

THE EFFECTS OF THE UNFOLDED PROTEIN RESPONSE (UPR) ON CELL MIGRATION IN ORGANOGENESIS IN VITRO

SU Rong Jian CHEN Yu Hua SONG Jin Dan*

(Department of Developmental Biology, Key Laboratory of Cell Biology,
Ministry of Public Health of China, China Medical University, Shenyang 110001 China)

ABSTRACT To investigate the influence of the unfolded protein response (UPR) on cell migration in organogenesis, we induced UPR with tunicamycin and observed the effects in vitro of UPR on the migration behaviors of human embryonic kidney cell line-293A. In the study, we examined some behaviors related to cell migration including cell adhesion, the distribution of microtubule and actin cytoskeleton, the filopodium on the leading edge and the expression level of small GTPase RhoA using scratch wound assay, cell adhesion assay, fluorescent staining, scanning electron microscopy and Western blotting respectively. The results have shown that UPR could inhibit cell migration by weakening cell adhesion to the substrate, causing the rearrangement of microtubule and actin cytoskeleton, inhibiting filopodium formation on the leading edge and decreasing the expression level of RhoA. We infer that UPR could win more time for the stressed cells for repairing their functions in the process of migration to their destination in organogenesis.

Key words: Cell migration the unfolded protein response Organogenesis

* Corresponding author. E-mail: jdsong@mail.cmu.edu.cn

SM22 α 对血管平滑肌细胞骨架及收缩功能的影响*

程云会 韩梅** 温进坤

(河北医科大学基础医学研究所 河北省医学生物技术重点实验室 石家庄 050017)

摘要 SM22 α (smooth muscle 22 alpha, SM22 α)是血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)的标志蛋白,为了探讨该蛋白与VSMC表型和功能的关系,利用血清饥饿法诱导VSMC由合成型向收缩型转变,用RT-PCR对不同表型VSMC的SM22 α 表达活性进行检测,并通过转染反义SM22 α 表达载体,观察SM22 α 表达对VSMC细胞骨架和收缩功能的影响。结果显示,在VSMC由合成型逆转为收缩型的过程中,SM22 α 和平滑肌 α -肌动蛋白(smooth muscle α -actin, SM α -actin)的表达分别被显著诱导和轻度上调,与此同时,细胞骨架由稀疏的网格状变成均匀、致密的束状,VSMC重新获得收缩功能。用反义SM22 α 抑制该基因表达后,血清饥饿诱导的VSMC细胞骨架重构受阻,乙酰胆碱刺激引发的细胞收缩消失。结果提示,SM22 α 参与VSMC细胞骨架的构成及调节细胞的收缩功能,对维持VSMC处于收缩表型具有重要作用。

关键词: 血管平滑肌细胞 平滑肌 22 α 细胞骨架 收缩

血管平滑肌细胞(VSMC)是一种非终末分化细胞,其表型具有多样性和可塑性。近年,我们及国外其他实验室对VSMC从收缩型向合成型转变的调控机制进行了一系列研究,发现以往被认为是收缩型VSMC标志基因的平滑肌 α -肌动蛋白(SM α -actin)、平滑肌肌球蛋白重链(SM-MHC)和calponin等在合成型VSMC中虽略有下调,但仍有大量表

达^[1],这与合成型VSMC丧失收缩功能的特征性改变不相吻合^[2]。SM22 α 也是收缩型VSMC的标志基因,与其他标志基因不同的是,SM22 α 仅在收缩

本文2003年6月16日受到,9月5日接受。

*基金项目:国家自然科学基金(30270499)和河北省自然科学基金(303454)资助课题

**通讯作者。E-mail: WJK@hebm. edu. cn

型 VSMC 中表达^[3]。然而这一表型特异性蛋白在 VSMC 中的确切功能至今尚不清楚。根据 SM22 α 在结构上与 calponin 具有较高的同源性^[4], 我们推测二者可能具有相似的功能, 即参与细胞骨架的构成和细胞收缩的调节。为了证实我们的推测, 本研究以 SM22 α 与 VSMC 收缩共存共失这一现象为切入点, 采用反义技术, 探讨 SM22 α 表达与否对 VSMC 细胞骨架及收缩能力的影响。

材料与方 法

1. 材料

M199 培养基(GIBCO), 脂质体 ESCORTTMIV(Sigma), G418(Sigma), 小鼠抗大鼠 SM α -actin 单克隆抗体(Sigma), HRP-1 标记的羊抗小鼠二抗(北京中山公司), RNase-free DNaseI (Promega), Taqman Gold RT-PCR 和 SYBRGreen 试剂盒(Applied Biosystems), PCR 引物由上海生工生物有限公司合成, 其他试剂为进口或国产分析纯。含有人 SM22 α 全长 cDNA 序列的重组子 pGEM3z-SM22 α (WS3-10)由美国芝加哥大学 Solway J. 教授惠赠, pcD2 表达质粒为本室保存。

2. 反义 SM22 α 表达载体的构建

以 pGEM3z-SM22 α 质粒为模板, PCR 扩增得到 128bp (559-686bp) 的 cDNA 片段。扩增产物用 EcoR I /Kpn I 双酶切后, 反向插入 pcD2 真核表达载体中, 构建针对 SM22 α mRNA 3' 端序列的反义 pcD2-SM22 α 。重组子经酶切鉴定及 DNA 序列分析确定无误后用于细胞转染。

3. 细胞培养与分组

取 5 周龄 SD 大鼠胸腹主动脉, 用贴块法分离 VSMC, 加入含 10% 胎牛血清(FBS)的 M199 进行培养, 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 取 3-7 代细胞进行实验。

血清刺激培养的 VSMC 为合成型。按文献^[3]方法诱导合成型细胞再分化为收缩型。待细胞生长至 100% 汇合后, 再继续培养 24-48h, 使其达到超汇合(post confluence)状态, 继之换成无血清 M199, 进行血清饥饿培养, 并于血清饥饿 0、24、48、72h 收集细胞。以细胞对乙酰胆碱刺激产生收缩反应作为判定收缩型 VSMC 的标准^[2]。另取血清饥饿培养 72h 的 VSMC, 按文献^[5]方法恢复血清刺激, 将细胞以 80%-90% 密度进行传代, 加入含 10% FBS 的 M199 继续培养, 并于 24、48h 收集已达到 100% 汇合的细胞, 以此作为恢复血清刺激的合成型 VSMC。

4. 细胞转染

当细胞生长至 60% 汇合时, 用脂质体介导法转染反义 pcD2-SM22 α 质粒, 以 pcD2 空质粒为对照。转染后的细胞用 400 μ g/ml G418 进行筛选, 3 天后改用 100 μ g/ml 维持。待 VSMC 生长至汇合后用于实验。

5. RT-PCR

按常规方法收集不同条件处理的 VSMC, 提取总 RNA。

以总 RNA 为模板, 进行荧光定量 RT-PCR, 检测不同条件处理的 VSMC 中 SM22 α 的表达活性。上、下游引物序列分别为 5'-TTCTGCTCAACATGGCCAAC-3' 和 5'-CACCTTCACTGGCTTGGATC-3'。用相同方法检测转染细胞中反义 SM22 α 的表达活性, 总 RNA 经无 RNase 的 DNase I 消除残余的质粒后作为 PCR 模板。所有反应均以三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作内参照, 对模板用量进行标化。PCR 产物通过 8% PAGE 分离、鉴定。

6. Western blot 分析

按文献^[6]方法, 用 RIPA 细胞裂解液(1% NP40, 1% SDS, 150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-Cl, pH7.5, 10% glycerol, 2 mmol/L 钒酸钠, 1 mmol/L PMSF)裂解 VSMC, 提取细胞总蛋白。用 Lowry 法测定蛋白含量后, 取 80 μ g 蛋白样品进行 8% SDS-PAGE 分离, 通过电转移将蛋白印迹到硝酸纤维素膜上。用 5% 脱脂奶粉 4 $^{\circ}$ C 封闭膜上非特异性位点后, 加入 SM α -actin 单克隆抗体(1:1000), 室温反应 5h, 洗膜 3 次, 随后加入 HRP-1 标记的羊抗小鼠二抗(1:1000), 室温反应 2h, 于 4-氯-1-萘酚/H₂O₂ 溶液中显色。

7. 细胞骨架的观察

按文献^[7]方法加以改良。将在盖玻片上培养的 VSMC 分别于血清饥饿前、后取出, 冷 PBS 清洗两次, 2% 多聚甲醛预固定 10s, 1% Triton X-100 处理 20min, 以除去胞浆内的可溶性蛋白。PBS 清洗, 4% 多聚甲醛固定, 0.2% 考马斯亮蓝 R250 染色, 蒸馏水漂洗, 加拿大树胶封片。于显微镜下观察细胞骨架的变化。

8. 细胞收缩性分析

按文献^[3]的方法进行, 转染或未转染的 VSMC 生长至汇合后, 换入无血清 M199 饥饿培养 48h, 诱导细胞向收缩型转变。随之向培养液中滴加乙酰胆碱至终浓度为 100 nmol/L, 于高倍显微镜下观察 1min 内单个 VSMC 长度缩短幅度。

结 果

1. 血清饥饿对 SM22 α 基因表达的影响

血清饥饿可诱导处于增殖状态的 VSMC 进入静止期, 并向收缩型转变^[2]。本实验动态观察了血清刺激与饥饿培养对 SM22 α 基因表达的影响。定量 RT-PCR 结果显示, 在血清刺激培养的 VSMC 中, 即使细胞生长至完全汇合而出现接触抑制时也难以检测到 SM22 α 的 mRNA。血清饥饿 24h 后, SM22 α mRNA 水平迅速上升至高峰, 并一直维持此水平不变。血清饥饿 72h 后的细胞再恢复血清(10% FBS)刺激时, SM22 α 表达活性又快速下调(图 1)。已经证明体外培养的 VSMC 在有或无血清存在时, 其表型也是不同的。血清饥饿培养时, VSMC 可表现出收缩表型的特征, 反之, 则为合成

表型^[2]。根据 SM22 α 的表达特点,可以认为, SM22 α 虽然是 VSMC 特异的标志基因,但因其仅在收缩型 VSMC 中表达,所以将该基因作为收缩型 VSMC 的标志更具有表型特异性。

2. 血清饥饿对收缩蛋白 SM α -actin 表达的影响

SM α -actin 是 VSMC 的最重要的收缩蛋白之一,也是 VSMC 收缩和细胞骨架形成的分子基础。本实验观察到,体外常规培养的合成型 VSMC 仍能表达较高水平的 SM α -actin;血清饥饿后,SM α -actin 的含量仅略有升高,约为血清饥饿前的 1.5 倍;再恢复血清刺激培养时,该蛋白又下降至基础水平(图 2)。结果表明,SM α -actin 并不是收缩型 VSMC 所特有的。提示,合成型 VSMC 中含有的

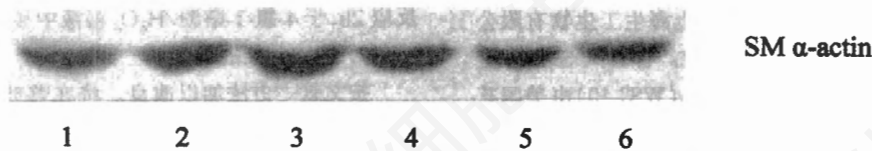


图 2 血清刺激或饥饿的 VSMC 中 SM α -actin 的 Western blot 分析

1. 10% 血清刺激; 2. 血清饥饿 24h; 3. 血清饥饿 48h; 4. 血清饥饿 72h; 5. 恢复 10% 血清刺激 24h; 6. 恢复 10% 血清刺激 48h。

3. SM22 α 表达对细胞骨架的影响

VSMC 的细胞骨架主要是由 actin 和少量波形蛋白聚集形成的蛋白纤维交织而成的立体网格结构,对于细胞保持特定形态及收缩变形具有重要作用。本实验采用我室建立的改良考马斯亮蓝染色法显示 VSMC 内的骨架结构,结果如图 3 所示。血清饥饿前,生长至汇合状态的 VSMC 中,细胞骨架呈稀疏的网格状,淡染,结构模糊(图 3A)。血清饥饿 48h 时,细胞骨架的纹理变得较为清晰,网格致密,而且是沿 VSMC 极性呈束状分布(图 3B)。细胞骨架的变化在血清饥饿 48h 时最明显,与 SM α -actin 和 SM22 α 的表达高峰时相一致。由于 SM α -actin 是构成细胞骨架中微丝的主要蛋白成分,因此,血清饥饿诱导的 SM α -actin 表达增加可能是细胞骨架改变的重要原因。然而,血清饥饿诱导的 SM22 α 表达是否也参与细胞骨架的重构过程尚不得而知。为了解释这一问题,本实验构建反义 pcD2-SM22 α 表达载体,用其转染 VSMC。结果证实,用 RT-PCR 可检测到被反义 pcD2-SM22 α 转染的 VSMC 中有转录产物的存在,而同样条件下,转染 pcD2 空载体的对照细胞则为阴性(图 4)。在此基础上,观察抑制内

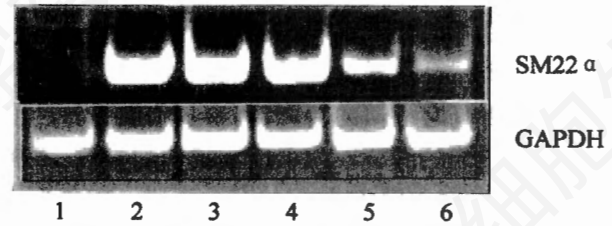


图 1 血清刺激或饥饿的 VSMC 中 SM22 α 的 RT-PCR 分析

1. 10% 血清刺激; 2. 血清饥饿 24h; 3. 血清饥饿 48h; 4. 血清饥饿 72h; 5. 恢复 10% 血清刺激 24h; 6. 恢复 10% 血清刺激 48h。

SM α -actin 可能是以一种结构成分(如构成细胞骨架)参与细胞形态的维持及变形运动。

源性 SM22 α 表达对细胞骨架的影响。结果显示,转染反义 pcD2-SM22 α 的 VSMC 经血清饥饿 48h 后,其细胞骨架不再出现由稀疏的网格状向束状的转变,而且细胞内的微丝主要沿胞膜内侧分布,胞浆中稀疏甚至缺乏(图 3C)。在相同条件下,转染 pcD2 空载体的对照 VSMC 不出现上述变化(图 3D)。由于在这种条件下,SM α -actin 表达不受 pcD2-SM22 α 转染的影响(结果未显示),因此提示,在血清饥饿诱导 VSMC 从合成型向收缩型转变过程中,SM22 α 参与了细胞骨架的重构过程。

4. SM22 α 表达与 VSMC 收缩之间的关系

对兴奋剂的收缩反应是收缩型 VSMC 不同于合成型细胞的特征之一。尽管合成型 VSMC 仍能表达一定量的收缩蛋白 SM α -actin,但是当用乙酰胆碱刺激这些细胞时并不出现收缩反应。血清饥饿后,随着 SM22 α 及 SM α -actin 的表达增加,VSMC 又重新获得收缩能力(图 5A,B)。为了证实 SM22 α 为 VSMC 收缩所必须,本实验观察了反义 SM22 α 对细胞收缩的影响。结果显示,转染反义 pcD2-SM22 α 的细胞用乙酰胆碱刺激后,不再出现明显的细胞缩短现象(图 5C,D)。

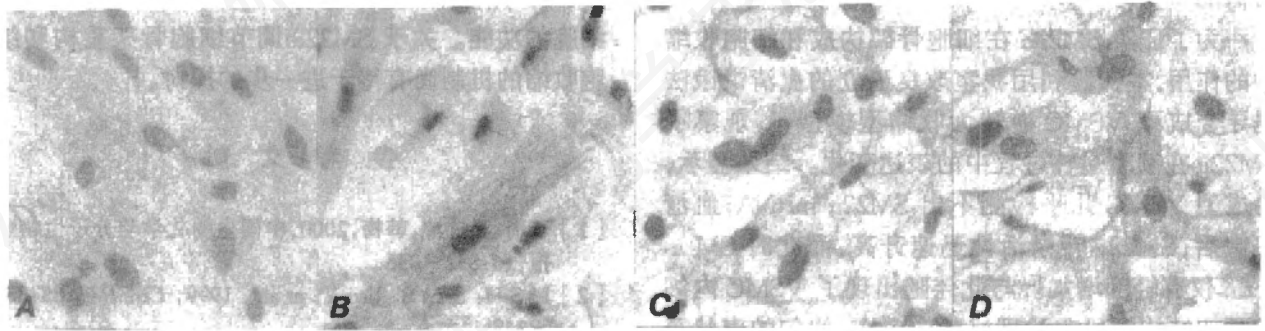


图3 VSMC细胞骨架的考马斯亮蓝染色观察

A. 10%血清刺激; B. 血清饥饿48h; C. 转染反义 pcD2-SM22 α 后血清饥饿48h; D. 转染 pcD2后血清饥饿48h。

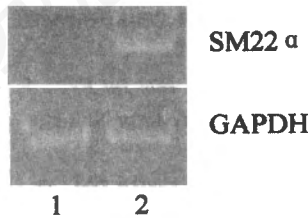


图4 反义 pcD2-SM22 α 表达质粒在转染细胞中的表达

1. 转染 pcD2 空质粒的 VSMC; 2. 转染反义 pcD2-SM22 α 表达质粒的 VSMC。

讨 论

VSMC 细胞骨架是由多种结构蛋白及收缩蛋白按照特定模式有机组装而形成的一种立体网格结构,参与维持 VSMC 形态及细胞的收缩变形调节。在 VSMC 表型重构过程中,由于表型标志基因表达的变化,进而引起细胞的形态、结构和功能的改变。以往,人们仅对不同表型 VSMC 基因表达调控机制、细胞生物学行为如增殖、迁移、凋亡、黏附以及细胞功能如收缩、合成释放各种因子和细胞外基质等方面进行了深入的研究,但对联系基因表达与细胞形态、行为和功能变化的中间环节研究甚少。越来越多的研究显示,细胞骨架的生物学意义已经远远超出了原有的作为细胞形态结构的“骨架”概念,几乎参与细胞所有重要的生命活动,如细胞内各种亚结构的定位、细胞运动、细胞信号转导、细胞增殖与分化等。本研究证实,在 VSMC 由收缩型向合成型转变过程中细胞仍能表达丰富的 SM α -actin,后者是 VSMC 中主要的收缩蛋白,同时也是构成细胞骨架的主要成份。然而,合成型 VSMC 与收缩型

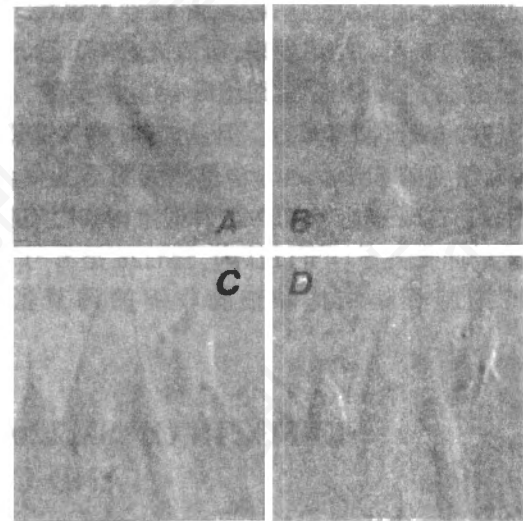


图5 乙酰胆碱刺激引发的 VSMC 收缩

A, B. 转染 pcD2; C, D. 转染反义 pcD2-SM22 α ; A, C. 乙酰胆碱刺激前; B, D. 乙酰胆碱刺激后。

细胞的骨架结构和细胞形态却有明显差异,并且失去收缩功能。这就提示,造成 VSMC 表型转变的主要原因除了像 SM α -actin 这样的结构蛋白出现“量变”以外,尚有一些更具有表型特征的调节蛋白起着决定作用。

SM22 α 是一种经典的 VSMC 标志蛋白,但迄今,对该蛋白的确切功能仍不清楚。一些体外实验证实,纯化的 SM22 α 蛋白可与 actin 纤维以 1:6 的单体比结合^[8];在 SMC 中,SM22 α 与 actin 纤维束和应力纤维共定位^[9],故推测 SM22 α 可能与 VSMC 骨架组织有关,直接或间接参与涉及细胞骨架的细胞表型、形态和收缩功能等多种 SMC 的生物学行为的调节,但缺乏进一步的实验证据。况且还有相反的报道,认为 SM22 α 不是 VSMC 结构和功能所

必需的^[10]。

为了证实 SM22 α 在细胞骨架构成和细胞收缩中的作用,本实验利用我室改良建立的血清饥饿法诱导合成型 VSMC 逆转为收缩型模型^[3],观察了 SM22 α 在表型逆转过程中的表达变化。结果显示,合成型 VSMC 几乎检测不出 SM22 α mRNA;血清饥饿后,SM22 α 转录活性迅速升高,而此时 SM α -actin 仅有轻度增加。与此伴随出现了 VSMC 内细胞骨架结构由稀疏的网格状向致密、均匀的束状重构,细胞也由铺展状转变为长梭状(结果未显示)。更重要的是随着 SM22 α 的表达,VSMC 又重新获得收缩功能。为了探明 SM22 α 表达与细胞骨架重构和细胞收缩之间共存共失是否存在因果关系,我们构建了反义 SM22 α 表达载体,并转染 VSMC 以封闭该基因的表达。结果发现,血清饥饿 48h 后,转染反义 SM22 α 的 VSMC 其细胞骨架重构受阻,乙酰胆碱引发的细胞收缩无力。但是,与对照 VSMC 比较,转染细胞的 SM α -actin 含量并无明显变化。结果提示,SM22 α 表达与 VSMC 骨架重构和收缩功能有直接的因果关系。可以认为,SM22 α 是参与调节 VSMC 细胞骨架结构和细胞收缩的调节蛋白,

SM22 α 缺陷所致的细胞骨架重构异常可进而影响细胞的功能。关于 SM22 α 调节细胞骨架重构和细胞收缩的机制尚有待于进一步的探讨。

参 考 文 献

- [1] 李琦、温进坤、韩梅,2000,中国生物化学与分子生物学报,16:832-836.
- [2] Li S H, Sims S, Jiao Y, et al., 1999, *Circ Res*, 85:338-348.
- [3] 韩梅、温进坤、郑斌等,2003,中国生物化学与分子生物学报,19:250-255.
- [4] Gimona M, Djinovic-Carugo K, Kranewitter W, et al., 2002, *FEBS Letters*, 513:98-106.
- [5] Solway J, Seltzer J, Samaha FF, et al., 1995, *J Biol Chem*, 270(22): 13460-13469.
- [6] 刘智敏、韩梅、温进坤,2003,中国病理生理杂志,19:163-166.
- [7] Pena SD, 1980, *Cell Biol Int Rep*, 4:149-153.
- [8] Shapland C, Hsuan JJ, totty NF, et al., 1993, *J Cell Biol*, 121:1065-1073.
- [9] Fu YP, Liu HW, Forsythe SM, et al., 2000, *J Appl Physiol*, 89:1985-1990.
- [10] Zhang JC, Kim S, Helmke BP, et al., 2001, *Mol cell Biol*, 219:1336-1344.

EFFECTS OF SM22 α ON VSMC CYTOSKELETON AND CONTRACTION*

CHENG Yun Hui HAN Mei** WEN Jin Kun

(Hebei Laboratory of Medical Biotechnology, Institute of Basic Medical Science, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017 China)

ABSTRACT The expression pattern of SM22 α gene and its effects on VSMC cytoskeleton and contraction were investigated during synthetic VSMC reversion to contractile phenotype induced by serum-free culture. The results suggested that the expression of SM22 α was induced quickly after serum starvation and maintained at higher levels, and the cytoskeletal structure was remodulated from discrete network to well arranged and dense bundles. At same time, acetylcholine (ACh)-induced contractility was observed in the serum-starved VSMC. However, after VSMC was transfected by antisense SM22 α recombinant plasmid, reorganization of cytoskeleton by serum starvation was blocked, and ACh-induced contraction was absent. The results demonstrated that SM22 α was involved in VSMC cytoskeleton reorganization and played a key role for VSMC remaining contractile phenotype.

Key words: Vascular smooth muscle cells SM22 α Cytoskeleton Contraction

* Foundation: This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (30270499) and the Natural Science Foundation of Hebei Province (303454)

** Corresponding author. E-mail: WJK@hebm. edu. cn