

[文章编号] 1007-3949(2008)16-10-0819-05

• 实验研究 •

降钙素基因相关肽抑制血管平滑肌细胞能量代谢的 AMP 激活蛋白激酶信号通路

秦旭平¹, 任俊芳¹, 邓水秀¹, 吴峻², 谌赞¹, 陈临溪¹, 肖瑞平³

(1. 南华大学药物药理研究所, 湖南省衡阳市 421001; 2 广州医学院附属第一医院, 广东省广州市 510120

3 北京大学医学部心血管研究所, 北京市 100083)

[关键词] 药理学; 血管平滑肌细胞; 降钙素基因相关肽; AMP 激活蛋白激酶; 能量代谢

[摘要] 目的 观察降钙素基因相关肽对血管紧张素Ⅱ诱导血管平滑肌细胞增殖过程中能量代谢的影响及机制, 探索细胞外信号调节激酶和 AMP 激活蛋白激酶相关信号蛋白在该作用中的地位。方法 组织贴块法体外培养 SD 大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞, 取第 3~10 代用于实验。分别用降钙素基因相关肽或 1 α -血管紧张素Ⅱ处理细胞。MTT 法及细胞计数法观察降钙素基因相关肽对血管紧张素Ⅱ诱导大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响; 詹纳斯绿 B 染色观察细胞线粒体形态及体积; ATP 检测试剂盒检测细胞内 ATP 水平; Western Blotting 检测细胞磷酸化 AMP 激活蛋白激酶的表达。结果 降钙素基因相关肽预处理能降低血管紧张素Ⅱ诱导的大鼠血管平滑肌细胞的增殖 ($P < 0.05$), 同时拮抗血管紧张素Ⅱ引起细胞内线粒体肿胀、ATP 水平升高, 在此过程中伴随细胞内磷酸化 AMP 激活蛋白激酶表达下调 ($P < 0.05$); 降钙素基因相关肽受体拮抗剂 CGRP₈₋₃₇ 能拮抗降钙素基因相关肽对血管紧张素Ⅱ促增殖和促代谢的抑制作用 ($P < 0.05$); 细胞外信号调节激酶抑制剂 PD98059 能部分拮抗降钙素基因相关肽对磷酸化 AMP 激活蛋白激酶的抑制作用 ($P < 0.05$)。结论 降钙素基因相关肽能显著抑制血管紧张素Ⅱ诱导大鼠血管平滑肌细胞增殖过程中的能量代谢, 其细胞内信号通路可能涉及到降钙素基因相关肽/降钙素基因相关肽 1 型受体-丝裂原细胞外激酶/细胞外信号调节激酶-磷酸化 AMP 激活蛋白激酶信息传递链。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Signal Pathway of AMP-Activated Protein Kinase Involvement in the Inhibition of Energy Metabolism of Vascular Smooth Muscle Cell Induced by Calcitonin Gene-Related Peptide

QIN Xu-Ping¹, REN Jun-Fang¹, DENG Shu-Xiu¹, WU Jun², CHEN Yun¹, CHEN Lin-Xi¹, and XIAO Rui-Ping³

(1. Institute of Pharmacy & Pharmacology, University of South China, Hengyang 421001; 2 the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510120; 3 Beijing University, Beijing 10083 China)

[KEY WORDS] Vascular Smooth Muscle Cells; Calcitonin Gene-Related Peptide; AMP-Activated Protein Kinase; Energy Metabolism

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of calcitonin gene-related peptide (CGRP) on the proliferation and energy metabolism of vascular smooth muscle cells (VSMC) induced by angiotensin II (Ang^{II}), and further explore whether AMP-activated protein kinase (AMPK) involved in the cellular signal pathway. **Methods** VSMC were prepared from thoracic aorta of male Sprague-Dawley rat by the explanted method. The 3~10 passages of cells were used for the present studies. The viability of cultured VSMC was estimated by MTT assay and cells counting. Cellular energy metabolism was tested by ATP assay kit, Janus Green B staining. Western Blotting was used to observe the expressions of phosphorylated AMPK (p-AMPK) in VSMC. **Results** Ang^{II} (100 nmol/L) increased the viability of VSMC. Pretreatment of the cell with CGRP significantly inhibited VSMC proliferation, hypertrophy of mitochondria, extra-generation of ATP induced by Ang^{II} ($P < 0.05$). Meanwhile, CGRP down-regulated expressions of p-AMPK induced by Ang^{II}, which were partly abolished by CGRP₈₋₃₇ or PD98059, respectively. **Conclusion** Pretreatment with CGRP inhibits the proliferation and energy metabolism of VSMC induced by Ang^{II}. The signal transduction involving in this process is likely to be related with the signal linkage, namely, CGRP/CGRP receptor-1 (CGRP-R1)-mitogen extracellular kinase (MEK)/ERK1/2-p-AMPK.

[收稿日期] 2008-09-08 [修回日期] 2008-10-12

[基金项目] 湖南省自然科学基金 (05JJ30042) 和广东省自然科学基金 (5300999)

[作者简介] 秦旭平, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管药理学, Email为 qinxp333@hotmail.com。任俊芳, 硕士, 研究方向为心血管药理。肖瑞平, 博士, 特聘教授, 研究方向为心血管疾病病理生理学。

AMP激活蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 是细胞能量状态的感受器, 当细胞受应激如缺血缺氧、肌肉收缩时 AMP/ATP 升高, AMP/ATP 激活 AMPK, 通过对下游蛋白的磷酸化, 关闭消耗 ATP 的合成代谢途径, 并开启分解代谢途径。研究显示, 在心肌缺血时, 存在 AMPK 活化异常^[1, 2]。高血压血管重构与血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 能量代谢和基因转录、翻译以及肌原纤维的排列改变有关。以往研究显示降钙素基因相关肽 (calcitonin gene-related peptide, CGRP) 有抑制牛血清、血管紧张素 I^{I} (angiotensin I^{I} , Ang I^{I}) 和内皮素引起的 VSMC 增殖作用, 其细胞内信号通路涉及到细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular signal regulated kinase 1/2, ERK1/2) 活性变化^[3-5]。关于 CGRP 在抑制 VSMC 增殖过程中细胞内能量代谢变化如何尚未见详细报道。本研究以 Ang I^{I} 孵育的 VSMC 作为增殖细胞模型, 探讨 AMPK 是否参与 CGRP 抑制 VSMC 增殖, 其信号通路是否涉及 AMPK 和丝裂原细胞外激酶 (mitogen extracellular kinase, MEK) /ERK1/2 途径。并在此基础上, 观察在 CGRP 干预下细胞能量代谢的改变及机制。

1 材料和方法

1.1 药品与试剂

标准胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自杭州四季青公司。Ang I^{I} 、CGRP、CGRP₈₋₃₇ 和 MTT 购于美国 Sigma 公司。HRP 山羊抗鼠、山羊抗兔二抗购于武汉博士德公司。PD98059、磷酸化 AMPK (p-AMPK) 和 AMPK 兔抗鼠多克隆抗体购于美国 Cell signaling 公司。ATP 检测试剂盒购于碧云天试剂公司。平衡盐溶液缓冲液各成分均为市售分析纯。甲醇和乙醇均为市售分析纯。文中所用 CGRP、CGRP₈₋₃₇、Ang I^{I} 和 PD98059 等药所用的剂量参考我们以往实验剂量^[4, 5]。

1.2 平滑肌细胞培养

VSMC 的培养采用本实验室已建立组织贴块法^[5]。将雄性 SD (体重 120 ~ 150 g) 大鼠胸主动脉浸泡于适量无菌 PBS 液体的培养皿中清洗 2 ~ 3 次, 沿胸主动脉纵轴剪开, 剥除血管外膜、内膜和纤维结缔组织后, 将血管中膜平滑肌层剪成 1 mm³ 大小组织块, 用眼科镊将组织小块送入 50 mL 培养瓶内, 培养 4 ~ 7 天后, 可看到少量细胞游出, 待细胞长至 70% ~ 80% 汇合时用 0.25% 胰蛋白酶消化传

代。实验用长势良好的 3 ~ 10 代细胞。

1.3 MTT 法检测细胞增殖

取生长良好的 3 ~ 10 代对数生长期平滑肌细胞, 平衡盐溶液 (PBS) 洗 2 ~ 3 次, 胰蛋白酶消化后, 用含 10% 新生牛血清的 DMEM 制成细胞悬液, 以 5×10^3 /孔的密度接种于 96 孔板, 100 μ L/孔, 随机分组, 每组设 6 个平行孔。置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养, 待细胞长至 70% ~ 80% 汇合状态时, 更换为 100 μ L 含 0.1% FBS 的 DMEM 培养 24 h 使细胞同步化, 按下列分组观测细胞活力的变化: 对照组 (0.1% FBS); ④ Ang I^{I} 组; ④ CGRP + Ang I^{I} 组, 在 Ang I^{I} 刺激前 30 min 加入 CGRP 孵育 12、24 和 48 h。在规定时间内, 每孔加 5 g/L MTT 10 μ L, 继续培养 4 h 后终止培养, 小心吸弃孔内培养上清液, 每孔加入 150 μ L DMSO, 室温振荡混匀 10 min, 待紫色结晶完全溶解后, 用酶联免疫仪在波长 570 nm 处读取吸光度 (A 值)。

1.4 詹纳斯绿 B 染色观察细胞内线粒体

线粒体的鉴定用詹纳斯绿 B 活染法。细胞接种于 24 孔板, 至 75% 汇合时换成含 0.1% FBS 的 DMEM 培养基同步化 24 h。按下列分组观测 CGRP 对能量代谢的影响: 对照组 (0.1% FBS); ④ Ang I^{I} 组; ④ CGRP + Ang I^{I} 组; CGRP₈₋₃₇ + CGRP + Ang I^{I} 组 (CGRP₈₋₃₇ 在 CGRP 刺激前 30 min 加入)。Ringer 溶液洗去培养液, 立即滴加 0.02% 詹纳斯绿 B 染色 20 min, 线粒体被染成蓝绿色圆形颗粒, 光学显微镜观察颗粒大小、数量及分布情况, 图形软件分析系统分析线粒体所占细胞质面积百分比。

1.5 细胞内 ATP 水平的测定

细胞经分组处理后 (样品裂解需在 4 $^{\circ}$ C 或冰上操作), 吸除培养液, 直径 10 cm 培养板加入 800 μ L 裂解液裂解细胞, 收集裂解液 4 $^{\circ}$ C 离心 5 ~ 10 min, 取上清。加 800 μ L 工作液到石英杯内, 室温放置 3 ~ 5 min 降低本底。加入 800 μ L 样品或标准品, 迅速用微量移液器混匀后, 立即用荧光分光光度计测定。根据标准曲线计算出样品中 ATP 水平。

1.6 Western Blotting 检测细胞信号蛋白

取提取的细胞蛋白质样品 (BCA 比色法进行蛋白定量, 50 μ g 总蛋白量/泳道) 加入上样缓冲液煮沸 3 ~ 5 min, 在 5% 积层胶和 10% SDS-PAGE 凝胶上进行电泳分离 (电压为 80V/120V)。电转膜至 PVDF 膜上, 丽春红染色观察蛋白质转移情况。TBST (50 mmol/L Tris·Cl, 150 mmol/L NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.6) 洗 5 min, 5% 脱脂牛奶室温摇床封闭 1 h 或 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜后, 加入一抗 (β -actin,

AMPK 和 p-AMPK 效价为 1: 1000) 37℃ 孵育 2 h 或 4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜 4 次后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔或羊抗小鼠二抗 (效价为 1: 1500), 室温下摇床孵育 1 h 或 37℃ 孵育 45 min, TBST 洗膜 3 次, 加发光剂 A、B 混液于 PVDF 膜上激发荧光后压片、显影和定影, 洗片晾干后用 AlphaImager™ 2200 进行图像分析, 结果以各目的蛋白与 β -actin 的灰度比值表示。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 10.0 软件进行分析。所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), $P < 0.05$ 判断为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 降钙素基因相关肽对血管紧张素 II 诱导的血管平滑肌细胞增殖的影响

MTT 检测结果发现, CGRP 预孵育 VSMC 后能降低 Ang II 所诱导的 VSMC 增殖作用。CGRP 与 Ang II 共同孵育 12 h 就能明显抑制 Ang II 诱导的 VSMC 增殖 ($P < 0.05$), 共同孵育 48 h 作用更明显 ($P < 0.01$, 表 1)。

表 1 降钙素基因相关肽在各时间点对血管紧张素 II 诱导的血管平滑肌细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$ $n=5$)

时间	对照组	Ang II 组	CGRP+ Ang II 组
12 h	100% \pm 1%	115% \pm 1% ^a	106% \pm 2% ^c
24 h	100% \pm 2%	130% \pm 2% ^a	116% \pm 3% ^c
48 h	100% \pm 2%	202% \pm 3% ^b	162% \pm 5% ^d

a 为 $P < 0.05$ b 为 $P < 0.01$, 与对照组比; c 为 $P < 0.05$ d 为 $P < 0.01$, 与 Ang II 组比。

2.2 降钙素基因相关肽对血管紧张素 II 刺激下细胞线粒体形态、体积和数量的影响

与对照组相比, 光学显微镜下可见 Ang II 组线粒体体积增大, 明显肿胀, 线粒体覆盖细胞质面积增加 ($P < 0.01$); 单独 CGRP 处理细胞后线粒体体积变化不明显, CGRP₈₋₃₇ 对其作用不明显; 但用 CGRP 预处理细胞, 再用 Ang II 刺激细胞, 线粒体肿胀明显减轻, CGRP 的这种抑制作用可被 CGRP₈₋₃₇ 所拮抗 (图 1)。各组线粒体所覆盖细胞质的面积见表 2。

2.3 PD98059 对血管紧张素 II 或降钙素基因相关肽处理的血管平滑肌细胞胞内 ATP 水平的影响

单独给予 Ang II 或 CGRP 可显著升高 VSMC 内 ATP 水平, PD98059 可降低此二者能量代谢的作用。与 Ang II 组比较, 预先给予 10 nmol/L CGRP 能显著

降低 Ang II 的促能量代谢作用。PD98059 预孵育细胞半小时后, 加入 CGRP 孵育 30 min, 再以 Ang II 刺激细胞 30 min, ATP 水平无显著改变 (表 3)。

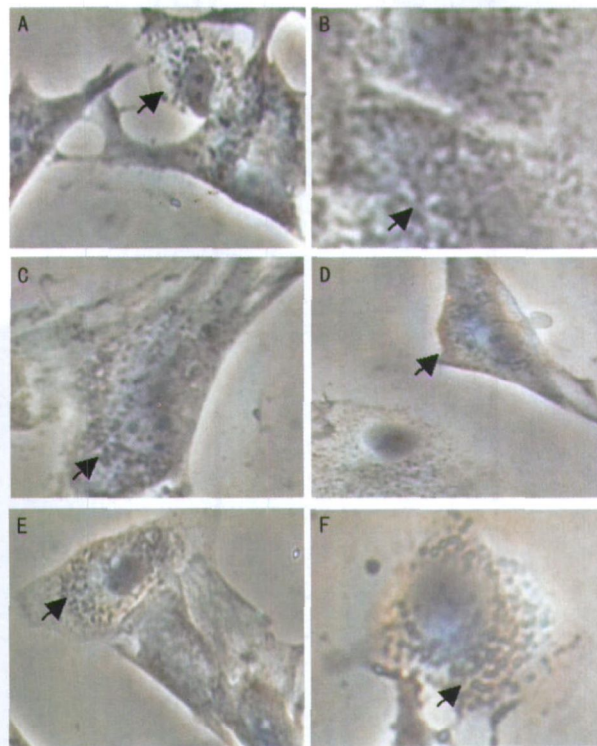


图 1 詹纳斯绿 B 染色观察降钙素基因相关肽对血管紧张素 II 刺激下血管平滑肌细胞线粒体密度的影响 ($\times 100$) A 为对照组, B 为 Ang II 组, C 为 CGRP+ Ang II 组, D 为 CGRP 组, E 为 CGRP₈₋₃₇+ CGRP 组, F 为 CGRP₈₋₃₇+ CGRP+ Ang II 组。

2.4 血管紧张素 II 对血管平滑肌细胞 AMP 激活蛋白激酶表达的影响

静止期细胞 Ang II 孵育 0、15、30、60 和 120 min 以及 24 h Western blotting 结果表明, Ang II 刺激细胞 15 min 时细胞内 p-AMPK 表达开始升高, 在刺激 30 min 时 p-AMPK 活性达到最大, 与对照组比较差异有显著性 ($P < 0.05$); 60 min 时下降至与正常水平无显著性差异。而 AMPK 的表达在各时间段差异无显著性 (表 4 和图 2)。

2.5 降钙素基因相关肽对血管紧张素 II 诱导的血管平滑肌细胞 AMP 激活蛋白激酶表达的影响

Ang II 孵育细胞 30 min 使细胞内 p-AMPK 水平明显升高 ($P < 0.01$); CGRP 预孵育 VSMC 30 min 后, 再以 Ang II 孵育细胞, 与单独使用 Ang II 孵育组比较, p-AMPK 表达明显降低 ($P < 0.05$); 使用 CGRP 受体阻断剂 CGRP₈₋₃₇ (50 nmol/L) 预孵育细胞 30 min 能拮抗 CGRP 对 AMPK 磷酸化的抑制作用 ($P < 0.05$); 而处理组与非处理组之间 AMPK 表达无显著变化 (表 2 和图 3)。

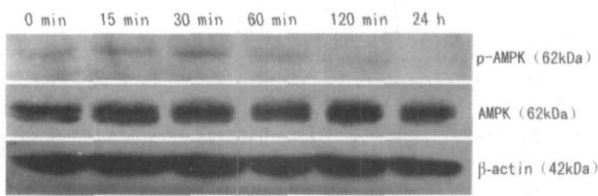


图 2 血管紧张素 II 孵育血管平滑肌细胞不同时间点 AMP 激活蛋白激酶表达的 Western blotting 检测图

表 2 降钙素基因相关肽对血管紧张素 II 诱导的血管平滑肌细胞线粒体所覆盖面积和 AMP 激活蛋白激酶表达的影响

分 组	线粒体面积 / 细胞质总面积	p-AMPK 蛋白	AMPK 蛋白
对照组	40.1% ± 5.0%	0.38 ± 0.01	0.96 ± 0.02
Ang II 组	87.5% ± 15.0% ^b	0.52 ± 0.02 ^b	1.00 ± 0.03
CGRP 组	42.2% ± 10.0%	0.44 ± 0.02 ^a	0.94 ± 0.02
CGRP + Ang II 组	51.4% ± 12.0% ^d	0.42 ± 0.02 ^c	0.96 ± 0.02
CGRP ₈₋₃₇ + CGRP 组	46.5% ± 12.0%	0.48 ± 0.01	0.94 ± 0.02
CGRP ₈₋₃₇ + CGRP + Ang II 组	72.0% ± 10.0% ^f	0.50 ± 0.01 ^e	0.95 ± 0.02

a为 P < 0.05, b为 P < 0.01, 与对照组比; c为 P < 0.05, d为 P < 0.01, 与 Ang II 组比; e为 P < 0.05, f为 P < 0.01, 与 CGRP + Ang II 组比。

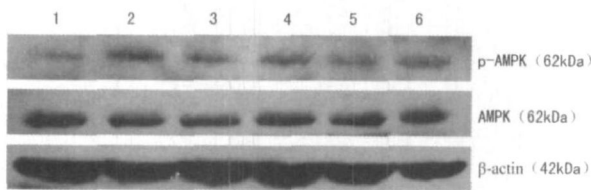


图 3 降钙素基因相关肽对血管紧张素 II 诱导的血管平滑肌细胞 AMP 激活蛋白激酶表达的影响 1 为对照组, 2 为 Ang II 组, 3 为 CGRP 组, 4 为 CGRP + Ang II 组, 5 为 CGRP₈₋₃₇ + CGRP 组, 6 为 CGRP₈₋₃₇ + CGRP + Ang II 组。

2.6 PD98059 对血管紧张素 II 或降钙素基因相关肽处理的血管平滑肌细胞磷酸化 AMP 激活蛋白激酶表达的影响

与单独使用 Ang II 组比较, 10 mmol/L CGRP 能抑制 Ang II 诱导的 p-AMPK 的表达 (P < 0.01), 使用抑制 ERK1/2 磷酸化的 PD98059 预孵育细胞 30 min 后, p-AMPK 水平显著升高 (表 3 和图 4)。

3 讨论

本研究主要探索了 CGRP 对 Ang II 诱导的 VSMC 增殖过程中能量代谢的影响, 结果表明 CGRP 抑制 VSMC 增殖过程, 也伴有能量代谢的变化, 表现在细胞内线粒体肿胀减轻和 ATP 的产生减少, 其细胞内的代谢通路与 ERK-AMPK 信号通路有关。

表 3 PD98059 对血管紧张素 II 或降钙素基因相关肽处理的血管平滑肌细胞内 ATP 水平和磷酸化 AMP 激活蛋白激酶的影响 (x ± s, n = 3)

分 组	ATP 水平	p-AMPK 蛋白
对照组	0.90 ± 0.05	0.92 ± 0.02
Ang II 组	4.50 ± 0.15 ^b	1.32 ± 0.02 ^b
PD98059 + Ang II 组	1.40 ± 0.05 ^d	1.42 ± 0.03 ^c
CGRP 组	2.20 ± 0.10 ^a	1.24 ± 0.01 ^b
PD98059 + CGRP 组	1.35 ± 0.10 ^c	1.32 ± 0.01 ^c
CGRP + Ang II 组	2.00 ± 0.10 ^d	0.94 ± 0.01 ^d
PD98059 + CGRP + Ang II 组	2.20 ± 0.50	1.11 ± 0.02 ^f

a为 P < 0.05, b为 P < 0.01, 与对照组比; c为 P < 0.05, d为 P < 0.01, 与 Ang II 组比; e为 P < 0.05, 与 CGRP 组比; f为 P < 0.01, 与 CGRP + Ang II 组比。

表 4 血管紧张素 II 孵育血管平滑肌细胞不同时间点 AMP 激活蛋白激酶表达的变化 (x ± s, n = 3)

孵育时间	p-AMPK 蛋白	AMPK 蛋白
0 min (对照组)	0.63 ± 0.03	0.97 ± 0.04
15 min	0.68 ± 0.03	0.97 ± 0.03
30 min	0.72 ± 0.02 ^a	0.97 ± 0.03
60 min	0.60 ± 0.02	1.00 ± 0.04
120 min	0.56 ± 0.02	0.99 ± 0.03
24 h	0.55 ± 0.02	1.00 ± 0.03

a为 P < 0.05 与对照组比。

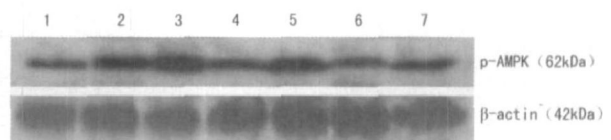


图 4 PD98059 对血管紧张素 II 或降钙素基因相关肽处理的血管平滑肌细胞 AMP 激活蛋白激酶磷酸化水平的影响

1 为对照组, 2 为 Ang II 组, 3 为 PD98059 + Ang II 组, 4 为 CGRP 组, 5 为 PD98059 + CGRP 组, 6 为 CGRP + Ang II 组, 7 为 PD98059 + CGRP + Ang II 组。

业已证明, 感觉神经纤维释放的神经肽 CGRP 有较强的舒张血管、保护心肌和保护血管内皮^[6-7]、抑制 Ang II 或牛血清的促体外培养的 VSMC 增殖作用, 其细胞内信号通路涉及 ERK1/2^[3-5]。但是, 有关 CGRP 在抑制 VSMC 增殖过程中的能量变化和信号通路还有待阐明。AMPK 是细胞内能量代谢的关键信号蛋白, 是在进化上高度保守的蛋白质分子, 广泛存在于真核生物的细胞中。AMPK 主要由 AMP 和 AMPK 调控激活, 细胞受到某些外源性刺激或缺血缺氧时, AMP/ATP 比值升高, 从而激活 AMPK。

本研究结果发现 Ang^②处理组细胞内线粒体肿胀或所覆盖面积增加,以及 ATP水平较对照组明显升高,说明 Ang^②在促进细胞增殖的同时,伴有能量代谢继发增强,与此对应 p-AMPK 表达上调。相关文献也有报道,细胞增殖过程中伴随能量代谢变化和基因转录、翻译以及肌原纤维的排列变化^[8]。也有文献报道 Ang^②可上调 VSMC 表面低密度脂蛋白受体,增加脂质摄取^[9]。由此我们推测,血管重构除 VSMC 增殖外,可能还与 VSMC 能量代谢失调有关。能量代谢的失调使细胞内聚集大量脂质和糖原使得 VSMC 收缩能力下降,同时分泌大量细胞外间质使细胞间质比例下降,表现为血管中膜肥厚、血管硬度增加、血管舒缩调节障碍,从而引发血管重构,这是高血压、动脉粥样硬化的重要原因之一。

本研究结果发现,Ang^②孵育的 VSMC, p-AMPK 水平明显升高,其活性在给予 Ang^②后 30 min 达最高值,随着时间的延长而降低。但 Ang^②引起的 AMPK 活性增加的意义和信号通路还不完全清楚。前期实验表明 Ang^②作用于 VSMC 5~30 min 内, ERK1/2 活性最高^[3-5]。本实验结果发现, ERK1/2 磷酸化抑制剂 PD98059 能进一步增加 p-AMPK 的表达,说明 ERK1/2 的活化能抑制 p-AMPK 的表达。然而,令人感兴趣的是, PD98059 进一步增加 p-AMPK 表达的同时,伴有细胞内 ATP 水平降低,可能的解释是由于 ERK1/2 磷酸化受阻,细胞合成代谢减弱,线粒体数量减少,导致细胞内 ATP 含量降低。另一种解释也可能是由于 Ang^②激活 MEK/ERK1/2 通路促进细胞增殖的同时,通过 NADPH-H₂O₂ 通路代偿性激活 AMPK, p-AMPK 可抑制 ERK1/2 磷酸化,从而抑制细胞分裂增殖^[10-11]。就我们了解而言,这也可能是细胞增殖时共同的内部自我保护机制。

本实验发现,单用 CGRP 有升高 p-AMPK 的趋势,说明单一因素的 CGRP 在促进平滑肌细胞增殖的同时也有刺激 p-AMPK 表达的作用。CGRP 能抑制 Ang^②引起的 AMPK 活性增加,这种抑制作用可被 CGRP 受体阻断剂 CGRP₈₋₃₇ 所取消。有趣的是,

应用 ERK1/2 阻断剂处理细胞后, p-AMPK 水平明显升高,这说明 p-ERK1/2 对 p-AMPK 的表达成负相关。ERK1/2 对 AMPK 调节作用的中介信号蛋白有待进一步探讨。

综上所述, Ang^② 诱导对 VSMC 增殖过程中存在能量代谢升高, CGRP 对 VSMC 增殖的抑制作用与抑制其能量代谢有关。其细胞内信号通路可能是通过 CGRP/CGRP 受体-MEK/ERK1/2-p-AMPK 信息传递链与 Ang^② 信号通路形成交叉网络调节。

[参考文献]

- [1] Baron SJ, Li J, Russell RR, et al. Dual mechanisms regulating AMPK kinase action in the ischemic heart [J]. *Circ Res* 2005; **96** (3): 337-345
- [2] Sakanoto K, Zarrinpashneh E, Budas GR, et al. Deficiency of LKB1 in heart prevents ischemia mediated activation of AMPK α 2 but not AMPK α 1 [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; **290** (5): E780-E788
- [3] Li Y, Ficus RR, Wu J, et al. The antiproliferative effects of calcitonin gene-related peptide in different passages of cultured vascular smooth muscle cells [J]. *Neuropeptides* 1997; **31** (5): 503-509
- [4] Qin XP, Ye F, Hu CP, et al. Effect of CGRP on proliferation-induced by angiotensin^② in vascular smooth muscle cells [J]. *Eur J Pharmacol* 2004; **488** (1-3): 45-49
- [5] 邓水秀, 曾泗宇, 任俊芳, 等. 降钙素基因相关肽对血管平滑肌细胞增殖及小凹蛋白 1 表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007; **15** (9): 661-665
- [6] Jansen-Olesen I, Mortensen A, Edvinsson L. Calcitonin gene-related peptide is released from capsaicin-sensitive nerve fibres and induces vasodilation of human cerebral arteries concomitant with activation of adenylyl cyclase [J]. *Cephalgia* 1996; **16** (5): 310-316
- [7] Wiskirchen FM, Gray DW, Marshall I. Receptors mediating CGRP-induced relaxation in the rat isolated thoracic aorta and porcine isolated coronary artery differentiated by h(α) CGRP (8-37) [J]. *Br J Pharmacol* 1999; **128** (2): 283-292
- [8] Eguchi S. Intracellular signaling of angiotensin^②-induced p70S6 kinase phosphorylation at Ser (411) in vascular smooth muscle cells: possible requirement of epidermal growth factor receptor, Ras, extracellular signal regulated kinase and Akt [J]. *J Biol Chem*, 1999; **274** (52): 843-851
- [9] Faure M, Voyno-Yasenetskaya TA, Boume HR. cAMP and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells [J]. *J Biol Chem*, 1994; **269** (11): 7851-854
- [10] Ceolotto G, Gallo A, Papparella I, et al. Rosiglitazone reduces glucose-induced oxidative stress mediated by NAD(P)H oxidase via AMPK-dependent mechanism [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; **27** (12): 2627-633
- [11] Nagata D, Takeda R, Sata M, et al. AMP-activated protein kinase inhibits angiotensin^②-stimulated vascular smooth muscle cell proliferation [J]. *Circulation*, 2004; **110** 444-451

(此文编辑 许雪梅)