

本文引用: 苏美名, 赵玫淇, 赵亚萍, 等. 转录因子 KLF2 和 KLF4 调控人血管内皮细胞血管稳态相关基因表达的特征[J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(5): 375-385. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2024.05.002.

[文章编号] 1007-3949(2024)32-05-0375-11

· 实验研究 ·

转录因子 KLF2 和 KLF4 调控人血管内皮细胞血管稳态相关基因表达的特征

苏美名, 赵玫淇, 赵亚萍, 徐索文

中国科学技术大学附属第一医院内分泌与代谢病研究所 代谢健康与泛血管病安徽省重点实验室, 安徽省合肥市 230001

[摘要] **[目的]** Krüppel 样因子(KLF)2 和 4 是与血管稳态密切相关的两个核心转录因子, 具有抗炎、抗钙化、抗血栓等多重保护效应。本研究旨在在内皮细胞中阐明并验证 KLF2 和 KLF4 共同调控的血管稳态相关基因谱。**[方法]** 使用腺病毒(Ad-KLF2 或 Ad-KLF4)及对照病毒(Ad-NC)处理人脐静脉内皮细胞(HUVEC)24 h 后提取 RNA 并进行转录组测序分析。过表达 KLF2 和 KLF4 的测序结果与已报道的 KLF2/KLF4 双基因敲除鼠测序结果进行叠加。筛选出的差异表达基因通过实时荧光定量 PCR 在 Ad-KLF2 或 Ad-KLF4 处理的 HUVEC 以及在阿托伐他汀或白藜芦醇处理的 HUVEC 中进行验证。**[结果]** 转录组学叠加发现, KLF2 和 KLF4 上调的差异基因有 256 个, KEGG 通路富集分析显示这些差异基因主要富集于肥厚型心肌病、扩张型心肌病、ECM-受体交互以及黏着斑、致心律失常性右心室心肌病等; KLF2 和 KLF4 下调的差异基因有 145 个, KEGG 通路富集分析显示这些差异基因主要富集于癌症中的 microRNA、糖胺聚糖生物合成-硫酸软骨素/硫酸皮聚糖、矿物质吸收、p53 信号通路以及氨基酸生物合成等。最终通过验证得到 6 个受到 KLF2 和 KLF4 调控的新基因。**[结论]** FGFR3、SEMA4B、SEMA6A、PTX3、FABP4 和 FABP5 可能是内皮细胞中转录因子 KLF2 和 KLF4 调控血管稳态的新基因。

[关键词] Krüppel 样因子 2; Krüppel 样因子 4; 血管稳态; 内皮细胞

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Characteristics of transcription factors KLF2 and KLF4 regulating gene expression related to vascular homeostasis in human endothelial cells

SU Meiming, ZHAO Wenqi, ZHAO Yaping, XU Suowen

Institute of Endocrine and Metabolic Diseases, First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China & Anhui Provincial Key Laboratory of Metabolic Health and Panvascular Disease, Hefei, Anhui 230001, China

[ABSTRACT] **Aim** Krüppel-like factor (KLF) 2 and 4 are two core transcription factors closely related to vascular homeostasis, with multiple protective effects such as anti-inflammatory, anti-calcification and anti-thrombotic. The aim of this study is to elucidate and validate the vascular homeostasis related gene profile co-regulated by KLF2 and KLF4 in endothelial cells. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were treated with adenovirus (Ad-KLF2 or Ad-KLF4) and control virus (Ad-NC) for 24 h, RNA was extracted from the cells and analyzed by transcriptomic sequencing. The sequencing results of overexpressed KLF2 and KLF4 were superimposed with the sequencing results of reported KLF2/KLF4 double-gene knockout mice. The selected differential expression genes were verified by real-time fluorescence quantitative PCR in HUVEC treated with Ad-KLF2 or Ad-KLF4, and in HUVEC treated with atorvastatin or resveratrol. **Results** Transcriptomic superposition revealed 256 differential expression genes were up-regulated by KLF2 and KLF4, and KEGG analysis showed that differential expression genes were enriched in hypertrophic cardiomyopathy, arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, dilated cardiomyopathy, ECM-receptor interaction and focal adhesion; there were 145 differential expression genes down-regulated by KLF2 and KLF4, and KEGG analysis showed that differential expression genes were enriched in microRNA of cancer, mineral absorption, glycosaminoglycan biosynthesis-

[收稿日期] 2023-11-14

[修回日期] 2024-01-30

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2021YFC2500500);国家自然科学基金资助(82070464、82370444)

[作者简介] 苏美名, 博士研究生, 主要从事动脉粥样硬化疾病的研究, E-mail: Sumeiming@mail.ustc.edu.cn. 通信作者徐索文, 博士, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事代谢与心血管病的基础和转化研究, E-mail: xsu1984@ustc.edu.cn.

chondroitin sulfate/dermatan sulfate, p53 signaling pathway and biosynthesis of amino acids. Finally, six novel genes regulated by KLF2 and KLF4 were obtained. **Conclusion** FGFR3, SEMA4B, SEMA6A, PTX3, FABP4 and FABP5 may be novel genes that regulate vascular homeostasis in endothelial cells by the transcription factors KLF2 and KLF4.

[**KEY WORDS**] Krüppel-like factor 2; Krüppel-like factor 4; vascular homeostasis; endothelial cell

血管内皮细胞是一种排列在血管壁上的单层细胞,在维持多器官健康和体内平衡中起着关键作用^[1]。健康的内皮表现出的功能包括动态维持血管张力、血管生成以及提供抗氧化、抗炎和抗血栓等作用^[2]。血管内皮功能失调表现为血管收缩、氧化应激升高、炎症反应、内皮间充质化、高通透性以及内皮衰老等^[2]。内皮功能失调被认为是多种人类泛血管疾病的标志之一,包括高血压、动脉粥样硬化、非酒精性脂肪性肝病和糖尿病等^[3]。

内皮细胞是感知(通过膜定位的机械传感器和机械传感复合物)和传导(通过机械传感器)来自剪切应力的机械信号来调节各种信号通路和生物功能的主要细胞类型^[4]。血流剪切应力在心血管发育、生理和病理中起着关键作用^[5]。内皮细胞中 Krüppel 样因子(Krüppel-like factor, KLF)2 和 4 是较早被发现且至关重要的血流机械敏感分子,可调节内皮细胞中多种抗炎、抗氧化和抗血栓基因的表达^[6]。KLF2 和 KLF4 的重要下游靶点包括内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS/NOS3)和血栓调节蛋白(thrombomodulin, THBD)等^[7]。eNOS 促进一氧化氮(nitric oxide, NO)的产生,调控血管舒张,THBD 调控血管收缩^[8]。这些蛋白在血管稳态中至关重要。KLF2 和 KLF4 还负调控多种促炎、促血栓形成和血管收缩基因,如血管细胞黏附分子 1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)、单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)、E-选择素(E-selectin, SELE)、内皮素 1(endothelin 1, ET1/EDN1)和纤溶酶原激活物抑制剂 1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)等^[7]。进一步的体内研究表明, KLF2 和 KLF4 可保护动脉血管免受动脉粥样硬化^[9-10]。

鉴于转录因子 KLF2 和 KLF4 共同调控的靶基因对血管稳态具有强效作用,所以本研究期望寻找到内皮细胞中 KLF2 和 KLF4 调控的新分子,以期为维持血管稳态、抵抗血管疾病提供潜在的新靶点。

1 材料和方法

1.1 药物与试剂

阿托伐他汀(#134523-00-5)和白藜芦醇(#501-

36-0)购自上海陶术生物科技有限公司;来自不同供者的 HUVEC (#FC-0003)购自美国 Lifeline 公司。内皮细胞 ECM 培养基、胎牛血清、内皮细胞生长因子、P/S 双抗(美国 ScienCell);总 RNA 提取试剂盒(上海奕杉);反转录试剂(日本 TaKaRa);SYBR green 试剂(南京诺唯赞)。PCR 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成;腺病毒以及对照病毒由山东维真生物科技有限公司构建。

1.2 细胞培养与处理

3~7 代 HUVEC 培养于含 5% 胎牛血清、1×内皮细胞生长因子、1% 青霉素-链霉素抗生素的内皮细胞生长培养基中,培养条件:37 °C、含 5% CO₂ 的培养箱中培养。将 HUVEC 接种于 12 孔板中,待细胞长至 80% 汇合后使用腺病毒(Ad-KLF2 或 Ad-KLF4)及对照病毒(Ad-NC)处理 HUVEC 24 h。药物处理实验中,使用 DMSO 或 5 μmol/L 阿托伐他汀或 10 μmol/L 白藜芦醇处理 HUVEC 24 h。

1.3 总 RNA 提取、RNA 测序及实时荧光定量 PCR 检测

使用总 RNA 提取试剂盒提取培养好的 HUVEC 总 RNA,由深圳华大基因股份有限公司准备 RNA 文库进行 RNA 测序。共有 9 个处理的 HUVEC 样本,包括 3 个 Ad-NC 处理的对照组样本、3 个 Ad-KLF2 处理的实验样本和 3 个 Ad-KLF4 处理的实验样本。利用反转录试剂将总 RNA 反转录为互补 cDNA,转录过程结束后使用实时荧光定量 PCR 试剂在罗氏 LightCycler96 实时荧光定量 PCR 检测体系进行检测,用 2^{-ΔΔCt} 法计算 mRNA 的相对表达量,以 GAPDH 为对照。

1.4 样本相关性检验

利用基迪奥生信云工具(<https://www.omicshare.com/tools>)对 mRNA 表达谱进行分析。使用 Pearson 相关系数对样本之间的相关性进行检验。Pearson 相关系数是用来衡量样本间的线性关系,使用 pheatmap 软件包绘制分层聚类热图,用于数据集中所有成对样本组合基因表达的相关性的可视化。

1.5 差异表达基因的鉴定

使用 R 中的 limma 软件包将对照样品和实验样品之间的差异表达基因(differential expression gene, DEG)进行归一化和筛选,筛选条件为 $q < 0.05$ 。使

用基迪奥生信云工具的 pheatmap 软件包绘制热图,用于 DEG 的可视化。

1.6 KEGG 和 GO 富集分析

利用基迪奥生信云工具的 clusterProfiler 软件包对 DEG 进行 KEGG 和 GO 富集分析。筛选条件为 $q < 0.05$ 。

1.7 微阵列数据集中的 DEG 分析

使用的数据集 (GSE92965) 是从 GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/>) 数据库中收集的微阵列数据集,并使用 R 语言进行分析。该数据集包含 4 只 cdh5-cre 对照鼠的内皮细胞和 4 只 KLF2 和 KLF4 内皮特异性敲除鼠的内皮细胞,对这 8 个样本中的 DEG 进行分析。

1.8 统计学分析

使用 Graphpad Prism 软件 8.0 版本进行绘图和统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组参数之间的比较

采用 t 检验,多组参数之间的比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 数据集验证和 DEG 识别

Pearson 相关热图显示,在对照组内的样本之间以及在 Ad-KLF2 组或 Ad-KLF4 组内的样本之间存在较强的相关性(图 1A)。箱型图显示样品的表达量分布一致(图 1B)。设置 $q < 0.05$, Ad-KLF2 组和 Ad-KLF4 组各发现 7 734 个和 3 364 个 DEG。与对照组相比, Ad-KLF2 组共发现了 4 036 个上调和 3 698 个下调的 DEG, Ad-KLF4 组共发现了 1 252 个上调和 2 112 个下调的 DEG,如火山图(图 1C 和图 1D)所示。表 1 和表 2 中列出了 Ad-KLF2 组和 Ad-KLF4 组上调和下调最显著的前 5 个基因。

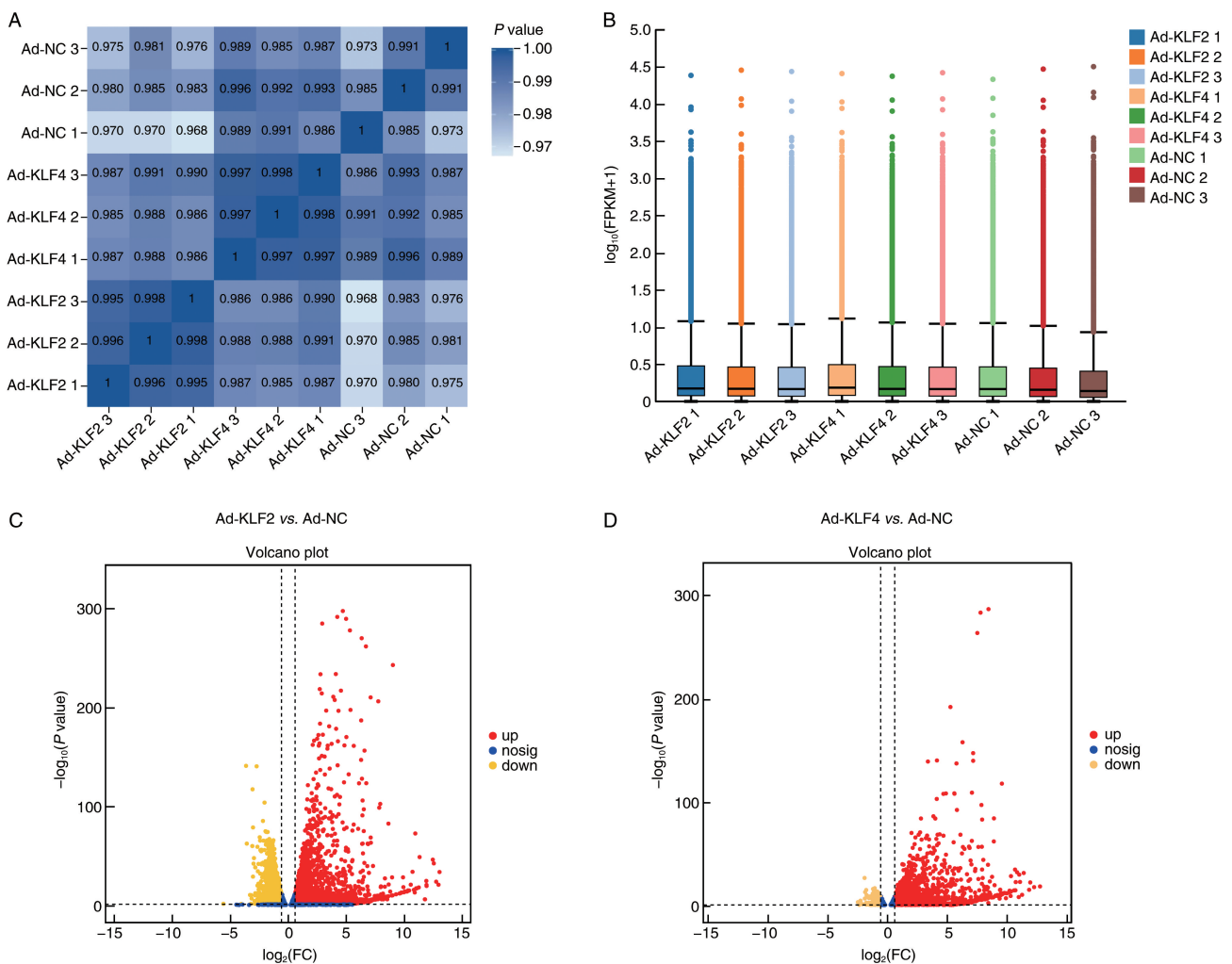


图 1. 数据集验证和 DEG 识别

A 为样本的 Pearson 相关分析 ($n=3$), B 为表达分布箱型图, C 为 Ad-KLF2 组与对照组的 DEG 的火山图 (Y 轴阈值为 0.01, X 轴阈值为 1.5), D 为 Ad-KLF4 组与对照组的 DEG 的火山图 (Y 轴阈值为 0.05, X 轴阈值为 1.5)。

Figure 1. Data set validation and DEG identification

表 1. Ad-KLF2 组上调和下调最显著的基因列表

Table 1. List of most significantly upregulated and downregulated genes in Ad-KLF2 group

基因描述	基因名称	作用	q	$\log_2(\text{FC})$
Hyaluronan and proteoglycan link protein 2	HAPLN2	上调	2.83E-35	13.04803436
LY6/PLAUR domain containing 2	LYPD2	上调	1.92E-22	12.95960956
Wnt family member 1	WNT1	上调	1.66E-25	12.55564486
Thyrotropin releasing hormone	TRH	上调	5.94E-44	12.55564486
Kallikrein related peptidase 10	KLK10	上调	9.64E-48	12.46817498
EF-hand domain containing 2	EFHC2	下调	3.44E-03	-5.595589216
Transmembrane protein 82	TMEM82	下调	2.54E-02	-4.474433795
Macrophage scavenger receptor 1	MSR1	下调	3.49E-02	-4.34971629
Lymphotoxin beta	LTB	下调	4.58E-02	-4.224042663
C-type lectin domain family 4 member M	CLEC4M	下调	4.91E-03	-4.050461216

表 2. Ad-KLF4 组上调和下调最显著的基因列表

Table 2. List of most significantly upregulated and downregulated genes in Ad-KLF4 group

基因描述	基因名称	作用	q	$\log_2(\text{FC})$
LY6/PLAUR domain containing 2	LYPD2	上调	5.58E-20	12.71944994
CD52 molecule	CD52	上调	2.63E-19	12.22964712
Keratin 13	KRT13	上调	7.26E-24	11.90338627
Transmembrane 4 L six family member 19	TM4SF19	上调	9.93E-17	11.81059430
Thyrotropin releasing hormone	TRH	上调	5.63E-33	11.35912149
Cysteinyl leukotriene receptor 2	CYSLTR2	下调	8.05E-05	-2.493568503
Ankyrin repeat and SOCS box containing 11	ASB11	下调	3.54E-02	-2.381291445
RNF103-CHMP3 readthrough	RNF103-CHMP3	下调	3.14E-06	-2.273712697
Solute carrier family 34 member 3	SLC34A3	下调	7.53E-03	-2.103558187
Endothelial cell specific molecule 1	ESM1	下调	3.59E-28	-1.932270393

2.2 KLF2 和 KLF4 共同调控的 DEG

根据 $q < 0.05$ 、 $\text{FC} > 1.5$ 倍 [$\log_2(\text{FC}) > 0.585$]，筛选出 1 051 个 Ad-KLF2 和 Ad-KLF4 处理后均上调的 DEG；KEGG 通路富集分析显示，这些 DEG 主要富集于 ECM-受体交互、肥厚型心肌病、致心律失常性右心室心肌病、黏着斑以及醛固酮的合成和分泌等信号通路中；GO 功能富集分析显示，这些 DEG 在生物过程 (biological process, BP) 层面主要富集于细胞代谢过程、单组织过程、生物调节等生物学功能中；在细胞组分 (cellular component, CC) 层面主要富集于细胞、细胞部分、细胞器等成分中；在分子功能 (molecular function, MF) 层面主要富集于结合、催化活性、分子传感器活性等功能中。根据 $q < 0.05$ 、 $\text{FC} > 30\%$ [$\log_2(\text{FC}) < -0.5145$]，筛选出 565 个 Ad-KLF2 和 Ad-KLF4 处理后均下调的 DEG；KEGG 通路富集分析显示，这些 DEG 主要富集于轴突导向、基底细胞癌、癌症中的 microRNA、Rap1 信号通路以及半胱氨酸和蛋氨酸代谢等信号通路中；GO 功能

富集分析显示，这些 DEG 在 BP 层面主要富集于细胞代谢过程、单组织过程、生物调节等生物学功能中；在 CC 层面主要富集于细胞、细胞部分、细胞器等成分中；在 MF 层面主要富集于结合、催化活性、核酸结合转录因子活性等功能中 (图 2)。

2.3 筛选 KLF2 和 KLF4 上调的 DEG

根据 $q < 0.05$ 、 $\text{FC} > 1.5$ 倍，筛选出 Ad-KLF2 和 Ad-KLF4 处理后均显著上调的 DEG，再与已报道的内皮特异性敲除 KLF2 和 KLF4 小鼠测序集^[11]中显著下调的 DEG 叠加，共有 256 个 DEG；KEGG 通路富集分析显示，这些 DEG 主要富集于肥厚型心肌病、致心律失常性右心室心肌病、扩张型心肌病、ECM-受体交互以及黏着斑等信号通路中；GO 分析显示，这些 DEG 在 BP 层面主要富集于细胞代谢过程、单组织过程、生物调节等生物学功能中；在 CC 层面主要富集于细胞、细胞部分、细胞器等成分中；在 MF 层面主要富集于结合、催化活性、分子功能调节剂等功能中。DEG 的热图显示，显著变化的基因

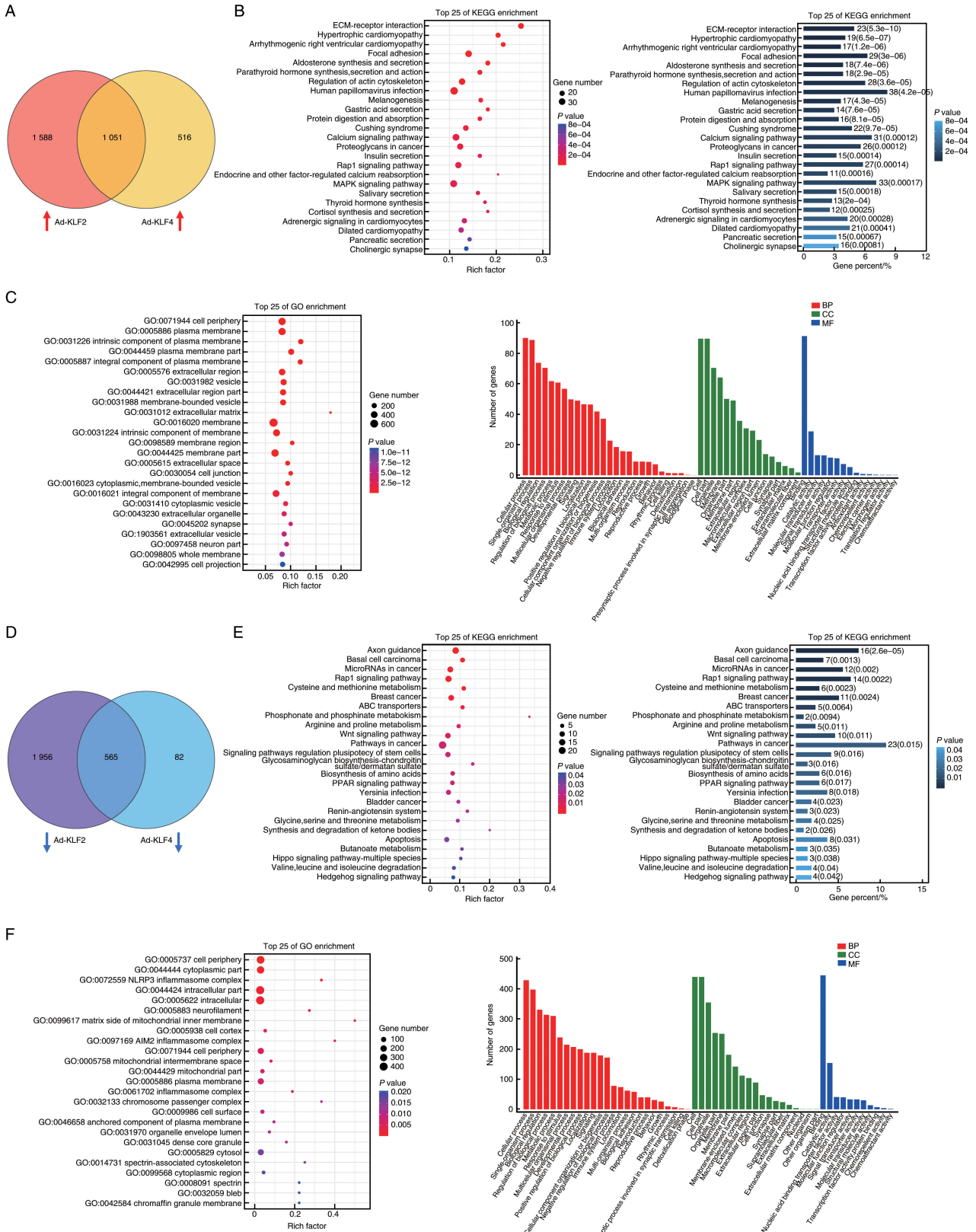


图 2. KLF2 和 KLF4 共同调控的 DEG

A 为 Ad-KLF2 和 Ad-KLF4 处理 HUVEC 的 2 个数据集中上调 DEG 叠加的维恩图($n=3$), B 为 DEG 的 KEGG 通路富集分析的气泡图和条形图, C 为 DEG 的 GO 功能富集分析图, D 为 Ad-KLF2 和 Ad-KLF4 处理 HUVEC 的 2 个数据集中下调 DEG 叠加的维恩图($n=3$), E 为 DEG 的 KEGG 通路富集分析的气泡图和条形图, F 为 DEG 的 GO 功能富集分析图。

Figure 2. DEG co-regulated by KLF2 and KLF4

有激肽释放酶相关肽酶 10 (kallikrein related peptidase 10, KLK10)、蜂窝通信网络因素 3 (cellular communication network factor 3, CCN3/NOV)、THBD、轴突导向因子 4B (semaphorin 4B, SEMA4B)、轴突导向因子 6B (semaphorin 6B, SEMA6B) 和成纤维细胞生长因子受体 3 (fibroblast growth factor receptor 3, FGFR3) 等 (图 3)。KLK10 已被证明是一种血流敏感的内皮细胞因子, 可发挥抗炎、屏障保护和抗动脉粥样硬化作用^[12]。NOV 是血管稳态的重要调节因子, 其水平在冠心病患者血清中显著上调, 且与

炎症标志物如 IL-6 和 TNF- α 水平存在正相关, 并且在动脉粥样硬化中发挥着重要作用; 也有研究通过启动子分析发现 KLF2 是 NOV 表达的上游转录因子^[13-15]。与层流剪切应力类似, 他汀类药物亦可通过 KLF2 诱导 THBD 表达, 因此 KLF2 也被进一步认为是调节血管疾病中内皮功能的潜在分子靶点^[16-17]。SEMA4B、SEMA6A 和 FGFR3 在内皮细胞中是否受到 KLF2 和 KLF4 调控及其是否参与动脉粥样硬化发病尚未见报道。

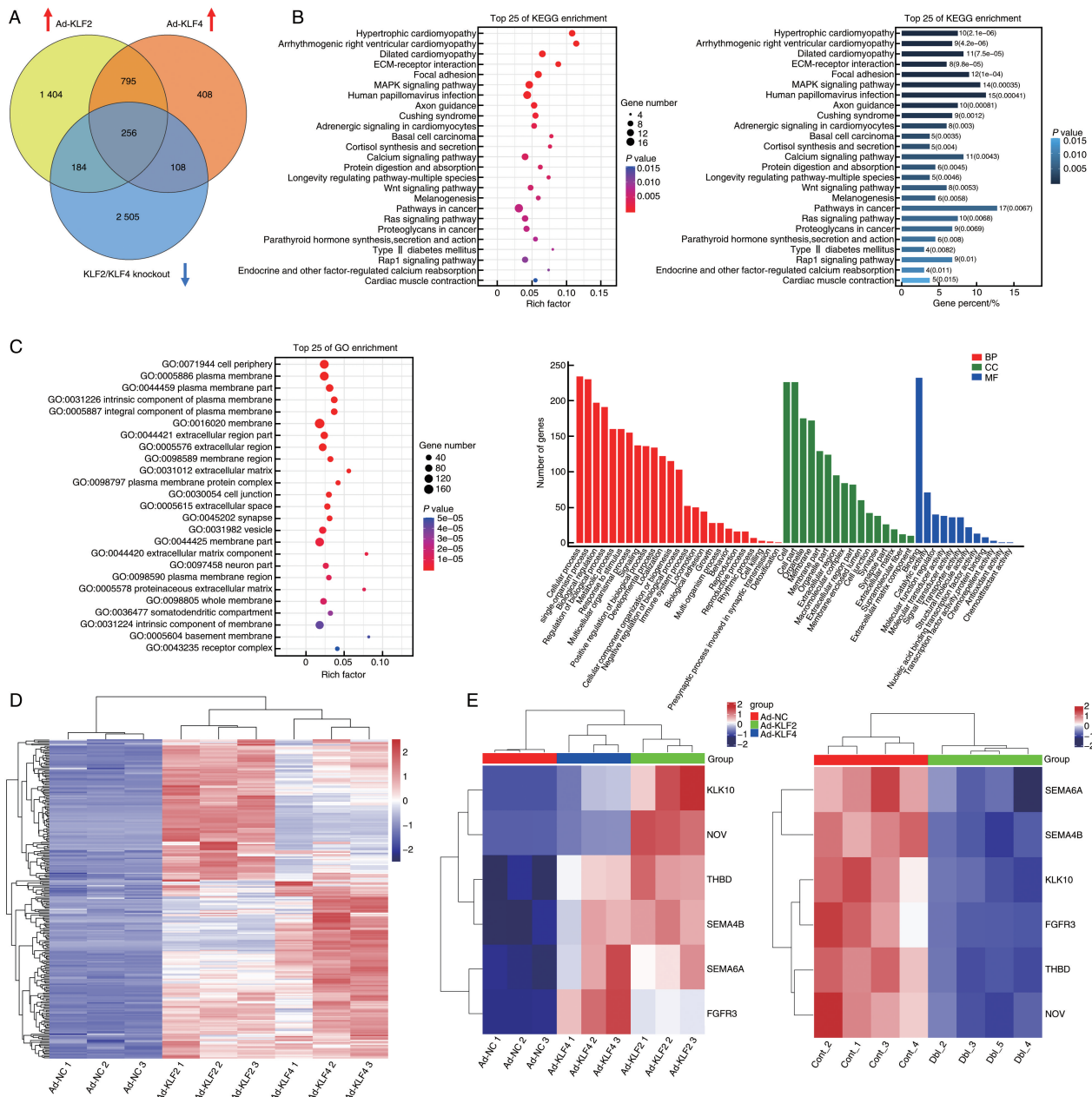


图 3. 筛选 KLF2 和 KLF4 上调的 DEG

A 为 Ad-KLF2 和 Ad-KLF4 处理 HUVEC (n=3) 及 KLF2 和 KLF4 敲除小鼠 (n=4) 的 3 个数据集中 DEG 叠加的维恩图, B 为 DEG 的 KEGG 通路富集分析的气泡图和条形图, C 为 DEG 的 GO 功能富集分析图, D 为 DEG 的热图, E 为显著变化的 DEG 的热图。

Figure 3. Screening for DEG upregulated by KLF2 and KLF4

2.4 筛选 KLF2 和 KLF4 下调的 DEG

根据 $q < 0.05$ 、 $FC > 30\%$ ，筛选出 Ad-KLF2 和 Ad-KLF4 处理后均显著下调的 DEG，再与内皮特异性敲除 KLF2 和 KLF4 小鼠中显著上调的 DEG 叠加，共有 145 个 DEG；KEGG 通路富集分析显示，这些 DEG 主要富集于癌症中的 microRNA、矿物质吸收、糖胺聚糖生物合成-硫酸软骨素/硫酸皮聚糖、p53 信号通路以及氨基酸生物合成等信号通路中；GO 分析显示，这些 DEG 在 BP 层面主要富集于细胞代谢过程、单组织过程、生物调节等生物学功能中；在 CC 层面主要富集于细胞、细胞部分、细胞器等成分中；在 MF 层面主要富集于结合、

催化活性、转运蛋白活性等功能中。DEG 的热图显示，显著变化的基因有趋化因子配体 2 (C-C motif chemokine ligand 2, CCL2)、EDN1、正五聚蛋白 3 (pentraxin 3, PTX3)、脂肪酸结合蛋白 (fatty acid binding protein, FABP) 4 和 5 等(图 4)。有文献称西伐他汀通过诱导 KLF2，有效抑制炎症基因 MCP-1/CCL2，并且 CCL2 的缺失显著减少 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化斑块的形成^[18-19]。内皮细胞 KLF2 在体内受血流调节，是 EDN1 的转录调节剂，使用 ETA 受体阻断剂能显著降低小鼠动脉粥样硬化^[20-21]。PTX3、FABP4 和 FABP5 在内皮细胞中是否受到 KLF2 和 KLF4 调控尚未可知。

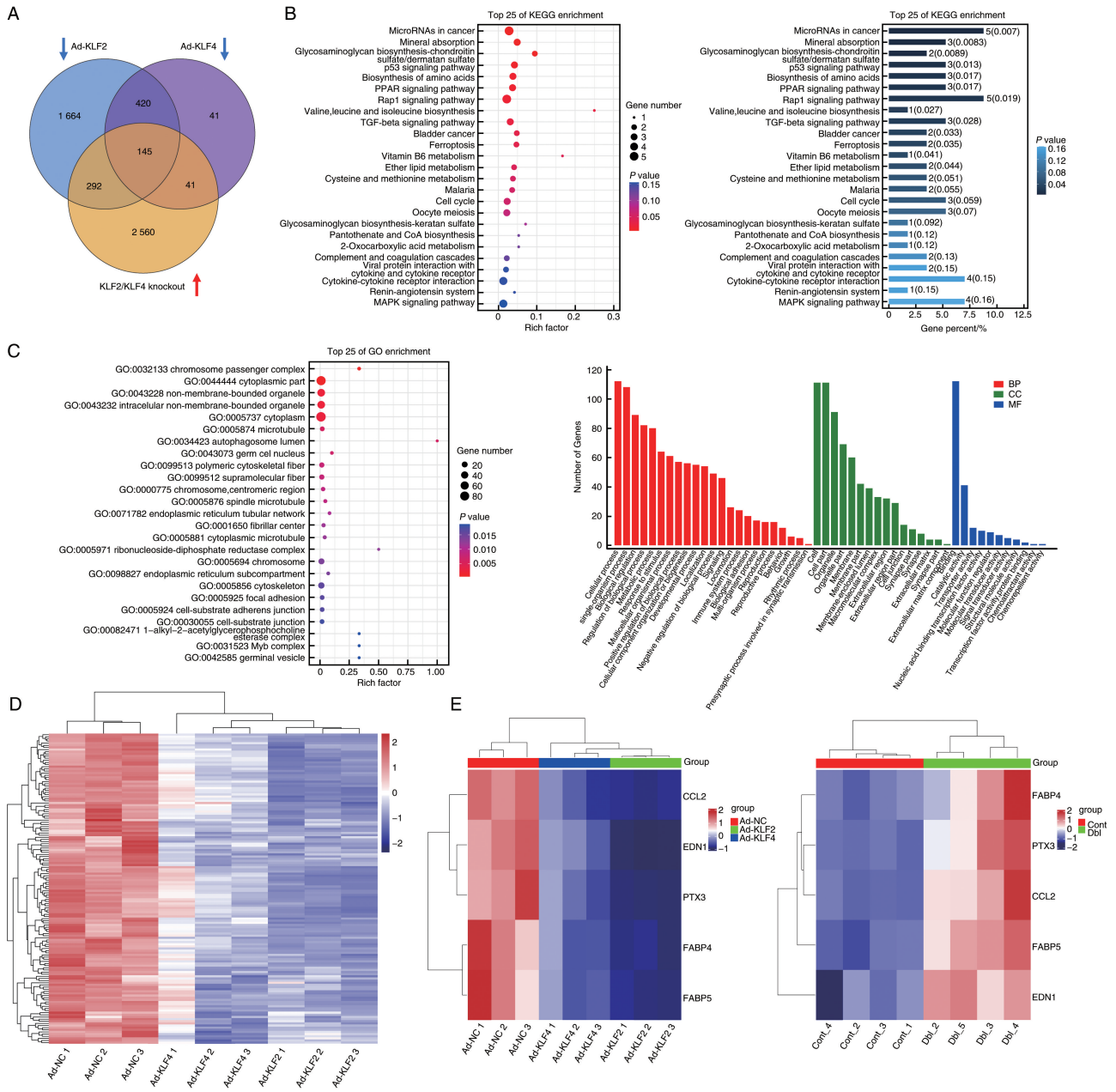


图 4. 筛选 KLF2 和 KLF4 下调的 DEG

A 为 Ad-KLF2 和 Ad-KLF4 处理 HUVEC ($n=3$) 及 KLF2 和 KLF4 敲除小鼠 ($n=4$) 的 3 个数据集中 DEG 叠加的维恩图，B 为 DEG 的 KEGG 通路富集分析的气泡图和条形图，C 为 DEG 的 GO 功能富集分析图，D 为 DEG 的热图，E 为显著变化的 DEG 的热图。

Figure 4. Screening for DEG upregulated by KLF2 and KLF4

2.5 对筛选出的 DEG 进行验证

使用腺病毒处理 HUVEC 使之过表达 KLF2 或 KLF4, 并使用实时荧光定量 PCR 验证 KLF2、KLF4 在 mRNA 水平上的表达, 以及几个已知的 KLF2 和 KLF4 调控的基因 (包括上调基因 NOS3、THBD, 下调基因 PAI-1、EDN1、MCP-1)。结果发现, KLF2 和 KLF4 在 mRNA 水平过表达成功, NOS3、THBD 上调, 而 PAI-1、EDN1、MCP-1 下调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 受 KLF2 和 KLF4 调控明显 (图 5A)。过表达 KLF2 或 KLF4 处理后, FGFR3、SEMA4B、SEMA6A 上调, PTX3、FABP4、FABP5 下调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。他汀和白藜芦醇均是有效的血管保护性药物, 且是已知的 KLF2 和 KLF4 的激动剂^[16, 22-24]。使用 5 $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀处理 HUVEC

24 h, 然后通过实时荧光定量 PCR 进行验证, 结果发现, 阿托伐他汀确实能够显著促进 KLF2、KLF4、NOS3、FGFR3、SEMA4B、SEMA6A 上调, 使 PTX3、FABP4、FABP5 下调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$; 图 5B)。使用 10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇处理 HUVEC 24 h, 然后通过实时荧光定量 PCR 进行验证, 结果发现, 白藜芦醇显著促进 KLF2、KLF4、THBD、FGFR3、SEMA4B 上调, 使 EDN1、FABP4、FABP5 下调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$; 图 5C)。以上结果表明, FGFR3、SEMA4B、SEMA6A、PTX3、FABP4 和 FABP5 可能是内皮细胞中转录因子 KLF2 和 KLF4 调控的新的血管稳态相关的基因。内皮细胞中 FGFR3、SEMA4B 和 SEMA6A 受到 KLF2 和 KLF4 的上调, 而 PTX3、FABP4 和 FABP5 受到 KLF2 和 KLF4 的下调。

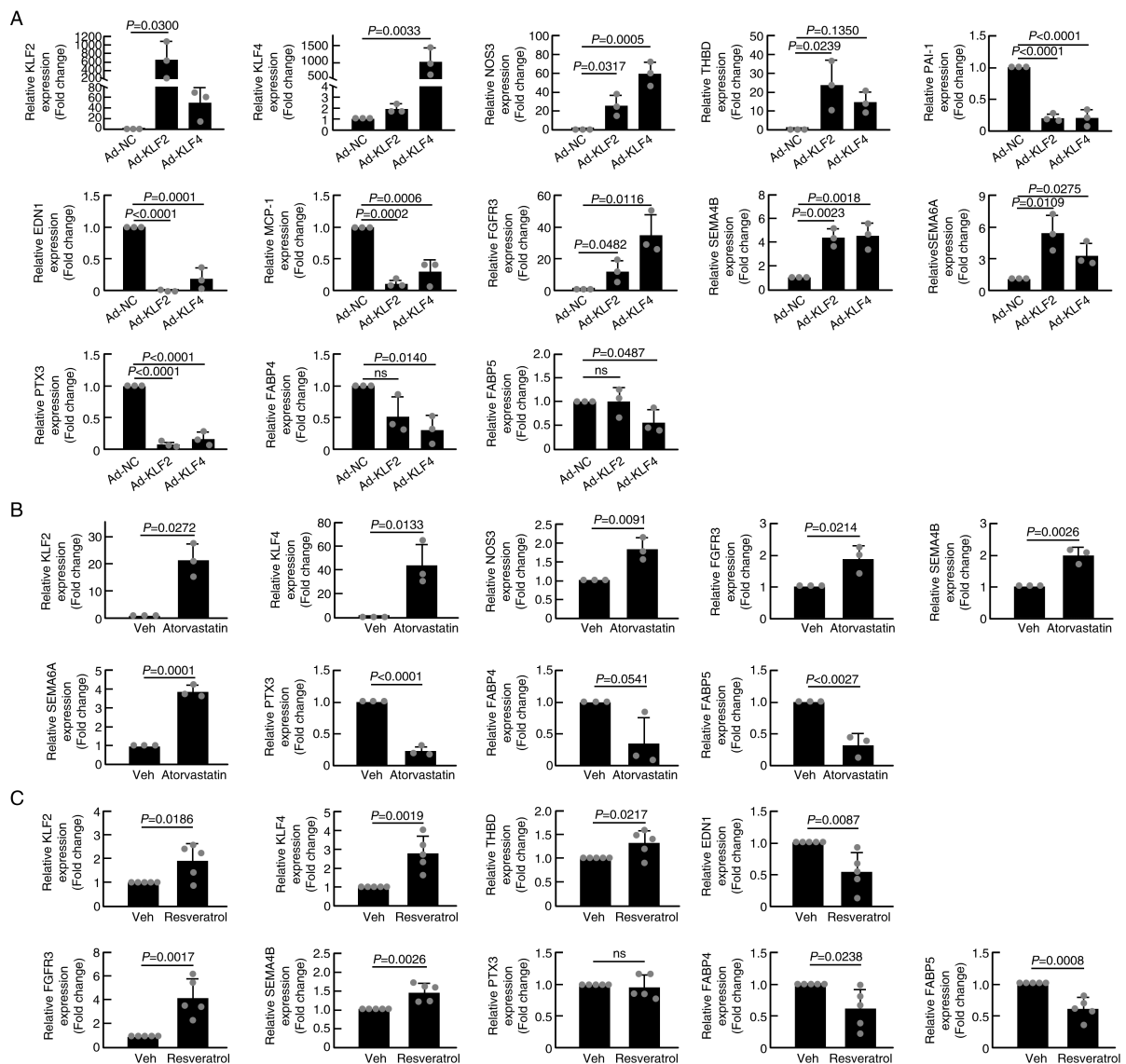


图 5. 对筛选出的 DEG 进行验证

A 为用 Ad-NC、Ad-KLF2 和 Ad-KLF4 处理 HUVEC 24 h, 实时荧光定量 PCR 检测 mRNA 水平 ($n=3$); B 为用 DMSO 和阿托伐他汀处理 HUVEC 24 h, 实时荧光定量 PCR 检测 mRNA 水平 ($n=3$); C 为用 DMSO 和白藜芦醇处理 HUVEC 24 h, 实时荧光定量 PCR 检测 mRNA 水平 ($n=5$)。

Figure 5. Validation of the selected DEG

3 讨论

KLF2 和 KLF4 调节内皮细胞稳态的核心转录因子,其通过响应血流剪切应力并直接参与抵抗多种心血管疾病的发生发展,如动脉粥样硬化和血栓形成等。KLF2 和 KLF4 已知的共同调控的分子近些年来也被认为是心血管疾病的重要靶点,如 eNOS 和 EDN1 等。寻找在血管内皮细胞中受到 KLF2 和 KLF4 调控的新分子有望成为治疗心血管疾病的新靶点。本研究证明了 FGFR3、SEMA4B、SEMA6A、PTX3、FABP4 和 FABP5 可能是内皮细胞中转录因子 KLF2 和 KLF4 调控血管稳态相关的新基因。

本研究结果发现,KLF2 和 KLF4 共同上调的分子共有 145 个,其中一些是已知的影响内皮细胞稳态并被 KLF2 或 KLF4 调控的分子。例如,本研究发现 NOV、THBD、KLK10 等分子被 KLF2 和 KLF4 上调,而 CCL2 和 END1 等分子被 KLF2 和 KLF4 下调,这足以说明本研究结果的可靠性。重要的是,本研究的关键发现是在内皮细胞中 FGFR3、SEMA4B、SEMA6A、PTX3、FABP4 和 FABP5 的 mRNA 水平在 KLF2 或 KLF4、阿托伐他汀或白藜芦醇处理后的显著变化。FGFR3 是成纤维细胞生长因子受体成员,已被发现在动脉粥样硬化患者组织中显著上调,敲低 FGFR3 能够抑制内质网应激以减轻 ox-LDL 处理的内皮细胞凋亡^[25]。Zhang 等^[26]发现中药材川芎通过抑制 MAPK/ERK 信号介导的启动子区 FGFR3 超甲基化而有效减缓动脉粥样硬化的进展。以上结果说明 FGFR3 可能在促进动脉粥样硬化疾病的发生发展中发挥作用,这与本研究内容的结论相反。近期有研究通过染色质免疫共沉淀 PCR 的方法证明了在间充质干细胞中,KLF2 通过结合 FGFR3 的启动子区域参与维持间充质干细胞的干细胞性^[27]。Choi 等^[28]研究发现在淋巴内皮细胞中 KLF2 和 KLF4 通过结合基因的调控区域协同调节 FGFR3、p57 等基因的表达。这些研究结果与本研究结果一致,KLF2 和 KLF4 确实能够正向调节 FGFR3 的表达。信号素家族(semaphorin, SEMA)参与心脏器官发生,控制生理性血管生成,这是促血管生成和抗血管生成信号平衡的结果^[29]。SEMA3A 在小鼠血管损伤后新生内膜增生组织和人类动脉粥样硬化斑块组织中显著下调,并抑制血管平滑肌细胞的增殖和迁移,有效抑制体内血管损伤后的新生内膜增生^[30]。SEMA3E 通过 plexin D1 受体抑制小鼠血管平滑肌细胞的增殖和迁移^[31]。SEMA4D 的缺失能够减少小鼠体内脂质沉积,并对动

脉粥样硬化的发展具有保护作用^[32]。SEMA6A 在内皮细胞中表达,并通过调节 VEGFR2 的表达和信号传导来调节内皮细胞的生存和生长^[33]。SEMA7A 通过整合素 $\beta 1$ 依赖的方式介导内皮功能障碍,促进动脉粥样硬化的发生与发展^[34]。上述说明 SEMA 各成员对心血管疾病的作用并不一致,筛选出的 SEMA4B、SEMA6A 和心血管疾病并无相关研究报道,并且 SEMA 与 KLF2 和 KLF4 的关系尚不清楚。本研究结果显示内皮细胞中 SEMA4B 和 SEMA6A 有望是 KLF2 和 KLF4 调控血管稳态的新分子。

五聚蛋白是一个急性期蛋白超家族,包括短五聚蛋白(如 C 反应蛋白)以及长五聚蛋白。PTX3 属于长五聚蛋白,已经被发现通过调节心血管系统的免疫炎症平衡对小鼠具有心血管保护作用^[35]。也有研究证明 PTX3 与冠心病危险因素、心肌梗死、炎症等具有正相关性^[36]。在动脉粥样硬化细胞模型中,和厚朴酚通过抑制 PTX3 的过表达而修复内皮功能障碍^[37]。以上说明 PTX3 在心血管疾病中的作用存在争议,需要实验进一步证明 PTX3 在心血管疾病中扮演的角色。FABP 在长链脂肪酸的摄取、转运以及代谢调节中发挥着不可替代的作用。FABP4 在脂肪细胞和巨噬细胞中表达,参与炎症和代谢反应,FABP4 的小分子抑制剂已被报道在应对小鼠动脉粥样硬化和 2 型糖尿病时是一种不错的治疗药物^[38]。也有研究揭示动脉粥样硬化病变中 FABP4 水平与斑块不稳定和心血管事件风险的增加有关,强调 FABP4 拮抗剂作为治疗动脉粥样硬化疾病进展的潜在药物的可能性^[39]。FABP5 通过抑制 PPAR γ 活性发挥促进动脉粥样硬化的作用,从而增加单核细胞 CC 趋化因子受体 2 的表达,并促进其向动脉粥样硬化病变的募集^[40]。FABP4 和 FABP5 的联合缺失改善了 ApoE 敲除小鼠的糖脂代谢,减少了动脉粥样硬化,并提高了小鼠的生存率^[41-42]。尽管 FABP4 和 FABP5 与心血管等代谢性疾病已经有了确切的认识,但其在血管内皮细胞中是否与 KLF2 和 KLF4 存在相关性并未可知,仅有研究证明 KLF2 通过调节 FABP4 在原代巨噬细胞泡沫细胞形成中的重要作用^[10],以及在 MCF-7 乳腺癌细胞中 FABP5 的表达能被 KLF2 下调^[43]。本研究结果表明内皮细胞中 PTX3、FABP4 和 FABP5 是 KLF2 和 KLF4 下调的分子,抑制其表达有望维持血管稳态。

他汀类药物和白藜芦醇均为 KLF2 和 KLF4 的

激动剂^[16,22-24]。他汀类药物可以治疗 FGFR3 相关软骨发育不良模型小鼠并显著恢复骨生长^[44]。本研究证明阿托伐他汀和白藜芦醇均能够促进 FGFR3 的表达。Baetta 等^[45]发现阿托伐他汀通过转录后效应降低人内皮细胞中 PTX3 的产生和释放,阿托伐他汀治疗的高胆固醇血症兔动脉粥样硬化病变中 PTX3 的含量也显著降低^[45]。另一项研究表明匹伐他汀可显著降低高胆固醇血症患者血浆中 PTX3 水平^[46]。这与本研究结果相同,阿托伐他汀能够显著降低 PTX3 的转录水平,但白藜芦醇并不影响 PTX3 的表达。有研究表明 FABP4 与肾功能障碍、肥胖和高甘油三酯血症有明显的独立相关性,在接受他汀类药物治疗的心血管疾病高危的 2 型糖尿病血脂异常患者中,FABP5 与低 HDLC 水平有明显的独立相关性^[47]。在人 THP-1 细胞中,阿托伐他汀可以阻止 ox-LDL 引起的 CD68 和 FABP4 表达的增加^[48]。还有研究表明在入子宫内皮细胞中,辛伐他汀并不诱导 FABP5 的表达^[49]。本研究锁定在内皮细胞中,阿托伐他汀和白藜芦醇均能够降低 FABP4 和 FABP5 的转录水平。

总之,本研究表明 FGFR3、SEMA4B、SEMA6A、PTX3、FABP4 和 FABP5 可能是内皮细胞中转录因子 KLF2 和 KLF4 调控血管稳态的新基因。这些新基因中,SEMA4B、SEMA6A、PTX3、FABP4 和 FABP5 属于分泌蛋白。深入研究这些基因的生物学功能有望为血管稳态失衡相关疾病,如动脉粥样硬化,提供潜在新靶点与新的疾病生物标志物。

[参考文献]

- [1] GIMBRONE JR M A, GARCÍA-CARDEÑA G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 118(4): 620-636.
- [2] XU S, ILYAS I, LITTLE P J, et al. Endothelial dysfunction in atherosclerotic cardiovascular diseases and beyond: from mechanism to pharmacotherapies[J]. *Pharmacol Rev*, 2021, 73(3): 924-967.
- [3] RAJENDRAN P, RENGARAJAN T, THANGAVEL J, et al. The vascular endothelium and human diseases[J]. *Int J Biol Sci*, 2013, 9(10): 1057-1069.
- [4] BAHEYENS N, BANDYOPADHYAY C, COON B G, et al. Endothelial fluid shear stress sensing in vascular health and disease[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(3): 821-828.
- [5] 瞿凯, 邱菊辉, 王贵学. 血管内皮细胞屏障功能的血流动力学调控及其与动脉粥样硬化的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2020, 28(1): 1-6.
QU K, QIU J H, WANG G X. Hemodynamic regulation of vascular endothelial barrier function and its relationship with atherosclerosis[J]. *Chin J Arterioscler*, 2020, 28(1): 1-6.
- [6] SWEET D R, FAN L, HSIEH P N, et al. Krüppel-like factors in vascular inflammation: mechanistic insights and therapeutic potential[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2018, 5: 6.
- [7] SIMMONS R D, KUMAR S, JO H. The role of endothelial mechanosensitive genes in atherosclerosis and omics approaches[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2016, 591: 111-131.
- [8] KUHLENCORDT P J, GYURKO R, HAN F, et al. Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice[J]. *Circulation*, 2001, 104(4): 448-454.
- [9] ZHOU G J, HAMIK A, NAYAK L, et al. Endothelial kruppel-like factor 4 protects against atherothrombosis in mice[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(12): 4727-4731.
- [10] ATKINS G B, WANG Y, MAHABELESWAR G H, et al. Hemizygous deficiency of Krüppel-like factor 2 augments experimental atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2008, 103(7): 690-693.
- [11] SANGWUNG P, ZHOU G, NAYAK L, et al. KLF2 and KLF4 control endothelial identity and vascular integrity[J]. *JCI Insight*, 2017, 2(4): e91700.
- [12] WILLIAMS D, MAHMOUD M, LIU R, et al. Stable flow-induced expression of KLK10 inhibits endothelial inflammation and atherosclerosis[J]. *Elife*, 2022, 11: e72579.
- [13] FADHIL JAAFAR A, AFRISHAM R, FADAEI R, et al. CCN3/NOV serum levels in coronary artery disease (CAD) patients and its correlation with TNF- α and IL-6[J]. *BMC Res Notes*, 2023, 16(1): 306.
- [14] SHI H, ZHANG C, PASUPULETI V, et al. CCN3 regulates macrophage foam cell formation and atherosclerosis[J]. *Am J Pathol*, 2017, 187(6): 1230-1237.
- [15] LIN Z Y, NATESAN V, SHI H, et al. A novel role of CCN3 in regulating endothelial inflammation[J]. *J Cell Commun Signal*, 2010, 4(3): 141-153.
- [16] SEN-BANERJEE S, MIR S, LIN Z Y, et al. Kruppel-like factor 2 as a novel mediator of statin effects in endothelial cells[J]. *Circulation*, 2005, 112(5): 720-726.
- [17] LIN Z, KUMAR A, SENBANERJEE S, et al. Kruppel-like factor 2 (KLF2) regulates endothelial thrombotic function[J]. *Circ Res*, 2005, 96(5): e48-e57.
- [18] ZHAO J, NATARAJAN S K, CHRONOS N, et al. Cerivastatin represses atherogenic gene expression through the induction of KLF2 via isoprenoid metabolic pathways[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2015, 20(5): 825-839.
- [19] BORING L, GOSLING J, CLEARY M, et al. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis[J]. *Nature*, 1998, 394(6696): 894-897.
- [20] DEKKER R J, VAN THIENEN J V, ROHLENA J, et al. Endothelial KLF2 links local arterial shear stress levels to the expression of vascular tone-regulating genes[J]. *Am J Pathol*, 2005, 167(2): 609-618.
- [21] BARTON M, HAUDENSCHILD C C, D'USCIO L V, et al. Endothelin ETA receptor blockade restores NO-mediated endothelial function and inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(24): 14367-14372.
- [22] OHNESORGE N, VIEMANN D, SCHMIDT N, et al. Erk5 activa-

- tion elicits a vasoprotective endothelial phenotype via induction of Kruppel-like factor 4 (KLF4) [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(34): 26199-26210.
- [23] GRACIA-SANCHO J, VILLARREAL G J R, ZHANG Y, et al. Activation of SIRT1 by resveratrol induces KLF2 expression conferring an endothelial vasoprotective phenotype [J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 85(3): 514-519.
- [24] VILLARREAL G J R, ZHANG Y, LARMAN H B, et al. Defining the regulation of KLF4 expression and its downstream transcriptional targets in vascular endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391(1): 984-989.
- [25] ZHANG Z, GUO Q, ZHAO Z, et al. DNMT3B activates FGFR3-mediated endoplasmic reticulum stress by regulating PTPN2 promoter methylation to promote the development of atherosclerosis [J]. *FASEB J*, 2023, 37(8): e23085.
- [26] ZHANG Y, LI D, JIA Z, et al. Zhizi-Chuanxiong herb pair alleviates atherosclerosis progression in ApoE^{-/-} mice by promoting the methylation of FGFR3 to inhibit MAPK/ERK-mediated apoptosis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 319(P11): 117188.
- [27] GONG Z, SHU Z, ZHOU Y, et al. KLF2 regulates stemness of human mesenchymal stem cells by targeting FGFR3 [J]. *Biotech Histochem*, 2023, 98(7): 447-455.
- [28] CHOI D, PARK E, JUNG E, et al. ORAI1 activates proliferation of lymphatic endothelial cells in response to laminar flow through Kruppel-Like factors 2 and 4 [J]. *Circ Res*, 2017, 120(9): 1426-1439.
- [29] CORÀ D, ASTANINA E, GIRAUDO E, et al. Semaphorins in cardiovascular medicine [J]. *Trends Mol Med*, 2014, 20(10): 589-598.
- [30] WU J H, ZHOU Y F, HONG C D, et al. Semaphorin-3a protects against neointimal hyperplasia after vascular injury [J]. *EBioMedicine*, 2019, 39: 95-108.
- [31] WU J H, LI Y, ZHOU Y F, et al. Semaphorin-3E attenuates neointimal formation via suppressing VSMCs migration and proliferation [J]. *Cardiovasc Res*, 2017, 113(14): 1763-1775.
- [32] ZHU L, STALKER T J, FONG K P, et al. Disruption of SEMA4D ameliorates platelet hypersensitivity in dyslipidemia and confers protection against the development of atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(7): 1039-1045.
- [33] SEGARRA M, OHNUKI H, MARIC D, et al. Semaphorin 6a regulates angiogenesis by modulating VEGF signaling [J]. *Blood*, 2012, 120(19): 4104-4115.
- [34] HU S, LIU Y, YOU T, et al. Vascular semaphorin 7a upregulation by disturbed flow promotes atherosclerosis through endothelial $\beta 1$ integrin [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(2): 335-343.
- [35] NORATA G D, MARCHESI P, PULAKAZHI VENU V K, et al. Deficiency of the long pentraxin PTX3 promotes vascular inflammation and atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2009, 120(8): 699-708.
- [36] JENNY N S, BLUMENTHAL R S, KRONMAL R A, et al. Associations of pentraxin 3 with cardiovascular disease: the multi-ethnic study of atherosclerosis [J]. *J Thromb Haemost*, 2014, 12(6): 999-1005.
- [37] QIU L, XU R, WANG S, et al. Honokiol ameliorates endothelial dysfunction through suppression of PTX3 expression, a key mediator of IKK/I κ B/NF- κ B, in atherosclerotic cell model [J]. *Exp Mol Med*, 2015, 47(7): e171.
- [38] FURUHASHI M, TUNCMAN G, GÖRGÜN C Z, et al. Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2 [J]. *Nature*, 2007, 447(7147): 959-965.
- [39] PEETERS W, DE KLEIJN D P, VINK A, et al. Adipocyte fatty acid binding protein in atherosclerotic plaques is associated with local vulnerability and is predictive for the occurrence of adverse cardiovascular events [J]. *Eur Heart J*, 2011, 32(14): 1758-1768.
- [40] BABAEV V R, RUNNER R P, FAN D P, et al. Macrophage Mall1 deficiency suppresses atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-null mice by activating peroxisome proliferator-activated receptor- γ -regulated genes [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(6): 1283-1290.
- [41] BOORD J B, MAEDA K, MAKOWSKI L, et al. Combined adipocyte-macrophage fatty acid-binding protein deficiency improves metabolism, atherosclerosis, and survival in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Circulation*, 2004, 110(11): 1492-1498.
- [42] MAEDA K, CAO H M, KONO K, et al. Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins control integrated metabolic responses in obesity and diabetes [J]. *Cell Metab*, 2005, 1(2): 107-119.
- [43] KANNAN-THULASIRAMAN P, SEACHRIST D D, MAHABLESHWAR G H, et al. Fatty acid-binding protein 5 and PPAR β /delta are critical mediators of epidermal growth factor receptor-induced carcinoma cell growth [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(25): 19106-19115.
- [44] YAMASHITA A, MORIOKA M, KISHI H, et al. Statin treatment rescues FGFR3 skeletal dysplasia phenotypes [J]. *Nature*, 2014, 513(7519): 507-511.
- [45] BAETTA R, LENTO S, GHILARDI S, et al. Atorvastatin reduces long pentraxin 3 expression in vascular cells by inhibiting protein geranylgeranylation [J]. *Vascul Pharmacol*, 2015, 67-69: 38-47.
- [46] OHBAYASHI H, MIYAZAWA C, MIYAMOTO K, et al. Pitavastatin improves plasma pentraxin 3 and arterial stiffness in atherosclerotic patients with hypercholesterolemia [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2009, 16(4): 490-500.
- [47] FURUHASHI M, SAKUMA I, MORIMOTO T, et al. Independent and distinct associations of FABP4 and FABP5 with metabolic parameters in type 2 diabetes mellitus [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2020, 11: 575557.
- [48] LLAVERIAS G, NOÉ V, PEÑUELAS S, et al. Atorvastatin reduces CD68, FABP4, and HBP expression in oxLDL-treated human macrophages [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 318(1): 265-274.
- [49] SOKALSKA A, ANDERSON M, VILLANUEVA J, et al. Effects of simvastatin on retinoic acid system in primary human endometrial stromal cells and in a chimeric model of human endometriosis [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98(3): E463-E471.