

过表达 CREB 减轻内皮细胞氧化应激损伤

屈顺林¹, 范文静³, 郭芳¹, 韦星¹, 姜志胜²

(1. 南华大学病理生理教研室, 湖南衡阳 421001; 2. 南华大学心血管病研究所
动脉硬化化学湖南省重点实验室; 3. 南华大学附属第二医院)

摘要: **目的** 探讨过表达 cAMP 反应元件结合蛋白(CREB)在内皮细胞氧化损伤中的作用。 **方法** 建立 H₂O₂ 诱导的血管内皮细胞损伤模型, 将内皮细胞 ECV304 分为对照组、H₂O₂ 组、转染 PCI 空载体组、转染 PCI 空载体 + H₂O₂ 组、转染 PCI-CRESAP 组和转染 PCI-CREB + H₂O₂ 组, 采用 MTT 法检测细胞存活率, 硫代巴比妥酸检测丙二醛(MDA)含量, 黄嘌呤氧化酶法检测细胞超氧化物歧化酶(SOD)活性。 **结果** 转染 CREB + H₂O₂ 组的细胞存活率和 SOD 活性明显高于 H₂O₂ 组($P < 0.05$), 而转染 CREB + H₂O₂ 组的 MDA 含量明显低于 H₂O₂ 组($P < 0.05$)。 **结论** 过表达 CREB 对 H₂O₂ 诱导的内皮细胞氧化损伤具有保护作用。

关键词: 过表达; cAMP 反应元件结合蛋白; 氧化应激; 过氧化氢

中图分类号: R363.2 文献标识码: A

Overexpression of CREB Attenuates Oxidative Injury in Endothelial Cells

QU Shunlin, FAN Wenjing, GUO Fang, et al

(Department of Pathophysiology, Institute of Cardiovascular Disease, Key Laboratory for Arteriosclerosis of Hunan Province, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of overexpression of CREB on oxidative injury in endothelial cells.

Methods The endothelial cell oxidative injury model was induced by H₂O₂. ECV304 cells were divided into 6 groups: control group, H₂O₂ group, PCI transfection group, PCI transfection + H₂O₂ group, PCI-CREB transfection group and PCI-CREB transfection + H₂O₂ group. The viability of ECV304 cells was detected by MTT. The MDA concentration was observed by TBA method. Levels of SOD were tested by xanthine oxidase. **Results** Compared with H₂O₂ group, both cell viability and SOD activity in PCI-CREB transfection + H₂O₂ group showed a significant increase, and MDA concentration decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Overexpression of CREB has protection role during oxidative injury induced by H₂O₂.

Key words: overexpression; CREB; oxidative injury; H₂O₂

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是严重危害人类健康的心血管系统疾病,内皮细胞功能失调是 As 发病的始动环节^[1]。内皮细胞功能失调会引起内皮的机械屏障作用和信息传递障碍,还可引起血管活性物质分泌失调导致血管内环境稳态失衡。本

课题组前期研究工作发现, cAMP 反应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)在 H₂O₂ 所致的心肌细胞氧化损伤中发挥了重要的保护作用^[2-3], 但是 CREB 在内皮细胞氧化损伤中的作用还尚不清楚。本实验拟用 H₂O₂ 复制内皮细胞氧化损伤模型, 观察过表达 CREB 对内皮细胞氧化损伤的影响。

收稿日期: 2011-09-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(81100212/H0215)和湖南省教育厅科研项目(11C1094)资助。

通讯作者: 姜志胜, 联系电话: 0734-8281409, E-mail: zsjiang2005@163.com.

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

H_2O_2 购自上海桃浦化学试剂公司, MTT 检测试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒和丙二醛(MDA)检测试剂盒购自南京建成生物研究所; DMEM 培养基购自美国 Sigma 公司; 新生小牛血清购自杭州四季青公司; CREB 抗体购自美国 CST 公司; CREB 表达质粒由澳大利亚 Robert LM 教授馈赠。

1.2 细胞培养和分组

ECV304 细胞购自中国典型培养物保藏中心(武汉大学保藏中心), 用含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养基于 37 °C、5% CO_2 条件下进行培养。选取对数生长期细胞做实验。实验共分为 6 组: 对照组、 H_2O_2 组(500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 6 h)、转染 PCI-CREB + H_2O_2 组(先转染 PCI-CREB 24 h 后, 再用 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 6 h)、转染 PCI 空载体 + H_2O_2 组(先转染 PCI 空载体 24 h 后, 再用 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 6 h)、转染 PCI 组(单独转染 PCI)和转染 PCI-CRESAP 组(单独转染 PCI-CREB)。

1.3 脂质体介导的瞬时转染

根据 Invitrogen 公司提供的转染操作说明书的方法进行。用无血清及无抗生素的 DMEM 培养基溶解重组质粒(PCI-CREB 或 PCI), 并将其与适量含脂质体的无血清 DMEM 培养基充分混匀, 室温放置 20 min。细胞用无血清 DMEM 培养基洗涤 2~3 遍后, 加入适量的无血清 DMEM 培养基, 然后加入含重组质粒(PCI-CREB 或 PCI)与脂质体的混合物, 在 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养, 6 h 后再加入含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基, 随后进行后续实验。

1.4 MTT 法检测细胞活性

将处理好的各组细胞(96 孔板)每孔加入 20 μL 的 MTT (5 g/L) 并培养 4 h, 弃上清后加入 DMSO (150 μL), 室温下摇匀 10~15 min, 然后用酶标仪测定吸光度值(OD)。

1.5 细胞内 MDA 含量和 SOD 活性测定

采用硫代巴比妥酸(TBA)法, 按南京建成生物制品公司生产的试剂盒说明书进行测定。采用黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧阴离子自由基, 后者氧化羟胺形成亚硝酸盐, 在显色剂作用下呈现红色, 用分光光度计检测吸光度, 计算样品中 SOD 的相对

活性。

1.6 统计学处理

所有数据均采用 SPSS 14.0 统计软件包进行分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 过表达 CREB 对内皮细胞活性的影响

H_2O_2 能明显损伤内皮细胞(ECV304)活性, 而过表达 CREB 后却能明显改善损伤后内皮细胞活性(由 H_2O_2 损伤所致), 与 H_2O_2 损伤组相比差异有显著性($P < 0.05$) (图 1)。

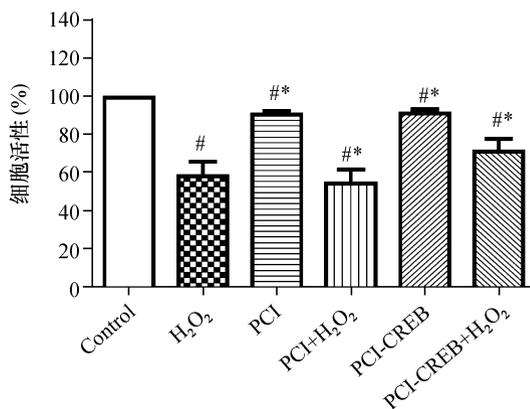


图 1 转染 CREB 对 H_2O_2 损伤内皮细胞活性的影响。#: 与对照组比较, $P < 0.05$; *: 与 H_2O_2 组比较, $P < 0.05$

Fig. 1 Transfection of CREB on endothelial cells activity induced by H_2O_2

2.2 过表达 CREB 对内皮细胞 MDA 含量的影响

MDA 含量检测结果显示, H_2O_2 损伤组 MDA 含量明显增加, 而过表达 CREB 后却能明显降低由 H_2O_2 损伤所致的 MDA 含量升高, 与 H_2O_2 损伤组相比有统计学意义($P < 0.05$) (图 2)。这些结果说明 CREB 可能对氧化应激所致的内皮细胞损伤具有保护作用。

2.3 过表达 CREB 对内皮细胞 SOD 活性的影响

为了进一步确认 CREB 在氧化应激所致的内皮细胞损伤中的作用, 本文检测了各组细胞中的 SOD 活性。结果显示 H_2O_2 损伤后 SOD 活性明显降低, 而过表达 CREB 后却能上调 SOD 活性(由 H_2O_2 损伤所致), 与 H_2O_2 损伤组相比差异有显著性($P < 0.05$) (图 3)。

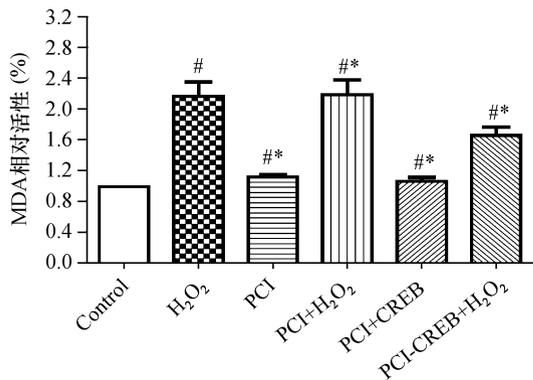


图 2 转染 CREB 对 H₂O₂ 损伤的内皮细胞 MDA 含量的影响。#:与对照组比较, P<0.05; *:与 H₂O₂ 组比较, P<0.05

Fig. 2 Transfection of CREB on MDA concentration induced by H₂O₂

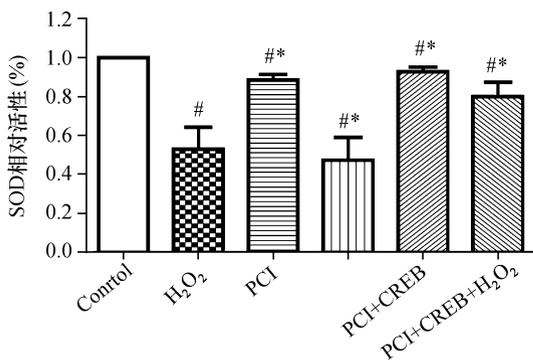


图 3 转染 CREB 对 H₂O₂ 损伤内皮细胞中 SOD 活性的影响。#:与对照组比较, P<0.05; *:与 H₂O₂ 组比较, P<0.05

Fig. 3 Transfection of CREB on SOD activity induced by H₂O₂

3 讨 论

CREB 是定位于细胞核内的第三信使,是 DNA 结合转录因子大家族中的一员,调节启动子中具有环磷酸腺苷反应元件(cAMP response element, CRE)的目的基因的转录,环磷酸腺苷(cAMP)或钙浓度升高等多种信号转导通路可启动 CREB 的磷酸化并使其活化。CREB 单体蛋白含有 N 端碱性区域、C 端激酶域和亮氨酸拉链模体。磷酸化的 CREB 可以激活启动子区含 CRE 基因的转录,调节某些蛋白质的表达,发挥调节细胞凋亡和细胞分化再生、细胞损伤后的修复作用。CREB 活化的中心环节是 Ser133 位点的磷酸化,其活化受多种蛋白激酶的磷酸化调节。对 CREB 的功能研究最初主要集中于神经系统,CREB 具有调节包括学习记忆在内的广泛的生

物学功能。神经系统内的信息储存与 CREB 磷酸化以及其转录活性密切相关。CREB 促进长时程记忆形成的功能只在较低等动物的行为模型中获得证据,而在高等动物大脑中的功能尚未得到证实^[4-5]。近年来学者们发现缺血预适应可能通过活化 PKA 和 PKC 等多种通路激活 CREB^[6]。且 Fentzke 等^[7]发现过表达负性 CREB 突变体的转基因小鼠的心功能明显受损。Zou 等^[8]发现 CREB 可能与神经细胞的氧化应激有关。然而 CREB 在内皮细胞氧化应激损伤时是否发挥作用以及如何发挥作用等目前尚不清楚。

丙二醛(MDA)水平可以反映脂质过氧化物和氧自由基的水平,常用来判定氧化损伤的程度。超氧化物歧化酶(SOD)能消除生物体在新陈代谢过程中产生的有害物质,特别是清除氧自由基从而保护细胞蛋白和 DNA 免受氧化损伤。本实验首先复制内皮细胞损伤模型,结果发现 H₂O₂ 损伤能使内皮细胞活性和 SOD 活性明显下降,MDA 含量明显增加,且转染 CREB 后能明显抑制由高浓度 H₂O₂ 所致的内皮细胞氧化损伤,与 H₂O₂ 组相比有统计学意义。这些结果初步表明 CREB 保护内皮细胞免受氧化应激损伤与其调节 SOD 和 MDA 活性有关,但其具体的信号通路和机制不清楚。CREB 是一重要的核转录因子,多种刺激因素可通过 PKA 等信号通路激活 CREB,激活后的磷酸化 CREB 可参与 BCL-2 和 P53 等下游靶基因的转录调控,从而发挥多种生物学效应^[9-10]。本课题组前期工作表明,CREB 在心肌细胞氧化应激损伤或是缺氧-复氧损伤时,发挥了重要的保护作用,而这种保护作用部分是通过上调 Mip1 实现的^[2]。研究发现胰岛素样生长因子-1(IGF-1)在心肌细胞缺氧损伤时的抗凋亡效应是通过活化 CREB 上调 BCL-2 表达而实现的^[11]。Okoshi 等^[12-13]发现抑制 CREB 表达能减轻人骨肉瘤 U2OS 细胞凋亡,这可能与其调控 P53 表达有关。因此推测氧化应激损伤内皮细胞时 CREB 发挥保护作用可能与活化的 CREB(磷酸化 CREB)调控 BCL-2、Mip1 和 P53 等基因的表达有关,本课题组下一步将在过表达 CREB 的基础上进一步改变其调控的靶基因水平以阐明 CREB 抵抗内皮细胞氧化损伤的作用机制。

参考文献:

[1] Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and athero-

- sclerosis[J]. *Circulation*,2002,105(9):1135-1143.
- [2] 屈顺林,肖献忠. CREB 介导的 Mipu1 表达上调及其在心肌缺血后适应中的作用[M]. 中南大学: 博士论文,2010.
- [3] Qu SL, Zhu HL, Wei X, et al. Oxidative stress-mediated up-regulation of myocardial ischemic preconditioning up-regulated protein 1 gene expression in H9c2 cardiomyocytes is regulated by cyclic AMP-response element binding protein[J]. *Free Radical Biology & Medicine*,2010,49(4):580-586.
- [4] White DM, Walker S, Brenneman DE, et al. CREB contributes to the increased neurite outgrowth of sensory neurons induced by vasoactive intestinal polypeptide and activity-dependent neurotrophic factor[J]. *Brain Res*,2000,868(1):31-38.
- [5] Kida S, Josselyn SA, Penade OS, et al. CREB required for the stability of new and reactivated fear memories[J]. *Nat Neurosci*,2002,5(4):348-355.
- [6] Marais E, Genade S, Lochner A. CREB activation and ischaemic preconditioning [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*,2008,22(1):3-17.
- [7] Fentzke RC, Korcarz CE, Lang RM, et al. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice expressing a dominant-negative CREB transcription factor in the heart[J]. *J Clin Invest*,1998,101(11):2415-2426.
- [8] Zou J, Crews F. CREB and NF- κ B Transcription factors regulate sensitivity to excitotoxic and oxidative stress induced neuronal cell death [J]. *Cellular and Molecular Neurobiology*,2006,26(4):383-403.
- [9] Cox AG, Hampton MB. Bcl-2 over-expression promotes genomic instability by inhibiting apoptosis of cells exposed to hydrogen peroxide[J]. *Carcinogenesis*,2007,28(10):2166-2171.
- [10] Jang JH, Surh YJ. Bcl-2 attenuation of oxidative cell death is associated with up-regulation of gamma-glutamylcysteine ligase via constitutive NF-kappaB activation[J]. *J Biol Chem*,2004,279(37):38779-38786.
- [11] Mehrhof FB, Muller FU, Bergmann MW, et al. In cardiomyocyte hypoxia, insulin-like growth factor-I-induced antiapoptotic signaling requires phosphatidylinositol-3-OH-kinase-dependent and mitogen-activated protein kinase-dependent activation of the transcription factor cAMP response element-binding protein [J]. *Circulation*,2001,104:2088-2094.
- [12] Okoshi R, Ando K, Suenaga Y, et al. Transcriptional regulation of tumor suppressor p53 by cAMP-responsive element-binding protein/AMP-activated protein kinase complex in response to glucose deprivation[J]. *Genes Cells*,2009,14(12):1429-1440.
- [13] Okoshi R, Ozaki T, Yamamoto H, et al. Activation of AMP-activated protein kinase induces p53-dependent apoptotic cell death in response to energetic stress[J]. *J Biol Chem*,2008,283(7):3979-3987.