

[文章编号] 1007-3949(2007)15-09-0661-05

• 实验研究 •

## 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

邓水秀, 曾泗宇, 任俊芳, 郑元斌, 廖端芳, 秦旭平

(南华大学药物药理研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 药理学; 降钙素基因相关肽; 血管平滑肌细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡; 小凹蛋白 1

[摘要] 目的 观察降钙素基因相关肽在抑制血管平滑肌细胞增殖或肥大过程中是否伴有诱导其凋亡的作用, 并探讨其作用机制是否涉及到血管平滑肌细胞内小凹蛋白 1 和 caspase-3 的变化。方法 采用贴块法体外培养大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞, 增殖或肥大型血管平滑肌细胞通过血管紧张素 $\text{E}$ 刺激静止期血管平滑肌细胞 24 h 建立。用噻唑蓝比色法和流式细胞仪分析血管平滑肌细胞增殖、凋亡及细胞周期变化, 吖啶橙/溴化乙啶染色观察细胞及细胞核形态改变, Western blotting 法测定不同状态下血管平滑肌细胞内小凹蛋白 1 和 caspase-3 的表达。结果 降钙素基因相关肽能降低血管紧张素 $\text{E}$ 诱导的增殖型血管平滑肌细胞的代谢活性、细胞周期增殖指数 ( $P < 0.05$ ); 形态学及流式细胞仪分析表明降钙素基因相关肽对增殖型血管平滑肌细胞无明显的诱导凋亡作用。同时发现降钙素基因相关肽使血管平滑肌细胞内小凹蛋白 1 的表达增加, 而对 caspase-3 的表达无明显影响。结论 降钙素基因相关肽能显著抑制血管紧张素 $\text{E}$ 诱导的血管平滑肌细胞增殖, 但诱导血管平滑肌细胞凋亡的作用较小; 其抑制增殖的细胞内信号传导途径可能与增强小凹蛋白 1 表达有关。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

### Effects of Calcitonin Gene-Related Peptide on the Hyperplasia of Vascular Smooth Muscle Cells and the Expression of Caveolin-1

DENG Shu-Xiu, ZENG Si-Yu, REN Jun-Fang, ZHENG Yuan-Bin, LIAO Duan-Fang, and QIN Xu-Ping

(Institute of Pharmacy and Pharmacology, University of South China, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Calcitonin Gene-Related Peptide; Vascular Smooth Muscle Cell; Hyperplasia; Apoptosis; Caveolin-1

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of calcitonin gene-related peptide (CGRP) on the proliferation or apoptosis of hyperplasia / hypertrophic vascular smooth muscle cells (HVSMC) induced by angiotensin  $\text{E}$  (Ang  $\text{E}$ ), and explore whether the mechanism is related to the expression of caveolin-1 and caspase-3. **Methods** The HVSMC was established by quiet rat vascular smooth muscle cells incubated with Ang II for 24 hours. MTT and flow cytometry were used to determine the ability of proliferation of HVSMC induced by Ang II in the presence or absence of CGRP. Western blotting was used to determine the expression of caveolin-1 and caspase-3. **Results** Treatment with CGRP for 8 h could inhibit the viability, continuous proliferation of HVSMC induced by Ang II, but it could not significantly induce the HVSMC apoptosis. This effect of CGRP was concomitant with the increased expression of caveolin-1 and with no significant change on the expression of caspase-3. **Conclusion** CGRP could significantly inhibit the proliferation of HVSMC induced by Ang  $\text{E}$  but not significantly induce apoptosis of HVSMC, the signal pathway of inhibitory effect of CGRP may be related to the increase of the caveolin-1 expression.

降钙素基因相关肽 (calcitonin gene-related peptide, CGRP) 是辣椒素敏感的感觉神经末梢释放的神经肽<sup>[1]</sup>, 广泛分布于中枢和外周心血管系统, 具有较强的舒血管功能<sup>[2,3]</sup>。以往研究证实, CGRP 与牛血清、血管紧张素 $\text{E}$  (angiotensin  $\text{E}$ , Ang  $\text{E}$ ) 和内皮素共同孵育静止期血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) 能抑制或预防 VSMC 增殖<sup>[4,6]</sup>,

但 CGRP 对增殖期 VSMC 命运如何还不清楚。本实验旨在用体外培养的大鼠 VSMC, 进一步研究 CGRP 对 Ang  $\text{E}$  诱导的增殖型 VSMC (hyperplasia / hypertrophic VSMC, HVSMC) 的增殖和凋亡的影响, 以及信号蛋白小凹蛋白 1 (caveolin-1) 和 caspase-3 在 VSMC 增殖或凋亡过程中的变化。

### 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  $\text{E}$ 、CGRP、CGRP8-37 和 MTT 购于美国 Sigma 公司。兔抗大鼠 caspase-3 抗体和兔抗

[收稿日期] 2007-04-23

[修回日期] 2007-09-02

[基金项目] 国家自然科学基金 (30572192) 和湖南省自然科学基金 (05JJ30042) 资助课题

[作者简介] 邓水秀, 硕士, 研究方向为心血管药理学。廖端芳, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管药理学。通讯作者秦旭平, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管药物的基础和临床, E-mail 为 qinxp333@hotmail.com。

大鼠 caveolin-1 抗体购于 Sant Cruz 公司。山羊抗兔二抗购于武汉博士德公司。Hanks 液、磷酸平衡盐溶液(PBS)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。

### 1.2 血管平滑肌细胞的分离和培养

组织贴块法培养 VSMC。取 180~200 g 的雄性 SD(Sprague-Dawley)大鼠(购于南华大学实验动物中心)脱颈椎致死,75%乙醇消毒胸、腹部,剖腹开胸取出胸主动脉,浸泡于无菌 Hanks 液的培养皿中。用眼科剪和眼科镊修剪组织,轻轻剥离外膜后,将组织剪成 0.5~1 mm<sup>3</sup> 左右的小块,用眼科镊将小块送入 25 mL 培养瓶内,小块间间距控制在 0.5 cm 左右,然后将培养瓶翻转放入 37℃ 培养箱内干固 3 h 后,向瓶内注入少量含 10% FBS 的 DMEM 培养基,平放培养 4~7 天后,可看到少量细胞游出。3~5 天换液一次,待细胞长到 70%~80% 汇合时可传代培养。取 3~10 代细胞用于实验。

### 1.3 细胞活力测定及增殖型血管平滑肌细胞建立

用含 10% FBS 的 DMEM 培养基将细胞制成单个细胞悬液,以每孔  $5 \times 10^3$  个细胞接种于 96 孔培养板中,每孔体积 200  $\mu$ L,放入培养箱中培养。在细胞长到 70% 汇合时,更换 0.1% FBS 培养 24 h 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 4、8、16 和 24 h,于各个时间点处理完后每孔加入 0.5% MTT 溶液 20  $\mu$ 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  $\mu$ L DMSO,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 Ang Ⅱ促进增殖最佳时间。在最佳时间点,以终浓度为 10 nmol/L CGRP 干预,继续培养 4、8、16 和 24 h,同前以 MTT 法测定各个时间点 CGRP 对 Ang Ⅱ过度刺激下 VSMC 活力的影响。

### 1.4 细胞周期的测定

取对数生长期的 VSMC 接种于 50 mL 培养瓶中,用 10% FBS 的 DMEM 培养基培养贴壁后,0.1% FBS 培养 24 h,使细胞周期同步于静止期。以 Ang Ⅱ刺激 VSMC 24 h 时的细胞状态为增殖型 VSMC,然后再加入 CGRP 与 Ang Ⅱ共同孵育细胞 4、8、16 和 24 h,并以加入 CGRP 的时间为准进行分组即:对照组、Ang Ⅱ组和 Ang Ⅱ+ CGRP 组,使每瓶内的 Ang Ⅱ和 CGRP 终浓度符合要求。细胞基本长满后,消化、离心收集细胞,以  $1 \times 10^9$  个/L 细胞收集于小离心管内,用 75%冰乙醇固定,再用 PBS 冲洗,碘化丙啶染色,流式细胞仪分析细胞增殖指数(proliferation in-

dex, PI) 和凋亡率,  $PI = (S + G_2M) / (G_0G_1 + S + G_2M)$ 。

### 1.5 吖啶橙/溴化乙啶染色与荧光显微镜观察细胞形态

(1) 荧光染液配制:用 0.1 mol/L PBS (pH 7.2) 将吖啶橙和溴化乙啶分别配制成 100 mg/L 贮液,使用前按 1:1 混合。(2) 细胞荧光染色:用含 10% FBS 的 DMEM 培养基将细胞制成单个细胞悬液,以每孔  $6 \times 10^4$  个细胞接种于 24 孔培养板中,每孔体积 500  $\mu$ L。放入培养箱中培养,在细胞长到 70% 汇合时,更换 0.1% FBS 继续培养 24 h。对照组继续以 0.1% FBS 培养,Ang Ⅱ组终浓度为 100 nmol/L, CGRP 组在 Ang Ⅱ刺激最佳时间点(24 h 时)加入 CGRP 处理 8 h,弃去培养基后用 PBS 轻洗,轻轻自培养孔中吸去 PBS,将吖啶橙和溴化乙啶贮液等份混合后 1:20 稀释成工作液,每孔加入工作液 20  $\mu$ L,常温下放 5 min,荧光倒置显微镜下观察并照相,每组各 3 个复孔。

### 1.6 小凹蛋白和半胱氨酸蛋白酶蛋白的检测

取 VSMC 接种于 50 mL 的培养瓶中培养至 70%~80% 汇合,用 0.1% FBS 的 DMEM 培养基继续培养 24 h 使细胞处于静止期,然后做 Ang Ⅱ与 caveolin-1 的时-效关系。细胞静止期后使用 100 nmol/L Ang Ⅱ刺激细胞 24 h,再加入 CGRP 使终浓度为 10 nmol/L 处理细胞,做 CGRP 与 caspase-3 和 caveolin-1 的时-效关系。提取细胞蛋白质,Ang Ⅱ和 CGRP 作用后的 VSMC 用 PBS 冲洗 3 次,每瓶加入 0.1 mL RIPA 裂解液(强)(50 mmol/L pH 7.4 Tris·Cl, 150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 1% 脱氧胆酸钠, 1% NP-40, 0.1% SDS, 原钒酸钠, 氟化钠, EDTA, 亮抑酶肽, 临用前加入 0.1 g/L PMSF) 裂解细胞。冰浴上刮下细胞碎片。再以超声波粉碎细胞,4℃ 10 kr/min 离心 30 min,取上清液,按 BCA 试剂盒说明测定蛋白浓度,样品贮存于 -80℃ 冰箱待用。

配制 10% 的 SDS-PAGE 分离胶和 5% 的浓缩胶,细胞样品加入到上样缓冲液(50 mmol/L Tris·Cl pH 6.8, 2% SDS, 100 mmol/L DTT, 0.1% 溴酚蓝, 10% 甘油)中,在沸水中煮 5 min,然后每孔加入 35  $\mu$ g 细胞蛋白样,置电解缓冲液中,80 V 电泳约 40 min,待样品进入分离胶后,改为 120 V 继续电泳,当溴酚蓝指示剂离胶底线 1 cm 时,停止电泳,然后将蛋白质转移到 PVDF 膜上。用 5% 脱脂牛奶封闭液封闭 1~2 h,然后加一抗(1:200) 4℃ 冰箱孵育 2 h,然后 TBST (150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris·Cl pH 7.5, Tween20 1 ml/L) 洗膜 3 次后,加入二抗(1:2 000) 常温下孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加发光剂

显色。用密度分析测量显色面积和密度。

### 1.7 统计学分析

数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。组间差异进行方差分析,再用  $t$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 降钙素基因相关肽对增殖型细胞活力的影响

使用 100 nmol/L Ang Ⅱ刺激 VSMC, 对其代谢活力或活性的影响存在时效关系。Ang Ⅱ处理 24 h 的 VSMC 为增殖型 VSMC, 再加入 CGRP 与 Ang Ⅱ共同孵育细胞, MTT 结果表明, CGRP 在 10 nmol/L 时能降低 Ang Ⅱ诱导的增殖型 VSMC 的代谢活力或活性, 并在干预 8 h 时(即第 32 h 时)作用最强(表 1)。

### 2.2 降钙素基因相关肽对血管平滑肌细胞周期分布特征的影响

研究表明, 10 nmol/L CGRP 干预 8 h 能明显抑制 100 nmol/L Ang Ⅱ诱导的增殖型 VSMC S 期(合成期)的百分率和 PI。说明 CGRP 能抑制 Ang Ⅱ

诱导的增殖型细胞蛋白质的合成, 抑制细胞分裂, 但 8 h 后抑制作用消失, 与 MTT 结果基本吻合。但 CGRP 对细胞凋亡率没有明显影响(表 2)。

表 1. 降钙素基因相关肽对大鼠血管紧张素 Ⅱ诱导的增殖型血管平滑肌细胞代谢活力的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

作用时间	Ang Ⅱ组	Ang Ⅱ+ CGRP
0 h	0.37 ± 0.02	
4 h	0.41 ± 0.01 <sup>a</sup>	
8 h	0.44 ± 0.01 <sup>a</sup>	
16 h	0.51 ± 0.01 <sup>a</sup>	
24 h	0.56 ± 0.02 <sup>a</sup>	
28 h	0.92 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.91 ± 0.08
32 h	1.14 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.92 ± 0.03 <sup>c</sup>
40 h	1.03 ± 0.02 <sup>b</sup>	1.02 ± 0.03
48 h	0.99 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.98 ± 0.03

a 为  $P < 0.01$ , 与 0 h 比; b 为  $P < 0.01$ , 与 24 h 比; c 为  $P < 0.05$ , 与 Ang Ⅱ组同期比。

表 2. 降钙素基因相关肽对增殖型血管平滑肌细胞细胞周期分布比例、增殖指数及凋亡率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

参数	对照组	Ang Ⅱ组				CGRP 干预组			
		4 h	8 h	16 h	24 h	4 h	8 h	16 h	24 h
G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	94.3% ± 0.3%	84.7% ± 2.0%	82.2% ± 0.5%	82.0% ± 1.4%	77.0% ± 1.5%	84.6% ± 1.3%	84.6% ± 0.3%	82.2% ± 2.6%	77.1% ± 1.25%
S	2.9% ± 0.2%	10.0% ± 0.7%	10.2% ± 0.2%	9.0% ± 2.2%	16.4% ± 3.3%	9.5% ± 0.7%	8.5% ± 0.3% <sup>a</sup>	8.2% ± 1.4%	15.8% ± 2.42%
G <sub>2</sub> /M	2.9% ± 0.6%	5.3% ± 1.8%	7.6% ± 0.3%	9.0% ± 1.2%	6.6% ± 4.0%	5.9% ± 2.0%	6.9% ± 0.4%	9.6% ± 1.2%	7.2% ± 2.08%
凋亡率	0.8% ± 0.2%	1.0% ± 0.2%	1.9% ± 0.2%	2.8% ± 0.3%	2.6% ± 0.5%	1.2% ± 0.3%	1.4% ± 0.4%	2.0% ± 0.4%	3.0% ± 0.75%
PI 值	0.06 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.18 ± 0.03	0.23 ± 0.04

a 为  $P < 0.05$ , 与血管紧张素 Ⅱ组 8 h 比。

### 2.3 降钙素基因相关肽对增殖型血管平滑肌细胞形态及细胞核形态的影响

增殖型 VSMC 使用 CGRP 干预 8 h 后, 经 AO/EB 双染荧光显微镜下观察, 各组细胞未见凋亡的形态学改变, 细胞形态为梭形, 细胞核组织结构完整, 染色质呈绿色, Ang Ⅱ组细胞体积较对照组增大, 且细

胞核 DNA 呈亮黄或黄绿色荧光较亮, 表明 Ang Ⅱ能够刺激 VSMC 增殖, DNA 含量增多。CGRP 组细胞核均匀染色, 但与 Ang Ⅱ组比较, 体积较小, 颜色减弱, 表明 CGRP 能抑制 Ang Ⅱ的促细胞增殖或肥大作用(图 1)。

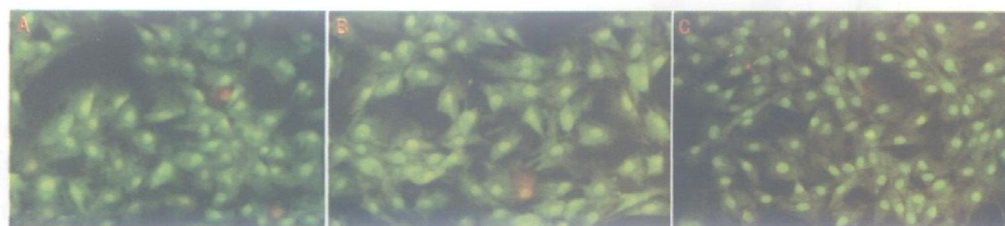


图 1. 降钙素基因相关肽干预增殖型血管平滑肌细胞 8 h 时细胞及细胞核形态的改变 ( $\times 400$ ) A 为对照组, B 为血管紧张素 Ⅱ作用 32 h, C 为降钙素基因相关肽干预 8 h。

## 2.4 降钙素基因相关肽对增殖型细胞小凹蛋白1表达的影响

以 100 nmol/L 的 Ang II 刺激静止期细胞, Ang II 使 caveolin-1 表达呈时间依赖性地降低(图 2)。CGRP 干预后 4 h, caveolin-1 表达显著低于未干预组 ( $P < 0.05$ ), 但在干预 8 h 时显著高于 4 h 组和 Ang II 刺激 32 h ( $P < 0.05$ ), 后又降低(图 3)。使用 CGRP 受体阻断剂 CGRP8-37 能部分减弱 CGRP 在干预 8 h 时升高 caveolin-1 的作用(图 4)。

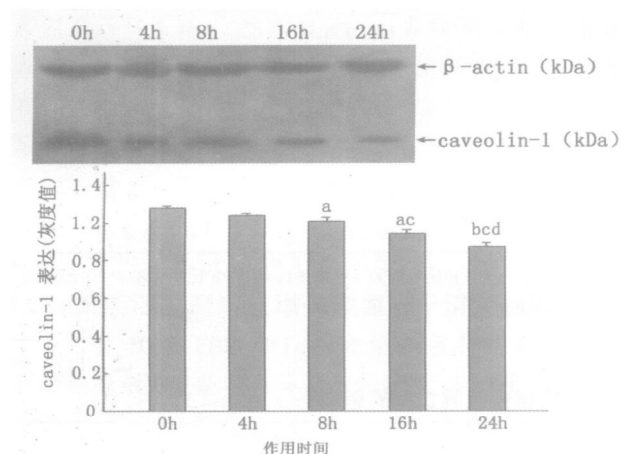


图 2. 血管紧张素 II 作用不同时间对大鼠血管平滑肌细胞小凹蛋白 1 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ ) a 为  $P < 0.05$ , 与作用 0 h 比较; b 为  $P < 0.01$ , 与作用 0 h 比较; c 为  $P < 0.05$ , 与作用 4 h 比较; d 为  $P < 0.05$ , 与作用 8 h 比较。

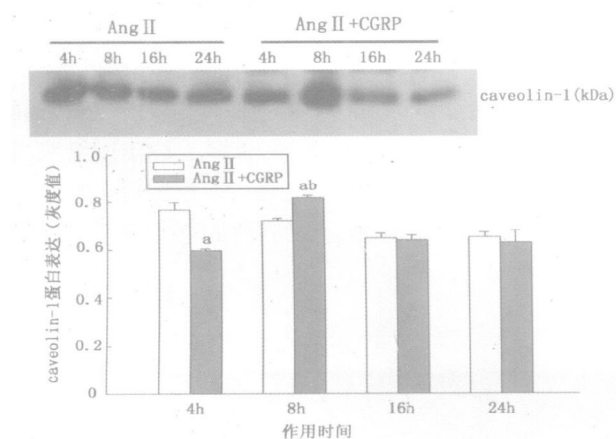


图 3. 降钙素基因相关肽刺激增殖型血管平滑肌细胞不同时间点小凹蛋白 1 表达的变化 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ ) a 为  $P < 0.05$ , 与血管紧张素 II 作用相同时间点相比; b 为  $P < 0.05$ , 与降钙素基因相关肽干预 4、16 和 24 h 比较。

## 2.5 降钙素基因相关肽对增殖型细胞 caspase-3 表达的影响

对 Ang II 诱导的增殖型 VSMC, 用 CGRP 干预,

在各时间点与单独 Ang II 作用组相比, CGRP 对 caspase-3 的表达差异无显著性(图 5)。

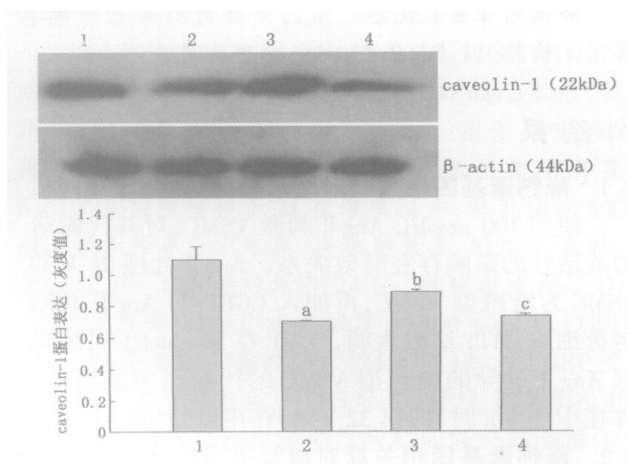


图 4. 降钙素基因相关肽 8-37 减弱降钙素基因相关肽干预 8 h 时升高小凹蛋白 1 的作用 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ ) 1 为对照组 (0.1% FBS), 2 为血管紧张素 II 组, 3 为血管紧张素 II + 降钙素基因相关肽组, 4 为降钙素基因相关肽 8-37 + 血管紧张素 II + 降钙素基因相关肽组。a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比; b 为  $P < 0.05$ , 与血管紧张素 II 组比; c 为  $P < 0.05$ , 与血管紧张素 II + 降钙素基因相关肽组比。

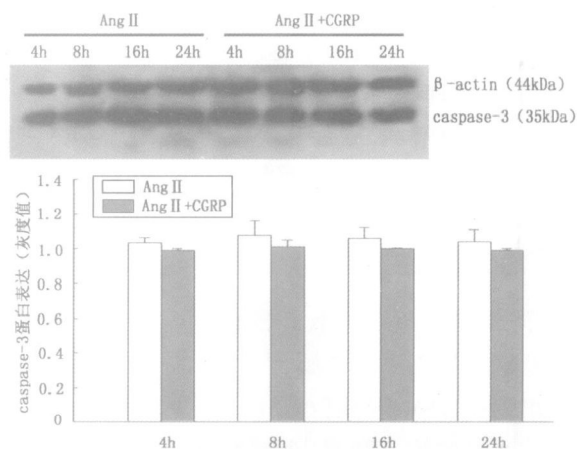


图 5. 降钙素基因相关肽刺激增殖型血管平滑肌细胞不同时间点 caspase-3 表达的变化 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

## 3 讨论

血管平滑肌细胞(VSMC)表型转变、异常增殖与凋亡以及细胞外间质组成改变所导致的血管重构是许多心血管疾病发生发展的重要病理基础<sup>[7]</sup>。在长期患有高血压的病人, 血管组织中 Ang II 过度分泌促进 VSMC 肥大或增殖是血管重构的主要原因。业已证实, 血管紧张素受体拮抗药或血管紧张素转化酶抑制剂的降压和逆转血管重构作用机制除了与抑制肾素-血管紧张素系统外, 还与增强辣椒素敏感

的感觉神经功能及增加 CGRP 的合成和释放有关<sup>[8,9]</sup>。并且, CGRP 呈剂量依赖性地抑制体外培养的 VSMC 增殖, 降低 DNA 和蛋白合成<sup>[6]</sup>, 在体内能抑制气囊血管成形术中气囊对主动脉损伤诱导的 VSMC 增殖以及内膜的形成<sup>[10]</sup>。我们最近研究证实, CGRP 可抑制 Ang Ⅱ刺激引起的大鼠 VSMC 增殖, 作用强于非肽类血管紧张素 Ⅱ受体阻滞剂 Losartan<sup>[11]</sup>, 并与细胞外信号调节激酶( extracellular signal-regulated kinase, ERK1/2) 有关<sup>[6,10,11]</sup>。前期研究显示 Ang Ⅱ呈浓度依赖性地增强静止期 VSMC 活性, 在浓度为 100 nmol/L 时, 对 VSMC 活性的影响达到最大值<sup>[6]</sup>。本实验研究表明, 100 nmol/L Ang Ⅱ呈时间依赖性地增强 VSMC 的代谢活力, 并在刺激 VSMC 24 h 时达到最大值。所以选择 Ang Ⅱ刺激 VSMC 24 h 时的细胞状态作为增殖或肥大 VSMC。本实验结果表明, 10 nmol/L CGRP 对已增殖的 VSMC 有抑制其继续增殖或肥大作用, 并且在 CGRP 与 Ang Ⅱ共同孵育 VSMC 8 h 时能显著逆转细胞肥大或增殖。这也进一步证明, 高血压发病较长时, VSMC 肥大或增殖是血管壁肥厚性重构的主要细胞学改变。血管紧张素受体拮抗药或血管紧张素转化酶抑制剂抑制或逆转血管重构部分与促进 CGRP 合成和释放有关。

小凹结构是细胞质膜表面特异性的内陷微区, 它具有包括从细胞外受体到细胞内效应系统在内的完整的信号转导复合物, 富含多种信号分子; caveolins 是小凹结构的主要表面标记蛋白, 是许多信号分子的支架蛋白和负性调节蛋白。近年来的研究可推测细胞膜上的小凹及其蛋白对调节细胞内信号蛋白活性、维持细胞功能具有重要作用, 其功能异常可能与血管性疾病有关<sup>[12,13]</sup>。血小板源生长因子刺激 VSMC, 细胞膜上的小凹结构数目和 caveolin-1 表达减少, 说明细胞表型方面的改变可能伴有细胞膜的结构改变, 这些变化可能改变细胞内的信号传导途径而决定着细胞的命运<sup>[14]</sup>。CGRP 受体是一个 G 蛋白耦联受体, 我们推测在增殖期的 VSMC 细胞膜表面 caveolae/ caveolins 结构或者数量表达的差异可能是调节 CGRP 受体信号转导的主要影响因素。有研究显示, 在体外培养的 Ang Ⅱ在激活 ERK1/2 刺激 VSMC 增殖的同时, 抑制了 caveolin-1 的表达<sup>[15]</sup>, 说明 caveolin-1 在调节细胞增殖中起一定的负性作用。

在哺乳动物细胞凋亡过程中, 半胱氨酸蛋白酶 (caspases) 家族的激活起关键作用。caspases 在正常细胞中以无活性的前体形式合成与储存, 凋亡信号

可激活 caspase 级联反应, 从而导致细胞 DNA 损伤和细胞凋亡。本实验结果表明, 在 Ang Ⅱ同时存在下, CGRP 没有显著促进增殖型 VSMC 中 caspase-3 的表达, 说明在体外, CGRP 对肥大或增殖期的 VSMC 促进凋亡作用不明显, 其机制不清。

综上所述, CGRP 对体外 Ang Ⅱ诱导的增殖型 VSMC 有抑制作用, 但不能显著诱导其凋亡。CGRP 的这种抑制作用可能与其增加 caveolin-1 蛋白表达, 继而负性调节引起 VSMC 增殖或肥大的主要信号途径丝裂原活化蛋白激酶有关。

#### [参考文献]

- [1] Kwasaki H, Takasaki K, Saito A, Goto K. Calcitonin gene-related peptide acts as a novel vasodilator neurotransmitter in mesenteric resistance vessels of the rat [J]. *Nature*, 1988, **335** (6186): 164-167.
- [2] 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 adenylylase [J]. *Cephalalgia*, 1996, **16** (5): 310-316.
- [3] Wisskirchen FM, Gray DW, Marshall L. Receptors mediating CGRP-induced relaxation in the rat isolated thoracic aorta and porcine isolated coronary artery differentiated by h (alpha) CGRP (8-37) [J]. *Br J Pharmacol*, 1999, **128** (2): 283-292.
- [4] Li Y, Fiscus RR, Wu J, Yang L, Wang X. The antiproliferative effects of calcitonin gene-related peptide in different passages of cultured vascular smooth muscle cells [J]. *Neuropeptides*, 1997, **31** (5): 503-509.
- [5] 武旭东, 徐成斌, 陈红, 刘秀华, 陈魁, 唐朝枢. 降钙素基因相关肽对内皮素致血管平滑肌细胞增殖的影响[J]. *北京医科大学学报*, 1997, **29** (1): 91-94.
- [6] Qin XP, Ye F, Hu CP, Liao DF, Deng HW, Li YJ. Effect of CGRP on proliferation induced by angiotensin Ⅱ in vascular smooth muscle cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, **488** (1-3): 45-49.
- [7] Giannattasio C, Mancia G. Arterial distensibility in humans: modulating mechanisms, alterations in diseases and effects of treatment [J]. *J Hypertens*, 2002, **20** (10): 1889-899.
- [8] Qin XP, Ye F, Liao DF, Li YJ. Involvement of calcitonin gene-related peptide in the depressor effects of losartan and perindopril in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, **464** (1): 63-67.
- [9] 秦旭平, 龙光, 徐立朋, 朱炳阳, 胡弼, 李元建, 等. 氯沙坦和培哚普利逆转高血压大鼠心血管重构的比较[J]. *中国药理学通报*, 2004, **20** (10): 1107-1111.
- [10] Liu N, Chen G, Wang X, Yao X, Su J, Li T, et al. Effects of certain vasoactive peptides on pathogenesis of vascular restenosis [J]. *Chin Med Sci J*, 2003, **18** (1): 1-8.
- [11] 张晓一, 刘玉环, 廖端芳, 秦旭平. 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.
- [12] Everson WV, Smart EJ. Influence of caveolin, cholesterol, and lipoproteins on nitric oxide synthase: implications for vascular disease [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2001, **11** (6): 246-250.
- [13] Razani B, Lisanti MP. Caveolin-deficient mice: insights into caveolae function and human disease [J]. *J Clin Invest*, 2001, **108** (11): 1553-561.
- [14] Peterson TE, Guicciardi ME, Gulati R, Kleppe LS, Mueske CS, Mookadam M, et al. Caveolin-1 can regulate vascular smooth muscle cell fate by switching platelet-derived growth factor signaling from a proliferative to an apoptotic pathway [J]. *Arterioscl, Throm, Vasc Biol*, 2003, **23** (9): 1521-527.
- [15] 王乾蕾, 汤勇波, 朱炳阳, 廖端芳. 小凹蛋白 1-小凹在血管紧张素 Ⅱ诱导血管平滑肌细胞增殖信号转导通路中的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (3): 353-354.

(此文编辑 许雪梅)