血管平滑肌细胞的分化与血管内壁的构建

赫荣乔 (中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)的发育与血管壁的构建是目前相关领域中的重要学科前沿。国内外同行的工作多集中在血管发育初始阶段内皮细胞及其前体细胞在血管新生中的作用、调节因素及生物学机制。VSMCs参与血管壁早期构建,特别是VSMCs的募集与分化机制已经成为血管新生研究中的一个新领域。

本期发表的《抑制Rac1蛋白活化阻碍胚胎发育早期血管新生》(见696~701页)报道了韩雅玲教授及其合作者在这一领域取得的最新研究成果。Rac1是真核细胞内重要的一类信号传递分子,在细胞信号传递过程中发挥分子开关作用。他们采用胚胎干细胞(ESCs)为模型,建立稳定表达持续型Rac1和显性失活型Rac1编码序列的小鼠ESCs并制备胚胎小体,诱导分化后观察其对内皮细胞分化和迁移的影响,发现抑制Rac1可以干扰血管内皮细胞连接成血管网状结构,细胞骨架F-actin排列紊乱,细胞的迁移受到明显抑制,表明Rac1在胚胎早期血管发育过程中与内皮细胞的迁移有关^[1]。

近年来,韩雅玲教授及其研究集体在VSMCs发育与血管构建、胚胎干细胞来源的拟胚体血管平滑肌发育与血管新生机制以及胚胎主动脉VSMCs起源等方面开展了研究,取得了一系列有价值的成果^[2~11],可能为闭塞性和增生性血管病的发生及防治提供理论依据和候选基因。详见“相关链接”。

参 考 文 献

- Zhang J, Han Y L, Kang J, *et al.* Inhibition of Rac1 activity hinders vasculogenesis during early embryonic development. *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(6): 696~701 (引自:生物化学与生物物理进展)
- Han Y L, Kang J, Zhang J, *et al.* Expression of smooth muscle-specific molecules and phenotypic changes in HITASY cells by serum withdrawal. *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30**(6): 868~873 (引自:生物化学与生物物理进展)
- Han Y L, Yan C H, Liu H W, *et al.* Overexpression of the cellular repressor of E1A-stimulated-genes regulate the rat primary VSMCs differentiation *in vitro*. *Prog Biochem Biophys*, 2004, **31**(12): 1099~1105 (引自:生物化学与生物物理进展)
- Ge J, Han Y, Jiang H, *et al.* A prospective randomized prospective antiplatelet trial of cilostazol versus ticlopidine in patients undergoing coronary stenting. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2005, **46**(2): 162~166
- Han Y L, Hu Y, Liu H W, *et al.* The cellular repressor of E1A-stimulated genes induces differentiation and migration of human vascular smooth muscle cells. *Prog Biochem Biophys*, 2005, **32**(6): 517~522 (引自:生物化学与生物物理进展)
- Han Y L, Xu K, Kang J, *et al.* Establishment of clones of SM22 α -EGFP expressing embryonic stem cells and *in vitro* dynamic tracing of smooth muscle cells development. *Prog Biochem Biophys*, 2006, **33**(4): 343~349 (引自:生物化学与生物物理进展)
- Han Y L, Xu H M, Yan C H, *et al.* The cellular repressor of E1A-stimulated genes promotes human VSMCs differentiation *in vitro* mediated by RhoA and SRF. *Prog Biochem Biophys*, 2006, **33**(5): 438~445 (引自:生物化学与生物物理进展)
- Han Y L, Zhao X, Yan C H, *et al.* Transcriptional factor E2F1 inhibits expression of the cellular repressor of E1A-stimulated genes and regulates VSMCs differentiation *in vitro*. *Prog Biochem Biophys*, 2007, **34**(5): 490~496 (引自:生物化学与生物物理进展)
- 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
- Han Y, Wang S, Jing Q, *et al.* Comparison of long-term efficacy of the paclitaxel-eluting stent versus the bare-metal stent for treatment of unprotected left main coronary artery. *Am J Cardiol*, 2009, **103**(2): 194~198

相关链接 >>

韩雅玲教授与血管新生研究

韩雅玲, 1994年获第二军医大学医学博士学位, 现任沈阳军区总医院副院长兼全军心血管病研究所所长、心血管内科主任。美国心脏学院(FACC)、美国心血管造影与介入协会(FSCAI)、亚太介入心脏病协会(FAPSIC)高级会员, 中国医师协会心血管内科医师分会副会长、中华医学会心血管病分会常委、全军心血管内科专业委员会主任委员及《中华心血管病杂志》、《中华医学杂志》等专业期刊副主编或编委。1996年当选全国中青年医学科技之星, 同年入选首批国家百千万人才工程, 2008年获中国医师奖, 2009年获首届五洲女医师临床医学科研创新奖。

韩雅玲教授长期从事心血管临床与基础研究工作, 在心血管发育研究、血管增生和再狭窄防治研究的某些领域做出创造性工作。以第一作者或通讯作者发表论文200余篇, 其中SCI收录31篇。主编、参编出版专著43部, 作为第一完成人获国家科技进步二等奖1项, 其他省部级及军队二等以上科技奖励5项。

主要研究工作及学术成就

1 胚胎干细胞来源的拟胚体血管平滑肌 (VSMCs) 发育研究. ① 胚胎干细胞来源的拟胚体(embryoid bodies, EBs) VSMCs 模型的建立. 目前血管发育生物学基础研究多集中于血管发育初始阶段血管内皮细胞或其前体细胞在血管新生中的作用、调节因素及分子生物学机制, 但对于 VSMCs 参与血管发育早期血管壁构建的过程及其机理研究不多, 其中 VSMCs 的募集和分化机制研究更是血管发育早期研究的薄弱环节, 这是血管新生研究中的一个新领域. 鉴于 EBs 能够模拟血管发生、血管新生的血管发育过程, 较好地再现胚胎干细胞向血管组织自然分化过程, 易于进行基因操作, 韩等在国家自然科学基金项目“胚胎早期 VSMCs 募集和分化研究”的支持下, 成功地构建了含有 SM22 α 启动子序列和增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 编码序列的质粒, 建立了平滑肌特异性蛋白 SM22 α 启动子控制下稳定表达 EGFP 的胚胎干细胞株, 并观察到 VSMCs 的发育特点: 起源于 SM22 α -EGFP 胚胎干细胞形成的 EBs 在第 11 天开启 SM22 α 并表达 EGFP, 随后 VSMCs 增殖逐渐增多; EBs 分化中 VSMCs 形态可分为纺锤形及上皮样的多角形, 卡巴可能诱导前者收缩. ② 生长因子在血管 VSMCs 募集及分化中的作用机制研究. 以琼脂糖凝胶小室作为 EB-VSMC 趋化模型, 用慢速视频显微摄像技术观察 EBs 分化后表达 EGFP-VSMCs 定向迁移的变化规律, 分析比较了不同生长因子对 VSMCs 分化和移行的影响, 证实外源性 PDGF-BB 能诱导 EBs 分化来源的 VSMCs 定向迁移, 而 VEGF 对此过程无明显影响. 这些研究揭示了血管发育早期 VSMCs 的募集和分化规律, 为进一步阐明血管成熟、血管重塑及动脉生成机制奠定了基础.

2 胚胎干细胞来源的 EBs 血管新生机制研究. ① Rac1 调控 EBs 分化形成新生血管. 利用 Rac1 持续活化状态 Rac1G12V 及主导抑制状态 Rac1T17N 的编码序列质粒, 通过电穿孔的方法转染胚胎干细胞, 经 G418 筛选后得到稳定表达两种基因调控型的胚胎干细胞. EBs 分化研究发现: 转染 Rac1G12V 质粒的胚胎干细胞可以发育成结构致密的 EBs, 第 7~9 天分化形成三胚层结构, 囊腔细胞凋亡发生较晚, 并可见血管网结构形成, 而转染 Rac1T17N 质粒的 EBs 结构疏松, 难以分化形成完整的三胚层结构, 细胞凋亡发生较早, 无血管网结构形成. 这些研究工作初步提示, Rac1 通过参与胚层分化、囊腔形成、细胞与基质相互作用、细胞游走等过程, 调控血管发育进程. ② TGF- β 1 在血管新生中的作用机制研究. 应用 Gate-way LR 重组技术构建 TGF- β 1 siRNA 载体. 将 GFP 标记的 TGF- β 1 siRNA 表达载体分别转染 3T3 细胞和胚胎干细胞, 经 G418 筛选 GFP 表达阳性的细胞克隆, RT-PCR 和 Western blot 分别从转录水平和蛋白质水平验证干扰载体的沉默效率. 研究证实, TGF- β 1 表达抑制的胚胎干细胞的游走功能丧失, 不能分化

为三胚层结构 EBs 从而无血管网结构形成, 提示 TGF- β 1 不仅是 VSMCs 募集分化的重要调控因子, 而且在胚胎发育极早期的三胚层发育中起重要调控作用, 其表达抑制导致 EBs 和胚胎早期血管网发育缺陷.

3 小鼠胚胎主动脉 VSMCs 起源的体内研究. 采用体内胚胎背主动脉形成模型, 探讨了中胚层平滑肌细胞、内皮细胞前体的原位分化及其与初级血管形成的时相关系, 观察了不同发育阶段主动脉形成的形态学变化特征, 分析比较了胚胎发育植入前 VEGF 受体 -1(Flk-1)表达及其对囊胚形成的影响. 证实小鼠胚胎发育第 8.5 天外形已基本形成, 在胸腔和腹腔部分均可见左、右背主动脉, 9.5 天胚胎回转变完成. 第 8.5~9.5 天背主动脉 Flk-1 及 CD31 表达阳性, VIII 因子相关抗原和 SM α -actin 表达阴性. 胚胎发育第 10.5 天左右背主动脉于心脏水平融合形成一条背主动脉, 但仍为单层细胞围成的管腔, SM α -actin、Flk-1、CD31、VIII 因子相关抗原表达均阳性. 提示胚胎发育早期 Flk-1、CD31 表达阳性细胞可能是血管内皮细胞和 VSMCs 共同前体细胞. 胚胎发育第 11.5 天后, 背主动脉管壁内层血管内皮细胞表达 Flk-1 和 SM α -actin 阳性细胞的分布和形态随胚胎进一步发育而变化, VSMCs 数量较前期增多, 免疫组化染色提示动脉周围散在的间充质细胞部分分化成 SM α -actin 表达阳性细胞. 胚胎第 13.5 天后, 外膜与周围的结缔组织分界明显, 主动脉管壁周围无 SM α -actin 阳性细胞. 提示血管外膜间充质分化可能参与平滑肌前体细胞的趋化作用. 应用免疫荧光染色及 RT-PCR 对植入前阶段的早期胚胎实施 Flk-1 表达分析, 显示在胚胎 4 细胞期 Flk-1 即开始表达, 8 细胞期达高峰, 随后在桑椹胚期及囊胚期 Flk-1 表达则转为阴性. 上述研究从胚胎发育学研究角度证实胚胎背主动脉 VSMCs 最早起源于背主动脉内皮转分化或与背主动脉内皮享有共同前体, 而后期则来源于周围间充质细胞的募集分化.

4 VSMCs 表型转化机制研究. 韩等首次发现了人 E1A 激活基因阻遏子基因(CREG)在成体 VSMCs 表型转化中的重要生物功能, 即 CREG 过表达促进 VSMCs 向分化表型转化、抑制其增殖及移行. 通过多种动物急性血管损伤模型治疗研究, 首次证实了 CREG 过表达或外源性 CREG 蛋白导入均可明显抑制血管损伤后的内膜增生, 进而提出 CREG 基因可能成为临床心血管病介入术后再狭窄防治的有效候选基因, 具有潜在的临床应用前景. 这一研究成果已发表在 2008 年出版的期刊, *Cardiovascular Research*, 并作为一部分工作成果获得 2008 年国家科技进步二等奖. 目前, 该系列研究项目已连续获得多项国家自然科学基金面上项目资助. 韩等已建立了具有很强实用性的 CREG 腺病毒载体和重组人 CREG 糖蛋白的真核表达、纯化的制备方法, 并已申请国家专利, 为 CREG 基因将来向临床过渡及产业化打下基础.

这些研究工作的完成有可能为临床闭塞性和增生性血管病发生及防治研究提供新的理论依据和候选治疗基因.