

泌,进而调节 LH 和 FSH 释放。本研究结果显示 DIO 组和 DIO-R 组小鼠 Kiss-1 mRNA 表达明显低于对照组小鼠,同 Smith 等<sup>[10]</sup>研究一致,提示肥胖小鼠可能因为 Kiss-1 mRNA 表达降低,进而影响 GnRH 分泌,通过下丘脑-垂体-睾丸轴,最终影响雄性生殖功能,但具体机制需要进一步验证。

#### 参考文献

- [1] Kumanyika SK, Obarzanek E, Stettler N, et al. Population-based prevention of obesity: the need for comprehensive promotion of healthful eating, physical activity, and energy balance: a scientific statement from American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention, Interdisciplinary Committee for Prevention (formerly the Expert Panel on Population and Prevention Science) [J]. *Circulation*, 2008, 118(4): 428-464.
- [2] Reis LO, Dias FG. Male fertility, obesity, and bariatric surgery [J]. *Reprod Sci*, 2012, 19(8): 778-785.
- [3] Tena-Sempere M. GPR54 and kisspeptin in reproduction [J]. *Hum Reprod Update*, 2006, 12(5): 631-639.

- [4] George JT, Millar RP, Anderson RA. Hypothesis: kisspeptin mediates male hypogonadism in obesity and type 2 diabetes [J]. *Neuroendocrinology*, 2010, 91(4): 302-307.
- [5] 翟玲玲, 赵剑, 白英龙, 等. 肥胖对小鼠生殖功能影响及与性激素关系 [J]. *中国公共卫生*, 2011, 27(2): 204-205.
- [6] Levin BE. Arcuate NPY neurons and energy homeostasis in diet-induced obese and resistant rats [J]. *The American Journal of Physiology*, 1999, 276(2 pt 2): 382-387.
- [7] Cabler S, Agarwal A, Flint M, et al. Obesity: modern man's fertility nemesis [J]. *Asian J Androl*, 2010, 12(4): 480-489.
- [8] Dungan HM, Clifton DK, Steiner RA. Minireview: kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion [J]. *Endocrinology*, 2006, 147(3): 1154-1158.
- [9] Colledge WH. GPR54 and kisspeptins [J]. *Results Probl Cell Differ*, 2008, 46: 117-143.
- [10] Smith JT, Acohido BV, Clifton DK, et al. Kiss-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse [J]. *Journal of Neuroendocrinology*, 2006, 18(4): 298-303.

收稿日期: 2012-06-27

(解学魁编辑 韩仰欢校对)

#### · 实验研究 ·

## AP-1 在锌离子诱导 BEAS-2B 细胞 COX-2 基因转录中作用\*

燕贞, 逯洋, 李娟, 张巧, 李时恩, 吴逸明, 吴卫东

**摘要:**目的 探讨外源性锌离子对人支气管上皮细胞环氧化酶 2(COX-2) 基因诱导表达及转录因子激活蛋白-1(AP-1) 的转录活性调节作用。方法 以人支气管上皮细胞株 BEAS-2B 作为体外模型, Real-time PCR 方法检测锌离子对 BEAS-2B 细胞 COX-2 基因表达影响; 染色质免疫沉淀(ChIP) 实验检测 50.0 μmol/L 锌离子温育 8 h 后 c-Jun(AP-1 亚单位) 和 COX-2 启动子的结合; 用野生型和 AP-1 结合位点突变的 COX-2 启动子报告质粒转染 BEAS-2B 细胞, 50.0 μmol/L 锌离子温育 8 h, 采用荧光素酶报告基因检测 COX-2 基因启动子转录活性。结果 50.0 μmol/L Zn<sup>2+</sup> 组 BEAS-2B 细胞中 COX-2 的 mRNA 相对表达量为 (1.23 ± 0.16), 是对照组表达量 (0.16 ± 0.02) 的 7.68 倍, 表达明显升高 ( $P < 0.05$ ); AP-1 可与 COX-2 的基因启动子结合, COX-2 基因启动子区 AP-1 结合位点突变可使锌离子所致的 COX-2 高转录活性降低 82%。结论 转录因子 AP-1 可调节外源性锌离子所致人支气管上皮细胞 COX-2 基因的转录表达。

**关键词:** 锌离子; 激活蛋白-1(AP-1); 环氧化酶 2(COX-2) 基因; BEAS-2B 细胞

中图分类号: R 994.6 文献标志码: A 文章编号: 1001-0580(2013)07-1001-03 DOI: 10.11847/zgggs2013-29-07-19

## Regulatory role of AP-1 to COX-2 transcriptional activity induced by exogenous zinc in bronchial epithelial cells

YAN Zhen, LU Yang, LI Juan, et al (Department of Occupational Medicine, College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan Province 450001, China)

**Abstract: Objective** To examine cyclooxygenase 2 (COX-2) transcriptional activity induced by exogenous zinc in bronchial epithelial cells and the regulatory role of activator protein-1 (AP-1). **Methods** Human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) were employed as the *in vitro* model. Expression of COX-2 mRNA was determined by real-time reverse transcription PCR (RT-PCR). Chromatin immunoprecipitation assay (ChIP) was used to investigate whether AP-1 (c-Jun) could bind to the COX-2 gene promoter in BEAS-2B cells incubated with 50.0 μmol/L Zn<sup>2+</sup> for 8 hours. Transcriptional activity of COX-2 promoter in Zn<sup>2+</sup>-treated BEAS-2B cells was measured using transient gene transfection luciferase reporter construct which was wild type or mutated at AP-1 binding site in the COX-2 promoter. **Results** Exposure of BEAS-2B cells to 50.0 μmol/L Zn<sup>2+</sup> induced significantly high expression of COX-2 mRNA which was 7.68

\* 基金项目: 国家自然科学基金 (81001240)

作者单位: 郑州大学公共卫生学院劳动卫生学教研室, 河南 郑州 450001

作者简介: 燕贞 (1980-), 女, 河南南阳人, 讲师, 博士, 研究方向: 职业肿瘤与分子毒理学。

通讯作者: 吴卫东, E-mail: wdwu98@gmail.com

folds over the control group of 0  $\mu\text{mol/L Zn}^{2+}$ .  $\text{Zn}^{2+}$  stimulation resulted in a marked increase in the binding of AP-1 (c-Jun) to the COX-2 gene promoter. Mutation of the AP-1 site significantly reduced  $\text{Zn}^{2+}$ -induced COX-2 promoter activity. **Conclusion** AP-1 regulates COX-2 expression in BEAS-2B cells exposed to exogenous  $\text{Zn}^{2+}$ .

**Key words:**  $\text{Zn}^{2+}$ ; AP-1; COX-2; BEAS-2B cell

锌离子 ( $\text{Zn}^{2+}$ ) 是大气污染细颗粒物的主要水溶性金属成分<sup>[1]</sup>, 研究表明, 长期吸入空气中含锌颗粒物与当地居民呼吸系统炎症性疾病的发病率升高有密切关系<sup>[2]</sup>。气管灌注含锌化合物, 可导致大鼠以中性粒细胞及蛋白渗出为主的呼吸道炎症<sup>[3]</sup>, 但机制尚不清楚。环氧化酶 2 (cyclooxygenase 2, COX-2) 是催化花生四烯酸合成前列腺素的限速酶, COX-2 表达水平升高已证实与慢性炎症有关<sup>[4-5]</sup>。COX-2 基因的启动子序列上游包括 1 个保守的启动子序列 TATA 盒和一些与早期应答相关的顺式作用元件, 其中包括核转录因子 (nuclear factor kappa B, NF $\kappa$ B) 位点, 激活蛋白-1 (activator protein-1, AP-1) 位点等<sup>[6]</sup>。不同刺激因子可诱导不同转录因子结合于不同的调控位点, 促进 COX-2 转录, COX-2 的诱导表达机制与刺激因子的种类和细胞组织特性有关<sup>[7]</sup>。为此, 本研究以永生化的支气管上皮细胞株 BEAS-2B 作为体外模型, 观察锌离子对细胞内 COX-2 的诱导表达及 AP-1 的转录调节作用。

## 1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 硫酸锌、Triton X-100、聚丙稀酰胺 (美国 Sigma 公司), 角化细胞生长培养液 (keratinocyte growth medium, KGM) (美国 Clonetics 公司), RNA 提取试剂 (美国 Invitrogen 公司), TaqMan master mix (美国 Perkin-Elmer 公司), 莫洛尼鼠类白血病病毒 (MMLV) 逆转录酶 (美国 Life Technologies 公司), Fugene 6 转染试剂 (瑞士 Roche 公司), 染色质免疫沉淀 (ChIP) 试剂盒 (美国 Upstate 公司), AP-1 亚单位 c-Jun 抗体 (美国 Cell Signaling 公司), ABI Prism 7700 Sequence Detector (美国 Applied Biosystems 公司), Gene Gynome Imagine System (美国 Syngene 公司), AutoLumat LB953 luminometer (德国 Berthold 公司)。

1.2 细胞与培养 BEAS-2B (S6) (美国 ATCC 公司), 细胞培养液为 KGM, 细胞在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱内培养, 乙二胺四乙酸-胰酶消化、传代。

1.3 COX-2 的转录表达 采用 real-time PCR 法, 引物及 TaqMan 荧光探针序列设计如下: COX-2 扩增片段 67 bp, 上游引物: 5'- GAATCATTCACCAG-GCAAATT G -3', 下游引物: 5'- TCT GTA CTG CGG GTG GAA CA -3', 探针: 5'- TCC TAC CAC CAG CAA CCC TGC CA -3'; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 扩增片段 226 bp, 上游引物: 5'- GAA GGT GAA GGT CGG AGT C -3', 下游引物: 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC -3', 探针: 5'- CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC -3'。用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 将硫酸锌配成 0 (对照组)、12.5、25.0、50.0  $\mu\text{mol/L}$  溶液, 分别刺激 BEAS-2B 细胞 8 h, 收集细胞, 加入 Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 逆转录合成 cDNA。PCR 扩增条件为: 反应终体积为 50  $\mu\text{L}$ , 反应体系包含 TaqMan master mix、1.25  $\mu\text{mol/L}$  荧光探针、3  $\mu\text{mol/L}$  上、下游引物。PCR 运行参数为: 50  $^{\circ}\text{C}$ , 2 min; 95  $^{\circ}\text{C}$ , 10 min; 95  $^{\circ}\text{C}$ , 15 s, 60  $^{\circ}\text{C}$ , 1 min, 40 个循环。COX-2 mRNA 的表达水平用 GAPDH 表达量进行标化。

1.4 AP-1 与 COX-2 的结合作用测定 将 BEAS-2B 细胞接种在 100  $\text{cm}^2$  培养瓶中, 培养至对数生长期加入 50.0  $\mu\text{mol/L}$  硫酸锌溶液并温育 8 h, 甲醛固定, 参照试剂盒说明书方法进行 ChIP 实验, PBS 漂洗后, 裂解细胞, 收集裂解液超声破碎。用 salmon sperm DNA/protein A agarose 清除染色质里非特异性抗体, 取上清分别加入 c-jun 抗体和阴性对照 IgG 抗体, 同时加入 salmon sperm DNA 和 protein G-Sepharose beads, 孵育 2 h。用低盐、高盐洗液及氯化锂洗液依次清洗 beads, 进行蛋白质 DNA 复合物的洗脱及 DNA 的去交联和纯化。取 2  $\mu\text{L}$  DNA 模板用 COX-2 启动子区特异性引物进行 PCR 扩增, PCR 反应扩增条件: 95  $^{\circ}\text{C}$ , 2 min, 95  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s, 35 个循环。取 5  $\mu\text{L}$  PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳。Input DNA 是清除了染色质中非特异性的抗体后直接进行去交联和纯化的基因组 DNA, 作为阳性对照。

1.5 COX-2 转录活性检测 克隆人 COX-2 基因启动子及 AP-1 结合位点突变的启动子, 与  $\beta$ -半乳糖苷酶报告基因载体 (pSV- $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -gal) 重组构建 (美国北卡罗来纳大学环境医学研究所赠送)。将 BEAS-2B 细胞接种到 24 孔细胞培养板内, 至细胞增长至 40% ~ 50% 融合时, 利用 Fugene6 转染试剂分别将  $\beta$ -gal 与 COX-2 启动子区 AP-1 结合位点突变的质粒 pAP-1-luc (荧光素酶基因) 共同转染到 BEAS-2B 细胞内。每孔内加入 1.2  $\mu\text{L}$  Fugene6 转染液、0.2  $\mu\text{g}$   $\beta$ -gal 及 0.2  $\mu\text{g}$  pAP-1-luc, 并以野生型的启动子荧光素酶报告质粒作为对照。培

养 24 h, 加入 50.0  $\mu\text{mol/L}$  锌溶液温育 8 h, PBS 洗 2 次, 裂解细胞。收集细胞裂解液, 按 Luciferase Assay System 的说明书测定裂解液中基因荧光强度。COX-2 的转录活性以荧光素酶的荧光强度和  $\beta\text{-gal}$  的荧光强度比值表示。

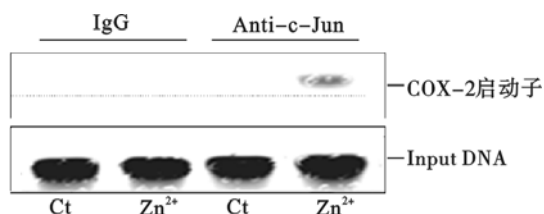
1.6 统计分析 数据以  $(\bar{x} \pm s)$  表示, 应用 SPSS 12.0 统计软件进行统计分析。采用单因素方差分析比较各组 BEAS-2B 细胞中 COX-2 mRNA 表达水平, 两两比较采用最小显著差法检验; 转录活性的比较采用  $t$  检验。检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 锌离子对 BEAS-2B 细胞 COX-2 转录影响

对照组、12.5、25.0、50.0  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Zn}^{2+}$  组 BEAS-2B 细胞中 COX-2 mRNA 相对表达量分别为  $(0.16 \pm 0.02)$ 、 $(0.14 \pm 0.06)$ 、 $(0.17 \pm 0.06)$ 、 $(1.23 \pm 0.16)$ ; 与对照组比较, 50.0  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Zn}^{2+}$  组 BEAS-2B 细胞中 COX-2 的 mRNA 表达量升高 7.68 倍 ( $P < 0.05$ )。

2.2 AP-1 与 COX-2 的结合作用验证 (图 1) 在 50.0  $\mu\text{mol/L}$  硫酸锌刺激 8 h 时, COX-2 启动子可和 AP-1 亚单位 c-Jun 特异性结合, 提示在锌离子刺激下转录因子 AP-1 可结合于 COX-2 启动子, 从而促进 COX-2 转录。



注: Ct: 对照组;  $\text{Zn}^{2+}$ : 50.0  $\mu\text{mol/L}$  硫酸锌组。

图 1 外源性锌诱导 COX-2 启动子与 AP-1 结合

2.3 COX-2 启动子区 AP-1 突变对锌离子诱导的转录活性影响 在 50.0  $\mu\text{mol/L}$  硫酸锌刺激 8 h 时, COX-2 启动子区 AP-1 结合位点突变质粒和野生型质粒转染的 BEAS-2B 细胞内荧光素酶的活性分别为  $(1.71 \pm 0.33)$ 、 $(9.19 \pm 2.02)$ , 差异有统计学意义 ( $t = 6.321$ ,  $P < 0.05$ )。COX-2 基因启动子区 AP-1 结合位点突变可使锌离子所致的 (COX-2) 高转录活性降低 82%, 提示 AP-1 在锌离子诱导的 COX-2 转录活性中具有重要调控作用。

## 3 讨论

环氧化酶 (cyclooxygenase, COX) 有 COX-1、COX-2、COX-3 3 种同工酶。COX-1 是一种持续表达的结构酶, 发挥看家作用, 主要调节生理性前列腺素合成; COX-3 是一种新型剪接异构体, 与 COX-1

源于同一基因, 主要在心、脑组织持续表达; COX-2 又称诱导型环氧化酶, 在正常生理状态下多数组织中不表达或者低表达, 但可在生长因子、内毒素及肿瘤促进因子诱导下产生, 是一种早期应答基因, 属于炎症相关酶<sup>[8]</sup>。

COX-2 作为在炎症发生中具有重要作用的因子, 其调控机制尤为重要。各种刺激因子可通过不同的信号转导通路作用于 COX-2 启动子调控序列, 促进 COX-2 转录, COX-2 的诱导表达机制与刺激因子的种类和细胞组织特性有关。成纤维细胞 L929 在肿瘤坏死因子  $\alpha$  刺激下可通过鞘氨醇激酶信号诱导 COX-2 的表达; 表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 对关节软骨细胞中的 COX-2 的诱导表达是通过细胞外调节蛋白激酶和 p38 丝裂原激活蛋白激酶信号通路进行调控<sup>[9]</sup>。本研究结果显示, 锌离子刺激可提高 BEAS-2B 细胞 COX-2 的 mRNA 表达, 而且锌离子刺激可使 AP-1 与 COX-2 启动子结合, 当 COX-2 启动子区 AP-1 结合位点突变时可降低锌离子所致的转录活性, 提示转录因子 AP-1 对锌离子所诱导的 COX-2 转录表达具有重要的调控作用。

## 参考文献

- [1] Wang X, Bi X, Sheng G, et al. Hospital indoor PM 10/PM 2.5 and associated trace elements in Guangzhou, China [J]. Science of the Total Environment, 2006, 366(1): 124 - 135.
- [2] Schreuder AB, Larson TV, Sheppard L, et al. Ambient woodsmoke and associated respiratory emergency department visits in Spokane, Washington [J]. Int J Occup Environ Health, 2006, 12(2): 147 - 153.
- [3] Warheit DB, Sayes CM, Reed KL. Nanoscale and fine zinc oxide particles; can *in vitro* assays accurately forecast lung hazards following inhalation exposures? [J]. Environ Sci Technol, 2009, 43(20): 7939 - 7945.
- [4] 李宝龙, 何灿霞, 王凤前, 等. 莱菔硫烷对膀胱癌细胞增殖抑制作用 [J]. 中国公共卫生, 2012, 28(2): 189 - 191.
- [5] Chen JJ, Huang WC, Chen CC. Transcriptional regulation of cyclooxygenase-2 in response to proteasome inhibitors involves reactive oxygen species-mediated signaling pathway and recruitment of CCAAT/enhancer-binding protein delta and CREB-binding protein [J]. Mol Biol Cell, 2005, 16(12): 5579 - 5591.
- [6] Kim SH, Oh JM, No JH, et al. Involvement of NF-kappaB and AP-1 in COX-2 upregulation by human papillomavirus 16 E5 oncoprotein [J]. Carcinogenesis, 2009, 30(5): 753 - 757.
- [7] Wu W, Silbajoris RA, Cao D, et al. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by cAMP response element and mRNA stability in a human airway epithelial cell line exposed to zinc [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2008, 231(2): 260 - 266.
- [8] Li CJ, Chang JK, Wang GJ, et al. Constitutively expressed COX-2 in osteoblasts positively regulates Akt signal transduction via suppression of PTEN activity [J]. Bone, 2011, 48(2): 286 - 297.
- [9] Wu W, Silbajoris RA, Whang YE, et al. p38 and EGF receptor kinase-mediated activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway is required for  $\text{Zn}^{2+}$ -induced cyclooxygenase-2 expression [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 289(5): L883 - 889.