DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.04.001
第25卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 4
2003年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2003

文章编号:1000-5404(2003)04-0279-04

论著

人脐静脉内皮细胞脂多糖刺激后上调基因表达谱的分析

梁自文,杨宗城,罗向东 (第三军医大学附属西南医院全军烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)受脂多糖(LPS)刺激后上调基因表达谱进行筛选及分析。方法 以受LPS刺激HUVCE为实验方,未刺激HUVEC为驱使方,进行抑制消减杂交(SSH)建立消减cDNA文库,经菌落原位斑点杂交筛选文库后将阳性克隆测序和同源性分析,并用RT-PCR验证新的cDNA序列。结果 共获得25条上调表达的基因,分别与炎症反应、细胞骨架重构、细胞生长和凋亡、胞内信号转导相关,并克隆到3条新基因表达序列标签(EST),RT-PCR验证了这些新EST序列只在LPS刺激的内皮细胞中表达。结论 抑制消减杂交有效地克隆了人脐静脉内皮细胞LPS刺激后上调表达基因,有助于阐明LPS直接激活血管内皮细胞的分子机制。

关键词:内皮细胞;脂多糖;抑制消减杂交
中图法分类号:R322.12/R329.28 文献标识码:A

Analysis of up-regulated genes in human umbilical vein endothelial cells stimulated by lipopolysaccharide

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

Abstract: Objective To screen and analyze genes up-regulated in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) stimulated by lipopolysaccharide (LPS). Methods Suppression subtractive hybridization (SSH) was performed between the unstimulated HUVEC (driver) and HUVEC stimulated with LPS (tester) to generate subtractive cDNA library. The library was screened with colony dot hybridization to further verify the differentially expressed cDNA clones. Positive clones were sequenced and BLAST analyzed. The 3 novel cDNA sequences were verified by RT-PCR. Results Twenty-five up-regulated genes related to inflammation, cellular cytoskeletal rearrangement, cellular proliferation and apoptosis, intercellular message transduction, and 3 new expression sequence tags (EST) were acquired. RT-PCR indicated the expression of the new ESTs only in HUVEC stimulated by LPS. Conclusion SSH is a powerful technique of high sensitivity for the detection and clone of up-regulated gene expressed in HUVEC stimulated by LPS, which may be helpful to clarify the mechanism of endothelial cells activation stimulated by LPS.

Key words: endothelial cells; lipopolysaccharide; suppression subtractive hybridization

严重烧创伤易诱发革兰阴性菌感染,导致中毒性休克和多器官功能衰竭。革兰阴性菌活性成分脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS),进入血循环后激活髓样细胞(如单核巨噬细胞)和实质细胞(如内皮细胞),释放大量炎症介质诱发全身性炎症反应的形成,并进一步发展为中毒性休克[1]。中毒性休克常伴有严重的系统性血管病变,如播散性血管内凝血和血管渗漏综合征等,其发病机制与LPS作用于血管内皮细胞后引起细胞表型改变和功能障碍密切相关,而细胞表型变化的基础是基因表达的改变,因此,克隆差异表达基因对于阐明LPS活化血管内皮细胞的机制有重要意义。本实验报告了我们通过抑制消减杂交筛选人脐静脉内皮细胞(Human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)LPS直接刺激后上调表达基因并进行分析的结果。

1 材料与方法

1.1 细胞培养及分组

将HUVEC细胞株ECV-304(ATCC)培养于含10%胎牛血清M_{199}培养基中,待细胞处于对数生长期中,分成LPS处理组(T组)和对照组(D组)。其中T组细胞用LPS(O111:B4, Sigma)刺激6 h(100 ng/ml)。

1.2 抑制消减杂交

提取两组细胞总RNA,按Oligotex Poly(A) Quick kit (Qigan)分离出mRNA,以T组为实验方,D组为驱使方进行正向抑制消减杂交(Suppression substractive hybridication, SSH),按PCR-select

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(39830400)
作者简介:梁自文(1967—),男,四川省彭州市人,博士研究生,主治医师,主要从事血管内皮细胞活化机制方面的研究,发表论文15篇。电话:(023) 68754523
收稿日期:2001-01-21;修回日期:2002-06-20

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

cDNA subtraction kit(Clontech)说明书操作并略加改进,简述如下:两组mRNA反转录合成双链cDNA,*Rsa*I酶切成平头末端片段;将实验方酶切cDNA分成两份,分别与接头1和接头2R连接,分析连接效率;用连有接头的实验方与未连接头的驱使方进行双轮消减杂交;以杂交产物为模板与接头外侧序列进行第一轮PCR扩增,反应条件为94℃变性25 s,94℃ 10 s,65℃ 30 s,71℃ 1.5 min,30个循环,将产物稀释后再以接头内侧序引物进行第二轮PCR扩增,反应条件为94℃ 10 s,68℃ 30 s,72℃ 1.5 min,15个循环,72℃延伸10 min。同理以D组为实验方,T组为驱使方进行反向SSH反应。

1.3 消减cDNA文库的构建

正向消减杂交产物第二轮PCR扩增后,立即取2 μl产物与2 μl线性化的pT-Adv质粒(Clontech)多克隆位点连接,电穿孔转化感受态大肠杆菌DH5a,将菌液涂在氨苄青霉素/X-gal/IPTG琼脂平板上,过夜培养,蓝白斑显色。

1.4 菌液斑点杂交

随机挑取白色菌落点种于96孔板中,每孔含100 μl LB培养基(氨苄青霉素50 mg/ml),培养过夜,将2张相同尺寸的阳离子尼龙膜消毒后置于含氨苄青霉素的LB琼脂平板上,取1 μl菌液分别接种于两张膜的同一位点上,过夜培养。将尼龙膜经碱变性、中和、80℃固定2 h后备用。取纯化的正向和反向消减杂交第二轮PCR产物各3 μl(约60 ng),用5 μl[α-^{32}P]dCTP(3000 Ci/mmol,北京亚辉)按随机引物法标记为探针,液闪计数测放射比活性。将尼龙膜于72℃预杂交40 min、再各加入等比活性探针杂交20 h,杂交液为ExpressHyb hybridization solution(Clontech),严谨洗膜(68℃ 2× SSC/0.5 % SDS 4× 20 min,0.2× SSC/0.5 % SDS 2× 20 min),−70℃放射自显影过夜。

1.5 阳性克隆的测序和同源性分析

取斑点杂交筛选的阳性克隆,以T7或M13引物在PE ABI PRISM 3700测序仪上测序(上海基康生物技术有限公司代理)。测序结果在GenBank(http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST)中进行序列同源性检索分析。

1.6 RT-PCR验证

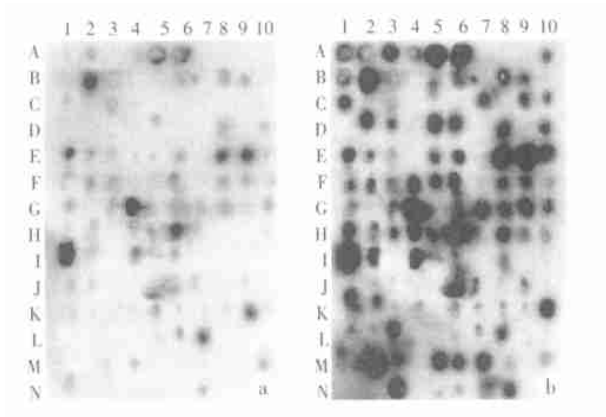
根据目的cDNA序列设计引物,各取1 μg T组和D组总RNA按One Step RNA PCR kit(TaKaRa)说明书在50 μl反应体积中进行一步法RT-PCR反应,反应条件为:50℃ 30 min,94℃ 2 min,30个循环(94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 90 s)。取10 μl产物于2 %琼脂糖电泳。设计引物序列如下:

G3PDH	5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′	
	5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′	438 bp
ST40	5′-CTAAGCAACTTCTGATTCC-3′	
	5′-GAAAGAGCATTGTTTACAG-3′	355 bp
ST67	5′-ACAGTTCATTATATTCTTCC-3′	
	5′-ACCAGAGCACCTCCAAACTG-3′	291 bp
ST78	5′-TATTCTAAGTGGTATAGGTC-3′	
	5′-CCCCTTCCCTTCCTGTTACT-3′	302 bp

2 结果

2.1 消减cDNA文库筛选

随机挑取消减cDNA文库中188个白色菌落进行菌液斑点杂交进一步筛选阳性菌落,取仅与正向消减cDNA探针杂交或杂交信号明显强于反向消减,DNA探针的克隆,结果显示共38个克隆中可能含有差异表达基因,见图1。



a: Dot blots hybridized with cDNA probes made from reverse-subtracted cDNA; b: Dot blots hybridized with cDNA probes made from forward-subtracted cDNA

图1 斑点杂交筛选

Fig 1 Screening by dot blots hybridization

2.2 DNA测序与同源性分析

将38个阳性克隆测序后经同源性比较显示有几个序列相同或来自同一个基因,总共获得25个上调表达基因,其中ST40、ST67和ST78在全长库中未检索到高度同源已知基因,在表达序列标签(EST)库中检索到来自其它组织的同源EST序列,提示它们可能为某个新基因的EST片段,已被GenBank EST库接受。其余22个cDNA序列与已知基因有较高的同源性,见表1。

表1 内皮细胞LPS刺激后上调表达基因与公共数据库中序列的同源性

Tab 1 Differentially expressed genes of HUVECs stimulated by LPS with homology to sequences in the public databases

cDNA (bp)	Accession No.	Identified gene	Location(nt)
ST3 (372)	XM048417	laminin receptor homolog	243-614
ST33 (380)	M12830	IL-8	3556-4021
ST38 (462)	M30257	VCAM-1	2234-2648
ST138(96)	M86400	phospholipase A2 mRNA	1329-1234
ST42 (402)	NM000450	E-selectin	3305-3678
ST162(397)	X14678	MCP-1	528-864
ST35(276)	BC015834	annexin 1	1057-1332
ST18 (271)	BC015695	actin gamma 1	1159-1429
ST48 (273)	NM021104	ribosomal protein L41	233-468
ST69 (244)	XM057981	caveolae protein	2182-2424
ST73 (447)	XM032117	Fas activated serine/threonine kinase	411-845
ST45 (84)	U33201	MDM2 gene	421-514
ST53 (336)	BC008855	G protein alpha subunit 1	834-1169
ST50(277)	NM002266	nuclear localization sequence receptor	1376-1652
ST25 (273)	BC009316	NADH dehydrogenase	327-599
ST64 (170)	XM050257	aldo-keto reductase family 1, member 1	500-668
ST19 (252)	NM014719	KIAA0800 protein	3568-4060
ST27 (397)	AB037715	KIAA1294 protein	4217-4484
ST30 (193)	AK027250	cDNA: FLJ23597	1979-2140
ST58 (384)	XM052860	Hypothetical protein FKSG32	825-1208
ST133 (526)	NM014719	dKIAA0738 protein	3568-4060
ST51 (131)	AK027713	DNA: FLJ14807	168-298

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

ST40(395bp, GenBank No. BI850093)

ACAGAGGGTGACTGTCATAGTTAGCTAAGCAACTTCTGATTCCAGCCCAGAAAACCTACCACTT
TGGGACAGGTTCAATATAGAATGAAATAGTCATTCTTGTATTTTCTTATGCCTCTTCCTTTCTCCT
GCATCTCAATGCATGCTGTATTAGGGAAGGACACCTCACCTGCTACAATTTGGCAAATGAGGCA
GGTAGTAACAAATAGGGCCTTAACTTGCTTTAATTTAATGCACAGATAGGCAGATGCCTAATTCT
GTGCAAAGTGTATTTCATAACTGATTTTCAGAAGACAAAGATGAATCTGAGTCTGTAAGAGTCC
CATGAGATGGATAGGTAAGAGTTAATAAAGTTTCTAACTGTAAACAATGCTCTTTCATGTTGGTG
ATTATTT

ST67(295bp, GenBank No. BI850094)

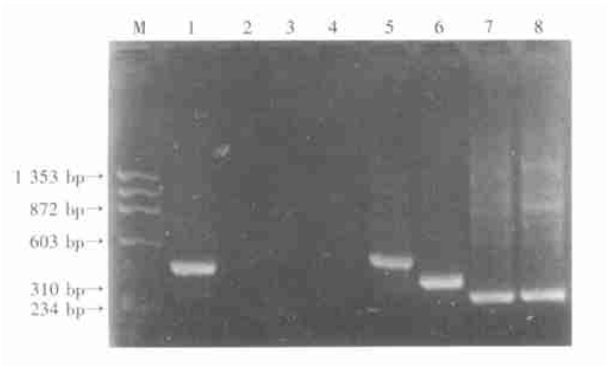
ACAGTTCATTATATTCTTCCTGAGAATAATTTATATCCCCCAACAAACTAAAGCGAGGGTATATTT
TTTCAAAATTAACAGAATGGATGGTGTAACTGGACATCAAAAGAAAACCAAATTCCTGTTTTGC
TTCATTCTCTCCTGGGAAGACAGATACAAGGAAGGGTTAGTTAACTCCAGTGGCTGTAAAATAG
TCAACATG-
GCTTTAATCTTTCTTTATAAATTATATAAAATGGAAAAAGGGGATGGTTCTGGAACT
TCTCCTCAATGCAGTTTGGAGGTGCTCTGGT

ST78(322bp, GenBank No. BI850055)

ACTCCAACTATTCTAAGTGGTATAGGTCGTTACCAGGAGTGTTCAAATAACCACTTAGAGAAACC
ACAGTGCTGCAGTGTTCTCATCACAAAACACTTTCAAAATTCATTAGAAATGACACAAACATCT
CCCCTGGACTAGAGAAAGCACTCCCCAAACAAGGCATTACAATGAAGGGGTTAAGTGTTCCCT
GACAAACCAGCCAAGGGGGGAGAGAACCGGGGTGGGAATAACTCCGGAGCCAGGCATAGTCA
GAGCCATCTGTATTTACAGTTAGGCCCTAATCATCTACAGTAACAGGAAGGGAAGGGGTAAGAA
ACGT

2.3　RT-PCR 结果

ST40、ST67 和 ST78 仅在内皮细胞受到 LPS 刺激后才表达, 而在正常内皮细胞不表达, 见图 2。



D group (lane1-4): 1: G3PDH; 2: ST40; 3: ST67; 4: ST78; T group (lane5-8): 5: G3PDH; 6: ST40; 7: ST67; 8: ST78; M: φX174/Hae Ⅲ digest size markers

图 2　LPS 刺激后 ST40、ST67 和 ST78 mRNA 的表达

Fig 2　Expression of ST40, ST67 and ST78 specific mRNA in response to LPS stimulation

3　讨论

严重烧创伤易致革兰阴性菌感染, LPS 大量进入血循环, 激活单核巨噬细胞、白细胞和血管内皮细胞, 释放大量炎症介质, 诱发全身性炎症反应, 进一步发展为中毒性休克。在体内, LPS 可通过间接和直接两条途径激活血管内皮细胞, 其受体是由膜锚定蛋白 CD14、MD-2 和跨膜蛋白 TLR4(Toll-like receptor 4)组成的受体复合物, 信号通过以 NF-κB 为主的多条通路进行转导, 调控相关基因的表达, 改变内皮细胞表型[2,3]。由于相同基因的不同表达决定了细胞表型的变化, 因此, 克隆内皮细胞 LPS 刺激后差异表达基因对于阐明 LPS 激活血管内皮细胞及中毒性休克发生的机制有重要意义。

随着人类基因组计划的进展[4], 发展了许多基因克隆方法, 其中, 由 Diatchenko 等提出的 SSH 技术, 基于抑制 PCR 基础, 可高效、灵敏、特异地分离两组间差异基因, 避免丢失低丰度差异基因信息。本实验利用 SSH 技术, 对 LPS 刺激后内皮细胞上调表达基因进行克隆, 共获得 25 条上调表达差异基因, 按功能大致可分为 5 组, 第 1 组为炎症介质, 如细胞粘附分子-1(VCAM-1)、层粘连蛋白受体、白细胞趋化因子-1(MCP-1)、IL-8、E-选择素。这些基因的上调表达将促进循环白细胞粘附到血管内皮细胞并穿过内皮下基底膜向烧创伤部位游走, 形成局部或全身性炎症反应[5]; 磷脂酶 A2 表达增加促进膜磷脂降解为花生四烯酸和前列腺素, 导致炎症部位毛细血管扩张和充血; 实验中发现 LPS 同时引起内皮细胞表达膜脂蛋白 1 增加, 该蛋白对炎症反应和免疫反应起负调控作用[6], 它的上调表达表明细胞自身能对参与炎症反应的程度进行调控。但有研究表明, 膜脂蛋白 1 对 LPS 的抑制作用仅在 2 h 内较明显, 6 h 后已明显减弱, 而此时 LPS 对内皮细胞的刺激作用正达高峰。第 2 组为与蛋白合成有关的基因, 如核糖体蛋白 L41 和肌动蛋白 r-1。表明 LPS 刺激后内皮细胞合成新的蛋白增加, 以满足功能改变的需要, 特别是细胞骨架蛋白既降解加速, 又合成增多, 使细胞骨架发生重构[7], 是导致内皮细胞形态和通透性改变的重要原因。第 3 组与细胞增殖和凋亡有关, 如小窝蛋白、FAS 活化的丝/苏氨酸激酶(FASK)和 MDM2 基因。小窝蛋白本身是抑制一氧化氮合酶活性的, 最近发现它对细胞增殖有明显的抑制作用[8]; FASK 是调控细胞凋亡的重要信号分子, 它参与对 caspase 8 的激活作用; 另外, 膜脂蛋白 1 也通过活化 caspase 3 促时细胞凋亡; MDM2 基因促进 P53 蛋白快速泛素化降解, 而 P53 蛋白与细胞的生长密切相关。第 4 组与胞内信号转导有关, 如 G 蛋白 α 亚基和核定位序列受体。已有报道 G 蛋白参与了 LPS 信号转导, 但其详细途径尚不清楚; 核定位序列受体与转录因子从胞浆移位入核调控相关基因表达密切相关, 它的上调表达反映了 LPS 刺激细胞导致多条信号通路转录因子激活竞相入核的需要。第 5 组与能量代谢有关, 如

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

NADH 脱氢酶和醛-酮还原酶。LPS 作用于内皮细胞后,引起胞内能量代谢障碍,葡萄糖氧化受阻,转而经醛糖还原生成山梨醇,后者在山梨醇脱氢酶作用下以 NAD 作为受氢体氧化还原成果糖,过量的果糖增加多元醇通路和胶原糖基化形成Ⅰ型和Ⅳ型胶原,促使基底膜增厚和屏障功能下降。

此外,还有几个功能尚未阐明的基因表达增加,并且克隆到3个可能的新基因序列,它们在 LPS 激活内皮细胞中的作用尚不清楚。然而,有一些已明确表达增加的基因,如 IL-6、IL-1 和组织因子等,在我们的实验中未能克隆到,其原因可能是:①SSH 筛选基因表达丰度差异在4~5倍以上,表达差异不是特别显著的基因将被消减掉;②随机挑取白色克隆进行筛选取有可能丢失部分差异基因;③血管内皮细胞的异质性,在脐静脉内皮细胞上的实验结果不一定能代表所有组织的内皮细胞。

总之,我们的实验结果表明,LPS 直接作用于人脐静脉内皮细胞6 h 后,细胞活化,表现为大量基因表达发生改变,特别是促炎症细胞因子的释放促进白细胞的粘附和移位;细胞骨架重构改变细胞的紧密连接和屏障功能,引起血管通透性增加;细胞增殖受阻,而凋亡增加导致细胞不能及时更新,严重者将导致细胞剥离暴露内皮下基底膜,诱发凝血,加重局部微循环障碍;葡萄糖代谢障碍也使能量合成不足,细胞正常功能难以完成;最终导致系统性血管病变和中毒性休克的形成。

参考文献:

[1] Nakae H, Endo S, Yamada Y, *et al*. Bound and soluble adhesion molecule and cytokine levels in patients with severe burns[J]. Burns, 2000, 26(2): 139—144.

[2] Cario E, Rosenberg I M, Brandwein S L, *et al*. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors[J]. J Immunol, 2000, 164(2): 966—972.

[3] Jersmann H P, Hii C S, Ferrante J V, *et al*. Bacterial lipolysaccharide and tumor necrosis activation of NF-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways[J]. Infect Immun, 2001, 69(3): 1273—1279.

[4] 梁自文,罗向东,杨宗城. 低丰度差异转录基因的克隆和高通量筛选[J]. 国外医学遗传学分册,2001,24(3):172—174.

[5] Steier S, Totzke G, Grunewald E, *et al*. Identification of syntenin and other TNF-inducible genes in human umbilical arterial endothelial cells by suppression subtractive hybridization[J]. FEBS Lett, 2000, 467(2-3): 299—304.

[6] Kim S, Ko J, Kim J H, *et al*. Differential effects of annexins I, II, III, and V on cytosolic phospholipase A2 activity: specific interaction model[J]. FEBS Lett, 2001, 489(2-3): 243—248.

[7] Joe G, Feng L, Alexander D V, *et al*. Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement[J]. J Clin Invest, 2001, 108(5): 689—701.

[8] Fujita T, Toya Y, Iwatsubo K, *et al*. Accumulation of molecules involved in alpha1-adrenergic signal within caveolae: caveolin expression and the development of cardiac hypertrophy[J]. Cardiovasc Res, 2001, 51(4): 709—716.

(编辑 张大春)

《武警医学院学报》(双月刊)2003年征订启事

《武警医学院学报》是由武警医学院主办的综合性学术刊物,是中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,被《中文科技资料目录》、《中国生物医学光盘数据库》、《中文科技期刊数据库》、《中文生物医学期刊文献数据库》、《中国学术期刊》(光盘版)、《中国期刊网》和《万方数据-数字化期刊群》等国内多家重要数据库和权威性文摘期刊所收录。

本刊报道校内外广大医疗、教学、科研工作者在医药科研领域中所取得的新理论、新成果、新经验、新技术、新方法。主要栏目设有:专家论坛、论著、综述、经验交流、学生园地等。

本刊从2003年1月起改为双月刊,版本采用国际标准大16开本(210mm×297mm),每期80页。国内统一刊号:12—1294/R,国际标准刊号:ISSN1008—5041,每期定价6.00元,全年36.00元,欢迎广大医务工作者订阅。请直接汇款至本刊编辑部,免收邮寄费。

地 址:天津市河东区《武警医学院学报》编辑部 邮政编码:300162

电 话:(022)60578423 传真:(022)24799262

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