

钙激动剂介导血管平滑肌细胞增殖的信号转导途径

杨永健, 朱 峻, 周兴文, 张 鑫, 赵龙生

(成都军区成都总医院心血管内科, 四川省成都市 610083)

[主题词] 钙调神经磷酸酶; 肌, 平滑, 血管; 细胞增殖; 信号通路

[摘 要] 为探讨钙调神经磷酸酶依赖的信号通路在雷尼丁刺激的大鼠血管平滑肌细胞增殖中的作用, 以培养的大鼠血管平滑肌细胞为模型, 用雷尼丁刺激其内贮 Ca^{2+} 释放入胞浆, 环孢素 A 阻断钙调神经磷酸酶信号通路, 维拉帕米阻断钙通道, 检测血管平滑肌细胞钙调神经磷酸酶、丝裂素活化蛋白激酶和蛋白激酶 C 活性, 用 ^3H - 亮氨酸及 ^3H - 胸腺嘧啶掺入量作为反应细胞增殖的指标。结果显示, 雷尼丁刺激组蛋白核酸合成速率明显增高, 与对照组相比差异显著 ($P < 0.01$); 环孢素 A 及维拉帕米能明显抑制雷尼丁介导的平滑肌细胞蛋白核酸合成速率增高, 与雷尼丁刺激组相比差异显著 ($P < 0.01$)。同时发现雷尼丁刺激组钙调神经磷酸酶、蛋白激酶 C 活性与对照组平滑肌细胞相比差异显著 ($P < 0.05$ 或 0.01)。环孢素 A 和维拉帕米抑制雷尼丁介导的平滑肌细胞钙调神经磷酸酶活性增高, 维拉帕米抑制雷尼丁介导的平滑肌细胞蛋白激酶 C 活性的增高。提示钙调神经磷酸酶信号通路在雷尼丁刺激的平滑肌细胞增殖中起重要作用, 但钙调神经磷酸酶信号通路不是雷尼丁介导平滑肌细胞增殖的唯一信号通路, 以丝裂素活化蛋白激酶为核心的信号通路亦参与了雷尼丁刺激的平滑肌细胞增殖。

[中图分类号] R318.04

[文献标识码] A

Signaling Pathway Mediated Cultured Vascular Smooth Muscle Cells Proliferation by Calcium Activator

YANG Yong- Jian, ZHU Jun, ZHOU Xing- Wen, ZHANG Xin, and ZHAO Long- Sheng

(Cardiology Department, General Hospital of Chengdu Army, Chengdu 610083, China)

MeSH Calcineurin; Muscle, Smooth, Vascular; Cell Proliferation; Signaling Transduction

ABSTRACT **Aim** To study the effect of calcineurin (CaN) - dependent signaling passway on proliferation of rat vascular smooth muscle cells (VSMC) under stimulation of Ryanodine (RY). **Methods** Upon the model of cultured rat VSMC, Ca^{2+} releasing from Ca^{2+} stores stimulated with RY, CaN signaling pathway was blocked with cyclosporine A (CsA) and Ca^{2+} channel with verapamil (Ver), detecting the activities of VSMC CaN, mitogen activated protein kinase (MAPK) and protein kinase C (PKC), ^3H - Leucine(^3H - Leu) and ^3H - Thymidine(^3H - TdR) incorporation as the target to evaluate VSMC proliferation.

Results Synthesis rate of protein and nucleic acid stimulated by RY in VSMC increased significantly in contrast to control ($P < 0.01$); CsA and Ver markedly inhibited syntheses of protein and nucleic acid mediated by RY in VSMC with a significant difference from RY- stimulated group ($P < 0.01$). CsA and Ver also suppressed VSMC CaN activity mediated by RY, and Ver suppressed VSMC PKC activity mediated by RY.

Conclusions The study indicates CaN signaling pathway play an important role in VSMC proliferation induced by RY, but it is not the only signaling pathway in regulating VSMC proliferation, MAPK- centered signaling pathway is also involved in VSMC proliferation induced by RY.

高血压病病程中, 血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 的增殖和肥大导致血管壁增厚及管腔缩小, 在血管重构中占有重要地位^[1]。细胞内钙离子浓度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 的变化是触发细胞增殖相关信号转导的始动因素^[2]。钙调神经磷酸酶 (calcineurin, CaN) 是一种受 Ca^{2+} 及钙调素调节的多

功能信号酶, 通过活化 T 细胞核因子转位入核, 调节核内一系列基因的表达, 在心肌细胞肥大过程中起重要作用^[3]。CaN 信号通路是否参与钙激动剂介导的 VSMC 增殖, 其它信号通路如丝裂素活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 信号通路的激活是否与 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化有关, 尚不十分清楚, 本文对此进行了研究。

[作者简介] 杨永健, 男, 1965 年出生, 重庆万州人, 博士, 主治医师, 从事心肌血管重构有关信号转导研究。朱 峻, 男, 1964 年出生, 四川成都人, 大学本科, 主治医师, 从事高血压病基础与临床研究。

1 材料与方法

1.1 主要材料

Wistar 大鼠(本院实验动物中心); CaN 底物 PNPP (杜帮公司); M199、环孢素 A、雷尼丁、维拉帕米、髓磷脂碱性蛋白(MBP)、磷脂酰丝氨酸、组蛋白 III-SS 和蛋白酶抑制剂(PMSF 等)(Sigma 公司); ^3H -Leu(中科院上海核技术开发公司); ^3H -TdR 北京原子能科学研究院)。

1.2 血管平滑肌细胞培养

组织贴块法培养 VSMC。无菌条件下分离 Wistar 大鼠胸主动脉, 剪碎后加入适量含 10% 胎牛血清的 M199 培养液, 37℃、5% CO₂ 培养箱中静置培养。用光镜和免疫组织化学法进行鉴定。选择生长良好的第 4~5 代 VSMC 用于实验, 消化的 VSMC 配制成 3×10^8 个/L 细胞的悬液, 按每孔 1 mL 接种于 24 孔板培养, 测定蛋白核酸合成速率, 2 mL 接种于 12 孔板培养测酶的活性, 按下列分组进行实验。

1.3 实验分组

对照组: 无特殊刺激因素; ④雷尼丁刺激组: 加雷尼丁 (10^{-7} mol/L) 刺激; ④环孢素 A 干预组: 雷尼丁 (10^{-7} mol/L) + 环孢素 A (100 μg /L) 刺激; 维拉帕米干预组: 雷尼丁 (10^{-7} mol/L) + 维拉帕米 (10^{-5} mol/L) 刺激。各组刺激时间均为 24 h。

1.4 钙调神经磷酸酶活性测定^[4,5]

将 VSMC 悬液接种于 24 孔培养板, 每孔 2 mL, 放入 CO₂ 培养箱, 24 h 后换上无血清培养基培养 12 h, 分组药物刺激后制备细胞提取液。冷 PBS 洗涤收集细胞 2 次, 加入预冷的匀浆液 (50 mmol/L Tris, pH 7.5, 0.1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L DTT, 50 mg/L PMSF, 50 mg/L STI, 5 mg/L leupeptin, 5 mg/L aprotinin)。反复冻融 3 次破碎细胞, 4℃离心, 取上清, 用考马斯亮蓝法蛋白定量后进行 CaN 活性测定。

底物 I 液含 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 0.5 mmol/L DDT, 0.2 g/L BSA, 10 mmol/L PNPP, 0.5 mmol/L MnCl₂, 0.2 mmol/L CaCl₂, 0.3 μmol /L CaM。底物 II 液含 3 mmol/L EGTA, 不含 CaCl₂ 和 CaM。测定时取待测提取液 20 μL 与底物 380 μL 30℃保温 10 min, 立即加入含 0.5 mmol/L Na₂CO₃ 及 0.4 mmol/L EGTA 的反应液终止反应, 在分光光度计 410 nm 读取吸光度, 以空白底物液调零, 每样本底物 I 液测出的值作为磷酸酶的总活力; 底物 II 液测出的值是非 CaN 的其它磷酸酶活力, 两者之差即 CaN 活力, 结果以比活力(A_{410 nm}/mg 蛋白)表示, 重复 6 次。

1.5 丝裂素活化蛋白激酶和蛋白激酶 C 活性测定

取细胞提取液, 按李田昌等^[6]方法, 用 γ -³²P-

ATP 磷酸化底物 MBP 测 VSMC MAPK 活性, 以 γ -³²P-ATP 磷酸化蛋白激酶 C 底物肽, 测 VSMC 蛋白激酶 C 活性。酶的活性均用 cpm/well 表示, 重复 6 次。

1.6 ^3H -亮氨酸和 ^3H -胸腺嘧啶掺入量的测定

消化的 VSMC 悬液配制成 5×10^8 /L 个细胞, 接种到 24 孔培养板, 每孔 1 mL, 放入 CO₂ 培养箱, 24 h 后换上无血清培养基培养 12 h, 分组药物刺激, ^3H -亮氨酸终浓度为 1.85×10^{11} Bq/L, 24 h 后收集各孔细胞液闪记数, 用放射性同位素 ^3H -亮氨酸掺入量反映 VSMC 蛋白质合成速率。 ^3H -TdR 终浓度为 3.7×10^{10} Bq/L, 其余同 ^3H -亮氨酸掺入量的测定。

1.7 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间进行 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异显著。

2 结果

2.1 钙调神经磷酸酶、丝裂素活化蛋白激酶和蛋白激酶 C 的活性

从表 1(Table 1) 可以看出, 雷尼丁刺激组 VSMC CaN 活性明显高于对照组 (*P* < 0.05), 环孢素 A 和维拉帕米可明显抑制雷尼丁介导的 VSMC CaN 活性增高 (*P* < 0.05)。雷尼丁刺激组 MAPK 活性与对照组相比差异无显著性 (*P* > 0.05); 维拉帕米能明显抑制 VSMC MAPK 活性 (*P* < 0.05); 雷尼丁刺激组 VSMC 蛋白激酶 C 活性明显高于对照组 (*P* < 0.01), 维拉帕米能明显抑制雷尼丁介导的 VSMC 蛋白激酶 C 活性增加 (*P* < 0.05)。

表 1 环孢素 A 与维拉帕米对雷尼丁刺激的血管平滑肌细胞钙调神经磷酸酶、丝裂素活化蛋白激酶和蛋白激酶 C 活性的影响

Table 1 The effect of cyclosporine (CsA) and verapamil (Ver) on calcium activator induced increase of CaN, MAPK, PKC activities in rat vascular smooth muscle cells ($\bar{x} \pm s$, *n* = 6)

Groups	CaN (A _{410nm} /Well)	MAPK (cpm/well)	PKC (cpm/well)
Control	0.045 ± 0.001	5 362 ± 276	1 512 ± 324
RY	0.068 ± 0.003 ^a	5 327 ± 411	5 133 ± 801 ^b
RY+ CsA	0.047 ± 0.002 ^c	5 299 ± 326	5 093 ± 678 ^b
RY+ Ver	0.046 ± 0.005 ^c	4 638 ± 253 ^c	4 316 ± 911 ^{bc}

a: *P* < 0.05, b: *P* < 0.01, compared with control group; c: *P* < 0.05, compared with RY group.

2.2 ^3H -亮氨酸和 ^3H -胸腺嘧啶掺入

从表 2(Table 2) 可以看出, 雷尼丁明显提高

VSMC ^3H - 亮氨酸和 ^3H - TdR 的掺入量 ($P < 0.01$), 而环孢素 A 和维拉帕米可明显抑制 VSMC ^3H - 亮氨酸和 ^3H - 胸腺嘧啶掺入量的增加, 与雷尼丁刺激组相比差异非常显著 ($P < 0.01$)。

表 2 环孢素 A 和维拉帕米对雷尼丁刺激的大鼠血管平滑肌细胞 ^3H - 亮氨酸和 ^3H - 胸腺嘧啶掺入的影响

Table 2 The effect of CsA and Ver on RY- induced increase of ^3H - leucine and ^3H - Thymidine incorporation in cultured rat vascular smooth muscle cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Groups	^3H - Leu incorporation (cpm/well)	^3H - TdR incorporation (cpm/well)
Control	906 \pm 102	34 661 \pm 2 001
RY	1 897 \pm 97 ^a	51 778 \pm 1 278 ^a
RY+ CsA	1 377 \pm 79 ^{ab}	42 356 \pm 1 128 ^{ab}
RY+ Ver	1 385 \pm 91 ^{ab}	45 611 \pm 1 998 ^{ab}

a: $P < 0.01$, compared with control group, b: $P < 0.01$, compared with RY group.

3 讨论

细胞内贮 Ca^{2+} 主要贮存在内质网(ER)/肌浆网(SR)中, 受细胞内 1, 4, 5- 三磷酸肌醇(IP_3)和雷尼丁受体系统调控^[7]。雷尼丁是细胞内钙激动剂, 与细胞内雷尼丁受体结合刺激细胞内钙释放, 但可以被钙通道阻滞剂如维拉帕米阻断。文献[3]报道, 心肌细胞内 Ca^{2+} 浓度增高, 激活 CaN, 使 NF- ATc 去磷酸化并进入胞核, 与心肌细胞核内的转录因子如锌指转录因子(GATA4, 一种心肌细胞内的特殊转录因子)等相互作用, 活化多种心肌肥厚的相关基因, 免疫抑制剂环孢素 A (CaN 的特异抑制剂)可抑制 CaN 活性, 消除心肌肥厚而改善心衰。本研究发现雷尼丁可使 VSMC CaN 活性增加, 同时使 VSMC 蛋白核酸合成速率增加, 环孢素 A 和维拉帕米可明显抑制该作用, 表明 CaN 信号通路在雷尼丁刺激的 VSMC 增殖中起重要作用。

丝裂素活化蛋白激酶是细胞增殖与分化信号转导的共同通路, 是血管平滑肌细胞和心肌细胞中多种信号向核内传递的共同途径, 在血管平滑肌与心肌肥大反应中起重要作用^[8,9]。细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度增高虽可激活蛋白激酶 C^[10], 但是否激活 VSMC MAPK 尚不清楚。本研究发现, 雷尼丁刺激 VSMC MAPK 活性增高不明显, 雷尼丁+ 维拉帕米引起 MAPK 活性降低; 而雷尼丁能明显提高蛋白激酶 C

活性, 维拉帕米能部分抑制该作用。表明细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度增高能激活蛋白激酶 C 介导的 VSMC 增殖, 钙通道阻滞剂能通过抑制 MAPK 和蛋白激酶 C 活性而抑制 VSMC 增殖。雷尼丁刺激 VSMC 24 h MAPK 活性增高不明显, 可能因为 MAPK 的激活发生于刺激的早期, 而本实验未检测雷尼丁刺激后 24 h 内 MAPK 活性的变化。

本研究揭示 CaN 信号通路参与了雷尼丁刺激的 VSMC 增殖, 但 CaN 信号通路不是雷尼丁介导 VSMC 增殖的唯一信号通路, CaN 信号通路与蛋白激酶 C 和 MAPK 之间的信号转导关系尚待进一步明确。

参考文献

- [1] Zhu Z, Zhang SH, Wagner C, et al. Angiotensin AT1B receptor mediates calcium signaling in vascular smooth muscle cells of AT1a receptor- deficient mice [J]. *Hypertension*, 1998, **31** (3): 1 171- 177
- [2] Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, et al. Differential activation of transcription factors induced by Ca^{2+} response amplitude and duration [J]. *Nature*, 1997, **386** (6627): 855- 858
- [3] Moldentin JD, Lu JR, Antos CL, et al. A calcineurin transcriptional pathway for cardiac hypertrophy [J]. *Cell*, 1998, **93** (17): 215 - 228
- [4] 符民桂, 王晓红, 姜志胜, 等. 钙调神经磷酸酶依赖的信号通路参与血管紧张素 II 刺激的心肌细胞肥大 [J]. *生理学报*, 1999, **51** (5): 597- 601
- [5] 符民桂, 唐朝枢. 钙调神经磷酸酶活性测定 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8** (1): 82- 83
- [6] 李田昌, 庞永政, 唐朝枢. 丝裂素活化蛋白激酶活性的测定 [J]. *基础医学与临床*, 1996, **16** (3): 155- 158
- [7] Bers DM, Perez RE. Ca^{2+} channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca^{2+} influx and intracellular Ca^{2+} release [J]. *Cardiovasc Res*, 1999, **42** (2): 339- 360
- [8] Lee HW, Eghbali WM. Estrogen enhances proliferative capacity of cardiac fibroblasts by estrogen receptor- and mitogen- activated protein kinase- dependent pathways [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1998, **30** (11): 1 359- 368
- [9] Rabikin SW, Sunga PS, Sanghera JS, et al. Reduction of angiotensin II- induced activation of mitogen- activated protein kinase in cardiac hypertrophy [J]. *Cell Mol Life Sci*, 1997, **53** (11): 955 - 959
- [10] Takeishi Y, Chu G, Kirkpatrick DM, et al. In vivo phosphorylation of cardiac troponin I by protein kinase C- β decreases cardiomyocytes calcium responsiveness and contractility in transgenic mouse hearts [J]. *J Clin Invest*, 1998, **102** (1): 72- 78

(此文 2000- 06- 21 收到, 2000- 11- 02 修回)

(此文编辑 朱雯霞)