

MAD1 基因在主动脉夹层中的表达及对 主动脉平滑肌细胞的影响

芮璐¹,刘锐²,张本青²,刘凯颺²,沈刘忠²,张晶²,王旭²,于存涛²,王巍^{1*}

(1. 中国医学科学院阜外医院胸心外科,北京 100037;2. 中国医学科学院阜外医院 北京协和医学院
国家心血管病中心 心血管疾病国家重点实验室 心脏外科,北京 100037)

摘要: 收集病变的升主动脉中膜组织标本为主动脉夹层组;收集同期在本院行尸检且无手术史、大血管病变的升主动脉壁内组织标本 18 份为对照组;RT-PCR 和 Western blot 检测有丝分裂阻滞缺陷蛋白(MAD1) mRNA 和蛋白表达水平。在体外建立 MAD1 基因高表达人主动脉血管平滑肌细胞(HA-VSMC)模型,检测细胞增殖和凋亡情况以及凋亡相关蛋白。结果显示主动脉夹层组患者主动脉夹层中 MAD1 mRNA 和蛋白相对表达量明显高于对照组($P<0.05$)。随着转染时间的延长,各组细胞增殖水平均逐渐增加,转染 48 h、72 h 后 MAD1 过表达组细胞增殖情况低于空白对照组及空载体转染组($P<0.01$)。转染 48 h 后,MAD1 过表达组细胞凋亡率明显高于空白对照组及空载体转染组($P<0.01$)。MAD1 过表达组含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 mRNA 和蛋白相对表达量明显高于空白对照组及空载体转染组($P<0.05$)。实验结果表明,MAD1 过表达可通过抑制细胞增殖,激活细胞外凋亡途径和细胞内凋亡途径来促进人主动脉平滑肌细胞 HA-VSMC 细胞凋亡,参与主动脉夹层的发生与发展。

关键词: 主动脉夹层; 主动脉平滑肌细胞; MAD1 基因; 细胞凋亡

中图分类号:R543.1 文献标识码:A

Expression of MAD1 gene in aortic dissection and its effect on aortic smooth muscle cells

RUI Lu¹, LIU Rui², ZHANG Bengqing², LIU Kaiyang², SHENG Liuzhong²,
ZHANG Jing², WANG Xu², YU Cuntao², WANG Wei^{1*}

(1. Fuwai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Cardiothoracic Surgery Beijing 100037, China;
2. Fuwai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, National
Center for Cardiovascular Diseases, National Key Laboratory of Cardiovascular Diseases,
Cardiac surgery, Beijing 100037, China)

Abstract: 30 patients with aortic dissection who underwent surgical treatment in our hospital were selected as the study group, and 18 ascending aortic tissue specimens without history of operation and macrovascular disease were collected as the control group. The expression of MAD1 was detected by RT-PCR and Western blot. The model of human aortic vascular smooth muscle cells (HA-VSMC) with high MAD1 gene expression was established in vitro by adenovirus vector transfection technology. The cell proliferation and apoptosis were detected. The results showed that The relative expression of MAD1 in aortic dissection of the study group was significantly higher than that of the control group ($P<0.05$). With the prolongation of transfection time, the cell proliferation level of each group increased gradually. The cell proliferation of MAD1 overexpression group was lower than that of blank control group and blank vector transfection group 48 hours and 72 hours after transfection, and the difference was statistically significant ($P<0.01$). After 48 hours of transfection, the apoptotic rate of MAD1 overexpression group was significantly higher than that of blank control group and blank vector transfection group ($P<0.01$). The relative expression of Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9 in MAD1 overexpression group was sig-

nificantly higher than that in blank control group and blank vector transfection group ($P < 0.05$). So overexpression of MAD1 can promote apoptosis of HA-VSMC cells by inhibiting cell proliferation, activating extracellular and intracellular apoptotic pathways, and participate in the occurrence and development of aortic dissection.

Key words: aortic dissection; aortic smooth muscle cells; MAD1 gene; apoptosis

主动脉夹层指主动脉腔内的血液从主动脉内膜撕裂处进入主动脉中膜,形成的真假两腔分离状态^[1],是一种起病迅速、死亡率高的大血管疾病^[2];若未得到及时有效治疗,死亡率至发病起以每小时2%~5%递增^[3]。虽然近年来临床对主动脉夹层的诊治水平有了明显提升,但围手术期患者死亡率仍超过20%^[4]。目前对主动脉夹层的发病机制仍未完全明确,阐明发病机制对改良治疗方案,提升患者预后水平具有重要意义。研究者发现,主动脉中膜在维持主动脉生理结构和功能中发挥决定作用,血管平滑肌细胞是主动脉中膜最主要的组成成分^[5]。亦有研究显示,主动脉夹层发生、发展中存在明显的主动脉中膜血管平滑肌细胞丢失,被认为与血管平滑肌细胞增殖、凋亡功能异常有关^[6],但分子机制仍未阐明。有丝分裂阻滞缺陷蛋白(Mitotic arrest deficient protein, MAD)和MAX作用蛋白(Max interacting protein, MAX),均属于原癌基因Myc family oncogene(MYC家族)^[7];相关研究显示,MAX高表达可明显抑制主动脉平滑肌细胞生长,促进凋亡,参与主动脉夹层的发生、发展^[8]。但关于MAD表达与主动脉平滑肌细胞的关系及在主动脉夹层发病中的作用仍未见研究报道。MAD各亚型中以MAD1研究最为广泛,已有报道证实,MAD1基因在白血病、乳腺癌、鼻咽癌等多种恶性肿瘤中发挥调控作用^[9-10]。本研究收集了Stanford A型主动脉夹层患者的升主动脉病变组织中膜标本,检测MAD1基因表达水平;并通过腺病毒载体转染技术在体外建立MAD1基因高表达人主动脉血管平滑肌细胞模型,检测细胞增殖、凋亡情况以及凋亡相关蛋白的表达水平。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选取2017年3月至2018年6月间在本院行手术治疗的主动脉夹层患者30例。入选标准:①经CT、MRI、超声检查并结合临床症状确诊为Stanford A型主动脉夹层患者;②发病到住院时间 ≤ 14 天。排除标准:①Stanford B型或慢性主动脉夹层患者;②马凡氏综合征、主动脉瓣二叶瓣化畸形的患者。

其中男性22例,女性8例;年龄28~68岁,平均年龄 (46.30 ± 12.75) 岁。收集术中切除的升主动脉病变组织,保留富含血管平滑肌的中膜组织标本为主动脉夹层组。收集同期在本院行尸检,且无手术史、无大血管病变史的升主动脉壁内组织标本18份为对照组,其中男性10例,女性8例;年龄30~65岁,平均年龄 (46.15 ± 6.90) 岁。两组性别、年龄之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。本研究经本院伦理委员会审核通过,受试者家属签署知情同意书。

1.2 材料与主要试剂

人主动脉血管平滑肌细胞(HA-VSMC)购于上海沪震生物科技有限公司;腺病毒载体AdEasy系统由北京安必奇生物科技有限公司设计合成;CCK8试剂盒、Annexin V细胞凋亡检测试剂盒购于上海钰博生物科技有限公司;兔抗人MAD1多克隆抗体,鼠抗人含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(cysteine aspartic acid specific protease, Caspase)Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9单克隆抗体均购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养与转染 HA-VSMC细胞放入含10%胎牛血清的DMEM培养基中,37℃5%CO₂的细胞培养箱中培养并传代,传至5~6代时取对数生长细胞用于后续实验。使用腺病毒载体AdEasy系统过表达MAD1,分为空白对照组、空载体转染组、MAD1过表达组;转染48h后通过RT-PCR和Western blot验证各组细胞中MAD1 mRNA和蛋白表达情况。

1.3.2 细胞增殖和凋亡实验 使用CCK8试剂盒检测细胞增殖能力,按5 000个/孔的密度将细胞接种于96孔板中,常规培养12h后分别以重组腺病毒AdEasy-MAD1和空载体转染细胞,同时设置空白对照组,分别于转染前,转染后24h、48h、72h,每孔滴加10 μ L CCK8溶液,继续培养1h后,酶标仪读取490 nm处吸光度值。细胞凋亡实验:细胞转染48h后,使用Annexin V细胞凋亡检测试剂盒进行测定,操作按试剂盒说明进行。

1.3.3 RT-PCR检测 Trizol法提取主动脉组织和HA-VSMC细胞中的总RNA,反转录得到cDNA。引物合成由上海捷瑞生物工程有限公司完成,MAD1

引物序列:上游 5'-CCAACGAGAAGCAGCGAGAG-3',下游 5'-GTGAGGTTCTCTCTTCCGT-3';Caspase-3 引物序列:上游 5'-CAGTTAGGACAGGCACAGGC-3',下游 5'-GCTTGCTCTGAGACCGTACG-3';Caspase-8 引物序列:上游 5'-GGACAGCCGAAGACGATA-3',下游 5'-GTAACGACCAGAGTGACC-3'。Caspase-9 引物序列:上游 5'-CCACTAT CTAACCAGGTAAAC-3',下游 5'-TGTTTCAGTAATAATGGGAGTG-3'。反应体系 30 μ L,反应条件:94 $^{\circ}$ C 2 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,52 $^{\circ}$ C 30 s,共 40 个循环,延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min。行 2% 琼脂糖凝胶电泳,以 GAPDH 为内参,计算 MAD1、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 mRNA 的相对表达量。

1.3.4 Western blot 检测 对 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 从前提转变为 cleaved Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 的蛋白表达水平进行检测,RIPA 提取主动脉组织和 HA-VSMC 细胞中总蛋白,BCA 法蛋白定量。蛋白样品行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,湿法转膜至 PVDF,5% 脱脂奶粉室温下封闭 1 h,滴加兔抗人 MAD1 多克隆抗体 (1 : 200),鼠抗人 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 单克隆抗体 (1 : 500),4 $^{\circ}$ C 过夜,滴加 HRP 标记羊抗兔 IgG、羊抗鼠 IgG (1 : 1 000),室温反应 2 h,ECL 显色,避光显影,以 GAPDH 为内参对照计算各条带灰度值。

1.4 统计学分析

使用 SPSS18.0 软件分析,以均数 $\pm$ 标准差表示,多组间进行 *F* 检验,两组间进行 *t* 检验,以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 主动脉夹层中 MAD1 mRNA 和蛋白表达分析

RT-PCR 检测显示,主动脉夹层组患者主动脉夹层中 MAD1 mRNA 相对表达量明显高于对照组 ($P < 0.05$);Western blot 检测显示,主动脉夹层组患者主动脉夹层中 MAD1 蛋白相对表达量明显高于对照组。见图 1,表 1。

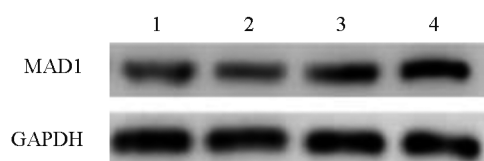


图 1 主动脉夹层中 MAD1 蛋白表达的 Western blot 电泳图

注:1~2 为对照组;3~4 为主动脉夹层组

表 1 两组主动脉夹层中 MAD1 mRNA 和蛋白表达分析

组别	<i>n</i>	MAD1 mRNA	MAD1 蛋白
对照组	18	1.68 $\pm$ 0.31	2.95 $\pm$ 0.63
主动脉夹层组	30	4.16 $\pm$ 1.09	6.31 $\pm$ 1.45
<i>t</i>		7.521	9.384
<i>P</i>		0.029	0.015

2.2 过表达 MAD1 的细胞系构建与验证

转染 48 h 后,空白对照组、空载体转染组、MAD1 过表达组 MAD1mRNA 相对表达量分别为 1.42 $\pm$ 0.11、1.50 $\pm$ 0.18、8.05 $\pm$ 0.73;MAD1 蛋白相对表达量分别为 1.07 $\pm$ 0.09、1.12 $\pm$ 0.14、7.63 $\pm$ 0.59。MAD1 过表达组 MAD1mRNA 和蛋白相对表达量均明显高于空白对照组、空载体转染组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);证明已成功构建过表达 MAD1 的 HA-VSMC。

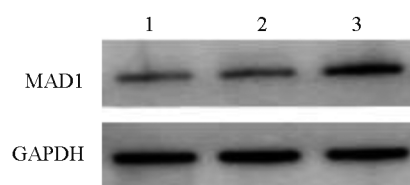


图 2 各组 MAD1 蛋白的 Western blot 电泳图

1:空白对照组;2:空载体转染组;3:MAD1 过表达组

2.3 各组细胞增殖情况

转染前各组细胞增殖情况之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$);随着转染时间的延长,各组细胞增殖水平均逐渐增加,转染 48 h、72 h 后 MAD1 过表达组细胞增殖明显低于空白对照组、空载体转染组 ($P < 0.01$);空白对照组与空载体转染组细胞增殖之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 各组细胞增殖情况分析 (OD 值)

组别	转染前	转染 24 h	转染 48 h	转染 72 h
空白对照组	0.17 $\pm$ 0.06	0.45 $\pm$ 0.08	0.97 $\pm$ 0.19	1.40 $\pm$ 0.26
空载体转染组	0.18 $\pm$ 0.06	0.43 $\pm$ 0.11	0.99 $\pm$ 0.25	1.37 $\pm$ 0.24
MAD1 过表达组	0.18 $\pm$ 0.09	0.39 $\pm$ 0.15	0.51 $\pm$ 0.17 ^{ab}	0.64 $\pm$ 0.19 ^{ab}

与空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与空载体转染组比较,^b $P < 0.05$

2.4 各组细胞凋亡情况分析

转染 48 h 后,空白对照组、空载体转染组、MAD1 过表达组细胞凋亡率分别为:(5.31 $\pm$ 0.86)%、(5.40 $\pm$ 0.93)%、(17.65 $\pm$ 2.50)%。MAD1 过表达组细胞凋亡率明显高于空白对照组、空载体转染组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$);空白

对照组与空载体转染组细胞凋亡率之间差异无统计学意义($P>0.05$)。见图3。

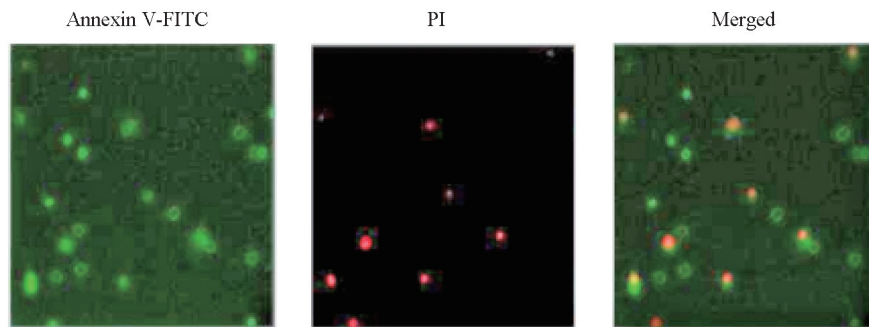


图3 Annexin V 细胞凋亡检测(400×)

2.5 各组 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 mRNA 表达水平比较

MAD1 过表达组 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 mRNA 相对表达量明显高于空白对照组、空载体转染组,差异有统计学意义($P<0.05$);空白对照组与空载体转染组 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 mRNA 相对表达量差异无统计学意义($P>0.05$)。见表3。

表3 各组 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 mRNA 相对表达量比较

组别	Caspase-3	Caspase-8	Caspase-9
空白对照组	5.52±0.85	2.21±0.69	4.06±0.72
空载体转染组	5.60±0.91	2.15±0.54	4.14±0.80
MAD1 过表达组	8.19±1.43 ^{ab}	4.93±0.81 ^{ab}	6.70±1.05 ^{ab}

与空白对照组比较,^a $P<0.05$;与空载体转染组比较,^b $P<0.05$

2.6 各组 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 蛋白表达水平比较

MAD1 过表达组 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 蛋白相对表达量明显高于空白对照组、空载体转染组($P<0.05$);空白对照组与空载体转染组 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 蛋白相对表达量差异无统计学意义($P>0.05$)。见表4、图4。

表4 各组 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 蛋白相对表达量比较

组别	Caspase-3	Caspase-8	Caspase-9
空白对照组	6.13±0.58	1.81±0.13	4.35±0.42
空载体转染组	6.25±0.64	1.89±0.17	4.41±0.59
MAD1 过表达组	10.51±1.73 ^{ab}	5.73±0.60 ^{ab}	9.23±1.40 ^{ab}

与空白对照组比较,^a $P<0.05$;与空载体转染组比较,^b $P<0.05$

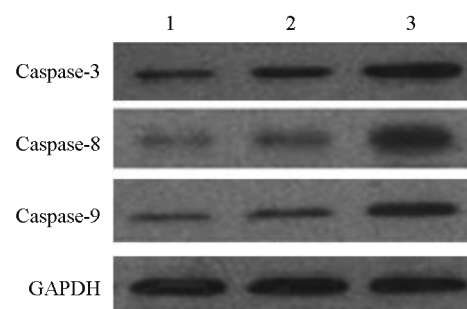


图4 各组细胞凋亡相关蛋白的 Western blot 电泳图

1:空白对照组;2:空载体转染组;3:MAD1 过表达组

3 讨 论

随着近年来我国人口老龄化 and 高血压患者的增加,主动脉夹层的发病率明显提升,而且已成为严重威胁居民生命安全的危重症之一^[11]。主动脉夹层可累及体内多个系统,表现复杂多样,常表现为高血压、胸痛、主动脉瓣关闭不全等^[12]。主动脉夹层发病机制目前仍未完全明确,研究者认为,主动脉内膜、中膜和外膜结构和功能的改变可能在主动脉夹层发生发展中发挥重要作用,其中主动脉中膜在维持主动脉壁生理结构和功能的首要因素,平滑肌细胞丢失、凋亡、数量下降等导致的主动脉中膜重构是主动脉夹层发生的病理基础^[13]。MAD 和 MAX 可通过与自身或 MYC 家族其他成员形成同源二聚体或异源二聚体,在细胞生长和凋亡中发挥调控作用^[14]。已有研究证实,MAX 表达上调可抑制主动脉平滑肌细胞生长,促进细胞凋亡。目前研究发现,MAD1 基因在白血病、乳腺癌、鼻咽癌等多种癌症的发生、发展过程中发挥调控作用;但在主动脉夹层发病过程中的作用仍未见相关研究报道。

Stanford A 型主动脉夹层是一种急需手术治疗的致命性疾病,是主动脉夹层中致死率最高的类型^[15]。本研究以在本院行手术治疗的 Stanford A 型主动脉夹层患者为研究对象,收集术中切除的升主动脉病变组织中膜部分为研究标本。研究结果显示,Stanford A 型主动脉夹层患者升主动脉病变组织中膜部分组织中 MAD1 mRNA 和蛋白表达水平明显高于正常升主动脉壁内组织。提示 MAD1 高表达可能在主动脉夹层发生发展中发挥调控作用。进一步在体外建立 MAD1 基因过表达人主动脉血管平滑肌细胞模型,检测细胞增殖和凋亡情况发现,MAD1 基因过表达可明显抑制 HA-VSMC 细胞增殖,促进细胞凋亡,加重主动脉夹层病情。

Caspase 家族是一组存在于细胞质溶胶中的半胱氨酸蛋白酶,目前已确定至少 11 种亚型,在细胞凋亡信号传导中发挥重要作用,是细胞凋亡的执行者^[16]。研究者发现,Caspase 级联反应是细胞凋亡的主要原因,其中 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 作用最明显^[17];Caspase-3 位于级联反应下游,直接诱导细胞凋亡^[18]。细胞凋亡的胞外途径中,凋亡信号传导分子与 Caspase-8 特异性结合,活化后的 Caspase-8 与 Caspase-3 相互作用,激活 Caspase-3,诱导细胞凋亡^[19];细胞内途径中,凋亡信号因子与相关蛋白酶形成复合物,之后与细胞质中 Caspase-9 前体结合,激活 Caspase-9,进而活化下游 Caspase-3,诱导细胞凋亡^[20]。本研究中,MAD1 过表达组 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 表达水平较空白对照组与空载体转染组明显增加,提示 MAD1 过表达促进 HA-VSMC 细胞凋亡可能通过激活细胞外凋亡途径和细胞内凋亡途径来实现的。

参考文献:

- [1] 杨霄,杨霞,谢辉,等.低主动脉夹层评分联合 D-二聚体阴性对排除急性主动脉夹层诊断的价值[J].实用医学杂志,2017,33(13):2213-6.
- [2] 李卓东.急性 Stanford A 型主动脉夹层临床分析及住院死亡危险因素探讨[D].海军军医大学,2018.
- [3] 宋玮.泰安近十年主动脉夹层临床特征及相关危险因素分析[D].青岛大学,2016.
- [4] 周阳,彭静,彭文,等.近十年我国主动脉夹层中文文献分析[J].中国急救复苏与灾害医学杂志,2018,13(2):120-4.
- [5] 吴琪,王志维.血管中膜与主动脉夹层发病机制的研究进展[J].中国循证心血管医学杂志,2017,9(5):625-8.
- [6] 陈庆良,李博.主动脉夹层诊疗进展[J].天津医药,2018,46(5):458-61.
- [7] 侯杨峰,杨文玲.主动脉夹层发病机制研究的新进展[J].心血管病学进展,2018,39(5):847-51. [8] 索晓慧,高建军,郭玮,等.抑癌基因 Mad1 在白血病细胞中突变的研究[J].中国美容医学,2012,21(18):51-52. DOI:10.3969/j.issn.1008-6455.2012.18.045.
- [9] 杨少宜,张庆英,吴俊东,等.纺锤体检查点功能复合物基因 MAD1L1 遗传变异与潮汕地区女性乳腺癌易感性研究[J].癌变·畸变·突变,2018,30(3):209-13.
- [10] 陈芳.鼻咽癌差异表达基因的生物信息学分析及 Mad1/c-Myc/P53 轴的调控机制研究[D].南方医科大学,2018.
- [11] 张迎峰,朱化刚,张志功,等.476 例主动脉夹层发病时间分布特点研究[J].中华消化外科杂志,2017,16(11):1113-7.
- [12] 王进,刘一帆,王利,等.主动脉夹层研究进展[J].实用医院临床杂志,2016,13(4):209-12.
- [13] 熊锐,王志维,胡小平,等.富含脯氨酸的酪氨酸激酶 2 信号通路在血管紧张素 II 诱导的血管平滑肌细胞表型转化及主动脉夹层形成中的作用[J].广西医学,2018,40(13):1405-9.
- [14] 郭义山,丛超,杨宁,等.主动脉夹层发病机制的研究进展[J].医学综述,2017,23(12):2339-43.
- [15] 孙立忠,李建荣.我国 Stanford A 型主动脉夹层诊疗进展与挑战[J].中华外科杂志,2017,55(4):241-4.
- [16] SCOTT J, KISHORE RAGHUPATHI, JEANNE A, et al. Phosphorylation of caspase-7 by PAK2 blocks apoptotic activity by two distinct mechanisms[J]. Structure, 2017, 25(1):27-39.
- [17] 杨涛,费振海,钟兴明,等. Caspase 家族与细胞凋亡的研究进展[J].浙江医学,2018,40(18):2083-7.
- [18] 蒲竞,李汛,朱骏,等. PARP-1 和 caspase-3 在胰腺癌及癌旁组织中的表达及意义[J].临床肝胆病杂志,2016,32(2):337-41.
- [19] 晓虹,齐洁敏.胃腺癌组织中凋亡相关因子 TRAF2、Caspase-8 的表达及其临床意义[J].临床与实验病理学杂志,2018,34(4):370-4.
- [20] 左俐俊,任亚萍.小鼠不同动情周期子宫内膜组织中 Bcl-2、Bax 和 Caspase-9 蛋白的表达[J].郑州大学学报(医学版),2016,51(2):183-6.

(本文编辑:蒋湘莲)