

Wnt3a 通过整合素连接激酶调节血管平滑肌细胞迁移和黏附*

吴校林,朱锐[△],李彬,刘文卫,周青,赵玉勤

(湖北文理学院附属襄阳市中心医院心血管内科,湖北襄阳 441000)

[摘要] 目的 探讨重组 Wnt3a 蛋白对大鼠血管平滑肌细胞(VSMCs)迁移和黏附的影响及相关机制。方法 原代培养大鼠 VSMCs,实验分为 Wnt3a 组和对照组,通过 Transwell 实验检测 VSMCs 的迁移能力,细胞基质黏附实验检测 VSMCs 黏附细胞外基质的能力,Western blot 检测 VSMCs 中 β -连环蛋白(β -catenin)、磷酸化 β -catenin(Ser675)、糖原合成激酶 3β (GSK- 3β)、磷酸化 GSK- 3β (Ser9)、整合素连接激酶(ILK)的蛋白表达水平。结果 Wnt3a 组中 VSMCs 迁移的数量明显高于对照组($P < 0.05$)。与对照组相比,Wnt3a 组中 VSMCs 黏附于胶原 I 的数量和光密度值均显著增加($P < 0.05$),且 Wnt3a 组中磷酸化 β -catenin(Ser675)、磷酸化 GSK- 3β (Ser9)和 ILK 蛋白的表达水平均显著上调($P < 0.05$)。结论 Wnt3a 可以通过 ILK 调节 VSMCs 迁移和黏附。

[关键词] Wnt 蛋白质类;肌,平滑,血管;细胞运动;细胞黏附;蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶

[中图分类号] R346

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)36-5049-03

Wnt3a regulates migration and adhesion of vascular smooth muscular cells via integrin-linked kinase*

Wu Xiaolin, Zhu Rui[△], Li Bin, Liu Wenwei, Zhou Qing, Zhao Yuqin

(Department of Cardiology, Xiangyang Municipal Central Hospital Affiliated to Hubei University of Arts and Science, Xiangyang, Hubei 441000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects and related mechanism of recombinant Wnt3a protein on vascular smooth muscle cells(VSMCs) migration and adhesion. **Methods** Primary rat VSMCs were cultured. The experiment was divided into the Wnt3a group and control group. The VSMC migration ability was detected by Transwell experiment. And the ability of VSMC adhesion to extracellular matrix was detected by the cellular matrix adhesion assay. The protein expression levels of β -catenin, phospho- β -catenin (Ser675), GSK- 3β , phospho-GSK- 3β (Ser9) and integrin-linked kinase(ILK) in VSMCs were detected by Western blot and analyzed. **Results** The number of VSMCs migration in the Wnt3a group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the number of VSMCs adhesion to collagen I and the optical density value in the Wnt3a group were significantly increased ($P < 0.05$), and the protein expression levels of β -catenin, Ser675, GSK- 3β , Ser9 and ILK in the Wnt3a group were significantly up-regulated ($P < 0.05$). **Conclusion** Wnt3a can regulate VSMCs migration and adhesion by ILK.

[Key words] Wnt proteins; muscle, smooth, vascular; cell movement; cell adhesion; protein-serine-threonine kinases

Wnt 蛋白通过分泌作用与位于细胞膜上的受体相结合,激活细胞内信号通路,调节靶基因的表达,控制细胞的生理行为和生物进程,包括细胞黏附、迁移、分化、增殖、极性与凋亡等^[1]。Wnt 信号传导通路分为经典 Wnt 信号通路和非经典 Wnt 信号通路,其中经典 Wnt 信号通路,即 Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin)通路是 Wnt 信号中研究最清楚的一条通路,在整个进化过程中高度保守,Wnt3a 可以激活经典 Wnt 信号通路。当经典 Wnt 信号通路活化时,Wnt 与受体 Fzd 结合,引起 β -catenin 在细胞内累积,并进入细胞核与淋巴细胞增强因子、T 细胞因子形成复合物,激活下游靶基因的转录^[1-3]。 β -catenin 的活性也受到整合素连接激酶(integrin-linked kinase, ILK)的调节,ILK 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,它可以与胞质区的 $\beta 1$ 和 $\beta 3$ 整合素结合,控制细胞外基质与细胞骨架的连接,从而调节细胞迁移和黏附^[4-5]。研究发现 ILK 磷酸化后可以促进 β -catenin 核易位并与淋巴细胞增强因子形成复合物^[6]。本研究采用重组 Wnt3a 蛋白激活 Wnt/ β -catenin 通路,观察其对大鼠血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)迁移和黏附的影响并探讨相关的作用机制。

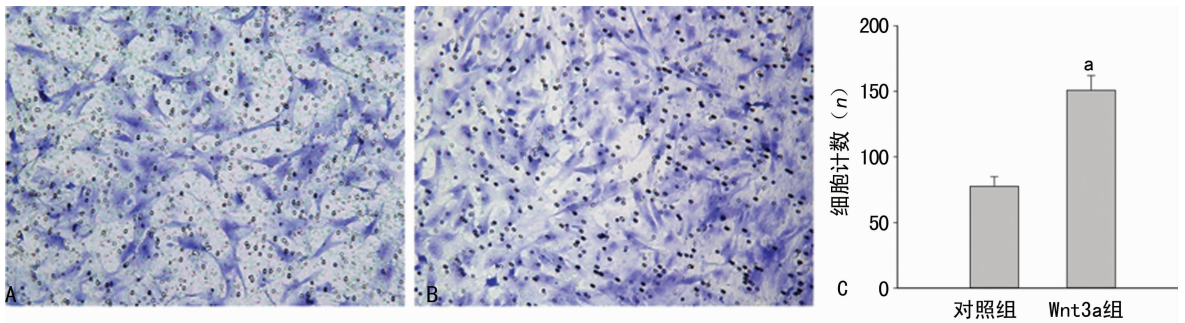
1 材料与方

1.1 材料与试剂 Sprague-Dawley 雄性大鼠购自武汉大学

物实验中心,体质量 100~150 g,许可证号 SCXK(鄂)2008-0004。重组 Wnt3a 蛋白购自美国 R&D 公司,抗 β -catenin 和磷酸化 β -catenin(Ser675)抗体均购自美国 Cell Signaling 公司,抗糖原合酶激酶 3β (GSK- 3β)、磷酸化 GSK- 3β (Ser9)和 α 肌动蛋白(α -actin)抗体均购自美国 Santa Cruz 公司,胶原 I 和抗 ILK 抗体购自美国 Sigma 公司,相关二抗购自武汉博士德生物工程公司。DMEM 培养液、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国 HyClone 公司。Transwell 小室购自美国 Corning 公司。

1.2 方法

1.2.1 VSMCs 原代培养 无菌条件下分离 Sprague-Dawley 大鼠胸主动脉,小心去除外膜和内膜,将中层平滑肌切成 1 mm² 左右的组织块,用含 20% FBS 的 DMEM 培养液行组织块贴壁法原代培养 VSMCs;在 37 °C、5% CO₂ 条件下静置培养,3 d 后更换培养液。待单层细胞覆盖细胞培养皿约 80% 时,取出组织块进行传代。用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,含 10% FBS、2 mmol/L 谷氨酰胺、100 μ g/mL 链霉素、100 U/mL 青霉素的 DMEM 培养液行传代培养。实验采用融合度 90% 左右的第 3~4 代 VSMCs。细胞鉴定采用 α -actin 免疫荧光染色。实验分两组,对照组[无菌磷酸盐缓冲液(PBS)处理]和



A: 对照组; B: Wnt3a 组; C: Transwell 实验分析图; ^a: $P < 0.05$, 与对照组比较

图 1 Transwell 实验检测 Wnt3a 对 VSMCs 迁移能力的影响

Wnt3a 组(终浓度为 100 ng/mL 的重组 Wnt3a 处理)。

1.2.2 Transwell 检测 采用 Transwell 小室法检测 VSMCs 迁移, 在 24 孔培养板插入直径 6.5 mm、硝酸纤维素滤膜孔径为 8 μ m 的小室, 上室加入无血清培养液的 VSMCs (3×10^5 个/mL) 100 μ L, 下室加入含 10% FBS 的培养液 600 μ L, 于培养箱中作用 24 h 后取出滤膜, 棉签小心去除上层未迁移细胞, 常温下无水甲醇固定 20 min, 0.1% 结晶紫染色 15 min, 双蒸水冲洗后, 取下滤膜, 下室朝上于显微镜下照相。每组设 4 个小室, 每个滤膜上选择 5 个视野计数取平均值, 实验重复 3 次。

1.2.3 细胞基质黏附检测 96 孔板包被胶原 I (20 μ g/mL), 在 4 $^{\circ}$ C 下过夜, PBS 冲洗后用 1% 牛血清清蛋白(BSA)在室温下阻断 1 h, 再用无血清的 DMEM 培养基冲洗, 每孔接种 3×10^4 个 VSMCs, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBS 冲洗后, 4% 多聚甲醛室温下固定 30 min, 0.5% 甲苯胺蓝染色 15 min, 双蒸水冲洗后在显微镜下照相, 每孔随机选取 5 个视野并计数。最后经 1% 十二烷基硫酸钠(SDS)裂解细胞后, 酶标仪(Infinite M200 Pro)590 nm 测光密度(optical density, OD)值。

1.2.4 Western blot 分析 VSMCs 用 100 ng/mL 的重组 Wnt3a 蛋白或无菌 PBS 处理 3 d 后收集 VSMCs, 加入含苯甲基磺酰(PMSF)的 RIPA 裂解液, 冰上放置 30 min, 4 $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min 离心 40 min, 取上清。以 BSA 为标准, 用 Bradford 比色法对上清进行蛋白定量。取 20 μ g 蛋白样品, 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳, 100 V 转移约 1 h, 溴酚蓝到达分离胶的底端即可停止电泳。再将蛋白电泳转移至硝酸纤维素薄膜(PVDF)上, 放入封闭液中 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h; 加入抗 β -catenin、磷酸化 β -catenin(Ser675)、GSK-3 β 、磷酸化 GSK-3 β (Ser9)、ILK 抗体, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 反复洗膜后, 将膜与二抗孵育, 室温轻摇 1 h, 洗膜后采用增强化学发光检测系统进行观察。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件对所有数据进行统计学处理, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

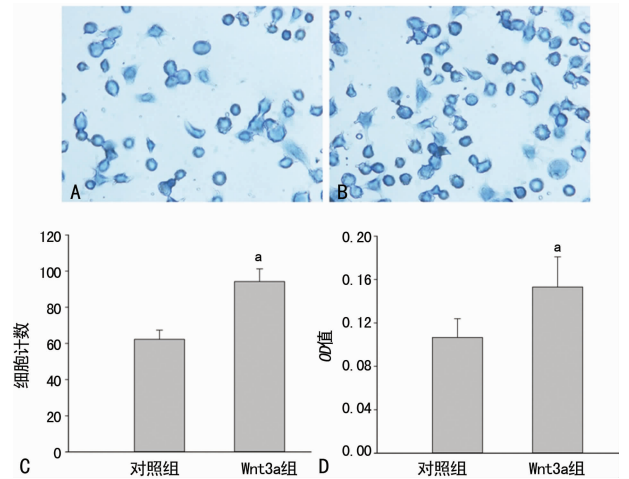
2 结果

2.1 Wnt3a 促进 VSMCs 迁移 Transwell 实验显示 Wnt3a 组 VSMCs 迁移的数量明显高于对照组 ($P < 0.05$), 提示 Wnt3a 刺激后可以显著增加 VSMCs 的迁移能力, 见图 1。

2.2 细胞基质黏附检测 结果显示 Wnt3a 组中 VSMCs 黏附于胶原 I 的数量较对照组明显增加 ($P < 0.05$)。另外, Wnt3a 组的 OD 值也明显增加 ($P < 0.05$), 见图 2。提示 Wnt3a 具有提高 VSMCs 黏附胶原 I 的能力。

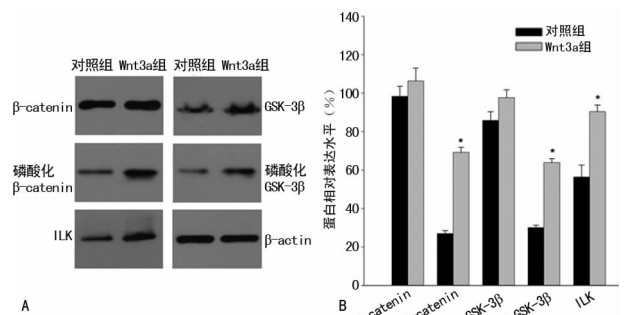
2.3 Western blot 分析结果 为了检测 Wnt3a 影响 VSMCs 迁移和黏附的相关机制, 笔者使用 Western blot 技术检测 VSMCs 中 β -catenin, 磷酸化 β -catenin(Ser-G75), GSK-3 β 、磷酸化 GSK-3 β (Ser) 和 ILK 蛋白水平的表达。结果显示使用 Wnt3a 蛋白刺激后, VSMCs 中磷酸化 β -catenin(Ser675)、磷酸

化 GSK-3 β (Ser9) 和 ILK 蛋白的表达水平均显著上调 ($P < 0.05$), 但是两组中总的 β -catenin 和总的 GSK-3 β 的蛋白水平表达没有明显变化 ($P > 0.05$), 见图 3。



A: 对照组; B: Wnt3a 组; C: 细胞黏附实验分析图(细胞计数), D: 细胞黏附实验分析图(OD 值); ^a: $P < 0.05$, 与对照组比较

图 2 两组大鼠 VSMCs 基质黏附能力比较



A: Western blot; B: Western blot 分析图

图 3 两组 VSMCs 细胞中 Wnt 相关蛋白表达水平比较

3 讨论

目前研究发现 Wnt 信号传导通路可以经下游信号调节细胞骨架结构并影响细胞迁移和黏附, 一些 Wnt 信号通路分子是调节细胞迁移和黏附的重要成分。 β -catenin 是经典的 Wnt 信号通路必不可少的调节蛋白^[7-9]。Wnt3a 是 Wnt 家族研究较多的成员之一, 它可以激活经典的 Wnt 信号通路并诱导细胞增殖^[6], 但 Wnt3a 对细胞迁移和黏附的影响还未进一步阐明。激活的 Wnt/ β -catenin 信号可以被 GSK-3 β 抑制, GSK-3 β 使 β -catenin N 末端磷酸化导致 β -catenin 降解。但是当 β -catenin C 末端 Ser675 位点磷酸化时却可以激活 β -catenin, 使 β -catenin 更易进入细胞核与淋巴细胞增强因子、T 细胞因子结

合增强转录活性^[10-12]。本研究发现重组的 Wnt3a 蛋白刺激大鼠 VSMCs 后可以增强 β -catenin Ser675 位点和 GSK-3 β Ser9 (抑制 GSK-3 β 的活性)位点的磷酸化,提示 Wnt3a 刺激可以激活 Wnt/ β -catenin 信号通路。

VSMCs 迁移和增殖可以导致损伤的动脉内膜增生引起动脉粥样硬化加重和血管内再狭窄。这一系列过程受到细胞外基质、黏附分子及细胞表面的整合素家族等许多蛋白及信号通路的调节^[9,12]。ILK 是整合素受体下游信号一个重要的分子,它可以通过磷酸化使 GSK-3 β 失活,GSK-3 β 失活又可以导致 Wnt 信号传导通路靶基因的激活,从而调节细胞的增殖、分化及存活。ILK 还可以作为分子桥接蛋白与整合素结合,调节肌动蛋白和细胞骨架结构,影响细胞迁移和黏附^[13-16]。研究还发现 ILK 可以通过磷酸化使 GSK-3 β 失活,促进 β -catenin 核易位并激活经典的 Wnt 信号通路^[14-17]。本研究在大鼠 VSMCs 中研究发现 Wnt3a 不仅可以激活经典的 Wnt 信号通路,还可以增加 ILK 蛋白水平的表达,并促进 VSMCs 迁移和黏附,提示 Wnt3a 可以通过 ILK 调节 VSMCs 迁移和黏附。

本研究得出 Wnt3a 可以通过 ILK 调节 VSMCs 迁移和黏附,这有可能成为治疗血管疾病和评估预后一个重要的靶点,然而,血管疾病的发生机制复杂并涉及许多信号传导通路,将来还应该其他的细胞中和动物模型中进一步探讨 Wnt3a 信号及 ILK 的机制和作用。

参考文献

- [1] Van DV, Smits JF, Blankesteyn WM. The Wnt/frizzled pathway in cardiovascular development and disease; friend or foe? [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 585(2/3): 338-345.
- [2] Rao TP, Kühl M. An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more [J]. *Circ Res*, 2010, 106(12): 1798-1806.
- [3] Tsaousi A, Mill C, George SJ. The Wnt pathways in vascular disease; lessons from vascular development [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2011, 22(5): 350-357.
- [4] Ghatak S, Morgner J, Wickström SA. ILK: a pseudokinase with a unique function in the integrin-actin linkage [J]. *Biochem Soc Trans*, 2013, 41(4): 995-1001.
- [5] Kim C, Ye F, Ginsberg MH. Regulation of integrin activation [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2011, 27: 321-345.
- [6] Shin HR, Islam R, Yoon WJ, et al. Pin1-mediated modification

prolongs the nuclear retention of β -Catenin in wnt3a-induced osteoblast differentiation [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(11): 5555-5565.

- [7] Amin N, Vincan E. The Wnt signaling pathways and cell adhesion [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2012, 17(1): 784-804.
- [8] Tan CW, Gardiner BS, Hirokawa Y, et al. Wnt signalling pathway parameters for mammalian cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31882.
- [9] Parmalee NL, Kitajewski J. Wnt signaling in angiogenesis [J]. *Curr Drug Targets*, 2008, 9(7): 558-564.
- [10] Vargas DA, Sun M, Sadykov K, et al. The integrated role of Wnt/ β -Catenin, N-Glycosylation, and E-Cadherin-Mediated adhesion in network dynamics [J]. *PLoS Comput Biol*, 2016, 12(7): e1005007.
- [11] Marchand A, Atassi F, Gaaya A, et al. The Wnt/beta-catenin pathway is activated during advanced arterial aging in humans [J]. *Aging Cell*, 2011, 10(2): 220-232.
- [12] Mill C, George SJ. Wnt signalling in smooth muscle cells and its role in cardiovascular disorders [J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 95(2): 233-240.
- [13] Ho B, Hou G, Pickering JG, et al. Integrin-linked kinase in the vascular smooth muscle cell response to injury [J]. *Am J Pathol*, 2008, 173(1): 278-288.
- [14] Ho B, Bendeck MP. Integrin linked kinase (ILK) expression and function in vascular smooth muscle cells [J]. *Cell Adh Migr*, 2009, 3(2): 174-176.
- [15] Moraes JA, Frony AC, Dias AM, et al. Alpha1beta1 and integrin-linked kinase interact and modulate angiotensin II effects in vascular smooth muscle cells [J]. *Atherosclerosis*, 2015, 243(2): 477-485.
- [16] McDonald PC, Fielding AB, Dedhar S. Integrin-linked kinase—essential roles in physiology and cancer biology [J]. *J Cell Sci*, 2008, 121(Pt 19): 3121-3132.
- [17] Lu C, Yu X, Zuo K, et al. Tripterine treatment improves endothelial progenitor cell function via integrin-linked kinase [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37(3): 1089-1103.

(收稿日期:2017-08-18 修回日期:2017-09-26)

(上接第 5048 页)

- 对肾上腺素损伤内皮细胞分泌 t-PA 和 PAI-1 的影响 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35(5): 1049-1053.
- [7] Liu L, Duan A, Tang YP, et al. Taoren-Honghua herb pair and its main components promoting blood circulation through influencing on hemorheology, plasma coagulation and platelet aggregation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 139(2): 381-387.
 - [8] Toth K, Kesmarky G, Vekasi J, et al. Hemorheological and hemodynamic parameters in patients with essential hypertension and their modification by alpha-1 inhibitor drug treatment [J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 1999, 21(3/4): 209-216.
 - [9] Tsuda Y, Satoh K, Kitadai M, et al. Effects of pravastatin Sodium and simvastatin on plasma fibrinogen level and blood rheology in type II hyperlipoproteinemia [J]. *Atherosclerosis*, 1996, 122(2): 225-233.

- [10] Bogar L, Juricskay I, Kesmarky G, et al. Gender differences in hemorheological parameters of coronary artery disease patients [J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2006, 35(1/2): 99-103.
- [11] Kowal P, Marcinkowska-Gapińska A. Hemorheological changes dependent on the time from the onset of ischemic stroke [J]. *J Neurol Sci*, 2007, 258(1/2): 132-136.
- [12] Li X, Han Y, Wang W, et al. Effect of the carthamins yellow from *Carthamus tinctorius* L. on hemorheological disorders of blood stasis in rats [J]. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47(8): 1797-1802.
- [13] 姬晓鹏, 蒋斌, 潘琳, 等. 复方丹参与丹参与对冠状动脉粥样硬化患者血小板活化抑制作用的比较 [J]. *中国药房*, 2010, 21(19): 1805-1806.

(收稿日期:2017-07-06 修回日期:2017-08-08)