

TGF- β 1/Smad3 参与调节氧化型低密度脂蛋白刺激的 内皮细胞炎症蛋白表达

王文东, 陈北冬, 齐若梅

(卫生部北京医院/卫生部北京老年医学研究所 卫生部老年医学重点实验室, 北京市 100730)

[关键词] 转化生长因子 β 1; Smad3; 人脐静脉内皮细胞; 血管细胞黏附分子 1; 细胞间黏附分子 1

[摘要] 目的 探讨转化生长因子 β 1/Smad(TGF- β 1/Smad) 信号通路参与氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)刺激的人脐静脉内皮细胞血管细胞黏附分子 1(VCAM-1)和细胞间黏附分子 1(ICAM-1)表达的分子机制。方法 体外培养人脐静脉内皮细胞,加入 ox-LDL(0.1 g/L)刺激细胞,用 Western blot 检测 TGF- β 1、Smad3 磷酸化、VCAM-1 和 ICAM-1 的表达。结果 ox-LDL 明显增加人脐静脉内皮细胞 VCAM-1 和 ICAM-1 的表达($P < 0.05$)。ox-LDL 激活人脐静脉内皮细胞 TGF- β 1/Smad 信号通路,TGF- β 1 表达明显增加,Smad3 磷酸化明显增强。细胞核提取物分析表明,磷酸化的 Smad3 在细胞核表达增加。特异性 Smad3 磷酸化抑制剂 SIS3 以浓度依赖方式抑制 ox-LDL 刺激的 Smad3 磷酸化($P < 0.05$),且 VCAM-1 和 ICAM-1 的表达增加($P < 0.05$)。结论 TGF- β 1/Smad 信号通路参与调节氧化型低密度脂蛋白刺激的内皮细胞炎症蛋白表达,抑制 Smad3 磷酸化反而增加炎症蛋白表达,提示 TGF- β 1/Smad3 通道活化具有抑制 ox-LDL 刺激的内皮细胞炎症蛋白表达的影响。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

TGF- β 1/Smad3 Regulation of Inflammatory Protein Expression Induced by Oxidized Low Density Lipoprotein in Human Umbilical Vein Endothelial Cells

WANG Wen-Dong, CHEN Bei-Dong, and QI Ruo-Mei

(Beijing Hospital of Ministry of Health/Beijing Institute of Geriatrics, Ministry of Health & Key Laboratory of Geriatric Medicine, Ministry of Health, Beijing 100730, China)

[KEY WORDS] Transforming Growth Factor- β 1; Smad3; Human Umbilical Vein Endothelial Cells; Vascular Cell Adhesion Molecular-1; Intercellular Cell Adhesion Molecule-1

[ABSTRACT] Aim To investigate the molecular mechanism of inflammatory protein expression via transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)/Smad pathway in ox-LDL-stimulated human umbilical vein endothelial cells (HUVEC).

Methods HUVEC were treated with 0.1 g/L of ox-LDL. TGF- β 1, Smad3, VCAM-1 and ICAM-1 protein expression, and Smad3 phosphorylation were determined by Western blot.

Results ox-LDL obviously increased the expression of VCAM-1 and ICAM-1 in HUVEC. TGF- β 1 expression and Smad3 phosphorylation were enhanced in ox-LDL-stimulated HUVEC. Nuclear extract analysis showed that the phosphorylated Smad3 expression was increased in ox-LDL-treated cells. SIS3 (a specific inhibitor of Smad3) inhibited Smad3 phosphorylation in a dose-dependent manner, however, VCAM-1 and ICAM-1 expression were increased in ox-LDL-treated cells.

Conclusions TGF- β 1/Smad signaling involved in the regulation of inflammatory protein expression in HUVEC induced by ox-LDL, the inhibition of Smad3 phosphorylation increased the expression of inflammatory protein, suggesting that TGF- β 1/Smad3 signaling repressed the inflammatory protein expression in ox-LDL-treated endothelial cells.

动脉粥样硬化是一种慢性炎症性疾病,氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)在这一炎症过程中起十分重要

的作用^[1,2]。ox-LDL 刺激血管内皮细胞可促使其表达炎症蛋白,并募集单核细胞参与炎症反应^[3]。ox-

[收稿日期] 2011-08-29

[基金项目] 国家自然科学基金项目(青年基金 30900627)

[作者简介] 王文东,硕士研究生,主要从事动脉粥样硬化的分子机制研究,E-mail 为 wwd.com2@163.com。通讯作者齐若梅,博士,研究员,博士研究生导师,主要从事动脉粥样硬化与炎症的分子机制、血栓学研究,E-mail 为 ruomeiqi@yahoo.com.cn。

LDL 刺激血管内皮细胞活化,表达血管细胞黏附分子 1 (VCAM-1) 和细胞间黏附分子 1 (ICAM-1) 已经被先前的研究所证实^[4]。TGF- β 1/Smad 信号通路在调节血管细胞功能方面具有多种作用,如抑制血管细胞活化、抗炎、抑制动脉粥样硬化的作用^[5,6]。转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 是一组在结构上相似的转化生长因子,具有多种调节细胞功能的作用,能够调节细胞增殖与分化、细胞凋亡、细胞迁移和细胞间粘连^[7,8]。然而,在血管细胞中,ox-LDL 对 TGF- β 1/Smad 信号通路的影响,以及这一通道参与调节炎症蛋白表达的分子机制尚未完全阐明^[9]。本研究观察了 ox-LDL 对于 TGF- β 1/Smad 信号通路,以及 Smad3 活化对 ox-LDL 刺激的血管内皮细胞炎症蛋白表达的影响。

1 材料和方法

1.1 药品与试剂

I 型胶原酶、明胶和抑制剂 SIS3 (Sigma 公司);胰蛋白酶、低糖型 DMEM 培养基和胎牛血清 (Hyclone 公司);内皮细胞生长因子 (Roche 公司);兔抗人 TGF- β 1 多克隆抗体 (中杉金桥公司);小鼠抗人 ICAM-1 单克隆抗体、兔抗人 VCAM-1 多克隆抗体、小鼠抗人 Smad3 单克隆抗体 (Santa Cruz 公司),兔抗人 p-Smad3 单克隆抗体 (Cell Signaling Technology 公司);细胞核和细胞质蛋白提取试剂盒 (Pierce 公司);辣根过氧化物酶标记的兔抗山羊、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔和辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠 (中杉金桥公司)。

1.2 ox-LDL 的制备

取新鲜人血清,用梯度超速离心法分离低密度脂蛋白,使用 BCA 法测定蛋白浓度。用 5 μ mol/L 硫酸铜氧化低密度脂蛋白,37 $^{\circ}$ C、16 h,将低密度脂蛋白在 PBS (pH 7.4) 中 4 $^{\circ}$ C 透析 24 h,除菌后备用。用硫代巴比妥法确认低密度脂蛋白的氧化程度。

1.3 人脐静脉内皮细胞的分离与培养

用 I 型胶原酶灌注消化法分离新鲜脐静脉血管内皮细胞,将分离的内皮细胞置于培养皿中,用含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基、1 $\times$ 10⁵ U/L 青霉素及链霉素在 5% CO₂ 孵箱中培养细胞。细胞传代至第 3 代供实验使用。

1.4 Western blot 检测人脐静脉内皮细胞 TGF- β 1、Smad3、磷酸化 Smad3、VCAM-1 及 ICAM-1 的蛋白表达

人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 接种于培养皿中,当培养至亚融合状态,实验前 12 h 去除牛血清,饥

饿细胞。加入 ox-LDL 刺激细胞,收集全细胞裂解液,采用 BCA 法进行蛋白定量。取 20 μ g 蛋白样品经 SDS-PAGE 后,转膜,5% PBS-T 缓冲液封闭 1 h,1:1000 一抗室温孵育 2 h,PBS-T 缓冲液洗 3 次,每次 5 min,用二抗室温孵育 1 h,PBS-T 缓冲液洗 3 次,每次 5 min,用化学发光剂显色,X 线片曝光。

1.5 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析及 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ox-LDL 刺激内皮细胞 VCAM-1 和 ICAM-1 表达

ox-LDL 刺激内皮细胞 VCAM-1 和 ICAM-1 蛋白表达明显增加 (*P* < 0.05), 4 ~ 6 h 达到高峰,12 h 后 VCAM-1 和 ICAM-1 蛋白表达渐下降,在 24 h 与空白对照组无明显差别 (图 1)。

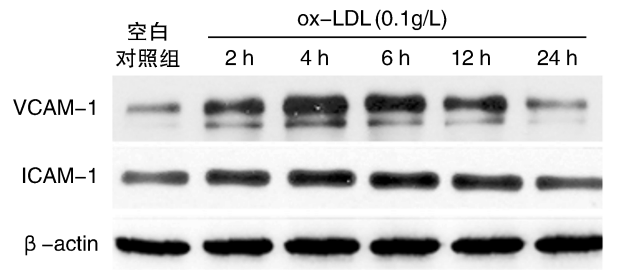


图 1. ox-LDL 刺激人脐静脉内皮细胞 VCAM-1 和 ICAM-1 表达 (*n* = 4)

Figure 1. ox-LDL induces the expression of VCAM-1 and ICAM-1 in HUVEC

2.2 ox-LDL 刺激 TGF- β 1/Smad 通道活化

与空白对照相比,ox-LDL 刺激 HUVEC 明显增加 TGF- β 1 蛋白表达 (*P* < 0.05)。ox-LDL 显著增加了 Smad3 的磷酸化 (*P* < 0.05),在 24 h 达到峰值,呈时间依赖性,而非磷酸化的 Smad3 表达逐渐减少 (图 2)。

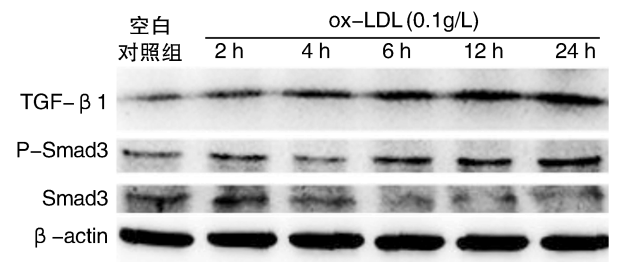


图 2. ox-LDL 刺激人脐静脉内皮细胞 TGF- β 1 表达和 Smad3 磷酸化 (*n* = 4)

Figure 2. ox-LDL increases TGF- β 1 expression and Smad3 phosphorylation in HUVEC

2.3 ox-LDL 刺激磷酸化的 Smad3 向细胞核转移

ox-LDL 刺激内皮细胞 6 h 后,与空白对照组相比,磷酸化的 Smad3 在全细胞以及细胞核中表达均

明显增加。二者相比,磷酸化的 Smad3 在细胞核中增加更为显著,提示 ox-LDL 刺激磷酸化的 Smad3 向细胞核转移(图 3)。

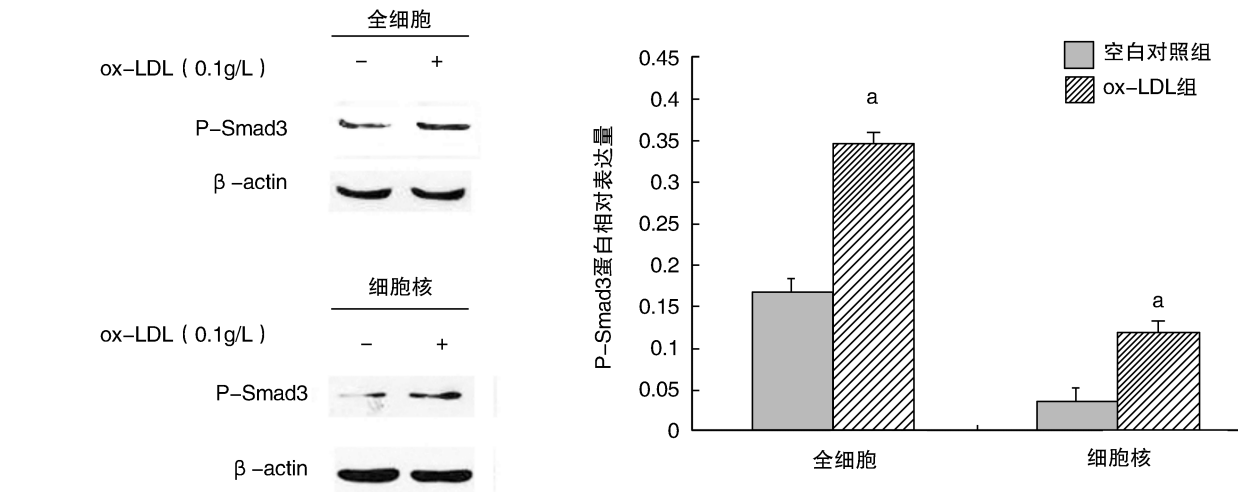


图 3. ox-LDL 刺激磷酸化的 Smad3 在细胞核内表达 ($n=4$) a 为 $P<0.01$,与空白对照组相比。
Figure 3. ox-LDL induces phosphorylated Smad 3 expression in nucleus

2.4 抑制 Smad3 的磷酸化 VCAM-1 和 ICAM-1 表达增加

SIS3 呈浓度依赖性抑制 ox-LDL 刺激的 Smad3 磷酸化($P<0.05$)。SIS3 预孵育的细胞 VCAM-1 和 ICAM-1 表达增加($P<0.05$;图 4),提示 Smad3 参与调节炎症蛋白的表达。

3 讨论

越来越多的研究证实 ox-LDL 在动脉粥样硬化的发生发展过程中发挥着关键的作用^[2]。ox-LDL 引起血管内皮活化,VCAM-1、ICAM-1 等黏附分子的表达水平上调,使单核细胞细胞黏附于血管内皮,是动脉粥样硬化的早期发生中极为重要的一步^[10]。TGF- β 1/Smad 信号通路早已被证实具有抗炎、抗动脉粥样硬化的作用^[5,6,11]。但是在血管细胞中,ox-LDL 对 TGF- β 1/Smad 信号通路的作用及具体分子机制并未被阐明^[9]。同时,TGF- β 1/Smad 信号通路影响血管内皮活化的具体机制也未见报道。

本研究中,ox-LDL 可激活 TGF- β 1/Smad 信号通路,引起 TGF- β 1 表达增加,Smad3 磷酸化并进入细胞核。同时,ox-LDL 也可使 HUVEC 中 VCAM-1 和 ICAM-1 的表达增高。随着 TGF- β 1 表达不断增加,VCAM-1、ICAM-1 表达呈减弱趋势。为了进一步验证 TGF- β 1 是否抑制血管内皮活化,我们用特异性 Smad3 磷酸化抑制剂 SIS3^[12] 抑制 Smad3 磷酸化,发现血管内皮细胞 VCAM-1 和 ICAM-1 表达明显上调,表明 TGF- β 1/Smad 信号通路通过 Smad3 磷酸化抑制内皮活化。该结果与先前报道的 TGF- β 1 可以抑制 VCAM-1 和 ICAM-1 相一致^[13,14],与 TGF- β 1 可以通过 Smad3 抑制单核细胞趋化蛋白 1 也相一致,其机制可能是通过磷酸化的 Smad3 入核和转录调节因子 c-Jun 结合,从而抑制转录激活蛋白 1

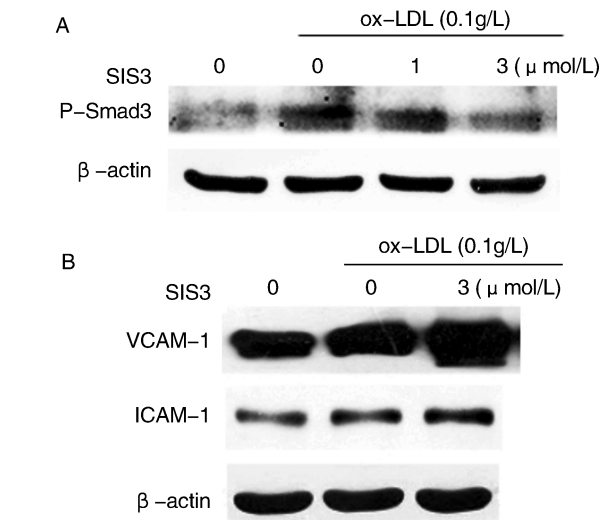


图 4. SIS3 对 ox-LDL 刺激 Smad3 磷酸化和 VCAM-1 和 ICAM-1 蛋白表达的影响 ($n=6$) A 为 SIS3 对 ox-LDL 刺激 Smad3 磷酸化的影响,B 为 SIS3 对 ox-LDL 刺激 VCAM-1 和 ICAM-1 蛋白表达的影响。
Figure 4. Effect of SIS3 on Smad3 phosphorylation and VCAM-1, ICAM-1 expression in ox-LDL-treated cells

(AP-1)与DNA结合来实现的^[15]。

ox-LDL 激活 TGF-β1/Smad 信号通路,早在1997年Ding等^[16]就报道 ox-LDL 可以引起 TGF-β1 的增高,其时间梯度与本实验相符。有研究表明在大鼠肾小球系膜细胞中,ox-LDL 通过 PKC 信号转导途径激活 AP-1 中的 c-Jun 蛋白,再由 c-Jun/AP-1 从转录水平上调 TGF-β1 的表达^[17]。同时也有研究证实血管紧张素 II 可通过 JNK-c-Jun/AP-1 信号通路上调系膜细胞 TGF-β1 的表达^[18]。这些研究都显示了 ox-LDL 可通过 PKC 信号通路激活 AP-1,继而激活 TGF-β1/Smad 信号通路。根据这些研究,我们推测 TGF-β1/Smad 信号通路与 AP-1 信号通路可能是负反馈机制:AP-1 激活 TGF-β1/Smad 信号通路,而 TGF-β1/Smad 信号通路通过磷酸化的 Smad3 与转录调节因子 c-Jun 结合,抑制 AP-1 的进一步激活,从而抑制炎症蛋白表达。

综上所述,本研究主要发现,在人脐静脉血管内皮细胞中,ox-LDL 可激活 TGF-β1/Smad 信号通路,引起 TGF-β1 表达以及 Smad3 磷酸化增强,并可见到磷酸化的 Smad3 向细胞核转移。伴随 Smad3 磷酸化增强,ox-LDL 刺激的 VCAM-1 和 ICAM-1 的表达减少。使用 Smad3 抑制剂,这些炎症蛋白表达增加。由于 TGF-β1/Smad 信号通路具有抗炎、抗动脉粥样硬化作用,其机制的阐明有助于找到新的药物干预靶点,为临床动脉粥样硬化治疗提供新的研究视野。

[参考文献]

[1] Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease[J]. N Engl J Med, 1999, 340 (2): 115-126.

[2] Parthasarathy S, Steinberg D, Witztum JL. The role of oxidized low density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. Annu Rev Med, 1992, 43: 219-225.

[3] O’Byrne D, Devaraj S, Islam KN, et al. Low density lipoprotein (LDL)-induced monocyte-endothelial cell adhesion, soluble cell adhesion molecules, and autoantibodies to oxidized-LDL in chronic renal failure patients on dialysis therapy[J]. Metabolism, 2001, 50: 207-215.

[4] Cernuda-Morollón E, Ridley AJ. Rho GTPases and leukocyte adhesion receptor expression and function in endothelial cells[J]. Circ Res, 2006, 98 (6): 757-767.

[5] Grainger DJ. Transforming growth factor and atherosclerosis: so far, so good, for the protective cytokine hypothesis [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24: 399-404.

[6] Feinberg MW, Watanabe M, Lebedeva MA, et al. Trans-

forming growth factor-beta1 inhibition of vascular smooth muscle cell activation is mediated via Smad3[J]. J Biol Chem, 2004, 279: 16 388-393.

[7] Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus[J]. Cell, 2003, 113: 685-700.

[8] Massague J. TGF-beta in Cancer[J]. Cell, 2008, 134: 215-230.

[9] Maziere C, Maziere JC. Activation of transcription factors and gene expression by oxidized low-density lipoprotein [J]. Free Radic Biol Med, 2009, 46: 127-137.

[10] Kita T, Kume N, Minami M, et al. Role of oxidized LDL in atherosclerosis[J]. Ann N Y Acad Sci, 2001, 947: 199-205.

[11] Werner F, Jain MK, Feinberg MW, et al. Transforming growth factor-beta 1 inhibition of macrophage activation is mediated via Smad3[J]. J Biol Chem, 2000, 275 (4): 36 653-658.

[12] Jinnin M, Ihn H, Tamaki K. Characterization of SIS3, a novel specific inhibitor of Smad3, and its effect on transforming growth factor-beta1-induced extracellular matrix expression[J]. Mol Pharmacol, 2006, 69 (2): 597-607.

[13] Gamble JR, Bradley S, Noack L, et al. TGF-β and endothelial cells inhibit VCAM-1 expression on human vascular smooth muscle cells[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995, 15: 949-955.

[14] Grunberg E, Eckert K, Maurer HR, et al. Prothymosin alphas antagonizes the inhibitory effects of transforming growth factor-beta1 on the adhesion of peripheral blood lymphocytes to human umbilical vein endothelial cells [J]. Int J Mol Med, 1998, V1N4: 741-746.

[15] Feinberg MW, Shimizu K, Lebedeva M, et al. Essential role for Smad3 in regulating MCP-1 expression and vascular inflammation[J]. Circ Res, 2004, 94: 601-608.

[16] Ding G, van Goor H, Ricardo SD, et al. Oxidized LDL stimulates the expression of TGF-beta and fibronectin in human glomerular epithelial cells[J]. Kidney Int, 1997, 51 (1): 147-154.

[17] 周钦, 兰洋, 王远程, 等. AP-1 在转录水平调控氧化低密度脂蛋白诱导的转化生长因子 β1 表达[J]. 中华医学杂志, 2002, 82 (16): 1 346-350.

[18] 黄松明, 张爱华, 丁桂霞, 等. 血管紧张素 II 通过 JNK-c-Jun/AP-1 信号通路调控系膜细胞转化生长因子 β1 表达[J]. 中华肾脏病杂志, 2003, 19 (5): 301-304.

(此文编辑 文玉珊)