

- diagnostic impressions(Insights from the Canadian GRACE and CAN-RACE) [J]. *Am J Cardiol*, 2013, 111(2): 202 – 207
- 2 Serruys PW, Onumay, Garg S, *et al.* Assessment of the SYNTAX score in the Syntax study[J]. *Euro Intervention*, 2009, 5(1): 50 – 56
- 3 Magro M, Nauta S, Simsek C, *et al.* Value of the SYNTAX score in patients treated by primary percutaneous coronary intervention for acute ST – elevation myocardial infarction: the MI SYNTAX score study [J]. *Am Heart J*, 2011, 161(2): 771 – 781
- 4 Ertan C, Ozeke O, Gul M, *et al.* Association of prediabetes with diffuse coronary narrowing and small – vessel disease [J]. *J Cardiol*, 2014, 63(1): 29 – 34
- 5 Elizabeth S, Michael W, Hong ZS, *et al.* Glycated hemoglobin diabetes, and cardiovascular risk in non – diabetic adults[J]. *N Eng J Med*, 2010, 96(18): 800 – 811
- 6 Acar B, Ozeke O, Karakurt M, *et al.* Association of pre – diabetes with higher coronary atherosclerotic burden among patients with first diagnosed acute coronary syndrome[J]. *Angiology*, 2019, 70(2): 174 – 180
- 7 Bastawesy R, Abdelmoniem A, Abdelkader M, *et al.* The relation between glycated hemoglobin and severity of coronary artery disease in non – diabetic patients with acute coronary syndrome[J]. *Int J Adv Res*, 2016, 4(1): 2393 – 2399
- 8 Libby P. Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(21): 2004 – 2013
- 9 Winter MP, Bless H, Ali A, *et al.* Long – term outcome and risk assessment in premature acute myocardial infarction: a 10 – year follow – up study[J]. *Int J Cardiol*, 2017, 240(1): 37 – 42
- 10 Sianos G, Morel MA, Kappetein AP, *et al.* The SYNTAX Score: an angiographic tool grading the complexity of coronary artery disease [J]. *Euro Intervention*, 2005, 5(1): 219 – 227
- 11 Palmerini T, Genereux P, Caixeta A, *et al.* Prognostic value of the SYNTAX score in patients with acute coronary syndromes undergoing percutaneous coronary intervention: analysis from the ACUITY (Acute Catheterization and Urgent Intervention Triage Strategy) trial[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2011, 57(24): 2389 – 2397
- 12 Luo M, Lim WY, Tan CS, *et al.* Longitudinal trends in HbA1c and associations with comorbidity and all cause mortality in Asian patients with type 2 diabetes: a cohort study[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2017, 133(1): 69 – 77
- 13 She J, Deng Y, Wu Y, *et al.* Hemoglobin A1c is associated with severity of coronary artery stenosis but not with long term clinical outcomes in diabetic and non – diabetic patients with acute myocardial infarction undergoing primary angioplasty [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2017, 16(1): 97 – 105
- 14 Verdoiam, Schaffer A, Barbieril, *et al.* Glycosylated hemoglobin and the risk of periprocedural myocardial infarction in non – diabetic patients[J]. *J Diabetes Complications*, 2015, 29(4): 517 – 522
- 15 Kapil C, Rajasekhar D, Vanjakshamma V, *et al.* Role of CIMT, eGFR, and serum HbA1c in predicting CAD in non – diabetic patients undergoing elective coronary angiography[J]. *World J Cardiovascular Dis*, 2018, 8(1): 1 – 10
- 16 Arbel Y, Zlotnik M, Halkin A, *et al.* Admission glucose, fasting glucose, HbA1c levels and the syntax score in non – diabetic patients undergoing coronary angiography[J]. *Clin Res Cardiol*, 2014, 103(3): 223 – 227
- 17 Sahal N, Farrag A, Ammar W, *et al.* Impact of glycated hemoglobin level on severity of coronary artery disease in non – diabetic patients [J]. *J Cardiol Curr Res*, 2016, 7(4): 258 – 271
- 18 Miyoshit, Hirohata A, Usuis, *et al.* Olmesartan reduces inflammatory biomarkers in patients with stable coronary artery disease undergoing percutaneous coronary intervention: results from the OLIVUS trial [J]. *Heart Vessels*, 2014, 29(2): 178 – 185
- 19 Rains JL, Jain SK. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes [J]. *Free Radi Biol Med*, 2011, 50(5): 567 – 575
- 20 Jung CH, Rhee EJ, Kim KJ, *et al.* Relationship of glycated hemoglobin A1c, coronary artery calcification and insulin resistance in males without diabetes[J]. *Arch Med Res*, 2015, 46(1): 71 – 77

(收稿日期:2020 – 03 – 31)

(修回日期:2020 – 04 – 02)

过表达 NF – κ B 对血管平滑肌细胞增殖与凋亡的影响

魏利超 吴 旻

摘 要 目的 为了明确过表达 NF – κ B 对血管平滑肌细胞增殖和凋亡中的作用。**方法** 将血管平滑肌细胞 HA – VSMC 分为正常对照组、NF – κ B 过表达组和空载组。通过构建 NF – κ B 过表达载体,转染 HA – VSMC 细胞后,通过 MTT 检测各组 HA – VSMC 细胞的增殖情况,流式细胞仪检测 HA – VSMC 细胞凋亡情况,WB 检测各组 HA – VSMC 细胞 NF – κ B 相对表达情况。**结果** 通过酶切验证证明 NF – κ B 过表达载体构建正确;成功转染 HA – VSMC 细胞后,MTT 检测结果显示 NF – κ B 被激活

基金项目:江苏省镇江市社会发展项目(SH2018055)

作者单位:212000 镇江,江苏大学医学院(魏利超);214400 江阴市人民医院神经外科(吴旻)

通讯作者:吴旻,电子信箱:wumin650822@sina.com

可以抑制 HA - VSMC 细胞增殖;流式检测细胞凋亡结果也证实 NF - κ B 激活可以促进细胞凋亡。结论 NF - κ B 表达升高会抑制血管平滑肌细胞的增殖并促进血管平滑肌细胞的凋亡。

关键词 NF - κ B HA - VSMC 细胞增殖 细胞凋亡

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.08.031

Effect of Overexpression of NF - κ B on Proliferation and Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells. Wei Lichao, Wu Min. School of medicine, Jiangsu university, Jiangsu 212000, China

Abstract Objective To clarify the role of overexpression of NF - κ B in the proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cells. **Methods** The vascular smooth muscle cell HA - VSMC was divided into normal control group, NF - κ B overexpression group and empty group. After NF - κ B overexpression vector was constructed and transfected into HA - VSMC cells, proliferation of HA - VSMC cells in each group was detected by MTT. Apoptosis of HA - VSMC cells was detected by flow cytometry and NF - κ B expression of HA - VSMC cells was detected by WB. **Results** The NF - κ B overexpression vector was constructed correctly by restriction enzyme digestion. After successful transfection into HA - VSMC cells, flow cytometry results also confirmed that NF - κ B activation promotes apoptosis. MTT assay showed that NF - κ B activation could inhibit HA - VSMC cell proliferation. **Conclusion** Overexpression of NF - κ B can inhibit the proliferation of vascular smooth muscle cells and promote the apoptosis of vascular smooth muscle cells.

Key words NF - κ B; HA - VSMC; Cell proliferation; Cell apoptosis

血管平滑肌细胞(VSMCs)是正常血管壁结构的主要细胞成分,它能够通过协调血管的舒张和收缩功能而维持血管的张力和弹性,从而在调节血流量和血压的过程中发挥作用;心血管疾病的发生、发展与血管平滑肌细胞的功能改变密切相关^[1]。血管壁的形态和结构并不是固定的,而血管壁重塑的重要细胞基础是VSMCs,当血管接受到生物信号或化学刺激时,VSMCs通过分泌的细胞外基质(ECM)维持基本的血管功能^[2]。VSMCs表型的转化主要导致其结构和功能的改变,这种结构和功能的改变在动脉粥样硬化症、高血压和血管成型术后再狭窄等大多数心血管系统疾病的发展过程中发挥了关键的作用^[3]。

核因子KappaB(NF - κ B)是一种在真核生物细胞内普遍表达的转录因子,最初被发现时是一种可以与免疫球蛋白 κ 轻链基因的 κ 增强子结核的B细胞核蛋白。NF - κ B含有一个由300个氨基酸构成的高度保守的N - 末端区域,称为Rel - 同源结构域(RHD)^[4]。通过该结构域,不同的NF - κ B成员可以相互作用形成各种同源或者异源二聚体并与靶基因的启动子或增强子区域中的 κ B序列元件结合,进而参与对靶基因的调节^[5]。研究表明,NF - κ B被激活后,即通过信号转导途径启动一系列联式翻译,可以促进多种细胞因子、黏附因子、化学因子和生长因子等的表达^[6-9]。本研究通过上调NF - κ B来研究其对血管平滑肌细胞增殖和凋亡的影响,为治疗动脉粥样硬化、血管成形术后在狭窄和其他血管增殖性病变提供新思路。

材料与方法

1. 材料:人主动脉平滑肌细胞 HA - VSMC 购自

中国科学院细胞库;质粒小提试剂盒和普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自天根生物公司;Opti - MEM[®]和 DMEM 购自美国 Gibco 公司;L - 谷氨酰胺购自中国 Solarbio 公司;超敏发光液购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;MTT 细胞增殖试剂盒购自凯基生物;Lipofectamine[®] 3000 购自美国 Invitrogen 公司;鼠单克隆抗体 GAPDH 购自中杉金桥公司;兔单克隆抗体 NF - κ B p65 购自英国 Abcam 公司;NovoCyte[™] 流式细胞仪 NovoCyte 2060R 购自艾森生物(杭州)有限公司;蛋白垂直电泳仪购自美国 Bio - Rad 公司;超高灵敏度化学发光成像系统购自伯乐生命医学产品(上海)有限公司。

2. 载体构建:NCBI 查找 NF - κ B 基因的 CDS 序列,引入酶切位点(BstBI/BamHI)送通用生物合成 cds 区基因片段(克隆至 pLVXpuro 载体)。质粒 NF - κ B - pLVXpuro 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,在含有氨苄青霉素的 LB 平板上培养过夜,抽提质粒并酶切验证。

3. 实验分组:载体转染 HA - VSMC 细胞实验分为 3 组,即对照组、空载组和 NF - κ B 过表达组。接种细胞至 80% 汇合度时转染,前一天接种或换液,取出质粒,使用 Opti - MEM[®] 培养基稀释,制备质粒 DNA 预混液,充分混匀。避光室温孵育 5min。使用 Opti - MEM[®] 培养基稀释 Lipofectamine[®] 3000 试剂 - 充分混匀,避光室温孵育 5min。在每管已稀释的 Lipofectamine[®] 3000 试剂中加入稀释的质粒 DNA,室温避光孵育 1h。加入 DNA - 脂质体复合物至细胞中。放入 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养箱孵育细胞。

4. MTT 检测各组细胞的增殖情况:将 HA - VSMC 细胞接种于 96 孔板培养(约 2×10^3 个/孔),置 37°C 5% CO_2 细胞培养箱培养 24h;按照要求在相应的实验分组中加入 NF - κB 抑制剂 IMD - 0354;将 96 孔板在 37°C 5% CO_2 细胞培养箱继续孵育 48h;将 $5 \times \text{MTT}$ 用 Dilution Buffer 稀释成 $1 \times \text{MTT}$;每孔加 $50\mu\text{l}$ $1 \times \text{MTT}$,在 37°C 孵育 4h,使 MTT 还原为甲臌;吸出上清液,每孔加 $150\mu\text{l}$ DMSO 使甲臌溶解,用平板摇床摇匀;酶标仪在 550nm 波长处检测各孔的吸光度。

5. 流式细胞仪检测各组细胞的凋亡情况:将细胞接种于 6 孔板,当细胞汇合度达到 50% ~ 70% 时,按实验分组进行操作,48h 后,离心收集各组细胞,细胞量为 5×10^5 个/组。用双蒸水稀释 $5 \times \text{Binding Buffer}$ 为 $1 \times$ 工作液,取 $500\mu\text{l}$ $1 \times \text{Binding Buffer}$ 重悬细胞。每管加入 $5\mu\text{l}$ Annexin V - FITC 轻柔混匀后加入 $10\mu\text{l}$ PI,缓慢涡旋混匀后于室温下避光孵育 5min。在流式细胞仪上,通过 FITC 检测通道(通常为 FL1)检测 Annexin V - FITC ($\text{Ex} = 488\text{nm}$; $\text{Em} = 530\text{nm}$)和通过 PE 检测通道(通常为 FL2)检测 PI。

6. 蛋白质印迹法检测各组细胞 NF - κB 的表达情况:收集转染 72h 后的各组细胞,用 PBS 洗涤细胞 3 次,加入细胞裂解液,冰上裂解 30min 后, 4°C 下 10000r/min 离心 10min,小心吸取上清,获得各组细胞总蛋白。根据 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。蛋白煮沸变性后上样,再进行十二烷基苯磺酸钠凝胶电泳 1 ~ 2h 后湿法转膜 30 ~ 50min。 4°C 孵育一抗过夜;二抗溶液中室温孵育 1 ~ 2h。最后通过滴加 ECL 曝光液,在凝胶成像系统中曝光。利用 Quantity One 软件进行各抗体条带灰度值的分析。

7. 统计学方法:采用 SPSS 19.0 统计学软件对数据进行统计分析,符合正态分布的计量资料采用样本均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 人主动脉平滑肌细胞的培养:HA - VSMC 培养的细胞的生长状态良好,详见图 1。

2. NF - κB 过表达载体鉴定结果:用 BstBI/Bam-HI 对抽提的质粒 NF - κB - plvxpuro 进行双酶切(图 2),条带与理论值相符,证明质粒 NF - κB - plvxpuro 为正确质粒。

3. NF - κB 过表达载体转染验证:与对照组比

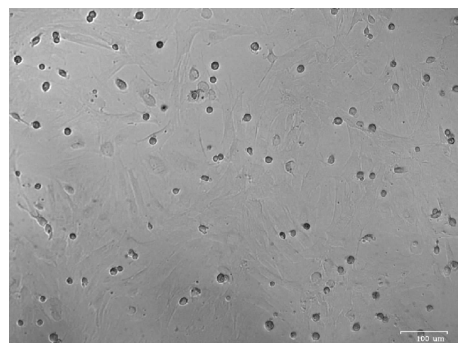


图 1 日常细胞培养显微镜拍照($\times 100$)

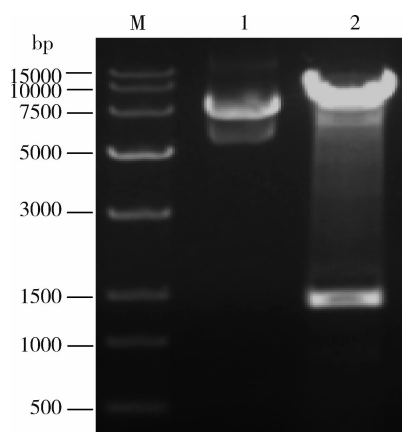


图 2 酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测条带

M. DL15000 maker; 1. NF - κB - plvxpuro 质粒;
2. NF - κB - plvxpuro/BstBI/BamHI

较,NF - κB 过表达组的 NF - κB 的表达明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 3)。

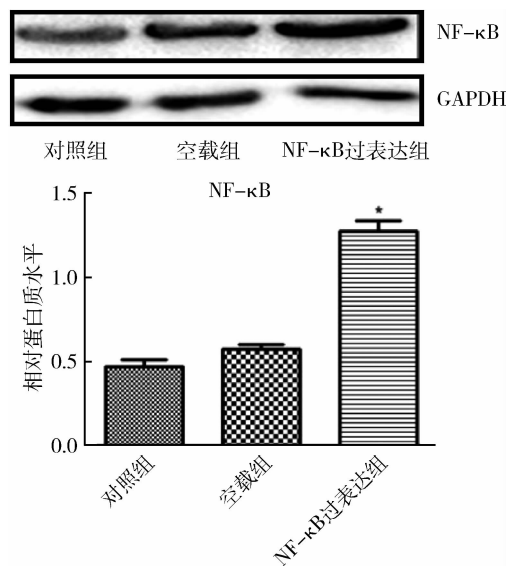


图 3 NF - κB 过表达载体转染验证

与对照组比较,* $P < 0.05$

4. MTT 检测细胞增殖的结果:用 MTT 法检测各组 HA - VSMC 不同时间点的增殖情况,与对照组比

较,NF - κ B 过表达组细胞的增殖率一直处于较低水平,差异有统计学意义($P < 0.05$),详见图 4。

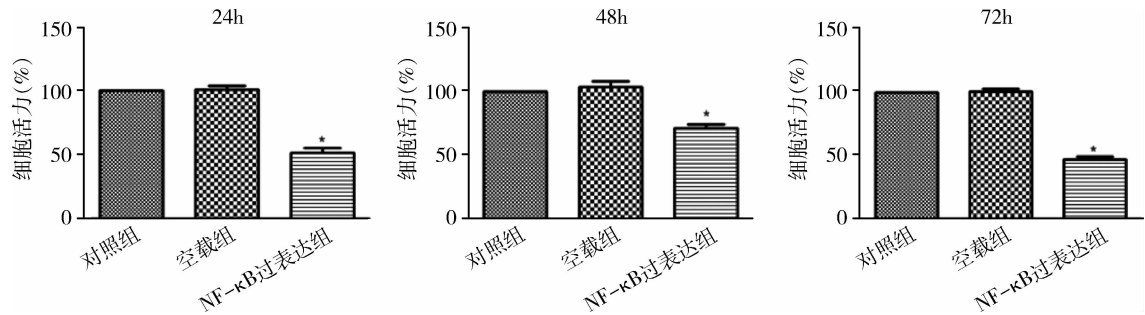


图 4 MTT 检测细胞增殖的结果
与对照组比较, * $P < 0.05$

5. 流式检测细胞凋亡结果:流式细胞仪检测各组 HA - VSMC 细胞的凋亡情况,与对照组比较,NF - κ B

过表达组细胞凋亡明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),详见图 5。

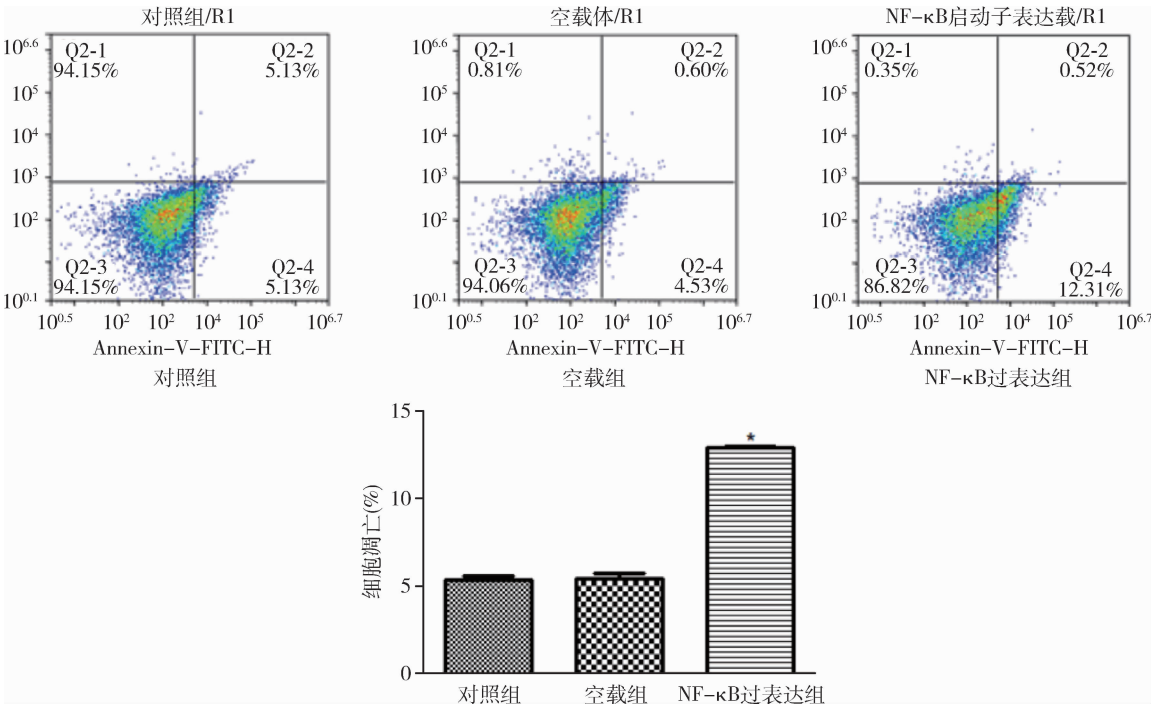


图 5 流式细胞仪检测细胞凋亡的结果
与对照组比较, * $P < 0.05$

讨 论

近年来,我国心脑血管疾病发生率不断增长,初步估计 2016 年我国心脑血管疾病患者人数约为 2.9 亿,心脑血管疾病死亡人数占居民疾病死亡人数 40% 以上,位居首位,高于肿瘤及其他疾病。心脑血管疾病已成为危害我国居民身体健康的重大疾病^[10]。越来越多的研究表明,血管平滑肌细胞在血

管壁发生病变时扮演着重要的角色^[11]。转录因子 NF - κ B 是一种调节炎症和免疫相关基因的转录因子^[12,13]。已有研究证明 NF - κ B 可以通过诱导 mi-croRNA 从而影响血管平滑肌细胞的增殖与迁移^[14]。

本研究目的旨在研究活化的 NF - κ B 对血管平滑肌细胞增殖和凋亡的影响,通过构建 NF - κ B 过表达载体来上调 NF - κ B 的表达,通过 MTT 法和流式

细胞仪来检测各组 HA - VSMCs 的增殖和凋亡情况。MTT 结果显示,与对照组细胞比较,NF - κ B 过表达组细胞的增殖率一直处于较低水平,说明 NF - κ B 被激活可以抑制 HA - VSMC 增殖。为验证 MTT 的结果,利用流式细胞仪来检测各组 HA - VSMCs 的凋亡情况,结果发现 NF - κ B 过表达组细胞较正常对照组细胞的凋亡率偏高,其结果与 MTT 检测的结果一致,得出过表达 NF - κ B 可以促进 HA - VSMC 凋亡,WB 检测各组 HA - VSMC 细胞 NF - κ B 表达情况,结果验证 NF - κ B 过表达组作用于 HA - VSMC 细胞可以提高 NF - κ B 的表达。

多项研究表明,NF - κ B 通路的激活介导 TNF - α 、IL - 1 和 IL - 6 等促炎性因子的转录以及各种趋化因子的产生。这些可溶性因子与其特异性受体结合,诱导血管舒张以及单核细胞和中性粒细胞向炎症部位的迁移^[15,16]。关于 NF - κ B 介导的炎症反应在心脑血管疾病的发生、发展中的作用值得进一步探讨。本实验未做深入探究,这也是本研究的不足之处。血管平滑肌细胞的异常增殖是高血压、动脉粥样硬化等许多心脑血管病的主要病理特征,然而涉及参与其异常增殖、分化、迁移等过程相关分子机制却一直未见阐明。

综上所述,本研究通过对过表达 NF - κ B 会抑制血管平滑肌细胞的增殖并促进血管平滑肌细胞的凋亡,为心脑血管疾病的基因靶向治疗的研究提供了方向。在后续研究中,对 NF - κ B 影响血管平滑肌细胞增殖和凋亡机制进行深入探讨,为阐明血管平滑肌细胞异常增殖、分化、迁移等过程,也为治疗动脉粥样硬化、血管成形术后再狭窄和其他心脑血管增殖性病变提供新思路。

参考文献

- 1 Lu QB, Wang HP, Tang ZH, *et al.* Nesfatin - 1 functions as a switch for phenotype transformation and proliferation of VSMCs in hypertensive vascular remodeling[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(6): 2154 - 2168
- 2 Shi L, Tian C, Sun L, *et al.* The lncRNA TUG1/miR - 145 - 5p/

FGF10 regulates proliferation and migration in VSMCs of hypertension [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 501(3): 688 - 695

- 3 Chen R, Kong P, Zhang F, *et al.* EZH2 - mediated α - actin methylation needs lncRNA TUG1, and promotes the cortex cytoskeleton formation in VSMCs[J]. *Gene*, 2017, 616: 52 - 57
- 4 Bennett J, Capece D, Begalli F, *et al.* NF - κ B in the crosshairs: rethinking an old riddle[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, 95: 108 - 112
- 5 Zhang Q, Lenardo MJ, Baltimore D. 30 years of NF - κ B: a blossoming of relevance to human pathobiology[J]. *Cell*, 2017, 168(1 - 2): 37 - 57
- 6 Antón M, Alén F, Gómezd HR, *et al.* Oleoylethanolamide prevents neuroimmune HMGB1/TLR4/NF - κ B danger signaling in rat frontal cortex and depressive - like behavior induced by ethanol binge administration[J]. *Addict Biol*, 2017, 22(3): 724 - 741
- 7 Zahradka P, Werner JP, Buhay S, *et al.* NF - kappaB activation is essential for angiotensin II - dependent proliferation and migration of vascular smooth muscle cells[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2003, 34(12): 1609 - 1621
- 8 Wang Z, Castresana MR, Newman WH. NF - kappaB is required for TNF - alpha - directed smooth muscle cell migration[J]. *FEBS Lett*, 2001, 508: 360 - 364
- 9 Wang Z, Castresana MR, Newman WH. Reactive oxygen and NF - kappaB in VEGF - induced migration of human vascular smooth muscle cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 285(3): 669 - 674
- 10 中国心血管病报告编写组.《中国心血管病报告 2016》概要[J]. *中国循环杂志*, 2017, 32(6): 521 - 530
- 11 Tabas I, Cardeña GG, Owens GK. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis[J]. *J Cell Biol*, 2015, 209(1): 13 - 22
- 12 Xavier D, David L, Judit P, *et al.* NF - κ B in development and progression of human cancer[J]. *Virchows Arch*, 2005, 446(5): 475 - 482
- 13 Tilborghs S, Corthouts J, Verhoeven Y, *et al.* The role of Nuclear Factor - kappa B signaling in human cervical cancer[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2017, 120: 141 - 150
- 14 Minsik P, Seunghwan C, Suji K, *et al.* NF - κ B - responsive miR - 155 induces functional impairment of vascular smooth muscle cells by downregulating soluble guanylyl cyclase[J]. *Exp Mol Med*, 2019, 51(2): 17 - 29
- 15 Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, *et al.* Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective[J]. *Ann Rev Immun*, 2015, 33(1): 257 - 290
- 16 Ruslan M. Origin and physiological roles of inflammation[J]. *Nature*, 2008, 454(7203): 428 - 435

(收稿日期:2020 - 02 - 10)

(修回日期:2020 - 03 - 03)

(上接第 61 页)

- 15 Zhao Y, Huan M, Liu M, *et al.* Doxorubicin and resveratrol co - delivery nanoparticle to overcome doxorubicin resistance[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 35267
- 16 Clark PA, Bhattacharya S, Elmayan A, *et al.* Resveratrol targeting of AKT and p53 in glioblastoma and glioblastoma stem - like cells to suppress growth and infiltration[J]. *J Neurosurg*, 2017, 126(5): 1448 - 1460
- 17 Jiao Y, Li H, Liu Y, *et al.* Resveratrol inhibits the invasion of glioblastoma - initiating cells via down - Regulation of the PI₃K/Akt/

NF - κ B signaling pathway[J]. *Nutrients*, 2015, 7(6): 4383 - 4402

- 18 Wang Z, Shen J, Sun W, *et al.* Antitumor activity of Raddeanin A is mediated by Jun amino - terminal kinase activation and signal transducer and activator of transcription 3 inhibition in human osteosarcoma[J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(5): 1746 - 1759
- 19 Zeke A, Misheva M, Reményi A, *et al.* JNK signaling: regulation and functions based on complex protein - protein partnerships[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2016, 80(3): 793 - 835

(收稿日期:2020 - 02 - 25)

(修回日期:2020 - 03 - 16)