

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2018)26-02-0122-05

磷酸化 p38 介导低切应力诱导的血管内皮细胞 Bmi-1 表达

兰祥星^{1,2}, 王汉琴², 操传斌¹, 张振建¹

(湖北医药学院附属随州医院 1. 心血管内科, 2. 转化医学研究中心, 湖北省随州市 441300)

[关键词] 血管内皮细胞; Bmi-1; 低切应力; p38 信号转导

[摘要] 目的 探讨低切应力(LSS)对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)中 Bmi-1 表达的影响及其可能的机制。方法 原代培养 HUVEC, 免疫荧光检测 Bmi-1 在细胞中的定位; 运用平行平板流动腔系统, 给 HUVEC 加载 0.5 Pa 低切应力 0.5 h、1 h、2 h 和 4 h, 以无切应力加载为对照组, 用实时定量 RT-PCR 检测 Bmi-1 mRNA 表达, 用 Western blot 检测 Bmi-1 蛋白表达, 利用 p38 特异性抑制剂 SB2219 探讨信号转导途径。结果 免疫荧光观察发现 Bmi-1 主要分布在 HUVEC 胞核中; HUVEC 在 LSS 作用 0.5 h 后 Bmi-1 表达即明显增强, 随着作用时间延长(1 h、2 h、4 h), Bmi-1 mRNA 及蛋白表达逐渐降低; 切应力能显著激活磷酸化 p38 表达; SB2219 可以明显抑制 Bmi-1 表达。结论 LSS 可诱导 HUVEC 中 Bmi-1 表达, 其表达量与刺激时间长短密切相关, 这种作用可能通过 p38 信号调节。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Phosphorylated p38 mediates the expression of Bmi-1 in vascular endothelial cells induced by low shear stress

LAN Xiang-Xing^{1,2}, WANG Han-Qin², CAO Chuan-Bin¹, ZHANG Zhen-Jian¹

(1. Cardiovascular Department, 2. Center for Translational Medicine Research, Suizhou Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Suizhou 441300, Hubei, China)

[KEY WORDS] Vascular endothelial cell; Bmi-1; Low shear stress; p38 signal transduction

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of low shear stress (LSS) on the expression of Bmi-1 in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and its possible mechanism. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells were cultured in vitro. Immunofluorescence was used to detect the localization of Bmi-1 in the cells. 0.5 h, 1 h, 2 h and 4 h were loaded into human umbilical vein endothelial cells by parallel plate flow chamber system. The expression of Bmi-1 mRNA was detected by real-time quantitative RT-PCR. The expression of Bmi-1 protein was detected by Western blot. Specific signal inhibitor SB2219 was used to investigate the signal transduction pathway. **Results** Immunofluorescence observation showed that Bmi-1 was mainly distributed in the nucleus of human umbilical vein endothelial cells. The expression of Bmi-1 was significantly increased after 0.5 h of LSS, the expression of Bmi-1 mRNA and protein decreased gradually with the prolongation of the time (1 h, 2 h and 4 h); the shear stress could significantly activate phosphorylated p38 expression; SB2219 could significantly inhibit the expression of Bmi-1. **Conclusion** LSS can induce the expression of Bmi-1 in human umbilical vein endothelial cells, the expression of Bmi-1 is closely related to the length of stimulation, this effect may be regulated by p38 signal.

力学环境的改变是许多常见的心血管疾病的诱发因素。切应力作为血流动力学的关键因素之一, 生理状态下具有维持血管生理稳态, 调节血管内皮细胞形态、结构和功能的作用。在生理状态下, 大动脉的血流切应力在 10~70 dyne/cm² 之间,

动脉粥样硬化容易发生在血管的分支和弯曲等部位, 这些部位的切应力发生了明显改变, 在这些区域, 切应力一般降低到 4 dyne/cm² 左右^[1]。Chiu 等^[2]证明低切应力(low shear stress, LSS)可以增加促动脉粥样硬化的基因和蛋白表达。显然, 低切应

[收稿日期] 2017-08-20

[修回日期] 2017-09-29

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31670961); 湖北省科技厅自然科学基金项目(2015CFB186)

[作者简介] 兰祥星, 硕士研究生, 研究方向为心血管病学, E-mail 为 lanxiangxing9003@163.com。通讯作者张振建, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管病学, E-mail 为 907606524@qq.com。

力在动脉粥样硬化的血管重建中发挥着重要作用。

Bmi-1 基因是多梳基因 (polycomb group genes, PcG) 家族中的重要成员之一, 是一种在体内广泛表达的核蛋白, 并直接参与细胞生长、增殖和衰老的调节^[3]。目前对 Bmi-1 基因研究多集中在肿瘤细胞, 其呈高度表达状态, 能促使肿瘤细胞的生长、增殖、侵袭等过程^[4]。前期我们利用原代培养人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC), 发现 Bmi-1 参与了 HUVEC 的衰老调节。本研究利用平行平板流动腔系统对 HUVEC 施加 5 dyne/cm² 的低切应力, 检测 Bmi-1 表达, 并采用特异性阻断剂, 探讨其可能的力学信号传导机制, 为切应力调控动脉粥样硬化血管重建提供力学生物学机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

酸性成纤维细胞生长因子、肝素和胸苷购自 Sigma 公司; 胎牛血清、M199 购自 Gibco 公司; Trizol 购自 Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒购自 Promega 公司; SYBR-Green supermix 购于 Bio-Rad 公司; Dylight594 荧光二抗购于 EARTHON 公司; Bmi-1 抗体购于 Cell Signaling 公司; 兔来源的 p38 和磷酸化 p38 (p-p38) 抗体购于 CST 公司; GAPDH 抗体购于碧云天; 碱性磷酸酶标记的山羊抗兔 IgG 和马抗小鼠 IgG 购于北京鼎国昌盛; 抑制剂 SB2219 购于 Sigma 公司; 其他生化试剂均为进口分装或国产分析纯。所用引物由生工生物工程 (上海) 有限公司合成。二氧化碳培养箱为 Thermo 产品; 倒置相差显微镜为 Olympus 产品; 高速冷冻离心机为 Eppendorf 产品; 荧光定量 PCR 仪购于 Bio-Rad 公司。平行平板流动腔加载装置由上海泉众机电科技有限公司提供。

1.2 HUVEC 的分离与培养

取新鲜新生儿脐带 (湖北医药学院附属随州医院产科提供), 根据脐带解剖结构找到脐静脉后用 0.125% 胰酶消化, 胰酶充分与内皮细胞接触, 持续消化 10 min, 用完全培养基终止消化, 低速离心机离心细胞悬液后, 再将悬浮液接种于用 4% 多聚赖氨酸包被的培养瓶中, 细胞培养液含 20% 胎牛血清, 终浓度为 4 μg/L 酸性成纤维细胞生长因子 (acid fibroblast growth factor, aFGF) 的 M199 培养基混合液, 1~2 天左右换液 1 次, 大约 1 周长至汇合状态。

1.3 HUVEC 的传代培养

待 HUVEC 生长汇合成单层后, 弃去培养液, 加入 0.125% 胰酶消化 1~2 min, 在倒置显微镜下观

察, 当细胞回缩变圆后弃去消化液, 加入适量 M199 完全培养液终止消化。枪头轻柔吹打, 制成细胞悬浮液, 按 1:2 比例将细胞悬浮液均匀地接种于培养皿中, 置于 5% CO₂、37℃ 培养箱中继续培养, 选取第 2~6 代细胞用于实验。

1.4 血管内皮细胞低切应力加载

流动腔流道高度 0.03 cm、宽度 2.4 cm。细胞沿中轴方向种植于以 7.5 cm×2.4 cm×0.01 cm (长×宽×高) 经过 0.1 g/L 多聚赖氨酸包被的玻璃载玻片上。待载玻片上的 HUVEC 达到 85% 以上汇合后, 置于平行平板流动腔中接受低切应力。采用 $\tau = 6 \mu Q / wh^2$ 计算低切应力强度。公式中 τ 为壁面低切应力 (Pa), Q 为流量 (cm³/s), μ 为液体黏度 (Pa·s), w 和 h 分别为流动腔的宽和高 (cm)。其中, w 和 h 恒定, 全部实验灌流液用含 1% FBS 的 M199, $\mu = 0.828 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ 。因此, 可以通过调节恒流泵大小改变 Q 值, 调整低切应力强度, 以至到达实验所需的低切应力。

以无低切应力作用细胞为静止对照组, 低切应力作用细胞为受力实验组。第一步, 用 0.5 Pa 切应力处理细胞, 作用时间分别为 0.5 h、1 h、2 h 和 4 h, 观察 Bmi-1 基因表达情况; 再用 0.5 Pa 切应力刺激 HUVEC 0.5 h, 观察特异性信号通路阻断剂 SB2219 对 Bmi-1 基因表达的影响。实验分组: ① 静止对照组 (static 组), 预先用 DMSO 处理 HUVEC 20 min; ② 低切应力对照组 (LSS 组), 预先用 DMSO 处理 HUVEC 20 min 后行低切应力处理; ③ LSS+SB2219 组, 预先用 10 mmol/L SB2219 处理 HUVEC 20 min 后行低切应力处理。除静止对照组外, 其余各组均施加 0.5 Pa 切应力, 作用时间均为 0.5 h。

1.5 免疫荧光检测

取出长满单层 HUVEC 的载玻片, 用 4% 多聚甲醛固定 20 min, 0.1 mol/L PBS 清洗; 浸泡于 0.1% Triton-X, 37℃、20 min, 0.1 mol/L PBS 清洗; 冷浸于 0.1% NaBH₄ 溶液中 30 min, 0.1 mol/L PBS 清洗; 用 5% BSA 孵育 1 h; 弃去封闭液, 孵育一抗 (兔来源 Bmi-1, 稀释比例 1:800), 4℃ 过夜, 0.1 mol/L PBS 清洗; 孵育二抗 (山羊抗兔 dylight-594, 稀释比例 1:800), 常温 3 h, 0.1 mol/L PBS 清洗; 用 DAPI 染核, 10 min, 0.1 mol/L PBS 清洗; 荧光倒置相差显微镜下观察。

1.6 逆转录和实时定量 PCR 检测

用适当体积的 Trizol 裂解各组 HUVEC, 加氯仿静置 2~3 min, 4℃、12000 g/min 离心 15 min 后, 将上层水相移至新管, 加异丙醇室温静置 10 min 后 12000 g/min 离心 10 min, 用 75% 冰乙醇洗 1 次后

7500 g/min 离心 5 min, 用适量 DEPC 处理过的水溶解后酶标仪测浓度。逆转录试剂盒逆转录 cDNA, 以逆转录的 cDNA 为模板进行 real-time PCR 检测, 以 GAPDH 为内参来调整模板的浓度。Bmi-1 上游引物为 5'-GCA GCT CAT CCT TCT GCT GAT-3', 下游引物为 5'-CAT CTG CAA CCT CTC CTC TAT CTT C-3'; GAPDH 上游引物为 5'-ATG GAA ATC CCA TCA CCA TCT T-3', 下游引物为 5'-CGC CCC ACT TGA TTT TGG-3'。每个样品设 3 个复孔, 反应总体积 20 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C、5 min, 95 $^{\circ}$ C、30 s, 58 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、30 s, 30 个循环。实验重复 3 次。然后进行数据分析, 各目的基因表达水平的变异用变化倍率($2^{-\Delta\Delta Ct}$)来表示。

1.7 Western blot 检测

收集各组 HUVEC, 用冰 PBS 洗 3 次后, 加入适量含有蛋白酶抑制剂的蛋白上样缓冲液冰上处理 5 min, 超声仪 0.5% 超声, 变性 25 min。用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 蛋白上样量 20 μ L。转膜

后用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 分别加兔抗 Bmi-1、p38 和 p-p38 (1 : 800), 4 $^{\circ}$ C 于湿盒中反应过夜; 二抗为碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG (1 : 800) 室温反应 2 h, TBST 洗后加 NBT/BCIP 显色液膜上显色, 检测蛋白表达量的差异。管家基因 GAPDH 作为内参。

1.8 统计学分析

每次实验独立重复 3 次, 各组实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组数据间比较采用 *t* 检验, 多组数据间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Bmi-1 在 HUVEC 中的定位

将 HUVEC 接种于 6 孔板内, 待细胞密度约 60%~70% 时, 采用细胞免疫荧光技术, 先孵育一抗, 再孵育 dylight-594 标记的二抗, DAPI 复染细胞核, 置于倒置荧光显微镜下, 可以观察到 Bmi-1 主要分布在细胞核中(图 1)。

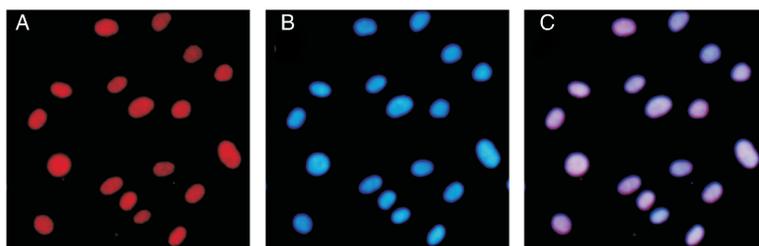


图 1. 免疫荧光检测 Bmi-1 在人脐静脉内皮细胞中的定位(200 \times) A 红色荧光为 Bmi-1 染色阳性区, B 蓝色荧光为 DAPI 细胞核染色区域, 红紫色为 A 和 B 叠加。

Figure 1. Subcellular localization of Bmi-1 in HUVEC(200 \times)

2.2 0.5 Pa 切应力刺激对 HUVEC 中 Bmi-1 表达的影响

将长满细胞的载玻片移入平行平板流动室内, 以 0.5 Pa 切应力分别刺激 HUVEC 0.5 h、1 h、2 h 和 4 h, 以无切应力为静止对照组。real-time PCR 和

Western blot 结果显示, 与静止对照组比较, HUVEC 在低切应力作用 0.5 h 后, Bmi-1 mRNA 和蛋白表达显著增强 ($P < 0.05$), 而且随着刺激时间的延长, Bmi-1 基因的表达降低(图 2)。

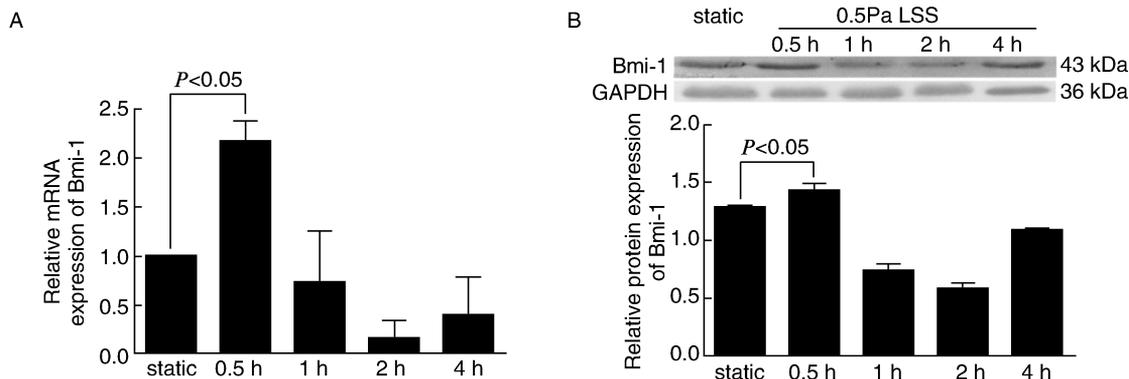
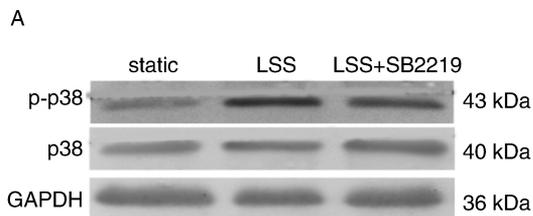


图 2. 0.5 Pa 切应力刺激对 Bmi-1 表达的影响($n=3$)

Figure 2. Effect of 0.5 Pa shear stress on Bmi-1 expression($n=3$)

2.3 0.5 Pa 切应力对 p38 活性的影响

Western blot 结果显示,与 LSS 组相比,LSS + SB2219 组 HUVEC 磷酸化 p38 条带颜色明显变浅,灰度扫描经软件分析是 LSS 组的 0.05 倍,差异显著 ($P < 0.05$; 图 3)。



2.4 SB2219 抑制低切应力诱导的 Bmi-1 表达

real-time PCR 和 Western blot 结果显示,与静止对照组比较,LSS 组 Bmi-1 的表达显著增高;与 LSS 组比较,LSS+SB2219 组 Bmi-1 的表达降低 ($P < 0.05$; 图 4)。

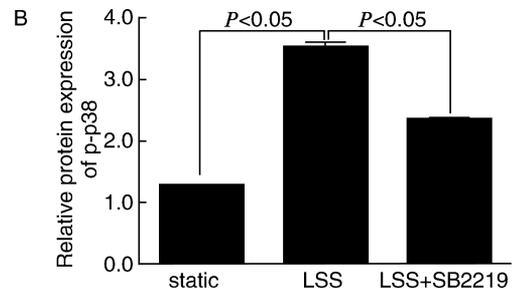


图 3. 0.5 Pa 切应力对 p38 活性的影响 ($n = 3$) a 为 $P < 0.05$,与静止对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与 LSS 组比较。

Figure 3. Effect of low shear stress on p38 activity ($n = 3$)

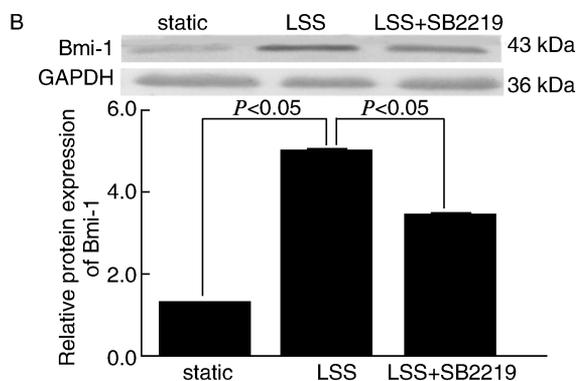
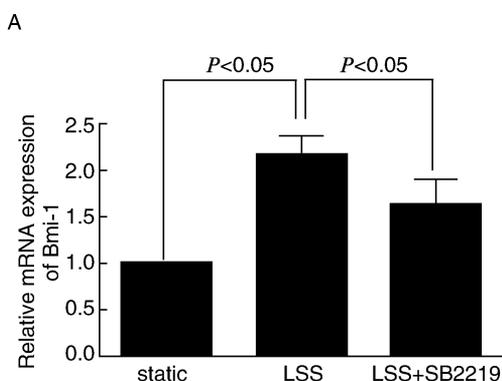


图 4. SB2219 抑制低切应力诱导的 Bmi-1 表达 ($n = 3$)

Figure 4. SB2219 inhibites low shear stress-induced Bmi-1 expression ($n = 3$)

3 讨论

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是一类严重威胁人类生命的重大疾病,是一种由机体对损伤所诱发的炎症反应。研究表明,力学因素对 As 局灶性病变起着重要作用,其中血液流动对内皮产生的切应力是关键性的因素之一^[5]。As 病灶发生位置具有一定的选择性,易出现于血管分支开口处、血管叉外侧壁、弯曲血管内侧壁等处,此处切应力作用发生明显变化^[1-2]。研究证实,可以引起细胞骨架重构^[6],导致血管内膜增生及内皮屏障功能损害,使血液中的脂质等物质更容易通过内皮,促成 As 形成^[7],说明低切应力与 As 的形成密切相关。

原癌基因 Bmi-1 在肿瘤发生、发展及临床预后等方面起着至关重要的作用^[8-9]。目前对 Bmi-1 的研究多集中于肿瘤细胞^[4,10],但对于正常组织和细

胞的研究比较少,前期实验我们发现在 HUVEC 中 Bmi-1 基因对细胞的衰老等有一定的调节作用^[11]。我们推断,低切应力、Bmi-1 基因及内皮细胞之间可能存在着一定的联系,切应力刺激有可能通过改变内皮细胞 Bmi-1 活性,从而对内皮细胞功能产生一定的影响。

本研究先采用细胞免疫荧光技术对目的基因 Bmi-1 进行细胞内定位检测,观察到 Bmi-1 主要分布在内皮细胞胞核中。Xie 等^[3]关于 Bmi-1 基因抗衰老的研究表明,Bmi-1 基因的细胞内定位主要分布于细胞核,本研究结果与其一致。提示 Bmi-1 基因可能通过影响细胞核的功能从而发挥其生物学作用。

本研究利用平行平板流动腔,建立 0.5 Pa 低切应力细胞加载系统,对 HUVEC 作用不同时间观察 Bmi-1 基因的表达情况。结果表明低切应力作用

0.5 h后, Bmi-1 mRNA 和蛋白呈现高表达, 随着时间(1 h、2 h、4 h)的推移, Bmi-1 表达降低, 说明 Bmi-1 表达量与刺激时间是密切相关的。

丝裂素活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)介导的信号转导通路是生物学信号引起细胞核反应的重要通路^[12], 主要包括应激活化蛋白激酶(JNK/SAPK)、细胞外调节激酶(ERK1/2)和 p38 MAPK 等成员, 其中, p38 MAPK 通路对 HUVEC 损伤密切相关^[13], 并且是细胞内炎症反应^[14]的主要通路之一, 从而参与 As 发生与发展。本研究发现, 低切应力刺激可激活 HUVEC 中 p38 MAPK 通路, 加入特异性抑制剂 SB2219 后 p-p38 被抑制, 同时 Bmi-1 mRNA 和蛋白表达明显降低, 说明低切应力可能通过激活 p38 MAPK 来调控 Bmi-1 表达。当然, 低切应力诱导下的 Bmi-1 基因表达相关功能的研究是我们后续将探讨的内容。

综上所述, 本研究利用平行平板流动腔系统对 HUVEC 加载低切应力, 可诱导 Bmi-1 mRNA 和蛋白的表达, 其表达量与刺激时间密切相关, 其中 p38 MAPK 信号分子参与调节这一过程。本研究为切应力调控 As 血管重建提供力学生物学机制。

[参考文献]

- [1] 唐植辉, 汪南平, 钱煦. 血流剪切力在动脉粥样硬化形成中的作用[J]. 生理科学进展, 2007, 38(1): 37-42.
- [2] Chiu JJ, Usami S, Chien S. Vascular endothelial responses to altered shear stress: pathologic implications for atherosclerosis[J]. *Ann Med*, 2009, 41(1): 19-28.
- [3] Xie C, Jin J, Lv X, et al. Anti-aging effect of transplanted amniotic membrane mesenchymal stem cells in a premature aging model of Bmi-1 deficiency[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 13975.
- [4] Zhang Z, Bu X, Chen H, et al. Bmi-1 promotes the invasion and migration of colon cancer stem cells through the downregulation of E-cadherin[J]. *Int J Mol Med*, 2016, 38(4): 1 199-207.
- [5] Winkel LC, Hoogendoorn A, Xing R, et al. Animal models of surgically manipulated flow velocities to study shear stress-induced atherosclerosis[J]. *Atherosclerosis*, 2015, 241(1): 100-110.
- [6] 马英英, 王璐, 包晗, 等. microRNA-133b 在低切应力诱导血管内皮细胞影响血管平滑肌细胞增殖中的作用[J]. *医用生物力学*, 2016, 31(5): 408-415.
- [7] Lehoux S, Jones EA. Shear stress, arterial identity and atherosclerosis[J]. *Thromb Haemost*, 2016, 115(3): 467-473.
- [8] Bansal N, Bartucci M, Yusuff S, et al. BMI-1 targeting interferes with patient-derived tumor-initiating cell survival and tumor growth in prostate cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(24): 6 176-191.
- [9] Zhang X, Guo W, Wang X, et al. Antitumor activity and inhibitory effects on cancer stem cell-like properties of Adeno-associated virus (AAV)-mediated Bmi-1 interference driven by Bmi-1 promoter for gastric cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(16): 22 733-745.
- [10] Yi C, Li BB, Zhou CX. Bmi-1 expression predicts prognosis in salivary adenoid cystic carcinoma and correlates with epithelial-mesenchymal transition-related factors[J]. *Ann Diagn Pathol*, 2016, 22: 38-44.
- [11] 王燕, 孙晓东, 王珺, 等. Bmi-1 基因表达与血管内皮细胞衰老的相关性[J]. *湖北医药学院学报*, 2014, 33(4): 318-320.
- [12] Uimari O, Rahmioglu N, Nyholt DR, et al. Genome-wide genetic analyses highlight mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling in the pathogenesis of endometriosis[J]. *Hum Reprod*, 2017, 32(4): 780-793.
- [13] 孙慧琳, 黄志秋, 曾海龙, 等. p38MAPK-eNOS-NO 信号通路在人脐静脉内皮细胞凋亡中的保护作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(6): 561-565.
- [14] 陆邦超, 邹大进. p38MAPK 信号通路在雨蛙素诱导的胰腺 AR42J 细胞炎症反应中的作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2011, 27(9): 1 832-835.

(此文编辑 文玉珊)