

## DEPP 蛋白对血管内皮细胞的存活及基因表达的影响

吉美玲,李文丽,石晨曦,李 皓\*

(南京医科大学病理生理学系,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:探讨孕酮诱导的蜕膜蛋白(decidual protein induced by progesterone, DEPP)在血管内皮细胞 EA.hy926 中的定位、对细胞存活及基因表达的影响。方法:构建表达人 DEPP 的重组腺病毒,测定病毒滴度并鉴定其表达的 DEPP 蛋白水平。用构建好的腺病毒感染 EA.hy926 内皮细胞,通过免疫荧光和 Western blot 确定 DEPP 蛋白在细胞中的定位。观察 DEPP 过表达对 EA.hy926 细胞存活的影响,用 MTT 法测定细胞的存活率,通过流式细胞仪检测 EA.hy926 细胞的坏死和凋亡情况。利用蛋白质芯片检测 DEPP 过表达时内皮细胞中血管发生相关基因表达水平的变化。结果:本研究成功构建了表达人 DEPP 蛋白的重组腺病毒。通过免疫荧光检测,发现 DEPP 蛋白呈全细胞分布。与过表达 GFP 的对照细胞相比,过表达 DEPP 时 EA.hy926 细胞明显皱缩、变圆,MTT 检测显示细胞的存活率明显下降,流式细胞仪检测显示 EA.hy926 细胞感染腺病毒后细胞的坏死水平与对照组相比升高。蛋白质芯片检测发现,DEPP 过表达导致内皮细胞中多种血管发生相关蛋白的水平发生明显改变。结论:DEPP 蛋白的表达升高对血管内皮细胞有损伤作用,可能参与血管发生的调控过程。

**[关键词]** 孕酮诱导的蜕膜蛋白;血管内皮细胞;细胞存活

**[中图分类号]** Q253

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2013)05-563-06

**doi:**10.7655/NYDXBNS20130501

## Effect on cell viability and gene expression in human umbilical endothelial cell EA.hy926 by adenovirus mediated DEPP over-expression

Ji Meiling, Li Wenli, Shi Chenxi, Li Hao\*

(Department of Pathophysiology, NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** Objective: To investigate the subcellular localization of decidual protein induced by progesterone (DEPP) as well as its effect on cell viability and gene expression in human umbilical endothelial cell line EA.hy926. **Methods:** Recombinant adenovirus expressing human DEPP was generated. The subcellular localization of DEPP was investigated by using immunofluorescence and Western blot assay with cells infected by ADV-DEPP. Cell viability was determined by using MTT assay. Apoptotic or necrotic cell numbers were measured by flow cytometry. Angiogenesis related protein expression pattern in response to DEPP over-expression was examined by using antibody microarray. **Results:** Over-expressed DEPP was localized both in the nucleus and cytoplasm in EA.hy926 cell. Compared with control cells, DEPP expression led to more severe cell shrinkage and detachment after adenovirus infection. MTT assay showed that cell viability was significantly decreased with exogenous DEPP. Flow cytometry analysis revealed that the main cell death induced by DEPP was necrosis. Finally, angiogenesis antibody microarray indicated that DEPP induced the increase of 7 genes and the reduction of 70 genes expression in endothelial cells. **Conclusion:** With increased expression, DEPP led to endothelial cell damage and may be involved in the regulation of angiogenesis.

**[Key words]** decidual protein induced by progesterone; endothelial cell; cell viability

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(5): 563-568]

孕酮诱导的蜕膜蛋白(decidual protein induced by progesterone, DEPP)基因,亦曾被命名为禁食诱

导基因,最初分别从孕酮诱导的人子宫间质 cDNA 文库和禁食状态下的脂肪组织中分离出来,但后来研究证实二者是来自 10 号染色体的同一基因(C10orf10)<sup>[1]</sup>。DEPP 分布广泛,在人卵巢、子宫、肾脏、白色脂肪组织以及肝脏中都有表达。研究发现,

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81070678)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: haoli@njmu.edu.cn

某些生理或病理条件下,DEPP的表达水平可发生改变。例如,在脂肪前体细胞3T3-L1细胞分化为脂肪细胞的过程中,DEPP mRNA水平随分化程度的增加而增加<sup>[2]</sup>;小鼠禁食后,心脏、肺、骨骼肌和白色脂肪组织的DEPP表达量上调,且在肝和肾中也出现明显的表达,再进食后则明显下降<sup>[2]</sup>;缺氧可诱导胶质瘤细胞DEPP的表达增加<sup>[3]</sup>。但是,DEPP表达改变对细胞功能和代谢的影响,目前无任何报道。

血管内皮细胞是循环系统的主要细胞之一,与动脉粥样硬化、高血压、冠心病等疾病的发生、发展密切相关<sup>[4]</sup>。研究发现,在胚胎发育的不同时期,DEPP表达于不同部位的动脉内皮细胞,并且在血管发育过程中表达量逐渐下降;在肿瘤发生或伤口愈合等形成的新生血管中,血管内皮细胞表达的DEPP增多<sup>[5]</sup>。我们在以往的研究中发现,血管内皮细胞对DEPP的表达受叉头转录因子O(Forkhead box O subfamily, FoxO)的调控;在缺氧刺激下,血管内皮细胞DEPP的表达上调,并且呈FoxO依赖性<sup>[6]</sup>。

本研究在构建表达DEPP的重组腺病毒基础上,观察了DEPP蛋白在血管内皮细胞中的分布,检测了过表达DEPP对血管内皮细胞存活的影响,并对DEPP导致的细胞基因表达改变进行了初步探索。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

RPMI-1640培养液(美国Gibco公司),胎牛血清(杭州四季青生物公司),MYC抗体、TRITC荧光二抗(美国Sigma公司),DEPP抗体(美国NOVUS公司),HRP标记山羊抗兔IgG、HRP标记的山羊抗小鼠IgG(北京中杉金桥),血管内皮细胞EA.hy926和人胚肾细胞293(南京KeyGEN公司),限制性内切酶*Cla*I和*Eco*R I、质粒小提试剂盒、胶回收试剂盒(日本TaKaRa公司),Annexin V-FITC试剂盒(南京建成生物有限公司),蛋白质芯片(美国Full Moon BioSystems公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 质粒的构建

人DEPP cDNA通过PCR进行扩增。引物序列如下:F:5'-AAAAAATCGATAGGTCCCAGCTTCTGCTC-3',R:5'-AAAAAGAATTCGAGTTCATGGATCACCGGG-3'。将myc-pcDNA3.1质粒用限制性内切酶*Cla*I和*Eco*R I双酶切后胶回收作为载体。将DEPP的PCR扩增产物用*Cla*I和*Eco*R I酶切后,胶回收作为目的基因。将上述载体与目的基因用T4 DNA连

接酶连接、转化DH5 $\alpha$ 感受态细胞。涂板、挑单克隆,小提质粒后用*Cla*I和*Eco*R I进行酶切鉴定,得到的阳性克隆经测序证实与人DEPP cDNA完全一致。

#### 1.2.2 重组腺病毒的构建、包装、纯化及滴度的测定

以上述DEPP表达质粒为模板,用BP和LR重组系统构建重组腺病毒。引物序列F:5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGCC-ACCATGG-AGCAGAACTCATCTC-3',R:5'-GGGG-ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC-3'。回收PCR产物,使用BP重组系统将目的片段AttB1-myc-DEPP-AttB2重组到载体pDONR221上,使用LR重组系统将目的序列myc-DEPP重组到腺病毒载体pAD/CMV/V5-DEST。重组好的病毒质粒pAD-DEPP-IRES-EGFP经测序确认。同法制备无外源基因插入的对照质粒。重组腺病毒质粒线性化后转染293细胞,转染24~48 h后观察细胞生长状态,此时可见随着时间的延长绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的表达逐渐增强。待细胞出现明显的病毒斑,大量细胞崩解脱落时,收集细胞,-80 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C反复冻融,离心收集上清即为重组腺病毒液,氯化铯密度梯度离心纯化。终点稀释法测定纯化病毒液滴度(T),Spearman-Karber法计算病毒滴度:T(pfu/ml)=10<sup>(x+0.8)</sup>,X为各稀释度病变率和。对照腺病毒滴度为8.5 $\times$ 10<sup>8</sup> pfu/ml,ADV-DEPP腺病毒滴度为3.2 $\times$ 10<sup>8</sup> pfu/ml。

#### 1.2.3 重组腺病毒DEPP的表达鉴定

将处于对数生长期的EA.hy926细胞用胰酶消化,制成细胞悬液接种于6孔板中,37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱培养,待细胞融合度达到约80%后,分别加入一定量的对照腺病毒以及梯度滴度的ADV-DEPP腺病毒,记录不同时间荧光表达情况和细胞的形态学变化,确定病毒感染的最佳浓度及检测时间。提取受感染的细胞蛋白进行Western blot实验,检测目的基因的表达。

#### 1.2.4 Western blot检测

收集感染腺病毒的细胞,提取蛋白。每孔上样50  $\mu$ g,10%SDS-PAGE分离,湿转至PVDF膜(100 V, 90 min)后,5%脱脂奶粉封闭1 h,加入一抗DEPP抗体(1:1 000),4 $^{\circ}$ C孵育过夜。TBS-T洗膜3次,5 min/次。二抗为HRP标记的山羊抗兔IgG,室温孵育1 h。TBS-T洗膜3次,5 min/次。杂交膜用ECL化学发光试剂显影后于成像仪器上读取。

#### 1.2.5 免疫荧光检测

感染重组腺病毒的细胞生长到亚融合状态时,

用 PBS 洗 3 次;3.7%的甲醛室温固定 5 min;除尽甲醛,PBS 洗 3 次;用含 3%BSA、0.1%NP-40 的 PBS 室温穿通加封闭 30 min~1 h;加入抗 DEPP 抗体,4℃孵育过夜;PBS 洗 3 次后加入 TRITC 二抗,室温避光孵育 1 h;PBS 洗 3 次后用置于荧光显微镜下观察。

### 1.2.6 MTT 法检测细胞存活率

在 96 孔板中接种细胞,每孔  $2 \times 10^4$  个细胞,每组 3 个复孔。根据确定好的最佳病毒感染滴度感染细胞后继续培养。一定时间后进行显色实验,每孔加入 90  $\mu$ l 无血清培养液以及 10  $\mu$ l MTT 溶液(5 g/L),37℃继续孵育 4 h。吸净培养液,每孔加入 200  $\mu$ l DMSO,震荡 15 min,在酶标仪 490 nm 波长下测其吸光度值。

### 1.2.7 流式细胞仪检测

细胞感染重组腺病毒后,PBS 洗涤细胞 1 次,胰酶消化细胞(胰酶不含 EDTA),加入培养液中中止消化,重悬细胞后进行计数。取  $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$  个细胞,1 000 g 离心 5 min,弃上清,收集细胞。加入 PBS 重悬,再次 1 000 g 离心 5 min。弃上清,加入 500  $\mu$ l 结合液轻轻重悬细胞。加入 5  $\mu$ l Annexin V-FITC,轻轻混匀;再加入 5  $\mu$ l 碘化丙啶(PI)轻轻混匀。室温避光孵育 10 min,进行流式细胞仪检测。Annexin V-FITC 为绿色荧光,PI 为红色荧光。

### 1.2.8 蛋白质芯片观察血管发生相关蛋白的表达

收集 EA.hy926 细胞,用预冷的 PBS 洗涤后加入裂解磁珠以及缓冲液提取蛋白。提取的蛋白经纯化后测定其蛋白浓度即得纯化的裂解产物。将纯化的裂解产物用生物素标记。封闭液封闭蛋白芯片并充分洗涤后,将生物素标记的蛋白与蛋白芯片进行交联反应,充分反应后洗涤。最后进行检测,蛋白芯

片加入 Cy3-Streptavidin 的检测液,室温避光孵育并充分洗涤,离心使得芯片表面干燥后扫描芯片。

### 1.3 统计学方法

每组试验都独立重复 3 次。采用 SPSS13.0 统计软件,所有数据的分析结果均以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用 *t* 检验, $P \leq 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 重组腺病毒表达蛋白的鉴定

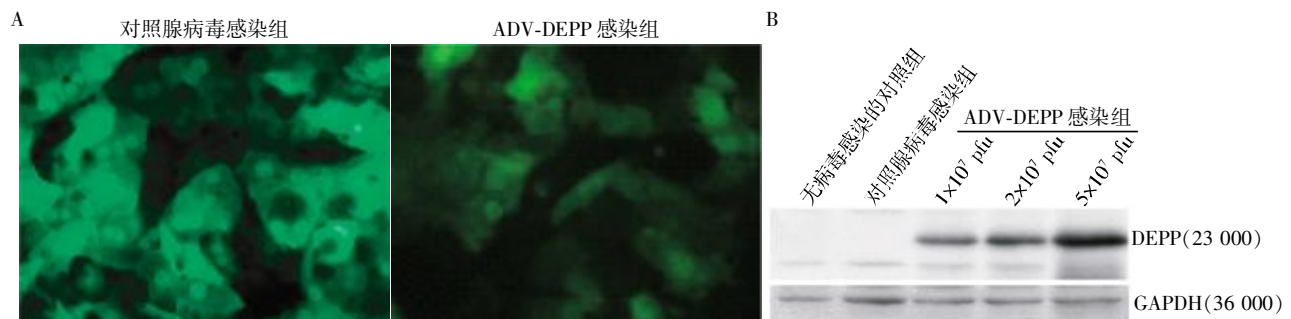
重组腺病毒感染 EA.hy926 细胞 2 d 后,在显微镜下即可观察到明显的 GFP 绿色荧光,说明感染效率良好(图 1A)。将感染腺病毒 ADV-DEPP 的细胞蛋白用 Western blot 检测,可在约 23 000 处检测到明显的条带,与预测的 DEPP 分子量一致。DEPP 蛋白的表达量与病毒的感染量存在明显的依赖性(图 1B)。以上结果表明,重组腺病毒 ADV-DEPP 的构建是成功的。

### 2.2 DEPP 蛋白在 EA.hy926 细胞中的定位

为了明确 DEPP 在 EA.hy926 细胞中的定位,将 ADV-DEPP 病毒感染 2 d 的细胞进行免疫荧光检测,发现 DEPP 在细胞质和细胞核中均有分布(图 2A)。与之一致,通过 Western blot 检测胞质和胞核蛋白,可以发现二者中均有 DEPP 蛋白表达(图 2B)。上述结果表明,DEPP 蛋白在内皮细胞 EA.hy926 中呈全细胞分布。

### 2.3 过表达 DEPP 蛋白导致 EA.hy926 细胞的存活率下降

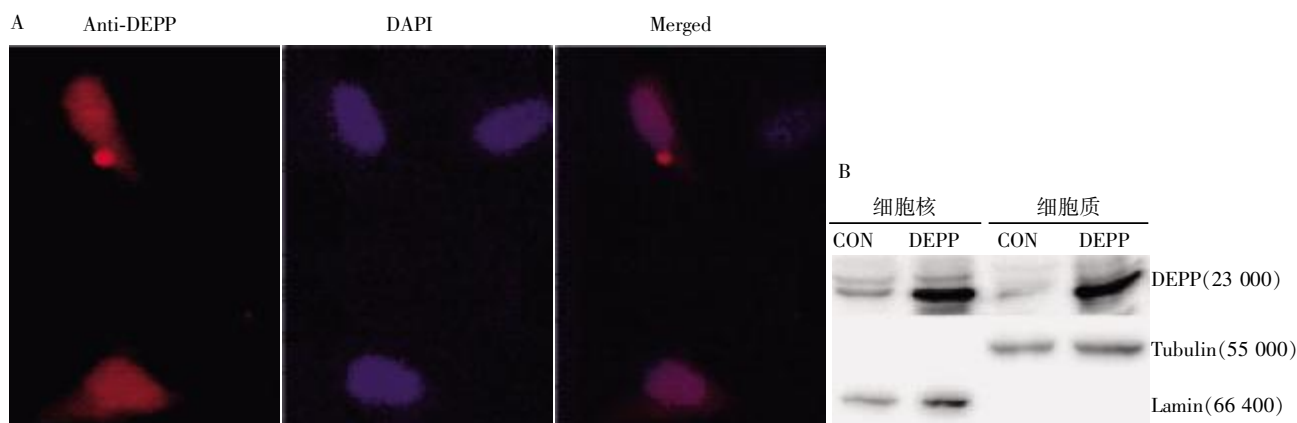
为了进一步探讨 DEPP 蛋白在细胞中的作用,持续观察了重组腺病毒 ADV-DEPP 和对照腺病毒



A:用带有 GFP 标记的对照腺病毒或 ADV-DEPP 感染 EA.hy926 细胞,2 d 后可在荧光显微镜下观察到明显的绿色荧光,提示腺病毒携带的目的基因得到表达( $\times 200$ )。B:对照腺病毒或 ADV-DEPP 感染 EA.hy926 细胞 2 d 后,用 Western blot 检测可见 DEPP 蛋白的表达随感染病毒 ADV-DEPP 数量的增加而增多。

图 1 重组腺病毒表达蛋白的免疫荧光和 Western blot 鉴定

Figure 1 Expression of DEPP in EA.hy926 cells infected with recombinant adenovirus was confirmed by fluorescence microscope and Western blot assay



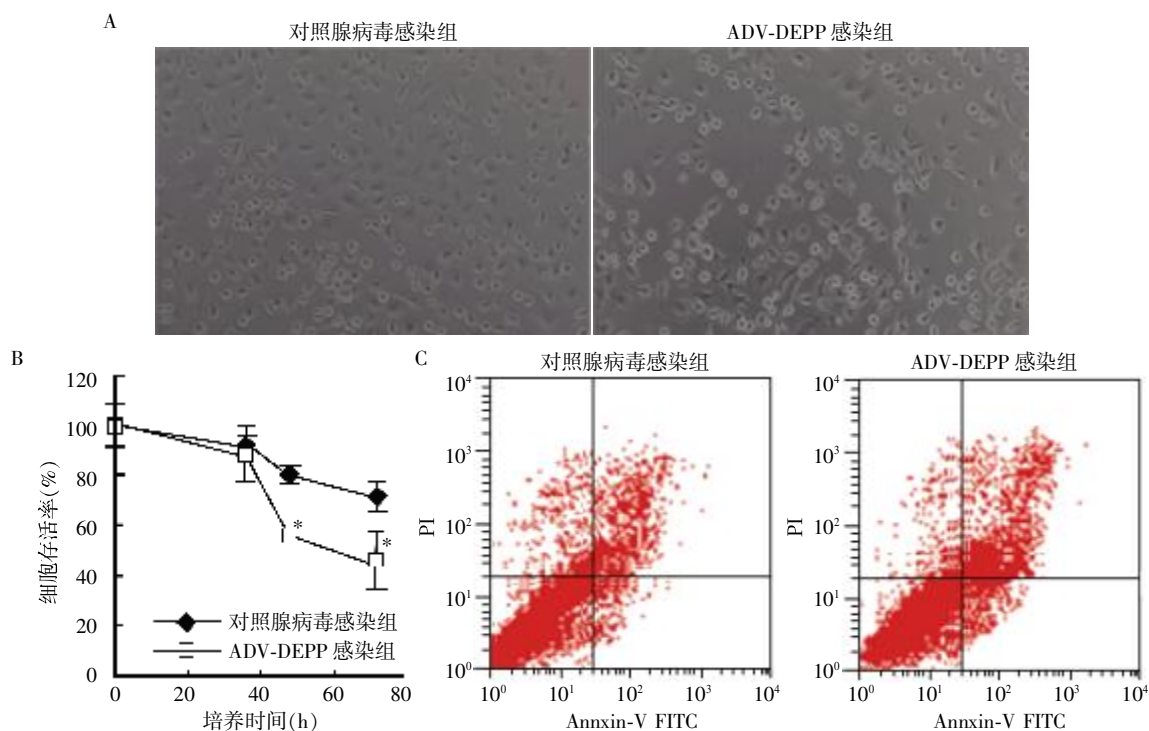
A:用 ADV-DEPP 感染 EA.hy926 细胞 48 h 后,用抗 DEPP 抗体和 TRITC 标记的二抗进行免疫荧光检测,可见红色荧光分布在细胞核和细胞浆( $\times 400$ )。B:用 ADV-DEPP 腺病毒感染 EA.hy926 细胞 48 h 后,分别提取胞质和胞核蛋白,通过 Western blot 检测 DEPP 蛋白的表达,Tubulin 和 Lamin 分别为胞质和胞核的标志蛋白。CON:对照腺病毒感染;DEPP:ADV-DEPP 腺病毒感染。

图 2 DEPP 在细胞内的定位

Figure 2 Subcellular localization of DEPP in EA.hy926 cells

感染细胞的生长状况。在感染后 24 h 内,2 组细胞无明显差异和变化;至 48 h 左右,与对照腺病毒感染组相比,ADV-DEPP 感染组发生皱缩、死亡的细胞增多;至 72 h,ADV-DEPP 感染组发生皱缩、死亡的细胞明显增多(图 3A)。通过 MTT 法检测发现,ADV-DEPP 感染组细胞较对照腺病毒感染组存活率

明显下降(图 3B)。进一步用流式细胞仪检测了坏死和凋亡细胞所占比例,发现 ADV-DEPP 感染组细胞坏死率比对照腺病毒感染组细胞明显增加 [(17.06  $\pm$  0.20)% vs (9.86  $\pm$  1.26)% ,  $P < 0.01$ , 图 3C]。上述结果表明,过表达 DEPP 可导致 EA.hy926 细胞损伤并发生死亡。



A:重组腺病毒感染 EA.hy926 细胞 72 h 后,倒置显微镜下可见 ADV-DEPP 感染组发生皱缩、死亡的细胞明显增多; B:重组腺病毒感染 EA.hy926 细胞 0、36、48、72 h 后,通过 MTT 法检测发现,ADV-DEPP 感染组细胞较对照腺病毒感染组存活率明显下降( $n = 3$ ,  $P < 0.01$ ); C:重组腺病毒感染 EA.hy926 细胞后,流式细胞术检测发现 ADV-DEPP 感染组细胞坏死率明显高于对照腺病毒感染组。

图 3 过表达 DEPP 蛋白导致 EA.hy926 细胞的存活率下降

Figure 3 Cell viability was significantly decreased with the over-expression of DEPP in EA.hy926 cells

### 2.4 DEPP 对血管内皮细胞中血管发生相关蛋白表达的影响

收集病毒感染 48 h 后的细胞蛋白,进行蛋白芯片检测。经计算机扫描和分析图像,发现 Raf1、Ras18、Stat3 等 7 个蛋白的表达增加 40% 以上,IL-1 $\alpha$ 、CD50、Glycophorin A 等 70 个蛋白的表达下降

40% 以上(表 1)。这些结果对进一步研究 DEPP 导致血管内皮细胞死亡的分子机制及其在血管发生中的作用提供了线索。

### 3 讨论

本研究通过免疫荧光和对胞质、胞核蛋白的

表 1 DEPP 对血管内皮细胞中血管发生相关蛋白表达的影响

Table 1 Effect of DEPP on the expression of angiogenesis related protein in endothelial cells

基因	对照腺病毒 毒感染组	ADV-DEPP 感染组	比值*	基因	对照腺病毒 毒感染组	ADV-DEPP 感染组	比值*
Raf1	0.25±0.02	0.48±0.01	1.90	COX2	0.77±0.08	0.33±0.03	0.43
Ras18	1.04±0.39	1.95±0.16	1.87	c-fos	1.37±0.27	0.58±0.11	0.43
Stat3	0.41±0.09	0.74±0.04	1.80	CD45RB	0.89±0.04	0.38±0.02	0.42
MHC II (HLA-DP and DR)	1.39±0.65	2.12±0.27	1.53	PDGF	0.93±0.07	0.39±0.03	0.42
MHC II (HLA-DQ)	1.14±0.35	1.69±0.14	1.47	VEGF	0.76±0.05	0.32±0.02	0.42
Cullin-3 (Cul-3)	2.08±0.53	3.00±0.22	1.45	Interferon-a( II )	0.49±0.01	0.21±0.01	0.42
eNOS	0.32±0.03	0.44±0.01	1.41	Hepatocyte Growth Factor	1.34±0.22	0.56±0.09	0.42
IGF-I	0.66±0.09	0.39±0.04	0.60	APC2	0.82±0.03	0.34±0.01	0.42
IL-30	0.17±0.02	0.10±0.01	0.59	CD54/ICAM-1	1.20±0.17	0.49±0.07	0.41
TIMP-2	0.44±0.04	0.26±0.02	0.59	CD40	0.96±0.08	0.38±0.03	0.40
TIMP-1	0.43±0.06	0.25±0.03	0.59	IGF-1R	0.99±0.12	0.39±0.05	0.40
HIF-1a	0.74±0.03	0.43±0.01	0.59	MHC I (HLA-A, B, C)	1.05±0.17	0.41±0.07	0.40
Cullin-2 (Cul-2)	0.62±0.02	0.35±0.01	0.58	Fibronectin	1.56±0.12	0.62±0.05	0.40
Mek1	0.89±0.05	0.51±0.02	0.57	Thymidine Phosphorylase	0.60±0.01	0.23±0.01	0.39
Flk-1/KDR/VEGFR2	1.09±0.07	0.60±0.03	0.55	IL-1 $\beta$	0.72±0.07	0.27±0.03	0.38
Catenin alpha	0.67±0.13	0.37±0.05	0.55	MHC I (HLA-A)	0.90±0.04	0.34±0.02	0.38
IFN gamma	0.57±0.09	0.31±0.04	0.54	GSK-3	1.65±0.16	0.62±0.07	0.38
NOS-u	0.75±0.01	0.40±0.01	0.53	uPA	0.55±0.01	0.21±0.01	0.37
JNK Activating kinase (JKK1)	0.62±0.13	0.33±0.05	0.53	IL-6	0.46±0.06	0.16±0.03	0.35
F.VIII/VWF	0.92±0.03	0.48±0.01	0.52	c-Src	1.38±0.16	0.48±0.07	0.35
MMP-9	0.57±0.12	0.29±0.05	0.51	MHC II (HLA-DR) Ia	1.25±0.18	0.43±0.08	0.35
TACE/ADAM17	0.64±0.07	0.32±0.03	0.51	EGFR	1.39±0.20	0.47±0.08	0.34
CD115/c-fms/CSF-1R/M-CSFR	0.65±0.06	0.33±0.02	0.51	CD36GP III b/GPIV	1.69±0.16	0.57±0.06	0.34
Grb2	2.36±0.39	1.19±0.16	0.50	GM-CSF	0.70±0.05	0.23±0.02	0.32
Raf-1 (Phospho-specific)	0.59±0.07	0.29±0.03	0.50	MHC I (HLA-B)	1.23±0.10	0.40±0.04	0.32
TNFa	0.56±0.03	0.28±0.01	0.50	CD56/NCAM-1	1.29±0.04	0.41±0.02	0.32
Plasminogen	0.86±0.12	0.42±0.05	0.49	Int-2 Oncoprotein	0.72±0.04	0.23±0.02	0.32
IP10/CRG2	0.70±0.14	0.34±0.06	0.49	Flt-1/VEGFR1	1.31±0.08	0.41±0.03	0.31
PDGFR, alpha	0.77±0.01	0.37±0.01	0.48	MHC II (HLA-DR)	1.32±0.11	0.41±0.05	0.31
Thomsen-Friedenreich Antigen	0.44±0.04	0.20±0.02	0.47	ERK2	1.68±0.09	0.51±0.04	0.30
NOS-i	0.67±0.11	0.32±0.05	0.47	G-CSF	0.70±0.03	0.21±0.01	0.30
SHP-1	0.59±0.08	0.27±0.03	0.46	MMP-2	1.25±0.14	0.37±0.06	0.30
Interferon-g	0.67±0.14	0.31±0.06	0.46	MHC II (HLA-DP)	1.29±0.12	0.37±0.05	0.29
MMP-1(Collagenase-I)	0.55±0.04	0.25±0.02	0.46	Flt-4	1.43±0.06	0.40±0.03	0.28
CD25/IL-2 Receptor a	1.68±0.13	0.77±0.05	0.46	IL-1 $\alpha$	0.74±0.06	0.20±0.02	0.26
IL-3	0.60±0.06	0.28±0.02	0.46	CD50/ICAM-3	2.39±0.25	0.61±0.1	0.25
Mek2	0.64±0.05	0.29±0.02	0.45	Glycophorin A	1.55±0.03	0.33±0.01	0.21
Cullin-1(Cul-1)	0.81±0.02	0.36±0.01	0.44	Endostatin	1.99±0.11	0.32±0.05	0.16
p300/CBP	0.69±0.14	0.30±0.06	0.43				

\* : ADV-DEPP 感染组/对照腺病毒感染组。

Western blot 检测,发现 DEPP 蛋白在 EA.hy926 细胞的胞质及胞核中均有表达,其在细胞质中的分布均匀,而非局限于某些细胞器如溶酶体、过氧化物酶体等。而 Watanabe 等<sup>[1]</sup>报道的 HEK293 细胞中 DEPP 主要定位于细胞核和 Shin 等<sup>[5]</sup>报道的 DEPP 蛋白分布在细胞质中,我们推测这种差异可能与细胞的种属有关。目前对 DEPP 在细胞内的定位均是通过过表达外源性蛋白的方式来确定的,有可能与内源性蛋白的胞内分布不完全一致,因此,内源性 DEPP 的亚细胞定位有待进一步实验证实。

目前虽然已发现脂肪细胞分化过程、禁食与恢复饮食、缺氧等生理或病理因素均可导致 DEPP 的表达水平发生改变,但是对 DEPP 的功能研究仍是空白。我们通过重组腺病毒介导的 DEPP 在 EA.hy926 细胞的过表达,观察到 DEPP 导致细胞存活率明显下降,死亡增加。因此推测,禁食或缺氧等刺激时 DEPP 的表达增多可能发挥促细胞死亡的作用。细胞的死亡主要分凋亡和坏死两种形式<sup>[7]</sup>。通过流式细胞仪的检测发现,DEPP 导致的细胞死亡以坏死为主。这一过程被认为是无序的、难以调控的。但随着对坏死调节关键蛋白 RIPK1 以及 RIPK3 的研究的深入<sup>[8]</sup>,这种观点发生了改变。对于 DEPP 过表达引起细胞坏死的具体分子机制还需要进一步探讨。

已有研究发现,DEPP 在胚胎发育的不同时期表达于外周组织不同部位的内皮细胞中,在成体的新生血管中也可检测到 DEPP 的表达<sup>[5]</sup>,提示 DEPP 可能参与血管的发生过程。本研究利用蛋白芯片技术,检测了 DEPP 过表达对血管内皮细胞中血管发生相关基因表达水平的影响,发现 Raf1 等 7 种基因的表达量升高以及大量基因的表达下调,其中包括胰岛素和胰岛素样生长因子-1、血小板源性生长因子、血管内皮生长因子、肝细胞生长因子等生长因子及其受体<sup>[9-11]</sup>、c-fos<sup>[12]</sup>和 c-Src<sup>[13]</sup>等原癌基因,这些基因的表达下降可能与 DEPP 导致血管内皮细胞死亡的分子机制有关,但尚有待进一步的验证和研究。

总之,本研究通过重组腺病毒介导的蛋白表达,不仅对 DEPP 蛋白在血管内皮细胞 EA.hy926 中的定位进行了探讨,而且首次发现 DEPP 可导致细胞存活率下降,发生坏死,并引起血管发生相关基因的表达水平发生明显改变。这些结果为进一步研究

DEPP 的作用机制提供了线索。

#### [参考文献]

- [1] Watanabe H, Nonoguchi K, Sakurai T, et al. A novel protein Depp, which is induced by progesterone in human endometrial stromal cells activates Elk-1 transcription factor[J]. *Mol Hum Reprod*, 2005, 11(7):471-476
- [2] Kuroda Y, Kuriyama H, Kihara S, et al. Insulin-mediated regulation of decidual protein induced by progesterone (DEPP) in adipose tissue and liver [J]. *Horm Metab Res*, 2010, 42(3):173-177
- [3] Ragel BT, Couldwell WT, Gillespie DL, et al. Identification of hypoxia-induced genes in a malignant glioma cell line (U-251) by cDNA microarray analysis[J]. *Neurosurg Rev*, 2007, 30(3):181-187
- [4] Kinlay S, Libby P, Ganz P. Endothelial function and coronary artery disease[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2001, 12(4):383-389
- [5] Shin D, Anderson DJ. Isolation of arterial-specific genes by subtractive hybridization reveals molecular heterogeneity among arterial endothelial cells[J]. *Dev Dyn*, 2005, 233(4):1589-1604
- [6] Chen S, Gai G, Wang Y, et al. FoxO regulates expression of decidual protein induced by progesterone (DEPP) in human endothelial cells[J]. *FEBS Lett*, 2011, 585(12):1796-1800
- [7] Krysko DV, Vanden Berghe T, D'Herde K, et al. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis[J]. *Methods*, 2008, 44(3):205-221
- [8] Holler N, Zaru R, Micheau O, et al. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule[J]. *Nat Immunol*, 2000, 1(6):489-495
- [9] Heldin CH. Autocrine PDGF stimulation in malignancies [J]. *Ups J Med Sci*, 2012, 117(2):83-91
- [10] Ungvari Z, Csiszar A. The emerging role of IGF-1 deficiency in cardiovascular aging: recent advances[J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2012, 67(6):599-610
- [11] Steffan JJ, Coleman DT, Cardelli JA. The HGF-met signaling axis: emerging themes and targets of inhibition [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2011, 12(1):12-22
- [12] Acquaviva C, Ferrara P, Bossis G, et al. Degradation of cellular and viral Fos proteins [J]. *Biochimie*, 2001, 83(3-4):357-362
- [13] Alper O, Bowden ET. Novel insights into c-Src[J]. *Curr Pharm Des*, 2005, 11(9):1119-1130

[收稿日期] 2013-03-26