

油酰乙醇胺对血管紧张素 II 诱导的血管平滑肌细胞增殖的影响

张 乐, 邹 军, 田 风, 魏 晓, 金 鑫

(厦门大学 医学院, 福建 厦门 361005)

摘要:目的 研究油酰乙醇胺(OEA)对血管紧张素 II(Ang II)刺激大鼠主动脉血管平滑肌细胞(VSMCs)增殖的抑制作用以及对 p38 信号通路的影响。方法 分离大鼠胸主动脉,组织贴块法培养 VSMCs,Ang II 刺激 VSMCs 建立细胞增殖模型,不同浓度 OEA(5,10,20 $\mu\text{mol/L}$)作用后,用溴脱氧核苷尿嘧啶(BrdU)掺入的方法检测细胞增殖活性;流式细胞术检测细胞周期变化;Western-bolt 法检测对 P-p38 和 p38 蛋白表达的影响。结果 与 Ang II 组比较,随着 OEA 浓度升高,VSMCs 的增殖受到抑制,G0/G1 比例显著升高,G2/M 比例显著降低,且 P-p38 和 p38 蛋白的表达量降低并呈浓度依赖关系。结论 OEA 对 VSMCs 的增殖有抑制作用,其机制可能是抑制了 p38MAPK 信号通路。

关键词:油酰乙醇胺;平滑肌细胞;增殖;p38;血管紧张素 II

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:1005-1678(2012)06-0709-04

Inhibitory effect of oleoylethanolamide on proliferation of vascular smooth muscle cells induced by angiotensin II

ZHANG Le, ZOU Jun, TIAN Feng, WEI Xiao, JIN Xin

(School of Medicine, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Purpose To investigate the inhibitory effect of oleoylethanolamide on the proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells(VSMCs) induced by angiotensin II and the effect on p38 signaling pathway. **Methods** VSMCs were primary cultured by tissue sticking method. Cell proliferation model was established by stimulation with Ang II. After incubation with various concentrations of OEA(5,10,20 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h, the proliferation effect was measured by using the BrdU cell proliferation assay kit. Cell cycle distribution was determined by flow cytometry analysis and the protein expression of P-p38 and p38 was assessed using Western blotting. **Results** Compared with the Ang II group, along with the increased concentration of OEA, the proliferation of VSMCs was obviously inhibited, the cell ratio of G0/G1 phase obviously increased, and the cell ratio of G2/M phase significantly decreased. Besides, the expression of P-p38 and p38 protein decreased in a dose-dependent manner. **Conclusion** OEA had a inhibition on the proliferation of VSMCs and might act by down-regulating p38MAPK pathway.

Key words: oleoylethanolamide; vascular smooth muscle cells; proliferation; p38; angiotensin II

血管平滑肌细胞(VSMCs)的增殖和迁移是血管再狭窄和动脉粥样硬化发展形成过程中的重要部分^[1]。过氧化增殖因子活化受体- α (PPAR- α)与动脉粥样硬化的发生发展紧密相连,不仅是由于它跟脂质代谢、糖类代谢密切相关,而且还由于其抗炎和

抗增殖作用^[2]。油酰乙醇胺(OEA)是一种天然的脂肪酸乙醇胺,已有研究表明,OEA是PPAR- α 的一个高亲和天然配体^[3-4]。实验发现,OEA可以通过激活PPAR- α 受体从而发挥血管内皮的保护^[5]、脑缺血的保护^[6]和抗炎等多种作用,但是对细胞增殖方面作用,尚未见报道。因此本实验的主要内容是对OEA在动脉粥样硬化后期形成过程中主要的抗增殖作用进行体外研究。

1 材料

OEA,自制;非诺贝特、血管紧张素 II(Ang II)、胰蛋白酶,美国Sigma公司;二甲亚砜,上海生物工

收稿日期:2012-03-26

基金项目:海峡(厦门)中医药科技平台项目(3502Z20100006);厦门市科技计划资助项目(3502Z20090009)

作者简介:张乐,女,硕士研究生;金鑫,男,通信作者,教授,从事心血管药理学研究,Tel:0592-2188676,Email:xinjin@xmu.edu.cn。

程技术服务有限公司; 胎牛血清, 新西兰 Hyclone 公司; 低糖 DMEM 培养基, 日本 GIBCO 公司; 小鼠抗大鼠 α -actin 单克隆抗体, 武汉博士德生物工程公司; 溴脱氧核苷尿嘧啶 (BrdU) 标记及检测试剂盒, 德国 Roche 公司; 兔抗鼠 Phospho-p38 单克隆抗体、兔抗鼠 p38 单克隆抗体, 美国 Cell Signaling 公司; 鼠抗人 β -actin 单克隆抗体, 美国 Santa Cruz 公司; 羊抗兔二抗、羊抗鼠二抗, 美国 Muhisciences 公司。

雄性 SD 大鼠, 体重 (100 ± 5) g, 上海斯莱克动物实验中心, 许可证号: SCXK(沪) 2007-0005。

SpectraMax-M2 多功能酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; 倒置荧光显微镜, 日本 Nikon 公司; FACSCalibur 型流式细胞仪, 美国 BD 公司; Kodak IS4000R 全自动图像工作站, 美国 Kodak 公司。

2 方法

2.1 大鼠 VSMCs 的培养和鉴定

大鼠断头处死, 无菌操作取一段胸主动脉, 洗去血液, 去除外膜纤维脂肪组织, 用眼科剪纵行剪开血管, 刀片刮血管内膜 2~3 遍, 然后将血管切成约 1 mm² 大小碎片, 分装贴入培养瓶中, 加入含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基, 倒置 3~4 h 后翻转, 于 37 °C 5% CO₂ 的细胞培养箱中静置 3 d, 每 2 天换液。4~7 d 平滑肌细胞从组织块中爬出, 2~3 周出现致密细胞层。待细胞快融合时用 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 取 3~8 代细胞做实验。在倒置显微镜下观察及 α -actin 单克隆抗体, 通过免疫组化法鉴定 VSMCs 的特异性肌动蛋白。

2.2 BrdU-ELISA 法检测

以细胞数 10 000/孔接种 96 孔板培养 48 h 后, 观察细胞生长状态良好, 换无血清培养液, 24 h 同步化后, 加入不同浓度的 OEA (分别为 5, 10 及 20 μ mol/L) 和非诺贝特 100 μ mol/L, 1 h 后再加入 Ang II 100 nmol/L, 共同培养 24 h 后, 每孔加入 BrdU 10 μ L 标记细胞, 37 °C 孵育 2 h, 弃培养液。经 60 °C 干燥 1 h, FixDenat 固定液室温固定 30 min。弃固定液加入 Anti-BrdU-POD 液室温放置 90 min, 吸弃抗体加洗涤工作液洗涤, 每孔 3 次。加底物溶液 100 μ L, 室温放置 30 min。每孔加终止反应液 (1 mol/L H₂SO₄) 25 μ L, 5 min 内自动酶标仪测定, λ (测) = 450 nm, λ (参) = 690 nm。

2.3 细胞周期测定

将细胞接种于 6 孔培养板, 37 °C 孵育 24 h 后换无血清培养液, 将细胞阻滞在 G₀/G₁ 期。48 h 后换 2% 低血清培养液, 分为正常组、Ang II 组、不同浓度

的 OEA 组和非诺贝特组, 将细胞置 37 °C 继续培养 36 h, 经碘化丙锭染色后, 用流式细胞仪自动计数 10 000 个细胞, 流式细胞仪测定细胞周期构成比。

2.4 Western blotting 检测

取 VSMCs 细胞, 以细胞数 1×10^5 个/mL 接种 6 孔板中, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养。细胞生长近融合后, 弃上清液, 以无血清高糖 DMEM 为空白对照, 分别加入含不同浓度的 OEA 和非诺贝特培养基培养 1 h 后, Ang II 刺激 5 min, 提取蛋白。用改良型 RIPA 细胞裂解液, 冰浴裂解细胞 30 min, BCA 方法测定细胞总蛋白浓度, 按常规方法进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜并封闭后, 分别加入 P-p38、p38、GAPDH 单克隆抗体 (1:1 000) 1 mL, 4 °C 过夜。再加入二抗 (1:1 000) 1 mL, 室温孵 1 h, 洗膜、使用 Kodak IS4000R 全自动图像工作站, 检测、拍照, 分析条带灰度值。

2.5 统计学分析

采用 Graphpad Prism 5 (GraphPad Software Inc, USA) 软件进行分析, 所有数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间样本均数比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 OEA 对 Ang II 诱导的 VSMCs 增殖的影响

不同浓度的 OEA 和非诺贝特作用 1 h 后, 给予 Ang II 刺激, 24 h 后检测细胞增殖, 结果显示 OEA 可以剂量依耐性抑制 VSMCs 增殖, 并在 20 μ mol/L 浓度作用最好, 见表 1。

表 1 OEA 对 Ang II 诱导的 VSMCs 增殖的影响 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)
Tab. 1 Effects of OEA on Ang II induced rat VSMCs proliferation ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /(μ mol/L)	A 值
正常对照组	-	0.577 ± 0.172 ¹
Ang II 组	100 ng/mL	0.920 ± 0.150
OEA 组	5	0.852 ± 0.197
	10	0.744 ± 0.153
	20	0.576 ± 0.134 ²
非诺贝特组	100	0.648 ± 0.141 ²

与 Ang II 组比较: ¹ $P < 0.05$, ² $P < 0.01$

¹ $P < 0.05$, ² $P < 0.01$ vs Ang II group

3.2 OEA 对 Ang II 诱导的 VSMCs 周期的影响

不同浓度的 OEA 和非诺贝特与 Ang II 共同作用 36 h, 可以影响 VSMCs 细胞周期分布, 使 G₀/G₁ 期细胞比例增高, S 期细胞比例降低, G₂/M 期比例降低, 特别浓度在 20 μ mol/L 的 OEA 作用效果最好, 与阴性对照组相比, 差异有显著性 ($P < 0.05$), 结

表 2 OEA 对 VSMCs 周期的影响 (n = 6, $\bar{x} \pm s$)
Tab.2 Effects of OEA on cell cycle of VMSCs(n = 6 $\bar{x} \pm s$)

组 别	剂量 /($\mu\text{mol/L}$)	G0 /G1 期	S 期	G2/M 期
		/%	/%	/%
正常对照组	-	79.17 \pm 1.66 ¹	9.46 \pm 0.72	11.37 \pm 1.91 ¹
Ang II 组	100 ng/mL	69.33 \pm 1.01	8.05 \pm 0.67	22.62 \pm 0.74
OEA 组	5	70.38 \pm 1.25	8.33 \pm 0.23	21.29 \pm 1.05
	10	74.74 \pm 1.29	8.69 \pm 0.36	16.57 \pm 1.31
	20	77.97 \pm 1.03 ¹	9.09 \pm 0.39	12.95 \pm 1.06 ¹
非诺贝特组	100	75.05 \pm 1.31 ²	8.78 \pm 0.48	16.17 \pm 1.28 ²

与 Ang II 组比较: ¹P < 0.05, ²P < 0.01

¹P < 0.05, ²P < 0.01 vs Ang II group

果见表 2。表明 OEA 将平滑肌细胞细胞周期阻滞于 G0/G1 期,从而抑制平滑肌细胞增殖。

3.3 OEA 对 Ang II 诱导的 VSMCs P-p38 和 p38 蛋白的影响

与对照组相比,Ang II 诱导后 P-p38 的表达明显增加 (P < 0.001),加入 OEA,P-p38 的表达呈一定的剂量依赖性减少,其中 20 $\mu\text{mol/L}$ OEA 对 P-p38 的下调作用最明显,作用好于 100 $\mu\text{mol/L}$ 非诺贝特,见表 3 和图 1A。同样,Ang II 诱导后,p38 的表达增加 (P < 0.05),给予 OEA 或非诺贝特干预后,p38 的表达下调,见图 1B。

表 3 OEA 对 VSMCs P-p38 和 p38 蛋白表达的影响 (n = 4, $\bar{x} \pm s$)

Tab.3 Effects of OEA on protein expression of P-p38 and p38 in VMSCs(n = 4 $\bar{x} \pm s$)

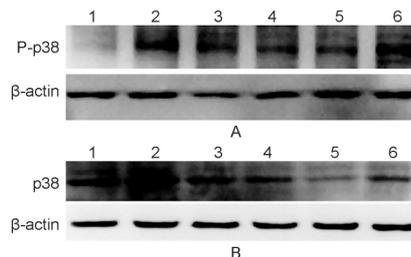
组 别	剂量 /($\mu\text{mol/L}$)	蛋白的表达量 /%	
		P-p38	p38
正常对照组	-	47.07 \pm 13.59 ³	77.80 \pm 9.10 ¹
Ang II 组	100 ng/mL	100	100
OEA 组	5	75.65 \pm 14.96	81.15 \pm 11.42
	10	66.54 \pm 17.53 ¹	78.54 \pm 7.11 ¹
	20	58.63 \pm 11.88 ²	70.88 \pm 12.83 ²
非诺贝特组	100	67.88 \pm 7.65 ¹	75.86 \pm 5.92 ¹

与 Ang II 组比较: ¹P < 0.05, ²P < 0.01, ³P < 0.001

¹P < 0.05, ²P < 0.01, ³P < 0.001 vs Ang II group

4 讨论

VSMCs 异常增殖是许多心血管疾病的共同病理过程,在众多促生长因子中,Ang II 已成为当前研究的热点。Ang II 是肾素-血管紧张素系统的主要活性物质,与 VSMCs 上其 1 型受体 (Angiotensin type 1 receptor, AT1R) 结合后,可经丝裂原激动蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK)、核因子- B (NF- κB) 等多条信号通路,启动 VSMCs 的增殖和迁移。其中 p38MAPK 信号转导通路是 MAPK 通路一个重要分支,它在炎症、应激、凋亡、细胞周期和生



1. 对照组; 2. Ang II 诱导组; 3 ~ 5. 5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$ OEA; 6. 100 $\mu\text{mol/L}$ 非诺贝特

1. Control; 2. Ang II stimulation group; 3-5. Treatment with 5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$ OEA II; 6. Treatment with 100 $\mu\text{mol/L}$ Fenofibrate

图 1 OEA 对 VSMCs 中 P-p38 (A) 和 p38 (B) 蛋白表达的影响

Fig.1 Effects of OEA on protein expression of P-p38 (A) and p38 (B) in VSMCs

长等多种生理和病理过程中发挥重要作用^[7-9]。MKK3 与 MKK6 是公认的 p38 上级激酶,它们通过直接磷酸化络氨酸、丝氨酸/苏氨酸残基激活 p38,作用与 GADD153、c-myc 等下游靶基因^[10],控制多种转录因子的基因表达活性,如激活作用转录因子、生长停滞及 DNA 损伤基因、核因子 NF- κB 等。

OEA 作为一个重要的体内脂质调节因子,通过激活 PPAR- α 起到调节脂质、糖类代谢的作用。已有研究发现,PPAR- α 可以抑制单核细胞转化为巨噬细胞,抑制血管平滑肌细胞增殖和迁移,抑制泡沫细胞的形成等^[11-12]。PPAR- α 的激动剂能够调节 p38MAPK 信号通路上调 PPAR- α 表达,诱导 VSMCs 凋亡^[13]。Gizard 等^[14]认为,PPAR- α 可以通过诱导细胞素依赖性激酶抑制子 p16,阻断细胞周期中 G1 到 S 期的转变,抑制 VSMCs 的增殖,这可能是 PPAR- α 影响动脉粥样硬化的发生发展和再狭窄的进程作用之一。本研究中,Ang II 诱导 VSMCs 增殖周期从 G0/G1 期向 S 期、G2/M 期转化,刺激 VSMCs 增殖,同时增强 P-p38 和 p38 蛋白表达。然而 5 ~ 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 OEA 能够阻止 VSMCs 向 S 期、

G2/M 期转化,显著抑制 VSMCs 增殖,降低 P-p38 和 p38 表达,且具有浓度依耐性。因此推测 OEA 能使细胞周期中静止和分裂前期的细胞显著增多,从而抑制 VSMCs 的增殖,且抗增殖的作用至少部分是由 p38MAPK 途径表达介导,至于 OEA 参与 p38MAPK 信号通路表达的分子机制尚不清楚,有待进一步研究。

综上所述,OEA 至少部分通过调节 p38 MAPK 信号通路,从而抑制 Ang II 诱导的 VSMC 增殖,发挥血管保护作用。本文加深对 PPAR- α 在动脉粥样硬化中作用的认识,并为该药的临床应用提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Schmidt-Ott K M ,Kagiyama S ,Phillips M I. The multiple actions of angiotensin II in atherosclerosis [J]. *Regul Peptides* ,2000 ,93(1-3) : 65-77.
- [2] Lefebvre P ,Chinetti G ,Stael B ,et al. Sorting out the roles of PPAR- α in energy metabolism and vascular homeostasis [J]. *J Clin Invest* ,2006 ,116(3) : 571-579.
- [3] Fu J ,Oveisi F ,Gaetani S ,et al. Oleoylethanolamide ,an endogenous PPAR- α agonist ,lowers body weight and hyperlipidemia in obese rats [J]. *Neuropharmacology* ,2005 ,48(8) : 1147-1153.
- [4] Guzman M ,Lo V J ,Fu J ,et al. Oleoylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR-alpha) [J]. *J Biol Chem* ,2004 ,279(27) : 27849-27854.
- [5] 秦文,金鑫,陈彩霞等.油酰乙醇胺对人脐静脉内皮细胞血管细胞黏附分子-1表达的影响 [J]. *中国生化药物杂志* ,2008 ,29(6) : 374-377.
- [6] 杨立朝,杨武双,周宇等.油酰乙醇胺对小鼠局灶性脑缺血的保护作用 [J]. *中国药理学通报* ,2009(9) : 1219-1223.
- [7] Bao X M ,Wu C F ,Lu G P. Atorvastatin attenuates homocysteine-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells via inhibiting NADPH oxidase-related oxidative stress-triggered p38 MAPK signaling [J]. *Acta Pharmacol Sin* ,2009 ,30(10) : 1392-1398.
- [8] Ho T C ,Chen S L ,Yang Y C ,et al. Cytosolic phospholipase A2-alpha is an early apoptotic activator in PEDF-induced endothelial cell apoptosis [J]. *Am J Physiol Cell Physiol* ,2009 ,296(2) : C273-284.
- [9] Wang X H ,Xu B ,Liu J T ,et al. Effect of beta-escin sodium on endothelial cells proliferation ,migration and apoptosis [J]. *Vascul Pharmacol* ,2008 ,49(4-6) : 158-165.
- [10] Enslen H ,Raingeaud J ,Davis R J. Selective activation of p38 mitogen-activated protein(MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6 [J]. *J Biol Chem* ,1998 ,273(3) : 1741-1748.
- [11] Zapolska Downal D ,Siennicka A ,Kaczmarczyk M ,et al. Butyrate inhibits cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in cultured endothelial cells: the role of NF- κ B and PPAR- α [J]. *J Nutr Biochem* ,2004 ,15(4) : 220-228.
- [12] Wang Y ,Wang Y ,Yang Q ,et al. Effects of bezafibrate on the expression of endothelial nitric oxide synthase gene and its mechanisms in cultured bovine endothelial cells [J]. *Atherosclerosis* ,2006 ,187(2) : 265-273.
- [13] Diep Q N ,Touyz R M ,Schiffman E L. Docosahexaenoic acid ,a peroxisome proliferator-activated receptor- α ligand ,induces apoptosis in vascular smooth muscle cells by stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase hypertension [J]. *J Biol Chem* ,2000 ,275(5) : 851-855.
- [14] Gizard F ,Amant C ,Barbier O ,et al. PPAR α inhibits vascular smooth muscle cell proliferation underlying intimal hyperplasia by inducing the tumor suppressor p16^{INK4a} [J]. *J Clin Invest* ,2005 ,115(11) : 3228-3238.

(上接第 708 页)

- [5] Zheng J ,Zheng P ,Zhou X ,et al. Relaxant effects of matrine on aortic smooth muscles of guinea pigs [J]. *Biomed Environ Sci* ,2009 ,22(4) : 327-332.
- [6] 王铁军,李绍平,简家荣等.苦参碱抗肿瘤作用研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志* ,2004 ,10(4) : 52-55.
- [7] Wan X Y ,Luo M ,Li X D ,et al. Hepatoprotective and anti-hepatocarcinogenic effects of glycyrrhizin and matrine [J]. *Chem Biol Interact* ,2009 ,181(1) : 15-19.
- [8] 常青,张冬青,李翠翠等.苦参碱脂质体抗乙型肝炎病毒的体外实验研究 [J]. *热带医学杂志* ,2003 ,3(1) : 19-21.
- [9] 中国药典[S]. 二部. 2010: 附录 XIXD.
- [10] Wang F Q ,Li P ,Zhang J P ,et al. A novel pH sensitive magnetic alginate-chitosan beads for albendazole delivery [J]. *Drug Dev Ind Pharm* ,2010 ,36(7) : 867-877.
- [11] Liu H J ,Li P ,Wei Q. Magnetic N-succinyl chitosan/alginate beads for carbamazepine delivery [J]. *Drug Dev Ind Pharm* ,2010 ,36(11) : 1286-1294.
- [12] 王家远,杨波,赵榆林等.壳聚糖-三七总皂苷缓释微囊的制备及体外溶出研究 [J]. *中国药业* ,2006 ,15(17) : 28-29.