

小凹蛋白 1 上调人脐静脉内皮细胞钙敏感受体介导一氧化氮合酶激活的机制

罗小林^{1,2}, 钟 华^{1,2}, 梁 霄^{1,2}, 王振焕^{1,2}, 龚 艳^{1,2}, 邓峰美^{1,2}, 孙志萍³, 何 芳^{1,2}
(新疆石河子大学医学院 1. 新疆地方与民族高发病教育部重点实验室,
2. 病理生理教研室, 3. 医学机能实验中心, 新疆石河子市 832002)

[关键词] 小凹蛋白 1; 内皮型一氧化氮合酶; 钙敏感受体; 人脐静脉内皮细胞

[摘 要] 目的 探讨小凹蛋白 1(Cav-1)上调人脐静脉内皮细胞钙敏感受体介导内皮型一氧化氮合酶(eNOS)激活的作用机制。方法 培养人脐静脉内皮细胞,取同代细胞随机分为:(1)对照组;(2)钙敏感受体激动剂精胺(2.0 mmol/L) + Ca²⁺ 组;(3)Caveolae 结构破坏剂(Filipin, 1.5 mg/L) + 精胺 + Ca²⁺ 组;(4)Cav-1 ShRNA + 精胺 + Ca²⁺ 组;(5)空质粒 + 精胺 + Ca²⁺ 组;(6)Filipin 不同浓度(1.5、2.0、2.5 mg/L)组。免疫印迹检测人脐静脉内皮细胞中 eNOS 和磷酸化 eNOS (p-eNOS)、Cav-1 以及 eNOS 膜蛋白表达;免疫荧光和免疫共沉淀技术检测 Cav-1 和 eNOS 表达、共定位以及相互作用。结果 不同浓度 Filipin 不影响 eNOS 和 p-eNOS 蛋白表达($P>0.05$);精胺作用下细胞内 p-eNOS 表达增加($P<0.05$),此作用可被 Filipin(1.5 mg/L)或 Cav-1 基因沉默完全阻断($P<0.05$);Filipin(1.5 mg/L)或 Cav-1 干扰处理后,eNOS 的膜蛋白表达减少($P<0.05$),eNOS 的蛋白表达无变化($P>0.05$);免疫荧光双标显示 Filipin(1.5 mg/L)或 Cav-1 基因沉默后 eNOS 在小凹定位减少,核周边局部区域聚集增多。与对照组和精胺 + Ca²⁺ 组比较,Cav-1 ShRNA 处理组 Cav-1 和 eNOS 相互作用减弱($P<0.05$),其他处理组间的相互作用无统计学意义($P>0.05$)。结论 人脐静脉内皮细胞中 Cav-1 上调钙敏感受体介导 eNOS 激活作用机制可能与 Cav-1 影响 eNOS 质膜定位及抑制 eNOS 向细胞器转位有关。

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Mechanisms of Caveolin-1 Up-regulating the Extracellular Ca²⁺-Sensing Receptor Mediated Endothelial Nitric Oxide Synthetase Activation in Human Umbilical Vein Endothelial Cells

LUO Xiao-Lin^{1,2}, ZHONG Hua^{1,2}, LIANG Xiao^{1,2}, WANG Zhen-Huan^{1,2}, GONG Yan^{1,2}, DENG Feng-Mei^{1,2}, SUN Zhi-Ping³, and HE Fang^{1,2}

(1. Key Laboratory of Education Ministry of Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases, 2. Department of Pathophysiology, 3. Centre of Medical Functial Experiments, Medical College of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832002, China)

[KEY WORDS] Caveolin-1; Endothelial Nitric Oxide Synthetase; Calcium-sensing Receptor; Human Umbilical Vein Endothelial Cells

[ABSTRACT] **Aim** To study the mechanisms of caveolin-1 (Cav-1) up-regulating the extracellular Ca²⁺-sensing receptor (CaR)-induced endothelial nitric oxide synthetase (eNOS) activation in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods** Cultured HUVECs, the same generation of cells were randomly divided into: (1) control group; (2) CaR agonist (spermine, 2.0 mmol/L) + Ca²⁺ group; (3) caveolae structural damage (filipin, 1.5 mg/L) + spermine + Ca²⁺ group; (4) Cav-1 short hairpin RNA (Cav-1 ShRNA) + spermine + Ca²⁺ group; (5) vehicle + spermine + Ca²⁺ group; (6) different concentrations (1.5, 2.0, 2.5 mg/L) filipin groups. Western blotting experiments were performed to detect protein expression of Cav-1, eNOS, phosphorylated eNOS (p-eNOS) and expressions of Cav-1 and eNOS membrane proteins. The interaction and co-localization between eNOS and Cav-1 were determined using co-immunoprec-

ipitates and immunofluorescence analysis, respectively. **Results** Different concentrations filipin did not influence the expression of eNOS and p-eNOS protein in HUVECs. In the presence of Ca^{2+} , the CaR agonist spermine at concentration of 2.0 mmol/L resulted in an increase in the p-eNOS in HUVECs ($P < 0.05$), the effect of spermine on the increase of p-eNOS was also completely blocked after acute caveolae disruption with filipin (1.5 mg/L) or transfected with Cav-1 ShRNA ($P < 0.05$). The expression of the eNOS membrane protein was decreased in HUVECs after cells were treated by filipin (1.5 mg/L) or transfected with Cav-1 ShRNA. Simultaneously, total protein level of eNOS was unaffected. Immunocytochemical results demonstrated that filipin (1.5 mg/L) or transfected with Cav-1 ShRNA decreased eNOS localization in caveolae, increased in the local area surrounding the nucleus. Compared with control group and spermine + Ca^{2+} group, the interaction of eNOS and Cav-1 in Cav-1 ShRNA group was attenuated ($P < 0.05$). **Conclusions** Cav-1 might promote CaR-induced eNOS activation. The mechanisms are involved in the effect of Cav-1 on eNOS localization at the plasma membrane and the inhibition of eNOS translocation to the organelles.

内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 通过促使一氧化氮 (nitric oxide, NO) 的合成,在维持血管张力从而调节血压等方面发挥重要作用。在血管内皮细胞, eNOS 主要富集于细胞膜小凹和高尔基复合体。小凹蛋白 1 (caveolin-1, Cav-1) 作为小凹表面标志蛋白和结构蛋白之一,其氨基酸序列的 N 端脚手架区能直接与多种信号分子上存在的共同特异性序列结合,调控这些信号分子的活性状态。如 Cav-1 有将 eNOS 锚定到小凹的作用,因而限制了 eNOS 易位和磷酸化^[1]。Cav-1 作为 eNOS 的负调控蛋白,也是与钙敏感受体 (Ca^{2+} -sensing receptor, CaR) 相互作用蛋白之一。CaR 属于 G 蛋白偶联受体 C 家族的 II 型受体,该受体激活后经磷脂酶 C 途径使 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高,是介导胞内 Ca^{2+} 释放和胞外 Ca^{2+} 内流的重要受体之一^[2]; 在人的主动脉血管内皮细胞, Ziegelstein 等证实了一个功能性的 CaR 表达,在 CaR 激动剂精胺的刺激下可引起 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增加和 NO 生成^[3]。

如上所述, Ca^{2+} 为激活 eNOS 生成 NO 的重要辅助因子,而在血管内皮细胞 Cav-1 是介导 Ca^{2+} 内流的重要的支架蛋白,同时又是 eNOS 的负调控蛋白。本课题组前期研究发现人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 有 CaR 和 Cav-1 表达,两者共定位于膜上, Cav-1 对 CaR 介导 eNOS 激活及 NO 生成有上调作用,并从 Cav-1 影响 CaR 膜定位及对激动剂反应性角度部分解释了 Cav-1 上调 CaR 介导 NO 生成的作用机制^[4]。本研究拟在前期研究基础上,以原代培养的 HUVECs 为研究对象,探讨 CaR 激动剂精胺和小凹结构破坏剂 (Filipin) 或 Cav-1 基因沉默后对 HUVECs 中 eNOS、磷酸化一氧化氮合酶 (phosphorated eNOS, p-eNOS) 蛋白及 eNOS 膜蛋白表达和 Cav-1/eNOS 相互作用的影响,试图进一步阐明 Cav-1 上调 CaR 介导 NO 生成

的作用机制,为心脑血管疾病防治提供新思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料、试剂、仪器

脐带来自华中科技大学同济医学院附属同济医院剖宫产健康产妇,经伦理道德委员会批准和个人知情同意。M199 (Thermo 公司), 胰酶 (Sigma 公司), ECM (Sciencellg 公司), Filipin (Sigma 公司), 精胺 (Sigma 公司), Cav-1 一抗 (Cell Signaling 公司, Santa Cruz 公司), eNOS 一抗 (Santa Cruz 公司), β -actin (Santa Cruz 公司), p-eNOS 一抗 (Santa Cruz 公司), 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的羊抗兔及四乙基若丹明异硫氰酸盐 (tetraethyl rhodamine isothiocyanate, TRITC) 标记的羊抗小鼠二抗 (Immunology Consultants Laboratory), Protein A agarose (Santa Cruz 公司), ECL 发光试剂盒 (Thermo 公司), Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen 公司), Cav-1 ShRNA 质粒 (上海吉凯公司), G418 (Biosharp 公司)。倒置荧光显微镜 (Olympus IX-70 型, 日本), 激光共聚焦显微镜 (Olympus FV300 型, 日本)。

1.2 HUVECs 的培养与鉴定

依据本研究室以前的研究方法培养 HUVECs^[4], 倒置显微镜下进行细胞形态学观察, 呈典型铺路石或鹅卵石样排列, 以及对细胞内 VIII 因子进行免疫细胞化学染色鉴定是否为 HUVECs。取 2~5 代细胞用于实验。

1.3 实验分组

按照以下方式分组处理, 试剂从自制的细胞培养皿盖的一孔注入, 另一孔输出, 从而实现持续灌流 20 min, 其中细胞外含钙离子组用含 2 mmol/L Ca^{2+} 的 Hank's 平衡盐溶液 (Hank's buffer solution, HBS) 将药物配制成不同浓度灌流, 分组如下: (1) 对照组;

(2) 钙敏感受体激动剂精胺(2.0 mmol/L) + Ca^{2+} 组;
(3) Caveolae 结构破坏剂 Filipin(1.5 mg/L) + 精胺 + Ca^{2+} 组;(4) Cav-1 ShRNA 组:转染靶向 Cav-1 基因的 siRNA;(5) Vehicle 组:转染空质粒;转染后的细胞按(2)组方式处理;(6) Filipin 不同浓度(1.5、2.0、2.5 mg/L)组。按照下述方法检测相应指标。

1.4 质粒转化及转染

本实验质粒为上海吉凯基因化学技术有限公司构建 pGCSi-U6/Neo/DsRed 重组质粒,该质粒经测序证实了克隆的 RNAi 打靶序列 100% 正确。热激法转化:制备选择性培养基平板;按每 0.1 μmL 感受态细胞中加入约 2 ng 质粒 DNA;挑选单克隆菌落,摇菌,用质粒提取试剂盒提取并检测质粒 DNA 浓度。转染:待细胞生长至 70% ~ 90% 融合度时,按照 Lipofectamine™2000(Invitrogen 公司)说明书操作步骤进行转染。瞬时转染 48 h 后,荧光显微镜下观察红色荧光,加入 G418(200 mg/L)进行筛选,待未表达抗性基因的细胞被杀死后,将 G418 改为 100 mg/L 维持 1 周。

1.5 免疫印迹检测 HUVECs 中 Cav-1、eNOS 和 p-eNOS 蛋白表达

吸弃培养基后,用预冷的 PBS 冲洗 2 遍,加入含 1% Cocktail 的裂解液,提取细胞浆蛋白和膜蛋白,BCA 法测定蛋白浓度后定量,电泳,湿转,封闭 1 h,分别加入 Cav-1(1:1 000)、eNOS(1:1 000)和 p-eNOS(1:400)的一抗,孵育过夜。次日,用 TBST 洗膜 3 次,每次 15 min。加入相应的二抗(1:1 000),摇床上孵育 2 h,TBST 洗膜 4 次,每次 15 min;ECL 化学发光试剂显色,显影定影处理,获得实验结果。

1.6 膜蛋白提取及免疫印迹检测 eNOS 和 Cav-1 膜蛋白表达

细胞按上述分组处理后,用预冷的 PBS 冲洗细胞 3 次,收集于含蛋白酶抑制剂的 Tris 缓冲液(pH 7.4)中。剧烈振荡破碎后,在 4℃ 条件下,800 g 离心力离心 10 min,将上清转移至新 EP 管中重复上述离心 1 次,收集上清,BCA 方法定量,4℃ 条件下,30 000 g 离心力离心 45 min。弃上清,取沉淀溶于 Tris 缓冲液中,再次 30 000 g 离心力离心 45 min。弃上清,取沉淀。BCA 方法定量,100℃ 加热 10 min,10% SDS-PAGE 电泳,湿转。

1.7 免疫荧光检测 HUVECs 中 Cav-1 与 eNOS 蛋白表达及两者共定位

细胞接种于玻片上孵育 24 h 后,用 PBS 溶液洗 3 次,冰甲醇 -20℃ 固定 20 min。用含 0.2% Triton 的 PBS 洗两次,加入含 0.5% Triton 的 PBS 室温下破

膜 15 min,含 0.2% Triton 的 PBS 洗 5 min,重复 3 次。5% BSA-PBS 封闭 40 min。保持湿度,加一抗,4℃ 孵育过夜。次日加二抗,室温避光孵育 1 h,含 0.2% Triton 的 PBS 洗 3 次,每次 5 min。加核染料 DAPI(1:500)室温避光孵育 6 min,含 0.2% Triton 的 PBS 洗 5 min,荧光显微镜下观察并记录结果。用 PBS 代替一抗做阴性对照,以上实验重复 3 次。

1.8 免疫共沉淀检测 HUVECs 中 Cav-1 与 eNOS 蛋白相互作用

细胞刮刀法收集处理后的细胞,用适用于免疫共沉淀(co-immunoprecipitate,CO-IP)的裂解缓冲液裂解细胞,在 4℃ 条件下 12 000 g 离心力离心 10 min,上清转移至新管中,分别加入 Protein A agrose 10 μL 预清洗后,BCA 方法定量,加入一抗,在 4℃ 条件下垂直混匀过夜,次日加 Protein A beads,4℃ 混匀 2 h,500 g 离心力离心 2 min,弃上清,珠子用裂解缓冲液洗涤 5 次后,用 20 μL 的加样缓冲液重悬,100℃ 加热 10 min。

1.9 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析,均数间的比较采用 *t* 检验。所有数据采用 SPSS 13.0 统计软件包进行分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HUVECs 的培养与鉴定

原代培养的 HUVECs 贴壁后,倒置显微镜下观察其形态呈典型的铺路石或鹅卵石样排列;对细胞内 VIII 因子进行免疫细胞化学染色,95% 以上的细胞呈阳性着色,胞浆内有棕黄色颗粒,证实细胞为 HUVECs。

2.2 小凹结构破坏对 HUVECs 中 eNOS 和 p-eNOS 蛋白表达影响

HUVECs 经不同浓度 Filipin 处理 6 h 后提取 HUVECs 的蛋白,采用免疫印迹检测各蛋白表达。结果显示对照组和 1.5、2.0、2.5 mg/L Filipin 组中 eNOS 蛋白表达相对值分别为 0.68 ± 0.15 和 0.63 ± 0.15 、 0.64 ± 0.12 、 0.63 ± 0.10 ,p-eNOS 蛋白表达相对值分别为 0.53 ± 0.08 和 0.47 ± 0.04 、 0.51 ± 0.07 、 0.46 ± 0.02 。各加药组与对照组相比,均无统计学意义($P > 0.05$;图 1)。

2.3 不同处理因素刺激下 HUVECs 中 Cav-1、eNOS 和 p-eNOS 蛋白表达

转染 48 h 后用 G418(200 mg/L)进行筛选 7 天

后提取 HUVECs 的蛋白,与对照组比较,免疫印迹检测结果显示精胺 + Ca^{2+} 组和 Vehicle + 精胺 + Ca^{2+} 组中 p-eNOS 蛋白表达增加 ($P < 0.05$);Filipin 或 Cav-1 干扰处理后,p-eNOS 蛋白表达较对照组和精胺 + Ca^{2+} 组减少 ($P < 0.05$);Cav-1 蛋白表达除 Cav-1 ShRNA 组较对照组和精胺 + Ca^{2+} 组降低 ($P < 0.05$)外,其余各组 Cav-1 和 eNOS 蛋白表达均无差异 ($P > 0.05$) (图 2)。

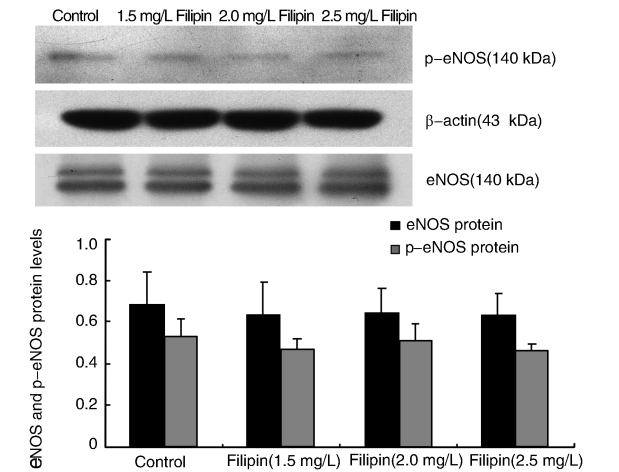


图 1. 不同浓度 Filipin 对 HUVECs 中 eNOS 和 p-eNOS 蛋白表达影响

Figure 1. Effects of different concentrations filipin on the expression of eNOS and p-eNOS protein in HUVECs

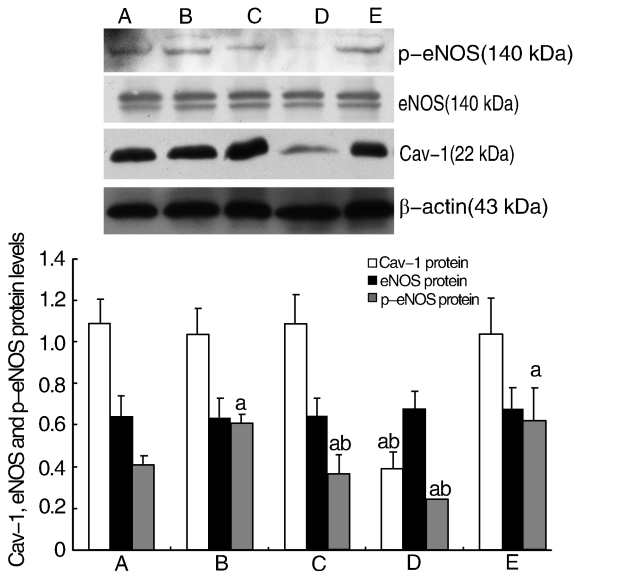


图 2. 不同处理组 HUVECs 中 eNOS 和 p-eNOS 蛋白表达

A 为对照组,B 为精胺 + Ca^{2+} 组,C 为 Filipin + 精胺 + Ca^{2+} 组,D 为 Cav-1 ShRNA + 精胺 + Ca^{2+} 组,E 为 Vehicle + 精胺 + Ca^{2+} 组。a 为 $P < 0.05$,与对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与精胺 + Ca^{2+} 组比较。

Figure 2. Effects of different treatments on the expression of eNOS and p-eNOS protein in HUVECs

2.4 不同处理因素刺激下 HUVECs 内 eNOS 膜蛋白的变化

采用免疫印迹技术检测 Cav-1 和 eNOS 膜上的表达情况,结果显示:胞浆蛋白 β -actin 没有表达,而细胞膜标志蛋白转铁蛋白受体 (transferrin receptor, TfR) 有较多表达,可证实所提为膜蛋白成分。以各处理组 Cav-1 和 eNOS 蛋白灰度值分别与对照组 Cav-1 和 eNOS 蛋白灰度值相对比值的百分数表示蛋白相对表达,结果显示:同对照组和精胺 + Ca^{2+} 组比较,Filipin 或 Cav-1 干扰处理后,Cav-1 膜蛋白和 eNOS 膜蛋白表达均减少 ($P < 0.05$;图 3)。

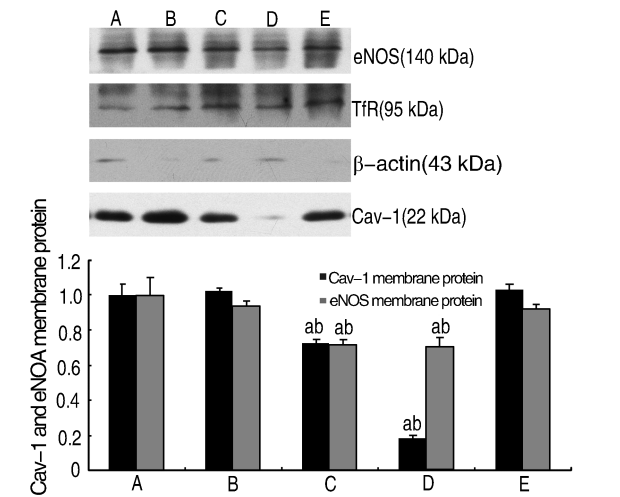


图 3. 不同处理因素刺激下 HUVECs 中 Cav-1 和 eNOS 膜蛋白表达

A 为对照组,B 为精胺 + Ca^{2+} 组,C 为 Filipin + 精胺 + Ca^{2+} 组,D 为 Cav-1 ShRNA + 精胺 + Ca^{2+} 组,E 为 Vehicle + 精胺 + Ca^{2+} 组。a 为 $P < 0.05$,与对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与精胺 + Ca^{2+} 组比较。

Figure 3. Expressions of Cav-1 and eNOS membrane proteins after different treatments in HUVECs

2.5 免疫细胞化学技术检测不同处理因素刺激下 HUVECs 中 Cav-1 和 eNOS 蛋白表达及共定位

共聚焦荧光显微镜下观察荧光,蓝色荧光为细胞核 DNA 染料 (DAPI) 阳性着色,红色荧光为 Cav-1 的阳性着色,主要定位于胞膜,绿色荧光为 eNOS 的阳性着色,主要定位于胞膜和胞浆,橙色荧光为两者的合成荧光,主要定位于胞膜;可见 HUVECs 中 Cav-1 与 eNOS 蛋白表达呈阳性,两者共定位于细胞膜上。HUVECs 经不同处理后观察到的荧光,C4 显示细胞经 Filipin + 精胺 + Ca^{2+} 刺激后,Cav-1 膜上定位减少,与 eNOS 在核周局部区域聚集明显增多,D3 显示细胞 Cav-1 干扰后,eNOS 较多在核周局部区域聚集 (图 4)。

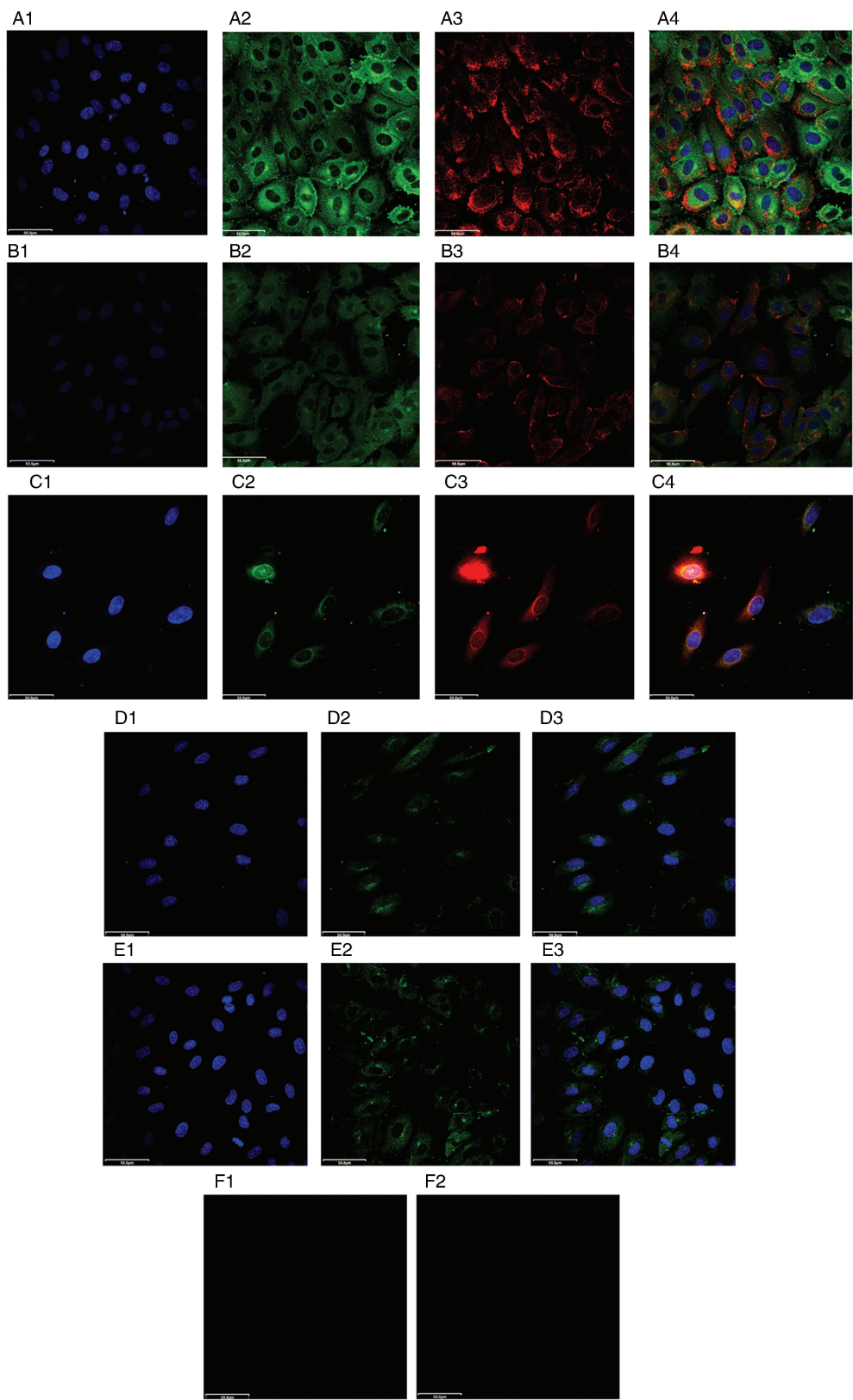


图 4. 免疫细胞化学技术检测 HUVECs 中 Cav-1 和 eNOS 蛋白表达及共定位 (荧光显微镜, $\times 60$) A1 ~ A4 为对照组, B1 ~ B4 为精胺 + Ca^{2+} 组, C1 ~ C4 为 Filipin + 精胺 + Ca^{2+} 组, D1 ~ D3 为 Cav-1 ShRNA + 精胺 + Ca^{2+} 组, E1 ~ E3 为 Vehicle + 精胺 + Ca^{2+} 组, F1 为空白对照组, F2 为阴性对照组。

Figure 4. Expressions of Cav-1 and eNOS proteins and their co-localization in HUVECs were detected by immunocytochemical technique (fluorescence microscope, $\times 60$)

2.6 不同处理因素刺激下对 HUVECs 内 Cav-1 和 eNOS 相互作用的影响

正向 Co-IP 用 Cav-1 抗体做一抗,反向 Co-IP 用 eNOS 抗体做一抗,免疫共沉淀步骤按“1.8”项。用免疫印迹技术检测到 Cav-1 和 eNOS 的相互作用,结果用各处理组正向 eNOS/Cav-1 或反向 Cav-1/eNOS 分别与静息状态下的正向 eNOS/Cav-1 或反向 Cav-1/eNOS 的相对比值的百分数表示 eNOS 和 Cav-1 相互作用强弱。与对照组和精胺 + Ca^{2+} 组比较,Cav-1 shRNA 处理组 Cav-1 和 eNOS 相互作用减弱($P < 0.05$),其他处理组间的相互作用无统计学意义($P > 0.05$)(图 5)。

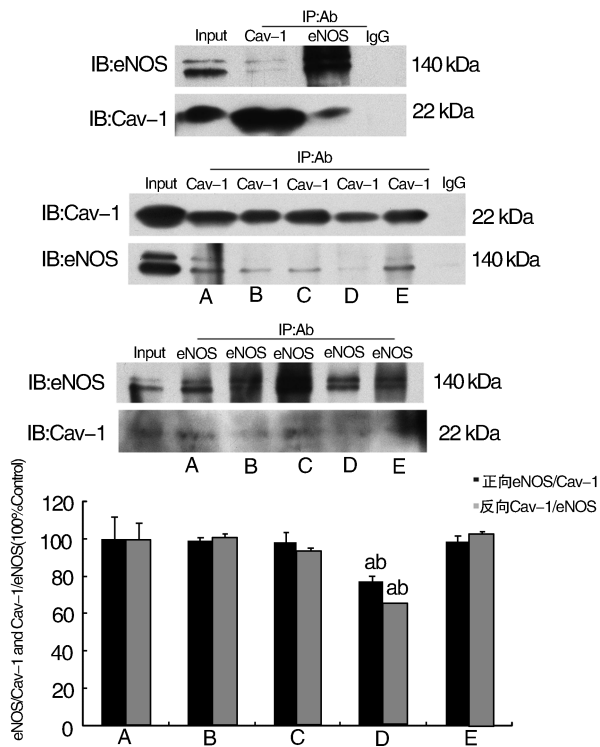


图 5. 不同处理因素刺激下 HUVECs 中 Cav-1 和 eNOS 相互作用 A 为对照组, B 为精胺 + Ca^{2+} 组, C 为 Filipin + 精胺 + Ca^{2+} 组, D 为 Cav-1 ShRNA + 精胺 + Ca^{2+} 组, E 为 Vehicle + 精胺 + Ca^{2+} 组。a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与精胺 + Ca^{2+} 组比较。

Figure 5. The interaction of Cav-1 and eNOS proteins after different treatments in HUVECs

3 讨论

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增加是促进 eNOS 激活和 NO 生成重要因素之一,已有研究表明许多 G 蛋白偶联受体激动剂如乙酰胆碱和缓激肽等亦可通过 Ca^{2+} 依赖的机制刺激内皮细胞产生 NO。本课题组前期亦证实,在 HUVECs,精胺激活 G 蛋白偶联受体 CaR 介导持

续 Ca^{2+} 内流亦是 NO 生成所必须的,但作为与 CaR 相互作用蛋白之一的 Cav-1 可下调 CaR 激活引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增加^[5],对 CaR 介导的 eNOS 激活和 NO 生成却有促进作用^[4]。本研究亦在细胞外有钙的情况下(作为外钙来源,模拟 CaR 激活介导外钙内流),给予精胺刺激,与对照组相比,虽然 HUVECs 内 eNOS 蛋白表达无变化,但 p-eNOS 表达增加, Cav-1 干扰或小凹结构破坏剂 Filipin(能破坏小凹的主要脂质成分胆固醇和磷脂,影响 Cav-1 功能,但对细胞膜的完整性无影响^[6])处理后,在不影响 eNOS 表达的情况下却降低了反应 eNOS 活化状态的 p-eNOS 表达,这与我们前期按照上述同样方式处理后 HUVECs 内 eNOS 活性与 NO 含量变化趋势一致^[4],进一步佐证了 Cav-1 对 CaR 介导的 eNOS 激活和 NO 生成的促进作用。这与 Neetu 等^[7]研究结果一致。该研究在 17β -雌二醇介导的信号途径中发现, Cav-1 过度表达引起 NO 生成增加, Cav-1 敲除或 Y14F 突变体过度表达则使 NO 生成减少,也提示 Cav-1 对 eNOS 负调控作用和 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化并不能完全解释 Cav-1 与 eNOS 活性的作用关系。

Cav-1 调节 NO 生成的机制十分复杂, eNOS 在质膜上正确定位及在各种亚细胞器内的分布定位是影响 eNOS 激活和 NO 生成重要因素之一,在细胞膜上, eNOS 与小凹微区相关。其它研究也发现在完整的细胞, eNOS 棕榈酰化缺失突变体的 eNOS 由于未能正确定位于 PM 使得 NO 产生较少,而质膜上 eNOS 具有最高的活性^[8]。研究还表明,位于细胞内的高尔基体的 eNOS 也能表现出酶的活性,产生出 NO 作为 NO 总产量的一部分,但如 eNOS 定位在细胞核或线粒体基质内,则会大大降低其产生 NO 能力^[9]。此外,决定 eNOS 位置的另一个重要因素是质膜胆固醇的含量,棕榈酰化 eNOS 蛋白可通过胆固醇依赖的方式与小凹相联系,胆固醇平衡障碍能影响内皮细胞内 eNOS 在内皮细胞的定位。在短期氧化低密度脂蛋白孵育的猪动脉内皮细胞,质膜胆固醇含量降低,引起质膜的 eNOS 减少,这可能与小凹解体有关^[10]。因此,为进一步探讨 Cav-1 对 CaR 上述功能的促进作用机制是否与影响 eNOS 膜定位或转位有关,我们提取细胞膜蛋白,结果显示不同处理因素作用后,除 Filipin 或 Cav-1 干扰组 Cav-1 表达明显减少外,各组间 Cav-1 和 eNOS 蛋白表达没有差异。Cav-1 并非是很强的可调节蛋白, Cav-1 的表达直接与膜上小凹数目相关^[11],所以 Filipin 处理使胆固醇和磷脂破坏可通过减少细胞膜

上小凹的数目而使 Cav-1 膜蛋白的表达水平降低。值得注意的是, Filipin 处理或 Cav-1 基因干扰可明显抑制 eNOS 膜蛋白表达。免疫荧光双标显示: HU-VECs 中 Cav-1 和 eNOS 共定位于同一含 Cav-1 的质膜上, Filipin 处理或 Cav-1 干扰后质膜上 Cav-1 表达减少的同时胞核周围 eNOS 和 Cav-1 的富集明显增多。结合上述小凹结构破坏或 Cav-1 基因干扰后 Cav-1 和 eNOS 膜蛋白表达减少结果, 我们认为 Cav-1 是 eNOS 膜上正确定位重要伴侣蛋白, 是 eNOS 在质膜分布的决定因素, 其影响 eNOS 在细胞内不同分布。由于小凹结构破坏或 Cav-1 基因干扰导致胆固醇平衡障碍或抑制了 Cav-1 膜定位, 最终影响 eNOS 在 HUVECs 膜上正确定位, 并促使 eNOS 和 Cav-1 转位至其他亚细胞器(如线粒体、细胞核等), 大大降低其产生 NO 能力。

同样值得注意的是, 现有的文献表明, Cav-1 对转录后 eNOS 活性的调控可以运用两个独立的模式, Cav-1 可以使 eNOS 富集于质膜的小凹, 将酶空间隔离使其可达到最佳活化(空间隔离效应)^[8], 然而, Cav-1 和 eNOS 之间的直接作用则使酶处于失活状态(限制效应)^[12]。我们上述研究中已经证实 Cav-1 和 eNOS 共定位于同一 PM 区, 故在本研究中用免疫共沉淀的方法进一步检测两者在 HUVEC 中的相互作用。结果显示正向和反向 CO-IP 都能检测到 Cav-1 和 eNOS 的表达, 表明在静息状态下 Cav-1 和 eNOS 在 HUVECs 中存在相互作用。用 RNAi 技术沉默 Cav-1 基因, 在保证 Cav-1 基因干扰效率前提下, Cav-1 和 eNOS 相互作用明显减弱, 但却减少了 CaR 介导的 eNOS 激活和 NO 生成。显然这不能用 Cav-1 对 eNOS 限制效应进行解释, 可能在 Cav-1 调节 CaR 介导的 eNOS 激活和 NO 生成过程中, Cav-1 对 eNOS 空间隔离效应更为重要。

通过上述一系列实验, 我们证实在 HUVECs 中 Cav-1 上调 CaR 介导 NO 生成作用机制可能与 Cav-1 影响 eNOS 质膜定位及抑制 eNOS 向线粒体、细胞核等细胞器转位有关。以往对 CaR 介导的生理及病理生理作用及机制研究大多围绕 Gq 等信号通路, 与 CaR 相互作用蛋白对 CaR 功能调节作用和机制的研究涉及甚少。然而, 我们的研究结果表明, Cav-1 在 CaR 介导 NO 生成中起积极作用, 提示 Cav-1 调节 NO 生成机制的复杂性。由于在血管系统中 CaR 可通过增加 $[Ca^{2+}]_i$ 调节 NO 的释放和钾

通道激活, 在调节血管张力及高血压、动脉粥样硬化等心血管疾病的发生发展中起着重要的作用, 故本课题研究从与 CaR 相互作用蛋白角度探讨 CaR 的作用和机制, 可为心血管疾病的防治提供一个新的途径。

[参考文献]

[1] Batova S, DeWever J, Godfraind T, et al. The calcium channel blocker amlodipine promotes the unclamping of eNOS from caveolin in endothelial cells[J]. Cardiovasc Res, 2006, 71(3): 478-485.

[2] Brown EM, Gamba G, Riccardi D, et al. Cloning and characterization of an extracellular Ca^{2+} -sensing receptor from bovine parathyroid[J]. Nature, 1993, 366(6455): 575-580.

[3] Ziegelstein RC, Xiong Y, He C, et al. Expression of a functional extracellular calcium-sensing receptor in human aortic endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 342(1): 153-163.

[4] 王振焕, 胡清华, 钟华, 等. 小凹蛋白 1 在脐静脉内皮细胞 CaR 介导 NO 生成中的作用和机制[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(5): 934-938.

[5] 王振焕, 胡清华, 钟华, 等. 小凹蛋白 1 下调人脐静脉内皮细胞外钙敏感受体介导的钙内流[J]. 生理学报, 2011, 63(1): 39-47.

[6] Galan C, Woodard GE, Dionisio N, et al. Lipid rafts modulate the activation but not the maintenance of store-operated Ca^{2+} entry[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1803(9): 1 083-093.

[7] Sud N, Wiseman DA, Black SM. Caveolin-1 is required for the activation of endothelial nitric oxide synthase in response to 17β -estradiol[J]. Mol Endocrinol, 2010, 24(8): 1 637-649.

[8] Garcia-Cardena G, Oh P, Liu J, et al. Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(13): 6 448-453.

[9] Jagnandan D, Sessa WC, Fulton D. Intracellular location regulates calcium-calmodulin-dependent activation of organelle-restricted eNOS[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2005, 289(4): 1 024-033.

[10] Blair A, Shaul PW, Yuhanna IS, et al. Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation[J]. J Biol Chem, 1999, 274(45): 32 512-519.

[11] Meze C, Schumann J, Wagner A, et al. Effects of homocysteine on the levels of caveolin-1 and eNOS in caveolae of human coronary artery endothelial cells[J]. Atherosclerosis, 2007, 190(2): 256-263.

[12] Feron O, Saldana F, Michel JB, et al. The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle[J]. J Biol Chem, 1998, 273(6): 3 125-128.

(此文编辑 曾学清)