

Caveolae 在 CGRP 保护人脐静脉内皮细胞中的作用及机制

朱 怡¹, 周孝钱², 肖云彬³, 全海燕², 骆竟妃², 彭虹艳², 秦旭平^{2*}

(1. 南华大学附属第二医院骨外科, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学
药物药理研究所; 3. 湖南省儿童医院心血管内科)

摘要: **目的** 探讨 Caveolae 对降钙素基因相关肽(CGRP)抑制过氧化氢(H_2O_2)诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVECs)损伤作用的影响及其机制。 **方法** 体外培养 HUVECs, 分别用 CGRP 和/或 H_2O_2 处理细胞, 光学显微镜观察细胞形态学和密度的变化; 流式细胞术观察细胞的增殖和周期分布; β -环糊精(β -CD)用于破坏 caveolae 结构; Western-blot 检测 caveolin-1 表达。 **结果** 与正常组比较, CGRP 组细胞密度增加, S 期细胞数明显增多, H_2O_2 组细胞密度降低, S 期细胞数明显减少; CGRP 预孵育细胞能抵抗 H_2O_2 引起的细胞数目减少; β -CD 剥夺胆固醇, 破坏 caveolae 结构, HUVECs 形态学发生改变, 但 CGRP 诱导的细胞密度和细胞增殖进一步提升, 恢复胆固醇后, 该作用被取消。与对照组比较, CGRP 组细胞 caveolin-1 表达水平降低($P < 0.05$); H_2O_2 组细胞 caveolin-1 水平上升($P < 0.05$), 给予 CGRP 预孵育后, 能显著逆转 H_2O_2 诱导的 caveolin-1 表达($P < 0.05$); β -CD 破坏 caveolae 结构后, 增强 CGRP 下调 HUVECs caveolin-1 表达的作用($P < 0.05$), 增加胆固醇 Caveolae 结构有所恢复且该作用被削弱。 **结论** Caveolae 结构完整性对 CGRP 保护 H_2O_2 损伤 HUVECs 有一定影响, 破坏 caveolae 结构能增强 CGRP 对 H_2O_2 损伤的 HUVECs 的增殖作用, 其机制可能与增强 CGRP 下调氧化应激导致的 caveolin-1 的表达有关。

关键词: 过氧化氢; 降钙素基因相关肽; caveolae; caveolin-1; 内皮细胞

中图分类号: R331.36 文献标识码: A

Role of Caveolae in the Protection of CGRP on the HUVECs Injury Induced by Oxidative

ZHU Yi, ZHOU Xiaoqiang, XIAO Yunbin, et al

(Department of Orthopaedic Surgery, the Second Affiliating Hospital,
University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To study the role of caveolae on the protective effect of calcitonin gene-related peptide (CGRP) on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) injury induced by oxidative stress. **Methods** HUVECs were cultured in vitro, and treated with CGRP or / and hydrogen peroxide (H_2O_2), the distribution of cell cycles and proliferation of cells were observed by flow cytometry. The density and morphology of cells were observed by optical microscope, β -cyclodextrin (β -CD) was used to injured the structure of caveolae, expression of caveolin-1 was measured by Western blot. **Results** Compared with control group, treatment of CGRP increased proliferation index (PI) and the number of S phase cells which were inhibited by H_2O_2 ; Destruction of caveolae structure could increase the density of cells and change the cells shape; The expression of caveolin-1 was down-regulated by CGRP but up-regulated by H_2O_2 , respectively. Pretreatment with CGRP, the up-regulation of caveolin-1 induced by H_2O_2 was significantly reverted ($P < 0.05$). Pretreatment of β -cyclodextrin with cells, the expression of caveolin-1 induced by CGRP was furtherly decreased. **Conclusions** the destruction of caveolae could increased the proliferative effect of CGRP on HUVECs induced by H_2O_2 , the mechanism involve

in change of the expression of caveolin-1.

Key words: H_2O_2 ; CGRP; caveolin-1; caveolae; endothelial cells

降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)是由辣椒素敏感性感觉神经末梢释放的神经肽,是目前发现的内源性最强的舒血管活性物质之一,有舒张血管和收缩心肌的作用,抑制血管平滑肌细胞增殖和内皮细胞凋亡^[1]。Caveolae 是细胞膜表面特异性内陷结构,是细胞内多数信号分子和转导通路的整合器。caveolin-1 是 caveolae 表面标记蛋白和结构蛋白,并通过其脚手架区域在 caveolae 区结合其他信号分子发挥负性调节的作用^[2]。前期研究工作表明,CGRP 能对抗 H_2O_2 引起的血管内皮细胞损伤,并上调 caveolin-1 的表达^[3]。本研究以体外培养人脐静脉内皮细胞株(HUVECs)为研究对象,采用 H_2O_2 诱导损伤建立血管内皮细胞氧化损伤模型,通过观察 HUVECs 生长、细胞周期分布及 caveolin-1 蛋白的表达,研究 CGRP 对氧化损伤内皮细胞的保护作用,探讨 caveolae 结构完整性对 CGRP 保护内皮细胞作用的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

人脐静脉内皮细胞细胞株(HUVECs, 型号: C-003-5C)由本实验室保存。CGRP, β -cyclodextrin (β -CD)为 Sigma 公司产品, Cholesterol (USA Amresco, Inc.), 胎牛血清购自杭州四季青公司。RPMI-1640 的培养基购自美国 Gibco 公司, 抗体及显色试剂购自武汉博士德生物有限公司。蛋白印迹所用试剂均为 USA Amresco, Inc. 公司产品。

1.2 人脐静脉内皮细胞培养

取冻存的 HUVECs, 解冻后置于 50 mL 无菌培养瓶中, 加入适量含 10% 胎牛血清 RPMI-1640 培养基, 在 37 °C、5% CO_2 、95% 空气饱和湿度的培养箱中培养。待长至 80% 左右时, 用 0.25% 胰酶消化传代。取长势良好的 3~10 代细胞用于实验。

1.3 实验分组及处理因素

在前期实验的基础上^[3], 通过量效关系确定 H_2O_2 及 CGRP 作用于 HUVECs 的浓度。对照组为 0.1% FBS 培养的静止期细胞; 实验组细胞分别用 H_2O_2 (0.5 mmol/L), CGRP (100 nmol/L), β -CD (5 mmol/L) 胆固醇 (Cholesterol 25 μ mol/L) 按实验

目的和程序处理细胞(见结果)。采取细胞计数板和光镜下肉眼观察的方法分析细胞密度的变化。

1.4 Western Blot

各组细胞弃去细胞培养液, 用冰 PBS 洗涤 3 次, 加入预冷的 RIPA 裂解液临用前加入 0.1 mg/mL PMSF 裂解细胞, 置冰上 10 min, 用细胞刮匙刮取蛋白, 再以超声波粉碎细胞, 4 °C 10 000 g 离心 15 min, 取上清分装后于 -85 °C 超低温冰箱冻存。BCA 法测蛋白质含量后, 每泳道上 30 μ g 总蛋白量进行 SDS-PAGE 电泳分离, 然后转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 1 h, 加入一抗(兔抗 caveolin-1, 1:400; 鼠抗 β -actin, 1:300) 4 °C 孵育过夜 TBST 洗膜 8 min/次, 洗 3 次, 加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(1:1 000)或兔抗小鼠二抗(1:1 000), 室温下摇床孵育 2 h, 常规洗膜, 化学发光剂显色, 胶片显影, 扫描胶片用凝胶系统分析系统测光密度值。结果以各目的蛋白和 β -actin 的灰度比值表示。

1.5 PI 单染流式细胞术观察 HUVECs 细胞周期分布情况

取 3~10 代对数生长期的 HUVECs, 以 2×10^5 个/mL 接种于 50 mL 培养瓶中, 置于 37 °C、5% CO_2 、95% 空气饱和湿度的培养箱中培养, 0.1% FBS 培养基同步化细胞 24 h, 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 3 次, 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 10% FBS 的细胞培养液终止消化, 吹打成细胞悬液后, 4 °C、75 g 离心 5 min, PBS 液清洗 3 次, 弃上清, 用体积分数为 75% 的冰乙醇吹打成单细胞悬液, 吸入到 1.5 mL 大的 EP 管, 4 °C 固定过夜。检测前, 75 g 离心 10 min, 弃上清, PBS 液清洗 3 次, 调整细胞浓度为 1×10^6 /L。加 PI 荧光染料, 350 目尼龙网滤膜过滤除去细胞团块, 于 4 °C 避光染色 30 min 后, 上流式细胞仪(FCM)检测各期细胞 DNA 的含量。计算 30 000 个细胞, 观察细胞的增殖以及细胞周期情况。

一般情况下, 细胞无增殖活动时皆停留于 G_0G_1 期, 在某些因素激活下, 启动 DNA 合成进入 S 期(DNA 合成期)及 M 期(DNA 分裂期), 使细胞增殖分化。可根据细胞周期各时相比比例, 计算增殖指数(proliferation index, PI), 以衡量细胞的分裂增殖活动。PI 的计算公式为: $PI = (S + G_2M) / (G_0G_1 + S +$

G₂M), PI 值越大表示细胞增殖越明显。

1.6 统计学处理

所有数据均采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。均采用 SPSS14.0 for windows 软件进行分析, 组间差异比较用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 及 t 检验, 用 $P < 0.05$ 判断统计差异有无显著性。

2 结 果

2.1 Caveolae 对 CGRP 保护 HUVECs 生长作用的影响

HUVECs 分别给予 CGRP (100 nmol/L) 或 H₂O₂

(0.5 mmol/L) 处理 24 h 后, 光学显微镜下观察发现: 与对照组相比, CGRP 能增加 HUVECs 的密度, 形态与排列与对照组无差别 (图 1B), 而 H₂O₂ 组形态变小变圆, 排列不规则 (图 1C)。CGRP 预孵育细胞 30 min 能显著改善 H₂O₂ 对细胞的损伤作用 (图 1D), 胞浆变得饱满。用 β -环糊精 (β -CD) 破坏 caveolae 结构后, 光学显微镜下观察, 细胞密度增加, 但形状不规则 (图 1F); 预先加入胆固醇保护 Caveolae 结构, 细胞多角形状更不规则, 与 CGRP + H₂O₂ 组相比, 细胞密度基本恢复, 各组细胞数的变化如图 2 所示。

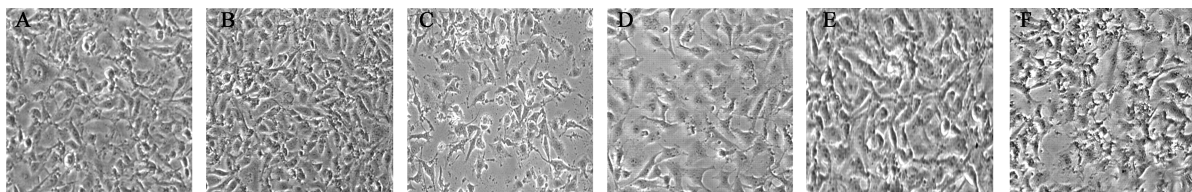


图 1 HUVECs 形态学图 ($\times 100$)。A: Control; B: CGRP; C: H₂O₂; D: CGRP + H₂O₂; E: β -CD + CGRP + H₂O₂; F: Cholesterol + β -CD + CGRP + H₂O₂

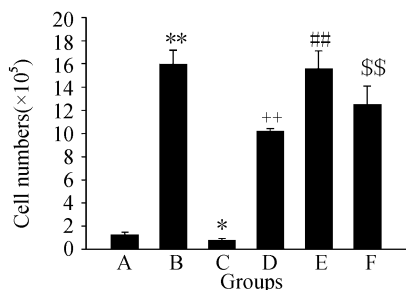


图 2 各组细胞数的变化 A: Control; B: CGRP; C: H₂O₂; D: CGRP + H₂O₂; E: β -CD + CGRP + H₂O₂; F: Cholesterol + β -CD + CGRP + H₂O₂. 与对照组 (A) 比较, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$; 与 C 比较, ++: $P < 0.01$; 与 D 比较, ##: $P < 0.01$; 与 E 组比较, \$\$: $P < 0.01$ ($n = 3$)

2.2 Caveolae 对 HUVECs 周期分布的影响

对细胞周期图统计分析发现, 与对照组比较, 单用 CGRP 能使 S 期细胞增多 (图 3B); H₂O₂ 组 S 期细胞较正常组减少 (图 3C); CGRP 预孵育细胞 30 min 使 H₂O₂ 组 S 期细胞明显增多 (图 3D), PI 值较 H₂O₂ 增大 ($P < 0.05$)。说明 CGRP 能够对抗 H₂O₂ 引起的 S 期细胞的减少, 促进正常和受损 HUVECs 的增殖。给予 β -CD, 细胞 PI 值增大, 与 CGRP + H₂O₂ 组相比, S 期细胞数目增加; 预先加入胆固醇, 该作用被削弱 (见表 1, $P < 0.05$)。由此可见, caveolae 在 CGRP 促进氧化损伤 HUVECs S 增殖过程中可能起负性调节的作用。

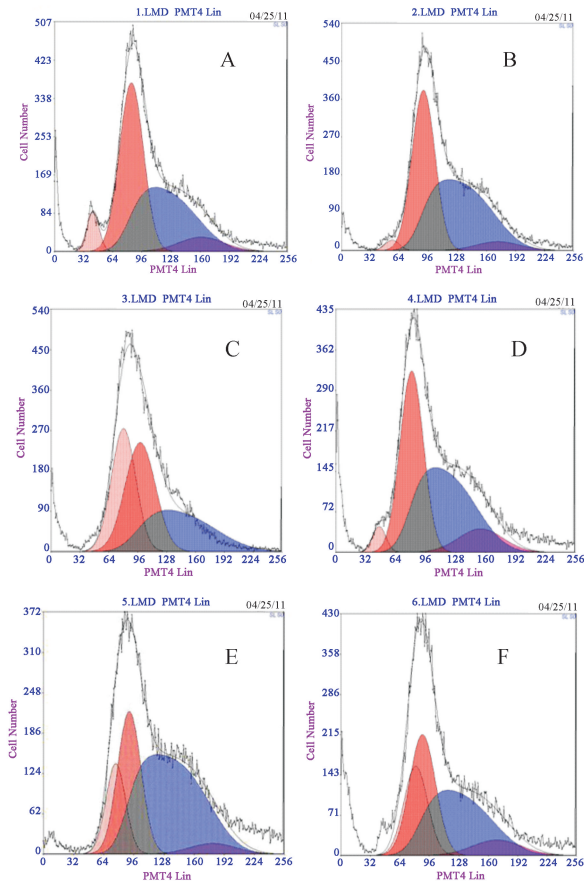


图 3 细胞周期分布的流式细胞仪代表图 A: Control; B: CGRP; C: H₂O₂; D: CGRP + H₂O₂; E: β -CD + CGRP + H₂O₂; F: Cholesterol + β -CD + CGRP + H₂O₂

表1 Caveolae 对 HUVECs 周期分布影响情况($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Group	G ₀ /G ₁ %	S%	G ₂ /M%	PI%
Control(0.1% FBS)	45.7 ± 2.3	41.5 ± 1.5	7.5 ± 0.6	51.7 ± 2.8
CGRP	43.6 ± 3.1	50.1 ± 2.6 ^a	4.6 ± 0.9	55.7 ± 4.1 ^a
H ₂ O ₂	36.4 ± 2.6	30.6 ± 2.2 ^a	1.4 ± 0.8	45.7 ± 3.4 ^a
CGRP + H ₂ O ₂	40.8 ± 4.2	45.6 ± 4.1 ^b	10.0 ± 1.2	57.8 ± 5.8 ^b
β-CD + CGRP + H ₂ O ₂	27.4 ± 4.9	54.2 ± 3.7 ^c	4.0 ± 1.0	68.0 ± 6.2 ^c
Cholesterol + β-CD + CGRP + H ₂ O ₂	31.4 ± 5.1	39.9 ± 3.3 ^d	7.6 ± 1.2	60.2 ± 6.1 ^d

PI = (S + G₂M)/(G₀G₁ + S + G₂M),PI 值越大表示细胞增殖越明显;G₀/G₁:停留于 G₁/G₀ 期(无增殖活动期)细胞;S;DNA 合成期细胞;G₂/M;DNA 合成后期细胞;a:*P* < 0.05 vs Control(0.1% FBS);b:*P* < 0.05 vs H₂O₂;c:*P* < 0.05 vs CGRP + H₂O₂;d:*P* < 0.05 vs β-CD + CGRP + H₂O₂

2.3 CGRP 抑制 H₂O₂ 处理的 HUVECs caveolin-1 的表达

单用 CGRP 能够降低 HUVECs caveolin-1 的表达,而用 0.5 mmol/L H₂O₂ 处理细胞 4 h 后,caveolin-1 的表达增加,说明 H₂O₂ 通过增加 caveolin-1 的表达得到抑制细胞增殖的作用。100 nmol/LCGRP 预孵育 30 min 后,再给 H₂O₂ 能够降低 caveolin-1 的表达(*P* < 0.05)(图 4)。

抑制 H₂O₂ 引起 HUVECs caveolin-1 表达上调的作用更明显(*P* < 0.05);预先加入胆固醇后,该抑制作用被削弱(*P* < 0.05)。

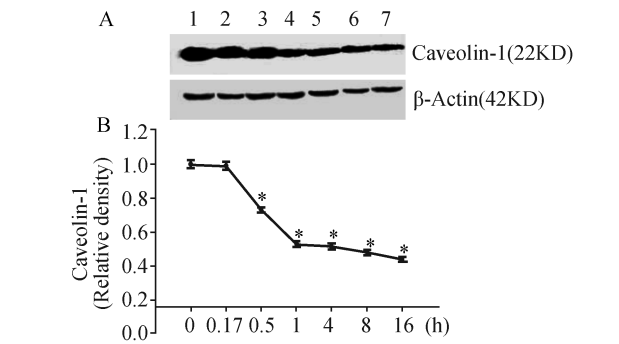


图5 β-环糊精对人脐静脉内皮细胞 caveolin-1 表达的影响 A:caveolin-1 蛋白表达的 Western-Blot 电泳图(1:0 h,2:10 min(0.17 h);3:30 min(0.5 h);4:1 h,5:4 h,6:8 h,7:16 h);B:灰度扫描密度图, ($\bar{x} \pm s, n = 3$) * *P* < 0.05 vs 对照组(0 h)

图4 CGRP 对 H₂O₂ 处理 HUVECs caveolin-1 表达的影响

1:Control(0.1% FBS);2:CGRP;3:H₂O₂;4:CGRP + H₂O₂. A:caveolin-1 蛋白表达的 Western-Blot 检测图;B:灰度扫描密度图. * *P* < 0.05 vs Control (0.1% FBS),#*P* < 0.05 vs H₂O₂

2.4 Caveolae 结构对 CGRP 抗氧化损伤作用的影响

如图 5 所示,用 0.1% FBS 同步化细胞 24 h,换含 5 mmol/Lβ-CD 的细胞培养液孵育细胞 0、0.17、0.5、1、4、8、16 h 提取细胞总蛋白。Western-blot 结果显示,β-CD 孵育细胞 0.5 h 后能够下调 HUVECs caveolin-1 的表达,并且降低幅度最大。由此选定 5 mmol/L β-CD 孵育细胞 0.5 h 作为破坏 caveolae 结构的条件。

如图 6 所示,同步化细胞按照处理因素分组,0.5 mmol/L H₂O₂ 处理细胞 4 h 后提取细胞总蛋白。Western-blot 结果显示:Caveolae 结构破坏后,CGRP

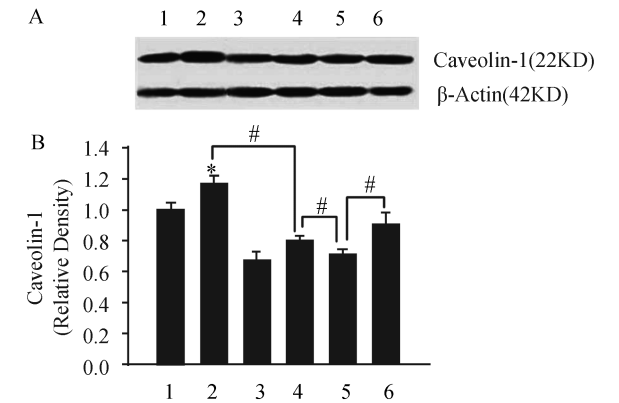


图6 各处理因素下 caveolin-1 的表达情况 1:Control(0.1% FBS);2:H₂O₂ 组;3:β-CD + CGRP 组;4:CGRP + H₂O₂ 组;5:β-CD + CGRP + H₂O₂ 组;6:Cholesterol + β-CD + CGRP + H₂O₂ 组. A:caveolin-1 蛋白表达的 Western-Blot 检测图;B:灰度扫描密度图. ($\bar{x} \pm s, n = 3$) * *P* < 0.05 vs Control;#*P* < 0.05

3 讨 论

本研究显示,caveolae 结构完整性对 CGRP 保护内皮细胞有一定的影响,主要表现在,完整的 caveolae 结构可以通过促进 caveolin-1 的表达降低 CGRP 对内皮细胞的促增殖作用,破坏 caveolae 结构后,这种作用降低。有研究表明,CGRP 还能刺激血管内皮细胞增殖,保护内皮祖细胞,修复和改善受损内皮的功能,沙坦类药物的降压和保护心血管作用与升高高血压患者体内的 CGRP 水平有关^[4]。

Caveolae 是富含胆固醇和蛋白质,其胆固醇含量占细胞内游离胆固醇的 90% 以上,胆固醇在维持 caveolae 结构完整性扮演重要角色^[5]。 β -环糊精能够结合胆固醇,导致 caveolae 在细胞膜上的形态发生变化,变得扁平,数目减少,从而影响其多数激酶活性抑制剂的生物学功能。本实验用 5 mmol/L β -CD 孵育细胞 30 min 后,发现在该时间点左右 caveolin-1 表达下降幅度最大,可能与小凹结构的破坏以及小凹数目急剧减少有关。流失细胞仪也发现,给予 β -CD,细胞 PI 值增大,与 CGRP + H_2O_2 组相比,S 期细胞数目增加;预先加入胆固醇,该作用被削弱,说明 caveolae 在 CGRP 促进氧化损伤 HUVECs S 增殖过程中可能起负性调节的作用。值得注意的是有文献^[6]指出一定剂量的 β -CD 能够使内皮细胞的活力下降,流式细胞术结果显示,加用 β -CD 处理细胞,细胞凋亡率较其他处理因素组有所增加。因此,应用 β -环糊精破坏小凹结构引起实验结果的偏差,可能与 β -CD 处理细胞的时间和剂量是否有关,这还需进一步阐明。本实验光镜下显示, β -CD 处理细胞后,虽然细胞密度有所增加,但形态也发生变化。恢复胆固醇细胞形态也与正常细胞有所不同,推测破坏小凹结构对细胞的功能可能有影响。

Caveolin-1 是组成 caveolae 结构和维持其完整性的所必需膜蛋白,并且前期工作证明 caveolin-1 参与负性调控细胞增殖的作用^[7]。Caveolin-1 已作为研究 caveolae 结构和功能以及 caveolae/caveolin-1 复杂的生物学功能的标志蛋白和工具。本实验用 5 mmol/L β -CD 处理细胞 30 min,caveolin-1 表达显著下降;能增强并放大 CGRP 对受损细胞的增殖作用;流式结果也表明 CGRP 预孵育细胞 30 min 使 H_2O_2 组 S 期细胞明显增多,这一增强效应在 caveolae 结构被破坏后得到放大,可被胆固醇削弱。由此

可见,CGRP 可能是通过推进 HUVECs 的 $G_1 \rightarrow S$ 期进程,促进细胞分裂增殖。Western-Blot 结果显示同样的效应:破坏 caveolae 后,CGRP 下调氧化损伤 HUVECs caveolin-1 作用更明显。说明内皮细胞膜表面 caveolae 结构或者数量表达的差异可能是调节 CGRP 受体信号转导的影响因素。实验对拟破坏小凹结构的内皮细胞加以胆固醇的供给,发现胆固醇逆转了 β -CD 上述的放大效应,外源性胆固醇结合了 β -CD,通过阻止 β -CD 结合细胞膜胆固醇破坏小凹结构,间接促进细胞膜胆固醇与 caveolin-1 相连形成 caveolae,恢复其与各种受体结合的能力,而发挥 caveolin-1 对增殖信号通路的负性调节作用。值得提出的是虽然剥夺胆固醇破坏小凹结构可以增强内皮细胞的数目,但就内皮细胞的功能影响来说是否受到影响还需进一步研究。

参考文献:

- [1] 邓水秀,秦旭平.降钙素基因相关肽的血管生物学功能多样性[J].国际病理科学与临床杂志,2006,26(3):246-249.
- [2] Santibanez JF,Blanco FJ,Garrido-Martin EM,et al. Caveolin-1 interacts and cooperates with the transforming growth factor- β type 1 receptor ALK-1 in endothelial caveolae [J]. Cardiovasc Res,2008,77(3):791-799.
- [3] 周孝钱,许俊,唐江琼,等. CGRP 对氧化损伤人脐静脉内皮细胞的保护作用及 Caveolin-1 表达的影响[J].中南医学科学杂志,2011,39(2):131-134.
- [4] Calò LA1,Dal Maso L,Pagnin E,et al. Effect of olmesartan medoxomil on number and survival of circulating endothelial progenitor cells and calcitonin gene related peptide in hypertensive patients [J]. J Hypertens,2014,32(1):193-199.
- [5] Suetsugu S,Kurisu S,Takenawa T. Dynamic shaping of cellular membranes by phospholipids and membrane-deforming proteins[J]. Physiol Rev,2014,94(4):1219-1248.
- [6] Kline MA,O'Connor Butler ES,Hinzey A,et al. A simple method for effective and safe removal of membrane cholesterol from lipid rafts in vascular endothelial cells: implications in oxidant-mediated lipid signaling. Methods Mol Biol. 2010;610:201-211.
- [7] 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]. Progress in Biochemistry and Biophysics,2013,40(5):445-453

(此文编辑:秦旭平)