

H₂O₂ 诱发人成纤维细胞衰老样变化的基因表达谱*

马 宏 张宗玉** 童坦君**

(北京大学医学部 生物化学与分子生物学系, 北京 100083)

摘要 以 50 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ 作用体外培养的人胚肺二倍体成纤维细胞 4 次, 使之出现不可逆的衰老表型. 提取年轻细胞及 H₂O₂ 处理衰老细胞的 mRNA, 以荧光物 Cy3 标记年轻细胞 cDNA, Cy5 标记 H₂O₂ 处理的细胞 cDNA, 并与点有 4 096 条人类基因的芯片杂交, 利用计算机数据处理判断基因是否存在表达差异. 结果显示: 有 123 种基因的表达变化较显著, 这些基因参与细胞周期进程、细胞代谢及蛋白质修饰、细胞外基质及细胞骨架蛋白的形成和调节、炎症反应、调节受体酪氨酸蛋白激酶和 G 蛋白耦联受体信号转导.

关键词 基因芯片, 基因表达谱, 衰老, 复制衰老, 氧化压力

学科分类号 Q26, Q52

活性氧基团 (reactive oxygen species, ROS) 引起生物大分子的氧化损伤被认为是影响细胞衰老进程的重要因素. ROS 有许多种, H₂O₂ 分子小, 无电荷, 可以自由渗透质膜, 并且相对稳定, 是体外培养细胞最常用的“衰老”诱导剂. H₂O₂ 诱导人成纤维细胞出现明显的衰老样改变, 如细胞变大、扁平, 胞浆内颗粒增多, 细胞排列不规则, 生长阻滞于 G1 期等, 但目前对其分子机理还知之甚少.

本文以亚致死量的 H₂O₂ 重复 4 次处理体外培养的人胚肺二倍体成纤维细胞 (2BS 细胞), 使细胞出现衰老样变化. 为了排除 H₂O₂ 引发的瞬时细胞周期阻滞, 对研究过氧化氢诱导的长期衰老样变化基因表达谱的干扰, 我们在 H₂O₂ 最后一次处理 2BS 细胞 48 h 后提取 RNA, 用含有 4 096 种人类基因的基因芯片, 检测 H₂O₂ 诱导体外培养的成纤维细胞出现衰老样变化的基因表达情况. 结果显示: 在检测的 4 096 种人类基因中, 有 123 种基因的表达变化较显著, 这些基因参与细胞周期进程、细胞代谢及蛋白质修饰、细胞外基质及细胞骨架蛋白的形成和调节、炎症反应、调节受体酪氨酸蛋白激酶和 G 蛋白耦联受体信号转导. 最令我们感兴趣的是与分泌功能相关的基因亦有表达增强现象.

1 材 料

人胚肺二倍体成纤维细胞由卫生部北京生物制品研究所建系.

2 方 法

2.1 细胞培养及早老表型的诱导

2BS 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养

液, 于 37℃ 5% CO₂ 条件下培养, 长至 80% ~ 90% 融合时, 1 瓶细胞分存两瓶, 传代. 30 代以下为年轻细胞, 55 代以上为老细胞. 细胞培养至 28 代, 当长至 60% ~ 70% 融合时, 倒掉培养液, 加入含 50 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ 的 PBS 于 37℃ 孵育 30 min, 倒掉 H₂O₂ 溶液, 以 PBS 洗两遍, 加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液孵育, 每隔两天作用一次, 共作用 4 次, 提取总 RNA.

2.2 衰老相关的 β -半乳糖苷酶染色

参考文献 [1] 进行.

2.3 总 RNA 的提取

参考 Gibco 公司的 Trizol 试剂提取总 RNA 的方法.

2.4 基因芯片与探针制备; 杂交与荧光扫描

参考文献 [2] 进行.

2.5 RT-PCR 验证分析

将上面提取的衰老细胞和对照组 2BS 细胞的总 RNA 逆转录合成 cDNA, 进行 PCR 扩增.

3 结 果

3.1 H₂O₂ 诱导 2BS 细胞出现衰老表型

50 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ 作用 2BS 细胞 4 次, 细胞增殖速度明显降低, 细胞变平、变大, 最后一次 H₂O₂ 处理 48 h 后, 对细胞进行衰老相关的 β -半乳

* 国家重点基础研究发展规划资助项目 (G2000517001 和 G1999053906) 和国家自然科学基金重点资助项目 (39930170).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62091454, E-mail: ttj@bjmu.edu.cn

收稿日期: 2002-06-07, 接受日期: 2002-06-28

糖苷酶染色, 阳性率明显高于年轻细胞, 与衰老细胞相似 (图 1)。

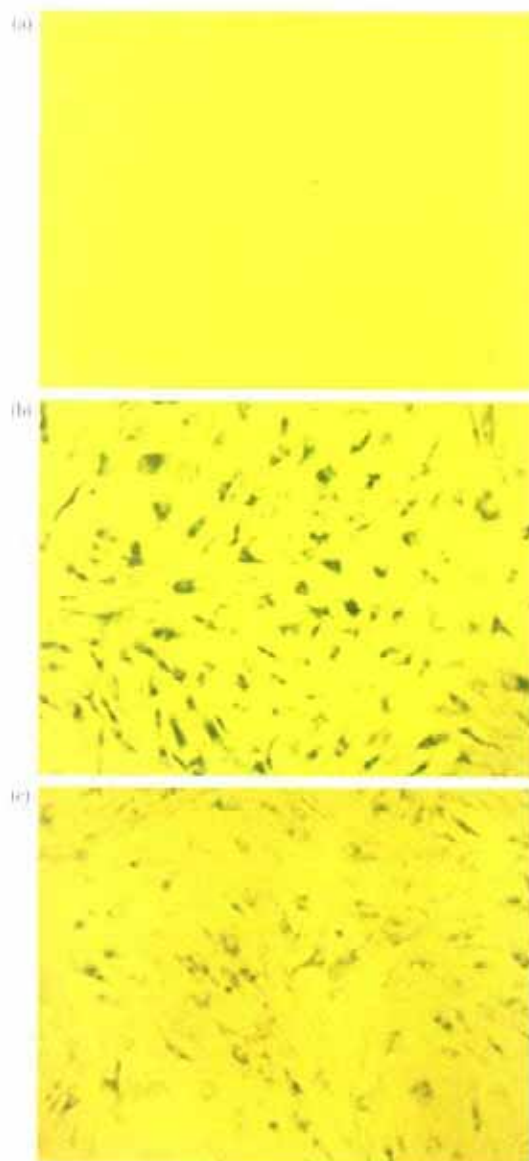


Fig. 1 2BS cells stained for senescence-associated β -galactosidase (a) early passage 2BS cells; (b) senescent 2BS cells; (c) premature senescence of 2BS cells induced by H_2O_2 . Photomicrographs were taken under bright field using a $10\times$ objective.

3.2 基因芯片的质量标准控制

提取纯化 H_2O_2 诱导前和诱导后细胞的 mRNA, 分别逆转录合成以 Cy3 和 Cy5 标记的 cDNA 探针, 混合后与含有 4 096 条人类全长基因的芯片 (HGEC-40S) 杂交, 用预先选定的内参基因 (40 个管家基因) 对 Cy3 和 Cy5 的原始信号进行均衡和修正。同时, 为了监控芯片制备和杂交过程, 设定水稻 U2RNA、HCV 外壳蛋白及空白液为

阴性对照, 经验证这些点都为阴性, 从而证明了数据的可靠性。

3.3 H_2O_2 诱导早老样 2BS 细胞基因表达谱的变化

在所检测的 4 096 种人类基因中, 有 303 种基因的荧光信号强度比在 2 倍以上 (图 2), 可能为差异表达的基因 (该结果的详细内容请与作者联系, E-mail: hongma@bjmu.edu.cn)。荧光信号强度比在 2.5 倍或 2.5 倍以上的基因有 123 种, 其中部分基因列于表 1。

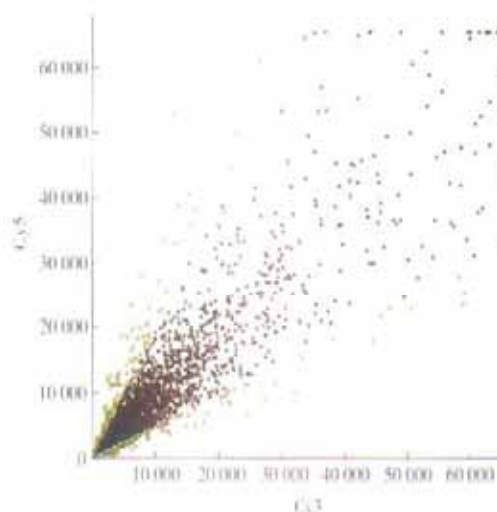


Fig. 2 Scattered plot graph of Cy3-labeled and Cy5-labeled probes hybridizing with HGEC 40s microarray

Each point on the plot represented a gene hybridization signal. The red points represented the ratios ranged from 0.5 to 2.0, belong to the undifferential group. The yellow points represented the ratios greater than 2.0 or smaller than 0.5, whose gene expression was mostly possible altered.

3.4 Mad2 与 α -2 巨球蛋白基因表达变化的验证

我们用 RT-PCR 验证了有丝分裂检控点激酶 Mad2 及 α -2 巨球蛋白在早老细胞中的表达变化 (图 3)。

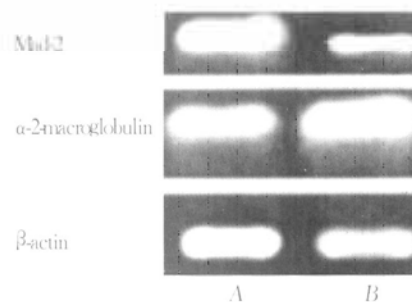


Fig. 3 The RT-PCR results of Mad-2 and α -2-macroglobulin A: early passage 2BS cells; B: premature 2BS cells induced by H_2O_2 .

Table 1 Partial gene expression changes in H₂O₂ induced premature senescence of 2BS cells

GenBank_ ID	Ratio	Definition
A. Genes involved in controlling and mediating the progress of cell cycle		
K02581	0.091	Thymidine kinase
NM_001034	0.128	Ribonucleotide reductase M2 polypeptide (RRM2)
AF053306	0.204	Mitotic checkpoint kinase Mad3L
D55716	0.210	P1cdc 47
NM_003981	0.214	Protein regulator of cytokinesis 1 (PRC1)
M25753	0.256	Cyclin B
U65410	0.307	Mad2 (hsMAD2)
M37583	0.320	Histone (H2A.Z)
U01038	0.334	PLK
X62534	0.334	HMG-2
AF071592	0.371	Kinesin superfamily motor KIF4
AJ006973	0.375	TOM 1 protein
B. Enzymes and protein factors involved in metabolism and protein processing		
U57623	0.300	Fatty acid binding protein FABP
NM_006579	0.316	Emopamil binding protein (EBP)
AF038660	0.330	Beta 1, 4-galactosyltransferase
NM_001960	0.336	Eukaryotic translation elongation factor 1 delta
AC004522	0.349	Zinc alpha 2-glycoprotein precursor
AB0032261	0.389	Stearoyl-CoA desaturase (Scd)
Z97029	0.395	Ribonuclease H1
Y10805	0.397	Arginine methyltransferase
X51405	2.513	Carboxypeptidase E
AF056072	2.611	Kynurenine 3-hydroxylase
U40490	2.722	Nicotinamide nucleotide transhydrogenase
X711254	2.784	Glutamine cyclotransferase
U005598	3.180	Dihydrodiol dehydrogenase
U05861	3.292	Hepatic dihydrodiol dehydrogenase
C. Receptor and signal transduction associated genes		
U87460	0.350	Putative endothelin receptor type B-like protein
X80754	0.381	GTP-binding protein
NM_003620	2.538	Protein phosphatase 1D magnesium-dependent, delta isoform
NM_002848	2.593	Protein tyrosine phosphatase, receptor type O
AF035752	2.607	Caveolin 2
X17576	2.908	Melanoma nck protein
M27534	3.020	Guanine nucleotide binding protein (Gi) alpha subunit
NM_002890	3.255	RAS p21 protein activator
X77794	3.879	Cyclin G1
AB014509	3.451	Nck-associated protein 1 (Nap1)
D89094	4.226	3', 5'-cyclic GMP phosphodiesterase
Z22533	4.470	ALK-1
D. Cytoskeleton and extracellular matrix associated genes		
U58048	0.198	Metalloproteinase PRSM 1
Z48199	0.343	Syndecan-1
D63998	2.585	Golgi alpha-mannosidase II
S80562	2.594	Acidic calponin
X14420	2.631	Pro-alpha 1 type 3 collagen
S65738	2.646	Actin depolymerizing factor
J04621	2.682	Heparan sulfate proteoglycan (HSPG) core protein
M83216	3.006	Aorta caldesmon
M23254	3.011	Ca ²⁺ -activated neutral protease large subunit
U53445	3.025	Ovarian cancer downregulated myosin homolog
NM_001449	3.025	Four and a half LIM domains 1 (FHL1)

续 表

GenBank_ ID	Ratio	Definition
D87930	3.042	Myosin phosphatase target subunit 1
NM_002291	3.092	Laminin beta 1
D67031	4.051	Adducin like protein (ADDL)
E. Genes involved in stress response		
NM_000305	2.563	Paraoxonase 2 (PON2)
NM_001512	2.652	Glutathione S-transferase A4
NM_007034	2.699	DnaJ-like heat shock protein 40
AF103796	2.918	Placenta specific ATP-binding cassette transporter
AF051894	3.042	15 kDa selenoprotein
U36336	3.342	Lysosome associated membrane protein 2b
F. Genes involved in cellular secretion and secretory protein		
M11313	2.112	Alpha 2 macroglobulin
NM_012329	2.520	Monocyte to macrophage differentiation associated protein
AJ131244	2.533	Sec24 protein
X63679	2.568	TRAMP protein
NM_003144	2.677	Signal sequence receptor alpha
M34057	2.700	Transform factor beta 1 binding protein
AB026908	2.782	Microvascular endothelial differentiation gene 1
X72308	2.883	Monocyte chemotactic protein 3 (MCP-3)
AB013452	2.979	ATPaseII
M23114	3.184	Calcium ATPase (HK1)
Y16752	3.700	Secretagogin
M15518	4.132	Tissue type plasminogen activator (t-PA)
M608028	5.242	Keratinocyte growth factor

4 讨 论

从表 1 可以看出 H_2O_2 诱导早老样 2BS 细胞部分基因表达谱的变化。

4.1 细胞周期蛋白及细胞周期进程相关基因

H_2O_2 诱导体外培养年轻的成纤维细胞, 出现细胞周期 G1 期阻滞是与其复制性衰老细胞的共同特征 (表 1A)。亚致死量的 H_2O_2 诱导的早老细胞中, 细胞蛋白及细胞周期进程相关的基因普遍下调。我们研究室曾在老年鼠的脑中发现非组蛋白 HMG-2 的表达下调, Ly 等^[3] 在老年人的皮肤成纤维细胞中检测到 HMG-2、PLK 和 cyclin B 的表达下调, cyclin B 在体外培养的人视网膜色素上皮细胞、血管内皮细胞及皮肤成纤维细胞的复制性衰老过程中表达均下调^[4], 这些基因表达在体内、体外衰老过程中的普遍下调, 说明它们可能对引发细胞周期 G1 期阻滞起重要作用。

4.2 细胞代谢及蛋白质修饰相关基因

由表 1B 可见, H_2O_2 诱导 2BS 细胞生长阻滞, 细胞内多数参与代谢的酶及相关蛋白表达下调, 然而, 氧化压力诱导生长抑制, 同时并不排除某些蛋白质合成增加及一些新蛋白质的出现, 还有一些原

有的蛋白质的结构和活性发生了改变。我们观察到蛋白质合成后的修饰酶呈现不同的变化趋势: 精氨酸甲基转移酶表达下调可能通过降低细胞的转录活性, 及其他多种方式影响 2BS 细胞衰老表型的出现; 羧肽酶 E、谷氨酰胺环化酶催化的反应是分泌蛋白质剪接过程中起重要作用的修饰方式, 这二种酶的高表达可能与过氧化氢诱导 2BS 细胞分泌行为的改变有关; 研究者很早就发现色氨酸与哺乳动物整体衰老的关系, 犬尿氨酸羟化酶作为色氨酸代谢的关键酶, 在早老样细胞中表达上调, 提示色氨酸可能在细胞的衰老过程中起着重要的作用。在早老的 2BS 细胞中, 与活性氧基团 (ROS) 生成相关的 NADH 转氢酶及两种二氢苯二醇还原酶的表达明显上调, 在 2BS 细胞复制性衰老细胞及其他哺乳动物的组织细胞中观测到同样的趋势^[5]。这说明: ROS 水平的升高是体内、体外及过氧化氢诱导细胞早老的结果。

4.3 受体、离子通道及细胞信号传导相关的基因

由表 1C 可见, 受体酪氨酸蛋白激酶 (receptor tyrosine kinases, RTKs) 和 G 蛋白耦连受体 (G-protein coupled receptor, GPCRs) 是将细胞外信号转化为胞内反应的两大类主要受体。“早老”细胞

中, 下调 RTKs 信号通路的基因表达普遍升高, 一种新型的 GTP 结合蛋白表达下调. 这一结果提示: H_2O_2 诱导的“衰老”细胞对外环境中生长因子等有丝分裂刺激原的可诱导性下降. 在介导两大类受体与胞内信号的分子中, 只有 Nck 分子及 Nck 相关蛋白 1 (Nck-associated protein 1, NAF1) 的表达上调, Nck 的效应分子多为细胞骨架蛋白, Nck 的上调可能与过氧化氢诱导的细胞形态的改变有关, 而 NAF1 的下调可以诱导凋亡, Nck 的上调可诱导 P21^{Cip1} 途径. P21^{Cip1} 是 P53 作用的重要靶基因, 受 P53 诱导的周期素 G1 (cyclin G1)、蛋白磷酸酶 wip-1 及 P21 激活蛋白在“衰老细胞”也表达上调, wip-1 与 P21 相似, 过高的表达会抑制细胞克隆的形成, 受环境中多种压力的诱导, 介导 P38 ~ P53 通路的负调控, 有助于抑制凋亡的诱导^[6]. 上述结果提示: “衰老细胞”可能与复制衰老细胞一样, 对凋亡诱导因素的反应性降低^[7]. 近年研究表明: 环鸟苷酸可通过 JNK1 途径介导凋亡的诱导^[8], 环鸟苷酸二酯酶表达的上调从另一方面提示“衰老”细胞抗凋亡诱导能力增强.

4.4 细胞外基质及细胞骨架相关基因

由表 1D 可见, 与文献报道氧化压力下皮肤与心肌体外培养成纤维细胞的变化趋势^[9]相反, 我们用 H_2O_2 诱导的衰老细胞中, 细胞外基质的胶原组分、非胶原组分及参与细胞外基质合成和降解的金属蛋白酶的表达变化, 与肾成纤维细胞氧化压力下细胞外基质组分的变化趋势相似^[10], 与 2BS 细胞复制衰老时也有相似之处. 这一结果提示: 不同组织来源的成纤维细胞在氧化压力下, 细胞外基质组分的变化不尽相同, 甚至差异很大, 这可能与成纤维细胞在不同组织中的功能密切相关. 细胞骨架蛋白是决定细胞形状的重要因素, 微丝连接蛋白 (calponin) 表达、肌动蛋白解聚因子、抑制肌动球蛋白 ATP 活性的钙调结合蛋白等细胞骨架及调节蛋白表达的变化, 可能是导致衰老细胞形态衰老样变化的根本原因.

4.5 抗细胞损伤基因

由表 1E 可见, 细胞的抗氧化防御机制分为两级: 一级防御系统由一些低分子质量的抗氧化化合物和酶组成, 阻止自由基与靶分子的氧化作用; 二级防御系统修复氧化损伤. 热休克蛋白是一类受热反应激活的蛋白质, 研究表明: 热休克蛋白的生成有利于细胞对抗高温、氧化压力、细胞毒药物等不利生存的因素. H_2O_2 诱导的衰老细胞中, 一种新的

热休克蛋白——类 DNA J 热休克蛋白表达升高, 与自由基清除相关的酶和蛋白质表达亦升高. 这一结果表明: 衰老细胞中, 抗氧化一级防御系统能力增强. 另外, 衰老细胞中保护溶酶体膜的溶酶体结合糖蛋白 2、消除有机磷毒性的对氧磷酸酶以及与细胞多药抗性相关的 ATP 结合传递蛋白的表达增强, 提示衰老细胞对凋亡信号及多种细胞毒性物质的抵抗力增强.

4.6 细胞分泌蛋白及相关基因

由表 1F 可见, 衰老细胞的基因表达谱中, 上调幅度最大的角质细胞生长因子 (KGF), 在生物体许多组织细胞的衰老过程中都上调, 肺成纤维细胞分泌的 KGF 与肺的发育、成熟有关; 我们首次发现 α -2-巨球蛋白在人成纤维细胞复制性衰老过程中不可逆地逐渐积累 (待发表), 其在衰老细胞中表达亦上调, 这提示 α -2-巨球蛋白表达升高是与细胞衰老密切相关的事件之一; 转化生长因子 β 1 (TGF β 1) 的表达与细胞衰老表型的出现密切相关^[11], 我们检测到促进 TGF β 1 成熟的 TGF β 1 结合蛋白质, 及一种新型的 TGF β 受体超家族成员 ALK-1 在衰老 2BS 细胞表达上调, 此二者可能通过调节 TGF β 1 的活性、传递 TGF β 1 信号, 介导细胞衰老表型的出现. 此外, 参与蛋白质分泌的基因, 如 Secretagogen、ATPase II 在衰老细胞中均表达上调. 上述结果提示: 衰老成纤维细胞分泌增强, 分泌蛋白将影响临近细胞发生相应衰老相关的变化.

综上所述, 亚致死量 H_2O_2 诱导 2BS 细胞出现衰老样变化的同时, 也诱导细胞周期蛋白、细胞骨架蛋白、细胞代谢、信号传导、分泌蛋白以及相关基因的表达发生显著的变化. 与复制衰老相比, 尽管差异表达的基因不尽相同, 变化的幅度也不一致, 但从总体看, 变化的趋势很相近. 最令我们感兴趣的是衰老细胞中, 分泌蛋白的表达增高, 分泌蛋白作为自分泌或旁分泌的细胞因子, 作用临近的细胞, 影响其形态和功能, 这就可以解释为什么机体体内极少量的衰老细胞就能损伤整体组织器官的功能.

参 考 文 献

- 1 Dimri G P, Lee X, Basile G, *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (20): 9363~ 9367
- 2 许沈华, 牟瀚舟, 吕桂泉, 等. 高转移人卵巢癌细胞系基因表达谱差异. *中国肿瘤*, 2001, **10** (1): 41~ 43

- Xu S H, Mu H Z, Lu G Q, *et al.* China Cancer, 2001, **10**: 41~43
- 3 Ly D H, Lockhart D J, Lerner R A, *et al.* Mitotic misregulation and human aging. Science, 2000, **287** (5462): 2486~2492
 - 4 Shelton D N, Chang E, Whittier P S, *et al.* Microarray analysis of replicative senescence. Curr Biol, 1999, **9** (17): 939~945
 - 5 Jiang C H, Tsien J Z, Schultz P G, *et al.* The effects of aging on gene expression in hypothalamus and cortex of mice. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, **98** (4): 1930~1934
 - 6 Takekawa M, Adachi M, Nakahata A, *et al.* p53-inducible wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation. EMBO J, 2000, **19** (23): 6517~6526
 - 7 黄 英, 张宗玉, 童坦君. p21 WAF1 在丁酸钠诱导的人成纤维细胞凋亡中的表现. 生物化学与生物物理进展, 2000, **27** (2): 182~185
 - 8 Huang Y, Zhang Z Y, Tong T J. Prog Biochem Biophys, 2000, **27** (2): 182~185
 - 8 Chae H J, Kim H R, Kwak Y G, *et al.* Signal transduction of nitric oxide donor-induced protection in hydrogen peroxide-mediated apoptosis in H9C2 cardiomyoblasts. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2001, **23** (2): 187~204
 - 9 Siwik D A, Pagano P J, Colucci W S. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. Am J Physiol Cell Physiol, 2001, **280** (1): C53~60
 - 10 Rossert J A, McClellan W M, Roger S D, *et al.* Contribution of anaemia to progression of renal disease: a debate. Nephrol Dial Transplant, 2002, **17** (Suppl 1): 60~66
 - 11 Fripiat C, Chen Q M, Zdanov S, *et al.* Subcytotoxic H₂O₂ stress triggers a release of transforming growth factor-beta which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. J Biol Chem, 2001, **276** (4): 2531~2537

Profile Gene Expression of H₂O₂-induced Premature Senescence of Human Fibroblasts*

MA Hong, ZHANG Zong-Yu**, TONG Tan-Jun**

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Health Science Center, Peking University, Beijing 10083, China)

Abstract The senescent phenotype of human embryo lung diploid fibroblasts was obtained by four treatments of early passage cells with 50 μ mol/L H₂O₂ for 30 min every 2 days. After total mRNA extraction from the two kinds of cells, the young cells and H₂O₂-induced premature senescence cells, the cDNA of two kinds of cells were labeled by Cy3 and Cy5 respectively were hybridized with microarray containing 4 096 human genes. The gene expression changes were identified by GnePix 4000B and GenePix 3.0. 123 genes changed their expression significantly, which involved in progress of cell cycle, metabolism and protein processing, formation and modification of cytoskeleton and extracellular matrix and signal transduction, and the most interesting finding was that secretory function seemed to be enhanced in premature senescence of fibroblasts.

Key words gene chip, gene expression, replicative senescence, premature senescence, oxidative stress

* This work was supported by grants from The Special Funds for Major State Basic Research of China (G2000517001 and G1999053906), The National Natural Sciences Foundation of China (39930170).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62091454, E-mail: ttj@bjmu.edu.cn

Received: June 7, 2002 Accepted: June 28, 2002