

P38 α 对人血管内皮一氧化氮合酶(eNOS) 基因启动子转录活性的影响

刘娜, 邢飞跃

(暨南大学生命科学技术学院组织移植与免疫实验中心, 广东 广州 510632)

[摘要] 目的: 研究 P38 α 对人血管内皮细胞一氧化氮合酶(eNOS) 基因启动子转录活性的影响。方法: 利用硝酸还原酶法检测不同浓度氯化钴作用下人脐静脉血管内皮细胞-12 (HUVEC-12) 上清中的一氧化氮(NO) 的含量。以 pRL-TK 为内参照, 将已经构建好的 *pGL2-eNOS-p* 质粒分别与 *pGL3-BASIC*、*pcDNA3*、*p38a*、及 *p38a (AF)* 共转染 HUVEC-12 细胞, 利用双荧光素酶报告基因技术检测 eNOS 基因启动子转录活性, 并在共转染的基础上加氯化钴刺激, 并检测 eNOS 基因启动子转录活性。结果: 氯化钴刺激下 HUVEC-12 细胞培养上清的 NO 含量随氯化钴作用浓度增加而提高, 成功建立化学缺氧模型; *p38a* 在正常和缺氧条件下均明显降低 eNOS 基因启动子的活性, 可被无活性诱变体 *p38a (AF)* 逆转。结论: P38 α 下调人血 eNOS 基因启动子转录活性。

[关键词] 一氧化氮合酶(NOS); 启动子; P38 丝裂原活化蛋白激酶(P38MAPK); 氯化钴; 内皮细胞

[中图分类号] R 392.12 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2009)06-0610-04

Regulation of human endothelial nitric oxide synthase(eNOS) promoter activity by p38 α -mitogen activated protein kinase

LIU Na, XING Fei-yue

(Institute of Tissue Transplantation and Immunology, College of Life Science
and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[Abstract] **Aim:** To study the effect of the p38 MAPK signaling pathway on the regulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) promoter activity. **Methods:** The nitric oxide(NO) from the supernatant of the cells treated with different concentrations of cobaltous chloride was measured through nitric reductase method. The cells were cotransfected with a *pGL2-eNOS-p* plus *pGL3-BASIC*, *pcDNA3*, *p38a* or negative mutant *p38a (AF)*, respectively, and a pRL-TK vector was used as an internal control. The transcription activity of human eNOS promoter was determined through using a double luciferase reporter gene system. Moreover, the cotransfected cells were stimulated with the different concentrations of cobaltous chloride and the transcription activity of human eNOS promoter was measured by the same system. **Results:** As the concentration of cobaltous chloride increased, the NO was also increased, suggesting that chemical hypoxia model is successfully established. The p38a markedly downregulated the promoter activ-

[收稿日期] 2009-05-18

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30471635); 广东省自然科学基金项目(04010451, 5006033)

[作者简介] 刘娜(1983-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 基因表达与调控

通讯作者: 邢飞跃, 男, 教授, 博士生导师, Tel: 020-85220723; E-mail: tfyxing@jnu.edu.cn

ity under either hypoxia or standard condition, which could be reversed by its negative mutant *p38a* (*AF*). **Conclusion:** The activation of the *p38a* MAPK signaling pathway downregulates the human eNOS promoter activity.

[Key words] nitric-oxide synthase (NOS); promoter; P38 mitogen activated protein kinases (P38MAPK); cobaltous chloride; endothelial cell

人血管内皮一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxid synthase, eNOS) 是血管系统中一氧化氮 (nitric oxide, NO) 的主要生理来源, 在血管内皮细胞, 心肌细胞中表达^[1]。eNOS 参与血压调整、血管通透性调节、防止白细胞粘附和血小板聚集等生理过程, 还参与休克、高血压、动脉粥样硬化、血管狭窄和阻塞等诸多重要病理过程的发生和发展^[2]。丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 在败血症和局部缺血损伤症中有重要作用, P38 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, P38MAPK) 是 MAPK 其中一员, 进一步研究发现其在保护心脏缺血再灌注损伤中起关键性作用^[3]。另有研究表明 P38MAPK 通过抑制内皮衍生舒张因子, 尤其是一氧化氮参与前列腺素 F2 α 和低氧诱导的小鼠肺内动脉血管收缩^[4]。本研究为 P38MAPK 对人 eNOS 基因启动子的调控作用, 为探索新的治疗心脑血管疾病的方法提供实验论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 DH5 α 菌株、氯化钴购自上海生物工程公司。人脐静脉血管内皮细胞系 (human umbilical vein endothelial cells-12, HUVEC-12) 购自长沙赢润生物技术有限公司。DMEM 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自美国 GibcoBRL 公司。质粒 *pGL3-BASIC*、*pRL-TK* 购自 Promega 公司。*pcDNA3*、红色荧光蛋白载体 *pDsRed* 购自 clontech 公司。Dual Luciferase Reporter Assay System kit 购自 Promega 公司。SunBioTM-EZ 转染试剂购自上海生博医学生物工程有限公司。质粒提取试剂盒购自上海申能博采公司。一氧化氮检测试剂盒购自凯基生物科技发展有限公司。*pGL2-eNOS-p* 真核表达载体由耶鲁大学医学院的 William C. Sessa 教授惠赠。

Flag 标记的野生型 *p38a* 和 *p38a* (*AF*) 无活性诱变体克隆在 *pcDNA3* 载体上, 载体由美国斯克利普斯研究所 R. J. Ulevitch 教授和 J. Han 博士惠赠。

1.2 方法

(1) 细胞培养 质量浓度的 HUVEC-12 细胞系用含体积分数为 5% 的胎牛血清、质量浓度为 0.1 g/L 青霉素、质量浓度为 0.1 g/L 链霉素的 DMEM 培养基, 在 37 °C 培养箱内培养。在细胞生长至 80% ~ 90% 融合时传代, 并按 7.0×10^4 /孔在 24 孔板内铺板, 待细胞生长至 50% ~ 60% 融合后, 弃细胞上清, 用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗细胞 1 次。

(2) 细胞处理 按 1.2(1) 方法铺板, 将细胞分成不同浓度氯化钴刺激组、普通转染组和共转染组。

对于不同浓度氯化钴刺激组, 在细胞铺板 24 h 后用含有不同浓度 0、50、100、200、400 和 800 $\mu\text{mol/L}$ 的 DMEM 培养基给细胞换液, 作用 48 h。普通转染组用红色荧光蛋白载体 *pDsRed* 转染 HUVEC。共转染组又分为正常共转染组和氯化钴刺激共转染组, 正常共转染组进行 *pGL3-BASIC/pcDNA3/pRL-TK*、*pGL2-eNOS-p/pcDNA3/pRL-TK*、*pGL2-eNOS-p/p38a/pRL-TK* 和 *pGL2-eNOS-p/p38a(AF)/pRL-TK* 共转染, *pRL-TK* 是内参用以校正转染效率, *pGL3-BASIC/pcDNA3* 是空载体作为对照; 氯化钴刺激共转染组分别在正常共转染组的基础上加 100 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴作用。红色荧光蛋白载体 *pDsRed* 为 1 μg , *pGL3-BASIC*、*pGL2-eNOS-p* 为 0.7 μg , *pcDNA3*、*p38a*、*p38a(AF)* 为 0.4 μg , *pRL-TK* 为 1 μg , 每孔转染试剂均为 1.5 μL 。按照 SunBio (tm) Trans-EZ 常见细胞系转染试剂说明书进行转染。其中氯化钴刺激共转染组在转染 8 h 加浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴刺激。

(3) 硝酸还原酶法检测 NO 浓度 将不同浓度

氯化钴刺激组 48 h 后收集上清,不同时间氯化钴刺激组分别在 12、24、36、48 和 72 h 收集上清,按照一氧化氮检测试剂盒操作说明,在紫外分光光度计(pharmacia biochrom4060)上测定吸光度。

(4) 普通转染组红色荧光蛋白载体 pDsRedl-1 的表达分析 使用倒置荧光 DIC 相差显微镜(NIKON ECLIPSE TE2000)通过冷 CCD 成像记录普通转染组红色荧光蛋白载体 pDsRed 的发光情况。

(5) 双荧光素酶报告基因活性的检测 正常共转染组和氯化钴刺激共转染组在细胞转染后 48 h 裂解细胞,收集裂解液 100 μL ,按照 Dual Luciferase Reporter Assay System kit 的操作说明,在生物发光多功能检测仪 PerkinElmer 1420 上检测双荧光素酶活性。

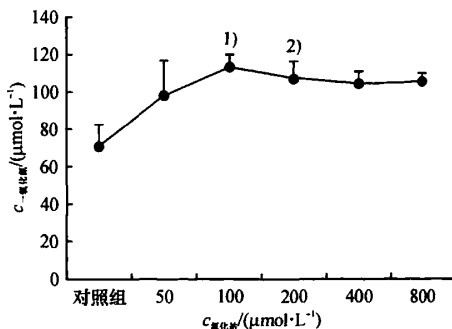
1.3 统计学处理

实验结果用统计软件包 SPSS 13.0 进行处理,数据以(均数 \pm 标准差)($\bar{x} \pm s$)表示,两组间的比较采用配对 t 检验, $P < 0.05$ 为具有统计学差异。

2 结果

2.1 氯化钴对 HUVEC-12 细胞释放一氧化氮的影响

用不同浓度氯化钴刺激培养 HUVEC-12 细胞,并在 48 h 收集细胞培养液上清测定 NO 浓度,发现随着氯化钴浓度上升,NO 释放量也在上升。与对照组相比,当氯化钴作用浓度在 100 ~ 200 $\mu\text{mol/L}$ 时,具有显著性差异($P < 0.05$,图 1);而药物浓度上升到 200 $\mu\text{mol/L}$ 后 NO 浓度开始下降,但仍然高于浓度 0 ~ 50 $\mu\text{mol/L}$ 组,与对照组相比无显著差异(图 1)。



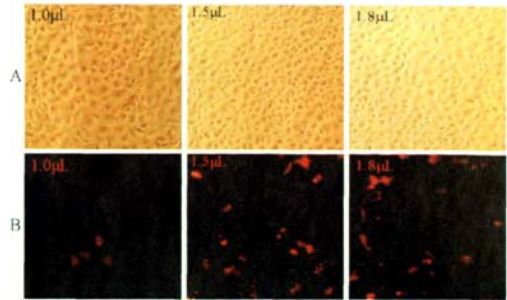
1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与对照组比较, $P < 0.01$

图 1 不同浓度氯化钴刺激下 HUVEC-12 细胞上清 NO 的变化

2.2 红色荧光蛋白载体 pDsRed 的表达分析

用不同剂量的转染试剂将红色荧光蛋白载体

pDsRed 转染 HUVEC-12 细胞。当转染试剂的用量为 1.5 μL 时,红色荧光蛋白在 HUVEC-12 细胞中表达丰富(图 2)。

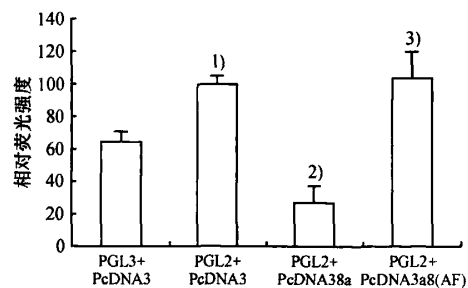


A. 普通光下 HUVEC-12 细胞形态 B. 红色荧光蛋白的表达

图 2 不同剂量转染试剂下红色荧光蛋白的表达($\times 200$)

2.3 P38 α 下调人 eNOS 基因启动子的转录活性

把 pGL3-BASIC、pCpDNA3、p38a、p38a(AF) 与 pGL2-eNOS-p 转染进 HUVEC-12 细胞。与阴性对照组 pGL3-BASIC/pCpDNA3 相比, pGL2-eNOS-p/pCpDNA3 相对荧光强度明显上升,具有极显著性差异($P < 0.01$,图 3)。与 pGL2-eNOS-p/pCpDNA3 组相比, pGL2-eNOS-p/p38a 组荧光强度明显下降, p38a 下调了 eNOS 启动子活性, eNOS 启动子活性降低却被 p38a 无活性突变体 p38a(AF) 逆转(图 3)。

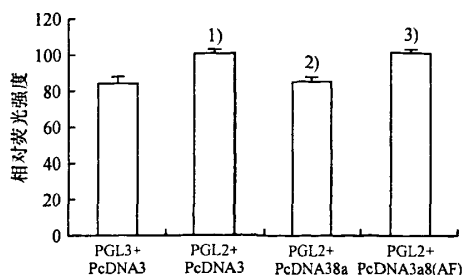


1) 与 PGL3-BASIC/PcDNA3 组比较, $P > 0.01$; 2) 与 PGL2-eNOS-p/PcDNA3 组比较, $P > 0.05$; 3) 与 PGL2-eNOS-p/PcDNA3 组比较, $P > 0.05$

图 3 锥形图示意图

2.4 氯化钴刺激下 P38 α 对人 eNOS 基因启动子转录活性的影响

用浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的氯化钴刺激各转染组,结果表明在缺氧条件下 p38a 依然下调了 eNOS 启动子活性,与 pGL2-eNOS-p/pCpDNA3 组相比,具有显著性差异($P < 0.01$,图 4)。p38a 的无活性突变体 p38a(AF) 恢复此作用(图 4)。



1) 与 PGL3-BASIC/PcDNA3 组比较, $P < 0.05$; 2) 与 PGL2-eNOS-p/PcDNA3 组比较, $P < 0.05$; 3) 与 PGL2-eNOS-p/PcDNA3 组比较, $P < 0.05$

图4 氯化钴刺激下野生型和无活性突变型 p38 对人 eNOS 基因启动子活性的影响

3 讨论

P38MAPK 信号通路在炎症反应、应激反应中具有重要作用,参与细胞的存活、分化和凋亡等过程,是细胞众多信号通路的中转站。阻断 P38MAPK 级联能减轻炎症反应,还可减轻心脏、肾脏和大脑的缺血再灌注损伤^[5]。另有研究证实,P38MAPK 调节了平滑肌细胞收缩,例如 P38MAPK 介导了急性缺氧条件下小鼠肺动脉的血管收缩^[6]。eNOS 基因的表达可以被一些内源和外源的因素调节,包括切应力,缺氧,溶血磷脂胆碱 (lysophosphatidylcholine, LPC) 和肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α)^[7] 等。P38MAPK 作为 PI 3-K/Akt 通路的上游组成部分激活了 Black Tea Polyphenols 诱导的 eNOS 活性^[8]。在前列腺素 F2a (prostaglandin F2a, PGF2a) 和低氧诱导的小鼠肺内动脉收缩中,P38MAPK 以抑制钙离子脱敏感型一氧化氮的方式起重要作用^[4]。Feiyue Xing 等^[9] 将 eNOS 基因启动子构建在红色荧光蛋白载体上,证实 P38MAPK 下调了人 eNOS 基因启动子活性。

本实验结果表明 P38MAPK 下调了 eNOS 基因启动子的活性,下调作用可以被 p38a 的无活性突变体 p38a(AF) 逆转。有文献表明缺氧可以调节 eNOS 基因的表达^[10]。氯化钴是常用的化学模拟缺氧药物,Guichun Wang 等^[11] 用氯化钴刺激大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤分化细胞系 PC12 细胞模拟缺氧。本研究用氯化钴模拟 HUVEC-12 细胞缺氧,通过测定细胞上清中亚硝酸盐的含量来代表一氧化氮的水平^[12] 以此评估细胞缺氧程度,判断缺氧模型是否成功建立。本研究采用浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的氯化钴刺激 HUVEC-12 细胞,在此缺氧条件下 P38MAPK 依然下调 eNOS 基因启动子的活性,且 p38a 无活性突变体恢复此下调作用。

[参考文献]

- [1] WEN H K, JUN T H, ZHENG F B, et al. p38 MAPK-dependent eNOS upregulation is critical for 17 β -estradiol-mediated cardioprotection following trauma-hemorrhage [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 294(6): 2627-2636.
- [2] XING F Y, JIANG Y, LIU J, et al. Role of AP1 Element in the Activation of Human eNOS Promoter by Lyso-phosphatidylcholine [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2006, 98(2): 872-884.
- [3] HSU J T, HSIEH Y C, KAN W H, et al. Role of p38 mitogen-activated protein kinase pathway in estrogen-mediated cardioprotection following traumahemorrhage [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292(6): 2982-2987.
- [4] GREG A K, ANUSHIKA S D, VLADIMIR A S, et al. Modulation of PGF2 α and hypoxia-induced contraction of rat intrapulmonary artery by p38 MAPK inhibition: a nitric oxide-dependent mechanism [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005, 289: 1039-1048.
- [5] 张奇,白晓东,付小兵. P38MAPK 信号通路研究进展 [J]. *感染、炎症、修复*, 2005, 6(2): 59-61.
- [6] KARAMSETTY M R, KLINGER J R, HILL N S. Evidence for the role of p38 MAP kinase in hypoxia-induced pulmonary vasoconstriction [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002, 283(4): 859-866.
- [7] HUIGE L, THOMAS W, ULRICH F. Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase [J]. *Nitric Oxide*, 2002, 7(2): 132-147.
- [8] ELAD A, SHANE R T, EBERHARD S, et al. Activation of endothelial nitric-oxide synthase by the p38 MAPK in response to black tea polyphenols [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(45): 46637-46643.
- [9] FEI Y X, YONG J, JING L, et al. Downregulation of human endothelial nitric oxide synthase promoter activity by p38 mitogenactivated protein kinase activation [J]. *Biochemistry & Cell Biology*, 2006, 84(5): 780-788.
- [10] MASAO T, JIANXIN S, JUNKO H, et al. Rho-kinase mediates hypoxia-induced down-regulation of endothelial nitric oxide synthase [J]. *Circulation*, 2002, 106(1): 57-62.
- [11] GUI C W, TAPAS K H, SANKAR M, et al. Mitochondrial DNA damage and a hypoxic response are induced by CoCl₂ in rat neuronal PC12 cells [J]. *Nucleic Research*, 2000, 28(10): 2135-2140.
- [12] GLOE T, RIEDMAYR S, SOHN H Y, et al. The 67-kDa lamininbinding protein is involved in shear stress-dependent endothelial nitric-oxide synthase expression [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(23): 15996-16002.

[责任编辑:朱颖娜]