

[文章编号] 1007-3949(2003)11-05-0397-04

•实验研究•

外源性 Rb 基因对 U937 细胞泡沫化过程中 CD36 表达的影响

何淑雅², 闫宏伟², 杨向东¹, 陈淑华³, 杨永宗¹, 李红霞⁴, 满永⁴, 黎健⁴

(南华大学 1. 心血管病研究所; 2. 生物化学教研室, 湖南省衡阳市 421001; 3. 中南大学湘雅医学院生物化学教研室, 湖南省长沙市 410078; 4. 卫生部北京医院老年医学研究所生物化学室, 北京市 100730)

[关键词] 病理生理学; Rb 基因导入对 CD36 表达的影响; 转染; 氧化型低密度脂蛋白; 流式细胞术; 清道夫受体; U937 细胞

[摘要] 为研究抑癌基因 Rb 基因在 U937 细胞泡沫化过程中的表达, 应用重组腺病毒载体导入外源性 Rb 基因, 采用逆转录聚合酶链反应和流式细胞术检测氧化型低密度脂蛋白致 U937 细胞泡沫化过程中清道夫受体 CD36 和 Rb 基因的表达和外源性 Rb 基因导入 U937 细胞后 CD36 和 Rb 基因的表达。结果发现, 氧化型低密度脂蛋白致 U937 细胞泡沫化过程中, Rb mRNA 和蛋白的表达随作用时间延长呈下调趋势, CD36 mRNA 和蛋白的表达则呈上调趋势; 随着外源性 Rb 导入 U937 细胞并表达, CD36 表达呈下调趋势。结果提示, 外源性 Rb 基因的导入可以下调清道夫受体 CD36 的表达。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Exogenous Rb Gene on Expression of CD36 Gene in U937 Cells Treated with Oxidized Low Density Lipoprotein

HE Shu-Ya², LU Hong-Wei², YANG Xiang-Dong¹, CHEN Shu-Hua³, YANG Yong-Zong¹, LI Hong-Xia⁴, MAN Yong⁴, and LI Jian⁴

(1. Institute of Cardiovascular Disease; 2. Institute of Biochemistry, Nanhua University, Hengyang 421001; 3. Department of Biochemistry, Xiangya Medical College, Central South University, Changsha 410078; 4. Department of Biochemistry, Beijing Institute of Geriatrics, Beijing 100730, China)

[KEY WORDS] Retinoblastoma; Scavenger Receptor; CD36; Transfection; Oxidized Low Density Lipoprotein; U937 Cells

[ABSTRACT] **Aim** To study the expression level of retinoblastoma (Rb) and CD36 in U937 cells treated with oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) or pretreated with exogenous Rb gene. **Methods** Human myeloid leukemia U937 cells were incubated with ox-LDL (80 mg/L) at 0 h, 12 h, 24 h and 48 h after ox-LDL loaded respectively. CD36 and Rb gene expression were detected by RT-PCR and flow cytometric analysis (FCA). **Results** RT-PCR and FCA results showed that the expression level of Rb was downregulated and the expression level of CD36 upregulated from 0h to 48h induced by ox-LDL. While after being transfected by exogenous Rb gene via a recombinant adenovirus vector, the expression level of Rb was upregulated and the expression level of CD36 downregulated with a time-dependent manner. **Conclusions** Ox-LDL could downregulate the expression level of Rb mRNA and protein, and upregulate that of CD36. Introduction of exogenous Rb gene could downregulate expression of CD36 of U937 cells.

视网膜母细胞瘤基因 (retinoblastoma, Rb) 是一重要的抑癌基因, 在细胞生长过程中发挥重要的调节作用, Rb 蛋白还参与转录因子活化和细胞周期调控等。我们在以前的研究中发现氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 孵育 U937 细胞可以使其泡沫化, B 族清道夫受体 CD36 主要参

与了 U937 细胞对脂蛋白的吞噬, 采用抑制消减杂交法筛选了 U937 细胞经 ox-LDL 孵育形成泡沫细胞后差异表达的基因, 发现 Rb 基因在泡沫细胞中表达下调^[1-6]。Rb 基因与单核细胞泡沫化过程中 CD36 表达的关系目前尚无文献报道, 本实验旨在研究外源性 Rb 基因导入对 U937 细胞泡沫化过程中 CD36 表达的影响, 初步探讨 Rb 基因在单核细胞泡沫化形成过程中的作用。

[收稿日期] 2003-04-07 [修回日期] 2003-09-06

[基金项目] 国家自然科学基金 (30200103)、湖南省自然科学基金 (02JJY4011) 和湖南省教育厅课题 (02B039) 资助

[作者简介] 何淑雅, 女, 1957 年出生, 湖南省茶陵县人, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事疾病基因表达调控研究。闫宏伟, 男, 1972 年出生, 湖南省岳阳市人, 硕士研究生, 现在中南大学附属第三医院工作。杨向东, 男, 1970 年出生, 湖南省衡阳市人, 副教授, 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, E-mail: XDY7@263.net。

1 材料与方法

1.1 细胞与主要试剂

人髓系白血病细胞 U937 购自中科院生物化学

与细胞生物所, TRIzolTM 试剂、胎牛血清和 RPMI1640 培养基为 Gibco BRL 产品, 逆转录试剂盒、PCR 试剂购自 Promega 公司, PCR 引物中 Rb 上游引物序列为 5'-CAGACTGATTCTATAGACAG-3', 下游为 5'-GTTTGTATCGCTGTGATCC-3', PCR 产物为 327 bp; β -actin 上游引物序列为 5'-GTGGGGCGCC-CCAGGCACCA-3', 下游为 5'-CTCCTTAATGT-CACGCACGATTTC-3', PCR 产物为 540 bp; CD36 上游引物序列为 5'-GAGAACTGTTATGGGGCTAT-3', 下游为 5'-TTCAACTGGAGAGGCAAAGG-3', PCR 产物为 389 bp。Rb 基因重组腺病毒载体和 LDL 均由卫生部北京医院老年医学研究所生物化学室黎健教授惠赠。

1.2 U937 细胞培养及分组

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℃ 5% CO₂ 培养。处理组用 ox-LDL (终浓度 80 mg/L) 孵育 U937 细胞, 分别于 0、12、24 和 48 h 收集细胞, 对照组未加 ox-LDL 处理。用 TRIzolTM 提取每组细胞总 RNA, 逆转录成 cDNA, 以 β -actin 作为内对照, 采用 RT-PCR 半定量检测 U937 细胞的 Rb 及 CD36 mRNA 的表达。

1.3 Rb 基因导入 U937 细胞的检测

U937 细胞培养同前。含有编码全长 Rb 蛋白的人 Rb cDNA 重组腺病毒载体 AdCMV-Rb 加入细胞培养基, 病毒滴度为 10^{13} cfu/L, 24 h 转染效率达 100%^[7]。用 AdCMV-Rb 作用 U937 细胞后 (AdCMV-Rb 终浓度为 10 mL/L), 分别于 0、12、24 和 48 h 收集细胞, 未加 AdCMV-Rb 处理的 U937 细胞作对照组。提取每组细胞基因组 DNA, PCR 扩增外源性导入的 Rb 基因 (Rb 基因引物设计为跨外显子)。

1.4 Rb 基因与 CD36 基因的表达

U937 细胞培养和 AdCMV-Rb 转染 U937 细胞同上。提取每组细胞总 RNA, 逆转录成 cDNA, 以 β -actin 作为内对照, 采用 RT-PCR 半定量检测 U937 细胞的 Rb 及 CD36 mRNA 的表达。PCR 如下: 样品 94℃ 预变性 2 min $\rightarrow$ 94℃ 变性 20 s $\rightarrow$ 60℃ 复性 20 s $\rightarrow$ 72℃ 延伸 45 s, 30 个循环后 72℃ 延伸 5 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶 (含溴乙啶 0.5 mg/L) 电泳检测。

1.5 流式细胞术检测 CD36 和 Rb 蛋白的表达

细胞培养和处理同上。依次于 0、12、24 和 48 h 各收集细胞 1×10^6 个, 800 r/min $\times$ 5 min 离心, 4℃, PBS 洗一次。用 4% 多聚甲醛 1 mL 室温固定 40 min。用含 5% 人血清 PBS 1 mL 重悬, 冰上孵育 10 min, 800 r/min $\times$ 5 min 离心去上清。CD36 检测采用直标法: 加入 200 μ L 含 0.5% BSA 和饱和剂量 FITC-anti-CD36 ($5 \times 10^5/20 \mu$ L) 的 PBS; Rb 的检测采用间标法: 一抗为羊抗人 Rb 单抗 (1:100 稀释), 冰浴 40 min, 1 000 r/min 离心 8 min, 1 mL PBS 洗涤 2 次, 二抗为 FITC 标记的兔抗羊 IgG (1:100 稀释)。避光冰上放置 45 min, 1 mL PBS 离心洗涤 2 次, 加入 200 μ L 1% 多聚甲醛。用流式细胞仪检测荧光值, 每管计数 10 000 个细胞。

2 结果

2.1 氧化型低密度脂蛋白处理 U937 细胞后不同时间点 Rb 与 CD36 mRNA 的差异表达

结果显示 U937 细胞 Rb mRNA 的表达随 ox-LDL 处理时间延长呈下调趋势, CD36 mRNA 的表达随 ox-LDL 处理时间延长呈上调趋势, 其对应的光密度比值 (运用 SigmaScan 软件) 见图 1 (Figure 1)。

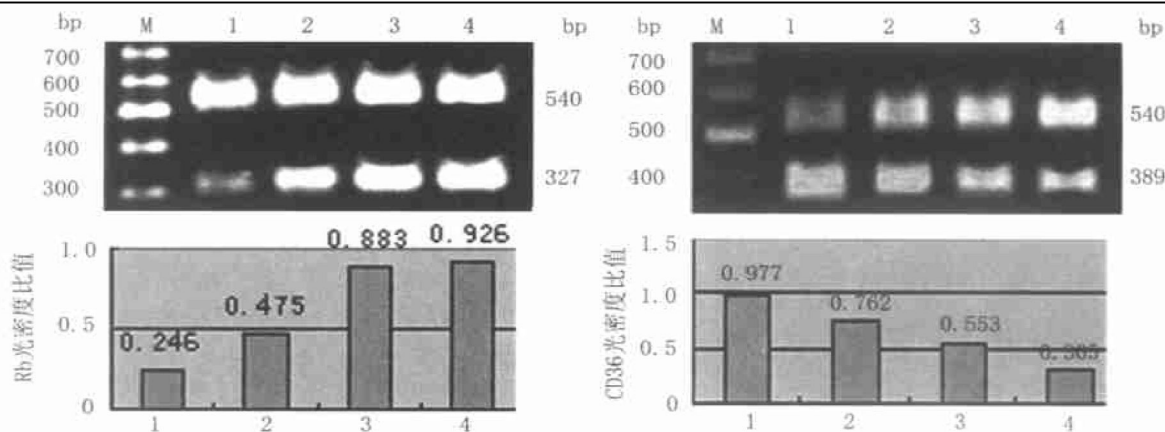


图 1. 氧化型低密度脂蛋白处理 U937 细胞后不同时间点 Rb 和 CD36 mRNA 的差异表达

M: 100 bp 标记物, 1: 孵育 48 h, 2: 孵育 24 h, 3: 孵育 12 h, 4: 对照组。

Figure 1. Differentia expression of Rb and CD36 mRNA on U937 cells treated by ox-LDL in time order

2.2 腺病毒载体介导的 Rb 基因导入 U937 细胞后的检测结果

对照组 PCR 扩增结果为阴性, AdCMV-Rb 导入 U937 细胞后 12、24 和 48 h 的每组 PCR 扩增结果均为阳性(图 2, Figure 2)。

2.3 Rb 基因导入 U937 细胞后不同时间点 Rb 与 CD36 mRNA 的差异表达

结果显示, U937 细胞 Rb mRNA 的表达随 Rb 基因导入时间延长呈上调趋势, CD36 mRNA 的表达随 Rb 基因导入时间延长呈下调趋势, 其对应的光密度比值见图 3(Figure 3)。

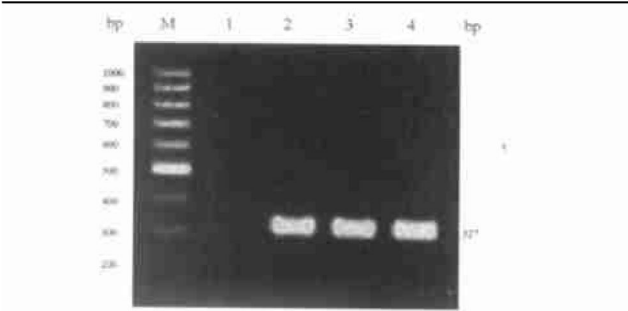


图 2. 腺病毒载体介导的 Rb 基因导入 U937 细胞后的检测
M: 100 bp 标记物, 1: 对照组, 2: 转染 12 h, 3: 转染 24 h, 4: 转染 48 h。

Figure 2. Detection of Rb gene in U937 cells transfected with foreign Rb gene mediated by recombinant adenovirus vector

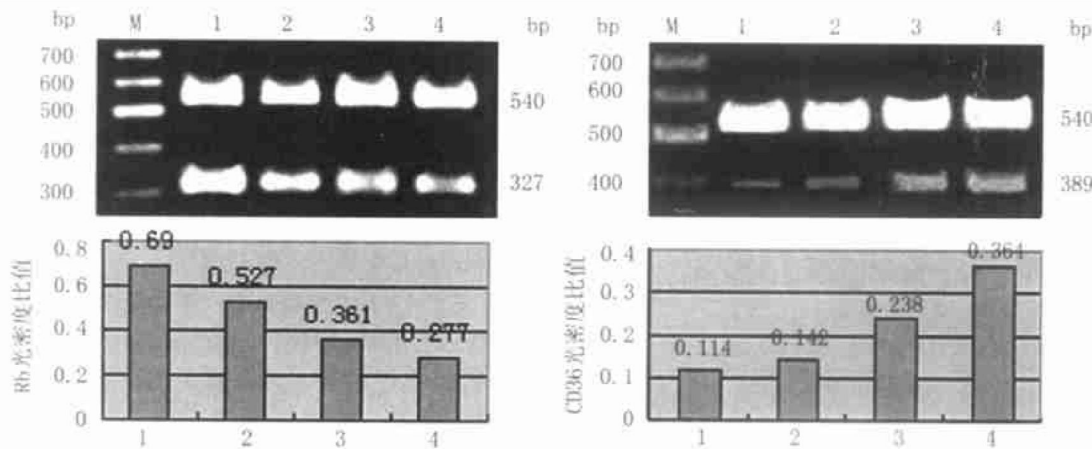


图 3. 腺病毒载体介导的 Rb 基因导入 U937 细胞后不同时间点 Rb 基因和 CD36 的差异表达 M: 100 bp 标记物, 1: 转染 48 h, 2: 转染 24 h, 3: 转染 12 h, 4: 对照组。

Figure 3. Differential expression of Rb mRNA and CD36 on U937 cells transfected by foreign retinoblastoma gene via a recombinant adenovirus vector in time course

2.4 氧化型低密度脂蛋白处理 U937 细胞后不同时间点 Rb 与 CD36 蛋白的差异表达

流式细胞术检测结果显示 U937 细胞 Rb 蛋白

的表达随 ox-LDL 处理时间延长呈下调趋势。CD36 蛋白的表达随 ox-LDL 处理时间延长呈上调趋势(图 4, Figure 4)。

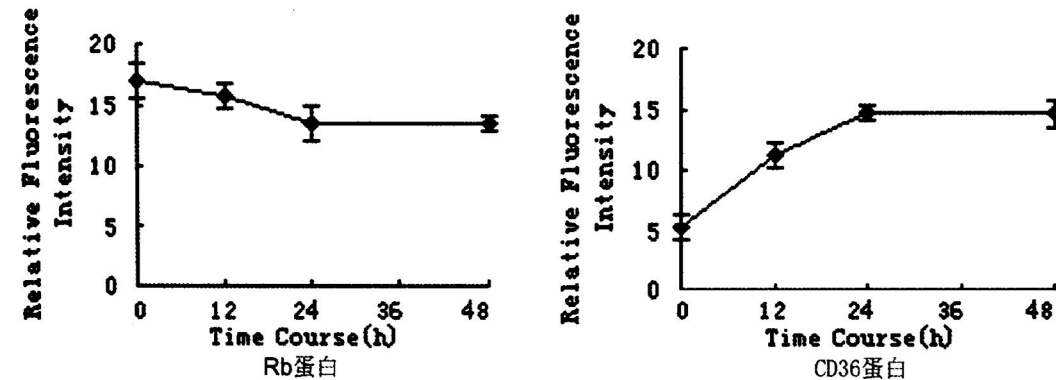


图 4. 流式细胞术检测 80 mg/L 氧化型低密度脂蛋白处理 U937 细胞不同时间后 Rb 和 CD36 蛋白的表达
Figure 4. Expression of Rb and CD36 protein on U937 cells incubated with 80 mg/L ox-LDL for 0 h (control), 12 h, 24 h, 48 h

2.5 Rb 基因导入 U937 细胞后不同时间点 Rb 与 CD36 蛋白的表达

流式细胞术检测结果显示: U937 细胞 Rb 蛋白的表达随 Rb 基因导入时间延长呈上调趋势, CD36

蛋白的表达随 Rb 基因导入时间延长呈下调趋势 (图 5, Figure 5)。

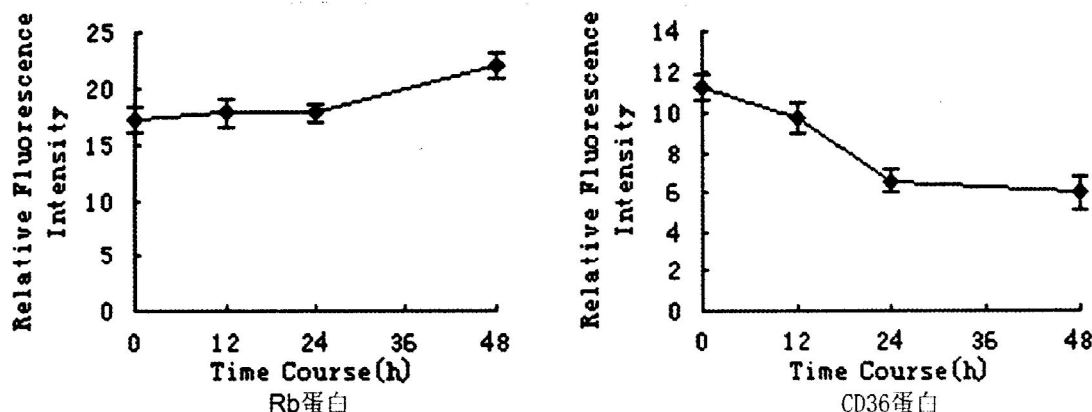


图 5. 流式细胞术检测腺病毒载体介导的 Rb 基因导入 U937 细胞不同时间后 Rb 和 CD36 蛋白的表达

Figure 5. Expression of Rb and CD36 protein on U937 cells transfected by foreign retinoblastoma gene via a recombinant adenovirus vector for 0 h (control), 12 h, 24 h, 48 h

3 讨论

在以前的实验中, 我们用抑制消减杂交法筛选氧化型低密度脂蛋白致单核细胞 U937 细胞泡沫化过程中差异表达的基因, 发现视网膜母细胞瘤基因 Rb 在泡沫化细胞中低表达。文献[8]报道, 在实验性动脉粥样硬化动脉中, *v-sis*、*c-fos*、*c-myc*、*c-jun* 和 *H-ras* 等五种癌基因表达均有不同程度的增加, 同时, Rb 抑癌基因的表达则明显减少, 提示动脉粥样硬化斑块的形成不仅与癌基因的表达增强有关, 而且与 Rb 抑癌基因表达减少有关。

清道夫受体包括 A 类 (SR-A^{iv} 和 SR-A[Ⓢ]) 和 B 类 (SR-BI、CD36、LIMP2 和 CLA-1), CD36 氨基酸序列与清道夫受体 B (SRBI) 有 30% 的同源性。CD36 是细胞表面糖蛋白, 广泛存在于单核/巨噬细胞、内皮细胞、血小板、脂肪细胞、红细胞前体和某些肿瘤细胞系等多种细胞, 是一种多功能的清道夫受体, 可介导细胞粘附、细胞分化和细胞信号传递, 并参与长链脂肪酸的转运^[4,7,9]。我们发现, U937 细胞泡沫化过程中, ox-LDL 的内吞主要由 CD36 介导^[3]。

本实验结果表明, 在 ox-LDL 诱导 U937 细胞泡沫化过程中, CD36 和 Rb 基因的 mRNA 与蛋白表达均呈现时序性改变。ox-LDL 孵育 0、12、24 和 48 h 后, 可检测到 CD36 mRNA 的表达随 ox-LDL 孵育时间的延长呈上调趋势, Rb mRNA 的表达呈下调趋势, 这与文献[1, 3, 4, 9]报道相符。同时, CD36 和 Rb 蛋白表达也与其相应 mRNA 表达趋势一致。

氧化型低密度脂蛋白诱导 U937 细胞 CD36 表达上调, 有利于 U937 细胞对 ox-LDL 的吞噬增加, 加

速 U937 细胞的泡沫化形成。导入 Rb 基因重组腺病毒载体后, U937 细胞 CD36 和 Rb 基因的表达呈现相反的时序性改变, 随着导入时间的延长, Rb 基因的 mRNA 与蛋白表达呈上调趋势, 而 CD36 mRNA 与蛋白表达呈下调趋势, CD36 表达降低使得 U937 细胞对 ox-LDL 的吞噬减少。我们的研究结果提示, 外源性 Rb 基因的导入可以下调清道夫受体 CD36 的表达, 延缓泡沫细胞的形成, 这为动脉粥样硬化的基因治疗提供了新的研究思路 and 手段。

[参考文献]

- [1] 杨向东, 王抒, 唐蔚青, 易光辉, 何淑雅, 唐朝枢, 等. 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
- [2] 李全忠, 杨永宗, 易光辉, 王佐, 杨向东. 泡沫细胞模型的建立. 中国动脉硬化杂志, 1999, 7 (2): 152-154
- [3] 杨向东, 李红霞, 王抒, 黎健, 李全忠, 杨和平, 等. CD36 介导氧化型低密度脂蛋白诱导 U937 细胞泡沫化和凋亡. 中国动脉硬化杂志, 2000, 8 (4): 315-318
- [4] Nicholson AC, Han J, Febbraio M, Silverstein RL, Hajjar DP. Role of CD36, the macrophage class B scavenger receptor, in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci*, 2001, 947: 224-228
- [5] Nakata A, Nakagawa Y, Nishida M, Nozaki S, Miyagawa J, Nakagawa T, et al. CD36, a novel receptor for oxidized low-density lipoproteins, is highly expressed on lipid-laden macrophages in human atherosclerotic aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, 19 (5): 1333-339
- [6] De Vries HE, Buchner B, van Berkel TJ, Kuiper J. Specific interaction of oxidized low-density lipoprotein with macrophage-derived foam cells isolated from rabbit atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, 19 (3): 638-645
- [7] 夏永静, 蒋雷, 黎健. Rb 基因对血管平滑肌细胞生长抑制作用的研究. 中华医学杂志, 1997, 77 (4): 252-255
- [8] 汪浩川, 刘秉文, 傅明德, 曾成林. 癌基因及抗癌基因在实验性动脉粥样硬化斑块中的转录表达. 华西医科大学学报, 1996, 27 (2): 117-121
- [9] Greenwalt DE, Lipsky RH, Ockenhouse CF, Ikeda H, Tandon NN, Jamieson GA. Membrane glycoprotein CD36: A review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood*, 1992, 80 (5): 1105-1115

(此文编辑 朱雯霞)