

内质网应激条件下血管内皮细胞生长因子 在人脑微血管内皮细胞中的表达

王大鹏 李波 方文刚 陈誉华* 宋今丹

(中国医科大学发育生物学教研室, 卫生部细胞生物学重点实验室, 沈阳 110001)

摘要 为观察内质网应激条件下血管内皮细胞生长因子的表达情况, 用不同浓度的衣霉素处理体外培养的人脑微血管内皮细胞, 建立内质网应激模型, 采用 RT-PCR、蛋白质免疫印迹以及免疫细胞化学的方法检测了细胞内血管内皮细胞生长因子的表达。结果发现血管内皮细胞生长因子在人脑微血管内皮细胞中存在一定的表达; 内质网应激可诱导血管内皮细胞生长因子表达升高, 随着衣霉素浓度的增高, 血管内皮细胞生长因子的表达逐渐增加, 与 mRNA 水平相比, 血管内皮细胞生长因子蛋白量的增加更明显。实验结果提示人脑微血管内皮细胞中存在血管内皮细胞生长因子自分泌, 血管内皮细胞生长因子可能是内质网应激的靶基因。

关键词 血管内皮细胞生长因子; 内质网应激; 人脑微血管内皮细胞

人脑微血管内皮细胞(human brain microvascular endothelial cell, HBMEC)是血脑屏障的主要组分, 它们(HBMEC)之间的紧密连接结构严格地限制了大分子物质及细胞进入脑内。有研究报道, 应激反应可通过改变HBMEC间的紧密连接而影响血脑屏障的通透性^[1], 血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)可作为应激反应的靶基因^[2]。VEGF 是一种重要的血管通透性调节因子, 其与受体 FLK-1 相互作用调节内皮细胞间紧密连接的开放^[3]。VEGF 在感染性脑疾病早期的炎性细胞内高表达^[4], 拮抗其表达可以减轻脑水肿的程度^[5], 说明在脑疾病应激期里, 旁分泌的 VEGF 可以影响血脑屏障的通透性。但目前未见文献报道在 HBMEC 内是否存在 VEGF 的自分泌, 也不知道应激状态下 HBMEC 中 VEGF 的表达情况, 了解这些对认识脑应激过程中血脑屏障的开通机制具有重要意义。

许多研究结果表明, 内质网应激反应的主要方式——未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)在脑应激过程中起重要作用, 其标志性靶基因之一是葡萄糖调节蛋白 94 (glucose regulated protein, GRP94)^[6,7]。GRP94 是 GRP 家族的主要成员, 与热休克蛋白(heat shock protein, HSP)90 有很高的同源性, 是内质网的标志性分子伴侣^[8]。鉴此, 本实验以 HBMEC 为研究对象, 以衣霉素(tunicamycin)

作为诱导 UPR 的应激因子, 探讨了在内质网应激条件下 VEGF 的表达情况, 希望为进一步研究脑应激过程中 VEGF 对血脑屏障通透性的影响积累资料。

1 材料与方法

1.1 试剂

HBMEC 由美国 Johns Hopkins 大学医学院 K. S. Kim 教授惠赠; Nu 血清为 BD 公司产品, 1640 培养基为 Gibco BRL 公司产品; 衣霉素为 Sigma 公司产品; β 肌动蛋白羊多克隆抗体、GRP94 羊多克隆抗体、VEGF 兔多克隆抗体为 SantaCruz 公司产品, FLK-1 羊多克隆抗体为武汉博士德公司产品; HRP 标记的兔抗羊抗体、HRP 标记的羊抗兔抗体为北京中山公司产品; ECL 为 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品; Trizol 为 Gibco BRL 公司产品; 逆转录酶 AMV 为 Promega 公司产品; Taq 酶、dNTP、随机引物为 TaKaRa 公司产品; β 肌动蛋白、GRP94、VEGF 引物由上海生工公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 按 2×10^6 个/平皿(直径 60 mm) 的密度种植 HBMEC, 37 °C、5% CO₂ 培养 48 h 后更换 Nu-1640 培养液: RPMI1640 (Gibco BRL 公司)

收稿日期: 2004-09-06 接受日期: 2004-11-18

* 通讯作者。Tel/ Fax: 024-23260246, E-mail: yhchen@mail.cmu.

edu.cn

+10% FBS (Hyclone 公司)+10% Nu- 血清(BD 公司)+非必需氨基酸 +MEM 维生素 +49.5 U/ml 青霉素 +38.8 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素, 加入不同浓度(2, 5, 10, 25 $\mu\text{g/ml}$)衣霉素, 继续培养 6 h 后收集样本。

1.2.2 RT-PCR检测GRP94、VEGF mRNA表达 按 Trizol 试剂盒步骤提取不同时间点样品的总 RNA, 紫外分光光度计测定 A_{260} 值, 按公式 RNA 浓度 = $A_{260} \times 40 \times$ 稀释倍数计算总 RNA 浓度。逆转录反应体系总体积为 20 μl , 含有样品 4 μg RNA, 20 U AMV, 20 U RNasin, 200 pmol 随机引物, 10 pmol dNTP, 反应条件为 42 $^{\circ}\text{C}$ 45 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。PCR 反应总体积为 25 μl , 含有 RT 产物 2 μl , 上、下游引物各 10 pmol, 1.25 U Taq 酶。GRP94 的 PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 共 25 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 终止。VEGF 的 PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 62 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 共 25 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 终止。 β 肌动蛋白引物序列: 上游引物为 5'-TCGTCACCAACTGGGACGACATGG-3', 下游引物为 5'-GATCTTGATCTTCATTGTGCT-3'; GRP94 引物序列: 上游引物为 5'-ACCTTCGGGTTTCGTCGA-3', 下游引物为 5'-CGTGAGC-GACCTTTACT-3'; VEGF 引物序列: 上游引物为 5'-CGAAGTGGTGAAGTTCATGGATG-3', 下游引物为 5'-TTCTGTATCAGTCTTTCCTGGTGAG-3'。取 8 μl PCR 反应产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后 EB 显色, 照相。PCR 产物: 297 bp GRP94, 385 bp VEGF₁₂₁, 523 bp VEGF₁₆₅, 700 bp β 肌动蛋白。

1.2.3 蛋白质免疫印迹(Western blot)方法检测GRP94、VEGF、FLK-1表达 将样品用 1 \times PBS 洗净后加入 RIPA 裂解液(1% NP40, 0.5% 脱氧胆酸钠, 0.1% SDS, 1% PMSF), 置于冰上温育 30 min 后以 10 000 g 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 取上清液。利用考马氏亮蓝 G-250 方法测定蛋白质浓度。各样品上样量为 25 μl , 含 20 μg 总蛋白质, 加入样品缓冲液, 沸水浴 5 min, 进行 SDS-PAGE 分离后采用半干转印技术进行转印。用 5% 脱脂牛奶封闭过夜后分别加入第一抗体(GRP94 为 1:500、VEGF 为 1:500、FLK-1 为 1:200、 β 肌动蛋白 为 1:500)室温温育 2 h, 用 PBST 洗膜后加入第二抗体(1:5000), 室温温育 1 h, 用 PBST 洗膜后进行 ECL 显色。

1.2.4 免疫细胞化学方法检测 GRP94、VEGF 表达 将细胞按 2×10^6 个/片的密度接种在 1.5 cm

$\times 1.5$ cm 盖玻片上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养 48 h 后更换 Nu-1640 培养液, 加入不同浓度(0, 2, 5 $\mu\text{g/ml}$)衣霉素, 继续培养 6 h 后, 用 10% 中性福尔马林常温固定 1 h。PBS 冲洗 3 次, 用 3% 的 H_2O_2 室温温育 15 min 后加入正常动物血清室温温育 20 min。加入第一抗体(GRP94 为 1:200、VEGF 为 1:200), 同时设立阴性对照(用抗体稀释液 PBS 替代第一抗体), 4 $^{\circ}\text{C}$ 温育过夜, 加入生物素标记的第二抗体, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min, 加入链霉素-亲和素-过氧化物酶复合物(SABC 复合物) 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min 后 DAB 显色。苏木素复染核, 脱水, 透明, 中性树胶封片, 照相。

1.2.5 数据处理 利用 Kadal Science 1D 及 BandScan 图像分析软件系统分析结果, 将内参照 β 肌动蛋白净密度值记做 100%, 计算不同浓度衣霉素处理后的细胞中 GRP94、VEGF 与 β 肌动蛋白净密度的比值, 以灰度比值作图。

2 结果

2.1 衣霉素诱导前后 HBMEC 内 GRP94 表达(内质网应激模型的制备)

实验结果显示在衣霉素诱导前后, HBMEC 内 GRP94 mRNA 和 GRP94 的表达水平存在明显的差异性, 诱导后较诱导前明显增高, 且随着衣霉素诱导浓度的增加, 二者的表达水平也增加(图 1A、图 1B、图 1C)。免疫细胞化学结果表明 HBMEC 细胞浆内出现 GRP94 免疫反应的阳性颗粒, 呈棕褐色, 并且阳性颗粒随着衣霉素诱导浓度的增加而逐渐增多(图 1D)。这些结果说明, 在 HBMEC 内出现了内质网应激。

2.2 衣霉素诱导前后 HBMEC 内 VEGF 及其受体 FLK-1 表达

在未用衣霉素处理的 HBMEC 内 VEGF mRNA 与 VEGF 均有表达, 提示在 HBMEC 内存在 VEGF 分泌途径。用衣霉素处理后 HBMEC 内 VEGF mRNA 及 VEGF 的表达水平明显增高, 随着诱导浓度的增加, 二者的表达量也随之增加, 但是 VEGF mRNA 的含量随浓度的增加变化不明显, 2 $\mu\text{g/ml}$ 衣霉素时 VEGF mRNA 的含量增加 2.6 倍, 25 $\mu\text{g/ml}$ 衣霉素时增加 3.9 倍, 而 VEGF 在 2 $\mu\text{g/ml}$ 衣霉素时增加 2.5 倍, 25 $\mu\text{g/ml}$ 衣霉素时增加 7.7 倍(图 2A、图 2B、图 2C)。这说明 VEGF mRNA 与 VEGF 的表达不是同步进行的。免疫细胞化学结果显示 HBMEC

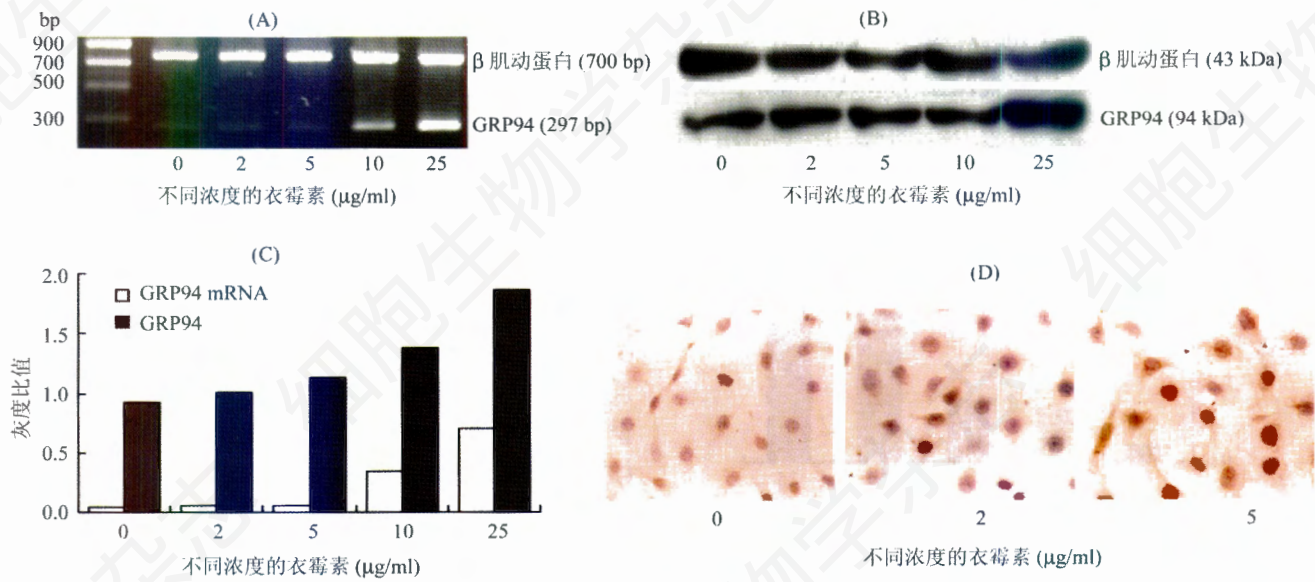


图1 不同浓度的衣霉素(µg/ml)诱导后 HBMEC 内 GRP94 表达

A: RT-PCR 检测 GRP94 mRNA 表达; B: Western 印迹检测 GRP94 表达; C: GRP94 mRNA 和 GRP94 与 β 肌动蛋白 mRNA 和 β 肌动蛋白灰度比值图; D: 免疫细胞化学检测 GRP94 细胞分布情况。

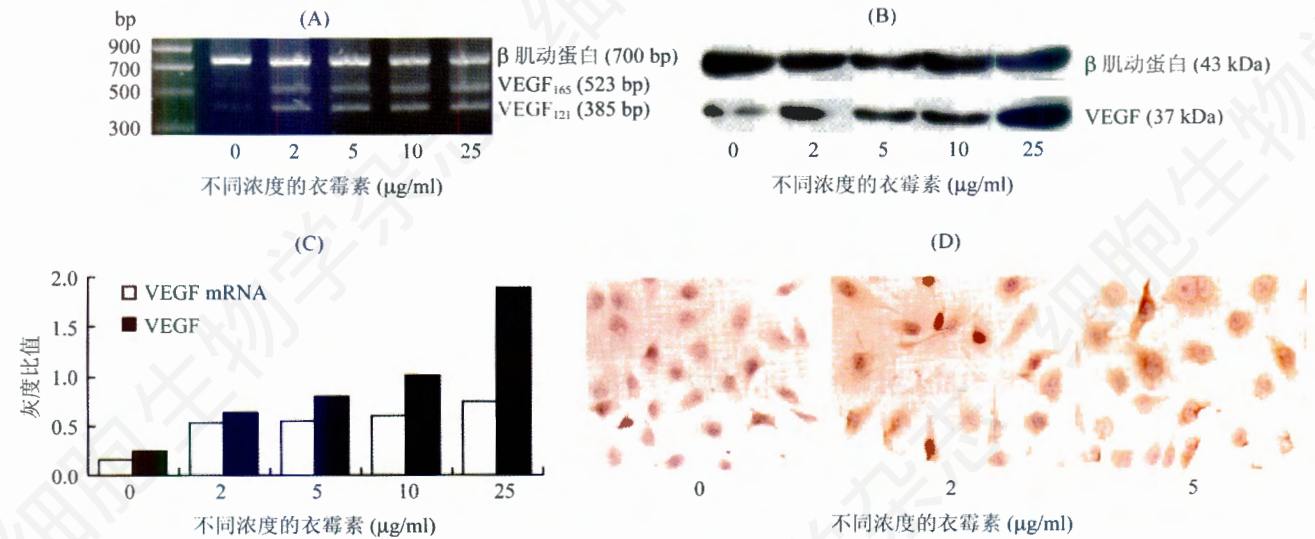


图2 不同浓度的衣霉素(µg/ml)诱导后 HBMEC 内 VEGF 表达

A: RT-PCR 检测 VEGF mRNA 表达; B: Western 印迹检测 VEGF 表达; C: VEGF mRNA 和 VEGF 与 β 肌动蛋白 mRNA 和 β 肌动蛋白灰度比值图; D: 免疫细胞化学检测 VEGF 细胞分布情况。

细胞浆内出现 VEGF 免疫反应阳性颗粒，呈棕褐色，并且阳性颗粒随着衣霉素诱导浓度的增加而逐渐增多(图 2D)。

在衣霉素诱导前后，HBMEC 内 VEGF 的受体 FLK-1 表达水平诱导后较诱导前明显增高，且随着衣霉素诱导浓度的增加，蛋白质的表达量随之增

加。蛋白质含量变化的趋势与 VEGF 相一致(图 3)。

2.3 衣霉素诱导前后 HBMEC 内 GRP94、VEGF 表达水平的比较

研究结果显示，HBMEC 内的 GRP94 和 VEGF 均存在基础表达，随着衣霉素浓度的增加，二者蛋白质的表达量随之增加。在低浓度衣霉素条件下，

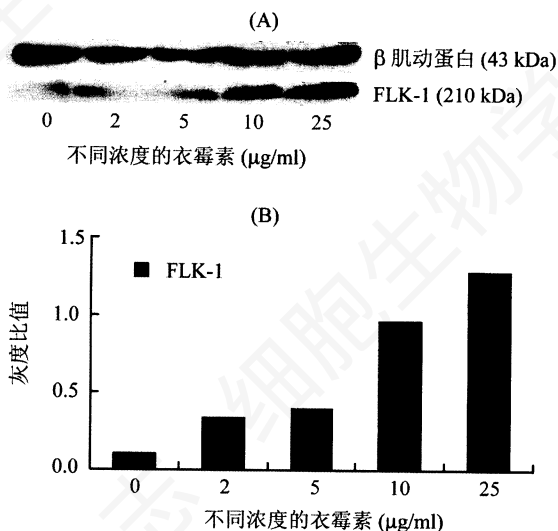


图3 不同浓度的衣霉素($\mu\text{g/ml}$)诱导后 HBMEC 内 FLK-1 表达
A: Western 印迹检测 FLK-1 表达; B: FLK-1 与 β 肌动蛋白灰度比值图。

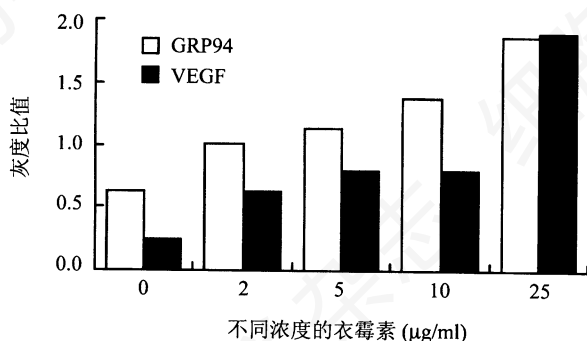


图4 不同浓度的衣霉素($\mu\text{g/ml}$)诱导后 HBMEC 内 GRP94、VEGF 表达水平的比较

GRP94 与 VEGF 表达的增加量无明显的差别, 如 2 $\mu\text{g/ml}$ 衣霉素时 GRP94 增加 1.6 倍, VEGF 增加 2.5 倍; 而在高浓度条件下 VEGF 的增加量明显高于 GRP94: 25 $\mu\text{g/ml}$ 衣霉素时 GRP94 增加 3 倍, VEGF 增加 7.7 倍(图 4)。这说明 GRP94 和 VEGF 同为内质网应激反应的靶基因。

3 讨论

已有文献表明, VEGF 是一种重要的血管通透性调节因子, 其与受体 FLK-1 相互作用可调节内皮细胞间紧密连接的开放^[3]。本研究观察到, 在 HBMEC 细胞内 VEGF 及其受体 FLK-1 同时存在基础表达, 提示 HBMEC 内存在 VEGF 的自分泌系统, 在正常生理条件下, HBMEC 中的这个自分泌环在调控内皮细胞间紧密连接的形成与血脑屏障生理性

开放上可能起重要作用。

内质网是细胞加工蛋白质和贮存 Ca^{2+} 的主要场所, 对应激极为敏感。内质网应激的主要方式之一是在内质网腔内出现错误折叠与未折叠蛋白积聚, 这种未折叠蛋白作为应激信号通过 I 型或 II 型内质网跨膜蛋白传递到细胞核, 调控内质网分子伴侣如 GRP94 的转录, 即未折叠蛋白反应(UPR)^[7,8]。许多文献报道衣霉素可以阻碍内质网内新生蛋白质的糖基化过程, 使蛋白质不能够正确的折叠而堆积在内质网腔中, 从而诱发 UPR^[8-10]。本实验应用衣霉素诱导体外培养的 HBMEC, 结果发现在 HBMEC 内 UPR 的靶基因 GRP94 mRNA 及 GRP94 表达量均随着衣霉素浓度的增加而逐渐增高, 这表明成功建立了处于内质网应激状态中的 HBMEC 研究模型。利用该研究模型观察到, 衣霉素处理后的 HBMEC 内 VEGF 的表达水平(mRNA 和蛋白质)明显增高, 并且变化趋势类似 UPR 的靶基因 GRP94, 提示内质网应激 UPR 除诱导分子伴侣如 GRP94 等的表达之外, 同样可以诱导 VEGF 的表达, VEGF 可能是内质网应激反应的靶基因。

本实验结果还显示, 在 UPR 时, GRP94 与 VEGF 的表达模式也有所不同: 随着 UPR 诱导剂衣霉素浓度的增高, GRP94 mRNA 和 GRP94 表达水平均呈一致性升高; 而在 VEGF, 其 mRNA 随着衣霉素浓度的增加其含量变化不明显, 但蛋白质的表达量变化较明显, 即 VEGF 的转录与翻译过程是非同步化的。这提示 GRP94 和 VEGF 同样作为内质网应激反应的靶基因, 但其表达调控的机制不同, 前者主要在转录水平, 后者可能在转录和翻译两个水平, 其中翻译水平可能更重要。UPR 引起的 VEGF 表达增高的机制有待进一步研究。

我们在研究过程中还观察到: 在低浓度衣霉素条件下, GRP94 和 VEGF 的表达增加量差别不大, 但在高浓度衣霉素时, VEGF 的增加量明显高于 GRP94, 比如 25 $\mu\text{g/ml}$ 衣霉素时 GRP94 增加 3 倍, 而 VEGF 增加 7.7 倍。这似乎提示 VEGF 比 GRP94 对强应激刺激反应更为敏感。GRP94 是一种保护性应激蛋白, 它可帮助细胞抵御应激的损伤^[11]。如果外界的刺激足以造成细胞的损伤或死亡, 那么 VEGF 在这个过程中的高表达提示了它可能是一种“损伤蛋白”。Lee 等^[12,13]研究发现外源性 VEGF 可以通过影响脑微血管内皮细胞内 Ca^{2+} 的浓度从而影响内皮细胞间的紧密连接, 改变血脑屏障的通透性,

使中性粒细胞及乳腺癌细胞穿过血脑屏障进入脑内。因此我们推测,在应激时HBMEC内源性VEGF的高表达可能影响到血脑屏障的完整性,加剧脑损伤的发生。

本实验以HBMEC为对象,研究了应激状态下细胞内VEGF的表达情况,结果表明在HBMEC内存在VEGF的自分泌系统,在应激反应中细胞内VEGF表达增高,推测UPR信号通路参与了VEGF的表达调控。

参考文献 (References)

- [1] Massa SM *et al.* *Cerebrovasc Brain Metab Rev*, 1996, **8**: 95
- [2] Ferrara N *et al.* *Endocr Rev*, 1997, **18**: 4
- [3] Connolly DT *et al.* *J Cell Biochem*, 1991, **47**: 219
- [4] Proescholdt M A *et al.* *J Neuropathol Exp Neurol*, 1999, **58**: 613
- [5] Van Bruggen N *et al.* *J Clin Invest*, 1999, **104**: 1613
- [6] Kumar R *et al.* *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003, **23**: 462
- [7] Pahl HL. *Physiol Rev*, 1999, **79**: 683
- [8] Kaufman RJ. *Genes Dev*, 1999, **13**: 1211
- [9] Ng DT *et al.* *J Cell Biol*, 2000, **150**: 77
- [10] Okada T *et al.* *Biochem J*, 2002, **366**: 585
- [11] Paschen W *et al.* *J Neurochem*, 2001, **76**: 1916
- [12] Lee TH *et al.* *J Biol Chem*, 2002, **277**: 10445
- [13] Lee TH *et al.* *J Biol Chem*, 2003, **278**: 5277

Response of VEGF Expression in Human Brain Microvascular Endothelial Cell to the Inducer of Endoplasmic Reticulum Stress

Da-Peng Wang, Bo Li, Wen-Gang Fang, Yu-Hua Chen*, Jin-Dan Song

(Department of Developmental Biology, Key Laboratory of Cell Biology of Ministry of Public Health of China, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract To reveal the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) under conditions that cause endoplasmic reticulum (ER) stress, human brain microvascular endothelial cells (HBMEC) were treated with tunicamycin at different concentration *in vitro*. RT-PCR, Western blot and immunocytochemistry analyses were used to measure intracellular levels of VEGF. The result showed that there was a basal expression of VEGF in HBMEC. Conditions known to active ER stress response could increase the expression of VEGF, and the level of VEGF mRNA was not correlated with that of VEGF under all conditions. Compared with GRP94, the increase of VEGF in response to tunicamycin at different concentrations was rapid. These results indicated that VEGF was an ER stress responsive gene and suggested that the expression of VEGF was regulated by unfolded protein response.

Key words VEGF; endoplasmic reticulum stress; human brain microvascular endothelial cell

Received: September 6, 2004 Accepted: November 18, 2004

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-24-23260246, E-mail: yhchen@mail.cmu.edu.cn