

RhoA和血清反应因子 (SRF) 介导 E1A 激活基因阻遏子诱导人血管平滑肌细胞分化*

韩雅玲^{1)**} 徐红梅¹⁾ 闫承慧¹⁾ 胡叶²⁾ 康建¹⁾ 刘海伟¹⁾

¹⁾沈阳军区总医院全军心血管病研究所心内科, 沈阳 110016, ²⁾大连市中心医院急诊科, 大连 116033

摘要 为探讨 E1A 激活基因阻遏子 (CREG) 对人血管平滑肌细胞 (VSMCs) 分化的调控机制, 应用重组逆转录病毒表达载体 pLNCX₂(+)/CREG 及 pLXSN(-)/CREG 制备稳定感染 HITASY 细胞模型, 观察 CREG 蛋白过表达及表达抑制对人 VSMCs 分化的影响并探讨其调控机制. 结果显示: pLNCX₂(+)/CREG 稳定感染细胞呈分化表型, 细胞细长变成组织样聚集生长趋势, 细胞中 CREG 蛋白和平滑肌分化标志蛋白平滑肌 α -肌动蛋白(SM α -actin)表达显著增加, 同时 SM α -actin 相关调控因子——血清反应因子(SRF)入核转位, RhoA 总蛋白表达上调, 以 Rho 激酶特异性抑制剂 Y-27632 作用后, CREG 诱导的 SM α -actin 表达下调的同时 SRF 出核转位; pLXSN(-)/CREG 稳定感染的细胞体积变大, 细胞极性消失, 呈无序生长, 细胞中 CREG 和 SM α -actin 蛋白表达显著降低, 同时伴有 SRF 出核转位及 RhoA 总蛋白表达下调. 免疫共沉淀分析发现, CREG 蛋白能被分泌到 VSMCs 培养基中表达, 并可与细胞膜受体 6-磷酸甘露糖/胰岛素样生长因子 II 型受体 (M6P/IGF2R) 发生直接相互作用. 用蛋白磷酸酶 PP2A 特异性抑制剂 okadaic acid 减少 M6P/IGF2R 在细胞膜表面分布, 可明显抑制 CREG 过表达引起的 RhoA、SRF 和 SM α -actin 表达. 上述结果提示, 在体外培养的人 VSMCs 中, CREG 可能作为一种分泌型蛋白质通过与细胞膜受体 M6P/IGF2R 相互作用, 依次激活 SM α -actin 蛋白相关调控因子 RhoA 和 SRF 引起 SM α -actin 表达增加, 促进 VSMCs 向分化表型转换.

关键词 阻遏蛋白, E1A, 表型, 细胞, 血管平滑肌, 人
学科分类号 Q555.7, R34

血管损伤后血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)由收缩表型向合成表型的转化, 是血管成形术和支架置入术后再狭窄及动脉粥样硬化发生发展的关键始动步骤, 也是 VSMCs 增生的病理基础. E1A 激活基因阻遏子 (cellular repressor of E1A-stimulated genes, CREG) 是 1998 年 Gill 等从 HeLa 细胞 cDNA 文库中克隆的一种新的转录调控相关因子. 先前本研究室应用差异显示 PCR 技术在体外培养的分化表型人 VSMCs 克隆株 HITASY 细胞中筛选到高表达差异性 CREG 基因^[1], 进一步系列研究发现, CREG 基因表达与 HITASY 细胞的分化状态密切相关, 即去血清培养诱导 HITASY 细胞由合成表型逆转为分化表型的过程中伴有 CREG mRNA 和蛋白质表达上调^[2]. CREG 可以与血清反应因子 (serum response factor, SRF) 协同作用于平滑肌 α -肌动蛋白(SM α -actin)启动子区的 CArG 元件, 启动 SM α -actin 的表达, 参与体外培养的大鼠原代 VSMCs 表型转换的调控^[3].

大鼠颈动脉拉伤实验证实, CREG 蛋白表达与血管损伤后再狭窄过程中平滑肌细胞增殖能力呈负相关^[4]. 但目前为止, CREG 调控人 VSMCs 分化的分子机制尚不明确. 本研究应用正、反义 CREG 逆转录病毒表达载体, [pLNCX₂(+)/CREG] 和 [pLXSN(-)/CREG], 分别感染 HITASY 细胞, 观察 CREG 蛋白过表达及表达抑制与人 VSMCs 分化的关系, 并初步探讨 CREG 基因调控人 VSMCs 分化的分子机制.

1 材料和方法

1.1 材料

人胸廓内动脉平滑肌细胞克隆株 HITASY 细胞, 正义 CREG 逆转录病毒载体 [pLNCX₂(+)/CREG]、反义 CREG 逆转录病毒载体 [pLXSN(-)

*国家自然科学基金资助项目(30570664, 30070280).

** 通讯联系人. Tel: 024-23922184, Fax: 024-23911006

E-mail: hanyal@mail.sy.ln.cn

收稿日期: 2005-12-06, 接受日期: 2006-02-09

/CREG]及带绿色荧光蛋白的空载体[pLNCX(+)/GFP]由本室自制保存;胎牛血清(FBS)购自杭州四季青公司;DMEM购自GIBCOBRL公司;抗CREG、SM α -actin、SRF、RhoA、胰岛素样生长因子II型受体(IGF2R)多克隆抗体购自Santa Cruz公司;4,6-联脒-2-苯基吡啶(4,6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)细胞核荧光染料、Okadaic Acid(OA)购自Sigma公司;辣根过氧化物酶及荧光标记的二抗购自北京中杉金桥生物公司;蛋白质印迹(Western blot)化学发光试剂(ECL, RPN2106)购自Amersham公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养, DNA 转染及阳性克隆筛选. HITASY 细胞培养在含 10% FBS 的 DMEM 培养基中. 细胞贴壁生长至 50% 融合时, 磷酸钙沉淀法转染正、反义逆转录病毒载体于 Phoenix 293 包装细胞, 48 h 后将收获的 pLNCX₂(+)/CREG、pLXSN(-)/CREG、pLNCX(+)/GFP 逆转录病毒上清及 10 mg/L Polybrene 感染 HITASY 细胞, 37°C, 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, 其后弃去转染试剂, 加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基继续培养 72 h 后, 加入 G418 (800 mg/L) 进行抗性筛选, 传代得到稳定表达的感染细胞. 去血清培养条件为 0.5% FBS 的 DMEM 培养基培养 72 h.

1.2.2 免疫荧光染色. 将 pLNCX₂(+)/CREG、pLXSN(-)/CREG 和 pLNCX(+)/GFP 稳定感染的 HITASY 细胞及正常 HITASY 细胞培养在盖玻片上, 至 70%~80% 融合, 用预冷的 PBS 洗 3 次, 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, 0.2% TritonX-100 通透 15 min, PBS 洗涤 3 次后, 5% 山羊血清封闭 30 min. 加入抗 CREG、SM α -actin、SRF、IGF2R 抗体(1:100), 4°C 孵育过夜. PBS 洗涤 3 次, 加入荧光标记二抗(1:100), 室温 2 h, PBS 洗涤细胞 3 次, DAPI 复染细胞核. 经 PBS 洗涤后甘油封片, 荧光显微镜(Olympus IX-70)下观察、摄像. 不加一抗做阴性对照片。

1.2.3 蛋白质印迹分析. 按文献[5]将全细胞提取物或细胞核蛋白、浆蛋白提取物行 SDS-PAGE、转膜、抗体结合及显色. 分离胶浓度为 12%. 一抗分别为抗 SRF、RhoA、SM α -actin 和抗 CREG 抗血清. 经辣根过氧化物酶标记的二抗孵育后, 按 ECL 试剂盒说明书曝光处理。

1.2.4 免疫共沉淀分析. 于全细胞提取物或无 FBS 的 DMEM 培养基中加入 protein A PLUS-Agarose

珠, 4°C 摇床旋转孵育 1 h, 离心后收集上清, 加入 3 μ g IGF2R 或 CREG 抗体, 4°C 摇床旋转孵育 1 h 后, 加入 protein A PLUS-Agarose 珠 20 μ l, 4°C 摇床旋转孵育过夜. 离心收集 Agarose 珠, 用细胞裂解液洗涤 3 次后, 加入上样缓冲液, 95°C 变性 5 min, 经 SDS-PAGE 后, 蛋白质印迹检测 CREG 蛋白或 IGF2R 蛋白的表达。

1.2.5 统计处理分析. 实验结果以($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS 12.0 统计软件, 组间比较用单因素方差分析. 每组实验结果重复测量 3 次以上。

2 结 果

2.1 CREG 蛋白在 VSMCs 中的表达和定位

蛋白质印迹分析显示, pLNCX₂(+)/CREG 稳定感染的 HITASY 细胞中, CREG 蛋白表达较未感染细胞显著增加, pLXSN(-)/CREG 感染则明显抑制 HITASY 细胞中 CREG 蛋白表达(图 1a). 免疫荧光染色显示, 正常 HITASY 细胞中 CREG 蛋白在胞浆中表达较弱, pLNCX₂(+)/CREG 稳定感染后, CREG 蛋白在核周大量表达, 而 pLXSN(-)/CREG 稳定感染的细胞中, CREG 蛋白在胞浆呈弥散样极弱表达(图 1b). pLNCX(+)/GFP 稳定感染细胞与正常 HITASY 细胞中 CREG 蛋白表达和定位无显著差异。

2.2 CREG 蛋白表达诱导体外培养人 VSMCs 分化

2.2.1 CREG 蛋白表达对 VSMCs 表型的调控. 将细胞培养于明胶包被的培养皿中, 于倒置相差显微镜下观察细胞形态. 正常 HITASY 细胞(对照组)在含 10% FBS 的 DMEM 培养基中生长良好, 呈长椭圆形, 生长至融合时出现典型的波峰波谷样形态; pLNCX₂(+)/CREG 稳定感染的细胞培养在含 10% FBS 的 DMEM 培养基中时细胞形态出现明显改变, 胞浆体积变小且更加细长, 细胞生长到一定密度后易于环绕排列呈管腔样结构并可重叠生长达多层; 而 pLXSN(-)/CREG 感染的细胞在含 10% FBS 的 DMEM 培养基中培养时体积明显变大, 形态多样, 核大小不一, 失去极性呈无序样生长, 同时死亡细胞明显增多, 细胞仅在含 20% FBS 的 DMEM 培养基中生长良好, 去血清培养后细胞不能和正常 HITASY 细胞一样呈现分化表型, 而出现不可逆转的死亡(图 2a)。

2.2.2 CREG 诱导 VSMCs 分化标志基因 SM α -actin 的表达增加. 蛋白质印迹分析和免疫荧光染色发现, 与正常培养的 HITASY 细胞相比, pLNCX₂(+)/CREG 稳定感染的 HITASY 细胞中 SM α -actin 表

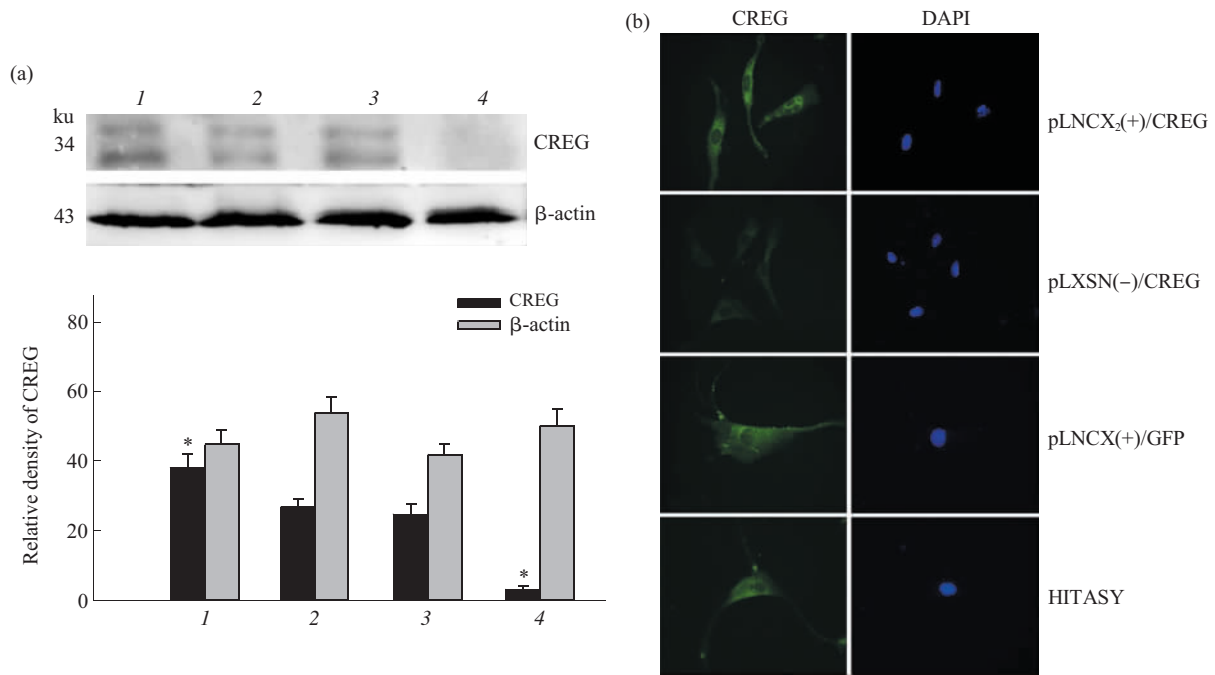


Fig. 1 Expression of CREG in HITASY cells was analyzed by Western blot and immunofluorescence

(a) Expression of CREG in HITASY cells were detected by Western blot. Blots were scanned with a biologic Doc2000 gel analysis system and band density was quantified with image analysis software. * $P < 0.05$ vs control HITASY cells. 1: pLNCX₂(+) / CREG; 2: pLNCX/GFP; 3: HITASY; 4: pLXSN(-)/CREG. (b) Expression of CREG in HITASY cells were detected by immunofluorescence microscopy. pLNCX₂(+)/CREG: HITASY cells infected with pLNCX₂(+)/CREG retroviral vectors; pLNCX(+)/GFP: HITASY cells infected with pLNCX(+)/GFP retroviral vectors; pLXSN(-) /CREG: HITASY cells infected with pLXSN(-)/CREG retroviral vectors.

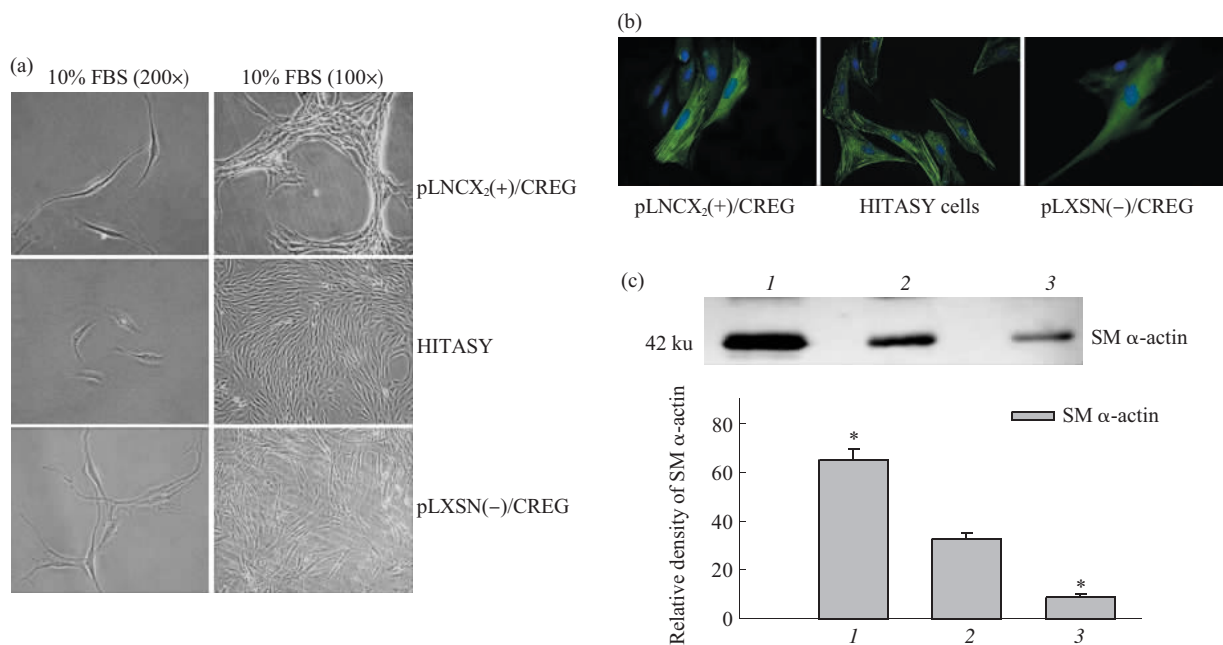


Fig. 2 Overexpression of CREG induced HITASY cells differentiation

(a) Phase-contrast photomicrographs of HITASY cells infected with pLNCX₂(+)/CREG or pLXSN(-)/CREG. (b) Expression of SM α -actin in HITASY cells was visualized by immunofluorescence microscopy ($\times 600$). Green fluorescence was used to display SM α -actin staining and DAPI staining was used to visualize the nuclei (blue). (c) Expression of SM α -actin in HITASY cells was detected by Western blot. Blots were scanned with a biologic Doc2000 gel analysis system and band density was quantified with image analysis software. * $P < 0.05$ vs control HITASY cells. 1: pLNCX₂(+)/CREG; 2: HITASY; 3: pLXSN(-)/CREG.

达明显增加, 而 pLXSN(-)/CREG 感染后, 细胞中 SM α -actin 表达受到明显抑制(图 2b, 2c).

2.3 CREG 蛋白介导 SM α -actin 相关调控因子的表达

2.3.1 CREG 蛋白对 RhoA 和 SRF 表达的调控.

蛋白质印迹分析发现, pLNCX₂(+)/CREG 稳定感染后, HITASY 细胞中 RhoA 总蛋白表达较正常

HITASY 细胞显著增加, 而 pLXSN(-)/CREG 感染则明显抑制 HITASY 细胞中 RhoA 总蛋白表达(图 3b). 免疫荧光染色发现, CREG 基因感染前后, HITASY 细胞中 SRF 表达定位发生明显改变. 正常 HITASY 细胞中的 SRF 主要在细胞浆中表达; pLNCX₂(+)/CREG 感染后, 细胞中 SRF 发生明显入核转位, SRF 主要在细胞核中表达; pLXSN(-)/CREG 组细胞

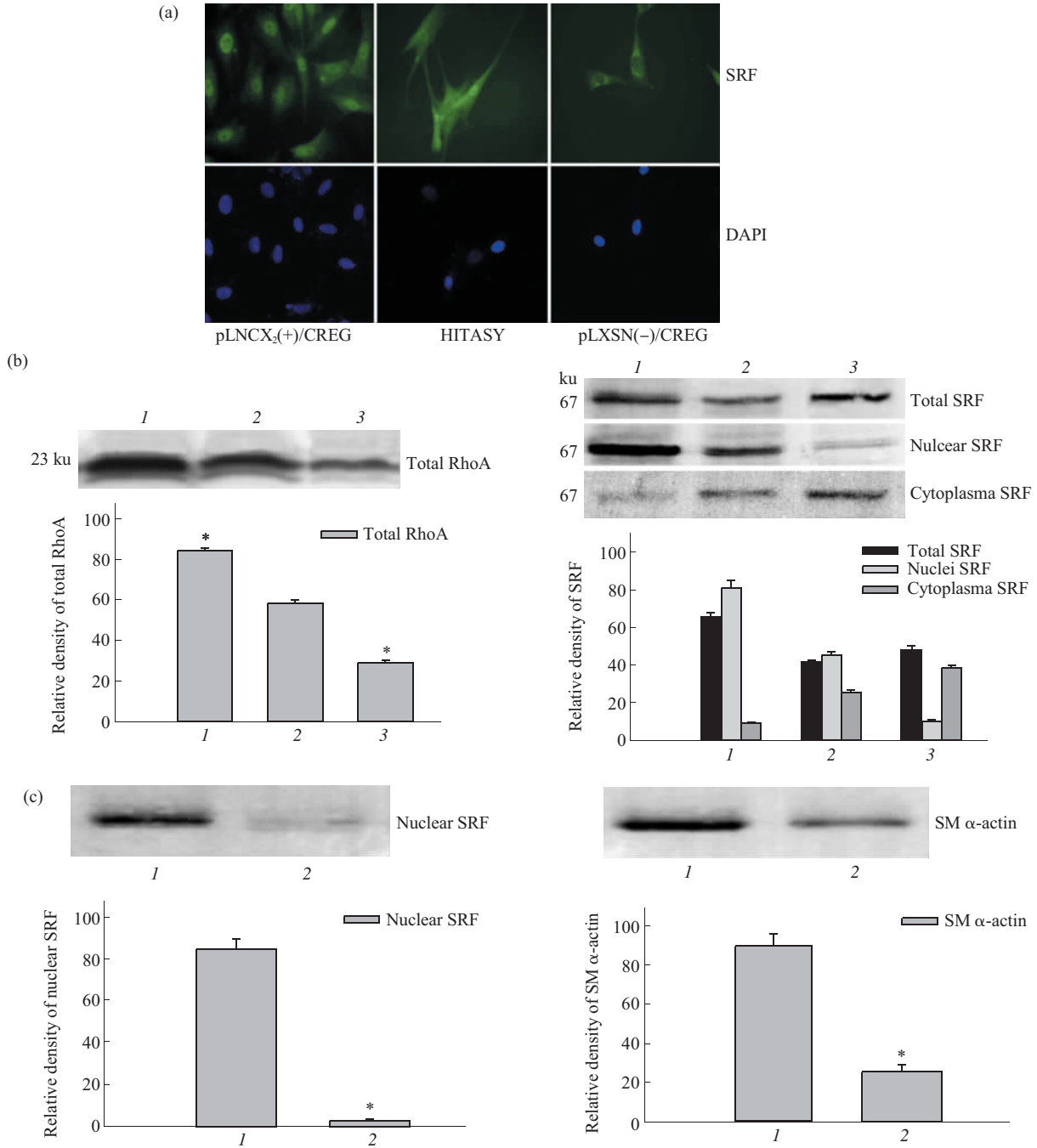


Fig. 3 The change of RhoA and SRF expression in HITASY cells was induced by CREG

(a) The localization and expression of SRF in HITASY cells were visualized by immunofluorescence microscopy ($\times 400$). (b) Expression of RhoA and SRF in HITASY cells were detected by Western blot. 1: pLNCX₂(+)/CREG; 2: HITASY; 3: pLXSN(-)/CREG. (c) The effect of Y-27632 on the expression of nuclei SRF and SM α -actin in HITASY cells infected with pLNCX₂(+)/CREG were analyzed by Western blot. Blots were scanned with a biologic Doc2000 gel analysis system and band density was quantified with image analysis software. 1: pLNCX₂(+)/CREG; 2: Y27632+pLNCX₂(+)/CREG. * $P < 0.05$ vs control HITASY cells.

中 SRF 则在细胞浆中低表达 (图 3a).

进一步用蛋白质印迹分析各组细胞总蛋白和核蛋白中 SRF 的表达和定位, 发现上述 3 组细胞中 SRF 总蛋白表达无明显差异. 核蛋白与浆蛋白分析显示, pLNCX₂(+)/CREG 组 SRF 在细胞核中表达显著增加, 细胞浆中表达极少, pLXSN(-)/CREG 组和正常 HITASY 细胞中 SRF 则主要在细胞浆表达, 上述结果与免疫荧光染色结果一致 (图 3b), 提示 CREG 大量表达诱导 RhoA 总蛋白表达增加的同时 SRF 发生入核转位现象.

2.3.2 Y-27632 抑制 CREG 蛋白介导的 SRF 入核转位. 为验证 Rho/ROCK 信号转导通路在 CREG 蛋白诱导的 VSMCs 表型转换中的作用, 将 pLNCX₂(+)/CREG 组细胞经 Rho 激酶特异性抑制剂 Y-27632 (10 μmol/L) 作用 24 h 后, 蛋白质印迹分析发现, 与未处理组细胞相比, SRF 在 pLNCX₂(+)/CREG 组细胞核中表达显著减少, 同时 SM α-actin 表达下调 (图 3c). 结果提示, CREG 对 HITASY 细胞分化标志蛋白 SM α-actin 的调控是通过 RhoA-SRF 信号通路介导的.

2.4 CREG 与 IGF2R 的直接相互作用调控 SM α-actin 表达

2.4.1 CREG 是一种分泌型蛋白质. 3 组细胞无血清培养基的免疫沉淀分析发现, pLNCX₂(+)/CREG 组

细胞培养基中存在大量分泌型 CREG, 而在 HITASY 细胞 (对照组) 及 pLXSN(-)/CREG 组细胞的培养基中均未检测到分泌型 CREG (图 4). 结果提示, 外源性 CREG 基因感染后, 大量表达的 CREG 蛋白可以作为一种分泌型蛋白质, 被分泌到 VSMCs 外.

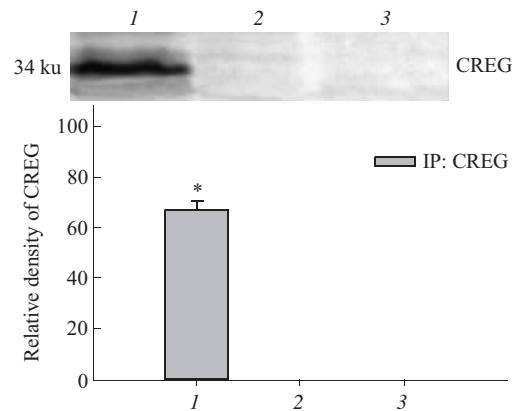


Fig. 4 CREG is a secreted glycoprotein

Cell culture media were immunoprecipitated with anti-CREG antibody and separated by SDS-PAGE. Western blot was performed for CREG. Blots were scanned with a biologic Doc2000 gel analysis system and band density was quantified with image analysis software. * $P < 0.05$ vs control HITASY cells. 1: pLNCX₂(+)/CREG; 2: HITASY; 3: pLXSN(-)/CREG.

2.4.2 CREG 基因表达调控细胞膜受体 IGF2R 的表达定位.

免疫组织化学染色发现, 与正常对照组细胞比

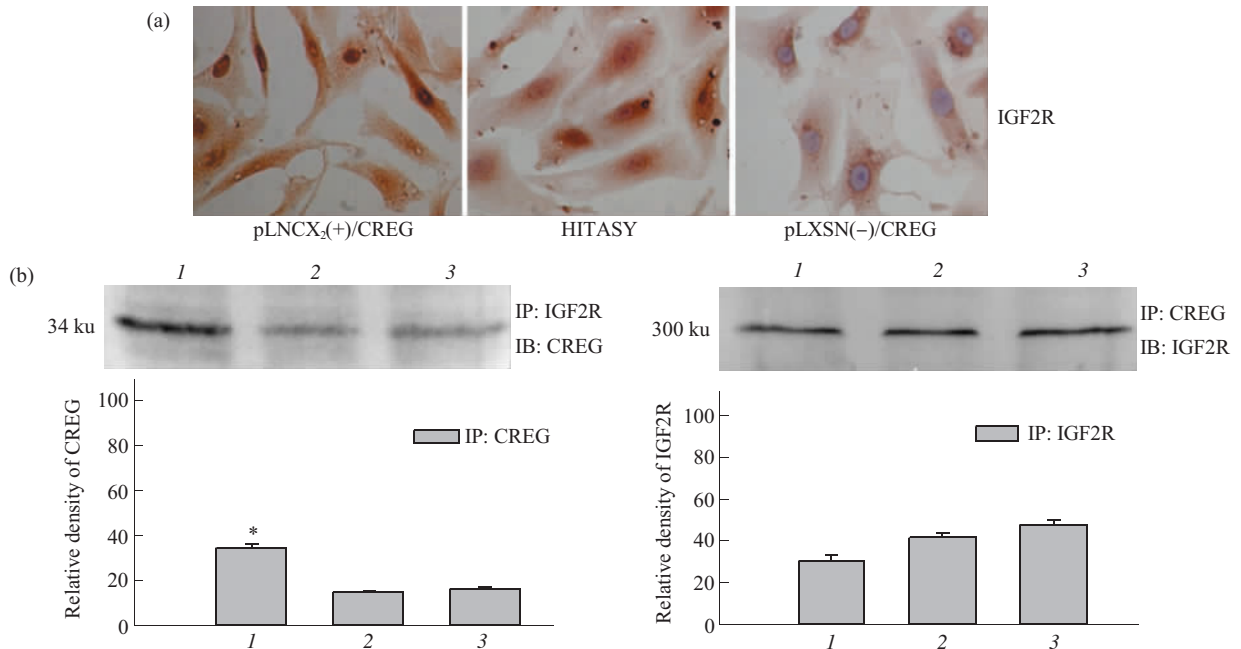


Fig. 5 Effects of CREG on the subcellular localization and expression of IGF2R in HITASY cells

(a) Expression of IGF2R in HITASY cells was detected by immunofluorescence microscopy (×400). (b) Immunoprecipitation analysis showed the interaction of CREG and IGF2R. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-IGF2R antibody and anti-CREG antibody separated by SDS-PAGE. Western blot was performed for CREG and IGF2R. Blots were scanned with a biologic Doc2000 gel analysis system and band density was quantified with image analysis software. * $P < 0.05$ vs control HITASY cells. 1: pLNCX₂(+)/CREG; 2: HITASY; 3: pLXSN(-)/CREG.

较, pLNCX₂(+)/CREG 稳定感染的 HITASY 细胞中, 6-磷酸甘露糖/胰岛素样生长因子 II 型受体(M6P/IGF2R)主要在细胞膜上表达明显增加, pLXSN(-)/CREG 感染细胞中, M6P/IGF2R 在细胞膜上表达明显减少, 呈散在分布, 而细胞内表达则较正常细胞增多(图 5a)。

免疫共沉淀分析显示, HITASY 细胞、pLNCX₂(+)/CREG 细胞及 pLXSN(-)/CREG 细胞中的 CREG 蛋白均可与 M6P/IGF2R 结合。提示 CREG 蛋白与细胞膜受体 M6P/IGF2R 发生直接相互作用

(图 5b)。

2.4.3 Okadaic acid 对 CREG 基因诱导的 RhoA、SRF、SM α -actin 表达的影响。将 HITASY 细胞, pLNCX₂(+)/CREG 细胞及 pLXSN(-)/CREG 细胞与蛋白磷酸酶 PP2A 的特异性抑制剂 okadaic acid (OA, 200 nmol/L)^[67]分别作用 60 min 以减少细胞膜上 IGF2R 表达后, 用蛋白质印迹分析发现, 上述 3 组细胞中 RhoA、SRF、SM α -actin 的表达均在 okadaic acid 作用后减弱(图 6), 提示 CREG 对 SM α -actin 表达的调控作用主要是通过 IGF2R 介导。

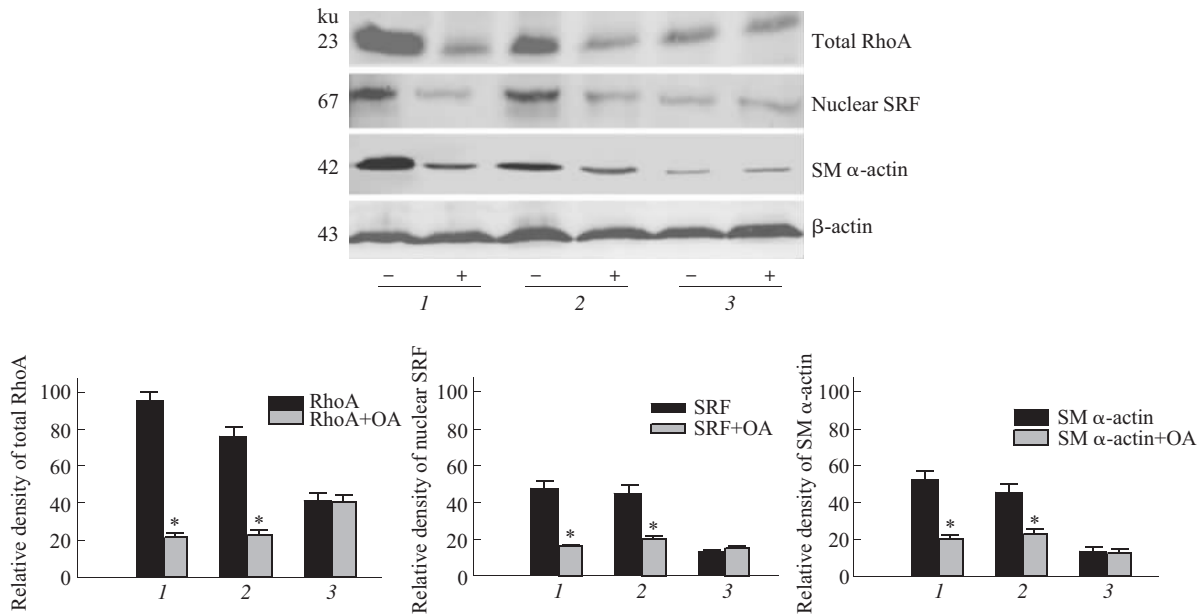


Fig. 6 Effects of okadaic acid on the expression of RhoA, SRF, SM α -actin and CREG in HITASY cells by Western blot

Blots were scanned with a biologic Doc2000 gel analysis system and band density was quantified with image analysis software. * $P < 0.05$ vs cells untreated with okadaic acid. 1: pLNCX₂(+)/CREG; 2: HITASY; 3: pLXSN(-)/CREG.

3 讨 论

HITASY细胞作为克隆化的人胸廓内动脉平滑肌细胞株具有表型转换的生理特性, 即去血清培养可以诱导其由合成表型向收缩表型转化^[1]。我们以往研究发现, 在去血清培养诱导 HITASY 细胞表型转换的同时伴有 CREG 基因的差异表达, 提示 CREG 基因表达与 VSMCs 的分化状态密切相关。但 CREG 表达变化参与 VSMCs 分化调控的分子机制尚未明确。本实验以正、反义 CREG 逆转录病毒表达载体稳定感染的 HITASY 细胞及正常 HITASY 细胞为模型, 以平滑肌特异性收缩蛋白 SM α -actin 的表达作为其分化表型的标志蛋白, 进行 CREG 蛋白参与 VSMCs 表型转换调控机制的研究。结果

发现, 正常 HITASY 细胞呈典型的波峰波谷样生长, 感染正、反义 CREG 基因后, HITASY 细胞形态明显改变, CREG 过表达的 HITASY 细胞体积变小且更加细长, 易于环绕排列生长呈管腔样结构, 细胞呈现典型的分化表型生长, SM α -actin 表达上调, 同时, 与 SM α -actin 蛋白表达调控相关的 RhoA 蛋白、SRF 核蛋白表达均明显增加。而 CREG 表达抑制后, HITASY 细胞体积明显增大, 细胞失去极性呈无序样生长, 同时细胞中 SM α -actin 蛋白及其相关调控蛋白 RhoA 和 SRF 核蛋白表达均较正常 HITASY 细胞明显减少, 去血清培养后, 细胞未呈现分化状态, 反而不耐受饥饿而出现大量死亡现象。上述实验结果提示, 在有血清培养条件下, CREG 蛋白过表达可以诱导体外培养的 HITASY 细

胞中 SM α -actin 表达, 促进 VSMCs 的分化. 相反, CREG 表达抑制后, 去血清培养诱导的 HITASY 细胞表型转换能力受到明显抑制, 细胞不耐受血清饥饿而发生死亡. 由此, 我们推测 CREG 可能作为 VSMCs 表型转换的关键调控因子, 在其表型转换的调控及分化表型的维持中起重要作用. 并且, 这可能与 CREG 能够调控 SM α -actin 的表达有一定关系.

RhoA 是小 G 蛋白家族的重要成员, 通常以 GTP 结合的活化型和 GDP 结合的非活化形式存在, 在细胞内信号传递中起开关作用. 许多研究证实, RhoA/Rho 激酶信号通路调控 SRF 的核转位及肌动蛋白的聚合作用而影响 VSMCs 的分化^[8], 同时 SRF 可与其他特异性转录因子协同作用于 SM α -actin 上游启动子区 CArG 调控元件而启动 SM α -actin 基因的转录^[9]. 本研究发现, CREG 过表达诱导 HITASY 细胞中 RhoA 总蛋白的表达和 SRF 入核转位, 提示 RhoA/SRF 信号通路参与了 CREG 对 SM α -actin 的表达调控.

已有研究发现, CREG 作为一种分泌型糖蛋白, 可以通过自分泌或旁分泌通路与细胞膜受体 M6P/IGF2R 发生相互作用, 在多种细胞如人畸胎癌细胞 NTERA-2 或小鼠胚胎干细胞中发挥抑制增殖和(或)促进分化的作用^[10,11]. 新近研究发现, 在回肠上皮细胞中, 糖皮质激素诱导的 CREG 表达能介导 M6P/IGF2R 降解, 从而可能促进细胞的增殖^[12]. 这些研究提示, 在不同类型细胞中, CREG 对 M6P/IGF2R 的调控作用是完全不同的. 我们发现, 外源性 CREG 基因感染人 VSMCs 后, CREG 蛋白可以作为一种分泌型蛋白, 分泌到细胞培养基中, 通过与细胞膜受体 IGF2R 直接作用诱导其在 HITASY 细胞膜上大量表达. 进一步以蛋白磷酸酶 PP2A 的特异性抑制剂 okadaic acid 处理细胞减少 M6P/IGF2R 在细胞表面的分布后, CREG 过表达引起的 SM α -actin 及其相关调控蛋白的表达受到明显抑制. 由此推断, 在人 VSMCs 中, M6P/IGF2R 可能作为 CREG 的受体调控 SM α -actin 及其相关转录因子的表达.

尽管本研究及以往研究均对 CREG 调控体外培养的 VSMCs 表型转化机制做了较为深入的研究, 但仍需进行更为深入的在体动物实验研究

证, 从而为 CREG 在再狭窄和动脉粥样硬化中的防治作用提供更为有力的依据.

参 考 文 献

- 1 韩雅玲, 康 建, 张 剑, 等. 对去血清后 HITASY 细胞分子表达及表型分析. 生物化学和生物物理进展, 2003, **30** (6): 868~873
Han Y L, Kang J, Zhang J, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2003, **30** (6): 868~873
- 2 韩雅玲, 刘海伟, 康 建, 等. E1A 激活基因阻遏子在不同表型血管平滑肌细胞中的表达. 中华医学杂志, 2005, **85** (1): 49~53
Han Y L, Liu H W, Kang J, *et al.* Natl Med J China, 2005, **85** (1): 49~53
- 3 韩雅玲, 闫承慧, 刘海伟, 等. E1A 激活基因阻遏子过表达诱导体外培养大鼠平滑肌细胞分化. 生物化学和生物物理进展, 2004, **31**(12): 1099~1105
Han Y L, Yan C H, Liu H W, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2004, **31** (12): 1099~1105
- 4 韩雅玲, 王效增, 康 建, 等. 大鼠颈动脉球囊损伤后血管平滑肌细胞 E1A 激活基因阻遏子的表达变化. 中华心血管病杂志, 2004, **32** (1): 53~58
Han Y L, Wang X Z, Kang J, *et al.* Chin J Cardiol, 2004, **32** (1): 53~58
- 5 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.1860
- 6 Braulte T, Mieskes G. Role of protein phosphatases in insulin-like growth factor II (IGF II)-stimulated mannose 6-phosphate/IGF II receptor redistribution. J Biol Chem, 1992, **267** (24): 17347~17353
- 7 Rocic P, Seshiah P, Griendling K K. Reactive oxygen species sensitivity of angiotensin II -dependent translation initiation in vascular smooth muscle cells. J Biol Chem, 2003, **278** (38): 36973~36979
- 8 Liu H W, Halayko A J, Fernandes D J, *et al.* The RhoA/Rho kinase pathway regulates nuclear localization of serum response factor. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003, **29** (1): 39~47
- 9 Owens G K, Kumar M S, Wamhoff B R. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. Physiol Rev, 2004, **84** (3): 767~801
- 10 Veal E, Groisman R, Eisenstein M, *et al.* The secreted glycoprotein CREG enhances differentiation of NTERA-2 human embryonal carcinoma cells. Oncogene, 2000, **19** (17): 2120~2128
- 11 Di Bacco A, Gill G. The secreted glycoprotein CREG inhibits cell growth dependent on the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. Oncogene, 2003, **22** (35): 5436~5445
- 12 Gordon P V, Paxton J B, Fox N S. The cellular repressor of E1A-stimulated genes mediates glucocorticoid-induced loss of the type-2 IGF receptor in ileal epithelial cells. J Endocrinol, 2005, **185** (2): 265~273

The Cellular Repressor of E1A-stimulated Genes Promotes Human VSMCs Differentiation *In vitro* Mediated by RhoA and SRF*

HAN Ya-Ling^{1)**}, XU Hong-Mei¹⁾, YAN Cheng-Hui¹⁾, Hu Ye²⁾, KANG Jian¹⁾, LIU Hai-Wei¹⁾

¹⁾Department of Cardiology, Shenyang General Hospital, Cardiovascular Research Institute of PLA, Shenyang 110016, China;

²⁾Emergency Department of Dalian Municipal Central Hospital, Dalian 116033, China)

Abstract To investigate the mechanism of the cellular repressor of E1A-stimulated genes (CREG) on the differentiation of vascular smooth muscle cells (VSMCs), the human internal thoracic artery cells (named HITASY cells) were stably infected with sense-CREG [pLNCX₂(+)/CREG] and antisense-CREG [pLXSN(-)/CREG] retroviral vectors and positive clone was obtained by G418 selection. The cells infected with pLNCX₂(+)/CREG take on the differentiated phenotype and overexpression of CREG can enhance SM α -actin expression accompanied with increase of the total RhoA and nuclear serum response factor (SRF) expression detected by immunofluorescence and Western blot. And treated with a selective Rho kinase inhibitor Y-27632, the expression of SM α -actin and nuclear SRF protein induced by CREG was effectively reduced. Meanwhile, the opposite results were observed in the CREG-depression HITASY cells. And immunoprecipitation assays indicate that as a secreted protein, CREG can be detected in the media of pLNCX₂(+)/CREG cells and can interact with insulin-like growth factor II /mannose 6-phosphate receptor (M6P/IGF2R). Furthermore, that using okadaic acid (an inhibitor of the protein phosphatases 2A) to decrease the number of M6P/IGF2R at the cell surface can significantly inhibit the expression of total RhoA, nuclear SRF and SM α -actin induced by CREG-overexpression. Taken together, as a secreted protein, CREG can enhance the expression of SM α -actin by interaction with M6P/IGF2R and perform a pivotal role in the process of VSMCs differentiation and phenotype modulation.

Key words repressor protein, E1A, phenotype, cell, vascular smooth muscle, human

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30570664, 30070280).

**Corresponding author . Tel: 86-24-23922184, Fax: 86-24-23911006, E-mail: hanyal@mail.sy.ln.cn

Received: December 6, 2005 Accepted: February 9, 2006