DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.18.010
第25卷第18期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 18
2003年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2003

文章编号:1000-5404(2003)18-1617-03

论著

内皮活化相关新基因 EOLA1 的体外表达及亚细胞定位

梁自文[1],杨宗城[1],罗向东[1],刘月明[1],蔡文琴[2] (第三军医大学:[1]附属西南医院全军烧伤研究所,创伤烧伤复合伤国家重点实验室;[2]基础医学部神经生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 研究内皮细胞高表达脂多糖相关因子1(Endothelial-over-expressed lipopolysaccharide-associated factor 1, EOLA1)基因的体外表达和亚细胞定位,为进一步功能研究打下基础。方法 通过偶联转录/翻译系统体外表达EOLA1蛋白,并用变性凝胶电泳进行产物检测;构建EOLA1-EGFP(绿色荧光蛋白)融合蛋白表达质粒,转染内皮细胞后瞬时表达,在激光共聚焦显微镜下观察EOLA1蛋白的亚细胞定位。结果 体外表达的EOLA1蛋白分子量约18×10³,与预测结果相符合;EOLA1蛋白主要定位于细胞浆,少量表达于细胞核。结论 EOLA1属细胞内结构蛋白,可能是参与了炎症时细胞内信号转导。

关键词:内皮细胞;内皮细胞高表达脂多糖相关因子1;亚细胞定位;体外表达
中图法分类号:Q75 文献标识码:A

Subcellular localization and *in vitro* expression of the novel gene EOLA1

LIANG Zi-wen, YANG Zong-cheng, LUO Xiang-dong, LIU Yue-ming, CAI Wen-qin (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the subcellular localization and *in vitro* expression of endothelial-overexpressed lipopolysaccharide-associated factor 1 (EOLA1) to establish the foundation for further studies. Methods EOLA1 protein was expressed *in vitro* through couple transcription and translation. The products were detected by gel electrophoresis. The EOLA1-EGFP (enhanced green fluorescent protein) fusion protein expression vector was constructed and transfected into human umbilical vein endothelial cells. At 24 h after transfection, the subcellular location of EOLA1 was detected by laser-scanning microscopy. Results The molecular weight of EOLA1 protein expressed *in vitro* was about 18×10³, accordant with the expected value. EOLA1 was mainly distributed in cytoplasm but little was expressed in the nuclei. Conclusion EOLA1 is one of the intercellular proteins and may play a role in intercellular signal conduction in inflammation.

Key words: endothelial cells; endothelial-overexpressed lipopolysaccharide-associated factor 1; subcellular location; *in vitro* expression

内皮细胞高表达脂多糖相关因子1(Endothelial-overexpressed lipopolysaccharide-associated factor 1, EOLA1)是本实验室从脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)激活的人脐静脉内皮细胞中克隆的新基因,其功能尚不清楚[1]。EOLA1包含1个完整的开放阅读框,其编码蛋白EOLA1经生物信息学分析分子量为17.89×10³,包含1个螺旋-转角-螺旋(HTH)模体,可能是一个信号分子。本实验在体外对EOLA1基因进行转录和翻译,获取纯净的EOLA1蛋白;另外,对EOLA1蛋白的亚细胞定位进行研究,以期了解EOLA1基因的特性,并为蛋白测序及进一步研究EOLA1基因功能打下基础。

1 材料与方法

1.1 体外转录和翻译

根据EOLA1基因全长cDNA序列设计一对引物(上游:5′-CCGCTAACACCTGTCACTG-3′,下游:5′-CCCCCTACTTCCTTCATCT-3′),特异扩增EOLA1基因接近全长cDNA片段(1 191 bp),其中包含完整的开放阅读框(ORF)全序列,取40 μl TNT快速T7 Master Mix (Promega),分别依次加入2 μl[35 S]蛋氨酸、5 μl PCR产物、1 μl T7 PCR增强子,再加无核酸酶水组成共50 μl的反应体系,混匀后于30 ℃反应90 min,取5 μl反应液与20 μl SDS上样缓冲液混匀,煮沸2 min,上样到SDS-聚丙烯酰胺凝胶上,电泳,置凝胶于保鲜膜上,浸泡于固定液中振摇30 min,于干胶器上80 ℃干胶90 min,室温下放射自显影6 h。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200101)
作者简介:梁自文(1967-),男,四川省彭州市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事基因功能方面的研究,发表论文20篇。电话:(023)68754523
收稿日期:2003-07-18;修回日期:2003-08-24

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2 构建融合蛋白表达质粒

根据EOLA1 ORF序列设计一对引物，分别在上游引物5′端引入*Eco*RI酵切位点，在下游引物5′端引入*Bam*HI酶切位点（上游引物：5′-GCTCGAATTCAGAAGTTTGGCTGCCTCTC-3′，下游引物：5′-AGCAGGATCCTCTCTTCATGCCCCAAAG-3′）。取本室保存的含全长EOLA1 cDNA序列的菌株DH5α，摇菌扩增，以1 μl菌液为模板，与上述两种引物进行PCR反应，扩增EOLA1基因ORF序列，将产物纯化后与N-端增强型绿色荧光蛋白质粒（pEGFP-N2，Clontech）一起进行*Eco*RI及*Bam*HI双酶切，纯化酶切产物，在DNA连接系统（TaKaRa）中将酶切ORF序列亚克隆入pEGFP-N2质粒，并使ORF序列3′端与EGFP-N端进行连接，构建EOLA1-EGFP融合蛋白表达质粒。

1.3 细胞培养及转染

取人脐静脉内皮细胞系ECV304（ATCC）培养于含10%胎牛血清的M199培养基中，于转染前一天，用胰蛋白酶及EDTA消化培养细胞，计数，接种于24孔板中无菌盖玻片上，接种密度3×10^5，共接种4孔，继续培养过夜。次日，以脂质体LF2000（Gibco BRL）分别转染空pEGFP-N2质粒和EOLA1-EGFP融合蛋白表达质粒于两组内皮细胞中，每种质粒各转4孔作为对照。继续培养24 h，以便转染质粒在细胞内瞬时表达。

1.4 激光共聚焦显微镜观察

待转染细胞瞬时表达后，以新配制的PBS/4%多聚甲醛固定每组各两孔细胞，直接于激光共聚焦显微镜下观察并摄像。

1.5 Wester杂交验证融合蛋白表达

提取各组另两孔转染细胞总蛋白，SDS-PAGE电泳，电转印迹于硝酸纤维素膜上，以抗GFP单抗作一抗，与羊抗鼠二抗进行Westem杂交，验证EOLA1-EGFP融合蛋白在转染细胞中表达。

2 结果

2.1 EOLA1基因的体外转录和翻译

通过TNT偶联转录/翻译系统体外表达EOLA1蛋白，经SDS-凝胶电泳检测，得到1条分子量约为18×10^3的单带蛋白，见图1。

2.2 EOLA1-GFP融合蛋白在转染细胞中表达

分别提取转染空pEGFP-N2质粒和转染EOLA1-EGFP融合蛋白表达质粒的两组内皮细胞总蛋白，进行Western杂交分析，结果显示转染空pEGFP-N2质粒的细胞表达GFP蛋白，分子量约为31×10^3，而转染EOLA1-EGFP融合蛋白表达质粒的细胞表达EOLA1-GFP融合蛋白，分子量约为55×10^3，证明融合蛋白在转染细胞内表达，见图2。

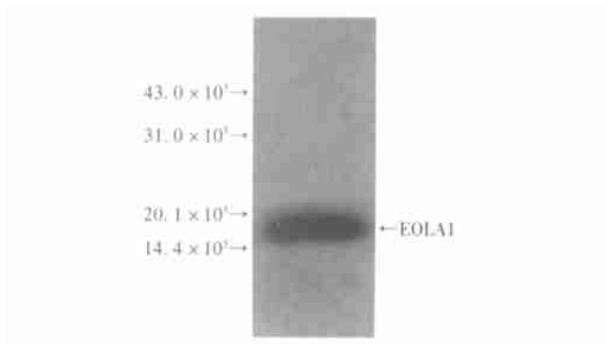
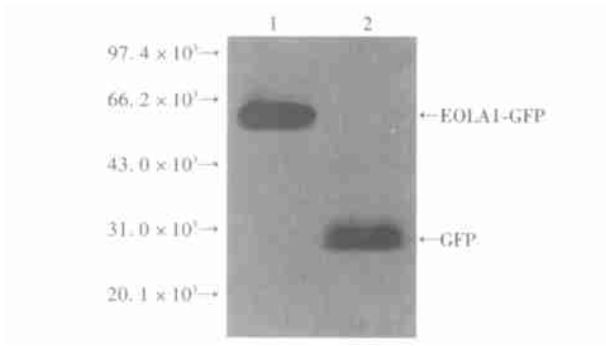


图1 体外转录/翻译EOLA1蛋白

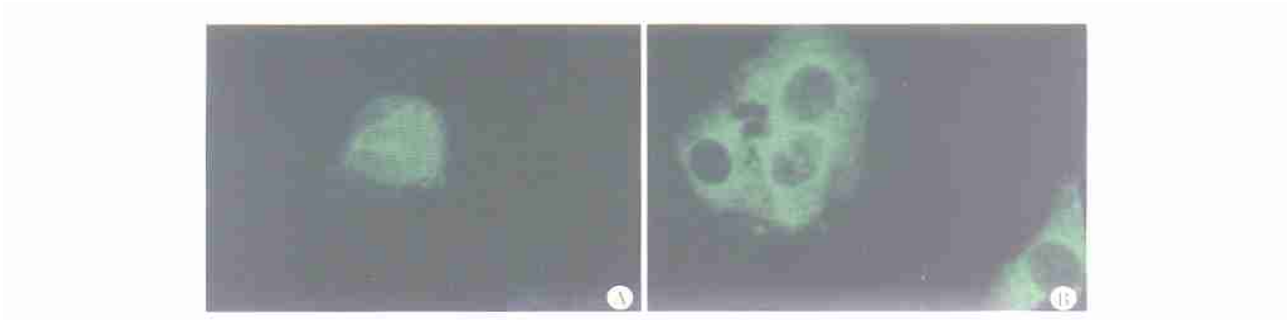
Fig 1 Transcription and translation of EOLA1 protein *in vitro*



1: Cell lysate from EOLA1-GFP-expressing cells; 2: Cell lysate from GFP-expressing cells

图2 Western blot分析验证GFP和EOLA1-GFP表达

Fig 2 Expressions of GFP and EOLA1-GFP confirmed by Western blot analysis



A: The images of the GFP green fluorescence of endothelial cells transfected with pEGFP-N2 vector; B: The images of the EOLA1-GFP green fluorescence of endothelial cells transfected with EOLA1-EGFP vector

图3 比较GFP和EOLA1-GFP的亚细胞定位 （×60）

Fig 3 Comparison of the subcellular localization of GFP and EOLA1-GFP （×60）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.3 EOLA1 蛋白的亚细胞定位

激光共聚焦显微镜下，单纯转染 EGFP 质粒的细胞荧光呈全细胞分布，而转染 EOLA1-EGFP 质粒的细胞荧光主要集中在细胞浆，在胞核内也有少量分布，提示 EOLA1 蛋白主要定位于胞浆，少量分布于胞核，见图 3。

3 讨论

人类基因组计划完成后，功能基因及蛋白质组研究迅猛发展，寻找功能新基因，特别是与重大疾病相关基因及其表达蛋白功能成为生命科学研究的重点[2]。脓毒症是导致严重烧创伤患者死亡的主要原因之一，其主要致病因子是 LPS，发病的关键环节是广泛的血管内皮细胞活化和功能障碍[3,4]。我们在研究 LPS 直接损伤血管内皮细胞的途径及其机制的研究中[5]，从激活的人脐静脉内皮细胞差异表达基因中克隆到一个新的人类基因 EOLA1，其功能尚不清楚，经生物信息学分析其编码蛋白 EOLA1 的结构特点，提示该蛋白可能是由 158 个氨基酸组成、分子量为 17.89×10^3 的强亲水性细胞内结构蛋白，没有跨膜区和信号肽，但包含有 HTH 模体和酪氨酸激酶 2 磷酸化位点，提示 EOLA1 可能与炎症时细胞内信号转导有关。

为了证实计算机分析结果，我们对 EOLA1 蛋白的体外表达和亚细胞进行实验研究，旨在为深入研究 EOLA1 基因功能打下基础。结果表明，EOLA1 蛋白分子量确为 18×10^3 左右，主要表达在细胞浆，并可进入细胞核，实验结果进一步印证了 EOLA1 为胞内蛋白并可能作为一个转录因子在细胞内转导信号的推测，至于 EOLA1 蛋白转导何种信号及其对细胞的影响，尚须深入研究。目前我们正通过酵母双杂交获取与 EOLA1 相互作用蛋白来帮助研究其功能。

参考文献：

[1] 梁自文，杨宗城，罗向东，等. 人类内皮活化相关新基因 EOLA1 的发现与初步研究[J]. 解放军医学杂志，2003，28(5)：422－424.
[2] Venter J C, Adams M D, Myers E W, *et al*. The sequence of the human genome[J]. Science, 2001, 291(5507): 1304－1351.
[3] Andonegui G, Goyert S M, Kubes P. Lipopolysaccharide-induced leukocyte-endothelial cell interactions: a role for CD14 versus toll-like receptor 4 within microvessels[J]. J Immunol, 2002, 169(4): 2111－2119.
[4] 梁自文，杨宗城，罗向东. 内毒素激活血管内皮细胞的机制研究进展[J]. 解放军医学杂志，2003，28(1)：92－93.
[5] Liang Z W, Luo X D, Yang Z C. Cloning of differentially expressed genes following lipopolysaccharide stimulation in human umbilical vein endothelial cells[J]. Chin J Traumatol, 2003, 6(2): 107－113.

（编辑 张 宁）

文章编号：1000-5404(2003)18-1619-01

个案与短篇

颈部静脉异常 1 例

A case of abnormal vein in the neck

蒋 平[1]，刘玉新[1]，朱星红[2]（第三军医大学：[1] 学员旅二队；[2] 基础医学部解剖学教研室，重庆 400038）

作者在解剖一成年男性尸体时，发现其右侧颈部静脉变异较为罕见，现报告如下。

该尸颈部除有颈前静脉及颈外静脉外（但枕静脉没有加入颈外静脉），还有一只较粗的异常浅静脉。该静脉起始于面静脉，在下颌骨下缘平面面静脉外径 8 mm，此处后方有下颌后静脉汇入，至颌下三角处有下颌下腺静脉汇入。此静脉下行 5 cm 汇入颈静脉弓。汇入处外径 12 mm。

颈内静脉自颈静脉孔出来后，行至距下颌骨下缘 4 cm 处发出一支斜向前下在该支的起始处有枕静脉汇入，此处静脉支外径 10 mm。然后与从颈部深面下行的咽静脉汇合。咽静脉在下行中在甲状软骨上缘平面有舌静脉汇入。

此静脉汇合支向前发一短干，与上述异常的颈浅静脉相连，此干外径 8 mm，长 1 cm，至此短干以下，该静脉汇合支外径变小，为 7 mm，向后下应 1.5 cm，注入颈内静脉。

从整体上看，颈内静脉与该静脉汇合支之间形成一弯弓样环状相连，并从弓上发一短干连至异常的颈部浅静脉。颈内静脉下端外径 18 mm。

虽然静脉变异较动脉多见，但此种变异实属罕见，未见文献报道，提醒临床做颈部手术时，注意有可能出现此类静脉变异。

关键词：颈内静脉；变异
中图法分类号：R322.1$^+$23 文献标识码：B

参考文献：

[1] 张培建. 临床畸形与变异解剖学[M]. 西宁：青海人民出版社，1998. 252－213

（编辑 刘洪娥）

作者简介：蒋 平（1983－），男，四川省广安市人，军医系二队学员。电话：(023)68772876

收稿日期：2002-10-18；修回日期：2002-12-19

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net