

AP-1 在 Ang II 正反馈调节 其前体基因表达中的作用 *

李爱英 温进坤** 韩 梅

(河北医科大学基础医学研究所, 河北省医学生物技术重点实验室, 石家庄 050017)

摘要 血管紧张素 II (Ang II) 可诱导其前体基因在血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) 中进行表达, 其作用机制与促进转录激活蛋白 -1 (activating protein-1, AP-1) 的基因调控区中存在的 AP-1 位点结合有关. 为进一步明确 Ang II 调节 AP-1 结合活性的分子机制, 用放线菌酮 (cycloheximide, CHX) 作为 c-Jun 磷酸化抑制剂, 经 DNA-蛋白质相互作用和蛋白质印迹实验, 探讨 Ang II 对 AP-1 结合活性的影响并探讨其分子机制. 结果表明, 受 Ang II 刺激的 VSMC, 其核蛋白中 AP-1 的组成亚基之一 c-Jun 水平明显升高. 免疫细胞化学染色显示, 在被 Ang II 处理的细胞中, c-Jun 主要定位于细胞核, 胞浆中几乎检测不出该转录激活蛋白的存在. 用丝氨酸磷酸化抗体检测证实, Ang II 可诱导 c-Jun 磷酸化. 电泳迁移率改变分析 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA) 显示, c-Jun 的磷酸化水平与 AP-1 结合血管紧张素原基因顺式元件的活性, 和对该基因的转录激活作用呈正相关关系, CHX 通过阻断 c-Jun 磷酸化抑制 Ang II 诱导的 AP-1 结合活性, 但是不影响 c-Jun 的表达水平. 上述结果提示, AP-1 的磷酸化活化是 Ang II 正反馈调节其前体基因表达的重要机制之一, 首次发现 CHX 是 c-Jun 磷酸化的抑制剂.

关键词 血管平滑肌细胞, 血管紧张素原基因, AP-1, c-Jun, 转录调节

学科分类号 R363

在心血管系统中, 血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) 不仅是血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 的一个重要来源, 而且, 也是 Ang II 调节血管功能的主要靶细胞. Ang II 除可诱发 VSMC 收缩外, 长时间刺激还可导致 VSMC 肥大和增殖. 本室前期研究显示, Ang II 能够诱导 VSMC 表达包括血管紧张素原在内的多种血管活性物质, 并且从染色质水平和转录水平上证实, 在 Ang II 对其前体基因表达进行正反馈调节的过程中, 伴有 AP-1 (Fos-Jun 二聚体) 与血管紧张素原基因启动子结合活性的增强^[1]. 然而, Ang II 促进 AP-1 与其顺式元件结合的分子机制尚不清楚. 本研究用放线菌酮 (cycloheximide, CHX) 作为 c-Jun 的阻断剂, 观察 Ang II 对 AP-1 与血管紧张素原基因启动子相互作用及对血管紧张素原基因表达的影响.

1 材料与方法

1.1 材料

SD 大鼠由河北省实验动物中心提供; 引物由

上海生工生物技术公司合成; Ang II、CHX (Sigma 公司); Taq DNA 聚合酶、dNTP (华美生物工程公司); M199、AMV 逆转录酶、T4 多核苷酸激酶 (Promega 公司); 凝胶阻滞分析系统 (Gel shift assay systems, Promega 公司); c-Jun、STAT5 多克隆抗体、Protein A-Sepharose、化学发光试剂 (Santa Cruz); [γ -³²P]-ATP (北京福瑞生物工程公司).

1.2 细胞培养与分组

选用 5 周龄雄性 SD 大鼠, 取胸腹主动脉中膜, 按贴块法分离、培养 VSMC. 0.25% 胰酶消化传代, 取 4~7 代细胞用于实验. 细胞在含 10% 新生小牛血清 (newborn calf serum, NCS) 的 M199 培养基中, 生长至 70%~80% 融合时, 换无血清 M199 培养液培养 24 h 后, 加入 Ang II 至终浓度为 1×10^{-6} mol/L, 继续培养 0.5、1、3、6、12、24 h 后

*国家自然科学基金资助项目 (30570661), 国家科技部基础研究重大项目前期研究专项资助项目 (2005CCA03100).

** 通讯联系人. Tel: 0311-86265563, E-mail: wjk@hebmu.edu.cn

收稿日期: 2006-03-01, 接受日期: 2006-04-21

收集细胞, 或给予 CHX (20 mg/L) 预孵育 0.5 h 后, 加入 Ang II 刺激不同时间, 收集细胞进行以下实验, 以无血清培养 24 h 细胞作为对照组.

1.3 MTT 分析

取对数生长期细胞, 传代接种于 96 孔板上, 细胞贴壁后, 无血清培养 24 h, 使细胞同步化. 每组设 8 个复孔, 分别加入不同浓度 CHX (5、10、20 mg/L), 刺激 0.5、1、3 h, 换无血清培养基, 加入 MTT 至终浓度为 1 g/L, 继续培养 4 h, 弃去上清液, 每孔加 20% SDS 100 μ l, 37℃ 孵育过夜. 酶标仪选 570 nm 波长处测光吸收值(A), 以此表示细胞活力.

1.4 免疫细胞化学染色

接种于盖玻片上的细胞生长至 70% 融合时, 用 CHX (20 mg/L) 预孵育 VSMC 0.5 h 后, 换用 Ang II 刺激 0.5、3 h, 经 4% 多聚甲醛固定、1% Triton X-100 处理和山羊血清封闭后, 依次加入兔抗鼠 c-Jun 多克隆抗体、生物素标记的二抗和 HRP 标记的链霉卵白素进行结合反应, DAB 显色.

1.5 RNA 提取及 RT-PCR

采用异硫氰酸胍: 酚: 氯仿一步法从 VSMC 中提取总 RNA, 以此为模板, 加入随机引物, 按照 Promega 公司 AMV 逆转录酶试剂盒说明书合成 cDNA. 以 cDNA 为模板, 进行定量 PCR 检测血管紧张素原基因的表达活性 (上游引物为 5' ACCTTTGAGCCTGTGCCCCAT 3', 下游引物为 5' GCTACACCTCTTGCTCACT 3'). 以 GAPDH 作为参照.

1.6 免疫沉淀及蛋白质印迹分析

按文献 [2] 方法用裂解液 A (10 mmol/L HEPES-KOH, pH 7.9, 10 mmol/L KCl, 0.1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L Na_3VO_4) 于冰浴中处理细胞 15 min 后, 加入 NP-40 至终浓度为 0.6%, 涡旋振荡混匀 3 s, 4℃, 12 000 r/min 离心 5 min, 收集沉淀, 加入裂解液 B (20 mmol/L HEPES-KOH, pH 7.9, 400 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L Na_3VO_4 , 1 mmol/L DTT), 涡旋振荡混匀, 冰浴 20 min, 4℃, 12 000 r/min 离心 20 min, 收集上清, 用改良 Lowry 法进行蛋白质定量. 取 200 μ g 细胞核提取物, 加入 NET- 明胶缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 0.1% NP-40, 1 mmol/L EDTA, 0.25% 明胶) 至总体积为 180 μ l 后, 加入

鼠抗丝氨酸磷酸化单克隆抗体 1 μ g, 4℃ 摇动 2 h, 加入 20 μ l Protein A-Sepharose 至总体积为 200 μ l, 4℃ 摇动过夜. 12 000 r/min 离心 20 s, 收集 Protein A- 抗原- 抗体三元复合物. 沉淀依次用 0.5 ml NET- 洗涤缓冲液 I (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 500 mmol/L NaCl, 0.1% NP-40, 1 mmol/L EDTA, 0.25% 明胶)、缓冲液 II (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 0.1% NP-40, 0.1% SDS, 1 mmol/L EDTA, 0.25% 明胶)、缓冲液 III (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 0.1% NP-40) 于 4℃ 下洗涤 20 min, 12 000 r/min 离心 20 s, 洗涤后用 2 $\times$ SDS 上样缓冲液悬浮沉淀, 100℃ 加热 3 min, 12 000 r/min 离心 20 s, 取上清用 8% SDS-PAGE 分离蛋白质后, 电转移至 PVDF 膜上, 用抗 c-Jun 抗体进行蛋白质印迹分析检测磷酸化 c-Jun 蛋白.

1.7 电泳迁移率改变分析

按文献 [1] 报道的方法, 分别以含有大鼠血管紧张素原基因上游 (-427~-402 bp) AP-1 结合基序 (5' AGAGCCGCTGATGACTTATGAGAGGT 3') 的双链寡脱氧核苷酸 (oligodeoxy-ribonucleotide, ODN) 为探针, 按 Promega 公司试剂盒说明书进行电泳迁移率改变分析 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA). 采用 T4 多核苷酸激酶末端标记法进行探针标记, 取 10 μ g 核蛋白与 [γ - 32 P] ATP 标记的探针混匀, 室温孵育 0.5 h, 分别用兔抗 c-Jun、STAT5 多克隆抗体进行超迁移分析, 以 100 倍过量的非标记探针作为竞争结合对照, 进行特异性分析. 形成的 DNA- 核蛋白复合物经 5% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 将凝胶置于 -70℃ 放射自显影 24 h.

1.8 统计学方法

将至少 3 次的实验结果采用 SPSS 10.0 统计软件进行组间方差分析, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 表示统计学上有显著差异.

2 结 果

2.1 不同剂量 CHX 对 VSMC 活力的影响

为了观察不同浓度 CHX 对细胞的毒性作用, 用不同剂量 (5、10、20 mg/L) 的 CHX 处理细胞 0.5、1、3 h 后, 进行 MTT 分析. 结果显示, 在所观察的浓度范围内, VSMC 活力无明显变化 ($P > 0.05$). 据此选用 20 mg/L 剂量的 CHX 预处理 VSMC, 进行其他实验.

2.2 Ang II 促进 c-Jun 蛋白表达与磷酸化

已经证实, AP-1 参与血管紧张素原基因的转录激活^[1]. 为了探讨 AP-1 在 Ang II 正反馈调节其前体基因表达中的作用机制, 用 Ang II 分别刺激培养的 VSMC 0.5、1、3 h, 蛋白质印迹结果显示, Ang II 作用于 VSMC 0.5 h 后, 细胞核内的 c-Jun 水平即显著升高并在此水平上保持至 3 h (图 1), 而且, Ang II 诱导表达的 c-Jun 主要分布在细胞核内, 胞浆中几乎检测不到 c-Jun 的存在 (结果未显示), 免疫细胞化学染色也证实了这一发现 (图 2). 由于

AP-1 的磷酸化修饰是其活化及与 DNA 结合的先决条件, 进而用丝氨酸磷酸化抗体对核提取物进行免疫沉淀后检测磷酸化 c-Jun 水平. 图 1 显示, 伴随 Ang II 诱导的 c-Jun 表达增高, 磷酸化 c-Jun 水平也平行升高. 用 CHX 预处理 VSMC 0.5 h 后, 再用 Ang II 刺激, c-Jun 表达虽然不受影响, 但其磷酸化水平明显降低. 这些结果提示, Ang II 对其前体基因的正反馈调节是通过促进 AP-1 表达及诱导 c-Jun 磷酸化活化而实现的, CHX 是一种 AP-1 磷酸化的抑制剂.

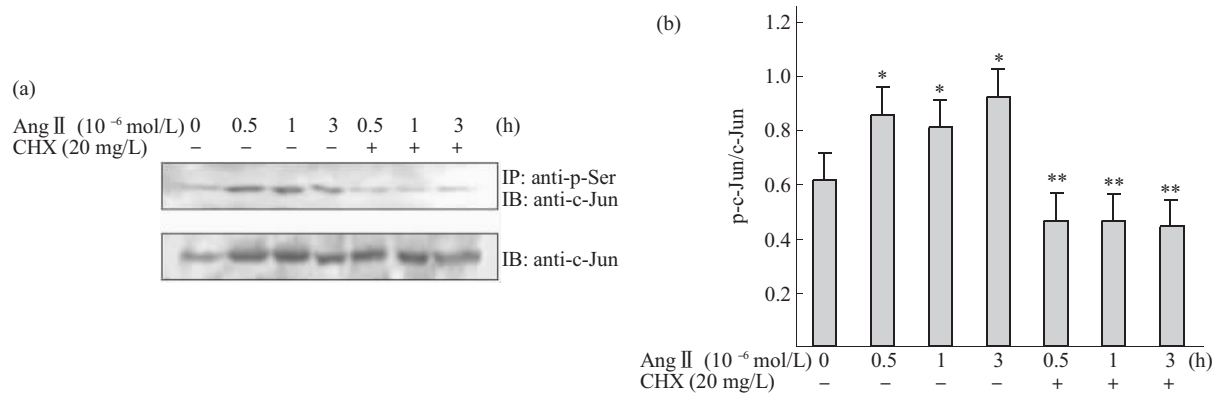


Fig. 1 Effect of Ang II and CHX on expression and phosphorylation of c-Jun

(a) Western blot. Cell nuclear extracts were immunoprecipitated (IP) by anti-phosphoserine antibody and immunoblotted (IB) with an anti-c-Jun antibody. Total c-Jun was detected by immunoblotting. (b) Rate of p-c-Jun/c-Jun as shown in panel (a). Results are $\bar{x} \pm s$ from three independent experiments. * $P < 0.05$, compared with control (0 h); ** $P < 0.05$, compared with VSMCs treated by Ang II.

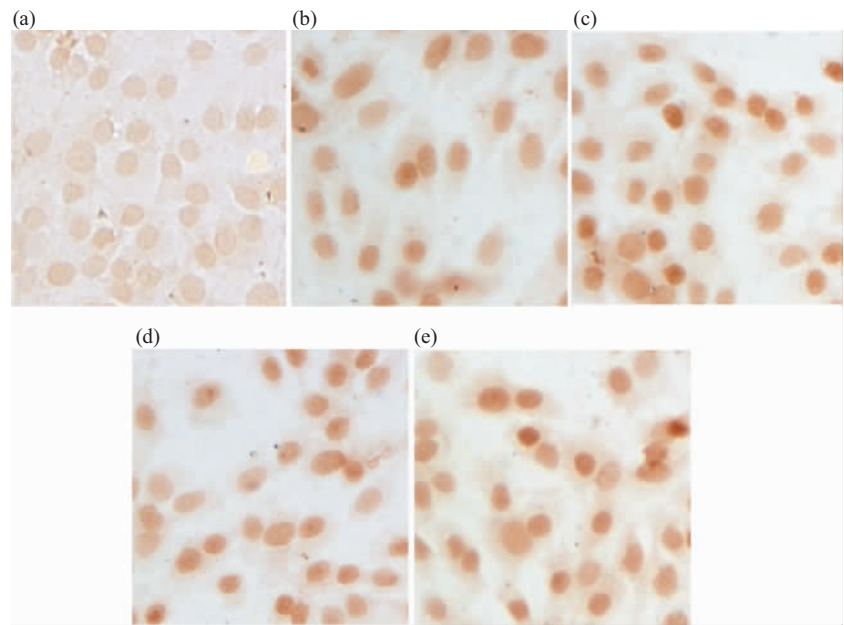


Fig. 2 Expression and localization of c-Jun in VSMC induced by Ang II

(a)~(c) VSMC was treated with Ang II (10⁻⁶ mol/L) for 0, 0.5, 3 h. (d) and (e) VSMC was treated with Ang II for 0.5, 3 h after incubation with CHX for 0.5 h. Immunocytochemistry $\times 200$.

2.3 CHX 抑制 Ang II 诱导的血管紧张素原基因表达

为了进一步观察 CHX 抑制 c-Jun 磷酸化对血管紧张素原基因表达的影响, 提取细胞总 RNA, 进行 RT-PCR. 结果显示, 用 Ang II (终浓度 10^{-6} mol/L) 处理 VSMC 3 h, 可显著提高血管紧张素原基因的表达活性, 其 mRNA 水平较刺激前升高 1 倍, 并持续至 12 h. 用 CHX 预处理 VSMC 可抑制 Ang II 诱导的血管紧张素原基因表达, 使转录产物在 3 h 减少至对照水平(图 3). 由此可见, CHX 对 c-Jun 磷酸化的抑制可下调血管紧张素原基因的表达活性, 提示 AP-1 的磷酸化活化是该基因表达所必需的.

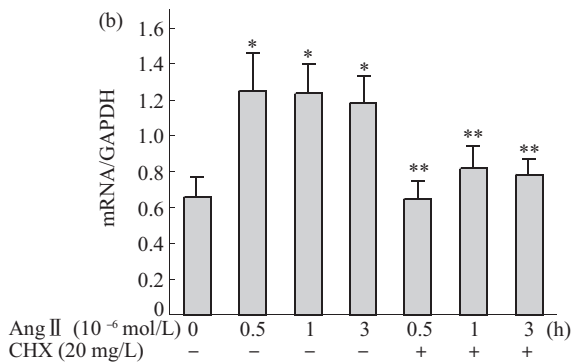
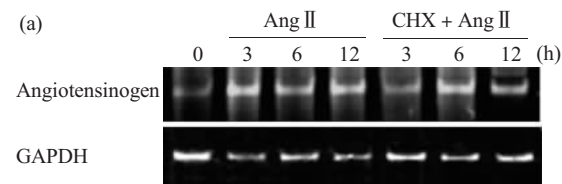


Fig. 3 CHX inhibited the expression of angiotensinogen gene in VSMC

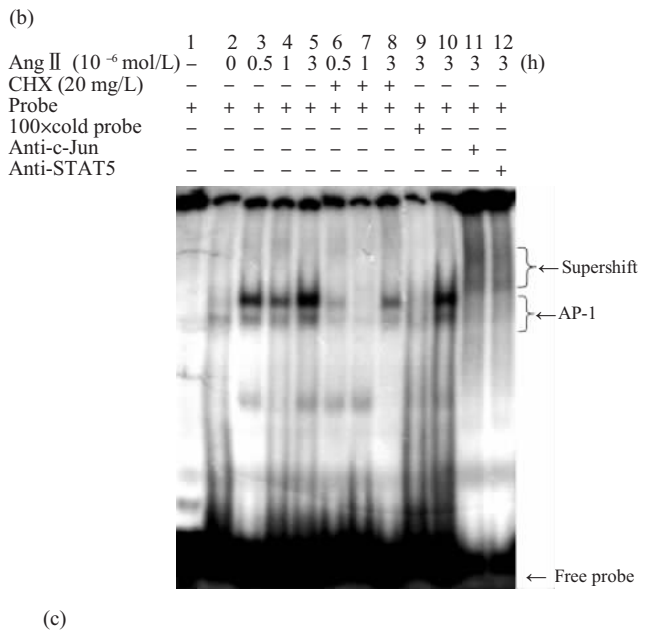
(a) The mRNA of angiotensinogen gene was detected by RT-PCR. (b) Bar graphs showed the densitometric analysis of RT-PCR products. Results are $\bar{x} \pm s$ from three independent experiments. * $P < 0.05$, compared with control, ** $P < 0.05$, compared with VSMC treated by Ang II.

2.4 Ang II 促进 AP-1 与血管紧张素原基因启动子结合

为寻找 Ang II 诱导 c-Jun 磷酸化与其促进血管紧张素原基因表达之间的关系, 用 EMSA 检测 Ang II 对 AP-1 与其顺式元件结合活性的影响. 结果显示, Ang II 处理 VSMC 0.5 h 后, 核蛋白与探针的结合活性显著升高, 至 3 h 达高峰, 该结果与 Ang II 诱导血管紧张素原基因表达的时程相吻合. 竞争抑制分析证实, DNA-核蛋白复合物迁移带可

被 100 倍过量的非标记探针所消除. 加入抗 c-Jun 抗体可使 DNA-核蛋白复合物发生超迁移, 说明 DNA-核蛋白复合物是由 AP-1 与相应顺式元件结合形成的. 由于 STAT5 也可与该基因调控区结合, 为了明确 AP-1 与 STAT5 之间的关系, 用抗 STAT5 抗体与核蛋白共孵育后再与 AP-1 探针结合, 也可形成滞后超迁移带(图 4). 在 CHX 预处理的细胞, 其核蛋白与探针的结合活性明显下降, 为了查明 CHX 抑制 AP-1 活性的机制, 对同样条件下收集的核蛋白进行蛋白质印迹, 结果表明, CHX 对 AP-1 结合活性的抑制效应与 AP-1 蛋白水平无关(图 4b 6~8 泳道与图 4c), 而是 CHX 抑制 AP-1 磷酸化的直接结果. 上述结果提示, Ang II 诱导 AP-1 与 DNA 结合的同时也使其与 STAT5 发生相互作用, AP-1 磷酸化是 Ang II 对其前体基因正反馈调节的机制之一.

(a) 5' AGAGCCGCTGATGACTTATGAGAGGT 3'
3' TCTCGCGACTACTGAATACTCTCCA 5'



(c)

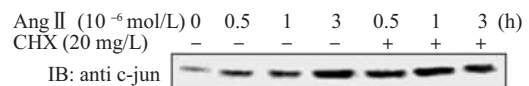


Fig. 4 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) of AP-1 binding activity in VSMC treated by Ang II with and without CHX

(a) Sequences of 26 bp fragment (positions -427 to -402) of angiotensinogen gene promoter used as the probe in EMSA. (b) EMSA for AP-1 binding to the *cis*-element of angiotensinogen gene. (c) Western blot for total c-Jun levels in nuclear extracts.

3 讨 论

Ang II 对 VSMC 功能的调节是多方面的, 在生理或病理条件下, Ang II 除直接作用于 VSMC, 引发细胞收缩或增殖外, 还可通过诱导 VSMC 表达、释放多种生物活性物质, 产生一系列继发效应。

研究结果显示, Ang II 对 VSMC 血管紧张素原基因表达具有正反馈作用, Ang II 刺激 3 h 时, 该基因转录产物即明显增多, 并持续保持在较高水平上。进一步研究证实, Ang II 可促进 c-Jun 的表达及 AP-1 活化, 受 Ang II 处理的 VSMC, 其核蛋白中的 c-Jun 水平明显高于未刺激的细胞。免疫细胞化学染色可见, VSMC 中表达的 c-Jun 蛋白主要定位于细胞核, 胞浆中几乎检测不出 c-Jun 的存在, 该结果与在成纤维细胞和单核白血病细胞(U937)中 c-Jun 蛋白主要分布于细胞核的报道相符^[3,4]。用抗丝氨酸磷酸化抗体进行免疫沉淀检测 c-Jun 磷酸化水平, 进而分析 AP-1 的 DNA 结合活性, EMSA 结果表明, Ang II 可诱导 AP-1 的磷酸化活化, c-Jun 的磷酸化水平与其结合血管紧张素原基因顺式元件的结合活性具有正相关关系。曾有报道, CHX 可消除 AP-1 的 DNA 结合活性^[5,6]。本研究发现, CHX 抑制 AP-1 的 DNA 结合活性是通过阻断 c-Jun 的磷酸化而实现的, 因为在用 CHX 预处理的 VSMC 中, c-Jun 的表达水平并未降低, 但 AP-1 的磷酸化水平却明显减少。上述结果提示, AP-1 的磷酸化活化是 Ang II 正反馈调节其前体基因表达的重要机制之一, 首次发现 CHX 是 c-Jun 磷酸化的抑制剂。CHX 的作用靶点可能是催化 c-Jun 或 c-Fos 磷酸化的某种蛋白激酶。

以往研究表明, AP-1 结合位点存在于多种血管活性肽基因启动子区, AP-1 与这些基因中顺式调控元件的结合活性升高, 参与了血管活性肽基因的转录激活^[1]。但有关 Ang II 促进 AP-1 与 DNA 结合的确切分子机制尚不十分清楚。AP-1 作为一种细胞增殖相关的转录调节因子, 通常是由 c-Jun 和 c-Fos 蛋白以同源或异源二聚体形式结合于启动子区的 AP-1 位点上。AP-1 的活性调节可在多层次上进行, 其中 c-Jun 的磷酸化修饰是快速调节 AP-1 功能的重要途径^[7,8]。研究证实, c-Jun 蛋白 N 端 Ser63、Sre73 位点的磷酸化可大大提高 AP-1 的转录激活活性。本研究证实, 在 Ang II 诱导的血管紧张素原基因表达过程中, 尽管伴有 c-Jun 的表达增加, 但 c-Jun 的磷酸化水平升高是 Ang II 发挥作用

的关键环节, 这也可能是 Ang II 促进细胞增殖的分子机制之一。此外, 还发现 VSMC 中的 c-Jun 蛋白主要定位于细胞核, 用免疫学方法很难从胞浆中检测出 c-Jun 蛋白, 当刺激信号传导至胞核后, 可快速引起 c-Jun 蛋白的磷酸化。因此, 用细胞核提取物分析 c-Jun 水平更为可靠。CHX 是一种传统的蛋白质合成抑制剂, 近年发现, CHX 具有抑制 AP-1 与靶基因启动子结合的作用^[5,6]。本研究进一步证实, CHX 对 AP-1 活性的抑制与其阻断 c-Jun 磷酸化活化有关, 在本实验所用的浓度范围内, 未发现 CHX 对 c-Jun 合成具有影响。

血管紧张素原基因的转录激活有赖于多种转录因子的协同作用, 已经证实, STAT5 是参与该基因表达调节的一个重要成员^[9]。本文发现, 在核蛋白-DNA 复合物中不仅含有 AP-1, 而且还存在 STAT5, 这提示 AP-1 和 STAT5 在与 DNA 结合的同时, 二者之间也可能存在相互作用。

总之, Ang II 对其前体基因的正反馈调节, 是从多个环节上发挥作用的, CHX 通过阻断 c-Jun 磷酸化而拮抗 Ang II 对其前体表达的诱导作用。

参 考 文 献

- 1 聂磊, 韩梅, 温进坤. 血管舒-缩肽在血管平滑肌细胞中的表达和调控. 中国生物化学与分子生物学报, 2005, **21** (1): 107~113
Nie L, Han M, Wen J K. Chin J Biochem Mol Biol, 2005, **21** (1): 107~113
- 2 韩梅, 温进坤, 郑斌, 等. 血清饥饿可诱导人血管平滑肌细胞再分化. 中国生物化学与分子生物学报, 2003, **19** (2): 250~255
Han M, Wen J K, Zheng B, *et al.* Chin J Biochem Mol Biol, 2003, **19** (2): 250~255
- 3 Lee S A, Dritschilo A, Jung M. Impaired ionizing radiation-induced activation of a nuclear signal essential for phosphorylation of c-jun by dually phosphorylated c-jun amino-terminal kinases in ataxia telangiectasia fibroblasts. J Biol Chem, 1998, **273** (49): 32889 ~ 32894
- 4 Franklin C C, Unlap T, Adler V, *et al.* Multiple signal transduction pathways mediate c-Jun protein phosphorylation. Cell Growth Differ, 1993, **4** (5): 377~385
- 5 Bergelson S, Klingmüller U, Socolovsky M, *et al.* Tyrosine residues within the intra-cellular domain of the erythropoietin receptor mediate activation of AP-1 transcription factors. J Biol Chem, 1998, **273** (4): 2396~2401
- 6 Gronowski A M, Stunff C L, Rotwein P. Acute nuclear actions of growth hormone (GH): Cycloheximide inhibits inducible activator protein-L activity, but does not block GH-regulated signal transducer and activator of transcription activation or gene expression. Endocrinology, 1996, **137** (1): 55~64
- 7 Minden A, Lin A, Smeal T, *et al.* c-Jun N-terminal phosphorylation correlates with activation of the JNK subgroup but not the ERK

- subgroup of mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol*, 1994, **14** (385): 6683~6688
- 8 Smeal T, Binetruy B, Mercola D A, *et al.* Oncogenic and transcriptional cooperation with HA-ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature*, 1991, **354** (6353): 494~496
- 9 聂磊, 韩梅, 温进坤. JAK-STAT5 参与血管平滑肌血管紧张素原和心钠素基因的转录激活. *中国生物化学与分子生物学报*, 2006, **22** (1): 70~76
- Nie L, Han M, Wen J K. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2006, **22** (1): 70~76

Role of AP-1 Activation in Regulation of Angiotensinogen Gene Expression Induced by Ang II *

LI Ai-Ying, WEN Jin-Kun**, HAN Mei

(Hebei Laboratory of Medical Biotechnology, Institute of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract Angiotensin II (Ang II) can induce the expression of its precursor, angiotensinogen, in vascular smooth muscle cells (VSMC), which is related with increased activating protein-1 (AP-1) binding to its *cis*-element located in the angiotensinogen gene promoter. In the present study, cycloheximide (CHX) was used as an inhibitor to interrupt c-Jun, the role of AP-1 in Ang II -induced its precursor gene activation was investigated by DNA-protein interaction and immunoblotting. The results showed that the level of c-Jun, the component of transcription factor AP-1, was significantly increased in the nucleus of VSMC after Ang II treatment. The majority of c-Jun was found in the nucleus but hardly detected in the cytoplasm by immunocytochemistry staining. Immunoprecipitation assays confirmed that Ang II could induce serine phosphorylation of c-Jun. EMSA results indicated that the level of phosphorylated c-Jun had a positive correlation with AP-1 binding activity to *cis*-acting element of angiotensinogen gene and transcription activation of angiotensinogen. CHX inhibited Ang II -induced binding activity of AP-1 by reducing the phosphorylation of c-Jun, though it did not affect the expression of c-Jun. These findings suggest that the AP-1 phosphorylation induced by Ang II is one of the important mechanisms whereby Ang II regulates its precursor gene expression in feedback manner. It is found that CHX is an inhibitor to phosphorylation of c-Jun.

Key words vascular smooth muscle cells, angiotensinogen, AP-1, c-Jun, transcription regulation

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30570661), Special Found for Preliminary Research of Key Basic Research Project of Ministry of Science and Technology of China (2005CCA03100).

**Corresponding author . Tel: 86-311-86265563, E-mail: wjk@hebmh.edu.cn

Received: March 1, 2006 Accepted: April 21, 2006