

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2007)15-03-0178-03

氧化型低密度脂蛋白对血管平滑肌细胞小凹蛋白 1 表达的抑制作用及其与信号调节激酶的关系

李世煌¹, 张 慧¹, 段才闻¹, 文小铃², 严鹏科¹

(南华大学 1. 药物药理研究所, 2. 医学院外总教研室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 药物化学; 氧化型低密度脂蛋白; 小凹蛋白 1; 细胞外信号调节激酶; 平滑肌细胞; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 观察氧化型低密度脂蛋白对血管平滑肌细胞小凹蛋白 1 表达的抑制作用及其与细胞外信号调节激酶活性的关系。方法 50 mg/L 氧化型低密度脂蛋白处理血管平滑肌细胞不同时间, 或同时加入 25 μmol/L 细胞外信号调节激酶信号通路的特异性阻断剂, Western 印迹检测血管平滑肌细胞小凹蛋白 1 和细胞外信号调节激酶的变化。结果 50 mg/L 氧化型低密度脂蛋白作用细胞 24 h 后小凹蛋白 1 的表达明显下降, 细胞外信号调节激酶磷酸化活性显著增高, 阻断氧化型低密度脂蛋白对细胞外信号调节激酶的激活可显著促进小凹蛋白 1 的表达。结论 血管平滑肌细胞源性泡沫细胞小凹蛋白 1 的表达下调与氧化型低密度脂蛋白激活细胞外信号调节激酶及其介导的信号传导密切相关。

[中图分类号] R9

[文献标识码] A

The Inhibitory Effect of Oxidized Low Density Lipoprotein on the Expression of Caveolin-1 in Vascular Smooth Muscle Cell and Its Relation with Extracellular-signal Regulated Kinases 1/2

LI Shi-Huang¹, ZHANG Hui¹, DUAN Cai-Wen¹, WEN Xiao-Ling², and YAN Peng-Ke¹

(1. Institute of Pharmacology and Pharmacy, 2. Institute of Surgery, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Oxidized Low Density Lipoprotein; Caveolin 1; Extracellular Signal Regulated Kinases 1/2; Smooth Muscle Cell; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To study the inhibitory effect of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) on the expression of caveolin 1 in vascular smooth muscle cell (SMC) and its relation with extracellular-signal regulated kinases 1/2 (ERK1/2). **Methods** Western blot was performed to evaluate the effects of ox-LDL (50 mg/L) or ox-LDL (50 mg/L) and PD98059 (25 μmol/L) on expression of caveolin 1 and ERK1/2 in vascular SMC in different times. **Results** Ox-LDL (50 mg/L) obviously decreased caveolin 1 expression, and significantly increased ERK1/2 phosphorylation activity. However, the activation of ERK1/2 blocked by PD98059 significantly promoted caveolin 1 expression. **Conclusions** Downregulation of caveolin 1 expression in foam cell derived from vascular smooth muscle cell is involved in ERK1/2 phosphorylation activity and its signaling pathway activated by ox-LDL.

小凹蛋白 1 是维持细胞质膜小凹结构的骨架蛋白, 具有结合、运载胆固醇的功能并促进细胞内游离胆固醇的流出, 对维持正常细胞胆固醇的稳态起着重要调节作用^[1]。氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 通过抑制血管平滑肌细胞 (smooth muscle cell, SMC) 小凹蛋白 1 的表达从而干扰血管 SMC 胆固醇流出; 过度表达小凹蛋白 1 可以减轻 ox-LDL 诱导的血管 SMC 内胆固醇聚集, 延

缓平滑肌源性泡沫细胞形成^[2]。小凹蛋白 1 与细胞外信号调节激酶 (extracellular-signal regulated kinases 1/2, ERK1/2) 及其信号传导系统存在相互的负性调节作用, ERK1/2 能有效地负性调控小凹蛋白 1 的表达^[3]。本研究旨在观察 ERK1/2 活性与 ox-LDL 抑制小凹蛋白 1 表达的关系, 探讨 ox-LDL 影响小凹蛋白 1 表达的内在机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM 培养基、无脂蛋白血清和胎牛血清购自 Gibco 公司; 小凹蛋白 1 一抗 (sc-894)、磷酸化 ERK1/2 一抗和辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗购自 Santa

[收稿日期] 2007-01-26 [修回日期] 2007-03-01

[基金项目] 湖南省自然科学基金 (01JJY2145); 湖南省教育厅科研项目 (4-02-JY-02C387)

[作者简介] 李世煌, 硕士研究生, 研究方向心血管药理, E-mail 为 confidentLSH@yahoo.com.cn。张慧, 硕士研究生, 研究方向心血管药理。通讯作者严鹏科, 博士后, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向心血管药理, E-mail 为 yanpke@tom.com。

Cruz 公司; BCA 蛋白含量测定试剂、BlueRanger 预染蛋白分子量标准和 Western blot 荧光检测试剂盒购自 Hyclone-Pierce 公司; PD98059、丽春红染色试剂购自 Sigma 公司; 其他试剂均为国产分析纯。计算机图像分析系统(HPIAS-1000 型)为 Olympus 公司产品; 蛋白电泳系统为 BioRad 公司产品。

1.2 氧化型低密度脂蛋白的制备

正常人血浆低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)采用超速离心法制备。按文献[2]方法,将 LDL 置于 PBS 溶液中,4℃透析 36 h,充分去除 EDTA 后,用含 10 μmol/L CuSO₄ 的 PBS 溶液(pH 7.2)37℃透析 20 h,进行氧化修饰。氧化修饰后的 LDL(ox-LDL)置含 100 μmol/L EDTA 的 PBS 中,4℃透析 24 h,终止氧化。超滤除菌,BCA 试剂定量蛋白,调蛋白浓度至 1 g/L 用于实验。

1.3 细胞培养及处理

采用我室建立的酶消化法^[4]分离大鼠主动脉血管 SMC,α-actin 染色鉴定,取 3~8 代细胞用于实验。用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基调细胞密度至 1×10^8 个/L 铺入 60 mm² 平皿和 100 mm² 平皿,或 5×10^7 个/L 接种于盖玻片上,24 h 后换含 0.1% 胎牛血清的 DMEM 培养基,使细胞静止 48 h 后,用含 50 mg/L ox-LDL 的 0.5% LPDS-DMEM 诱导不同时间,或同时加入 ERK1/2 信号通路的特异性阻断剂 PD98059 25 μmol/L,每 48 h 换液一次。

1.4 Western blot 检测蛋白表达

按 Smart 等^[3]方法,收集不同条件处理的 SMC,MBST 裂解液(25 mmol/L MBS, pH 6.5, 0.15 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100)裂解细胞,离心去除沉淀,BCA 试剂测定蛋白含量,1×SDS 凝胶加样缓冲液调蛋白浓度使各组一致。用 12.5% SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离。转移至 PDVF 膜上,丽春红染色观察转移效果,并确定蛋白分子量标准位置。用含 5% 脱脂奶粉的 TBST(20 mmol/L Tris base, pH 7.6, 50 mmol/L NaCl, 0.1% Tween)封闭 1 h,按 1:200 加入兔抗人小凹蛋白 1 一抗或 1:1000 加入兔抗鼠磷酸化 ERK1/2 一抗室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次,1:3 000 加入辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗,室温 1 h, TBST 洗 3 次后,用 Western blot 荧光检测试剂盒显示结果于 X 光片。Epson 1650 photo 扫描仪收集图像,用 Labworks 图像分析系统对 Western blot 结果进行吸光度扫描,以对照组面积灰度值为 100% 与实验组进行比较和半定量分析。

1.5 统计学分析

所有实验重复 4 次,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比

较用一步方差 ANOVA 分析,并经 LSD 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。采用 SPSS11.0 统计软件。

2 结果

2.1 氧化型低密度脂蛋白作用不同时间对小凹蛋白 1 表达的影响

50 mg/L ox-LDL 作用 16 h 以内 SMC 小凹蛋白 1 的表达有轻度升高的趋势;作用 24 h 小凹蛋白 1 的表达明显下降,此后随着处理时间的延长,抑制作用越明显(图 1)。

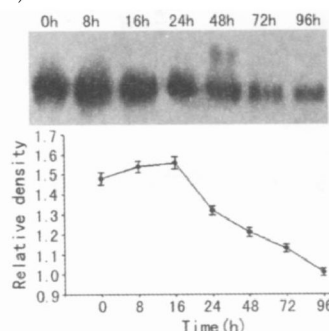


图 1 氧化型低密度脂蛋白作用不同时间对小凹蛋白 1 表达的影响 a 为 $P < 0.05$, 与 0 h 组比较。

2.2 氧化型低密度脂蛋白诱导平滑肌细胞源性泡沫细胞形成过程中细胞外信号调节激酶活性的变化

血管 SMC 经 48 h 静止后, ERK1/2 活性很弱, 仅见少量磷酸化 ERK1/2 (pERK1/2)。50 mg/L ox-LDL 刺激 8 h, ERK1/2 活性大幅度上升;继续刺激至 16 h, ERK1/2 活性回落;至 24 h 后轻微上升并维持一个相对稳定的高活性水平(图 2)。

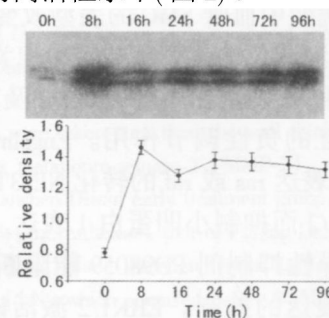


图 2 氧化型低密度脂蛋白作用不同时间对细胞外信号调节激酶表达的影响 a 为 $P < 0.05$, 与 0 h 组比较。

2.3 细胞外信号调节激酶活性对平滑肌细胞小凹蛋白 1 表达的影响

50 mg/L ox-LDL 处理 SMC 8 h, pERK1/2 和小凹蛋白 1 均高表达。同时加用 ERK1/2 信号通路的特异性阻断剂 PD98059 25 μmol/L 处理, 可有效阻断 pERK1/2 表达, 但对小凹蛋白 1 的表达无明显影响;

处理 24 h、96 h, pERK1/2 表达显著下降, 小凹蛋白 1 表达明显回升(图 3)。

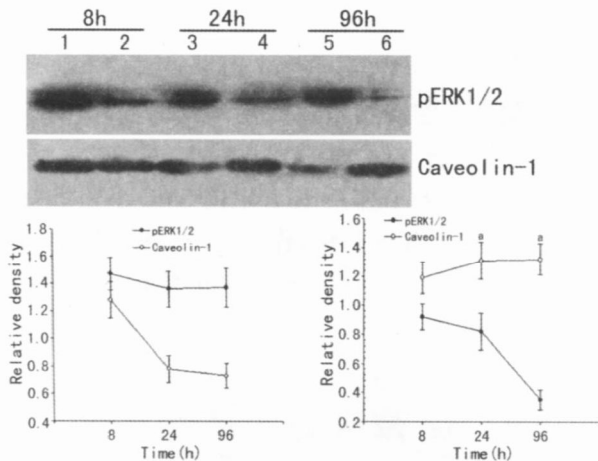


图 3. 细胞外信号调节激酶活性对平滑肌细胞小凹蛋白 1 表达的调控作用

3 讨论

本研究结果发现, 50 mg/L ox-LDL 作用细胞 16 h 以内 SMC 小凹蛋白 1 表达有轻度升高的趋势, 但作用 24 h 出现小凹蛋白 1 表达明显下降, 此后随着处理时间延长, 抑制作用越明显。ox-LDL 对小凹蛋白 1 表达的影响随作用时间不同而呈双相性。提示 ox-LDL 诱导血管 SMC 形成泡沫细胞的过程中, 可能存在小凹蛋白 1 表达的多途径调节。关于小凹蛋白 1 表达的调控, 目前较为肯定的是 ERK1/2 介导的调控^[5,6]。ox-LDL 是一种强效的 ERK1/2 激活剂, ox-LDL 激活 ERK1/2 引起的细胞内信号异常传导, 与动脉粥样硬化病变中血管 SMC 的表型改变、过度增殖和迁移, 乃至泡沫化等多个环节密切相关^[7]。

研究表明, 小凹蛋白 1 与 ERK1/2 及其信号传导系统存在相互的负性调节作用。Engelman 等^[5,6]研究发现, 过度表达 ras 或 raf 的转化 NIN3T3 细胞均通过激活 ERK1/2 而抑制小凹蛋白 1 表达。ERK1/2 信号系统的特异性抑制剂 PD98059 能阻断 ERK1/2 对小凹蛋白 1 表达的抑制。ERK1/2 激活以其蛋白磷酸化形式存在(pERK1/2), 通过作用于小凹蛋白 1 基因的增强子而发挥抑制效应。Li 等^[8]研究发现小凹蛋白 1 通过其骨架区域结合并失活 ERK1/2 信号传导系统的上游激酶 ras 及生长因子受体, 直接抑制 ERK1/2 信号通路的信号传导。

本研究发现, ox-LDL 处理血管 SMC 96 h 后,

ERK1/2 活性显著增加, pERK1/2 增加了近 4 倍; ERK1/2 信号通路的特异性阻断剂 PD98059 能阻断 ox-LDL 对 ERK1/2 的激活, 同时明显阻断 ox-LDL 对小凹蛋白 1 的抑制作用, 使小凹蛋白 1 表达回升。提示 ox-LDL 对血管 SMC 源性泡沫细胞小凹蛋白 1 表达的抑制作用与其激活 ERK1/2 及其介导的信号传导密切相关。为进一步了解 ox-LDL 诱导血管 SMC 泡沫化过程中小凹蛋白 1 的表达变化的内在机制, 我们对不同时间的 ERK1/2 活性进行了观察, 并将 ERK1/2 活性与小凹蛋白 1 表达情况进行综合, 研究发现在 ox-LDL 刺激血管 SMC 的早期(8 h), ERK1/2 活性升高, 同时小凹蛋白 1 的表达轻微升高, 这一作用不能被 PD98059 所阻断, 说明 ox-LDL 诱导的 ERK1/2 激活与 ox-LDL 作用早期所出现的小凹蛋白 1 表达上调无必然联系, 其机制有待进一步研究。而在后期(24 h~96 h), ox-LDL 在激活 ERK1/2 活性的同时, 抑制小凹蛋白 1 表达, 这一现象可被 PD98059 阻断, 说明 ox-LDL 诱导的血管 SMC 源性泡沫细胞小凹蛋白 1 的表达下调与 ox-LDL 激活 ERK1/2 及其介导的信号传导密切相关。

[参考文献]

- [1] Ammon Schlegel, Lisanti MP. Caveolae and their coat proteins, the caveolins: from electron microscopic novelty to biological launching pad [J]. *J Cell Physiol*, 2001, **186**: 329-337.
- [2] 严鹏科, 廖端芳, 杨永宗. Caveolin-1 表达对血管平滑肌细胞胆固醇逆转运的调节作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (5): 379-383.
- [3] Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction [J]. *Mol Cell Biol*, 1999, **19** (11): 7 289-304.
- [4] 涂永生, 黄红林, 朱炳阳, 廖端芳. ③型胶原酶/弹性蛋白酶消化法培养大鼠血管平滑肌细胞[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (5): 438-440.
- [5] Engelman JA, Zhang XL, Babak Razani, Pestell RG, Lisanti MP. p42/44 MAP kinase dependent and independent signaling pathways regulate caveolin-1 gene expression. Activation of Ras-MAP kinase and protein kinase A signaling cascades transcriptionally down-regulates caveolin-1 promoter activity [J]. *J Biol Chem*, 1999, **274**: 32 333-341.
- [6] Engelman JA, Lee RJ, Anthony Kamezis, Bearss DJ, Webster M, Siegel P. Reciprocal regulation of Neu tyrosine kinase activity and caveolin-1 protein expression in vitro and in vivo. Implications for mammary tumorigenesis [J]. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 20 448-455.
- [7] Yang CM, Chiu CT, Wang CC, Chien CS, Hsiao LD, Lin CC, et al. Activation of mitogen-activated protein kinase by oxidized low-density lipoprotein in canine cultured vascular smooth muscle cells [J]. *Cell Signal*, 2000, **12** (4): 205-14.
- [8] Li Sw, Takashi Okamoto, Chun M, Massimo Sargiacomo, Casanova JE, Hansen SH, et al. Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin [J]. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 15 693-701.

(此文编辑 文玉珊)