

人内皮高表达脂多糖相关因子 1 蛋白亚细胞定位研究



罗敏 梁自文 杨宗城 罗向东

【摘要】 目的 了解人内皮高表达脂多糖相关因子 1 (EOLA1) 蛋白在内皮细胞中的亚细胞定位情况。方法 体外培养人脐静脉内皮细胞株 ECV304, 另构建增强型绿色荧光蛋白 (EGFP)-EOLA1 融合蛋白表达质粒。用脂质体分别将空质粒 pEGFP-N2 和融合蛋白表达质粒 EGFP-EOLA1 转染入 ECV304 细胞。继续培养 48 h, 取细胞, 用蛋白质印迹法鉴定 EGFP 及 EGFP-EOLA1 融合蛋白的表达; 采用激光共聚焦显微镜和免疫电镜技术, 观察细胞中 EOLA1 蛋白的亚细胞定位情况。结果 经酶切和测序鉴定证实重组质粒 EGFP-EOLA1 构建成功。蛋白质印迹法检测结果显示, EGFP 和 EGFP-EOLA1 融合蛋白在转染细胞中成功表达。激光共聚焦显微镜下见转染空质粒的 ECV304, 绿色荧光遍布整个细胞, 但无细胞核聚集现象; 转染融合蛋白表达质粒的 ECV304, 绿色荧光也呈全细胞分布, 且在胞核内明显聚集。透射电镜下见转染空质粒的细胞内无免疫沉积物, 转染融合蛋白表达质粒的细胞质基质中有免疫沉积物。结论 EOLA1 蛋白定位在 ECV304 细胞核与细胞质基质中, 作为信号转导因子发挥作用。

【关键词】 内皮细胞; 显微镜检查, 免疫电子; 转染; 亚细胞定位; 内皮高表达脂多糖相关因子 1; 绿色荧光质粒

Subcellular localization of human endothelial-overexpressed lipopolysaccharide-associated factor 1 protein LUO Min, LIANG Zi-wen, YANG Zong-cheng, LUO Xiang-dong. Department of Endocrinology, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China
Corresponding author: LIANG Zi-wen, Email: liangzw99@163.com, Tel: 18983656668

【Abstract】 Objective To study the subcellular localization of human endothelial-overexpressed lipopolysaccharide-associated factor 1 (EOLA1) protein in endothelial cells. **Methods** Human umbilical vein endothelial cell strain ECV304 were cultured in vitro. The fusion protein of enhanced green fluorescent protein (EGFP)-EOLA1 expressing plasmid was constructed. Empty plasmid with EGFP at N side (pEGFP-N2) and fusion protein expressing plasmid EGFP-EOLA1 was respectively transfected into ECV304 cells with liposome. After being cultured for 48 hours, the expression levels of EGFP and fusion protein EGFP-EOLA1 in cells were detected with Western blot. The subcellular localization of EOLA1 protein was detected by laser scanning confocal microscope and immunoelectron microscopy. **Results** The EGFP-EOLA1 coexpression plasmid was verified to be successfully constructed by enzyme cutting and gene sequencing. The fusion protein of EGFP-EOLA1 was observed to express in transfected cells through Western blot. Green fluorescence scattered all over the ECV304 cells transfected with empty plasmid and cells transfected with fusion protein expressing plasmid, and it gathered obviously in the nuclei in the latter cells. Immune deposits were observed in the matrix of cells transfected with fusion protein expressing plasmid but not in the cells transfected with empty plasmid. **Conclusions** EOLA1 protein is localized in the nucleus and the matrix of ECV304 cell, and it plays its role as a signal transduction factor.

【Key words】 Endothelial cells; Microscopy, immunoelectron; Transfection; Subcellular localization; Endothelial overexpressed lipopolysaccharide associated factor 1; Green fluorescent plasmid

内皮高表达脂多糖相关因子 1 (endothelial-over-

expressed lipopolysaccharide-associated factor 1, EOLA1) 系本课题组 2002 年从内毒素刺激的 ECV304 细胞(人脐静脉内皮细胞株)中克隆出的功能未明基因, 经过近年来的系列研究, 已对 EOLA1 基因的特性和功能有了一定了解^[1-2]。EOLA1 基因定位于人类染色体 Xq 27.4, 在基因组上跨越了碱基, 被 4 个内含子分割为 5 个外显子, 其转录调控区

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2010.06.013

基金项目:国家自然科学基金(30300101,30371468,30670838)

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院内分泌科(罗敏、梁自文),全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室(杨宗城、罗向东)

通信作者:梁自文,Email:liangzw99@163.com,电话:18983656668

域核心启动子位于 -600 ~ -700 bp 序列内,但无典型的 TATA 盒结构,受转录因子 SP1 和 Myf 的调控。EOLA1 表达蛋白由 158 个氨基酸组成,无信号肽和跨膜结构域,但有多糖基化和磷酸化位点,以及螺旋-转角-螺旋基序。这些结构特点提示 EOLA1 为胞内蛋白,强制使其高表达具有促进 ECV304 细胞增殖的作用^[3],抑制其表达 ECV304 细胞生长速度明显减慢^[4]。故考虑 EOLA1 蛋白可能参与了胞内信号转导。因此,笔者构建了增强型绿色荧光蛋白 (EGFP)-EOLA1 融合蛋白表达质粒,以之转染 ECV304 细胞,并采用激光共聚焦显微镜和免疫电镜技术观察 EOLA1 蛋白的亚细胞定位情况。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

ECV304 细胞(美国 ATCC 公司)培养于含体积分数 10% FBS 的 DMEM 培养液(上海普飞生物技术有限公司)中。细胞转染时改用无抗生素和无血清的 DMEM 培养液。

1.2 扩增 EOLA1 基因开放阅读框(open read frame, ORF)序列

根据 EOLA1 基因的 ORF 序列,设计并在上海生工生物工程技术有限公司合成一对引物,上游引物:5'-AGCAGGATCCTCTTCATGCCCAAAG-3',下游引物:5'-AGCAGGATCCTCTTCATGCCCAAAG-3',在上、下游分别引入 *EcoR* I 和 *Bam* H I 酶切位点。提取 ECV304 细胞总 RNA 行 RT-PCR(其试剂盒为日本 TaKaRa 公司产品),扩增 EOLA1 基因的 ORF 序列。

1.3 构建 EGFP-EOLA1 融合蛋白表达质粒

用 *EcoR* I 和 *Bam* H I 双酶切 PCR 产物以及 pEGFP-N2 质粒(美国 Clontech 公司)。对酶切产物进行电泳回收,用 DNA 连接酶(日本 TaKaRa 公司)进行连接反应,将目的 ORF 序列插入 pEGFP-N2 质粒,转化感受态大肠杆菌 DH5 α 后,挑取单菌落送宝生物工程(大连)有限公司测序。

1.4 细胞转染和瞬时表达

将 ECV304 细胞接种于 6 孔培养板中(其中 2 孔预铺无菌盖玻片,用于后续激光共聚焦显微镜观察),密度为 1.5×10^5 个/孔。细胞培养至接近 80% 融合时,分为两部分,以脂质体 LipofectamineTM 2000(瑞士 Roche 公司)分别将空质粒 pEGFP-N2 和融合蛋白表达质粒 EGFP-EOLA1 转染入细胞。培养 48 h,转染质粒在细胞中瞬时表达,进行下述检测。

1.5 检测项目

1.5.1 转染后蛋白表达鉴定

取转染 2 种质粒的细胞各 1 孔,提取总蛋白,行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳。电转印迹至聚偏氟乙烯膜上,将膜与鼠抗绿色荧光蛋白(GFP)单克隆抗体(一抗)、羊抗鼠二抗(2 种抗体均购自江苏海门碧云天生物研究所)共同孵育,化学发光法显影后于凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司)下扫描。

1.5.2 激光共聚焦显微镜观察

取转染 2 种质粒的细胞各 1 孔,用 40 g/L 多聚甲醛固定,以鼠抗 GFP 单克隆抗体(一抗)、羊抗鼠二抗孵育,4'-6 二氨基-2-苯基吡啶(DAPI,江苏海门碧云天生物研究所)染色,于 LSM510 META 型激光共聚焦显微镜(德国 Zeiss 公司)下观察照相。

1.5.3 免疫电镜观察

取转染 2 种质粒的细胞, PBS 清洗后用胰蛋白酶消化,离心,取细胞沉淀,置于 40 g/L 多聚甲醛中固定,用体积分数 3% 过氧化氢氧化,血清孵育。分别以前期制备的兔抗 EOLA1 多克隆抗体^[5]作为一抗,辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG(江苏海门碧云天生物研究所)作为二抗进行孵育。加入 HRP 标记的链霉卵白素(北京中山生物技术有限公司),二氨基联苯胺染色,体积分数 2.5% 戊二醛再固定,10 g/L 锇酸固定,梯度丙酮脱水,置于用体积分数 70% 丙酮配制的饱和醋酸铀中过夜。纯丙酮清洗,丙酮与环氧树脂(体积比为 1:1)混合液浸透,于 40 °C 条件下先后用纯包埋剂(不加环氧树脂固化促进剂 DMP-30)、包埋剂(添加 DMP-30)处理,再以环氧树脂 618 包埋。超薄切片,铅染色,在 TECNAI10 型透射电镜(荷兰 Philip 公司)下观察照相。

2 结果

2.1 融合蛋白表达质粒的构建

扩增获得的 EOLA1 基因 ORF 序列长度约为 470 bp,插入 pEGFP-N2 质粒后经酶切和测序鉴定,证实重组质粒 EGFP-EOLA1 构建成功(图 1)。

2.2 蛋白表达鉴定

蛋白质印迹检测结果显示,EGFP 以及 EGFP-EOLA1 融合蛋白在转染细胞中成功表达(图 2)。

2.3 激光共聚焦显微镜观察

转染空质粒 pEGFP-N2 者,绿色荧光呈全细胞分布,但无细胞核聚集现象。转染融合蛋白表达质粒 EGFP-EOLA1 者,绿色荧光也呈全细胞分布,且在细胞核内明显聚集(图 3)。

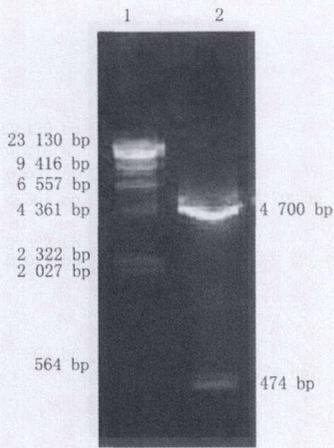


图 1 重组质粒增强型绿色荧光蛋白(EGFP)-内皮高表达脂多糖相关因子 1(EOLA1)的双酶切电泳结果。1. λ -Hind III DNA marker; 2. 重组质粒 EGFP-EOLA1 双酶切后产物

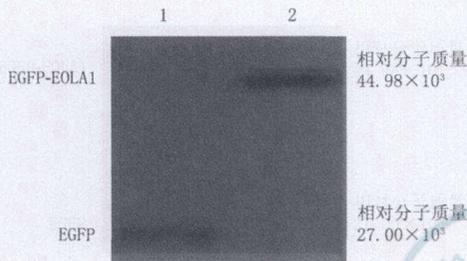


图 2 蛋白质印迹法检测人脐静脉内皮细胞株 ECV304 转染 2 种质粒后蛋白表达情况。EGFP 为增强型绿色荧光蛋白; EOLA1 为内皮高表达脂多糖相关因子 1; 1. 转染空质粒 pEGFP-N2; 2. 转染重组质粒 EGFP-EOLA1

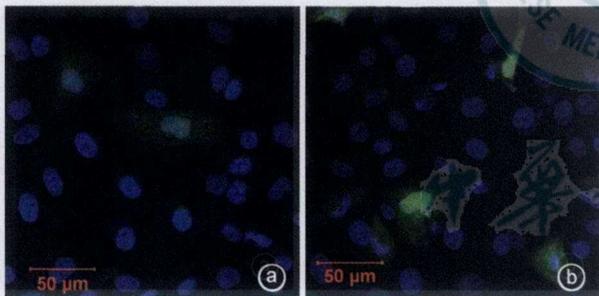


图 3 人脐静脉内皮细胞株 ECV304 转染 2 种质粒后激光共聚焦显微镜下观察结果 4'-6 二氨基-2-苯基吡啶染色, 图中标尺的全长为 50 μ m。EGFP 为增强型绿色荧光蛋白; a. 转染空质粒 pEGFP-N2 后, 绿色荧光在细胞中均匀分布; b. 转染重组质粒 EGFP-内皮高表达脂多糖相关因子 1 后, 绿色荧光呈全细胞分布且在胞核内明显聚集

2.4 免疫电镜观察

转染空质粒 pEGFP-N2 的细胞内未见免疫沉积物, 转染融合蛋白表达质粒 EGFP-EOLA1 的细胞质基质中有免疫沉积物沉积, 即 EOLA1 蛋白在胞质中有表达(图 4)。

3 讨论

EOLA1 基因 (GenBank No. AY074889) 是本课题组从内毒素刺激的内皮细胞差异表达基因谱中筛

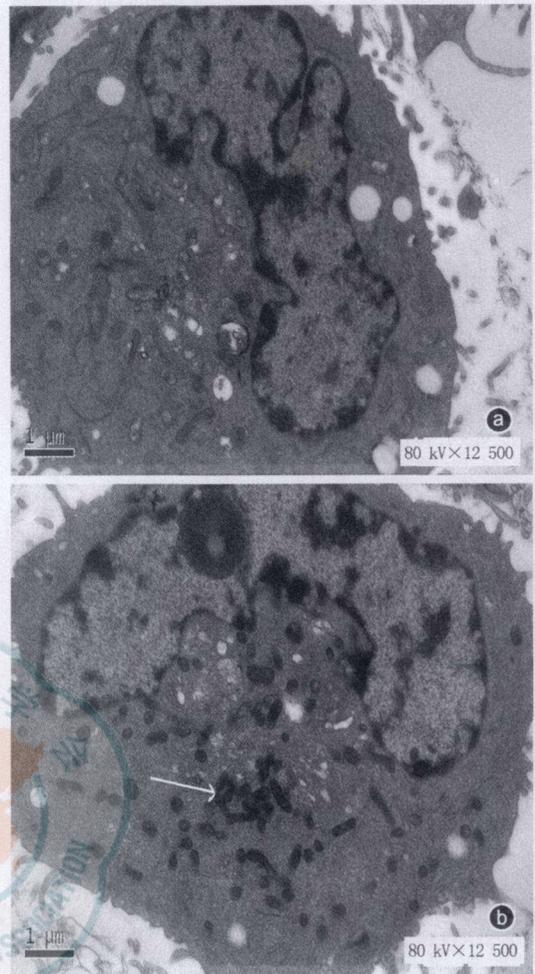


图 4 人脐静脉内皮细胞株 ECV304 转染 2 种质粒后免疫电镜检测结果 透射电镜 $\times 12\ 500$ 。EGFP 为增强型绿色荧光蛋白; a. 转染空质粒 pEGFP-N2 后, 细胞内未见免疫沉积物; b. 转染重组质粒 EGFP-内皮高表达脂多糖相关因子 1 后, 细胞质基质中见免疫沉积物(箭头所示)

选克隆出的人类未知功能基因全长序列, 经前期系列研究基本阐明了 EOLA1 基因的特性, 但对其表达产物在细胞中的作用仍不清楚^[1-2]。通过生物信息学手段分析 EOLA1 蛋白氨基酸序列, 获知该蛋白不存在信号肽和跨膜结构域, 极有可能以胞内蛋白的形式在细胞内发挥作用, 故迫切需要确定 EOLA1 蛋白的亚细胞定位情况以推测其功能。

GFP^[6] 是由 238 个氨基酸组成、相对分子质量为 27×10^3 的单体蛋白。它是一种较佳的新型生物分子标签, 可通过激光共聚焦显微镜观察蛋白表达定位情况。EGFP 是 GFP 野生型突变体的一种, 可与目的基因连接表达 EGFP 融合蛋白, 较 GFP 的荧光更明亮, 在哺乳动物细胞内表达效率更高。因此本实验中, 我们将 EOLA1 基因 ORF 序列定向克隆至 pEGFP-N2 载体, 成功构建了 EGFP-EOLA1 融合

蛋白的真核表达质粒,以之转染 ECV304 细胞,瞬时表达后经激光共聚焦显微镜观察^[7],细胞质及细胞核呈现均匀分布的强绿色荧光信号,且经 DAPI 染色证实 EGFP-EOLA1 融合蛋白有细胞核聚集现象。另外,为进一步从细胞超微结构水平上对 EOLA1 蛋白进行亚细胞定位,我们采用了免疫电镜酶标技术^[8]进行观察,结果显示 EOLA1 蛋白在细胞质基质中有表达。以上观察结果证实了 EOLA1 为胞内蛋白的推论,且其能与胞核染色质结合。由此可知,EOLA1 蛋白具有从胞质进入胞核,与其中的染色质结合,转导相关信号的作用,是胞内信号转导因子。

我们将进一步研究 EOLA1 蛋白的结构和信号转导途径,阐明 EOLA1 蛋白的功能。

参考文献

[1] 梁自文,周广举,杨宗城,等. EOLA1 基因启动子序列的鉴定.

第三军医大学学报,2009,31(23):2309-2311.

[2] Liang Z, Yang Z. Identification and characterization of a novel gene EOLA1 stimulating ECV304 cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004,325(3):798-802.

[3] 陈渝,梁自文,刘月明,等. 人内皮高表达脂多糖相关因子 1 强表达模型的建立及对 ECV304 细胞增殖的影响. *中华烧伤杂志*,2005,21(4):278-281.

[4] 梁自文,杨宗城,陈建,等. 抑制 ECV304 细胞内 EOLA1 基因表达后效应观察. *中华医学遗传学杂志*,2007,24(3):293-297.

[5] 蔡震,梁自文,罗向东,等. 人内皮细胞高表达脂多糖相关因子 1 蛋白的纯化. *中华烧伤杂志*,2005,21(5):367-369.

[6] 张荣媛,王静,李茜,等. 融合蛋白技术及临床应用进展. *国际生物制品学杂志*,2006,29(2):82-84.

[7] 杨怡妹,李岚,李泽琳,等. 激光扫描共聚焦显微镜研究 APOBEC3G 蛋白的亚细胞定位. *病毒学报*,2007,23(1):16-21.

[8] 王少华,曹广信,王燕华,等. 病理性瘢痕中结缔组织生长因子的免疫电镜观察. *中国美容医学*,2007,16(7):871-873.

(收稿日期:2010-06-10)

(本文编辑:罗勤)

· 警钟 ·

15% TBSA 氢氟酸烧伤一例

卓丹 章祥洲 张松 李方奇

患者女,26 岁,被约 500 mL 不明液体从头面部浇下,当时未行任何处理,于伤后 1 h 送入笔者单位治疗。入院时患者意识清楚,自诉疼痛剧烈,称曾被他人威胁“用硫酸毁容”,双眼角膜混浊,口腔流涎,呼吸中有轻微酸性刺激气味,头面部及躯干前后创面约 15% TBSA、深 II ~ III 度。生理盐水清洗创面,常规补液,入院后 40 min 患者出现深昏迷,表现为四肢松软、肌张力低、咽喉喘鸣、深大呼吸,SO₂ 0.97、血压 110/70 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)。急请多学科医师会诊,患者昏迷渐加重,呼唤无应答,查头颅、胸、腹 CT 无异常,伤后给予保留导尿,尿量约 700 mL。此时考虑是否由化学物品中毒所致,继续追问病史并给予相关检查和抢救。伤后 4 h SO₂ 呈下降趋势,加大氧流量无效,血压约为 70/50 mm Hg。立即请麻醉科医师行气管插管并转入 ICU 行呼吸机支持治疗,急查血常规、生化指标。心电监测示心室颤动(心率为 170 ~ 180 次/min),约 20 min 后患者出现心搏骤停。检查结果显示,白细胞计数 26.9 × 10⁹/L、红细胞计数 3.82 × 10¹²/L、Hb 119 g/L、血钙 0.43 mmol/L、血镁 0.28 mmol/L、血钾 5.05 mmol/L、血钠 136.4 mmol/L、血氯 96.3 mmol/L,给予心肺复苏抢救无效,患者死亡。后经尸检化验得知该不明液体为氢氟酸。

讨论 氢氟酸的损伤机制主要为初始的脱水作用、由于

pH 值低引起的损伤, F⁻ 结合作用。F⁻ 通过皮肤、呼吸道或胃肠道吸收后,分布在组织器官,从而抑制多种酶的活性, F⁻ 与 Ca²⁺ 结合形成不溶性的氟化钙,使血浆钙浓度降低,严重时可引起致命的低钙血症。7 mL 无水氢氟酸即可结合正常成人体内所有游离的 Ca²⁺^[1]。救治本例患者笔者有以下几点经验教训:(1)入院时诊断不明确。患者自述曾被他人威胁将用硫酸毁容,一定程度上存在误导。氢氟酸烧伤平时不多见,常为小面积,以手指、面部暴露部位多见,且多为工伤所致,本例患者为相对较大面积氢氟酸烧伤较罕见。(2)抢救措施未能及时实施。伤后患者入院时间延误以及自诉致伤原因引起的误导,给诊断带来困难。同时患者病情进展较快,入院后 40 min 进入深昏迷,为明确是否存在颅脑损伤或中毒可能,进行了大量检查从而延误抢救时机。(3)医务工作者治疗经验不足。患者死亡后经法医鉴定确诊为氢氟酸烧伤,血生化、血常规检查提示该例患者出现严重低钙、低镁血症,也佐证法医诊断,未能及时补充钙剂是一大遗憾。持续静脉滴注 100 g/L 葡萄糖酸钙同时实施血钙监测,乃是大面积氢氟酸烧伤早期治疗的重点,希望此文能供同行借鉴。

参考文献

[1] 黎鳌. 黎鳌烧伤学. 上海:上海科学技术出版社,2001:11.

(收稿日期:2010-08-27)

(本文编辑:莫愚)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2010.06.014

作者单位:233000 安徽省蚌埠市第三人民医院烧伤整形科