

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2016)24-09-0924-05

人脐静脉内皮细胞损伤后迁移能力的变化与血管内皮钙黏蛋白和连环蛋白 p120 的关系

隋冰, 刘闰男, 何爱荣

(中国医科大学附属第一医院心血管内科, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 人脐静脉内皮细胞; 血管内皮钙黏蛋白; 连环蛋白 p120; 迁移

[摘要] 目的 初步探讨人脐静脉内皮细胞(HUVEC)损伤之后迁移能力的变化与血管内皮钙黏蛋白(VE-cad)和连环蛋白 p120(p120ctn)的关系。方法 DMEM 培养基培养 HUVEC, 将 HUVEC 分为对照组和损伤组。Transwell 实验检测 HUVEC 迁移能力的变化。Western blot 测定 p120ctn 与 VE-cad 蛋白表达水平。免疫荧光实验检测 VE-cad 的定位表达变化。免疫共沉淀法检测 p120ctn 与 VE-cad 的相互结合。结果 Transwell 实验发现 HUVEC 经损伤刺激 6、8 h 后迁移能力最强($P<0.05$)。Western blot 结果显示 HUVEC 损伤 6、8 h 后 p120ctn 及 VE-cad 表达水平明显上调。免疫荧光实验显示 HUVEC 经损伤刺激后, VE-cad 的定位由细胞膜转到细胞浆。免疫共沉淀证实 p120ctn 可以与 VE-cad 相互结合。结论 HUVEC 损伤刺激后迁移能力增强, 其机制可能与升高的 p120ctn 将 VE-cad 由细胞膜携带入细胞浆导致 VE-cad 膜表达缺失有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Change of Migration Ability of Human Umbilical Vein Endothelial Cell After Injury and Its Relationship with Vascular Endothelial Cadherin and p120 Catenin

SUI Bing, LIU Gui-Nan, and HE Ai-Rong

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning 110001, China)

[KEY WORDS] Human Umbilical Vein Endothelial Cell; Vascular Endothelial Cadherin; p120 Catenin; Migration

[ABSTRACT] **Aim** To explore preliminarily the change of migration ability of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) after injury and its relationship with vascular endothelial cadherin (VE-cad) and p120 catenin (p120ctn).

Methods HUVEC was cultured in MEM culture medium, and was divided into control group and injury group. The change of HUVEC migration ability was detected by Transwell experiment. Expression levels of P120ctn and VE-cad protein were determined by Western blot. Location expression change of VE-cad was detected by immunofluorescence assay. Mutual combination of P120ctn and VE-cad was detected by Co-immunoprecipitation.

Results Transwell experiment showed that the migration ability of HUVEC was the strongest in the 6 and 8 h after injury ($P<0.05$). Western blot results showed that p120ctn and VE-cad expression levels of HUVEC were significantly up-regulated in the 6 and 8 h after injury. Immunofluorescence assay showed that VE-cad was localized from cell membrane into cytoplasm after HUVEC was injured. Co-immunoprecipitation confirmed that P120ctn could be mutually combined with VE-cad.

Conclusion The migration ability of HUVEC is enhanced after injury stimulation, and its mechanism may be related to that elevated p120ctn carries VE-cad from cell membrane into cytoplasm, which leads to loss of VE-cad expression on the membrane.

冠心病作为心血管系统的常见病之一, 患病率逐年递增, 严重影响人们的健康及生活质量。目前

[收稿日期] 2015-07-19

[修回日期] 2015-12-25

[基金项目] 中国医科大学附属第一医院科学研究基金项目(fsh1502)

[作者简介] 隋冰, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化及血管再狭窄的机制及基因干预, E-mail 为 suibing100@sina.com。通讯作者刘闰男, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化及血管再狭窄的机制及基因干预, E-mail 为 guinlianliu@hotmail.com。何爱荣, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化及血管再狭窄的机制及基因干预, E-mail 为 791635123@qq.com。

冠状动脉血管重建技术已在临床广泛应用,经皮冠状动脉介入术(percutaneous coronary intervention, PCI)已成为治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病的重要手段,但也有造成医源性内皮细胞损伤所致血管炎症及术后再狭窄(restenosis, RS)的风险,严重影响患者预后^[1-2]。引起RS的原因及机制比较复杂,涉及到内皮细胞损伤、血栓形成、血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)增殖、血管重构及迁移等,包括损伤部位的局部炎症反应及各种细胞因子的释放^[3-4]。血管内皮钙黏蛋白(vascular endothelial cadherin, VE-cadherin, VE-cad)是内皮细胞黏附、连接的主要成分^[5];作为参与内皮细胞接合部的形成及调控的最基本的内皮细胞特异性钙黏蛋白,除了维持内皮细胞的完整性及调控接合部位的完整性外^[6],VE-cad还能调节多种信号转导过程来影响内皮细胞的行为和其他接合成分的表达,如增殖、迁移、极性及血管管腔的形成等^[7],并在这些活动的调节中起着至关重要的作用^[8]。连环蛋白p120(p120 catenin, p120ctn)被认为是钙黏蛋白复杂的黏附功能中重要的调控原件之一,在哺乳动物细胞中,p120ctn的核心功能是通过调节钙黏蛋白的膜转运及降解来影响细胞膜上的钙黏蛋白的转归^[9],其通过与钙黏蛋白结合,在细胞间黏附的稳定性上发挥着重要作用^[10]。有研究表明,p120ctn通过调节VE-cad和N-cad(神经钙黏蛋白)进而发挥调节VSMC及血管内皮细胞间的黏附作用^[9,11]。尽管VE-cad及p120ctn在参与及调控内皮细胞迁移过程中发挥着重要作用,但具体机制研究尚少。本课题意在初步探讨人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)损伤之后迁移能力的变化与VE-cad和p120ctn的关系。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

HUVEC购自上海细胞库,原代来自于ATCC细胞库,用含10%胎牛血清、pH 7.4的DMEM培养基,在37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。以0.25%胰酶消化、传代。传代后用含10%胎牛血清、pH 7.4的DMEM培养基维持细胞生长,两、三天换液1次。选取第3~8代细胞进行实验。

1.2 Western blot

将HUVEC分为对照组和损伤组。对照组用含10%胎牛血清、不含抗生素的DMEM培养;损伤组于缺氧(4 mmol/L 低亚硫酸钠)及无血清培养基分

别作用6、8 h。收集两组细胞,加入裂解液充分裂解,低温高速离心(4℃、12000 r/min)15 min,提取上清作为总蛋白,考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。8% SDS-PAGE凝胶电泳,上样蛋白量为60 μg。转印p120ctn、VE-cad、β-actin(220 mA、2 h)。5%脱脂牛奶封闭2 h。加抗p120ctn(1:1000, BD公司)、抗VE-cad(1:200, Cell Signal公司)、抗β-actin(1:1000, 中山金桥公司),4℃孵育过夜,分别与对应的二抗(1:2500, 中山金桥公司)25℃孵育2 h, ECL显色。结果经自动电泳凝胶成像分析仪(Chemi Imager 5500型, Alpha Innotech公司, 美国)测定。

1.3 免疫共沉淀

收集对照组、损伤组细胞,加入NP-40裂解液裂解细胞,低温高速离心(4℃、12000 r/min)15 min,提取上清即为总蛋白。分出适量上清作为Input(即原始蛋白样),余加入Protein A+G(即磁珠)和IgG,冰上孵育2 h,1000 r/min、5 min离心取上清,将上清分为IgG管和样品管;IgG管加入适量IgG,样品管加入适量p120ctn抗体,冰上摇过夜;分别加入适量Protein A+G,冰上摇过夜;1000 r/min、5 min离心取沉淀,加入适量2×loading buffer(加样缓冲液),沸水煮10 min,上清蛋白用Western blot检测。

1.4 免疫荧光检测

在24孔板中铺入细胞爬片,将HUVEC分为对照组及损伤组并接种于24孔板,37℃、5%CO₂孵箱中培养24 h。取出24孔板,吸尽培养基,4%多聚甲醛固定15 min, PBS洗3遍,每次5 min,0.1% Triton作用15 min, PBS洗3遍,每次5 min,正常山羊血清封闭,室温下保湿盒内孵育2 h;弃去血清,滴加一抗(VE-cad, 1:50),湿盒内4℃过夜;PBS洗3遍,每次5 min,避光加FITC(或TRITC)标记二抗(1:100),室温下湿盒内孵育2 h;PBS洗3遍,每次5 min,避光加DAPI染液复染核,室温下孵育5 min;PBS洗3次,每次5 min,将细胞爬片挑出,封片。Radiance 2000激光共聚焦显微镜(Carl Zeiss公司, 美国)进行共聚焦扫描成像。

1.5 Transwell 实验

按实验说明进行,用含2%胎牛血清的DMEM培养基重悬细胞,调整细胞浓度为5.0×10⁵个/毫升,取100 μL细胞悬液加入上室中(孔径8 μm; Costar公司, 美国),下室加入600 μL含20%胎牛血清的DMEM培养基。37℃、5%CO₂孵箱中培养24 h。24 h后吸尽培养基,将小室用PBS洗3遍,用棉签轻擦掉小室上表面的细胞;冰甲醇固定15 min,

PBS 洗 1~2 遍;苏木素染色 15 min, PBS 洗 1~2 遍; 1% 盐酸酒精分化;自然水返蓝 10 min;室温干燥,取下小室微孔膜,置载玻片上,中性树脂封片。随机选取 10 个视野于 400 倍光镜下观察,计数微膜孔下表面的细胞,重复 3 次,取均值。

1.6 统计分析

应用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析, Transwell 数据采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为存在统计学差异。

2 结果

2.1 损伤刺激后 HUVEC 迁移能力的变化

我们应用缺氧及无血清培养基作为损伤条件作用于 HUVEC, 连续培养 0、1、2、4、6、8、12、24 h, 通过 Transwell 检测发现 HUVEC 损伤 6、8 h 后迁移能力增强最明显 ($P < 0.05$; 图 1)。

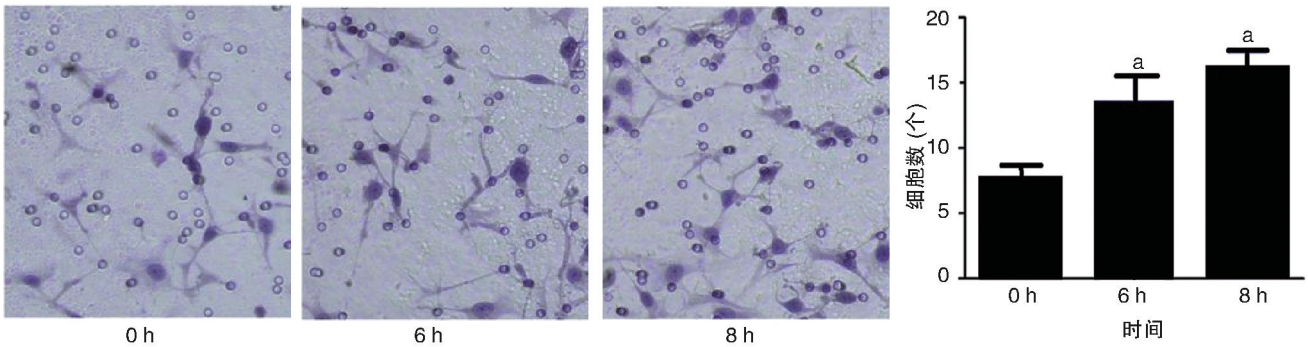


图 1. 损伤刺激 6、8 h 后 HUVEC 迁移的变化 (400×) a 为 $P < 0.05$, 与 0 h 时比较。

Figure 1. The changes of HUVEC migration in 6 and 8 h after injury stimulation (400×)

2.2 HUVEC 损伤后 p120ctn 与 VE-cad 蛋白表达水平的变化

用 Western blot 分别测定 HUVEC 损伤后 0、1、2、4、6、8、12、24 h p120ctn 与 VE-cad 的蛋白表达水平, 发现 HUVEC 损伤 6、8 h p120ctn 及 VE-cad 表达水平明显上调 (图 2), 此与 HUVEC 损伤后迁移能力增强的时间点相一致。

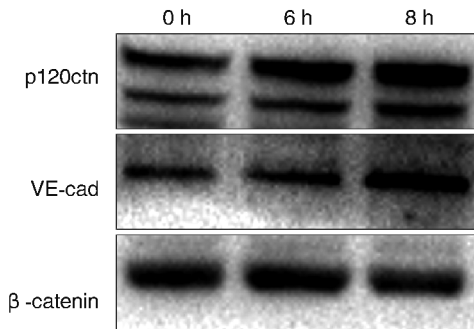


图 2. 损伤刺激对 HUVEC 中 p120 和 VE-cad 蛋白表达的影响

Figure 2. Effect of injury stimulation on p120 and VE-cad protein expressions in HUVEC

2.3 HUVEC 损伤后 VE-cad 的定位表达变化

上述结果证实, HUVEC 经损伤刺激后 VE-cad 的蛋白表达水平明显上调, 而细胞的迁移能力却出

现了增强, 这两种结果相互矛盾, 我们猜测, 很可能是增高的 VE-cad 的定位发生了改变从而导致了细胞迁移能力的增强, 于是, 我们通过免疫荧光结果检测到 VE-cad 在 HUVEC 损伤后由细胞膜转入细胞浆 (图 3)。

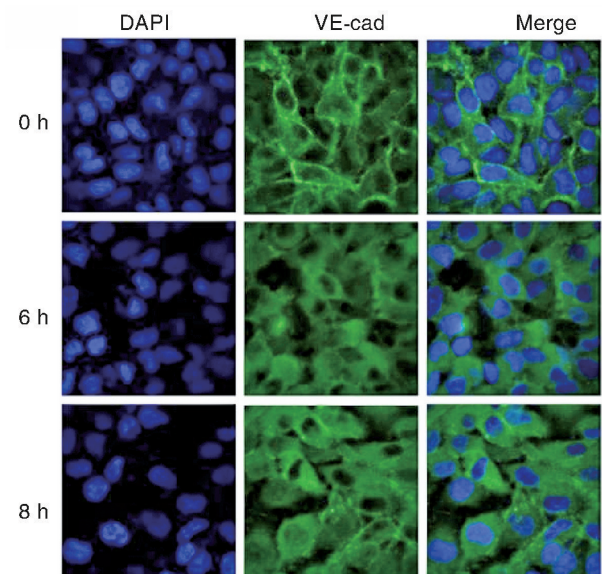


图 3. 损伤刺激 6、8 h 后 HUVEC VE-cad 的定位表达变化
Figure 3. Changes of VE-cad location expression in 6 and 8 h after injury stimulation in HUVEC

2.4 HUVEC 中 p120ctn 与 VE-cad 相互结合

我们已通过免疫荧光检测发现 HUVEC 经损伤刺激后 p120ctn 的定位由细胞膜转至细胞浆及细胞核,而上述实验结果证实,p120ctn 和 VE-cad 的蛋白水平在损伤的同一时间点出现高峰,且 VE-cad 由细胞膜转移到细胞浆,故我们猜测是升高的 p120ctn 将 VE-cad 转移到了细胞浆,于是,我们应用免疫共沉淀证实 p120ctn 可与 VE-cad 相互结合(图 4),因此我们猜测,HUVEC 损伤后 VE-cad 的定位发生变化可能是因其被 p120ctn 携带进入细胞浆。

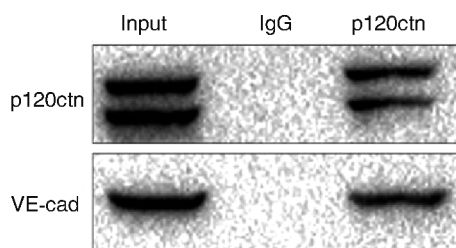


图 4. 免疫共沉淀证实 HUVEC 中 p120ctn 可以和 VE-cad 相互结合

Figure 4. Co-immunoprecipitation confirmed that p120ctn could be combined with VE-cad in HUVEC

3 讨论

目前 PCI 已成为治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病的重要手段,但 RS 的发生仍严重影响患者预后^[1]。RS 是一种病理生理机制尚未完全阐明的复杂疾病,许多研究已经证实多种危险因子在 RS 过程中起到了关键性作用^[12-13],包括 C 反应蛋白、炎症因子(如细胞因子和黏附分子)、氧自由基等。正常动脉壁由内膜、中膜、外膜 3 层构成,主要包含内皮细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞,其中内皮细胞的损伤及功能失调是 RS 发生的始动因素^[14]。

VE-cad 和 p120ctn 在参与及调控内皮细胞迁移过程中发挥着重要作用。内皮细胞本身参与血管生成,并在调控血管和灌溉组织的双向传输中形成了一道选择性半通透屏障,参与调节血管紧张性、细胞间黏附、平滑肌细胞的迁移和增殖、血管壁的炎症等^[15-16]。从分子角度来看,内皮细胞屏障功能主要依赖于内皮细胞间连接的结构,尤其是 VE-cad 起到了至关重要的作用^[6]。VE-cad 是内皮细胞黏附连接的主要成分^[5],作为参与内皮细胞接合部的形成及调控的最基本的内皮细胞特异性钙黏蛋白,除了维持内皮细胞的完整性及调控接合部位的完

整性外,VE-cad 还能调节多种信号转导过程来影响内皮细胞的行为和其他接合成分的表达,如增殖、迁移、极性及血管管腔的形成,参与调节血管通透性,并参与肿瘤的生长与转移等^[7,17-18]。

有研究表明,VE-cad 在细胞膜上呈高表达来维持细胞间的黏附及内皮细胞的完整性,VE-cad 可以与不同的伴侣结合形成独特的复合体^[17]。p120ctn 一直被认为是钙黏蛋白复杂的黏附功能中重要的调控原件之一,在哺乳动物细胞中,p120ctn 的核心功能是通过调节钙黏蛋白的膜转运及降解来影响细胞膜上的钙黏蛋白的转归^[9],并通过与钙黏蛋白结合,在细胞间黏附的稳定性上发挥着重要作用^[10,19]。而 VE-cad 通过其胞质结构域与 p120ctn 和 β -catenin 或斑珠蛋白结合形成了黏附连接的基本组织结构^[17]。已有研究证实,p120ctn 通过调节 VE-cad 和 N-cad 进而发挥调节 VSMC 及血管内皮细胞间的黏附作用^[11]。

在本实验中,我们首先应用缺氧及无血清培养基对 HUVEC 进行损伤刺激,连续培养 0、1、2、4、6、8、12、24 h,通过 Transwell 实验发现 HUVEC 损伤 6、8 h 后迁移能力最强,其余时间点迁移能力较弱。HUVEC 损伤后出现迁移能力增强的现象,可能与损伤 6、8 h 后内皮细胞间的黏附能力明显下降有关。VE-cad 是内皮细胞特异性钙黏蛋白,p120ctn 为稳定 VE-cad 的重要调控因子。曾有研究^[19]显示,因钙黏蛋白的减少,敲除 p120ctn 的人类细胞变得弥散,因此测定 HUVEC 损伤 6、8 h 后 VE-cad 和 p120ctn 的蛋白表达水平有助于我们了解其机制。应用 Western blot 检测发现 HUVEC 损伤 6、8 h 后 p120ctn 及 VE-cad 蛋白表达水平明显上调,理论上细胞的黏附性应增强,迁移能力应下降,但我们的实验结果却显示,在 p120ctn 和 VE-cad 升高的时间点,细胞的迁移能力出现了上调,正常情况下,内皮细胞的稳定性及黏附性与细胞膜上的黏附分子有关,考虑到蛋白的功能不仅与蛋白的表达量有关,并且与其定位密切相关。我们进一步应用免疫荧光技术来明确 VE-cad 在 HUVEC 损伤前后的定位变化,发现 HUVEC 损伤后 VE-cad 定位由细胞膜转至细胞浆,同时本研究小组已经证实,在 HUVEC 损伤后 p120ctn 定位亦发生变化,由细胞膜转至细胞浆和细胞核,于是我们猜测很可能是由于 VE-cad 与 p120ctn 相结合,升高的 p120ctn 携带 VE-cad 进入细胞浆,造成 VE-cad 膜表达的缺失,因此导致 HUVEC 的迁移能力增强。

目前,对血管内皮细胞迁移机制的研究尚少。

最新一项研究应用单分子膜制备的表面富含多种化学官能团的系统模型来探讨表面化学调节内皮细胞迁移的机制,并指出再内皮化绝大部分取决于植入物的表面性质^[20]。总之,研究血管内皮细胞迁移行为将有助于我们了解植入生物材料或损伤后细胞之间的行为变化,从而进一步揭示血管内皮细胞迁移的分子机制。

[参考文献]

- [1] Kiernan TJ, Kiernan GD, Yan BD. Coronary artery restenosis: a paradigm of current treatment approaches [J]. *Minerva Cardioangiol*, 2009, 57(1): 77-94.
- [2] Xu BY, Xiang MX, Wang JA. Endothelial progenitor cells and in-stent restenosis[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2015, 10(4): 364-371.
- [3] Marx SO, Totary-Jain H, Marks AR. Vascular smooth muscle cell proliferation in restenosis[J]. *Circ Cardiovasc Interv*, 2011, 4(1): 104-111.
- [4] Selvendiran K, Kuppusamy ML, Bratasz A, et al. Inhibition of vascular smooth-muscle cell proliferation and arterial restenosis by HO-3867, a novel synthetic curcuminoid, through up-regulation of PTEN expression [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, 329(3): 959-966.
- [5] Herwig MC, Müller KM, Müller AM. Endothelial VE-cadherin expression in human lungs [J]. *Pathol Res Pract*, 2008, 204(10): 725-730.
- [6] Gavard J. Endothelial permeability and VE-cadherin: a wacky comradeship [J]. *Cell Adh Migr*, 2013, 7(6): 455-461.
- [7] Dejana E, Vestweber D. The role of VE-cadherin in vascular morphogenesis and permeability control [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2013, 116: 119-144.
- [8] Bravi L, Dejana E, Lampugnani MG. VE-cadherin at a glance [J]. *Cell Tissue Res*, 2014, 355(3): 515-522.
- [9] Xiao K, Oas RG, Chiasson CM, et al. Role of p120-catenin in cadherin trafficking [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1773(1): 8-16.
- [10] Sakamoto N, Segawa K, Kanzaki M, et al. Role of p120-catenin in the morphological changes of endothelial cells exposed to fluid shear stress [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 398(3): 426-432.
- [11] Gentil-dit-Maurin A, Oun S, Almagro S, et al. Unraveling the distinct distributions of VE- and N-cadherins in endothelial cells: a key role for p120-catenin [J]. *Exp Cell Res*, 2010, 316(16): 2 587-599.
- [12] Jukema JW, Verschuren JJ, Ahmed TA, et al. Restenosis after PCI (Part 1): pathophysiology and risk factors [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2012, 9(1): 53-62.
- [13] Räber L, Kelbæk H, Ostojic M, et al. Effect of biolimus-eluting stents with biodegradable polymer vs bare-metal stents on cardiovascular events among patients with acute myocardial infarction: the COMFORTABLE AMI randomized trial [J]. *JAMA*, 2012, 308(8): 777-787.
- [14] Wang Y, Tang JF, Yang PL. Recovery of endothelium, a new policy of integrative Chinese and Western medicine in prevention and treatment of post-PCI restenosis [J]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, 2004, 24(10): 944-946.
- [15] Dejana E, Simionescu M, Wolburg H. Endothelial cell biology and pathology [J]. *Cell Tissue Res*, 2009, 335(1): 1-3.
- [16] Pate M, Damarla V, Chi DS, et al. Endothelial cell biology: role in the inflammatory response [J]. *Adv Clin Chem*, 2010, 52: 109-130.
- [17] Giannotta M, Trani M, Dejana E. VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity [J]. *Dev Cell*, 2013, 26(5): 441-454.
- [18] Hoelzle MK, Svitkina T. The cytoskeletal mechanisms of cell-cell junction formation in endothelial cells [J]. *Mol Bio Cell*, 2012, 23(2): 310-323.
- [19] Davis MA, Ireton RC, Reynolds AB. A core function for p120-catenin in cadherin turnover [J]. *J Cell Biol*, 2003, 163(3): 525-534.
- [20] Shen Y, Gao M, Ma Y, et al. Effect of surface chemistry on the integrin induced pathway in regulating vascular endothelial cells migration [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2015, 126: 188-197.

(此文编辑 曾学清)