

## RNA 干扰沉默基质交感分子 1 基因后对血管平滑肌细胞周期的影响

郭瑞威, 黄 岚, 宋明宝, 王 红, 郜 攀

(第三军医大学附属新桥医院全军心血管研究所, 重庆市 400037)

[关键词] 内科学; 基质交感分子 1; 血管平滑肌细胞; 细胞周期; RNA 干扰

[摘要] 目的 探讨 RNA 干扰技术沉默基质交感分子 1 基因后对血管平滑肌细胞周期的影响。方法 原代培养血管平滑肌细胞, 用构建好的大鼠基质交感分子 1 干扰腺病毒载体和人重组基质交感分子 1 腺病毒载体进行转染, Western blot 检测细胞基质交感分子 1、p21 和 pRb 表达, 流式细胞仪测定细胞周期。结果 大鼠基质交感分子 1 干扰腺病毒载体转染后 48 h 细胞基质交感分子 1 表达与转染对照腺病毒载体比较明显降低 ( $P < 0.05$ ), 处于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 细胞比例也明显增多 ( $P < 0.05$ ), p21 表达上调, pRb 表达下调 ( $P < 0.05$ ); 人重组基质交感分子 1 腺病毒载体共转染后 48 h 细胞基质交感分子 1 表达恢复到正常水平; G<sub>0</sub>/M 细胞比例、p21 和 pRb 表达恢复到正常水平。结论 基质交感分子 1 基因沉默上调 p21 表达, 下调 pRb 表达, 抑制细胞进入 S 期, 进而参与对血管平滑肌细胞增殖的调控。[中图分类号] R5 [文献标识码] A

### Effect of Stromal Interaction Molecule 1 Knockdown on Cell Cycle of Vascular Smooth Muscle Cell

GUO Rui Wei, HUANG Lan, SONG Ming-Bao, WANG Hong, and GAO Pan

(Cardiovascular Research Institute of Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

[KEY WORDS] Stromal Interaction Molecule 1; Vascular Smooth Muscle Cell; Cell Cycle; RNAi

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of STIM1 knockdown on cell cycle of vascular smooth muscle cell. **Methods** Rat VSMC was isolated and primary cultured. Ad-si/rSTIM1 and Ad-hSTIM1 were transfected into VSMC. The protein of STIM1, p21 and pRb were measured by western blot, the cell cycle of VSMC was analyzed by flow cytometry. **Results** On 48 h after transfected Ad-si/rSTIM1, the expression of STIM1 protein was decreased significantly compared to that in Ad-hSTIM1-treated group ( $P < 0.05$ ). The percent of G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase cell was significantly increased ( $P < 0.05$ ). The expression of p21 protein was increased and the expression of pRb protein was decreased ( $P < 0.05$ ). However, the cotransfection of Ad-hSTIM1 with Ad-si/rSTIM1 restored these responses. **Conclusions** STIM1 knockdown up-regulates the expression of p21 and down-regulates the expression of pRb, which inhibits cell to progress into S phase. Stim1 maybe have a key role in the vascular smooth muscle cell proliferation.

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 的增殖是导致动脉粥样硬化斑块形成的重要机制之一<sup>[1]</sup>。基质交感分子 1 (stromal interaction molecule 1, STIM1) 表达于细胞内质网上, 通过调控钙库操控钙通道从而影响着细胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度的变化<sup>[2]</sup>。本实验来探讨 STIM1 基因沉默后对 VSMC 细胞周期的影响, 以及对 p21 和 pRb 表达的影响。

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要试剂

小鼠抗大鼠和人 STIM1 抗体购自 BD 公司; 小

鼠抗大鼠 p21、pRb 和  $\beta$ -actin 抗体购自中杉公司, HRP 标记抗小鼠 IgG, T4 DNA Ligase、BamH I、Hind III 购自 NEB 公司; PEGFP6-1、PEGFP6-4、PGSAdeno、Adenovirus Expression System 重组腺病毒构建系统和腺病毒阴性对照购自武汉晶赛生物工程有限公司; 包装细胞 HEK 293 购自美国 ATCC。DMEM、胎牛血清购自 Gibco 公司; SD 大鼠由第三军医大学动物实验中心提供。

#### 1.2 大鼠基质交感分子 1 干扰腺病毒载体和人重组基质交感分子 1 腺病毒载体构建

大鼠 siRNA 靶序列的设计根据文献报道选取 2 条 25nt 的序列 (rSTIM1, GenBank NO: NM-001108496)<sup>[3]</sup>, 即 STIM11: GCA UGG AAG GCA UCA GAA GUG UUA; STIM12: GGA UGA GGU GAU ACA GUG GCU GAU, 在引物设计时两端分别加入 BamH

[收稿日期] 2008-07-01 [修回日期] 2008-09-21

[作者简介] 郭瑞威, 博士研究生, 主治医师, 研究方向为血管损伤与修复, E-mail 为 gw771210@163.com。通讯作者黄岚, 博士, 博士研究生导师, 教授, 研究方向为血管损伤与修复, E-mail 为 huanglan260@126.com。宋明宝, 博士, 主治医师, 研究方向为血管损伤与修复。

iv和Hind Ⅲ酶切位点(武汉晶赛生物工程有限公司)。稀释退火片段分别与线性化 PEGFP6-1、PEGFP6-4 载体的连接:STIM11 稀释退火片段与 PEGFP6-1 载体的连接为 STIM11-22;STIM12 稀释退火片段与 PEGFP6-4 载体的连接为 STIM12-4。质粒 STIM11-22、STIM12-4 的 Sal Ⅰ+ Pst Ⅰ双酶切分别回收大片段和小片段:STIM11-22 回收大片段与 STIM12-4 回收小片段的连接,筛选后鉴定,将其连接到穿梭质粒 PGSadeno,包装重组腺病毒,命名为 Ad $\Delta$ si/rSTIM1;(2) 人源 STIM1(hSTIM1, GenBank NO: U52426), 亚克隆到穿梭质粒 PGSadeno,包装重组腺病毒,命名为 Ad $\Delta$ hSTIM1;纯化病毒滴度在  $10^9$  以上。

### 1.3 大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞的培养鉴定与病毒转染

无菌条件下取大鼠胸主动脉,采用组织贴块法培养于含 20% FBS 的 DMEM 培养液中,  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中静置培养,实验用 4~6 代 VSMC; VSMC 的鉴定严格按 SABC 试剂盒操作步骤进行,封固后,倒置相差显微镜下观察可见 > 98% 的培养细胞染色阳性,细胞呈梭形或长梭形,细胞核染成蓝紫色,细胞质染成棕黄色,证明培养的是 VSMC。将病毒液加入细胞培养上清中感染细胞,4 h 后更换含 20% FBS 的 DMEM 培养基,12 h 后可以看见绿色荧光。细胞分组为空白病毒液转染组; Ad $\Delta$ si/rSTIM1 转染组; Ad $\Delta$ si/rSTIM1 和 Ad $\Delta$ hSTIM1 共转染组。

### 1.4 Western Blotting 法检测基质交感分子 1、p21 和 pRb 表达

分别提取血管组织胞浆蛋白的提取参照文献 [4] 进行。胞浆蛋白经考马斯亮兰蛋白定量后点样 100  $\mu\text{g}$ /孔,行 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,待电泳完毕电转移至硝酸纤维素滤膜。5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,一抗为 1:200 小鼠抗大鼠 STIM1、p21、pRb 及  $\beta$ -actin 抗体;  $4^{\circ}\text{C}$  过夜。二抗为 HRP 标记抗小鼠 IgG,室温 1 h,漂洗后将 DAB 显色。

### 1.5 流式细胞仪测定细胞周期

将细胞按  $(1\sim 2.5) \times 10^8/\text{L}$  接种于 6 孔培养板,置于  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  常氧细胞培养箱培养。待细胞生长基本融合后,行无血清培养液培养 24 h 同步化。转染后培养 48 h。PBS 清洗细胞,胰蛋白酶消化,吹打混匀,离心弃上清液后加入预冷的 70% 乙醇,置于  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱固定 24 h。PBS 洗去固定液,加 25 mg/L RNA 酶、50 mg/L PI 溶液,  $37^{\circ}\text{C}$  水浴 30 min,以 300 目滤网过滤细胞,流式细胞仪测定细胞周期。

### 1.6 统计学方法

所得结果用医学图像分析系统测定其灰度值,

用 SPSS 11.0 对数据进行处理,多组间进行单因素的方差分析,组间比较用 Tukey's 方法进行。以  $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 大鼠基质交感分子 1 干扰腺病毒载体和人重组基质交感分子 1 腺病毒载体转染血管平滑肌细胞后基质交感分子 1 蛋白的表达

分别用不同感染复数的腺病毒阴性对照(Ad $\Delta$ empty)、Ad $\Delta$ si/rSTIM1 及 Ad $\Delta$ hSTIM1 转染 VSMC,在转染后 48 h 检测 STIM1 表达。结果表明感染复数为 15 和 30 MOI 的 Ad $\Delta$ si/rSTIM1 转染组的 STIM1 表达较 Ad $\Delta$ empty 转染组显著下降( $P < 0.05$ )。15 MOI 的 Ad $\Delta$ hSTIM1 和 15 MOI 的 Ad $\Delta$ si/rSTIM1 共转染后 STIM1 恢复至正常水平(图 1 和表 1)。

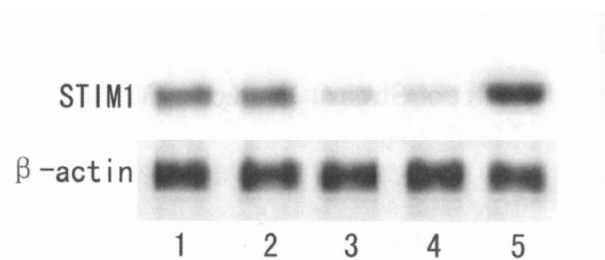


图 1. 细胞中基质交感分子 1 蛋白的表达 1 为 Ad $\Delta$ empty (15MOI) 转染组, 2 为 Ad $\Delta$ empty (30MOI) 转染组, 3 为 Ad $\Delta$ si/rSTIM1 (15MOI) 转染组, 4 为 Ad $\Delta$ si/rSTIM1 (30MOI) 转染组, 5 为 Ad $\Delta$ si/rSTIM1 (15MOI) + Ad $\Delta$ hSTIM1 (15MOI) 共转染组。

表 1. 细胞中基质交感分子 1 蛋白的表达

分 组	n	STIM1/actin 比值
Ad $\Delta$ empty (15MOI) 转染组	3	0.79 $\pm$ 0.08
Ad $\Delta$ empty (30MOI) 转染组	3	0.77 $\pm$ 0.10
Ad $\Delta$ si/rSTIM1 (15MOI) 转染组	3	0.21 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
Ad $\Delta$ si/rSTIM1 (30MOI) 转染组	3	0.20 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
Ad $\Delta$ si/rSTIM1 (15MOI) + Ad $\Delta$ hSTIM1 (15MOI) 共转染组	3	0.91 $\pm$ 0.09

a 为  $P < 0.05$ , 与其它 3 组比较。

### 2.2 转染后各组细胞周期分布情况

转染 Ad $\Delta$ si/rSTIM1 后细胞分布于  $G_0/G_1$  期的细胞数目较转染 Ad $\Delta$ empty 组明显增多 ( $P < 0.05$ ), S 和  $G_2/M$  期细胞数目明显减少 ( $P < 0.05$ )。而 Ad $\Delta$ hSTIM1 和 Ad $\Delta$ si/rSTIM1 共转染后细胞周期分布与转染 Ad $\Delta$ empty 组差异无显著性(图 2)。

### 2.3 转染后各组细胞 p21 和 pRb 表达变化

腺病毒转染 48 h 后对细胞内 p21 和 pRb 表达进行检测。结果表明与 Ad $\Delta$ empty 转染组比较, Ad $\Delta$

si/rSTIM1 转染组细胞内 p21 表达上调、pRb 表达下调 ( $P < 0.05$ ), 而 Ad-hSTIM1 和 Ad-si/rSTIM1 共转染后 p21 和 pRb 表达恢复到转染 Ad-empty 组水平(图 3 和表 2)。

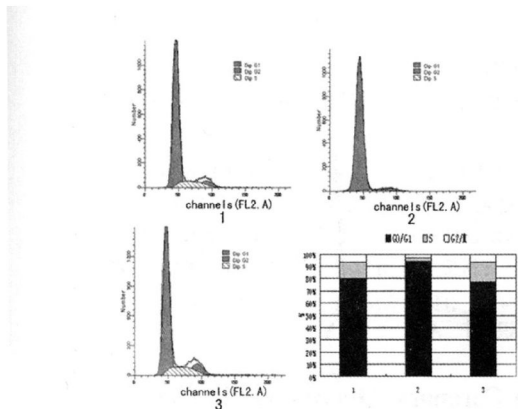


图 2. 各组细胞周期分布情况 1 为 Ad-empty(15MOI)转染组, 2 为 Ad-si/rSTIM1(15MOI)转染组, 3 为 Ad-si/rSTIM1(15MOI) + Ad-hSTIM1(15MOI)共转染组。

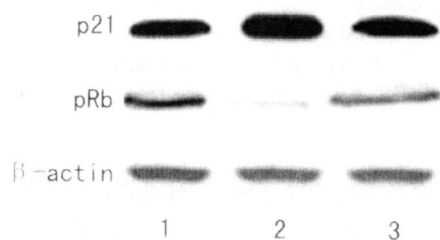


图 3. 各组细胞 p21 和 pRb 表达变化 1 为 Ad-empty 转染组, 2 为 Ad-si/rSTIM1 转染组, 3 为 Ad-si/rSTIM1 + Ad-hSTIM1 共转染组。

表 2. 各组细胞 p21 和 pRb 表达变化

分组	n	p21/actin 比值	pRb/actin 比值
Ad-empty 转染组	3	1.21 ± 0.06	0.95 ± 0.15
Ad-si/rSTIM1 转染组	3	2.02 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.41 ± 0.12 <sup>a</sup>
Ad-si/rSTIM1 + Ad-hSTIM1 共转染组	3	1.18 ± 0.15	1.05 ± 0.12

a 为  $P < 0.05$ , 与其它两组比较。

### 3 讨论

血管平滑肌细胞异常增殖参与了高血压、动脉粥样硬化、血管成形术后再狭窄和脉管炎等多种心血管疾病的病理改变<sup>[1]</sup>。STIM1 基因是近期才发现的一个基因序列, 其位于人的 11 号染色体上, 可以在人类的多种细胞中表达, 包括平滑肌细胞<sup>[5]</sup>。Takahashi 等<sup>[6]</sup>研究也指出沉默 STIM1 表达后通过阻断  $Ca^{2+}$  内流从而抑制体外培养的 VSMC 增殖。在本实验中作者检测 STIM1 基因沉默对 VSMC 细胞周期的影响, 结果表明沉默 STIM1 表达后细胞多数停留在

G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期, 进入 S 期的细胞数减少; 在 STIM1 基因沉默的基础上, 再表达人的重组 STIM1 基因, 进入 S 期的细胞数目被恢复。可以看出 STIM1 沉默后影响了细胞周期的分布, 从而抑制 VSMC 的增殖。

平滑肌细胞增殖的分子机制是从细胞外到细胞内再到核内的复杂过程, 细胞内信息传递分子 MAPK 和核内周期调控蛋白如 p27、p21 和 PCNA 都参与了这一过程<sup>[7,8]</sup>。在正常细胞周期中 G<sub>1</sub> 期是决定细胞增殖的重要时期。p21 属于细胞周期蛋白依赖性激酶抑制物分子中的 KIP/CIP 家族, 其主要功能是与一些激酶复合物结合并抑制这些激酶活化, 使细胞停滞于 G<sub>1</sub> 期, 在细胞周期进程中起负调控作用。本实验结果表明沉默 STIM1 可以上调周期调控蛋白 p21 的表达, 阻滞细胞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期, 抑制细胞增殖。作者又检测了 p21 下游蛋白 pRb 的磷酸化水平, 结果表明沉默 STIM1 细胞中 pRb 磷酸化降低。这提示 p21 通过降低 pRb 磷酸化水平, 使与 pRb 结合的 E2F 基因转录因子不能被释放出来, 因而不能进行 DNA 复制实现抑制细胞增殖<sup>[9]</sup>。

总之, 本研究表明 STIM1 基因沉默上调 p21 表达, 下调 pRb 表达, 抑制细胞进入 S 期, 进而参与对血管平滑肌细胞增殖的调控。由此可以初步推测 STIM1 可能是抑制血管平滑肌细胞的增殖新的药物靶点。

### [参考文献]

- [1] Satoh K, Matoba T, Suzuki J, et al. Cyclophilin A mediates vascular remodeling by promoting inflammation and vascular smooth muscle cell proliferation [J]. *Circulation*, 2008, **117** (24): 3 088-098.
- [2] Zhang SL, Yu Y, Roos J, et al. STIM1 is a  $Ca^{2+}$  sensor that activates CRAC channels and migrates from the  $Ca^{2+}$  store to the plasma membrane [J]. *Nature*, 2005, **437** (7 060): 902-905.
- [3] Spassova MA, Soboloff J, He LP, et al. STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated  $Ca^{2+}$  channels [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103** (12): 4 040-045.
- [4] Guo RW, Yang LX, Wang H, et al. Angiotensin II induces matrix metalloproteinase 9 expression via a nuclear factor-kappaB-dependent pathway in vascular smooth muscle cells [J]. *Regul Pept*, 2008, **147** (1-3): 37-44.
- [5] Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV, et al. STIM1, an essential and conserved component of store-operated  $Ca^{2+}$  channel function [J]. *J Cell Biol*, 2005, **169** (3): 435-445.
- [6] Takahashi Y, Watanabe H, Murakami M, et al. Functional role of stromal interaction molecule 1 (STIM1) in vascular smooth muscle cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, **361** (4): 934-941.
- [7] 薛林, 潘春水, 赵晶, 等. 肾上腺髓质素及其受体系统抑制溶血磷脂酸诱导的大鼠主动脉平滑肌细胞增殖[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, **16** (1): 17-20.
- [8] Sandow SL, Bramich NJ, Bandi HP, et al. Structure, function, and endothelium-derived hyperpolarizing factor in the caudal artery of the SHR and WKY rat [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23** (5): 822-828.
- [9] 何淑雅, 阎宏伟, 杨向东, 等. 外源性 Rb 基因对 U937 细胞泡沫化过程中 CD36 表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (5): 397-400.

(此文编辑 李小玲)