

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.16.003

时钟基因 Bmal1 促进血管平滑肌细胞增殖 *

王 媛¹ 王钧左¹ 陈 励² 严溢泉² 赵星成^{1△} 孙喜庆¹

(空军军医大学 1 航空航天医学训练教研室; 2 航空航天生理学教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的:观察时钟基因 Bmal1 的过表达对血管平滑肌细胞增殖的影响,进一步探讨生物节律对于血管发育的具体影响。**方法:**采用包装 GV341-Bmal1 载体的慢病毒转染的方法构建大鼠胸主动脉平滑肌细胞 (A7R5) 稳定转染 Bmal1 的细胞系,实时定量 PCR 和细胞爬片 Bmal1 的免疫荧光染色的方法判断所构建细胞系是否稳定过表达 Bmal1,细胞爬片 Ki67 的免疫荧光染色的方法观察时钟基因 Bmal1 的过表达对血管平滑肌细胞增殖的影响。**结果:**实时定量 PCR 结果显示稳定转染 Bmal1 组细胞 Bmal1 的表达是对照组的 11.2 倍 ($P<0.01$);细胞爬片的免疫荧光染色结果显示稳定转染 Bmal1 组细胞 BMAL1 的表达明显升高 ($P<0.05$),且稳定转染 Bmal1 组 Ki67 阳性细胞比例明显升高 ($P<0.05$)。**结论:**通过慢病毒转染的方法成功构建了血管平滑肌细胞稳定转染 Bmal1 的细胞系,细胞片 Ki67 的免疫荧光染色结果显示 Bmal1 的过表达促进了血管平滑肌细胞的增殖。

关键词:Bmal1;血管平滑肌细胞;增殖;昼夜节律

中图分类号:R331.2;R329.28;Q593;Q813 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2022)16-3010-04

Clock Gene Bmal1 Promotes Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cell*

WANG Yuan¹, WANG Jun-zuo¹, CHEN Li², YAN Yi-quan², ZHAO Xing-cheng^{1△}, SUN Xi-qing¹

(1 Department of Aerospace Medical Training; 2 Department of Aerospace Physiology, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To observe the effect of overexpression of clock gene Bmal1 on the proliferation of vascular smooth muscle cells and investigate potential role mechanism of biological rhythms on vascular development through experiments. **Methods:** The method of lentiviral transfection packaging GV341-Bmal1 vector was used to construct rat thoracic aortic smooth muscle cells (A7R5) stably transfected with Bmal1 cell line. Real-time fluorescent quantitative PCR (RT-PCR) and immunofluorescence staining of Bmal1 on the cells grown on coverslips were used to determine whether the stable transfected cell line overexpressed Bmal1 stably. Immunofluorescence staining of Ki67 on the cells grown on coverslips was used to observe the effect of overexpression of clock gene Bmal1 on the proliferation of vascular smooth muscle cells. **Results:** The results of Real-time fluorescent quantitative PCR showed that the expression of Bmal1 in cells stably transfected with Bmal1 was 11.2 times higher compared to control group ($P<0.01$). The results of immunofluorescence staining of the cells grown on coverslips showed that the expression of BMAL1 was significantly increased in stable transfected cell lines ($P<0.05$). Furthermore, compared to the control group, the proportion of Ki67 positive cells was also increased significantly in vascular smooth muscle cells stably transfected with Bmal1 ($P<0.05$). **Conclusion:** We have established a vascular smooth muscle cell line with Bmal1 overexpressed stably by Lentiviral transfection method. Through observing immunofluorescence staining of Ki67 on the cells grown on coverslips, we have found that overexpression of Bmal1 promoted the proliferation of vascular smooth muscle cells.

Key words: Bmal1; Vascular smooth muscle cell; Proliferation; Circadian rhythm

Chinese Library Classification(CLC): R331.2; R329.28; Q593; Q813 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)16-3010-04

前言

人体血压的变化具有昼夜节律性,主要表现为白昼血压水平较高,夜晚睡眠时血压水平较低^[1,2]。正常人白天交感神经活动占优势,夜晚副交感神经活动占优势,心输出量减少,全身肌肉松弛,外周血管阻力下降,因此夜间血压下降。血压这种节律性变化对适应机体活动,保护心血管结构和功能、保护心肝肾

等重要脏器具有重要意义^[3-5]。

人 Bmal1 基因由 20 个外显子组成,位于 11 号染色体短臂 (11p15)。Bmal1 基因编码蛋白 BMAL1,属于 bHLH-PAS 结构域转录因子家族,是一种调节生物节律的重要转录因子,处于时钟体系的上游^[6,7]。BMAL1 是核心生物钟基因的关键元素,该基因的缺失会导致哺乳动物所有节律完全消失^[8]。Bmal1 基因在维持昼夜血压方面和调节血管生理功能上有着重要的作用。

* 基金项目:陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2020JM-317);国家自然科学基金项目(81803098)

作者简介:王媛(1999-),女,本科,主要研究方向:血管与生物节律,E-mail: 2825744502@qq.com

△ 通讯作者:赵星成,男,博士,副教授,主要研究方向:血管与生物节律,E-mail: xingcheng_zhao@163.com

(收稿日期:2021-12-11 接受日期:2021-12-30)

血管平滑肌细胞(Vascular smooth muscle cells, VSMCs)主要存在于血管壁的中层,在维持血管稳态中起着重要作用,然而,异常的 VSMC 增殖可能会导致各种心血管疾病的发展,包括动脉粥样硬化、高血压和新内膜形成等^[9]。平滑肌细胞条件性剔除 Bmal1 会使血压降低、脉压升高,血压昼夜波动幅度减小,脉压昼夜节律消失。进一步的研究发现,Bmal1 调节血管收缩是通过靶向调节 ROCK2 的表达实现的^[8]。在血管外周脂肪组织(PVAT)中的 Bmal1 敲除会导致小鼠静息状态的血压下降,Bmal1 可调控血管紧张素 II (Ang II)昼夜表达的变化,通过作用于血管壁的平滑肌细胞,调节血压和血管活性的变化呈现出昼夜节律的特点^[10]。以往的研究表明,时钟基因 Bmal1 能够调节血压的节律性变化,而血管舒缩活动主要取决于血管平滑肌细胞,Bmal1 虽然能够调节血压的节律性变化,但其在血管平滑肌细胞中的功能还不完全清楚。本实验我们主要通过慢病毒转染的方式,研究大鼠胸主动脉平滑肌细胞(A7R5)过表达 Bmal1 后增殖的变化,为进一步研究血压昼夜节律调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大鼠胸主动脉平滑肌细胞(A7R5)购自美国 ATCC 公司,RPMI-1640 细胞培养基购自美国 Gibco 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,PBS 缓冲液购自北京金克隆公司,胰蛋白酶购自美国 Corning 公司,Hoechst 染料购自美国 Sigma 公司,Bmal1 (Arntl)过表达慢病毒委托上海吉凯基因公司定制,Ki67 抗体 (#ab16667) 购自美国 Abcam 公司,BMAL1 抗体 (#ab3350) 购自美国 Abcam 公司,FITC 标记山羊抗兔二抗 (#SA00003-11) 购自美国 Proteintech 公司,Cy3 标记山羊抗兔二抗 (#SA00009-2) 购自美国 Proteintech 公司,共聚焦显微镜购自德国 Carl Zeiss 公司,实时定量 PCR 试剂盒购自日本 Takara 公司,实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 稳定转染 Bmal1 的 A7R5 细胞系构建 将 A7R5 细胞系接种于 6 孔板 (约 2×10^5 细胞 / 孔)。第二天将包装 GV341-Bmal1 载体的慢病毒 (对照组为包装 GV341 空载体的慢病毒)从 -80°C 冰箱取出,放在冰上融化,取适量病毒原液,加 Enhanced Infection Solution 稀释使其滴度为 1×10^8 TU/mL。将 $20 \mu\text{L}$ 病毒加入 6 孔板,RPMI-1640 细胞培养基补充至 1 mL,水平方向混匀,培养 (8-12)h 后观察细胞状态,24 h 后更换新鲜培养基并加入嘌呤霉素至浓度 2 mg/mL ,连续筛选 8 天,每两天换一次培养液。

1.2.2 实时定量 PCR 检测 收集转染慢病毒的 A7R5 细胞,每份样品 (约 1×10^6 细胞)加入 1 mL Trizol,移液器反复吹打后加入 0.2 mL 氯仿,剧烈振荡 15 s,室温放置 3 min, 4°C 条件下 $10\,000 \text{ r/min}$ 离心 15 min,吸取上层水相;在水相中加 0.5 mL 异丙醇,室温放置 10 min, 4°C 条件下 $10\,000 \text{ r/min}$ 离心 10 min,弃去上清;加入浓度为 750 mL/L 的乙醇 1 mL 清洗沉淀, 4°C 条件下 $7\,500 \text{ r/min}$ 离心 5 min,弃去上清,室温干燥 RNA 沉淀,加入 $50 \mu\text{L}$ (视 RNA 的量而定)无 RNase 的水,RNA 定量后反转录为 cDNA。采用 Takara 公司的实时定量试剂盒进行实时定量

PCR,方法参照试剂盒说明书配制实时定量反应体系,SYBR premix Ex Taq $12.5 \mu\text{L}$,上游引物 $0.5 \mu\text{L}$,下游引物 $0.5 \mu\text{L}$,ROX 0.5 mL ,cDNA 1 mL ,双蒸水 10 mL 。使用实时定量 PCR 仪进行反应。反应条件: 95°C 30 s 预变性; 95°C 5 s, 60°C 34 s,40 个循环。引物序列 -Actin P1: GCGCGCACCACCATGTACCCT, P2: AGGGGCCGGACTCGTCATACT; Bmal1 P1: GCCCACT-GAACATCACAAGT, P2: TAAAGTCAACGGGACCACC。

1.2.3 细胞爬片的免疫荧光染色 使用 $f12 \text{ mm}$ 的盖玻片,用锡纸包裹经高压蒸汽灭菌箱消毒。取出无菌 24 孔板,先加少量培养基 (以使盖玻片与培养皿紧密接触),将盖玻片小心放入。用胰酶消化好细胞,充分吹打使之成为单细胞悬液,细胞计数后接种于 24 孔板 (约 2×10^4 细胞 / 孔),24 h 后取出爬片。将爬片置于 PBS 中洗 3 次,每次 5 min,用浓度为 40 mL/L 的多聚甲醛固定 15 min,然后再用 PBS 浸洗玻片 3 次,每次 10 min。加入 BSA 封闭 30 min,按相应稀释浓度加入一抗 (BMAL1 或 Ki67 抗体), 4°C 孵育过夜。用 PBS 浸洗爬片 3 次,每次 10 min,加入 Cy3 或 FITC 标记的荧光二抗 ($1:500$ 稀释)孵育 1 h,PBS 浸洗 3 次,每次 10 min。Hoechst 染核 10 min,PBS 浸洗 3 次,每次 10 min。用浓度为 500 mL/L 的甘油封片后在荧光显微镜下观察,共聚焦显微镜拍照。

1.3 统计学处理

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组数据的组间比较采用 student t 检验, $P \leq 0.05$ 为有统计学差异,绘图和统计软件使用 Graph-Pad Prism 8。

2 结果

2.1 稳定转染 Bmal1 基因的 A7R5 细胞系构建

A7R5 细胞转染慢病毒载体 GV341-Bmal1 后实时定量 PCR 检测 Bmal1 基因表达结果显示,稳定转染 GV341-Bmal1 组细胞 Bmal1 的表达是对照组的 11.2 倍 ($P=0.008$),见图 1;免疫荧光染色检测 BMAL1 蛋白表达结果显示,相比于对照组,稳定转染 GV341-Bmal1 组 BMAL1 蛋白表达更高,对照组平均每个细胞 BMAL1 阳性信号面积为 40.5 mm^2 ,稳定转染 GV341-Bmal1 组平均每个细胞 BMAL1 阳性信号面积为 79.5 mm^2 ($P=0.01$),见图 2。

2.2 时钟基因 Bmal1 对血管平滑肌细胞增殖的影响

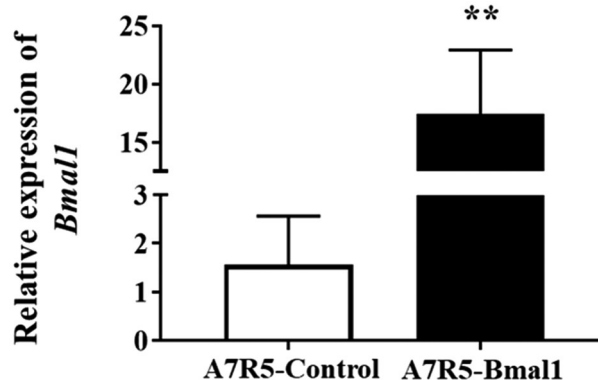


图 1 A7R5 细胞稳定转染 Bmal1 基因表达的定量 PCR 检测

Fig.1 Quantitative real-time PCR detection of Bmal1 gene expression in A7R5 cells stably transfected with Bmal1, ** $P=0.008$ compared with control

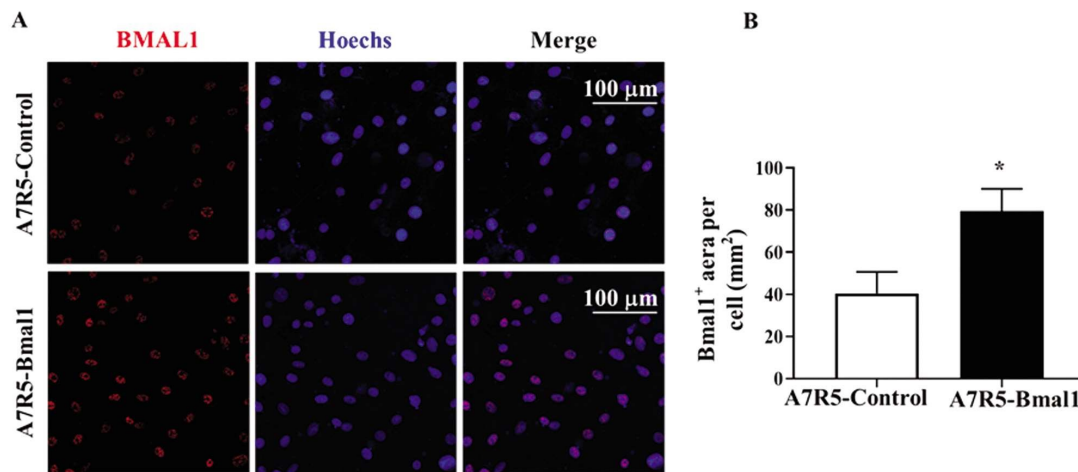


图2 A7R5 细胞稳定转染细胞系 BMAL1 蛋白表达的免疫荧光染色和阳性信号面积

Fig.2 Immunofluorescence staining of BMAL1 protein expression and positive signal area in A7R5 cells stably transfected with Bmal1

* $P=0.01$ compared with control

免疫荧光染色结果显示,相比于对照组,稳定转染 Bmal1 组 Ki67 的表达更高,对照组 Ki67 阳性细胞的比例为 41.1%, 稳定转染 Bmal1 组 Ki67 阳性细胞的比例为 64.5% ($P=0.045$), 见图 3。

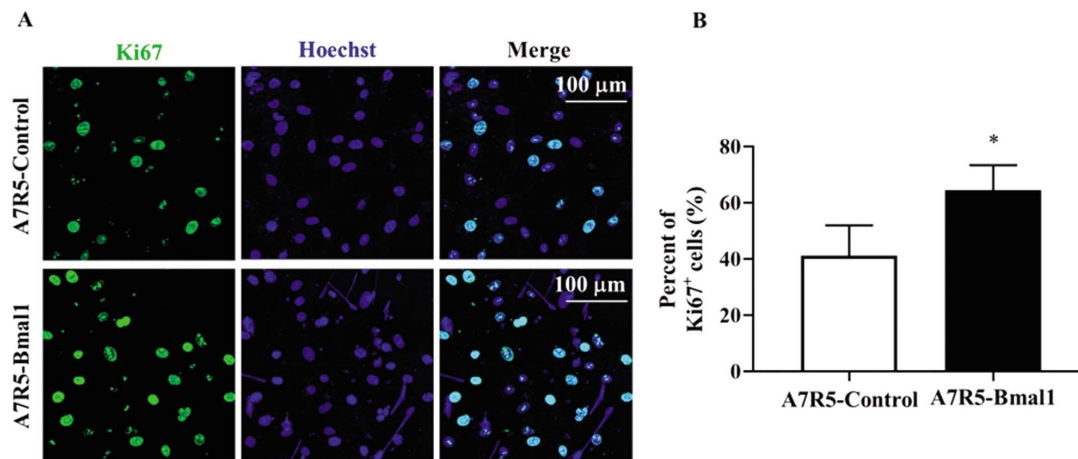


图3 A7R5 细胞稳定转染 Bmal1 后 Ki67 蛋白的免疫荧光染色和阳性细胞的比例

Fig.3 The immunofluorescence staining of Ki67 protein and the proportion of positive cells in A7R5 cells stably transfected with Bmal1

* $P=0.045$ compared with control

3 讨论

血管收缩与舒张活动主要取决于血管平滑肌细胞,研究认为时钟基因 Bmal1 在调节血压的节律变化中具有重要作用^[10,12-17],但是 Bmal1 在血管平滑肌细胞功能中的作用还不清楚。本实验我们用慢病毒转染的方式构建了稳定表达 Bmal1 的血管平滑肌细胞系,Ki67 的免疫荧光染色发现 Bmal1 的过表达能够促进血管平滑肌细胞的增殖。Beker 等人^[18]的研究发现 Bmal1 能够通过促进 AKT、ERK-1/2 和 PDK1 等分子的磷酸化促进小鼠神经瘤母细胞的存活,表明在小鼠神经瘤母细胞中,Bmal1 可以通过调节 PI3K/AKT 信号通路来影响细胞的存活。我们推测,Bmal1 很有可能通过上调 PI3K/AKT 信号通路促进了大鼠平滑肌细胞 A7R5 的增殖。另外,在血管新生的过程中平滑肌细胞的增殖直接影响血管的结构形成和成熟^[19-22],已有体外实验表明,降低 Bmal1 的表达会增加 ox-LDL 的摄取,损害内皮细胞的功能,包括增殖、迁移和血管形成^[23],因此我们推

测,时钟基因 Bmal1 很有可能参与血管新生的过程,这部分内容我们将在接下来课题研究中深入探讨。

血管平滑肌细胞在不同的生理和病理条件下(如血管损伤、机械应力和生长因子刺激等)会由收缩表型向合成表型转换。这种表型调节利于血管平滑肌细胞增殖,是增生性血管疾病强有力的促进因子,如在动脉粥样硬化、高血压等多种心血管疾病中,血管平滑肌细胞增殖均是疾病发展的关键步骤^[24,25]。近些年的报道中,体外多种细胞因子的刺激都可以促进血管平滑肌细胞的增殖,如血管紧张素 II (Ang II)、血小板源性生长因子(PDGF-BB)、氧化型低密度脂蛋白(oxLDL)、脂多糖(LPS)、转换生长因子 α (TGF- α) 和成纤维细胞生长因子(FGF)等^[26,27]。且正因为如此多的细胞因子参与血管平滑肌细胞的增殖,而抑制平滑肌细胞增殖是治疗动脉粥样硬化的重要手段。Lutshumba 等人已经证实小鼠 VSMC 中特异性敲除 Bmal1 在血管紧张素 II 输注引起腹主动脉瘤的过程中起保护作用^[28]。此外,有研究表明,PDGF-BB 通过活性氧/ERK/Egr-1 途径介导

而增强 Bmal1 的表达,这一过程可正向调节 PDGF-BB 诱导的 VSMC 增殖^[29]。因此以这些因子为靶点为治疗动脉粥样硬化等疾病提供了可能^[30],本实验研究也将为动脉粥样硬化的靶向治疗提供理论基础。

在接下来的研究中我们会进一步展开 Bmal1 在平滑肌细胞收缩功能中的作用的探讨,这方面的研究将会为深入理解血压昼夜节律调控机制奠定基础,也会为血压昼夜节律异常的患者提供可能的治疗靶点。

参考文献(References)

- [1] Agarwal R. Regulation of circadian blood pressure: from mice to astronauts[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2010, 19(1): 51-58
- [2] Lecarpentier Y, Schussler O, Hébert JL, et al. Molecular Mechanisms Underlying the Circadian Rhythm of Blood Pressure in Normotensive Subjects[J]. *Curr Hypertens Rep*, 2020, 22(7): 50
- [3] Plesh IA, Karatieieva SY, Muzyka NY, et al. Influence of variants circadian rhythm of blood pressure on the functional state of the cardiovascular system in patients with essential hypertension II degree [J]. *Wiad Lek*, 2019, 72(12 cz 1): 2361-2365
- [4] 高珊,张树龙,卢慧. 高血压患者血压昼夜节律的影响因素研究进展[J]. *山东医药*, 2017, 57(35): 105-108
- [5] Thosar SS, Butler MP, Shea SA. Role of the circadian system in cardiovascular disease[J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(6): 2157-2167
- [6] Ikeda, M, Nomura M. cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS protein (BMAL1) and identification of alternatively spliced variants with alternative translation initiation site usage [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 233(1): 258-264
- [7] Tamaru T, Takamatsu K. Circadian modification network of a core clock driver BMAL1 to harmonize physiology from brain to peripheral tissues[J]. *Neurochem Int*, 2018, 119: 11-16
- [8] Bunker MK, Wilsbacher LD, Moran SM, et al. Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals [J]. *Cell*, 2000, 103(7): 1009-1017
- [9] Doran AC, Meller N, McNamara CA. Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(5): 812-819
- [10] Xie Z, Su W, Liu S, et al. Smooth-muscle BMAL1 participates in blood pressure circadian rhythm regulation [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(1): 324-336
- [11] Chang L, Xiong W, Zhao X, et al. Bmal1 in Perivascular Adipose Tissue Regulates Resting-Phase Blood Pressure Through Transcriptional Regulation of Angiotensinogen[J]. *Circulation*, 2018, 138(1): 67-79
- [12] Crislip GR, Douma LG, Masten SH, et al. Differences in renal BMAL1 contribution to Na⁺ homeostasis and blood pressure control in male and female mice [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2020, 318(6): F1463-F1477
- [13] Zhang D, Jin C, Obi IE, et al. Loss of circadian gene Bmal1 in the collecting duct lowers blood pressure in male, but not female, mice [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2020, 318(3): F710-F719
- [14] Zhang D, Pollock DM. Circadian regulation of kidney function: finding a role for Bmal1 [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2018, 314(5): F675-F678
- [15] Wang N, Yang G, Jia Z, et al. Vascular PPARgamma controls circadian variation in blood pressure and heart rate through Bmal1[J]. *Cell Metab*, 2008, 8(6): 482-491
- [16] Monosíková J, Herichová I, Mravec B, et al. Effect of upregulated renin-angiotensin system on per2 and bmal1 gene expression in brain structures involved in blood pressure control in TGR(mREN-2)27 rats [J]. *Brain Res*, 2007, 1180: 29-38
- [17] Woon PY, Kaisaki PJ, Braganca J, et al. Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (BMAL1) is associated with susceptibility to hypertension and type 2 diabetes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(36): 14412-14417
- [18] Beker MC, Caglayan B, Caglayan AB, et al. Interaction of Melatonin and Bmal1 in the Regulation of PI3K/AKT Pathway Components and Cellular Survival[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 19082
- [19] Shi N, Mei X, Chen SY. Smooth Muscle Cells in Vascular Remodeling [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019, 39(12): e247-e252
- [20] Frisantiene A, Philippova M, Erne P, et al. Smooth muscle cell-driven vascular diseases and molecular mechanisms of VSMC plasticity[J]. *Cell Signal*, 2018, 52: 48-64
- [21] Psaltis PJ, Simari RD. Vascular wall progenitor cells in health and disease[J]. *Circ Res*, 2015, 116(8): 1392-412
- [22] Pařízek M, Novotná K, Bařáková L. The role of smooth muscle cells in vessel wall pathophysiology and reconstruction using bioactive synthetic polymers[J]. *Physiol Res*, 2011, 60(3): 419-437
- [23] Xu L, Liu Y, Cheng Q, et al. Bmal1 Downregulation Worsens Critical Limb Ischemia by Promoting Inflammation and Impairing Angiogenesis[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 712903
- [24] Lim S, Park S. Role of vascular smooth muscle cell in the inflammation of atherosclerosis[J]. *BMB Rep*, 2014, 47: 1-7
- [25] Shi N, Chen SY. Mechanisms simultaneously regulate smooth muscle proliferation and differentiation[J]. *J Biomed Res*, 2014, 28(1): 40-46
- [26] Muto A, Fitzgerald TN, Pimiento JM, et al. Smooth muscle cell signal transduction: implications of vascular biology for vascular surgeons[J]. *J Vasc Surg*, 2007, 45(suppl A): A15-A24
- [27] Jiang D, Yang Y, Li D. Lipopolysaccharide induced vascular smooth muscle cells proliferation: A new potential therapeutic target for proliferative vascular diseases[J]. *Cell Prolif*, 2017, 50(2): e12332
- [28] Lutshumba J, Liu S, Zhong Y, et al. Deletion of BMAL1 in Smooth Muscle Cells Protects Mice From Abdominal Aortic Aneurysms [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(5): 1063-1075
- [29] Takaguri A, Sasano J, Akihiro O, et al. The role of circadian clock gene BMAL1 in vascular proliferation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 872: 172924
- [30] Wang D, Uhrin P, Mocan A, et al. Vascular smooth muscle cell proliferation as a therapeutic target. Part 1: molecular targets and pathways[J]. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(6): 1586-1607