

本文引用: 余卫英, 夏子荣, 李青, 等. 剪切修复基因 D 通过下调 mTOR/LOX-1 抑制 ox-LDL 诱导的人脐静脉平滑肌细胞增殖[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(11): 929-937. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2023.11.002.

[文章编号] 1007-3949(2023)31-11-0929-09

· 实验研究 ·

剪切修复基因 D 通过下调 mTOR/LOX-1 抑制 ox-LDL 诱导的人脐静脉平滑肌细胞增殖

余卫英, 夏子荣, 李青, 夏珍, 李菊香

(南昌大学第二附属医院心内科, 江西省南昌市 330006)

[摘要] **[目的]** 探讨剪切修复基因 D(XPD)在氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)促血管平滑肌细胞增殖中的作用及分子机制。**[方法]** 将重组质粒 pEGFP-N2/XPD 利用脂质体转染人脐静脉平滑肌细胞(HUVMSC), 沉默哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)基因, 用 MTT、EdU 法测定各组细胞的增殖; 流式细胞仪检测各组凋亡率; 利用 Western blot 检测 XPD、血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1(LOX-1)、mTOR、p-mTOR、Bcl-2 及 Bax 的表达。**[结果]** 与对照组比较, ox-LDL 组 XPD 表达明显下调($P<0.05$), Bax 蛋白表达下调($P<0.05$), Bcl-2 蛋白、Bcl-2/Bax、mTOR 磷酸化活性及 LOX-1 蛋白表达升高($P<0.05$); MTT、BdU 结果显示, ox-LDL 组细胞增殖较对照组上调($P<0.05$)。转染 pEGFP-N2/XPD 重组质粒能上调 Bax 蛋白表达($P<0.05$)并抑制 Bcl-2 蛋白、mTOR 磷酸化活性及 LOX-1 蛋白表达($P<0.05$), Bcl-2/Bax 比值下调($P<0.05$); 流式细胞仪检测结果显示, 转染 pEGFP-N2/XPD 重组质粒后, 细胞凋亡率较对照组增加($P<0.05$); MTT、BdU 结果显示, 转染 pEGFP-N2/XPD 重组质粒后, 细胞增殖较对照组下调($P<0.05$)。沉默 mTOR 基因后, 与对照组相比, siRNA mTOR 组 HUVMSC 中 LOX-1 蛋白表达被抑制($P<0.05$)。**[结论]** XPD 能抑制 HUVMSC 的增殖并且促进其凋亡, 下调 mTOR 和 LOX-1 蛋白表达, 抑制 ox-LDL 的促 HUVMSC 增殖和抗凋亡作用, 有可能成为抗动脉粥样硬化治疗的靶点。

[关键词] 剪切修复基因; 氧化型低密度脂蛋白; 人脐静脉平滑肌细胞; 动脉粥样硬化; mTOR

[中图分类号] R5; R363

[文献标识码] A

Xeroderma pigmentosum group D gene inhibits the proliferation of human umbilical vein smooth muscle cell induced by ox-LDL via down-regulating mTOR/LOX-1 pathway

YU Weiying, XIA Zirong, LI Qin, XIA Zhen, LI Juxiang

(Department of Cardiovascular Medicine, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the mechanism and signal pathways of xeroderma pigmentosum group D(XPD) gene on the proliferation of human umbilical vein smooth muscle cell (HUVMSC) induced by ox-LDL. **Methods** HUVMSCs were transfected with the plasmids of pEGFP-N2/XPD using Lipofectamine 2000, and subsequently silent mTOR gene. MTT and EdU assay was used to detect the cell proliferation. Flow cytometry was used to examine the cell apoptosis. The expression of XPD, lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1(LOX-1), mTOR, phospho-mTOR, Bcl-2 and Bax was measured by Western blot. **Results** The expression of XPD and Bax protein was down-regulated in ox-LDL group ($P<0.05$), while the expression of LOX-1, mTOR, Bcl-2 protein and the ratio of Bcl-2/Bax was significantly up-regulated ($P<0.05$), compared with control group. Cell proliferation of ox-LDL group increased obviously ($P<0.05$). After transfected with the pEGFP-N2/XPD plasmid, the expression of Bax was significantly up-regulated, while the expression of LOX-1, mTOR, Bcl-2 and the ratio of Bcl-2/Bax were significantly down-regulated ($P<0.05$). Flow cytometry showed that overexpression of XPD increased the apoptosis rate of HUVMSC ($P<0.05$). MTT and BdU showed that cell proliferation of pEGFP-N2/XPD group reduced compared with control group ($P<0.05$). Com-

[收稿日期] 2023-04-03

[修回日期] 2023-07-02

[基金项目] 江西省自然科学基金资助项目(2019GZY0254); 江西省卫生健康委科技计划(20204238)

[作者简介] 余卫英, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化和内科护理, E-mail: 425599293@qq.com。通信作者夏子荣, 博士, 副主任医师, 研究方向为动脉粥样硬化和心律失常, E-mail: xiazirong@sina.com。

pared with control group, the expression of LOX-1 was significantly down-regulated in siRNA mTOR group ($P < 0.05$).

Conclusion XPD can inhibit HUVMSC proliferation and promote its apoptosis, and reduce the effect of ox-LDL promoting proliferation of HUVMSC via the mTOR/LOX-1 pathway. XPD may be the target of treatment of atherosclerosis.

[**KEY WORDS**] xeroderma pigmentosum group D gene; ox-LDL; human umbilical vein smooth muscle cell; atherosclerosis; mTOR

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是心血管疾病最常见的病理特征之一,血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)过度增殖是促进As发生发展的一个关键因素。VSMC增殖与凋亡失衡是动脉粥样硬化斑块形成及易损斑块恶化的主要病理基础^[1],研究表明,氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)在As的形成过程中扮演极其重要的角色^[2]。最近大量研究证实可以通过抑制VSMC增殖而阻止As的进程^[3]。剪切修复基因D(xeroderma pigmentosum D, XPD)是转录因子IIH(transcription factor IIH, TFIIH)9个亚基中的一个^[4-5]。XPD可以激活DNA损伤检控点,增加基因的稳定性,防止基因突变和疾病的产生^[6-7]。有报道XPD通过P53促进细胞凋亡^[8-9],P53通过抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)而抑制肿瘤的发展^[10-11]。另有研究发现,在内皮细胞中雷帕霉素可以通过抑制mTOR的活性而抑制血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体1(lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1, LOX-1)对ox-LDL的结合,LOX-1不仅参与血管内皮损伤,还介导平滑肌细胞的增殖和迁移进而影响动脉粥样硬化斑块的稳定性^[12]。目前对XPD的研究主要集中在肿瘤的发生与核酸剪切修复途径中基因功能缺失的关系^[13]。XPD除了在核苷酸切除修复和转录过程中发挥主要作用外,还参与细胞的增殖与凋亡^[14]。

前期研究证明过表达XPD可以抑制ox-LDL诱导的血管平滑肌细胞增殖,促进细胞凋亡,在抑制As的形成过程中起重用作用^[15],因此,我们设想高表达XPD是否可以下调mTOR/LOX-1蛋白表达,从而抑制ox-LDL诱导的血管平滑肌细胞增殖并促进细胞凋亡,在抑制As的形成过程中起作用,从而寻找抗As的新途径。本研究将pEGFP-N2/XPD重组表达质粒,转染人脐静脉平滑肌细胞(human umbilical vein smooth muscle cell, HUVMSC)使XPD高表达,给予ox-LDL预处理,沉默mTOR基因,观察HUVMSC增殖和凋亡情况,探讨XPD参与ox-LDL诱导的HUVMSC增殖作用信号通路机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料

HUVMSC细胞株购自上海众华生物科技有限公司,本实验所用的重组质粒pEGFP-N2/XPD和空载质粒pEGFP-N2由张吉翔教授(南昌大学第二附属医院消化内科)赠予,经过PCR反应、酶切以及基因测序鉴定pEGFP-N2/XPD后用于实验。DMEM(高糖)培养基及胎牛血清购自Hyclone公司,DMSO购自Ameresco公司,ox-LDL购自广州奕源生物科技有限公司,脂质体Lipofectamine™2000购自美国Invitrogen公司,siRNA mTOR购自GenePharma(上海)公司,一抗XPD、LOX-1、mTOR、p-mTOR、Bcl-2和Bax购自美国Cell Signaling Technology(CST)公司, β -actin购自Santa Cruz公司,辣根过氧化物酶羊抗兔IgG(二抗)购自北京中杉。Annexin V-FITC细胞凋亡试剂盒购自南京凯基生物有限公司,MTT购自北京索莱宝科技有限公司,BdU购自广州市锐博生物科技有限公司。

1.2 人脐静脉平滑肌细胞培养和ox-LDL诱导HUVMSC增殖模型的建立

实验中HUVMSC置于细胞玻璃培养瓶中,用含12%胎牛血清和双抗(1×10^5 U/L的链霉素和 1×10^5 U/L的青霉素)的RPMI 1640培养基培养,置于95%空气湿度孵箱内培养(37°C 、5% CO_2)。实验中将HUVMSC以 5×10^7 个/L接种在96孔板,每孔均为100 μL ,并设置一调零孔(只加培养液)。加入不同浓度的ox-LDL(0、6.25、12.5、25、50、100 mg/L),以最佳浓度后给予不同作用时间(0、6、12、24、36 h)得出最佳作用时间,每组3个平行,通过MTT、BdU法检测细胞增殖。

1.3 质粒转染

将HUVMSC置于含10%胎牛血清及双抗(青霉素和链霉素)的DMEM培养基中,以 37°C 、95%空气湿度、5% CO_2 条件下培养。转染前1天,用不含抗生素的培养基将细胞按 1.5×10^5 个/孔种于6孔板中。24 h后,待细胞融合度约50%时可进行转染。分别将8 μg /孔的空载质粒pEGFP-N2及重组

质粒 pEGFP-N2/XPD 稀释在 250 μL /孔不含血清的培养基中,轻轻混匀。在 EP 管中加 10 μL /孔的 Lipofectamine™2000,用不含血清培养基稀释成 250 μL /孔,轻轻混匀后在室温下孵育 5 min。将混合稀释好的质粒分别与稀释好的 Lipofectamine™2000 轻轻混匀,室温下孵育 20 min,形成复合物。用 PBS 清洗细胞,每孔加入 2 mL 不含抗生素的培养基。把混匀后的质粒 Lipofectamine™2000 复合物加入到每孔,并轻轻摇动混匀。在培养箱中培养 6 h 后换有血清的培养基常规条件下继续培养。培养 48 h 后,提取各孔细胞的蛋白,通过 Western blot 检验重组质粒 pEGFP-N2/XPD 的转染效果。实验分组:(1)对照组;(2)pEGFP-N2 组;(3)pEGFP-N2/XPD 组;(4)ox-LDL 组;(5)ox-LDL+pEGFP-N2 组;(6)ox-LDL+pEGFP-N2/XPD 组。

1.4 siRNA mTOR

siRNA mTOR (forward: 5'-GCCGCAUUGUCUCU AUCAATT-3'; reverse: 5'-UUGAUAGAGACAAUGCG GCTT-3')由 GenePharma(上海)公司构建。按试剂盒给予转染,实验分为:(1)对照组;(2)阴性对照(siRNA NC)组;(3)siRNA mTOR 组;(4)ox-LDL 组;(5)ox-LDL+siRNA NC 组;(6)ox-LDL+siRNA mTOR 组。转染 24 h 后通过 Western blot 检验 siRNA mTOR 的转染效果。

1.5 MTT 检测细胞活力

将 HUVMSC 以适量(确保行 MTT 检测时细胞铺至 80%左右)接种在 96 孔板,每孔均为 100 μL ,并设置一调零孔(加等量培养液),加入 MTT 约 48 h 后弃去上清液后再每孔加入 150 μL 的 DMSO,锡箔纸遮盖避光在摇床上振荡 10 min。调酶标仪在 492 nm 处测定各孔吸光度($\text{OD}_{492\text{ nm}}$ 值),细胞存活率 = $(\text{OD}_{\text{实验组}}/\text{OD}_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 。

1.6 EdU 检测细胞增殖

采用 EdU 测定细胞增殖。细胞以 4 000 个/孔接种于 96 孔板,细胞贴壁后,根据 ox-LDL 不同预处理浓度及预处理时间进行分组,给予重组质粒 pEGFP-N2/XPD 及载体转染结束时,按试剂盒进行 EdU 标记,细胞固定化,Apollo 及 DNA 染色,荧光显微镜下计算染色细胞核占相应总细胞的百分比,每组 6 个复孔。

1.7 流式细胞仪检测细胞凋亡率

用 PBS 液洗涤细胞 2 次后弃残余液。用不含 EDTA 的胰酶消化(注意避免过度消化细胞),加培养基终止消化,收集约 $(2 \times 10^5) \sim (1 \times 10^6)$ 的细胞数

量,用 500 μL Binding Buffer 冲悬细胞,分别加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI,15 min 后用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.8 RT-qPCR 法检测 mRNA 表达水平

将 6 孔板内各组试剂孵育 24 h 后,去除培养液洗涤后,按每 10 cm^2 培养面积加入 1 mL Trizol,加入 1/5 体积氯仿并颠倒混匀,静置 15 min 离心 25 min (12 000 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$)。吸取上层水相而转移至 1.5 mL 新灭菌无核酶离心管内,沉淀 RNA 后弃上清,加 75% 乙醇再次离心收集 RNA。按试剂盒测试 RNA 浓度,再行 cDNA 合成及按试剂盒 RT-qPCR 的操作条件完成,引物采用广州市锐博生物科技有限公司(锐博公司作为专利未公布引物序列)。mRNA 表达量以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 公式计算。

1.9 Western blot 检测蛋白表达水平

将 6 孔板内各组试剂孵育 24 h 后吸净各个孔内培养基,预冷 PBS 冲洗 3 次后,分别加入细胞裂解 200 μL ,裂解细胞提取总蛋白,使用 BCA 法测定蛋白质浓度,按 100 μg /孔上样,经 12% SDS-PAGE 电泳分离蛋白,转膜,5% 脱脂奶粉-TBST 封闭 2 h,分别用 XPD、LOX-1、mTOR、p-mTOR、Bcl-2、Bax 和 β -actin 的一抗(1:1 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,加二抗孵育 2 h,0.1% Tween-TBS 洗 10 min,重复 3 次,经过显色后置入 BIO-RAD Image Lab 成像系统中曝光成像。将图片用凝胶图象处理系统分析每组条带灰度比值。

1.10 统计学处理

以上实验均重复 3 次。采用 SPSS 20.0 统计学软件分析,实验所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据总体差异的比较采用单因素方差分析(ANOVA),组间两两比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ox-LDL 促 HUVMSC 增殖

不同浓度的 ox-LDL 孵化 HUVMSC 24 h,使用 MTT、EdU 法检测细胞增殖率比值,结果显示 50 mg/L 的 ox-LDL 效果最佳,100 mg/L 与 50 mg/L 的 ox-LDL 作用效果差异无统计学意义($P > 0.05$),因此后续实验采用 50 mg/L 的 ox-LDL 孵化 HUVMSC 6、12、24 和 36 h,结果表明 24 h 作用效果最佳,后续研究采用 50 mg/L 的 ox-LDL 孵化 HUVMSC 24 h 构建模型(图 1)。

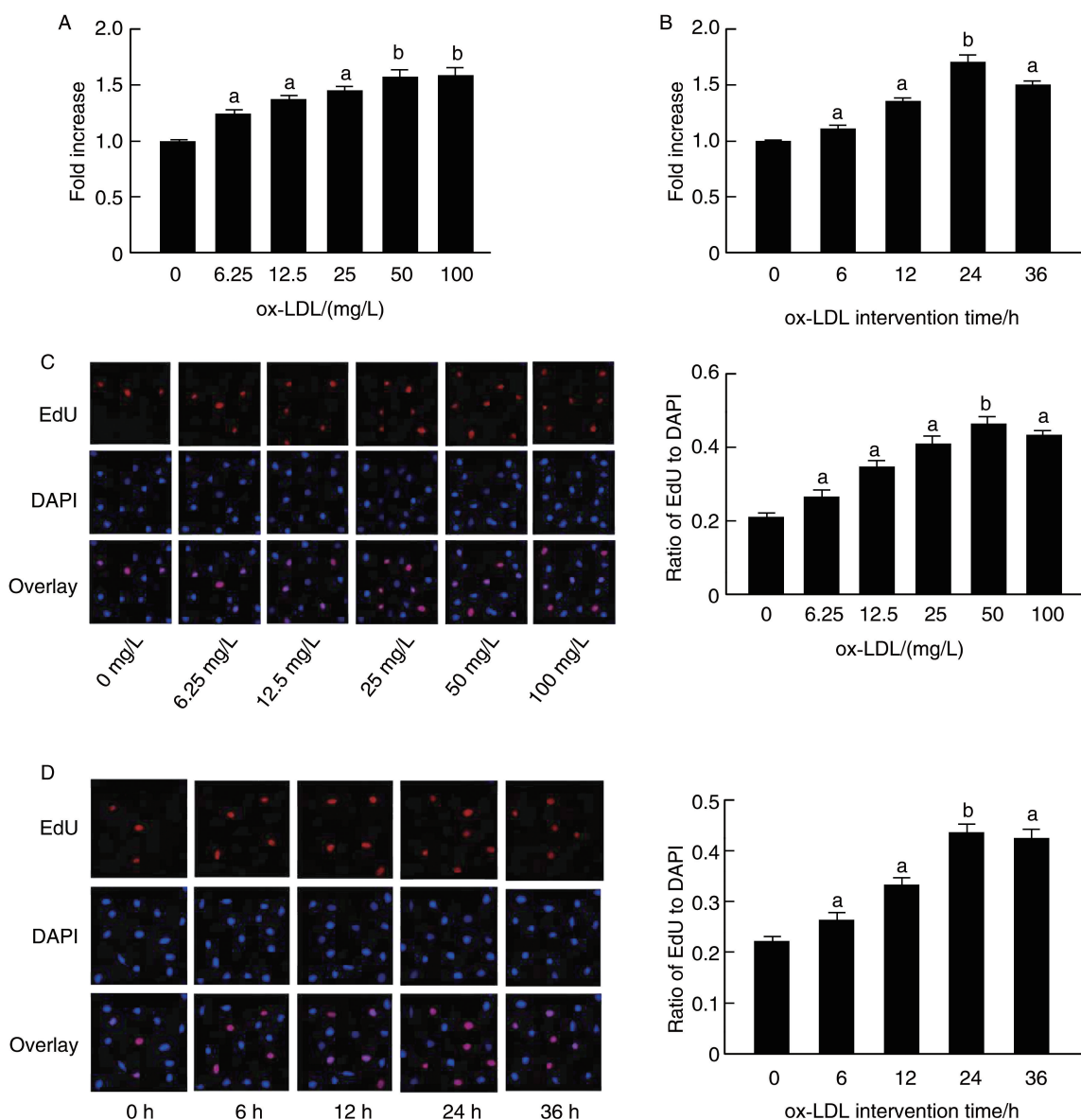


图 1. ox-LDL 促 HUVMSC 增殖作用的时间和剂量相关性 ($n=3$)

A 为 MTT 检测不同浓度 ox-LDL 对 HUVMSC 增殖的影响; B 为 MTT 检测 50 mg/L 的 ox-LDL 干预不同时间对 HUVMSC 增殖的影响; C 为 EdU 检测不同浓度 ox-LDL 对 HUVMSC 增殖的影响; D 为 EdU 检测 50 mg/L 的 ox-LDL 干预不同时间对 HUVMSC 增殖的影响。
a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与对照组比较。

Figure 1. Dose-dependent and time-course effects of ox-LDL on HUVMSC proliferation ($n=3$)

2.2 ox-LDL 对 HUVMSC 中 XPD 蛋白表达的影响

与对照组比较, 50 mg/L ox-LDL 孵化 HUVMSC 24 h 使 XPD 的表达下降 61.71% ($P<0.01$), 表明在 HUVMSC 中, ox-LDL 抑制 XPD 蛋白的表达 (图 2)。

2.3 过表达 XPD 对 ox-LDL 诱导 HUVMSC 增殖的影响

为探索过表达 XPD 后对 ox-LDL 诱导 HUVMSC 增殖的影响, 采用脂质体转染法瞬时分别转染重组质粒 pEGFP-N2/XPD 和空载质粒 pEGFP-N2 至 HUVMSC。与对照组相比, 重组质粒 pEGFP-N2/

XPD 组 XPD 蛋白表达增高 2.6 倍 ($P<0.01$, 图 3), 表明重组质粒 pEGFP-N2/XPD 转染成功。EdU 检测结果显示, 与对照组相比, ox-LDL 组细胞增殖率增加 56.51% ($P<0.05$), 转染 pEGFP-N2/XPD 后细胞增殖率较对照组减少 39.13% ($P<0.05$), 而转染 pEGFP-N2/XPD 的 ox-LDL 预处理组细胞增殖率较 ox-LDL 组减少 29.45% ($P<0.05$, 图 4), 以上证实过表达 XPD 可以抑制 ox-LDL 预处理诱导的 HUVMSC 增殖。

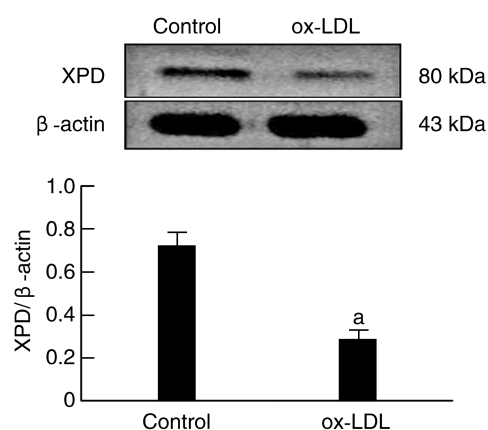


图 2. ox-LDL 对 HUVMSC 中 XPD 蛋白表达的影响 ($n=3$)

a 为 $P<0.01$, 与对照组比较。

Figure 2. Effect of ox-LDL on XPD protein expression in HUVMSC ($n=3$)

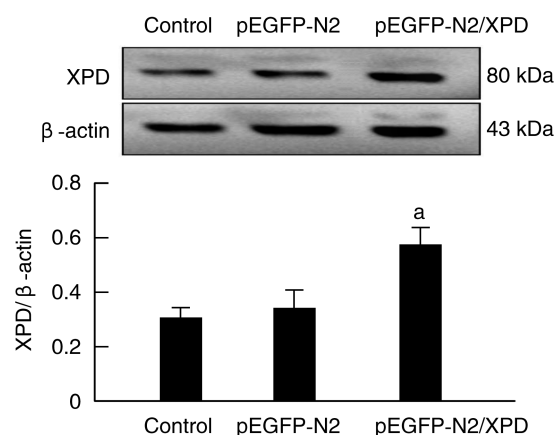


图 3. 不同组 HUVMSC 中 XPD 蛋白的表达 ($n=3$)

a 为 $P<0.01$, 与对照组比较。

Figure 3. Expression of the XPD protein in HUVMSC from different groups ($n=3$)

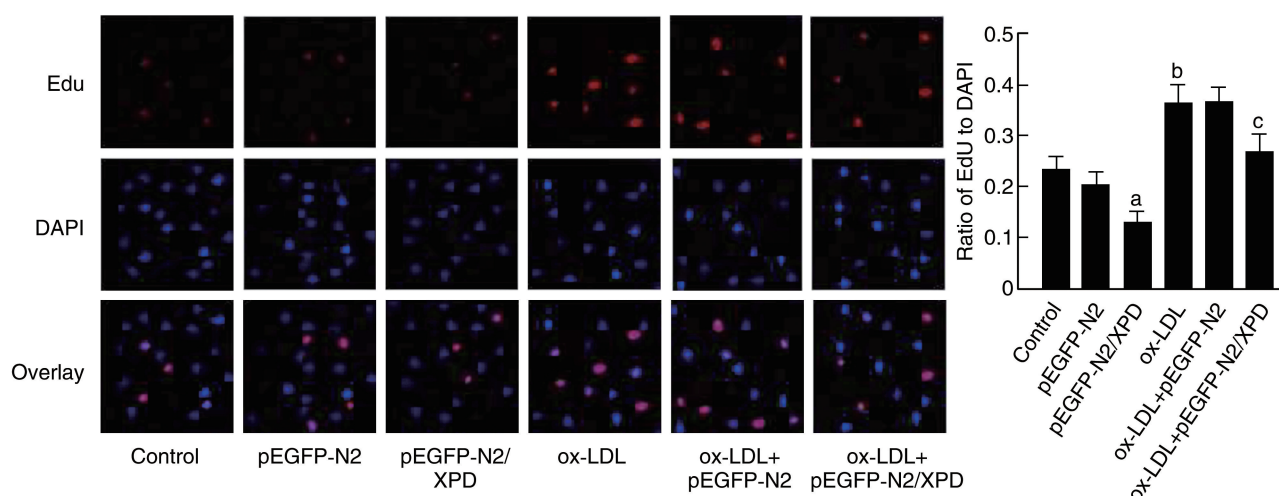


图 4. EdU 检测 pEGFP-N2/XPD 转染和 ox-LDL 处理后 HUVMSC 细胞增殖的变化 ($n=6$)

a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与对照组比较; c 为 $P<0.05$, 与 ox-LDL 组比较。

Figure 4. EdU assay detected changes of proliferation of HUVMSC treated with pEGFP-N2/XPD transfection and ox-LDL ($n=6$)

2.4 过表达 XPD 对 HUVMSC 凋亡的影响

流式细胞仪检测结果显示,与对照组比较,ox-LDL 组凋亡率减少 35.35% ($P<0.05$),重组质粒 pEGFP-N2/XPD 组的凋亡率增加 38.09% ($P<0.05$);过表达 XPD 可以减弱 ox-LDL 抗凋亡作用,凋亡率增加 62.02% (图 5)。

与对照组相比,ox-LDL 组 Bax 蛋白表达下调 ($P<0.05$),Bcl-2 蛋白表达上调 ($P<0.05$),Bcl-2/Bax 比值增加 2.53 倍 ($P<0.05$);重组质粒 pEGFP-N2/XPD 组 HUVMSC 中 Bax 蛋白表达上调 ($P<0.01$),Bcl-2 蛋白表达显著下调 ($P<0.01$),Bcl-2/Bax 比值下降 68.72% ($P<0.05$)。过表达 XPD 可

以抑制 ox-LDL 预处理 HUVMSC 诱导的凋亡相关蛋白表达 ($P<0.05$; 图 6)。

2.5 过表达 XPD 对 ox-LDL 诱导 LOX-1 蛋白的表达以及 mTOR 磷酸化的影响

与对照组相比,ox-LDL 组 LOX-1 蛋白表达增加 89.81% ($P<0.01$),mTOR 磷酸化活性上调,增加 90.74% ($P<0.01$);重组质粒 pEGFP-N2/XPD 组中 LOX-1 蛋白表达减少 40.21% ($P<0.01$),mTOR 磷酸化活性下调,减少 53.37% ($P<0.01$)。过表达 XPD 抑制 ox-LDL 预处理诱导的 LOX-1 蛋白表达及 mTOR 磷酸化活性 ($P<0.01$; 图 7)。

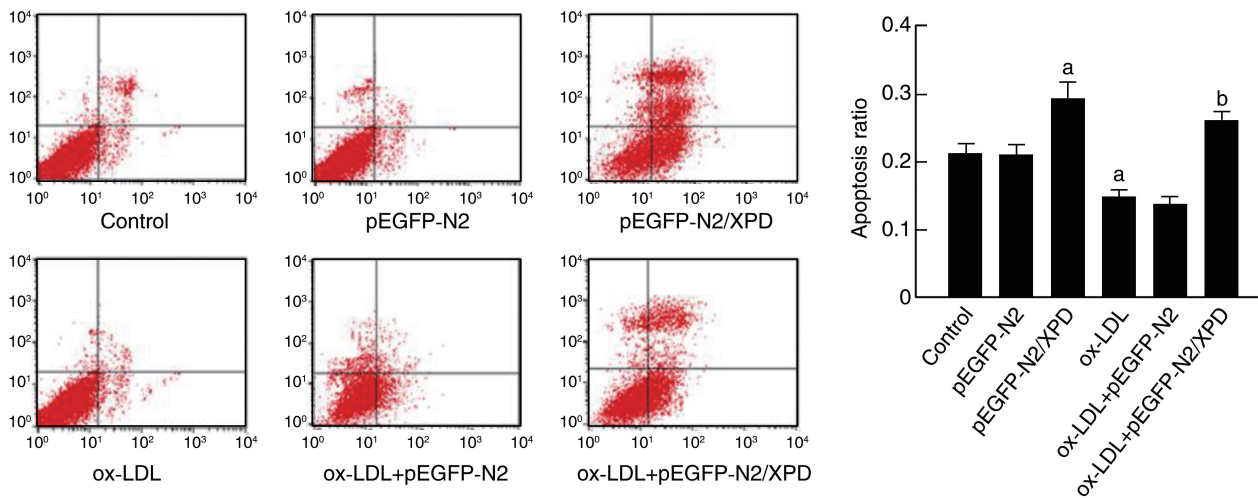


图 5. 各组细胞凋亡情况 ($n=3$)

a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与 ox-LDL 组比较。

Figure 5. Cell apoptosis rate of HUVMSC from different groups ($n=3$)

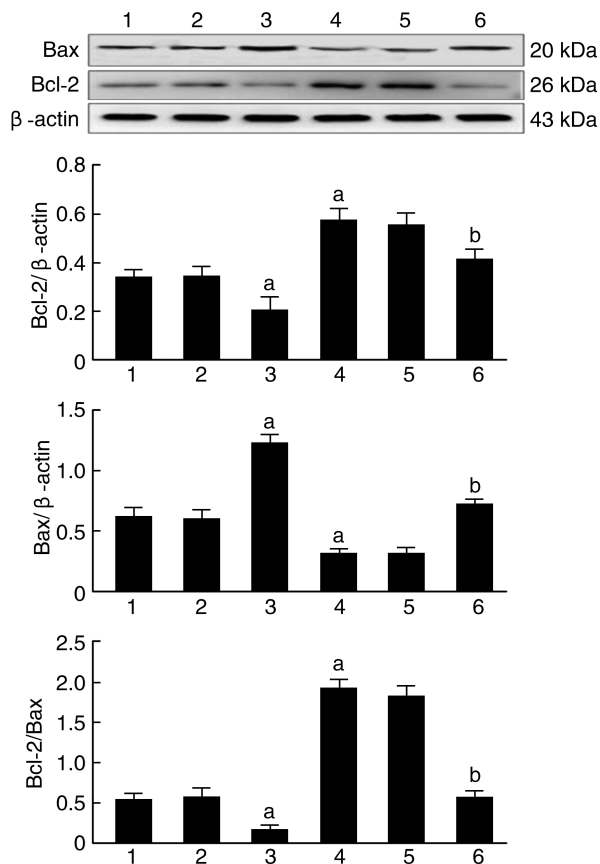


图 6. pEGFP-N2/XPD 转染和 ox-LDL 处理后 HUVMSC 中 Bcl-2、Bax 蛋白表达水平及 Bcl-2/Bax 变化 ($n=3$)

1 为对照组, 2 为 pEGFP-N2 组, 3 为 pEGFP-N2/XPD 组, 4 为 ox-LDL 组, 5 为 ox-LDL+pEGFP-N2 组, 6 为 ox-LDL+pEGFP-N2/XPD 组。a 为 $P<0.01$, 与对照组比较; b 为 $P<0.01$, 与 ox-LDL 组比较。

Figure 6. The changes of Bcl-2 and Bax protein levels and Bcl-2/Bax in HUVMSC treated with pEGFP-N2/XPD transfection and ox-LDL ($n=3$)

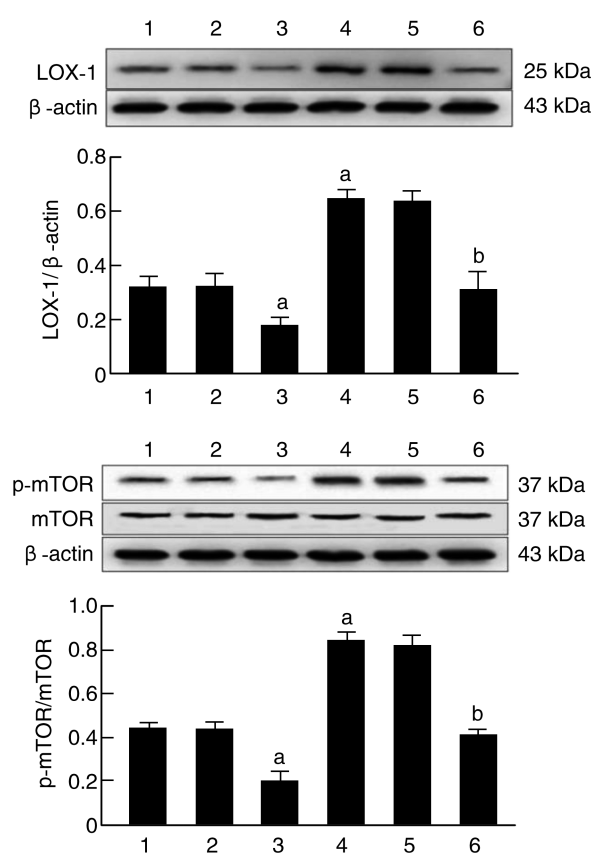


图 7. pEGFP-N2/XPD 转染和 ox-LDL 处理后 HUVMSC 中 LOX-1 和 p-mTOR 蛋白表达水平变化 ($n=3$)

1 为对照组, 2 为 pEGFP-N2 组, 3 为 pEGFP-N2/XPD 组, 4 为 ox-LDL 组, 5 为 ox-LDL+pEGFP-N2 组, 6 为 ox-LDL+pEGFP-N2/XPD 组。a 为 $P<0.01$, 与对照组比较; b 为 $P<0.01$, 与 ox-LDL 组比较。

Figure 7. The changes of LOX-1 and p-mTOR protein levels in HUVMSC treated with pEGFP-N2/XPD transfection and ox-LDL ($n=3$)

2.6 沉默 mTOR 对 ox-LDL 诱导的 LOX-1 蛋白表达的影响

为了确定 mTOR 与 LOX-1 蛋白之间的关系,采用脂质体转染 siRNA mTOR 至 HUVMSC。与对照组相比,siRNA mTOR 组 mTOR 明显下调,下降 48.03% ($P<0.01$;图 8),说明 siRNA mTOR 转染

成功。

与对照组相比,siRNA mTOR 组 HUVMSC 中 LOX-1 蛋白表达减少 46.32% ($P<0.05$),ox-LDL 组 LOX-1 蛋白表达增加 2.09 倍 ($P<0.05$)。抑制 mTOR 表达可以下调 LOX-1 蛋白,说明 LOX-1 蛋白在 mTOR 蛋白下游($P<0.05$;图 9)。

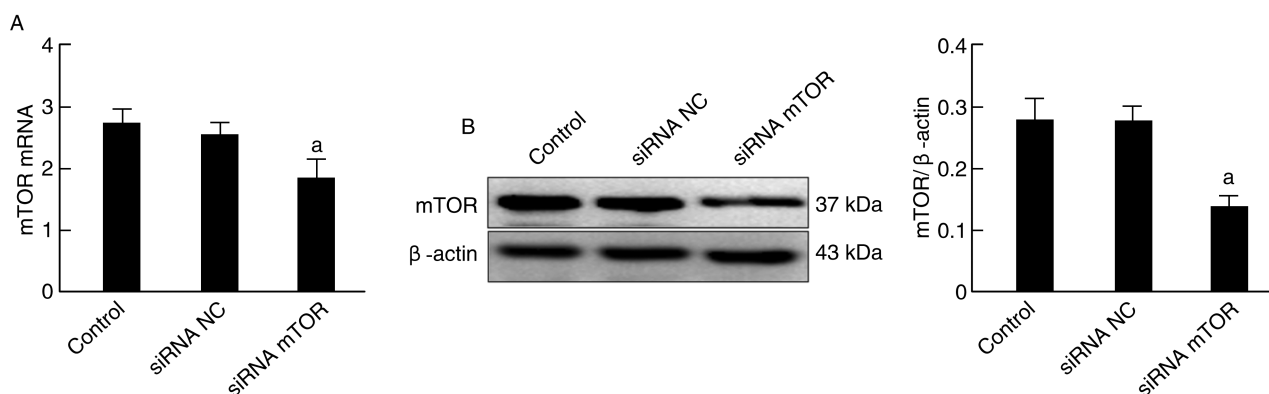


图 8. 各组 HUVMSC 中 p-mTOR 的表达($n=3$)

A 为 RT-qPCR 检测各组细胞 mTOR mRNA 表达量;B 为 Western blot 检测各组细胞 mTOR 蛋白表达量。a 为 $P<0.01$,与对照组比较。

Figure 8. Expression of p-mTOR in HUVMSC from different groups($n=3$)

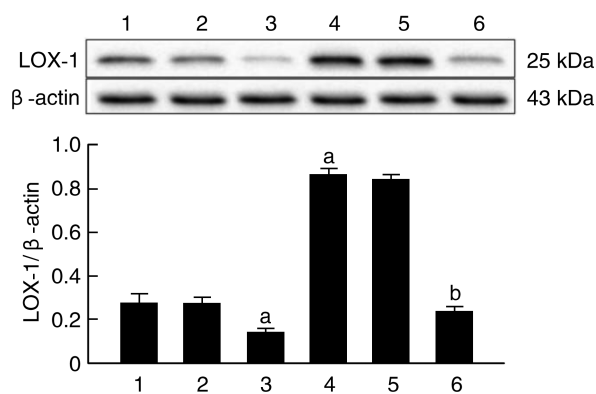


图 9. siRNA mTOR 转染和 ox-LDL 处理后 HUVMSC 中 LOX-1 蛋白表达水平变化($n=3$)

1 为对照组,2 为 siRNA NC 组,3 为 siRNA mTOR 组,4 为 ox-LDL 组,5 为 ox-LDL+siRNA NC 组,6 为 ox-LDL+siRNA mTOR 组。a 为 $P<0.01$,与对照组比较;b 为 $P<0.01$,与 ox-LDL 组比较。

Figure 9. The changes of LOX-1 protein levels in HUVMSC treated with siRNA mTOR transfection and ox-LDL($n=3$)

3 讨论

XPD 是 TF II H 的组成部分之一,在转录起始和核苷酸切除修复中增加基因稳定性,XPD 的表达及功能缺陷可能导致机体不能有效修复突变基因,促进肿瘤的发生发展^[16]。肿瘤抑制基因 p53 是最关

键的肿瘤抑制基因之一,它通过激活癌细胞凋亡和自噬性细胞死亡,以及细胞周期阻滞来发挥抗癌作用。p53 分为野生型和突变型。野生型 p53 基因在维持细胞正常生长、抑制恶性增殖中起重要作用,当某些细胞的 DNA 损伤无法修复时,其诱导细胞发生凋亡^[17]。已有研究显示,在 p53 诱导的凋亡过程中,XPD 能结合并作用于 p53,加速细胞凋亡^[18]。

近年研究发现,在老龄、高胆固醇血症、糖尿病及吸烟等各种 As 的危险因素作用下,血管内皮受损并产生活性氧可导致 DNA 损伤,提示 As 的发生发展与 DNA 损伤有密切关系^[19-20]。VSMC 过度增殖是导致 As 发生发展的一个极其重要的环节^[21]。已有研究表明,小剂量的 ox-LDL 即可直接或间接导致血管平滑肌细胞增殖,ox-LDL 刺激 VSMC 过度增殖是 As 发病机制之一^[2,22]。本研究发现 ox-LDL 预处理 HUVMSC 后 XPD 蛋白表达减少,并且通过上调抗凋亡基因 Bcl-2 和下调促凋亡基因 Bax 以及上调 Bcl-2/Bax 比值来发挥抗凋亡作用,抗凋亡基因 Bcl-2 和促凋亡基因 Bax 是参与细胞凋亡调控关键的基因族,在凋亡的各个阶段起调节作用,Bcl-2 表达上调和 Bax 表达下调可以认为是凋亡被抑制^[23],而过表达 XPD 可以通过下调 Bcl-2 蛋白及上调 Bax 蛋白表达来减弱 ox-LDL 的抗凋亡作用。

人 LOX-1 蛋白是 C 型凝集素基因簇中 II 型跨

膜糖蛋白,是 ox-LDL 结合、内化和降解的重要受体。在正常生理状态下,LOX-1 在血管平滑肌细胞的细胞膜上呈低水平表达^[24]。然而,在 As、心力衰竭、肥胖、糖尿病、缺血再灌注等许多疾病状态下 LOX-1 的表达均增加^[25-26]。

最近研究发现 LOX-1 除了结合和内化 ox-LDL 外,还有助于血管平滑肌细胞中泡沫细胞的形成;LOX-1 在 As 发生的早期和晚期均发挥了重要作用。有报道指出,LOX-1 不仅参与血管内皮损伤,诱导炎症反应,介导平滑肌细胞的增殖和迁移,而且还参与了泡沫细胞的形成以及血小板的激活,甚至还能够影响动脉粥样硬化斑块的稳定性^[2,27]。本研究使用 ox-LDL 刺激 HUVMSC 增殖,模拟 As 的发生,发现 ox-LDL 能够上调 HUVMSC 中 LOX-1 蛋白的表达,其上调作用能被 XPD 过表达所抑制,提示过表达 XPD 能够抑制 ox-LDL 诱导的 HUVMSC 增殖,与其抑制平滑肌细胞 LOX-1 介导的 ox-LDL 入胞有关^[28]。

mTOR 是一种高度保守的丝氨酸/苏氨酸激酶,对细胞的生长、增殖有重要的调控作用^[29]。mTOR 信号通路由于处于生长调节的中心环节而倍受关注,mTOR 作为一种重要的调节基因,通过调节细胞能量代谢及细胞周期等途径发挥重要的生理功能,mTOR 在调节脂肪及细胞增殖、生长等过程中起着中心调控点的作用^[30]。在动物模型中使用西罗莫司(mTOR 抑制剂)能够通过减少炎症反应而抑制脂质在血管平滑肌细胞中聚集,增加斑块的稳定性^[31-32]。最近有研究发现雷帕霉素脂质体可能通过调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路抑制人主动脉血管平滑肌细胞过度迁移^[33]。Dou 等^[34]采用纳米医学方法选择性抑制小鼠的哺乳动物雷帕霉素复合物靶点 1(mTORC1)信号通路,增强雷帕霉素的抗 As 活性。

最近报道雷帕霉素(mTOR 抑制剂)通过干扰 mTOR、NF- κ B 及 LOX-1 之间的信号通路下调 LOX-1 与自噬减少有关,mTOR 是 LOX-1 的上游^[35-36]。本研究发现过表达 XPD 可以抑制 ox-LDL 诱导的 mTOR 及 LOX-1 的表达,siRNA mTOR 下调 mTOR 表达可抑制 ox-LDL 上调 LOX-1 表达的作用。提示在 HUVMSC 中,过表达 XPD 抑制 ox-LDL 诱导 LOX-1 的表达作用可能与其抑制 mTOR 通路有关;本研究结果与既往文献结果相一致。这种现象提示或许可以通过上调 VSMC 中的 XPD 表达来抑制 mTOR/LOX-1 进而控制及治疗 As 的发生及发展。

综上所述,XPD 能抑制 HUVMSC 的增殖并且促

进其凋亡,XPD 可以下调 mTOR 和 LOX-1 蛋白表达,抑制 ox-LDL 的促 HUVMSC 增殖和抗凋亡作用。这也许成为治疗 As 新的靶点,为 As 治疗提供新的思路。

[参考文献]

- [1] 罗宇霖,袁 渊,罗 茂. 细胞外囊泡微小 RNA 在动脉粥样硬化中的作用研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(2): 157-164, 170.
LUO Y L, YUAN Y, LUO M. Research progress on the role of extracellular vesicle microRNA in atherosclerosis[J]. Chin J Arterioscler, 2023, 31(2): 157-164, 170.
- [2] KATTOOR A J, KANURI S H, MEHTA J L. Role of ox-LDL and LOX-1 in atherogenesis[J]. Curr Med Chem, 2019, 26(9): 1693-1700.
- [3] KHATANA C, SAINI N K, CHAKRABARTI S, et al. Mechanistic insights into the oxidized low-density lipoprotein-induced atherosclerosis[J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 5245308.
- [4] LOW G K M, TING A P L, FOK E D Z, et al. Role of xeroderma pigmentosum D (XPD) protein in genome maintenance in human cells under oxidative stress[J]. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen, 2022, 876-877: 503444.
- [5] LEHMANN A R. The xeroderma pigmentosum group D (XPD) gene: one gene, two functions, three diseases[J]. Genes Dev, 2001, 15(1): 15-23.
- [6] LAWANIA S, SINGH N, BEHERA D, et al. Xeroderma pigmentosum complementation group D polymorphism toward lung cancer susceptibility survival and response in patients treated with platinum chemotherapy[J]. Future Oncol, 2017, 13(29): 2645-2665.
- [7] FREDERICK G D, AMIRKHAN R H, SCHULTZ R A, et al. Structural and mutational analysis of the xeroderma pigmentosum group D (XPD) gene[J]. Hum Mol Genet, 1994, 3(10): 1783-1788.
- [8] DING H, WEN Z L, SUN G F. Silencing of xeroderma pigmentosum group D gene promotes hepatoma cell growth by reducing P53 expression[J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 8015-8021.
- [9] MA J M, SHAO X L, GENG F, et al. ERCC2/XPD deficiency results in failure of digestive organ growth in zebrafish with elevated nucleolar stress[J]. iScience, 2022, 25(9): 104957.
- [10] LUO Y D, FANG L, YU H Q, et al. p53 haploinsufficiency and increased mTOR signalling define a subset of aggressive hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2021, 74(1): 96-108.
- [11] KON N, OU Y, WANG S J, et al. mTOR inhibition acts as an unexpected checkpoint in p53-mediated tumor suppression[J]. Genes Dev, 2021, 35(1/2): 59-64.
- [12] SHORNING B Y, DASS M S, SMALLEY M J, et al. The PI3K-Akt-mTOR pathway and prostate cancer: at the crossroads of AR, MAPK, and WNT signaling[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(12): 4507.
- [13] RINCK-JUNIOR J A, TORRICELLI C, GOMEZ G V B, et al. Influence of functional variants Asp312Asn and Lys751Gln of xeroderma pigmentosum group D (XPD) and glutathione S-transferase

- Mu 1 (GSTM1) and Theta 1 (GSTT1) genes on cutaneous melanoma susceptibility and prognosis[J]. *Exp Dermatol*, 2019, 28(5): 631-635.
- [14] HE Y, TAO W Q, SHANG C, et al. Xeroderma pigmentosum group D suppresses proliferation and promotes apoptosis of HepG2 cells by downregulating ERG expression via the PPAR γ pathway[J]. *Int J Exp Pathol*, 2021, 102(3): 157-162.
- [15] 夏子荣, 李青, 夏珍, 等. 剪切修复基因 XPD 抑制 Ox-LDL 诱导人脐动脉平滑肌细胞的增殖[J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(12): 2238-2244.
- XIA Z R, LI Q, XIA Z, et al. Effect of xeroderma pigmentosum group D gene on proliferation of human umbilical arterial smooth muscle cells induced by ox-LDL[J]. *Chin J Pathophysiol*, 2017, 33(12): 2238-2244.
- [16] ZHANG H, WANG Y, DING H. COL4A1, negatively regulated by XPD and miR-29a-3p, promotes cell proliferation, migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition in liver cancer cells[J]. *Clin Transl Oncol*, 2021, 23(10): 2078-2089.
- [17] LEE S B, LEE S, PARK J Y, et al. Induction of p53-dependent apoptosis by prostaglandin a2[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(3): 492.
- [18] ZHANG G P, GUAN Y Y, ZHAO Y J, et al. ERCC2/XPD Lys751Gln alter DNA repair efficiency of platinum-induced DNA damage through P53 pathway[J]. *Chem Biol Interact*, 2017, 263: 55-65.
- [19] LIBBY P. The changing landscape of atherosclerosis[J]. *Nature*, 2021, 592(7855): 524-533.
- [20] BIROS E, REZNIK J E, MORAN C S. Role of inflammatory cytokines in genesis and treatment of atherosclerosis[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2022, 32(3): 138-142.
- [21] GROOTAERT M O J, MOULIS M, ROTH L, et al. Vascular smooth muscle cell death, autophagy and senescence in atherosclerosis[J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114(4): 622-634.
- [22] ZHANG L, CHENG H L, YUE Y X, et al. H19 knockdown suppresses proliferation and induces apoptosis by regulating miR-148b/WNT/ β -catenin in ox-LDL-stimulated vascular smooth muscle cells[J]. *J Biomed Sci*, 2018, 25(1): 11.
- [23] ZHAO S, ZHANG Y C, LU X Q, et al. CDC20 regulates the cell proliferation and radiosensitivity of P53 mutant HCC cells through the Bcl-2/Bax pathway[J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(13): 3608-3621.
- [24] KATTOOR A J, GOEL A, MEHTA J L. LOX-1: regulation, signaling and its role in atherosclerosis[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2019, 8(7): 218.
- [25] BALZAN S, LUBRANO V. LOX-1 receptor: a potential link in atherosclerosis and cancer[J]. *Life Sci*, 2018, 198: 79-86.
- [26] OU H C, CHOU W C, HUNG C H, et al. Galectin-3 aggravates ox-LDL-induced endothelial dysfunction through LOX-1 mediated signaling pathway[J]. *Environ Toxicol*, 2019, 34(7): 825-835.
- [27] LI H L, ZHUANG W W, XIONG T Q, et al. Nr1h2 deficiency attenuates atherosclerosis by reducing LOX-1-mediated proliferation and migration of vascular smooth muscle cells[J]. *Atherosclerosis*, 2022, 347: 1-16.
- [28] WANG Z W, CHEN J, ZENG Z L, et al. The LOX-1 receptor ectopically expressed in the liver alleviates atherosclerosis by clearing ox-LDL from the circulation[J]. *Mol Med*, 2022, 28(1): 26.
- [29] MOSSMANN D, PARK S, HALL M N. mTOR signalling and cellular metabolism are mutual determinants in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(12): 744-757.
- [30] SAXTON R A, SABATINI D M. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease[J]. *Cell*, 2017, 169(2): 361-371.
- [31] ZHAO L, DING T, CYRUS T, et al. Low-dose oral sirolimus reduces atherogenesis, vascular inflammation and modulates plaque composition in mice lacking the LDL receptor[J]. *Br J Pharmacol*, 2009, 156(5): 774-785.
- [32] CHEN W Q, ZHONG L, ZHANG L, et al. Oral rapamycin attenuates inflammation and enhances stability of atherosclerotic plaques in rabbits independent of serum lipid levels[J]. *Br J Pharmacol*, 2009, 156(6): 941-951.
- [33] 李玉婷, 冯森玲, 林彩燕, 等. 雷帕霉素脂质体对 ox-LDL 诱导血管平滑肌细胞迁移的抑制作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2023, 31(7): 581-587.
- LI Y T, FENG S L, LIN C Y, et al. inhibitory effect of rapamycin liposomes on ox-LDL induced vascular smooth muscle cell migration[J]. *Chin J Arterioscler*, 2023, 31(7): 581-587.
- [34] DOU Y, GUO J W, CHEN Y, et al. Sustained delivery by a cyclodextrin material-based nanocarrier potentiates antiatherosclerotic activity of rapamycin via selectively inhibiting mTORC1 in mice[J]. *J Control Release*, 2016, 235: 48-62.
- [35] ZHOU Y D, CAO X Q, LIU Z H, et al. Rapamycin inhibits oxidized low density lipoprotein uptake in human umbilical vein endothelial cells via mTOR/NF- κ B/LOX-1 pathway[J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0146777.
- [36] DING Z F, LIU S J, WANG X W, et al. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 regulates autophagy and Toll-like receptor 4 in the brain of hypertensive mice[J]. *J Hypertens*, 2015, 33(3): 525-533.
- (此文编辑 许雪梅)