

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2005)13-06-0698-03

内皮素 1 对人血管内皮细胞基因表达谱的影响

范秀珍¹, 王婧婧², 陈 融², 李 莉², 胡维诚²

(山东大学 1. 护理学院, 2. 医学院病理生理学教研室, 山东省济南市 250012)

[关键词] 病理学与病理生理学; 血管内皮细胞; 基因表达谱; 内皮素 1; 基因芯片

[摘要] 目的 探讨内皮素 1 对人血管内皮细胞基因表达谱的影响, 进一步阐明内皮素 1 导致内皮细胞功能异常的分子机制。方法 培养人血管内皮细胞, 提取总 RNA, 采用人内皮细胞生物学功能基因芯片(含 96 个基因), 检测内皮素 1 作用 12 h 后人血管内皮细胞主要功能基因表达谱的变化。结果 与未用内皮素处理的对照组相比, 人血管内皮细胞在内皮素 1 作用 12 h 后, 共有 53 个基因出现差异表达, 其中抗凝血和抗氧化基因等 22 个基因表达下调, 促凝和炎症因子基因等 31 个基因表达上调。结论 内皮素通过诱导人血管内皮细胞凝血和纤溶系统基因表达失衡、下调抗氧化酶基因表达和上调促炎因子基因表达, 损伤人血管内皮细胞, 造成其生物学功能异常。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Endothelin-1 on the Gene Expression of Human Vascular Endothelial Cells

FAN Xiu-Zhen¹, WANG Jing-Jing², CHEN Rong², LI Li², and HU Wei-Cheng²

(1. School of Nursing, 2. Department of Pathophysiology, School of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, China)

[KEY WORDS] Gene Expression; Vascular Endothelial Cells; Endothelin-1; Gene Chip

[ABSTRACT] **Aim** To explore the influence of endothelin-1 (ET-1) on the gene expression of human vascular endothelial cells and the molecular mechanism of vascular endothelial cells injury induced by ET-1. **Methods** ECV304 cells were cultured and the total RNA was extracted. The GEArray Q Series Human Endothelial Cell Biology Gene Array was used to analyze the differential expression of genes associated with the major functions of endothelial cells 12 hours after treated with ET-1. **Results** Compared with control group, expression of 53 genes was differentiated at the time point of 12-hour in endothelin group. Among them, expression of 22 genes including mainly antithrombotic and antioxidant genes was downregulated and that of 31 genes including mainly prothrombotic and inflammatory factor genes was upregulated. **Conclusions** ET-1 could injure human vascular endothelial cells by downregulating antithrombotic and antioxidant genes and upregulating prothrombotic and inflammatory factors genes

大量临床和实验研究发现动脉内皮损伤后, 内皮细胞释放内皮素(endothelin)增多, 增多的内皮素可引起血管平滑肌细胞收缩和增殖^[1,2]。但是目前尚不明确血液中增多的内皮素反过来是否会对血管内皮细胞造成进一步的损伤, 本文采用基因芯片技术检测内皮素对培养的人脐静脉内皮细胞(ECV304)基因表达谱的影响, 以揭示内皮素影响内皮细胞功能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

血管内皮细胞选用经转化的人脐静脉内皮细胞 ECV304 购于上海细胞生物研究所, 以含 10% 胎牛

血清的 DMEM 培养基培养, 传至第 2~3 代细胞, 以 $4 \times 10^7/L$ 的密度分别接种于 2 个 50 mL 培养瓶中, 每瓶 4 mL, 待细胞完全贴壁后, 换成无血清培养基, 使细胞生长阻滞于 G1 期, 于 6 h 后换回含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 其中一瓶加入内皮素 1 至终浓度为 $0.5 \mu\text{mol/L}$, 继续培养 12 h, 收获细胞以备用, 另设一瓶不加内皮素 1 作为阴性对照。

1.2 总 RNA 提取及纯度检测

内皮细胞结束诱导培养后, 各瓶以每 10 cm^2 培养面积加入 1 mL TRIZOL 试剂的比例裂解细胞, 用氯仿进行两相分离, 异丙醇沉淀 RNA, 75% 乙醇清洗沉淀 2 次, 置于超净台中干燥 5 min, 无 RNA 酶水重新溶解 RNA 沉淀, 紫外和电泳分析 RNA 质量合格。

1.3 基因芯片选择

选用含 96 个内皮功能基因的人内皮细胞生物学功能基因芯片(HS-036N), 由 SuperArray 公司提供。

1.4 探针合成及芯片杂交

逆转录生物素标记 cDNA 探针, 94°C 孵育 2 min

[收稿日期] 2005-08-06

[修回日期] 2005-11-15

[基金项目] 教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助(20030422067); 山东省自然科学基金(Y2004C32)

[作者简介] 范秀珍, 硕士研究生, 副教授, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制。通讯作者胡维诚, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制。王婧婧, 博士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制。

变性,然后溶解在预热至 60℃的 GEAhyb 杂交液中待用,芯片加热至 100℃,5 min 后冷却,与探针置于杂交管中 6 r/min 杂交过夜,经洗膜、膜封闭后加链亲和素偶联的碱性磷酸酶,洗膜后加入化学发光底物,用 X-射线胶片曝光。

1.5 图像采集和数据分析

基因芯片实验结果以 ScanAlyze 软件将灰度 TIFF 格式图片的点阵转化为数字型数据,存为 Microsoft Excel 文件。使用芯片配套软件 GEArray Analyzer 对原始数据进行去背景计算以及比较运算。以基因表达比值 > 2.0 作为上调标准,≥0 和 < 0.5 作为下调标准。

2 结果

基因芯片实验结果如图 1(Figure 1)、表 1(Table 1)和表 2(Table 2)所示:0.5 μmol/L 内皮素 1 作用 12 h 后,与对照组相比,共有 53 条基因出现差异表达,其中 22 条基因表达下调,31 条基因表达上调。表达下调的有抗凝血功能基因,如组织型纤溶酶原激活物(tissue-type plasminogen activator, t-PA)、尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase type plasminogen activator, uPA)、组织因子途径抑制物(tissue factor pathway inhibitor, TFPI1)和 TFPI2;抗氧化功能基因,如超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)。表达上调的有促凝血基因,如凝血酶活化纤溶抑制物(thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, TAFI)和炎症因子基因,如基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、白细胞介素 3(interleukin-3, IL-3)、环氧合酶(cyclooxygenase-2, Cox-2)基因等。另外,血管新生基因、促凋亡基因和抑凋亡基因表达有下调,也有上调;血管张力基因表达上调。

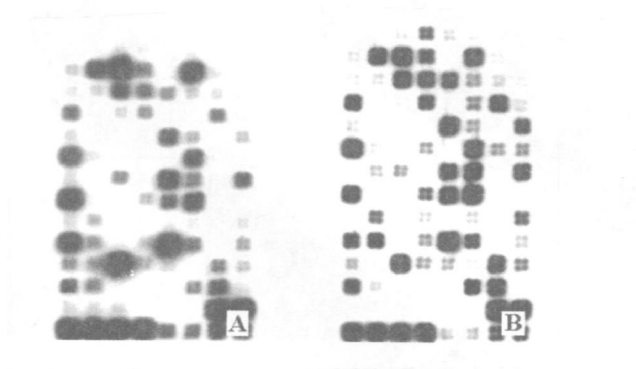


图 1. 内皮素 1 作用 12 h 与正常内皮细胞 V304 细胞基因表达谱的比较 A 为对照组, B 为内皮素组

Figure 1. Comparison of genes expression in ECV304 treated with ET-1 for 12 hours with that in normal ECV304

表 1. 内皮素 1 作用 12 h 内皮细胞 V304 表达下调基因

Table 1. Genes downregulated of ECV304 cells treated with ET-1 for 12 h

基因功能	分类	基因库编号	基因名称	基因表达比值 (内皮素 1 组/对照组)
血管张力	血管紧张素系统	NM_152831	ACE	5.335E-2
		NM_021804	ACE2	2.708E-1
	前列环素系统	NM_003706	PLA2G4C	0.000E+0
	超氧离子系统	NM_000454	Cu/ZnSOD	2.941E-1
血管新生	生长因子	NM_000379	XDH	1.200E-1
		NM_002253	FLK1/VEGFR2	4.576E-3
	基质金属蛋白酶	NM_002421	胶原酶 1	0.000E+0
内皮细胞活化	粘附分子表达	NM_002538	OCIN	4.996E-3
		NM_000655	L 选择素	1.918E-3
		NM_001078	VCAM-1	0.000E+0
	抗凝血	NM_000930	t-PA	3.763E-2
凋亡		NM_002658	uPA	1.099E-1
		NM_006287	TFPI	0.000E+0
		NM_006528	TFPI2	1.174E-2
		NM_000576	IL1B	4.807E-2
	促凋亡	NM_000880	IL-7	9.660E-2
		NM_003183	TACE/CD156b	2.850E-1
		NM_003805	CRADD	2.880E-1
	抑凋亡	NM_000043	Fas/Apo1/CD95	1.918E-1
		NM_003810	TRAIL	9.170E-4
		NM_000639	Fas 配体	0.000E+0
		NM_004049	BFL1	3.768E

3 讨论

内皮素是作用最强的血管收缩剂之一,它与血管内皮细胞或平滑肌细胞上的内皮素受体结合,通过 IP₃、Ca²⁺-钙调蛋白激酶途径作用于多个转录因子,影响基因表达。本研究采用细胞培养技术,并用内皮素 1 处理人血管内皮细胞,应用人内皮细胞生物学功能基因芯片,分析对照组和内皮素组人血管内皮细胞基因表达谱的差异,反映内皮素 1 对人血管内皮细胞基因表达的影响。

3.1 内皮素影响血管内皮细胞凝血和纤溶功能

纤溶酶由无活性的纤溶酶原经纤溶酶原激活物(plasminogen activator, PA)活化而来。PA 有两种形式:tPA 和 uPA。tPA 介导纤溶酶原活化并分解循环中的纤维蛋白,uPA 则主要负责外周的蛋白水解。PA 的抑制物为纤溶酶原激活物抑制物 1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1),当两者失衡,无论 PA 降低,还是 PAI-1 增高均可引起纤溶功能低下,与血栓形成和动脉粥样硬化的发展密切相关^[4]。本研究

表 2. 内皮素作用 12 h 内皮细胞 V304 表达上调基因

Table 2 Genes upregulated of ECV304 cells treated with ET-1 for 12 h

基因功能	分类	基因库编号	基因名称	基因表达比值 (内皮素 1 组/对照组)
血管张力	血管紧张素系统	NM_000029	血管紧张素原	9.323E+ 0
		NM_031850	AT1	5.474E+ 1
	一氧化氮系统	NM_000625	NOS	4.656E+ 0
		NM_000603	eNOS	1.586E+ 1
	前列环素系统	NM_000698	ALOX5	2.879E+ 0
		NM_000961	PTGIS	2.478E+ 0
		NM_000963	Cox-2	9.266E+ 0
	内皮素系统	NM_001955	内皮素 1	2.778E+ 0
		NM_001956	内皮素 2	3.636E+ 0
血管新生	粘附分子表达	NM_002205	整合素 $\alpha 5$	2.658E+ 0
		NM_000442	CD31	2.160E+ 0
	生长因子及受体	NM_001146	血管形成素 1	N/A
		NM_002019	VEGFR1	4.248E+ 2
		NM_002020	VEGFR3	5.650E+ 0
		NM_003376	VEGF	2.883E+ 0
	基质金属蛋白酶	NM_004995	MT-MMP	2.874E+ 0
		NM_004530	MMP-2	2.166E+ 0
	生长抑制物	NM_001275	CGA	2.648E+ 0
内皮细胞活化	粘附分子表达	NM_002162	ICAM3	1.516E+ 1
		NM_002205	Integrin $\alpha 5$	2.658E+ 0
		NM_000442	CD31	2.160E+ 0
		NM_000450	ELAM-1/E-selectin	2.219E+ 0
	促凝血	NM_001872	TAFI	5.109E+ 0
		NM_000758	GM-CSF	2.628E+ 0
	细胞因子产生	NM_000759	G-CSF	4.665E+ 1
		NM_002996	SCYD1	4.323E+ 1
		NM_002985	SCYA5/RANTES	3.009E+ 0
		L15344	IL-14	8.817E+ 0
凋亡	抑制凋亡	NM_172175	IL-15	7.589E+ 1
		NM_000588	IL-3	4.988E+ 0
		NM_003841	TRAIL-R3/DR1	2.955E+ 0
	促凋亡	NM_003840	TRAIL-R4/DR2	2.589E+ 0
		NM_001230	MCH4/FLICE2	3.966E+ 1

整合素 $\alpha 5$ 和 CD31 兼有血管新生和内皮细胞活化功能,在表内重复。

结果显示:内皮素组 tPA 和 uPA 基因表达下调,PAI-1 基因表达数值增加(但未达到正常对照组的 2 倍),因此,tPA/PAI 比值降低,内皮细胞处于纤溶低下状态。TAFI 是肝脏合成的羧肽酶,可被凝血酶—凝血酶调节蛋白复合物激活,进一步激活纤维蛋白的羧末端,使纤维蛋白结合 tPA 的能力降低而导致纤溶低下。内皮素组 TAFI 基因表达上调,说明内皮素 1 可使血管内皮细胞处于纤溶低下状态。

体内形成血栓的关键在于组织因子凝血途径,组织因子(tissue factor,TF)是该途径的启动因子。TFPI 是 TF 途径的天然抑制物,TFPI 通过与因子 Ca^{2+} 形成四聚体可抑制组织因子 α 复合物^[5],从而抑制凝血过程,TF 途径的活性水平,取决于 TF/TFPI

的对比。内皮素组 TFPI、TFPI2 基因表达下调,说明内皮素 1 可促进血管内皮细胞的凝血功能,使其处于高凝状态。

3.2 内皮素对血管内皮细胞抗氧化功能的影响

氧自由基生成和清除之间的失衡与血管内皮功能异常密切相关^[6]。SOD 是体内重要的抗氧化酶。它可使超氧离子转变为过氧化氢,后者被过氧化氢酶分解生成水。内皮素 1 作用 12 h 后 SOD 基因表达下调说明内皮素 1 可致人血管内皮细胞清除氧自由基的能力下降。

3.3 内皮素对血管内皮细胞释放炎症因子的影响

内皮素组促炎因子基因如 MMP-2、IL-3 和 Cox-2 基因表达上调,说明内皮素 1 可诱导内皮细胞炎症因子释放增加^[8],诱导血管内皮的炎症反应。

内皮素 1 对血管新生基因、促凋亡基因和抑凋亡基因表达的作用有上调,也有下调,不能明确判定内皮素 1 对血管内皮细胞新生或凋亡的作用。另外,由于干预因素是具有血管张力调节作用的内皮素,所以血管张力基因的表达差异是否引发血管张力的变化亦难以判断。综上所述,内皮素 1 可损伤血管内皮细胞,作用机制可能通过诱导凝血和纤溶系统基因表达失衡、下调抗氧化基因表达,及上调炎症因子基因表达造成血管内皮细胞凝血和纤溶系统失衡、抗氧化功能下降及炎症反应等。因此,拮抗内皮素 1 可保护血管内皮细胞,为药物研究领域开发内皮素 1 拮抗剂用于临床防治动脉粥样硬化乃至心脑血管疾病提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] Mawatari K, Kakue S, Harada N, Ohnishi T, Niwa Y, Okada K, et al. Endothelin-1 levels are increased in atherosclerotic lesions of the thoracic of hypercholesterolemic hamsters. *Atherosclerosis*, 2004, **175** (2): 203-212
- [2] Cheng Z J, Vapaatalo H, Mervaala E. Angiotensin II and vascular inflammation. *Med Sci Monit*, 2005, **11** (6): RA194-205
- [3] 韩英,谢良地,许昌声,王华军.阿魏酸钠对血小板源生长因子和内皮素 1 诱导的血管迁移的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (6): 659-661
- [4] Chen PR, Lee CC, Chang H, Tsai CE. Sesamol regulates plasminogen activator gene expression in cultured endothelial cell: a potential effect on the fibrinolytic system. *J Nutr Biochem*, 2005, **16** (1): 59-64
- [5] Levi M, Keller TT, van Gorp E, ten Cate H. Infection and inflammation and the coagulation system. *Cardiovas Res*, 2003, **60** (1): 26-39
- [6] Pratico D. Antioxidants and endothelium protection. *Atherosclerosis*, 2005, **181**: 215-224
- [7] Peluffo H, Acarin L, Faiz M, Castellano B, Gonzalez B. Cu/Zn superoxide dismutase expression in the postnatal rat brain following an excitotoxic injury. *J Neuroinf*, 2005, **2** (1): 12-25
- [8] 顾菲菲,高炜,蒋捷,卜定方,柳景华.基因芯片在同型半胱氨酸诱导动脉粥样硬化基因表达谱变化中的应用. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (4): 433-437

(此文编辑 胡必利)