

[文章编号] 1007-3949(2010)18-02-0099-06

• 实验研究 •

降钙素基因相关肽介导内皮祖细胞抑制血管紧张素 Ang^{II} 诱导的血管平滑肌细胞表型转化

方立¹, 陈晓彬², 陈美芳¹, 肖智林², 欧亚莉², 谢秀梅¹

(中南大学 1. 湘雅医院干部医疗科; 2. 湘雅医院心内科, 湖南省长沙市 410008)

[关键词] 内皮祖细胞; 血管平滑肌细胞; 表型转化; 血管紧张素 Ang^{II} 降钙素基因相关肽

[摘要] 目的 初步探讨内皮祖细胞抑制血管紧张素 Ang^{II} 诱导的血管平滑肌细胞表型转化的分子机制。方法 从人脐带血分离、培养、诱导内皮祖细胞分化并鉴定, 制备早期内皮祖细胞条件培养基, 酶联免疫吸附试验检测降钙素基因相关肽分泌情况。经降钙素基因相关肽抗体预处理内皮祖细胞条件培养基或阻断内皮祖细胞降钙素基因相关肽受体后, 采用逆转录聚合酶链反应和免疫印迹观察内皮祖细胞条件培养基对血管紧张素 Ang^{II} 诱导的血管平滑肌细胞收缩表型标志基因平滑肌 α -肌动蛋白以及合成表型标志基因骨桥蛋白表达变化的作用; 进一步观察内皮祖细胞条件培养基对血管紧张素 Ang^{II} 诱导的血管平滑肌细胞增殖信号通路(ERK、核因子 KB 通路)的作用。结果 早期内皮祖细胞能够分泌较高浓度的降钙素基因相关肽, 并且较晚期内皮祖细胞及脐静脉内皮祖细胞高; 内皮祖细胞条件培养基处理能明显抑制血管平滑肌细胞表型转化; 阻断降钙素基因相关肽作用后, 内皮祖细胞条件培养基对血管紧张素 Ang^{II} 诱导的血管平滑肌细胞表型转化的抑制能力明显降低; 同时内皮祖细胞条件培养基能够明显抑制血管紧张素 Ang^{II} 诱导的 ERK 以及核因子 KB 通路的活化; 阻断降钙素基因相关肽作用后, 内皮祖细胞条件培养基对血管紧张素 Ang^{II} 诱导的 ERK、核因子 KB 信号通路活化的抑制能力明显降低。结论 降钙素基因相关肽参与介导内皮祖细胞抑制血管紧张素 Ang^{II} 诱导的血管平滑肌细胞的表型转化, 其机制可能与其抑制血管平滑肌细胞 ERK、核因子 KB 信号通路活化有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

CGRP Involve Inhibition of Endothelial Progenitor Cells on Phenotype Transformation of Cultured Rat Vascular Smooth Muscle Cells Induced by Angiotensin Ang^{II}

FANG Li¹, CHEN Xiaobin², CHEN Meifang¹, XIAO Zhiling², OUYali², and XIE Xiumei¹

(1. Cadre Division, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 2. Department of Cardiology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

[KEY WORDS] Endothelial Progenitor Cell Vascular Smooth Muscle Cells Phenotype Transformation Angiotensin Ang^{II} Calcitonin Gene-Related Peptide

[ABSTRACT] **Aim** To explore the potential mechanism of endothelial progenitor cells (EPC) on the regulation of Ang^{II} -induced phenotype transformation of vascular smooth muscle cell (VSMC). **Methods** EPC were obtained by isolating mononuclear cells using Ficoll density-gradient centrifugation and were identified by morphology, fluorescence double-staining and flow cytometry according to previous methods. ELISA were performed to analyze the secretion of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in EPC and HUVEC. Early endothelial progenitor cells conditioned medium (E-EPC-CM) was pre-incubated with functional blocking antibodies against CGRP for 1h or VSMC was pretreated with CGRP837 (CGRP receptor antagonist) for 1h before VSMC were pretreated with CM for 30min. RT-PCR and Western-blot were performed to analyze the effect of E-EPC-CM on Ang^{II} -induced the expression of α -SM-actin, calponin and phosphorylation of ERK, NF- KB (p65) in VSMC. **Results** The level of CGRP was higher than that observed in the E-EPC-CM and HUVEC-CM groups. After stimulation with angiotensin Ang^{II} for 48h, the expression of the α -SM-actin mRNA and protein significantly decreased and the osteopontin mRNA and protein markedly increased compared with control group, suggesting that VSMC was changed from contractile to synthesize type by angiotensin Ang^{II} . But treatments with E-EPC-CM could up-regulate the expression of the α -SM-actin and down-regulate the expression of the osteopontin, suggesting that E-EPC-CM could inhibit the phenotype of VSMC from contractile to synthesize type induced by angiotensin Ang^{II} . Moreover, we demonstrated that treatments with CGRP837 or anti-CGRP antibody could partly reverse the inhibition effect of phenotype transformation.

[收稿日期] 2009-10-09

[修回日期] 2010-01-01

[基金项目] 湖南省教育厅“十一五”重点学科资助项目(湘教发(2005)100); 长沙市科技局重点资助项目(k0803149-21)

[作者简介] 方立, 博士研究生, 主要从事内皮祖细胞在心血管疾病中的基础研究与临床应用, E-mail为 f120083@sina.com。陈美芳, 博士, 主治医师, 主要研究方向是内源性活性物质与心血管疾病的联系, E-mail为 chenmeifang16@hotmail.com。陈晓彬, 博士, 副教授, 主要研究方向为心血管疾病介入诊断与治疗, E-mail为 chenxiaobinxy16@sina.com。通讯作者谢秀梅, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心血管病的基础与临床研究, E-mail为 xyxiem@sina.com。

of E-EPC-CM on the Ang II-stimulated VSMC. Likewise, we also demonstrated that treatment with anti-CGRP antibody or CGRP837 could partly reverse Ang^{II}-induced phosphorylation of ERK, NF- κ B (p65). **Conclusion** It is showed that the inhibitory effect of EPCs on phenotype transformation of VSMC is associated at least partly with release of CGRP, which inactivates ERK and NF- κ B signaling pathway.

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell VSMC) 表型转化在心血管疾病的发生、发展中起着重要的作用, 是形成高血压、动脉粥样硬化、介入治疗后血管再狭窄等血管增殖性疾病的关键性起始步骤^[1]。近年来大量研究表明内皮祖细胞 (endothelial progenitor cell EPC) 移植在冠心病、高血压、血管成形术后血管再狭窄等血管性疾病中发挥了积极的治疗作用, 如血压下降、血管弹性增加、肺动脉阻力下降、肺小动脉壁变薄, 降低血管损伤后血管内膜增殖、预防支架植入术后支架内血栓形成和血管再狭窄等^[2-5]。这些都充分表明 EPC 能够延缓高血压等血管增殖性疾病血管重塑的进程, 其机制可能与其抑制血管平滑肌细胞表型转化有关。我们的前期研究已初步证实早期 EPC 条件培养基 (E-EPC-CM) 能够明显抑制血管紧张素^{II} (angiotensin^{II} Ang^{II}) 诱导的 VSMC 的表型转化, 其机制与内皮祖细胞旁分泌功能有关^[6], 但具体的分子机制尚不是很清楚, 即 EPC 通过何种旁分泌物质参与调控 VSMC 的表型转化。研究表明降钙素基因相关肽 (calcitonin gene-related peptide CGRP) 能够显著抑制血管活性物质 (Ang^{II})、炎症因子 (IL-1, TNF)、高半胱氨酸等诱导的血管平滑肌细胞 DNA 合成、细胞周期进程、表型转化以及 VSMC 增殖信号转导通路 (MAPK, NF- κ B) 等^[7-8]; EPC 是维持血管内皮完整性和促进血管新生的重要血管内皮前体细胞, 且具有活跃的自分泌和旁分泌功能, 已有研究证实 EPC (主要是早期 EPC) 能够合成并分泌 CGRP。EPC 能否通过旁分泌 CGRP 参与介导 Ang^{II} 诱导的 VSMC 表型转化, 值得进一步研究。本研究旨在探讨 CGRP 是否参与介导内皮祖细胞抑制 Ang^{II} 所致血管平滑肌细胞的表型转化。

1 材料与方法

1.1 材料

EPC 来源于人脐带血液, 脐血均取自我院产科及湖南省妇幼保健院产科。VSMC 购于上海天呈生物信息科技有限公司 (ATCC 来源, 货号 CRL-1476TM)。Osteopontin 兔单克隆抗体 (英国 Abcam 公司); α -SM-actin 小鼠单克隆抗体; CGRP 兔单克隆抗体 (Santa cruz 公司); Phospho-p44/42MAPK (Erk1/2) 兔单克隆抗体、Phospho-NF- κ B p65 兔单

克隆抗体、CGRP837 (美国 cell signaling 公司); β -actin 小鼠单克隆抗体 (深圳晶美生物工程公司)、PCR 引物由上海英俊公司合成; Hoechst33258、MMLV 逆转录酶 (Takara 公司); p44/42 (Erk1/2) MAPK 兔多克隆抗体、Trizol 2 \times PCR Master Mix、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、Western 及 IP 细胞裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、BeyoECL Plus 化学发光试剂盒 (碧云天生物技术研究); 硝酸纤维素膜 (PVDF) (美国 Millipore 公司); 流式细胞仪 FACS Calibur (中南大学附三医院中心实验室)。

1.2 细胞培养

采用 3% 明胶沉降红细胞和密度梯度离心法分离人脐血单个核细胞, EBM-2 细胞培养基进行培养, 诱导单个核细胞贴壁向内皮祖细胞分化; 并且采用荧光显微镜双染色、流式细胞术鉴定内皮祖细胞, 具体方法同文献 [6]。VSMC 正常生长培养基为 DMEM (高糖) + 10% FBS, 细胞呈梭形, 贴壁生长, 置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 条件下, 6 孔细胞培养板培养。

1.3 制备内皮祖细胞条件培养基

消化原代培养 14 天和 28 天左右的 EPC, 以 10⁶ 个细胞/孔接种到 6 孔细胞培养板中, 加入 2 mL EBM-2 完全培养基, 置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 细胞培养箱培养; 待其生长至 80% 左右时更换为无血清、无生长因子的 EBM-2 培养基继续培养约 48 h 后, 于超静台取各种细胞培养基, 2 kr/min 离心 5 min 后, 0.22 μ m 滤器过滤, 即得早期内皮祖细胞条件培养基 (early endothelial progenitor cell conditional medium, E-EPC-CM) 和晚期内皮祖细胞条件培养基 (late endothelial progenitor cell conditional medium, L-EPC-CM), 至 -20 $^{\circ}$ C 冻存备用, 同样方法制备脐静脉内皮条件培养基, 同时采用 ELISA 法检测早期、晚期内皮祖细胞和脐静脉内皮细胞条件培养基 CGRP 的浓度。

1.4 试验分组

试验细胞随机分为以下 6 组: (1) 正常对照组: VSMC 不予任何处理; (2) 单纯 Ang^{II} 组: VSMC 用 Ang^{II} 诱导培养不同时间; (3) EBM-2 + Ang^{II} 组: VSMC 用 EBM-2 各 1 mL (6 孔) 预处理 30 min 然后用 DMEM (终浓度为 10% FBS) 补至 2 mL, 再同时加入 Ang^{II} (10⁻⁶ mmol/L) 诱导培养不同时间; (4) E-EPC-CM + Ang^{II} 组: VSMC 用 E-EPC-CM 各 1 mL (6

孔)预处理 30 min, 然后用 DMEM (终浓度为 10% FBS)补至 2 mL, 再同时加入 Ang^{II} (10^{-6} mmol/L) 诱导培养不同时间; (5) E-EPC-CM + Ang^{II} + CGRP837组: VSMC 预先用 CGRP837 (5 mg/L) 预处理 1 h, 余处理同 (4); (6) E-EPC-CM + Ang^{II} + CGRP-Ab组: E-EPC-CM 预先用 CGRP 单克隆抗体 (CGRP-Ab, 10^{-5} mol/L) 预处理 1 h, 余处理同 (4)。

1.5 酶联免疫吸附实验 (ELISA)

细胞释放的 CGRP 经 CGRP-ELISA 试剂盒检测: 200 μL 细胞上清加入到包被有抗炎症因子的单克隆抗体的 96 孔板中, 37℃ 孵育 2 h, 吸弃孔板中的液体; 200 μL 酶标二抗加入每孔中, 37℃ 反应 1 h, 0.01 mol/L TBS 洗涤 3 次, 每次 1 min; 200 μL 底物溶液加入每孔中, 37℃ 反应 30 min, 加入终止液终止反应; 经酶标仪在 450 nm 测定光密度 OD 值; 根据标准品的 OD 值和浓度, 以 OD 值作为横坐标, 浓度作为纵坐标作出线性方程; 根据样品的吸光值在坐标上找到对应的浓度。

1.6 免疫印迹分析

按照实验室常规方法进行, 细胞经相应刺激后移去培养液, 用 4℃ PBS 洗涤 2 次; 加入 100 μL 2% SDS 蛋白裂解液裂解细胞, 将裂解液转移至 Eppendorf 管, 超声 10~15 s, 12 kr/m 离心 5 min, 将上清液转移到另一干净 Eppendorf 管; 用 BCA 法测定蛋白浓度; 将 20 μg 蛋白与 2×SDS 加样缓冲液混合, 100℃ 煮沸 5 min, 样品经 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 电转移法转移到硝酸纤维素膜上; 室温下封闭 4 h 后, 加入 Osteopontin (1: 1000)、 α -SM-actin (1: 500) 以及 ERK (1: 1000) 抗体, 4℃ 过夜; 洗去一抗后, 加入辣根过氧化物酶偶联的相应二抗 (1: 1000), 反应 2 h, 化学发光法显色、显影、定影, 扫描结果。

1.7 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR)

根据目的基因 mRNA 序列, 采用 Primer 5.0 引物分析软件设计相应引物, 引物如下: α -SM-actin (正义链): 5'-ACT GGG ACG ACA TGG AAA AG-3', α -SM-actin (反义链): 5'-CAT CTC CAG AGT CCA GCA CA-3'; OPN (正义链): 5'-GAG GAG AAG GCG CAT TAC AG-3', OPN (反义链): 5'-ATG GCT TTC ATT GGA GTT GC-3'; β -Actin (正义链): 5'-CCT CGC CTT TGC CGA TCC-3', β -Actin (反义链): 5'-GGA TCT TCA TGA GGT AGT CAG TC-3'。以 Trizol 法抽提的细胞总 RNA 为模板进行 RT-PCR 反应, 用 MMLV 逆转录酶合成第一链; 用 1 μg 的反

转录产物作为模板, 按如下的反应条件进行 PCR: α -SM-actin 扩增: 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 扩增 28 个循环 (198 bp); OPN 扩增: 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 扩增 28 个循环 (324 bp); β -Actin 扩增: 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 扩增 26 个循环 (626 bp), 均以 β -Actin 作为内对照, PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 溴乙锭染色后于紫外透射仪摄像。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 12.0 统计软件进行数据处理分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组资料比较采用单因素方差分析, 组间比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 内皮祖细胞分泌降钙素基因相关肽

早期 EPC 能够分泌较高浓度的 CGRP, 并且较晚期内皮祖细胞及脐静脉内皮祖细胞明显升高; 而 EBM-2 培养基不含有 CGRP (表 1)。

表 1 ELISA 检测降钙素基因相关肽的分泌情况 ($n=3$)

分 组	CGRP ($\mu\text{g/L}$)
EBM-2/E-EPC-CM	138.85 \pm 8.94 ^a
L-EPC-CM	78.043 \pm 7.45
HUVEC-CM	35.67 \pm 4.92

a 为 $P < 0.01$ 与其他 2 组比较。

2.2 降钙素基因相关肽在早期内皮祖细胞条件培养基抑制血管紧张素 II 诱导的血管平滑肌细胞表型转化中作用

Ang^{II} (10^{-6} mmol/L) 诱导 VSMC 增殖 48 h 后, VSMC 收缩表型标志基因 α 平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SM-actin) mRNA 和蛋白表达明显减少, 而合成表型标志基因骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) mRNA 和蛋白表达明显增加, 表明 VSMC 从收缩表型向合成表型转化; 而 E-EPC-CM 处理后, Ang^{II} 诱导的 α -SM-actin 表达减少和 OPN 表达增加均受到不同程度的抑制, 表现在 α -SM-actin 表达增加和 OPN 表达下降, 即 E-EPC-CM 处理能明显抑制 VSMC 表型转化; CGRP 抗体预处理封闭内皮祖细胞 CGRP 表达或 CGRP 受体阻断剂 (CGRP837) 阻断 CGRP 作用后, E-EPC-CM 对 Ang^{II} 诱导的 VSMC 表型转化的抑制能力明显降低 (表 2)。

表 2 血管平滑肌细胞 α-平滑肌肌动蛋白和骨桥蛋白 mRNA 及蛋白的相对表达 (n = 3)

分 组	mRNA		protein	
	α-SM-actin	骨桥蛋白	α-SM-actin	骨桥蛋白
正常对照组	1.47317 ± 0.06588	0.37529 ± 0.0273	0.04623 ± 0.00184	0.0676 ± 0.00648
AngⅡ组	0.27306 ± 0.03683 ^a	1.93777 ± 0.10134 ^a	0.0136 ± 0.00287 ^a	0.40846 ± 0.01393 ^a
AngⅡ+ EBM-2组	0.32826 ± 0.03221 ^a	2.06406 ± 0.14794 ^a	0.01232 ± 0.00109 ^a	0.41337 ± 0.01006 ^a
AngⅡ+ E-EPC-CM 组	1.13039 ± 0.10071 ^b	0.67419 ± 0.03432 ^b	0.03661 ± 0.00398 ^b	0.16311 ± 0.0072 ^b
AngⅡ+ E-EPC-CM + CGRP ₈₃₇ 组	0.54106 ± 0.02845 ^{bc}	1.42923 ± 0.08938 ^{bc}	0.02214 ± 0.00295 ^{bc}	0.33012 ± 0.01539 ^{bc}
AngⅡ+ E-EPC-CM + CGRP-Ab 组	0.56331 ± 0.02425 ^{bc}	1.34493 ± 0.06565 ^{bc}	0.02059 ± 0.00136 ^{bc}	0.30099 ± 0.0072 ^{bc}

a为 $P < 0.05$ 与正常对照组比较; b为 $P < 0.05$ 与 AngⅡ组和 AngⅡ+ EBM-2组比较; c为 $P < 0.05$ 与 AngⅡ+ E-EPC-CM 组比较。

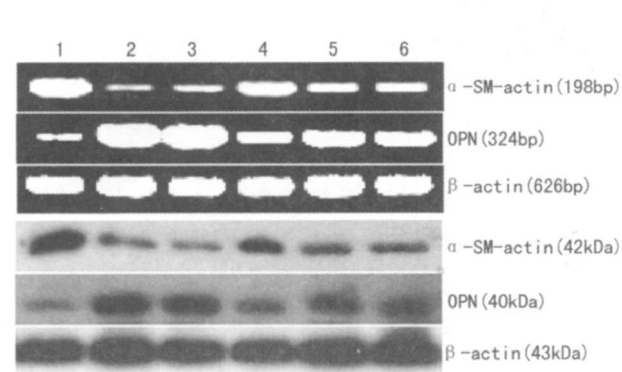


图 1 降钙素基因相关肽在早期内皮祖细胞条件培养基对 AngⅡ诱导的血管平滑肌细胞表型标志基因 α-SM-actin、OPN mRNA 和蛋白表达中的作用 上图为 mRNA 组, 下图为蛋白表达; 1~6 分别为正常对照组、单纯 AngⅡ组、EBM-2+ AngⅡ组、E-EPC-CM + AngⅡ组、E-EPC-CM + AngⅡ+ CGRP837 组、E-EPC-CM + AngⅡ+ CGRP-Ab 组。

2.3 降钙素基因相关肽在早期内皮祖细胞条件培养基抑制血管紧张素Ⅱ诱导的血管平滑肌细胞表型转化信号通路中的作用

大量研究表明 MAPK、核因子 κB 信号通路在血管平滑肌细胞增殖和表型转化中发挥了非常重要的作用, 我们的前期研究也证实血管紧张素Ⅱ刺激血管平滑肌细胞增殖 30 min 和 60 min 后, MAPK 信号通路中 ERK1/2 以及核因子 κB 亚单位 P65 的磷酸化明显增加; 而早期内皮祖细胞条件培养基处理能够明显抑制血管紧张素Ⅱ所致 ERK1/2 和 P65 的磷酸化及其 P65 的核移位; 经降钙素基因相关肽抗体预处理封闭内皮祖细胞条件培养液降钙素基因相关肽表达或降钙素基因相关肽 837 阻断降钙素基因相关肽作用 30 min 和 60 min 后, 早期内皮祖细胞条件培养基对血管紧张素Ⅱ诱导的 ERK1/2 和 P65 磷酸化(核移位)的抑制能力明显下降 ($P < 0.05$ 表 3、图 2 和图 3)。

表 3 血管平滑肌细胞 ERK 蛋白的相对表达 (n = 3)

分 组	30 min	60 min
对照组	0.056937 ± 0.007501	0.056937 ± 0.007501
AngⅡ组	0.555884 ± 0.031527 ^a	0.83009 ± 0.060044 ^a
AngⅡ+ E-EPC-CM 组	0.180711 ± 0.006027 ^b	0.26724 ± 0.012123 ^b
AngⅡ+ E-EPC-CM + CGRP ₈₃₇ 组	0.396852 ± 0.006111 ^{bc}	0.665256 ± 0.03552 ^{bc}
AngⅡ+ E-EPC-CM + CGRP-Ab 组	0.416107 ± 0.006064 ^{bc}	0.643901 ± 0.021036 ^{bc}

a为 $P < 0.05$ 与正常对照组比较; b为 $P < 0.05$ 与 AngⅡ组比较; c为 $P < 0.05$ 与 AngⅡ+ E-EPC-CM 组比较。

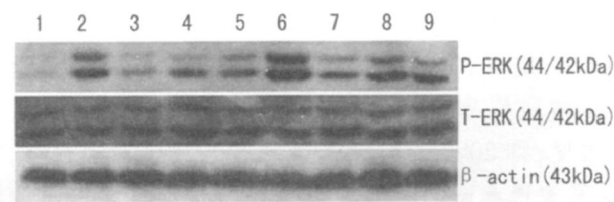


图 2 降钙素基因相关肽在早期内皮祖细胞条件培养基对 AngⅡ诱导的血管平滑肌细胞 ERK 活化以及 NF-κB(P65)核移位中的作用 1 为正常对照组、2~5 为 AngⅡ刺激 30 min 分别为对照组、AngⅡ、E-EPC-CM + AngⅡ、E-EPC-CM + AngⅡ+ CGRP837 和 E-EPC-CM + AngⅡ+ CGRP-Ab 组。6~9 为 AngⅡ刺激 60 min 分别为 AngⅡ、EBM-2+ AngⅡ、E-EPC-CM + AngⅡ、E-EPC-CM + AngⅡ+ CGRP₈₃₇ 和 E-EPC-CM + AngⅡ+ CGRP-Ab 组。

3 讨论

EPC 是一类能增殖并分化为血管内皮细胞, 但尚未表达成熟血管内皮细胞表型、也未形成血管的前体细胞。自从 Asahara 等^[9]在外周血液中成功分离出具有单个核、体外呈梭形、能形成管腔样结构且 CD34⁺ 的 EPC 以来, 其在心血管疾病方面的研究日益受到重视, 也为心血管疾病的治疗提供了新的策略。目前研究表明 EPC 最主要的生物学功能是促进血管新生和参与血管损伤后的内皮修复及内膜再生^[10]。因此, EPC 在心血管疾病中的应用主要是促进缺血心肌的血管新生治疗、修复损伤血管及内

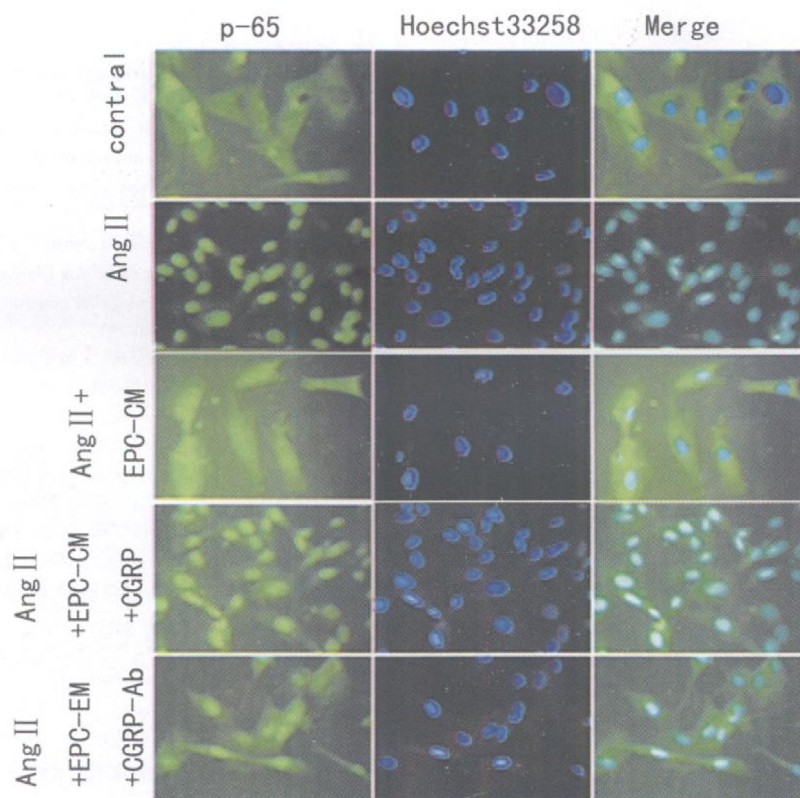


图 3 降钙素基因相关肽在早期内皮祖细胞对血管紧张素Ⅱ诱导的血管平滑肌细胞 NF-κB (P65)核移位中的作用 (×400)

血管紧张素Ⅱ诱导细胞培养 60 min, p-65为绿色荧光; Hoechst33258为对细胞核染色, 蓝色区域表示细胞核; Merge为二者图片叠加。

皮再生化、种植支架预防血栓形成及再狭窄等。

血管壁 VSMC 增殖是高血压、动脉粥样硬化、冠心病血管成形术后再狭窄等血管增殖性疾病的共同病理基础之一, 而 VSMC 表型转化是其关键性起始步骤。这些都充分表明 EPC 能够延缓高血压等血管性疾病血管重塑的进程, 其共同机制除了与 EPC 促进血管新生、内皮修复及内膜再生化有关外, 可能还与其抑制血管平滑肌细胞表型转化有关。我们的前期研究结果已证实 10^{-6} mmol/L AngⅡ诱导 VSMC 增殖 48 h 后, VSMC 收缩表型标志基因 α -SM-actin 表达明显减少, 而合成表型标志基因 OPN 表达明显增加, 表明 VSMC 从收缩表型向合成表型转化; 而 E-EPC-CM 处理后, AngⅡ诱导的 α -SM-actin 表达减少和 OPN 表达增加均受到不同程度的抑制, 即抑制 VSMC 表型转化。大量研究表明, EPC 自分泌和旁分泌众多的细胞因子参与维持自身功能的调节。基于 EPC 的许多生物学功能主要是通过其旁分泌功能实现的, 我们推断 EPC 抑制 VSMC 表型转化的机制与其旁分泌功能有关, 但具体的分子机制尚不是很清楚。

降钙素基因相关肽 (calcitonin gene-related peptide, CGRP) 是一种血管活性肽, 广泛分布于心血管

系统, 具有强大的扩血管、降低血压、保护缺血心肌和以及明显抑制 VSMC 增殖等作用^[11, 12]。多项研究表明降钙素基因相关肽能显著抑制 10% 小牛血清及血管紧张素Ⅱ等细胞因子诱导的 VSMC 增殖及表型转化, 其机制与其限制细胞周期的进程, 降低细胞内 Ca^{2+} 的含量, 通过调整细胞内 Ca^{2+} 稳态、抑制细胞内蛋白磷酸化及蛋白激酶 C (PKC) 和丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 活性等有关^[13-15]。此外, 有研究也证实 EPC 能表达并分泌 CGRP。因此, EPC 能否通过分泌 CGRP 抑制血管紧张素Ⅱ诱导的 VSMC 表型转化, 值得进一步研究。本研究通过 ELISA 检测发现早期 EPC 在培养 48 h 后能大量表达 CGRP, 并且较晚期 EPC 和 HUVEC 明显高, 为进一步研究 CGRP 调控 VSMC 表型转化提供了实验基础。

基于上述研究基础, 本研究采用 CGRP 抗体预处理封闭内皮祖细胞 CGRP 表达或 CGRP 受体阻断剂 (CGRP837) 阻断 CGRP 后, 首先观察 CGRP 介导 EPC-CM 对血管平滑肌细胞的表型转化的影响, 然后进一步观察 CGRP 介导 EPC-CM 对 AngⅡ所致 ERK、NF-κB 信号转导通路的影响。结果发现阻断 CGRP 作用后, E-EPC-CM 对 AngⅡ所致 VSMC 表型转化的抑制能力明显降低, 表现在 VSMC 收缩表型

标志基因 α -SM-actin (mRNA 和蛋白) 表达开始减少, 而合成表型标志基因 (OPN mRNA 和蛋白) 表达开始回升。近年来关于调控 VSMC 表型转化的细胞内信号转导通路得到了广泛的研究。目前研究最多的与 VSMCs 表型转化有关的信号转导途径主要包括 MAPK (主要是 ERK 通路)^[16]、NF- κ B 等信号通路^[17]; 同样, 在上述信号转导通路方面, CGRP 抗体预处理封闭内皮祖细胞 CGRP 表达或 CGRP 受体阻断剂阻断 CGRP 作用 30 min 和 60 min 后, E-EPC-CM 对 Ang II 所致 ERK1/2 和 P65 磷酸化 (核移位) 的抑制能力明显下降。进一步在信号通路方面证实了 EPC 能够通过 CGRP 抑制 Ang II 诱导的 VSMC 表型转化。

这些实验结果都表明 EPC 能够通过 CGRP 抑制 Ang II 诱导的 VSMC 表型转化, 即 EPC 通过旁分泌 CGRP 参与抑制 VSMC 的表型转化。在本试验中我们也发现阻断 CGRP 作用后并不能完全取消 E-EPC-CM 对 VSMC 表型转化的抑制作用, 提示 EPC 还可能还有其他旁分泌物质 (如一氧化氮) 或者是细胞之间的相互作用等机制参与, 有待于进一步研究。总之, 本研究初步证实了 EPC 能够通过旁分泌 CGRP 等细胞因子抑制 Ang II 所致 VSMC 的表型转化, 进一步丰富了 EPC 移植治疗心血管疾病的分子机制, 也为临床应用 EPC 移植防治冠心病、高血压、血管成形术后再狭窄等血管性疾病提供了理论基础。因此, 如何调控 EPC 旁分泌 CGRP 含量来调控不同病理状态下 VSMC 表型转化, 可能是治疗原发性高血压等血管增殖性疾病的新思路。但 CGRP 参与调控 VSMC 表型转化的具体分子机制是什么? 除了 CGRP 外, EPC 是否还有其他旁分泌物质参与抑制 VSMC 的表型转化? 是否能够通过细胞之间的相互作用参与调控 VSMC 的表型转化? 这些研究领域均需要我们进一步去研究。

[参考文献]

- [1] Rudijanto A. The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Acta Med Indones* 2007; **39** (2): 86-93
- [2] Inanishi T, Moriwaki C, Hano T, et al. Endothelial progenitor cell senescence is accelerated in both experimental hypertensive rats and patients

- with essential hypertension [J]. *J Hypertens* 2005; **23** (10): 1831-837.
- [3] Oliveras A, Soler M J, Martinez-Estrada OM, et al. Endothelial progenitor cells are reduced in refractory hypertension [J]. *J Hum Hypertens* 2008; **22** (3): 183-190
- [4] Wang HY, Gao PJ, Ji KD, et al. Circulating endothelial progenitor cells, C-reactive protein and severity of coronary stenosis in Chinese patients with coronary artery disease [J]. *Hypertens Res* 2007; **30** (2): 133-141
- [5] Blindt R, Vogt E, Astafieva I, et al. A novel drug-eluting stent coated with an integrin-binding cyclic Arg-Gly-Asp peptide inhibits neointimal hyperplasia by recruiting endothelial progenitor cells [J]. *J Am Coll Cardiol* 2006; **47** (9): 1786-795
- [6] 方立, 陈美芳, 余国龙, 等. 内皮祖细胞对血管紧张素 II 诱导的血管平滑肌细胞表型转化的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009; **17** (6): 459-464
- [7] Xu-Ping Q, Feng Y, Chang-Ping H, et al. Effect of calcitonin gene-related peptide on angiotensin II-induced proliferation of rat vascular smooth muscle cells [J]. *Eur J Pharmacol* 2004; **488** (1-3): 45-49
- [8] XU Hong-tao, YANG Q, WANG Cai-ying, et al. Influence of calcitonin gene-related peptide on the proliferation and phenotype transformation of vascular smooth muscle cells [J]. *Acta Anatomica Sinica* 2007; **38** (4): 452-456
- [9] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. *Science* 1997; **275** (5302): 964-967
- [10] Zhang Q, Shi M, Peng S. Biological behaviour and role of endothelial progenitor cells in vascular diseases [J]. *Chin Med J* 2007; **120** (24): 2297-303
- [11] Deng OY, Li YJ. Calcitonin gene-related peptide and hypertension [J]. *Peptides* 2005; **26** (9): 1676-685
- [12] Qian XP, Zeng SY, Li D, et al. Calcitonin gene-related Peptide mediated depressor effect and inhibiting vascular hypertrophy of natecaprine in renovascular hypertensive rats [J]. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007; **50** (6): 654-659
- [13] Schaeffer C, Vandroux D, Thomassin D, et al. Calcitonin gene-related peptide partly protects cultured smooth muscle cells from apoptosis induced by an oxidative stress via activation of ERK1/2 MAPK [J]. *Biochim Biophys Acta* 2003; **1643** (123): 65-73
- [14] Lin N, Chen G, Wang X, et al. Effects of certain vasoactive peptides on pathogenesis of vascular restenosis [J]. *Chin Med Sci J* 2003; **18** (1): 128
- [15] 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
- [16] Chang WC, Yu YM, Chiang SY, et al. Ellagic acid suppresses oxidized low-density lipoprotein-induced aortic smooth muscle cell proliferation: studies on the activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and proliferating cell nuclear antigen expression [J]. *Br J Nutr* 2008; **99** (4): 709-714
- [17] Ogawa A, Firth AL, Yao W, et al. Prednisolone inhibits PDGF-induced nuclear translocation of NF- κ B in human pulmonary artery smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; **295** (4): L648-657

(此文编辑 李玲玲)