

缺氧诱导内皮祖细胞中孤儿核受体 基因 *Nur77* 的表达

夏爽 张玉 邓松柏 余强*

(重庆医科大学第二附属医院心血管内科, 重庆 400010)

摘要 孤儿核受体 *Nur77* 蛋白是早期反应转录因子之一, 多种刺激因子如缺氧可诱导其迅速表达, 参与调控细胞增殖、存活、分化等过程。内皮祖细胞移植可治疗缺血性疾病, 缺氧是其移植后主要的早期刺激因素, 缺氧诱导下内皮祖细胞的基因表达及其增殖、分化、凋亡的变化目前尚不清楚。本文研究了大鼠骨髓来源的内皮祖细胞缺氧诱导下 *Nur77* 基因的表达变化。通过 RT-PCR 和 Western 印迹方法检测 *Nur77* mRNA、蛋白质的表达, 发现正常氧浓度下内皮祖细胞中 *Nur77* 基因几乎不表达, 而 1% 氧浓度诱导 30 min 时 *Nur77* 基因即迅速表达, 其 mRNA 表达量于缺氧 1 h 达到峰值, 随后下降, 缺氧 4 h 时表达量仍高于正常氧浓度下的表达量 ($P < 0.05$); 其蛋白质的表达量持续增加并于 4 h 达到峰值。本研究证实了大鼠骨髓来源的内皮祖细胞中存在 *Nur77* 基因, 缺氧可诱导 *Nur77* 基因迅速表达, 这种表达可能对内皮祖细胞生物学特性的改变产生影响。

关键词 内皮祖细胞; *Nur77*; 缺氧; 孤儿核受体

近年来, 缺血性心脏病在我国发病率和死亡率呈迅速上升趋势, 在传统的药物、手术治疗基础上, 基因、干细胞移植治疗方式获得可喜的研究进展, 有望成为一种有效的治疗途径。其中内皮祖细胞 (endothelial progenitors cells, EPC) 在缺血性心脏病的干细胞治疗领域占据重要的地位^[1]。然而 EPC 移植到缺血组织中在缺氧环境下其细胞本身的基因表达变化以及生物学性状如增殖、凋亡等的改变目前所知甚少。

孤儿核受体 *Nur77* 蛋白 (又称 NR4A1、TR3、NGFI-B、NAK-1) 是 NR4A 孤儿核受体家族中的一员, 为即刻早期基因反应产物, 目前发现它存在于内皮细胞、淋巴细胞、肌细胞等多种细胞中, 在受到细胞外刺激因素如缺氧作用下迅速表达, 调控与增殖、凋亡、炎症相关基因的表达^[2]。然而 *Nur77* 基因在 EPC 中是否表达, 以及其表达在缺氧环境中有什么变化尚不清楚。因此, 本研究将对体外分离培养的 Sprague-Dawley (SD) 大鼠骨髓来源的 EPC (bone marrow-EPC, BM-EPC) 在缺氧环境下 *Nur77* 基因表达的情况进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

清洁级 SD 大鼠, 雄性, 体质量 80~100 g, 购自

重庆医科大学实验动物中心。M199 基础培养基、南美胎牛血清、双抗 (Hyclone 公司), 牛垂体提取物 (bovine pituitary extract, BPE, Millipore 公司), 碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF, Peprotech 公司), 纤连蛋白 (Chemicon 公司), 兔抗大鼠 CD133 抗体 (Abcam 公司), 兔抗大鼠 CD34 (Millipore 公司), FITC 标记山羊抗兔荧光二抗 (中杉金桥公司), 6 孔板 (BD 公司); RNAiso Plus、RT 及 PCR 试剂盒购自大连 TaKaRa 公司, 全蛋白提取试剂盒购自南京凯基生物有限公司, *Nur77* 兔多克隆抗体购自 Abcam 公司 (1:500), 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗 (1:1 000) 购自北京中杉金桥生物公司, *Nur77* (基因序列号: NM-173157.1) 引物由上海生物工程公司合成。

CO₂ 细胞培养恒温箱 (美国 Forma Scientific 公司), 激光共聚焦成像仪 (LCS-SP2, Leica 公司), 倒置相差显微镜 / 倒置荧光显微镜 (Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 BM-EPC 的采集分离、培养及分组 选用 80~100 g 左右的雄性 SD 大鼠, 采用本课题组实验方

收稿日期: 2009-06-15 接受日期: 2009-09-15

重庆市科学技术委员会 (CSTC, 2008BB5077) 和重庆市卫生局 (渝卫科教 [2004] 53 号) 资助项目

* 通讯作者。Tel: 023-63693751, E-mail: qshe98@hotmail.com

Table 1 Primer sequences and react condition of *Nur77* and *GAPDH* in polymerase chain reaction

Gene	Primers sequences	Product (bp)	Temperature (°C)
<i>Nur77</i>	Forward : 5'-GTTCTCTGGAGGTCATCCGCAAG -3'	326	56.0
	Reverse : 5'-GCAGGGACCTTGAGAAGGCCA -3'		53.0
<i>GAPDH</i>	Forward : 5'-GTGCTGAGTATGTCGTGGAGTCT-3'	610	60.8
	Reverse : 5'-GTGGAAGAATGGGAGTTGCTGT-3'		62.7

法分离培养大鼠股骨骨髓中的 EPC, 并用含 20% FCS、1 ng/ml bFGF、40 μg/ml BPE 的 M199 培养液调整细胞浓度至 1×10^7 个 / 孔, 接种于纤连蛋白预铺的 6 孔板, 置于饱和湿度、37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱培养。于培养的第 5、7、12 天进行细胞表面特异性抗原 CD133、CD34 鉴定和吞噬 Dil-acLDL 功能鉴定。取培养的第 12 天细胞进行分组: 分为 5 组, 每组 3 个复孔, 提前一夜更换为含有 5% 胎牛血清的培养液, 然后分别置于正常氧浓度、1% 氧浓度 30 min、1% 氧浓度 1 h、1% 氧浓度 2 h、1% 氧浓度 4 h, 取出各组细胞进行 *Nur77* 基因表达的检测。

1.2.2 RT-PCR 检测 *Nur77* mRNA 的表达 各组细胞用 RNAiso Plus 试剂提取总 RNA (具体步骤参见试剂说明书)。取 4 μl 总 RNA 逆转录成 20 μl cDNA (试剂盒: Primescript RT reagent Kit; 反应条件: 37 °C, 15 min; 85 °C, 5 s)。以 cDNA 作为 PCR 反应模板扩增目的基因和内参基因, 引物序列、目的片段长度、温度值见表 1。反应条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 退火 30 s, 72 °C 延伸 40 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 各组内参反应体系和条件与所测指标相同。取 5 μl PCR 产物和 1 μl 上样缓冲液, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 全自动凝胶成像分析系统对凝胶成像, Quantity One 4.4.0 软件分析后分别计算 *Nur77* 与 *GAPDH* 吸光度比值代表其相对表达量。

1.2.3 Western 印迹法检测各组 *Nur77* 蛋白表达量 用细胞刮刀刮下各组贴壁细胞并离心收集细胞沉淀, 每管加入 200 μl 裂解液和蛋白酶抑制剂的混合液, 冰上充分裂解 30 min, 4 °C 下 12 000 r/min 离心 5 min, 取 20 μl 上清液 BCA 法测定蛋白质浓度, 酶标仪测定波长, 根据标准曲线计算出蛋白质浓度, 其余上清液中按照 1 : 4 加入上样缓冲液 100 °C 加热 5 min。以 10% SDS-PAGE 分离 *Nur77* 蛋白, 电转移蛋白质至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭, 室温温育 2 h 后弃去封闭液, 加入一抗, 封闭袋中 4 °C 过夜, 弃去一抗, 用 TBS 洗涤 10 min, 共 3 次。弃去 TBS, 加入二抗 37 °C 温育 1 h, 弃去二抗, 用 TBS 洗涤 10 min, 共 3 次。增强化学发光显影, 置于凝胶图像分析系统分

Table 2 The mRNA and protein expression level of *Nur77* in BM-EPC cultured of all groups

Groups	n	<i>Nur77</i> mRNA	<i>Nur77</i> protein
Control	6	0.18±0.01 _{b,c,d,e}	0.06±0.02 _{b,c,d,e}
30 min	6	0.37±0.01 _{a,c,d,e}	0.15±0.01 _{a,c,d,e}
1 h	6	1.18±0.04 _{a,b,d,e}	0.23±0.02 _{a,b,d,e}
2 h	6	0.76±0.06 _{a,b,c,e}	0.30±0.01 _{a,b,c,e}
4 h	6	0.28±0.03 _{a,b,c,d}	0.45±0.01 _{a,b,c,d}

a: $P < 0.05$, compared with control group; b: $P < 0.05$, compared with 30 min group; c: $P < 0.05$, compared with 1 h group; d: $P < 0.05$, compared with 2 h group; e: $P < 0.05$, compared with 4 h group.

析条带灰度。

1.2.4 统计学处理 上述实验重复 2 次, 所有计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析, 各组间 mRNA 及蛋白质表达量均数比较采用单因素方差分析, 两两间多重比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠 BM-EPC 分离、培养和鉴定结果

体外分离培养的大鼠 BM-EPC 于 3~5 天后开始呈集落样生长, 细胞膜特异性抗原 CD133、CD34 呈现阳性, 而在 12 天时 BM-EPC 具有吞噬 Dil-LDL 的功能, 说明体外分离培养 BM-EPC 成功(图 1)。

2.2 *Nur77* mRNA 和蛋白质的表达

正常氧浓度组中未检测到 *Nur77* mRNA 的表达, 而缺氧 30 min 时 *Nur77* mRNA 已经开始升高, 并于 1 h 时达到高峰, 2 h 时持续升高, 4 h 时表达下降低于 30 min 组, 但仍高于正常组。同样的正常氧浓度组中未检测到 *Nur77* 蛋白的表达, 但是在缺氧后呈现逐步升高的趋势, 并于缺氧 4 h 时达到高峰(图 2、图 3、表 2)。

3 讨论

内皮祖细胞存在于人出生后的外周循环血液中, 其具有分化成血管内皮细胞的能力, 表面标志为 CD34⁺。二十多年的研究证实了 EPC 移植可使缺血

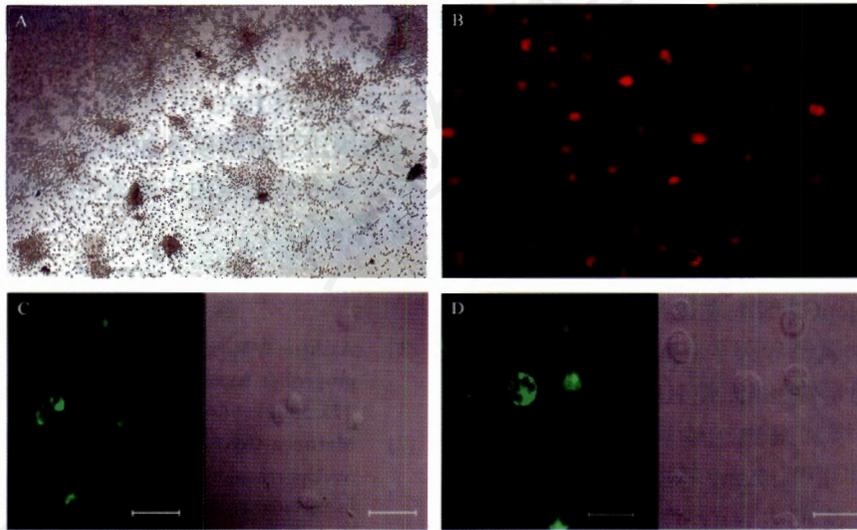


Fig.1 BM-EPC characterization

A: BM-Cells colonies (inverted Microscope, 4 \times); B: adherent cells were positive for uptake of DiI-labeled acetylated LDL (fluorescence microscopy, 10 \times); C: CD133 were positively expressed in BM-EPC by immunofluorescence staining (laser scanning confocal microscopy, 100 \times). Bar=30 μ m; D: CD34 were positively expressed in BM-EPC by immunofluorescence staining (laser scanning confocal microscopy, 200 \times). Bar=15 μ m.

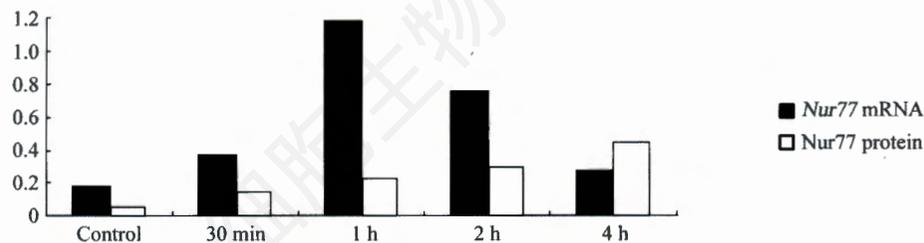


Fig.2 The mRNA and protein expression level of *Nur77*

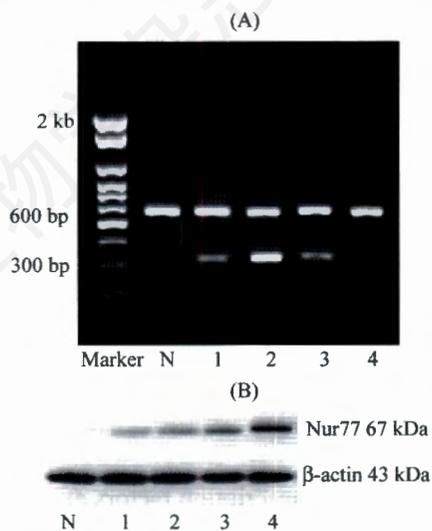


Fig.3 The mRNA (A) and protein (B) expression of *Nur77* in BM-EPC cultured in hypoxia with different time point

N: control group; 1: 30 min group; 2: 1 h group; 3: 2 h group; 4: 4 h group.

组织血流增加、毛细血管密度增加、改善缺血组织的功能, 因此可以用来治疗缺血性疾病。最近有研究把EPC作为基因载体细胞, 携带促血管生成因子移植入缺血组织, 使更少数量的EPC移植发挥更强的促血管生成的能力, 起到事半功倍的效果^[3]; 缺血是许多基因尤其是凋亡、增殖相关基因的天然刺激因子, 而在缺血环境下EPC基因的表达发生了什么变化, 这些基因的表达对移植的EPC增殖、分化、存活、凋亡等生物学功能起到什么作用, 目前研究尚未阐明。

Nur77 蛋白是甾体类固醇孤儿核受体转录因子NR4A 家族之一, 可以上调或抑制基因的表达, 它的结构由N末端转活区域、DNA结合区域以及C末端配体结合区域组成。缺氧、生长因子、脂多糖、低密度脂蛋白等可以诱导 *Nur77* 基因在平滑肌细胞、内皮细胞、巨噬细胞等细胞中表达升高。我们的研究发现, 体外分离培养的大鼠BM-EPC在正常氧浓度下无 *Nur77* 基因的表达, 但是在1%氧气浓度

中 30 min *Nur77* 基因 mRNA 表达迅速升高, 并且在缺氧 1 h 达到高峰, 随后表达逐渐下降, 缺氧 4 h 时表达仍高于正常, 但低于缺氧 30 min 时。而 *Nur77* 蛋白的表达则在 30 min 时开始升高, 随后逐渐升高并于缺氧 4 h 达到高峰, 证明了 *Nur77* 基因在 EPC 可以被缺氧诱导表达。表达升高的 *Nur77* 基因可以参与细胞增殖、存活、分化等生物功能。有研究报道缺氧可以诱导肝脏 HepG2 细胞表达 *Nur77* 蛋白, 而其表达增高可以维持缺氧诱导因子 1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) 的稳定性, 继而使 HIF-1 启动一些靶基因的转录以发挥增加细胞运输氧、以及调节代谢、促细胞存活的作用^[4]。Zeng 等^[5]的研究表明, 人脐静脉内皮细胞中过表达 *Nur77* 蛋白可以引起 VEGF-A 依赖性的细胞增殖、存活和细胞周期相关基因的表达, 提示 *Nur77* 核受体与血管新生有关。然而在 Pei 等^[6]的研究显示平滑肌细胞中过表达 *Nur77* 蛋白可以抑制内膜损伤诱导的新生内膜增生, 最近的研究也提示 *Nur77* 蛋白起到抑制细胞增殖的作用, 并可异位于线粒体中诱导胸腺细胞凋亡^[7,8]。此外, 有研究证明 *Nur77* 可以诱导 *IκBα* 表达从而抑制内皮细胞的活性^[9]。因此 *Nur77* 蛋白的表达在细胞增殖、存活、分化等功能中占据重要地位, 而缺氧诱导 EPC 中 *Nur77* 基因的表达上调, 可能参与 EPC 的增殖和分化的过程, 这些生物学功能在 EPC 移植入缺血组织并生成新生血管的过程中至关重要, 或许通过调控 *Nur77* 基因的表达可以促进 EPC 血管生成的作用。

本研究发现体外分离培养的大鼠骨髓内皮祖细胞在缺氧诱导下 *Nur77* 蛋白表达上调, 并在缺氧不同时间点表达出现动态变化。作为早期即刻基因, 其表达的迅速上调可能会引起内皮祖细胞生物学功能

上的改变, 进而可能影响内皮祖细胞移植在治疗性血管发生中的作用。然而 *Nur77* 蛋白的表达上调通过何种方式对 EPC 中调节细胞分化、增殖、存活相关基因进行激活以及如何对 *Nur77* 基因进行调控使 EPC 更有效地应用于缺血性疾病的治疗仍需进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis, *Science*, 1997, 275(5302): 964-967
- [2] Martínez-González J, Badimon L. The NR4A subfamily of nuclear receptors: new early genes regulated by growth factors in vascular cells, *Cardiovasc Res*, 2005, 65(3): 609-618
- [3] Badorff C, Dimmeler S. Neovascularization and cardiac repair by bone marrow-derived stem cells, *Handb Exp Pharmacol*, 2006, (174): 283-298
- [4] Yoo YG, Yeo MG, Kim DK, *et al.* Novel function of orphan nuclear receptor *Nur77* in stabilizing hypoxia-inducible factor-1 α , *J Biol Chem*, 2004, 279(51): 53365-53373
- [5] Zeng H, Qin L, Zhao D, *et al.* Orphan nuclear receptor TR3/*Nur77* regulates VEGF-A-induced angiogenesis through its transcriptional activity, *J Exp Med*, 2006, 203(3): 719-729
- [6] Pei L, Castrillo A, Chen M, *et al.* Induction of NR4A orphan nuclear receptor expression in macrophages in response to inflammatory stimuli, *J Biol Chem*, 2005, 280(32): 29256-29262
- [7] Pires NM, Pols TW, de Vries CM, *et al.* Activation of nuclear receptor *Nur77* by 6-mercaptopurine protects against neointima formation, *Circulation*, 2007, 115(4): 493-500
- [8] Thompson J, Winoto A. During negative selection, *Nur77* family proteins translocate to mitochondria where they associate with Bcl-2 and expose its proapoptotic BH3 domain, *J Exp Med*, 2008, 205(5): 1029-1036
- [9] You B, Jiang YY, Chen S, *et al.* The orphan nuclear receptor *Nur77* suppresses endothelial cell activation through induction of *IκBα* expression, *Circ Res*, 2009, 104(6): 742-749

The Orphan Nuclear Receptor Gene *Nur77* Expression Induced by Hypoxia in Endothelial Progenitor Cells

Shuang Xia, Yu Zhang, Song-Bai Deng, Qiang She*

(Department of Cardiovascular Medicine, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract Orphan nuclear receptor *Nur77* was one of early response transcription factors expressed under many stimuli such as hypoxia, and has been shown to be functionally involved in cell apoptosis, proliferation and differentiation. endothelial progenitor cell (EPC) had been used to treat ischemic disease. Hypoxia was the main and early stimulation after EPC transplantation in ischemic tissue; however, the gene expression and bionomic changes of EPC under hypoxia condition had not been well understood. Therefore we studied the dynamic changes of *Nur77*

gene expression in EPC isolated from rat's bone marrow (BM-EPC) and cultured in a hypoxia environment, with *Nur77* mRNA and protein levels detected using reverse transcriptase PCR and Western blotting. We found that *Nur77* gene was not expressed in BM-EPC cultured in normal oxygen concentration while its expression was significantly augmented after cultured in 1% oxygen concentration for 30 min, and that mRNA achieved its highest level within 1 h, then decreased. Nevertheless, the mRNA level of *Nur77* remained significantly higher in hypoxia environment 4 h, compared with that in normal oxygen concentration ($P < 0.05$). However, *Nur77* increased continuously and achieved its highest level within 4 h. We thereby demonstrated in this study that *Nur77* gene existed in BM-EPC, and the expression of *Nur77* gene was induced by hypoxia.

Key words endothelial progenitor cells; *Nur77*; hypoxia; orphan nuclear receptor

Received: June 15, 2009 Accepted: September 15, 2009

This work was supported by the Chongqing Science and Technology Commission (CSTC, 2008BB5077) and the Chongqing Municipal Health Bureau (No.[2004]53)

*Corresponding author. Tel: 86-23-63693751, E-mail: qshe98@hotmail.com