

# 活化激酶 C 受体 1 在切应力调控 血管平滑肌细胞增殖中的作用

沈 岩, 王 璐, 韩 悦, 杨煜晨, 沈宝荣, 齐颖新, 姜宗来  
(上海交通大学 生命科学技术学院, 力学生物学与医学工程研究所, 上海 200240)

**摘要:** 目的 探讨活化激酶 C 受体 1 (receptor for activated C kinase 1, RACK1) 在内皮细胞 (endothelial cells, ECs) 感受切应力刺激调控血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 增殖中的作用及其机制。方法 应用平行平板流动腔系统, 对联合培养的大鼠 ECs 和 VSMCs 施加 1.5 Pa 正常切应力 (normal shear stress, NSS) 和 0.5 Pa 低切应力 (low shear stress, LowSS), 应用 BrdU ELISA 方法检测 VSMCs 增殖水平, 对蛋白质组学研究发现力学响应分子 RACK1 表达以及 Akt 磷酸化, 应用 Western blot 技术进行检测。静态条件下, 应用 RNA 干扰技术特异性抑制 VSMCs 的 RACK1 表达, 检测其对细胞增殖和 Akt 磷酸化的作用。应用 ECs 与 VSMCs 分开培养和联合培养模型, 检测 ECs 对 VSMCs 的 RACK1 表达和 Akt 磷酸化水平的影响。结果 血管差异蛋白质组学的结果发现, 与 NSS 组相比, RACK1 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 诱导了与 ECs 联合培养的 VSMCs 增殖, 上调 VSMCs 的 RACK1 表达和 Akt 磷酸化。静态条件下, 特异性抑制 VSMCs 的 RACK1 表达后, VSMCs 的增殖水平和 Akt 磷酸化水平均显著下降。与 ECs 联合培养 VSMCs, 其 RACK1 表达和 Akt 磷酸化水平较分开培养组均上调。结论 VSMCs 的 RACK1 表达受细胞接触与切应力的影响, 并可能通过 PI3K/Akt 信号通路参与 LowSS 诱导的 VSMCs 增殖的调控。探讨 VSMCs 增殖功能变化及其力学生物学机制对于认识动脉粥样硬化等疾病发病机理和疾病防治有重要意义。

**关键词:** 切应力; 内皮细胞; 血管平滑肌细胞; 活化激酶 C 受体 1; 细胞增殖

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

## Shear stress modulates the proliferation of vascular smooth muscle cells via receptor for activated C kinase 1

SHEN Yan, WANG Lu, HAN Yue, YANG Yu-chen, SHEN Bao-rong, QI Ying-xin, JIANG Zong-lai (Institute of Mechanobiology and Medical Engineering, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

**Abstract: Objective** To investigate the role of receptor for activated C kinase 1 (RACK1) in vascular smooth muscle cells (VSMCs) proliferation modulated by co-cultured endothelial cells (ECs) and shear stress. **Methods** Using EC/VSMC co-cultured parallel plate flow chamber system, two levels of shear stress, i. e. low shear stress (LowSS, 0.5 Pa) and normal shear stress (NSS, 1.5 Pa), were applied for 12 h. BrdU ELISA was used to detect the proliferation of VSMCs, and Western blot was used to detect the protein expressions of RACK1 and phospho-Akt. Under the static condition, RNA interference was used to suppress the expression of RACK1 in VSMCs, and then the proliferation of VSMCs and expressions of RACK1 and phospho-Akt were detected. By using co-culture model (ECs/VSMCs) and separated culture model (ECs//VSMCs), the effect of ECs on expressions of RACK1 and phospho-Akt in VSMCs was further analyzed. **Results** Comparative proteomic analysis revealed that LowSS increased the expression of RACK1 in rat aorta. *In vitro* experiments showed that LowSS

induced the proliferation, expressions of RACK1 and phospho-Akt in VSMCs co-cultured with ECs. Target RNA interference of RACK1 significantly decreased the proliferation of VSMCs, and the phosphorylation of Akt. In comparison with ECs/VSMCs (separated culture) group, the expression of RACK1 and phospho-Akt were both up-regulated in the VSMCs co-cultured with ECs (ECs/VSMCs group). **Conclusions** The expression of RACK1 in VSMCs was modulated by shear stress and neighboring ECs, which might induce cellular proliferation via PI3K/Akt pathway. The investigation on VSMC proliferation and the involved biomechanical mechanism will contribute to understanding and help preventing the pathogenesis and progress of atherosclerosis.

**Key words:** Shear stress; Endothelial cells (ECs); Vascular smooth muscle cells (VSMCs); Receptor for activated C kinase 1 (RACK1); Cell proliferation

心血管系统时刻处于综合的力学环境中,其中血流动力学是影响血管重建的重要因素。大量研究发现,动脉粥样硬化多发生在血管分叉起始处和弯曲处等血流切应力较低的区域,提示低切应力(low shear stress, LowSS)在动脉粥样硬化血管重建的发生和发展中起重要作用<sup>[1]</sup>。动脉粥样硬化以脂质沉积、中膜的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)向内膜下层迁移和增殖为主要特征。研究表明,LowSS诱导的VSMCs增殖是动脉粥样硬化血管重建的重要病理过程<sup>[2]</sup>。因此,研究VSMCs增殖功能变化及其力学生物学分子机制,对于认识动脉粥样硬化等疾病发病机理和疾病防治有重要意义。

VSMCs和血管内皮细胞(endothelial cells, ECs)是血管壁的主要细胞成分。在体情况下,单层排列的ECs位于血管内侧,其管腔面与血流直接接触;而VSMCs主要位于血管中膜,通过血管内弹力膜上的孔隙与ECs基底面相邻<sup>[3]</sup>。正常情况下,VSMCs不直接感受血流切应力的刺激,但是可以通过与ECs的直接接触和旁分泌作用响应切应力作用。研究发现,切应力调控ECs分泌多种细胞因子作用于VSMCs,从而激活一系列细胞内信号分子,引起VSMCs增殖、分化、凋亡等功能的改变,导致血管重建<sup>[4-5]</sup>。

PI3K/Akt通路是保护细胞生存、抑制细胞凋亡的重要信号通路<sup>[6]</sup>。在多种细胞内,Akt磷酸化水平的抑制均显著降低细胞增殖水平<sup>[7]</sup>。本课题组前期研究发现,LowSS诱导血管组织p-Akt表达水平升高,且Akt磷酸化水平与血流切应力大小呈负相关<sup>[8]</sup>。然而,切应力这一力学刺激如何调控Akt磷酸化从而影响细胞增殖的分子机制尚不清楚。

本文应用双向凝胶电泳结合质谱分析的蛋白质

组学方法,发现活化激酶C受体1(receptor for activated C kinase 1, RACK1)在LowSS作用下的血管组织中高表达,提示RACK1可能作为一种重要的力学响应分子参与了LowSS诱导的血管重建。RACK1是一种高度保守的细胞内衔接蛋白,与G蛋白 $\beta$ 亚单位同源<sup>[9]</sup>。现已证实RACK1参与整合来自不同信号转导途径的信息,在细胞增殖、迁移、凋亡等多种基本细胞功能调控中起到重要作用<sup>[10]</sup>。然而,LowSS诱导的RACK1在心血管疾病血管重建中的作用及其机制尚不清楚。大量研究证实,RACK1能够调控Akt活性影响细胞功能。Kiely等<sup>[11]</sup>发现,RACK1可以与胰岛素样生长因子受体-1结合,通过PI3K/Akt信号通路,调控细胞的生存代谢。Wang等<sup>[10]</sup>发现,RACK1通过激活PI3K/Akt信号通路调控血管内皮生长因子(VEGF)/Flt1介导的人胚胎肾细胞迁移。因此,本文推测LowSS刺激可能通过RACK1调控Akt的磷酸化水平,从而诱导VSMCs的增殖。

本文应用ECs与VSMCs联合培养的平行平板流动腔系统,模拟在体ECs与VSMCs间的内在联系<sup>[12]</sup>,探讨不同切应力对VSMCs的RACK1表达、Akt磷酸化以及细胞增殖功能的影响;进而应用RNA干扰技术特异性抑制VSMCs的RACK1表达,检测其对于Akt磷酸化和VSMCs增殖的作用,并应用两种细胞隔开培养和联合培养模型,探讨ECs的直接接触和旁分泌作用对VSMCs的RACK1表达和Akt磷酸化的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 体外培养血管组织的差异蛋白质组学

无菌条件下游离220~240g雄性SD大鼠胸主动脉,手术显微镜下游离胸主动脉并结扎各肋间动

脉分支,将血管接入改良的血管体外培养装置<sup>[13]</sup>,分别施加 0.5 Pa 的 LowSS 和 1.5 Pa 的正常切应力(normal shear stress, NSS)。37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内灌注培养 24 h 后提取血管组织总蛋白。

Brandford 法定量后取 1 mg 血管组织总蛋白,24 cm IPG 胶条(pH3-10,非线性)(GE 公司)等电聚焦,之后 12% SDS-PAGE 电泳。应用改良 Neuhoff 胶体考马斯亮蓝染色,ImageMater 软件分析蛋白表达水平。取灰度均值相差大于 2 倍的蛋白质点,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。

## 1.2 ECs 和 VSMCs 培养及鉴定

采用胶原酶消化法培养原代 ECs<sup>[14]</sup>。每 3 d 换液,约 7 d 后可观察到 ECs 爬出。用抗 von Willebrand Factor 抗体(1:200, Sigma 公司)鉴定 ECs,阳性着色 95% 以上的第 2~4 代 ECs 用于本实验。

采用组织块贴壁法培养原代 VSMCs<sup>[15]</sup>。每 3 d 换液,约 3~6 d 后可见 VSMCs 从组织块中爬出。用抗  $\alpha$ -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% 以上的第 4~7 代 VSMCs 用于本实验。

## 1.3 实验分组

### 1.3.1 ECs 与 VSMCs 联合培养(ECs/VSMCs)

ECs 胰蛋白酶消化、计数后,以  $4.5 \times 10^4$  个/cm<sup>2</sup> 密度接种于联合培养杯(Becton Dickinson Labware 公司)底部聚对苯二甲酸乙二酯(polyethylene terephthalate, PET)膜的外侧面。37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 6~8 h 后,翻转培养杯并置于预加 ECs 培养基的 6 孔培养板中,在杯底 PET 膜的内侧面接种  $4.5 \times 10^4$  个/cm<sup>2</sup> VSMCs,将 6 孔培养板放入 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中进行联合培养。该模型中,PET 膜厚度为 10  $\mu$ m,且膜上含有  $1.6 \times 10^6$  个/cm<sup>2</sup> 直径为 0.4  $\mu$ m 的微孔。VSMCs 可通过 PET 膜上的微孔与 ECs 相互接触,膜两侧的培养液也可以通过微孔相互沟通。

### 1.3.1 ECs 与 VSMCs 隔开培养(ECs//VSMCs)

ECs 胰蛋白酶消化、计数后,以  $4.5 \times 10^4$  个/cm<sup>2</sup> 密度接种在联合培养杯 PET 膜的外侧面,VSMCs 以  $2 \times 10^4$  个/cm<sup>2</sup> 密度接种在 6 孔培养板中,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,6~8 h 待 ECs 与 VSMCs 贴壁后,将接种有 ECs 的联合培养杯置于接种有

VSMCs 的 6 孔培养板中,进行隔开培养。该模型中,联合培养杯的底部不能与 6 孔板底部直接接触,但是 ECs 与 VSMCs 可以通过培养液相互沟通。

**1.3.3 切应力加载分组** 待细胞生长至 80% 融合后,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 后用于切应力加载实验。

联合培养 ECs 和 VSMCs 置于平行平板流动腔系统<sup>[12]</sup>,对 ECs 侧分别施加 1.5 Pa 的 NSS(ECs/VSMCs, NSS 组)和 0.5 Pa 的 LowSS(ECs/VSMCs, LowSS 组)。切应力加载时间为 12 h。

## 1.4 蛋白质免疫印迹检测(Western blotting)

提取各组 VSMCs 总蛋白,用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白;5% 的脱脂奶粉封闭 1 h;RACK1 兔多克隆抗体(Abcam 公司,1:1000),Akt 兔多克隆抗体(Cell Signal Technology 公司,1:500),磷酸化 Akt 兔单克隆抗体(Cell Signal Technology 公司,1:500),GAPDH 鼠多克隆抗体(Proteintech 公司,1:1000),4 °C 孵育过夜;碱性磷酸酶标记二抗(Vector 公司,1:1000)室温孵育 2 h;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。

## 1.5 RNA 干扰实验

第 4~7 代 VSMCs 消化、计数后,以每孔  $2 \times 10^4$  个/cm<sup>2</sup> 密度接种于 6 孔细胞培养板,次日细胞生长至 70% 左右融合。

RNA 干扰操作依据 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 说明书,特异性小干扰 RNA(small interference RNA, siRNA)100 nmol 和 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 5  $\mu$ L 分别溶于 250  $\mu$ L opti-MEM 中轻轻混匀,之后将两者混合放置 15 min 后加入种有 VSMCs 的 6 孔板中,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱培养,8 h 后每孔细胞补加 1 mL 含血清不含抗生素的培养液,继续培养 48 h。

RACK1 的特异性 siRNA 序列(上海吉玛制药技术有限公司)为:5'-CCC ACU UUG UUA GCG AUG UTT-3' 和 5'-ACA UCG CUA ACA AAG UGG GTT-3'。所有 RNA 干扰实验均设置阴性对照组,加入的是与大鼠基因不具同源性的阴性 siRNA,序列为:5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3' 和 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3'。

## 1.6 BrdU ELISA 方法检测细胞增殖

RNA 干扰、切应力加载后立即用胰酶消化细胞,以  $6 \times 10^4$  个/cm<sup>2</sup> 密度接种到 96 孔酶标板,终体积为 100  $\mu$ L;将 BrdU(1:1 000)加入细胞培养液,37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养 12 h;吸干培养液,4  $^{\circ}$ C,过夜;固定后加入 anti-BrdU 抗体(1:100),室温孵育 2 h。加入 POD 显色底物,3~10 min 待样品呈现适当深度的天蓝色加入 1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应,25  $\mu$ L/孔。用酶标仪检测细胞吸光值(吸收波长为 450 nm,参考波长为 690 nm)。

## 1.7 统计学分析

所有实验至少独立重复 3 次,实验数据均以均值  $\pm$  标准差表示,两组间比较采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  表示差异具有显著性。

## 2 结果

### 2.1 LowSS 上调培养血管组织 RACK1 表达

双向凝胶电泳结果显示,与 NSS(1.5 Pa)相比,LowSS(0.5 Pa)作用 12 h 诱导了体外培养大鼠胸主动脉某种蛋白质表达(见图 1(a)),经质谱鉴定该蛋白质为 RACK1(见图 1(b)),提示 RACK1 可能是一种重要的力学响应分子。

### 2.2 LowSS 诱导 VSMCs 增殖

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)对 VSMCs 增殖功能的影响。结果显示,与 NSS 组相比,LowSS 显著上调联合培养 VSMCs 的增殖水平( $P < 0.05$ ,见图 2),提示 LowSS 可能通过促进 VSMCs 增殖参与血管重建。

### 2.3 LowSS 诱导联合培养 VSMCs 的 RACK1 表达和 Akt 磷酸化

应用平行平板流动腔系统,对联合培养的 ECs 和 VSMCs 施加 NSS 和 LowSS,通过检测 VSMCs 的 RACK1 蛋白表达变化,从细胞水平验证蛋白质组学的结果。与 NSS 组相比,LowSS 组 VSMCs 的 RACK1 表达明显上升( $P < 0.05$ ,见图 3),这一结果与蛋白质组学揭示的 LowSS 条件下培养血管 RACK1 表达水平上升相一致;Akt 的磷酸化水平也在 LowSS 条件下显著升高( $P < 0.05$ ,见图 3),提示 LowSS 可能通过 RACK1、PI3K/Akt 通路参与 VSMCs 增殖的调控。

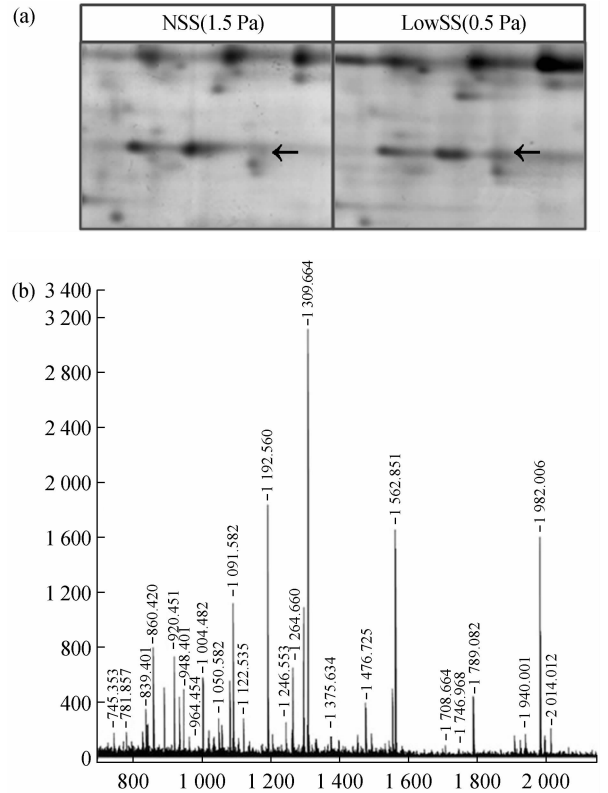


图1 LowSS 诱导体外培养血管组织 RACK1 表达 (a)双向电泳分离结果( $\leftarrow$ 指示差异表达的蛋白质点), (b)质谱分析结果显示该蛋白质点为 RACK1

Fig.1 LowSS induced the expression of RACK1 in vessels cultured *in vitro* (a) The two-dimensional electrophoresis gel maps ( $\leftarrow$  pointed the differentially expressed protein), (b) The mass spectrometry revealed that the protein was RACK1

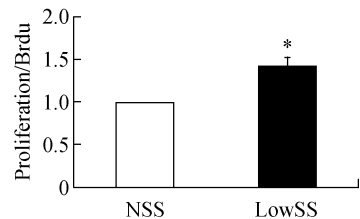


图2 低切应力促进 VSMCs 的增殖( $n=5$ , \* $P < 0.05$ )

Fig.2 LowSS induced the proliferation of VSMCs

### 2.4 抑制 RACK1 表达对 VSMCs 增殖和 Akt 磷酸化的影响

为深入探讨信号分子 RACK1 与 Akt 的上、下游关系及其在 VSMCs 增殖调控中的作用,在静态条件下应用特异性 RNA 干扰抑制 VSMCs 的 RACK1 表达,并检测其对 Akt 磷酸化和细胞增殖功能的影响。

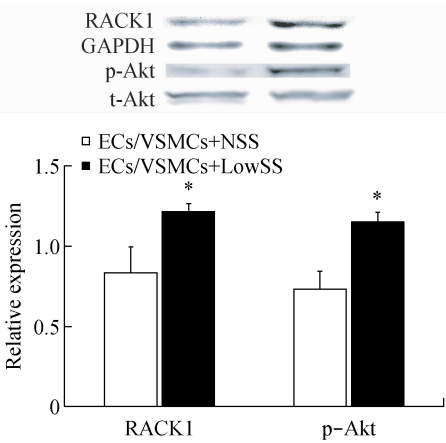


图3 联合培养条件下 NSS 与 LowSS 对 VSMCs 的 RACK1 表达和 Akt 磷酸化的影响 ( $n=4$ ,  $*P < 0.05$ )

Fig. 3 Effects of NSS and LowSS on the expression of RACK1 and the phosphorylation of Akt in co-cultured VSMCs

结果显示,与阴性对照组相比,特异性抑制 RACK1 的表达后,VSMCs 的 Akt 磷酸化水平显著降低 ( $P < 0.05$ , 见图 4(a));抑制 RACK1 显著降低 VSMCs 的增殖水平 ( $P < 0.05$ , 见图 4(b)),提示 LowSS 诱导的 VSMCs 内 RACK1 表达水平降低可能通过抑制 PI3K/Akt 信号通路调控细胞增殖。

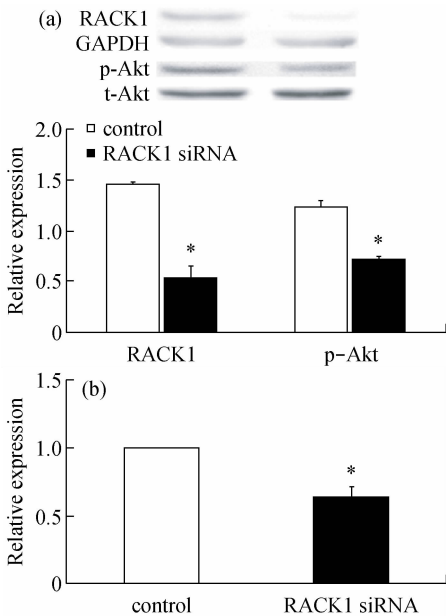


图4 抑制 VSMCs 的 RACK1 表达对与 Akt 磷酸化 (a) 和 VSMCs 增殖 (b) 的影响 ( $n=3$ ,  $*P < 0.05$ )

Fig. 4 Effects of RACK1 knock-down on Akt phosphorylation (a) and cell proliferation (b) in VSMCs

## 2.5 ECs 直接接触和旁分泌作用对联合培养 VSMCs 的 RACK1 表达与 Akt 磷酸化的作用

由于 VSMCs 不直接受到切应力作用,故应用联合培养 (ECs/VSMCs) 和隔开培养 (ECs//VSMCs) 模型,探讨 ECs 直接接触和旁分泌对 VSMCs 的 RACK1 表达的影响。

结果显示,与隔开培养组相比,联合培养条件下 VSMCs 的 RACK1 表达水平显著升高,联合培养组 VSMCs 的 Akt 磷酸化水平较隔开培养组亦显著升高 ( $P < 0.05$ , 见图 5),提示联合培养条件下 ECs 可能通过细胞间连接促进相邻 VSMCs 的 RACK1 表达和 Akt 磷酸化。

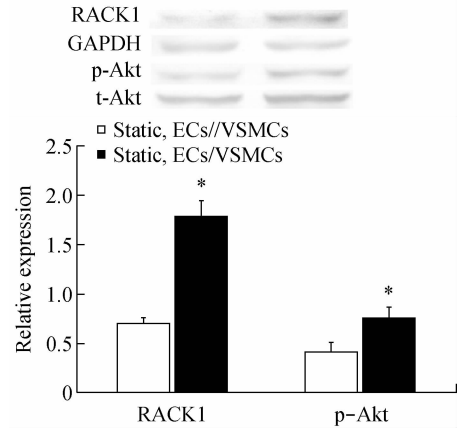


图5 与 ECs 隔开培养和联合培养条件下 VSMCs 的 RACK1 表达与 Akt 磷酸化的变化情况 ( $n=3$ ,  $*P < 0.05$ )

Fig. 5 Expression of RACK1 and phosphorylation of Akt in co-cultured and separated cultured VSMCs under static stress

## 3 讨论

本研究中差异蛋白质组学结果提示,不同水平的切应力刺激调控血管组织 RACK1 表达。本实验室前期研究亦发现,RACK1 表达水平受到不同幅度的周向张应变调控,并通过 Src 激酶通路影响 VSMCs 凋亡<sup>[16]</sup>。上述结果均提示,RACK1 可能作为一种重要的力学响应分子参与血管细胞功能的调控。

作为一种在进化中高度保守的蛋白质,RACK1 在多种细胞类型中有着重要作用。RACK1 通过激活 Src 激酶 Tyr416 残基磷酸化调控神经母细胞瘤细

胞的迁移和增殖<sup>[17]</sup>。此外, Dai 等<sup>[18]</sup>研究发现, 在患有冠状动脉疾病患者的单核细胞中 RACK1 表达明显升高, 且在动脉粥样硬化斑块区域局部该现象更为明显。Zakrzewicz 等<sup>[19]</sup>研究表明, RACK1 与骨形成蛋白受体 II 共定位于肺动脉 VSMCs 中, 抑制 RACK1 表达并上调肺动脉 VSMC 增殖水平, 过表达 RACK1 出现相反变化。应用联合培养平行平板流动腔系统发现, LowSS 可能通过诱导 VSMCs 的 RACK1 表达, 引起 VSMCs 增殖水平增加。虽然上述研究均提示 RACK1 在调控细胞增殖中具有重要作用, 但是力学刺激诱导的 RACK1 表达在 VSMCs 功能调控中的分子机制目前仍不清楚。

本研究结果显示, 在切应力条件下 RACK1 对 VSMCs 增殖的调控作用可能与信号分子 Akt 密切相关。PI3K/Akt 作为一个保护细胞生存、抑制细胞凋亡的重要信号通路, 其活性上升时, 能够促进细胞生长; 若 Akt 的磷酸化水平被抑制, 则细胞增殖下降<sup>[7]</sup>。振荡切应力能诱导单独培养 VSMCs 的 Akt 磷酸化, 从而促进其增殖<sup>[20]</sup>, 提示 PI3K/Akt 在切应力介导的 VSMCs 增殖中具有重要作用。为探讨 LowSS 对 VSMCs 增殖和 Akt 磷酸化的作用, 以及 RACK1 在其中的可能机制, 本文首先应用平行平板流动腔系统对联合培养 ECs/VSMCs 加载 NSS 和 LowSS。结果显示, LowSS 诱导了 VSMCs 增殖和 Akt 磷酸化。RNA 干扰特异性抑制 VSMCs 的 RACK1 表达则细胞增殖、Akt 磷酸化均被抑制, 提示 LowSS 刺激可能通过诱导 VSMCs 的 RACK1 表达激活 Akt 磷酸化, 从而调控 VSMCs 增殖。

在体条件下, VSMCs 对切应力的响应受到与之相邻的 ECs 调控。ECs 主要通过两种方式影响 VSMCs: 一种是 ECs 与 VSMCs 通过内弹力膜上的微孔由细胞间连接构成直接接触; 另一种是 ECs 感受切应力刺激后合成和分泌多种血管活性物质, 通过旁分泌作用调控相邻的 VSMCs 功能<sup>[21]</sup>。为探讨 ECs 直接接触和旁分泌作用对 VSMCs 的影响, 本文使用 ECs 与 VSMCs 联合培养和分开培养模型。在联合培养模型中, ECs 和 VSMCs 分别种植于联合培养杯的内、外两侧。这种培养杯的底面为厚 10  $\mu\text{m}$  的 PET 膜, 膜上有孔径为 0.4  $\mu\text{m}$  的微孔 ( $1.6 \times 10^6$  个/ $\text{cm}^2$ ), ECs 与 VSMCs 可通过小孔形成细胞间连接。PET 膜模拟了在体条件下内弹力膜, 其两侧的

培养液也可以通过这些微孔互相沟通。ECs 和 VSMCs 隔开培养则打断了 ECs 和 VSMCs 间的直接接触, 保留了细胞间的旁分泌作用<sup>[22]</sup>。结果显示, 与 ECs 联合培养 VSMCs 的 RACK1 表达和 Akt 磷酸化均显著高于分开培养组, 提示 ECs 通过细胞间直接接触调控 VSMCs 的 RACK1 表达和 Akt 磷酸化。

ECs 与 VSMCs 之间可以由间隙连接蛋白构成肌-内皮间隙连接。这种细胞间连接为细胞内第 2 信使和多种离子的传输提供了通道, 如 cAMP 和  $\text{Ca}^{2+}$  等信号分子能够通过间隙连接从一个细胞进入到相邻细胞, 从而激活一系列信号通路, 对细胞的功能产生影响<sup>[23]</sup>。在 ECs 与 VSMCs 肌-内皮间隙连接中, 连接蛋白 37 (Cx37)、连接蛋白 40 (Cx40) 和连接蛋白 43 (Cx43) 起到重要的作用<sup>[24]</sup>; Cx40 参与了 VSMCs 调控的 ECs 增殖<sup>[25]</sup>。然而, 切应力条件下何种细胞间连接介导了 ECs 调控的 VSMCs 内 RACK1 表达和 Akt 磷酸化及其可能的分子机制仍不清楚, 有待于今后实验进一步的研究。

综上所述, RACK1 在 VSMCs 的表达受细胞接触与 LowSS 的影响, 并可能通过 PI3K/Akt 信号通路调控 VSMCs 增殖。RACK1 有可能成为抑制血管重建过程中 VSMCs 增殖的作用靶点, 在心血管疾病的防治中具有潜在的应用价值。深入探讨 RACK1 在应力调控 VSMCs 增殖活性中的作用及其分子机制, 对于深入了解动脉粥样硬化等心血管疾病血管重建发病机制具有重要的理论和临床意义。

## 参考文献:

- [1] Boisseau MR. Roles of mechanical blood forces in vascular diseases. A clinical overview [J]. Clin Hemorheol Microcirc, 2005, 33(3): 201-207.
- [2] Faxon DP, Creager MA, Smith SC, et al. Atherosclerotic vascular disease conference executive summary: Atherosclerotic vascular disease conference proceeding for health-care professionals from a special writing group of the American Heart Association [J]. Circulation, 2004, 109(21): 2595-2604.
- [3] Cunningham KS, Gotlieb AI. The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. Lab Invest, 2004, 85(1): 9-23.
- [4] Nguyen LL, D'Amore PA. Cellular interactions in vascular growth and differentiation [J]. Int Rev Cytol, 2001, 204:

- 1-48.
- [5] Darland DC, D'Amore PA. Cell-cell interactions in vascular development [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2001, 52: 107-149.
- [6] Downward J. PI 3-kinase, Akt and cell survival [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2004, 15(2): 177-182.
- [7] Zhou H, Li XM, Meinkoth J, *et al.* Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level [J]. *J Cell Biol*, 2000, 151(3): 483-494.
- [8] 孔翰, 张明亮, 严志强, 等. 高血压与低切应力对大鼠颈总动脉血管重建的影响 [J]. *医用生物力学*, 2011, 26(2): 109-115.
- Kong H, Zhang ML, Yan ZQ, *et al.* Effects of hypertension and low shear stress on common carotid remodeling in rats [J]. *J Med Biomech*, 2011, 26(2): 109-115.
- [9] Cblp R. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins [J]. *Nature*, 1994, 371(6495): 297-300.
- [10] Wang F, Yamauchi M, Muramatsu M, *et al.* RACK1 regulates VEGF/Flt1-mediated cell migration via activation of a PI3K/Akt pathway [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(11): 9097-9106.
- [11] Kiely PA, Leahy M, O'Gorman D, *et al.* RACK1-mediated integration of adhesion and insulin-like growth factor I (IGF-I) signaling and cell migration are defective in cells expressing an IGF-I receptor mutated at tyrosines 1250 and 1251 [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(9): 7624-7633.
- [12] 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*, 2011, 16(1): 1-5.
- [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] Kwan HY, Leung PC, Huang Y, *et al.* Depletion of intracellular  $Ca^{2+}$  stores sensitizes the flow-induced  $Ca^{2+}$  influx in rat endothelial cells [J]. *Circ Res*, 2003, 92(3): 286-292.
- [15] Stavri GT, Hong Y, Zachary IC, *et al.* Hypoxia and platelet-derived growth factor-BB synergistically upregulate the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells [J]. *FEBS Lett*, 1995, 358(3): 311-315.
- [16] Qi YX, Yao QP, Zhang P, *et al.* RACK1 regulates Src activity on apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by cyclic strain [J]. *Cell Mole Bioeng*, 2011, 4(3): 358-367.
- [17] Lu F, Zhang C, Wu W J, *et al.* RACK1 downregulation suppresses migration and proliferation of neuroblastoma cell lines [J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(5): 1646-1652.
- [18] Dai HY, Xing MQ, Guan J, *et al.* Implication of elevated expression of receptor for activated C kinase 1 in mononuclear cells and coronary atherosclerotic plaques from patients with coronary artery disease [J]. *Chin J Cardiol*, 2013, 41(1): 23-27.
- [19] Zakrzewicz A, Hecker M, Marsh LM, *et al.* Receptor for activated C-kinase 1, a novel interaction partner of type II bone morphogenetic protein receptor, regulates smooth muscle cell proliferation in pulmonary arterial hypertension [J]. *Circulation*, 2007, 115(23): 2957-2968.
- [20] Haga M, Yamashita A, Paszkowiak J, *et al.* Oscillatory shear stress increases smooth muscle cell proliferation and Akt phosphorylation [J]. *J Vasc Surg*, 2003, 37(6): 1277-1284.
- [21] Palumbo R, Gaetano C, Antonini A, *et al.* Different effects of high and low shear stress on platelet-derived growth factor isoform release by endothelial cells consequences for smooth muscle cell migration [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22(3): 405-411.
- [22] Chiu JJ, Chen LJ, Lee CI, *et al.* Mechanisms of induction of endothelial cell E-selectin expression by smooth muscle cells and its inhibition by shear stress [J]. *Blood*, 2007, 110(2): 519-528.
- [23] 邱国松, 陈君柱. 连接蛋白, 缝隙连接的结构功能及其与心血管疾病 [J]. *心血管病学进展*, 2000, 21(3): 172-176.
- [24] Isakson BE, Best AK, Duling BR. Incidence of protein on actin bridges between endothelium and smooth muscle in arterioles demonstrates heterogeneous connexin expression and phosphorylation [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 294(6): H2898-H2904.
- [25] Yao QP, Qi YX, Zhang P, *et al.* SIRT1 and Connexin40 mediate the normal shear stress-induced inhibition of the proliferation of endothelial cells co-cultured with vascular smooth muscle cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 31(2-3): 389-399.