

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.26.012

Ets-1 在姜黄素抑制心脏纤维化的表达研究

杨蕙宇 潘瑾 李平 唐蕊 向萌

(西安医学院临床医学院内科教研室 陕西 西安 710021)

摘要 目的:研究姜黄素的抗增殖作用是否依赖于其对 Ets-1 表达的下调。**方法:**使用 Ets-1 siRNA 对 CFs 细胞 Ets-1 基因进行沉默;Real-time PCR 和 western-blot 法测定各组细胞 Ets-1 mRNA 和蛋白的表达水平。**结果:**在 mRNA 和蛋白水平上,AngII 明显增加 CFs 细胞内 Ets-1 的表达;使用 siRNA 技术对 Ets-1 进行沉默后,随着 Ets-1 表达的降低及转录调节能力的下降,由 AngII 诱导的 CFs 细胞的增殖能力及增殖相关细胞因子分泌减少;姜黄素可以显著降低 AngII 诱导的 Ets-1 表达升高,并具有浓度依赖性 ($P<0.05$)。说明姜黄素对 AngII 诱导的 CFs 增殖的抑制作用可能依赖于其对 Ets-1 表达的抑制作用。**结论:**Ets-1 siRNA 对 Ets-1 进行基因沉默后,显示出抗增殖效用;姜黄素能够有效地抑制 AngII 诱导的 CFs 细胞 Ets-1 mRNA 和蛋白的过表达;姜黄素的抗增殖作用可能依赖于其对 Ets-1 基因的表达下调而得以实现的。

关键词:Ets-1;姜黄素;血管紧张素-II;纤维化

中图分类号:Q95-3,R542.23 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)26-5045-04

Curcumin Through Reduced Ets-1 Expression Induced Inhibition of AngII Heart into Fibroblast Proliferation

YANG Hui-yu, PAN Jin, LI Ping, TANG Rui, XIANG Meng

(Department of internal medicine, Clinical Medical College of Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710021, China)

ABSTRACT Objective: To observe the inhibition effect of curcumin (Cur) on AngII-induced over-proliferation and overexpression of CTGF and PAI-1 in CFs and relation between its inhibitory effect and the suppressing expression of Ets-1. **Methods:** Ets-1 were measured by real-time PCR and western-blotting, respectively. After transfected with Ets-1 si-RNA, the cells were incubated with AngII (100 nmol/L) for indicated times. The cell activity was detected by MTT assay and the levels of mRNA and protein of CTGF, PAI-1, Ets-1 were measured by real-time PCR and western-blotting, respectively. **Results:** With the lower expression of Ets-1, the proliferation which were induced by AngII was decreased in CFs cells and the expression of CTGF and PAI-1 also declined. Curcumin can significantly reduced the expression of Ets-1 and the reduction was also concentration-related ($P<0.05$). **Conclusion:** Curcumin significantly inhibits AngII-induced overexpression of Ets-1 in the levels of mRNA and protein in CFs, and Ets-1 siRNA also has the same inhibitory effect as Cur. These results suggested that Cur's anti-fibrotic effect, in part, depends on its inhibitory effect on the overexpression of Ets-1 in AngII-stimulated CFs.

Key words: Ets-1; Curcumin; Angiotensin II; Cardiac fibroblast

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R542.23 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)26-5045-04

前言

前期研究发现姜黄素能够有效地抑制 AngII 诱导的心脏成纤维细胞过度增殖和 CTGF、PAI-1 mRNA 和蛋白的过表达,从而起到抗增殖的作用。研究表明,结缔组织生长因子(CTGF)、血小板活化因子-1(PAI-1)等,促进细胞基质的堆积,导致心脏纤维化的形成^[1]。Ets-1 属于 E26 转录调节因子家族, Ets-1 通过对靶基因表达的调节,可能参与到细胞的增殖、迁移、凋亡、分化、恶变等多个行为学改变过程^[2-4]。在肝脏中,Ets-1 能够激活肝脏星形细胞,使其分泌 TGF- β 增多而分泌金属基质酶 MMP-1 等减少,导致细胞外基质生成与代谢的失衡,而启

动并加速了肝硬化的进程。抑制 Ets-1 的表达和调节功能,可以显著降低纤维化的程度^[5-8]。根据我们的实验结果,姜黄素可以有效的抑制 AngII 诱导的 CFs 细胞的增殖。据此,本研究将进一步阐释姜黄素的抗纤维化作用,而这种作用是否通过其对 Ets-1 表达下调作用而得以实现的。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

出生 1-2 日的 S-D 大鼠,雌雄不限,由西安交通医学院医学院实验动物中心提供。姜黄素粉末纯品购于美国 Sigma 公司。

1.2 研究方法

1.2.1 心脏成纤维细胞原代培养 选择出生 1~2 天的 S-D 大鼠乳鼠 15 只,分离心脏组织,4℃ D-Hanks 中反复漂洗,摘取左心室部分,约 1-2 mm³ 大小的组织块,用 5 g/L 的胰酶对其消化;

作者简介:杨蕙宇(1984-),女,硕士,助教,从事心内科方面的研究,E-mail:yhy_2005@126.com

(收稿日期:2014-03-18 接受日期:2014-04-12)

采用差速贴壁的方法分离心脏成纤维细胞。使用 3-7 代的细胞进行实验并使用倒置显微镜对原代培养细胞进行鉴定;免疫组织化学法检测。

1.2.2 姜黄素溶液配制 姜黄素粉末纯品购于美国 Sigma 公司。使用 DMSO 溶解,制成 10 mmol/L 保存浓度,放置于 -20℃ 冰箱内长期储存。使用时候再稀释成相应浓度。

1.2.3 荧光定量 PCR (real-time PCR) 反应 引物设计: 依据 GenBank 提供的大鼠 Ets-1 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的核苷酸序列,使用 Desiner v4.0 进行引物设计,由南京金斯瑞生物有限公司合成。引物序列:Ets-1 forward 5'-TGATGTTGAGGGCTGTGAATGAG-3';reverse 5'-TGAAGTAATCCGAGGTGTAACG-3' GAPDH 引物序列,5'-ATGCAGGGATGATGTTCTGG-3'。用上述引物进行 PCR,95℃,5 min 95℃,15s 55℃,15s 72℃,30s 35 个循环。

1.2.4 蛋白免疫印迹实验 (Western-blot) 总蛋白提取 蛋白浓度测定 SDS-PAGE 电泳、制胶、加样和电泳、转膜 电泳结束后,一抗孵育,4℃ 孵育过夜。二抗孵育 使用 TBST 对 PVDF 膜进行清洗,每次 8 min,共 4 次。配制相应二抗(1:2000),室温下孵育 2 h。化学发光 使用 Quantity One 图像分析软件,对胶片进行灰度扫描,以 control 为对照,其他各组灰度按照 control

组倍数进行统计。

1.2.5 siRNA 转染 CFs 细胞 实验分组 依据干预措施不同,将细胞分为 4 组:control 组,AngII 组,AngII+NC siRNA 和 AngII+Ets-1 siRNA。Ets-1 siRNA 转染 CFs 细胞,将细胞按照 1×10^6 的密度接种于 6 孔板中,待生长至融合约 50%-60% 密度时候,准备进行转染。按照干预方式的不同,将 Ets-1 siRNA、NC siRNA、FAM siRNA 加入相应的空中。转染 6 h 后,观察细胞内荧光强度。CFs 细胞内显示均匀分布的绿色荧光提示转染成功。转染后 24 h,将培养基换为含 AngII(100 nmol/L)的高糖 DMEM 培养基,继续培养 6 h 或者 24 h,real-time PCR、western-blotting 法检测 Ets-1 mRNA 和蛋白的表达。

1.2.6 统计学分析 采用 SPSS20.0 统计软件,Ets-1 组与对照组进行方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Ets-1 siRNA 对 CFs 细胞增殖能力和 CTGF、PAI-1 表达的影响

结果显示:同 AngII 组相比,Ets-1 siRNA 可以有效的抑制 AngII 诱导的 CFs 细胞增殖 ($P < 0.01$),NC-siRNA 与对照组相比,未显示统计学差异,见图 1。

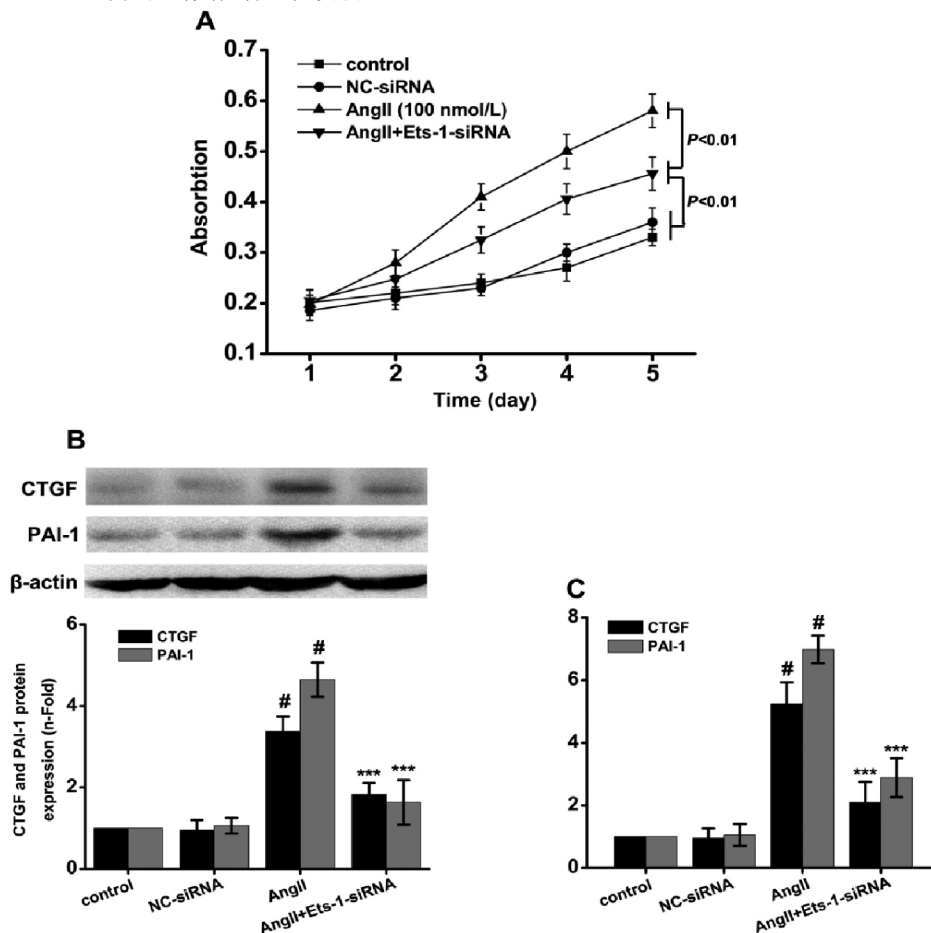


图 1 Ets-1-siRNA 对 AngII 诱导的 CFs 细胞增殖能力和 CTGF、PAI-1 表达的影响。(A) Ets-1-siRNA 对 AngII 诱导的 CFs 细胞增殖能力的影响。(B) Ets-1-siRNA 对 AngII 诱导的 CFs 细胞 CTGF 和 PAI-1 mRNA 表达的影响。(C) Ets-1-siRNA 对 AngII 诱导的 CFs 细胞 CTGF 和 PAI-1 蛋白表达的影响。数据采用 3 次独立实验结果的均值

Fig. 1 Inhibitory effects of Ets-1-siRNA on proliferation and overexpression of CTGF and PAI-1 in AngII-stimulated CFs. (A) Inhibitory effects of Ets-1-siRNA on proliferation in AngII-stimulated CFs. (B) Inhibitory effects of Ets-1-siRNA on mRNA expression of CTGF and PAI-1 in AngII-stimulated CFs. (C) Inhibitory effects of Ets-1-siRNA on protein expression of CTGF and PAI-1 in AngII-stimulated CFs

注: 同 control 组相比, $^{*}P < 0.001$; 同 AngII 组相比, $^{**}P < 0.01$ 和 $^{***}P < 0.001$

Note: $^{*}P < 0.001$ vs control; $^{**}P < 0.01$ and $^{***}P < 0.001$ vs AngII

2.2 不同浓度姜黄素对 CFs 细胞 Ets-1 表达的影响

Ets-1 通过与靶基因上游的特殊位点结合后,上调增殖相关基因的表达,促进 CFs 细胞增殖和 PAI-1、CTGF、胶原等致纤维因子的分泌。因此,有理由认为减少 Ets-1 的表达及核转位能够起到 CFs 细胞的抗增殖作用。使用 (5, 10, 30 $\mu\text{mol/L}$) 姜黄素

对 CFs 细胞预处理 1 h, 在给与 AngII (10^{-6} mol/L) 刺激 6 h 和 24 h。结果提示,在 mRNA 和蛋白水平上,AngII 明显增加 CFs 细胞内 Ets-1 的表达;姜黄素可以显著降低 AngII 诱导的 Ets-1 表达升高,并具有浓度依赖性 ($P < 0.05$),见图 2。

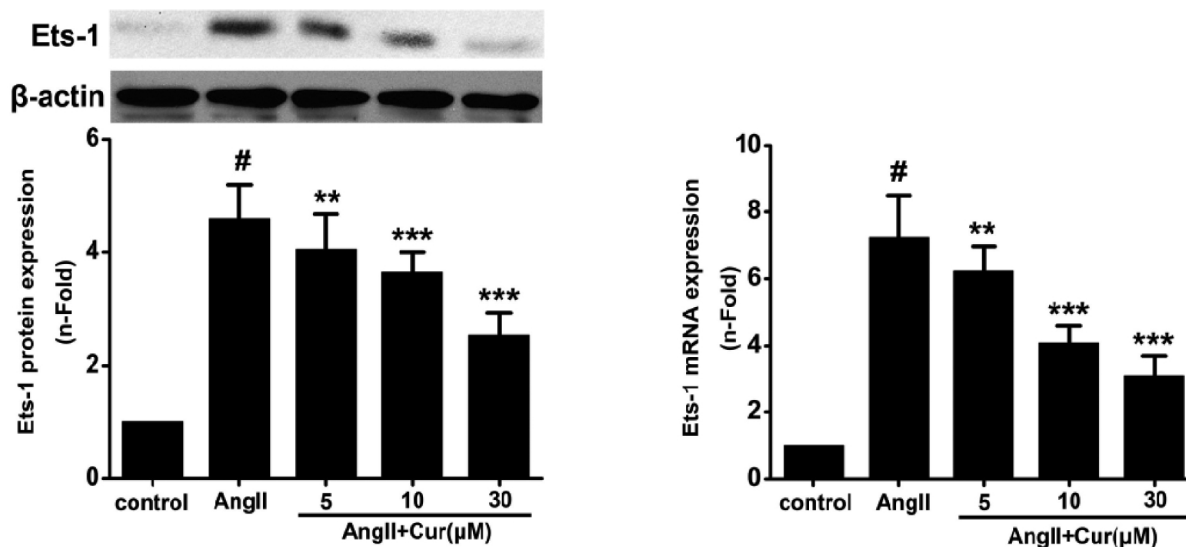


图 2 不同浓度姜黄素对 CFs 细胞 Ets-1 表达的影响

Fig. 2 Inhibitory effects of Cur on the mRNA and protein expression of Ets-1 in AngII-induced CFs.

注:同 control 组相比, # $P < 0.001$;同 AngII 组相比, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ 。

Note: # $P < 0.001$ vs control; ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs AngII.

3 讨论

Ets-1 属于 E26 转录调节因子家族,不仅具有靶基因调节功能,同时也是一种原癌基因^[9,11]。Ets-1 是一种进化高度保守的转录调节因子,从低等生物到人类,Ets-1 对包括平滑肌细胞、上皮细胞、心肌细胞在内的多种细胞的功能都具有调节作用^[12-14]。Ets-1 通过对靶基因表达的调节,可能参与到细胞的增殖、迁移、凋亡、分化、恶变等多个行为学改变过程^[15,16]。包括心脏纤维化在内的多种器官的纤维化过程,均表现为成纤维细胞的过度增殖和 ECM 的病理性堆积。因此,成纤维细胞增殖和 ECM 分泌的调控机制成为抗纤维化研究的热点。给与星状细胞 TGF- β 或者乙醇刺激后,星状细胞增殖能力和胶原分泌水平明显增高,同时伴有促分裂素原活化蛋白激酶(MAPK)传导通路的磷酸化水平和 Ets-1 的表达显著升高。给与 MAPK 通路抑制剂后,可以显著抑制 TGF- β 或者乙醇诱导的星状细胞增殖和胶原过分泌,同时伴有 Ets-1 表达的下调^[17,18]。在心血管系统,对于 AngII 诱发的血管纤维化^[9],较之普通小鼠,Ets-1 基因敲除小鼠的血管平滑肌细胞增殖能力显著降低,CTGF、胶原等纤维化因子明显减少,整体纤维化程度较低。在我们之前的实验中发现,使用 siRNA 对 Ets-1 进行基因沉默后,可以显著抑制 AngII 诱导的 CFs 细胞增殖和 CTGF、PAI-1 的过表达。据此,我们有理由认为,抑制 Ets-1 的表达、降低其基因调节功能,可能是一个抑制 AngII 诱导的心脏纤维化的治疗靶点^[20]。

如前述,抑制 Ets-1 的表达和调节功能,可以显著降低纤维

化的程度。Ziming Yu 等发现,姜黄素可以下调子宫内膜癌 HEC-1-A 细胞 Ets-1 的表达,从而起到抑制癌细胞增殖的作用。根据我们的实验结果,姜黄素可以有效的抑制 AngII 诱导的 CFs 细胞的增殖。据此,我们为了进一步阐释姜黄素的抗纤维化作用,将姜黄素对 Ets-1 表达的调节作为研究的重要环节。给与姜黄素预处理后,可以显著抑制 AngII 诱导的 CFs 细胞增殖和 CTGF、PAI-1 的过表达,提示姜黄素的抗纤作用可能与 Ets-1 表达下调有关。为了进一步说明两者的关系,我们使用 Ets-1 特异性 siRNA 对 Ets-1 基因进行沉默,取得了与姜黄素相似的实验结果。以上结果进一步证明,姜黄素能够抑制 AngII 诱导的 CFs 增殖和 CTGF、PAI-1 的过表达,这种作用是通过其对 Ets-1 表达下调作用而得以实现的。

参考文献(References)

- Brigstock, et al. Regulation of angiogenesis and endothelial cell function by connective tissue growth factor (CTGF) and cysteine-rich 61[J]. Angiogenesis, 2002, 5(2): 153-165
- Verschoor ML, Singh G. Ets-1 regulates intracellular glutathione levels: key target for resistant ovarian cancer [J]. Mol Cancern, 2013, 12(1): 138
- Wan SM, Peng P, Guan T. Ets-1 regulates its target genes mainly by DNA methylation in human ovarian cancer [J]. J Obstet Gynaecol, 2013, 33(8): 877-881
- Ren QJ, Li XP, Tao JH, et al. Role of transcription factor ETS-1 and B cell in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus [J]. National Medical Journal of China, 2013, 93(31): 2483-2486

- [5] Knittel T, Kobold D, Dudas J, et al. Role of the Ets-1 transcription factor during activation of rat hepatic stellate cells in culture[J]. *Am J Pathol*, 1999, 155(1): 1841-1849
- [6] Znoyko I, Trojanowska M, Reuben A. Collagen binding $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 1\beta 1$ integrins play contrasting roles in regulation of Ets-1 expression in human liver myofibroblasts[J]. *Mol Cell Biochem*, 2006, 282(1-2): 89-99
- [7] Ozaki I, Mizuta T, Zhao G, et al. Induction of multiple matrix metalloproteinase genes in human hepatocellular carcinoma by hepatocyte growth factor via a transcription factor Ets-1 [J]. *Hepatol Res*, 2003, 27(4): 289-301
- [8] Mouly E, Chemin K, Nguyen HV, et al. The Ets-1 transcription factor controls the development and function of natural regulatory T cells[J]. *J Exp Med*, 2010, 207(10): 2113-2125
- [9] Barembaum M, Bronner ME. Identification and dissection of a key enhancer mediating cranial neural crest specific expression of transcription factor, Ets-1[J]. *Dev Biol*, 2013, 382(2): 567-575
- [10] Jantarotnotai N, Ling A, Cheng J, et al. Upregulation and expression patterns of the angiogenic transcription factor ets-1 in Alzheimer's disease brain[J]. *J Alzheimers Dis*, 2013, 37(2): 367-377
- [11] Lee KH, Koh SA, Kim JR. Hepatocyte growth factor-mediated gastrin-releasing peptide induces IL-8 expression through Ets-1 in gastric cancer cells[J]. *Oncol Res*, 2013, 20(9): 393-402
- [12] Kato M, Dang V, Wang M, et al. TGF- β induces acetylation of chromatin and of Ets-1 to alleviate repression of miR-192 in diabetic nephropathy[J]. *Sci Signal*, 2013, 6(278): ra43
- [13] Dong Z. Acetylation of Ets-1 is the key to chromatin remodeling for miR-192 expression[J]. *Sci Signal*, 2013, 6(278): pe21
- [14] Evangelista AM, Deschamps AM, Liu D, et al. miR-222 contributes to sex-dimorphic cardiac eNOS expression via ets-1 [J]. *Physiol Genomics*, 2013, 45(12): 493-498
- [15] Mizui M, Isaka Y, Takabatake Y, et al. Transcription factor Ets-1 is essential for mesangial matrix remodeling[J]. *Kidney Int*, 2006, 70(2): 298-305
- [16] Czuwara-Ladykowska J, Shirasaki F, Jackers P, et al. Fli-1 inhibits collagen type I production in dermal fibroblasts via a Sp1-dependent pathway[J]. *Biol Chem*, 2001, 276(24): 20839-20848
- [17] Li JC, Lau AS. A role for mitogen-activated protein kinase and Ets-1 in the induction of interleukin-10 transcription by human immunodeficiency virus-1 Tat[J]. *Immunology*, 2007, 121(3): 337-348
- [18] Liu S, Liang Y, Huang H, et al. ERK-dependent signaling pathway and transcriptional factor Ets-1 regulate matrix metalloproteinase-9 production in transforming growth factor-beta1 stimulated glomerular podocytes[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2005, 16(4-6): 207-216
- [19] Abrahamsen CT, Pullen MA, Schnackenberg CG, et al. Effects of angiotensins II and IV on blood pressure, renal function, and PAI-1 expression in the heart and kidney of the rat [J]. *Pharmacology*, 2003, 66(2): 26-30
- [20] Kosaka T, Miyajima A, Shirotake S, et al. Ets-1 and hypoxia inducible factor-1 α inhibition by angiotensin II type-1 receptor blockade in hormone-refractory prostate cancer[J]. *Prostate*, 2010, 70(2): 162-169

(上接第 5041 页)

- [15] Javeed Iqbal, Paul N. Meyer, Lynette M. Smith, et al. BCL2 Predicts Survival in Germinal Center B-cell-like Diffuse Large B-cell Lymphoma Treated with CHOP-like Therapy and Rituximab[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17: 7785-7795
- [16] Shen J, Chen X, Hendershot L, et al. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals[J]. *Dev Cell*, 2002, 3: 99-111
- [17] Liu XA, Song J, Jiang Q, et al. Expression of the hyperphosphorylated tau attenuates ER stress-induced apoptosis with upregulation of unfolded protein response[J]. *Apoptosis*, 2012, 17: 1039-1049
- [18] Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress[J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13: 184-190
- [19] L E Dalton, H J Clarke, J Knight, et al. The endoplasmic reticulum stress marker CHOP predicts survival in malignant mesothelioma[J]. *British Journal of Cancer*, 2013, 108: 1340-1347
- [20] Yokoyama M. Oxidant stress and atherosclerosis [J]. *Current Opin Pharmacol*, 2004, 4: 110-119
- [21] Xu Z R, Hu L, Cheng L F, et al. Dihydrotestosterone protects human vascular endothelial cells from H₂O₂-induced apoptosis through inhibition of caspase-3, caspase-9 and p38 MAPK [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 643: 254-259
- [22] Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature molecular and cellular mechanisms[J]. *Hypertension*, 2003, 42: 1075-1081