

结蛋白介导的雌激素受体对颅内动脉瘤血管平滑肌细胞表型的调控作用

隋昕¹, 隋天意², 张旭³, 冯旭¹, 王东玉⁴

(1. 锦州医科大学附属第一医院神经外科, 辽宁 锦州 121000; 2. 中国人民解放军总医院研究生院, 北京 100000; 3. 锦州市疾病预防控制中心, 辽宁 锦州 121000; 4. 锦州市中心医院神经内科, 辽宁 锦州 121000)

摘要 目的 探讨颅内动脉瘤组织中结蛋白的表达及其通过雌激素受体(ER)对血管平滑肌细胞(VSMC)表型调控的影响。方法 选取非动脉瘤患者手术区颈外动脉分支(正常动脉血管)和颅内动脉瘤切除标本28例。采用免疫组织化学染色法检测正常动脉血管和颅内动脉瘤中结蛋白的表达情况,采用Western blotting和实时定量PCR检测颅内动脉瘤组织及正常血管中结蛋白和DES mRNA的表达。将VSMC分为control组、shNC组、shDesmin组、pcDNA3.1/NC组、pcDNA3.1/Desmin组和pcDNA3.1/Desmin+3-MA组。shNC组、shDesmin组、pcDNA3.1/NC组、pcDNA3.1/Desmin组分别转染shNC、shDesmin、pcDNA3.1/NC和pcDNA3.1/Desmin质粒,pcDNA3.1/Desmin+3-MA组在转染前加入10 μmol/L 3-MA预处理6 h。采用实时定量PCR和Western blotting检测VSMC中DES mRNA和结蛋白的表达;用CCK-8实验检测沉默DES对VSMC增殖能力的影响;用Transwell实验检测沉默DES对VSMC迁移能力的影响;用Western blotting检测沉默DES对VSMC中ERα/ERβ比例和表型调节相关蛋白表达水平的影响。结果 结蛋白在颅内动脉瘤组织中的阳性表达率低于正常动脉血管($\chi^2=16.601, P<0.001$);与shNC组比较,shDesmin组VSMC中结蛋白表达水平降低($P<0.001$),细胞增殖力增强($P<0.05$),细胞迁移数量增多($P<0.001$),ERα/ERβ比例升高($P<0.001$);与pcDNA3.1/NC组比较,pcDNA3.1/Desmin组VSMC中人平滑肌α肌动蛋白(SM-α-actin)、人平滑肌肌球蛋白重链(SM-MHC)蛋白表达水平升高($P<0.01$),基质金属蛋白酶-3(MMP-3)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)蛋白表达水平下降($P<0.05$)。与pcDNA3.1/Desmin组比较,pcDNA3.1/Desmin+3-MA组VSMC中SM-α-actin、SM-MHC蛋白表达水平下降($P<0.05$),MMP-3、TNF-α蛋白表达水平升高($P<0.05$)。结论 结蛋白在颅内动脉瘤组织中低表达。沉默DES促进VSMC增殖、迁移,进而可能促进VSMC表型调节。

关键词 颅内动脉瘤;结蛋白;血管平滑肌细胞;雌激素;表型调节

中图分类号 R651 文献标志码 A 文章编号 0258-4646(2024)12-1094-06

网络出版地址 <https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20241206.1530.014>

DOI:10.12007/j.issn.0258-4646.2024.12.006

Effect of desmin-mediated estrogen receptors on phenotype regulation of vascular smooth muscle cells in intracranial aneurysms

SUI Xin¹, SUI Tianyi², ZHANG Xu³, FENG Xu¹, WANG Dongyu⁴

(1. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China; 2. People's Liberation Army General Hospital Graduate School, Beijing 100000, China; 3. Jinzhou Center for Disease Control and Prevention, Jinzhou 121000, China; 4. Department of Neurology, Jinzhou Central Hospital, Jinzhou 121000, China)

Abstract Objective To investigate desmin expression in intracranial aneurysm tissue and its mediating effect on the phenotype regulation of vascular smooth muscle cell (VSMC) by estrogen receptor (ER). **Methods** Twenty-eight samples of surgical site specimens including external carotid artery branches and intracranial aneurysm resection were collected from patients with nonarterial aneurysms in clinical practice. Desmin expression in the arterial blood vessels and intracranial aneurysms was detected using immunohistochemical staining (SABC), whereas desmin expression in the intracranial aneurysm tissue and normal blood vessels was detected using real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blotting. The VSMC were divided into control, shNC, shDesmin, pcDNA3.1/NC, pcDNA3.1/Desmin, and pcDNA3.1/Desmin+3-MA groups. The shNC, shDesmin, pcDNA3.1/NC, and pcDNA3.1/Desmin groups were transfected with shNC, shDesmin, pcDNA3.1/NC, or pcDNA3.1/Desmin plasmids, respectively. The pcDNA3.1/Desmin+3-MA group was pretreated with 10 μmol/L 3-MA for 6 hours before transfection was performed. qRT-PCR and Western blotting were used to detect the expression of silenced DES in VSMC. CCK-8 assay was used to detect the effect of silencing DES on the prolifer-

基金项目:辽宁省教育厅科学研究经费项目(KJKZ0812)

作者简介:隋昕(1971-),男,主任医师,硕士。

通信作者:王东玉, E-mail: 1448219167@qq.com

收稿日期:2024-09-29

网络出版时间:2024-12-09 12:14:37

ration ability of VSMC. Transwell cell migration assay was used to detect the effect of silencing *DES* on the migration ability of VSMC. Western blotting was used to detect the effects of *DES* silencing on the ER α /ER β ratio, and phenotype regulatory protein levels in VSMC.

Results Immunohistochemical staining showed that the positive expression rate of desmin in intracranial aneurysms was significantly lower than that in normal arterial blood vessels ($\chi^2 = 16.601, P < 0.001$). Compared with normal vascular tissue, desmin expression in intracranial aneurysm tissue was reduced ($P < 0.001$). Compared with the shNC group, the expression level of desmin in VSMC of the shDesmin group decreased ($P < 0.001$), the cell proliferation was stronger ($P < 0.05$), the number of cell migrations increased ($P < 0.001$), and the ER α /ER β protein expression ratio increased ($P < 0.001$). Compared with the pcDNA3.1/NC group, the expression levels of human smooth muscle α -actin (SM- α -actin) and human smooth muscle myosin heavy chain (SM-MHC) proteins in the VSMC of the pcDNA3.1/Desmin group increased ($P < 0.01$), while the expression levels of matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) proteins decreased ($P < 0.05$). When compared with the pcDNA3.1/Desmin group, the expression levels of SM- α -actin and SM-MHC proteins in the VSMC of the pcDNA3.1/Desmin+3-MA group decreased ($P < 0.05$), while the expression levels of MMP-3 and TNF- α proteins increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Desmin is expressed at low levels in intracranial aneurysm tissues. Silencing *DES* promotes VSMC proliferation and migration, which may, in turn, promote VSMC phenotype regulation.

Keywords intracranial aneurysm; desmin; vascular smooth muscle cell; estrogen; phenotype regulation

颅内动脉瘤 (intracranial aneurysm, IA) 发病隐匿, 是由颅内血管壁变薄、扩张膨起导致的瘤样突起, 患者生存率低且预后差^[1]。IA病理基本发展过程包括动脉壁损伤修复阶段、动脉瘤形成阶段 (未破裂阶段) 和动脉瘤破裂阶段。研究^[2-5]已证实, 血液流变学、内皮损伤、滋养血管栓塞、炎症及血管壁细胞因子紊乱等多种因素与动脉瘤形成有关。血管受损时, 血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 迅速改变, 肌纤维骤减, 收缩功能消失, 细胞器 (如粗面内质网、核糖体、高尔基体等) 增加, 转变为合成型VSMC, 合成细胞外基质的能力增强^[6]。结蛋白是VSMC特征性的中间丝蛋白, 由*DES*基因编码, 分布于VSMC致密体中, 可调节内皮细胞多种蛋白表达, 包括内皮素、内皮型一氧化氮合酶和基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 等, 并参与构建VSMC与周围细胞间联系。雌激素通过保护血管的雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 发挥保护血管的作用, 传统的ER包括位于细胞核内的ER α 和ER β , 通过促分裂原活化的蛋白质激酶、蛋白激酶A等介导一系列快速信号转导, 调控细胞表达。本研究拟检测结蛋白在IA组织中的表达, 并利用shRNA转染VSMC构建结蛋白低表达稳定细胞株, 分析其介导的ER对VSMC表型的调控。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象: 选取2022年10月至2023年12月

锦州医科大学附属第一医院收治的经数字化减影血管显像技术确诊并进行开颅夹闭手术的IA患者28例, 其中男18例, 女10例, 平均年龄 (42.15 \pm 2.89) 岁。另选取因颞叶癫痫切除颞叶皮层动脉血管组织的非同期患者28例作为对照组, 男15例, 女13例, 平均年龄 (39.22 \pm 1.25) 岁。2组患者年龄和性别无统计学差异, 具有可比性。本研究获得锦州医科大学附属第一医院医学研究伦理委员会批准 (KYLL2022355)。所有患者签署知情同意书。

1.1.2 主要试剂: DMEM和胎牛血清购自美国Thermo Fisher Scientific公司; pcDNA3.1/NC、pcDNA3.1/Desmin、shNC、shDesmin购自美国Sigma-Aldrich公司; 免疫组织化学试剂盒和结蛋白抗体购自英国abcam公司; 人平滑肌 α 肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 抗体、人平滑肌肌球蛋白重链 (smooth muscle myosin heavy chain, SM-MHC) 抗体、ER α 、ER β 抗体、MMP-3抗体、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 抗体和GAPDH抗体购自英国abcam公司。实时定量PCR试剂盒购自美国Thermo Fisher Scientific公司。

1.2 方法

1.2.1 IA VSMC分离与鉴定: 将新鲜的IA组织剪至约1 cm \times 1 cm \times 1 cm大小, 用胰酶消化至表面出现白色絮状物。继续剪碎, 置于细胞培养箱中孵育8 h, 加入含10%胎牛血清的DMEM培养液继续培养。至第5天时移除组织, 加入含10%胎牛血清的DMEM培养液。待细胞融合至90%时进行传代。获取第3代

VSMC,在倒置相差显微镜下观察细胞形态,进行α-SMA免疫细胞化学染色,鉴定VSMC。

1.2.2 细胞转染:将VSMC按照 1×10^5 /孔接种于24孔板中,将细胞随机分为对照组、shNC组、shDesmin组、pcDNA3.1/NC组、pcDNA3.1/Desmin组和pcDNA3.1/Desmin+3-MA组。待细胞生长融合至60%,按照Lipofectamine 3000转染试剂说明进行转染。其中shNC组、shDesmin组、pcDNA3.1/NC组、pcDNA3.1/Desmin组和pcDNA3.1/Desmin+3-MA组转染终浓度为50 nmol/L。在转染前6 h进行3-MA预处理。48 h后结束培养,收集各组细胞进行后续实验。

1.2.3 实时定量PCR:采用TRIzol法提取样本总RNA,用反转录试剂盒反转录成cDNA。PCR反应条件为95℃预变性3 min,95℃ 5 s,60℃ 30 s,共40个循环。每孔设置2个复孔,取其平均值。引物序列如下:DES,正向5'-CCTACATTACATGTGCCACT-3',反向5'-GCAATTCATATGGTCTG-3';GAPDH,正向5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3',反向5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGGA-3'。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算DES相对表达量。

1.2.4 CCK-8法检测细胞增殖:常规胰酶消化细胞,加入96孔板中(3×10^3 /孔,100 μL),加入10 μL CCK-8溶液,37℃培养3 h。用酶标仪测量490 nm处吸光度值,实验重复3次。

1.2.5 Transwell实验检测细胞侵袭和迁移:调整转染细胞悬液密度至 1×10^6 /mL。向24孔Transwell小室上室(底部覆盖Matrigel生物胶)中加入细胞悬液100 μL,下室中加入500 μL完全培养基。进行3组平行实验。37℃、5%CO₂条件下培养48 h后取出小室,用无水乙醇固定15 min,用结晶紫固定20 min,倒置显微镜下观察穿过半透膜附着于Transwell小室下层的细胞并拍照。

1.2.6 Western blotting:向新鲜IA和正常动脉血管组织中加入RIPA蛋白裂解液提取总蛋白,按照BCA蛋白定量试剂盒说明书操作测定蛋白浓度。取30 μg总蛋白,经10%SDS-PAGE分离胶电泳分离后,转至PVDF膜,2%BSA室温封闭2 h,分别加入结蛋白抗体(1 : 1 000)、α-SMA抗体(1 : 1 000)、SM-MHC抗体(1 : 1 000)、ERα和ERβ抗体(1 : 1 000)、MMP-3抗体(1 : 1 000)、TNF-α抗体(1 : 1 000)、GAPDH抗体(1 : 2 000),4℃孵育过夜。用TBST洗膜5次,10

min/次。加入二抗(1 : 1 500),室温下孵育1 h,洗膜5次,10 min/次。显影,用方正Z320扫描仪扫描图像,用Image J软件测定条带灰度值。

1.3 统计学分析

采用SPSS 22.0软件进行统计分析。计量数据符合正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 χ^2 检验进行比较。采用单因素方差分析对多组间数据进行比较,采用Tukey检验对组间数据进行两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常动脉血管和IA中结蛋白的表达

免疫组织化学染色结果显示,结蛋白在正常动脉血管中呈弥漫性阳性表达,表达率85.7%(24/28);在IA中局灶性弱表达或不表达(图1),表达率32.1%(9/28),二者比较差异有统计学意义($\chi^2 = 16.601, P < 0.001$)。

实时定量PCR和Western blotting结果(图2)显示,IA中DES mRNA (0.85 ± 0.24)和蛋白(0.15 ± 0.03)表达水平较正常动脉血管中($1.67 \pm 0.36, 0.46 \pm 0.21$)降低,差异有统计学意义($P < 0.001$)。

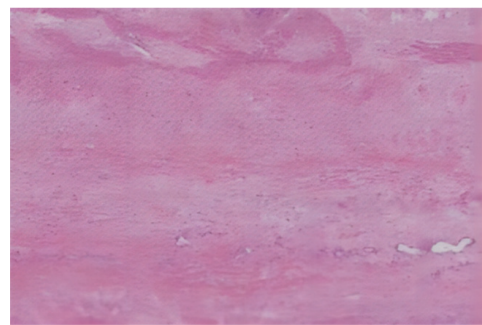


图1 结蛋白在IA中的表达 SABC × 200
Fig.1 Expression of desmin in intracranial aneurysms SABC × 200

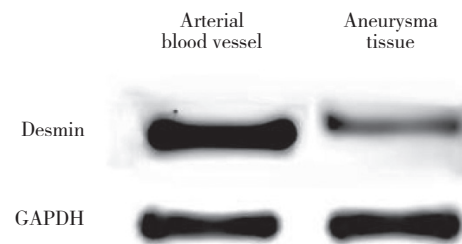


图2 动脉血管及IA组织中结蛋白表达情况
Fig.2 Expression of desmin in arterial blood vessel and intracranial aneurysmal tissue

2.2 VSMC鉴定结果

免疫组织化学染色结果(图3)显示,光镜下可

见细胞质呈深棕黄色,证实细胞 α -SMA抗原表达呈阳性,鉴定细胞为VSMC。

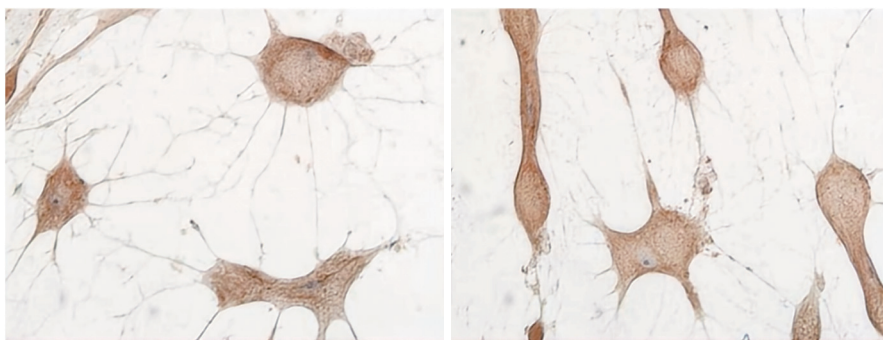


图3 免疫组织化学染色结果 $\times 200$
Fig.3 Immunohistochemical staining results $\times 200$

2.3 沉默DES对VSMC中DES mRNA和结蛋白表达的影响

实时定量PCR结果显示,与shNC组(0.98 ± 0.01)和对照组(0.98 ± 0.02)比较,shDesmin组VSMC中DES mRNA(0.57 ± 0.04)表达降低,差异有统计学意义($P < 0.001$)。Western blotting结果(图4)显示,与shNC组(0.60 ± 0.02)组及对照组(0.59 ± 0.02)比较,shDesmin组VSMC中结蛋白表达水平下调(0.28 ± 0.02),差异有统计学意义($P < 0.001$)。

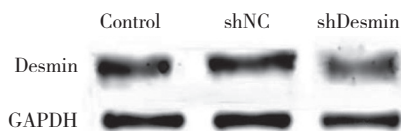


图4 沉默DES后VSMC中结蛋白的表达情况
Fig.4 Expression of desmin protein in VSMC after silencing DES

2.4 沉默DES对VSMC增殖能力的影响

CCK-8实验结果显示,shDesmin组细胞增殖能力(24 h, 1.32 ± 0.04 ; 48 h, 2.65 ± 0.03 ; 72 h, 3.82 ± 0.01)较shNC组(24 h, 0.81 ± 0.02 ; 48 h, 1.27 ± 0.03 ; 72 h, 1.50 ± 0.04)和对照组(24 h, 0.81 ± 0.02 ; 48 h, 1.26 ± 0.02 ; 72 h, 1.49 ± 0.01)增强,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 沉默DES对VSMC迁移能力的影响

Transwell实验结果显示,shDesmin组VSMC迁移细胞数量($8 \times 10^5 \pm 0.15 \times 10^5$)较shNC组($3 \times 10^5 \pm 0.25 \times 10^5$)和对照组($4 \times 10^5 \pm 0.20 \times 10^5$)增加,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

2.6 沉默DES对VSMC中ER α /ER β 的影响

Western blotting结果(图5)显示,shDesmin组VSMC中ER α /ER β (0.61 ± 0.03)较shNC组(0.28 ± 0.02)和对照组(0.27 ± 0.02)升高,差异有统计学意义($P < 0.001$)。



图5 沉默DES对VSMC中ER α /ER β 的影响
Fig.5 Effects of DES silencing on ER α /ER β in VSMC

2.7 沉默DES对VSMC表型调节的影响

Western blotting结果(图6)显示,与pcDNA3.1/NC组比较,pcDNA3.1/Desmin组VSMC中 α -SMA、SM-MHC蛋白表达水平升高($P < 0.01$),MMP-3、TNF- α 蛋白表达水平下调($P < 0.05$)。与pcDNA3.1/Desmin组比较,pcDNA3.1/Desmin+3-MA组VSMC中SM- α -actin、SM-MHC蛋白表达水平下调,MMP-3、TNF- α 蛋白表达水平上调,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

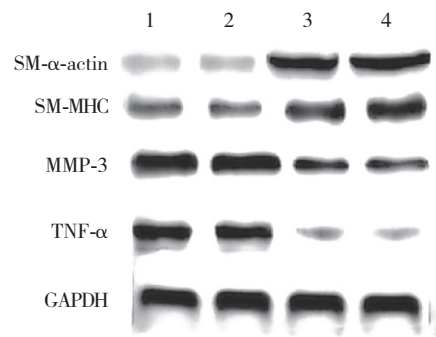
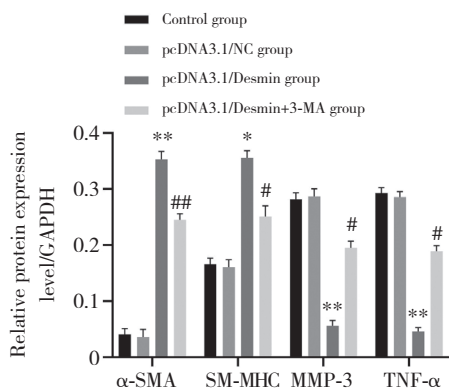
3 讨论

IA是一种较常见的脑血管疾病,破裂致死率约为50%^[7],主要的治疗方法包括手术和血管介入。IA的发病机制尚不明确,目前的研究热点主要集中于IA形成和破裂的相关基因及其作用机制。

研究^[8]显示,沉默小鼠A20基因后,结蛋白的表

达增加,核因子κB途径活性下降。本研究发现,与正常动脉血管组织比较,IA组织结蛋白表达降低,提示结蛋白对维持血管张力具有重要作用。VSMC对维持血压平衡、调节血管张力和血流量功能具有重要作用^[9]。α-SMA是血管平滑肌细胞的重要标志抗原,在VSMC中含量最为丰富。α-SMA在VSMC中的表达呈动态变化,在收缩型VSMC中呈优势表达,而合成表型VSMC中含量甚微。研究^[10]发现,miR-331-3p通过下调TNF-α和CD14抑制IA形成。IA中MMP-2、MMP-9和MMP-13表达水平升高,而组织金属蛋白

酶抑制剂可使其表达降低^[11]。研究^[12]表明,COL1A2基因rs42524的C等位基因对IA的形成有显著影响。研究^[13]发现,IA的MMP-2基因rs243865位点存在C>T的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP),导致MMP-2表达上调。HAGEMAN等^[14]对282例IA的血液样本测序分析发现,MMP-9基因SNP与IA的发生存在相关性。本研究发现,沉默DES后,与pcDNA3.1/NC组比较,pcDNA3.1/Desmin组VSMC中MMP-3蛋白表达水平下调,具体机制尚待进一步研究。



1, control group; 2, pcDNA3.1/NC group; 3, pcDNA3.1/Desmin group; 4, pcDNA3.1/Desmin +3-MA group. ***P* < 0.001, **P* < 0.01 vs. pcDNA3.1 /NC group; ###*P* < 0.01, #*P* < 0.05 vs. pcDNA3.1 /Desmin group.

图6 沉默DES对VSMC表型调节的影响

Fig.6 Effects of DES silencing on phenotypic regulation of VSMC

雌激素是保护血管内皮细胞正常生理功能的重要的类固醇激素,具有促进生长和组织增生的作用^[15]。巴多昔芬(选择性ER调节剂)可降低卵巢切除大鼠的IA破裂率,但其作用靶点尚未明确^[16]。雌激素缺乏可能通过靶向Src家族酪氨酸激酶(tyrosine kinase, FYN)和FYN结合蛋白促进血管壁重塑,促进IA的形成^[17]。另外,雌激素还可通过受体调节分泌不同的一氧化氮合酶,影响平滑肌表型和炎症反应^[18],进而影响IA的形成与破裂^[19]。本研究结果显示,沉默DES后,与shNC组比较,shDesmin组VSMC中ERα及ERβ的表达水平平均升高,ERα/ERβ比例升高,但ER变化是否与VSMC细胞表型变化有关尚需进一步验证。

综上所述,本研究结果表明,结蛋白在IA组织中低表达,沉默DES可促进VSMC增殖、迁移,促进VSMC的表型调节。因此,结蛋白可能成为诊断IA的潜在生物标志物。本研究结果为IA的临床诊断和治

疗提供了新思路。

参考文献:

[1] LI XG, WANG YB. *SRPK1* gene silencing promotes vascular smooth muscle cell proliferation and vascular remodeling via inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway in a rat model of intracranial aneurysms [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2019, 25 (2) : 233-244. DOI: 10.1111/cns.13043.

[2] 郭冉,信瑞强,李凤菊,等. 颅内多发动脉瘤破裂的临床与影像学危险因素分析[J]. *河北医学*, 2024, 30 (6) : 960-964. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6233.2024.06.016.

[3] FRERICH S, COLE JW. Novel polygenic risk score for intracranial aneurysms [J]. *Stroke*, 2023, 54 (3) : 819-820. DOI: 10.1161/STROKEAHA.122.041807.

[4] BACKES D, VERGOUWEN MDI, VELTHUIS BK, et al. Difference in aneurysm characteristics between ruptured and unruptured aneurysms in patients with multiple intracranial aneurysms [J]. *Stroke*, 2014, 45 (5) : 1299-1303. DOI: 10.1161/STROKEAHA.113.004421.

[5] WHITE PW, SAMPSON JB. Training paradigms for vascular trauma [M] // *Rich's vascular trauma*. Amsterdam: Elsevier, 2022: 42-54. DOI: 10.1016/b978-0-323-69766-8.00004-4.