

氧化型低密度脂蛋白对人脐静脉内皮细胞 TET2 表达及自噬的影响

危当恒^{1,2}, 贾小英^{2,3}, 刘艳辉², 郭凤霞², 刘慧婷², 王佐², 阮长耿¹

(1. 苏州大学附属第一医院, 江苏省杭州市 215006; 2. 动脉硬化化学湖南省重点实验室
南华大学心血管疾病研究所, 湖南省衡阳市 421001; 3. 湘南学院护理学系, 湖南省郴州市 423000)

[关键词] TET2; 氧化型低密度脂蛋白; 血管内皮细胞; 自噬

[摘要] **目的** 观察氧化型低密度脂蛋白对人脐静脉内皮细胞自噬的影响及其调节机制。**方法** 氧化型低密度脂蛋白孵育人脐静脉内皮细胞 24 h, RT-PCR 检测 TET2 mRNA 表达, Western blot 检测 TET2 以及自噬标记物 Beclin 1、LC3 的表达。TET2 siRNA 转染人脐静脉内皮细胞, Western blot 检测 Beclin 1、LC3 的表达。**结果** 人脐静脉内皮细胞经不同浓度氧化型低密度脂蛋白孵育 24 h 后, 浓度依赖性地下调 TET2 mRNA 以及蛋白的表达 ($P < 0.05$), 并且下调 Beclin 1 表达以及 LC3 II/LC3 I 的比值。TET2 siRNA 转染人脐静脉内皮细胞后, Beclin 1 表达以及 LC3 II/LC3 I 的比值明显降低。**结论** 氧化型低密度脂蛋白促进人脐静脉内皮细胞自噬, 可能与下调 TET2 表达相关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Oxidized Low Density Lipoprotein on TET2 Expression and Autophagy of Human Umbilical Vein Endothelial Cell

WEI Dang-Heng^{1,2}, JIA Xiao-Ying^{2,3}, LIU Yang-Hui², GUO Feng-Xia², LIU Hui-Ting², WANG Zuo², and RUAN Chang-Geng¹

(1. The First Affiliated Hospital of Suzhou University, Hangzhou 215006, China; 2. Key Laboratory for Arteriosclerosis of Hunan Province & The Institute of Cardiovascular Disease, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 3. Department of Nursing, Xiangnan University, Chenzhou, Hunan 423000, China)

[KEY WORDS] Ten-Eleven-Translocation 2; Oxidized Low Density Lipoprotein; Human Umbilical Vein Endothelial Cell; Autophagy

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) on ten-eleven-translocation 2 (TET2) expression and autophagy in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). **Methods** After treatment with ox-LDL for 24 h, RT-PCR was used to detect mRNA expression of TET2. Western blot was used to detect protein expression of TET2 and autophagic marker Beclin 1 and microtubule-associated protein light chain 3 (LC3). HUVEC were transfected with TET2 siRNA, and then Beclin 1 and LC3 were detected by using Western blot. **Results** After treatment with ox-LDL for 24 h, the expression of TET2 was decreased with a concentration-depended manner both in mRNA and protein levels. The protein expression of Beclin 1 and the ratio of LC3II/LC3I were increased with response to ox-LDL concentration. Transfection with TET2 siRNA, the expression of Beclin 1 and the ratio of LC3II/LC3I were upregulated. **Conclusion** ox-LDL decreased the expression of TET2, which might contribute to the increase of HUVEC autophagy.

氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的独立危险因素。ox-LDL 引起血管内皮细胞

(endothelial cells, EC)功能障碍和 EC 损伤是 As 生的重要环节。研究表明, ox-LDL 破坏 EC 骨架、促进细胞色素 C 释放, 进而诱导 EC 的 I 型程序性死亡

[收稿日期] 2012-07-13

[基金项目] 国家自然科学基金(30800449)以及南华大学高层次人才启动基金

[作者简介] 危当恒, 博士, 副教授, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制及其防治, E-mail 为 weizhonghua99@126.com。贾小英, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制及其防治, E-mail 为 jialijuan198509@163.com。

(凋亡)^[1,2]。最近研究表明 ox-LDL 亦诱导 EC II 型程序性死亡(自噬)^[3],但其作用机制尚不清楚。

TET2(ten-eleven-translocation 2)是新发现的骨髓恶性肿瘤患者 4q24 上的肿瘤抑制基因^[4]。Tahiliani 等^[5]研究表明,体细胞 TET2 突变可以加强 DNA 甲基化,从而为突变细胞提供潜在的生长优势,从而促发肿瘤的形成。本实验将探讨 ox-LDL 对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)自噬以及 TET2 表达的影响,并采用 siRNA 干扰的方式,探讨 TET2 对 HUVEC 自噬的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

TET2 siRNA, siRNA Transfection Reagent 购自 Santa Cruz 公司;逆转录试剂盒购自 Fermentas 公司, LC3A PolyClonal Antibody, Beclin1 PolyClonal Antibody, TET2 PolyClonal Antibody 购自 Datasheet 公司;人脐静脉内皮细胞细胞株购自中南大学湘雅医学院细胞中心。

1.2 细胞培养及分组

HUVEC 用 DMEM 培养基置于 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。取对数生长期细胞用于实验。实验分为四组:①0 mg/L ox-LDL 组(对照组);②25 mg/L ox-LDL 组;③50 mg/L ox-LDL 组;④75 mg/L ox-LDL 组,均孵育 24 h。

1.3 RT-PCR

按通用型 RNA 提取试剂盒说明书提取细胞总 RNA,紫外分光光度计测定 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值;分别取 1 μg 总 RNA,逆转录成 cDNA;再取 1 μL cDNA 进行扩增。引物序列为:GAPDH 正义链 5'-CAAG-GTCATCCATGACAACCTTTG-3',反义链 5'-GTCCAC-CACCCTGTTGCTGTAG-3',扩增片段长度 496 bp;PCR 反应条件:预变性 94℃ 2 min,变性 94℃ 30 s,退火 60℃ 30 s,延伸 72℃ 30 s,26 个循环,终延伸

72℃ 5 min。TET2 引物序列:正义链 5'-AGACG-GCACTCTGCTGCTCTGTGT-3',反义链 5'-GGAGCT-TACCGAGACGCTGAGGAA-3',扩增片段长度为 342 bp;PCR 反应条件:预变性 94℃ 2 min,变性 94℃ 30 s,退火 66℃ 30 s,延伸 72℃ 30 s,32 个循环,继续延伸 94℃ 2 min。扩增产物利用凝胶成像系统分析^[6],实验重复 3 次。

1.4 Western blot 分析

提取处理后 HUVEC 总蛋白,BCA 法进行蛋白质定量,SDS-PAGE 进行电泳分离,转膜,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,分别加入 TET2,Beclin 1 及 LC3 一抗孵育过夜,洗涤,再分别加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1 h,洗涤、显色。结果用 Labwork 凝胶图象分析系统对胶片进行扫描并进行分析^[7],实验重复 3 次。

1.5 TET2 siRNA 转染

取生长良好 HUVEC,接种于 6 孔板;于培养箱培养至 60%~80% 融合进行 siRNA 转染。转染过程根据试剂盒的操作说明进行,转染后置于 37℃ CO₂ 培养箱中孵育。6 h 后,添加 1 mL 包含 2 倍正常血清及抗生素的正常培养基,24 h 后。提取细胞总蛋白,备用。

1.6 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析及 *t* 检验等统计学分析方法,运用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ox-LDL 对 HUVEC TET2 表达的影响

ox-LDL 下调 TET2 mRNA 和蛋白表达,与 0 mg/L ox-LDL 组相比,50 和 75 mg/L ox-LDL 组中 TET2 mRNA 表达显著减少(*P* < 0.05,图 1);TET2 蛋白表达量随 ox-LDL 浓度的增加而递减(*P* < 0.05;图 2)。

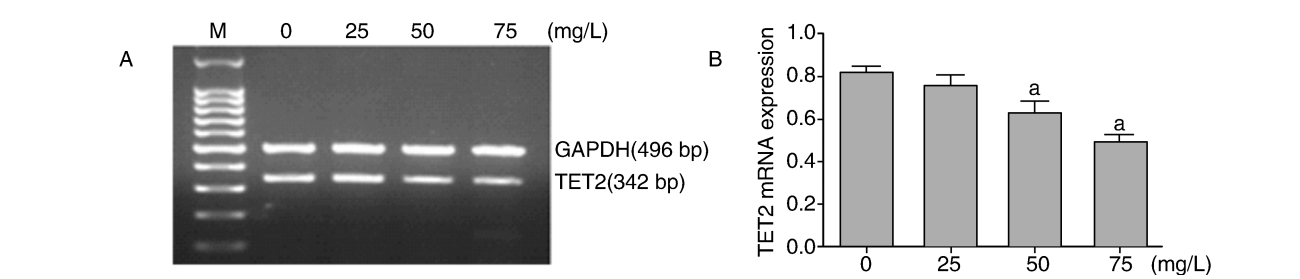


图 1. ox-LDL 对 HUVEC TET2 mRNA 表达的影响 A 为 TET2 mRNA 的电泳图;B 为 TET2 mRNA 表达的半定量分析图;a 为 *P* < 0.05, 与对照组比较,*n* = 3。

Figure 1. Effect of ox-LDL on TET2 mRNA expression

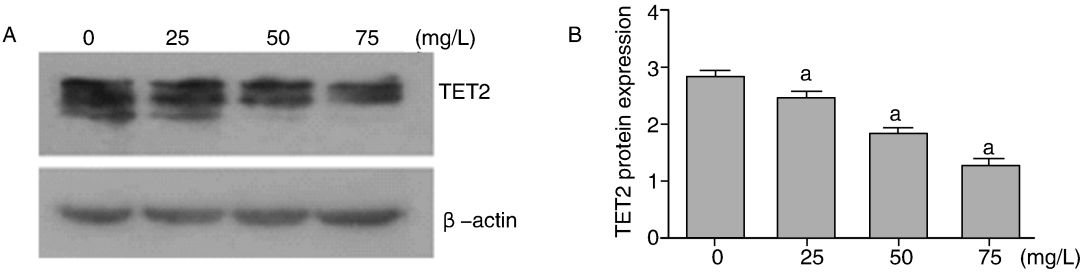


图 2. ox-LDL 对 HUVEC TET2 蛋白表达的影响 A 为 TET2 蛋白表达电泳图;B 为 TET2 蛋白表达的半定量分析图;a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较, $n = 3$ 。

Figure 2. Effect of ox-LDL on TET2 protein expression

2.2 ox-LDL 对 HUVEC 自噬的影响

随着 ox-LDL 浓度的增加, Beclin 1 蛋白表达水平及 LC3 II/LC3 I 值明显增加, 表明 ox-LDL 浓度依赖性地上调 HUVEC 自噬(图 3)。

2.3 TET2 siRNA 对 HUVEC 自噬的影响

TET2 siRNA 显著上调 HUVEC Beclin 1 蛋白表达($P < 0.05$) 以及 LC3 II/LC3 I 值($P < 0.05$; 图 4), 提示 TET2 siRNA 增加 HUVEC 自噬。

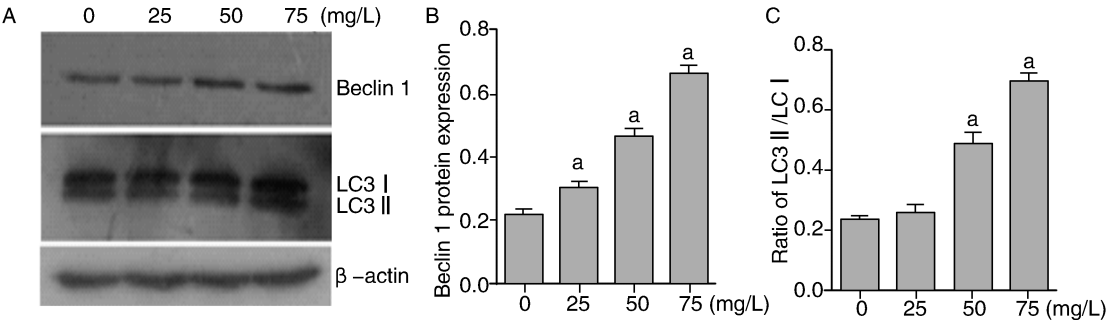


图 3. ox-LDL 对 HUVEC 自噬标记物 Beclin1 表达及 LC3 II/LC3 比值的影响 A 为 Beclin 1、LC3 蛋白表达电泳图;B 为 Beclin 1 蛋白表达的半定量分析图;C 为 LC3 II/LC3 I 值;a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较, $n = 3$ 。

Figure 3. Effect of ox-LDL on the autophagic marker of Beclin 1 and LC3

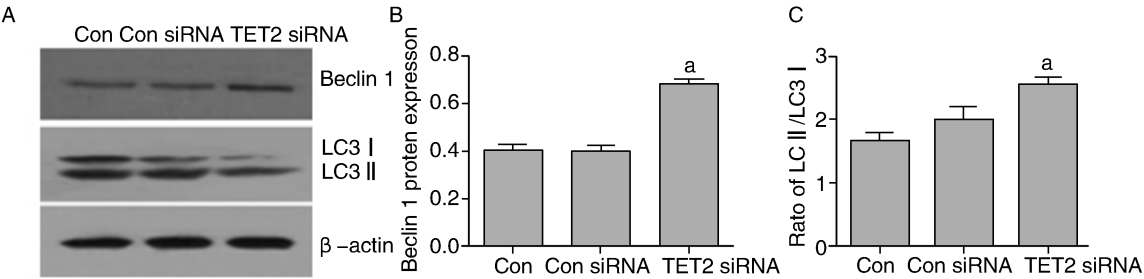


图 4. TET2 siRNA 对 Beclin 1 表达以及 LC3 II/LC3 比值的影响 A 为 Beclin 1、LC3 蛋白表达电泳图;B 为 Beclin 1 蛋白表达的半定量分析图;C 为 LC3 II/LC3 I 值;a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较, $n = 3$ 。

Figure 4. Effect of TET2 siRNA on autophagic marker of Beclin 1 and LC3

3 讨论

自噬在消除、降解和消化受损、变性、衰老和失去功能的细胞、细胞器和变性蛋白质与核酸等生物大分子的过程中起着非常重要的作用,是细胞应激情况下维持细胞内环境稳定和存活的重要机

制^[8,9]。越来越多的研究表明,自噬参与并调控动脉粥样硬化病变的发生发展过程^[10,11]。

Beclin 1 是酵母 ATG6 的同系物,也是哺乳动物参与自噬的特异性基因^[12]。通过与 Class III PI3K 形成复合物及复合体分别参与自噬体和 PI3P 的形成,在自噬前体复合物的形成及自噬小体膜来源中发

挥着重要的作用^[13,14]。微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) 是哺乳动物细胞中酵母 ATG8 (Aut7/Apg8) 基因的同源物,定位于前自噬泡和自噬泡膜表面,参与自噬体的形成,是目前检测自噬较为可靠的生物学标志物^[15,16];LC3 分为 I 型和 II 型,无自噬时,细胞表达 LC3 I,自噬发生后,LC3 I 经泛素样加工修饰形成 LC3 II。LC3 II 结合并位于胞内自噬体膜上,其含量与自噬泡数量成正比^[17,18]。因此,LC3 II 与 LC3 I 的比值能真实反映细胞自噬情况。我们的研究表明,ox-LDL 浓度依赖性地上调 Beclin 1 的表达以及 LC3 II 与 LC3 I 的比值,说明 ox-LDL 浓度依赖性地促进 HUVEC 自噬。

研究表明,自噬受基因的表现遗传调控。表现遗传调控主要包括组蛋白修饰、非编码 RNA 调控以及甲基化修饰,其中甲基化异常在介导 HUVEC 损伤中起着非常重要的作用^[19]。TET2 是一种抑癌基因,TET 蛋白属于 α -酮戊二酸和 Fe^{2+} 依赖的双加氧酶,具有催化 5mC 甲基化的酶活性,从而调节着 DNA 的去甲基化过程^[20]。为了探讨 ox-LDL 促进 HUVEC 自噬的分子机制,我们检测了 ox-LDL 对 TET2 表达的影响,并采用 TET siRNA 干预 TET2 的表达观察 TET2 对 HUVEC 自噬的影响。结果表明,不同浓度 ox-LDL 处理 HUVEC 后,TET2 mRNA 及蛋白表达呈 ox-LDL 处理浓度依赖性减低;TET2 siRNA 转染后,自噬标记物 Beclin 1 以及 LC3 II/LC3 I 明显升高,提示 ox-LDL 通过下调 TET2 的表达从而促进 HUVEC 自噬,但是否与 TET2 的去甲基化机制相关还有待于进一步探讨和证实。

综上所述,我们推测:当 HUVEC 受到 ox-LDL 作用时,抑制 TET2 的表达从而上调自噬水平(适应性反应),从而减轻 HUVEC 的损伤,有利于 HUVEC 存活。

[参考文献]

- [1] 乔春霞,徐贵发,赵秀兰. 茶多酚对 ox-LDL 诱导人血管内皮细胞及平滑肌细胞凋亡作用的抑制作用[J]. 营养学报, 2006, 28 (6): 490-493.
- [2] Vasques E, Almeida AL, Noya V, et al. Impairment of endothelium-dependent aorta relaxation by phospholipid components of oxidized low-density lipoprotein[J]. Endothelium, 2006, 13(1): 1-8.
- [3] Zhang YL, Cao YJ, Zhang X, et al. The autophagy-lysosome pathway: a novel mechanism involved in the processing of oxidized LDL in human vascular endothelial cells [J]. Biochem Biophys Res

Commun, 2010, 394(2): 377-382.

- [4] Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, et al. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies [J]. Blood, 2009, 114(1): 144-147.
- [5] Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1 [J]. Science, 2009, 324(5 929): 930-935.
- [6] 危当恒,夏敏,贾小英,等. 组织蛋白酶 L 在动脉粥样硬化病变中的表达以及对巨噬细胞脂质蓄积的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(12): 963-968.
- [7] 危当恒,王贵学,王佐,等. 基质细胞衍生因子 1 对低密度脂蛋白诱导单核—内皮细胞粘附的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14(5): 387-390.
- [8] Xie Y, You SJ, Zhang YL, et al. Protective role of autophagy in AGE-induced early injury of human vascular endothelial cells[J]. Mol Med Report, 2011, 4(3): 459-464.
- [9] Martinet W, De Meyer GR. Autophagy in atherosclerosis[J]. Curr Atheroscler Rep, 2008, 10(3): 216-223.
- [10] Liu J, Thewke DP, Su YR, et al. Reduced macrophage apoptosis is associated with accelerated atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-null mice [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(1): 174-179.
- [11] Cancel LM, Tarbell JM. The role of apoptosis in LDL transport through cultured endothelial cell monolayers [J]. Atherosclerosis, 2010, 208(2): 335-341.
- [12] Meijer AJ, Codogno P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36(12): 2 445-462.
- [13] Friedman LS, Ostermeyer EA, Lynch ED, et al. The search for BRCA1 [J]. Cancer Res, 1994, 54(24): 6 374-382.
- [14] Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, et al. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis[J]. Nat Cell Biol, 2007, 9(10): 1 142-151.
- [15] Mizushima N. Methods for monitoring autophagy[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36(12): 2 491-502.
- [16] Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing [J]. EMBO J, 2000, 19(21): 5 720-728.
- [17] Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword[J]. Science, 2004, 306(5 698): 990-995.
- [18] Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? [J]. J Clin Invest, 2005, 115(10): 2 679-688.
- [19] Chang PY, Lu SC, Lee CM, et al. Homocysteine inhibits arterial endothelial cell growth through transcriptional downregulation of fibroblast growth factor-2 involving G protein and DNA methylation [J]. Circ Res, 2008, 102(8): 933-941.
- [20] Loenarz C, Schofield CJ. Oxygenase catalyzed 5-methylcytosine hydroxylation [J]. Chem Biol, 2009, 16(6): 580-583.

(此文编辑 李小玲)