SM22α 参与血清饥饿诱导的血管平滑肌细胞微丝重塑

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 血清饥饿可诱导体外培养的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)由合成型转变为收缩型，微丝重塑是该过程的一个重要事件。平滑肌 22α(smooth muscle 22 alpha, SM22α)是 VSMC 的标志蛋白，为了证实 SM22α 是否参与调节 VSMC 的微丝重塑过程，采用反义技术，封闭 SM22α 表达，利用间接免疫荧光染色、透射电镜观察 SM22α 表达对 VSMC 微丝重塑的影响，利用细胞平面迁移实验观察 SM22α 表达对 VSMC 运动功能的影响。实验结果显示，在血清饥饿培养的 VSMC 中，伴随着 SM22α 和 SM α 肌动蛋白表达上调，微丝数量明显增多，呈极性束状分布。用反义 SM22α 抑制 SM22α 表达后，血清饥饿诱导的 VSMC 微丝重塑受阻，微丝纤细，排列紊乱，且细胞迁移活性下降。结果提示，在 VSMC 微丝组装过程中，SM22α 可能起一种捆绑蛋白作用。

关键词 血管平滑肌细胞；平滑肌 22α；微丝重塑；迁移

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)的细胞骨架是由肌动蛋白聚合成的微丝和多种微丝结合蛋白所构成的，用于维持细胞特有的形态，并参与细胞运动、收缩等功能的调节。在 VSMC 表型转化、增殖、迁移、黏附和收缩等多种生物学行为中均有微丝的重塑，其中肌动蛋白聚合形式的改变是微丝重塑的一个重要内容，许多微丝结合蛋白都参与微丝的重塑过程，从而影响 VSMC 的生物学行为。平滑肌 22α(smooth muscle 22 alpha, SM22α)作为一种收缩调节蛋白，其是如何发挥生物学作用的尚不十分清楚[1]。本研究以血清饥饿诱导 VSMC 再分化[2]，采用反义技术，封闭 SM22α 表达，旨在探讨 SM22α 在 VSMC 微丝重塑中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

M199 培养基(Gibco)，脂质体 ESCORT™IV (Sigma)，G418(Sigma)，小鼠抗大鼠 SM α 肌动蛋白单克隆抗体(Sigma)，SM22α 多克隆抗体为本室制备，TRITC 标记的羊抗小鼠二抗(北京中山公司)，反义 SM22α 表达载体的构建参照文献[3]的方法，其他试剂为进口或国产分析纯。

1.2 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。以常规血清培养的 VSMC 为合成型。待细胞生长至 100% 汇合后，再继续培养 24~48 h，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，以血清饥饿 48 h 的 VSMC 为收缩型[2]。

1.3 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-SM22α 质粒，以 pcD2 空质粒为对照。转染后的细胞用 400 μg/ml G418 进行筛选，3 天后改用 100 μg/ml 维持，待 VSMC 生长至汇合后用血清饥饿处理细胞。

1.4 Western 印迹分析

按文献[4]的方法，收集血清饥饿 0、24、48、72 h 的细胞。用 RIPA 细胞裂解液(1% NP40，1% SDS，150 mmol/L NaCl，50 mmol/L Tris-Cl，pH 7.5，10% 甘油，2 mmol/L 钒酸钠，1 mmol/L PMSF)裂解后，提取细胞总蛋白。用 Lowry 法测定蛋白质含量，取等量蛋白质样品进行 12% SDS-PAGE 分离，通过电转移将蛋白质印迹到硝酸纤维素膜上。用 5% 脱脂奶粉封闭膜上非特异性位点

收稿日期：2004-10-12 接受日期：2005-10-13

国家自然科学基金(No.30270499)和河北省自然科学基金(No.303454)资助项目

* 通讯作者。Tel: 0311-6265563；Fax: 0311-6047450；E-mail: hanmei@hebmu.edu.cn

后，加入抗SM22α多克隆抗体或抗SM α肌动蛋白单克隆抗体，室温反应5 h，洗膜3次，随后加入HRP-1标记的羊抗兔或羊抗鼠二抗，室温反应2 h，于4-氯-1-萘酚/H_2O_2溶液中显色。

1.5 间接免疫荧光细胞化学分析

按文献[5]的方法，取爬片培养的各实验组VSMC，用冷PBS清洗2次，4%多聚甲醛固定30 min，1% Triton X-100处理30 min，10%山羊血清室温封闭15 min，依次加入SMα肌动蛋白单克隆抗体(1∶1000)和TRITC标记的二抗(1∶200)进行结合反应。各步骤间均用PBS充分漂洗，缓冲甘油封片，于荧光显微镜(Olympus公司)下观察细胞内微丝分布的变化。

1.6 透射电镜

收集VSMC，用PBS洗3次，2000 r/min离心5 min，细胞团块固定于2%戊二醛中，按常规方法制备透射电镜(Hitachi公司)切片，观察细胞内的微丝结构。

1.7 细胞迁移分析

按文献[6]的方法，爬片培养的VSMC生长至超汇合状态后，血清饥饿培养48 h，用无菌刀片刮除玻片一侧的细胞，将玻片置于含10% FBS的M199中进行继续温育24 h。取出玻片，甲醇固定20 min，HE染色。于高倍镜下(×100)，随机选取5个视野，用测微尺量取迁移起始点至迁移最远端细胞核的距离，以此表示VSMC迁移活性。实验重复3次，所得数据以均数±标准差表示，用方差分析进行差异显著性分析。

2 结果

2.1 血清饥饿对SM22α和SM α肌动蛋白表达的影响

SM22α和SM α肌动蛋白是组成VSMC微丝的分子基础。本实验观察到体外常规培养的合成型VSMC仅能表达少量的SM22α；血清饥饿后，SM22α的含量迅速升高，于48 h达到高峰，约为血清饥饿前的3倍，并一直维持在较高水平不变。体外培养的合成型VSMC中SM α肌动蛋白有较低的表达，血清饥饿使该蛋白质含量水平逐渐上升，于72 h时达到高峰，但升高幅度较小(图1)。

2.2 反义SM22α对微丝重塑的影响

采用反义pcD2-SM22α表达载体转染VSMC，再经血清饥饿48 h后，Western印迹检测到反义pcD2-SM22α可有效降低SM22α水平，而对SM α肌动蛋白无影响(图2)。间接免疫荧光分析结果显示，在血清饥饿过程中，未经转染的VSMC，微丝出现了由稀疏向粗密、由周边分布向中央集中的重塑过程。在转染反义pcD2-SM22α表达载体的细胞中，虽然血清饥饿可诱导微丝的数量明显增多，

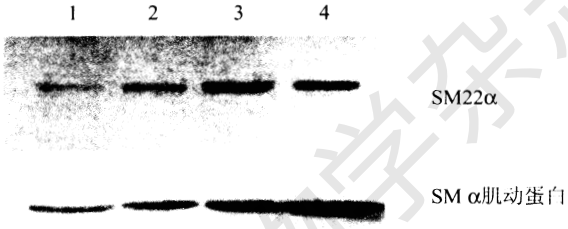

图1 VSMC中SM22α的Western印迹分析

1：10%血清刺激；2：血清饥饿24 h；3：血清饥饿48 h；4：血清饥饿72 h。

图2 转染反义SM22α对SM22α表达的影响

1：转染pcD2质粒；2：转染反义pcD2-SM22α质粒。

但是呈疏细、散乱分布(图3)。透射电镜下观察显示，合成型VSMC中微丝数量少，散在分布于胞质中(图4A)。血清饥饿48 h后胞浆中微丝增多，并集结成平行束状的纤维样结构(图4B)；转染反义pcD2-SM22α表达载体的细胞中，较多的微丝是在胞浆中呈均匀、散在的分布，而呈束状分布的微丝数量较少(图4C)。

2.3 反义SM22α对VSMC迁移活性的影响

为了证实反义SM22α抑制微丝重塑的生理学意义，本研究进一步观察了VSMC迁移活性的变化。结果显示，转染反义pcD2-SM22α的VSMC其迁移活性(140 ± 22.3) μm较转染pcD2的对照组(210 ± 42.7) μm明显下降(P<0.05, 图5)，迁移细胞的数量明显减少。提示SM22α介导的微丝重塑对VSMC的运动功能具有重要作用。

3 讨论

VSMC微丝是一个复杂的动态性可变结构，多种细胞生物学过程如基因转录、细胞外信号转导、细胞运动和伸展、蛋白质合成和分泌以及细胞分裂等均伴有微丝的重塑。许多微丝结合蛋白如calponin、caldesmon、vinculin和tropmyosin等以不同的方式结合到肌动蛋白微丝上，并参与对微丝结构与功能的调节[7]。如采用非黏附培养方法诱导成纤维细胞形态发生显著改变时，许多微丝结合蛋白的表达下降，其中以SM22α和SM α肌动蛋白的变化最为明显，提示二者是细胞形态变化的敏感蛋白。一些体外实验亦证实，纯化的SM22α可迅

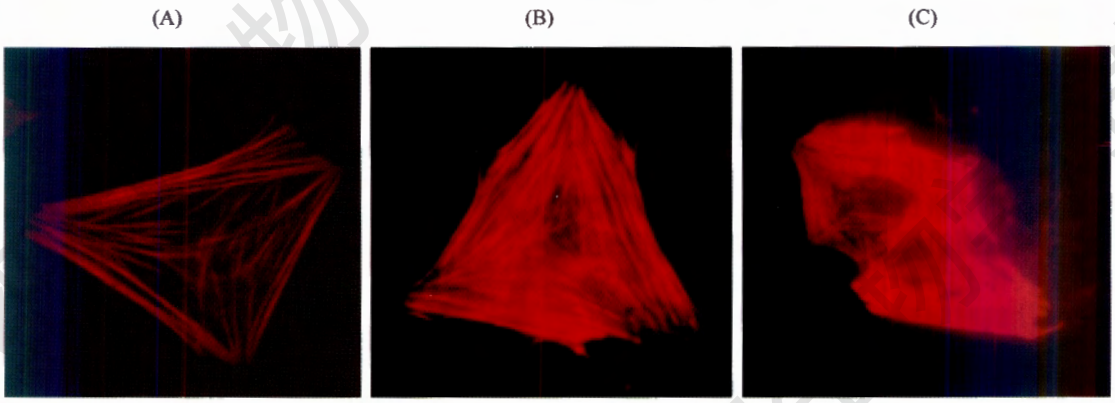

图 3　VSMC 细胞骨架的间接免疫荧光细胞化学分析(400 ×)

A：10% 血清刺激；B：血清饥饿 48 h；C：转染反义 pcD2-SM22α 质粒后血清饥饿 48 h。

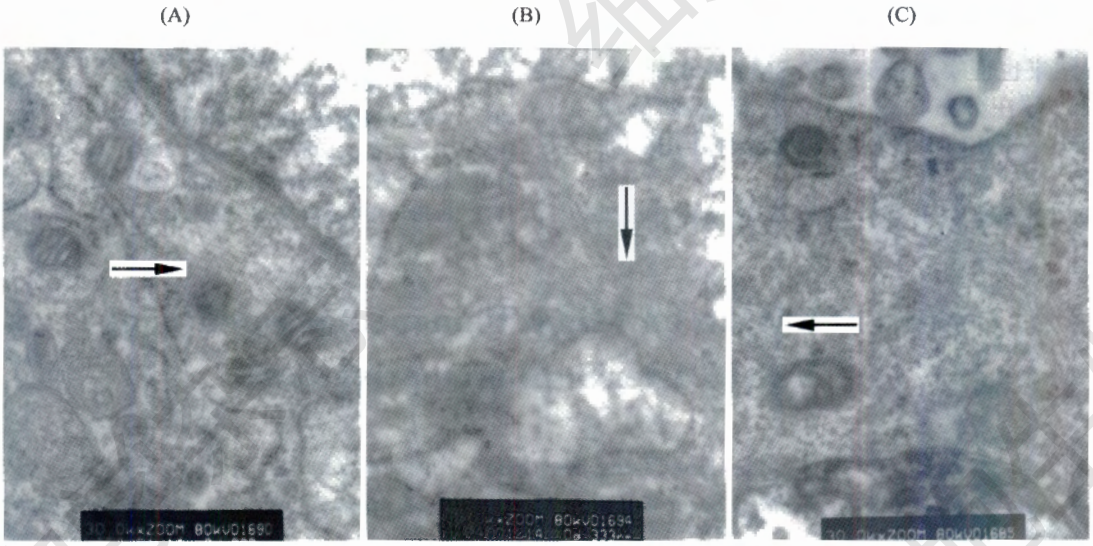

图 4　透射电镜观察 VSMC 细胞骨架(30 k ×)

A：10% 血清刺激；B：血清饥饿 48 h；C：转染反义 pcD2-SM22α 质粒后血清饥饿 48 h。

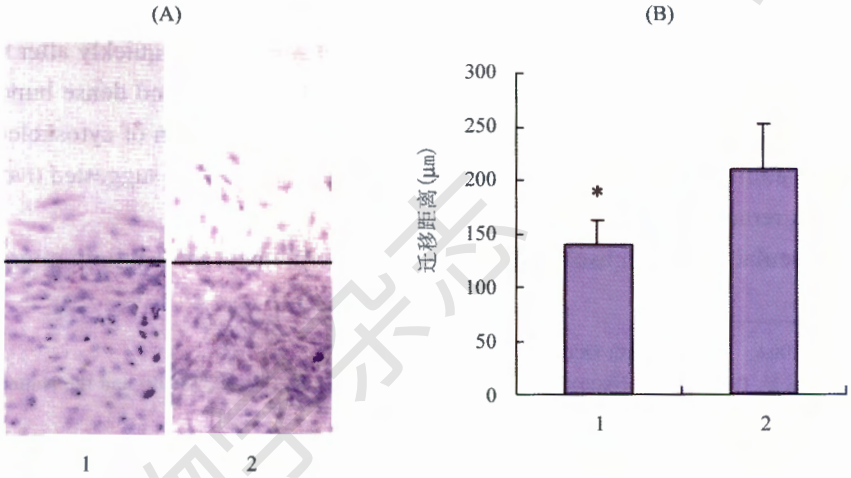

图 5　转染反义 pcD2-SM22α 对 VSMC 迁移活性的影响

A：HE 染色；B：柱形图。1：转染反义 pcD2-SM22α 质粒；2：转染 pcD2 质粒。与转染 pcD2 质粒的 VSMC 比较，$^*P<0.05$。

速诱导微丝形成凝胶状网络[8,9]; 在VSMC中，虽然SM22α与微丝束和应力纤维共定位[10]，但是，有关SM22α在微丝结构重塑中的作用报道不一。

为此，本研究在观察了血清饥饿诱导VSMC再分化过程微丝结构变化特点的基础上，探讨了SM22α和SM α肌动蛋白的表达变化及与微丝重塑的关系。发现在血清饥饿过程中， SM22α的表达变化模式虽然大体上类似于SM α肌动蛋白，但前者表达高峰到达的时间较后者早，说明SM22α对VSMC的表型转化更为敏感。为了探明SM22α表达与微丝重塑之间是否存在因果关系，我们利用反义SM22α表达载体转染VSMC以封闭该基因的表达。结果发现，转染反义SM22α的细胞其微丝重塑过程出现异常，虽然血清饥饿可诱导细胞内的微丝数量增多，但其结构较细疏，且排列紊乱，不能形成与其收缩功能相适应的粗大、平行的束状结构。电镜观察结果也证实，转染反义SM22α的细胞中，微丝纤细、散在分布。这提示，在VSMC的微丝重塑过程中，SM22α可能起一种捆绑作用，促使微丝成束。

细胞局部微丝的可逆性解聚与聚合是细胞运动的基本机制[11]。为了进一步证实SM22α参与微丝重塑的生物学意义，本实验采用细胞平面迁移分析观察了封闭SM22α表达对细胞运动的影响。结果发现，转染反义SM22α后，随着微丝重塑受阻，细胞的迁移活性也明显降低。提示SM22α介导的微丝重塑对于细胞运动是至关重要的。结果表明，在微丝由分散状态组装成束状的重塑过程中，SM22α具有调节作用，但是有关SM22α对微丝重塑的调节机制尚有待于进一步的探讨。

参考文献 (References)

[1] Fu Y *et al*. *J Appl Physiol*, 2000, **89**: 1985
[2] 韩 梅等。*中国生物化学与分子生物学报*, 2003, **19**: 250
[3] 程云会等。*细胞生物学杂志*, 2003, **25**: 384
[4] 刘智敏等。*中国病理生理杂志*, 2003, **19**: 163
[5] 程云会等。*细胞生物学杂志*, 2004, **26**: 207
[6] Wen JK *et al*. *Life Sci*, 2002, **70**: 799
[7] Morgan KG *et al*. *J Appl Physiol*, 2001, **91**: 953
[8] Miralles F *et al*. *Cell*, 2003, **113**: 329
[9] 程云会等。*细胞生物学杂志*, 2004, **26**: 281
[10] Zhang JC *et al*. *Mol Cell Biol*, 2001, **21**: 1336
[11] Pollard TD *et al*. *Cell*, 2003, **112**: 453

Effect of SM22α on Microfilament Remodeling of VSMC after Serum Deprivation

Yun-Hui Cheng, Mei Han*, Jin-Kun Wen

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

Abstract Smooth muscle 22 alpha (SM22α) is a marker of vascular smooth muscle cells (VSMC). In order to investigate the effect of SM22α on microfilament remodeling, antisense SM22α was used in present study. The change of microfilaments in VSMC was observed by immunofluorescence and transmission electron microscopy (TEM), and the ability of migration of VSMC was measured by using a monolayer wounding model. The results demonstrated that the expression of SM22α and SM α-actin was induced quickly after serum starvation and the microfilaments were remodulated from discrete network to well arranged and dense bundles. However, after VSMC was transfected by antisense SM22α recombinant plasmid, reorganization of cytoskeleton by serum starvation was blocked, and the ability of migration of VSMC was declined. These data suggested that SM22α plays a key role during microfilament remodeling.

Key words vascular smooth muscle cells; SM22α; microfilament remodeling; migration

Received: October 12, 2004 Accepted: October 13, 2005

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30270499) and the Natural Science Foundation of Hebei Province (No.303454)

*Corresponding author. Tel: 86-311-6265563, Fax: 86-311-6047450, E-mail: hanmei@hebmu.edu.cn

细胞生物学杂志