

GLP-1R核输出通过C14orf166-GSK3 β 信号轴促进血管平滑肌细胞增殖和迁移

范韶华¹ 石亚伟^{2*}

(¹太原师范学院, 生物科学与技术学院, 晋中 030619; ²山西大学, 生物技术研究, 太原 030006)

摘要 胰高血糖素样肽-1受体(glucagon-like peptide-1 receptor, GLP-1R)的心血管保护效应已被证实, 现有研究大多聚焦于GLP-1R介导的经典细胞膜信号通路。前期研究发现, GLP-1R具有非经典的核定位特征, 血管紧张素II(angiotensin II, AngII)可诱导其核输出, 但GLP-1R调控血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)异常增殖迁移的潜在分子机制尚不明确。该研究旨在探究GLP-1R核输出介导大鼠胸主动脉平滑肌细胞(rat thoracic aortic smooth muscle cells, RASMCs)增殖和迁移的分子机制。利用MTT、划痕实验和Western blot分别检测细胞增殖、细胞迁移以及cyclin D1、PCNA蛋白水平; 免疫荧光检测GLP-1R定位情况; 免疫共沉淀验证蛋白间相互作用。经生物信息学分析与酵母双杂交证实GLP-1R与C14orf166在核内存在互作, 为进一步明确它们在核内的功能, 构建了AngII诱导的RASMCs损伤细胞模型。结果显示, 在静息状态下, 核内GLP-1R可与C14orf166结合, 抑制其转录活性。AngII诱导GLP-1R核输出后GLP-1R与C14orf166解离, 游离的C14orf166通过抑制糖原合成酶激酶3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK3 β)活性, 激活促增殖迁移通路, 进而诱发病理性血管重构。该研究阐明了GLP-1R核输出介导血管重构的全新分子机制: GLP-1R核输出–激活C14orf166转录活性–抑制GSK3 β 活性–促进RASMCs增殖迁移–血管重构, 拓展了GLP-1R的功能范围, 为理解GLP-1R的心血管保护效应提供了新视角。

关键词 GLP-1R核输出; C14orf166; GSK3 β

GLP-1R Nuclear Export Promotes the Proliferation and Migration of Vascular Smooth Muscle Cells via the C14orf166-GSK3 β Signaling Axis

FAN Shaohua¹, SHI Yawei^{2*}

(¹College of Biological Science and Technology, Taiyuan Normal University, Jinzhong 030619, China;

²Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract The cardiovascular protective effects of GLP-1R (glucagon-like peptide-1 receptor) have been documented, and most studies have focused on canonical cell-membrane signaling pathways mediated by GLP-1R. The previous study revealed that GLP-1R exhibited a non-classical nuclear localization, and AngII (angiotensin II) induced its nuclear export. However, the molecular mechanism by which GLP-1R regulates the abnormal proliferation and migration of VSMCs (vascular smooth muscle cells) remains unclear. This study aimed to explore the molecular mechanism underlying the proliferation and migration of RASMCs (rat thoracic aortic smooth muscle cells) mediated by GLP-1R nuclear export. Cell proliferation, cell migration, as well as the expression levels of cyclin D1

收稿日期: 2026-05-09 接受日期: 2026-07-07

山西省基础研究计划自由探索类青年科学研究项目(批准号: 202203021222246)资助的课题

*通信作者。E-mail: yaweishi@sxu.edu.cn

Received: May 9, 2026

Accepted: July 7, 2026

This work was supported by the Fundamental Research Program of Shanxi Province (Grant No.202203021222246)

*Corresponding author. E-mail: yaweishi@sxu.edu.cn

and PCNA, were detected by MTT assay, wound healing assay and Western blot. Immunofluorescence staining was used to observe the subcellular localization of GLP-1R, and co-immunoprecipitation was applied to verify protein-protein interactions. Bioinformatics analysis and yeast two-hybrid assay confirmed the nuclear interaction between GLP-1R and C14orf166. To further clarify their intranuclear functions, an AngII-induced injury model of RASMCs was established. The results showed that under resting conditions, GLP-1R binded to C14orf166 in the nucleus, and inhibited its transcriptional activity. Upon AngII stimulation, GLP-1R undergone nuclear export, leading to its dissociation from C14orf166. The dissociated free C14orf166 inhibits the activity of GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 β), consequently activating the signaling pathways that promote proliferation and migration of RASMCs, and ultimately mediating pathological vascular remodeling. In conclusion, this study elucidates a novel molecular mechanism of vascular remodeling mediated by GLP-1R nuclear export: GLP-1R nuclear export-activating the transcription of C14orf166-inhibition of GSK3 β activity-promoting RASMCs proliferation and migration-vascular remodeling. These finding expands the functional scope of GLP-1R, provides new perspectives for understanding the cardiovascular protective effects of GLP-1R.

Keywords GLP-1R nuclear export; C14orf166; GSK3 β

心血管疾病致死率位居全球慢性病之首,患者群体庞大且数量逐年增加。在我国,由于人口老龄化、生活方式不健康及代谢异常等问题,该病的发病率亦呈现持续上升趋势^[1]。血管重构是动脉粥样硬化、高血压等心血管疾病的核心病理特征,其本质是血管壁结构与功能的异常重塑,主要表现为血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)过度增殖迁移及细胞外基质重构,最终导致血管狭窄、僵硬增加,加剧心脑血管事件风险^[2]。血管紧张素 II(angiotensin II, AngII)作为肾素-血管紧张素-醛固酮系统的核心效应分子,被证实是诱导VSMCs异常增殖和迁移、介导病理性血管重构的关键致病因子^[3]。AngII通过调控多条信号通路促进VSMCs增殖迁移^[4],但其下游分子调控网络仍存在未被阐明的关键节点。因此,深入解析AngII介导VSMCs功能异常的分子机制,寻找潜在干预靶点,对心血管疾病的防治具有重要临床价值。

胰高血糖素样肽-1受体(glucagon-like peptide-1 receptor, GLP-1R)作为G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)家族的重要成员,最初因在血糖调节中的关键作用而被广泛关注^[5]。近年来,大量临床与基础研究证实GLP-1R具有显著的心血管保护效应,其激动剂可降低主要不良心血管事件风险,改善血管内皮功能、减轻血管炎症及氧化应激^[6-7],为心血管疾病治疗提供了新的策略。目前,针对GLP-1R的信号转导研究主要聚焦于细胞膜表面经典受体激活^[8]、受体内吞过程^[9-10]及cAMP/PKA等下游经典通路的调控机制^[11],但随着GPCRs非经典信号功能的

不断发现^[12],核定位GPCRs在基因转录调控中的作用逐渐成为研究热点。我们前期研究发现,GLP-1R在大鼠胸主动脉平滑肌细胞(rat thoracic aortic smooth muscle cells, RASMCs)中定位于细胞核^[13],且在AngII刺激下会发生显著的核输出^[14],提示其可能通过核内信号调控参与血管病理生理过程。然而,GLP-1R的非经典核定位与核输出在RASMCs异常增殖迁移中的作用,以及其下游分子调控机制尚未明确,极大限制了对GLP-1R心血管保护效应的全面理解。

核孔复合物相关蛋白C14orf166(chromosome 14 open reading frame 166)是一类参与核质运输及RNA代谢的多功能蛋白,其通过与核孔复合物组分及RNA聚合酶II等相互作用,调控基因转录与RNA转运过程^[15]。近年研究发现,C14orf166在肿瘤细胞中高表达,通过激活STAT3信号通路或调控细胞周期相关基因表达,促进细胞增殖与侵袭^[16],提示其可能具有促细胞异常增殖的功能特性。Huang等^[17]通过生物信息学分析和分裂泛素化膜酵母双杂交实验证明C14orf166与GLP-1R在细胞核内存在相互作用,结合二者均涉及核质转运与基因调控的功能特征,推测这种相互作用可能参与GLP-1R非经典信号通路的调控,进而影响AngII介导的RASMCs细胞功能失调。现有研究报道C14orf166在血管重构中具有调控作用;C14orf166与GLP-1R的相互作用是否参与AngII诱导的RASMCs增殖迁移过程,及其相关分子调控机制仍有待研究。

基于上述研究背景与科学问题,本研究采用AngII诱导RASCs构建细胞模型,探究细胞异常增殖与迁移的分子机制,围绕GLP-1R核输出、GLP-1R与C14orf166互作展开探讨。通过细胞功能实验、免疫共沉淀(co-immunoprecipitation, Co-IP)、突变体构建等技术,明确GLP-1R核输出对AngII介导RASCs异常增殖和迁移的调控作用,阐明C14orf166在这一过程中的调控作用及分子机制。本研究旨在揭示“GLP-1R核输出-激活C14orf166转录活性-抑制糖原合成酶激酶3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK3 β)活性-促进RASCs增殖迁移-血管重构”的全新分子通路,深化了对GLP-1R非经典信号功能的认知,不仅有助于从多元化机制层面阐释其心血管保护效应,也为动脉粥样硬化、高血压等疾病的靶向干预提供了新的分子靶点与理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 实验使用的RASCs来源于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.1.2 仪器 去卷积活细胞工作站DeltaVision购自美国GE公司;荧光定量PCR仪和NanoDrop微量分光光度计购自瑞士Roche公司;PCR仪、转膜仪、水平电泳槽、电泳仪均购自美国Bio-Rad公司;CO₂细胞培养箱、-80℃超低温冰箱、低速离心机均购自德国Eppendorf公司;Synergy Mx多功能酶标仪购自美国BioTek公司;倒置相差显微镜购自德国ZEISS公司;金属浴购自上海珂淮仪器有限公司;超净工作台购自力康生物医疗科技控股有限公司;高压灭菌锅购自致微(厦门)仪器有限公司;恒温摇床购自上海知楚仪器有限公司。

1.1.3 试剂 C14orf166、GSK3 β 多克隆抗体购自南京巴傲得生物科技有限公司;GLP-1R多克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司;cyclin D1抗体、PCNA抗体、 β -actin抗体、FITC标记羊抗兔IgG抗体、HRP标记羊抗鼠IgG多克隆抗体、ECL化学发光检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;BCA蛋白定量试剂盒、X-光片、PVDF膜、MTT试剂均购自北京索莱宝科技有限公司;TurboFect转染试剂购自美国ThermoFisher Scientific公司;AngII多肽由上海生工生物工程有限公司合成,其纯度为99.98%。

1.2 方法

1.2.1 细胞分组处理 AngII组: AngII处理RASCs细胞24 h; shRNA-GLP-1R质粒转染联合组: 将RASCs细胞先后转染shRNA-GLP-1R及pEGFP-C1-GLP-1R(Δ NES)或pEGFP-C1-GLP-1R(Δ NLS),两种质粒转染间隔24 h; GLP-1R位点突变体转染+AngII组: pEGFP-C1-GLP-1R S416A与pEGFP-C1-GLP-1R S416D分别转染RASCs,培养24 h后,再给予AngII干预处理24 h; C14orf166过表达及敲低组: pEGFP-C1-C14orf166或shRNA-C14orf166转染RASCs细胞24 h; C14orf166过表达及敲低+AngII组: RASCs转染pEGFP-C1-C14orf166或shRNA-C14orf166 24 h后,再以AngII刺激24 h; 抑制剂+AngII组: RASCs细胞经PKC θ 抑制剂预处理30 min,随后以AngII刺激24 h。

1.2.2 MTT 取对数生长期、状态良好的RASCs,经胰酶37℃消化1~2 min后计数,调整细胞浓度并将其以5 000/孔的密度接种于96孔培养板。置于37℃、5% CO₂培养箱中培养24 h,待细胞贴壁率达80%以上时,进行相应处理。各处理组于37℃、5% CO₂培养箱中孵育结束后,每孔加入20 μ L MTT试剂(5 mg/mL),继续置于37℃、5% CO₂培养箱中避光反应4 h。小心吸去上清液后,每孔加入150 μ L 二甲基亚砜,于摇床上振荡(3 000 r/min、10 min)使结晶充分溶解。随后用酶标仪在490 nm波长处测定各孔吸光度(D)值,记录数据并进行分析。

1.2.3 划痕实验 取对数生长期、状态稳定的RASCs,经计数后调整细胞浓度,以每孔 1×10^5 个细胞的密度接种于6孔培养板,置于37℃、5% CO₂培养箱中培养。待细胞融合度达到90%以上时,采用无菌200 μ L枪头,在各孔培养面中央垂直划一道均匀划痕,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)轻轻冲洗2次,去除划下的细胞碎片,进行不同干预。分别在划痕处理后的0 h和24 h,使用倒置相差显微镜(10倍物镜)在同一视野下拍摄各孔划痕图像。采用Image-Pro Plus 6.0图像分析软件,测量各时间点划痕的平均宽度,每组实验重复3次。细胞迁移能力以迁移率表示,计算公式为:

$$b = \frac{w_{0C} - w_{24E}}{w_{0C}} \times 100\%$$

b: 细胞迁移率,单位为%,反映细胞24 h内向划痕

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	正向引物	反向引物
Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>C14orf166</i>	5'-TGT TCC GAC GCA AGT TGA-3'	5'-CGC TGC TGT GGA TGT TTC T-3'
<i>GAPDH</i>	5'-ACA GCA ACA GGG TGG TGG AC-3'	5'-TTT GAG GGT GCA GCG AAC TT-3'

痕空白区域迁移的能力; w_{0C} : 0 h时对照组的划痕宽度(即初始划痕宽度); w_{24E} : 24 h时实验组的划痕宽度(即处理后划痕宽度)。

1.2.4 免疫荧光 将对数生长期RASCs接种于预先放置无菌盖玻片的培养皿中进行爬片。待细胞融合度达40%~50%时,进行相应处理。细胞处理完成后,移除培养基,用PBS轻柔洗涤盖玻片3次,以-20℃预冷甲醇固定细胞20 min,再以0.3% Triton X-100室温透化10 min。随后,用5%胎牛血清于37℃摇床封闭30 min。加入兔源GLP-1R一抗(稀释比例为1:250),4℃孵育过夜。次日,用PBS洗涤3次(每次5 min)后加入异硫氰酸荧光素标记的羊抗兔IgG二抗(稀释比例为1:1 000),37℃孵育2 h。再次PBS洗涤后,用DAPI染液于37℃孵育10 min,抗荧光淬灭封片剂封片。采用DeltaVision高分辨成像系统观察GLP-1R定位情况。

1.2.5 蛋白质印迹法(Western blot) 收集各组处理后的细胞,加入含蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂及苯甲基磺酰氟的预冷细胞裂解液,冰上裂解20 min。裂解物于4℃、12 000 r/min离心15 min,取上清,采用BCA试剂盒测定蛋白浓度。各组蛋白以相同上样量(50 μg)进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。电泳结束后,将PVDF膜放入甲醇中活化5 s。随后按正极、滤纸、PVDF膜、凝胶、滤纸、负极的顺序组装转膜三明治,将其置于含预冷电转液的转膜槽中,根据目的蛋白分子量设定相应参数,进行湿法转膜。转膜完成后取出PVDF膜,含吐温20的Tris缓冲液(Tris-buffered saline with Tween 20, TBST)漂洗后,以5%脱脂奶粉室温封闭2 h。封闭结束后, TBST洗膜3次(每次5 min),加入大鼠来源的cyclin D1(稀释比例为1:1 000)和β-actin(稀释比例为1:10 000)一抗4℃孵育过夜;弃去一抗, TBST洗膜3次(每次5 min),加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG(稀释比例为1:1 000)二抗4℃孵育过夜。最后在暗室中采用ECL化学发光检测试剂盒,经X-光片显影、定影完成蛋白表达检测。

1.2.6 免疫共沉淀 将细胞接种于6孔板,待细胞汇合度达90%时,给予相应药物干预。收集细胞后,于冰上裂解20 min。裂解完成后,在4℃条件下以12 600 r/min离心,收集上清液并测定蛋白浓度。取20 μL上清作为input样品,剩余样品均分至两管,分别设为对照组与实验组:对照组加入2 μg IgG,实验组加入2 μg GLP-1R抗体,于4℃摇床孵育过夜,使抗体与抗原充分结合。将孵育后的样品分别加入已平衡的Protein A+G琼脂糖珠中,于4℃摇床上继续结合4~8 h。然后用PBS洗涤3次,以去除非特异性结合的蛋白。洗涤结束后,加入20 μL PBS并将其与柱材料混匀,再加入上样缓冲液制备样品,后续进行蛋白质印迹检测。

1.2.7 实时荧光定量PCR 取逆转录成功的cDNA(100 ng)作为PCR模板,采用20 μL总反应体系,各组分添加量为10 μL SYBR Premix Ex Taq™、0.8 μL上下游引物混合液、2 μL模板、7.2 μL DEPC水。将各组分加入无菌PCR管,混匀后置于荧光定量PCR仪,每组设3个复孔,同时设空白对照组。扩增程序为95℃预变性30 s,随后进行40个循环的扩增(95℃变性5 s、65℃退火延伸30 s)。扩增结束后,通过仪器自带软件分析扩增曲线和熔解曲线以验证扩增产物特异性,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目标基因相对表达量,实验重复3次。引物序列见表1。

1.2.8 数据统计 本研究所有实验均独立重复3次,所得数据以均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。统计学分析采用两种方法:多组间比较使用单因素方差分析,两组间比较使用Student's *t*检验。所有数据的整理与图表绘制均通过Origin 8.5软件完成。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义的判定标准。

2 结果

2.1 GLP-1R胞质定位显著促进RASCs细胞异常增殖和迁移

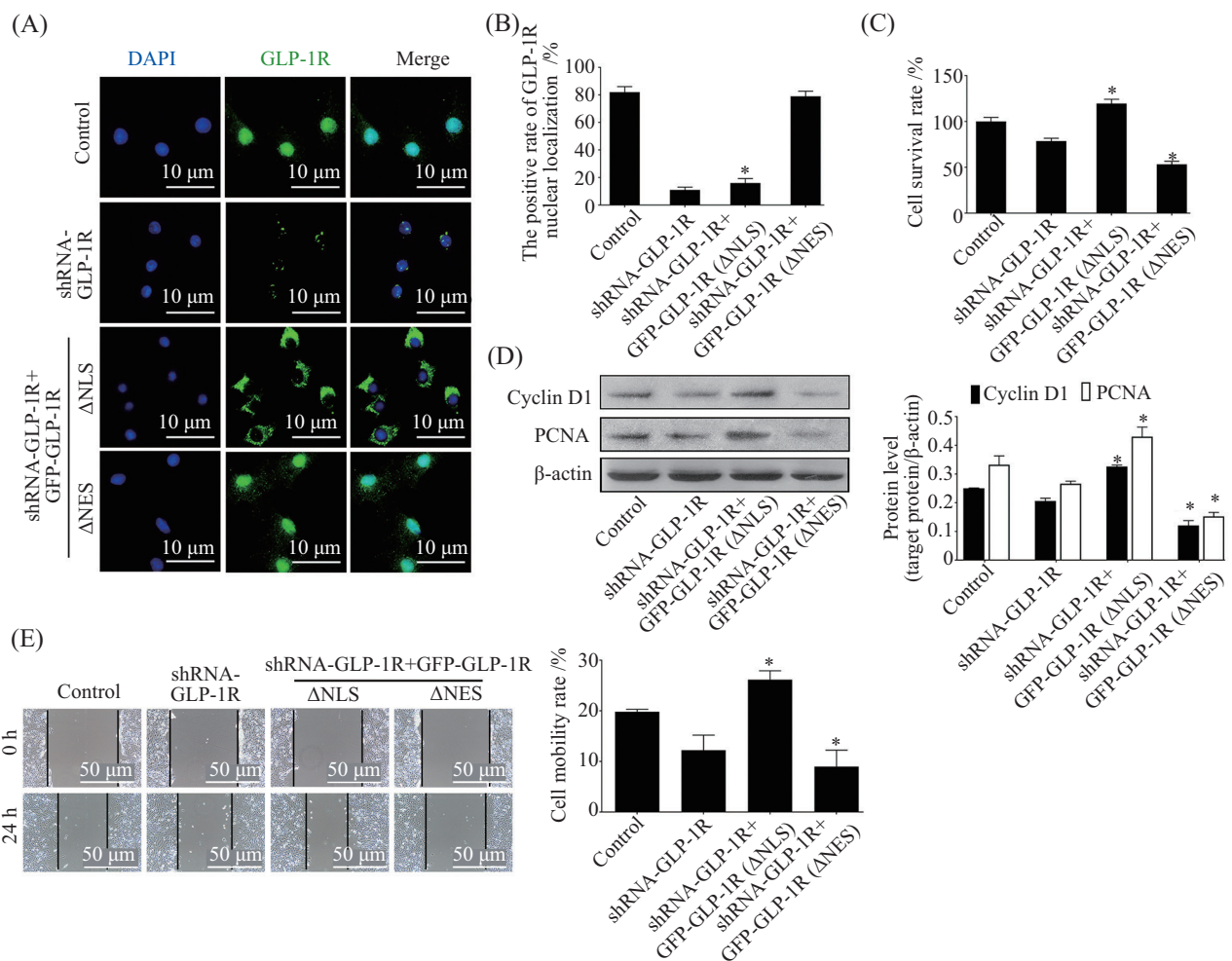
为探究GLP-1R不同亚细胞定位对RASCs细胞生物学功能的影响,本研究检测了各突变体对

RASMCs细胞增殖和迁移的影响。我们前期研究已证实, *GLP-1R*序列中含有介导GLP-1R细胞核定位的核定位信号(nuclear localization signal, NLS)序列^[13]和介导GLP-1R核输出的核输出信号(nuclear export signal, NES)序列^[14]。基于此,本研究首先对内源性*GLP-1R*进行敲除,随后分别在细胞中过表达胞质定位突变体GFP-GLP-1R(Δ NLS)与核定位突变体GFP-GLP-1R(Δ NES)(图1A和图1B)。进一步研究GLP-1R亚细胞定位差异对RASMCs增殖与迁移的影响。结果显示:过表达胞质定位的GFP-GLP-1R(Δ NLS)可增强RASMCs生长活力、上调cyclin D1、PCNA表达并促进RASMCs细胞迁移(图1C~

图1E);而过表达核输出信号缺失突变体GFP-GLP-1R(Δ NES)则呈现相反效应。综上,GLP-1R的胞质定位有利于诱导RASMCs的异常增殖与迁移。

2.2 C14orf166对RASMCs细胞增殖和迁移的影响

为进一步探究C14orf166对RASMCs生物学功能的影响,采用过表达与干扰技术分别调控C14orf166的表达水平,结果显示:过表达*C14orf166*可显著促进RASMCs的增殖与迁移,表现为细胞活力提高(图2A)、cyclin D1和PCNA表达上调(图2B)以及细胞迁移能力增强(图2C);而敲低*C14orf166*则显著抑制这些效应。综上,C14orf166表达上调对RASMCs的增殖和迁移具有促进作用。

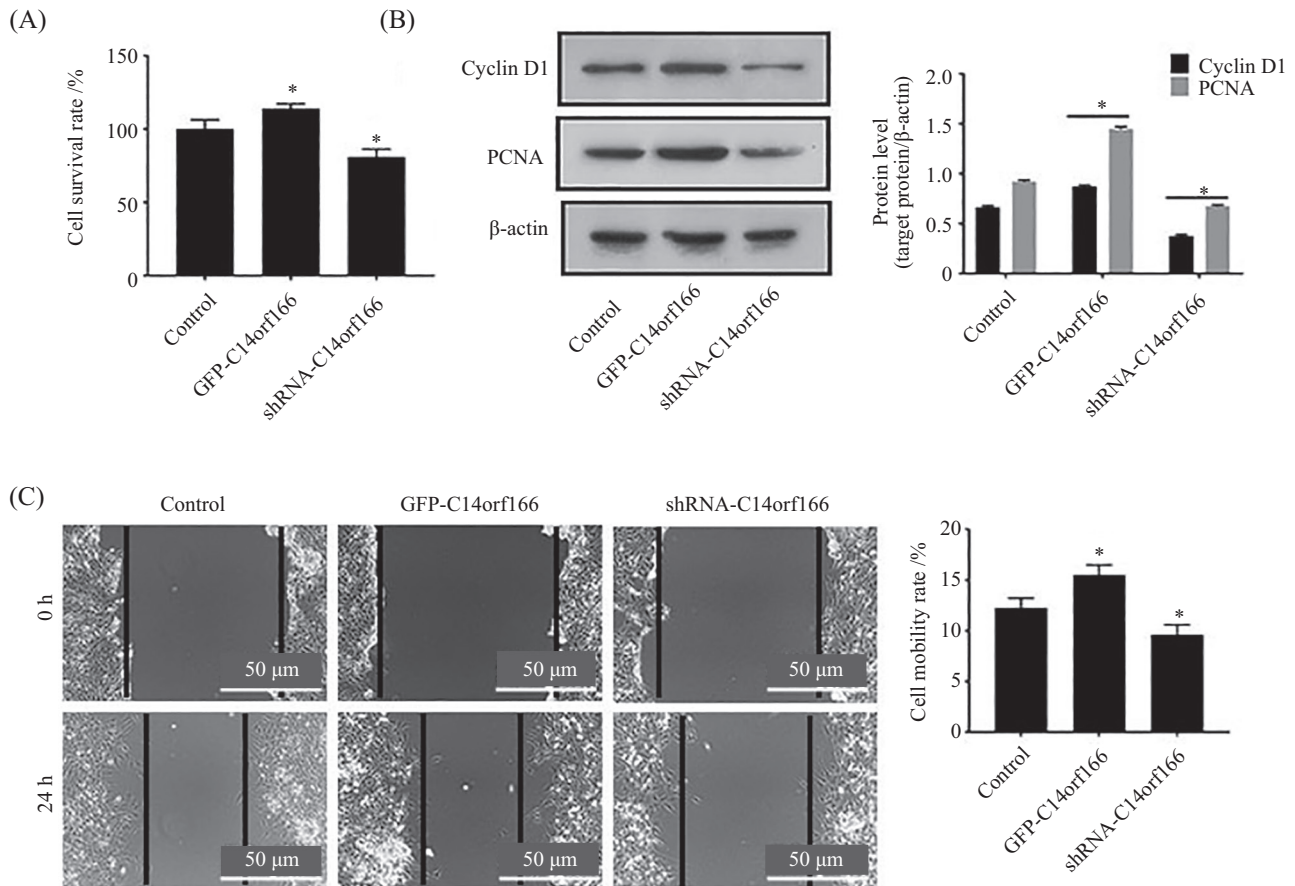


A: 免疫荧光法观察GLP-1R亚细胞定位; B: 统计至少100个细胞中GLP-1R核定位的阳性率; C: MTT法评估细胞活力; D: Western blot检测cyclin D1与PCNA的蛋白表达水平; E: 划痕实验分析细胞迁移能力。结果均以均值 $\pm$ 标准差表示。* P <0.05, 与对照组相比。

A: subcellular localization of GLP-1R was observed via immunofluorescence; B: the positive rate of GLP-1R nuclear localization was quantified in no less than 100 cells; C: cell viability was assessed using the MTT assay; D: the protein expression levels of cyclin D1 and PCNA were detected by Western blot; E: cell migration ability was analyzed by wound healing assay. All data are presented as $\bar{x} \pm s$. * P <0.05 compared with control group.

图1 GLP-1R在胞质中的定位对RASMCs的增殖和迁移具有促进作用

Fig.1 Cytoplasmic localization of GLP-1R promotes the proliferation and migration of RASMCs



A: MTT检测细胞活力; B: Western blot检测cyclin D1和PCNA的蛋白表达情况; C: 划痕实验检测细胞迁移能力。结果均以均值±标准差表示。
* $P < 0.05$, 与对照组相比。

A: cell viability was measured by MTT assay; B: protein expression of cyclin D1 and PCNA was detected via Western blot; C: cell migration ability was examined using wound healing assay. All data are shown as $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ compared with control group.

图2 C14orf166对RASMCs细胞增殖和迁移的影响

Fig.2 Effects of C14orf166 on proliferation and migration of RASMCs

2.3 C14orf166对AngII诱导的RASMCs细胞增殖和迁移的影响

前期研究提示,细胞核内GLP-1R与C14orf166存在相互作用^[17],本研究进一步探究C14orf166是否参与AngII诱导的RASMCs增殖与迁移过程。结果显示:敲低C14orf166表达可显著抑制AngII对RASMCs细胞活力(图3A)、周期蛋白cyclin D1和PCNA表达(图3B)以及细胞迁移(图3C)的促进作用;反之,过表达C14orf166则显著增强AngII的上述促进作用。上述结果表明,C14orf166是AngII诱导RASMCs增殖与迁移的关键调控因子。

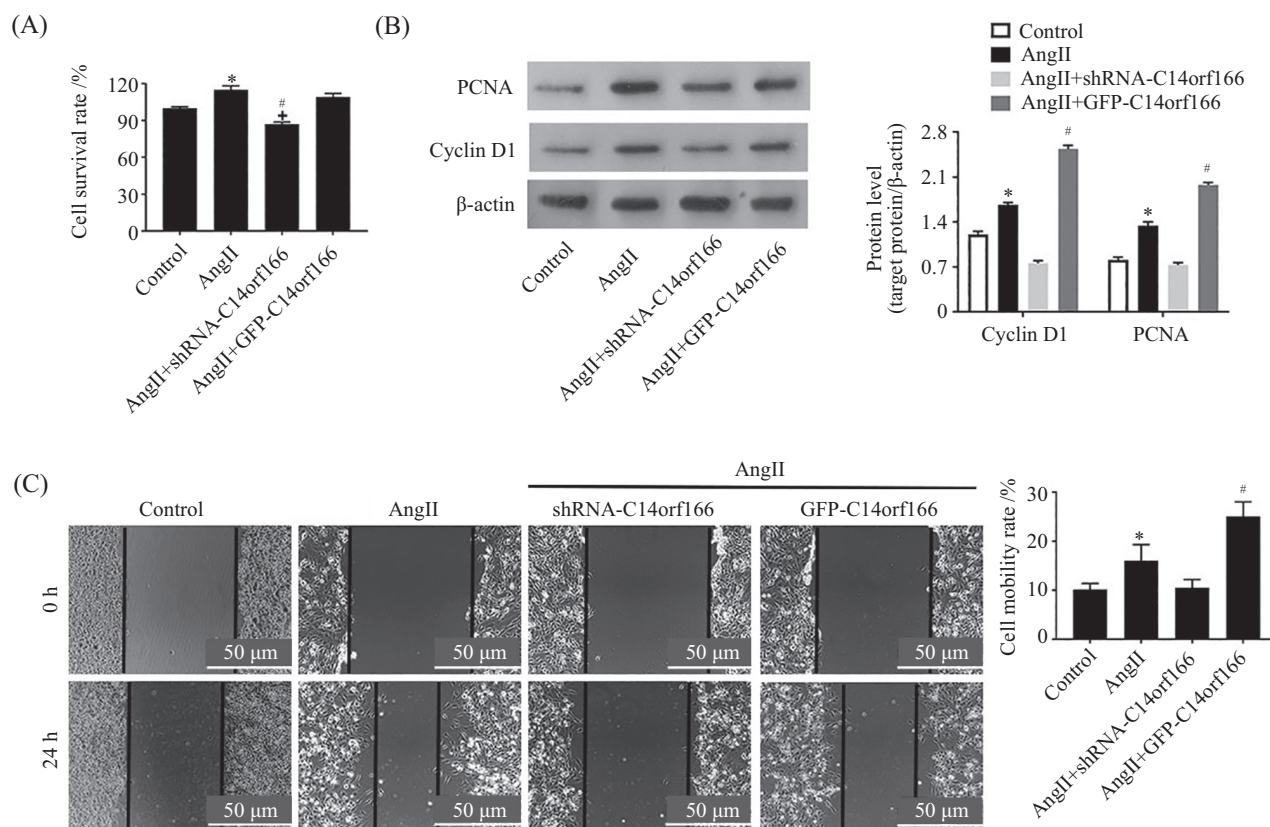
2.4 AngII通过诱导GLP-1R核输出促使C14orf166与GLP-1R复合物发生解离

为进一步揭示C14orf166在AngII诱导RASMCs增殖与迁移中的调控角色,本研究基于上述结论,检测了AngII干预前后细胞中C14orf166的蛋白及mRNA

表达水平变化。结果显示,AngII处理并未显著改变C14orf166的蛋白与mRNA表达水平(图4A和图4B),提示在AngII诱导的RASMCs增殖和迁移过程中,C14orf166并非通过调控自身表达量发挥生物学功能。

据此,本研究进一步观察了AngII干预下C14orf166与GLP-1R的亚细胞共定位及蛋白相互作用特征。免疫荧光结果显示,在静息状态下,C14orf166与GLP-1R主要共定位于细胞核内(图4C和图4D),并存在稳定结合(图4E);经AngII刺激后,二者的核内共定位消失,蛋白相互作用也消失(图4C~图4E)。该结果提示C14orf166依赖GLP-1R核输出这一关键调控环节,参与AngII介导的RASMCs异常增殖和迁移。

为进一步验证上述结论,我们检测了阻断GLP-1R核输出后GLP-1R与C14orf166之间的互作。本课题组前期研究证实,AngII可通过PI3K/PDK1/Akt/PKC θ 信号通路,介导Ser416位点磷酸化,进而促进GLP-1R核



A: MTT检测细胞活力; B: Western blot检测cyclin D1和PCNA的蛋白表达情况; C: 划痕实验检测细胞迁移能力。结果均以均值 $\pm$ 标准差表示。
* $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与AngII组相比。

A: cell viability was determined by MTT assay; B: protein expression of cyclin D1 and PCNA was detected using Western blot; C: cell migration ability was evaluated via wound healing assay. All data are presented as $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with AngII group.

图3 C14orf166在AngII诱导的RASMCs细胞增殖和迁移中的影响

Fig.3 Roles of C14orf166 in AngII-induced proliferation and migration of RASMCs

输出。基于此,本研究分别采用PKC θ 抑制剂、Ser416位点模拟磷酸化突变和去磷酸化突变调控GLP-1R的亚细胞定位,进而研究GLP-1R核输出过程对GLP-1R与C14orf166互作的调控作用。实验结果显示,特异性抑制GLP-1R核输出,并不会改变GLP-1R与C14orf166的互作(图4C~图4E)。同时,Co-IP结果表明C14orf166能够与GLP-1R S416A(去磷酸化突变体)特异性结合,而无法与GLP-1R S416D(磷酸化突变体)结合(图4F)。

综上,在静息状态下,GLP-1R定位于细胞核内并与C14orf166结合,进而抑制C14orf166转录活性;AngII刺激诱导GLP-1R Ser位点磷酸化并使其向细胞质和细胞膜转移,促使GLP-1R与C14orf166解离,解除GLP-1R对C14orf166转录功能的抑制,最终激活下游效应,促进RASMCs细胞异常增殖和迁移。

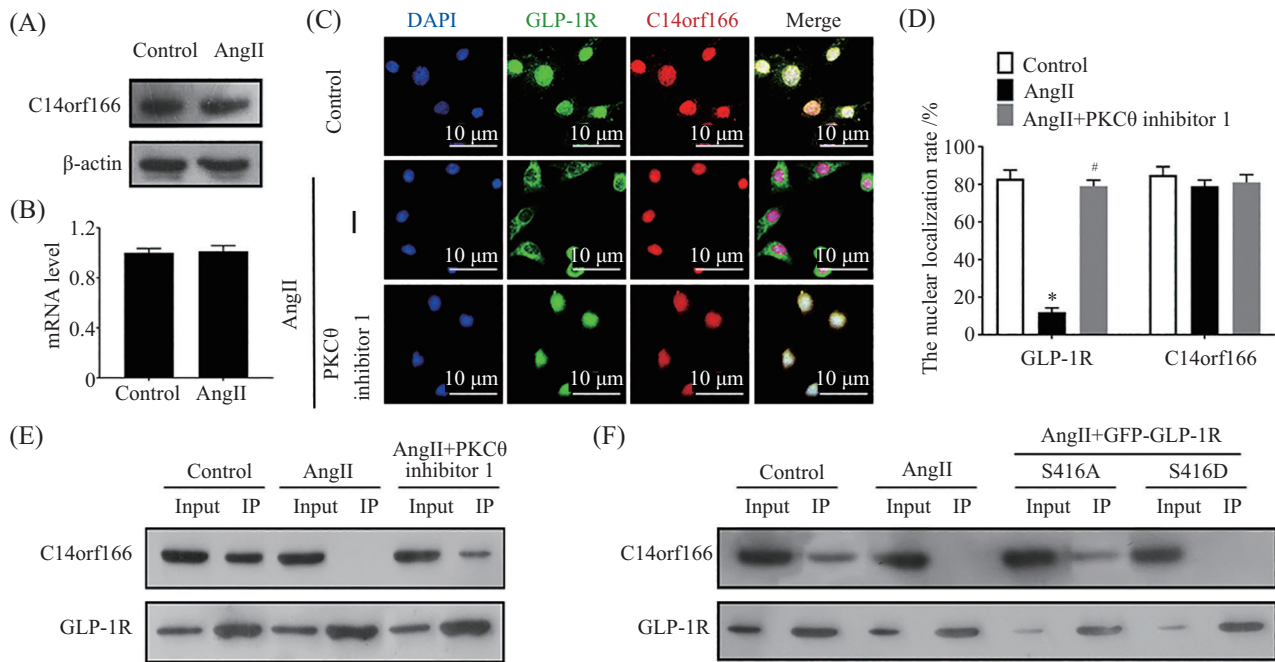
2.5 GLP-1R核输出通过增强C14orf166转录活性进而诱导RASMCs细胞异常增殖和迁移

接下来,本研究进一步探究C14orf166与GLP-

1R的相互作用对RASMCs细胞增殖和迁移的调控效应。结果显示,细胞核内GLP-1R与C14orf166结合时,可显著逆转AngII介导的生物学效应:RASMCs细胞活力显著下降(图5A),周期相关蛋白cyclin D1及PCNA的表达被明显抑制(图5B),同时细胞迁移能力呈现显著减弱趋势(图5C)。反之,GLP-1R发生核输出、C14orf166与GLP-1R的相互作用消失,AngII诱导的RASMCs促增殖与促迁移作用得以恢复。

2.6 C14orf166通过抑制GSK3 β 活性促进RASMCs细胞异常增殖和迁移

在利用AngII构建的体外主动脉夹层模型中,circUBE4B通过上调GSK3 β 活性抑制AngII诱导的VSMCs细胞增殖和迁移^[18],提示抑制GSK3 β 活性可能是血管重构病理的重要环节。C14orf166可通过抑制GSK3 β 磷酸化,进而调控下游信号通路,加快肿瘤恶性转化进程^[16]。基于上述研究背景,我们检测



A: Western blot检测C14orf166蛋白表达情况; B: qRT-PCR检测C14orf166的mRNA水平; C: 免疫荧光检测GLP-1R与C14orf166的亚细胞定位; D: 对C图中的细胞核定位阳性细胞进行计数统计, 每组至少分析100个细胞; E: Co-IP检测C14orf166与GLP-1R的互作情况; F: Co-IP检测不同处理条件下C14orf166与GLP-1R的互作情况。结果均以均值±标准差表示。* $P<0.05$, 与对照组相比; # $P<0.05$, 与AngII组相比。

A: the protein expression of C14orf166 was detected by Western blot; B: the mRNA level of C14orf166 was measured by qRT-PCR; C: subcellular localization of GLP-1R and C14orf166 was observed by immunofluorescence; D: the number of cells positive for nuclear localization in figure C was counted, with at least 100 cells analyzed per group; E: Co-IP was used to examine the interaction between C14orf166 and GLP-1R; F: the interaction between C14orf166 and GLP-1R under different treatments was detected via Co-IP. All data are presented as $\bar{x} \pm s$. * $P<0.05$ compared with control group; # $P<0.05$ compared with AngII group.

图4 AngII通过诱导GLP-1R核输出导致GLP-1R与C14orf166复合物发生解离

Fig.4 AngII induces GLP-1R nuclear export and thereby dissociates the GLP-1R/C14orf166 complex

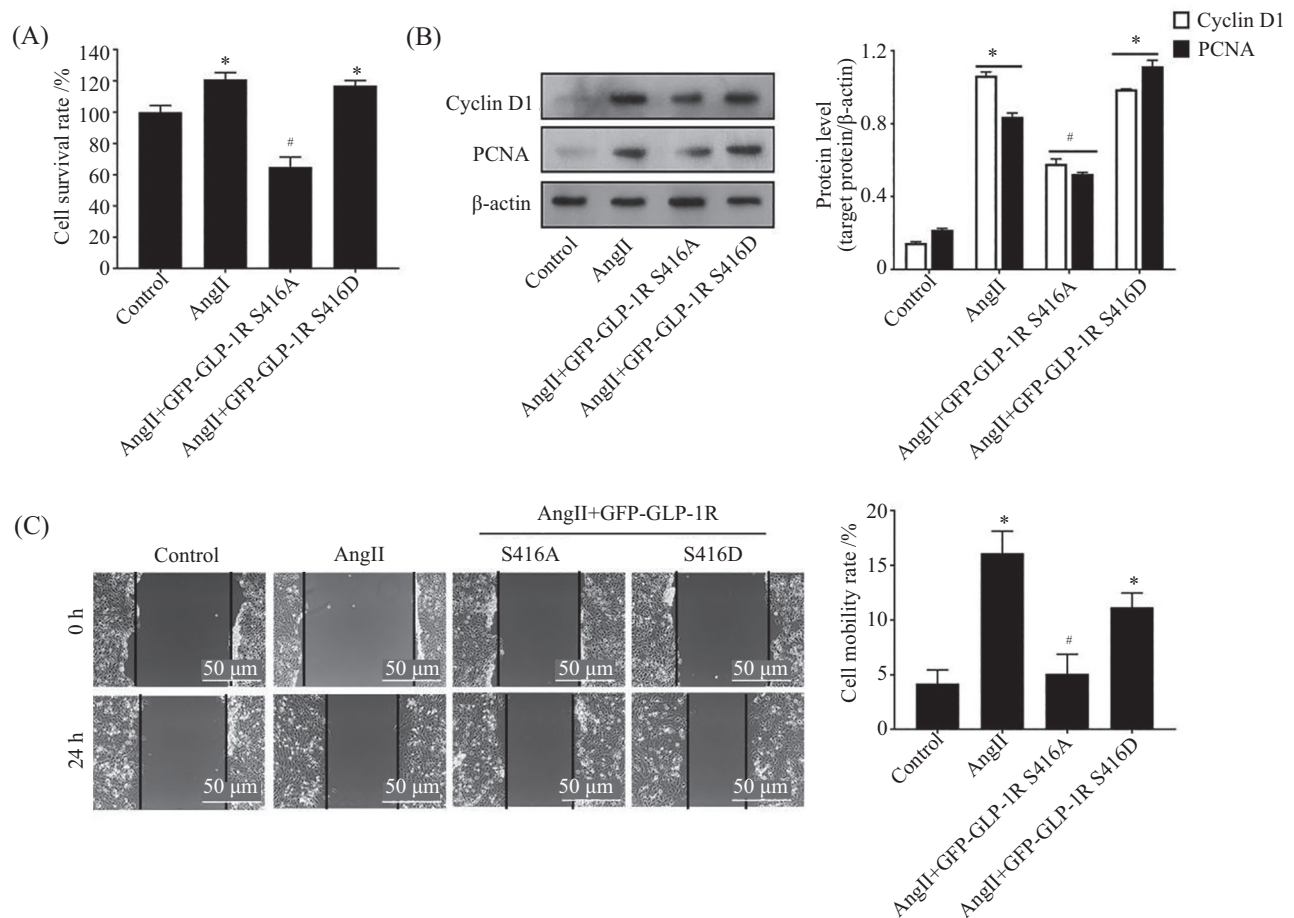
了AngII对GSK3β的影响, 实验结果表明, 与对照组相比, AngII能够显著降低GSK3β的磷酸化水平(图6A和图6B)。该结果提示, C14orf166可能通过调控GSK3β参与AngII诱导的RASCs增殖与迁移过程。

3 讨论

GPCRs可通过精密的时空调控机制, 介导信号分子呈区域化分布^[12], 亦可自身定位于质膜特定微区及各类细胞器中^[19], 通过与支架蛋白及下游信号分子特异性结合, 介导多样化的信号转导效应。

作为GPCRs家族成员之一的GLP-1R, 不仅可通过经典的G蛋白αs亚基(G protein alpha S subunit, Gαs)/cAMP通路发挥功能, 更重要的是, 它能够通过与多种蛋白组装成时空特异性的信号复合物, 从而实现对信号分子的精确区室化调控。小窝蛋白-1可将GLP-1R锚定于细胞膜脂筏/小窝微区, 不仅可调控受体的膜定位与内吞效率, 还可特异性介导ERK1/2信号通路的激活^[20-21]; β-arrestin 1/2展

现出双重调控功能: 其一方面参与受体脱敏与内吞过程, 另一方面可作为独立信号支架, 在胰岛β细胞中以非G蛋白依赖的方式调控ERK/CREB信号通路^[22-23]; 此外, 受体活性修饰蛋白3(receptor activity-modifying protein 3, RAMP3)能够与GLP-1R形成异源二聚体, 使受体信号偏好由cAMP转向Ca²⁺通路^[24]; 值得注意的是, GLP-1R的信号活动并未止步于质膜。GLP-1R内化至Ras相关蛋白5(Ras-related protein 5, Rab5)早期内体后, Gαs蛋白仍持续结合受体, 产生持续的cAMP信号^[25], 这种内体区室的持续信号可能对β细胞的长期存活和基因转录具有独特贡献。本课题组前期研究发现GLP-1R在RASCs细胞核中定位的特征^[13], 在血管重构致病因子AngII的刺激下GLP-1R会发生核输出^[14], 但GLP-1R这一非经典定位的生物学意义未被阐明。本研究在此基础上证实, GLP-1R的亚细胞定位直接决定其对RASCs增殖迁移的调控方向: 胞质定位GLP-1R显著促进细胞增殖与迁移, 而核滞留



A: 采用MTT法检测RASMCs细胞活力; B: 通过Western blot检测cyclin D1、PCNA蛋白表达水平; C: 利用划痕实验评估细胞迁移能力。结果均以均值±标准差表示。* $P<0.05$, 与对照组相比; # $P<0.05$, 与AngII组相比。

A: cell viability of RASMCs was detected by MTT assay; B: the protein expression levels of cyclin D1 and PCNA were determined by Western blot; C: cell migration ability was evaluated using wound healing assay. All data are presented as $\bar{x} \pm s$. * $P<0.05$ compared with control group; # $P<0.05$ compared with AngII group.

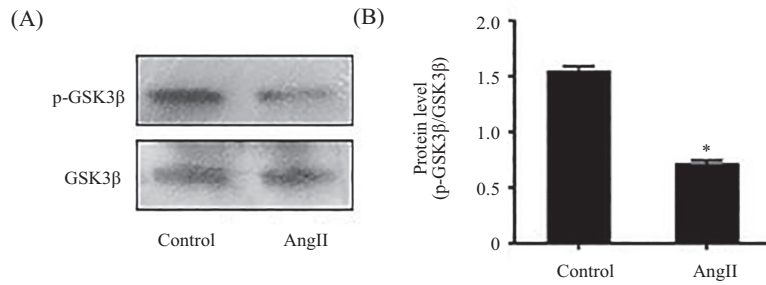
图5 GLP-1R核输出通过增强C14orf166转录活性进而诱导RASMCs细胞异常增殖和迁移

Fig.5 GLP-1R nuclear export induces abnormal proliferation and migration of RASMCs by potentiating C14orf166 transcriptional activity

GLP-1R则发挥抑制细胞增殖与迁移的作用,提示核输出是GLP-1R从“稳态调控”转向“病理促重构”的关键分子开关。

C14orf166是一种多功能蛋白,通过参与RNA代谢的多个关键环节包括RNA聚合酶II介导的转录调控、mRNA核质运输以及tRNA剪接修饰,在细胞生物学功能调控中发挥核心作用^[16]。C14orf166的核质分布的动态变化与其功能状态密切相关:在C14orf166转录活跃时聚集于细胞核,C14orf166低水平时则积累于细胞质,它通过与DDX1、HSPC117等蛋白形成复合物,以转录依赖的方式调控RNA核质运输,这种依赖转录活性调控的亚细胞定位机制为其参与RNA代谢的不同环节提供了空间层面的精准调控^[26]。本研究结果显示,无论是在正常生理状

态还是病理状态下,C14orf166均稳定定位于细胞核内,这一特征与既往报道的核质穿梭规律存在明显差异,提示其在RASMCs细胞中可能具备独特的调控方式。值得关注的是,在生理状态下GLP-1R可与C14orf166发生直接相互作用,进而抑制C14orf166的转录活性;而在病理刺激下,GLP-1R与C14orf166发生解离,使C14orf166转录抑制效应被解除,C14orf166的转录活性得以充分释放。该结果提示,GLP-1R不仅是经典的膜表面信号受体,还可在细胞核内作为负向调控因子,通过蛋白-蛋白相互作用参与转录调控。该机制与C14orf166活性受精细调控的基本特征高度吻合:在生理条件下,GLP-1R的结合可将C14orf166维持于低活性的静息状态;病理信号诱导二者解离后,C14orf166的转录功能被激活,



A: 采用Western blot检测GSK3β蛋白表达水平; B: 对A图的蛋白表达的定量统计图。结果均以均值±标准差表示。* $P<0.05$, 与对照组相比。

A: the protein level of GSK3β was detected by Western blot; B: quantitative analysis of protein expression in panel A. All data are presented as $\bar{x} \pm s$.

* $P<0.05$ compared with control group.

图6 C14orf166通过抑制GSK3β活性促进RSMCs细胞增殖和迁移

Fig.6 C14orf166 promotes the proliferation and migration of RSMCs by inhibiting GSK3β activity

进而启动下游信号转导。这种动态相互作用模式, 为阐释GPCR核内非经典信号功能提供了新视角。

此外, C14orf166在细胞周期进程中扮演重要角色, 它通过提高视网膜母细胞瘤蛋白 (retinoblastoma protein, Rb) 等G₁期关键蛋白促进G₁/S期转换, 从而调节细胞增殖^[27-28]。这一发现与其在多种肿瘤中的异常高表达及不良预后密切相关。已有研究在肝细胞癌^[29]、膀胱癌^[27]、宫颈癌^[30]等恶性肿瘤中证实C14orf166可作为独立的预后生物标志物, 其促癌机制涉及下调Rb、上调白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)表达以及调控GSK3β介导的信号通路^[16]。GSK3β是心肌缺血/再灌注损伤的关键保护性信号节点^[31-32], C14orf166可通过与nuclein蛋白结合, 竞争性抑制GSK3β的活性, 进而促进细胞增殖^[33]。体内实验证明, 活化GSK3β能够抑制VSMCs细胞增殖、诱导细胞凋亡, 减轻血管球囊损伤后的内膜增生, 阻碍血管病理性重构, GSK3β是维持血管稳态的关键负向调控蛋白^[34]。罗格列酮可通过激活GSK3β抑制NF-κB转录活性, 从而下调MMP9表达抑制VSMCs细胞增殖和迁移, 进而抑制内膜增生^[35]。周期性机械牵张通过降低GSK3β活性, 减弱Notch信号, 进而抑制VSMCs细胞增殖^[36]。在肺动脉高压模型中, GSK3β呈现双向调控作用。野生型GSK3β可激活ERK通路, 促进肺动脉平滑肌细胞增殖; 激活的GSK3β则通过抑制ERK磷酸化, 有效抑制细胞异常增殖^[37]。GSK3β作为Akt下游关键分子, 活化后可通过调控离子通道与钙稳态, 有效抑制VSMCs细胞异常增殖, 进而减轻血管损伤引发的重构^[38]。基于上述研究, 我们推测GSK3β可能参与AngII诱导的RSMCs增殖与

迁移过程。为验证这一假设, 我们检测了AngII处理后RSMCs中GSK3β的活性变化情况。实验结果进一步显示, AngII可显著抑制GSK3β活性。这一发现提示, AngII可能通过抑制GSK3β活性, 解除其对细胞周期进程的负向调控, 从而促进平滑肌细胞的增殖与迁移。本研究结果揭示了C14orf166-GSK3β信号轴调控细胞增殖和迁移的新机制。在AngII刺激的病理状态下, GLP-1R发生核输出, 释放C14orf166转录活性, 进而抑制GSK3β活性, 最终促进RSMCs细胞增殖和迁移。

综上, 本研究聚焦GLP-1R核输出对RSMCs细胞异常增殖迁移的调控效应, 明确级联分子机制: GLP-1R发生核输出后解除对C14orf166活性的抑制, 进而抑制GSK3β活性, 最终促进RSMCs细胞增殖与迁移。本研究阐明了一条全新的分子调控通路, 为解析GPCRs非经典核信号介导血管重构的分子机制开辟了新视角, 同时鉴定出了GLP-1R核输出的关键调控蛋白以及C14orf166这两类潜在干预靶点, 也为高血压、动脉粥样硬化等以血管重构为特征的心血管疾病的靶向防治提供了新思路, 具有重要的理论价值与广泛的转化前景。

作者贡献

范韶华负责设计论文框架、进行实验操作、收集数据、撰写文章; 石亚伟负责设计论文框架、拟定写作思路、指导文章撰写。

参考文献 (References)

- [1] 刘明波, 何新叶, 杨晓红, 等. 《中国心血管健康与疾病报告2024》要点解读[J]. 实用医学杂志, 2025, 41(14): 2111-2131.
Liu M B, He X Y, Yang X H, et al. Interpretation of annual report

- on cardiovascular health and diseases in China 2024 [J]. The Journal of Practical Medicine, 2025, 41(14): 2111-2131.
- [2] Harvey A, Montezano A C, Lopes R A, et al. Vascular fibrosis in aging and hypertension: molecular mechanisms and clinical implications [J]. Canadian Journal of Cardiology, 2016, 32(5): 659-668.
- [3] Schnull S, Wang Z H, Gao L P, et al. Angiotensins and their receptors in cardiac and vascular injury [J]. Current Hypertension Reviews, 2016, 12(3): 170-180.
- [4] Forrester S J, Booz G W, Sigmund C D, et al. Angiotensin II signal transduction: an update on mechanisms of physiology and pathophysiology [J]. Physiological Reviews, 2018, 98(3): 1627-1738.
- [5] Li S J, Huang N Q, Wang M, et al. GLP-1R in diabetes mellitus: from basic discovery to therapeutics development [J]. Frontiers Pharmacology, 2025, 16: 1610512.
- [6] Mansoor M. The cardiovascular physiology of glucagon-like peptide-1 receptor agonists: from macro-level outcomes to micro-level mechanisms [J]. Physiologia, 2025, 5(3): 34.
- [7] Park B, Bakbak E, Teoh H, et al. GLP-1 receptor agonists and atherosclerosis protection: the vascular endothelium takes center stage [J]. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2024, 326(5): H1159-H1176.
- [8] Donnelly D. The structure and function of the glucagon-like peptide-1 receptor and its ligands [J]. British Journal of Pharmacology, 2012, 166(1): 27-41.
- [9] Fletcher M M, Halls M L, Zhao P S, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor internalisation controls spatiotemporal signalling mediated by biased agonists [J]. Biochemical Pharmacology, 2018, 156: 406-419.
- [10] Moo E V, Møller T C, Sørensen F A, et al. Arrestin-independent internalization of the GLP-1 receptor is facilitated by a GRK, clathrin, and caveolae-dependent mechanism [J]. The FEBS Journal, 2025, 292(7): 1675-1695.
- [11] Shao Q, Xiong J, Wu J, et al. Research progress on oral glucagon-like peptide-1 receptor agonists in the treatment of diabetes mellitus type 2 [J]. Frontiers in Molecular Biosciences, 2026, 12: 1729904.
- [12] Yang L K, Wang W, Guo D Y, et al. Non-canonical signaling initiated by hormone-responsive G protein-coupled receptors from subcellular compartments [J]. Pharmacology and Therapeutics, 2025, 266: 108788.
- [13] Zhang X, Fan S H, Zhang L H, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor undergoes importin- α -dependent nuclear localization in rat aortic smooth muscle cells [J]. FEBS Letters, 2020, 594(10): 1506-1516.
- [14] 范韶华, 石亚伟. AngII通过NES/CRM1介导的GLP-1R核输出促进血管平滑肌细胞增殖和迁移[J]. 生命的化学, 2026, 46(8): 1-13.
Fan S H, Shi Y W. Angiotensin II promotes the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells via NES/CRM1-mediated nuclear export of GLP-1R [J]. Chemistry of Life, 2026, 46(8): 1-13.
- [15] Rodriguez A, Perez-Gonzalez A, Nieto A. Cellular human CLE/C14orf166 protein interacts with influenza virus polymerase and is required for viral replication [J]. Journal of Virology, 2011, 85(22): 12062-12066.
- [16] Chen Q X, Li R. Role of C14orf166 in viral infection and RNA metabolism and its relationship with cancer (Review) [J]. Molecular Medicine Reports, 2021, 23(6): 1-5.
- [17] Huang X, Dai F F, Gaisano G, et al. The identification of novel proteins that interact with the GLP-1 receptor and restrain its activity [J]. Molecular Endocrinology, 2013, 27(9): 1550-1563.
- [18] Wang R, He Y L, Ma W X, et al. CircUBE4B attenuates AngII-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration through upregulating GSK3B by sponging miR-199a-5p [J]. International Immunopharmacology, 2026, 168: 115925.
- [19] Pham U, Chundi A, Rajagopal S. Mechanisms of location bias in G protein-coupled receptors [J]. Handbook of Experimental Pharmacology, 2026, 290: 87-119.
- [20] Syme C A, Zhang L, Bisello A. Caveolin-1 regulates cellular trafficking and function of the glucagon-like peptide 1 receptor [J]. Molecular Endocrinology, 2006, 20(12): 3400-3411.
- [21] Puddu A, Maggi D. Emerging role of caveolin-1 in GLP-1 action [J]. Frontiers in Endocrinology, 2021, 12: 668012.
- [22] Liu L, Rashid M, Wess J. Regulation of GLP-1 and glucagon receptor function by β -arrestins in metabolically important cell types [J]. Biochemistry, 2025, 64(5): 978-986.
- [23] Zaïmia N, Obeid J, Varrault A, et al. GLP-1 and GIP receptors signal through distinct β -arrestin 2-dependent pathways to regulate pancreatic β cell function [J]. Cell Reports, 2023, 42(11): 113326.
- [24] Pearce A, Kumari P, Sisk C M, et al. Receptor activity-modifying protein 3 enhances GLP-1-mediated insulin secretion [J]. Journal of Biological Chemistry, 2025, 301(10): 110604.
- [25] Girada S B, Kuna R S, Bele S, et al. Gas regulates glucagon-like peptide 1 receptor-mediated cyclic AMP generation at Rab5 endosomal compartment [J]. Molecular Metabolism, 2017, 6(10): 1173-1185.
- [26] Pérez-González A, Pazo A, Navajas R, et al. hCLE/C14orf166 associates with DDX1-HSPC117-FAM98B in a novel transcription-dependent shuttling RNA-transporting complex [J]. PLoS One, 2014, 9(3): e90957.
- [27] Chen M K, Ye Y L, Zou B J, et al. C14orf166 is a high-risk biomarker for bladder cancer and promotes bladder cancer cell proliferation [J]. Journal of Translational Medicine, 2016, 14: 55.
- [28] Cheang T Y, Zhou H Y, Chen W, et al. C14orf166 overexpression correlates with tumor progression and poor prognosis of breast cancer [J]. Journal of Translational Medicine, 2016, 14(3): 333-341.
- [29] Chen J X, Chen J D, Gong Y H, et al. C14orf166 is a biomarker for predicting hepatocellular carcinoma recurrence [J]. Journal of Investigative Surgery, 2020, 33(10): 914-923.
- [30] Zhang W J, Ou J P, Lei F Y, et al. C14ORF166 overexpression is associated with pelvic lymph node metastasis and poor prognosis in uterine cervical cancer [J]. Tumor Biology, 2017, 37(1): 369-379.
- [31] Ajzashokouhi A H, Rezaee R, Omidkhoda N, et al. Natural compounds regulate the PI3K/Akt/GSK3 β pathway in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Cell Cycle, 2023, 22(7): 741-757.
- [32] Zhai P Y, Sciarretta S, Galeotti J, et al. Differential roles of GSK-3 β during myocardial ischemia and ischemia/reperfusion [J]. Circulation Research, 2011, 109(1): 502-511.

- [33] Howng S L, Hsu H C, Cheng T S, et al. A novel ninein-interaction protein, CGI-99, blocks ninein phosphorylation by GSK3 β and is highly expressed in brain tumors [J]. *FEBS Letters*, 2004, 566(1/2/3): 162-168.
- [34] Park K W, Yang H M, Youn S W, et al. Constitutively active glycogen synthase kinase-3 β gene transfer sustains apoptosis, inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells, and reduces neointima formation after balloon injury in rats [J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2003, 23(8): 1364-1369.
- [35] Lee C S, Kwon Y W, Yang H M, et al. New mechanism of rosiglitazone to reduce neointimal hyperplasia: activation of glycogen synthase kinase-3 β followed by inhibition of MMP-9 [J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2009, 29(4): 472-479.
- [36] Guha S, Cullen J P, Morrow D, et al. Glycogen synthase kinase 3 beta positively regulates Notch signaling in vascular smooth muscle cells: role in cell proliferation and survival [J]. *Basic Research in Cardiology*, 2011, 106(5): 773-785.
- [37] Sklepkiwicz P, Schermuly R T, Tian X, et al. Glycogen synthase kinase 3beta contributes to proliferation of arterial smooth muscle cells in pulmonary hypertension [J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e18883.
- [38] Bonnet S, Paulin R, Sutendra G, et al. Dehydroepiandrosterone reverses systemic vascular remodeling through the inhibition of the Akt/GSK-3 β /NFAT axis [J]. *Circulation*, 2009, 120(13): 1231-1240.