

转录因子 E2F1 抑制 CREG 表达 调控体外培养的人血管平滑肌细胞分化*

韩雅玲** 赵 昕 闫承慧 康 建 张效林 邓 捷 徐红梅 刘海伟

(沈阳军区总医院全军心血管病研究所心内科, 沈阳 110016)

摘要 为探讨转录因子 E2F1 在血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 表型转化中的作用及其对 E1A 激活基因阻遏子 (cellular repressor of E1A-stimulated genes, CREG) 表达调控的分子机制, 应用生物信息学方法, 定位人 CREG (hCREG) 基因启动子并确定转录因子 E2F1 在 hCREG 启动子区的结合位点, PCR 方法克隆并构建 hCREG 基因启动子绿色荧光报告基因载体, 以 hCREG 启动子区 E2F1 结合位点为模板, 化学合成 E2F1 寡聚脱氧核苷酸(ODN)和错配 E2F1 ODN, 利用转录因子“诱骗(Decoy)”策略, 用 E2F1 ODN 转染体外培养的 VSMCs 以阻断 E2F1 与 hCREG 基因启动子区的结合, 蛋白质印迹(Western blot)分析检测阻断前后细胞内 hCREG 蛋白、报告基因绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)和平滑肌细胞分化标志蛋白 SM α -actin 表达变化. 结果显示: 分化表型 HITASY 细胞中 E2F1 表达下调伴出核转位, 而增殖表型的 HITASY 细胞中 E2F1 蛋白表达明显增加且定位于核内. 进一步应用 FuGene 6 瞬时转染 E2F1 ODN 和错配 E2F1 ODN 于体外培养 HITASY 细胞中, 蛋白质印迹分析发现, 转染 E2F1 ODN 后, HITASY 细胞中 hCREG、SM α -actin 和 GFP 表达均较未阻断组及错配组细胞明显增加. 上述研究结果证实, E2F1 是 hCREG 基因转录的重要调控因子, 能够直接结合于 hCREG 启动子区阻遏 hCREG 表达, 参与 hCREG 蛋白对 VSMCs 表型转化的调控作用.

关键词 E2F1, 转录因子, 阻遏蛋白, E1A, 表型, 血管平滑肌细胞

学科分类号 Q555.7, R34

许多研究证实血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)由分化表型向增殖表型转化是高血压、动脉粥样硬化和经皮冠状动脉介入术(PCI)术后再狭窄等心血管疾病发生的重要始动因素. 因而, 深入研究并阐明 VSMCs 表型转化的分子机制对这些疾病的防治具有重要意义. E1A 激活基因阻遏子 (cellular repressor of E1A-stimulated genes, CREG) 是 Veal 等^[1]克隆的转录调控相关基因. 近年研究证实^[2], CREG 在成熟分化的组织中广泛表达, 但在去分化组织或细胞, 如鼠胚胎干细胞、人畸胎瘤细胞和造血干细胞中却呈明显低表达或无表达状态. 将外源性 CREG 蛋白导入多种体外培养的肿瘤细胞中发现^[3], CREG 可以显著抑制肿瘤细胞的增殖并诱导其分化, 提示 CREG 是重要的细胞分化调控基因. 本室最初应用差异显示 PCR 技术在体外培养的分化表型人 VSMCs 克隆株中筛选到高表达的人 CREG 基因(hCREG). 随后的系列研究发现, hCREG 能够显著抑制体外培养和在体

损伤后 VSMCs 的增殖和凋亡, 诱导并维持其分化表型^[4,5], hCREG 对人 VSMCs 分化的调控作用是由 RhoA/SRF 信号转导通路介导的^[6]. 上述研究结果提示, hCREG 是人 VSMCs 分化的重要调控基因, 诱导其大量表达可以有效抑制 VSMCs 由分化表型向去分化表型的转化. 尽管目前对 hCREG 蛋白功能研究的报道已较多, 但调控 hCREG 蛋白表达的上游信号分子尚未见报道. 本研究以体外培养的人 VSMCs 克隆株 HITASY 为模型, 应用生物信息学方法确定 hCREG 基因的启动子及可能参与 hCREG 表达调控相关的转录调控因子 E2F1, 克隆并构建含有 hCREG 上游 945 bp 的启动子报告基因载体(pEGFP-hCREG-P945), 转染不同分化表型的

*国家自然科学基金(30570664)和辽宁省自然科学基金(2050426)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 024-23922184, Fax: 024-23911006, E-mail: hanyal@mail.sy.ln.cn

收稿日期: 2006-11-02, 接受日期: 2007-01-31

VSMCs, 观察 GFP 蛋白的表达, 以进一步明确 hCREG 蛋白与 VSMCs 细胞表型转化的关系. 同时应用免疫荧光和蛋白质印迹(Western blot)分析不同表型 VSMCs 中 E2F1 的表达和定位. 以 hCREG 启动子区 E2F1 结合位点为模板化学合成 E2F1 寡聚脱氧核苷酸(ODN)和错配 E2F1 ODN, 应用 E2F1 Decoy 技术封闭 VSMCs 中 hCREG 启动子区 E2F1 结合位点, 观察 E2F1 蛋白对 hCREG 的表达调控, 以期进一步阐明 hCREG 蛋白表达及诱导 VSMCs 分化的分子机制.

1 材料和方法

1.1 材料

人胸廓内动脉平滑肌细胞克隆株 HITASY (human internal thoracic artery-Shenyang)由本研究室建立并保存, 经鉴定为血管平滑肌细胞^[7]; 胎牛血清(FBS)购自杭州四季青公司; DMEM 购自 GIBCOBRL 公司; 兔抗人 CREG 多抗、E2F1 单抗、GFP 单抗和平滑肌 α -肌动蛋白(SM α -actin)单抗购自 Santa Cruz 公司; 蛋白质印迹(Western blot)化学发光试剂(ECL, RPN2106)、HRP 和荧光标记的二抗购自 Amersham 公司; FuGene 6 转染试剂购自 Roche 公司; PCR 引物、E2F1 ODN 和错配 E2F1 ODN 寡核苷酸由上海生工生物技术公司合成; EGFP-1 报告基因质粒购自 Clontech 公司.

1.2 实验方法

1.2.1 hCREG 基因的生物信息学分析. 在 NCBI 的 GenBank 中获得 hCREG 全长编码基因. 将转录起始位点上游大约 4 000 bp 序列输入 First EF 软件和 Footprinter 软件中预测 hCREG 基因的启动子区定位, 用 Motif 软件分析可能与 hCREG 基因启动子区结合的转录因子.

1.2.2 hCREG 启动子区序列扩增及 pEGFP-hCREG-P945 报告基因载体构建. 以 HITASY 细胞基因组 DNA 为模板, 根据 GenBank 中人类 CREG 基因上游序列(M8804)设计扩增范围为 945 bp 的引物 P1、R1. 引物序列为: P1, 5' cgacgcgtGATC-AGGCCCTTGCTTGAC 3', R1, 5' ccgctcgagCT-CAGGTAGAAATAGGGCAC 3'. PCR 扩增条件: 95℃变性 5 min, 94℃ 1 min, 68℃ 3 min, 35 个循环, 72℃延伸 7 min, PCR 产物回收、纯化并克隆入 pMD18-T 载体, 通过 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切亚克隆入 pEGFP-1 报告基因载体, 最终得到 pEGFP-hCREG -P945 报告基因质粒, 经酶切、测

序鉴定无误后大量扩增.

1.2.3 细胞培养和转染. HITASY 在含 10% FBS 的 DMEM 培养基、37℃和 5% CO₂ 的恒温培养箱中培养. 应用 FuGene 6 转染试剂将 pEGFP-hCREG-P945 转染至 HITASY 细胞, 转染后 72 h 荧光倒置显微镜下观察 GFP 表达. 转染后 24 h 的细胞, 按文献[7]换成含 0.5% FBS 的 DMEM 培养基, 去血清培养 72 h, 观察 GFP 表达.

1.2.4 免疫荧光分析. 细胞接种于盖玻片上至对数生长期, 用预冷的 PBS 洗 3 次, 4%多聚甲醛室温固定 15 min, 0.2% Triton X-100 通透 15 min, PBS 洗涤 3 次后, 5%山羊血清封闭 30 min. 加入抗 E2F1 抗体(1:100), 4℃孵育过夜. PBS 洗涤 3 次, 加入荧光标记的二抗(1:100), 室温 2 h, PBS 洗涤细胞 3 次, DAPI 复染细胞核, 经 PBS 洗涤后甘油封片, 荧光显微镜(Olympus IV-70)下观察、摄像. 不加一抗做阴性对照.

1.2.5 蛋白质印迹分析. 按文献[8]对全细胞提取物进行 SDS-PAGE、转膜、抗体结合及显色. 分离胶浓度为 12%, 一抗分别为抗 E2F1、hCREG、GFP 和 SM α -actin 抗体. 经 HRP 标记的二抗孵育后, 按 ECL 试剂盒说明书曝光处理.

1.2.6 E2F1 ODN 设计与合成和细胞转染. 参照文献[9]报道, 分别设计 hCREG 基因启动子区 E2F1 结合位点的碱基序列合成硫代磷酸化 ODN 正链及互补链, 正链序列如下: E2F1 ODN, 5'CTAGATT-GGCGCG 3'; E2F1 错配 ODN, 5' CTAGATT-GCTGCG 3'.

分别将上述 2 种 ODN 及其互补链溶解于 3×SSC 溶液中, 加热至 80℃后, 缓慢降温至 55℃, 使其退火生成双链 ODN. 用 FuGene 6 转染法将 7 mg/L E2F1 ODN 转染至生长密度为 60%~80%的 HITASY 细胞, 转染 24 h 后去血清继续培养 72 h, 观察 E2F1 ODN 转染对 VSMCs 分化的影响, 以错配 ODN 转染组为对照.

1.2.7 统计处理分析. 实验结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS 12.0 统计软件, 组间比较用单因素方差分析. 每组实验结果均重复测量 3 次以上.

2 结 果

2.1 hCREG 启动子区转录调控因子结合位点的预测

在 NCBI 的 GenBank 中查找并获得 hCREG 基因转录起始位点上游 3 677 bp 序列, 用 First EF 软

件预测 hCREG 基因的启动子(表 1), 结果显示翻译起始点上游 945 bp 内为 hCREG 启动子定位区. 进一步应用 Motif 软件分析 hCREG 基因上游 945 bp 区域的转录调控因子结合位点(表 2), 结果显示, 上游 945 bp 区域含有多个转录因子结合位点, 其中 E2F1 有 2 个结合位点, 分别定位为: -97 bp 和 -446 bp. 提示 E2F1 可能参与 hCREG 基因的转录调控.

Table 1 Prediction of hCREG promoter region

Processed sequence	Promoter region predicted/bp	Promoter score
3 677 Base pairs	-3 101~-2 851	68.66
2 310 Base pairs	-1 732~-1 482	95.23
945 Base pairs	-359~-109	158.26

Table 2 Prediction of transcriptional factor binding sites in hCREG promoter

Transcriptional factor	Sequences	Start	End	Correlation
TATA box	cctttaaaaa	-356	-365	86%
GC box	agggggcggggcct	-85, -116	-88, -129	98%
CCAAT box	tatagccaataa	-91	102	92%
E2F1	attggcgc	-97, -446	-104, -453	97%
p300	aatgggagtgaggt	-704, -812	-717, -825	93%
p53	agacttgctc	-446	-455	88%
GATA	agataattcct	-360, -654	-370, -664	96%

2.2 CREG 启动子报告载体的构建及表达

以 HITASY 细胞基因组 DNA 为模板, 采用高保真 Taq 酶扩增出大小为 945 bp 的 hCREG 基因上游 DNA 片段. PCR 产物经纯化后, 克隆入 pMD18-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α . 利用 pMD18-T-P945 载体上的限制性内切酶位点 *Kpn* I 和 *Hind* III, 将 PCR 产物亚克隆入 pEGFP-1 中, 筛选出阳性克隆, 得到 pEGFP-CREG-P945 重组质粒, 重组体经酶切和测序鉴定无误后, 大量扩增.

将 pEGFP-hCREG-P945 转染体外培养的 HITASY 细胞, 观察 GFP 表达. 荧光显微镜下观察可见, 10% FBS 培养 72 h 的转染细胞中有较弱 GFP 表达, 而转染 24 h 后, 应用 0.5%FBS 继续培养 72 h 的 VSMCs 中, GFP 表达较 10% FBS 培养细胞中明显增强(图 1a). 蛋白质印迹分析 GFP 表达与荧光显微镜下观察结果一致(图 1b). 这些结果提示, hCREG 基因上游 945 bp 含有 hCREG 启动子, 能够启动报告基因 GFP 表达. 分化表型的 VSMCs 中

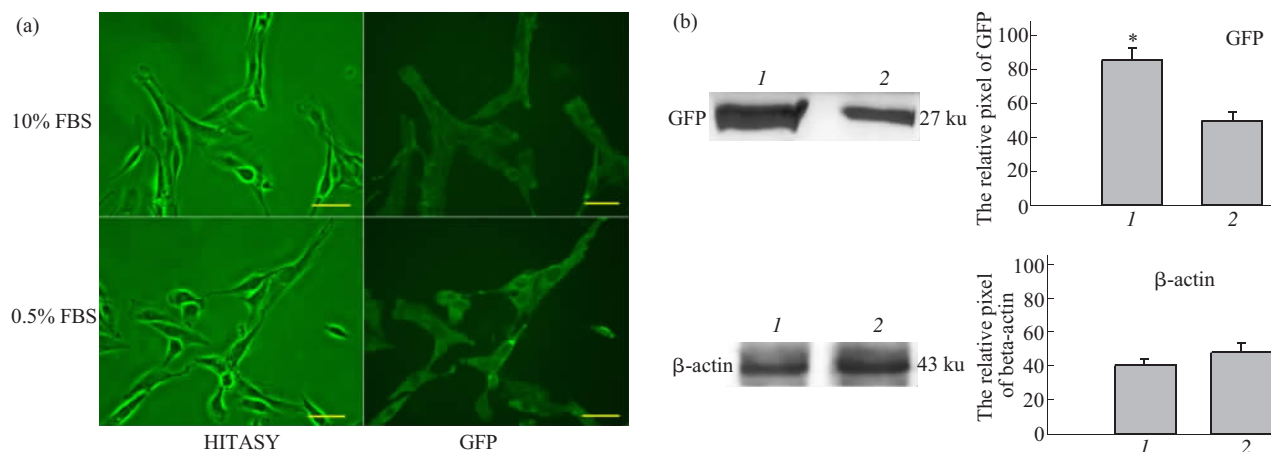


Fig. 1 Expression of GFP in HITASY cells transfected with pEGFP-hCREG-P945

(a) Phase-contrast photomicrographs of HITASY cells after transfection pEGFP-hCREG-P945 with and without serum deprivation 72 h. Bar: 50 μ m. (b) Expressions of GFP was detected by Western blot. Blots were scanned with a biologic Doc2000 gel analysis system and band intensity was quantified with image analysis software. * P < 0.05 as compared with HITASY cells in DMEM with 10% FBS. 1: HITASY cells in DMEM with 0.5% FBS after transfected with pEGFP-hCREG-P945 for 72 h; 2: HITASY cells in DMEM with 10% FBS for 72 h after transfected 24 h with pEGFP-hCREG-P945.

GFP表达明显增加.

2.3 不同表型 VSMCs 中 E2F1 表达分析

为明确 E2F1 在 hCREG 转录调控中的作用, 我们首先检测 E2F1 在不同表型 VSMCs 中的表达. 体外培养的 VSMCs 可以根据不同的血清刺激呈现分化和去分化 2 种表型: 正常 HITASY 细胞(对照组)在含 10% FBS 的 DMEM 培养基中呈去分化生长, 细胞呈长椭圆形, 体积较大, 生长至融合时出

现典型的“峰谷”样形态; 而于 0.5% FBS 的 DMEM 培养基中培养 72 h 后, 细胞呈典型的分化表型, 胞体细长呈梭形, 体积减小并呈多层重叠排列, 环绕出现明显的管腔样生长趋势 (图 2a). 同时, 蛋白质印迹分析显示, 去血清培养 72 h 的 HITASY 细胞中 hCREG 蛋白和分化标志蛋白 SM α -actin 表达均较 10% FBS 培养细胞中明显增加, 提示 HITASY 细胞向分化表型转化. 与 hCREG 蛋

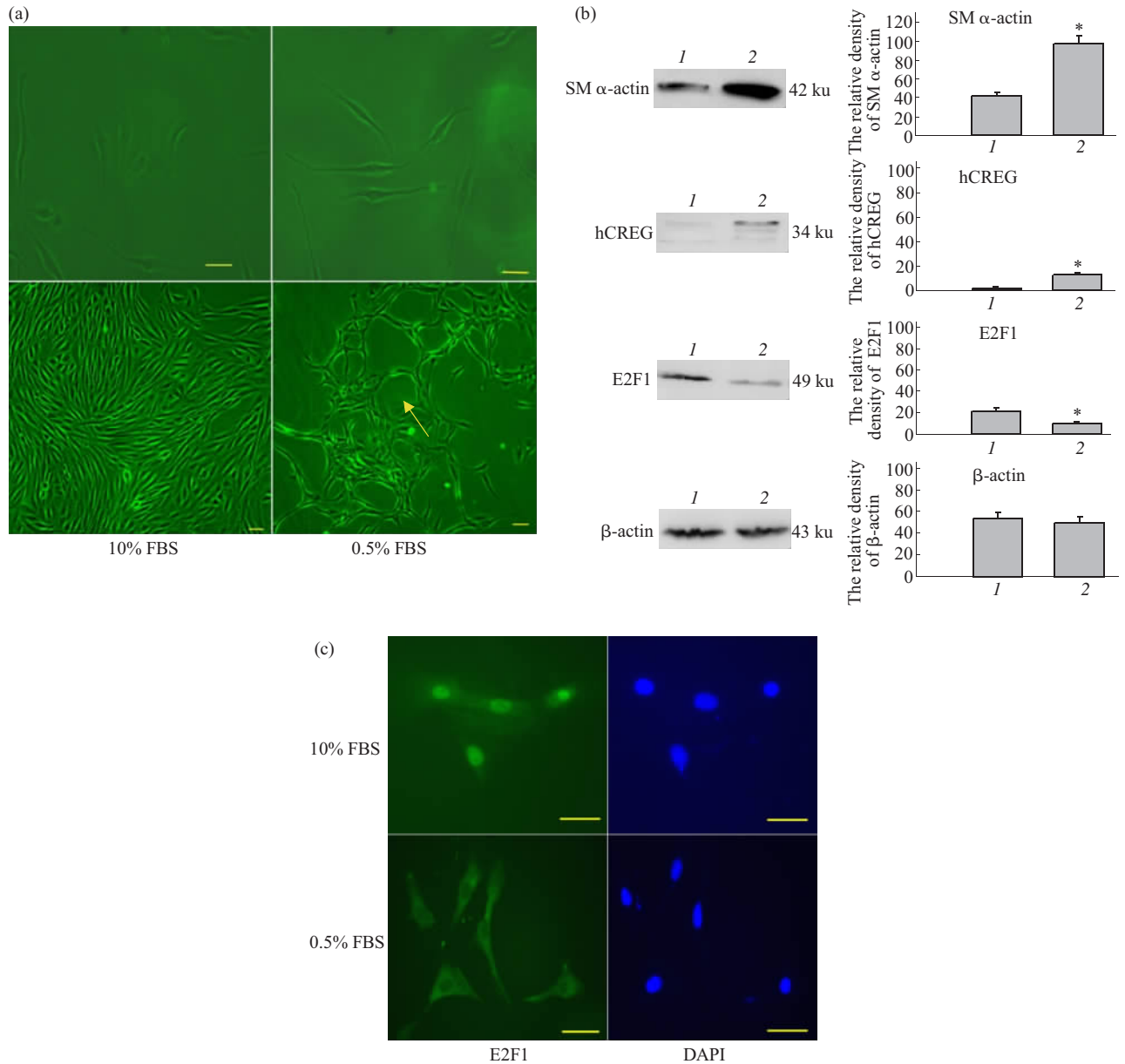


Fig. 2 Immunolocalization and expression of E2F1 was analyzed in differential phenotype of HITASY cells by Western blot and immunofluorescence

(a) Phase-contrast photomicrographs of HITASY cells before and after serum deprivation 72 h. Yellow arrow heads to the edge of the tube-like structure. Bar: 50 μ m. (b) Expressions of proteins were detected by Western blot. Blots were scanned with a biologic Doc2000 gel analysis system and band intensity was quantified with image analysis software. * $P < 0.05$ as compared with HITASY cells in DMEM with 10% FBS. 1: HITASY cells in DMEM with 10%FBS; 2: HITASY cells in DMEM with 0.5%FBS after 72 h. (c) The expression of E2F1 in HITASY cells was visualized by immunofluorescence microscopy before and after serum deprivation. Green fluorescence was used to display E2F1 staining and DAPI staining was used to visualize the nuclei(blue). Bar: 50 μ m.

白和 SM α -actin 蛋白的表达相反, 蛋白质印迹分析显示去血清培养后 HITASY 细胞内转录调控因子 E2F1 的表达较 10% FBS 培养细胞中显著降低 (图 2b). 应用免疫荧光染色分析 E2F1 在细胞中的定位发现, 10% FBS 培养的 HITASY 细胞中 E2F1 表达较强, 主要定位于细胞核内, 去血清培养后细胞内 E2F1 表达明显下调, 主要定位于细胞浆 (图 2c). 上述结果提示正常血清状态下 E2F1 在细胞核内大量表达可能对 hCREG 基因转录具有阻遏作用.

2.4 E2F1 蛋白与 hCREG 启动子结合抑制 hCREG 基因表达

为进一步探讨 E2F1 能否直接结合于 hCREG 基因上游启动子区调控其表达, 依据 hCREG 基因启动子区的 E2F1 结合序列设计 E2F1 ODN 和错配

E2F1 ODN, 封闭 hCREG 基因启动子区的 E2F1 结合位点, 进一步观察 hCREG 的表达变化及其与细胞表型转化的关系. 应用 E2F1 Decoy 技术分别将 E2F1 ODN 和错配 ODN 与 pEGFP-hCREG-P945 报告基因共转染 HITASY 细胞, 观察 E2F1 蛋白对 CREG 基因表达的调控作用. 蛋白质印迹分析发现, E2F1 ODN 转染后细胞中 GFP、hCREG 和 SM α -actin 的蛋白表达均较未转染细胞明显增加. 而错配组 ODN 转染细胞中上述蛋白质表达与单独 pEGFP-hCREG-P945 报告基因转染组比较无显著性差别 (图 3). 上述结果提示, E2F1 ODN 封闭了 hCREG 基因启动子区 E2F1 结合位点后, 减弱了 E2F1 对 hCREG 基因转录的阻遏调控作用, 启动 hCREG 及报告基因 GFP 表达, 并进一步引起 VSMCs 分化标志蛋白 SM α -actin 的表达增加.

3 讨 论

许多研究已证实, E2F1 是血管损伤后 VSMCs 增殖的重要调控因子. 它可以调控多种细胞周期调节基因, 如 c-myc、PCNA 等的表达, 促使细胞周期由 G1 期向 S 期演进, 引起 VSMCs 的分裂和增殖, 导致血管再狭窄的发生^[10,11]. 相反, 应用“Decoy”技术抑制 E2F1 对下游目的基因的调控作用, 则可有效抑制移植血管狭窄和 PCI 术后再狭窄的发生, 目前相关研究工作已进入了临床阶段并取得了一定的效果^[12,13].

本研究发现, 作为重要的转录调控因子, E2F1 除了能够调控细胞周期相关基因的表达促进细胞增殖外, 还可以与细胞分化基因 hCREG 启动子区调控位点结合, 阻遏细胞分化调控基因 hCREG 表达, 从而进一步抑制 VSMCs 分化.

我们应用生物信息学技术将 hCREG 基因的启动子区定位在 hCREG 转录起始点上游-945~0 bp, 并发现该区域含有启动子元件和多个转录因子(如 E2F1、P53、GATA 等)的结合位点. 其中转录调控因子 E2F1 蛋白在此区域有 2 个结合位点, 提示 E2F1 可能参与 hCREG 转录调控, 这与 Gill 报道的 E2F1 与 CREG 的竞争抑制相似. 为进一步明确 E2F1 在 hCREG 转录调控中的作用, 本实验首先构建了含 hCREG 上游-945 bp 的启动子报道基因载体 pEGFP-hCREG-P945, 并将其转染至体外培养的人分化表型 VSMCs, 验证其具有较高的启动活性. 继而以体外培养的不同表型人 VSMCs 克隆株 HITASY 细胞为模型, 观察了转录因子 E2F1 的表

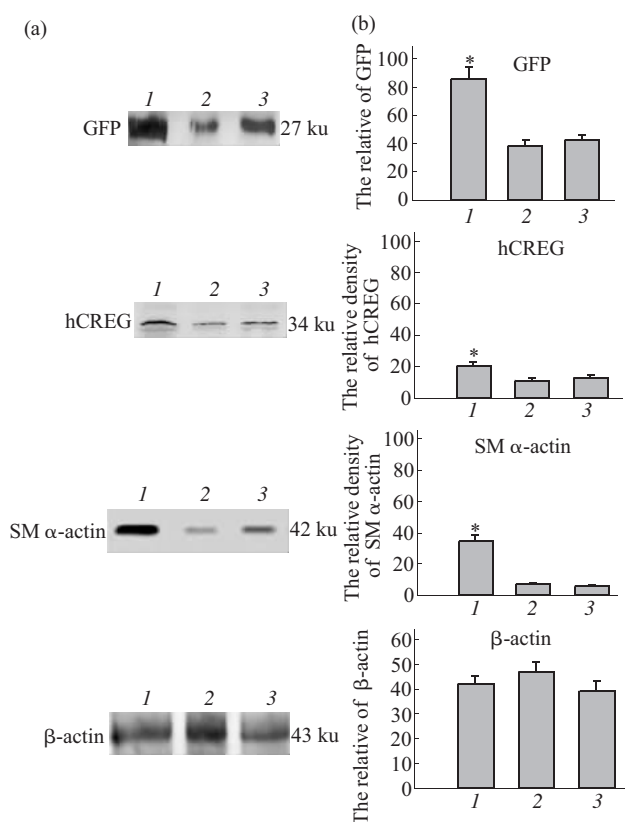


Fig. 3 Analysis of protein expressions in HITASY cells co-transfected with E2F1 ODN or mismatched ODN and pEGFP-hCREG-P945 vector by Western blot

(a) The expressions of proteins was analyzed by Western blot. (b) Relative density of proteins. The bar graphs above have numbered columns represent the quantities of proteins expression in three experimental groups. Blots were scanned with a biologic Doc2000 gel analysis system and band intensity was quantified with image analysis software. * $P < 0.05$ vs control HITASY cells. 1: HITASY cells with pEGFP-hCREG-P945 and 200 fold excess amount E2F1 ODN co-transfection; 2: HITASY cells with pEGFP-hCREG-P945 transfection; 3: HITASY cells with pEGFP-hCREG-P945 and 200 fold excess amount mismatched ODN co-transfection.

达与 HITASY 细胞表型转化的关系. 免疫荧光和蛋白质印迹分析证实, E2F1 蛋白表达与 hCREG 蛋白表达和 VSMCs 分化均呈负相调控关系, 提示 E2F1 蛋白可能作为反式作用因子参与 hCREG 基因的转录调控. 为进一步阐明 E2F1 与 hCREG 蛋白之间的作用机制, 本研究设计了含有 hCREG 启动子区 E2F1 结合位点的 E2F1 ODN 和错配 ODN 序列. 利用转录因子“Decoy”策略, 封闭了 E2F1 蛋白在 hCREG 基因启动子区的结合位点, 干扰了 E2F1 对 hCREG 的转录调控. 结果证实, E2F1 蛋白阻遏 hCREG 基因的转录, 同时抑制 VSMCs 的分化.

综上所述, 本研究初步证实 E2F1 作为反式调控因子, 通过阻遏 hCREG 的转录参与了 VSMCs 表型转化的调控. 从一个全新角度进一步阐述了 E2F1 Decoy 技术应用于临床再狭窄治疗的分子机制. 但是, VSMC 表型转化的过程十分复杂, 可能涉及多种细胞分子调控机制, 它们的功能及其复杂的相互调控网络仍尚未完全阐明. 对基因 (如 hCREG) 功能的不断深入研究, 将为阐明增生性血管疾病发病机制及选择新的治疗靶点提供更加有益的思路.

参 考 文 献

- 1 Veal E, Eisenstein M, Tseng Z H, *et al.* A cellular repressor of E1A-stimulated genes that inhibits activation by E2F. *Mol Cell Biol*, 1998, **18** (9): 5032~5041
- 2 Veal E, Groisman R, Eisenstein M, *et al.* The secreted glycoprotein CREG enhances differentiation of NTERA-2 human embryonal carcinoma cells. *Oncogene*, 2000, **19** (17): 2120~2128
- 3 Di Bacco A, Gill G. The secreted glycoprotein CREG inhibits cell growth dependent on the mannose-6-phosphate / insulin-like growth factor II receptor. *Oncogene*, 2003, **22** (35): 5436~5445
- 4 韩雅玲, 闫承慧, 刘海伟, 等. E1A 激活基因阻遏子过表达诱导体外培养大鼠平滑肌细胞分化. *生物化学和生物物理进展*, 2004, **31** (12): 1099~1105
- 5 Han Y L, Yan C H, Liu H W, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2004, **31** (12): 1099~1105
- 5 韩雅玲, 王效增, 康 建, 等. 大鼠颈动脉球囊损伤后血管平滑肌细胞 E1A 激活基因阻遏子的表达变化. *中华心血管病杂志*, 2004, **32** (1): 53~58
- 6 Han Y L, Wang X Z, Kang J, *et al.* *Chin J Cardiol*, 2004, **32** (1): 53~58
- 6 韩雅玲, 徐红梅, 闫承慧, 等. Rho A 和血清反应因子(SRF)介导 E1A 激活基因阻遏子诱导人血管平滑肌细胞分化. *生物化学与生物物理进展*, 2006, **33** (5): 438~455
- 7 Han Y L, Xu H M, Yan C H, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2006, **33** (5): 438~455
- 7 韩雅玲, 康 建, 张 剑, 等. 对去血清后 HITSY 细胞分子表达及表型分析. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30** (6): 868~873
- 8 Han Y L, Kang J, Zhang J, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30** (6): 868~873
- 8 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1860
- 9 Morishita R, Gibbons G H, Horiuchi M. A gene therapy strategy using a transcription factor decoy of the E2F binding site inhibit smooth muscle proliferation *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (13): 5855~5859
- 10 Zhu W, Giangrande P H, Nevins J R. E2Fs link the control of G1/S and G2/M transcription. *EMBO J*, 2004, **23** (23): 4615~4626
- 11 Li Y Y, Wang L, Lu C D. An E2F site in the 5'-promoter region contributes to serum-dependent up-regulation of the human proliferating cell nuclear antigen gene. *FEBS Lett*, 2003, **544** (1~3): 112~118
- 12 Alexander J H, Hafley G, Harrington R A, *et al.* Efficacy and safety of edifoligide, an E2F transcription factor decoy, for prevention of vein graft failure following coronary artery bypass graft surgery: PREVENT IV: a randomized controlled trial. *The Journal of the American Medical Association*, 2005, **294** (19): 2446~2454
- 13 Morishita R. Recent progress in gene therapy for cardiovascular disease. *Circ J*, 2002, **66** (12): 1077~1086

Transcriptional Factor E2F1 Inhibits Expression of The Cellular Repressor of E1A-Stimulated Genes and Regulates VSMCs Differentiation *In vitro**

HAN Ya-Ling**, ZHAO Xin, YAN Cheng-Hui, KANG Jian,
ZHANG Xiao-Lin, DENG Jie, XU Hong-Mei, LIU Hai-Wei

(Department of Cardiology, Shenyang General Hospital, Cardiovascular Research Institute of PLA, Shenyang 110016, China)

Abstract The human cellular repressor of E1A-stimulated genes (hCREG), originally cloned from the cDNA library of HeLa cell line, was found to rapidly induce the differentiation of diverse type cells such as pluripotent mouse EC cells, monocytes U937 and myeloid cells EML. It was identified in previous study that not only could overexpression of hCREG regulate and hold the differentiation vascular smooth muscle cells (VSMCs) *in vitro*, but inhibit the neointima formation in rat carotid artery after balloon injury. These properties suggest that hCREG might have played an important role in antagonizing restenosis of vessel by inhibiting phenotypic modulation of VSMCs. In order to further elucidate the biological functions of hCREG in VSMCs, the upstream molecule mechanisms in regulating its expression were analyzed. At first, bioinformatics was used to predict the hCREG promoter and the binding sites of transcriptional factors. According to bioinformatic results, the pEGFP-hCREG-P945 reporter gene vector was constructed successfully which contained upstream 945 bp of hCREG where two binding sites of E2F1 were determined. Subsequently, the hCREG promoter activity was identified directly by detecting the expression of reporter protein-GFP with fluorescence microscope and Western blot analysis when the vector was transfected into human VSMCs-HITASY. Secondly, both the expression of hCREG and smooth muscle α -actin (SM α -actin) was detected to increase in differentiation HITASY cells cultured for 72 h with serum deprivation, in which the expression of E2F1 was reduced significantly. Inversely, the increase of E2F1 expression was detected in dedifferentiation cells cultured with 10% FBS medium accompanied with the reduction of hCREG and SM α -actin. It is suggested that E2F1 maybe inhibit the expression of hCREG by binding to the hCREG promoter. Furthermore, the E2F1 oligodeoxynucleotide (ODN) and mismatch E2F1 ODN were designed and used to block the binding of E2F1 to hCREG promoter by transcriptional factor “decoy strategy”. Western blot analysis showed that expression of hCREG, GFP and SM α -actin was increased obviously when the E2F1 ODN was transfected in dedifferentiation HITASY cells. The result identified that transcription factor E2F1 inhibited the expression of hCREG and promote dedifferentiation of VSMCs by binding to the sites of hCREG promoter. It can be concluded that E2F1, as a transcriptional regulation factor of hCREG, can repress the expression of hCREG and involve in a pivotal role in the process of VSMCs phenotypic modulation.

Key words E2F1, transcription factor, repressor protein, E1A, phenotype, vascular smooth muscle cell

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30570664) and The Natural Science Foundation of Liaoning Province (2050426).

**Corresponding author . Tel: 86-24-23922184, Fax: 86-24-23911006, E-mail: hanyal@mail.sy.ln.cn

Received: November 2, 2006 Accepted: January 31, 2007