

# PDGF-BB下调血管平滑肌标志物SM22 $\alpha$ 表达的机制

董丽华 舒亚南 薛震颖 韩梅\*

(河北医科大学基础医学研究所生物化学与分子生物学教研室, 河北省医学生物技术重点实验室, 神经与血管生物学省部共建教育部重点实验室, 石家庄 050017)

**摘要** 血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)表型转化是血管重塑性疾病的细胞病理学基础, 血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)-BB抑制平滑肌分化标志基因表达、加速其降解, 是VSMC表型转化的关键。该研究用PDGF-BB刺激VSMC诱导细胞发生表型转化, 利用Western blot和免疫共沉淀等技术, 检测PDGF-BB对早期分化相关基因平滑肌22 alpha(smooth muscle 22 alpha, SM22 $\alpha$ )磷酸化与泛素化的影响。实验结果显示, PDGF-BB促进VSMC增殖; 上调增殖相关蛋白PCNA的表达, 下调分化相关蛋白SM22 $\alpha$ 与SM  $\alpha$ -actin的表达; 诱导SM22 $\alpha$ 发生磷酸化和泛素化, 而且, 该过程与SM22 $\alpha$ 水平下调具有时相相关性; 抑制剂阻断分析证实, ERK和PKC参与介导了PDGF-BB诱导的SM22 $\alpha$ 磷酸化。以上结果提示, 在VSMCs表型转化中, PDGF-BB可能是通过激活ERK-PKC信号通路, 促进SM22 $\alpha$ 的磷酸化和泛素依赖的蛋白质降解。

**关键词** 血管平滑肌细胞; 表型转化; 平滑肌22 alpha; 泛素化降解

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)表型转化是其进行增殖和向血管内膜迁移的先决条件, 受细胞外信号调节, 是血管重塑性疾病的细胞病理学基础<sup>[1-2]</sup>。在血管损伤因素刺激下, VSMC可从分化(收缩)表型转化为去分化(合成)表型并获得增殖能力, 阐明VSMC表型转化的调控机制, 对防治血管重塑和逆转增殖性血管病变具有重要的意义。

血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)是一种强效促有丝分裂剂, 是介导VSMC增殖和内膜增生的重要因素之一, 与血管重塑和高血压的发生密切相关。PDGF-BB刺激可抑制平滑肌分化标志基因如平滑肌22 alpha(smooth muscle 22 alpha, SM22 $\alpha$ )、SM  $\alpha$ -actin与Caldesman等表达, 进而诱导VSMC表型转化。PDGF等丝裂原刺激引起的分化标志基因表达降低, 除了与这些标志基因的表达受抑有关外, 其泛素化降解加快也是一个重要因素<sup>[3]</sup>, 但是相关的研究较少。SM22 $\alpha$ 作为VSMC早期的一种分化相关基因, 仅在收缩型(分化型)的VSMC中表达。我们近期发现, SM22 $\alpha$ 可通过抑制Ras-ERK通路而阻断PDGF-BB诱导的VSMC增殖<sup>[4]</sup>。本研究探讨PDGF-BB下调SM22 $\alpha$ 表达的机制及其与VSMC表型转化的关系, 为揭示SM22 $\alpha$ 在VSMC表型转化中的作用提供研究线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 SD大鼠(清洁级)由河北医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 DMEM培养基和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自Gibco公司, PDGF-BB购自R&D公司, 兔抗SM22 $\alpha$ 多克隆抗体购自Abcam公司, 小鼠抗增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)单克隆抗体、小鼠抗SM  $\alpha$ -actin单克隆抗体、小鼠抗 $\beta$ -actin单克隆抗体、小鼠抗p-Ser单克隆抗体、兔抗Ub多克隆抗体、辣根酶标记羊抗兔IgG和辣根酶标记羊抗鼠IgG抗体购自Santa Cruz公司。PD98059和staurosporine购自Sigma公司。

### 1.2 方法

1.2.1 VSMC培养、鉴定与分组 选取80~100 g雄性SD大鼠(清洁级), 贴块法分离培养胸腹主动脉中膜VSMC于含10% FBS的DMEM培养基中。倒置相差显微镜下显示, 单个VSMC呈梭形或带状, 有多个细胞突起, 胞浆丰富, 胞质密度高, 呈典型的峰谷样生长(图1A)。经特异的SM  $\alpha$ -actin免疫细胞化学

收稿日期: 2012-03-14 接受日期: 2012-06-08

国家自然科学基金(No.31071003, No.31100989)、河北省自然科学基金(No.C2011206154)和河北省高等学校优秀青年基金(No.Y2011209)资助项目

\*通讯作者。Tel: 0310-86266321, E-mail: hanmei@hebm.edu.cn

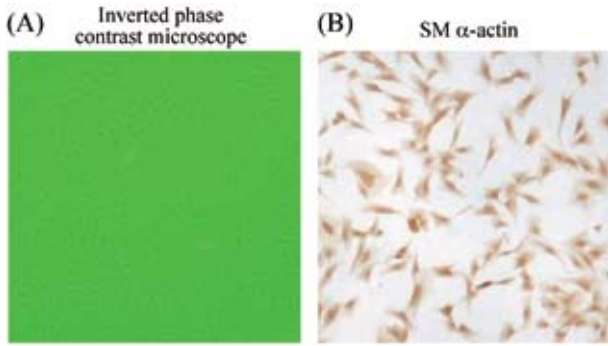


图1 VSMC的鉴定

Fig.1 The identification of VSMC

染色后镜下观察,胞浆着色,可见大量与细胞长轴平行的纤维细丝(图1B)。待细胞生长至汇合后,用0.25%胰蛋白酶消化传代,取3~5代细胞进行实验。血清饥饿24 h使细胞同步于G<sub>0</sub>期后,分别用10 ng/mL的PDGF-BB刺激不同时间(3, 6, 12, 24, 48 h),同时设不含刺激物的阴性对照组。

**1.2.2 MTT分析** 接种于96孔板中的VSMC,血清饥饿24 h后,分别用10 ng/mL的PDGF-BB刺激不同时间。加MTT孵育4 h后弃去上清,再加DMSO孵育10 min,酶标仪上测其吸光度值。每组设6个复孔。

**1.2.3 流式细胞术分析** 悬浮并收集不同时间点细胞,生理盐水冲洗细胞两遍,70%乙醇固定细胞。加入碘化丙啶DNA荧光染色(propidium iodide, PI: 50 mg/L, 1% Triton X-100), 4 °C冰箱避光染色30 min,铜网过滤,使样本成为合格的单细胞悬液,流式细胞仪检测细胞周期。

**1.2.4 细胞总蛋白提取与Western blot分析** 按常规方法收集和裂解细胞,取上清,用改良Lowry法进行蛋白定量。取等量的蛋白进行SDS-PAGE,半干法将分离胶上的蛋白转移至PVDF膜上;以5%脱脂奶粉37 °C封闭2 h,加入一抗4 °C过夜, TBST洗膜后以HRP标记的IgG二抗37 °C封闭2 h, TBST洗膜后ECL化学发光成像。

**1.2.5 免疫共沉淀分析** 取60 μg细胞总蛋白,加抗SM22α抗体3 μL, IPH缓冲液补齐体积, 4 °C摇动2 h,加入Protein A-agarose, 4 °C过夜。洗涤后收集Protein A-抗原-抗体复合物进行Western blot。

**1.2.6 免疫沉淀分析** 取60 μg细胞总蛋白与小鼠抗p-Ser单克隆抗体混合, 4 °C摇动2 h后加入Protein A-agarose, 4 °C过夜。洗涤后收集Protein A-抗原-

抗体复合物进行Western blot,用兔抗SM22α多抗检测SM22α的磷酸化水平。

**1.2.7 统计学分析** 采用SPSS13.0软件处理,计量资料以均数±标准差表示,两组间比较采用方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PDGF-BB对VSMC细胞活力和细胞周期的影响

MTT分析结果显示,用10 ng/mL PDGF-BB分别处理VSMC 3, 6, 12, 24, 48 h,与对照组相比, VSMC细胞活力呈现时间依赖性增高,刺激24 h时达到高峰,48 h时仍维持在较高水平(图2)。用10 ng/mL PDGF-BB刺激VSMC 24 h后,流式细胞术检测结果显示,与对照组相比, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞数减少,而S期的细胞数升高,两组间差异显著( $P < 0.05$ , 图3)。

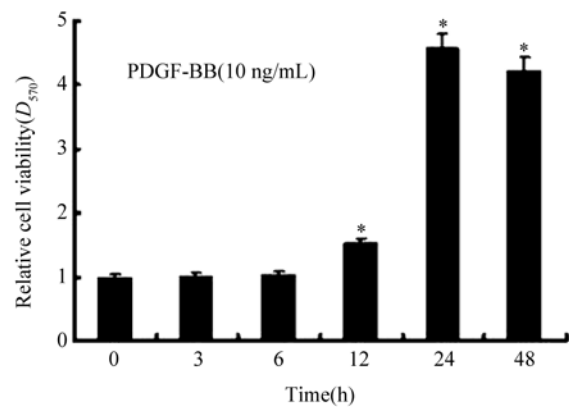


图2 MTT分析检测PDGF-BB刺激不同时间对VSMC活力的影响

Fig.2 The effect of PDGF-BB in different time on VSMC viability examined by MTT assays

\* $P < 0.05$ , 与对照组(0 h)相比。

\* $P < 0.05$  vs control group(0 h).

### 2.2 PDGF-BB对VSMC表型标志物表达的差异影响

用PDGF-BB分别处理VSMC不同时间(3, 6, 12, 24, 48 h),收集细胞,Western blot分析结果显示,静止期的VSMC中仅有少量的增殖相关蛋白PCNA表达,而随着PDGF-BB刺激时间的延长,PCNA的表达量逐渐增高。同时,分化标志蛋白SM22α和SM α-actin的表达量均逐渐减少,于刺激24 h达低谷(图4)。分

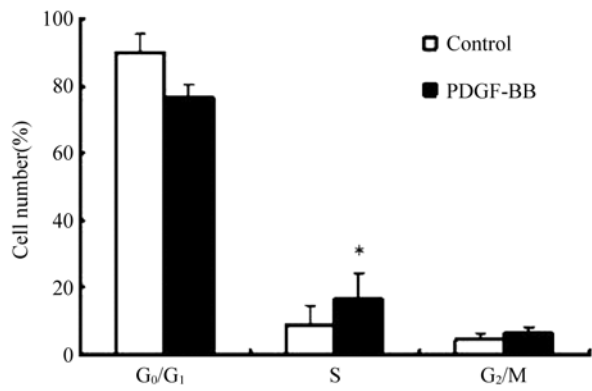


图3 流式细胞技术检测PDGF-BB对VSMC细胞周期的影响  
Fig.3 The effect of PDGF-BB on VSMC cell cycle distribution examined by FCM

\* $P < 0.05$ , 与对照组相比。

\* $P < 0.05$  vs control group.

化标志蛋白表达与细胞增殖活性变化成反向同步关系, 标志VSMC发生表型转化。

### 2.3 PDGF-BB下调SM22 $\alpha$ 表达与其泛素化降解有关

Western blot分析结果显示, PDGF-BB作用于VSMC 12 h, SM22 $\alpha$ 的表达量显著降低, 48 h时仍维持在较低水平(图4)。为了进一步揭示PDGF-BB下调SM22 $\alpha$ 水平的机制, 细胞裂解液用SM22 $\alpha$ 抗体进行免疫沉淀后, 用抗Ub抗体检测磷酸化的SM22 $\alpha$ 水平。结果显示, PDGF-BB作用于VSMC 12 h, SM22 $\alpha$ 的泛素化水平显著增高, 24 h达到高峰, 48 h时仍维持在较高水平(图5)。上述结果表明, SM22 $\alpha$ 泛素化降解加快可能是PDGF-BB下调SM22 $\alpha$ 表达的机制之一, 其泛素化降解的峰值与细胞增殖活性峰值相吻合。

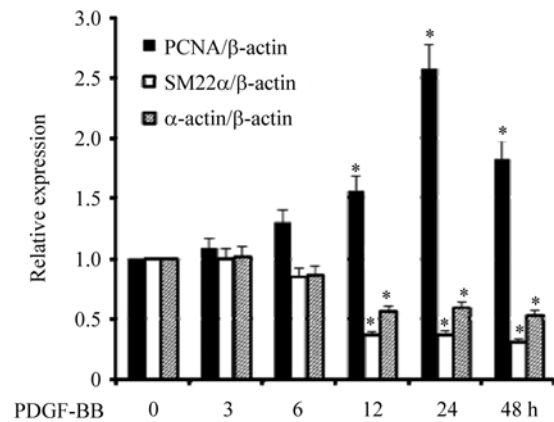
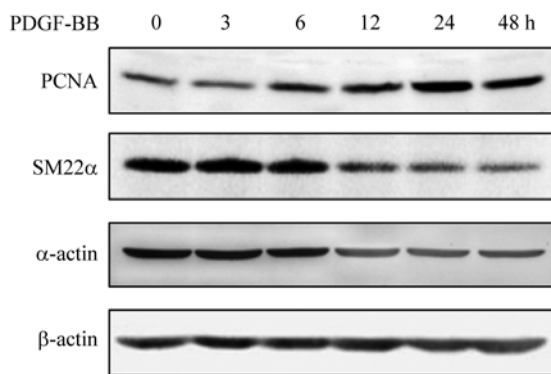


图4 PDGF-BB刺激不同时间对VSMC表型标志物表达的差异影响

Fig.4 The effect of PDGF-BB in different time on the expression of phenotypic markers in VSMC

\* $P < 0.05$ , 与对照组(0 h)相比。

\* $P < 0.05$  vs control group(0 h).

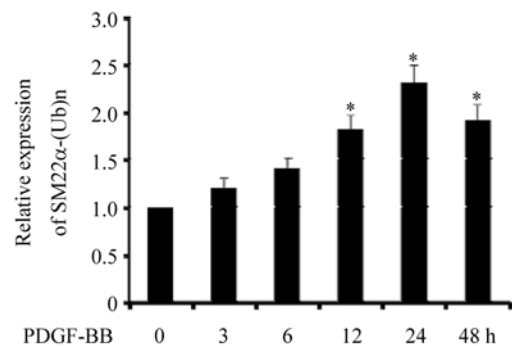
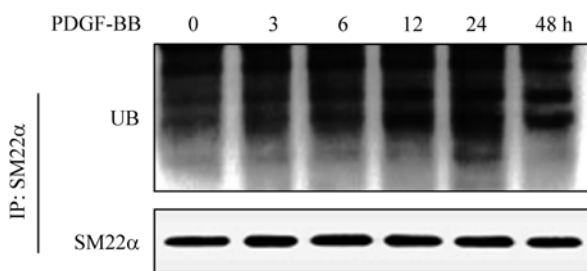


图5 PDGF-BB刺激不同时间对SM22 $\alpha$ 泛素化的影响

Fig.5 The effect of PDGF-BB in different time on ubiquitination of SM22 $\alpha$

\* $P < 0.05$ , 与对照组(0 h)相比。

\* $P < 0.05$  vs control group(0 h).

## 2.4 PDGF-BB诱导SM22 $\alpha$ 磷酸化

为了探讨PDGF-BB加速SM22 $\alpha$ 泛素化降解的上游机制, 细胞裂解液用抗p-Ser抗体进行免疫沉淀后, 用抗SM22 $\alpha$ 抗体检测磷酸化的SM22 $\alpha$ 水平。结果显示, PDGF-BB处理VSMC 3 h, SM22 $\alpha$ 的磷酸化水平显著增高, 6 h达到高峰, 24 h时仍维持在较高水平(图6)。前移的磷酸化峰值, 提示SM22 $\alpha$ 的磷酸化可能加速其泛素化降解。

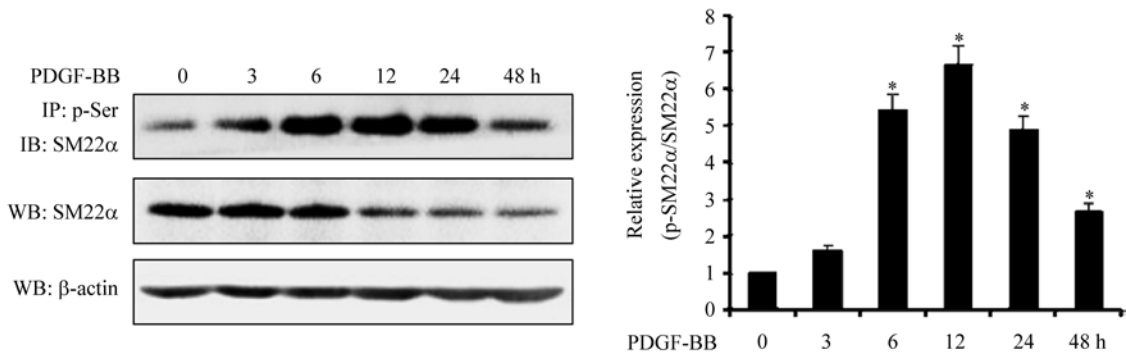


图6 PDGF-BB刺激不同时间对SM22 $\alpha$ 磷酸化的影响

Fig.6 The effect of PDGF-BB in different time on phosphorylation of SM22 $\alpha$

\* $P < 0.05$ , 与对照组(0 h)相比。

\* $P < 0.05$  vs control group(0 h).

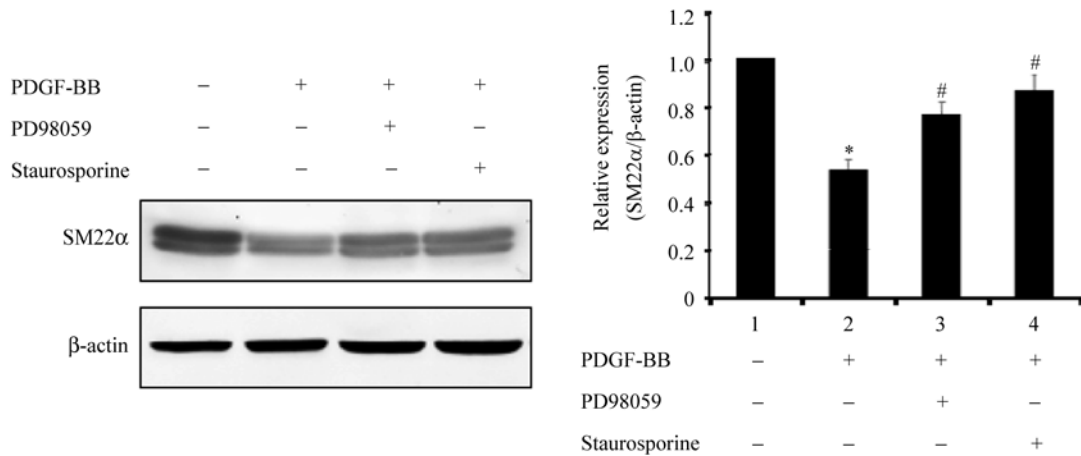


图7 PKC抑制剂和PD98059对SM22 $\alpha$ 表达量的影响

Fig.7 The effect of PKC inhibitor and PD98059 on the expression of SM22 $\alpha$

\* $P < 0.05$ , 与组1相比; # $P < 0.05$ , 与组2相比。

\* $P < 0.05$  vs group 1; # $P < 0.05$  vs group 2.

## 3 讨论

PDGF是动脉粥样硬化形成过程中介导血管内皮细胞、血小板、单核细胞和VSMC之间相互作用的

## 2.5 PDGF-BB诱导SM22 $\alpha$ 磷酸化的信号途径

为了进一步探讨介导SM22 $\alpha$ 磷酸化的信号途径, 利用PD98059和staurosporine分别抑制细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK) 1/2和蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)活性后, 观察PDGF-BB刺激对SM22 $\alpha$ 表达的影响。Western blot分析结果显示, ERK和PKC活性分别被抑制后, PDGF-BB促进SM22 $\alpha$ 泛素化降解的作用消失(图7)。

重要介质之一<sup>[5]</sup>。目前, 已知有PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-AB、PDGF-CC和PDGF-DD几种类型。该因子可与VSMC膜上的PDGF受体(PDGF recep-

tor, PDGFR)结合,通过Ras/GTP逐级激活Raf/MEK/ERK丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路,促进细胞的有丝分裂<sup>[6-7]</sup>,与机体组织的生长发育、创伤愈合、动脉粥样硬化以及肿瘤的发生、发展有密切的关系<sup>[8-9]</sup>。PDGF-BB可通过激活多条信号通路而调节功能蛋白的磷酸化状态和相互作用关系,最终抑制或激活靶基因的表达。本研究结果显示,PDGF-BB可以加速细胞周期由G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期进入S期,诱导VSMC增殖。为了观察PDGF-BB对VSMC表型转化的影响,本实验检测了增殖相关蛋白PCNA,分化相关蛋白SM22 $\alpha$ 与SM $\alpha$ -actin的表达变化情况。结果显示,在PDGF-BB刺激的VSMC中,PCNA增加,细胞增殖活跃;SM22 $\alpha$ 和SM $\alpha$ -actin降低,表明细胞发生去分化。VSMC表型标志物的表达变化与细胞周期分析结果相一致。

SM22 $\alpha$ 是分化型VSMC特异表达的一种小分子蛋白质,该蛋白的表达活性与VSMC表型状态密切相关。近年来的研究表明,SM22 $\alpha$ 具有抑制VSMC表型由收缩型转化成合成型和抑制动脉粥样硬化发生过程中斑块形成的作用<sup>[10]</sup>。当遭受损伤刺激或体外培养时,VSMC发生表型转化而快速去分化,该过程的一个重要标志就是SM22 $\alpha$ 水平的快速降低<sup>[3]</sup>。PDGF等丝裂原刺激不仅诱导这些分化标志基因表达降低,而且还可能是由于加速它们的泛素化降解<sup>[3]</sup>。Chen等<sup>[11]</sup>报道,血清刺激可诱导分化相关因子Krüppel样因子(Krüppel-like factor, KLF)4的泛素化降解,进而使KLF4表达降低。最近有研究证实,CHIP作为泛素连接酶,通过与myocardin相互作用,进而启动后者泛素化降解,抑制myocardin诱导的VSMC分化<sup>[12]</sup>。本研究发现,PDGF-BB可诱导SM22 $\alpha$ 泛素化水平的升高和降解加快。免疫共沉淀分析结果显示,PDGF-BB作用于VSMC 12 h,SM22 $\alpha$ 的泛素化水平显著增高,24 h达到高峰,48 h时仍维持在较高水平。表明PDGF-BB下调SM22 $\alpha$ 表达的机制之一可能是由于SM22 $\alpha$ 泛素化降解加快。

细胞内蛋白质泛素化是重要的翻译后修饰方式之一,受到细胞外信号的严格调控。在很多情况下,这种调控依赖于蛋白质的磷酸化。蛋白质丝氨酸和苏氨酸的磷酸化可以使底物蛋白质迅速经泛素-蛋白酶体途径降解。我们的研究表明,PDGF-BB作用于VSMC 3 h,SM22 $\alpha$ 的磷酸化水平显著增高,6 h达到高峰,24 h时仍维持在较高水平。提示

PDGF-BB诱导SM22 $\alpha$ 磷酸化水平升高要早于其对泛素化水平的影响,SM22 $\alpha$ 的磷酸化可能加速其泛素化降解。我们课题组近期发现,SM22 $\alpha$ 是一种内源性Ras抑制因子,通过与Ras相互作用而抑制Ras募集和激活Raf-1,阻断ERK1/2信号级联的诱导,进而阻滞细胞周期进程,抑制PDGF-BB诱导的VSMC增殖,维持VSMC收缩表型的稳定性<sup>[4,13]</sup>。序列分析显示,SM22 $\alpha$ 具有一个PKC磷酸化位点(S/T-X/R/K)Ser181<sup>[14]</sup>。本实验结果显示,ERK1/2和PKC活性分别被抑制后,PDGF-BB促进SM22 $\alpha$ 泛素化降解的作用消失,从而可以推测,PDGF-BB通过激活ERK-PKC信号通路,促进SM22 $\alpha$ 泛素化降解。综上所述,在VSMCs中,PDGF-BB部分通过激活ERK信号通路,促进PKC磷酸化SM22 $\alpha$ ,进而发生泛素依赖的蛋白质降解,从而降低SM22 $\alpha$ 的蛋白含量,进而影响VSMC表型转化。

## 参考文献 (References)

- 1 Shimoyama T, Hiraoka S, Takemoto M, Koshizaka M, Tokuyama H, Tokuyama T, *et al.* CCN3 inhibits neointimal hyperplasia through modulation of smooth muscle cell growth and migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30(4): 675-82.
- 2 Sun SG, Zheng B, Han M, Fang XM, Li HX, Miao SB, *et al.* miR-146a and Krüppel-like factor 4 form a feedback loop to participate in vascular smooth muscle cell proliferation. *EMBO Rep* 2011; 12(1): 56-62.
- 3 Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* 2004; 84(3): 767-801.
- 4 Dong LH, Wen JK, Liu G, McNutt MA, Miao SB, Gao R, *et al.* Blockade of the Ras-extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway is involved in smooth muscle 22 $\alpha$ -mediated suppression of vascular smooth muscle cell proliferation and neointima hyperplasia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30(4): 683-91.
- 5 Boucher P, Gotthardt M, Li WP, Anderson RG, Herz J. LRP: Role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis. *Science* 2003; 300(5617): 329-32.
- 6 Okano J, Nagahara T, Matsumoto K, Murawaki Y. Caffeine inhibits the proliferation of liver cancer cells and activates the MEK/ERK/EGFR signaling pathway. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; 102(6): 543-51.
- 7 Nakata S, Fujita N, Kitagawa Y, Okamoto R, Ogita H, Takai Y. Regulation of platelet-derived growth factor receptor activation by afadin through SHP-2: Implications for cellular morphology. *J Biol Chem* 2007; 282(52): 37815-25.
- 8 Doanes AM, Irani K, Goldschmidt-Clermont PJ, Finkel T. A requirement for rac1 in the PDGF-stimulated migration of fibroblasts and vascular smooth cells. *Biochem Mol Biol Int* 1998; 45(2): 279-87.
- 9 Inoue K, Cynshi O, Kawabe Y, Nakamura M, Miyauchi K, Kimura T, *et al.* Effect of BO-653 and probucol on c-MYC and

- PDGF-A messenger RNA of the iliac artery after balloon denudation in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 2002; 161(2): 353-63.
- 10 Feil S, Hofmann F, Feil R. SM22 $\alpha$  modulates vascular smooth muscle cell phenotype during atherogenesis. *Circ Res* 2004; 94(7): 863-5.
- 11 Chen ZY, Wang X, Zhou Y, Offner G, Tseng CC. Destabilization of Krüppel-like factor 4 protein in response to serum stimulation involves the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res* 2005; 65(22): 10394-400.
- 12 Xie P, Fan Y, Zhang H, Zhang Y, She M, Gu D, *et al.* CHIP represses myocardin-induced smooth muscle cell differentiation via ubiquitin-mediated proteasomal degradation. *Mol Cell Biol* 2009; 29(9): 2398-408.
- 13 苗穗兵, 董丽华, 温进坤, 韩梅. SM22 $\alpha$ 抑制球囊损伤诱导的新生内膜形成. *中国细胞生物学学报*(Miao Suibing, Dong Lihua, Wen Jinkun, Han Mei. SM22 $\alpha$  inhibits neointimal hyperplasia after balloon injury in rat. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2010; 32(4): 541-5.
- 14 Fu Y, Liu HW, Forsythe SM, Kogut P, McConville JF, Halayko AJ, *et al.* Mutagenesis analysis of human SM22: Characterization of actin binding. *J Appl Physiol* 2000; 89(5): 1985-90.

## Mechanism of PDGF-BB Down-regulating SM22 $\alpha$ Expression in Vascular Smooth Muscle Cells

Dong Lihua, Shu Yanan, Xue Zhenying, Han Mei\*

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Basic Medicine, Key Laboratory for Medical Biotechnology of Hebei Province, Key Laboratory of Neural and Vascular Biology, Ministry of Education, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

**Abstract** Vascular smooth muscle cell (VSMC) phenotypic modulation is considered to be key event in the development of vascular proliferative disorders. Platelet-derived growth factor (PDGF)-BB inhibits the expression of differentiation marker genes and promotes their degradation. Here, the phosphorylation and ubiquitination of smooth muscle 22 alpha (SM22 $\alpha$ ) stimulated by PDGF-BB was identified by Western blot analysis and coimmunoprecipitation analysis. The results showed PDGF-BB induced the proliferation of VSMCs. PDGF-BB increased the expression of PCNA, and reduced the levels of SM  $\alpha$ -actin and SM22 $\alpha$ . PDGF-BB increased the expression of phosphorylated and ubiquitinated SM22 $\alpha$ , and the raise of phosphorylated level was earlier than the effect to ubiquitination. Moreover, after the ERK and PKC activity were inhibited, the SM22 $\alpha$  phosphorylation and destabilization stimulating by PDGF-BB was disappeared. Collectively, these results indicate that destabilization of SM22 $\alpha$  following PDGF-BB is mediated, at least in part, through ERK-PKC-depended pathway.

**Key words** vascular smooth muscle cells; phenotypic modulation; smooth muscle 22 alpha; ubiquitination

Received: March 14, 2012 Accepted: June 8, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.31071003, No.31100989), the Natural Science Foundation of Hebei Province (No.C2011206154) and the Outstanding Youth Foundations of the Department of Education of Hebei Province (No.Y2011209)

\*Corresponding author. Tel: 86-310-86266321, E-mail: hanmei@hebm.edu.cn