

·基础研究·

锌指蛋白 A20 基因抑制缺氧诱导内皮细胞 CD54 的表达

张剑凯^{1,2}, 李国营³, 朱楚洪², 糜建红², 应大君²

(1. 广东医学院基础学院解剖学教研室, 广东 湛江 524023; 2. 第三军医大学解剖学教研室//国家教育部生物力学与组织工程重点实验室生物力学室, 重庆 400038; 3. 广东药学院解剖学教研室, 广东 广州 510224)

摘要:【目的】探讨外源性锌指蛋白基因 A20 对缺氧诱导内皮细胞黏附分子 CD54 表达的影响。【方法】培养原代人脐静脉内皮细胞, 将细胞分组建立缺氧模型; 采用 DOTAP 脂质体介导 pcDNA3.1EHA20 质粒转染培养的内皮细胞, 筛选抗 G418 的阳性克隆, 经免疫荧光鉴定 A20 基因的表达; 采用免疫组化和原位杂交检测内皮细胞 CD54 的表达。【结果】A20 基因在经 G418 筛选后的内皮细胞中得到高效表达。缺氧能诱导人内皮细胞 CD54 高表达, 外源性 A20 基因能抑制 75% 以上由缺氧诱导的内皮细胞 CD54 表达, 两者间相差明显 ($P < 0.01$)。【结论】外源性 A20 基因能够显著抑制缺氧诱导的内皮细胞活化, 有效抑制 CD54 的表达, 可能在内皮细胞缺氧损伤中具有保护作用。

关键词: A20 基因; 黏附分子; CD54; 内皮细胞; 缺氧

中图分类号: R329.25; R329.21 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-3554(2008)06-0654-05

Zinc Finger Protein Gene A20 Inhibits Hypoxia-inducible CD54 Expression of Endothelial Cells

ZHANG Jian-kai^{1,2}, LI Guo-ying³, ZHU Chu-hong², MI Jian-hong², YING Da-jun²

(1. Department of Anatomy, Basal Institute of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China;

2. Department of Anatomy, Biomechanics Section, The Key Lab for Biomechanics and Tissue Engineering of the Ministry of National Education, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;

3. Department of Anatomy, Guangdong College of Pharmacy, Guangzhou 510224, China)

Abstract: 【Objective】 To explore the effectiveness of exogenous A20 gene on hypoxia-induced CD54 expression of endothelial cells. 【Methods】 Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were cultured and then the hypoxic model was established. With the help of DOTAP liposome, the endothelial cells were transfected with pcDNA3.1EHA20. The positive cell clones were selected with G418. The stable transfection and expression of A20 in the endothelial cells were determined by immunofluorescence analysis. The CD54 expression was checked by immunohistochemistry and in situ hybridization. 【Results】 Abundant A20 gene can be expressed stably in endothelial cells transfected with pcDNA3.1EHA20. Hypoxia significantly increased the expression of CD54 in endothelial cells. Exogenous A20 gene inhibited hypoxia-induced CD54 expression by 75%, which had a significant difference ($P < 0.01$). 【Conclusion】 Exogenous A20 gene can significantly inhibit the activation of HUVECs and the expression of hypoxia-induced CD54, which may play a protective role in hypoxia-injured endothelial cells.

Key words: A20 gene; adhesion molecule; CD54; endothelial cells; hypoxia

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2008, 29(6): 654-658]

收稿日期: 2008-06-24

基金项目: 国家自然科学基金(30770575)

作者简介: 张剑凯(1973-), 男, 河南商丘人, 医学硕士, 讲师, 主要从事解剖临床应用与基础研究工作, E-mail: zhangjiankai2002@163.com; 朱楚洪, 通讯作者, E-mail: Chuhong@mail.tmmu.com.cn

内皮细胞(endothelial cells, EC)结构或功能受损是大多数心血管疾病共同的特征性病变,也是其始动环节,黏附分子(adhesion molecule)在内皮细胞受损过程中起重要作用,控制内皮细胞黏附分子的表达在防止心血管疾病发生中至关重要^[1]。内皮细胞缺氧损伤是许多心血管疾病的病理基础,缺氧导致内皮细胞结构和功能损伤,诱导内皮细胞活化及黏附分子表达^[2]。锌指蛋白 A20 基因(zinc finger protein A20 gene,简称 A20)是体内炎症反应过程中内源性表达的一种炎症调节蛋白,最先确定是在肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)诱导的内皮细胞中获得,在内皮细胞受外界损伤因子刺激时能保护细胞,属内皮细胞保护基因^[3]。本研究通过观察内皮细胞转染外源性基因 A20 在缺氧培养条件下表达 CD54(即细胞间黏附分子-1, intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)的情况,探讨 A20 基因对内皮细胞缺氧损伤抑制 CD54 表达的作用,将会为心血管疾病的防治提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 质粒、菌株和试剂

pcDNA3.1EHA20 质粒由比利时 LMBP Dr. Martine V 提供相应 A20cDNA 质粒在第三军医大学解剖学教研室重点实验室重组构建并保存,其中 EHA20 为人 A20cDNA,其 N 末端标记有人体中不存在的 E-tag 序列,便于检测其表达。大肠杆菌 DH5 α 由该室保存。质粒抽提试剂盒、低熔点琼脂糖购自上海生物工程技术有限服务公司,限制性内切酶购自华美公司, T₄ DNA Ligase 购自 Gibco BRL 公司, Lambda DNA EcoR I + Hind III Marker 购自 Promega 公司, DOTAP 脂质体转染试剂购自 Roche 公司, E-tag 抗体购自美国 Amersham pharmacia biotech 公司, M199 培养基及胎牛血清购自 Hyclone 公司, G418 为美国 Gibco 公司产品,胰蛋白酶购自 Sigma 公司, VIII 因子相关抗原抗体、SABC-Cy3 免疫荧光试剂盒、CD54 抗体及原位杂交试剂盒均购自武汉博士德公司。

1.2 人脐静脉内皮细胞培养及鉴定

人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)在无菌条件下取胎儿脐带 15 ~ 20 cm, D-Hanks 液冲洗至静脉内无血,静

脉腔内注入 0.25%胰蛋白酶 5 ~ 10 mL, 37 °C 消化 17 min, 加入含 10%胎牛血清的 M199 培养液终止消化, 收集消化液, 离心 5 min, 弃去上清, 加入含 20%胎牛血清的 M199 培养液, 制成细胞悬液。以 $1 \times 10^5/cm^2$ 的细胞密度接种于 75 cm² 培养瓶内, 于体积分数为 5%CO₂ 孵箱内静置培养。VIII 因子相关抗原免疫荧光组化染色, SABC-Cy3 显色。

1.3 A20 基因转染及抗 G418 阳性克隆的筛选与培养

当细胞融合至 75% ~ 80%时, 采用 DOTAP 脂质体介导将 pcDNA3.1EHA20 重组质粒转染内皮细胞, 具体步骤见 Roche 公司试剂操作手册。转染 18 h 后弃去转染液, 换回正常培养液继续培养 2 d 后弃培养液, 用含 G418 300 $\mu g/mL$ 的 M199 培养液进行筛选, 2 周后收集阳性细胞, 分不同培养瓶继续在 300 $\mu g/L$ 的 G418 筛选下培养 4 周, 按常规在细胞长满时消化、传代, 并在倒置显微镜下动态观察转染前后细胞形态的变化。将转染 pcDNA3.1EHA20 重组质粒后的抗 G418 阳性细胞用丙酮固定, 加 1:50 PBS 稀释的正常羊血清, 室温孵育 10 min, 去多余血清, 不洗, 加一抗即鼠抗人 E-tag 单克隆抗体。4 °C 过夜, 加二抗即生物素化羊抗鼠 IgG, 20 ~ 37 °C 孵育 30 min, 再滴加 SABC-Cy3, 20 ~ 37 °C 孵育 30 min。上述每一步完成之后, 均需 PBS 充分振荡洗涤。最后用 PBS 甘油封片。激光共聚焦荧光显微镜照相。同时对未转染质粒细胞组及转染 pcDNA3.1 细胞组也用相同的方法进行处理, 作为对照。选择出高表达 A20 基因的抗 G418 阳性克隆细胞用于后续实验。

1.4 细胞缺氧模型的建立及实验分组

将缺氧组细胞放入缺氧培养罐^[4]。罐内保持 37 °C 恒温, 同时持续通入体积分数为 5%CO₂ 和 95%N₂ 混合气体, 多次抽取罐内气体作气体分析, 使罐内 PO₂ 保持 (6.5 ± 0.4) mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa)。以往有人研究了内皮细胞在不同缺氧时间(0、12、24、48 h)内皮细胞的凋亡情况^[4], 表明缺氧可直接导致内皮细胞凋亡, 且随着缺氧时间的延长细胞凋亡率增加。本实验中将培养的内皮细胞分为 3 组: 未转染的正常对照组、转染空载体 pcDNA3.1 组和转染 pcDNA3.1EHA20 组。每组再分别缺氧培养及正常条件下培养 24 h 作为自身对照。

1.5 CD54 表达的检测

对上述各组细胞分别用两种不同的方法进行

CD54 表达检测,即免疫荧光组织化学法和原位杂交法。

1.5.1 免疫荧光组织化学法检测 CD54 的表达

一抗为鼠抗人 CD54 抗体,二抗为生物素化羊抗鼠 IgG,再加 SABC-Cy3,上述各步之间均需用 0.01 mol/L PBS 充分洗涤。最后用 PBS 甘油封片,显微镜观察 CD54 的表达。

1.5.2 原位杂交法检测 CD54 的表达

原位杂交按常规方法进行,其中敏感加强型探针序列为:5'-TGC ATC CCC CAG GCC ACC AT-3',5'-GCC GAG GTC CAT GTC GTA CGC-3'。计算机图像分析结果。

1.6 统计学方法处理

所有数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 10.0 处理,行 ANOVA 检验,取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结 果

2.1 培养人脐静脉内皮细胞的鉴定

倒置相差显微镜下可见内皮细胞呈棱形或多角形,汇合成片后可形成鹅卵石状镶嵌排列。Cy3 为新一代荧光,在激发后发射鲜红色荧光,免疫荧光组化染色,Ⅷ因子相关抗原表达呈阳性(图 1)。

2.2 A20 基因表达检测

激光共聚焦显微镜观察可见转染 pcDNA3.1 EHA20 的内皮细胞胞质中有很强的红色荧光,胞核区未见荧光(图 2)。实验表明,经 DOTAP 介导转染、并经 G418 选择的阳性细胞中,A20 基因表达细胞占 95%以上,选择 A20 基因高表达细胞培养用于后续实验。而作为对照组的转染 pcDNA3.1 及未转染质粒的内皮细胞未见红色荧光^[4]。

2.3 CD54 表达的检测

实验结果发现正常培养条件下转染和未转染质粒的内皮细胞中 CD54 表达极弱。缺氧条件下培养 24 h 后,转染 pcDNA3.1 组和未转染组的内皮细胞中 CD54 表达均比正常培养条件下明显升高($P < 0.01$),见图 3A、3B、4A、4B;而 A20 基因转染组的内皮细胞 CD54 表达在正常情况下和缺氧培养 24 h 后变化不明显($P > 0.05$)。缺氧培养 24 h 后,转染 A20 基因组与未转染组和转染 pcDNA3.1 组相比较其 CD54 的表达差异非常显著($P < 0.01$;表 1)。

表 1 各组内皮细胞 CD54 表达的检测

Table 1 The CD54 expression of HUVECs in different groups ($\overline{OD} \pm s, \times 10^3$)

Group	Immunohistochemistry		In situ hybridization	
	Hypoxia 24 h	Normal	Hypoxia 24 h	Normal
Control	213 ± 17 ¹⁾	13 ± 2	203 ± 15 ¹⁾	11 ± 6
pcDNA3.1	218 ± 16 ¹⁾	14 ± 4	207 ± 8 ¹⁾	11 ± 7
pcDNA3.1EHA20	13 ± 5 ²⁾³⁾	12 ± 5	10 ± 6 ²⁾³⁾	11 ± 6

1) $P < 0.01$ compared with normal condition; 2) $P < 0.01$ compared with pcDNA3.1 group; 3) $P < 0.01$ compared with control group

3 讨 论

3.1 ICAM-1 参与介导白细胞与内皮细胞起始黏附,抑制其表达以保护内皮细胞

黏附分子(adhesion molecule)介导细胞与细胞间以及细胞与细胞外基质间的识别和黏附,参与机体多种生理病理过程,其不正常表达在心血管疾病尤其是动脉粥样硬化(Atherosclerosis,AS)等发生发展过程中扮演重要角色^[1]。ICAM-1 属于黏附分子中免疫球蛋白超家族的重要成员,正常情况下低水平表达于血管内皮细胞,但在 IL-1、TNF- α 、IFN- γ 等炎症因子刺激下,可导致 ICAM-1 持续异常高表达,致自身免疫平衡紊乱,单核巨噬细胞在局部大量聚集,并释放多种炎症因子,加速炎症细胞浸润,细胞外基质(ECM)产生增多,降解减少,最终对机体造成不利的影响。有研究表明^[5],ICAM-1 与动脉粥样硬化的形成有关,Okada 等^[6]提出 ICAM-1 能够引起血管内皮损伤,可作为血管内皮功能障碍的标志物之一。因此,研究如何调控或抑制 ICAM-1 的表达以减少对血管的损伤,将对预防心血管疾病的发生发展有着重要意义。

3.2 缺氧损伤诱导内皮细胞黏附分子 CD54 异常表达

疾病导致的微循环障碍,使组织、细胞缺氧,是许多临床疾病尤其是血管性疾病发生与发展的重要改变之一。缺氧能够加速血管内皮细胞的凋亡,破坏内皮结构,使内皮功能出现异常,导致血管痉挛、血小板聚集、血栓形成甚至血管阻塞。不同的缺氧时间对 HUVECs 的损伤程度具有不同影响,且随着缺氧时间的延长(0、6、12、24、48 h),其细胞凋亡率逐渐升高^[4],说明缺氧作为一种致病因素,对内皮细胞的损伤是随缺氧时间的延长而加重的。本实验选择培养 24 h 作为观察时点,正

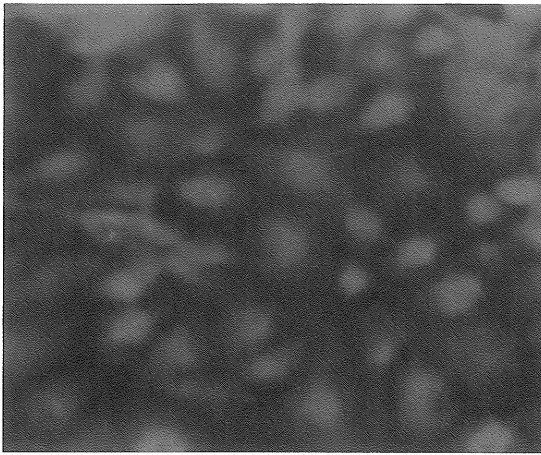


图 1 VIII因子相关抗原鉴定内皮细胞
Fig.1 Identification of endothelial cells by immunofluorescence histochemistry VIII factor related antigen (× 200)

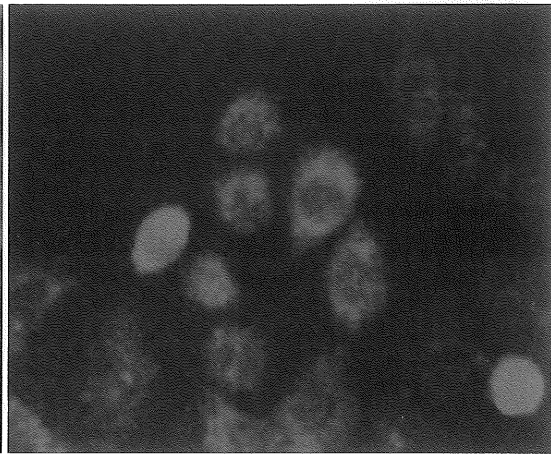


图 2 免疫荧光检测转染内皮细胞 A20 基因表达
Fig.2 Expression of A20 in the transfected endothelial cells detected by immunofluorescence (× 400)

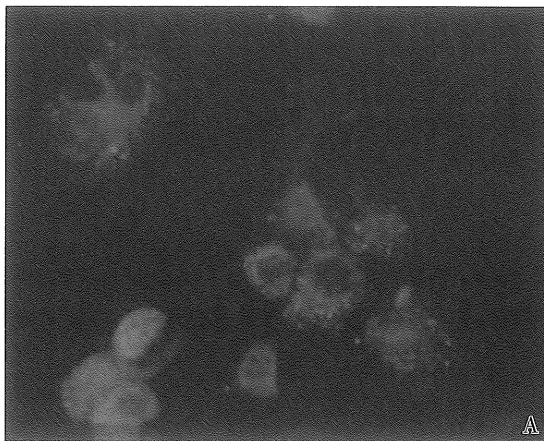


图 3 免疫荧光组织化学法检测内皮细胞在缺氧诱导 24 h 后 CD54 的表达
Fig.3 CD54 expression of HUVECs checked by immunohistochemistry (× 400)
A: untransfected with A20 gene; B: transfected with A20 gene

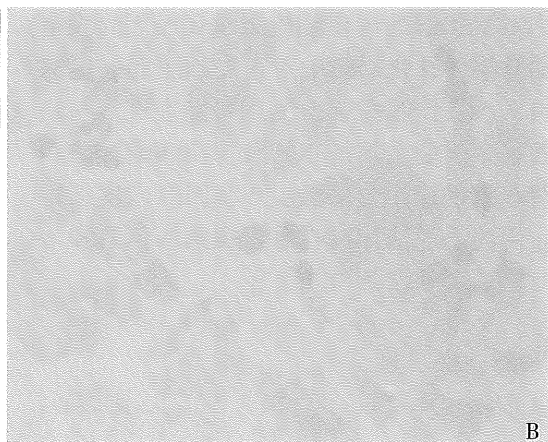
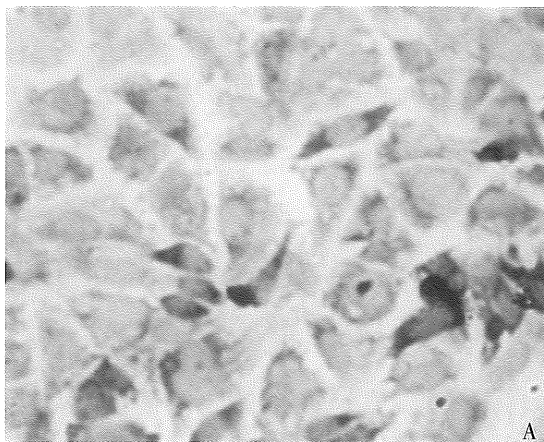


图 4 原位杂交法检测内皮细胞在缺氧诱导 24 h 后 CD54 的表达
Fig.4 CD54 expression of HUVECs checked by in situ hybridization (× 200)
A: untransfected with A20 gene; B: transfected with A20 gene

常条件下培养的内皮细胞 CD54 的表达极弱,但是在缺氧条件下培养 24 h 后,内皮细胞中可见高表达的 CD54,这表明此时的内皮细胞已被活化。缺氧损伤诱导内皮细胞活化并表达 CD54 上调,此与 Min 等^[7,8]研究缺血再灌注、缺氧再复氧等因素诱导其表达上调的报道一致。

3.3 A20 抑制内皮细胞黏附分子 CD54 表达,可能通过阻断 NF- κ B 信号转导途径

本实验采用 A20 基因转染原代培养的人脐静脉内皮细胞,观察缺氧条件下转染细胞黏附分子 CD54 的表达情况,尝试探讨 A20 对缺氧损伤内皮细胞表达 CD54 的调控作用。结果发现 A20 转基因处理后的内皮细胞,其 CD54 在缺氧刺激培养后表达增加,但 A20 基因能抑制 75% 以上的表达。本实验结果表明 A20 基因可有效抑制缺氧损伤刺激的内皮细胞活化,下调其黏附分子的表达。

A20 是炎症时 NF- κ B 活化后由 NF- κ B 介导自体合成的一种强力抑制 NF- κ B 活化的炎症反应特异性调控蛋白^[9],其通过抑制各种损伤机制中炎症信号转导途径的重要核转录因子 NF- κ B 的活化^[10],减少 TNF- α 和 IL-1 β 等炎性细胞因子的产生,特异性地调节细胞所处的功能状态,参与炎症时机体对自身组织细胞的保护,表现出抗炎、抗凋亡的双重作用^[3]。A20 能够下调缺氧损伤内皮细胞黏附分子的表达,其机制可能是 A20 通过有效抑制缺氧损伤诱导的 NF- κ B 活化,减缓内皮细胞功能失调,对缺氧内皮细胞的保护将阻止内皮细胞功能的进一步恶化,从而有效地抑制了缺氧引起的内皮细胞损伤。

本实验以往的研究表明,A20 基因可以有效的抑制内毒素引起的内皮细胞组织因子^[4]的表达并且在动脉粥样硬化损伤中对内皮细胞起一定的保护作用^[11]。综上所述,A20 基因可能在许多与缺氧有关的临床疾病尤其是心脑血管疾病的预防和治疗中有一定的应用价值。A20 基因对内皮细胞的保护作用为基因治疗在心脑血管疾病的预防和治疗方面提供了新的思路和方法。

参考文献:

- [1] Blankenberg S, Barbarux S, Tirit L. Adhesion molecules and atherosclerosis[J]. *Atherosclerosis*, 2003,170(2): 191-203.
- [2] Farhangkhoe H, Khan ZA, Kaur H, et al. Vascular endothelial dysfunction in diabetic cardiomyopathy: Pathogenesis and potential treatment targets [J]. *Pharmacol Ther*, 2006,11:384-399.
- [3] Wertz IE, O'Rourke KM, Zhou H, et al. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 down regulate NF-kappaB signaling[J]. *Nature*, 2004, 430(7000):694-699.
- [4] Zhu CH, Ying DJ, Mi JH, et al. The zinc finger protects endothelial cells from burns serum injury [J]. *Burns*, 2004,30(2):127-133.
- [5] Rizzoni D, Muiesan ML, Porteri E, et al. Circulating adhesion molecules and carotid artery structural changes in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus [J]. *J Hum Hypertens*, 2003(17):463-470.
- [6] Okada S, Shikata K, Matsuda M, et al. Intercellular adhesion molecule-1 deficient mice are resistant against renal injury after induction of diabetes [J]. *Diabetes*, 2003(52):2586-2593.
- [7] Min JK, Kim YM, Kim SW, et al. TNF-related activation-induced cytokine enhances leukocyte adhesiveness: induction of ICAM-1 and VCAM-1 via TNF receptor-associated factor and protein kinase C-dependent NF-kappaB activation in endothelial cells [J]. *J Immunol*, 2005,175(1):531-540.
- [8] Ziegelstein RC, He C, Hu Q. Hypoxia/reoxygenation stimulates Ca²⁺-dependent ICAM-1 mRNA expression in human aortic endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004,322(1):68-73.
- [9] Liuwantara D, Elliot M, Smith MW, et al. Nuclear factor-kappaB regulates beta-cell death: a critical role for A20 in beta-cell protection[J]. *Diabetes*, 2006,55 (9):2491-2495.
- [10] Zhou ZG, Connell MC, MacEwan DJ. TNFR1-induced NF- κ B, but not ERK, p38MAPK or JNK activation, mediates TNF-induced ICAM-1 and VCAM-1 expression on endothelial cells[J]. *Cell Sig*, 2007,21(9):1238-1248.
- [11] 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.

(编辑 徐杰)