

Bmi1 在低切应力抑制血管内皮细胞迁移中的作用

张炎林^{1,2}, 兰祥星¹, 刘睿², 王汉琴^{1,2}

(1. 湖北医药学院 附属随州医院, 转化医学研究中心, 湖北 随州 441300; 2. 湖北医药学院 基础医学院, 湖北 十堰 442000)

摘要:目的 探讨低切应力刺激对血管内皮细胞 Bmi1 表达的影响及其在迁移中的作用。方法 体外原代培养人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs),运用平行平板流动腔系统给 HUVECs 加载正常切应力(1.5 Pa)和低切应力(0.5 Pa) 12 h,用实时定量 PCR 法和免疫印迹法检测 Bmi1 mRNA 和蛋白表达水平,用细胞划痕实验检测细胞迁移能力,利用特异性小干扰 RNA(siRNA)转染技术沉默 Bmi1 基因。结果 HUVECs 受力 12 h 后,与 1.5 Pa 切应力组相比,0.5 Pa 低切应力能显著上调 Bmi1 表达,同时抑制细胞迁移。siRNA 敲低 Bmi1 表达后,减弱了低切应力对 HUVECs 迁移的抑制作用。结论 低切应力对 HUVECs 迁移的抑制作用可能是通过上调 Bmi1 蛋白的表达实现。Bmi1 表达沉默后可逆转低切应力对 HUVECs 迁移的抑制。

关键词:切应力; 内皮细胞; 细胞迁移

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2019.05.013

The Role of Bmi1 on Migration of HUVECs under Low Shear Stress

ZHANG Yanlin^{1,2}, LAN Xiangxing¹, LIU Rui², WANG Hanqin^{1,2}

(1. Center for Translational Medicine, Suizhou Hospital, Hubei University of Medicine, Suizhou 441300, Hubei, China; 2. College of Basic Medicine, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei, China)

Abstract: Objective To investigate the role of Bmi1 on the migration of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in response to low shear stress. **Methods** A parallel plate flow chamber system was used to generate low (0.5 Pa) or normal (1.5 Pa) laminar shear stress. HUVECs were isolated, cultured and exposed to flow for 12 hours. The mRNA and protein levels of Bmi1 were analyzed by real-time PCR and Western blot, respectively. Meanwhile, wound healing assay was performed to determine the migration of HUVECs. Bmi1 specific small interference RNA (siRNA) was used to silence Bmi1 gene. **Results** Low shear stress (0.5 Pa) significantly inhibited migration of HUVECs compared with normal shear stress (1.5 Pa). Similarly, compared with HUVECs exposed to normal shear stress, the expression of Bmi1 significantly increased in HUVECs exposed to low shear stress. Small interfering RNA knockdown of Bmi1 attenuated low shear stress-induced inhibition of HUVECs migration. **Conclusions** Low shear stress may inhibit the migration of HUVECs through up-regulation of Bmi1 expression. Knockdown of Bmi1 may reverse the HUVECs migration inhibited by low shear stress.

Key words: shear stress; endothelial cells; cell migration

血流低切应力是导致动脉粥样硬化等动脉疾病发生的危险因素之一^[1]。内皮细胞迁移伴随在血管发育、血管新生以及血管内膜损伤修复等过程中,是动脉粥样硬化斑块形成进展中的重要事件^[2]。切应力对血管内皮细胞迁移调节的相关机制有很多,例如:信号途径的调节、基因表达的调节、细胞骨架的重排、黏附分子表达等^[3]。因此,深入探讨应力环境下内皮细胞迁移的调控机制,对阐明与血管相关的生理、病理过程有重要意义。

原癌基因 Bmi1 是多梳基因 (polycomb group genes, PcG) 家族中的核心成员之一,是一种在体内广泛表达的核蛋白。Bmi1 在干细胞和肿瘤细胞中呈高度表达状态,参与干细胞的自我更新及肿瘤细胞的生长、增殖、侵袭的调节^[4]。研究发现,Bmi1 通过黏附分子 E-cadherin 调节肿瘤干细胞的迁移和侵袭^[5];miR-495 通过 Bmi1 调节脐带间充质干细胞的衰老和迁移^[6];Bmi1 表达上调在微血管内皮细胞迁移及管样形成能力中起作用^[7]。前期本课题组已证实,切应力可以调节血管内皮细胞 Bmi1 表达^[8],但尚不清楚 Bmi1 是否参与切应力条件下血管内皮细胞迁移行为。本实验在前期工作基础上,利用原代培养人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs),对 HUVECs 施加正常层流切应力 (1.5 Pa) 和低切应力 (0.5 Pa) 刺激,检测细胞迁移能力变化及 Bmi1 表达变化,为低切应力血管重建提供新的力学生物学思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

胎牛血清、M199 (Gibco 公司,美国);EGM™-2 内皮细胞生长培养基 (Lonza 公司,瑞士);Trizol (Invitrogen 公司,美国);逆转录试剂盒 (Promega 公司,美国);SYBR-Greensupermix (Bio-rad 公司,美国)。Bmi1 抗体 (Cell Signaling 公司,美国);GAPDH 抗体 (上海 Beyotime 公司);碱性磷酸酶标记的山羊抗兔 IgG 和马抗小鼠 IgG (北京鼎国昌盛生物技术有限公司);Lipofectamine™ 3000 (Invitrogen 公司,美国)。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。CO₂ 培养箱 (Thermo 公司,美国);倒置相差显微镜 (Olympus 公司,日本) 产品;高

速冷冻离心机 (Eppendorf 公司,德国);酶标仪 (Bio Tek 公司,美国);荧光定量 PCR 仪 (Bio-rad 公司,美国);平行平板流动腔加载装置 (上海泉众机电科技有限公司)。

1.2 HUVECs 的培养及传代

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,注意让胰酶充分与血管内皮层接触,持续消化 10 min,用含血清的培养基终止消化,低速离心细胞悬液,再将悬浮液接种在用 0.1 mg/mL 多聚赖氨酸包被的培养瓶中,EGM™-2 内皮细胞生长培养基培养,置于 5% CO₂、37 °C 培养箱中继续培养,24 h 后换液,大约 7 d 长至融合状态。待 HUVECs 融合成单层后,按 1:2 比例传代,将细胞接种于培养皿中,免疫荧光 VIII 鉴定,2~4 代用于实验。每次实验前,细胞先用 1% 的低血清 M199 同步处理 4~6 h。

1.3 流体切应力加载

平行平板流动腔系统用于流体切应力加载。该系统包括蠕动泵、储液瓶、管道及流室。流室流道高度 0.03 cm、宽度 2.4 cm。细胞沿中轴方向种植于 7.6 cm × 2.4 cm × 0.1 cm (长 × 宽 × 高) 经过 0.1 mg/mL 多聚赖氨酸包被的玻璃载玻片上。通过此装置,细胞可接受到稳定的层流切应力刺激。灌流液为 1% 低血清 M199,采用 $\tau = 6\mu Q / (wh)^2$ 计算切应力强度。本实验通过调节恒流泵大小改变 Q 值,调整切应力强度以达到实验所需值。实验分两个组,正常切应力 (1.5 Pa) 组 and 低切应力 (0.5 Pa) 组,切应力加载时间均为 12 h。

1.4 蛋白印迹 (Western blot) 检测

收集各组 HUVECs,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 左右,超声仪 0.5% 超声,变性 25 min。用 10% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,蛋白上样量 20 μL。转膜后用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,加兔抗 Bmi1 抗体,4 °C 于湿盒中反应过夜;II 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。

1.5 逆转录和实时定量 PCR (Real-time PCR)

用适当体积的 Trizol 裂解各组 HUVECs,加氯仿静置 2~3 min,4 °C,12 000 g/min 离心 15 min

后,将上层水相移至新管,加异丙醇静置 10 min 后 12 000 g/min 离心 10 min,用 75% 冰乙醇洗 1 次后 7 500 g/min 离心 5 min,用适量 DEPC 处理过的水溶解后酶标仪测浓度。Promega 公司的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 作为内参来调整模板的浓度。Bmi1 上游引物:5'-GCAGCTCATCTTCT-GCTGAT-3',下游引物:5'-CATCTGCAACCTCTCCTCTATCTTC-3';GAPDH 上游引物:5'-ATGGAAATCCCATCACCATCTT-3',下游引物:5'-CGCCCACTTGATTTTGG-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。

1.6 细胞划痕实验

当载玻片上的 HUVECs 已有 80% 融合,用无菌 10 μ L 加样枪头垂直于流体方向划一直线,形成一个细胞“裸露”区域,经预热的 M199 洗净刮掉的细胞后,按实验分组加载切应力,分别在 0、12 h 时间点,在倒置显微镜下采集图像,通过 Photoshop 软件在细胞划痕(或迁移)的边缘画线标记后,测定各组细胞“裸露”区域的面积,测量划痕面积,细胞迁移用划痕愈合指数来反映,计算公式为:

$$\text{划痕愈合指数} = (\text{0 h 划痕面积} - \text{12 h 后划痕面积}) / \text{0 h 划痕面积}^{[9]}$$

1.7 siRNA 干扰实验

依据 Gen Bank 中人 Bmi1 基因全长 cDNA 序列,委托广州锐博生物科技有限公司设计合成特异性靶向 Bmi1 基因的 siRNA 片段。待 HUVECs 生长融合至 80% 时,用 LipofectamineTM 3000 介导 siRNA 转染,实验方法按说明书进行。转染 24 h 后,提取各组总蛋白进行 Western blot 检测。阴性对照干扰 RNA(control siRNA, siCTL) 序列正义链:5'-UUCUC-CGAACGUGUC ACGUTT-3',反义链:5'-ACGUGA-CACGUUCGGAGAATT-3'。筛选出最佳 siBmi1 序列正义链:5'-GCGTAACCAATCTTC TT-3',反义链:5'-GAAGAUUGGUGGUACCGC-3'。

1.8 统计学处理

所有实验至少独立重复 3 次,各组实验数据以均数 \pm 标准差表示,两组数据间的差异采用 *t* 检验。

$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义, $P < 0.01$ 表示差异有高度显著性。

2 结果

2.1 低切应力对 HUVECs 迁移的影响

细胞划痕后,移入平行平板流动腔,分别以 1.5、0.5 Pa 切应力刺激 12 h。结果显示,与 1.5 Pa 切应力组相比较,0.5 Pa 切应力组 HUVECs 裸露区面积明显增多(见图 1)。

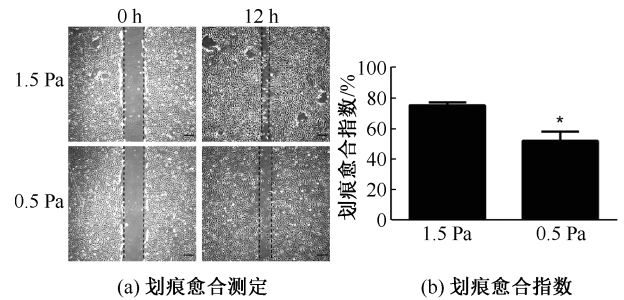


图 1 低切应力对 HUVECs 迁移的影响 ($P < 0.05$, bars = 20 μ m)

Fig.1 Effects of low shear stress on migration of HUVECs

(a) Wound-healing assay, (b) Wound-healing rates

2.2 低切应力对 HUVECs Bmi1 表达的影响

将细胞移入平行平板流动腔内,分别以 1.5、0.5 Pa 切应力刺激 12 h。Real-time PCR 及 Western blot 结果显示:与 1.5 Pa 组比较,HUVECs 在 0.5 Pa 作用 12 h 后,Bmi1 mRNA 和蛋白表达均显著升高(见图 2)。

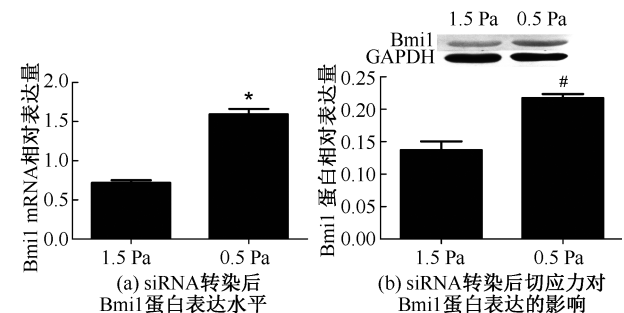


图 2 低切应力对 HUVECs Bmi1 表达的影响 ($*P < 0.01$, $\#P < 0.05$)

Fig.2 Effects of low shear stress on the expression of Bmi1 in HUVECs (a) Relative mRNA expression of Bmi 1,

(b) Relative protein expression of Bmi 1

2.3 siRNA 转染对 HUVECs Bmi1 表达的影响

HUVECs 转染 24 h 后,Western blot 检测结果表

明,siBmi1 转染组与对照组相比 Bmi1 蛋白表达水平明显减少,说明本实验设计合成的 siRNA 能显著抑制目的基因 Bmi1 的表达,可以用于后续实验。转染后的细胞分别加载 1.5、0.5 Pa 切应力刺激 12 h, 0.5 Pa 切应力上调的 Bmi1 蛋白表达明显被抑制。

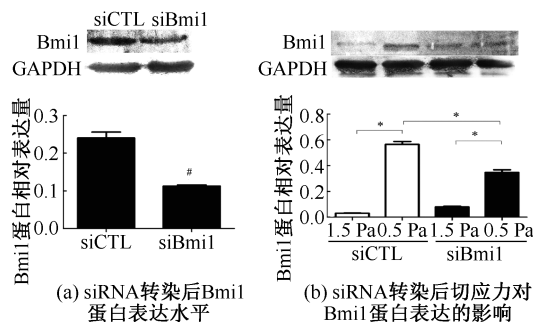


图3 siRNA 转染对 HUVECs 中 Bmi1 表达的影响 (* $P < 0.05$, # $P < 0.01$)

Fig.3 Effects of siRNA transfection on Bmi1 expression in HUVECs (a) Bmi1 protein expression level after siRNA transfection, (b) Effects of shear stress after siRNA transfection on Bmi1 protein expression

2.4 干扰 Bmi1 表达后切应力对 HUVECs 迁移的影响

HUVECs 转染处理后,将细胞移入平行平板流动腔内,分别加载 1.5、0.5 Pa 切应力 12 h,重复细胞划痕实验。结果显示,0.5 Pa 低切应力刺激下,相对于 siCTL 组,siBmi1 组 HUVECs 迁移能力明显增强($P < 0.05$),证明干扰 Bmi1 后减弱了低切应力对细胞迁移的抑制(见图 4)。

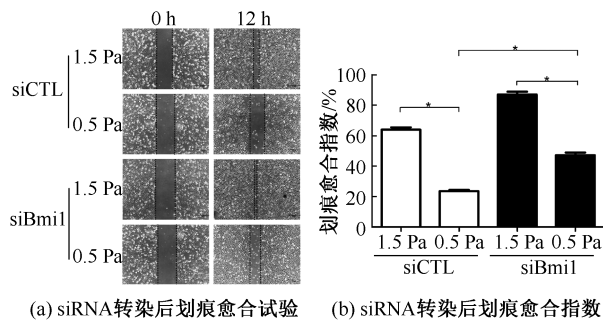


图4 敲低 Bmi1 表达后切应力对 HUVECs 迁移的影响 (* $P < 0.05$, bars = 20 μm)

Fig.4 Effects of shear stress after silencing Bmi1 on HUVECs migration (a) Wound-healing assay after siRNA transfection, (b) Wound-healing rates after siRNA transfection

3 讨论与结论

流体切应力作为血流动力学的重要因素之一,具有维持血管生理稳态、调节血管内皮细胞表型和功能的作用。生理状态下,人体动脉的正常切应力为 1.0~7.0 Pa。越来越多的研究证明,动脉水平的层流切应力(>1.5 Pa)可以诱导血管内皮细胞抗动脉粥样硬化基因的表达,而小于 0.4 Pa 低切应力则刺激内皮细胞形成动脉粥样硬化表型^[1],此为选择切应力大小提供了依据。以往多数研究选择观察细胞受力组与静止组之间的功能变化,本文认为选择不同强度应力之间的比较,更接近在体血管状态。因此,本文运用平行平板流动腔系统加载层流切应力,参考文献[10-11]中的实验方法,选择 1.5 Pa 正常切应力为对照,0.5 Pa 为低切应力刺激,探讨低切应力环境对内皮细胞迁移的影响。

血管内皮细胞在流体切应力作用下的迁移运动,与机体多种生理、病理过程密切相关,多年来一直是研究热点。运用平行平板流动腔系统,Gojova 等^[12]以 1.9 Pa 高切应力为对照,发现 0.3 Pa 低切应力明显抑制内皮细胞的迁移,且迁移能力与血流方向有关。孙胡蓉等^[13]给内皮细胞加载 0.556、1.002、1.527 Pa 切应力,发现切应力作用能够促进内皮细胞在切应力方向上的迁移,且细胞迁移距离与切应力大小正相关。本文得到类似的结果,与 1.5 Pa 切应力相比,0.5 Pa 低切应力明显减弱了内皮细胞划痕愈合能力。同时,也观察到在划痕上游,细胞向划痕区迁移的方向与切应力方向一致,但本文并未深入探讨细胞迁移方向和血流方向之间的关系。

多梳基因 Bmi1 由于其高表达在干细胞、肿瘤细胞,故目前的研究多集中在探讨 Bmi1 对干细胞自我更新和肿瘤细胞增殖、侵袭的调控方面。Zhang 等^[5]研究发现,Bmi1 通过下调 E-cadherin 调节肿瘤干细胞的迁移和侵袭;miR-495 通过 Bmi1 调节脐带间充质干细胞的迁移^[6],说明 Bmi1 在细胞迁移运动中起作用,也为本文研究提供了依据。对体细胞而言,可能由于 Bmi1 表达水平较低,故目前鲜有研究报道。晏咏朗等^[14]建立动脉粥样硬化大鼠模型,比较正常大鼠和动脉粥样硬化大鼠主动脉血管壁 Bmi1 表达,发现 Bmi1 的表达在动脉粥样硬化大鼠主动脉血管壁显著高于正常大鼠,提示 Bmi1 可能

参与动脉粥样硬化的形成。Miao 等^[7]研究发现, Bmi1 作为 miR-134 的靶基因, Bmi1 表达上调可以消除 miR-134 过表达抑制的微血管内皮细胞迁移及管样形成能力。因此, 结合低切应力对 HUVECs 迁移的作用, 本文以正常大小切应力为对照, 观察其中 Bmi1 的作用。结果发现, 低切应力在减弱 HUVECs 迁移的同时显著上调 HUVECs Bmi1 表达, 敲低 Bmi1 表达后重复上述实验, 在一定程度上解除了低切应力对 HUVECs 迁移的抑制作用, 更明确了 Bmi1 在切应力调节 HUVECs 迁移中的作用, 提示上调 Bmi1 表达可能是低切应力内皮损伤机制之一。在后续的研究中, 将围绕 Bmi1 调节内皮细胞迁移的分子机制而展开。

综上所述, 本研究运用平行平板流动腔系统, 以正常大小切应力为对照, 探讨低切应力刺激对 HUVECs Bmi1 表达的影响及迁移的作用。结果发现, 低切应力可显著促进 HUVECs Bmi1 表达并抑制迁移, Bmi1 参与了低切应力对血管内皮细胞迁移的调节。

参考文献:

- [1] MALEK AM, ALPER SL, IZUMO S. Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis [J]. JAMA, 1999, 282(21): 2035-2042.
- [2] 黄华, 王贵学. 血管内皮细胞迁移及相关影响因素研究进展 [J]. 国际生物医学工程杂志, 2006, 29(6): 357-361
- [3] CHIEN S, LI S, SHIU YT, *et al.* Molecular basis of mechanical modulation of endothelial cell migration [J]. Front Biosci, 2005, 10: 1985-2000.
- [4] LIU J, CAO L, CHEN J, *et al.* Bmi1 regulates mitochondrial function and the DNA damage response pathway [J]. Nature, 2009, 459(7245): 387-392.
- [5] 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): 1199-1207.
- [6] LI X, SONG Y, LIU D, *et al.* MiR-495 promotes senescence of mesenchymal stem cells by targeting bmi-1 [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 42(2): 780-796.
- [7] MIAO C, CAO H, ZHANG Y, *et al.* LncRNA DIGIT accelerates tube formation of vascular endothelial cells by sponging miR-134 [J]. Int Heart J, 2018, 59(5): 1086-1095.
- [8] 兰祥星, 王汉琴, 操传斌, 等. 磷酸化 p38 介导低切应力诱导的血管内皮细胞 Bmi-1 表达 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2018, 26(2): 122-126.
- [9] 包勤学, 陈丽, 吴思媛, 等. 受体相互作用蛋白激酶 1 在血管平滑肌细胞表型转换中的作用研究 [J]. 生物医学工程学杂志, 2016, 33(4): 719-728.
- [10] QI YX, JIANG J, JIANG XH, *et al.* PDGF-BB and TGF- β 1 on cross-talk between endothelial and smooth muscle cells in vascular remodeling induced by low shear stress [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(5): 1908-1913.
- [11] YANG Q, LI X, LI R, *et al.* Low shear stress inhibited endothelial cell autophagy through TET2 downregulation [J]. Ann Biomed Eng, 2016, 44(7): 2218-2227.
- [12] GOJOVA A, BARAKAT AI. Vascular endothelial wound closure under shear stress: Role of membrane fluidity and flow-sensitive ion channels [J]. J Appl Physiol, 2005, 98(6): 2355-2362.
- [13] 孙胡蓉, 韦琳, 刘肖珩, 等. CXCR1/2 在剪应力诱导血管内皮细胞迁移中的作用 [J]. 生物医学工程学杂志, 2009, 26(3): 512-517.
- [14] 晏咏朗, 李丽娟, 谢静, 等. 多梳基因 EZH2 与 BMI-1 在动脉粥样硬化大鼠主动脉中的过表达和 EZH2 的磷酸化 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17(1): 23-26.