

[文章编号] 1007-3949(2007)15-06-0431-04

• 实验研究 •

血管紧张素 Ang II 上调血管平滑肌细胞富含半胱氨酸蛋白 61 的表达

付 鹏, 牛铁生, 孙英贤

(中国医科大学附属盛京医院心内科, 辽宁省沈阳市 110004)

[关键词] 病理学与病理生理学; 血管紧张素 Ang II ; 血管平滑肌细胞; 富含半胱氨酸蛋白 61; 细胞外信号调节激酶; 丝裂原活化蛋白激酶

[摘要] 目的 探讨血管紧张素 Ang II 对培养鼠血管平滑肌细胞富含半胱氨酸蛋白 61 的影响及其可能的转导通路。方法 组织贴块法培养血管平滑肌细胞, 血管紧张素 Ang II 处理平滑肌细胞 15 min、30 min、60 min、180 min, PD98059 在血管紧张素 Ang II 刺激细胞前 1 h 加到培养基中, 用逆转录聚合酶链反应和 Western blotting 检测分析富含半胱氨酸蛋白 61 的表达。结果 逆转录聚合酶链反应分析显示用 1 $\mu\text{mol/L}$ 血管紧张素 Ang II 刺激细胞培养 15 min、30 min 富含半胱氨酸蛋白 61 的表达与对照组相比明显增加; 同时细胞外信号调节激酶 1/2 活性高于对照组 ($P < 0.01$), 60 min 时仍有表达, 180 min 时减弱; 细胞外信号调节激酶 1/2 特异性抑制剂 PD98059 (20 $\mu\text{mol/L}$) 能阻断血管紧张素 Ang II 上调富含半胱氨酸蛋白 61 的表达并抑制增加的磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2 活性。结论 血管紧张素 Ang II 通过细胞外信号调节激酶 1/2 促进血管平滑肌细胞上调富含半胱氨酸蛋白 61 表达, 这可能是血管紧张素 Ang II 促血管平滑肌细胞增殖的一个重要机制。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Angiotensin Ang II Up-Regulates Vascular Smooth Muscle Cells Cysteine-Rich 61 Expression Via Extracellular Signal Regulated Kinase 1/2

FU Peng, NIU Tie-Sheng, and SUN Ying-Xian

(Department of Cardiology, Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China)

[KEY WORDS] Angiotensin Ang II ; Vascular Smooth Muscle Cells; Cysteine-Rich 61; Mitogen-Activated Protein Kinases; Extracellular Signal Regulated Kinase

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of angiotensin Ang II on cysteine-rich 61 (Cyr61) expression and its transduction access in cultured rat vascular smooth muscle cells (VSMC). **Methods** VSMC were cultured in sticking mass methods. VSMC were treated with Ang II for 15 min, 30 min, 60 min, 180 min, which were pretreated with PD98059 for 60 min before Ang II treatment. The Cyr61 expression in VSMC were characterized by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting. **Results** RT-PCR analysis revealed that Cyr61 increased in cells treated with 1 $\mu\text{mol/L}$ Ang II for 15, 30 min compared with control ($P < 0.01$) and still expressed at 60 min and attenuated at 180 min. Phosphorylated extracellular signal regulated kinase (P-ERK) 1/2 activity increased in cells treated with 1 $\mu\text{mol/L}$ Ang II for 30 min compared with control ($P < 0.01$), Cyr61 expression and P-ERK1/2 activity were inhibited by the presence of 20 $\mu\text{mol/L}$ PD98059, a specific inhibitor of ERK1/2. **Conclusions** Ang II up-regulates Cyr61 expression in cultured rat VSMC via ERK1/2. This may be a significant mechanism for VSMC proliferation by Ang II .

富含半胱氨酸蛋白 61 (cysteine-rich 61, Cyr61) 是一种肝素绑定的富含半胱氨酸的分泌性多肽^[1]。研究表明, Cyr61 可以促进血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) 的增殖、粘附和迁移, 与血管动脉硬化、血管再生及肿瘤的生长有关^[2,3]。血管紧张素 Ang II (angiotensin Ang II) 是肾素-血管紧张

素系统的活性产物, 可促进 VSMC 高度表达 Cyr61, 但 Ang II 经何种信号通路发挥作用目前尚不清楚。本研究旨在对 Ang II 刺激 VSMC 表达 Cyr61 的信号途径作进一步探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

健康雄性 Wistar 大鼠, 体重 180~200 g (由中国医科大学实验动物中心提供)。引物、逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂盒为宝生物公司产品, 山羊抗大鼠

[收稿日期] 2007-02-01 [修回日期] 2007-04-26

[作者简介] 付鹏, 博士研究生, 讲师, 研究方向为冠心病的基础与临床, E-mail 为 fupeng990927@yahoo.com.cn。牛铁生, 副教授, 研究方向为冠心病的介入治疗。通信作者孙英贤, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管病的介入治疗, E-mail 为 sunyingxian@medmail.com.cn。

Cyr61 多克隆抗体为美国 Santa Cruz, α -平滑肌肌动蛋白(α SM-actin)抗体及 FITC 荧光二抗为武汉博士德公司产品, 过氧化物酶(HRP)标记的兔抗山羊 IgG 二抗为北京中山公司产品, Ang ④和 PD98059 购自 Sigma, p42/p44 丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)测试试剂盒购自 BioLab。

1.2 血管平滑肌细胞培养及分组

贴块法培养 VSMC。取 180~200 g 左右的雄性 Wistar 大鼠, 脱颈椎致死, 浸泡于 75% 乙醇中消毒 20 min, 无菌操作取出大鼠胸主动脉, 置于无菌的 PBS 液的培养皿中。用眼科剪和眼科镊修剪组织, 轻轻剥离外膜, 0.25% 胰酶消化内膜后, 将组织剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm 左右的小块, 用眼科镊将动脉小块送入 25 mL 培养瓶内, 小块间间距控制在 1.5 cm 左右, 然后将培养瓶翻转放入 37 °C 培养箱内干固 3~4 h 后, 向瓶内注入少量含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 平放培养 24~48 h 后, 可看到少量细胞游出。3~4 天换液 1 次, 待细胞长到 70%~80% 汇合时可传代培养。特异性 α SM-actin 免疫组织荧光染色鉴定为 VSMC。取 4~6 代细胞用于实验。传代培养细胞生长汇合后, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 调细胞密度为 5×10^8 个/L, 悬液均匀接种于培养瓶内, 放入培养箱内培养 48 h 后换无血清培养 24 h。

实验分三组: 对照组: 正常培养的 VSMC, 不加特殊试剂。④Ang ④组: 培养瓶内加入 1 μ mol/L Ang ④培养 15 min、30 min、60 min 和 180 min。④PD98059 组: 加入 20 μ mol/L PD98059 预孵育 60 min 后, 再用 1 μ mol/L Ang ④培养。

1.3 细胞免疫组织化学检测

细胞爬片, 灭活内源性过氧化物酶、正常血清封闭、0.1% Triton X-100、一抗小鼠抗大鼠 α SM-actin (1:200) 4 °C 过夜、二抗兔抗小鼠荧光抗体 FITC (1:200) 孵育 20 min (各步骤间用 0.1 mol/L PBS 缓冲液漂洗切片 5 min, 3 次)、液体石蜡封片, 荧光显微镜下观察拍片。以 PBS 缓冲液为一抗作阴性对照, 着绿色发光处为阳性信号。

1.4 富含半胱氨酸蛋白 61 mRNA 表达的检测

各组 VSMC 加入 Trizol 试剂提取 VSMC RNA。以 RT-PCR 检测试剂盒, 按说明书操作, 首先合成 cDNA 第一链, 然后以逆转录产物为模板, 进行 PCR 扩增。反应条件为 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s \rightarrow 60 °C 退火 30 s \rightarrow 72 °C 延伸 60 s, 共 30 个循环; 72 °C 再延伸 10 min。PCR 扩增所用引物为: Cyr61 上游 5' CAACCCAACTGTAAACATC3', 下游 5' GCATCC TGCTAAGTAAATC3' (GenBank accession No. NM_

0313327), 扩增片段长度为 451 bp; 内参 β -actin 为对照, 引物序列为上游 5' TTCCAGCCITCCTTCCTGG3', 下游 5' TTGCGCTCAGGAGGAGCAAT3', 扩增片段长度为 360 bp。扩增产物经电泳后, 以密度扫描分析软件(Gene Tools)检测条带灰度值, 以相对灰度值(Cyr61/ β -actin)为量化指标。上述引物由大连宝生物技术公司合成。

1.5 Western blotting

各组 VSMC 用裂解缓冲液提取总蛋白质, 用 Bradford 方法测定蛋白质浓度。等量蛋白质分别采用 12% SDS 或 5% SDS 聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳进行分离, 然后转至醋酸纤维滤膜上, 室温下摇动封闭(TBST+5%脱脂奶粉)1 h, 经洗膜后加入抗 Cyr61 多克隆抗体(1:200 稀释), p42/p44 磷酸化抗 MAPK 抗体(1:200 稀释)4 °C 过夜, 室温下洗膜后加入辣根过氧化物酶耦联兔抗羊 IgG(1:300 稀释), 最后用化学发光底物进行发光显迹。均以 β -actin 为内参, 用 Kodak Digital Science 1D 210 图像分析软件对 Cyr61 和 p42/p44 进行半定量分析。

1.6 统计学处理

所有数值均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS10.0 统计软件对数据进行处理, 多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血管平滑肌细胞的光镜下形态观察及免疫荧光鉴定

平滑肌细胞接种于培养瓶 72 h 后, 细胞基本都已贴壁生长, 形态多呈梭形或者长梭形(图 1)。对平滑肌细胞行 α 肌动蛋白免疫荧光染色, 98% 以上细胞染色结果为阳性, 荧光显微镜下观察可见平滑肌细胞呈绿色发光, 并且含有与细胞纵轴平行排列的肌丝(图 2)。

2.2 血管紧张素 ④上调血管平滑肌细胞富含半胱氨酸蛋白 61 mRNA 的表达

1 μ mol/L Ang ④刺激 VSMC 15 min 即有 Cyr61 mRNA 的表达(2.364 ± 0.054), 30 min 时达高峰(3.432 ± 0.067), 与未加入 Ang ④刺激的对照组(1.146 ± 0.022)相比表达明显增强, 差异有显著性($P < 0.01$); 60 min(1.172 ± 0.025)、180 min(1.158 ± 0.021)时减弱(图 3)。

2.3 血管紧张素 ④活化血管平滑肌细胞细胞外信号调节激酶 1/2

为了探讨 Ang ④是否激活 VSMC 细胞外信号调

节激酶 1/2 (extracellular signal regulated kinase-1 and 2, ERK1/2), 用 $1 \mu\text{mol/L}$ Ang Ⅱ刺激细胞 30 min, 收集细胞并制备细胞总蛋白质, 用抗磷酸化 ERK1/2 抗体, Western blotting 检测 ERK1/2 磷酸化水平(活化程度)。磷酸化 ERK1/2 (phosphorylated ERK1/2, P-ERK1/2) 活性与对照组相比明显增加($P < 0.01$, 图 4 和表 1)。

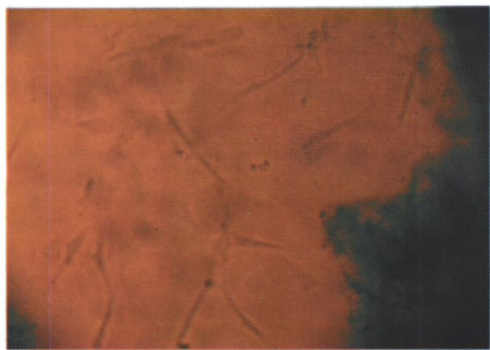


图 1. 原代培养的平滑肌细胞相差显微镜下的形态学观察 (×100)

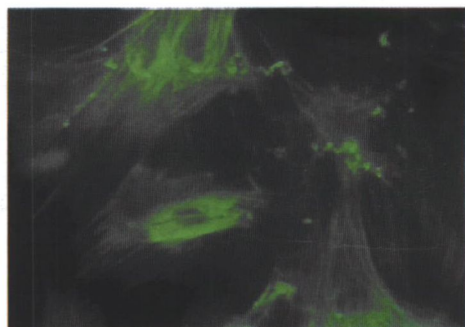


图 2. 荧光显微镜下平滑肌细胞 α 肌动蛋白鉴定 (×400)

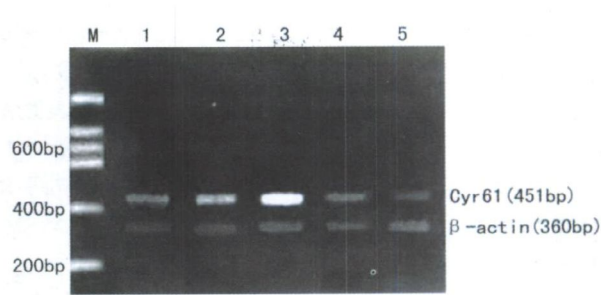


图 3. 血管紧张素 Ⅱ上调血管平滑肌细胞富含半胱氨酸蛋白 61 mRNA 表达 M 为相对分子质量 Marker, 1 为对照组, 2~5 分别为血管紧张素 Ⅱ作用 15、30、60 和 180 min。

2.4 血管紧张素 Ⅱ可经细胞外信号调节激酶 1/2 信号转导通路上调血管平滑肌细胞富含半胱氨酸蛋白 61 的表达

血管紧张素 Ⅱ刺激 VSMC 后, 既激活 ERK1/2, 又上调 Cyr61 表达。为探讨 Ang Ⅱ上调 VSMC Cyr61 表达是否通过 ERK1/2 信号通路, 用 ERK1/2 特异性抑制剂 PD98059 ($20 \mu\text{mol/L}$) 处理细胞后, 再用 Ang Ⅱ刺激细胞, 制备细胞总蛋白。Western blotting 检测 ERK1/2 的磷酸化水平以及 Cyr61 表达水平。结果表明 PD98059 能阻断 Ang Ⅱ激活 ERK1/2 和上调 Cyr61 表达(图 4 和表 1)。

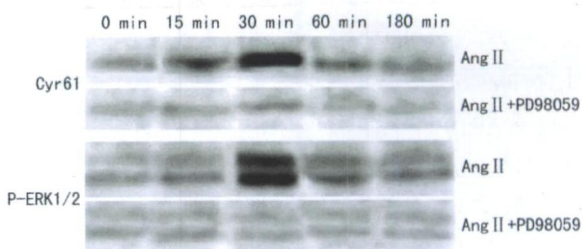


图 4. 血管紧张素 Ⅱ经细胞外信号调节激酶 1/2 信号通路上调血管平滑肌细胞富含半胱氨酸蛋白 61 表达

表 1. 各组血管平滑肌细胞富含半胱氨酸蛋白 61 及细胞外信号调节激酶 1/2

	Cyr61		ERK1		ERK2	
	Ang Ⅱ	Ang Ⅱ+ PD98059	Ang Ⅱ	Ang Ⅱ+ PD98059	Ang Ⅱ	Ang Ⅱ+ PD98059
对照组	0.126 ± 0.010	0.118 ± 0.006	0.082 ± 0.016	0.088 ± 0.017	0.084 ± 0.017	0.085 ± 0.017
15 min	0.258 ± 0.022 ^a	0.120 ± 0.008	0.125 ± 0.020	0.102 ± 0.018	0.126 ± 0.021	0.100 ± 0.018
30 min	0.397 ± 0.065 ^a	0.134 ± 0.014	0.420 ± 0.074 ^a	0.108 ± 0.019	0.431 ± 0.075 ^a	0.112 ± 0.019
60 min	0.135 ± 0.016	0.132 ± 0.012	0.169 ± 0.034	0.110 ± 0.018	0.170 ± 0.036	0.109 ± 0.0171
180 min	0.129 ± 0.011	0.130 ± 0.010	0.158 ± 0.029	0.092 ± 0.017	0.160 ± 0.030	0.096 ± 0.018

^a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

3 讨论

研究表明, Ang Ⅱ可以诱导多种活性物质表达,

与 VSMC 增殖密切相关。Cyr61 具有明显促有丝分裂活性和趋化性, 可诱导成纤维细胞增殖和分泌细

胞外基质,参与调节细胞增生、分化、胚胎发育形成^[4]。Wu等^[2]在整体实验中发现,球囊损伤猴子血管动脉新内膜中平滑肌增殖的同时Cyr61的表达明显增加,我们也在球囊损伤的大鼠腹主动脉中检测到Cyr61表达明显增加^[5],说明Cyr61能促进平滑肌细胞增殖。本研究结果表明,Ang Ⅱ处理的VSMC Cyr61的表达明显增加,而且表达迅速,说明Ang Ⅱ可上调Cyr61的表达,而且诱导Cyr61的表达可能直接在转录水平,而不是通过生长因子或细胞因子的间接诱导,这一点与Hilfiker等^[6]的研究结果一致,说明Ang Ⅱ可能通过上调VSMC Cyr61表达促进VSMC的增殖,这可能是Ang Ⅱ促VSMC增殖的一个重要机制。Ang Ⅱ经何种信号通路促进Cyr61的表达目前尚不清楚,近年来发现Ang Ⅱ引起的VSMC增殖机制除通过经典的信号转导途径外,还与MAPK激活有关^[7]。ERK为MAPK的成员之一,主要介导增殖反应,包括细胞的分裂、生长和分化等,其中ERK1/2是MAPK信号转导通路的枢纽,也是介导细胞增殖的最重要途径。ERK1/2信号链构成细胞对胞外信号反应的关键途径,导致VSMC增殖的有丝分裂反应大部分都是经过ERK途径^[8]。PD98059作为MAPK的阻滞剂,可阻断MAPK激活后引起ERK活化^[9]。国外研究表明,纯化的Cyr61可持续激活MAPK/ERK信号转导通路^[10],这一途径对Cyr61的表达非常重要^[11]。本研究结果表明Ang Ⅱ刺激VSMC上调ERK1/2活性,应用PD98059可抑制Ang Ⅱ引起的ERK活化,提示MAPK参与Ang Ⅱ对VSMC的促增殖作用,PD98059抑制Ang Ⅱ引起的ERK活化的同时也抑制Ang Ⅱ上调Cyr61的表达,这说明ERK1/2是Ang Ⅱ上调Cyr61表达的重要信号传

递物质。综上所述,Ang Ⅱ通过ERK1/2介导促进VSMC上调Cyr61的表达,这可能是平滑肌细胞增殖的一条重要途径。

[参考文献]

- [1] Bork P. The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor [J]. *FEBS Lett*, 1993, **327**: 125-130.
- [2] Wu KJ, Yee A, Zhu NL, Gordon EM, Hall FL. Characterization of differential gene expression in monkey arterial neointima following balloon catheter injury [J]. *Int J Mol Med*, 2000, **6**: 433-440.
- [3] Tsai MS, Hornby AE, Lakins J, Lupu R. Expression and function of Cyr61, an angiogenic factor, in breast cancer cell lines and tumor biopsies [J]. *Cancer Res*, 2000, **60**: 5 603-607.
- [4] Kolesnikova TV, Lau LF. Human Cyr61-mediated enhancement of bFGF-induced DNA synthesis in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Oncogene*, 1998, **16**: 747-754.
- [5] 付鹏, 孙英贤, 牛铁生, 付新. 富含半胱氨酸蛋白61在球囊损伤大鼠腹主动脉中的表达变化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (11): 971-974.
- [6] Hilfiker A, Hilfiker-Kleiner D, Martin Fuchs, Karol Kaminski, Artur Lichterberg, Drexler H. Expression of Cyr61, an angiogenic immediate early gene, in arteriosclerosis and its regulation by angiotensin Ⅱ [J]. *Circulation*, 2002, **106** (2): 254-260.
- [7] Duff JL, Marrero MB, Paxton WG. Angiotensin Ⅱ signal transduction and the mitogen activated protein kinase pathway [J]. *Cardiovasc Res*, 1995, **30**: 511-517.
- [8] Talmor D, Applebaum A, Rudich A. Activation of mitogen activated protein kinases in human heart during cardiopulmonary bypass [J]. *Circ Res*, 2000, **86** (9): 1 004.
- [9] Snabaitis AK, Yokoyama H, Avkiran M. Roles of mitogen activated protein kinases and protein kinases C in α 1A-adrenoceptor-mediated stimulation of the sarcolemmal Na^+/H^+ exchanger [J]. *Circ Res*, 2000, **86** (2): 214-220.
- [10] Chen CC, Chen N, Lau LF. The angiogenic factors Cyr61 and connective tissue growth factor induce adhesive signaling in primary human skin fibroblasts [J]. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 10 443-452.
- [11] Schutze N, Rucker N, Muller J, Adamski J, Jakob F. 5' Flanking sequence of the human immediate early responsive gene *ccn1* (cyr61) and mapping of polymorphic CA repeat sequence motifs in the human *ccn1* (cyr61) locus [J]. *Mol Pathol*, 2001, **54**: 170-175.

(此文编辑 许雪梅)