

## 氧化型低密度脂蛋白对血管平滑肌细胞 磷酸酶 PTEN 活性的影响

吴兴利<sup>1</sup>, 王士雯<sup>1</sup>, 杨中苏<sup>1</sup>, 徐雅琴<sup>1</sup>, 杨丁友<sup>1</sup>, 刘秀云<sup>2</sup>

(解放军总医院 1. 老年心血管病研究所, 2. 南楼四科, 北京市 100853)

[关键词] 脂蛋白, 低密度, 氧化型; 肌, 平滑, 血管; 磷酸酶, 同源性, 细胞骨架蛋白; 动脉粥样硬化

[摘要] 为探讨氧化型低密度脂蛋白促血管平滑肌细胞增殖的细胞内信号转导机制, 将兔血管平滑肌细胞分为对照组、低密度脂蛋白组和氧化型低密度脂蛋白组。以细胞计数和噻唑蓝比色法测定细胞增殖能力, Western blot 定量与细胞骨架蛋白同源在 10 号染色体有缺失的磷酸酶 (PTEN) 表达水平, 免疫沉淀和特异底物  $\text{diC}_{16}\text{PIP}_3$  脱磷酸绿色试剂法检测该磷酸酶活性。实验发现氧化型低密度脂蛋白 (50 mg/L) 可使细胞计数及噻唑蓝比色吸光值分别增加 1.78 和 3.21 倍, 而低密度脂蛋白 (50 mg/L) 无明显作用。各浓度低密度脂蛋白及氧化型低密度脂蛋白对该磷酸酶蛋白表达水平均无显著影响。氧化型低密度脂蛋白对 PTEN 活性的抑制在 20~50 mg/L 范围内呈浓度依赖性。时间曲线表现为 10 min 作用最强, 并可持续达 24 h (与对照组比较, 均  $P < 0.01$ )。结果提示, 氧化型低密度脂蛋白可能通过对负性调节蛋白 PTEN 磷酸酶的抑制而发挥促进血管平滑肌细胞增殖功能。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### The Effect of Oxidized Low Density Lipoprotein on PTEN Phosphatase Activity in Rabbit Vascular Smooth Muscle Cells

WU Xing-Li<sup>1</sup>, WANG Shi-Wen<sup>1</sup>, YANG Zhong-Su<sup>1</sup>, XU Ya-Qin<sup>1</sup>, YANG Ding-You<sup>1</sup>, and LIU Xiur-Yun<sup>2</sup>

(PLA General Hospital, 1. Institute of Geriatric Cardiology; 2. the Fourth Department of Nanlou, Beijing 100853, China)

[MeSH] Lipoprotein, LDL, Oxidized; Muscle, Smooth, Vascular; Phosphatase, Homologous, Cytoskeleton Protein; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the cellular signal transduction pathway of vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation stimulated by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL). **Methods** Rabbit aortic VSMC was cultured in 3 groups: control, low density lipoprotein (LDL), and ox-LDL. Cell proliferating ability was determined by measuring cell number and mitochondrial dehydrogenase activity (MTT assay). Western blotting was used to detect the protein expression of phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten (PTEN). Phosphate concentration released from PTEN-specific substrate  $\text{diC}_{16}\text{PIP}_3$  was assessed using green reagent method. **Results** ox-LDL (50 mg/L) increased cell number and MD activity to 1.78~3.21 fold, but the same concentration of LDL has no such mitogenic effect. Phosphatase activity detection showed that the dephosphate action of PTEN was inhibited by ox-LDL (20~50 mg/L) in a concentration dependent manner, and this inhibiting effect was at its maximum within 10 min, lasting at least for 24 h ( $P < 0.01$ , vs. control group). **Conclusion** Ox-LDL improved VSMC proliferation probably by inhibiting the lipid phosphatase activity of PTEN.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是以血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 增殖为主要病理改变的动脉壁炎症纤维增生性病理改变。氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 及其组分的促 VSMC 增殖与迁移功能已被大量实验证实, 但其受体途径及细胞内信号转导机制尚未充分阐明<sup>[1]</sup>。我们的实验已证实, ox-LDL 的作用系由磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B (PI<sub>3</sub>K/

PKB) 信号通路介导的。随着细胞调控理论研究的深入, 一些新的蛋白激酶和蛋白磷酸酶被陆续发现, 并认识到这两类酶的动态平衡决定着细胞的生存与死亡, 即所谓蛋白激酶/蛋白磷酸酶阴阳平衡学说<sup>[2]</sup>。与细胞骨架蛋白同源在 10 号染色体有缺失的磷酸酶 (phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten, PTEN) 是 1997 年由 3 个实验室几乎同时发现的磷酸酶, 其作为肿瘤增生负性调控信号蛋白已为多个实验室证实<sup>[3,4]</sup>。有关 PTEN 是否参与 ox-LDL 病理生理效应尚未见报道, 本实验对此进行初步研究。

[收稿日期] 2002-07-08 [修回日期] 2002-11-25

[作者简介] 吴兴利, 男, 1964 年出生, 博士, 副主任医师, 主要从事冠心病基础与临床研究, 为本文通信作者。王士雯, 女, 中国工程院院士, 博士后导师。杨中苏, 男, 医学博士, 副主任医师, 现在北京朝阳医院心内科工作。

### 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

Micro BCA 蛋白测定盒 (Pierce 公司), 人抗兔 PTEN 多克隆抗体 (Sant Cruz 公司), diC<sub>16</sub>PIP<sub>3</sub> (Biomol 公司), 辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 单克隆抗体 (武汉博士德公司), 孔雀石绿 (中国医药公司北京采购供应站)。

### 1.2 氧化型低密度脂蛋白的制备<sup>[5]</sup>

采用垂直转头单个不连续密度超速离心法提取健康人血清低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL)。将透析过的 LDL 用 PBS 溶液稀释至蛋白浓度为 0.5 g/L, 加入 CuCl<sub>2</sub> 至终浓度为 60 mmol/L, 置于 37 °C 孵育 24 h。将制好的 ox-LDL 以 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 置 4 °C 避光保存, 于 2 周内使用。用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳及苏丹黑预染脂蛋白观察电泳迁移率, 并通过测定硫代巴比妥酸反应物丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量, 进一步鉴定其氧化修饰程度。ox-LDL 的相对迁移率及 MDA 含量分别是 LDL 的 2.9 倍和 8.6 倍, 符合实验要求。

### 1.3 细胞培养和分组

采用贴块法培养兔主动脉平滑肌细胞。用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养, 细胞铺满瓶底后, 0.125% 胰蛋白酶消化, 按 1:3 传代, 实验用第 5~6 代细胞。细胞鉴定采用倒置显微镜形态学与免疫组织化学方法。

血管平滑肌细胞在含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基中培养至融和后, 换无血清培养基继续培养 24 h。然后加入不同浓度 ox-LDL 或 LDL (均为 5、10、20、30、40 和 50 mg/L) 培养 10 min; 同时另组加入 ox-LDL 或 LDL (均为 50 mg/L) 培养 1/20、1/12、1/6、1/2、1、3、8 和 24 h; 设立对照组。每次均为 3 瓶, 共重复实验 2 次。

### 1.4 平滑肌细胞计数

取生长状态良好的第 5~6 代 VSMC 制成细胞悬液 ( $4 \times 10^7/L$ ), 接种于 24 孔细胞培养板中, 每孔 0.5 mL, 孵育 24 h, 换无血清培养基继续培养 24 h 后, 加 10% 胎牛血清, 同时分组加入 ox-LDL 和 LDL (50 mg/L), 以不加药物只含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基为对照孔, 培养 3 天后用 4% 台盼蓝染色计细胞数。

### 1.5 四唑盐比色试验

通过测定线粒体脱氢酶对四唑盐的脱氢活性反映细胞活力。同上细胞培养 3 天后, 每孔加入四唑盐溶液 (5 g/L) 20 μL, 37 °C 继续孵育 4 h, 终止培养, 小心吸弃孔内培养基。然后每孔加入 150 μL DM-SO, 振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。选择 490 nm

波长, 在酶联免疫检测仪测定各孔光吸收值, 以不加细胞只含四唑盐及 DMSO 的孔为空白对照, 各测定值以空白孔调零。

### 1.6 免疫印记分析

参考文献 [6] 及单抗产品实验方案进行。VSMC 培养至各指定时间后, 按 5 μL/cm<sup>2</sup> 加入裂解液裂解 (含 pH 8.0 50 mmol/L Tris HCl), 500 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 0.5% Triton-X100, 1 mmol/L PMSF, 2 mmol/L DTT, 0.02% sodium azid), 上清液用 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 凝胶分离蛋白在电转移液中电转膜, 然后用抗 PTEN 多克隆抗体和辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 单克隆抗体温育。最后显色, 扫描滤膜, 蛋白带染色密度用 Scion Image 软件分析。

### 1.7 免疫沉淀<sup>[6]</sup>

取上述裂解物上清液, 按每 500 μg 总蛋白加蛋白质 A-琼脂糖 (Protein A-Sepharose) 15 μL, 4 °C 30 min, 以预清除裂解液, 继以 12 000 × g 4 °C 离心 5 min, 上清液与 PTEN 抗体 2 μg, 4 °C 孵育 2 h, 然后与 40 μL 蛋白质 A-琼脂糖 4 °C 免疫沉淀 1 h。免疫复合物用缓冲液 A (含 500 mmol/L NaCl) 洗 3 遍, 缓冲液 B (含 pH 7.5 50 mmol/L Tris HCl, 0.03% Brij35, 0.1 mmol/L EGTA, 0.1% β-MG) 洗 2 遍, 检测稀释液 (20 mmol/L MOPS, pH 7.2, 25 mmol/L sodium β-glycerol phosphate, 1 mmol/L sodium orthovanadate, 1 mmol/L DTT) 洗 2 遍。继以 4 °C 12 000 × g 离心 20 s, 收集蛋白 A 抗原抗体复合物, 缓慢吸出上清液。

### 1.8 PTEN 活性测定

参照文献 [6, 7] 及试剂说明进行, 免疫沉淀的复合物以 10 μL 激酶反应混合液 (含 100 mmol/L Tris HCl, pH 8.0, 10 mmol/L DTT, 0.01% Brij35, 1 g/L BSA, 1 mmol/L EDTA, 25 μmol/L diC<sub>16</sub>PIP<sub>3</sub>) 重悬, 37 °C 孵育 1 h 后加入 15 μL 100 μmol/L NEM 孵育以终止反应, 继以 18 000 × g 4 °C 离心 15 min, 上清液中释放的磷离子采用孔雀石绿色反应法测定。上清液加入绿色反应试剂 80 μL, 室温放置 30 min 后, 加入 34% 柠檬酸钠 100 μL 混合, 然后用酶联分析仪在 620 nm 波长测定吸光值, 以系列 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1~1 000 pmol/L) 建立标准曲线。

### 1.9 统计学处理

数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 应用 STATA 软件 6.0 处理。方差齐性及数据分布情况采用 Bartlett 方法检验。方差不齐或非正态分布资料进行对数转换后行 Scheffe 方差分析。P < 0.05 为统计学有意义, P < 0.01 为具有显著意义。

## 2 结果

### 2.1 氧化型低密度脂蛋白对血管平滑肌细胞增殖的影响

氧化型 LDL (50 mg/L) 孵育 72 h, 其 VSMC 计数与光吸收值分别是对照组的 1.78 和 3.21 倍 (均  $P < 0.01$ ), 同样浓度的 LDL 对 VSMC 增殖无显著影响 (表 1, Table 1)。本实验每次做 3 孔, 重复 2 次。

表 1. 氧化型低密度脂蛋白对血管平滑肌细胞增殖的影响.

Table 1. The effect of ox-LDL on VSMC proliferation ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ ).

Groups	Cell number ( $\times 10^3$ )	MIT value
Control	21.2 $\pm$ 2.67	0.24 $\pm$ 0.04
LDL (50 mg/L)	22.22 $\pm$ 2.86	0.23 $\pm$ 0.04
Ox-LDL (50 mg/L)	37.47 $\pm$ 5.11 <sup>a</sup>	0.77 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>

a:  $P < 0.01$ , compared with control group.

### 2.2 氧化型低密度脂蛋白对 PTEN 蛋白表达及脂质磷酸酶活性的影响

低密度脂蛋白和 ox-LDL 对 PTEN 蛋白表达水平均无显著影响。ox-LDL 呈浓度依赖性 (20~50 mg/L) 抑制 PTEN 活性。时间曲线表现为 ox-LDL (50 mg/L) 作用 3 min, PTEN 活性即减至对照组的 80% ( $P < 0.05$ ), 10 min 达谷值, 然后稍有回升, 至 8 h 再度降至 55%, 24 h 其活性仍为对照组的 69.3% (与对照组比较, 均  $P < 0.01$ , 图 1~3, Figure 1~3)。

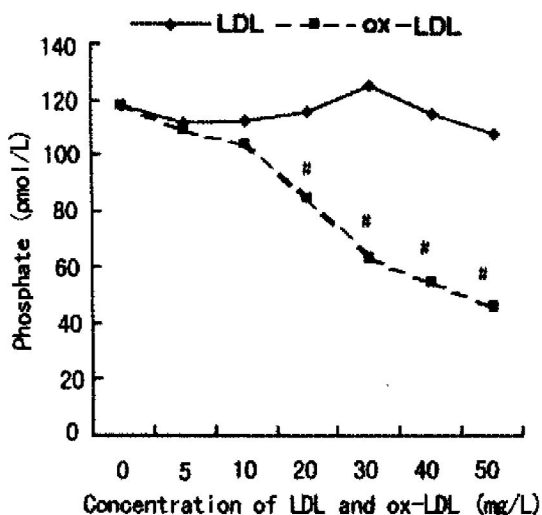


图 1. 氧化型低密度脂蛋白对血管平滑肌细胞 PTEN 磷酸酶活性的影响. # :  $P < 0.01$ , 与对照组比较.

Figure 1. Concentration effect of ox-LDL on PTEN activity in rabbit VSMC. # :  $P < 0.01$ , compared with control group.

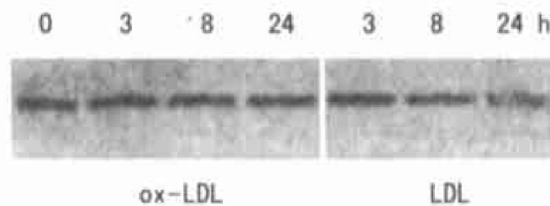


图 2. 氧化型低密度脂蛋白对 PTEN 磷酸酶蛋白表达的影响.

Figure 2. The effect of ox-LDL on PTEN expression in rabbit VSMC.

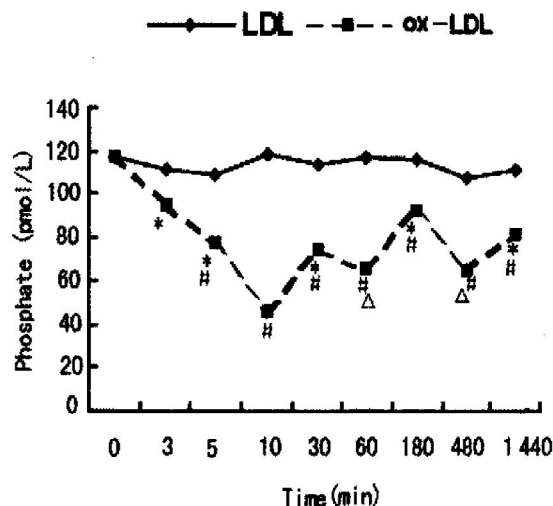


图 3. 氧化型低密度脂蛋白影响 PTEN 磷酸酶活性的时间效应.  $\Delta$ :  $P < 0.05$ , \* :  $P < 0.01$ , 与 10 min 时比较; # :  $P < 0.01$ , 与对照组比较.

Figure 3. Time course of the effect of ox-LDL on PTEN activity.  $\Delta$ :  $P < 0.05$ , \* :  $P < 0.01$ , compared with 10 min; # :  $P < 0.01$ , compared with control group.

## 3 讨论

氧化型低密度脂蛋白是 LDL 在体内经多种自由基离子及其他致氧化因素氧化修饰的产物, 其流入细胞内的机制与 LDL 不同, 可被 VSMC 通过清道夫受体以无负性调节的方式大量摄入、堆积, 最终使 VSMC 形成泡沫细胞。本实验证实, ox-LDL 可显著增加 VSMC 增殖。对不同种系细胞的实验研究提示 ox-LDL 的细胞丝裂作用系通过清道夫受体、表皮生长因子受体和血小板衍生生长因子受体等受体介导的<sup>[6]</sup>。其细胞内信号途径有蛋白激酶 C、P38、P42/44 丝裂原活化的蛋白激酶 (MAPK)、百日咳毒素敏感的 G 蛋白 (Gi/G<sub>0</sub>)、蛋白酪氨酸激酶 (PTK) 以及神经鞘磷脂—神经酰胺途径等<sup>[6]</sup>。上述实验结果以及受体与信号途径之间关系的报道并非一致, Martens 报道 ox-LDL 促 THP-1 单核细胞增殖是 PI<sub>3</sub>K 依赖性的, 我们实验曾发现, ox-LDL 促进 VSMC 增殖与增加 PKB

活性有关。

磷酸化与去磷酸化的动态平衡是细胞发育、生长及凋亡所必须的,随着PI<sub>3</sub>K/PKB等大量蛋白激酶研究的深入,与之相拮抗的磷酸酶被陆续发现,PTEN为一没有SH<sub>2</sub>结构,也没有跨膜信号的位于胞浆的蛋白及脂质双重磷酸酶。其作用靶底物研究发现,PTEN可脱去PIP<sub>3</sub>肌醇环上3号位值的磷酸根,特异性使局部粘附激酶去磷酸化水平增高<sup>[3,4]</sup>。缺失型及突变型PTEN转基因实验系列从不同方面证实PTEN在前列腺癌和乳腺癌中的抑瘤作用及对NIH-3T3和人成纤维细胞迁移的负性调节作用<sup>[8,9]</sup>。最近Ozes等<sup>[10]</sup>利用转基因技术证实PKB与PTEN在肿瘤坏死因子抑制胰岛素信号转导中发挥相反作用,PTEN是否参与ox-LDL等丝裂因子对VSMC增殖的调控尚未见报道。本实验发现,ox-LDL对PTEN蛋白表达无影响,但可呈浓度依赖性地抑制PTEN的脂质磷酸酶活性。时间曲线表现为10 min作用最强,持续至少24 h,而同等浓度的LDL对PTEN酶活性无影响,提示ox-LDL不同于LDL,它可能通过降低促凋亡磷酸酶PTEN的活性较全面调控细胞生长。PTEN活性在时间上呈双峰表现的原因不明,作者曾报道ox-LDL对VSMC PKB活性的增加在10 min及8 h呈双峰,ox-LDL处理8 h后显著增加肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、白细胞介素6和白细胞介素8分泌,实验发现肿瘤坏死因子 $\alpha$ 的作用系通过PKB/PTEN共同调节的,提示ox-LDL对PTEN活性的抑制与其增加PKB活性及细胞因子分泌有关,但确切机制仍有待大量研究揭示<sup>[10,11]</sup>。有关ox-LDL抑制PTEN活性的机制不明,对其他磷酸酶的研究发现,哺乳动物细胞内的雷帕霉素靶体可磷酸化Tap42蛋白,磷酸化的Tap42与cdc55或Tpd3竞争与蛋白磷酸酶PP2A亚

单位结合、进而抑制PP2A活性<sup>[12~14]</sup>。这些实验结果为PTEN活性的调节机制提供一定启示。深入了解PTEN双重酶活性,必将为As及相关疾病的机制研究及药物开发提供新的思路。

#### [参考文献]

- [1] Chatterjees. Role of oxidized human plasma LDL in atherosclerosis: effect on smooth muscle cell proliferation. *Mol Cell Biochem*, 1992, **111**: 142-147
- [2] Cohen P. Protein kinases and protein phosphatase: the Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, 1995, **80**: 255-236
- [3] Yao YJ, Li PX, Zhang H, et al. PTEN/MMAC1 mutation in hepatocellular carcinomas. *Oncogen*, 1999, **18**: 3 181-185
- [4] Zhong H, Chiles K, Feldser D, et al. Modulation of hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  expression by the epidermal growth factor PI<sub>3</sub>K/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cell: implication for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res*, 2000, **60**: 1 541-545
- [5] 袁中华, 杨永宗, 杨小毅, 等. 氧化型低密度脂蛋白诱导猪主动脉平滑肌细胞凋亡. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (1): 23-25
- [6] Martens JS, Reiner NE, Herrera VP, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in the induction of macrophage growth by oxidized low density. *Lipoprtein*, 1998, **1 273**: 4 915-920
- [7] Han HY, Kato H, Kato S, et al. Functional evaluation of PTEN missense mutation using in vitro phosphoinositide phosphatase assay. *Cancer Res*, 2000, **60**: 3 147-151
- [8] Tamura M, Gu J, Matsumoto K, et al. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science*, 1998, **280**: 1 614-617
- [9] Hanks SK, Polte TR. Signaling through focal adhesion kinase. *Biol Essay*, 1997, **19**: 137-145
- [10] Ozes ON, Akca H, Mayo LD, et al. A PI3K/Akt/mTOR pathway mediates and PTEN antagonize tumor necrosis factor inhibition of insulin signaling through insulin receptor substrate 1. *PNAS*, 2001, **98**: 4 640-645
- [11] 吴兴利, 王士雯, 杨中苏, 等. 氧化型低密度脂蛋白刺激血管平滑肌细胞. *军医进修学院学报*, 2002, **23** (4): 361-363
- [12] Jiang Y, Broach JR. Tor proteins and protein phosphatase2A reciprocally regulate Tap42 in controlling cell growth in yeast. *EMBO J*, 1999, **18**: 2 782-792
- [13] Cheung AT, Wang J, Ree D, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces hepatic insulin resistance in obese Zucker (fa/fa) rats via interaction of leukocyte antigen-related tyrosine phosphatase with focal adhesion kinase. *Diabetes*, 2000, **49**: 810-819
- [14] Goldberg Y. Protein phosphatase 2A: who shall regulate the regulator? *Biochem Pharmacol*, 1999, **57**: 321-328

(此文编辑 朱雯霞)