

转录因子 GATA 家族在人血管内皮细胞中的表达

曾巧慧¹, 徐 令¹, 麦友刚¹, 冯淑英²

(中山大学附属第二医院 1.儿科, 2.妇产科, 广东 广州 510120)

摘 要:【目的】了解转录因子 GATA 家族在人血管内皮细胞中表达的情况。【方法】体外培养人的脐静脉内皮细胞(HUVECs)、主动脉内皮细胞(HAECs)、肺动脉内皮细胞(HPAECs)及肠系膜动脉内皮细胞(HMAECs) 4 种血管内皮细胞, 取 1×10^6 个上述细胞采用 RT-PCR 法检测转录因子 GATA 家族 mRNA 在人的上述四种血管内皮细胞中的表达情况并对结果进行定性分析。【结果】GATA-2 mRNA 及 GATA-3 mRNA 在上述 4 种血管内皮细胞中均表达, GATA-2 mRNA 及 GATA-3 mRNA 在大部分血管内皮细胞中表达, 仅 HUVECs 细胞中未能检测到 GATA-4 的表达, HMAECs 未能检测到 GATA-6 的表达。而在 HUVEC、HAEC、HPAECs 及 HMAECs 4 种血管内皮细胞均未检测到 GATA-1 mRNA 及 GATA-5 mRNA 的表达。【结论】转录因子 GATA 家族在人不同血管内皮细胞中的表达是不一致的, GATA-2 及 GATA-3 在上述 4 种血管内皮细胞中均表达, 它们可能参与血管内皮细胞的基因调控。

关键词: GATA; 转录因子; 血管内皮细胞

中图分类号: R329

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2008)3S-0009-03

1988 年 Evans 等^[1]首次报道鸡的珠蛋白基因启动子上含有(T/A)GATA(A/G)序列, 接着又先后发现了与之结合的转录因子 GATA-1、GATA-2、GATA-3、GATA-4、GATA-5 及 GATA-6^[2-6], 这 6 个 GATA 转录因子组成了 GATA 家族。而 Tie 2 (tyrosine kinase receptors with immunoglobulin and EGF homology domains receptors 2) 是血管生成素-1 (angiopoietin-1, Ang-1) 内皮细胞特异的酪氨酸激酶受体, 两者结合促进血管的成熟。Tie 2 基因启动子包含 3 个转录因子 GATA 结合位点, 但转录因子 GATA 家族在正常人不同的血管内皮细胞中的表达如何? 以及是否对 Tie 2 基因功能具有调控作用? 国内外还未见报道。为了了解转录因子 GATA 家族在正常人的血管内皮细胞中的表达情况, 本研究采用 RT-PCR 的方法检测转录因子 GATA 家族在人原代的脐静脉内皮细胞 (HUVECs)、主动脉内皮细胞 (HAECs)、肺动脉内皮细胞 (HPAECs) 及肠系膜动脉内皮细胞 (HMAECs) 的 mRNA 表达情况, 为进一步研究转录因子 GATA 家族是否参与了人血管内皮细胞的基因调控打下基础。

1 材料与方 法

1.1 培养细胞

原代人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)、人主动脉内皮细胞 (human aortic endothelial cells, HAECs)、肺动脉内皮细胞 (human pulmonary artery endothelial cells, HPAECs) 及肠系膜动脉内皮细胞 (human mesenteric artery endothelial cells, HMAECs) 细胞株均购自 Clonetics 公司, 并根据试剂盒说明

在 EGM-MV 培养液 (Clonetics 公司) 中培养。细胞均常规在 5% CO₂ 及 37 °C 条件下孵育, 隔天换液。

1.2 RNA 提取和 RT-PCR

采用 TRIzol 试剂盒 (Gibco/Brl), 取 1×10^6 个细胞按说明提取总 RNA, 用 Oligo (dT)20 为引物 (Gibco/Brl) 将 1 μ g RNA 逆转录成 cDNA。PCR 扩增 cDNA, 反应体系为 20 μ L (cDNA 1 μ L, 引物浓度 5 ng/ μ L, *Taq* 酶 1 U/L (Promega), dNTP 200 μ mol/L, 1 ~ 2 mmol/L MgCl₂)。

GATA1-6 及 GAPDH 的引物序列

名称	上游引物	下游引物
GATA-1	5'-CAG TAA ACG AGC AGG TAC TC-3'	5'-CAT AAA GCC ACC AGC TGG TC-3'
GATA-2	5'-GAA GAG CCG GCA CCT GTT GT-3'	5'-GGA TGA CTT CTC CTG CAT GC-3'
GATA-3	5'-GAA TGC CAA TGG GGA CCC TG-3'	5'-CTA ACC CAT GGC GGT GAC CA-3'
GATA-4	5'-CCA AAC CAG AAA.ACG.GAA.CCC-3'	5'-AGA CAT CCG ACT GAC TGA GAA CG-3'
GATA-5	5'-GAA CAG CCT GGA ACA GAC CA-3'	5'-TCC CTC ACC AGC CTT CTT GC-3'
GATA-6	5'-TGG ATT GTC CTC TGC CAA CTG-3'	5'-TGG GGG AAG TAT TTT TGC TGC-3'
GAPDH	5'-CAA ACT TGT CAT GGA TGA CC-3'	5'-CCA TGG AGA AGG CTC GGG-3'

PCR 扩增法采用温空器 PTC-100 (MJ Research Inc), 方法如下: 94 °C 1 min, 56 ~ 65 °C (根据不同引物选择适合的条件) 1 min, 72 °C 7 min, 30 ~ 35 个循环。取 10 μ L PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外照相。

2 结 果

如图 1 示, 人的上述四种血管内皮细胞中均表达 GATA-2 mRNA 及 GATA-3 mRNA, 而 GATA-4 mRNA 及 GATA-6 mRNA 在大部分血管内皮细胞中表达, 仅 HUVECs 细胞中

收稿日期: 2008-04-01

基金项目: 广东省自然科学基金 (06023171, 5100992)

作者简介: 曾巧慧 (1970-), 女, 广东五华人, 硕士, 主治医师; 徐令, 通讯作者, 副研究员, E-mail: luoxul64@yahoo.com

未能检测到 GATA-4 的表达, HMAECs 未能检测到 GATA-6 的表达。在 HUVEC、HAEC、HPAECs 及 HMAECs 四种血管内皮细胞上均未检测到 GATA-1 mRNA 及 GATA-5 mRNA 的表达。

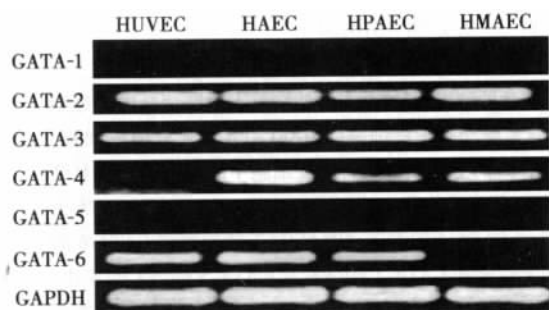


图 1 GATA1-6 mRNA 在 HUVEC、HAEC、HPAECs 及 HMAECs 上的表达

3 讨论

GATA 家族是一类具有锌指的结构转录因子, 其共同特点是对一致性序列(T/A)GATA(A/G)具有高度亲和性, 其家族成员在动物、真菌、植物等生物中广泛存在。GATA 转录因子分为两类, GATA-1/2/3 和 GATA-4/5/6, 它们有完全不同又相互重叠的作用模式。有关转录因子 GATA 家族在人体的各种生理病理中的作用已成当今研究的热点之一, 认为转录因子 GATA 家族可能在造血细胞的调控、心血管疾病及肿瘤等多种疾病的发生发展中起着重要作用, 随着对转录因子 GATA 家族的深入研究, 可能为上述疾病找到新的治疗靶点。

血管增生是人体在多种病理状态下, 如创伤的修复、关节炎、冠状动脉缺血、肿瘤等, 产生炎症反应时存在的一种基本而重要的现象。血管增生有时能减轻病情, 如冠状动脉缺血时, 新生的血管能减轻心肌缺血及组织损伤; 但也能加重病情, 如加速肿瘤生长。因此人类若能够在人体病理状态时根据需要来调控血管增生, 则可能为许多难治性疾病提供新的治疗方法。Tie 2 与内皮细胞上的血管生成素-1 结合能促进血管的成熟。研究发现低氧及炎症的刺激可导致局部血管增生, Tie 2 基因的表达上调, 但调控 Tie 2 基因的分子机制目前尚不明了^[7]。已知人类 Tie 2 基因启动子包含 3 个转录因子 GATA 结合位点, 是否参与 Tie 2 基因的调控呢? 为此, 我们应了解正常生理状态下转录因子 GATA 家族在人类血管内皮细胞上的表达状况。我们采用了 RT-PCR 的方法检测转录因子 GATA mRNA 在人的原代脐静脉内皮细胞(HUVECs)、主动脉内皮细胞(HAECs)、肺动脉内皮细胞(HPAECs)及肠系膜动脉内皮细胞(HMAECs)上的表达情况。结果发现 HUVECs、HAECs、HPAEC 及 HMAECs 等四种内皮细胞均表达 GATA-2 及 GATA-3; 除了 HUVECs 不表达 GATA-4 外, HAECs、HPAEC 及 HMAECs 均表达 GATA-4, 而 HUVEC、HAEC、HPAECs 均表达 GATA-6, 但 HMAECs 除外; 上述四种血管内皮细胞中均未检测到 GATA-1 及

GATA-5 的表达。结果显示转录因子 GATA 家族在血管内皮细胞中的表达是不一致的, 转录因子 GATA-2 及 GATA-3 在人血管内皮细胞上的广泛表达。现已明确多种转录因子在介导炎症反应中起作用, 其中包括 ETS、Egr-1、C/EBP 等^[8]。研究^[9]发现炎症性细胞因子及内毒素的刺激能诱导某些细胞表达 ESE-1(转录因子 ETS 成员之一), 而后者能调节一氧化氮合成酶基因的表达形式, 从而调节炎症反应。Dube 等^[10]发现转录因子 E1f-1(转录因子 ETS 的一种亚型)在血管的发育中能调控 Tie2 基因的表达。GATA-3 内显子表达缺陷的哮喘模型鼠的气道炎症程度显著降低^[11], 国内学者^[12]研究也发现哮喘发作时 GATA-3 的表达增高, 使用药物抑制 GATA-3 的表达, 可以纠正哮喘 Th1/Th2 的失衡。可见 GATA 因子在炎症反应中起着重要的调控作用, 研究也表明转录因子 GATA 在造血细胞的调控中起重要作用^[13]。而本研究结果显示转录因子 GATA-2 及 GATA-3 在人血管内皮细胞上的广泛表达, 那么转录因子 GATA 家族是否通过 GATA-2 及 GATA-3 调控 Tie 2 基因功能, 从而调控血管的生成? 转录因子 GATA 家族与炎症性细胞因子的关系或其他转录因子的关系又如何? 上述问题均有待进一步探讨。

结论: 转录因子 GATA 家族在人不同血管内皮细胞中的表达水平是不一致的, GATA2 及 GATA-3 在上述四种血管内皮细胞中均表达, 它们可能参与人类血管内皮细胞基因的调控, 为进一步研究转录因子 GATA 家族是否参与了人血管内皮细胞基因的调控提供了研究基础, 并可进一步研究转录因子 GATA 家族与炎症性细胞因子及其他转录因子的关系。

参考文献:

- [1] Evans T, Reitman M, Felsenfeld G. An erythrocyte-specific DNA-binding factor recognizes a regulatory sequence common to all chicken globin genes [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85(16): 5976-5980.
- [2] Tsai SF, Martin DI, Zon LI, et al. Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells [J]. Nature, 1989, 339(6224): 446-451.
- [3] Dorfman DM, Wilson DB, Bruns GA, et al. Human transcription factor GATA-2. Evidence for regulation of preendothelin-1 gene expression in endothelial cells [J]. J Biol Chem, 1992, 267(2): 1279-1285.
- [4] Marine J, Winoto A. The human enhancer-binding protein Gata3 binds to several T-cell receptor regulatory elements [J]. Proc Natl Acad Sci, 1991, 88(16): 7284-7288.
- [5] Heikinheimo M, Scandrett JM, Wilson DB. Localization of transcription factor GATA-4 to regions of the mouse embryo involved in cardiac development [J]. Dev Biol, 1994, 164(2): 361-373.
- [6] Laverriere AC, Macneill C, Mueller C, et al. GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut [J]. J Biol Chem, 1994, 269(37):

- 23177-23184.
- [7] Christensen RA, Fujikawa K, Madore R, et al. NERF2, a member of the Ets family of transcription factors, is increased in response to hypoxia and angiopoietin-1: a potential mechanism for Tie2 regulation during hypoxia [J]. *J Cell Biochem*, 2002, 85(3):505-515.
- [8] Hanada T, Yoshimira A. Regulation of cytokine signaling and inflammation [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2002, 13(4-5): 413-421.
- [9] Rudders S, Gaspar J, Madore R, et al. ESE-1 is a novel transcriptional mediator of inflammation that interacts with NF-kappa B to regulate the inducible nitric-oxide synthase gene [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(5):3302-3309.
- [10] Dube A, Thai S, Gaspar J, et al. Elf-1 is a transcriptional regulator of the Tie2 gene during vascular development [J]. *Circ Res*, 2001, 88(2):237-244.
- [11] Zhang DH, Yang I, Cohn I, et al. Inhibition of allergic inflammation in a murine model of asthma by expression of a dominant-negative mutant of GATA-3 [J]. *Immunity*, 1999, 11(4): 473-482.
- [12] 吉宁飞, 卞涛, 符晓苏, 等. 殷凯生川芎嗪对支气管哮喘大鼠肺组织转录因子 GATA-3 表达的影响 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2006, 29(12):852-853.
- [13] Wozniak RJ, Boyer ME, Grass JA, et al. Context-dependent GATA factor function: combinatorial requirements for transcriptional control in hematopoietic and endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(19):14665-14674.

(编辑 刘清海)

不同剂量苯那普利对自发性高血压大鼠肾小球硬化的影响

石成钢, 尹琼丽, 成彩联, 洪国保, 施 杰
(中山大学附属第三医院肾内科, 广东广州 510630)

摘要:【目的】观察超大剂量血管紧张素转化酶抑制剂干预能否进一步抑制肾小球硬化。【方法】30只8周龄雄性自发性高血压大鼠随机分为模型对照组(M组),大剂量(10 mg·kg⁻¹·d⁻¹)苯那普利治疗组(LT组),超大剂量(50 mg·kg⁻¹·d⁻¹)苯那普利治疗组(HT组),以10只Wistar-Kyoto大鼠(Wistar-Kyoto rats, WKY)为正常对照组(N组)。检测各组大鼠的血压、血清肌酐及24h尿蛋白;RT-PCR和免疫组织化学方法分别检测肾组织转化生长因子-β₁(transforming growth factor, TGF-β₁)和纤溶酶原激活物抑制因子(Plasminogen Activator Inhibitor, PAI-1)的mRNA和蛋白表达;肾组织石蜡切片评估肾小球胶原沉积程度,采用MASSON染色。【结果】1)TGF-β₁和PAI-1的mRNA和蛋白表达:LT组和HT组的TGF-β₁和PAI-1的mRNA和蛋白表达被抑制($P < 0.01$);两治疗组间无统计学差异($P > 0.05$)。2)肾小球胶原沉积:LT组和HT组的胶原面积/肾小球面积比值均明显减低($0.17 \pm 0.15, 0.18 \pm 0.11$ vs 0.30 ± 0.28 ; $P = 0.001$);两治疗组间无统计学差异(0.17 ± 0.15 vs 0.18 ± 0.11 ; $P = 0.404$)。【结论】大剂量与超大剂量血管紧张素转化酶抑制剂均能降低血压,减少蛋白尿,抑制肾组织TGF-β₁和PAI-1的mRNA和蛋白表达,延缓肾小球硬化;但超大剂量血管紧张素转化酶抑制剂不能进一步的抑制肾小球硬化。

关键词: 血管紧张素转化酶抑制剂; 肾小球硬化; 转化生长因子-β₁; 纤溶酶原激活物抑制因子

中国分类号:R692 文献标识码:A 文章编号:1672-3554(2008)3S-0011-04

血管紧张素转化酶抑制剂(angiotensin-converting enzyme inhibitor, ACEI)能减少蛋白尿,减轻细胞外基质沉积,从而延缓肾小球硬化(glomerulosclerosis, GS)的进展已被大量研究证实^[1-3]。迄今已有大量关于ACEI对肾保护作用的临床及动物实验研究,就ACEI治疗剂量而言,过去大部分研究结果^[4]显示:大剂量ACEI的肾保护作用优于常规剂量。但在超大剂量ACEI对肾小球硬化的影响方面,研究不多,并存在争议。本实验设计将大剂量与超大剂量苯那普利(benazepril)进行比较观察,探讨超大剂量ACEI能否进一步抑制肾小球硬化。

1 材料与方法

1.1 材料

TRIZON试剂购自Invitrogene公司,逆转录试剂盒购自Fermentas公司,Taq酶购自Takara公司,苯那普利(商品名:洛汀新),购自瑞士诺华制药有限公司。

1.2 动物分组

8周龄自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rat, SHR)30只,质量170~220g,购自北京维通利华动物

收稿日期:2008-01-17

基金项目:广东省自然科学基金(05001702)

作者简介:石成钢(1963-),男,安徽安庆人,医学博士,副主任医师, E-mail:ericshi412@sina.com