

过表达 Syndecan-4促进人脐静脉内皮细胞增殖

宗斌, 谢峻, 徐标

(南京大学医学院附属鼓楼医院心脏科, 江苏省南京市 210008)

[关键词] 血管新生; Syndecan-4 人脐静脉内皮细胞; 增殖

[摘要] 目的 内皮细胞增殖在血管新生中起着非常重要的作用。本研究拟观察过表达 Syndecan-4对人脐静脉内皮细胞的促增殖作用并对其相关机制进行探讨。方法 分离和培养人脐静脉内皮细胞, 分别将过表达 Syndecan-4的腺病毒、空病毒转染至人脐静脉内皮细胞, 用免疫染色法观察人脐静脉内皮细胞的 Syndecan-4的表达水平和自聚现象, 用 Western blotting方法检测人脐静脉内皮细胞内 Akt内皮细胞氮氧化物合酶蛋白磷酸化的水平; 用磷酸化组蛋白 3、5-溴脱氧尿嘧啶核苷、5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷法观察人脐静脉内皮细胞的增殖情况。结果 与对照组相比, 转染 Syndecan-4组的人脐静脉内皮细胞增殖明显活跃, Syndecan-4表达明显增加, 且存在自聚现象; Western blotting检测发现, Akt内皮细胞氮氧化物合酶磷酸化水平较对照组明显升高。结论 过表达人脐静脉内皮细胞 Syndecan-4可诱导 Syndecan-4自聚, 并可能通过活化下游 Akt内皮细胞氮氧化物合酶, 促进人脐静脉内皮细胞的增殖。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Syndecan-4 Overexpression Enhances Human Umbilical Vein Endothelial Cells Proliferation

ZONG Bin, XIE Jun, and XU Biao

(Department of Cardiology, Nanjing Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing, Jiangsu 210008 China)

[KEY WORDS] Angiogenesis Syndecan-4 Human Umbilical Vein Endothelial Cell Proliferation

[ABSTRACT] **Aim** The proliferation of endothelial cells plays an important role in angiogenesis. In present study, we observed the effect of syndecan-4 on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) proliferation as well as its possible mechanism. **Methods** HUVECs were isolated and cultured. The cells were infected with Ad-syndecan-4 or Ad-null as control. Immunostaining was performed to investigate syndecan-4 expression and clusterization. Western blotting was used to assess phosphorylation of downstream kinase Akt and endothelial nitric oxide synthase (eNOS). Proliferation ability of HUVECs was assessed by pH3, bromodeoxyuridine (5-BrdU) and 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU). **Results** Compared with the Ad-null group, increased cell proliferation rate was observed in the Ad-syndecan-4 group. Syndecan-4 overexpression induced the clusterization of syndecan-4 themselves. The levels of Akt and eNOS phosphorylation were also increased in HUVECs with syndecan-4 overexpression. **Conclusion** Overexpressed syndecan-4 induced the self-clusterization of syndecan-4 and the activation of downstream Akt and eNOS, which may contribute to increased proliferation of HUVECs.

Syndecan-4是硫酸乙酰肝素类的跨膜转运蛋白多糖 Syndecans家族的成员之一^[1]。Syndecan-4主要在血管内皮细胞和平滑肌细胞上表达, 它作为一种与生长因子结合的共受体, 通过自身聚集, 激活下

游信号通路, 在细胞伸展、识别、黏附、迁移尤其是增殖中扮演着重要的角色^[1-3]。既往的研究发现, Syndecan-4参与了机体血管新生相关分子信号的传递。在 Syndecan-4基因敲除的小鼠中, 肉芽组织血管新

[收稿日期] 2011-02-14

[作者简介] 宗斌, 硕士, 研究方向为心肌梗死后心衰的发病机制及治疗, Email为 zongbin009@163.com。谢峻, 博士, 研究方向为心肌梗死后心衰的发病机制及治疗。通讯作者徐标, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心力衰竭的发病机制及治疗, Email为 xubiao@medmail.com.cn。

生发生障碍,导致这种小鼠创伤后伤口愈合率低^[4]。激活 Syndecan-4可以有效的激活内皮细胞,促进内皮细胞的迁移^[5]。是否增加 Syndecan-4表达可以有效的促进内皮细胞的增殖进而促进血管新生值得我们进一步研究。因此,在本实验中,我们采取基因转染的方法,观察过表达 Syndecan-4是否可以有效地使其自身激活,并进一步起到促进内皮细胞增殖的作用。

1 材料与方法

1.1 重组腺病毒的准备和构建

提取 Hela细胞总 RNA,合成 cDNA 第一链,根据 GenBank 已发表的人 Syndecan-4 基因 (GenBank 登录号: NM_002999.3) 的 mRNA 序列,利用 Oligo6 软件设计 Syndecan-4 基因引物,由南京金思瑞生物技术有限公司合成。利用聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 方法扩增 Syndecan-4 的 DNA,纯化与回收 PCR 扩增产物。然后进行 Syndecan-4 基因克隆,构建、鉴定及扩增重组腺病毒质粒 pAd-Syndecan-4 包装、扩增重组腺病毒 Ad-Syndecan-4 最后进行病毒滴度的测定^[6]。

1.2 细胞培养和转染

依据文献用胶原酶消化人脐带,分离人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)^[7]。本研究遵循 1975 年《赫尔辛基宣言》(1983 年修订)所规定的操作规程,并且得到了南京大学医学院伦理委员会的批准。在 M199 (Invitrogen 公司, CA) 培养基中培养 HUVECs 该培养基含 20% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、100 kU/L 青霉素、100 g/L 链霉素、100 mg/L 的内皮细胞生长添加剂 (endothelial cell growth supplement ECGS) (Becton Dickinson 公司, NJ),待细胞汇合至 80%~90% 状态,然后将细胞置于仅含 0.2% FBS 而不含任何生长因子添加剂的 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 培养基中培养 24 h 最后将细胞分为转染 Syndecan-4 腺病毒和转染空病毒两组: A 组转染空病毒 (对照组), B 组转染 Syndecan-4 腺病毒,转染时间均为 12 h (MOI = 200)。

1.3 Syndecan-4 聚集检测

免疫染色法检测 Syndecan-4 聚集。将上述两组细胞于 4℃ 多聚甲醛冰上固定 10 min,磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 充分洗涤后,羊抗 Syndecan-4 抗体 (Santa Cruz Biotechnology 公司, CA) 孵育 2 h, 37℃, PBS 再次洗涤后,兔抗羊二抗

(Santa Cruz Biotechnology 公司, CA) 孵育 1 h, 37℃, 封片。400 倍荧光显微镜下随机取 10 个视野观察被染成红色的为 Syndecan-4。

1.4 人脐静脉内皮细胞内 Syndecan-4 表达水平以及 Akt 内皮细胞氮氧化物合酶蛋白磷酸化水平的检测

通过 Western blotting 法检测。Syndecan-4 以磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase GAPDH) 蛋白表达作为内参。洗涤上述 AB 两组细胞,提取蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。取 50 μg 蛋白进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis SDS-PAGE) 使蛋白分离,然后转移至 PVDF 膜,脱脂牛奶封闭 60 min,分别用羊抗人 Syndecan-4 抗体 (1:100, Santa Cruz Biotechnology 公司) 和鼠抗人 GAPDH (1:500, BD Bioscience 公司) 室温孵育过夜,洗膜后孵育二抗 (室温, 2 h),羊抗人 Syndecan-4 抗体的二抗为辣根过氧化物酶标记的兔抗羊 IgG (1:1000, Santa Cruz Biotechnology 公司),鼠抗人 GAPDH 的二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG (1:1000, BD Bioscience 公司),洗膜后加入辣根过氧化物酶的荧光底物 (Millipore 公司, USA),曝光,Quantity One 图像分析软件分析各条带累积光密度值,以 Syndecan-4 与内参 GAPDH 的光密度相对比值作为评价指标。然后分别以总 Akt 和总内皮细胞氮氧化物合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 标化,检测磷酸化 Akt (P-Akt) 和磷酸化 eNOS (P-eNOS) 的表达水平。

1.5 人脐静脉内皮细胞增殖检测

1.5.1 磷酸化组蛋白 3 免疫细胞化学染色法

分别将上述两组细胞制作细胞爬片, PBS 清洗, 4% 多聚甲醛固定,兔抗磷酸化组蛋白 3 抗体 (上海亿欣生物科技有限公司) 孵育 4℃ 过夜,羊抗兔 IgG (上海亿欣生物科技有限公司) 孵育 (PBS 配, 滴度, 湿盒), DAB 显色, 400 倍光学显微镜下随机取 10 个视野观察有丝分裂的染色体。

1.5.2 5-溴脱氧尿嘧啶核苷标记免疫细胞化学染色法

用终浓度 10 μmol/L 的 5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (bromodeoxyuridine BrdU) (武汉博士德生物工程有限公司) 分别处理上述两组细胞,收集细胞,冲洗,制作细胞爬片, 70% 乙醇固定, PBS 冲洗, 5-BrdU 抗体 (武汉博士德生物工程有限公司) 4℃ 过夜; 二抗 (武汉博士德生物工程有限公司) 孵育后封片,在 400 倍光学显微镜下随机取 10 个视野观察着色的细胞核。

1.5.3 5-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶核苷掺入检测法

将上述两组细胞分别接种于 8 孔腔室培养玻片, 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶核苷 (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) (Invitrogen 公司, USA) 孵育 24 h 多聚甲醛固定 10 min, click-it EdU 反应混合液 (Invitrogen 公司, USA) 染色, 共聚焦显微镜观察, EdU 阳性细胞核被染为红色, 在 20 倍镜下随机取 10 个视野观察。

1.6 统计学方法

所有统计学分析由 SPSS 16.0 软件完成。定量资料描述采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。服从正态分布的指标采用成组 t 检验, 不服从正态分布的指标进行组间比较, 采用秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Syndecan-4 聚集检测

与转染空病毒组 (对照组) 相比, 转染 Syndecan-4 腺病毒组细胞表现出的红染加深, 说明了转染 Syndecan-4 腺病毒组细胞表达 Syndecan-4 增高; 另外, 我们观察到转染 Syndecan-4 腺病毒组和加入抗-Syndecan-4 抗体组的细胞出现红染区积聚的现象 (图 1), 说明过表达的 Syndecan-4 可以引起不依赖配体的自发的聚集。

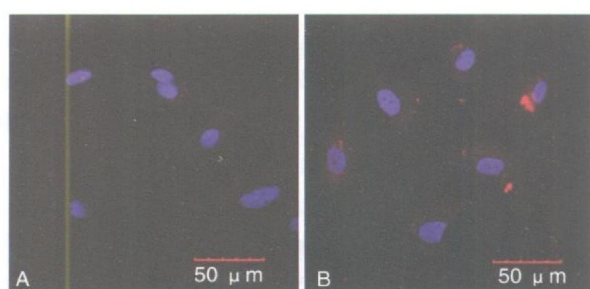


图 1. HUVECs Syndecan-4 聚集的免疫染色法检测 ($\times 200$)
A 为转染空病毒组 (对照组), B 为转染 Syndecan-4 腺病毒组; 红色代表 Syndecan-4。

Figure 1. Immunofluorescence staining for clusterization of syndecan-4 of HUVECs ($\times 200$)

2.2 人脐静脉内皮细胞内 Syndecan-4 表达水平以及 Akt 内皮细胞氮氧化物合酶蛋白磷酸化水平的检测

与转染空病毒组 (对照组) 和加入抗-Syndecan-4 抗体组相比, 转染 Syndecan-4 腺病毒组细胞内 Syndecan-4 表达水平明显增高 (图 2)。

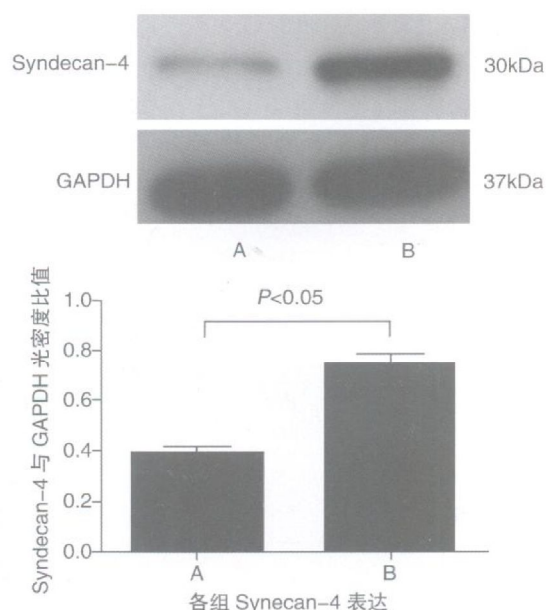


图 2. 各组 Syndecan-4 的表达情况 ($n = 6$) A 为转染空病毒组 (对照组), B 为转染 Syndecan-4 腺病毒组; B 组 Syndecan-4 表达量明显高于 A 组, $P < 0.05$ 。

Figure 2. Expression of syndecan-4 of HUVEC ($n = 6$)

另外, 和加入抗-Syndecan-4 抗体组相似, 转染 Syndecan-4 腺病毒组细胞较转染空病毒组磷酸化 Akt (P-Akt) 和磷酸化 eNOS (P-eNOS) 的表达也在增加 (图 3)。

2.3 人脐静脉内皮细胞增殖检测

2.3.1 磷酸化组蛋白 3 免疫细胞化学染色法

与转染空病毒组 (图 4 A) 相比, 转染 Syndecan-4 腺病毒组 (图 4 B) 的细胞内棕黄色标记的有丝分裂的染色体明显增多 (表 1)。

表 1. 3 种方法检测 Syndecan-4 转染后 HUVECs 的增殖情况 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$) (每 100 个细胞中阳性细胞数)

Table 1. Three methods for the proliferation of HUVECs after infected ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$) (The number of positive cells in 100 cells)

分 组	磷酸化组蛋白 3 免疫细胞化学染色法	5-BrdU 标记免疫细胞化学染色法	EdU 掺入检测法
转染空病毒组 (对照组)	3.22 ± 0.29	15.98 ± 1.24	13.01 ± 1.75
转染 Syndecan-4 腺病毒组	16.44 ± 3.01^a	32.79 ± 3.91^a	46.23 ± 5.53^a

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较。

2.3.2 5-溴脱氧尿嘧啶核苷标记免疫细胞化学染色法 转染 Syndecan-4 腺病毒组 (图 4 B) 的细胞内可见大量棕黄色标记增殖的细胞核, 较转染空

病毒组(图 4④A)细胞明显增多(表 1)。

2.3.3 5-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶核苷掺入检测法

与转染空病毒组(图 4④A)相比,转染 Syndecan-4

腺病毒组(图 4④B)的细胞内 EdU 阳性细胞数明显增多(表 1)。

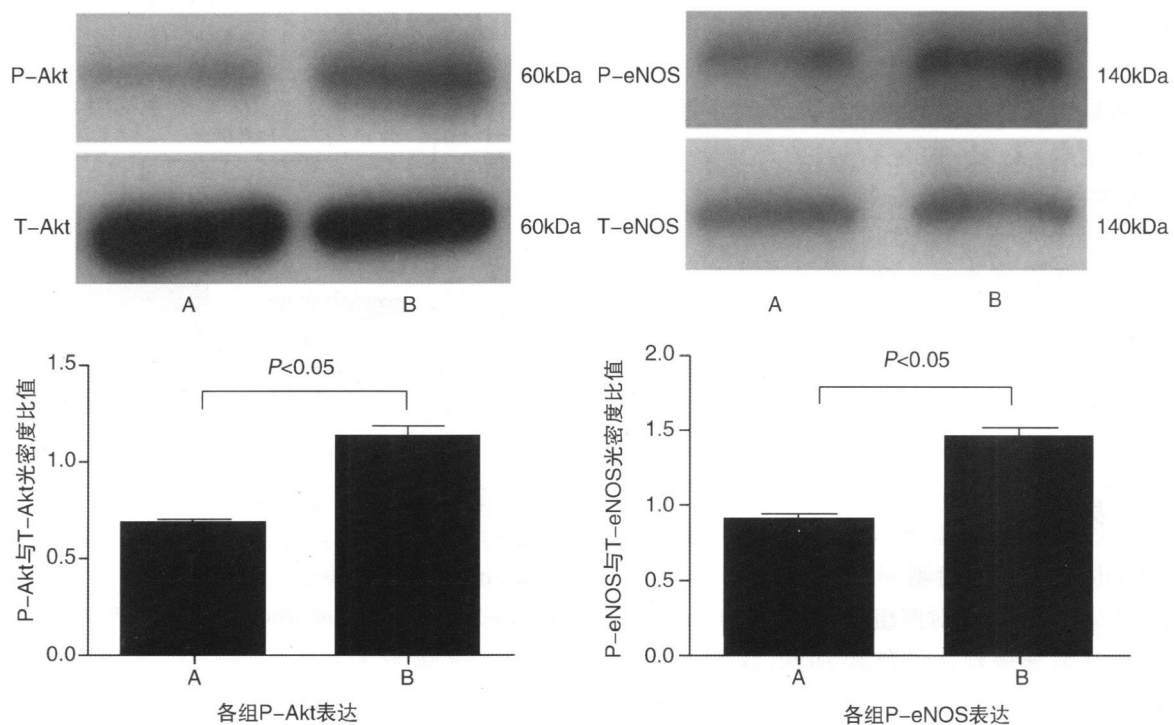


图 3. 各组 P-Akt P-eNOS 的表达情况 ($n=6$) A 为转染空病毒组(对照组), B 为转染 Syndecan-4 腺病毒组;其中 A 与 B 有统计学差异, $P < 0.05$ 。

Figure 3. Phosphorylation of Akt and eNOS of HUVECs ($n=6$)

3 讨论

本研究中,我们通过转染 Syndecan-4 基因促进 Syndecan-4 过表达,触发 Syndecan-4 的自身激活,并引起其下游信号通路活化,发现过表达的 Syndecan-4 组的 HUVECs 较对照组增殖明显活跃。

Syndecan-4 是多种促血管新生生长因子的受体,在配体介导的血管新生^[8]和创伤修复^[4]方面起重要作用。Syndecan-4 通过细胞外的硫酸肝素链非特异性地与促血管新生因子结合,如成纤维细胞生长因子^[8]、血小板源性生长因子^[9]和中期因子^[10]等,然后利用其羧基末端的 PDZ 绑定区激活下游信号因子^[5]。在本实验中,我们重组了 Syndecan-4 腺病毒,并将其转染至 HUVECs,使其 Syndecan-4 过表达,观察过表达的 Syndecan-4 能否激活下游信号并促进 HUVECs 的增殖。

为了独立地观察过表达 Syndecan-4 对 HUVECs 的影响,我们转染 Syndecan-4 腺病毒时并未加入任何生长因子添加剂。经 Western blotting 检测,发现

转染腺病毒组的细胞 Syndecan-4 蛋白表达量较转染空病毒组(对照组)明显升高,说明转染成功, Syndecan-4 得到了过表达。既往的文献报道 Syndecan-4 聚集是 Syndecan-4 被激活的关键环节^[5],我们用免疫染色法观察细胞表面 Syndecan-4 的聚集情况。我们观察到转染 Syndecan-4 腺病毒组细胞表现出红染加深,肯定了转染 Syndecan-4 腺病毒组细胞表达 Syndecan-4 增高;同时出现红染区积聚的现象,说明过表达的 Syndecan-4 可以引起不依赖配体的、自发的聚集, Syndecan-4 发生自发性的激活。

研究表明, Syndecan-4 聚集后可招募磷脂酰肌醇二磷酸 (phosphatidylinositol biphosphate, PIP_2) 和蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 至胞浆膜^[11],导致下游的蛋白激酶 $C\alpha$ (protein kinase $C\alpha$, $PKC\alpha$) 激活。 $PKC\alpha$ 可以直接^[12]或通过哺乳动物的雷帕霉素靶蛋白复合体 2 (mammalian target of rapamycin complex 2, mTORC2) 依赖的方式^[13]使 Akt 磷酸化。Akt 是内皮细胞激活的重要激酶^[14],通过启动一系列的信号通路来调节内皮细胞功能,如迁移、蛋白合成、

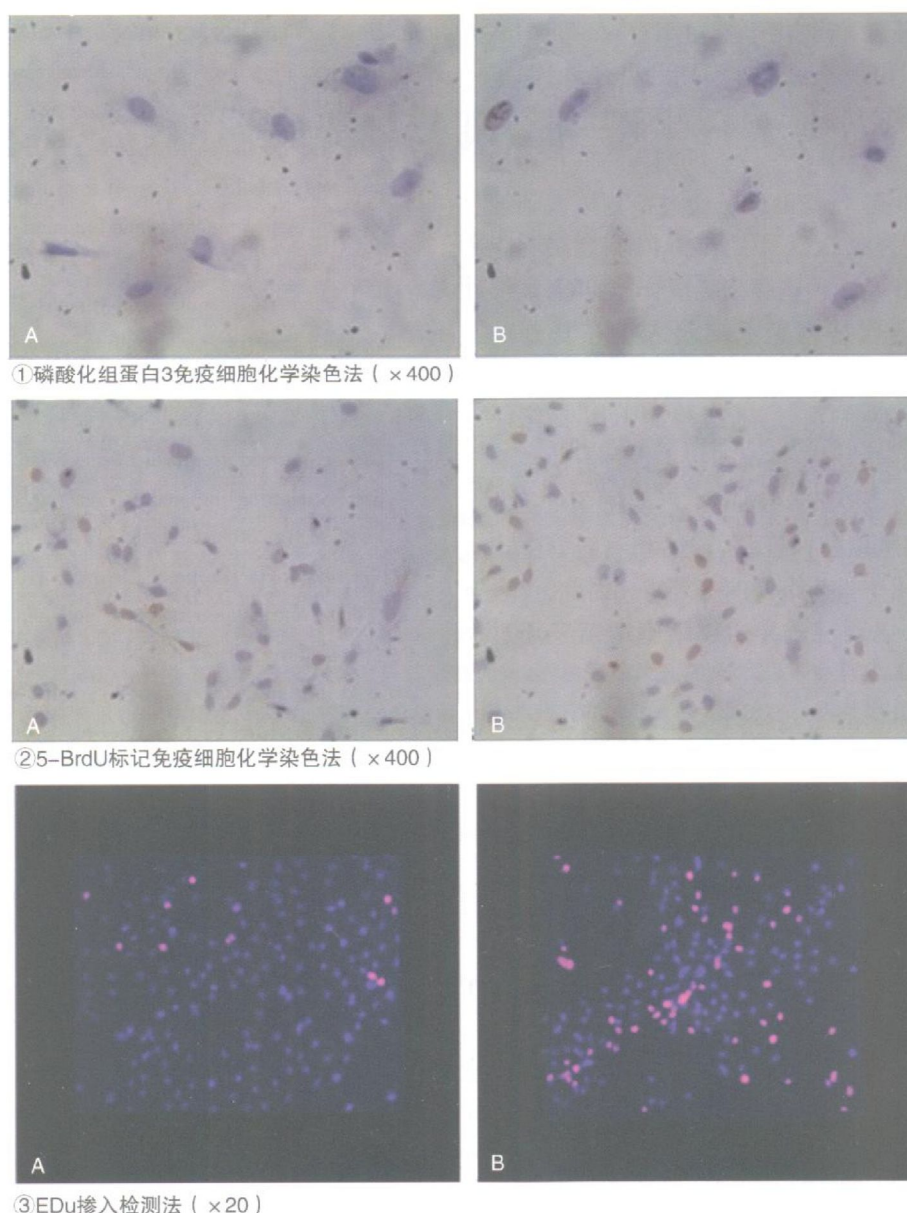


图 4. 3种方法检测 HUVEC增殖 为 HUVECs磷酸化组蛋白 3免疫细胞化学染色 (×400), 棕黄色代表有丝分裂的染色体; ④为 HUVECs 5-BrdU 标记免疫细胞化学染色 (×400), 棕黄色代表增殖的细胞核; ⑤为 HUVEC EdU 掺入检测增殖 (×20), 红色代表增殖的细胞核。A 为转染空病毒组, B 为转染 Syndecan-4腺病毒组。

Figure 4. Three methods for the proliferation of HUVEC

增殖等。作为 Akt 的重要下游分子, 内皮细胞氮氧化物合酶的激活可促进内皮细胞合成更多的 $\text{NO}^{[15]}$, 进而调节内皮细胞功能及其生长、凋亡, 并可通过磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) 依赖的途径诱导内皮细胞增殖^[16]。在本实验中, 我们通过 Akt 和 eNOS 的磷酸化水平来评价激酶的活化情况。我们发现, 转染 Syndecan-4 腺病毒组的细胞内 Akt 和 eNOS 的磷酸化水平较转染空病毒组明显提高, 说明过表达 Syndecan-4 可以使下游的 Akt 和 eNOS 激活。

实验中我们验证了过表达 Syndecan-4 促进 HU-

VECs 增殖的作用。目前主要有两类用于检测细胞增殖能力的方法。一类是直接的方法, 通过直接测定进行分裂的细胞数来评价细胞的增殖能力。另一类是间接的方法, 即细胞活力 (cell viability) 检测方法, 通过检测样品中健康细胞的数目来评价细胞的增殖能力, 如 MTT。但是间接法无法直接判断细胞增殖的情况, 且受到细胞凋亡、代谢水平的影响大, 检测可重复性差。故在本实验中我们选择直接法对分裂细胞进行计数。为减少单一实验所带来的误差, 我们选用了磷酸化组蛋白 3 免疫细胞化学染色法、5-BrdU 和 EdU 掺入检测法 3 种方法检测 HU-

VECs的增殖情况。磷酸化组蛋白 H3 (phospho-Histone H3, H3P) 只出现于有丝分裂期的染色体, 静止期细胞不表达, 我们用免疫染色法让磷酸化组蛋白 H3 染色, 这样就使处于有丝分裂的细胞与静止期细胞区分开来; 5-BrdU 免疫染色法通过检测掺入到细胞增殖过程中新合成 DNA 中的 5-BrdU 来反映细胞增殖的情况; EdU 是一种胸腺嘧啶核苷类似物, 能够在细胞增殖时期代替胸腺嘧啶掺入正在复制的 DNA 分子, 通过基于 EdU 与 Apollo 荧光染料的特异性反应检测 DNA 复制活性, 通过检测 EdU 标记便能准确地反映细胞的增殖情况。以上 3 种方法检测结果均证明了过表达 Syndecan-4 可促进 HUVECs 增殖。而内皮细胞增殖同迁移、成熟和毛细血管生成一样, 是血管新生中极为重要的一环^[17], 因此, 过表达 Syndecan-4 可以通过诱导内皮细胞增殖来促进血管新生。

综上所述, 本研究通过体外实验观察了过表达 Syndecan-4 促进人脐静脉内皮细胞 Syndecan-4 的自聚以及下游的 Akt 和 eNOS 激活, 并诱导内皮细胞增殖。当然, 过表达 Syndecan-4 促增殖、促血管新生的作用还需要在体实验的进一步证实, 并且其他机制也可能参与了 Syndecan-4 促增殖作用, 因此 Syndecan-4 的治疗效果走向临床还需要进行更多的研究。

[参考文献]

- [1] Alexopoulos AN, Muthaupf A, Couthman JR. Syndecans in wound healing inflammation and vascular biology [J]. *Int J Biochem Cell Biol* 2007, 39(3): 505-528
- [2] Tkachenko E, Rhodes JM, Simons M. Syndecans new kids on the signaling block [J]. *Circ Res* 2005, 96(5): 488-500
- [3] Fears CY, Woods A. The role of syndecans in disease and wound healing [J]. *Matrix Biol* 2006, 25(7): 443-456
- [4] Echemeyer F, Streit M, Wilcox-Adelman S, et al. Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4 [J]. *J Clin Invest* 2001, 107(2): R9-R14
- [5] Tkachenko E, Ellenbein A, Tirziu D, et al. Syndecan-4 clustering induces cell migration in a PDZ-dependent manner [J]. *Circ Res* 2006, 98(11): 1398-404
- [6] He TC, Zhou S, da Costa LT, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(5): 2509-514
- [7] Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, et al. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins Identification by morphologic and immunologic criteria [J]. *J Clin Invest* 1973, 52(11): 2745-756
- [8] Murakami M, Ellenbein A, Simons M. Non-canonical fibroblast growth factor signalling in angiogenesis [J]. *Cardiovasc Res* 2008, 78(2): 223-231
- [9] Kim J, Lee JH, Park HS, et al. Syndecan-4 regulates platelet-derived growth factor mediated MAP kinase activation by altering intracellular reactive oxygen species [J]. *FEBS Lett* 2008, 582(18): 2725-730
- [10] Takenaka H, Horiba M, Ishiguro H, et al. Milkine prevents ventricular remodeling and improves long-term survival after myocardial infarction [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009, 296(2): H462-469
- [11] Keum E, Kim Y, Kim J, et al. Syndecan-4 regulates localization, activity and stability of protein kinase C- α [J]. *Biochem J* 2004, 378(Pt 3): 1007-014
- [12] Partovian C, Simons M. Regulation of protein kinase B/Akt activity and Ser473 phosphorylation by protein kinase C- α in endothelial cells [J]. *Cell Signal* 2004, 16(8): 951-957
- [13] Partovian C, Ju R, Zhuang ZW, et al. Syndecan-4 regulates subcellular localization of mTOR complex 2 and Akt activation in a PKC α -dependent manner in endothelial cells [J]. *Mol Cell* 2008, 32(1): 140-149
- [14] 董莉, 刘莹, 沈宇, 等. 胰岛素对糖尿病小鼠缺血诱导的血管新生障碍的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18(9): 491-495
- [15] 姚康, 刘亚平, 徐标. 急性冠状动脉综合征患者血小板一氧化氮合酶活性及表达改变 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, 12(2): 209-211
- [16] Kawasaki K, Smith Jr RS, Hsieh CM, et al. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt pathway mediates nitric oxide-induced endothelial cell migration and angiogenesis [J]. *Mol Cell Biol* 2003, 23(16): 5726-737
- [17] Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases [J]. *Nature* 2000, 407(6801): 249-257

(此文编辑 曾学清)