

# 血管紧张素 II 在翻译后水平影响血管平滑肌细胞缺氧诱导因子 1 $\alpha$ 表达的机制

夏珂<sup>1,2</sup>, 赵震宇<sup>1,3</sup>, 杨天伦<sup>1,4</sup>

(1. 中南大学湘雅医院心内科, 湖南省长沙市 410078; 2. 美国哈佛医学院 BWH 心内科, 美国麻省波士顿 02115;

3. 中南大学临床药理研究所, 湖南省长沙市 410008; 4. 中南大学高血压研究所, 湖南省长沙市 410008)

[关键词] 血管紧张素 II; 缺氧诱导因子 1 $\alpha$ ; 血管内皮生长因子; 脯氨酸羟化酶 2; 缺氧诱导因子 1 抑制因子

[摘要] **目的** 观察血管紧张素 II (Ang II) 对人脐动脉平滑肌细胞 (HUASMC) 缺氧诱导因子 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )、血管内皮生长因子 (VEGF) 以及脯氨酸羟化酶 2 (PHD2)、缺氧诱导因子 1 抑制因子 (FIH-1)、p-ERK 表达的影响, 探讨 PHD2、FIH-1、p-ERK 在 Ang II 作用下对 HIF-1 $\alpha$  表达的影响机制。**方法** HUASMC 分为三组: (1) 对照组: 正常培养基培养细胞 6 h; (2) Ang II 组: 含 Ang II 的培养基 (终浓度为  $10^{-6}$  mol/L) 培养细胞 6 h; (3) Ang II + PD98059 组: 含 PD98059 的培养基 (终浓度为  $10^{-5}$  mol/L) 预处理细胞 1 h 后, 加入含 Ang II 的培养基 (终浓度为  $10^{-6}$  mol/L) 培养细胞 6 h。RT-PCR 检测细胞 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、PHD2、FIH-1 的基因表达; Western blot 检测上述目的蛋白表达及 p-ERK 表达。**结果** (1) 与对照组比较, Ang II 增加 HUASMC 中 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 基因和蛋白表达 ( $P < 0.05$ ), 增加 p-ERK 蛋白表达 ( $P < 0.05$ ), 降低 FIH-1 基因和蛋白表达 ( $P < 0.05$ ), 不影响 PHD2 基因和蛋白表达; (2) 与 Ang II 组比较, ERK 抑制剂 PD98059 降低 HUASMC 中 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 基因和蛋白的表达 ( $P < 0.05$ ) 以及 p-ERK 蛋白的表达 ( $P < 0.05$ ), 增加 FIH-1 的基因和蛋白表达 ( $P < 0.05$ )。**结论** (1) Ang II 增加 HUASMC 中 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 的表达, 该作用通过激活 ERK 通路、抑制 FIH-1 表达, 在翻译后水平减少 HIF-1 $\alpha$  的降解所致; (2) ERK 抑制剂可削弱 Ang II 的促 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 表达作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## The Post-translational Affection and the Mechanism of Angiotensin II on Hypoxia-Inducible Factor-1 Expression in Human Umbilical Artery Smooth Muscle Cells

XIA Ke<sup>1,2</sup>, ZHAO Zhen-Yu<sup>1,3</sup>, and YANG Tian-Lun<sup>1,4</sup>

(1. Cardiology Department, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410078, China; 2. Division of Cardiology, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston 02115, USA; 3. Institute of Clinical Pharmacology, Central South University, Changsha, Hunan 410008, China; 4. Institute of Clinical Pharmacology, Central South University, Changsha, Hunan 410008, China)

[KEY WORDS] Angiotensin II; Hypoxia-Inducible Factor-1; Vascular Endothelial Growth Factor; Prolyl Hydroxylases; Factor Inhibiting Hypoxia-Inducible Factor-1

[ABSTRACT] **Aim** To observe the affection of angiotensin II (Ang II) on hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1 $\alpha$ ), vascular endothelial growth factor (VEGF), prolyl hydroxylases-2 (PHD2), factor inhibiting hypoxia-inducible factor-1 (FIH-1), and p-ERK expression in human umbilical artery smooth muscle cells (HUASMC), and clarify the mechanism of PHD2, FIH-1, and p-ERK on HIF-1 $\alpha$  expression on the condition of Ang II. **Method** HUASMC were divided into: (1) Control group: normal culture medium for 6 hours; (2) Ang II group:  $10^{-6}$  mol/L Ang II culture medium for 6 hours; (3) Ang II + PD98059 group:  $10^{-5}$  mol/L PD98059 added 1 hour before  $10^{-6}$  mol/L Ang II, and then for 6 hours. Gene expression of HIF-1 $\alpha$ , VEGF, PHD2 and FIH-1 were checked by real-time PCR, and the corresponding proteins of above factors, and the p-ERK activation were checked with Western blot. **Results** (1) Compared with control group, Ang II promoted both gene and protein expression of HIF-1 $\alpha$  and VEGF ( $P < 0.05$ ), and activated p-ERK ( $P < 0.05$ ),

[收稿日期] 2014-01-22

[作者简介] 夏珂, 博士, 研究方向为心血管疾病防治, E-mail 为 zyakk@163.com。通讯作者杨天伦, 博士研究生导师, 研究方向为心血管疾病防治, E-mail 为 tianlun@163.com。

with the decreased FIH-1 gene and protein expression ( $P < 0.05$ ), but has no effect on PHD2 gene and protein expression in HUASMC. (2) Compared with Ang II group, both gene and protein expression of HIF-1 $\alpha$ , VEGF and the p-ERK activation were significantly reduced ( $P < 0.05$ ), with the increased gene and protein expression of FIH-1 ( $P < 0.05$ ) in HUASMC. **Conclusions** (1) Ang II promoted both gene and protein expression of HIF-1 $\alpha$  and VEGF in HUASMC. Its mechanism is that activated ERK pathway inhibited FIH-1, leading post-translational reduction of degradation of HIF-1 $\alpha$ . (2) ERK inhibitor weakened the promoted affection of Ang II on HIF-1 $\alpha$  and VEGF.

肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 的激活引起高血压, 血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 作为该系统的最终效应分子, 可上调人脐动脉平滑肌细胞 (human umbilical artery smooth muscle cells, HUASMC) 缺氧诱导因子 1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1 $\alpha$ ) 的表达, 增加其下游血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达, 具有促 HUASMC 增殖<sup>[1]</sup> 的作用, 是导致高血压血管阻力增加的原因之一。HIF-1 $\alpha$  是缺氧调节中的重要因子, 其表达主要受氧浓度影响, 低氧可在转录和翻译水平激活 HIF-1 $\alpha$  的表达, 对其下游基因进行调节, 产生一系列代偿或病理反应, 在氧稳态调节、低氧适应等方面发挥重要作用。此外, Ang II、凝血酶等非缺氧刺激也能上调 HIF-1 $\alpha$  的表达<sup>[2]</sup>。Ang II 可通过不同机制在转录或翻译水平影响 HIF-1 $\alpha$  的表达<sup>[3]</sup>, 也可在翻译后水平影响细胞 HIF-1 $\alpha$  的稳态, 如: 在翻译后水平影响 HIF-1 $\alpha$  的羟化。脯氨酸羟化酶 (prolyl hydroxylases, PHD) 和缺氧诱导因子 1 抑制因子 (factor inhibiting hypoxia-inducible factor-1, FIH-1) 是羟化 HIF-1 $\alpha$  的关键酶。哺乳动物有 3 种 PHD: 即 PHD1、PHD2 和 PHD3, 其相对活性大小为 PHD2 > PHD3 > PHD1, PHD2 对 HIF-1 $\alpha$  的调节呈氧依赖性, 是常氧状态下维持 HIF-1 $\alpha$  稳态水平的关键限制酶<sup>[4]</sup>。常氧时 PHD2 与 FIH-1 羟化 HIF-1 $\alpha$ , 使之迅速降解; 缺氧时, PHD2 失去活性、FIH-1 酶活性受抑制, HIF-1 $\alpha$  降解受阻, 在胞内积聚并转位入核, 促进其下游低氧反应基因的转录, 引起细胞对低氧的一系列反应。Pagé 等<sup>[5]</sup> 研究表明, 在 HUASMC 中, Ang II 通过调节细胞内抗坏血酸浓度改变 PHD2 的活性, 在翻译后水平改变 HIF-1 $\alpha$  的羟化, 影响胞内 HIF-1 $\alpha$  的稳定性, PHD2 基因与蛋白的表达不受 Ang II 的影响。Ang II 对 HUASMC 中 FIH-1 的影响及其具体机制如何尚未见报道。本研究拟通过观察 Ang II 对 HUASMC 中 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 以及 PHD2、FIH-1 和 p-ERK 表达的影响, 探讨 PHD2、FIH-1、p-ERK 在 Ang II 影响 HIF-1 $\alpha$  表达中的作用; 并用 ERK 信号通路抑制剂 PD98059 阻断 ERK 信号通路激活, 探讨

ERK 通路在 Ang II 作用下介导 FIH-1 影响 HIF-1 $\alpha$  的可能机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料

HUASMC 购于美国 Scien Cell 公司; Ang II 购于美国 Sigma 公司; 细胞培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、RIPA 裂解液购于瑞典 Gibco 公司; 青霉素和链霉素购于美国 Sigma 公司; 兔抗 HIF-1 $\alpha$ 、兔抗 PHD2 购于瑞典 Novus Bioscience 公司; 兔抗 VEGF、兔抗 FIH-1 购于英国 Abingdon 公司; HRP 标记的二抗购于瑞典 Amersham Biosciences 公司; PVDF 膜购于美国 Millipore 公司; ECL 显色试剂盒购于 GE Healthcare 公司。

### 1.2 HUASMC 的复苏、传代培养及分组

将细胞冻存管从液氮中取出, 迅速复温到 37℃, 将细胞悬液吸入 15 mL 离心管, 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 以含 20% 胎牛血清的细胞培养基 15 mL 吹打, 制成细胞悬液, 用 5 mL 移液器转移细胞悬液至一次性细胞培养瓶中, 放入 37℃、5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。待细胞生长融合 80% 时, 吸出培养液, PBS 轻轻洗涤 3 次, 加入胰蛋白酶 1 mL 消化 2~3 min 弃胰酶, 加入含 10% 胎牛血清的细胞培养基终止消化, 用 5 mL 移液器吹打, 使细胞完全脱落, 并吹打混匀。取 0.1 mL 消化液, 倒置显微镜下观察计数, 调整细胞数为  $5 \times 10^8$ /L, 将细胞悬液接种于新的培养瓶中, 每 24 h 换液一次。细胞分为 3 组: (1) 对照组: 正常培养基培养细胞 6 h; (2) AngII 组: 含 AngII 的培养基 (终浓度为  $10^{-6}$  mol/L) 培养细胞 6 h; (3) AngII + PD98059 组: 含 PD98059 的培养基 (终浓度为  $10^{-5}$  mol/L) 预处理细胞 1 h 后, 加入含 AngII 的培养基 (终浓度为  $10^{-6}$  mol/L) 培养细胞 6 h。

### 1.3 Real Time PCR 检测 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、PHD2 和 FIH-1 基因表达

Trizol 法提取细胞 RNA, 逆转录成 cDNA, 以  $\beta$ -actin 为内参行 Real Time PCR, 记录 Ct 值, 分别检测 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 以及 PHD2、FIH-1 的基因表达。HIF-

1 $\alpha$  上、下游引物分别为 5'-TGC TTG GTG CTG ATT TGT GA-3'和 5'-GGT CAG ATG ATC AGA GTC CA-3',产物长度 209 bp。VEGF 上、下游引物分别为 5'-CCT CCG AAA CCA TGA ACT TT-3'和 5'-AGA GAT CTG GTT CCC GAA AC-3',产物长度 637 bp。PHD2 上、下游引物分别为 5'-CTC ACT GAC CTA CGC CGT GT-3'和 5'-CGC ATC TTC CAT CTC CAT TT-3'。FIH-1 上、下游引物分别为 5'-ACA GTG CCA GCA CCC ACA AC-3'和 5'-GCC CAC AGT GTC ATT GAG CG-3'。PCR 条件为:95℃ 变性 5 min,94℃ 20 s,72℃ 20 s,72℃ 5 min,55℃ 10 s,40 个循环。内参  $\beta$ -actin 上、下游引物分别为 5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA-3'和 5'-CTT CCT TAA TGT CAC CCA CGA TTT C-3',产物长度 540 bp,其 PCR 条件为:94℃ 变性 5 min,94℃ 30 s,66℃ 45 s,72℃ 45 s,72℃ 10 min,40 个循环。

#### 1.4 Western blot 检测 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、PHD2、FIH-1、ERK 和 p-ERK 的蛋白表达

分组处理细胞后,弃培养基,PBS 洗 2 次,加 RIPA 裂解液,冰孵 30 min,4℃ 12000 r/min 离心 20 min,收取上清液分装于 -80℃ 备用。取总蛋白 60  $\mu$ g,100℃ 煮沸 5 min,10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,转印到 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶封闭 60 min,加一抗(稀释度 1:1000),4℃ 过夜,HRP 标记的二抗孵育 1 h,TBS-T 漂洗 5 次(每次 5 min)。ECL 试剂盒显影,X 线片扫描后,Image J 图像分析软件分析。

#### 1.5 统计学分析

数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,SPSS 17.0 软件进行统计分析。多组间比较用 ANOVA 方差分析,组间比较用独立样本  $t$  检验;双侧  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、PHD2 和 FIH-1 基因的表达

与对照组比较,Ang II 组 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 基因表达显著增加,FIH-1 基因表达降低( $P$  均  $< 0.05$ ),PHD2 基因表达无显著变化。与 Ang II 组比较,Ang II + PD98059 组 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 基因表达显著降低,FIH-1 基因表达增加( $P$  均  $< 0.05$ ),同样 PHD2 基因表达无明显改变(图 1)。

### 2.2 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、PHD2、FIH-1 及 ERK、p-ERK 蛋白的表达

与对照组比较,Ang II 组 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 蛋白表达显著增加,FIH-1 蛋白表达显著降低( $P$  均  $< 0.05$ ),而 PHD2 蛋白和 ERK 蛋白表达无显著变化,但磷酸

化 ERK (p-ERK) 蛋白表达显著增加( $P < 0.05$ )。与 Ang II 组比较,Ang II + PD98059 组 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 蛋白表达显著降低,FIH-1 蛋白表达显著增加( $P$  均  $< 0.05$ ),而 PHD2 蛋白和 ERK 蛋白表达无明显改变,p-ERK 蛋白表达显著降低( $P < 0.05$ ;图 2)。

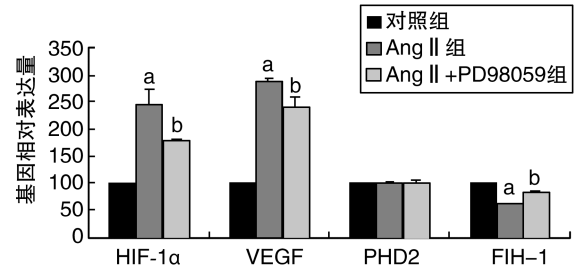


图 1. 各不同处理组 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、PHD2、FIH-1 基因相对表达量 a 为  $P < 0.05$ ,与对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与 Ang II 组比较。

Figure 1. Gene expression of HIF-1 $\alpha$ , VEGF, PHD2 and FIH-1 in different groups

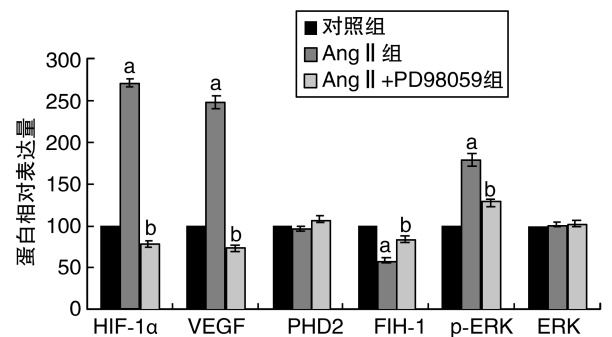
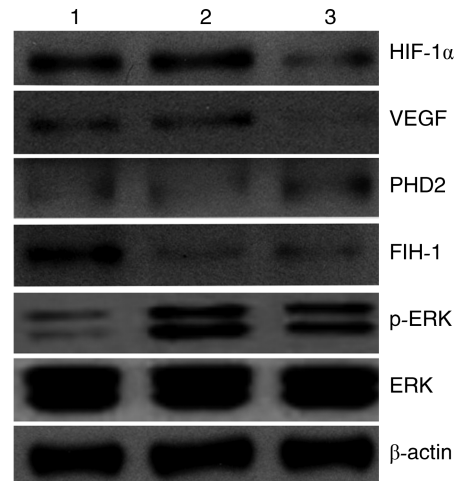


图 2. 各不同处理组 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、PHD2、FIH-1 及 ERK、p-ERK 蛋白的表达 1 为对照组,2 为 Ang II 组,3 为 Ang II + PD98059 组。a 为  $P < 0.05$ ,与对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与 Ang II 组比较。

Figure 2. Protein expression of HIF-1 $\alpha$ , VEGF, PHD2, FIH-1, ERK and p-ERK in different groups

### 3 讨论

高血压时 Ang II 与其受体 AT1R 结合后通过多条信号通路促进平滑肌细胞增殖、向内膜迁移,是导致血管阻力增大的原因之一。Ang II 上调 HIF-1 $\alpha$  的表达后促进 HIF-1 $\alpha$  下游靶基因 VEGF 的表达,在平滑肌细胞增殖中起重要作用。与以往研究一致<sup>[1,6]</sup>,我们的结果显示,Ang II 处理的 HUASMC 中 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 的表达均显著增加,说明 Ang II 上调 HIF-1 $\alpha$  表达,具有促 VEGF 表达的作用。

HIF-1 $\alpha$  是细胞缺氧时被诱导产生的关键因子,通过激活其下游近 100 多种与缺氧相关基因的转录,在缺氧适应性反应和损伤中起重要作用。HIF-1 $\alpha$  翻译后水平的调节受氧浓度影响:常氧时,HIF-1 $\alpha$  被氧依赖性与氧非依赖性通路所激活的酶降解,几乎无活性;细胞缺氧时,堆积在胞浆的 HIF-1 $\alpha$  入核,与靶基因 DNA 结合,发挥其转录激活功能。

PHD2 是翻译后水平调节 HIF-1 $\alpha$  的限速酶,通过羟化 HIF-1 $\alpha$  促进其降解<sup>[7]</sup>。我们发现,Ang II 组 HIF-1 $\alpha$  表达虽增加,但 PHD2 基因和蛋白表达无显著变化。根据 Pagé 等<sup>[5]</sup>研究结果,需考虑 Ang II 不影响 PHD2 基因和蛋白表达,但不排除其它因素参与 Ang II 对 HIF-1 $\alpha$  的调节作用。

FIH-1 是另一种在翻译后水平通过羟化 HIF-1 $\alpha$  而影响其稳态的关键酶。FIH-1 的蛋白表达在组织细胞中比较稳定<sup>[8]</sup>,对低氧的耐受性比 PHD2 强,0.2% 的低氧处理可使 PHD2 的羟化作用失活,但 FIH-1 的羟化作用仍存在<sup>[9]</sup>,缺氧不改变 FIH-1 蛋白的表达<sup>[10]</sup>。有研究表明 FIH-1 的转录活性受 PKC 信号通路的影响,活化的 PKC 通过与 FIH-1 基因 DNA 的 CDP/Cut 相结合,可抑制 FIH-1 的转录活性<sup>[11]</sup>。结果显示,Ang II 显著降低 HUASMC 中 FIH-1 基因和蛋白表达的同时,显著激活 ERK 信号通路,增加 p-ERK 蛋白表达;用 ERK 抑制剂 PD98059 阻断 ERK 信号通路的活化后,p-ERK 蛋白表达显著降低,FIH-1 表达上调,HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 表达均下降。提示 ERK 通路对 FIH-1 的影响趋势与 PKC 通路的影响趋势类似:ERK 信号通路激活后磷酸化的 ERK 介导 Ang II 下调 FIH-1 的表达,使 HIF-1 $\alpha$  的降解减少,增加细胞内 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达以及 VEGF 基因和蛋白表达,这可能是 Ang II 上调 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达的机制;然而 ERK 信号通路介导 Ang II 下调 FIH-1 表达的具体作用机制有待进一步研究。同时,HUASMC 中 HIF-1 $\alpha$  基因表达上调并不能单一地归于

FIH-1 表达下降所致,可能 Ang II 本身从转录水平上调了 HIF-1 $\alpha$  的基因表达<sup>[3]</sup>。

综上所述,我们发现磷酸化 ERK 信号通路介导 Ang II 下调 HUASMC 中 FIH-1 基因和蛋白表达,该表达的下调可能是 Ang II 上调 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达的机制之一;ERK 抑制剂削弱了 Ang II 对 HUASMC 中 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 表达的诱导作用。这些结果为防治高血压 Ang II 促血管平滑肌细胞增殖提供了新思路。

### [参考文献]

- [1] Richard DE, Berra E, Pouyssegur J. Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells[J]. J Biol Chem, 2000, 275 (35): 26 765-771.
- [2] Görlach A, Diebold I, Schini-Kerth VB, et al. Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: role of the p22 (phox)-containing NADPH oxidase [J]. Circ Res, 2001, 89 (1): 47-54.
- [3] Pagé EL, Robitaille GA, Pouyssegur J, et al. Induction of hypoxia-inducible factor-1 by transcriptional and translational mechanisms [J]. J Biol Chem, 2002, 277 (50): 48 403-409.
- [4] Su Y, Loos M, Giese N, et al. Prolylhydroxylase-2 (PHD2) exerts tumor-suppressive activity in pancreatic cancer[J]. Cancer, 2012, 118 (4): 960-972.
- [5] Pagé EL, Chan DA, Giaccia AJ, et al. Hypoxia-inducible factor-1 alpha stabilization in nonhypoxic conditions: role of oxidation and intracellular ascorbate depletion[J]. Mol Biol Cell, 2008, 19 (1): 86-94.
- [6] Lauzier MC, Pagé EL, Michaud MD, et al. Differential regulation of hypoxia-inducible factor-1 through receptor tyrosine kinase transactivation in vascular smooth muscle cells [J]. Endocrinology, 2007, 148 (8): 4 023-031.
- [7] McMahon S, Charbonneau M, Grandmont S, et al. Transforming growth factor beta1 induces hypoxia-inducible factor-1 stabilization through selective inhibition of PHD2 expression[J]. J Biol Chem, 2006, 281 (34): 24 171-181.
- [8] Bracken CP, Fedele AO, Linke S, et al. Cell-specific regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha stabilization and transactivation in a graded oxygen environment [J]. J Biol Chem, 2006, 281 (32): 22 575-585.
- [9] Stolze IP, Tian YM, Appelhoff RJ, et al. Genetic analysis of the role of the asparaginyl hydroxylase factor inhibiting hypoxia-inducible factor (HIF) in regulating HIF transcriptional target genes[J]. J Biol Chem, 2004, 279 (41): 42 719-725.
- [10] Fukuba H, Yamashita H, Nagano Y, et al. Siah-1 facilitates ubiquitination and degradation of factor inhibiting HIF-1alpha (FIH) [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 353 (2): 324-329.
- [11] Li J, Wang E, Dutta S, et al. Protein kinase C-mediated modulation of FIH-1 expression by the homeodomain protein CDP/Cut/Cux[J]. Mol Cell Biol, 2007, 27 (20): 7 345-353.

(此文编辑 许雪梅)