

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.31.015

热休克蛋白 90 对血小板源衍生因子诱导的大鼠主动脉平滑肌细胞增殖的影响 *

吴 峰¹ 冯金忠^{1△} 李松华³ 俞 峰¹ 邱一华¹ 张 帅¹ 周 巍¹ 骆合德¹ 王国坤^{2△}

(1 解放军第九八医院心血管内科 浙江 湖州 313000; 2 第二军医大学附属长海医院胸心外科 上海 200433;

3 第二军医大学附属长海医院心血管内科 上海 200433)

摘要 目的:研究热休克蛋白 90(HSP90)对血小板衍生因子(Platelet derived growth factor, PDGF)诱导的大鼠主动脉平滑肌细胞增殖的影响。**方法:**采用胶原酶消化法原代培养大鼠胸主动脉平滑肌细胞,应用脂质体细胞转染 siRNA 的方法抑制 HSP90 的表达,定量 PCR 和 western blot 的方法检测抑制效率。利用 PDGF-bb 诱导刺激平滑肌细胞增殖,CCK8 法检测细胞增殖能力的变化,流式细胞术检测细胞生长周期的改变。**结果:**平滑肌细胞中转染 HSP90 的 siRNA 后,HSP90 的 mRNA 和蛋白水平明显降低,分别为对照组的 65.3%和 57.6%($P<0.05$);PDGF-bb 刺激明显促进平滑肌细胞生长,而降低 HSP90 水平显著影响 PDGF-bb 诱导的细胞增殖($P<0.05$);流式细胞术检测发现降低 HSP90 水平引起平滑肌细胞生长停滞,分布在细胞周期 G1 期的细胞比例明显增多($P<0.05$)。**结论:**HSP90 通过调控平滑肌细胞的生长周期参与调节细胞增殖过程。

关键词:热休克蛋白 90;平滑肌细胞;增殖;细胞周期

中图分类号:Q253 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)31-6062-03

Effect of Heat Shock Protein 90 on Proliferation of Rat Aortic Smooth Muscle Cells Induced by Platelet Derived Growth Factor *

WU Feng¹, FENG Jin-zhong^{1△}, LI Song-hua³, YU Feng¹, QIU Yi-hua¹, ZHANG Shuai¹, ZHOU Wei¹, LUO He-de¹, WANG Guo-kun^{2,3}

(1 Department of Cardiology, the 98th Hospital of PLA, Huzhou, Zhejiang, 313000, China; 2 Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai, 200433, China; 3 Department of Cardiology, Changhai Hospital,

Second Military Medical University, Shanghai, 200433, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of heat shock protein 90 (HSP90) on proliferation of rat aortic smooth muscle cells induced by PDGF (Platelet derived growth factor). **Methods:** The primary aortic smooth muscle cells were cultured from thoracic aortas by collagenase digestion methods. The expression of HSP90 was intervened by liposomes with siRNA, and determined by real-time PCR and western blot. Proliferation of smooth muscle cells were stimulated PDGF-bb, and were detected by CCK8 assay. The cell cycle of smooth muscle cells were determined by flow cytometry. **Results:** Smooth muscle cells transfected with siRNA 24 h later, mRNA and protein levels of HSP90 significantly decreased by 65.3% and 57.6% respectively, compared with control groups. The proliferation of fibroblasts were markedly promoted by PDGF-bb, but HSP90 siRNA suppressed the cell proliferation. Flow cytometry assay showed that smooth muscle cells transfected with HSP90 siRNA were found arrest in the G1 phase of the cell cycle. **Conclusions:** HSP90 is involved in the proliferation of smooth muscle cells by regulating cell cycle.

Key words: Heat shock protein 90; Smooth muscle cells; Proliferation; Cell cycle

Chinese Library Classification (CLC): Q253 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)31-6062-03

前言

动脉粥样硬化是许多心脑血管疾病的共同病理基础,平滑肌细胞在其病理过程中的作用愈发引起关注^[1,2]。在动脉斑块形成中,平滑肌细胞通过表型转化吞噬脂质变成泡沫细胞;同时平滑肌细胞还释放细胞生长因子,促进自身的大量增殖^[3,4]。受细胞因子刺激的平滑肌细胞和内皮细胞还合成基质金属蛋白

酶分解基质,为平滑肌细胞的迁移创造条件^[5,6]。热休克蛋白(Heat shock protein, HSP)是一类功能性蛋白质,作为分子伴侣,调控相关蛋白的空间结构和突变,缓冲应激过程,以此维持信号转导蛋白的功能^[7,8]。HSP90 是热休克蛋白家族中重要的蛋白之一,参与调控、维持细胞内多种蛋白的构象和功能,在调节细胞生长、分化和凋亡等方面发挥重要的作用^[9,10]。本研究针对于动脉粥样硬化过程中主动脉平滑肌细胞的增殖表型,以

* 基金项目:上海市自然科学基金项目(13ZR1409000)

作者简介:吴峰(1979-),男,主治医师,研究方向:心血管疾病诊治,电话:0572-3269999, E-mail: sailing.wu@163.com

△通讯作者:冯金忠, E-mail: Fengjz98@163.com; 王国坤, E-mail: dearwkgk@163.com

(收稿日期:2014-05-05 接受日期:2014-05-30)

PDGF 为增殖诱导因子, siRNA 为基因干预手段, 探索 HSP90 对平滑肌细胞增殖的作用。

1 材料与方法

1.1 试剂

实验型 SD 大鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司。胶原酶, M199 培养液, 胰酶, 胎牛血清等细胞培养试剂购自 Gibco 公司。基因 siRNA 由上海吉码制药公司合成。脂质体 lipofectamineTM 2000, Trizol 试剂, 细胞周期检测试剂盒, 逆转录试剂盒, 定量 PCR 试剂等分子生物学试剂购自 Invitrogen 公司。RIPA 试剂, BCA 试剂盒, HSP90 抗体、HRP 标记二抗和 ECL 显色试剂盒等蛋白检测试剂购自武汉博士德公司。

1.2 大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞的原代培养

颈椎脱臼法处死大鼠, 无菌条件下迅速取出主动脉, 置于生理盐水中漂洗, 去除凝血。用弯头镊剥除外膜的纤维脂肪层, 用虹膜剪沿血管外侧纵向剪开, 在生理盐水中漂洗 2 次。用手术刀片自上而下刮 1-2 次, 去除内皮细胞层。小心撕下血管中膜内层、中层, 剪成 1 mm 小条, 浸泡于含 10% 胎牛血清的 M199 培养液中。倾去浸泡液后, 加入 2 mL 的 0.2 % 胶原酶, 在 37℃ 孵箱内消化过夜。离心后去除消化液, 用 20% 胎牛血清的 M199 培养液重悬细胞, 接种于细胞培养瓶中。每 2 天更换培养液, 6 天后长成单层致密细胞层, 即可传代。

1.3 平滑肌细胞 siRNA 的转染

将培养 4 代的平滑肌细胞接种于 12 孔细胞培养板中, 每孔 1×10^5 个细胞, 在 37℃, 5% CO₂ 条件下培养, 至细胞融合至 70%, 参照脂质体说明书进行 siRNA 转染, 并设对照组。用 50 nmol/L 终浓度的 siRNA 进行转染, 转染前更换培养液, 将 siRNA 按比例与脂质体混匀, 室温孵育 20 min 后, 滴加至细胞培养液中, 置于细胞培养箱内孵育, 6 h 后更换新鲜的培养液。48 h 后收获细胞进行检测。对照组为不添加 siRNA 的脂质体。

1.4 定量 PCR 检测基因表达

提取细胞总 RNA, 经紫外分光光度计检测 RNA 质量。以 500 ng 总 RNA 为模板, 利用 oligo dT20 和随机引物合成 cDNA, 反应条件: 16℃ 30 min, 42℃ 30 min, 85℃ 5 min。将 cDNA 适当比例稀释后, 进行定量 PCR 检测, 反应条件为 94℃ 30 sec, 60℃ 1 min, 40 个循环。结果用 Ct 值分析, 以 18S 作为内参, 折算为相对倍数。

1.5 CCK8 检测细胞增殖

在 96 孔培养板中接种 200 μ L 的细胞悬液 (1×10^4 个细胞), 在培养箱中预培养 24 h, 经 siRNA 转染后, 用含 PDGF-bb 的培养液培养 24 h 后, 每孔加入 10 μ L 的 CCK 溶液, 继续在培养箱内孵育 4 h, 用酶标仪在 450 nm 处的测定吸光度。

1.6 Western blot 检测蛋白表达

收集细胞, 用 RIPA 裂解液抽提细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。取 30 μ g 蛋白样品, 加入 SDS 凝胶加样缓冲液, 沸水浴变性 5 min, 迅速冷却后上样于 10 % 聚丙烯酰胺凝胶中, 100 V 稳压条件电泳。经转膜、封闭后, 加入一抗 (1:5000 稀释), 4℃ 孵育过夜, 加入二抗 (1:10000 稀释) 常温孵育 1 h, 应用 ECL 显色试剂盒, 在化学发光成像仪中检测。

1.7 统计学分析

每组实验至少重复三次, 数据以平均值 $\pm$ 标准误表示。采用 SPSS18.0 软件进行数据统计, 样本间比较采用 One-Way ANOVA 分析, 各组均数的多重比较采用最小显著差值法 (Least Significant Difference, LSD), $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 主动脉平滑肌细胞中 HSP90 siRNA 的抑制效率

在原代培养的主动脉平滑肌细胞中分别转染 HSP90 的 3 个 siRNA 序列, 24 h 后收集细胞, 提取 RNA 后, 定量 PCR 检测 HSP90 的 mRNA 水平。结果 (图 1) 发现 3 个序列都能明显降低 HSP90 的 mRNA 水平, 分别为对照组的 67.8 %, 45.3 % 和 55.8 % ($P < 0.01$)。选取抑制效率最高的 siRNA 序列, 转染主动脉平滑肌细胞, 48 h 后收集细胞, 提取蛋白, western blot 检测 HSP90 的蛋白水平。结果发现 HSP90 的蛋白表达水平也明显降低, 为对照组的 48.5 % ($P < 0.05$)。

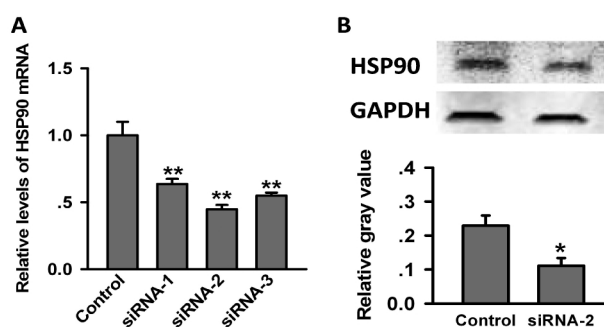


图 1 HSP90 的 siRNA 抑制效率的定量 PCR (A) 和 western blot (B) 检测
Fig. 1 The inhibition efficiency detection of HSP90 siRNA by real-time PCR (A) and western blot (B)

注: * $P < 0.05$ vs 对照组, ** $P < 0.01$ vs 对照组。

Note: * $P < 0.05$ vs control group, ** $P < 0.01$ vs control group.

2.2 HSP90 对平滑肌细胞增殖的作用

在主动脉平滑肌细胞中转染 HSP90 siRNA, 6 h 后更换含 PDGF-bb (25 ng/mL) 的培养基继续培养。48 h 后, CCK8 法检测细胞增殖变化。结果 (图 2) 发现 PDGF-bb 刺激明显促进平滑肌细胞生长 ($P < 0.01$), 而 HSP90 siRNA 对 PDGF-bb 诱导的平滑肌细胞增殖具有显著的抑制作用 ($P < 0.05$)。

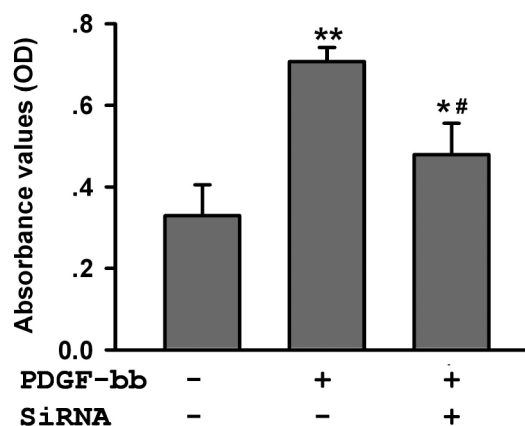


图 2 平滑肌细胞增殖能力的 CCK8 法检测

Fig. 2 The proliferation detection of smooth muscle cell by CCK8 assay
注: * $P < 0.05$ vs 对照组, ** $P < 0.01$ vs 对照组, # $P < 0.05$ vs PDGF-bb 组。

Note: * $P < 0.05$ vs control group, ** $P < 0.01$ vs control group

$P < 0.05$ vs PDGF-bb group.

2.3 HSP90 对平滑肌细胞生长周期的作用

在主动脉平滑肌细胞中转染 HSP90 siRNA 后,用 PDGF-bb 刺激培养 24 h 后,收集细胞,流式细胞术检测生长周期的变化。结果(图 3)发现,相对于 PDGF-bb 刺激组(A),同时转染 HSP90 siRNA 的细胞生长出现停滞,分布在细胞周期 G1 期的比例由 48 %增加至 57 %。

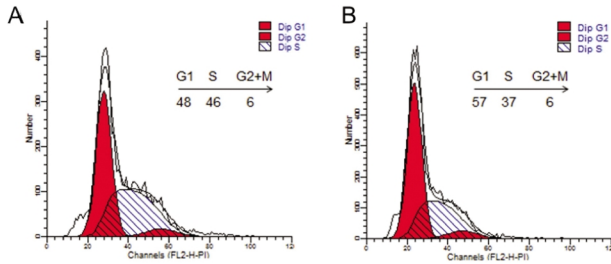


图 3 平滑肌细胞生长周期的流式细胞术检测

Fig. 3 The cell cycle detection of smooth muscle cell by flow cytometry assay

3 讨论

血管平滑肌细胞的过度增殖是动脉粥样硬化形成、高血压以及血管再狭窄共同的细胞病理基础之一^[6,11]。生理条件下血管平滑肌细胞存在着稳定的增殖与凋亡,二者保持平衡,而在心病理情况下,血管疾病的众多危险因素影响血管内皮分泌功能,激活血管平滑肌细胞内的信号转导通路,导致血管平滑肌细胞的过分增殖^[12,13]。探索血管平滑肌细胞增殖的调控基因和信号转导途径,对于阐明动脉粥样硬化等血管疾病的发病机制以及早期防治都具有重要意义。

HSP90 是一种 ATP 依赖的分子伴侣,在真核生物的生命活动中是必不可少的,参与了许多重要细胞通路的激活和稳定^[14,15]。鉴于对信号转导、细胞内运输等生理过程中的重要作用,HSP90 作为癌症潜在治疗靶点的研究层出不穷^[16,17]。最近的一项研究发现,HSP90 在动脉粥样硬化斑块中的表达明显升高,并且与斑块的不稳定性相关。同时体外实验发现,HSP90 抑制剂(17-AAG)对平滑肌细胞的增殖和迁移有抑制作用^[18]。我们的实验通过 siRNA 手段降低平滑肌细胞中 HSP90 的表达水平,流式细胞术检测发现干预后细胞在 G1 的比例明显增加。结果提示 HSP90 对平滑肌细胞生长周期具有重要作用,尤其是 G1 的细胞生长和染色体复制具有重要作用。

细胞的生长周期主要分为 DNA 复制期(G1 期,完成 DNA 合成前准备;S 期,进行 DNA 合成期;G2 期,DNA 合成后期)和细胞分裂期(M 期)^[19]。研究发现 G1 期主要进行细胞生长及准备染色体复制,细胞周期的调节主要是通过 G1 期的阻滞而实现的^[20]。我们的研究发现降低 HSP90 的水平,可在 PDGF-bb 刺激平滑肌细胞过程中,通过影响细胞生长周期而抑制其增殖进程。

总之,本研究显示降低 HSP90 的表达,通过引起细胞生长停滞在细胞周期 G1 期,而抑制 PDGF-bb 诱导的主动脉平滑肌细胞增殖。深入研究主动脉平滑肌细胞过度增殖的机制,可能为阐明动脉粥样硬化的发病机制以及动脉粥样硬化性心脑血管

管疾病的治疗探索提供依据。

参考文献(References)

- [1] Gomez D, Owens GK. Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis[J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 95(2): 156-164
- [2] Hopkins PN. Molecular biology of atherosclerosis [J]. *Physiol Rev*, 2013, 93(3): 1317-1542
- [3] Lee S, Birukov KG, Romanoski CE, et al. Role of phospholipid oxidation products in atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2012, 111(6): 778-799
- [4] Gonzalez-Navarro H, Abu Nabah YN, Vinue A, et al. p19 (ARF) deficiency reduces macrophage and vascular smooth muscle cell apoptosis and aggravates atherosclerosis[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2010, 55(20): 2258-2268
- [5] Nachtigal P, Zemankova Vecerova L, Rathouska J, et al. The role of endoglin in atherosclerosis[J]. *Atherosclerosis*, 2012, 224(1): 4-11
- [6] Fuhrman B. The urokinase system in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. *Atherosclerosis*, 2012, 222(1): 8-14
- [7] Grundtman C, Kreutmayer SB, Almanzar G, et al. Heat shock protein 60 and immune inflammatory responses in atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(5): 960-968
- [8] Zuehlke A, Johnson JL. Hsp90 and co-chaperones twist the functions of diverse client proteins[J]. *Biopolymers*, 2010, 93(3): 211-217
- [9] Fan GC, Kranias EG. Small heat shock protein 20 (HspB6) in cardiac hypertrophy and failure[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 51(4): 574-577
- [10] Trepel J, Mollapour M, Giaccone G, et al. Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(8): 537-549
- [11] Soubrier F, Chung WK, Machado R, et al. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 62(25 Suppl): D13-21
- [12] Jain MK, Sangwung P, Hamik A. Regulation of an inflammatory disease: Kruppel-like factors and atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(3): 499-508
- [13] Alexander MR, Owens GK. Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease[J]. *Annu Rev Physiol*, 2012, 74: 13-40
- [14] Barrott JJ, Haystead TA. Hsp90, an unlikely ally in the war on cancer [J]. *FEBS J*, 2013, 280(6): 1381-1396
- [15] Heikkila JJ. Regulation and function of small heat shock protein genes during amphibian development[J]. *J Cell Biochem*, 2004, 93(4): 672-680
- [16] Li J, Buchner J. Structure, function and regulation of the hsp90 machinery[J]. *Biomed J*, 2013, 36(3): 106-117
- [17] Isaacs JS, Xu W, Neckers L. Heat shock protein 90 as a molecular target for cancer therapeutics[J]. *Cancer Cell*, 2003, 3(3): 213-217
- [18] Kim J, Jang SW, Park E, et al. The role of heat shock protein 90 in migration and proliferation of vascular smooth muscle cells in the development of atherosclerosis [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, 72C: 157-167
- [19] David M, Petit D, Bertoglio J. Cell cycle regulation of Rho signaling pathways[J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(16): 3003-3010
- [20] Lim S, Kaldis P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation[J]. *Development*, 2013, 140(15): 3079-3093