

DOI:10.16781/j.cn31-2187/R.20220187

· 论 著 ·

S100A11对主动脉夹层的影响及其机制

薄海美¹, 曹新营^{1,2}, 李东琦¹, 王志军^{1,2*}

1. 华北理工大学临床医学院, 唐山 063000

2. 华北理工大学附属医院心内科, 唐山 063000

[摘要] **目的** 探讨S100A11在主动脉夹层(AD)中的作用及可能的机制。**方法** 在体内实验中,构建携带S100A11的慢病毒质粒Lv-S100A11-shRNA和阴性对照质粒Lv-NC-shRNA,分别转染至HEK293T细胞,获得病毒上清。将40只SD大鼠随机分为5组:对照组(不做任何干预)、假手术组(尾静脉注射生理盐水)、AD组(连续3周在饮水中加入0.25%的β-氨基丙腈建立AD模型)、AD+Lv-NC-shRNA组(AD模型大鼠予尾静脉注射Lv-NC-shRNA)和AD+Lv-S100A11-shRNA组(AD模型大鼠予尾静脉注射Lv-S100A11-shRNA),每组8只。通过H-E染色观察主动脉的组织病理学变化,TUNEL染色观察细胞凋亡情况,免疫组织化学染色检测S100A11和下游信号通路相关蛋白糖基化终末产物受体(RAGE)和磷酸化p38(p-p38)的表达,蛋白质印迹法检测迁移蛋白基质金属蛋白酶(MMP)2和MMP9、凋亡相关蛋白Bcl-2和Bcl-2相关X蛋白(Bax)、细胞增殖相关蛋白增殖细胞核抗原(PCNA)和Ki-67的表达水平。在体外实验中,构建S100A11过表达质粒OV-S100A11,将人主动脉平滑肌细胞(HASMC)分为3组:对照组(未进行任何干预)、EV组(转染pIRES2-GFP空载体)和OV-S100A11组(转染pIRES2-GFP-S100A11过表达S100A11)。通过流式细胞术检测细胞凋亡情况,然后用RAGE抑制剂FPS ZM1和p38磷酸化抑制剂SB203580处理转染pIRES2-GFP-S100A11的细胞,采用蛋白质印迹法检测S100A11、RAGE、p38、p-p38、MMP2、MMP9、Bax、Bcl-2、PCNA、Ki-67的表达。**结果** 动物实验结果显示,与假手术组相比,AD组大鼠主动脉血管形成充满血液的夹层,凋亡细胞增多,S100A11、RAGE、p-p38、MMP2、MMP9和Bax蛋白水平均升高(P 均 <0.01),Bcl-2、PCNA和Ki-67蛋白水平均降低(P 均 <0.01);与AD组相比,Lv-S100A11-shRNA组主动脉病变得到缓解,凋亡细胞减少,S100A11、RAGE、p-p38、MMP2、MMP9和Bax蛋白水平均降低(P 均 <0.01),Bcl-2、PCNA和Ki-67蛋白水平均升高(P 均 <0.01)。细胞实验结果显示,与对照组相比,OV-S100A11组细胞凋亡率升高($P<0.01$),细胞中RAGE、p-p38、MMP2、MMP9、Bax蛋白水平均升高(P 均 <0.01),Bcl-2、PCNA、Ki-67蛋白水平均降低(P 均 <0.01),而在FPS ZM1和SB203580处理后上述蛋白质的变化趋势相反。**结论** S100A11在AD大鼠中高表达,其可通过RAGE-p38 MAPK通路促进细胞凋亡从而参与AD的形成。

[关键词] 主动脉夹层; S100A11蛋白; 增殖细胞核抗原; p38丝裂原激活蛋白激酶; 基质金属蛋白酶; 细胞凋亡

[中图分类号] R 543.16 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-1338(2023)03-0310-10

Role of S100A11 in aortic dissection and its mechanism

BO Hai-mei¹, CAO Xin-ying^{1,2}, LI Dong-qi¹, WANG Zhi-jun^{1,2*}

1. School of Clinical Medicine, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, Hebei, China

2. Department of Cardiology, Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, Hebei, China

[Abstract] **Objective** To investigate the role of S100 calcium binding protein A11 (S100A11) in aortic dissection (AD) and its possible mechanism. **Methods** *In vivo*, lentivirus plasmid Lv-S100A11-shRNA and negative control plasmid Lv-NC-shRNA were constructed and transfected into HEK293T cells respectively to obtain viral supernatant. Forty SD rats were randomly divided into 5 groups: control group (without any intervention), sham operation group (with physiological saline injected into the tail vein), AD group (with 0.25% β-aminopropionitrile added into drinking water for 3 consecutive weeks to establish AD model), AD+Lv-NC-shRNA group (AD model rats were injected with Lv-NC-shRNA via tail vein) and AD+Lv-S100A11-shRNA group (AD model rats were injected with Lv-S100A11-shRNA via tail vein), with 8 rats

[收稿日期] 2022-03-04 **[接受日期]** 2022-07-01

[基金项目] 唐山市科学技术局科技计划项目(20130214b)。Supported by Science and Technology Project of Tangshan Bureau of Science and Technology (20130214b).

[作者简介] 薄海美, 博士, 副教授、主治医师. E-mail: bohaimai@sina.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 0315-2308170, E-mail: wzj300@163.com

in each group. Hematoxylin-eosin (H-E) staining was used to observe the histopathological changes of the aorta, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) staining was used to observe cell apoptosis, immunohistochemistry staining was used to detect the protein expression levels of S100A11 and downstream signaling pathway related proteins receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and phosphorylated p38 (p-p38), and Western blotting was used to detect the protein expression levels of migration proteins matrix metalloproteinase (MMP) 2 and MMP9, apoptosis proteins B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2-associated X (Bax), proliferation proteins proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67. *In vitro*, the S100A11 overexpression plasmid OV-S100A11 was constructed, and human aortic smooth muscle cells (HASMC) were divided into 3 groups: control group (without any intervention), EV group (transfected with pIRES2-GFP empty vector) and OV-S100A11 group (transfected with pIRES2-GFP-S100A11 overexpression S100A11). Flow cytometry was used to detect apoptosis, and then the cells transfected with pIRES2-GFP-S100A11 were treated with RAGE inhibitor FPS ZM1 and p38 phosphorylation inhibitor SB203580. Western blotting was used to detect the protein expression of S100A11, RAGE, p38, p-p38, MMP2, MMP9, Bax, Bcl-2, PCNA and Ki-67. **Results** The results of animal experiments showed that compared with the sham operation group, the aortic vessels of rats in the AD group formed a blood-filled dissection, the apoptotic cells were increased, the protein levels of S100A11, RAGE, p-p38, MMP2, MMP9 and Bax were increased (all $P < 0.01$), while the protein levels of Bcl-2, PCNA and Ki-67 were decreased (all $P < 0.01$). Compared with the AD group, the aortic lesions in the Lv-S100A11-shRNA group were relieved, the apoptotic cells were decreased, the levels of S100A11, RAGE, p-p38, MMP2, MMP9 and Bax were decreased (all $P < 0.01$), while the protein levels of Bcl-2, PCNA and Ki-67 were increased (all $P < 0.01$). The results of cell experiments showed that the apoptosis rate of OV-S100A11 group was increased compared with the control group (all $P < 0.01$), the protein levels of RAGE, p-p38, MMP2, MMP9 and Bax in the cells were increased (all $P < 0.01$), the protein levels of Bcl-2, PCNA and Ki-67 were decreased (all $P < 0.01$), but the change of the above proteins was reversed after the treatment with FPS ZM1 and SB203580. **Conclusion** S100A11 is highly expressed in AD formation rats, and it can promote cell apoptosis through RAGE-p38 mitogen activated protein kinase pathway, participating in AD formation.

[**Key words**] aortic dissection; S100A11 protein; proliferating cell nuclear antigen; p38 mitogen-activated protein kinase; matrix metalloproteinase; apoptosis

[Acad J Naval Med Univ, 2023, 44(3): 310-319]

主动脉夹层 (aortic dissection, AD) 和动脉瘤是较常见的主动脉疾病, 在世界范围内具有较高的发病率^[1]。AD的发病机制主要有炎症、缺氧、氧化应激和基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 表达增加^[2], 其中血管炎症是常见的致病因素。血管炎症是一个复杂的过程, 包括外渗和循环单核白细胞进入血管壁的局部活化, 这一多步骤过程是局部分泌趋化因子、巨噬细胞激活细胞因子、血管黏附分子和 MMP 上调产生的结果^[2-3]。

研究表明 S100 钙结合蛋白 (S100 calcium binding protein, S100) A4、S100A12 参与 AD 炎症过程^[4-5]。S100 蛋白家族是一个多基因钙结合家族, 由 S100A8/9 和 S100A12 等 20 多个成员组成, 其在细胞炎症和细胞生长等方面功能广泛。糖基化终末产物受体 (receptor for advanced glycation end-product, RAGE) 是一种多配体蛋白质, 而 S100 是其配体之一。研究证实 S100 蛋白家族成员 S100A11

是 RAGE 的配体之一, 在细胞生长、凋亡和炎症中发挥作用^[6-7]。实验表明, S100A11/RAGE 能够介导多种信号通路调控生物学过程, 如通过介导 p38 MAPK 信号转导通路调控小鼠骨关节炎软骨细胞肥大和细胞外基质的代谢^[8], 介导腺苷一磷酸依赖的蛋白激酶-信号转导及转录激活因子 3 信号通路调控鼻上皮细胞的重构和炎症^[9], 介导 Akt-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路促进肝脏脂肪变性^[10]。然而, 近年来对 S100A11 在血管疾病中的作用研究较少。本研究通过动物实验探究 S100A11 能否诱导 AD 炎症, 并通过细胞实验探讨 S100A11 诱导 AD 炎症的发生机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物 55 只 3 周龄雌性 SD 大鼠, 体重 48~50 g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司 [实验动物生产许可证号为 SCXK (京) 2019-0008], 自由采食和饮水, 饲养环境为温度 22~

26 ℃,相对湿度 50%~60%,人工光照明暗各 12 h,适应性喂养 3 d。

1.2 细胞及主要试剂 人胚胎肾细胞 HEK293T 购于中国科学院上海细胞库,人主动脉平滑肌细胞 (human aortic smooth muscle cell, HASMC) 购自美国 Invitrogen 公司。戊巴比妥钠(货号 P3761)、 β -氨基丙腈(货号 A3134-10G)、血管紧张素 II(货号 A9525-10MG) 购自美国 Sigma 公司,质粒提取试剂盒(货号 D6950-02) 购自美国 OMEG 公司, DNA 凝胶回收试剂盒(货号 DP209-02)、LA Taq(货号 RR002A) 购自武汉华联科生物技术有限公司, T4 DNA 连接酶(货号 2011A) 购自日本 TaKaRa 公司,内切酶 *Bam*H I(货号 R0136V) 和 *Xho* I(货号 R0146V) 购自美国 NEB 公司, Lipofectamine 2000(货号 11668-027) 购自美国 Invitrogen 公司, pIRES2-GFP 空载体(货号 52107) 购自美国 addgene 公司, Opti-MEM(货号 31985-062) 购自美国 Gibco 公司, 苏木精(货号 PAB180015)、伊红(货号 PAB180016)、膜联蛋白 V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(货号 PAB180012)、RIPA(强)组织细胞快速裂解液(货号 PAB180006)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(货号 PAB180007)、HRP 标记的山羊抗兔和山羊抗小鼠二抗(货号分别为 PAB160011、PAB160009) 购自武汉贝茵莱生物科技有限公司, TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(货号 11684817910) 购自瑞士 Roche 公司, DMEM(货号 SH30022.01B) 购自美国 HyClone 公司, 蛋白质 G 磁珠(货号 9006S) 购自美国 CST 公司, 蛋白质 Marker(货号 26634) 购自美国 Thermo 公司, PVDF 膜(货号 IPVH00010)、化学发光试剂(货号 WBKLS0010) 购自美国 Millipore 公司, 吐温-20(货号 P-1379) 购自美国 Amresco 公司, 兔抗 β 肌动蛋白(货号 4970) 购自美国 CST 公司, 兔抗 S100A11(货号 ab169530)、兔抗 RAGE(货号 ab30381)、兔抗磷酸化 p38 (phosphorylated p38, p-p38)(货号 ab4822)、兔抗 p38(货号 ab31828)、兔抗 MMP2(货号 ab37150)、兔抗 MMP9(货号 ab76003)、兔抗 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X, Bax)(货号 ab182733)、兔抗 Bcl-2(货号 ab59348)、兔抗增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)(货号 ab29)、兔抗 Ki-67(货号 ab16667) 购自英国 Abcam 公司。

1.3 细胞培养 细胞 HEK293T 和 HASMC 复苏后用含 10% FBS 和 1% 青霉素、链霉素的 DMEM 培养基置于 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养, HEK293T 细胞密度达 70%~80% 时即可用于转染; HASMC 取 4~7 代细胞进行后续实验。

1.4 慢病毒 S100A11-短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 质粒的构建 构建 S100A11 基因的 shRNA 慢病毒载体, S100A11-shRNA 靶序列为 5'-GGTGGCTTAGCTATAGCATGC-3' (shRNA 1)、5'-GCTTAGCTATAGCATGCCATG-3' (shRNA 2)、5'-GCTATAGCATGCCATGAGTCC-3' (shRNA 3), 将干扰序列打乱并随机突变得到阴性对照序列为 5'-GATCCGCAACTGAGAAGATTG-3' (NC-shRNA)。将合成的序列连入用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切过的 pSICOR 载体中, 然后取连接产物转入大肠杆菌 DH5 α , 提取质粒并进行测序。将载体用慢病毒包装获得 Lv-NC-shRNA 和 Lv-S100A11-shRNA 1/2/3 并转染到 HEK293T 细胞中, 收集病毒 Lv-NC-shRNA 和 Lv-S100A11-shRNA 1/2/3 并将最终浓度调整为 1×10^8 TU/mL。选取 15 只大鼠, 尾静脉分别注射 300 μ L 重组病毒或生理盐水, 72 h 后用 1% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉大鼠, 取主动脉组织, 采用蛋白质印迹法检测 S100A11 的表达。

1.5 大鼠 AD 模型的构建及实验分组 将大鼠随机分为 5 组, 每组 8 只, 分别为对照组 (不做任何处理)、假手术组 (尾静脉注射 300 μ L 生理盐水)、AD 组 (饮水中加入 0.25% β -氨基丙腈连续 3 周构建 AD 模型^[11])、AD+Lv-NC-shRNA 组 (AD 模型大鼠予尾静脉注射 300 μ L 1×10^8 TU/mL Lv-NC-shRNA) 和 AD+Lv-S100A11-shRNA 组 (AD 模型大鼠予尾静脉注射 300 μ L 1×10^8 TU/mL Lv-S100A11-shRNA)。

1.6 病理组织学检测 (1) H-E 染色: 1% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉大鼠, 取大鼠主动脉组织, 用 4% 多聚甲醛溶液固定, 石蜡包埋后切片, 厚度约为 4 μ m, 将切片置于载玻片上, 展片烤片后, 根据试剂说明书步骤进行苏木精-伊红染色, 显微镜拍照。

(2) TUNEL 染色: 取主动脉组织切片, 加入蛋白酶 K 工作液孵育 8~10 min, PBS 洗涤 5 min, 加入 TUNEL 反应液 37 ℃ 避光孵育 1 h, 最后加入 DAPI 复染细胞核, 封片, 荧光显微镜下观

察并拍照。

1.7 免疫组织化学染色 主动脉组织包埋石蜡后切成4 μm厚切片, 烤片, 用3% H₂O₂ 孵育10 min, PBS洗涤3次。0.5% BSA封闭30 min, 加入S100A11、RAGE和p-p38(稀释比例均为1:100)一抗, 4℃孵育过夜; 加入二抗, 室温孵育30 min。最后用DAPI对细胞核进行复染, 光学显微镜下观察并拍照。

1.8 S100A11过表达质粒的构建与细胞实验分组 设计大鼠S100A11(NM_001004095.1)引物序列5'-cgcGGATCCTGCCTACAGAGACTGAG-3'、5'-cgcGAATTCTTAGATACGCTTCTGGGA-3'(斜体字母表示限制位点, 小写字母表示保护位点)。双酶切(BamH I和EcoR I)分别对恢复的目的基因片段和真核表达载体pIRES2-GFP质粒进行酶切。利用T4 DNA连接酶将纯化的大鼠S100A11基因靶片段定向连接到pIRES2-GFP载体上。37℃振荡培养过夜, 在大肠杆菌DH5α中扩增后, 按质粒提取试剂盒说明书步骤从菌液中提取目标质粒。重组载体命名为pIRES2-GFP-S100A11。将HASMC分为3组: 对照组(未进行任何干预)、EV组(转染pIRES2-GFP空载体)和OV-S100A11组(转染pIRES2-GFP-S100A11)。EV组、OV-S100A11组细胞分别用Lipofectamine 2000将pIRES2-GFP空载体和pIRES2-GFP-S100A11瞬时转染到HASMC细胞中, 培养48 h后采用荧光显微镜观察和蛋白质印迹法检测转染效率, 然后进行后续实验。

1.9 流式细胞术检测HASMC凋亡 各组取5万~10万重悬的细胞于1 000×g 4℃离心5 min, 弃上清后加入1 mL预冷PBS, 振荡使细胞悬浮后再次于1 000×g 4℃离心5 min, 弃上清; 将细胞重悬于200 μL结合缓冲液, 加入10 μL膜联蛋白V-FITC和10 μL PI, 混匀后4℃避光孵育30 min; 加入300 μL结合缓冲液, 随即进行流式细胞仪检测, 使用贝克曼FC500流式细胞仪自带软件CXP进行分析。

1.10 FPS ZM1或SB203580处理 用200 nmol/L的RAGE抑制剂FPS ZM1或10 μmol/L的p38磷酸化抑制剂SB203580处理转染pIRES2-GFP-S100A11的HASMC 1 h, 收集细胞进行后续实验。

1.11 蛋白质印迹法检测蛋白表达水平 细胞用

PBS洗涤后加入裂解液, 4℃充分裂解细胞, 转移至EP管中, 95℃以上加热10 min, 12 000×g离心10 min, 取上清进行蛋白定量。采用SDS-PAGE分离蛋白, 然后通过湿转法转至PVDF膜上, 用5%脱脂奶粉溶液4℃封闭过夜。加入一抗(S100A11、MMP2、Bax一抗稀释比例均为1:2 000, RAGE、p-p38、p38、Bcl-2、PCNA、Ki-67、GAPDH一抗稀释比例均为1:1 000, MMP9一抗稀释比例为1:5 000)于室温孵育1 h, 洗膜; 加入二抗(稀释比例为1:10 000)室温孵育1 h, 洗膜后加入化学发光试剂, 采用全自动化学发光分析仪检测。

1.12 统计学处理 使用GraphPad Prism 8.0软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用最小显著性差异法。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 Lv-S100A11-shRNA降低了HEK293T细胞中S100A11的表达 见图1, 与对照组(0.73±0.01)相比, 转染Lv-NC-shRNA后HEK293T细胞中S100A11的表达水平(0.75±0.01)无明显变化($P>0.05$); 与Lv-NC-shRNA组相比, 转染Lv-S100A11-shRNA 1/2/3后S100A11的表达水平(0.50±0.01、0.30±0.01、0.34±0.00)均降低(P 均 <0.01), 其中Lv-S100A11-shRNA 2组S100A11的表达水平最低, 因此后续实验选用Lv-S100A11-shRNA2。

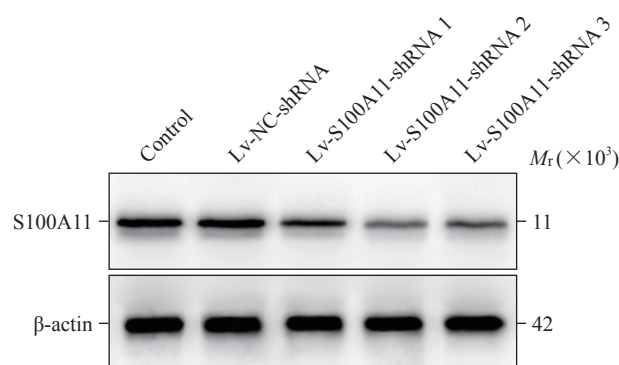


图1 Lv-S100A11-shRNA转染HEK293T细胞后S100A11蛋白的表达

Fig 1 Expression of S100A11 protein after Lv-S100A11-shRNAs transfection into HEK293T cells

Lv: Lentiviral vector; S100A11: S100 calcium binding protein A11; shRNA: Short hairpin RNA; NC: Negative control.

2.2 AD模型鉴定 由图2可见,对照组大鼠主动脉血管正常;AD组大鼠主动脉血管出现明显血肿,表明AD模型构建成功。

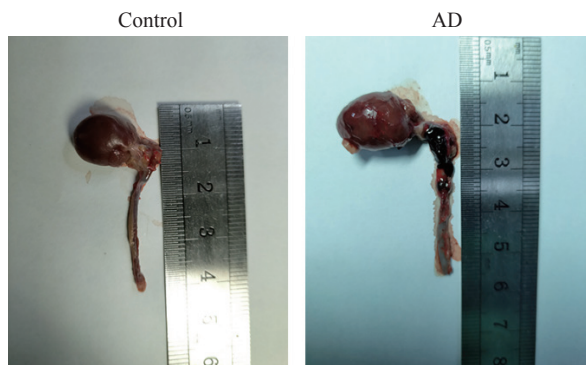


图2 大鼠AD模型鉴定

Fig 2 Identification of AD model rats

AD: Aortic dissection.

2.3 Lv-S100A11-shRNA改善大鼠主动脉病变 H-E染色结果(图3)显示,对照组和假手术组大鼠主动脉血管正常,而AD组主动脉血管撕裂形成充满血液的夹层;与AD组相比,AD+Lv-NC-shRNA组大鼠主动脉病变无明显变化,而AD+Lv-S100A11-shRNA组大鼠主动脉病变改善。

2.4 Lv-S100A11-shRNA减少大鼠主动脉组织细胞凋亡 TUNEL染色结果(图4)显示,对照组和假手术组主动脉组织中细胞凋亡均较少;与假手术组相比,AD组主动脉组织中细胞凋亡增多;与AD组相比,AD+Lv-NC-shRNA组主动脉组织中细胞凋亡无明显变化,而AD+Lv-S100A11-shRNA组细胞凋亡减少。

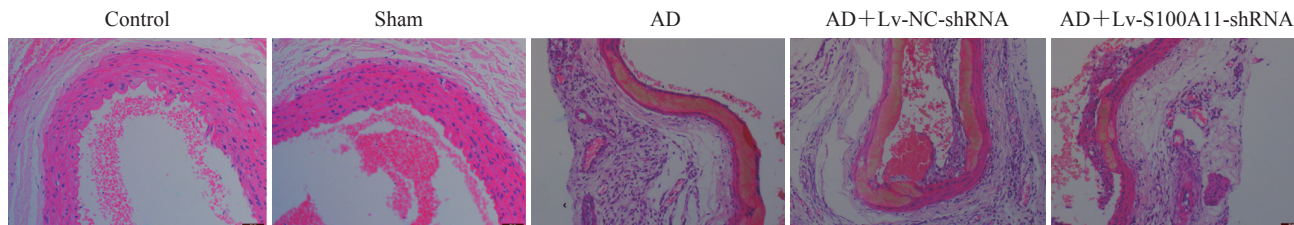


图3 H-E染色观察大鼠主动脉的组织学变化(200x)

Fig 3 Histological changes of rat aorta showed by H-E staining (200x)

H-E: Hematoxylin-eosin; AD: Aortic dissection; Lv: Lentiviral vector; NC: Negative control; shRNA: Short hairpin RNA; S100A11: S100 calcium binding protein A11.

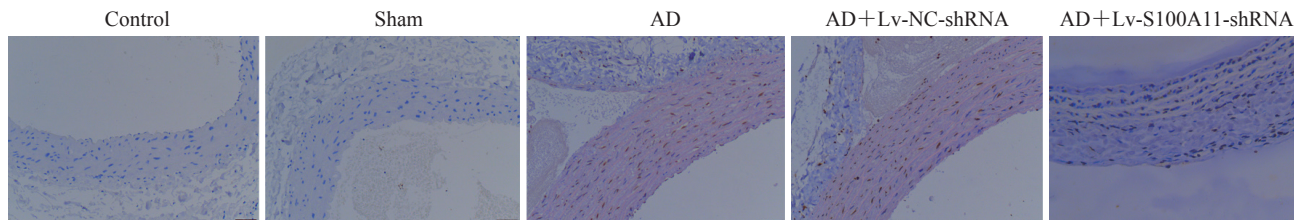


图4 TUNEL染色检测大鼠主动脉组织中细胞凋亡情况(200x)

Fig 4 TUNEL staining detecting cell apoptosis level in aortic tissue of rats (200x)

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling; AD: Aortic dissection; Lv: Lentiviral vector; NC: Negative control; shRNA: Short hairpin RNA; S100A11: S100 calcium binding protein A11.

2.5 Lv-S100A11-shRNA降低大鼠主动脉组织中S100A11、RAGE和p-p38的表达 免疫组织化学染色法检测结果(图5)显示,与对照组相比,假手术组大鼠主动脉组织中S100A11、RAGE、p-p38的表达无明显变化;与假手术组相比,AD组大鼠主动脉组织中S100A11、RAGE、p-p38表达均升高;

与AD组相比,AD+Lv-NC-shRNA组大鼠主动脉组织中S100A11、RAGE、p-p38表达无明显变化,而AD+Lv-S100A11-shRNA组大鼠主动脉组织中S100A11、RAGE、p-p38表达均降低,表明RAGE和p-p38可能参与S100A11引起的AD形成。

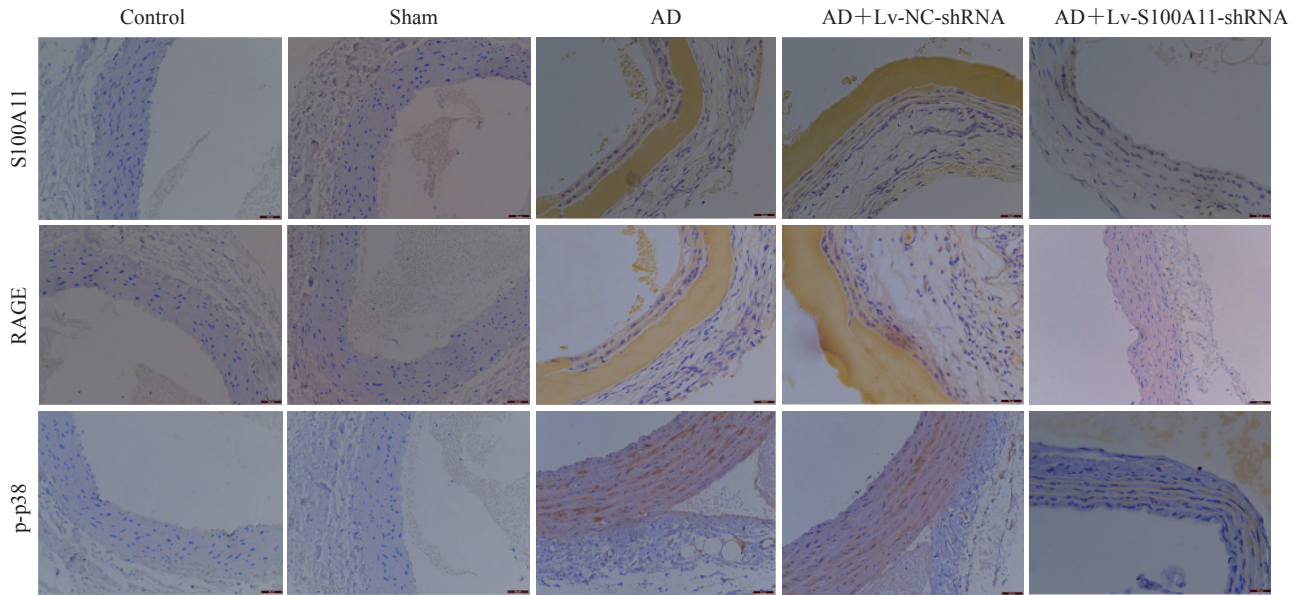


图5 免疫组织化学染色检测大鼠主动脉组织中 S100A11、RAGE 和 p-p38 蛋白的表达 (200×)

Fig 5 Expression of S100A11, RAGE and p-p38 proteins in aorta of rats detected by immunohistochemical staining (200×)

S100A11: S100 calcium binding protein A11; RAGE: Receptor for advanced glycation end-product; p-p38: Phosphorylated p38; AD: Aortic dissection; Lv: Lentiviral vector; NC: Negative control; shRNA: Short hairpin RNA.

2.6 Lv-S100A11-shRNA 对大鼠主动脉组织中 MMP2、MMP9、Bax、Bcl-2、PCNA、Ki-67 蛋白表达的影响 蛋白质印迹法检测结果 (图6、表1) 显示, 与对照组相比, 假手术组大鼠主动脉组织中 MMP2、MMP9、Bax、Bcl-2、PCNA 和 Ki-67 的表达均无显著变化 (P 均 >0.05); 与假手术组相比, AD 组大鼠主动脉组织中 MMP2、MMP9 和 Bax 表达均升高 (P 均 <0.01), Bcl-2、PCNA 和 Ki-67 表达均降低 (P 均 <0.01); 与 AD 组相比, AD+Lv-NC-shRNA 组 MMP2、MMP9、Bax、Bcl-2、PCNA 和 Ki-67 的表达均无显著变化 (P 均 >0.05), 而 AD+Lv-S100A11-shRNA 组 MMP2、MMP9、Bax 表达均降低 (P 均 <0.01), Bcl-2、PCNA、Ki-67 表达均升高 (P 均 <0.01)。

2.7 S100A11 过表达质粒的转染效率 荧光显微镜观察结果 (图7A) 显示, EV 组和 OV-S100A11 组 HASMC 均表达 GFP, 且转染 pIRES2-GFP-S100A11 促进了 S100A11 的表达。蛋白质印迹法检测结果 (图7B) 显示, OV-S100A11 组 HASMC 中 S100A11 蛋白的表达高于对照组和 EV 组 (0.72 ± 0.01 vs 0.34 ± 0.01 、 0.35 ± 0.00 , P 均 <0.01), 表明 pIRES2-GFP-S100A11 转染成功。

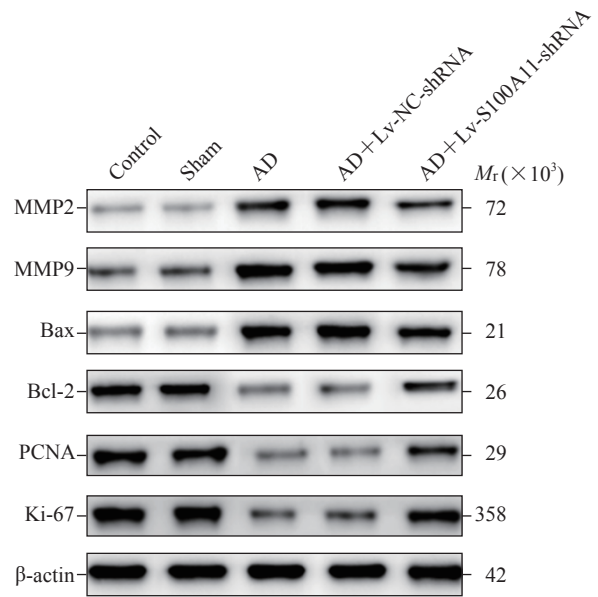


图6 蛋白质印迹法检测大鼠主动脉组织中 MMP2、MMP9、Bax、Bcl-2、PCNA、Ki-67 蛋白的表达

Fig 6 Expression of MMP2, MMP9, Bax, Bcl-2, PCNA and Ki-67 proteins in aorta of rats detected by Western blotting

MMP: Matrix metalloproteinase; Bax: Bcl-2-associated X; Bcl-2: B-cell lymphoma-2; PCNA: Proliferating cell nuclear antigen; Ki-67: Cell proliferation associated antigen; AD: Aortic dissection; Lv: Lentiviral vector; NC: Negative control; shRNA: Short hairpin RNA; S100A11: S100 calcium binding protein A11.

表 1 各组大鼠主动脉组织中 MMP2、MMP9、Bax、Bcl-2、PCNA、Ki-67 蛋白的表达水平

Tab 1 Protein expression levels of MMP2, MMP9, Bax, Bcl-2, PCNA and Ki-67 in aortic tissue of rats in each group

Protein	<i>n</i> =8, $\bar{x}\pm s$				
	Control group	Sham group	AD group	AD+Lv-NC-shRNA group	AD+Lv-S100A11-shRNA group
MMP2	0.21±0.01	0.21±0.01	0.71±0.03**	0.75±0.01	0.63±0.01 ^{△△}
MMP9	0.43±0.02	0.48±0.01	0.91±0.02**	0.97±0.01	0.81±0.02 ^{△△}
Bax	0.35±0.02	0.39±0.01	0.86±0.03**	0.84±0.01	0.62±0.01 ^{△△}
Bcl-2	0.75±0.01	0.72±0.01	0.37±0.01**	0.37±0.01	0.62±0.01 ^{△△}
PCNA	0.77±0.02	0.76±0.01	0.30±0.00**	0.27±0.01	0.59±0.02 ^{△△}
Ki-67	0.75±0.01	0.66±0.02	0.35±0.02**	0.42±0.01	0.62±0.03 ^{△△}

***P*<0.01 vs sham group; ^{△△}*P*<0.01 vs AD group. MMP: Matrix metalloproteinase; Bax: Bcl-2-associated X; Bcl-2: B-cell lymphoma-2; PCNA: Proliferating cell nuclear antigen; Ki-67: Cell proliferation associated antigen; AD: Aortic dissection; Lv: Lentiviral vector; NC: Negative control; shRNA: Short hairpin RNA; S100A11: S100 calcium binding protein A11.

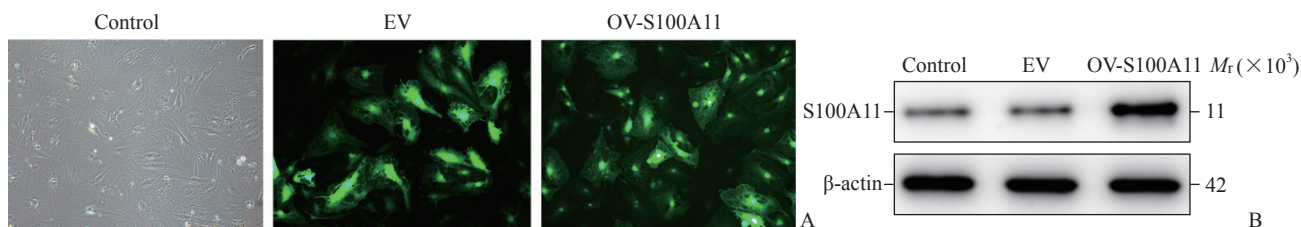


图 7 HASMC 中 S100A11 过表达质粒的转染效率

Fig 7 Transfection efficiency of S100A11 overexpression plasmid in HASMCs

A: Immunofluorescence detection results of HASMCs transfected with OV-S100A11 (100×); B: Western blotting detecting the expression of S100A11. Control group: Untreated cells; EV group: Transfected empty vector cells; OV-S100A11 group: Transfected overexpression of S100A11 vector cells. HASMC: Human aortic smooth muscle cell; S100A11: S100 calcium binding protein A11.

2.8 S100A11 过表达促进 HASMC 凋亡 流式细胞术检测结果 (图 8) 显示, 与对照组 [(6.09±0.56)%] 相比, EV 组 HASMC 凋亡率

[(6.37±0.54)%] 无显著变化 (*P*>0.05), 而 OV-S100A11 组 HASMC 凋亡率 [(18.60±1.07)%] 明显升高 (*P*<0.01)。

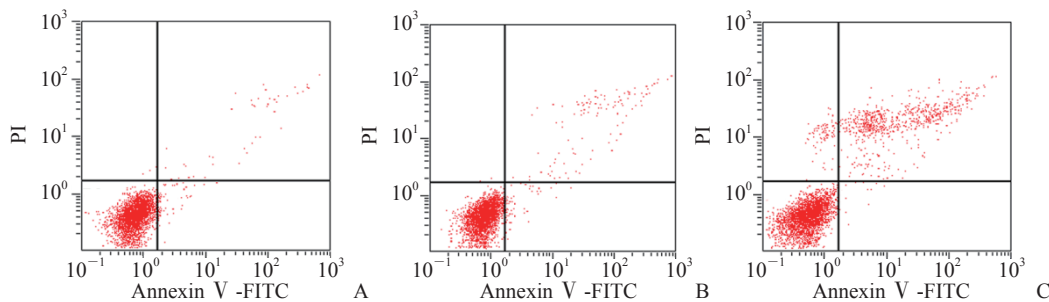


图 8 流式细胞术检测过表达 S100A11 对 HASMC 细胞凋亡的影响

Fig 8 Effect of S100A11 overexpression on apoptosis of HASMCs detected by flow cytometry

A: Control group, untreated cells; B: EV group, transfected empty vector cells; C: OV-S100A11 group, transfected overexpression of S100A11 vector cells. S100A11: S100 calcium binding protein A11; HASMC: Human aortic smooth muscle cell; PI: Propidium iodide; FITC: Fluorescein isothiocyanate.

2.9 S100A11 过表达 对 HASMC 中 RAGE/p38 MAPK 通路的影响 蛋白质印迹法检测结果 (图 9、表 2) 显示, 与对照组相比, OV-S100A11 组

HASMC 中 RAGE、p-p38、MMP2、MMP9、Bax 的表达均升高 (*P*均<0.01), Bcl-2、PCNA、Ki-67 的表达均下降 (*P*均<0.01); 与 OV-S100A11

组相比, OV-S100A11+FPS ZM1 组 S100A11、RAGE、p-p38、MMP2、MMP9、Bax 的表达均下降 (P 均 <0.01), Bcl-2、PCNA 和 Ki-67 的表达均升高 (P 均 <0.01), 说明 S100A11 通过 RAGE 影响 AD 的发生; 与 OV-S100A11 组相比, OV-S100A11+

SB203580 组 p-p38、MMP2、MMP9 和 Bax 的表达均降低 (P 均 <0.01), Bcl-2、PCNA 和 Ki-67 的表达均升高 (P 均 <0.01), 而 S100A11 和 RAGE 的表达无明显变化 (P 均 >0.05), 表明 S100A11/RAGE 对 AD 的作用通过 p38 MAPK 介导。

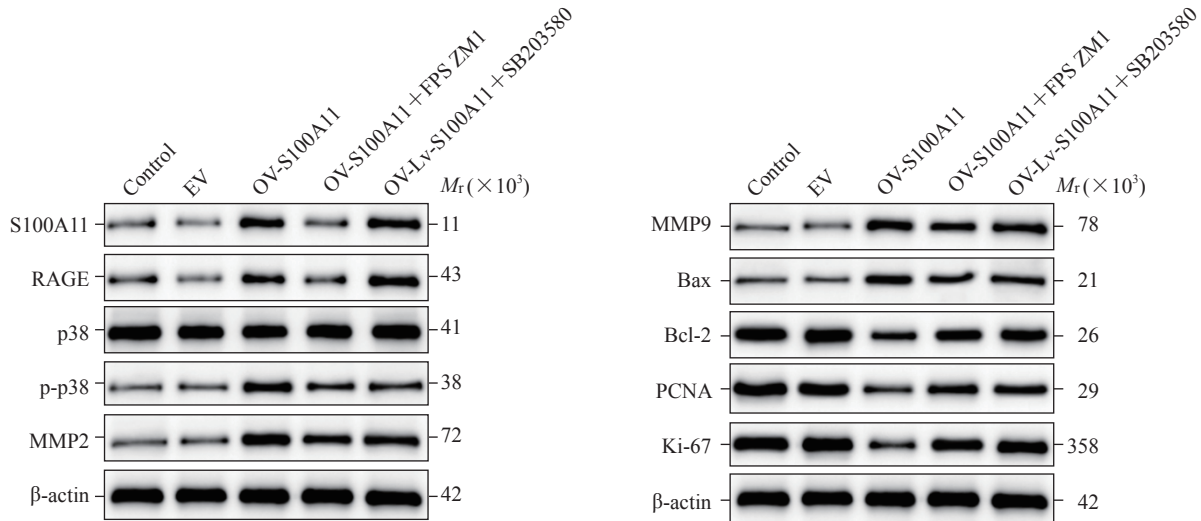


图9 蛋白质印迹法检测 HASMC 中 S100A11、RAGE、p38、p-p38、MMP2、MMP9、Bax、Bcl-2、PCNA 和 Ki-67 蛋白质的表达

Fig 9 Protein expression of S100A11, RAGE, p38, p-p38, MMP2, MMP9, Bax, Bcl-2, PCNA and Ki-67 in HASMCs detected by Western blotting

Control group: Untreated cells; EV group: Transfected empty vector cells; OV-S100A11 group: Transfected overexpression of S100A11 vector cells; OV-S100A11+FPS ZM1 group: OV-S100A11 cells treated with RAGE inhibitor FPS ZM1; OV-Lv-S100A11+SB203580 group: OV-S100A11 cells treated with p38 phosphorylation inhibitor SB203580. HASMC: Human aortic smooth muscle cell; S100A11: S100 calcium binding protein A11; RAGE: Receptor for advanced glycation endproducts; p-p38: Phosphorylated p38; MMP: Matrix metalloproteinase; Bax: Bcl-2-associated X; Bcl-2: B-cell lymphoma-2; PCNA: Proliferating cell nuclear antigen; Ki-67: Cell proliferation associated antigen.

表2 各组 HASMC 中 S100A11、RAGE、p-p38、p38、MMP2、MMP9、Bax、Bcl-2、PCNA 和 Ki-67 蛋白的表达水平
Tab 2 Protein expression levels of S100A11, RAGE, p-p38, p38, MMP2, MMP9, Bax, Bcl-2, PCNA and Ki-67 in HASMCs of each group

Protein	Control group	EV group	$n=3, \bar{x} \pm s$		
			OV-S100A11 group	OV-S100A11+FPS ZM1 group	OV-Lv-S100A11+SB203580 group
S100A11	0.28±0.01	0.28±0.01	0.65±0.01**	0.35±0.01 $\Delta\Delta$	0.65±0.00
RAGE	0.34±0.00	0.32±0.01	0.65±0.01**	0.44±0.00 $\Delta\Delta$	0.66±0.01
p-p38	0.38±0.00	0.37±0.00	0.67±0.01**	0.48±0.01 $\Delta\Delta$	0.51±0.00 $\Delta\Delta$
MMP2	0.39±0.01	0.36±0.00	0.71±0.01**	0.61±0.00 $\Delta\Delta$	0.62±0.00 $\Delta\Delta$
MMP9	0.35±0.01	0.36±0.01	0.65±0.02**	0.53±0.01 $\Delta\Delta$	0.57±0.01 $\Delta\Delta$
Bax	0.36±0.01	0.34±0.01	0.51±0.01**	0.40±0.01 $\Delta\Delta$	0.45±0.00 $\Delta\Delta$
Bcl-2	0.86±0.01	0.89±0.01	0.54±0.02**	0.67±0.01 $\Delta\Delta$	0.69±0.01 $\Delta\Delta$
PCNA	0.81±0.01	0.79±0.01	0.48±0.01**	0.63±0.00 $\Delta\Delta$	0.60±0.00 $\Delta\Delta$
Ki-67	0.86±0.01	0.87±0.01	0.49±0.01**	0.71±0.00 $\Delta\Delta$	0.72±0.00 $\Delta\Delta$

Control group: Untreated cells; EV group: Transfected empty vector cells; OV-S100A11 group: Transfected overexpression of S100A11 vector cells; OV-S100A11+FPS ZM1 group: OV-S100A11 cells treated with RAGE inhibitor FPS ZM1; OV-Lv-S100A11+SB203580 group: OV-S100A11 cells treated with p38 phosphorylation inhibitor SB203580. ** P <0.01 vs control group; $\Delta\Delta P$ <0.01 vs OV-S100A11 group. HASMC: Human aortic smooth muscle cell; S100A11: S100 calcium binding protein A11; RAGE: Receptor for advanced glycation endproducts; p-p38: Phosphorylated p38; MMP: Matrix metalloproteinase; Bax: Bcl-2-associated X; Bcl-2: B-cell lymphoma-2; PCNA: Proliferating cell nuclear antigen; Ki-67: Cell proliferation associated antigen.

3 讨论

S100A11 是大型钙结合蛋白家族 S100 的成员,被认为在胞吞、胞吐、酶活性调节^[12]、细胞生长^[13]、凋亡^[14]和炎症^[15]等过程中发挥特定的生物学作用。S100A11 在不同组织中表达水平存在差异^[16],且主要集中在细胞质^[17-18]。S100A11 与许多肿瘤的发生有关,在一些恶性肿瘤中被确定为肿瘤抑制因子,但在有些恶性肿瘤中其也被确定为促癌因子^[19]。研究发现, S100A11 在生长调节中也发挥矛盾作用^[17,20],在人角质形成细胞中通过 RAGE 依赖信号转导发挥作用^[17]。

本研究建立了β-氨基丙腈诱导的 AD 大鼠模型,探究 S100A11 在 AD 中的作用与相关机制。研究结果显示,在 AD 模型中β-氨基丙腈能够促进主动脉细胞的凋亡,促进主动脉组织中 S100A11、RAGE 和 p-p38 的表达,上调主动脉组织中 MMP2、MMP9 和 Bax 的表达,下调主动脉组织中 Bcl-2、PCNA 和 Ki-67 的表达。进一步用 Lv-S100A11-shRNA 降低 AD 大鼠中 S100A11 的表达,观察到下调 S100A11 表达可以抑制 RAGE 和 p-p38 的表达、减轻主动脉组织细胞凋亡和 AD 的形成,提示 S100A11 的表达与 AD 的形成有密切的关系, S100A11 或可通过调控 RAGE 和 p-p38 参与 AD 形成。

p38 MAPK 是 MAPK 家族中的一个成员,包括 p38α、p38β、p38γ 和 p38δ,其中 p38α 是最常见的一种蛋白质^[21]。据报道, p38 MAPK 通路在转录和翻译水平上是促炎细胞因子生物合成的关键调控因子,这使得该通路的不同成分成为治疗自身免疫病和炎症性疾病的潜在靶点^[22]。研究表明, S100A11 是 RAGE 的配体, RAGE 能够与 S100A11 相互作用并在众多疾病中发挥作用^[10]。为了探究 S100A11 的下游分子,本研究构建了 S100A11 过表达载体转染 HASMC。研究结果显示过表达 S100A11 能促进 HASMC 的凋亡,上调 RAGE 和 p-p38 的表达,并能调节迁移、凋亡、增殖相关蛋白质的表达水平。为了进一步确认 RAGE 及 p38 的作用,本实验将 RAGE 抑制剂 FPS ZM1 与 OV-S100A11 转染的 HASMC 共孵育,抑制受体结合,结果显示, FPS ZM1 组 S100A11、RAGE 和 p-p38 的表达均下调,且能够逆转过表达 S100A11 引起

的迁移、凋亡、增殖相关蛋白质表达水平的改变,提示 S100A11 通过与 RAGE 结合发挥作用。最后又用 p38 磷酸化抑制剂 SB203580 处理过表达 S100A11 的 HASMC,抑制 p38 的磷酸化,结果显示, SB203580 能降低 p-p38 的表达且迁移、凋亡、增殖相关蛋白质的表达趋势与 FPS ZM1 干预效果一致,表明 RAGE 和 p38 MAPK 是 S100A11 的下游分子, S100A11 可能通过其受体 RAGE 激活 p38 MAPK 信号通路参与 AD 形成。

综上所述,体内和体外实验表明, S100A11 通过 RAGE 受体和 p38 MAPK 效应因子对 AD 的发生起促进作用,提示 S100A11 可能是 AD 的诊断指标之一。

[参考文献]

- [1] NIENABER C A, CLOUGH R E, SAKALIHASAN N, SUZUKI T, GIBBS R, MUSSA F, et al. Aortic dissection[J/OL]. *Nat Rev Dis Primers*, 2016, 2: 16053. DOI: 10.1038/nrdp.2016.53.
- [2] WU D, SHEN Y H, RUSSELL L, COSELLI J S, LEMAIRE S A. Molecular mechanisms of thoracic aortic dissection[J]. *J Surg Res*, 2013, 184: 907-924.
- [3] CIFANI N, PROIETTA M, TRITAPEPE L, DI GIOIA C, FERRI L, TAURINO M, et al. Stanford-A acute aortic dissection, inflammation, and metalloproteinases: a review[J]. *Ann Med*, 2015, 47: 441-446.
- [4] DAUGHERTY A, RATERI D L, LU H. S100A12 links to thoracic aortic aneurysms[J]. *Circ Res*, 2010, 106: 13-15.
- [5] JIANG W L, WANG Z W, HU Z P, WU H B, ZHANG M, HU X P, et al. Highly expressed S100A12 in aortic wall of patients with DeBakey type I aortic dissection could be a promising marker to predict perioperative complications[J]. *Ann Vasc Surg*, 2014, 28: 1556-1562.
- [6] 赵本正,陈俊宇,徐萍,陈莹莹,邱俊,郑晶莹,等. S100A11,一种多生物学功能的Ca²⁺结合蛋白[J]. *中国实验诊断学*, 2018, 22: 1655-1658.
- [7] HUANG Y K, CHOU R H, YU C. Tranilast blocks the interaction between the protein S100A11 and receptor for advanced glycation end products (RAGE) V domain and inhibits cell proliferation[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291: 14300-14310.
- [8] 赵晓,黄飞麒,姚乃婕,陈扬声. S100A11-RAGE 通过 P38MAPK 信号转导通路调控小鼠骨关节炎软骨细胞肥大和细胞外基质代谢[J]. *中国现代医学杂志*, 2016, 26: 6-11.
- [9] LIU C C, DU H J, WANG Y J, GONG N Y, QI W W, ZHOU X M, et al. S100A11 regulates nasal epithelial

- cell remodeling and inflammation in CRSwNPs via the RAGE-mediated AMPK-STAT3 pathway[J]. *Mol Immunol*, 2021, 140: 35-46.
- [10] TENG F, JIANG J J, ZHANG J H, YUAN Y W, LI K L, ZHOU B, et al. The S100 calcium-binding protein A11 promotes hepatic steatosis through RAGE-mediated AKT-mTOR signaling[J/OL]. *Metabolism*, 2021, 117: 154725. DOI: 10.1016/j.metabol.2021.154725.
- [11] LI J S, LI H Y, WANG L, ZHANG L, JING Z P. Comparison of β -aminopropionitrile-induced aortic dissection model in rats by different administration and dosage[J]. *Vascular*, 2013, 21: 287-292.
- [12] ZHAO X Q, NAKA M, MUNHEYUKI M, TANAKA T. Ca^{2+} -dependent inhibition of actin-activated myosin ATPase activity by S100C (S100A11), a novel member of the S100 protein family[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 267: 77-79.
- [13] SAKAGUCHI M, MIYAZAKI M, INOUE Y, TSUJI T, KOUCHI H, TANAKA T, et al. Relationship between contact inhibition and intranuclear S100C of normal human fibroblasts[J]. *J Cell Biol*, 2000, 149: 1193-1206.
- [14] MAKINO E, SAKAGUCHI M, IWATSUKI K, HUH N H. Introduction of an N-terminal peptide of S100C/A11 into human cells induces apoptotic cell death[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2004, 82: 612-620.
- [15] CECIL D L, JOHNSON K, REDISKE J, LOTZ M, SCHMIDT A M, TERKELTAUB R. Inflammation-induced chondrocyte hypertrophy is driven by receptor for advanced glycation end products[J]. *J Immunol*, 2005, 175: 8296-8302.
- [16] INADA H, NAKA M, TANAKA T, DAVEY G E, HEIZMANN C W. Human S100A11 exhibits differential steady-state RNA levels in various tissues and a distinct subcellular localization[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 263: 135-138.
- [17] SAKAGUCHI M, SONEGAWA H, MURATA H, KITAZOE M, FUTAMI J, KATAOKA K, et al. S100A11, an dual mediator for growth regulation of human keratinocytes[J]. *Mol Biol Cell*, 2008, 19: 78-85.
- [18] BROOME A M, ECKERT R L. Microtubule-dependent redistribution of a cytoplasmic cornified envelope precursor[J]. *J Invest Dermatol*, 2004, 122: 29-38.
- [19] SALAMA I, MALONE P S, MIHAIMEED F, JONES J L. A review of the S100 proteins in cancer[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2008, 34: 357-364.
- [20] SAKAGUCHI M, MIYAZAKI M, TAKAISHI M, SAKAGUCHI Y, MAKINO E, KATAOKA N, et al. S100C/A11 is a key mediator of Ca^{2+} -induced growth inhibition of human epidermal keratinocytes[J]. *J Cell Biol*, 2003, 163: 825-835.
- [21] RODRÍGUEZ-CARBALLO E, GÁMEZ B, VENTURA F. p38 MAPK signaling in osteoblast differentiation[J/OL]. *Front Cell Dev Biol*, 2016, 4: 40. DOI: 10.3389/fcell.2016.00040.
- [22] CUENDA A, ROUSSEAU S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1773: 1358-1375.

[本文编辑] 杨亚红