

# Src 在氧化型低密度脂蛋白诱导平滑肌细胞表型转化中的作用

李森 杨克 王艳萍 李海清 刘震杰 王坚 高志伟 潘以锋 何敏志 陈兵

**【摘要】** 目的:探究 Src 对氧化型低密度脂蛋白(oxLDL)诱导血管平滑肌细胞表型转化的调控作用。 方法:体外培养小鼠原代平滑肌细胞,以不同浓度的 oxLDL 刺激血管原代平滑肌细胞,检测平滑肌细胞表型分子平滑肌细胞表型肌球蛋白重链 11(MYH11)、巨噬细胞表型 CD68 的表达变化,以及 Src 的激活情况。通过小干扰 RNA(siRNA)抑制 Src 蛋白表达,Src 特异性抑制剂 PP2 抑制 Src 激活,观察 Src 对 oxLDL 诱导的平滑肌细胞表型转化的影响。 结果:分别以 0、12.5、25.0、50.0  $\mu\text{g/mL}$  oxLDL 刺激血管平滑肌细胞后发现 MYH11 的 mRNA 及蛋白表达逐渐下降( $P<0.05$ ),CD68 的 mRNA 及蛋白表达逐渐升高( $P<0.05$ )。以不同浓度(12.5、25.0、50.0  $\mu\text{g/mL}$ )、不同时间(15、30、60 min)的 oxLDL 刺激平滑肌细胞后,发现 Src 活性逐渐升高( $P<0.05$ )。敲减 Src siRNA 或以 PP2 抑制 Src 蛋白活性后,oxLDL 诱导的平滑肌细胞向巨噬细胞转化的分子表型的表达水平受到抑制。 结论:oxLDL 可以通过提高 Src 活性,进而诱导平滑肌细胞表型改变。

**【关键词】** 动脉粥样硬化;氧化型低密度脂蛋白;平滑肌细胞;Src;表型

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2020.03.010

**The role of Src in oxidized low-density lipoprotein induced phenotypic switching of vascular smooth muscle cells** LI Sen<sup>1</sup>, YANG Ke<sup>2</sup>, WANG Yanping<sup>2</sup>, LI Haiqing<sup>2</sup>, LIU Zhenjie<sup>1</sup>, WANG Jian<sup>1</sup>, GAO Zhiwei<sup>1</sup>, PAN Yifeng<sup>1</sup>, HE Minzhi<sup>1</sup>, CHEN Bin<sup>1</sup>. 1. Department of Vascular Surgery, the Second Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Zhejiang 310000; 2. Department of Cardiology, Rui Jin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

**【Abstract】 Objective:** To investigate whether Src can regulate oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) induced phenotypic transformation of vascular smooth muscle cells (SMCs). **Methods:** The primary mouse SMCs were cultured in vitro. And then we stimulated SMCs with different doses of oxLDL to detect the protein expression of phenotype molecules including Myosin Heavy Chain 11 (MYH11) and CD68, as well as the activation of Src. Inhibiting Src expression with small interfering RNA (siRNA) and Src activation with specific inhibitor PP2 to observe the impact of Src on phenotypic transformation of SMCs. **Results:** The expression level of MYH11 mRNA and protein were down-regulated gradually, while the expression of CD68 mRNA and protein level were up-regulated gradually when vascular SMCs were stimulated with 0, 12.5, 25.0 and 50.0  $\mu\text{g/mL}$  oxLDL ( $P<0.05$ ). The activity of Src was up-regulated gradually ( $P<0.05$ ) when vascular SMCs were stimulated with different dose of oxLDL (12.5, 25.0, 50.0  $\mu\text{g/mL}$ ) for different time (15, 30, 60 minutes) ( $P<0.05$ ). Src siRNA knock-out and PP2 could inhibit the expression of phenotype molecules which indicated the

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81470547);浙江省自然科学基金(Q20H020047)

作者单位:310000 杭州,浙江大学医学院附属第二医院血管外科(李森,刘震杰,王坚,高志伟,潘以锋,何敏志,陈兵);200025 上海交通大学医学院附属瑞金医院心脏科(杨克,王艳萍,李海清)

通信作者:陈兵,E-mail:2114008@zju.edu.cn

transformation from SMCs to macrophage. **Conclusions:** OxLDL can induce phenotype transformation in SMCs by enhancing Src activity.

**【Key words】** Atherosclerosis; Oxidized low-density lipoprotein; Smooth muscle cells; Src; Phenotype

平滑肌细胞在动脉粥样硬化的发生发展中发挥着重要作用<sup>[1]</sup>。血管平滑肌细胞受病理刺激时可发生表型变化,即收缩型表型向合成型表型的转变<sup>[2]</sup>。氧化型低密度脂蛋白(oxLDL)可诱导血管平滑肌细胞发生细胞增殖、迁移及表型转化等病理变化,促进动脉粥样硬化的发生<sup>[3]</sup>,但 oxLDL 调控平滑肌细胞的分子机制仍不清楚。本研究拟探讨非受体蛋白酪氨酸激酶(PTK)家族成员 Src 激酶对 oxLDL 诱导血管平滑肌细胞表型转化的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及试剂

C57BL/6 小鼠购自南京大学模式动物研究所,oxLDL 购自英国 Serotec 公司;Src 小干扰 RNA (siRNA)购自美国 SMARTpool™公司;PP2(Src 抑制剂)、PP3(PP2 的阴性对照)购自美国 CalBiochem 公司;抗  $\beta$ -肌动蛋白抗体、抗 Src 抗体(Y-416)抗体、抗 Src 抗体、抗肌球蛋白重链 11(MYH11)抗体及抗 CD68 抗体购自美国 Abcam 公司;细胞培养用培养基及试剂购自美国 Gibco 公司;总 RNA 抽提、cDNA 逆转录及 Western blot 检测试剂盒均购自中国碧云天公司;实时聚合酶链反应(real-time PCR)检测用试剂购自中国天根生物科技有限公司,检测用引物由中国吉玛公司合成。

### 1.2 原代血管平滑肌细胞培养

清洁级 4~6 周龄雄性 C57BL/6 小鼠,体质量 20~22 g,断颈处死后暴露胸腔及腹腔,完整分离主动脉,并置于预冷的组织清洗液(生理盐水+1000 IU/mL 青霉素+1000  $\mu$ g/mL 链霉素)中,于解剖学显微镜下清洗血污,剥离并去除外膜,保留血管中层。反复清洗 2~3 次后,将组织移入新的无菌培养皿中,将血管组织快速剪碎成约 1 mm<sup>2</sup> 大小的组织块,均匀铺于皿底,于 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱内放置 1 h。缓慢加入原代细胞培养液(F12 培养基+20%胎牛血清+100 IU/mL 青霉素+100  $\mu$ g/mL 链霉素),放置于培养箱中,每 48 h 更换新鲜原代细胞培养液。显微镜下定期观察,当达到理想的培养密度后进行分盘培养。

### 1.3 oxLDL 处理血管平滑肌细胞

使用不同浓度的 oxLDL (0、12.5、25.0、50.0  $\mu$ g/mL)刺激原代平滑肌细胞 48 h 后,通过

Western blot 及 real-time PCR 检测平滑肌细胞表型 MYH11 及 CD68 的表达。使用 50.0  $\mu$ g/mL 的 oxLDL 刺激原代平滑肌细胞不同时间(0、15、30、60 min),使用不同浓度 oxLDL (0、12.5、25.0、50.0  $\mu$ g/mL)刺激原代平滑肌细胞 1 h 后,通过 Western blot 检测 Src 蛋白的激活情况。

### 1.4 Src 特异性 siRNA 转染

使用脂质体试剂(Invitrogen 公司)将 Src 特异性 siRNA 导入平滑肌细胞内。设 Src siRNA 组,以 100 nm/10<sup>5</sup> 个细胞的细胞转染比例将 Src 特异性 siRNA 导入平滑肌细胞内;设阴性 siRNA 组,在平滑肌细胞中转染无细胞效应的 siRNA。使用 50  $\mu$ g/mL 的 oxLDL 刺激原代平滑肌细胞 48 h。

### 1.5 Src 抑制剂处理血管平滑肌细胞

设 Src 抑制剂组,使用 Src 特异性活性抑制剂 PP2(10  $\mu$ mol/L)预刺激原代血管平滑肌细胞 1 h 后,换正常培养基或 50.0  $\mu$ g/mL oxLDL 刺激 48 h。设阴性刺激组,以 PP3(10  $\mu$ mol/L)预刺激原代血管平滑肌细胞 1 h 后,换正常培养基或 50.0  $\mu$ g/mL oxLDL 刺激 48 h。

### 1.6 Western blot 检测

取等量蛋白样品进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),电转移法将蛋白转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,室温封闭 1 h,加入相应一抗,4 °C 孵育过夜,加入二抗,室温孵育 1 h,成像仪曝光记录蛋白条带情况,并采用 Image J 软件对其进行灰度分析。

### 1.7 Real-time PCR 检测

使用 SYBR Green PCR Master Mix 反应试剂盒和 StepOne 系统(Applied BioSystems)对 MYH11 及 CD68 的 mRNA 表达水平进行分析。MYH11 上游引物:5'-CGGCAACTCGTGTC CAAC-3',下游引物:5'-GGTCTTCCATTTC GGCTTT-3';CD68 上游引物:5'-CCCAA GGAACAGAGGAAG-3',下游引物:5'-GTGGCAGGGTTATGAGTG-3'; $\beta$ -actin 上游引物:5'-CTGTCCCTGTATGCCTCTG-3',下游引物:5'-ATGTCACGCACGATTTC-3'。反应条件:95 °C 30 s;95 °C 10 s,65 °C 31 s,共 40 个循环。以  $\beta$ -actin 为内参,采用 StepOne 软件 v2.1(Applied BioSystems)对结果进行数据分析。

1.8 统计学分析

采用 SPSS11.0 软件进行统计学分析,计量资料采用均数±标准差表示,组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 oxLDL 诱导原代平滑肌细胞表型转分化

MYH11 为平滑肌细胞表型,CD68 为巨噬细胞

表型。oxLDL 刺激平滑肌细胞后,随着 oxLDL 刺激浓度的增加,MYH11 的 mRNA 表达水平呈浓度依赖性降低,CD68 的 mRNA 表达水平呈浓度依赖性升高( $P$  均 $<0.05$ )。oxLDL 刺激平滑肌细胞后,随着 oxLDL 刺激浓度的增加,MYH11 的蛋白质表达水平呈浓度依赖性降低,而 CD68 的蛋白表达水平呈浓度依赖性升高( $P$  均 $<0.05$ )。见表 1。

表 1 不同浓度 oxLDL 对平滑肌细胞表型 mRNA 及蛋白表达水平的影响

oxLDL 浓度	mRNA		蛋白	
	MYH11/ $\beta$ -actin	CD68/ $\beta$ -actin	MYH11/ $\beta$ -actin	CD68/ $\beta$ -actin
0 $\mu$ g/mL	1.02 $\pm$ 0.09	1.03 $\pm$ 0.08	1.12 $\pm$ 0.12	1.05 $\pm$ 0.13
12.5 $\mu$ g/mL	0.64 $\pm$ 0.06 <sup>(1)</sup>	1.76 $\pm$ 0.08 <sup>(1)</sup>	0.56 $\pm$ 0.05 <sup>(1)</sup>	1.75 $\pm$ 0.16 <sup>(2)</sup>
25.0 $\mu$ g/mL	0.41 $\pm$ 0.05 <sup>(2)</sup>	2.73 $\pm$ 0.09 <sup>(2)</sup>	0.51 $\pm$ 0.08 <sup>(1)</sup>	1.95 $\pm$ 0.11 <sup>(1)</sup>
50.0 $\mu$ g/mL	0.37 $\pm$ 0.06 <sup>(2)</sup>	2.95 $\pm$ 0.08 <sup>(2)</sup>	0.46 $\pm$ 0.07 <sup>(1)</sup>	2.21 $\pm$ 0.12 <sup>(1)</sup>

注:与 oxLDL 0  $\mu$ g/mL 组相比,<sup>(1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>(2)</sup> $P<0.01$

2.2 oxLDL 促进原代平滑肌细胞中 Src 激活

为明确 oxLDL 对于血管平滑肌细胞中 Src 活化的影响,使用 oxLDL 刺激平滑肌细胞后检测 Src (Y-416)位点磷酸化水平及 Src 总蛋白表达水平,Src 的活性以 Src(Y-416)位点磷酸化水平(p-Src)与 Src 总蛋白表达水平(t-Src)的比值表示。oxLDL 刺激平滑肌细胞后,随着 oxLDL 刺激浓度的增加,Src 活性(p-Src/t-Src)呈浓度依赖性与时间依赖性升高( $P$  均 $<0.05$ )。见表 2。

表 2 oxLDL 对平滑肌细胞中 Src 激活的影响

处理		Src 活性
oxLDL 浓度	0 $\mu$ g/mL	0.75 $\pm$ 0.02
	12.5 $\mu$ g/mL	0.76 $\pm$ 0.09 <sup>(1)</sup>
	25.0 $\mu$ g/mL	0.81 $\pm$ 0.03 <sup>(1)</sup>
	50.0 $\mu$ g/mL	0.93 $\pm$ 0.06 <sup>(2)</sup>
oxLDL 处理时间	0 min	0.76 $\pm$ 0.05
	15.0 min	0.85 $\pm$ 0.07 <sup>(3)</sup>
	30.0 min	1.05 $\pm$ 0.03 <sup>(3)</sup>
	60.0 min	1.49 $\pm$ 0.06 <sup>(4)</sup>

注:与 oxLDL 0  $\mu$ g/mL 组相比,<sup>(1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>(2)</sup> $P<0.01$ ;与 oxLDL 处理 0 min 组相比,<sup>(3)</sup> $P<0.01$ ,<sup>(4)</sup> $P<0.01$

2.3 敲减 Src 表达可抑制 oxLDL 诱导的原代平滑肌细胞表型转化

为明确 Src 在 oxLDL 诱导平滑肌表型转化中的作用,我们通过转染 Src siRNA 敲低 Src 蛋白的表达水平,并观察 oxLDL 刺激后平滑肌细胞的表型变化。在导入 Src siRNA 及阴性 siRNA 后,可见 Src siRNA 显著抑制 Src 在平滑肌细胞中的表达( $P<0.05$ )。而在 oxLDL 刺激后,阴性 siRNA 组可见 MYH11 的蛋白表达水平显著降低,CD68 的蛋白表达水平显著升高( $P$  均 $<0.05$ );Src siRNA 组 MYH11 和 CD68 的蛋白表达水平均未见明显改变。见表 3。

2.4 抑制 Src 蛋白活性可抑制 oxLDL 诱导的原代平滑肌细胞表型转化

为明确 Src 激活状态在 oxLDL 诱导平滑肌表型转化中的作用,我们通过 Src 特异性抑制剂 PP2 抑制 Src 蛋白的激活,并观察 oxLDL 刺激后平滑肌细胞表型变化。结果显示,Src 抑制剂组平滑肌细胞中 Src 磷酸化水平明显受抑( $P<0.05$ )。而在 oxLDL 刺激后,阴性刺激组 MYH11 的蛋白表达水平明显降低,CD68 的蛋白表达水平明显升高( $P$  均 $<0.05$ )。见表 4。

表 3 Src 敲低后平滑肌细胞表型蛋白表达水平的影响

	阴性 siRNA 组		Src siRNA 组	
	-	+	-	+
Src/ $\beta$ -actin	1.35 $\pm$ 0.21	1.36 $\pm$ 0.32	0.52 $\pm$ 0.09 <sup>(1)</sup>	0.56 $\pm$ 0.07 <sup>(2)</sup>
MYH11/ $\beta$ -actin	0.96 $\pm$ 0.19	0.45 $\pm$ 0.08 <sup>(1)</sup>	0.75 $\pm$ 0.04	0.78 $\pm$ 0.05 <sup>(2)</sup>
CD68/ $\beta$ -actin	0.35 $\pm$ 0.07	1.49 $\pm$ 0.22 <sup>(1)</sup>	0.58 $\pm$ 0.09	0.59 $\pm$ 0.07 <sup>(2)</sup>

注:“-”为未处理组,“+”为 oxLDL(50  $\mu$ g/mL)处理组;与阴性 siRNA 组的未处理组相比,<sup>(1)</sup> $P<0.05$ ;与阴性 siRNA 组的 oxLDL 处理组相比,<sup>(2)</sup> $P<0.05$

表 4 Src 活性抑制对平滑肌细胞表型蛋白表达水平的影响

	阴性刺激组		Src 抑制组	
	-	+	-	+
Src/ $\beta$ -actin	1.05 $\pm$ 0.11	1.36 $\pm$ 0.18	0.46 $\pm$ 0.07 <sup>(1)</sup>	0.50 $\pm$ 0.09 <sup>(2)</sup>
MYH11/ $\beta$ -actin	0.86 $\pm$ 0.15	0.32 $\pm$ 0.08 <sup>(1)</sup>	0.77 $\pm$ 0.09	0.80 $\pm$ 0.12 <sup>(2)</sup>
CD68/ $\beta$ -actin	0.42 $\pm$ 0.17	1.29 $\pm$ 0.14 <sup>(1)</sup>	0.48 $\pm$ 0.12	0.52 $\pm$ 0.17 <sup>(2)</sup>

注：“-”为未处理组，“+”为 oxLDL(50  $\mu$ g/mL)处理组；与阴性刺激组的未处理组相比，<sup>(1)</sup>  $P < 0.05$ ；与阴性刺激组的 oxLDL 处理组相比，<sup>(2)</sup>  $P < 0.05$

3 讨论

在本研究中,我们发现 oxLDL 可诱导血管平滑肌细胞发生平滑肌表型下调,而巨噬细胞表型上调。oxLDL 可促进血管平滑肌细胞中 Src 激活,抑制 Src 表达和活性均可减少 oxLDL 诱导的血管平滑肌细胞表型的变化,提示 Src 参与 oxLDL 诱导的血管平滑肌细胞表型转化过程。

Src 激酶属于 PTK 家族成员,其他 PTK 家族成员包括 Yes、Fyn、Fgr、Lck、Hck、Blk、Lyn、Frk、Srm、Brk<sup>[4-5]</sup>。Src 是 PTK 家族最早被发现的成员,结构从氨基端到羧基端分别为豆蔻酰化序列、单一序列、SH3 结构域、SH2 结构域、激酶结构域和羧基端调节尾端<sup>[6]</sup>。Src 通过磷酸化修饰调控自身活性并向下传递信号。一般情况下,Src527 位点酪氨酸处于磷酸化状态,与 SH2 结构域结合,此时 Src 呈卷曲状态,将酶活性中心 416 位点酪氨酸磷酸化位点遮蔽。当 Src 激酶与细胞膜表面受体结合发生构象改变时,416 位点酪氨酸暴露并发生自身磷酸化,同时 527 位点去磷酸化,使激酶处于激活状态,将细胞外信号向下传递。Src 激酶作为受体结合型 PTK,缺乏跨膜及胞外段,需与跨膜受体如激素受体、细胞因子及生长因子受体结合以传递细胞外信号,促进细胞增殖、迁移、细胞间黏附及脂质累积<sup>[7]</sup>。

在动脉粥样硬化中,Src 可结合并激活 p47phox,继而激活还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶(NOX),产生大量 O<sup>2-</sup>,促进内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞参与氧化应激<sup>[8]</sup>。Src 还参与丝裂原激活的蛋白激酶(MAPK)和细胞外信号调节激酶 1/2 (ERK1/2)信号通路的激活,促进细胞炎症反应和增殖迁移<sup>[9-10]</sup>,从而调控整个内皮-平滑肌-巨噬细胞网络,促进动脉粥样硬化发展。本研究发现 oxLDL 可以通过提高 Src(Y-416)酪氨酸磷酸化水平,促使 Src 活化,进而诱导平滑肌细胞表型改变,使平滑肌细胞发生表型转化。在抑制 Src 表达及活化后,平滑肌细胞表型改变被抑制,提示 Src 的激活参与并调控平滑肌细胞的表型转化。

动脉粥样斑块中平滑肌细胞表型的表达降低和巨噬细胞表型的表达升高,与斑块不稳定明显相关。在动脉粥样硬化斑块进展过程中,平滑肌细胞迁出到内皮下参与斑块区纤维帽的形成,从而稳定斑块<sup>[11-12]</sup>。因此,平滑肌的表型转化对动脉粥样硬化的发生发展有重要意义。本研究通过体外分离并鉴定原代平滑肌细胞,均检测到 oxLDL 可使原代平滑肌细胞中平滑肌表型 MYH11 表达降低,巨噬细胞表型 CD68 表达升高,表明 oxLDL 可诱导平滑肌细胞向巨噬细胞表型转化。

探讨动脉粥样硬化过程中 oxLDL 诱导平滑肌细胞表型转化的分子机制,对研究动脉粥样硬化斑块进展有重要意义。本研究发现 Src 激活对平滑肌细胞表型的调控作用,有望为动脉粥样硬化的治疗提供潜在靶点。

参 考 文 献

[1] Matic LP, Rykaczewska U, Anton R, et al. Phenotypic modulation of smooth muscle cells in atherosclerosis is associated with downregulation of LMOD1, SYNPO2, PDLIM7, PLN, and SYNM[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2016, 36(9):1947-1961.

[2] Liu RJ, Lo L, Angelina JL, et al. ARHGAP18 protects against thoracic aortic aneurysm formation by mitigating the synthetic and proinflammatory smooth muscle cell phenotype [J]. Circ Res, 2017, 121(5):512-524.

[3] Kiyan Y, Tkachuk S, Hilfiker-Kleiner DA, et al. oxLDL induces inflammatory responses in vascular smooth muscle cells via urokinase receptor association with CD36 and TLR4 [J]. J Mol Cell Cardiol, 2014, 66:72-82.

[4] Kumar A, Amteshwar SJ, Nirmal S. Pharmacology of Src family kinases and therapeutic implications of their modulators[J]. Fundam Clin Pharmacol, 2015, 29(2): 115-130.

[5] Reinecke J, Caplan S. Endocytosis and the Src family of non-receptor tyrosine kinases[J]. Biomol Concepts, 2014, 5(2): 143-155.

[6] Roskoski R. Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors [J]. Pharmacol Res, 2015, 94:9-25.

- [7] Landon JI, Fowler AJ, Kimberly MP, et al. Dasatinib, a small molecule inhibitor of the Src kinase, reduces the growth and activates apoptosis in pre-neoplastic Barrett's esophagus cell lines; evidence for a noninvasive treatment of high-grade dysplasia[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2013, 145(2): 531-538.
- [8] Dupont L, Du L, Poulter M, et al. Src family kinase activity drives cytomegalovirus reactivation by recruiting MOZ histone acetyltransferase activity to the viral promoter[J]. J Biol Chem, 2019, 294(35):12901-12910.
- [9] Ju XM, Jiao XM, Ertel A, et al. v-Src oncogene induces Trop2 proteolytic activation via cyclin D1[J]. Cancer Res, 2016, 76(22):6723-6734.
- [10] Mei HJ, Ah-Rong N, Ji EP, et al. Resistance mechanism against trastuzumab in HER2-positive cancer cells and its negation by Src inhibition[J]. Mol Cancer Ther, 2017, 16(6):1145-1154.
- [11] Sima A, Chiraz C, Kamel B, et al. Smooth muscle cell fate and plasticity in atherosclerosis[J]. Cardiovasc Res, 2018, 114(4):540-550.
- [12] Osonoi Y, Mita T, Azuma K, et al. Defective autophagy in vascular smooth muscle cells enhances cell death and atherosclerosis[J]. Autophagy, 2018, 14(11):1991-2006.
- (收稿:2019-07-15 修回:2020-02-15)  
(本文编辑:胡晓静)

**NO NSOMKING**  
THE LIFE WILL BE MORE BEAUTIFUL

不吸烟，生活更美好

