

剪切应力强度对内皮细胞Piezo1表达的影响

赵一蔚¹,任培乐¹,于凤旭²,代红燕³,聂永梅²

1. 新疆医科大学基础医学院生理学教研室, 新疆 乌鲁木齐 830011; 2. 西南医科大学附属医院心脏大血管外科, 四川 泸州 646000; 3. 新疆医科大学基础医学院机能中心实验室, 新疆 乌鲁木齐 830011

【摘要】目的:探究不同强度(0、2.37、4.14、7.11、9.47、14.21、17.76 dyne/cm²)剪切应力对血管内皮细胞Piezo1表达的影响。**方法:**选取人脐静脉内皮细胞株EA.hy926进行常规体外培养,使用平行板流槽加载不同强度剪切应力,分别采用实时荧光定量PCR及Western-blot方法从基因水平和蛋白水平检测Piezo1表达情况。**结果:**剪切应力强度影响Piezo1的表达,加载剪切应力为4.14 dyne/cm²时,Piezo1 mRNA和蛋白表达与静止状态相比均显著减少($P<0.05$)。**结论:**剪切应力影响内皮细胞中Piezo1改变,且强度为4.14 dyne/cm²时最为明显,提示Piezo1可能参与低剪切应力诱导的动脉粥样硬化过程。

【关键词】剪切应力;Piezo1;内皮细胞;动脉粥样硬化

【中图分类号】R35

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2019)04-0474-05

Effects of shear stress intensity on the expression of Piezo1 in vascular endothelial cells

ZHAO Yiwei¹, REN Peile¹, YU Fengxu², DAI Hongyan³, NIE Yongmei²

1. Department of Physiology, Collage of Basic Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. Department of Cardiovascular Surgery, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 3. Laboratory Centre of Mechanism, Collage of Basic Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

Abstract: Objective To investigate the effects of shear stress of different intensities (0, 2.37, 4.14, 7.11, 9.47, 14.21, 17.76 dyne/cm²) on the expression of Piezo1 in vascular endothelial cells. **Methods** The human umbilical vein endothelial cell lines (EA.hy926) were cultured *in vitro*, and the shear stress of different intensities were applied on endothelial cell lines by parallel-plate flow chamber. Real-time fluorescent quantitative PCR and Western-blot analysis were used to detect the expression of Piezo1 in endothelial cell lines at gene level and protein level. **Results** The expression of Piezo1 was affected by shear stress intensity. The expressions of Piezo1 mRNA and proteins under a shear stress of 4.14 dyne/cm² were significantly reduced as compared with those in control group ($P<0.05$). **Conclusion** Shear stress intensity has significant effects on the expression of Piezo1 in vascular endothelial cells, and when the shear stress intensity is 4.14 dyne/cm², the effect is the most obvious, which indicates that Piezo1 may involve in the arteriosclerosis induced by shear stress of low intensity.

Keywords: shear stress; Piezo1; endothelial cell; arteriosclerosis

前言

血管内皮细胞处于血管内腔面,是血流与血管壁相互作用的界面,对机械刺激、炎症信号以及血液

循环中激素水平的变化敏感^[1]。正常的血管内皮细胞是维持心血管系统稳态的前提条件,其功能异常是心血管疾病早期的重要特征,与动脉粥样硬化、高血压及心衰等疾病的发生、发展关系密切^[2]。在机械刺激中剪切应力作为主要的力学刺激,不仅影响内皮细胞形态和功能,还可以调节内皮细胞中基因的表达^[3]。当剪切应力 ≥ 15 dyne/cm²时,可以促进内皮细胞中血管舒张因子、生长抑制因子和抗氧化剂等表达,同时可以抑制血管收缩因子、生长因子、炎症介质等的表达,使内皮细胞不易受损。而低剪切应力(± 4 dyne/cm²)时,内皮细胞形态呈多角形,排列不规则,易受化学物质的刺激,分泌血管紧张素转换

【收稿日期】2018-11-23

【基金项目】新疆维吾尔自治区自然科学基金联合基金项目(2018D0-1C161);泸州市人民政府-西南医科大学科技战略合作项目(2018LZXNYD-ZK27)

【作者简介】赵一蔚,硕士,研究方向:心血管力学生物学, E-mail: zhaoyw126@126.com

【通信作者】聂永梅,教授,研究方向:心血管力学生物学, E-mail: nieyongmei@126.com

酶等血管活性物质、炎症介质、生长因子、粘附分子, 使内皮细胞损伤; 促进细胞增生、细胞黏附, 诱导内皮细胞功能紊乱, 具有促进动脉粥样硬化的作用^[4-5]。

研究发现Piezo1是一种机械敏感性阳离子通道^[6]。该通道表现出参与细胞发育、血管容量调节、细胞迁移, 以及细胞增殖和延长等生物学作用, 在血管发育形成过程中也有重要参与, 目前受到科学家们的关注^[7]。已证实在发生动脉粥样硬化过程中, 内皮细胞受到显著损害; 剪切应力作用下, 血管内皮细胞中机械离子通道Piezo1有表达, 那么在受到不同强度剪切应力刺激时, Piezo1的生成与表达会有何种变化, 尚未有报道。本实验通过加载不同强度剪切应力, 从基因和蛋白质水平检测Piezo1表达情况, 研究流体剪切应力强度对内皮细胞中Piezo1表达的影响, 进而了解流体剪切应力强度是否可以影响Piezo1的表达。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

M199培养基、PBS缓冲液、胰酶、双抗青/链霉素合剂(Hyclone, 美国), 胎牛血清(Gibco, 美国), 人纤维黏连蛋白(CORNING, 美国), TRIzol总RNA提取试剂(Thermo Fisher Scientific, 美国), PCR反转录试剂盒(Thermo Fisher Scientific, 美国), QuantiFast SYBER Green PCR Kit(QIAGEN, 美国), Piezo1引物、 β -actin引物(生工生物, 中国上海), RIPA裂解液(Thermo Fisher Scientific, 美国), PMSF(博士德生物, 中国武汉), 蛋白酶抑制剂(Thermo Fisher Scientific, 美国), BCA法蛋白定量试剂盒(Pierce, 美国), SDS-PAGE凝胶制备试剂盒(Solarbio, 中国), 4 \times 蛋白上样缓冲液(Solarbio, 中国), 预染蛋白分子量Marker(Thermo Fisher Scientific, 美国), GAPDH兔抗多克隆抗体(GOODHERE, 中国), 兔源抗Piezo1多克隆抗体(Abcam, 美国), 辣根酶标记山羊抗兔(中杉金桥, 中国北京), SuperSignal West Femto 高灵敏度化学发光底物(Thermo Fisher Scientific, 美国)。

1.2 细胞培养

EA.hy926人脐静脉内皮细胞株(来自上海细胞库)进行常规体外培养, 于含10%胎牛血清、1%双抗的M199完全培养基中, 在37℃、5% CO₂培养箱中培养。

1.3 剪切应力加载

将已经过消毒处理的载玻片(75 mm \times 25 mm), 放入10 cm培养皿中。将1 mL纤维黏连蛋白(Fibronectin, FN)铺于载玻片上, 再将培养皿移至37℃恒温培养箱中, 静置30 min, 回收FN。将消化后

的细胞1 mL(1×10^6 个/mL)均匀种植于载玻片上。将培养皿轻轻放至37℃、5% CO₂培养箱中培养。待细胞贴壁后, 加10 mL M199生长液到培养皿中, 待细胞长满后, 将载玻片放置于平行板流槽中, 分别加载不同强度剪切应力(根据装置低中高档各设置两组, 对应应力依次为0、2.37、4.14、7.11、9.47、14.21、17.76 dyne/cm²)处理2 h。

平行板流室系统是由四川大学设计, 提供相关标测数据, 成都西木子公司制造。安装后流室的尺寸为: 长185 mm, 宽95 mm, 高0.8 mm。流入孔与流出孔之间的距离为215 mm。实验装置包括恒流泵、流通管、流室、灌流瓶(图1)。用无血清M199培养液作为灌流液体, 其粘度为0.72 mPa \cdot s。力学加载过程中储液瓶始终置水浴锅中保持37℃, 培养液中维持pH值为7.0, 为排除流体静水压的影响, 整个装置系统应处在同一个水平面上。

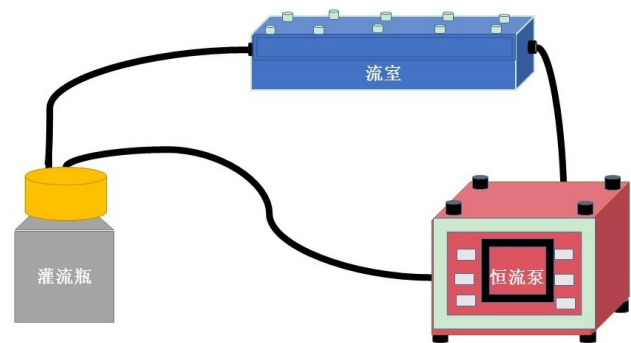


图1 流室系统简图

Fig.1 Schematic diagram of flow chamber system

1.4 实时荧光定量PCR

收集细胞, 1 000 r/min离心弃上清, 加入1 mL TRIzol试剂混匀。将匀浆样品在室温放置5 min, 4℃、13 000 r/min离心10 min, 取上清。加入0.2 mL氯仿, 4℃、13 000 r/min离心10~15 min, 取出水相RNA(约500 μ L), 加入等体积异丙醇。4℃、13 000 r/min离心10 min, 去上清, 加入30 μ L 75%乙醇(Rnase-Free ddH₂O配置)洗涤沉淀。用NANODROP 2000 Spectrophotometer核酸定量仪对提出的RNA进行浓度和纯度检测。采用Thermo RevertAid™第一链cDNA合成试剂盒合成cDNA。实时荧光定量PCR, 具体操作根据Thermo Scientific Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix(2 \times)说明书进行。引物序列: Piezo1, F: 5'-gcagccgagagaaagagaag-3', R: 5'-agagcagtgggaaccagatg-3'; β -actin, F: 5'-ggtagtcaccaaggcattcatt-3', R: 5'-ctccttaatgtcacgcacgat-3'。配置20 μ L体系, 按如下条件

进行扩增:50℃ 2 min;95℃ 10 min;95℃ 15 s;60℃ 30 s;72℃ 30 s;40个循环后延伸20 s。对扩增产物进行溶解曲线分析。

1.5 Western-blot

自平行板流槽取出玻片,用遇冷的PBS液洗2次,并吸出;加入1 mL PBS刮下细胞,移入1.5 mL无菌的EP管中,高速离心3~5 min,吸出PBS。在EP管中按比例加入蛋白裂解液,冰上孵育30 min,期间漩涡振荡3~4次。之后,4℃、12 000 r/min离心20 min,将上清转移到无菌EP管。用BCA试剂盒检测蛋白样品浓度。蛋白变性。SDS-PAGE蛋白质电泳,80 mA恒流,4℃过夜转膜,5%脱脂奶粉封闭6 h,加入一抗(1:1 000),4℃孵育过夜。取出常温放置30 min,洗涤3次,每次10 min。加二抗(1:1 000),摇床振荡,室温避光孵育2 h。吸出二抗。蒸馏水洗涤1次,5 min。1:1配置显色液,将显色液敷于PVDF上约3 min,使用Bio-Rad化学发光成像仪中拍照。蛋白分子质量:Piezo1为286 kD;GAPDH为37 kD。

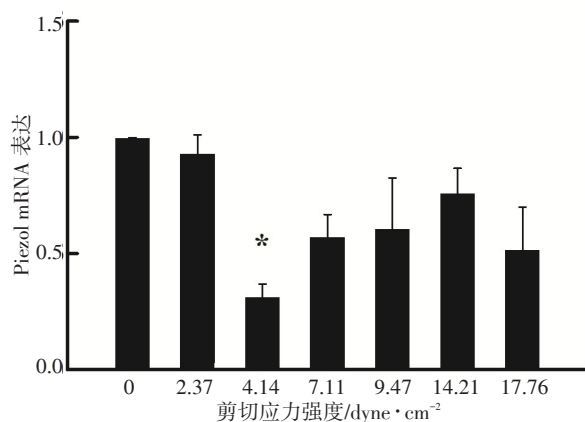
1.6 统计学处理

实验重复3次,使用SPSS 17.0统计软件对参数进行单因素方差分析,两两比较采用SNK法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 剪切应力强度影响EA.hy926中Piezo1的基因表达

加载不同强度剪切应力,处理细胞,qRT-PCR方法检测Piezo1 mRNA表达情况,使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 进行结果分析。对照组与处理组相比,只有在刺激强度为4.14 dyne/cm²时,Piezo1 mRNA的表达显著降低(图2),与静止状态比较有显著统计学差异($P<0.05$)。其他处理组与对照组比较均无差异。



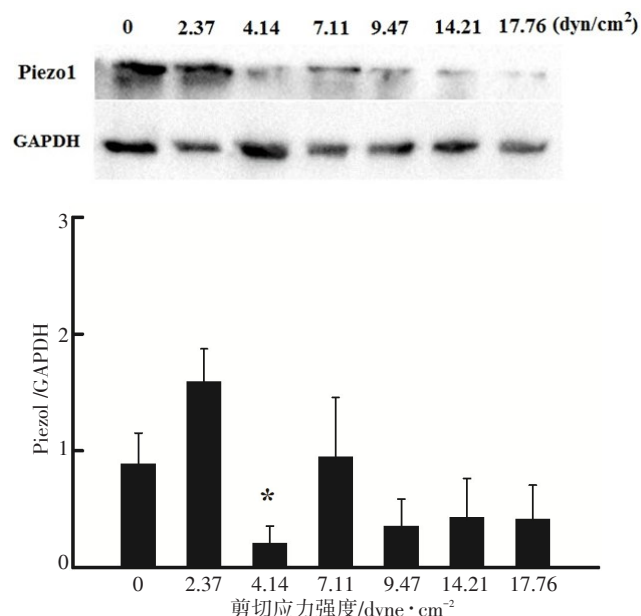
*:与对照组比较, $P<0.05$

图2 不同强度剪切应力对Piezo1 mRNA表达的影响

Fig.2 Effects of shear stress of different intensities on the expression of Piezo1 mRNA

2.2 剪切应力强度影响EA.hy926中Piezo1的蛋白表达

收集各组细胞,Western-blot方法进行蛋白测定。通过Image pro plus6.0对结果进行灰度扫描,定量分析发现蛋白表达与基因表达结果相一致。在刺激强度为4.14 dyne/cm²时,Piezo1蛋白表达量最低(图3),与对照组比较有统计学差异($P<0.05$)。其余处理组与对照组比较均无差异。



*:与对照组比较, $P<0.05$

图3 不同强度剪切应力对Piezo1蛋白表达的影响

Fig.3 Effects of shear stress of different intensities on the expression of Piezo1 protein

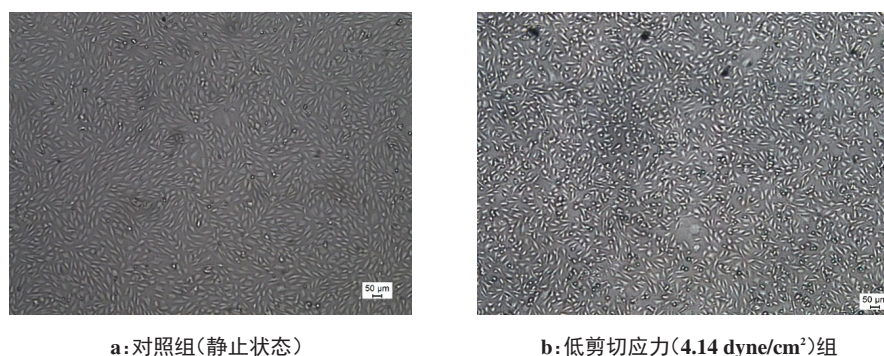
2.3 低剪切应力刺激影响EA.hy926细胞形态

静止状态细胞呈长梭形(图4a)。低剪切应力(4.14 dyne/cm²)刺激后细胞形态不规则,局部可见细胞间隙增大,细胞有脱落现象(图4b)。

3 讨论

3.1 剪切应力影响内皮细胞中Piezo1的表达

血流动力学作为一个重要因素,参与血管的生理和病理调节活动。内皮细胞持续受到血管的力学作用,其中剪切应力(是血流经过血管时内皮细胞受到的与血管壁平行的力)为主要的力学刺激因素之一。内皮细胞在不同区域的血管中,受到的剪切应力也不尽相同。动脉粥样硬化的好发部位,如动脉分叉处和血管弯曲处等为 ± 4 dyne/cm²。正常或稍高的剪切应力($\geq 10 \sim 15$ dyne/cm²)可上调内皮细胞的抗炎作用^[8]。有研究显示在剪切应力作用下Piezo1作



a: 对照组(静止状态)

b: 低剪切应力(4.14 dyne/cm²)组

图4 光学显微镜下EA.hy926细胞株形态

Fig.4 Morphology of EA.hy926 cell lines under optical microscope

为力学感受器在小鼠内皮细胞中表达,其表达参与到剪切应力诱导的Ca²⁺的流动以及细胞迁移^[9-10]。Piezo1蛋白参与细胞发育、血管容量调节、细胞迁移,以及细胞增殖和延长等作用^[11]。那么Piezo1是否在人内皮细胞中表达?剪切应力是否也会影响内皮细胞中Piezo1的表达?基于此,本研究选取人脐静脉内皮细胞株EA.hy926作为研究对象^[12],分别设置不同强度力学刺激内皮细胞。经检测发现,在静止状态下人脐静脉内皮细胞中有Piezo1表达;通过不同强度力学刺激,观察到强度刺激在4.14 dyne/cm²时Piezo1变化最明显,其基因与蛋白表达均显著降低;相关性分析结果显示,Piezo1表达与剪切应力的强度梯度无相关性,Piezo1对强度为4.14 dyne/cm²最为敏感。原因分析可能需要选择不同的力作用时间来检测其生物特性。

3.2 剪切应力影响内皮细胞中Piezo1表达的临床意义

2010年Coste等^[6]研究发现Piezo1是机械敏感阳离子通道,由Piezo1/FAM38A基因编码,由包含了30个跨膜区域约2500个氨基酸构成,参与多种生理学过程。类似于许多对机械敏感的内生性阳离子通道,通过GsMTx4可以抑制Piezo1的活性^[13]。Miyamoto等^[14]发现膀胱上皮中Piezo1缺失时的应力诱导会引起Ca²⁺流动减少,以及ATP释放减少。Piezo1在皮肤、膀胱、肾、肝、内皮细胞、牙周组织细胞及红细胞中有广泛表达^[15]。Li等^[16]研究显示Piezo1在小鼠发育血管的内皮细胞中表达,Piezo1基因的缺失会导致小鼠胚胎发育的致命性损伤,在妊娠中期造成血管重构缺陷。Piezo1是血管发育的重要因素,体外层流剪切应力作用下内皮细胞中Piezo1缺失,表现出细胞排列缺陷,这些提示Piezo1的机械力传导与细胞的形态学调节有关^[9]。静止状态下,人脐静脉内皮细胞缺少Piezo1时,表现为eNOS蛋白总量减少,血管内皮生长因子诱发的Ser-1177(增强eNOS活动的关键因子)的磷酸化水平降低,以及内皮细胞迁

移受到抑制^[11]。Huang等^[17]通过研究发现MiR-103a在急性心梗患者中明显升高,而这一过程可能是通过调节Piezo1的表达来实现的。Piezo1的结构和功能影响高血压的发生过程^[18]。运动过程中血流可以影响Piezo1这一机械通道,最终引起血管的收缩过程^[19]。本课题组前期研究明确动脉粥样硬化好发部位的流体剪切应力在4 dyne/cm²左右^[20]。4 dyne/cm²强度比10 dyne/cm²强度明显刺激内皮细胞MCP-1蛋白增高^[21]。低剪切应力诱导IL-8表达,且4.2 dyne/cm²时的蛋白量最高^[22]。Fractalkine在动脉粥样硬化中也起重要作用,而低剪切应力可以诱导内皮细胞Fractalkine表达上调,这一过程有低剪切应力激活的p38信号分子参与^[23]。本实验显示低剪切应力4.14 dyne/cm²可以明显降低Piezo1在内皮细胞中的表达,提示Piezo1可能参与低剪切应力诱导的动脉粥样硬化过程。

本研究通过对内皮细胞进行不同强度的力学刺激,发现低剪切应力4.14 dyne/cm²降低Piezo1在内皮细胞的表达,这为了解复杂的生命发育过程提供了新方式和观点。然而剪切应力是如何刺激Piezo1表达,Piezo1又是否以及如何参与动脉粥样硬化的发生发展过程,还需要进一步深入研究。

【参考文献】

- [1] BOWDEN N, BRYAN M T, DUCKLES H, et al. Experimental approaches to study endothelial responses to shear stress[J]. Antioxid Redox Signal, 2016, 25(7): 389-400.
- [2] LIBBY P. Inflammation in atherosclerosis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012, 32(9): 2045.
- [3] WRAGG J W, DURANT S, MCGTTRICK H M, et al. Shear stress regulated gene expression and angiogenesis in vascular endothelium[J]. Microcirculation, 2014, 21(4): 290-300.
- [4] CHIU J J, CHIEN S. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives[J]. Physiol Rev, 2011, 91(1): 327-387.
- [5] ZHOU J, LIY S, CHIEN S. Shear stress-initiated signaling and its regulation of endothelial function[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014, 34(10): 2191-2198.

- [6] COSTE B, MATHUR J, SCHMIDT M, et al. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels [J]. *Science*, 2010, 330(6000): 55-60.
- [7] VOLKERS L, MECHIOUKHI Y, COSTE B. Piezo channels: from structure to function[J]. *Pflugers Arch*, 2015, 467(1): 95-99.
- [8] CHIU J J, CHEN L J, CHEN C N, et al. A model for studying the effect of shear stress on interactions between vascular endothelial cells and smooth muscle cells[J]. *J Biomech* 2004, 37: 531-539.
- [9] RANADE S S, QIU Z Z, WOO S H, et al. Piezo1, a mechanically activated ion channel, is required for vascular development in mice[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(28): 10347-10352.
- [10] LI J, HOU B, TUMOVA S, et al. Piezo1 integration of vascular architecture with physiological force[J]. *Nature*, 2014, 515(7526): 279-282.
- [11] BAGRIANTSEV S N, GRACHEVA E O, GALLAGHER P G. Piezo proteins: regulators of mechanosensation and other cellular processes [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(46): 31673-31681.
- [12] 李慧, 李秀娟, 古力热巴·夏依买旦, 等. EA.HY926人脐静脉内皮细胞株与原代细胞生物特性的比较研究[J]. *新疆医科大学学报*, 2014, 37(1): 36-39.
- LI H, LI X J, GULIREBA X, et al. Comparative study of biological characteristics between primary human umbilical vein endothelial cells and human umbilical vein endothelial cell line[J]. *Journal of Xinjiang Medical University*, 2014, 37(1): 36-39.
- [13] BAE C, SACHS F, GOTTLIEB P A. The mechanosensitive ion channel Piezo1 is inhibited by the peptide GsMTx4[J]. *Biochemistry*, 2011, 50(29): 6295-6300.
- [14] MIYAMOTO T M, NAKAGOMI H, KIRA S, et al. Piezo1, a novel mechanosensor in the bladder urothelium, transmits signals of bladder sensation[J]. *Eur Urol Suppl*, 2013, 12(1): e71.
- [15] JIN Y, LI J, WANG Y T, et al. Functional role of mechanosensitive ion channel Piezo1 in human periodontal ligament cells[J]. *Angle Orthod*, 2015, 85(1): 87-94.
- [16] LI J, HOU B, BEECH D J. Endothelial Piezo1: life depends on it[J]. *Channels (Austin)*, 2015, 9(1): 1-2.
- [17] HUANG C L, LI L Z, CHEN X F, et al. MiR-103a targeting Piezo1 is involved in acute myocardial infarction through regulating endothelium function[J]. *Cardiol J*, 2016, 23(5): 556-562.
- [18] WANG S P, CHEN N R, KAUAR H, et al. Endothelial cation channel PIEZO1 controls blood pressure by mediating flow-induced ATP release[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(12): 4527-4536.
- [19] BEECH D J. Endothelial Piezo1 channels as sensors of exercise[J]. *J Physiol*, 2018, 596(6): 979-984.
- [20] 聂永梅, 陈槐卿, 蒋文涛. 动脉粥样硬化模型中颈动脉分叉流场的数值模拟[J]. *航天医学与医学工程*, 2006, 19(2): 134-138.
- NIE Y M, CHEN H Q, JIANG W T. Numerical simulation of carotid bifurcation flow field in atherosclerosis model[J]. *Space Medicine & Medical Engineering*, 2006, 19(2): 134-138.
- [21] YU H, ZENG Y, HU J, et al. Fluid shear stress induces the secretion of monocyte chemoattractant protein-1 in cultured human umbilical vein endothelial cells[J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2002, 26(3): 199.
- [22] 成敏, 聂永梅, 陈槐卿. 流体切应力作用时间对内皮细胞IL-8生成的影响[J]. *生物医学工程学杂志*, 2004, 21(3): 363-366.
- CHENG M, NIE Y M, CHEN H Q. Force-dependent effects of interleukin-8 production in endothelial cells exposed to fluid shear stress [J]. *Journal of Biomedical Engineering*, 2004, 21(3): 363-366.
- [23] JONES B A, BEAMER M, AHMED S. Fractalkine/CX3CL1: a potential new target for inflammatory diseases[J]. *Mol Intern*, 2010, 10(5): 263-270.

(编辑:黄开颜)