

[文章编号] 1007-3949(2002)10-03-0195-04

• 实验研究 •

人单核细胞泡沫化敏感候选基因的筛选

杨向东, 王抒¹, 唐蔚青¹, 易光辉, 何淑雅, 唐朝枢², 杨永宗

(南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001;

1. 卫生部老年医学研究所生物化学室; 2. 北京大学医学部生理系, 北京市 100730)

[关键词] 脂蛋白, 低密度, 氧化型; 泡沫细胞; 基因; 杂交, 抑制消减

[摘要] 为克隆调控单核细胞源性泡沫细胞形成的相关基因, 采用抑制消减杂交法筛选 U937 细胞经氧化型低密度脂蛋白温育形成泡沫细胞后差异表达的基因。经过正向、反向两轮消减杂交和巢式聚合酶链反应扩增, 获得了富集的差异表达的 cDNA 片段, 即表达序列标签, 克隆化后挑选经鉴定含有插入片段的质粒测序。经 Genbank 数据库进行同源比较, 获得 20 余个差异表达的 EST, 其中 2 个克隆 FRG4 和 FRG14 只有片段同源序列而无全长同源序列, 提示可能来自新基因。Genbank 登录号为: FRG4(BI 502586) 和 FRG14(BI 502587)。

[中图分类号] Q781

[文献标识码] A

A Gene in Foam Cell Formation in Monocyte-Derived Macrophages Induced by ox-LDL with Suppression Subtractive Hybridization

YANG Xiang-Dong, WANG Shu, TANG Wei-Qing, YI Guang-Hui, HE Shu-Ya, TANG Chao-Shu^④, and YANG Yong-Zong
(Institute of Cardiovascular Disease, Nanhua University, Hengyang 421001; Department of Biochemistry, Beijing Institute of Geriatrics, Beijing 100730; ④Department of Physiology, Medical College of Beijing University, Beijing 100034, China)

[MeSH] Lipoprotein, LDL, oxidized; Foam Cells; Genes; Hybridization, Suppression Subtractive

[ABSTRACT] **Aim** Identification of genes that differentially expressed during foam cell formation is important for understanding the molecular basis of atherosclerosis. **Methods** We used suppression subtractive hybridization (SSH) to isolate differentially expressed cDNA species in foam cells induced by incubation of U937 cells in the presence of oxidized LDL. This led to identification of more than twenty differential expressed sequence tags (EST) after further cloned and sequenced and homology searched in Genbank with software advanced BLAST 2.0. **Results** EST FRG4 (a 273 bp cDNA) and FRG14 (a 346 bp cDNA) had very low homology with sequence in Genbank, which may be new genes. Moreover, the results from RT-PCR confirmed that FRG4 and FRG14 are indeed genes induced by ox-LDL. The sequences have been assigned the database accession numbers in Genbank as below: BI50286, BI502587. Also we have found other genes such as human ubiquitin proteasome pathway and human retinoblastoma-binding protein 4 differentially expressed in foam cells. **Conclusions** Suppression subtractive hybridization (SSH) is a kind of high efficient method to clone differentially displayed genes in tester and driver. We have found genes or ESTs may be related genes of atherosclerosis.

泡沫细胞和粥样斑块的形成是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 最具特征性的病变, 主要由单核细胞/巨噬细胞吞噬胆固醇酯并蓄集脂质形成^[1,2]。单核细胞泡沫化受到多种细胞因子的影响和基因的调控, Cullen 等^[3] 采用差异展示法 (differential display, DD) 从人血单核细胞源泡沫细胞中筛选到一

下调表达的基因, 其序列与岩藻糖酰转移酶-④ Fucosyltransferases Fuc-T ⑤ 完全相同。目前尚不完全清楚影响泡沫细胞形成的特异的调控基因, 我们选用一种新的、高效的筛选基因的方法——抑制消减杂交法 (suppression subtractive hybridization, SSH), 筛选在泡沫细胞或正常细胞中特异表达或者高表达的基因^[4,5]。

[收稿日期] 2001-12-10 [修回日期] 2002-05-10

[基金项目] 国家重点基础研究项目基金 (G2000056905)、湖南省自然科学基金 (00JJY2027) 和湖南省教育厅课题 (00C151) 资助。

[作者简介] 杨向东, 男, 1970 年出生, 心血管病理生理学博士, 主要从事动脉粥样硬化相关基因克隆和细胞凋亡机制研究, 为本文通讯作者。唐朝枢, 男, 1945 年出生, 博士研究生导师, 973 项目首席科学家, 长期从事心血管疾病病理生理研究及教学工作。

1 材料和方法

1.1 材料

人髓系白血病细胞 U937 细胞购自中科院生物化学与细胞生物所; Trizol Reagent、EcoR I、胎牛血清

和 RPMI1640 培养基为 Gibco BRL 产品; mRNA 分离试剂盒、cDNA 抑制消减试剂盒、高保真聚合酶链反应试剂盒和 AdvanTAge™ PCR 克隆试剂盒均为 Clontech 产品; 其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 泡沫细胞模型的建立

人髓系白血病细胞 U937 细胞 ($5 \times 10^8/L$) 用含 100 mg/L 青霉素、100 mg/L 链霉素和 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基于 37 °C 5% CO₂ 培养。实验用低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 采用密度梯度离心方法制备, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定为单一蛋白带。将 LDL 置于含 10 μmol/L CuSO₂ 的 PBS 溶液中, 37 °C 温育 24 h, 然后置于含 200 μmol/L EDTA 的 PBS 中透析 48 h, 滤过除菌后 4 °C 保存。对照组不加氧化型 LDL (oxidized LDL, ox-LDL) 处理, 实验组 ox-LDL 终浓度为 80 mg/L, 培养 48 h 后, 应用高效液相色谱分析和电镜观察, 细胞内胆固醇酯占细胞内总胆固醇的 50% 以上即形成泡沫细胞^[6]。

1.3 细胞总 RNA 提取和 mRNA 分离

总 RNA 的抽提按照 TRIzol™ 试剂说明书进行, 分别提取实验组和对照组细胞总 RNA, 复溶于无 RNase 的水中, 其纯度在 1.8~2.0。细胞 mRNA 的分离采用 mRNA 分离试剂盒过柱分离, 提取的 mRNA 复溶于无 RNase 的水中 (浓度为 500 mg/L), 用于合成双链 cDNA。

1.4 合成双链 cDNA

cDNA 第一链合成采用 PCR-Select™ cDNA 消减试剂盒中的逆转录酶, 反应液总体积为 10 μL, 模板为上述驱赶子和检测子的 Poly A+ RNA (2 μg) 2~4 μL, cDNA 合成引物 (10 μmol/L) 1 μL, 70 °C 2 min, 冰上放置 2 min 后, 加入 5 × 第一链反应缓冲液 2 μL, dNTP mix (10 mmol/L each) 1 μL, Sterile H₂O 1 μL, AMV 反转录酶 (2.0×10^7 unit/L) 1 μL, 42 °C 1.5 h。cDNA 第二链合成体系 80 μL, Sterile H₂O 48.4 μL, 5 × 第二链反应缓冲液 16 μL, dNTP mix (10 mmol/L) 1.6 μL, 20 × 第二链反应酶混合物 4 μL, 16 °C 2 h。加入 T4 DNA 聚合酶 2 μL (6 unit), 16 °C 30 min, 加入 20 × EDTA/glycogen 4 μL 终止第二链合成反应。于 -20 °C 保存。

1.5 抑制消减杂交和聚合酶链反应扩增

正向消减以 ox-LDL 处理细胞作为检测子, 对照组细胞作为驱赶子; 反向消减以正常细胞作为检测子, ox-LDL 处理细胞作为驱赶子。操作完全按 PCR-Select™ cDNA 消减试剂盒说明书进行。简述如下: cDNA 链以 RsaI 酶消化成短的片段, 将检测子的 cDNA 分为 2 管, 分别连接试剂盒提供的特殊设计的寡

核苷酸接头 1 和 2, 然后分别与驱赶子 cDNA 杂交; 合并 2 种杂交产物后再与驱赶子 cDNA 做第 2 轮杂交; 然后将杂交产物通过巢式聚合酶链反应选择性扩增, 使检测子 cDNA 中特异表达或高表达的片段得到特异性扩增。

1.6 聚合酶链反应扩增产物的克隆、纯化和测序

采用 AdvanTAge™ PCR 克隆试剂盒扩增产物直接连接到 pT-Adv Vector 后, 转化 TOP10F/ E. coli 感受态细胞, 进行克隆化。从平板上挑取白色菌落, 提取质粒 DNA, 经 EcoR iv 酶切后琼脂糖凝胶电泳鉴定或以 M13 为引物聚合酶链反应扩增鉴定。提取阳性克隆重组质粒 DNA, 纯化后用 ABI 377 DNA 自动测序仪测序, 测序引物为 M13R。测得序列通过使用 Advanced BLAST 2.0 软件与 GenBank 中收录序列进行同源比较。

1.7 半定量逆转录-聚合酶链反应鉴定

从序列分析后显示可能来自新基因的 cDNA 序列中设计基因特异的引物 (gene-specific primers, GSPs), 可用于逆转录-聚合酶链反应鉴定和后续的应用 cDNA 末端快速扩增技术 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 快速扩增 cDNA 两端的未知序列。

FRG4: GSP1 5'-CTT GCT CTC TGC CAT TGC TG-3'

GSP2 5'-CGT GGC CCT GGT CAT GCT CC-3'

FRG14: GSP1 5'-GGC TGC AGA TGA GAT AGG GC-3'

GSP2 5'-ACA AAA CTG CGG ACA CCA CC-3'

分别以质粒 DNA 和泡沫细胞中提取的 RNA 逆转录 cDNA 为模板, 聚合酶链反应扩增, 反应程序为: 94 °C 3 min 变性; 94 °C 30 s, 68 °C 1 min, 30 个循环; 68 °C 10 min 延伸。1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析。

2 结果

2.1 抑制消减杂交结果

经两轮消减杂交和两轮 PCR 扩增后, PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分析。从图 1 (Figure 1) 可见, 第一轮聚合酶链反应扩增后 (图 1 第 5~8 道), 差异表达条带尚不明显, 但经第二轮巢式聚合酶链反应扩增后 (图 1 第 1~4 道), 在检测子组中特异表达或高表达的基因片段得到富集, 消减后再聚合酶链反应扩增, 检测子和驱赶子的电泳图谱带型明显不同。

2.2 差异带的克隆和酶切鉴定

从每个平板上随机挑取 10~15 个白色菌落, 提取质粒 DNA 经 EcoR iv 酶切反应鉴定, 载体大小为 3.9 kb, 酶切片段大小在 300 bp~1 000 bp 之间。

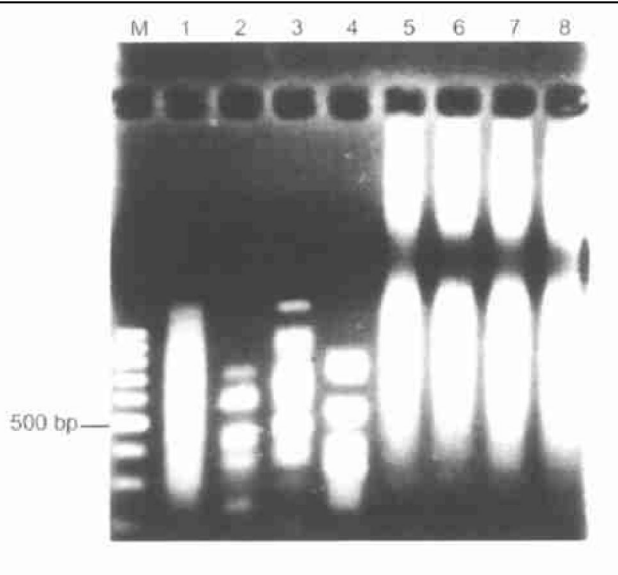


图 1. 抑制消减后巢式聚合酶链反应扩增差异表达 cDNA 凝胶电泳图谱。第 1~4 道为第一轮 PCR 产物, 第 5~8 道为第二轮 PCR 产物。

Figure 1. Results of SSH-PCR amplified foam cells differential expression cDNA from subtraction experiment. Lane M: 100 bp DNA size marker, Lane(1~4): Secondary PCR products of subtracted foam cell and control cell cDNA, Lane(5~8): Primary PCR products of subtracted foam cell and control cell cDNA, Lane 1: Control cell as driver 1, Lane 2: Foam cell as tester 1, Lane 3: Foam cell as driver 2, Lane 4: Control cell as tester 2% agarose gel /EtBr gel.

2.3 测序及同源分析

挑选 25 个酶切片段在 300~800 bp 的阳性克隆, 小量制备质粒 DNA, 纯化后测序。获得 20 个 cDNA 克隆, 测序结果检索后多为已知序列, 其中两个克隆 FRG4 和 FRG14 的序列经 Genbank 检索, 没有发现全长的同源序列, 提示其可能来自新基因, Genbank 登录号为: FRG4(BI 502586) 和 FRG14(BI 50287)。序列如下:

FRG4 (273 bp) TCG AGC GGC CGC CCG GGC AGG TAC CCC GTG GCC CTG GTC ATG CTC CAG GAG GAT GAG CTG CTA AGC AAG ATG AGA TTT GCC CTC GTT CCT AAA CTT GTG AAG GAA GAA GTG TTC CTG GAG GAA CTA CTT TTA CCG CGT CTC CCT GAT TAA GCA GTC AGC CCA ACT CAC GGC CCT GGC TGC CCA ACA GCA GGC CGC AGG GAA GGA GGA GAA GAG CAA TGG CAG AGA GCA AGA TTT GCC GCT GGC AGA GGC AGT ACC TCG GCC GCG ACC ACG CTA

FRG14 (346 bp) CGA GCG GCC GCC GGG CAG GTG TTT AAA AAT TGG TTT AAA ACA AAA CTG CGG ACA CCA CCA TAA AAA TGG AAT CAA AAG AAA GTT AAT TTA TGA AAT TAA GAG GTC AGC AGA ATA TAC TCA GTG ATG GAA GGC ACT TGG GAA AGT CIT TTT AAT AGA ACA AGA ACG ATC TTA ATT TAA GAA TAT TAT CCT GGT TTA ACA ACA GTG CCC TGT TTA CAA CAG ATT GTG CCC TAT CTC ATC TGC AGC CGA GGA

ATA AAG GAT TCT GAT TAG AAA GAG GGT TGC CTA CAG ATT AGT AAG CAA TTC CTT GGA TCT TAT GCA CAG AAC TTG TAC CTC GGC CGC GAC CAC GCT A

2.4 半定量逆转录—聚合酶链反应鉴定

分别以 U937 细胞和泡沫细胞、人脐静脉内皮细胞和 α -LDL 处理的内皮细胞等多种细胞中提取的 RNA 逆转录 cDNA 为模板, 以 GAPDH 为内对照, 根据 FRG4 和 FRG14 cDNA 序列设计的 GSP 引物, RT-PCR 扩增 FRG4 和 FRG14 基因片段。其片段大小分别为 202 bp 和 206 bp。实验结果说明在上述的各种细胞中均有含 FRG4 和 FRG14 片段的基因转录表达 (图 2, Figure 2)。

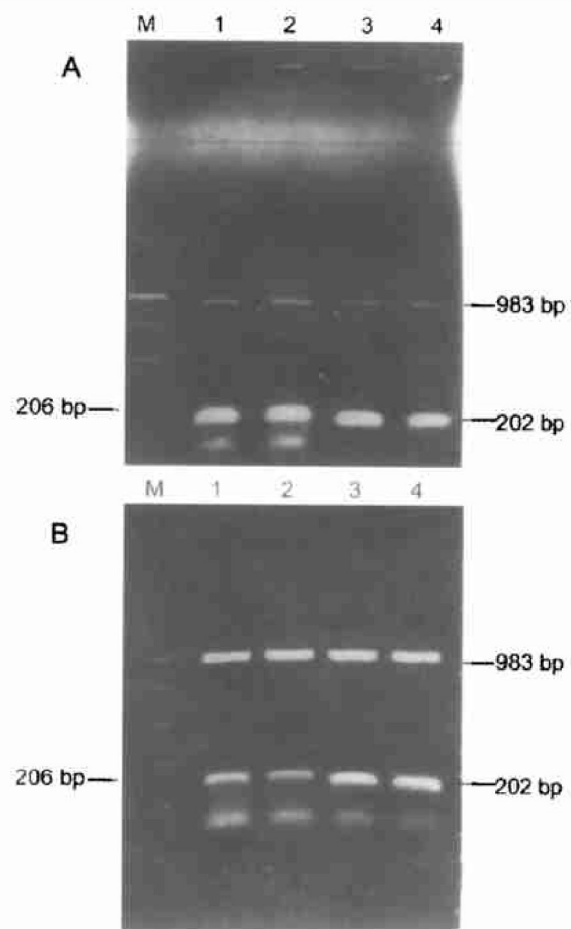


图 2. 逆转录—聚合酶链反应检测差异表达 FRG4 和 FRG14 在血管细胞中的表达。A: α -LDL 处理 U937 细胞, B: α -LDL 处理人脐静脉内皮细胞。第 1 和第 3 道为对照组, 第 2 和第 4 道为 α -LDL 处理组。第 1 和第 2 道引物为 FDG14, PCR 产物为 206 bp, 第 3 和第 4 道引物为 FRG4, PCR 产物为 202 bp。

Figure 2. Result of RT-PCR using Gene specific Primers (GSPs). Reverse transplate total RNA as cDNA template. The size of PCR amplification is 202 bp and 206 bp. GAPDH is 983 bp. Lane M: 200 bp DNA size marker.

3 讨论

目前有许多分离差别表达基因的方法,如差异显示 PCR (differential display PCR, DD-PCR)、消减杂交 (subtractive cDNA hybridization, SH)、cDNA 代表性差异分析 (cDNA representational difference analysis, cDNA-RDA) 和 RNA 指纹技术 (RNA fingerprinting) 等,但要找出低丰度的差异表达基因,消减杂交操作太烦琐且效率低,差异显示和 RNA 指纹则倾向于高丰度表达基因且假阳性率高。抑制消减杂交 (SSH) 在运用消减杂交的同时引进抑制 PCR (suppression PCR),免去了分离单链和双链 cDNA 的麻烦,操作简便且效率高,不需要使用同位素。我们应用 SSH 从 U937 细胞和单核细胞源泡沫细胞中获得了 20 余条差异表达的 cDNA 片段,其中片段 FRG4 和 FRG14 基因序列可能是未知新基因的表达片段。整个操作可在 2 周内完成,对仪器设备的要求也不高,SSH 方法确实简单、高效。

采用 SSH 获得的在单核/巨噬细胞泡沫化过程中差异表达的已知基因:人棕榈基硫酯酶基因 (human palmitoyl-protein thioesterase gene)、蛋白磷酸(酯)酶 2 调节亚基 (human protein phosphatase 2 regulatory subunit B)、溶血磷脂酶 1 基因 (human lysophospholipase 1 gene) 和羟丁酸脱氢酶 (putative 2-hydroxy acid dehydrogenase gene) 等与脂蛋白代谢有关;核糖体蛋白 L3 基因 (human ribosomal protein L3 mRNA)、核糖体蛋白 S24 基因 (human ribosomal protein S24 mRNA) 和延伸因子 1- α 基因 (human elongation factor 1-alpha mRNA) 等与基因转录表达有关;泛素缀合酶 E2A (human ubiquitin conjugating enzyme E2A) 和人视网膜母细胞瘤结合蛋白 4 基因 (human retinoblastoma-binding protein 4 mRNA) 等与细胞周期调控和细胞凋亡有关。氧化型低密度脂蛋白诱导 U937 细胞分化、泡沫化和细胞凋亡的过程中,必定有相关基因参与,我们通过 SSH 筛选获得的这些基因是否与单核细胞源性泡沫细胞的演变有关还需进一步研究证实。文献[7~9]报道,与泛素缀合酶关联的蛋白酶体系统 (the ubiquitin proteasome system) 不仅能降解变性的、异常的或短命的蛋白质,而且能降解转录因子、内膜蛋白和细胞周期蛋白等天然蛋白。泛素一蛋白酶体

通路在真核细胞的转录水平的调节、蛋白质的降解、蛋白质稳定状态的调节、受体胞吞的调控、细胞凋亡和应激反应等过程中有重要作用。研究发现肝细胞系 hepG2 细胞对载脂蛋白 B 的降解是通过泛素一蛋白酶通路,对未与脂质结合的载脂蛋白 B 的降解可以防止载脂蛋白 B 的异常积聚所导致的毒性作用。氧化型 LDL 诱导培养的内皮细胞系 ECV-304 和成纤维细胞凋亡可能与氧化型低密度脂蛋白影响泛素一蛋白酶复合体活性有关。酶解系统的功能缺陷增强了氧化型低密度脂蛋白的细胞毒性作用,从而诱导培养的血管细胞凋亡。目前我们通过电子克隆和基于文库 cDNA 基础热启动 PCR 快速扩增 cDNA 末端技术,获得 EST FRG4 全长 cDNA 序列。该基因全长 2 031 bp,编码蛋白与果蝇突触相关蛋白 (synapse-associated protein, sap47-1-fruit fly) 有 37% 同源性,与脂蛋白代谢和泡沫细胞形成、凋亡的关系经联机检索没有报道。有关研究工作正在整理,对新基因的表达和功能研究正在继续。

[参考文献]

- [1] Martin W, Kockx MM. Apoptosis in atherosclerosis: focus on oxidized lipids and inflammation. *Curr Opin Lipidol*, 2001, **12** (5): 535-541
- [2] Best P J, Hasdai D, Sangiorgi G, et al. Apoptosis Basic concepts and implications in coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, **19** (1): 14-22
- [3] Cullen P, Mohr S, Brennhause B, et al. Downregulation of the selectin ligand-producing fucosyltransferases Fuc-TIV and Fuc-TVII during foam cell formation in monocyte-derived macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17** (3): 1 591-598
- [4] Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, et al. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (10): 6 025-030
- [5] Stein OD, Thies WG, Hofman M. A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes. *Nucleic Acids Research*, 1997, **25** (13): 2 598-602
- [6] 李全忠, 杨永宗, 杨向东, 等. U937 泡沫细胞模型的建立. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7**(2): 152-154
- [7] Vieira O, Escargueil BI, Jurgens G, et al. Oxidized LDL alter the activity of the ubiquitin proteasome pathway: potential role in oxidized LDL-induced apoptosis. *FASEB J*, 2000, **14**(3): 532-542
- [8] Edward AF, Mingyue Z, Henry NG, et al. The degradation of apolipoprotein B100 is mediated by the ubiquitin proteasome pathway and involves heat shock protein 70. *J Biol Chem*, 1997, **272**(33): 20 427-434
- [9] Kikuchi J, Furukawa Y, Kubo N, et al. Induction of ubiquitin conjugating enzyme by aggregated low density lipoprotein in human macrophages and its implications for atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20** (2): 128-134

(此文编辑 朱雯霞)