

血管平滑肌细胞增殖中蛋白激酶 G 与钙调磷酸酶信号通路的交互调节

孙宁玲, 马 旌, 李世军

(北京大学人民医院心内科, 北京市 100044)

[关键词] 内科学; 蛋白激酶 G 与钙调磷酸酶交互调节影响血管平滑肌增殖; 免疫印迹法; 蛋白激酶 G; 钙调磷酸酶; 血管平滑肌细胞

[摘要] 目的 探讨血管平滑肌细胞增殖过程中蛋白激酶 G 与钙调磷酸酶信号通路之间是否存在交互调节作用。方法 植块法原代培养 Wistar 大鼠血管平滑肌细胞。Western blot 测定钙调磷酸酶和蛋白激酶 G Ia 蛋白的表达。定磷法测定钙调磷酸酶活性, MTT 法测定血管平滑肌细胞的增殖。结果 苯肾上腺素刺激诱发的平滑肌细胞钙调磷酸酶的表达和活性可被一氧化氮供体 S-亚硝基-N-乙酰青霉胺和 Sp8-pCPT-cGMP 抑制, 但可被 Rp8-pCPT-cGMP 增强。应用环孢素 A 干预增殖细胞后蛋白激酶 G Ia 蛋白表达量较对照组明显提高 ($P < 0.01$), 而加入苯肾上腺素刺激后蛋白激酶 G Ia 蛋白的表达较对照组也有明显提高 ($P < 0.05$), 但较 5 mg/L 环孢素 A 干预组减少了 36.7%, 两组之间差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。经 0.5 mg/L 环孢素 A 预处理后, 苯肾上腺素刺激诱发的平滑肌细胞吸光度降低 36.67%, S-亚硝基-N-乙酰青霉胺、Sp8-pCPT-cGMP 或 Rp8-pCPT-cGMP 并不能进一步抑制或升高已升高的吸光度。结论 蛋白激酶 G 介导钙调磷酸酶信号抑制血管平滑肌细胞增殖, 并且蛋白激酶 G 与钙调磷酸酶能够交互调节影响血管平滑肌细胞增殖进程。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Cross Regulation of cGMP-Dependent Protein Kinase and Calcineurin in Vascular Smooth Muscle Cells Proliferation

SUN Ning-Ling, MA Zhan, and LI Shi-Jun

(Cardiac Department, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China)

[KEY WORDS] Protein Kinase G; Calcineurin; Vascular Smooth Muscle Cell; Cyclosporin A; Phenylephrine

[ABSTRACT] Aim To research the cross regulation of cGMP-dependent protein kinase (PKG) and calcineurin (CaN) in vascular smooth muscle cells (SMC) proliferation. Methods Primary vascular SMC from rat aorta were used as the experimental model. Expression of CaN and PKG was assayed using immunoblotting. Cell growth was determined by MTT assay.

Results The results showed that phenylephrine (PE)-induced expression and activity of CaN protein was reduced by S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) and Sp8-pCPT-cGMP, but increased by Rp8-pCPT-cGMP. The OD ratio of PKG Ia mRNA expression in 0.5 mg/L cyclosporin A (CsA) group resembled control group while in 5 mg/L CsA group was significantly higher than control group ($P < 0.01$). Although the result of 5 mg/L CsA + 10 μ mol/L PE group was lower than 5 mg/L CsA group (the expression of mRNA decreased 32.2%; the production of PKG Ia protein decreased 36.7%, $P < 0.01$), but still higher than control group obviously ($P < 0.05$). In SMC pretreated with CsA, absorbance of cells stimulated by PE decreased by 36.67%, but it could not be further altered by the additional treatment of SNAP, Sp8-pCPT-cGMP and Rp8-pCPT-cGMP. Conclusion PKG and CaN can cross-regulate in vascular smooth muscle cells proliferation.

血管内皮损伤可诱发血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) 迁移、肥大、增殖, 引起 VSMC 增殖相关性疾病的发生。钙调磷酸酶 (calcineurin, CaN) 是促进细胞增殖的重要信号分子, 钙-CaN 信号通路参与 VSMC 特异性转录, 可能是抑制

平滑肌细胞增殖的潜在靶点^[1,2]。既往研究发现 NO-cGMP-蛋白激酶 G (protein kinase G, PKG) 信号通路可以抑制心肌细胞增殖, 并且可以多个水平调节细胞浆内游离钙离子浓度^[3]。但是, 在 VSMC 中 NO-cGMP-PKG I 通路与钙-CaN 信号通路之间是否存在交互调节作用, 进而影响 VSMC 的增殖进程并不完全清楚。本研究旨在探讨 VSMC 的增殖过程中 NO-cGMP-PKG I 通路与钙-CaN 通路之间是否存在交互调节作用。

[收稿日期] 2005-08-29 [修回日期] 2006-08-10

[基金项目] 国家重点基础研究发展项目 (G2000056905) 资助

[作者简介] 孙宁玲, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 长期从事高血压、动脉硬化方面的研究, E-mail 为 nlsun@263.net。马旌, 博士研究生, 主要从事高血压、动脉硬化方面的研究。李世军, 博士, 主治医师, 主要从事高血压、动脉硬化方面的研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 Wistar 大鼠乳鼠(1 周龄以内),由北京医科大学实验动物中心提供。

1.2 试剂

DMEM 培养基干粉、胎牛血清均购自 Gibco 公司;一氧化氮供体 S-亚硝基-N-乙酰青霉胺(S-nitroso-N-acetylpenicillamine, SNAP)、苯肾上腺素(phenylephrine, PE)、环孢素 A(cyclosporin A, CsA)、维拉帕米和兔抗鼠 PKG I α 抗体为 Sigma 公司产品;PKG 选择性 cGMP 类似物 Sp-8-pCPT-cGMP(简称类似物)和 PKG 拮抗剂 Rp-8-pCPT-cGMP(简称拮抗剂)购自 Biomol 公司;钙荧光指示剂 Fluor-3/AM Ester 购自 Biotium 公司;兔抗钙调磷酸酶 A α 亲和纯化多克隆抗体购自 Chemicon 公司;胰蛋白酶、二硫苏糖醇购自 Amersco 公司;RNA 提取试剂盒购自 Promega 公司;生物素酰基化蛋白 Marker 购自 Cell Signaling Technology 公司;钙调磷酸酶活性测定试剂盒购自南京建成生物工程有限公司;辣根酶标记羊抗兔 IgG 由北京中山生物技术公司提供;其它试剂为国产分析纯。

1.3 平滑肌细胞的分离与培养

分离 Wistar 大鼠胸主动脉,去除内膜后采用植块法种植于 25 cm² 培养瓶,培养基为含 20% 胎牛血清、100 ku/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 DMEM,置于 37℃、5% CO₂~95% 空气的孵箱中。3~4 天更换一次培养基,细胞传代至 4 代,用胰酶消化成细胞悬液[(5~8)×10⁷ 个/L],转移至 6 孔板中准备分组实验。细胞经抗 α -actin 单克隆抗体免疫组织化学染色鉴定为平滑肌细胞。

1.4 一氧化氮/环磷酸鸟苷/蛋白激酶 G I 通路对钙/钙调磷酸酶通路的调节作用

实验分为 8 组:空白对照组;④PE 刺激 48 h(PE 组);④SNAP 250 μ mol/L 刺激 48 h(SNAP 组);500 μ mol/L Sp-8-pCPT-cGMP 刺激 48 h(类似物组);

100 μ mol/L Rp-8-pCPT-cGMP 刺激 48 h(拮抗剂组);VSMC 用 250 μ mol/L SNAP 处理 24 h 后,加入 10 μ mol/L PE 共同刺激 24 h(SNAP+PE 组);⑧VSMC 用 500 μ mol/L Sp-8-pCPT-cGMP 处理 24 h 后,加入 10 μ mol/L PE 共同刺激 24 h(类似物+PE 组);⑨VSMC 用 100 μ mol/L Rp-8-pCPT-cGMP 处理 24 h 后,加入 10 μ mol/L PE 共同刺激 24 h(拮抗剂+PE 组)。

1.5 钙调磷酸酶对蛋白激酶 G I 的调节作用

实验分为 4 组:空白对照组;④5 mg/L CsA 干预组,VSMC 内加 5 mg/L CsA 刺激 72 h;④0.5 mg/L

CsA 组,VSMC 内加 0.5 mg/L CsA 刺激 72 h;PE 刺激组,先用 5 mg/L CsA 预处理 VSMC 24 h,加入 10 μ mol/L PE 共同刺激 48 h。

1.6 激光共聚焦显微镜测定细胞内游离 Ca²⁺ 浓度

Fluor-3/AM 监测 VSMC 内钙离子浓度。细胞布满培养皿底 90% 后,用含 10 μ mol/L Fluor-3/AM 的 Krebs-Ringer 溶液(NaCl 140 mmol/L, KCl 5 mmol/L, MgCl₂ 0.5 mmol/L, HEPES 5.5 mmol/L, Glucose 10 mmol/L, CaCl₂ 1.2 mmol/L, pH 7.4)以及 0.05% pluronic, 37℃负载 60 min,随后加相应药物进行刺激。荧光测量的激发波长 488 nm,发射波长 522 nm。荧光值比率为实际荧光强度(F)与刺激前荧光强度(F₀)之比,以此表示细胞内 Ca²⁺ 浓度。

1.7 血管平滑肌细胞增殖活性测定

培养细胞每孔加入 MTT 溶液(5 g/L) 20 μ L,继续孵育 4 h 后终止培养,弃上清。每孔加入 150 μ L DMSO,振荡 3~5 min。选择 490 nm 波长,在酶标仪上测定各孔光吸收值。吸光度反映细胞增殖活性。

1.8 Western blot 测定蛋白表达

用 RIPA 细胞裂解液(含 Tris-HCl 50 mmol/L, pH7.5、NaCl 150 mmol/L、EDTA 1 mmol/L 和 0.5% 脱氧胆酸钠)在冰浴中裂解 VSMC,Lowry 法进行蛋白定量^[4]。配 10% 分离胶与 4% 浓缩胶,加入变性蛋白样品后置于 Tris-甘氨酸电泳液中,浓缩胶电压 90 V、分离胶电压 140 V,电泳 120 min,再以 0.65 mA/cm² 电流持续转膜 120 min,然后予 5% TBST+ 脱脂奶粉封闭液封闭,4℃过夜,第 2 天洗膜后分别加入 1 mg/L 的兔抗鼠 CaN A α 抗体或兔抗鼠 PKG I α 抗体,冰浴振摇 2 h,洗膜 3 次,加入 1:1000 的羊抗兔 IgG 抗体,室温振摇 1 h,加显色液反应 5 min,压片 2 min 后胶片曝光。对 Western 印迹区带进行定量分析,灰度值用积分光密度值表示。

1.9 钙调磷酸酶活性测定

按照试剂盒说明进行测定,反应终止 30 min 后,用紫外分光光度仪在 660 nm 读取样品吸光度。CaN 活性为测定组与对照组活性之比的百分数。

1.10 统计学处理

实验每组进行 6 次,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间资料比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 一氧化氮/蛋白激酶 G I 对苯肾上腺素诱发的血管平滑肌细胞增殖的影响

与对照组比较,SNAP 和 Sp-8-pCPT-cGMP 分别

使 VSMC 吸光度降低 36.79% 和 39.28%, 而 Rp-8-pCPT-cGMP 则使吸光度增加 42.66%。SNAP 和 Sp-8-pCPT-cGMP 分别使 PE 诱发的 VSMC 吸光度降低 27.32% 和 36.57%, 而 Rp-8-pCPT-cGMP 使吸光度增加 79.02% (表 1)。

表 1. 一氧化氮/蛋白激酶 G I 对苯肾上腺素诱发的血管平滑肌细胞吸光度的影响 ($n=6$)

分 组	吸光度
对照组	100% \pm 0%
PE 组	156.72% \pm 3.28% ^a
SNAP 组	52.91% \pm 2.96%
SNAP+ PE 组	76.89% \pm 0.82% ^a
类似物组	50.11% \pm 1.62% ^a
类似物+ PE	69.76% \pm 1.83% ^a
拮抗剂组	142.55% \pm 2.86 ^a
拮抗剂+ PE 组	168.42% \pm 1.35% ^a

a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比。

2.2 一氧化氮/蛋白激酶 G I 对血管平滑肌细胞钙调磷酸酶表达的影响

PE 可使 VSMC CaN 表达与活性显著提高, 这一效应可以被 SNAP 和 Sp-8-pCPT-cGMP 抑制, 但被 Rp-8-pCPT-cGMP 增加 (表 2)。

表 2. 一氧化氮/蛋白激酶 G I 对血管平滑肌增殖中钙调磷酸酶表达的影响

分 组	蛋白表达	酶活性
对照组	100% \pm 0.00%	100% \pm 0.00%
PE 组	163.14% \pm 1.32% ^a	155.30% \pm 4.13% ^a
SNAP 组	51.08% \pm 0.83% ^{ab}	47.70% \pm 1.61% ^{ab}
SNAP+ PE 组	72.98% \pm 0.89% ^{ab}	70.69% \pm 0.86% ^{ab}
类似物组	50.26% \pm 1.73% ^{ab}	47.36% \pm 2.00% ^{ab}
类似物+ PE 组	72.69% \pm 4.22% ^{ab}	73.65% \pm 1.23% ^{ab}
拮抗剂组	129.87% \pm 3.42% ^{ab}	135.06% \pm 2.82% ^{ab}
拮抗剂+ PE 组	180.78% \pm 3.08% ^{ab}	176.68% \pm 2.37% ^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.05$, 与 PE 组相比。

2.3 钙调磷酸酶抑制剂对血管平滑肌增殖活性的影响

与空白对照组比较, 0.5 mg/L CsA 预处理 VSMC 后, 吸光度降低 36.7%, 并且在加入 SNAP、Sp-8-pCPT-cGMP 及 Rp-8-pCPT-cGMP 后吸光度无明显变化 (表 3)。

表 3. 钙调磷酸酶抑制剂对血管平滑肌增殖的影响

分 组	吸光度
对照组	100% \pm 0.00%
PE 组	167.12% \pm 2.87% ^a
CsA+ PE 组	63.67% \pm 1.95% ^{ab}
CsA+ SNAP+ PE 组	58.47% \pm 1.37% ^{ab}
CsA+ 类似物+ PE 组	56.53% \pm 1.91% ^{ab}
CsA+ 拮抗剂+ PE 组	60.97% \pm 0.56% ^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.05$, 与 PE 组相比。

2.4 钙调磷酸酶抑制剂对血管平滑肌增殖中蛋白激酶 G I α 表达的影响

对照组有一定量的 PKG I α 蛋白表达; 0.5 mg/L CsA 干预后表达量较对照组提高, 但无统计学意义; 5 mg/L CsA 干预后 PKG I α 蛋白表达量较对照组明显提高 ($P < 0.01$); PE 刺激组 PKG I α 蛋白表达量较对照组也有明显提高 ($P < 0.05$), 但较 5 mg/L CsA 干预组减少了 36.7% ($P < 0.01$)。见表 4 和图 1。

表 4. 钙调磷酸酶抑制剂对血管平滑肌增殖中蛋白激酶 G I α 表达的影响

	对照组	CsA 干预组		PE 刺激组
		0.5 mg/L	5 mg/L	
积分光密度比值	77.96 \pm 1.21	82.11 \pm 1.36	174.28 \pm 0.79 ^b	110.34 \pm 1.02 ^{ac}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组相比; c 为 $P < 0.01$, 与 5 mg/L CsA 干预组相比。

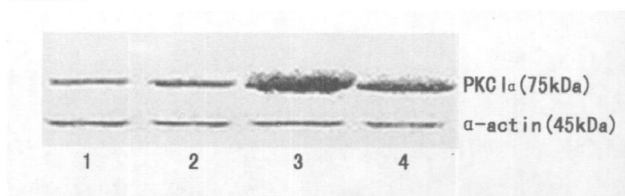


图 1. 钙调磷酸酶抑制剂对血管平滑肌细胞蛋白激酶 G I α 蛋白表达的影响 M 为对照组, 1 为 0.5 mg/L CsA 组, 2 为 5 mg/L CsA 组, 3 为 5 mg/L CsA + 10 μ mol/L PE 组。

3 讨论

蛋白磷酸化和去磷酸化几乎调节着生命活动的所有过程, 而磷酸化和去磷酸化是细胞信号转导的公共通路或最后通路。CaN 信号通路在 VSMC 增殖及功能维持中起到重要作用。胞内 Ca^{2+} 浓度控制着不同的细胞功能, 包括基因表达、增殖、凋亡、粘附和迁移等, CaN 可通过其去磷酸化作用调节 Ca^{2+} 通道、影响胞内 Ca^{2+} 浓度、参与 VSMC 增殖等功能活动的调控, 其特异性底物 NFAT 激活后可以传递细胞外信号而引起 VSMC 核内基因转录, 刺激 VSMC 增

殖^[5]。钙/钙调磷酸酶参与 VSMC 特异性转录, 已经被建议作为平滑肌细胞增殖的潜在靶点。

一氧化氮(nitric oxide, NO)能够激发多种信号传导通路,刺激可溶性鸟苷环化酶催化细胞内 cGMP 合成,再由 cGMP 激活 PKG 调节局部和全身信号等。同时 NO 通过抑制肌浆网 IP3 受体和雷尼丁受体释放 Ca^{2+} , 以及介导 cGMP 和 PKG 抑制 N 型钙通道 Ca^{2+} 内流^[6], 调节平滑肌细胞内钙离子浓度。PKG 存在于多种组织细胞, 是重要的信号分子 NO 的下游底物, 能够在多种水平调节 Ca^{2+} 水平。Fiedler 等^[7]发现 PKG 激活后可以抑制 Ca^{2+} 从 L 型钙通道进入胞质, 可以抑制 CaN-NFAT 信号通路, 从而减少心肌细胞体积。有研究显示, 当细胞内 Ca^{2+} 水平升高时, 引起一氧化氮合酶(NO synthase, NOS)活性上调, NO 合成增加, 刺激细胞内可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)生成, 产生大量 cGMP, 后者能够激活蛋白激酶 A(protein kinase A, PKA)而抑制 PKG mRNA 的表达^[8]。由于 CaN 能够通过去磷酸化作用调控 Ca^{2+} 通道, 因此可能影响 PKG I 活性。PKG 是在出现细胞肥大现象后通过阻碍 NFAT 向核内转移来对抗细胞肥大的, 而与激活的 CaN 没有直接的相互作用, 因此提示它可能既是 CaN 信号通路的上游通路也是其下游通路^[8]。

NO/PKG 是否通过对 VSMC 内 Ca^{2+} 浓度的调节进而调节平滑肌细胞增殖目前还不清楚。本研究结果发现, 一氧化氮供体 SNAP 和 PKG 选择性 cGMP 类似物 Sp-8-pCPT-cGMP 分别能使培养的及 PE 诱发的 VSMC 的吸光度明显降低, 而用 PKG 拮抗剂 Rp-8-pCPT-cGMP 刺激后吸光度明显增加。PE 可使 VSMC 的 CaN 表达与活性显著提高, 这一效应可以被 SNAP 和 Sp-8-pCPT-cGMP 抑制, 可以被 Rp-8-pCPT-cGMP 增加, 提示 NO 和 PKG 能够抑制培养的及 PE 诱发的 VSMC 增殖, 和增殖过程中 CaN 表达与活性的增高, 而抑制 PKG 活性后, 上述作用被抑制, CaN 表达与活性显著提高。

本研究还发现, 与空白对照组比较, VSMC 用 0.5 mg/L CsA 预处理后, 吸光度降低 36.7%, 并且在加入 SNAP、Sp-8-pCPT-cGMP 及 Rp-8-pCPT-cGMP 后, 吸光度无明显变化。0.5 mg/L CsA 干预后 PKG I α 蛋白表达量较对照组提高; 5 mg/L CsA 干预后 PKG I α

蛋白表达量较对照组明显提高($P < 0.01$), PE 刺激组 PKG I α 蛋白表达量较对照组也有明显提高($P < 0.05$), 但较 5 mg/L CsA 干预组减少了 36.7% ($P < 0.01$)。以上的研究证实了 Pilz 等^[9]的假设, 即 VSMC 细胞增殖过程中 CaN 激活, 使 PLB 去磷酸化而活化, PLB 能够抑制肌浆网钙-ATP 酶(SERCA2a)的活性, 从而减少肌浆网对胞质内 Ca^{2+} 的重吸收, 使胞质内 Ca^{2+} 水平升高, 上调 NOS 活性, NO 水平增加, 继而生成大量 cGMP, 激活 PKA, 抑制 PKG I α 表达^[9]。当用特异性抑制物 CsA 阻断 CaN 活性后, 上述过程被抑制, 从而使 PKG I α 表达明显增加。本研究发现低浓度 CsA (0.5 mg/L) 对 PKG I α 的表达影响较少, 说明 CsA 对 CaN 的抑制作用可能具有浓度依赖性。

本研究结果提示, 培养 VSMC 内 NO/PKG 信号通路和 Ca^{2+} /CaN 信号存在交互调节作用。VSMC 过度增殖可导致血管张力增加, 血管阻力增加而顺应性下降, 进而导致血压增加。已经证实 CaN-NFAT 信号通路是促进细胞肥大重要调节者, 明确 CaN 与 PKG I 之间的相互关系有助于了解动脉硬化发生发展的另一可能发病机制, 并为抗动脉硬化的药物治疗提供新的途径。

[参考文献]

- [1] Wada H, Hasegawa K, Morimoto T. Calcineurin-GATA-6 pathway is involved in smooth muscle-specific transcription[J]. *J Cell Biol*, 2002, **156**: 983-991
- [2] Lipskaia L, Pourci ML, Delomenie C. Phosphatidylinositol 3-kinase and calcineurin-activated transcription pathways are required for VLDL-induced smooth muscle cell proliferation[J]. *Circ Res*, 2003, **92** (10): 1115-1122
- [3] Hofmann F, Ammendola AS. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases[J]. *J Cell Sci*, 2000, **113**: 1671-676
- [4] Ramakrishnan PR, Lin WL, Sodeh J. Development of mineralized nodules by rat periodontal ligament cells in vitro[J]. *Calcif Tissue Int*, 1995, **57**: 52-59
- [5] Vega RB, Duby R, Olson EN. Control of cardiac growth and function by calcineurin signaling[J]. *J Biol Chem*, 2003, **278** (39): 36981-984
- [6] D'Ascenzo M, Martinotti G, Azzena GB, Grassi C. cGMP/protein kinase G-dependent inhibition of N-type Ca^{2+} channels induced by nitric oxide in human neuroblastoma IMR32 cells[J]. *J Neurosci*, 2002, **22** (17): 7485-492
- [7] Fiedler B, Lohmann SM, Smolenski A. Inhibition of calcineurin-NFAT hypertrophy signaling by cGMP-dependent protein kinase type I in cardiac myocytes[J]. *PNAS*, 2002, **99** (17): 11363-368
- [8] Lincoln TM, Dey N, Sellak H. Signal transduction in smooth muscle invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression[J]. *J Appl Physiol*, 2001, **91**: 1421-430
- [9] Pilz RB, Casteel DE. Regulation of gene expression by cyclic GMP[J]. *Circ Res*, 2003, **93** (11): 1034-046

(此文编辑 文玉珊)