锌指蛋白基因抑制人平滑肌细胞表型转化的实验研究

柏 力[1],糜建红[2],杨明粲[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)

[摘 要] **目的** 探讨锌指蛋白基因A20抑制氧化型低密度脂蛋白诱导平滑肌细胞增殖及表型转化的影响。**方法** 用DOTAP脂质体转染pEGFPEHA20-N1原代培养的平滑肌细胞,经G418筛选,A20表达经免疫荧光鉴定。Brdu检测转染前后氧化型低密度脂蛋白诱导平滑肌细胞增殖情况及α-SM-actin抗体检测细胞表型转化情况。**结果** A20基因在平滑肌细胞得到有效表达,少量的氧化型低密度脂蛋白能诱导平滑肌细胞增殖,平滑肌细胞α-SM-actin骨架蛋白表达减少,而A20转染的平滑肌细胞增殖不明显,α-SM-actin骨架蛋白表达呈强阳性。**结论** A20基因在动脉粥样硬化中能抑制平滑肌细胞的病理性增生。

[关键词] A20基因;氧化型低密度脂蛋白;表型转化增殖平滑肌细胞

[中图分类号] R329.26;R543.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2010)04-0285-02

Zinc finger protein inhibits the proliferation and phenotype changing of OxLDL-induced smooth muscle cells

BAI Li, MI Jian-hong, YANG Ming-can, ZHANG Wei (Emergency Department, Kunming General Hospital of Chengdu Military Region, Kunming Yunnan 650032, China)

Abstract: Objective To examine the effectiveness of zinc finger protein A20 in inhibiting the proliferation and phenotype changing of OxLDL-induced smooth muscle cells. **Methods** Smooth muscle cells were transfected with pEGFPEHA20-N1 with the help of DOTAP. The positive cell clones were selected by G418. The stable transfection and expression of A20 in smooth muscle cells were determined by fluorescence analysis. The proliferation and phenotype changing in transfected and untransfected OxLDL-induced smooth muscle cells were determined by immunofluorescence analysis. **Results** A20 gene can significantly inhibit the proliferation and phenotype changing of OxLDL-induced smooth muscle cells. **Conclusion** A20 gene is conducive to the treatment of atherosclerosis.

Keywords: A20 gene; oxidized low density lipoprotein; smooth muscle cells prolifration phenotype

动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)的发展与氧化修饰低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein,Ox-LDL)密切相关,后者血中含量的高低在动脉粥样硬化的病变形成中起重要作用。研究表明,小剂量氧化修饰低密度脂蛋白通过间接或直接作用可导致平滑肌细胞的病理性增殖[1]。血管平滑肌细胞(VSMC)的病理性增殖主要体现在其表型的转变,即平滑肌细胞从收缩型向合成型的转变。病理性增殖的VSMC对外界各种病理性刺激条件下能增生,具体表现可为VSMC从血管的中膜迁移至内膜,并在血管内膜中大量增殖,是最后导致AS和血管再狭窄等疾病的主要原因。锌指蛋白家族成员A20基因是内皮细胞的保护基因,当外界损伤因子作用于细胞时能有效对其进行保护[2-3]。因此,深入研究锌指蛋白A20基因对平滑肌细胞的表型转化及病理性增殖的影响,将为A20基因在AS中的作用提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 试验试剂

E-tag抗体购自美国Amersham Pharmacia Biotech,pEGFPE-HA20-N1质粒为本实验室保存。G418购自美国Gibico公司,DMEM培养基及胎牛血清为HLycone公司产品,Brdu抗体、Cy3免疫荧光试剂盒、α-SM-actin抗体为博士德产品。

1.2 DOTAP脂质体介导的锌指蛋白基因转染

原代培养人平滑肌细胞,保持无菌条件取人脐静脉,用消毒PBS液反复冲洗管腔,清除管腔中的血凝块,待冲洗干净后再分离脐动脉,将脐动脉中膜在手术显微镜下分离出来,取一块组织放入无菌小烧杯,用酶消化法(大豆胰蛋白酶抑制剂1 mg/mL,弹性蛋白酶1 mg/mL,胶原酶3 mg/mL,牛血清白蛋白1 mg/mL)分离VSMC,然后将分离的细胞中加入低血清1640培养液进行培养。采用α-SM-actin(S-actin)抗体做免疫组织荧光化学染色鉴定原代培养的平滑肌细胞是否符合需要。

1.3 细胞转染和筛选、培养

用胰酶消化原代培养的平滑肌细胞,然后将其种植在培养玻片上。转染方法采用DOTAP脂质体介导法,在原代培养的SMC进行pEGFPEHA20-N1质粒转染,大约8 h后将转染液去

[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,第三军医大学基础医学部人体解剖学教研室,E-mail:zhangwei@mail.tmmu.com.cn

[收稿日期] 2010-03-12 [修回日期] 2010-05-11

掉,采用低血清的1640培养液继续培养1~2 d后换液,细胞筛选采用含G418 600 μg/mL的1640培养液培养,1~2周后收集能抵抗G418的细胞。对照组中也同样要用含G418 600 μg/mL的1640培养液进行选择性培养。荧光显微镜检测转染A20重组质粒的抗G418活细胞GFP表达情况,对照组为转染空载体、未转染的细胞。后续实验选用高表达锌指蛋白A20基因的抗G418阳性细胞。

1.4 OxLDL的制备

OxLDL购自协和医科大学生物化学教研室,氧化试验在本实验室进行,主要方法是添加铜离子至终浓度为1 μmol/L,在37 ℃条件下氧化24 h。试验分组如下:原代培养的SMC分两组,一组为A20基因组,另一组为空载体pEGFP-N1组。在同等条件下每组再分别以不加任何刺激因素作为对照和加OxLDL 10 mg/L。

1.5 细胞增殖实验

用Brdu检测种植在玻片上的原代细胞,在加入Brdu 2 h后用4%多聚甲醛固定,按常规免疫荧光方法检测,一抗为鼠抗Brdu单克隆抗体,二抗、三抗分别为生物素化的羊抗鼠IgG和SABC-cy3,荧光显微镜观察计数。转染pEGFP-N1及未转染细胞作为对照。

1.6 α-SM-actin骨架蛋白检测

4%多聚甲醛固定玻片上的原代细胞,按常规免疫荧光方法检测,一抗为鼠抗人α-SM-actin单克隆抗体,二抗、三抗分别为生物素化的羊抗鼠IgG和SABC-cy3,激光共聚焦荧光显微镜照相。转染pEGFP-N1及未转染细胞作为对照。

1.7 统计学方法

采用SPSS6.0统计软件处理所有数据,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,行t检验。

2 结果

原代培养的SMC呈梭形,状态良好,经S-actin抗体做单抗行细胞免疫荧光染色鉴定原代培养的细胞为平滑肌细胞,说明获得的原代细胞主要是收缩型SMC,为进一步进行表型转化实验提供了基础。筛选A20基因超表达的SMC。本实验表明经DOTAP介导质粒转染,在所有经过G418选择的阳性细胞中,锌指蛋白A20基因表达的SMC达100%,选择锌指蛋白A20基因高表达的SMC继续培养用于下一步检测。转染成功的SMC通过荧光显微镜观察可见胞浆胞核中有很强的绿色荧光,而未转染的SMC无绿色荧光。

增殖检测未加OxLDL时转染pEGFP-N1与转染A20组平滑肌细胞增殖相差不显着。加OxLDL时,转染pEGFP-N1组平滑肌细胞增殖明显上升,而转染A20组细胞增殖上升不明显,两组间相差显著。免疫荧光结果还表明,未加OxLDL时,转染pEGFP-N1与转染A20组平滑肌细胞均有较强的α-SM-actin表达,两者间相差不显著;加OxLDL时,转染pEGFP-N1组平滑肌细胞α-SM-actin的表达较低,而转染A20组细胞α-SM-actin的表达很强,两组间相差显著。

3 讨论

本实验观察到转染的SMC有很强的绿色荧光,说明通过本方法能使A20目的基因转染成功并有强表达[4-5]。平滑肌细胞表型由收缩型向合成型转化是病理性增殖的起始,是其进行有丝分裂和增殖的重要前提。VSMC两种表型相互转化时其主要的表型标志是肌动蛋白α-SM-actin。研究表明肌动蛋白actin有α、β、γ三种分型。肌细胞中有α-actin分布,而VSMC中的α-actin又称为α-SM-actin。原代VSMC中分离到α-SM-actin的cDNA表达量远高于传代细胞(去分化细胞),在原代SMC(分化状态)α-SM-actin的基因高度表达,但在SMC传代后(低分化)呈低表达,说明SMC由增殖型向收缩型转化,α-SM-actin表达的增加是其标志之一[6-8]。因此,本实验采用α-SM-actin作为平滑肌表型转化的标志是可行的。OxLDL有助于AS形成,通过促进内皮细胞凋亡,从而曝露内皮下基质,促使血液中单核细胞从血中迁移到内皮下间隙,从而在血管壁聚集,这是AS形成的早期机制[1]。

小剂量的OxLDL可直接或间接导致平滑肌细胞增殖,其间接导致血管平滑肌细胞增殖是通过诱导一系列生长因子产生从而诱导平滑肌细胞增殖。本实验观察到α-SM-actin的基因在原代细胞中呈强表达,但OxLDL作用后可见平滑肌细胞增殖明显加强,同时细胞α-SM-actin表达减少,说明OxLDL可诱导平滑肌细胞由收缩型向合成型转变,从而启动平滑肌细胞的病理性增殖。而A20基因表达的细胞经OxLDL处理后细胞增殖不明显,同时细胞仍有很强的α-SM-actin表达,细胞仍处于收缩状态,说明A20基因可有效对抗OxLDL诱导的平滑肌细胞病理性增殖。锌指蛋白A20基因C-末端包括7个Cys2/Cys2锌指,A20基因通过它的锌指区可以与一系列功能蛋白连接(如LMP1、TRAFs、IKK-/NEMO/IKKAP1、14-3-3、ABINs等),从而发挥作用[9-10]。本研究同时表明A20基因能有效抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的SMC增殖,提示A20基因可能在预防和治疗动脉粥样硬化方面具有意义。

[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 kappa B-dependent gene activation in islets[J]. J Exp Med, 1999, 190(8): 1135-1146.

(下转第288页)

直视下缝扎胆囊三角系膜止血。1例胆囊十二指肠瘘直视下修补十二指肠瘘口。2例继发胆总管结石患者切除胆囊后，切开胆总管，行胆道镜取石及T管引流术。2例胆总管损伤，均为电灼小破口，行胆总管探查，3-0细针线修补破口，T管引流。术后10 d带T管出院，1个月后行T管造影无异常，拔T管。全组无严重并发症

3 讨论

3.1 LC中转MC原因分析

主要有以下原因：①胆囊炎处于急性期，胆囊三角粘连及炎性充血水肿，胆囊三角解剖不清。②胆囊萎缩，胆囊炎病史长，且反复多次发作者，胆囊三角区为“冰冻样改变”。③胆囊管结石嵌顿，嵌顿的结石与胆总管紧贴并压迫部分胆总管，而且不能挤压到胆囊方向，属于Mirrzzi综合症 型，此种情况继续LC操作胆管损伤机率高。④胆囊管解剖变异。本组1例胆囊管汇入肝右管，1例胆囊管紧贴胆总管，且并行较长，约2.5 cm，1例胆囊管从胆总管后方绕过汇入胆总管左侧，术中解剖关系不清，为避免不必要的医源性损伤，应及时中转。⑤胆囊十二指肠瘘。术中发现胆囊三角解剖不清，大网膜、十二指肠与胆囊致密粘连，中转后发现胆囊十二指肠瘘，切除胆囊，修补十二指肠瘘口。⑥腹腔内广泛粘连，本组1例因既往有胃大部切除术、剖腹产手术史，腹腔内广泛粘连，无法建立有效气腹；另2例既往有上腹部手术史，虽建立了气腹，但因广泛致密粘连难以进行腔镜下操作。⑦继发胆总管结石。术中因胆囊管直径大于0.5 cm，而胆囊内多数结石直径小于0.5 cm，可疑继发胆总管结石。本组2例中转证实胆总管内继发结石。⑧术中胆总管损伤。均为电灼小破口，行胆总管探查，细针线修补破口，T管引流。⑨术中出血。本组中2例因术中胆囊动脉出血严重，且残端较短，腹腔镜下止血可能误伤胆管；另2例因胆囊床出血，腹腔镜下止血失败。⑩胆囊床迷走胆管胆漏。术中发现漏胆，腹腔镜下无法明确原因，不得不中转MC[3-5]。

3.2 LC中转MC的意义

腹腔镜胆囊切除术、小切口胆囊切除术均为微创外科技术(minimall invasice suryery, MIS)，已被医患双方接受。由腹腔镜胆囊切除术中转小切口胆囊切除术，并没有改变手术微创结果；与腹腔镜胆囊切除术中转传统开腹大切口胆囊切除术相比较，中转小切口胆囊切除术还具有对术后患者痛苦、创伤、内环境无影响等优点；术后平均住院时间及费用也没有增加。而且MC技术包含了传统和微创双重特点[6-8]。所以，在LC术中遇到困难时选择MC，兼顾了利用传统积累的经验不但解决术中问题，而且还不失微创特色，极大地符合病人的利益。

[参考文献]

[1] 曹启鸾，杨远秋，张晓蓉. 双极BiClamp钳替代钛夹在腹腔镜胆囊切除术中的应用[J]. 中华消化外科杂志，2007，6(2)：138－139.

[2] 张光全，程泰煦. 小切口胆囊切除术的深部打结技术[J]. 肝胆胰外科杂志，2001，13(4)：209.

[3] 王 宝. 小切口胆囊切除术80例临床分析[J]. 局解手术学杂志，2009，18(2)：112.

[4] 李英杰，孟 镔，王 钢，等. 小切口传统胆囊切除术85例的临床分析[J]. 局解手术学杂志，2008，17(1)：35.

[5] 张光全，徐荣华，廖 忠，等. 小切口胆囊切除术10 200例的并发症及预防[J]. 中国普通外科杂志，2007，16(2)：117－120.

[6] 吴硕东，范 莹. 2000例腹腔镜胆囊切除术的临床研究[J]. 中华消化外科杂志，2009(6)：472－473.

[7] 王 超，孟 镔，陈 磊，等. 腹腔镜胆囊切除术并发症临床分析[J]. 局解手术学杂志，2009，18(4)：245.

[8] 黄志伟. 腹腔镜胆囊切除术与小切口胆囊切除术的对比研究[J]. 微创医学，2009，4(6)：662－663.

(编辑：朱志立)

(上接第286页)

[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] 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.

[5] 柏 力，杨明璨，李至伟，等. 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[J]. 局解手术学杂志，2010，19(3)：171－173.

[6] 王志勇，邹祖玉，刘维新. 血管平滑肌细胞的表型标志α-SM-actin的表达与调控的研究进展[J]. 数理医药学杂志，2001，14(5)：443－445.

[7] Heyninck K, Kreike MM, Beyaert R. Structure-function analysis of the A20-binding inhibitor of NF-kappa B activation, ABIN-1[J]. FEBS Lett, 2003, 536(1-3): 135－140.

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

[9] 吴丽娟，陈 潇，冯建男，等. 锌指蛋白A20突变体转基因小鼠脓毒症肺损伤的研究[J]. 第三军医大学学报，2010，32(5)：435－438.

[10] 解 婧，王杰军. 锌指蛋白A20与恶性肿瘤相关性研究的进展[J]. 临床肿瘤学杂志，2010，15(1)：86－89.

(编辑：文 灿)