锌指蛋白基因抑制内皮细胞粘附分子表达及单核细胞粘附

柏 力[1],杨明璨[2],李至伟[3],李小松[2],李 立[2],张 伟[2] (1.成都军区昆明总医院急诊科,云南 昆明 650032;2.第三军医大学基础医学部人体解剖学教研室,重庆 400038;3.解放军78511部队门诊部,四川 雅安 625000)

[摘 要] **目的** 单核细胞粘附是动脉粥样硬化发生的重要阶段,研究锌指蛋白A20基因在氧化型低密度脂蛋白诱导内皮细胞粘附分子表达及单核细胞粘附中的作用。**方法** 脂质体DOTAP转染pEGFPEHA20-N1于原代培养的脐静脉内皮细胞,经G418筛选,A20表达经免疫荧光鉴定。激光共聚焦显微镜及微管吸吮系统分别检测转染前后氧化型低密度脂蛋白诱导单核细胞粘附情况及内皮细胞粘附分子VCAM-1表达。**结果** 氧化型低密度脂蛋白能显著提高单核细胞粘附力及内皮细胞VCAM-1表达,A20基因能显著抑制氧化型低密度脂蛋白诱导单核细胞粘附及内皮细胞VCAM-1表达。**结论** A20基因对动脉粥样硬化的防治可能有一定作用。

[关键词] A20基因;氧化型低密度脂蛋白;VCAM-1;单核细胞

[中图分类号] R329.26;R543.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2010)03-0171-03

Overexpression of A20 inhibits OxLDL-inducible endothelial cells VCAM-1 expression and monocyte Adhesion

BAI Li, YANG Ming-can, LI Zhi-wei, LI Xiao-song, LI Li, ZHANG Wei (Emergncy Department, Kunming General Hospital of Chengdu Military Region, Kunming Yunnan 650032, China)

Abstract: Objective To examine the effectiveness of A20 inhibits OxLDL-inducible endothelial cells VCAM-1 expression and monocyte adhesion. **Methods** With the help of DOTAP, endothelial cells were transfected with pEGFPEHA20-N1. The positive cell clones were selected with G418. Immunofluorescence analysis determined the stable transfection and expression of A20 in the endothelial cells. The expression of VCAM-1 in endothelial cells induction by OxLDL was determined by immunofluorescence and in situ hybridization. The adhension force between endothelial cells and monocytes was checked by micropipette aspiring system. **Results** A20 gene can significantly inhibit the VCAM-1 expression of endothelial cells and decrease the adhension force between endothelial cells and monocytes induction by OxLDL. **Conclusion** A20 gene can be helpful for the treatment atherosclerosis.

Keywords: A20 gene; OxLDL; VCAM-1; monocyte

动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)是一种发病率很高的心血管疾病,动脉粥样硬化的发生发展与氧化修饰低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein,OxLDL)密切相关,OxLDL在AS的病变形成中起重要作用。内皮细胞损伤后单核细胞归巢于损伤血管是AS发生过程中的重要步骤,OxLDL是导致血管内皮损伤的主要原因。OxLDL可导致内皮表达一些粘附分子如血管内皮粘附分子(VCAM-1),促进单核细胞粘附[1],而单核细胞与内皮细胞的粘附是AS形成机制的第一步。A20基因属锌指蛋白家族,属内皮细胞保护基因,在机体抵抗炎症时能发挥重要作用[2-5],在慢性炎症AS中也发现有重要的保护作用,但其机制尚不清楚。因此研究A20基因在OxLDL诱导的内皮细胞粘附分子表达及单核细胞粘附中的作用,将为AS预防和治疗应用A20基因提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

本实验室保存pEGFPEHA20-N1质粒(比利时RUG LMBP Dr Martine V提供EHA20 cDNA)在本实验室构建而成。DOTAP脂质体转染试剂(Roche公司),E-tag抗体(美国Amersham Pharmacia Biotech),质粒抽提试剂盒、琼脂糖购自上海生工,DMEM培养基及胎牛血清购自HLycone公司,G418为美国Gibico公司产品,限制性内切酶(华美公司),Lambda DNA EcoR Ⅰ和Hind Ⅲ Marker(Promega公司),cy3免疫荧光试剂盒、Ⅷ因子抗体、VCAM-1鼠抗人抗体、原位杂交试剂盒购自武汉博士德公司。大肠杆菌DH5α由本实验室保存。

1.2 A20基因在原代培养的内皮细胞转染

取脐静脉进行原代内皮细胞培养,先用胶原酶消化,以1×10^5的浓度接种细胞,培养基为150 mg/L内皮生长因子,90 mg/L肝素钠,含20%胎牛血清的M199液。培养7~14 d细胞融合后传代。传代后培养的内皮细胞生长至70%~80%融

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30770771)

[作者简介] 柏 力(1973-),男,云南省昆明市人,主治医师,硕士,主要从事血管损伤修复方面的研究。E-mail:zhangwei@mail.tmmu.com.cn

[通讯作者] 张 伟,第三军医大学人体解剖学教研室,E-mail:zhangwei@mail.tmmu.com.cn

[收稿日期] 2010-03-10 [修回日期] 2010-04-01

合时进行基因转染,脂质体采用 DOTAP,在内皮细胞将 pEGFP-PEHA20-N1 重组质粒转染,约 18 h 后弃去转染液,换含 M199 培养液(含 20% FBS)培养 2 d 后换液,用含 G418 300 mg/L 的 M199 培养液进行筛选,14 d 后收集 G418 抗性细胞,将收集的细胞继续在 300 mg/L 的 G418 筛选下培养 28 d,在荧光显微镜下观察细胞转染情况。用含 G418 300 mg/L 的 M199 培养液同时培养转染 pEGFP-N1 及未转染内皮细胞。

细胞转染后,将抗 G418 细胞继续培养 2 周,免疫荧光方法检测 A20 基因表达情况,一抗使用鼠抗人 E-tag 单克隆抗体(HA20 cDNA N 末端标记 E-tag 序列 GGT GCG CCG GTG CCG TAT CCG GAC CCG CTG GAA CCG CGT),二抗及三抗分别使用生物素化的羊抗鼠 IgG、SABC-cy3,对照组为内皮细胞转染 pEGFP-N1 重组质粒。免疫组织荧光化学染色鉴定内皮细胞,标记抗体为内皮Ⅷ因子抗体。将选择出高表达 A20 基因的抗 G418 阳性克隆细胞用于后续实验。

1.3 氧化型低密度脂蛋白的制备

氧化低密度脂蛋白(购自协和医科大学生物化学教研室)加铜离子达终浓度为 1 μmol/L,37 ℃氧化 24 h[6]。

1.4 NF-κB 及 VCAM-1 在细胞内的表达检测

内皮细胞分两组,分别为转染 pEGFP-N1 组和 pEGFPE-HA20-N1 组。实验分三组如下:1 组加 LDL 50 mg/L;2 组加 OxLDL 50 mg/L;3 组不加任何刺激因素作为对照。所有组分别作用 6 h。按常规免疫荧光方法检测,一抗为鼠抗人 NF-κBp65 抗体及 VCAM-1 抗体,二抗为生物素化的羊抗鼠 IgG、三抗为 SABC-cy3,激光共聚焦荧光显微镜照相图像分析。常规原位杂交方法,VCAM-1 寡核苷酸探针序列(敏感加强型):5'-TAACC GAAAG GTGGC AACAG AATTT GAGTC-3';5'-TATTC AGGCC TGCCG TGGTA CAGAA CTGGA-3';5'-CTGGA CAACA GTTAT AAAAT GGATT ATCCT-3'。再依次滴加封闭液,兔抗地高辛抗体,生物素化羊抗兔 IgG,SABC,DAB 显色。计算机图像分析结果。

1.5 微管吸吮系统检测单核细胞粘附

1.5.1 单核细胞分离 取正常成人新鲜血离心后的白膜层 1 mL,以 Percoll(等渗比重为 1.085)3 mL 于 2 500 r/min 行梯度离心,吸取界面上的白细胞层以 3 mL Hanks 液清洗,沉淀以 1 mL Hanks 液重悬后加于 3 mL 淋巴细胞分离液(比重 1.077)2 500 r/min 梯度离心。沉淀经涂片染色证实 85% 为单核细胞,胎盘兰拒染实验显示有活力细胞达 95% 以上,以 Hanks 液冲洗 2 次后按 1×10^7/mL 重悬于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中备用。

1.5.2 微管吸吮 以电视摄像磁带记录的方式记录,实验在 2.5 h 内完成。操作过程:微管吸吮实验系统连接完毕后,将单核细胞悬液加入到前一天已种植内皮细胞的特制圆形小室,湿热静置于 37 ℃孵箱内 30 min 后开始实验。在倒置显微镜载物台上将样本小室置于其上。未粘附的细胞于轻微的机械扰动即悬浮,而待实验的粘附细胞不动,实验细胞在显微镜下确定后利用显微操作器引导微管尖端靠近细胞表面,由于通过负压吸引可以吸吮细胞,这个负压由压力控制系统产生,可见细胞的小部分将被吸入微管内并密封管口,实验操作以显微操作器轻轻侧向牵引单核细胞离开其粘附的内皮表面。在实验过程中可以逐步加大吸吮负压(步长 0.049 ~ 0.098 kPa)使单核细胞与内皮细胞分离直至取得表面间粘附分离的临界负压值。

1.5.3 计算细胞与细胞的粘附力 细胞粘附性的定量指标为粘附力(F),计算公式为:$F = \pi Rp^2 \Delta P \cos\theta \approx \pi Rp^2 \Delta P$,其中 π 为圆周率,Rp 为微管半径,ΔP 为所测细胞与粘附面分离的临界负压值,θ 为微管与粘附面间的夹角,当 θ 小于 10° 时,$\cos\theta \approx 1$。在进行有关测量时可通过电视回放输入图像处理仪进行。每个组检测细胞个数为 20 个。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 6.0 统计软件,实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两样本均数进行 t 检验。

2 结果

2.1 A20 基因表达检测

原代培养的内皮细胞经过内皮Ⅷ因子抗体染色鉴定后为本实验需要的细胞,采用 G418 筛选后选择阳性且 A20 基因超表达的内皮细胞。内皮细胞转染后经过 G418 选择的细胞中,A20 基因表达细胞达 100%。荧光显微镜观察未转染的细胞未见绿色荧光,而转染成功的细胞胞浆胞核中有很强的绿色荧光。用 E-tag 抗体实验结果表明转染 A20 成功的内皮细胞胞核区未见荧光,胞浆中有很强的红色荧光。而实验对照组转染空载体的内皮细胞没有见到红色荧光。转染 A20 基因细胞绿色荧光蛋白表达情况与经 cy3 荧光检测 E-tag 结果一致,说明通过实时观察绿色荧光蛋白表达可检测 A20 基因表达情况。

2.2 VCAM-1 在细胞内的表达检测

原位杂交与免疫荧光结果表明未修饰的 LDL 不能提高 VCAM-1 在内皮细胞的表达,而 OxLDL 能显著提高 VCAM-1 在内皮细胞的表达。A20 基因可抑制 80% 以上 OxLDL 诱导的 VCAM-1 在内皮细胞的表达。

2.3 NF-κB 表达检测

免疫荧光显示 OxLDL 诱导的内皮细胞可见明显的 NF-κB 迁移入核,而 LDL 诱导的内皮细胞无明显改变,A20 基因可显著抑制 OxLDL 诱导的 NF-κB 迁移入核。

2.4 内皮细胞与单核细胞的粘附力

微管吸吮检测表明(表 1),OxLDL 能明显增强内皮细胞与单核细胞的粘附力,而 LDL 则没有影响。未加 OxLDL 时转染 A20(pEGFPEHA20-N1)和转染空载体(pEGFPE-N1)的内皮细胞与单核细胞的粘附力相差不显著($P > 0.05$)。A20 基因能明显减少 OxLDL 诱导的单核细胞与内皮细胞与的粘附力,与转染空载体的内皮细胞相差非常显著($P < 0.01$)。

表 1 单核细胞与内皮细胞粘附力检测($\bar{x} \pm s$,10^{-10}N)

组别	OxLDL	LDL
pEGFPEHA20-N1	30 ± 8 *	20 ± 6
pEGFPE-N1	140 ± 12	20 ± 8

*:与 pEGFPE-N1 比较,$P < 0.01$

3 讨论

本实验构建的 pEGFPEHA20-N1 真核表达重组体，因 E-tag 标记在 HA20 cDNA N 末端，通过 cy3 免疫荧光检测 E-tag 的表达可确定 A20 基因在内皮细胞的表达，由于实验使用的载体包含 neo 基因及 GFP 基因，本实验可应用抗性筛选如 G418 来筛选含此载体的内皮细胞，同时可经荧光显微镜适时检测 A20 基因在细胞的转染效果。经过上述实验，结果表明转染 A20 的内皮细胞有非常高的绿色荧光及 E-tag 有强表达，表明人的 A20 基因在内皮细胞能成功转染，并有很高的表达，可以用于以后的研究。

在 AS 形成过程中，OxLDL 是重要的致病因素，其中原因之一是其能刺激血管内皮细胞释放 VCAM-1、IL-8 等白细胞趋化因子和粘附分子，这些粘附分子可介导循环的单核细胞粘附到病变的内皮细胞，VCAM-1 主要和慢性炎症有关，在 AS 早期的瘢块中可同时检测到 VCAM-1 的表达和单核细胞粘附，这是 AS 形成的早期机制[1,6-7]。本实验可见 OxLDL 能提高单核细胞和内皮细胞的粘附力，同时可见内皮细胞 VCAM-1 的高表达，说明 VCAM-1 可诱导单核细胞粘附到内皮细胞，促使单核细胞迁移到内皮下间隙在血管壁聚集，导致 AS 形成。

本实验观察到 OxLDL 能诱导内皮细胞核转录因子 NF-κB 活化，因 VCAM-1 基因启动子区有 NF-κB 连接位点，说明 OxLDL 诱导内皮细胞 VCAM-1 的表达可能通过活化核转录因子 NF-κB 所致。而 A20 基因转染的细胞在 OxLDL 诱导时未见内皮细胞核转录因子 NF-κB 活化，说明 A20 抑制 OxLDL 诱导的内皮细胞 VCAM-1 表达。其可能的机制是 A20 抑制了内皮细胞 NF-κB 活化。

本实验结果表明 OxLDL 可促进内皮细胞 VCAM-1 的表达，LDL 则不能，说明在诱导血管内皮细胞损伤中 OxLDL 起着一定作用。本实验结果还表明锌指蛋白 A20 基因在抑制 OxLDL 诱导的单核细胞粘附中起重要作用，这种抑制影响可能与其抑制 OxLDL 诱导的血管内皮细胞 VCAM-1 的表达有关。这些结果表明 A20 基因可能通过抑制血管内皮细胞 VCAM-1 的表达从而抑制 OxLDL 诱导的单核细胞和内皮细胞粘附。因 A20 尚能抑制其他粘附分子的表达，本实验观察到 A20 抑制单核细胞和内皮细胞粘附不排除 A20 尚抑制了其他粘附分子的表达，由此可见锌指蛋白 A20 基因将能在动脉粥样硬化中具有一定的应用价值。

[参考文献]

[1] Hsieh CC, Yen MH, Liu HW, et al. Lysophosphatidylcholine induces apoptotic and non-apoptotic death in vascular smooth muscle cells: in comparison with oxidized LDL[J]. Atherosclerosis, 2000,151(2):481-491.

[2] Grey ST, Arvelo MB, Hasenkamp W, et al. A20 inhibits cytokine-induced apoptosis and nuclear factor kappaB-dependent gene activation in islets[J]. J Exp Med, 1999,190(8):1135-1146.

[3] Lee EG, Boone DL, Chai S, et al. Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice[J]. Science, 2000,289(5488):2350-2354.

[4] Song XT, Evel Kabler K, Shen L, et al. A20 is an antigen presentation attenuator, and its inhibition overcomes regulatory T cell-mediated suppression[J]. Nat Med, 2008,14(3):258-265.

[5]. Coornaert B, Carpentier I, Beyaert R. A20: central gatekeeper in inflammation and immunity[J]. J Biol Chem, 2009,284(13):8217-8221.

[6]. 朱楚洪，应大君，糜建红，等. A20 基因在动脉粥样硬化损伤中对内皮细胞的保护作用[J]. 中华老年心脑血管病杂志，2003,5(5):325-327.

[7] Farber A, Kitzmiller T, Morganelli PM, et al. A caspase inhibitor decreases oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis in bovine endothelial cells[J]. J Surg Res, 1999,85(2):323-330.

（编辑：左艳芳）

（上接第 170 页）

疾病的性质，病灶位置，切除范围一直是临床治疗疾病的关键问题。正常人每个乳房一般有 15～20 个乳管，开口于乳头，乳头溢液即表现于乳头开口处。我们掌握的手术指征一般为：①单发；②血性溢液或浆液样溢液；③不除外恶性；④除外生理性溢液。在无腔镜的前提下，利用带金属丝芯硬膜外导管插入病变乳管，其优点是：①由于有金属丝，故在 X 线下便于了解其走行，准确定位；②由于有导管的引导，可使手术范围极度缩小，且不容易残留病变组织，使手术后的乳房外形改变不大[3]；③方法简单，不需要特殊设备及器材，适用于大多数无腔镜的医院，极易推广。

[参考文献]

[1] 董树枫. 乳头溢液 36 例临床分析[J]. 现代预防医学，2005,32(10):94.

[2] 朱建敏. 乳头溢液辅助检测与中医证型相关性[J]. 中华中医药学刊，2009,27(2):70.

[3] 郭晓雷，汪 妍，唐文东，等. 硬膜外导管在乳管切除中的应用[J]. 临床医学，2003,23(3):61.

（编辑：侯晓宇）