

内源性一氧化碳对肺动脉平滑肌细胞 凋亡基因表达谱的影响

孙晓洁 余莉 王晓琴 刘忠强 王娟 高正祥 刘瀚旻

(四川大学华西第二医院肺血管重构研究室,四川 成都 610041)

[摘要] 目的 运用芯片技术研究内源性一氧化碳(CO)刺激下血管平滑肌细胞凋亡相关基因表达谱的变化。**方法** 取 Sprague-Dawley (SD)大鼠肺动脉平滑肌细胞进行离体培养,用血小板源性生长因子 BB(platelet-derived growth factor,PDGF-BB, 20 ng/mL)和高氯血红素(hemin, 20 μg/mL)进行刺激后 2 h,用 Affymetrix 表达基因谱芯片检测其基因表达谱变化。**结果** PDGF 刺激后,Map2k3(P38)信号通路中相关差异表达基因 *Kras*、*Nras*、丝分裂原蛋白激酶的激酶 Map2k3、细胞周期素 *CyclinD1*、*CyclinH*、*CyclinL1* 等的表达显著上调,而周期素依赖性蛋白激酶抑制因子 *P27* 的表达显著下调。Hemin 刺激后,P53 依赖途径中的一些基因如:*Gadd45α*、*P21*、*Trp53inp1* 表达显著上调。**结论** 内源性 CO 所引发的血管平滑肌细胞的凋亡可能与 P53 调控途径密切相关。

[中国当代儿科杂志,2010,12(11):882-885]

[关键词] 基因芯片;凋亡相关差异表达基因;血管平滑肌细胞;大鼠
[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)11-0882-04

Effects of endogenous carbon monoxide on gene expression profiles associated with the apoptosis of pulmonary arterial smooth muscle cells

SUN Xiao-Jie, YU Li, WANG Xiao-Qin, LIU Zhong-Qiang, WANG Juan, GAO Zheng-Xiang, LIU Han-Min. Pulmonary Vascular Remodeling Research Unit, West China Second University Hospital, Chengdu 610041, China (Liu H-M, Email: myuxuan@163.net)

Abstract: Objective To identify the gene expression profiles associated with the apoptosis of pulmonary arterial smooth muscle cells stimulated by carbon monoxide (CO). **Methods** Primary cultured Sprague-Dawley rat pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMC) were stimulated by platelet-derived growth factor (PDGF, 20 ng/mL) and hemin (20 μmol/L). Cells were harvested after 2 hrs and Affymetrix microarrays were used to detect the gene expression profile. **Results** Some genes associated with Map2k3 (P38) signal pathway, such as *CyclinD1*, *CyclinH*, *CyclinL1*, *MAP2K3*, *Kras* and *Nras*, were upregulated, but *P27* expression was downregulated after PDGF treatment. After endogenous CO treatment, some genes associated with P53 pathway, such as *Gadd45α*, *P21* and *Trp53inp1*, were upregulated. **Conclusions** P53 pathway probably plays an important role in apoptosis of pulmonary arterial smooth muscle cells treated with endogenous CO.

[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (11):882-885]

Key words: Microarray; Differentially expressed genes associated with apoptosis; Vascular smooth muscle cell; Rats

肺血管重构是肺动脉高压的主要病理学改变^[1]。血管重构受细胞增殖及凋亡双重机制调控。近二十年来,人们发现内源性一氧化碳(CO)可以通过旁分泌与自分泌的方式来调控血管平滑肌细胞的增殖与凋亡^[2-3]。但其分子调控机制不甚清楚。本研究利用基因芯片技术,用内源性 CO 干预处于异常生长状态的肺动脉平滑肌细胞,通过对其凋亡相关基因表达谱的分析,来探讨内源性 CO 对肺动脉平滑肌细胞凋亡调控的可能分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

M199 培养基购于 GIBCO 公司;血小板源性生长因子 BB(PDGF-BB)和高氯血红素(hemin)购于 Sigma 公司;胎牛血清(FBS)购自 Hyclone 公司;α-actin 抗体购自博瑞克生物有限公司;Trizol、Superscript TmII、DNA Ligase 均购自 Invitrogen 公司;RNeasy min Kit 和 Oligotex Diret Mrna Kit 购自 Qiagen 公司;IVT labeling Kit、Gene chip T7-Oligo(Dt) Promoter Primer Kit、Affymetrix

[收稿日期]2010-02-27;[修回日期]2010-04-18
[基金项目]国家自然科学基金资助项目,项目号 30300145。
[作者简介]孙晓洁,女,硕士,主治医师。现工作单位:陕西省交通医院儿科,邮编:710068。
[通信作者]刘瀚旻,教授。

mouse 430 2.0 基因表达谱芯片购自 Affymetrix 公司。

1.2 大鼠肺动脉平滑肌细胞培养及分组

试验用 110 ± 10 g 雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠(购自华西医学实验动物中心),麻醉后,于无菌状态下迅速取肺动脉血管,分离中膜,剪碎并置于培养瓶内,采用含 20% FBS 的 M199 培养液于 37°C , 95% 空气, 5% 二氧化碳条件下贴块法培养。经形态学及 α -肌动蛋白(α -actin)免疫组化染色证实为平滑肌细胞。取第 4 代细胞,胰酶消化后稀释并配置计数细胞浓度为 $1 \times 10^5/\text{L}$ 的细胞悬液,接种于 75 cm 的培养皿内,待平滑肌细胞培养至 80% 融合状态时,采用含 0.5% FBS 的 M199 继续培养细胞 24 h 后随机分为对照组:不加特殊刺激因素(5 个培养瓶);实验组 I:加有 20 ng/mL PDGF-BB 的刺激组(5 个培养瓶);实验组 II:加有 20 ng/mL PDGF-BB 及 20 $\mu\text{mol/L}$ hemin 的刺激组(5 个培养瓶);于加药 2 h 后收集细胞。各组的 5 瓶细胞收集混匀后备用。

1.3 各组肺动脉平滑肌细胞基因表达的差异检测

应用 Affymetrix 表达谱基因芯片检测。取各组收集的细胞,利用 Trizol 一步法提取大鼠肺动脉平滑肌细胞的总 RNA,电泳及分光光度计测 A260/A280 以鉴定总 RNA 质量。将每一组提取的 RNA 50 μL 加入 RNA 纯化离心柱中进行纯化。定量后每组取 5 μg 总 RNA,以 T7-(d7)24 为引物进行反转录反应,总体系为 12 μL 。将反转录合成的双链 cDNA 加入 cDNA 纯化离心柱内进行纯化。以每组反转录 cDNA 为模板合成带有生物标记的 cRNA 并进行纯化。每组各取 20 μg 带有生物标记的 cRNA 加入 cRNA 裂解缓冲液中,进行片断化,后再各取 10 μL 片断化 cRNA 与 mouse 430 2.0 基因表达谱芯片进行杂交,将芯片置于杂交炉中 45°C , 60 rpm 转速下杂交 16 h。洗涤完毕后用 Gene array Scanner 3000 7G 扫描仪进行扫描。通过扫描得到对照组与实验组的荧光信号。再利用 GCOS(Affymetrix 公司)图像分析软件对芯片图像进行分析,并把图像信号转化为数字信号,最后以各实验组与对照组进行比较,差异为两倍的标准来确定差异表达基因,比值 ≥ 2 为表达显著上调,比值 ≤ 0.5 为表达显著下调。为了减少误差,在列表中用该比率的自然对数值表示, ≥ 1 为表达显著上调。

2 结果

2.1 细胞形态及 α -actin 免疫组化染色结果

所培养细胞光镜下可见呈条索状生长,经 α -actin 免疫组化染色后,可见细胞浆呈黄色或棕黄色,

证实所培养的细胞确实为血管平滑肌细胞。

2.2 总 RNA 抽提结果

抽提总 RNA 经琼脂糖凝胶电泳后可见 18 S 和 28 S 条带清晰,说明 RNA 的纯度基本达到要求,根据紫外线分光光度计检测 A260/A280 的吸收值,总 RNA 的获得率为 $0.614 \sim 1.033 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

2.3 芯片杂交结果

将图像信号转化为数字信号,并根据同一探针基因在不同组中所测出的信号强度值,绘制散点图。散点图中 X 轴为对照组的信号值,Y 轴为实验组的信号值,图中红色点代表在实验组和对照组中该基因的检测值均为 P(Present)即达到检出所规定的信号强度,蓝色的点代表两组中一个值为非 P,黄色的点代表两组均为 A(Absent)即未达到检出所规定的信号强度。散点图中共有 8 条斜线,它们的斜率由上往下为 30, 10, 3, 2, -2, -3, -10, -30, 以差异为两倍的标准来确定差异表达基因,所以筛选出来的差异基因应该在 2 和 -2 线外,即实验组与对照组进行比较,比值 ≥ 2 表示表达显著上调,比值 ≤ 0.5 表示表达显著下调。且为红色点所代表的基因。见图 1、图 2。

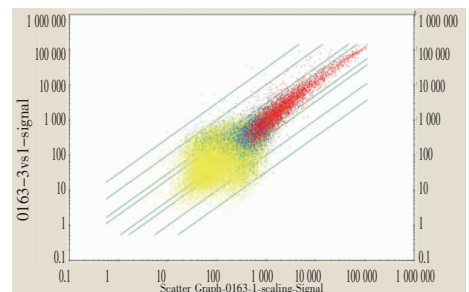


图 1 实验组 I 与对照组杂交后信号对比散点图

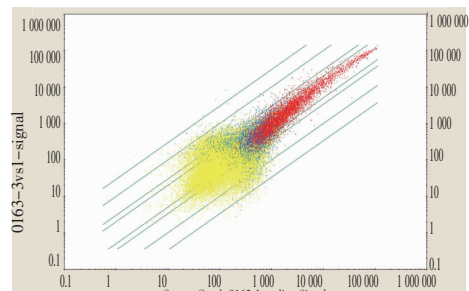


图 2 实验组 II 与实验组 I 杂交后信号对比散点图

2.4 PDGF 刺激后 Map2k3(P38) 信号通路中相关差异表达基因

Kras、Nras、丝分裂原蛋白激酶的激酶 Map2k3、细胞周期素 CyclinD1、CyclinH、CyclinL1 等的表达显著上调,而周期素依赖性蛋白激酶抑制因子 P27 的表达显著下调。见表 1。

2.5 Hemin 刺激后凋亡相关差异表达基因

实验组 II 与实验组 I 相比,在 45 102 条基因中差异表达基因有 364 条,其中上调 212 条,下调 152 条,与凋亡相关的差异表达基因 18 条,包括沉默调节蛋白 1 (*Sirt1*)、内质网核信号因子 1 (*Ern1*) 等。其中与平滑肌细胞凋亡相关的 P53 依赖途径中的一些基因如 *Gadd45α*、*P21*、*Trp53inp1* 表达显著上调。

见表 2。

实验组 II 与对照组相比,在 45 102 条基因中差异表达基因有 683 条,其中上调 360 条,下调 323 条,与凋亡相关的差异表达基因 12 条,包括白介素 6 (*IL6*)、*Mcl1*、细胞分裂及凋亡调控因子 1 (*Ccar1*) 等。其中 P53 依赖途径中的一些基因如 *P21*、*Gadd45α*、*Trp53inp1* 表达显著上调。见表 3。

表 1 PDGF 刺激后 Map2k3 (P38) 信号通路中相关差异表达基因

基因库序号	比率 log 值	基因名称	基因代码
M64403.1	1.4	cyclin D1	<i>Ccnd1</i>
BC010202.1	1.1	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	<i>Kras</i>
BM250672	1	cyclin L1	<i>Ccnl1</i>
NM_023243.1	1.1	cyclin H	<i>Ccnh</i>
BB018528	1.2	neuroblastoma ras oncogene	<i>Nras</i>
D87115.1	2	mitogen activated protein kinase kinase 3	<i>Map2k3</i>
NM_009875.1	-1	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (P27)	<i>Cdkn1b</i>

表 2 Hemin 刺激后凋亡相关差异表达基因 (与单独 PDGF 刺激比较)

基因库序号	比率 log 值	基因名称	基因代码
NM_019812	1.5	Sirtuin 1 (silent mating type information regulation 2, homolog) 1 (S. cerevisiae)	<i>Sirt1</i>
BG075179	1.5	Endoplasmic reticulum (ER) to nucleus signalling 1 (Ern1), mRNA	<i>Ern1</i>
BC012955	1.2	tribbles homolog 3 (Drosophila)	<i>Trib3</i>
NM_007570	1.3	B-cell translocation gene 2, anti-proliferative	<i>Btg2</i>
NM_013863	1.7	Bcl2-associated athanogene 3	<i>Bag3</i>
NM_011361	2.1	serum/glucocorticoid regulated kinase	<i>Sgk</i>
NM_134097	2.9	topoisomeraseI binding, arginine/serine-rich	<i>Topors</i>
NM_007836	3.6	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha	<i>Gadd45a</i>
NM_007669	3.8	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	<i>Cdkn1a</i>
NM_010442	4.4	heme oxygenase (decycling) 1	<i>Hmox1</i>
AW495711	3.1	transformation related protein 53 inducible nuclear protein 1	<i>Trp53inp1</i>
BM232298	2	sequestosome 1	<i>Sqstm1</i>
M12573	3.6	heat shock protein 1B	<i>Hspa1b</i>
BC003839	-1	myeloid cell leukemia sequence 1	<i>Mcl1</i>
M60651	-1	phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 1 (p85 alpha)	<i>Pik3r1</i>
NM_011810	-2.1	Fas apoptotic inhibitory molecule	<i>Faim</i>
BG075165	-1.2	Insulin-like growth factor 1, mRNA (cDNA clone MGC:18617 IMAGE:4194295)	<i>Igfl</i>
BC026947	-1	RIKEN cDNA A230072116 gene	<i>A230072116Rik</i>

表 3 Hemin 刺激后凋亡相关差异表达基因 (与对照组比较)

基因库序号	比率 log 值	基因名称	基因代码
NM_031168	4.3	interleukin 6	<i>IL6</i>
BC003839	1	myeloid cell leukemia sequence 1	<i>Mcl1</i>
AW538049	1	cell division cycle and apoptosis regulator 1	<i>Ccar1</i>
AK017622	1.6	phosphatidylserine receptor	<i>Ptdsr</i>
NM_007669	3.5	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	<i>Cdkn1a</i>
NM_007836	2.3	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha	<i>Gadd45a</i>
AW495711	1.3	transformation related protein 53 inducible nuclear protein 1	<i>Trp53inp1</i>
BM232298	2.2	sequestosome 1	<i>Sqstm1</i>
AY057913	2.1	brain derived neurotrophic factor	<i>Bdnf</i>
NM_020581	-1	angiopoietin-like 4	<i>Angptl4</i>
AF319981	-1	melanoma antigen, family H, 1	<i>Mageh1</i>
AK012404	-1.1	BCL2-like 13 (apoptosis facilitator)	<i>Bcl2l13</i>

3 讨论

随着基因组计划的深入发展,基因芯片在基因功能研究中,正发挥着越来越重要的作用。通过它可以快速筛选两个或多个样本之间的差异表达基因,并可以监测同一组织细胞在不同状态下多种基因表达水平的差异,对于揭示疾病的发生发展机制有重要意义。

在肺血管重构中,平滑肌细胞的增殖状态是决定血管反应性和血管重构性的重要因素。近二十年来,人们发现内源性 CO 可以通过旁分泌与自分泌的方式来调控血管平滑肌细胞的增殖与凋亡^[2-3]。但多数学者认为内源性 CO 只对处于异常增殖状态的血管平滑肌细胞发挥作用,而对静息状态的细胞却无显著作用,因此本研究利用 PDGF 促进肺动脉平滑肌细胞增殖;再选择内源性 CO 合成所需要的血红素氧合酶诱导剂 hemin 进行干预,探讨内源性 CO 抑制肺动脉高压形成的作用机制。

本研究结果显示经 PDGF-BB 刺激血管平滑肌后,细胞内 *Kras*、*Nras* 及丝裂素活化蛋白激酶系统中的 *Map2k3* (*P38*) 表达显著上调,细胞周期素 *CyclinD1*、*CyclinH* 及 *CyclinL1* 等的表达也显著上调,而周期素依赖性蛋白激酶抑制因子 *P27* 的表达却明显受抑制,与既往研究结果相符^[4-5]。

Hemin 可以诱导 *Hmox1* 表达进而促进 CO 的生成。本研究也证实经 hemin 刺激后 *Hmox1* 表达上调 16 倍之多。Maines^[6] 则认为该系统是产生内源性 CO 最主要的途径。

多数学者认为平滑肌细胞的凋亡可分为 P53 依赖性和非 P53 依赖性。目前对 P53 调控凋亡的具体机制不甚清楚。有研究表明 P53 蛋白与细胞周期中的 G1、G2 和 M 两个关卡的形成有关,可触发其下游的细胞周期素依赖性蛋白激酶抑制剂 P21 参与细胞周期阻滞,促进细胞凋亡^[7]。有关 CO 对细胞凋亡的调节作用目前并不十分清楚。有研究表明 CO 有促进增殖状态下的细胞发生凋亡的作用^[8],然而也有研究表明其有拮抗炎症状态下的细胞发生凋亡的作用^[9],Brouard 等^[10] 则认为 CO 对细胞凋亡的作用存在细胞类型的特异性。总之 CO 对细胞凋亡的作用是复杂的,可能与细胞所处的状态以及细胞种类有关。本研究结果显示经内源性 CO 干预后, *Trp53inp1* 表达显著上调,同时 P53 的下游基因 *P21* 表达上调近 16 倍,而非 P53 依赖性凋亡途径中的 *Bcl-2*、*Bax* 等则无显著变化,因此推测内源性 CO 所引发的血管平滑肌细胞的凋亡可能属 P53 依赖性。

另外近年研究发现 *Gadd45* 基因家族也是 P53 调控的下游基因,它可以与 P21 相互作用抑制细胞生长^[11],参与细胞凋亡过程^[12]。本研究中 *Gadd45α* 表达上调近 16 倍,进一步说明内源性 CO 所引发的血管平滑肌细胞的凋亡可能与 P53 调控途径密切相关。

本研究发现经内源性 CO 刺激后的 PASMC 与静息状态 PASMC 的基因表达有很大差异,其中抑制细胞增殖和促进凋亡的基因如 *P21*、*Gadd45α*、*Trp53inp1* 表达上调 8~9 倍,说明内源性 CO 刺激后并不是使细胞恢复到常态,而是进一步促进血管壁中已增多的平滑肌细胞发生增殖抑制和凋亡。

【参 考 文 献】

- [1] Farber HW, Loscalzo J. Pulmonary arterial hypertension[J]. New Engl J Med, 2004, 14(351): 1655-1665.
- [2] Fujita T, Toda K, Karimova A, Yan SF, Naka Y, Yet SF, et al. Paradoxical rescue from ischemic lung injury by inhaled carbon monoxide driven by derepression of fibrinolysis[J]. Nat Med, 2001, 42(7): 598-604.
- [3] Schillinger M, Exner M, Mlekusch W, Ahmadi R, Rumpold H, Mannhalter C, et al. Heme oxygenase-1 genotype is a vascular anti-inflammatory factor following balloon angioplasty[J]. J Endovasc Ther, 2002, 28(9): 385-394.
- [4] Fang LH, Zhang YH, Ma JJ, Du GH, Ku BS, Yao HY, et al. Inhibitory effects of tetrandrine on the serum- and platelet-derived growth factor-BB-induced proliferation of rat aortic smooth muscle cells through inhibition of cell cycle progression, DNA synthesis, ERK1/2 activation and c-fos expression[J]. Atherosclerosis, 2004, 174(2): 215-223.
- [5] Servant MJ, Coulombe P, Turgeon B, Meloche S. Differential regulation of p27(Kip1) expression by mitogenic and hypertrophic factors: Involvement of transcriptional and posttranscriptional mechanisms[J]. J Cell Biol, 2000, 148(3): 543-556.
- [6] Maines MD. The heme oxygenase system: a regulation of second messenger genes[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1997, 12(37): 517-554.
- [7] Cory S, Adams JM. The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(9): 647-656.
- [8] Zhao H, Jin S, Antinore MJ, Antinore MJ, Feng DT, Wang XW, et al. The central region of Gadd45 is required for its interaction with p21/WAF1[J]. Exp Cell Res, 2000, 258(1): 92-100.
- [9] Dulak J, Jozkowicz A. Carbon monoxide—a “new” gaseous modulator of gene expression[J]. Acta Biochim Pol, 2003, 7(50): 31-47.
- [10] Brouard BS, Otterbein LE, Anrather J, Tobiasch E, Bach FH, Choi AM, et al. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis[J]. J Exp Med, 2000, 6(192): 1015-1025.
- [11] Jin S, Antinore MJ, Lung FD, Smith ML, Zhan Q, Coursen JC, et al. The GADD45 inhibition of Cdc2 kinase correlates with GADD45-mediated growth suppression[J]. J Biol Chem, 2000, 275(22): 16602-16608.
- [12] Ziad M, Alain T, Hajra L, Evans AI, Chen M, Hyduk SJ, et al. NF-κB activation in atherosclerosis: a friend or a foe[J]. Blood, 2004, 13(3): 754-775.

(本文编辑:黄 榕)