

去除蛋白激酶 A 磷酸化位点的线粒体融合素 2 基因对血管平滑肌细胞凋亡的影响

周炜¹, 曹文静², 陈莉莉³, 郭小梅⁴

(1. 武汉市中心医院内科, 湖北省武汉市 430014; 华中科技大学同济医学院附属同济医院

2. 检验科, 3. 老年科, 4. 心内科, 湖北省武汉市 430030)

[关键词] 线粒体融合素 2 基因; 血管平滑肌细胞; 细胞凋亡

[摘要] **目的** 研究大鼠线粒体融合素 2 基因在去除蛋白激酶 A 磷酸化位点后对大鼠血管平滑肌细胞凋亡的影响及其相关的信号通路。**方法** 利用携带去除蛋白激酶 A 磷酸化位点的线粒体融合素 2 基因重组腺病毒(Adv-Mfn2-PKA(Δ))和携带线粒体融合素 2 基因的重组腺病毒(Adv-Mfn2), 感染培养的大鼠血管平滑肌细胞。免疫印迹分析相关蛋白的表达; 激光共聚焦显微镜观察其亚细胞定位; 细胞凋亡酶联免疫吸附法比较其对细胞凋亡的影响; 免疫印迹法分析磷酸化蛋白激酶 B 蛋白表达变化。**结果** 外源基因转染后可表达特异性蛋白产物; 激光共聚焦显微镜显示去除蛋白激酶 A 磷酸化位点后的线粒体融合素 2 基因表达产物主要分布于线粒体外膜; 酶联免疫吸附法检测显示去除蛋白激酶 A 磷酸化位点后, 线粒体融合素 2 基因诱导大鼠血管平滑肌细胞凋亡作用显著减弱($P < 0.01$), 与空白对照组差异无显著性; 免疫印迹检测表明 Mfn2-PKA(Δ)组磷酸化蛋白激酶 B 表达较 Mfn2 组显著升高($P < 0.01$), 与空白对照组差异无显著性。**结论** 去除蛋白激酶 A 磷酸化位点的线粒体融合素 2 基因表达产物仍主要分布于线粒体外膜, 但其诱导血管平滑肌细胞凋亡的作用丧失, 对蛋白激酶 B 信号通路也无抑制作用。这表明蛋白激酶 A 磷酸化位点是调控线粒体融合素 2 基因诱导血管平滑肌细胞凋亡的重要功能位点。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Removal of Protein Kinase A Phosphorylation Site from Mfn2 Gene on the Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cell

ZHOU Wei¹, CAO Wen-Jing², CHEN Li-Li³, and GUO Xiao-Mei⁴

(1. Department of Cardiology, the Central Hospital of Wuhan, Wuhan, Hubei 430014, China; 2. Clinical Laboratory, 3. Geriatrics, 4. Department of Cardiology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China)

[KEY WORDS] Mitofusin2; Vascular Smooth Muscle Cell; Apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of mitofusin2 (Mfn2) with the removal of protein kinase A (PKA) phosphorylation site (Mfn2-PKA(Δ)) on promoting the apoptosis of vascular smooth muscle cell (VSMC) and related signaling pathway. **Methods** VSMC were transfected with adenovirus vector encoding Mfn2-PKA(Δ) or Mfn2 (Adv-Mfn2-PKA(Δ), Adv-Mfn2). The abundance of Mfn2-PKA(Δ) protein and Mfn2 protein were determined by Western Blot analysis using Mfn2 phosphorylated antibody. Laser confocal microscopy(LCMS) was used to observe the location of proteins. The effect of Adv-Mfn2-PKA(Δ) on the apoptosis of VSMC was explored by cell death ELISA. Western Blot were used to detect the expression of p-Akt. **Results** Both Mfn2-PKA(Δ) and Mfn2 were located at the outmembrane of mitochondria. ELISA assay showed Mfn2-PKA(Δ) had no effect on promoting the apoptosis of VSMC compared with Mfn2 ($P < 0.01$). Western Blot indicated that overexpression of Mfn2-PKA(Δ) gene could not down-regulate the phosphorylation of Akt ($P < 0.01$). **Conclusion** Mfn2-PKA(Δ) could not induce the apoptosis of VSMC. PKA phosphorylation site plays an important role in regulating the function of Mfn2 gene.

[收稿日期] 2012-02-08

[基金项目] 国家自然科学基金(30672206, 30600233)

[作者简介] 周炜, 博士, 主治医师, 研究方向为心血管疾病的基础、临床研究, E-mail 为 wzhou@live.cn. 曹文静, 博士, 副教授, 研究方向为心血管疾病的基因治疗。陈莉莉, 博士, 副教授, 研究方向为分子心脏病学。

由基因调控的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)增殖过度及凋亡不足在高血压、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。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^[1,2],该基因可作用于 VSMC 的 Ras 原癌基因,通过蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)激活线粒体凋亡路径诱导细胞凋亡,与上述疾病关系密切^[3,4]。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 位丝氨酸为蛋白激酶 A(protein kinase A, PKA)的磷酸化位点,该位点与 Mfn2 的磷酸化状态密切相关^[3]。但是,该位点是否参与 Mfn2 活性的调控尚不清楚。为此,本研究采用基因重组技术,去除 Mfn2 基因 PKA 磷酸化位点丝氨酸,并构建重组腺病毒(Adv-Mfn2, Adv-Mfn2-PKA(Δ)),并以携带绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因的重组腺病毒(Adv-GFP)为对照,研究去除 PKA 磷酸化位点(Ser442)的 Mfn2 基因诱导 VSMC 凋亡的作用,并探讨其对细胞信号转导通路的影响。

1 材料与方法

1.1 主要仪器、试剂

激光共聚焦显微镜 FV300(ZEISS 公司);酶标仪 ELX-800(BIO-TEK 公司);紫外分光光度计 UV-2550(SHIMADZU 公司)。DMEM 培养基、胎牛血清(Gibco 公司);线粒体示踪剂 Mito Tracker Orange(Invitrogen 公司);内皮素 1(endothelin, ET-1)、抗 Mfn2 多克隆抗体(Sigma 公司);细胞凋亡 ELISA 试剂盒(Roche 公司);抗 p-Akt、 α -actin 多克隆抗体(Cell signaling 公司);显色剂 DC protein assay reagent A/B(Bio-Rad 公司)。其他试剂采用国产分析纯试剂。

1.2 血管平滑肌细胞的培养及实验分组

大鼠 VSMC 由本研究室保存。用含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基在 37°C、5% CO₂ 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。实验分为空白对照组及携带绿色荧光蛋白基因的研究组,包括腺病毒对照组(Adv-GFP 组)、Adv-Mfn2 组和 Adv-Mfn2-PKA(Δ)组。

1.3 腺病毒载体的构建和感染

重组腺病毒 Adv-GFP、Adv-Mfn2-PKA(Δ)、Adv-Mfn2 均由本课题组构建并测序鉴定,前期研究中已经完成^[5,6]。将 VSMC 均匀接种于培养皿中,

用含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养 24 h 后进行同步化处理,之后用含 120 MOI(multiplicity of infection)的重组腺病毒感染细胞。

1.4 激光共聚焦显微镜观察基因表达产物的细胞内定位

VSMC 接种于含有盖玻片的培养皿,按上述方法处理。24 h 后加入线粒体示踪剂 Mito Tracker Orange。激光共聚焦显微镜下观察 Mfn2 蛋白和 Mfn2-PKA(Δ)在细胞中的定位。

1.5 酶联免疫吸附法检测细胞凋亡

VSMC 接种于 96 孔板,每组设 6 复孔,处理后分别于 1、2、3 天收集各组细胞,按试剂盒说明进行后续操作,酶标仪测定各孔 OD₄₀₅ 值。

1.6 免疫印迹法检测蛋白表达

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 μ g。SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭后,将膜在一抗(抗 Mfn2、抗 p-Akt、抗 α -actin, 1:1000)中 4°C 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 软件测定光密度值,进行半定量分析。

1.7 统计学分析

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 16.0 统计软件,均数比较采用方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外源基因在血管平滑肌细胞中的表达

Adv-Mfn2 和 Adv-Mfn2-PKA(Δ)感染 VSMC 24 h 后,提取细胞总蛋白,免疫印迹检测结果显示, Mfn2 和 Mfn2-PKA(Δ)蛋白特异性条带明显强于对照组,说明基因转染成功,可以有效表达出相应蛋白;可见两条特异性蛋白条带,大小分别为 86 kDa 和 68 kDa(图 1 和表 1)。

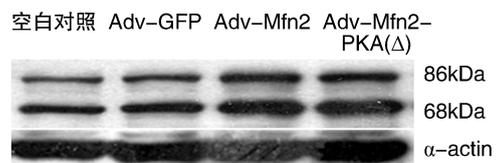


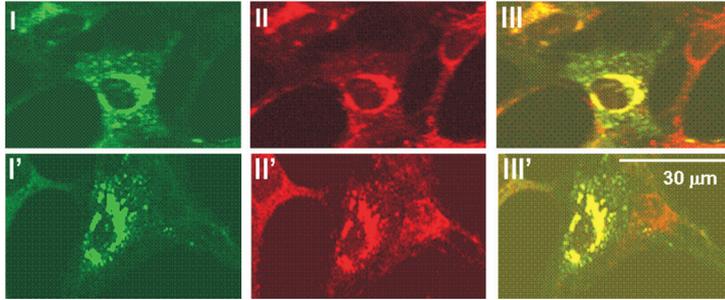
图 1. 转染 Mfn2 和 Mfn2-PKA(Δ) 基因后,相关蛋白在 VSMC 中的表达

Figure 1. The expression of Mfn2 and Mfn2-PKA(Δ) in infected VSMC

表 1. 外源基因在 VSMC 中的表达 ($n=3$)Table 1. The expression of Mfn2 and Mfn2-PKA (Δ) in infected VSMC

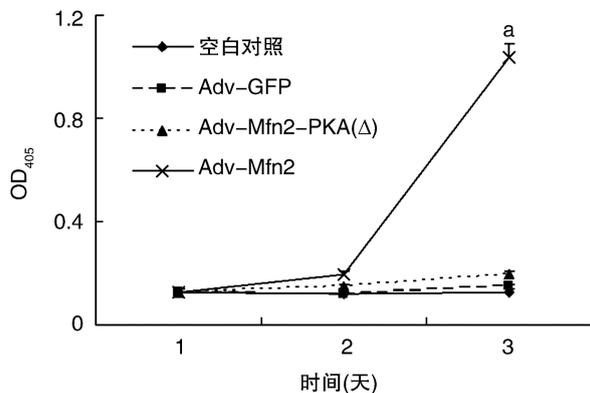
分 组	Mfn2 灰度值
空白对照组	0.25 ± 0.02
Adv - GFP 组	0.27 ± 0.02
Adv - Mfn2 组	0.64 ± 0.07 ^a
Adv - Mfn2 - PKA (Δ) 组	0.66 ± 0.08 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与空白对照组比较。

图 2. 外源基因表达产物的亚细胞定位 上图(I, II, III)为 Mfn2 组, 下图(I', II', III')为 Mfn2-PKA(Δ) 组。Figure 2. Confocal microscopy imaging to visualize the subcellular localization of the Mfn2 and Mfn2-PKA(Δ)

2.3 细胞凋亡情况

与空白对照组及 Adv-GFP 组相比, Adv-Mfn2 组 OD_{405} 值在第 3 天显著升高 ($P < 0.01$), 而 Adv-Mfn2-PKA (Δ) 组 OD_{405} 值差异无显著性 (图 3)。

图 3. 细胞凋亡情况 ($n=3$) a 为 $P < 0.01$, 与空白对照组及 Adv-GFP 组相比。Figure 3. The effect of Mfn2 and Mfn2-PKA (Δ) on the apoptosis of VSMC

2.4 磷酸化蛋白激酶 B 的表达水平

与 Adv-GFP 组相比, Adv-Mfn2 组由内皮素 1 (ET-1) 诱导的 p-Akt 表达水平在转染重组腺病毒后 24 h、36 h 及 48 h 都显著减低 ($P < 0.01$), 而 Adv-Mfn2-PKA (Δ) 组无明显差异 (图 4 和表 2)。

2.2 外源基因表达产物的亚细胞定位

带有绿色荧光的 Mfn2 蛋白与 Mfn2-PKA (Δ) 蛋白主要位于细胞核周围。带红色荧光的 Mito Tracker Orange 分布于线粒体外膜。将图 I 与图 II 重叠得到图 III, 图 I' 与图 II' 重叠得到图 III'。可见图 III 和图 III' 中绿色荧光和红色荧光重叠变成黄色, 表示 Mfn2 蛋白与 Mfn2-PKA (Δ) 蛋白都主要位于线粒体外膜 (图 2)。

表 2. 磷酸化蛋白激酶 B 的表达水平 ($n=3$)

Table 2. The expression of p-Akt in infected VSMC

时间	Adv-GFP 组	Adv-Mfn2 组	Adv-Mfn2-PKA (Δ) 组
24 h	0.97 ± 0.08	0.21 ± 0.04 ^a	0.99 ± 0.09
36 h	0.93 ± 0.07	0.20 ± 0.03 ^a	0.99 ± 0.10
48 h	0.92 ± 0.06	0.09 ± 0.01 ^a	0.90 ± 0.06

a 为 $P < 0.01$, 与 Adv-GFP 组同时时间比较。

3 讨论

血管增殖性疾病的主要病理特征是 VSMC 异常增殖, 因此通过药物或基因治疗诱导 VSMC 凋亡有可能成为治疗血管增殖性疾病的新手段。比如血管介入术后诱导血管中膜的 VSMC 凋亡有助于防止新生内膜的形成和再狭窄的发生^[7]。

Mfn2 广泛分布于人体的心、肾、脑、肺、肝等不同组织中, 尤以心脏、肾和脑最为丰富, 对线粒体的融合、线粒体形态及功能的调节有重要的作用^[8-12]。我们最近报道^[4], Mfn2 是细胞信号转导通路中的一个新的调控点, 在与细胞凋亡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-PI3K-Akt 通路, 显著抑制 Akt 的磷酸化水平, 进而减少 Bcl-2 蛋白表达, 增加 Bax 蛋白表达, 通过线粒体途径诱导细胞凋亡, 其作用与线粒体融合无关。动物试验进一步表

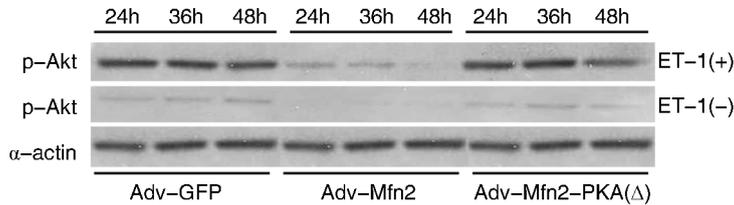


图 4. 磷酸化蛋白激酶 B 的表达水平

Figure 4. The expression of p-Akt in infected VSMC

明^[13], Mfn2 能诱导大鼠颈动脉球囊损伤后 VSMC 凋亡, 从而抑制新生内膜的形成。随后研究发现^[14], 氧化应激诱导心肌细胞凋亡时 Mfn2 表达上调, 过表达 Mfn2 通过上述通路诱导心肌细胞凋亡。这些研究都提示该基因是干预或治疗心血管异常增殖性疾病的新靶点。

大鼠 Mfn2 的全长 cDNA 序列为 4151 bp, 编码 757 个氨基酸残基, 表达两种蛋白产物, 分子量分别为 86 kDa 和 68 kDa。其中第 442 位丝氨酸为 PKA 磷酸化位点, 第 599 ~ 644 氨基酸位置为穿膜区序列, Mfn2 凭借此结构锚定于线粒体外膜^[3]。我们近期研究发现, 去除穿膜区序列后 Mfn2 游离于胞浆, 对 VSMC 诱导凋亡的作用明显增强^[15]。而本研究发现, 去除 PKA 磷酸化位点后, Mfn2 的表达和亚细胞水平的定位未发生改变, 仍主要位于线粒体外膜。但是, 在不同时间点 Mfn2-PKA(Δ) 对 VSMC 都不具有诱导凋亡的作用, 也不能抑制由 ET-1 诱导的 Akt 磷酸化。这充分表明, 去除 PKA 磷酸化位点 (Ser442) 对 Mfn2 表达及亚细胞水平定位无影响, 但对于 Mfn2 调控 Ras-PI3K-Akt 通路的作用极为重要, 该位点对 Mfn2 的功能是完全必需的。因此我们认为, Mfn2 的 PKA 磷酸化位点可能是上游信号通路对其进行功能调节的作用位点。

PKA 是环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, 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, 通过磷酸化作用激活或抑制各种效应蛋白, 影响细胞功能。Mfn2 蛋白具有 PKA 磷酸化位点, 本研究表明, 该位点的缺失导致 Mfn2 诱导 VSMC 凋亡的功能丧失。由此我们推测, cAMP-PKA 信号通路很可能通过调节 Mfn2 磷酸化状态, 进而调节其功能变化, 但尚需进一步试验证实。

[参考文献]

[1] 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.

- [2] Chen KH, Wang FQ, Zhang JH, et al. Cloning and expression of a novel cDNA related to hypertension[J]. Chin Med J, 1998, 111(5): 384-386.
- [3] Chen KH, Guo XM, Ma DL, et al. Dysregulation of HSG triggers vascular proliferative disorders[J]. Nature Cell Biol, 2004, 6(9): 872-883.
- [4] Guo XM, Chen KH, Guo YH, et al. Mitofusin 2 triggers vascular smooth muscle cell apoptosis via mitochondrial death pathway[J]. Circul Res, 2007, 101(11): 1113-1122.
- [5] 周炜, 廖华, 郭小梅, 等. 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[J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17(11): 885-888.
- [6] Zhou W, Chen KH, Guo XM, et al. Mutation of the protein kinase A phosphorylation site influences the anti-proliferative activity of mitofusin 2[J]. Atherosclerosis, 2010, 211(1): 216-223.
- [7] Inoue T, Node K. Molecular basis of restenosis and novel issues of drug-eluting stents[J]. Circ J, 2009, 73(9): 615-621.
- [8] Hales KG, Fuller MT. Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase[J]. Cell, 1997, 90(3): 121-129.
- [9] Hermann GJ, Thatcher JW, Mills JP, et al. Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1[J]. J Cell Biol, 1998, 143(2): 359-373.
- [10] Santel A, Fuller MT. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin[J]. J Cell Sci, 2001, 114(7): 867-874.
- [11] 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): 25060-25070.
- [12] 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.
- [13] 廖华, 曹文静, 陈莉莉, 等. 腺病毒介导的线粒体融合素基因-2 诱导大鼠颈动脉球囊损伤后血管平滑肌细胞凋亡[J]. 中华急诊医学杂志, 2006, 15(4): 506-509.
- [14] 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): 23354-23361.
- [15] 糜涛, 赵丽, 郭小梅, 等. tMfn2 基因对大鼠血管平滑肌细胞凋亡的影响[J]. 临床心血管病杂志, 2008, 24(7): 691-694. (此文编辑 许雪梅)