

非磷酸化肌球蛋白在血小板衍生生长因子诱导的血管平滑肌细胞迁移中的作用

秦宵然 张晓东* 叶丽虹*

(南开大学生命科学学院, 天津 300071)

摘要 为了阐明非磷酸化肌球蛋白在平滑肌细胞迁移中的作用, 研究探讨了非磷酸化肌球蛋白是否介导了血小板衍生生长因子(PDGF)诱导豚鼠脑基底动脉平滑肌细胞(GbaSM-4)的迁移。研究结果显示, 20 ng/ml 以下剂量的 PDGF 可诱导 GbaSM-4 细胞发生迁移, 此时肌球蛋白轻链(MLC20)磷酸化水平无变化。该迁移作用可被肌球蛋白特异性抑制剂 blebbistatin 所拮抗。应用 RNA 干扰技术抑制肌球蛋白轻链激酶表达, 经免疫印迹检测结果显示, MLC20 的磷酸化水平发生了显著下降; 但对 PDGF 诱导的迁移作用无影响; 在 RNA 干扰后 blebbistatin 也可抑制其迁移作用。体外 ATP 酶活性测定结果显示, blebbistatin 对从平滑肌中提取的非磷酸化肌球蛋白的 ATP 酶活性有明显的抑制作用, 其主要作用位点位于肌球蛋白头的头部 S1。上述结果提示, 非磷酸化的肌球蛋白参与了 PDGF 诱导的平滑肌细胞迁移。

关键词 平滑肌细胞; 迁移; 肌球蛋白非磷酸化; ATP 酶活性

机体的胃肠运动、子宫收缩和循环系统均离不开平滑肌的收缩, 并且在动脉粥样硬化等病理情况下存在平滑肌细胞迁移的现象。因此, 探讨平滑肌细胞收缩与迁移的分子机制具有重要的意义。平滑肌细胞的收缩与迁移涉及促迁移信号的跨膜转导、细胞内信号分子的级联活化、细胞骨架蛋白的收缩和细胞变形等过程, 其收缩是迁移必不可少的步骤^[1]。在平滑肌收缩的分子机制中, 经典的磷酸化学说认为, 肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC)的磷酸化是启动平滑肌收缩的必要条件^[2,3]。然而, 非磷酸化的肌球蛋白是否也参与平滑肌细胞的收缩和迁移仍是该领域的难点。叶丽虹等^[4,5]通过体外实验研究发现, 肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)的片段具有促进非磷酸化的肌球蛋白头部 ATP 酶活性的作用。最近又发现花生四烯酸具有促进非磷酸化肌球蛋白的血管平滑肌细胞发生迁移^[6]。为此, 我们提出了非磷酸化肌球蛋白也可能参与收缩或迁移的非磷酸化假说。为了进一步验证非磷酸化的假说, 本文对非磷酸化肌球蛋白在血小板衍生生长因子(PDGF)诱导的血管平滑肌细胞迁移中的作用做了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 GbaSM-4 细胞为来源于豚鼠脑基底动脉平滑肌细胞系, 由日本兹惠医科大学医学部惠赠。

1.1.2 仪器与试剂 NeuroProb MB96 型 Boyden 小室为 NeuroProb 公司产品; 肌球蛋白抑制剂 blebbistatin 为 Toronto Research Chemicals, Inc. 产品; RNAi 试剂盒 BLOCK-iT™ U6 RNAi Entry Vector Kit (Invitrogen)、BLOCK-iT™ Lentiviral RNAi Expression System (Invitrogen)、ATP 酶活性测定试剂盒 EnzChek Kit (Molecular Probes)、PDGF 和鼠抗 MLC20 单克隆抗体等均购于 Sigma 公司; 胎牛血清购于 Gibico 公司; 质粒提取试剂盒 Aurum™ Plasmid Mini Kit Vacuum Format 购于 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 GbaSM-4 细胞用 Dulbecco's 改良的 Eagle's 培养基(DMEM)培养, 培养基中含有 10%

收稿日期: 2006-06-06 接受日期: 2006-10-16

国家自然科学基金资助项目 (No.30170203)

* 通讯作者。Tel/Fax: 022-23501385, E-mail: yelihong@nankai.

edu.cn, zhangxd@nankai.edu.cn

胎牛血清(FBS), 100 U/ml 青霉素和 100 µg/ml 硫酸链霉素, 于 37 °C 培养箱 5% CO₂ 条件下培养。

1.2.2 细胞迁移实验 采用改良的 Boyden 小室法, 取对数生长期的 GbaSM-4 细胞进行实验。将 GbaSM-4 细胞消化后, 以 2×10^5 个/ml 密度接种于无血清含 0.2% 牛血 BSA 的 DMEM 培养基中培养。取 50 µl 单细胞悬液加入 Boyden 小室的上层小室; 取 450 µl 含有不同浓度 PDGF 的 DMEM 培养基, 加入 Boyden 小室的下层小室; 应用的抑制剂分别加入上、下层小室中, 每组设为 4 个重复孔。上下两室以预先包被 I 型胶原的聚碳酸酯微孔膜相隔, 将 Boyden 小室置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 8 h 后, 从 Boyden 小室中取出聚碳酸酯微孔膜, 用甲醇于室温下固定, 然后用吉姆萨染色。显微镜下随机选择视野, 计数迁移至聚碳酸酯微孔膜下表面的细胞数, 每孔随机取 5 个视野在 400 倍视野下计数 ($\times 400$ high-power field, HPF)。每个实验重复 3 次, 取平均数, 进行 *t* 检验统计分析。

1.2.3 MLC20 磷酸化检测 采用甘油-PAGE^[7,8]并结合免疫印迹方法, 测定 MLC20 的磷酸化水平。实验前用无血清培养基培养 2 h, 用含 2 mmol/L DTT 的 5% 三氯乙酸于 4 °C 进行固定, 将细胞刮起, 以含 10 mmol/L DTT 的丙酮洗去三氯乙酸并干燥, 加入上样缓冲液(20 mmol/L Tris, 22 mmol/L 甘氨酸, 10 mmol/L DTT, 8 mol/L 去离子尿素和 0.1% 溴酚蓝)于室温溶解细胞沉淀, 应用甘油聚丙烯酰胺凝胶电泳。经湿转法将蛋白质转移至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂牛奶封闭, 用鼠 MLC20 单克隆抗体和 ECL 显示系统检测。

1.2.4 RNA 干扰 根据豚鼠 MLCK 的 mRNA 序列设计编码短发夹 RNA(short hairpin RNA, shRNA) 的单链寡核苷酸片段, 有义链序列: 5'-CACCGAAGTATCTGACCTGTACGACACGAATGTCGTACAGGTCAGATAC-3', 反义链序列: 5'-AAAAGTATCTGACCTGTACGACATTCGTGTCGTACAGGTCAGATACTTC-3'。将两个单链寡核苷酸退火成双链寡核苷酸。然后将 ds oligo 克隆至 pRNTRTM/U6 载体, 转化 TOP10 感受态细胞, 挑取阳性克隆, 提取质粒进行鉴定。测序 pRNTRTM/U6 载体, 确认 ds oligo 的序列及插入方向。用 pRNTRTM/U6 和 pLenti6/BLOCK-iTTM-DEST 载体进行 LR 重组反应, 构建表达载体, LR 重组反应物转入 Stb13TM 感受态细胞, 取阳性克隆提取质粒, 测序确定表达载体的序列。用 LipofectamineTM2000 进行基因转染, 将 9 µg ViraPowerTM Packaging Mix 和 3 µg

pLenti6/BLOCK-iTTM-DEST 表达载体共转染 293FT 细胞, 产生病毒粒子。感染后 24 h 时弃掉培养基, 更换新鲜完全培养基。于感染后 72 h 时收获含有病毒粒子的上清液, 保存于 -80 °C 中。用病毒感染 GbaSM-4 细胞, 培养基中含有 6 µg/ml polybrene。感染后第二天, 弃掉含病毒粒子的培养基, 更换新鲜完全培养基, 感染后第三天, 弃掉培养基, 更换含有 6 µg/ml blasticidin 的完全培养基, 筛选稳定感染的细胞。

1.2.5 免疫印迹 将培养的细胞以预冷的 PBS 洗 3 次, 用适量细胞裂解液(20 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA pH 8.0, 1% TritonX-100, 1% DOC, 1 mmol/L DTT), 采用 Bradford 法测定蛋白质浓度。应用 SDS 凝胶电泳, 经湿转法将蛋白质转移至 PVDF 膜上, 加鼠抗 MLCK 单克隆抗体和二抗, 经 ECL 曝光, 检测细胞内 MLCK 的表达水平。

1.2.6 蛋白质样品的制备 按文献报道的方法^[4,8]从新鲜鸡胃中制备肌球蛋白。采用盐析、DEAE-toyopeal 650 M 离子交换层析和凝胶过滤等分离纯化方法, 从新鲜的鸡胃中制备 MLCK^[7]。应用如下反应液(5 mmol/L 肌球蛋白, 60 mmol/L KCl, 5 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L DTT, 0.2 mmol/L CaCl₂, 4 mmol/L ATP, 20 mmol/L Tris-HCl (pH7.4), 0.2 µmol/L MLCK 和 0.5 mmol/L CaM) 于 25 °C 作用 10 min, 将肌球蛋白轻链磷酸化, 用甘油-PAGE 电泳检测其磷酸化水平。按文献报道的方法^[5]制备重酶解肌球蛋白(HMM)和肌球蛋白头部 S1。以上蛋白质的纯化均在 4 °C 进行, 用 SDS-PAGE 确认纯化蛋白质的纯度, 用 Bradford 法测定蛋白质样品的浓度。

1.2.7 ATP 酶活性测定 用试剂盒 EnzChek Kit 测定纯化的肌球蛋白 ATP 酶活性。通过测定无机磷的释放, 于紫外分光光度仪上 360 nm 处测定吸收值, 具体操作步骤根据试剂盒说明书进行。实验在 25 °C 条件下进行, 半数抑制剂量均为 3 次统计结果。

2 结果

2.1 PDGF 对血管平滑肌细胞 MLC20 磷酸化水平的影响

应用 PDGF(剂量分别为 5, 10, 20 ng/ml)预培养 GbaSM-4 细胞 30 min 后, 采用甘油胶电泳结合免疫印迹方法, 检测细胞中 MLC20 磷酸化水平的变化。结果显示, 上述各剂量对 GbaSM-4 细胞内 MLC20 磷酸化水平无影响(图 1)。

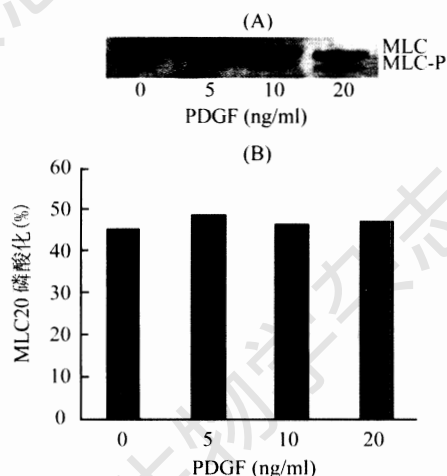


图1 PDGF对GbaSM-4细胞MLC20磷酸化水平的影响

A: 不同浓度PDGF作用GbaSM-4细胞后, 经甘油胶结免疫印迹方法检测细胞内MLC20的磷酸化水平; B: 用BandScanner软件对A中的条带进行灰度分析的结果。

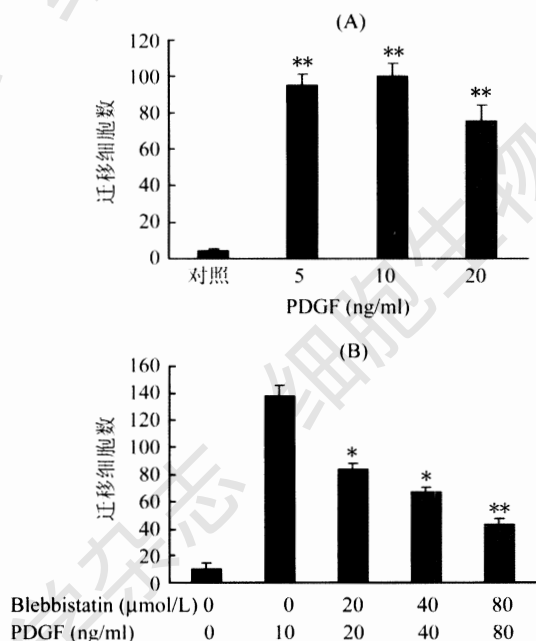


图2 Blebbistatin对PDGF诱导血管平滑肌细胞迁移的影响

A: PDGF诱导GbaSM-4细胞的迁移 将不同浓度的PDGF加于小室下层, 将GbaSM-4细胞加于小室上层, 计数迁移至膜下层的细胞数; B: 将10 ng/ml PDGF加于小室下层, 以不同浓度的blebbistatin预处理GbaSM-4细胞30 min, 然后加于小室上层, 计数迁移至下层的细胞数; 与单独10 ng/ml PDGF组相比, *t*检验: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.2 Blebbistatin对PDGF诱导血管平滑肌细胞迁移的影响

采用Boyden小室法测定GbaSM-4细胞迁移, 结果表明PDGF在5、10和20 ng/ml剂量下可诱导GbaSM-4细胞的迁移, 且在10 ng/ml剂量时引起的迁移作用最强(图2A)。用肌球蛋白特异性抑制剂

blebbistatin^[9,10]预先作用细胞30 min后, 检测10 ng/ml PDGF对GbaSM-4细胞迁移的影响, 结果发现blebbistatin明显抑制了PDGF诱导细胞迁移的作用, 并呈剂量依赖性, 半数抑制剂量(IC₅₀)为(35.2±1.3) μmol/L ($n=3$) (图2B)。

2.3 肌球蛋白轻链激酶在PDGF诱导血管平滑肌细胞迁移中的作用

运用BLOCK-iT™ Lentiviral RNAi表达系统对GbaSM-4细胞中MLCK基因的表达进行干扰, 免疫印迹结果显示, 长型和短型的MLCK均未见表达(图3A), GbaSM-4细胞中磷酸化MLC20水平显著降低(图3B);应用Boyden小室检测发现, GbaSM-4细胞的MLCK被干扰后, 10 ng/ml PDGF的诱导迁移作用与未干扰组相比无明显差异, 且blebbistatin也可阻碍该迁移作用, 并呈剂量依赖性(图3C)。

2.4 Blebbistatin对平滑肌肌球蛋白ATP酶活性的抑制作用

本研究从鸡胃中提取纯化了肌球蛋白和MLCK, 经SDS-PAGE检测, 肌球蛋白的纯度达到实验要求(图4A), 且肌球蛋白的调节轻链(regulatory light chain, RLC)可被不同浓度的MLCK一重或二重磷酸化(图4B), 以下所称磷酸化肌球蛋白均为RLC二重磷酸化。ATP酶活性测定结果表明, blebbistatin对非磷酸化肌球蛋白ATP酶活性的IC₅₀为(23.9±2.2) μmol/L, 在肌动蛋白存在时对ATP酶活性的抑制作用增强, IC₅₀为(17.5±0.7) μmol/L; Blebbistatin对磷酸化肌球蛋白ATP酶活性的IC₅₀为(26.1±1.1) μmol/L, 弱于对非磷酸化肌球蛋白的ATP酶活性(图4C)。为了进一步确定blebbistatin对非磷酸化肌球蛋白的作用位点, 经检测其对重酶解肌球蛋白(HMM)和肌球蛋白头部(S1)的ATP酶活性抑制作用, IC₅₀分别为(19.2±1.2) μmol/L和(13.6±1.2) μmol/L, 与上述对非磷酸化肌球蛋白的作用相比, blebbistatin对HMM(包括S1)和S1的ATP酶活性均有抑制作用, 其中, 对后者作用非常明显(图4D)。综上结果推测, blebbistatin主要通过作用于肌球蛋白的头部抑制非磷酸化肌球蛋白ATP酶的活性。

3 讨论

通常认为平滑肌收缩和迁移的主要信号转导途径为肌球蛋白轻链磷酸化途径, 即通过钙离子和钙调蛋白(CaM)与MLCK共同激活MLC20, 使其磷酸化, 或者Rho通过下游靶分子Rho激酶抑制肌球蛋白轻链磷酸化酶(MLCP), 提高MLC20磷酸化水平, 进而

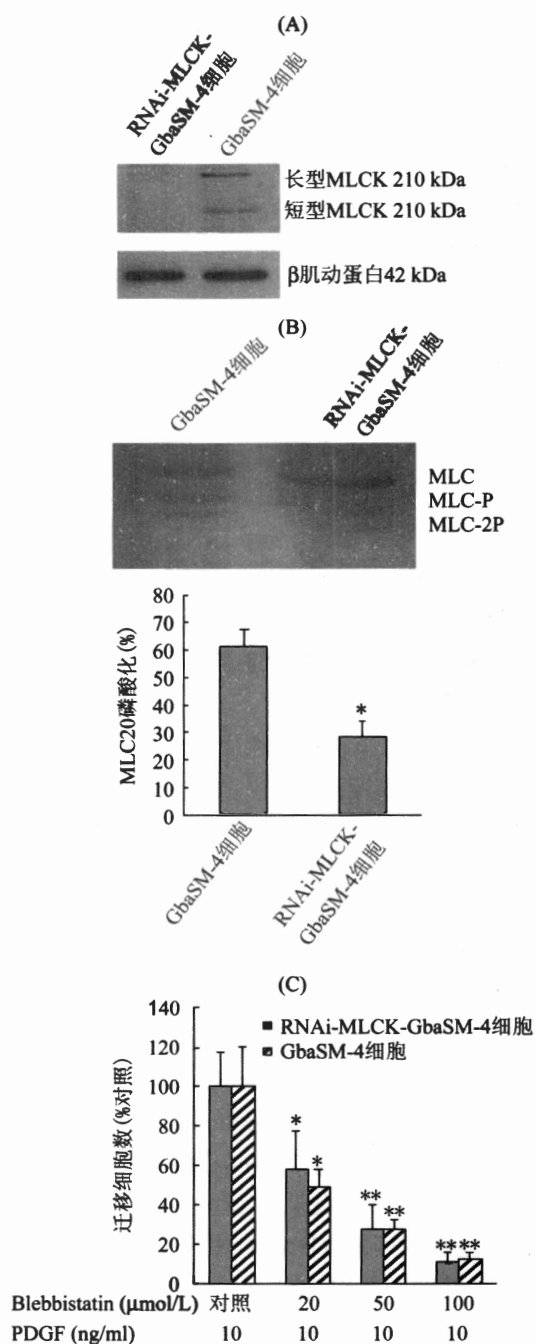


图3 MLCK不影响PDGF诱导的血管平滑肌细胞迁移

A: 以Western印迹方法检测RNA干扰作用后GbaSM-4细胞MLCK表达水平的变化; B: 以甘油胶结免疫印迹方法检测RNA干扰作用后GbaSM-4细胞内MLC20磷酸化水平的变化及BandScanner软件对其条带进行的灰度分析; C: 将10 ng/ml PDGF加于小室下层, 以不同浓度的blebbistatin预处理细胞30 min, 然后加于小室上层, 计数迁移至下层的细胞数。与对照组相比, t 检验: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

磷酸化的肌球蛋白与肌动蛋白相互作用, 促进细胞收缩或迁移。该机制认为, 平滑肌收缩和迁移主要是由磷酸化肌球蛋白产生的收缩力所介导, 并认为唯有磷酸化的肌球蛋白是与肌动蛋白丝产生相互作用的

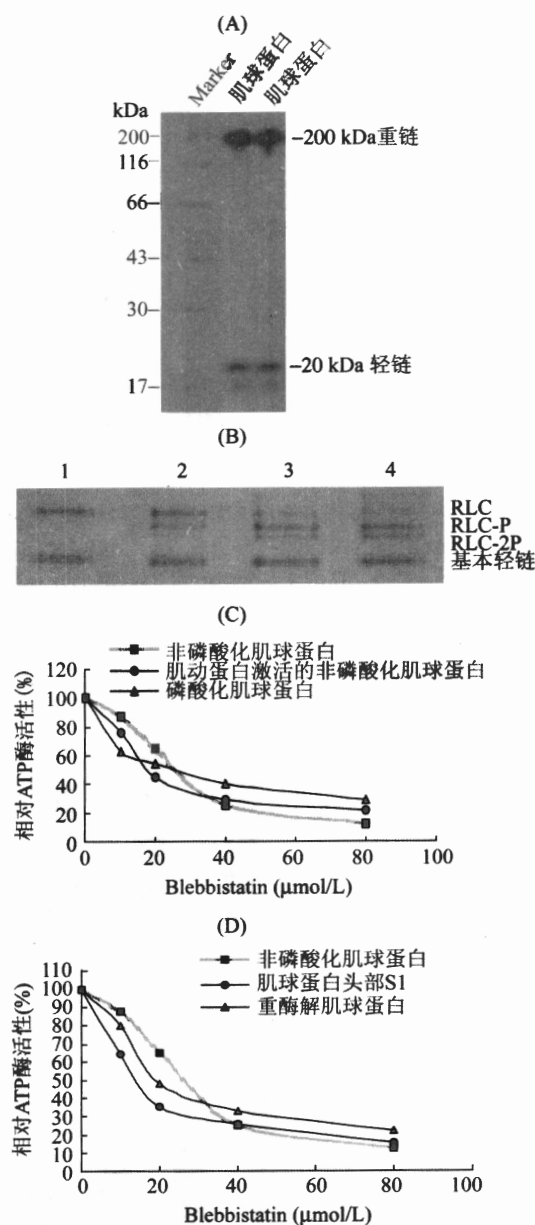


图4 Blebbistatin可抑制平滑肌肌球蛋白ATP酶活性

A: SDS-PAGE检测纯化的肌球蛋白; B: 肌球蛋白磷酸化的检测, 1: 肌球蛋白; 2-4: 随MLCK剂量增加肌球蛋白的磷酸化水平增加; C、D: ATP酶活性测定结果, ATP酶活性测定实验的反应条件为60 mmol/L KCl, 0.01 mmol/L CaCl_2 , 0.5 mmol/L ATP, 1.5 mmol/L MgCl_2 , 0.5 μ mol/L 肌球蛋白和磷酸化肌球蛋白, 0.25 μ mol/L S1, 0.3 μ mol/L HMM, 测定 β 肌动蛋白激活的肌球蛋白ATP酶活性时, β 肌动蛋白浓度为6.0 μ mol/L, 所有实验均在25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行。

活性结构, 磷酸化的肌球蛋白在平滑肌细胞迁移的最后收缩过程起作用^[11,12]。肌球蛋白II是MLCK的生理性底物, 是真核细胞内的一类分子马达, 直接参与细胞的收缩和迁移^[13], 它由轻酶解肌球蛋白(LMM)和重酶解肌球蛋白(HMM)构成, 其中HMM可分为肌球蛋白头部S1和杆状颈部S2, 肌球蛋白最重要的部分

是S1,它具有ATP酶活性,同时也是和肌动蛋白分子结合的位置。

本研究首先应用Boyden小室跨膜迁移实验发现,PDGF在20 ng/ml剂量以内可明显诱导GbaSM-4细胞迁移,但并不增加细胞内MLC20的磷酸化水平,表明PDGF诱导的迁移是肌球蛋白轻链(MLC20)磷酸化非依赖的。那么非磷酸化的肌球蛋白是否具有介导迁移的作用,我们进一步结合肌球蛋白特异性抑制剂blebbistatin进行了研究,发现blebbistatin可明显阻碍上述PDGF诱导的MLC20磷酸化非依赖的迁移作用,提示非磷酸化的肌球蛋白可能参与了PDGF诱导的GbaSM-4细胞迁移。Blebbistatin是一种对肌球蛋白具有高度亲和性和选择性的小分子抑制剂,它不影响MLCK的激酶活性,也不影响肌球蛋白对肌动蛋白的结合,不影响ATP诱导的肌动球蛋白解离^[9,10]。我们进一步检测了blebbistatin对提取的平滑肌肌球蛋白ATP酶活性的直接抑制作用,发现blebbistatin对非磷酸化和磷酸化平滑肌肌球蛋白的ATP酶活性都有直接抑制作用,半数抑制剂量分别为 IC_{50} 为 (23.9 ± 2.2) 和 $(26.1 \pm 1.1) \mu\text{mol/L}$,并发现在肌动蛋白存在时对ATP酶活性的抑制作用增强, IC_{50} 为 $(17.5 \pm 0.7) \mu\text{mol/L}$ 。为确定blebbistatin对非磷酸化肌球蛋白的作用位点,经检测发现其对肌球蛋白的S1和包括S1的HMM部分的ATP酶活性均有抑制作用,对前者作用更明显,因此,推测blebbistatin主要是作用于肌球蛋白的头部S1抑制肌球蛋白ATP酶的活性。体外实验结果也表明非磷酸化的肌球蛋白具有参与PDGF诱导GbaSM-4细胞迁移的可能性。

众所周知,通常平滑肌收缩和迁移主要是由MLCK等激活MLC20肌球蛋白轻链磷酸化使其水平增加引起的^[14,15]。我们在PDGF诱导细胞迁移前后未见肌球蛋白磷酸化水平的改变,一直保持较低的基础磷酸化水平,认为磷酸化的肌球蛋白不参与上述PDGF诱导的细胞迁移。但是,因在我们的体外实验中发现blebbistatin对磷酸化和非磷酸化的肌球蛋白ATP酶活性都有直接抑制作用,所以我们为了进一步

验证磷酸化的肌球蛋白是否参与了PDGF诱导细胞迁移。又进行了如下实验,运用BLOCK-iT™ Lentiviral RNA干扰表达系统,建立稳定干扰MLCK的细胞系,干扰了GbaSM-4细胞中MLCK长型和短型MLCK的表达,结果发现与GbaSM-4细胞相比,RNAi-MLCK GbaSM-4细胞内的MLC20磷酸化水平显著降低,并发现10 ng/ml PDGF对MLCK干扰组 and 对照组所诱导的迁移作用未见差异,且其迁移作用也可被blebbistatin所阻碍。结果可见GbaSM-4细胞中的磷酸化肌球蛋白由RNAi-MLCK前较低的基础水平降至RNAi-MLCK后的更低水平的情况下,对PDGF诱导的细胞迁移作用没有影响,表明肌球蛋白的磷酸化与PDGF诱导的迁移作用是不相关的,因此上述磷酸化肌球蛋白没有参与PDGF诱导的细胞迁移,同时也进一步说明了PDGF诱导的细胞迁移是非磷酸化肌球蛋白介导的。我们曾报道的关于花生四烯酸诱导非磷酸化肌球蛋白的平滑肌细胞迁移作用及机制的研究也进一步证明了本实验结果推论的可靠性^[6]。

综上所述提示,非磷酸化的肌球蛋白直接参与了PDGF诱导的血管平滑肌细胞迁移,其相关信号转导途径有待于进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] Giannotti FG *et al. Science*, 1999, **285**: 1028
- [2] Kamm KE *et al. Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1985, **25**: 593
- [3] Amano M *et al. Exp Cell Res*, 2000, **261**: 44
- [4] Ye LH *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 6666
- [5] Gao Y *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **305**: 16
- [6] 叶丽虹等. *中国生物化学与分子生物学报*, 2005, **21**: 440
- [7] Kishi H *et al. J Biol Chem*, 2000, **275**: 1414
- [8] 叶丽虹等. *细胞生物学杂志*, 2005, **27**: 459
- [9] Straight AF *et al. Science*, 2003, **299**: 1743
- [10] Kovacs M *et al. J Biol Chem*, 2004, **279**: 35557
- [11] Horowitz A *et al. Physiol Rev*, 1996, **76**: 967
- [12] 卢中举等. *生理科学进展*, 1997, **28**: 337
- [13] Limouze J *et al. J Muscle Res Cell Motil*, 2004, **25**: 337
- [14] Sohn UD *et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001, **281**: G467
- [15] Loirand G *et al. J Physiol*, 1999, **516**: 825

Effect of Myosin without Phosphorylation on the Migration of Vascular Smooth Muscle Cells induced by Platelet-derived Growth Factor

Xiao-Ran Qin, Xiao-Dong Zhang*, Li-Hong Ye*

(College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin, 300071, China)

Abstract In order to demonstrate the effect of myosin without phosphorylation on the migration of smooth muscle cells, we investigated myosin without phosphorylation whether involved in the migration of GbaSM-4 cells induced by platelet-derived growth factor (PDGF). It was found that lower 20 ng/ml PDGF was able to induce the migration of GbaSM-4 cells, in which myosin light chain (MLC20) with phosphorylation was not necessary. The migration can be depressed by blebbistatin, a specific inhibitor of myosin. The phosphorylation of MLC20 was downregulated in the GbaSM-4 cells by RNA interference (RNAi) targeting myosin light chain kinase (MLCK), examined by Western blot analysis. Moreover, PDGF still was able to induce the migration when RNAi was used, which could be blocked by blebbistatin. The ATPase activity assay for myosin in smooth muscle cells *in vitro* showed that blebbistatin was able to inhibit the ATPase activity of myosin without phosphorylation in smooth muscle cells. The target was mainly localized at the head of myosin S1. The data demonstrated that the non-phosphorylated myosin may involved in the migration of vascular smooth muscle cells induced by PDGF.

Key words smooth muscle cells; migration; myosin light chain without phosphorylation; ATPase activity

Received: June 6, 2006

Accepted: October 16, 2006

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30170203)

*Corresponding authors. Tel/Fax: 86-22-23501385, E-mail: yelihong@nankai.edu.cn, zhangxd@nankai.edu.cn