染试剂盒(Invitrogen公司,美国),TRIzol试剂(TaKaRa公司,日本),CCK-8试剂检测盒、Z-VAD-FMK(Z-VAD)、Necrostatin-1(Nec-1)(Med Chem Express公司,美国),PCR逆转录试剂盒、PCR荧光定量试剂盒(上海翊圣生物技术公司),Annexin V-FITC/propidium iodide(PI)检测试剂盒(南京Fcmacs公司),Caspase 3、8活性检测试剂盒

(BioVision公司,美国),凋亡抑制蛋白1(cellular inhibitor of apoptosis protein 1, cIAP1)siRNA、IRF2 siRNA(Santa Cruz Biotechnology,美国),BCA蛋白浓度测定试剂盒(北京碧云天生物技术有限公司),Lipofactamine 2000、Protein Marker(Thermo公司,美国),MVP抗体(Santa Cruz Biotechnology,美国),cIAP1抗体、cIAP2抗体、cleaved Caspase 3抗体(Cell Signaling Technology,美国),GAPDH抗体、 α -Tubulin抗体(Proteintech公司,中国), β -actin抗体(上海Abmart公司)。MVP敲降和过表达慢病毒(shRNA-MVP和Lenti-MVP)以及空载体病毒由南京医科大学陈琪教授课题组赠送。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及处理

HAEC使用含10%FBS的EC培养基EGM-2重悬,铺到以明胶包被的培养板内,置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中培养。待细胞生长到培养板表面约80%时,以Z-VAD-FMK(50 μ mol/L)或Nec-1(50 μ mol/L)预处理4h,加入人TNF- α (10 ng/mL)共孵育8h后,收集细胞进行下一步分析。

1.2.2 慢病毒感染及细胞转染

待HAEC生长到培养板表面约80%时,直接加入慢病毒感染细胞以敲降或过表达MVP。siRNA则以Lipofactamine 2000转染HAEC:按照说明书配制转染液和siRNA稀释液,两者混匀后室温下静置20 min,加入到已换液的细胞培养板中。培养72 h后,进行下一步处理与分析。

1.2.3 CCK-8 试验

在96孔板中每孔加入100 μ L的HAEC细胞悬液,密度约5 000个细胞/孔。37 $^{\circ}$ C培养箱中培养24 h后,感染慢病毒。72 h后,以TNF- α (10 ng/mL)处理8 h。贴壁加入10 μ L CCK-8溶液,在37 $^{\circ}$ C孵育1 h后,用酶标仪(ELx800)检测450 nm与600 nm的吸光度值,计算两者的差值。以已知数量细胞绘制细胞活性曲线,计算细胞增殖活力。

1.2.4 流式细胞术

Annexin V结合实验和Caspase 3、Caspase 8活性实验均按试剂盒说明书要求操作。使用不含EDTA的胰酶消化HAEC,以培养液终止消化后,400 g离心5 min,收集细胞。PBS洗涤细胞后,加入FITC-Annexin V/PI染料,或Caspase 3、Caspase 8底物荧光染料避光染色后,以FACSCalibur流式细胞仪(BD Biosciences,美国)进行检测,以FlowJo软件进行数据分析。

1.2.5 RNA提取和荧光定量PCR

使用TRIzol试剂分离提取总RNA。使用逆转录试剂盒将1 μg 总核糖核酸逆转录成cDNA。逆转录温度参数如下:25 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。使用荧光定量试剂盒进行实时聚合酶链反应,热循环参数如下:在95 $^{\circ}\text{C}$ 下初始变性5 min; 40个扩增循环:95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s;最后在72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸20 s。使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法(其中Ct是循环阈值)将相关基因表达量与GAPDH mRNA水平做标准化计算,每个处理组做3个复孔。MVP、IRF2引物由南京擎科公司合成,其他引物均由上海生工公司合成(表1)。

表1 荧光定量PCR引物序列

Table 1 Primer sequences for real-time PCR

基因名称	引物序列(5'→3')
Caspase 8	F: AGGGACAGGAATGGAACAC R: TGTCAGTCATAGATGGGG
cIAP1(BIRC2)	F: TGTGGTGGGAAGCTCAGT R: GACATCATCATTGCGACCC
cIAP2(BIRC3)	F: AGGTGTTGGGAATCTGG R: TGGGCTGTCTGATGTG
CYLD	F: AGGGTGAGGATGGTTCT R: CGAGAGTTGGAAGGCA
FADD	F: GCCTAGACCTCTTCTCC R: AGCCAGCCTTCTCCA
FLIP(CFLAR)	F: TCTGGTTTTGCGGAGC R: GCAGGCAGTCAACTTC
RIP1	F: AGTAATCCCAACCCTC R: GGGTCTGTGGAACAC
TRADD	F: ATCTGAAGTGGGCTC R: TGCGCCATTTGAGACC
TRAF2	F: TACTGCTCCTTCTGCCT R: GGACATTCGGTCAGCAT
TNFR1(TNFRSF1A)	F: AACCTCAACTGTCACC R: ACCAGTCCAATAACCCC
GAPDH	F: GAGTCAACGGATTTGGTCGT R: GGTGCCATGGAATTTGCCAT

1.2.6 蛋白质免疫印迹(Western blot)

在冰上以蛋白裂解液裂解HAEC细胞,提取总蛋白。经BCA试剂盒测量蛋白浓度后,取含等量(20~30 μg)蛋白质的裂解液,于95 $^{\circ}\text{C}$ 加热5 min。以SDS聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)分离样品中的蛋白质,转到0.22 μm 聚偏氟乙烯(PVDF)膜。将膜置于室温下以5%脱脂奶粉溶液封闭2 h后,加入相应的一抗于4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。第2天,用TBST(含0.1%吐温20)洗涤后,在室温下与辣根过氧化物酶

(HRP)标记的二抗孵育2 h。使用增强型化学发光试剂(ECL)和数字凝胶图像分析系统检测结果。使用Image J软件定量蛋白质表达水平。本研究展示了至少3个独立实验的代表性图像。

1.3 统计学方法

所得数据采用GraphPad Prism软件作图,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组数据的差异通过 t 检验进行分析,多组之间的比较采用单因素方差分析。所有实验至少独立重复3次, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MVP促进HAEC增殖,抑制HAEC死亡

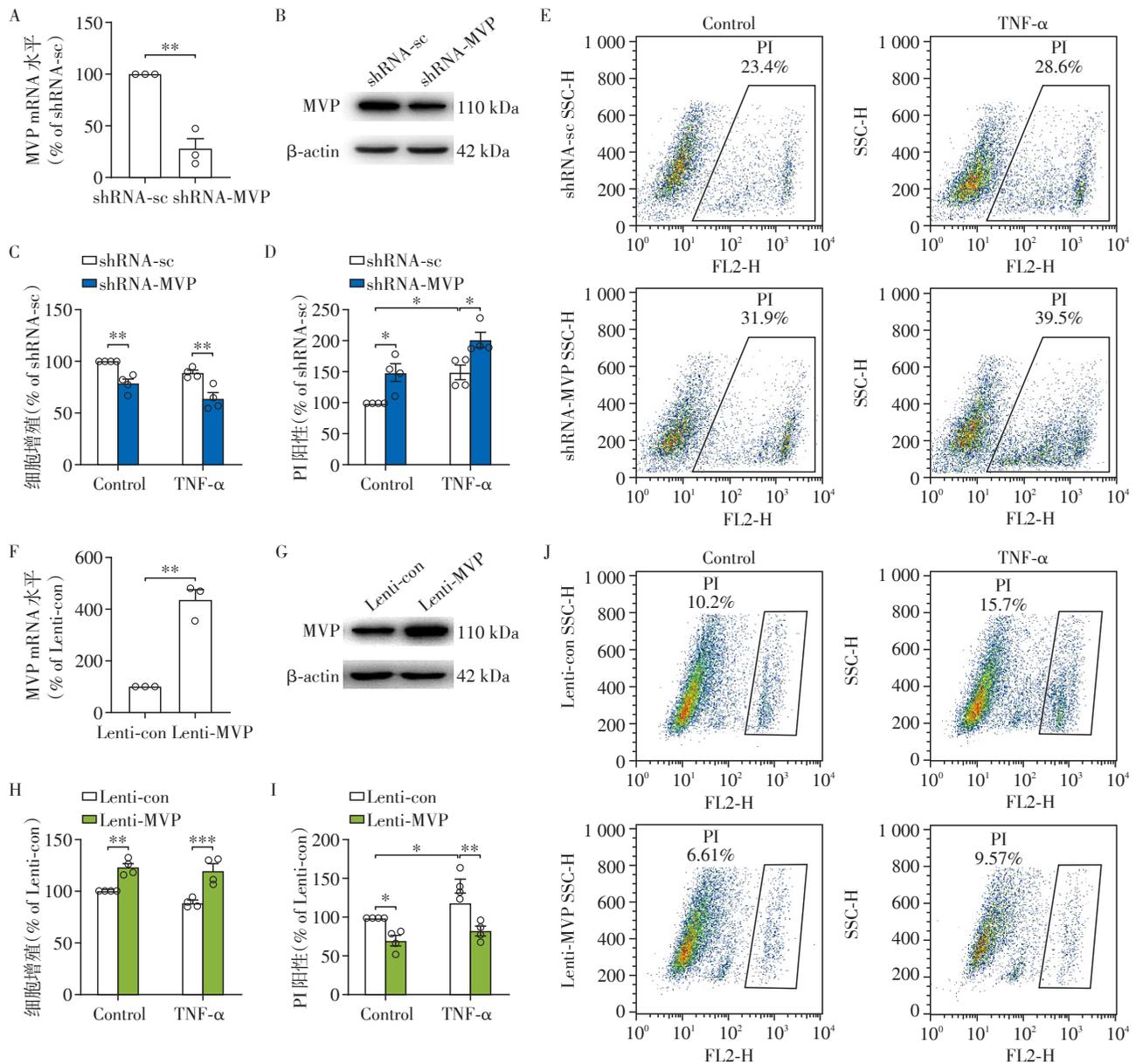
为探究MVP对HAEC增殖活性的影响,使用慢病毒在HAEC中敲降MVP。荧光定量PCR和蛋白Western blot均验证敲降效率($P < 0.01$,图1A、B)。CCK-8法检测MVP对HAEC增殖的影响,结果显示,与对照组相比,敲降MVP显著降低HAEC基底增殖活性($P < 0.01$,图1C)。TNF- α 是促细胞死亡的炎性细胞因子,10 ng/mL的TNF- α 处理8 h后,降低了HAEC增殖水平。在MVP被敲降的HAEC中,其增殖进一步降低。与该结果相一致,流式细胞术检测PI阳性细胞,结果显示,敲降MVP显著增加基底以及TNF- α 诱导的细胞死亡($P < 0.05$,图1D、E)。

在HAEC中过表达MVP,荧光定量PCR和Western blot均验证过表达效率($P < 0.01$,图1F、G)。在基底或TNF- α 处理时,MVP过表达均促进HAEC增殖(图1H)、抑制HAEC死亡(图1I、J)。以上结果证实,MVP对HAEC具有保护作用。

2.2 MVP抑制TNF- α 诱导的HAEC凋亡

使用两种抑制剂评估MVP对HAEC死亡的调控:①Z-VAD-FMK(简写Z-VAD),一种广谱的半胱氨酸蛋白酶(Caspase)抑制剂,阻断凋亡通路;②Necrostatin-1(简写Nec-1),是受体相互作用蛋白1(receptor-interacting protein 1, RIP1)的激酶抑制剂,被认为是坏死性凋亡的阻断剂。结果显示,Z-VAD可以显著逆转MVP敲降引起的HAEC死亡($P < 0.01$,图2A、B),而使用Nec-1对敲降MVP引起的HAEC死亡无明显影响(图2C、D),提示细胞凋亡参与了MVP缺失导致的HAEC死亡。

以流式细胞术检测Annexin V结合与Caspase 3活性,以Western blot检测Caspase 3剪切体,均证实敲降MVP增加TNF- α 诱导的HAEC凋亡($P < 0.01$,图2E~G),过表达MVP则完全相反($P < 0.05$,图



A、B: HAEC 感染 MVP 敲降慢病毒 (shRNA-MVP) 后,以定量 PCR (A) 和 Western blot (B) 验证 MVP 敲降效率 ($n=3$), shRNA-sc 为空载体对照; C: CCK-8 法检测敲降 MVP 后 HAEC 增殖活性 ($n=4$); D、E: HAEC 细胞经 PI 标记后,以流式细胞术检测细胞死亡率 ($n=4$) 的定量图 (D) 和流式点状图代表图 (E); F、G: HAEC 感染 MVP 过表达慢病毒 (Lenti-MVP) 后,以定量 PCR (F) 和 Western blot (G) 验证 MVP 过表达效率 ($n=3$), Lenti-con 为空载体对照; H: CCK-8 法检测过表达 MVP 后 HAEC 增殖活性 ($n=4$); I、J: HAEC 细胞经 PI 标记后,以流式细胞术检测细胞死亡率 ($n=4$) 的定量图 (I) 和流式点状图代表图 (J)。两组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图1 MVP 促进 HAEC 增殖和抑制 HAEC 死亡

Figure 1 MVP promoted HAEC proliferation and inhibited HAEC death

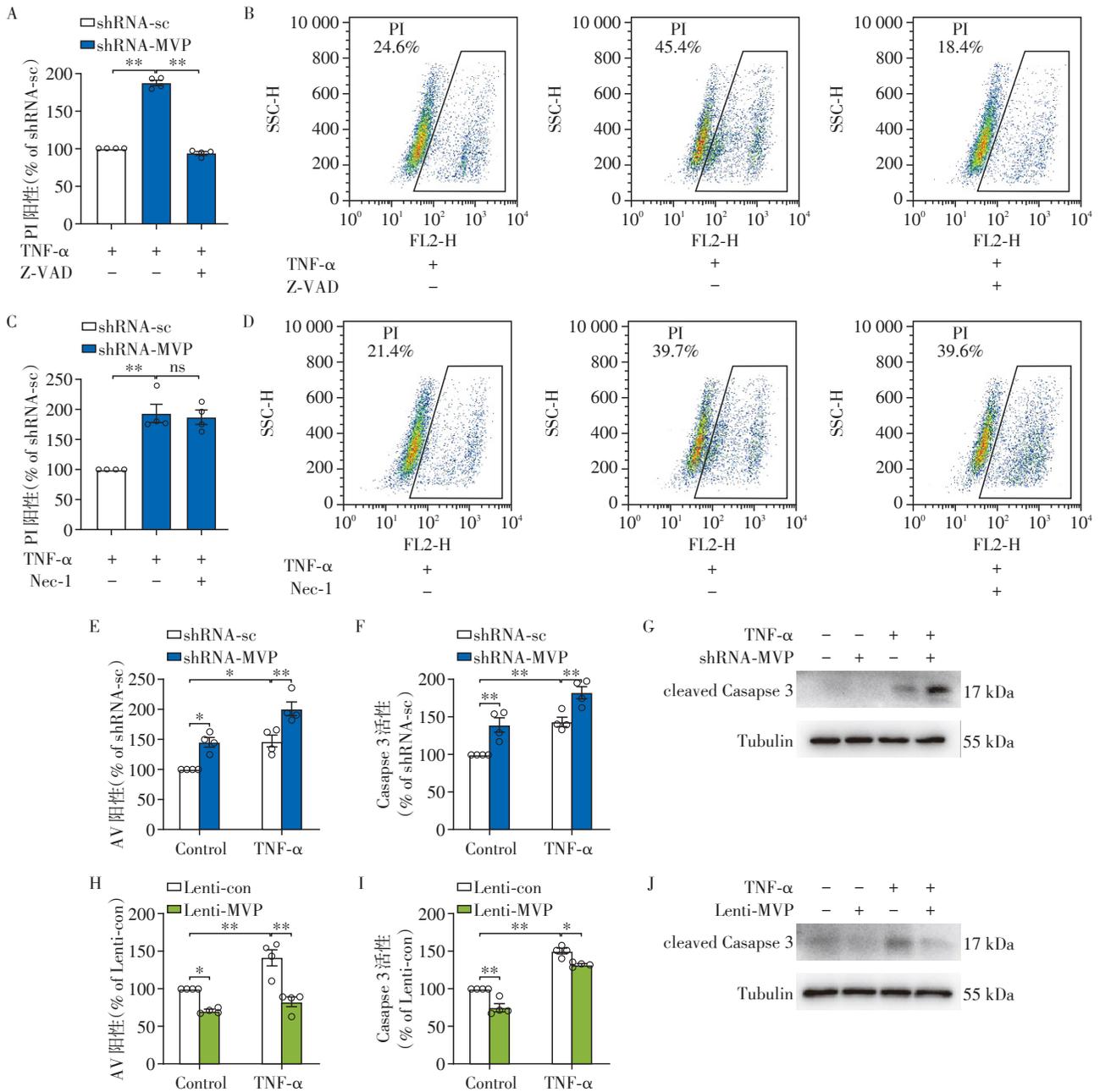
2H~J)。这些结果表明 MVP 抑制 TNF- α 诱导的 HAEC 凋亡。

2.3 MVP 促进凋亡抑制蛋白 cIAP1 的转录表达

本研究探究 MVP 与外源性凋亡之间的调控关系。流式细胞术结果显示, TNF- α 可诱导外源性凋亡关键分子 Caspase 8 的活性增高 ($P < 0.01$), 敲降 MVP 增加 TNF- α 诱导的 Caspase 8 活性 ($P < 0.001$,

图 3A), 而过表达 MVP 抑制 TNF- α 诱导的 Caspase 8 活性 ($P < 0.05$, 图 3B)。结果提示外源性凋亡通路参与了 MVP 敲降引起的 HAEC 凋亡。

为了进一步探究机制, 检测了 Caspase 8 通路相关分子 (包括 FADD、FLIP、RIP1、cIAP1/2、CYLD、TRADD、TNFR1 和 TRAF2) mRNA 表达水平。结果显示, 凋亡抑制蛋白 cIAP1/2 的 mRNA 水平在敲降



A-D: 流式细胞术检测 Z-VAD(50 μmol/L)(A、B)、Nec-1(50 μmol/L)(C、D)对敲降 MVP 后 HAEC 死亡的影响(n=4);E、F: 流式细胞术检测敲降 MVP 后细胞的 Annexin V 结合(E)和 Caspase 3 活性(F)(n=4);G: Western blot 检测敲降 MVP 后 Caspase 3 剪切体蛋白表达;H、I: 流式细胞术检测过表达 MVP 后 Annexin V 阳性率(H)和 Caspase 3 活性(I)(n=4);J: Western blot 检测过表达 MVP 后 Caspase 3 剪切体蛋白表达。两组比较,**P* < 0.05,***P* < 0.01。

图2 MVP抑制TNF-α诱导的HAEC凋亡

Figure 2 MVP inhibited TNF-α-induced HAEC apoptosis

MVP时显著降低(*P* < 0.05, 图3C)。Western blot 检测其蛋白水平变化,发现敲降 MVP 降低 cIAP1 的蛋白表达,过表达 MVP 升高 cIAP1 的蛋白表达,而 MVP 的缺失或过表达对 cIAP2 的蛋白表达水平都无明显的影响(图3D、E)。定量 PCR 结果显示,在基底以及 TNF-α 处理条件下,过表达 MVP 均增加 cIAP1 的 mRNA 表达水平(*P* < 0.05, 图3F)。

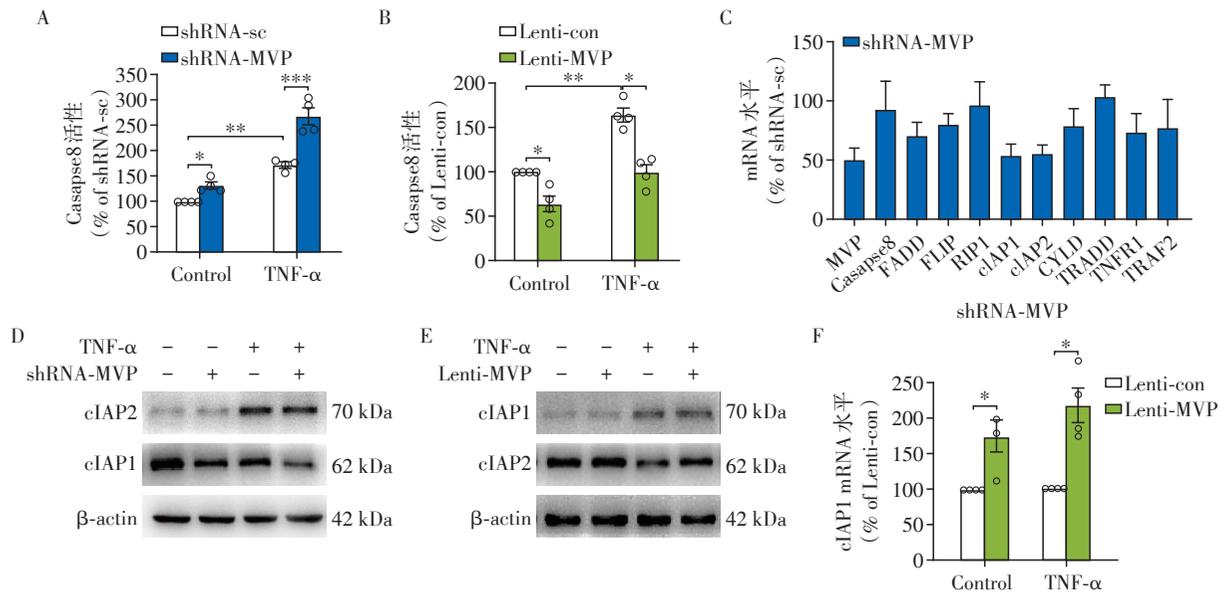
2.4 cIAP1 敲降逆转 MVP 过表达导致的凋亡抑制
为了探究 MVP 是否通过 cIAP1 调控 HAEC 凋亡,使用 cIAP1 siRNA 降低 cIAP1 的表达(图4A)。流式细胞术结果显示,与对照组相比,敲降 cIAP1 恢复了过表达 MVP 导致的 Caspase 3 活性、Caspase 3 剪切体蛋白表达以及 Annexin V 阳性率降低(*P* < 0.01, 图4B-E)。这些结果表明 MVP 通过增加

cIAP1的转录表达进而抑制HAEC凋亡。

2.5 MVP通过上调IRF2介导cIAP1表达升高,实现对凋亡的抑制

为了进一步探究MVP对cIAP1的作用机制,通

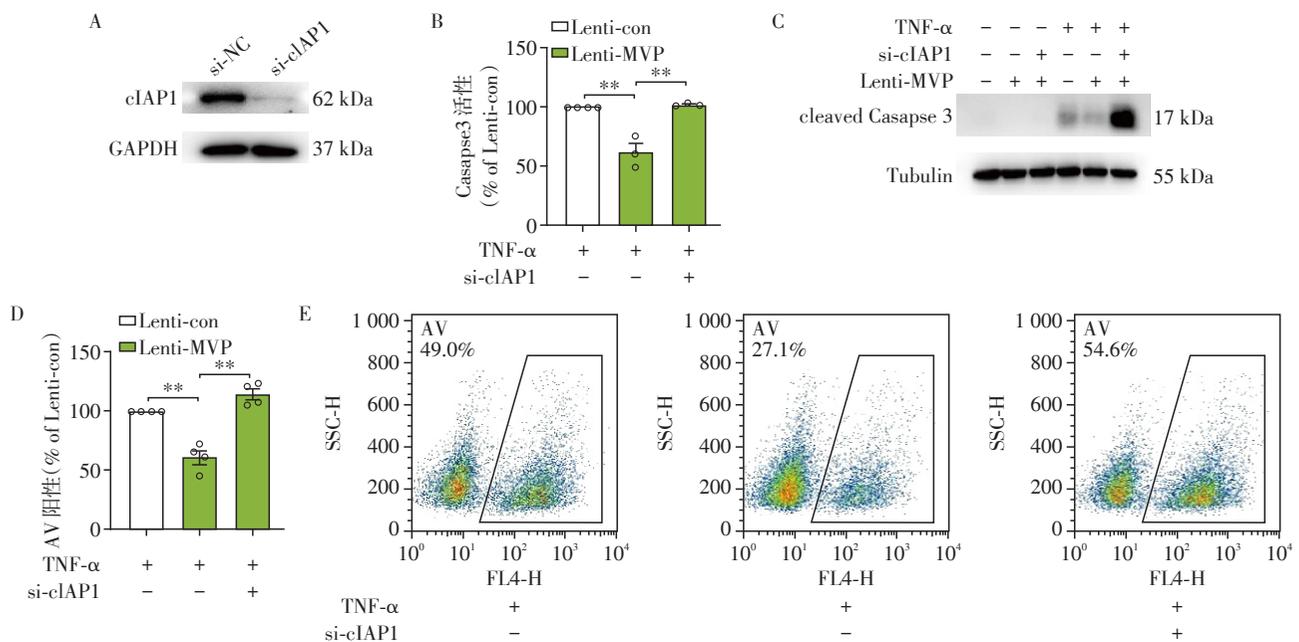
过JASPAR网站预测转录因子干扰素调节因子2(interferon regulatory factor 2, IRF2)可与BIRC2启动子结合,因此将IRF2作为下一步探究靶标。免疫印迹结果显示,过表达MVP上调IRF2蛋白表达水平(图



A、B: 流式细胞术检测敲降(A)和过表达MVP(B)后细胞 Caspase 8 活性($n=4$); C: 荧光定量PCR法检测在TNF- α 处理的细胞中敲降MVP后 Caspase 8 通路相关分子的mRNA表达水平($n=4$); D、E: Western blot检测敲降(D)和过表达MVP(E)后cIAP1、cIAP2蛋白表达; F: 荧光定量PCR法检测过表达MVP后cIAP1的mRNA表达。两组比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ 。

图3 MVP促进cIAP1的转录表达

Figure 3 MVP promoted cIAP1 transcriptional expression



A: 敲降cIAP1后检测cIAP1表达; B: 流式细胞术检测过表达MVP同时敲降cIAP1后Caspase 3活性($n=3$); C: Western blot检测过表达MVP同时敲降cIAP1后Caspase 3 剪切体蛋白表达; D、E: 流式细胞术检测过表达MVP同时敲降cIAP1后Annexin V阳性率($n=4$)。两组比较, $^{**}P < 0.01$ 。

图4 cIAP1敲降逆转MVP过表达引起的HAEC凋亡抑制

Figure 4 cIAP1 knockdown reversed HAEC apoptosis inhibited by MVP overexpression

5A、B)。IRF2 siRNA 显著下调 cIAP1 的 mRNA 和蛋白表达水平(图 5C~E)。

流式检测 IRF2 对 HAEC 凋亡的影响。结果显示, IRF2 敲降后 HAEC 凋亡大量升高, 表现为 Annexin V 结合细胞数增多和 Caspase 3 活性的升高($P < 0.05$, 图 5F、G)。

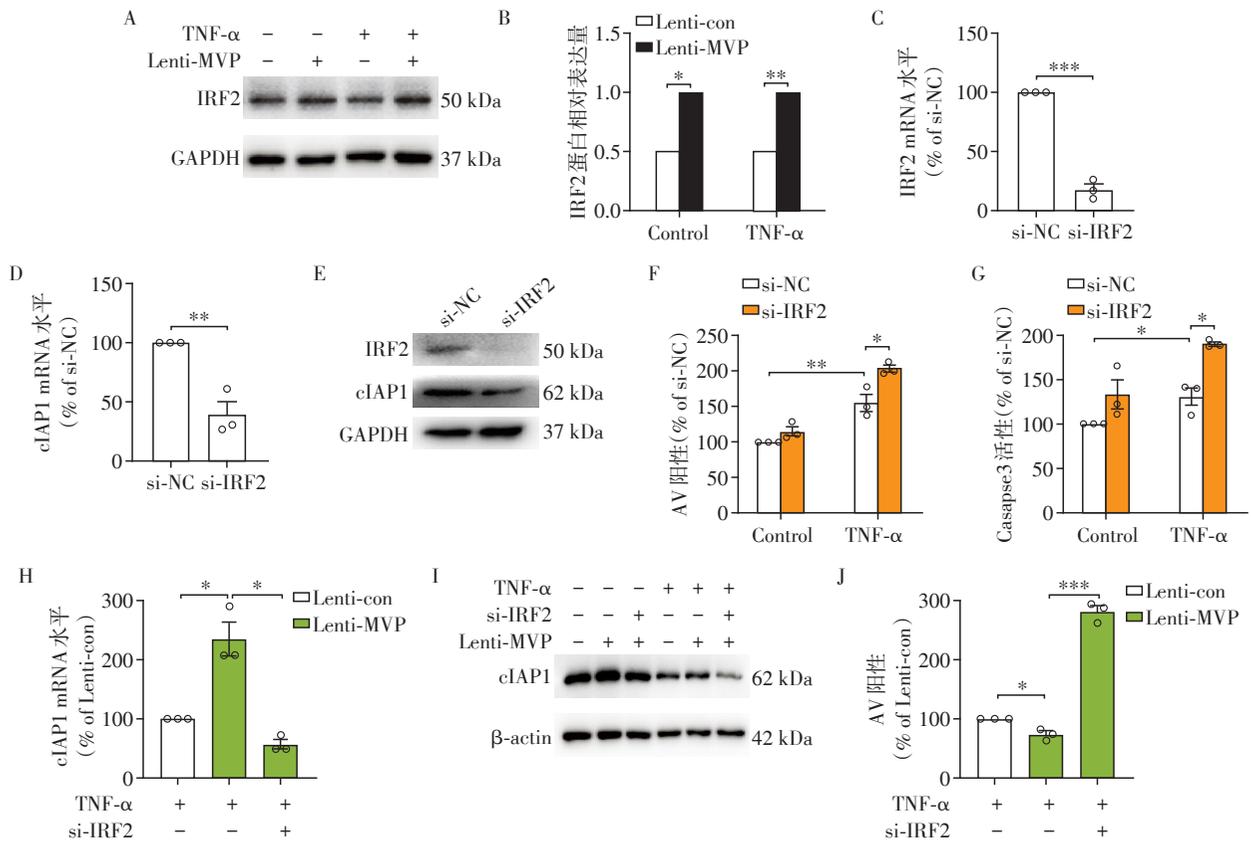
进一步研究显示, 敲降 IRF2 明显逆转过表达 MVP 导致的 cIAP1 表达升高($P < 0.05$, 图 5H、I)和 HAEC 凋亡抑制($P < 0.001$, 图 5J)。

3 讨论

EC 生存与死亡动态平衡被危险因素打破造成内皮损伤, 被认为是动脉粥样硬化等多种血管疾病发生的始动环节^[8]。近年来研究发现, MVP 在血管平滑肌细胞增殖活性的调控中发挥着重要的保护作用, 而巨噬细胞中的 MVP 可减弱 IKK-NF- κ B 通路介导的炎症而抑制动脉粥样硬化与肥胖^[7]。本研究对 HAEC

中 MVP 发挥的作用及潜在机制等进行了探索, 揭示 MVP 在 HAEC 细胞增殖与凋亡功能中发挥的作用, 即 MVP 抑制 TNF- α 诱导的 HAEC 凋亡, 促进其增殖。后续研究发现, MVP 可通过上调 IRF2、cIAP1 表达而抑制 HAEC 凋亡。这些结果为阐明 MVP 保护内皮细胞的具体机制提供部分线索, 给临床诊治相关疾病带来启发。

MVP 最初在肿瘤与肿瘤耐药中被广泛研究。研究发现, MVP 能抑制 PTEN, 促进 PI3K/AKT 途径介导的细胞增殖; MVP 也能通过增强 ERK/MAPK 磷酸化水平介导肝癌细胞增殖^[9-10]。MVP 与细胞凋亡的调控关系也十分密切。研究表明, MVP 能通过调控蛋白激酶 p38 抑制凋亡信号^[11]。最新一项研究表明 MVP 通过与 IRF2 互作破坏 IRF2-HDM2 复合物, 释放的 HDM2 导致 p53 降解和转录失活, 从而增加肝癌细胞增殖活性和凋亡耐受性^[12]。MVP 不仅参与细胞内信号转导、核质药物运输, 在先天免疫、病



A、B: Western blot 检测过表达 MVP 后 IRF2 蛋白表达($n=4$); C: 荧光定量 PCR 验证 IRF2 敲降效率($n=3$); D、E: 检测 IRF2 敲降对 cIAP1 的 mRNA(D)和蛋白(E)水平的影响($n=3$); F、G: 流式细胞术检测敲降 IRF2 后细胞的 Annexin V 结合(F)和 Caspase 3 活性(G)($n=3$); H、I: 荧光定量 PCR(H)和 Western blot(I)检测敲降 IRF2 对 MVP 过表达细胞中 cIAP1 表达的影响($n=3$); J: 流式细胞术检测敲降 IRF2 对 MVP 过表达细胞 Annexin V 结合阳性率的影响($n=3$)。两组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图5 MVP通过上调IRF2蛋白介导cIAP1转录表达升高,抑制HAEC凋亡

Figure 5 MVP promoted cIAP1 transcriptional expression by up-regulating IRF2 protein expression thereby inhibiting-HAEC apoptosis

毒感染中也具有重要作用^[13]。在临床研究中,MVP被作为前列腺癌的预后指标^[14]。MVP和抗MVP的自身抗体也可作为类风湿关节炎诊断和预后的生物学标志^[15]。在不同的疾病模型中MVP也有着重要的调控作用,MVP可通过氧化修饰调控人气道平滑肌细胞的存活,在哮喘发生时发挥保护气道平滑肌的作用^[16]。

cIAP1/2分别由基因BIRC2和BIRC3转录,属于IAP家族,IAP家族主要功能是抑制外源信号和内源信号刺激所诱发的细胞凋亡^[17]。研究发现cIAP1/2可通过以下方式抑制TNF- α 诱导的凋亡:①cIAP1/2发挥E3泛素连接酶特性泛素化RIP1,激活NF- κ B,进一步促进自身和其他抗凋亡蛋白,如FLIP、Survivin的转录表达,从而抑制凋亡^[18]。②cIAP1通过直接结合Caspase 3、7、9阻断凋亡^[19]。BIRC2和BIRC3基因串联在11号染色体上,由于它们的高度相似性,有学者认为cIAP1和cIAP2的产生可能是由基因复制引起的,然而一些研究表明,在某些相同环境中它们可能发挥不同的作用:①cIAP1是NF- κ B信号通路中一个关键调节因子,能减轻去神经引起的肌肉萎缩,而cIAP2并不能^[20];②cIAP1在细胞中的表达更丰富、更广泛,其表达水平可以经由泛素化而得到负调控,cIAP1可能是TNF- α 介导的NF- κ B激活的主要调节因子,而cIAP2可能是在cIAP1不足时的“备份”^[21]。这些差异或许是导致cIAP1和cIAP2在同种情形下表现出不同功能的原因。

IRF2属于IRF家族,该家族是一类转录因子,在先天和适应性免疫应答、肿瘤增殖中具有非常重要的调控作用^[22]。研究表明IRF2-INPP4B可诱导自噬并抑制白血病细胞的凋亡^[23],而敲降IRF2可通过升高Caspase 3/7活性促进前列腺癌细胞凋亡^[24],但IRF2与EC凋亡的调控还未见报道。本研究发现IRF2敲降促进HAEC凋亡,表明IRF2在HAEC凋亡调控中可发挥保护性作用。

综上所述,本研究显示,MVP通过促进IRF2表达上调cIAP1,保护HAEC免受TNF- α 诱导的凋亡。本研究首次揭示MVP在动脉EC中具有保护作用,为防治AS等血管疾病提供新思路和理论基础。本研究也存在一些局限性,如未研究MVP的在体表达及作用,寻找到的靶分子可能需要体内模型的进一步验证等。

[参考文献]

[1] PAONE S, BAXTER A A, HULETT M D, et al. Endothelial cell apoptosis and the role of endothelial cell-derived

extracellular vesicles in the progression of atherosclerosis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(6):1093-1106

- [2] 孙冰,王海昌. 动脉粥样硬化性心血管疾病高危人群胆固醇管理的临床研究进展[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2021, 41(10):1546-1551
- [3] LOU L, WANG J, LV F, et al. Y-box binding protein 1(YB-1) promotes gefitinib resistance in lung adenocarcinoma cells by activating AKT signaling and epithelial-mesenchymal transition through targeting major vault protein (MVP)[J]. *Cell Oncol(Dordrecht)*, 2021, 44(1):109-133
- [4] FRASCOTTI G, GALBIATI E, MAZZUCHELLI M, et al. The vault nanoparticle: a gigantic ribonucleoprotein assembly involved in diverse physiological and pathological phenomena and an ideal nanovector for drug delivery and therapy[J]. *Cancers*, 2021, 13(4):707
- [5] DONG X, AKUETTEH P D P, SONG J, et al. Major vault protein(MVP) associated with BRAF(V600E) mutation is an immune microenvironment-related biomarker promoting the progression of papillary thyroid cancer via MAPK/ERK and PI3K/AKT pathways [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9:688370
- [6] 童星,江斌,柏惠,等. 穹窿主体蛋白对血管平滑肌细胞增殖的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(5):539-543
- [7] BEN J, JIANG B, WANG D, et al. Major vault protein suppresses obesity and atherosclerosis through inhibiting IKK-NF- κ B signaling mediated inflammation [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):1801
- [8] 尹超云,潘雅妮,刘彬,等. 丹参酮II A磺酸钠对LPS引起的HUVEC功能异常和凋亡调控作用的研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2020, 40(11):1590-1596
- [9] PIETRAS P, LEŚNICZAK-STASZAK M, KASPRZAK A, et al. MVP expression facilitates tumor cell proliferation and migration supporting the metastasis of colorectal cancer cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(22):12121
- [10] XIAOQIAN W, BING Z, YANGWEI L, et al. DEAD-box helicase 27 promotes hepatocellular carcinoma progression through ERK signaling [J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2021, 20:15330338211055953
- [11] RAYO J, GREGOR R, JACOB N T, et al. Immunoediting role for major vault protein in apoptotic signaling induced by bacterial N-acyl homoserine lactones [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118(12):e2012529118
- [12] YU H, LI M, HE R, et al. Major vault protein promotes hepatocellular carcinoma through targeting interferon regulatory factor 2 and decreasing p53 activity [J]. *Hepatology (Baltimore, Md)*, 2020, 72(2):518-534
- [13] WANG W, XIONG L, WANG P, et al. Major vault protein

- plays important roles in viral infection [J]. *IUBMB Life*, 2020, 72(4):624-631
- [14] RAMBERG H, RICHARDSEN E, DE SOUZA G A, et al. Proteomic analyses identify major vault protein as a prognostic biomarker for fatal prostate cancer [J]. *Carcinogenesis*, 2021, 42(5):685-93
- [15] MARINOU D, KATSIFIS G, BAROUTA G, et al. Major vault protein/lung resistance related protein: a novel biomarker for rheumatoid arthritis [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2020, 39(5):1033-1042
- [16] DAS D, WANG Y H, HSIEH C Y, et al. Major vault protein regulates cell growth/survival signaling through oxidative modifications [J]. *Cell Signal*, 2016, 28(1):12-18
- [17] KUMAR S, FAIRMICHAEL C, LONGLEY D B, et al. The Multiple Roles of the IAP Super-family in cancer [J]. *Pharmacol Ther*, 2020, 214:107610
- [18] VARFOLOMEEV E, GONCHAROV T, VUCIC D. Immunoblot analysis of the regulation of TNF receptor family-induced NF- κ B signaling by c-IAP proteins [J]. *Methods Mol Biol (Clifton, NJ)*, 2021, 2366:109-123
- [19] CHEN J, CHEN X, CHEN X, et al. SM-164 enhances the antitumor activity of adriamycin in human U2-OS cells via downregulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(6):5079-5086
- [20] LALA-TABBERT N, LEJMI-MRAD R, TIMUSK K, et al. Targeted ablation of the cellular inhibitor of apoptosis 1 (cIAP1) attenuates denervation-induced skeletal muscle atrophy [J]. *Skelet Muscle*, 2019, 9(1):13
- [21] LALAOUI N, VAUX D L. Recent advances in understanding inhibitor of apoptosis proteins [J]. *F1000Research*, 2018, 7:F1000 Faculty Rev-1889
- [22] JEFFERIES C A. Regulating IRFs in IFN driven disease [J]. *Front Immunol*, 2019, 10:325
- [23] ZHANG F, ZHU K, LIU L, et al. IRF2-INPP4B axis inhibits apoptosis of acute myeloid leukaemia cells via regulating T helper 1/2 cell differentiation [J]. *Cell Biochem Funct*, 2020, 38(5):582-590
- [24] KNEITZ B, KREBS M, KALOGIROU C, et al. Survival in patients with high-risk prostate cancer is predicted by miR-221, which regulates proliferation, apoptosis, and invasion of prostate cancer cells by inhibiting IRF2 and SOCS3 [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(9):2591-603

[收稿日期] 2023-01-30

(本文编辑:唐震)