

差异显示法证实氧化型低密度脂蛋白刺激 血管内皮细胞胸腺素 β_4 的高表达

张可满, 陈保生, 薛红, 吴刚, 曾武威

(中国医学科学院中国协和医科大学基础医学研究所, 北京 100005)

[主题词] 差异显示法; 脂蛋白, 低密度; 氧化; 内皮细胞; 胸腺素

[摘要] 克隆、分离在致动脉粥样硬化因素作用下血管内皮细胞基因的差异表达对了解动脉粥样硬化发生的分子机制至关重要, 用改进的差异显示-多聚酶链技术分离、克隆氧化型低密度脂蛋白刺激培养的内皮细胞有差异表达的基因, 用 Northern 印迹法证实差异表达的基因。结果发现氧化型低密度脂蛋白诱导培养的人脐静脉内皮细胞中出现一个上调的 cDNA 片段, 长 283 bp, 其序列与人胸腺素 β_4 基因有 100% 的同源性, 具有完整的开放阅读框架。Northern 印迹分析证实氧化型低密度脂蛋白诱导人脐静脉内皮细胞胸腺素 β_4 升调了 3 倍。从而提示氧化型低密度脂蛋白刺激血管内皮细胞胸腺素 β_4 的高表达, 进而调节血管内皮细胞的增殖、分化。改进的差异显示-多聚酶链技术具有便捷、特异性高、重复性好的特点。

[中图分类号] Q786

[文献标识码] A

High Expression of Thymosin β_4 in Vascular Endothelial Cells Stimulated by Oxidized Low Density Lipoprotein by Differential Display Analysis

ZHANG Ke-Man, CHEN Bao-Sheng, XUE Hong, WU Gang, and ZENG Wu-Wei

(Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100005, China)

MeSH Differential Display Analysis; Lipoprotein, LDL; Oxidization; Endothelials; Thymosin

ABSTRACT **Aim** To clone and isolate the altered expression genes induced by atherogenic factor will improve our understanding the molecular mechanism in atherosclerosis. **Methods** Modified differential display-PCR method was used to clone the differential expressed genes in cultured vascular endothelial cells stimulated by oxidized low density lipoprotein. Northern blot analysis was chosen to verify the results. **Results** One up-regulated cDNA band was found in oxidized low density lipoprotein induced human umbilical vein endothelial cells. It is 283 bp in length and 100% homologous to human thymosin β_4 in sequence. It also contain the complete open reading frame. Thymosin β_4 was up-regulated 3-fold in oxidized low density lipoprotein induced human umbilical vein endothelial cells. Thymosin β_4 was a differentiation molecular for many cells and is involved in angiogenesis. **Conclusions** Our results first show that oxidized low density lipoprotein can stimulate the high expression of thymosin β_4 in vascular endothelial cells and may be regulate the proliferation, differentiation of vascular endothelial cells. The modified differential display technique has the characteristics of convenience, high specificity and reproducibility.

氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, Ox-LDL) 是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 发生的危险性因子, 可引起内皮细胞损伤及炎症反应, 导致内皮细胞依赖的血管活性物质及细胞粘附分子等众多基因表达发生变化^[1], 如果持续改变某些基因的表达可能诱发 As 发生发展。差异显示技术用不同的随机引物和锚定引物组合, 比较细胞在两种状态下 mRNA 生成质和量的差异^[2], 从

而发现一些未知的诱导基因, 或证实已知基因的功能。本实验首次用该方法证实血管内皮细胞在 Ox-LDL 诱导下有关细胞增殖、分化基因的差异表达。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与刺激物的处理

人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 是采用 0.1% 的 IV 型胶原酶消化新生儿脐静脉, 收集内皮细胞作原代培养。M199 培养基含 20% 胎牛血清、25 mg/L 表皮细胞生长因子、2 μ mol/L 谷氨酰胺和 50 mg/L 肝素钠。在 37 $^{\circ}$ C

[基金项目] 国家攀登项目资助课题

[作者简介] 张可满, 男, 1965 年出生, 博士学位, 主要从事心血管疾病分子生物学研究。陈保生, 教授, 博士生导师, 本课题负责人。

5% CO₂ 条件下培养。第二代细胞用于刺激物处理。1 g/L LDL 经 PBS 透析去 EDTA 后, 加 Cu²⁺ 至终浓度为 10 μmol/L, 于 37℃ 孵育 7 h。第二代细胞生长至亚融合状态时加入 Ox- LDL, 终浓度为 45 mg/L, 处理 32 h。

1.2 总 RNA 提取

细胞终止处理后, PBS 洗去表层培养基, 加入 Trizol 试剂, 提取总 RNA, 甲醛变性凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

1.3 差异显示- 多聚酶链分析

一链 cDNA 合成: 10 μL 体系中含 2 μg 总 RNA, 0.1 μmol/L Oligo(dT) 引物, 1 mmol/L dNTP; 加入 200 u MMLV 逆转录酶于 42℃ 温育 1 h。PCR: 20 μL 反应体系中含 1 μL cDNA 一链产物、1 μmol/L 30 寡聚核苷酸(nucleotide, nt) 锚定引物、1 μmol/L 25 nt 寡聚核苷酸随机引物、1 u 聚合酶、50 μmol/L dNTP 及 2 μCi α- ³²P- dCTP。进行以下温控反应: 94℃ 5 min → 40℃ 5 min → 68℃ 5 min 三个循环进行二链合成, 然后于 94℃ 1 min → 60℃ 1 min → 68℃ 2 min 进行 24 个循环的扩增反应, 最后于 68℃ 延伸 7 min。多聚酶链产物进行 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 恒功率 50 W 泳动 6~8 h; 80℃ 干胶后放射自显影。

1.4 差异显示区带的克隆和测序

用消毒刀片切下刺激物处理后表达差异的 cDNA 片段, 加 100 μL H₂O 于 100℃ 20 min, 回收 cDNA, 用对应锚定引物及随机引物进行温控反应: 94℃ 1 min → 60℃ 1 min → 68℃ 2 min, 共 25 个循环。扩增产物纯化回收并克隆到 T 载体中。对插入片段测序并通过 BLAST 方式与基因库进行同源性比较。

1.5 Northern 印迹分析

用 Trizol 试剂提取 Ox- LDL 刺激和非刺激 HUVEC 总 RNA。各取 25 μg 的总 RNA 进行 1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳。用标准毛细管印迹技术转移 RNA 至带正电荷的尼龙膜上, 紫外光交联固定核酸分子。随机引物法标记 cDNA 探针。快速杂交液 68℃ 预杂交 30 min, 68℃ 杂交 1 h 后放射自显影。

2 结果

2.1 人脐静脉内皮细胞的培养

融合状态的 HUVEC 呈单层“铺路石”排列, 免疫荧光第Ⅱ因子相关抗原检查阳性, 鉴定为血管内皮细胞。Ox- LDL 经琼脂糖电泳、脂质油红“O”染色为一清晰区带, 泳动速度较 LDL 快。实验浓度的 Ox

- LDL 刺激 HUVEC 未导致明显细胞毒性作用。

2.2 差异显示- 多聚酶链分析

用差异显示技术进行了 60 对锚定引物与随机引物的组合实验。非刺激组和刺激组中绝大部分 cDNA 区带是一致的, 但 Ox- LDL 刺激组中出现一条明显增强的区带, 约 280 bp。从胶中回收、二次扩增其大小为 283 bp。经克隆、测序, 发现其序列两端均含同一引物序列: 5' - ATTAACCCTCACTAAAT GCTGGTGG- 3', 经 BLAST 同源性比较发现其与人胸腺素 β4 有 100% 的同源性, 包括胸腺素 β4 基因 70 bp 的 5' 非编码区、138 bp 的完整开放阅读框架及 41 bp 的 3' 端非编码区, 见图 1 和 2 (Figure 1 and 2)。

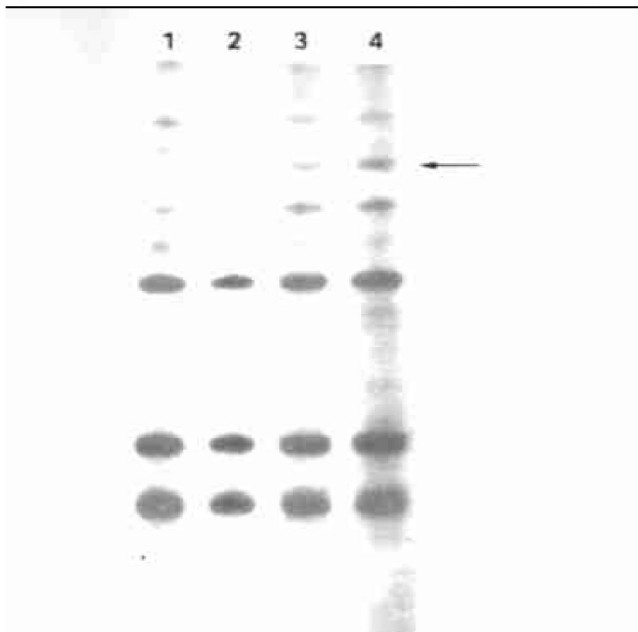


图 1 氧化型低密度脂蛋白刺激人脐静脉内皮细胞 mRNA 的差异显示- 多聚酶链分析

Figure 1 The differential display PCR of human umbilical vein endothelial cells stimulated by Ox- LDL. Lane 1 and 2: duplicate non- stimulate; lane 3 and lane 4: duplicate Ox- LDL stimulated.

Arrow shows the up- regulated cDNA band.

```

ATTAACCCTCACTAAATGCT GCTGG TGGCCACTGCGCAGACC
AGACITCGCTCGTACTCGTGGCCCTCGCTTCGCTTTTCTCCGCA
ACCATGTCTGACAAACCCGATATGGCTGAGATCGAGAAA
TTTCGATAAGTCGAAACTGAAGAAGACAGACGCAAGAG
AAAAATCCACTGCCCTTCCAAAGAAACGATTGAACAGGAG
AAGCAAGCAGGCGAATCGTAATGAGGCGTGGCCGCCCAAT
ATGCACTGTACATT CCACCAGCATT TAGTGAGGGTTAAT
  
```

图 2 氧化型低密度脂蛋白刺激人脐静脉内皮细胞上调 cDNA 片段的序列

Figure 2 The sequence of the up- regulated cDNA fragment.

Primer sequence is indicated in underline. Box show both the primer and thymosinβ4 sequence. The complete open reading frame sequence is in Bold type.

2.3 Northern 印迹分析

为证实 Ox- LDL 作用血管内皮细胞引起的胸腺素 $\beta 4$ 表达差异, 将克隆的 cDNA 片段进行酶切回收用于探针标记。提取 Ox- LDL 刺激和非刺激 HUVEC 细胞总 RNA 进行甲醛变性电泳、转膜, Northern 印迹分析。如图 3 (Figure 3) 所示, 两组细胞胸腺素 $\beta 4$ 均有一个 0.8 kb 大小的转录本。Ox- LDL 刺激 HUVEC 组胸腺素 $\beta 4$ 上调了 3 倍。

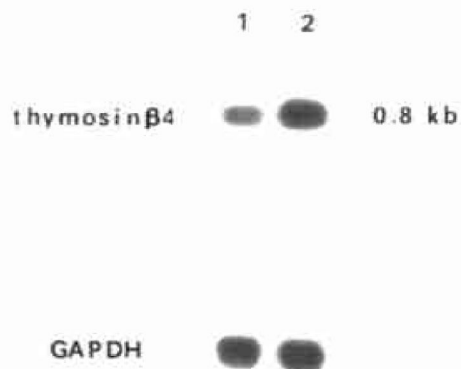


图3 氧化型低密度脂蛋白刺激脐静脉内皮细胞胸腺素 $\beta 4$ 的 Northern 印迹分析

Figure 3 Northern blot analysis for human thymosin $\beta 4$ mRNA in human umbilical vein endothelial cells. Lane 1: non-stimulated; lane 2: Ox- LDL stimulated

3 讨论

本文差异显示- 多聚酶链技术用 oligo(dT) 为引物一次性合成一链 cDNA 模板, 而不是文献[2]中的 9~12 次逆转录; 所用的锚定引物及随机引物长分别为 30 nt 和 25 nt, 较文献报道的 10 nt 寡聚随机引物和 12 nt 寡聚锚定引物长; 多聚酶链反应中首先进行 40 °C 退火温度的低严谨性三轮扩增, 使随机引物与 cDNA 分子进行不完全互配合成二链 cDNA 模板; 然后用 68 °C 复性温度的高严谨性 24 个反应产生终 PCR 产物。这样, 既可产生足够量的 cDNA 分子, 又提高了特异性。故本文采用的差异显示- PCR 技术具有便捷、特异性高、重复性好的特点。

本实验获得的差异 cDNA 片段长为 283 bp, 两端均为随机引物序列, 考虑是随机引物与模板的不完全匹配后扩增结果。该片段中含一个完整的读码框架, 编码 46 个氨基酸的人胸腺素 $\beta 4$ 前体物^[3]; 用标记的该片段在内皮细胞中检测到了 0.8 kb 的转录本。我们首次证实了 HUVEC 中的胸腺素 $\beta 4$ 表达可被 Ox- LDL 所调节。胸腺素 $\beta 4$ 最初在小牛胸腺

中分离得到, 不同动物种属的胸腺素 $\beta 4$ 高度保守, 成熟肽均含 43 个氨基酸^[4], 它能调节胸腺依赖淋巴细胞的分化, 还与 B 淋巴细胞、血小板及巨噬细胞的发育相关, 故被认为是造血细胞分化的一个标志物^[5]。胸腺素 $\beta 4$ 与细胞内 G 肌动蛋白相结合, 是细胞内一种主要的肌动蛋白隔绝蛋白, 使肌动蛋白处于单体状态; 如果胸腺素 $\beta 4$ 与低水平的前纤维蛋白并存, 肌动蛋白则发生聚合反应, 并对细胞增殖、迁移和分化至关重要, 故胸腺素 $\beta 4$ 具有调节细胞进程的作用^[6]。Grants 等^[7]认为胸腺素 $\beta 4$ 与体外培养的 HUVEC 血管形成过程相关。用原位杂交技术发现胸腺素 $\beta 4$ 在小鼠的大小血管中均存在。胸腺素 $\beta 4$ 基因转染入 HUVEC 中能增加其表达并与快速内皮细胞贴附、伸展及管状形成相关, 而胸腺素 $\beta 4$ 反义寡核苷酸则抑制这种作用。Malinda 等^[8]经过体内、体外实验认为胸腺素 $\beta 4$ 具有化学趋化剂的活性, 只选择性地刺激内皮细胞迁移来促进血管形成过程。推测 Ox- LDL 可能通过损伤内皮细胞引起内皮细胞的增殖和分化发生变化; 但血管内皮细胞胸腺素 $\beta 4$ 表达改变与 As 发生发展的关系尚有待深入的研究。

参考文献

- [1] Dart AM, Chin- Dusting JP. Lipid and the endothelium [J]. *Cardiovasc Res*, 1999, **43**: 308- 322
- [2] Liang P, Averbouch L, Pardee AB. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization [J]. *Nucleic Acid Research*, 1993, **21**: 3 269- 275
- [3] Gondo H, Kudo J, White JW, et al. Differential expression of the human thymosin beta- 4 gene in lymphocytes, macrophages, and granulocytes [J]. *J Immunol*, 1987, **139**: 3 840- 848
- [4] Low TL, Goldstein AL. Thymosin beta 4 [J]. *Meth Enzymol*, 1985, **116**: 248- 255
- [5] Gomez- Marquez J, Dosil M, Segard F, et al. Thymosin beta 4 gene: preliminary characterization and expression in tissues, thymic cells, and lymphocytes [J]. *J Immunol*, 1989, **14**: 2 740- 744
- [6] Pantaloni D, Carlier MF. How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin beta 4 [J]. *Cell*, 1995, **75**: 1 007- 014
- [7] Grant DS, Kinsella JL, Kibbey MC, et al. Matrigel induces thymosin beta 4 gene in differentiating endothelial cells [J]. *J Cell Science*, 1995, **108**: 3 685- 694
- [8] Malinda KM, Goldstein AL, Kleinman HK. Thymosin beta 4 stimulates directional migration of human umbilical vein endothelial cells [J]. *FASEB J*, 1997, **11**: 474- 481

(此文 2000- 03- 13 收到, 2000- 07- 23 修回)

(此文编辑 朱雯霞)