

## 线粒体融合素 2 基因突变体对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响

周炜<sup>1</sup>, 廖华<sup>1</sup>, 曹文静<sup>2</sup>, 陈莉莉<sup>3</sup>, 郭小梅<sup>1</sup>

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 1. 心内科, 2. 检验科, 3. 老年科, 湖北省武汉市 430030)

[关键词] 线粒体融合素 2 基因; 点突变; 血管平滑肌细胞; 细胞增殖

[摘要] 目的 研究大鼠线粒体融合素 2 基因的蛋白激酶 A 磷酸化位点两种突变体对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响及其相关的信号通路。方法 利用两种携带蛋白激酶 A 磷酸化位点突变的线粒体融合素 2 基因重组腺病毒 (Adv-M fn2-alaPKA 和 Adv-M fn2-asnPKA) 和携带线粒体融合素 2 基因的重组腺病毒 (Adv-M fn2), 感染培养的大鼠血管平滑肌细胞。水溶性四甲基偶氮唑盐法比较各组细胞增殖的变化; 流式细胞术比较各组细胞周期的变化; 免疫印迹法比较各组线粒体融合素 2 基因和磷酸化细胞外调节激酶 1/2 蛋白表达变化。结果 感染重组腺病毒的三组细胞线粒体融合素 2 基因表达差异无显著性。与对照组相比, Adv-M fn2-alaPKA 和 Adv-M fn2 组显著抑制细胞增殖 ( $P < 0.01$ ), 停滞于  $G_0/G_1$  期细胞比例显著增加 ( $P < 0.01$ ), 磷酸化细胞外调节激酶 1/2 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ ), 且 Adv-M fn2-alaPKA 作用更明显 ( $P < 0.01$ ), 而 Adv-M fn2-asnPKA 组较对照组差异无显著性。结论 M fn2-alaPKA 通过细胞外调节激酶 1/2 信号通路抑制大鼠血管平滑肌细胞增殖的作用较线粒体融合素 2 基因更明显; 而 M fn2-asnPKA 对血管平滑肌细胞无抑制增殖的作用, 对细胞外调节激酶 1/2 信号通路也无作用。蛋白激酶 A 磷酸化位点是调控线粒体融合素 2 基因抗血管平滑肌细胞增殖的重要功能位点。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Effect of Mitofusin 2 Gene Mutations on the Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells

ZHOU Wei<sup>1</sup>, LIAO Hua<sup>1</sup>, CAO Wen-Jing<sup>2</sup>, CHEN Li-Li<sup>3</sup>, and GUO Xiao-Mei<sup>1</sup>

(1 Department of Cardiology, 2 Clinical Laboratory, 3 Geriatrics Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030 China)

[KEY WORDS] Mitofusin 2 Point Mutation; Vascular Smooth Muscle Cells; Cell Proliferation

[ABSTRACT] **Aim** To study the role of mutations of Mfn2 protein kinase A phosphorylation site in the proliferation of vascular smooth muscle cell (VSMC) and related signaling pathways. **Methods** Two novel mutations were constructed, Adv-Mfn2-alaPKA and Adv-Mfn2-asnPKA, then VSMC were infected with them. The effect of mutations on the proliferation of VSMC was explored by WST-1 assay. The cell cycle was determined using flow cytometry. Western blotting were used to detect the expression of Mfn2 and p-ERK1/2. **Results** The expression of Mfn2 protein has no significant difference in Adv-Mfn2, Adv-Mfn2-alaPKA and Adv-Mfn2-asnPKA groups. Mfn2-alaPKA and Mfn2 both showed stronger inhibitory effect on VSMC proliferation ( $P < 0.01$ ). Most of the cells in these two groups were blocked in the stage of  $G_0/G_1$  ( $P < 0.01$ ), and the expression levels of p-ERK1/2 also decrease ( $P < 0.01$ ). Mfn2-alaPKA is superior to Mfn2 in attenuating the proliferation of VSMCs. The effect of Mfn2-asnPKA is similar to the control. **Conclusion** Mfn2-alaPKA has more stronger inhibitory effect on the proliferation of VSMC than Mfn2, while Mfn2-asnPKA has no effect. PKA phosphorylation site plays an important role in regulating the function of Mfn2 gene.

由基因调控的血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) 过度增殖在动脉粥样硬化、血管介入治疗后再狭窄等细胞异常增殖性疾

病的发生发展中起重要作用<sup>[1]</sup>。线粒体融合素 2 基因 (mitofusin 2, Mfn2) 是从自发性高血压大鼠 VSMC 中克隆获得的基因<sup>[2,3]</sup>。该基因的表达产物可负向调控细胞外调节激酶 1/2 (extracellular signal-regulated kinase, ERK1/2) 信号路径及细胞周期抑制 VSMC 增殖, 与上述疾病关系密切<sup>[4,5]</sup>。目前, 对于 Mfn2 自身活性的调控机制缺乏研究。已知大鼠 Mfn2 蛋白含 757 个氨基酸残基, 其中第 442 位丝氨酸 (Ser442) 为蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 磷酸化位点, 该位点与 Mfn2 的磷酸化状态密切相

[收稿日期] 2009-09-22 [修回日期] 2009-11-02

[基金项目] 国家自然科学基金 (30672206, 30600233)

[作者简介] 周炜, 博士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制及基因治疗, E-mail 为 betaloc25mg@yahoo.com.cn; 廖华, 博士研究生, 研究方向为分子心脏病学。通讯作者郭小梅, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管疾病的介入治疗及分子心脏病学研究, E-mail 为 xmguo@tjh.tjnu.edu.cn

关<sup>[4]</sup>。Mfn2磷酸化是否参与Mfn2功能的调控尚不清楚。为此,本研究利用已构建的4种重组腺病毒,分别携带半乳糖苷酶、Mfn2基因(A<sub>dv</sub>-LacZ, A<sub>dv</sub>-Mfn2),以及两种PKA磷酸化位点突变体,通过研究Mfn2突变体对VSMC增殖及细胞信号通路的影响,阐明PKA磷酸化位点对Mfn2功能的调节作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要仪器和试剂

酶标仪 ELX-800(BIO-TEK 公司);紫外分光光度计 UV-2550(SHIMADZU 公司);流式细胞仪(Becton-Dickinson 公司)。DMEM 培养基、胎牛血清(Gibco 公司);水溶性四甲基偶氮唑盐(WST-1)、碘化丙啶(PI)、RNase A 酶、抗 Mfn2 多克隆抗体(Sigma 公司);抗磷酸化 ERK1/2(p-ERK1/2)、 $\alpha$ -肌动蛋白( $\alpha$ -actin)多克隆抗体(Cell Signaling 公司);显色剂 DC protein assay reagent A/B(Bio-Rad 公司)。其他的试剂采用国产分析纯试剂。

### 1.2 实验分组

我们前期研究已经发现<sup>[4,5]</sup>,Mfn2的Ser442点突变为甘氨酸(ala)后失去磷酸化功能,而突变为天冬酰胺(asn)后具有持续磷酸化特性,因此我们构建了包含这两种突变体的重组腺病毒(A<sub>dv</sub>-Mfn2-alaPKA和A<sub>dv</sub>-Mfn2-asnPKA)以及A<sub>dv</sub>-Mfn2、A<sub>dv</sub>-LacZ。实验分为空白对照组、腺病毒对照组(A<sub>dv</sub>-LacZ)、A<sub>dv</sub>-Mfn2组、A<sub>dv</sub>-Mfn2-alaPKA组和A<sub>dv</sub>-Mfn2-asnPKA组,共5组。

### 1.3 血管平滑肌细胞的培养及重组腺病毒感染

大鼠VSMC由美国国立卫生研究院陈光慧教授惠赠。用含10%胎牛血清(FBS)的DMEM培养液在37℃、5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养,0.25%胰蛋白酶消化传代,3天传一代,实验用第4~5代细胞<sup>[6]</sup>。将VSMC均匀接种于培养皿中,用含10%FBS的DMEM培养液培养24h后利用血清饥饿法进行同步化处理,之后用含100感染复数(multiplicity of infection, MOI)的重组腺病毒感染细胞。

### 1.4 水溶性四甲基偶氮唑盐法检测细胞增殖

将VSMC以每孔 $2 \times 10^3$ 个接种于96孔板,按上述方法处理后继续培养5天。每天各组取6复孔,加入WST-1后按常规方法处理,酶标仪( $\lambda = 450$  nm)测定各孔吸光度(A)值,绘制生长曲线。

### 1.5 流式细胞仪检测细胞周期

将VSMC以每孔 $3 \times 10^5$ 个细胞接种于直径为35 mm培养皿,处理后消化离心收集各组细胞,70%

冰乙醇固定,-20℃过夜,按常规方法加PI染液和RNase A 酶,流式细胞仪分析细胞周期。

### 1.6 免疫印迹检测

细胞裂解法提取蛋白,紫外分光光度计测定蛋白浓度。蛋白上样量均为50  $\mu$ g。10% SDS-PAGE电泳、转膜、封闭后,将膜在一抗(抗 $\alpha$ -actin,抗Mfn2,抗p-ERK1/2 1:2000)中4℃孵育过夜。TBS-T洗脱后放入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2000)中室温孵育2 h ECL系统进行检测。Quantity One软件测定条带灰度值,进行半定量分析。

### 1.7 统计学分析

相关实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 16.0统计软件进行单因素方差分析,组间两两比较采用 $q$ 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结 果

### 2.1 外源基因在血管平滑肌细胞中的表达

用Mfn2多克隆抗体检测各组蛋白表达量,发现A<sub>dv</sub>-Mfn2-alaPKA、A<sub>dv</sub>-Mfn2和A<sub>dv</sub>-Mfn2-asnPKA组特异性条带较对照组明显增强( $P < 0.01$ ),说明基因转染成功,并有效表达出相应蛋白,大小分别为86 kDa和68 kDa(表1和图1)。

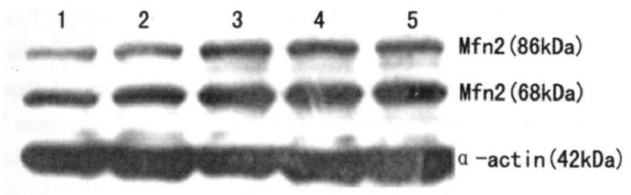


图1 外源基因在血管平滑肌细胞中的表达 1为对照组,2为A<sub>dv</sub>-LacZ组,3为A<sub>dv</sub>-Mfn2-alaPKA组,4为A<sub>dv</sub>-Mfn2组,5为A<sub>dv</sub>-Mfn2-asnPKA组。

表1 外源基因在血管平滑肌细胞中的表达

分 组	Mfn2灰度值
对照组	0.31 ± 0.03
A <sub>dv</sub> -LacZ组	0.35 ± 0.04
A <sub>dv</sub> -Mfn2-alaPKA组	0.74 ± 0.08 <sup>a</sup>
A <sub>dv</sub> -Mfn2组	0.73 ± 0.07 <sup>a</sup>
A <sub>dv</sub> -Mfn2-asnPKA组	0.76 ± 0.08 <sup>a</sup>

a为 $P < 0.01$ ,与对照组A<sub>dv</sub>-LacZ组比较。

### 2.2 细胞生长情况

与对照组和A<sub>dv</sub>-LacZ组相比,A<sub>dv</sub>-Mfn2和

Adv-M fn2-alaPKA 组的细胞增殖明显受到抑制, 且 M fn2-alaPKA 较 M fn2作用更显著 ( $P < 0.01$ ), 而 Adv-M fn2-asnPKA 组较对照组差异无显著性 (图 2)。在第 3、4、5天, Adv-M fn2对细胞增殖的抑制率分别为  $41.6\% \pm 3.2\%$ 、 $46.2\% \pm 3.5\%$ 、 $32.0\% \pm 2.9\%$  ( $P < 0.01$ ); 在第 4、5天, Adv-M fn2-alaPKA 组对细胞增殖的抑制率分别为  $58.6\% \pm 5.1\%$ 、 $50.3\% \pm 4.7\%$  ( $P < 0.01$ ; 图 3)。

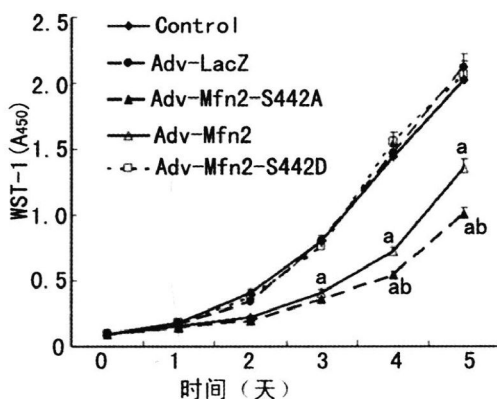


图 2 细胞增殖情况 a为  $P < 0.01$  与对照组、Adv-LacZ组和 Adv-M fn2-asnPKA 组相比; b为  $P < 0.01$  与 Adv-M fn2组相比。

### 2.3 细胞周期

同步化 48 h后, 有  $96.4\% \pm 2.23\%$  的细胞位于  $G_0/G_1$  期。给予含 10% FBS 的 DMEM 培养液刺激 18 h后, 对照组和 Adv-LacZ 组分别有  $62.39\% \pm 4.33\%$  和  $60.42\% \pm 4.57\%$  的细胞进入 S 期; Adv-M fn2-alaPKA 和 Adv-M fn2 组分别有  $36.21\% \pm 3.28\%$  和  $46.83\% \pm 4.42\%$  的细胞进入 S 期。与对照组相比, 此两组细胞周期明显受到抑制 ( $P < 0.01$ ), 且 Adv-M fn2-alaPKA 组更显著 ( $P < 0.01$ )。Adv-M fn2-asnPKA 组有  $60.97\% \pm 5.34\%$  的细胞进入 S 期, 较对照组差异无显著性 (图 3)。

### 2.4 磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2 的表达水平

与对照组和 Adv-LacZ 组相比, Adv-M fn2-alaPKA 和 Adv-M fn2 组的 p-ERK1/2 表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ ), 且 Adv-M fn2-alaPKA 组更显著 ( $P < 0.01$ )。而 Adv-M fn2-asnPKA 组较对照组差异无显著性 (图 4)。

## 3 讨论

M fn2 广泛分布于人体的心、肾、脑、肝、肺等不同组织中, 尤以心脏、肾和脑组织最为丰富, 对线粒体形态及功能的调节, 并在参与线粒体与内质网结

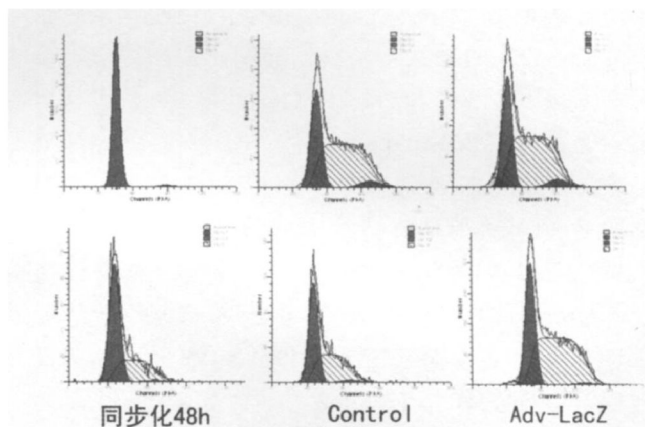


图 3. 流式细胞术检测各组细胞周期 图中从左至右, 第 1 峰  $G_0/G_1$  期, 第 2 峰 S 期, 第 3 峰  $G_2/M$  期。

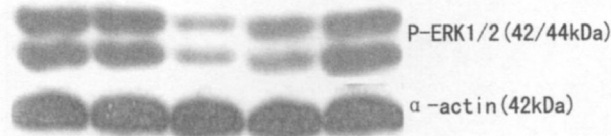


图 4. 磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2 的表达 1 为对照组, 2 为 Adv-LacZ 组, 3 为 Adv-Mfn2-alaPKA 组, 4 为 Adv-Mfn2 组, 5 为 Adv-Mfn2-asnPKA 组。

表 2 磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2 的表达

分 组	p-ERK1/2 灰度
对照组	0.96 ± 0.09
Adv-LacZ 组	0.97 ± 0.08
Adv-M fn2-alaPKA 组	0.22 ± 0.01 <sup>ab</sup>
Adv-M fn2 组	0.45 ± 0.03 <sup>a</sup>
Adv-M fn2-asnPKA 组	0.95 ± 0.08

a为  $P < 0.01$  与对照组、Adv-LacZ 组和 Adv-M fn2-asnPKA 组相比; b为  $P < 0.01$  与 Adv-M fn2 组相比。

合方面有重要的作用<sup>[7-11]</sup>。我们过去的研究发现<sup>[4,5]</sup>, M fn2 是细胞信号转导通路中一个新的调控点, 在与细胞增殖相关的信号传导中具有重要作用。该基因是原癌基因 Ras 的直接负调控因子, 能够与其相互作用, 阻滞 Ras-Raf-ERK1/2 信号通路而将细胞周期阻断在  $G_0/G_1$  期, 抑制细胞增殖。随后研究表明<sup>[12]</sup>, M fn2 通过以上信号路径抑制由氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL) 诱导的 VSMC 增殖, 并延缓大鼠动脉粥样硬化的进程。另有研究发现<sup>[13]</sup>, M fn2 也参与氧化应激诱导的心肌细胞凋亡。这些研究都提示该基因是干预或治疗血管增殖性疾病的新靶点。

大鼠 M fn2 的全长 cDNA 序列为 4 151 bp 编码含 757 个氨基酸残基的蛋白质, 其中 Ser442 为 PKA

磷酸化位点<sup>[4]</sup>。Mfn2蛋白在细胞中存在PKA磷酸化和非磷酸化两种状态。我们前期研究采用点突变方法,将Mfn2基因Ser442用甘氨酸取代,并表达此点突变蛋白(Mfn2-alaPKA),体外磷酸化实验证实此蛋白不能被PKA磷酸化。而将Ser442用天冬酰胺取代,则可获得具有持续磷酸化活性的突变蛋白(Mfn2-asnPKA)。而本研究发现,Ser442点突变不影响Mfn2蛋白表达,但Mfn2-alaPKA抑制细胞增殖作用较Mfn2更显著;Mfn2-alaPKA将细胞周期阻滞于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期的作用较Mfn2更强;Mfn2-alaPKA对ERK1/2信号通路的抑制作用也较Mfn2更显著。而Mfn2-asnPKA不能抑制细胞增殖及阻滞细胞周期,对ERK1/2信号通路也无显著的抑制作用。这表明,Mfn2蛋白Ser442的磷酸化状态对其功能具有重要的调节作用。在Ser442突变为甘氨酸去磷酸化的状态下,Mfn2抑制VSMC增殖的作用显著增强;而在Ser442突变为天冬酰胺具有持续磷酸化活性的状态下,Mfn2不能抑制VSMC增殖。

PKA是环磷酸腺苷(cAMP)最主要的效应分子,而cAMP又是细胞信号转导中重要的第二信使。cAMP-PKA构成的信号通路是真核细胞的重要信号调控系统,通过对丝氨酸和苏氨酸的磷酸化作用激活或抑制各种效应蛋白,影响细胞功能<sup>[14]</sup>。Mfn2蛋白具有PKA磷酸化位点,本研究表明,该位点的突变导致Mfn2磷酸化状态的变化,影响其对VSMC增殖抑制的功能。由此推测,cAMP-PKA信号通路可通过调节Mfn2磷酸化状态进而调节其功能变化,影响VSMC的增殖过程,但尚需进一步试验证实。

#### [参考文献]

- [1] 于维东,胡新华,范红杰,等. 蛋白激酶B短发夹环RNA表达载体的构建及其对血管平滑肌细胞增殖活性的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15(10): 721-724
- [2] 陈光慧,张晨晖,汤健,等. 一个新的高血压病相关基因的克隆和表达[J]. 中华医学杂志, 1997, 77(11): 823-828
- [3] Chen KH, Wang FQ, Zhang H, et al. Cloning and expression of a novel cDNA related to Hypertension [J]. *Clin Med J*, 1998, 111(4): 384-386
- [4] Chen KH, Guo XM, Ma DL, et al. Dysregulation of HSC triggers vascular proliferative disorders [J]. *Nature Cell Biol*, 2004, 6(9): 872-883
- [5] Guo XM, Chen KH, Guo YH, et al. Mitofusin 2 triggers vascular smooth muscle cell apoptosis via mitochondrial death pathway [J]. *Circ Res*, 2007, 101(11): 1113-1122
- [6] 涂兵,贺红,杨发林,等. 阿司匹林对血管平滑肌细胞增殖及增殖细胞核抗原表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15(5): 358-360
- [7] Neuspiel M, Zunino R, Gangaraju S, et al. Activated mitofusin 2 signals mitochondrial fusion, interferes with Bax activation, and reduces susceptibility to radical induced depolarization [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(26): 25060-070
- [8] Huang PW, Yu TZ, Yoon YS, et al. Mitochondrial clustering induced by overexpression of the mitochondrial fusion protein Mfn2 causes mitochondrial dysfunction and cell death [J]. *Euro J Cell Biol*, 2007, 86(6): 289-302
- [9] De Brito OM, Scorrano L. Mitofusin 2: A Mitochondria-Shaping Protein with Signaling Roles Beyond Fusion [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2008, 10(3): 621-633
- [10] Carsten M, Thomas L. Mitofusin 2 builds a bridge between ER and mitochondria [J]. *Cell*, 2008, 135(7): 1165-1167
- [11] De Brito OM, Scorrano L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria [J]. *Nature*, 2008, 456(7222): 605-611
- [12] Guo YH, Chen KH, Wei G, et al. Overexpression of mitofusin 2 inhibited oxidized low-density lipoprotein induced vascular smooth muscle cell proliferation and reduced atherosclerotic lesion formation in rabbit [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 363(2): 411-417
- [13] Shen T, Zheng M, Cao CM, et al. Mitofusin-2 is a major determinant of oxidative stress-mediated heart muscle cell apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(32): 23354-361
- [14] Baillie GS. Compartmentalized signalling: spatial regulation of cAMP by the action of compartmentalized phosphodiesterases [J]. *FEBS J*, 2009, 276(7): 1790-799

(此文编辑 李小玲)