

Rab28 相关信号通路在低切应力诱导血管平滑肌细胞迁移中的作用

陆奇明, 顾翔, 姜晓华, 姜隽, 齐颖新, 姜宗来
(上海交通大学 力学生物学研究所, 上海 200240)

摘要: **目的** 研究低切应力(low shear stress, LowSS)诱导的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)迁移功能异常在动脉粥样硬化血管重建病理过程中的作用及其分子机制。**方法** 应用双向凝胶电泳结合质谱分析的差异蛋白质组学方法,研究 1.5 Pa 正常切应力(normal shear stress, NSS)与 0.5 Pa LowSS 条件下培养血管组织的蛋白质差异表达谱。应用血管内皮细胞(endothelial cells, ECs)与 VSMCs 联合培养的平行平板流动腔系统,分别施加 NSS 和 LowSS, Western blot 检测 ECs 与 VSMCs 的 Rab28 表达水平以及 VSMCs 的磷酸化 ERK 表达水平; Transwell 法检测 VSMCs 的迁移能力; RNA 干扰和 PD98059 分别特异性抑制 VSMCs 的 Rab28 表达和 ERK 磷酸化,再观察 VSMCs 迁移能力变化。**结果** 血管差异蛋白质组学的结果发现,与 NSS 组相比, Rab28 在 LowSS 组血管组织的表达水平明显升高。细胞实验结果显示, LowSS 加载明显上调 VSMCs 的 Rab28 蛋白表达、VSMCs 迁移和 ERK 磷酸化。静态条件下 RNA 干扰抑制单独培养 VSMCs 的 Rab28 表达, VSMCs 迁移能力明显降低,但 ERK 磷酸化水平无明显变化;应用 PD98059 特异性抑制 VSMCs 的 ERK 磷酸化, VSMCs 迁移能力和 Rab28 表达水平均明显降低。**结论** LowSS 可能通过上调 VSMCs 的 ERK 磷酸化水平引起 Rab28 表达水平增加,从而诱导 VSMCs 迁移。探讨 Rab28 及其相关信号通路在切应力调控 VSMCs 功能中的作用及其机制,可能为深入理解动脉粥样硬化血管重建疾病发病机制和寻找新的药物治疗靶点提供力学生物学依据。

关键词: 切应力; 血管平滑肌细胞; 细胞迁移; 血管重建

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

The role of Rab28 and ERK in low shear stress induced migration of vascular smooth muscle cells

LU Qi-ming, GU Xiang, JIANG Xiao-hua, JIANG Jun, QI Ying-xin, JIANG Zong-lai
(Institute of Mechanobiology and Medical Engineering, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: **Objective** To study the role of abnormally changed migration of vascular smooth muscle cells (VSMCs) induced by low shear stress (LowSS) in vascular remodeling during atherosclerosis as well as the molecular mechanism involved in this process. **Methods** By using comparative proteomic analysis with two-dimensional electrophoresis combined with mass spectrometry, differential protein expression profiles of cultured vascular tissues under normal shear stress (NSS) (1.5 Pa) and LowSS (0.5 Pa) were studied. Using endothelial cells (ECs) and VSMCs co-cultured parallel plate flow chamber system, two levels of shear stress i. e. LowSS and NSS, were applied, respectively. Western blot was used to detect the protein expressions of Rab28 and phospho-ERK. Transwell system was used to detect the migration ability of VSMCs. After using RNA interference and ERK inhibitor PD98059 to decrease the expressions of Rab28 and phospho-ERK, respectively, the migration ability of VSMCs was observed again. **Results** The expression of Rab28 in the cultured rat aorta was significantly up-regulated by the LowSS (0.5 Pa) application in comparison with the NSS (1.5 Pa). The migration, ex-

pressions of Rab28, and phosphorylation of ERK in VSMCs were significantly increased by the LowSS application. Target RNA interference of Rab28 significantly decreased the migration of VSMCs, but had no specific effect on the phosphorylation of ERK. Target inhibitor of ERK, PD98059, significantly decreased both the migration and Rab28 expression in VSMCs. **Conclusions** The LowSS may increase the phosphorylation of ERK and then increase the expression of Rab28 in VSMCs, which subsequently modulate VSMC migration during vascular remodeling. The investigation on the role of Rab28 and its signal path in LowSS-regulated VSMCs as well as the molecular mechanism might provide a biomechanical reference for understanding the pathogenesis of vascular remodeling during atherosclerosis and finding the therapeutic target of new drugs.

Key words: Shear stress; Vascular smooth muscle cells (VSMCs); Cell migration; Vascular remodeling

血管重建是高血压、动脉粥样硬化、血管成形术后再狭窄等心血管疾病的基本病理表现,其主要特征包括血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)迁移、增殖、凋亡、表型转化异常,以及细胞外基质成分合成、降解、重新排列等过程^[1-2]。研究血管重建过程中 VSMCs 迁移等功能变化及其分子机制对于认识心血管疾病的发病机理和疾病防治具有重要意义。

动脉粥样硬化血管重建受生物、化学和物理等多种体内、外因素的影响,其发病机制尚未完全明了。大量临床研究发现,动脉粥样硬化血管重建多发生在冠状动脉主干、颈外动脉、股动脉等动脉分叉、起始处,提示力学因素,尤其是低切应力(low shear stress, LowSS)在血管重建的发生和发展中起重要作用^[1,3]。近年来,国内外在 LowSS 诱导血管重建分子机制方面开展了许多工作。现有研究结果显示,机械应力刺激可以激活 VSMCs 和血管内皮细胞(endothelial cells, ECs)细胞膜表面多种应力感受器,如整合素、Paxillin 和黏着斑激酶组成的复合体^[4]、血小板内皮细胞黏附分子-1、血管内皮细胞钙黏蛋白和血管内皮细胞生长因子 2 型受体组成的生长因子受体应力感受复合体^[5]、离子通道^[6]等。上述感受器感受应力刺激后可以激活多种细胞内信号转导通路,将应力信号转导入细胞核,从而调控基因转录、蛋白质表达和细胞功能^[4-7]。然而,LowSS 诱导血管重建的分子机制还远未阐明。

蛋白质组学技术能够研究在特定时间及环境条件下细胞或组织表达的全部蛋白质^[8];在肿瘤疾病相关研究中最先得到广泛应用,鉴定了一批肿瘤相关蛋白,为肿瘤的早期诊断、药靶寻找、疗效判断和预后提供了重要依据^[8-9]。在心血管相关疾病研究方面,Faber 等^[10]开展了高血压大鼠心肌肥厚差异

蛋白质组学研究,鉴定、得到评价心肌肥厚程度的相关靶点蛋白。White 等^[11]将蛋白质组学技术引入心肌缺血再灌注损伤疾病的研究,提出新的可能作为临床评估损伤程度的生物标记蛋白。在本实验室前期工作中,应用差异蛋白质组学结合生物信息学分析的方法,初步构建了可能的应力细胞内信号转导网络,并应用分子生物学方法对其中的部分关键结点进行深入研究,发现了一些在应力条件下细胞间信息交流和细胞内信号转导过程中起重要作用的分子^[12]。

本研究应用双向凝胶电泳结合质谱分析的差异蛋白质组学研究方法,发现了一种在血管组织中表达、且功能尚未见报道的蛋白质 - Rab28,其表达水平在 LowSS 培养血管组织内明显升高。之后,应用联合培养切应力加载模型,在细胞水平探讨不同切应力条件下 ECs 和 VSMCs 的 Rab28 表达情况,并应用 RNA 干扰和特异性抑制剂等方法,研究 Rab28 在 VSMCs 迁移功能中的作用及其机制。

1 材料和方法

1.1 血管组织体外培养

SD 大鼠(上海西普而比凯实验动物中心),雄性,体重 220 ~ 240 g。颈椎拉脱处死后,无菌条件、手术显微镜下游离胸主动脉并结扎各肋间动脉分枝,超净工作台内去除血管周围结缔组织。将血管接入改良的血管体外培养装置^[13-14],计算血管壁切应力

$$\tau = \frac{4\eta Q}{\pi r^3}$$

式中: η 为灌流液(1%胎牛血清(Giboco 公司),青链霉素(BBI 公司))的黏度; Q 为灌流液流量; r 为培养血管内半径。

然后,计算血管壁切应力分别为 0.5 和 1.5 Pa 时对应的灌流液流量,并通过蠕动泵控制;调节储液槽高度控制培养血管入口端压力为 13.3 kPa^[14]。37 ℃、5% CO₂ 培养箱内灌流培养 24 h 后液氮研磨,提取血管组织总蛋白用于后续实验。

1.2 差异蛋白质组学分析

Brandford 法定量后取 1 mg 血管组织总蛋白,补足水化液至终体积 450 μL,放入标准型 24 cm 胶条槽中,覆以 24 cm IPG 胶条(pH3-10,非线性)(GE 公司),设置 IPGphor 等电聚焦仪器(GE 公司)运行参数:等电聚焦温度为 20 ℃;每根 IPG 胶条最大允许电流 50 μA;30 V 12 h,200 V 2 h,500 V 1 h,1 kV 1 h,8 kV 80 000 Vh。

等点聚焦结束后平衡 IPG 胶条,置于 12% SDS-PAGE 上缘,琼脂糖封顶后进行第二向电泳,电泳参数为恒功率电泳,每块 26 cm × 20 cm 胶板电泳功率 5 W,持续 45 min 后调至每块胶板电泳功率 20 W,至溴酚蓝染料迁移到胶的底部边缘时结束电泳。应用改良 Neuhoff 胶体考马斯亮蓝染色^[15],ImageMater 软件分析蛋白表达水平。组间蛋白质点灰度值均值相差大于 2 倍作为筛选“门槛”,切取差异表达的蛋白质胶粒,胶内酶解后进行基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)鉴定蛋白质。

1.3 血管内皮细胞、平滑肌细胞培养以及联合培养的平行平板流动腔

采用酶消化法原代培养大鼠胸主动脉 ECs^[16]。无菌条件下取 200 ~ 250 g 雄性 SD 大鼠胸主动脉。将血管纵行剪开,ECs 面向下平铺在盛有 0.2% I 型胶原酶(Worthington 公司)的细胞培养皿里,37 ℃ 消化并轻轻拍打培养皿 30 min 后,加入 ECs 培养基(CC-3202, Lonza)终止消化,以 1 100 r/min 的速度离心 10 min,用 ECs 培养液约 3 mL 重悬细胞,均匀接种至细胞培养皿中。平放于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱内 24 h,待细胞贴壁后换液。以后隔天换液 1 次,以 2 ~ 4 代 ECs 用于本实验。用抗 vWF(von Willebrand Factor)抗体(1 : 200, Sigma 公司)对 ECs 胞质中 vWF 进行免疫细胞化学鉴定,阳性着色 95% 以上者用于实验。

采用组织贴块法原代培养大鼠胸主动脉 VSMCs^[14]。将上述消化去除 ECs 的大鼠胸主动脉

小心擦拭去除外膜后,反复剪切成 1 mm³ 碎块,加入少量 VSMCs 培养液(10% 小牛血清(Giboco 公司),青链霉素(BBI 公司)),将组织块均匀接种至培养瓶中,将有组织块的一面朝上置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中,待 6 h 后,加入 3 mL VSMCs 培养液,轻轻翻转培养瓶,使培养液浸润组织块,继续静置培养。约 3 ~ 6 d 后可见细胞从组织块中爬出。以 4 ~ 7 代 VSMCs 用于本实验。用抗 α-肌动蛋白抗体(1 : 200, Sigma 公司)对 VSMCs 进行免疫细胞化学鉴定,阳性着色 95% 以上者用于实验。

将 2 × 10⁵ 个 ECs 种植于 0.4 μm 联合培养杯(FALCON)底部的聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene terephthalate, PET)膜外底面,6 h 后细胞贴壁完全,翻转培养杯放入预先加入 ECs 培养液的无菌 6 孔培养板内,将 2 × 10⁵ 个 VSMCs 种植于 PET 膜内底面。静置培养 12 h 后吸出培养液,在 ECs 侧加入含 1% 胎牛血清的 M199(Giboco 公司)培养液, VSMCs 侧加入含 1% 小牛血清的 DMEM(Giboco 公司)培养液同步化 12 h,之后置于平行平板流动腔系统^[17]分别施加 1.5 Pa 正常切应力(normal shear stress, NSS)和 0.5 Pa LowSS 层流切应力 12 h。

1.4 RNA 干扰及特异性抑制剂实验

将 VSMCs 消化并计数,按每孔 2 × 10⁵ 接种于 6 孔细胞培养板,不含抗生素的 VSMCs 培养液培养 24 h。取 250 μL opti-MEM 加入 100 nmol siRNA,轻轻混匀;取 250 μL opti-MEM 加入 5 μL Lipofectamine™ 2000,轻轻混匀,室温放置 5 min;将上述 siRNA 和 Lipofectamine™ 2000 稀释液混合,室温放置 20 min。将 6 孔细胞培养板内 VSMCs 预先用 DMEM 洗 1 次,每孔预留 300 μL DMEM 加入 500 μL siRNA 和 Lipofectamine™ 2000 的混合液,混匀后置于 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱。6 h 后,每孔补加 1 mL 不含抗生素的 VSMCs 培养液,继续培养 48 h。Rab28 干扰 siRNA 序列:5'-GGC AAG AUG UUG GAU AAA UTT-3', 5'-AUU UAU CCA ACA UCU UGC CTT-3'。对照组使用无意义 siRNA,序列:5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT -3', 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3'。

将 VSMCs 消化并计数,按每孔 2 × 10⁵ 接种于 6 孔细胞培养板,培养 24 h 后,加入 ERK 特异性抑制剂 PD98059(终浓度 10 μmol/L),37 ℃、5%

CO₂细胞培养箱内继续培养 24 h。对照组加入等体积 DMSO。

1.5 蛋白免疫印记实验(Western blot)

提取各组细胞总蛋白,用 12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,蛋白上样量 30 μg。5% 的脱脂奶粉封闭 1 h,抗 Rab28(Abcam, 1 : 500), GAPDH(Santa Cruz, 1 : 500), phospho-ERK(Cell Signal Technology, 1 : 500), total-ERK(Cell Signal Technology, 1 : 500) 4 °C 孵育过夜,碱性磷酸酶标记二抗(中杉金桥生物公司, 1 : 1 000)室温孵育 2 h,用 NBT/BCIP(KPL 公司)底物显色。扫描后使用 BIO-RAD 公司一维分析软件 Quantity One 进行图像灰度分析。

1.6 Transwell 法检测 VSMCs 的迁移能力

将 VSMCs 消化并计数,按 1×10^6 个/mL 的密度重悬于 DMEM 中,吸取 40 μL 细胞悬液种植于 0.8 μm 孔径的 Transwell 杯(FALCON)上腔中,将 Transwell 杯置于 6 孔细胞培养板,孔内预先加入 1 mL 含 10% 小牛血清的 DMEM,37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养 8 h,中性福尔马林固定液固定、苏木精染色后,擦去上腔内细胞,杯底面细胞即是已完成迁移的细胞。在每个迁移杯底部随机选取 6 个视野,倒置显微镜 200 倍拍照,计数。

1.7 统计学分析

实验数据以均数 ± 标准差表示,组间比较采用单因素方差分析(one way ANOVA),以 $P < 0.05$ 作为差异显著的关键值。

2 结果

2.1 LowSS 上调培养血管组织和联合培养 VSMCs 的 Rab28 表达

对体外培养大鼠胸主动脉分别施加 NSS(1.5 Pa)和 LowSS(0.5 Pa),双向凝胶电泳检测这 2 种切应力条件下血管组织差异表达的蛋白质。图 1(a)显示在 LowSS 条件下培养血管组织内表达灰度值较 NSS 组升高 2 倍以上的蛋白质点,经质谱鉴定该蛋白质为 Rab28(见图 1(b))。

应用 ECs/VSMCs 联合培养平行平板流动腔系统,检测 NSS(1.5 Pa)和 LowSS(0.5 Pa)条件下, Rab28 在 ECs 和 VSMCs 这 2 类重要血管细胞中的表达水平。结果显示,与 NSS 相比,LowSS 加载

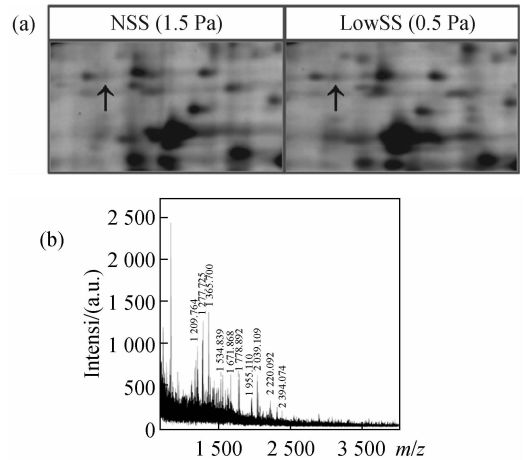


图 1 LowSS 促进体外培养血管组织 Rab28 蛋白表达 (a)双向凝胶电泳显示的差异表达的蛋白质点(↑指示), (b)质谱鉴定显示该蛋白质为 Rab28

Fig.1 LowSS increased the expression of Rab28 in the cultured aorta (a) Two-dimensional electrophoresis revealed the differentially expressed protein (pointed by ↑), (b) Mass spectrum revealed that the protein was Rab28

12 h 显著增加 VSMCs 的 Rab28 表达水平,但对 ECs 的 Rab28 表达却无显著影响(见图 2)。结果提示,LowSS 诱导的血管组织 Rab28 表达水平增加可能主要是由 VSMCs 的 Rab28 增加引起的。

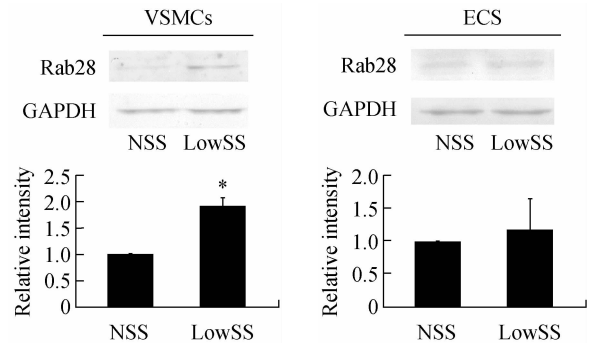


图 2 LowSS 上调 VSMCs 的 Rab28 蛋白表达,但对 ECs 的 Rab28 表达却无明显作用(*与 NSS 相比, $P < 0.05$)

Fig.2 LowSS increased the expression of Rab28 in VSMCs, but not in ECs

2.2 LowSS 上调联合培养 VSMCs 迁移及 ERK 磷酸化

对联合培养 ECs/VSMCs 分别施加 NSS 和 LowSS 作用 12 h,Transwell 结果显示,与 NSS 加载相比,LowSS 明显上调 VSMCs 迁移能力(见图 3

(a),提示 LowSS 促进 VSMCs 迁移能力,参与了血管重建过程。

LowSS 加载还显著增加 VSMCs 细胞内信号转导分子 ERK 磷酸化水平(见图 3(b))。然而,LowSS 上调 Rab28 表达与 VSMCs 迁移增加和 ERK 磷酸化之间有何关系,目前并不清楚。因此,后续研究将深入探讨 Rab28 表达水平变化在 VSMCs 迁移和 ERK 磷酸化调控中的作用。

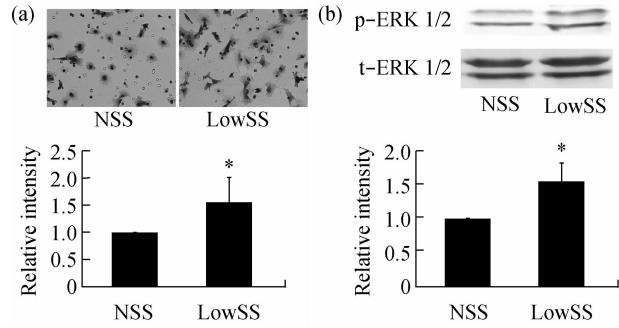


图3 LowSS 上调 VSMCs 的迁移能力 (a), 并且促进 VSMCs 的 ERK 磷酸化 (b) (*与 NSS 相比, $P < 0.05$)

Fig.3 LowSS promoted the migration of VSMCs (a) and increased the phosphorylation of ERK in VSMCs (b)

2.3 RNA 干扰抑制 VSMCs 的 Rab28 表达,并抑制细胞的迁移

应用 RAN 干扰技术,特异性抑制静态培养 VSMCs 的 Rab28 表达(见图 4(b))。Transwell 结果显示,特异性抑制 Rab28 表达能够显著下调 VSMCs 迁移能力(见图 4(a)),但对细胞 ERK 磷酸化水平无显著影响(见图 4(b))。结果提示切应力调控的 Rab28 表达水平变化可能参与了 VSMCs 迁移功能的调控,但 ERK 信号通路未受 Rab28 表达水平变化的调控。

2.4 ERK 特异性抑制剂抑制 VSMCs 的 ERK 磷酸化,抑制细胞迁移,并下调 Rab28 表达

应用 ERK 特异性抑制剂 PD98059 孵育静态培养 VSMCs,细胞 ERK 磷酸化水平显著降低(见图 5(b))。Transwell 结果显示,特异性抑制 ERK 磷酸化能够显著下调 VSMCs 迁移能力(见图 5(a)),且细胞 Rab28 表达水平亦显著下降(见图 4(a))。结果提示 ERK 可能作为 Rab28 的上游信号分子,其磷酸化水平变化可能通过调控 Rab28 表达影响 VSMCs 迁移功能。

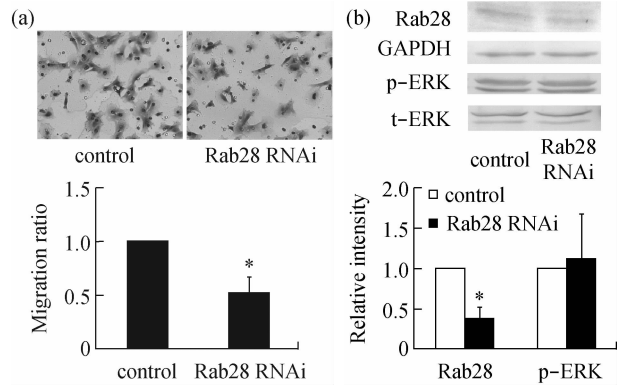


图4 RNA 干扰抑制 VSMCs 迁移 (a),对 VSMCs 的 ERK 磷酸化水平无显著影响 (b) (*与对照组相比, $P < 0.05$)

Fig.4 Rab28 target RNA interference decreased the migration of VSMCs (a), but had no specific effect on the phosphorylation of ERK (b)

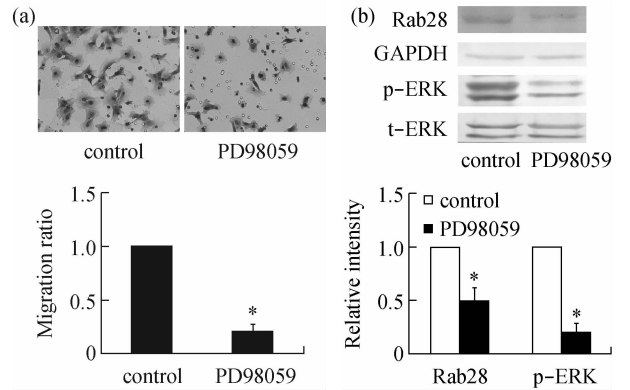


图5 ERK 特异性抑制剂 PD98059 抑制 VSMCs 迁移 (a),并且下调 VSMCs 的 Rab28 蛋白表达水平 (b) (*与对照组相比, $P < 0.05$)

Fig.5 PD98059, the target inhibitor of ERK MAPK, decreased the migration of VSMCs (a) and expression of Rab28 (b)

3 讨论

Rab 蛋白是 Ras 蛋白超家族中最大的亚家族,表达于从酵母、果蝇、小鼠到人类等各种真核生物中,参与了细胞增殖、凋亡和分化等多种功能的调控^[18]。Rab 蛋白是一种单体 GTP 结合蛋白,由大约 200 个氨基酸组成,目前在人类已发现约 70 种 Rab 蛋白,不同的 Rab 蛋白在细胞内有不同的定位与功能,而每种 Rab 蛋白又可以作用于不同的效应因子,在细胞内囊泡的形成、运输、黏附和聚集中起重要作用^[19]。Rab28 是 Rab 蛋白家族的成员,在植

物学中研究较多。它在种子胚芽和成熟植物体的分生组织中表达,定位于细胞核上,调控脱落酸(abscise acid)的表达^[20]。近期研究表明,Rab28的mRNA存在于人体许多组织,如大脑皮质、肝、肾、骨骼肌、脂肪组织^[21]。放射性标记的GTP能够快速与Rab28结合,并在15 min内达到反应平衡,且这种结合作用能够被无放射性标记的GTP完全抑制,提示Rab28具有GTP酶活性^[22]。应用双向凝胶电泳结合质谱分析的差异蛋白质组学方法,发现Rab28在LowSS培养血管组织中表达水平明显升高,然而Rab28在动物细胞、尤其是血管细胞的功能目前仍不清楚。因此,应用ECs/VSMCs联合培养平行平板流动腔模型,继续深入探讨Rab28蛋白表达水平变化的力学生物学机制。

细胞水平研究发现,LowSS组VSMCs的Rab28表达明显高于NSS组,而ECs的Rab28表达水平在2种切应力加载条件下无明显变化。由于ECs仅以单层衬于血管内膜表面,而血管壁的大量细胞成分是位于中膜的VSMCs。因此,LowSS诱导的血管组织的Rab28表达水平增加可能主要是VSMCs的Rab28增加所引起的。上述组织水平与细胞水平研究均提示,切应力调控了VSMCs的Rab28蛋白表达水平,然而其功能尚不清楚。由于VSMCs由中膜向内膜下层迁移增加是动脉粥样硬化斑块发生、发展的重要事件之一,而LowSS加载同时上调VSMCs迁移能力和Rab28表达,故探讨Rab28表达水平变化是否参与VSMCs迁移调控的分子机制。结果表明应用RNA干扰特异性抑制Rab28表达能够显著降低VSMCs的迁移水平,提示LowSS可能通过增加Rab28表达水平变化上调VSMCs迁移,从而诱导血管重建。

ERK作为一类重要的MAPK信号分子参与了多种类型细胞的迁移过程的调控^[23]。ERK信号通路的抑制剂PD98059和U0126可以抑制多种类型细胞在fibronectin、vitronectin和胶原等细胞外基质蛋白上的迁移^[24]。Liu等^[25]研究表明,LowSS能够激活酪氨酸蛋白激酶受体,并通过ERK调控VSMCs迁移功能。为了进一步探讨Rab28分子表达升高与VSMCs迁移功能改变之间的关系,观察ERK蛋白质磷酸化变化。Western blot结果显示,同Rab28蛋白变化相一致,在LowSS作用后ERK磷酸

化水平也显著升高,但Rab28特异性RNA干扰对ERK磷酸化水平无显著影响。结果提示,Rab28调控的VSMCs迁移并不是通过调控ERK活性变化,推测Rab28是否为ERK的下游信号分子而参与LowSS诱导的VSMCs迁移。应用ERK特异性抑制剂PD98059抑制了ERK磷酸化水平,结果发现VSMCs迁移能力和Rab28表达水平均显著降低。

本研究结果显示,LowSS能够上调VSMCs内Rab28表达,诱导细胞迁移。但在体条件下,切应力主要作用于血管内膜单层排列的ECs,ECs如何感受切应力刺激并调控相邻的VSMCs功能目前尚不清楚。本实验室近期研究结果表明,机械张应变刺激诱导的血管紧张素II(angiotension II, AngII)能够通过旁分泌作用调控VSMCs和ECs迁移、增殖、凋亡等多种生物学功能^[26]。切应力是否通过调控ECs合成和释放AngII等血管活性物质影响VSMCs功能还有待进一步研究。

上述研究结果提示,LowSS可能通过上调VSMCs的ERK信号分子的磷酸化水平,增加细胞的Rab28蛋白表达,从而诱导细胞迁移并参与动脉粥样硬化等血管重建过程。然而,切应力条件下ERK、Rab28调控VSMCs迁移的分子机制仍需要后续深入研究,如ERK作为MAPK家族的重要成员,其通过哪些下游分子调控了Rab28蛋白的表达?Rab28作为一类具体功能仍不清楚的蛋白质,其表达水平如何调控了VSMCs迁移功能变化?开展Rab28在切应力调控VSMCs功能分子机制中的研究,对于深入了解心血管活动和疾病发生本质以及心血管疾病的防治具有重要的理论和临床意义。

参考文献:

- [1] Cunningham KS, Gotlieb AI. The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Lab Invest*, 2005, 85 (7): 9-23.
- [2] Sakamoto N, Ohashi T, Sato M. Effect of fluid shear stress on migration of vascular smooth muscle cells in cocultured model [J]. *Ann Biomed Eng*, 2006, 28 (4): 512-518.
- [3] Gnasso A, Irace C, Carallo C, et al. In vivo association between low wall shear stress and plaque in subjects with asymmetrical carotid atherosclerosis [J]. *Stroke*, 1997, 28 (5): 993-998.

- [4] Li C, Xu Q. Mechanical stress-initiated signal transductions in vascular smooth muscle cells [J]. *Cell Signal*, 2000, 12(7): 435-445.
- [5] Tzima E, Irani-Tehani M, Kiosses WB, *et al.* A mechanosensory complex that mediates the endothelial cells response to fluid shear stress [J]. *Nature*, 2005, 437(15): 426-431.
- [6] Hoger JH, Ilyin VI, Forsyth S, *et al.* Shear stress regulates the endothelial Kir2.1 ion channel [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(11): 7780-7785.
- [7] Urbich C, Stein M, Reisinger K, *et al.* Fluid shear stress-induced transcriptional activation of the vascular endothelial growth factor receptor-2 gene requires Sp1-dependent DNA binding [J]. *FEBS Lett*, 2003, 535(1-3): 87-93.
- [8] Fields S. Proteomics in genomeland [J]. *Science*, 2001, 291(5507): 1221-1224.
- [9] Wulfkuhle JD, Liotta LA, Petricoin EF. Proteomic applications for the early detection of cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(4): 267-275.
- [10] Faber MJ, Dalinghaus M, Lankhuizen IM, *et al.* Proteomic changes in the pressure overloaded right ventricle after 6 weeks in young rats: Correlations with the degree of hypertrophy [J]. *Proteomics*, 2005, 5(10): 2519-2530.
- [11] White MY, Cordwell SJ, McCarron HCK, *et al.* Proteomics of ischemia/reperfusion injury in rabbit myocardium reveals alterations to proteins of essential functional systems [J]. *Proteomics*, 2005, 5(5): 1395-1410.
- [12] Qi YX, Jiang J, Jiang XH, *et al.* PDGF-BB and TGF β 1 on cross-talk between endothelial and smooth muscle cells in vascular redodeling induced by low shear stress [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(5): 1908-1913.
- [13] 刘波, 姜宗来, 张炎, 等. 血管体外应力培养系统:一种新的血管生物力学实验模型 [J]. *医用生物力学*, 2001, 16(4): 225-230.
- Liu B, Jiang ZL, Zhang Y, *et al.* The vessel organ culture system under stress in vitro: A new model for vascular biomechanical experiment [J]. *J Med Biomech*, 2001, 16(4): 225-230.
- [14] Qi YX, Qu MJ, Long DK, *et al.* Rho-GDP dissociation inhibitor alpha downregulated by low shear stress promotes vascular smooth muscle cell migration and apoptosis: A proteomic analysis [J]. *Cadiovasc Res*, 2008, 80(1): 114-122.
- [15] Candiano G, Bruschi M, Musante L, *et al.* Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis [J]. *Electrophoresis*, 2004, 25(9): 1327-1333.
- [16] Kwan HY, Leung PC, Huang Y, *et al.* Depletion of intracellular Ca²⁺ stores sensitizes the flow-induced Ca²⁺ influx in rat endothelial cells [J]. *Circ Res*, 2003, 92(3): 286-292.
- [17] 丛兴忠, 姜宗来, 李玉泉, 等. 用于内皮细胞与平滑肌细胞联合培养的流动腔系统[J]. *医用生物力学*, 2001, 16(1): 1-5.
- Cong XZ, Jiang ZL, Li YQ, *et al.* A new flow chamber system for endothelial cells and smooth muscle cells co-culture model [J]. *J Med Biomech*, 2001, 16(1): 1-5.
- [18] Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ. The Ras superfamily at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2005, 118(Pt 5): 843-846.
- [19] Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2(2): 107-117.
- [20] Nieva C, Busk PK, Dominguez-Puigianer E, *et al.* Isolation and functional characterisation of two new bZIP maize regulators of the ABA responsive gene rab28 [J]. *Plant Mol Biol*, 2005, 58(6): 899-914.
- [21] Hutagalung AH, Novick PJ. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology [J]. *Physiol Rev*, 2011, 91(1): 119-149.
- [22] Lumb JH, Leung KF, Dubois KN, *et al.* Rab28 function in trypanosomes: Interactions with retromer and ESCRT pathways [J]. *J Cell Sci*, 2011, 124(Pt 22): 3771-3783.
- [23] 袁琳, 宋美斌, 罗庆, 等. ERK 信号分子介导周期机械拉伸诱导的骨髓间充质干细胞增殖[J]. *医用生物力学*, 2011, 26(3): 217-224.
- Yuan L, Song GB, Luo Q, *et al.* Proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells induced by cyclic mechanical stretch mediated with ERK signal molecules [J]. *J Med Biomech*, 2011, 26(3): 217-224.
- [24] Webb DJ, Nguyen DH, Gonias SL. Extracellular signal-regulated kinase functions in the urokinase receptor-dependent pathway by which neutralization of low density lipoprotein receptor-related protein promotes fibrosarcoma cell migration and matrigel invasion [J]. *J Cell Sci*, 2000, 113(Pt 1): 123-134.
- [25] Liu SQ, Goldman J. Role of blood shear stress in the regulation of vascular smooth muscle cell migration [J]. *IEEE Trans Biomed Eng*, 2001, 48(4): 474-483.
- [26] Jiang J, Qi YX, Zhang P, *et al.* Involvement of Rab28 in NF- κ B nuclear transport in endothelial cells [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(2): e56076.