论著

文章编号:1000-5404(2009)12-1144-03

CASK下调表达对人血管内皮细胞ECV-304增殖能力的影响

陈 建,苏踊跃,梁光萍,陈 渝,罗向东,杨宗城 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 建立CASK下调表达细胞株,研究钙/钙调蛋白依赖性丝氨酸蛋白激酶(calcium, calmodulin-associated serine/threonine kinase, CASK)下调表达对ECV-304细胞增殖能力的影响。**方法** 将包含针对CASK基因干扰siRNA片段的pGenesil-1-hCASK重组质粒转染人ECV-304细胞株,经G418加压筛选,成功筛选出CASK下调表达的细胞株。用蛋白免疫印迹法鉴定转染细胞中CASK基因的表达水平。采用流式细胞技术、MTT法观察CASK下调表达对ECV-304细胞增殖能力的变化。**结果** 成功筛选出CASK下调表达ECV-304细胞株(siCASK细胞株),这些细胞在传代过程中绿色荧光蛋白能维持表达,细胞株中转染阳性率在90%以上;经蛋白免疫印迹法检测CASK表达明显降低;siCASK细胞株中G_0/G_1细胞比率下降,G_2M期细胞比率明显上升,增殖指数明显提高,生长曲线左移。**结论** 成功建立了CASK下调表达的ECV-304细胞株,CASK下调表达可导致细胞增殖能力增强。

关键词: RNA干扰;钙/钙调蛋白依赖性丝氨酸蛋白激酶;真核细胞转染;细胞增殖
中图法分类号: R322.12;R329.28;R345 **文献标识码:** A

Effects of CASK down-regulation on the proliferation of ECV-304 cells

CHEN Jian, SU Yong-yue, LIANG Guang-ping, CHEN Yu, LUO Xiang-dong, YANG Zong-cheng (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish calcium, calmodulin-associated serine/threonine kinase (CASK) down-regulation ECV-304 cell line and to study the effects of CASK down-regulation on the proliferation of ECV-304 cells. **Methods** The recombinant pGenesil-1-hCASK plasmids containing siRNA targeting CASK gene were transfected into ECV-304 cells. The stable cell strain was screened by adding G418 into cell culture medium. The protein expression levels of CASK gene were detected by Western Blotting. Flow cytometry and MTT method were used to investigate the effects of CASK down-regulation on the proliferation of the transfected cells. **Results** CASK down-regulation cell strain, siCASK cell line, was successfully screened. These cells could maintain over 90% green fluorescent protein expression. The decreased expression of CASK could lower but enhance the cell population at G_0/G_1 phase but G_2M phase and lead to left-shift of the cell growth curve. **Conclusion** CASK down-regulation cell strain was successfully constructed and CASK down-regulation could enhance the cell proliferation.

Key words: RNA interference; CASK; eukaryotic transfection; cell proliferation

烧伤后多种因素可导致血管内皮细胞的激活与损伤[1],损伤的血管内皮细胞使毛细血管通透性增加、组织脏器微循环障碍,是烧伤后多脏器功能不全综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)的重要发病机制[2]。微循环功能的恢复依赖血管内皮细胞结构及功能的修复。因此,内皮细胞的修复是烧伤后脏器功能障碍防治研究的重要内容之一。损伤修复过程中的一个重要环节就是细胞的增殖反应,如果能全

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973计划)(2005CB522601);国家自然科学基金重点项目(30730093)
Supported by the National Basic Research Program (973 Program, 2005CB522601) and Key Program of the National Natural Science Foundation of China (30730093)
作者简介: 陈 建,女,湖北省枝城市人,博士研究生,主治医师,主要从事细胞信号传导方面的研究。E-mail: hhhcc2003@yahoo.com.cn
通信作者: 罗向东, E-mail: luoxd@mail.tmmu.com.cn
收稿日期: 2009-03-18;**修回日期:** 2009-04-07

面揭示细胞增殖调控的信号网络,我们就可能主动参与内皮细胞损伤的修复进程,在治疗大面积烧伤、防治内脏并发症时就可能掌握主动。

人钙/钙调蛋白依赖性丝氨酸蛋白激酶(CASK)广泛分布于多种组织和细胞,属于膜相关鸟苷酸激酶家族成员(MAGUK),现已发现它具有参与蛋白质的分子组织、细胞连接组装、转录调节、发育调节等功能。本实验室研究发现,CASK 可参与细胞的增殖与分化调节,过度表达的 CASK 可以明显的抑制 ECV-304 细胞的增殖[3],提示 CASK 可能在血管内皮细胞的增殖调控中起到一定的作用。本研究拟建立 CASK 下调表达细胞株(siCASK 细胞株)并观察其对细胞增殖能力的影响,为今后 CASK 基因功能研究提供实验工具。

1　材料与方法

1.1　实验材料及仪器

siRNA 表达载体 pGenesil-1 购自武汉晶赛公司、含针对 CASK 基因的 siRNA 寡核苷酸序列的重组质粒 pGenesil-1-hCASK 由苏踊跃博士后惠赠(siRNA 模板序列设计借助于 www. ambion. com 网站,RNAi 靶点位于 CASK 基因外显子 2,序列为 CASK:5′-GATCCGTCCAGGGTTAAGTACAGATTCAAGAG-ATCTGTACTTAACCCTGGACTTTTTTGGAAA-3′; CASKa:5′-AG-CTTTTCCAAAAAAGTCCAGGGTTAAGTACAGATCTCTTGAATC-TGTACTTAACCCTGGACG-3′,重组质粒经测序鉴定)。人血管内皮细胞株 ECV-304 细胞(ATCC)、大肠杆菌 DH5α 由本室保存;M199 培养基购于 HyClone 公司;质粒抽提试剂盒购于 Omega 公司;Dotap 购于 Promega 公司;G418 购于 Gibco 公司;BCA 蛋白浓度检测试剂盒、ECL 增强化学发光试剂盒购于 Pierce 公司、鼠抗人 CASK 抗体购于 Santa Cruz 公司;内对照鼠抗 GAPDH 抗体及 HRP 耦联的兔抗鼠二抗购于上海康成。

GS215G 型台式低温高速离心机(Beckman)、Mini-PROTEAN Ⅱ电泳槽及转移电泳槽(Bio-Rad)、全自动凝胶成像及图象分析系统(Bio-Rad)、荧光倒置显微镜(Nikon)、酶标仪(Bio-Rad)、FACS Calibur 流式细胞仪(BD)。

1.2　实验方法

1.2.1　siCASK 细胞株的建立　　分别将 siRNA 重组质粒、pGenesil-1 空载体转染 ECV-304 细胞,按照 1 μg 质粒加 5 μl Dotap 转染试剂的比例进行转染,转染 48 h 后向培养液中加入 G418 至终浓度 800 μg/ml 继续培养,每隔 3 天换液 1 次,维持相同浓度的 G418 持续筛选,中途不传代,6 周左右细胞呈单克隆生长后,继续筛选 2 ~ 3 周,挑取细胞数较多的单克隆于新 6 孔板培养扩增,适时冻存。培养过程中用 Nikon 荧光倒置显微镜、430 nm 滤光片下观察 ECV-304 细胞中绿色荧光蛋白的表达情况,拍照保存。

1.2.2　siCASK 细胞株 CASK 蛋白抑制效率的检测　　等量接种 ECV-304 及筛选出的 ECV-304-pGenesil-1 细胞、siCASK 细胞株的 3 个克隆,常规培养 48 h 后用 RIPA 裂解液冰上裂解细胞,提取细胞总蛋白,BCA 法进行蛋白定量,分 ECV-304 对照、ECV-304-pGenesil-1、siCASK 细胞株(3 个克隆)5 组,每组细胞蛋白总量 30 μg 上样,聚丙烯酰胺凝胶电泳,Western blot 检测 CASK 蛋白表达,anti-CASK 抗体稀释比例 1∶1 000,兔抗鼠 IgG HRP 稀释倍数为 1∶5 000,内对照鼠抗 GAPDH 抗体稀释比例 1∶5 000,ECL 化学发光法显色。

1.2.3　MTT 法观察 CASK 下调表达对细胞生长曲线的影响　　收集生长良好的 ECV-304 及筛选出的 siCASK 细胞株细胞,按 3×10^3 个/孔(0.2 ml)接种于 96 孔培养板上,每 8 孔为 1 组,共接种 7 组。每日取 1 组弃去培养液,PBS 漂洗后,向培养液中加入 20 μl MTT 染液,终浓度为 0.5 mg/ml,置培养箱中继续培养,4 h 后将孔中液体吸净,加入 150 μl DMSO,在酶标仪中振荡 10 min,至紫色结晶全部溶解,570 nm 波长处测定其吸光度值 $D(570)$,以每组 $D(570)$ 值的平均值为纵坐标,以时间为横坐标绘制生长曲线。

1.2.4　细胞周期的检测　　把处于对数生长期的 ECV-304 细胞及 siCASK 细胞分别接种于 3.5 cm 平皿,细胞贴壁后无血清培养基培养 12 h 使细胞同步化,然后加入有血清培养基继续培养至细胞融合,0.25% 胰酶消化收集细胞,有血清培养基终止消化,PBS 漂洗 3 遍,70% 乙醇固定,调节细胞密度在 1×10^6/ml,PI 染色,流式细胞仪检测细胞周期。

1.3　统计学处理

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,均数之间的比较采用 t 检验,用 SPSS 10.0 统计软件进行统计学处理。

2　结果

2.1　CASK 下调表达(siCASK)细胞株的建立

将 siCASK 重组质粒转染 ECV-304 细胞,经 6 周左右的 G418 加压筛选和挑取克隆扩大培养,成功筛选出重组质粒转染 ECV-304 细胞株,这些细胞在传代过程中绿色荧光蛋白能维持表达,转染细胞株中转染阳性率在 90% 以上(图 1)。

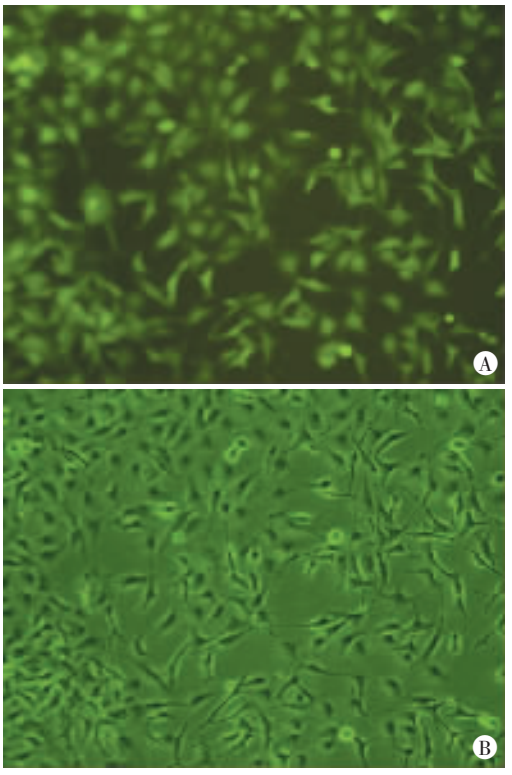
经蛋白免疫印迹法检测,siCASK 细胞株 hCASK 表达明显降低,证实 siCASK 细胞株成功建立(图 2)。

2.2　CASK 下调表达对 ECV-304 细胞周期的影响

同 ECV-304 细胞株相比,siCASK 细胞株中 G_0/G_1 细胞比率下降约 10.7%,G_2M 期细胞比率上升约 58.2%,增殖指数明显提高,提示处于增殖期细胞增多,细胞增殖能力增强。

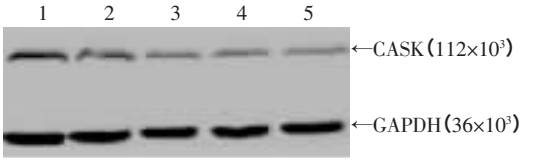
2.3　CASK 下调表达对细胞生长曲线的影响

CASK 下调表达后,siCASK 细胞增殖加快,表现为曲线左移、斜率变陡(图 3),细胞的增殖能力较转染前明显增强,在接种后第 3 天起细胞的生长速度较对照组显著加快。



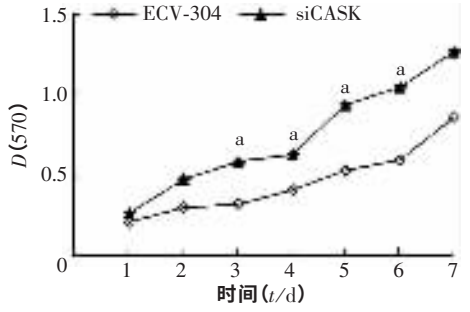
A:绿色荧光蛋白表达阳性细胞大于90%(荧光倒置显微镜);B:培养细胞在普通光源倒置显微镜下同一视野的对照影像

图1 siCASK 细胞株绿色荧光蛋白表达情况 (×100)



1:ECV-304 control;2:ECV-304-pGenesil-1;3-5:筛选出的 siCASK 细胞株的3个细胞克隆

图2 siCASK 细胞株 CASK 蛋白表达



a: $P<0.05$,与 ECV-304 细胞比较

图3 CASK 下调表达对 ECV-304 细胞生长曲线的影响

3 讨论

本实验室研究发现,CASK 可参与细胞的增殖反应,过表达的 CASK 可以明显抑制 ECV-304 细胞的增殖,并发现 Id1 可与 CASK 结合、并通过 E2A 影响下游信号分子 p21 蛋白的表达,提出 CASK 可能是调节细胞增殖反应的新的信号通路[4]。其他学者也报道了 CASK 可调控角质形成细胞增殖反应,通过 RNAi 方法下调 CASK 表达可促进培养角质形成细胞的增殖,并发现 CASK 下调所导致的细胞周期加速同 Myc 的上调表达和 Rb 的磷酸化相关[5]。

本研究建立的 siCASK 细胞株采用了 RNA 干扰技术,并能同时表达绿色荧光蛋白,方便转染效率的观察和细胞株的筛选。在成功建立 siCASK 细胞株的同时,观察了 hCASK 下调表达可以使 ECV-304 细胞的生长曲线左移,细胞群中 G_2M 期细胞比率升高,G_0/G_1 期细胞减少,增殖指数(G_2M+S)升高,提示抑制 CASK 表达可以促使细胞由 G_0/G_1 期进入 G_2/M 期,减轻 G_1/S 期阻滞,是细胞增殖能力增强的表现。这些结果同本室的前期工作——CASK 强制表达可抑制细胞增殖一致,可互为验证和补充。

既往研究发现,诱导表达 CASK 可导致细胞周期依赖性激酶抑制因子(cyclin-dependent kinase inhibitor, CDKI)$p16^{INK4a}$、$p21^{WAF1/CIP1}$ 等表达上调,而它们发挥抑制细胞增殖功能的方式是导致细胞 G_1/S 期阻滞[6,7],提示 CASK 可以通过调节细胞周期调控因子参与细胞周期的调控、影响细胞的增殖功能。

由于血管内皮细胞损伤在 MODS 发病机制中起到中心性作用,揭示血管内皮细胞增殖调控的机制对于血管内皮的损伤修复具有重要意义,而 CASK 参与细胞增殖调控机制的发现可能为血管内皮细胞损伤修复的研究提供新的思路。

参考文献:

[1] Volk T, Kox W J. Endothelium function in sepsis[J]. Inflamm Res, 2000, 49(5): 185-198.

[2] Pastores S M, Katz D P, Kvetan V. Splanchnic ischemia and gut mucosal injury in sepsis and the multiple organ dysfunction syndrome[J]. Am J Gastroenterol, 1996, 91(9): 1697-1710.

[3] Qi J, Su Y, Sun R, *et al*. CASK inhibits ECV304 cell growth and interacts with Id1[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 328(2): 517-521.

[4] Sun R, Su Y, Zhao X, *et al*. Human calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase regulates the expression of p21 *via* the E2A transcription factor[J]. Biochem J, 2009, 419(2): 457-466.

[5] Ojeh N, Pekovic V, Jahoda C, *et al*. The MAGUK-family protein CASK is targeted to nuclei of the basal epidermis and controls keratinocyte proliferation[J]. J Cell Sci, 2008, 121(Pt 16): 2705-2717.

[6] Shapiro G I, Edwards C D, Rollins B J. The physiology of p16 (INK4A)-mediated G1 proliferative arrest[J]. Cell Biochem Biophys, 2000, 33(2): 189-197.

[7] Liu G, Lozano G. p21 stability: linking chaperones to a cell cycle checkpoint[J]. Cancer Cell, 2005, 7(2): 113-114.

(编辑 吴培红)