

网络出版时间: 2019-9-19 10:03 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190917.1059.001.html>

◇基础医学研究◇

CP-25 抑制 GRK2-ERK 信号调节血管内皮细胞迁移和成管功能

程琢玉, 严尚学, 魏伟

摘要 目的 明确 CP-25 抑制肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和血管紧张素 II (Ang II) 联合诱导的血管内皮细胞的迁移与成管作用及部分机制。方法 体外培养脐静脉内皮细胞 (HUVEC), 用 Ang II (1×10^{-7} mol/L)、TNF- α (5 ng/ml)、CP-25 (1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} mol/L) 联合作用于细胞 24 h, 用 CCK8 试剂法检测 HUVEC 的增殖功能, transwell 法检测 HUVEC 的迁移功能, 成管实验检测 HUVEC 的成管功能, Western blot 法检测 Ang II 1 型受体 (AT1R) 及 G 蛋白偶联受体激酶 2 (GRK2)、ERK1/2、p-I κ B α 等的表达变化。结果 与对照组比较, Ang II (1×10^{-7} mol/L)、TNF- α (5 ng/ml) 联合使用可以促进内皮细胞的增殖 ($P < 0.05$)、迁移 ($P < 0.01$)、成管 ($P < 0.01$) 功能, 差异有统计学意义; CP-25 (1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} mol/L) 可以抑制 Ang II (1×10^{-7} mol/L)、TNF- α (5 ng/ml) 联合诱导的内皮细胞的迁移 ($P < 0.05$)、成管能力 ($P < 0.05$), 与 Ang II、TNF- α 联合刺激组比较差异有统计学意义。但其诱导的内皮细胞的增殖没有显著影响 ($P > 0.05$)。CP-25 可以下调 AT1R、GRK2、p-ERK、p-I κ B α 蛋白的表达水平 ($P < 0.05$)。与 Ang II、TNF- α 联合刺激组比较差异有统计学意义。结论 CP-25 可以抑制 Ang II 和 TNF- α 联合诱导的 HUVEC 迁移及成管功能, 其机制可能与抑制细胞上 AT1R 和 GRK2 的表达、抑制 ERK 通路活化有关。

关键词 人脐静脉内皮细胞; 血管紧张素 II; CP-25

中图分类号 R 967

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)11-1667-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.11.001

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以滑膜增生、血管翳形成为特征的自身免疫性疾病。

2019-07-03 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81673444)

作者单位: 安徽医科大学临床药理研究所, 抗炎免疫药物教育部重点实验室, 抗炎免疫药物安徽省协同创新中心, 合肥 230032

作者简介: 程琢玉, 女, 硕士研究生;

严尚学, 男, 博士, 副研究员, 责任作者, E-mail: yan-shx@163.com;

魏伟, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

新生血管形成是 RA 发展过程中的早期事件^[1]。新生血管为关节滑膜细胞提供营养和氧气^[2], 招募细胞炎症因子, 引起滑膜组织的增生, 形成血管翳, 致关节畸形。血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 是重要的促炎介质, 在 RA 过程中发挥着重要的作用^[3]。Ang II 可以通过 Ang II-AT1R-ERK1/2 信号通路加强佐剂性关节炎 (CIA) 大鼠血管损伤^[4]。

新药芍药苷-6'-O-苯磺酰酯 (代号 CP-25) 是芍药苷的新型衍生物, 具有良好的抗炎免疫调节活性。研究^[5]表明, CP-25 可以减轻 CIA 小鼠关节滑膜炎性细胞浸润、滑膜增生以及滑膜炎, 血管翳形成, 提示 CP-25 可有效抑制大鼠新生血管形成。本实验拟以人脐带静脉内皮细胞株 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 为对象, 观察 CP-25 体外对其功能的影响及其相关作用机制, 为进一步了解 RA 的病理机制及发现新的作用靶点提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 Ang II、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、Matrigel 基质胶 (美国 Sigma 公司); 8 μ m Transwell 小室 (美国 Corning 公司); 兔来源抗人 Ang II 1 型受体 (angiotensin II type 1 receptor, AT1R) 单克隆抗体 (美国 Abcam 公司, 批号: ab9391); p-ERK1/2 抗体 (美国 CST 公司, 批号: 8544); p-I κ B α 抗体 (美国 CST 公司, 批号: 4025); G 蛋白偶联受体激酶 2 (G-protein-coupled receptor kinase 2, GRK2) 抗体 (美国 CST 公司, 批号: 3982S); β -actin 抗体 (北京博奥森生物有限公司, 批号: bs-0061R); HUVEC 由安徽医科大学基础医学院朱华庆教授课题组惠赠; 芍药苷-6'-O-苯磺酰酯 (代号 CP-25) 由安徽医科大学临床药理研究所合成。

1.2 方法

1.2.1 HUVEC 的培养 铺路石样的 HUVEC 长至培养瓶的 90% 单层, 此时传代。倾弃培养基, 用无菌的 PBS 溶液洗 2~3 次, 加入 1 ml 消化液。在显

显微镜下观察,待细胞变圆,倒去消化液并加入含10%胎牛血清DMEM培养液终止反应。用一次性吸管将细胞吹打下来,取一半细胞液传至另一无菌培养瓶中,37℃、5%CO₂培养箱中培养。

1.2.2 CCK8 法检测细胞的增殖 课题组前期实验表明,TNF- α 刺激HUVEC增殖的亚适浓度为5 ng/ml,作用最强在24 h;Ang II (1×10^{-9} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} mol/L)刺激HUVEC均可使细胞数目显著增高,最适浓度为 10^{-7} mol/L,作用最强在24 h。TNF- α (5 ng/ml)和Ang II (1×10^{-7} mol/L)联合使用可促进HUVEC增殖功能^[6]。HUVEC消化后,以 1.5×10^4 细胞/孔种到96孔板中。分别设对照组、TNF- α + Ang II组、TNF- α + Ang II + CP-25(1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} mol/L)组作用24 h,终止培养前每孔加入10 μ l CCK8试剂室温下震荡30 s混匀后继续培养1~3 h。肉眼观察细胞孔中颜色由黄色变成深橙色,于酶标仪中读取波长450 nm处的吸光度值(A),结果以3个复孔的均值表示。

1.2.3 transwell 小室法检测细胞的迁移 预先用对照组、TNF- α + Ang II、TNF- α + Ang II + CP-25(1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} mol/L)处理24 h的HUVEC,用胰酶消化后制备成 1×10^5 /ml的细胞悬液,取100 μ l加入无菌的8 μ m的transwell小室上室,下室加入含20% FBS的培养液,37℃、5%CO₂培养箱中培养过夜。第2天取出小室,用棉签轻轻擦去内面未迁移的细胞,下室已迁移的细胞用20%甲醇配制的结晶紫室温下染色10 min。显微镜检迁移细胞数,4倍镜视野统计细胞数目。

1.2.4 HUVEC的成管实验 Matrigel基质胶溶解后4℃环境下取55 μ l包被于96孔板中,室温平衡30 min,37℃凝胶60 min。预先对照组、TNF- α + Ang II、TNF- α + Ang II + CP-25(1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} mol/L)处理24 h的HUVEC,胰酶消化,用2% FBS的DMEM培养液制备细胞悬液。以 1×10^4 个细胞/孔的密度种到Matrigel胶上,将96孔板置于37℃、5%CO₂培养箱中孵育6 h后每隔2 h在显微镜下观察细胞的成管状况并拍照。4倍显微镜下统计成管数目。

1.3 Western blot 检测 HUVEC 相关蛋白的表达

HUVEC加入6孔板中培养至90%时,分别加入TNF- α + Ang II、TNF- α + Ang II + CP-25(1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} mol/L)培养24 h。弃去培养液后加入100 μ l裂解液于冰上裂解30 min后,收集蛋

白,预处理后,每孔30 μ g蛋白加入10% SDS-PAGE凝胶电泳孔中电泳、转膜。室温封闭后,加入抗AT1R抗体、抗GRK2抗体、抗p-ERK抗体、抗p-I κ B α 抗体或 β -actin抗体4℃过夜。辣根过氧化物酶标记的相应二抗室温孵育2 h后。采用凝胶成像系统扫描结果后,Image J软件分析以目的蛋白条带在相同面积下的灰度值为有效值,反映蛋白表达水平。

1.4 统计学处理 采用SPSS 17.0软件对实验数据进行统计分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析(ANOVA)对各组的结果进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CP-25 对 Ang II 和 TNF- α 联合诱导的 HUVEC 增殖功能的影响 与对照组(1.06 ± 0.10)相比,Ang II + TNF- α 组给药作用于HUVEC 24 h后,可以促进HUVEC增殖功能(1.50 ± 0.11),差异有统计学意义($F = 6.74, P < 0.05$)。与Ang II (1×10^{-7} mol/L) + TNF- α (5 ng/ml)组相比,TNF- α + Ang II + CP-25(1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} mol/L)组作用24 h,细胞增殖反应无明显影响($P > 0.05$)。见图1。

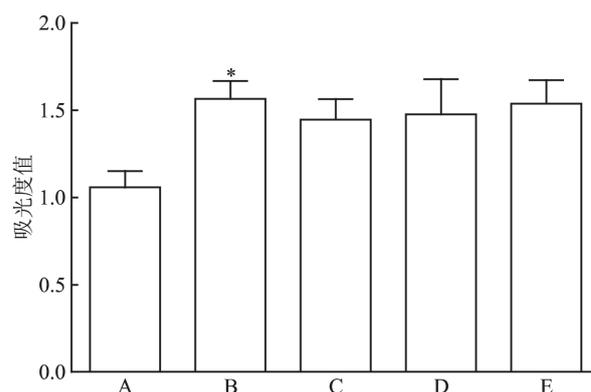


图1 CP-25对Ang II和TNF- α 诱导的HUVEC增殖的影响

A: 正常组; B: Ang II + TNF- α 组; C: Ang II + TNF- α + CP-25(1×10^{-7} mol/L)组; D: Ang II + TNF- α + CP-25(1×10^{-6} mol/L)组; E: Ang II + TNF- α + CP-25(1×10^{-5} mol/L)组; 与正常组比较: * $P < 0.05$

2.2 CP-25 对 Ang II 和 TNF- α 联合诱导的 HUVEC 迁移功能的影响 与正常组比较(67.36 ± 32.15),Ang II + TNF- α 组给药作用于HUVEC 24 h后,可以促进HUVEC迁移功能(190.00 ± 11.50),差异有统计学意义($F = 34.06, P < 0.01$);与Ang II

+ TNF- α 组比较, TNF- α + Ang II + CP-25 (1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} mol/L) 组给药作用 24 h 可抑制其诱导的 HUVEC 的迁移能力, 与 Ang II + TNF- α 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且不同浓度间的 CP-25 的抑制迁移作用没有显著性差异 ($P > 0.05$)。见图 2。

2.3 CP-25 对 Ang II 和 TNF- α 联合诱导的 HUVEC 成管功能的影响 与正常组比较, Ang II + TNF- α 组给药作用于 HUVEC 24 h 后, 可以促进 HUVEC 成管功能 (367.90 ± 48.19), 差异有统计学意义 ($F = 31.24$, $P < 0.01$); 与 Ang II + TNF- α 组比较, TNF- α + Ang II + CP-25 (1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} mol/L) 组给药作用 24 h 可抑制其诱导的 HUVEC 的成管能力 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), TNF- α + Ang

II + CP-25 (1×10^{-6} mol/L) 抑制成管作用最强 ($P < 0.01$)。见图 3。

2.4 CP-25 对 Ang II 和 TNF- α 联合诱导的 HUVEC 相关信号蛋白表达的影响 与 Ang II + TNF- α 组比较, TNF- α + Ang II + CP-25 (1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} mol/L) 组给药可以降低 AT1R 蛋白 ($F = 4.11$, $P < 0.05$, $P < 0.01$)、GRK2 蛋白 ($F = 14.00$, $P < 0.05$, $P < 0.01$) 表达水平。TNF- α + Ang II + CP-25 (1×10^{-7} 、 1×10^{-6} mol/L) 组给药明显降低 HUVEC 内 Ang II + TNF- α 组给药诱导活化的 p-ERK1/2 蛋白 ($F = 13.53$, $P < 0.05$, $P < 0.01$) 的表达水平, 而 TNF- α + Ang II + CP-25 (1×10^{-6} 、 1×10^{-5} mol/L) 组给药降低 HUVEC 内 Ang II + TNF- α 组给药诱导活化的 p-I κ B α 蛋白 ($F = 8.61$, $P <$

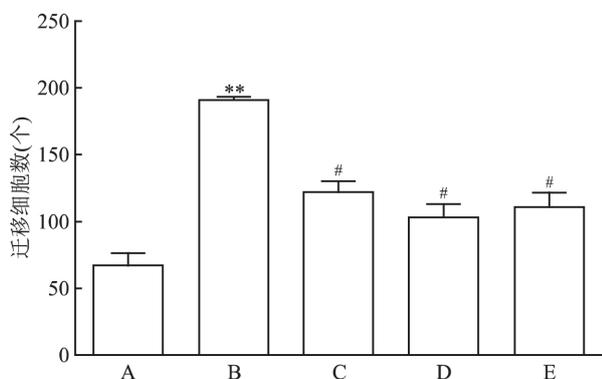
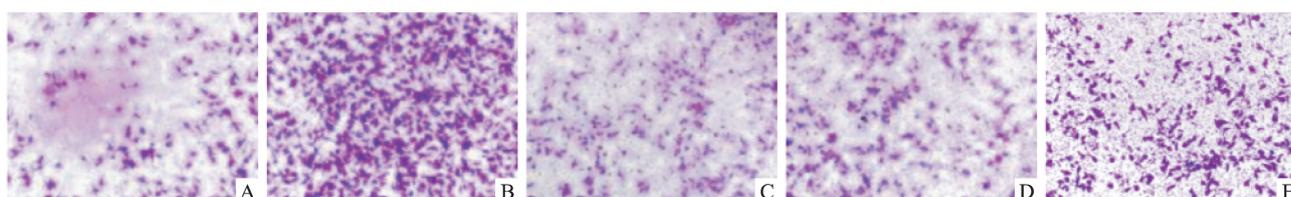


图2 CP-25 对 Ang II 和 TNF- α 诱导的 HUVEC 迁移的影响 $\times 40$
A: 正常组; B: Ang II + TNF- α 组; C: Ang II + TNF- α + CP-25 (1×10^{-7} mol/L) 组; D: Ang II + TNF- α + CP-25 (1×10^{-6} mol/L) 组; E: Ang II + TNF- α + CP-25 (1×10^{-5} mol/L) 组; 与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与 Ang II + TNF- α 组比较: # $P < 0.05$

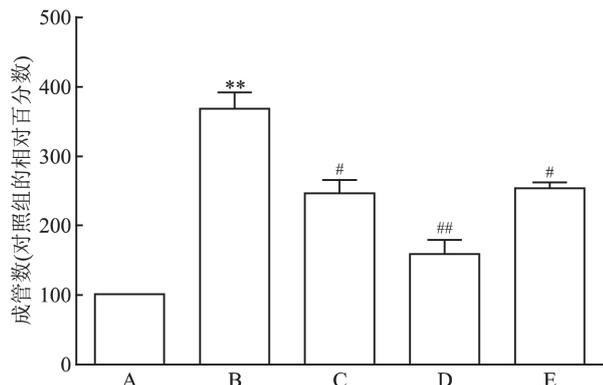
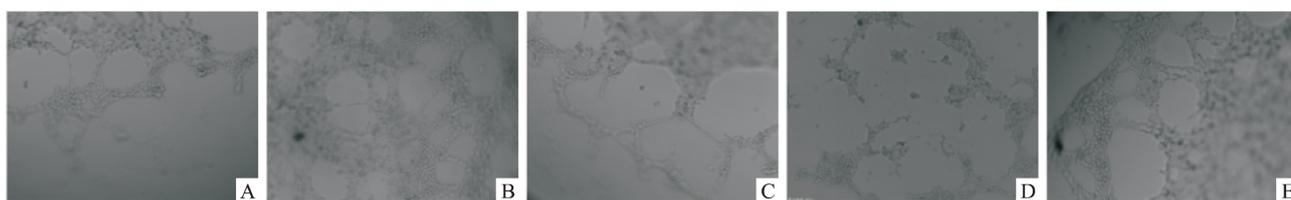


图3 CP-25 对 Ang II 和 TNF- α 诱导的 HUVEC 成管的影响 $\times 40$
A: 正常组; B: Ang II + TNF- α 组; C: Ang II + TNF- α + CP-25 (1×10^{-7} mol/L) 组; D: Ang II + TNF- α + CP-25 (1×10^{-6} mol/L) 组; E: Ang II + TNF- α + CP-25 (1×10^{-5} mol/L) 组; 与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与 Ang II + TNF- α 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

0.05, $P < 0.01$) 的表达水平,见图 4。

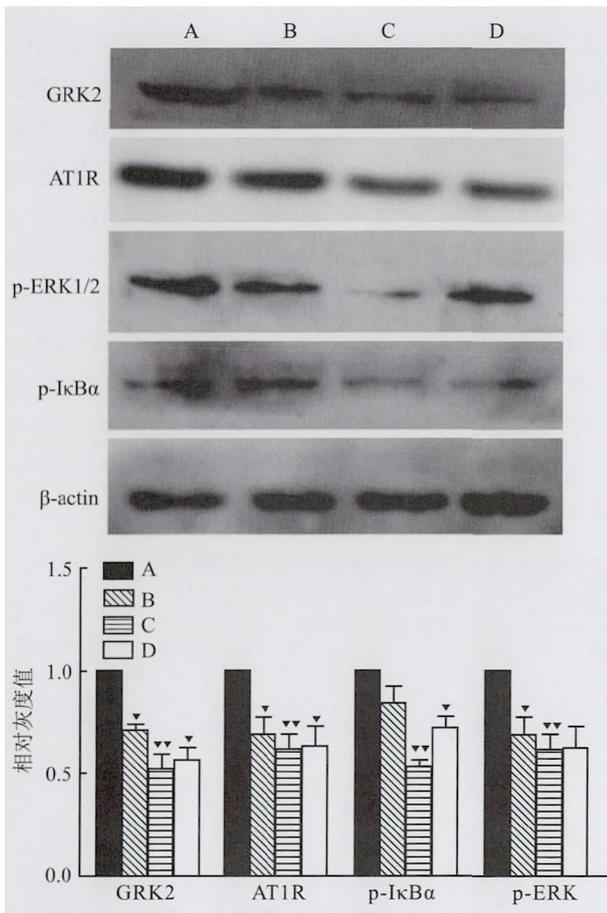


图4 CP-25对Ang II与TNF-α联合刺激的HUVEC细胞AT1R、GRK2、p-ERK、p-IκBα表达的影响

A: Ang II + TNF-α 组; B: Ang II + TNF-α + CP-25(1 × 10⁻⁷ mol/L) 组; C: Ang II + TNF-α + CP-25(1 × 10⁻⁶ mol/L) 组; D: Ang II + TNF-α + CP-25(1 × 10⁻⁵ mol/L) 组; 与 Ang II + TNF-α 组比较: ▼ $P < 0.05$, ▼▼ $P < 0.01$

3 讨论

新生血管生成是由原有的血管形成新的毛细血管,随着对氧气和营养物质需求的增加,它在缺血/缺氧组织中更为常见。生理性血管生成在胚胎发育、创面愈合等过程中起着不可缺少的作用,但是不受控制的病理性血管生成在RA滑膜炎中发挥了重要作用。在炎症早期阶段,RA患者关节滑膜内分泌大量TNF-α、前列腺素E、IL-1等促血管因子,激活内皮细胞促进其增殖迁移,形成新生微血管^[7]。这些新血管为肥厚关节滑膜细胞提供营养和氧气^[2],并招募细胞因子和炎症因子浸润滑膜,引起滑膜组织的增生,这种恶性循环最终形成血管翳,引起滑膜炎以及骨和软组织的破坏,最终导致关节畸形及功能障碍。在RA血管生成和血管翳形成过程

中,血管内衬的血管内皮细胞是各种细胞因子发挥作用的重要靶点,例如血管生成介质、生长因子、渗透因子、基质降解酶等作用因子^[8]。这些因子作用于内皮细胞,导致内皮基底膜和滑膜细胞外基质的降解,最终促进血管翳的形成^[9]。由于滑膜血管内的内皮细胞难以分离出来作为研究对象,本实验选取HUVEC作为替代研究对象,观察了CP-25对其增殖、迁移以及体外成管的作用。研究^[10-11]表明,Ang II及TNF-α都参与了RA疾病的病理进程。而且在课题组前期预实验发现,Ang II刺激HUVEC增殖的最适浓度是10⁻⁷ mol/L,TNF-α刺激HUVEC增殖的适宜浓度是5 ng/ml。本实验结果显示,经Ang II(10⁻⁷ mol/L)和TNF-α(5 ng/ml)联合刺激后HUVEC的增殖、迁移与成管能力显著增强,CP-25(1 × 10⁻⁷、1 × 10⁻⁶、1 × 10⁻⁵ mol/L)体外给药可明显抑制TNF-α和Ang II联合诱导的HUVEC迁移与成管反应,但对其增殖作用无显著影响。

白芍总苷(total glucosides of paeony, TGP)是临床治疗RA的主要药物,以其主要生物活性成分芍药苷结构修饰改造合成的新药芍药苷-6'-O-苯磺酰酯(代号CP-25)具有良好的抗炎免疫调节活性。研究表明,CP-25可以减轻CIA小鼠关节滑膜炎性细胞浸润、滑膜增生以及滑膜炎,抑制淋巴细胞活化,下调白介素2(IL-2)和白介素17(IL-17)的水平,改善脾脏病理变化^[5];CP-25还可抑制人的活化B细胞的功能^[12],通过调节炎症和骨损伤的免疫介质来预防自身免疫性关节炎^[13]。

由于ERK信号通路通过激活细胞核转录因子(NF-κB)调节细胞因子水平与细胞增殖、迁移紧密相关,因此检测Ang II和TNF-α联合使用以及CP-25(1 × 10⁻⁷、1 × 10⁻⁶、1 × 10⁻⁵ mol/L)对HUVEC p-ERK、p-IκBα等蛋白的表达变化。结果显示,与Ang II和TNF-α联合给药组相比,CP-25(1 × 10⁻⁷、1 × 10⁻⁶、1 × 10⁻⁵ mol/L)体外给药可显著降低HUVEC的GRK2蛋白表达水平,明显降低AT1R、p-ERK和p-IκBα的蛋白表达。AT1R为G蛋白偶联受体(GPCRs),可被G蛋白偶联受体激酶2(GRK2)调控。GRK2属于丝/苏氨酸蛋白激酶家族(GRKs)成员,可以磷酸化受体蛋白,参与受体的内吞和脱敏过程。它的异常表达与多种炎症疾病有关。本实验提示CP-25可能通过减弱GRK2的表达从而调控ERK1/2-NF-κB来抑制RA的发生。

参考文献

[1] Yang G, Chang C C, Yang Y, et al. Resveratrol alleviates rheu-

- matoid arthritis *via* reducing ROS and inflammation , inhibiting MAPK signaling pathways , and suppressing angiogenesis [J]. J Agric Food Chem 2018 , 66(49) : 12953 – 60.
- [2] Felmeden D C , Blann A D , Lip G Y. Angiogenesis: basic pathophysiology and implications for disease[J]. Eur Heart J 2003 , 24 (7) : 586 – 603.
- [3] Hallberg M , Summers C , Steckelings U M , et al. Small-molecule AT2 receptor agonists [J]. Med Res Rev 2018 , 38(2) : 602 – 24.
- [4] Zhang Y , Luo X , Zhou Y , et al. 2K1C-activated angiotensin II (Ang II) exacerbates vascular damage in a rat model of arthritis through the ATR/ERK1/2 signaling pathway [J]. Inflamm Res , 2017 , 66(10) : 881 – 90.
- [6] Chen J , Wang Y , Wu H , et al. A modified compound from paeoniflorin , CP-25 , suppressed immune responses and synovium inflammation in collagen-induced arthritis mice [J]. Front Pharmacol , 2018 , 9: 563.
- [6] 罗学霞. 肿瘤坏死因子- α 和血管紧张素 II 信号对人脐静脉内皮细胞和成纤维样滑膜细胞功能的影响及 CP-25 的作用[D]. 合肥: 安徽医科大学 2016.
- [7] Macdonald I J , Liu S C , Su C M , et al. Implications of angiogenesis involvement in arthritis [J]. Int J Mol Sci , 2018 , 19(7) : 2012 – 29.
- [8] Lee T H , Avraham H , Avraham S , et al. Vascular endothelial growth factor modulates neutrophil transendothelial migration *via* up-regulation of interleukin-8 in human brainmicrovascular endothelial cells [J]. J Biol Chem , 2012 , 277(12) : 10445 – 51.
- [9] Ostrowska M , Maslinski W , Prochorec-Sobieszek M , et al. Cartilage and bone damage in rheumatoid arthritis [J]. Reumatologia , 2018 , 56(2) : 111 – 20.
- [10] Wang Y , Kou J , Zhang H , et al. The renin-angiotensin system in the synovium promotes periarticular osteopenia in a rat model of collagen-induced arthritis [J]. Int Immunopharmacol , 2018 , 65: 550 – 8.
- [11] Bonetti N R , Diaz-Canestro C , Liberale L , et al. Tumour necrosis factor- α inhibition improves stroke outcome in a mouse model of rheumatoid arthritis [J]. Sci Rep 2019 , 9(1) : 2173.
- [12] Zhang F , Shu J L , Li Y , et al. CP-25 , a novel anti-inflammatory and immunomodulatory drug , inhibits the functions of activated human B cells through regulating BAFF and TNF- α signaling and comparative efficacy with biological agents [J]. Front Pharmacol , 2017 , 8: 933.
- [13] Chang Y , Jia X , Wei F , et al. CP-25 , a novel compound , protects against autoimmune arthritis by modulating immune mediators of inflammation and bone damage [J]. Sci Rep 2016 , 6: 26239.

CP – 25 inhibit GRK2 – ERK signaling and regulate vascular endothelial cell migration and tube formation

Cheng Zhuoyu , Yan Shangxue , Wei Wei

(Institute of Clinical Pharmacology , Anhui Medical University , Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine Ministry of Education , Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immune Medicines , Hefei 230032)

Abstract Objective To identify the effects and part mechanisms of CP-25 inhibit vascular endothelial cell migration and tube formation induced by tumor necrosis factor- α (TNF- α) and angiotensin II (Ang II) . **Methods** Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) were cultured *in vitro* , and treated with Ang II (1×10^{-7} mol/L) , TNF- α (5 ng/ml) , CP-25 (1×10^{-7} , 1×10^{-6} , 1×10^{-5} mol/L) . After 24 h , proliferation function of HUVEC was detected by CCK8 reagent method , migration function of HUVEC was detected by transwell method , and tube formation function of HUVEC was detected by tube formation test. Western blot method was used to detected Ang II downstream signaling molecules such as angiotensin II type 1 receptor (AT1R) , G-protein – coupled receptor kinase 2 (GRK2) , p-ERK1/2 , p-I κ B α . **Results** The proliferation ($P < 0.05$) , migration ($P < 0.01$) , tube formation ($P < 0.01$) ability of HUVEC induced by Ang II and TNF- α were significantly promoted. CP-25 (1×10^{-7} , 1×10^{-6} , 1×10^{-5} mol/L) inhibited migration ($P < 0.05$) , tube formation ($P < 0.05$) of HUVEC induced by Ang II (1×10^{-7} mol/L) and TNF- α (5 ng/ml) . CP-25 (1×10^{-7} , 1×10^{-6} , 1×10^{-5} mol/L) inhibited the expression of AT1R , GRK2 , p-ERK and p-I κ B α induced by TNF- α and Ang II ($P < 0.05$) . **Conclusion** CP-25 inhibit HUVEC migration and tube formation , which may be related to the inhibition of the expression of AT1R and GRK2 and ERK signaling pathway.

Key words human umbilical vein endothelial cells; angiotensin II ; CP-25