

研究论文

微管相关肿瘤抑制因子1通过血红素加氧酶1抑制血红素诱导的血管内皮细胞凋亡

武生云¹, 程珂茹², 周妍芸¹, 汪引芳^{1,2,*}

¹上海中医药大学附属普陀医院中心实验室, 上海 200062; ²安徽医科大学基础医学院, 合肥 230032

摘要: 本研究旨在探讨微管相关肿瘤抑制因子1 (microtubule associated tumor suppressor 1, MTUS1)对血红素诱导的血管内皮细胞凋亡的影响, 并探讨其对血红素加氧酶1 (hemeoxygenase 1, HMOX1)表达的影响及具体机制。采用RNA 测序、RT-qPCR和Western blot分析MTUS1敲低后人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)中血红素结合相关蛋白、cAMP反应元件结合蛋白(cAMP response element-binding protein, CREB)和核呼吸因子2 (nuclear respiratory factor 2, NRF2)表达的变化, 及MTUS1敲低对血红素诱导的HMOX1表达变化, CREB和NRF2过表达对MTUS1敲低介导的293T细胞中HMOX1表达变化的影响; CCK8及Western blot检测MTUS1或者HMOX1敲低对血红素诱导的HUVEC凋亡和存活的影响, NRF2过表达对MTUS1敲低介导的血红素诱导的293T细胞存活的影响。结果显示: 小分子干扰RNA有效敲低HUVEC中MTUS1表达($P < 0.01$), HUVEC中MTUS1敲低后, 血红素结合相关蛋白中HMOX1下调显著($P < 0.01$); MTUS1敲低能够抑制血红素诱导的HUVEC中HMOX1上调($P < 0.01$), 并能促进血红素诱导的HUVEC凋亡; HMOX1敲低能促进血红素诱导的HUVEC凋亡($P < 0.01$); MTUS1敲低能抑制HUVEC中CREB和NRF2表达, NRF2过表达能部分逆转MTUS1敲低引起的293T细胞中HMOX1下调, 并能部分逆转MTUS1敲低加剧的血红素诱导的293T细胞凋亡效应, 但是CREB过表达不能。上述结果提示MTUS1部分通过NRF2上调HUVEC中HMOX1表达, 从而抑制血红素诱导的血管内皮细胞凋亡。

关键词: 血红素; 血红素加氧酶-1; 人脐静脉内皮细胞; 凋亡; 核呼吸因子2

Microtubule-associated tumor suppressor 1 inhibits hemin-induced apoptosis of vascular endothelial cells via hemeoxygenase 1

WU Sheng-Yun¹, CHENG Ke-Ru², ZHOU Yan-Yun¹, WANG Yin-Fang^{1,2,*}

¹Central Laboratory, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China; ²School of Basic Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032, China

Abstract: This study aimed to investigate the effects of microtubule associated tumor suppressor 1 (MTUS1) on hemeoxygenase 1 (HMOX1) expression and hemin-induced apoptosis of vascular endothelial cells and its regulatory mechanism. RNA sequencing, RT-qPCR and Western blot were used to assess altered genes of hemin binding proteins, the expression of cAMP response element-binding protein (CREB) and nuclear respiratory factor 2 (NRF2), hemin-induced HMOX1 expression in MTUS1 knockdown human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), and the effect of overexpression of CREB and NRF2 on HMOX1 expression in MTUS1 knockdown 293T cells. The effect of MTUS1 or HMOX1 knockdown on hemin-induced apoptosis in HUVEC, and the overexpression of NRF2 on hemin-induced apoptosis in MTUS1 knockdown 293T cells were assayed with CCK8 and Western blot. The results showed that MTUS1 was knocked down significantly in HUVEC by siRNA ($P < 0.01$), accompanied by decreased HMOX1 expression ($P < 0.01$). The increased HMOX1 expression induced by hemin was also inhibited by MTUS1 knockdown ($P < 0.01$). And the apoptosis

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 82170479), the Natural Science Foundation of Shanghai (No. 21ZR1457500) and the Science and Technology Innovation Project of Health System in Putuo District of Shanghai, China (No. ptkwvs202102).

*Corresponding author. Tel: +86-21-22233345; E-mail: wngynfng@163.com

of HUVEC induced by hemin was amplified by MTUS1 or HMOX1 knockdown ($P < 0.01$). Moreover the expression of CREB and NRF2 were both inhibited by MTUS1 knockdown in HUVEC ($P < 0.01$). The decreased HMOX1 regulated by MTUS1 knockdown could be rescued partly by overexpression of NRF2 ($P < 0.01$), however, not by overexpression of CREB. And the MTUS1 knockdown mediated decreased 293T cells viability induced by hemin could be partly rescued by NRF2 overexpression ($P < 0.01$). These results suggest that MTUS1 can inhibit hemin-induced apoptosis of HUVEC, and the mechanism maybe related to MTUS1/NRF2/HMOX1 pathway.

Key words: hemin; hemeoxygenase 1; human umbilical vein endothelial cell; apoptosis; nuclear respiratory factor 2

血管内皮细胞位于血流与血管平滑肌之间,是介于血液与血管壁组织之间的天然屏障。血管内皮损伤是多种心脑血管类疾病的始发因素,血管内皮细胞凋亡是内皮损伤的重要环节,与动脉粥样硬化、高血压等心血管疾病的发生和发展密切相关,因此关于血管内皮细胞凋亡的研究越来越受到关注。

多种因素可激活相同或不同的信号转导通路,诱导血管内皮细胞凋亡。有报道称血红素可增强缺氧/葡萄糖剥夺等因素诱导的脑微血管内皮细胞凋亡,加剧脑缺血造成的脑损伤^[1]。虽然血红素作为血红蛋白的辅基,生理功能主要是辅助供氧,但在脑缺血等病理情况下,红细胞裂解,大量游离血红素可引起炎症介质释放、氧自由基产生,造成严重的血管内皮损伤。血红素加氧酶 1 (hemeoxygenase 1, HMOX1) 是血红素代谢途径中的限速酶之一,可清除有害的游离血红素。近年来的研究证实, HMOX1 在颈动脉粥样硬化、冠心病、脑血管损伤等心脑血管疾病中具有保护作用^[2],提示我们探讨靶向调节血管内皮细胞中 HMOX1 的具体机制对于心脑血管疾病的防治有着重要意义。

微管相关肿瘤抑制因子 1 (microtubule associated tumor suppressor 1, MTUS1), 也叫血管紧张素 II 2 型受体相互作用蛋白 (angiotensin II receptor subtype 2-interacting protein, ATIP), 最初被发现其 C 端可与血管紧张素 II 2 型受体 (angiotensin II receptor subtype 2, AT2) 结合而命名^[3]。研究初期,人们认为 MTUS1 是一个肿瘤抑制因子,其在膀胱癌、前列腺癌、结肠癌、胰腺癌及卵巢癌等许多肿瘤组织中表达下降^[4]。后来,Shinoda 等研究发现 MTUS1 是白色脂肪细胞分化和体热调节功能所必需的^[5]。近期研究发现 MTUS1 在心血管疾病中也发挥重要作用,其在心血管系统发育的过程中高表达^[6]。既往我们的研究发现 MTUS1 敲低可以抑制血管内皮细胞的管腔形成及迁移,并增加活性氧的产生^[7]。MTUS1 与 HMOX1 的关系目前尚未可知,结合前期报道的

HMOX1 在保护血管内皮细胞损伤及清除过量血红素中的重要作用^[8],本研究拟观察 MTUS1 对血红素诱导的血管内皮细胞凋亡的影响,并探讨其对 HMOX1 表达的影响及具体机制,以探讨 MTUS1/HMOX1 系统对血管内皮细胞的保护作用,为心血管相关疾病的防治提供新思路。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 血红素购自 Sigma; 纤维连接蛋白 (fibronectin, FN) 购自 ScienCell, DMEM、双抗 (青霉素和链霉素) 和 0.25% 胰蛋白酶购自 Gibco; 抗 cAMP 反应元件结合蛋白 (cAMP response element-binding protein, CREB) (#9197, 1:1000)、Flag (#14793, 1:1 000) 和 Caspase 3 (#9662, 1:1 000) 抗体购自 Cell Signaling Technology; 抗 MTUS1 (13436-1-AP, 1:1 000)、HMOX1 (10701-1-AP, 1:1 000)、 β -actin (66009-1-Ig, 1:2 000) 抗体购自 Proteintech; HRP 标记的抗小鼠 (#7076, 1:2 000) 和抗兔 (#7074, 1:2 000) 的二抗购自 Cell Signaling Technology。

1.2 细胞培养 人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 及配套的含 5% 胎牛血清、1% 双抗、1% 生长因子补充物的内皮细胞培养液均购自 ScienCell。HUVEC 需种在提前包被了 FN 的培养皿里。293T 细胞株购自上海中乔生物。细胞常规复苏后,于含 10% 胎牛血清、1% 双抗、89% DMEM 培养液中培养。细胞均培养在 37 °C, 5% CO₂ 的培养箱中,每 1~2 天更换培养液,待细胞长至铺满皿底 90% 时,用 0.25% 胰蛋白酶进行消化传代。

1.3 小干扰 RNA (siRNA) 转染 合成针对靶基因 MTUS1、HMOX1 的特异的 siRNA (siMTUS1, siHMOX1) (上海吉玛生物技术有限公司), 设阴性对照 siRNA (siNC), siRNA 片段序列见表 1。siRNA 用 Lipofectamine (购自 Invitrogen) 按照说明书进行转染细胞。48 h 后以 qRT-PCR 和蛋白免疫印迹方法确认基因表达水平。

1.4 RT-qPCR 检测 mRNA 水平 RNAiso PLUS (购自 TaKaRa) 法提取 RNA, 取 1 μ g 总 RNA, 用 PrimeScript RT-PCR Kit (购自 TaKaRa) 反转录成 cDNA, 用 SYBR Premix ExTaq Kit (TaKaRa) 进行荧光实时定量 PCR (qPCR), 检测靶基因 mRNA 表达, 扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。以 18S rRNA 为内参测定靶基因的相对表达量。引物序列见表 2。

1.5 Western blot 检测蛋白水平 含蛋白酶和磷酸蛋白酶抑制剂混合物 (购自 Cell Signaling Technology) 的 RIPA (Pierce) 收集细胞总蛋白, 蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳分离, 转膜。用含 5% 牛血清白蛋白 (BSA, 购自 BBI) 的 0.1% TBST 封闭液封闭 1 h, 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 0.1% TBST 洗膜 3 次后加入相应的二抗, 室温孵育 1 h; 0.1% TBST 洗膜 3 次后 ECL 化学发光法显色 (Bio-Rad)。

1.6 质粒构建和转染 设计引物, 以 293T 细胞株的 DNA 为模板, PCR 扩增 CREB 和带 Flag 标签的核呼吸因子 2 (nuclear respiratory factor 2, NRF2) cDNA 片段, 利用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (购自 TaKaRa) 对 PCR 产物进行回收。通过 In Fusion Dry-Down PCR Cloning Kit (购自 TaKaRa) 连接到 *Kpn*I 酶切后的 pcDNA3.1 载体 (购自 Promega) 上。质粒转化涂板, 鉴定后选取阳性克隆在含氨苄青霉

素的 LB 培养基中扩增。质粒扩增后用质粒中抽试剂盒 (购自 Qiagen) 纯化和提取。质粒用 Lipofectamine 3000 (购自 Invitrogen) 转染到 293T 细胞中。

1.7 CCK8 检测细胞增殖 CCK8 试剂盒购自 Dojindo。将细胞制成 1×10^4 的细胞悬液, 接种于 48 孔板中, 细胞经相应处理后, 加入 CCK8 溶液 (每孔 20 μ L), 继续在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的培养箱中培养 1 h。然后在酶联免疫检测仪器中检测 OD_{450 nm}。

1.8 RNA 测序和差异基因分析 HUVEC 经 siMTUS1 敲低 48 h 后, 使用 RNAiso PLUS (TaKaRa) 按照说明书提取细胞总 RNA。每个样品取 3 μ g 总 RNA 构建转录组测序文库, 文库测序由上海欧易生物科技有限公司完成。对测序后的数据进行过滤和归一化处理, 运用基于超几何分布的 R 分析对照组和 MTUS1 敲低组基因的差异表达。差异表达基因筛选标准如下: $P < 0.05$, 增加倍数 > 2 或者下降倍数 < 0.5 。以“hemin binding”为关键词进行功能聚类分析。

1.9 统计学处理 采用 GraphPad Prism 9 软件进行数据统计分析。计量资料以 mean \pm SEM 表示。两组数据差异的比较采用两独立样本 *t* 检验; 多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有显著统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有极其显著统计学意义。

表1. siRNA序列

Table 1. The sequences of siRNA

Name	Sense (5'→3')	Anti-sense (5'→3')
siNC	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	ACGUGACACGUUCGGAGAATT
siMTUS1	GGAGUUAGAAAGCCUGAAATT	UUUCAGGCUUUCUAACUCCTT
siHMOX1	CUGUCUACUCCAGAAGATT	UCUUCUGGGAAGUAGACAGTT

siNC: negative control siRNA; siMTUS1: MTUS1 siRNA; siHMOX1: HMOX1 siRNA.

表2. RT-qPCR引物序列

Table 2. The sequences of the primers for RT-qPCR

Name	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
MTUS1	TGCTTCGAAACCTTCGACTT	TGTCAATGCCTCAAACCTTGG
HMOX-1	AGTCTTCGCCCTGTCTACT	GCTGGTGTGTAGGGGATGAC
CREB	ATTCACAGGAGTCAGTGGATAT	CACCGTTACAGTGGTGATCC
NRF2	CCAAAACCACCCTGAAAGCA	CCAGGGGCACTATCTAGCTC
18S rRNA	GTAACCCGTTGAACCCCAT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG
CREB plasmid	GCCGTCGACGTCTAGAATGACC- ATGGAATCTGGAGC	CTTCGAATCCGCTAGCATCTGATTTGTGGCAGTAAA
NRF2 plasmid	GTGGATCCGAGCTCGGTACCATG- ATGGACTTGGAGCTGCCG	GTTCTAGAAAGCTTGGTACCGATTACTTGTTCATCG- TCATCCTTGTAAATCGTTTTTCTTAACATCTGGCTTC

2 结果

2.1 敲低MTUS1基因后HUVEC中HMOX1表达下调

在HUVEC中转染 siMTUS1 后, RT-PCR 及 Western blot 验证 MTUS1 的 mRNA 和蛋白水平显著下降 ($P < 0.01$, 图 1A、B)。将 MTUS1 敲低 48 h 后的 HUVEC 进行 RNA 测序, 在检测到的目的基因中以“hemin binding”为关键词聚类分析出 26 个差异表达基因, 与对照组相比, 敲低组中 HMOX1、HCCS、NOS3、SDHC 等 15 个基因有显著差异性, 其中以 HMOX1 下调最明显 ($P < 0.01$, 见图 1C)。RT-PCR 及 Western blot 进一步验证了 MTUS1 敲低显著下调 HUVEC 中 HMOX1 表达 ($P < 0.01$, 图 1D、E)。

2.2 敲低MTUS1增强血红素诱导的HUVEC凋亡

RT-PCR 结果显示血红素可显著诱导 HUVEC

中 HMOX1 表达, 而敲低 MTUS1 可显著抑制这一诱导效应 ($P < 0.01$, 图 2A)。我们进一步运用 CCK8 实验发现血红素可显著抑制 HUVEC 的存活, 而敲低 MTUS1 可进一步增强这一效应 ($P < 0.01$, 图 2B)。Western blot 结果显示血红素可诱导 HUVEC 中 cleaved-caspase 3 表达, 诱导凋亡, 而敲低 MTUS1 可进一步增强血红素诱导的内皮细胞凋亡 ($P < 0.01$, 图 2E)。在 HUVEC 中转染 siHMOX1 后, Western blot 验证 HMOX1 的蛋白水平显著下降 ($P < 0.01$, 图 2C)。而 HMOX1 敲低也可进一步增强血红素抑制 HUVEC 存活的效应 ($P < 0.01$, 图 2D)。

2.3 NRF2过表达部分逆转MTUS1敲低后下调HMOX1表达的效应

RT-PCR 结果显示敲低 HUVEC 中 MTUS1 后,

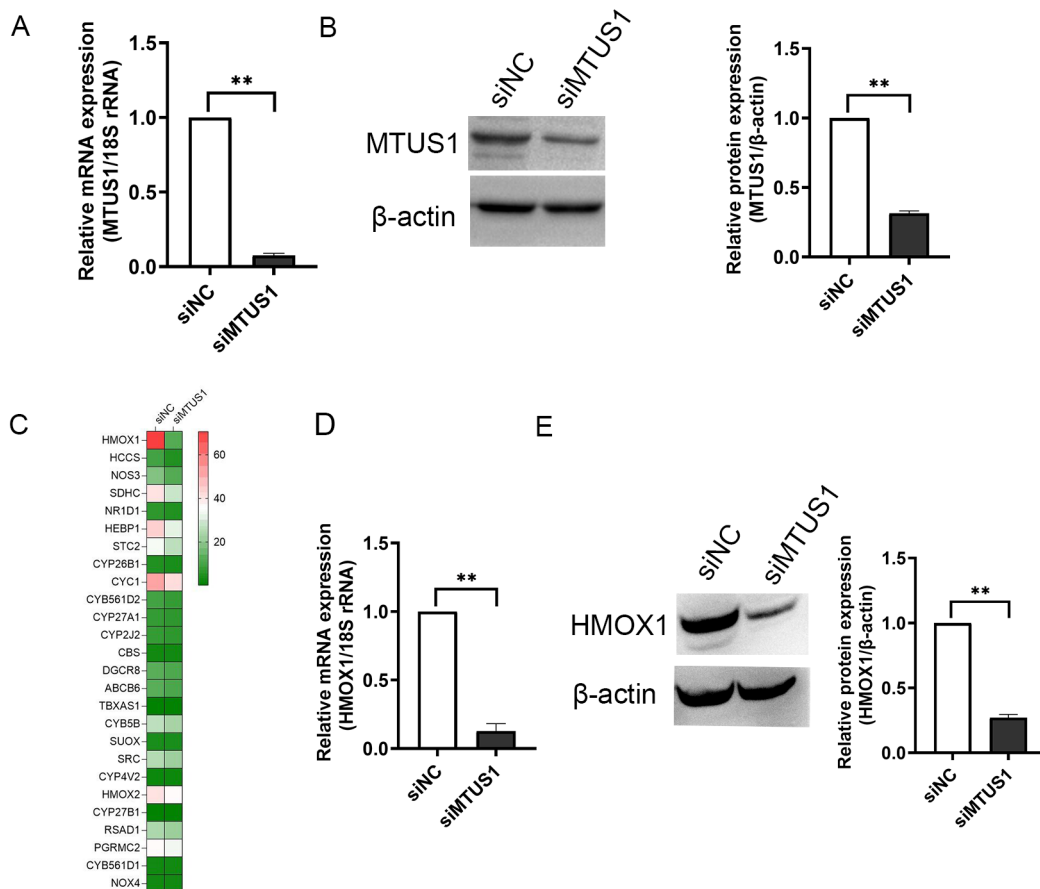


图 1. 敲低MUS1基因下调HUVEC中HMOX1表达

Fig. 1. The expression of HMOX1 was reduced in MTUS1 knock down HUVEC. Cells were treated with the MTUS1 siRNA (siMTUS1) and negative siRNA (siNC) for 48 h. mRNA and protein expression of MTUS1 were determined by RT-PCR (A) and Western blot (Left: representative bands, Right: statistical graph of the relative band intensity) (B), respectively. RNA-sequencing was carried out to characterize the differentially expressed genes in siMTUS1 and siNC treated HUVEC and GO analyses was shown (C). mRNA and protein expression of HMOX1 were determined by RT-PCR (D) and Western blot (Left: representative bands, Right: statistical graph of the relative band intensity) (E), respectively, in siMTUS1 and siNC treated HUVEC. Mean \pm SEM, $n = 3$. ** $P < 0.01$.

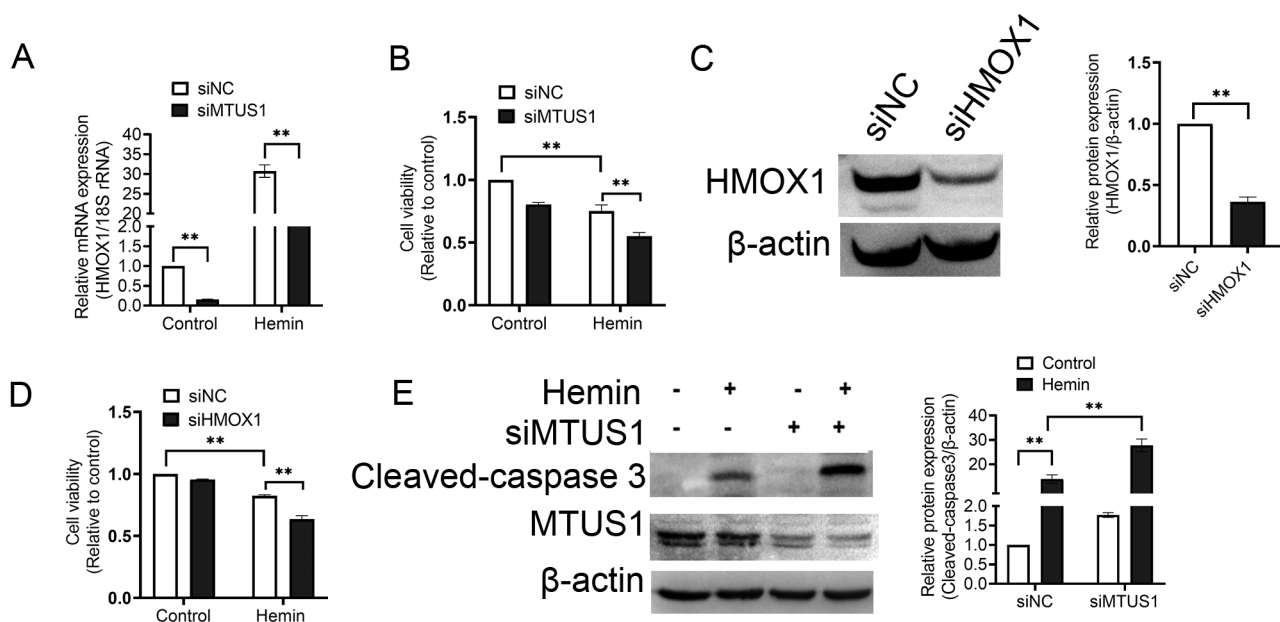


图 2 敲低MTUS1基因抑制血红素诱导的HMOX1表达并增强其诱导的HUVEC凋亡

Fig. 2. The expression of HMOX1 induced by hemin was inhibited, but the apoptosis of HUVEC was exacerbated by MTUS1 knock down. HUVEC were treated with MTUS1 siRNA (siMTUS1) and negative siRNA (siNC) for 24 h, and then with hemin (30 μ M/L) for another 24 h. The mRNA expression of HMOX1 was measured by RT-PCR (A). CCK8 assay was used to detect the cell number relative to control (B). The protein levels of cleaved-caspase 3 were examined by Western blot (Left: representative bands, Right: statistical graph of the relative band intensity) (E). Cells were treated with HMOX1 siRNA (siHMOX1) and siNC for 48 h, and the protein expression of HMOX1 was determined by Western blot (Left: representative bands, Right: statistical graph of the relative band intensity) (C). HUVEC were treated with siHMOX1 and siNC for 24 h, and then with hemin (30 μ M/L) for another 24 h. CCK8 assay was used to detect the cell number relative to control (D). Mean \pm SEM, $n = 3$. ** $P < 0.01$.

CREB ($P < 0.01$) 和 NRF2 ($P < 0.05$) 的 mRNA 表达均显著下调 (图 3A)。Western blot 结果显示, 在 293T 细胞中过表达 CREB 后, 不能逆转 MTUS1 敲低引起的 HMOX1 表达下调 (图 3B)。但是 Western blot 结果显示, 在 293T 细胞中过表达 NRF2 后能部分逆转 MTUS1 敲低引起的 HMOX1 表达下调 ($P < 0.01$, 图 3C)。同时, CCK8 结果显示 MTUS1 敲低加剧的血红素诱导细胞凋亡效应能被过表达 NRF2 部分逆转 ($P < 0.01$, 图 3D)。

3 讨论

本研究初步探索 MTUS1 在血红素诱导的 HUVEC 凋亡中的作用, 结果显示, MTUS1 和 HMOX1 敲低均可加剧血红素诱导的血管内皮细胞凋亡; 下调 MTUS1 可抑制血管内皮细胞中 HMOX1、CREB 和 NRF2 的表达; 过表达 NRF2 可部分逆转 MTUS1 敲低对 293T 细胞中 HMOX1 表达的影响, 并能部分逆转 MTUS1 敲低加剧血红素诱导的细胞凋亡过

程, 而过表达 CREB 则无此效应。这些结果提示 MTUS1 可能通过影响 HMOX1 的表达参与血红素诱导的血管内皮细胞凋亡过程, 而 NRF2 介导了血管内皮细胞中 MTUS1 对 HMOX1 表达的调节过程。

在正常生理状态下, 血红素与原卟啉或其他分子结合, 具有载氧、贮氧、促进氧化还原、进行电子传递、毒物降解等重要生物学功能。然而在病理状况下, 血红素脱离血红蛋白成为游离血红素时, 不仅失去了生物学功能, 还会对细胞及机体产生损伤。游离血红素通过促进白细胞活化和迁移, 诱导多种黏附分子、细胞因子和急性期蛋白表达, 促进炎症反应发生。血红素可增加结肠癌细胞和线粒体中活性氧的产生, 从而诱导细胞氧化损伤和线粒体功能障碍, 诱导结肠癌和正常结肠上皮细胞的凋亡^[9]。血红素还能有效诱导白血病成红细胞系细胞线粒体降解及诱导线粒体膜去极化^[10]。血红素还可通过抑制蛋白酶体和引起线粒体功能障碍导致细胞损伤和凋亡^[11]。虽然也有报道称血红素预处理后可

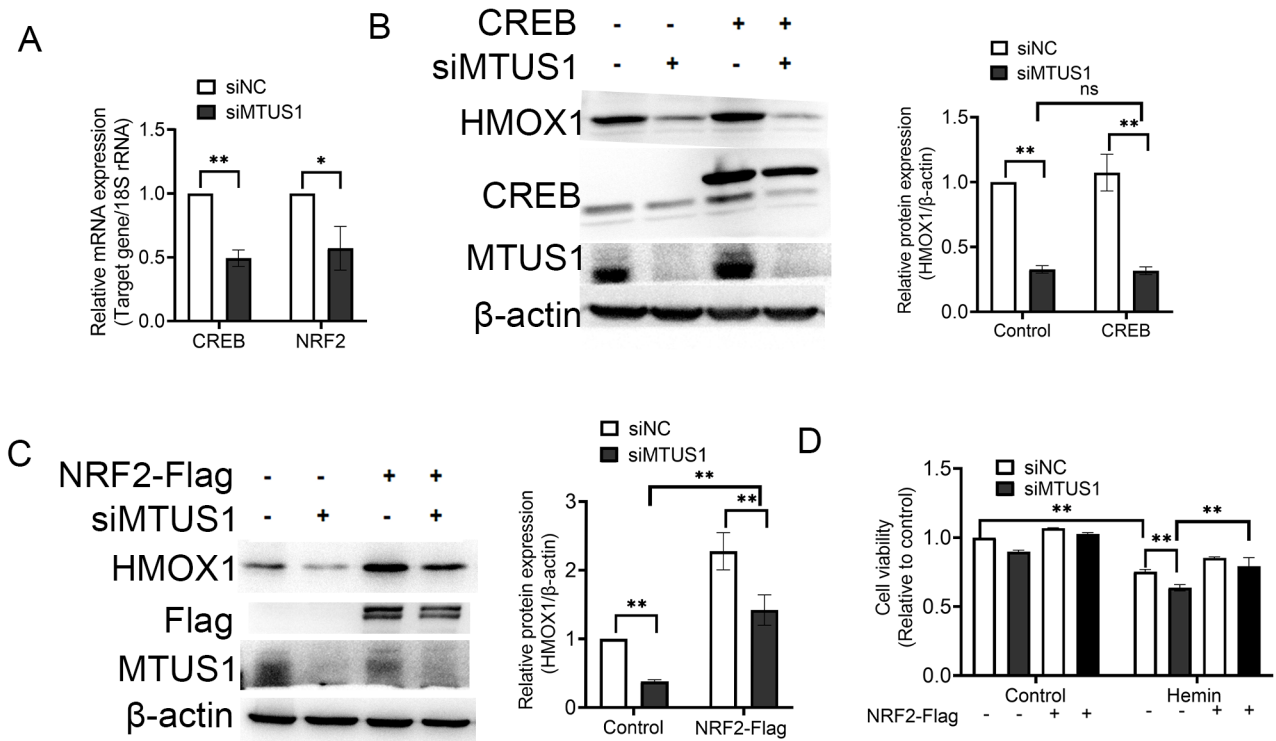


图 3. NRF2过表达部分逆转MTUS1敲低后下调HMOX1表达的效应

Fig. 3. The expression of HMOX1 reduced by MTUS1 knockdown was partly rescued by overexpression of NRF2. HUVECs were treated with the MTUS1 siRNA (siMTUS1) and negative siRNA (siNC) for 48 h. The mRNA expression of CREB and NRF2 were determined by RT-PCR (A). CREB (B) or Flag tagged NRF2 (C) overexpression plasmid was transfected to 293T cells for 24 h, and then siMTUS1 and siNC were transfected to 293T cells for another 48 h. Western blot (Left: representative bands, Right: statistical graph of the relative band intensity) was used to examine the protein expression of HMOX1, CREB, MTUS1 and Flag. D: siMTUS1 and siNC was transfected to 293T cells for 24 h, and then Flag tagged NRF2 overexpression plasmid was transfected to 293T cells for another 24 h, and then hemin (30 $\mu\text{mol/L}$) was added for another 24 h. CCK8 assay was used to detect the cell number relative to control. Mean \pm SEM, $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. ns: no significance.

以减轻 H_2O_2 诱导的血管内皮损伤^[12]，但其机制也是通过血红素诱导 HMOX1 产生。本研究结果也显示血红素可显著诱导 HUVEC 凋亡。我们推测这些研究结果的不一致性可能跟血红素处理的浓度和时间相关。

近期研究发现 MTUS1 在心血管疾病中发挥重要作用，其在心血管系统发育的过程中高表达^[6]。Ito 等学者在 小鼠心肌肥厚的模型中发现总的 MTUS1 基因表达不变，但是其中一个剪切体 Mtus1A 表达增加，该剪切体蛋白定位于线粒体，并能抑制心肌肥厚，其机制可能与下调氧自由基和细胞外信号信号调节激酶 (extracellular-signal regulated kinase, ERK) 磷酸化有关^[13]。在 MTUS1 敲除的小鼠模型中发现自发性心肌肥厚，并伴有淋巴增生，淋巴细胞增多症^[14]。研究还发现，过表达 MTUS1 可缓解

袖套模型诱导的小鼠血管重构^[15]。MTUS1 可通过调节甲烷磺酸盐敏感酶 2 的表达和含 Src 同源区域 2 酪氨酸磷酸酶 1 活性抑制血管平滑肌细胞衰老^[16]。上述报道表明 MTUS1 在心血管系统相关疾病中发挥重要作用。本课题组前期研究也发现敲除 HUVEC 中 MTUS1 可通过泛素化降解 CREB，增加核转录因子 κB (nuclear factor κB , NF- κB) 与 CREB 结合蛋白 (CREB-binding protein, CBP) 结合并发生乙酰化，进而激活 p38 有丝分裂原激活蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK) 和 NF- κB ，诱导选择素 E (selectin E, SELE) 和单核细胞趋化蛋白 -1 (monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1) 的表达，促进单核细胞与内皮细胞的黏附作用^[17]。既往我们的研究还发现 MTUS1 定位于 HUVEC 中线粒体，敲低 MTUS1 可以影响内皮细胞线粒体的融合和分

裂动态过程,抑制血管内皮细胞的管腔形成及迁移,并能增加活性氧的产生^[7]。上述研究表明MTUS1在血管内皮细胞的迁移、增殖、凋亡中发挥重要作用,结合前期报道血红素影响线粒体功能及活性氧的产生^[11],提示血红素与MTUS1可能存在功能相关。本研究发现MTUS1敲低可加剧血红素对内皮细胞的凋亡诱导作用,表明MTUS1参与了血红素诱导的血管内皮细胞凋亡过程。该结果一方面拓展了缺血缺氧等病理条件下大量游离血红素释放对血管内皮损伤的机制,另一方面也为血红素造成血管内皮细胞损伤的防治提供了可能的新靶点。

我们采用RNA测序分析MTUS1敲低组血管内皮细胞中血红素结合相关蛋白差异表达时,发现HMOX1表达显著下调。血红素加氧酶是血红素代谢途径中的限速酶,血红素在其催化下分解为胆绿素、CO和Fe²⁺,胆绿素随后在胆绿素还原酶催化下还原为胆红素^[18]。胆红素及胆绿素具有重要的抗氧化作用,内源性CO则作为第二信使在各种病理生理学过程中发挥抗炎、抗氧化、抗凋亡等作用^[19]。人血红素加氧酶存在3种亚型:HMOX1、HMOX2及HMOX3,其中HMOX2及HMOX3均呈组成型表达,而HMOX1呈诱导型表达,分布于肝脏、脾脏、肾脏、心脏、肺部、脑、血管、平滑肌细胞、内皮细胞等多种组织及细胞中^[20]。在正常情况下,HMOX1在大多数组织中呈低水平表达;在病理性损伤刺激下,缺血、缺氧、血红素、应激等因素可诱导HMOX1显著表达,在细胞抗氧化损伤防御机制中发挥重要作用^[20]。本研究结果显示血红素可显著诱导内皮细胞中HMOX1表达,而MTUS1敲低可明显抑制该效应。据文献报道,HMOX1可促进骨髓内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)的增殖动员及迁移,并能增强其活力及抗氧化损伤能力,促进血管损伤的修复^[21]。近年来的研究证实,HMOX1在颈动脉粥样硬化、冠心病等动脉粥样硬化性疾病中具有保护作用^[2]。有实验发现培养的内皮细胞中HMOX1通过释放CO激活p38MAPK途径来介导抗凋亡作用,发挥细胞保护作用^[22]。以上研究提示,HMOX1通过不同机制发挥保护血管内皮细胞的作用,本研究中MTUS1敲低和HMOX1敲低均能加剧血红素诱导的血管内皮细胞凋亡,我们推测MTUS1可能是通过调节HMOX1表达介导该效应的。

HMOX1的表达由NRF2及Kelch样ECH相关

蛋白1(Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)系统控制。在静息条件下,NRF2与Keap1结合,导致Cullin-3依赖性E3泛素连接酶募集,通过蛋白酶体降解将NRF2维持在低水平。在氧化应激等病理生理条件下,Keap1发生构象变化并释放NRF2。游离NRF2转移到细胞核中,其与小Maf蛋白相互作用,并进一步结合到抗氧化反应元件(antioxidant reaction element, ARE)或亲电反应元件(electrophilic reaction element, ERE)上,以反式激活编码抗氧化酶的各种基因,包括HMOX1、Bcl-2、Bcl-xL等因子的转录^[23]。血红素通过与NRF2拮抗剂Bach1竞争结合启动子,诱导HMOX1表达。NRF2/HMOX1信号通路通过调节细胞内氧化与抗氧化物质的产生,维持氧化还原平衡,减轻氧化应激反应,抑制细胞凋亡^[24]。既往研究还发现蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)/CREB也是HMOX1的上游转录因子,通过直接结合启动子或者结合NRF2结合蛋白/激活蛋白间接调节HMOX1表达。目前研究结果倾向于认为CREB1是NRF2的辅助激活因子^[25]。本研究结果显示MTUS1敲低后,血管内皮细胞中HMOX1的转录调节因子NRF2和CREB表达均显著下调。虽然前期报道薄荷草药可诱导CREB/NRF2/HMOX1相关的抗氧化信号通路^[26];谷氧还蛋白可通过CREB/HMOX1信号通路抑制骨关节炎中软骨细胞的氧化应激和凋亡^[27],但是我们的结果显示过表达NRF2可部分逆转293T细胞中MTUS1敲低引起的HMOX1表达下降,而过表达CREB则无此效应。而且过表达NRF2能部分逆转MTUS1敲低加剧的血红素诱导细胞凋亡效应。

综上所述,本研究结果显示MTUS1敲低和HMOX1敲低均可加剧血红素诱导的血管内皮细胞凋亡,MTUS1敲低的效应可能是通过下调HMOX1表达介导的。另外我们还发现MTUS1敲低下调血管内皮细胞中HMOX1表达及加剧血红素诱导的细胞凋亡主要是通过NRF2介导,而非CREB。上述结果提示MTUS1部分通过NRF2上调HUVEC中HMOX1表达,从而抑制血红素诱导的血管内皮细胞凋亡。因此我们推测血红素/MTUS1/NRF2/HMOX1信号轴在保护血管内皮细胞免受损伤的过程中发挥重要作用,为进一步拓展如动脉粥样硬化、高血压、炎症、弥散性血管内凝血和缺血再灌注损伤等血管内皮损伤相关疾病的发病机制及防治研究提供新思路。

参考文献

- Guo Q, Xie M, Guo M, Yan F, Li L, Liu R. ZEB2, interacting with MDM2, contributes to the dysfunction of brain microvascular endothelial cells and brain injury after intracerebral hemorrhage. *Cell Cycle* 2021; 20: 1692–1707.
- Ishikawa K, Navab M, Lusis AJ. Vasculitis, atherosclerosis, and altered HDL composition in heme-oxygenase-1-knockout mice. *Int J Hypertens* 2012; 2012: 948203.
- Nouet S, Amzallag N, Li JM, Louis S, Seitz I, Cui TX, Alleaume AM, Di Benedetto M, Boden C, Masson M, Strosberg AD, Horiuchi M, Couraud PO, Nahmias C. Trans-inactivation of receptor tyrosine kinases by novel angiotensin II AT2 receptor-interacting protein, ATIP. *J Biol Chem* 2004; 279: 28989–28997.
- Rogler A, Hoja S, Giedl J, Ekici AB, Wach S, Taubert H, Goebell PJ, Wullich B, Stockle M, Lehmann J, Petsch S, Hartmann A, Stoehr R. Loss of MTUS1/ATIP expression is associated with adverse outcome in advanced bladder carcinomas: data from a retrospective study. *BMC Cancer* 2014. 14: 214.
- Shinoda K, Luijten IH, Hasegawa Y, Hong H, Sonne SB, Kim M, Xue R, Chondronikola M, Cypess AM, Tseng YH, Nedergaard J, Sidossis LS, Kajimura S. Genetic and functional characterization of clonally derived adult human brown adipocytes. *Nat Med* 2015; 21: 389–394.
- Bundschu K, Schuh K. Cardiovascular ATIP (Angiotensin receptor type 2 interacting protein) expression in mouse development. *Dev Dyn* 2014; 243: 699–711.
- Wang Y, Huang Y, Liu Y, Li J, Hao Y, Yin P, Liu Z, Chen J, Wang Y, Wang N, Zhang P. Microtubule associated tumor suppressor 1 interacts with mitofusins to regulate mitochondrial morphology in endothelial cells. *FASEB J* 2018; 32: 4504–4518.
- Nitti M, Furfaro AL, Mann GE. Heme oxygenase dependent bilirubin generation in vascular cells: a role in preventing endothelial dysfunction in local tissue microenvironment? *Front Physiol* 2020; 11: 23.
- Catalan M, Ferreira J, Carrasco-Pozo C. The microbiota-derived metabolite of quercetin, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid prevents malignant transformation and mitochondrial dysfunction induced by heme in colon cancer and normal colon epithelia cell lines. *Molecules* 2020; 25(18): 4138.
- Fader CM, Salassa BN, Grosso RA, Vergara AN, Colombo MI. Heme induces mitophagy in a leukemic erythroblast cell line. *Biol Cell* 2016; 108: 77–95.
- Luu Hoang KN, Anstee JE, Arnold JN. The diverse roles of heme oxygenase-1 in tumor progression. *Front Immunol* 2021; 12: 658315.
- Wilson SJ, Keenan AK. Role of heme in the modulation of H₂O₂-mediated endothelial cell injury. *Vascul Pharmacol* 2003; 40: 109–118.
- Ito S, Asakura M, Liao Y, Min KD, Takahashi A, Shindo K, Yamazaki S, Tsukamoto O, Asanuma H, Mogi M, Horiuchi M, Asano Y, Sanada S, Minamino T, Takashima S, Mochizuki N, Kitakaze M. Identification of the Mtus1 splice variant as a novel inhibitory factor against cardiac hypertrophy. *J Am Heart Assoc* 2016; 5(7): e003521.
- Zuern C, Krenacs L, Starke S, Heimrich J, Palmetshofer A, Holtmann B, Sendtner M, Fischer T, Galle J, Wanner C, Seibold S. Microtubule associated tumor suppressor 1 deficient mice develop spontaneous heart hypertrophy and SLE-like lymphoproliferative disease. *Int J Oncol* 2012; 40: 1079–1088.
- Fujita T, Mogi M, Min LJ, Iwanami J, Tsukuda K, Sakata A, Okayama H, Iwai M, Nahmias C, Higaki J, Horiuchi M. Attenuation of cuff-induced neointimal formation by overexpression of angiotensin II type 2 receptor-interacting protein 1. *Hypertension* 2009; 53: 688–693.
- Min LJ, Mogi M, Iwanami J, Jing F, Tsukuda K, Ohshima K, Horiuchi M, Angiotensin II type 2 receptor-interacting protein prevents vascular senescence. *J Am Soc Hypertens* 2012; 6: 179–184.
- Wang Y, Dai X, Liu Y, Li J, Liu Z, Yin P, Chen J, Wang Y, Wang N, Zhang P. MTUS1 silencing promotes E-selectin production through p38 MAPK-dependent CREB ubiquitination in endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 2016; 101: 1–10.
- Ma LL, Sun L, Wang YX, Sun BH, Li YF, Jin YL. Association between HO-1 gene promoter polymorphisms and diseases (Review). *Mol Med Rep* 2022; 25: 29.
- Kim HP, Ryter SW, Choi AM. CO as a cellular signaling molecule. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2006; 46: 411–449.
- Exner M, Minar E, Wagner O, Schillinger M. The role of heme oxygenase-1 promoter polymorphisms in human disease. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 1097–1104.
- Wu BJ, Midwinter RG, Cassano C, Beck K, Wang Y, Changsiri D, Gamble JR, Stocker R. Heme oxygenase-1 increases endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 1537–1542.
- Soares MP, Usheva A, Brouard S, Berberat PO, Gunther L, Tobiasch E, Bach FH. Modulation of endothelial cell apoptosis by heme oxygenase-1-derived carbon monoxide. *Antioxid Redox Signal* 2002; 4: 321–329.
- He F, Ru X, Wen T. NRF2, a transcription factor for stress response and beyond. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 4777.
- Jiang T, Harder B, Rojo de la Vega M, Wong PK, Chapman E,

- Zhang DD. p62 links autophagy and Nrf2 signaling. *Free Radic Biol Med* 2015; 88: 199–204.
- 25 Mylroie H, Dumont O, Bauer A, Thornton CC, Mackey J, Calay D, Hamdulay SS, Choo JR, Boyle JJ, Samarel AM, Randi AM, Evans PC, Mason JC. PKCepsilon-CREB-Nrf2 signalling induces HO-1 in the vascular endothelium and enhances resistance to inflammation and apoptosis. *Cardiovasc Res* 2015; 106: 509–519.
- 26 Park YJ, Yang HJ, Li W, Oh YC, Go Y. Menthae herba attenuates neuroinflammation by regulating CREB/Nrf2/HO-1 pathway in BV2 microglial cells. *Antioxidants (Basel)* 2022; 11(4): 649.
- 27 Sun J, Wei X, Lu Y, Cui M, Li F, Lu J, Liu Y, Zhang X. Glutaredoxin 1 (GRX1) inhibits oxidative stress and apoptosis of chondrocytes by regulating CREB/HO-1 in osteoarthritis. *Mol Immunol* 2017; 90: 211–218.