论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201409063

胰岛素下调 AP-1 抑制血管平滑肌 α 肌动蛋白的表达以及对细胞增殖的影响

彭 岩[1],章 波[2],仲伟天[1],许雪清[1],白 云[2],王旭开[1] (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所心血管内科,重庆市心血管病研究所[1];400038 重庆,第三军医大学基础医学部医学遗传学教研室[2])

[摘要] **目的** 研究胰岛素诱导大鼠血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell,VSMC)转录因子激活蛋白-1(activator protein 1,AP-1)表达下调对 VSMC 表型转换标志蛋白 α 肌动蛋白(alpha smooth muscle actin,SM-α)表达调控及细胞增殖的影响。**方法** 流式细胞术检测不同浓度(0、25、50、100、125 nmol/L)的胰岛素刺激 VSMC 24 h 后的细胞周期。设计 AP-1 表达质粒载体,转染至血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)。分为4组:空白对照组、胰岛素实验组、AP-1 表达载体组、胰岛素 + AP-1 表达载体组。分别采用 Western blot、RT-PCR 检测 AP-1 蛋白及 SM-α 蛋白的表达及 mRNA 水平。**结果** 细胞周期分布结果显示,不同浓度的胰岛素刺激 VSMC 24 h 后,VSMC 的 S 期百分比升高至峰值后开始下降[(23.49 ± 1.17)%、(28.08 ± 0.68)%、(30.44 ± 1.77)%、(47.47 ± 0.88)%、(46.23 ± 1.65)%,$P<0.05$],100 nmol/L 的胰岛素刺激 VSMC 24 h 后,VSMC 的 S 期百分比达到峰值(47.47 ± 0.88)。RT-PCR 及 Western blot 检测结果显示,胰岛素刺激 VSMC 可下调 AP-1[(0.47 ± 0.09)、(0.46 ± 0.14),$P<0.05$]及抑制 SM-α 的表达[(0.41 ± 0.03)、(0.32 ± 0.03),$P<0.05$]。**结论** 胰岛素能下调转录因子 AP-1 表达,进而抑制表型转换标志蛋白 SM-α 的表达,诱导 VSMC 发生增殖。

[关键词] 胰岛素;血管平滑肌细胞;平滑肌肌动蛋白-α;激活蛋白-1
[中图法分类号] R322.12;R329.28;R347.8 [文献标志码] A

Insulin inhibits SM-α expression by down-regulating AP-1 and induces cell proliferation in rat vascular smooth muscle cells

Peng Yan[1], Zhang Bo[2], Zhong Weitian[1], Xu Xueqing[1], Bai Yun[2], Wang Xukai[1] ([1]Department of Cardiology, Institute of Cardiovascular Diseoses Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042; [2]Department of Medical Genetics, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of down-regulating insulin-induced transcription activator protein 1 (AP-1) on the expression regulation of alpha smooth muscle actin (SM-α) and cell proliferation in rat vascular smooth muscle cells (VSMCs). **Methods** Flow cytometry was employed to analyze the cell cycle of VSMCs after treatment of 0, 25, 50, 100 and 125 nmol/L insulin for 24 h. Plasmid vector encoding AP-1 gene was designed and then transfected into VSMCs. Meanwhile there were 4 groups of VSMCs, that is, control, insulin treatment, AP-1 expression vector, and insulin + AP-1 expression vector group. The expression of AP-1 and SM-α at protein and mRNA levels was detected by Western blotting and RT-PCR respectively. **Results** Flow cytometry results showed that after stimulating of insulin at different concentrations (0, 25, 50, 100 and 125 nmol/L), the percentage of the cells at S phase was risen to a peak and then declined after rising [(23.49 ± 1.17)%, (28.08 ± 0.68)%, (30.44 ± 1.77)%, (47.47 ± 0.88)% and (46.23 ± 1.65)%, $P<0.05$]. The peak of the amount of S phase cells were the VSMCs treated by 100 nmol/L insulin [(47.47 ± 0.88)%]. Western blotting and RT-PCR showed that insulin down-regulated the expression of AP-1 (0.46 ± 0.14 and 0.47 ± 0.09) ($P<0.05$) and suppressed the expression of SM-α (0.32 ± 0.03 and 0.41 ± 0.03) ($P<0.05$) by stimulating VSMCs. **Conclusion** Insulin suppresses the expression of SM-α by down-regulating the expression of AP-1 to induce the proliferation of VSMCs.

[**Key words**] insulin; vascular smooth muscle cells; alpha smooth muscle actin; activator protein-1

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81170281). Corresponding author: Wang Xukai, E-mail: wangxuk@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81170281)
[通信作者] 王旭开,E-mail: wangxuk@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141208.1427.017.html(2014-12-08)

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)表型转换是由分化的静止收缩表型转换为去分化的合成分泌表型,从而导致 VSMC 增殖、迁移能力增强[1]。研究证实,胰岛素干预培养的 VSMC 后,VSMC 发生了表型转换,其增殖及迁移能力明显增强[2],并且决定 VSMC 分化的静止收缩型的标志蛋白 α 肌动蛋白(alpha smooth muscle actin, SM-α)显著下调[3],最终促使 VSMC 生物学功能异常,该过程在人类和大鼠均可观察到[4]。

激活蛋白-1(activator protein 1, AP-1)是细胞内的一个转录因子,由 c-Jun 和 c-Fos 蛋白家族组成的异二聚体[5]。在不同的组织细胞,激活的 AP-1 能结合特定的基因序列,控制着分化、凋亡等细胞进程。在 VSMC 中,AP-1 能结合于 SM-α 启动子特异区域的一段序列,从而进一步引起下游的反应[6]。但是,在胰岛素诱导 VSMC 表型转换中,SM-α 基因表达下调是否与 AP-1 有关尚不清楚,胰岛素促进 VSMC 表型转换是否是通过 AP-1 调控 SM-α 基因表达下调来实现有待探究。因此,本实验通过胰岛素、AP-1 表达载体及胰岛素 + AP-1 表达载体干扰大鼠 VSMC,探讨胰岛素诱导 VSMC 表型转换标志基因 SM-α 表达下调与转录因子 AP-1 之间的关系。

1 材料与方法

1.1 质粒、细胞和主要试剂

SM-α 启动子特异区域转录因子 AP-1 结合位点的序列参照 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_007392.3。AP-1 表达载体质粒购于广州复能基因有限公司;质粒转化宿主菌大肠杆菌 XL1-Blue 由第三军医大学基础医学部医学遗传学教研室章波教授惠赠;SD 大鼠 VSMC 株购自美国 ATCC。Real-time PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司;质粒提取试剂盒购自 Omega 公司;Lipofectamine 2000 转染试剂购自上海联硕公司;DMEM 细胞培养基和胰酶消化液均购自赛默飞世尔公司;胎牛血清购自成都哈里生物公司;AP-1 鼠单克隆抗体购自密理博公司;SM-α 鼠单克隆抗体和辣根酶标记山羊抗兔 IgG 二抗均购自中杉金桥生物技术有限公司;AP-1 基因及 SM-α 启动子区特异序列引物合成为上海生工生物工程有限公司。

1.2 转染及分组

将对数生长期的 VSMC 按每孔 2×10^5 个分 4 组接种于 6 孔板上:空白对照组、胰岛素干扰组、AP-1 表达载体组、胰岛素 + AP-1 表达载体组($n=3$)。将接种好的培养板放置 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后,参照说明书用 Lipofectamine 2000 转染试剂转染,24 h 后在荧光显微镜下观察。

1.3 流式细胞仪检测细胞周期

分别收集空白对照组与不同浓度(25、50、100、125 nmol/L)胰岛素干扰组的细胞($n=3$),PBS 洗涤,70% 乙醇 4 ℃固定过夜,离心后弃上清,PBS 洗涤,加 100 μL RNase 于 37 ℃水浴 30 min,加入 500 μL 碘化丙啶(50 μg/mL)染液 4 ℃避光 30 min,上机检测。

1.4 Western blot 检测 AP-1 及 SM-α 蛋白表达

收集以上分组的细胞,加入 80 μL 预冷的细胞裂解液,超声破碎仪破碎提取各组总蛋白,测定浓度后常规进行 SDS-PAGE 电泳。95 V 电泳 120 min,15 V 电转入 DVPF 膜约 50 min,封闭液 4 ℃封闭 2 h,分别加入兔抗大鼠 AP-1(1∶2 000),兔抗大鼠 SM-α(1∶2 000),4℃孵育过夜,PBST 漂洗 3 次后加入辣根酶标记山羊抗兔 IgG(1∶2 000),室温孵育 1 h,PBST 漂洗 3 次后 ECL 显影液显色,Bio-Rad 凝胶成像系统扫描成像。以磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内参参照,用 Quantity One 软件分析条带灰度值。

1.5 RT-PCR 检测 AP-1 及 SM-α 的 mRNA 表达

提取以上分组细胞的总 RNA,按 TaKaRa 试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA。在 Bio-Rad PCR 上进行定量 PCR 反应,其反应总体系包括:2 × SYBR Premix Ex Taq^{TM} Ⅱ,去离子水,PCR 上游引物,PCR 下游引物,模板为 cDNA。反应条件为:95 ℃预变性 5 min;95 ℃ 10 s,58 ℃ 20 s,72 ℃ 30 s,共 45 个循环。AP-1 上游引物:5′-CTCAGCAACTTCAACCCG-3′,下游引物:5′-GCACTTGGAGGCAGCGAT-3′,扩增片段为 260 bp;SM-α 上游引物:5′- CGGGCATCCACGAAACCA-3′,下游引物:5′-CCGCCGATCCAGACAGAA-3′,扩增片段为 200 bp,内参 GAPDH 上游引物:5′-TCTGCTCCTCCCT-GTTC-3′,下游引物:5′-CACCCCATTTGATGTTAG-3′,扩增片段为 327 bp。

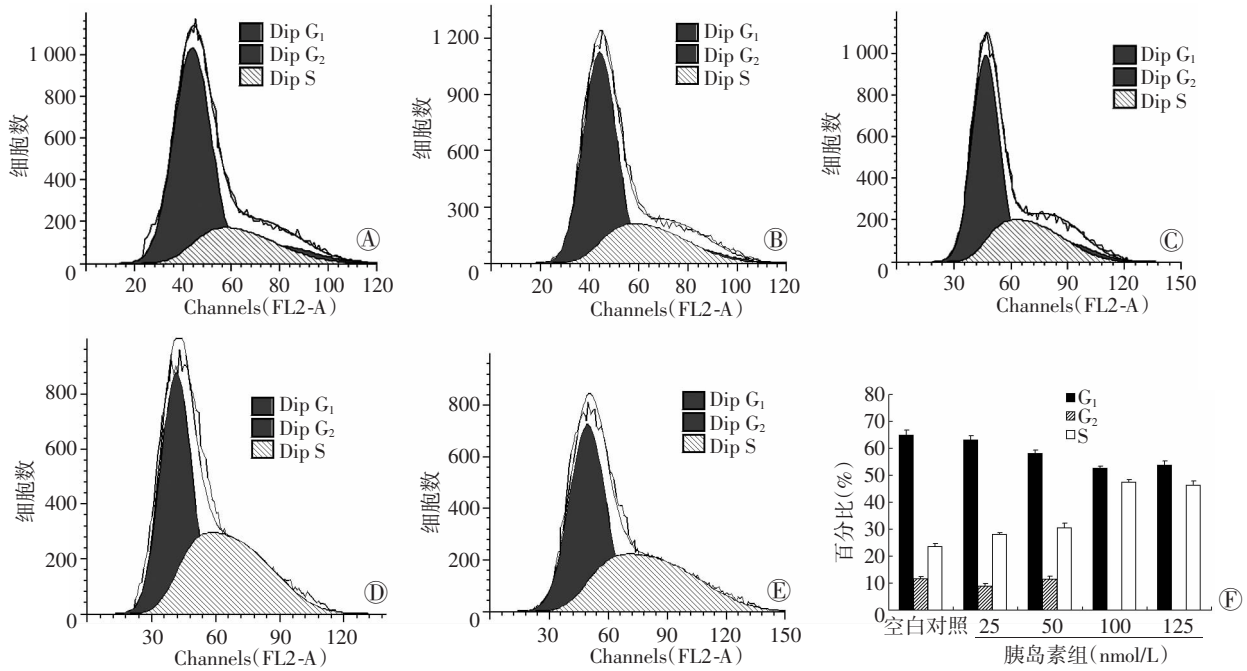
1.6 统计学分析

计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件对实验数据进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 胰岛素对 VSMC 细胞周期的影响

如图 1 所示,不同浓度的胰岛素体外处理大鼠 VSMC 24 h 后,处于 S 期的细胞百分比呈现先上升后下降的趋势。该结果显示,胰岛素作用于 VSMC,使 S 期的比例增加,引起 VSMC 发生表型转换,进而导致 VSMC 增殖,差异有统计学意义($P<0.05$),在 100 nmol/L 的浓度下,发挥的效应最佳,因此,我们选择 100 nmol/L 的胰岛素浓度进行后续的实验。

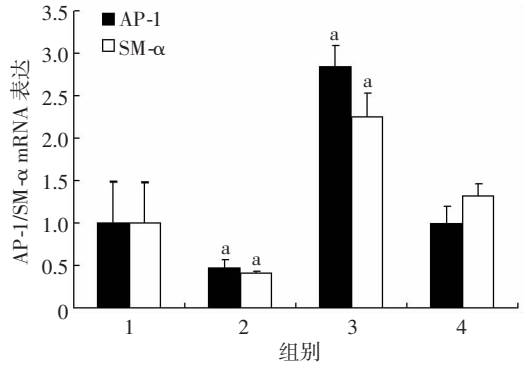


A:空白对照组;B:25 nmol/L 胰岛素组;C:50 nmol/L 胰岛素组;D:100 nmol/L 胰岛素组;E:125 nmol/L 胰岛素组;F:各组 S 期百分比($n=3$)

图1 各组 VSMC 细胞周期流式细胞仪检测结果与定量分析结果

2.2 胰岛素对 AP-1、SM-α mRNA 的影响

与空白对照组比较,胰岛素组中 AP-1、SM-α 的 mRNA 水平同时下降($P<0.05$),AP-1 表达载体组中 AP-1、SM-α 的 mRNA 水平同时升高($P<0.05$),而胰岛素 + AP-1 表达载体组中 AP-1、SM-α 的 mRNA 水平无明显变化($P>0.05$,图2)。

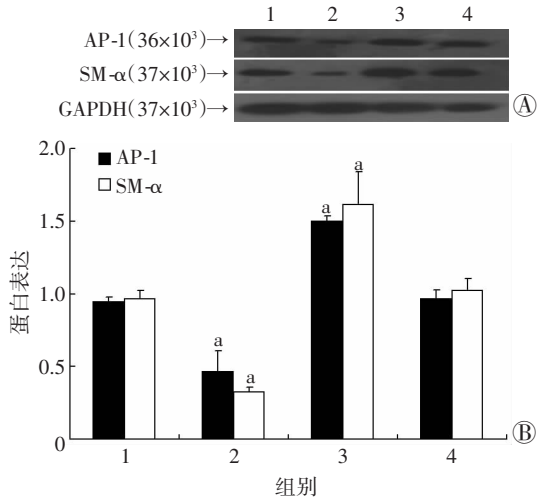


1:空白对照组;2:胰岛素组干扰组;3:AP-1 表达载体组;4:胰岛素 + AP-1 表达载体组 a:$P<0.05$,与空白对照组比较

图2 RT-PCR 检测胰岛素诱导 VSMC 的 AP-1、SM-α mRNA 表达

2.3 胰岛素对 AP-1、SM-α 蛋白表达的影响

AP-1 蛋白表达水平:与空白对照组比较,胰岛素 + AP-1 表达载体组无明显变化($P>0.05$),胰岛素干扰组明显下降($P<0.01$),而 AP-1 表达载体组明显升高($P<0.01$)。SM-α 蛋白表达水平:与空白对照组比较,胰岛素 + AP-1 表达载体组无明显变化($P>0.05$),胰岛素干扰组明显下降($P<0.01$),而 AP-1 表达载体组明显升高($P<0.01$,图3)。AP-1 蛋白表达水平与 SM-α 蛋白表达水平的变化趋势相一致。



1:空白对照组;2:胰岛素干扰组;3:AP-1 表达载体组;4:胰岛素 + AP-1 表达载体组

A:Western blot 检测结果;B:半定量分析结果 a:$P<0.01$,与空白对照组比较

图3 Western blot 检测胰岛素诱导 VSMC 的 AP-1、SM-α 蛋白表达水平

3 讨论

临床资料显示,患病多年的2型糖尿病患者长时

间地应用高剂量胰岛素后,其合并大血管动脉粥样硬化的概率明显增高[7-8],可能与 VSMC 由分化的静止收缩表型转换为去分化的合成分泌表型[9]。本研究通过不同浓度的胰岛素刺激 VSMC 体外培养 24 h 后,采用流式细胞术检测其细胞周期,发现 S 期百分比呈浓度依赖性的升高,并且在 100 nmol/L 的浓度下达到峰值后开始小幅度的下降。因此,我们推测胰岛素作用于 VSMC 的 S 期,引起 VSMC 发生表型转换,进而导致 VSMC 增殖。

SM-α 是 VSMC 细胞骨架的结构蛋白,其在细胞运动及收缩中起了关键性的作用[10]。当血流发生异常、血胆固醇升高、血管内皮损伤等因素引起血管壁斑块形成时,观察到 VSMC 中 SM-α 的表达大大降低[11]。Kee 等[12]发现 SM-α 基因是分化静止收缩表型的 VSMC 中高表达的基因标记之一,当分化的静止收缩表型的 VSMC 向去分化的合成分泌表型转换时,细胞中 SM-α 的量大大降低。Crawford 等[13]发现,缺少 SM-α 的鼠由于 VSMC 生长及功能异常,在出生后不久就死亡了。AP-1 是细胞内的一个转录激活因子。通过特定的保守序列与一定的受体和一些信号通路蛋白的基因结合来启动基因的表达,从而控制了许多细胞进程,包括分化、凋亡等[14]。有研究发现,VSMC 中 AP-1 能维持其分化的静止收缩表型[15]。并发现 AP-1 在静止收缩表型的 VSMC 中表达升高且其引导的与维持 VSMC 静止收缩型相关的下游信号通路表现活跃[16]。因而推测:胰岛素诱导 VSMC 表型转换决定基因 SM-α 下调与转录因子 AP-1 可能存在相关性。实验证实,上调 VSMC 中 AP-1 表达,VSMC 表型决定基因 SM-α 表达上调,胰岛素可以抑制 AP-1 上调 SM-α 的表达水平。

本实验结果提示:胰岛素诱导 VSMC 表型转换决定基因 SM-α 下调与转录因子 AP-1 的表达下调相关,最终引起了 VSMC 的表型转换导致其发生增殖,为胰岛素诱导 VSMC 表型转换的内在机制深入研究提供了新的研究靶点。本研究仅观察胰岛素诱导增殖时SM-α 表达下调的现象是否与该基因启动子区转录因子 AP-1 相关,其机制有待深入研究。

参考文献:

[1] Zhang J, Zheng B, Zhou P P, *et al*. Vascular calcification is coupled with phenotypic conversion of vascular smooth muscle cells through KLF5-mediated transactivation of the Runx2 promoter[J]. Biosci Rep, 2014, [Epub ahead of print].

[2] Cersosimo E, Xu X, Upala S, *et al*. Acute insulin resistance stimulates and insulin sensitization attenuates vascular smooth muscle cell migration and proliferation[J]. Physiol Rep, 2014, 2(8): e12123.

[3] Bhattacharyya A, Lin S, Sandig M, *et al*. Regulation of vascular smooth muscle cell phenotype in three-dimensional coculture system by Jagged1-selective Notch3 signaling[J]. Tissue Eng Part A, 2014, 20(7/8): 1175-1187.

[4] Wang C C, Gurevich I, Draznin B. Insulin affects vascular smooth cell phenotype and migration *via* distinct signaling pathways[J]. Diabetes, 2003, 52(10): 2562-2569.

[5] Milde-Langosch K. The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis[J]. Eur J Cancer, 2005, 41(16): 2449-2461.

[6] Zhang H W, Zhang T, Shen B Z, *et al*. Toxicological insight from AP-1 silencing study on proliferation, migration, and dedifferentiation of rat vascular smooth muscle cell[J]. Cardiovasc Toxicol, 2012, 12(1): 25-38.

[7] Sun X, Han F, Yi J, *et al*. The effect of telomerase activity on vascular smooth muscle cell proliferation in type 2 diabetes *in vivo* and *in vitro*[J]. Mol Med Rep, 2013, 7(5): 1636-1640.

[8] 王旭开, 杨成明, 王红勇, 等. 医源性不同胰岛素剂量对中年 2 型糖尿病患者合并冠状动脉事件的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13(3): 345-347.

[9] Allahverdian S, Chehroudi A C, Mcmanus B M, *et al*. Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis[J]. Circulation, 2014, 129(15): 1551-1559.

[10] Weymouth N, Shi Z, Rockey D C. Smooth muscle α actin is specifically required for the maintenance of lactation[J]. Dev Biol, 2012, 363(1): 1-14.

[11] Chen C H, Ho H H, Wu M L, *et al*. Modulation of cysteine-rich protein 2 expression in vascular injury and atherosclerosis[J]. Mol Biol Rep, 2014, 41(11): 7033-7041.

[12] Kee H J, Kim G R, Cho S N, *et al*. miR-18a-5p MicroRNA Increases Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation by Downregulating Syndecan4[J]. Korean Circ J, 2014, 44(4): 255-263.

[13] Crawford K, Flick R, Close L, *et al*. Mice lacking skeletal muscle actin show reduced muscle strength and growth deficits and die during the neonatal period[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(16): 5887-5896.

[14] Lazenka M F, David B G, Lichtman A H, *et al*. Delta FosB and AP-1-mediated transcription modulate cannabinoid CB1 receptor signaling and desensitization in striatal and limbic brain regions[J]. Biochem Pharmacol, 2014, 91(3): 380-389.

[15] Zhao J, Imbrie G A, Baur W E, *et al*. Estrogen receptor-mediated regulation of microRNA inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013, 33(2): 257-265.

[16] Guo Y, Fan Y, Zhang J, *et al*. Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1β (PGC-1β) protein attenuates vascular lesion formation by inhibition of chromatin loading of minichromosome maintenance complex in smooth muscle cells[J]. J Biol Chem, 2013, 288(7): 4625-4636.

(**收稿**:2014-09-09;**修回**:2014-10-11)

(编辑 栾 嘉)