文章编号:1000-5404(2011)11-1095-04

论著

Jagged1 真核表达质粒构建及其对 VSMCs 增殖凋亡的影响

钱德慧,武晓静,姜 洪,匡春燕,王 逵,宋明宝,黄 岚 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院心血管内科,全军心血管病研究所)

【摘要】 **目的** 构建大鼠 Jagged1 真核表达质粒,分析 Jagged1 过表达对血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,VSMCs)增殖和凋亡的影响。**方法** 从带 Jagged1 全长基因质粒 pBOS-SN3T 中酶切获得目的基因,用载体 pCMV-IRES-GFP 构建重组质粒,转染至 VSMCs。Western blot 检测 Jagged1 蛋白表达变化,[^{3}H]-TdR 掺入法检测细胞增殖,流式细胞仪(FACS)检测细胞凋亡。**结果** 成功构建大鼠 Jagged1 真核表达载体并转染至 VSMCs,经 G418 筛选后转染率可达 90% 以上,转染上调了 VSMCs 的 Jagged1 蛋白水平约 6 倍。转染 p-rJagged1 后 VSMCs 的增殖能力明显降低[(10 265 ± 1 004) cpm/孔 *vs* (17 584 ± 1 587) cpm/孔,$P<0.01$],而凋亡明显增高[总凋亡率:(32.35 ± 2.86)% *vs* (15.24 ± 1.27)%;早期凋亡率:(22.47 ± 2.54)% *vs* (10.22 ± 0.98)%;$P<0.01$]。**结论** 成功构建大鼠 Jagged1 真核表达质粒,过表达 Jagged1 可抑制 VSMCs 增殖并促进其凋亡。

【关键词】 平滑肌细胞;细胞增殖;细胞凋亡;Notch 通路
【中图法分类号】 R394-33;R322.12;R394.2 【文献标志码】 A

Construction of eukaryotic vector expressing Jagged1 gene and its effect on proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cells

Qian Dehui, Wu Xiaojing, Jiang Hong, Kuang Chunyan, Wang Kui, Song Mingbao, Huang Lan (Institute of Cardiovascular Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

【**Abstract**】 **Objective** To construct a recombinant eukaryotic vector expressing rat Jagged1, and to explore the effect of Jagged1 over-expression on the proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cells (VSMCs). **Methods** The full-length fragment of Jagged1 gene was obtained from the plasmid pBOS-SN3T (encoding rat Jagged1) by digestion. A eukaryotic vector expressing rat Jagged1 (p-rJagged1) was constructed with the aid of the plasmid pCMV-IRES-GFP, and then the vectors were transfected into VSMCs. The expression of Jagged1 protein was detected by Western blotting. The proliferation of VSMCs was observed by assessing the incorporation of ^{3}H-thymidine. The apoptosis of VSMCs was analyzed by flow cytometry. **Results** Recombinant plasmid p-rJagged1 was successfully constructed and transfected into VSMCs. The efficiency of transfection was over 90% after G418 screening. The protein levels of Jagged1 were increased by almost 6 folds after transfection. The proliferation of VSMCs was significantly lower[(10 265 ± 1 004) *vs* (17 584 ± 1 587) cpm/well, $P<0.01$], and the apoptotic rate of VSMCs was significantly higher[total rate of apoptosis: (32.35 ± 2.86)% *vs* (15.24 ± 1.27)%; early rate of apoptosis: (22.47 ± 2.54)% *vs* (10.22 ± 0.98)%; $P<0.01$] in the p-rJagged1 transfected group compared with those in the untransfected group. **Conclusion** A recombinant eukaryotic vector expressing rat Jagged1 is constructed. Jagged1 over-expression can suppress the proliferation and promote the apoptosis of VSMCs.

【**Key words**】 smooth muscle cells; cell proliferation; cell apoptosis; Notch pathway

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30872710). Corresponding author: Huang Lan, Tel: 86-23-68755601, E-mail: huanglans260@yahoo.cn

【基金项目】 国家自然科学基金(30872710)
【通信作者】 黄 岚,电话:(023)68755601,E-mail:huanglans260@yahoo.cn

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)生长异常是动脉粥样硬化和血管损伤后新生内膜增生等多种心血管疾病的共同病理改变[1-2]。增殖和凋亡平衡失调是引起VSMCs生长异常最重要的影响因素。Notch通路是一种存在于多种组织、进化保守的控制细胞命运的信号转导系统,它在多种细胞的增殖、凋亡、分化等多个方面有重要调控作用[3]。我们之前的研究发现,抑制相邻血管内皮细胞的Notch配体Jagged1,可促进VSMCs增殖[4],但直接上调VSMCs的Jagged1是否对其增殖及凋亡有影响目前尚不清楚。本研究采用基因重组方法,构建大鼠Jagged1真核表达载体转染至VSMCs,探索过表达Jagged1对VSMCs增殖和凋亡的影响,以期为动脉粥样硬化和新生内膜增生的基础研究和防治提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

SPF级雄性SD大鼠(2月龄,180~200g)12只,均由第三军医大学实验动物中心提供;空载体质粒pCMV-IRES-GFP、大肠杆菌DH5α为本实验室保存。胎牛血清(FBS)、DMEM/F12、G418购自美国Gibco公司;质粒pBOS-SN3T(SN3tag包含全长的大鼠Jagged1基因序列)为美国加州大学洛杉矶分校的G. Weinmaster教授惠赠。脂质体Lipofectamine™2000购自美国Invitrogen公司,核酸内切酶*Xba* Ⅰ、*Nhe* Ⅰ、*Not* Ⅰ和Wide Range DNA Marker购自TaKaRa公司;抗大鼠Jagged1抗体、抗大鼠GAPDH抗体购自美国Santa公司;Annexin V-APC/7-AAD购自南京凯基公司。

1.2 方法

1.2.1 重组大鼠Jagged1真核表达质粒的构建及鉴定 含有全长大鼠Jagged1基因的质粒pBOS-SN3T中,大鼠Jagged1基因序列两端分别有一个*Xba* Ⅰ位点,经*Xba* Ⅰ酶切后获得全长Jagged1基因的目的片段,胶回收后定向连接至经Nhe Ⅰ酶切得到的线性化的真核表达载体质粒pCMV-IRES-GFP中,得重组质粒p-rJagged1,转化、扩增细菌,酶切鉴定后回收正义表达质粒的胶,再进一步将p-rJagged1转化、扩增细菌。

1.2.2 重组质粒的转染与筛选 取3~5代的大鼠平滑肌细胞,按Lipofectamine™2000说明书操作,将带大鼠Jagged1的真核表达质粒pJagged1及空载体质粒pCMV-IRES-GFP经脂质体转入平滑肌细胞中,以600μg/ml G418筛选具有抗性的细胞克隆,挑取克隆扩大培养,3周后流式细胞仪检测GFP阳性细胞比例判断转染率。

1.2.3 大鼠主动脉平滑肌细胞培养 参考宋明宝等[5]的方法,颈椎脱臼法处死动物,无菌条件下取大鼠胸腹主动脉,剔除外膜及脂肪组织,将血管纵向剖开后剪成约1.5 mm×1.5 mm大小的组织块,用吸管将组织块平铺于瓶底,37 ℃、5% CO_2孵箱干贴壁4 h后加入含20% FBS及双抗的DMEM/F12培养基继续培养。以后每3天更换培养液1次。取3~5代的细胞用于实验。

1.2.4 Western blot检测Jagged1蛋白 首先用4 ℃预冷的PBS洗细胞3次,加入预制的含PMSF裂解液,冰上裂解30 min,裂解后,用干净的刮棒将细胞碎片和裂解液移至离心管中。4 ℃,16 000 r/min离心20 min,收集上清,取其中少量测蛋白浓度(BCA法),其余分装冻存。取等量预处理的蛋白样品上样,恒压80V进行SDS-PAGE电泳,电转至PVDF膜,5%脱脂奶粉-PBST室温封闭1 h后,加入羊抗大鼠Jagged1抗体(1∶1 000)、小鼠抗大鼠GAPDH(1∶1 000)4℃孵育过夜,再与HRP标记的兔抗羊IgG、抗鼠IgG 37 ℃孵育1 h,按ECL发光试剂盒说明书操作,凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司)曝光、照相。目的蛋白量以GAPDH相对量表示。

1.2.5 [^{3}H]-TdR掺入法检测细胞增殖能力 去血清培养平滑肌细胞6 h,使其同步化后,加入10 μl[^{3}H]-TdR,使其终浓度为37 kBq/ml。24 h后,吸弃培养液,等量PBS小心洗涤以清除游离的[^{3}H]-TdR。0.25%胰酶500 μl消化,并将细胞悬液转移入小试管。用多头细胞收集器将小试管中的细胞悬液收集于49型玻纤滤纸上。0.9% NaCl 3 ml洗涤3次后,5%的三氯醋酸2 ml淋洗2次,固定细胞;无水乙醇1 ml淋洗1次,脱水。取烘干的玻纤滤纸置入闪烁杯中,加闪烁液,暗适应3 h以上,上机检测。结果以每孔每分钟闪烁数(counts per min per well,cpm/孔)表示,掺入量反映平滑肌细胞DNA合成速率。DNA合成速率越快,细胞增殖能力越强。

1.2.6 流式细胞仪检测 取对数生长期细胞,凋亡诱导剂H_2O_2(100 mmol/L)作用6 h后,0.25%胰酶消化,0.01 mol/L PBS洗涤3次,计数细胞后以250 μl结合缓冲液重悬,制成细胞浓度1×10^6/ml的单细胞悬液。取100 μl细胞悬液于5 ml流式管中,加入5 μl Annexin V-APC和10 μl 20 μg/ml的碘化丙啶(PI)溶液,混匀后室温避光孵育15 min,在反应管中加400 μl 0.01 mol/L PBS,流式细胞仪(FACS)分析检测凋亡率,Annexin V+细胞比例为总凋亡率,Annexin V+/PI-细胞比例为早期凋亡率。

1.3 统计学分析

使用SPSS 11.5软件进行数据的统计分析,定量资料采用$\bar{x}\pm s$进行描述。3组间比较使用单因素方差分析。

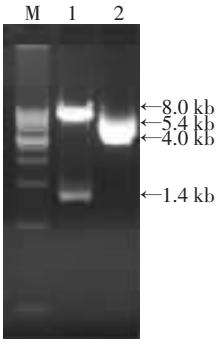
2 结果

2.1 重组质粒的酶切鉴定

经DNAstar软件分析,质粒p-rJagged1上在4 633 bp和6 166 bp处有2个*Not* Ⅰ酶切位点。因此,重组载体构建成功后,若为正义表达质粒,应用*Not*Ⅰ酶切后,理论上应释放出大小约1.4 kb的小片段和约8.0 kb的大片段。若为反义表达质粒,则酶切后释放出大小约4.0 kb和约5.4 kb 2个片段(图1)。

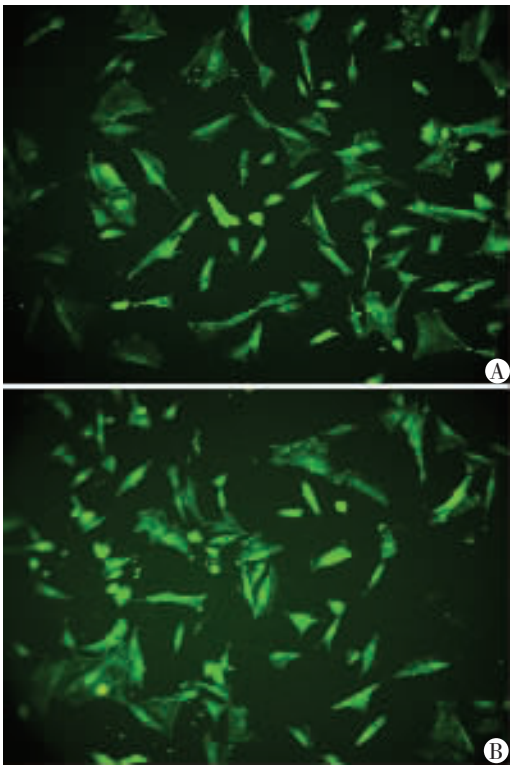
2.2 质粒转染效率测定

流式细胞仪检测的GFP阳性细胞比例即为质粒的转染效率。经G418筛选3周后,重组质粒p-rJagged1和空载体对照质粒pCMV-IRES-GFP的转染效率分别为(92.30±4.77)%和(93.65±2.33)%(图2)。



M：Wide Range DNA 标准；1：大鼠 Jagged1 基因正义表达质粒；2：大鼠 Jagged1 基因反义表达质粒

图 1 重组 p-rJagged1 质粒酶切鉴定结果

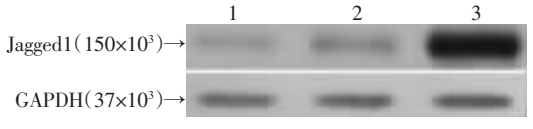


A：转染质粒 p-rJagged1；B：转染空载体

图 2 质粒 p-rJagged1 和空载体转染 VSMCs 荧光显微镜观察 （×200）

2.3 p-rJagged1 转染后 VSMCs Jagged1 蛋白表达变化

经 Western blot 检测，与未转染对照组相比，转染 p-rJagged1 后 VSMCs 的 Jagged1 蛋白水平明显增高（3.36 ± 0.32 *vs* 0.56 ± 0.04，$P < 0.01$），而空载体转染组与未转染对照组相比，Jagged1 蛋白水平无统计学差异（0.62 ± 0.05 *vs* 0.56 ± 0.04，$P > 0.05$）（图 3）。



1：VSMCs 未转染对照；2：VSMCs 转染空载体；3：VSMCs 转染质粒 p-rJagged1

图 3 Western blot 检测 VSMCs Jagged1 蛋白的表达

2.4 转染 p-rJagged1 对 VSMCs 增殖的影响

经 [^{3}H]-TdR 掺入法检测，与未转染对照组相比，转染 p-rJagged1 后 VSMCs 的增殖能力明显降低［（10 265 ± 1 004）cpm/孔 *vs*（17 584 ± 1 587）cpm/孔，$P < 0.01$］，而空载体转染组，VSMCs 的增殖能力与未转染对照组相比无统计学差异（17 090 ± 1 623）cpm/孔 *vs*（17 584 ± 1 587）cpm/孔，$P > 0.05$］。

2.5 转染 p-rJagged1 对 VSMCs 凋亡的影响

流式细胞仪检测结果显示，与未转染对照组相比，p-rJagged1 转染组 VSMCs 的总凋亡率和早期凋亡率均明显增高［总凋亡率：（32.35 ± 2.86）% *vs*（15.24 ± 1.27）%；早期凋亡率：（22.47 ± 2.54）% *vs*（10.22 ± 0.98）%；$P < 0.01$］，而空载体转染组与未转染对照组相比，两者凋亡率无统计学差异［总凋亡率：（16.02 ± 1.75）% *vs*（15.24 ± 1.27）%；早期凋亡率：（10.84 ± 1.35）% *vs*（10.22 ± 0.98）%；$P > 0.05$］。

3 讨论

Notch 信号通路广泛存在于脊椎和非脊椎动物中，与其他多个高度保守的细胞传导通路一起决定细胞的命运，影响组织形成及器官发生。在血管的发生、发展，包括细胞增殖、迁移、平滑肌分化、血管生成、动静脉分化等多个方面，Notch 信号均发挥了重要的调控作用。在血管壁中，Notch 信号系统包括 Notch 受体（Notch1 ~4）、配体（Jagged1、2 和 DLL1、3、4）及其靶基因。其中 Jagged1 被认为是唯一同时存在于内皮和平滑肌的 Notch 配体[4]。我们之前的研究发现，下调共培养内皮细胞的 Jagged1 表达，可以增加 VSMCs 增殖能力。由于之前实验的共培养体系中，内皮细胞和平滑肌细胞并未接触[4]，而是通过培养基交换细胞因子来相互影响，因此，Jagged1 是否可以直接影响 VSMCs 的生长目前尚不明确。

本实验通过基因重组获得了大鼠 Jagged1 真核表达质粒，转染后经 G418 筛选，转染率可达 90% 以上，可上调 VSMCs 的 Jagged1 蛋白水平约 6 倍。VSMCs 的 Jagged1 蛋白水平上调后，细胞增殖能力明显降低，而 H_2O_2 诱导的细胞凋亡明显增加。提示通过过表达质粒直接增加 VSMCs 的 Jagged1 蛋白水平，可以抑制 VSMCs 增殖和促进其凋亡，最终可能导致 VSMCs 数量减少。

Notch 受体和配体均是单链跨膜蛋白，由胞外域和跨膜区/胞内域组成。相邻细胞通过 Notch 受体与配体的结合触发 Notch 信号活化[4,6]。因此，本实验中上调平滑肌的 Jagged1 表达，可通过平滑肌-平滑肌间受体配体作用，激活 Notch 信号信号通路。Notch 受体与配体结合后，相继发生 2 次蛋白水解，使活化的胞内

域(NICD)释放入细胞质,进入细胞核后,NICD与DNA结合因子CSL结合,进而调节靶基因转录[7]。Jagged1抑制VSMCs增殖的机制尚不清楚,但VSMCs开始增殖的先决条件之一是平滑肌细胞由收缩型向合成型转换。SM-α-actin是平滑肌细胞的表型基因,在维持平滑肌细胞处于收缩表型中发挥重要作用。Noseda等[8]发现SM-α-actin基因启动子区域包含了与CSL一致的结合序列TGGGAA,激活CSL就能诱导内皮和成纤维细胞SM-α-actin表达,提示SM-α-actin是Notch/CSL的下游靶基因。所以可以推测本实验中上调Jagged1可能也是通过促进NICD活化,从而下调平滑肌细胞SM-α-actin表达,抑制平滑肌增殖。

另外,凋亡也是机体调节细胞生长的一种重要方式,Notch1信号不仅参与细胞增殖的调控,还可以影响细胞凋亡。Robert等[9]发现,Jagged1过表达细胞能诱导红细胞凋亡,而阻断其Notch1活性则能抑制红细胞凋亡。在肿瘤领域的研究中也发现,Jagged1可促进乳腺B淋巴样细胞,神经祖细胞和卵巢癌细胞凋亡[10-12]。上述研究均与本研究相似,提示Jagged1具有促细胞凋亡作用。然而在对乳腺上皮细胞和宫颈癌细胞的研究中发现[13-14],Jagged1具有保护凋亡的作用。因此可以推测Jagged1对细胞凋亡的影响具有高度的细胞特异性,其机制目前尚不明确。Yang等[11]发现,Notch激活可以上调核因子p53水平,进而增加其靶基因促凋亡线粒体膜蛋白Bax表达,而既往的研究已明确Bax蛋白增多具有促进凋亡的作用。因此VSMCs的Jagged1上调可能通过激活Notch,进而增加Bax表达而发挥促凋亡作用。

血管损伤后平滑肌增生参与形成新生内膜是机体对损伤血管的修复反应,但过度的平滑肌增生往往导致血管管腔丢失,引起脉管阻塞。Lindner等[15]和我们之前的研究[4]均发现血管损伤后损伤局部的Jagged1上调。结合本研究结果提示Jagged1上调可能是机体的一种内源性保护机制,其生理作用不仅包括抑制平滑肌细胞过度增殖,还包括促进平滑肌细胞凋亡。综上所述,在体外实验中,通过转染Jagged1表达质粒上调VSMCs的Jagged1可以抑制对其增殖和促进其凋亡,但其具体机制和在体内的作用情况还有待进一步研究。

参考文献:

[1] 郭付有,宋来君,孙红卫,等. 破裂颅内动脉瘤组织中Caspase-3 mRNA的表达与血管平滑肌细胞的凋亡测定[J]. 郑州大学学报(医学版),2007,42(5):877-878.

[2] 刘宏,高云华,夏红梅. 趋化因子受体4与血管内皮生长因子在兔动脉粥样硬化斑块演进中的表达变化及意义[J]. 第三军医大学学报,2010,32(16):1694-1697.

[3] Hofmann J J, Iruela-Arispe M L. Notch signaling in blood vessels: who is talking to whom about what? [J]. Circ Res, 2007, 100(11): 1556-1568.

[4] Wu X, Zhou Q, Huang L, *et al*. Ageing-exaggerated proliferation of vascular smooth muscle cells is related to attenuation of Jagged1 expression in endothelial cells[J]. Cardiovasc Res, 2008, 77(4): 800-808.

[5] 宋明宝,于学军,朱光旭,等. 双层共培养模型中缝隙连接在内皮细胞调节平滑肌细胞增殖能力中的作用[J]. 第三军医大学学报,2009,31(4):285-289.

[6] 杨东虹,唐文渊,徐伦山,等. Notch1胞内结构域在星形细胞肿瘤中的表达及其临床意义[J]. 第三军医大学学报,2010,32(20):2189-2192.

[7] 巩天晓,刘红涛,鲁照明,等. Notch1-NICD胞内结构域真核表达载体的构建及其初步功能分析[J]. 郑州大学学报:医学版,2009,44(3):468-472.

[8] Noseda M, Fu Y, Niessen K, *et al*. Smooth muscle alpha-actin is a direct target of Notch/CSL[J]. Circ Res, 2006, 98(12): 1468-1470.

[9] Robert-Moreno A, Espinosa L, Sanchez M J, *et al*. The notch pathway positively regulates programmed cell death during erythroid differentiation[J]. Leukemia, 2007, 21(7): 1496-1503.

[10] Romer S, Saunders U, Jack H M, *et al*. Notch1 enhances B-cell receptor-induced apoptosis in mature activated B cells without affecting cell cycle progression and surface IgM expression[J]. Cell Death Differ, 2003, 10(7): 833-844.

[11] Yang X, Klein R, Tian X, *et al*. Notch activation induces apoptosis in neural progenitor cells through a p53-dependent pathway[J]. Dev Biol, 2004, 269(1): 81-94.

[12] Wang M, Wu L, Wang L, *et al*. Down-regulation of Notch1 by gamma-secretase inhibition contributes to cell growth inhibition and apoptosis in ovarian cancer cells A2780[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 393(1): 144-149.

[13] Meurette O, Stylianou S, Rock R, *et al*. Notch activation induces Akt signaling via an autocrine loop to prevent apoptosis in breast epithelial cells[J]. Cancer Res, 2009, 69(10): 5015-5022.

[14] Perumalsamy L R, Nagala M, Sarin A. Notch-activated signaling cascade interacts with mitochondrial remodeling proteins to regulate cell survival[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(15): 6882-6887.

[15] Lindner V, Booth C, Prudovsky I, *et al*. Members of the Jagged/Notch gene families are expressed in injured arteries and regulate cell phenotype via alterations in cell matrix and cell-cell interaction[J]. Am J Pathol, 2001, 159(3): 875-883.

(收稿:2011-02-09 修回:2011-03-14)

(编辑 王 红)