

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.07.007

利用转录组测序筛选低切应力作用下人脐静脉内皮细胞的差异表达基因*

生欣¹ 生燕² 谢夏丹¹ 王俊华¹ 郜双林¹

(1 遵义医学院基础医学院生物化学教研室 贵州 遵义 563000; 2 遵义医学院基础医学院形态学实验室 贵州 遵义 563000)

摘要 目的:通过转录组测序分析获得不同切应力作用下人脐静脉内皮细胞的基因的表达谱,为进一步探索切应力影响内皮细胞形态和功能的机制提供依据。**方法:**以人脐静脉内皮细胞为材料,通过 Streamer 系统建立 6 通道可控切应力的流体动力学细胞模型,以层流切应力(15 dynes/cm²)为对照,以低切应力(0.1 dynes/cm²)为实验组,分别加载细胞 18 h。提取总 RNA 逆转录合成 cDNA,建立文库,以二代测序平台 Illumina HiSeq 中进行扩增和测序。**结果:**序列比对结果显示,有 19986 个基因比对上,新转录本分析显示各组新转录本数约占总转录本数的 50%。基因表达差异分析显示,较对照组,低切应力组表达上调基因 983 个,表达下调基因 701 个。GO 分析显示,有 18499 个基因得到了归类注释,绝大多数基因富集到生物学过程。KEGG 分析显示,富集 Top20 的信号通路与细胞周期、DNA 复制和细胞分裂、细胞应激和凋亡等生物学过程相关。**结论:**低切应力作用不仅仅激活内皮细胞中细胞的增殖相关基因,同时也涉及到 DNA 损伤修复和凋亡相关基因。

关键词:人脐静脉内皮细胞;切应力;转录组测序;GO 分析;KEGG 分析

中图分类号:R-33;R331.36;R318.01 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)07-1233-08

Screening of Differentially Expressed Genes in hUVECs under Low Shear Stress by RNA-Seq*

SHENG Xin¹, SHENG Yan², XIE Xia-dan¹, WANG Jun-hua¹, GAO Shuang-lin¹

(1 Department of Biochemistry, Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou, 563000, China;

2 Laboratory of Basic Medical Morphology, Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou, 563000, China)

ABSTRACT Objective: This study is to obtain the gene expression profiles of human umbilical vein endothelial cells (hUVECs) under different shear stress by RNA-Sequencing (RNA-Seq), and provide evidence for further exploring the mechanism on morphological and functional changes in endothelial cells affected by flow shear stress. **Methods:** A 6-channel streamer system was used to establish the hydrodynamic cell model with adjustable shear stress in hUVECs. Laminar shear stress (15 dynes/cm²) was used as control group and low shear stress (0.1 dynes/cm²) was used as experimental group. All cells were loaded for 18 h respectively; total RNA was extracted and synthesized by reverse transcription. The library was constructed and sequenced using Illumina HiSeq. **Results:** Sequence alignment showed that there were 19986 gene alignments, and the number of new transcripts in each group was about 50% of the total transcripts. Differential expression analysis of genes showed that, compared with control group, there were 983 up-regulated genes and 701 down-regulated genes in low shear stress group. 18499 genes were classified and annotated, GO analysis showed that most of the genes were enriched into biological process. KEGG analysis showed that Top20 enrichment signal pathway is related to cell cycle, DNA replication, cell division, cell stress and apoptosis. **Conclusion:** Low shear stress not only activates proliferation-related genes in endothelial cells, but also involves DNA damage repair and apoptosis-related genes.

Key words: Human umbilical vein endothelial cells; Fluid shear stress; RNA-Sequencing; GO analysis; KEGG analysis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R331.36; R318.01 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)07-1233-08

前言

血流切应力(Fluid shear stress, FSS)是血液流动所产生的平行于血管壁的摩擦力,其大小与血流模式密切相关。通常情况下,正常生理状态下高速的血流产生的 FSS 称为层流 FSS (≥ 15 dynes/cm²),而低速、回旋的血流所产生的 FSS 称为紊流

FSS 或低 FSS (≤ 1 dynes/cm²)^[1]。FSS 直接作用于血管内皮细胞,是影响其形态、功能乃至损伤的重要因素^[2-4]。研究显示,不同的 FSS 对于内皮细胞的影响不同,层流 FSS 具有抗炎的作用,而低 FSS 具有致炎的作用,且越来越多的学者认为低 FSS 与动脉粥样硬化的发生密切相关^[5-7]。目前虽然有研究探索 FSS 参与调节内皮细胞功能、损伤以及导致动脉粥样硬化的机制,

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31360278);遵义医学院博士启动基金项目(F566)

作者简介:生欣(1984-),副教授,博士,研究方向:心血管分子生物学,电话:18212136401, E-mail: xshengbio@163.com

(收稿日期:2018-08-08 接受日期:2018-08-31)

但由于研究只能局限于某几个基因或某些信号通路,且各蛋白和信号分子间存在网络化连接和相互作用,其复杂的分子机制仍不清楚。随着高通量测序技术的普及和测序深度的提高,使研究不同条件下基因的表达和调控机制进入“组学”时代。转录组测序技术又称为 RNA 测序(RNA Sequencing, RNA-Seq),是利用高通量测序技术对经过 RNA 逆转录和 PCR 扩增得到的 cDNA 进行测序分析的技术^[89],能够快速获得某一细胞在某一特定状态下几乎所有的转录本,具有准确性高、通量高和成本低等特点^[10]。本课题组前期研究显示,与层流切应力作用相比,在低切应力作用人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, hUVECs) 18 h 后,其形态和多个信号通路基因表达具有显著差异^[11,12]。因此,本研究通过转录组测序和生物信息学分析描绘低 FSS 作用下 hUVECs 的转录组图谱,并进行基因表达差异分析和转录本结构分析,为获得低切应力作用下的差异表达基因谱,挖掘新基因和新转录本及其功能提供数据,也为进一步探索 FSS 在动脉粥样硬化发生过程中的作用研究提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

hUVECs 细胞,内皮细胞专用培养基购自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)。RNA 提取试剂盒(RNAiso Plus)、反逆转录试剂盒(PrimeScript™ RT reagent Kit)均购自 Takara 公司,DNA Marker DL2000 购自 Thermo Fisher Scientific 公司,引物合成以及 DNA 测序均由上海生工生物工程有限公司提供。

1.2 体外流体切应力作用下的细胞培养和分组

将对数生长期的细胞接种到包被有 $1 \times$ Poly-L-lysine 载玻片上,静置 10 min 后转移至 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 培养箱内培养。待生长至 70%左右融合度时,转移至 flexcell 公司 6 通道 Streamer 系统(图 1)建立可调控切应力的流体动力学细胞模型,利用流模式控制器对 FSS 大小和方向进行调控,设置 DF 模式和 USS 模式,电脑配套软件实时监测 FSS 情况,每次同时放入 6 张细胞爬片,细胞面面对 FSS 作用槽,两个阻尼器排除 FSS 系统中的空气后,FSS 连续模式作用 18 h。胰酶消化收集细胞,PBS 重悬,液氮冻存,用于 RNA 提取和测序分析。

以正常生理作用下的层流切应力(15 dynes/cm^2)为对照,低切应力组(0.1 dynes/cm^2)为实验组,作用时间均为 18 h。每组收集 3 个重复,用于转录组测序。

1.3 转录组文库的建立和测序分析

按照 RNA 提取试剂盒要求提取总 RNA,采用微量核酸蛋白定量仪检测 RNA 浓度和 OD 值,RNA 专用琼脂糖电泳检测总 RNA 完整性,Agilent 21000 Bioanalyzer 测定 RIN 值。纯化 mRNA,通过离子打断的方式将 mRNA 打断为 200-300 bp 片段。逆转录合成 cDNA,通过 PCR 富集文库片段,Agilent 21000 Bioanalyzer 检测文库大小,荧光定量检测文库总浓度。采用二代测序技术,在 Illumina HiSeq 平台中以单链文库为模板进行桥式 PCR 扩增、测序引物退火、边合成边测序。

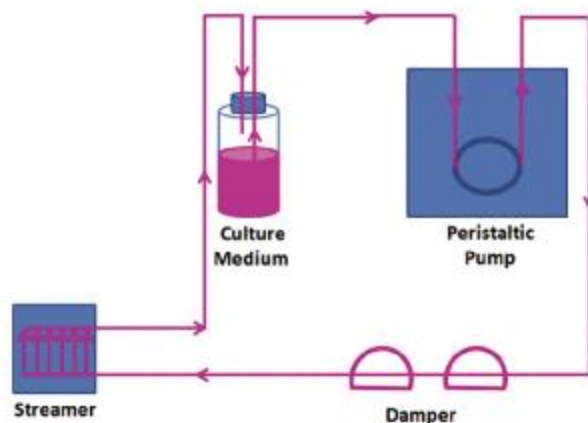


图 1 流体剪切力加载系统示意图

Fig.1 Schematic diagram of fluid shear loading system (Streamer, slide carrying cells inserted into Streamer)

1.4 转录组测序分析

对原始下机数据进行过滤,将过滤后的高质量序列利用 Tophat/Tophat2 软件比对到人的参考基因组中,根据比对结果,计算每个基因的表达量,在此基础上,对不同样品进行表达分析、富集分析和聚类分析。此外,还进行了转录结构分析,包括可变剪接分析、新的 UTR 区域注释,cSNP 和 InDel 分析,差异基因筛选条件为表达倍数差异 $|\text{fold change}| > 2$,显著性 $P\text{-value} < 0.05$ 。

2 结果

2.1 原始测序数据质量

采用 FastQC 对原始下机数据进行单碱基质量、Base Content 分布、GC Content 分布、Sequence Base Quality 分析。结果显示大部分序列的碱基质量在 20 以上,表明测序质量较好(图 2A)。测序样品四条线平行且接近,未出现碱基偏移(图 2B)。GC 分布曲线均一,无文库内源和外源污染(图 2C)。Sequence Base Quality 分布显示峰尖对应值较高,测序质量和整体质量分布较好(图 2D)。

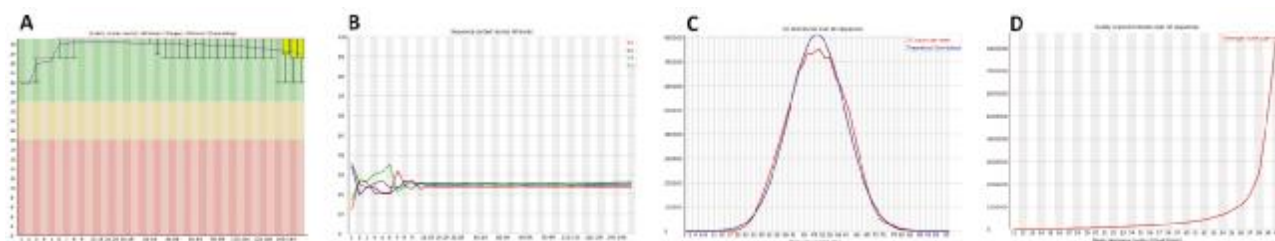


图 2 原始数据质量检测图

Fig. 2 Quality inspection chart of initial data

2.2 参考基因信息统计与比对分析

以 Ensembl 数据库来源的基因为参考基因,统计了 19986 个基因,并从不同的数据库中整理该物种的注释信息。获得了基因的编号(ENSEMBL ID),染色体上位点信息,基因的命名(HGVS Symbol、NCBI Gene ID、UniProtKB ID),基因的分类(GO、KO、EC 分类),基因的文字注释信息。以 Bur-

rows-Wheeler Transform 算法为基因组序列建立索引,使用全局比对法将过滤后的短序列与基因组进行比较,得到序列的来源基因及其表达产物的结构。结果显示,所有样本中比对上参考基因组的序列占 91%以上,其中只比对到一个位置的序列占 97%,而比对到基因区域的 Reads 占 95%以上,其中比对到外显子区域的 Reads 占 94%以上(表 2)。

表 2 RNASeq Map 统计

Table 2 Statistics of RNASeq Map

Sample	Map events count	Total Mapped %	Uniquely Mapped %	Mapped to Genn %	Mapped to exon %
0.1 dynes/cm ² S1	44240688	91.97	97.55	96.77	94.71
0.1 dynes/cm ² S2	46442780	92.30	97.51	96.26	94.18
0.1 dynes/cm ² S3	45951078	91.67	97.49	96.36	94.09
15 dynes/cm ² S1	4439251	91.78	96.97	95.59	95.32
15 dynes/cm ² S2	45066008	91.90	97.01	95.12	94.26
15 dynes/cm ² S3	46385672	92.34	97.38	96.62	94.91

2.3 基因表达量分析

使用 HTSeq 0.6.1p2 统计比对每一个基因上 Read Count 值,作为基因的原始表达量。进一步采用 RPKM 对表达量进行标准化。RPKM 密度分布模式显示中等表达的基因占绝大多数,低表达和高表达的基因占小部分(图 3A)。RSeQC 测序饱和

度分析显示,随着抽样比例的增加,相对误差减少,测序结果区域饱和(图 3B);测序 Reads 在基因上覆盖度的分布情况显示总体分布趋势是 5' 端和 3' 端测序覆盖度较低,中间较高,测序结果可信(图 3C)。样品间基因表达模式相关性检验显示,重复样本间的相关系数接近于 1。切应力作用差异越大的样本之间,其相关系数越低(图 3D)。

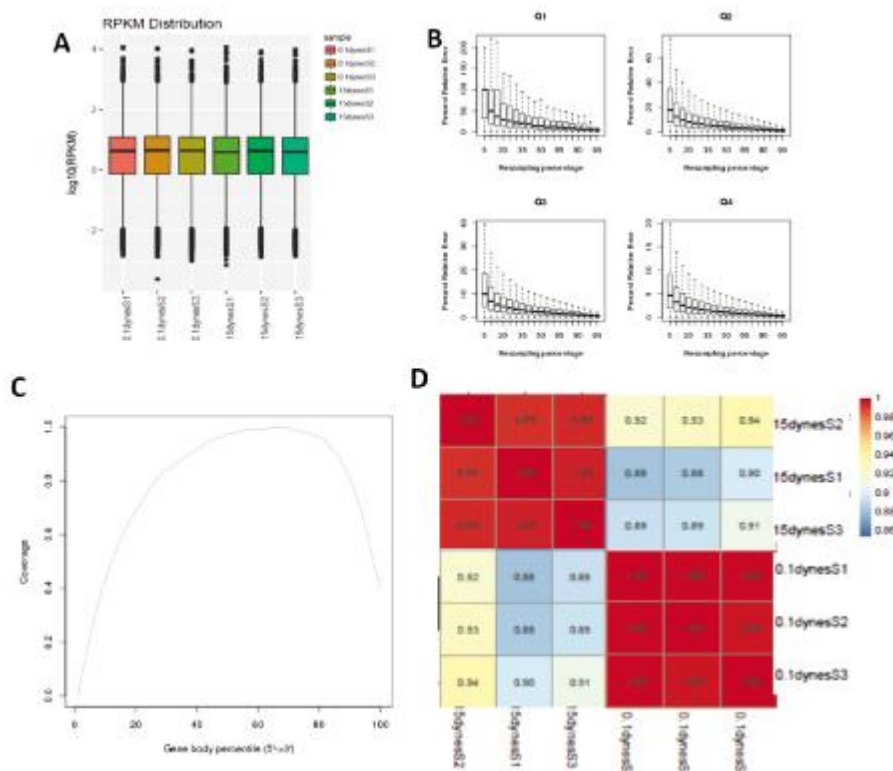


图 3 基因表达量分析

Fig.3 Gene expression analysis

A. RPKM density distribution, gene expression patterns of the whole sample, the majority of genes are moderately expressed, with a small number of low and high expression genes; B. RSeQC sequencing saturation analysis, the horizontal coordinate is the ratio of resampling and the vertical coordinate is the relative error; C. Gene coverage analysis, the transverse coordinate is the relative position from the 5' end of the transcript, and the vertical coordinate is the average of the coverage depth; D. Sample correlation test, the red represents the high correlation coefficient, and the blue represents the low correlation coefficient.

通过 DESeq (version 1.18.0)对基因表达进行差异分析,筛选差异表达基因条件为:表达倍数差异 $|\text{fold change}| > 2$, 显著性 $P\text{-value} < 0.05$ 。差异表达基因统计结果显示,较对照组,低切

应力组表达上调基因 983 个,表达下调基因 701 个(表 3)。火山图和 MA 图也能够显示低切应力组较层流切应力组表达上调基因多于下调基因(图 4)。

表 3 表达差异分析结果统计

Table 3 Statistics of expression difference analysis

Case	Control	Up-regulated Genes	Down-regulated Genes	Total DEGs
0.1 dynes/cm ²	15 dynes/cm ²	983	701	1684

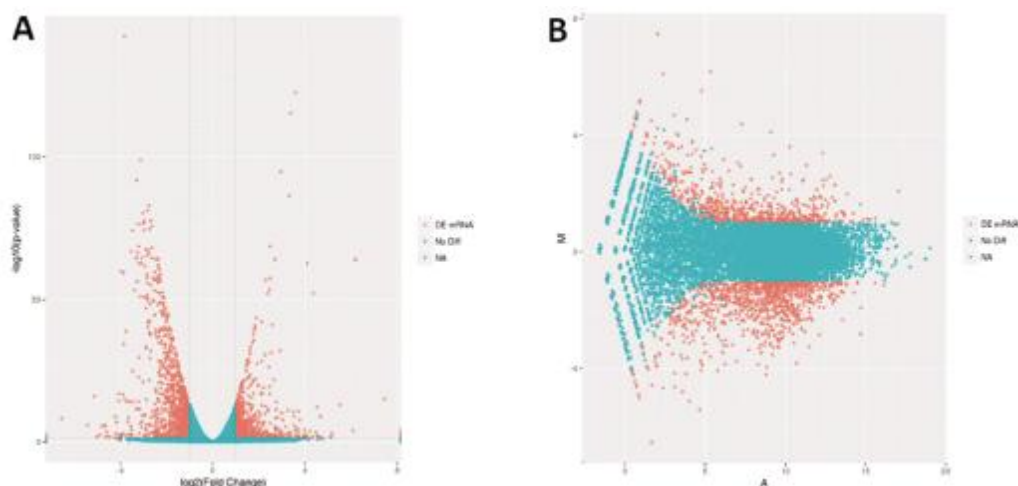


图 4 差异表达基因火山图与 MA 图

Fig.4 Volcanography and MA Map of differential expression gene

A. Volcanic map of differential gene(横坐标为表达差异倍数取 $\log_2$ 的数值,纵坐标为表达差异显著性 $p\text{-value}$ 取 $-\log_{10}$ 的数值。图中竖线为 2 倍表达差异阈值;横线为 $P\text{-value}=0.05$ 阈值。红点表示显著差异表达基因,蓝点表示非显著差异表达基因。); B. MA Map of differential gene(横坐标为两样品基因表达量之和,即 $\log_2(A) + \log_2(B)$, A 和 B 分别表示基因在两样本的表达量,纵坐标为表达量之差,即 $\log_2(A) - \log_2(B)$ 。红点表示显著差异表达基因,蓝点表示非显著

A. Volcanic map of differential gene (Abcissa indicate the value of $\log_2$ expressed as the multiple of difference, and the ordinate is the value of $-\log_{10}$ for expressing the significant difference of $p\text{-value}$. The vertical line is 2 times the difference threshold, and the horizontal line is $P\text{-value} 0.05$. Red dots indicate significantly differentially expressed genes and blue dots indicate non-significant differentially expressed genes.); B. MA Map of differential gene (The horizontal coordinate is the sum of the gene expression in the two samples, that is, $\log_2(A) + \log_2(B)$, A and B respectively represent the expression amount of the gene in the two samples, and the vertical coordinate is the difference of the expression amount, that is, $\log_2(A) - \log_2(B)$. Red dots mean significantly differentially expressed genes, blue dots mean non-significant.)

2.4 基因富集分析

通过 GO 功能富集和 KEGG 富集对各组转录组数据进行功能注释。GO 富集分析的结果显示,共有 18499 个基因得到了归类注释。较层流切应力作用的细胞,低切应力作用下有 1604 个差异显著的基因得到了 GO 注释,分别按照生物学过程 (biological processes, BP),细胞组份 (cellular components, CC) 和分子功能 (molecular functions, MF) 3 个大类。其中绝大多数富集到 BP 中。在 BP 分类中,细胞学过程 (cellular process) 所占比例最多,为 80.5%,其次为单细胞器过程 (single-organism process),占 75.8%。在 CC 分类中,细胞 (cell) 所占比例最多,其次为细胞组份 (cell part) 和胞内 (intracellular)。在 MF 分类中,结合 (binding) 所占比例最多,其次为蛋白结合 (protein binding) 和离子结合 (ion binding) (图 5A)。采用 topGO 将差异表达基因的 GO 映射到其特有的有向无环图结构上,然后按照 GO 条目富集分数高低,赋予深浅不同的颜色,结果显示较层流切应力作用的细胞,低切应力作用下,差异基因富集到生物学过程中 top10 的是染色体分离、细胞周期、细胞分裂、细胞器分离、有丝

分裂、细胞周期过程、核分裂、有丝分裂过程、有丝分裂核分裂、DNA 复制(图 5B)。而富集到细胞组份 top10 的 GO 术语均与染色体相关;其富集到分子功能 top10 的 GO 术语为蛋白结合、阴离子配位、结合碳水化合物衍生物、嘌呤核苷酸结合、结合 ATP、核苷酸磷酸酶活性、ATP 酶活性、DNA 解旋酶活性、单链 DNA 依赖的 ATP 酶活性。对比两组表达上调与下调基因在 GO 富集中的变化可见,在表达上调的基因中,上调 20 倍以上的基因 12 个,绝大多数富集到细胞学过程,与细胞响应机械刺激、内皮细胞分化、cAMP 信号传递等生物学过程相关。其中 50 倍以上的基因 1 个,为血管细胞黏附分子 (ENSG00000162692, VCAM1),GO 富集到生物学过程,与细胞对机械刺激的应激反应、细胞形态、增殖和迁移等相关。而表达下调 20 倍的基因 17 个,其中表达下调 175 倍的基因为 (ENSG00000130487, KL-HDC7B),GO 富集到蛋白泛素化过程。

利用 KEGG 富集对差异基因所参与的代谢途径和信号通路进行分析,共有 1666 个差异表达基因涉及到 228 条信号通路,富集 Top20 的信号通路见图 6。其中,细胞周期 (cell cycle)

最为富集,其次为 DNA 复制和 p53 信号通路。在富集 Top10 的信号通路中与细胞增殖和凋亡相关的细胞学过程占 50%,与

基因复制和修复相关的过程占 30%,其余为与细胞应激和环境信号传递相关的过程(表 4)。

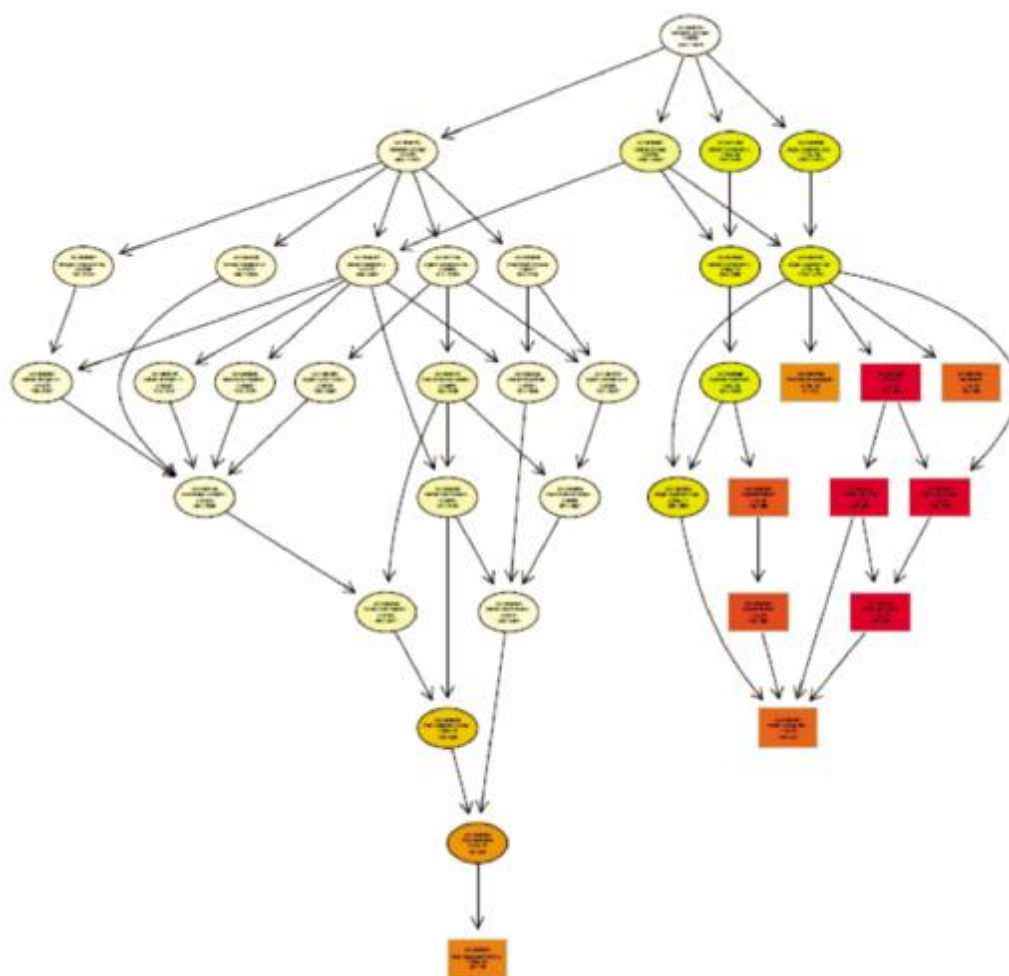
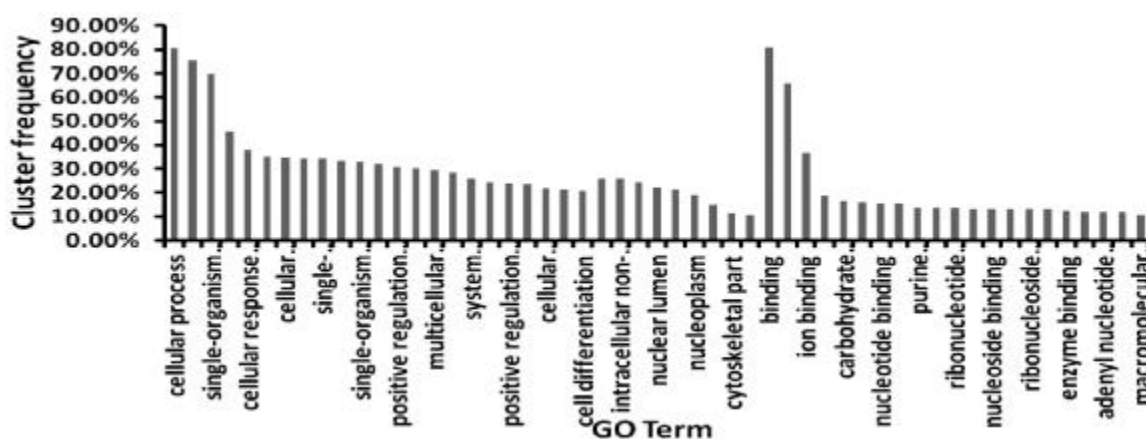


图 5A GO 富集分析图

Fig.5A Go enrichment analysis map

图 5B GO 富集分析有环向图(颜色越深富集程度越高)

Fig.5B Acyclic graph of Go enrichment analysis

纵坐标为 KEGG Pathway 条目;横坐标为 Richfactor,图中圆点的大小表示注释到该通路的差异基因的多少,颜色表示该通路的显著性 P 值。图中展示的是结果里最显著的 20 个通路。

2.5 结构分析

使用 Sringtie 软件组装出样品的转录本中,并对新的转录

区域、剪切位点、转录起始终止位点、UTR 区域等进行了转录本结构分析。使用 gffcompare 与参考基因组对比,找出新的转录本区域,结果统计显示较低切应力作用与层流切应力作用下产生的新转录本无统计学差异(表 5)。

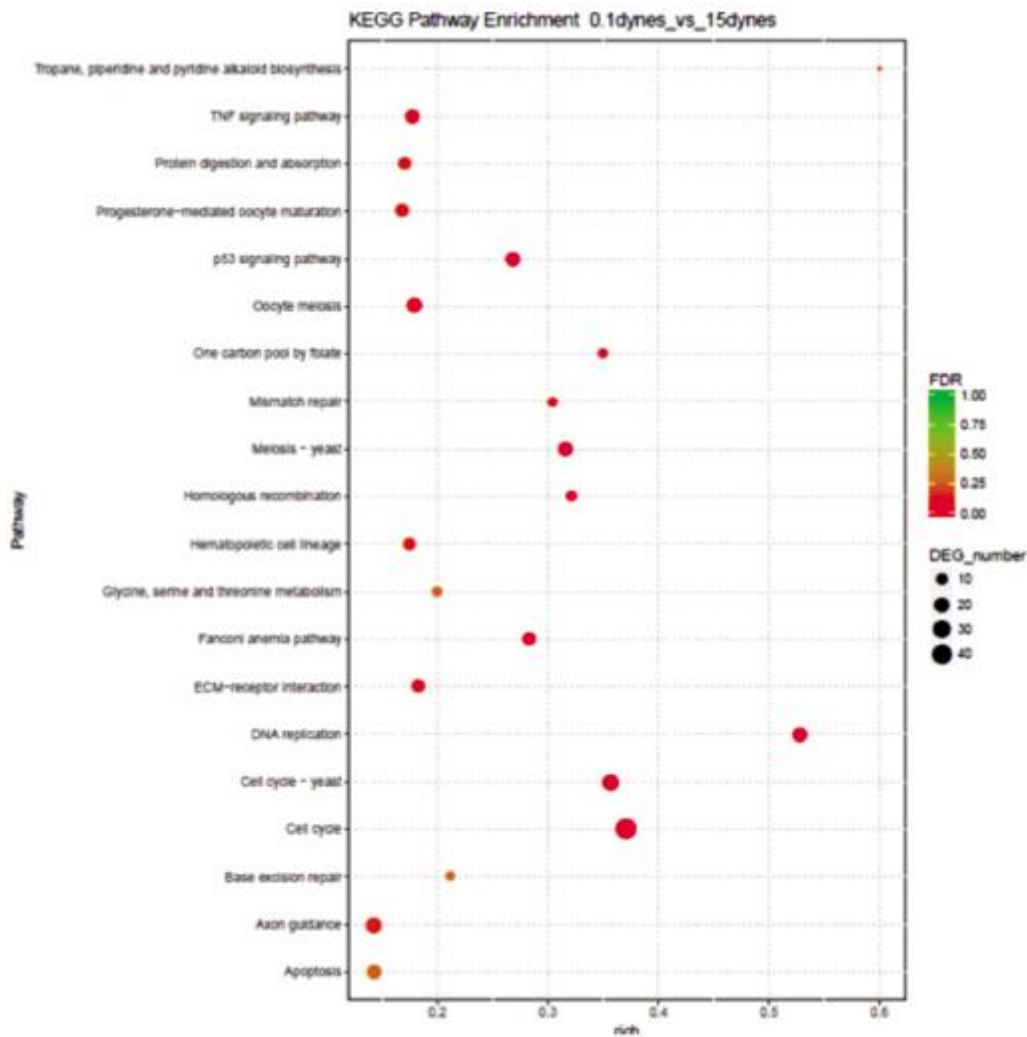


图 6 低切应力作用相比层流切应力作用的 KEGG 富集 Top20 的信号通路

Fig.6 KEGG signal pathway for enrichment of Top20 under low shear stress compared with laminar shear stress

表 4 KEGG 富集 Top 10 的信号通路(0.1 dynes/cm² vs.15 dynes/cm²)

Table 4 KEGG enriched Top 10 signaling pathway (0.1 dynes/cm² vs.15 dynes/cm²)

Pathway ID	Pathway	GO richment	DEG number	P value
ko04110	Cell cycle	Cell growth and death	46	4.46E-18
ko03030	DNA replication	Replication and repair	19	1.75E-11
ko04111	Cell cycle - yeast	Cell growth and death	25	4.95E-10
ko04113	Meiosis - yeast	Cell growth and death	18	1.09E-06
ko04115	p53 signaling pathway	Cell growth and death	18	1.41E-05
ko03460	Fanconi anemia pathway	Replication and repair	15	3.71E-05
ko03440	Homologous recombination	Replication and repair	9	0.000479443
ko00670	One carbon pool by folate	Metabolism of cofactors and vitamins	7	0.001165994
ko04114	Oocyte meiosis	Cell growth and death	21	0.001353547
ko04668	TNF signaling pathway	Signal transduction	19	0.002547359

表 5 转录本统计表

Table 5 Statistical table of transcripts

	总转录本	已知转录本	新转录本
0.1 dynes/cm ²	35241.67	18043.33	17198.33
15 dynes/cm ²	36969.33	17731.67	19237.67

使用 ASprofile 软件对可变剪接事件进行分类和表达量统计,将可变剪接事件分为 12 种类型(图):AE(alternative exon ends),IR(retention of single introns),MIR(retention of multiple introns),SKIP(exon skipping),MSKIP(multi-exons skipping),TSS(alternative transcription start site),TTS(alternative tran-

scription termination site),XAE(approximate AE),XIR(approximate IR),XMIP(approximate MIP),XSKIP(approximate SKIP),XMSKIP(approximate MSKIP),结果显示,各样本间可变剪接无明显差异,剪接方式以 SKIP、TSS 和 TTS 最多,其次为 AE、IR、XIR 和 XSKIP(图 7)。



图 7 各样品可变剪接事件数量统计

Fig.7 Statistics on the number of variable splicing events

3 讨论

内皮细胞对血流切应力的感应是通过细胞的信号转导来调控的,而大量的基因表达变化则将机械信号转换为细胞行为。早在 1993 年,Resnick 就首次提出了特异性切应力反应元件的概念,认为该元件定位于基因启动子内,能够被切应力诱导的转录因子特异性激活并启动基因转导^[13]。随后在 2001 年,McCormick 利用 DNA 微阵列证实了内皮细胞的基因表达受到切应力的调控,并认为有上百个基因受到层流切应力的调控,且长时间将内皮细胞处于单一流动形式的切应力下,可激活抗增殖基因和抑制炎症或动脉粥样硬化的基因^[14]。目前,已知的受到层流切应力调控的基因多达 100 多种,根据其在体内发挥的生物学特征,可分为血管活性物质、生长因子、凝血因子、黏附因子、原癌基因和趋化因子等^[15-17]。虽然近年来对于部分基因,如血管收缩相关的 eNOS 和 ET、调节内皮细胞通透性的 VEGFR-2、与内皮细胞炎症相关的 ICAM-1、VCAM-1 和 MCP-1 等在此过程中的作用机制有较为深入的研究,但更多的基因表达谱还有待发掘。且绝大多数研究均以静止培养的细胞作为对照探讨不同切应力对内皮细胞的影响,就生理状态下层流切应力和病理状态下紊流或低切应力对于细胞基因表达的不同影响还未见报道。随着二代测序技术的普及,RNA 序列分

析相比过去的研究方法能够更为完整的描述细胞对于机械刺激的转录调控。Govey 等在软骨细胞中对切应力诱导的基因表达谱进行了分析,检测到了预期的流体敏感转录本,并发现了新的炎症信号通路和流体敏感转录本^[18]。因此,分析不同切应力作用下的基因表达谱能够为深入挖掘相关基因和信号通路提供准确的依据。

本研究分别对 2 种不同 FSS 作用下 hUVECs 的转录组进行了测序和分析,每种样本提供了三个重复样本,共 6 个样本。每个样品获得约 4500 万条原始序列读数,通过数据过滤去掉接头污染和低质量序列,最终获得了 3 Gb 数据量。碱基质量检测显示 Q20 (质量不低于 20 的碱基) 比例为 97% 以上,GC 含量,且 GC 分布曲线均一,无文库内源和外源污染,结果表明文库构建成功且测序质量良好。序列比对结果显示,有 19986 个基因比对上,新转录本分析显示各组新转录本数约占总转录本数的 50%。比较各组各样本间可变剪接分类和数量可见,不同切应力作用下并无较大差异,而单核苷酸多态性分析显示较层流 FSS 作用细胞,低 FSS 作用下的纯合 SNP 具有显著差异。而差异表达分析显示不同 FSS 作用下的基因表达变化在 1000-3000 之间,可见参与 hUVECs 正常生理功能与异常 FSS 切应力作用下的基因在结构上并未发生巨大变化,而差异主要存在于表达量的变化。相对于层流切应力,低切应力作用下,差

异表达基因为 1684 个,其中上调基因 983 个,下调基因 701 个,可见表达上调基因多于受抑制基因。在表达上调基因中,80% 的基因富集到细胞学过程。KEGG 结合 GO 富集分析显示层流切应力和低切应力作用下的差异基因富集到细胞增殖和凋亡相关的细胞学过程占 50%,与基因复制和修复相关的过程占 30%,其余为与细胞应激和环境信号传递相关的过程。已有的研究显示,层流切应力能够抑制 DNA 的合成和细胞增殖,而低切应力则促进细胞增殖^[19-21]。而切应力作为一种机械作用力,能够通过“力感反馈”细胞的增殖、分化、转移和凋亡^[22-24],只是低切应力作用较层流切应力作用产生的应激反应更为显著。由此可见两种不同切应力导致的基因差异主要存在于两个方面:一,细胞周期、DNA 复制和细胞分裂;二,细胞应对切应力刺激的炎症反应。此外,本研究也发掘了一些未曾报道过的差异表达基因和相关信号通路。其中,值得关注的是表达下调的基因绝大多数富集到泛素化过程,提示低切应力可能通过抑制蛋白质的泛素化调控细胞相关生物学过程。而作为肿瘤相关的 p53 信号通路和凋亡相关的 Apoptosis 出现在 KEGG 富集 Top20 的信号通路中,而该现象在 2011 年也被王贵学等报道,体内实验表明 p53 信号通路参与了切应力调控的血管新生过程^[25]。且最新的研究显示,促肿瘤细胞增殖和侵袭相关的 Bmi-1 基因能够被低切应力诱导表达并通过 p38 调节^[26]。因此,低切应力作用所激活的基因对于内皮细胞的影响不仅仅是细胞的增殖,同时也涉及到 DNA 损伤修复和凋亡相关基因的变化。

4 结论

低切应力作用对内皮细胞结构和功能的调节主要表现在两个方面:其一,通过表达上调细胞周期相关基因促进细胞的增殖和迁移;其二,通过抑制脂泛素化相关基因调节细胞的功能。

参考文献(References)

- [1] Hahn C, Schwartz MA. Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis[J]. *Molecular Cell Biology*, 2009, 10: 53-62
- [2] Steward JrR, Tambe D, Hardin CC, et al. Fluid shear, intercellular stress, and endothelial cell alignment [J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2015, 308(8): C657-C664
- [3] Baeyens N, Nicoli S, Coon B G, et al. Vascular remodeling is governed by a VEGFR3-dependent fluid shear stress set point[J]. *Elife*, 2015, 4: e04645
- [4] Russell-Puleri S, dela Paz N G, Adams D, et al. Fluid shear stress induces upregulation of COX-2 and PGI2 release in endothelial cells via a pathway involving PECAM-1, PI3K, FAK, and p38 [J]. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2016, 312(3): H485-H500
- [5] Baeyens N, Bandyopadhyay C, Coon BG, et al. Endothelial fluid shear stress sensing in vascular health and disease[J]. *The Journal of clinical investigation*, 2016, 126(3): 821-828
- [6] Moonen JRAJ, Lee ES, Schmidt M, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to fibro-proliferative vascular disease and is modulated by fluid shear stress[J]. *Cardiovascular research*, 2015, 108(3): 377-386
- [7] Cecchi E, Giglioli C, Valente S, et al. Role of hemodynamic shear stress in cardiovascular disease [J]. *Atherosclerosis*, 2011, 214(2): 249-256
- [8] 张春兰, 秦孜娟, 王桂芝, 等. 转录组与 RNA-Seq[J]. *生物技术通报*, 2012, 12: 51-56
- [9] 李小白, 向林, 罗洁, 等. 转录组测序(RNA-seq)策略及其数据在分子标记开发上的应用 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2013, 35(05): 720-726+740
- [10] 祁云霞, 刘永斌, 荣威恒. 转录组研究新技术:RNA-Seq 及其应用 [J]. *遗传*, 2011, 33(11): 1191-1202
- [11] 刘月华, 生燕, 涂应杰, 等. β -catenin 在兔颈总动脉套管导致的动脉粥样硬化血管壁中高表达[J]. 2017, 46(12): 1588-1591
- [12] 生欣, 刘月华, 王俊华, 等. 人脐静脉内皮细胞通过 Wnt/ β -catenin 信号通路响应低切应力刺激[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2017, 33(12): 1657-1661
- [13] Resnick N, Collins T, Atkinson W, et al. Platelet-derived growth factor B chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress-responsive element [J]. *Proceeding of the National Academy of Science*, 1993, 90(10): 2591-4595
- [14] 张伟, 潘君, 郝莉娜. 流体切应力对血管内皮细胞基因表达的影响 [J]. *国际生物医学工程杂志*, 2006, 29(2): 81-84
- [15] 袁伟, 张学渊. 剪切力对血管内皮细胞的生物学影响[J]. *重庆医学*, 2003, 32(11): 1490-1492
- [16] Bin G, Cuifang W, Bo Z, et al. Fluid shear stress inhibits TNF- α -induced osteoblast apoptosis via ERK5 signaling pathway[J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2015, 466(1): 117-123
- [17] Chistiakov D A, Orekhov A N, Bobryshev Y V. Effects of shear stress on endothelial cells: go with the flow [J]. *Acta Physiologica*, 2017, 219(2): 382-408
- [18] Govey PM, Kawasaki YI, Donahue HJ. Mapping the osteocytic cell response to fluid flow using RNA-Seq [J]. *Journal of biomechanics*, 2015, 48(16): 4327-4332
- [19] 曹雪飞, 董国, 杨树森. 剪切力对血管内皮细胞功能影响及机制研究进展[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*. 2016, 30(10): 956-958
- [20] Moonen J R A J, Lee E S, Schmidt M, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to fibro-proliferative vascular disease and is modulated by fluid shear stress [J]. *Cardiovascular research*, 2015, 108(3): 377-386
- [21] Zheng L, Chen L, Chen Y, et al. The effects of fluid shear stress on proliferation and osteogenesis of human periodontal ligament cells[J]. *Journal of biomechanics*, 2016, 49(4): 572-579
- [22] 唐志晗, 杨琼, 任重, 等. VEGFR-2 在异常切应力诱导的动脉粥样硬化病变中的表达[J]. *中南医学科学杂志*, 2011, 39(2): 135-138
- [23] Conway D E, Schwartz M A. Mechanotransduction of shear stress occurs through changes in VE-cadherin and PECAM-1 tension: implications for cell migration [J]. *Cell adhesion & migration*, 2015, 9(5): 335-339
- [24] Panciera T, Azzolin L, Cordenonsi M, et al. Mechanobiology of YAP and TAZ in physiology and disease [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2017, 18(12): 758
- [25] 王贵学, 邱菊辉, 胡建军, 等. Idl-p53 调控血管新生参与高切应力街道的易损斑块形成的机制[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(3): 235
- [26] 兰祥星, 王汉琴, 操传斌, 等. 磷酸化 p38 介导低切应力诱导的血管内皮细胞 Bmi-1 表达 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26(2): 122-126