

人血管内皮细胞氧化低密度脂蛋白基因表达谱分析

刘水逸¹, 李曙波¹, 郑芳², 武军驻¹

(武汉大学 1. 医学院生物化学与分子生物学系, 2. 附属中南医院检验科, 湖北省武汉市 430071)

[关键词] 生物化学; 基因芯片; 低密度脂蛋白; 细胞株, ECV304; 髓过氧化物酶; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 检测内皮细胞中与低密度脂蛋白氧化可能相关的信号传导相关蛋白基因, 期望获得阐明氧化机制的有价值的线索。方法 利用低密度脂蛋白作用人血管内皮细胞系 ECV304, 通过基因芯片分析人信号传导相关蛋白的表达谱。结果 在被检测的 1 990 个基因中, 52 个基因的表达变化超过了 2 倍以上, 其中 23 个基因表达增加, 29 个基因表达减少。在表达发生改变的基因中, 有 7 个已在最新的报道中认为可能和动脉粥样硬化相关。结论 我们的发现可能给内皮细胞氧化低密度脂蛋白的机制的揭示提供全新的思路。

[中图分类号] Q5

[文献标识码] A

Expression Profiling Analysis of ECV304 Endothelial Cells Induced by Low Density Lipoprotein

LIU Shu-Yi¹, LI Shu-Bo¹, ZHENG Fang², and WU Jun-Zhu¹

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine Sciences; 2. Clinical Laboratory, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China)

[KEY WORDS] cDNA array; Lipoprotein, LDL; ECV304; Myeloperoxidase; Atherosclerosis

[ABSTRACT] Aim To determine the genes involved in the mechanisms of LDL oxidation mediated by endothelial cells.

Methods Microarray analysis on human signal transduction associated proteins was applied to profile changes in gene expression of human ECV304 endothelial cells induced by low density lipoprotein. Results In 1 990 genes detected, 52 genes were identified to be > 2-fold difference in expression, among which 23 genes with elevated expression and 29 genes with reduced expression. Some of these 52 genes encoding proteins have been determined to be correlated with atherosclerosis. Conclusion

Those genes expressed differently may provide new insights into the possible mechanisms of low density lipoprotein oxidation mediated by endothelial cells.

研究表明,任何在动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)斑块中发现的细胞如单核-巨噬细胞、血管内皮细胞、平滑肌细胞等均可氧化低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)^[1],并与细胞髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)等产生的氧化剂有关。而且 MPO 及其生成物次氯酸被证实参与了体内 LDL 氧化修饰,在人体 As 斑块处检测到具有免疫催化活性的 MPO 的存在。我们亦发现细胞内 ox-LDL 的量与细胞内及分泌的 MPO 活性呈正相关^[2],为明确内皮细胞结合 LDL 之后信号如何传导至胞内并启动氧化,促使 MPO 活性增强并被分泌至胞外发挥作用,我们试图利用基因芯片对细胞与 LDL 作用后信号传导蛋白基因的表达情况作一深入研究。根据对这些基因表达情况改变的所作的分析和研究,我们希

望发现一些在 LDL 氧化中参与信号传导的蛋白并寻找到内皮细胞氧化 LDL 的可能途径,为抗氧化治疗提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 试剂

RPMTI640 培养基、新生牛血清(new calf serum, NCS)和 TRIzol 试剂购自 Gibco 公司,胰蛋白酶(trypsin)购自 Amresco 公司, Oligotex mRNA midi 试剂盒购自 Qiagen 公司,人新鲜血浆购自武汉市血液中心;其余试剂为国产或进口分析纯。人血管内皮细胞系 ECV304 由武汉大学医学院病理与病理生理系馈赠。

1.2 血浆低密度脂蛋白的分离

参照王淳本等^[3]方法,采用健康供血者血浆,两步超速离心法快速分离人血浆 LDL。PBS 充分透析,除去溴化钠,后经 0.22 μm 滤膜过滤除菌 4℃ 保存备用。Bradford 法检测蛋白质浓度。

1.3 人血管内皮细胞系 ECV304 的培养

按贴壁法常规培养细胞。用含 10% NCS 的

[收稿日期] 2005-08-01 [修回日期] 2006-07-09

[基金项目] 国家自然科学基金(3020010)

[作者简介] 刘水逸, 硕士, 研究方向为动脉粥样硬化的分子机制。通讯作者武军驻, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化分子的机制, E-mail 为 wujzh46@yahoo.com.cn。李曙波, 硕士, 研究方向为动脉粥样硬化的分子机制。

RPMI1640 培养基(含青霉素和链霉素)置 37℃、5% CO₂ 条件下培养,待瓶底细胞长满 90% 左右传代,传代时用含 0.25% 胰蛋白酶+ 0.02% EDTA 消化。

1.4 细胞对低密度脂蛋白的氧化修饰

选用生长良好的细胞,无血清培养基 37℃ 温育 2 h,后用含 10% 新生牛血清、200 mg/L LDL 及 1 μmol/L Cu²⁺ 的 RPMI 1640 培养基培养,20 h 后收集细胞备用^[4]。未经 LDL 处理的细胞作为对照。

1.5 细胞内总 RNA 的提取及 mRNA 分离

迅速加 Trizol 试剂于培养细胞中,高速离心 3~5 min,取上清,加入 200 μL 氯仿,充分混匀,4℃ 12 kr/min 离心 15 min。取上清,加入 500 μL 异丙醇,−80℃ 放置片刻,12 kr/min 4℃ 离心 10 min。弃去上清,沉淀用 75% 乙醇洗涤。高速离心后弃乙醇,沉淀用适量水溶解,在含甲醛的琼脂糖凝胶中电泳检测,测 OD 值。参照试剂盒说明书用 Qiagen 公司的 Oligotex mRNA midi 试剂盒分离 mRNA。所用枪头、EP 管及器械均提前在 DEPC 水中浸泡过夜,灭菌后烘干并严格戴手套操作。

1.6 人信号 cDNA 基因芯片的制备

人信号传导相关蛋白 cDNA 由上海中科开瑞公司提供。自动点样器将 1 990 个 cDNA 样品、3 980 个点样至尼龙膜上,经紫外照射后 cDNAs 与尼龙膜发生交联。其中有 8 个“看家基因”作为阳性对照,包括 α-肌动蛋白、3-磷酸甘油醛脱氢酶、次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶、转录 23 kDa 蛋白的 H. sapiens mRNA、ubiquitin c、磷酸酯酶 A2、羧基 ubiquitin 和末端酯酶 LI。pTriplEx2 DNA 和 puc18 质粒 DNA 作为阴性对照。

1.7 预杂交

将点制好的 8 cm × 12 cm 的尼龙膜浸泡于 6 × SSC 溶液中 2 min 以上,加入 40 mL 预杂交液及变性的鱼精 DNA(100 mg/L) 600 μL。将膜取出,放入杂交管中,置杂交炉中 68℃ 预杂交 3 h 以上。

1.8 逆转录聚合酶链反应和探针标记

取 mRNA 1 μg,加入随机引物(8 个碱基) 3 μL,用不含 RNA 酶的水定溶至 20 μL。70℃ 水浴 3 min 后冰冷,依次加入 M-MLV(5 × buffer) 10 μL、RNA 酶抑制剂 1 μL、TP(A⁻) 1 μL、dATP 1 μL、M-MLV 酶 2 μL 和 ³³P-dATP 15 μL,混匀,37℃ 水浴 30 min 后,再 42℃ 水浴 1.5 h,水浴结束后加 1.5 μL 10 mol/L 氢氧化钠,沸水浴 5~7 min,取出冰上冷却 3 min 后,依次加入 0.9 μL 冰醋酸和 10 μL 醋酸钠,混匀后再加入 2.5 倍体积无水乙醇,彻底混匀后 15 kr/min 离心 10 min。取上清至另一 EP 管中,测量沉淀管和上清管

中的 Counts。向沉淀中加入 40 μL 无 RNA 酶的水溶解,放置待用。

1.9 杂交和洗膜

从杂交炉中取出膜,弃预杂交液,加杂交液 6 mL 和变性鱼精 DNA(100 mg/L) 80 μL,加入 40 μL 标记探针。入杂交炉中 68℃ 杂交 24 h。取出杂交膜,置 500 mL 洗液 1 中,37℃ 水浴中轻晃 5 min。转移至 500 mL 洗液 2 中,37℃ 水浴振荡 15 min。转移至 500 mL 洗液 3 中,37℃ 水浴振荡 1 h。换 500 mL 洗液 3,62℃ 水浴振荡 1 h。清水漂洗数次,用草纸吸干膜。测量膜上残留 Counts,根据 Counts 确定压屏时间。

1.10 基因芯片扫描和荧光信号的检测分析

FLA-3 000A 荧光成像分析仪对芯片进行扫描,分析比较处理组与对照组荧光信号差异,得出定性和定量结果。

2 结果

将 200 mg/L LDL 与 ECV304 细胞温育 20 h^[5],Trizol 试剂提取细胞总 RNA,经分离提纯得到 mRNA,逆转录成 cDNA 同时进行探针标记。杂交后扫描芯片,得到的结果见表 1,可见与对照组相比,ECV304 与 LDL 温育 20 h 后,有 52 个基因的表达变化超过 2 倍以上,其中 23 个基因表达增加,29 个表达减少。从基因芯片扫描图(图 1)和样品对散点图(图 2)我们亦能发现与 LDL 一起温育后处理组细胞和对照组细胞基因表达存在差异。

3 讨论

在内皮细胞 52 个表达发生异常改变的基因中,23 个基因表达增高,29 个基因表达降低。其中,有 7 个基因跟 As 发生有关,表达增高的有 MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3 和 chemokine (C-C motif) receptor 6,表达降低的有胶原纤维(α₁)、肌型肉毒碱棕榈酰转移酶 1(carnitine palmitoyltransferase-1, muscle, CPT-1)、phospholipase A2 group V、protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor alpha 和 histidine triad nucleotide-binding protein。其中 CPT-1 参与了线粒体肉毒碱穿梭机制,介导长链脂肪酸转运通过线粒体内膜,从而调节脂质代谢。研究发现在骨骼肌细胞中,过氧化体增殖物激活型受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) 通过激活 CPT-1 增加线粒体游离脂肪酸的摄入,进而促进脂肪酸的氧化^[5]。由此可见当 CPT-1 表达降低,线粒体摄取游离脂肪酸减少,表现为脂肪酸在胞内堆积

表 1. 经 LDL 处理的血管内皮细胞表达改变的基因

基因库代码	基因名称	克隆代码	比率(处/ 正)
X99585	SMT3 (suppressor of mif two 3, yeast) homolog 2	ADAAFG11	2. 92496092593912
D29958	KIAA0116 蛋白	ADBAPC11	0. 443209692788006
X03963	Ⅲ型胶原 α1	ADBABB10	0. 489766788373425
M80359	AP/ 亲微管调节激酶 3	ADBAD08	2. 37837654500943
AW273780	微原纤维相关蛋白 3	ADBBNH11	0. 422339856954874
AJ010841	thioredoxin like 2	ADBBOF06	0. 275642699642604
M31470	ras 样蛋白	ADBBOG12	0. 474717974957549
U62317	肌型肉毒碱棕榈酰转移酶 1	02B03	0. 40118572492565
X15183	热休克蛋白 90-1α	02B10	0. 468492689193726
AF047433	整合子 B4 结合蛋白	03D04	0. 475125474865943
AW410423	ribosomal protein S2	ADBBIC06	3. 82656989704044
AF135187	myxovirus (influenza) resistance 1, homolog of murine (interferon inducible protein p78)	ADBCLF04	0. 499091837462657
U03090	phospholipase A2, group V	ADCAGG12	0. 355867476226724
S76965	蛋白激酶抑制剂 α(cAMP 依赖型)	ADCAGH10	0. 255939475580188
AI346507	ESTs, Moderately similar to 2109260A B cell growth factor [H. sapiens]	BMFAOC04	2. 31769555452497
BE274335	stathmin 1/oncoprotein 18	ADBCTD02	2. 22816697199485
AF038633	MpV17 transgene, murine homolog, glomerulosclerosis	ADCAJG08	0. 440436546128625
U11050	NIMA (never in mitosis gene a) 激酶 2	BMFARA07	0. 480391858199011
AW575605	chemokine (C-C motif) 受体 6	CBCBQA01	2. 10253182949255
NM_014232	囊泡相关膜蛋白 2 (synaptobrevin 2)	ADBDE09	0. 49778487876659
AF061739	protein associated with PRK1	ADCATE03	0. 421667902042129
X82068	glutamate receptor, ionotropic, AMPA 3	ADCABA05	2. 34182636490372
U15979	delta like homolog (Drosophila)	ADCAVA01	2. 228262512152
U44103	RAB9, member RAs oncogene family	CBFAKA09	2. 66357079431216
L77213	phosphomevalonate kinase	CBFALB09	2. 95725780619413
AF034790	translocase of inner mitochondrial membrane 17 (yeast) homolog B	CBFAXF09	3. 22335843913253
D83492	EphB6	GLAAD05	0. 430120582970146
U07857	signal recognition particle 14kD (homologous Alu RNA-binding protein)	CDAAOA11	0. 419492476049702
AL031230	glycosylphosphatidylinositol specific phospholipase D1	GLCABG07	0. 167377001908513
AB011170	B cell RAG associated protein	GLCBLE01	2. 24073527280719
NM_006420	brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 2	GKCFEB07	2. 70057665621062
AB000509	TNF receptor-associated factor 5	GKCCUE01	0. 469245182379042
NM_001882	corticotropin releasing hormone-binding protein	GLCCWE07	0. 384746609525013
K02276	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog	GLCDHF09	0. 243251081842102
AC005192	interferon-related developmental regulator 1	GLCDVB11	0. 486877214095716
U91932	adaptor-related protein complex 3, sigma 1 subunit	HTBABB05	3. 80036608049052
NM_013241	FH1/FH2 domain containing protein	HTBAVG03	0. 341112534246647
U51004	histidine triad nucleotide-binding protein	HTBACA07	0. 43071850335227
AF112200	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 7 (18 kD, B18)	HTBAZB01	2. 18752759739481
NM_004105	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	HTBCEG10	2. 25138560273607
AL096723	arsenate resistance protein ARS2	HTBBBG09	2. 24952346745225
AL117505	ATPase, Ca ⁺ + transporting, cardiac muscle, slow twitch 2	HTBBDD09	2. 14214978232954
AF038966	secretory carrier membrane protein 1	HTCANF09	0. 4922887571566
AF049895	calbindin 1, (28 kD)	NPCAVC06	2. 45521070867129
AA521128	transcription elongation factor B (S α , polypeptide 1 (15 kD, elongin C)	NPCBBH12	0. 499724642592542
AA046743	ESTs, Weakly similar to RHG6_HUMAN RHO-GTPase-ACTIVATING PROTEIN 6 [H. sapiens]	NPAATG0	4. 435951380002393
AW957224	ESTs, Moderately similar to A47582 B-cell growth factor precursor [H. sapiens]	HTCBEC07	2. 07499152831453
M25393	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2	NPCBGB11	3. 18660697034961
U12134	RAD52 (S. cerevisiae) homolog	MDSBHA01	3. 23517802846468
W27031	PI 3-kinase-related kinase SMG-1	MDSBHA10	2. 53313864550395
AL034417	Gene 33/Mig-6	NPCBNB01	0. 299691938939769
AF113125	E-1 enzyme	CBFAKF01	0. 032161450201855

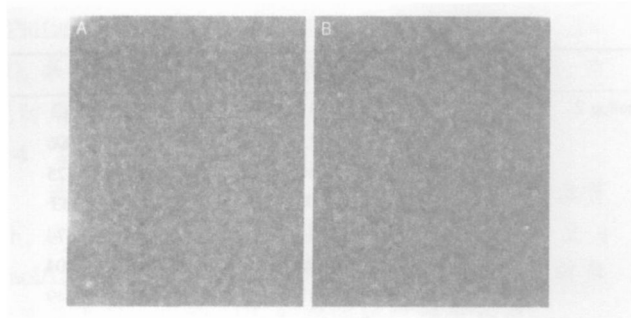


图 1. 细胞系 ECV304 基因芯片扫描图 A 为正常内皮细胞, B 为 LDL 处理的内皮细胞

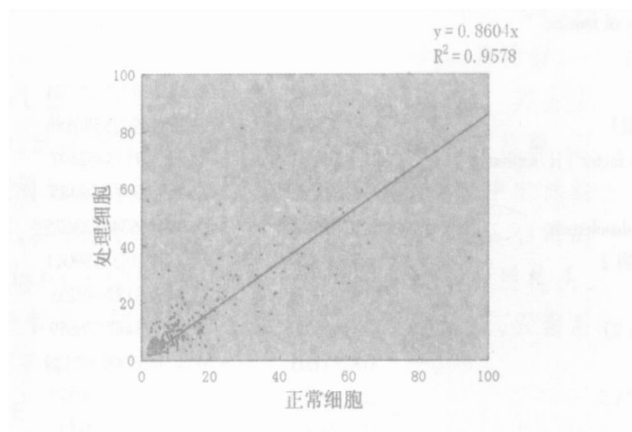


图 2. 细胞系 ECV304 处理组和对照组基因芯片散点图

并被氧化成过氧化脂质, 细胞脂质过氧化水平影响其氧化 LDL 能力。

细胞趋化因子受体是 G 蛋白偶联受体超家族成员, 根据对趋化因子特异性的不同, 细胞趋化因子受体可划分为两个主要的亚族 CCR 和 CXCR。单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1), 属于 C-C 亚族成员, 主要存在于 As 损伤处^[6], 由其介导的炎症反应在 As 及其并发症形成过程中有重要作用^[7]。CCR2 为 MCP-1 的受体, 其表达降低可减慢 As 形成, LDL 量增加可促进 CCR2 的表达增加, 继而加强机体对 MCP-1 的趋化反应并可促进单核细胞向炎症初始部位的回流^[8]。CCR5 在移植相关的 As 过程中有着重要作用, 这可能与金属酶蛋白调节的血管壁再造有关^[9]。CCR6 基因具体功能目前不详, 根据基因芯片初步结果 LDL 诱导 CCR6 升高, 由此我们推测其可能也跟 As 的形成有关。

与 As 相关的另 5 个基因中, MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3 和 phospholipase A2 group V 与 ox-LDL 作用于细胞产生的效应相关, 这可能跟细胞与 LDL 作用时间较长(20 h^[10]), 部分 LDL 已发生氧化有关。永生性 GP8.39 型内皮细胞内 ox-LDL 可活化 MAP 激酶, 少量 ox-LDL 可激活人冠状细胞内多重细胞凋亡的信号传导途径, 而 ox-LDL 亦可抑制胰岛素的信号传导^[11]。

基因芯片只能对基因的表达进行初筛, 存在假阳性和假阴性结果问题, 因此, 在以后的研究工作中, 我们需要用 PT-PCR 和 Western Blot 验证基因芯片中异常表达的基因。

[参考文献]

- [1] Exner M, Susani M, Witzum JL, Hovorka A, Curtiss LK, Spitzauer S. Lipoproteins accumulate in immune deposits and are modified by lipid peroxidation in passive Heymann nephritis [J]. *Am J Pathol*, 1996, **149**: 1313-320
- [2] 武军驻, 洪嘉玲. 低密度脂蛋白诱导巨噬细胞髓过氧化物酶活性的研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2003, **19** (1): 16-18
- [3] 王淳本, 宗义强, 吴万生, 冯友梅, 邓耀祖, 冯宗忱. 两步超速离心法快速分离大量血浆极低密度脂蛋白及低密度脂蛋白[J]. *同济医科大学学报*, 1995, **24** (3): 169-171
- [4] Hirst J, Robinson MS. Clathrin and adaptors [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, **1404** (1-2): 173-193
- [5] Lau P, Nixon SJ, Parton RC, Muscat GE. RORalpha regulates the expression of genes involved in lipid homeostasis in skeletal muscle cells: caveolin3 and CPT-1 are direct targets of ROR [J]. *J Biol Chem*, 2004, **279** (35): 36828-840
- [6] 胡厚源, 陈运贞. 单核细胞趋化蛋白 1 对其表面淋巴细胞功能相关抗原 1、清道夫受体和在职蛋白 E 表达的影响及雌二醇的干预作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8** (4): 322-326
- [7] Inoue S, Egashira K, Ni W, Kitamoto S, Usui M, Otani K, et al. Anti-monocyte chemoattractant protein 1 gene therapy limits progression and destabilization of established atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice [J]. *Circulation*, 2002, **106** (21): 2700-706
- [8] Han KH, Chang MK, Boullier A, Green SR, Li A, Glass CK, et al. Oxidized LDL reduces monocyte CCR2 expression through pathways involving peroxisome proliferator-activated receptor γ [J]. *J Clin Invest*. 2000, **106** (6): 793-802
- [9] Luckow B, Joergensen J, Chilla S, Li JP, Henger A, Kiss E, et al. Reduced intragraft mRNA expression of matrix metalloproteinases MMP3, MMP12, MMP13 and ADAM8, and diminished transplant arteriosclerosis in Ccr5-deficient mice [J]. *Eur J Immunol*, 2004, **34** (9): 2568-578
- [10] Fernando RL, Varghese Z, Moorhead JF. Moorhead Differential ability of cells to promote oxidation of low density lipoproteins in vitro [J]. *Clin Chim Acta*, 1998, **269** (2): 159-173
- [11] Lupo G, Nicotra A, Giordanella G, Anfuso CD, Romeo L, Biondi G, et al. Activation of phospholipase A(2) and MAP kinases by oxidized low-density lipoproteins in immortalized GP8.39 endothelial cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, **1735** (2): 135-150

(此文编辑 胡必利)