

Rho-GDI α 抑制尼古丁诱导的血管平滑肌细胞迁移

曲明娟* 舒霏霏 靖美东 张 莉

(鲁东大学生命科学学院, 烟台 264010)

摘要 研究尼古丁对大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)迁移的影响和机制, 为探讨吸烟加速动脉粥样硬化等心血管疾病的机制研究提供实验依据。用终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的尼古丁作用于体外培养的大鼠 VSMCs 24 h, 以不加尼古丁的细胞为对照组, 采用迁移小室法(Transwell)和划痕法检测有或无尼古丁条件下 VSMCs 的迁移情况, 实时定量 RT-PCR 检测 Rho 家族活性调节因子 Rho-GDI α 的表达; RNA 干扰抑制 Rho-GDI α 的表达, 探讨其在尼古丁诱导的 VSMCs 迁移中的作用。迁移小室法和划痕法分别显示了尼古丁组的 VSMCs 迁移数量和距离明显比对照组的远; 尼古丁显著抑制 Rho-GDI α 的 mRNA 表达; RNA 干扰 Rho-GDI α 后, VSMCs 的迁移能力明显提高。结果提示, 尼古丁可能部分通过抑制 Rho-GDI α 的表达促进 VSMCs 的迁移。

关键词 尼古丁; 血管平滑肌细胞; 迁移; 鸟苷酸分离抑制因子; RNA 干扰

Rho 激酶能够参与多种心血管疾病的发病过程, 抑制 Rho 激酶能逆转相应的病理过程。临床研究中应用 Rho 激酶抑制剂—fasudil 治疗高血压、心绞痛和肺动脉高压取得一定疗效^[1,2], 但 fasudil 的应用无法排除肝功能损害等不良反应, 因此无或少毒副作用的生物制剂的开发对心血管病的防治具有重要临床意义。鸟苷酸分离抑制因子(Guanine nucleotide dissociation inhibitors, GDIs)作为 Rho 激酶磷酸化的重要调控因子, 包括 3 个亚型: $-\alpha(\alpha)$ 、 $-\beta$ 和 $-\gamma$ 。Rho-GDI α 是其中含量最多、分布最广的一种, 其通过与 RhoA、Rac 和 Cdc42 结合或解聚有效抑制或激活上述 Rho 蛋白的活性^[3]。我们以往的研究^[4]显示, Rho-GDI α 可以通过抑制 Rac1 的磷酸化抑制高张应力诱导的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)的迁移, 提示 Rho-GDI α 对防治动脉粥样硬化有明显作用。吸烟是加速心脑血管疾病发生的重要危险因素之一。尼古丁作为烟草的主要成分可以影响多种细胞的功能^[5-7], 但其对 VSMCs 迁移的影响机制尚无统一定论。因此, 本文拟采用 RNA 干扰的方法研究 Rho 激酶负性调控因子 Rho-GDI α 在尼古丁诱导的 VSMCs 迁移中的作用, 为防治吸烟引起的血管粥样硬化提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

以 NCBI GenBank 提供的大鼠 Rho-GDI α (No. NM_001007005) mRNA 序列为模板, 由上海吉玛生物

制药公司设计并合成 Rho-GDI α 的 siRNA 序列: 上游引物: 5'-AGC ACU CU G UGA ACU ACA AdT dT-3', 下游引物: 5'-UUG UAG UUC ACA GAG UGC UCD G-3'。所有 PCR 引物均由上海生工生物技术有限公司合成。2 \times 实时 RT-PCR 绿色荧光试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司。逆转录试剂盒购自美国 Fermentas 公司。DMEM 购自美国生命技术公司(GIBCO/BRL)。鼠抗人 α -肌动蛋白和罗丹明标记的鬼笔环肽购自美国 Sigma 公司。TRIzol、LipofectamineTM 2000 和 Opti-MEM 购自美国 Invitrogen 公司。迁移杯购自美国 Costar 公司。

1.2 方法

1.2.1 血管平滑肌细胞的培养和鉴定 组织贴块法培养 8~10 周龄雄性 SD 大鼠的 VSMCs。待细胞长成单层后用鼠抗人 α -肌动蛋白对 VSMCs 特异的 α -actin 进行免疫荧光化学检测, 主要步骤如下: ① 3.7% 甲醛固定 VSMCs 20 min; ② 0.1 \times PBS 漂洗; ③ 10% 羊血清室温封闭 1 h, 小鼠单克隆 α -actin 抗体(1:200) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; ④ 0.1 \times PBS 漂洗; ⑤ 二抗加罗丹明标记的山羊抗小鼠 IgG(1:500), 室温孵育 1 h; ⑥ 0.1 \times PBS 漂洗; ⑦ 荧光显微镜下观察拍照。所

收稿日期: 2010-07-05 接受日期: 2010-09-08

鲁东大学人才引进基金(No.LY20083302)和鲁东大学学科建设经费资助项目

* 通讯作者。Tel: 0535-6681053, Fax: 0535-6696598, E-mail: shqmj@163.com

用细胞代数在 10 代以内。

1.2.2 划痕法检测 VSMCs 的迁移(Wound healing assay) 90% 以上融合的 VSMCs 经无血清 DMEM 同步化 24 h, 用无菌的移液管尖(约 0.7 mm)在各培养板细胞生长单层的相同位置划垂直或平行直线, 造成几条“伤口”。分别用 2 ml 含尼古丁(参考影响效果比较明显的工作浓度 100 $\mu\text{mol/L}$ ^[8])的 DMEM 和不含尼古丁的 DMEM 刺激划痕后的 VSMCs 各 24 h。苏木精染色后显微镜下测量细胞从划痕处向外爬出的距离, 迁移距离越远, 表明细胞迁移能力越强, 反之则弱。随机选取 10 个视野进行拍摄, Photoshop CS3 软件测量并求平均值^[9]。

1.2.3 Transwell 迁移小室检测 VSMCs 迁移能力 将 100 $\mu\text{mol/L}$ 尼古丁刺激组和对照组的 VSMCs 分别作用 24 h 后消化计数, 以 1×10^6 个/ml 的密度分别重悬于 DMEM 中; 各取 20 μl 细胞悬液种植于迁移杯上腔中, 将迁移杯移至 6 孔细胞培养板, 孔内预先加入 500 μl 含 10% 小牛血清的 DMEM, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养 6 h; 吸干细胞培养液, 中性福尔马林固定细胞 15 min, 苏木精染色 10 min, 流水冲洗返蓝; 擦去上腔面细胞, 杯底面细胞即是已完成迁移的细胞, 每个迁移杯底部随机选取 6 个视野, 倒置显微镜下拍照, 计数^[4]。

1.2.4 RT-PCR 检测尼古丁刺激 VSMCs 后 Rho-GDI α 的 mRNA 的表达 用适当体积的 TRIzol 裂解各组 VSMCs, 提取 RNA 并按逆转录试剂盒说明逆转录 cDNA, 进行 RT-PCR 检测。以 GAPDH 作为内参来调整模板的浓度。Rho-GDI α 的引物序列为: 上游引物: 5'-TGT GCT GCT GTT GCT TCC-3', 下游引物: 5'-GCT CGG CTG GCT TTG T-3', PCR 扩增产物长度为 230 bp; GAPDH 引物序列为: 上游引物: 5'-GGC AGC CCA GAA CAT CAT CC-3', 下游引物: 5'-GCC AGC CCA AGC ATC AAA G-3', PCR 扩增产物长

度为 298 bp。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min \rightarrow 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s \rightarrow Rho-GDI α 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s (GAPDH 65.5 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s) \rightarrow 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 30 cycles \rightarrow 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, Bio-Rad 凝胶成像分析系统测量电泳条带灰度值^[10]。

1.2.5 Real-time RT-PCR 检测 RNA 干扰后 Rho-GDI α 的表达 按照 Invitrogen 试剂盒说明进行 RNA 干扰实验^[10], 提取 RNA 并逆转录, 按照实时 PCR 荧光试剂盒定量检测 24 h、48 h 的干扰效率。主要步骤如下: ①标准曲线: 取特异性的 Rho-GDI α 和 GAPDH 的 PCR 产物, 按 1.0×10^0 、 1.0×10^{-1} 、 1.0×10^{-2} 、 1.0×10^{-3} 、 1.0×10^{-4} 、 1.0×10^{-5} 倍比稀释, 各取 2 μl 作为 PCR 扩增模板, 绘制标准曲线。②取实验组和对照组细胞反转录的 cDNA 各 2 μl , 与上述标准品同时进行 Real-time RT-PCR 反应, 得到 cDNA 中 Rho-GDI α 的相对拷贝数从而进行相对定量比较。

1.2.6 统计 各组间实验数据均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组数据间的差异用 *t* 检验, * $P < 0.05$ 为差异具有显著性, ** $P < 0.01$ 为差异极其显著。

2 结果

2.1 VSMCs 的培养及鉴定

免疫荧光化学结果显示, 阴性对照组的细胞胞浆未着色, 蓝色荧光为 DAPI 显示的细胞核(图 1A); 孵育 α -actin 抗体组的细胞胞浆呈红色荧光, 可见 α -actin 阳性着色率达到 95% 以上(图 1B), 表明 VSMCs 纯度很高, 能够很好地应用到后续实验中。

2.2 划痕法检测尼古丁对 VSMCs 迁移的影响

如图 2 所示, 显微镜下观察到 VSMCs 从划痕的边缘以出芽的方式向外生长, 对照组 VSMCs 的迁移距离为 $157.56 \pm 0.916 \mu\text{m}$; 尼古丁组 VSMCs 的迁移距离约为 $185.904 \pm 0.204 \mu\text{m}$ 。尼古丁组细胞迁移的距离明显比对照组的远, 差异极其显著($P < 0.01$)。

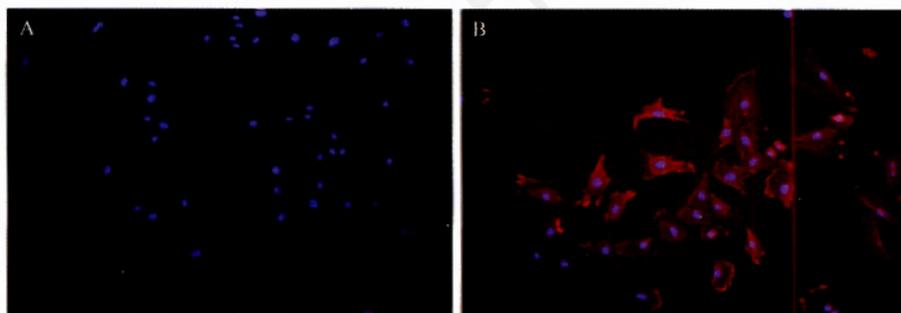


Fig.1 Identification of VSMCs by immunocytochemistry(200 \times)

A: control group; B: α -actin incubated group.

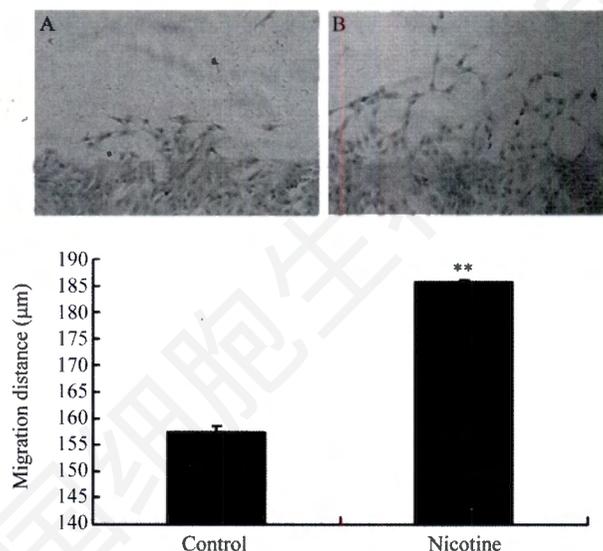


Fig.2 The migration distance of VSMCs was promoted by nicotine (200 \times)

A: control group; B: nicotine group, ** $P < 0.01$ compared with control, $n = 3$.

2.3 Transwell 法检测尼古丁对 VSMCs 迁移的影响

结果如图 3 所示, 6 h 后迁移到杯底的对照组细胞数目平均为 197 ± 17 个, 尼古丁组细胞迁移的数目平均为 359 ± 15 个, 即尼古丁组迁移的数目是对照组的 1.82 倍, 差异显著 ($P < 0.05$)。

2.4 RT-PCR 检测尼古丁对 Rho-GDI α 的影响

结果显示, 与对照组相比, 100 $\mu\text{mol/L}$ 尼古丁组

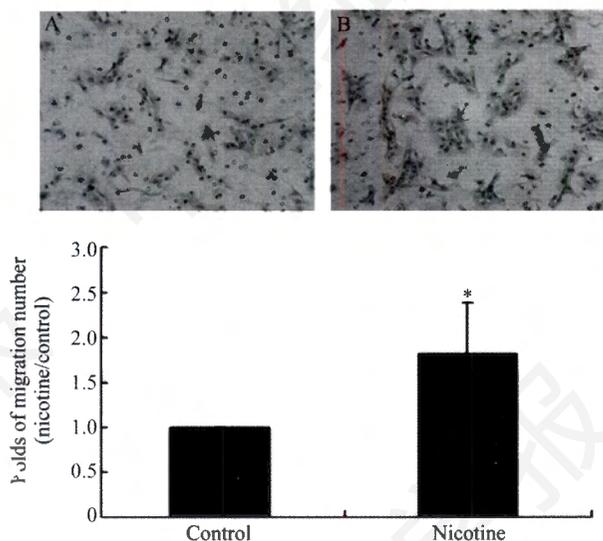


Fig.3 Nicotine promoted the migration number of VSMCs (200 \times)

A: control group; B: nicotine group, * $P < 0.05$ compared with control, $n = 3$.

VSMCs 表达的 Rho-GDI α 明显降低, 差异极其显著 ($P < 0.01$)。

2.5 实时定量 RT-PCR 检测 RNA 干扰后 Rho-GDI α 的表达

如图 5 所示, 经内源性参照 GAPDH 校正后, 24 h 和 48 h 时相点 RNA 干扰对 Rho-GDI α 的 mRNA 表达均有明显抑制效果, 与各自对照组相比差异显著 ($P < 0.05$)。

2.6 RNA 干扰 Rho-GDI α 对 VSMCs 迁移的影响

如图 6 所示, 迁移 6 h 后, 对照组 VSMCs 迁移的

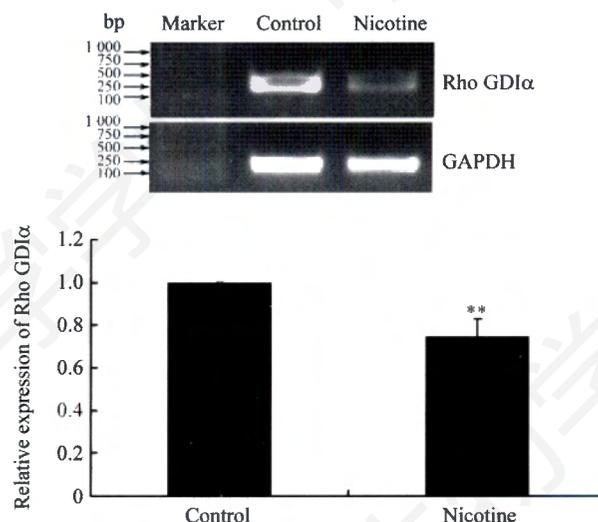


Fig.4 The expression of Rho-GDI α was inhibited by nicotine ** $P < 0.01$, compared with control, $n = 3$.

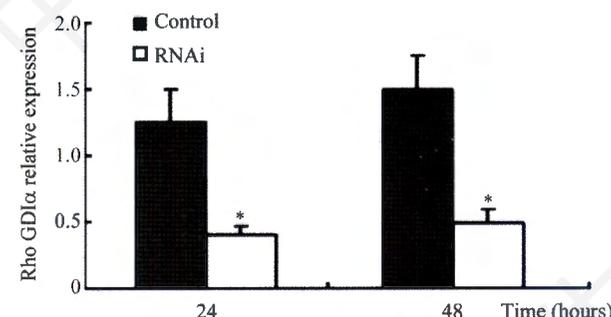
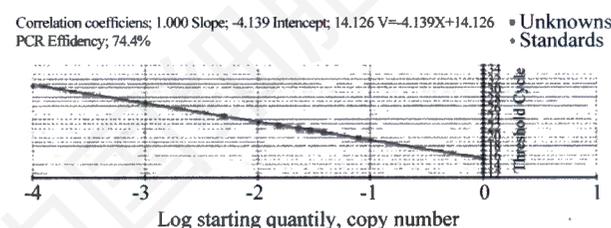


Fig.5 The mRNA expression of Rho-GDI α was significantly repressed in 24 h and 48 h after “knock-down” transfection * $P < 0.05$ vs its control, $n = 3$.

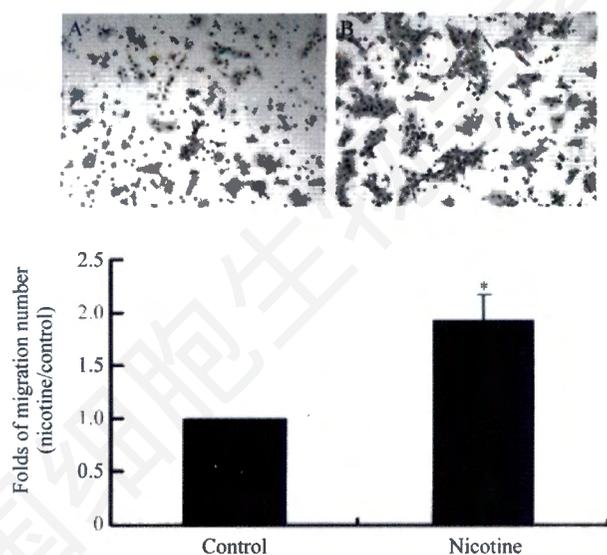


Fig.6 The effect of Rho-GDI α "knocked-down" on the VSMCs migration ability(200 \times)

A: control group; B: nicotine group, * $P < 0.05$ vs control, $n = 3$.

细胞数目约为 60 ± 9 个, RNAi 组迁移的数目约为 100 ± 11 个, 为对照组的 1.6 倍左右, 差异显著 ($P < 0.05$)。

3 讨论

流行病学资料显示, 吸烟可以加速高血压、动脉粥样硬化等心血管疾病的发生^[11]。如何预防和治疗吸烟引起的心血管疾病日益成为人们关注的焦点。研究表明, 病理情况下受多种因素如生物、化学和物理等的影响, VSMCs 从血管中膜向内膜迁移是动脉粥样硬化、再狭窄等多种血管疾病发生和发展的主要特征之一^[12]。烟草中的重要危害成分尼古丁对 VSMCs 的迁移也起着重要的促进作用^[13]。但其通过何种途径引起 VSMCs 迁移能力的增强尚未完全明了。因此, 深入研究尼古丁引起 VSMCs 迁移能力改变的方法途径, 对防治吸烟引起的心血管疾病具有重要的指导意义。本文采用 Transwell 法和划痕法检测了尼古丁刺激 24 h 后 VSMCs 迁移能力的变化。结果显示, $100 \mu\text{mol/L}$ 尼古丁作用组的 VSMCs 迁移的距离比对照组细胞的远, 迁移的细胞数目是酒精组的 1.82 倍, 差异均具有统计学意义。提示, 一定量的尼古丁对 VSMCs 的迁移有明显促进作用。

Rho 激酶被报道参与 VSMCs 迁移、增殖等多种血管重建过程, 若能抑制 Rho 激酶的活性, 则可有效缓解粥样硬化过程^[1,2]。作为 Rho 激酶磷酸化的重要负性调控因子 Rho-GDI α 在吸烟引起的血管病中是否参与调节 Rho 激酶的活性尚无文献报道。我们

通过实验得到结果, 与未经尼古丁刺激组相比较, 一定剂量的尼古丁可以抑制 Rho-GDI α 的表达。结合本实验中相同剂量的尼古丁可以促进 VSMCs 迁移的结果推测, Rho-GDI α 表达受到抑制后, VSMCs 的迁移能力反而增强, 提示 Rho-GDI α 的高表达对 VSMCs 的迁移可能起到抑制作用。为了验证设想, 我们采用体外 RNA 干扰的方法, 检测干扰 Rho-GDI α 后 VSMCs 迁移能力是否发生改变。结果发现 Rho-GDI α 被干扰后迁移到杯底的 VSMCs 数量明显比对照未干扰 Rho-GDI α 组的细胞数量多, 提示 Rho-GDI α 可以显著抑制 VSMCs 的迁移。由此推断, 在体情况下, 尼古丁可能或至少部分通过抑制 Rho-GDI α 的表达从而促进 VSMCs 向内膜的迁移, 加速粥样硬化等血管病的重建过程。

参考文献(References)

- 1 Fujita H, Fukumoto Y, Saji K, Sugimura K, Demachi J, Nawata J, *et al*. Acute vasodilator effects of inhaled fasudil, a specific Rho-kinase inhibitor, in patients with pulmonary arterial hypertension. *Heart Vessels* 2010; 25(2): 144-9.
- 2 Chan CK, Mak JC, Man RY, Vanhoutte PM. Rho kinase inhibitors prevent endothelium-dependent contractions in the rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; 329(2): 820-6.
- 3 Dovas A, Couchman JR. RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *Biochem J* 2005; 390(Pt 1): 1-9.
- 4 Qi YX, Qu MJ, Yan ZQ, Zhao D, Jiang XH, Shen BR, *et al*. Cyclic strain modulates migration and proliferation of vascular smooth muscle cells via Rho-GDI α , Rac1, and p38 pathway. *J Cell Biochem* 2010; 109(5): 906-14.
- 5 Breen LT, McHugh PE, Murphy BP. HUVEC ICAM-1 and VCAM-1 synthesis in response to potentially athero-prone and athero-protective mechanical and nicotine chemical stimuli. *Ann Biomed Eng* 2010; 38(5): 1880-92.
- 6 Kanda Y, Watanabe Y. Nicotine-induced vascular endothelial growth factor release via the EGFR-ERK pathway in rat vascular smooth muscle cells. *Life Sci* 2007; 80(15): 1409-14.
- 7 Jacob-Ferreira AL, Palei AC, Cau SB, Moreno H Jr, Martinez ML, Izidoro-Toledo TC, *et al*. Evidence for the involvement of matrix metalloproteinases in the cardiovascular effects produced by nicotine. *Eur J Pharmacol* 2010; 627(1-3): 216-22.
- 8 Kanda Y, Watanabe Y. Nicotine-induced vascular endothelial growth factor release via the EGFR-ERK pathway in rat vascular smooth muscle cells. *Life Sci* 2007; 80(15): 1409-14.
- 9 Stone OA, Richer C, Emanuelli C, van Weel V, Quax PH, Katara R, *et al*. Critical role of tissue kallikrein in vessel formation and maturation: implications for therapeutic revascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29(5): 657-64.
- 10 Qu MJ, Liu B, Qi YX, Jiang ZL. Role of Rac and Rho-GDI α in the frequency-dependent expression of h1-calponin in vascular smooth muscle cells under cyclic mechanical strain. *Ann Biomed Eng* 2008; 36(9): 1481-8.
- 11 Clarke MC, Littlewood TD, Figg N, Maguire JJ, Davenport AP, Goddard M, *et al*. Chronic apoptosis of vascular smooth

muscle cells accelerates atherosclerosis and promotes calcification and medial degeneration. *Circ Res* 2008; 102(12): 1529-38.

Tada T, Nawata J, Wang H, Onoue N, Zhulanqige D, Ito K, *et al.* Enhanced pulsatile pressure accelerates vascular smooth muscle migration: implications for atherogenesis of

hypertension. *Cardiovasc Res* 2008; 80(3): 346-53.

13 Di Luozzo G, Pradhan S, Dhadwal AK, Chen A, Ueno H, Sumpio BE. Nicotine induces mitogen-activated protein kinase dependent vascular smooth muscle cell migration. *Atherosclerosis* 2005; 178(2): 271-7.

Rho-GDI α Inhibited the Migration of Vascular Smooth Muscle Cells Induced by Nicotine in Rats

Ming-Juan Qu*, Fei-Fei Shu, Mei-Dong Jing, Li Zhang
(College of Life Sciences, Ludong University, Yantai 264010, China)

Abstract To investigate the mechanism of the smoking-induced progress and mechanism of the atherosclerosis, the effect of nicotine on the migration of vascular smooth muscle cells (VSMCs) of rats was studied. Vascular smooth muscle cells (VSMCs) isolated from rats were subjected to 100 $\mu\text{mol/L}$ nicotine for 24 hours, and cells treated without nicotine were used as control. The migration ability of VSMCs was checked by Transwell assay and Wound healing assay, respectively. The mRNA expression of Rho-GDI α was detected using RNA interference (RNAi) and Real-time RT-PCR. The migration ability of VSMCs was significantly promoted by nicotine stimulation compared with the control group. The mRNA expression of Rho-GDI α was depressed by nicotine treated as well as RNAi. It is concluded that nicotine can promote the migration of VSMC *in vitro* partly through inhibiting the expression of Rho-GDI α , which explicits the role of nicotine in the atherosclerosis.

Key words nicotine; vascular smooth muscle cell; Rho-GDI α ; migration; RNAi

Received: July 5, 2010 Accepted: September 8, 2010

This work was supported by the Discipline Construction Foundation and the Talents Introduction Foundation of Ludong University (No.LY20083302)

*Corresponding author. Tel: 86-535-6681053, Fax: 86-535-6696598, E-mail: shqmj@163.com