

# Krüppel样因子5介导血管平滑肌细胞的增殖和迁移

刘 玉<sup>1,2</sup> 王海军<sup>3</sup> 李爱英<sup>2</sup> 李 楠<sup>3</sup> 韩 梅<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>河北医科大学基础医学院生物化学教研室, 石家庄 050017; <sup>2</sup>河北医科大学中医学院生物化学教研室, 河北省医学生物技术重点实验室, 石家庄 050091; <sup>3</sup>河北大学附属医院普通外科, 保定 071000)

**摘要** Krüppel样因子5(krüppel-like factor 5, KLF5)是KLF家族中与胚胎发育、细胞增殖和肿瘤发生密切相关的转录调节因子。为观察KLF5在体外培养的大鼠血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)增殖和迁移活性中的作用,通过构建KLF5腺病毒表达载体并感染细胞以过表达KLF5或用特异性siRNA敲低KLF5,用MTT、流式细胞术以及免疫细胞化学染色和伤口愈合实验检测其对VSMCs增殖和迁移活性的影响。结果发现, KLF5过表达可加速细胞由G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期向S期转变,促进细胞增殖和迁移;反之,敲低KLF5后细胞增殖活性明显低于转染无关序列NS-siRNA对照组细胞, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞数所占比例增多, S期细胞数所占比例减少, VSMCs迁移活性也明显降低。结果表明KLF5可参与介导VSMCs的增殖和迁移。

**关键词** Krüppel样因子5; 增殖; 迁移; 血管平滑肌细胞

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)异常增殖是高血压、动脉粥样硬化和血管成形术后再狭窄等血管重塑性疾病发生、发展的重要细胞病理学基础<sup>[1]</sup>。VSMC在血管损伤因素刺激下,可发生表型转化而获得增殖能力。虽然多种细胞因子和血管活性物质能促进VSMC的增殖,但血管紧张素II(angiotensin II, Ang II)在VSMC增殖及血管重塑性疾病的发生发展过程中处于关键地位。已经证明, Ang II不仅是VSMC收缩的诱导剂,还是VSMC重塑和炎症应答的致病因素之一。已有研究证实, AT1-ERK1/2通路参与介导Ang II的促增殖活性<sup>[2-3]</sup>。Krüppel样因子5(krüppel-like factor 5, KLF5)通过与另一转录因子c-Jun相互作用促进Ang II诱导的VSMC增殖<sup>[4]</sup>。

KLF5是KLF家族中与胚胎发育、细胞增殖和肿瘤发生密切相关的转录因子<sup>[5-7]</sup>。在心血管系统, KLF5在胚胎期的VSMC中高表达,而在成年血管中该蛋白的表达活性迅速下调,当血管损伤时, VSMC中KLF5的表达又迅速上调<sup>[8-9]</sup>。KLF5可通过上调细胞周期调节蛋白如cyclin D1、cyclin B、Cdc2的表达而发挥促细胞增殖作用<sup>[10-12]</sup>。本研究采用过表达和敲低技术观察KLF5在VSMC增殖和迁移中的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

DMEM培养基(Gibco公司),兔抗KLF5多克隆抗体、小鼠抗增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)单克隆抗体和小鼠抗β-actin单克隆抗体(Santa Cruz公司), Ang II(Sigma公司)。脂质体2000(Invitrogen公司),免疫组化试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司), MTT(噻唑蓝)试剂(Sigma公司),反转录体系和扩增体系(Promega公司),其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养与分组** 选取80~100 g健康雄性SD大鼠,取胸腹主动脉血管中膜,用贴块法分离、培养VSMC<sup>[13]</sup>。细胞在含10% FBS的DMEM中生长至汇合后,0.25%胰蛋白酶消化传代,取3-6代细胞进行实验。

用KLF5腺病毒(Ad-KLF5)表达载体和空病毒(Ad)感染VSMC,于感染48 h后用于实验。

VSMC生长至50%~60%密度时,分别以KLF5-siRNA及无关序列对照siRNA(non-specific siRNA,

收稿日期: 2012-06-25 接受日期: 2012-08-20

国家自然科学基金(No.31071003)、河北省自然科学基金(No. C2009001053)和河北省教育厅(No.2010262)资助项目

\*通讯作者。Tel: 0311-86265563, E-mail: hanmei@hebm.edu.cn

NS-siRNA)按 50 nmol/L 浓度转染 VSMC, 20 h 后更换为含 5% FBS 的培养基; 加入  $1 \times 10^{-7}$  mol/L 的 Ang II 或 PBS 对照孵育 24 h, 以诱导 KLF5 表达。用 Western blot 验证 KLF5 过表达效率和敲低效率。

**1.2.2 MTT 分析** 将处于对数生长期的 VSMC 接种于 96 孔板中, 每孔 100  $\mu$ L (约  $3 \times 10^4$  细胞), 每组设 6 个复孔。于上述处理结束前 4 h, 每孔加入 MTT (5 mg/mL) 100  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C 孵育后, 加 DMSO 200  $\mu$ L, 在酶标仪上于 570 nm 波长处测吸光度 ( $D$  值)。实验重复 3 次。

**1.2.3 FCM 检测细胞周期变化** 采用碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 荧光染色法。应用 Beckman Coulter 公司生产的 Epics-XL-II 型流式细胞仪进行检测。采用 DNA 细胞周期分析软件进行细胞周期分析, 依据 DNA 分布组方图, 计算出各时相分布的百分比。

**1.2.4 伤口愈合实验** 按文献 [14] 的方法, 将 VSMCs 接种于玻片上, 用无菌刀片将玻片中央的细胞划一伤痕, PBS 洗净被刮下的细胞, 按照上述条件处理后, 低倍镜下观察细胞伤口愈合情况。任意取 3 个视野, 计数迁移至伤痕处的细胞数, 以此表示细胞的迁移活性。

**1.2.5 细胞免疫化学染色** 接种于盖玻片上的 VSMCs 按照上述条件处理后, 取出玻片, 按试剂盒说明书进行细胞免疫化学染色。于镜下观察细胞内棕黄色颗粒的分布及数量。阴性对照用 PBS 替代一抗, 随机选取 5 个视野, 计数阳性染色细胞。

**1.2.6 总 RNA 提取及 RT-PCR** 按照 Invitrogen 公司的产品手册, 采用 Trizol 一步法, 从不同处理组的 VSMCs 中提取总 RNA。按照 Promega 公司 M-MLV 逆转录酶试剂盒说明书进行反转录反应。之后建立 PCR 反应体系, 置 PCR 仪上进行扩增。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 扫描成像, 用凝胶成像分析系统进行密度分析。以  $\beta$ -actin 作为内参照。所用引物序列如下: KLF5 上游引物: 5'-CTT CAT CTC TCG GTC CCT TC-3', 下游引物: 5'-CGG GTT ACT CCT TCT GTT GT-3'; cyclin D1 上游引物: 5'-GAC ACC AAT CTC CTC AAC G-3', 下游引物: 5'-TTG TTC TCA TCC GCC TCT-3';  $\beta$ -actin 上游引物: 5'-CAG GGT GTG ATG GTG GG-3', 下游引物: 5'-GGA AGA GGA TGC GGC AG-3'。

**1.2.7 细胞总蛋白提取与 Western blot 印迹分析** 收集各组细胞, 用冷 PBS 洗涤 3 次后, 将细胞重悬于细胞裂解液 (1% NP40, 150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 10% 甘油, 1 mmol/L  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L DTT) 中, 冰浴 30 min, 使细胞充分裂解。4  $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 10 min, 收集上清, 用改良的 Lowry 法进行蛋白质定量。SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离、转膜, 5% 脱脂奶粉 (TTBS) 封闭 2 h。一抗、二抗孵育, ECL 化学发光法检测。信号强度用 Bio 1D 图像分析软件进行相对定量分析。

**1.2.8 统计学处理** 实验数据用均数  $\pm$  标准差表示, 采用 SPSS 10.0 统计分析软件进行组间及组内方差分析。Origin 6.0 Professional 软件作图。

## 2 结果

### 2.1 KLF5 上调增殖了相关蛋白的表达

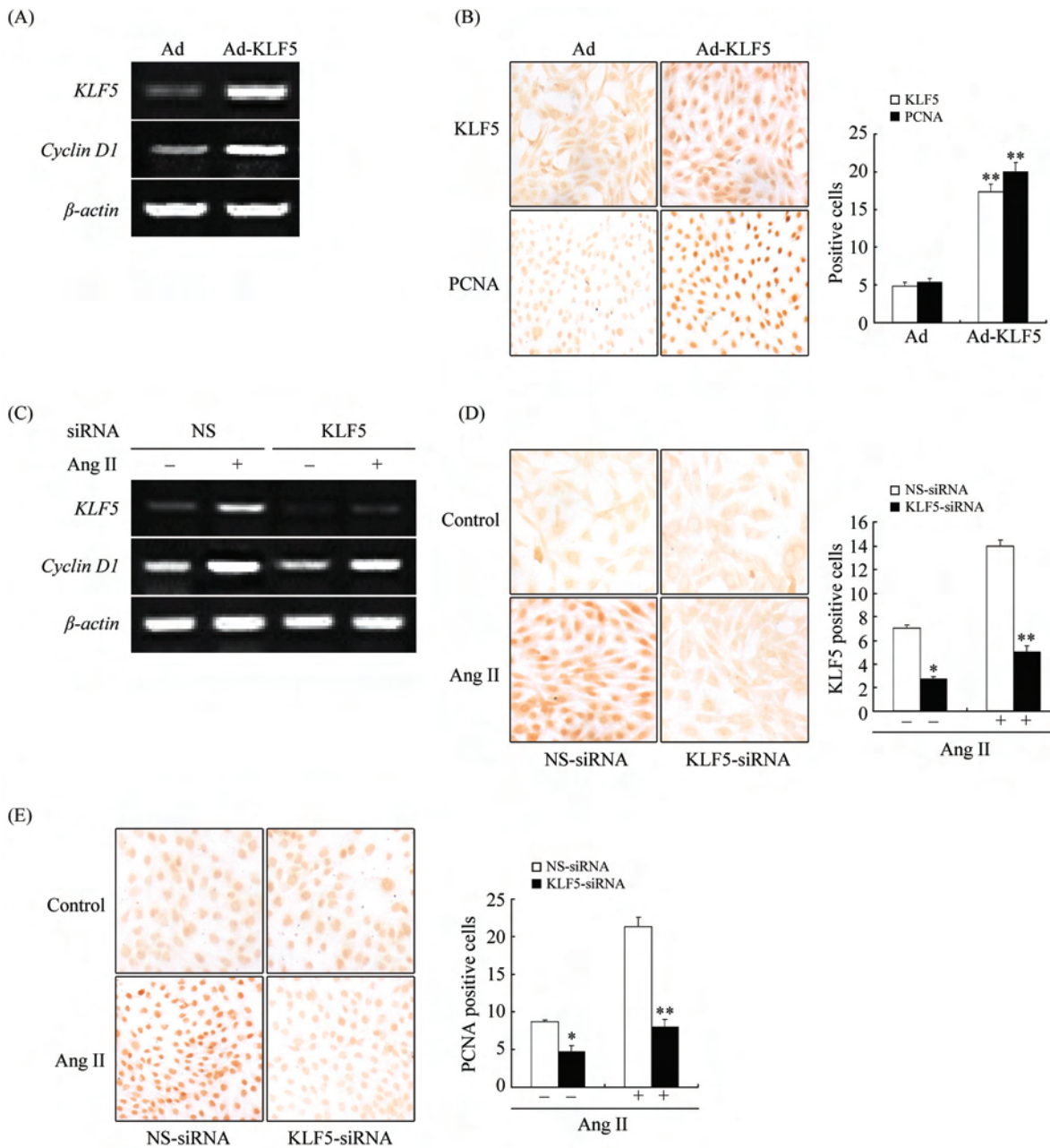
将 Ad-KLF5 腺病毒和空病毒调整为同一滴度 ( $1 \times 10^9$  pfu/mL) 后感染 VSMC。RT-PCR 实验结果显示, 在 Ad-KLF5 感染的 VSMC 中, 外源 KLF5 得到高效表达; 细胞周期蛋白 *cyclin D1* 的表达上调与 KLF5 过表达具有明显的相关性; 细胞免疫化学染色结果显示, 感染 Ad-KLF5 的 VSMC 中, 其 KLF5 和 PCNA 阳性染色的细胞数明显增多 ( $P < 0.01$ ), 棕黄色阳性颗粒主要分布在核内 (图 1A 和图 1B)。

反之, 将 KLF5 特异性小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 导入 VSMC, 敲低 Ang II 诱导的内源性 KLF5 的表达后, *cyclin D1* 和 *PCNA* 的表达也明显受抑制 (图 1C-图 1E)。

### 2.2 KLF5 促进 VSMCs 增殖

MTT 分析结果显示, Ad-KLF5 感染的 VSMC 细胞增殖活性明显高于腺病毒空载体感染的细胞 ( $P < 0.01$ , 图 2A)。流式细胞术检测结果显示, KLF5 腺病毒感染的 VSMCs S 期细胞数明显增多 ( $P < 0.01$ , 图 2B)。以上结果提示, KLF5 过表达可促进细胞从  $G_0/G_1$  期向 S 期转变。

在用 Ang II 处理和未处理的 VSMCs 中, 转染 KLF5-siRNA 组的细胞增殖活性均明显低于转染无关序列 NS-siRNA 对照组细胞 ( $P < 0.01$ , 图 2C); 流式细胞术检测结果显示, 与转染无关序列 NS-siRNA 对照组细胞相比, 转染 KLF5-siRNA 组细胞其  $G_0/G_1$  期细胞数所占



A,C: RT-PCR方法检测KLF5、cyclin D1和β-actin表达; B,D,E: 免疫细胞化学方法检测KLF5和PCNA表达。\*P<0.05, \*\*P<0.01, 与对照组相比。  
A,C: RT-PCR analysis for expression of KLF5, cyclin D1 and β-actin; B,D,E: immunocytochemistry staining for expression of KLF5 and PCNA.  
\*P<0.05, \*\*P<0.01 compared with control group.

图1 KLF5上调VSMCs中cyclin D1和PCNA基因表达

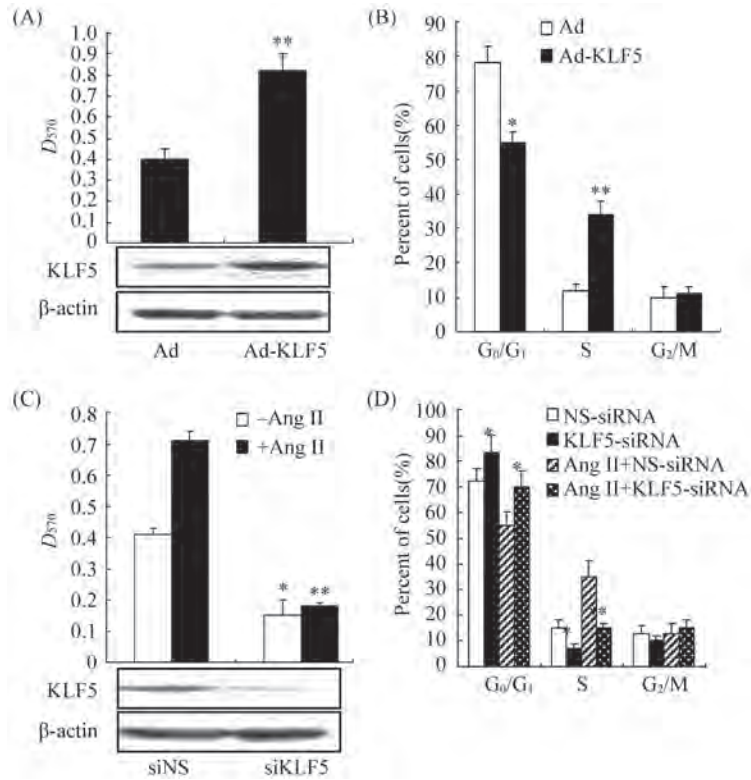
Fig.1 KLF5 up-regulates the expression of cyclin D1 and PCNA in VSMCs

比例增多, S期细胞数所占比例减少(P<0.01, 图2D)。以上结果提示, KLF5在Ang II诱导的VSMCs增殖中发挥了重要作用。

### 2.3 KLF5促进VSMCs迁移

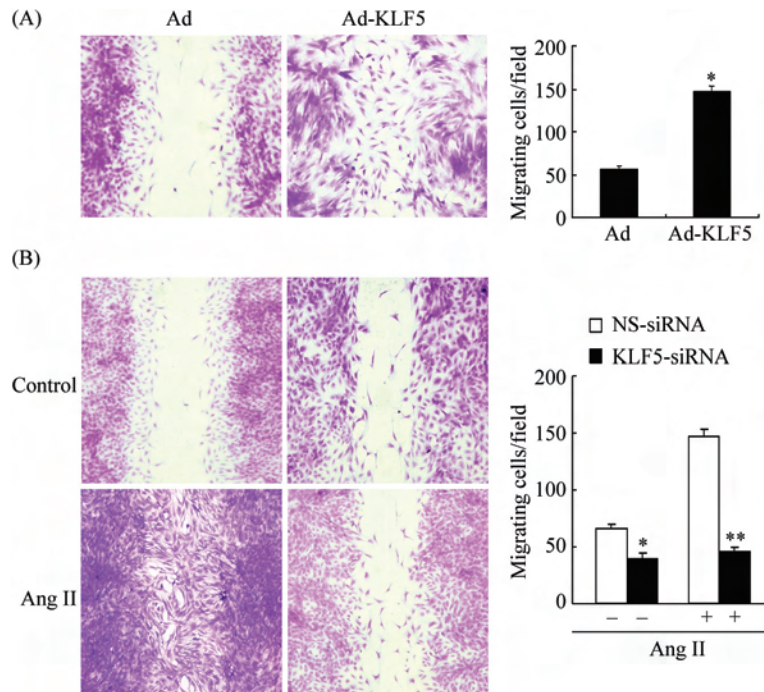
伤口愈合实验结果显示, 被KLF5腺病毒感染的

VSMC细胞迁移活性明显增高, 显著高于空病毒感染细胞(P<0.01, 图3A)。在Ang II存在的条件下, 转染KLF5-siRNA与转染NS-siRNA的VSMC相比, 细胞的迁移活性明显降低(图3B)。表明KLF5可增加VSMC的迁移活性。



A,C: MTT法分析血管平滑肌细胞的增殖活性; B,D: 流式细胞术检测细胞周期。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与对照组相比。  
A,C: proliferation activity of VSMCs assayed by MTT; B,D: cell cycle analysis by FACS. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with control group.

图2 KLF5促进VSMCs增殖  
Fig.2 The effects of KLF5 on VSMCs proliferation activity



伤口愈合实验检测血管平滑肌细胞的迁移活性。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与对照组相比。  
VSMC migration activities were measured by wound healing assays. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with control group.

图3 KLF5促进VSMCs迁移  
Fig.3 The effects of KLF5 on VSMCs migration activity

### 3 讨论

VSMC的增殖、迁移和细胞外基质的合成是高血压、动脉粥样硬化和血管成形术后再狭窄等血管重塑性疾病发生、发展的重要细胞病理学基础<sup>[1]</sup>。然而,有关VSMC增殖的转录调控机制尚不清楚。KLF5是KLF家族转录因子中的成员,多种细胞系中的研究表明,KLF5是一个重要的生长促进基因和分化抑制基因<sup>[6-7]</sup>。当KLF5作为一个独立的转录因子结合于VSMC增殖标志基因*SMemb*的启动子区时,KLF5在血管中的作用首次被证实<sup>[15]</sup>。在血管重塑过程中,KLF5可激活多种基因的表达,如PDGF-A/B、Egr-1、血浆酶原激活抑制因子、可诱导型一氧化氮合酶、血管内皮生长因子受体和几种细胞周期促进基因如*cyclin D1*、*cyclin B1*、*Cdc2*<sup>[10-12]</sup>。血清刺激细胞呈现增殖状态时,KLF5高水平表达;而在无血清培养的静止细胞中,KLF5表达迅速下调。在血管组织中,KLF5在胚胎的平滑肌细胞中高表达,而在血管发展过程中表达迅速下调,更重要的是,在血管损伤后血管内膜的平滑肌细胞增生过程中KLF5的表达再次上调<sup>[16]</sup>。已有研究表明,在NIH3T3细胞中,KLF5可通过加速G<sub>1</sub>/S期转变和促进有丝分裂而促进细胞生长和细胞周期进程<sup>[17]</sup>。此外,有研究报道,在Ang II诱导VSMC增殖中KLF5表达增加,提示KLF5可介导Ang II诱导的VSMC增殖<sup>[18]</sup>。

为了进一步阐明KLF5在VSMC增殖中的作用,我们分别通过过表达和敲低KLF5表达来观察其对VSMC增殖和迁移的影响。过表达KLF5的VSMC细胞增殖活性和迁移活性明显升高,且在KLF5表达水平显著升高的同时,细胞周期蛋白*cyclin D1*表达水平也显著升高。鉴于KLF5以上的作用,封闭其表达后再给予Ang II刺激,是否会阻断Ang II对VSMC诱导增殖的作用呢?我们利用RNA干扰技术,将KLF5特异性小干扰RNA导入VSMC,阻断内源性KLF5的表达,结果发现,封闭内源性KLF5表达再给予Ang II刺激后,细胞增殖活性和迁移活性降低,同时*cyclin D1*表达水平也显著降低。这表明KLF5有可能通过*cyclin D1*在VSMC增殖和迁移中发挥重要作用。

总之,本研究证实KLF5可介导VSMC的增殖和迁移过程,该发现为进一步揭示VSMC增殖的转录调控机制奠定了基础。

### 参考文献 (References)

- Li HX, Han M, Bernier M, Zheng B, Sun SG, Su M, *et al.* Krüppel-like factor 4 promotes differentiation by transforming growth factor- $\beta$  receptor-mediated Smad and p38 MAPK signaling in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2010; 285(23): 17846-56.
- Gervais M, Dugourd C, Muller L, Ardiel C, Canton B, Loviconi L, *et al.* Akt down-regulates ERK1/2 nuclear localization and angiotensin II-induced cell proliferation through PEA-15. *Mol Biol Cell* 2006; 17(9): 3940-51.
- Dugourd C, Gervais M, Corvol P, Monnot C. Akt is a major downstream target of PI3-kinase involved in angiotensin II-induced proliferation. *Hypertension* 2003; 41(4): 882-90.
- 刘 玉, 王海军, 李爱英, 韩 梅. KLF5与c-Jun相互作用促进Ang II诱导的血管平滑肌细胞增殖. *中国生物化学与分子生物学报*(Liu Yu, Wang Haijun, Li Aiyang, Han Mei. Interaction between KLF5 and c-Jun promotes Ang II-induced VSMC proliferation. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*) 2011; 27(7): 52-8.
- Shields JM, Christy RJ, Yang VW. Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Krüppel-like factor expressed during growth arrest. *J Biol Chem* 1996; 271(33): 20009-17.
- Garrett-Sinha LA, Eberspaecher H, Seldin MF, Crombrughe BD. A gene for a novel zinc-finger protein expressed in differentiated epithelial cells and transiently in certain mesenchymal cells. *J Biol Chem* 1996; 271(49): 31384-90.
- Ghaleb AM, Nandan MO, Chanchevalap S, Dalton WB, Hisamuddin IM, Yang VW. Krüppel-like factors 4 and 5: the yin and yang regulators of cellular proliferation. *Cell Res* 2005; 15(2): 92-6.
- Bateman NW, Tan D, Pestell RG, Black JD, Black AR. Intestinal tumor progression is associated with altered function of KLF5. *J Biol Chem* 2004; 279(13): 12093-101.
- Watanabe N, Kurabayashi M, Shimomura Y, Kawai-Kowase K, Hoshino Y, Manabe I, *et al.* BTEB2, a Krüppel-like transcription factor, regulates expression of the SMemb/Nonmuscle myosin heavy chain B (SMemb/NMHC-B) gene. *Circ Res* 1999; 85(2): 182-91.
- Alvarez-Castelao B, Castano JG. Mechanism of direct degradation of IkappaBalpha by 20S proteasome. *FEBS Lett* 2005; 579(21): 4797-802.
- Geisterfer AA, Peach MJ, Owens GK. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res* 1988; 62(4): 749-56.
- Schorb W, Peeler TC, Madigan NN, Conrad KM, Baker KM. Angiotensin II-induced protein tyrosine phosphorylation in neonatal rat cardiac fibroblasts. *J Biol Chem* 1994; 269(30): 19626-32.
- Han M, Wen JK, Zheng B, Cheng Y, Zhang C. Serum deprivation results in redifferentiation of human umbilical vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 291(1): C50-8.
- Ma J, Wang Q, Fei T, Han JD, Chen YG. MCP-1 mediates TGF- $\beta$ -induced angiogenesis by stimulating vascular smooth muscle cell migration. *Blood* 2007; 109(3): 987-94.
- Aizawa K, Suzuki T, Kada N, Ishihara A, Kawai-Kowase K, Matsumura T, *et al.* Regulation of platelet-derived growth

- factor-A chain by Krüppel-like factor 5: New pathway of cooperative activation with nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* 2004; 279(1): 70-6.
- 16 Suzuki T, Aizawa K, Matsumura T, Nagai R. Vascular implications of the Krüppel-like family of transcription factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25(6): 1135-41.
- 17 Sun R, Chen X, Yang VW. Intestinal-enriched Krüppel-like factor (Krüppel-like factor 5) is a positive regulator of cellular proliferation. *J Biol Chem* 2001; 276(10): 6897-900.
- 18 Gao DF, Niu XL, Ning N, Hao GH. Regulation of angiotensin II-induced Krüppel-like factor 5 expression in vascular smooth muscle cells. *Biol Pharm Bull* 2006; 29(10): 2004-8.

## Krüppel-like Factor 5 Promotes VSMC Proliferation and Migration

Liu Yu<sup>1,2</sup>, Wang Haijun<sup>3</sup>, Li Aiyang<sup>2</sup>, Li Nan<sup>3</sup>, Han Mei<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>The Key Laboratory of Medical Biotechnology of Hebei, Department of Biochemistry, Institute of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; <sup>2</sup>Department of Biochemistry, Traditional Chinese Medical College, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050091, China; <sup>3</sup>Department of General Surgery, Hebei University, Baoding 071000, China)

**Abstract** Krüppel-like factor 5 (KLF5), a member of the Sp/KLF family of zinc finger factors, is a key regulator of cardiovascular remodeling. To determine the role of KLF5 in cell proliferation and migration, VSMCs were infected with Ad-KLF5 to over-express KLF5, and transfected KLF5-specific siRNA to knockdown the endogenous KLF5, respectively. The activity of the cell proliferation and migration was detected using MTT assay, flow cytometric analysis, immunocytochemistry and wound healing assays, respectively. The results showed that the over-expression of KLF5 increased the expression of PCNA protein in VSMCs, and resulted in an increase in proliferation and number of S-phase cells, compared with empty vector controls. In addition, the migration activity increased in KLF5-overexpressed VSMC. Conversely, the knockdown of KLF5 by specific siRNA abolished Ang II-induced cell growth via reduction of the number of S-phase cells, inhibited the migration of VSMCs. These findings indicate that KLF5 is required for VSMC proliferation and migration.

**Key words** KLF5; proliferation; migration; VSMC

Received: June 25, 2012 Accepted: August 20, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.31071003), the Natural Science Foundation of Hebei Province (No.C2009001053) and the Education Department of Hebei Province (No.2010262)

\*Corresponding author. Tel: 86-311-86265563, E-mail: hanmei@hebm.edu.cn