论著

文章编号:1000-5404(2010)14-1546-03

CASK在血管内皮细胞缺氧应激增殖反应中的作用

苏踊跃[1],孙林辉[1],邬 江[1],徐永清[1],陆 声[1],陈 兵[1],罗向东[2],许 波[3] (650032 昆明,成都军区昆明总医院骨科[1];400038 重庆,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[2],口腔科[3])

[摘要] **目的** 建立钙/钙调蛋白依赖性丝氨酸蛋白激酶(calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase, CASK)剔降血管内皮细胞株,初步探讨其对短暂缺氧的反应性。**方法** 采用RNAi技术和脂质体介导的细胞转染技术,建立CASK表达下调的血管内皮细胞株,并观察缺氧应激条件下培养0(常氧)、1、3、6、12 h细胞增殖指数的变化。**结果** 血管内皮细胞在短暂缺氧后细胞增殖指数升高(常氧:42.93%,1 h:50.46%, 3 h:52.53%),随着缺氧时间延长增殖指数则低于常氧对照组(6 h:40.71%,12 h:25.18%)。而CASK剔降血管内皮细胞株,在1~12 h缺氧应激时限内,其增殖指数无明显变化。**结论** CASK剔降内皮细胞株与对照EA.hy926细胞比较,对短暂缺氧应激的增殖反应性减弱。

[关键词] 缺氧;钙/钙调蛋白依赖性丝氨酸蛋白激酶;血管内皮细胞

[中图法分类号] R322.12;R345.57;R364.4 **[文献标志码]** A

Role of calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase in hypoixa related endothelial cell proliferation

Su Yongyue[1], Sun Linhui[1], Wu Jiang[1], Xu Yongqing[1], Lu Sheng[1], Chen Bing[1], Luo Xiangdong[2], Xu Bo[3] ([1]Department of Orthopaedics, Kunming General Hospital of Chengdu Military Command, Kunming, Yunnan Province, 650032; [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, [3]Department of Stomatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] Objective To screen an endothelial cell line with calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (CASK) knockdown and explore the cells' reaction to hypoxia stress. Methods CASK RNA interference plasmid pGenesil-siCASK and control plasmid pGenesil-Negative were generated, and then transfected into EA.hy926 endothelial cells with liposome followed by screened with G418. The expression of CASK was detected in normal, pGenesil-siCASK and pGenesil-Negative transfected cells with Western blotting. Hypoxic stress was induced in the transfected and untransfected cells cultured under an atmosphere with an airflow (94% N_2, 5% CO_2 and 1% O_2) at 10 L/min in an interval of 5 min inflow and 5 min stillness for 3 times. After the cells were cultured for 0, 1, 3, 6 and 12 h, the cell cycle was investigated by using flow cytometric analysis. Results Western blotting results showed that CASK was mildly expressed in the EA.hy926 cells after pGenesil-siCASK transfection, while its expression had no obvious change in those transfected with pGenesil-negative. The cell proliferation indexes of EA.hy926 cells were elevated by short term hypoxia (0 h: 42.93%, 1 h: 50.46% and 3 h: 52.53%), while were decreased with the prolongation of hypoxic duration (6 h: 40.71%, 12 h: 25.18%). However, the proliferation indexes of CASK-knockdown endothelial cells were not changed significantly under transient hypoxic stress. Conclusion CASK knockdown endothelial cells have less proliferation changes than EA.hy926 endothelial cells under short term hypoxic stress.

[Key words] hypoxia; calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase; endothelial cells

Corresponding author: Luo Xiangdong, E-mail:luoxd@mail.tmmu.com.cn

[通信作者] 罗向东,E-mail:luoxd@mail.tmmu.com.cn

钙/钙调蛋白依赖性丝氨酸蛋白激酶(calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase, CASK)属于膜相关鸟苷酸激酶(membrane associated guanylate kinase, MAGUK)家族,通常作为蛋白支架(scaffolds),利用其多蛋白结构域,结合不同的靶蛋白,形成分子内或/和分子间的多蛋白复合物,参与构建细胞膜骨架、细胞连接,调节靶蛋白亚细胞定位,参与细胞内外信息传递等重要的细胞生理过程[1]。近年研究表明,CASK 可能具有更为广泛的生物学功能,如细胞增殖调节[2],基因转录调节[3,4]等。我们前期研究证实,CASK 在血管内皮细胞缺氧应激反应后,表达明显升高,提示其可能作为缺氧反应蛋白参与血管内皮细胞的应激反应[5]。本研究应用 RNA 干扰技术构建 CASK 剔降[6]的血管内皮细胞株,探讨 CASK 对缺氧状态下血管内皮细胞应激反应的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

血管内皮细胞株 EA. hy926(美国 Edgell 教授惠赠),DMEM 培养基(美国 Sigma 公司),小鼠抗人 CASK 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),偶联辣根过氧化物酶的抗人 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体,脂质体转染试剂 Dotap(瑞士 Roche 公司),蛋白定量试剂盒(美国 Pierce 公司)。

1.2 siRNA 方法介导的 CASK 剔降细胞株构建

构建靶基因 CASK 特异性的 siRNA 质粒,以 pGenesil-1(武汉晶赛公司)为载体,选择 CASK mRNA(GenBank accession number: AF032119)编码区 +152 ~ +170 位 19 bp 作为靶位点(本室前期研究确认的抑制效率较高的 siRNA 靶序列[7]),同时选取无关对照靶序列(Ambion 公司提供,与人基因组所有 mRNA 无明显同源性),分别亚克隆方法构建 pGenesil-siCASK 重组质粒和 pGenesil-Negative 重组质粒,转染 EA. hy926 细胞,以 G418 (终浓度 600 mg/L)进行细胞克隆筛选,借助载体携带的增强绿色荧光蛋白表达序列,在倒置荧光显微镜下,挑选带有绿色荧光蛋白的细胞克隆。细胞克隆编号后,采用蛋白免疫印迹验证 CASK 的表达水平。

1.3 蛋白免疫印迹

实验分 4 组,正常对照组:未转染的 EA. hy926 细胞;转染无关质粒对照组:EA. hy926 细胞转染无关 siRNA 质粒;细胞克隆组 1、2:分别为 Genesil-siCASK 转染后筛选的 2 个细胞克隆。以 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,样品蛋白以 20 μg 加样。聚丙烯酰胺凝胶电泳以及转膜,免疫印迹均按照分子克隆实验指南操作,条带以增强化学发光法显示。

1.4 细胞培养

血管内皮细胞株 EA. hy926 以 DMEM 培养基培养于 37 ℃,5% CO_2,95% 空气(体积分数) 培养箱中,添加 1% HAT,10% 胎牛血清。

缺氧置换反应在密闭容器(Billups-Rothenberg, Del Mar, CA)中完成[8],以 10 L/min 流量充入配制好的混合气体(体积分数 94% N_2、5% CO_2、1% O_2),持续 5 min 后关闭进、出气口,平衡 5 min,重复注气和平衡 3 次。

1.5 细胞周期检测

EA. hy926 细胞和 EA. hy926-siCASK 细胞接种于直径 6.0 cm 的平皿,3.0×10^5/孔,培养至 60% ~70% 融合时,用无血清培养基培养 24 h 进行细胞周期同步,进行缺氧气体置换,在缺氧条件下,分别培养 0、1、3、6、12 h。在规定的时间,取出细胞培养皿,添加胎牛血清(终浓度体积分数 10%)后,继续常规培养 24 h。以 0.25% 胰蛋白酶和 0.04% EDTA 消化细胞,以 PBS 洗涤细胞沉淀 3 次,充分涡旋形成单细胞悬液,离心,细胞用 70% 乙醇悬浮固定,碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色,上机分析。根据细胞周期的结果,计算细胞增殖指数。

增殖指数 = G_2/M 期细胞 + S 期细胞/细胞总数 ×100%

1.6 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件,各组间多重比较采用双因素方差分析。

2 结果

2.1 CASK 剔降血管内皮细胞株的克隆化筛选

应用本室前期构建的 CASK 小干扰 RNA 质粒 pGenesil-siCASK,转染 EA. hy926 细胞,经 G418 压力筛选后,倒置荧光显微镜下可见细胞呈现克隆样生长(图 1)。挑取单个细胞克隆进行扩增培养后,部分冻存保种,部分用于继续培养,鉴定 CASK 表达情况。

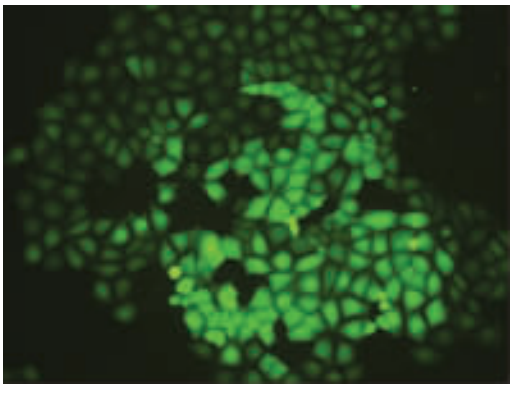
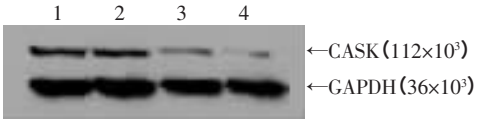


图 1 小 RNA 介导的 CASK 剔降血管内皮细胞株筛选
(倒置荧光显微镜 ×200)

2.2 CASK 剔降血管内皮细胞株的鉴定

以增强绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)荧光标志为筛选标准进行的细胞克隆筛选,并不能保证 CASK 表达量均一性下调。因此需要进行细胞克隆 CASK 表达量的鉴定。图 2 为 3 个细胞克隆中 CASK 表达情况的蛋白免疫印迹定量。可见转染 Genesil-siCASK RNAi 质粒后,细胞克隆组 2 的 CASK 表达抑制效率最高,光密度分析表明,抑制率达

到76%。

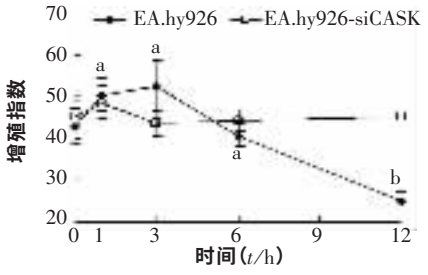


1:正常对照组;2:转染无关质粒组;3:细胞克隆组1;4: 细胞克隆组2

图2 Western blot检测不同细胞克隆CASK的表达

2.3 CASK剔降细胞对缺氧应激反应性

结果表明,CASK剔降内皮细胞株与对照EA.hy926细胞比较,对短暂缺氧应激的增殖反应性减弱。EA.hy926细胞在短暂缺氧(1、3 h)后细胞增殖指数升高,随着缺氧时间延长,增殖指数低于常氧对照组。而CASK剔降细胞株,在1~12 h缺氧应激时限内,其增殖指数无明显变化(图3)。



a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与EA.hy926组比较

图3 缺氧应激对EA.hy926细胞增殖的影响

3 讨论

CASK是一种具有多个功能结构域的细胞支架蛋白,其作用方式主要是将功能相关的蛋白质在物理空间上进行装配,以便执行复杂的生物学功能。前期研究中我们发现CASK介导了血管内皮细胞的生长抑制信号[2],而CASK参与细胞增殖调节的可能机制,以及CASK参与细胞增殖调控的功能是否在创伤应激反应、组织修复方面具有一定的作用一直是我们关注的课题。此前,我们在血管内皮细胞株EA.hy926细胞短暂缺氧的实验模型中,发现短暂缺氧条件下,CASK表达升高[5],这促使我们有兴趣了解CASK是否参与血管内皮细胞缺氧应激的调节。本研究应用RNA干扰技术,构建了CASK剔降血管内皮细胞株EA.hy926-siCASK,进而通过短暂缺氧应激反应及细胞周期检测,发现CASK剔降内皮细胞株与对照EA-hy926细胞比较,对短暂缺氧应激的增殖反应性减弱。EA-hy926细胞在短暂缺氧(1、3 h)后细胞增殖指数一过性升高,随着缺氧时间延长,增殖指数低于常氧对照组。而CASK剔降细胞株,在1~12 h缺氧应激时限内,其增殖指数无明显变化。

血管内皮细胞是创伤、感染、休克等多种伤病中极易受损的细胞,同时也是参与机体应激反应、创伤组织修复的重要成员。创伤导致的低血容量性休克是影响各脏器功能的关键因素,也是严重创伤防治的重点。本研究提示短暂缺氧条件下,EA.hy926血管内皮细胞启动了适应性反应,也承受着损伤性反应,细胞增殖指数先一过性增高,然后降低,而CASK剔降的EA.hy926血管内皮细胞,对短期缺氧应激表现出增殖方面的稳定性,表现为增殖指数变化不大,这是否意味着CASK可能参与血管内皮细胞缺氧应激内源性保护机制?

最近我们发现,CASK参与血管内皮细胞增殖调节,可能与细胞周期分子p21的表达调节有关[9]。有趣的是,以往科学家们普遍认为,CASK的钙调蛋白激酶域是一个非活性假性激酶域,因为其缺少结合Mg^{2+}规范的模体,但最近研究发现,CASK能在缺少Mg^{2+}结合的情况下起到活性蛋白激酶的作用[10]。这说明CASK可能不是单一功能的细胞脚手架蛋白,其多样的生物学功能,尚需深入研究。

参考文献:

[1] 刘 煜, 赵晓航, 吴 旻. 钙/钙调蛋白依赖性丝氨酸蛋白激酶的结构和功能[J]. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29(1): 14-18.

[2] 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.

[3] Dimitratos S D, Woods D F, Stathakis D G, *et al*. Signaling pathways are focused at specialized regions of the plasma membrane by scaffolding proteins of the MAGUK family[J]. Bioessays, 1999, 21(11): 912-921.

[4] Bredt D S. Cell biology. Reeling CASK into the nucleus[J]. Nature, 2000, 404(6775): 241-242.

[5] 苏踊跃, 梁光萍, 许波, 等. 缺氧对钙/钙调蛋白依赖性丝氨酸蛋白激酶表达的影响及其与p38 MAPK信号通路活化的关系[J]. 中华实验外科杂志, 2008, 25(1): 39-41.

[6] 苏踊跃, 齐洁, 罗向东. RNA干扰技术在功能基因研究中的应用[J]. 生命的化学, 2002, 22(5): 485-487.

[7] 孙荣距, 杨宗城, 苏踊跃, 等. siCASK重组载体构建及效应检测[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(23):2123-2125.

[8] 李晓东, 黄跃生, 张家平. 机械牵张对缺血缺氧心肌细胞肌球蛋白重链mRNA表达的影响[J]. 中华烧伤杂志, 2004, 20(3): 138-140.

[9] 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.

[10] Mukherjee K, Sharma M, Urlaub H, *et al*. CASK Functions as a Mg^{2+}-independent neurexin kinase[J]. Cell, 2008, 133(2): 328-339.

(**收稿**:2009-12-27;**修回**:2010-03-25)

(编辑 汪勤俭)