

SelS高表达保护人脐静脉内皮细胞 免于 H₂O₂ 诱导的细胞损伤*

杜建玲^{1,2)} 安利佳^{1)**} 孙长凯³⁾ 门莉莉²⁾ 张秀娟²⁾ 李昌臣²⁾

(¹⁾大连理工大学环境与生命工程学院生命科学与工程系, 大连 116024;

²⁾大连医科大学附属第一医院内分泌科, 大连 116011; ³⁾大连医科大学脑疾病研究所, 大连 116027)

摘要 采用以下方法探讨 SelS 在内皮细胞中的表达和作用: 将 SelS 基因克隆到真核表达载体 pLNCX2, RT-PCR、*Xho* I / *Cla* I 双酶切以及 DNA 序列分析验证目的基因; 利用脂质体转染技术将 pLNCX2-SelS 或 pLNCX2 转染至人脐静脉内皮细胞 (ECV₃₀₄ 细胞), RT-PCR 检测重组基因 SelS 的表达; MTT 方法检测转染后过氧化氢(H₂O₂)对内皮细胞增殖能力的影响; 硫代巴比妥酸法测定暴露于 H₂O₂ 中不同转染组细胞脂质过氧化产物丙二醛含量. 结果表明: 成功构建真核表达载体 pLNCX2-SelS; 转染后重组 SelS mRNA 表达水平是内源性水平的 1.76 倍; H₂O₂ 对 ECV₃₀₄ 细胞损伤后, 高表达 SelS 组细胞活性增强、H₂O₂ 诱导产生的丙二醛减少. 上述结果表明, 高表达 SelS 可保护内皮细胞免于 H₂O₂ 诱导的细胞损伤, 其作用机制与抗氧化有关.

关键词 内皮功能障碍, Tanis/SelS, ECV₃₀₄ 细胞, 氧化应激, pLNCX2

学科分类号 Q78, R34

血管内皮功能障碍在糖尿病(diabetes mellitus, DM)血管并发症^[1]、动脉粥样硬化^[2]及缺血性卒中^[3]等全身性血管系统疾病的发生与发展中扮演着重要角色. 内皮功能障碍主要是指内皮分泌活性物质的改变(如: 一氧化氮和前列环素生成减少), 也包括黏附分子和趋化因子表达上调、脂蛋白摄取增加以及内皮渗透性改变^[4~6]. 近来研究表明高糖诱导的氧化应激是 DM 血管并发症的共同发病机制^[7]. 因此, 加强内皮抗氧化能力可以防治 DM 血管并发症的发生与发展.

Walder等^[8]在以色列沙鼠(DM 和代谢综合征的动物模型)中发现一种新的跨膜蛋白 / 基因——Tanis, Tanis 是一种与慢性低度炎症相关的糖调节蛋白, 在骨骼肌、脂肪以及肝脏等组织中广泛分布. 后来, Gao 等^[9]的研究提示, Tanis 在体外肝脏细胞与胰岛素抵抗有关.

在人类也存在与 Tanis 相似的基因, 被命名为 SelS 或 AD-015, 其 mRNA 由 1 209 bp 组成, 编码 204 个氨基酸残基组成的蛋白质. 已知的硒蛋白家族成员——谷胱甘肽过氧化物酶、硫氧还蛋白还原酶能调节细胞内的氧化还原平衡, 具有抗氧化的作用^[10]. SelW 和 SelP 在氧化损伤中具有保护意义^[11,12].

硒具有降低血糖和调控胰岛素介导的代谢过程等拟胰岛素作用. SelS 是一种新的硒蛋白, 体外研究表明, SelS 具有保护胰岛 β 细胞免受过氧化氢(hydrogen peroxide, H₂O₂)损伤的作用^[13], 可见 SelS 与氧化应激有关.

目前, 炎症相关的内皮损伤、动脉粥样硬化与 Tanis/ SelS 的关系未见报道. 本研究以人脐静脉内皮细胞(ECV₃₀₄ 细胞)为对象, 利用脂质体转染技术将 pLNCX2-SelS 转染至 ECV₃₀₄ 细胞, 观察 SelS 对暴露于外源性 H₂O₂ 的内皮细胞的影响, 探讨内皮保护的新方法.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和材料. TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司; RT-PCR 试剂盒[RNA LA PCR™ Kit (AMV) Ver 1.1]、Lataq 酶、DNA Marker、质粒提取试剂盒 (MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver.2.0)、

*国家自然科学基金资助项目(30670649).

** 通讯联系人. Tel: 0411-84706356, E-mail: bioeng@dlut.edu.cn

收稿日期: 2006-10-16, 接受日期: 2006-12-06

DNA连接试剂盒(DNA Ligation Kit)、pMD18-T 载体、DNA 凝胶回收试剂盒(Gel DNA Purification Kit Ver.2.0)、限制性内切酶 *Cla* I 和 *Xho* I 均购自大连宝生物工程公司;人脐静脉内皮细胞株(ECV₃₀₄ 细胞)购自湘雅医学院细胞中心;真核表达载体 pLNCX2 购自 Clontech 公司;脂质体 Lipofectin Reagent、Opti-MEMI 购自 Invitrogen 公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自 Sigma 公司;丙二醛(maleic dialdehyde, MDA)试剂盒购自南京建成生物工程研究所.

1.1.2 各种引物由大连宝生物工程公司合成. SelS 上游引物: 5' CCGCTCGAGATGGAACGCCAA-GAGGAGTCTCTG 3'; SelS 下游引物: 5' CCATCGATCATAAATCTCCTTGAATAAAGATGC 3'. PLNCX2 上游引物: 5'AGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATC 3'; PLNCX2 下游引物: 5'ACCTACAGGTGGGGTCTTTCATTCCC 3'. β -actin 上游引物: 5' CCTTCCTGGGCATGGAGTCCTG 3'; β -actin 下游引物: 5'GGAGCAATGATCTTGATCTTC 3'. neo^r 基因上游引物: 5'CAAGATGGATTGCACGCAGG 3'; neo^r 基因下游引物: 5' CCGCTCAGAAGAACTCGTC 3'.

1.2 方法

1.2.1 目的基因的提取和重组真核表达载体

a. 总 RNA 的提取以及 SelS 基因片段的扩增. 取外科手术患者皮下脂肪组织, 根据 TRIzol 说明书提取总 RNA. 通过 RT-PCR 扩增 SelS 基因. 从 GenBank 中检索人 SelS 基因(NM-018445), 针对包括基因编码区的 1 102 bp 设计引物, 上、下游引物 5'端分别包含 *Xho* I (CTCGAG)和 *Cla* I (ATCGAT)限制性内切酶酶切位点. 以提取的总 RNA 为模板, Oligo dT-Adaptor Primer 为反转录酶, 使用 RNA LA PCR™ Kit (AMV)Ver 1.1 反转录合成 cDNA. PCR 反应条件为: 94℃ 1 min, 98℃ 10 s, 53℃ 1 min, 72℃ 1 min 共 35 个循环, 最后于 72℃ 10 min. 电泳鉴定.

b. SelS 克隆到克隆载体 pMD18-T. 按照 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0 说明回收 PCR 产物, 并命名为 SelS Insert DNA1, 电泳鉴定. 按照 TaKaRa DNA Ligation Kit 说明将 SelS 克隆到克隆载体 pMD18-T, 产物命名为 pMD18-SelS. 按照 MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver.2.0 说明提取质粒 DNA. 将上述质粒 DNA 以 M 13-47/RV-M (M13-47, 5' CGC CAG GGT

TTT CCC AGT CAC GAC 3' 和 RV-M, 5' GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG 3')为引物交大连宝生物工程公司进行 DNA 测序, 使用限制性内切酶 *Xho* I / *Cla* I 对质粒 DNA 进行酶切鉴定, TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0 切胶回收目的基因片段, 命名为 SelS Insert DNA2, 电泳鉴定.

c. SelS 亚克隆至真核表达载体 pLNCX2. *Xho* I / *Cla* I 分别对质粒 pLNCX2 和 SelS Insert DNA2 进行大量酶切, 使用 TaKaRa DNA Ligation Kit将 SelS 亚克隆至真核表达载体 pLNCX2, 命名为 pLNCX2-SelS. 提取质粒, 限制性内切酶 *Xho* I / *Cla* I 对质粒 DNA 进行酶切并在大连宝生物工程公司进行 DNA 测序鉴定. TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0 切胶回收目的基因片段, 电泳鉴定.

1.2.2 SelS 基因的表达

a. ECV₃₀₄ 细胞培养. 常规培养于含 10%小牛血清以及青、链霉素 10⁵ U/ml 的 IMDM 培养液中, 37℃、5% CO₂ 孵箱内培养. 2~3 天换液一次, 细胞达 80%融合时, 用 0.25%胰酶消化吹打后传代.

b. ECV₃₀₄ 细胞转染. 转染前 24 h 将细胞以 2×10⁵/ml 的密度传代于 6 孔板中, 随机将细胞转染 pLNCX2-SelS 或 pLNCX2. 按照脂质体 Lipofectin Reagent 和 Opti-MEMI 说明进行转染. 24 h 后用 600 mg/L G418 (预实验表明 ECV₃₀₄ 细胞暴露在 600 mg/L G418, 一周后几乎没有存活细胞)进行筛选, 获得稳定克隆后, 挑取单克隆放大培养.

c. 转染鉴定. 按照 1.2.1 所述提取总 RNA 和进行 RT-PCR 反应. 检测 neo^r 基因在转染 pLNCX2-SelS 组、转染 pLNCX2 组以及未转染组细胞中的表达, 评定转染是否成功. β -actin 作为内参半定量检测 SelS mRNA 在各组细胞中的表达. Neo^r 基因 PCR 反应条件: 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共 35 个循环, 最后于 72℃ 7 min. β -actin 基因 PCR 反应条件: 94℃ 2 min, 53℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共 35 个循环, 最后于 72℃ 10 min. 电泳鉴定.

1.2.3 不同转染组细胞对 H₂O₂ 损伤效应的影响

a. 实验分组与损伤模型的建立. 将转染 pLNCX2-SelS 组、转染 pLNCX2 组以及未转染组细胞以 2×10⁵/ml 的密度铺板, 用含 0.5%小牛血清的 IMDM 培养液于 37℃、5% CO₂ 孵箱中同步 16 h 后, 弃上清分别暴露于含 0、100、200、300 以及 400 μ mol/L H₂O₂ 的含 10%小牛血清的 IMDM 培养

液继续培养 24 h.

b. 倒置相差显微镜观察实验 a 各组细胞形态学变化.

c. MTT 比色法检测内皮细胞的活性. 将细胞以 2×10⁵/ml 密度接种于 96 孔板(每孔 200 μl), 按上述处理后于培养结束前 4 h 每孔加入 MTT(5 g/L) 20 μl, 培养结束时弃培养液上清, 加入二甲亚砜 150 μl, 于 37℃ 振荡至紫色结晶完全溶解后, 在 570 nm 波长处测定吸光度值.

d. MDA 水平的测定: 取实验 a 各组上清液测 MDA 水平(按试剂盒说明操作).

1.3 统计学处理

所有数据均通过 2 次独立实验, 每次实验设 3 个复孔获得. 采用 Microsoft Excel 建立数据库, 用 SPSS11.0 进行数据分析. 计量资料用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 均数比较用 *t* 检验, *P*<0.05 为差异显著.

2 结 果

2.1 pLNCX2-SelS 的克隆构建及鉴定

a. 总 RNA 的提取以及 SelS 基因片段的扩增. 电泳结果显示提取的总 RNA. RT-PCR 扩增 SelS 基因产物回收并命名为 SelS Insert DNA1, 电泳结果表明(图 1)获得较纯的目的基因片段(1 102 bp).

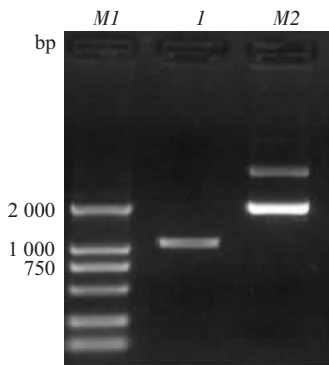


Fig. 1 SelS gene was amplified by RT-PCR after the total RNA was extracted from adipose tissues of human

M1: DNA marker DL 2 000; I: SelS Insert DNA1; M2: pUC119 DNA marker.

b. SelS 克隆到克隆载体 pMD18-T. SelS Insert DNA1 被克隆至克隆载体 pMD18-T, PCR、限制性内切酶分析(图 2)以及 DNA 序列分析鉴定结果. pMD18-SelS 质粒进行大量酶切, 切胶回收目的基因片段, 命名 SelS Insert DNA2, 电泳鉴定证实正确(图 3). 将 pMD18-SelS 质粒进行 DNA 测序结果

与预期结果一致.

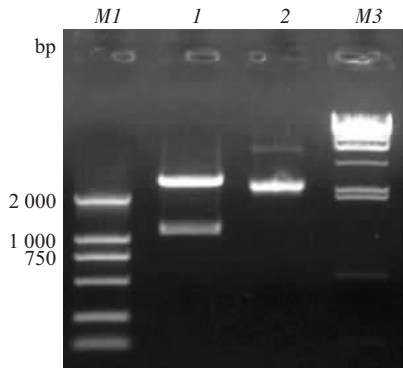


Fig. 2 Restriction endonuclease analysis of pMD18-SelS

M1: DNA marker DL2 000; I: SelS Insert DNA2; 2: pMD18-T-SelS Insert DNA1; M3: λ-Hind III DNA marker.

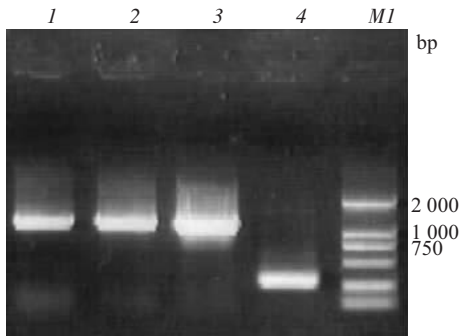


Fig. 3 RT-PCR analysis of SelS subcloned into pLNCX2

M1: DNA marker DL2 000; 1~4: pLNCX2-SelS (1~3: Positive results; 4: Negative result).

c. SelS 亚克隆至真核表达载体 pLNCX2. SelS Insert DNA2 亚克隆至真核表达载体 pLNCX2, 命名为 pLNCX2-SelS. PCR(图 3)以及 DNA 序列分析(图 4)鉴定结果证实真核表达载体 pLNCX2-SelS 构建成功.

d. 转染鉴定. 转染 pLNCX2-SelS 或 pLNCX2 后, neo^r 基因检测证明转染成功. RT-PCR 结果显示, 重组 SelS 基因在转染 pLNCX2-SelS 组是 ECV₃₀₄ 细胞内源性水平的 1.76 倍(图 5, 图 6).

2.2 不同转染组细胞对 H₂O₂ 损伤效应的影响

倒置显微镜观察形态学变化. 可见转染 pLNCX2 组以及未转染组暴露在 H₂O₂ 后, 内皮细胞皱缩、变圆、间隙增大, 胞浆内出现空泡, 核染色质浓缩、聚集, 细胞排列紊乱, 失去典型的单层铺路石状排列形态(图 7a, 图 7b). 转染 pLNCX2-SelS 组可见细胞形态、结构清晰, 大小均匀(图 7c).

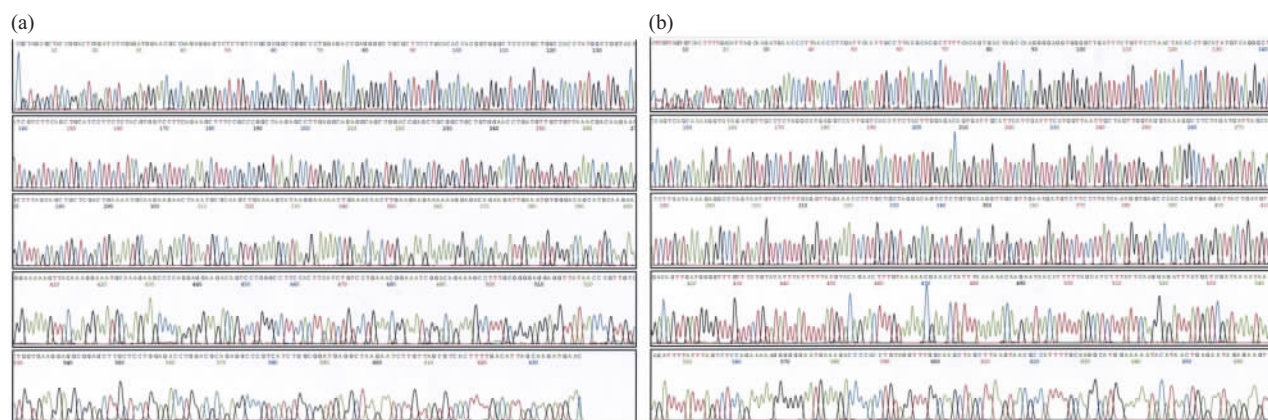


Fig. 4 Sequencing analysis of pLNCX2-SelS

(a) 5' flanking sequence. (b) 3' flanking sequence.

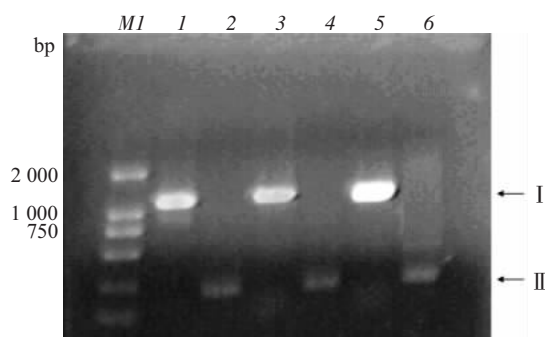


Fig. 5 PCR gel showing upregulated gene expression in the ECV₃₀₄ cells

Arrow I shows location of band corresponding to the SelS gene. Arrow II shows location of band corresponding to the β -actin. M1: DNA marker DL2 000; 1,2: Non-transfection group; 3,4: pLNCX2 group; 5,6: pLNCX2-SelS group.

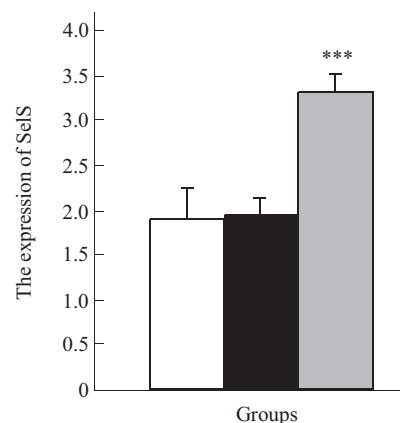


Fig. 6 SelS mRNA expression in different groups

□: Non-transfection; ■: pLNCX2 group; ▒: pLNCX2-SelS group.

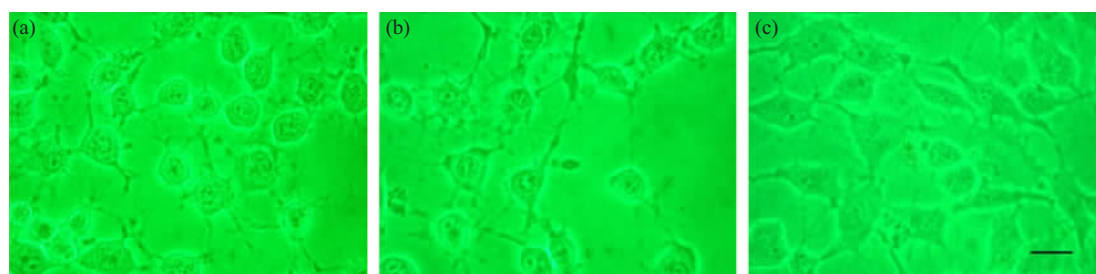


Fig. 7 Cellular morphology changes were observed by phase contrast microscope after ECV₃₀₄ cells treated by H₂O₂

(a) Non-transfection group. (b) pLNCX2 group. (c) pLNCX2-SelS group. Scale bar, 10 μ m.

100、200、300 以及 400 μ mol/L H₂O₂ 均能损伤内皮细胞. MTT 法检测细胞增殖情况(表 1), 高表达 SelS 组能显著增加细胞活性, 尤以 H₂O₂ 在 300 和 400 μ mol/L ($P < 0.05$; $P < 0.01$) 更为显著.

转染 pLNCX2-SelS 组细胞能显著抑制 H₂O₂ (200 μ mol/L, $P < 0.05$; 300 μ mol/L, $P < 0.01$; 400 μ mol/L, $P < 0.01$) 诱导 ECV₃₀₄ 细胞产生 MDA (表 2).

Table 1 The influence of H₂O₂ on cell viability of ECV₃₀₄ cells

<i>c</i> (H ₂ O ₂)/ μmol/L	Cell viability /%		
	Non-transfection group	pLNCX2 transfection group	pLNCX2-SelS transfection group
0	84 ± 7	86 ± 5	85 ± 8
100	73 ± 16	71 ± 9	80 ± 5
200	64 ± 10	60 ± 16	78 ± 16
300	52 ± 8	56 ± 3	73 ± 11*
400	38 ± 12	37 ± 9	67 ± 6**

P* < 0.05, *P* < 0.01 vs non-transfection group. $\bar{x} \pm s$.

Table 2 MDA concentration in different groups treated by H₂O₂

<i>c</i> (H ₂ O ₂)/ μmol/L	<i>c</i> (MDA) /(μmol·L ⁻¹)		
	Non-transfection group	pLNCX2 transfection group	pLNCX2-SelS transfection group
0	2.55 ± 0.17	2.48 ± 0.15	2.52 ± 0.20
100	4.87 ± 0.14	4.92 ± 0.31	4.53 ± 0.11
200	6.32 ± 0.23	6.38 ± 0.11	5.25 ± 0.21*
300	8.15 ± 0.20	8.24 ± 0.11	6.17 ± 0.27**
400	8.92 ± 0.16	9.09 ± 0.11	6.88 ± 0.17**

P* < 0.05, *P* < 0.01 vs non-transfection group. $\bar{x} \pm s$.

3 讨 论

Tanis是由 1 155 核苷编码的 cDNA, 本研究成功地把 1 102 bp 的 SelS 基因克隆到真核表达载体 pLNCX2 中, 构建了真核表达载体 pLNCX2-SelS, 并且发现有内源性 SelS 在 EVC₃₀₄ 细胞中表达, EVC₃₀₄ 细胞的增殖活性能被外源性 H₂O₂ 抑制, 高表达 SelS 能抵抗 H₂O₂ 诱导的细胞损伤. 这些结果提示: SelS 可能是内源性内皮保护因子之一.

在 DM 状态下, 高血糖导致血管病变主要通过 4 条途径: 多元醇通路活性增强、糖基化终末产物形成增多、蛋白激酶 C 激活以及氨基己糖通路活性增高. 目前认为上述 4 个途径存在一个共同的致病机制——线粒体电子传递链产生超氧化物增多^[7,14]. 本研究表明, 外源性 H₂O₂ 以浓度依赖的形式降低 ECV₃₀₄ 细胞的增殖能力, 但是高表达 SelS 能增加 H₂O₂ 损伤的 ECV₃₀₄ 细胞的增殖能力, 减少 MDA 的生成, 可见 SelS 能通过抗氧化应激保护 ECV₃₀₄ 细胞.

DM 以慢性血糖升高为特征并逐步导致动脉粥样硬化和脑卒中. 高血糖、胰岛素抵抗、氧化应激、脂代谢紊乱以及慢性炎症反应等内皮功能障碍的危

险因素相互作用、叠加共同促进了 DM 血管并发症的发生和进展, 其中氧化应激是各种危险因素导致内皮损伤的共同机制. 活性氧产生过多超过体内抗氧化防御机制, 导致内皮功能障碍, 是各种血管疾病的病理生理基础^[15]. 提供有效的抗氧化治疗可望为 DM 血管并发症的预防和治疗找到切实可行的办法. 但是, 到目前为止几个人类干预研究并没有证明传统抗氧化剂(如维生素 C、维生素 E、谷胱甘肽等)能降低疾病的发生^[16,17]. 这可能是因为这些抗氧化剂虽然在体内外研究中具有改善 EC 功能的作用, 但它们仅对已形成的脂质过氧化物有作用而对过氧化物所致的其他后果无影响, 可谓“治标不治本”. SelS 增强胰岛细胞^[13]及内皮细胞(本研究)抗氧化应激能力说明 SelS 具有抗氧化保护作用. 推测高表达 SelS 可能是内皮保护的新措施. 但 SelS 抵抗氧化应激的机制还不清楚.

酵母双杂交分析发现 Tanis/SelS 是急性血清淀粉样蛋白 A(acute-phase protein serum amyloid A, SAA)的受体^[8]. 体内的研究也表明血浆 SAA 和 Tanis/SelS mRNA 表达水平正相关^[18]. SAA 是一种急性反应蛋白, 在循环中由高密度脂蛋白运输^[19], 在宿主防御过程中具有重要作用, 有研究表明在炎症反应过程 SAA 具有抗氧化保护作用^[20,21]. SelS 是否通过与其受体 SAA 结合发挥抗氧化保护作用进而防治血管疾病有待进一步证明.

致谢 本研究完成之际衷心感谢大连医科大学生化教研室张嘉宁教授的指导以及大连医科大学附属第二医院内分泌科苏本利教授的支持.

参 考 文 献

1 Dunn E J, Grant P J. Type 2 diabetes: an atherothrombotic syndrome. *Curr Mol Med*, 2005, **5** (3): 323~332

2 Nachman R L, Jaffe E A. Endothelial cell culture: beginnings of modern vascular biology. *J Clin Invest*, 2004, **114** (8): 1037~1040

3 Pesic S, Radenkovic M, Grbovic L. Endothelial dysfunction: mechanisms of development and therapeutic options. *Med Pregl*, 2006, **59** (7~8): 335~341

4 Margaret A C. The potential for novel anti-inflammatory therapies for coronary artery disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2002, **1** (2): 122~130

5 Dzau V J, Braun-Dullaeus R C, Sedding D G. Vascular proliferation and atherosclerosis: New perspectives and therapeutic strategies. *Nature Medicine*, 2002, **8** (11): 1249~1256

6 Lipinski M J, Fuster V, Fisher E A, *et al.* Technology insight: targeting of biological molecules for evaluation of high-risk atherosclerotic plaques with magnetic resonance imaging. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, 2004, **1** (1): 48~54

- 7 Schalkwijk C G, Stehouwer C D. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clin Sci (Lond)*, 2005, **109** (2):143~159
- 8 Walder K, Kantham L, McMillan J S, *et al.* Tanis: A link between type 2 diabetes and inflammation?. *Diabetes*, 2002, **51** (6): 1859~1866
- 9 Gao Y, Walder K, Sunderland T, *et al.* Elevation in tanis expression alters glucose metabolism and insulin sensitivity in H4IIE cells. *Diabetes*, 2003, **52** (4): 929~934
- 10 Kunsch C, Medford R M. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res*, 1999, **85** (8): 753~766
- 11 Yant L J, Ran Q, Rao L, *et al.* The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free Radic Biol Med*, 2003, **34** (4): 496~502
- 12 Mostert V. Selenoprotein P: properties, functions and regulation. *Arch Biochem Biophys*, 2000, **376** (2): 433~438
- 13 Gao Y, Feng H C, Walder K, *et al.* Regulation of the selenoprotein SelS by glucose deprivation and endoplasmic reticulum stress SelS is a novel glucose-regulated protein. *FEBS Letters*, 2004, **563** (1~3): 185~190
- 14 Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 2001, **414** (13): 813~820
- 15 Loscalzo J, Voetsch B, Liao R, *et al.* Genetic determinants of vascular oxidant stress and endothelial dysfunction. *Congest Heart Fail*, 2005, **11** (2): 73~79
- 16 Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *British Journal of Pharmacology*, 2004, **142**: 231~255
- 17 Forrester J S. Prevention of plaque rupture: a new paradigm of therapy. *Ann Intern Med*, 2002, **137** (10): 823~833
- 18 Karlsson H K R, Tsuchida H, Lake S, *et al.* Relationship between serum amyloid A level and Tanis/SelS mRNA expression in skeletal muscle and adipose tissue from healthy and type 2 diabetic subjects. *Diabetes*, 2004, **53** (6): 1424~1428
- 19 Rohrer L, Mand H, Eckardstein A V. High density lipoproteins in the intersection of diabetes mellitus, inflammation and cardiovascular disease. *Current Opinion in Lipidology*, 2004, **15** (3): 269~278
- 20 Wang L, Colo W. Urea-induced denaturation of apolipoprotein serum amyloid A reveals marginal stability of hexamer. *Protein Science*, 2005, **14** (7):1811~1817
- 21 Uhlir C M, Whitehead A S. Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur J Biochem*, 1999, **265** (2): 501~523

Overexpressing SelS May Protect Human Umbilical Vein Endothelial Cells From Injuring by H₂O₂*

DU Jian-Ling^{1,2)}, AN Li-Jia^{1)*}, SUN Chang-Kai³⁾, MEN Li-Li²⁾, ZHANG Xiu-Juan²⁾, LI Chang-Chen²⁾

⁽¹⁾*Department of Bioscience and Biotechnology, School of Environmental and Biological Sciences, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China;*

⁽²⁾*Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, China;*

⁽³⁾*Institute for Brain Disorders, Dalian Medical University, Dalian 116027, China)*

Abstract In order to investigate the expression and roles of SelS in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs, ECV₃₀₄ cells), total RNAs were extracted with TRIzol from adipose tissues of human, then the 1 102 bp fragment of SelS was amplified by RT-PCR. After the expected 1 102 bp PCR fragment was purified, SelS was cloned into pMD18-T vector. Purification, RT-PCR, restriction endonuclease analysis and DNA sequencing were performed to confirm the results. pMD18-SelS was incubated in presence of *Xho* I /*Cla* I and then ligated into pLNCX2 vector corresponding restriction sites. RT-PCR and DNA sequencing were performed to confirm a 1 102 bp SelS gene fragment was successfully inserted into pLNCX2. The ECV₃₀₄ cells were stably infected with pLNCX2-SelS or pLNCX2 alone and positive clone was obtained by G418 selection. After transient transfection, ECV₃₀₄ cells expressed pLNCX2 was verified by neo^r gene detection and the expression of recombinant SelS in the ECV₃₀₄ cells was 1.76-fold higher than the endogenous level by RT-PCR. After the cultured ECV₃₀₄ cells was treated with hydrogen peroxide (H₂O₂, 100, 200, 300, 400 μmol/L) for 24 h, cell viability was measured by MTT assay and the intracellular maleic dialdehyde(MDA)was detected by TBA method. The results showed that ECV₃₀₄ cells were injured by H₂O₂, overexpressing SelS increased the cell viability apparently and inhibited the production of MDA induced by H₂O₂. So overexpressing SelS protects ECV₃₀₄ cells from injuring by H₂O₂, and SelS may have the antioxidant protection effective on endothelial cells.

Key words endothelial dysfunction, Tanis/SelS, HUVECs(ECV₃₀₄ cells), oxidative stress, pLNCX2

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30670649).

**Corresponding author . Tel: 86-411-84706356, E-mail: bioeng@dlut.edu.cn

Received: Octbor 16, 2006 Accepted: December 6, 2006