

文章编号:1004-7220(2018)03-0240-08

生理性张应变通过增加核骨架蛋白 Emerin 表达 抑制血管平滑肌细胞凋亡

陈小虎, 包 晗, 黄 凯, 鲍 敏, 张 萍, 齐颖新
(上海交通大学 力学生物学研究所, 上海 200240)

摘要:目的 探讨细胞核骨架蛋白 Emerin 及其调控的转录因子在感受张应变力学刺激影响血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 凋亡中的作用。方法 应用 FX-5000T 张应变加载系统, 对体外培养的 VSMCs 施加 5% 幅度、1.25 Hz 频率生理性张应变, 以静止组为对照; 应用 cleaved-caspase3 ELISA 试剂盒检测 VSMCs 凋亡水平, Western blotting 检测 VSMCs 细胞核骨架蛋白 Emerin 蛋白表达水平。静态条件下, RNA 干扰抑制 VSMCs 的 Emerin 表达, Protein/DNA 芯片检测 345 种转录因子活性; 将特异性干扰 Emerin 后活性发生明显变化 (上调或下调超过 2 倍) 的转录因子进行 IPA (Ingenuity Pathway Analysis) 信息学分析, 筛选与凋亡功能相关的转录因子; 染色质免疫共沉淀 (chromatin immunoprecipitation, CHIP) 结合 qPCR 检测特异性干扰 Emerin 对其与两种转录因子 motif 区域结合能力的影响。结果 与静止组相比, 5% 生理性张应变加载 24 h 后, VSMCs 凋亡水平显著降低, 提示生理性张应变对细胞具有保护作用; 5% 张应变作用 6、12 和 24 h 均显著增加 VSMCs 的 Emerin 表达水平。静态条件下 RNA 干扰抑制 Emerin 表达, VSMCs 凋亡水平显著增加, 且 10 种参与细胞凋亡功能调控的转录因子活性显著上调 (2 倍以上), 包括 CREB-BP1、p300、p55、MAX、NRF-1、STAT1、STAT3、TEF1、TR 和 BZP; CHIP-qPCR 结果显示, Emerin 特异性干扰可以显著降低 Emerin 与 STAT 家族的两个成员 STAT1 和 STAT3 的 motif 区域结合能力。结论 生理性张应变可能通过增加核骨架蛋白 Emerin 表达而调控 Emerin 与 STAT1、STAT3 等多种凋亡相关转录因子 motif 区域结合, 进而调控转录因子活性影响 VSMCs 凋亡。探讨张应变力学刺激调控 VSMCs 功能的力学生物学分子机制, 对揭示血管生理稳态维持和血管病理重建的分子机制具有一定意义。

关键词: 周期性张应变; 血管平滑肌细胞; 细胞凋亡; 细胞核骨架

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2018.03.009

Physiological Cyclic Stretch Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Apoptosis via Inducing Expression of Nuclear Envelope Protein Emerin

CHEN Xiaohu, BAO Han, HUANG Kai, BAO Min, ZHANG Ping, QI Yingxin

(Institute of Mechanobiology and Medical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanical response of Emerin, a nuclear envelope protein, and its role in apoptosis of vascular smooth muscle cells (VSMCs) during cyclic stretch, and the potential effect of transcriptional factors in this process. **Methods** Physiological cyclic stretch with the magnitude of 5% and frequency of 1.25 Hz was subjected to VSMCs *in vitro* by using FX-5000T cyclic stretch loading system. VSMCs cultured under

收稿日期:2017-05-31; 修回日期:2017-07-22

基金项目:国家自然科学基金项目(11572199, 10972178)

通信作者:齐颖新,教授,E-mail: qiyx@sjtu.edu.cn

the same conditions but without applying mechanical stretch were used as the static control. The apoptosis of VSMCs was detected by using Cleaved-caspase3 ELISA kit, and the expression of Emerin was revealed by using Western blotting. The effects of Emerin on activities of 345 kinds of transcriptional factors in VSMCs were demonstrated with Protein/DNA array after Emerin specific RNA interference (RNAi) under static condition, and the potential transcriptional factors involved in VSMC apoptosis were analyzed with Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software. Furthermore, the binding abilities of Emerin to the motif of 2 kinds of apoptosis-related transcriptional factors were detected with chromatin immunoprecipitation (CHIP) and qPCR. **Results** Compared with the static control, the apoptosis of VSMCs was significantly decreased by 5% cyclic stretch, which suggested a protective effect of physiological cyclic stretch. The expressions of Emerin in VSMCs was remarkably increased with 5% cyclic stretch applied for 6 h, 12 h and 24 h. Specific RNAi under static condition decreased the expressions of Emerin but increased the apoptosis of VSMCs. Emerin siRNA transfection remarkably increased (more than 2 times) the activities of 10 transcriptional factors that participated in cellular apoptosis, i. e. CREB-BP1, p300, p55, MAX, NRF-1, STAT1, STAT3, TEF1, TR and BZP. CHIP-qPCR result revealed that the binding ability of Emerin to specific motif of STAT1 or STAT3 was significantly repressed with Emerin RNAi. **Conclusions** Physiological cyclic stretch could increase the expression of Emerin which might modulate the binding of Emerin to motifs of apoptosis-related transcriptional factors such as STAT1 and STAT3, regulate the activities of these factors, and then subsequently repress the VSMC apoptosis. The investigation on mechanobiological mechanisms of VSMC apoptosis induced by cyclic stretch may contribute to further understanding the physiological and pathological mechanisms of vascular homeostasis and vascular remodeling.

Key words: cyclic stretch; vascular smooth muscle cells (VSMCs); cell apoptosis; nuclear envelope protein

血管生理性稳态在维持机体正常生理过程中具有重要意义,其中血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)的迁移、分化、增殖、凋亡等功能稳定在维持血管生理稳态中起到重要作用。研究表明,体内条件下位于血管中膜的 VSMCs 主要承载由脉动血压引起的周向张应变力学刺激,且该种力学刺激在维持血管生理稳态和高血压病理重建过程中均起到重要作用^[1-2]。深入研究这一问题,对了解心血管生理活动的本质、揭示高血压等心血管疾病发生、发展的病理机制以及疾病的临床防治均具有重要的理论和实际意义。

大量研究显示,VSMCs 的细胞膜表面存在多种机械应力感受器,如整合素-局部黏着斑激酶复合体、血小板内皮细胞黏附分子 1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM1)^[3]、骨形态发生蛋白受体 (bone morphogenetic protein receptor, BMPR) 异源二聚体^[4]以及多种离子通道^[5-6]等。上述应力感受器感受应力(应变)刺激后引起自身磷酸化或构型变化,将细胞外的机械刺激信号转化为细胞内的生物化学信号,进而通过细胞内多种信号通路将机械信号传递入细胞核调控基因转录,并最

终诱导 VSMCs 分化、增殖、凋亡及迁移等生物学功能变化。然而,应力(应变)刺激的细胞内信号转导是一个复杂的过程,除现有研究已关注的位于细胞膜表面的机械应力感受器外,细胞核作为细胞内硬度最高和基因转录发生的亚细胞结构,近年来成为新型机械应力感受器研究领域的热点之一。

研究表明,细胞骨架-核/细胞骨架连接复合体-细胞核骨架结构能够直接将细胞外的应力刺激传递至细胞核,引起细胞核变形^[7]。细胞核骨架是位于细胞核的蛋白纤维网架体系。Guilluy 等^[8]研究结果显示,对游离细胞核直接施加应力刺激引起的细胞核形态变化,能够调控细胞核骨架蛋白 Emerin 和 LaminA 表达(降解)、分布和磷酸化;而 Emerin 和 LaminA 磷酸化水平变化,对于调控细胞核内染色质空间分布和基因转录具有重要作用。上述研究提示,细胞核骨架蛋白可能作为重要的细胞内应力感受器,直接感受应力(应变)力学刺激,进而调控基因转录。然而,核骨架蛋白在血管稳态维持中的分子机制目前仍未阐明。

本课题组前期基于蛋白质组学的研究结果提示,Emerin 和 LaminA/C 是非常重要的力学敏感因

子,能够与染色质 DNA 结合参与病理性升高的张应变调控的血管细胞功能,并在高血压血管重建过程中起到重要作用^[9-10]。现有研究发现,LaminA 对染色质 DNA 的作用是通过 Emerin 实现的,提示 Emerin 可能在细胞核骨架蛋白应力感知过程中起到更为核心的作用。然而生理水平应力(应变)力学刺激是否通过调控 Emerin 影响 VSMCs 凋亡功能,目前尚不清楚。

本文使用 FX-5000T 周期性张应变加载系统对 VSMCs 进行体外张应变加载实验,加载幅度为 0% (静态对照组)、5% (模拟正常生理状态下 VSMCs 受到的张应变)^[11],研究周期性张应变加载不同时间对细胞核骨架蛋白 Emerin 表达的影响;应用 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 特异性抑制 Emerin 表达,并检测 VSMCs 的凋亡功能;为研究 Emerin 调控 VSMCs 凋亡的分子机制,通过 protein/DNA 芯片寻找 VSMCs 内与 Emerin 表达变化相关的转录因子,并通过生物信息学分析软件 Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 探讨变化的 Emerin 参与的与细胞凋亡功能相关的转录因子,最后应用染色质免疫共沉淀 (chromatin immunoprecipitation, CHIP) 结合 qPCR 分析其可能调控机制。本文研究结果为深入理解生理水平周期性张应变在血管稳态维持中的作用以及细胞核骨架蛋白在其中的分子机制提供了新的实验依据。

1 材料和方法

1.1 大鼠 VSMCs 原代培养

采用组织块贴壁法培养原代大鼠胸主动脉 VSMCs^[9]。雄性 SD 大鼠 (180 ± 20) g, 无菌环境下取出胸主动脉,剪刀剪成 1 mm³ 组织块,加入少量 VSMCs 培养液 [DMEM (Gibco 公司), 10% 胎牛血清 (Gibco 公司), 青链霉素 (BBI 公司)]。37 °C、5% CO₂ 培养箱中倒置培养 6 h, 轻轻翻转培养瓶继续正置培养。用 smooth muscle specific α -actin 抗体 (1:200, Sigma 公司) 对 VSMCs 进行细胞免疫荧光鉴定,阳性率 > 95% 用于后续实验。

1.2 VSMCs 周期性张应变加载

第 4~7 代 VSMCs 按照 2×10^5 /孔的密度种植于 Flexercell 6 孔细胞培养板 (BioFlex 公司) 中。次日加入 DMEM 基础培养基同步化 24 h, 之后依据人

体大动脉和中动脉周向张应变的临床数据^[11], 应用 FX-5000T 细胞应变加载系统对 VSMCs 施加幅度为 5% 张应变,模拟体内生理条件下 VSMCs 受到的周向张应变量学刺激,加载时间为 6、12、24 h, 频率均为 1.25 Hz。以不受力的静止组作为对照。

1.3 蛋白免疫印记实验 (Western blotting)

10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,电泳完毕后将蛋白转印到硝酸纤维素膜。5% 脱脂奶粉 TBST 溶液中封闭 1 h; 抗 Emerin (Abcam 公司, 1:500), GAPDH (Proteintech 公司, 1:1 000), 4 °C 孵育过夜; 碱性磷酸酶标记二抗 (Jackson ImmunoResearch 公司, 1:1 000) 室温孵育 2 h; NBT/BCIP (KPL 公司) 底物显色。扫描后使用一维分析软件 Quantity One (BIO-RAD 公司) 进行图像灰度分析。

1.4 细胞凋亡检测

用预冷的 PBS 洗细胞 2 次,每孔加入 200 μ L 裂解液,静置 5 min 充分裂解细胞,用细胞刮轻轻刮培养板底部,移至 EP 管离心,14 000 r/min 离心 10 min。Cleaved caspase-3 ELISA 试剂盒 (Cell Signaling Technology 公司) 检测 VSMCs 凋亡。酶标仪设置参数为单波长,450 nm 检测吸光度值。

1.5 RNA 干扰实验

第 4~7 代 VSMCs 按照 2×10^5 /孔的密度种植于 6 孔细胞培养板。次日取 250 μ L opti-MEM 加入 100 nmol 小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA); 另取 250 μ L opti-MEM 加入 5 μ L LipofectamineTM 2000; 6 孔板内每孔预留 500 μ L DMEM, 加入 500 μ L siRNA 和 LipofectamineTM 2000 混合液,37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱培养 8 h, 每孔补加 1 mL 含 10% 胎牛血清的 VSMCs 培养液,继续培养至 48 h。Emerin 特异性 siRNA 序列: 5'-CUAC CUUU CUGC UCUU UGUT T-3', 5'-ACAA AGAG CAGA AAGG UAGT T-3'。对照组使用无意义 siRNA, 序列: 5'-UUCU CCGA ACGU GUCA CGUT T-3', 5'-ACGU GACA CGUU CGGA GAAT T-3'。

1.6 Protein/DNA 芯片

RNAi 结束后,用预冷的 PBS 洗细胞 2 次,每 1×10^6 个 VSMCs 加入 500 μ L 含蛋白酶抑制剂的裂解液, nuclear extraction kit (Panomics 公司) 提取细胞核蛋白。由上海康成生物工程有限公司应用 TransSignal Arrays (Panomics 公司) 检测 345 种转录

因子与序列特异性 DNA 的结合能力。用 X 光胶片曝光;通过扫描仪获得 X 光胶片曝光图片。信号强度通过灰度值定量获得原始信号值,经修正后与阳性蛋白进行标准化。通过标准化数值的组间比较得到活性差异的转录因子。

1.7 染色质免疫共沉淀

RNAi 结束后,1% 福尔马林的新鲜培养液室温固定细胞 10 min,预冷的甘氨酸 PBS 洗细胞 2 次,加入 1 mL 的裂解缓冲液用细胞刮收集细胞,4 °C 旋转混合 10 min 后,800 g,4 °C 离心 5 min;超声破碎 DNA 后样品分成 2 份,1 份为对照,保存于 4 °C,另 1 份应用 One-Day Chromatin immunoprecipitation Kit (Millipore 公司)结合 Emerin 抗体(Abcam 公司)沉淀与 Emerin 结合的 DNA 片段。qPCR 反应引物序列见表 1。数据采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行分析。

表 1 qPCR 引物序列

Tab.1 Sequences of the primers

序列	STAT1	STAT3
正引物	5'-GGAG GAAG TTTG	5'-CACC CTGG GAGT
	GCGT CAGT A -3'	GGAG TTAC A-3'
反引物	5'-GCCA TAAG GACC TCTT	5'-CCGA TGCC TCAG
	TGCT C -3'	CAGA TAAA-3'

1.8 统计学分析

实验结果均用均数 ± 标准差表示。采用 *t* 检验比较两组间的差异, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义, $P < 0.01$ 表示差异有高度统计学意义。

2 结果

2.1 生理性张应变抑制 VSMCs 凋亡、增加 Emerin 表达

应用 FX-5000T 细胞张应变加载系统,对体外培养 VSMCs 施加 1.25 Hz、5% 周期性张应变模拟生理状态的张应变力学刺激。1.25 Hz、5% 周期性张应变加载 24 h 后,VSMCs 凋亡水平显著降低[见图 1(a)]。5% 张应变加载 6、12 和 24 h 后,与静止组相比,VSMCs 的 Emerin 表达水平均显著增加[见图 1(b)]。

上述结果提示,生理性张应变抑制的 VSMCs 凋亡,对于血管稳态维持具有保护性作用;生理性张应变上调 VSMCs 的细胞核骨架蛋白 Emerin 表达,提示变化的核骨架蛋白 Emerin 可能参与了张应变调控的 VSMCs 凋亡。

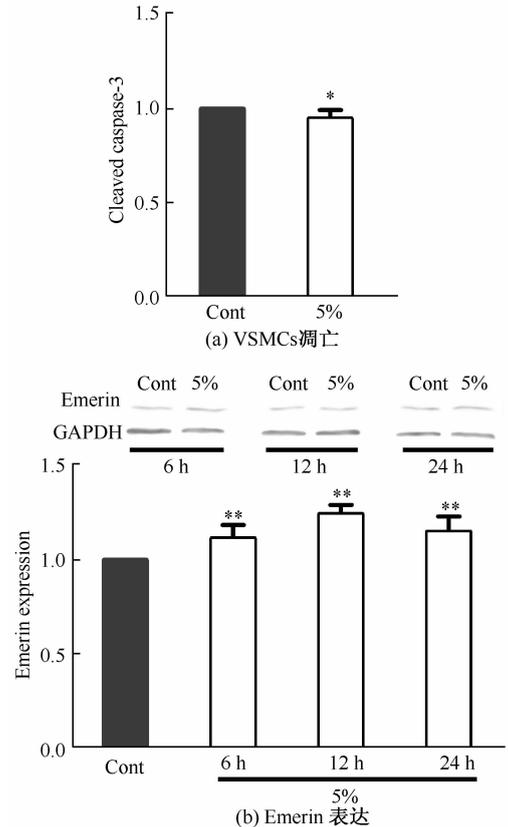


图 1 5% 张应变对 VSMCs 凋亡和 Emerin 表达的影响

(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 5$)

Fig.1 The effect of 5% cyclic stretch on VSMC apoptosis and expression of Emerin in VSMCs (a) VSMC apoptosis, (b) Emerin expression

2.2 RNA 干扰抑制 VSMCs 的 Emerin 表达诱导 VSMCs 的凋亡

为了检测 VSMCs 内细胞核骨架蛋白 Emerin 对细胞凋亡的作用,静态条件下应用 RNAi 特异性抑制 VSMCs 的 Emerin 表达,Cleaved caspase-3 ELISA 检测细胞凋亡。与无意义片段的阴性对照(negative control, NC)相比,特异性 RNAi 能够显著抑制 VSMCs 的 Emerin 表达[见图 2(a)];并且 Emerin 特异性 RNAi 能够显著上调 VSMCs 凋亡水平[见图 2(b)]。

上述结果显示,核骨架蛋白 Emerin 表达水平变化能够反向调控 VSMCs 凋亡,提示生理性张应变可能上调 Emerin 表达抑制 VSMCs 凋亡。

2.3 RNA 干扰抑制 Emerin 表达调控 VSMCs 的多种转录因子活性

研究显示,Emerin 可能与转录因子结合调控其

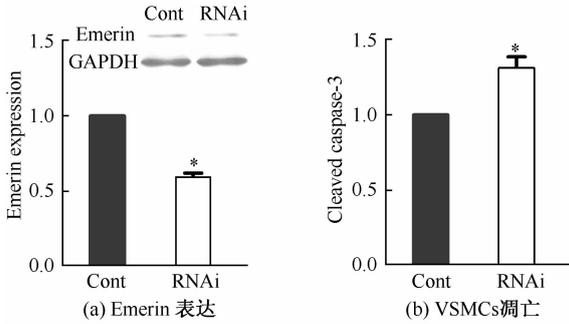


图2 静态条件下特异性 RNAi 对 VSMCs 的 Emerin 表达和 VSMCs 凋亡的影响 (* $P < 0.05, n = 4$)

Fig. 2 The effect of specific RNAi on the expression of Emerin in VSMCs and VSMC apoptosis under static conditions

(a) Emerin expression, (b) VSMC apoptosis

活性^[12],故通过 protein/DNA 芯片寻找 Emerin 表达变化后 VSMCs 内活性发生显著变化的转录因子。静态条件下,特异性 RNAi 抑制 VSMCs 的 Emerin 表达,Protein/DNA 芯片检测 345 种转录因子活性,活性发生明显上调(上调超过 2 倍)的转录因子有 33 种,活性发生显著下调(下调超过 0.5 倍)的转录

表 2 Emerin 特异性 RNAi 后活性显著变化的转录因子

Tab. 2 Transcription factors whose activities were significantly changed by Emerin specific RNAi

上调 2 倍以上 的转录因子	CEF1, HFH-8, PPAR α , AREB6, TR, RREB, TREF1/2, TEF1, ATF/CRE, ICSBP, v-Maf, myc-PRF, RFX1/2/3, BZP, p300, CD28RC, HFH-8, HNF3, LUN, NFIL - 2, CD28RC, NF-IL2B, LR1, NF-Y, HLF, LyF, NRF-1, p55, Stat1, Stat3, MAZ, PRDII-BF1, YB1
下调 0.5 倍以下 的转录因子	HOXD8, Freac-7, CREB-BP1, Myc/Max, SIE, SRY, Smad SBE, DE 1, SPERM1, URE, NF-Atx, SSAP, oct-1, FKHR, Stat5b

2.4 活性显著变化的转录因子参与细胞凋亡功能调控

为深入探讨 Emerin 表达水平变化调控的转录因子在细胞凋亡中的作用,将上述 Emerin 特异性 RNAi 后活性发生显著变化(上调超过 2 倍和下调超过 0.5 倍)的转录因子输入 IPA 生物信息学分析软件,筛选与凋亡功能相关的转录因子。RNAi 抑制 Emerin 表达上调 10 种参与细胞凋亡功能调控的转录因子活性,包括 CREB-BP1、p300、p55、MAX、NRF-1、STAT1、STAT3、TEF1、TR 和 BZP;并且下调两种参与细胞凋亡功能调控的转录因子活性,包括 CREB-BP1 和 STAT5b。IPA 生物信息学分析结果表明,上述转录活性因子与 Emerin 构成了复杂的相互作用网络(见图 4),该网络中分子之间的相互关系在应力调控 VSMCs 凋亡功能中的作用尚需今后

因子有 15 种(见图 3、表 2)。

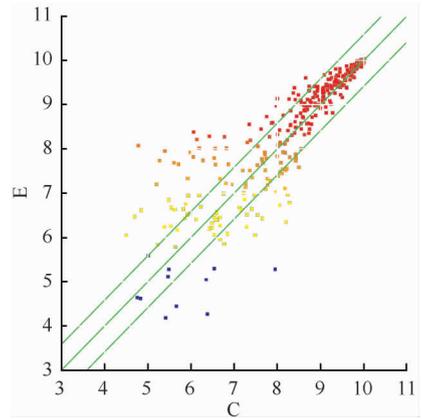


图 3 Emerin 表达变化对 VSMCs 中转录因子活性的影响

Fig. 3 Effect of Emerin expression on transcription factor activity in VSMCs

上述结果表明,细胞核骨架蛋白 Emerin 表达水平发生变化时,VSMCs 内多种转录因子活性发生变化,提示 Emerin 可能通过影响转录因子活性参与细胞凋亡功能调控。

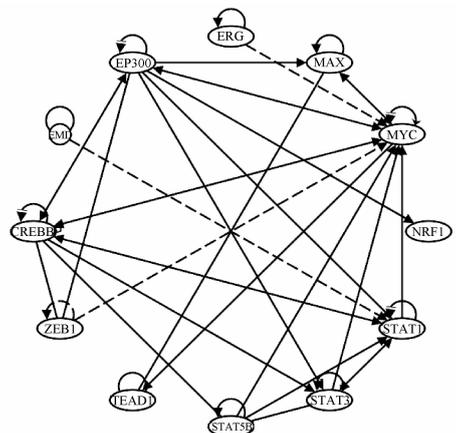


图 4 Emerin 调控的与 VSMCs 凋亡功能相关的转录因子网络

Fig. 4 Network of Emerin regulated-transcription factors involved in the apoptosis of VSMCs

进一步生物学实验加以验证。

上述结果提示,细胞核骨架蛋白 Emerin 可能通过调控复杂转录因子影响 VSMCs 凋亡功能。

2.5 活性显著变化的转录因子参与细胞凋亡功能调控

为深入探讨表达水平变化的 Emerin 调控转录因子活性的可能分子机制,在上述 Protein/DNA 芯片和 IPA 生物信息学分析的基础上,关注 Emerin 与凋亡相关转录因子 motif 区域的结合能力。选择两种凋亡相关转录因子 STAT1 和 STAT3,检测 VSMCs 内 Emerin 表达水平变化是否影响其与 STAT1 和 STAT3 特异性 motif 序列结合能力。CHIP-qPCR 结果显示,静态条件下, RNAi 抑制 Emerin 表达能够后,与 Emerin 共沉淀的 DNA 中 STAT1 和 STAT3 特异性 motif 序列含量明显降低(见图 5)。

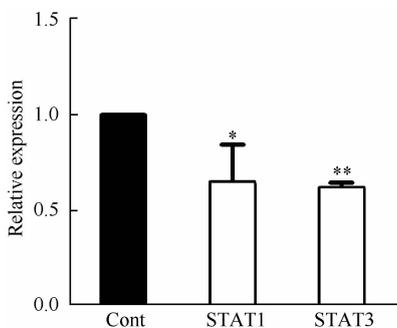


图5 特异性 RNAi 对 Emerin 结合 STAT1 及 STAT3 motif 序列的影响(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 3$)

Fig.5 Effect of specific RNAi on the binding between Emerin and motif of STAT1 or STAT3

上述结果提示,细胞核骨架蛋白 Emerin 表达水平变化能够影响其与 STAT1 以及 STAT3 的 motif 序列结合的能力。

3 讨论

血管发生的周期性的舒张和收缩形变(周向张应变)是作用在血管壁的周向张应力导致的结果^[2]。在正常生理状态下,体内大动脉血管受到的周向张应变幅度约为 5%,然而,在高血压状态下,血管受到的周向张应变可以达到 15% 及以上^[11]。研究表明,位于血管中膜层的 VSMCs 对周向张应变起着非常重要的承载作用,并且 VSMCs 可以响应周向

张应变力学刺激而改变细胞功能,不仅参与血管正常生理稳态的维持,而且还在血管的病理性重建过程中发挥重要作用^[2,13]。

本课题组前期研究表明,VSMCs 受到异常增高张应变作用后,细胞核骨架蛋白 Emerin 表达水平发生明显变化,通过调控细胞增殖参与高血压血管重建^[10],然而 Emerin 的力学响应机制及其在 VSMCs 凋亡功能调控中的作用尚不清楚。因此,本文关注生理水平的周期性张应变对核骨架蛋白 Emerin 表达的影响,以及变化的 Emerin 调控 VSMCs 凋亡功能的可能分子机制。

VSMCs 的凋亡异常在多种血管疾病中起到非常关键的作用。近年的研究表明,VSMCs 凋亡是影响动脉粥样硬化斑块稳定性的重要因素。体外培养 VSMCs 发现,与正常 VSMCs 相比,动脉粥样硬化斑块来源的细胞具有更高的凋亡率^[14]。有研究报道揭示,体外培养的细胞中,氧化修饰低密度脂蛋白(ox-LDL)可以下调 GAPDH 消耗细胞内 ATP,抑制糖酵解,对 VSMCs 的凋亡过程起到非常重要的作用^[15]。在动脉粥样硬化病理过程中,ox-LDL、活性氧(reactiveoxygen species, ROS)、一氧化氮(NO)、机械应力及细胞成分等,都可以诱导 VSMCs 的凋亡^[14-15]。应用 FX-5000T 系统,根据需要调节所需要的周期张应变的加载幅度、时间和频率,能够很好模拟体内条件下 VSMCs 受到的张应变力学刺激。本研究结果表明,5% 周期性张应变力学刺激能够抑制 VSMCs 凋亡,提示生理性张应变可能在血管生理稳态维持中具有重要作用。通过对 VSMCs 加载生理性周期性张应变以及 Emerin 的 RNAi 实验发现,VSMCs 中的 Emerin 表达水平与细胞凋亡水平负相关。

Emerin 广泛存在于很多组织细胞核内,其尾部有一个羧基末端,以此来使其固定在内核膜上,其他部分则暴露在核基质中^[16]。研究表明,Emerin 基因突变与肌营养不良等疾病的联系非常密切^[16]。近年来研究揭示,Emerin 在细胞核的固定和正常功能的维持中起到非常重要的作用。细胞核结构部件如 A 型、B 型核纤层蛋白和肌动蛋白可以与 Emerin 相互作用,故 Emerin 在细胞中的含量或者在细胞核膜上的含量减少,会扰乱 Emerin 与细胞核结构部件的相互作用,从而影响细胞核抵抗机械压

力、维持正常形貌的特性^[17]。在细胞有丝分裂过程中, Emerin 通过磷酸化、分布和位置的周期性变化在核膜的重组过程中起到至关重要的作用^[18]。

除了已知的支持核膜机械完整性的功能外, Emerin 可能在调控基因表达中起重要作用。Emerin 可以与很多蛋白相互作用, 包括核纤层蛋白 Lamin、nesprin-1 α 和 germ cell-less (GCL) 等^[19-20]。尤其 GCL 蛋白位于核膜上, 结合了 GCL 的 Emerin 同时也可以与 DP3 的亚基 E2F-DP 二聚体相互作用, 抑制 E2F-DP-dependent 基因的表达^[21]。Emerin 的下调导致 GCL 在核膜上的位置错乱, 进而使 E2F-DP-dependent 基因的表达增加, 这表明 Emerin 通过 GCL 在转录水平起到非常重要的作用^[22-23]。同样, Bcl-2-associated transcription factor 可以与 Emerin 相互作用, 发挥其抑制转录作用。这些研究提示, Emerin 可能通过抑制转录因子, 负性调节基因表达。在本研究中, 应用 RNAi 抑制 Emerin 表达, 发现 48 种转录因子活性均受到 Emerin 表达水平变化的影响, 其中参与细胞凋亡功能调控的转录因子有 12 种。上述研究提示, Emerin 对于转录因子具有非常重要调控作用, 但是其分子机制目前仍不清楚。

应用 CHIP-qPCR 初步发现, Emerin 表达水平被抑制后, Emerin 与两种转录因子 STAT1 和 STAT3 的 motif 区域结合能力降低。Motif 是染色质 DNA 上转录因子特异性结合的功能域, 其暴露或封闭对于转录因子与 DNA 结合调控基因转录具有非常重要的调控作用。转录因子 STAT1 和 STAT3 都是 STAT 家族一员, STAT 家族可将细胞外的细胞因子、生长因子等多种生物化学信号转导到细胞核内, 从而调控细胞功能^[24]。研究发现, STAT1 可介导 IFNs 诱导的细胞凋亡并抑制生长, 在此通路中, caspases 蛋白表达被 STAT1 激活, 同时 NF-kappaB 表达被 STAT1 下调^[25]。在对多发性骨髓瘤细胞的研究中发现, STAT3 通过诱导 Bcl-2 家族成员 Bcl-xL 的表达水平来发挥抗凋亡作用^[26]。

虽然现有研究提示, 生理性张应变可能通过增加核骨架蛋白 Emerin 表达而调控 Emerin 与 STAT1、STAT3 等多种凋亡相关转录因子 motif 区域结合, 进而调控转录因子活性影响 VSMCs 凋亡, 但仍存在很多亟需解决的问题。首先, 张应变力学刺

激如何调控细胞核骨架蛋白 Emerin 表达; 其次, Emerin 对 motif 序列的结合是否通过竞争性作用调控转录因子活性; 虽然生物信息学分析初步揭示了 Emerin 及其调控的转录因子可能的调控细胞凋亡的网络, 但需要大量分子生物学和细胞生物学实验对其进行后续的验证和分析; 此外, 已有研究提示, STAT1 和 STAT3 在细胞的生长与凋亡中可能介导完全相反的作用, 即激活 STAT1 抑制细胞生长、促进凋亡, 而 STAT3 保护细胞抑制凋亡^[27], 在 Emerin 介导的应力调控 VSMCs 凋亡过程中 STAT1 和 STAT3 的具体作用机制需要今后深入研究。另外, 体内条件下, 位于血管中膜的 VSMCs 与其相邻的血管内皮细胞 (endothelial cells, ECs) 具有重要的交互作用, 周期性张应变力学刺激亦可能调控 VSMCs 与 ECs 细胞间的信息交流, 进而调控血管组织整体结构和功能变化。探究上述问题对于揭示血管生理稳态维持和血管病理重建的分子机制具有重要意义。

参考文献:

- [1] CHIEN S. Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: The wisdom of the cell [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 293(3): H1209-1224.
- [2] LEHOUX S, TEDGUI A. Cellular mechanics and gene expression in blood vessels [J]. *J Biomech*, 2003, 36(5): 631-643.
- [3] TZIMA E, IRANI-TEHRANI M, KIOSSES WB, *et al.* A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress [J]. *Nature*, 2005, 437(7057): 426-431.
- [4] ZHOU J, LEE PL, TSAI CS, *et al.* Force-specific activation of Smad1/5 regulates vascular endothelial cell cycle progression in response to disturbed flow [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(20): 7770-7775.
- [5] THODETI CK, MATTEWS B, RAVI A, *et al.* TRPV4 channels mediate cyclic strain-induced endothelial cell re-orientation through integrin-to-integrin signaling [J]. *Circ Res*, 2009, 104(9): 1123-1130.
- [6] WAN XJ, ZHAO HC, ZHANG P, *et al.* Involvement of BK channel in differentiation of vascular smooth muscle cells induced by mechanical stretch [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014, 59: 21-29.
- [7] RAZAFSKY DS, WARD CL, KOLB T, *et al.* Developmental regulation of linkers of the nucleoskeleton to the cytoskeleton during mouse postnatal retinogenesis [J]. *Nu-*

- cleus, 2013, 4(5): 399-409.
- [8] GUILLUY C, OSBORNE LD, VAN LANDEGHEM L, *et al.* Isolated nuclei adapt to force and reveal a mechanotransduction pathway in the nucleus [J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(4): 376-381.
- [9] QI YX, JIANG J, JIANG XH, *et al.* PDGF-BB and TGF- β 1 on cross-talk between endothelial and smooth muscle cells in vascular remodeling induced by low shear stress [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(5): 1908-1913.
- [10] QI YX, YAO QP, HUANG K, *et al.* Nuclear envelope proteins modulate proliferation of vascular smooth muscle cells during cyclic stretch application [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(19): 5293-5298.
- [11] SAFAR ME, PERONNEAU PA, LEVENSON J A, *et al.* Pulsed doppler: Diameter, blood flow velocity and volumic flow of the brachial artery in sustained essential hypertension [J]. *Circulation*, 1981, 63(2): 393-400.
- [12] MEABURN KJ, MISTELI T. Cell biology: Chromosome territories [J]. *Nature*, 2007, 445(7126): 379-781.
- [13] GLAGOV S. Intimal hyperplasia, vascular modeling, and the restenosis problem [J]. *Circulation*, 1994, 89(6): 2888-2891.
- [14] LITTLEW TD, BENNETT MR. Apoptotic cell death in atherosclerosis [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2003, 14(5): 469-475.
- [15] SUKHANOV S, HIGASHI Y, SHAI SY, *et al.* Novel effect of oxidized low-density lipoprotein: Cellular ATP depletion via down regulation of glyceraldehyde-3-phosphated ehydrogenase [J]. *Circ Res*, 2006, 99(2): 191-200.
- [16] NAGANO A, KOGA R, OGAWA M, *et al.* Emerin deficiency at the nuclear membrane in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy [J]. *Nat Genet*, 1996, 12(3): 254-259.
- [17] FAIRLEY EA, KENDRICK-JONES J, ELLIS JA. The emery-dreifuss muscular dystrophy phenotype arises from aberrant targeting and binding of emerin at the inner nuclear membrane [J]. *J Cell Sci*, 1999, 112(Pt 15): 2571-2582.
- [18] ELLIS JA, CRAXTON M, YATES JR, *et al.* Aberrant intracellular targeting and cell cycle-dependent phosphorylation of emerin contribute to the emery-dreifuss muscular dystrophy phenotype [J]. *J Cell Sci*, 1998, 111(Pt 6): 781-792.
- [19] MISLOW JM, HOLASKA JM, KIM MS, *et al.* Nesprin-1alpha self-associates and binds directly to emerin and lamin A *in vitro* [J]. *FEBS Lett*, 2002, 525(1-3): 135-140.
- [20] LEE KK, HARAGUCHI T, LEE RS, *et al.* Distinct functional domains in emerin bind lamin A and DNA-bridging protein BAF [J]. *J Cell Sci*, 2001, 114(Pt 24): 4567-4573.
- [21] NILI E, COJOCARU GS, KALMA Y, *et al.* Nuclear membrane protein LAP2beta mediates transcriptional repression alone and together with its binding partner GCL (germ-cell-less) [J], *J Cell Sci*, 2001, 114(Pt 18): 3297-3307.
- [22] KASOF GM, GOYAL L, WHITE E. A novel death-promoting transcriptional repressor that interacts with Bcl-2-related proteins [J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(6): 4390-4404.
- [23] NAGASE T, SEKI N, ISHIKAWA K, *et al.* The coding sequences of 40 new genes (KIAA0161-KIAA0200) deduced by analysis of cDNA clones from human cell line KG-1 [J]. *DNA Res*, 1996, 3(1): 17-24.
- [24] DARNELL JE, KERR IM, STARK GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins [J]. *Science*, 1994, 264(5164): 1415-1421.
- [25] CHAN C, LI L, MCCALL CE, *et al.* Endotoxin tolerance disrupts chromatin remodeling and NF-kappaB transactivation at the IL-1 beta promoter [J]. *J Immunol*, 2005, 175(1): 461-468.
- [26] SOSA BA, KUTAY U, SCHWARTZ TU. Structural insights into LINC complexes [J]. *Curr Opin in Struct Biol*, 2013, 23(2): 285-291.
- [27] KRAMER OH, HEINZEL T. Phosphorylation-acetylation switch in the regulation of STAT1 signaling [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, 315(1-2): 40-48.