

表皮生长因子受体在血管紧张素 Ang II 促血管平滑肌细胞增殖中的作用

尹小龙¹, 朱艳霞², 姚雨凡¹, 雷芸¹

(1. 昆明市延安医院心内科, 云南省昆明市 650051; 2. 昆明医学院附属第一医院心内科, 云南省昆明市 650032)

[关键词] 病理学与病理生理学; 表皮生长因子受体; 血管紧张素 Ang II ; 血管平滑肌细胞; 细胞增殖; 氟标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入实验

[摘要] 目的 探讨表皮生长因子受体在血管紧张素 Ang II 促大鼠血管平滑肌细胞增殖效应中的作用。方法 用反义表皮生长因子受体寡核苷酸脂质体复合物转染 SD 大鼠血管平滑肌细胞, 用逆转录聚合酶链反应、Western Blotting 分别检测转染后表皮生长因子受体 mRNA 及蛋白的表达情况, 用氟标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入实验检测血管平滑肌细胞的增殖情况。结果 反义组大鼠血管平滑肌细胞表皮生长因子受体 mRNA 表达(0.18 ± 0.03)较正义组(0.61 ± 0.11)及对照组(0.66 ± 0.09)明显减少($P < 0.05$), 反义组大鼠血管平滑肌细胞表皮生长因子受体蛋白的表达(43.1 ± 8.4)较正义组(92.6 ± 10.5)及对照组(100.7 ± 11.3)明显减少($P < 0.05$); 反义组细胞的氟标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入率(1055.1 ± 95.7)较正义组(1882.4 ± 129.7)及对照组(2013.3 ± 121.3)明显降低($P < 0.05$)。结论 表皮生长因子受体在血管紧张素 Ang II 促血管平滑肌细胞增殖中起重要作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Role of Epidermal Growth Factor Receptor in Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells Activated by Angiotensin Ang II

YIN Xiaolong¹, ZHU Yanxia², YAO Yufan¹, and LEI Yun¹

(1. Department of Cardiology, Kunming Yunnan Hospital, Kunming 650051; 2. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Kunming Medical College, Kunming 650032, China)

[KEY WORDS] Epidermal Growth Factor Receptor; Angiotensin Ang II ; Vascular Smooth Muscle Cells; Proliferation

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role of epidermal growth factor receptor (EGFR) in proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) activated by angiotensin Ang II . **Methods** The cultured VSMC of Sprague-Dawley rat were transfected with antisense sequences of EGFR. EGFR mRNA and protein in VSMC was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and western blot analysis, the proliferation of VSMC was determined by ^3H -thymidine (^3H -TdR) incorporation. **Results** The expression of EGFR mRNA in VSMC transfected with antisense sequences of EGFR were significantly lower than transfected with sense sequences of EGFR and control group (0.18 ± 0.03 , 0.61 ± 0.11 , and 0.66 ± 0.09 respectively, $P < 0.05$). The expression of EGFR protein in VSMC transfected with antisense sequences of EGFR were significantly lower than transfected with sense sequences of EGFR and control group (43.1 ± 8.4 , 92.6 ± 10.5 , and 100.7 ± 11.3 respectively, $P < 0.05$). The ^3H -TdR incorporation of VSMC transfected with antisense sequences of EGFR were significantly lower than that transfected with sense sequences of EGFR and control group (1055.1 ± 95.7 , 1882.4 ± 129.7 , and 2013.3 ± 121.3 respectively, $P < 0.05$). **Conclusion** EGFR play an important role in proliferation of VSMC of rat induced by angiotensin Ang II .

血管紧张素 Ang II (angiotensin Ang II) 是一种强的缩血管多肽, 具有促进靶细胞增殖和肥大作用, 在许多心血管疾病的发生发展中起重要作用。 Ang II 的作用主要通过细胞膜上的 Ang II 1 型受体 (angiotensin type 1 receptor, AT1R) 介导, AT1R 为 G 蛋白偶

联受体家族的一员, 这类受体缺乏像生长因子受体那样的内在酪氨酸激酶活性, 不能直接激活促增殖信号通路如丝裂原激活蛋白激酶 (mitogen activation protein kinases, MAPK) 信号通路。近年来研究证明表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 在 Ang II 的信号传导通路中起了重要的媒介作用。 Ang II 通过 AT1R 转导激活了 EGFR, EGFR 激活 MAPK 通路, 促进了细胞的分裂增殖^[1,2]。本文探讨 EGFR 在 Ang II 促血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) 增殖效应中的作用。

[收稿日期] 2006-03-13 [修回日期] 2006-09-09

[作者简介] 尹小龙, 医学博士, 副教授, 主要研究方向为心脏病和心血管分子生物学, 联系电话 0871-3211342, E-mail 为 km8yx1@sohu.com。朱艳霞, 硕士研究生, 主治医师, 主要研究方向为冠心病的发病机理及治疗, 联系电话 13561011927, E-mail 为 zhuyx@163.com。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和材料

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)寡核苷酸针对大鼠 EGFR mRNA 翻译起始点-9~+7 碱基序列设计,正义链为 5'-CGA GCC GGG ATG CGA C-3';反义链为 5'-GTC GCA TCC CGG CTC G-3',末端进行硫代化修饰。EGFR 引物为上游 5'-CTG CTG GGG AAG AGG AGA GG-3'。下游 5'-AGC ATG AGT GGT GGG CAG GTG-3',扩增产物长度 213 bp。EGFR 引物、寡核苷酸均由宝生物工程(大连)有限公司合成纯化;Ang ①、Lipofectamine2000 购自 Sigma 公司;RNA 提取试剂盒购自上海华迅生物工程有限公司;逆转录试剂盒购自 Fermentas 公司;TaqP 酶、PCR 反应体系(Mg²⁺ + Plus)购自宝生物工程(大连)有限公司;山羊 IgG 抗体(SC-03-G)(EGFR 抗体)购自 Santa Cruz Biotechnology 公司;辣根酶标记兔抗山羊 IgG(H+L)抗体(ZB-2306)由北京中杉金桥生物技术有限公司分装;³H-胸腺嘧啶脱氧核苷(³H-TdR)购自北京原子高科股份有限公司。

1.2 血管平滑肌细胞的分离培养与实验分组

贴块法培养原代血管平滑肌细胞^[3],传代后取 4~6 代细胞进行实验,实验分反义组、正义组、对照组。正义组和反义组用 lipofect2000 脂质包裹正、反义 EGFR 寡核苷酸转染细胞,对照组只加培养基,当细胞达 90% 融合时可用于实验。

1.3 细胞转染

将所需量 EGFR 寡核苷酸用双无 DMEM 液稀释,混匀,室温下静置 5 min,等量 Lipofect2000 稀释加入双无 DMEM 液,混匀,室温下静置 20 min,加入到培养瓶中。置 37℃ 6 h 后加入 3 mL 含 20% 胎牛血清培养基,置 37℃ 培养 18 h。吸出含转染液的培养基,加入含 10% 胎牛血清完全培养基 6 mL,37℃ 培养 48 h 后进行实验。

1.4 逆转录-聚合酶链反应检测

用胰蛋白酶消化并收集细胞于离心管中,用小计量柱离心式总 RNA 抽提试剂盒抽提细胞总 RNA,紫外分光光度计测 A260/280 在 1.8~2.0 之间、取总 RNA 10 μL 逆转录合成 cDNA,取 2 μL 逆转录产物和 EGFR 上下游引物各 5 μL 进行 PCR 反应,反应条件是:94℃ 预变性 3 min 后,94℃ 30 s → 55℃ 45 s → 72℃ 1 min,共 30 个循环。将扩增产物在含溴化乙锭的 1% 琼脂糖凝胶上电泳分离,用 PHARMACIA 凝胶图象分析系统,以 EGFR 与 β-actin 密度比来表示 EGFR 在转录水平的相对表达量。

1.5 Western-blotting 分析

参照文献[4],收集消化细胞于离心管中,加入裂解液裂解细胞,离心取上清液。测定蛋白浓度,各取等浓度样品 20 μL 行聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳。转膜,封闭,加入 EGFR 单克隆抗体温育,漂洗后加入 HRP 标记的羊多抗 IgG,温育,漂洗,加 DAB 显色,采用图象分析软件对产物条带光度扫描以其灰度值表示蛋白浓度。

1.6 氚标胸腺嘧啶脱氧核苷(³H-TdR)掺入试验

细胞数为 2×10⁷/L,每孔 200 μL 加入 96 孔板中培养,每组设 5 个复孔,当达 80% 融合时饥饿 24 h,转染 24 h 后,加入 Ang ①(终浓度为 100 nmol/L)及³H-TdR(每孔加入 1.85 kBq),24 h 后裂解细胞,加入到液相闪烁管中,在液相闪烁计数器上测每分钟计数(CPM)值。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较用方差分析, $P < 0.05$ 为有显著差异性。

2 结果

2.1 反义表皮生长因子受体寡核苷酸对血管平滑肌细胞表皮生长因子受体 mRNA 表达的影响

反义组 EGFR mRNA 表达量与正义组及对照组比较有显著差异($P < 0.05$),对照组与正义组比较无统计学差异($P > 0.05$)(图 1 和表 1)。

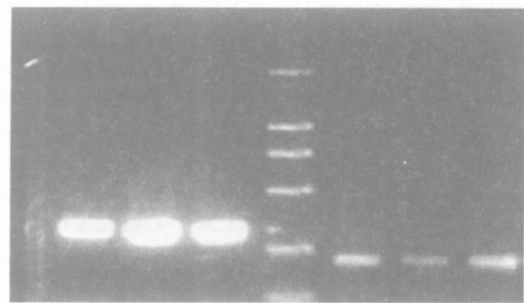


图 1. 表皮生长因子受体 mRNA 表达的检测结果 1、2 和 3 为内参照,4、5 和 6 分别为正义组、反义组和对照组,M 为 DNA 分子标准(自上而下依次为 2 000 bp, 1 000 bp, 750 bp, 500 bp, 250 bp, 100 bp)

2.2 反义表皮生长因子受体寡核苷酸对血管平滑肌细胞表皮生长因子受体蛋白表达的影响

反义组 EGFR 蛋白表达量明显少于对照组及正义组($P < 0.05$),正义组的蛋白表达强度与对照组的 EGFR 蛋白表达强度无明显差别(图 2 和表 2)。

表 1. 血管平滑肌细胞表皮生长因子受体 mRNA 表达量

分 组	n	相对表达量
对照组	3	0.66 ± 0.09
正义组	3	0.61 ± 0.11
反义组	3	0.18 ± 0.03 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与对照组和正义组比较。

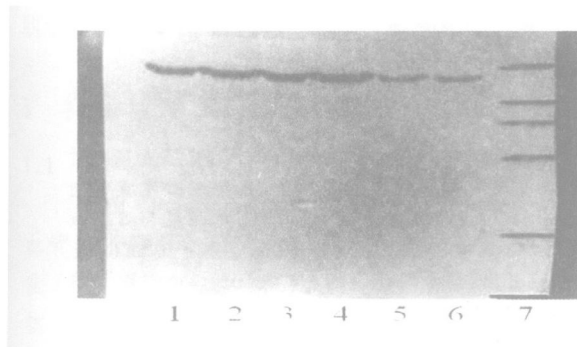


图 2. 反义表皮生长因子受体寡核苷酸对血管平滑肌细胞表皮生长因子受体蛋白表达的影响 1 和 2 为正义组, 3 和 4 为对照组, 5 和 6 为反义组, 7 为蛋白分子量标准(自上至下依次为 205 kD、116 kD、97.4 kD、66 kD、45 kD 和 29 kD)

表 2. 表皮生长因子受体蛋白表达的相对浓度

分 组	n	相对浓度
对照组	4	100.7 ± 11.3
正义组	4	92.6 ± 10.5
反义组	4	43.1 ± 8.4 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与对照组和正义组比较。

2.3 反义表皮生长因子受体寡核苷酸对血管紧张素 α 促血管平滑肌细胞增殖的影响

与正义组、对照组比较, 反义组 ³H-TdR 掺入量明显降低($P < 0.05$), 而正义组与对照组之间无明显统计学差异(表 3)。

表 3. 血管平滑肌细胞氚标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入量

分 组	n	CPM 值
对照组	5	2 013.3 ± 121.3
正义组	5	1 882.4 ± 129.7
反义组	5	1 055.1 ± 95.7 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与对照组和正义组比较。

3 讨论

本实验以反义 EGFR 寡核苷酸作为一种选择性抑制剂, 转染反义 EGFR 寡核苷酸后 VSMC 表达 EGFR mRNA 及蛋白表达下降, 说明反义 EGFR 寡核苷酸转染可以有效抑制 VSMC EGFR mRNA 及蛋白表达, 而抑制 VSMC EGFR mRNA 及蛋白表达也抑制了 Ang α 诱导的 VSMC 的增殖。说明 EGFR 在 Ang α 诱导大鼠 VSMC 增殖过程中发挥了重要作用。研究发现在其他类型细胞中 EGFR 也起到相似的作用, Ang α 通过 EGFR 激活心肌细胞 MAPK^[5,6] 和胰腺星型细胞增殖^[7]。

血管紧张素(Ang) α 促 VSMC 增殖通过与 VSMC 膜上的 AT1R 结合启动细胞内信号转导系统, 促进细胞增殖。AT1R 是 G-蛋白偶联受体, 本身无内在酪氨酸激酶活性, 不能直接促进酪氨酸磷酸化及激活丝裂原激活蛋白激酶(MAPK) 信号通路, Ang α 促 VSMC 增殖用可能通过被称为转移激活(transactivation) 机制来实现。Ang α 与 VSMC 膜上 AT1R 结合激活 EGFR, EGFR 具有受体酪氨酸激酶活性, 通过 EGFR 再激活 MAPK 信号通路^[1], 因此可解释抑制 EGFR 表达可抑制 Ang α 诱导大鼠 VSMC 增殖。

综上所述, 转移激活 EGFR 在血管紧张素 α 诱导大鼠血管平滑肌细胞增殖过程中发挥重要作用。

[参考文献]

- [1] Eguchi S, Numaguchi K, Iwasaki H, Matsumoto T, Yamakawa T, Utsunomiya H, et al. Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin α -induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 1998, **273** (15): 8 890-896
- [2] Eguchi S, Dempsey PJ, Frank GD, Motley ED, Inagami T. Activation of MAPKs by angiotensin α in vascular smooth muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 2001, **276** (11): 7 957-962
- [3] 尹小龙, 吕俊升. 蛋白-酪氨酸激酶在大鼠血管平滑肌细胞诱导型一氧化氮合酶基因表达中的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7** (2): 149-151
- [4] 刘东, 吕俊升, 尹小龙. pp60c-src 在血管平滑肌细胞内丝裂原活化蛋白激酶激活中的作用[J]. *生理学报*, 2000, **52** (6): 483-486
- [5] Kagiya S, Eguchi S, Frank GD, Inagami T, Zhang YC, Phillips MI. Angiotensin α -induced cardiac hypertrophy and hypertension are attenuated by epidermal growth factor receptor antisense [J]. *Circulation*, 2002, **106** (8): 909-912
- [6] Kagiya S, Qian K, Kagiya T, Phillips MI. Antisense to epidermal growth factor receptor prevents the development of left ventricular hypertrophy [J]. *Hypertension*, 2003, **41** (3Pt2): 824-829
- [7] Hama K, Ohnishi H, Yasuda H, Ueda N, Mashima H, Satoh Y, et al. Angiotensin α stimulates DNA synthesis of rat pancreatic stellate cells by activating ERK through EGF receptor transactivation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **315** (4): 905-911

(此文编辑 胡必利)