

P38MAPK/NOX4 通路介导 CGRP 对氧化损伤 HUVEC 保护作用

徐竞鸥¹, 于潇华¹, 汪煜华¹, 秦旭平¹, 张 亮²

(1. 南华大学 药物药理研究所, 湖南 衡阳 421001; 2. Laboratory of Cell & Molecular Biology, Palmer College of Chiropractic-Florida, USA)

关键词: 降钙素基因相关肽; 内皮细胞; NADPH 氧化酶; 信号通路

中图分类号: R3

文献标识码: A

文章编号: 2095-1116(2011)06-0712-01

氧化应激过程调控细胞增殖和凋亡。研究发现, 某些血管活性肽的保护血管作用与抑制氧化应激有关。降钙素基因相关肽(CGRP)是一种由辣椒素敏感的感觉神经末梢释放的神经递质, 在体内有广泛的分布和表达, 有多种生理功能, 如舒张血管和收缩心肌、抑制血管平滑肌细胞增殖、保护内皮细胞、调节神经系统和消化系统等。最新研究表明, CGRP 作为神经元钙调蛋白依赖激酶-cAMP 反应原件结合蛋白(CaMKII-CREB)的调节因子, 能通过调节 p38 MAPK-NF κ B 级联反应来介导吗啡止痛的耐受过程。本实验用外源性 H₂O₂ 诱导人脐静脉内皮细胞(HUVEC)损伤, 观察 CGRP 预处理对 HUVEC 病理损伤的保护作用。检测 p38 MAPK 磷酸化及胞内活性氧主要来源的 NADPH 氧化酶 4(Nox4)在 HUVEC 损伤及 CGRP 保护过程中的表达变化。以此探讨 CGRP 对 H₂O₂ 损伤 HUVEC 的保护机制。

1 材料与方法

HUVEC (Catalog Number: C-003-5C) 接种于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 10 μ g/mL 链霉素的 DMEM 培养基中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% 的 CO₂ 的培养箱内培养。待细胞长到 50% 融合时更换含 0.1% 血清的 DMEM 培养基同步化 24 h, 并分别给予 H₂O₂ 和 CGRP 处理细胞, MTT 检测 HUVEC 活力, 流式细胞术检测细胞凋亡率; Western blot 法检测 CGRP 预处理

30 min, 500 μ mol/L H₂O₂ 处理 5~60 min p38 MAPK、磷酸化 p38 MAPK 表达, 以及 CGRP 预处理 30 min, 500 μ mol/L H₂O₂ 处理 24 h Nox4 蛋白表达; p38 MAPK 磷酸化阻断剂 SB203580 (20 μ mol/L) 预处理细胞 30 min 前后, Nox4 蛋白和 mRNA (Real-time PCR 检测) 表达的变化。

2 结 果

(1) 分别以浓度为 10、50、500、1 000 μ mol/L 的 H₂O₂ 孵育细胞 6 h 时, HUVEC 活力与对照组相比, 分别增加 23.01% $\pm$ 0.12%, 49.23% $\pm$ 0.13%, 21.14% $\pm$ 0.10%, 17.31% $\pm$ 0.13%。但随着作用时间的延长, HUVEC 活力逐渐减弱, 在 12 h 时, 与对照组相比, 在以上 4 个浓度分别降低 HUVEC 活力 3.65% $\pm$ 0.06%, 12.25% $\pm$ 0.09%, 26.32% $\pm$ 0.12%, 41.54% $\pm$ 0.15%。24 h 时, 细胞活力进一步下降, 分别降低 11.27% $\pm$ 0.11%, 27.36% $\pm$ 0.16%, 50.48% $\pm$ 0.14%, 75.54% $\pm$ 0.32%。说明 H₂O₂ 在低浓度或短时间内对细胞有促进增殖作用, 但长时间内(>12 h), H₂O₂ 促进细胞增殖的作用明显减弱, 甚至有诱导其凋亡的趋势。

(2) CGRP (10、100 nmol/L) 能降低 H₂O₂ (500 μ mol/L) 刺激时 HUVEC 的凋亡率, 同时增加其增殖指数。(2) H₂O₂ 处理后能诱导 p38 MAPK 磷

(下转第 715 页)

收稿日期: 2011-10-31

基金项目: 国家自然科学基金(NO. 30572192, 81173060)。

通讯作者: 秦旭平, 电话: 0734-8281604, E-mail: qinxp333@sina.com.

(上接第 712 页)

酸化,且呈时间依赖性。CGRP(100 nmol/L)预处理 HUVEC 30min 能显著抑制 H_2O_2 处理 5、10、30 min 时 p38 MAPK 磷酸化,其在 3 个时间点的抑制率分别是 $33.21\% \pm 0.10\%$ 、 $24.89\% \pm 0.19\%$ 和 $20.32\% \pm 0.15\%$ (与 H_2O_2 组相比, $P < 0.05$)。

(3) H_2O_2 能显著激活 HUVEC Nox4 蛋白的表达 (与对照组相比增加 $24.43\% \pm 0.14\%$, $P < 0.05$)。p38 MAPK 抑制剂 SB203580 均能抑制 H_2O_2 诱导的 Nox4 表达上调, CGRP 能部分通过抑制 p38 MAPK 磷酸化抑制 H_2O_2 诱导的 Nox4 表达 ($P < 0.05$),并能协同 CGRP 抑制 Nox4 的表达。同样, CGRP 和/或 p38 MAPK 抑制剂 SB203580 均能降低 H_2O_2 诱导的 Nox4 mRNA 表达。

3 讨 论

长期以来,活性氧对细胞命运的影响一直是人们研究的热点。本研究发现,小剂量 H_2O_2 对内皮细胞在短时间 (< 12 h) 有增殖作用,但随着 H_2O_2 浓度的增大以及作用时间的延长, HUVEC 活力逐渐减弱。说明 H_2O_2 在低浓度或短时间内对细胞有促进增殖作用,但随着细胞受活性氧作用时间的延长 (> 12 h), H_2O_2 对细胞的增殖作用明显减弱,甚至有促进其凋亡的作用。 H_2O_2 处理细胞 24 h,能显著激活 Nox4 蛋白的表达。p38 MAPK 抑制剂 SB203580 也能抑制 H_2O_2 诱导的 Nox4 表达上调,说明外源性给予 H_2O_2 激活 Nox4 的过程与 p38 MAPK 信号通路有关。CGRP 可能通过抑制 p38 MAPK 磷酸化抑制 H_2O_2 诱导的 Nox4 的表达,进而降低强活性氧的产生发挥保护内皮的作用,这还需进一步探讨。

(此文编辑 蒋湘莲)