

胆固醇诱导血管内皮细胞基因的差异表达

唐蔚青, 王 抒¹, 杨向东², 陈保生³, 李凌松

(北京大学医学部生物化学与分子生物学系, 北京市 100083; 1. 卫生部北京医院北京老年医学研究所, 北京市 100730;

2. 南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001; 3. 中国医学科学院基础医学研究所, 北京市 100005)

[关键词] 分子生物学; 血管内皮细胞基因差异表达; 抑制消减杂交; 聚合酶链反应; 胆固醇; 血小板反应蛋白 1; 蛋白酶体亚单位; 内皮细胞, 人脐静脉; 基因表达

[摘要] 为探讨高胆固醇致动脉粥样硬化的分子机理, 利用抑制消减杂交技术克隆胆固醇诱导脐静脉内皮细胞产生的差异表达基因, 并对其表达进行初步研究。经顺、反双向消减杂交和巢式聚合酶链反应扩增, 获得了差异表达的 cDNA 片段, 克隆化后挑选部分进行测序、同源性比较及应用半定量逆转录-聚合酶链反应分析部分差异基因的表达情况, 得到 23 个差异表达的 cDNA 片段, 其中 6 个新差异表达 cDNA 片段被 GenBank 接受。已知基因中的血小板反应蛋白 1 和蛋白酶体亚单位基因表达的改变可能与高胆固醇致动脉粥样硬化作用相关。

[中图分类号] Q78

[文献标识码] A

Differentially Expressed Genes in Vascular Endothelial Cell Induced by Cholesterol

TANG Wei-Qing, WANG Shu¹, YANG Xiang-Dong², CHEN Bao-Sheng³, and LI Ling-Song

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Peking University Health Science Center, Beijing 100083; 1. Beijing Hospital and Beijing Institute of Geriatrics, Beijing 100730; 2. Institute of Cardiovascular Disease, Nanhua University, Hengyang 421001; 3. Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, China)

[KEY WORDS] Suppression Subtractive Hybridization; Polymerase Chain Reaction; Cholesterol; Thrombospondin 1; Proteasome Subunit; Endothelial Cell, Human Umbilical Vein; Gene Expression

[ABSTRACT] **Aim** To investigate cholesterol induced atherogenesis molecular mechanism, clone and analyse the differentially expressed genes in vascular endothelial cell induced by cholesterol. **Methods** Suppression subtractive hybridization (SSH) method is used to isolate the differentially expressed cDNA in human umbilical vein endothelial cell induced by cholesterol.

After sequencing and homology analysis, ten differentially expressed cDNA fragments are selected and analysed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Twenty-three differentially expressed cDNA fragments have been isolated. Seventeen of them are known genes, the other six are unknown genes. The known genes include thrombospondin 1, proteasome subunit (type and so on). The ten elective cDNA fragments (including four known genes and six unknown genes) that are identified by RT-PCR have the same expressed tendency as SSH discovery. Six differentially expressed unknown cDNA fragments have been accepted by GenBank as novel expressed sequence tags (EST). **Conclusion** The high level expression of thrombospondin 1 and the low level expression of proteasome subunit (type) in endothelial cell induced by cholesterol may be related to cholesterol induced atherogenesis.

After sequencing and homology analysis, ten differentially expressed cDNA fragments are selected and analysed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Twenty-three differentially expressed cDNA fragments have been isolated. Seventeen of them are known genes, the other six are unknown genes. The known genes include thrombospondin 1, proteasome subunit (type and so on). The ten elective cDNA fragments (including four known genes and six unknown genes) that are identified by RT-PCR have the same expressed tendency as SSH discovery. Six differentially expressed unknown cDNA fragments have been accepted by GenBank as novel expressed sequence tags (EST). **Conclusion** The high level expression of thrombospondin 1 and the low level expression of proteasome subunit (type) in endothelial cell induced by cholesterol may be related to cholesterol induced atherogenesis.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是发病广泛、危害严重的血管疾病, 始于内皮细胞的损伤、脂质沉积和平滑肌细胞增殖。低密度脂蛋白胆固醇升高被公认为是 As 的重要危险因素, 其诱导内皮细胞产生的差异表达基因文献 [1] 已经报道。流行病学调查和体内实验证明, 不论是人类自然发生的, 还是实验动物用高饱和脂肪和高胆固醇膳食诱导产生的动脉粥样硬化, 动脉壁细胞内和细胞之间都有胆固醇

及其酯的大量沉积^[2]。但胆固醇对内皮细胞生理功能的影响尚不明确。本实验利用抑制消减杂交 (suppression subtractive hybridization, SSH), 克隆胆固醇诱导人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, hUVEC) 产生的差异表达基因, 并进行功能分析, 以利于进一步探讨高胆固醇致动脉粥样硬化的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

⑦型胶原酶、M199 培养基、Trizol Reagent 和胎牛血清为 Gibco BRL 产品; mRNA 分离试剂盒为 Promega 产品; PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒和

[收稿日期] 2002-08-12 [修回日期] 2003-01-08

[基金项目] 国家重点项目研究发展规划 (G2000057007) 资助

[作者介绍] 唐蔚青, 女, 1969 年出生, 湖南省永州市人, 在职硕士研究生, 助理研究员, 主要从事血脂与动脉粥样硬化关系的分子生物学研究, 联系电话: 010-65130302, E-mail: tangweiqing@btmail.net.cn。王抒, 女, 1961 年出生, 北京市人, 研究员, 硕士研究生导师, 从事血脂与动脉粥样硬化关系的研究。杨向东, 男, 1970 年出生, 湖南省衡阳市人, 博士, 硕士研究生导师, 从事动脉粥样硬化病理生理的研究。

AdvanTAge PCR 克隆试剂盒为 Clontech 产品;胆固醇及其它试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 细胞培养与处理

采用 0.1% Ⅲ型胶原酶消化人脐静脉,收集内皮细胞作原代培养^[3]。M199 培养基中含 20% 胎牛血清、2 mmol/L 谷氨酰胺和 1 mmol/L 丙酮酸钠,在 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养。将胆固醇溶于乙醇溶液,待第 2 代细胞长至亚汇合状态时加入胆固醇溶液,终浓度为胆固醇 50 mg/L、乙醇 0.25%,对照组乙醇终浓度为 0.25%,处理 48 h。

1.3 总 RNA 提取和 mRNA 分离

用 Trizol Reagent 提取细胞总 RNA,甲醛变性凝胶电泳检测 RNA 的完整性;吸光度(absorbent values, A) A₂₆₀/A₂₈₀ 测定值在 1.8~2.0 之间;用 mRNA 分离试剂盒分离 mRNA。

1.4 抑制消减杂交

按 PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒说明操作,顺向 SSH 组以胆固醇刺激组 cDNA 为检测子,以对照组 cDNA 为驱赶子;反向 SSH 组以对照组 cDNA 为检测子,以胆固醇刺激组 cDNA 为驱赶子。

1.5 基因克隆、纯化和测序

应用 AdvanTAge PCR 克隆试剂盒,将顺向和反向 SSH 产物分别连接到 PT-Adv 载体后,转化 TOP10F/E. coli 感受态细胞,利用 α 互补,通过蓝白斑筛选有插入片段的克隆,提取质粒 DNA,经 EcoRI 酶切后琼脂糖电泳鉴定。将有插入片段的重组质粒 DNA 扩增和纯化,于 ABI 377 DNA 自动测序仪上测序,测序引物为 M13R。应用 Advanced BLAST 2.0 软件将测得序列与 GenBank 中收录的序列进行同源性比较。

1.6 半定量逆转录—聚合酶链反应分析差异基因的表达情况

应用 Oligo 6 软件,根据差异表达的未知基因和部分与内皮细胞损伤和凋亡有关的已知基因 cDNA 序列设计特异引物;以胆固醇刺激的内皮细胞和对照组内皮细胞提取的 RNA 逆转录 cDNA 为模板,聚合酶链反应扩增,鉴定基因的差异表达情况,内对照为 β -肌动蛋白(β -actin)。 β -actin 上、下游引物序列分别为:5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'和 5'-CTC-CITAATGTCACGCACGATTTG-3';血小板反应蛋白 1(thrombospondin 1, TSP-1)上、下游引物序列分别为:5'-CGGAAAGAGTTTAAGTGTCTAA-3'和 5'-AG-ATATCTATTCCAATGGG-3';蛋白酶体亚单位 β 型(proteasome subunit β type)上、下游引物序列分别为:5'-GGAACATGCTCCACATTCTGCA-3'和 5'-TTCATG-

GAGACTGTCTTACGG-3';未知基因 F13 上、下游引物序列分别为:5'-CTAATCCTCGGTACACATTAAG-3'和 5'-GTTCTTCGCATGTTAAGGAAAG-3';未知基因 F110104 上、下游引物序列分别为:5'-CGGGC-CITTTGAAATTTG-3'和 5'-AGACAGGGTCATTTCACT-3'。反应程序为:94℃ 5 min 变性;94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环;72℃ 延伸 7 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。

2 结果

2.1 抑制消减杂交结果

经抑制消减杂交分别获得顺向和反向 2 组 SSH cDNA 产物,经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳分析, cDNA 呈涂布状分布于 0.1~2.0 kb 之间,已消减的 cDNA 亮度明显暗于未被消减的 cDNA 亮度(图 1, Figure 1),表明实验组和对照组中相同表达的基因已被消减。

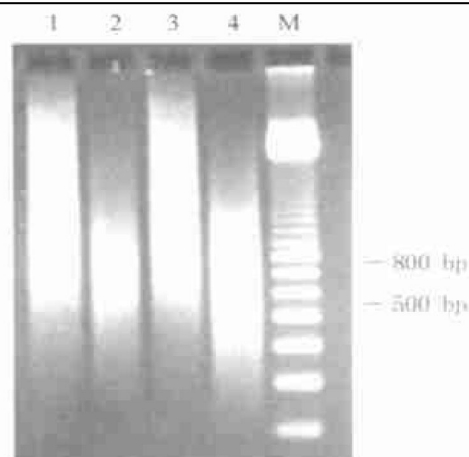


图 1 抑制消减杂交后巢式聚合酶链反应扩增差异表达 cDNA 凝胶电泳图谱

Figure 1. Results of SSH-PCR amplified differentially expressed cDNA from subtraction experiment M: 100 bp DNA marker; 1: reverse subtraction group, unsubtraction sample; 2: reverse subtraction group, subtraction sample; 3: forward subtraction group, unsubtraction sample; 4: forward subtraction group, subtraction sample.

2.2 差异带的克隆和酶切鉴定

从培养板中挑选白色菌落,提取质粒 DNA,经 EcoRI 酶切鉴定,载体大小为 3.9 kb,酶切片段大小在 100~1 000 bp 之间。

2.3 基因片段的测序和同源性分析

测序结果经同源性分析后得到 23 个差异基因片段(表 1, Table 1),其中 17 个差异基因片段与已知基因序列高度同源,另外 6 个为未知新基因的序列,GenBank 接受号为 BI307818、BI307819、BI307820、BI307821、BI307822 和 BI307823。

表 1. 经胆固醇诱导内皮细胞产生的差异 cDNA 片段的表达趋势

Table 1. The expression tendency of the differentially expressed genes in endothelial cell induced by cholesterol

序号	cDNA 片断 长度(bp)	基因名称	表达趋势
F01	189	人核糖体蛋白 S11	上调
F05	455	人核糖体蛋白 S6	上调
F06	366	人血小板反应蛋白-1	上调
F08	489	人内皮生长因子包含的 扣样细胞间基质蛋白	上调
F09	516	人白细胞表面蛋白前体	上调
F11	428	人原肌球蛋白 4	上调
F15	420	人真核细胞转录因子 1	上调
F18	326	人糖原合成酶	上调
F19	240	人血管紧张素原	上调
F110607	476	人弹性蛋白	上调
F102608	502	人丝氨酸蛋白酶抑制物	上调
R02	330	人细胞表面糖蛋白 PIH12 前体	下调
R04	533	人蛋白酶体 β 亚单位	下调
R06	450	人网腔钙结合蛋白	下调
R08	443	人法尼酯二磷酸酯合成酶	下调
R09	345	人克隆 IMAGE 4108909	下调
R11	490	人单倍体 M* 1 线粒体	下调
F102603	362	未知	上调
F110104	441	未知	上调
F10	428	未知	上调
F12	528	未知	上调
F13	267	未知	上调
F14	138	未知	上调

2.4 半定量逆转录—聚合酶链反应结果

经逆转录—聚合酶链反应分析了 6 个未知基因片段和 4 个已知基因片段, 结果发现在上述细胞中均有这些基因的转录表达, 且与 SSH 法显示的差异表达趋势基本一致(图 2 和图 3, Figure 2 and Figure 3)。

3 讨论

抑制消减杂交技术是一种快速、高效的克隆差异表达基因的方法, 它具有特异性高、假阳性低、灵敏度高和操作简便等优点^[4,5]。我们利用此方法获得差异表达基因片段 23 个, 选取了 10 个进行逆转

录—聚合酶链反应分析, 结果均为阳性, 与 SSH 法

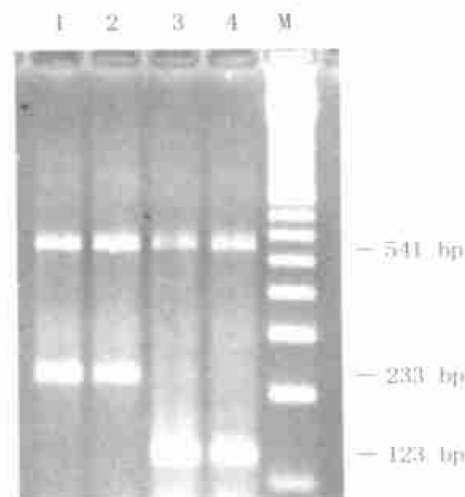


图 2. 逆转录—聚合酶链反应分析未知差异基因 F13 和 F110104 在内皮细胞中的表达

Figure 2. RT-PCR analysis of unknown differentially expressed genes mRNA level in endothelial cell 1 and 3: RT-PCR products of endothelial cell induced by cholesterol; 2 and 4: RT-PCR products of control endothelial cell; M: 100 bp DNA marker. The size of PCR amplification product: β -actin contain 541 bp, F13 contain 123 bp, F110104 contain 233 bp.

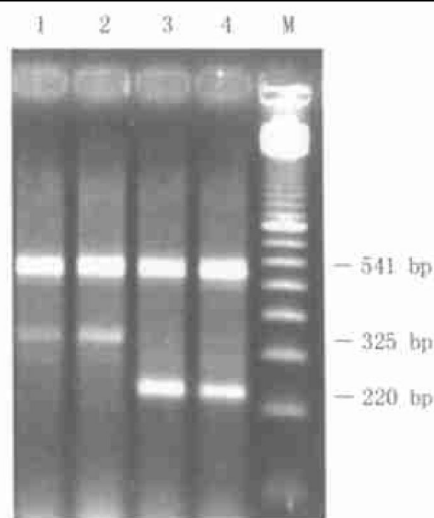


图 3. 逆转录—聚合酶链反应分析已知差异基因血小板反应蛋白 1 和蛋白酶体 β 亚基在内皮细胞中的表达

Figure 3. RT-PCR analysis of known differentially expressed genes mRNA level in endothelial cell 1 and 3: RT-PCR products of endothelial cell induced by cholesterol; 2 and 4: RT-PCR products of control endothelial cell; M: 100 bp DNA marker. The size of PCR amplification product: β -actin contain 541 bp, TSP-1 contain 220 bp, Proteasome contain 325 bp.

显示的差异表达趋势基本一致。

在本实验顺向 SSH 组中有一条 266 bp 的上调基因片断与人的血小板反应蛋白 1(thrombospondin

1, TSP-1)mRNA 有 96% 的同源性。TSP-1 是一种基质蛋白,可由内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞、单核细胞、巨噬细胞、肺细胞和激活的血小板分泌,它有介导细胞间粘附、诱导平滑肌细胞增殖、内皮细胞凋亡及抑制血管形成等作用^[6,7]。不同的 TSP-1 结合区域可与不同的细胞表面受体结合,TSP-1 C-末端钙结合区域的 Arg-Gly-Asp 序列与内皮细胞 $\alpha\beta_3$ 整合素受体结合,影响内皮细胞生理功能^[8]。文献[9,10]报道 TSP-1 可通过内皮细胞表面 CD36 受体,快速、短暂激活 c-Jun N-末端激酶(JNK),抑制裸鼠角膜新血管的生成。它还可与微血管内皮细胞表面的 CD36 受体结合,激活 P38MAP 激酶,最终通过 Caspase-3 样效应诱导内皮细胞凋亡。故 TSP-1 在高胆固醇致动脉粥样硬化的发生和发展过程中可能起一定的作用。

在本实验反向 SSH 组中一条 533 bp 的下调基因片断与人的蛋白酶体 β 亚基(proteasome β subunit)同源。文献[11,12]报道,蛋白酶体是依赖 ATP 的蛋白水解酶复合物,其蛋白水解作用需要泛素参与。泛素-蛋白酶体通路(ubiquitin-proteasome pathway)是生物体内进行蛋白质选择性降解的重要途径之一,它参与细胞内 DNA 修复、细胞周期运转、信号传递、抗原提呈和蛋白质的跨膜定位等生理和生物化学过程。参与调控细胞周期及与肿瘤发生有关的一些短寿蛋白如 P27、P53、细胞周期蛋白 D1、B1 及 P53 诱导的基因产物 Bax、Mdm2 和 P21 等,在细胞内是通过泛素-蛋白酶体通路降解的。因此,酶解系统的缺陷及应用蛋白酶体抑制剂时,细胞内上述蛋白含量增多,可使细胞周期停滞并诱导细胞凋亡。故

蛋白酶体可能也在高胆固醇致动脉粥样硬化过程中起一定的作用。

上述基因及其它已知基因如糖原合成酶基因在高胆固醇致动脉粥样硬化过程中的作用及新基因的全长、结构和功能尚在研究之中。

[参考文献]

- [1] 张文成,陈宝生,吴刚,曾威武,薛红. 低密度脂蛋白调节新基因 cDNA 克隆及结构研究. 中华医学杂志, 2001, **81** (7): 435-436
- [2] 王克勤. 脂蛋白与动脉粥样硬化. 北京: 人民卫生出版社, 1995; 417-419
- [3] 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术. 北京: 人民卫生出版社, 1995; 125-126
- [4] 王涛,陆应麟. 抑制消减杂交技术的原理及应用. 国外医学分子生物学分册, 1998, **20** (6): 271-275
- [5] 杨向东,王抒,唐蔚青,易光辉,何淑雅,唐朝枢,杨永宗. 人单核细胞泡沫化敏感候选基因的筛选. 中国动脉硬化杂志, 2002, **10** (3): 195-198
- [6] Jeffrey JR, Vivian G, Jeffrey LB, Christine G, Vanlila KS, Vicki LR. Thrombospondin 1 is elevated with both intimal hyperplasia and hypercholesterolemia. *J Surgical Res*, 1998, **74** (1): 11-16
- [7] Ferrari do outerior-bernstein MA, Nunes SS, Andrade AC. A recombinant NH (2)-terminal heparin-binding domain of the adhesive glycoprotein, thrombospondin 1, promotes endothelial tube formation and cell survival: a possible role for syndecan-4 proteoglycan. *Matrix Biol*, 2002, **21** (4): 311-324
- [8] Hotchkiss KA, Matthias LJ, Hogg PJ. Exposure of the cryptic Arg-Gly-Asp sequence in thrombospondin 1 by protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta*, 1988, **1388** (2): 478-488
- [9] Jimenez B, Volpert OV, Reiher F, Chang LF, Munoz A, Karin M, et al. c-Jun N-terminal kinase activation is required for the inhibition of neovascularization by thrombospondin 1. *Oncogene*, 2001, **20**: 3 443-448
- [10] Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest*, 2001, **108** (6): 785-791
- [11] Monney L, Otter I, Olivier R, Ozer HL, Haas AL, Omura S, et al. Defects in the ubiquitin pathway induce caspase-independent apoptosis blocked by Bcl-2. *J Biol Chem*, 1998, **273** (11): 6 121-131
- [12] Lopes UG, Erhardt P, Yao R, Cooper GM. P53-dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors. *J Biol Chem*, 1997, **272** (20): 12 893-896

(此文编辑 朱雯霞)

•读者•作者•编者

作者更正

发表于《中国动脉硬化杂志》2002 年第 10 卷第 3 期第 210~ 213 页的文章“神经肽对人血管平滑肌细胞脂质代谢的调制作用”的英文摘要 Result(结果)中原“decreasing by 26. 92%, 24. 64%, 22. 62% and 17. 49% ($P < 0.01$)”有误,应将数据由小到大重新排列,即更正为“decreasing by 17. 49%, 22. 62%, 24. 64% and 26. 92% ($P < 0.01$)”。谨此为因疏忽而造成读者的不便而道歉。