文章编号:1000-5404(2007)11-0999-04

论著

AT2R基因可调控表达对体外培养VSMC纤维黏连蛋白表达的影响

景 涛[1],何国祥[1],刘建平[1],王海东[2],苗 莉[1],冉擘力[1] (第三军医大学西南医院:[1]心血管内科,重庆市介入心脏病学研究所,[2]胸心外科,重庆 400038)

提 要:目的 利用Dox-on可调控哺乳动物表达系统,建立起了受四环素类似物Doxycycline(Dox)紧密调控、表达AT2R基因的双重稳定血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,VSMC),在此基础上对纤维黏连蛋白(fibronectin,FN)的表达受AngⅡ及其受体拮抗剂的影响进行研究。**方法** 建立Dox可调控表达AT2R基因的双重稳定大鼠VSMC细胞,观察该VSMC细胞中AT2R受调控表达情况,以及血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ,AngⅡ)及其1型、2型受体拮抗剂干预上述细胞后FN的mRNA及蛋白表达情况变化。**结果** Dox-on可调控哺乳动物表达系统可成功介导AT2R基因在原代培养大鼠主动脉VSMC的表达,该表达受到Dox给予/去除的紧密调控;Dox干预可在48 h内迅速诱导该VSMC细胞表达AT2R,AT2R表达在Dox干预后72 h进一步增强($P<0.01$)。AT2R基因的可调控表达抑制由于AngⅡ干预VSMC后引起FN表达的增强($P<0.01$)。这一作用被AT1R拮抗剂CV-11974进一步增强($P<0.01$);而被加入AT2R拮抗剂干预而取消;同时给予AT1R拮抗剂和AT2R拮抗剂时FN的表达与基础状态时的情况一致。**结论** AngⅡ干预增强FN的表达,该作用是通过AT1R介导的;经Dox诱导表达AT2R基因可以明显抑制这一生物学作用,说明在这一生物学效应上,AT2R具有与AT1R相拮抗的生物学功能。

关键词:血管紧张素Ⅱ;受体;平滑肌细胞;AT2R基因;纤维黏连蛋白
中图法分类号:R322.12;R329.26;R394.2 **文献标识码**:A

Effect of conditional expression of angiotensin Ⅱ type 2 receptor gene on mRNA and protein expression of fibronectin in rat vascular smooth muscle cells *in vitro*

JING Tao[1], HE Guo-xiang[1], LIU Jian-ping[1], WANG Hai-dong[2], MIAO Li[1], RAN Bo-li[1] ([1]Department of Cardiology, Chongqing Institute of Interventional Cardiology, [2]Department of Cardiothoracic Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of AngⅡ and its receptor antagonist on the fibronectin (FN) mRNA and protein expression in VSMC of double stable AT2R expression. **Methods** VSMC was established, in which the expression levels of AT2R is tightly controlled by Doxycycline (Dox). The VSMC were treated with AngⅡ, Dox, CV-11974, PD123319. The effect of AT2R overexpression on the mRNA and protein expression of FN in VSMC were detected and the effects of AT1R antagonist (CV-11974) and AT2R antagonist (PD123319) on aforementioned target were studied. **Results** The Dox-on gene expression system could generate high-level, regulable expression of AT2R that was tightly controlled by addition or removal of Dox. The AT2R expression were induced obviously in double stable VSMC within 48 h by Dox and further enhanced after 72 h ($P<0.01$). In the well established double stable VSMC, the addition of AngⅡ resulted in an increase of the FN expression ($P<0.01$). The FN expression decreased after Dox treatment ($P<0.01$). The decreased expression of FN induced by Dox was further enhanced by CV-11974 ($P<0.01$), and were removed by PD123319. There was no difference in FN expression between CV-11974 and PD123319 simultaneous group

基金项目:国家自然科学基金(30400180);第三军医大学学校中青年基金(2004)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30400180) and the Scientific Research Foundation for Young Scholars of Third Military Medical University (2004)

作者简介:景 涛(1972-),女,四川省成都市人,博士,主治医师,主要从事冠心病的发病机制及防治方面的研究。电话:(023)68765171, E-mail:a65427862@public.cta.cq.cn
通讯作者:王海东,E-mail:xxwkwhd@sina.com

收稿日期:2007-03-12;修回日期:2007-04-10

and control group. **Conclusion** The enhancement effect of Ang Ⅱ on the FN expression is mediated by AT1R and inhibited by Dox-induced AT2R expression. It is suggested that AT2R acts an antagonistic effect against AT1R in those biological effect.

Key words: angiotensin Ⅱ; receptor; muscle, smooth, vascular; AT2R gene; fibronectin

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)从血管中膜向内膜下迁移并在内膜聚集、增生而凋亡减少是PCI术后再狭窄形成过程中最具特征性的细胞生物学事件之一[1,2]。在内皮损伤后3 d,中膜的VSMC的生物学特性发生改变,细胞表型由呈分化状态的收缩型转化为去分化状态的合成型,开始向内膜下迁移,在内膜增殖,并分泌大量的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)。血管病变局部的ECM合成降解的再平衡与血管再狭窄等病理过程密切相关。纤维黏连蛋白(fibronectin, FN)是细胞外基质中的重要功能蛋白,在血管受损伤时表达量均明显增加。有研究表明,FN不仅可促进VSMC发生表型转变、促进其增殖,而且是细胞迁移的重要趋化因子[3]。本研究旨在了解AT2R基因可调控表达对体外培养VSMC中FN表达的影响,进而了解其在再狭窄防治中的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 Dox调控的哺乳动物表达系统 采用同源重组方法将AT2R目的基因片段克隆于含TetO重复序列的表达载体pUHD10-3中,从而建立由调控质粒pUHD 17-1hyg、哺乳动物表达质粒pUHD 10-3/AT2R、荧光报告质粒pUHC 13-3以及提供新霉素筛选抗性的简单质粒pSV2neo 4种成分组成的受Dox调控的哺乳动物表达系统(Dox-on系统)。

1.1.2 Dox诱导双重稳定表达AT2R基因VSMC细胞的建立 采用酶消化法原代培养大鼠主动脉VSMC,采用常规分子生物学方法连续两个回合转染体外培养的VSMC,并分别采用闪烁计数仪检测不同细胞克隆荧光素酶活性改变以及RT-PCR方法检测AT2R目的基因片段的mRNA表达情况,根据各个细胞克隆受Dox调控表达的程度,选择高诱导表达AT2R目的基因但低背景的细胞,作为双重稳定VSMC细胞。

1.1.3 主要试剂 Ang Ⅱ(美国Sigma公司),CV11974(日本Takeda制药公司赠送);PD133319(Univ. Emory, Dr. Zhao惠赠),RNA-PCR试剂盒(大连TaKaRa公司),S-P试剂盒(武汉博士德),大鼠纤维黏连蛋白(FN)引物(大连TaKaRa公司),大鼠GAPDH(上海基康公司),羊多克隆AT2R抗体(美国Santa Cruz公司),羊FN多克隆抗体(美国Santa Cruz公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 ①未转染对照组;②未转染VSMC + Ang Ⅱ 10^{-7} mol/L组;③转染组;④转染组 + Ang Ⅱ 10^{-7} mol/L组;⑤转染组 + Ang Ⅱ 10^{-7} mol/L + Dox 1 μg/ml组;⑥转染组 + Ang Ⅱ 10^{-7} mol/L + Dox 1 μg/ml + CV-11974 10^{-7} mol/L组;⑦转染组 + Ang Ⅱ 10^{-7} mol/L + Dox 1 μg/ml + PD123319 10^{-7} mol/L组;⑧转染组 + Ang Ⅱ 10^{-7} mol/L + Dox 1 μg/ml + CV-11974 10^{-7} mol/L + PD123319 10^{-7} mol/L组。

1.2.2 Dox诱导双重稳定VSMC细胞AT2R蛋白表达检测(免疫印迹方法) 结果采用凝胶成像系统进行检测并行图像分析,蛋白表达量用表达强度(Intensity, INT)表示。

1.2.3 RT-PCR方法检测AT2R表达对VSMC中FN mRNA表达变化的影响 用Tripure™试剂盒提取RNA;应用Premier Primer 5.0软件设计特异性引物:FN引物(418 bp),退火温度59 ℃,正义:5′-CTGCCGAATGTAGATGAGGA-3′,反义:5′-CGTAATGGGAAACCGTGTAA-3′。GAPDH引物:(294 bp),退火温度50~60 ℃,正义:5′-GTGACTTCAACAGCAACTCCCATTC-3′,反义:5′-GTTATGGGGTCTGGGATGGAATTGTG-3′。PCR扩增产物行1.2%琼脂糖凝胶常规电泳,结果行凝胶扫描留存,并行图像分析。

1.2.4 免疫细胞化学检测 AT2R可调控表达对VSMC中FN蛋白表达变化的影响 按S-P试剂盒使用说明进行免疫组化染色,一抗工作浓度分别为1∶100,阴性对照用PBS代替一抗工作液。显微镜下观察及图像分析:每张玻片检测5个视野(×100)的吸光度值,计算均值和标准差。

1.3 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS 11.0统计软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 AT2R蛋白在双重稳定VSMC细胞中的表达

实验结果表明,未转染对照组未检测到明显的AT2R蛋白的表达(2.110 ± 1.451),转染组中未经Dox干预的细胞未见到明显的AT2R蛋白的表达(1.894 ± 1.482),与对照组比较,差异不显著($P > 0.05$),转染后经Dox 1 μg/ml干预48 h后可以见到在双重稳定VSMC细胞中AT2R蛋白诱导表达增强(111.876 ± 9.912),与对照组比较,差异显著($P < 0.01$),这种表达在Dox干预后72 h进一步增强[(156.477 ± 20.641) $P < 0.01$]。

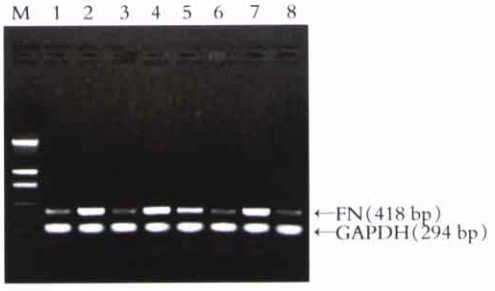
2.2 AT2R可调控表达对双重稳定VSMC中FN mRNA表达的影响

未转染对照组中着FN基础表达很弱(142.19 ± 11.33),给予Ang Ⅱ的刺激后FN表达显著上调[(216.32 ± 25.75), $P < 0.01$];在转染后经过筛选建立的双重稳定细胞中,FN的基础表达情况与未转染对照组比较无显著性差异($P > 0.05$)。在接受Ang Ⅱ刺激后FN表达增加的情况也与未转染VSMC中一致[(210.63 ± 29.53), $P > 0.05$]。在双重稳定VSMC接受Dox干预下表达AT2R后,可以见到由Ang Ⅱ刺激引起的FN表达增加的现象受到抑制(186.11 ± 9.36);AT1R拮抗剂CV-11974

的干预使 FN 的表达进一步减少[(152.09 ± 3.05)]，不过 FN 的表达量仍旧稍高于未转染对照组($P < 0.01$)；使用 AT2R 拮抗剂干预的结果(211.24 ± 13.79)与双重稳定 VSMC 未接受 Dox 干预而给予 Ang Ⅱ 刺激时结果一致($P > 0.05$)，细胞中 FN 均表现较高程度的表达；同时采用 AT1R 和 AT2R 拮抗剂干预双重稳定 VSMC，则 Ang Ⅱ 由 AT1R 及 AT2R 介导产生的对 FN 表达的生物学效应完全被解除(140.82 ± 1.79)(图 1)。

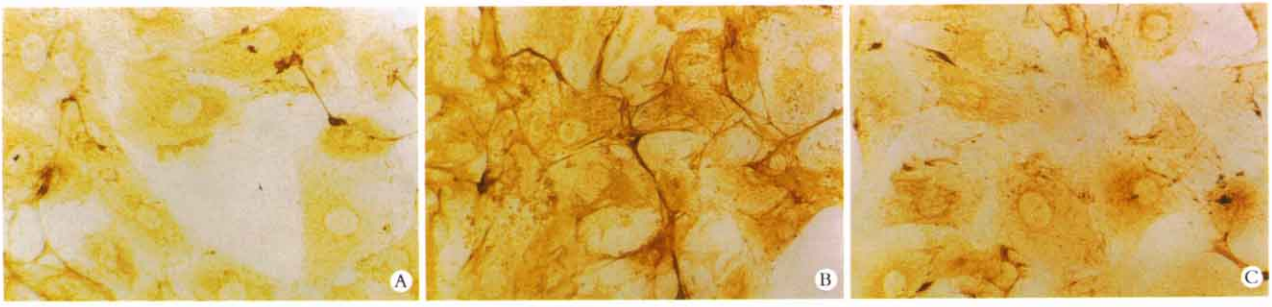
2.3　AT2R 可调控表达对双重稳定 VSMC 中 FN 蛋白表达的影响

结果显示，未转染对照组中，可见少量 VSMC 细胞质中有棕黄色的、颗粒状的弱阳性着色，细胞质内散再分布，同时可以见到存在于细胞外间质中丝状的、棕黄色的弱阳性着色；转染后获得的双重稳定 VSMC 基础状态下少数细胞在胞质内也存在少量 FN 棕黄色阳性着色(图 2A)，两者间比较无显著性差异($P > 0.05$)；给予 Ang Ⅱ 干预后，上述两组中 FN 阳性着色的 VSMC 的数量及强度均显著增加($P < 0.01$)(图 2B)；而在双重稳定 VSMC 给予 Dox 干预后，FN 阳性表达显著减弱(图 2C)；这一减弱表达的趋势被 AT1R 拮抗剂 CV-11974 进一步增强；而被加入 AT2R 拮抗剂干预而取消；同时给予 AT1R 拮抗剂和 AT2R 拮抗剂时 MMP-2 的表达恢复基础状态时的表达强度。



M：DNA 标准(DL 2000)；1：未转染对照组；2：未转染 VSMC + Ang Ⅱ 10^{-7} mol/L 组；3：转染组；4：转染组 + Ang Ⅱ 10^{-7} mol/L 组；5：转染组 + Ang Ⅱ 10^{-7} mol/L + Dox 1 μg/ml 组；6：转染组 + Ang Ⅱ 10^{-7} mol/L + Dox 1 μg/ml + CV-11974 10^{-7} mol/L 组；7：转染组 + Ang Ⅱ 10^{-7} mol/L + Dox 1 μg/ml + PD123319 10^{-7} mol/L 组；8：转染组 + Ang Ⅱ 10^{-7} mol/L + Dox 1 μg/ml + CV-11974 10^{-7} mol/L + PD123319 10^{-7} mol/L 组

图 1　AT2R 可调控表达对双重稳定 VSMC 中 FN mRNA 表达的影响



A：Dox 干预前；B：Ang Ⅱ 10^{-7} mol/L 刺激后；C：Ang Ⅱ 10^{-7} mol/L + Dox 1 μg/ml 刺激后

图 2　双重稳定 VSMC 细胞中 FN 的表达　(S-P ×400)

3　讨论

血管损伤后新生内膜形成的过程，也是基质重建的过程，众多的生长因子和细胞因子参与这一过程[4]。其中，血管局部存在的肾素-血管紧张素系统(RAS)参与再狭窄发生的全过程，是促进再狭窄发生十分重要的因素之一。由于 AT1R 在生长发育过程中始终保持较高水平的稳定表达，并且在血管损伤后表达进一步增加，而 AT2R 在血管损伤后仅重新出现极少量的表达[5]，因此使损伤血管增强表达 AT2R 可能有利于再狭窄的防治。不过，正常情况下 AT2R 主要在胚胎组织中表达，但在成年组织中表达量极低或没有表达[4]。在这种情况下导入 AT2R 基因后，如果其表达处于无调控状态，将可能造成严重后果。基于这一认识，本研究利用基因治疗的方法，使损伤血管在适当的条件下可控制性地增强表达 AT2R，一方面可以利用 AT2R 发挥其拮抗 AT1R 生物学效应的有利作用；同时，又可以最大程度地减少这种由于过度表达成熟组织本来并不表达的 AT2R 后，可能带来的各种潜在的不利影响。

纤维黏连蛋白(FN)是一种多功能的细胞外基质糖蛋白，在正常动脉壁中只占非常少的部分，但当血管损伤后，细胞外基质中纤维黏连蛋白含量明显增加[6]。研究表明[7]，FN 通过整合素受体与 VSMC 内骨架蛋白如 α-肌动蛋白和踝蛋白(talin)结合，形成黏着斑，使相关酪氨酸激酶活化，转导细胞信息，使肌动蛋白骨架重排，从而促进 VSMC 的表型由收缩型转化为合成型。另外，FN 也是细胞迁移的趋化因子。FN 通过整合素受体与 VSMC 的肌动蛋白结合后，再和Ⅰ、Ⅳ型胶原连接，FN 通过这一连接结构调节细胞骨架，产生的内张力转化为细胞外在的迁移。同时在体研究表明：球囊损伤大鼠颈动脉后，在动脉中层的 VSMC 基

底膜中层黏连蛋白(laminin,LN)消失,而在增殖和迁移的VSMC周围基质中富含FN;在成熟的新生内膜内,非增殖VSMC周围LN重新出现,FN减少[8]。这表明当细胞处于高LN、低FN的基底膜中时,将不再增殖;相反,细胞在富含FN的基质中时,在外来刺激因子的作用下将大量增殖。有研究表明[9],在鼠颈动脉球囊损伤后3 d,FN的mRNA和蛋白即开始表达,14 d达高峰,到30 d时仍持续高表达,尤以新生内膜及近内膜的中层最为明显,说明FN在球囊损伤后异常增加,为新生内膜形成的重要原因。

实验中,我们对双重稳定VSMC中FN的表达受AngⅡ及其受体拮抗剂的影响进行了观察。结果显示,Dox干预前,该双重稳定VSMC中存在一定水平的FN的基础表达,在AngⅡ刺激后,FN的表达显著升高,提示FN可能参与了由AngⅡ刺激VSMC产生的VSMC迁移、增殖和细胞外基质形成增加的过程。双重稳定VSMC经Dox诱导表达AT2R蛋白后,AngⅡ刺激所引起的上述FN表达升高得到显著抑制,说明AT2R可以通过减少FN表达来减少血管损伤后新生内膜形成。实验同时显示AT1R拮抗剂CV-11974可使AT2R表达后已经下调的FN的表达进一步减少;而AT2R拮抗剂PD123319则解除了AT2R对FN表达的抑制作用。我们的结果提示AngⅡ通过AT1R介导增强FN的表达,而AT2R对AT1R介导的该效应具有拮抗作用,说明外源性给予Dox诱导AT2R表达后可以通过调节FN表达,对VSMC迁移、增殖和细胞外基质形成进行有效调控。综上,利用Dox-on[10]可调控哺乳动物表达系统,使AT2R基因的表达处于人们的主动控制下,可以针对血管损伤后仅一小部分患者发生再狭窄的临床特点,仅对发生再狭窄的患者进行治疗。因此,可以最大程度上利用AT2R基因表达的正面作用,而将其可能具有的负面影响降至最低,有益于再狭窄的防治。

参考文献:

[1] Zargham R, Thibault G. alpha8beta1 Integrin expression in the rat carotid artery: involvement in smooth muscle cell migration and neointima formation[J]. Cardiovasc Res, 2005, 65(4): 813-822.

[2] 景 涛,何国祥,刘建平,等. 血管紧张素Ⅱ对血管平滑肌细胞粘着斑及肌动蛋白细胞骨架组装的影响及意义, 2001, 23(10): 1173-1176.

[3] Midwood K S, Mao Y, Hsia H C, *et al*. Modulation of cell-fibronectin matrix interactions during tissue repair[J]. J Investig Dermatol Symp Proc, 2006, 11(1): 73-78.

[4] Takeda-Matsubara Y, Matsubara K, Ochi H, *et al*. Expression of endothelial angiotensin Ⅱ receptor mRNA in pregnancy-induced hypertension[J]. Am J Hypertens, 2003, 16(12): 993-999.

[5] Sales V L, Sukhova G K, Lopez-Ilasaca M A, *et al*. Angiotensin type 2 receptor is expressed in murine atherosclerotic lesions and modulates lesion evolution[J]. Circulation, 2005, 112(21): 3328-3336.

[6] Stringa E, White D, Tuan R S, *et al*. Role of newly synthesized fibronectin in vascular smooth muscle cell migration on matrix-metalloproteinase-degraded collagen[J]. Biochem Soc Trans, 2002, 30(2): 102-111.

[7] Parameswaran K, Radford K, Zuo J, *et al*. Extracellular matrix regulates human airway smooth muscle cell migration[J]. Eur Respir J, 2004, 24(4): 545-551.

[8] Roy J, Tran P K, Religa P, *et al*. Fibronectin promotes cell cycle entry in smooth muscle cells in primary culture[J]. Exp Cell Res, 2002, 273(2): 169-177.

[9] Thyberg J, Hultgardh-Nilsson A. Fibronectin and the basement membrane components laminin and collagen type Ⅳ influence the phenotypic properties of subcultured rat aortic smooth muscle cells differently[J]. Cell Tissue Res, 1994, 276(2): 263-271.

[10] Stieger K, Le-Meur G, Lasne F, *et al*. Long-term doxycycline-regulated transgene expression in the retina of nonhuman primates following subretinal injection of recombinant AAV vectors[J]. Mol Ther, 2006, 13(5): 967-975.

(编辑 陈聪连)

文献标识码的标识方法

为了便于文献的统计和期刊评价,确定文献的检索范围,提高检索结果的适用性,每篇文章或资料应标识1个文献标识码。一般设置以下5种标准:

A:理论与应用研究学术论文(包括综述报告)

B:实用性技术成果报告(科技)、理论学习与社会实践总结(社科)

C:业务指导与技术管理性文章(包括领导讲话、特约评论等)

D:一般动态性信息(通讯、报道、会议活动、专访等)

E:文件、资料(包括历史资料、统计资料、机构、人物、书目、知识介绍等)

不属于上述各类的文章以及文摘、索引、补白、广告、启事等不加文献标识码

本刊编辑部