

高血压大鼠重塑血管差异表达基因的克隆及表达

杨向东, 闫宏伟, 郭芳, 徐立朋, 万载阳, 何淑雅, 杨永宗

(南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学; 重塑血管差异表达基因; 抑制消减杂交; 高血压; 胸主动脉; 细胞色素 C; 细胞凋亡

[摘要] 为从基因水平研究高血压病大鼠血管重塑机制, 采用抑制消减杂交法筛选两肾一夹肾血管性高血压大鼠重塑大血管(胸主动脉)差异表达基因。经过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 cDNA 片段, 经 Genbank 等数据库进行同源比较, 获得 10 余个差异表达的表达序列标签; 采用 Western blot 方法对其 2 个已知基因编码蛋白细胞色素 C 和 Bcl-2 的表达进行检测。结果发现细胞色素 C 在高血压大鼠重塑大血管组织中表达增高, 而 Bcl-2 在高血压大鼠重塑大血管组织中表达减少。研究结果提示氧化应激导致细胞凋亡机制尤其是 Bcl-2/细胞色素 C-半胱天冬酶途径在大血管重塑过程中具有重要作用。

[中图分类号] R36

[文献标识码] A

Differentially Displayed Genes Cloned in Remodeling Thoracic Aorta of 2K1C Hypertensive Rats

YANG Xiang-Dong, LU Hong-Wei, GUO Fang, XU Li-Peng, WAN Zai-Yang, HE Shu-Ya, and YANG Yong-Zong

(Institute of Cardiovascular Disease, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Suppression Subtractive Hybridization; Hypertension; Thoracic Aorta; Cytochrome C; Cell Apoptosis; Vascular Remodeling Related Gene; Gene Expression

[ABSTRACT] **Aim** Cloning of genes that differentially expressed in remodeling thoracic aorta of 2K1C hypertensive rats (2-kidney, 1-clip Goldblatt rats), which is important for understanding the molecular basis of hypertensive vascular remodeling.

Methods We used suppression subtractive hybridization (SSH) to isolate differentially expressed EST in remodeling thoracic aorta. This led to identification of more than fifteen differential expressed sequence tags (EST). After further cloned and sequenced and homology searched in Genbank with software Stand BLAST. Some differentially displayed genes coding protein were confirmed by western blot.

Results We have obtained fifteen pieces of differentially displayed EST, such as cytochrome C and Bcl-2. Moreover, the results from Western Blot confirmed that cytochrome C is highly expressed in remodeling thoracic aorta and Bcl-2 lowly expressed in remodeling thoracic aorta.

Conclusion Cytochrome C is released from mitochondria in response to a variety of apoptotic stimuli, such as reactive oxygen radicals, calcium and ceramide. The Bcl-2 family of proteins serves as critical regulators of pathways involved in apoptosis. Bcl-2 protein is anti-apoptotic. Our data indicate that cell apoptotic mechanism may have important role in hypertensive vascular remodeling.

高血压病是危害严重、发病率高的心血管疾病。心脏和血管重构是高血压病的一个重要病理改变, 动脉结构和功能的重构性变化既是高血压病血液动力学紊乱及神经体液变化的后果, 又是高血压病发展恶化及心脑肾等靶器官损害的重要病理基础。对高血压的相关多态性研究发现, 高血压病是一种多基因病, 与高血压相关的基因有: 肾素-血管紧张素系统基因、血管紧张素 E 型(angiotensin E , Ang E)受体基因、胰岛素受体基因和热休克蛋白基因等^[1-3]。对高血压血管重塑的形态学研究较多,

对其分子机制和相关基因的研究尚不明了。本实验采用两肾一夹法复制肾血管性高血压大鼠(2K1C-RHR)模型, 运用抑制消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)克隆肾性高血压大鼠重塑大血管的差异表达基因, 并初步研究其表达。

1 材料和方法

1.1 材料

Trizol 试剂和 EcoR I 均为 Gibco BRL 产品; mRNA 分离试剂盒、cDNA 消减杂交试剂盒和 AdvanTageTM PCR 克隆试剂盒均为 Clontech 产品; 兔来源抗 cytochrome C 和 Bcl-2 多克隆抗体均购自美国 Santa Cruz 公司, 血管紧张素 E 放射免疫试剂盒购自中国北方免疫试剂研究所, 其他试剂均为进口或国产分析纯。

[收稿日期] 2002-07-22 [修回日期] 2003-01-13

[基金项目] 国家基础研究重点规划项目(G2000056905)、湖南省自然科学基金(00JJY2027)和湖南省教育厅课题(02B039)资助

[作者简介] 杨向东, 男, 1970 年出生, 湖南省衡阳市人, 心血管病理生理学博士, 硕士研究生导师, 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, 联系电话: 0734-8281277, E-mail: XDY7@263.net。

1.2 两肾一夹肾血管性高血压大鼠(2K1C-RHR)模型的建立^[4]

实验用 SD(Sprague-Dawley) 大鼠 60 只, 平均体重为 150 ± 7.8 g, 雌雄各半, 购自中国医学科学院实验动物中心。采用银夹法制作 2K1C 高血压大鼠模型。实验大鼠分为模型组和对照组各 30 只。用 3% 戊巴比妥钠注射液腹腔注射麻醉大鼠, 在腹部做切口, 分离左肾周围脂肪组织, 小心游离左肾动静脉, 模型组用内径为 0.2 mm 的银夹套住左肾动脉, 夹紧造成左肾动脉狭窄; 对照组(假手术组)部分分离左肾动静脉, 不用银夹。普通饲料喂养 6 周, 从第 2 周起采用尾部套管法每周测量大鼠血压。经 6 周饲养后, 麻醉大鼠, 用颈动脉插管测血压, 模型组大鼠血压在 145~200 mm Hg 之间, 对照组血压在 80~120 mm Hg 之间, 模型组大鼠血压在 150 mm Hg 以下者为模型不成功(2 只), 将其剔除。

1.3 大鼠胸主动脉总 RNA 的提取、mRNA 分离和合成双链 cDNA

麻醉处死实验组大鼠和对照组大鼠各 20 只, 快速分离胸主动脉, 剥离血管外结缔组织, 放入液氮中保存。总 RNA 的抽提按照 TRIzolTM 试剂说明书进行, 分别提取实验组和对照组胸主动脉总 RNA, 复溶于无 RNase 的水中, 其纯度在 1.6~1.8。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)。

1.4 合成双链 cDNA 和抑制消减杂交差异筛选

正向消减以高血压大鼠血管组织作为检测子, 对照组(假手术组)作为驱赶子; 反向消减以对照组作为检测子, 高血压大鼠血管组织作为驱赶子。操作按 PCR-SelectTM cDNA Subtraction 试剂盒说明书和文献[5]进行。

1.5 聚合酶链反应扩增产物的克隆、纯化和测序

采用 AdvanTageTM 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 Ⅰ酶切后琼脂糖凝胶电泳鉴定, 或以 M13 为引物 PCR 扩增鉴定。提取阳性克隆重组质粒 DNA, 用 ABI 377 DNA 自动测序仪测序。测得的序列通过 BLAST 软件与 GenBank 中收录序列进行同源比较。

1.6 Western 印迹检测细胞色素 C 和 Bcl-2 的表达

取大鼠胸腹主动脉, 剥离血管外结缔组织, 将血管剪碎, 加入 1 mL RIPA 裂解液(Tris HCL 50 mmol/L, pH 7.5; NaCl 150 mmol/L; NP-40 1%; 脱氧胆酸

钠 0.5%; SDS 0.1%; EDTA 1 mmol/L; PMSF 1 mmol/L; Leupeptin 2 mg/L), 冰浴条件下进行组织匀浆; 4℃ 10 000 g 离心 10 min, 弃除沉淀, 用 BCA 法进行蛋白定量, 取 20 μg 蛋白加入上样缓冲液, 煮沸 3 min 后进行 SDS-PAGE 电泳, 转 PVDF 膜, 分别与一抗(兔来源抗细胞色素 C 和 Bcl-2 多克隆抗体 1:200 稀释)和二抗(HRP 标记的羊抗鼠 IgG 按照 1:1000 稀释)室温孵育 2 h 和 1 h, 利用化学发光法进行显色反应, 同一实验重复 3 次。

1.7 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 10.0 进行处理, 统计学采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 两肾一夹肾血管性高血压大鼠(2K1C-RHR)模型的建立

实验组和对照组(假手术组)大鼠普通饲料饲养 6 周, 用颈动脉插管测血压, 实验组大鼠血压为 158.19 ± 6.74 mm Hg, 对照组血压为 103.68 ± 10.89 mm Hg, 达到高血压大鼠模型建立标准。实验组大鼠左肾均有不同程度的萎缩, 右肾均代偿性肥大, 而对照组大鼠左右肾无明显差异。放射免疫法测定血浆血管紧张素Ⅱ水平, 实验组大鼠血浆血管紧张素Ⅱ浓度为 85.6 ± 10.9 ng/L, 对照组大鼠血浆血管紧张素Ⅱ浓度为 48.5 ± 8.3 ng/L, 两组间差异有显著性($P < 0.05$)。

2.2 两肾一夹肾血管性高血压大鼠(2K1C-RHR)重塑血管的检测

对大血管(胸主动脉)和小血管(肠系膜动脉 3 级分支)进行 HE 染色、胶原纤维和弹力纤维染色。HE 染色后形态学观察, 与对照组比较实验组大鼠胸主动脉内径增大不明显, 主要表现为中层厚度增大, 胶原纤维和弹力纤维含量显著增加, 细胞层数略微增加; 实验组大鼠肠系膜动脉 3 级分支内径缩小, 中层厚度增大, 细胞层数明显增加, 胶原纤维及弹力纤维含量略微增加, 与对照组比较差异有显著性($P < 0.05$)。以上实验结果说明, 两肾一夹肾血管性高血压大鼠(2K1C-RHR)模型已经成功复制, 高血压大鼠各级血管都有重塑现象出现, 大血管(胸主动脉)以中层胶原纤维和弹力纤维含量显著增加为主, 内径改变不明显(图 1, Figure 1); 小血管(肠系膜动脉 3 级分支)以内径明显缩小, 中膜平滑肌细胞增殖为显著特征(图 2, Figure 2)。

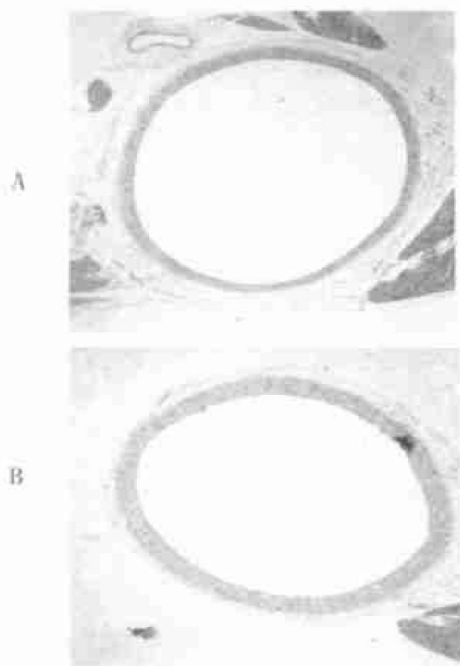


图 1. 两肾一夹肾血管性高血压大鼠(2K1C-RHR)大血管(胸主动脉)的重塑(HE 染色 $\times 40$) A: 对照组; B: 2K1C 高血压大鼠组。

Figure 1. Remodeling thoracic aorta of 2K1C hypertensive rats (2-kidney, 1-clip Goldblatt rats) (HE $\times 40$) A: control group; B: 2K1C-RHR group.

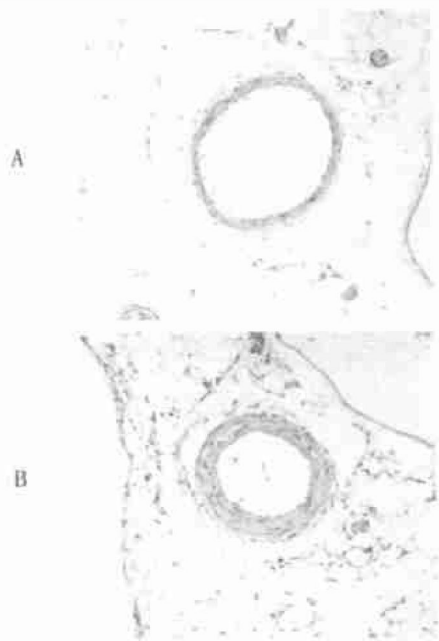


图 2. 两肾一夹肾血管性高血压大鼠(2K1C-RHR)小血管(肠系膜小动脉)的重塑(HE 染色 $\times 200$) A: 对照组; B: 2K1C 高血压大鼠组。

Figure 2. Remodeling arteriole of 2K1C hypertensive rats (2-kidney, 1-clip Goldblatt rats) (HE $\times 200$) A: control group; B: 2K1C-RHR group.

2.3 抑制消减杂交结果

挑选阳性克隆酶切鉴定后提取质粒 DNA, 纯化后测序, 使用 BLAST 软件与 GenBank 中收录序列进行同源性比较, 获得 10 余个差异表达的序列标签。其中细胞色素 C 氧化酶亚型 iv (Co iv)、细胞色素 C 氧化酶亚型 iv (Co iv) 基因、Bcl-2 基因和 MDM2 基因主要与细胞凋亡相关, 其它有: 人磷酸化酶 2A b56- α (PP2A) 基因、etoposide-induced mRNA、gal-lus paraxis mRNA、homo sapiens mRNA for KIAA0469 protein 和 homo sapiens CGI-101 protein mRNA 等。

2.4 细胞色素 C 和 Bcl-2 的表达

对获得的差异表达基因, 选择功能明确、与细胞凋亡途径相关的细胞色素 C 和 Bcl-2, 采用 Western Blot 方法对其编码蛋白表达进行初步研究, 同时也是对抑制消减结果的一个验证(图 3, Figure 3)。

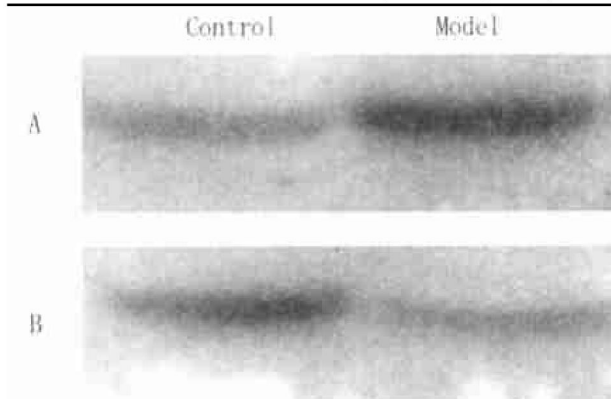


图 3. Western 免疫印迹方法检测结果 模型组细胞色素 C 的表达较对照组增高(A), 而细胞凋亡调节蛋白 bcl-2 的表达较对照组减少(B)。

Figure 3. Expression Cytochrome C and Bcl-2 in control group and 2K1C-RHR group by Western Blot

3 讨论

细胞凋亡现象具有重要的病理与生理意义, 在高血压大鼠的心脏、脑、肾脏和动脉血管中广泛存在, 目前对细胞凋亡在高血压血管重塑中的机制和作用还不清楚^[6,7]。高血压时常见调节细胞凋亡的因素有活性氧、一氧化氮、血管紧张素 I 受体和血管紧张素 II 受体和血管紧张素 II 受体等, 还有一些凋亡相关基因如 Bcl-2、bax 和 caspase 等参与。Bcl-2 家族成员在细胞凋亡过程中起着至关重要的作用^[8-11], Bcl-2 家族可以分为 2 大类, 一类是抗凋亡的, 主要有 Bcl-2、Bcl-XL、Bcl-W、Mcl-1 和 CED9 等; 另一类是促细胞凋亡的, 主要包括 Bax、Bak、Bcl-XS、Bad、Bik 和 Bid 等, 它们主要定位在核膜的胞质面、内质网及线粒体外膜

上,与膜的结合对于其功能的发挥是极其重要的。线粒体膜上的 Bcl-2 至少在 3 个水平上发挥功能来抑制凋亡: Bcl-2 可能是通过抑制谷胱甘肽的外泄,降低胞内的氧化还原电位,改变线粒体巯基的氧化还原状态来控制其膜电位从而调控细胞凋亡;④ Bax 能在较为广泛的 pH 范围内由胞液转移至线粒体膜上,在此构建膜孔(mitochondria permeability transition pore, PT),能允许一些离子和小分子如细胞色素 C 等穿过线粒体膜,进入细胞质,从而引起细胞凋亡,而 Bcl-2 的作用正好相反,它能封闭 Bax 形成孔道的活性,使一些小分子不能自由通透,从而保护细胞凋亡;⑤Bcl-2 能将凋亡相关因子(apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1)等定位至线粒体膜上,使其不能发挥凋亡作用。线粒体是细胞生命活动控制中心,它不仅是细胞呼吸链和氧化磷酸化的中心,而且是细胞凋亡调控中心^[12]。细胞色素 C 作为一种信号物质,在细胞凋亡中发挥着重要的作用,正常情况下,它存在于线粒体内膜和外膜之间的腔中,活性氧等凋亡信号刺激能使细胞色素 C 从线粒体释放至细胞液是细胞凋亡的关键步骤。释放到细胞质的细胞色素 C 在 dATP 存在的条件下能与 Apaf-1 的 C-端 WD 重复区结合,使其形成 C/Apaf-1 复合物,启动半胱天冬酶级联反应,促使前半胱天冬酶 9 转变为半胱天冬酶 9,被激活的半胱天冬酶 9 能激活其它的半胱天冬酶如半胱天冬酶等,从而诱导细胞凋亡。

本文研究发现,两肾一夹肾血管性高血压大鼠其血浆血管紧张素 Ⅱ的浓度显著增高,大小动脉血管都有重塑现象出现,大动脉的重塑以中层厚度增大、平滑肌细胞肥大、胶原纤维和弹力纤维含量显著增加以及血管顺应性下降为特征。运用抑制消减杂交方法从重塑大血管筛选出多个与细胞凋亡相关的基因,如: Bcl-2、细胞色素 C 氧化酶基因和 MDM2 基因等,通过 Western Blot 检测到 Bcl-2 和 细胞色素 C 蛋白的表达与抑制消减杂交结果一致。文献[13-16]报道,血管紧张素 Ⅱ通过激活磷脂酶 D 和磷脂酶 C,通过活化 NAD(P)H 氧化酶,通过切应力诱导血管细胞产生的活性氧增加。活性氧既可以通过多条信号途径引起血管壁细胞增殖,活性氧也可以

通过增加细胞内的钙离子,破坏细胞膜系统的不饱和脂肪酸,产生不饱和醛等细胞毒性和致突变物质,造成膜结构和功能的改变,还可以造成细胞骨架的损坏和细胞外胶原的降解,最终导致细胞凋亡。本文研究结果提示肾性高血压大鼠血液中血管紧张素 Ⅱ增高,促进活性氧产生,活性氧通过 Bcl-2/细胞色素 C-半胱天冬酶途径激活引起的血管细胞凋亡可能高血压大鼠大血管重塑过程中具有重要作用。

[参考文献]

- [1] Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev*, 2000, **52**: 11-34
- [2] Wamholtz A, Nickenig G, Schulz E, Macharzina R, Brasen JH, Skatchkov M, et al. Increased NADH oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation*, 1999, **99**: 2 027-033
- [3] 王兆禹, 陈明, 丁云川, 丁立群. 高血压病患者体循环动脉重构性变化. *高血压杂志*, 2002, **10** (1): 37-41
- [4] Li JS, Knafo L, Turgeon A, Garcia R, Schiffrin EL. Effect of endothelin antagonism on blood pressure and vascular structure in renovascular hypertensive rats. *Am J Physiol*, 1996, **40**: H88-H93
- [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] Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension. Roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension*, 2001, **38** (part 2): 581-587
- [7] Hamet P, de Blois D, Dam TV, Richard L, Teiger E, Tea BS, et al. Apoptosis and vascular wall remodeling in hypertension. *Can J Physiol Pharmacol*, 1996, **74**: 850-861
- [8] Reed JC, Green DR. Remodeling for demolition, changes in mitochondrial ultrastructure during apoptosis. *Mol Cell*, 2002, **9** (1): 1-3
- [9] Williams GT. Programmed cell death, apoptosis and oncogenesis. *Cell*, 1995, **65**: 1 097-098
- [10] Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nature Medicine*, 1997, **3**: 614-620
- [11] Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family, arbiters of cell survival. *Science*, 1998, **281** (5381): 1 322-326
- [12] Zamzami N, Hirsch T, Dallaporta B, Petit PX, Kroemer G. Mitochondrial implication in accidental and programmed cell death: apoptosis and necrosis. *J Bioenergetics Biomembranes*, 1997, **29**: 185-193
- [13] Touyz RM, Schiffrin EL. AngII-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 1999, **34** (part2): 976-982
- [14] Fukui T, Siegfried MR, Ushio FM, Griendling KK, Harrison DG. Modulation of extracellular superoxide dismutase expression by angiotensin Ⅱ and hypertension. *Circ Res*, 1999, **85**: 23-28
- [15] Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J*, 1997, **324**: 1-18
- [16] Wang HD, Xu S, Johns DG, Du Y, Quinn MT, Cayatte AJ, et al. Role of NADPH oxidase in the vascular hypertrophic and oxidative stress response to angiotensin II in mice. *Circ Res*, 2001, **88**: 947-953

(此文编辑 朱雯霞)