

E1A 激活基因阻遏子蛋白与细胞膜受体 IGF2R(11 ~ 13) 结构域作用抑制人血管平滑肌细胞迁移

闫承慧, 孙鸣宇, 张效林, 徐凯, 李毅, 王效增, 韩雅玲
(解放军沈阳军区总医院全军心血管病研究所, 辽宁省沈阳市 110840)

[关键词] E1A 蛋白; 阻遏子; 平滑肌细胞迁移

[摘要] **目的** 研究人 E1A 激活基因阻遏子基因(CREG)蛋白在人血管平滑肌细胞迁移中的作用。**方法** 构建含有 myc 和 His 标签的野生型 CREG(wtCREG)和去糖基化突变型 CREG(mCREG)真核表达载体 pcDNA3.1 myc-His/wt/mCREG。转染人 293F 细胞株, Ni-NTA 亲和层析方法纯化获得 wtCREG 和 mCREG 蛋白; 将重组 wt-CREG(400 nmol/L)及 mCREG 蛋白(400 nmol/L), 分别加入体外培养的低表达 CREG 的人血管平滑肌细胞 OB2 中, 应用 Western blot、细胞刮伤实验、明胶酶电泳方法观察两种重组人 CREG 蛋白对人血管平滑肌细胞迁移和分化等生物学行为的影响; 通过不同浓度(2、4、8 mg/L)的胰岛素生长因子 2 受体(M6P/IGF2R)中和抗体与人 M6P/IGF2R 细胞外结构域蛋白小肽分别进行阻断实验, 分析 M6P/IGF2R 是否参与介导 CREG 蛋白对平滑肌细胞迁移的调控。**结果** 刮伤实验发现, 加入最佳效应浓度的 wtCREG 和 mCREG 蛋白 24 h 后, OB2 组细胞的迁移能力均明显下降; 明胶酶电泳和 Western blot 检测结果也证实, 两种重组 CREG 蛋白均可以使细胞外基质金属蛋白酶 2、基质金属蛋白酶 9 的合成及活性减少, 而组织金属蛋白酶抑制物表达则明显增加; 同时, Western blot 分析也证实, 平滑肌细胞分化标志蛋白 myocardin、SM α -actin、肌球蛋白重链和 caldesmin 表达增加, LM-1 和 FN 表达减少。提示两种重组 CREG 蛋白均能够抑制体外培养的人血管平滑肌细胞迁移, 促进其分化。IGF2R 中和抗体和 IGF2R 小肽阻断实验证实: 不同浓度的 Anti-M6P/IGF2R 能有效阻断两种 CREG 蛋白对人血管平滑肌细胞迁移和细胞外基质合成的调控作用。并且, M6P/IGF2R 的第 11~13 结构域小肽片段对 wt/mCREG 蛋白的生物学效应也有明显的阻断作用。**结论** 重组 CREG 蛋白可能通过细胞膜表面 M6P/IGF2R 的 11~13 结构域抑制人血管平滑肌细胞迁移和细胞外基质分泌, 维持细胞分化。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Cellular Repressor of E1A-stimulated Genes Inhibits the Migration of Human Vascular Smooth Muscle Cells via Binding of the M6P/IGF2R (11-13) Domains

YAN Cheng-Hui, SUN Ming-Yu, ZHANG Xiao-Lin, XU Kai, LI Yi, WANG Xiao-Zeng, and HAN Ya-Ling

(Cardiovascular Research Institute and Department of Cardiology, Shenyang General Hospital of PLA, Shenyang, Liaoning 110840, China)

[KEY WORDS] E1A Protein; Repressor; Smooth Muscle Cell Migration

[ABSTRACT] **Aim** The present study aimed to investigate the bio-function and mechanism of cellular repressor of E1A-stimulated genes (CREG) protein on the migration of vascular smooth muscle cells (SMCs). **Methods** Human wild-type and glycosylation mutant CREG proteins (named wtCREG or mCREG) were transfected and purified in human 293F cells. Human SMCs with CREG knocked-down expression (named OB2) were used to evaluate the effects of two kinds of recombinant CREG protein. The migration of OB2 cells was evaluated by wound-healing assay. The expression and activity was detected by Western blot and gelatin zymography. The differentional marker proteins of SMCs were i-

[收稿日期] 2011-12-17

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81070097、30971218); 辽宁省科技攻关项目(200925009-9); 辽宁省自然科学基金资助项目(20092088、20092090、20091100)

[作者简介] 闫承慧, 博士, 副主任技师, 研究方向为冠心病治疗的基础研究, E-mail 为 yanch1029@gmail.com。孙鸣宇, 硕士, 主治医师, 研究方向为冠心病治疗的基础研究, E-mail 为 sunmingyu@126.com。通讯作者韩雅玲, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 博士后指导教师, 研究方向为心血管疾病的的基础、临床及介入治疗, E-mail 为 yalinghan@gmail.com。

identified to express by Western blot analysis. Furthermore, using soluble mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor-2 receptor (M6P/IGF2R) fragments and M6P/IGF2R neutralizing antibody, the blocking analysis was finished by detecting the migration of OB2 cells. **Results** Both wtCREG and mCREG (400 nmol/L) inhibit the migration of OB2 cells. Meanwhile, the expression and activity of matrix metalloproteinase-2 (MMP2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP9) were identified to reduce in OB2 cells when treated with recombinant CREG protein. Reversely, the expressions of myocardin, smooth muscle α -actin (SM α -actin), myosin heavy chain (MHC) and caldesmin were detected to enhance obviously. Further blocking experiments using soluble M6P/IGF2R fragments and M6P/IGF2R neutralizing antibody suggest that two kinds of recombinant protein are adequate for modulating SMC migration by binding to domains 11-13. **Conclusion** These data suggest that soluble CREG protein can exert its biological function via binding to cell surface M6P/IGF2R, and thereby provide novel insights into CREG modulation of SMC phenotypic switching from contractile to migration.

血管损伤后,血管中膜平滑肌细胞(smooth muscle cells, SMCs)由静息分化表型向去分化表型转化,发生迁移,形成增生内膜,是血管疾病病理发生的重要环节^[1]。目前已知多种生长因子、细胞外基质和细胞活性分子都参与诱导病理性损伤后血管中膜 SMCs 从分化表型向去分化表型转化的迁移过程,产生过度修复的有害作用,参与增生性血管病的形成。相反,那些在病理损伤过程中能够维持 SMCs 分化稳态的有益的血管活性分子却鲜有报道^[2]。因此,寻找这类保护性血管活性分子并探明其作用机制对人类增生性血管疾病的防治研究具有重要意义。

人 E1A 激活基因阻遏子基因(cellular repressor of E1A-stimulated genes, CREG)是 1998 年美国哈佛大学医学院 Gill 从子宫颈内膜癌 HeLa 细胞 cDNA 文库中克隆的一个转录相关调控因子^[3]。CREG 基因 cDNA 全长 667 bp,编码 220 个氨基酸的小分子糖蛋白,在 N 末端含有 3 个甘露糖-6-磷酸(mannose-6-phosphate, M6P)结合位点。Gill 等早期研究认为^[4],CREG 可作为一种转录因子与腺病毒蛋白 E1A、转录因子 E2F 竞争结合靶基因的启动子区,阻遏 E1A 和 E2F 对靶基因的转录,抑制细胞增殖。进一步研究证实^[5],CREG 是一种分泌型糖蛋白,在分化成熟的组织和血管中广泛表达,在未分化组织细胞(如胚胎干细胞和畸胎瘤细胞)中表达极低。体外添加分泌型 CREG 蛋白显著抑制了畸胎瘤细胞的增殖并促进其向神经细胞自主分化。这些研究提示:CREG 可以通过自分泌或旁分泌作用诱导并维持多种组织或细胞的分化成熟稳态。

我所 1999 年应用 mRNA 差异显示技术首次从体外培养的人胸腔内动脉 SMCs 中克隆到了人 CREG 基因,证实 CREG 表达与 SMCs 分化成熟密切相关,提示 CREG 基因促进了 SMCs 向分化表型的转化。本所多年研究证实^[6]:CREG 蛋白表达并分

泌后可抑制体外培养的血管 SMCs 增殖。并且,进一步在体动物实验研究也证实外源性 CREG 基因过表达维持 SMCs 分化稳态,能够抑制损伤血管中新生内膜形成,对抗损伤后血管增生性疾病的发生。那么,CREG 蛋白作为 SMCs 表达并分泌的一种新的血管活性分子,能否通过自分泌和/或旁分泌方式抑制 SMCs 迁移,从而维持细胞的分化稳态对抗病理性疾病的发生呢? 这些问题仍待阐明。为解决这些问题,深入揭示 CREG 蛋白在 SMCs 分化稳态调控中的生物学机制,本研究分别借助我所构建的含有 His-myc 蛋白标签的重组野生型 CREG 蛋白(wild type CREG, wtCREG)表达载体和糖基化位点缺失突变型的重组 CREG 蛋白(mutant CREG, mCREG)表达载体,应用人胚肾工程细胞株(293F)和 Ni-NTA 亲和层析方法纯化得到重组的人 wtCREG 蛋白及 mCREG 蛋白^[7],进一步应用体外培养的正常 SMCs(命名为 HITASY 细胞)和 CREG 基因 knock-down 的 SMCs(命名为 OB2 细胞)模型,探讨外源性添加两种 CREG 蛋白对 SMCs 迁移的调控作用,并确定细胞膜受体胰岛素生长因子 2 受体(mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor-2 receptor, M6P/IGF2R)参与介导两种重组 CREG 蛋白对细胞表型转化的调控及互作结构域,进一步阐明 CREG 蛋白作为维持血管分化稳态的活性分子的临床应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料

HITASY 细胞株, HITASY CREG knock down 细胞株(以下简称为 OB2 细胞株),稳定表达重组人 wtCREG/myc-His 融合糖蛋白和稳定表达重组人 mCREG/myc-His 融合糖蛋白的 293F 细胞由本所建立。Anti-myc、Anti-His 抗体和 Ni-NTA 蛋白纯化试剂盒均购自美国 Invitrogen 公司。 β -巯基乙醇、咪

唑、蛋白酶抑制剂购自美国 Sigma 公司。增强化学发光试剂 (ECL) 购自美国 Amersham 公司, 蛋白测定 BCA 试剂盒购自美国 Pierce 公司, 辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠抗体购自中杉公司, DMEM 和小牛血清购自 Gibco 公司。Centriprep 离心超滤管购自美国 Millipore 公司。HiTrap 脱盐柱购自美国 GE Healthcare Bio-Sciences 公司。Anti-CREG、Anti-IGF2R、Anti-SMA、Anti-FN、Anti-MMP2、Anti-MMP9 抗体和 IGF2R(11~13) 小肽购自美国 RD 公司。

1.2 重组人 wtCREG/myc-His 融合糖蛋白和 mCREG/myc-His 蛋白的制备

1.2.1 重组蛋白的表达及纯化

重组人 wt-CREG/myc-His 和 mCREG/myc-His 融合糖蛋白表达、纯化及鉴定方法参照文献进行^[7,8]。

1.2.2 重组人 wtCREG/myc-His 融合糖蛋白和 mCREG/myc-His 蛋白的鉴定^[8]

取 10 μ L 细胞裂解产物、穿透液及洗液, 30 μ L 洗脱液 (第 1~8 管) 上样, 以 1:3 500 Anti-myc 单克隆抗体作为一抗, 以 1:2 000 辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠抗体作为二抗, 行 Western blot 检测, 用 ECL 试剂盒发光显影。取浓缩脱盐后的纯化蛋白 30 μ L, 行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 0.1% 考马斯亮蓝染色, 用脱色液 (50 mL 乙酸 + 150 mL 甲醇 + 300 mL 双蒸水) 脱色至出现明显清晰的谱带。经 Image-J 软件分析蛋白纯度。取 30 μ L 浓缩并脱盐后的纯化蛋白, 加入 1 \times 糖蛋白变性缓冲液 3 μ L, 100 $^{\circ}$ C 煮沸 10 min 后, 加入 10 \times G7 缓冲液 3 μ L 及 10% NP-40 3 μ L, 再加入 3 μ L PNGaseF, 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h。分别取 10 μ L 细胞裂解产物、穿透液及洗液, 30 μ L 浓缩并脱盐后的纯化蛋白及 PNGaseF 处理过的纯化蛋白行 SDS-PAGE 并银染。

1.3 重组人 wt/mCREG/myc-His 融合蛋白的功能分析

1.3.1 刮伤实验

将 HITASY 和 CREG 低表达的 OB2 细胞培养在 35 mm 的 6 孔板内, 细胞密度为 $3 \times 10^6/\text{cm}^2$ 。去血清培养 48 h 进行细胞周期同步化。用牙签尖端直线划过单层细胞层后, PBS 洗 3 次, 加入含 1% 胎牛血清 (fetal calf serum, FCS) 的 DMEM。显微镜下测量直线两侧细胞间的距离, 每个皿选择 5 个测量点。24 h 后再次测量相应测量点细胞的距离。两个距离的差值的 1/2 为细胞迁移的距离。每种细胞共 45 个测量点。

1.3.2 明胶酶活性分析

配制 10% 的聚丙烯酰胺凝胶, 其中含 0.1% 明胶。将细胞培养至 60% ~

70% 融合, 无血清培养 72 h 行细胞周期同步化, 其后更换为含 10% FBS 的 DMEM, 同时将重组 wt/mCREG 蛋白以最适宜浓度添加至 OB2 细胞和 HITASY 细胞培养液中, 12 h 后进行上清液明胶酶活性检测。SDS-PAGE 电泳, 剥离凝胶, 以蒸馏水漂洗后, 移入 2.5% Triton X-100 溶液 100 mL 中, 摇床上低速摇动以洗脱 SDS 30 min 后, 重复 1 次。再以蒸馏水漂洗, 凝胶移入明胶酶缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 10 mmol/L CaCl₂ 和 1 μ mol/L ZnCl₂) 100 mL 中, 37 $^{\circ}$ C 温育 12~16 h。0.1% 考马斯亮蓝染色 2 h, 用脱色液脱色至出现明显清晰负染谱带。

1.3.3 Western blot 检测重组蛋白对体外培养的平滑肌细胞的分化能力分析

提取 HITASY 细胞、OB2 细胞以及外源性添加 CREG 蛋白 24 h 后的 OB2 细胞总蛋白, SDS-PAGE 电泳, 并转移蛋白至 PVDF 膜上, 用抗平滑肌 α -肌动蛋白 (anti-smooth muscle α -actin, Anti-SM α -actin)、抗平滑肌肌球蛋白重链 (anti-smooth muscle myosin heavy chain, Anti-SM-MHC)、anti-caldesmin、anti-myocardin、anti-fibronectin (Anti-FN)、anti-lamine-1 (Anti-LM-1)、抗基质金属蛋白酶 2 (anti-matrix metalloproteinase-2, Anti-MMP2)、Anti-MMP9 和抗组织金属蛋白酶抑制物 (anti-tissue inhibitor of metalloproteinase, Anti-TIMP) 检测细胞内上述蛋白的表达。

1.4 IGF2R 中和抗体阻断实验

饥饿 48 h 同步化的 OB2 细胞中, 同时添加 400 nmol/L 的 wt/mCREG 和不同浓度的 IGF2R 中和抗体, 8 h 后应用刮伤实验观察 CREG 蛋白抑制 OB2 细胞迁移效应的变化。

1.5 重组 IGF2R 胞外结构域小肽阻断实验

饥饿 48 h 同步化的 OB2 细胞中, 同时添加 400 nmol/L 的 wt/mCREG 和 IGF2R(11~13) 结构域片段小肽, 8 h 后应用刮伤实验观察 CREG 蛋白抑制 OB2 细胞迁移效应的变化。

1.6 统计学分析

本研究实验数据均为百分数。两样本率的比较应用卡方检验, 统计学处理均应用 SPSS 11.0 软件包处理。P < 0.05 为有统计学差异。每组实验结果重复 3 次以上。

2 结果

2.1 重组人 wt/mCREG/myc-His 融合蛋白的表达及纯化

2.1.1 重组人 wt/mCREG/myc-His 融合蛋白的表

达、纯化及糖苷酶切鉴定 同本所以前研究^[7], 收集稳定转染上述表达质粒的 293F 细胞裂解产物, 经 Ni-NTA 柱亲和层析纯化后, Centriprep 离心超滤管(10000NMWL)浓缩至 600 μL, 浓缩后的重组 wt/mCREG/myc-His 蛋白与标准品白蛋白对比, 计算出纯化的重组蛋白浓度分别为 0.692 g/L 和 0.984 g/L, 经 BCA 法测定并与蛋白标准曲线比较, 经 Image-J 软件分析, 重组 wtCREG 和 mCREG 蛋白纯度分别为 92% 和 93%。两种蛋白在考马斯亮蓝染色结果中显示为 28 kDa 和 26 kDa 左右的两条单一的纯化蛋白条带(图 1)。

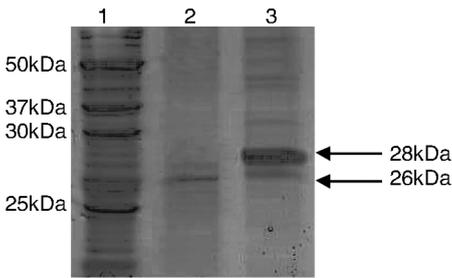


图 1. 蛋白凝胶电泳鉴定人重组 wt/mCREG/myc-His 蛋白纯度 1 为 Marker, 2 为人 mCREG 蛋白, 3 为人 wtCREG 蛋白。

Figure 1. Identification of human wt/mCREG/myc-His protein purity by Western blot

2.1.2 应用平滑肌细胞增殖效应确定 wt/mCREG/myc-His 融合蛋白的有效工作浓度 由于本所已证实重组 CREG 蛋白可以明确抑制 SMCs 增殖。因此, 我们首先选择不同浓度(200、400、800、1 600 nmol/L) wt/mCREG 蛋白添加到 CREG 基因 knock down 的 SMC(OB2)中, 以 HITASY 和 OB2 空白组细胞为对照组。行流式细胞周期分析, 观察各组细胞 G1 细胞周期比例, 用以确定两种重组 CREG 蛋白的有效作用剂量。结果显示: 两种重组蛋白对 OB2 空白组细胞增殖的最适宜作用浓度均为 400 nmol/L(图 2)。

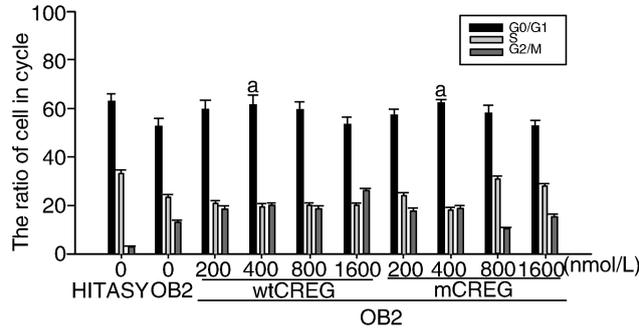


图 2. 两种重组 CREG 蛋白有效工作浓度 (n=6) a 为 P < 0.05, 与 OB2 空白组比较。

Figure 2. Analysis of effective working concentration in two recombinant CREG group (n=6)

2.2 重组人 wt/mCREG/myc-His 融合蛋白对平滑肌细胞迁移的调控作用

2.2.1 wt/mCREG/myc-His 融合蛋白对平滑肌细胞迁移的效应 刮伤实验结果显示, 加入 400 nmol/L 的 wtCREG 和 mCREG 24 h 后, 与空白对照组比较, CREG 低表达的 OB2 组的迁移能力明显受到抑制, HITASY 组无明显变化(图 3)。

进一步应用 Western blot 和明胶酶谱分析方法检测发现, 两种 CREG 蛋白添加使 OB2 细胞中 MMP2、MMP9 合成减少, TIMP2 合成增加; wtCREG 对细胞迁移的抑制效应强于 mCREG。进一步应用明胶酶谱分析发现, 两种 CREG 蛋白添加后, OB2 细胞中 MMP2 和 MMP9 的活性也明显受到抑制(图 4)。

2.2.2 wt/mCREG/myc-His 融合蛋白促进平滑肌细胞分化 Western blot 分析显示, 添加外源性 CREG 蛋白 12 h 后, OB2 细胞分化表型的标志物 MHC、SM α-actin、caldesmin 和 myocardin 表达均显著增加, 而合成表型标志蛋白 Fibronectin 和 Lamine-1 表达则显著减少(图 5)。以上结果提示, 外源性 CREG 蛋白促进体外培养的 SMC 由去分化表型向成熟分化表型转化。

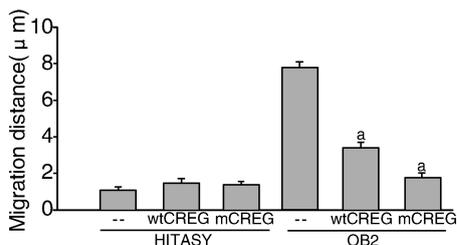
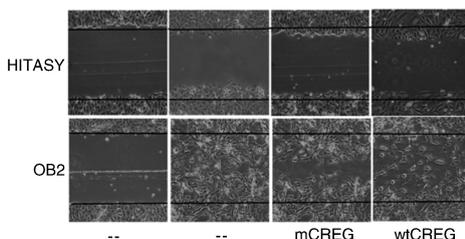


图 3. CREG 蛋白添加后抑制 SMC 迁移 (n=6) a 为 P < 0.05, 与 OB2 空白组比较。

Figure 3. Recombinant wt/mCREG inhibits cultured VSMC migration (n=6)

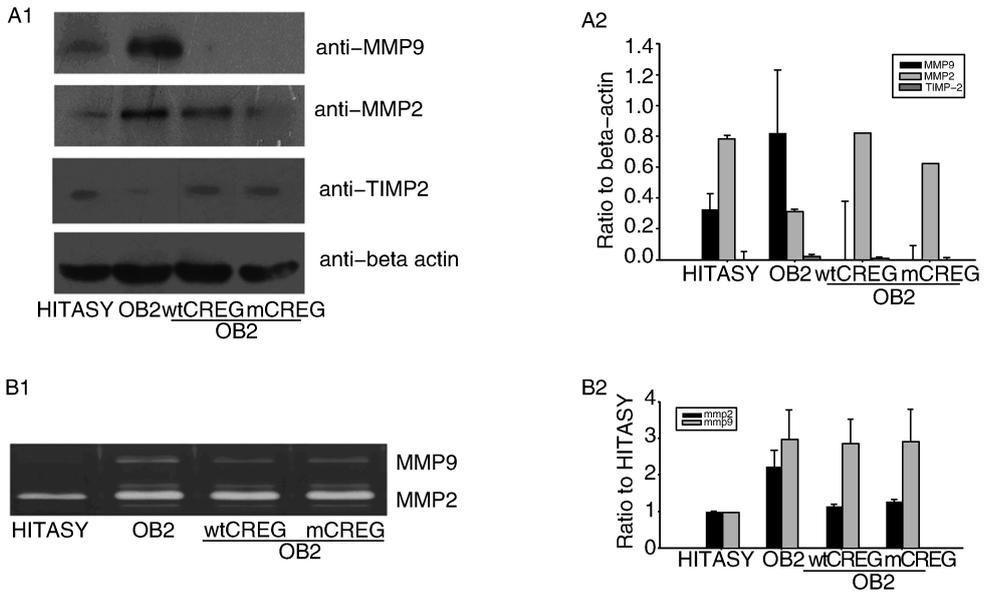


图 4. 细胞中 MMP2/9 表达及活性分析 A1、A2 为 Western blot 检测 MMP2、MMP9 表达; B1、B2 为明胶酶电泳检测 MMP2、MMP9 活性。

Figure 4. The expression and activity of MMP2 and MMP9 was detected by Western blot and MMPs assay

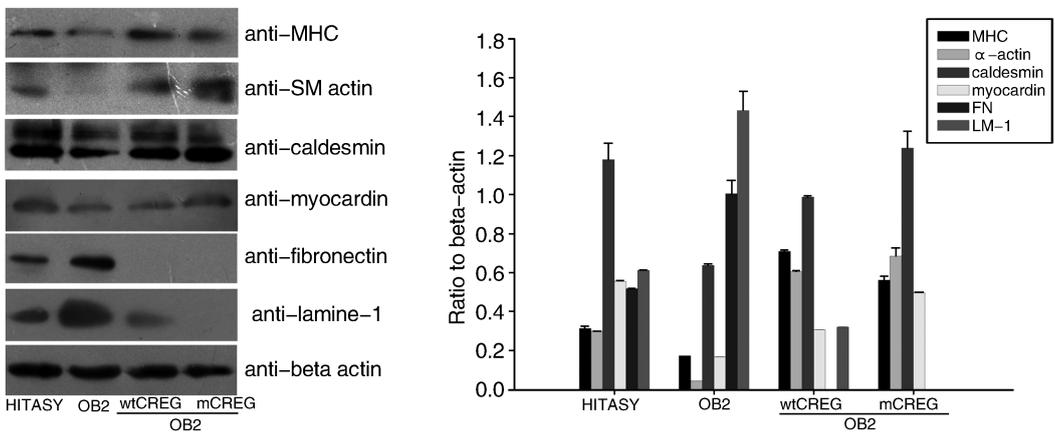


图 5. 重组 CREG 蛋白促进 SMC 分化

Figure 5. Recombinant CREG proteins promote cultured SMC differentiation

2.3 细胞膜受体 M6P/IGF2R 介导重组 CREG 蛋白的生物学功能

2.3.1 中和抗体阻断抑制 CREG 蛋白对 OB2 细胞迁移的生物学效应 为确定 M6P/IGF2R 是否介导 CREG 蛋白的生物学效应,我们同时加入 M6P/IGF2R 中和抗体和重组 CREG 蛋白分析 SMC 生物学效应的改变。刮伤实验结果显示,添加 Anti-IGF2R(8 mg/L) 24 h 后,OB2 + wtCREG 组中 SMC 迁移距离由 1.87 μm 增加至 6.13 μm , OB2 + mCREG 组中 SMC 迁移距离由 3.56 μm 增加至 5.73 μm ,提示加入 Anti-IGF2R 后重组 CREG 蛋白

对 SMC 迁移的抑制效应减弱(图 6)。

2.3.2 M6P/IGF2R(11~13) 阻断重组 CREG 蛋白对 OB2 细胞迁移的作用 以往实验研究结果^[8]提示 M6P/IGF2R 细胞外段的第 11~13 结构域片段,是重组 CREG 蛋白直接结合的功能位点。本研究进一步利用刮伤实验观察 M6P/IGF2R 结构域小肽片段是否影响 CREG 蛋白对细胞迁移的调控效应。结果发现,加入 M6P/IGF2R(11~13) 小肽片段后,wtCREG 蛋白和 mCREG 抑制 SMC 迁移的生物效应都显著减弱(图 7),提示 M6P/IGF2R(11~13) 结构域可能是重组 CREG 蛋白直接结合的功能位点。

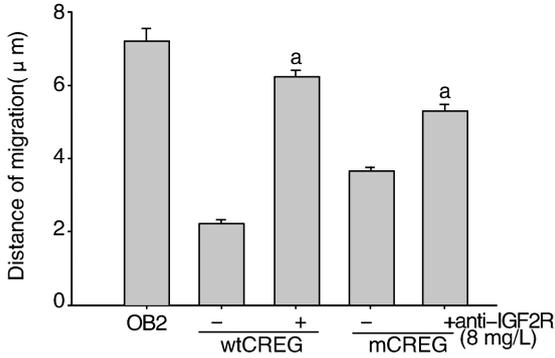


图 6. Anti-IGF2R 阻断 CREG 抑制迁移的生物学效应 ($n=6$)
a 为 $P<0.05$, 与 OB2 空白组比较。

Figure 6. Anti-IGF2R neutralizing antibody block CREG regulated migration in OB2 cells ($n=6$)

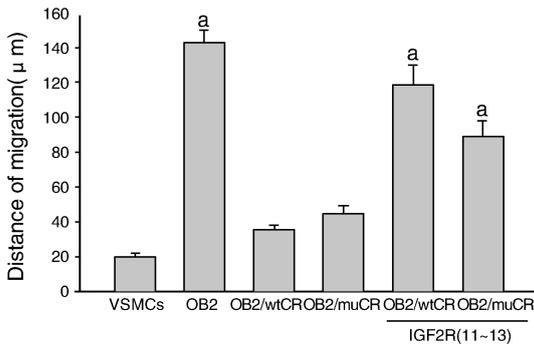


图 7. M6P/IGF2R 结构域小肽阻断 CREG 对 SMC 迁移的抑制效应 ($n=6$)
a 为 $P<0.01$, 与 OB2 空白组比较。

Figure 7. M6P/IGF2R (11-13) domain fragments block CREG regulated migration of OB2 ($n=6$)

3 讨论

近年研究发现^[9],成熟血管壁的 SMC 具有极大可塑性。生理状态下血管壁中 SMC 处于分化表型,血管损伤后 SMC 可发生表型逆转,由分化表型(收缩表型)转变为去分化表型(合成表型),并获得增殖、迁移及合成、分泌大量细胞外基质的能力。SMC 由分化表型向去分化表型的转化是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)及经皮冠状动脉介入(percutaneous transluminal coronary intervention, PCI)治疗后再狭窄等疾病发生中新生内膜形成和管腔狭窄的重要病理基础。因此,对 SMC 表型转化机制的研究是增生性血管病防治研究的一个重要方向。

长期以来,人们一直试图寻求某种能抑制 SMC 增殖的有效方法,外源性蛋白抑制是其中之一。CREG 是 1998 年 Gill 等^[1]采用酵母双杂交法从 HeLa 细胞的 cDNA 文库中发现并克隆的一种转录因

子。CREG 是一种具有 220 个氨基酸的分泌型糖蛋白,其 mRNA 在成熟分化的组织广泛表达,但在去分化的细胞(如鼠胚胎干细胞、人胚胎瘤细胞)却是低表达的^[2]。CREG 可直接与外源性腺病毒蛋白 E1A 及哺乳动物体内转录因子 E2F 家族蛋白竞争性地结合在靶基因的启动子上,从而阻遏 E1A 和 E2F 对靶基因的激活作用。已有研究发现, E1A 能够改变细胞(宿主)转录过程,激活和/或抑制基因表达,促进细胞分裂,使其进入 S 期; E2F 是细胞周期中 G1 期向 S 期过渡的重要调控因子,它通过与视网膜母细胞瘤基因编码蛋白及相关蛋白等多种依赖细胞周期的蛋白及酶相互作用调控细胞的增殖。因此,CREG 可阻遏由 E1A 和 E2F 引起的细胞增殖和分化表型转换等相关生理活动^[10]。本研究在细胞水平研究了外源性重组 CREG 蛋白对 SMC 的迁移以及分化的影响。结果表明,两种外源性重组 CREG 明显抑制了 SMC 的迁移和分泌细胞外基质的能力,说明 CREG 具有促进 SMC 由去分化表型向分化表型转化的生物学效应。以往研究主要基于 CREG 基因表达对细胞生物学效应,而可溶性 CREG 分子对细胞生物学效应的研究报道极少,对于 SMC 的迁移效应研究则未见报道。本研究的结果发现,CREG 对 SMC 抑制迁移、促进分化的效应均不依赖于 CREG 蛋白中是否存在糖基化修饰作用,但糖链修饰可以明显增强 CREG 对 SMC 的生物学效应。这为以后进一步研究 CREG 蛋白分子中糖基化结构的作用提供了初步的基础。同 CREG 的生物学效应相似, M6P/IGF2R 蛋白在正常的胚胎发育和抑制细胞增殖中也具有重要的作用。大量研究报道, M6P/IGF2R 受体的功能缺失或突变与多种肿瘤的发生密切相关,其中主要包括肝癌、乳腺癌、肺癌及胃癌^[11,12]。它是目前已知的一种重要的肿瘤抑制因子,能与多种 M6P 蛋白和非糖基化蛋白结合,参与细胞因子活化或降解。M6P/IGF2R 可以介导新合成的酸性水解酶至溶酶体,并使细胞外的溶酶体酶内化。这些研究提示: M6P/IGF2R 受体可能是外源性 CREG 蛋白入胞的直接作用受体,其可能通过与 M6P/IGF2R 结合发挥生物学功能^[13]。

为确定 M6P/IGF2R 与 CREG 蛋白的相互作用在 CREG 蛋白调控的 SMC 迁移中的作用,我们设计了抗体中和和结构域阻断实验。结果表明, Anti-M6P/IGF2R 和 IGF2R (11~13) 结构域阻断 M6P/IGF2R 与 CREG 蛋白的结合后,重组 CREG 蛋白对 OB2 细胞迁移能力明显受到抑制;相反,细胞迁移效应显著增强。这些结果证明了重组 CREG 蛋白对

SMC 生物学效应是通过 SMC 细胞膜表面 M6P/IGF2R(11~13)结构域介导的。这与我们前期和其他已报道的研究结果证明 M6P/IGF2R 介导人工重组可溶性蛋白 CREG 生物学效应的主要细胞膜表面受体的结论是一致的,但对于二者结合的分子机制仍需要深入的研究证实。

[参考文献]

- [1] Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease[J]. *N Eng J Med*, 1999, 340(2): 115-126.
- [2] Duewell P, Kono H, Rayner KJ, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals that form early in disease[J]. *Nature*, 2010, 464(7293): 1 357-361.
- [3] Veal E, Eisenstein M, Tseng ZH, et al. A cellular repressor of E1A-stimulated genes that inhibits activation by E2F[J]. *Mol Cell Biol*, 1998, 18(9): 5 032-041.
- [4] Veal E, Groisman R, Eisenstein M, et al. The secreted glycoprotein CREG enhances differentiation of NTERA-2 human embryonic carcinoma cells[J]. *Oncogene*, 2000, 19(17): 2 120-128.
- [5] Di Bacco A, Gill G. The secreted glycoprotein CREG inhibits cell growth dependent on the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor[J]. *Oncogene*, 2003, 22(35): 5 436-445.
- [6] Han Y, Deng J, Guo L, et al. CREG promotes a mature smooth muscle cell phenotype and reduces neointimal formation in balloon-injured rat carotid artery[J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 78(3): 597-604.
- [7] Han Y, Wu G, Deng J, et al. Cellular repressor of E1A-

stimulated genes inhibits human vascular smooth muscle cell apoptosis via blocking P38/JNK MAP kinase activation[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 48(6): 1 225-235.

- [8] Han Y, Luan B, Sun M, et al. Glycosylation-independent binding to extracellular domains 11-13 of mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor-2 receptor mediates the effects of soluble CREG on the phenotypic proliferation of vascular smooth muscle cells[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 50(4): 723-730.
- [9] 韩雅玲, 孙鸣宇, 郭亮, 等. 重组人 E1A 激活基因阻遏子 MYC/HIS 融合糖蛋白表达鉴定[J]. *中国免疫学杂志*, 2008, 24(8): 685-688.
- [10] Bian Z, Cai J, Shen DF, et al. Cellular repressor of E1A-stimulated genes attenuates cardiac hypertrophy and fibrosis[J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(7): 1 302-313.
- [11] Prince SN, Foulstone EJ, Zaccheo OJ, et al. Functional evaluation of novel soluble insulin-like growth factor (IGF)-II-specific ligand traps based on modified domain 11 of the human IGF2 receptor[J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(2): 607-617.
- [12] Essegir S, Reis-Filho JS, Kennedy A, et al. Identification of transmembrane proteins as potential prognostic markers and therapeutic targets in breast cancer by a screen for signal sequence encoding transcripts[J]. *J Pathol*, 2006, 210(4): 420-430.
- [13] Han Y, Cui J, Tao J, et al. CREG inhibits migration of human vascular smooth muscle cells by mediating IGF-II endocytosis[J]. *Exp Cell Res*, 2009, 315(19): 3 301-311.

(此文编辑 曾学清)