

钙敏感受体在动脉粥样硬化大鼠血管内皮细胞中的表达

裴天仙¹, 王晶晶¹, 郭景玥¹, 郭传敏¹, 胡 曼¹, 徐长庆²

(1. 天津药物研究院, 天津市 300193; 2. 哈尔滨医科大学病理与病理生理学教研室, 黑龙江省哈尔滨市 150086)

[关键词] 钙敏感受体; 大鼠; 动脉粥样硬化; 细胞凋亡; 内皮细胞

[摘要] **目的** 探讨钙敏感受体在动脉粥样硬化大鼠胸主动脉血管内皮细胞中的表达及其与细胞凋亡的关系。

方法 Wistar 大鼠 144 只, 随机分为对照组和动脉粥样硬化组, 每组 72 只。动脉粥样硬化早期模型复制首先每千克体重注射维生素 D₃ 60 万单位, 然后喂养高脂饲料 6 周。自动生化仪检测血清甘油三酯、总胆固醇; 光镜观察胸主动脉形态学变化; TUNEL 染色观察胸主动脉内皮细胞凋亡情况; 采用 RT-PCR 和免疫印迹法分别检测胸主动脉血管内皮细胞中钙敏感受体、Bax、Bcl-2 及 Caspase-3 的 mRNA 和蛋白表达。**结果** 与对照组比较, 动脉粥样硬化组细胞凋亡指数以及钙敏感受体、Bax 和 Caspase-3 的表达升高, Bcl-2 的表达降低; 光镜下可见胸主动脉部分内皮脱落, 表面不光滑, 中膜平滑肌细胞数目明显增多, 排列紊乱。**结论** 钙敏感受体可能参与了主动脉血管内皮细胞的凋亡, 进而启动动脉粥样硬化的形成。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Expression of Calcium Sensing Receptor in Atherosclerosis Rat Vascular Endothelial Cells

PEI Tian-Xian¹, WANG Jing-Jing¹, GUO Jing-Yue¹, GUO Chuan-Min¹, HU Man¹, and XU Chang-Qing²

(1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China; 2. Department of Pathophysiology, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150086, China)

[KEY WORDS] Calcium Sensing Receptor; Rat; Atherosclerosis; Apoptosis; Endothelial Cell

[ABSTRACT] **Aim** To observe the expression of calcium sensing receptor (CaSR) in atherosclerosis rat vascular endothelial cells and the relationship with apoptosis. **Methods** 144 Wistar rats were randomly divided into control group ($n=72$) and atherosclerosis groups ($n=72$). Early atherosclerosis models were copied by injection of vitamin D₃ 60 million units/kg body weight, and then fed with high fat diet for 6 weeks. Serum triglyceride (TG) and total cholesterol (TC) were detected by automatic biochemistry analyzer. The morphological changes were observed under optical microscope. The mRNA and protein expressions of CaSR, Bcl-2, Bax and Caspase-3 were analyzed by Western blotting and RT-PCR. Apoptotic cells were measured by TUNEL staining. **Results** Compared with control group, the apoptosis index and the expression of CaSR, Bax and Caspase-3 were increased, Bcl-2 expression were decreased, the changes in aorta thoracica were aggravated in the atherosclerosis group. **Conclusion** CaSR may participate in the apoptosis of vascular endothelial cell, and then accelerate the formation of atherosclerosis.

钙敏感受体 (calcium sensing receptor, CaSR) 属 G 蛋白偶联受体 C 家族成员, 具有氨基胞外域、7 个跨膜结构组成的中心区和胞内羧基末端^[1,2]。1993 年, CaSR 首先发现于牛甲状腺旁腺^[3]。CaSR 不仅在

维持机体 Ca²⁺ 和其它金属离子稳态发挥关键作用^[4], 而且参与调节细胞分化、增殖、凋亡、基因表达、离子通道开放等^[5]。2003 年, Wang 等^[6] 首次证实在大鼠心肌组织存在 CaSR。本研究旨在探讨大鼠动脉粥样硬化模型中主动脉内皮细胞 CaSR 的表达及其与细胞凋亡的关系。

[收稿日期] 2010-12-08

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30370577、30470688 和 30700288)

[作者简介] 裴天仙, 助理研究员, 研究方向为毒性病理、心血管药理, E-mail 为 yp616727@sina.com。通讯作者徐长庆, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心肌缺血/再灌注损伤及其保护机制, E-mail 为 xucq45@126.com。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

Trizol 试剂 (Invitrogen 公司); Reverse Tran-

scription System (Promega 公司); Isoprel (Sigma 公司); ExTaq™ (TaKaRa 公司); 引物由 TaKaRa 宝生物工程(上海)有限公司合成。PCT-100 型 PCR 仪; 紫外凝胶检测和成像系统 (Bio-Rad); Beckman DU640 紫外分光光度计; 日立 7080 型全自动生化仪。

1.2 大鼠动脉粥样硬化模型的复制

参照杨鹏远等^[7]方法, 首先每千克体重注射维生素 D₃ 60 万单位, 然后喂养高脂饲料(2% 胆固醇、10% 猪油、0.2% 丙基硫氧嘧啶、87.8% 基础饲料) 6 周, 复制动脉粥样硬化早期模型。

1.3 实验分组

Wistar 大鼠 144 只, 雌雄各半, 体重 180 ± 10 g, 随机分为对照组和动脉粥样硬化组, 每组 72 只。

1.4 总胆固醇和甘油三酯水平测定

大鼠麻醉后, 眼球取血 2 mL, 待血液凝固后, 4℃、3000 r/min 离心 10 min, 取上层血清, 采用自动生化仪检测血清甘油三酯(TG)和总胆固醇(TC)。

1.5 血管组织形态学观察

实验结束后, 从大鼠胸主动脉处切取血管组织, 用 4% 多聚甲醛磷酸缓冲溶液固定 24~48 h。常规脱水、浸蜡、包埋、染色、透明和封片, 制成 HE 染色切片, 于光学显微镜下观察血管组织的形态学变化。

1.6 主动脉内皮细胞 CaSR、Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 mRNA 的表达检测

按照徐荣良等^[8]改进的酶消化法, 用 0.1% II 型胶原酶消化 15 min, 收集消化液, 1200 r/min 离心 8 min, 弃上清液, 收集主动脉内皮细胞, 6 条血管的内皮细胞合为一个标本。用 Trizol 试剂抽提总 RNA, 取总 RNA 5 μ L, 在 20 μ L 逆转录体系中合成 cDNA, 以 5 μ L cDNA 为模板加入靶基因上下游引物, 在 50 μ L 体系中进行 PCR 扩增(表 1)。CaSR 扩增条件: 94℃ 预变性 2 min, 94℃ 变性 20 s, 55℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 40 s, 35 个循环, 72℃ 延伸 2 min。PCR 产物在 1.2% 琼脂糖胶上电泳分离, 以 GAPDH 为内参照, 以 CaSR PCR 产物与内参照的荧光密度比作为 CaSR 基因的相对表达含量。Bcl-2 扩增条件: 除退火温度为 57℃, 内参照为 β -actin, 30 个循环外, 余与 CaSR 扩增条件相同。Bax 扩增条件: 除退火温度为 56℃, 余与 Bcl-2 扩增条件一致。Caspase-3 扩增条件与 Bax 扩增条件相同。

1.7 主动脉内皮细胞 CaSR、Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 的蛋白表达检测

同上方法收集主动脉内皮细胞, 6 条血管的内皮细胞合为一个标本。加入蛋白裂解液及 PMSF, 冰上放置 40 min, 4℃、12000 r/min 离心 40 min, 取

上清。以 BSA 为标准, 用 Bradford 法对上清进行蛋白定量。取 20 μ g 蛋白样品, 10% SDS-PAGE 电泳, 100 V 转移 1 h 至硝酸纤维素薄膜, 放入封闭液中 37℃ 封闭 1 h; 一抗分别为抗 CaSR (1:3000)、抗 Bax (1:500)、抗 Bcl-2 (1:500)、抗 Caspase-3 (1:500), 4℃ 过夜。同时, 另 1 张用不含抗体 TBS-T 液孵育, 作为阴性对照。反复洗膜后, 将膜与碱性磷酸酶 (AP) 标记的抗 IgG 抗体 (1:1000) 孵育, 室温轻摇 1 h, 洗膜后, 用免疫印迹法检测, 用图像分析测定各条带吸光度 (A) 值作定量分析。

表 1. PCR 引物序列

Table 1. PCR primers sequences

基因	引物序列	产物长度
CaSR	正义: 5'-TTCGGCATCAGCTTTGTG-3'	280 bp
	反义: 5'-TGAAGATGATTTCTCTTCC-3'	
Bcl-2	正义: 5'-GGGATACTGGAGATGAAGACT-3'	367 bp
	反义: 5'-CCCACCGAACTCAAAGAAGG-3'	
Bax	正义: 5'-TTTGTACAGGGTTTCATCCAGG-3'	447 bp
	反义: 5'-GTCACCTGTCTGCCATGTGGG-3'	
Caspase-3	正义: 5'-GCTGGACTGCGTATTGAG-3'	493 bp
	反义: 5'-CCTGGAACATCGGATTTGATT-3'	
GAPDH	正义: 5'-CTCAACTACATGGTCTACATG-3'	420 bp
	反义: 5'-TGGCATGGACTGTGCTCATGAG-3'	
β -actin	正义: 5'-TTGTAACCAACTGGGACGATATGG-3'	760 bp
	反义: 5'-GATCTTGATCTTCATGCTGCTAGG-3'	

1.8 TUNEL 染色观察细胞凋亡

大鼠胸主动脉处切取血管组织, 切片常规脱蜡脱水, 20 μ L 蛋白酶 K 室温孵育 15~30 min, 消化组织蛋白 $\rightarrow$ 3% H₂O₂ 溶液浸泡 10 min, 灭活内源性酶 $\rightarrow$ 滴加 50 μ L TUNEL 反应混合液, 37℃ 孵育 60 min $\rightarrow$ 50 μ L POD 标记的抗荧光素抗体滴于玻片, 37℃ 孵育 30 min $\rightarrow$ DAB 显色 20 min $\rightarrow$ 苏木素复染, PBS 冲洗, 脱水、透明、封片。光镜下正常细胞核染成蓝色 (TUNEL 阴性), 凋亡细胞核呈棕褐色 (TUNEL 阳性)。每张切片随机取 5 个以上高倍视野, 计数不少于 100 个内皮细胞核, 计算凋亡率。

1.9 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 体重测定

实验前 144 只大鼠体重为 180 ± 10 g; 6 周后, 给予高脂饮食的大鼠体重为 360 ± 18 g, 而给予正常饮食的

大鼠体重为 210 ± 10 g, 二者有显著差异 ($P < 0.01$)。

2.2 血脂测定

实验前, 对照组 TC 和 TG 分别为 1.24 ± 0.11 mmol/L 和 0.33 ± 0.04 mmol/L, 而动脉粥样硬化组 TC 和 TG 分别为 1.28 ± 0.08 mmol/L 和 0.35 ± 0.05 mmol/L, 两组比较无明显差异; 6 周后, 对照组 TC 和 TG 分别为 1.41 ± 0.09 mmol/L 和 0.36 ± 0.07 mmol/L, 动脉粥样硬化组 TC 和 TG 分别为 13.25 ± 0.98 mmol/L 和 0.80 ± 0.08 mmol/L, 均明显高于对照组 ($P < 0.01, n = 12$), 可见大鼠动脉粥样硬化早期模型复制成功。

2.3 大鼠血管形态学变化

光学显微镜下, 对照组血管内膜光滑, 完整, 中膜平滑肌细胞与弹力纤维极向一致, 走行规律, 无增殖; 动脉粥样硬化组部分内皮脱落, 表面不光滑, 可见炎细胞黏附, 中膜平滑肌细胞数目明显增多, 排列紊乱, 核深染, 细胞间基质丰富, 管壁增厚 (图 1)。

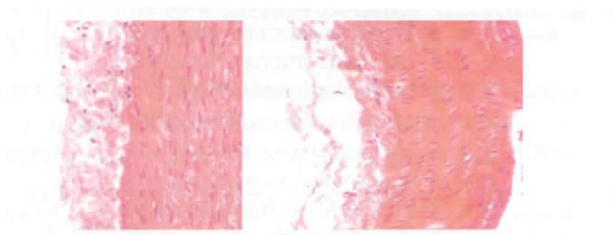


图 1. 光镜下大鼠胸主动脉形态学观察 ($\times 400$) 左图为对照组, 右图为动脉粥样硬化组。

Figure 1. Morphological observation of rat thoracic aorta under light microscope

2.4 主动脉内皮细胞 CaSR mRNA 和蛋白的表达

与对照组相比, 动脉粥样硬化组 CaSR mRNA 和蛋白的表达增强 ($P < 0.01$; 表 1 和图 2)。

2.5 主动脉内皮细胞 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 mRNA 和蛋白的表达

与对照组比较, 动脉粥样硬化组 Bax 和 Caspase-3

的 mRNA 和蛋白表达升高, Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达降低 ($P < 0.01$; 表 2 和图 3)。

表 1. 主动脉内皮细胞 CaSR mRNA 和蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1. The expression of CaSR mRNA and protein in rat aortic endothelial cells

分 组	CaSR mRNA	CaSR 蛋白
对照组	0.27 ± 0.06	0.46 ± 0.04
动脉粥样硬化组	0.55 ± 0.15^a	0.72 ± 0.05^a

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

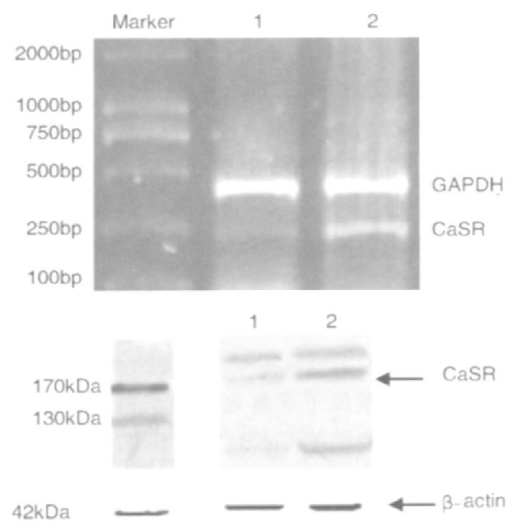


图 2. 主动脉内皮细胞 CaSR mRNA 和蛋白的表达 ($n = 6$)

1 为对照组, 2 为动脉粥样硬化组。

Figure 2. The expression of CaSR mRNA and protein in rat aortic endothelial cells

2.6 主动脉细胞凋亡的变化

对照组凋亡阳性细胞数为 $9.67\% \pm 2.73\%$, 动脉粥样硬化组凋亡阳性细胞数为 $54.50\% \pm 8.60\%$, 两组比较差异显著 ($P < 0.01$; 图 4)。

表 2. 主动脉内皮细胞 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 mRNA 和蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2. The expression of Bax, Bcl-2 and Caspase-3 mRNA and protein in rat aortic endothelial cells

分 组	Bcl-2		Bax		Caspase-3	
	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
对照组	0.23 ± 0.04	0.55 ± 0.08	0.54 ± 0.06	0.42 ± 0.05	0.42 ± 0.05	0.10 ± 0.03
动脉粥样硬化组	0.11 ± 0.03^a	0.21 ± 0.06^a	0.95 ± 0.05^a	0.72 ± 0.05^a	0.83 ± 0.06^a	0.18 ± 0.03^a

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

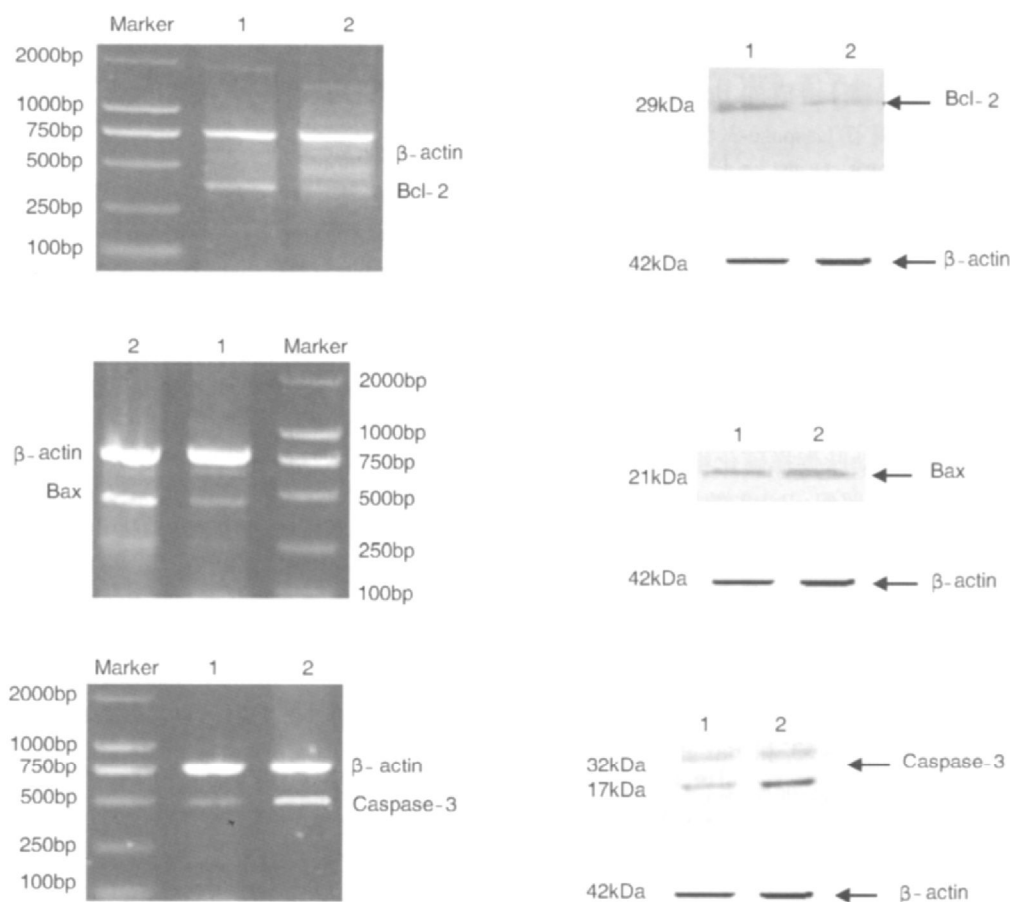


图 3. 主动脉内皮细胞 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 mRNA 和蛋白的表达

Figure 3. The expression of Bax, Bcl-2 and Caspase-3 mRNA and protein in rat aortic endothelial cells

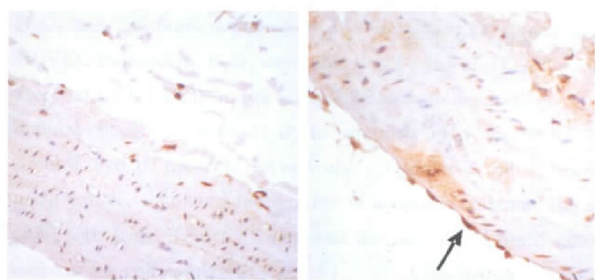


图 4. 主动脉组织细胞 TUNEL 染色 ($\times 400, n = 6$) 左图为对照组, 右图为动脉粥样硬化组。

Figure 4. Representative illustration of TUNEL staining in rat aortic tissue

3 讨论

动脉粥样硬化是一多因素参与、多环节相互作用的慢性疾病, 发病机制复杂。近年来, 许多研究已经证实细胞凋亡是动脉粥样硬化病变的主要特征^[9]。目前, 大量的流行病学、基础及临床研究已

经公认, 高脂血症及其随后形成的动脉粥样硬化是导致缺血性心脏疾病的最重要的危险因素^[10]。鉴此, 本研究采用高脂饮食饲养及注射维生素 D₃ 的方法, 维生素 D₃ 使大鼠动脉壁完整性受到破坏, 内皮通透性增高, 更有利于脂质沉积于血管壁; 并且维生素 D₃ 也导致动脉壁钙超载, 这些因素均加速了动脉粥样硬化的形成^[11]。血清中观察到 TG、TC 水平明显升高; 组织学可见动脉粥样硬化组大鼠胸主动脉部分内皮脱落, 表面不光滑, 中膜平滑肌细胞数目明显增多, 排列紊乱。这充分说明本研究成功复制了大鼠动脉粥样硬化早期模型。

血管内皮细胞的损伤是动脉粥样硬化始动环节, 内皮细胞凋亡及相关调控基因异常表达是这一过程的主要结果。本研究中, 采用 TUNEL 法发现模型组大鼠内皮细胞凋亡数增多; 采用 RT-PCR 和免疫印迹法观察到模型组主动脉血管内皮细胞 CaSR mRNA 和蛋白表达明显增多, 提示 CaSR 的表达增加可能参与了内皮细胞的凋亡, 进而启动动脉粥样硬化的发生。

细胞凋亡又称程序性细胞死亡,是由基因控制的细胞主动死亡形式。由抗凋亡蛋白(如 Bcl-2 等)和促凋亡蛋白(如 Bax 等)组成的 Bcl-2 家族,作为凋亡调节蛋白,可以调节 Caspase-3 活性。Bcl-2 的同型二聚体可以稳定线粒体膜,抑制其释放细胞色素 C,从而阻止 Caspase 酶的激活,进而发挥抗凋亡作用;Bax 可与 Bcl-2 形成异二聚体,拮抗 Bcl-2 的抗凋亡作用,同时 Bax 的同型二聚体也可加速细胞凋亡的发生^[12]。而 Caspase-3 是各凋亡通路下游进行底物酶解的共同的蛋白酶,作为凋亡的效应因子被称为凋亡的“执行者”,在细胞凋亡中起着不可替代的作用。本研究中,动脉粥样硬化组 Caspase-3 和 Bax 的表达明显高于对照组,Bcl-2 的表达明显低于对照组。Bax 表达升高,Bcl-2 表达降低,使线粒体内膜跨膜电位降低,导致细胞色素 C 从线粒体内释放,进而升高 Caspase-3 的水解活性,促进动脉粥样硬化组大鼠内皮细胞凋亡。

综上,CaSR 参与了大鼠动脉粥样硬化的形成,机制可能是其上调 Caspase-3 和 Bax 的表达,下调 Bcl-2 的表达,进而导致内皮细胞凋亡。CaSR 有可能成为治疗动脉粥样硬化的一个新的药物靶点。

[参考文献]

- [1] Bai M, Quinn S, Trivedi S, et al. Expression and characterization of inactivating and activating mutations in the human Ca^{2+} -sensing receptor [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271: 19 537-545.
- [2] Bai M. Structure and function of the extracellular [J]. *Int J Mol Med*, 1999, 4: 115-125.
- [3] Brown EM, Gamba G, Riccardi D, et al. Cloning and characterization of an extracellular Ca^{2+} -sensing receptor from bovine parathyroid [J]. *Nature*, 1993, 366 (6455): 575-580.
- [4] Hebert SC, Brown EM, Harris HW. Role of the Ca^{2+} -sensing receptor in divalent mineral ion homeostasis [J]. *Exper Bio*, 1997, 200 (Pt 2): 295-302.
- [5] Hebert SC, Cheng S, Geibel J. Functions and roles of the extracellular Ca^{2+} -sensing receptor in the gastrointestinal tract [J]. *Cell Calcium*, 2004, 35 (3): 239-247.
- [6] Wang R, Xu C, Zhao W, et al. Calcium and polyamine regulated calcium-sensing receptors in cardiac tissues [J]. *Eur Biochem*, 2003, 270 (12): 2 680-688.
- [7] 杨鹏远, 芮耀诚, 焦亚斌. 动脉粥样硬化大鼠实验模型的建立 [J]. *第二军医大学学报*, 2003, 24 (7): 802-804.
- [8] 徐荣良. 酶消化法分离大鼠主动脉内皮细胞的改进方法 [J]. *中国病理生理杂志*, 1999, 15 (3): 284.
- [9] Stein J. Motor recovery strategies after stroke [J]. *Top Stroke Rehabil*, 2004, 11 (2): 12-22.
- [10] 叶任高, 陆再英. 内科学 [M]. 第 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2000; 149-280.
- [11] Liu L, Jiao X Y, Zhang W F. Establishment of atherosclerotic rat model using large amount vitamin D3 and atherogenic diet [J]. *J Shanxi Med Univ*, 2005, 36 (6): 681-92.
- [12] Wang L, Ma W, Markovich R, et al. Regulation of cardiomyocyte apoptotic signaling by insulin-like growth factor I [J]. *Circ Res*, 1998, 83 (5): 516-22.

(此文编辑 文玉珊)