

血管疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001867

Kindlin-2 RNA 干扰经 Wnt 信号通路抑制血管平滑肌细胞增殖

吴校林, 朱 锐, 周 青, 胡 河, 朱通建, 刘文卫

(襄阳市中心医院、湖北文理学院附属医院心血管内科, 襄阳 441000)

【摘要】目的:观察 Kindlin-2 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)对大鼠血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)增殖的影响并探讨相关的作用机制。**方法:**构建并制备 Kindlin-2 siRNA 慢病毒载体并感染大鼠 VSMC, CCK-8 和 BrdU 技术检测重组 Wnt3a 蛋白诱导的 VSMC 增殖情况, 实时定量 PCR 测定 VSMC 中 Kindlin-2、c-Myc 和 cyclin D1 mRNA 的表达水平, 免疫共沉淀了解 Kindlin-2 和 β -catenin 的关系, Western blot 检测 VSMC 中 Kindlin-2、 β -catenin、磷酸化 β -catenin(Ser675)、GSK-3 β 和磷酸化 GSK-3 β (Ser9)蛋白的表达。**结果:**Kindlin-2 siRNA 慢病毒载体能有效感染大鼠 VSMC。CCK-8 和 BrdU 结果表明 Kindlin-2 RNAi 能够显著抑制 Wnt3a 诱导的 VSMC 增殖(1.12 ± 0.14 vs. 2.25 ± 0.15 , $P=0.000$; 0.162 ± 0.017 vs. 0.288 ± 0.019 , $P=0.000$)。与阴性对照组相比, Kindlin-2 RNAi 组和 Kindlin-2 RNAi+Wnt3a 组中 Kindlin-2、c-Myc 和 cyclin D1 mRNA 表达水平平均明显下降(0.964 ± 0.014 vs. 0.530 ± 0.029 , $P=0.000$; 0.980 ± 0.025 vs. 0.572 ± 0.022 , $P=0.000$; 0.979 ± 0.009 vs. 0.590 ± 0.035 , $P=0.002$ 和 0.964 ± 0.014 vs. 0.569 ± 0.027 , $P=0.000$; 0.980 ± 0.025 vs. 0.741 ± 0.026 , $P=0.001$; 0.979 ± 0.009 vs. 0.769 ± 0.017 , $P=0.023$)。免疫共沉淀证实 VSMC 中 Kindlin-2 可以与 β -catenin 结合, 而且 Kindlin-2 RNAi+Wnt3a 组中 Kindlin-2、磷酸化 β -catenin(Ser675)和磷酸化 GSK-3 β (Ser9)蛋白的表达水平较阴性对照+Wnt3a 组明显降低(0.468 ± 0.029 vs. 0.725 ± 0.033 , $P=0.001$; 1.058 ± 0.109 vs. 1.478 ± 0.045 , $P=0.001$; 0.624 ± 0.048 vs. 0.809 ± 0.067 , $P=0.020$)。但各组中总 β -catenin 和总 GSK-3 β 蛋白水平没有明显变化($F=0.638$, $P=0.647$; $F=0.781$, $P=0.563$)。**结论:**Kindlin-2 RNAi 可以通过 Wnt 信号通路发挥作用并抑制 VSMC 增殖。

【关键词】Kindlin-2; RNA 干扰; 血管平滑肌细胞; Wnt 信号通路**【中图分类号】**R541.4**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-05-21

Kindlin-2 RNA interference inhibits vascular smooth muscle cell proliferation via the Wnt signaling pathway

Wu Xiaolin, Zhu Rui, Zhou Qing, Hu He, Zhu Tongjian, Liu Wenwei

(Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Hubei University of Arts and Science, Xiangyang Central Hospital)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of Kindlin-2 RNA interference(RNAi) on rat vascular smooth muscle cell(VSMC) proliferation and related mechanism of action. **Methods:** Kindlin-2 small interfering RNA(siRNA) lentiviral vectors were constructed and then used to infect rat VSMCs. CCK-8 assay and the BrdU technique were used to assess the proliferation of VSMCs induced by recombinant Wnt3a protein; quantitative real-time PCR was used to measure the mRNA expression of Kindlin-2, c-myc, and cyclinD1 in VSMCs; co-immunoprecipitation was used to evaluate the association between Kindlin-2 and β -catenin; Western blot was used to measure the protein expression of Kindlin-2, β -catenin, phosphor- β -catenin(Ser675), glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), and phosphor-GSK-3 β (Ser9) in VSMCs. **Results:** Kindlin-2 siRNA lentiviral vectors effectively infected rat VSMCs. The CCK-8 and BrdU results indicated that Kindlin-2 RNAi significantly inhibited the proliferation of VSMCs induced by Wnt3a (1.12 ± 0.14 vs. 2.25 ± 0.15 , $P=0.000$; 0.162 ± 0.017 vs. 0.288 ± 0.019 , $P=0.000$). Compared with the negative control group, the Kindlin-2 RNAi group had significantly lower mRNA expression of Kindlin-2, c-Myc, and cyclin D1 (Kindlin-2: 0.530 ± 0.029

作者介绍: 吴校林, Email: wxling.23@163.com,

研究方向: 冠心病机制与临床研究。

通信作者: 朱 锐, Email: zhuruiwz@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(编号: 81600288);

湖北省自然科学基金青年科学基金资助项目(编号: 2016CFB344)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20181019.1643.006.html>

(2018-10-22)

vs. 0.964 ± 0.014 , $P=0.000$; c-Myc: 0.572 ± 0.022 vs. 0.980 ± 0.025 , $P=0.000$; cyclin D1: 0.590 ± 0.035 vs. 0.979 ± 0.009 , $P=0.002$), and the Kindlin-2 RNAi+Wnt3a group also had significantly lower expression than the negative control group (Kindlin-2: 0.569 ± 0.027 vs. 0.964 ± 0.014 , $P=0.000$; c-Myc: 0.741 ± 0.026 vs. 0.980 ± 0.025 , $P=0.001$; cyclin D1: 0.769 ± 0.017 vs. 0.979 ± 0.009 , $P=0.023$). Co-immunoprecipitation confirmed that Kindlin-2 could bind to β -catenin in VSMCs, and the Kindlin-2 RNAi+Wnt3a group had significantly lower protein expression of Kindlin-2, phosphor- β -catenin (Ser675), and phosphor-GSK-3 β (Ser9) than the negative control+Wnt3a group (Kindlin-2: 0.468 ± 0.029 vs. 0.725 ± 0.033 , $P=0.001$; phosphor- β -catenin: 1.058 ± 0.109 vs. 1.478 ± 0.045 , $P=0.001$; phosphor-GSK-3 β : 0.624 ± 0.048 vs. 0.809 ± 0.067 , $P=0.020$). There were no significant changes in the total levels of β -catenin and GSK-3 β protein in each group (β -catenin: $F=0.638$, $P=0.647$; GSK-3 β : $F=0.781$, $P=0.563$). **Conclusion:** Kindlin-2 RNAi can inhibit VSMC proliferation via the Wnt signaling pathway.

[Key words] Kindlin-2; RNA interference; vascular smooth muscle cell; Wnt signaling pathway

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 增殖、迁移及大量细胞外基质沉积等引起的内膜增生是动脉粥样硬化和经皮冠状动脉介入治疗术后血管再狭窄等疾病重要的病理改变^[1-2]。Kindlin-2 是近期发现的一个黏着斑蛋白, 在心肌细胞和平滑肌细胞中均有表达, 它可以通过 FERM 结构域与整合素 β 亚基胞内段相互作用, 在细胞增殖、迁移、细胞-细胞外基质黏附、细胞骨架重构及整合素介导的双向信号转导中都具有重要作用^[3-4]。最近研究发现, Kindlin-2 能与 β -catenin 和转录因子 4 形成转录复合体并增强 Wnt/ β -catenin 信号传导, Wnt/ β -catenin 信号是 VSMC 增殖的重要调节因子, Kindlin-2 可以结合激活的 β -catenin 并阻止 Wnt 信号通路负向调节蛋白 GSK3 β 与 β -catenin 结合^[5]。这些研究表明, Kindlin-2 和 Wnt 在调节细胞行为和生理过程中具有重叠功能。目前 Kindlin-2 在 VSMC 的作用还未见报道。本研究根据大鼠 Kindlin-2 基因序列构建 Kindlin-2 siRNA 慢病毒载体, 探讨 RNAi 沉默 Kindlin-2 基因对大鼠 VSMC 增殖的影响及与 Wnt/ β -catenin 信号通路相互作用机制。

1 资料与方法

1.1 材料与试剂

Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠购自武汉大学动物实验中心, 体质量 100~150 g, 许可证号 SCXK (鄂) 2008-0004。Wnt3a 重组蛋白购自美国 R&D 公司, 小鼠抗 α -actin 和兔抗 Kindlin-2 抗体购自美国 Sigma 公司, 兔抗 β -catenin 和兔抗磷酸化 β -catenin (Ser675) 抗体购自美国 Cell Signaling 公司, 兔抗 GSK-3 β 和兔抗磷酸化 GSK-3 β (Ser9) 抗体购自美国 Santa Cruz 公司, 二抗均购自武汉博士德生物工程有限公司。

DMEM 培养液、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自美国 HyClone 公司。Trizol 购自美国 Invitrogen 公司。实时定量 PCR 试剂盒购自 Fermentas 中国公司。

1.2 方法

1.2.1 Kindlin-2 慢病毒载体的构建与制备 根据大鼠 Kindlin-2 基因序列 (NM_001011915) 和 RNAi 原理, 构建 3 条 siRNA 序列及 1 条阴性对照序列 (上海吉凯基因化学技术有限公司), 选取最有效的一条 Kindlin-2 siRNA 靶向序列即为 5'-CAAACAGATAACAGCACGG-3', 阴性对照序列为 5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'。制备含有绿色荧光蛋白基因标记的短发夹 RNA (Short hairpin RNA, shRNA) 并插入到慢病毒载体 GV118 基因组中, 共转染至 293T 细胞培养后收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液, 通过逐孔稀释滴度测定法, 测定慢病毒滴度接近 1×10^9 TU/mL。

1.2.2 VSMC 原代培养和感染 采用组织块贴壁法原代培养大鼠 VSMC, 无菌条件下分离 SD 大鼠胸主动脉, 去除内膜和外膜后取中层平滑肌切成 1 mm^2 左右的组织块, 置于含 20% FBS 的 DMEM 培养基中, 于 37°C 、5% CO_2 细胞培养箱中静置培养, 3 d 后更换培养基。待单层细胞覆盖培养皿约 80% 时传代, 0.25% 胰蛋白酶消化细胞后用含 10% FBS、2 mmol/L 谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的 DMEM 培养基行传代培养。实验中采用融合度 90% 左右的第 3~6 代 VSMC。细胞鉴定采用肌动蛋白 (α -actin) 免疫荧光染色。将 1×10^5 个/mL 浓度的 VSMC 1 mL/孔接种于 6 孔板内, 常规培养使 VSMC 融合率达到 50% 左右, 然后无血清 DMEM 培养基同步化 24 h。再用 Kindlin-2 siRNA 慢病毒载体和阴性对照慢病毒载体与无血清、无抗生素的 DMEM 培养基混合, 感染 VSMC 12 h 左右, 感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 100。弃上清后, 用含 10% FBS 的 DMEM 培养基继续培养用于后续实验。2 d 后于荧光显微镜下检测荧光表达并计算慢病毒的感染效率。

1.2.3 CCK-8 检测细胞增殖 VSMC 以 5×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔培养板, 分为 5 组, 分别为空白对照组、阴性对

照组、Kindlin-2 RNAi 组、阴性对照+Wnt3a 组和 Kindlin-2 RNAi+Wnt3a 组,常规培养 1 d,使细胞融合率达 40%~50%,接着各组细胞以无血清 DMEM 培养基同步化 24 h,之后感染慢病毒 12 h,随后加入 200 mL 10%FBS 培养基(不含抗生素),Wnt3a 组中加入 Wnt3a 刺激增殖,Wnt3a 终浓度为 100 ng/mL,继续培养 3 d。最后每孔加入 20 μ L CCK-8 孵育 3 h,酶标仪 450 nm 波长检测各孔光密度(optical density, OD)值。

1.2.4 BrdU 检测细胞增殖 VSMC 以 5×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔培养板常规培养 1 d,接着以无血清 DMEM 培养基同步化 24 h,感染慢病毒 12 h 后置于 200 μ L 含 10%FBS 的培养基中继续培养 2 d。然后加入 BrdU Reagent(20 μ L/孔),孵育 24 h 后吸出培养基,加入固定液室温下孵育 30 min, Wash Buffer 洗涤 3 次后再加入 BrdU 检测抗体孵育 1 h,洗涤后再加入羊抗小鼠 IgG 孵育 30 min,再次洗涤后加入 Substrate 避光孵育 30 min,最后每孔加入 100 μ L 终止液,15 min 内用酶标仪在 450 nm 波长测定各孔的 OD 值。

1.2.5 实时定量 PCR Trizol 试剂抽提处理好的 VSMC 总 RNA,分光光度计测定 RNA 浓度,取总 RNA 4.5 μ g,在 20 μ L 逆转录体系中合成 cDNA,以 4 μ L cDNA 为模板加入 Kindlin-2、c-Myc 和 cyclin D1 上下游引物和荧光物质在 20 μ L 反应体系中进行 PCR 扩增,50 $^{\circ}$ C 2 min,95 $^{\circ}$ C 10 min,之后 95 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s 共 40 个循环,利用 ABI Prism 7900 序列检测系统得到每个样品的 C_t 值,使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 比较量化方法分析实时定量 PCR 所得结果。引物序列分别为 Kindlin-2 上游 5'-AGATCTGGCTTCGCTGTGAT-3',下游 5'-CGGGATTGATG-TCACTTGTG-3';c-Myc 上游 5'-CGAGCTGAAGCGTAGC-TTTT-3',下游 5'-CTCGCCGTTTCCTCAGTAAG-3';cyclin D1 上游 5'-GCGTACCCTGACACCAATCT-3',下游 5'-GGCTCC-AGAGACAAGAAACG-3';内参(β -actin)上游 5'-CAGCAT-GGAGGGGCCGACTCATC-3',下游 5'-TAAAGACCTCTA-TGCCAACACAGT-3'。

1.2.6 免疫共沉淀 将正常的 VSMC 悬浮在细胞裂解缓冲液中,冰上裂解 30 min,4 $^{\circ}$ C 12 000 g 离心 30 min,保留上清备用。取 200 μ L 蛋白样品,加入 1 μ g 和免疫沉淀时使用的 IgG 种属相同的普通 IgG 和 20 μ L 充分重悬的 Protein A+G Agarose,4 $^{\circ}$ C 缓慢摇动 1 h 以去除非特异性结合。之后 1000 g 离心 5 min,取上清加入 1 μ g 兔抗 β -catenin 抗体,4 $^{\circ}$ C 缓慢摇动过夜。再加入 40 μ L 充分重悬的 Protein A+G Agarose,4 $^{\circ}$ C 缓慢摇动 1 h,1 000 g 离心 5 min,小心吸除上清,用 PBS 洗涤沉淀 5 次,去除上清沸水浴处理 5 min,取部分样品进行 Kindlin-2 Western blot 分析。

1.2.7 Western blot 分析 收集处理好的 VSMC 加入含 PMSF 的 RIPA 裂解液,冰上放置 30 min,4 $^{\circ}$ C 下 12 000 g 离心 40 min,取上清,并用 Bradford 比色法对上清进行蛋白定量。取 20 μ g 蛋白样品,SDS-PAGE 电泳,100 V 转移约 1 h,溴酚

蓝到达分离胶的底端处附近即可停止电泳。再将蛋白电泳转移至 PVDF 膜上,放入封闭液中 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h;加入抗 Kindlin-2(1:500)、 β -catenin(1:1 000)、磷酸化 β -catenin(Ser675, 1:1 000)、GSK-3 β (1:400)和磷酸化 GSK-3 β (Ser9, 1:400)抗体,4 $^{\circ}$ C 过夜,反复洗膜后,将膜与相应的二抗孵育,室温轻摇 1 h,洗膜后采用增强化学发光检测系统进行观察。

1.3 统计学处理

所有数据采用 SPSS 19.0 软件包进行统计学处理,计量数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间计量数据的比较采用单因素方差分析,其组间两两比较采用 LSD- t 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 慢病毒感染效率

Kindlin-2 siRNA 和阴性对照慢病毒载体感染 VSMC 2 d 后在荧光显微镜下观察均见绿色荧光表达(图 1),感染效率达 90%以上,提示慢病毒载体成功感染了 VSMC。

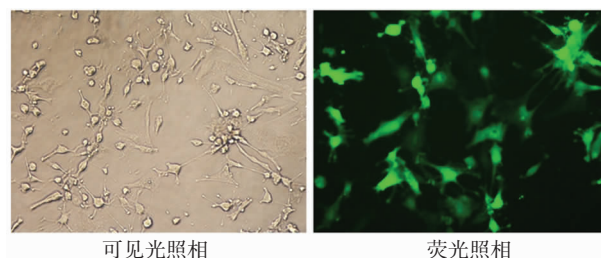
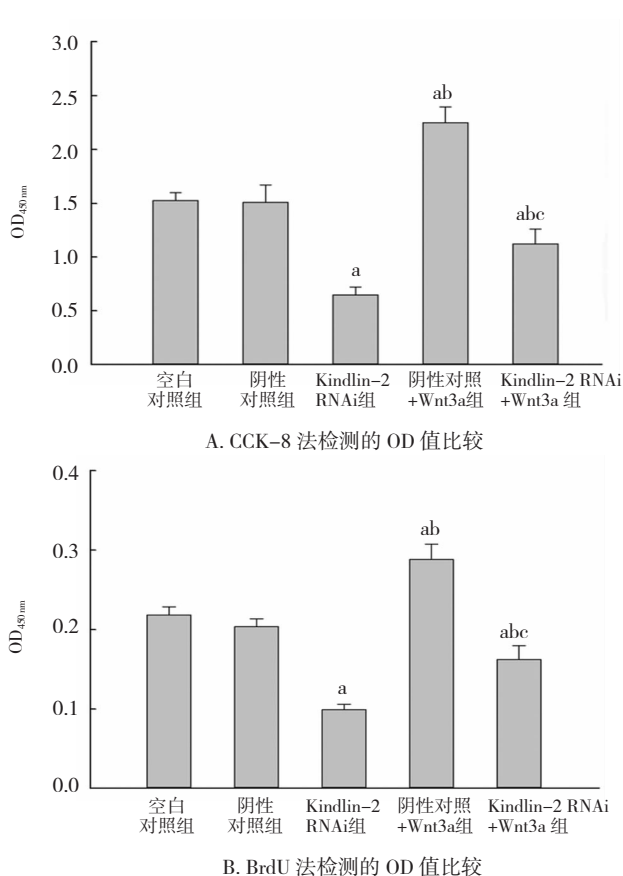


图 1 慢病毒感染 VSMC 效率检测(200 $\times$)

2.2 Kindlin-2 RNAi 抑制 VSMC 增殖

使用重组 Wnt3a 蛋白刺激大鼠 VSMC 增殖,然后通过 CCK-8 和 BrdU 2 种方法检测 VSMC 增殖情况。CCK-8 检测结果分析显示($F=28.087, P=0.000$,图 2A):空白对照组与阴性对照组之间的 OD 值差异无统计学意义($P=0.911$),Kindlin-2 RNAi 组吸光度值较空白对照组和阴性对照组明显降低(0.65 ± 0.07 vs. $1.52 \pm 0.07, P=0.000$; 0.65 ± 0.07 vs. $1.51 \pm 0.16, P=0.000$),Wnt3a 刺激后,阴性对照+Wnt3a 组 OD 值明显增加(1.52 ± 0.07 vs. $2.25 \pm 0.15, P=0.000$; 1.51 ± 0.16 vs. $2.25 \pm 0.15, P=0.000$)。但 Kindlin-2 RNAi+Wnt3a 组 OD 值较空白对照组、阴性对照组及阴性对照+Wnt3a 组都低(1.12 ± 0.14 vs. $1.52 \pm 0.07, P=0.012$; 1.12 ± 0.14 vs. $1.51 \pm 0.16, P=0.017$; 1.12 ± 0.14 vs. $2.25 \pm 0.15, P=0.000$)。BrdU 检测结果与 CCK-8 结果一致($F=26.378, P=0.000$,图 2B):Kindlin-2 RNAi 组 OD 值(0.099 ± 0.006)较空白对照组(0.218 ± 0.010)、阴性对照组(0.203 ± 0.011)、阴性对照+Wnt3a 组(0.288 ± 0.019)、Kindlin-2 RNAi+Wnt3a 组(0.162 ± 0.017)都明显降低($P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.002$),提示 Kindlin-2 RNAi 可显著抑制 Wnt3a 诱导的大鼠 VSMC 增殖。



注:a,与空白对照组和阴性对照组相比, $P<0.05$;b:与 Kindlin-2 RNAi 组相比, $P<0.05$;c:与 Kindlin-2 RNAi+Wnt3a 组相比, $P<0.05$

图 2 各组 OD 值比较

2.3 实时定量 PCR 结果

空白对照组与阴性对照组 Kindlin-2、c-Myc 和 cyclin D1 mRNA 水平没有统计学差异($P=0.338$, $P=0.740$, $P=0.800$)。与阴性对照组相比,Kindlin-2 RNAi 组和 Kindlin-2 RNAi+Wnt3a 组中 Kindlin-2 mRNA 表达水平明显下降(0.964 ± 0.014 vs. 0.530 ± 0.029 , $P=0.000$; 0.964 ± 0.014 vs. 0.569 ± 0.027 , $P=0.000$),提示 Kindlin-2 RNAi 是有效的。而且 c-Myc 和 cyclin D1 mRNA 表达水平也被 Kindlin-2 RNAi 显著抑制(0.980 ± 0.025 vs. 0.572 ± 0.022 , $P=0.000$; 0.979 ± 0.009 vs. 0.590 ± 0.035 , $P=0.001$)。Wnt3a 刺激后,c-Myc 和 cyclin D1

mRNA 表达水平明显上调(0.980 ± 0.025 vs. 1.980 ± 0.083 , $P=0.000$; 0.979 ± 0.009 vs. 2.322 ± 0.118 , $P=0.000$),但 Kindlin-2 RNAi+Wnt3a 组中 c-Myc 和 cyclin D1 mRNA 表达水平仍较阴性对照组低(0.741 ± 0.026 vs. 0.980 ± 0.025 , $P=0.002$; 0.769 ± 0.017 vs. 0.979 ± 0.009 , $P=0.023$),见表 1。

2.4 免疫共沉淀及 Western blot 结果分析

β -catenin 和 GSK-3 β 是 Wnt 信号通路下游最重要的蛋白分子,而 Kindlin-2 与 β -catenin 在肿瘤细胞中可以共表达^[5],通过免疫共沉淀也证实 VSMC 中 Kindlin-2 可以与 β -catenin 结合(图 3)。Western blot 分析进一步发现,与阴性对照组相比,Kindlin-2 RNAi 可以显著降低 VSMC 中 Kindlin-2、磷酸化 β -catenin (Ser675) 和磷酸化 GSK-3 β (Ser9) 蛋白的表达水平(0.648 ± 0.051 vs. 0.317 ± 0.035 , $P=0.000$; 1.122 ± 0.054 vs. 0.399 ± 0.006 , $P=0.000$; 0.621 ± 0.018 vs. 0.395 ± 0.044 , $P=0.007$);Wnt3a 处理后可以明显上调阴性对照+Wnt3a 组 VSMC 中磷酸化 β -catenin (Ser675) 和磷酸化 GSK-3 β (Ser9) 蛋白的表达水平(1.122 ± 0.054 vs. 1.478 ± 0.045 , $P=0.003$; 0.621 ± 0.018 vs. 0.809 ± 0.067 , $P=0.018$);但是加入 Kindlin-2 siRNA 慢病毒载体(Kindlin-2 RNAi+Wnt3a 组)后,Kindlin-2、磷酸化 β -catenin (Ser675) 和磷酸化 GSK-3 β (Ser9) 蛋白的表达却明显被抑制(0.725 ± 0.033 vs. 0.468 ± 0.029 , $P=0.001$; 1.478 ± 0.045 vs. 1.058 ± 0.109 , $P=0.001$; 0.809 ± 0.067 vs. 0.624 ± 0.048 , $P=0.020$)。但各组中总 β -catenin 和总 GSK-3 β 蛋白水平没有明显变化($F=0.638$, $P=0.647$; $F=0.781$, $P=0.563$, 图 4, 表 2)。

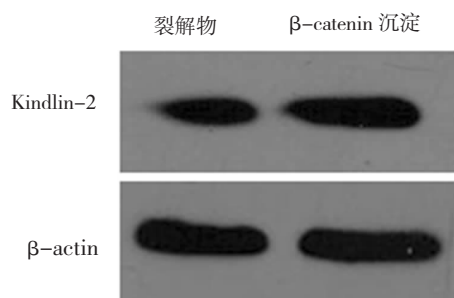


图 3 免疫共沉淀结果

表 1 各组 Kindlin-2, c-Myc 和 cyclin D1 mRNA 的表达水平比较

组别	Kindlin-2	c-Myc	cyclin D1
空白对照组	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
阴性对照组	0.964 ± 0.014	0.980 ± 0.025	0.979 ± 0.009
Kindlin-2 RNAi 组	0.530 ± 0.029 ^a	0.572 ± 0.022 ^a	0.590 ± 0.035 ^a
阴性对照 + Wnt3a 组	1.032 ± 0.038 ^b	1.980 ± 0.083 ^{ab}	2.322 ± 0.118 ^{ab}
Kindlin-2 RNAi+Wnt3a 组	0.569 ± 0.027 ^{ac}	0.741 ± 0.026 ^{abc}	0.769 ± 0.017 ^{abc}
F 值	94.278	172.172	150.845
P 值	0.000	0.000	0.000

注:a,与空白对照组和阴性对照组相比, $P<0.05$;b:与 Kindlin-2 RNAi 组相比, $P<0.05$;c:与 Kindlin-2 RNAi+Wnt3a 组相比, $P<0.05$

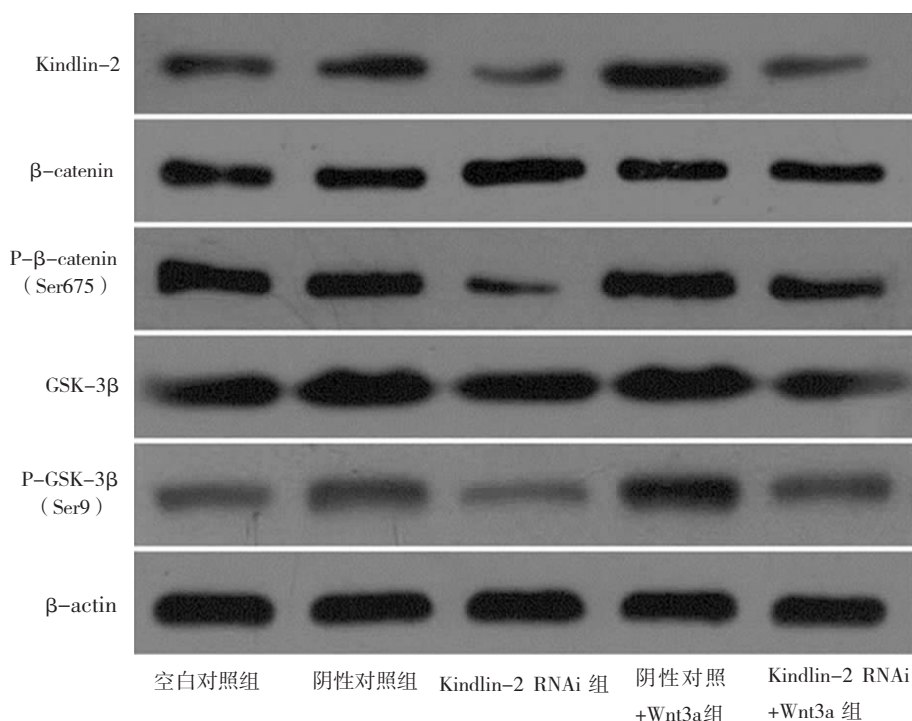


图 4 Western blot 结果

表 2 每组以 β -actin 内参进行标化的检测蛋白相对光密度值比较

组别	Kindlin-2	总 β -catenin	磷酸化 β -catenin(Ser675)	总 GSK-3 β	磷酸化 GSK-3 β (Ser9)
空白对照组	0.600 ± 0.053	0.634 ± 0.050	1.194 ± 0.057	1.040 ± 0.028	0.600 ± 0.046
阴性对照组	0.648 ± 0.051	0.644 ± 0.031	1.122 ± 0.054	1.143 ± 0.082	0.621 ± 0.018
Kindlin-2 RNAi 组	0.317 ± 0.035^a	0.719 ± 0.029	$0.399 \pm 0.006a$	0.991 ± 0.089	0.395 ± 0.044^a
阴性对照 + Wnt3a 组	0.725 ± 0.033^b	0.658 ± 0.037	1.478 ± 0.045^{ab}	1.083 ± 0.057	0.809 ± 0.067^{ab}
Kindlin-2 RNAi+Wnt3a 组	0.468 ± 0.029^{abc}	0.673 ± 0.043	1.058 ± 0.109^{bc}	1.028 ± 0.056	0.624 ± 0.048^{bc}
F 值	15.131	0.638	39.146	0.781	9.712
P 值	0.000	0.647	0.000	0.563	0.002

注:a,与空白对照组和阴性对照组相比, $P < 0.05$;b:与 Kindlin-2 RNAi 组相比, $P < 0.05$;c:与 Kindlin-2 RNAi+Wnt3a 组相比, $P < 0.05$

3 讨论

RNAi是指在进化过程中高度保守、由双链 RNA 诱发同源 mRNA 特异性降解的现象。RNAi 诱导的基因沉默具有高效性、特异性、低毒性等特点,故该技术已被广泛用于探索基因功能、疾病发病机制及恶性肿瘤的基因治疗等领域^[6-7]。本研究根据 RNAi 原理构建了 Kindlin-2 siRNA 慢病毒载体并感染 VSMC,结果发现 Kindlin-2 RNAi 可以抑制 VSMC 增殖,进一步研究发现 Kindlin-2 RNAi 可能通过 Wnt 信号通路发挥作用。

Kindlin-2 属于黏着斑蛋白,含有一个典型的 FERM 结构域(4.1,ezrin,radixin,moesin),主要通过

FERM 结构域与整合素 β 亚基胞内段相互作用发挥重要的生理作用,包括细胞增殖、迁移、分化、细胞-细胞外基质黏附、细胞骨架重构等^[3-4,8-10]。既往研究发现,Kindlin-2 基因敲除的小鼠和斑马鱼心脏发育严重异常并具有胚胎致死性,而且能明显降低胚胎干细胞黏附于层黏蛋白和纤维连接蛋白的能力,调节细胞外基质沉积^[10-11],但 Kindlin-2 在 VSMC 中的作用还鲜有研究。本研究采用 Kindlin-2 siRNA 慢病毒感染 VSMC,通过 CCK-8 和 BrdU 技术检测细胞增殖情况,结果显示 Kindlin-2 RNAi 显著抑制 VSMC 增殖,并能降低 c-Myc 和 cyclin D1 mRNA 表达水平。c-Myc 属于原癌基因,是细胞增殖的始动子,具有使 VSMC 进入细胞周期和维持细胞增殖的双重作用;cyclin D1 是调控细胞增殖周期的重要作

用蛋白,在 G_1 中期合成达到高峰,并与细胞周期蛋白依赖激酶结合使细胞进入增殖状态(S 期)^[12-13]。而且 c-Myc 和 cyclin D1 是 Wnt/ β -catenin 信号转导通路的下游靶基因^[12-14]。

最近研究发现 Kindlin-2 可以和 β -catenin、转录因子 4 形成转录复合体增强 Wnt/ β -catenin 信号转导,Kindlin-2 可以结合激活的 β -catenin 并阻止 Wnt 信号通路负向调节蛋白 GSK3 β 与 β -catenin 结合^[15]。本研究通过免疫共沉淀确定 VSMC 中 Kindlin-2 可以与 β -catenin 结合,而 β -catenin 是经典的 Wnt 信号通路必不可少的调节蛋白。Wnt3a 是 Wnt 家族研究较多的成员之一,可以激活经典的 Wnt 信号通路并诱导细胞增殖^[15]。Wnt/ β -catenin 信号通路激活后导致 β -catenin 在细胞内累积并进入细胞核与 T 细胞因子、淋巴细胞增强因子家族的转录因子形成复合物,激活下游靶基因的转录(如 c-Myc 和 cyclin D1)^[14,16]。激活的 Wnt/ β -catenin 信号可以被 GSK-3 β 抑制,GSK-3 β 使 β -catenin N 末端磷酸化导致 β -catenin 降解。但是当 β -catenin C 末端 Ser675 位点磷酸化时却可以激活 β -catenin 信号,使 β -catenin 更易进入细胞核增强转录活性^[14]。本研究使用重组 Wnt3a 蛋白激活 Wnt/ β -catenin 信号途径并了解 Kindlin-2 RNAi 在大鼠 VSMC 增殖中的作用,观察到 Wnt3a 刺激 VSMC 后使 β -catenin Ser657 位点和 GSK-3 β Ser9 位点(抑制 GSK-3 β 活性)磷酸化加强,Kindlin-2 RNA 干扰明显降低磷酸化 β -catenin (Ser657) 和磷酸化 GSK-3 β (Ser9) 蛋白的表达水平,但对总 β -catenin 和总 GSK-3 β 蛋白水平没有明显影响,表明 Kindlin-2 可以通过 Wnt/ β -catenin 信号通路发挥作用。

既往研究发现, β -catenin 蛋白的表达在增生的血管内膜中明显增加,提示 Wnt 信号通路在 VSMC 中起重要作用^[17-18]。目前 Wnt 信号通路已成为 VSMC 增殖和内膜增生新的调节因素^[18]。本研究得出 Kindlin-2 RNA 干扰可以经 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制 VSMC 增殖,为认识 Kindlin-2 的功能提供了进一步的证据,也为治疗动脉粥样硬化相关疾病提供了新的作用靶点和思路。

参 考 文 献

[1] Marx SO, Totary-Jain H, Marks AR. Vascular smooth muscle cell proliferation in restenosis[J]. Circ Cardiovasc Interv, 2011, 4(1): 104-

111.

- [2] Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis[J]. Acta Physiol (Oxf), 2015, 214(1): 33-50.
- [3] Moslem M, Eggenschwiler R, Wichmann C, et al. Kindlin-2 modulates the survival, differentiation, and migration of induced pluripotent cell-derived mesenchymal stromal cells[J]. Stem Cells Int, 2017, 2017: 7316354.
- [4] Xu Z, Gao J, Hong J, et al. Integrity of kindlin-2 FERM subdomains is required for supporting integrin activation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 434(2): 382-387.
- [5] Yu Y, Wu J, Wang Y, et al. Kindlin 2 forms a transcriptional complex with beta-catenin and TCF4 to enhance Wnt signaling[J]. EMBO Rep, 2012, 13(8): 750-758.
- [6] Qiu Y, Lam JK, Leung SW, et al. Delivery of RNAi therapeutics to the airways—from bench to bedside[J]. Molecules, 2016, 21(9): E1249.
- [7] Poller W, Tank J, Skurk C, et al. Cardiovascular RNA interference therapy: the broadening tool and target spectrum[J]. Circ Res, 2013, 113(5): 588-602.
- [8] Ali RH, Khan AA. Tracing the evolution of FERM domain of kindlins[J]. Mol Phylogenet Evol, 2014, 80: 193-204.
- [9] Bledzka K, Bialkowska K, Sossey-Alaoui K, et al. Kindlin-2 directly binds actin and regulates integrin outside-in signaling[J]. J Cell Biol, 2016, 213(1): 97-108.
- [10] Pluskota E, Dowling JJ, Gordon N, et al. The integrin coactivator Kindlin-2 plays a critical role in angiogenesis in mice and zebrafish[J]. Blood, 2011, 117(18): 4978-4987.
- [11] Qu H, Tu Y, Shi X, et al. Kindlin-2 regulates podocyte adhesion and fibronectin matrix deposition through interactions with phosphoinositides and integrins[J]. J Cell Sci, 2011, 124(Pt 6): 879-891.
- [12] Ma J, Ren Y, Zhang L, et al. Knocking-down of CREPT prohibits the progression of oral squamous cell carcinoma and suppresses cyclin D1 and c-Myc expression[J]. PLoS One, 2017, 12(4): e0174309.
- [13] Pestell RG. New roles of cyclin D1[J]. Am J Pathol, 2013, 183(1): 3-9.
- [14] Marchand A, Atassi F, Gaaya A, et al. The Wnt/beta-catenin pathway is activated during advanced arterial aging in humans[J]. Aging Cell, 2011, 10(2): 220-232.
- [15] Bao XL, Song H, Chen Z, et al. Wnt3a promotes epithelial-mesenchymal transition, migration, and proliferation of lens epithelial cells[J]. Mol Vis, 2012, 18: 1983-1990.
- [16] Johnson ML, Recker RR. Exploiting the WNT signaling pathway for clinical purposes[J]. Curr Osteoporos Rep, 2017, 15(3): 153-161.
- [17] Mill C, George SJ. Wnt signalling in smooth muscle cells and its role in cardiovascular disorders[J]. Cardiovasc Res, 2012, 95(2): 233-240.
- [18] Drenzo DM, Chaudhary MA, Shi X, et al. A crosstalk between TGF-beta/Smad3 and Wnt/beta-catenin pathways promotes vascular smooth muscle cell proliferation[J]. Cell Signal, 2016, 28(5): 498-505.

(责任编辑:张辉洁)