

## 构建过表达 FNDC5 慢病毒载体抑制平滑肌细胞的增殖与迁移

<https://doi.org/10.12307/2021.298>

王 向, 韦朝俊, 王 尧, 潘裕佳, 刘大男

投稿日期: 2020-09-18

送审日期: 2020-09-21

采用日期: 2020-11-13

在线日期: 2021-04-01

中图分类号:

R459.9; R318; R543

文章编号:

2095-4344(2021)35-05670-06

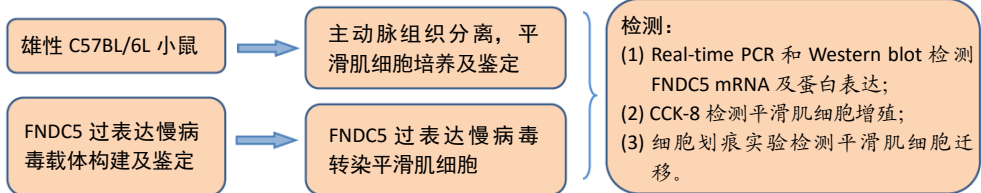
文献标识码: B

## 文章快速阅读:

## 文章特点—

△基于目前组织工程常用的基因转染策略, 将携带过表达III型纤连蛋白结构域包含蛋白 5(FNDC5) 的慢病毒转染小鼠主动脉血管平滑肌细胞;

△过表达 FNDC5 转染可显著抑制血管平滑肌细胞增殖、迁移, 这为临床治疗动脉粥样硬化形成、血管再狭窄等问题提供了新的临床思路。



## 文题释义:

III型纤连蛋白结构域包含蛋白5(fibronectin type III domain containing 5, FNDC5): 属于一种肌肉因子, 主要表达于骨骼肌及其他肌肉较多的组织中。FNDC5的羧基端被蛋白水解酶水解释放Irisin(鸢尾素), 鸢尾素在调节糖脂代谢及心血管稳态方面具有重要作用, 另有报道FNDC5通过结合不同受体影响多种细胞增殖与迁移。

## 摘要

背景: III型纤连蛋白结构域包含蛋白5(fibronectin type III domain containing 5, FNDC5)属于一种肌肉因子, 主要表达于骨骼肌及其他肌肉较多的组织中, 可通过结合不同受体影响多种细胞增殖与迁移。

目的: 构建过表达FNDC5基因的慢病毒载体, 获得稳定转染FNDC5的平滑肌细胞系, 并观察其对平滑肌细胞增殖与迁移的影响。

方法: ①体外培养血管平滑肌细胞, 经鉴定合格后传代培养。②PCR扩增目的基因FNDC5, 将目的基因构建入pLVX-mCMV-ZsGreen-IRES-Puro慢病毒载体中, 在JM109感受态细胞中进行扩增, 测序及鉴定合格后转染293T细胞, 包装成过表达慢病毒颗粒并测定病毒滴度。将获得的重组慢病毒转染平滑肌细胞系, 倒置荧光显微镜下观察细胞形态并计算转染效率, 嘌呤霉素筛选获得稳转平滑肌细胞株。③将平滑肌细胞分为3组, 分别为对照组、空载组和FNDC5过表达组, Real-time PCR和Western blot检测各组平滑肌细胞FNDC5 mRNA及蛋白表达, CCK-8和细胞划痕实验检测各组平滑肌细胞增殖活性及迁移能力。

结果与结论: ①成功构建FNDC5过表达慢病毒, 并得到稳定转染的平滑肌细胞株, 平滑肌细胞转染效率为86%; ②与对照组、空载组比较, FNDC5过表达组FNDC5 mRNA及蛋白表达显著升高( $P < 0.001$ ); ③与空白组、空载组比较, FNDC5过表达组细胞增殖活性、迁移率明显下降( $P < 0.05$ ); ④结果显示, 得到FNDC5稳定转染的平滑肌细胞株, FNDC5过表达可抑制平滑肌细胞增殖与迁移。

关键词: III型纤连蛋白结构域包含蛋白5; FNDC5; 慢病毒; 转染; 血管平滑肌细胞; 细胞增殖; 细胞迁移

缩略语: III型纤连蛋白结构域包含蛋白5; fibronectin type III domain containing 5, FNDC5

## Lentiviral vector overexpressing FNDC5 inhibits proliferation and migration of smooth muscle cells

Wang Xiang, Wei Chaojun, Wang Yao, Pan Yujia, Liu Danan

Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Institute of Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Wang Xiang, Master candidate, Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Institute of Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

**Corresponding author:** Liu Danan, MD, Professor, Chief physician, Master's/Doctoral supervisor, Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Institute of Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

贵州医科大学附属医院心内科, 贵州医科大学医学科学研究所, 贵州省贵阳市 550004

第一作者: 王向, 女, 1991年生, 汉族, 贵州医科大学在读硕士, 主要从事血管疾病基础与临床研究。

通讯作者: 刘大男, 博士, 教授, 主任医师, 硕士、博士生导师, 贵州医科大学附属医院心内科, 贵州医科大学医学科学研究所, 贵州省贵阳市 550004

<https://orcid.org/0000-0003-4397-7789> (王向)

基金资助: 国家自然科学基金项目(81660083), 项目负责人: 刘大男; 贵州省科技创新人才团队项目[黔科合平台人才(2020)5014],

项目负责人: 刘大男; 贵州省“百”层次创新型人才培养计划项目[黔科合人才(2015)4026号], 项目负责人: 刘大男

引用本文: 王向, 韦朝俊, 王尧, 潘裕佳, 刘大男. 构建过表达 FNDC5 慢病毒载体抑制平滑肌细胞的增殖与迁移 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(35):5670-5675.



## Abstract

**BACKGROUND:** Fibronectin type III domain containing 5 (FNDC5), mainly expressed in skeletal muscle and other muscle tissues, is a muscle factor that affects the proliferation and migration of various cells through binding different receptors.

**OBJECTIVE:** To construct the lentiviral vector overexpressing FNDC5, and to obtain the smooth muscle cell line stably transfected with FNDC5.

**METHODS:** The extracted C57BL/6L mouse VSMCs were identified by immunofluorescence. FNDC5 gene was amplified by PCR and was then inserted to pLVX-mCMV-ZsGreen-IRES-Puro lentiviral vector. The recombinant vector was amplified in JM109 competent cells, and after sequencing and identification, the vectors were transfected into 293T cells to produce overexpression lentiviral particles. Virus titer was then measured. The recombinant lentivirus that was transfected into smooth muscle cell line, and a fluorescence microscope was used to calculate transfection efficiency. After a stably transfected cell line with FNDC5 overexpression was screened out by puromycin, the cells were divided into blank group, empty group, and FNDC5 group. RT-PCR and western blot were used to measure the mRNA and protein expression of FNDC5, and the proliferation and migration ability of smooth muscle cells were detected by cell counting kit-8 and cell scratch test.

**RESULTS AND CONCLUSION:** A lentiviral vector with FNDC5 overexpression was successfully constructed, and a vascular smooth muscle cell line stably transfected with FNDC5 was established. The transfection efficiency of smooth muscle cells was 86%. Compared with the blank group and empty group, the FNDC5 overexpression group had a significant increase in mRNA and the protein expression of FNDC5 ( $P < 0.001$ ). Compared with blank group and empty group, the cell proliferation and migration rate of FNDC5 overexpression group decreased significantly ( $P < 0.05$ ). To conclude, a vascular smooth muscle cell line stably transfected with FNDC5 is established by the lentiviral vector with FNDC5 overexpression, indicating that FNDC5 can significantly inhibit the proliferation and migration of thoracic aortic smooth muscle cells.

**Key words:** fibronectin type III domain containing 5; FNDC5; lentivirus vector; transfection; vascular smooth muscle cells; cell proliferation; cell migration

**Funding:** The National Natural Science Foundation of China, No. 81660083 (to LDN); Guizhou Provincial Science and Technology Innovation Talent Team Project, No. (2020)5014 (to LDN); Guizhou Provincial Hundred-level Innovative Talent Cultivation Plan, No. (2015)4026 (to LDN)

**How to cite this article:** WANG X, WEI CJ, WANG Y, PAN YJ, LIU DN. Lentiviral vector overexpressing FNDC5 inhibits proliferation and migration of smooth muscle cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(35):5670-5675.

## 0 引言 Introduction

随着人口老龄化增加、人民生活环境、饮食结构等的改变,心血管性已成为国内死亡的首要原因,动脉粥样硬化是心血管性疾病的常见病理基础,病理变化包括血管内壁脂质形成、血管壁弹性降低、管腔狭窄等,最终导致机体局部组织缺血坏死,数据显示中国因动脉粥样硬化引起的心脑血管性疾病的经济和社会负担正在急剧增加<sup>[1]</sup>。血管性疾病的的治疗包括基础治疗和手术治疗,虽然血管性疾病的的手术治疗见效快、方法多样,比如血管再通术、血管支架置入术、血管移植术等,但是术后再发或术后狭窄等问题依旧严峻<sup>[2-3]</sup>。血管壁主要分外膜、中膜和内膜,其中血管中膜主要由平滑肌细胞构成,在正常情况下,血管平滑肌细胞增殖、迁移及表型的转换受到精确的调控,从而保证血管的正常结构与功能。多项研究表明动脉粥样硬化形成、高血压及血管再狭窄等与平滑肌细胞增殖、迁移及表型转换相关<sup>[4-7]</sup>,因此抑制平滑肌细胞过度增殖、迁移及表型转换对心血管具有保护性作用。

运动能够改善心血管疾病,肌肉因子的发现揭示了运动与心血管疾病潜在联系的分子机制。III型纤连蛋白结构域包含蛋白5(fibronectin type III domain containing 5, FNDC5)是一种新发现的运动诱导的肌肉因子,主要存在于骨骼肌、心脏等富含肌肉的组织中,鸢尾素是 FNDC5 蛋白水解后产生的含有 112 个氨基酸的多肽激素<sup>[8]</sup>。鸢尾素可促进白色脂肪棕色化,燃烧脂肪产热减轻体重,改善胰岛素抵抗等功能,研究显示其可通过 ERK 信号通路上调 microRNA126-5p 表达促进血管内皮细胞增殖,减轻动脉粥样硬化诱导的内膜增厚<sup>[9]</sup>,通过抗炎、抗氧化应激减轻内皮损伤等作用一定程度阻止动脉粥样硬化进程<sup>[10-11]</sup>。血清中鸢尾素水平变化与冠心病严重程度<sup>[12]</sup>、经皮冠状动脉介入治疗术后发生主要不良心血管事件有关,发生急性冠脉综合征时鸢尾素水平显著升高<sup>[13-14]</sup>,鸢尾素水平降低时可增加 10 年心血管疾病风险<sup>[15]</sup>,因此鸢尾素有望成为心血管疾病风险增加的预测指标和分子治疗的靶

点。作者前期研究证实冠心病患者血清中鸢尾素水平降低,另外鸢尾素可改善高脂饮食小鼠的血脂水平,降低超氧化物歧化酶、丙二醛、核因子  $\kappa B$  p65 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  表达水平延缓动脉粥样硬化形成<sup>[16-18]</sup>。巨噬细胞和平滑肌细胞内脂质蓄积形成泡沫细胞,而泡沫细胞形成是动脉粥样硬化发病机制核心环节,ZHENG 等<sup>[19]</sup>研究发现鸢尾素可通过上调 PERK/eIF2 $\alpha$ /CHOP/Bcl-2 和 ATF6 ERS 表达,抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的巨噬细胞内脂质蓄积<sup>[19]</sup>,而这与前期研究的 FNDC5 过表达能抑制巨噬细胞源性泡沫细胞脂质蓄积结果相一致<sup>[20]</sup>,表明 FNDC5 可通过减少巨噬细胞或平滑肌细胞泡沫样形成而在动脉粥样硬化形成中发挥保护性作用。同时也启发作者,构建的 FNDC5 过表达载体也许能成功转染到血管平滑肌细胞,联系到鸢尾素有抗多种肿瘤细胞增殖、迁移等功能<sup>[21]</sup>,并且鸢尾素可通过调控自噬抑制平滑肌细胞增殖<sup>[22]</sup>,循环中鸢尾素水平降低与颈动脉内膜增厚相关<sup>[23]</sup>,而动脉内膜增厚关键因素之一是平滑肌细胞过度增殖并迁移至内膜,作者前期体内研究证明抑制平滑肌细胞增殖可减少血管新生内膜的形成<sup>[24-25]</sup>,综上,推测 FNDC5 可通过抑制平滑肌细胞增殖、迁移在新生内膜形成方面发挥防治作用。

鉴于平滑肌细胞增殖、迁移在动脉粥样硬化形成中扮演重要角色,此次研究通过构建 FNDC5 过表达稳转平滑肌细胞株,初步探究 FNDC5 过表达对平滑肌细胞增殖、迁移的影响,为后续体外、体内实验奠定基础。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照细胞实验。

1.2 时间及地点 实验于 2019 年 6 至 12 月在贵州医科大学分子重点实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 6-8 周龄雄性 C57BL/6L 小鼠 3 只,体质量为 20-30 g,由贵州医科大学动物中心提供。

1.3.2 实验主要试剂与仪器 pLVX-mCMV-ZsGreen-IRES-Puro 质粒、HEK293 细胞、JM109 感受态细胞、CPT 高效转染试剂盒购于武汉维诺赛生物科技有限公司；限制性内切酶 *EcoRI*、*BamHI* 及  $T_4$  DNA Ligase 购于美国 NEB 生物公司；小量质粒抽提试剂盒、Trans2K Plus II DNA Marker 购于北京全式金生物公司；琼脂糖凝胶回收试剂盒购于 Omega 公司；Qiagen 大规模质粒抽提试剂盒德国 Qiagen 有限公司；DMEM 培养基、胎牛血清、0.25%Trypsin-EDTA 购于美国 life 有限公司；Millex-HV 0.45  $\mu\text{m}$  PVDF filters 购于美国 Millipore 有限公司；引物及测序均由北京擎科生物科技有限公司完成；FNDC5 抗体购于北京博奥森生物技术有限公司。

#### 1.4 实验方法

1.4.1 小鼠胸主动脉血管平滑肌细胞分离提取培养及鉴定 C57BL/6L 小鼠腹腔注射 3 mL 10% 水合氯醛致死浸泡于体积分数 75% 乙醇中 15 min，在无菌条件下分离出胸主动脉组织并仔细剔除周围脂肪组织及筋膜等，将主动脉中膜组织剪成 1 mm<sup>2</sup> 碎块，PBS 及血清润洗后，用显微镊将组织块种植于 6 cm 培养皿中，于 37 °C，体积分数 5%CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中干贴 1 h。缓慢加入平滑肌细胞完全培养基，静养 4 d，待细胞爬出后首次换液，以后 3 d 换一次液，待细胞长到 80% 以上融合时传代，3-5 代细胞用于后续实验。

##### 胸主动脉血管平滑肌细胞培养及鉴定

细胞来源:	C57BL/6L 小鼠胸主动脉
基础培养基:	DMEM/F12 培养基
培养时间:	原代细胞培养 4 d 后换液，之后每 3 d 换液 1 次，细胞培养 14 d 开始传代
细胞传代:	细胞培养融合到 80% 以上用胰蛋白酶消化，按 1 : 2 比例传代培养到第 3-5 代
细胞鉴定:	免疫荧光法鉴定平滑肌特异性表面抗原
伦理委员会批准:	实验方案经贵州医科大学动物实验伦理委员会批准

1.4.2 FNDC5 慢病毒载体构建及鉴定 在 GenBank 中查找小鼠 FNDC5 基因 (NM\_027402.4) 上下游序列设计并合成引物，取 pLVX-mCMV-ZsGreen-IRES-Puro 质粒载体，经 *EcoRI* 和 *BamHI* 双酶切后，1% 琼脂糖凝胶电泳回收大片段，FNDC5 基因质粒经双酶切后回收小片段，将目的基因片段与酶切质粒载体片段反应后，转入 JM109 感受态细胞，37 °C 恒温培养箱倒置培养过夜。挑取 3 个单菌落接种于含 5 mL，100 mg/L Ampicillin 抗性的 LB 培养液中，250 r/min，37 °C 恒温摇床培养过夜，次日用小量质粒抽提试剂盒抽提质粒，*EcoRI*+*BamHI* 进行酶切鉴定，挑取鉴定正确的阳性克隆进行测序验证。测序引物：CMV-F(5'-CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG-3')。测序结果经 Snapgene 比对结果表明测序结果与设计序列一致。将质粒 pLVX-mFndc5-ZsGreen-Puro 导入 293T 细胞进行慢病毒包装，最后进行滴度测定。

1.4.3 FNDC5 过表达载体转染平滑肌细胞 取处于对数生长期平滑肌细胞，将细胞分为空白组 (平滑肌细胞)、空载组 (空

载慢病毒转染平滑肌细胞)、FNDC5 组 (转染过表达 FNDC5 慢病毒的平滑肌细胞)。提前 1 d 将细胞按  $3 \times 10^5$  个 / 孔密度接种于 6 孔板中，每孔加入培养液 1 mL，置 37 °C 体积分数 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养过夜。按照预实验感染复数 (multiplicity of infection, MOI)=30 加入病毒，每孔加入 90  $\mu\text{L}$  的病毒液，置 37 °C 体积分数 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 72 h，之后对细胞进行血小板衍生生长因子 BB(20  $\mu\text{g/L}$ ) 诱导 24 h，做后续实验。

1.4.4 Real-Time PCR 检测 FNDC5 mRNA 表达 收集 6 孔板中各组细胞或主动脉组织，采用 Trizol 法提取总 RNA，去 DNA 组后，经反转录合成 cDNA，然后使用 SYBR Green Master Mix 试剂盒进行实时定量聚合酶链反应 (qRT-PCR)，用熔解曲线及扩增曲线分析排除非特异性扩增，反应条件：95 °C 预变性 10 min，95 °C 变性 30 s，60 °C 退火 30 s，进行 40 个循环。以  $\beta$ -actin 作为内参基因，用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算目的基因相对表达水平； $[\Delta\text{Ct} = \text{实验组目的基因平均 Ct 值} - \text{对照组目的基因平均 Ct 值} - \text{内参基因平均 Ct 值}]$ 。内参基因  $\beta$ -actin 上游引物序列 5'-CAC GAT GGA GGG GCC GGA CTC ATC-3'，下游引物序列：5'-TAA AGA CCT CTA TGC CAA CAC AGT-3'；目的基因 FNDC5 上游引物序列：5'-TGA AGG AGA TGG GGA GGA AC-3'，下游引物序列：TGG TTT CTG ATG CGC TCT TG-3'。

1.4.5 Western blot 检测 FNDC5 蛋白表达 收集培养的各组成细胞或主动脉组织，PBS 润洗后，加入 RIPA 裂解液，冰上裂解 30 min，裂解物至于 1.5 mL EP 管，于 4 °C，12 000 r/min 高速离心 20 min，取上清后采用 BCA 法进行蛋白定量，取等量蛋白上样，经 SDS-PAGE 电泳后恒流转膜至 PVDF 膜上，然后将其浸于 5% 脱脂奶粉中，室温摇床 2 h，用 TBST 溶液清洗 PVDF 膜 3 次。封闭后分别加入兔多抗 FNDC5 (1 : 1 000)， $\beta$ -actin 一抗 (1 : 6 000)，4 °C 孵育过夜，TBST 洗膜 3 次，每次 15 min，之后加入羊抗兔 IgG (1 : 50 000) 室温孵育 2 h，TBST 洗膜 3 次，每次 15 min，洗膜后 ECL 显影用凝胶图像处理软件分析图像， $\beta$ -actin 作为内参照，目的蛋白与其灰度比值表示目的蛋白的相对表达量。

1.4.6 CCK-8 检测平滑肌细胞增殖活性 取处于对数生长期、生长状态良好的小鼠主动脉平滑肌细胞，按  $5 \times 10^3$  个 / 孔密度接种于 96 孔板中，每孔加入培养液 200  $\mu\text{L}$ ，置 37 °C 体积分数 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养；细胞随机分组并做相应的处理，病毒转染 72 h 后，每孔加入 CCK-8 液 20  $\mu\text{L}$ ，37 °C 培养箱中分别培养 4，24，48 h，酶标仪测定各孔吸光度值  $A_{450}$ 。各组细胞实验独立重复 3 次。

1.4.7 细胞划痕实验检测迁移能力 取处于对数生长期、生长状态良好的小鼠主动脉平滑肌细胞，接入 6 孔板，制作线性划痕，洗去损伤细胞，加入无血清培养基，拍取 0 h 照片，然后于培养箱培养 24 h 后再次拍照，用 ImageJ.16 软件测量细胞迁移面积，迁移率 = (0 h 划痕面积 - 24 h 划痕面积) / 0 h 划痕面积  $\times 100\%$ 。各组细胞实验独立重复 3 次。

1.5 主要观察指标 ①免疫荧光检测平滑肌细胞特异性抗原；② FNDC5 克隆基因导入质粒进行酶切后电泳，阳性克隆菌液

的基因测序比对；③ FNDC5 mRNA 和蛋白在各组细胞或主动脉内表达水平；④ FNDC5 过表达转染后，各组细胞增殖活性、迁移变化。

1.6 统计学分析 应用 GraphPad Prism 6.0 统计学软件对数据进行统计分析，数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示。两组间的比较使用 *t* 检验或秩和检验，多组间的比较使用单因素方差分析或 Kruskal-Wallis 检验。显著性水准  $\alpha=0.05$ ， $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

2.1 血管平滑肌细胞鉴定 胸主动脉组织块在培养基中贴壁培养，约 6 d 后可看见有细胞从组织块向周围爬出，10 d 左右形成细胞群，当呈典型“峰-谷”状时，采用平滑肌细胞特异性抗体  $\alpha$ -SMA 进行免疫荧光染色鉴定，红色荧光为  $\alpha$ -SMA 阳性，阳性率 >90%，即：细胞纯度 >90% (图 1A)，DAPI 染核呈蓝色 (图 1B)。

2.2 rLV-mFndc5-ZsGreen-Puro 质粒的构建与鉴定 取 pLVX-mCMV-ZsGreen-IRES-Puro 质粒，该质粒含有 *EcoRI*、*BamHI* 双酶切位点 (图 2A)，将 FNDC5 克隆到质粒上，双酶切后用 1% 琼脂糖凝胶电泳回收并分析产物片段长度，酶切后电泳结果与预期结果一致 (图 2B)，得到目的基因阳性克隆，送菌液 pLVX-mFndc5-ZsGreen-Puro 测序，测序结果经 Snapgene 比对表明测序结果与设计序列一致 (图 2C)，已成功构建 FNDC5 过表达质粒。

2.3 rLV-mFndc5-ZsGreen-Puro 慢病毒包装及转染平滑肌细胞 将质粒 pLVX-mFndc5-ZsGreen-Puro 导入 293T 细胞 (图 3A, C)，48 h 后收集细胞上清液，通过 PCR 法定量测定上清液中的病毒滴度为  $1 \times 10^8$  TU/mL。将慢病毒包装的 rLV-mFndc5-ZsGreen-Puro 表达质粒按照 MOI 为 10, 15, 30 转染平滑肌细胞，24 h 后能明显观察到绿色荧光 (图 3B, D, MOI=30)，得到 FNDC5 过表达转染的平滑肌细胞株。

2.4 各组平滑肌细胞 FNDC5 mRNA 和蛋白表达 收集转染后的平滑肌细胞，实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测结果显示 (图 4)，对照组与空载组比较，FNDC5 mRNA 和蛋白表达水平差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ )，与对照组、空载组比，FNDC5 过表达组平滑肌细胞的 FNDC5 mRNA 和蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.000 1$ )。这些结果表明，FNDC5 过表达可明显上调体外培养的血管平滑肌细胞 FNDC5 mRNA 和蛋白的表达水平，证明得到 FNDC5 过表达的平滑肌细胞株。

2.5 CCK-8 法检测各组平滑肌细胞活性 CCK-8 结果显示 (图 5)，对照组与空载组比较，细胞增殖活性差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ )，与空白对照组、空载组相比，FNDC5 组细胞增殖活性下降 ( $P < 0.05$ )，这一结果表明，FNDC5 过表达能够抑制血管平滑肌细胞增殖活性。

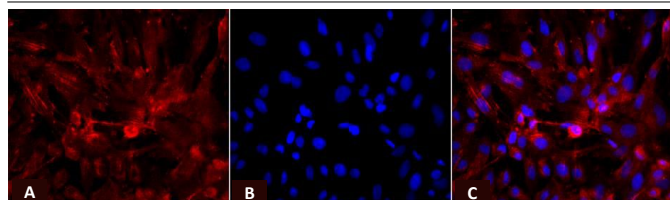
2.6 细胞划痕实验检测平滑肌细胞迁移 划痕结果显示 (图 6)，对照组与空载组比较差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ )，与对照组、空载组相比，FNDC5 组细胞迁移率下降 ( $P < 0.01$ )，这一结果表明，FNDC5 过表达能够抑制平滑肌细胞迁移。

## 3 讨论 Discussion

基因工程是一种能够将靶基因组整合到宿主染色质内的技术，目前最常见的用于基因治疗的病毒载体包括腺病毒、腺相关病毒、慢病毒等，其中慢病毒具有转染细胞广泛、转染效率高、靶基因表达稳定与持久性等优势，已成为基因治疗的常用递送载体 [26]。慢病毒是一种很有前途的基因传递载体系统，并且其安全性越来越高 [27-28]。近年来，慢病毒已成为基因治疗研究的热点，特别是在心血管疾病机制探讨和治疗研究中的应用较广泛 [29-30]。利用基因重组原理构建 FNDC5 过表达慢病毒载体 [20]，荧光显微镜下可看到绿色荧光蛋白大量表达，同时实时荧光定量及蛋白免疫印记实验检测证实 FNDC5 能在体外培养的血管平滑肌细胞内高表达。

血管平滑肌细胞过度增殖与迁移是引起动脉粥样硬化、血管狭窄的关键因素之一 [31]。调节平滑肌细胞生物学行为对维持血管组织结构稳定性很重要，血管组织工程最大的挑战是如何靶向防止新生内膜形成，从而保证血管支架置入或旁路移植术后等血管功能的远期效果 [32]。鉴于平滑肌细胞在动脉粥样硬化形成、内膜增厚和再狭窄等心血管疾病中的重要作用，课题组采用组织贴壁法提取了小鼠胸主动脉血管平滑肌细胞，而  $\alpha$ -SMA 是平滑肌细胞的特异性标志物，据此作者用免疫荧光法鉴定提取的原代平滑肌细胞，经传代培养细胞纯和度达到 80% 以上，平滑肌细胞是研究动脉粥样硬化等相关血管性疾病良好的体外模型，这为后期细胞相关的实验提供了基础。

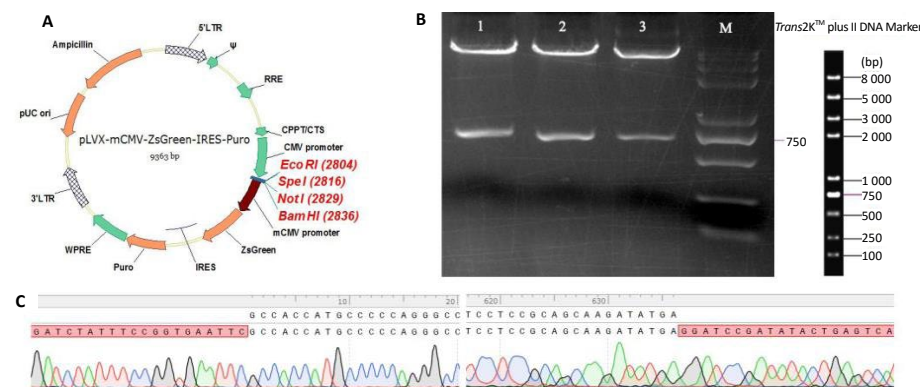
FNDC5 是一种新发现的由骨骼肌细胞分泌的肌肉因子，鉴于其在心血管相关疾病中的作用，使其很有望成为心血管治疗的靶分子 [33-34]。血管平滑肌细胞在受到炎症、氧化因子、内皮损伤等刺激时其表型由收缩型向合成型转换，可引起过度增殖与迁移 [35-36]。最新发现鸢尾素可以通过激活 STAT3 信号通路，抑制血管平滑肌细胞表型向增殖型转换 [37]，FNDC5 可抑制氧化型低密度脂蛋白诱导核因子  $\kappa$ B 介导的 NLRP3 的上调，减少平滑肌细胞泡沫样形成 [38]，作者猜测鸢尾素可通过抑制平滑肌细胞增殖和泡沫源性细胞形成而延缓动脉粥样硬化。FNDC5 基因敲除小鼠主动脉血管中膜增厚，体内炎症因子、氧化因子增多，且动脉粥样硬化加重 [39]，这与课题组前期研究的鸢尾素通过抗炎、抗氧化延缓动脉粥样硬化的形成结果一致 [18]，因此鸢尾素参与动脉内膜增厚等，可能与平滑肌细胞增殖密切相关。此次研究利用基因工程原理，经 *EcoRI*、*BamHI* 双酶切出目的基因片段与载体片段，再利用连接酶进行连接，转化后再次经酶切，电泳鉴定可见到阳性克隆，阳性克隆菌液测序，比对结果表明与设计序列一致，证明成功构建了 FNDC5 过表达质粒。质粒经包装后得到含 FNDC5 过表达的缺陷慢病毒，因该载体含有绿色荧光蛋白，转染主动脉平滑肌细胞在荧光显微镜下见绿色荧光，FNDC5 过表达载体转染平滑肌细胞后，荧光显微镜下看到明显的绿色荧光，实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测到 FNDC5 过表达组比对照组、空载组平滑肌细胞 FNDC5 mRNA 和蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.001$ )，表明构建的 FNDC5 过表达载体可稳定转染体外培养的血管平滑肌细胞。



图注：图 A 为  $\alpha$ -SMA 荧光显微镜下观察，可见呈梭形的红色荧光细胞；B 为 DAPI 荧光显微镜下观察，蓝色荧光为细胞核；C 为 A 与 B 合成荧光照片

图 1 | 血管平滑肌细胞鉴定 ( $\times 400$ )

Figure 1 | Identification of vascular smooth muscle cells ( $\times 400$ )



图注：图 A 为质粒图谱；B 为 pLVX-mFncd5-ZsGreen-Puro 质粒经 *EcoRI*+*Bam*HI 酶切电泳鉴定结果，泳道 1, 2, 3 分别为挑选的 3 个阳性单菌落，C 为阳性克隆菌液测序结果，经 Snapgene 比对结果表明测序结果与设计序列一致

图 2 | 过表达载体酶切电泳及阳性克隆基因测序

Figure 2 | Enzyme digestion electrophoresis of overexpression vector and gene sequencing of positive clones

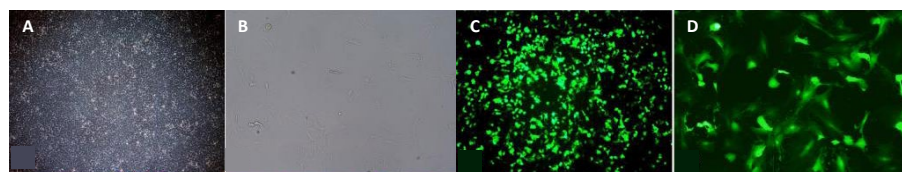
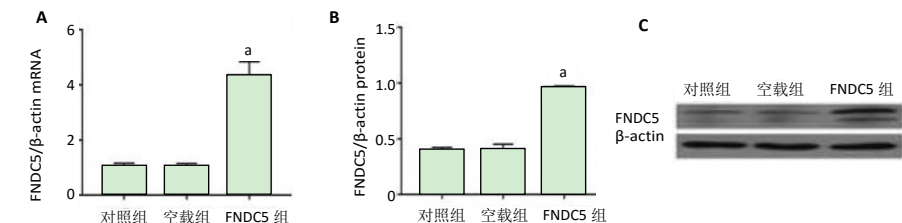


图 3 | 慢病毒转染血管平滑肌细胞 ( $\times 100$ )

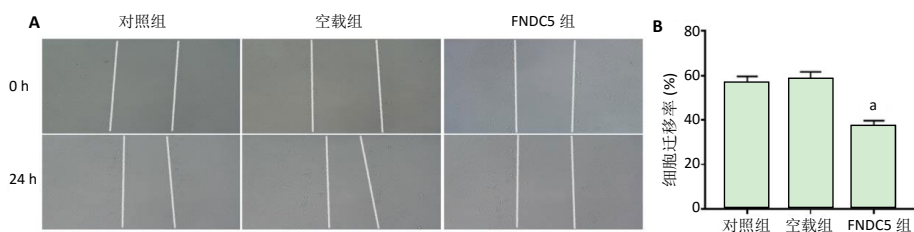
Figure 3 | Lentivirus transfected vascular smooth muscle cells ( $\times 100$ )



图注：图 A 为 FNDC5 mRNA 相对表达水平，对照组、空载组低表达 FNDC5 mRNA，FNDC5 组高表达 FNDC5 mRNA ( $^*P < 0.001$ )；B, C 为 FNDC5 蛋白相对表达水平，对照组、空载组低表达 FNDC5 蛋白，FNDC5 组高表达 FNDC5 蛋白 ( $^*P < 0.001$ )

图 4 | 血管平滑肌细胞 FNDC5 mRNA 及蛋白相对表达水平

Figure 4 | Relative expression levels of FNDC5 mRNA and protein in vascular smooth muscle cells



图注：图 A 显示细胞划痕实验结果 ( $\times 100$ )；B 显示对照组、空载组细胞迁移率差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ )，与对照组、空载组比较，FNDC5 组平滑肌细胞迁移率降低 ( $^*P < 0.01$ )

图 6 | 细胞划痕实验检测迁移率

Figure 6 | Detection of migration in cell scratch test

平滑肌细胞异常增殖与迁移参与动脉粥样硬化形成及血管增殖性疾病的发生<sup>[40]</sup>，因此积极寻找抑制平滑肌细胞增殖、迁移对于延缓心血管相关疾病发生有重要意义。该课题构建的 FNDC5 过表达可稳定在平滑肌细胞内表达，因此在 FNDC5 过表达慢病毒转染平滑肌细胞后，同时检测了 FNDC5 过表达对平滑肌细胞增殖及迁移的影响，以期为进一步机制研究奠定基础。结果显示，FNDC5 过表达转染后，平滑肌细胞增殖活性、迁移率比对照组和空载组明显下降 ( $P < 0.05$ )，

表明 FNDC5 过表达可一定程度上抑制平滑肌细胞增殖、迁移。据此，下一步实验将在体外培养的血管平滑肌细胞模型中，进一步明确 FNDC5 对平滑肌细胞增殖、迁移和凋亡的影响及分子机制。然而局限于体外细胞实验研究结果，细胞不能模拟体内环境，实验虽能从一定程度上说明上调 FNDC5 表达可能是通过抑制平滑肌细胞增殖与迁移生物学行为对动脉粥样硬化形成及血管再狭窄具有一定的抑制作用，但还需更进一步研究 FNDC5 是否通过某一关键信号通路来抑制动脉粥样硬

化形成及血管再狭窄，还需要对其具体的作用位点、磷酸化修饰及其下游分子更进一步检测，此次研究主要针对于用药3 d左右作用效果，还需要延长 FNDC5 转染时间，了解其作用效果最长时间。动脉粥样硬化发病机制复杂，平滑肌细胞增殖与迁移异常可引起动脉粥样硬化早期形成，高脂血症、氧化应激、炎症因子激活等也是引起血管性疾病病理过程关键环节，故此下一步将通过建立动脉粥样硬化小鼠模型，尾静脉注射 FNDC5 过表达载体或干扰载体，进一步探索 FNDC5 对动脉粥样硬化形成的影响及分子机制。

作者期待通过增强或沉默 FNDC5 基因的表达更深入地理解其在心血管相关疾病发病机制中所扮演的角色，为心血管病的治疗提供新的思路。

**作者贡献：**设计及资料收集为王向；文献分析为韦朝俊；王向成文。刘大男审核，刘大男对文章负责。

**经费支持：**该文章接受了“国家自然科学基金项目(81660083)、贵州省科技创新人才团队项目[黔科合平台人才(2020)5014]及贵州省‘百’层次创新型人才培养计划项目[黔科合人才(2015)4026号]”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突：**文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题：**实验方案经贵州医科大学动物实验伦理委员会批准，批准号为1603170。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术，并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

**写作指南：**该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重：**文章出版前已进行过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审：**文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发表稿宗旨。

**生物统计学声明：**该文统计学方法已经贵州医科大学生物统计学专家审核。

**文章版权：**文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明：**这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

## 4 参考文献 References

[1] ZHAO D, LIU J, WANG M, et al. Epidemiology of cardiovascular disease in China: current features and implications. *Nat Rev Cardiol*. 2019;16(4):203-212.

[2] NOBUYOSHI M, KIMURA T, NOSAKA H, et al. Restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty: serial angiographic follow-up of 229 patients. *J Am Coll Cardiol*. 1988;12(3):616-623.

[3] MINER SE, HEGELE RA, SPARKES J, et al. Homocysteine, lipoprotein(a), and restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: a prospective study. *Am Heart J*. 2000;140(2):272-278.

[4] CLOWES AW, CLOWES MM, KOCHER O, et al. Arterial smooth muscle cells in vivo: relationship between actin isoform expression and mitogenesis and their modulation by heparin. *J Cell Biol*. 1988;107(5):1939-1945.

[5] DESMOULIERE A, RUBBIA-BRANDT L, GABBIANI G. Modulation of actin isoform expression in cultured arterial smooth muscle cells by heparin and culture conditions. *Arterioscler Thromb*. 1991;11(2):244-253.

[6] WANG DD, UHRIN P, MOCAN A, et al. Vascular smooth muscle cell proliferation as a therapeutic target. Part 1: molecular targets and pathways. *Biotechnol Adv*. 2018;36(6):1586-1607.

[7] GALLO G, PIERELLI G, FORTE M, et al. Role of oxidative stress in the process of vascular remodeling following coronary revascularization. *Int J Cardiol*. 2018;268:27-33.

[8] PUKAJŁO K, KOLACKOV K, ŁACZMAŃSKI Ł, et al. Irisin--a new mediator of energy homeostasis. 2015;69,233-242.

[9] ZHANG Y, SONG H, ZHANG Y, et al. Irisin Inhibits Atherosclerosis by Promoting Endothelial Proliferation Through microRNA126-5p. *J Am Heart Assoc*. 2016; 5(9):e004031.

[10] FRÜHBECK G, FERNÁNDEZ-QUINTANA B, PANIAGUA M, et al. FNDC4, a novel adipokine that reduces lipogenesis and promotes fat browning in human visceral adipocytes. *Metabolism*. 2020;108:154261.

[11] DU X, JIANG W, LV Z. Lower Circulating Irisin Level in Patients with Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis. 2016;48,644-652.

[12] EFE TH, AÇAR B, ERTEM AG, et al. Serum Irisin Level Can Predict the Severity of Coronary Artery Disease in Patients with Stable Angina. 2017;47,44-49.

[13] ARONIS KN, MORENO M, POLYZOS SA, et al. Circulating irisin levels and coronary heart disease: association with future acute coronary syndrome and major adverse cardiovascular events. *Int J Obes (Lond)*. 2015;39(1):156-161.

[14] DENG W. Association of Serum Irisin Concentrations with Presence and Severity of Coronary Artery Disease. *Med Sci Monit*. 2016;22:4193-4197.

[15] PARK KH, ZAICHENKO L, BRINKOETTER M, et al. Circulating Irisin in Relation to Insulin Resistance and the Metabolic Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013; 98(12):4899-4907.

[16] 何青松, 刘大男, 谭娟. 鸢尾素对高脂饮食诱导 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠动脉粥样硬化形成的影响及其机制 [J]. *山东医药*, 2020,60(22):39-43.

[17] 何青松, 刘大男, 谭娟. 冠心病患者血清鸢尾素水平变化观察 [J]. *山东医药*, 2020,60(6):69-71.

[18] 谭娟, 刘大男, 何青松, 等. 鸢尾素对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017,25(8):773-777.

[19] ZHENG G, LI H, ZHANG T, et al. Irisin protects macrophages from oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis by inhibiting the endoplasmic reticulum stress pathway. *Saudi J Biol Sci*. 2018;25(5):849-857.

[20] 覃铮, 刘大男, 肖金翠, 等. FNDC5 过表达慢病毒载体的构建及稳定转染 THP-1 细胞系 [J]. *重庆医科大学学报*, 2020,45(2):212-216.

[21] ZHANG D, TAN X, TANG N, et al. Review of Research on the Role of Irisin in Tumors. *Oncol Targets Ther*. 2020;13:4423-4430.

[22] 牟仁奎, 向水, 黄进启, 等. 鸢尾素通过磷酸腺苷活化蛋白激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路调控自噬抑制血管平滑肌细胞炎症反应和增殖的研究 [J]. *中华实验外科杂志*, 2019,36(6):1020-1023.

[23] SESTI G, ANDREOZZI F, FIORENTINO TV, et al. High circulating irisin levels are associated with insulin resistance and vascular atherosclerosis in a cohort of nondiabetic adult subjects. *Acta Diabetol*. 2014;51(5):705-713.

[24] 刘大男, 何作云, 方颖, 等. 血红素氧合酶-1/一氧化氮系统对胰岛素样生长因子-1 诱导的兔血管平滑肌细胞增殖的抑制作用 [J]. *中华心血管病杂志*, 2006,34(2):153-158.

[25] LIU D, MO X, ZHANG H, et al. Heme oxygenase-1 (HO-1) alleviates vascular stenosis after balloon injury in a rabbit carotid artery model. *Int J Clin Exp Pathol*. 2018;11(5):2479.

[26] KURODA H, KUTNER RH, BAZAN NG, et al. Simplified lentivirus vector production in protein-free media using polyethylenimine-mediated transfection. *J Virol Methods*. 2009;157(2):113-121.

[27] BUCHHOLZ CJ, FRIEDEL T, BÜNING H. Surface-Engineered Viral Vectors for Selective and Cell Type-Specific Gene Delivery. *Trends Biotechnol*. 2015;33(12):777-790.

[28] CHIANG CY, LIGUNAS GD, CHIN WC, et al. Efficient Nonviral Stable Transgenesis Mediated by Retroviral Integrase. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2020;17:1061-1070.

[29] DI PASQUALE E, LATRONICO MV, JOTTI GS, et al. Lentiviral vectors and cardiovascular diseases: a genetic tool for manipulating cardiomyocyte differentiation and function. *Gene Ther*. 2012;19(6):642-648.

[30] THOMAS CE, EHRHARDT A, KAY MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet*. 2003;4(5):346-358.

[31] BENNETT MR, SINHA S, OWENS GK. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118(4):692-702.

[32] BEAMISH JA, HE P, KOTTKE-MARCHANT K, et al. Molecular regulation of contractile smooth muscle cell phenotype: implications for vascular tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010;16(5):467-491.

[33] BOSTROM P, WU J, JEDRYCHOWSKI MP, et al. A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*. 2012;481(7382):463-468.

[34] ZHANG X, HU C, WU HM, et al. Fibronectin type III domain-containing 5 in cardiovascular and metabolic diseases: a promising biomarker and therapeutic target. *Acta Pharmacol Sin*. 2020. doi: 10.1038/s41401-020-00557-5.

[35] TENG Y, WANG Z, LI W, et al. Mitoxantrone suppresses vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation and balloon injury-induced neointima formation: An in vitro and in vivo study. *Bosn J Basic Med Sci*. 2017;17(4):339-348.

[36] WANG KC, CHEN PS, CHAO TH, et al. The role of vascular smooth muscle cell membrane-bound thrombomodulin in neointima formation. *Atherosclerosis*. 2019;287:54-63.

[37] SONG H, XU J, LV N, et al. Irisin reverses platelet derived growth factor-BB-induced vascular smooth muscle cells phenotype modulation through STAT3 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;479(2):139-145.

[38] ZANG YH, CHEN D, ZHOU B, et al. FNDC5 inhibits foam cell formation and monocyte adhesion in vascular smooth muscle cells via suppressing NF- $\kappa$ B-mediated NLRP3 upregulation. *Vascul Pharmacol*. 2019;121:106579.

[39] ZHOU B, QIU Y, WU N, et al. FNDC5 Attenuates Oxidative Stress and NLRP3 Inflammation Activation in Vascular Smooth Muscle Cells via Activating the AMPK-SIRT1 Signal Pathway. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:6384803.

[40] RYKACZEWSKA U, SUUR BE, RÖHL S, et al. PCSK6 Is a Key Protease in the Control of Smooth Muscle Cell Function in Vascular Remodeling. *Circ Res*. 2020;126(5):571-585.

(责任编辑: ZN, SX)