

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2017)25-05-0452-05

血管紧张素Ⅱ诱发自噬对血管平滑肌细胞表型转换的调控作用

张紫薇^{1,2}, 杨丽霞¹, 吕晋琳^{1,2}, 王先梅¹, 杨智华¹, 陆霓虹^{1,2}

(1.成都军区昆明总医院心内科, 云南省昆明市 650032; 2.昆明医科大学昆明总医院临床学院, 云南省昆明市 650500)

[关键词] 血管紧张素Ⅱ; 自噬; 血管平滑肌细胞; 细胞表型

[摘要] **目的** 观察血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)对小鼠主动脉血管平滑肌细胞(VSMC)自噬的影响以及自噬对细胞表型转换的调控作用。**方法** 原代培养小鼠 VSMC, 用 10^{-6} mol/L AngⅡ作用 VSMC 不同时间, 采用 Western blot 检测微管相关蛋白轻链-3-Ⅱ(LC3-Ⅱ)的表达以观察 AngⅡ对 VSMC 自噬的影响, 透射电镜观察对照组及 AngⅡ组的自噬小体。用 Western blot 检测自噬抑制剂 3-MA 和 Baf-A1 干预后对 AngⅡ诱导自噬及细胞表型转换的影响。使用 siRNA 抑制自噬相关基因 Atg7 的表达, qRT-PCR 检测转染后 Atg7 的表达变化, Western blot 检测转染 siRNA Atg7 后对 LC3-Ⅱ及细胞表型蛋白标志物的影响。**结果** AngⅡ以时间依赖方式促进 LC3-Ⅱ表达, 自噬抑制剂 3-MA 抑制 AngⅡ促 LC3-Ⅱ的表达作用, 而 Baf-A1 则增强 AngⅡ促 LC3-Ⅱ的表达作用, 两种自噬抑制剂均可抑制 AngⅡ促 VSMC 表型转换作用。转染 siRNA Atg7 后显著抑制 AngⅡ促 LC3-Ⅱ的表达作用, 并可抑制 AngⅡ促细胞表型转换作用。**结论** AngⅡ促进 VSMC 从收缩表型转化为合成表型可能是自噬依赖性的, 抑制自噬可以抑制 AngⅡ诱导的 VSMC 表型转换。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of AngⅡ-stimulated autophagy on phenotype conversion of vascular smooth muscle cells

ZHANG Zi-Wei^{1,2}, YANG Li-Xia¹, LV Jin-Lin^{1,2}, WANG Xian-Mei¹, YANG Zhi-Hua¹, LU Ni-Hong^{1,2}

(1. Department of Cardiology, Kunming General Hospital of Chengdu Military Area, Kunming, Yunnan 650032, China; 2. Department of Postgraduate, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650500, China)

[KEY WORDS] AngiotensinⅡ; Autophagy; Vascular smooth muscle cell; Cell phenotype

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of angiotensinⅡ(AngⅡ) on the autophagy of mouse aortic smooth muscle cells and the regulation of autophagy on cell phenotype conversion. **Methods** Mouse vascular smooth muscle cells were obtained by primary culture, vascular smooth muscle cells were incubated with 10^{-6} mol/L AngⅡ at different time, Western blot was used to detect the expression of LC3-Ⅱ. Transmission electron microscope was used to observe the autophagic body of different groups. Vascular smooth muscle cells were pretreated with 3-MA, Baf-A1 and then incubated with 10^{-6} mol/L AngⅡ for 24 h, Western blot was used to detect the expression of LC3-Ⅱ and the contractile phenotype marker (SM22 α and SM- α -actin) and synthetic phenotype marker (OPN) of vascular smooth muscle cells in different groups. qRT-PCR was performed to detect the Atg7 mRNA level after transfection with siRNA Atg7. Western blot was performed to detect the expression of LC3-Ⅱ, SM22 α , SM- α -actin and OPN to observe the effect of siRNA Atg7 on AngⅡ-induced autophagy and VSMC phenotype conversion. **Results** AngⅡ stimulated LC3-Ⅱ expression in a time-dependent manner, 3-MA significantly attenuated the AngⅡ-enforced expression of LC3-Ⅱ while Baf-A1 further increased the expression of LC3-Ⅱ. Both 3-MA and Baf-A1 significantly suppressed AngⅡ-stimulated VSMC phenotype conversion. Transfection with siRNA Atg7 remarkably decreased the expression of LC3-Ⅱ stimulated by AngⅡ and suppressed AngⅡ-stimulated VSMC phenotype conversion. **Conclusion** AngⅡ-stimulated VSMC phenotype conversion may be autophagy-depend-

[收稿日期] 2016-09-27

[修回日期] 2017-03-13

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81170250)

[作者简介] 张紫薇, 博士研究生, 主治医师, E-mail 为 zzwkumming@126.com。通讯作者杨丽霞, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, E-mail 为 doctorlxyang@126.com。

ent, and inhibition of autophagy significantly suppressed Ang II-stimulated VSMC phenotype conversion.

病理状态下,血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell,VSMC)的异常生物学活性可导致高血压、冠心病、血管内再狭窄等心血管疾病的发生,而这些异常的生物学功能往往跟受到刺激后的 VSMC 表型转换有关。在各种刺激因素作用下,VSMC 可从生理状态下的收缩表型转化为合成表型,导致 VSMC 增殖、迁移能力大大增加,分泌各种炎症相关因子,细胞外基质也增多,从而参与血管重塑过程^[1]。血管紧张素Ⅱ(angiotensinⅡ,AngⅡ)作为体内常见的生长因子之一,参与各种心血管疾病的发生发展^[2-3]。

自噬即细胞对自身的吞噬作用,指细胞通过形成自噬溶酶体消化自身大分子蛋白及细胞器的降解过程,从而维持细胞稳态^[4]。自噬广泛参与体内各种病理生理过程,目前已成为医学研究热点,尤其在肿瘤领域报道颇多^[5-6]。越来越多的证据显示自噬亦参与心血管疾病的发生发展^[7-10]。自噬在动脉粥样斑块中的作用逐渐受到人们的重视,研究发现在粥样斑块内可观察到 VSMC 发生自噬^[11],但 VSMC 自噬在动脉粥样硬化病变发展过程中的作用机制尚不明确。Ang Ⅱ可促进 VSMC 表型转换,也可作为自噬的一种刺激因素^[12-13],所以我们设想自噬可能参与 Ang Ⅱ促进 VSMC 表型转换过程。本研究以小鼠 VSMC 为研究对象,观察自噬是否参与 Ang Ⅱ促进 VSMC 表型转换过程及其作用。

1 材料和方法

1.1 材料

C57BL/6 小鼠由昆明医科大学实验动物中心提供;DMEM 高糖培养基、胎牛血清、0.25% EDTA 胰蛋白酶、免疫组织化学试剂盒、Trizol (Invitrogen 公司);逆转录试剂盒、PVDF 膜、Lipofectamine2000、siRNA Atg7 及 NC(CST 公司);细胞裂解液、LC3B 单抗 (Abcam,ab51520);骨桥蛋白 (osteopontin, OPN)、SM22 α 单抗 (Proteintech 公司);SM- α -actin、AngⅡ (Sigma 公司);二抗 IgG-HRP;ECL 显色试剂盒。

1.2 VSMC 原代培养、传代及鉴定

无菌条件下取出 C57BL/6 小鼠主动脉,用镊子去除外膜及内膜,磷酸盐缓冲液冲洗 3 次后将中膜剪成约 1 mm³ 大小的组织块,种植于 25 cm² 塑料培养瓶,加入含青霉素、链霉素及含 10% 胎牛血清的高糖细胞培养基 3~5 mL,置于 37℃ 恒温箱培养,使组织块浸于培养液中,继续静置培养。培养 5~7 天

可见细胞爬出,呈贴壁生长。将其用胰蛋白酶消化后制成细胞悬液,接种于培养瓶或 96 孔培养板。选取第 3 代细胞进行形态学及免疫组织化学染色观察,第 4~8 代细胞用于实验。

1.3 转染

细胞处理后置于 6 孔板,按说明书分别将 5 μ L Lipofectamin2000 与 siRNA Atg7 及 NC 稀释、混合,室温下孵育 20 min,使用 qRT-PCR 检测转染效率,转染浓度为 100 nmol/L。

1.4 实时荧光定量 PCR 检测

Trizol 法提取总 RNA,以总 RNA 为模板逆转录成 cDNA,根据 mRNA 定量检测试剂盒操作说明进行逆转录及 PCR 扩增。Atg7 正向引物为 5'-GGG GTT TTC TGT CAC GGT TC-3',反向引物为 5'-AGC AGC TTG GGT CTC TTG AT-3'; β -actin 正向引物为 5'-CAT CCG TAA AGA CCT CTA TGC CAA C-3',反向引物为 5'-ATG GAG CCA CCG ATC CAC A-3'。总反应体积 25 μ L,采用两步法,第一步 95℃ \times 10 min,第二步 95℃ \times 15 s,60℃ \times 60 s,40 个循环。反应结束后确认解离曲线,以 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 对结果进行分析。

1.5 Western blot 检测蛋白表达

将各处理组细胞培养基吸出,用预冷 PBS 洗 2 次,加入适量胰酶,补充少量培养基终止反应,反复吹打,使细胞脱落后转移至灭菌 1.5 mL 离心管,室温 2000 r/min 离心 3 min;弃上清,预冷 PBS 洗沉淀 1 次,室温 2000 r/min 离心 3 min;弃上清,加入适量 RIPA 裂解液,冰浴 30 min;4℃、12000 r/min 离心 5 min;取上清,用 BCA 法测定蛋白浓度。于 10% SDS-PAGE 行细胞蛋白电泳,转 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉室温封闭过夜,一抗孵育(一抗以 1:500 或 1:1000 稀释),4℃ 孵育过夜;将二抗以 1:5000 稀释,室温孵育 1 h,漂洗,ECL 显色,置于 Bio-Rad 化学发光仪器中,滴加适量的 ECL 发光液,曝光。采用 Bio-Rad Quantity One 软件进行定量分析。

1.6 电镜观察自噬体

用 200 mmol/L 酒精处理对数生长期细胞 2 h,3% 戊二醛固定细胞,4℃ 过夜,PBS 洗涤,饿酸固定,丙酮脱水,树脂包埋,超薄切片,MORADA G2 电镜下观察并摄片。

1.7 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采取 Tukey 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠原代 VSMC 的鉴定

倒置相差显微镜下观察原代培养大鼠 VSMC, 细胞呈贴壁生长, 形态多为长梭形, 细胞质丰富, 单层或多层平行排列生长, 并呈现典型的峰-谷样生长, 荧光显微镜下蓝色为 DAPI 核染色, SM- α -actin 染色显示胞质红染, 提示为阳性染色(图 1)。

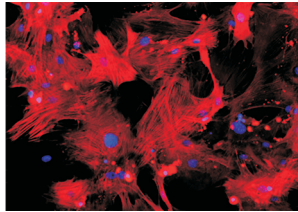


图 1. 小鼠原代 VSMC SM- α -actin 免疫组织化学鉴定 (100 \times)

Figure 1. Immunohistochemistry identification of primary VSMC for SM- α -actin of mouse (100 \times)

2.2 Ang II 促进 VSMC 发生自噬

LC3-II 表达水平在 Ang II 作用 24 h 及 48 h 时显著增高, 在 24 h 时表达最强, 证实 Ang II 可促进 VSMC 发生自噬(图 2A)。电镜下, Ang II 作用 VSMC 后自噬小体较对照组显著增加(图 2B), 证实 Ang II 促进 VSMC 发生自噬。

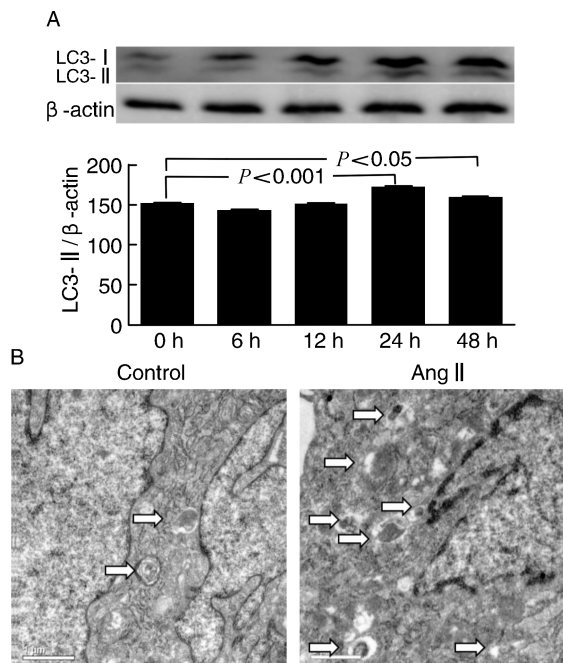


图 2. Ang II 促进 VSMC 发生自噬 A 为不同时间点 Ang II 对 LC3-II 表达的影响; B 为电镜观察不同组别自噬小体 (25000 \times), 白色箭头标记为自噬小体。

Figure 2. Ang II promotes autophagy in VSMC

2.3 自噬抑制剂抑制 Ang II 促 VSMC 表型转换

分别使用自噬抑制剂 3-MA 和 Baf-A1 预处理, 再观察 Ang II 对 VSMC 自噬的影响, 结果发现, 3-MA 可显著减少基础及 Ang II 促 LC3-II 表达水平, 而 Baf-A1 预处理后则可增加 Ang II 促 LC3-II 表达水平。3-MA 和 Baf-A1 预处理后显著增加基础及 Ang II 抑制的 SM22 α 及 SM- α -actin 表达, 并可显著减少基础及 Ang II 促进的 OPN 表达, 提示自噬抑制剂 3-MA 和 Baf-A1 可抑制 Ang II 促进的 VSMC 表型转换(图 3)。

2.4 干扰 Atg7 后抑制 Ang II 促 VSMC 表型转换

Ang II 可显著增加 Atg7 mRNA 表达, 转染 siRNA Atg7 后显著减少 Atg7 mRNA 表达及 Ang II 的促 LC3-II 表达, 证实干扰自噬相关基因 Atg7 后可显著抑制 Ang II 的促 VSMC 自噬 ($P < 0.05$)。与转染 siRNA NC 组相比, 转染 siRNA Atg7 后可显著增加 Ang II 抑制的 SM- α -actin 和 SM22 α 表达, 并减少 Ang II 促进的 OPN 表达(图 4)。

3 讨论

大量证据表明, 在动脉粥样斑块进展过程中伴随着自噬, 其可由氧化脂质、炎症因子、代谢应激等多种因素刺激产生^[14]。多数研究显示自噬可能在动脉粥样斑块的形成过程中对细胞起着抗凋亡、修复的作用, 具有细胞保护效应。Liao 等^[9]报道巨噬细胞自噬可能对斑块进展起保护作用, 抑制自噬后可促进斑块坏死。Grootaert 等^[15]发现抑制自噬可促进 VSMC 衰老、减少内膜增生及动脉粥样斑块形成。

Ang II 是肾素-血管紧张素-醛固酮系统的重要效应分子, 它可通过与相应受体相结合, 对血管壁细胞可产生多种生物学效应, 如促进 VSMC 增殖、迁移、细胞表型转换等^[1,16]。新近研究显示 Ang II 在多种心血管疾病病理过程中可刺激自噬产生。Dai 等^[13]发现 Ang II 通过诱导自噬进一步促进心肌细胞肥大从而导致心衰, Shan 等^[12]报道 Ang II 诱导的自噬对 Ang II 引起的血管内皮细胞衰老、凋亡可能起到保护作用, Liu^[17]等发现抑制 Ang II 诱导的自噬可减少 Ang II 促进的心肌成纤维细胞细胞外基质的产生。自噬是细胞通过形成双层膜样结构的自噬小泡对大分子蛋白、残存细胞器进行吞噬, 最终形成自噬溶酶体将吞噬物质消化降解的过程。Ang II 促进 VSMC 由收缩表型转换为合成表型的过程必然存在收缩表型标志蛋白的降解以及合成表型标志

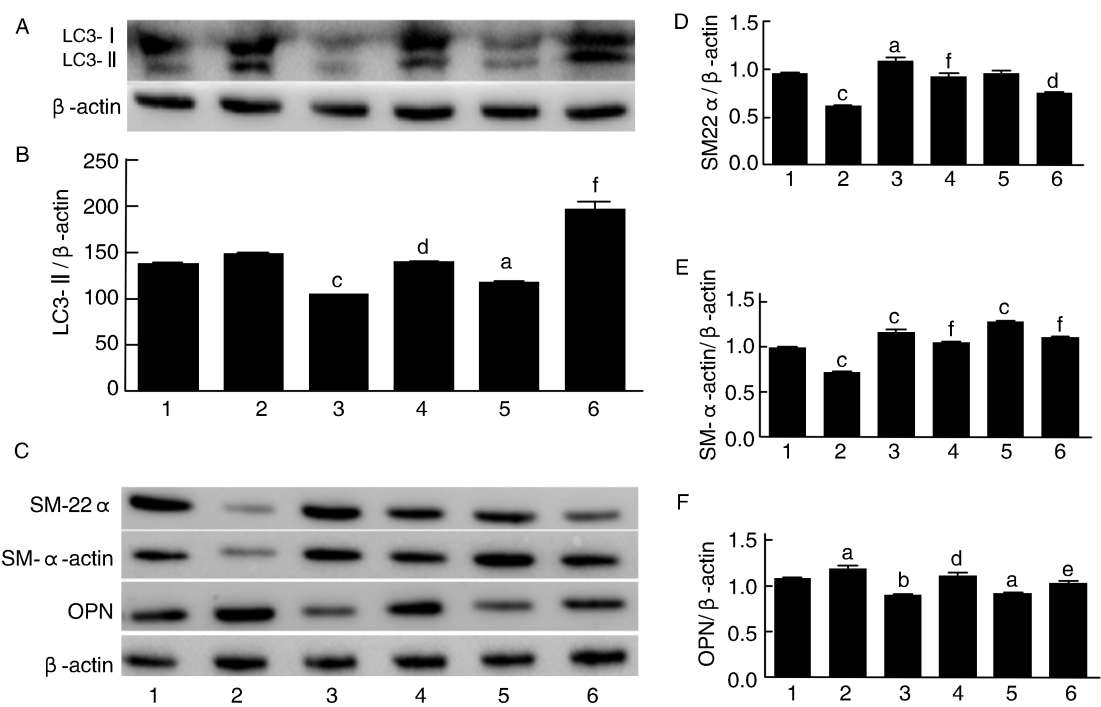


图 3. 自噬抑制剂 3-MA 和 Baf-A1 对 Ang II 诱导自噬及促细胞表型转换的影响 A 为 Western blot 检测不同组 LC3-II 的表达;B 为定量分析不同处理组 LC3-II 的表达水平;C 为 Western blot 检测不同组 SM22α、SM-α-actin 和 OPN 的表达;D-F 为定量分析不同处理组 SM22α、SM-α-actin、OPN 的表达水平。1 为对照组,2 为 Ang II 组,3 为 3-MA 组,4 为 3-MA+Ang II 组,5 为 Baf-A1 组,6 为 Baf-A1+Ang II 组。a 为 $P<0.05$,b 为 $P<0.01$,c 为 $P<0.001$,与对照组比较; d 为 $P<0.05$,e 为 $P<0.01$,f 为 $P<0.001$,与 Ang II 组比较。

Figure 3. Effect of 3-MA and Baf-A1 on Ang II-stimulated autophagy and phenotype conversion

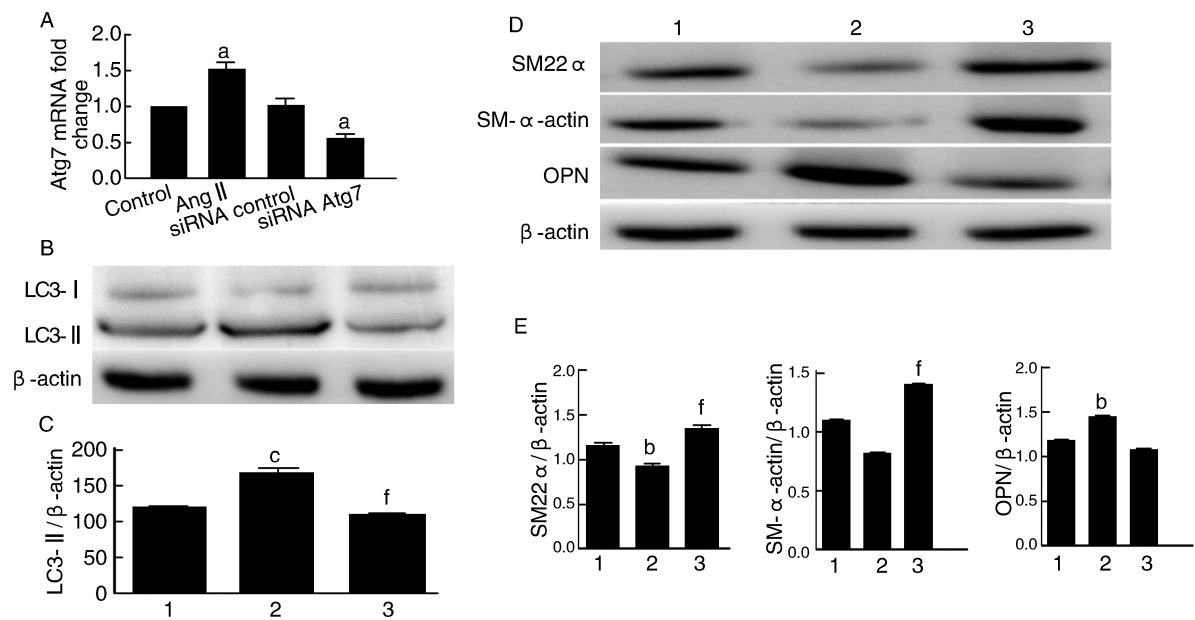


图 4. 干预自噬基因 Atg7 对 Ang II 诱导自噬及促细胞表型转换的影响 A 为 qRT-PCR 检测不同组 Atg7 mRNA 的表达,B 为 Western blot 检测不同组 LC3-II 的表达,C 为定量分析不同组 LC3-II 的表达,D 为 Western blot 检测不同组 SM22α、SM-α-actin、OPN 的表达,E 为定量分析不同组 SM22α、SM-α-actin、OPN 的表达。1 为对照组,2 为 siRNA NC+Ang II 组,3 为 siRNA Atg7+Ang II 组。a 为 $P<0.05$,b 为 $P<0.01$,c 为 $P<0.001$,与对照组比较;f 为 $P<0.001$,与 Ang II 组比较。

Figure 4. Effect of 3-MA and Baf-A1 on Ang II-stimulated autophagy and phenotype conversion

蛋白的生成,因此我们设想自噬是否通过影响这些表型标志蛋白的表达参与 Ang II 促进的 VSMC 表型转换过程。与既往研究相一致,本研究首先证实了 Ang II 以时间依赖方式促进 LC3-II 的表达,电镜下

观察到 Ang II 可显著增加自噬小体,且 Ang II 可增加自噬相关基因 Atg7 的 mRNA 表达,通过这些结果证实 Ang II 可促进 VSMC 发生自噬。使用自噬抑制剂 3-MA 抑制 Ang II 诱发的自噬后,Western blot 结果显示 SM- α -actin 及 SM22 α 等收缩表型标志蛋白显著增多,而合成表型蛋白 OPN 表达明显减少,VSMC 细胞表型趋于转化为分化表型。由于 3-MA 是通过选择性抑制 PI3K 信号通路抑制自噬的^[18],其抑制 Ang II 促进 VSMC 表型转换的作用可能不完全是通过抑制自噬来产生的。因此我们还使用了溶酶体抑制剂 Baf-A1 观察其对 VSMC 表型转换的影响。由于 Baf-A1 在自噬晚期阶段能阻断自噬体与溶酶体的融合过程从而发挥其抑制自噬的作用,本研究证实,通过 Ang II 升高的 LC3-II 的降解途径被 Baf-A1 所抑制,从而起到抑制自噬的作用。Baf-A1 可抑制 Ang II 促 VSMC 去分化的作用。进一步通过抑制干扰自噬相关基因 Atg7 来观察其对 VSMC 表型转换的影响,结果发现,转染 siRNA Atg7 后同样可显著抑制 Ang II 促 VSMC 去分化过程。以上结果表明,当 Ang II 诱发的自噬受到抑制后,其促进 VSMC 去分化过程亦受到抑制。

Ang II 作为一种生长因子,可促进 VSMC 的一系列生物学功能,包括诱导自噬、增殖等,本研究发现 Ang II 促进 VSMC 表型转换可能是自噬依赖性的。抑制自噬后可显著抑制 Ang II 促进的 VSMC 由收缩表型转换为合成表型的过程,从而可能抑制 Ang II 促 VSMC 增殖、迁移、分泌等生物活性,为动脉粥样硬化、高血压等心血管疾病提供了一个新的治疗方向。

[参考文献]

- [1] Savoia C, Burger D, Nishigaki N, et al. Angiotensin II and the vascular phenotype in hypertension[J]. *Expert Rev Mol Med*, 2011, 13: e11.
- [2] van den Borne SWM, Diez J, Blankesteijn WM, et al. Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts[J]. 2010, 7(1): 30-37.
- [3] Sata M, Fukuda D. Crucial role of renin-angiotensin system in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. *J Med Invest*, 2010, 57(1-2): 12-25.
- [4] Marino G, Niso-Santano M, Baehrecke EH, et al. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis[J]. 2014, 15(2): 81-94.
- [5] Guo JY, Xia B, White E. Autophagy-mediated tumor promotion[J]. *Cell*, 2013, 155(6): 1 216-219.
- [6] Chaachouay H, Ohneseit P, Toulany M, et al. Autophagy contributes to resistance of tumor cells to ionizing radiation[J]. *Radiother Oncol*, 2011, 99(3): 287-292.
- [7] Ramadan A, Singh K, Quan A, et al. Abstract 15196: autophagy regulates vascular smooth muscle cell phenotypic switching: translational implications for aneurysm formation[J]. *Circulation*, 2013, 128(Suppl 22): A15196.
- [8] Xie M, Kong Y, Tan W, et al. HDAC inhibition blunts ischemia/reperfusion injury by inducing cardiomyocyte autophagy[J]. *Circulation*, 2014, 129(10): 1 139-151.
- [9] Liao X, Sluimer J C, Wang Y, et al. Macrophage autophagy plays a protective role in advanced atherosclerosis[J]. *Cell Metab*, 2012, 15(4): 545-553.
- [10] Peng N, Meng N, Wang S, et al. An activator of mTOR inhibits oxLDL-induced autophagy and apoptosis in vascular endothelial cells and restricts atherosclerosis in apolipoprotein E^{-/-} mice[J]. 2014, 4: 5519.
- [11] Lavandero S, Chiong M, Rothermel BA, et al. Autophagy in cardiovascular biology[J]. *J Clin Invest*, 125(1): 55-64.
- [12] Shan H, Guo D, Li X, et al. From autophagy to senescence and apoptosis in angiotensin II-treated vascular endothelial cells[J]. *APMIS*, 2014, 122(10): 985-992.
- [13] Dai D, Johnson SC, Villarin JJ, et al. Mitochondrial oxidative stress mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and G α q overexpression-induced heart failure[J]. *Circ Res*, 2011, 108(7): 837.
- [14] Martinet W, De Meyer GRY. Autophagy in atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2009, 104(3): 304-317.
- [15] Grootaert MO, Da Costa Martins PA, Bitsch N, et al. Defective autophagy in vascular smooth muscle cells accelerates senescence and promotes neointima formation and atherogenesis[J]. *Autophagy*, 2015, 11(11): 2 014-032.
- [16] Vukelic S, Griendling KK. Angiotensin II, from vasoconstrictor to growth factor a paradigm shift[J]. *Circ Research*, 2014, 114(5): 754-757.
- [17] Liu S, Chen S, Li M, et al. Autophagy activation attenuates angiotensin II-induced cardiac fibrosis[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2016, 590: 37-47.
- [18] Liu D, Yang Y, Liu Q, et al. Inhibition of autophagy by 3-MA potentiates cisplatin-induced apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells[J]. *Med Oncol*, 2011, 28(1): 105-111.

(此文编辑 文玉珊)