

## 低表达核糖体蛋白 L22 对人肺动脉平滑肌细胞增殖的影响

孙 凯,薛 鸿,解卫平,王 虹\*

(南京医科大学第一附属医院呼吸科,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:研究抑制核糖体蛋白 L22(ribosomal protein L22,RPL22)基因表达后对 ET-1 诱导的人肺动脉平滑肌细胞(pulmonary arterial smooth muscle cells,HPASMC)异常增殖的影响。方法:体外原代培养 HPASMC,用 ET-1 诱导其增殖。设计 siRNA-RPL22 干涉片段,瞬时转染 siRNA-RPL22 后培养 HPASMC,检测其增殖状况。采用 Realtime-PCR、Western blot 分别检测 RPL22 mRNA 和 RPL22 蛋白的表达;PCNA、FACScan 流式细胞仪检测细胞增殖。结果:HPASMC 在转染 siRNA-RPL22 后,与对照组相比,RPL22 mRNA 和 RPL22 蛋白的表达都显著减少( $P < 0.05$ );siRNA-RPL22 组 HPASMC 增殖较对照组显著降低。结论:抑制 RPL22 表达后,可抑制 ET-1 诱导的 HPASMC 增殖,提示 RPL22 与 HPASMC 增殖有关,值得进一步深入研究。

**[关键词]** 肺动脉平滑肌细胞;核糖体蛋白 L22;增殖;肺动脉高压

**[中图分类号]** R543.2

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)06-763-05

## The effects of siRNA against RPL22 on the proliferation of human pulmonary arterial smooth muscle cells

SUN Kai, XUE Hong, XIE Wei-ping, WANG Hong\*

(Department of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of small interference RNA (siRNA) against ribosomal protein L22 (RPL22) on ET-1 induced proliferation of human pulmonary arterial smooth muscle cells (HPASMC). **Methods:** The experimental models of primary cultured HPASMC induced by ET-1 were established *in vitro*. HPASMC were transfected with siRNA-RPL22, incubated in smooth muscle cell culture medium (SMCM). The mRNA and protein expression levels of RPL22 in HPASMC were measured by real-time PCR and Western blot, respectively. The HPASMC proliferation was evaluated by PCNA expression and flow cytometry analysis. **Results:** Compared with control groups, RPL22 expression in HPASMC was significantly inhibited after siRNA-RPL22 transfection ( $P < 0.05$ ), and HPASMC proliferation was significantly inhibited after siRNA-RPL22 transfection. **Conclusion:** The data suggest that interruption of RPL22 expression can inhibit HPASMC proliferation. It's a novel finding needs to be further explored.

**[Key words]** pulmonary arterial smooth muscle cell; ribosomal protein L22; proliferation; pulmonary arterial hypertension

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(6): 763-767]

肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)是肺高压最常见的类型,其病理生理基础是肺动脉血管壁的重构<sup>[1]</sup>。在病理情况下,肺动脉血管壁的各层结构都可发生不同程度的增生,导致血管腔狭窄、血管扭曲变形、新生血管形成以及血管丛状改变等病变。在这些病理改变中,尤以构成肺动脉管壁中层结构的人肺动脉平滑肌细胞(human pulmonary arterial smooth muscle cell, HPASMC)增厚最

为显著<sup>[2-3]</sup>。近来发现核糖体蛋白可通过调控蛋白质的翻译而影响蛋白质合成和功能,其在疾病发生发展中的作用引起重视。本课题组前期的研究发现,内皮素-1(endothelin 1, ET-1)刺激 HPASMC 增殖过程中,出现核糖体蛋白 L22(ribosomal protein L22, RPL22)的异常表达,推测 RPL22 可能参与调控 PASMC 的异常增殖<sup>[4]</sup>。本研究抑制 RPL22 表达后,在 ET-1 条件下对 HPASMC 异常增殖的影响。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助(30971319)

\*通讯作者, E-mail: hongwang\_prof@sina.com

SMCM 平滑肌细胞专用培养基(Sciencell 公司, 美国); Fetal Bovine Serum(胎牛血清 FBS, Invitrogen 公司, 美国); 鼠抗人  $\alpha$  平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)单抗(Bioss Biotechnology 公司, 上海); ET-1(Sigma 公司, 美国); 一抗兔抗人 RPL22(Abcam 公司, 美国); X-tremeGENE siRNA 转染试剂(Roche 公司, 德国); PCNA 抗体(Santa Cruz 公司, 美国); CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(Heraeus 公司, 德国); ABI Prism 7300 型荧光定量 PCR 仪(ABI 公司, 美国); 流式细胞仪(FAC-Scan, Becton Dickinson 公司, 德国)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 原代 HPASMC 体外培养和实验分组

肺动脉段取材于南京医科大学第一附属医院胸外科手术的患儿, 实验经江苏省医学伦理委员会审核批准。在无菌条件下分离肺动脉, 仔细剥离肺动脉管壁内皮层和外膜, 将肺动脉平滑肌切成 1 mm × 1 mm × 1 mm 的小块, 按照组织贴块法在 37°C 含 5%CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养。培养液用含有 20%小牛血清的专用培养基 SMCM, 每周换液 2 次。培养 3~4 周, 以 0.25%胰蛋白酶消化传代培养, 取其 3~5 代作为实验用细胞。

实验共分 6 组: 阴性对照组(control): 正常培养的 HPASMC; RPL22 干扰组(siRNA-RPL22): 转染 siRNA-RPL22 条件下培养 HPASMC; 空白对照组(siRNA-NT): 含 siRNA 片段培养 HPASMC; 另外对应的相同条件下加 ET-1(10 nmol/L)刺激的 3 组。

### 1.2.2 设计 siRNA-RPL22 干涉片段

根据报道的人 RPL22 基因序列(GenBank No. NM\_000983)设计、完善基因 siRNA 有效干涉小片段的筛选和验证。设计并筛选了 4 条 siRNA 干涉小片段: ① GCAUUAGAAUUUACGGUGU; ② GUCAAUAAAUGCGGGUUU; ③ ACAAAUUUCUCUUGACGCA; ④ UGGAUUGAGUUGAACGUGU。使用 Thermo Scientific Dharmacon 公司 on-TARGET plus SMARTpool 技术混合 4 条序列后在 293T 细胞验证, 干涉效率在 90%(荧光定量 PCR 水平鉴定), 用于后续试验。

### 1.2.3 细胞转染

使用 X-tremeGENE(Roche 公司, 美国)转染方法, 转染前 24 h HPASMC 按  $1 \times 10^5$  个/ml 密度铺板培养, 然后根据 X-tremeGENE 转染方法步骤予以转染: 0.5  $\mu$ mol siRNA-RPL22 加入 750  $\mu$ l OptiMEM 培养液稀释混匀, 加入 10  $\mu$ l X-tremeGENE 转染试剂, 37°C 孵育 25 min 后再室温放置 15 min, 以使转

染复合体形成。将 X-tremeGENE/siRNA 混合物加入 HPASMC 培养液后, 细胞继续培养 6 h。然后, 吸除培养液加入 SMCM 培养基继续培养细胞。

### 1.2.4 Realtime PCR 检测 RPL22 mRNA 的表达

转染细胞培养 72 h, 收集细胞, RNA 提取使用 TriPure Isolation Reagent 试剂盒(Roche 公司, 美国), 按照说明书进行。提取的总 RNA 用 SYBR Prime Script RT reagent Kit(Takara 公司, 日本)逆转录成 cDNA 备用。根据 GenBank 人 RPL22 和内参  $\beta$ -actin 基因序列, 应用 Prime 软件设计引物, RPL22 mRNA 上游引物序列为: 5'-CATGCCACTTAGGC-CATGACT-3', 下游引物序列为: 5'-TGGTAGCCC-CITTCAGTTGTCTA-3',  $\beta$ -actin 上游引物引物为: 5'-TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT-3', 下游引物序列为: 5'-CACGATGGAGGGGCCGGACTCATC-3'。Real-time PCR 使用 ABI PRISM<sup>®</sup> 7300PCR 仪完成。

### 1.2.5 Western blot 检测 RPL22 蛋白的表达

用 RIPA 裂解液裂解各组细胞, 提取 3 组培养细胞的总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 60 V 电泳 4 h, 40 V 转膜 2 h, 含 5%脱脂奶粉的 TBST 封闭 60 min, 加入 1:1 000 稀释的 RPL22 抗体, 4°C 封闭孵育过夜, 接着将蛋白膜用 TBST 漂洗 3 次, 使用 SuperSignal West Pico 化学发光底物显影, 结果使用 Quantity One 软件分析。

### 1.2.6 流式细胞仪检测

使用流式细胞仪分析细胞周期。将细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔培养板, 按上述实验分组处理后, 收集各组细胞, PBS 洗涤细胞 2 次, 离心弃上清后用 70% 的冷乙醇固定细胞, -20°C 过夜, 分别用核糖核酸酶 A 和碘化丙啶室温避光作用 30 min 后, 用 FACScan 流式细胞仪检测, Cellquest 软件分析细胞周期中各期细胞所占的百分比。

### 1.2.7 细胞免疫荧光法检测 PCNA 蛋白表达

将细胞以  $2 \times 10^4$  个/孔接种于放有盖玻片的 24 孔板中, 按上述实验分组处理后, 用 4% 多聚甲醛固定细胞 10 min, 采用免疫荧光法检测 PCNA 蛋白的表达, PCNA (1:100)一抗 4°C 过夜, 以 PBS 代替一抗作阴性对照。具体步骤参照 SP 法免疫组化试剂盒说明进行, 二氨基联苯胺(DAB)显色, 苏木素复染, 酒精脱水, 二甲苯透明, 封片。阳性判断标准: 细胞核呈棕黄色或棕褐色。每张切片在光学显微镜下随机计数 200 个细胞并计算阳性细胞占细胞总数的百分率。

## 1.3 统计学方法

所有数据采用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 用

SPSS 统计软件进行方差分析,各组间差异采用单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HPASMC 培养和鉴定

采用组织块法原代培养 HPASMC,培养的 HPASMC 经抗  $\alpha$ -肌动蛋白单克隆抗体免疫细胞化学染色鉴定(图 1)。3~4 周细胞生长状态良好,予以传代保种。

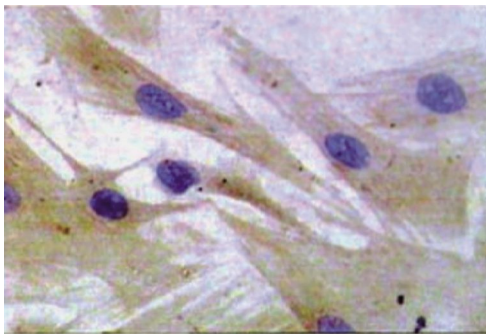


图 1 HPASMC  $\alpha$ -肌动蛋白免疫组化鉴定结果( $\times 400$ )

Figure 1 Immunocytochemical staining for  $\alpha$ -actin in cultured HPASMC( $\times 400$ )

### 2.2 RPL22 基因表达和 RPL22 蛋白水平变化

RT-PCR 检测 RPL22 mRNA 的表达:空白对照组 RPL22 mRNA 表达( $0.88 \pm 0.11$ )与阴性对照组 RPL22 mRNA 表达( $1.00 \pm 0.11$ )比较,无明显变化( $P > 0.05$ );siRNA-RPL22 组 RPL22 mRNA 表达( $0.25 \pm 0.06$ )与空白对照组及阴性对照组比较,均显著降低( $P$  均  $< 0.05$ ,图 2A)。Western blot 检测转染后 3 组细胞 RPL22 蛋白表达情况:细胞培养 24 h 后,siRNA-RPL22 组 RPL22 蛋白的表达较另外两组也明显降低(图 2B)。

### 2.3 PCNA 检测

免疫荧光检测 PCNA,结果提示 siRNA-RPL22 组细胞 PCNA 阳性表达率较其他组细胞降低,提示该组细胞与其他组细胞相比,增殖受到抑制( $P < 0.05$ ,图 3)。

### 2.4 流式细胞术检测

流式细胞检测结果示在无 ET-1 刺激条件下,siRNA-RPL22 组的 S 期和 G2/M 期细胞占 ( $4.4 \pm 2.6$ )%和 ( $6.8 \pm 1.9$ )%,较 siRNA-RPL22 和 siRNA-NT 组细胞明显减少;ET-1 刺激下,siRNA-RPL22+ET-1 组的 S 期和 G2/M 期细胞占 ( $7.4 \pm 1.7$ )%和 ( $7.8 \pm 1.4$ )%,较 siRNA-RPL22 + ET-1 和 siRNA-NT + ET-1 组细胞也显著降低( $P < 0.05$ ,图 4)。

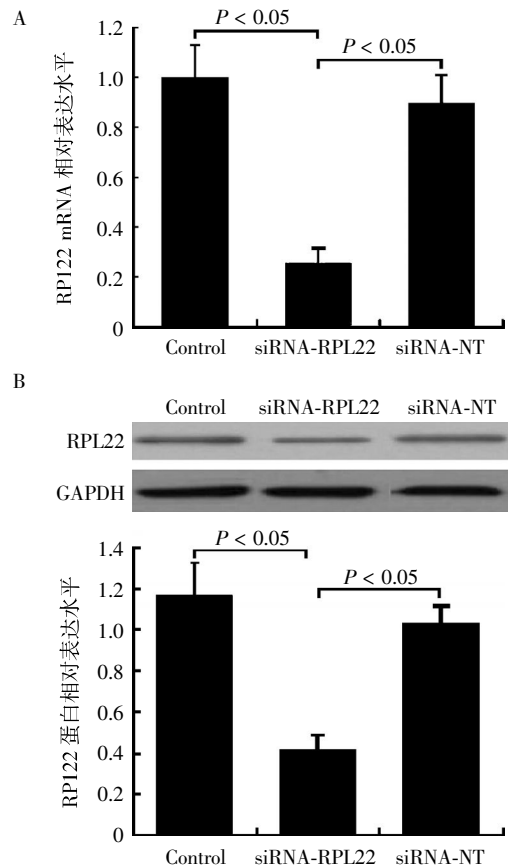


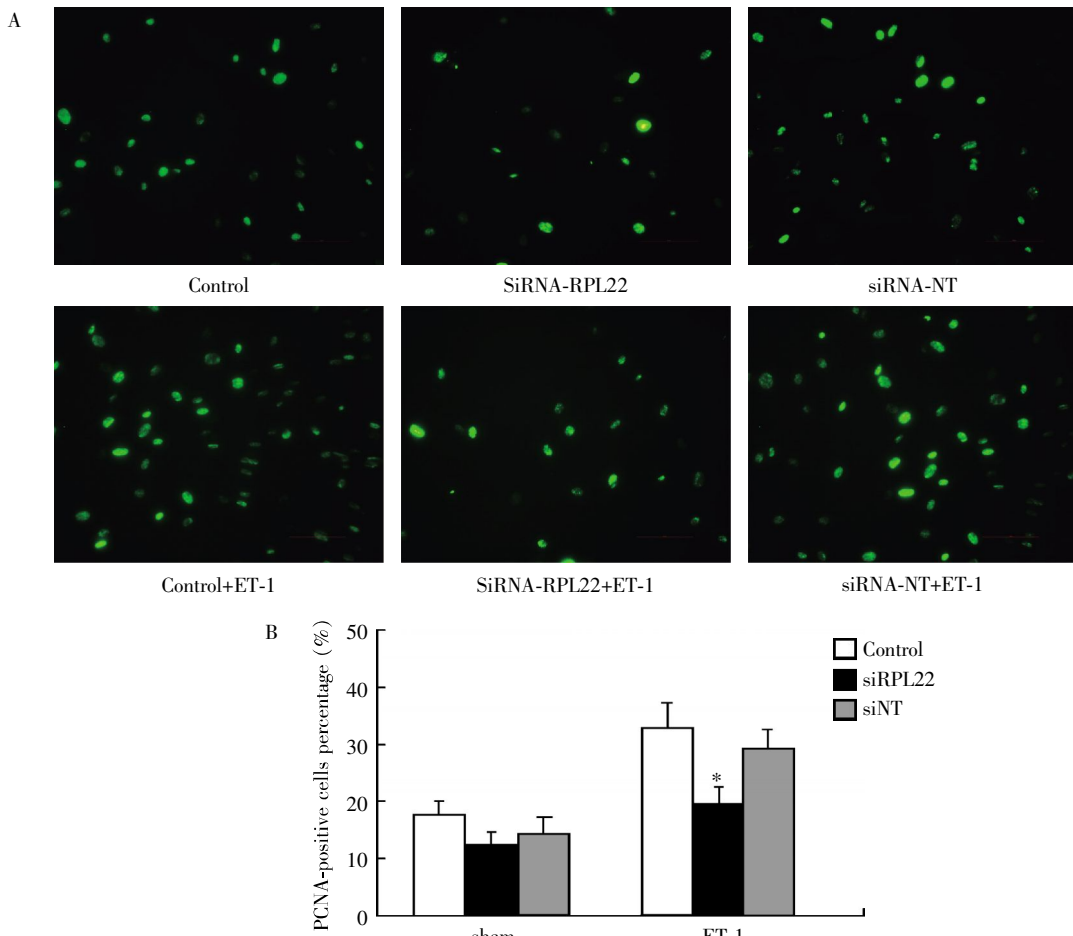
图 2 siRNA 转染后 RPL22 表达检测结果

Figure 2 SiRNA treatment reduced RPL22 expression in HPASMC

## 3 讨论

PAH 显著的病理生理变化为肺动脉血管壁的正常增厚。研究显示,包括 ET-1<sup>[5]</sup>、5-HT 系统<sup>[6]</sup>、K<sup>+</sup>通道<sup>[7]</sup>以及 BMPR-II<sup>[3]</sup>等多种因子参与了 PASMC 的异常增殖。肺血管壁异常增殖最显著的是 PASMC 的异常增殖<sup>[2]</sup>,具体的调控机制至今尚未完全清楚。

本课题组在研究 Iptakalim 在肺动脉高压中的作用时,发现 RPL22 异常表达,推测 RPL22 可能参与了 HPASMC 异常增殖的调控<sup>[4]</sup>。RPL22 是随着人们对核糖体认识的加深,越来越多的研究证实了核糖体对人类疾病的发生发展起到重要的作用<sup>[9]</sup>。真核细胞的核糖体具有 80 多种核糖体蛋白,主要功能是参与蛋白质的合成<sup>[10]</sup>。有些核糖体蛋白已明确与人类的某些疾病有关,如 RPL5、RPL11 和 RPS17 基因的变异可引起 Diamond Blackfan 贫血<sup>[11]</sup>。既往的研究发现 RPL22 的异常表达可引起蛋白翻译和表达的异常,从而影响蛋白质的功能<sup>[12]</sup>。在 T 淋巴细胞前体细胞分化和发育的实验研究中,RPL22 基因表达的缺失能通过选择性上调 P53 基因的表达,起到



A: 细胞免疫荧光法检测 PCNA 阳性细胞; B: PCNA 阳性细胞百分比结果, 与其他两组比较, \* $P < 0.05$ 。

图 3 免疫荧光检测 PCNA 阳性细胞

Figure 3 PCNA-positive cells measured by immunofluorescence assay

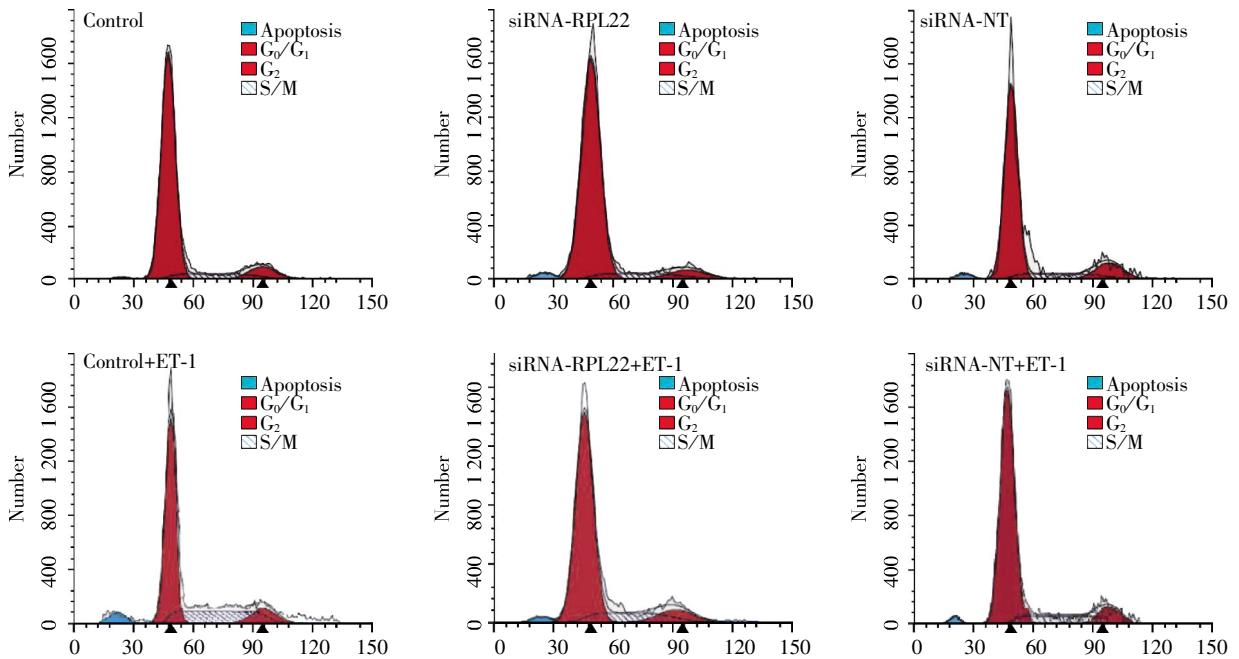


图 4 siRNA-RPL22 转染后 HPASMC 细胞周期的变化

Figure 4 Effect of siRNA-RPL22 transfection on cell cycle alterations of HPASMC

调节 T 淋巴细胞分化的功能<sup>[13]</sup>。由于 RPL22 在 HPASMC 增殖中的表达异常,有理由推测其可能参与了 HPASMC 的增殖调控。

本课题使用 siRNA 干涉 RPL22 的表达来观察其对 HPASMC 增殖的影响,并使用 ET-1 作为促进 HPASMC 增殖的因素。ET-1 通过激活 HPASMC 细胞膜表面 ETA 受体,促进 c-fos,c-myc 等的 mRNA 水平升高实现促增殖作用<sup>[14]</sup>。本研究结果显示,在 ET-1 作用下,HPASMC 出现了明显的增殖。随后运用转染 siRNA-RPL22 的方法抑制 RPL22 的表达,通过检测 RPL22 mRNA 和 RPL22 蛋白的表达,验证抑制 RPL22 的作用,最后通过检测细胞 PCNA 的表达和细胞周期的变化观察 HPASMC 增殖情况。结果显示,HPASMC 转染 siRNA-RPL22 后,RPL22 表达显著降低,达到抑制 RPL22 的目的。抑制 RPL22 表达后,HPASMC 增殖与对照组相比明显受到抑制,在 ET-1 刺激条件下,抑制作用更明显。同时发现,抑制 RPL22 表达后,在普通培养基中培养的 HPASMC 的增殖也受到了抑制。这一现象说明 RPL22 可能作为一个独立因素影响 HPASMC 的增殖。由于 RPL22 为核糖体蛋白,主要参与蛋白质的翻译,推测 RPL22 是某些促增殖、调节蛋白合成所必需的,抑制了 RPL22,从而减少了促增殖蛋白的合成,继而抑制细胞增殖;而在 ET-1 促增殖的条件下,这种抑制作用更明显。本课题首次证实了抑制 RPL22 表达可抑制 HPASMC 增殖的现象,为阐明 PAH 发病机制提供了新的实验依据,但 RPL22 参与调控 HPASMC 增殖的机制尚不明确,值得进一步深入研究。

#### [参考文献]

- [1] Galie N,Hoeper MM,Humbert M,et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension [J]. Eur heart J,2009,30(20):2493-2537
- [2] Mandegar M,Fung YC,Huang W,et al. Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension [J]. Microvasc Res,2004,68(2):75-103
- [3] Morrell NW,Adnot S,Archer SL,et al. Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension [J]. J Am Coll Cardiol,2009,54(1):s20-31
- [4] Yang M,Liu Z,Zhang S,et al. Proteomic analysis of the effect of iptakalim on human pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation [J]. Acta Pharmacol Sin,2009,30(2):175-183
- [5] Humbert M,Montani D,Perros F,et al. Endothelial cell dysfunction and cross talk between endothelium and smooth muscle cells in pulmonary arterial hypertension [J]. Vascul Pharmacol,2008,49(4):113-118
- [6] Maclean MR,Dempsey Y. The serotonin hypothesis of pulmonary hypertension revisited[J]. Adv Exp Med Biol,2010,661:309-322
- [7] Burg ED,Remillard CV,Yuan JX. Potassium channels in the regulation of pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and apoptosis:pharmacotherapeutic implications[J]. Br J Pharmacol,2008,153(Suppl1):S99-S111
- [8] Sakao S,Tatsumi K,Norbert FV. Endothelial cells and pulmonary arterial hypertension:Apoptosis proliferation, interaction and transdifferentiation [J]. Respir Res,2009,10(1):95-103
- [9] Uechi T,Tanaka T,Kenmochi N. A complete map of the human ribosomal protein genes:assignment of 80 Genes to the cytogenetic map and implications for human disorders[J]. Genomics,2001,72(3):223-230
- [10] Robledo S,Idol RA,Crimmins DL,et al. The role of human ribosomal proteins in the maturation of rRNA and ribosome production[J]. RNA,2008,14(9):1918-1929
- [11] Cmejla R,Cmejlova J,Handrkova H,et al. Ribosomal protein S17 gene (RPS17) is mutated in Diamond-Blackfan anemia[J]. Hum Mutat,2007,289(12):1178-1182
- [12] Verdun DH. Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle[J]. Nucleus,2011,2(3):189-194
- [13] Anderson SJ,Lauritsen JP,Hartman MG,et al. Ablation of ribosomal protein L22 selectively impairs  $\alpha$ T cell development by activation of a p53 dependent checkpoint[J]. Immunity,2007,26(6):759-772
- [14] Davie N,Haleen SJ,Upton PD,et al. ETA and ETB receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells [J]. Am J Respir Crit Care Med,2002,165(3):398-405

[收稿日期] 2012-01-17