

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.11.006

盐酸戊乙奎醚诱导早期生长反应蛋白1的表达及其对 人血管平滑肌细胞的增殖作用

陈曦, 胡婷婷, 史惠卿, 刘小娟, 李楠

(中国人民解放军西部战区总医院, 四川 成都 610083)

摘要:目的 探讨早期生长反应蛋白1(EGR1)在人血管平滑肌细胞(CRL-1999)增殖过程中的作用,以及影响下游基因和盐酸戊乙奎醚对其表达的影响。方法 慢病毒转染敲低CRL-1999细胞中EGR1表达,构建siEGR1-CRL-1999细胞,利用实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)和蛋白质印迹(Western Blot, WB)法实验验证其表达降低,同时观察下游基因细胞周期调控蛋白D1(CCND1)的表达变化。采用EDU法检测siEGR1-CRL-1999细胞的增殖能力。不同时间点观察用盐酸戊乙奎醚处理的CRL-1999细胞和siEGR1-CRL-1999细胞内EGR1蛋白的表达情况,并用WB法检测上述细胞不同时间点的磷酸化ERK1/2(p-ERK1/2)、ERK1/2蛋白表达。结果 成功构建siEGR1-CRL-1999细胞;siEGR1-CRL-1999细胞增殖能力较对照组降低,且CCND1的表达相应减弱;盐酸戊乙奎醚能诱导提高CRL-1999细胞的EGR1表达水平,1 h后开始提高,2 h时达峰值,并持续至8 h时;p-ERK1/2表达在处理1 h后达峰值,并维持至2 h时,而EGR1的蛋白表达变化在时间上总落后于p-ERK1/2。结论 EGR1通过CCND1影响CRL-1999细胞增殖,盐酸戊乙奎醚可能通过ERK1/2通路诱导EGR1表达。

关键词:早期生长反应蛋白1;细胞周期调控蛋白D1;血管平滑肌细胞;戊乙奎醚

中图分类号:R965

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)11-0022-04

Expression of Cell Cycle Regulatory Protein 1 Induced by Penethylidine Hydrochloride and Its Effect on Early Growth Response Protein 1

CHEN Xi, HU Tingting, SHI Huiqing, LIU Xiaojuan, LI Nan

(The General Hospital of Western Theater Command PLA, Chengdu, Sichuan, China 610083)

Abstract: Objective To investigate the role of early growth response protein 1(EGR1) in the proliferation of human vascular smooth muscle cells(CRL-1999) and the effect of downstream genes and penethylidine hydrochloride on its expression. **Methods** Lentivirus was used to knock down the expression of EGR1 in CRL-1999 cells to build siEGR1-CRL-1999 cells. The expression of EGR1 and cell cycle regulatory protein 1(CCND1) was detected by quantitative real-time polymerase chain reaction(qRT-PCR) and Western Blot(WB). The proliferation ability of siEGR1-CRL-1999 cells was examined by EDU method. CRL-1999 cells were treated with penethylidine hydrochloride, and the expression of EGR1 p-ERK1/2 and ERK1/2 were detected at different time points. **Results** The siEGR1-CRL-1999 cell was successfully constructed. Compared to the control group, the proliferation of siEGR1-CRL-1999 cells was reduced, and the expression of CCND1 was also reduced. The results showed that penethylidine hydrochloride could stimulate the expression of EGR1 in CRL-1999 cells, the EGR1 expression level began to increase at 1 h, peaked at 2 h, and continued for 8 h. After 1 h of treatment with penethylidine phosphate, phosphorylated ERK1/2 reached the highest point of expression and remained for 2 h, while the protein increase of EGR1 always lagged behind the former in time. **Conclusion** EGR1 affects the proliferation of CRL-1999 cells through CCND1, while penethylidine hydrochloride can induce the expression of EGR1 through ERK1/2 pathway.

Key words: early growth response protein 1; cell cycle regulatory protein 1; vascular smooth muscle cells; penethylidine hydrochloride

早期生长反应蛋白1(EGR1)属即刻早期基因家族、编码cys2-his2型锌指蛋白,广泛表达于从酵母到人类的真核细胞中^[1]。作为转录因子的EGR1,能与多种下游基因的启动子区域相结合,调控许多基因的表达,这些基因参与细胞增殖、分化、凋亡、缺氧反应等生物学效应^[2-3],有的甚至在肿瘤中发挥重要作用^[4-5]。EGR1是表皮生长因子受体(EGFR)介导的脑室区神经干细胞和祖细胞在缺氧-低血糖恢复期扩增的关键调节因子^[6]。DICKINSON等^[7]的研究显示,EGR1能促进血管

表皮细胞的增殖,但EGR1通过何种基因影响细胞的增殖仍有待进一步研究。本研究中探讨了EGR1在人类血管平滑肌细胞(CRL-1999)增殖过程中的作用及影响的下游基因,旨在揭示其在肺血管损伤修复中的作用提供参考。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂与仪器

细胞株:CRL-1999购于ATCC。

试剂:F-12K营养混合物培养基,胎牛血清,均购

自 Gibco 公司;抗人 EGR1 抗体(Santa 公司);抗人细胞周期调控蛋白 D1(CCND1)抗体,抗人细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)抗体,抗人磷酸化的 ERK1/2(p-ERK1/2)抗体,均购自 CST 公司;辣根氧化酶标记的山羊抗兔,山羊抗鼠二抗,均购自博奥生物公司);RIPA 裂解液;二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒,5%~20% 梯度预制胶,电泳液,转膜液及蛋白彩色预染 MARKER、ECL 化学发光试剂盒,均购自碧云天公司;逆转录试剂盒,实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)试剂盒,均购自日本 Takara 公司;慢病毒购自吉凯生物公司;EDU 检测试剂盒(iClick™ EdU Andy Fluor 647 Flow Cytometry Assay Kit,广东复能基因有限公司)。

仪器:7500 型 Real-Time PCR System PCR 仪(美国 ABI 公司);Fluor Chem 型凝胶成像化学发光系统(美国 Protein Simple 公司);Gallios 型流式细胞仪(美国贝克曼库尔特公司)。

1.2 方法

细胞培养:取 CRL-1999 细胞,置含 10% 胎牛血清的 F-12K 营养混合物培养基于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

细胞慢病毒干扰实验:取 10×10⁴ 个/孔对数期生长的细胞,置 12 孔板中,过夜贴壁培养。按感染复数(MOI)为 30 的量加入慢病毒,培养 12 h 后,换成新鲜的培养基继续培养 36 h,然后在荧光显微镜下观察转染效率。

qRT-PCR:采用 Trizol 法分别提取 siEGR1-CRL-1999 细胞和对照细胞总 RNA,用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA,用 SYBR PCR 试剂盒在 7500 型 Real-Time PCR System PCR 仪上进行 qRT-PCR 检测(预变性,95℃ 30 s,然后 95℃ 5 s,60℃ 34 s,40 个循环),设置 3 个复孔。PCR 引物:ACTIN,正向引物 5'-GAGC-TACGAGCTGCCTGACG-3',反向引物 5'-GTAGTTTC GTGGATGCCACAG-3';EGR1,正向引物 5'-CAGCAC CTTCAACCCTCAG-3',反向引物 5'-CACAAGGTGTT GCCACTGTT-3';CCND1,正向引物 5'-TATTGCGCT-GCTACCGTTGA-3',反向引物 5'-CCAATAGCAGCAA ACAATGTGAAA-3'。

蛋白质印迹(WB)法检测 EGR1, CCND1, ERK1/2 和 p-ERK1/2 蛋白表达:采用 RIPA 裂解液法提取细胞总蛋白,采用 BCA 法测蛋白浓度,加入蛋白上样缓冲液后,沸水煮 5 min 使蛋白变性;蛋白上样量为 40 μg,以 5%~20% 梯度胶电泳分离蛋白质;湿转法转移蛋白至聚偏乙烯(PVDF)膜,5% BSA 封闭 1 h,加入一抗 4℃ 过夜(EGR1 1:1 000, ACTIN 1:2 000, CCND1 1:1 000, ERK1/2 1:1 000, p-ERK1/2 1:1 000),二抗室温孵育 1 h(山羊抗鼠 1:5 000,山羊抗兔 1:5 000),采用

ECL 化学发光法显示结果。

EDU 法检测细胞增殖:分别用胰酶消化对照组细胞和 siEGR1-CRL-1999 细胞,计数,2×10⁵ 个/孔接种于 6 孔板内,37℃ 过夜培养,弃培养基,每孔加入 2 mL 含 10 μmol/mL EDU 的培养液,37℃,CO₂ 培养箱中继续培养 6 h,按试剂盒说明处理细胞,采用流式细胞仪分析。

盐酸戊二醛处理细胞:将 CRL-1999 细胞和 siEGR1-CRL-1999 细胞按 5×10⁵ 个/孔接种于 6 孔板中,培养过夜,然后加入盐酸戊二醛,并设空白对照组,最终质量浓度为 2 μg/mL。放入培养箱中培养,并于 0, 0.5, 1, 2, 4, 8 h 取材备用。

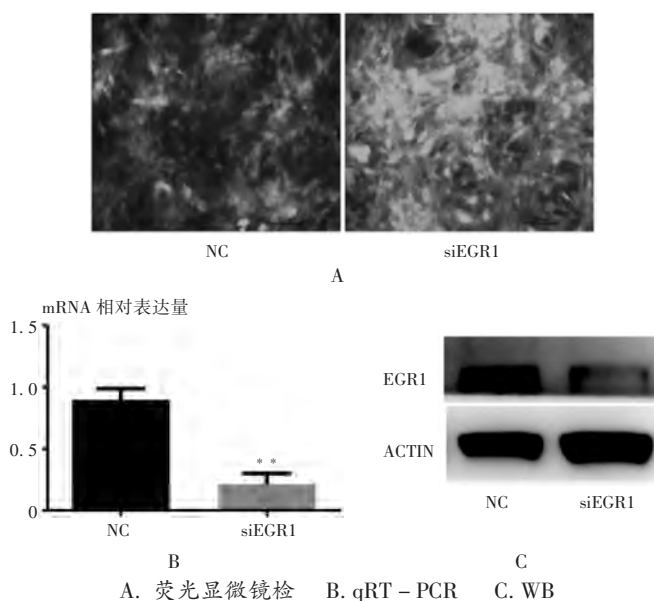
1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计学软件分析。计量资料(正态分布)以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内两两比较行 *t* 检验;采用相关性分析采用 Pearson 相关分析,*r* < 0.3 为低度正相关,0.3 ≤ *r* < 0.7 为中度正相关,0.7 ≤ *r* < 1.0 为高度正相关;统计图表采用 GraphPad Prism 6 绘制。*P* < 0.01 为差异有显著统计学意义,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慢病毒对 CRL-1999 细胞中 EGR1 表达水平的影响

细胞转染 EGR1 干扰慢病毒 48 h 后,荧光显微镜下观察发现,大部分细胞都表现出明显的绿色荧光(见图 1 A),表明细胞转染了慢病毒,并整合到基因组上,成功构建 siEGR1-CRL-1999 细胞。qRT-PCR 结果显示,EGR1 被成功干扰(见图 1 B, *P* < 0.01)。同时,WB 实验结果表明,EGR1 蛋白表达水平也明显降低(见图 1 C)。



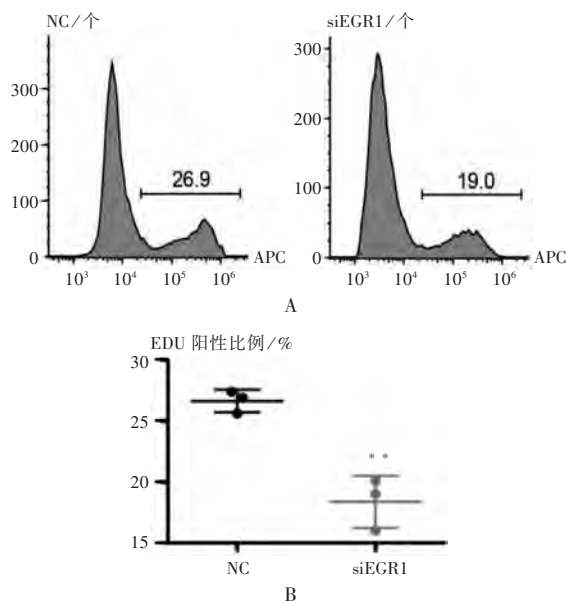
注:**为 *P* < 0.01。

图1 慢病毒对 CRL-1999 细胞中 EGR1 表达水平的影响

2.2 敲低 EGR1 表达对 CRL-1999 细胞增殖的影响

将 EDU 加入 siEGR1-CRL-1999 细胞或对照组

细胞中,培养6 h后,阴性对照组中26%的细胞含有EDU,即26%的细胞进入了S期;同时,siEGR1-CRL-1999细胞中只有19%的细胞含有EDU,其增殖效率减少了27%(见图2, $P < 0.01$)。表明干扰EGR1后,CRL-1999细胞增殖受到了明显抑制。



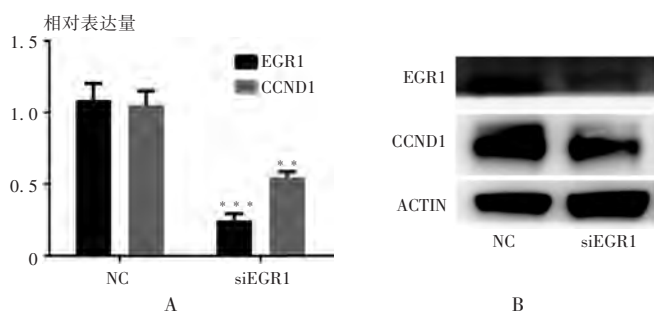
A. EDU 流式法 B. EDU 3 次重复实验

注: ** 为 $P < 0.01$ 。

图2 敲低EGR1表达对CRL-1999细胞增殖的影响

2.3 敲低EGR1表达对CCND1表达水平的影响

敲低EGR1后,qRT-PCR结果表明,CCND1的表达相应降低(见图3A, *** $P = 0.0003$, ** $P = 0.0011$)。WB实验也表明,敲低CRL-1999细胞的EGR1后,CCND1蛋白表达水平明显降低(见图3B)。



A. qRT-PCR B. WB

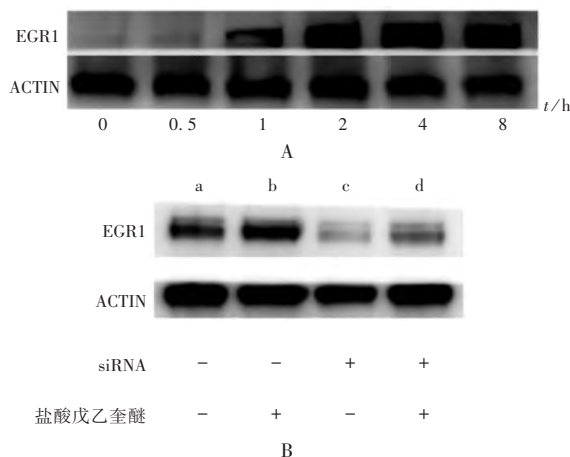
注: *** 为 $P = 0.0003$, ** 为 $P = 0.0011$ 。

图3 敲低EGR1表达对CCND1表达水平的影响

2.4 盐酸戊乙奎醚对EGR1表达水平的影响

对CRL-1999细胞进行盐酸戊乙奎醚处理,分别在0 h(处理前),及处理后0.5,1,2,4,8 h时提取蛋白质,进行WB检测,发现处理1 h后EGR1蛋白表达开始增多,2 h时达顶点,一直持续到8 h时(见图4A),表明盐酸戊乙奎醚能诱导CRL-1999细胞的EGR1表

达。为了进一步验证,对siEGR1-CRL-1999细胞和CRL-1999细胞同时进行盐酸戊乙奎醚处理,并进行WB检测。处理4 h后,盐酸戊乙奎醚处理组的CRL-1999细胞和siEGR1-CRL-1999细胞的(b,d)EGR1蛋白表达量均比未处理组(a,c)增多,且药物诱导后的siEGR1-CRL-1999细胞(d)的EGR1蛋白表达量显著低于CRL-1999细胞(b),进一步表明盐酸戊乙奎醚能诱导CRL-1999细胞的EGR1表达(见图4B)。



A. 加入盐酸戊乙奎醚后,不同时间点EGR1蛋白表达水平

B. 加入盐酸戊乙奎醚后4 h,CRL-1999细胞(a,b)和siEGR1-CRL-1999细胞(c,d)EGR1蛋白表达水平

图4 盐酸戊乙奎醚对EGR1表达水平的影响

2.5 盐酸戊乙奎醚可通过ERK1/2通路刺激EGR1表达

对2.4项下不同时间点提取的蛋白质中p-ERK1/2, ERK1/2和EGR1蛋白的表达水平进行检测,结果显示,p-ERK1/2在盐酸戊乙奎醚处理1 h后表达水平达峰值,维持至2 h时,随后逐渐减少。而EGR1的表达在1 h时仅轻微增多,后逐渐增多,其蛋白水平表达变化在时间上总落后于p-ERK1/2(见图5),提示盐酸戊乙奎醚可通过ERK1/2通路诱导EGR1的表达。

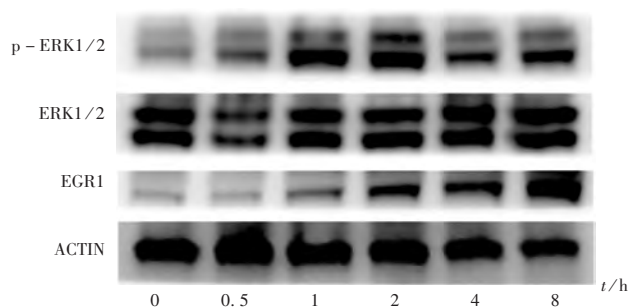


图5 加入盐酸戊乙奎醚后,不同时间点p-ERK1/2,EGR1蛋白表达水平

3 讨论

通常血管平滑肌细胞在动脉中膜中维持非增殖状态,但在损伤或其他刺激下,中膜的血管平滑肌细胞会迁移到内膜,开始增殖并分泌细胞外基质,导致动脉内膜扩张,即新内膜形成^[8]。富含丝/精氨酸剪辑因子1

(SRSF1)能通过 $\Delta 133p53 - EGR1$ 复合体,影响 KLF5 的表达,从而促进血管平滑肌细胞的增殖^[9]。XIE 等^[10]的研究发现,EGR-1 参与了瘦素诱导的过氧化物酶体增殖剂激活受体 γ (PPAR γ)的减少和肺动脉平滑肌细胞的增殖。SYSOL 等^[11]的研究发现,血小板源生长因子(PDGF)通过 EGR-1 诱导鞘氨醇激酶 1(SphK1)的表达,可促进肺动脉平滑肌细胞增殖。此外,在其他组织中,EGR1 也起到了促进细胞增殖的作用,如肌肉衍生的卫星细胞^[12]、小鼠肝脏细胞^[13]等。EGR1 除了能被生长因子诱导高表达外,也能被一些刺激诱导高表达,如缺氧、辐照等;缺氧情况下,会对肺动脉造成一定程度损伤,故进一步研究 EGR1 的功能,不但能在损伤修复阶段起作用,而且在损伤防治阶段也能起到一定作用。

阿魏酸通过缺氧上调 EGR1 来改善人肌腱衍生干细胞的自我更新和分化^[14]。CHEN 等^[15]的研究结果证实,CCND1 的转录是由 EGR1 直接调控的,CCND1 是 3 种非连接蛋白(Cyclin D1,D2,D3)之一,在哺乳动物细胞周期中主要调控 G₁ 期向 S 期过渡。敲低 CRL-1999 细胞的 EGR1 后,会影响 CCND1 的表达,从而影响人血管平滑肌细胞 CRL-1999 的体外增殖。

盐酸戊乙奎醚是我国自主研发的抗胆碱 I 类新药,有较强的抗 M 和 N 样受体作用,对外周神经有较强的抗 M 样作用和一定程度的抗 N 样作用,临床主要用于对抗有机磷的中毒和全身麻醉患者术前给药。盐酸戊乙奎醚能较早改善氧合,减缓急性肺损伤的进展,可应用于对创伤性急性肺损伤早期的干预治疗^[16]。盐酸戊乙奎醚能抑制炎症反应,减轻肺组织的损伤,改善氧合,能有效缓解多发伤导致的急性肺损伤^[17],但其具体作用机制和通路仍不清楚。ZHANG 等^[18]的研究认为,在缺血再灌注诱导的急性肺损伤中,通过适当增加自噬可起到保护作用,同时 ERK1/2 信号通路具有积极的调节作用。ERK1/2 是 20 世纪 80 年代末期发现的一类丝/苏氨酸蛋白激酶,是 MAPK 家族的一个重要亚族,正常定位于胞浆,当激活后转位至胞核,调节转录因子活性,产生细胞效应。本研究中发现盐酸戊乙奎醚能通过 ERK1/2 通路刺激 EGR1 的表达,但盐酸戊乙奎醚通过 EGR1 影响血管平滑肌细胞的具体作用机制仍不清楚,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] ZWANG Y, OREN M, YARDEN Y. Consistency test of the cell cycle: roles for p53 and EGR1[J]. *Cancer Res* 2012, 72(5): 1051 - 1054.
- [2] GALLO FT, KATCHE C, MORICI JF, et al. Immediate Early Genes, Memory and Psychiatric Disorders: Focus on c - Fos, Egr1 and Arc[J]. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 2018, 12: 79.
- [3] TIAN J, LI Z, HAN Y, et al. The progress of early growth response factor 1 and leukemia[J]. *Intractable & Rare Diseases Research*, 2016, 5(2): 76 - 82.
- [4] RITCHIE MF, ZHOU Y, SOBOLOFF J. WT1/EGR1 - mediated control of STIM1 expression and function in cancer cells[J]. *Frontiers in Bioscience*, 2011, 16: 2402 - 2415.
- [5] ABDULKADIR SA. Mechanisms of prostate tumorigenesis: roles for transcription factors Nkx3. 1 and Egr1[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2005, 1059: 33 - 40.
- [6] ALAGAPPAN D, BALAN M, JIANG Y, et al. Egr - 1 is a critical regulator of EGF - receptor - mediated expansion of subventricular zone neural stem cells and progenitors during recovery from hypoxia - hypoglycemia[J]. *ASN Neuro*, 2013, 5(3): 183 - 193.
- [7] DICKINSON MG, KOWALSKI PS, BARTELD B, et al. A critical role for Egr - 1 during vascular remodelling in pulmonary arterial hypertension[J]. *Cardiovascular Research*, 2014, 103(4): 573 - 584.
- [8] DZAU VJ, BRAUN - DULLAEUS RC, SEDDING DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies[J]. *Nat Med*, 2002, 8(11): 1249 - 1256.
- [9] XIE N, CHEN M, DAI R, et al. SRSF1 promotes vascular smooth muscle cell proliferation through a Delta133p53/EGR1/KLF5 pathway[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 16016.
- [10] XIE X, LI S, ZHU Y, et al. Egr - 1 mediates leptin - induced PPARgamma reduction and proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2018, 29(3): 356 - 362.
- [11] SYSOL JR, NATARAJAN V, MACHADO RF. PDGF induces SphK1 expression via Egr - 1 to promote pulmonary artery smooth muscle cell proliferation[J]. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 2016, 310(11): C983 - C992.
- [12] LI X, WANG Z, TONG H, et al. Effects of COL8A1 on the proliferation of muscle - derived satellite cells[J]. *Cell Biology International*, 2018, 42(9): 1132 - 1140.
- [13] LAI S, YUAN J, ZHAO D, et al. Regulation of mice liver regeneration by early growth response - 1 through the GGPPS/RAS/MAPK pathway[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2015, 64: 147 - 154.
- [14] QIU S, SUN Y, XU J, et al. Ferulic acid improves self - renewal and differentiation of human tendon - derived stem cells by upregulating early growth response 1 through hypoxia[J]. *Genesis*, 2019; e23291.
- [15] CHEN DG, ZHU B, LV SQ, et al. Inhibition of EGR1 inhibits glioma proliferation by targeting CCND1 promoter[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2017, 36: 186.
- [16] 俞辰斌, 孙海晨, 聂时南, 等. 盐酸戊乙奎醚对创伤性急性肺损伤的早期干预作用[J]. *创伤外科杂志*, 2007, 9(4): 359 - 362.
- [17] 曹 昕, 周克兵. 盐酸戊乙奎醚对多发伤致急性肺损伤患者血浆肺表面活性物质相关蛋白 D、肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 8 水平的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2015, 25(16): 58 - 61.
- [18] ZHANG D, LI C, ZHOU J, et al. Autophagy protects against ischemia / reperfusion - induced lung injury through alleviating blood - air barrier damage [J]. *Journal of Heart & Lung Transplantation*, 2015, 34(5): 746 - 755.

(收稿日期: 2019 - 10 - 30)