

氧化型低密度脂蛋白诱导血管内皮细胞 基因表达谱的改变

卢次勇, 凌文华, 马静, 吴聪娥

(中山大学公共卫生学院, 广东省广州市 510080)

[关键词] 动脉粥样硬化; 脂蛋白, 低密度, 氧化型; 内皮细胞; 基因表达芯片

[摘要] 通过对氧化型低密度脂蛋白诱导血管内皮细胞基因表达谱改变的研究, 为阐明氧化型低密度脂蛋白致内皮细胞功能障碍及动脉粥样硬化形成的分子机制提供科学依据。采用含有 4 000 条全长已知人类基因 cDNA 以及 96 条参照基因 cDNA 克隆制作的基因表达谱芯片, 筛查氧化型低密度脂蛋白(100 mg/L)作用 24 h 对人脐静脉血管内皮细胞的基因表达谱改变的影响。结果显示, 氧化型低密度脂蛋白可诱导 1 条基因表达下调(泛肽激活酶), 3 条基因表达上调(血清和糖皮质激素诱导的蛋白激酶、热休克蛋白 70 和 KDRF)。结果发现, 在氧化型低密度脂蛋白作用的早期阶段可诱导内皮细胞相关基因的表达改变; 首次发现氧化型低密度脂蛋白可诱导内皮细胞 KDRF、泛肽激活酶和血清和糖皮质激素诱导的蛋白激酶基因表达改变, 为揭示氧化型低密度脂蛋白引起血管内皮细胞功能障碍的机制提供了研究线索。

[中图分类号] R543.5

[文献标识码] A

Changes of the Gene Expression Pattern of Vascular Endothelial Cells Induced by Oxidized Low Density Lipoprotein

LU Ci-Yong, LING Wen-Hua, MA Jing, and WU Cong-Er

(School of Public Health, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

[MeSH] Atherosclerosis; Lipoproteins, LDL, oxidized; Endothelial cells; Oligonucleotide Array Sequence Analysis

[ABSTRACT] **Aim** To study the change of the gene expression pattern of vascular endothelial cells induced by oxidized low density lipoprotein. **Methods** After human umbilical vein endothelial cells was exposed to oxidized low density lipoprotein(100 mg/L) for 24 h, genes expression was screened with a complementary DNA microarray representing 4 000 different human genes and 96 control genes. **Results** There were 1 down regulated gene and 3 up regulated genes. The down regulated gene was ubiquitin activating enzyme E1. The up regulate genes were as follows: serum and glucocorticoid-inducible protein kinase (SGK), heat shock protein 70 (HSP70), and KM-102-derived reductase-like factor (KDRF). **Conclusions** Oxidized low density lipoprotein could induce the change of gene expression pattern of endothelial cells. It was the first time to find that oxidized low density lipoprotein could induce the change of the gene expression of SGK, HSP70 and KDRF. All the changed genes were related to the stress stimulation. These changes might be related to the dysfunction of endothelial cells induced by oxidized low density lipoprotein.

氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)作为动脉粥样硬化形成的重要危险因素之一, 可诱导内皮细胞基因表达发生变化。本研究首次采用基因芯片技术筛选 ox-LDL 对血管内皮细胞基因表达的影响, 为阐明 ox-LDL 致内皮细胞功能损伤的可能机制以及 ox-LDL 致动脉粥样硬

化的分子机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 基因芯片

基因芯片由上海博星基因芯片有限责任公司提供, 型号为 H40d, 即含有 4 000 条人类全长基因和 96 条参照基因, 其 cDNA 来源为博星基因芯片有限公司的 cDNA 文库, 有效基因的组成为: 原癌基因和抑癌基因(OTS)、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因(ARP-SRP)、免疫相关基因(IC)、离子通道和运输蛋白相关基因(ICTP)、细胞周期蛋白相关基因(CCCP)、细胞骨架和运动蛋白相关基因(FMS)、DNA 合成、修复和重组蛋白相关基因(SRRP)、细胞受体

[收稿日期] 2002-07-15 [修回日期] 2002-11-08

[基金项目] 国家杰出青年科学基金(30025037)和广东省自然科学基金(990090)资助。

[作者简介] 卢次勇, 男, 1972 年出生, 安徽省萧县人, 在职博士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化形成的分子机制。凌文华, 男, 1955 年出生, 安徽省巢湖人, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制和氧化-抗氧化作用。马静, 女, 1957 年出生, 广东省广州市人, 硕士, 副教授, 研究方向为营养学。

相关基因(CR)、细胞信号和传递蛋白相关基因(EC-SCP)、发育相关基因(GC)以及相关的热点基因,每条基因进行双点点样。

1.2 血管内皮细胞的分离、培养及鉴定

将新鲜新生儿脐带两端用无菌血管钳夹住,置于75%乙醇中浸泡数秒。无菌PBS洗净乙醇后,用无菌PBS将静脉中的残血冲洗干净。注入灌流用胰蛋白酶(1.25%胰蛋白酶和0.02% EDTA- Na_2),室温消化15~20 min,反复摇动。吸出含有内皮细胞的消化液注入离心管,并用PBS冲洗。低速离心,PBS洗涤后将细胞接种于培养瓶中,37℃、5% CO_2 培养箱中培养并传代,第4~7代细胞用于实验。

血管内皮细胞的鉴定采用凝血酶第8因子相关抗原检测法。细胞培养已近似汇合时,用PBS洗2次,水分尽量吸干,置于丙酮中10 min,室温固定、干燥,滴加羊抗人第8因子相关抗原的第一抗体(10倍稀释),室温放置30 min,用PBS洗3次,尽量吸干水分,再滴加荧光标记的兔抗羊IgG(10倍稀释),室温30 min,用PBS洗3次,无水分时用缓冲甘油封片,在荧光显微镜下观察。血管内皮细胞的胞浆中发出均一的荧光为阳性。

1.3 血管内皮细胞的处理

将实验用细胞用含15%胎牛血清的IMDM(Gibco公司)培养密度达80%以后,换成含0.5%胎牛血清的IMDM培养6 h,恢复15%的胎牛血清,加入100 mg/L ox-LDL作用24 h,收获细胞备用。对照组除不加ox-LDL外,其余处理方法相同。

1.4 总RNA提取及探针制备

用Gibco公司Trizol试剂一步法抽提培养内皮细胞总RNA。细胞用冰冷PBS(pH 7.2)洗涤2次,加Trizol裂解细胞:氯仿抽提一次:异丙醇沉淀RNA;75%乙醇洗2次,真空干燥2~3 min,Nets缓冲液溶解,总RNA进行电泳,紫外分光光度计测定 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值,70℃保温实验电泳检测总RNA的质量是否合格。参照Schena等^[1]的方法逆转录标记cDNA探针并纯化。用Cy3-dUTP标记对照组细胞cDNA,用Cy5-dUTP标记实验组细胞cDNA。

1.5 杂交及洗片

将探针乙醇沉淀后,溶解在20 mL 5×SSC+0.2% SDS杂交液中,置于95℃水浴中变性2 min;芯片置于95℃水浴中变性30 s,玻片取出浸于无水乙醇30 s;探针取出后迅速置于冰上。将探针置于芯片上,用盖玻片覆盖,置于杂交舱中,用Parafilm密封,放入42℃杂交箱内杂交过夜(16~18 h)。然后揭开盖玻片,分别用2×SSC+0.2% SDS、0.1% ×

SSC+0.2% SDS和0.1% ×SSC洗涤10 min,室温晾干。

1.6 基因芯片扫描数据的判定标准

采用ScanArray4000进行荧光信号的扫描,图像信号采用图像处理软件GenePix Pro 3.0分析。先将所有数据用对照基因进行均衡^[2],筛选出实验组与对照组信号Ratio大于2.0或小于0.5的数据项(表达差异在2倍以上),将在双点点样中均出现表达差异的数据项筛出。

2 结果

2.1 总RNA质量检验结果

在进行表达谱基因芯片实验前进行总RNA的质量检验,检验结果发现,RNA总质量、 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 、电泳结果及保温实验均符合实验要求。

2.2 氧化型低密度脂蛋白对人脐静脉内皮细胞基因表达谱的影响

100 mg/L氧化型低密度脂蛋白作用24 h后,1条基因表达下调,3条基因表达上调。这些表达差异的基因基本为应激相关基因及细胞凋亡相关基因(表1, Table 1);表达差异 $\text{Cy}5/\text{Cy}3 \geq 2.0$ 或 ≤ 0.5 。

表1. 氧化型低密度脂蛋白诱导内皮细胞基因表达差异。

Table 1. Differential expressed genes in endothelial cells induced by oxidized low density lipoprotein.

Genbank ID No.	Average Ratio (Cy5/Cy3)	Definition (Gene Name)
Hume1urp	0.475	Homo sapiens ubiquitin activating enzyme E1 related protein mRNA, complete cds
Hssgk	2.080	Homo sapiens sgk gene
Cruhsp70a	2.161	Chinese hamster heat shock protein (cognate form of hsp70) mRNA, complete cds
d88687	2.559	Homo sapiens mRNA for KM-102-derived reductase-like factor, complete cds

图1(Figure 1)中,X轴和Y轴分别以Cy3荧光强度值(前景值-背景值)和Cy5荧光强度值为坐标,每一个数据点代表芯片上一个基因点的杂交信号;45°角直线上的数据点Cy5/Cy3比率为1,表示无表达差异;数据点若偏离45°角直线,代表Y值与X值的比值偏离1,该点很可能属于表达差异。

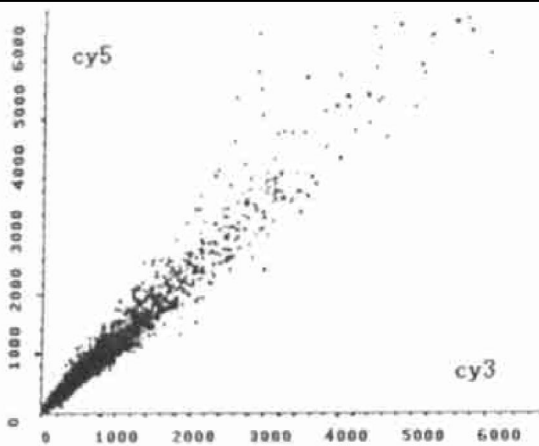


图 1. 基因芯片杂交信号散点图.

Figure 1. The scatter plots of hybridizing signals on gene chip.

3 讨论

基因芯片, 又称 DNA 微阵列, 是指固着在固相载体上的高密度 DNA 微点阵。基因芯片技术可以大规模、高通量地对成千上万个基因进行同时研究, 从而解决了传统核酸印迹杂交 (Southern blotting 和 Northern blotting 等) 技术操作繁杂、自动化程度低、操作序列数量少和检测效率低等不足。

本研究采用包含 4 000 种人类已知基因的芯片, 对氧化型低密度脂蛋白影响人脐静脉血管内皮细胞早期基因的表达进行了分析。其中有 1 条基因表现下调, 3 条基因表现为上调。现分别就表达异常的基因进行讨论。

3.1 泛肽激活酶

泛肽激活酶 (ubiquitin activating enzyme E1) 是泛肽通路的重要成分之一。泛肽是迄今为止所知在种系发生上最保守的多肽, 具有内在蛋白分解酶的活性, 与 ATP 依赖性蛋白降解有关。另外泛肽化修饰还有着其它细胞学功能^[3], 包括细胞凋亡、DNA 修复、信号传导、应激反应 (包括免疫反应)、跨膜转运、细胞周期、细胞分化、神经系统功能、受体介导内吞、转录和细胞器发生等。蛋白质的泛肽化不仅是蛋白质的正常生理更新所需, 而且也可作为细胞内监视系统的一部分^[4]。Delic 等^[5] 研究发现, 在凋亡启动的 15~90 min, 作为泛肽基因转录激活的结果, 泛肽 mRNA 水平是增加的。特别是在凋亡细胞中, 核蛋白高度泛肽化; 泛肽与泛肽化蛋白仅仅在凋亡细胞是增加的; 有泛肽系列特异性的反义寡核苷酸引起了泛肽化核蛋白水平降低和凋亡细胞大大的减少。提示泛肽基因是在凋亡过程中具有诱导活力的基因之一。其它的研究也得到了类似的结果^[6,9]。

本文发现, 在氧化型低密度脂蛋白作用下, 早期的泛肽激活酶表达是下降的, 提示在内皮细胞早期的反应中可能存在通过影响泛肽途径来减少细胞凋亡。但其信号传导途径尚有待于进一步的研究。

3.2 血清和糖皮质激素诱导的蛋白激酶

在本研究中表达出现异常的基因还有血清和糖皮质激素诱导的蛋白激酶 (serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase, SGK) 基因。Bell 等^[10] 研究表明其为高渗应激反应的一种新成分, P38MAPK 信号通路调节高渗应激刺激的 SGK 表达。用 P38MAPK 或 P38MAPK 的上游调节子 MKK3 的阻断剂, 可显著降低山梨醇诱导的 SGK 启动子活性及其蛋白产物。因此 SGK 的表达可能是内皮细胞通过 P38MAPK 调节高渗应激的一种新定义的成分。

3.3 热休克蛋白 70

热休克蛋白 (heat shock protein, HSP) 是在热休克状态下启动一系列特殊基因编码合成的蛋白质, 普遍存在于生物体细胞中。HSP 能保护细胞并促进细胞从各种刺激所造成的损伤中自身修复, 具有多种生物学功能。HSP70 是 HSP 家族中重要的组成成员, 目前研究认为, 细胞可在应激条件下合成 HSP 70, 从而使细胞避免不可恢复的变性, 在一定程度上干扰外界刺激所启动的细胞凋亡程序^[11-13]。Pirillo 等^[14,15] 研究表明, 氧化型低密度脂蛋白可诱导培养的内皮细胞 (EAhy-926) 和平滑肌细胞 HSP70 的表达。这一反应被认为与保护细胞免受毒性损害有关。Zhu 等^[16] 研究显示, 氧化型低密度脂蛋白具有细胞毒性, 同时诱导多种热休克蛋白 (HSPs) 包括 HSP70 的表达, 保护细胞免受变性的威胁, 同时 HSP70 表达的增加使细胞存活的机会增加。

本文发现, 在氧化型低密度脂蛋白作用 24 h 后, HSP70 出现高表达, 提示内皮细胞可能通过激活该途径对抗氧化型低密度脂蛋白引起的内皮细胞损伤。

3.4 KM-102-源性还原酶样因子

KM-102 (KDRF) (KM-102-derived reductase-like factor) 为一种新发现的氧化还原酶^[17,18], 在清除活性氧中间体对炎症刺激作出反应的过程中发挥作用。本文发现, 在氧化型低密度脂蛋白作用 24 h 时 KDRF 呈现高表达, 其高表达及其与 NADH/NADPH 氧化酶系统之间的关系, 以及其在氧化型低密度脂蛋白致动脉粥样硬化中的地位和作用值得进一步深入的探讨。

本研究揭示了氧化型低密度脂蛋白短时间作用下, 在导致内皮细胞功能损伤的开始阶段, 细胞通过

一系列的应激反应来对抗外界刺激,为进一步研究氧化型低密度脂蛋白诱导相关基因的表达异常导致内皮细胞功能障碍的机制提供了线索。

[参考文献]

- [1] Schena M, Shalon D, Dais RW, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 1995, **270** (20): 467-470
- [2] Rolli M, Kotlyarov A, Sakamoto KM, et al. Stress-induced stimulation of early growth response gene 1 by p38/stress-activated protein kinase 2 is mediated by a cAMP-responsive promoter element in a MAPKAP kinase 2-independent manner. *J Biol Chem*, 1999, **274** (28): 19 559-564
- [3] Gropper RRA, Vrandt S, Elias CF, et al. The ubiquitin-activating enzyme E1 is required for stress-induced lysosomal degradation of cellular proteins. *J Biol Chem*, 1991, **266**: 3 602
- [4] Weissman AM. Regulating protein degradation by ubiquitination. *Immunol Today*, 1997, **18** (4): 189
- [5] Delic J, Morange M, Magdelenat H. Ubiquitin pathway involvement in human lymphocyte gamma irradiation induced apoptosis. *Mol Cell Biol*, 1993, **13** (8): 4 875
- [6] Sandri M, Podhorska OM, Geromel V, et al. Exercise induces myonuclear ubiquitination and apoptosis in dystrophin deficient muscle of mice. *J Neuro-pathol Exp Neurol*, 1997, **56** (1): 45
- [7] Soldatenkov VA, Dritschilo A. Apoptosis of Ewing's sarcoma cells is accompanied by accumulation of ubiquitinated proteins. *Cancer Res*, 1997, **57** (18): 3 881
- [8] Phillips ME, Platt JE. The use of ubiquitin as a marker of thyroxine-induced apoptosis in cultured rana catesbeiana tail tips. *Gen Comp Endocrinol*, 1994, **95** (3): 409
- [9] Ferrer I, Pozas E, Planas AM. Ubiquitination of apoptotic cells in the develop-

ing cerebellum of the rat following ionizing radiation of methylazoxymethanol injection. *Acta Neuropathol Berl*, 1997, **93** (4): 402

- [10] Bell LM, Leong ML, Kim B, et al. Hyperosmotic stress stimulates promoter activity and regulates cellular utilization of the serum and glucocorticoid inducible protein kinase (Sgk) by a p38 MAPK-dependent pathway. *J Biol Chem*, 2000, **275** (33): 25 262-272
- [11] Mosser DD, Caron AW, Bouquet L, et al. Role of the human heat shock protein 70 in protection against stress induced apoptosis. *Mol Cell Biol*, 1997, **17**: 5 317
- [12] Gabai VL, Meriin AB, Mosser DD, et al. HSP70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance. *J Biol Chem*, 1997, **272** (29): 18 033-037
- [13] 谭红梅, 吴伟康. HSP70 调节应激活化蛋白激酶 JNK 活性与细胞凋亡. *中国病理生理杂志*, 2001, **17** (5): 477-480
- [14] Pirillo A, Zhu E, Roma P, et al. Oxysterols from oxidized LDL are cytotoxic but fail to induce hsp 70 expression in endothelial cells. *FEBS Lett*, 1999, **462** (1-2): 113-116
- [15] Pirillo A, Jacoviello C, Longoni C, et al. Simvastatin modulates the heat shock response and cytotoxicity mediated by oxidized LDL in cultured human endothelial smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **231** (2): 437-441
- [16] Zhu W, Roma P, Pirillo A, et al. Human endothelial cells exposed to oxidized LDL express hsp70 only when proliferating. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, **16** (9): 1 104-111
- [17] Miranda VA, Spyrou G. The novel oxidoreductase KDRF (KM-102-derived reductase-like factor) is identical with human thioredoxin reductase. *Biochem J*, 1997, **325** (1): 287-288
- [18] Koishi R, Kawashima I, Yoshimura C, et al. Cloning and characterization of a novel oxidoreductase KDRF from a human bone marrow-derived stromal cell line KM-102. *J Biol Chem*, 1997, **272** (4): 2 570-577

(此文编辑 朱雯霞)

•消息•

2003 年中国病理生理学会学术活动安排

会议名称	日期	地点	预期人数	联系人
1. 动物病理生理专业委员会第 11 次学术研讨会	8 月	广州	120- 150	哈尔滨东北农业大学动物医学院 病理郑世民 150030 电话:0451- 5390405
2. 西部地区动脉硬化性疾病学术研讨会	8 月 18- 23	待定	80- 100	湖南南华大学中国动脉硬化杂志编辑部 胡必利 421001 电话:0734- 8281289 dmzbbj@163.net
3. 炎症、感染、发热和低温专业委员会和中医专业委员会第 9 次学术会议暨第 4 届中国病理生理杂志常务编委会	9 月	上海	120	广州暨南大学医学院病理生理教研室 颜亮 510632 电话:020- 85220253
4. 中专教育委员会第 5 届 9 次学术会议	10 月	成都	80	三军大成都医学院病理生理室周其全 610083 电话:028- 6571072
5. 受体专业委员会第 5 届 9 次学术会议	10 月	南京	100	北京大学医学部第三医院血管医学研究所 张幼怡 100083 电话:010- 62092316
6. 第 4 届国际高血压与相关疾病暨第 10 届全国微循环学术会议	10 月	北京	700	中国人民解放军总医院病理生理学研究室 刘秀华 电话:010- 66939763 北京市复兴路 28 号 100853
7. 第 9 届全国实验血液学会议	11 月	上海	400	第二军医大学长海医院王建明教授上海长海路 174 号, 邮编 200433 电话:020- 250705345