

干扰 SET8 调节血管平滑肌细胞增殖、 凋亡促进血管钙化

张东雪, 李同妙, 高少辉, 张胜雷

(河北医科大学第四医院肾内科, 河北省石家庄 050011)

[关键词] 血管平滑肌细胞; 赖氨酸甲基转移酶 SET8; 细胞增殖; 细胞凋亡; RNA 干扰; 血管钙化

[摘要] **背景与目的** 血管平滑肌细胞(VSMC)凋亡在许多血管钙化疾病的病理过程中起关键作用。近期研究表明,赖氨酸甲基转移酶 SET8 参与调节细胞增殖、凋亡过程。文章旨在探寻 SET8 是否通过调节 VSMC 增殖、凋亡而影响血管钙化。**方法** 体外培养原代大鼠 VSMC,将 VSMC 随机分为正常对照组、空质粒组和 SET8-shRNA 组。以脂质体 LipofectamineTM2000 为载体,转染 VSMC。采用茜素红染色法和钙含量测定法判断细胞钙化程度;采用 MTT 法检测三组细胞的增殖能力;实时荧光定量 PCR、Western blot 法检测三组细胞中增殖基因 Survivin 和凋亡基因 Caspase-3 的表达水平,分析干扰 SET8 对 VSMC 增殖、凋亡及其相关基因和蛋白表达的影响。**结果** ①干扰 SET8 可成功抑制 VSMC 中 SET8 蛋白的表达($P<0.05$)。②转染 VSMC 后,与正常对照组和空质粒组比较,SET8-shRNA 组钙含量明显升高($P<0.05$)。③MTT 结果显示,在第 12 h、24 h、36 h、48 h,SET8-shRNA 组 VSMC 的增殖能力较正常对照组和空质粒组明显降低($P<0.05$)。④实时荧光定量 PCR 和 Western blot 结果显示 SET8-shRNA 组 Survivin 的 mRNA 和蛋白表达较正常对照组和空质粒组明显下降,而 Caspase-3 的 mRNA 和蛋白表达则相反($P<0.05$)。**结论** 干扰 SET8 能够增加促凋亡基因表达,抑制增殖基因表达,SET8 有可能参与调节大鼠血管钙化。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Interfering SET8 promotes vascular calcification by regulating the proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cell

ZHANG Dong-Xue, LI Tong-Miao, GAO Shao-Hui, ZHANG Sheng-Lei

(Department of Nephrology, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050011, China)

[KEY WORDS] Vascular smooth muscle cell; Lysine methyltransferase SET8; Cell proliferation; Cell apoptosis; RNA interference; Vascular calcification

[ABSTRACT] **Background and Aim** Vascular smooth muscle cell (VSMC) apoptosis plays a critical role in the pathogenesis of many angiocalcified diseases. Recent studies have shown that lysine methyltransferase SET8 was involved in regulating cell proliferation and apoptosis. The purpose of this study was to explore whether SET8 can influence calcification by regulating proliferation and apoptosis of VSMC. **Methods** VSMC were obtained from rat thoracic aorta, and then randomly divided into control group, the empty plasmid group and SET8-shRNA group. Transfection was performed with cationic lipid vectors (LipofectamineTM2000) on VSMC. Calcium deposition was measured by alizarin red staining and calcium content measurement; The proliferation of VSMC in vitro was measured by MTT assay. The expressions of proliferation-related genes survivin and apoptosis-related genes caspase-3 were determined by real-time PCR and Western blot assay. **Results** The expression of SET8 protein in VSMC was effectively inhibited by SET8-shRNA. The calcium content was decreased in cells after SET8-shRNA transfection. Proliferation of VSMC was inhibited after transfected with SET8-shRNA 12 h, 24 h, 36 h and 48 h ($P<0.05$). The expressions of survivin was decreased in cells, but expressions of caspase-3 was increased after SET8-shRNA transfection ($P<0.05$ for all). **Conclusion** Interfering with SET8 can increase the expression of apoptosis gene and inhibit the expression of proliferative genes, and SET8 may be involved in regulating the calcification of rat blood vessels.

[收稿日期] 2017-06-19

[修回日期] 2017-07-26

[作者简介] 张东雪,研究方向为慢性肾脏疾病血管钙化机制,E-mail 为 zhangdx009@163.com。通讯作者张胜雷,硕士,主治医师,研究方向为慢性肾脏疾病血管钙化机制,E-mail 为 lei06352511@126.com。

终末期肾脏病(end stage renal disease, ESRD)患者首位死亡原因是心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)^[1],而血管钙化的存在及其严重程度是导致 ESRD 患者 CVD 发病率和死亡率升高的关键环节^[2]。血管钙化不是被动的过程,而是由细胞介导且高度可调的过程,其中血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)的凋亡是血管钙化发生的重要机制^[3]。SET8 是现今发现的唯一能够特异性单甲基化组蛋白 H4 赖氨酸 20 位的赖氨酸甲基转移酶,且参与调控细胞增殖、凋亡及细胞浸润转移等^[4]。目前 SET8 对大鼠 VSMC 钙化的具体作用尚不明确。为此,本研究以大鼠 VSMC 为模型,观察通过干扰 SET8 促进大鼠 VSMC 凋亡对 VSMC 钙化的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选取 4 周龄健康雄性 SD 大鼠 10 只,体重 80~100 g,通过组织贴壁法用于体外培养原代大鼠胸主动脉平滑肌细胞。SD 大鼠均由河北医科大学动物实验中心提供(动物合格证标号:1305090)。

1.2 实验试剂及仪器

胎牛血清(fetal bovineserum, FBS)和 DMEM 培养基购自美国 GIBCO 公司,SET8 一短发夹 RNA(shRNA)质粒由广州复能基因有限公司合成,LipofectamineTM2000 购自美国 Invitrogen 公司,MTT 购自美国 Sigma 公司。实时荧光定量 PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司,PCR 引物均由上海捷瑞生物工程有限公司合成,SET8 抗体、Survivin 抗体和 Caspase-3 抗体购自英国 Abcam 公司,GAPDH 抗体购自美国 Bioworld 公司,山羊抗兔 IgG 抗体购自美国 KPL 公司,增强型 ECL 试剂盒购自美国 Thermo 公司。细胞培养箱购自美国 Sheldon 公司,倒置相差显微镜(LH50A 型)购自日本 OLYMPUS 公司,酸度计购自北京赛多利斯科学仪器有限公司,酶标仪(CYTATION3 型)购自美国 Biotek 公司,凝胶成像系统(Fluor Chem 型)购自美国 Proteinsimple 公司,实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Life 公司,蛋白电泳仪(PowerPacTM Basic 型)购自美国 BIO-RAD 公司。

1.3 实验模型的制备与分组

采用组织块贴壁法培养原代大鼠胸主动脉平滑肌细胞,原代 VSMC 传代培养至第 3 代时用于细胞实验。将细胞接种于 6 孔板中,在含有 10%胎牛

血清的 DMEM 培养基中生长至 80%汇合状态后,给予转染干预^[5]。①正常对照组:加入 10%胎牛血清的 DMEM 培养基。②空质粒组:NS-shRNA 浓度为 2 $\mu\text{g/L}$ 、Lipo2000 为 4 μL /孔条件下转染 VSMC。③ SET8-shRNA 组:SET8-shRNA 浓度为 2 $\mu\text{g/L}$ 、Lipo2000 为 4 μL /孔条件下转染 VSMC。

1.4 钙化情况测定

(1)茜素红染色:取 3 代细胞以 5×10^4 /孔密度接种于 12 孔板内,融合率达 80%,进行转染干预,14 天后,用质量浓度为 0.1%、pH8.4 的茜素红染液进行钙化染色,置于 37℃温箱孵育 30 min,于倒置显微镜下观察照相。结果判断标准:钙盐沉积为橘红色。(2)钙含量测定:细胞转染干预 14 天后弃上清液,用 0.6 mmol/L 的盐酸 37℃脱钙 24 h,弃去上清,用钙定量检测试剂盒测定钙含量,脱钙后的细胞用 0.1 mol/L NaOH 与质量浓度为 0.1%的 SDS 溶解 30 min,BCA 法测定细胞内蛋白质含量,结果用细胞钙含量比蛋白质含量表示($\mu\text{g/mg}$)。实验均重复 3 次。

1.5 MTT 法检测 VSMC 增殖情况

取 3 代 VSMC 以 $(3 \sim 10) \times 10^3/\text{L}$ 接种于 96 孔板,生长至 60%~70%融合时转染 2 $\mu\text{g/L}$ 的 SET8-shRNA。每组设 3 个复孔。实验结束前 4 h 加入 5 g/L MTT 20 μL ,培养 4 h 后,弃培养液,各孔加入二甲亚砜 150 μL ,室温振荡 10 min。于酶标仪 490 nm 波长处测定吸光度(A)值,记录结果。实验重复 3 次。

1.6 实时荧光定量 PCR 和 Western blot 法分别检测 VSMC 内 SET8、Survivin、Caspase-3 的 mRNA 和蛋白表达

分别提取转染 48 h 后正常对照组、空质粒组、SET8-shRNA 组的 mRNA 和蛋白质,测定 SET8、Survivin、Caspase-3 的表达。实验均重复 3 次。(1)实时荧光定量 PCR:以各组 cDNA 为模板,分别加入大鼠 SET8、Survivin、Caspase-3 上游、下游引物,GAPDH 作为内参照。PCR 引物由 Primer 5.0 软件设计,引物序列为 SET8 上游 5'-AAAGACGCCAG-GAAAGGTCC-3',下游 5'-TTCCACCACAAAGTCAC-CCC-3',产物长度 384 bp;Survivin 上游 5'-AGGAC-CACCGCATCTCTACAT-3',下游 5'-AAGTCTGGCTCGT-TCTCAGTG-3',产物长度 118 bp;Caspase-3 上游 5'-TCTGAGCCATGCTGAAGAAGG-3',下游 5'-TGGAT-GAACCAGGAGCCATC-3',产物长度 297 bp;GAPDH 上游 5'-CAAGGTCATCCATGACAACCTTG-3',下游

5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3', 产物长度 496 bp。采用 SYBR® Green 方法进行检测。20 μL 体系的反应条件: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 10 min, 60℃ 退火/延伸 30 s, 循环 40 次, 溶解曲线设置为 95℃ 15 s, 60℃ 延伸 1 min, 95℃ 15 s, 将信号采集设置在退火延伸阶段, 采集图像进行分析。

(2) Western blot: 细胞蛋白质采用 10% SDS-PAGE 分离, 转膜、牛奶封闭, 加入一抗 (GAPDH 1 : 10000, Survivin 1 : 1000, Caspase-3 1 : 2000, SET8 1 : 500) 稀释液, 4℃ 孵育过夜。洗膜, 放入二抗稀释液 (1 : 10000), 室温下孵育 1 h, ECL 显色并采集图像进行分析。

1.7 统计学分析

采用 SPSS19.0 软件进行统计学处理。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间的比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 Student-Newman-Keuls (SNK) 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 干扰 SET8 对 VSMC 中 SET8 表达的影响

SET8-shRNA 转染 VSMC 48 h 后, 荧光显微镜下观察转染效率为 50%。实时荧光定量 PCR 和 Western blot 结果显示, SET8-shRNA 组 VSMC 中 SET8 蛋白和 mRNA 的表达水平明显低于正常对照组和空质粒组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 空质粒组与正常对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 表明 RNA 干扰 (RNAi) 有效抑制了 SET8 表达 (图 1)。

2.2 干扰 SET8 对 VSMC 钙化的影响

细胞转染后, 继续培养 14 天后, 茜素红染色和钙含量测定结果均显示, 与正常对照组和空质粒组

比较, SET8-shRNA 组钙盐沉积显著增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$; 图 2)。

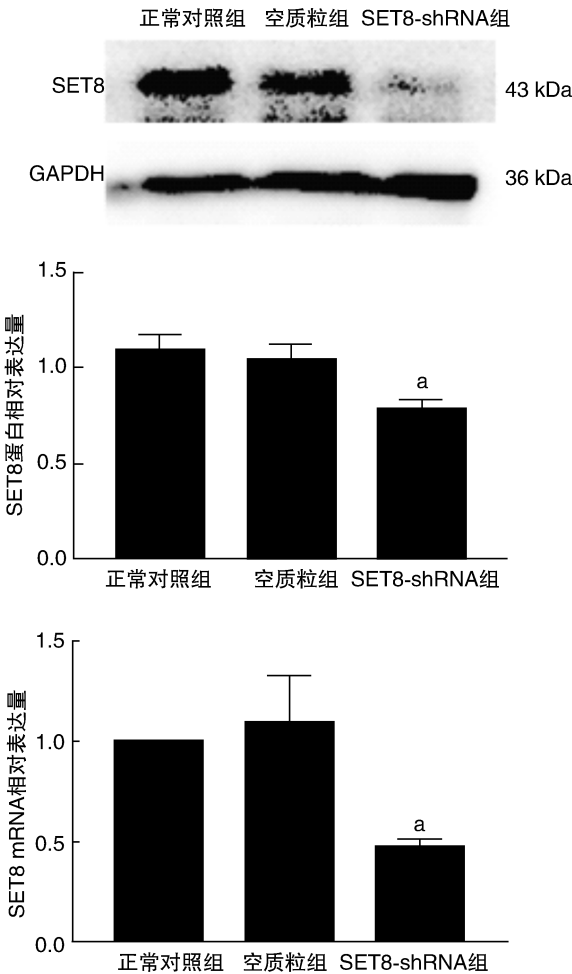


图 1. 干扰 SET8 对 VSMC 中 SET8 表达的影响 ($n = 3$)
a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组和空质粒组比较。
Figure 1. The influence of interfering SET8 on SET8 expression in the VSMC ($n = 3$)

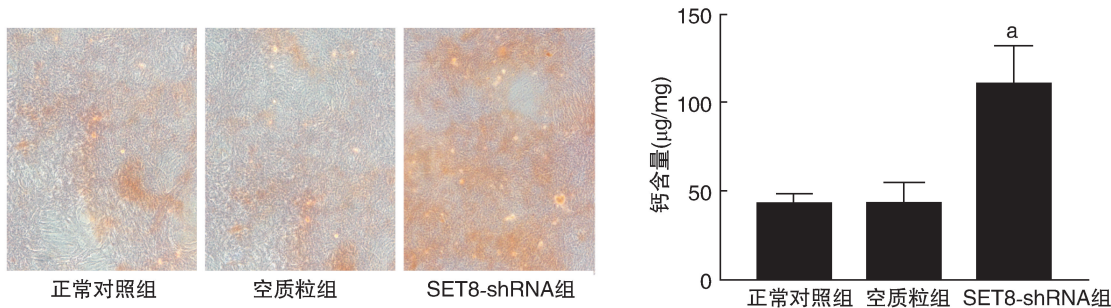


图 2. 干扰 SET8 对 VSMC 钙化的影响 ($n = 3$) 左为茜素红染色 (100×), 右为钙含量测定。a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组和空质粒组比较。
Figure 2. The influence of interfering SET8 on VSMC calcification ($n = 3$)

2.3 干扰 SET8 对 VSMC 增殖能力的影响

MTT 检测结果表明, VSMC 转染质粒后 0 h、12 h、24 h、36 h、48 h, 正常对照组 OD 值分别为: 0.43 ± 0.01 、 0.72 ± 0.01 、 0.96 ± 0.03 、 1.30 ± 0.09 、 1.48 ± 0.12 ; 空质粒组 OD 值分别为: 0.47 ± 0.03 、 0.68 ± 0.01 、 0.90 ± 0.08 、 1.09 ± 0.06 、 1.32 ± 0.05 ; SET8-shRNA 组 OD 值分别为: 0.43 ± 0.13 、 0.43 ± 0.09 、 0.57 ± 0.16 、 0.73 ± 0.16 、 0.90 ± 0.21 ; 与正常对照组和空质粒组比较, SET8-shRNA 组细胞增殖显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明转染 SET8-shRNA 质粒后, VSMC 增殖能力明显降低 (图 3)。

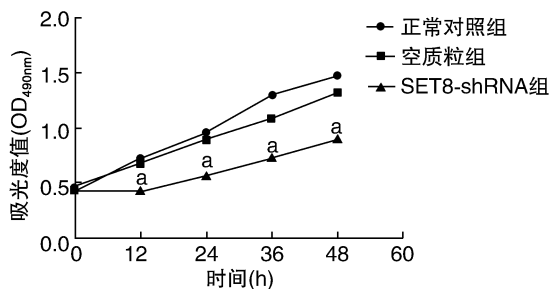


图 3. MTT 法检测各组 VSMC 增殖能力 ($n=3$) a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组和空质粒组比较。

Figure 3. MTT method was used to detect the proliferation of VSMC in each group ($n=3$)

2.4 干扰 SET8 对 VSMC 中 Survivin、Caspase-3 的 mRNA 和蛋白表达的影响

实时荧光定量 PCR 和 Western blot 结果表明, 与正常对照组和空质粒组相比, SET8-shRNA 组 Survivin 的 mRNA 和蛋白相对表达量明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); Caspase-3 的 mRNA 和蛋白相对表达量明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$; 图 4)。

3 讨论

心血管疾病是 ESRD 患者的首位死亡原因, 而血管钙化是导致 ESRD 患者 CVD 发病和死亡风险增加的关键环节^[6]。影响血管钙化的危险因素有高钙血症、钙磷代谢失调、高血糖、高血脂、高血压等^[7-8]。随着研究的进展, 目前认为血管钙化不是一个被动的过程, 而是由细胞介导的高度可调的过程, 其可能机制有平滑肌细胞表型转化、凋亡、自噬等, 其中 VSMC 凋亡是血管钙化发生的重要机制之一^[9-11]。SET8 是现今发现唯一能够特异性单甲基化组蛋白 H4 赖氨酸 20 位 (H4K20), 其主要参与细

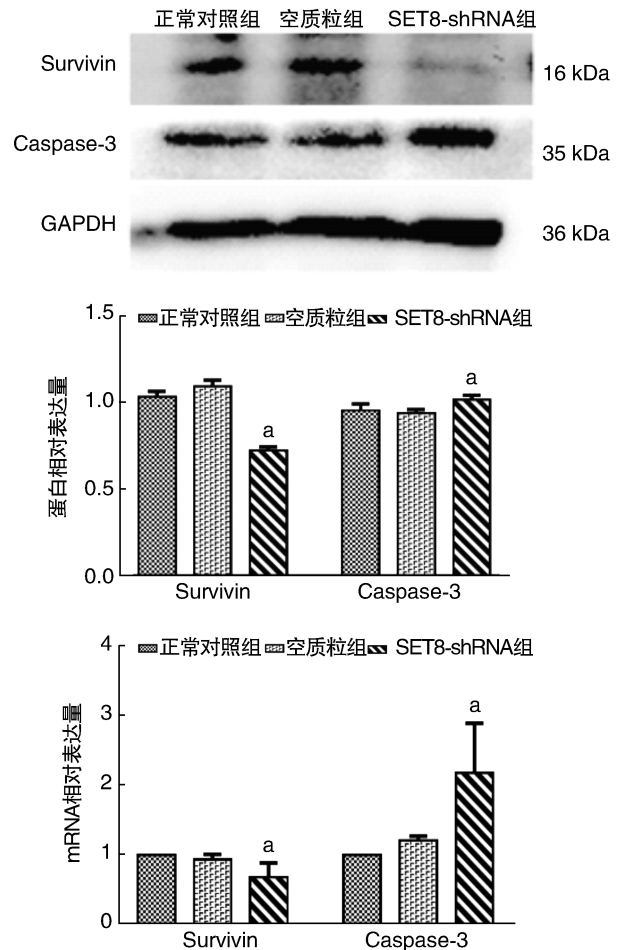


图 4. 干扰 SET8 对 VSMC 中 Survivin、Caspase-3 的 mRNA 和蛋白表达的影响 ($n=3$) a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组和空质粒组比较。

Figure 4. The influence of interfering SET8 on survivin, caspase-3 mRNA and protein expression in the VSMC ($n=3$)

胞增殖、细胞分化等多种细胞生理功能。有研究显示敲低 SET8 可导致肿瘤细胞凋亡^[12-13]。在本研究中通过 RNAi 技术干扰 SET8 表达后, 发现干扰 SET8 表达能够促进 VSMC 发生钙化。

SET8 能特异性单甲基化 P53 的 382 赖氨酸位点, 从而抑制其靶基因转录, 进而抑制细胞凋亡及细胞周期阻滞^[14]。Survivin 是迄今发现抗凋亡能力最强的凋亡抑制因子, 基因卫士 P53 可以通过与 Survivin 基因启动子结合, 进而抑制其与 E2F 转录因子的结合, 使细胞在 G2/M 期凋亡^[15-16]。SET8 通过甲基化 P53 蛋白第 382 位赖氨酸, 使其与 Survivin 基因启动子分离, 导致 Survivin 转录增加。Survivin 能够以同源二聚体形式与 Caspase-3 稳定结合, 以切断 Caspase 级联反应, 进而抑制细胞凋亡^[17-18]。本研究 MTT 结果表明, 与空白对照组、空质粒组比较, SET8-shRNA 组细胞增殖能力在转染后 12 h、24 h、

36 h、48 h 明显降低。实时荧光定量 PCR 与 Western blot 结果表明,与空白对照组和空质粒组相比,SET8-shRNA 组抗凋亡因子 Survivin 的蛋白及 mRNA 表达明显下调,而促凋亡因子 Caspase-3 的蛋白及 mRNA 表达则明显升高。提示 SET8 可能通过调节与增殖相关的 Survivin 和凋亡相关的 Caspase-3 的表达来调控着 VSMC 的凋亡,进而参与 VSMC 钙化的发生、发展。而干扰 SET8 后,VSMC 增殖能力降低,凋亡增多,促进了血管钙化的发生。

综上所述,本研究发现 RNA 干扰(RNAi)有效抑制 SET8 表达能够促进大鼠胸主动脉 VSMC 钙化,其可能机制是通过促进 VSMC 的凋亡而增加血管钙化。本研究仅在细胞实验中观察到了 SET8 在血管钙化中的作用,SET8 具体是通过何种机制来影响 VSMC 的增殖和凋亡,进而影响 VSMC 钙化仍需进一步实验验证,为治疗血管钙化提供新靶点。

[参考文献]

- [1] Moe OW, Kuro OM. Fibroblast growth factor 23 and uremic vascular calcification: is it time to escalate from biomarker status to pathogenic agent[J]. *Kidney Int*, 2014, 85(5): 1 022-023.
- [2] Lanzer P, Boehm M, Sorribas V, et al. Medial vascular calcification revisited: review and perspectives [J]. *Eur Heart J*, 2014, 35(23): 1 515-525.
- [3] 王伟明,刘勇,何廷政. 糖尿病血管钙化中 Wnt/ β -catenin 信号通路被调控机制的研究新进展[J]. *西南军医*, 2015, 17(2): 183-185.
- [4] 徐金升,王静,张俊霞,等. 赖氨酸甲基转移酶 SET8 基因沉默通过 Wnt 信号通路抑制肾透明细胞癌 786-O 细胞增殖转移[J]. *中华实验外科杂志*, 2016, 33(6): 1 684-685.
- [5] 徐金升,王静,张俊霞,等. SET8 在肾透明细胞癌中的表达及其对 786-O 细胞增殖迁移能力的影响[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2016, 37(11): 860-865.
- [6] Bai YL, Zhang JX, Xu JS, et al. Alteration of type I collagen in the radial artery of patients with end-stage renal disease[J]. *Am J Med Sci*, 2015, 349(4): 292-297.
- [7] 陶静,贺倩,孙伟. 维持性血液透析患者血管钙化的研究进展[J]. *中华肾脏病杂志*, 2015, 31(7): 548-552.
- [8] 魏晓,欧三桃. 骨形态发生蛋白 4 与血管钙化的相关性[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(5): 529-534.
- [9] 蒲江,欧三桃. 血管平滑肌细胞自噬与血管钙化关系的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(3): 321-324.
- [10] 欧林灵,刘江华,祖旭宇,等. 与血管钙化相关的因素[J]. *岭南心血管病杂志*, 2016, 22(5): 616-618.
- [11] 郭润民,刘畅,吴斌,等. 内质网应激介导了高糖引起的血管平滑肌细胞钙化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(7): 668-672.
- [12] Zheng N, Dai X, Wang Z, et al. A new layer of degradation mechanism for PR-Set7/Set8 during cell cycle[J]. *Cell Cycle*, 2016, 15(22): 3 042-047.
- [13] 徐金升,高少辉,白亚玲,等. 干扰组蛋白赖氨酸甲基转移酶 SET8 对肾透明细胞癌 786-O 细胞增殖的影响[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2017, 24(8): 524-528.
- [14] Weirich S, Kusevic D, Kudithipudi S, et al. Investigation of the methylation of Numb by the SET8 protein lysine methyltransferase[J]. *Sci Rep*, 2015, 22(5): 13 813.
- [15] Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, et al. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(5): 3 247-257.
- [16] Yang XP, Liu SL, Xu JF, et al. Pancreatic stellate cells increase pancreatic cancer cells invasion through the hepatocyte growth factor /c-Met/survivin regulated by P53/P21[J]. *Exp Cell Res*, 2017, 357(1): 79-87.
- [17] Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins [J]. *Cell*, 2000, 102(1): 43-53.
- [18] Ma X, Lin Y, Yang K, et al. Effect of lentivirus-mediated survivin transfection on the morphology and apoptosis of nucleus pulposus cells derived from degenerative human disc in vitro[J]. *Int J Mol Med*, 2015, 36(1): 186-194.

(此文编辑 许雪梅)