

# ROCK1 及其相关信号分子参与张应变调控的血管平滑肌细胞增殖

王立意, 郭东铭, 庞景之, 杨煜晨, 沈宝荣, 齐颖新  
(上海交通大学 生命科学技术学院, 力学生物学研究所, 上海 200240)

**摘要:** **目的** 探讨 Rho 相关卷曲蛋白激酶 1 (Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1, ROCK1) 及其相关信号分子在感受张应变机械刺激、调控血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 增殖功能中的作用。**方法** 应用张应变加载系统对体外培养 VSMCs 施加牵张幅度 10%、频率 1.25 Hz 生理性周向张应变; BrdU 检测 VSMCs 增殖水平; Western blotting 检测力学加载后 VSMCs 的 ROCK1 表达水平以及蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC)  $\alpha/\beta$  II、蛋白激酶 D (protein kinase D, PKD)、胞外信号调节激酶 (extracellular regulated protein kinase, ERK) 磷酸化水平; 采用 RNA 干扰技术 (RNA interference, RNAi) 检测 ROCK1 对 VSMC 增殖和 PKC $\alpha/\beta$  II、PKD、ERK 磷酸化的调控作用。**结果** 10% 生理性张应变加载 12、24 h 显著抑制 VSMCs 的 ROCK1 表达, 并显著抑制 PKD 和 ERK 的磷酸化; 10% 生理性张应变加载 12 h 显著抑制 PKC $\alpha/\beta$  II 的磷酸化, 但加载 24 h PKC $\alpha/\beta$  II 的磷酸化与静止对照组相比无显著差异。RNAi 抑制 VSMCs 的 ROCK1 表达后, VSMCs 增殖水平显著降低, 同时 PKC $\alpha/\beta$  II 和 PKD 磷酸化水平显著降低, 但 ERK 磷酸化无明显变化。**结论** 10% 生理性张应变可能通过抑制 ROCK1 表达调控 PKC $\alpha/\beta$  II 和 PKD 的磷酸化水平, 从而影响 VSMCs 增殖, 维持血管稳定性。探讨张应变力学刺激调控血管细胞功能的细胞内信号转导网络, 对心血管生理和疾病病理机制研究具有一定意义。

**关键词:** 血管平滑肌细胞; 张应变; Rho 相关卷曲蛋白激酶; 蛋白激酶

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2017.03.001

## ROCK1 and the relative signal molecules participate in proliferation of vascular smooth muscle cells induced by cyclic strain

WANG Li-yi, GUO Dong-ming, PANG Jing-zhi, YANG Yu-chen, SHEN Bao-rong, QI Ying-xin (Institute of Mechanobiology & Medical Engineering, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the role of Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1 (ROCK1) and the relative signal molecules in sensing the mechanical stimulation from tensile strain and regulating the proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs). **Methods** Physiological cyclic strain with magnitude of 10% and at frequency of 1.25 Hz was applied to VSMCs *in vitro* by using the strain loading system. The proliferation level of VSMCs was analyzed by BrdU ELISA; the expression level of ROCK1, phosphorylations of protein kinase C (PKC)  $\alpha/\beta$  II, protein kinase D (PKD) and extracellular regulated protein kinase (ERK) in VSMCs modulated by cyclic strain were detected with Western blotting; the expression of ROCK1 was specifically repressed by using RNA interference (RNAi). **Results** Compared with the static control, 10% cyclic strain significantly decreased the expression of ROCK1 and phosphorylations of PKD and ERK. The phosphorylation of PKC $\alpha/\beta$  II decreased significantly under 10% cyclic strain for 12 h, but returned to normal level after loading for 24 h. Repressed ex-

pression of ROCK1 with RNAi significantly down-regulated VSMC proliferation, suppressed phosphorylations of PKC $\alpha$ / $\beta$ II and PKD, but no obvious changes were found in phosphorylation of ERK. **Conclusions** Physiological cyclic strain with magnitude of 10% may repress the phosphorylation of PKC $\alpha$ / $\beta$ II and PKD via inhibiting the expression of ROCK1, and subsequently affects VSMC proliferation and maintains vascular hemostasis. The investigation on intracellular mechanotransduction network of VSMCs under mechanical stimulation of cyclic strain may contribute to studying the physiological and pathological mechanisms of cardiovascular diseases.

**Key words:** Vascular smooth muscle cells; Cyclic strain; Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1 (ROCK1); Protein kinase

体内条件下,血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)主要受到由于血液脉动产生的张应变作用。研究表明,张应变力学刺激可以调节血管细胞的增殖、凋亡和迁移,同时对细胞外基质的合成、降解和重组也有着重要作用,从而在血管功能调控中发挥作用。Chapman等<sup>[1]</sup>发现,10%张应变可以诱导 p21 表达从而抑制 Rb 蛋白磷酸化,使 VSMCs 滞留在 G1 期失去分裂能力;Schulze等<sup>[2]</sup>通过 4% 张应变诱导即刻早期基因 iex-1 表达,从而抑制 VSMCs 增殖。上述研究提示,生理性(5%~10%)张应变力学刺激抑制 VSMCs 增殖,从而参与血管稳态维持。此外,异常降低和增高的张应变对 VSMCs 增殖有一定的刺激作用。研究发现,低于 7% 张应变对 VSMCs 增殖有促进作用<sup>[3]</sup>;20% 张应变可以诱导胞外信号调节激酶(extracellular regulated protein kinase, ERK)的磷酸化,从而促进 DNA 合成<sup>[4]</sup>。

已有研究显示,整合素、酪氨酸激酶受体和离子通道参与了 VSMCs 感受力学刺激,并将力学信号转换为生物信号,进而通过细胞内逐层的信号传导,调控细胞增殖、凋亡和迁移等功能变化<sup>[5]</sup>。目前,VSMCs 的信号调节通路虽然被广泛研究,但在磷酸化蛋白质分离纯化和质谱鉴定技术的发展下,大规模、高通量鉴定磷酸化蛋白质的研究为其提供新的研究靶点。本课题组基于磷酸化蛋白质组学研究,初步揭示 Rho 相关卷曲蛋白激酶 1(Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1, ROCK1)、ERK 和包括蛋白激酶 D(protein kinase D, PKD)的蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)家族可能参与张应变细胞内信号传导网络<sup>[6]</sup>,但该网络提示的 ROCK1 对 ERK、PKC 家族的调控作用及其对 VSMCs 功能的影响目前尚未明确。

本文模拟生理状况对 VSMCs 加载 10% 张应变力学刺激,应用蛋白免疫印迹实验(Western blotting)、

RNA 干扰等方法,比较 12、24 h 静止条件与张应变加载条件下 VSMCs 中 ROCK、ERK、PKC 蛋白质的反应变化,进一步检验并确认 ROCK1 对 VSMCs 增殖功能及 ERK 和 PKC 家族的调控作用。研究生理状态张应变力学刺激对 VSMCs 功能的作用及其分子信号调控路径,对理解血管生理和疾病机制具有重要作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 大鼠 VSMCs 的取材及传代培养

原代 VSMCs 采用组织贴块法培养。具体步骤如下:SD 大鼠麻醉处死后,取胸主动脉,置于含有 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中,用眼科剪将其剪成 1 mm<sup>2</sup> 大小的组织块,均匀铺展在细胞培养瓶中,倒置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 2~3 h,待组织块贴壁牢固后,正置培养瓶。以后,隔天换液,4~7 d 后,可见组织块的周围有细胞爬出,待细胞长到融合状态,便可以传代培养。取第 4~8 代且纯度大于 95% 以上的 VSMCs 用于后续实验。

### 1.2 细胞周期性张应变加载

应用 FX 4000T 细胞周期性张应变加载装置(Flexercell 公司,美国),对 VSMCs 进行张应变加载。VSMCs 以 3 × 10<sup>5</sup> 个/孔密度种植于 Bioflex 6 孔培养板,培养板置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养,当细胞达到 70%~80% 融合时,换成无血清 DMEM 培养液同步化 24 h 后,对 VSMCs 施加频率为 1.25 Hz 的张应变,加载时间分别为 12、24 h。根据施加的周期性张应变的幅度,将实验分为 2 组:静态组和 10% 生理性张应变组。以不施加张应变的静态组为对照。

### 1.3 荧光定量 PCR 实验

TRIzol 法提取细胞总 RNA,加入 DEPC 处理的无 RNA 酶水溶解后用紫外分光光度计测定所提取 RNA 的纯度及浓度。逆转录体系为 20 μL,各成分

及配比如下:5×缓冲液 4 μL,脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP, 10 mmol/L)1 μL,oligo dT 1 μL,RNA 酶抑制剂(40 U/μL)0.25 μL,MMLV 逆转录酶(200 U/μL)0.25 μL,总 RNA 样品 2 μg,加水至 20 μL。逆转录反应结束后,立即将 cDNA 产物置于冰上冷却,-20 ℃短期保存,长期保存放置在-80 ℃冰箱中。

大鼠 ROCK1 引物(上海生工)序列如下: sense 5'-CAGT TGGT TCTG CCTG CATT C-3'; antisense 5'-GCTG CTCA CCAC AACA TACT G-3'。内参基因 GAPDH 引物(上海生工)序列如下: sense 5'-GGCA GCCC AGAA CATC ATCC-3'; antisense 5'-GCCA GCCC AAGC ATCA AAG-3'。PCR 反应体系为 20 μL,各成分及配比如下:SYBR Premix Ex Taq™ 10 μL, sense Primer 1 μL, antisense Primer 1 μL,cDNA 2 μL,最后加水至 20 μL。实时定量 PCR 反应程序:95 ℃、3 min 预热;95 ℃、30 s,62 ℃、40 s,72 ℃、30 s,40 个循环。

#### 1.4 Western blotting 实验

用 4 ℃预冷的 PBS 清洗细胞两次。在倒置显微镜下观察细胞密度,根据密度加入 80~120 μL 2×细胞裂解液。放置 5 min,用细胞刮在孔内来回刮擦,使细胞充分裂解。收集不同分组的蛋白样品,贮于-80 ℃冰箱中。

配制 10% 下层分离胶和 4% 上层浓缩胶进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白。将提取后的蛋白样品沸水浴 5 min,13 000 r/min 离心 2 min,吸取上清液进行电泳,蛋白上样量 12 μg。电泳为恒流模式,电流为 12 mA。半干式电转仪恒压 15 V,转膜 60 min。蛋白条带放入含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 1 h。用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 按比例稀释一抗,一抗浓度如下:ROCK1(Santa Cruz Biotechnology, 1:200),Total-PKC(CST, 1:300),Phosphorylation-PKC(CST, 1:300),Total-PKD(CST, 1:400),Phosphorylation-PKD(CST, 1:400),Total-ERK(CST, 1:800),Phosphorylation-ERK(CST, 1:800)和 GAPDH(Proteintech, 1:1 000),放置于湿盒中,4 ℃反应过夜;次日,1×TBST 洗膜 3 次,每次 5 min;二抗(碱性磷酸酶标记)同样用 1×TBST 按 1:1 000 的比例稀释后室温反应 2 h;1×TBST 洗膜 3 次,每次 5 min;加 NBT/BCIP 显色液膜上显色;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

由上海吉玛生物制药公司设计并化学合成 ROCK1 特异性干扰片段(Sense: 5'-GGA GGA AGA AAU AAG UAA UTT-3'; Antisense: 5'-AUU ACU UAU UUC UUC CUC CTT-3'),使用与大鼠 ROCK1 不发生特异性干扰反应的 NC 片段(Sense: 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3'; Antisense: 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3')作为对照。

静态培养下 VSMCs 种于 6 孔细胞培养板进行 RNA 干扰,步骤如下:①取 250 μL opti-MEM 加入 100 nmol siRNA/NC,轻轻混匀,作为 Mix 1 溶液;②取 250 μL opti-MEM 加入 5 μL Lipofectamine™ 2000,轻轻混匀,混匀后室温放置 5 min,作为 Mix 2 溶液;③将上述 Mix 1 溶液和 Mix 2 溶液混合均匀,作为 Mix 3 溶液并在室温放置 10 min;④用基础培养基 DMEM 将 6 孔细胞培养板内 VSMCs 漂洗 2 次,每孔预留 500 μL DMEM。加入 Mix 3 溶液,混匀后置于温度为 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养;⑤6 h 后每孔补加 1 mL 含 10% 小牛血清的 DMEM,之后继续置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱培养。24 h 后裂解细胞提取蛋白样品。

#### 1.6 细胞增殖实验

张应变加载和 RNA 干扰结束前 8 h,将 BrdU (1:1 000)加入细胞培养液,处理结束后用按照  $2 \times 10^4$ /孔密度接种在 96 孔酶标板中,37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中继续培养 12 h,VSMCs 贴壁后吸出培养液,4 ℃过夜。固定后加入 anti-BrdU 抗体(1:100),25 ℃湿盒中孵育 2 h。加入 POD 显色底物,25 ℃避光孵育 3~10 min,待样品呈现适当深度的蓝色后以 1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止显色反应。用酶标仪读数,测定波长为 450 nm,参考波长为 630 nm。

#### 1.7 统计学分析

实验所有数据以均数±标准差表示,采用 *t* 检验比较 2 组数据间的统计学差异,*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。所有实验重复 3 次及以上。

## 2 结果

### 2.1 生理性张应变加载对 VSMCs 增殖和 ROCK1、PKC 家族和 ERK 的影响

2.1.1 生理性张应变加载对 VSMCs 增殖和 ROCK1 表达的影响 频率 1.25 Hz、幅度 10% 周期

性张应变作用于 VSMCs 24 h 后, BrdU ELISA 检测 VSMCs 增殖。结果表明, 10% 周期性张应变抑制 VSMCs 增殖 ( $P < 0.05$ )。Western blotting 检测 ROCK1 蛋白质水平, 荧光定量 PCR 检测 ROCK1 的 mRNA 表达量。结果显示, 与静止 12、24 h 的对照

组相比, 周期性张应变加载 12、24 h 后, ROCK1 的 mRNA 和蛋白表达量均显著性下降 ( $P < 0.05$ )。因此, 生理性张应变抑制 VSMCs 的增殖和 ROCK1 表达 (见图 1)。

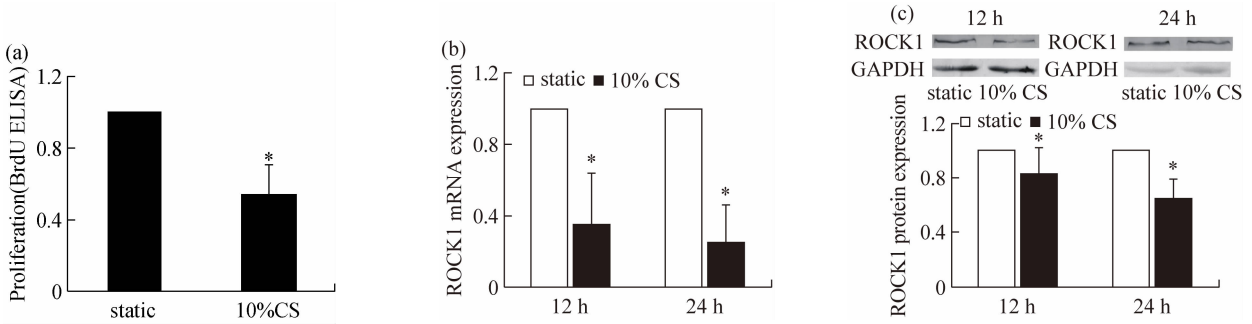


图 1 生理性张应变对 VSMCs 增殖和 ROCK1 表达的影响 (\*  $P < 0.05$ ) (a) 10% 张应变加载 24 h 显著抑制 VSMCs 增殖, (b) 10% 张应变加载 12、24 h 抑制 ROCK1 的 mRNA 表达, (c) 10% 张应变加载 12、24 h 抑制 ROCK1 的蛋白表达

**Fig. 1** Effects of physiological cyclic strain on VSMC proliferation and ROCK1 expression (a) 10% cyclic strain applied for 24 h significantly repressed VSMC proliferation, (b) 10% cyclic strain applied for 12 h or 24 h significantly decreased the mRNA expression of ROCK1 in VSMCs, (c) 10% cyclic strain applied for 12 h or 24 h significantly decreased the protein expression of ROCK1 in VSMCs

**2.1.2 生理性张应变加载对 PKC $\alpha/\beta$ 、PKD Ser916 磷酸化的影响** 频率 1.25 Hz、幅度 10% 周期性张应变作用于 VSMCs 12、24 h 后, Western blotting 检测 PKC $\alpha/\beta$  和 PKD Ser916 蛋白质磷酸化水平。结果表明, 与静止对照组相比, p-PKC $\alpha/\beta$  在周期性张

应变的作用下, 12 h 呈现显著性下降 ( $P < 0.05$ ), 24 h 相对表达量基本不变。与静止对照组相比, p-PKD Ser916 在 12、24 h 均呈现显著性下降 ( $P < 0.05$ )。此结果提示, 生理性张应变持续、显著地抑制 VSMCs 的 PKD Ser916 的磷酸化表达 (见图 2)。

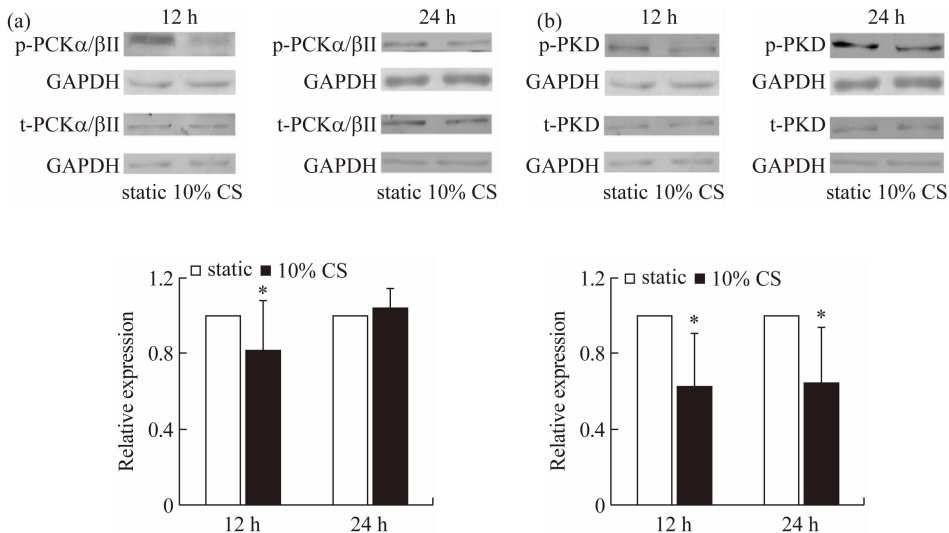


图 2 生理性张应变对 PKC $\alpha/\beta$  和 PKD Ser916 磷酸化的作用 (\*  $P < 0.05$ ) (a) 10% 张应变加载 12 h 抑制 PKC $\alpha/\beta$  磷酸化, (b) 10% 张应变加载 12、24 h 均显著抑制 PKD Ser916 磷酸化

**Fig. 2** Effects of physiological cyclic strain on phosphorylation of PKC $\alpha/\beta$  and PKD Ser916 (a) 10% cyclic strain applied for 12 h decreased phosphorylation of PKC $\alpha/\beta$ , (b) 10% cyclic strain applied for 12 h or 24 h markedly repressed phosphorylation of PKD on Ser916 residue

**2.1.3 生理性张应变加载对 ERK 的影响** 频率 1.25 Hz、幅度 10% 周期性张应变作用与 VSMCs 12、24 h 后, Western blotting 检测 ERK 蛋白质磷酸化。检测结果表明,与静止对照组相比,p-ERK 的表达量在周期性张应变的作用下,12、24 h 均呈现显著性下降 ( $P < 0.05$ )。因此,生理性张应变抑制 VSMCs 的 ERK 磷酸化(见图 3)。

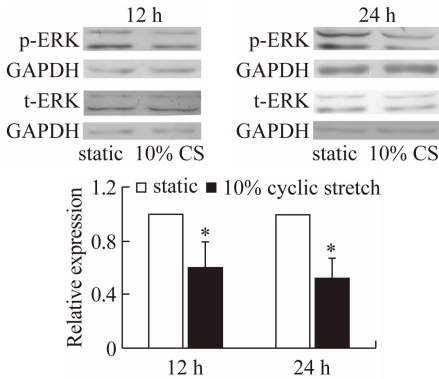


图 3 生理性张应变加载 12、24 h 显著抑制 ERK 磷酸化 (\*  $P < 0.05$ )

Fig. 3 Physiological cyclic strain applied for 12 h or 24 h significantly repressed the expression of p-ERK

**2.2 RNA 干扰抑制 ROCK1 表达对 PKC $\alpha$ / $\beta$ 、PKD 和 ERK 磷酸化的影响**

**2.2.1 RNA 干扰抑制 ROCK1 表达** 为了检测 VSMCs 内 ROCK1 对 ERK、PKC $\alpha$ / $\beta$ 、PKD 磷酸化的作用,通过特异性 RNAi 抑制 ROCK1 的表达。静态条件下,用 ROCK1 的特异性干扰片段显著抑制 VSMCs 的 ROCK1 表达 ( $P < 0.05$ )。检测结果表明,所选用的特异性干扰片段对 ROCK1 的表达可以起到有效的抑制作用,可以用于后续实验(见图 4)。

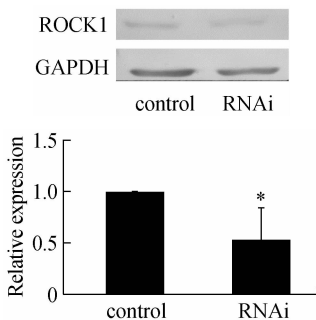


图 4 RNA 干扰显著抑制 VSMCs 的 ROCK1 表达 (\*  $P < 0.05$ )

Fig. 4 The expression of ROCK1 in VSMCs was significantly decreased by the specific RNA interference

**2.2.2 ROCK1 干扰对 VSMCs 增殖的影响** 静态

条件下,用 ROCK1 特异性干扰片段抑制 VSMCs 的 ROCK1 表达, BrdU ELISA 检测 VSMCs 增殖。结果表明,与对照相比,干扰 ROCK1 后 VSMCs 增殖能力显著降低 ( $P < 0.05$ , 见图 5)。因此,ROCK1 表达可能正向调控 VSMCs 增殖。

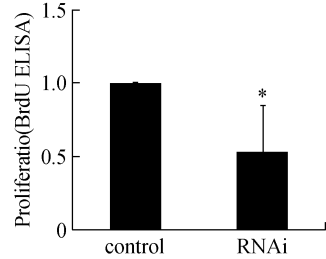


图 5 RNA 干扰抑制 ROCK1 表达显著降低 VSMCs 增殖 (\*  $P < 0.05$ )

Fig. 5 Specific RNA interference of ROCK1 significantly suppressed VSMC proliferation

**2.2.3 ROCK1 干扰对 PKC $\alpha$ / $\beta$ II, PKD Ser916 磷酸化的影响** 静态条件下,用 ROCK1 特异性干扰片段抑制 VSMCs 的 ROCK1 表达, Western blotting 检测 PKC $\alpha$ / $\beta$ II 蛋白质和 PKD 蛋白质在 Ser916 位点的磷酸化水平,分别以总 PKC $\alpha$ / $\beta$ II 和总 PKD 蛋白质水平为内参。结果表明,与对照相比,干扰 ROCK1 后 VSMCs 的 PKC $\alpha$ / $\beta$ II 和 PKD Ser916 磷酸化水平显著降低 ( $P < 0.05$ , 见图 6)。因此,ROCK1

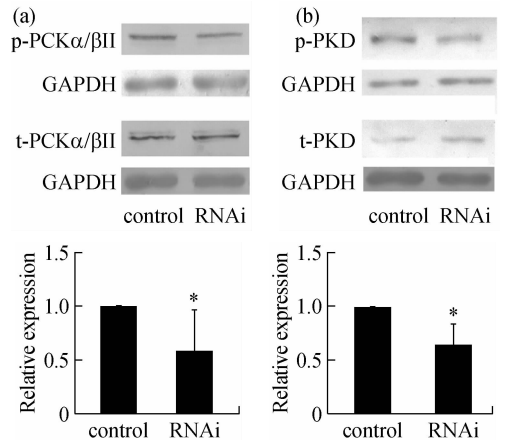


图 6 抑制 ROCK1 表达对 PKC $\alpha$ / $\beta$ II 和 PKD Ser916 磷酸化水平的影响 (\*  $P < 0.05$ ) (a) RNA 干扰抑制 ROCK1 显著降低 VSMCs 的 PKC $\alpha$ / $\beta$ II 磷酸化, (b) RNA 干扰抑制 ROCK1 显著降低 VSMCs 的 PKD Ser916 磷酸化

Fig. 6 The effect of ROCK1 RNA interference on phosphorylation of PKC $\alpha$ / $\beta$ II and PKD Ser916 (a) Specific RNA interference of ROCK1 repressed the phosphorylation of PKC $\alpha$ / $\beta$ II, (b) Specific RNA interference of ROCK1 decreased the phosphorylation of PKD on Ser916 residue

表达可能正向调控 PKC $\alpha$ / $\beta$ II 和 PKD Ser916 位点磷酸化。

**2.2.4 ROCK1 干扰对 ERK 的磷酸化影响** 静态条件下,用 ROCK1 特异性干扰片段抑制 VSMCs 的 ROCK1 表达,Western blotting 检测 ERK 蛋白质磷酸化水平,以总 ERK 为内参。结果表明,与对照相比,干扰 ROCK1 后 VSMCs 的 ERK 磷酸化水平略降低,但差异无显著性( $P > 0.05$ ,见图 7)。上述结果提示,VSMCs 的 ROCK1 表达水平变化对 ERK 磷酸化的作用可能没有其对 PKC $\alpha$ / $\beta$ II 和 PKD Ser916 磷酸化的作用显著,但 ROCK1 表达对 ERK 磷酸化是否具有调控作用可能需要后续更大样本量的研究证实。

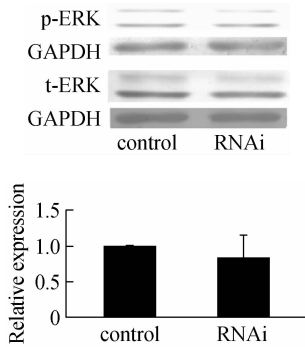


图7 RNA 干扰抑制 ROCK1 表达对 VSMCs 的 ERK 磷酸化无显著影响

Fig.7 Specific RNA interference of ROCK1 in VSMCs had no significant effect on ERK phosphorylation

### 3 讨论

ROCKs 属于 AGC 家族的丝氨酸/苏氨酸激酶,已知包括 ROCK1 和 ROCK2,是 Rho 家族 GTP 酶主要的下游靶分子,主要参与包括细胞黏附、增殖、迁移、吞噬等多种细胞活动。ROCKs 主要通过磷酸化下游底物提高细胞内肌动蛋白纤维稳定性,形成有收缩性质的肌动蛋白-肌球蛋白,进而调节细胞骨架的变化<sup>[7]</sup>。已有研究表明,ROCKs 在平滑肌细胞收缩中起到重要作用<sup>[8]</sup>。ROCKs 的信号通路被认为是治疗神经系统和心血管疾病的潜在目标<sup>[9]</sup>。

ROCK 提高细胞质中钙离子感受性使肌球蛋白轻链磷酸化从而改变血管紧张性<sup>[10]</sup>。体内或体外实验发现,抑制 ROCKs 可以激活血管内皮生长因子 VEGF 诱导的血管再生<sup>[11]</sup>。同时抑制 ROCK1 和 ROCK2 可以抑制 VSMCs 的增殖;仅抑制 ROCK1 则

减低 PDGF-BB 诱导的 VSMC 的迁移,而仅抑制 ROCK2 时并未有此效果<sup>[12]</sup>。由此可见,ROCKs 与 VSMCs 的功能密切相关。本研究结果揭示,生理性张应变抑制 VSMCs 的 ROCK1 表达,而降低的 ROCK1 抑制了 VSMCs 增殖。抑制 VSMCs 的增殖水平可以维持 VSMCs 的增殖和凋亡平衡,降低高血压血管重建风险<sup>[13]</sup>,维持血管的内环境平衡。

PKC 是一种普遍存在于体内的磷脂依赖苏氨酸/丝氨酸激酶,在 VSMCs 的增殖、分化中扮演着重要角色。现已知 PKC 的 11 个亚型,依据其调节域的不同分为含有与 DAG 和 Ca<sup>2+</sup> 结合域的保守型 PKC (PKC $\alpha$ 、PKC $\beta$ I、PKC $\beta$ II 和 PKC $\gamma$ )、含有 DAG 结合域但缺少 Ca<sup>2+</sup> 结合域的新奇型 PKC (PKC $\delta$ 、PKC $\epsilon$ 、PKC $\eta$  和 PKC $\theta$ ) 和既不含 DAG 结合域也不含 Ca<sup>2+</sup> 结合域的非典型 PKC (PKC $\zeta$ 、PKC $\lambda$  和 PKC $\iota$ )<sup>[14]</sup>。另外,PKD 也被认为是构成 PKC 家族的第 4 类(包括 PKC $\mu$  和 PKC $\nu$ )。本文研究主要针对 PKC $\alpha$ / $\beta$ II 和 PKD Ser916 等在生理性张应变下在 VSMCs 内信号网络中发挥的作用。

PKC 的丰度及分布因细胞功能而异。现有研究表明,PKCs 在张应变的作用下表达量会显著提升,在多种以 VSMCs 增殖、分化为基础的病理变化中扮演重要角色<sup>[15]</sup>。一般而言,当信号分子与有关受体结合后,会引发 G 蛋白调控的磷脂酶 C 激活,从而产生 DAG 激活剂,最终调控 PKCs<sup>[16]</sup>。另外,DAG 也可磷酸化 PKCs 或直接与 PKD 的 C1 域结合<sup>[17]</sup>。而具体到每个亚型,则发现它们发挥着不同乃至相反的调控作用,甚至某些亚型在不同研究中都可能表现出不同作用。血管术后再狭窄时,新奇型 PKCs 能抑制血栓的形成,而保守型 PKCs 则促进血栓的形成,血小板分泌方面亦是如此<sup>[18]</sup>。可是也有报道显示,PKC $\theta$  缺失使啮齿目鼠科动物凝血酶激发的血小板活化过程受损<sup>[19]</sup>。在猪和大鼠的研究中发现,PKC $\alpha$  与 VSMCs 的增殖有负向调控关系<sup>[20]</sup>;而在人 VSMCs 的研究中则发现,两者之间存在正向调控<sup>[21]</sup>。至于 PKD,也在细胞增殖的信号网络中发挥作用;现有研究发现,该蛋白及其有关网络在胰腺癌细胞中可以通过促进 DNA 合成来实现细胞的进一步增殖<sup>[22]</sup>。

已有研究表明,通过反义寡核苷酸抑制 ERK 的表达可以有效抑制苯肾上腺素诱导的心肌细胞肥大

反应和 VSMCs 的增殖<sup>[23]</sup>。Zhan 等<sup>[24]</sup>通过重组腺病毒导入 Ad-DN-JNK、Ad-DN-P38、Ad-DN-ERK 分别抑制 JNK、P38 和 ERK3 种分子的磷酸化,虽然 3 种分子均对 PDGF-BB 诱导的 VSMCs 的增殖迁移有一定影响,但是与 JNK 和 p38 相比,抑制 ERK 的磷酸化可以最大程度地抑制 VSMCs 增殖。除了上述研究 ERK 和 VSMCs 的关系外,研究者对 ROCK 如何影响 ERK 有着不同的看法。Zohrabian 等<sup>[25]</sup>发现,干扰 ROCK1 可以降低 PEGF-或 FN-诱导的 ERK1/2 活性。Kroll 等<sup>[26]</sup>发现,干扰 ROCK1/2 可以促进血管内皮细胞 ERK1/2 活性。Zhao 等<sup>[27]</sup>发现,在大鼠 VSMCs 中,干扰 ROCK1 对于胞浆内的 p-ERK 无明显作用,但可降低细胞核中 p-ERK 含量。上述研究提示,对于不同的细胞种类、诱导条件来说,ROCKs 对 ERK 可能有不同甚至相反的影响。本文结果显示,抑制 ROCK1 表达可能对于 VSMCs 的 p-ERK 无明显作用。

#### 4 结语

综上所述,ROCK1 在 VSMCs 的表达受张应变力学加载的影响。10% 生理性张应变抑制 ROCK1 表达,并可能通过影响 PKC $\alpha$ / $\beta$ II、PKD 磷酸化激活实现对 VSMCs 增殖功能的调节。在今后的研究中,将构建 ROCK1 的慢病毒高表达载体,并在张应变加载条件下上调 ROCK1 表达,以深入研究应力调控的 VSMCs 功能变化是否为 ROCK1 依赖性及其相关分子机制。深入探讨 ROCK1 在张应变调控 VSMCs 增殖活性中的作用及其分子机制,对于深入了解血管稳态维持的生理机制和高血压血管重建的发病机制具有重要理论和临床意义。

#### 参考文献:

[1] CHAPMAN GB, DURANTE W, HELLUMS JD, *et al.* Physiological cyclic stretch causes cell cycle arrest in cultured vascular smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, 278(3): H748-H754.  
[2] SCHULZE PC, DE KEULENAER GW, KASSIK KA, *et al.* Biomechanically induced gene iex-1 inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation [J]. *Circ Res*, 2003, 93(12): 1210-1217.  
[3] MILLS I, COHEN CR, KAMAL K, *et al.* Strain activation of

bovine aortic smooth muscle cell proliferation and alignment: Study of strain dependency and the role of protein kinase A and C signaling pathways [J]. *J Cell Physiol*, 1997, 170(3): 228-234.  
[4] IWASAKI H, EGUCHI S, UENO H, *et al.* Mechanical stretch stimulates growth of vascular smooth muscle cells via epidermal growth factor receptor [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, 278(2): H521-H529.  
[5] HAGA JH, LI YS, CHIEN S. Molecular basis of the effect of mechanical stretch on vascular smooth muscle cells [J]. *J Biomech*, 2007, 40(5): 947-960.  
[6] YANG YC, WANG XD, HUANG K, *et al.* Temporal phosphoproteomics to investigate the mechanotransduction of vascular smooth muscle cells in response to cyclic stretch [J]. *J Biomech*, 2014, 47(15): 3622-2629.  
[7] AMANO T, TANABE K, ETO T, *et al.* LIM-kinase 2 induces formation of stress fibres, focal adhesions and membrane blebs, dependent on its activation by Rho-associated kinase-catalysed phosphorylation at threonine-505 [J]. *Biochem J*, 2001, 354(Pt 1): 149-159.  
[8] WANG Y, ZHENG XR, RIDDICK N, *et al.* ROCK isoform regulation of myosin phosphatase and contractility in vascular smooth muscle cells [J]. *Circ Res*, 2009, 104(4): 531-540.  
[9] KUBO T, YAMAGUCHI A, IWATA N, *et al.* The therapeutic effects of Rho-ROCK inhibitors on CNS disorders [J]. *Ther Clin Risk Manag*, 2008, 4(3): 605-615.  
[10] VAN NIEUW AMERONGEN GP, VAN HINSBERGH VW. Cytoskeletal effects of rho-like small guanine nucleotide-binding proteins in the vascular system [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21(3): 300-311.  
[11] KROLL J, EPTING D, KERN K, *et al.* Inhibition of Rho-dependent kinases ROCK I/II activates VEGF-driven retinal neovascularization and sprouting angiogenesis [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 296(3): H893-899.  
[12] ZHAO Y, LV M, LIN H, *et al.* ROCK1 induces ERK nuclear translocation in PDGF-BB-stimulated migration of rat vascular smooth muscle cells [J]. *IUBMB Life*, 2012, 64(2): 194-202.  
[13] KOLLER A. Signaling pathways of mechanotransduction in arteriolar endothelium and smooth muscle cells in hypertension [J]. *Microcirculation*, 2002, 9(4): 277-294.  
[14] CHUICHILL E, BUDAS G, VALLENTIN A, *et al.* PKC isozymes in chronic cardiac disease: Possible therapeutic targets? [J] *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2008, 48: 569-599.  
[15] SUGIYAMA T, YOSHIZUMI M, TAKAKU F, *et al.* The elevation of the cytoplasmic calcium ions in vascular smooth muscle cells in SHR: Measurement of the free calcium ions

- in single living cells by laser microfluorospectrometry [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1986, 141(1): 340-345.
- [16] GRIENGLING KK, RITTENHOUSE SE, BROCK TA, *et al.* Sustained diacylglycerol formation from inositol phospholipids in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 2986, 261(13): 5901-5906.
- [17] HURD C, WALDRON RT, ROZENGURT E. Protein kinase D complexes with C-Jun N-terminal kinase via activation loop phosphorylation and phosphorylates the C-Jun N-terminus [J]. *Oncogene*, 2002, 21(14): 2154-2160.
- [18] HARPER MT, POOLE AW. Diverse functions of protein kinase C isoforms in platelet activation and thrombus formation [J]. *J Thromb Haemost*, 2012, 8(3): 454-462.
- [19] NAGY B JR, BHAVARAJU K, GETZ T, *et al.* Impaired activation of platelets lacking protein kinase C-theta isoform [J]. *Blood*, 2009, 113(11): 2557-2567.
- [20] WANG S, DESAI D, WRIGHT G, *et al.* Effects of protein kinase C alpha overexpression on A7r5 smooth muscle cell proliferation and differentiation [J]. *Exp Cell Res*, 1997, 236(1): 117-126.
- [21] MARILLEY D, MOSIENIAK G, BOSCOBOINIK D, *et al.* Correlation between human vascular smooth muscle cell proliferation and protein kinase C alpha-expression: Effect of d-alpha-tocopherol [J]. *Biochem Mol Biol Int*, 1996, 40(4): 699-707.
- [22] GUHA S, REY O, ROZENGURT E. Neurotensin induces protein kinase C-dependent protein kinase D activation and DNA synthesis in human pancreatic carcinoma cell line PANC-1 [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(6): 1632-1640.
- [23] GLENNON PE, KADDOUR S, SALE EM, *et al.* Depletion of mitogen-activated protein kinase using an antisense oligodeoxynucleotide approach downregulates the phenylephrine-induced hypertrophic response in rat cardiac myocytes [J]. *Circ Res*, 1996, 78(6): 954-961.
- [24] ZHAN Y, KIM S, IZUMI Y, *et al.* Role of JNK, p38, and ERK in platelet-derived growth factor-induced vascular proliferation, migration, and gene expression [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(5): 795-801.
- [25] ZOHRABIAN VM, FORZANI B, CHAU Z, *et al.* Rho/ROCK and MAPK signaling pathways are involved in glioblastoma cell migration and proliferation [J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(1): 119-123.
- [26] KROLL J, EPTING D, KERN K, *et al.* Inhibition of Rho-dependent kinases ROCK I/II activates VEGF-driven retinal neovascularization and sprouting angiogenesis [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 296(3): H893-899.
- [27] ZHAO Y, LV M, LIN HS, *et al.* ROCK1 induces ERK nuclear translocation in PDGF-BB-stimulated migration of rat vascular smooth muscle cells [J]. *IUBMB Life*, 2012, 64(2): 194-202.