

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.28.003

文章编号: 1005-8982 (2018) 28-0013-08

cAMP对高血压鼠血管平滑肌细胞增殖的影响

王瑶函, 吴蕊

(河南省阜外华中心血管病医院 心肺功能科, 河南 郑州 450003)

摘要: **目的** 探讨3', 5'-环化腺苷一磷酸(cAMP)对高血压鼠血管平滑肌细胞增殖的影响, 并进一步证明分子机制。**方法** 复制高血压鼠模型, 提取血管平滑肌细胞。噻唑蓝比色(MTT)法检测db-cAMP对正常鼠和高血压鼠在对照组、db-cAMP组和腺苷酸环化酶激活剂Forskolin(FSK)组血管平滑肌细胞活性的影响。Western blot法检测不同浓度的db-cAMP对正常鼠和高血压鼠血管平滑肌细胞中抑制性蛋白 α 亚基2($G_{i\alpha 2}$)和抑制性蛋白 α 亚基3($G_{i\alpha 3}$)蛋白表达以及对表皮生长因子受体(EGFR)蛋白、细胞外调节蛋白激酶(ERK1/2)蛋白和原癌基因(c-Src)蛋白磷酸化水平的影响。流式细胞仪检测不同浓度的db-cAMP对正常鼠和高血压鼠血管平滑肌细胞内活性氧(ROS)生成的影响。**结果** 在正常鼠中, 与对照组的细胞活性水平相比, db-cAMP组和FSK组的细胞活性水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。在高血压鼠中, 与对照组的细胞活性水平比较, db-cAMP组和FSK组的细胞活性水平差异有统计学意义($P < 0.05$), db-cAMP组和FSK组均下降; 与正常鼠不添加db-cAMP比较, 高血压鼠不添加db-cAMP的血管平滑肌细胞中 $G_{i\alpha 2}$ 和 $G_{i\alpha 3}$ 的蛋白表达增加, 超氧阴离子 O_2^- 生成, EGFR蛋白、ERK1/2蛋白和c-Src蛋白的磷酸化水平均增加。与正常鼠不添加db-cAMP比较, 正常鼠添加0.5 mmol/L db-cAMP的血管平滑肌细胞中上述参数部分差异有统计学意义($P < 0.05$)。与高血压鼠不添加db-cAMP相比, 在高血压鼠血管平滑肌细胞中分别加入0.1、0.3、0.5和1 mmol/L db-cAMP后上述参数均降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 初步认为db-cAMP可能通过抑制细胞中 $G_{i\alpha}$ 蛋白的表达、氧化应激水平及下游信号通路, 从而抑制高血压鼠血管平滑肌细胞增殖。

关键词: 3', 5'-环化腺苷一磷酸; 高血压; 血管平滑肌细胞; 增殖

中图分类号: R-332

文献标识码: A

Effect of cAMP on proliferation of vascular smooth muscle cells in hypertensive rats

Yao-han Wang, Rui Wu

(Department of Cardiopulmonary Function, Fuwai Central China Cardiovascular Hospital, Zhengzhou, Henan 450003, China)

Abstract: Objective To discuss the effect of 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) on the proliferation of vascular smooth muscle cells in hypertensive rats and further demonstrate the molecular mechanism. **Methods** The hypertensive rat models were constructed and the vascular smooth muscle cells were extracted. MTT method was used to detect the effect of db-cAMP on the activity of vascular smooth muscle cells in the control group, the db-cAMP group and the Forskolin (cAMP activator) group. Western blot was used to detect the effect of db-cAMP with different concentrations on the levels of inhibitory protein α subunit 2 ($G_{i\alpha 2}$) and inhibitory protein α subunit 3 ($G_{i\alpha 3}$) and the phosphorylation levels of epidermal growth factor receptor (EGFR) protein, ERK1/2 protein and c-Src protein of vascular smooth muscle cells in the normal and hypertensive rats. Flow cytometry was used to detect the effect of db-cAMP with different concentrations on the formation of reactive oxygen species (ROS) in the vascular smooth muscle cells of the normal and hypertensive rats. **Results** In the normal rats, the cell viability in the db-

收稿日期: 2018-04-28

cAMP group and the Forskolin group was not significantly different from that in the control group ($P > 0.05$). In the hypertensive rats, the cell viability in the db-cAMP group and the Forskolin group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). Compared with the normal rats without adding db-cAMP, the protein expression levels of G_{i2} and G_{i3} , the generation of superoxide anion O_2^- , the phosphorylation levels of EGFR, ERK1/2 and c-Src proteins were significantly increased in the vascular smooth muscle cells of the hypertensive rats without adding db-cAMP ($P < 0.05$). Compared with the normal rats without adding db-cAMP, some of the above parameters in the vascular smooth muscle cells were statistically different in the normal rats adding 0.5 mmol/L db-cAMP ($P < 0.05$). Compared with the hypertensive rats without adding db-cAMP, the above parameters were reduced in the vascular smooth muscle cells of the hypertensive rats adding 0.1, 0.3, 0.5 and 1 mmol/L db-cAMP ($P < 0.05$). **Conclusions** It is suggested that db-cAMP may inhibit the proliferation of vascular smooth muscle cells in hypertensive rats by inhibiting the expression level of G_i protein, oxidative stress and downstream signaling pathway.

Keywords: 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate; hypertension; vascular smooth muscle cell; proliferation

高血压以体循环动脉压升高为特征, 是伴有心脏、血管、脑和肾脏等器官功能性或器质性损害的临床综合征^[1]。高血压治疗不及时将导致脑溢血、动脉硬化、心肌梗死、肾衰竭和失明。高血压的发病率和病死率逐年在增加, 已严重威胁人类的生命与健康^[2]。3', 5'-环化腺苷一磷酸 (3', 5'-cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 在心肌收缩、血管平滑肌紧张性、细胞增殖和蛋白质的合成等多种生物学活动中发挥作用^[3]。本研究通过实验观察 cAMP 对高血压鼠血管平滑肌细胞增殖的影响, 并初步探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

WKY 大鼠 20 只, 体重 200 ~ 215 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号 SCXK(京) 2016-0011。20 只大鼠随机分为高血压鼠和正常鼠, 每组各 10 只。

1.2 试剂与仪器

蛋白提取试剂盒 (美国 Thermo Scientific 公司), DMEM 培养液、胎牛血清 (美国 Gibco 公司), MTT 试剂盒、DAB 试剂盒、ROS 试剂盒 (广州碧云天公司), 腺苷酸环化酶激活剂 (Forskolin, FSK)、一氧化氮合酶抑制剂 (N-Nitro-L-arginine Methyl Ester, L-NAME)、胶原酶 I、db-cAMP (美国 Sigma 公司) 及其配套供给的稀释溶剂, 兔抗鼠 G_{i2} 抗体、兔抗鼠 G_{i3} 抗体、羊抗鼠表皮生长因子受体 (EGFR) 抗体、兔抗鼠 p-EGFR 抗体、兔抗鼠细胞外调节蛋白激酶 (ERK1/2) 抗体、兔抗鼠 p-ERK1/2 抗体、羊抗鼠原癌基因 (c-Src) 抗体、兔抗鼠 pc-Src 抗体和 Dynein 抗体 (美国 Abcam 公司), ECL 发光液 (美国 Millipore 公司)。流式细胞仪 (FACSVerse, 美国 BD

公司), 凝胶成像仪 (GelDoc-It, 美国 UVP 公司), 酶标仪 (ELX800, 美国 Bio-Tek 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 一氧化氮 (NO) 缺乏性高血压鼠模型的复制^[4]

正常鼠常规饲养, 高血压鼠每日喂食 L-NAME, 每天灌胃给药 L-NAME 1 次, 剂量为 6 mg/kg, 连续给药 1 周和 3 周后, 每天对大鼠进行 24 h 动态血压检测和活动记录, 大鼠动态血压的收缩压 / 舒张压符合白昼 > 150/100 mmHg, 夜间 >140/90 mmHg 时为高血压。

1.3.2 血管平滑肌的原代培养

正常和高血压大鼠脱颈处死, 75% 酒精浸泡 2 ~ 3 min, 无菌台中迅速将胸 / 腹主动脉取出, 放到盛有预冷的 PBS 的平皿中清洗表面的凝血块。把主动脉放到盛有 DMEM+ 双抗的培养皿中用手术钳除去外膜和脂肪。将血管纵向剪开, 用刀片自上而下轻轻刮 2 下, 除去内膜。放到加有 3 ~ 5 ml 1 mg/ml 胶原酶 I +DMEM+ 双抗的 15 ml 管中, 室温孵育 3 h。用 20% FBS+ 双抗的 DMEM 洗血管, 把血管切成 1 mm³ 的小片, 内膜一面朝下贴向培养瓶底, 放到 5% CO₂ 培养中培养 4 h 贴壁后加入适量的 20% FBS+ 双抗的 DMEM 液。培养过夜。第 2 天换液, 待组织处长出细胞后移去组织, 继续培养细胞, 待后续实验用。

1.3.3 流式细胞仪检测活性氧 (ROS)

取培养的正常鼠和高血压鼠血管平滑肌细胞胰酶消化计数后在 24 孔板中接种 $3 \times 10^4/2$ ml 个细胞每孔, 贴壁培养 24 h。正常鼠血管平滑肌细胞加入 0.5 mmol/L db-cAMP, 高血压鼠血管平滑肌细胞加入 0.1、0.3、0.5 和 1.0 mmol/L db-cAMP 培养 12 h, 同时设空白对照组。弃去培养液, 用 PBS 清洗细胞 2 次。用无血清 DMEM 培养液按照 1 : 1 000 稀释 DCFH-DA 探针, 使其终浓度为 10 μ l/L, 每孔加入 500 μ l 稀释后的探针, 培养

箱中孵育 20 min。用无血清 DMEM 洗涤细胞 3 次, 充分洗去未进入细胞的 DCFH-DA 探针。细胞刮刀收集细胞, 流式细胞仪定量检测细胞 ROS 水平。

1.3.4 噻唑蓝比色 (MTT) 法检测 db-cAMP 对正常鼠和高血压鼠血管平滑肌细胞活性的影响 取培养的正常鼠和高血压鼠血管平滑肌细胞消化计数以每孔 2×10^3 个细胞 ($100 \mu\text{l}$) 的数量接种在 96 孔板培养 24 h, 分别加入 0.5 mmol/L db-cAMP 和 FSK, 同时设对照组, 37°C , $5\% \text{ CO}_2$ 条件下培养 48 h。取出 96 孔板弃掉培养液, 每孔加入 $100 \mu\text{l}$ 无血清的 DMEM 培养液, 再每孔加入 5 g/L MTT $20 \mu\text{l}$, 继续培养 4 h, 吸出培养液, 加入 DMSO $150 \mu\text{l}$ 充分溶解, 待甲臜完全溶解后, 用酶标仪在波长 490 nm 处读取吸光度 (A490) 值。

1.3.5 Western blot 检测 取培养的正常鼠和高血压鼠血管平滑肌细胞消化计数以每孔 5×10^4 个细胞的数量接种在 6 孔板培养 24 h, 正常鼠血管平滑肌细胞加入 0.5 mmol/L db-cAMP, 高血压鼠血管平滑肌细胞加入 0.1 、 0.3 、 0.5 和 1 mmol/L db-cAMP, 同时设对照组, 37°C , $5\% \text{ CO}_2$ 条件下培养 24 h。用蛋白提取试剂盒提取细胞蛋白, 用 BCA 法测定每组蛋白浓度, 每孔总蛋白上样量为 $50 \mu\text{g}$, 上完样后进行 $12\% \text{ SDS-PAGE}$ 凝胶电泳分离后转 PVDF 膜 (80 V , 90 min), 用封闭液 ($5\% \text{ 脱脂奶粉}$) 封闭 2 h, TBST 洗膜 5 min/次 , 洗 5 次。分别用如下—抗 $\text{Gi}_\alpha\text{-2}$ ($1:1000$)、 $\text{Gi}_\alpha\text{-3}$ ($1:1000$)、p-EGFR ($1:5000$)、p-EKR1/2 ($1:2000$)、ERK1/2 ($1:1000$)、c-Src ($1:1000$)、pc-Src ($1:1000$) 和 Dynein ($1:2000$) 4°C 过夜, TBST 洗膜 5 min/次 , 洗 5 次。分别用稀释比例为 $1:1000$ 的对应二抗 37°C 摇床反应 1 h, TBST 洗膜 5 min/次 , 洗 5 次。然后采用 ECL 发光液显影, 凝胶成像仪对蛋白条带进行观察, 获取图像, 并用 Labworks 4.6 软件对图像进行灰度分析, 记录灰度值, 计算目的蛋白与内参蛋白的灰度比值。进行 3 次独立实验后, 进行统计分析。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 均通过正态性检验。多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD- t 检验, 两组间比较采用成组 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 db-cAMP 对正常鼠和高血压鼠血管平滑肌细胞增殖的影响

在正常鼠中 (见图 1 左), 对照组细胞活性水平为 (100.0 ± 0.0)%, db-cAMP 组和 FSK 组细胞活性水平均相近, 3 组整体比较, 差异无统计学意义 ($F = 0.483$, $P = 0.324$), 提示在正常鼠中 db-cAMP 和 FSK 对血管平滑肌细胞无促增殖作用。在高血压鼠中 (见图 1 右), 对照组细胞活性水平为 (100.0 ± 0.0)%, db-cAMP 组细胞活性水平为 (36.7 ± 0.2)%, FSK 组细胞活性水平为 (49.1 ± 0.3)%, 3 组整体比较, 差异有统计学意义 ($F = 24.483$, $P = 0.025$); 与对照组比较, db-cAMP 组和 FSK 组细胞活性均下降, 差异有统计学意义 ($t = 5.916$ 和 4.136 , $P = 0.021$ 和 0.039), 提示 db-cAMP 和 FSK 对血管平滑肌细胞具有抑制增殖的作用。

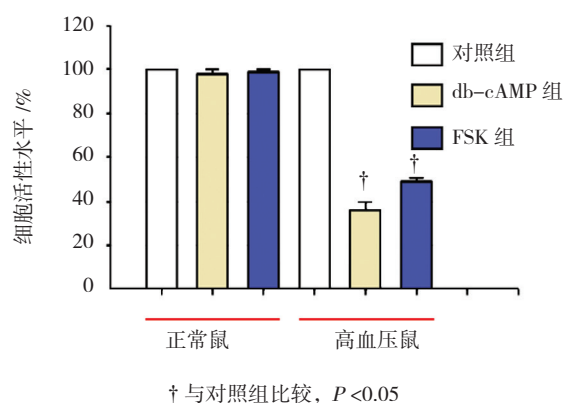


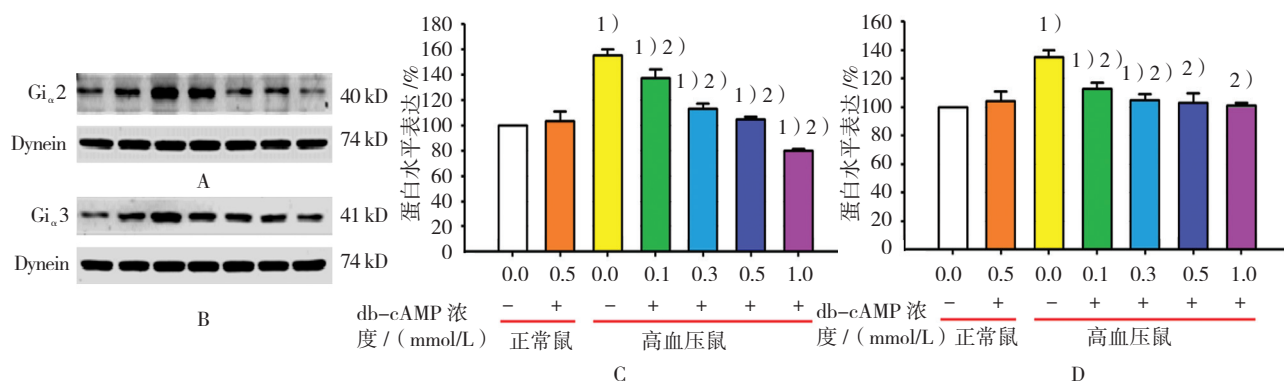
图 1 db-cAMP 对正常鼠和高血压鼠血管平滑肌细胞增殖的影响

2.2 db-cAMP 对正常鼠和高血压鼠血管平滑肌细胞 $\text{Gi}_\alpha\text{-2}$ 和 $\text{Gi}_\alpha\text{-3}$ 蛋白表达的影响

与正常鼠不添加 db-cAMP 比较, 高血压鼠不添加 db-cAMP 的血管平滑肌细胞中 $\text{Gi}_\alpha\text{-2}$ (见图 2A) 和 $\text{Gi}_\alpha\text{-3}$ (见图 2B) 的蛋白表达均增加 ($t = 83.785$ 和 32.935 , $P = 0.000$ 和 0.001)。①在高血压鼠血管平滑肌细胞中分别加入 0.1 、 0.3 、 0.5 和 1.0 (mmol/L) db-cAMP 后 $\text{Gi}_\alpha\text{-2}$ 蛋白表达从开始的 158.1 逐渐下降, 甚至降到比正常鼠不添加 db-cAMP 时还低, 其中高血压鼠的 $\text{Gi}_\alpha\text{-2}$ 蛋白表达与正常鼠不添加 db-cAMP 比较差异有统计学意义 ($t = 22.171$ 、 14.008 、 6.880 和 31.502 , $P = 0.002$ 、 0.005 、 0.020 和 0.001), 高血压鼠中添加 db-cAMP 的 $\text{Gi}_\alpha\text{-2}$ 蛋白表达均低于不添加 db-

cAMP, 差异有统计学意义 ($t=9.949$ 、 28.289 、 57.677 和 83.653 , $P=0.001$ 、 0.000 、 0.000 和 0.000) (见图 2C 和表 1); ②在高血压鼠血管平滑肌细胞中分别加入 0.1、0.3、0.5 和 1.0 mmol/L db-cAMP 后 $G_{i\alpha 3}$ 蛋白表达从开始的 138.0 逐渐下降, 最终降到与正常鼠不添加 db-cAMP 时的水平相近, 其中高血压鼠不添加 db-cAMP、添加 0.1、0.3 mmol/L db-cAMP 的 $G_{i\alpha 3}$ 蛋

白表达高于正常鼠不添加 db-cAMP, 差异有统计学意义 ($t=32.935$ 、 13.313 和 7.772 , $P=0.001$ 、 0.006 和 0.016), 高血压鼠中添加 db-cAMP 的 $G_{i\alpha 3}$ 蛋白表达均低于不添加 db-cAMP, 差异有统计学意义 ($t=12.07$ 、 24.503 、 19.804 和 22.093 , 均 $P=0.000$) (见图 2D 和表 2)。



1) 与正常鼠不添加 db-cAMP 比较, $P < 0.05$; 2) 高血压鼠与不添加 db-cAMP 比较, $P < 0.05$

图 2 db-cAMP 对正常鼠和高血压鼠血管平滑肌细胞 $G_{i\alpha 2}$ 和 $G_{i\alpha 3}$ 蛋白表达的影响

表 1 正常鼠和高血压鼠不同 db-cAMP 浓度下的 $G_{i\alpha 2}$ /Dynein 蛋白相对表达量比较 ($n=10$)

组别	0.0 mmol/L	0.1 mmol/L	0.3 mmol/L	0.5 mmol/L	1.0 mmol/L	t/F 值	P 值
正常鼠	100.0 ± 0.0	-	-	106.2 ± 2.1	-	5.090	0.036
高血压鼠	158.1 ± 1.2	139.2 ± 3.1	117.6 ± 2.2	104.3 ± 1.1	80.7 ± 1.1	763.214	0.000

表 2 正常鼠和高血压鼠不同 db-cAMP 浓度下的 $G_{i\alpha 3}$ /Dynein 蛋白相对表达量比较 ($n=10$)

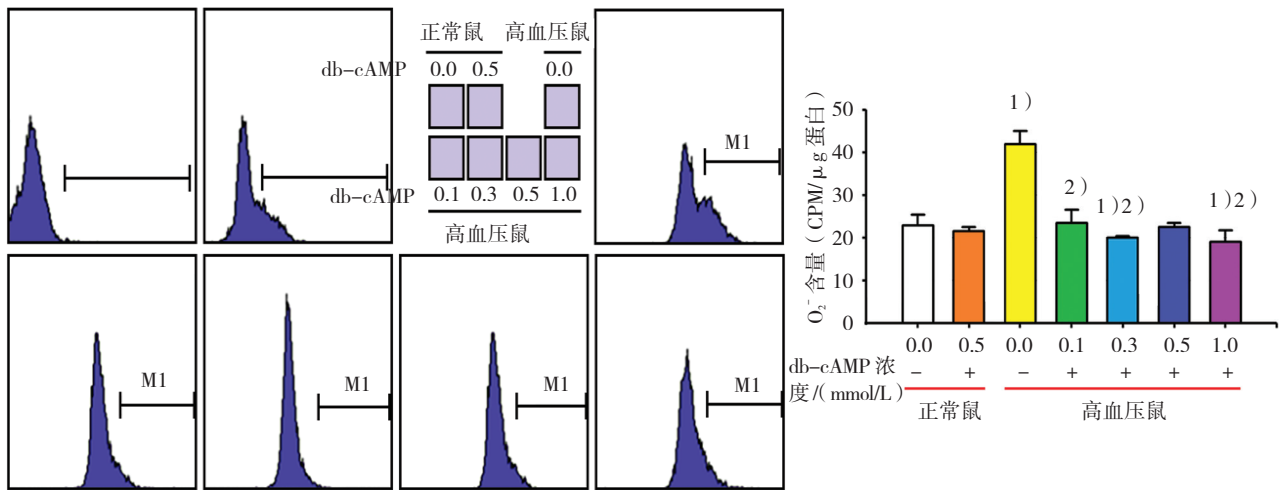
组别	0.0 mmol/L	0.1 mmol/L	0.3 mmol/L	0.5 mmol/L	1.0 mmol/L	t/F 值	P 值
正常鼠	100.0 ± 0.0	-	-	105.2 ± 2.1	-	4.347	0.049
高血压鼠	138.0 ± 2.0	117.1 ± 2.2	105.3 ± 1.2	102.3 ± 2.4	100.2 ± 2.2	176.230	0.000

2.3 db-cAMP 对正常鼠和高血压鼠血管平滑肌细胞内 ROS 生成的影响

与正常鼠不添加 db-cAMP 比较, 高血压鼠不添加 db-cAMP 的血管平滑肌细胞中的超氧阴离子 (O_2^-) 含量明显增加 (见图 3)。在高血压鼠血管平滑肌细胞中分别加入 0.1、0.3、0.5 和 1.0 mmol/L db-cAMP 后血管平滑肌细胞内的 O_2^- 含量从开始的 42.12 逐渐下降, 甚至降到比正常鼠不添加 db-cAMP 时还低, 其中高血压鼠不添加 db-cAMP、添加 0.3、1.0 mmol/L 的 O_2^- 含量与正常鼠不添加 db-cAMP 比较差异有统计学意义 ($t=14.440$ 、 3.348 和 4.449 , $P=0.000$ 、 0.029 和 0.011), 高血压鼠中添加 db-cAMP 的 O_2^- 含量均低于不添加 db-cAMP, 差异有统计学意义 ($t=12.433$ 、 16.210 、 13.633 和 17.183 , 均 $P=0.000$) (见表 3)。

2.4 db-cAMP 对正常鼠和高血压鼠血管平滑肌细胞 EGFR 蛋白磷酸化水平的影响

与正常鼠不添加 db-cAMP 相比, 高血压鼠不添加 db-cAMP 的血管平滑肌细胞中 EGFR 的磷酸化水平表达增加 (见图 4)。与正常鼠不添加 db-cAMP 相比, 正常鼠添加 0.5 mmol/L db-cAMP 的血管平滑肌细胞中 EGFR 的磷酸化水平变化不大, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。高血压鼠血管平滑肌细胞中分别加入 0.1、0.3、0.5 和 1.0 mmol/L db-cAMP 后 EGFR 的磷酸化水平逐渐降低, 从 142.2 降低到接近正常鼠不添加 db-cAMP 时的水平。其中高血压鼠不添加 db-cAMP、添加 0.1、0.3 mmol/L db-cAMP 后 EGFR 的磷酸化水平高于正常鼠不添加 db-cAMP, 差异有统计学意义 ($t=68.340$ 、 52.952 和 25.993 , $P=$



1) 与正常鼠不添加 db-cAMP 比较, $P < 0.05$; 2) 高血压鼠与不添加 db-cAMP 比较, $P < 0.05$

图 3 db-cAMP 对正常鼠和高血压鼠血管平滑肌细胞内 ROS 生成的影响

表 3 正常鼠和高血压鼠不同 db-cAMP 浓度下的 O_2^- 生成比较 ($n = 10$)

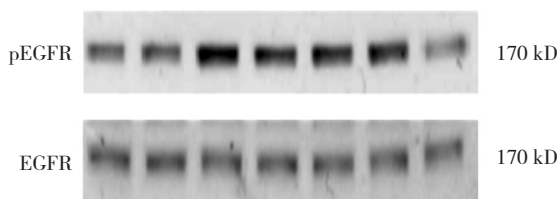
组别	0.0 mmol/L	0.1 mmol/L	0.3 mmol/L	0.5 mmol/L	1.0 mmol/L	t/F 值	P 值
正常鼠	23.0 ± 1.0	-	-	21.3 ± 1.1	-	1.972	0.120
高血压鼠	42.1 ± 2.1	24.3 ± 1.4	20.1 ± 1.2	23.2 ± 1.3	19.3 ± 1.1	128.457	0.000

0.000、0.000 和 0.001), 高血压鼠中添加 0.3、0.5 和 1.0 mmol/L db-cAMP 后 EGFR 的磷酸化水平均低于不添加 db-cAMP, 差异有统计学意义 ($t = 22.080$ 、31.976 和 40.912, 均 $P = 0.000$)。见表 4。

2.5 db-cAMP 对正常鼠和高血压鼠血管平滑肌细胞 ERK 蛋白磷酸化水平的影响

与正常鼠不添加 db-cAMP 比较, 高血压鼠不添加 db-cAMP 的血管平滑肌细胞中 ERK 的磷酸化水平明显增加 (见图 5)。血管平滑肌细胞中 ERK 的

磷酸化水平在高血压鼠血管平滑肌细胞中分别加入 0.1、0.3、0.5 和 1.0 mmol/L db-cAMP 后, ERK 的磷酸化水平均降低, 从 139.3 直降至 78.1, 其中高血压鼠不添加 db-cAMP、添加 0.1、0.5、1.0 mmol/L 后 ERK 的磷酸化水平与正常鼠不添加 db-cAMP 比较差异有统计学意义 ($t = 54.421$ 、30.797、11.949 和 27.559, $P = 0.000$ 、0.001、0.007 和 0.001), 高血压鼠中添加 db-cAMP 的 ERK 的磷酸化水平均低于不添加 db-cAMP,

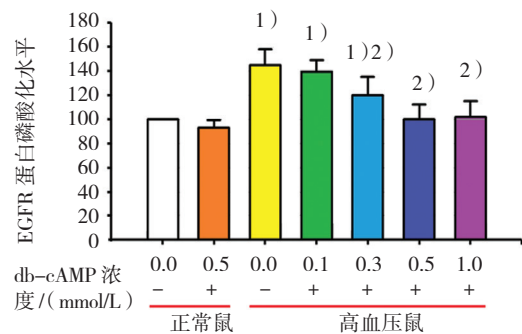


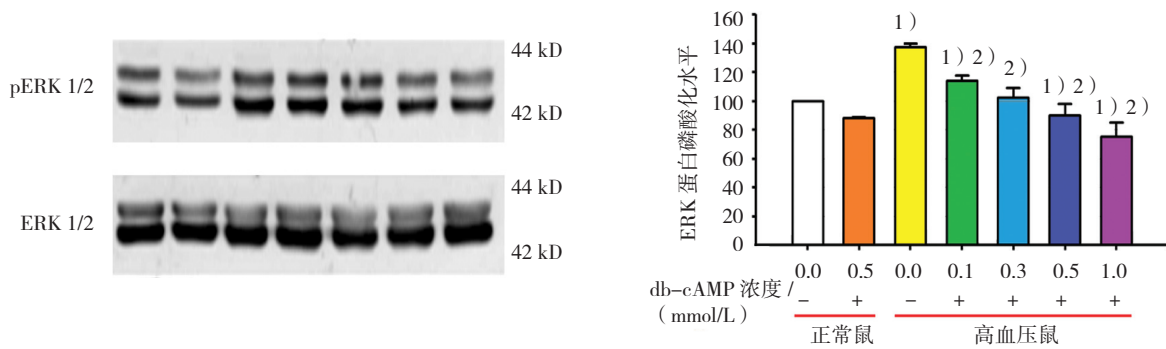
1) 与正常鼠不添加 db-cAMP 比较, $P < 0.05$; 2) 高血压鼠与不添加 db-cAMP 比较, $P < 0.05$

图 4 db-cAMP 对正常鼠和高血压鼠血管平滑肌细胞 EGFR 蛋白磷酸化水平表达的影响

表 4 正常鼠和高血压鼠不同 db-cAMP 浓度下的 pEGFR/ 总 EGFR 比较 ($n = 10$)

组别	0.0 mmol/L	0.1 mmol/L	0.3 mmol/L	0.5 mmol/L	1.0 mmol/L	t/F 值	P 值
正常鼠	100.0 ± 0.0	-	-	97.1 ± 1.2	-	4.060	0.056
高血压鼠	142.2 ± 1.0	140.1 ± 1.3	120.3 ± 1.4	100.0 ± 2.0	101.2 ± 1.4	583.485	0.000





1) 正常鼠不添加 db-cAMP 比较, $P < 0.05$; 2) 高血压鼠与不添加 db-cAMP 比较, $P < 0.05$

图 5 db-cAMP 对正常鼠和高血压鼠血管平滑肌细胞 ERK 蛋白磷酸化水平表达的影响

表 5 正常鼠和高血压鼠不同 db-cAMP 浓度下的 PERK1/2/ 总 ERK1/2 比较 ($n = 10$)

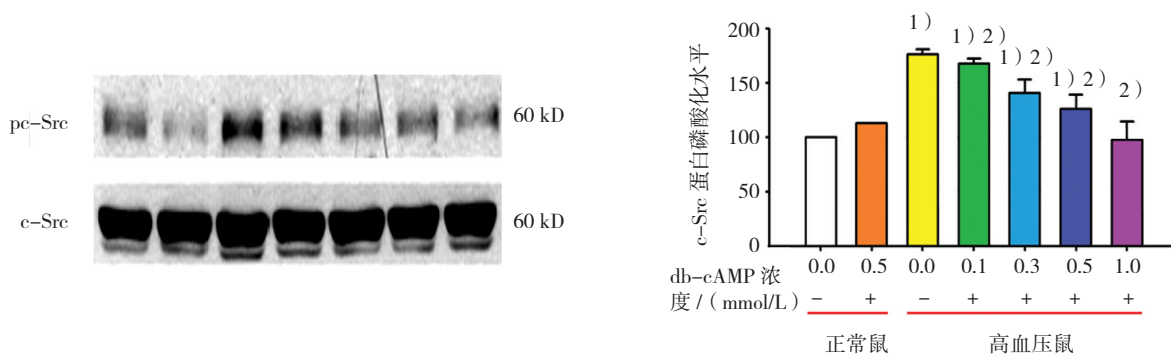
组别	0.0 mmol/L	0.1 mmol/L	0.3 mmol/L	0.5 mmol/L	1.0 mmol/L	t/F 值	P 值
正常鼠	100.0 ± 0.0	-	-	87.4 ± 2.4	-	9.068	0.012
高血压鼠	139.3 ± 1.3	118.2 ± 1.0	102.0 ± 2.1	90.4 ± 1.4	78.1 ± 1.4	808.974	0.000

差异有统计学意义 ($t = 22.695$ 、 26.886 、 45.280 和 56.967 , 均 $P = 0.000$)。见表 5。

2.6 db-cAMP 对正常鼠和高血压鼠血管平滑肌细胞 c-Src 蛋白磷酸化水平的影响

与正常鼠不添加 db-cAMP 比较, 高血压鼠不添加 db-cAMP 的血管平滑肌细胞中 c-Src 的磷酸化水平明显增加 (见图 6)。高血压鼠血管平滑肌细胞中分别加入 0.1、0.3、0.5 和 1.0 mmol/L db-cAMP 后 c-Src 的磷酸化水平降低, 从 177.3 降至与正常鼠不

添加 db-cAMP 时的水平接近。其中高血压鼠不添加 db-cAMP、添加 0.1、0.3、0.5 mmol/L db-cAMP 后 c-Src 的磷酸化水平高于正常鼠不添加 db-cAMP, 差异有统计学意义 ($t = 56.544$ 、 93.928 、 36.290 和 22.761 , $P = 0.000$ 、 0.000 、 0.000 和 0.001), 高血压鼠中添加 db-cAMP 的 c-Src 的磷酸化水平均低于不添加 db-cAMP, 差异有统计学意义 ($t = 4.411$ 、 17.528 、 23.924 和 50.542 , $P = 0.012$ 、 0.000 、 0.000 和 0.000)。见表 6。



1) 与正常鼠不添加 db-cAMP 比较, $P < 0.05$; 2) 高血压鼠与不添加 db-cAMP 比较, $P < 0.05$

图 6 db-cAMP 对正常鼠和高血压鼠血管平滑肌细胞 c-Src 蛋白磷酸化水平的影响

表 6 正常鼠和高血压鼠不同 db-cAMP 浓度下的 pc-Src/ 总 c-Src 比较 ($n = 10$)

组别	0.0 mmol/L	0.1 mmol/L	0.3 mmol/L	0.5 mmol/L	1.0 mmol/L	t/F 值	P 值
正常鼠	100.1 ± 0.1	-	-	113.3 ± 3.1	-	7.435	0.018
高血压鼠	177.3 ± 2.4	170.4 ± 1.3	145.0 ± 2.1	131.2 ± 2.4	99.4 ± 1.3	787.767	0.000

3 讨论

cAMP 是由腺苷酸环化酶信号转导系统所产生的第 2 信使, 在血管平滑肌紧张性和细胞增殖等多种生物学活动中发挥作用^[9]。Gs 和 Gi 分别是鸟嘌呤核苷酸调节蛋白的调节因子和抑制因子, 它们可以通过调节激素的水平从而调节腺苷酸环化酶的活性和 cAMP 的表达水平。Gi 蛋白的表达减少可以诱导高血压、心肌肥大和心力衰竭等多种病理状态^[5]。报道指出, 在自发性高血压鼠模型的心血管组织中, Gi 蛋白表达、腺苷酸环化酶活性和 cAMP 的表达异常^[6]。在自发高血压鼠模型和醋酸脱氧皮质酮高血压鼠模型的心脏中, Gi 蛋白表达增加导致 cAMP 水平的下降, 并且自发高血压鼠模型和醋酸脱氧皮质酮高血压鼠模型中, Gi_α 蛋白表达的增加现象出现于高血压现象出现之前, 这表明 Gi_α 蛋白表达的增加和 cAMP 表达的下降可能是高血压发病机制的重要因素^[7]。通过用百日咳毒素处理 2 周大小的自发高血压鼠模型来抑制 Gi_α 蛋白的活性, 可以有效抑制腺苷酸环化酶的活性并且增加 cAMP 的表达水平, 同时缓解自发高血压鼠模型高血压状态^[8]。血管紧张素 II 所诱导的 Gi_α 蛋白表达的增加可以被 db-cAMP 所抑制, 从而抑制血管平滑肌细胞的增殖^[9]。本研究在探究 cAMP 对高血压鼠血管平滑肌细胞增殖影响的过程中发现与正常鼠模型中的血管平滑肌细胞相比, 高血压鼠模型中 VSMC 细胞中的 Gi_α 蛋白表达水平增加, 并且细胞增殖速度加快。有报道指出^[10-11] 增加内源性血管紧张素 II (ANG II) 和内皮素 1 (ET-1) 的表达可以增加 Gi_α 蛋白的表达和细胞增殖。

通过研究初步发现在高血压鼠模型中血管平滑肌细胞中, db-cAMP 可以通过抑制 ROS 和 ROS 所介导的 c-Src 信号通路来抑制 Gi_α 蛋白表达的增加和细胞增殖的提高。cAMP 在调节多种细胞增殖具有重要作用。其中 cAMP 已经被证实可以调节上皮细胞、甲状腺细胞、肝细胞、Swiss 3T3 细胞和角质细胞的增殖^[12-13]。同时, cAMP 也可以抑制多种细胞的增殖, 例如白血病细胞和平滑肌细胞^[14]。本研究选取 db-cAMP, 其为可以穿透细胞的 cAMP 类似物, 作用于高血压鼠模型中血管平滑肌细胞时, 可以抑制 Gi_α 蛋白表达的增加和细胞增殖。db-cAMP 对正常鼠血管平滑肌细胞增殖无抑制作用, 而在高血压鼠中, db-cAMP 对血管平滑肌细胞具有抑制增殖的作用, 加入 db-cAMP 后细胞活性分别大幅降低。高血压鼠血管平滑肌细胞中分别加入

db-cAMP 后 Gi_{α2} 和 Gi_{α3} 的蛋白表达亦明显降低。

有报道显示^[15] 在高血压鼠模型的血管平滑肌细胞中, 蛋白激酶 A (PKA) 抑制剂可以抑制 db-cAMP 对 Gi_α 蛋白表达增加和细胞增殖。因此笔者推测 db-cAMP 对抑制 Gi_α 蛋白表达的增加和细胞增殖的潜在分子机制可能是由于 PKA 细胞通路介导的。本实验发现, db-cAMP 不仅可以抑制 Gi 蛋白表达的增加和细胞增殖, 同时还可以抑制 ERK1/2 的磷酸化, 表明在高血压鼠模型的 VSMC 细胞中, db-cAMP 对于抑制 Gi_α 蛋白表达的增加和细胞增殖可能是由丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路介导的。EGFR 活化可以提高 Gi_α 蛋白的表达和促进细胞增殖^[16]。本研究同时还发现, 加入外源 cAMP 可以抑制 EGFR 的活性。初步说明, cAMP 可能是通过抑制 EGFR 的表达从而抑制细胞的增殖和提高 Gi 蛋白的表达。

c-Src 是介导氧应激和 EGFR 反式激活的主要分子, c-Src 抑制因子 PP2 可以抑制 PDGFR 和 EGFR 磷酸化水平的提高^[17]。在高血压鼠血管平滑肌细胞中分别加入 0.1、0.3、0.5 和 1.0 mmol/L db-cAMP 后, c-Src 的磷酸化水平表达降低, 0.5 和 1.0 mmol/L db-cAMP 组分别降低。所以初步推测外源 cAMP 可以抑制高血压鼠模型血管平滑肌细胞中 c-Src 磷酸化水平。应强调的是, 本研究的设计存在较大的不足和局限性: 要观察某一物质是否具有某一新的作用, 除了要设置阴性对照和阳性对照外 (本实验未设计), 还应做量-效实验, 至少要有 5 个浓度点, 剂量范围至少达 100 倍。而本研究观察仅有 4 个点, 剂量范围也只有 10 倍 (0、0.1、0.3、0.5 和 1.0), 不是真正的量-效实验, 今后将按照此要求设计实验, 进行量效关系的研究。

综上所述, 本研究初步发现 cAMP 可以抑制 Gi_α 蛋白的表达, 细胞增殖, 氧化应激, c-Src 活化, EGF-R 活化。提示 db-cAMP 抑制高血压鼠模型的血管平滑肌细胞中 Gi_α 蛋白的表达提高和细胞增殖可能是由于其可以抑制氧化应激的上升和下游的信号通路。即高血压鼠中 cAMP 表达水平的提高可能具有保护高血压细胞免受氧应激所诱导的并发症。

参 考 文 献:

- [1] 鹿子龙, 唐俊利, 张高辉, 等. 山东省 2013 年居民高血压患病率、知晓率、治疗和控制状况分析 [J]. 中华流行病学杂志, 2016, 37(9): 1207-1212.
- [2] 陆凤, 胡如英, 方乐, 等. 高血压患者的危险因素及其在知晓、治疗、控制上的性别差异 [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2016,

- 32(11): 922-927.
- [3] TALLAPRAGADA V J, HILDRETH C M, BURKE P G, et al. tonically active cAMP-dependent signaling in the ventrolateral medulla regulates sympathetic and cardiac vagal outflows[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2016, 356(2): 424-433.
- [4] ROSSI M A, RAMOS S G, PRADO C M. Chronic inhibition of nitric oxide synthase induces hypertension and cardiomyocyte mitochondrial and myocardial collagen remodelling in the absence of hypertrophy[J]. *J Hypertens*, 2003, 21(5): 993-1001.
- [5] LI Y, ANAND-SRIVASTAVA M B. Regulation of $G_{i\alpha}$ protein expression by vasoactive peptides in hypertension: molecular mechanisms[J]. *Indian J Biochem Biophys*, 2014, 51(6): 467-475.
- [6] LECARPENTIER E, ATALLAH A, GUIBOURDENCHE J, et al. Fluid shear stress promotes placental growth factor upregulation in human syncytiotrophoblast through the cAMP-PKA signaling pathway[J]. *Hypertension*, 2016, 68(6): 1438-1446.
- [7] LI Y, SARKAR O, BROCHU M, et al. Natriuretic peptide receptor-C attenuates hypertension in spontaneously hypertensive rats: role of nitroxidative stress and Gi proteins[J]. *Hypertension*, 2014, 63(4): 846-855.
- [8] AHMAD J N, CERNY O, LINHARTOVA I, et al. cAMP signaling of Bordetella adenylate cyclase toxin through the SHP-1 phosphatase activates the BimEL-Bax pro-apoptotic cascade in phagocytes[J]. *Cell Microbiol*, 2016, 18(3): 384-398.
- [9] LI Y, ANAND-SRIVASTAVA M B. Implication of multiple signaling pathways in the regulation of angiotensin II induced enhanced expression of $G_{i\alpha}$ proteins in vascular smooth muscle cells[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2012, 90(8): 1105-1116.
- [10] SANDOVAL Y H, LI Y, ANAND-SRIVASTAVA M B. Transactivation of epidermal growth factor receptor by enhanced levels of endogenous angiotensin II contributes to the overexpression of $G_{i\alpha}$ proteins in vascular smooth muscle cells from SHR[J]. *Cell Signal*, 2011, 23(11): 1716-1726.
- [11] CHAKRABORTI S, CHOWDHURY A, CHAKRABORTI T. Cross-talk between p (38) MAPK and $G_{i\alpha}$ regulating cPLA 2 activity by ET-1 in pulmonary smooth muscle cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 400(1-2): 107-123.
- [12] FAUCHEUX N, CORREZE C, HAYE B, et al. Accumulation of cyclic AMP in Swiss 3T3 cells adhering to a cellulose biomaterial substratum through interaction with adenylyl cyclase[J]. *Biomaterials*, 2001, 22(22): 2993-2998.
- [13] QIAN J, MUMMALANENI S, PHAN T T, et al. Cyclic-AMP regulates postnatal development of neural and behavioral responses to NaCl in rats[J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0171335.
- [14] PEREZ D R, SMAGLEY Y, GARCIA M, et al. Cyclic AMP efflux inhibitors as potential therapeutic agents for leukemia[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(23): 33960-33982.
- [15] SEVETSON B R, KONG X, LAWRENCE J C J R. Increasing cAMP attenuates activation of mitogen-activated protein kinase[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(21): 10305-10309.
- [16] LIEBIG H, GÜNTHER G, KOLB M, et al. Reduced proliferation and colony formation of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) after dual targeting of EGFR and hedgehog pathways[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2017, 79(2): 411-420.
- [17] OVERMILLER A M, MCGUINN K P, ROBERTS B J, et al. c-Src/Cav1-dependent activation of the EGFR by Dsg2[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(25): 37536-37555.

(张蕾 编辑)