

## • 基础研究 •

## 亚油酸对纤溶酶原激活物抑制剂-1 表达的影响及其机制

陈静 叶平 刘永学 贺艳丽

**【摘要】** 目的 探讨过氧化体增殖物激活型受体  $\alpha$ (PPAR $\alpha$ )的特异性激活物亚油酸对 HepG2 细胞 1 型纤溶酶原激活物抑制剂(PAI-1)mRNA 表达及其活性的影响和在该基因转录调控中的作用机制。方法 用不同浓度亚油酸为诱导因素刺激 HepG2 细胞,采用半定量 RT-PCR 法检测 PAI-1mRNA 水平,发色底物法检测 PAI-1 的活性变化。构建四个含 PAI-1 启动子序列从-804~+17 间不同长度片段驱动的荧光素酶报告基因质粒,体外瞬时转染 HepG2 细胞,检测荧光素酶的活性。结果 与对照组相比,亚油酸组能使 HepG2 细胞 PAI-1mRNA 表达及蛋白活性显著升高( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),且呈一定剂量依赖性;亚油酸诱导可使 PAI-1 转录活性显著升高( $P<0.01$ );与转染质粒 PAI-pGL3-A(-804/+17)相比较,当转染质粒含有 PAI-pGL3-B(-636/+17)、PAI-pGL3-C(-449/+17)时,荧光素酶活性显著降低( $P<0.01$ );共转染 PPAR $\alpha$  表达质粒(PPAR $\alpha$ -pSG5)的细胞在亚油酸诱导下 PAI-1 转录活性显著升高( $P<0.01$ )。结论 亚油酸可以增加 HepG2 细胞 PAI-1mRNA 表达及其蛋白活性,调节 PAI-1 的基因转录,PPAR $\alpha$  参与亚油酸对 PAI-1 基因的表达调控;在 PAI-1 启动子-804~-636、-449~-276 区域内存在亚油酸作用的调控 PAI-1 基因表达的序列。

**【关键词】** 亚油酸;过氧化体增殖物激活型受体;纤溶酶原激活物抑制剂-1;HepG2 细胞

## Effect of linoleic acid on the expression of plasminogen activator inhibitor type-1 and its mechanism

CHEN Jing, YE Ping, LIU Yongxue, et al.

*The Second Department of Geriatric Cardiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China*

**【Abstract】** Objectives To observe the effect of linoleic acid which is the activator of peroxisome proliferator-activated receptors alpha (PPAR $\alpha$ ) on plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) expression in HepG2 cells, and to investigate the mechanisms how the linoleic acid and PPAR $\alpha$  influence and regulate PAI-1 gene. Methods HepG2 cells were exposed to linoleic acid at various concentrations, RT-PCR and ELISA were used to determine the expression of PAI-1 in HepG2 cells. Four luciferase reporter gene plasmids containing different human PAI-1 gene promoter from -804 to +17 were constructed and transfected into HepG2 cells. The transcriptional activity of PAI-1 was demonstrated by the luciferase activity. Results

Compared with the control, linoleic acid could remarkably increase PAI-1 mRNA expression and protein activity in a concentration-dependent manner( $P=0.038$ , $P<0.001$ ), and enhance the level of PAI-1 transcription significantly( $P<0.01$ ). Compared with the PAI-pGL3-A(-804/+17) plasmid, when the plasmids PAI-pGL3-B(-636/+17) and PAI-pGL3-C(-449/+17) were transfected, linoleic acid depressed the luciferase activity remarkably( $P<0.01$ ). When co-transfected with PPAR $\alpha$ -pSG5, linoleic acid could increase the level of PAI-1 transcription further( $P<0.01$ ). Conclusions Linoleic acid could regulate PAI-1 mRNA expression and gene transcription. PPAR $\alpha$  was involved in the regulation of PAI-1 gene expression. The sequences that could regulate the expression of PAI-1 gene induced by linoleic acid may exist in the areas from -804 to -636 and -449 to -276 of PAI-1 promoter.

**【Key words】** linoleic acid; peroxisome proliferator-activated receptor; plasminogen activator inhibitor type-1; human hepatoma cells

收稿日期:2005-11-14

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30470717)

作者单位:100853 北京市,中国人民解放军总医院老年心血管二科(陈静,叶平);军事医学科学院(刘永学,贺艳丽)

作者简介:陈静,女,1976年3月生,河北省邯郸市人,在读博士研究生,主治医师。Tel:010-67413120, E-mail: wylcj312@sina.com

通讯作者:叶平, Tel:010-66939635, E-mail: yeping@sina.com

1型纤溶酶原激活物抑制剂(plasminogen activator inhibitor type-1, PAI-1)是体内纤溶酶原激活物(plasminogen activator, PA)主要的生理抑制物,能够抑制纤维蛋白降解、促进纤维蛋白沉积于血管壁和刺激平滑肌细胞增生,是重要的纤溶活性调节者,维持机体凝血和纤溶功能的平衡<sup>[1]</sup>。血浆 PAI-1 水平的升高是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS)、冠心病形成的重要危险因素, PAI-1 与血栓性疾病密切相关,是判断血栓性疾病相关的标志物之一<sup>[2]</sup>。过氧化体增殖物激活型受体 (peroxisome proliferators-activated receptors, PPARs) 是一类由配体激活的核转录因子,属于核受体超家族,具有多种生物学效应。PPAR $\alpha$  是其中的一个亚型,主要表达于肝脏、心脏、肾脏、骨骼肌等器官与组织,参与对脂质代谢、糖代谢、炎症反应有关的多个环节的调节,在 AS 的发生、发展中发挥重要作用。亚油酸是 PPAR $\alpha$  的特异性天然配基。本文通过研究亚油酸对 PAI-1 基因表达调控的影响,旨在探讨亚油酸和 PPAR $\alpha$  参与 PAI-1 基因表达调控的可能机制。

## 1 材料与方 法

1.1 材 料 (1)人肝癌(human hepatoma HepG2)细胞株、PPAR $\alpha$ -pSG5 表达质粒由北京军事医学科学院放射医学研究所药毒理室保存。(2)主要试剂和仪器:高糖 DMEM 培养基粉剂、优级胎牛血清购自 Gibco BRL 公司,总 RNA 提取试剂 Trizol/Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 (0.75g/L) 购自 Invitrogen 公司,RT-PCR 试剂盒、DNA Marker DL 2000 购自 TaKaRa 大连宝生物工程有限公司,亚油酸购自 Sigma 公司,pGL3-Basic-Vector 荧光素酶报告基因载体、转染内参照 pSV $\beta$ -gal 和相应的荧光素酶报告基因检测试剂盒及  $\beta$ -gal 检测试剂盒均为 Promega 公司产品,PCR 扩增仪为 Perkin-Elmer 公司产品,DU(r)-640 核酸蛋白分析仪为 Beckman 产品,凝胶成像分析系统为 Tanon Gis-2008 产品。(3)引物:分别设计 PAI-1 及内参照 GAPDH 基因的扩增引物。PAI-1 上游:5'-GAGGTGCCTCTCTGC-CCTCACCAACATT-3', 下游:5'-AGCCTGA-AACTGTCTGAACATGTCG-3'; GAPDH 上游:5'-ACGGATTTGGTCGTATTGGG-3', 下游:5'-TGATTTTGGAGGGATCTCGC-3'。以上引物均由北京赛百胜生物工程公司合成。

1.2 方 法 (1)细胞培养:HepG2 细胞以  $2 \times 10^4$ /ml 密度接种于 6 孔板中,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液进行培养,37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 温箱孵育 2~3d,至 60%~70% 单层融合状态,更换为无血清 DMEM 培养液饥饿 12h; PBS 洗涤 3 次,加入诱导液继续培

养 24h,收集上清,4 $^{\circ}$ C、9000g 离心 10min, -20 $^{\circ}$ C 保存,用于 PAI-1 活性检测; PBS 冲洗细胞,应用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,用于 RT-PCR 分析。诱导液使用前新鲜配制,于无血清 DMEM 培养液中加入亚油酸,使其终浓度为 0(空白对照组)、50、100 $\mu$ mol/L,37 $^{\circ}$ C 温育 30min 后用于诱导细胞。(2) RT-PCR 分析:用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,测定其浓度。在 20 $\mu$ l 逆转录体系中加入 2 $\mu$ g 总 mRNA 为模板,反应条件:42 $^{\circ}$ C, 30min; 99 $^{\circ}$ C, 5min。逆转录产物于 -20 $^{\circ}$ C 保存。以 25 $\mu$ l PCR 反应体系,分别加入 2 $\mu$ g 模板的逆转录产物用于扩增 PAI-1 和内参照 GAPDH。扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5min,继续 94 $^{\circ}$ C 变性 45s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min 为 1 个循环,共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min,取 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像分析系统扫描并记录电泳结果。各待测基因 mRNA 相对表达量以其电泳条带与相应内参照电泳条带的吸光度比值表示。(3) PAI-1 活性测定:采用 STA-CHROM PAI Kit 测定 PAI-1 活性,具体操作按说明书进行。(4)质粒构建:构建含 PAI-1 启动子全长序列(-804~+17bp)控制表达的荧光素酶报告基因质粒,及从 PAI-1 启动子-804~+17bp 间不同长度片段驱动的荧光素酶报告基因质粒。设计 5'端和 3'端分别含有 Mlu I (CGACGCGT)、Bgl II (GAAGATCT)限制性酶切位点及相应保护性碱基的多对引物,上游引物(5'~3') PAI-pGL3-A (-804~+17bp): CGACGCGTGCTTTTACCATGGT; PAI-pGL3-B (-636~+17bp): CGACGCGTGGCAGGCGCGTGGCAGGGATGAGGGAAAGAC; PAI-pGL3-C (-449~+17bp): CGACGCGT-GTTTTGATGGAGGTTATCTTTG; PAI-pGL3-D (-276~+17bp): CGACGCGTACAGGCAGAGGGCAGAAAG,共同下游引物(5'~3'): GAAGATCTCAGCCAAACACAGCTGTGCTCCTCT。以人基因组 DNA 为模板,扩增 PAI-1 启动子区-804~+17 区域不同长度的片段,与荧光素酶报告基因载体 pGL3-Basic-Vector 连接获得重组质粒, DNA 测序鉴定正确。(5)实验分组:转染细胞分为非共转染和共转染两大组,每组分别设立正常细胞组、空白对照组、亚油酸组和阳性对照组(转染空 pGL3-Basic 质粒)。(6)HepG2 细胞瞬时转染:转染前细胞常规传代,以  $1 \times 10^5$ /ml 密度接种于 24 孔板,当细胞生长至 80%~90% 融合时以脂质体转染法转染构建质粒 PAI-1-pGL3X0.5 $\mu$ g、内参照质粒 pSV $\beta$ -gal 0.1 $\mu$ g,共转染组另加表达质粒 PPAR $\alpha$ -pSG5 0.2 $\mu$ g,转染 5h 后,更换为新鲜无血清 DMEM 培养液继续培养 12h,更换为分别含溶剂

(空白对照)、100μmol/L 亚油酸的诱导液,作用 24h 后收集细胞。(7)转染细胞的裂解和荧光素酶活性检测:严格按照 Promega 公司荧光素酶报告基因及 β-gal 检测试剂盒说明操作,检测荧光素酶活性和 β-gal 活性。各组荧光素酶活性的相对表达量以其荧光素酶活性与相应内参照 β-gal 活性的比值表示。

1.3 统计学处理 本实验每组数据均为 3 次独立重复实验测定数值的平均值,结果以均数±标准差表示,采用 SPSS11.0 统计软件 One way ANOVA 分析。P<0.05 为差异有显著性。

### 2 结果

2.1 不同浓度亚油酸对 PAI-1 mRNA 表达的影响 与空白对照组(0μmol/L)相比,亚油酸组在 50μmol/L、100μmol/L 浓度诱导下 PAI-1 mRNA 表达分别增加 43.0%(P=0.038),129.0%(P<0.001,图 1)。

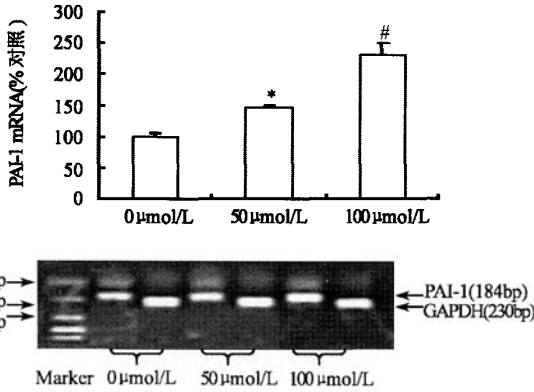


图 1 不同浓度亚油酸对 PAI-1 mRNA 表达的影响的统计图及电泳图 与对照组比较,\* P<0.05,# P<0.001

2.2 不同浓度亚油酸对 PAI-1 蛋白活性的影响 与空白对照组相比,亚油酸组在 50μmol/L、100μmol/L 浓度诱导下 PAI-1 蛋白活性分别升高 37.5%(P<0.01),112.6%(P<0.01,图 2)。

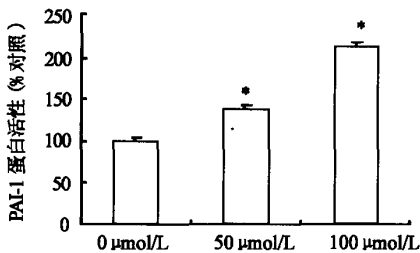


图 2 不同浓度亚油酸对 PAI-1 蛋白活性的影响 与对照组比较,\* P<0.01

2.3 不同诱导因素对转染 PAI-1 启动子全长序列驱动的重组质粒的 HepG2 细胞 PAI-1 转录活性的影响 瞬时转染分析结果提示,正常细胞组和阳性对照组中均未检测到荧光素酶的表达。转染 PAI-1 启动子全长序列驱动的重组质粒后,与溶剂对照组相比,亚油酸可以显著升高 PAI-1 转录活性(P<0.01);共转染 PPARα-pSG5 表达质粒的细胞在亚油酸诱导下 PAI-1 转录活性进一步显著升高(P<0.01,图 3)。

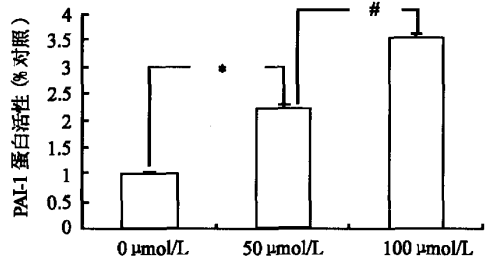


图 3 不同诱导因素对转染 PAI-1 启动子全长序列驱动的重组质粒的 HepG2 细胞 PAI-1 转录活性的影响 与对照组比较,\* P<0.01,与亚油酸组比较,# P<0.01

2.4 转染 PAI-1 启动子序列不同长度片段驱动的重组质粒的 HepG2 细胞在亚油酸诱导下 PAI-1 转录活性的变化在亚油酸诱导下,与转染 PAI-1 启动子全长序列(-804~+17bp)重组质粒 A 组相比,当转染质粒为 B(-636~+17bp)、C(-449~+17bp)时,细胞 PAI-1 转录活性显著降低(P<0.01),转染质粒 B(-636~+17bp)、C(-449~+17bp)组与 D(-276~+17bp)组相比,PAI-1 转录活性显著降低(P<0.01,图 4)。

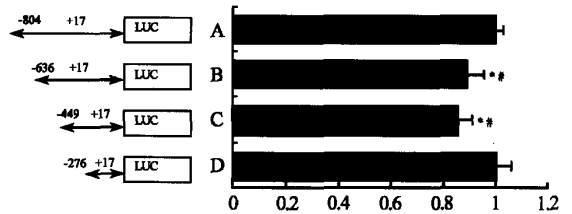


图 4 转染 PAI-1 启动子序列不同长度片段驱动的重组质粒的 HepG2 细胞在亚油酸诱导下 PAI-1 转录活性的变化 与 A 组比较,\* P<0.01;与 D 组比较,\* P<0.01

### 3 讨论

亚油酸属于不饱和脂肪酸,是 PPARα 特异的内源性激活物,研究证实亚油酸能降低总胆固醇、甘油三酯,具有抗动脉粥样硬化的作用。血浆 PAI-1 水平升高导致的纤溶活性受损与动脉粥样硬化、血

栓的形成及进一步的急性缺血性心脑血管疾病的发生、发展密切相关<sup>[3]</sup>。既往研究资料有关亚油酸对 PAI-1 的影响的结论并不一致。

本实验结果显示在亚油酸诱导下, HepG2 细胞 PAI-1 mRNA 表达和蛋白活性显著增加, 且呈一定的剂量依赖性。为探讨亚油酸与 PPAR $\alpha$  是否参与对 PAI-1 基因的表达调控, 本研究构建了 PAI-1 启动子全长序列(-804~+17bp)控制表达的荧光素酶报告基因重组质粒转染 HepG2 细胞, 以亚油酸作为诱导因素, 同时设立 PPAR $\alpha$ -pSG5 表达质粒共转染组。结果显示, 与空白对照组相比, 亚油酸可以显著增加 PAI-1 转录活性, 共转染 PPAR $\alpha$ -pSG5 表达质粒后, 亚油酸使 PAI-1 转录活性的升高更加明显。提示增加外源性 PPAR $\alpha$  在 HepG2 细胞中的表达, 亚油酸对 PAI-1 转录的影响进一步增强, PPAR $\alpha$  参与亚油酸对 PAI-1 基因的表达调控。这与文献报道在血管内皮细胞中, 亚油酸激活 PPAR $\alpha$  后诱导 PAI-1 表达的作用一致<sup>[4~6]</sup>。

为进一步探讨亚油酸调节 PAI-1 基因表达的作用机制, 本研究又分别构建了三个含 PAI-1 启动子序列-804~+17bp 间不同长度片段的荧光素酶报告基因重组质粒, 与前述重组质粒分别转染 HepG2 细胞。结果显示在亚油酸作用下, 与转染启动子全长序列(-804~+17bp)质粒的细胞比较, 含有 PAI-1 启动子序列-636~+17bp、-449~+17bp 的质粒转染细胞后, PAI-1 转录活性明显降低; 当转染质粒为-276~+17bp 时, 转染细胞的 PAI-1 转录活性又得以恢复, 提示在 PAI-1 启动子-804~-636 和-449~-276 区域内存在亚油酸调控 PAI-1 转录并且方向相反的作用序列。

PPAR $\alpha$  由配基激活后, 可以 DNA 结合方式直接同位于目的基因上的 PPAR 反应元件(PPAR response elements, PPRE)结合而发挥转录调控的作用, 也可通过非 DNA 结合方式, 作用于相关的信号传导途径, 间接实现对靶基因的调控。研究证实 PAI-1 基因的转录调控十分复杂, 在 PAI-1 5' 端启动子序列并不含有典型的 PPRE, 但含有其他多个作用元件, 如 VLDL / 脂肪酸反应元件、FFA 反应区域、NF- $\kappa$ B 样蛋白结合序列、smad3/4 结合序列以及 AP-1、SP-1、NF-1 等, VLDL / 脂肪酸反应元件与 PPRE 还具有一定的同源性<sup>[2,7,8]</sup>。其中 Smads 蛋白家族是近年来发现的新的细胞内信号转导蛋白, 在 TGF- $\beta$  超家族成员的信号转导中发挥重要作用。研究表明 Smads 蛋白还参与多个信号通路的调控, 如 PPARs 激活后能够通过影响 TGF- $\beta$ /smads 信号

途径发挥对靶基因的调控作用<sup>[9,10]</sup>。而在 PAI-1 启动子-804~-276bp 区域内含有三个能与 smad3/4 特异性结合的序列<sup>[11]</sup>。Smads 是否参与亚油酸激活 PPAR $\alpha$  后对 PAI-1 基因转录的调控, 还需要通过对 PAI-1 启动子序列上 smads 结合位点进行突变或缺失的方法进行深入的研究。

#### 参考文献

- 1 William PF. Plasminogen activator inhibitor 1, fibrin, and the vascular response to injury. *Trends Cardiovasc Med*, 2004, 14: 196-202.
- 2 Bernd RB, Günter C, Florian G, et al. Plasminogen activator inhibitor 1: physiological and pathophysiological roles. *News Physiol Sci*, 2002, 17: 56-61.
- 3 Alessi MC, Juhan VI. Contribution of PAI-1 in cardiovascular pathology. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 2004, 97: 673-678.
- 4 Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA, et al. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 4318-4323.
- 5 胡晓晖, 叶平, 刘永学. 脂肪酸影响血管内皮细胞纤溶酶原激活物抑制剂-1 表达的机制初探. *中华心血管病杂志*, 2002, 30: 684-686.
- 6 Ye P, Hu XH, Liu YX, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  in human endothelial cells increases plasminogen activator inhibitor type-1 expression. *Chin Med J*, 2003, 118: 29-31.
- 7 Chen YB, Joseph JB, David JS. Identification and localization of a fatty acid response region in the human plasminogen activator inhibitor-1 gene. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*, 2000, 20: 2696-2701.
- 8 Mishra A, Chaudhary A, Sethi S. Oxidized omega-3 fatty acids inhibit NF- $\kappa$ B activation via a PPAR $\alpha$ -dependent pathway. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*, 2004, 24: 1621-1627.
- 9 Redondo S, Ruiz E, Santos-Gallego CG, et al. Pioglitazone induces vascular smooth muscle cell apoptosis through a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, transforming growth factor-beta 1, and a smad 2-dependent mechanism. *Diabetes*, 2005, 54: 811-817.
- 10 Wilmer WA, Dixon CL, Hebert C, et al. PPAR-alpha ligands inhibit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated activation of transforming growth factor-beta 1 in human mesangial cells. *Antioxid Redox Signal*, 2002, 4: 877-884.
- 11 Dennler S, Itoh S, Vivien D, et al. Direct binding of Smad 3 and Smad 4 to critical TGF $\beta$ -inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J*, 1998, 17: 3091-3100.