

Ang II 对人脐静脉内皮细胞 CGRP 受体组分的调节差异

吴媛¹, 彭虹艳^{2#}, 朱怡¹, 骆竟妃², 秦旭平^{2*}

(1. 南华大学附属第二医院检验科, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学药物药理研究所)

摘要: **目的** 探讨血管紧张素 II 对人脐静脉内皮细胞(HUVECs)中降钙素基因相关肽(CGRP)受体组分的影响。**方法** 以 HUVECs 作为实验对象,用无血清培养基同步化 24 h 后,以 Ang II 非处理细胞为对照组,Ang II 处理组为不同剂量的 Ang II 处理 HUVECs 12 h,流式细胞仪检测细胞增殖率和凋亡率。Western Blot 检测 CGRP 三种受体组分,即降钙素受体样受体(CRLR)、降钙素受体组分蛋白(RCP)和受体修饰蛋白(RAMP)1 的蛋白表达。**结果** 与对照组相比,在处理组细胞,Ang II 呈剂量依赖性地抑制 HUVECs 增殖和诱导细胞凋亡,同时上调 CRLR 表达($P < 0.01$)。而对另外两个受体蛋白而言,Ang II (0.01 ~ 100 nmol/L)呈剂量依赖性的下调 HUVECs 的 RAMP1 的表达和 RCP 表达($P < 0.05$)。**结论** Ang II 影响人脐静脉内皮细胞 CGRP 受体组分的表达存在差异,可引起人脐静脉内皮细胞 CGRP 受体功能改变。

关键词: 血管紧张素 II; 降钙素基因相关肽受体; 人脐静脉内皮细胞

中图分类号:R972

文献标识码:A

Difference of Expression of CGRP Receptor Components Regulated by Angiotensin II in Human Umbilical Vein Endothelial Cells

WU Yuan, PENG Hongyan, ZHU Yi, et al

(Clinical Laboratory of the Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of angiotensin II on the expression of calcitonin gene related peptide (CGRP) in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods** HUVECs was employed as the experimental object, cells were incubated by free serum for 24 h for synchronous cell cycle, then, Ang II group cells were incubated with different concentration of angiotensin II (Ang II), the control cells were incubated by free Ang II. The cell proliferation and apoptosis were observed by flow cytometry. Western blot was used to determine the expressions of calcitonin receptor like receptor (CRLR), receptor activity modifying protein-1 (RAMP1) and receptor component protein (RCP). **Results** Compared with the control group, in the treated cells, Ang II inhibited the HUVECs proliferation and induced cell apoptosis, and also up-regulated the CRLR expression of HUVECs ($P < 0.01$) as well. In addition to the other two receptor proteins, Ang II (0.01 ~ 100 nmol/L) down regulated expression of RAMP1 and RCP expression ($P < 0.05$) in a dose-dependent manner. **Conclusion** Ang II can affect the expression of CGRP receptor in HUVECs, which can cause the functional changes of CGRP receptor in the cells.

Key words: angiotensin II; calcitonin gen related-peptide receptor; human umbilical vein endothelial cell

内皮细胞损伤与动脉粥样硬化、高血压等多种心血管疾病的发生密切相关。正常生理状态下,内

皮细胞能够产生一些细胞因子通过调节血管张力、细胞生长和死亡、血液凝固等外周环境的变化,来维持其功能的稳定性。当各种损伤因素导致其功能失代偿时,其细胞受体和离子通道可能发生变化,进而加重细胞损伤。血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 是肾素-血管紧张素系统中的主要活性肽^[1]。

收稿日期:2015-10-29;修回日期:2015-12-28

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 81173060, 81500041)。

* 通讯作者, E-mail: qinxp333@hotmail.com.

#: 同为第一作者。

Ang II 可通过多种途径如刺激细胞壁产生过量活性氧簇(reactive oxygen space, ROS)、致敏血小板、促进血管内皮细胞表达粘附分子、抑制一氧化氮(nitrogen monoxide, NO)产生以及促进血管内皮细胞凋亡等作用损伤血管内皮^[2-3],但 Ang II 作用的具体机制仍不十分明确。

降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)是目前已知的最强的扩血管物质之一,并对心血管功能保护有重要作用。CGRP 受体是由降钙素受体样受体(calcitonin receptor-like receptor, CRLR),受体活性修饰蛋白 1(receptor activity modifying protein, RAMP1),受体组分蛋白(receptor component protein, RCP)三个组分组成^[4]。前期工作表明,CGRP 能抑制 Ang II 诱导的血管平滑肌细胞增殖和内皮细胞损伤,其机制可能与干扰受体后信号通路如 ERK1/2, P38MAPK 有关^[5]。但 Ang II 是否影响细胞 CGRP 受体发生重构,仍不清楚,本研究以内皮细胞为研究对象,探讨 Ang II 诱导的内皮细胞功能障碍是否伴随有 CGRP 受体成分的变化,为研究不同血管活性物质之间的相互作用提供新思路。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂 Ang II 购于美国 Sigma 公司;低糖 DMEM 培养基购于美国 Hyclone 公司;胎牛血清为天津灏洋生物公司;BCA 蛋白定量试剂盒购于康为世纪公司;胰蛋白酶为碧云天生物公司。RAMP1、CRLR、RCP、 β -actin 一抗购于 Santa 公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 细胞培养 人脐静脉内皮细胞接种于含 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养基,置于 37 ℃, 5% CO₂ 的培养箱内培养。细胞经胰蛋白酶消化传代、收集,取对数生长期细胞进行后续实验。用无血清培养基同步化 24 h 后,以 Ang II 非处理细胞为对照组,Ang II 处理组为不同剂量的 Ang II 处理 HUVECs 12 h。

1.3 PI 单染色流式细胞术 取对数生长期的 HUVECs,以 2×10^5 个/mL 的细胞密度接种于 50 mL 培养瓶中,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养,待细胞长至 70% ~ 80% 融合状态时,更换为含 0.1% FBS 的 1640 培养 24 h 使细胞同步化,再按分组加入不同的处理因素继续孵育后收集细胞。PBS 液清洗 1 次,用 0.25% 的胰蛋白酶消化细胞,含 10%

FBS 的 1640 终止消化,吹打成细胞悬液后,4 ℃, 100 00 rpm 离心 5 min,弃上清,用体积分数为 75% 冰乙醇吹打成单细胞悬液,吸入到的 EP 管中,4 ℃ 固定过夜。样品寄北京中国中医科学院基础理论研究所流式细胞仪(FCM)检测细胞凋亡与增殖。

1.4 Western blot 收集不同浓度 AngII 处理的人脐静脉内皮细胞,细胞裂解液(RIPA: PMSF = 6: 1)冰上裂解 15 min,4 ℃、12 000 rpm 离心 15 min,取上清;BCA 试剂盒测定蛋白含量;上清液中加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液,100 ℃沸水煮 10 min;经 12% 分离胶/5% 浓缩胶的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 1.5 h,电转 2 h 至 PVDF 膜上。用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 2 h;分别按照 1: 1 000、1: 650、1: 200、1: 100 的浓度加入 β -actin、RCP、CRLR、RAMP1 一抗,4 ℃ 孵育过夜,TBST 洗 3 次;按照 1: 5 000 浓度孵育辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔、山羊抗鼠二抗,室温摇晃 45 min,TBST 洗 3 次;用 Western blot 荧光检测试剂盒显影 1 ~ 20 min,定影 1 min;结果图用 AlphaImager2200 进行图片灰度扫描。

1.5 统计学方法 数据以均数 $\pm$ 标准差表示,采用 Graph Pad Prism5 进行统计分析和作图,两样本均数比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HUVECs 增殖与凋亡率 前期研究表明,Ang II 对 HUVECs 的增殖和凋亡有影响。本研究采用流式细胞术结果发现,选用不同浓度(0.01、1、100 nmol/L) Ang II 刺激 HUVECs 24 h 后,结果显示 0.01、1、100 nmol/L 浓度的 Ang II 呈浓度依赖性抑制 HUVECs 的增殖或活力。在 100 nmol/L Ang II 时的抑制作用达到最大。Ang II 对细胞凋亡的影响趋势却与增殖相反,随着 Ang II 浓度的增加 HUVECs 的凋亡率也增加(见表 1)。

表 1 不同浓度的 Ang II 对 HUVECs 增殖和凋亡的影响

组别	凋亡率(%)	增殖率(%)
对照组	2.76 $\pm$ 0.35	100 $\pm$ 8.21
Ang II (nmol/L)		
0.01	2.89 $\pm$ 0.77	90.8 $\pm$ 8.71 ^a
1.00	29.2 $\pm$ 1.24 ^a	85.3 $\pm$ 9.03 ^a
100	79.6 $\pm$ 1.35 ^b	55.7 $\pm$ 8.03 ^b

与对照组比较,a:*P* < 0.05,b:*P* < 0.01

2.2 Ang II对 CRLR 表达的影响 CRLR 是一个 7 个跨膜蛋白,从图 1 可以看出,与对照组相比,Ang II 能使内皮细胞 CRLR 蛋白表达增加。并表现出剂量依赖性,在 1 nmol/L 时差异有显著性($P < 0.01$)。

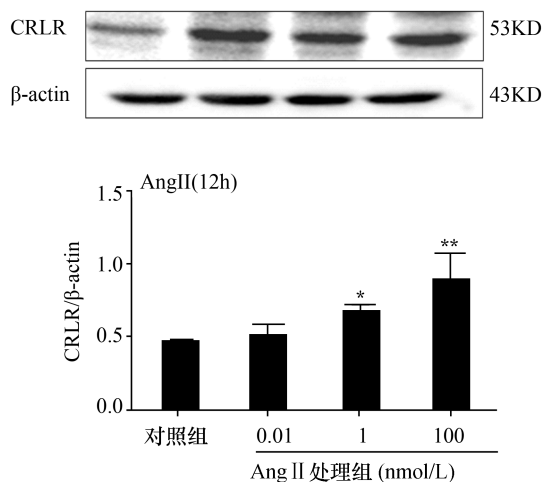


图 1 血管紧张素 II 对内皮细胞 CRLR 表达的影响 与对照组比较, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ ($n = 3$)

2.3 Ang II 对 RAMP1 表达的影响 RAMP1 是受体伴随蛋白,与 CRLR 的分布有关,从图 2 可以看出,与对照组相比,Ang II 能使内皮细胞 RAMP1 蛋白表达降低。在 0.01 nmol/L 时差异具有统计学意义($P < 0.01$),但在 100 nmol/L 时,Ang II 对 RAMP1 表达抑制作用,虽然与 1 nmol/L 有所升高,但与对照组比较仍有降低趋势($P < 0.05$)。

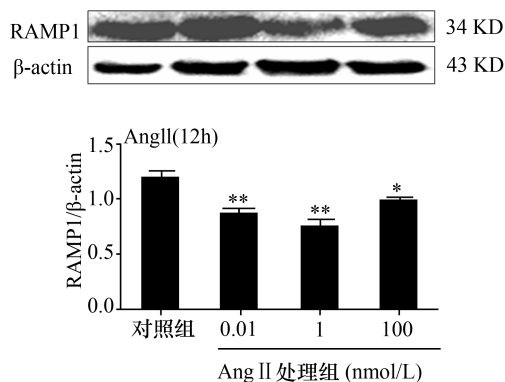


图 2 血管紧张素 II 对内皮细胞 RAMP1 表达的影响 与对照组比较, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ ($n = 3$)

2.4 Ang II 对 RCP 表达的影响 RCP 是受体周边蛋白,与 CRLR 的信号转导有关,从图 3 可以看

出,与对照组相比,Ang II 能使内皮细胞 RCP 蛋白表达降低,并具有剂量依赖性。但在 100 nmol/L 时,Ang II 对 RCP 表达抑制作用才具有统计学意义($P < 0.05$)。Ang II 对 RCP 蛋白的表达影响与其他两个受体蛋白表达有差异。

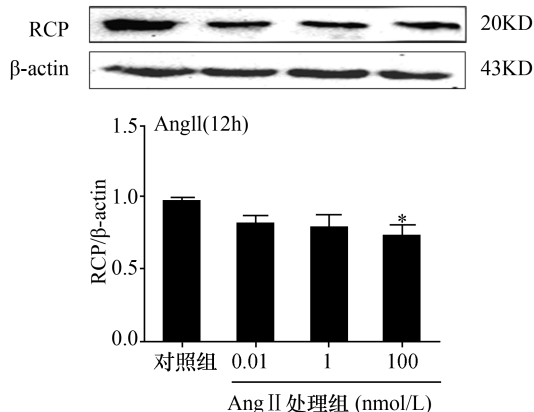


图 3 血管紧张素 II 对内皮细胞 RCP 表达的影响 与对照组比较, *: $P < 0.05$ ($n = 3$)

3 讨 论

本研究发现,在 Ang II 诱导的内皮细胞功能障碍的同时伴随有 CGRP 受体成分的变化,具体表现在 Ang II 可上调 HUVECs 的 CRLR 表达,而下调 HUVECs 的 RAMP1 和 RCP 表达,说明 Ang II 对 CGRP 受体成分的影响不同。

已知,CGRP 对心血管系统有保护作用主要通过其受体实现,CRLR 是 7 次跨膜的 G 蛋白偶联受体蛋白,其本身不具有生物活性,单独转染 CRLR 基因,则表现为非功能型的受体形式,其主要与 CGRP 结合,在 RAMP1 伴随下才能介导 CGRP 的生物学功能。RCP 是 CGRP 受体的一个成分蛋白,存在于膜内周边,协助 RAMP1 和 CRLR 信号跨膜转导中起作用^[4]。本实验结果显示,Ang II 诱导内皮细胞凋亡和抑制其增殖的同时,虽然也使 CRLR 蛋白表达增加,代偿性增强 CGRP 与 CRLR 结合,这与对血管平滑肌细胞一致^[6],但 Ang II 同时也使内皮细胞 RAMP1 和 RCP 表达降低,使 CRLR 的分布和信号转导受到障碍。故在 Ang II 过量刺激下,CGRP 的受体功能会受到影响,推测受体成分发生重构是影响 CGRP 信号转导的主要原因。本实验也进一步证明 CGRP 和 Ang II 的相互作用不仅仅在细胞浆的酶

水平,如 ERK1/2, P38MAPK 等水平^[7-8],也存在与细胞受体或信号跨膜转导水平,这与在血管平滑肌细胞相似^[6,9]。有研究表明, RCP 不仅是 CGRP 受体的主要成分,可能也参与了其他活性肽的信号转导,如 ADM, Amylin^[10-11],其机制是 RCP 是参与了 CRLR/RAMP 信号传递作用^[12],另外,也有研究证明在鼠 RAMP1 可能还参与了抗原诱导的呼吸道敏感性^[13]。总之,不仅仅是 Ang II,其他病理刺激也可能通过影响 CGRP 受体重构,导致某些疾病的发生发展,这些证据还需进一步研究。

参考文献:

- [1] Miura S, Karnik SS, Saku K. Angiotensin II type 1 receptor blockers: Class effects vs. Molecular effects [J]. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2011, 12(1): 1-7.
- [2] 王利, 罗义, 杨阳, 等. 血管紧张素 II 及缬沙坦对培养人脐静脉内皮细胞产生纤溶因子的影响[J]. 岭南心血管病杂志, 2007, 13(1): 54-57.
- [3] 杨丽娟, 母义明. 血管紧张素 II 在细胞凋亡中的作用[J]. 第二军医大学学报, 2006, 27(12): 1368-1371.
- [4] 孙飞, 秦旭平. 降钙素基因相关肽受体生命的化学, 2009, 29(5): 731-734.
- [5] 欧奇林, 曾泗宇, 骆竞妃, 等. 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, 中南医学科学杂志, 2015, 43(4): 374-378.
- [6] 孙飞, 唐江琼, 郑元斌, 等. 高表达受体活性修饰蛋白 1 对血管紧张素 II 和降钙素基因相关肽诱导的 A10 细胞降钙素受体样受体膜分布的影响中国药理学与毒理学杂志 2013, 27(2): 209-215.
- [7] 徐竞鸥, 于潇华, 汪煜华, 等. P38MAPK/NOX4 通路介导 CGRP 对氧化损伤 HUVECs 保护作用[J]. 中南医学科学杂志, 2011, 39(6): 712-715.
- [8] Chen Y, Dai Z, Liu YM, et al. Inhibitory Effects of CGRP on Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation: Role of Caveolae/ caveolin-1/ ERK1/2 Signal Pathway[J]. Prog Biochem Biophys, 2013, 40(5): 445 - 53.
- [9] 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氢酶 1 表达调控中的作用[J]. 生理学报, 2015, 67(2): 193-200.
- [10] Evans BN. CGRP-RCP, a novel protein required for signal transduction at calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin receptors [J]. J Biol Chem, 2000, 275(40): 31438-31443.
- [11] Liao SB, Cheung KH, Cheung MP, et al. Adrenomedullin increased the short-circuit current in the pig oviduct through chloride channels via the CGRP receptor; mediation by cAMP and calcium ions but not by nitric oxide [J]. Biol Reprod, 2013, 89(4): 99.
- [12] Dickerson IM. Role of CGRP-receptor component protein (RCP) in CLR/RAMP function[J]. Curr Protein Pept Sci, 2013, 14(5): 407-415.
- [13] Li M, Wetzel-Strong SE, Hua X, et al. Deficiency of RAMP1 attenuates antigen-induced airway hyperresponsiveness in mice[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e102356.

(本文编辑: 蒋湘莲)