

[文章编号] 1000-4718(2008)12-2382-04

腺病毒 E1A 蛋白抑制大鼠肺泡上皮细胞 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶催化亚单位表达的机制研究*

方怡¹, 李冰¹, 陈娟¹, 刘启才², 冉丕鑫^{1Δ}
(广州医学院¹广州呼吸疾病研究所,²实验医学研究中心,广东 广州 510120)

[摘要] 目的: 研究腺病毒 E1A 蛋白抑制大鼠肺泡上皮细胞 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶催化亚单位 (GCLC) 表达的机制。方法: 构建稳定表达腺病毒 E1A 蛋白的大鼠肺泡上皮细胞, 将 GCLC 基因 5' - 上游调控序列不同长度的缺失体 - 萤火虫荧光素酶报道系统转染后分析转录活性的变化; 检测 AP-1、NF- κ B、USF 与 GCLC 基因调控序列的结合活性。结果: GCLC 基因 5' - 上游调控序列报道系统检测结果显示大部分 (9/11) 缺失体的转录活性抑制, AP-1、NF- κ B、USF 与 GCLC 基因的结合活性增强, 而对应的功能元件的转录活性降低。结论: 腺病毒 E1A 蛋白通过抑制 GCLC 基因 5' - 上游调控序列的转录活性, 扩大大鼠肺泡上皮细胞氧化应激时的氧化/抗氧化失衡, 其机制可能涉及 E1A 对辅助转录因子的抑制。

[关键词] 腺病毒 E1A 蛋白质类; γ 谷氨酰半胱氨酸合成酶; 肺疾病, 慢性阻塞性

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Adenovirus E1A protein downregulates the gamma - glutamylcysteine synthetase in rat alveolar epithelial cells

FANG Yi¹, LI Bing¹, CHEN Juan¹, LIU Qi - cai², RAN Pi - xin¹

(¹Guangzhou Institute of Respiratory Diseases, ²The Experimental Medical Research Center, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510120, China. E - mail: pxran@gzhmc.edu.cn)

[ABSTRACT] **AIM:** To analyze the mechanism of GCLC inhibition by adenovirus latent infection in rat alveolar epithelial cells. **METHODS:** The rat alveolar epithelial cells were stably transfected with the plasmid pE1Aneo and control plasmid. For detecting the factors involving in the transcription inhibition, 11 deletion mutants of the 5' - flanking region of γ - GCS GCLC gene were transfected into the cells and the transcriptional activity was determined by luciferase activity assay. EMSA was used to determine the binding activities of AP - 1, NF - κ B and USF. **RESULTS:** The transcriptional activity of 9/11 deletion mutants was repressed by E1A protein. The binding activities of AP - 1, NF - κ B and USF were increased, but the transcriptional activities of the corresponding elements were decreased. **CONCLUSION:** Adenovirus latent infection amplifies the oxidant/antioxidant imbalance by repressing the promoter transcriptional activity of GCLC. Since the DNA binding activity of factors was not decreased, the transcription co - factors may involved in the inhibition of γ - GCS expression.

[KEY WORDS] Adenovirus E1A proteins; gamma - Glutamate - cysteine synthetase; Pulmonary disease, chronic obstructive

腺病毒是儿童时期下呼吸道感染的主要病原体之一。腺病毒感染的特点是在肺内形成潜伏感染, 即长期表达早期转录蛋白 E1A 而不出现整个病毒复制。E1A 基因具有自身的启动子和增强子, 在病毒基因中最早转录, 所编码的早期蛋白正向调节腺病毒其它基因活化, 同时还对宿主细胞基因有调节作用, 所以 E1A 表达在腺病毒潜伏感染中居主导

地位^[1]。已有研究表明腺病毒潜伏感染可能参与了慢性阻塞性肺病 (chronic obstructive pulmonary diseases, COPD) 的发生发展过程^[2-4]。氧化/抗氧化失衡是 COPD 的重要发病机制之一, 但 E1A 对肺组织细胞氧化/抗氧化平衡的影响尚未有系统报道。

本实验在前期已成功构建稳定表达 E1A 蛋白的大鼠肺泡上皮细胞株, 观察了 E1A 在氧化应激时对

[收稿日期] 2007-09-11 [修回日期] 2007-11-12

* [基金项目] 广东省自然科学基金团队资助项目 (No. 05200239)

Δ 通讯作者 E - mail: pxran@gzhmc.edu.cn

细胞内一系列抗氧化酶的影响,结果显示 E1A 的重要作用是抑制了谷胱甘肽(GSH)合成限速酶 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶催化亚单位(glutamate-cysteine ligase catalytic subunit, GCLC)的表达,从而扩大了大鼠肺泡上皮细胞氧化/抗氧化失衡。本实验将进一步研究其具体机制。

材 料 和 方 法

1 材料

大鼠肺泡上皮 L2 细胞(来源于大鼠 II 型肺泡上皮细胞,货号为 CCL-149),购自 ATCC。pE1Aneo 质粒由加拿大 F. L. Graham 教授馈赠,稳定表达 E1A

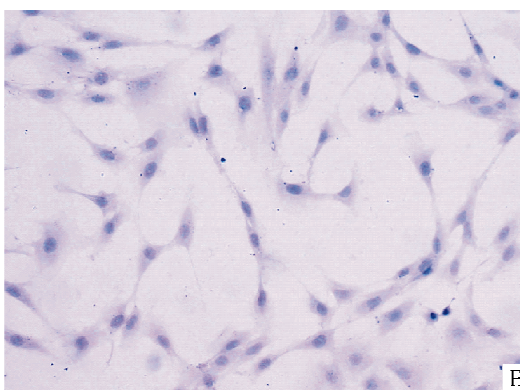
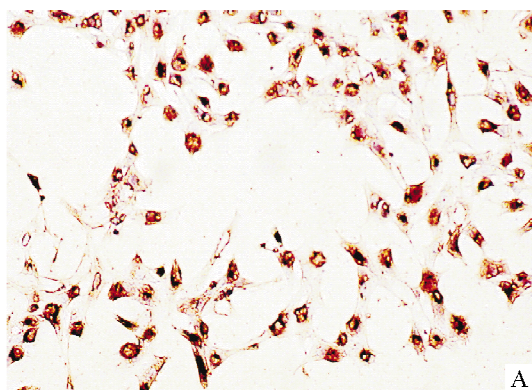


Fig 2 Immunohistochemistry. A: CCL-149 cells transfected with pE1Aneo; B: CCL-149 cells transfected with Pneo ($\times 200$)

图 2 稳定转染细胞株 E1A 蛋白表达的免疫组化鉴定

2 方法

2.1 检测荧光素酶活性观察 GCLC 基因 5' - 上游调控序列的转录活性 为寻找 E1A 蛋白作用于 GCLC 基因 5' - 上游调控序列上的可能位点,将 GCLC 基因 5' - 上游调控序列用外切核酸酶 III 单向切成 113 bp、405 bp、597 bp、615 bp、636 bp、707 bp、747 bp、878 bp、1 089 bp、1 110 bp、1 233 bp 的缺失体,并连接于荧光素酶报道载体 pGL3 enhancer,荧光素酶报道载体 GCLC-Luc 和其系列缺失载体由本实验室构建^[5]。将 E1A+ 和 E1A- 细胞分别接种于 24 孔培养板中,当细胞长至 95% 融合时,用 Lipofectamine2000 将各报道载体(均为 0.5 μg)分别转染于细胞,并分别共转染 0.5 μg pSV- β -半乳糖苷酶表达质粒作为内参照。24 h 后,按试剂盒要求检测每孔细胞的荧光素酶活性和 β -半乳糖苷酶活性,并测定蛋白浓度,每种处理取 6 个平行孔测得的平均数。校正后的荧光素酶活性值 = 测得的荧光素酶活性值 \div 同一样品的 β -半乳糖苷酶活性值 \div 蛋白浓度。相对荧光素酶活性值 = 校正后的荧光素酶活性值 \div pGL3 enhancer 空载体的荧光素酶活性值。结果用相对荧光素酶活性值表示。

蛋白的大鼠肺泡上皮细胞株及对照细胞株由本实验室构建,分别简称 E1A+ 和 E1A- 细胞,Western blotting 检测 E1A 蛋白表达情况见图 1、2。荧光素酶检测系统购自 Promega, EMSA 试剂盒购自 Pierce,其余所用化学试剂均购自 Sigma。



Fig 1 Western blotting detection in E1A gene stable-transfected and control cells.

图 1 稳定转染细胞株 E1A 蛋白表达的 Western blotting 鉴定

2.2 EMSA 分析 E1A 蛋白对主要转录因子 AP-1、NF- κ B、USF 与其功能元件结合活性的影响 根据软件分析 GCLC 5' - 上游调控序列对应的转录因子。合成以下转录因子的结合探针: AP-1 5' - GGCCT-CAACCCCTGACGGCCCCG - 3'; NF- κ B 5' - TT-GCTAACACCCGGGAACACCCACGGCCTC - 3'; USF 5' - TCCCGGCACATGGGAAGC - 3'。并将各正义链 5' 端进行生物素标记。每个结合反应体系包括 10 μg E1A+ 或 E1A- 细胞核蛋白提取物、3.0 pmol 双链互补 DNA 探针、4 μL 的结合缓冲液等。EMSA 具体步骤按试剂盒说明书进行。

2.3 分析 E1A 蛋白对转录因子 AP-1、NF- κ B、USF 在 GCLC 基因 5' - 上游调控序列上主要功能元件转录活性的影响 合成各转录因子位于 GCLC 基因 5' - 上游调控序列上主要功能元件的互补探针,序列同上,并在各探针两端分别加上 Mlu 和 Xho 酶切位点,用 T4 DNA Ligase 将各互补探针连接于同样经 Mlu 和 Xho 酶切的 pGL3 线性化载体上,构建成荧光素酶报道载体,经测序鉴定正确后,再分别转染于 E1A+ 和 E1A- 细胞,并检测荧光素酶活性,方法同 2.1。

3 统计学处理

数据处理采用 SPSS12.0 统计软件进行分析, 各组间比较采用单因素方差分析, 方差不齐时做秩和检验。数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

结 果

E1A 蛋白对 GCLC 基因 5' - 上游调控序列不同长度缺失体转录活性的影响 (图 3): 结果显示, E1A +

细胞除了缺失体 4 和缺失体 5 的转录活性与 E1A - 细胞比较无显著差异外, 其它 8 个缺失体的转录活性均显著低于 E1A - 细胞。

E1A 蛋白对转录因子 AP - 1、NF - κ B、USF 与其功能元件结合活性的影响 (图 4): 结果显示, 在 E1A + 和 E1A - 细胞中各转录因子的结合活性均较强, 但 E1A + 细胞明显高于 E1A - 细胞。

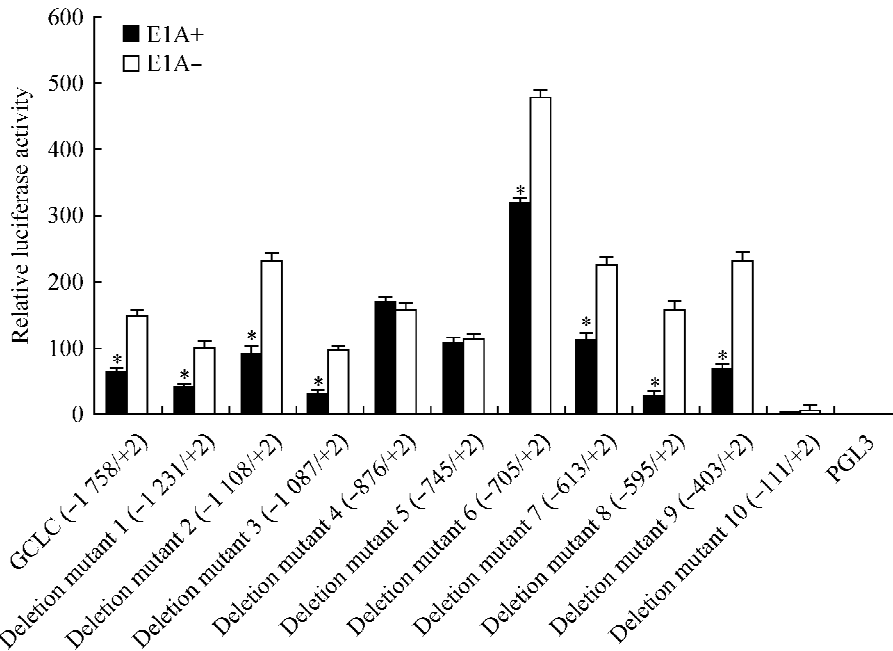


Fig 3 The influence of E1A protein on the transcriptional activity of a series of deletion mutants in the 5' - flanking region of the rat GCLC gene. * $P < 0.05$ vs E1A - .

图 3 腺病毒 E1A 蛋白对 GCLC 基因 5' - 上游调控序列不同长度缺失体转录活性的影响

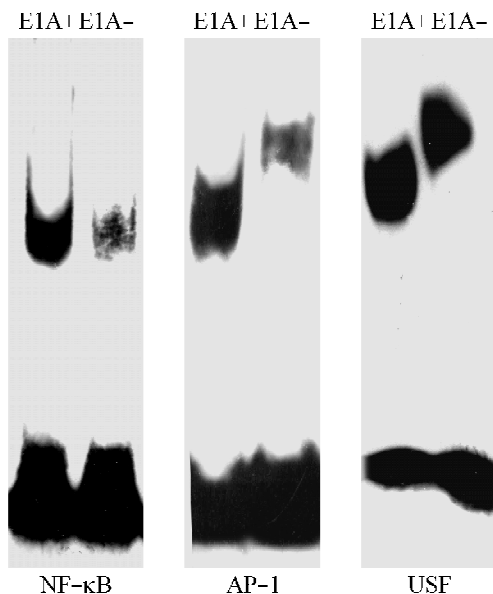


Fig 4 The influence of E1A protein on the binding activity of transcriptional factor AP - 1, NF - κ B and USF to GCLC promoter.

图 4 E1A 蛋白对转录因子 AP - 1、NF - κ B、USF 与其功能元件结合活性的影响

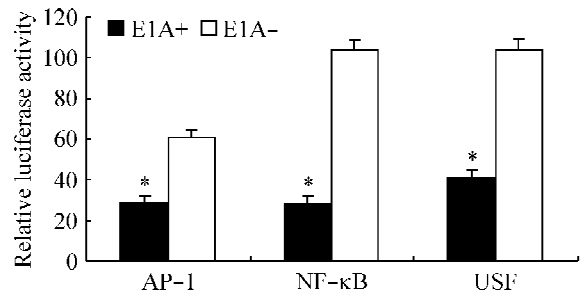


Fig 5 The influence of E1A protein on the transcriptional activity of the elements of AP - 1, NF - κ B and USF in GCLC promoter. * $P < 0.05$ vs E1A - .

图 5 E1A 蛋白对转录因子 AP - 1、NF - κ B、USF 功能元件转录活性的影响

E1A 蛋白对转录因子 AP - 1、NF - κ B、USF 的功能元件转录活性的影响 (图 5): E1A + 细胞中转录因子 AP - 1、NF - κ B、USF 的功能元件转录活性显著低于对照细胞。

讨 论

氧化/抗氧化失衡是 COPD 的重要发病机制^[5],

GSH 是机体抗氧化防御系统中的最重要成分。细胞内 GSH 含量降低将使细胞可能更易被氧化剂攻击受损。 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶是合成 GSH 的关键限速酶,决定细胞内 GSH 的水平。 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶是由催化亚单位(GCLC)和调节亚单位组成,GCLC 含有 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶所有底物的结合位点和催化亚基,具有催化活性。前期实验已从各个层次证明 E1A 蛋白通过抑制 GCLC 的转录调控从而抑制 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶全酶的活性,使氧化应激时细胞内 GSH 含量不能相应升高,扩大了大鼠肺泡上皮细胞的氧化/抗氧化失衡。

本实验结果证实 GCLC 是 E1A 蛋白作用的靶基因。E1A 蛋白对 GCLC 基因 5' - 上游调控序列多数缺失体的转录活性均有抑制作用,说明 E1A 蛋白对于 GCLC 上游调控序列与相应转录因子之间相互作用而介导的转录激活抑制具有普遍性特征。EMSA 实验观察到 GCLC 上游调控序列中的重要转录因子 AP-1、NF- κ B、USF 与相应功能元件的结合活性增强,理应使 GCLC 基因表达上调,但这些功能元件的转录活性却是降低的。有两种机制可以解释我们所观察到的事实:第一,虽然 E1A 蛋白增强了包括 AP-1、NF- κ B 等正性调控转录因子的 DNA 结合,但由于同样使 USF 因子结合于负性调控元件 E-Box 活性增强,由于该元件的强烈负调控作用^[6],最终结果是基因表达的抑制。第二,E1A 蛋白可以特异地结合 CBP/P300 蛋白,并抑制其转录激活功能^[7]。CBP/P300 蛋白是广谱的转录激活辅因子,其主要作用是建立了转录因子与基因转录系统之间的桥梁,从而稳定了转录起始复合物的形成,以促进转录^[8]。CBP/P300 的另一个特点是具有组蛋白乙酰基转移酶(HAT)活性。HAT 可使组蛋白高度乙酰化,染色质呈开放状态,以激活转录^[9]。多数研究认为 E1A 能抑制 CBP/P300 的 HAT 活性^[10,11]。因此,虽然众多转录因子在 E1A 蛋白存在时结合增强,但无法通过下游过程激活基因转录。结合因子水平的提高可能与下游途径抑制条件下的反馈调节有关。在我们另一组研究中,已初步发现 E1A 蛋白可抑制细胞 HAT 活性,因此 E1A 蛋白也可通过抑制 CBP/P300 的 HAT 活性而抑制各转录因子功能元件的转录活性。

综上所述,我们的实验研究证明 E1A 表达可以抑制肺上皮细胞内 GCLC 基因的表达,进而使细胞产生还原性 GSH 的能力下降,可能是导致 COPD 发生发展

过程中的重要因素。基因表达水平的下降发生于基因转录水平,与多种转录因子介导的调控机制相关,但不是通过影响转录因子与 DNA 元件的结合能力实现的。具体的抑制机制尚需要深入的探讨。

[参 考 文 献]

- [1] Gaynor RB, Hillman D, Berk AJ. Adenovirus early region 1A protein activates transcription of a nonviral gene introduced into mammalian cells by infection or transfection [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81(4): 1193 - 1197.
- [2] Hogg JC. Latent adenoviral infection in the pathogenesis of emphysema: the Parker B. Francis Lectureship [J]. Chest, 2000, 117(5 Suppl 1): 282S - 285S.
- [3] Vitalis TZ, Keicho N, Itabashi S, et al. A model of latent adenovirus 5 infection in the guinea pig (*Cavia porcellus*) [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1996, 14(3): 225 - 231.
- [4] Fujii T, Hogg JC, Keicho N, et al. Adenoviral E1A modulates inflammatory mediator expression by lung epithelial cells exposed to PM10 [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003, 284(2): L290 - L297.
- [5] 陈林,戴爱国,胡瑞成. aPKC 及 ERK 在慢性阻塞性肺疾病大鼠中对 NRF2 - γ - GCS 的调控作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(11): 2239 - 2243.
- [6] Cheng LL, Li B, Luo JD, et al. Identification of an E-box motif as a transcriptional repressor element in the proximal promoter region of the GCLC gene [J]. Free Radic Biol Med, 2005, 39(8): 1030 - 1040.
- [7] O'Connor MJ, Zimmermann H, Nielsen S, et al. Characterization of an E1A - CBP interaction defines a novel transcriptional adapter motif (TRAM) in CBP/p300 [J]. J Virol, 1999, 73(1): 3574 - 3581.
- [8] Chakravarti D, LaMorte VJ, Nelson MC, et al. Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling [J]. Nature, 1996, 383(6595): 99 - 103.
- [9] Bannister AJ, Kouzarides T. The CBP co-activator is a histone Acetyltransferase [J]. Nature, 1996, 384(6610): 641 - 643.
- [10] Caron C, Col E, Khochbin S. The viral control of cellular acetylation signaling [J]. Bioessays, 2003, 25(1): 58 - 65.
- [11] Ait-Si-Ali S, Ramirez S, Barre FX, et al. Histone acetyltransferase activity of CBP is controlled by cycle-dependent kinases and oncoprotein E1A [J]. Nature, 1998, 396(6707): 184 - 186.