

血流切应力对血管内皮细胞 PCP 信号通路 与初级纤毛发生的影响

刘月华^{1a,2}, 生 燕^{1b}, 欧刚卫^{1a}, 生 欣^{1a}

(1. 遵义医学院 基础医学院 a. 生物化学教研室, b. 形态学实验室, 贵州 遵义 563000;
2. 解放军白求恩国际和平医院 妇产生殖科, 石家庄 050082)

摘要:目的 研究不同血流切应力(fluid shear stress, FSS)对内皮细胞平面细胞极性通路(planar cell polarity, PCP)的调节作用,进一步探讨 FSS、PCP 信号通路以及纤毛发生之间的关系。方法 建立可调控 FSS 的流体动力学细胞培养模型,qPCR 以及免疫荧光检测不同 FSS 作用下 PCP 信号通路核心蛋白 Dvl2 及纤毛装配蛋白 IFT88 的 mRNA 表达与细胞定位以及两者的共定位,Western blot (WB) 检测不同 FSS 作用 18 h 时 Dvl2 蛋白表达。结果 qPCR 结果显示,与 1.5 Pa 比较,Dvl2 mRNA 的表达量在 0.1 Pa FSS 作用 6 h 和 18 h 时均升高($P<0.05$)、12 h 时显著升高($P<0.01$);IFT88 mRNA 表达量在 0.1 Pa FSS 作用 18 h 时显著升高($P<0.01$)。WB 结果显示,与 0 h 比较,Dvl2 蛋白的表达在 0.1 Pa FSS 作用 18 h 时升高($P<0.05$),在 1.5 Pa FSS 作用 18 h 时显著降低($P<0.05$);与 1.5 Pa FSS 比较,Dvl2 蛋白的表达在 0.1 Pa FSS 作用 18 h 时升高($P<0.05$)。免疫荧光结果显示,Dvl2 蛋白阳性表达随 FSS 作用时间的增加增多,且逐渐聚集于细胞核周边一点;IFT88 蛋白阳性表达在 0.1 Pa FSS 作用下逐渐由细胞核向细胞质转移并聚集为一点,1.5 Pa FSS 作用下逐渐减少且解聚;蛋白 Dvl2、IFT88 在 0.1 Pa FSS 作用下均定位于细胞的同一位置,在 1.5 Pa FSS 作用 18 h 内均定位于细胞的同一位置,18 h 后由于蛋白 IFT88 发生解聚,未观察到共定位。结论 层流 FSS 作用能够抑制 PCP 信号通路的转导并阻碍纤毛发生,低 FSS 促进其转导,且 PCP 信号通路可能通过 Dvl2 调控 FSS 诱导的初级纤毛发生。

关键词:血流切应力; PCP 信号通路; 初级纤毛; 血管内皮细胞

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2019.01.010

Effects of Fluid Shear Stress on PCP Signaling Pathway and Ciliogenesis in Vascular Endothelial Cells

LIU Yuehua^{1a,2}, SHENG Yan^{1b}, OU Gangwei^{1a}, SHENG Xin^{1a}

(1a. Department of Biochemistry, 1b. Morphological Laboratory, School of Basic Medicine, Zunyi Medical College, Zunyi 563000, Guizhou, China; 2. Department of Maternity Reproduction, Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang 050082, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of different fluid shear stress (FSS) on the regulation of planar cell polarity (PCP) signaling, and further to explore the relationship among FSS, PCP signaling pathway and ciliogenesis. **Methods** The hydrodynamic cell model of adjustable FSS was established. qPCR and immunofluorescence were used to detect the mRNA expression of PCP signaling pathway core protein Dvl2 and cilia assembly protein IFT88, cell targeting and co-localization under different FSS. Western blot (WB) was used to detect the

protein expression of Dvl2 at 18 h under different FSS. **Results** The qPCR result showed that compared with 1.5 Pa FSS, under 0.1 Pa FSS, the mRNA expression of Dvl2 was higher at 6 h and 18 h ($P < 0.05$), significantly higher at 12 h ($P < 0.01$); the mRNA expression of IFT88 was significantly higher at 18 h ($P < 0.01$). The WB result showed that compared with 0 h, under 0.1 Pa FSS, the protein expression of Dvl2 was higher at 18 h ($P < 0.05$), significantly lower under 1.5 Pa FSS ($P < 0.01$); compared with 1.5 Pa FSS, the protein expression of Dvl2 was higher at 18 h under 0.1 Pa FSS ($P < 0.05$). The immunofluorescence result showed that the positive expression of Dvl2 increased with the loading time on FSS increasing, and gradually aggregated at a point around the nucleus; the positive expression of IFT88 was gradually transferred from the nucleus to the cytoplasm and aggregated at a point under 0.1 Pa FSS, and gradually decreased and depolymerized under 1.5 Pa FSS. Protein Dvl2 and IFT88 were located in the same position in cells under 0.1 Pa FSS and before 18 h under 1.5 Pa FSS, and colocalization of proteins Dvl2 and IFT88 was not observed after 18 h under 1.5 Pa FSS due to IFT88 depolymerization. **Conclusions** Laminar FSS played an inhibition on the transduction of PCP signaling pathway and a hindrance on the process of ciliogenesis, while low FSS played a promotion on the transduction. PCP signaling pathway might regulate FSS-induced ciliogenesis by Dvl2.

Key words: fluid shear stress (FSS); planar cell polarity (PCP) signaling pathway; primary cilia; vascular endothelial cells (VECs)

血流切应力 (fluid shear stress, FSS) 是血流对血管内表面产生的平行于管壁的摩擦力, FSS 直接作用于血管内皮细胞 (vascular endothelial cells, VECs), 是影响其形态、功能和损伤的重要因素。内皮细胞对不同血流模式的应答能力依赖于其表面的各种机械和化学信号传感器, 初级纤毛便是其中最为重要的一类。研究显示, FSS 能够影响纤毛在血管中的分布, 调控纤毛的发生^[1-2]。在众多与纤毛相关的信号通路中, 平面细胞极性通路 (planar cell polarity, PCP) 受到关注, 它通过小 GTPases、Daam1 和 c-Jun N-terminal kinase 等下游效应分子起作用^[3], 参与细胞骨架的组装、细胞增殖和纤毛发生等活动^[4]。其核心组件 Dvl2 具有将纤毛基体定位于细胞膜的作用^[5-6], 能够支配纤毛形成, 被认为是对顶部肌动蛋白装配是必不可少的; 然而, 该信号通路是否被 FSS 调控并且参与 FSS 调节的纤毛发生, 目前鲜有报道。本文应用不同 FSS 作用于人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, hUVECs), 通过检测不同 FSS 作用下细胞中 Dvl2 和纤毛装配蛋白 IFT88 mRNA 表达和蛋白定位以及两者的共定位, 探讨不同 FSS 对 VECs 初级纤毛的形成的影响以及 PCP 信号通路与此过程的相关性。研究结论对于进一步探讨 VECs 对不同 FSS 作用的应答及其在异常 FSS 作用下的炎症反应机制, 揭示初级纤毛在心血管系统中的机械传递功

能和调控机理具有重要的科学价值。

1 材料与amp;方法

1.1 细胞株与试剂

hUVECs 细胞株 (美国 ATCC 细胞库), DMEM 培养液、FBS (Gibco 公司, 美国), 鼠抗人 Dsh 一抗、兔抗人 Dsh 一抗、兔抗人 IFT88 一抗、鼠抗人 GAPDH 一抗 (Sigma-Aldrich 公司, 美国), 羊抗兔二抗、兔抗鼠二抗 (武汉三鹰生物技术有限公司), 羊抗鼠绿色荧光二抗、驴抗兔红色荧光二抗 (上海 Thermo Fisher 公司), BSA (上海 Solarbio 公司)。

1.2 hUVECs 原代细胞培养

hUVECs 用含 1% 双抗、2% 胎牛血清的 DMEM 培养基在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。

1.3 方法

1.3.1 建立可调控 FSS 的流体动力学细胞模型 利用 Flexcell 公司 Streamer 系统建立 6 通道可调控 FSS 加载细胞实验^[7]。以 6 通道 Streamer 为细胞加载培养室, 以数字精密蠕动泵为动力, 并以液流脉冲阻尼器维持稳定流速并防止气泡建立起内皮细胞体外流动培养系统。实验分组为: 对照组 (0 Pa)、层流组 (1.5 Pa)、低 FSS 组 (0.1 Pa)。FSS 作用时间梯度分别为: 0、6、12、18 h。

1.3.2 检测 Dvl2、IFT88 mRNA 表达水平 细胞培养及分组同上。收集各组细胞, 按 Trizol 试剂盒操

作要求提取各组总 RNA,按 RT-PCR 试剂盒操作进行反转录(见表1)。扩增的 cDNA 加入至 20 μL 反应体系中。逆转录反应条件为 37 °C 15 min、85 °C 5 s、4 °C。

表1 hUVECs Dvl2、IFT88 mRNA 表达的 qPCR 实验相关引物序列

Tab.1 Primer sequences of Dvl2 and IFT88 for qPCR experiments

引物	正向序列	反向序列
Dvl2	5'-TTCAACCGAAGGCTGCTATC-3'	5'-TGGCAAAGGAGCTAAAGCTG-3'
IFT88	5'-GAGAGGCTCTGCATTGTACC-3'	5'-CCTGCATCTTTTGCCTTTTC-3'
GAPDH	5'-CAGGAGCATTGCTGATGAT-3'	5'-GAAGGCTGGGGCTCATT-3'

qPCR 采用 SYBR GREEN 法,反应条件:95 °C 3 min、95 °C 10 s、60 °C 30 s、40 cycle、65 °C 5 s、95 °C 5 min。以 GAPDH 作为内参照,目的基因的表达根据经 qPCR 仪器检测的 Ct 值,通过公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行相对定量分析计算得到。

1.3.3 Dvl2 蛋白表达水平检测 细胞培养及分组同上。收集各组细胞,加入 RIPA 裂解液和 1% 体积 PMSF 裂解细胞收获蛋白进行 Western blot (WB) 检测。制备凝胶,样品制备,取 25 μg 蛋白样品溶液加入制备好的 SDS-PAGE 上样缓冲液,电泳后转膜,封闭,抗体孵育,其中一抗为兔抗人 Dvl2 抗体(1:1 000)及鼠抗人 GAPDH 抗体(1:10 000),二抗为 HRP-羊抗兔抗体(1:3 000)和 HRP-兔抗鼠抗体(1:3 000),自动曝光仪器曝光显影,对显影结果进行灰度值扫描,用 Quantity One 软件进行定量分析,以目的条带的光密度和 GAPDH 条带的光密度比值作为目的蛋白的相对表达水平。

1.3.4 Dvl2、IFT88 蛋白表达定位及两者共定位 免疫荧光:分别将静置和 FSS 加载培养的 hUVECs 于 4% 多聚甲醛中 4 °C 固定,PBS 洗涤,0.5% Triton X-100 中室温下通透,PBS-3% BSA 清洗,抗体孵育,其中一抗为鼠抗人 Dvl2 抗体(1:1 000)及兔抗人 IFT88 抗体(1:1 000),二抗为羊抗鼠绿色荧光抗体(1:100)和驴抗兔红色荧光抗体(1:100),DAPI 室温避光孵育,防猝灭剂封片,Olympus IX83 荧光显微镜观察、拍照。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,计量资料以均值±标准差表示,多样本均数比较采用单因素方差分析,其两两比较采用 LSD-t 法,检验水准

$\alpha=0.05, P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 qPCR 检测 Dvl2、IFT88 mRNA 表达

采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析结果:与 0 h 比较,Dvl2 mRNA 的表达量在 0.1 Pa FSS 作用 18 h 时升高 ($P<0.05$),1.5 Pa FSS 作用 6、12、18 h 时均显著降低 ($P<0.01$),IFT88 mRNA 表达量在不同 FSS 作用时均显著降低 ($P<0.01$);与 1.5 Pa FSS 比较,Dvl2 mRNA 的表达量在 0.1 Pa FSS 作用 6、18 h 时均升高 ($P<0.05$)、12 h 时显著升高 ($P<0.01$),IFT88 mRNA 表达量在 0.1 Pa FSS 作用 6、12 h 时均显著降低 ($P<0.01$)、18 h 时均显著升高 ($P<0.01$),见表 2。

表2 不同 FSS 作用下 hUVECs 中 Dvl2、IFT88 mRNA 相对表达量 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Tab.2 Dvl2 and IFT88 mRNA relative expression in hUVECs under different FSS

组别	Dvl2 mRNA 相对表达量		IFT88 mRNA 相对表达量	
	1.5 Pa	0.1 Pa	1.5 Pa	0.1 Pa
0 h	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
6 h	0.419±0.030**	0.593±0.112#	0.270±0.051**	0.053±0.003###
12 h	0.598±0.011**	0.959±0.024##	0.612±0.069**	0.011±0.001###
18 h	0.794±0.076**	1.519±0.390##	0.034±0.000**	0.096±0.001###

注:与 0 h 比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 1.5 Pa FSS 比较, # $P<0.05$,## $P<0.01$

2.2 WB 检测 FSS 作用 18 h 时 Dvl2 蛋白表达

与 0 h 比较,Dvl2 蛋白的表达在 0.1 Pa FSS 作用 18 h 时升高 ($P<0.05$),在 1.5 Pa FSS 作用 18 h 时显著降低 ($P<0.05$);与 1.5 Pa FSS 比较,Dvl2 蛋白,表达在 0.1 Pa FSS 作用 18 h 时升高 ($P<0.05$),见图 1、表 3。

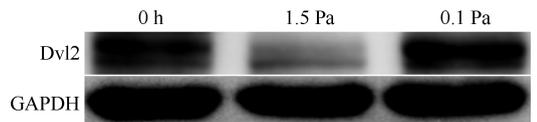


图1 不同 FSS 对 hUVECs 中 Dvl2 蛋白表达的影响
Fig.1 Effects of different FSS on protein expression level of Dvl2 in hUVECs

2.3 Dvl2、IFT88 蛋白免疫荧光检测

采用免疫荧光的方法检测 Dvl2、IFT88 蛋白表达定位及两者的共定位,红色荧光标记 IFT88 蛋白,蓝色荧光标记细胞核,白色箭头所示为目的基因所

表3 不同 FSS 对 hUVECs 中 Dvl2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
 Tab.3 Effects of different FSS on protein expression level of Dvl2 in hUVECs

组别	1.5 Pa	0.1 Pa
0 h	1.000±0.000	1.000±0.000
18 h	0.643±0.035**	1.198±0.025*#

注: 与 0 h 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 1.5 Pa FSS 比较, # $P < 0.05$

在(见图 2)。结果显示: 不同 FSS 作用下, Dvl2 蛋白均随 FSS 作用时间的增加蛋白阳性表达增多, 且逐渐聚集于细胞核周边一点; IFT88 蛋白阳性表达在 0.1 Pa FSS 作用下逐渐由细胞核向细胞质转移并聚集为一点, 1.5 Pa FSS 作用下逐渐减少且解聚; 蛋白 Dvl2、IFT88 在 0.1 Pa FSS 作用下均定位于细胞的同一位置, 在 1.5 Pa FSS 作用 18 h 内均定位于细胞的同一位置, 18 h 后由于蛋白 IFT88 发生解聚, 未观察到共定位。

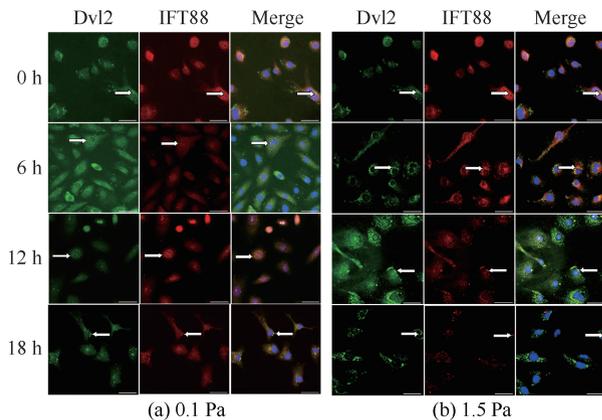


图2 免疫荧光显示不同 FSS 作用下 hUVECs 中蛋白 Dvl2 与 IFT88 的共定位 (bar=50 μm)

Fig.2 Immunofluorescence showed co-localization of Dvl2 and IFT88 in hUVECs under different FSS (a) 0.1 Pa, (b) 1.5 Pa

3 讨论

3.1 FSS 作用 18 h 时, 层流 FSS 抑制 PCP 信号通路转导, 而低 FSS 促进其转导

PCP 信号通路与生物力学刺激有关。FSS 在内皮细胞以快速和短暂的方式活化 JNK, JNK 活化在血管生物学中具有重要的作用, 可参与程序性细胞死亡^[8]。此外, PCP 信号通路还参与细胞形态的重建, 如 PCP 核心基因 Dvl2 过表达模型中, PCP 信号

通路也被激活, 引起心肌肥大、心衰和过早死亡^[9]。近年来研究发现, FSS 也能够影响细胞形态变化^[10], 尤其是能够导致内皮细胞形态重建^[11], 提示 PCP 信号通路可能参与了 FSS 导致的 VECs 形态变化。本实验结果表明, Dvl2 mRNA 及蛋白的表达在 0.1 Pa FSS 作用 18 h 时升高, 在 1.5 Pa FSS 作用下显著降低, 且蛋白阳性表达随 FSS 作用时间的增加而增多, 并逐渐聚集于细胞核周边一点。因此, 推测 FSS 能够影响 PCP 信号通路的转导, 并且在 FSS 作用 18 h 时, 层流 FSS 抑制 PCP 信号通路的转导, 而低 FSS 促进其转导。

3.2 层流 FSS 对初级纤毛发生过程起阻碍作用

VEC 感受 FSS 的变化, 通过细胞内信号调节因子、基因表达和特异转录因子等途径将力学信息传递到细胞内, 再经级联放大作用将信息作用于相应的靶细胞, 从而参与动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 的形成过程^[12]。VEC 对不同血流模式的应答能力依赖于其表面的各种机械和化学信号传感器, 初级纤毛便是其中最为重要的一类。研究证实, 纤毛的传感功能依赖于其应对流体流动和机械应力而做出的弯曲反应^[13]; 且最近的研究发现, 在心血管系统功能失调时纤毛可能增加 AS 的风险^[14]。近年来研究显示, 外界环境的变化能够影响纤毛的发生。以抗 acetyl- α -微管蛋白抗体对初级纤毛进行标记, 发现在层流 FSS 作用下, 初级纤毛发生解聚^[15]; 在鸡胚胎心内膜内皮细胞中, 分布于低 FSS 区域的细胞突起正是初级纤毛^[16]; 初级纤毛在心血管系统中的分布依赖于血流模式^[17], 高 FSS 区域的内皮细胞通常不具有纤毛, 而低 FSS 区域的内皮细胞则存在纤毛的定位。此外, 高 FSS 区域纤毛的内皮细胞在紊流作用下能够重新形成纤毛。本实验结果表明, hUVECs 初级纤毛装配蛋白 IFT88 在 1.5 Pa FSS 作用下, 蛋白阳性表达均随 FSS 作用时间的增加逐渐减少且解聚; IFT88 mRNA 表达量在不同 FSS 作用下均显著降低。因此, 本实验进一步证实了外界机械作用力能够影响初级纤毛的发生过程, 1.5 Pa FSS 接近于体内正常血流产生的层流 FSS, 而初级纤毛较少出现于正常血流区域 VECs 表面。综上所述, 层流 FSS 对初级纤毛发生过程起阻碍作用。

3.3 PCP 信号通路可能通过 Dvl2 调控 FSS 诱导的初级纤毛发生

PCP 信号通路和初级纤毛密切相关,其组分能够调控纤毛发生^[18],且初级纤毛在它的传导中也起到重要作用。PCP 信号通路核心蛋白 Dvl2 位于初级纤毛基体上^[19],为基体的顶端定位所必需。纤毛基因 IFT88 编码纤毛转运蛋白,其亚效等位基因突变时,导致初级纤毛的畸形。本实验结果表明,PCP 蛋白 Dvl2 与纤毛装配蛋白 IFT88 在不同 FSS 作用下均定位于细胞的同一位置;Dvl2、IFT88 mRNA 表达量在 0.1 Pa FSS 作用 12 h 后表达趋势相同,1.5 Pa FSS 作用 12 h 内表达趋势相同。因此,本实验进一步证实了 PCP 信号通路和初级纤毛发生过程密切相关,且 PCP 信号通路可能通过 Dvl2 调控 FSS 诱导的初级纤毛发生。

4 结语

层流 FSS 能够抑制 PCP 信号通路的转导并阻碍纤毛发生,低 FSS 促进其转导,且 PCP 信号通路可能通过 Dvl2 调控 FSS 诱导的初级纤毛发生。研究结果对于进一步探讨 VECs 对不同 FSS 作用下初级纤毛在心血管系统中的机械传递功能和调控机制具有重要的科学价值。

参考文献:

- [1] HIERCK BP, HEIDEN K, ALKEMADE FE, *et al.* Primary cilia sensitize endothelial cells for fluid shear stress [J]. *Dev Dyn*, 2010, 237(3): 725-735.
- [2] LI XM, SHENG X, GUO PF, *et al.* Changes on morphology and ciliogenesis of hUVECs loaded on different flow shear stress [J]. *Life Sci Res*, 2015, 19(1): 13-18.
- [3] WANG Y, NATHANS J. Tissue/planar cell polarity in vertebrates: New in-sights and new questions [J]. *Development*, 2007, 134(4): 647-658.
- [4] GERDES JM, LIU Y, ZAGHLOUL NA, *et al.* Disruption of the basal body compromises proteasomal function and perturbs intracellular Wnt response [J]. *Nat Genet*, 2007, 39(11): 1350-1360.
- [5] MCNEILL H. Planar cell polarity: Keeping hairs straight is not so simple [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010, 2(2): a003376.
- [6] WALLINGFORD JB, MITCHELL B. Strange as it may

seem: The many links between Wnt signaling planar cell polarity, and cilia [J]. *Genes Dev*, 2011, 25(3): 201-213.

- [7] REGNAULT V, PERRET-GUILLAUME C, KEARNEY-SCHWARTZ A, *et al.* Tissue factor pathway inhibitor: A new link among arterial stiffness, pulse pressure, and coagulation in postmenopausal women [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(5): 1226-1232.
- [8] ZOU Y, HU Y, METZLER B, *et al.* Signa I transduction in arteriosclerosis; Mechanical stress-activated MAPK inases in vascular smooth muscle cells [J]. *Int J Mol Med*, 1998, 1(5): 827-834.
- [9] MALEKAR P, HAGENMUELLER M, ANYANWU A, *et al.* Wnt signaling is critical for maladaptive cardiac hypertrophy and accelerates myocardial remodeling [J]. *Hypertension*, 2010, 55(4): 939-945.
- [10] CIASCA G, PAPI M, MINELLI E, *et al.* Changes in cellular mechanical properties during onset or progression of colorectal cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(32): 7203-7214.
- [11] 王艺璇, 蔡军. 剪切力和拉伸应力对血管内皮细胞的影响 [J]. *中国医学前沿杂志*, 2012, 4(8): 38-41.
- [12] LU X, ZHAO J, GREGERSEN H. Small intestinal morphometric and biomechanical changes during physiological growth in rats [J]. *J Biomech*, 2005, 38(3): 417-426.
- [13] PRAETORIUS HA, SPRING KR. Bending the MDCK cell primary cilium increases intracellular calcium [J]. *J Membr Biol*, 2001, 184(1): 71-79.
- [14] HEIDEN K, HIERCK BP, KRAMS R, *et al.* Endothelial primary cilia in areas of disturbed flow are the base of atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2008, 196(2): 542-550.
- [15] IOMINI C, TEJADA K, MO W, *et al.* Primary cilia of human endothelial cells disassemble under laminar shear stress [J]. *J Cell Biol*, 2004, 164(6): 811-817.
- [16] HEIDEN K, GROENENDIJK BC, HIERCK BP, *et al.* Monocilia on chicken embryonic endocardium in low shear stress areas [J]. *Dev Dyn*, 2006, 235(1): 19-28.
- [17] HIERCK BP, HEIDEN K, ALKEMADE FE, *et al.* Primary cilia sensitize endothelial cells for fluid shear stress [J]. *Dev Dyn*, 2008, 237(3): 725-735.
- [18] GOETZ SC, ANDERSON KV. The primary cilium: A signalling center during vertebrate development [J]. *Nat Genet*, 2010, 11(5): 331-344.
- [19] YASUNAGA T, ITOH K, SOKOL SY. Regulation of basal body and ciliary functions by Diversin [J]. *Mech Dev*, 2011, 128(7-10): 376-386.