

ADAM17 调控 CGRP 对血管紧张素 II 诱导的血管平滑肌细胞增殖的抑制效应

曾泗宇¹, 洪陈亮², 兰树敏¹, 卢慧勤¹, 陈燕¹, 严秋江³, 秦旭平²

(1.广东省第二人民医院药物临床试验基地,广东省广州市 510317;2.南华大学药物药理研究所,湖南省衡阳市 421001;3.广州医科大学附属第三医院心胸外科,广东省广州市 510000)

[关键词] 肿瘤坏死因子 α 转化酶; 降钙素基因相关肽; 细胞增殖; 血管平滑肌细胞; 血管紧张素 II

[摘要] **目的** 阐明肿瘤坏死因子 α 转化酶(ADAM17)调控降钙素基因相关肽(CGRP)的抗血管平滑肌细胞(VSMC)增殖效应。**方法** 以大鼠源性胸主动脉平滑肌细胞株(A10VSMC)为研究对象,采用 RNA 干扰抑制 ADAM17 表达;采用蛋白质免疫印迹和实时定量 PCR 检测蛋白和 mRNA 表达水平;采用噻唑蓝比色法评估细胞活性。**结果** CGRP 显著抑制血管紧张素 II 介导的 VSMC 增殖。血管紧张素 II 刺激 24 h 后,VSMC 中 ADAM17 表达显著增加。CGRP 预处理 30 min 能显著降低 VSMC 中 ADAM17 表达,而 CGRP 受体拮抗剂 CGRP8-37 可抑制或逆转上述效应。ADAM17 RNA 干扰可显著抑制血管紧张素 II 介导的 VSMC 增殖。**结论** 降低 ADAM17 表达可能是 CGRP 抑制血管紧张素 II 介导的 VSMC 增殖效应的机制。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

ADAM17 regulates inhibitory effect of CGRP on angiotensin II-induced proliferation of vascular smooth muscle cells

ZENG Si-Yu¹, HONG Chen-Liang², LAN Shu-Min¹, LU Hui-Qin¹, CHEN Yan¹, YAN Qiu-Jiang³, QIN Xu-Ping²

(1.Department of Drug Clinical Trial, Second People's Hospital of Guangdong Province, Guangzhou, Guangdong 510317, China; 2.Institute of Drug and Pharmacology, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 3.Department of Cardiothoracic Surgery, Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510000, China)

[KEY WORDS] A disintegrin and metalloproteinase 17; Calcitonin gene-related peptide; Cell proliferation; Vascular smooth muscle cell; Angiotensin II

[ABSTRACT] **Aim** To explore a disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17) regulating the protective effect of calcitonin gene-related peptide (CGRP) against proliferation of vascular smooth muscle cell (VSMC) and its mechanism.

Methods The rat thoracic aortic smooth muscle cell line (A10VSMC) was used as the object of study. RNA interference was adopted to reduce ADAM17 expression. Western blot and real-time quantitative PCR were used to detect the expression levels of protein and mRNA. Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide assay was used to evaluate cell viability of VSMC.

Results CGRP could markedly attenuate angiotensin II-induced VSMC proliferation. There were significant increases in expression levels of ADAM17 protein and mRNA in VSMC stimulated with angiotensin II for 24 hours. Pretreatment with CGRP for 30 minutes significantly reduced the expression levels of ADAM17 protein and mRNA, whereas the effects could be reversed by CGRP receptor antagonist CGRP8-37. The results of RNA interference showed that ADAM17 siRNA significantly inhibited angiotensin II-mediated VSMC proliferation.

Conclusion The reduction of ADAM17 expression may be the mechanism by which CGRP inhibits angiotensin II-mediated VSMC proliferation.

《中国心血管病报告 2015》^[1]指出:2015 年 6 月 30 日国务院新闻办发布 2012 年国民营养与慢性

[收稿日期] 2017-04-18

[修回日期] 2017-06-13

[基金项目] 广东省自然科学基金(2015A030310076);广东省科技计划(2016A020226005);广东省医学基金(A2014159)

[作者简介] 曾泗宇,博士,主管药师,研究方向为心血管药理学,E-mail 为 cosmo81@qq.com。通讯作者秦旭平,博士,教授,研究方向为心血管药理学,E-mail 为 qinxp333@hotmail.com。

病状况调查报告,中国 18 岁及以上居民高血压患病率为 25.2%,根据 2010 年第六次全国人口普查数据测算患病人数为 2.7 亿。血管重构是高血压发生、发展的重要的病理学基础和病因。病理条件下过度表达的血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 作用于 Ang II 1 型受体后,可引起血管收缩,平滑肌细胞增殖、肥大、凋亡、迁移以及细胞外基质的沉积,从而介导血管重构。降钙素基因相关肽 (calcitonin gene-related peptide, CGRP) 是由 37 个氨基酸组成的活性肽,主要分布于中枢神经系统和心血管系统,具有强效的心血管保护作用。我们的前期研究表明,CGRP 可抑制 Ang II 介导的血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 增殖^[2-3]。CGRP 抗 VSMC 增殖的机理非常复杂,涉及氧化应激、Caveolae/Caveolin-1 以及 ERK1/2 和 P38MAPK 信号通路^[3-6],但 CGRP 抗 VSMC 增殖的调控网络目前尚未阐述清楚。因此,深入研究发现该网络的重要蛋白,将有助于为血管重构和高血压的新药研发提供新靶点。

肿瘤坏死因子 α 转化酶 (a disintegrin and metalloproteinase 17, ADAM17) 能调控细胞相互作用 (如细胞黏附和聚集)、细胞信号通路以及重要的细胞因子、细胞因子受体和其他靶标因子的水解活化。ADAM17 的功能多样性特点提示其可能是生物体内信号网络的重要调控蛋白。ADAM17 促进 Ang II 诱导的高血压小鼠 VSMC 增生、肥大,从而介导血管重构^[7]。体外实验表明 ADAM17 参与 Ang II 介导的 VSMC 增殖^[8]。目前尚未阐明 ADAM17 与 CGRP 抗 VSMC 增殖的关系。本研究拟揭示 CGRP 通过降低 ADAM17 表达来抑制 Ang II 介导的 VSMC 增殖,为将 ADAM17 作为血管重构和高血压的潜在治疗靶点提供进一步的理论依据和实验基础。

1 材料和方法

1.1 细胞系

大鼠源性胸主动脉平滑肌细胞株 (A10VSMC) 来源于 ATCC 细胞库 (Manassas, VA, USA),购自上海众华生物公司。

1.2 主要试剂

胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自加拿大维森特生物技术有限公司。Ang II、CGRP、CGRP 受体拮抗剂 CGRP8-37 和噻唑蓝均购于美国 Sigma 公司。增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 抗体和 ADAM17 抗体均购自英国

Abcam 公司。辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠和山羊抗兔二抗购于武汉博士德公司。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。

1.3 主要仪器

Perking-Elmer 2400 PCR 仪 (美国 Perking-Elmer 公司),德国 Eppendorf 低温高速离心机 (5810R),酶联免疫检测仪 Elx-800 型 (美国 Bio-Tek Instruments 公司),蛋白质免疫印迹检测全套设备 (美国 Bio-Rad 公司),微量移液器 (德国 Eppendorf 公司)。

1.4 细胞培养

鼠源性 A10VSMC 株按照经典细胞培养方法培养、传代^[5]。简述如下:细胞接种于含 10%FBS 的高糖 DMEM 培养基,置于 37℃、5%CO₂ 的培养箱内培养。细胞长至 80%左右,用 0.25%胰酶消化、传代或用于实验。

1.5 实验分组

用含 10%FBS 的 DMEM 培养基将细胞制成单个细胞悬液,以每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔培养板中 (每孔体积 200 μ L),放入培养箱中培养,分组如下:(1)对照组;(2)CGRP 组;(3)Ang II 组;(4)Ang II +CGRP 组;(5)Ang II +CGRP+CGRP8-37 组。在细胞长到 80%汇合时,更换 0.1%FBS 培养 24 h 后,CGRP (终浓度为 10 nmol/L) 或 CGRP (终浓度为 10 nmol/L)+CGRP8-37 (终浓度为 50 nmol/L) 预处理 30 min 后,对照组继续以 0.1%FBS 培养,Ang II 组加入 Ang II 使其终浓度为 100 nmol/L。在培养箱中培养 24 h 后每孔加入 0.5%噻唑蓝溶液 20 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 二甲基亚砷,振荡 10 min,结晶溶解后用于比色。在酶标仪上选择 570 nm 波长,通过测定各孔的吸光度来确定 VSMC 活力,以确定 CGRP 对 Ang II 过度刺激下 VSMC 活力的影响。

1.6 蛋白质免疫印迹

用预冷 PBS 漂洗细胞后,加入蛋白裂解液及苯甲基磺酰氟后轻轻刮下细胞,并在冰上放置 30 min (每 5 min 涡漩 1 次);4℃ 下 12000 r/min 离心,30 min 后取上清。以牛血清白蛋白为标准,用 Bradford 法对上清进行蛋白定量。取 20 μ g 蛋白样品,10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,100 V 转移 1 h 至二氟化树脂膜,放入封闭液中 37℃ 封闭 1 h;一抗 [PCNA 抗体 (1:1000)、ADAM17 抗体 (1:1000)] 4℃ 过夜。用碱性磷酸酶标记的抗 IgG 抗体室温孵育 1 h,然后用 Image J 软件定量分析蛋白免疫印迹的条带。

1.7 实时定量 PCR

弃掉细胞培养基,用预冷 PBS 洗 2 遍,加入 1 mL Trizol(RNA 酶抑制剂)轻轻敲打使细胞脱落并转移液体至一新的离心管中。然后按照试剂盒操作说明提取 RNA、进行逆转录以及实时定量 PCR。ADAM17 引物:5'-GTGAGCAGTTTCTCGAACGC-3'(正义链),5'-AGCTTCTCAAGTCGCAGGTG-3'(反义链); β -actin 引物:5'-TTCCTTCTTGGGTATGGAAT-3'(正义链),5'-GAGCAATGATCTTGATCTTC-3'(反义链)。

1.8 RNA 干扰

针对大鼠 ADAM17 基因的小分子 RNA 干扰序列(small interference RNA, siRNA)由上海吉玛生物有限公司合成,具体序列如下:5'-UUACACGUGUUCUUAUGGTT-3'(反义核苷酸序列);打乱的序列作为阴性对照(negative control, NC)。血管平滑肌细胞 RNA 干扰的操作步骤参照参考文献[5],具体如下:转染前应确保细胞汇合达到 70%,且转染前 24 h 内细胞未加抗生素处理;用 200 μ L 的优化培养基(Opti-MEM)稀释 5 μ L 脂质体 2000,轻轻混匀后室温放置 5 min;用 250 μ L 优化培养基稀释 0.2 nmol siRNA,柔和混匀;将混匀后的 siRNA 和脂质体 2000 混合,定容到 500 μ L,室温放置 20 min,以形成 siRNA/脂质体 2000 复合物。将上述复合物加入到 VSMC 中(总体积为 2 mL),37℃、二氧化碳培养箱中培养 6 h 后除去复合物,更换培养基。

1.9 统计分析

所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,用 SPSS 统计软件进行分析。两样本分析采用 *t* 检验,多样本分析采用单因素方差分析。利用 GraphPad Prism 5.0 软件作统计图。*P*<0.05 被认为具有统计学意义。

2 结 果

2.1 CGRP 对 Ang II 诱导 VSMC 增殖的影响

研究结果显示,降钙素基因相关肽预孵育 30 min 可抑制 Ang II 诱导的血管平滑肌细胞中 PCNA 蛋白表达和细胞活性的增加,而降钙素基因相关肽受体拮抗剂 CGRP8-37 可抑制或逆转 CGRP 的上述效应(图 1)。课题组之前的研究结果显示^[9],CGRP 能抑制 Ang II 诱导的血管平滑肌细胞中细胞活性、DNA 合成和细胞合成期(S 期)百分率。综上所述,CGRP 能抑制 Ang II 诱导的血管平滑肌细胞增殖。

2.2 CGRP 对 VSMC 中 ADAM17 表达的影响

Ang II 刺激 VSMC 24 h 后,细胞中 ADAM17 表

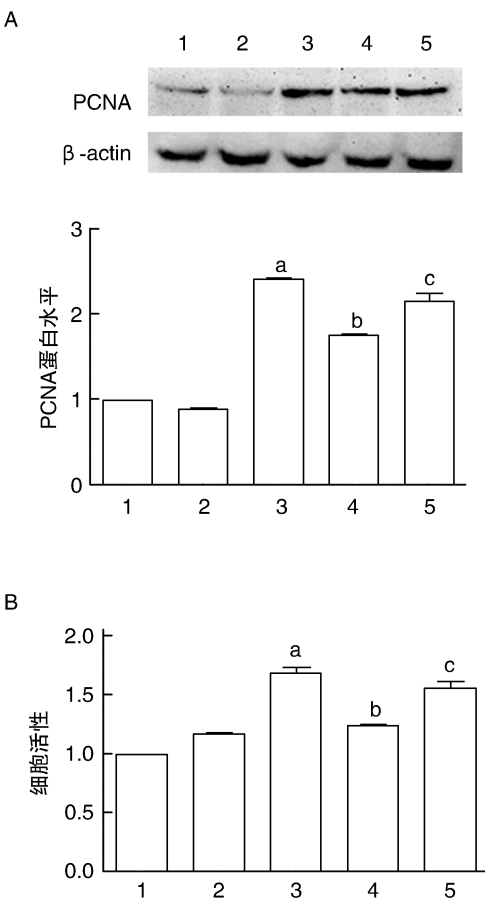


图 1. CGRP 对 Ang II 诱导的 VSMC 增殖的影响
CGRP 预处理 30 min 后,再用 Ang II 刺激 VSMC 24 h。A 为 PCNA 蛋白表达;B 为细胞活性。1 为对照组,2 为 CGRP 组,3 为 Ang II 组,4 为 Ang II +CGRP 组,5 为 Ang II +CGRP+CGRP8-37 组。a 为 *P*<0.05,与对照组比较;b 为 *P*<0.05,与 Ang II 组比较;c 为 *P*<0.05,与 Ang II +CGRP 组比较。
Figure 1. Effects of CGRP on the proliferation of VSMC induced by Ang II

达显著增加。CGRP 预处理 30 min 能显著降低 VSMC 中 ADAM17 表达,而 CGRP 受体拮抗剂 CGRP8-37 可抑制或逆转上述效应(图 2)。

2.3 ADAM17 对 Ang II 诱导 VSMC 增殖的影响

采用 RNA 干扰观察 ADAM17 对 Ang II 介导的血管平滑肌细胞增殖的影响,分组如下:①对照组;②Ang II 组;③Ang II +NC 组;④Ang II +ADAM17 siRNA 组。如图 3 所示,ADAM17 siRNA 能有效降低 Ang II 介导的血管平滑肌细胞中 ADAM17 表达,提示 RNA 干扰序列能有效抑制 ADAM17 表达;同 Ang II 组比较,ADAM17 siRNA 可显著降低 Ang II 介导的血管平滑肌细胞中 PCNA 蛋白表达和细胞活性。提示,ADAM17 是 Ang II 介导血管平滑肌细胞增殖的重要蛋白。

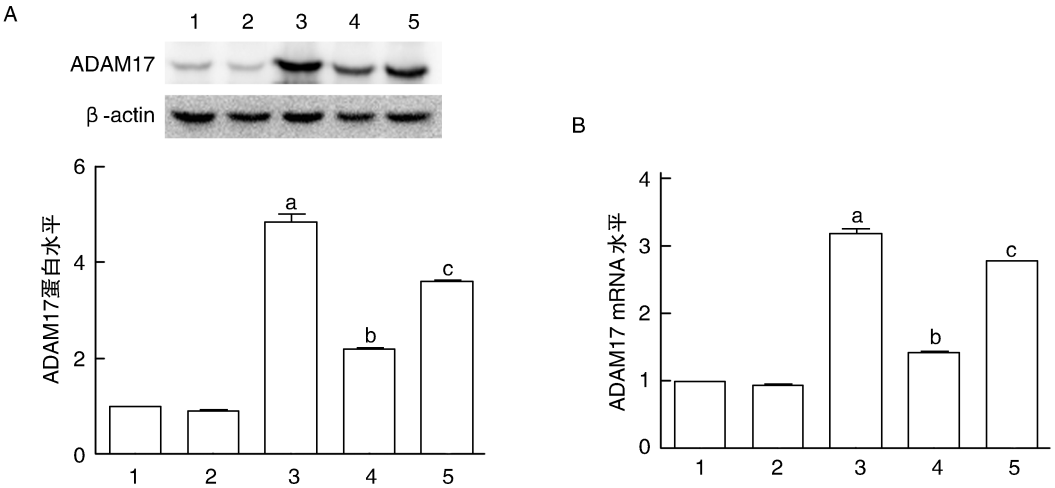


图 2. CGRP 对 Ang II 诱导的 VSMC 中 ADAM17 表达的影响 CGRP 预处理 30 min 后,再用 Ang II 刺激 VSMC 24 h。A 为 ADAM17 蛋白表达;B 为 ADAM17 mRNA 表达。1 为对照组,2 为 CGRP 组,3 为 Ang II 组,4 为 Ang II +CGRP 组,5 为 Ang II +CGRP+CGRP8-37 组。a 为 $P<0.05$,与对照组比较;b 为 $P<0.05$,与 Ang II 组比较;c 为 $P<0.05$,与 Ang II +CGRP 组比较。

Figure 2. Effects of CGRP on the expression of ADAM17 induced by Ang II in VSMC

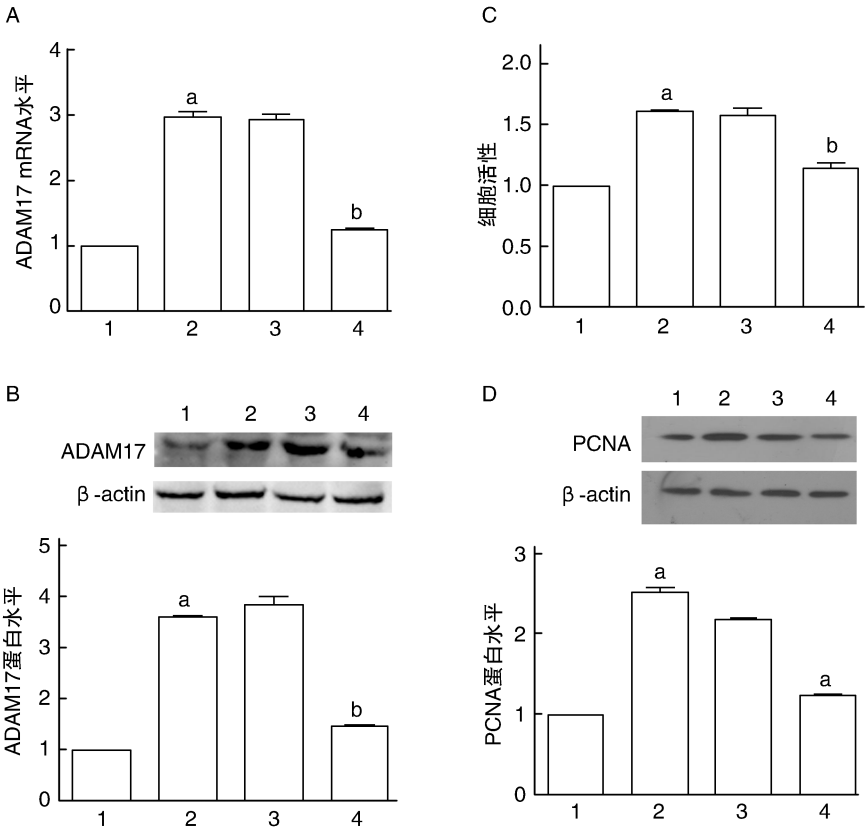


图 3. ADAM17 siRNA 对 Ang II 诱导的 VSMC 增殖的影响 转染 ADAM17 siRNA 30 h 后,再用 Ang II 刺激 VSMC 24 h。A 为 ADAM17 mRNA 表达;B 为 ADAM17 蛋白表达;C 为细胞活性;D 为 PCNA 蛋白表达。1 为对照组,2 为 Ang II 组,3 为 Ang II +NC 组,4 为 Ang II +ADAM17 siRNA 组。a 为 $P<0.05$,与对照组比较;b 为 $P<0.05$,与 Ang II 组比较。

Figure 3. Effects of ADAM17 siRNA on the proliferation of VSMC induced by Ang II

3 讨论

CGRP 是目前已知的最强效的舒血管物质。自

发性高血压大鼠和两肾一夹高血压大鼠血浆 Ang II 浓度升高,CGRP 含量下降,拮抗 Ang II 的作用能增加 CGRP 表达^[10-11]。敲除 α -CGRP 能显著降低 Ang

II 介导的高血压小鼠主动脉和肠系膜动脉中 α -CGRP 和 β -CGRP 的表达水平,从而加剧高血压的发生发展,促进血管平滑肌细胞增殖、肥大^[12]。体外研究表明,来源于内皮干细胞的或外源性的 CGRP 能削弱 Ang II 介导的 VSMC 增殖^[13-14];我们的研究结果与此一致。因此, CGRP 能显著抑制 Ang II 介导的 VSMC 增殖。

ADAM17 是基质金属蛋白酶家族的重要成员。ADAM17 基因敲除不能削弱 Ang II 处理 2 周诱导的高血压^[7],这与 Shen 等^[8]的报道一致;ADAM17 基因敲除在第 1 周能降低 Ang II 诱导的高血压小鼠血压水平,但第 2 周降压效应消失。ADAM17 基因敲除能抑制 Ang II 介导的高血压小鼠 VSMC 增殖、肥大^[7];体外实验显示, ADAM17 RNA 干扰能抑制 Ang II 介导的 VSMC 增殖^[8],这与我们的研究结果一致。ADAM17 能水解、活化肿瘤坏死因子 α 、表皮生长因子受体配体(如肝素结合表皮生长因子、转化生长因子 α 和表皮生长因子),后者可通过激活相应受体促进 VSMC 增殖^[15-16]。上述研究表明,降低 ADAM17 表达是抑制 Ang II 介导的 VSMC 增殖的重要机制。我们的研究结果显示, CGRP 预处理 30 min 能显著降低 Ang II 介导的 VSMC 中 ADAM17 表达,而 CGRP 受体拮抗剂 CGRP8-37 可抑制上述效应。因此, ADAM17 表达降低可能是 CGRP 抑制 Ang II 介导的 VSMC 增殖的重要机理。

本研究可得出以下结论:①CGRP 能抑制 Ang II 介导的 VSMC 增殖;②CGRP 预处理 30 min 能显著降低 VSMC 中 ADAM17 表达;③ADAM17 是 Ang II 介导 VSMC 增殖的重要蛋白。

综上所述, CGRP 可通过降低 ADAM17 表达抑制 Ang II 介导的 VSMC 增殖。这有助于我们更好地理解调控 CGRP 抑制 Ang II 介导的 VSMC 增殖的信号网络,为将 ADAM17 作为血管重构和高血压的新的药物研发靶点提供进一步的理论依据和实验基础。

[参考文献]

- [1] 胡盛寿. 中国心血管病报告 2015[M]. 北京: 中国大百科全书出版社, 2016; 2.
- [2] 邓水秀, 曾泗宇, 任俊芳, 等. 降钙素基因相关肽对大鼠血管平滑肌细胞 CDK2 和 Cyclin E 的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2011, 16(3): 249-253.
- [3] 张晓一, 于萧华, 刘玉环, 等. ERK1/2 和 p38MAPK 在介导 CGRP 和 Ang II 诱导血管平滑肌细胞 Nox1 表达中的作用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2017, 22(1): 13-19.

- [4] 湛赞, 戴忠, 刘彦梅, 等. Caveolae/Caveolin-1/ERK1/2 信号通路在降钙素基因相关肽抑制血管平滑肌细胞增殖中的作用[J]. 生物化学与生物物理进展, 2013, 40(5): 445-453.
- [5] 刘彦梅, 彭虹艳, 郭锋, 等. 受体成分蛋白在降钙素基因相关肽和血管紧张素 II 对血管平滑肌细胞血管过氧化物酶 1 表达调控中的作用[J]. 生理学报, 2015, 67(2): 193-200.
- [6] 于萧华, 徐竞欧, 汪煜华, 等. 降钙素基因相关肽通过 p38MAPK/Nox1 通路抑制 Ang II 诱导的血管平滑肌细胞增殖[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20(3): 246.
- [7] Takayanagi T, Forrester SJ, Kawai T, et al. Vascular ADAM17 as a novel therapeutic target in mediating cardiovascular hypertrophy and perivascular fibrosis induced by angiotensin II[J]. Hypertension, 2016, 68(4): 949-955.
- [8] Shen M, Morton J, Davidge ST, et al. Loss of smooth muscle cell disintegrin and metalloproteinase 17 transiently suppresses angiotensin II-induced hypertension and end-organ damage[J]. J Mol Cell Cardiol, 2017, 103: 11-21.
- [9] 张晓一, 刘玉环, 廖端芳, 等. Losartan 和 CGRP 对血管紧张素 II 诱导血管平滑肌细胞增殖作用的影响[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(1): 101-105.
- [10] Shi RZ, Hu CP, Luo D, et al. Decreased anandamide transporter activity and calcitonin gene-related peptide production in spontaneously hypertensive rats: role of angiotensin II[J]. Eur J Pharmacol, 2012, 680(1-3): 81-87.
- [11] Qin XP, Zeng SY, Li D, et al. Calcitonin gene-related peptide-mediated depressor effect and inhibiting vascular hypertrophy of rutaecarpine in renovascular hypertensive rats[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2007, 50(6): 654-659.
- [12] Smillie SJ, King R, Kodji X, et al. An ongoing role of α -calcitonin gene-related peptide as part of a protective network against hypertension, vascular hypertrophy, and oxidative stress[J]. Hypertension, 2014, 63(5): 1056-1062.
- [13] Fang L, Chen MF, Xiao ZL, et al. Calcitonin gene-related peptide released from endothelial progenitor cells inhibits the proliferation of rat vascular smooth muscle cells induced by angiotensin II[J]. Mol Cell Biochem, 2011, 355(1-2): 99-108.
- [14] Qin XP, Ye F, Hu CP, 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.
- [15] Haider A, Lee I, Grabarek J, et al. Dual functionality of cyclooxygenase-2 as a regulator of tumor necrosis factor-mediated G1 shortening and nitric oxide-mediated inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation[J]. Circulation, 2003, 108(8): 1015-1021.
- [16] Li Y, Lévesque LO, Anand-Srivastava MB. Epidermal growth factor receptor transactivation by endogenous vasoactive peptides contributes to hyperproliferation of vascular smooth muscle cells of SHR[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010, 299(6): H1959-1967.

(此文编辑 曾学清)