穹窿主体蛋白对血管平滑肌细胞增殖的影响

童　星,江　斌,柏　惠,陈　琪*

(南京医科大学病理生理学系,江苏　南京　211166)

[摘　要]　**目的**:探讨穹窿主体蛋白(major vault protein,MVP)对血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,VSMCs)增殖的影响。**方法**:分离培养野生型小鼠 VSMCs,用血小板源性生长因子(PDGF-BB)或 15% 胎牛血清(FBS)刺激 VSMCs 增殖,Western blot 检测 VSMCs 的 MVP 表达水平,同时检测特异性分化标记物 α-SMA 和 SM22α 表达水平。然后用 PDGF-BB 刺激人主动脉平滑肌细胞(HAoSMCs),检测 MVP 的表达差异。再分别分离培养野生型小鼠和 MVP 敲除型小鼠的 VSMCs,通过 CCK8 细胞增殖实验检测两者的增殖能力;同时用 siRNA 干扰的方法,使 HAoSMCs 中 MVP 低表达,检测其增殖能力的变化。**结果**:用 PDGF-BB 或 15% FBS 刺激 VSMCs 后,MVP 表达水平呈浓度和时间依赖性下降,α-SMA 和 SM22α 表达水平也相应降低。MVP 缺失或低表达情况下,VSMCs 的增殖能力均下降。**结论**:MVP 在 VSMCs 增殖中起了重要作用。

[关键词]　穹窿主体蛋白;小鼠主动脉平滑肌细胞;人主动脉平滑肌细胞;增殖

[中图分类号]　R329.26　　[文献标志码]　A　　[文章编号]　1007-4368(2016)05-539-05

doi:10.7655/NYDXBNS20160506

Effects of major vault protein on the proliferation of vascular smooth muscle cells

Tong Xing,Jiang Bin,Bai Hui,Chen Qi*

(*Department of Pathophysiology,NJMU,Nanjing 211166,China*)

[**Abstract**]　**Objective**:To investigate the effects of major vault protein(MVP)on the proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs). **Methods**:The wild-type mouse VSMCs were isolated,and cultured,and the human aortic smooth muscle cells(HAoSMCs) were used. Western blot analysis was used to determine the MVP,α-SMA and SM22α. Expression of MVP stimulated by platelet-derived growth factor(PDGF-BB)or 15% fetal bovine serum(FBS) was measured. MVP siRNA was used to downregulate the MVP expression in HAoSMCs. Cell proliferation CCK-8 assay was conducted to detect the proliferation ability of VSMCs in the case of MVP deficiency or downregulation. **Results**:After the treatment of PDGF-BB or 15% FBS,the MVP expression of VSMCs was downregulated in a time-dependent and dose-dependent manner. Compared with wild-type mouse VSMCs,the proliferation of MVP in knockout mouse VSMCs was suppressed. MVP siRNAs inhibited FBS-induced HAoVSMCs proliferation. **Conclusion**:MVP may played crucial effects in the proliferation of the VSMCs.

[**Key words**]　major vault protein; primary mouse aortic vascular smooth muscle cells; human aortic smooth muscle cells; proliferation

[Acta Univ Med Nanjing,2016,36(05):539-543]

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,VSMCs)存在于血管内膜内皮细胞下的中膜层,是构成血管壁的重要组成部分。当血管内皮损伤时,局部释放细胞因子和生长因子,刺激 VSMCs 从中膜层迁移至内膜层并大量增殖来参与损伤修复。当这种修复作用过度时,将引起 VSMCs 异常增殖,从而导致血管腔狭窄[1]。

穹窿主体蛋白(major vault protein,MVP),也称为肺耐药相关蛋白 (lung resistance-related protein,LRP),是穹窿体的主要成分,其最早作为肿瘤多药耐药相关蛋白被 Scheffer 等[2]发现。穹窿体是一种重要的细胞器,广泛存在于从黏菌直至人的多个物种中,在真核生物中高度保守,说明其在细胞生理过程中起重要作用[3]。近年来很多研究表明,MVP 是一个重要的信号通路调节蛋白,可通过调节细胞内人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源

[基金项目]　国家自然科学基金重点项目(81230070);973 项目(2012CB517503)

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

基因(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten,PTEN)蛋白的分布来调节 PI3K-AKT 信号通路[4],以及影响 MAPK 磷酸化水平,从而参与细胞周期的调控[5]。Daniela 等[6]发现 MVP 可通过上调 EGFR/PI3K 信号通路促进脑胶质瘤细胞的生长和迁移能力。最近 Das 等[7]报道 MVP 通过氧化修饰来调节人类气道平滑肌细胞的生长和存活。然而,目前尚未见文献报道 MVP 在 VSMCs 增殖中的作用。本实验选用小鼠原代 VSMCs 和人 HAoSMCs 系,检测 MVP 在这两种 VSMCs 增殖时的表达差异,以及 MVP 在 VSMCs 增殖过程中所起的作用。再通过检测在 MVP 缺失或低表达的情况下,VSMCs 增殖能力的改变,进一步验证 MVP 对 VSMCs 增殖的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

Lipofectamine™ RNAi MAX(Invitrogen 公司,美国),HAoSMCs(ATCC 公司,美国),PDGF-BB(Sigma-Aldrich 公司,美国),FBS(Gibco 公司,美国),DMEM/F12 培养基(HyClone 公司,美国),胰蛋白酶、青霉素、链霉素(Gibco 公司,美国),LRP 抗体(Santa Cruz Biotechnology 公司,美国),α-SMA 抗体、SM22α 抗体(Abcam 公司,美国),GAPDH 抗体(Sigma-Aldrich 公司,美国),HRP 标记的羊抗小鼠、羊抗兔和兔抗羊 IgG(生兴生物公司,中国),CCK8 Cell Counting Kit(南京诺唯赞生物科技有限公司),BCA 蛋白定量试剂盒(Pierce 公司,美国),预染标准蛋白质 Marker(Fermentas 公司,美国),蛋白电泳系统(BIO-RAD 公司,美国)。

MVP 基因敲除型小鼠($MVP^{-/-}$)由荷兰 Erasmus 大学 Erik A.C. Wiemer 教授实验室提供,实验采用 6 周龄雄性 $MVP^{-/-}$小鼠,同周龄、性别的 C57BL/6J 小鼠作为野生型对照。两种小鼠都由南京医科大学医药实验动物中心饲养,所有实验操作符合 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH 颁布,No 85~23)要求,获得南京医科大学动物保护委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 分离及培养小鼠 VSMCs

选择 6 周龄雄性小鼠,戊巴比妥钠麻醉小鼠,在无菌条件下取出小鼠胸主动脉血管,剥离周围结缔组织,置于盛有 PBS 的平皿,用无菌刀片刮除内膜面,取出中膜层转移至盛有 FBS 的培养基中,切成 1 cm × 1 cm 大小的组织块,用已消过毒的玻片盖上,置于 37℃ 5%CO_2 孵箱,7 d 后长满,传代,用第 3~6 代细胞做实验。

1.2.2 siRNA 转染 HAoSMCs

将 HAoSMCs 种于 6 孔板中,采用脂质体法(Lipofectamine™ RNAiMAX)进行转染。将 2 种 siRNA 各 6 μL 与等容积的脂质体分别溶于 100 μL opti-MEM 培养基中,并在 5 min 内将以上 2 种液体轻轻混匀,室温下静置。在 6 孔板每孔中加入无血清的 DMEM/F12 培养液 800 μL,再将以上 siRNA 和脂质体混合物 200 μL 滴加至每孔中,轻轻摇匀。将细胞置于标准培养条件下,6~8 h 后更换新鲜正常培养基继续培养。

针对人类 MVP 基因的 2 对 siRNA 及阴性对照 siRNA (siRNA-N),均由上海吉玛制药公司设计合成。其核苷酸序列见表 1。

表 1 MVP siRNA 核苷酸序列

Table 1 Nucleotide sequence of siRNA for MVP gene

siRNA	序列(5′→3′)
siRNA-MVP1	CCUACAUGCUGACCCAGGATT(sense)
	UCCUGGGUCAGCAUGUAGGTG(anti-sense)
siRNA-MVP2	CGACUACCGAGAGAAGCGATT(sense)
	UCGCUUCUCUCGGUAGUCGTA(anti-sense)

1.2.3 Western blot

提取 VSMCs 蛋白,用 PBS 洗 2 遍,置于冰上,加入适量含磷酸酶抑制剂的裂解液,30 min 后离心,取上清,用 BCA 法测定蛋白浓度,分装蛋白,每管 20 μg。配置聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE),取 20 μg 上述制备所得蛋白上样,电泳分离 1~2 h,湿转法转膜 2 h,将蛋白转至 PVDF 膜上。将膜置入含 2.5% BSA 的 TBS-T 中室温封闭 2 h,一抗孵育,4℃过夜,第 2 天,用 TBS-T 漂洗 3 次后,每次 10 min,二抗室温孵育 2 h,再用 TBS-T 漂洗 6 次,每次 10 min,用 ECL 显影液显影成像,并保存记录,用 Image J 软件分析目的条带光密度值。

1.2.4 CCK8 检测细胞增殖

在 96 孔板中接种细胞悬液(100 μL/孔),每孔 2 000 个细胞。将培养板放在培养箱(37℃、5% CO_2),第 2 天将培养基换成含 0.5% FBS 的培养基,饥饿细胞以同步 48 h,再换上含 PDGF-BB 或 15% FBS 的培养基进行刺激,分别在刺激前,以及刺激后 2、4、6、8 d 用 CCK8 试剂盒检测,向每孔中加入 10 μL CCK8 溶液。将培养板在培养箱中孵育 2 h,用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度值。

1.3 统计学方法

数值以均值 ± 标准误($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)表示,数据分析用

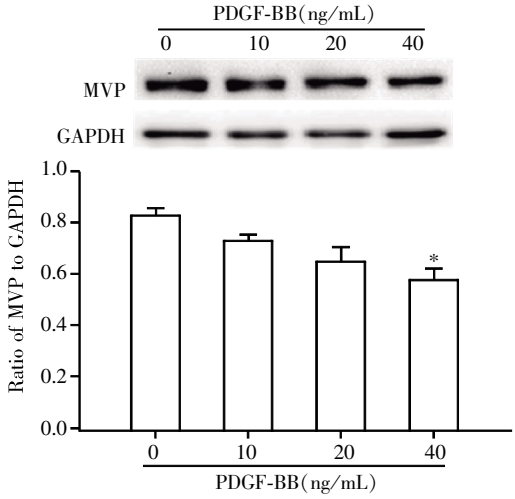
Graphpad Prism 5 统计软件进行处理,两组间比较采用 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析,$P \leqslant 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结　果

2.1 VSMCs 上的 MVP 表达水平随细胞增殖而下降

为研究小鼠 VSMCs 在增殖状态下 MVP 表达水平的改变,首先分离 C57BL/6J 小鼠的 VSMCs(VSMC WT),用不同浓度 (0、10、20、40 ng/mL)的 PDGF-BB 加以刺激使其增殖，检测发现 MVP 的表达水平呈下降趋势,且呈浓度依赖性(图 1)。接着用 40 ng/mL 的 PDGF-BB 刺激小鼠 VSMCs,分别刺激 0、24、48、72 h,检测发现 MVP 的表达水平呈时间依赖性下降。同时,又检测了 VSMCs 的特异性分化标记物 α-SMA 和 SM22α 表达水平，结果显示在 PDGF-BB 的作用下，VSMCs 处于增殖状态，由原来的分化状态向去分化状态转变,其分化标志物表达水平下降(图 2)。

除了 PDGF-BB 可以诱导 VSMCs 向去分化方向转化，使其增殖能力增加以外，很多文献报道

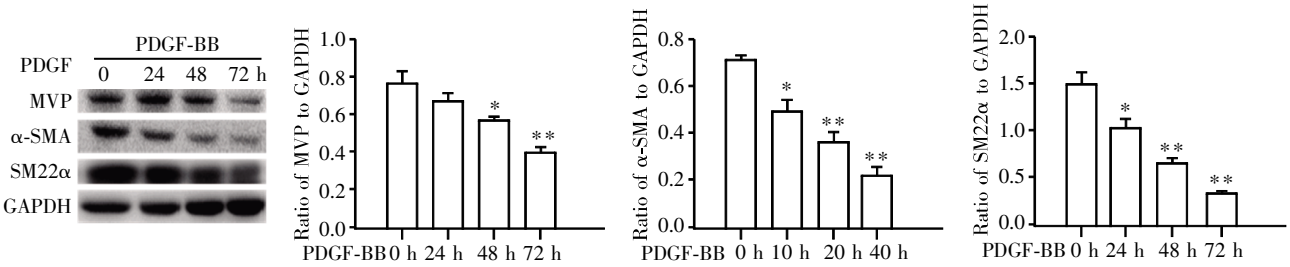


与对照组比较,$^{*}P < 0.05$(n=3)。

图 1　不同浓度 PDGF-BB 刺激 VSMC WT 后 MVP 的表达水平

Figure 1　The relative expression of MVP after stimulation of PDGF-BB with different doses.

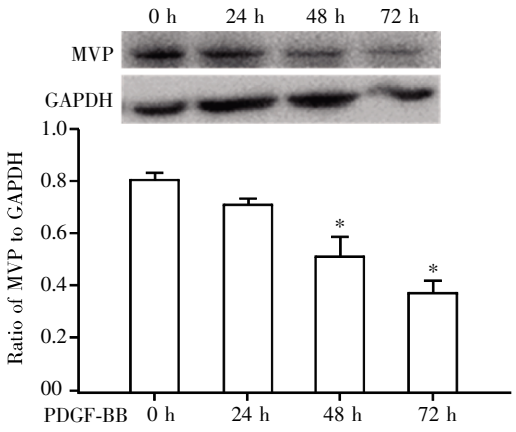
15% FBS 也具有类似作用，为进一步验证以上结果,又用 15% FBS 刺激小鼠 VSMCs,检测结果发现 MVP 的表达水平也呈明显下降(图 3)。



与对照组比较,$^{*}P < 0.05$,$^{**}P < 0.01$(n=3)。

图 2　PDGF-BB 刺激 VSMC WT 不同时间后 MVP,α-SMA 和 SM22α 的表达水平

Figure 2　The relative expression of MVP,α-SMA and SM22α after stimulation of PDGF-BB for different time.



与对照组比较,$^{*}P < 0.01$(n=3)。

图 3　15%FBS 刺激 VSMC WT 不同时间后 MVP 的表达水平

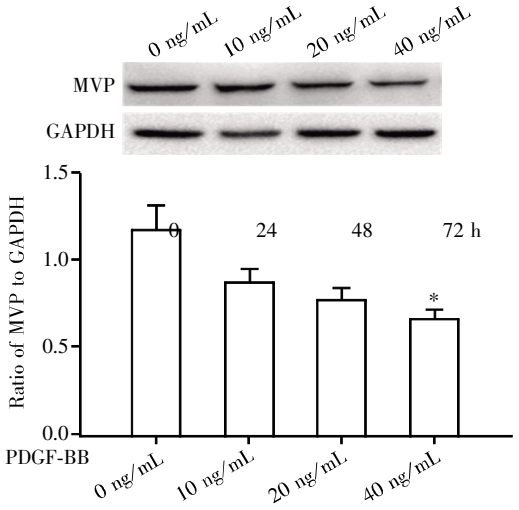
Figure 3　The relative expression of MVP after stimulation of 15%FBS for different time.

为了进一步验证 MVP 在人 VSMCs 增殖时的表达差异，又选用 HAoSMCs，用 PDGF-BB 加以刺激,结果发现 MVP 的表达也是明显下降的。以上结果均提示 MVP 与 VSMCs 的增殖有关(图 4)。

2.2 MVP 基因的缺失可以抑制 VSMCs 增殖

为了进一步确认 MVP 对小鼠 VSMCs 增殖的作用,分别分离培养野生型小鼠 VSMCs(WT)和 $MVP^{-/-}$ 小鼠 VSMCs(MVP KO),同步处理后,用 CCK8 实验方法比较两者的增殖能力。结果显示，无论是 PDGF-BB 处理还是 15% FBS 处理,MVP 基因敲除后,VSMC 增殖能力均下降(图 5)。

同样，也在 HAoSMCs 上进行验证，首先用 siRNAs 干扰 MVP 的表达,通过 Western blot 检测发现,其干扰效率在 65%左右(图 6)。再用 CCK8



与对照组比较，$^{**}P < 0.05$(n=3)。

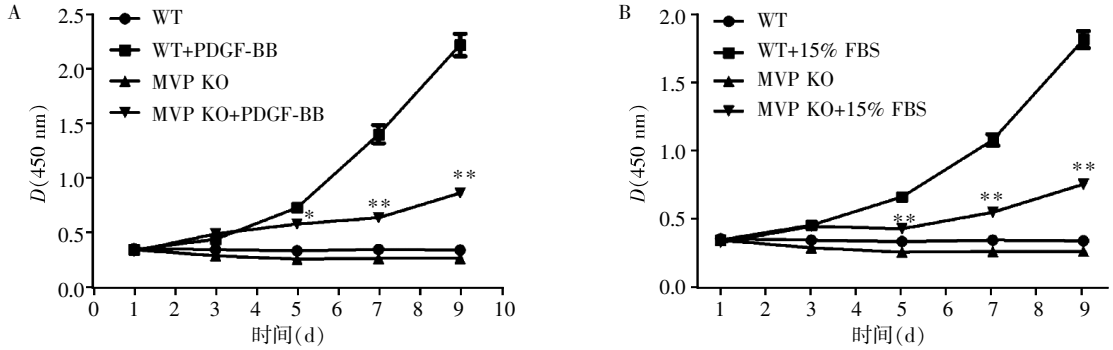
图 4　不同浓度 PDGF-BB 刺激 HAoSMCs 后 MVP 的表达水平

Figure 4　The relative expression of MVP after stimulation of PDGF-BB with different doses

实验方法检测，结果显示，MVP 低表达时，与 siRNA-N+15%FBS 相比，HAoSMCs 增殖能力降低(图 7)。

3　讨　论

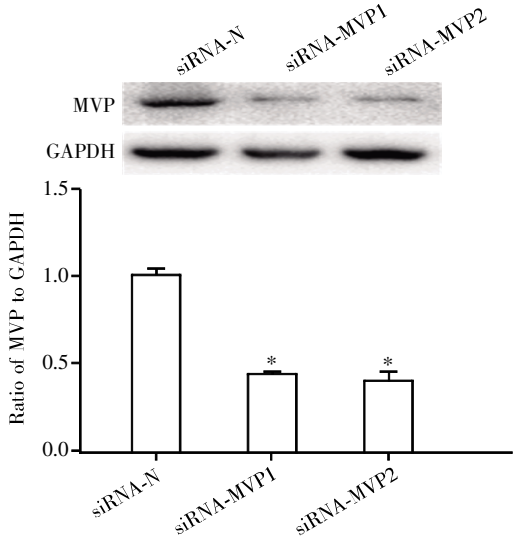
VSMCs 来自胚胎发育时期的中胚层，它与骨骼肌细胞、心肌细胞不同，并不是终末分化细胞，在某些因素的刺激下可以发生表型转化[8]。正常的动脉血管壁中的 VSMCs 以收缩型为主，主要功能是是维持血管壁弹性和收缩血管。当血管发生损伤时，血小板黏附，炎症细胞募集浸润于损伤处，释放大量的生长因子(如 PDGF)以及细胞因子，从而促进VSMCs 增殖迁移，从中膜层迁移至内膜层。同时由原来的收缩型转化为分泌型，并产生大量的细胞外基质，从而导致血管中膜层增厚，新生内膜形成，进而促成管腔狭窄，甚至阻塞血管[9]。已被公认为是动脉粥样硬化、肺动脉高压以及血管成形术后再狭窄等病变的病理基础。但其中具体调节机制尚未得到完全阐明。



A：PDGF-BB 刺激 VSMCs；B：15% FBS 刺激 VSMCs。MVP KO 与 WT 相比较，MVP KO+PDGF-BB 与 WT +PDGF-BB 相比较，$^{*}P < 0.05$(n=5)，$^{**}P < 0.01$(n=5)。

图 5　MVP 对小鼠原代 VSMCs 增殖的影响

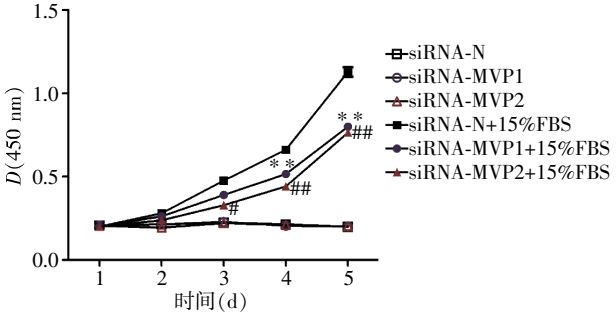
Figure 5　The effect of MVP on the proliferation of mouse VSMCs



与 siRNA-N 组比较，$^{*}P < 0.01$(n=3)。

图 6　MVP siRNAs 抑制 HAoSMCs 中 MVP 的表达

Figure 6　MVP siRNAs inhibit the expression of MVP in HAoSMCs



与对照组比较，$^{**}P < 0.01$，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$(n=6)。

图 7　MVP 对 HAoSMCs 增殖的影响

Figure 7　The effect of MVP on the proliferation of HAoSMCs

目前为止，VSMCs 增殖相关的信号转导途径并未完全明确，研究最多的是 MAPK 通路[10]和 PI3K/AKT 通路[11]。MAPK 通路是细胞外信号引起细胞核反应

的共同通路,参与多种细胞功能的调控,尤其在细胞增殖、分化与凋亡中起着关键作用。MAPK 通路异常与血管增生性疾病密切相关[12],Park 等[13]则发现下调 PI3K/AKT 通路可以抑制 PDGF-BB 诱导的 VSMCs 增殖。

Kolli 等[14] 研究表明,MVP 作为酪氨酸磷酸酶 SHP-2 的底物,参与 EGFR 依赖的 MAPK 通路的激活。另一方面,活化的 ERKs 也可与 MVP 结合,说明在 MAPK 通路中,MVP 可能有更广泛的作用。矛盾的是,有研究报道纯化的 MVP 可以抑制 Src 磷酸激酶的活性, 并且在 Src 过表达细胞中,MVP 过表达会削弱 ERK 活性[15]。这就提示,在不同的 SH2 结合区域和 MVP 结合蛋白之间存在一种平衡, 这种平衡可以决定促进还是抑制 MAPK 通路的激活。

本研究通过 PDGF-BB 或 15% FBS 诱导建立 VSMCs 增殖模型,观察了 MVP 在 VSMCs 增殖时表达水平的改变情况。又通过与 MVP 敲除或低表达的 VSMCs 增殖能力的比较, 进一步验证了 MVP 在 VSMCs 增殖时所起的重要作用。表明 MVP 在 PDGF-BB 或 15% FBS 诱导的 VSMCs 增殖和向去分化方向转化的信号转导途径中确实扮演重要角色。在血管性疾病中, 除了 VSMCs 异常增殖之外, VSMCs 的迁移和表型转化在其中也发挥关键作用。所以将进一步探索 MVP 在 VSMCs 多种功能中的作用及其分子机制,并在动物模型上加以验证,为今后在血管增生性疾病的靶向基因治疗研究提供新的思路和理论依据。

[参考文献]

[1] Owens GK,Kumar MS,Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease[J]. Physiol Rev,2004,84(6):767-780

[2] Scheffer GL,Wijngaard PL,Flens MJ,et al. The drug resistance related protein LRP is the human major vault protein[J]. Nat Med,1995,1(6):578-582

[3] Berger W,Steiner E,Grusch M,et al. Vaults and the major vault protein:novel roles in signal pathway regulation and immunity[J]. Cell Mol Life Sci,2009,66(1):43-61

[4] Yu Z,Fotouhi-Ardakani N,Wu L,et al. PTEN associates with the vault particles in HeLa cells[J]. J Biol Chem,2002,277(43):40247-40252

[5] Chung JH,Eng C. Nuclear-cytoplasmic partitioning of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10(PTEN)differentially regulates the cell cycle and apoptosis[J]. Cancer Res,2005,65(18):8096-8100

[6] Daniela Lötsch,Elisabeth Steiner,Klaus Holzmann,et al. Major vault protein supports glioblastoma survival and migration by upregulating the EGFR/PI3K signalling axis[J]. Oncotarget,2013,4(11):1904-1918

[7] Das D,Wang YH,Hsieh CY,et al. Major vault protein regulates cell growth/survival signaling through oxidative modifications[J]. Cell Signal,2016,28(1):12-18

[8] Davis-Dusenbery BN,Wu C,Hata A. Micromanaging vascular smooth muscle cell differentiation and phenotypic modulation[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2011,31(11):2370-2377

[9] O′Brien ER,Ma X,Simard T,et al. Pathogenesis of neointima formation following vascular injury[J]. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets,2011,11(1):30-39

[10] Zhan Y,Kim S,Izumi Y,et al. Role of JNK,p38,and ERK in platelet-derived growth factor-induced vascular proliferation,migration,and gene expression[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2003,23(5):795-801

[11] Hanada M,Feng J,Hemmings BA. Structure,regulation and function of PKB/AKT-a major therapeutic target[J]. Biochim Biophys Acta,2004,1697(1-2):3-16

[12] Fumie Kureha,Seimi Satomi-Kobayashi,Yoshiki Kubo,et al. Nectin-like molecule-5 regulates intimal thickening after carotid artery ligation in mice[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2013,33(6):1206-1211

[13] Park ES,Kang SI,Yoo KD et al. Camptothecin inhibits platelet-derived growth factor-BB-induced proliferation of rat aortic vascular smooth muscle cells through inhibition of PI3K/Akt signaling pathway[J]. Exp Cell Res,2013,319(7):982-991

[14] Kolli S,Zito C,Mossink MH et al. The major vault protein is a novel substrate for the tyrosine phosphatase SHP-2 and scaffold protein in epidermal growth factor signaling[J]. J Biol Chem,2004,279(28):29374-29385

[15] Kim E,Lee S,Mian MF et al. Crosstalk between Src and major vault protein in epidermal growth factor-dependent cell signaling[J]. FEBS J,2006,273(4):793-804

[收稿日期] 2016-03-17