

小凹蛋白 1—小凹在血管紧张素 II 诱导血管平滑肌细胞增殖信号转导通路中的作用

王乾蕾, 汤勇波, 朱炳阳, 廖端芳

(南华大学药物药理研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 药理学; 血管紧张素 II; 血管平滑肌细胞; 细胞外信号调节激酶; 小凹蛋白 1 表达; 小凹; 细胞 DNA 合成

[摘要] 为观察小凹蛋白 1 和小凹对血管紧张素 II 诱导血管平滑肌细胞增殖信号转导通路的调控作用, 本文用 Western Blot、小凹蛋白 1 反义寡核苷酸技术及氚标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入法观察到血管紧张素 II 刺激细胞外信号调节激酶活化和血管平滑肌细胞增殖, 同时抑制小凹蛋白 1 表达。小凹蛋白 1 反义寡核苷酸处理可增强血管紧张素 II 激活细胞外信号调节激酶和刺激血管平滑肌细胞增殖的作用。细胞外信号调节激酶抑制剂 PD98059 和小凹结构抑制剂制霉菌素均可阻断血管紧张素 II 所致细胞外信号调节激酶的活化和小凹蛋白 1 表达下降和细胞增殖。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 通过细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK1/2) 信号通路刺激血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 增殖要求信号的放大与强化, 然而其机制还不清楚。文献 [1] 报道, ERK1/2 活化可抑制小凹蛋白 1 表达。而后者又通过其 Scaffold 区域反馈抑制 MEK-ERK1/2 信号通路。我们推测 Ang II 在激活 ERK1/2 信号通路导致 VSMC 增殖的同时抑制小凹蛋白 1 表达, 从而取消小凹蛋白 1 对 MEK-ERK1/2 信号通路的反馈抑制, 实现信号强化作用。

1 材料与方法

1.1 材料

Opti-MEM 和 LipofectamineTM 转染试剂购于美国 Gibco 公司, Ang II 和 PD98059 购于 Sigma 公司, 磷酸化 ERK 抗体和小凹蛋白 1 抗体购于美国 Santa Cruz 公司, 小凹蛋白 1 反义寡核苷酸购于上海生物工程公司, 其余试剂均为进口分装或国内产品。

1.2 血管平滑肌细胞培养

贴块法进行 SD 大鼠胸主动脉 VSMC 原代培养, 倒置相差显微镜下观察, 细胞为梭形, 具典型峰谷生

长状态。传代培养至 4~10 代用于实验。

1.3 细胞 DNA 合成和蛋白表达测定

取培养的 VSMC 制成细胞悬液, 每孔 1 mL 含 3×10^4 个细胞, 接种于 24 孔培养板, 加入 Ang II 等处理因素。然后每孔加入氚标胸腺嘧啶脱氧核苷 (^3H -TdR) $1 \mu\text{Ci}$ 孵育 18 h, 弃上清液, 按 ^3H -TdR 试剂盒说明书固定处理细胞, 液体闪烁记数仪测定每分钟计数 (cpm) 以反映 DNA 合成量。另外, 取 Ang II 等处理 VSMC 后, 提取细胞总蛋白, 用 Western blot 方法测定 ERK1/2 和小凹蛋白 1 表达。

1.4 小凹蛋白 1 反义寡核苷酸处理

5×10^5 个 VSMC 接种于六孔培养板, 用脂质体导入法将小凹蛋白 1 反义寡核苷酸 $2 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 导入 VSMC, 孵育 24 h 后, 按照上述方法检测 DNA 合成、ERK1/2 和小凹蛋白 1 表达。

1.5 统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两均数比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 血管紧张素 II 处理不同时间的影响

用 100 nmol/L Ang II 处理 VSMC 0.5、1、2、4、8 和 16 h 后, ERK1/2 活性增加, 然后下降, 24 h 时下降到接近正常水平 (图 1 和表 1)。同时小凹蛋白 1 表达也存在变化, 先下降 (0~4 h), 后逐步恢复到正常水平 (图 1 和表 1)。

2.2 小凹蛋白 1 反义寡核苷酸、PD98059 和制霉菌素对 ERK1/2 活性和小凹蛋白 1 表达的影响

如表 2 所示, 小凹蛋白 1 反义寡核苷酸处理使

[收稿日期] 2004-05-23

[修回日期] 2004-05-25

[基金项目] 国家自然科学基金 (39900061, 39970847) 和国家 973 项目 (G2000056905) 共同资助。

[作者简介] 王乾蕾, 硕士研究生, 研究方向为心血管药理学。廖端芳, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管药理学, 本文通讯作者, 联系电话 0734-8281308, E-mail 为 dfliao@hotmail.com。

Ang II 刺激 ERK1/2 活化进一步增强。PD98059 处理 VSMC 后, p-ERK1/2 处于正常水平, 小凹蛋白 1 蛋白表达升高。制霉菌素处理细胞后, 静息状态下, 对小凹蛋白 1 和 ERK1/2 活性没有影响, 在加入 Ang II 共同处理细胞后, 与单独 Ang II 处理细胞相比, 小凹蛋白 1 蛋白表达没有变化, ERK1/2 活性下降至正常水平。

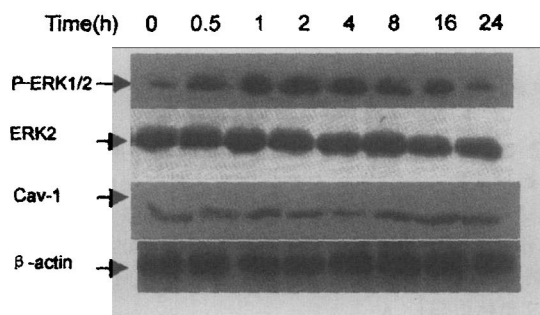


图 1. 血管紧张素 II 处理不同时间的 Western blot 图

表 1. 血管紧张素 II 处理不同时间的影响 ($\bar{x} \pm s$)

处理时间	ERK1/2 活性 (相对密度值)	小凹蛋白 1 表达 (相对密度值)
对照	100.2 ± 5.2	100.0 ± 5.5
0.5 h	130.5 ± 6.4 ^a	97.4 ± 4.6
1 h	132.9 ± 5.8 ^a	95.7 ± 5.3
2 h	136.5 ± 7.5 ^a	85.5 ± 4.9 ^a
4 h	133.5 ± 7.8 ^a	68.4 ± 5.7 ^b
8 h	120.0 ± 6.7 ^a	87.2 ± 6.2 ^a
16 h	112.9 ± 8.2 ^a	101.0 ± 5.6
24 h	103.5 ± 7.4	100.4 ± 4.5

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照时比较。

表 2. 小凹蛋白 1 反义寡核苷酸、PD98059 和制霉菌素的影响

分 组	ERK1/2 活性 (相对密度值)	蛋白 1 表达 (相对密度值)	³ H-TdR (cpm)
对照	100.0 ± 6.3	100.0 ± 5.8	16.4 ± 1.0
CASON	97.5 ± 5.7	67.6 ± 5.3 ^a	15.3 ± 1.2
Ang II	132.4 ± 6.4 ^a	48.2 ± 6.3 ^a	20.5 ± 1.5 ^a
CASON + Ang II	198.7 ± 8.9 ^c	30.3 ± 7.2 ^c	25.8 ± 1.3 ^c
PD98059	110.1 ± 7.3	98.4 ± 8.5	16.1 ± 1.2
PD98059 + Ang II	98.5 ± 7.7 ^c	94.6 ± 5.7 ^c	16.7 ± 1.5 ^c
制霉菌素	104.6 ± 5.6	94.2 ± 6.5	15.6 ± 1.0
制霉菌素 + Ang II	97.8 ± 6.5 ^c	101.3 ± 4.9 ^c	15.2 ± 1.5 ^c

CASON: 小凹蛋白 1 反义寡核苷酸。a: $P < 0.05$, 与对照组比较; c: $P < 0.05$, 与 Ang II 组比较。

2.3 小凹蛋白 1 反义寡核苷酸、PD98059 和制霉菌素对 DNA 合成的影响

用小凹蛋白 1 反义寡核苷酸处理 VSMC, 对细胞

DNA 合成几乎没有影响, 在加入 Ang II 处理后, 细胞 DNA 合成较单用 Ang II 明显增加。PD98059 预处理 VSMC, 抑制了 Ang II 增加细胞 DNA 合成效应。制霉菌素破坏 VSMC 细胞膜小凹结构后, Ang II 诱导细胞 DNA 合成效应也被抵消 (表 2)。

3 讨论

文献[2, 3]报道, Ang II 可通过 Ras-Raf-MEK-ERK1/2 途径刺激 VSMC 增殖, 此一过程要求信号的放大与强化, 然而其强化机制并不清楚。小凹蛋白 1 是 ERK1/2 激酶活性重要负性调节蛋白, ERK1/2 信号通路上游蛋白 Ras 和 ERK1/2 本身定位于小凹区域, 小凹蛋白 1 通过其 scaffolding 区域与肾素-血管紧张素系统和 ERK1/2 等信号分子结合, 并使其处于失活状态从而抑制 ERK1/2 活化^[4-7]。实验发现, Ang II 在激活 ERK1/2 通路刺激 VSMC 增殖的同时, 抑制小凹蛋白 1 表达。小凹蛋白 1 反义寡核苷酸处理下调小凹蛋白 1 表达, 使 Ang II 刺激的 VSMC ERK1/2 活性和 DNA 合成增加, 细胞增殖加强。PD98059 抑制 ERK1/2 活化和制霉菌素破坏小凹结构均可取消 Ang II 诱导 ERK1/2 活化及细胞增殖。此结果说明, (1) Ang II 通过激活 MEK/ERK1/2 信号通路, 一方面可启动 VSMC 增殖, 另一方面可通过抑制小凹蛋白 1 表达, 取消小凹蛋白 1 对 MEK/ERK1/2 信号通路反馈抑制, 强化 Ang II 对 VSMC 增殖的刺激作用。(2) 小凹结构完整为 Ang II 诱导 VSMC 增殖信号转导所必需。

【参考文献】

- [1] Jeffrey A, Richard G, Michael P, Zhang XL. p42/44 MAP kinase-dependent and -independent signaling pathways regulate caveolin-1 gene expression. *J Biol Chem*, 1999, 274 (45): 32 333-341
- [2] Cobb MH, Goldsmith EJ. How MAP kinase are regulated. *J Biol Chem*, 1995, 270 (25): 14 843-846
- [3] Song KS, Li S, Okamoto T, Quilliam LA, Lisanti MP. Copurification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent free purification of caveolae membranes. *J Biol Chem*, 1996, 271 (16): 9 690-697
- [4] Kim JH, Han JM, Lee S, Kim Y, Lee TG, Lee SD, et al. Phospholipase D1 in caveolae: regulation by protein kinase C alpha and caveolin-1. *Biochemistry*, 1999, 38 (12): 3 763-769
- [5] Stuart EJ, Ying YS, Donzell WC, Richard G. A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem*, 1996, 271 (46): 29 427-435
- [6] 徐立朋, 秦旭平, 廖端芳. 氯沙坦调节两肾—夹型高血压大鼠血管重塑及其与细胞外信号调节激酶 1/2 的关系. *中国动脉硬化杂志*, 2003, 11 (1): 17-21
- [7] 秦旭平, 叶峰, 廖端芳, 朱炳阳, 李元建. 肾性高血压大鼠血浆中降钙素基因相关肽与血管紧张素浓度及肾素活性的变化. *中国动脉硬化杂志*, 2002, 10 (6): 469-472

(此文编辑 胡必利)