

转录因子对内皮型一氧化氮合酶表达的调节作用

黎媚媚 综述, 欧和生 审校

(南华大学生命科学与技术学院药物药理研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 内皮型一氧化氮合酶; 转录因子; 启动子; 转录调节; 后转录调节

[摘要] 血管内皮细胞损伤及其功能紊乱在心血管疾病(如冠心病)发生发展过程中起重要作用。某些内皮特异性基因的表达直接影响病变的发生和发展进程,如内皮型一氧化氮合酶。后者介导体内左旋精氨酸降解产生一氧化氮。内皮型一氧化氮合酶的基因表达调控有转录水平的调控、转录后调控和翻译后调控,而转录因子在内皮型一氧化氮合酶基因的表达调控过程中起关键性作用。

[中图分类号] Q753

[文献标识码] A

人血管内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)基因表达与血管内皮细胞结构和功能调节密切相关,它不仅参与血压调整、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,而且还参与休克、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。由于人 eNOS基因启动子不同区段含有不同功能的顺式调控元件,而 eNOS基因启动子可能受到许多刺激因素的影响,因此不同区段可能与不同刺激因素导致不同的 eNOS基因转录活性有关。本文就 eNOS基因启动子中不同功能区及其所含顺式反应元件的作用和相关转录因子(transcription factor TF)对 eNOS基因表达调控机制作一综述。

Sp1结合位点、GATA 基序、CACCC 盒、AP-1 和 AP-2 结合位点、p53 结合区域、NF-1 元件、急性反应物调节元件、固醇调节元件和切应力反应元件。

在人类 eNOS 基因的核心启动子区域里存在两个与 eNOS 基本转录密切相关的调节区。一个是 -104 位到 -95 位的正向调节区 iv (positive regulatory domain iv, PRD iv), 这个区域是转录因子 Sp1 的高亲和和识别位点。另一个调节区是 -144 位到 -115 位正向调节区 ⑤ (PRD ⑤), 这个区域可结合转录因子 Ets-1、Elf-1、YY1、Sp1 和 MYC 基因相关的锌指蛋白。此外,基本的 eNOS 基因启动子的活性依赖于结合到这两个调节区的反式作用因子间功能上的相互作用。人类 eNOS 基因调控区上较为重要的还有 -4907 位到 -4638 位(长度为 269 nt)的增强子。增强子上的元件具有组织特异性,并且结合到增强子元件上的蛋白质与结合到启动子元件上的蛋白质可以相互作用。其中结合到增强子元件上的较为重要的转录因子有 Erg 及其它的 Ets 相关因子、AP-2、Sp-1 相关因子和髓细胞锌指基因样因子^[2,3](图 1)。

1 内皮型一氧化氮合酶基因的启动子和增强子

eNOS 基因定位于 7q 35-36 它含有 26 个外显子和 25 个内含子,所表达的蛋白分子量约为 142 kDa 其编码的 mRNA 长度为 4 052 nt^[1]。eNOS 基因的启动子不含 TATA 盒,但是含有较复杂的下游启动子元件,这些元件包括:CCAT 盒、

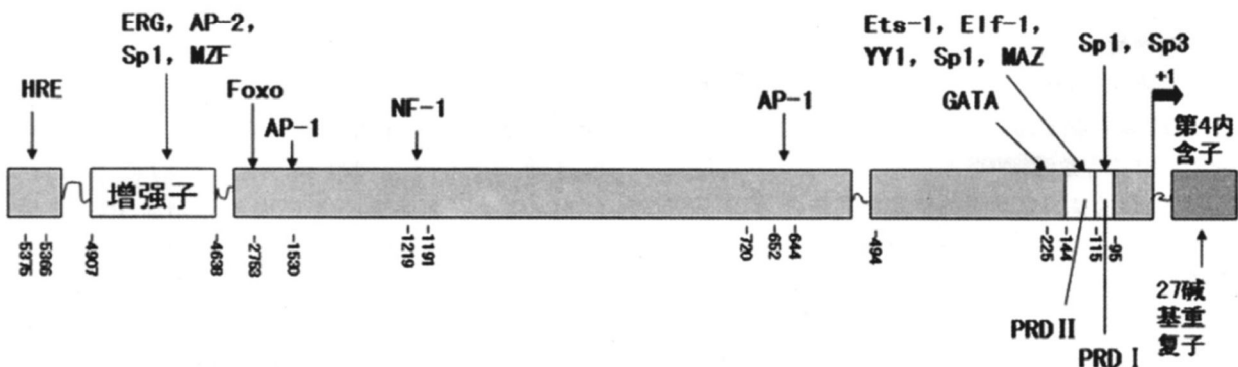


图 1 人内皮型一氧化氮合酶基因调控区上含有的主要调控元件

[收稿日期] 2008-06-04 [修回日期] 2009-01-06

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30670834)

[作者简介] 黎媚媚, 硕士研究生, 研究方向为心血管疾病分子病理学, E-mail 为 vivy_l@126.com。通讯作者欧和生, 博士, 副教授, 主要研究方向为心血管分子病理学、糖尿病分子病理学, E-mail 为 h_ou 2008@yahoo.com.cn。

2 转录因子对内皮型一氧化氮合酶基因表达调控的分子机制

转录因子的参与是 eNOS 基因表达的转录与转录后调

节机制的一个重要方面,其中转录因子 Sp1起着较为重要的作用,其它许多转录因子的作用都与 Sp1有关。

2.1 Sp1

Sp家族有四个成员: Sp1、Sp2、Sp3和 Sp4 它们具有相似的域结构,靠近 N端的是 DNA 结合功能域,含有 3个保守的 Cys2His2 锌指结构。目前备受关注的是 Sp1与 Sp3间的相互作用。Sp3能够激活或抑制 Sp1发挥作用^[4]。Sp1对 eNOS基因的转录是必需的, -104位到 -95位是 Sp1的高亲和位点(5'-GGGGCGGGC-3'), -146位到 -141位则是 Sp1的低亲和位点(5'-CCTCCC-3')^[2]。Sp1可与 GC 盒共有序列 5'-GGGCG-3'相结合,若 eNOS基因的启动子或增强子发生甲基化则使 Sp1的结合活性下降。Sp1有利于 DNA 无甲基化状态的维持^[5]。有报道认为^[6]由蛋白质磷酸酶 2A 催化 Sp1去磷酸化后,eNOS基因启动子的活性增加。而另外有报道则认为^[7]在细胞周期中,Sp1的 C末端磷酸化后其转录活性增强,表明 Sp1的磷酸化或去磷酸化所产生的效应可能与所涉及到的酶的组织特异性有关。

2.2 AP-1激活蛋白

AP-1是一种核转录因子,通常以 Jun(c-Jun, junB, junD)与 Fos(Fra-1, Fra-2, c-fos, fosB)家族成员组成的同源或异源二聚体表达其活性,并通过亮氨酸拉链与 DNA 结合,即结合于 5'-GTGAGCTCAG-3'序列。在人类 eNOS基因的启动子上,AP-1的结合位点主要在 -667 bp处,并促进 eNOS的转录^[8]。同时,AP-1还是一个对氧化还原敏感的转录因子,可激活许多基因的表达参与氧化应激的保护性反应,因此 AP-1在调节 eNOS在响应抗氧化剂的表达上起主要作用,如酚类抗氧化剂能够诱导 c-Jun和 c-fos的表达从而增强 AP-1的活性,增强 eNOS基因的表达,增加内皮型 NO 的含量,同时减少其氧化灭活^[9]。

2.3 核因子 KB

转录因子核因子 KB由与 DNA 结合的 Rel蛋白家族相联系的同源或异源二聚体组成。在已知的 5个 Rel家族中,均包含一个允许蛋白质结合到阻遏蛋白 KB的锚蛋白重复序列区域。核因子 KB/KB复合物存在于细胞质中,当 KB从轴心复合体中被释放,核因子 KB的 p50、p65亚基便被激活。活化后的核因子 KB(p50、p65二聚体)进入细胞核并移位到核 DNA 结合位点上,激活基因的表达^[10]。核因子 KB在氧耐受进程中具有激活 eNOS基因的作用,但 KB可使核因子 KB无法与目的基因启动子的特定序列结合,调节基因转录的功能被抑制。NO 能抑制核因子 KB的活性,其机制可能有以下几点: NO 可使核因子 KB/KB复合物稳定。④NO 与超氧负离子有着高亲和力,它们的结合减少了超氧负离子的歧化作用产物和过氧化二氢,而后两者可以激活内皮细胞中的核因子 KB。⑤NO 可能直接影响调节 KB磷酸化的蛋白激酶与磷酸酶的作用^[11]。

2.4 其他转录因子

除上述转录因子外,还有其他很多转录因子参与 eNOS基因表达的调控。譬如 eNOS基因启动子上的 -2753位(TTGTTTAC)为 Foxo蛋白的结合位点。在内皮细胞中,Foxo

蛋白的功能是多样化的。Foxo-1与 Foxo-3a的过表达可减少 eNOS基因的表达,而 Foxo-4并不影响 eNOS基因启动子的活性^[12]。MAZ对 eNOS基因启动子起抑制作用,它主要结合到 eNOS基因启动子的 -191、-146、-99、-75、-62和 -47位的 GGGAGGG或 CCCTCCC(CT元件)上。MAZ的抑制作用可能是由于它参与 PRD^③调节区的蛋白质-蛋白质和蛋白质-DNA 相互作用并且对转录因子 Ets-1、Sp3和 Sp1的协同相互作用起负性影响效应的结果^[13]。

3 影响转录因子对内皮型一氧化氮合酶基因表达的转录和转录后调节的因素

eNOS基因的表达调控是复杂的。对于内皮细胞而言,切应力、转化生长因子 β1、溶血磷脂脂碱、亚麻酸、3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A(HMG-CoA)还原酶抑制剂和过氧化氢等的作用均能增强 eNOS基因的表达。相反地,肿瘤坏死因子 α、低氧、脂多糖、凝血酶素和氧化型低密度脂蛋白等的作用均能减少 eNOS基因的表达^[2]。

3.1 高糖

高糖时,体内的活性氧(reactive oxygen species ROS)产生过多,ROS的增加会导致 eNOS蛋白表达的减少,其原因部分是由于 eNOS自身的解偶联作用^[14]。ROS的增多可活化转录因子如 AP-1、Sp-1和核因子 KB等。eNOS基因启动子上的 AP-1位点发生突变后可有效抑制高糖引起的 ROS增多,这提示,ROS介导的 AP-1活化在高糖诱导的 eNOS表达中起重要作用^[15]。防治高糖诱导的内皮细胞凋亡在预防糖尿病血管并发症方面具有重要作用,也是目前研究的热点之一。核因子 KB是多种信号通路的交汇点,它的激活能下调促凋亡的 JNK信号途径,进而预防多种细胞类型的凋亡。但是,对于内皮细胞而言,核因子 KB的激活能促进凋亡。高糖能通过对核因子 KB/JNK/Caspase-3途径的活化和对 Akt/eNOS/NO的抑制诱导内皮细胞凋亡^[16]。

3.2 切应力

切应力是通过应力反应元件来上调 eNOS基因的表达和促进 NO 分泌。其机制为切应力触发了 c-Jun的核转运并使 c-Jun局部集中于核内,但是对于 c-Jun的核定位机制仍未弄清^[17]。切应力对 eNOS基因的激活,还归功于核因子 KB的亚基 p50/p65异源二聚体的核移位,并结合到 eNOS基因启动子上位于 -990到 -984位的应力反应元件(GAGACC),从而促使 eNOS基因转录,增加 NO 的产量。但是,随着 NO 产物的增加,最终会导致 p50蛋白的亚硝基化和核因子 KB作用的抑制,从而终止 eNOS基因的转录。因此核因子 KB的激活机制只适用于受到切应力刺激之后的短暂时间内^[18]。切应力对 eNOS的作用还与转录因子 Foxo-1有关,Foxo-1可被切应力经 Akt介导的磷酸化所灭活,而 Foxo-1的调控反过来也会促使 eNOS基因表达的增加^[19]。

3.3 低氧

低氧可以上调或下调 eNOS基因的表达。低氧会导致机体 ROS产生增加,诱导 c-Jun和 c-fos的表达,氧化还原状态敏感的转录因子 AP-1与 DNA 的结合活性增加,核 AP-1

与 DNA 结合需保守的氧化状态敏感的半胱氨酸通过静电作用与锌原子形成“锌指结构”与 DNA 结合。由于巯基基团对氧化还原状态的敏感性,可调节转录因子 AP-1 的活性。调节作用有正调节和负调节,因此能上调或下调 eNOS 基因的表达。缺氧诱导因子 (hypoxia-inducible factor, HIF) 可结合到 eNOS 基因启动子的 -5375 到 -5366 位上的低氧反应元件 (HRE) 处。低氧时, HIF-2 优先结合到 HRE 反应元件上并且比 HIF-1 在更高的水平上诱导 eNOS 基因表达。但是当 HIF-2 结合了位于 -5523 到 -3555 位置处的 E 盒元件后,它反过来激活那些能够抑制 eNOS 基因启动子的转录因子^[20, 21]。

4 微小核糖核酸与转录因子对内皮型一氧化氮合酶基因表达的调节作用

Shalgı 等^[22]证实转录因子与微小核糖核酸 (microRNA) 间强烈的相互作用可使前馈环路 (feedforward loop, FFL) 形成的几率增加,并发现存在着以下四种 FFL 结构。“FFL TF \rightarrow mRNA”: 这是 iv 型非连贯型 FFL。在外来信号的刺激作用下,靶基因的表达水平首先升高,TF 活化的同时也激活了靶基因的抑制因子 mRNA,随着 mRNA 水平的升高,靶基因的表达也逐渐降至一个非零水平。④“FFL mRNA \rightarrow TF”: 这种结构为 ④ 型连贯型 FFL。这是一种与“FFL TF \rightarrow mRNA”相反的基序。mRNA 直接抑制靶基因,并同时抑制 TF 对靶基因的激活作用。此基序可被用于最大限度地减少时空上基因转录的遗漏。⑤“FFL mRNA \rightarrow TF”: 此基序为 TF 与 mRNA 相互调节。已知 TF 能够正调控或负调控转录,而 mRNA 在大多数情况下抑制基因的表达。mRNA-TF 配偶体间的这种正负相关关系在机械论上是可行的。“间接型 FFL”: 这种情况为 TF 通过一个或一个以上的中介 TF 来实施对 mRNA 的调控。此基序中, mRNA-TF 配偶体在中介 TF 的启动子上有保守的结合位点,同时,中介 TF 在其作用的 mRNA 启动子上也存在着保守的结合位点。不同网络间的 mRNA-TF 配偶体可以此途径连接起来。

eNOS 基因存在多态性,包括某些点突变或片段缺失,如 eNOS 基因启动子中的 T-786 \rightarrow C 点突变和第 4 内含子中缺失一个长度为 27 碱基的重复子 (序列为 5'-AAATGTTAC-CTACATCTGCAACCACA-3')。eNOS 基因中第 4 内含子的 27 碱基重复子在 mRNA 形成的过程中没有被核酸酶降解,以 mRNA 的方式对 eNOS 基因的表达行使重要的内源性调节作用^[23]。血管内皮细胞存在 27 碱基 RNA 片段 (5'-AAAUGUUCACCUACAUCUGCAACCACA-3'), 即 27 碱基 mRNA。27 碱基 mRNA 可能“逃逸”核酸酶的降解,这种幸存的 27 碱基 mRNA 主要分布于胞浆外核膜的周围。这一分布可能具有十分重要的意义,因为无论是 mRNA 从胞核转出还是胞浆中的信号传入核内的过程都可能受到这种 mRNA 的监控。因此,27 碱基 mRNA 是 eNOS 基因转录表达的内源性调节因子,细胞内某些功能性蛋白与 mRNA 协同调控 eNOS 基因的表达。27 碱基 mRNA 能与存在于血管

内皮细胞内的 β -actin 相结合,协同调控 eNOS 基因的转录和表达。当 β -actin 表达减少时,eNOS 基因的表达明显受到抑制,而 β -actin 高表达时,eNOS 的表达增加,这提示 β -actin 的正常表达是 eNOS 基因转录和表达的重要调节因子, β -actin 作为转录因子刺激 eNOS 并且这个转录效应依赖于 27 碱基 mRNA^[24]。因此有理由推测,作用于 eNOS 启动子的转录因子可以像 β -actin 一样与 27 碱基 mRNA 相结合,并且有可能以前馈环路的作用模式来协同调控 eNOS 基因的转录和表达。对转录因子和 27 碱基 mRNA 参与调控 eNOS 基因表达的具体环节和分子机制的探讨,无疑是一种理论上的新突破,并且将会为临床上某些心血管疾病 (如高血压、冠心病) 寻找新的药物或防治措施提供理论依据。

5 问题与展望

随着对 eNOS 基因表达调控机制的不断深入研究,人们对其调控的机制也越来越明晰。除了 eNOS 基因的转录与转录后调节的分子机制外,目前人们的焦点转移到寻求更深一层的调节机制上面。将来研究者们的工作重点也许会是明确每一个与 eNOS mRNA 表达相关的组件及组件间的相互作用。具体阐明外来因素对 eNOS 基因表达的影响、在复杂的 eNOS 基因启动子结构中所发生的改变以及这些改变会使得 eNOS mRNA 的表达发生怎样的变化等,将有助于寻找针对人类一些重大疾病尤其是心血管疾病防治的新途径。

【参考文献】

- Tai SC, Robb GB, Marsden PA. Endothelial nitric oxide synthase: a new paradigm for gene regulation in the injured blood vessel [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; **24**: 405-412
- Charles D, Searles. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression [J]. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; **291**: C803-C816
- Karantzioulis-Fegaras F, Antoniou H, Lai SL, et al. Characterization of the human endothelial nitric-oxide synthase promoter [J]. *J Biol Chem*, 1999; **274** (5): 3 076-093
- Boumber YA, Kondo Y, Chen X, et al. An Sp1/Sp3 binding polymorphism confers methylation protection [J]. *PLoS Genet* 2008; **4** (8): e1000162
- Wierstra I. Sp1: emerging roles-beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes [J]. *Biochim Biophys Res Commun*, 2008; **372** (1): 1-13
- Vicart A, Lefebvre T, Imbert J, et al. Increased chromatin association of Sp1 in interphase cells by PP2A mediated dephosphorylations [J]. *J Mol Biol* 2006; **364** (5): 897-908
- 李黔宁, 应大君, 戴光明, 等. 切应力对内皮细胞组织因子表达上调的影响及其作用机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004; **12** (1): 1-4
- Xing F, Jiang Y, Liu J, et al. Role of AP1 element in the activation of human eNOS promoter by lysophosphatidylcholine [J]. *J Cell Biochem*, 2006; **98** (4): 872-884
- Kumar S, Wedgwood S, Black SM. Nondihydropyridine increases endothelial nitric oxide synthase expression via the transcription factor AP-1 [J]. *DNA Cell Biol* 2007; **26** (12): 853-862
- Gareus R, Kotsaki E, Xanthoulas S, et al. Endothelial cell-specific NF-kappaB inhibition protects mice from atherosclerosis [J]. *Cell Metab* 2008; **8** (5): 372-383
- Rui T, Kviets PR. NFkappaB and AP-1 differentially contribute to the induction of Mn-SOD and eNOS during the development of oxidant tolerance [J]. *FASEB J*, 2005; **19** (13): 1 908-910
- Potente M, Urbich C, Sasaki K, et al. Involvement of Foxo transcription

- factors in angiogenesis and postnatal neovascularization [J]. *J Clin Invest* 2005 **115** (9): 2382-392
- [13] Song J, Ugai H, Nakata-Tsutsui H, et al. Transcriptional regulation by zinc-finger proteins Sp1 and MAZ involves interactions with the same cis-elements [J]. *Int J Mol Med* 2003 **11** (5): 547-553
- [14] Mata-Greenwood E, Jenkins C, Farrow KN, et al. eNOS function is developmentally regulated: uncoupling of eNOS occurs postnatally [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006 **290** (2): L232-L241
- [15] Srinivasan S, Hatley ME, Bolick DT, et al. Hyperglycemia-induced superoxide production decreases eNOS expression via AP-1 activation in aortic endothelial cells [J]. *Diabetologia* 2004 **47** (10): 1727-734
- [16] 牟伦盼, 陈刚. NF- κ B及 JNK 通路与高糖下内皮细胞凋亡 [J]. 国际心血管病杂志, 2007, **34** (5): 330-333
- [17] Morawietz H, Wagner AH, Hecker M, et al. Endothelin receptor B-mediated induction of c-jun and AP-1 in response to shear stress in human endothelial cells [J]. *Can J Physiol Pharmacol* 2008 **86** (8): 499-504
- [18] Gumbach M, Chen W, Mertens SA, et al. A negative feedback mechanism involving nitric oxide and nuclear factor kappa-B modulates endothelial nitric oxide synthase transcription [J]. *J Mol Cell Cardiol* 2005 **39** (4): 595-603
- [19] Chlench S, Mecha D, Isassa N. Regulation of Foxo-1 and the angiotensin-2/Tie2 system by shear stress [J]. *FEBS Lett* 2007 **581** (4): 673-680
- [20] Nanduri J, Yuan C, Kumar GK, et al. Transcriptional responses to intermittent hypoxia [J]. *Respir Physiol Neurobiol* 2008 **164** (1-2): 277-281
- [21] Presley T, Vedam K, Velayutham M, et al. Activation of Hsp90-eNOS and increased NO generation attenuate respiration of hypoxia-treated endothelial cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008 **295** (5): C1281-291
- [22] Shalgi R, Lieber D, Oren M, et al. Global and local architecture of the mammalian microRNA-transcription factor regulatory network [J]. *PLoS Comput Biol* 2007 **3** (7): e131
- [23] Ou H, Shen YH, Utama R, et al. Effect of nuclear actin on endothelial nitric oxide synthase expression [J]. *Arterioscler Thromb Vas Biol* 2005 **25** (12): 2509-514
- [24] Zhang MX, Ou H, Shen YH, et al. Regulation of eNOS expression by small RNA [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005 **102** (47): 1667-672

(此文编辑 许雪梅)

• 征稿征订 •

SCI收录的《中国神经再生研究(英文版)》 (NRR)杂志征订及组稿

NRR 杂志由中国卫生部主管, 中国康复医学会主办, 中国科学出版社出版, 《中国神经再生研究(英文版)》杂志社编辑。主要发表神经再生领域应用基础及临床研究的专业性学术期刊。NRR 杂志为月刊, CN 5422/R, ISSN 1673-5374 国际发行代号 M8761, CODEN: NRREBM。

NRR 杂志从 2008 年 1 月已被科学引文索引 (SCI)、美国生物学文摘数据库 (BP)、美国《化学文摘》(CA)、荷兰《医学文摘库 医学文摘》(EM)、SCOUPS 数据库、波兰《哥伯尼索引》(IC)、中国科技论文统计源期刊、中国科学引文数据库等多家国内外著名数据库收录。

2009 年 NRR 杂志出版重点: 神经损伤修复过

程中原位神经干细胞以及移植的神经干细胞的作用及其机制研究, 神经组织工程、神经退行性疾病组织形态学变化以及中医药对神经细胞、神经组织再生过程中生理、病理及组织结构变化影响的相关研究。NRR 关注全球范围内具有创新性的抑制、促进或影响神经再生结构变化相关机制的研究, 以及由此而发生的一系列功能变化及其相互关系。作为 SCI 收录期刊, NRR 杂志以面向国际、立足国际为宗旨, 以创办好学科界专家公认的学术期刊为不懈的工作目标。

订阅汇款: 沈阳 1234 邮政信箱 邮编: 110004

网站: www. sjzsyj. com

电话: 024-23380579