

Notch 3 表达抑制后血管平滑肌细胞增殖能力的变化

刘楠 刘莹 丁玉

100700 北京, 陆军总医院神经内科(刘楠、丁玉), 干部病房三科(刘莹)

通信作者: 刘楠, Email: 2427326710@qq.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2018.09.013

【摘要】目的 利用已成功建立的 Notch 3 基因表达下调的血管平滑肌细胞(VSMCs)模型, 检测在不同培养环境下 VSMCs 增殖能力的变化, 进一步了解 Notch 3 表达抑制后 VSMCs 的生存状态。**方法** 利用氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)和胰岛素样生长因子-1(IGF-1)干预正常 VSMCs 及 Notch 3 表达下调的 VSMCs, 倒置显微镜下观察细胞生长情况, CCK-8 检测细胞生长曲线变化。**结果** ox-LDL 对照干预组的生长曲线明显高于 ox-LDL 阳性干预组; 接种第 1~4 天 ox-LDL 对照干预组、IGF-1 阳性干预组与 IGF-1 对照干预组的生长曲线略高于其他各组, 第 5、6 天后此趋势更加明显, 而 3 组间增殖程度相似。**结论** ox-LDL 与 IGF 对于 Notch 3 信号系统的作用并不一致。当 Notch 3 受到抑制, ox-LDL 的促增殖作用则明显减弱; 而 IGF-1 对 VSMCs 的促增殖作用依然保留。

【关键词】 Notch 3; 血管平滑肌细胞; 增殖

Changes in proliferation of vascular smooth muscle cells after inhibition of Notch 3 Liu Nan, Liu Ying, Ding Yu

Neurology Department, Military General Hospital of Beijing PLA, Beijing 100700, China (Liu N, Ding Y); Third Department of Cadre, Military General Hospital of Beijing PLA, Beijing 100700, China (Liu Y)

Corresponding author: Liu Nan, Email: 2427326710@qq.com

【Abstract】Objective To detect the change of proliferation and further find out the survival state of vascular smooth muscle cells (VSMCs) after knocked down the expression of Notch 3 by RNA interference in different surroundings. **Methods** Ox-LDL and IGF-1 were applied to intervene normal VSMCs and Notch 3 knocked down VSMCs. Cell growth was observed under inverted microscope. Cell growth curve was detected by CCK-8. **Results** The growth curve of the ox-LDL control group was obviously higher than that of the ox-LDL positive group. During the first four days, the growth curve of ox-LDL control group, IGF-1 positive group and IGF-1 control group were higher than that of the other groups. This trend was more obvious in the fifth and sixth day. The proliferative rate was similar among the 3 groups. **Conclusions** For Notch 3 signal system, ox-LDL and IGF had different effects. When Notch 3 was inhibited, the proliferation of ox-LDL decreased. However, the proliferation promoting effect of IGF-1 on VSMCs remained.

【Key words】 Notch 3; Vascular smooth muscle cell; Growth

在哺乳动物中, Notch 3 基因特异性表达于成熟的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMCs), 对 VSMCs 信号转导机制起着特殊的作用, 是发育过程中动脉成熟所必需的基因。正常情况下, Notch 3 能调节 VSMCs 的分化与成熟, 维持其收缩表型, 形成功能性动脉, 在病理状态下参与 VSMCs 的表型转化, 促使其转化为合成型细胞。所以进一步深入研究 Notch 3 突变或表达异常时, VSMCs 表型的转变、细胞增殖率的影响等, 对于明确动脉粥样硬化性血管病的发生机制及支架术后再狭窄等均有十

分重要的意义, 有望据此提出新的治疗靶点。在前期的研究中, 我们通过 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)的方法成功建立 Notch 3 表达下调的 VSMCs 模型。本研究利用已建立的细胞模型, 检测在不同培养环境下, VSMCs 增殖能力的变化, 进一步了解 Notch 3 表达抑制后 VSMCs 的生存状态。

一、材料与方法

1. 细胞模型制备与实验分组: 研究共分为 7 个不同的处理组: (1) 空白对照组: 正常 VSMCs 培养, 无任何特殊处理; (2) 阴性对照组: 细胞培养时加入

无 Notch 3 干扰片段的空白病毒载体; (3) 阳性对照组: 即成功制备的 Notch 3 表达下调的 VSMCs 细胞模型, 制备过程详见前期研究^[1]; (4) 氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 阳性干预组: 阳性对照组+ox-LDL 干预; (5) ox-LDL 对照干预组: 空白对照组+ox-LDL 干预; (6) 胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor 1, IGF-1) 阳性干预组: 阳性对照组+IGF-1 干预; (7) IGF-1 对照干预组: 空白对照组+IGF-1 干预。

2. ox-LDL 和 IGF-1 的制备: 将 LDL(购于 Sigma 公司)溶于无菌生理盐水中; 10 μmol/L CuSO₄ 于 37 °C 避光与 LDL 孵育 24 h 得到 ox-LDL 溶液。再测定 ox-LDL 丙二醛值, 当为 n-LDL 的 8 倍时, 提示 LDL 已被氧化完全, EDTA 溶液终止氧化反应; 再用无菌的 0.9% NaCl 充分透析 37 h 后过滤除菌, 4 °C 存放; 并用电泳法和荧光测定硫代巴比妥酸反应物来鉴定氧化程度; 将 IGF-1(购于北京鼎国公司)冻干粉末溶于 1 mg/ml 的 BSA 中, 配置浓度为 1mg/ml 的 IGF-1 溶液。调整 ox-LDL 最终浓度为 50 μg/ml, IGF-1 溶液最终浓度为 100 μg/ml。

3. CCK-8 检测细胞生长曲线: 接种各组细胞于 6 孔板, 2 × 10⁵ 个/孔, 分别使细胞置于 500 μl 含 10% 胎牛血清(FBS) 的 DMEM 培养基, 在 5% CO₂、95% 湿度、37 °C 条件下培养, 孵育 24 h, 换无血清培养液继续培养 24 h 后, 换完全培养基, 加入干预药物 IGF-1(100 μg/L) 或 ox-LDL(50 μg/ml), 培养 3 d 后接种到 96 孔板中; 24 h 后, 进行 CCK-8 检测。6 d 内每 24 小时在相对应的孔中加入 10 μl CCK-8 试剂, 孵育 3 h 后, 吸取 100 μl 上清液, 在 450 nm 处检测吸光度(A 值)为初始值。空白对照为 100 μl 培养基与 10 μl CCK-8 试剂混合, 将其在 450 nm 处检测, 测定 A 值为空白值。计算公式: 最终值=初始值-空白值。每组各测 3 次, 取平均值, 之后绘制细胞生长曲线。

4. 统计学方法: 采用 SPSS 12.0 统计软件进行数据处理, 数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较行方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

二、结果

1. 不同时间点显微镜下细胞生长状况观察: 见图 1。接种第 1 天在倒置显微镜下观察, 各组细胞生长状况良好, 单位视野内细胞数目基本相似。接种第 6 天后观察, 空白对照组和阴性对照组下单位视野内细胞数有所减少, 细胞形态变圆, 足突减少, 呈老化趋势。其他 5 组组间比较生长状况及单位视

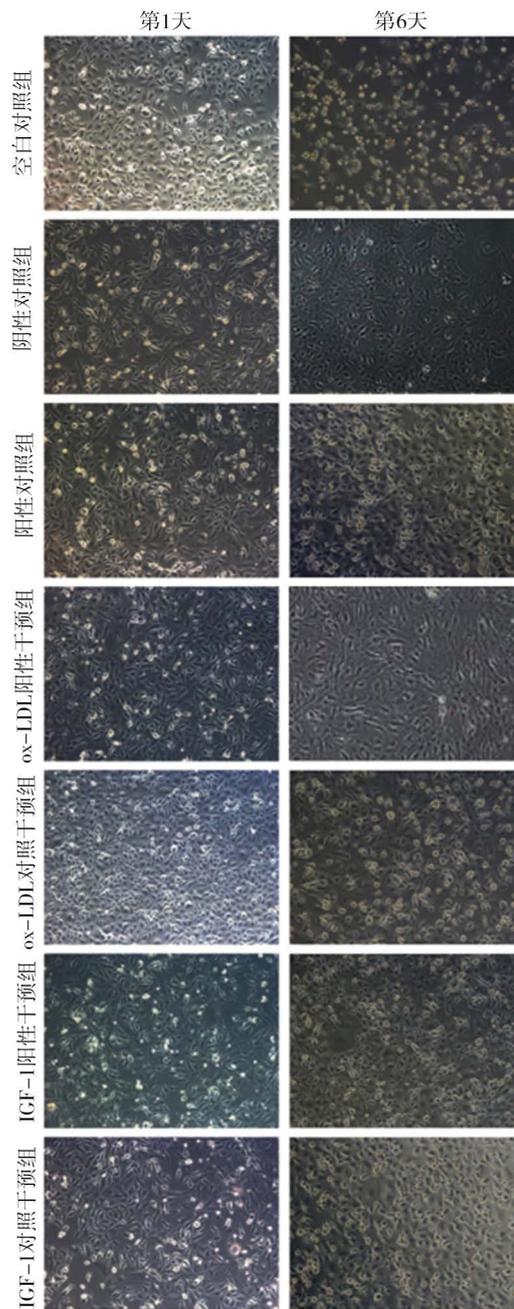


图1 各组第1天和第6天镜下细胞数目与形态变化(×10)

野内细胞数目相似。各组单位视野内细胞数目较接种第 1 天增多, 而形态变化不明显。

2. CCK-8 检测各组不同时间点的生长情况: 见表 1。空白对照组、阴性对照组与阳性对照组在接种的第 1 ~ 6 天, 生长曲线基本一致, 增殖程度相似。ox-LDL 阳性干预组的生长曲线与空白对照组、阴性对照组和阳性对照组也基本一致, 然而 ox-LDL 对照干预组的 A 值高于 ox-LDL 阳性干预组。接种第 1 ~ 4 天 ox-LDL 对照干预组、IGF-1 阳性干预组与 IGF-1 对照干预组的 A 值略高于其他各组, 但差异无统计学意

表1 CCK-8检测各组细胞不同时间点的A值($\bar{x} \pm s$)

组别	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天	第6天
空白对照组	0.32 ± 0.06	0.42 ± 0.05	0.51 ± 0.07	0.59 ± 0.08	0.72 ± 0.06	0.80 ± 0.05
阴性对照组	0.28 ± 0.04	0.41 ± 0.06	0.49 ± 0.04	0.56 ± 0.06	0.67 ± 0.05	0.76 ± 0.04
阳性对照组	0.32 ± 0.06	0.40 ± 0.05	0.48 ± 0.05	0.56 ± 0.09	0.67 ± 0.03	0.76 ± 0.15
ox-LDL阳性干预组	0.35 ± 0.05	0.42 ± 0.06	0.49 ± 0.04	0.58 ± 0.09	0.69 ± 0.06	0.78 ± 0.14
ox-LDL对照干预组	0.33 ± 0.05	0.44 ± 0.06	0.55 ± 0.10	0.66 ± 0.17	0.88 ± 0.21 ^a	1.06 ± 0.20 ^a
IGF-1阳性干预组	0.37 ± 0.04 ^a	0.46 ± 0.11	0.56 ± 0.12	0.67 ± 0.18	0.90 ± 0.23 ^a	1.10 ± 0.20 ^a
IGF-1对照干预组	0.37 ± 0.05 ^a	0.46 ± 0.10	0.58 ± 0.16	0.67 ± 0.20	0.87 ± 0.18 ^a	1.10 ± 0.21 ^a
F值	5.11	5.11	2.19	26.44	8.11	12.55
P值	0.05	0.18	0.06	<0.05	<0.05	<0.01

注:与阳性对照组比较,^a $P < 0.05$

义。第5、6天后此趋势更加明显,ox-LDL对照干预组、IGF-1阳性干预组和IGF-1对照干预组与阳性对照组比较,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05),并且3组间增殖程度相似。

讨论 Notch 3蛋白是一种跨膜受体蛋白,特异性表达于成熟的VSMCs,参与VSMCs的增殖、分化和凋亡,是其存活的决定因素。在VSMCs表型维持、细胞增殖与迁移中都起着重要的作用,并有可能是动脉发育成熟,形成最终形态的始动因素^[2]。

成熟的VSMCs并不是终末分化,仍可在某些因素的刺激下去分化成为分化程度较低的分泌型,即表型转化,由收缩型转为合成型,而表型转化所引发的细胞增殖、迁移、血管重构是多种血管病变发生及发展的根本原因^[3-4]。维持VSMCs的收缩表型,能够维持动脉的弹性及血管收缩的特点,这是动脉重要的生理功能。VSMCs的表型是可以调节的,在收缩型及合成表型间动态变化。在正常的生理状况下,VSMCs保持收缩表型,细胞外形规整,成梭形、多边形;病理状态下,Notch 3可能在表型转化中发挥重要作用^[5-7],即可以向合成表型转化,细胞外形不规整,伪足增多,甚至骨架蛋白也发生改变,导致细胞过度增殖、迁移,进而导致动脉粥样硬化性血管狭窄。此外,循环张力的变化可引起Notch 3信号系统的激活。血管损伤,循环张力改变,Notch 3表达下调,进一步改变VSMCs的形态及在血管中的排列^[8]。

在前期的研究中,我们通过人类Notch 3 mRNA,设计siRNA,再进一步构建表达质粒载体,将病毒液加到培养的VSMCs中,48 h后经荧光显微镜观察转染效率可达50%以上。利用实时荧光定量PCR技术检测Notch 3的表达量,siRNA表达阳性的VSMCs中,Notch 3的表达量降低了36%,成功的构建了Notch 3表达下调的VSMC模型(Notch 3 -/-

VSMC)^[1]。本研究中利用已构建好的细胞模型,观察了在不同干预条件下Notch 3 -/- VSMC的生长情况。结果发现,干扰Notch 3的表达对细胞的生长并无明显影响,干扰Notch 3表达后的VSMCs对ox-LDL促增殖作用的反应性有所降低,然而IGF-1对Notch 3表达抑制的VSMCs的促增殖作用却依然保留。

IGF是影响VSMCs增殖、迁移的重要生物因子,有研究认为IGF是激活丝裂原活化的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)及磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)的途径而引发细胞内信号转导^[9]。其中PI3K通路起主导作用,国内有人认为IGF-1可能通过增加PI3K蛋白激酶活性及抑制PTEN脂质磷酸酶活性,从两个相反的方面全面调控VSMCs增殖^[10]。ox-LDL是动脉粥样硬化的危险因素,过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ)是配体诱导的转录因子的核受体超家族成员,参与脂肪形成、脂质代谢和糖代谢以及VSMCs的增殖迁移及炎症反应^[11-12]。有文献报道ox-LDL部分通过PPAR γ -ABCG1通路调节^[13]。

然而大多数的研究均认为ox-LDL与IGF对VSMCs的作用靶点基本相似。本研究提示,对于Notch 3信号系统,两者的作用并不一致,一旦Notch 3受到抑制,ox-LDL的促增殖作用则明显减弱,而IGF仍保留较强的促增殖作用。此结果可能表明,调节IGF有可能成为与Notch 3表达受抑制的相关疾病的治疗新靶点,比如Cadasil、动脉粥样硬化性血管病或血管成形术后再狭窄等。

目前,国际上血管内成形及支架植入术已经开展多年,技术成熟,但是术后有高达10%~50%的再狭窄发生率,尽管有药物洗脱支架的出现,但仍没有达到理想的预防和治疗措施。初步研究提示,

再狭窄的重要因素之一就是 VSMCs 表型转换导致的细胞过度增生、迁移以及细胞外基质的大量积聚。因此深入研究 VSMCs 的病理生理过程,探索新的分子细胞学治疗靶点是国际上的热点。近期有研究表明,Notch 3 基因表达的缺陷,可以干扰 ERAD 信号系统,使培养的 VSMCs 聚集趋势增强,从而抑制其增殖过程。并认为可通过抑制 Notch 3 缺陷产生的细胞聚集作用,或强化正常 Notch 3 的表达,可以用于治疗常染色体显性遗传病合并皮质下梗死和脑白质病(cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy, CADASIL)患者^[14]。Notch 3 的表达降低后,联合 IGF-1 可明显增加体外 VSMCs 的增殖过程,阻断此过程,有可能适用于血管再狭窄的治疗。

今后的研究中,我们将深入探讨 VSMCs 形态学、细胞骨架蛋白以及信号转导通路等与其生理功能、病理改变的关系。希望通过抑制 VSMCs 的过度增殖、迁移,来寻找新的治疗靶点,为解决动脉内膜损伤后再狭窄等难题提供新方法和新途径。

利益冲突 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

作者贡献声明 试验设计、论文撰写、论文修订为刘楠,数据收集为刘莹、丁玉

参 考 文 献

- [1] 朱光明,郭会娥,张微微. Notch 3 表达下调的血管平滑肌细胞模型的建立[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2011, 13(12): 1127-1129. DOI: 10.3969/j.issn.1009-0126.2011.12.022.
Zhu GM, Guo HE, Zhang WW. Knockdown of Notch 3 expression in VSMC by RNA interference[J]. Chin J Geriatr Heart Brain Vessel Dis, 2011, 13(12): 1127-1129.
- [2] Domenga V, Fardoux P, Lacombe P, et al. Notch 3 is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells[J]. Genes Dev, 2004, 18(22): 2730-2735. DOI: 10.1101/gad.308904.
- [3] Kawai-Kowase K, Owens GK. Multiple repressor pathways contribute to phenotypic switching of vascular smooth muscle cells[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 292(1): C59-C69. DOI: 10.1152/ajpcell.00394.2006.
- [4] 朱光明,张微微,陈冰璞,等. RNA 干扰技术建立细丝蛋白表达下调的血管平滑肌细胞模型[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2008, 10(1): 50-52. DOI: 10.3969/j.issn.1009-0126. 2008.01.017.
Zhu GM, Zhang WW, Chen BP, et al. Establishment of filamin downregulated VSMC model using RNAi technique[J]. Chin J Geriatr Heart Brain Vessel Dis, 2008, 10(1): 50-52.
- [5] Morrow D, Scheller A, Birney YA, et al. Notch-mediated CBF-1/RBP-J(kappa)-dependent regulation of human vascular smooth muscle cell phenotype in vitro[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2005, 289(5): C1188-C1196. DOI: 10.1152/ajpcell.00198.2005.
- [6] Proweller A, Pear WS, Parmacek MS, et al. Notch signaling represses myocardin-induced smooth muscle cell differentiation[J]. J Biol Chem, 2005, 280(10): 8994-9004. DOI: 10.1074/jbc.M413316200.
- [7] Bhattacharyya A, Lin S, Sandig M, et al. Regulation of vascular smooth muscle cell phenotype in three-dimensional coculture system by Jagged1-selective Notch 3 signaling[J]. Tissue Eng Part A, 2014, 20(7/8): 1175-1187. DOI: 10.1089/ten.TEA.2013.0268.
- [8] Jin C, Guo J, Qiu X, et al. IGF-1 induces iNOS expression via the p38 MAPK signal pathway in the anti-apoptotic process in pulmonary artery smooth muscle cells during PAH[J]. J Recept Signal Transduct Res, 2014, 34(4): 325-331. DOI: 10.3109/10799893.2014.903417.
- [9] Zhu JH, Chen CL, Flavahan S, et al. Cyclic stretch stimulates vascular smooth muscle cell alignment by redox-dependent activation of Notch 3 [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011, 300(5): H1770-H1780. DOI: 10.1152/ajpheart.00535.2010.
- [10] 吴兴利,刘文静,杨丁友,等. 胰岛素样生长因子-1 对血管平滑肌细胞 PHLPP 蛋白表达的影响[J]. 实用医学杂志, 2010, 26(4): 552-554. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2010.04.012.
Wu XL, Liu WJ, Yang DY, et al. Effect of insulin like growth factor-1 on the expression of phosphatase PHLPP in vascular smooth muscle cells[J]. The Journal of Practical Medicine, 2010, 26(4): 552-554.
- [11] Ahmadian M, Suh JM, Hah N, et al. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future[J]. Nat Med, 2013, 19(5): 557-566. DOI: 10.1038/nm.3159.
- [12] Zhang LL, Gao CY, Fang CQ, et al. PPAR γ attenuates intimal hyperplasia by inhibiting TLR4-mediated inflammation in vascular smooth muscle cells[J]. Cardiovasc Res, 2011, 92(3): 484-493. DOI: 10.1093/cvr/cvr238.
- [13] 曹小洁,张莉莉,郭露,等. oxLDL 通过 PPAR γ -ABCG1 通路促进血管平滑肌细胞泡沫化[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(4): 325-329. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201409084.
Cao XJ, Zhang LL, Guo L, et al. OxLDL promotes vascular smooth muscle cells to form foam cells through PPAR γ -ABCG1 signal pathway[J]. J Third Mil Med Univ, 2015, 37(4): 325-329.
- [14] Takahashi K, Adachi K, Yoshizaki K, et al. Mutations in Notch 3 cause the formation and retention of aggregates in the endoplasmic reticulum, leading to impaired cell proliferation[J]. Hum Mol Genet, 2010, 19(1): 79-89. DOI: 10.1093/hmg/ddp468.

(收稿日期: 2018-07-20)

(本文编辑: 戚红丹)