

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.24.001

CD151 促进 Rac/cdc42 信号通路激活并维持体外血管生成的稳定性*

刘涛¹, 李鹏程², 刘照宇², 刘正湘², 左后娟^{2△}

(1. 华中科技大学同济医学院附属普爱医院心血管内科, 武汉 430000; 2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院心血管内科, 武汉 430000)

[摘要] 目的 探讨 CD151 及其 QRD 突变体对 Rac/cdc42 信号通路和体外血管生成的稳定性影响及机制。方法 脂质体介导质粒(pAAV-CD151、pAAV-CD151-QRD、pAAV-anti-CD151)转染人脐静脉内皮细胞(HUVEC),将 HUVECs 细胞分为对照组、CD151 组、CD151-QRD 组,anti-CD151 4 组,分别取各个不同时间点评价 Matrigel 上的各组管腔血管形成能力及新生血管的稳定性。Western blot 法检测各组 CD151 蛋白表达,以及 Rac 和 cdc 42 信号通路蛋白表达。结果 CD151 组内皮细胞 CD151 表达(1.86 ± 0.15)明显高于对照组(0.90 ± 0.06),差异有统计学意义($P < 0.01$);CD151-QRD 组(1.75 ± 0.16)与 CD151 组相比 CD151 蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$),但 anti-CD151 组蛋白表达(0.51 ± 0.06)明显下降。在 12 h Matrigel 上 CD151 及其他各组之间血管生成比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。36 h 时,各组血管生成有区别。72 h,CD151 组 Matrigel 上血管生成明显高于其他各组,其他各组生成的血管不能维持。CD151 高表达促进 cdc 42,Rac 蛋白表达增加,CD151-QRD 组、anti-CD151 组蛋白表达则较 CD151 组下降。结论 CD151 促进 Rac 和 cdc 42 信号通路激活,促进体外血管生成并可维持生成血管的稳定性。

[关键词] CD151;脐静脉;内皮细胞;血管生成;血管稳定性**[中图分类号]** R543.5**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)24-3313-03

The promotion of CD151 on activation of Rac/cdc42 signaling pathway and its maintenance on angiogenesis's stability in vitro*

Liu Tao¹, Li Pengcheng², Liu Zhaoyu², Liu Zhengxiang², Zuo Houjuan^{2△}(1. Department of Cardiology, Puai Hospital, Affiliated Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430000, China;
2. Department of Cardiology, Tongji Hospital, Affiliated Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430000, China)

[Abstract] **Objective** To discuss the effect of CD151 and QRD mutant on Rac/cdc42 pathway and the angiogenesis capabilities and vascular stability. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) lines were transfected (pAAV-CD151, pAAV-CD151-QRD, pAAV-anti-CD151) by plasmid liposome-mediated transfection, HUVECs cells were divided into control group, CD151 group, CD151-QRD group, and anti-CD151 group. Lumen formation on Matrigel was used to evaluate the angiogenesis capacity and stability of neovascularization in different times. The levels of CD151, Rac and cdc42 protein were tested by Western blot. **Results** CD151 expression in endothelial cells was significantly higher in CD151 group (1.86 ± 0.15) than that in the control group (0.90 ± 0.06), with statistical difference ($P < 0.01$), but had no statistical difference between CD151 group and CD151-QRD group (1.75 ± 0.16, $P > 0.05$), and it was significantly lower in anti-CD151 group (0.51 ± 0.06) than that in CD151 group. There was no significant difference in angiogenesis capabilities between CD151 and other groups at 12 hours ($P > 0.05$), the angiogenesis differed in each group at 36 hours. CD151 groups' matrigel angiogenesis was significantly higher than other groups', and blood vessels could not be maintained in other groups at 72 hours. High expression of CD151 could promote higher expression of Rac and cdc 42 protein than the CD151-QRD group and the anti-CD151 group. **Conclusion** CD151 promotes the activation of Rac and cdc 42 signaling pathway, and promotes angiogenesis and the maintenance of stability in vitro angiogenesis.

[Key words] CD151;umbilical veins;endothelial cells;angiogenesis;vascular stability

CD151 是四跨膜蛋白超家族重要的成员之一,与整合素的作用关系最为密切^[1-5]。血管形成的过程中,内皮细胞发生极化,细胞间接触形成,CD151 定位在极化内皮基底膜的外侧^[6-7]。CD151 在血管生成中有重要作用,其是否通过与整合素结合调节内皮细胞黏附影响血管的新生,以及维持新生血管稳定性的机制并不清楚。CD151-QRD 是整合素结合缺陷的 CD151 突变体,将破坏 CD151 与整合素的结合,本研究通过

Matrigel 上的管腔形成实验评价各组血管形成能力及新生血管的稳定性维持的差异。Rac 和 cdc 42 是血管生成过程中调节内皮细胞增殖、迁移,促进细胞间黏附的主要信号转导分子^[8],本研究将进一步探讨 CD151 促进血管形成及新生血管稳定性的相关分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和细胞株 pZeoSV-CD151 质粒由美国 Oklahoma 大学张欣教授提供。pAAV-CD151-QRD 突变体采用定点突变法构建, pAAV-anti-CD151 质粒构建采用反义核苷酸技术将 CD151 基因反向插入载体; 已通过测序证实目的质粒的构建。人脐静脉内皮细胞株 (HUVECs) 购自武汉大学。

1.1.2 主要试剂 琼脂糖 (agarose)、胰蛋白酶 (Trypsin)、溴乙啶、改良 Eagle 培养基 (DMEM)、二甲基亚砷购自美国 Sigma 公司。Matrigel、Fugene-HD 转染试剂购自美国 BD 公司。胎牛血清购自美国 Gibco 公司。鼠抗人 CD151 抗体 (5C-11) 由美国 Oklahoma 大学张欣教授提供, Rac 抗体、cdc42 抗体、 β -actin 抗体购自美国 SantaCruz 公司。化学发光试剂购自美国 Pierce 公司。PVDF 膜购自美国 Life Science 公司。

1.1.3 仪器 超低温冰箱 (Revco 公司, 美国)、JA1003 型电子天平 (武汉医用仪器公司)、HQ-45 型恒温摇床 (中科院武汉科学仪器厂)、DKZ-2 电热恒温震荡水槽 (上海医用电子仪器厂)、台式高速低温离心机 (Beckman 公司, 美国)、微量紫外分光光度计、电泳仪 (Bio-Rad 公司, 美国)、微型离心机 (Sigma 公司, 美国)、荧光倒置显微镜 (Nikon 公司, 日本)。

1.2 方法

1.2.1 HUVECs 细胞的培养 HUVECs 细胞复苏, 接种至 75 cm 的培养瓶中 (0.2% 明胶铺被), 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中采用 DMEM 培养基培养 (含 10% 胎牛血清), 贴壁后换液, 细胞生长融合后传代。继续培养, 选取第 3~4 代亚融合状态的 HUVECs 进行实验。

1.2.2 pAAV-CD151、pAAV-CD151-QRD、pAAV-anti-CD151 质粒的转染 HUVECs 细胞分为对照组、CD151 组、CD151-QRD 组、anti-CD151 4 组。对照组采用 Fugene-HD 及等体积磷酸盐缓冲液 (PBS), 其余组将质粒与 Fugene-HD 配成混合体系 (质粒终浓度为 2 μ g/100 μ L, Fugene-HD 转染试剂浓度为 6 μ L/100 μ L), 将 100 μ L 体系溶于 OP-TIM-DMEM 中, 混匀后, 室温下孵育 15 min, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱, 待细胞长至 70%~80% 密度。转染 48 h 检测目的基因蛋白的表达。

1.2.3 管腔形成实验检测 HUVECs 的血管生成能力及血管稳定性的维持 Matrigel 铺 24 孔板 (每孔约加入 100 μ L 融化的 Matrigel 并缓慢凝固), 实验前 1 d 饥饿处理细胞 (更换无血清培养基)。调整细胞计数板浓度至每毫升 1×10^5 个, 加入 500 μ L 细胞悬液, 12、36、72 h 后观察管腔形成情况。

1.2.4 细胞蛋白质的提取及浓度测定 用刮法提取各时间点各组细胞总蛋白。各组取等量的细胞总蛋白常规电泳、转膜、孵育; 加入相应抗体, 4 °C 过夜后加入相应的二抗 (1:5 000), 常温封闭, 洗去二抗, 采用电化学发光 (ECL) 在暗室中曝光; 采用灰度分析软件, 分析目的条带相对吸光度值, 数据用相应的 β -actin 进行标准化处理。

1.2.5 Western blot Western blot 法检测各组 CD151、Rac 和 cdc42 蛋白表达, 计算相对吸光度值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异用单因素方差 (ANOVA) 分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD151 蛋白表达 CD151 组 (1.86 ± 0.15) CD151 蛋白表达明显高于对照组 (0.90 ± 0.06), 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); CD151-QRD 组 (1.75 ± 0.16) 与 CD151 组相比 CD151

蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但 anti-CD151 组蛋白表达 (0.51 ± 0.06) 明显下降。

2.2 Matrigel 上血管生成的能力 在 12 h 时 Matrigel 上 CD151 及其他各组之间血管生成差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。36 h 时, 各组血管生成有区别。但是 72 h 时, CD151 组 Matrigel 上血管生成明显高于其他各组, 其他各组的生成的血管不能维持 (图 1)。显示: CD151 促进体外血管生成并可维持生成血管的稳定性, 而 CD151-QRD 组、anti-CD151 组血管生成和维持血管生成能力明显下降。

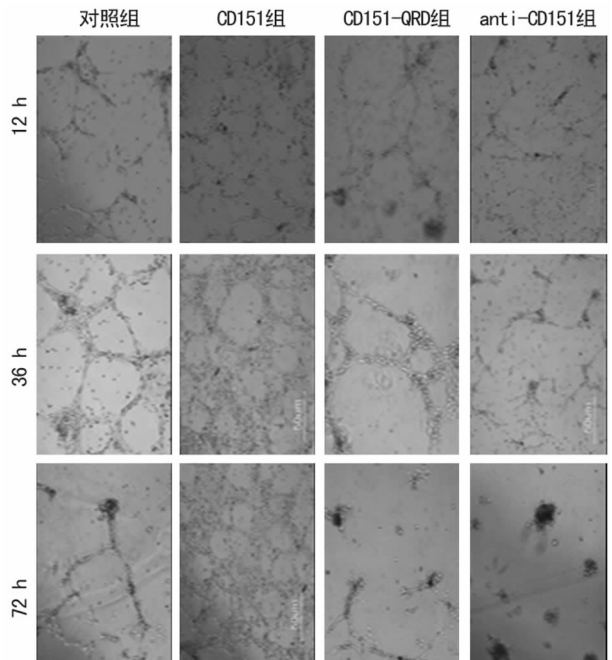
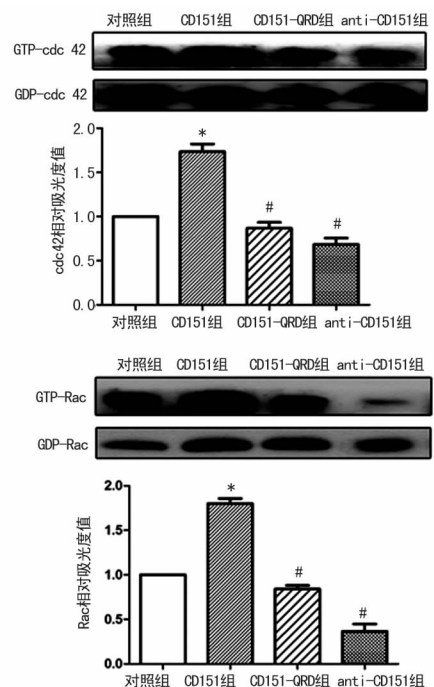


图 1 Matrigel 上类微血管管型结构形成



*: $P < 0.05$, 与对照组比较; #: $P < 0.05$, 与 CD151 组比较。

图 2 Western blot 检测 cdc 42、Rac 信号通路蛋白表达

2.3 Western blot 法检测信号通路 CD151 高表达促进 cdc 42、Rac 蛋白表达增加, CD151-QRD 组、anti-CD151 组蛋白表

达则较 CD151 组下降(图 2)。CD151 促进 cdc 42、Rac 信号通路激活; anti-CD151 组 cdc 42、Rac 信号通路激活明显下降, QRD 破坏 CD151 引起的 cdc 42、Rac 信号通路激活。

3 讨 论

内皮细胞间黏附连接的建立是血管形成的关键环节, 无论是机体最初的血管形成还是在原有血管基础上的血管再生, 均以内皮细胞网络结构形成为前提, 内皮细胞间的节点形成, 是各种不同类型血管形成的关键调节者^[9]。前期研究表明, CD151 在血管形成的过程中发挥着极为重要的作用^[10-12]。CD151 定位在极化内皮基底膜的外侧, 可能通过与整合素相互作用, 参与整合素相关的内皮细胞-细胞间的黏附, 调节血管形成及稳定性维持。

本研究采用前期构建的整合素结合缺陷的 CD151-QRD 突变体, 以及采用反义核苷酸技术构建的 anti-CD151 基因^[13]。体外内皮细胞管腔形成实验研究中证实, CD151 基因表达增加, 其体外血管再生能力明显增强, 相同时间内, 内皮细胞节点形成数目明显高于对照组, 抑制 CD151 的表达, 内皮细胞管腔形成受到抑制。对于整合素结合缺陷的 CD151-QRD 突变体研究, 本研究发现, 内皮细胞管腔形成能力明显被削弱, 这可能与突变体组中内皮细胞黏附、迁移、侵袭能力被削弱有关。随着时间的推移, 36 h, 各组血管生成有区别。72 h 后, CD151 高表达组血管结构清晰完整, 但其余各组新形成的血管结构均有不同程度的破坏, 以 CD151 表达抑制组破坏最为明显。因此, 本研究认为, CD151 是通过与整合素结合形成复合物促进和维持细胞黏附结构形成及黏附稳定性维持, 影响内皮细胞迁移、侵袭等血管形成的相关事件, 最终促进体外内皮细胞血管形成, 维持血管稳定性的。

Cdc42 与 Rac 协同作用, 参与调节血管再生中内皮细胞管腔形成的过程^[14-15]。本研究观察到 CD151-QRD 突变体、anti-CD151 削弱了 Rac、cdc42 的激活, 而 CD151 高表达的内皮细胞, Rac、cdc42 激活明显增强。Rac、cdc42 的激活促进了细胞间黏附连接的建立, 最终促进内皮细胞血管形成, 维持新生血管的稳定性。

研究表明 CD151 是调节内皮细胞 Rac、cdc42 信号分子活动的上游蛋白, 同时还通过与整合素的相互作用促进内皮细胞黏附连接的建立及功能完整性的维持, 最终促进内皮细胞体外管腔形成, 并维持新生血管的稳定性。

参考文献

[1] Kang M, Ryu J, Lee D, et al. Correlations between transmembrane 4 L6 family member 5 (TM4SF5), CD151, and CD63 in liver fibrotic phenotypes and hepatic migration and invasive capacities [J]. PLoS One, 2014, 9 (7): e102817.

[2] Yamada M, Sekiguchi K. Molecular basis of laminin-integrin interactions [J]. Curr Top Membr, 2015, 76(2 Pt 2): 47-54.

[3] Huang Z, Miao X, Patarroyo M, et al. Tetraspanin CD151 and integrin $\alpha 6 \beta 1$ mediate platelet-enhanced endothelial

colony forming cell angiogenesis[J]. J Thromb Haemost, 2016, 14(3): 606-618.

- [4] Tilghman J, Schiapparelli P, Lal B, et al. Regulation of glioblastoma tumor-propagating cells by the integrin partner tetraspanin CD151 [J]. Neoplasia, 2016, 18(3): 185-198.
- [5] Ke AW, Zhang PF, Shen YH, et al. Generation and characterization of a tetraspanin CD151/integrin $\alpha 6 \beta 1$ -binding domain competitively binding monoclonal antibody for inhibition of tumor progression in HCC [J]. Oncotarget, 2016, 7(5): 6314-6322.
- [6] Zhang Z, Zhang L, Hua Y, et al. Comparative proteomic analysis of plasma membrane proteins between human osteosarcoma and normal osteoblastic cell lines [J]. BMC Cancer, 2010, 10(1): 1-9.
- [7] Halova I, Draber P. Tetraspanins and transmembrane adaptor proteins as plasma membrane organizers-mast cell case[J]. Front Cell Dev Biol, 2016(4): 43.
- [8] Guo Y, Kenney SR, Muller CY, et al. R-ketorolac targets cdc42 and Rac1 and alters ovarian cancer cell behaviors critical for invasion and metastasis[J]. Mol Cancer Ther, 2015, 14(10): 2215-2227.
- [9] Fukuhara S, Mochizuki N. Vascular endothelial cells and adjoining cells for their mutual adhesion/interaction for stabilization and angiogenesis[J]. Seikagaku, 2010, 82(4): 290-301.
- [10] Kumari S, Devi G, Badana A, et al. CD151-A striking marker for cancer therapy[J]. Biomark Cancer, 2015, 7(7): 7-11.
- [11] Tang QH, Liu ZY, Zuo HJ, et al. Involvement of activation of C-met signaling pathway in CD151-induced HU-VECs angiogenesis [J]. J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci, 2015, 35(1): 35-41.
- [12] Fu H, Tan J, Yin Q. Effects of recombinant adeno-associated virus-mediated CD151 gene transfer on the expression of rat vascular endothelial growth factor in ischemic myocardium[J]. Exp Ther Med, 2015, 9(1): 187-190.
- [13] Kazarov AR, Yang X, Stipp CS, et al. An extracellular site on tetraspanin CD151 determines alpha 3 and alpha 6 integrin-dependent cellular morphology [J]. J Cell Biol, 2002, 158(7): 1299-1309.
- [14] Tan W, Palmby TR, Gavard J, et al. An essential role for Rac1 in endothelial cell function and vascular development [J]. FASEB J, 2008, 22(6): 1829-1838.
- [15] Czuchra A, Wu X, Meyer H, et al. Cdc42 is not essential for filopodium formation, directed migration, cell polarization, and mitosis in fibroblastoid cells[J]. Mol Biol Cell, 2005, 16(10): 4473-4484.