

## 心肌素在周期性张应变调控血管平滑肌细胞表型转化中的作用

潘敏焯<sup>1</sup>, 郑熙隆<sup>2</sup>, 廖端芳<sup>1</sup>

(1. 湖南中医药大学药学院, 湖南省长沙市 410208; 2. 湖南中医药大学中西医结合学院, 湖南省长沙市 410208)

[关键词] 周期性张应变; 血管平滑肌细胞; 心肌素; 肌肉萎缩相关基因 1; 泛素蛋白酶体降解

[摘要] 目的 探讨周期性张应变条件下诱导血管平滑肌细胞(VSMC)表型转换时, 心肌素在其中可能的作用。方法 应用 FX-5000T 体外周期性张应变加载系统, 分别对体外培养的 VSMC 施加频率为 1.25 Hz、加载幅度为 5% (正常张应变状态)、15% (高张应变状态) 的周期性张应变力学刺激, 加载时间为 24 h。采用蛋白免疫印迹法和实时荧光定量 PCR 技术检测心肌素、肌肉萎缩相关基因 1 (atrogin-1) 及相关收缩蛋白 SMA、SM22 的蛋白表达水平和 mRNA 水平; 敲除 atrogin-1 后测心肌素及相关收缩蛋白 SMA、SM22 的变化; 用蛋白酶体抑制剂 MG132 处理后测心肌素和 atrogin-1 的表达水平。结果 与 5% 正常张应变组比较, 15% 高张应变促进平滑肌细胞的去分化。15% 高张应变下调心肌素和 SMA、SM22 蛋白水平; 上调 atrogin-1 蛋白表达水平; 下调心肌素和 SMA、SM22 的 mRNA 水平, 上调 atrogin-1 mRNA 水平。应用 siRNA 特异性下调 atrogin-1 后, 心肌素、SMA、SM22 蛋白水平均上升。用 1 μmol/L MG132 处理细胞后, 心肌素、SMA、SM22 的蛋白水平上升, atrogin-1 蛋白水平下降。结论 周期性高张应变可以通过调节血管平滑肌细胞中 atrogin-1/心肌素轴来调控血管平滑肌表型转换, 进而影响 VSMC 的分化增殖。

[中图分类号] R54

[文献标识码] A

### Role of myocardin in the regulation of phenotypic transformation of vascular smooth muscle cell by cyclic stretch

PAN Minhe<sup>1</sup>, ZHENG Xilong<sup>2</sup>, LIAO Duanfang<sup>1</sup>

(1. School of Pharmacy, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. College of Chinese and Western Combination, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[KEY WORDS] high cyclic stretch; vascular smooth muscle cell; myocardin; atrogin-1; ubiquitin-proteasome degradation

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the possible role of myocardin in the vascular remodeling of vascular smooth muscle cell (VSMC) induced by high cyclic tensile stress. **Methods** Using FX-5000T in vitro cyclic stretch loading system, the VSMC in vitro were stimulated by cyclic stretch with frequency of 1.25 Hz, loading amplitude of 5% (normal physiological state) and 15% (simulated hypertension state) for 24 hours; Western blot and real time RT-PCR were used to detect the protein expression level and mRNA level of myocardin, atrogin-1, SMA and SM22. The expression level of myocardin and atrogin-1 were measured after the treatment with proteasome inhibitor MG132. The alteration of myocardin, SMA and SM22 was measured after the knockdown of atrogin-1. **Results** Compared with 5% normal group, 15% cyclic stretch promoted the dedifferentiation of SMCs. Western blot showed that 15% of cyclic stretch decreased the protein levels of myocardin, SMA and SM22, and increased the protein expression level of atrogin-1. RT-PCR showed that the mRNA levels of myocardin, SMA and SM22 were down regulated, and the mRNA level of atrogin-1 was up regulated. The results showed that the protein levels of myocardin, SMA and SM22 increased after siRNA down-regulation of atrogin-1. The protein levels of myocardin, SMA and SM22 increased and the protein level of atrogin-1 de-

[收稿日期] 2020-04-27

[修回日期] 2020-06-04

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81773736)

[作者简介] 潘敏焯, 硕士研究生, 研究方向为心血管药理, E-mail 为 1025080043@qq.com。通信作者郑熙隆, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管药理, E-mail 为 xilingzheng@qq.com。通信作者廖端芳, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管药理, E-mail 为 dfliao@hnu.cm.edu.cn。

creased after treated with 1  $\mu\text{mol/L}$  MG132. **Conclusion** High cyclic stretch can regulate phenotypic transformation of VSMC by regulating the expression of myocardin, an important transcription co-factor, thus affecting the differentiation and proliferation of VSMC.

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 根据结构和功能的不同, 可分为分化程度较高的收缩表型和分化程度较低的合成表型两种表型。在高血压、动脉粥样硬化及冠状动脉旁路移植术后再狭窄等心血管疾病所导致的血管病变中, VSMC 由收缩表型向合成表型转化, 获得更高的增殖和迁移能力, 导致血管壁变厚变硬变狭窄。VSMC 收缩表型标志分子, 如  $\alpha$  平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin, SMA)、肌动蛋白相关蛋白 (SM22)、调宁蛋白 (calponin)、肌球蛋白重链蛋白 (myosin heavy chain, MHC) 等均与平滑肌的收缩功能密切相关<sup>[1-2]</sup>。SMA 和 SM22 一般在平滑肌收缩表型细胞中高表达, 常用作 VSMC 表型的检测。VSMC 表型转化是这些心血管疾病发病的基础, 因此研究 VSMC 表型转化的分子机制是防治这些疾病的关键切入点。已有研究证明, 心肌素可调控 VSMC 的表型转化, 抑制 VSMC 的增殖和迁移。

心肌素, 已被证实是一种强效的转录共激活因子, 是心肌细胞和平滑肌细胞发育和分化增殖所必需的转录辅助因子<sup>[3]</sup>, 其功能主要是通过与 SRF 结合, 形成 MYOCD-SRF 复合物, 激活 CArG box 依赖性的肌细胞特异性基因的启动子, 能够特异性的调节心肌和平滑肌细胞分化标志基因的表达<sup>[4]</sup>, 调控着血管平滑肌的分化和增殖。其转录活性由很多因素调节, 包括磷酸化、泛素化等。肌肉萎缩相关基因 1 (atrogin-1) 是构成泛素蛋白连接酶 E3 复合体 4 个亚单位中的一员<sup>[5]</sup>。最近研究发现, atrogen-1 能诱导平滑肌细胞中心肌素的泛素化降解<sup>[6]</sup>, 并且其泛素化降解可以促进心肌素的转录活性, 从而影响 VSMC 收缩标志蛋白的表达来调控 VSMC 的表型转化。

有研究表明, 周期性高张应变可以促进 VSMC 由收缩表型向合成表型转化。正常生理条件下, VSMC 主要承载血流脉动产生的血管周期性张应变<sup>[7]</sup>, 能够帮助维持血管的稳态和正常生理功能。当心血管疾病发生时, 血管的环境发生改变, 血管受到的生物力也会发生改变, 经过长期稳定的力学刺激, 血管会释放各种血管活性物质来调整, 使血管壁形态和成分发生适应性的改变, 而这种改变与 VSMC 异常增殖和迁移等密切相关。研究表明, 高血压病理状态下, VSMC 承载的周期性张应变持续

增高, 可高达 15% 以上<sup>[8]</sup>, 能够显著抑制 VSMC 收缩标志基因的表达。

根据以上文献的依据, 本团队提出以下的科研假设: 周期性高张应变可能通过调节心肌素的表达来影响 VSMC 的表型转化。然而力学条件下心肌素在 VSMC 表型转化中调控作用尚不明确, 因此探讨张力对心肌素的调控作用对于高血压等心血管疾病的预防及治疗意义重大。

为了检验本团队提出的科研假设, 通过培养原代大鼠胸主动脉平滑肌细胞, 利用体外细胞周期性张应变加载系统对 VSMC 进行力学加载, 模拟 VSMC 在正常生理条件和高血压病理条件下所受到的周期性张应变力学刺激, 检测 VSMC 中心肌素及平滑肌收缩蛋白的表达情况。在细胞水平上探讨病理性高张应变对 VSMC 中心肌素表达的影响, 为张应变调控 VSMC 表型转化的分子机制提供一些新的思路和实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物、试剂和仪器

SD 大鼠, 购于上海杰斯捷实验动物有限公司; 人主动脉血管平滑肌细胞 (human vascular smooth muscle cell, HVSMC) 购于 ATCC; DMEM 培养液购于 Gibco 公司; 胎牛血清、多西环素 (Doxycycline, DOX)、MG132 和 Anti-myocardin 抗体购于 Sigma 公司; Anti-atrogen-1 抗体购于 Abcam 公司; Anti-SMA 和 Anti-SM22 抗体购于 Proteintech 公司; Anti-GAPDH 抗体购于 Cell Signal Technology 公司; 辣根过氧化物酶标记二抗购于 Jackson Immuno Research 公司; 青霉素和链霉素购于 BBI 公司; Trizol 试剂、Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 和 Opti-MEM 购于 Invitrogen 公司; SYBR<sup>®</sup> Premix ExTaq<sup>TM</sup> 试剂盒购于 TaKaRa 公司; PCR 引物由生工生物设计; siRNA 由吉玛公司设计合成; FX-5000T Strain Unit 细胞张应变加载系统和 Flexercell 细胞培养板购于 Flexcell International 公司。

### 1.2 VSMC 的培养及鉴定

采用组织块贴壁法培养原代大鼠胸主动脉 VSMC。取 (200 $\pm$ 20) g SD 大鼠经 1% 戊巴比妥钠麻醉, 固定四肢, 取胸主动脉血管, 小心剥离外膜, 纵向剪开血管, 轻轻刮去表层的内皮细胞, 将血管在

无菌条件下剪成 1 mm<sup>3</sup> 左右小块,加入少量 VSMC 培养液(含胎牛血清、青霉素、链霉素),将组织块均匀平铺在皿底,置于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 恒温箱中培养。约 1 周后观察到细胞自组织块边缘爬出,细胞基本长满培养皿底部至 80% 时,即可进行细胞传代培养和鉴定。用抗 SMA 抗体(1:200)对第一代 VSMC 进行免疫荧光鉴定,阳性率大于 95%。

### 1.3 周期性张应变加载

选用第 4~7 代 VSMC,胰酶消化后按照 2×10<sup>5</sup> 个/孔细胞种植在用明胶预先包被的无菌 Flexercell 六孔细胞培养板中,每孔含有 2 mL VSMC 培养基。次日待细胞铺满约 70% 时,用不含血清的 DMEM 培养液同步化 24 h 后,应用 FX-5000T Strain Unit 细胞张应变加载系统对 VSMC 施加 5% 和 15% 幅度的张应变,频率为 1.25 Hz,加载时间为 24 h。5% 牵拉幅度模拟 VSMC 在体生理条件所受到的正常周期性张应变刺激(5% 正常张应变组),15% 牵拉幅度模拟 VSMC 在体动脉受到的异常周期性高张应变刺激(15% 高张应变组)<sup>[8]</sup>,同样种于 Flexercell 六孔板但不进行张应变加载的 VSMC 作为静态对照。

### 1.4 蛋白免疫印迹实验

用蛋白裂解液提取各组细胞样品蛋白,用 BCA 法进行蛋白定量。配置 10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白然后转移至 PVDF 膜上。用 5% 脱脂奶粉 TBST 溶液封闭 1 h,抗心肌素(1:500),抗 atrogen-1(1:500),抗 SMA、SM22(1:1 000),GAPDH(1:1 000),4 °C 孵育过夜;辣根过氧化物酶标记二抗(1:5 000)室温孵育 2 h;ECL 显色。扫描后使用 Quantity One 进行图像灰度分析。

### 1.5 实时荧光定量 PCR 实验

幅度为 5%、15%,频率为 1.25 Hz,时长为 24 h 的体外张应变加载后,用 Trizol 法从细胞中提取各组总 RNA,测定 RNA 浓度后再取 1 μg 总 RNA 按照反转录试剂盒说明书合成 cDNA 来作为荧光定量 PCR 的模板。采用 SYBR® PremixExTaq™ II 试剂盒进行 PCR 扩增。扩增体系为 20 μL,反应条件为:95 °C 2 min 预变性,然后 95 °C 15 s,60 °C 30 s,72 °C 30 s,重复循环 40 个循环,最后进行溶解曲线分析。以 GAPDH 为内参蛋白,采用相对定量 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法分析所得数据,并比较在高张应变条件下心肌素、atrogen-1、SMA、SM22 mRNA 的表达情况。目的基因及内参基因的引物序列见表 1。

### 1.6 细胞转染

根据 NCBI 上 GeneBank 查到大鼠 atrogen-1 的

mRNA 序列,再由上海吉玛公司设计合成 siRNA, atrogen-1 特异性小分子干扰 RNA (small interference RNA, siRNA) 干扰片段序列如表 2 所示。

表 1. 目的基因引物序列

Table 1. Primer sequence of the target gene

名称	引物序列(5'-3')
Rat-心肌素	FW:GCC AGA CAC CTT CAC CGA TGC RV:TCA GCA GAC GCT CAT CCG TAC AGG
Rat-atrogen-1	FW:CCA CTC TAC ACT GGC AAC AGC AG RV:AGG CAG GTC GGT GAT CGT GAG
Rat-SMA	FW:GCG TGG CTA TTC CTT CGT GAC TAC RV:CCA TCA GGC AGT TCG TAG CTC TTC
Rat-SM22	FW:CTG GAG GAG CGG CTA GTG GAG RV:GGC ACC TTC ACT GGC TTG GAT C
Rat-GAPDH	FW:GGA AGG GTG GGG CCA AAA RV:GCT GAC AAT CTT GAG GGA GT

表 2. Atrogen-1 干扰片段序列

Table 2. Interference fragment sequences of atrogen-1

名称	序列(5'-3')
Rat-atrogen-1 #1	FW:GGA GAA GUG GAU CUA UGU UTT RV:AAC AUA GAU CCA CUU CUC CTT
Rat-atrogen-1 #2	FW:GCA AAG UCA CAG CUC ACA UTT RV:AUG UGA GCU GUG ACU UUG CTT
Rat-atrogen-1 #3	FW:CCC AAG AAG AGA ACA GUA UTT RV:AUA CUG UUC UCU UCU UGG GTT
阴性对照	FW:UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT RV:ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT

将 VSMC 胰酶消化后种于六孔板中,次日待细胞融合度达到 40%~50% 后,依照 Lipo-fectamine™2000 说明书进行 RNA 干扰。将 100 nmol 特异性小分子干扰 RNA (small interference RNA, siRNA) 和 5 μL Lipo-lectamine™2000 分别溶于 250 μL opti-MEM 中并轻轻混匀,再将其混匀后室温放置 15 min。将六孔板里的细胞用 500 μL DMEM 冲洗两次后,每孔轻轻加入 500 μL 上述混合液和 500 μL DMEM,置于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中,6~8 h 后每孔补加 1 mL 完全培养液(不含抗生素),继续培养至 48 h 后收样。选择与目的基因序列无同源性的通用阴性对照对 3 种干扰片段进行筛选,选择最佳干扰效率片段进行后续干扰试验。

### 1.7 加药处理实验

将 VSMC 按 2×10<sup>5</sup> 个/孔种于六孔板,每孔加 2 mL 完全培养液,置于细胞培养箱中过夜。次日倒

置相差显微镜下观察细胞状态,细胞状态良好则换成不含血清(含双抗)的培养液进行同步化 24 h。然后加入预先配好的 MG132 溶液,对照组加入等体积的无菌 PBS 缓冲液,24 h 后收取蛋白样品。首先根据参考文献<sup>[9]</sup>方法进行浓度梯度摸索,确定 MG132 的最佳浓度,再进行后续实验。

### 1.8 四环素过表达系统过表达心肌素

从液氮罐中取出冻存的已转染心肌素基因的 HVSMC,放入 37℃ 水浴箱中加热,一边加热一边轻轻摇晃,待其快要溶解完全时,取出置于超净台中,将细胞悬液转移至预先装好完全培养液的培养皿中。放入细胞培养箱中培养,8 h 后换液,减少 DMSO 对细胞的毒害。培养 3~5 天,以待细胞恢复活力后代进行后续实验。加入 1 mg/L 多西环素(Doxycycline, DOX)来诱导心肌素的过表达。再对 VSMC 施加频率为 1.25 Hz,幅度分别为 5%、15% 的周期性张应变,检测心肌素、atrogen-1、SMA、SM22 的蛋白表达量。

### 1.9 统计学处理

所涉实验均独立重复不少于 3 次,实验结果采用 Prism 7.0 统计软件进行数据分析,数据用( $\bar{x} \pm s$ )表示。两组间数据分析比较采用 Student's *T*-检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 VSMC 鉴定及高张应变对 VSMC 形态的影响

由组织块贴壁法培养得到 VSMC,将 P1 代种于 confocal 小皿中,对其细胞表面的 SMA 基因进行免疫荧光鉴定,阳性率达到了 95% 以上(图 1),说明所培养的 VSMC 纯度高,达到实验要求,可进行后续实验。

如图 1 所示,5% 幅度下,细胞形态并无太大改变;15% 幅度下,细胞由长梭形的收缩表型向方形的合成表型转换(图 1)。提示高张应变能够影响 VSMC 的表型转换,促进 VSMC 的去分化。

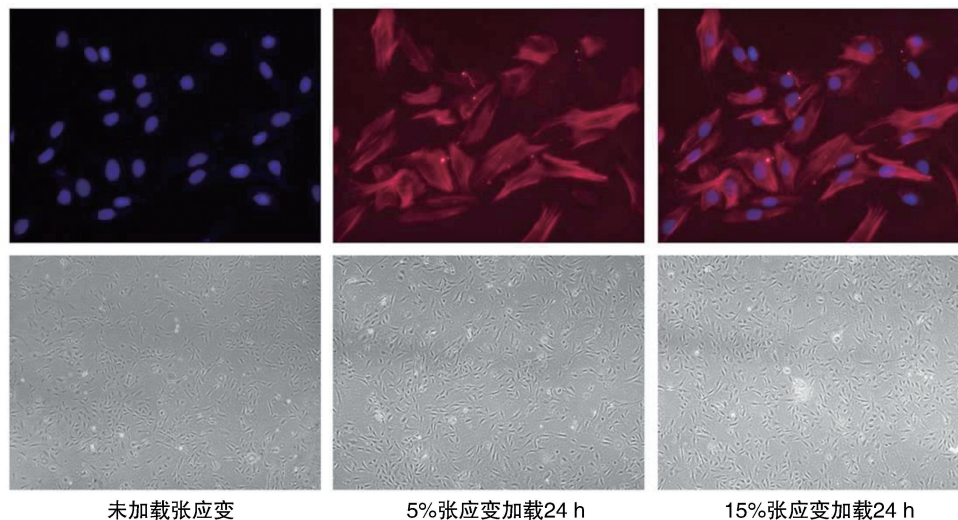


图 1. VSMC 的免疫荧光鉴定(上,20×)及周期性张应变对 VSMC 形态的影响(下,4×)

Figure 1. Immunofluorescence identification of VSMC (above, 20×) and the effect of cyclic stretch on the morphology of VSMC (below, 4×)

### 2.2 高张应变抑制了心肌素的表达,促进了 VSMC 的去分化

与 5% 正常张应变组比较,15% 高张应变条件下的心肌素、SMA 及 SM22 的表达均降低( $P < 0.05$ ; 图 2)。说明周期性高张应变抑制了心肌素的表达,促进了 VSMC 的去分化,向合成表型转化。

### 2.3 周期性高张应变对 atrogen-1 蛋白表达的影响

15% 高张应变条件下,atrogen-1 表达有显著性增加( $P < 0.05$ ; 图 3),说明高张应变影响了心肌素

泛素化进程。

### 2.4 周期性高张应变对心肌素、atrogen-1、SMA、SM22 mRNA 水平的影响

与 5% 正常张应变组比较,15% 高张应变条件下的心肌素、SMA 及 SM22 mRNA 均降低,atrogen-1 mRNA 增高( $P < 0.05$ ; 图 4)。验证了这些分子在蛋白水平的表达,心肌素和 atrogen-1 均能响应力学刺激,提示了高张应变能够通过影响 atrogen-1 介导的泛素化降解心肌素过程来促进 VSMC 的去分化。

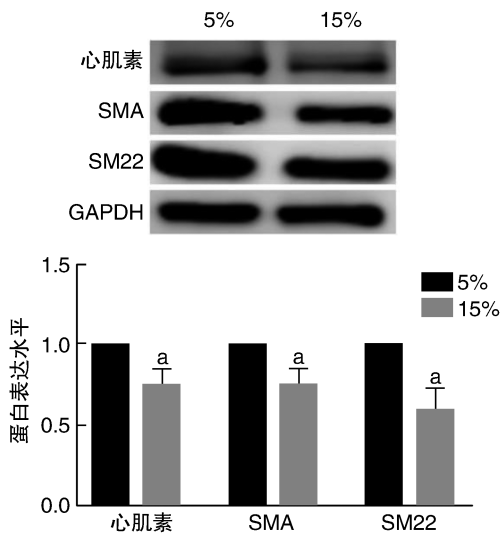


图 2. 周期性高张应变抑制了心肌素及 VSMC 收缩表型标志分子的表达 (n=7) a 为 P<0.05, 与 5% 正常张应变组比较。

Figure 2. High cyclic stretch inhibited the expression of myocardin and VSMC contractile phenotype markers (n=7)

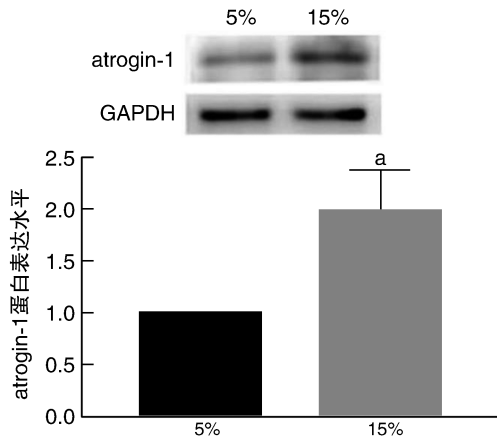


图 3. 周期性高张应变促进 atrogin-1 的蛋白表达 (n=7) a 为 P<0.05, 与 5% 正常张应变组比较。

Figure 3. Protein expression of atrogin-1 was promoted by high cyclic stretch (n=7)

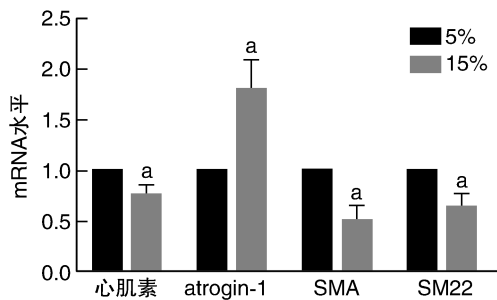


图 4. 高张应变条件下大鼠 VSMC 中心肌素、SMA、SM22 的 mRNA 表达水平变化 (n=4) a 为 P<0.05, 与 5% 正常张应变组比较。

Figure 4. mRNA expression levels of myocardin, SMA and SM22 in VSMC of rats under high cyclic stretch (n=4)

### 2.5 atrogin-1 诱导心肌素的降解

干扰片段 si-atrogin-1 #2 在干扰 48 h 时, 转染效率最高, 因此选择 si-atrogin-1 #2 进行后续干扰实验 (图 5)。使用 si-atrogin-1 #2 干扰 VSMC 48 h 后, 检测心肌素及相关收缩标志分子的蛋白表达量。结果如图 5 所示, 干扰 atrogin-1 后, 心肌素及相关收缩标志分子的蛋白表达量均增加 (P<0.05)。

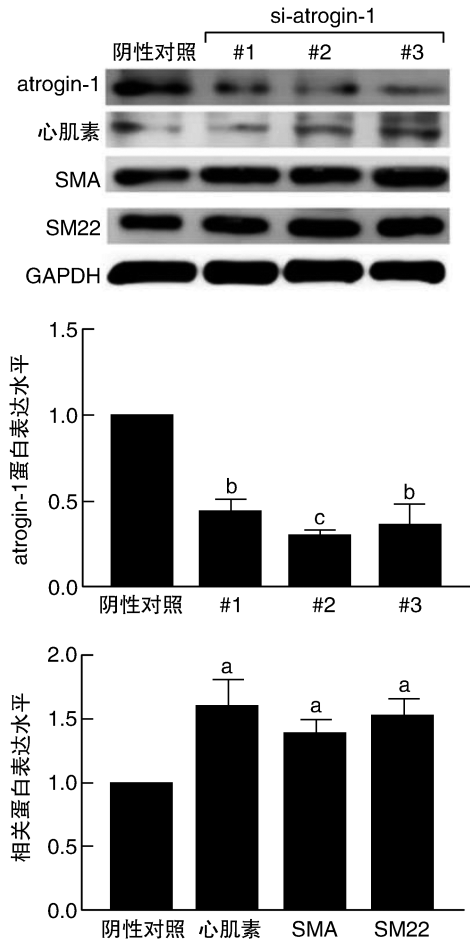


图 5. siRNA 干扰片段的筛选及干扰抑制 VSMC 的 atrogin-1 的表达后, 心肌素表达的变化 (n=3) a 为 P<0.05, b 为 P<0.01, c 为 P<0.0001, 与阴性对照比较。

Figure 5. Screening of siRNA interference fragments and changes of myocardin expression after atrogin-1 expression of VSMC was inhibited by interference (n=3)

MG132 浓度选用 0.01 ~ 1.00 μmol/L, 检测心肌素表达, 当浓度为 0.50 μmol/L 和 1.00 μmol/L 时, 差异有显著性 (P<0.05; 图 6), 但由于在 1.00 μmol/L 时能获得比 0.50 μmol/L 更高的表达量, 更便于观察, 故选用 1.00 μmol/L 为最佳浓度, 进行后续实验。用蛋白酶体抑制剂 MG132 处理后, 可抑制 atrogin-1 诱导的心肌素泛素化降解, 引起心肌素蛋

白的蓄积,表达量增多 ( $P < 0.05$ ; 图 6)。说明 atrogen-1 诱导心肌素的泛素化蛋白酶体降解过程的确存在于这些细胞中。

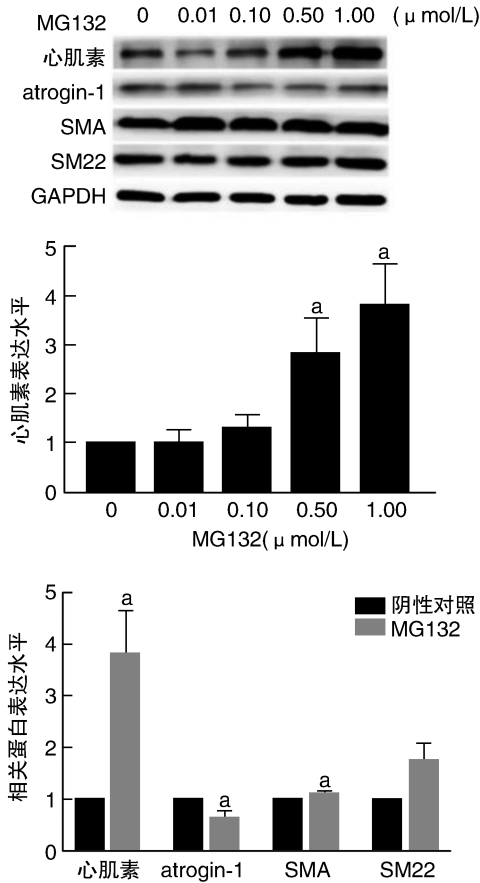


图 6. 蛋白酶体抑制剂 MG132 抑制了心肌素的降解 ( $n=4$ )  
a 为  $P < 0.05$ , 与阴性对照比较。  
Figure 6. Proteasome inhibitor MG132 inhibited myocardin degradation ( $n=4$ )

### 2.6 过表达心肌素后, 高张应变对心肌素的影响

HVSMC 加入 1 μg/mL DOX 诱导心肌素过表达后, VSMC 形态发生改变, 长梭形的收缩表型细胞变多, 细胞中分化标志因子表达量也有非常大的增加 (图 7)。说明过表达模型表达成功, 并且心肌素是平滑肌细胞非常关键的促分化因子。对过表达心肌素的 VSMC 进行张应变加载, 结果如图 8 显示, 心肌素有显著下降 ( $P < 0.05$ ), atrogen-1、SMA、SM22 无显著变化。说明心肌素的确参与了周期性张应变调控的表型转换, 而因为过表达心肌素能够促进 VSMC 收缩标志蛋白表达作用较强, 而周期性高张应变能够促进 VSMC 去分化, 抑制 VSMC 收缩标志蛋白表达的作用较弱, 所以 SMA、SM22 的表达差异并没有统计学意义。

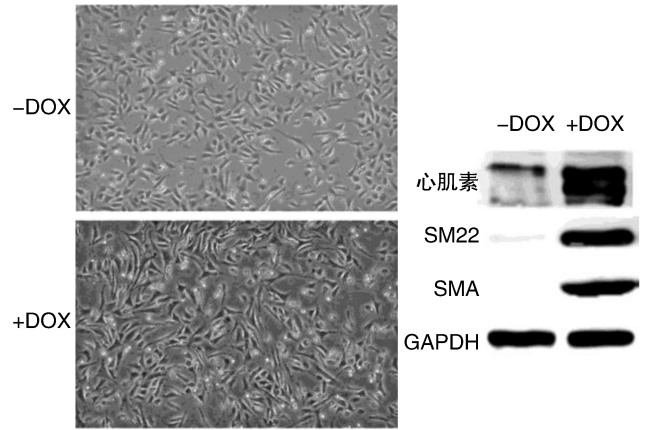


图 7. 心肌素过表达模型的构建 (10×)  
Figure 7. Construction of myocardin overexpression model (10×)

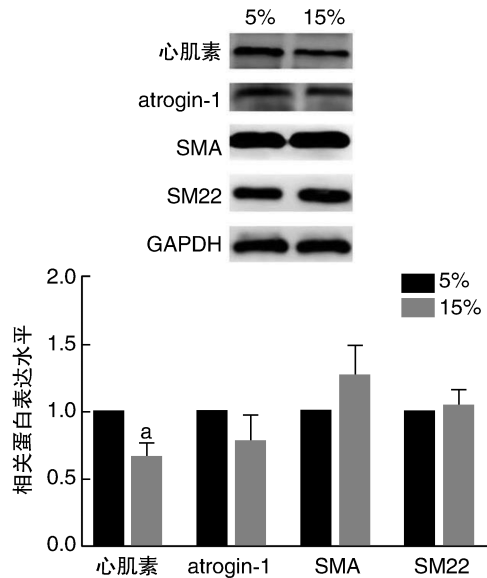


图 8. 过表达心肌素后, 15% 高张应变对心肌素的影响 ( $n=4$ )  
a 为  $P < 0.05$ , 与 5% 正常张应变组比较。  
Figure 8. Influence of high strain on over expressed myocardin ( $n=4$ )

### 3 讨论

心肌素已经被证明是平滑肌细胞的高效促分化因子<sup>[10]</sup>, 能在胚胎发育期和成年个体的心肌和平滑肌细胞中特异性表达, 能够在转录水平调控 VSMC 的表型转化, 与血清应答因子 (serum response factor, SRF)、CArG box 结合形成复合体, 特异性激活心脏或平滑肌细胞收缩标志基因表达上调<sup>[11]</sup>, 从而参与 VSMC 的表型调控。并有多种功能因子, 如组蛋白修饰<sup>[12]</sup>、雌激素受体  $\alpha$ <sup>[13]</sup>、DNA 甲基化<sup>[14]</sup> 和 microRNA<sup>[15]</sup> 等, 都可以与心肌素联合作用调节

VSMC 的表型转换;多种作用途径,如血小板衍生生长因子 BB<sup>[16]</sup>、转化生长因子  $\beta$ <sup>[17]</sup> 等信号通路,可增加心肌素表达,促进 VSMC 分化,抑制 VSMC 增殖。研究发现胚胎鼠时期敲除心肌素基因后无法存活,因为血管平滑肌的分化发育完全被阻断,说明心肌素在血管的发育和平滑肌分化中起重要作用<sup>[3]</sup>。在平滑肌细胞中过表达心肌素后,可以显著激活平滑肌细胞分化标志基因的表达<sup>[6]</sup>。atrogin-1 是泛素-蛋白酶体系统的 E3 连接酶,可以有效识别和泛素化蛋白底物,促进相关蛋白的泛素化降解。本实验室前期工作显示,atrogin-1 能通过泛素化蛋白酶体系统来促进心肌素的降解,增加了心肌素的转录活性来增加 VSMC 的收缩表型标志分子的表达,促进了 VSMC 的表型转换<sup>[18]</sup>。

心血管系统可以看做是一个以心脏为“动力泵”的生物力学系统。力学因素在心血管重建中发挥着重要作用<sup>[19]</sup>。VSMC 位于血管中膜,主要承载脉动血压作用在血管壁的周向张应力<sup>[20]</sup>。研究表明,VSMC 可以响应周向张应力学刺激而改变细胞表型和功能,不仅能维持血管的正常生理稳态,还在血管病理性改变过程中发挥重要作用。病理性高张应变在调控血管平滑肌细胞的生物学行为方面具有重要意义<sup>[21]</sup>,但病理性高张应变对血管平滑肌细胞中心肌素的影响尚不明确。本研究关注高张应变条件下 VSMC 中心肌素的力学敏感性,并初步探讨其对血管平滑肌细胞的调控作用,为高血压等心血管疾病的控制提供了新的思路。

目前,VSMC 表型转换的机制已经有很多研究,但张应变通过调控心肌素来调控 VSMC 的表型转换尚不清楚。本研究通过细胞体外周期性张应变加载系统对 VSMC 分别加载 5% 幅度和 15% 幅度、1.25 Hz 频率的周期性张应变刺激,5% 幅度模拟正常生理水平下 VSMC 所受到的张应力,15% 幅度模拟病理情况下高血压状态 VSMC 所受到的张应力,在加载 24 h 后,结果显示,心肌素和 VSMC 的收缩表型标志分子 SMA、SM22 蛋白表达和 mRNA 水平均下降,说明心肌素是一个力学敏感分子,受到了力的调控,而且周期性高张应变抑制了心肌素的表达及转录活性,调控了 VSMC 的表型转换。文献<sup>[6]</sup>证明 atrogin-1 能够诱导心肌素的降解和增强心肌素的转录活性来调控 VSMC 的表型转换。然后进一步探索张应变调控心肌素及 VSMC 分化的机制,发现张应变也调控了 atrogin-1 分子水平,15% 高张应变促进了 atrogin-1 蛋白表达及 mRNA 水平上升,说明周期性高张应变条件下,调控了由 atrogin-1 介导的

泛素化降解心肌素的表达水平和活性来调节 VSMC 的表型转换。然而心肌素的降解并没有增加心肌素的转录活性,从而促进 VSMC 收缩表型标志蛋白的表达,这与本实验室的前期研究结果不符<sup>[6]</sup>,本团队猜测可能是因为施加了周期性张应变这个因素,周期性高张应变能够促进 VSMC 去分化,使平滑肌细胞向合成表型转化,这种去分化效应强于 atrogin-1 诱导心肌素降解,增加心肌素转录活性而促进 VSMC 收缩蛋白的形成这个效应。接着用 siRNA 干扰 atrogin-1 后,心肌素蛋白表达增加,VSMC 表型标志分子 SMA、SM22 蛋白表达也增加;蛋白酶体抑制剂 MG132 也能抑制心肌素降解,使心肌素蛋白质蓄积,但 VSMC 的收缩表型标志分子 SMA 蛋白表达增加,验证了心肌素通过 atrogin-1 介导的泛素化蛋白酶体降解来调控 VSMC 的表型转化。随后过表达心肌素后,加载周期性张应变,检测心肌素、atrogin-1 及平滑肌细胞收缩表型标志分子的蛋白表达,心肌素有显著性下降,atrogin-1 及 SMA、SM22 表达并没有显著性,这个结果验证了心肌素确实是一个力响应因子参与了周期性张应变调控,但是可能由于过表达心肌素已经是一个变量,早期研究表明过表达心肌素可以抑制由 atrogin-1 引起的 VSMC 收缩标志蛋白的表达增加,因此这里过表达心肌素后施加周期性高张应变,可能引发了其他的机制来影响 VSMC 收缩标志蛋白的表达,但并不影响本研究得出心肌素是一个力敏感分子参与周期性张应变调控过程这个结论。

本文结果可以得知病理性的周期性高张应变刺激可以通过调控泛素化蛋白酶体降解过程以及心肌素来调节血管平滑肌细胞中分化标志蛋白表达,从而促进 VSMC 的去分化、增殖。本研究为周期性张应变调控 VSMC 表型转化的分子机制提供新的靶点,这对心血管疾病的防控具有重要意义。

**致谢** 衷心感谢上海交通大学生命科学技术学院齐颖新教授为本课题提供细胞张应变加载系统等实验条件。

#### [参考文献]

- [1] Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease[J]. *Physiol Rev*, 2004, 84(3): 767-801.
- [2] Wang G, Jacquet L, Karamariti E, et al. Origin and differentiation of vascular smooth muscle cell[J]. *J Physiol*, 2015, 593(14): 3013-3030.
- [3] Li S, Wang DZ, Wang Z, et al. The serum response factor coactivator myocardin is required for vascular smooth muscle

- development [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100 (16): 9366-9370.
- [4] Zheng XL. Myocardin and smooth muscle differentiation [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2014, 543: 48-56.
- [5] Kang SH, Lee HA, Kim M, et al. Forkhead box O3 plays a role in skeletal muscle atrophy through expression of E3 ubiquitin ligases MuRF-1 and atrogin-1 in cushing's syndrome [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2017, 312 (6): E495-E507.
- [6] Singh P, Li D, Gui Y, et al. Atrogin-1 increases smooth muscle contractility through myocardin degradation [J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(4): 806-817.
- [7] Chiu JJ, Chien S. Effects of disturbed flow on vascular endothelium; pathophysiological basis and clinical perspectives [J]. *Physiol Rev*, 2011, 91(1): 327-387.
- [8] Safar ME, Peronneau PA, Levenson JA, et al. Pulsed doppler; diameter, blood flow velocity and volumic flow of the brachial artery in sustained essential hypertension [J]. *Circulation*, 1981, 63(2): 393-400.
- [9] Tan X, Gao J, Shi Z, et al. MG132 induces expression of monocyte chemotactic protein-induced protein 1 in vascular smooth muscle cells [J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(1): 122-128.
- [10] Xia XD, Zhou Z, Yu XH, et al. Myocardin; a novel player in atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2017, 257: 266-278.
- [11] Wang D, Chang PS, Wang Z, et al. Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor [J]. *Cell*, 2001, 105(7): 851-862.
- [12] Sun HJ, Ren XS, Xiong XQ, et al. NLRP3 inflammasome activation contributes to VSMC phenotypic transformation and proliferation in hypertension [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(10): e3074.
- [13] Gao F, Huang Y, Zhang L, et al. Involvement of estrogen receptor and GPER in bisphenol a induced proliferation of vascular smooth muscle cell [J]. *Toxicol In Vitro*, 2019, 56: 156-162.
- [14] Liu Y, Peng W, Qu K, et al. TET2: a novel epigenetic regulator and potential intervention target for atherosclerosis [J]. *DNA Cell Biol*, 2018, 37(6): 517-523.
- [15] Li H, Xiang Y, Fan LJ, et al. Myocardin inhibited the gap protein connexin 43 via promoted miR-206 to regulate vascular smooth muscle cell phenotypic switch [J]. *Gene*, 2017, 616: 22-30.
- [16] Lu QB, Wan MY, Wang PY, et al. Chicoric acid prevents PDGF-BB-induced VSMC dedifferentiation, proliferation and migration by suppressing ROS/NF- $\kappa$ B/mTOR/P70S6K signaling cascade [J]. *Redox Biol*, 2018, 14: 656-668.
- [17] Zhao J, Wu W, Zhang W, et al. Selective expression of TSPAN2 in vascular smooth muscle is independently regulated by TGF- $\beta$ 1/SMAD and myocardin/serum response factor [J]. *FASEB J*, 2017, 31(6): 2576-2591.
- [18] Tang RH, Zheng XL, Callis TE, et al. Myocardin inhibits cellular proliferation by inhibiting NF- $\kappa$ B (p65)-dependent cell cycle progression [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(9): 3362-3367.
- [19] Campos LCG, Ribeiro-Silva JC, Menegon AS, et al. Cyclic stretch-induced Crp3 sensitizes vascular smooth muscle cell to apoptosis during vein arterialization remodeling [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2018, 132(4): 449-459.
- [20] Chien S. Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis; the wisdom of the cell [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292(3): H1209-H1224.
- [21] Qi YX, Yao QP, Huang K, et al. Nuclear envelope proteins modulate proliferation of vascular smooth muscle cell during cyclic stretch application [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(19): 5293-5298.

(此文编辑 朱雯霞)