

CGRP 通过抑制 p38MAPK/ NOX4 通路保护 氧化应激诱导的血管内皮细胞损伤

欧奇林¹, 曾泗宇², 骆竞妃³, 彭虹艳³, 洪陈亮³, 曾高峰¹, 秦旭平^{3*}

(1. 南华大学附属第二医院心血管内科 湖南 衡阳 421001;

2. 广东省第二人民医院药物临床试验基地; 3. 南华大学 湖南省分子靶标新药研究协同创新中心)

摘要: **目的** 观察降钙素基因相关肽(CGRP)对氧化应激损伤血管内皮细胞的保护作用及其对 p38 MAPK/NOX4 信号通路的抑制作用。 **方法** 体外培养人脐静脉内皮细胞株(HUVECs), 外源性给予过氧化氢(H_2O_2)或血管紧张素 II (Ang II) 作为氧化刺激因素, CGRP 作为保护剂处理细胞。噻唑蓝比色法(MTT)观察 HUVECs 活力; 流式细胞仪(FCM)观察分析 HUVECs 增殖指数的改变; Western Blot 和 Real-time PCR 分别检测 p38 MAPK、NADPH 氧化酶 4 (NOX4) 蛋白和 mRNA 的表达。 **结果** 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 或 100 nmol/L Ang II 能浓度依赖性地降低 HUVECs 活力和增殖指数(PI); CGRP 可以显著增加 HUVECs 活力和及其 PI。同时, H_2O_2 、Ang II 均能诱导 p38 MAPK 磷酸化, 并能上调 NOX4 蛋白和 mRNA 表达, p38 MAPK 阻断剂能部分增强 CGRP 抑制 Ang II 或 H_2O_2 诱导的 NOX4 的表达。 **结论** CGRP 对内外源性的氧化应激损伤 HUVECs 的保护机制可能与抑制 p38 MAPK/NOX4 信号通路有关。

关键词: 降钙素基因相关肽; 氧化应激; 内皮细胞; NADPH 氧化酶 4

中图分类号: R54 **文献标识码:** A

Inhibition of p38MAPK / NOX4 Signal Pathway Mediates the Protection of CGRP on the HUVECs Injured by Oxidative Stress

OU Qilin, ZENG Siyu, LUO Jingfei, et al

(Department of Cardio Medicine, The Second Affiliated Hospital, University of South China,
Hengyang 421001, Hunan, China)

Abstract: **Objective** To study the protection of calcitonin gene-related peptide (CGRP) on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) injured by oxidative stress, and explore whether the mechanism involved in inhibition of p38MAPK/ NOX4 signal pathway. **Methods** HUVECs cell line were cultured in vitro, angiotensin II (Ang II) or hydrogen peroxide (H_2O_2) serves as the agent of oxidative stress, CGRP serves as the protection agent. MTT was used to test the viability of cells, distribution of cell cycles and proliferation of cells were observed by flow cytometry. The protein or mRNA expressions of the p38 MAPK, NADPH oxidase 4 (NOX4) was measured by Western blot or RT-PCR, respectively.

Results Compared with control group, Ang II or H_2O_2 decreased the cell viability and proliferation index (PI) dose-dependently, which were inhibited by 100 nmol/L CGRP; Meantime, the level of phosphorylated p38 MAPK was induced by Ang II or H_2O_2 , and increased the expression of NOX4. Pretreatment with CGRP and SB 203580 can inhibit the up-regulation of NOX4 induced by Ang II or H_2O_2 . **Conclusions** The protection of CGRP on the HUVECs injured by oxidative stress from in vitro (H_2O_2) or in vivo (Ang II) is related to inhibition of p38MAPK/ NOX4 signal pathway.

Key words: CGRP; oxidative stress; endothelial cell; NADPH Oxidase4

血管内皮损伤及其功能紊乱是引起心血管疾病发生发展的起始事件^[1]。探讨内皮损伤的病理过程对治疗各种心血管疾病具有重要意义。活性氧(ROS)主要包括羟基自由基(-OH)、过氧化氢(H₂O₂)、超氧阴离子(-O₂⁻)、单线态氧(1O₂)等。近年研究表明 ROS 在内皮损伤中的作用不容忽视。多种细胞生长因子,如血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)^[2],血小板源性生长因子(PDGF)^[3]能通过激发内源性的 ROS 损伤血管内皮细胞。研究明确烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化酶,简称 NADPH 氧化酶(NADPH oxidase, Nox)是血管内生成 ROS 的主要酶类^[4]。有证据证明,NOX4 在内皮细胞中的表达显著高于其它 Nox 成员,研究数据证实 NOX4 对内皮氧化还原反应发挥关键作用,并对内皮细胞生理有重要的功能性调节作用^[5]。降钙素基因相关肽(CGRP)是目前已知的最强舒张血管的神经多肽,其舒张血管作用与保护内皮细胞功能相关^[6]。本研究拟证明,CGRP 通过对抗内外源性氧化应激保护内皮细胞功能的机制,为阐明 CGRP 的生理功能提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂 人脐静脉内皮细胞株(HUVECs)(Catalog Number: C-003-5C)购自上海拜力生物技术公司。CGRP、Ang Ⅱ(Sigma 公司)、β-actin 多克隆抗体(长沙艾杰生物技术有限公司)、NOX4 多克隆一抗(Santa Cruze 公司)、P38 MAPK/P-p38 MAPK 兔源单克隆抗体(cell signaling technology 公司);辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔或二抗(Santa Cruze 公司);Real-time quantitative PCR 试剂盒(广州东盛生物技术有限公司);优质胎牛血清(杭州四季青公司)。

1.2 HUVECs 培养 HUVEC 接种于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 10 μg/mL 链霉素的 DMEM 培养基中,置于 37 ℃、5% 的 CO₂ 的培养箱内培养。细胞用 0.25% 的胰酶消化传代,取长势良好的细胞用于实验。

1.3 MTT 法检测细胞的活力 将 HUVECs 在 DMEM 培养基制成单个细胞悬液,以每孔 2×10^3 个细胞接种于 96 孔培养板中,并放入 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养,待细胞长到 50% 融合时更换含 0.1% 血清的 DMEM 培养基(每孔 180 μL)同步化 24 h,之后分别按

实验要求分组处理。①对照组(0.1% 血清的 DMEM 培养),实验组在此基础上分别加入 H₂O₂、AngⅡ或 CGRP 处理;观察 CGRP 保护作用时,CGRP 预处理 30 min 后再加 H₂O₂ 或 AngⅡ处理 24 h。随后在培养板中加入 $10 \times$ MTT 20 μL/孔,继续培养 4 h,弃去培养基,加入 200 μL DMSO,37 ℃孵育 10 min,酶联免疫检测仪测定在波长为 570 nm 时的光密度值(OD₅₇₀)。

1.4 流式细胞术检测细胞周期和增殖 将 100 mL 细胞培养瓶中的 HUVEC 用含 0.1% 血清的 DMEM 培养基同步化 24 h,后按要求(见方法 1.3)处理细胞。随后收集细胞,PBS 清洗一遍,弃上清,每组用 1 mL 75% 乙醇固定。样品寄至北京中国中医科学院基础理论研究所检测。

1.5 Western Blot 检测蛋白表达 按实验要求(见方法 1.3)处理细胞,按照细胞浆/核/膜/结构蛋白抽提试剂盒步骤提取细胞蛋白。按照 BCA 试剂盒说明用酶联免疫检测仪检测 OD₅₇₀ 计算蛋白含量。将提取的细胞总蛋白的上样缓冲液 100 ℃煮 5 min 后冰浴,配制 10% 分离胶和 5% 积层胶,灌 1.5 mm 板,100 V 电压跑过积层胶后,换 160 V 电压跑分离胶,将电泳总时间控制在 90 min 之内。然后转膜、丽春红染色观察蛋白质转移情况。5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,1:1000 加入 p38 MAPK、NOX4 和 β-actin 等一抗,4 ℃孵育过夜,TBST 洗涤 15 min,每 5 min 换液 1 次。1:2000 加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗、山羊抗鼠二抗,37 ℃孵育 45 min,TBST 洗涤 45 min,每 15 min 换液 1 次。然后在暗室中滴加化学发光试剂激发荧光,压片,然后显影、定影。图片用 AlphaImager2200 进行灰度扫描。

1.6 RT-PCR 检测 NOX4 mRNA 表达 NOX4 和 GAPDH 引物由艾杰生物公司设计,并由北京三博远志生物公司合成。NOX4 正义链:AACTTATGTTCCCTGGCTATC,反义链:TCTTGAAGCTCTGACCTCGT;GAPDH 正义链:CTGCACCACCAACTGCTTAG,反义链:AGGTCCACCACTGACACGTT。

细胞按实验要求处理后,提取总 RNA 并合成 cDNA。-20 ℃长期保存。在八联管中依次加入:第一链 cDNA 1 μL、引物 2 μL,2 × SYBR Green qPCR Mix 15 μL,ddH₂O 补至 25 μL。荧光 PCR 仪上按以下步骤进行:94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 45 s、NOX4 和 GAPDH 50 ℃退火延伸共 1 min,40 个循环。最后 72 ℃终延伸 10 min。55 ℃到 95 ℃之间每 0.5 ℃为一个梯度,每个梯度延续 10 s,测定引物的融解曲线。统计 Ct 值,

根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法表示相对定量结果。以 GAPDH 作为内参,根据公式 $\Delta Ct = [Ct(NOX4)] - [Ct(GAPDH)]$ 、 $\Delta\Delta Ct = [\Delta Ct(\text{实验组}) - \Delta Ct(\text{对照组})]$, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示实验组 NOX4 相对于对照组原始拷贝数的倍数差异。

1.7 统计学方法 各组实验重复三次,数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 SPSS16.0 for windows 软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)检验分析,取 $P < 0.05$ 作为具有统计显著性差异标准。

2 结 果

2.1 CGRP 逆转 Ang II 或 H₂O₂ 对 HUVECs 生长的

抑制作用 根据本组前期研究结果和本次结果可以看出,CGRP 能剂量依赖性增加 HUVECs 活力(图 1A),Ang II 或 H₂O₂ 剂量依赖性地降低 HUVECs 活力(图 1B,1C)。按照保护或损伤有明细差异的原则,我们选择处理细胞的剂量分别是:CGRP 100 nmol/L、H₂O₂ 500 μ mol/L、Ang II 100 nmol/L;给予 CGRP 分别预处理 HUVEC 30 min,如图 1D 所示,CGRP 能使 Ang II 或 H₂O₂ 损伤的 HUVEC 活力增加,说明 CGRP 具有明显的抗氧化作用。另外,从流式细胞仪结果(表 1)看,CGRP 具有明显的促进内皮细胞增殖,并对抗 Ang II 或 H₂O₂ 对 HUVECs 的抑制增殖或损伤作用。

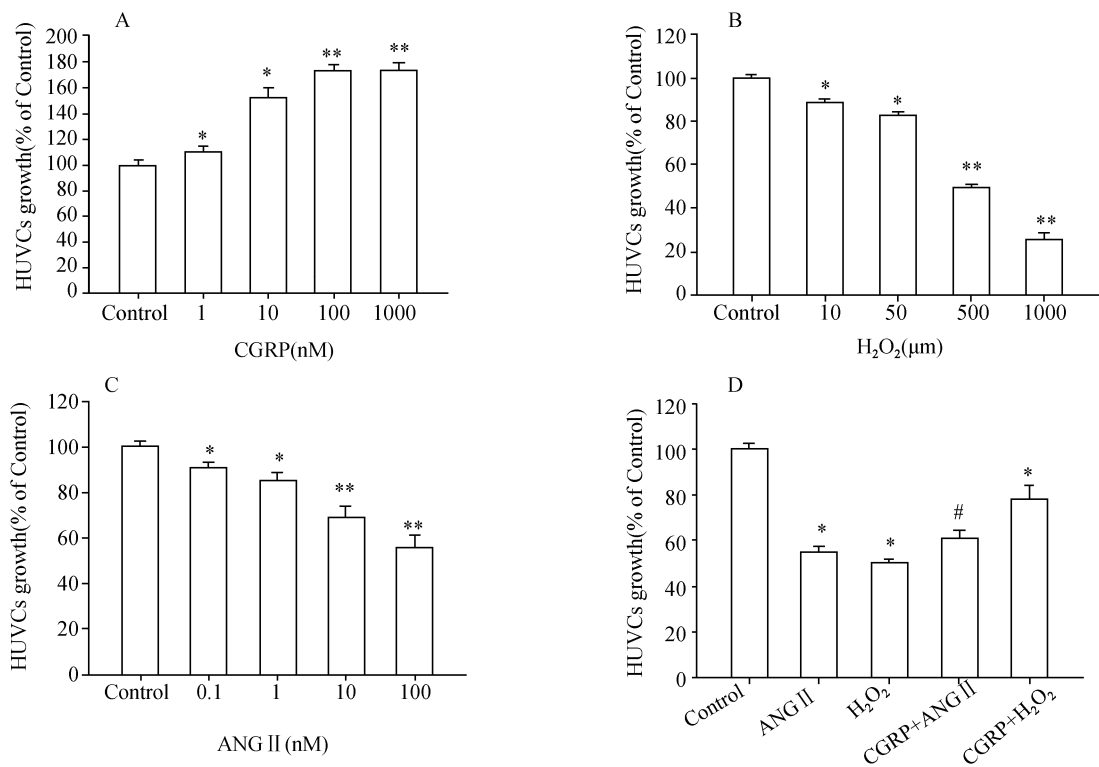


图 1 CGRP 对 Ang II 或 H₂O₂ 抑制 HUVECs 生长作用的影响 A、B、C 分别为 CGRP、H₂O₂、Ang II 对细胞作用的量—效关系,D: CGRP(100 nmol/L) 预处理对 Ang II (100 nmol/L) 或 H₂O₂ (500 μ mol/L) 损伤细胞的保护作用。与对照组 (Control) 比较, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$;与 Ang II 比较, #: $P < 0.05$;与 H₂O₂ 比较 + : $P < 0.05$, ($n = 3$)

2.2 H₂O₂, Ang II 通过 P38 MAPK 磷酸化诱导 NOX4 表达 为了观察 Ang II 或 H₂O₂ 对氧化应激 p38 MAPK 信号通路的影响,用 Ang II (100 nmol/L) 或 500 μ mol/L H₂O₂ 以及 SB 203580 (p38 MAPK 磷酸化抑制剂) 分别处理 HUVECs 10 min,观察 p38 MAPK 磷酸化水平的变化。如图 2 所示,Ang II 或 H₂O₂ 能显著增加磷酸化 p38 MAPK

(p-p38 MAPK) 表达(A) 和 NOX4 的蛋白表达(B) 水平,给予 SB 203580 后,p-p38 MAPK 表达显著降低,同时,也降低了 NOX4 的蛋白表达。说明内源性 (Ang II) 和外源性 (H₂O₂) 氧化应激均通过 p38 MAPK 信号通路发生作用。

2.3 CGRP 对 Ang II (A) 或 H₂O₂ 对 NOX4 表达的影响 如图 3 所示,与对照组相比,单独 CGRP

表 1 CGRP 对 ANG II 或 H₂O₂ 引起的 HUVECs 周期分布的影响

组别	G ₁ /G ₀ %	S%	G ₂ /M%	PI 值%
Control	44.8 ± 0.35	43.9 ± 0.27	11.3 ± 0.11	55.2 ± 0.35
Ang II	50.5 ± 0.15	42.6 ± 0.42	7.1 ± 0.46	49.6 ± 0.21 ^a
H ₂ O ₂	51.0 ± 2.6	40.6 ± 2.2 ^a	8.4 ± 0.8	46.8 ± 0.45 ^a
CGRP + Ang II	41.0 ± 0.61	47.6 ± 0.83 ^b	11.4 ± 0.31	59.0 ± 0.60 ^b
GRP + H ₂ O ₂	40.8 ± 4.2	45.6 ± 4.1 ^b	10.0 ± 1.2	61.1 ± 1.3 ^b

G₁/G₀:停留于 G₁/G₀ 期(无增殖活动期)细胞的百分数;S: DNA 合成期细胞的百分数;G₂:DNA 合成后期细胞的百分数;M: DNA 分裂细胞的百分数.PI = (S + G₂M)/(G₁G₀ + S + G₂M),与对照组(Control)a:P < 0.01;与 Ang II 或 H₂O₂ 比较,b:P < 0.05

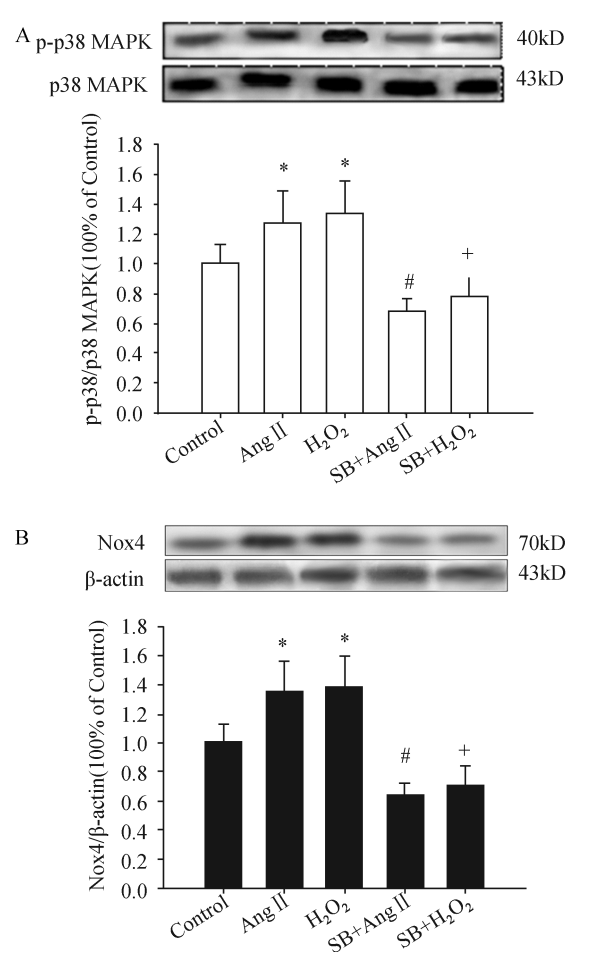


图 2 抑制 p38MAPK 磷酸化对 Ang II 或 H₂O₂ 诱导细胞内 NOX4 表达的影响 A:p38MAPK 磷酸化蛋白表达,B:NOX4 蛋白表达;SB:SB 203580(p38 MAPK 磷酸化抑制剂);与对照组(Control)比较,* :P < 0.05,与 Ang II 比较,#:P < 0.01,与 H₂O₂ 比较,+ :P < 0.01(n = 3)

能明显降低 NOX4 蛋白(图 3A)和 mRNA(图 3B)的表达,p38 MAPK 磷酸化抑制剂 SB203580 能取消 CGRP 这种抑制作用,说明 CGRP 是通过 p38 MAPK

磷酸化诱导 NOX4 表达增加;给细胞预孵育 CGRP 30 min,再给予 Ang II 或 H₂O₂ 共培养细胞 24 h。与比对照组相比,NOX4 表达并没有增加,且略有降低,结合图 2B 中 Ang II 及 H₂O₂ 单独应用的结果,说明 CGRP 对 Ang II 或 H₂O₂ 诱导的 NOX4 表达增加有抑制作用;CGRP 加 p38 MAPK 磷酸化抑制剂 SB203580 共预孵育细胞 30 min,并能进一步降低 CGRP 对 Ang II 或 H₂O₂ 诱导的 NOX4 表达能力。说明 CGRP 对 Ang II 或 H₂O₂ 诱导的 NOX4 表达的抑制作用可能部分通过 p38 MAPK 信号途径。

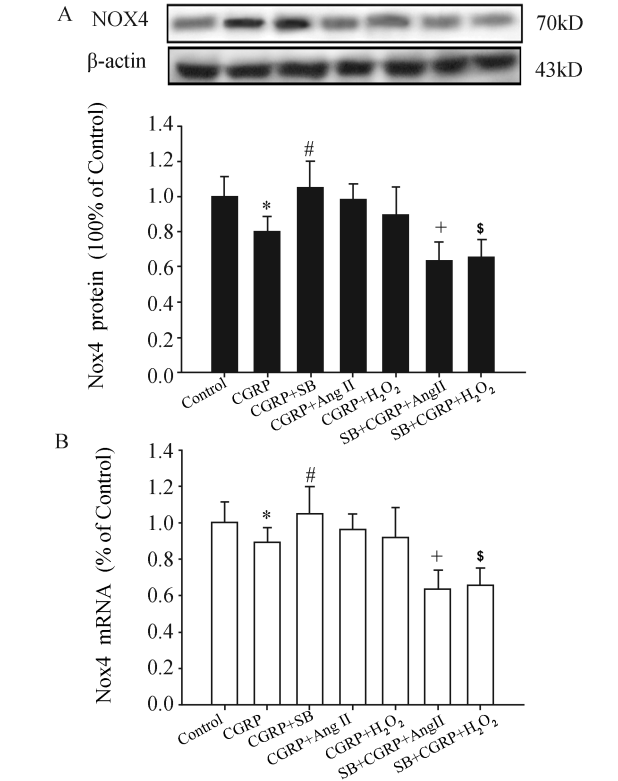


图 3 CGRP 对 Ang II 或 H₂O₂ 诱导的 NOX4 表达影响 A:蛋白质表达;B:mRNA 表达(n = 3),SB:SB 203580 是 p38 MAPK 磷酸化抑制剂;与对照组(Control)比较,* :P < 0.05,与 CGRP 比较,#:P < 0.05;与 CGRP + Ang II 比较,+ :P < 0.01;与 CGRP + H₂O₂ 比较,\$:P < 0.05(n = 3)

3 讨 论

本研究发现,无论是外源性 H₂O₂ 还是 Ang II 内源性刺激血管内皮细胞可能通过激活 p38 MAPK 磷酸化导致内源性氧化应激增加 NOX4 表达,导致内源性 ROS 增加并引起 HUVEC 损伤;CGRP 保护 HUVEC 的机制可能与通过抑制 p38 MAPK 磷酸化水平、下调 NOX4 表达有关。

氧化应激是指多种原因致使体内的 ROS (如 H_2O_2 、OH、 O_2^-) 及其相关物质在体内或细胞内蓄积而引起的氧化损伤过程。ROS 作用于机体细胞和组织后,生物分子受损,并产生更多的 ROS,从而导致疾病产生渐进式损害(如高血压、糖尿病、高脂血症等)。ROS 既是促氧化中的主要参与者,也是细胞的重要信号分子。

研究报道,外源性的 Ang II 增加平滑肌细胞 NADPH 氧化酶源性 ROS 的产生,损伤平滑肌细胞引起血管重构^[7],外源性 Ang II 增加平滑肌细胞中 VPO1 蛋白及 mRNA 表达,伴随胞内 H_2O_2 增加;用外源性的 H_2O_2 刺激平滑肌细胞,显著上调胞内血管过氧化酶(VPO1)表达和 HOCL 水平^[8]。在血管内皮细胞中,NOX4 是 NADPH 氧化酶的调节亚基,被认为是 O_2^- 产生的主要来源。关于 Ang II 引起内源性氧化应激(H_2O_2) 损伤是否与直接加入外源性 H_2O_2 损伤内皮细胞都通过相同信号通路还不太清楚。本实验结果显示,外源性给予 Ang II 或 H_2O_2 都能够剂量依赖性地使 HUVECs 活性降低,CGRP 保护能在一定程度上抗两者诱导的细胞活性降低,并增加 HUVECs 的生长。这与文献报道一致^[10]。

研究显示,MAPK 家族中的 p38 MAPK 信号通路主要介导细胞氧化应激损伤^[11]。本实验结果显示, H_2O_2 和 Ang II 能显著升高磷酸化 p38 MAPK 及 NOX4 表达水平,可能是由于过多的 Ang II 和 H_2O_2 处理内皮细胞后引发 p38 MAPK 磷酸化使内源性 ROS 浓度升高,进而引起细胞损伤,降低内皮细胞增殖,甚至是细胞凋亡。100nmol/LCGRP 干预后,能明显下调 H_2O_2 和 Ang II 引起的磷酸化 p38 MAPK 水平,且给予 p38 MAPK 磷酸化抑制剂 SB203580 能抑制 H_2O_2 和 Ang II 诱导的 NOX4 蛋白和 mRNA 的表达,提示 CGRP 可能不是直接作用于 NOX4,而可能通过抑制 p38 MAPK 磷酸化进而抑制 NOX4 表达。

总之,本实验证明,在 H_2O_2 和 Ang II 诱导的 HUVEC 损伤过程中,NOX4 呈激活状态,说明 NOX4 与 HUVEC 损伤密切相关,CGRP 对 HUVECs 的保护作用也可能与下调 p38 MAPK 磷酸化和进而抑制 NOX4 表达有关。

参考文献:

- [1] Kasprzak JD, Klosinska M, Drozd J. Clinical aspects of assessment of endothelial function [J]. *Pharmacol Rep*, 2006, 58 (Suppl): 33-40.
- [2] Griending KK, Sorescu D, Lassègue B, et al. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20 (10): 2175-2183.
- [3] Sundaresan M, Zu-Xi Y, Ferrans VJ, et al. Requirement for generation of H_2O_2 for platelet-derived growth factor signal transduction [J]. *Science*, 1995, 270 (5234): 296-299.
- [4] Di Lisa F, Kaludercic N, Paolocci N. β_2 -Adrenoceptors, NADPH oxidase, ROS and p38 MAPK; another 'radical' road to heart failure [J]. *Br J Pharmacol*, 2011, 162 (5): 1009-1011.
- [5] Petry A, Djordjevic T, Weitnauer M, et al. NOX2 and NOX4 mediate proliferative response in endothelial cells [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2006, 8 (9-10): 1473-1484.
- [6] Chattergoon NN, D'Souza FM, Deng W, et al. The anti-proliferative effects of calcitonin gene-related peptide in aortic and pulmonary artery smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005, 288 (1): L202-L211.
- [7] Peng H, Li W, Seth DM, et al. (Pro)renin Receptor mediates both angiotensin II dependent and -independent oxidative stress in neuronal cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (3): e58339.
- [8] Shi R, Hu C, Yuan Q, et al. Involvement of vascular peroxidase 1 in angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell proliferation [J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 91 (1): 27-36.
- [9] Liu T1, Shen D, Xing S, et al. Attenuation of exogenous angiotensin II stress-induced damage and apoptosis in human vascular endothelial cells via microRNA-155 expression [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31 (1): 188-196.
- [10] 朱怡, 周孝钱, 全海燕, 等. Caveolae 在 CGRP 保护人脐静脉内皮细胞中的作用及机制 [J]. *中南医学科学杂志*, 2015, 43 (2): 132-133.
- [11] Guo RW, Yang LX, Li MQ, et al. Angiotensin II induces NF- κ B activation in HUVEC via the p38MAPK pathway [J]. *Peptides*, 2006, 27 (12): 3269-3275.

(此文编辑:秦旭平)