

[文章编号] 1000-4718(2007)09-1665-06

· 论 著 ·

EDN1 基因 5'上游 AP-1 顺式调控元件在同型半胱氨酸诱导 HUVECs EDN1 基因转录中的作用*

段金虹¹, 徐海珊¹, 戴顺龄^{1Δ}, 王小明¹, 吴云清¹, 张彦东¹,
程锦轩¹, 孙仁宇¹, 李良², 陈槐卿^{2Δ}

(¹中国医学科学院基础医学研究所, 中国协和医科大学基础医学院, 北京 100005;

²四川大学华西医学中心生物医学工程研究所, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的: 探讨 EDN1 基因 5'上游 AP-1 顺式调控元件在同型半胱氨酸(Hcy)诱导 HUVECs EDN1 基因转录中的作用。方法: 用荧光探针 DCF 检测 HUVECs 内活性氧的含量; 用 RT-PCR 法检测 EDN1mRNA 的表达, 用 Western blotting 法测定 c-jun/AP-1 蛋白的表达; 同时用双抗夹心法测定 HUVECs 上清液中 EDN1 的分泌; 利用重组质粒的瞬时转染技术观察了 HUVECs 的 AP-1 报告基因的活性。结果: Hcy 能明显增加 HUVECs ROS 的生成, 促进 EDN1 的分泌和提高 EDN1mRNA 的表达; 瞬时转染分析实验结果显示 Hcy 能明显诱导质粒 pGL3-EDN1-AP-1(-115/+135) 荧光素酶的表达, 但对质粒 pGL3-EDN1-AP-1(-115/+135) 的突变体 pGL3-EDN1-AP-1 MU(-115/+135) 荧光素酶的基础表达及 Hcy 的诱导作用均明显降低。结论: 推测 Hcy 可能改变 HUVECs 内的氧化还原状态, 促进 ROS 的释放, 激活核转录因子 AP-1, 通过 EDN1 基因中 AP-1 顺式作用元件调控该基因转录。

[关键词] 转录因子 AP-1; 高半胱氨酸; 基因, EDN1

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Effects of AP-1 element on endothelin-1 gene transcription in homocysteine-induced HUVECs

DUAN Jin-hong¹, XU Hai-shan¹, DAI Shun-ling¹, WANG Xiao-ming¹, WU Yun-qing¹, ZHANG Yan-dong¹, CHENG Jin-xuan¹, SUN Ren-yu¹, LI Liang², CHEN Huai-qing²

(¹ Institute of Basic Medical Sciences, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, China; ² Institute of Biomedical Engineering, West China Center of Medical Sciences, Sichuan University, Chengdu 610041, China. E-mail: daishunling@pumc.edu.cn)

[ABSTRACT] **AIM:** The objective of this study was to observe the effects of AP-1 element on endothelin-1 (EDN1) gene transcription in homocysteine (Hcy)-induced human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **METHODS:** The redox level in Hcy-induced HUVECs was determined by using the fluorescent product DCF. The influences of Hcy on expressions of EDN1 mRNA and protein of c-jun/AP-1 in HUVECs were measured by the methods of RT-PCR and Western blotting, respectively. The EDN1 secretion level of HUVECs induced by Hcy was determined by enzymatic immunoassay. The transient transfection assay was performed and luciferase activity of transcriptional factor AP-1 reporter gene induced by Hcy was detected. **RESULTS:** The Hcy significantly increased EDN1 secretion, EDN1 mRNA expression and oxidative stress in HUVECs. Hcy remarkably induced the expression of pGL3-EDN1-AP-1 (115/+135) luciferase reporter gene plasmid. However, basic expression of mutation of pGL3-EDN1-AP-1 (-115/+135) luciferase reporter gene plasmid was downregulated markedly in HUVECs induced by Hcy. **CONCLUSION:** Redox-active and release of ROS are changed by Hcy. Activated AP-1 element plays an important role in EDN1 gene transcription in HUVECs induced by Hcy.

[KEY WORDS] Transcription factor AP-1; Homocysteine; Genes, EDN1

[收稿日期] 2005-12-14 [修回日期] 2006-04-12

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 30170376)

Δ通讯作者 陈槐卿 Tel: 028-85503400; E-mail: chq@wcums.edu.cn; 戴顺龄 Tel: 10-65284020; E-mail: daishunling@pumc.edu.cn

大量的文献报道同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)作为独立的危险因子能促进心血管系统动脉粥样硬化的发病进程^[1,2],它造成心血管疾病有多种机制,其中它所致人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)损伤、功能失调是动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的始动环节^[3]。Hcy可通过巯基自氧化,形成活性氧(reactive oxygen species, ROS)如 O₂⁻ 和 OH[·],使内皮细胞 ROS 产生增多;同时又可选择性降低内皮依赖性血管舒张因子的释放如前列腺素和一氧化氮,促进缩血管物质内皮血管缩血管素(endothelin-1, EDN1)的生成^[4]。ROS 作为胞内信使可能调节 2 种分裂原蛋白激酶家族(ERK1/2 和 MAP 激酶)与酪氨酸激酶(Src/Syk)活性,进而使氧化还原敏感的核转录因子 AP-1 基因表达增强^[5,6]。我们的研究发现用 Hcy 5 × 10⁻⁴ mol/L 处理 HUVECs 24 h 后能产生大量 ROS,并促进 EDN1 的释放,加重对内皮的损伤。对内皮细胞的损伤有很多方面,其中包括诱导内皮细胞 EDN1 基因表达的异常增高,然而对 EDN1 基因表达异常增高的机制却并不清楚。本研究通过作为第二信使的 ROS 来进一步探讨 Hcy 在血管内皮损伤过程中是如何通过激活核转录因子 AP-1,与靶基因 EDN1 启动子区上的相应作用元件结合从而促进 EDN1 的表达。

材 料 和 方 法

1 试剂

同型半胱氨酸(Hcy)、2,7-二氯荧光素二乙酯(DCF-DA)购自 Sigma 公司;c-Jun/AP-1 抗体购于 Santa Cruz 公司;限制性内切酶 *Hind* III、*Kpn* I 购自 TaKaRa 公司;DNA marker 购自天为时代生物技术公司;DNA 凝胶玻璃奶快速纯化回收试剂盒购自北京博大泰克公司;质粒 DNA 制备和纯化试剂盒购自 NucleoBond 公司;Lipofectin 试剂购自 Invitrogen 公司;pGL3-basic vector、pSV-β-galactosidase vector、luciferase assay system 检测试剂盒和 luminescent β-Gal 荧光检测试剂盒均购自 Promega 公司;正常人基因组 DNA 由首都儿科研究所赵小元老师惠赠;实验所用引物均由上海生工公司合成并测序。

2 方法

2.1 人脐静脉内皮细胞培养 人脐静脉内皮细胞参照 Jaffe 等^[7]方法进行。无菌条件下取健康产妇产脐带,PBS 反复冲洗脐静脉后,注入 0.2% 胶原酶,37 °C 温育 20-30 min,收集消化液,离心后弃上清收集细胞,加入含 20% 胎牛血清、内皮细胞生长因子

的 M199 培养液悬浮细胞,分装培养瓶中,置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,待细胞达到 80% 以上融合生长时,进行实验或传代,本实验选用第 2-5 代细胞。实验用细胞预先经过无酚红无血清 M199 培养液处理 16-24 h 后用于实验。

实验分成正常组和 Hcy 处理组(Hcy 组经 Hcy 5 × 10⁻⁴ mol · L⁻¹ 处理 24 h),用于以下实验。

2.2 细胞内活性氧的测定^[8] 荧光探针 DCF 检测细胞内氧化-还原状态。二氯荧光素 DCF-DA 在体内被酯酶水解,形成无荧光的还原型二氯荧光素 DCFH,后者对活性氧敏感,可迅速被氧化成为具有高荧光的物质氧化型 DCF,利用荧光显微镜可直接观察细胞内活性氧的产生,荧光强度反映了氧化应激的程度。将 HUVECs 接种至 35 mm 培养皿中至 90% 融合,Hcy 5 × 10⁻⁴ mol · L⁻¹ 孵育 24 h,加入 25 μmol · L⁻¹ DCF 作用 50 min。分析前细胞用 Hanks 液洗 3 次,用荧光显微镜观察细胞内活性氧的产生,激发 λ 为 488 nm,发射 λ 为 510 nm。

2.3 细胞上清液 EDN1 含量的测定 收集 1 × 10⁶ 细胞的上清液 1 mL,采用双抗夹心法^[9]。选用 Assay Designs Inc. 公司生成的人 EDN1 酶联免疫测定试剂盒。具体实验过程详见说明书。试剂盒质量控制检测标准灵敏度为 0.14 ng · L⁻¹,组间和组内变异系数 < 3.3%。

2.4 RNA 的提取和 RT-PCR 反应 采用 Trizol (Invitrogen, USA) 一步法提取 HUVEC 总 RNA,紫外分光光度计测定总 RNA 浓度,A₂₆₀/A₂₈₀ 为 1.8-2.0,并用 1% 甲醛凝胶电泳鉴定 RNA 质量;每组取总 RNA 2 μg,采用逆转录试剂盒(Invitrogen, USA)合成 cDNA;取该产物 2 μL 进行 PCR 反应:94 °C 预变性 4 min,94 °C 30 s,53 °C 30 s,72 °C 60 s,共 30 个循环,末次延伸为 72 °C 10 min。引物通过 GenBank (RefSeq:21359816) 查找基因序列,使用 primer5.0 软件设计如下:CGTTGTTCCGTATGGACTTG (EDN1, sense), AGGCTATGGCTTCAGACAGG (EDN1, anti-sense),扩增产物长度为 436 bp;ACGGATTTGGTGG-TATTGGG (GAPDH, sense), TCCTGGAAGATGGT-GATGGG (GAPDH, antisense),扩增产物长度为 211 bp。反应结束,取反应产物 10 μL 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,于紫外灯下观察,以凝胶成像分析仪分析各 DNA 条带灰度值,各反应体系以 GAPDH 为内参照,计算待测基因与 GAPDH 基因的相对比值。

2.5 Western blotting 检测 5 × 10⁶ HUVECs 用 50 μL 细胞裂解液:20 mmol · L⁻¹ Tris (pH 7.4), 150 mmol · L⁻¹ NaCl, 1 mmol · L⁻¹ EDTA, 1 mmol · L⁻¹ EGTA, 1%

Triton X, 0.1% SDS and 1% sodium deoxychlorate, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ phenylmethylsulfonyl fluoride, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ sodium fluoride, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ sodium orthovanadate, $5 \times 10^3 \text{ g/L}$ aprotinin, 和 $5 \times 10^3 \text{ g/L}$ leupeptin 冰浴裂解细胞 30–40 min, $12\,000 \times g$, 离心 15 min 后取上清, 进行 Bradford 法蛋白定量。取 $10 \mu\text{g}$ 内皮细胞蛋白提取物加等量 $1 \times \text{SDS}$ 上样缓冲液煮沸变性后, 上样、电泳、转膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2–3 h, 加入 I 抗, 抗 c-jun/AP-1 多克隆兔抗体 1:1 000 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜; 且用 β -actin 作为内参照; 相对应 II 抗 1:5 000 室温孵育 2–3 h, 辣根过氧化物酶化学发光法进行显色反应。

2.6 含人 ET-1 基因 5' 上游调控序列不同长度荧光素酶报告基因质粒的构建

① PCR 引物设计和 PCR 根据目的 DNA 片段和表达载体 pGL3-Basic vector 的结构特点及实验设计需要, 用核酸序列分析软件 PRIME5.0 辅助设计 6 对引物, 在上游引物 5' 端导入 *Kpn* I 的酶切位点, 在下游引物 5' 端导入 *Hind* III 酶切位点。引物序列为: Senses: -431 5' - GGGGTACCGAAAATGAAGCGAGCAA -3'; -293 5' - GGGGTACCTGGCAGCTTGCAAA -3'; -149 5' - GGGGTACCTTTCCGGCCTGGCTT -3'; -115 5' - GGGGTACCTGTTGCTGACTAATAACAC -3'; -98 5' - GGGGTACCCACAATAACATTGCTCTGGG -3'; -50 5' - GGGGTACCCACTCTAATAGGGGT-TCAA -3'; 突变 sense: -115 5' - GGGGTACCTGTTGGTACTAATAACAC -3'; Antisense: +135 5' - CCCAAGCTTAACGGGGAGAAAAGG -3'。

所有引物均以基因组 DNA 为模板扩增所需 DNA 片段。PCR 反应: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 240 s, $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 60 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 60 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 45 s, 共 30 个循环, 末次延伸为 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 6 min。对 PCR 反应液进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 用 DNA 凝胶玻璃奶快速纯化回收试剂盒快速回收纯化 DNA。

② 限制性内切酶反应和 DNA 片段连接 用 *Hind* III 和 *Kpn* I 酶分别对 pGL3-basic vector、含有目的 DNA 片段的 PCR 产物进行双酶切, 以获得黏性末端。具体过程为将 $1 \mu\text{L}$ pGL3-Basic vector 和 $4 \mu\text{L}$ 含有目的 DNA 片段的 PCR 产物分别加入 $1 \mu\text{L}$ *Hind* III 和 $1 \mu\text{L}$ *Kpn* I 酶液, 再加入到 $10 \times$ 缓冲液中, 终体积为 $20 \mu\text{L}$, 并在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜, 完后用 DNA 凝胶玻璃奶快速纯化回收试剂盒快速回收与纯化酶切产物。将酶切后的目的片段与 pGL3-basic vector 连接, 按照插入片段与载体的比例为 3:1, 计算所需 DNA 片

段的量, 分别将 $4 \mu\text{L}$ 酶切回收片段、 $2 \mu\text{L}$ pGL3-basic vector、 $1 \mu\text{L}$ $10 \times$ T4 ligase 缓冲液和 $1 \mu\text{L}$ T4 ligase 混匀后 $16 \text{ }^\circ\text{C}$ 、16 h, 完成质粒的构建。

③ 重组质粒的转化和质粒 DNA 的制备 将 $5 \mu\text{L}$ DNA 片段连接反应液和 $200 \mu\text{L}$ 新鲜的大肠杆菌感受态细胞液混匀后 (并设无质粒 DNA 的阴性对照组), 冰浴 30 min, $42 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴、90 s, 冰浴 2 min, 加入 $800 \mu\text{L}$ LB 培养基, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 温和振荡 60 min, 将 $200 \mu\text{L}$ 菌液接种到含氨苄青霉素 (60 mg/L) 的琼脂板上, 均匀涂抹静置使液体吸收后倒置平皿 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、12–20 h 后, 观察菌落生长情况, 挑选转化的单一菌落, 接种到含氨苄青霉素的 5 mL LB 培养基中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、剧烈振荡过夜, 第 2 d 转种到含氨苄青霉素的 250 mL LB 培养基中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、剧烈振荡 12–16 h 收集菌液, 用质粒 DNA 制备和纯化试剂盒制备质粒 DNA, 构建的荧光素酶报告基因组质粒分别用 *Hind* III 和 *Kpn* I 双酶切鉴定, 序列测定由上海博亚公司完成。将质粒用含胰 RNase 的 TE 溶解后储存于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

2.7 真核细胞转染^[10] 采用脂质体法瞬时转染 HUVECs, 以内参照质粒 Psv- β -Gal 矫正转染效率。转染前细胞常规传代, 以细胞量 $3 \times 10^5/35 \text{ mm}$ 培养皿接种; 当细胞生长至 80%–90% 融合时, 取转染试剂 lipofectin™3 μL 与 $97 \mu\text{L}$ Opti-MEM 培养基混合, 逐滴加到装有 1 g/L 质粒 DNA (待转染的报告基因质粒 DNA $1 \mu\text{g}$ 和内参照质粒 $0.5 \mu\text{g}$) 的 $100 \mu\text{L}$ Opti-MEM 培养基中, 置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 的 CO_2 孵育箱中培养 7 h 后, 更换完全培养基继续培养 36 h, 按试剂盒说明书收获细胞裂解液进行荧光素酶活性检测, 于 TD-20/20 发光仪上检测荧光素酶活性; 用可见紫外分光光度计检测 β -Gal 浓度; 荧光素酶表达量以荧光素酶活性单位 (U)/ β -Gal 浓度 (U) 表示。

3 统计学处理

数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多个样品均数的比较用 ANOVA 单因素方差分析, 两组之间的比较 Student-Newman-Keuls 检验。

结 果

1 Hcy 诱导 HUVECs 氧化-还原状态、EDN1 基因表达和对核转录因子 AP-1 的蛋白表达影响

Hcy $5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用 HUVECs 24 h, 荧光强度显著增高 (图 1A); Hcy 作用 HUVECs 24 h 后诱导 HUVECs 的 EDN1 分泌上升 ($P < 0.05$) (图 1B); Hcy 诱导 HUVECs 的 EDN1 mRNA 表达的影响 (图 1C), 结果与图 1A 所示基本相同。

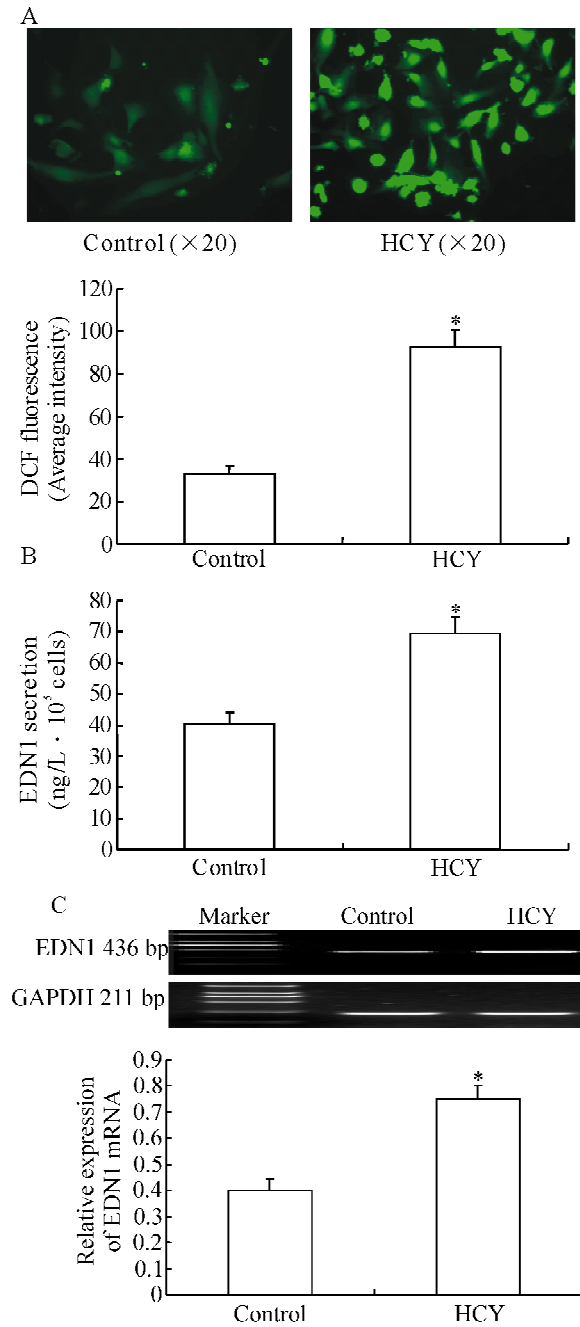


Fig 1 Effects of Hcy on redox, EDN1 secretion levels and expression of EDN1 mRNA in HUVECs. HUVECs were treated with Hcy of $5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 24 h. $\bar{x} \pm s$. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs control. A: Hcy-increased intracellular ROS levels were revealed by fluorescent intensities of DCF. DCF fluorescence scanning by fluorescence spectrophotometry and fluorescence intensities of HUVECs are shown as the average intensity; B: Hcy increased EDN1 secretion levels in HUVECs; C: Hcy enhanced EDN1 mRNA expression in HUVECs.

图 1 Hcy 对 HUVECs 氧化-还原状态、ET-1 分泌和 ET-1 mRNA 表达的影响

2 构建 6 个含有 ET-1 基因上游不同长度序列的荧光素酶报告基因质粒

以基因组 DNA 为模板,采用 PCR 方法成功地扩

增出与预期长度一致的 6 条 DNA 片段经 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切后,进行 DNA 电泳、回收和纯化,与经过相同处理的 pGL3-Basic Vector 连接,并转化大肠杆菌 DH5 α ,阳性克隆经限制性内切酶分析和核苷酸序列测定证明人 EDN1 基因上游序列 -431/+135、-293/+135、-149/+135、-115/+135、-98/+135 和 -50/+135 已经被定向克隆在 pGL3-Basic Vector 荧光酶报告基因上游,分别命名为 pGL3-ET-1-431/+135、pGL3-ET-1-293/+135、pGL3-ET-1-149/+135、pGL3-ET-1-115/+135、pGL3-ET-1-98/+135 和 pGL3-ET-1-50/+135。所构建质粒所含顺式元件的结构和位置如图 2。

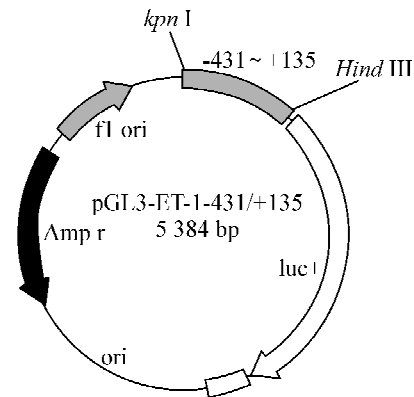


Fig 2 Schematic diagram of construction of the luciferase reporter gene plasmids.

图 2 构建 6 个含有 ET-1 基因上游不同长度序列的荧光素酶报告基因质粒

3 EDN1 基因 5' 上游不同长度序列在 Hcy 诱导内皮细胞 EDN1 基因转录中的作用

瞬时转染分析实验结果显示(图 3),当转染质粒含有 EDN1 基因上游序列 -431/+135(566 bp)、-293/+135(428 bp)、-149/+135(284 bp)和 -115/+135(250 bp)时可测出基础荧光素酶表达量,Hcy $5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 可使转染细胞的荧光素酶表达量明显大于基础数值。当转染质粒含有 -98/+135(233 bp)和 -50/+135(185 bp)时,转染细胞的荧光素酶表达量显著降低,Hcy 作用组与对照组无明显差异,重复实验结果一致。

4 EDN1 基因 5' 上游 AP-1 顺式调控元件在 Hcy 诱导血管内皮细胞 EDN1 基因转录中的作用

瞬时转染分析实验结果如图 4 所示, Hcy 能明显诱导质粒 pGL3-PAI-1-AP-1(115/+135) 荧光素酶的表达,但对质粒 pGL3-PAI-1-AP-1(115/+135) 的突变体 pGL3-ET-1-AP-1 MU(-115/+135) 荧光素酶的基础表达及 Hcy 的诱导作用均明显降低。重复实验结果一致。

讨 论

近十年来,临床流行病学调查显示同型半胱氨酸(Hcy)作为心血管疾病的一个新的独立危险因素可引起缺血性心脏病、中风和外周血管病等心脑血管病,而引起 Hcy 升高的原因也是多方面的,其中包括代谢酶的基因突变、复合维生素 B 和叶酸的摄入缺乏、老年人、更年期妇女和某些代谢性疾病^[1],在上述情况下,Hcy 的升高往往是心血管病发病率和死亡率的预警信号^[11];动物实验结果表明高同型半胱氨酸血症往往都伴随血管内皮的损伤和活性氧的增加^[4]。

EDN1 是一种具有生物活性的 21 个氨基酸组成的活性多肽,是目前所知的作用强、持续久的血管收缩肽。血管系统的内皮素主要为 EDN1。内皮细胞是产生 EDN1 的主要场所,EDN1 与动脉粥样硬化的发生、发展有密切的关系。它可以通过调控内皮细胞或其它血管壁细胞的 ET-1 基因表达而促使粥样斑块形成,而这些信号传导通路通常受细胞内活性氧的影响。越来越多的证据表明,许多细胞内的信号传导通路对氧化应激都很敏感,活性氧可能是诸多信号传导通路的共同环节^[12,13]。

我们的实验结果显示,用 Hcy 处理 HUVECs 24 h 后,可明显升高细胞内活性氧的水平,同时明显增加 EDN1 的分泌和 EDN1mRNA 的表达。推测 Hcy 可能是通过改变 HUVECs 内的氧化还原状态,促进 ROS 的释放,进而诱导 HUVECs 合成 EDN1 增加,上调 EDN1 基因的表达。研究发现人 EDN1 基因 5' 上游调控区 -109 到 -102 bp 之间存在一个 AP-1 顺式作用元件 GTGACTAA。这种元件在佛波酯(TPA)的诱导下,能与核反式作用因子 AP-1 蛋白结合,因此该顺序称为 TPA 反应元件(TRE 元件)。AP-1 作为核内反式作用因子又是受细胞氧化还原状态影响的主要转录因子,它参与细胞生长、调节基因的转录活性^[10],而 Western blotting 结果也显示 Hcy 能明显增加 c-jun/AP-1 蛋白的表达,推测 Hcy 能激活转录因子 AP-1(c-Jun)的活性,而磷酸化的 c-Jun 可以和 EDN1 基因上的 AP-1 位点结合,上调 EDN1 基因的表达,从而使 Hcy 诱导的 EDN1 释放增加。为进一步了解 Hcy 是如何通过 AP-1 元件在 EDN1 基因转录调控中的作用,我们进行了质粒构建和突变的研究。真核细胞瞬时转染技术结果显示含有 AP-1 反应元件的质粒 pGL3-EDN1-431/+135、pGL3-EDN1-293/+135、pGL3-EDN1-149/+135 和 pGL3-ET-1-115/+135 存在基础荧光

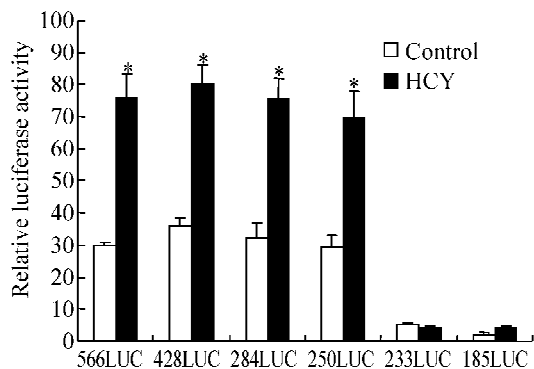


Fig 3 Analysis of luciferase activity of ET-1 promoter deletion constructs in Hcy-treated HUVECs. *P < 0.05 vs control. $\bar{x} \pm s$. n = 3.

图 3 ET-1 基因 5' 上游不同长度序列在 Hcy 诱导内皮细胞 ET-1 基因转录中的作用

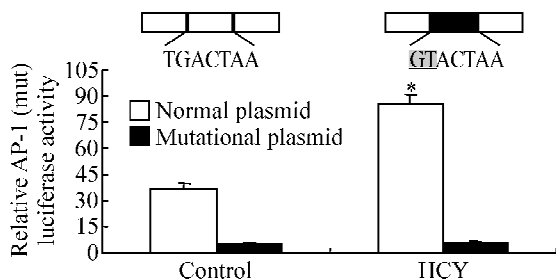


Fig 4 Effect of site-directed mutants of AP-1 in EDN1 promoter on luciferase activity induced by Hcy (5×10^{-4} mol · L⁻¹, 24 h) in HUVEC. *P < 0.05 vs control. $\bar{x} \pm s$. n = 3.

图 4 EDN1 基因 5' 上游 AP-1 顺式调控元件在 Hcy 诱导血管内皮细胞 EDN1 基因转录中的作用

5 Hcy 对核转录因子 AP-1 的蛋白表达的影响

Western blotting 杂交结果显示(图 5), Hcy 5×10^{-4} mol · L⁻¹ 作用 HUVECs 24 h 后,能诱导核转录因子 AP-1 的蛋白表达增加。

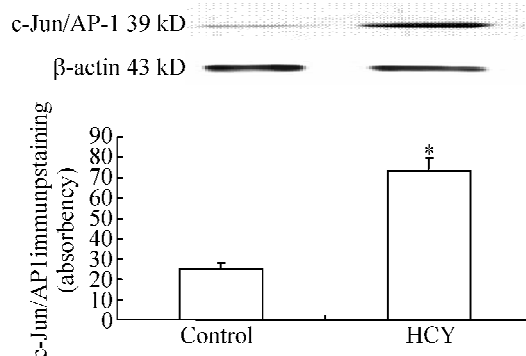


Fig 5 Effect of Hcy on c-Jun/AP-1 protein levels. ECs were incubated with 5×10^{-4} mol · L⁻¹ Hcy for 24 h. Equal amounts of nuclear proteins were analyzed by Western blotting with a rabbit anti-human c-Jun/AP-1 polyclonal antibody. Representative blots of three independent experiments. Results quantitated by densitometric scanning in untreated cells and Hcy-treated cells. $\bar{x} \pm s$. n = 3. *P < 0.05 vs control.

图 5 Hcy 对核转录因子 AP-1 蛋白表达的影响

素酶表达, Hcy 可增加上述表达; 而不含有 AP-1 反应元件的质粒 pGL3-EDN1-98/+135 和 pGL3-EDN1-50/+135 基础荧光素酶表达非常低, Hcy 对 pGL3-EDN1-98/+135 和 pGL3-EDN1-50/+135 无诱导作用, 提示在人 EDN1 基因 5' 上游调控区 -115 到 +135 序列之间可能存在对人 EDN1 基因转录起作用的基本作用元件。因为 AP-1 反应元件位于 -98 到 -115 序列之间, 我们的质粒瞬时转染实验也表明存在基础荧光素酶表达和 Hcy 诱导它的表达增强, 推测 AP-1 反应元件可能是人 EDN1 基因转录的重要调节元件之一, 而 AP-1 定点突变实验结果显示突变导致 EDN1 基因启动子基础活性和 Hcy 诱导活性明显降低, 进一步证实该启动子区的 AP-1 元件对 EDN1 基因表达具有重要的调节作用。本实验初步探讨了 Hcy 在诱导血管内皮细胞 ET-1 基因表达中, 可能存在氧应激(ROS)使蛋白激酶(ERK)磷酸化, 通过激活核转录因子(AP-1), 调节 ET-1 基因表达, 基因转录调控机制相当复杂, 常常需要多种顺式作用元件、反式作用因子参与。EDN1 基因 5' 上游序列还存在 GATA、NF-1 等其它作用元件, 是否有协同作用, 还有待于进一步研究。

(致谢: 本研究工作得到了本所病理生理学研究室高友鹤教授、马素参老师, 分子生物学研究室蒋澄宇教授, 解剖学研究室张晓东教授, 生理学研究室齐宝申教授、周小梅老师, 国家重点实验室余跃老师等无私的帮助, 在此表示深深的谢意。)

[参 考 文 献]

- [1] Austin RC, Lentz SR, Werstuck GH. Role of hyperhomocystine in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease[J]. *Cell Death Differ*, 2004, 11(Suppl 1):S56-S64.
- [2] 王祥贵, 冯义柏, 曾秋棠, 等. 同型半胱氨酸对人血管平滑肌细胞凋亡及半胱天冬酶-3 表达的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22(4): 707-710.
- [3] Mujumdar VS, Aru GM, Tyagi SC. Induction of Oxidative stress by homocystine impairs endothelial function[J]. *J Cell Biochem*, 2001, 82(3):491-500.
- [4] Weiss N. Mechanism of increased vascular oxidant stress in hyperhomocysteinemia and its impact on endothelial function[J]. *Curr Drug Metab*, 2005, 6(1):27-36.
- [5] Spirichev VB. Antioxidant vitamins in the treatment and prevention of cardiovascular diseases. vitamin E [J]. *Vopr Pitan*, 2003, 72(6):45-51.
- [6] Kyosseva SV. Mitogen-activated protein kinase signaling [J]. *Int Rev Neurobiol*, 2004, 59:201-220.
- [7] Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, et al. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria [J]. *J Clin Invest*, 1973, 52(11):2745-2756.
- [8] Mudali S, Dobs AS, Ding J, et al. Endogenous postmenopausal hormones and serum lipids: the atherosclerosis risk in communities study [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(2):1202-1209.
- [9] Zagariya A, Doherty J, Bhat R, et al. Elevated immunoreactive endothelin-1 levels in newborn rabbit lungs after meconium aspiration [J]. *Pediatr Crit Care Med*, 2002, 3(3):297-302.
- [10] Ji ES, Li Q, He RR. Action of genistein on tension of isolated rabbit femoral artery and its mechanism [J]. *Sheng Li Xue Bao*, 2002, 54(5):422-426.
- [11] Zok A, Zeman M. Consequences of moderate hyperhomocysteinemia in internal medicine [J]. *Casopis Lekaru Ceskych*, 2004, 143(6):367-374.
- [12] Batt KV, Patel L, Botham KM, et al. Chylomicron remnants and oxidised low density lipoprotein have differential effects on the expression of mRNA for genes involved in human macrophage foam cell formation [J]. *J Mol Med*, 2004, 82(7):449-458.
- [13] Auge N, Garcia V, Maupas-Schwalm F, et al. Oxidized LDL-induced smooth muscle cell proliferation involves the EGF receptor/PI-3 kinase/Akt and the sphingolipid signaling pathways [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22(12):1990-1995.