

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2016)24-09-0882-07

Notch 信号通路介导血小板源生长因子 AA 诱导的血管平滑肌细胞增殖和迁移

王金祥¹, 周芳^{1,2}, 朱光旭¹, 刘菊芬¹, 朱向情¹, 康华莉³, 庞荣清¹, 黄岚³, 潘兴华¹

(1.成都军区昆明总医院细胞生物治疗中心 云南省细胞生物医药技术国家地方联合实验室, 云南省昆明市 650032;

2.昆明医科大学成都军区昆明总医院临床学院, 云南省昆明市 650032;

3.第三军医大学新桥医院全军心血管疾病研究所, 重庆市 430037)

[关键词] Notch; 血管平滑肌细胞; 血小板源生长因子 AA; 细胞增殖; 细胞迁移

[摘要] **目的** 探讨 Notch 信号通路在血小板源生长因子 AA(PDGF-AA)诱导血管平滑肌细胞(VSMC)增殖和迁移中的作用及机制。**方法** 脱白处死 1~2 月龄雄性 SD 大鼠, 无菌取腹主动脉, 剥弃外膜及去除内皮后, 贴块法培养 VSMC, α -SM-actin 染色鉴定。实验分为四组: 对照组、 γ -secretase 抑制剂组(DAPT 组)、PDGF-AA 组和 PDGF-AA+ γ -secretase 抑制剂组(PDGF-AA+DAPT 组)。实时荧光定量 PCR(Real-time qPCR)检测 Notch 信号分子 mRNA 表达; CellTiter96 Aqueous One Solution 试剂盒检测细胞增殖活性; 采用细胞划痕实验检测 VSMC 的迁移能力。**结果** 腹主动脉 VSMC 表达 Notch 信号通路 Jagged1、Jagged2、Notch1~3 等几种主要的配体及受体; PDGF-AA 刺激 24 h 和 48 h 后分别导致 Jagged2 和 Jagged1 mRNA 表达显著增强($P<0.01, n=4$); 与 0 h 相比, PDGF-AA 刺激 72 h 后, Notch1、Notch3 mRNA 表达显著增高($P<0.01, n=4$), 而刺激 24 h 后 Notch2 mRNA 表达显著降低。PDGF-AA 显著促进 HES1($P<0.05, n=4$)、HEY2($P<0.05, n=4$)和转录因子 Rbp-jK mRNA($P<0.05, n=4$)表达, DAPT 抑制 PDGF-AA 介导的 HES1、HEY2 mRNA 表达增强($P<0.01, n=4$), 但是进一步促进 PDGF-AA 诱导的 Rbp-jK mRNA 表达($P<0.05, n=4$); PDGF-AA 刺激促进 VSMC 增殖($P<0.01, n=5$)和减少划痕残留面积($P<0.01, n=4$), 两种效应均可被 DAPT 显著阻抑($P<0.01, n=4$)。**结论** PDGF-AA 调节了 VSMC Notch 信号分子表达, PDGF-AA 部分通过激活 Notch 信号通路调节 VSMC 的增殖和迁移。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Notch Signaling Pathway Is Involved in Platelet Derived Growth Factor-AA Induced Vascular Smooth Muscle Cells Proliferation and Migration

WANG Jin-Xiang¹, ZHOU Fang^{1,2}, ZHU Guang-Xu¹, LIU Ju-Fen¹, ZHU Xiang-Qing¹, KANG Hua-Li³, PANG Rong-Qing¹, HUANG Lan³, and PAN Xing-Hua¹

(1. Cell Biological Therapy Center of Kunming General Hospital, Chengdu Military Region of PLA & Cell Biological Medicine Integrated Engineering Laboratory of State and Region of Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650032, China; 2. Clinical College of Medicine, PLA Kunming General Hospital, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650032, China; 3. Cardiovascular Institute of Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

[KEY WORDS] Notch; Vascular Smooth Muscle Cell; Platelet Derived Growth Factor-AA; Cell Proliferation; Cell Migration

[ABSTRACT] **Aim** To explore the role of Notch signaling pathway in platelet derived growth factor-AA (PDGF-AA) induced vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation and migration. **Methods** 1-2 months old Sprague Dawley (SD) male rats were used in present study. Rat abdominal aorta was gained by aseptic operation, after removing the outer membrane of vascular and the endothelium, smooth muscle cells (SMC) was acquired by block pasting method

[收稿日期] 2015-07-03

[修回日期] 2015-10-13

[基金项目] 国家自然科学基金(81170316)资助

[作者简介] 王金祥, 硕士研究生, 主要研究方向为干、祖细胞与组织工程, E-mail 为 wangjinxiang43@126.com。通讯作者朱光旭, 博士, 副主任技师, 硕士研究生导师, 主要研究方向为干、祖细胞与血管损伤修复, E-mail 为 zhgxu2001@aliyun.com。通讯作者潘兴华, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, 主要研究方向为干细胞与组织工程, E-mail 为 xinghuapang@aliyun.com。

and identified by immunofluorescence assay for α -SM-actin staining. The experiment was divided into four groups: normal group (Control), γ -secretase inhibitor group (DAPT), PDGF-AA group (PDGF-AA), PDGF-AA combined γ -secretase group (PDGF-AA+DAPT). The expression of Jagged1, Jagged2, Notch1-4, HES1, HEY1 and HEY2 mRNA was detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (real-time qPCR), cell proliferation activity was detected by CellTiter96 Aqueous One Solution kit, and the migration of SMC was detected by cell scratching assay. **Results** Notch signals including Jagged1, Jagged 2, and Notch1-3 were expressed in cultured SMC. PDGF-AA induced increased Jagged 2 mRNA expression 24 h post-stimulation ($P<0.01, n=4$) and increased Jagged1 mRNA expression 48 h post-stimulation ($P<0.01, n=4$); Notch1 and 3 mRNA expression also significantly increased 72 h after PDGF-AA stimulation compared with 0 h group ($P<0.01, n=4$), whereas Notch2 mRNA were obviously decreased by PDGF-AA 48 h post-stimulation ($P<0.01, n=4$). PDGF-AA also significantly promoted the HES1 ($P<0.05, n=4$), HEY2 ($P<0.05, n=4$) and transcription factor Rbp-j kappa ($P<0.05, n=4$) mRNA expression in SMC, DAPT markedly inhibited PDGF-AA induced HES1, HEY2 mRNA expression ($P<0.01, n=4$), but DAPT further increased PDGF-AA induced Rbp-j kappa mRNA expression ($P<0.05, n=4$); PDGF-AA stimulation obviously promoted SMC proliferation ($P<0.01, n=5$) and reduced remaining scratches area ($P<0.01, n=4$), whereas the effects were significantly attenuated by DAPT ($P<0.01, n=4$). **Conclusions** PDGF-AA can directly affect the expressions of Notch signaling molecules in SMC, Notch signaling pathway is partly in responsible for PDGF-AA-induced SMC proliferation and migration.

血管损伤处平滑肌细胞 (smooth muscle cells, SMC) 过度增殖和迁移是损伤血管新内膜形成的关键病理基础^[1]。Notch 信号是控制细胞增殖、迁移等细胞命运的重要信号系统,其在配体、受体相互作用后,受体细胞内结构域 (intracellular domain, ICD) 转位到细胞核,调节下游靶基因表达^[2-3],血管损伤后新生内膜 SMC 表达多种 Notch 信号分子,提示该通路和新生内膜形成密切相关^[3-4]。血小板源生长因子 (platelet derived growth factor, PDGF) 主要由体内单核/巨噬细胞合成,以 α 颗粒形式储存于血小板,血管损伤导致损伤处血小板聚集以及 PDGF 释放,调节新内膜形成^[5]。有关 Notch 通路在 PDGF 诱导 SMC 活性变化中的作用已有部分文献报道,但是一方面这些研究并未完全阐明该通路在 PDGF 诱导 SMC 增殖、迁移中的详细调节机制,并且尚存在一些较为矛盾的结论。Campos 等^[6]研究发现 PDGF 显著下调 VSMC 中 Notch3 表达,而新近研究显示 PDGF-BB 通过促进 Notch3 表达以增强 SMC 增殖和迁移能力^[7]。由于 PDGF 存在 PDGF-AA、BB 及 AB 三种形式,PDGF 受体由 α 及 β 亚单位构成, α 亚单位可与 AA、AB 及 BB 结合, β 亚单位仅与 BB 及 AB 结合,因此尚不清楚这些矛盾的研究结果是否源于不同类型 PDGF 具有不一致的配、受体结合特性。本研究通过观察 PDGF-AA 对血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) Notch 信号分子表达的影响以及 Notch 通路对 SMC 增殖和迁移的调节作用,从一侧面探讨损伤血管新内膜形成的分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

SD 大鼠 (Sprague-Dawley rats) (1~2 月龄大鼠,雄性,无既往病史,均饲养于环境湿度、温度适中,饮食良好的环境) 由昆明医科大学实验动物中心提供,所有动物实验经成都军区昆明总医院伦理委员会批准。DMEM/F12 干粉培养基 (Hyclone 公司), 优质胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, PAA 公司), 抗大鼠 α -SM-actin (Sigma 公司), 二甲基亚砜 (DMSO)、 γ -secretase 抑制剂 (DAPT) (Sigma, Dissolved in DMSO), GoScript 反转录系统、逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) Marker、GoTaq qPCR Master Mix (Progema 公司), CellTiter96 Aqueous One Solution 试剂盒 (Promega 公司), 重组人 PDGF-AA (Peprotech 公司), 6 孔及 96 孔培养板 (Corning 公司), CO_2 培养箱 (Harris 公司), 实时定量 PCR 仪以及凝胶扫描仪 (Bio-RAD), 倒置荧光相差显微镜 (Leica 公司), FT-6000 酶标仪 (RAYTO 公司), Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件 (Media Cybernetics 公司)。实验所需引物由奥科鼎盛生物科技公司 (上海) 合成。

1.2 血管平滑肌细胞的培养及鉴定

采用贴块法培养: 脱臼处死 SD 大鼠, 无菌取腹主动脉, 剥弃外膜以及用无菌刀片反复刮内膜面去除内皮后, 将中膜切成 $1 \times 1 \text{ mm}^3$ 小块, 用刮匙移入培养瓶内, 用玻璃分针以 $3 \sim 5 \text{ 块}/\text{cm}^2$ 均匀接种于瓶底, 慢慢翻转培养瓶, 使贴有块的瓶底朝上, 少数培养液在下面, 放入 37°C 5% CO_2 培养箱内干涸 4 h

后,将培养瓶轻轻翻转,加入含 15%FBS 的 DMEM/F12 培养基(含青霉素、链霉素各 100 kU/L)进行培养,每 4 天换液一次,培养 SMC 约 6 天爬出,2 周后铺满培养瓶底 80%后传代,取第 4 代细胞进行 α -SM-actin 染色鉴定,经抗大鼠 α -SM-actin 单抗鉴定阳性细胞率达 85%、3~5 代细胞用于实验。

1.3 实时荧光定量 PCR 检测细胞 Notch 信号分子表达

按照 GoScript 反转录系统试剂说明,取各组细胞进行 mRNA 提取并进行反转录,获得 cDNA,所获得的 cDNA 用 GoTaq[®] qPCRMaster MiX,按照操作

说明进行实时定量 PCR 测定。以 β -actin 作内参。反应条件为 50℃ 2 min,95℃ 变性 10 min→95℃ 15 s →55℃ 退火 1 min→72℃ 延伸 30 s,循环 35 次,溶解曲线 65℃ ~ 55℃,增量 0.5℃ 5 s。同时取正常组 SMC PCR 产物进行凝胶电泳,反应结束后各取 PCR 产物 4 μ L 进行 1.7%琼脂糖凝胶电泳,并用 Gel Doc 2000 凝胶图像扫描仪分析,观察 Notch 信号通路配体和受体分子表达情况。所需 PCR 引物应用 Primer3web version 4.0.0 (<http://primer3.ut.ee/>) 设计,详细序列见表 1。

表 1. 实时定量 PCR 引物列表

Table 1. Primers for real-time qPCR analysis of mRNA

名称		引物序列	扩增长度(bp)	基因序列号
Jagged1	sense	5'-tgacagccagtgtgacgaagc-3'	165	NM019147
	antisense	5'-acgcaggtgcctccattatgac-3'		
Jagged2	sense	5'-tggttatctgcgtgtggtggac-3'	19	NM021838
	antisense	5'-ggcggcggtgtgaagttctt-3'		
Notch1	sense	5'-aggctccaccgtctcactctt-3'	125	NM001105721
	antisense	5'-accatctgaggcgttcttca-3'		
Notch2	sense	5'-gcagccgcctcaataatgtg-3'	181	M93661
	antisense	5'-gggccatgtggtccgtgatgc-3'		
Notch3	sense	5'-gccagccacgcagatgtcaa-3'	101	NM020087
	antisense	5'-ttcagcagagccaaggtagcc-3'		
Notch4	sense	5'-gatccacctgcacgcaccgt-3'	197	NM001002827
	antisense	5'-atcttgggtggcagggtgggtc-3'		
HES1	sense	5'-ctggagaggctgccaagttt-3'	168	NM024360
	antisense	5'-tggaaggcgacactgcgttag-3'		
HEY1	sense	5'-tgtctgaactgcgacattggt-3'	149	NM001107977
	antisense	5'-cagggctcgggcatcaagaa-3'		
HEY2	sense	5'-gcagcagtgatgacatctcca-3'	139	NM130417
	antisense	5'-ggcgacatggcgttgactct-3'		
Rbp-jK	sense	5'-tcactctgtgcctctgctaga-3'	200	NM001106631
	antisense	5'-ccatcgccaacctctcggaa-3'		
β -actin	sense	5'-agatcctgaccgagcgtggc-3'	122	NM017008
	antisense	5'-ccaggagggaagaggatgcg-3'		

1.4 血管平滑肌细胞增殖能力检测

0.25%胰蛋白酶消化,PBS 洗 3 次,以含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基(含青霉素、链霉素各 100 kU/L)分别配成 10⁷/L 细胞悬液,以 200 μ L/孔接种于 96 孔板,培养 24 h 后弃去未贴壁细胞,确保各孔贴壁细胞数量一致。按照实验设计加入 PDGF-AA

25 μ g/L 或/和 DAPT 25 μ mol/L,由于 DAPT 溶于 DMSO,因此各组加入等量 DMSO,培养 48 h,弃培养基,于各孔再加入 100 μ L 新鲜培养基,孵育 1 h 后加入增殖检测试剂 20 μ L,轻轻混匀,于培养箱孵育 3 h 后,于 FT-6000 酶标仪震荡混匀,492 nm 读取光密度值。

1.5 细胞划痕实验

参照文献[8],将 SMC 接种到 6 孔板内,以含 15%FBS 的 DMEM /F12 培养,待培养 SMC 达到完全融合生长后,用 200 μ L 移液管经过板孔中心、无菌比着直尺垂直于板底低速划痕,用 PBS 洗细胞 3 次,彻底去除划下的悬浮细胞,按照实验设计加入含 PDGF-AA 25 μ g/L 或/和 DAPT 25 μ mol/L、含 15%FBS 的 DMEM/F12 培养基(含青霉素、链霉素各 100 kU/L),由于 DAPT 溶于 DMSO,因此各组同样加入等量 DMSO。分别于 0、24、48、72 h 分别进行观察拍照,使用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件(Media Cybernetics, USA)进行图像分析。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。以 SPSS10.0 统计软件包行统计学处理。

2 结果

2.1 血管平滑肌细胞培养鉴定以及 Notch 通路配体、受体在血管平滑肌细胞的表达

培养 5 天左右可见长梭型细胞自组织块边缘长出(图 1A),14 天左右可见培养细胞呈“谷峰”样生长(图 1B),取传代培养细胞进行 α -SM-actin 染色呈阳性(图 1C),对照为阴性,证实所培养的细胞为 VSMC。取正常培养 SMC 进行 PCR 扩增后电泳显示,Notch 信号分子包括主要配体 Jagged1、Jagged2 以及主要受体 Notch1~3 均表达于 SMC(图 1D)。应用大鼠肾脏组织作为阳性对照,肾脏组织显著表达 Notch4,但是在培养 SMC 未检测到 Notch4 表达(数据未显示)。

2.2 PDGF-AA 调节 Notch 通路配体和受体 mRNA 在血管平滑肌细胞表达

PDGF-AA (25 μ g/L) 刺激 24 h 后,培养 SMC Jagged2 mRNA 表达较 0 h (1 ± 0.124) 显著增高 (2.367 ± 0.394) ($P < 0.01$),48 h、72 h 均维持在较高水平。Jagged1 mRNA 表达增强较 Jagged2 mRNA 表达延迟,与 0 h (1 ± 0.092) 相比,48 h 后表达显著增强 (1.941 ± 0.222) ($P < 0.01$),72 h 后表达进一步增高 (3.089 ± 0.278) ($P < 0.01$) (图 2)。在受体表达中,Notch1、Notch3 mRNA 在 24 h、48 h 均未见有显著差别,72 h 后二者表达均显著增高 ($P < 0.01$);与 0 h (1 ± 0.187) 相比,Notch3 mRNA 表达在 48 h 显著下降 (0.550 ± 0.055) ($P < 0.01$),72 h 后表达有所上升 ($P < 0.05$) (图 2)。

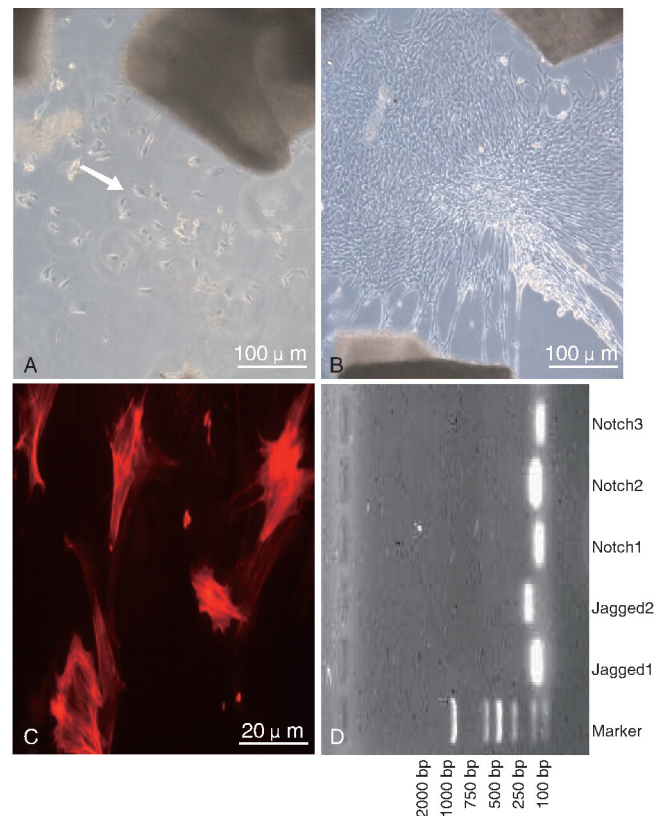


图 1. 血管平滑肌细胞培养、鉴定以及 Notch 通路配体和受体在 SMC 的表达

A 为培养 6 天,可见大量细胞从组织块爬出,白色箭头示爬出的细胞;B 为 SMC 培养 14 天,组织块爬出的细胞呈“谷峰”样生长;C 为培养细胞 α -SM-actin 免疫荧光染色阳性;D 为 Notch 信号通路配体和受体在 SMC 表达。

Figure 1. Vascular smooth muscle cells culture, identification and Notch signals mRNA expression in vascular smooth muscle cells

2.3 PDGF-AA 调节 HES1、HEY1 及 HEY2 和转录因子 Rbp-jK mRNA 在平滑肌细胞表达

HES1、HEY1 及 HEY2 是 Notch 信号通路下游重要的信号分子^[2]。PDGF-AA 刺激 72 h 后检测 HES1、HEY1 及 HEY2 mRNA 表达,与对照相比(分别为 1 ± 0.057 和 1 ± 0.078),DAPT 可显著抑制 HES1、HEY1 mRNA 表达(分别为 0.569 ± 0.034 和 0.097 ± 0.001 , $P < 0.01$);PDGF-AA 显著促进 HES1 和 HEY2 表达(分别为 1.267 ± 0.117 和 0.889 ± 0.132 , $P < 0.05$),该效应被 DAPT 有效抑制(分别为 0.563 ± 0.058 和 0.525 ± 0.080 , $P < 0.01$),与这些效应不同,即使在培养的正常 SMC,DAPT 也显著促进 Rbp-jK 表达 (1.860 ± 0.054 , $P < 0.01$)。与对照相比 (1 ± 0.094),PDGF-AA 显著增强 Rbp-jK mRNA 表达 (1.304 ± 0.031 , $P < 0.05$),而 DAPT 刺激可使 PDGF-AA 导致的 Rbp-jK mRNA 表达进一步显著增高 (1.991 ± 0.331 , $P < 0.05$;图 3)。

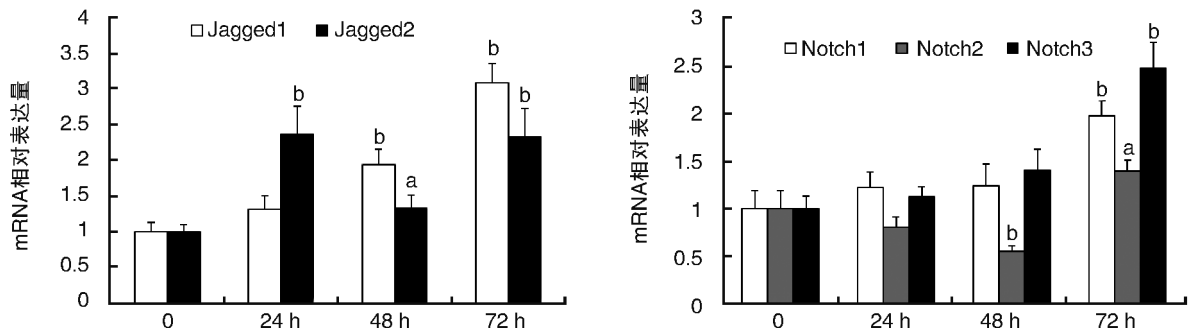


图 2. PDGF-AA (25 $\mu\text{g/L}$) 对 Notch 通路配体和受体在 VSMC 表达的影响 ($n=4$) a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与 0 h 比较。

Figure 2. Effects of platelet derived growth factor-AA on ligands and receptors mRNA expressions of Notch signaling pathways in vascular smooth muscle cells ($n=4$)

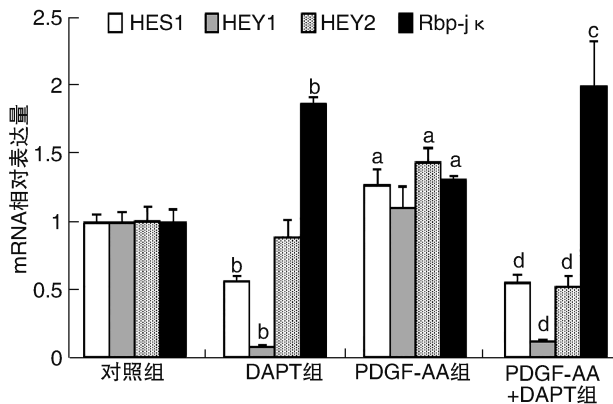


图 3. γ -secretase 抑制剂 (DAPT, 25 $\mu\text{mol/L}$) 对 PDGF-AA (25 $\mu\text{g/L}$) 诱导的 HES1、HEY1 及 HEY2 和转录因子 Rbp-jk 在平滑肌细胞表达的影响 ($n=4$) a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与对照组比较; c 为 $P<0.05$, d 为 $P<0.01$, 与 PDGF-AA 组比较。

2.4 γ -secretase 抑制剂抑制 PDGF-AA 介导的平滑肌细胞增殖

实验检测 72 h 后细胞增殖活性, 结果显示正常 SMC 增殖效应本身就受到 Notch 信号通路调控, 与对照组 (1 ± 0.027) 相比, DAPT 可以显著抑制 SMC 增殖 (0.856 ± 0.009 , $P<0.01$), PDGF-AA 显著促进 SMC 增殖 (1.117 ± 0.018 , $P<0.01$), 这一效应可被 DAPT 显著抑制 (0.896 ± 0.045 , $P<0.01$; 图 4)。

2.5 γ -secretase 抑制剂抑制 PDGF-AA 介导的平滑肌细胞迁移

γ -secretase 抑制剂 (DAPT) 可以直接影响 SMC 迁移能力, 表明培养的正常 SMC 迁移能力本身也受

Notch 信号通路的调控。与对照组 ($28.4\% \pm 3.7\%$) 相比, DAPT 组余留面积显著增加 ($41.6\% \pm 6.1\%$, $P<0.01$), 而 PDGF-AA 显著减少余留面积 ($3.1\% \pm 1.1\%$, $P<0.01$), 这一效应被 DAPT 显著抑制 ($16.5\% \pm 3.8\%$, $P<0.01$; 图 5)。

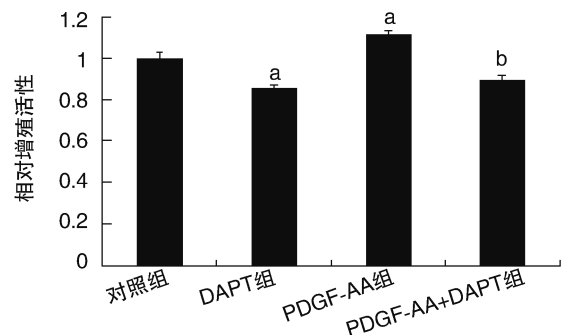


图 4. γ -secretase 抑制剂 (DAPT, 25 $\mu\text{mol/L}$) 抑制 PDGF-AA (25 $\mu\text{g/L}$) 诱导的 VSMC 增殖 ($n=5$) a 为 $P<0.01$, 与对照组比较; b 为 $P<0.01$, 与 PDGF-AA 组比较。

Figure 4. γ -secretase inhibitor (25 $\mu\text{mol/L}$) inhibits platelet derived growth factor-AA (25 $\mu\text{g/L}$)-induced vascular smooth muscle cells proliferation ($n=5$)

3 讨论

血管损伤后损伤处血小板聚集, 随后发生 PDGF 释放, 血管损伤后损伤处局部的 SMC 以及内皮细胞 (endothelial cell, EC) 本身也表达和分泌 PDGF, PDGF 在损伤血管新内膜形成中的重要作用已比较明确^[9]。Notch 信号是在进化上高度保守、控制细胞增殖及迁移等细胞命运的信号转导系统^[10], 主要通过配体激活细胞膜 Notch 信号受体, 引起受体构象改变后裂解, 产生的 ICD 释放后转位到细胞核, 调节下游靶基因转录及活性, 在这些靶

基因中,HES1、HEY1 及 HEY2 最受关注^[2],新近研究证实 Notch 信号通路调节了 PDGF 受体 β 表达^[11],提示该通路与 PDGF 调节 SMC 生物学活性密切相关。由于 PDGF 存在 PDGF-AA、PDGF-BB 及 PDGF-AB 三种形式,且 PDGF 受体由两种亚单位 α

及 β 构成,二者与 PDGF 结合力相差很大,导致 α 亚单位可与 PDGF-AA、PDGF-AB 及 PDGF-BB 结合, β 亚单位仅与 PDGF-BB 及 PDGF-AB 结合,因此不同类型 PDGF 可能具有不完全一致的信号调节方式^[11]。

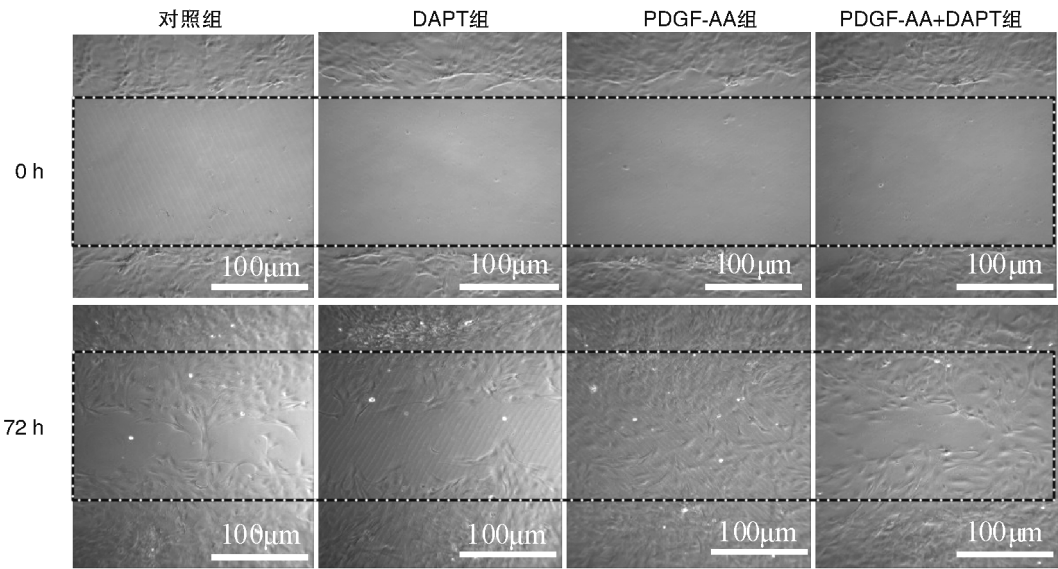


图 5. γ -secretase 抑制剂 (DAPT, 25 $\mu\text{mol/L}$) 抑制 PDGF-AA (25 $\mu\text{g/L}$) 诱导的血管平滑肌细胞迁移 ($n=4$)
Figure 5. γ -secretase inhibitor (25 $\mu\text{mol/L}$) inhibits platelet derived growth factor-AA (25 $\mu\text{g/L}$)-induced vascular smooth muscle cells migration ($n=4$)

本研究结果显示 VSMC 表达主要的 Notch 信号分子,包括配体 Jagged1、Jagged2 以及受体 Notch1、Notch2 和 Notch3,应用大鼠肾脏组织作阳性对照^[12],未检测到 Notch4 表达于 SMC,既往文献研究显示 Notch4 主要表达于 EC 以及心内膜等,尚未见有 Notch4 表达于 SMC 的文献报道^[13]。PDGF-AA 刺激直接影响 Notch 信号通路配体和受体分子表达。配体 Jagged2 mRNA 在 PDGF-AA 刺激后表达增强早于 Jagged1 mRNA,提示二者在针对 PDGF-AA 刺激存在不同的反应机制。PDGF-AA 刺激显著促进 Notch1、Notch3 受体 mRNA 表达,在刺激 72 h 后均维持较高水平,与此不同的是,Notch2 mRNA 在 PDGF-AA 刺激后 48 h 显著降低,尽管在刺激后 72 h 显著增高,但是并未达到与 Notch1、Notch3 mRNA 类似较高的表达水平,提示 Notch2 针对 PDGF-AA 刺激可能具有不同于 Notch1、Notch3 的生物学作用。有文献研究表明,与 Notch3 相反,Notch2 主要作用是抑制 SMC 增殖以及促进 SMC 凋亡,PDGF-BB 刺激抑制 Notch2 mRNA 表达^[6],因此推测 Notch2 在 PDGF-AA 作用于 SMC 过程中具有类似的生物学作用。HES1、HEY1 及 HEY2 是 Notch

信号通路下游重要的信号分子^[2],但是在 PDGF-AA 作用于 SMC 过程中呈不同的表现方式,PDGF-AA 显著促进 HES1 和 HEY2 表达,而对 HEY1 表达并无明显影响,提示 HES1 和 HEY2 在 PDGF-AA 刺激 SMC 反应过程中可能较 HEY1 起到更为关键的作用。值得注意的是,在培养的正常 SMC,DAPT 和 PDGF-AA 均显著促进 Rbp-jK mRNA 表达,且 DAPT 可使 PDGF-AA 介导的 Rbp-jK mRNA 表达进一步增高,这可能与 Rbp-jK 特殊功能有关。文献报道 Rbp-jK 作为转录调节子具有双向作用,即当与 NICD 结合时作为转录激活子促进 Notch 靶基因转录,当其未与 NICD 结合时其又可以充当转录抑制子抑制基因转录^[14-15]。正常培养 SMC 本身具有一定量 NICD,Rbp-jK 具备转录激活子作用,PDGF-AA 激活 Notch 信号后产生 NICD,可能进一步促进 Rbp-jK 的激活子功能;当 DAPT 阻断 Notch 信号通路,NICD 减少或缺如,导致 Rbp-jK 向转录抑制子功能转换,因此无论 PDGF-AA 刺激或 DAPT 阻断 Notch 通路,均可能刺激 Rbp-jK mRNA 显著表达,这一推测能否成立,需要进一步实验验证。这些研究结果表明,PDGF-AA 可以激活 Notch 信号通路,PDGF-

AA 可能通过 Notch 信号调节 SMC 生物学行为,进一步的研究结果表明,PDGF-AA 刺激可显著促进 SMC 增殖和迁移,这两种效应均可被 DAPT 有效抑制,表明 PDGF-AA 部分通过 Notch 通路调节 SMC 的增殖和迁移能力。

Notch 通路在细胞命运调控中起重要作用,但是其成员在调控细胞生物学行为中的作用可能较其他类型信号系统更为复杂,同一 Notch 信号分子在不同的细胞或者同一细胞的不同分化阶段,其生物学功能可能完全不同甚至相反,如文献报道 Notch2 可能促进 SMC 凋亡和抑制其增殖^[7],但是也有研究显示内源性 Notch 2 干扰却抑制胶质瘤 U251 细胞增殖^[16];在肿瘤发生发展过程中,Notch1 作为某些肿瘤的癌基因,但是在其他类型肿瘤中则可能为抑癌基因^[17],该通路各成员在 VSMC 生物活性转换中的作用也表现出复杂性特点。就本次实验而言,Notch2 mRNA 表达在 PDGF-AA 刺激 48 h 后显著下降,但是刺激后 72 h 表达又表现为明显上升,以及 PDGF-AA 并不引起 HEY1 mRNA 表达显著改变,其中原因值得深入研究。综合本次实验结果,概言之,PDGF-AA 调节 VSMC Notch 通路配体和受体表达,PDGF-AA 部分通过激活 Notch 信号通路促进 SMC 增殖和迁移,研究结果为深入认识损伤血管新生内膜形成的分子机制提供了部分新的理论基础。

[参考文献]

- [1] 周 炜, 陈曼华. 瑞舒伐他汀对大鼠颈动脉球囊损伤后内膜增生及线粒体融合素 2 表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(5): 424-428.
- [2] Grogan SP, Olee T, Hiraoka K, et al. Repression of chondrogenesis through binding of notch signaling proteins HES1 and HEY1 to N-box domains in the COL2A1 enhancer site [J]. Arthritis Rheum, 2008, 58(9): 2754-763.
- [3] Liang M, Wang Y, Liang A, et al. Migration of smooth muscle cells from the arterial anastomosis of arteriovenous fistulas requires Notch activation to form neointima [J]. Kidney Int, 2015, 88(3): 490-502.
- [4] Lindner V, Booth C, Prudovsky I, et al. Members of the Jagged/Notch gene families are expressed in injured arteries and regulate cell phenotype via alterations in cell matrix and cell-cell interaction [J]. Am J Pathol, 2001, 159(3): 875-883.
- [5] Yang X, Thomas DP, Zhang X, et al. Curcumin inhibits platelet-derived growth factor-stimulated vascular smooth muscle cell function and injury-induced neointima formation [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(1): 85-90.
- [6] Campos AH, Wang W, Pollman MJ, et al. Determinants of Notch-3 receptor expression and signaling in vascular smooth muscle cells: implications in cell-cycle regulation [J]. Circ Res, 2002, 91(11): 999-1006.
- [7] Baeten JT, Lilly B. Differential regulation of NOTCH2 and NOTCH3 contribute to their unique functions in vascular smooth muscle cells [J]. J Biol Chem, 2015, 290(26): 16226-237.
- [8] Yaqi Shen, Wei Guo, Zhijun Wang, et al. Protective effects of hydrogen sulfide in hypoxic human umbilical vein endothelial cells: a possible mitochondria-dependent pathway [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(7): 13093-108.
- [9] Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor [J]. Physiol Rev, 1999, 79: 1283-316.
- [10] 常 成, 靳 鹏, 郑 薇, 等. 野百合碱诱导大鼠肺动脉高压时对肺血管壁 Jagged2/Notch3 信号分子表达的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(1): 12-17.
- [11] Jin S, Hansson EM, Tikka S, et al. Notch signaling regulates platelet-derived growth factor receptor-beta expression in vascular smooth muscle cells [J]. Circ Res, 2008, 102(12): 1483-491.
- [12] Karcher JR, Hoffmann BR, Liu P, et al. Genome-wide epigenetic and proteomic analysis reveals altered Notch signaling in EPC dysfunction [J]. Physiol Rep, 2015, 3(4): e12358.
- [13] Boucher J, Gridley T, Liaw L. Molecular pathways of notch signaling in vascular smooth muscle cells [J]. Front Physiol, 2012, 3: 81.
- [14] Iso T, Chung G, Hamamori Y, et al. HERP1 is a cell type-specific primary target of Notch [J]. J Biol Chem, 2002, 277(8): 6598-607.
- [15] Iso T, Sartorelli V, Chung G, et al. HERP, a new primary target of Notch regulated by ligand binding [J]. Mol Cell Biol, 2001, 21(17): 6071-079.
- [16] Yu HP, Qi ST, Feng WF, et al. Interference of Notch 2 inhibits the progression of gliomas and induces cell apoptosis by induction of the cell cycle at the G0/G1 phase [J]. Mol Med Rep, 2015, 11(1): 734-738.
- [17] Fan X, Mikolaenko I, Elhassan I, et al. Notch1 and notch2 have opposite effects on embryonal brain tumor growth [J]. Cancer Res, 2004, 64(21): 7787-793.

(此文编辑 许雪梅)