

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2010)18-05-0358-05

生长素对人脐静脉内皮细胞增殖和迁移的影响及机制

邓彬, 陈美芳, 陈晓彬, 方立, 谢秀梅

(中南大学湘雅医院心内科, 湖南省长沙市 410008)

[关键词] 生长素; 人脐静脉内皮细胞; 细胞增殖; 细胞迁移; 丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶信号通路

[摘要] **目的** 观察生长素对血管紧张素Ⅱ所致的脐静脉内皮细胞增殖和迁移的影响。**方法** 采取不同浓度的血管紧张素Ⅱ($10^{-9} \sim 10^{-6}$ mol/L)刺激脐静脉内皮细胞 24 h 获取最佳浓度(10^{-6} mol/L)后用此浓度的血管紧张素Ⅱ分别刺激脐静脉内皮细胞 0、6、12 和 24 h 观察脐静脉内皮细胞的增殖和迁移; 并观察生长素($10^{-9} \sim 10^{-6}$ mol/L)预处理 2 h 后与 10^{-6} mol/L 血管紧张素Ⅱ共同孵育 24 h 和 10^{-6} mol/L 生长素预处理 0、0.5、1 和 2 h 后与 10^{-6} mol/L 血管紧张素Ⅱ共同孵育 24 h 对脐静脉内皮细胞增殖和迁移的影响。加入丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶信号通路阻滞剂 PD98059(25 μmol/L)、生长激素促分泌素受体 1a 阻断剂([Dys3]GHRP-6 25 μmol/L)预处理人脐静脉内皮细胞, 观察其对生长素影响血管紧张素Ⅱ诱导的内皮细胞增殖和迁移的作用。水溶性四氮唑 8 法测细胞增殖, Transwell 小室测细胞迁移, 免疫印迹法测细胞中细胞外信号调节激酶 1/2 磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2 蛋白表达。**结果** 血管紧张素Ⅱ呈浓度和时间依赖性促进内皮细胞迁移和增殖。生长素抑制血管紧张素Ⅱ引起的内皮细胞迁移和增殖呈浓度和时间依赖性。PD98059(25 μmol/L)预处理可以抑制血管紧张素Ⅱ促内皮细胞增殖作用, [Dys3]GHRP-6(25 μmol/L)预处理阻断生长素对内皮细胞迁移和增殖的抑制作用。生长素可减少磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2 的表达。**结论** 生长素可抑制血管紧张素Ⅱ诱导的内皮细胞增殖和迁移, 其机制涉及细胞外信号调节激酶 1/2 途径。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Mechanism of Ghrelin Influencing Human Umbilical Endothelial Cell Proliferation and Migration

DENG Bin, CHEN Meifang, CHEN Xiaobin, FANG Li and XIE Xiumei

(Affiliated Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410008, China)

[KEY WORDS] Ghrelin; Human Umbilical Endothelial Cell; Proliferation; Migration; Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal Regulated Kinase 1/2 Signal Pathway

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of ghrelin on human umbilical endothelial cell(HUVEC) proliferation and migration. **Methods** Different concentration of angiotensinⅡ(AngⅡ)($10^{-9} \sim 10^{-6}$ mol/L) was adopted to excite HUVEC for 24 hours and the best concentration of 10^{-6} mol/L was acquired and used to stimulate HUVEC for 0, 6, 12, 24 hours respectively to observe human umbilical endothelial cell proliferation and migration. ($10^{-9} \sim 10^{-6}$ mol/L) ghrelin was pretreated for 2 hours and cultivated for 24 hours with HUVEC and 10^{-6} mol/L ghrelin was used to pretreat for 0, 0.5, 1, 2 hour and cultivate HUVEC for 24 hours to observe the cells proliferation and migration. MAPK/ERK1/2 signal pathway inhibitor PD98059(25 μmol/L), GHSR1a receptor inhibitor([Dys3]GHRP-6 25 μmol/L) were added to pretreat HUVEC to observe ghrelin effect on AngⅡ induced endothelial cell injury. Cell proliferation was measured with WST-8 and cell migration with Transwell. ERK1/2 and p-ERK1/2 protein expression with western blot. **Results** AngⅡ promoted HUVEC proliferation and migration with dose and time dependent manner. Ghrelin inhibited AngⅡ promoting effect on cell migration and proliferation with dose and time dependent manner. Pretreatment with PD98059(25 μmol/L) can inhibit the promoting effect of HUVEC proliferation and migration, pretreatment with [Dys3]GHRP-6(25 μmol/L) can block ghrelin's inhibiting effect on cell migration and proliferation effect. Ghrelin can decrease the p-ERK1/2 expression. **Conclusion** Ghrelin can inhibit AngⅡ induced HUVEC proliferation and migration, and the mechanism was involved in ERK1/2 pathway.

[收稿日期] 2010-03-05 [修回日期] 2010-05-13

[作者简介] 邓彬, 博士, 主治医师, 研究方向为冠心病基础与临床。E-mail为 dengbinchang_cr@yahoo.com。谢秀梅, 教授, 博士生导师, 研究方向为心血管疾病及临床。E-mail为 xyxiem@sina.com。陈美芳, 博士, 主治医师, 研究方向为心血管活性物质在心血管领域中的应用, E-mail为 chemeifang1@hotmail.com。

生长素(ghrelin)是丝氨酸-3N端辛酰化的 28 肽氨基酸^[1], 由胃分离提纯而获得, 被认为是生长激素促分泌素受体(growth hormone secretagogue receptor, GHSR)的内源性配体, 生长素除具有促生长激素释放的内分泌功能和非内分泌功能, 还被发现

有很多心血管作用^[2]。健康志愿者皮下注射生长素引起左心室射血分数增加^[3],同时静脉注射导致平均血压和心脏后负荷降低,并在不增加心率的情况下增加心输出量。生长素对慢性心功能衰竭患者有增加心脏指数和每搏指数的作用^[4]。生长素的心血管作用直接通过非生长激素 (growth hormone, GH) 依赖的机制^[5],因为生长素肽和 mRNA 在各种组织包括心脏和血管有存在。已报道生长素在人内皮细胞抑制促炎因子的产生和核因子 κ B 激活^[6],生长素的抗炎作用提示,在体内生长素水平下降的患者中生长素对动脉粥样硬化 (atherosclerosis As) 起调节作用。为增加对生长素影响血管水平的了解,我们拟探讨生长素对血管紧张素 Ang^{II} (angiotension Ang^{II}) 诱导的人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell-12 HUVEC-12) 增殖和迁移的影响,并探讨所涉及的信号转导通路。

1 材料和方法

1.1 主要材料

人脐静脉内皮细胞株购于 ATCC (American Type Culture Collection) (Manassas VA); 重组人生长素、D-Lys³GHRP 购于 Phoenix Pharmaceutical (Burlingame CA); Ang^{II} 、MAPK/ERK1/2 PD98059 购于 Sigma 抗 p-P44/42 (Thr202/Tyr204) 和抗 total ERK1/2 购于 cell signaling technology; Transwell 小室购于 coming inc; WST-8 试剂盒购于 MERK。

1.2 细胞培养

取 HUVEC-12 细胞株,解冻复苏后加入含 10% 小牛血清、100 ku/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), 在 37°C、5% CO₂ 的环境下培养;待细胞汇合至 80%~90% 状态进行以下实验。(1) 细胞分: 空白组,除培养液 (含 10% FBS) 外不加任何处理; (2) 不同浓度 Ang^{II} 处理组,分别用 10⁻⁹、10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶ mol/L Ang^{II} 刺激 HUVEC 24 h (3) Ang^{II} 处理不同时间组,10⁻⁶ mol/L Ang^{II} 处理 HUVEC 0、6、12 和 24 h

生长素处理不同时间组,分别用 10⁻⁶ mol/L 生长素预处理 0.5 h、1 h 和 2 h 后予 10⁻⁶ mol/L Ang^{II} 继续培养 24 h (4) 不同浓度生长素组,10⁻⁹、10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶ mol/L 生长素预处理 2 h 后予 10⁻⁶ mol/L Ang^{II} 继续培养 24 h (5) 细胞分: 空白组; (6) 药物对照组: 分别用 [Dys3]GHRP-6 (25 μ mol/L)、PD98059 (25 μ mol/L)、生长素 10⁻⁶ mol/L 及 Ang^{II} 10⁻⁶ mol/L 孵育 24 h (7) 生长素 + Ang^{II} 组: 10⁻⁶

mol/L 生长素预处理 30 min 后与 10⁻⁶ mol/L Ang^{II} 共孵育 24 h (8) 信号通路阻断剂 + Ang^{II} 组: 生长素受体阻断剂 [Dys3]GHRP-6 (25 μ mol/L) 或 MAPK/ERK1/2 信号通路阻滞剂 PD98059 (25 μ mol/L) 预处理 30 min 后与 Ang^{II} (10⁻⁶ mol/L) 共培养 24 h (9) 生长素 + [Dys3]GHRP-6 + Ang^{II} 组: 10⁻⁶ mol/L 生长素和 [Dys3]GHRP-6 (25 μ mol/L) 一同预处理 30 min 后加 Ang^{II} (10⁻⁶ mol/L) 孵育 24 h

1.3 细胞增殖活力的测定

采用水溶性四氮唑 8 (water soluble tetrazolium-8 WST-8) 法测定细胞增殖活力。96 孔细胞培养板内每孔加入 100 μ L 约 5 000 个细胞,37°C、5% CO₂、饱和湿度培养箱中静置培养,每 48 h 换液一次。在细胞约 70% 汇合状态下,将 96 孔板中的 HUVEC-12 细胞换上 0.2% BSA 的 1640 培养基培养 12 h 后,换以含 0.2% BSA 的含药培养基分别培养 6 h、12 h 和 24 h 每孔加入细胞计数试剂 8 (cell counting kit-8 CCK-8) 溶液 10 μ L,细胞培养箱内孵育 4 h 然后将培养基吸干,每孔加入 200 μ L 二甲基亚砜,混匀后于酶标仪 450 nm 处测 OD 值,以检测细胞的数目和活力。

1.4 Transwell 小室测细胞迁移

用 Matrigel 胶制备 Transwell 小室,取细胞悬液 100~200 μ L (2 \times 10⁴) 内皮细胞加入 Transwell 小室,每孔三重孔,24 孔板下室加入 500 μ L 含 FBS 培养基。在无血清或包含不同浓度处理组的培养基中于 37°C、CO₂ 培养箱中孵育 2 h 用棉棒擦去上室未迁移细胞,结晶紫染色,显微镜 (Olympus DP5Q Japan) 下观察并拍照,染色后可以用 33% 醋酸脱色,将结晶紫完全洗脱下来,洗脱液可在酶标仪上 570 nm 处测 OD 值,间接反映细胞数。

1.5 免疫印迹法检测细胞外信号调节激酶 1/2 和磷酸化细胞外信号调节激酶的蛋白表达

细胞干预采用 Ang^{II} (10⁻⁶ mol/L) 孵育 0、10、30 和 60 min 及生长素 (10⁻⁶ mol/L) 预处理 0、5、10、20、30 和 60 min 后与 Ang^{II} (10⁻⁶ mol/L) 共培养 1 h。细胞裂解用细胞裂解液 [150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.2, 1 mmol/L 1% NP-40, 1 mmol/L EDTA, 15 mmol/L β -巯基乙醇, 0.1% SDS 加 10 μ L PMSF (100 mmol/L)] 摇匀置于冰上。每瓶细胞加 400 μ L 含 PMSF 的裂解液,于冰上裂解 30 min。裂解完后,用干净的刮棒将细胞刮于培养瓶的一侧,然后用枪将细胞碎片和裂解液移至 1.5 mL 离心管中。于 4°C 12 000 r/min 离心 5 min。将离心后的上清分装转移到 0.5 mL 的离心管中放于 -

20℃保存。用 BCA 法蛋白浓度测定试剂盒测蛋白浓度。临用前,冰上冻融标本,取一定体积(含 50 μg蛋白质)的样本至一干净的 Eppendorf管,加入 4 μL 的 5×SDS 上样缓冲液(0.31 mol/L Tris, 25% β 巯基乙醇, 50% 甘油, 12.5% SDS, 0.005% 溴酚兰, pH 6.8)补加 1% 的 SDS 至 20 μL, 95℃变性 5 min, 将样本置于冰上并尽快上样,实验样本每道点样 20 μL, 全分子量的蛋白质标准各点样 10 μL, 100 V 电压电泳 1.5 h 然后将凝胶上的蛋白质转印至 PVDF 膜上(100V, 1 h),用含 5% 脱脂奶粉的 PBST(含 0.5% Tween-20 的 PBS 溶液)室温封闭 2 h。在 5 mL 含 2% 脱脂奶粉的 PBST 中,加入鼠抗人 phospho-ERK 1/2 和 totalERK 1/2 抗体(1: 1000),将转印过的 PVDF 膜置于其中,4℃摇床孵育过夜,然后与辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠二抗(1: 2 000)室温反应 1.5 h 化学发光试剂盒(enhanced chemiluminescence, ECL)显色,曝光。将胶片进行扫描或拍照,凝胶图象处理系统分析软件 Gel-Pro Analyzer 分析条带 OD 值(累积光密度值)。

1.6 统计学处理

应用 SPSS11.0 软件系统进行统计分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。计量资料采用单因素方差分析(one-way ANOVA), $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血管紧张素 II 对内皮细胞增殖和迁移的影响

Ang II 呈浓度和时间依赖性增加内皮细胞的增殖和迁移(表 1 和表 2)。

表 1 不同浓度血管紧张素 II 对人脐静脉内皮细胞增殖和迁移的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 6)

分 组	细胞增殖 (A ₄₅₀)	细胞迁移 (A ₅₇₀)
空白组	0.35 ± 0.03	0.06 ± 0.00
10 ⁻⁹ mol/L Ang II 组	0.43 ± 0.04 ^a	0.12 ± 0.01 ^b
10 ⁻⁸ mol/L Ang II 组	0.50 ± 0.04 ^{ac}	0.25 ± 0.02 ^{bc}
10 ⁻⁷ mol/L Ang II 组	0.55 ± 0.05 ^{acd}	0.48 ± 0.03 ^{bcd}
10 ⁻⁶ mol/L Ang II 组	0.60 ± 0.06 ^{bcd}	0.68 ± 0.04 ^{bcd}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与空白组比较; c 为 $P < 0.05$ 与 10⁻⁹ mol/L Ang II 组比较; d 为 $P < 0.05$ 与 10⁻⁸ mol/L Ang II 组比较; e 为 $P < 0.05$ 与 10⁻⁷ mol/L Ang II 组比较。

2.2 生长素对血管紧张素 II 诱导脐静脉内皮细胞增殖和迁移的影响

生长素(10⁻⁹ ~ 10⁻⁶ mol/L)预处理 2 h 呈浓度依赖性抑制 Ang II 诱导的内皮细胞增殖和迁移(表

3); 10⁻⁶ mol/L 生长素预处理 0, 0.5, 1 和 2 h 呈时间依赖性地抑制 Ang II 诱导的内皮细胞增殖和迁移(表 4)。

表 2 血管紧张素 II 处理不同时间对内皮细胞增殖和迁移的影响

处理时间	细胞增殖 (A ₄₅₀)	细胞迁移 (A ₅₇₀)
0 h	0.09 ± 0.01	0.35 ± 0.04
6 h	0.31 ± 0.03 ^a	0.55 ± 0.04 ^a
12 h	0.55 ± 0.06 ^{ac}	0.68 ± 0.04 ^{ac}
24 h	0.90 ± 0.01 ^{bcd}	0.78 ± 0.06 ^{acd}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与 0 h 组比较; c 为 $P < 0.05$ 与 6 h 组比较; d 为 $P < 0.01$, 与 12 h 组比较。

表 3 不同浓度生长素对血管紧张素 II 诱导脐静脉内皮细胞增殖和迁移的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 6)

分 组	细胞增殖 (A ₄₅₀)	细胞迁移 (A ₅₇₀)
空白组	0.35 ± 0.03	0.06 ± 0.00
Ang II 组	0.60 ± 0.06 ^a	0.68 ± 0.04 ^a
10 ⁻⁹ mol/L 生长素 + Ang II 组	0.20 ± 0.02 ^b	0.55 ± 0.04 ^b
10 ⁻⁸ mol/L 生长素 + Ang II 组	0.15 ± 0.02 ^{bc}	0.49 ± 0.04 ^{bc}
10 ⁻⁷ mol/L 生长素 + Ang II 组	0.10 ± 0.01 ^{bcd}	0.40 ± 0.04 ^{bcd}
10 ⁻⁶ mol/L 生长素 + Ang II 组	0.06 ± 0.01 ^{bcd}	0.27 ± 0.03 ^{bcd}

a 为 $P < 0.05$ 与空白组比较; b 为 $P < 0.05$ 与 Ang II 组比较; c 为 $P < 0.05$ 与 10⁻⁹ mol/L 生长素 + Ang II 组比较; d 为 $P < 0.05$ 与 10⁻⁸ mol/L 生长素 + Ang II 组比较; e 为 $P < 0.05$ 与 10⁻⁷ mol/L 生长素 + Ang II 组比较。

表 4 生长素预处理不同时间对血管紧张素 II 诱导的内皮细胞增殖和迁移的影响

处理时间	细胞增殖 (A ₄₅₀)	细胞迁移 (A ₅₇₀)
0 h	0.35 ± 0.03	0.80 ± 0.06
0.5 h	0.27 ± 0.03 ^a	0.60 ± 0.05 ^a
1 h	0.19 ± 0.02 ^{ab}	0.40 ± 0.07 ^{ab}
2 h	0.06 ± 0.02 ^{abc}	0.25 ± 0.06 ^{abc}

a 为 $P < 0.05$ 与预处理 0 h 比较; b 为 $P < 0.05$ 与预处理 0.5 h 比较; c 为 $P < 0.05$ 与预处理 1 h 比较。

2.3 不同的抑制剂对生长素抑制血管紧张素 II 诱导内皮细胞增殖和迁移的影响

生长素、[Dys3] GHRP-6、PD98059 本身对细胞增殖和迁移无影响,与空白组相比差异无统计学意义。生长素预处理能减少 Ang II 诱导的内皮细胞增殖, PD98059 对 Ang II 诱导的内皮细胞增殖有抑制作用,提示 Ang II 促细胞增殖是通过 MAPK 通路的,用生长素受体拮抗剂 [Dys3] GHRP-6 预处理后可取消生长素抑制 Ang II 诱导的细胞增殖作用,说明生长素通过作用于 GHSR 1a 抑制内皮细胞增殖(表

5)。

Ang^Ⅱ明显增加脐静脉内皮细胞迁移,与空白组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$);生长素 (10^{-6} mol/L)预处理 2 h后加 Ang^Ⅱ (10^{-6} mol/L)继续培养 24 h内皮细胞迁移较单用 Ang^Ⅱ组显著减少 ($P < 0.05$); [Dys3]GHRP-6+ Ang^Ⅱ组内皮细胞迁移与 Ang^Ⅱ组比较差异无显著性;但 [Dys3]GHRP-6+生长素 + Ang^Ⅱ组比生长素 + Ang^Ⅱ组内皮细胞迁移数增多,说明生长素通过 GHSR1a起作用;PD98059+ Ang^Ⅱ组较单用 Ang^Ⅱ组内皮细胞迁移数差异无统计学意义,说明 Ang^Ⅱ促内皮细胞迁移与 MAPK/ERK1/2通路无关(表 5)。

表 5 不同的抑制剂对生长素抑制血管紧张素^Ⅱ诱导内皮细胞增殖和迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分 组	细胞增殖 (A450)	细胞迁移 (A570)
空白组	0.35 ± 0.03	0.06 ± 0.02
Ang ^Ⅱ 组	0.65 ± 0.06 ^a	0.68 ± 0.04 ^a
生长素组	0.34 ± 0.03	0.06 ± 0.01
[Dys3]GHRP-6组	0.36 ± 0.04	0.06 ± 0.01
生长素 + Ang ^Ⅱ 组	0.33 ± 0.03 ^b	0.07 ± 0.03 ^b
[Dys3]GHRP-6+ Ang ^Ⅱ 组	0.64 ± 0.06 ^a	0.68 ± 0.07 ^a
[Dys3]GHRP-6+ 生长素 + Ang ^Ⅱ 组	0.65 ± 0.06 ^c	0.66 ± 0.06 ^c
PD98059组	0.34 ± 0.04	0.06 ± 0.02
PD98059+ Ang ^Ⅱ 组	0.36 ± 0.04 ^b	0.72 ± 0.03

a为 $P < 0.05$ 与空白组比较; b为 $P < 0.05$ 与 Ang^Ⅱ组比较; c为 $P < 0.05$ 与生长素 + Ang^Ⅱ组比较。

2.4 生长素和血管紧张素^Ⅱ对细胞外信号调节激酶 1/2磷酸化的影响

10^{-6} mol/L Ang^Ⅱ作用 0、10、30和 60 min可见 ERK1/2磷酸化逐渐增加(分别为 0.10 ± 0.05 、 0.45 ± 0.05 、 0.60 ± 0.06 和 0.95 ± 0.10),呈时间依赖性(图 1)。 10^{-6} mol/L生长素预处理 5 min开始就可以观察到 ERK1/2磷酸化减弱(0.90 ± 0.10 比 1.20 ± 0.11),预处理 10 min和 20 min更弱(分别为 0.75 ± 0.08 和 0.40 ± 0.04),持续 1 h(预处理 30 min和 1 h时依次为 0.22 ± 0.03 和 0.64 ± 0.06),生长素抑制 ERK1/2活化呈时间依赖性(图 2)。

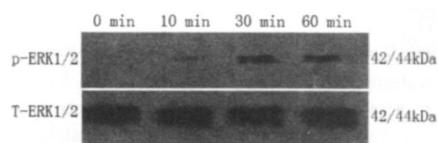


图 1. 血管紧张素^Ⅱ激活磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2蛋白表达的时间依赖性

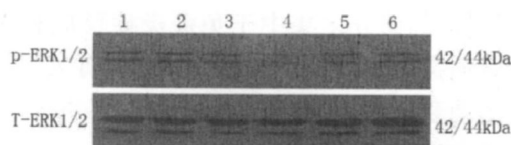


图 2 生长素抑制磷酸化细胞外信号调节激酶蛋白表达的时间依赖性 1为 Ang^Ⅱ组, 2~ 6依次为生长素预处理 5 min, 10 min, 20 min, 30 min和 60 min。

3 讨论

血管内皮细胞大量增殖与迁移是 As发病过程中血管新生的关键环节^[7]。近年研究发现粥样硬化病变局部的动脉内膜常出现病理性新生血管,它们可以促进 As病变的发展,甚至引起斑块内出血和斑块的破裂。血管新生是 As血管功能异常的一种表现^[8]。抑制血管新生可能为治疗 As开辟一条新道路。内皮素 1和整合素参与动脉内膜血管新生,生长素被证明是内皮素 1的拮抗剂,能对抗内皮素 1的缩血管作用。至于生长素对内皮细胞的增殖和迁移是否有影响,从而影响动脉内膜血管新生还未有文献报道。本研究通过观察生长素对 Ang^Ⅱ诱导的 HUVEC增殖和迁移的影响,以了解生长素对动脉内膜新生血管的形成和发展的作用。

以往的研究发现^[9], Ang^Ⅱ诱导血管平滑肌细胞增殖,减少血管平滑肌细胞收缩型表型标志 α 平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle-actin, α -SM-actin)表达和增加血管平滑肌细胞合成型表型标志骨桥蛋白的表达。Ang^Ⅱ能诱导主动脉平滑肌细胞增殖和迁移,但 Ang^Ⅱ是否引起血管内皮细胞增殖和迁移的研究报道很少。Ang^Ⅱ刺激内皮细胞迁移有不同的报道,有人认为它对人类冠状动脉内皮细胞迁移没有作用^[10],对脐静脉内皮细胞迁移无作用或有抑制作用^[11, 12],而最近的两项研究又说明它有促进内皮细胞迁移的作用^[13]。本研究用 Ang^Ⅱ (10^{-9} ~ 10^{-6} mol/L)诱导脐静脉内皮细胞,发现 Ang^Ⅱ呈剂量依赖性和时间依赖性增加内皮细胞的增殖和迁移,与空白组相比 Ang^Ⅱ分别使内皮细胞增殖增加 22.9%、42.9%、57.1%和 71.4%,使迁移增加 1倍、3.17倍、7倍和 10.33倍;使增殖和迁移增加的最佳时间点都在 24 h,最佳浓度为 10^{-6} mol/L。说明 Ang^Ⅱ不仅对血管重构有影响,而且对血管内膜新生血管有作用,可能通过此途径促进 As进展。

生长素是胃颈部黏膜分泌的一种脑肠肽,除具有调节能量代谢和食欲、脂肪生成等作用外,还有许多心血管的作用。在 As斑块病变处发现有其 mRNA和蛋白的表达。生长素对 As的作用尚不十分

清楚, 目前的研究多集中于免疫炎症反应和内皮舒张功能损害对 As 形成初期的作用, 而有关内皮细胞自身活动变化导致 As 发生发展的研究报道尚不多见。研究发现抑制和促进血管新生的因素可分别减少和增加粥样硬化斑块发生率和斑块面积, 说明斑块内血管新生是 As 不断进展的关键因素。不仅如此, 新生血管的密度与动脉狭窄程度呈正相关, 其活跃时易导致斑块破裂、斑块内出血及急性冠状动脉综合征的发生。Conconi 等^[13]发现生长素抑制成纤维生长因子 2 (fibroblast growth factor-2, FGF-2) 诱导的细胞增殖和 Matrigel 血管发生, 且对抗 FGF 介导的鸡胚绒毛膜尿囊膜血管生成反应。我们的研究发现, 生长素剂量依赖性和时间依赖性地抑制 Ang[⊕] 诱导的 HUVEC 增殖和迁移。生长素可能通过影响内皮细胞增殖和迁移而抑制血管内膜病理性血管新生, 抗动脉粥样硬化。

MAPK/ERK1/2 级联通路是血管内皮细胞信号转导的重要途径。MAPK 通路与 Ang[⊕] 激活血管内皮细胞增殖有关^[14], 在血管紧张素[⊖]受体 1a (AT1 α), ERK1/2 既能被 G 蛋白又能被 β 视紫红质介导的信号途径激活。Gq 蛋白介导的激活是迅速和短暂的导致 ERK1/2 核转位, 因此导致促有丝分裂活性, 而 β 视紫红质介导的激活是延迟的细胞内小泡的激活, 因此不能导致有丝分裂的增加。而 AT1 α 具有这两种特性^[14], 所以既能促进细胞增殖, 又能导致炎症因子的分泌增加。我们的研究证明 Ang[⊕] 剂量依赖性和时间依赖性地促进内皮细胞增殖, 并与 ERK1/2 激活有关。PD98059 预处理对 Ang[⊕] 诱导的内皮细胞迁移无影响, 说明 MAPK/ERK1/2 途径与脐静脉内皮细胞迁移无关。

对生长素与 MAPK 信号途径激活, 在不同的细胞上得出不同的结论。在肾上腺细胞^[15]上通过激活酪氨酸激酶激活 Ras-RAF-MEK-MAPK 信号通路。在 3T3-L1 细胞上, 生长素通过 3 磷酸肌醇激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) 和蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 激活 Gi/o 蛋白^[16]。生长素在这些细胞中也激活 PI3K, 在肝细胞瘤细胞, 生长素通过与胰岛素受体底物 1^[17] 有关的生长因子受体结合蛋白 2 (growth factor receptor-bound protein 2, GRB2) 作用, 增加 MAPK 活性。在神经微血管内皮细胞, 生长素抑制与 FGF 有关神经微血管内皮细胞的酪氨酸激酶和 MAPK 活性^[18], 抗血管钙化。本研究证明 Ang[⊕] 促进脐静脉内皮细胞 ERK1/2 磷酸化呈时间依赖性, 10^{-7} mol/L 生长素抑制 Ang[⊕] 诱导的 ERK1/2 活化, 因此生长素可能通过抑制 ERK1/2

活化而抗脐静脉内皮细胞增殖, 并且这种作用是通过 GHSR1a 起作用, 具体激活何种分子有待进一步实验阐明。

[参考文献]

- [1] Kojima M, Hosoda H, Date Y, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach [J]. *Nature* 1999; **402** (6762): 656-660.
- [2] Enomoto M, Nagaya N, Umatsu M, et al. Cardiovascular and hormonal effects of subcutaneous administration of ghrelin, a novel growth hormone-releasing peptide, in healthy humans [J]. *Clin Sci* 2003; **105** (4): 431-435.
- [3] Nagaya N, Kojima M, Umatsu M, et al. Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers [J]. *Am J Physiol Regulatory*; 2001; **280** (5): R1483-R1487.
- [4] Nagaya N, Miyatake K, Umatsu M, et al. Hemodynamic, renal and hormonal effects of ghrelin infusion in patients with chronic heart failure [J]. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; **86** (12): 5854-5859.
- [5] Ghigo E, Arvat E, Broglio F, et al. Endocrine and nonendocrine activities of growth hormone secretagogues in humans [J]. *Horm Res* 1999; **51** (suppl 3): pp9-15.
- [6] Li WG, Gavrilu D, Liu X, et al. Ghrelin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor- κ B activation in human endothelial cells [J]. *Circulation* 2004; **109** (18): 2221-2226.
- [7] 金惠铭, 李先涛. 血管新生的调控 [J]. *中国循环*, 2001; **5** (2): 84-88.
- [8] Judith C, Shliner M, at J Daemen. Novel concepts in atherogenesis: angiogenesis and hypoxia in atherosclerosis [J]. *J Pathol* 2009; **218** (1): 7-29.
- [9] 方立, 陈美芳, 余国龙, 等. 内皮祖细胞对血管紧张素[⊖]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.
- [10] Desideri G, Bravi M, Tuccim. Angiotensin II inhibits endothelial cell motility through an AT1-dependent oxidant-sensitive decrement of nitric oxide availability [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; **23** (7): 1218-1223.
- [11] Benndorf R, Blüger RH, Ergün S. Angiotensin[⊖] type 2 receptor inhibits vascular endothelial growth factor-induced migration and in vitro tube formation of human endothelial cells [J]. *Circ Res* 2003; **93** (5): 438-447.
- [12] Montiel M, de la Blanca EP, Jimenez E. Angiotensin[⊖] induces focal adhesion kinase/paxillin phosphorylation and cell migration in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **327** (4): 971-8.
- [13] Conconi MT, Nico R, Guidolin D, et al. Ghrelin inhibits FGF-2-mediated angiogenesis in vitro and in vivo [J]. *Peptides* 2004; **25** (12): 2179-185.
- [14] Wei H, AS, Shenoy SK, KSS, Hunyady L, et al. Independent beta-arrestin 2 and G-protein-mediated pathways for angiotensin[⊖] activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 [J]. *Proc Natl Acad Sci* 2003; **100** (19): 10782-787.
- [15] Mazzocchi G, Neri G, Rucinski M, et al. Ghrelin enhances the growth of cultured human adrenal zona glomerulosa cells by exerting MAPK-mediated proliferative and antiapoptotic effects [J]. *Peptides* 2004; **25** (8): 1269-277.
- [16] Kim MS, Yoon CY, Jang PC, et al. The mitogenic and antiapoptotic actions of ghrelin in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Mol Endocrinol* 2004; **18** (9): 2291-301.
- [17] Murata M, Okimura Y, Iida K, et al. Ghrelin modulates the downstream molecules of insulin signaling in hepatoma cells [J]. *J Biol Chem* 2002; **277** (7): 5667-674.
- [18] Baiguera S, Conconi MT, Guidolin D, et al. Ghrelin inhibits in vitro angiogenic activity of rat brain microvascular endothelial cells [J]. *Int J Mol Med* 2004; **14** (5): 849-854.

(此文编辑 许雪梅)