肾上腺髓质素对尾加压素Ⅱ诱导的大鼠血管平滑肌细胞内皮素生成的影响

齐永芬[①] 卜定方[①] 杨 军[②] 张肇康[②] 石彦荣[①] 高 霖[③]
庞永正[①] 唐朝枢[①③]

(①北京大学第一医院心血管研究所, 北京 100034; ②Phoenix Pharmaceutical, INC 2438, Wyandotte Street Mountain View, CA94043, USA; ③北京大学医学部生理系, 北京 100083)

摘要 旨在观察肾上腺髓质素(adrenomedullin, ADM)对尾加压素Ⅱ(urotensin Ⅱ, UⅡ)刺激的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)内皮素(endothelin, ET)生成的影响, 以探讨 ADM 和 UⅡ在血管功能调节中的相互作用. 贴块法培养的大鼠 VSMCs 经 10^{-8} mol/L UⅡ和不同浓度 ADM 孵育后测定其 ^{3}H-胸腺嘧啶(^{3}H-TdR)掺入、细胞外信号调节激酶(ERK)活性、VSMCs ET mRNA 含量和 ET 生成量. UⅡ(10^{-8} mol/L)刺激 VSMCs ET mRNA 含量增加、ET 生成、VSMCs ^{3}H-TdR 掺入和 ERK 激活. 10^{-10} ~ 10^{-8} mol/L ADM 以浓度依赖的方式抑制 UⅡ刺激的上述效应, 与单纯 UⅡ组比较, 10^{-10} ~ 10^{-8} mol/L ADM 分别与 UⅡ(10^{-8} mol/L)合用时, VSMCs ET mRNA 水平下降 15 % ~ 45 %(均 $P < 0.01$); 培养基中 ET 含量分别下降为 14.13, 11.38 和 11.0 pg/mL(均 $P < 0.01$); 10^{-9} ~ 10^{-8} mol/L ADM 使 VSMCs ^{3}H-TdR 掺入分别降低 32%($P < 0.05$)和 41%($P < 0.01$), ERK 活性分别降低 32% ($P < 0.05$)和 36% ($P < 0.05$). 单用 ADM(10^{-8} mol/L)对 VSMCs ET mRNA 含量、ET 生成、VSMCs ^{3}H-TdR 掺入和 ERK 活性均无明显影响. 结果提示肾上腺髓质素抑制 UⅡ诱导的 VSMCs ET mRNA 表达和生成, 并通过抑制 ERK 途径抑制 UⅡ诱导的 VSMCs 增殖.

关键词 肾上腺髓质素 尾加压素Ⅱ 内皮素 mRNA 肽类/相互作用

尾加压素Ⅱ(urotensinⅡ, UⅡ)最初是从鱼脊髓尾垂体中分离出的一种生长抑素样环形多肽[1]. 包括人在内的哺乳动物中亦呈现高表达[2]. UⅡ与其特异受体——孤立的 G 蛋白偶联受体(GPR14)结合产生强大的收缩血管、升高血压和促进血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)增殖等生物学效应[3~8]. 最近研究发现, UⅡ可刺激大鼠胸主动脉 VSMCs ET mRNA 含量增加和 ET 的合成释放, 且 UⅡ的促增殖效应至少部分与其促 ET 自分泌/旁分泌有关[9].

肾上腺髓质素(adrenomedullin, ADM)是由 52 个氨基酸组成的环状多肽, 血管平滑肌细胞富含 ADM 及其受体[10]. ADM 具有舒张血管和抑制 VSMCs 增殖的作用[11]. 心血管系统功能稳态的维持取决于多种生物活性肽的相互调节作用. ADM 是调节循环系统功能稳态的重要的生物活性肽, 但 ADM 与 UⅡ的相互作用在心血管系统的生理和病理生理意义目前尚不清楚.

本工作在离体培养的大鼠胸主动脉 VSMCs 上观察 ADM 对 UⅡ刺激的 ET 生成和基因转录的影响, 以探讨 ADM 与 UⅡ对 VSMCs 功能的相互调节作用, 认识血管多肽之间的相互调节作用.

1 材料与方法

(ⅰ) 材料. 8 ~ 10 周龄雄性 Wistar 大鼠由北京大学医学部实验动物中心提供. UⅡ和 ADM, ADM 及 ET 放射免疫分析药盒为 Phoenix Pharmaceutical, Inc(美国)产品; ^{32}P-ATP 购自 Dupont NEN 公司; ERK 单克隆抗体为 Zymed Lab Inc 产品; 髓磷脂化碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)为 Sigma 公司产品; Trizol 购自 Clontech 公司. 逆转录酶, Taq 酶, RNsin 和 Oligo(dT)为 Promega 公司产品. 5 个 PCR 引物由赛百盛公司合成. 其余的为分析纯产品. 用于 ET RT-PCR 定量的引物 ET-正义链引物: 5′-GGTCTTGAT-GCTGTTGCTGA-3′, ET-反义链引物: 5′-GAGCTG AGAAGGAAGTGCAGA-3′. 另有引物 ET-T: 5′-CGT-TTGCTGACAGCTTGGGACAGGGTTTT-3′用于制作内标准时用 PCR 方法引入 61 bp 缺失. β-肌动蛋白引

物 S: 5′-ATCTGGCACCACACCTTC-3′, A: 5′-AGCCAGGTC CAG ACG CA-3′.

(ⅱ) 血管平滑肌细胞 ET mRNA 含量及 ^{3}H-TdR 掺入测定. VSMCs 培养参照文献[12]方法. 实验用第 5 ~ 8 代细胞. 取处于融合状态的 VSMCs 按 5×10^5 细胞/mL 接种于 6 孔培养板培养 48 h, 换无血清 RPMI-1640 培养基培养 24 h 后按下述不同分组进行实验: (1) 对照组. 不加任何特殊试剂. (2) 单纯 ADM 组. 加入 ADM 10^{-8} mol/L. (3) UⅡ组. 加入 10^{-8} mol/L UⅡ. (4) UⅡ+ADM 组. 在加入 10^{-8} mol/L UⅡ的基础上分别加入 10^{-10}, 10^{-9} 和 10^{-8} mol/L ADM. 加入上述试剂处理 8 h 后收集各组细胞定量测定 ET mRNA.

^{3}H-TdR 掺入是在上述各组中加入不同药物孵育 10 h, 加入 ^{3}H-TdR 1.85×10^{-4} Bq/mL 孵育 10 h, 令 PBS(pH 7.4)终止反应. 在 Millipore 上经 0.45 μm 微孔滤膜收集并洗净细胞. 滤膜干燥后加入闪烁液(ppo, popop, 二甲苯和无水乙醇), β闪烁计数仪(Beckman)测定 ^{3}H 放射活性, 放射性强度用每分钟计数表示.

(ⅲ) ERK 活性测定. 参照文献[13]方法.

(ⅳ) 制备定量 PCR 的竞争性内标准和 VSMCs 总 RNA 的提取. 提取正常大鼠肺的总 RNA, 逆转录合成 cDNA 作为模板, 用 ET-S 及 ET-A 引物做 PCR, 放大一段 446 bp 的 ET cDNA. 用 ET-T 及 ET-A 然后用 ET-S 及 ET-A 作为引物, 两次做 PCR 得到 385 bp 的 DNA 片段, 它的序列和上述 446 bp 片段的序列相同, 但在 ET-S 引物序列的下游缺失 61 bp, 方法见文献[14]. 此即为用于 ET mRNA RT-PCR 定量的竞争性内标准. 为便于保存和定量, 将这两个片段的 DNA 分别克隆至 pBluescript(SK+)的 *Eco*RⅤ位点中, 质粒经扩增、纯化、*Bam*HⅠ酶切线性化和紫外分光光度法定量后备用.

血管平滑肌细胞总 RNA 提取. 用 Trizol 试剂提取 VSMCs 的总 RNA, 紫外分光光度计(SDU-68 型)定量.

(ⅴ) ET mRNA 的定量. 参照文献[15]和[16]方法. PCR 反应体系 25 μL, 反应条件: 95℃变性 5 min, 然后以 94℃, 30 s, 60℃, 30 s, 72℃, 40 s, 循环 30 次. 用竞争性定量 RT-PCR 求得标本中 ET cDNA 和竞争性内标准之比, 通过标准曲线得标本中 ET mRNA 含量; 以标本中β-肌动蛋白 cDNA 相对含量来校正定量 PCR 时标本的加样误差.

(ⅵ) ET 含量的放射免疫分析测定. 参照药盒说明书操作, 放免 IC_{50} = 15 pg/管, 与血管紧张素Ⅱ(AⅡ)和加压素等均无交叉反应. 批间和组间差异均 < 10%.

(ⅶ) 统计学处理. 实验结果以均数 ± 标准差(X ± SD)表示. 单因子 ANOVA 方差分析, 组间 q 检验. $P < 0.05$ 为具有显著性差异.

2 结果分析

2.1 肾上腺髓质素下调 UⅡ诱导的 ET 基因表达

10^{-8} mol/L UⅡ可使 VSMCs ET mRNA 含量比对照组增加 79%($P < 0.01$). UⅡ(10^{-8} mol/L)分别与 10^{-10}, 10^{-9} 和 10^{-8} mol/L ADM 合用时, VSMCs ET mRNA 含量较 UⅡ单用时分别低 15%, 24% 和 45%. (均 $P < 0.01$). 单用 ADM 对 VSMCs ET mRNA 含量没有明显影响($P > 0.05$). 表明 ADM 以浓度依赖的方式下调 UⅡ诱导的 VSMCs ET 基因表达(图 1).

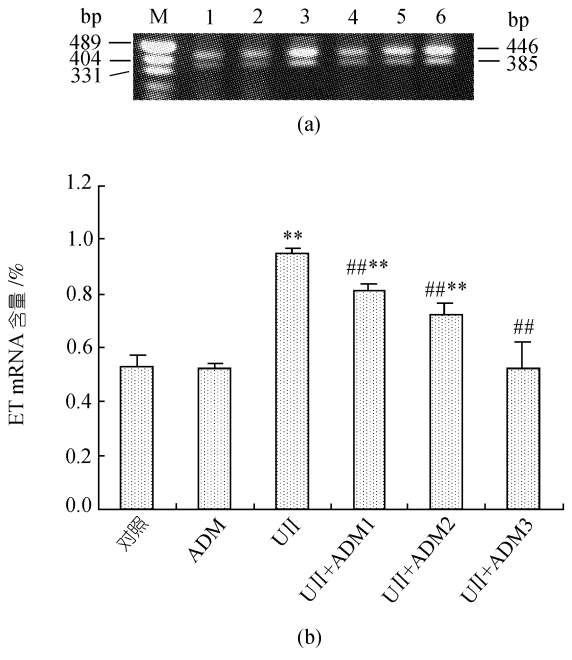

图 1 ADM 对 UⅡ诱导的 VSMC ET mRNA 生成的影响
(a) 溴化乙锭染色电泳图. M 示分子量标准, 1 示对照, 2 示 ADM, 3 示 UⅡ, 4 示 UⅡ+ADM3, 5 示 UⅡ+ADM2, 6 示 UⅡ+ADM1. (b) 密度灰度扫描图. UⅡ为 10^{-8} mol/L, ADM1 为 10^{-10} mol/L, ADM2 为 10^{-9} mol/L, ADM3 为 10^{-8} mol/L. ** 示 $P < 0.01$(与对照组比较), ## 示 $P < 0.01$(与单纯 UⅡ组比较). n = 6

2.2 肾上腺髓质素抑制 UⅡ刺激的 ET 释放

10^{-8} mol/L UⅡ可使培养 VSMCs 的上清液中 ET 释放较对照组增加 76.5% ($P < 0.01$). UⅡ(10^{-8} mol/L)分别与 10^{-10}, 10^{-9} 和 10^{-8} mol/L ADM 合用时, 上清液中 ET 含量分别降低 18%, 35%和 36%(均 $P < 0.01$). 单用 ADM(10^{-8} mol/L)时, 上清液中的 ET 含量无变化, 提示对 VSMCs 释放 ET 无明显影响. 表明 ADM 以浓度依赖方式抑制 UⅡ刺激的 VSMCs 中 ET 的释放(图 2).

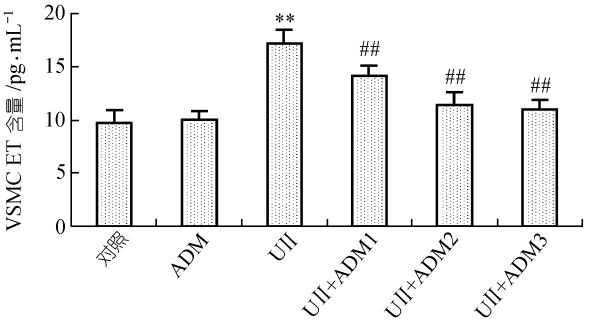

图 2 ADM 对 UⅡ刺激的 VSMCs ET 合成释放的影响
UⅡ为 10^{-8} mol/L, ADM1 为 10^{-10} mol/L, ADM2 为 10^{-9} mol/L, ADM3 为 10^{-8} mol/L. ** 示 $P < 0.01$(与对照组比较), ## 示 $P < 0.01$(与单纯 UⅡ组比较). $n = 6$

2.3 肾上腺髓质素抑制 UⅡ诱导的 VSMCs ^{3}H-TdR 掺入

在对照组, 培养的 VSMCs ^{3}H 放射性活度为(3289 ± 548)计数·min^{-1}·孔$^{-1}$. 10^{-8} mol/L UⅡ可使 VSMCs ^{3}H-TdR 掺入增加 38%((4542 ± 906)计数·min^{-1}·孔$^{-1}$, $P < 0.05$). UⅡ(10^{-8} mol/L)分别与 10^{-10}, 10^{-9} 和 10^{-8} mol/L ADM 合用时, VSMCs ^{3}H-TdR 掺入下降, 分别为(4224 ± 1493), (3114 ± 342) ($P < 0.05$)和(2684 ± 762)计数·min^{-1}·孔$^{-1}$ ($P < 0.01$). 单独用 ADM(10^{-8} mol/L)对 ^{3}H-TdR 掺入无明显影响((3333 ± 1201) vs (3289 ± 548)计数·min^{-1}·孔$^{-1}$). 表明 ADM 以浓度依赖的方式抑制 UⅡ刺激的 VSMCs 增殖.

2.4 肾上腺髓质素抑制 UⅡ刺激的细胞外信号调节激酶激活

在对照组, ERK 活性为(3.2×10^4 ± 2.4×10^4) × 10^{-5} 计数·min^{-1}·细胞$^{-1}$. 10^{-8} mol/L UⅡ可使 ERK 活性增加 260%((11.6×10^4 ± 1.2×10^4) × 10^{-5} 计数·min^{-1}·细胞$^{-1}$, $P < 0.01$). UⅡ(10^{-8} mol/L)分别与 10^{-10}, 10^{-9} 和 10^{-8} mol/L ADM 合用时, ERK 活性降低, 分别为(8.7×10^4 ± 2.3×10^4), (7.8×10^4 ± 4.5×10^4) ($P < 0.05$)和(7.4×10^4 ± 2.3) × 10^{-1} 计数·min^{-1}·细胞$^{-1}$($P < 0.05$); 单用 ADM(10^{-8} mol/L)对 ERK 活性无明显影响. 表明 ADM 呈浓度依赖的方式抑制 UⅡ刺激的 VSMCs ERK 激活, ADM 通过抑制 ERK 活性抑制 VSMCs 增殖.

3 讨论

ADM 和 ET 是调节血管功能的主要因子, 在心血管系统的功能稳态调节中具有重要作用. 大量实验研究表明 ADM 有拮抗 ET 的缩血管和促 VSMCs 的增殖效应[11]. UⅡ是新近发现的心血管活性因子, 具有与 ET 相似或更强的生物学效应, 如收缩血管和促 VSMCs 的增殖等作用, UⅡ还可上调 VSMCs ET 基因表达和促进 VSMCs ET 的合成释放, 表明 UⅡ的生物学效应至少部分是通过旁分泌或自分泌方式促进 ET 生成所介导[9]. 本工作在离体培养的大鼠胸主动脉 VSMCs 发现 UⅡ刺激 VSMCs ET mRNA 表达, VSMCs ET 合成释放, 增加 ^{3}H-TdR 掺入和促进 VSMCs ERK 激活, 与以前报道[9]一致. ADM 呈浓度依赖抑制 UⅡ刺激的 VSMCs ET mRNA 水平增加. VSMCs 不能贮存 ET, ET 在 VSMCs 合成后即释放到培养基中. 放射免疫分析显示 ADM 呈浓度依赖方式抑制 UⅡ诱导的 VSMCs ET 合成释放. 表明 ADM 抑制 UⅡ刺激的 *ET* 基因转录和蛋白质的变化水平是一致的.

目前认为丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)是一组广泛分布于细胞浆内的具有丝氨酸和酪氨酸双重磷酸化活性的蛋白激酶, 是细胞外信号和细胞核反应间信号转导的汇聚途径, 在细胞外信号引起细胞核内基因转录的调控方面具有重要的作用. MAPK 家系包括 ERK, JNK/SAPK 和 P^{38}MAPK. 前者与细胞增殖反应关系最密切, 后两者与组织应激有关[17]. 本实验测定的是 MAPK 家系中的 ERK 活性, 观察到 ADM 本身并不影响 VSMCs 的 ERK 活性, 但对 UⅡ刺激的

ERK 激活有显著的抑制效应. 文献报道[11]引起细胞内环一磷酸腺苷(cAMP)升高的物质具有抑制细胞增殖的作用. ADM 与细胞膜上的受体结合后激活 cAMP/PKA 途径, 而且 cAMP 具有抑制 ERK 激活作用[11]. 推测 ADM 通过 cAMP 增加抑制了 UⅡ激活的 ERK, 从而起到抑制 UⅡ的促细胞增殖效应. 以前的工作[18]表明 ADM 通过抑制 MAPK 活性而抑制 ET 刺激的血管平滑肌细胞增殖. 文献[11]报道 ADM 通过激活 cAMP/PKA 途径抑制凝血酶和血小板源性生长因子刺激的 VSMCs ET 生成. 推测 ADM 可能通过 cAMP/PKA 途径抑制 UⅡ刺激的 ET 基因转录和 ET 的生成. 本实验 ADM 呈浓度依赖的抑制 UⅡ刺激的血管平滑肌细胞 ^{3}H-TdR 掺入增加和抑制 ERK 激活, 推测 ADM 通过 cAMP 促进 PKA 激活从而抑制 Ras 到 Raf-1 的信号转导, 进而阻断 ERK 的激活, 抑制 VSMCs 增殖.

生物活性肽相互作用共同调节循环系统功能稳态. 这些不同的活性因子在体内的生物学效应取决于不同分子间的相互作用. 不同的活性分子在生物学效应、细胞信号转导和基因表达调控(或协同或拮抗或修饰)而相互影响, 是机体维持自稳态的重要的物质基础. 本工作在培养的大鼠主动脉 VSMCs 上发现 ADM 抑制 UⅡ刺激的 VSMCs ET mRNA 水平增加及 ET 的合成和释放, 并抑制 UⅡ刺激的 VSMCs DNA 合成. ADM 和 UⅡ相互作用在心血管系统生理和病理生理中的意义, 值得进一步研究.

致谢 本工作为国家重点基础研究发展规划资助项目(批准号: G2000056905).

参 考 文 献

1 Coulouarn Y, Jegou S, Tostivint H, et al. Cloning, sequence analysis and tissue distribution of the mouse and rat urotensinⅡ precursors. FEBS Lett, 1999, 457(1): 28~32

2 Coulouarn Y, Fernex C, Jegou S, et al. Specific expression of the urotensinⅡ gene in sacral motoneurons of developing rat spinal cord. Mechanism of Development, 2001, 1: 187~190

3 Ames R S, Sarau H M, Chambers J K, et al. Human urotensin-Ⅱ: a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. Nature, 1999, 401: 282~286

4 Liu Q, Pong S S, Zeng Z, et al. Identification of urotensinⅡ as the endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR14. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 266(1): 174~178

5 Mori M, Sugo T, Abe M, et al. UrotensinⅡ is the endogenous ligand of a G-protein-coupled orphan receptor, SENR (GPR14). Biochem Biophys Res Commun, 1999, 265(1): 123~129

6 张勇刚, 齐永芬, 夏春芳, 等. 尾加压素Ⅱ对血管平滑肌细胞增殖的影响. 中国药理学通报, 2001, 17(2): 155~157

7 Watanabe T, Pakala R, Katagiri T, et al. Synergistic effect of urotensin ii with mildly oxidized LdL on DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. Circulation, 2001, 104(1): 16~18

8 Sauzeau V, Le Mellionnec E. Human urotensinⅡ-induced contraction and arterial smooth muscle cell proliferation are mediated by RhoA and Rho-kinase. Circ Res, 2001, 88(11): 1102~1104

9 齐永芬, 卜定方, 牛大地, 等. 尾加压素Ⅱ促进大鼠血管平滑肌细胞内皮素生成. 科学通报, 2002, 47(2): 289~292

10 Owji A A, Smith D M, Coppock H A, et al. An abundant and specific binding site for the novel vasodilator adrenomedullin in the rat. Endocrinology, 1995, 136(5): 2127~2134

11 HinsonJp, K, Smith D M. Adrenomdullm, a multional regulatory peptide. Endocrin Rev, 2000, 21(2): 138~167

12 Campbell J H, Campbell G R. Culture techniques and their applications to studies of vascular smooth muscle. Clin Sci, 1993, 85: 501 ~ 512

13 李田昌, 庞永正, 苏静怡, 等. 丝裂素活化蛋白激酶活性测定. 基础医学与临床, 1996, 16(2): 78~80

14 Celi F S, Zenilman M E, Shuldiner A R. A rapid and versatile method to synthesize internal standards for competitive PCR. Nucleic Acids Research, 1993, 21(4): 1047

15 Siebert P D, Larrick J W. Competitive PCR. Nature, 1992, 359: 557 ~ 558

16 Tsai S J, Wiltbank M C. Standard curve quantitative competitive RT-PCR (SC-QC-RT-PCR): a simple method to quantify absolute concentration of mRNA from limited amounts of sample. In: Siebert P D, Larrick J W, eds. Gene Cloning and Analysis by RT-PCR. Natick, MA: Biotechniques Books, 1998. 91~101

17 Hill C S, Treisman R. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. Cell, 1995, 80: 199~224

18 李田昌, 田青, 赵东, 等. 肾上腺髓质素抑制内皮素的促血管平滑肌细胞增殖作用. 高血压杂志, 1996, 4(3): 171~174

(2002-02-01 收稿, 2002-04-19 收修改稿)