DOI:10.16016/j.1000-5404.201503129

论著

降钙素基因相关肽对血管平滑肌细胞的心肌素表达及细胞炎症激活的作用

龙仙萍[1],王 艳[1],汪 松[2],石 蓓[1],赵然尊[1] (563003 贵州 遵义,遵义医学院第一附属医院:心内科[1],急诊科[2])

[摘要] **目的** 探讨降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide,CGRP)对体外培养的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,VSMCs)心肌素表达及细胞炎症激活的影响。**方法** 取大鼠胸主动脉,以组织块贴壁培养法获得VSMCs,根据不同的处理方案,分为对照组、IL-1β组、CGRP组、心肌素高表达组、心肌素干扰组和$CGRP_{8-37}$组(CGRP受体拮抗剂组)。Western blot检测不同组VSMCs中心肌素和IL-6蛋白表达水平。**结果** 以IL-1β处理VSMCs后,细胞培养24、48、72 h时IL-6表达水平均高于基线水平($P<0.05$),而心肌素水平无显著变化;以高表达心肌素的腺病毒载体转染VSMCs并给予IL-1β处理后,与单纯IL-1β处理比较,各时间点IL-6水平显著下降($P<0.05$)。CGRP组中各个时间点VSMCs内心肌素水平较同时间点IL-1β组心肌素水平显著增加[24 h:(1.17±0.03) *vs* (0.25±0.03);48 h:(2.04±0.05) *vs* (0.19±0.01);72 h:(0.96±0.02) *vs* (0.28±0.02);$P<0.05$],而细胞内IL-6表达水平较同时间点IL-1β组水平显著降低[24 h:(0.23±0.01) *vs* (0.77±0.03);48 h:(0.28±0.02) *vs* (1.35±0.04);72 h:(0.20±0.02) *vs* (1.04±0.04);$P<0.05$]。心肌素干扰组VSMCs中CGRP处理后各个时间点细胞内IL-6水平较CGRP组显著升高[24 h:(1.74±0.04) *vs* (0.51±0.01);48 h:(1.68±0.03) *vs* (0.29±0.01);72 h:(0.98±0.02) *vs* (0.31±0.01);$P<0.05$],且$CGRP_{8-37}$组与CGRP组比较也获得类似结果,而心肌素干扰组和$CGRP_{8-37}$组中同时间点的细胞内IL-6水平无明显差异。**结论** CGRP通过促进VSMCs心肌素的表达而抑制IL-1β诱导的细胞炎症激活蛋白IL-6表达,且这一作用是CGRP通过与其受体结合后实现的。

[关键词] 血管平滑肌细胞;降钙素基因相关肽;心肌素;白介素-6
[中图法分类号] R322.12;R341;R392.11 [文献标志码] A

Effect of calcitonin gene-related peptide on myocardin expression and inflammatory activation in vascular smooth muscle cells

Long Xianping[1], Wang Yan[1], Wang Song[2], Shi Bei[1], Zhao Ranzun[1] ([1]Department of Cardiology, [2]Department of Emergency, First Affiliated Hospital, Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou Province, 563003, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of calcitonin gene-related peptide (CGRP) on myocardin expression and inflammatory activation in vascular smooth muscle cells (VSMCs) *in vitro*. **Methods** VSMCs were obtained by aortic tissue adherent culture and treated with interleukin-1β (IL-1β group), IL-1β + CGRP (CGRP group), and IL-1β + CGRP + $CGRP_{8-37}$ (CGRP receptor antagonist, $CGRP_{8-37}$ group) or transfected with recombinant adenovirus vector over-expressing myocardin (myocardin group) or siRNA-myocardin (siRNA-myocardin group). The expression of myocardin protein and interleukin-6 (IL-6) protein at different time points in the VSMCs were detected by Western blotting. **Results** In the *in vitro* cultured VSMCs of the IL-1β group, the expression of IL-6 at 24, 48 and 72 h were significantly higher than the baseline ($P<0.05$), and the expression of myocardin was similar. In the myocardin group, the level of

[基金项目] 国家自然科学基金(81360021);贵州省国际合作项目[黔科合外G字(2013)7037号]
[通信作者] 赵然尊,E-mail:kouke80@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150910.1106.012.html(2015-09-10)

IL-6 at any time point was obviously lower than that in the IL-1β group ($P<0.05$). The CGRP group showed higher myocardin expression and lower IL-6 level at any time point than the IL-1β group (myocardin: 1.17 ± 0.03 *vs* 0.25 ± 0.03 at 24 h; 2.04 ± 0.05 *vs* 0.19 ± 0.01 at 48 h; 0.96 ± 0.02 *vs* 0.28 ± 0.02 at 72 h; $P<0.05$; IL-6: 0.23 ± 0.01 *vs* 0.77 ± 0.03 at 24 h; 0.28 ± 0.02 *vs* 1.35 ± 0.04 at 48 h; 0.20 ± 0.02 *vs* 1.04 ± 0.04 at 72 h; $P<0.05$). The level of IL-6 in the siRNA-myocardin group was higher than that in the IL-1β group at any time point (1.74 ± 0.04 *vs* 0.51 ± 0.01 at 24 h; 1.68 ± 0.03 *vs* 0.29 ± 0.01 at 48 h; 0.98 ± 0.02 *vs* 0.31 ± 0.01 at 72 h; $P<0.05$). The comparison had similar results between the $CGRP_{8-37}$ group and the CGRP group. Also, there was no difference in the IL-6 level at the same time point between the siRNA-myocardin group and the $CGRP_{8-37}$ group. **Conclusion** CGRP may inhibit IL-1β-induced IL-6 protein expression through up-regulating the expression of myocardin protein in the VSMCs, which may be accomplished by binding CGRP and its receptor.

[**Key words**] vascular smooth muscle cells; calcitonin gene-related peptide; myocardin; interleukin-6

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81360021) and the International Cooperation Project of Guizhou Province (2013-7037).
Corresponding author: Zhao Ranzun, E-mail: kouke80@126.com

心血管疾病是严重威胁中老年健康的常见疾病。目前基础研究显示,慢性炎症是动脉粥样硬化性相关心血管疾病的主要病理机制。在动脉损伤和疾病中,血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,VSMCs)经历特异性的形态和功能改变,即细胞收缩表型和合成表型的转换,且细胞表型转换过程中,VSMCs 涉及炎症激活,分泌多种促炎症介质,包括细胞因子、趋化因子和黏附分子,进而促进血管病理生理发展、疾病进展和最终不良临床事件发生。因此,识别调节 VSMCs 炎症反应机制对于动脉粥样硬化性心血管疾病研究具有重要意义。心肌素(myocardin)是一种潜在的肌源性共激活剂,特异性表达于成熟 VSMCs 和心肌组织中,涉及 VSMCs 表型调节和分化[1],是维持 VSMCs 自稳态所必需的因子[2]。本课题组先前研究显示,降钙素基因相关肽(calcitonin gene related peptide,CGRP)通过调节 VSMCs 表型改变而抑制体外培养的 VSMCs 增殖,但对于 CGRP 是否调节 VSMCs 炎症激活及相关机制尚未明确。本实验拟通过观察 CGRP 对体外培养的 VSMCs 中心肌素表达和炎症激活的影响,探讨 CGRP 对 VSMCs 炎症的调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性 SD 大鼠 42 只,体质量约 100 g(约 4 周龄),购自遵义医学院实验动物中心(清洁级,批号 ZMC201304Q)。IL-1β、CGRP、$CGRP_{8-37}$(CGRP 受体拮抗剂)以及抗大鼠心肌素抗体、IL-6 抗体购自美国 Abcam 公司。高表达心肌素的腺病毒载体和干扰心肌素腺病毒载体由上海生物工程公司协助构建。其余试剂由遵义医学院中心实验室提供。

1.2 VSMCs 培养与鉴定

参考课题组前期实验方法[3]培养细胞,采用组织块贴壁法培养 VSMCs;细胞免疫化学法对 VSMCs 中的 α-actin 进行鉴定;实验选用 3 ~ 6 代状态良好的 VSMCs。

1.3 VSMCs 分组培养与处理

培养的 VSMCs 按实验要求分为对照组、IL-1β 组、心肌素高表达组、心肌素干扰组和 $CGRP_{8-37}$ 组,其中 IL-1β 组为加入 IL-1β 处理;CGRP 组为同时给予IL-1β 和 CGRP 处理;心肌素高表达组和心肌素干扰组为分别应用携带心肌素表达质粒或心肌素干扰质粒的腺病毒载体转染 VSMCs 24 h 后再给予 IL-1β 处理;$CGRP_{8-37}$ 组为给予 IL-1β 和 CGRP 处理的同时加入 CGRP 受体拮抗剂 $CGRP_{8-37}$。所有分组中 IL-1β 的应用浓度为 10 ng/mL,CGRP 应用浓度为 3.5×10^{-7} mol/L,$CGRP_{8-37}$ 应用浓度为 10.0×10^{-7} mol/L。

1.4 心肌素和炎症相关蛋白 IL-6 的检测

采用 Western blot 检测各组细胞心肌素和炎症相关蛋白 IL-6 蛋白变化。方法简介:收集经 CGRP 处理后不同时间点 VSMCs,提取细胞总蛋白,以 50 μL 上样,10%十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳后将蛋白转移至硝酸纤维素膜上,用 TBST 配置的 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,分别封闭膜与 IL-6(1∶1 000)单克隆抗体和心肌素多克隆抗体(1∶100)共孵育,4 ℃过夜,再与二抗共同孵育 2 h(1∶5 000),显色曝光,实验重复 3 次。以 β-actin 作为内参,利用伯乐凝胶成像系统分析各条带光密度值,计算各条带与内参条带的比值作为蛋白含量半定量分析。

1.5 统计学分析

应用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。所有参数

用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析和 t 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$。

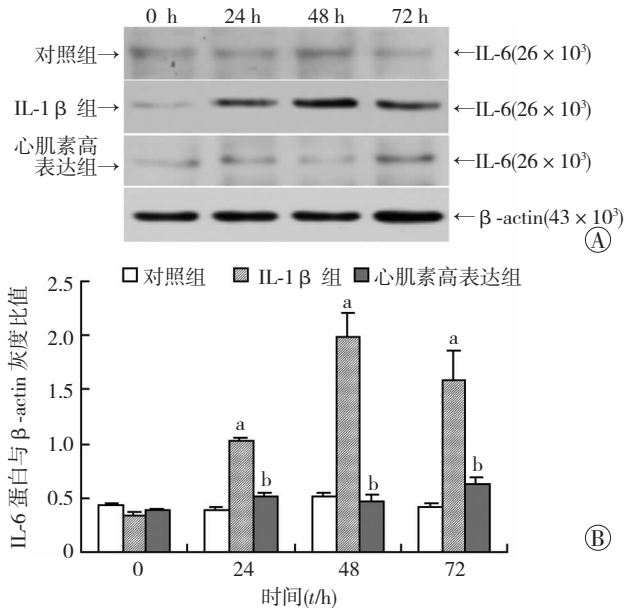
2 结果

2.1 VSMCs 培养情况

在 VSMCs 培养实验中,分离的胸主动脉组织块静置培养 3 ~5 d 后,光学显微镜下观察见组织块边缘有梭形排列的少量细胞生长,换液后继续培养至 1 周左右时细胞数目明显增多,呈放射性生长;传代培养后细胞呈单层或多层重叠生成,即典型"峰-谷"样生长。取第 4 ~5 代培养细胞行 α-SMA 和 DAPI 免疫荧光双染色鉴定,结果阳性细胞胞浆为绿色,胞核为蓝色;同时免疫细胞化学法染色 α-SMA,阳性细胞细胞质为棕褐色,这提示培养细胞为 VSMCs。

2.2 心肌素对炎症激活的 VSMCs 中 IL-6 表达的影响

如图 1,在对照组 VSMCs 中,IL-6 水平持续低水平表达,与基线 0 h 比较,各时间点 IL-6 水平无明显变化;以 IL-1β 诱导 VSMCs 炎症激活后,IL-1β 组细胞 IL-6 表达水平逐渐增加,细胞培养 24、48 h 和 72 h 时 IL-6 水平较同时间点对照组增加($P < 0.05$);但心肌素高表达组中,以高表达心肌素的腺病毒载体转染 VSMCs 后再加入 IL-1β 处理,24、48 h 和 72 h 时 IL-6 水平较 IL-β 组显著降低($P < 0.05$),而与对照组水平类似。

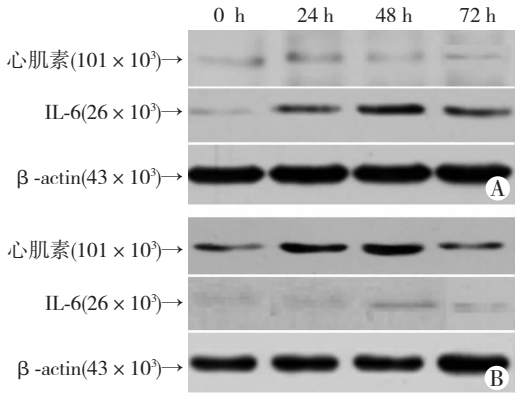


A:Western blot 检测 VSMCs 内 IL-6 蛋白水平;B:半定量分析($n = 3, \bar{x} \pm s$);a:$P < 0.05$,与对照组同时间点比较;b:$P < 0.05$,与 IL-1β 组同时间点比较

图 1　不同分组处理对 VSMCs 中 IL-6 表达的影响

2.3 CGRP 对 VSMCs 中心肌素表达及炎症的作用

如图 2 和表 1,在 IL-1β 组中,IL-1β 处理 VSMCs 后细胞内 IL-6 表达水平显著增加,表现为 24、48 h 和 72 h 时 IL-6 水平均高于基线水平($P < 0.05$),而心肌素水平无显著变化;在 CGRP 组中,CGRP 处理 VSMCs 后各个时间点细胞内心肌素水平较同时间点 IL-1β 组心肌素水平显著增加($P < 0.05$),而各个时间点细胞内 IL-6 表达水平较同时间点 IL-1β 组水平显著降低($P < 0.05$)。



A:对照组;B:CGRP 组

图 2　Western blot 检测 CGRP 对 VSMCs 中心肌素和 IL-6 表达的影响

表 1　CGRP 处理 VSMCs 后细胞心肌素和 IL-6 表达水平变化(与内参灰度比值,$\bar{x} \pm s$,$n = 3$)

时间点	对照组		CGRP 组	
	心肌素	IL-6	心肌素	IL-6
0 h	0.21 ± 0.01	0.34 ± 0.02	0.45 ± 0.01	0.18 ± 0.01
24 h	0.25 ± 0.03	0.77 ± 0.03[a]	1.17 ± 0.03[a]	0.23 ± 0.01[b]
48 h	0.19 ± 0.01	1.35 ± 0.04[a]	2.04 ± 0.05[a]	0.28 ± 0.02[b]
72 h	0.28 ± 0.02	1.04 ± 0.04[a]	0.96 ± 0.02[a]	0.20 ± 0.02[b]

a:$P < 0.05$,与同组 0 h 比较;b:$P < 0.05$,与对照组同时间点比较

2.4 CGRP IL-1β 诱导的 VSMCs 中 IL-6 表达

如图 3 和表 2,在 CGRP 组 VSMCs 中,CGRP 抑制 IL-1β 诱导的细胞 IL-6 蛋白表达,表现为细胞培养的 24、48 和 72 h 时 IL-6 蛋白水平与基线水平比较,差异无统计学意义;但心肌素干扰组 VSMCs 中,CGRP 处理后各个时间点 IL-6 水平较 CGRP 组显著升高($P < 0.05$);同样地,在 $CGRP_{8\text{-}37}$ 组 VSMCs 中,各个时间点细胞 IL-6 蛋白表达水平与 CGRP 组比较亦显著增加($P < 0.05$),与心肌素干扰组水平类似。

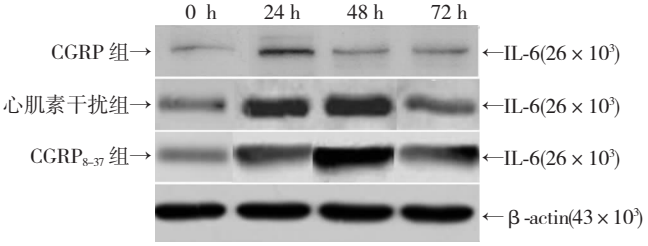


图 3　Western blot 检测抑制心肌素表达或 $CGRP_{8\text{-}37}$ 处理对 VSMCs 中 IL-6 表达的影响

表2 抑制心肌素或 $CGRP_{8-37}$ 处理 VSMCs 后 IL-6 表达水平变化 （与内参灰度比值，$\bar{x} \pm s$，$n=3$）

时间点	CGRP 组	心肌素干扰组	$CGRP_{8-37}$ 组
0 h	0.36 ± 0.01	0.48 ± 0.01	0.42 ± 0.01
24 h	0.51 ± 0.01	1.74 ± 0.04[a]	1.56 ± 0.03[a]
48 h	0.29 ± 0.01	1.68 ± 0.03[a]	1.84 ± 0.03[a]
72 h	0.31 ± 0.01	0.98 ± 0.02[a]	1.15 ± 0.02[a]

a：$P<0.05$，与同时间点的 CGRP 组比较

3 讨论

动脉粥样硬化是一种多因素共同作用的慢性炎症性血管疾病，其发展涉及包括 VSMCs 和浸润的免疫细胞等相互作用。在这一过程中，除了收缩静止的 VSMCs 进行表型转换而成为增殖迁移细胞并分泌细胞外基质外，VSMCs 还涉及炎症激活过程，释放一系列炎症细胞因子和趋化因子，并吸收氧化脂质，与浸润炎症细胞相互作用，促进炎症和病变进展。本研究结果显示，在体外培养的 VSMCs 中，CGRP 通过促进细胞心肌素蛋白表达，抑制 IL-1β 诱导的细胞炎症激活反应，这进一步阐明了 CGRP 对 VSMCs 生物学功能的调节作用。

早在 2001 年，Wang 等[4]在小鼠胚胎心脏 cDNA 数据库中筛选新的心脏特异性基因时偶然发现一种心肌特异性蛋白，并命名为心肌素（myocardin）。研究显示，心肌素与血浆反应因子密切相关，在血管损伤疾病中心肌素表达减少[5-7]，负性调节 VSMCs 增殖[8]，而在心肌梗死后抑制成肌纤维细胞分化而减轻梗死组织纤维化[9]；且抑制心肌素相关血浆反应因子将降低肺脏纤维化和促进间质细胞凋亡[10]。Lovren 等[11]研究显示，在 ApoE 基因缺陷的小鼠中，腺病毒高表达 miR-145 能够促进 VSMCs 中心肌素的表达，从而维持细胞收缩表型并减轻动脉粥样硬化病变进展。新近研究显示，心肌素也是 VSMCs 炎症激活的负性调节剂[12]；与野生型小鼠相比，心肌素杂合子小鼠来源的 VSMCs 中心肌素表达水平降低伴随着炎症激活显著增加[12]；在体外培养的人冠状动脉 VSMCs 中，高表达心肌素显著抑制一系列炎症细胞因子、趋化因子和黏附分子的表达，且抗炎症介质表达亦增加，同时心肌素降低细胞氧化脂质吸收和白细胞趋化作用，抑制巨噬细胞在动脉粥样硬化病变的聚集[12]。本实验结果显示，在体外培养的 VSMCs 中，以高表达心肌素的腺病毒载体转染细胞后，再加入 IL-1β 激活细胞炎症反应，结果显示作为 VSMCs 炎症激活的代表性炎症因子 IL-6 表达水平较单纯 IL-1β 处理的细胞组显著降低，差异具有统计学意义，这表明心肌素具有抑制 VSMCs 炎症激活的作用。继之，应用 CGRP 处理 IL-1β 激活的 VSMCs 后，细胞中心肌素水平较对照组显著升高，且伴随着 IL-6 水平降低；而给予心肌素干扰后，则消除 CGRP 诱导的 IL-6 水平降低，这提示 CGRP 具有抑制 IL-1β 诱导培养的 VSMCs 炎症激活的作用，且这一作用可能是通过促进细胞中心肌素表达增加实现的。目前认识到，动脉粥样硬化发生与发展中 VSMCs 的炎症激活是关键事件之一，细胞激活后发生表型改变，促进细胞增殖和迁移，并可能表达巨噬细胞标记等，从而促进动脉粥样硬化进展。因此阐明 CGRP 抗 VSMCs 炎症激活作用以及在血管稳态和抗动脉粥样硬化中的作用具有重要现实意义，且心肌素可能作为 CGRP 抗动脉粥样硬化的作用靶点。

CGRP 是一种广泛分布于神经和心血管系统的血管活性肽。生理条件下，CGRP 需要与降钙素受体样受体/受体活性修饰蛋白 1（receptor activity modifying protein 1，RAMP1）组成的复合受体结合才能发挥作用。研究显示，CGRP 涉及三叉神经和偏头痛等疾病[13-14]，并在心血管系统自我稳态调节和血管结构中具有重要作用[15]。Kroeger 等[16]研究显示，在肝脏中，CGRP 通过减少促炎症介质（如可诱导的 cAMP 早期抑制因子）而发挥抗炎症作用。本研究结果显示，应用 CGRP 受体阻断剂 CGRP8-37 处理后阻断 CGRP 上调 VSMCs 心肌素表达作用和抗 IL-1β 诱导细胞炎症激活作用，提示 CGRP 是通过与其受体结合后发挥作用的。

总之，本研究发现，CGRP 通过促进体外培养的 VSMC 的心肌素表达而抑制细胞炎症激活反应，这为以慢性炎症为主要发病机制的动脉粥样硬化性心血管疾病的防治提供了新的靶点和治疗策略。但研究也存在一定局限性，如未深入探讨 CGRP 与心肌素表达的相关信号通路和机制等，这需要进一步深入研究。

参考文献：

[1] Zheng X L. Myocardin and smooth muscle differentiation [J]. Arch Biochem Biophys, 2014, 543: 48-56.

[2] Huang J, Wang T, Wright A C, *et al*. Myocardin is required for maintenance of vascular and visceral smooth muscle homeostasis during postnatal development[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(14): 4447-4452.

[3] 陈攀科, 石蓓, 龙仙萍, 等. CGRP 修饰大鼠 MSCs 对血管平滑肌细胞增殖及表型转化的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(10): 1777 - 1782.

[4] Wang D, Chang P S, Wang Z, *et al*. Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor[J]. Cell, 2001, 105(7): 851 - 862.

[5] Minami T, Kuwahara K, Nakagawa Y, *et al*. Reciprocal expression of MRTF-A and myocardin is crucial for pathological vascular remodelling in mice[J]. EMBO J, 2012, 31(23): 4428 - 4440.

[6] Starke R M, Ali M S, Jabbour P M, *et al*. Cigarette smoke modulates vascular smooth muscle phenotype: implications for carotid and cerebrovascular disease[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e71954.

[7] van-der-Veer E P, de-Bruin R G, Kraaijeveld A O, *et al*. Quaking, an RNA-binding protein, is a critical regulator of vascular smooth muscle cell phenotype[J]. Circ Res, 2013, 113(9): 1065 - 1075.

[8] Talasila A, Yu H, Ackers-Johnson M, *et al*. Myocardin regulates vascular response to injury through miR-24/-29a and platelet-derived growth factor receptor-beta[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013, 33(10): 2355 - 2365.

[9] Lei H, Wu D, Wang J Y, *et al*. C1q/tumor necrosis factor-related protein-6 attenuates post-infarct cardiac fibrosis by targeting RhoA/MRTF-A pathway and inhibiting myofibroblast differentiation [J]. Basic Res Cardiol, 2015, 110(4): 35.

[10] Sisson T H, Ajayi I O, Subbotina N, *et al*. Inhibition of myocardin-related transcription factor/serum response factor signaling decreases lung fibrosis and promotes mesenchymal cell apoptosis[J]. Am J Pathol, 2015, 185(4): 969 - 986.

[11] Lovren F, Pan Y, Quan A, *et al*. MicroRNA-145 targeted therapy reduces atherosclerosis[J]. Circulation, 2012, 126(11 Suppl 1): S81 - S90.

[12] Ackers-Johnson M, Talasila A, Sage A P, *et al*. Myocardin regulates vascular smooth muscle cell inflammatory activation and disease [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2015, 35(4): 817 - 828.

[13] Diener H C. CGRP as a new target in prevention and treatment of migraine [J]. Lancet Neurol, 2014, 13(11): 1065 - 1067.

[14] Capuano A, Greco M C, Navarra P, *et al*. Correlation between algogenic effects of calcitonin-gene-related peptide (CGRP) and activation of trigeminal vascular system, in an *in vivo* experimental model of nitroglycerin-induced sensitization [J]. Eur J Pharmacol, 2014, 740: 97 - 102.

[15] Mai T H, Wu J, Diedrich A, *et al*. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) in autonomic cardiovascular regulation and vascular structure[J]. J Am Soc Hypertens, 2014, 8(5): 286 - 296.

[16] Kroeger I, Erhardt A, Abt D, *et al*. The neuropeptide calcitonin gene-related peptide (CGRP) prevents inflammatory liver injury in mice[J]. J Hepatol, 2009, 51(2): 342 - 353.

(**收稿**:2015-03-18;**修回**:2015-06-08)

(编辑 栾 嘉)