

## E1A 激活基因阻遏子(CREG)过表达通过抑制 p38/JNK 信号分子活化对抗人血管平滑肌细胞凋亡\*

吴光哲<sup>1)</sup> 闫承慧<sup>2)</sup> 韩雅玲<sup>2)\*\*</sup> 陶杰<sup>2)</sup> 邓捷<sup>2)</sup>  
田孝祥<sup>2)</sup> 张保海<sup>2)</sup> 王涛<sup>2)</sup> 康建<sup>2)</sup> 张效林<sup>2)</sup>

(<sup>1)</sup>第四军医大学西京医院心内科, 西安 710032; <sup>2)</sup>沈阳军区总医院全军心血管病研究所心内科, 沈阳 110016)

**摘要** 血管平滑肌细胞(VSMCs)凋亡参与了动脉粥样硬化(AS)及冠状动脉介入治疗(PCI)术后再狭窄(RS)等心血管疾病的发生发展过程. E1A 激活基因阻遏子(CREG)是新近发现的一种分泌型糖蛋白, 在维持细胞和组织稳态方面发挥重要作用. 前期研究发现 CREG 蛋白过表达能够对抗血清饥饿诱导的人血管平滑肌细胞(hVSMCs)凋亡, 进一步探讨 CREG 对 hVSMCs 凋亡的调控作用及相关的分子机制. 以逆转录病毒稳定转染的 CREG 过表达及表达抑制的 hVSMCs 为模型, 应用两种药物 Staurosporine (STS) 和 Etoposide (VP-16) 诱导细胞发生凋亡, 检测细胞凋亡和相关信号通路变化. 结果显示, 在药物干预后, CREG 表达抑制时细胞凋亡明显增多, 而 CREG 过表达明显抑制 hVSMCs 凋亡. 同时也发现, CREG 表达抑制时 p38 及 JNK 活性明显增强, 而 CREG 过表达时 p38 和 JNK 活性被抑制. 经腺病毒转染和药物干预抑制 p38 表达后, 细胞凋亡均受到抑制, 而且在 p38 活性被抑制的同时, JNK 活化也受到抑制. 说明 p38 和 JNK 表现为协同作用. 结果也显示, VSMCs 分化指标 SM  $\alpha$ -actin 和 SM MHC 与 CREG 表达呈一致趋势, 而细胞外基质蛋白 Fibronectin 与 CREG 表达呈负相关. 以上结果提示, CREG 在维持 VSMCs 表型转换方面发挥重要作用, 并且通过 p38 和 JNK 信号转导通路对 hVSMCs 凋亡进行调控. CREG 可能对于 AS 和 PCI 术后 RS 的防治具有重要价值.

**关键词** E1A 激活基因阻遏子, 血管平滑肌细胞, 细胞凋亡, 信号通路

**学科分类号** Q555.7, R34

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2009.00448

血管平滑肌细胞(VSMCs)凋亡在血管重塑、动脉粥样硬化(AS)和经皮冠状动脉介入治疗(PCI)术后再狭窄(RS)发生及发展中具有重要作用. 一般认为, VSMCs 凋亡可减少增生细胞数量, 抑制血管损伤引起的新生内膜形成. 然而, 近年采取多种诱导 VSMCs 凋亡的方法, 试图对 AS 和 PCI 术后 RS 引发的临床事件进行干预, 均未取得显著效果<sup>[1,2]</sup>. 事实上, VSMC 的大量凋亡会减少细胞外基质的合成, 破坏血管的稳定性, 其发生无论是对 AS 不稳定斑块的破裂还是损伤血管的重构都具有负性的调控作用. 进一步研究发现<sup>[3,4]</sup>, 易于凋亡的 VSMC 不能维持正常细胞的成熟分化状态, 而是呈现出一种衰老表型, 细胞在损伤发生后不能进行有效地自身修复, 从而引发细胞死亡、不稳定斑块的破裂以及血管壁重构的发生. 因而, 如果能够阐明易损 VSMCs 凋亡的机制, 寻找并发现既能够抑制损伤血管的 VSMC 凋亡, 又能够维持细胞成熟分化状

态的分子, 将为临床 AS 斑块的演进和 PCI 术后 RS 的发生提供新的治疗策略<sup>[1,5,6]</sup>.

E1A 激活基因阻遏子(CREG)是新近发现的一种分泌型糖蛋白, 可通过阻遏腺病毒 E1A 和 E2F 对靶基因的转录激活作用, 抑制细胞增殖<sup>[7,8]</sup>. 以前的研究证实, CREG 基因过表达可以诱导体外培养的 hVSMCs 分化, 参与维持其分化状态, 同时抑制细胞迁移和增殖<sup>[9,10]</sup>. 通过正、反义 CREG 逆转录病毒干预研究进一步证实, CREG 能够调控体外和在体血管的 VSMCs 向分化表型转换, 抑制损伤血管新生内膜的形成和 RS 的发生<sup>[11,12]</sup>. 进一步观察发现, CREG 过表达能够对抗血清饥饿诱导的

\* 国家自然科学基金资助项目(30770793, 30800465).

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

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

收稿日期: 2009-07-23, 接受日期: 2009-10-15

VSMCs 凋亡, 而抑制 CREG 表达后, 细胞不耐受去血清培养而发生大量凋亡<sup>[13]</sup>. 这些研究提示 CREG 可能参与维持血管损伤修复过程中 VSMCs 的分化表型. 尽管在急性损伤的动脉修复过程中已发现有 VSMCs 凋亡存在, 但 CREG 是否参与调控 VSMCs 凋亡有待进一步明确. 为此, 本实验以体外培养的 hVSMCs 为研究对象, 通过逆转录病毒载体构建 CREG 过表达和表达抑制的稳定细胞株, 在药物刺激下诱导细胞发生凋亡, 进一步检测 CREG 对 hVSMCs 凋亡的效应及可能的信号转导通路.

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞和质粒

人胸廓内动脉平滑肌细胞克隆株 HITASY, 由本实验室自制保存; Phoenix 293 包装细胞购自美国 ATCC 公司; pLNCX<sub>2</sub>-CREG 质粒由本实验室刘海伟博士构建; pSM<sub>2</sub>-siCREG 质粒购自 Open Biosystems 公司; p38 $\alpha$ AGF 腺病毒质粒由美国新泽西大学李少华教授惠赠.

### 1.2 主要试剂

Staurosporine (STS)、Etoposide (VP-16) 及 SP600125 购自美国 Sigma 公司; 抗 CREG 多克隆抗体、抗磷酸化 p38(p-p38)抗体和抗磷酸化 JNK (p-JNK)抗体、抗磷酸化 ERK1/2(p-ERK)抗体、抗磷酸化 Akt(p-Akt)抗体、抗 PI3K 抗体和抗 cleaved caspase-3 单克隆抗体购自美国 R&D 公司; 抗 p38 抗体、抗 JNK 抗体、抗 ERK1/2 抗体购自北京中杉金桥生物公司; LY294002、抗 Akt 抗体购自 Cell signaling 公司; 抗 SM MHC 抗体、抗 Fibronectin 抗体购自美国 Santa cruz 公司; 抗 SM  $\alpha$ -actin 单克隆抗体购自丹麦 Dako 公司; SB203580 购自美国 Alexis 公司; TUNEL 凋亡试剂盒购自美国宝灵曼生物公司; Annexin V-FITC 凋亡试剂盒购自美国 BD 公司; ECL 化学发光试剂盒购自美国 Amersham 公司.

### 1.3 方法

**1.3.1 构建 CREG 基因过表达和表达抑制的 hVSMCs 模型.** 将质粒 pLNCX<sub>2</sub>-CREG(CREG 过表达, CREG-UP)及 pSM<sub>2</sub>-siCREG(CREG 表达抑制, CREG-DW)分别感染 HITASY 细胞(CREG-NR), 24 h 后传代, 分别加入 G418 500 mg/L 及嘌呤霉素 (puromycin) 6 mg/L, 筛选生长良好的耐药克隆. Western blot 鉴定培养上清及细胞中 CREG 表达.

**1.3.2 细胞转染.** 将冻存的 AD293 细胞融化, 加入 10 ml 10% FCS 的 DMEM, 600 g 离心 5 min 弃去上清, 在 10% FCS 的 DMEM 中常规培养, 传代 2~3 次. 待生长至 20%~25% 融合, 感染 p38 $\alpha$ AGF 质粒. 采用 TCID<sub>50</sub> 方法测定病毒的滴度. 在 CREG-DW 细胞中加入滴度为 50 MOI 的 p38 $\alpha$ AGF 腺病毒, 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 48~72 h, 制备瞬时感染 p38 $\alpha$ AGF-CREG-DW 细胞.

**1.3.3 蛋白质印迹分析.** 收集细胞, 用冷却的 PBS 洗 2 次, 以细胞刮刮取细胞, 转移至 Eppendorf 管中, 4 $^{\circ}$ C 1 000 r/min, 离心 10 min, 弃去上清, 于沉淀中加入细胞裂解液(50 mmol/L Tris, 10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100)裂解细胞, 于冰上静置 15 min 后, 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min, 离心 10 min, 收集上清后加入蛋白酶抑制剂. 采用 BCA 比色法测定裂解液中蛋白质浓度. 样品经 12% 分离胶行 SDS-PAGE. 于 4 $^{\circ}$ C 循环水浴, 以 300 mA 电流将样品转至硝酸纤维素滤膜(PVDF 膜)上, 时间为 2 h. 经 5% 脱脂奶粉 TBS-T 缓冲液室温封闭 1 h, TBS-T 洗膜 3 次, 每次 10 min. 加入稀释后的一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBS-T 洗膜 3 次, 每次 10 min. 加入 HRP 标记的二抗, 室温孵育 2 h, 以 TBS-T 洗 3 次, 每次 10 min. ECL 化学发光试剂盒显色, 暗室曝光, 在 bio-Rad Geldoc 2000 图像分析仪扫描分析.

**1.3.4 Annexin V/PI 双染色检测细胞凋亡.** 胰酶消化, 收集细胞. 按照 Annexin V:FITC Apoptosis Detection Kit I(BD Pharmingen)说明书操作. 以 1 $\times$ 结合缓冲液重悬细胞, 加入 5  $\mu$ l Annexin V-FITC 及 5  $\mu$ l PI. 室温避光孵育 15 min 后, 样品经 260 目滤网过滤, 行流式细胞仪检测.

**1.3.5 TUNEL 荧光染色检测细胞凋亡.** 参照试剂盒说明书进行. 收取细胞后, 于 4% 多聚甲醛室温中固定 30 min. 用 PBS 洗 3 次, 每次 5 min. 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 甲醇溶液室温孵育 30 min. PBS 洗片后, 与 0.1% TritonX-100 通透液在冰浴中孵育 2 min. PBS 洗片后, 滴加 50  $\mu$ l TUNEL 反应混合液, 放置湿盒中 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBS 液洗 3 次后在荧光显微镜(Olympus IX-70)下观察细胞核的形态, 活的细胞核染色质在核内分布均匀, 凋亡细胞核染色质凝集、边缘化或裂解为小片段. PBS 洗片后, 加入 50  $\mu$ l DAB 底物溶液室温孵育 10 min, PBS 洗片后, 在光镜下分析结果.

**1.3.6 统计学分析.** 实验结果以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )

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.  $P < 0.05$  为差异有统计学意义.

## 2 结 果

### 2.1 转染前后 hVSMCs 的 CREG 表达

逆转录病毒介导 CREG 基因表达前后 hVSMCs

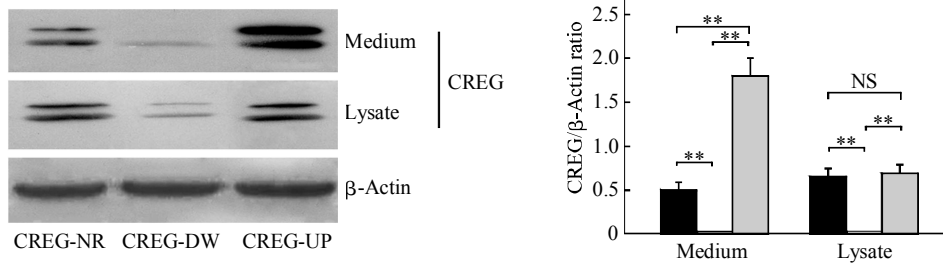


Fig. 1 Expression of CREG in hVSMCs after transfection

HITASY were infected with retrovirus pLNCX expressing CREG or knocking down CREG. Cell lysates and medium were analyzed by Western blotting for CREG expression. NS: Not significant,  $**P < 0.01$ . ■: CREG-NR; □: CREG-DW; ▨: CREG-UP.

### 2.2 感染前后 hVSMCs 的形态学改变及分化指标检测结果

正常 hVSMCs 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; pLNCX<sub>2</sub>(+)/CREG 稳定感染细

胞的 CREG 蛋白表达及分泌情况: CREG-UP 胞浆中 CREG 水平与 CREG-NR 细胞无明显变化, 而 CREG-UP 培养基中 CREG 含量较 CREG-NR 明显增加( $P < 0.01$ ). 与前两组比较, CREG-DW 培养基及胞浆中 CREG 水平明显降低( $P < 0.01$ )(图 1).

胞的形态出现明显改变, 胞浆体积变小且更加细长, 呈分化表型生长; 而 pSM<sub>2</sub>-siCREG 感染的细胞在含 10% FCS 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, 同时出现不可逆转的死亡(图 2a).

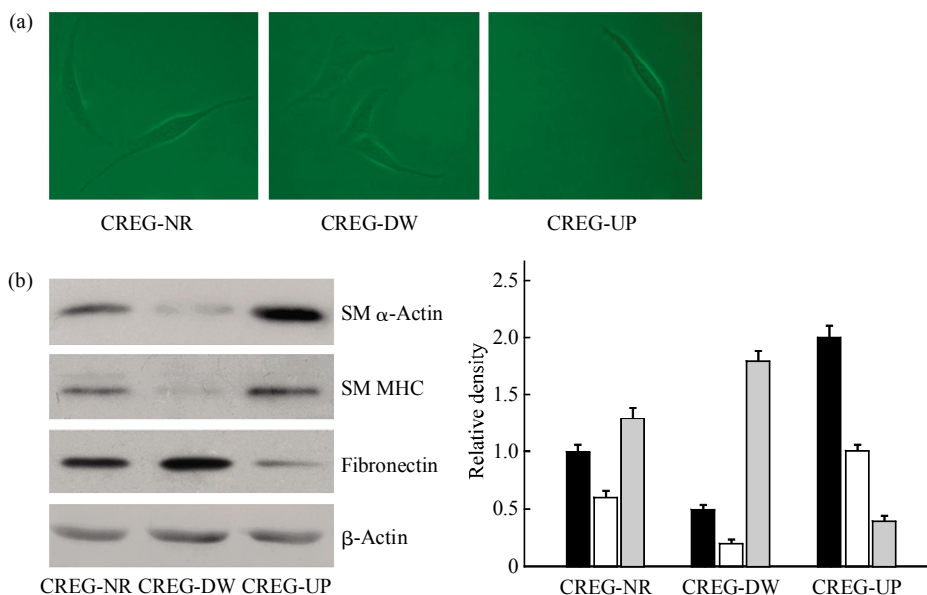


Fig. 2 Morphology and expression of differentiation marker in hVSMCs after transfection

(a) Morphology of hVSMCs was observed by phase-contrast photomicrographs. (b) HITASY were infected with retrovirus pLNCX expressing CREG or knocking down CREG. Cell lysates and medium were analyzed by Western blotting for SM α-Actin, SM MHC and fibronectin expression. ■: SM α-Actin; □: SM MHC; ▨: Fibronectin.

Western blot 分析发现, 与正常培养的 HITASY 细胞相比, pLNCX<sub>2</sub>-CREG 稳定感染的 VSMCs 中分化指标 SM  $\alpha$ -actin 和 SM MHC 水平明显增加, shRNA-CREG 感染后, SM  $\alpha$ -actin 和 SM MHC 表达受到明显抑制, 细胞外基质蛋白 Fibronectin 变化趋势与之相反(图 2b). 提示 CREG 在调控 VSMCs 向分化表型转换过程中发挥重要作用.

### 2.3 STS 及 VP-16 有效浓度的确立

HITASY 细胞(CREG-NR)常规培养至 80%~90%

融合时,选择不同浓度的 STS(50、100、200 nmol/L)、VP-16(20、50、100  $\mu$ mol/L), 分别在药物刺激后 0 h、4 h、8 h、12 h 和 24 h 收集细胞. Annexin V/PI 双染色流式细胞分析显示: 不同浓度的 STS 和 VP-16 对细胞凋亡均有作用, 且它们的效应具有时间和浓度依赖性, 即随浓度增加和时间延长, 细胞凋亡效应越来越明显. 其中 STS(200 nmol/L) 在给药后 24 h 细胞凋亡率达(40.1  $\pm$  2.3)%, VP-16 (100  $\mu$ mol/L)高达(50.3  $\pm$  5.4)% (图 3).

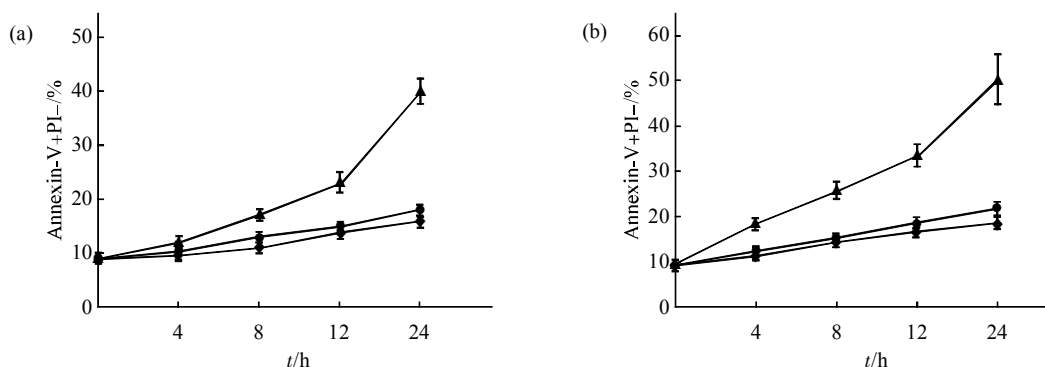


Fig. 3 The time-course analysis of STS and VP-16 in HITASY cells

HITASY cells were exposed to STS (50, 100 and 200 nmol/L) or VP-16 (20, 50 and 100  $\mu$ mol/L) for various periods. Apoptotic death was estimated by flow cytometry. (a) STS.  $\blacklozenge$ - $\blacklozenge$ : 50 nmol/L;  $\bullet$ - $\bullet$ : 100 nmol/L;  $\blacktriangle$ - $\blacktriangle$ : 200 nmol/L. (b) VP-16.  $\blacklozenge$ - $\blacklozenge$ : 20  $\mu$ mol/L;  $\bullet$ - $\bullet$ : 50  $\mu$ mol/L;  $\blacktriangle$ - $\blacktriangle$ : 100  $\mu$ mol/L.

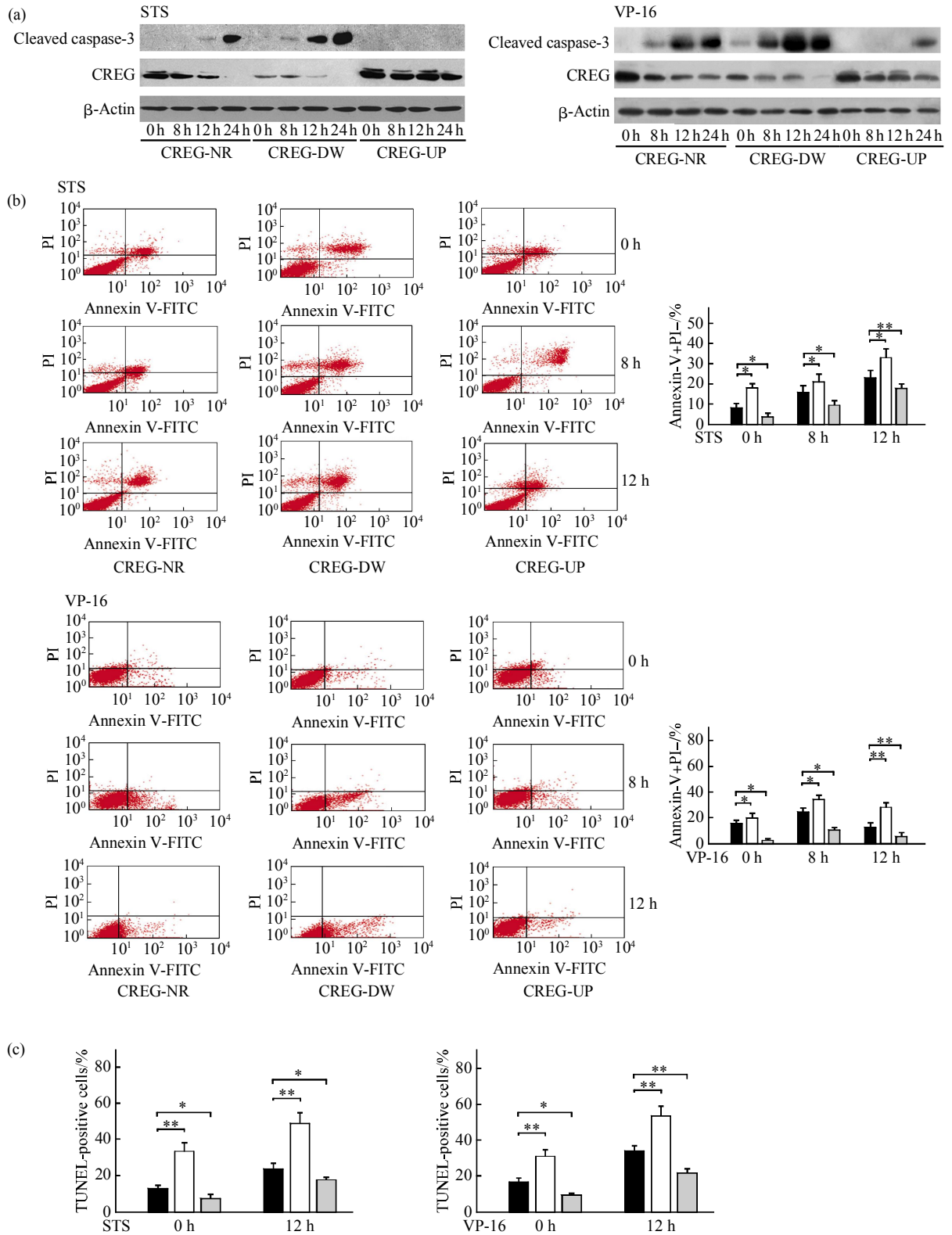
### 2.4 在凋亡诱导剂作用下, CREG 蛋白过表达抑制 hVSMCs 凋亡

**2.4.1** Western blot 分析 CREG 和 cleaved caspase-3 变化. CREG-NR、CREG-DW 和 CREG-UP 细胞分别在有效浓度的 STS(200 nmol/L)和 VP-16(100  $\mu$ mol/L)刺激下, 在不同时间点(0 h、8 h、12 h、24 h)终止培养, 收集蛋白质, 行 Western blot 分析. 结果显示: CREG-UP 组 CREG 蛋白持续高表达, CREG-NR 组 CREG 蛋白在给药后 12 h 表达开始下降, 而 CREG-DW 组 CREG 蛋白低表达, 且逐渐减低. Cleaved caspase-3 的表达趋势与 CREG 完全相反, 即 CREG-UP 组在药物刺激后 Cleaved caspase-3 少量表达, 而 CREG-DW 组给药后明显增高, 24 h 达到高峰(图 4a). 提示 CREG 蛋白表达与 VSMCs 凋亡呈负相关, CREG 蛋白可能参与调控 VSMCs 凋亡.

**2.4.2** Annexin-V/PI 双染检测细胞凋亡. Annexin-V/PI 双染流式细胞计数检测细胞凋亡的结

果显示, 在含 10% FCS 的 DMEM 中培养时, CREG-UP 细胞自然凋亡率(3.5  $\pm$  2.1)%, 正常 VSMCs 凋亡率(8.1  $\pm$  2.3)%, 而 CREG-DW 凋亡率增高至(18.1  $\pm$  2.3)% ( $P < 0.05$ ). 在 STS 处理后, CREG-DW 细胞 12 h 时凋亡明显增加, 凋亡率为(33.0  $\pm$  4.2)%, 而 CREG-UP 细胞仅为(18.1  $\pm$  2.2)% ( $P < 0.05$ ). 在 VP-16 刺激下, 也显示同样的结果: CREG-DW 细胞 12 h 凋亡率为(49.9  $\pm$  4.3)%, 而 CREG-UP 仅为(22.5  $\pm$  1.9)% ( $P < 0.05$ ) (图 4b).

**2.4.3** TUNEL 染色分析细胞凋亡. 在 STS 和 VP-16 刺激细胞 0h 和 12h 分别收集细胞, TUNEL 染色进行细胞凋亡分析. 结果显示: CREG-UP、CREG-NR 和 CREG-DW 在 STS 组凋亡率分别为(17.9  $\pm$  1.2)%、(23.5  $\pm$  3.4)%和(48.8  $\pm$  5.7)%, 而三者 VP-16 组凋亡率分别为(21.8  $\pm$  2.3)%、(33.8  $\pm$  3.1)%和(53.7  $\pm$  4.8)%, CREG-DW 细胞的自然凋亡率及药物诱导后凋亡率均比前两组明显增高( $P < 0.05$ , 图 4c).



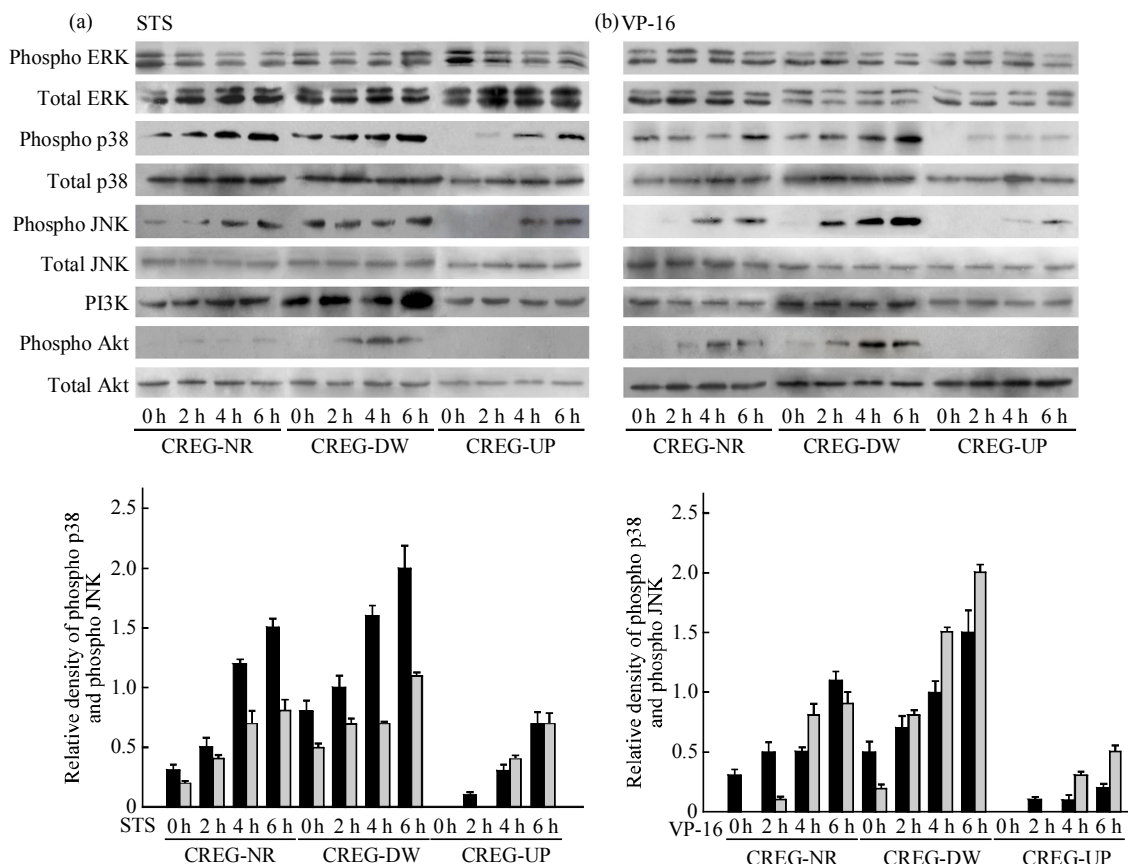
**Fig. 4** Effects of CREG on VSMC apoptosis after STS and VP-16 stimulation

(a) CREG and cleaved caspase-3 levels were quantified by Western blotting at different time points after STS and VP-16 stimulation. (b) The number of cells undergoing apoptosis was estimated by annexin V/PI dual-color flow cytometry at various periods after STS and VP-16 provocation. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . ■: CREG-NR; □: CREG-DW; ▨: CREG-UP. (c) The percentage of TUNEL-positive cells with STS (left-hand panel) and VP-16 (right-hand panel) treatment at 12 h was calculated by the total number of nuclei. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . ■: CREG-NR; □: CREG-DW; ▨: CREG-UP.

## 2.5 CREG 通过 p38/JNK 信号转导通路调控 hVSMCs 凋亡

**2.5.1** 在凋亡诱导剂作用下, Western blot 检测 MAPK 及 PI3K/Akt 信号分子表达变化. 在药物刺激后 0 h、2 h、4 h、6 h 收集细胞, 检测 ERK、p38、JNK、PI3K 及 Akt 等信号分子表达. 结果显示: 在 STS 处理后, 尽管总的 ERK、p38、JNK 及

Akt 蛋白表达水平无改变, 但是 p38、JNK 及 Akt 的磷酸化水平在 CREG 基因转染前后的 VSMC 凋亡中变化显著, 并且变化趋势一致. 即在 CREG-UP 细胞中含量较低, 而在 CREG-DW 细胞中在给药后含量明显增高, 并维持在较高水平 (图 5a). 在 VP-16 作用下, 信号分子也显示同样的变化趋势(图 5b).



**Fig. 5 Western blot analysis of ERK, p38, JNK, PI3K and Akt**

(a)Western blot showed changes in different intracellular signals in response to STS stimulation. ■: p-p38; □: p-JNK. (b)Western blot showed changes in different intracellular signals in response to VP-16 stimulation. ■: p-p38; □: p-JNK.

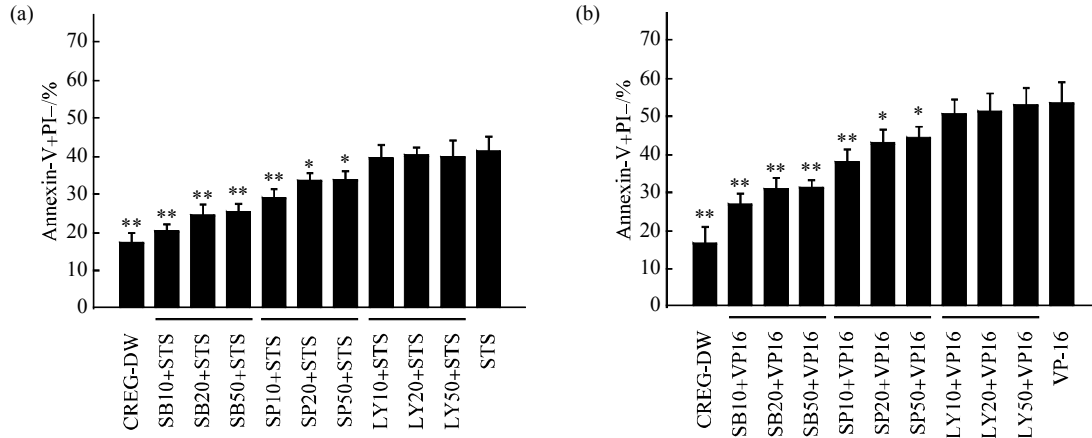
**2.5.2** 在特异性信号抑制剂作用下, 通过 Annexin V/PI 流式分析明确 CREG 调控 VSMCs 凋亡的信号通路. 在 CREG-DW 细胞中分别给予特异性 p38 抑制剂 SB203580、JNK 抑制剂 SP600125 及 PI3K 抑制剂 LY294002 预处理, 然后在 STS(图 6a)和 VP-16(图 6b)作用下刺激 12 h, 通过流式分析检测细胞凋亡. 结果发现, 不同浓度的 SB203580 及 SP600125 对细胞的凋亡均有明显的抑制作用 ( $P < 0.05$ ), 并且在浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$  时效果最明显, 其中 p38 抑制剂 SB203580 对细胞凋亡的抑制作用最为显著; 而 PI3K 抑制剂 LY294002 无明显

效应. 提示 p38 和 JNK 通路可能介导了 CREG 调控 hVSMCs 凋亡.

**2.5.3** 建立 p38 表达抑制细胞株, 进一步验证 p38MAPK 参与调控 hVSMCs 凋亡. 在 CREG-DW 细胞中瞬时感染 p38 表达抑制质粒(p38 $\alpha$  AGF). 结果显示 p38 $\alpha$ AGF-CREG-DW 细胞中磷酸化 p38 无表达, p38 活性受到抑制(图 7a). 在 STS 刺激后, 采用 Western blot 和 Annexin V/PI 流式分析检测转染前后细胞凋亡情况. 结果显示, 在 CREG-DW 细胞中, Cleaved caspase-3 表达水平较高, 且呈现明显的增高趋势, 在 p38 $\alpha$ AGF 转染组仅在 24 h 才

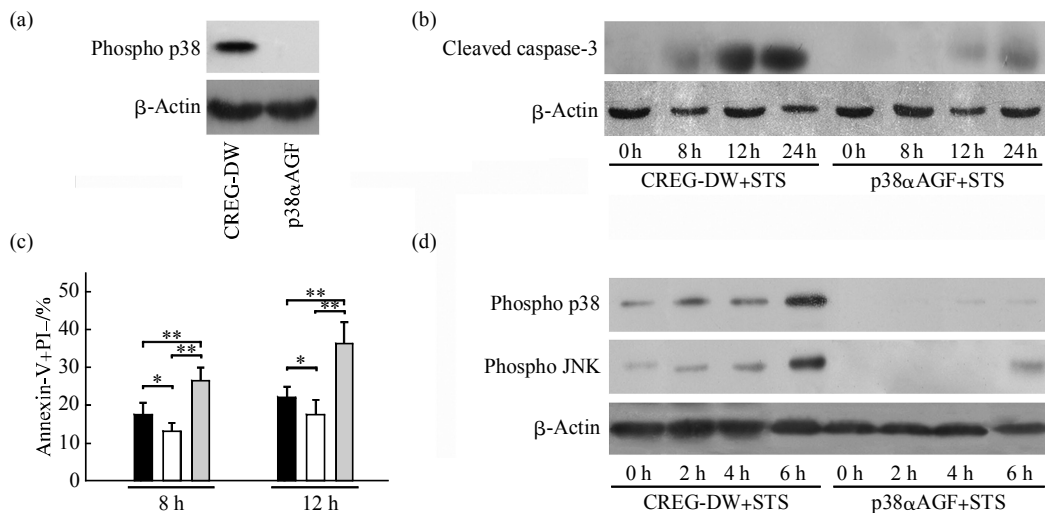
有低水平表达, 提示 STS 诱导的细胞凋亡受到抑制(图 7b). 流式分析也显示同样的结果: STS 刺激 12 h 后 CREG-DW 细胞凋亡率高达(36.2 ± 5.8)%, 而 p38αAGF 转染细胞凋亡率仅为(17.7 ± 3.6)% ( $P < 0.05$ , 图 7c). 我们也发现: STS 刺激后 CREG-

DW 细胞中 p38 及 JNK 磷酸化水平明显增高, 而瞬时转染 p38αAGF 后, 磷酸化 p38 下调的同时, JNK 活性也受到抑制. 提示 p38 磷酸化激活了 JNK 蛋白的表达共同调控 hVSMCs 凋亡(图 7d).



**Fig. 6 Effects of SB203580, SP600125 and LY294002 on apoptosis in CREG-DW cells**

(a) Effects of STS on CREG-DW cells with SB203580 or SP600125 or LY294002 pretreatment were estimated by flow cytometric analysis.  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  compared with STS stimulation. (b) Effects of VP-16 on CREG-DW cells with SB203580 or SP600125 or LY294002 pretreatment were estimated by flow cytometric analysis.  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  compared with VP-16 stimulation.



**Fig. 7 Effects of CREG on apoptosis of CREG-DW cells after transfection**

(a)Western blot analysis demonstrated using antibody against phosphorylated p38 the expression of transiently transfected p38α AGF in CREG-DW cells. (b)Western blot showed that the amount of cleaved caspases-3 in p38α AGF-CREG-DW cells after STS treatment. (c) Flow cytometry displayed that apoptotic death in p38α AGF-CREG-DW cells after STS treatment.  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ . ■:CREG-NR; □:CREG-DW; ▨:CREG-UP. (d) Western blot showed changes in different intracellular signals in response to STS stimulation after transfection.

## 2.6 CREG 蛋白过表达维持 hVSMCs 分化

三种细胞在 STS 和 VP-16 刺激下, 分别在给药后不同时间点检测细胞分化指标的表达变化. 结果显示: VSMCs 分化标记物 SM α-actin 和 SM MHC

水平在 CREG-UP 组高度表达, 而在 CREG-DW 组含量明显下降, 处于极低水平. 而细胞外基质蛋白 Fibronectin 变化趋势则相反. VSMCs 分化标志蛋白 SM α-actin 和 SM MHC 表达的变化趋势与

CREG 表达一致，而细胞外基质蛋白 Fibronectin 含量与 CREG 变化相反(图 8a, b)。这一结果提示 CREG

过表达促进 VSMCs 分化，可能是维持 VSMCs 分化的重要调控因子。

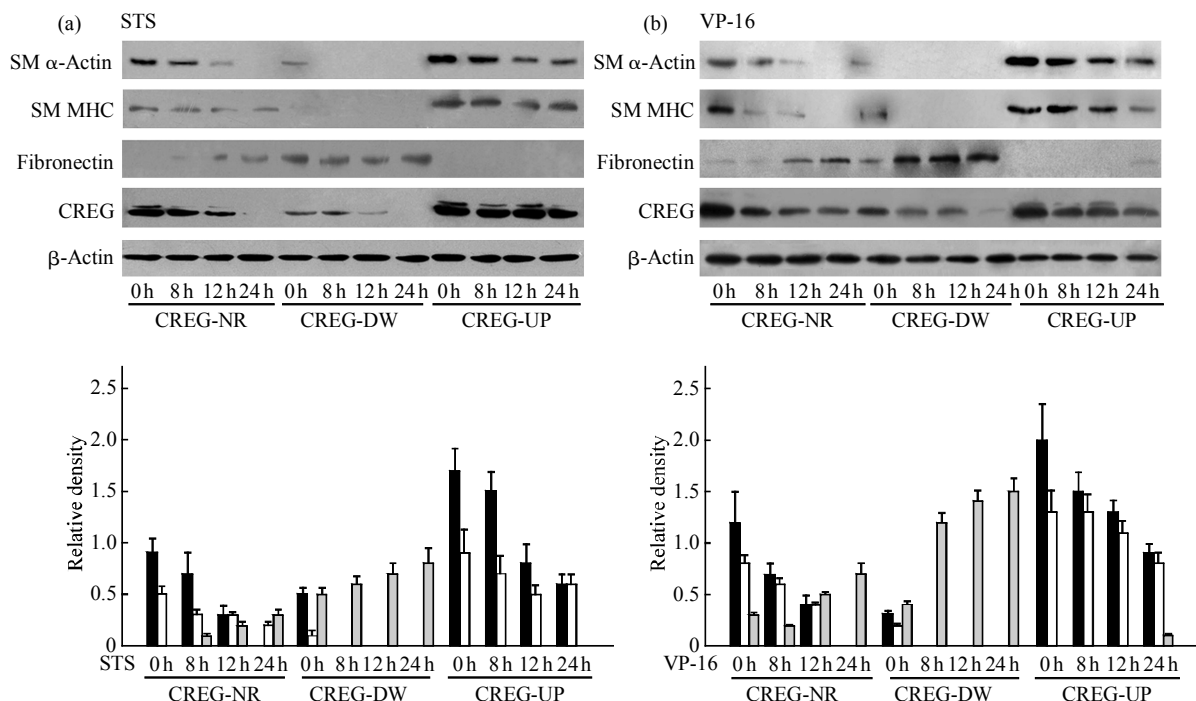


Fig. 8 Effects of CREG on VSMC differentiation by Western blot

(a) Cellular extracts were studied in different time points with STS treatment. The amount of SM  $\alpha$ -actin, SM MHC and Fibronectin were evaluated by Western blotting. ■: SM  $\alpha$ -actin; □: SM MHC; ▨: Fibronectin. (b) Cellular extracts were prepared at different time points in cells treated with VP-16. Western blot analysis of SM  $\alpha$ -actin, SM-MHC and Fibronectin were performed. ■: SM  $\alpha$ -actin; □: SM MHC; ▨: Fibronectin.

### 3 讨 论

CREG 是新近发现的一种分泌型糖蛋白，前期研究表明，CREG 在多种细胞中发挥抑制增殖和促进分化的作用，是维持细胞和组织稳态方面的重要调控因子。为此，进一步探讨 CREG 对 VSMCs 凋亡是否具有调控作用。我们首先以逆转录病毒表达载体稳定感染的 CREG 过表达及表达抑制 VSMCs 为模型，通过药物诱导细胞发生凋亡，探讨 CREG 对体外培养的 hVSMCs 凋亡效应及相关的信号转导通路。结果发现，在药物刺激后，CREG 表达抑制的 VSMCs 更容易发生凋亡，凋亡比率明显增高，而 CREG 过表达明显抑制细胞凋亡。同时，CREG 过表达明显抑制 p38 和 JNK 蛋白活性，而 CREG 表达抑制 p38 和 JNK 活性明显增高。在药物和腺病毒转染干预抑制 p38 表达后，细胞凋亡均明显被抑制，且在 p38 活性被抑制的同时，JNK 活性也明显被抑制。

在生理状态下，CREG 在许多组织中广泛存

在，并参与细胞分化表型的维持<sup>[7,9,14]</sup>。在目前的研究中我们进一步检测了 VSMCs 表型转换和细胞凋亡之间的关系。结果显示，CREG 过表达的细胞处于良好的分化状态，而表达抑制的细胞呈现去分化状态，并且发生凋亡细胞明显增多。细胞分化指标 SM  $\alpha$ -actin 和 SM MHC 与 CREG 表达趋势一致，而细胞外基质蛋白 Fibronectin 表达与 CREG 变化呈负相关，进一步证实了 CREG 过表达参与 VSMCs 分化表型的维持，同时抑制了细胞凋亡。以上结果提示 CREG 在维持 VSMCs 表型转换和调控细胞凋亡方面均发挥重要作用。

丝裂原活化蛋白激酶信号转导通路存在于大多数细胞内，在调控细胞的增殖、分化、迁移、凋亡等过程中具有至关重要的作用<sup>[15~19]</sup>。其中 p38 MAPK 及 JNK/SAPK 为应激蛋白激酶，这两条通路的激活参与多种应激所介导的细胞凋亡，JNK 通路和 p38 通路常表现为协同作用，大多数情况下，凋亡信号可以同时激活两条通路<sup>[16,20,21]</sup>。在本研究中我们发现，CREG 表达抑制 p38 和 JNK 活性增高，



且与 VSMCs 凋亡密切相关. 提示 JNK 信号转导作为 p38 信号转导通路的下游调控分子共同介导了 CREG 调控的 hVSMCs 凋亡, 且两者具有协同作用. 以往研究提示, CREG 是一种溶酶体蛋白, 可能通过 M6P 与细胞膜受体 M6P/IGF2R 结合, 并启动细胞膜受体 M6P/IGF2R 上的多个结合位点, 导致溶酶体酶如组织蛋白酶等内吞, 进而对抗 p38/JNK 信号转导分子诱导的细胞凋亡的发生<sup>[14, 22~24]</sup>. 这些研究结果与本实验类似, 提示 CREG 可能是一种新的 VSMCs 生存调控因子, 其大量表达可能通过其受体 M6P/IGF2R 促进溶酶体酶向细胞内转位, 发挥对抗血管损伤后 VSMCs 异常凋亡的作用, 从而维持细胞成分化表型. 鉴于 CREG 在维持 VSMCs 稳态和抑制细胞凋亡中的作用, 其有可能成为临床 PCI 术后 RS 防治研究中的一种新的治疗策略.

### 参 考 文 献

- Bennett M R. Vascular smooth muscle cell apoptosis-a dangerous phenomenon in vascular disease?. *J Clin Basic Cardiol*, 2000, **3**(1): 63~65
- Mallat Z, Tedgui A. Current perspective on the role of apoptosis in atherothrombotic disease. *Circ Res*, 2001, **88**(10): 998~1003
- Bennett M R, Macdonald K, Chan S W, *et al.* Cooperative interactions between RB and p53 regulate cell proliferation, cell senescence, and apoptosis in human vascular smooth muscle cells from atherosclerotic plaques. *Circ Res*, 1998, **82**(6): 704~712
- Mccarthy N J, Bennett M R. The regulation of vascular smooth muscle cell apoptosis. *Cardiovasc Res*, 2000, **45**(3): 747~755
- Spiguel L R, Chandiwala A, Vosicky J E, *et al.* Concomitant proliferation and caspase-3 mediated apoptosis in response to low shear stress and balloon injury. *J Surg Res*, 2008. [Epub ahead of print]
- Libby P, Aikawa M. Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets. *Nat Med*, 2002, **8**(11): 1257~1262
- 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
- Veal E, Eisenstein M, Tseng Z H, *et al.* A cellular repressor of E1A-stimulated genes that inhibits activation by E2F. *Mol Cell Biol*, 1998, **18**(9): 5032~5041
- 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
- Small T W, Bolender Z, Bueno C, *et al.* Wilms' tumor 1-associating protein regulates the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 2006, **99**(12): 1338~1346
- Han Y, Deng J, Guo L, *et al.* CREG promotes a mature smooth muscle cell phenotype and reduces neointimal formation in balloon-injured rat carotid artery. *Cardiovasc Res*, 2008, **78**(3): 597~604
- Han Y, Guo L, Yan C, *et al.* Adenovirus-mediated intra-arterial delivery of cellular repressor of E1A-stimulated genes inhibits neointima formation in rabbits after balloon injury. *J Vasc Surg*, 2008, **48**(1): 201~209
- 韩雅玲, 徐红梅, 邓捷, 等. E1A 激活基因阻遏子过表达抑制体外人血管平滑肌细胞凋亡. *生理学报*, 2006, **58**(4): 324~330  
Han Y L, Xu H M, Deng J, *et al.* *Acta Physiologica Sinica*, 2006, **58**(4): 324~330
- 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
- Chen G, Hitomi M, Han J, *et al.* The p38 pathway provides negative feedback for Ras proliferative signaling. *J Biol Chem*, 2000, **275**(50): 38973~38980
- Qi X, Pohl N M, Loesch M, *et al.* p38alpha antagonizes p38gamma activity through c-Jun-dependent ubiquitin-proteasome pathways in regulating Ras transformation and stress response. *J Biol Chem*, 2007, **282**(43): 31398~31408
- Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal*, 2000, **12**(1): 1~13
- Nebreda A R, Porras A. p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci*, 2000, **25**(6): 257~260
- Kyriakis J M, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*, 2001, **81**(2): 807~869
- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, *et al.* Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*, 1995, **270**(5240): 1326~1331
- Tournier C, Hess P, Yang D D, *et al.* Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science*, 2000, **288**(5467): 870~874
- Schahs P, Weidinger P, Probst O C, *et al.* Cellular repressor of E1A-stimulated genes is a bona fide lysosomal protein which undergoes proteolytic maturation during its biosynthesis. *Exp Cell Res*, 2008, **314**(16): 3036~3047
- Kang J X, Bell J, Leaf A, *et al.* Retinoic acid alters the intracellular trafficking of the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor and lysosomal enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(23): 13687~13691
- Han Y L, Guo P, Sun M Y, *et al.* Secreted CREG inhibits cell proliferation mediated by mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor in NIH3T3 fibroblasts. *Genes Cells*, 2008, **13**(9): 977~986

## Overexpression of The Cellular Repressor of E1A-stimulated Genes Inhibits The Apoptosis of Human Vascular Smooth Muscle Cells *via* Blocking p38/JNK MAP Kinase Activation\*

WU Guang-Zhe<sup>1</sup>, YAN Cheng-Hui<sup>2</sup>, HAN Ya-Ling<sup>2\*\*</sup>, TAO Jie<sup>2</sup>, DENG Jie<sup>2</sup>, TIAN Xiao-Xiang<sup>2</sup>,  
ZHANG Bao-Hai<sup>2</sup>, WANG Tao<sup>2</sup>, KANG Jian<sup>2</sup>, ZHANG Xiao-Lin<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Cardiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China;

<sup>2</sup> Department of Cardiology, Shenyang General Hospital, Cardiovascular Research Institute of PLA, Shenyang 110016, China)

**Abstract** The cellular repressor of E1A-stimulated genes (CREG) is a recently described glycoprotein which plays a critical role in keeping cells or tissue in homeostasis states. The current study examined whether and how CREG may regulate VSMC apoptosis. Both loss-of-function (CREG-DW by retrovirus expressing CREG shRNAs) and gain-of-function (CREG-UP by retroviral infection with vector pLNCX-CREG) studies were performed to support this notion. Western blot showed that CREG knockdown stimulated with STS or VP-16 was identified to increase cleaved caspase-3, a marker for apoptosis. It was also observed that the number of cells undergoing apoptosis remarkably increased in CREG-DW cells by annexin V/PI dual-color flow cytometry and TUNEL assays. Moreover, p38 and JNK mitogen-activated protein kinases were significantly upregulated in CREG-DW and significantly reduced in CREG-UP VSMCs. More importantly, CREG-DW-induced VSMC apoptosis was blocked by a p38-specific inhibitor (SB203580), or by overexpression of a dominant negative p38 $\alpha$  (p38 $\alpha$  AGF). The data also showed that inactivation of p38 decreased the amount of phosphorylated JNK, indicated that the p38 fusion proteins are functionally active in regulating JNK activity and induced JNK phosphorylation contributes positively to VSMC apoptosis. In addition, CREG-UP increased expression of the VSMC differentiation markers SM  $\alpha$ -actin and SM-MHC, and reduced cell-associated fibronectin in cultured VSMCs. These results demonstrate for the first time that CREG plays a key role in modulating VSMC apoptosis by p38/JNK signaling transduction pathway *in vitro*. Accordingly, CREG might have potential applicational perspective in attenuating the progression of atherosclerotic plaques and restenosis after percutaneous coronary intervention.

**Key words** cellular repressor of E1A-stimulated genes (CREG), E1A, vascular smooth muscle cells, apoptosis, signaling pathway

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2009.00448

\*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30770793, 30800465).

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

Received: July 23, 2009 Accepted: October 15, 2009