

血管加压素 1a 与血管加压素 2 受体在精氨酸加压素调节缺氧血管平滑肌细胞蛋白激酶 C 表达中的作用

杨光明, 徐 竞, 李 涛, 明 佳, 陈 玮, 刘良明*
(第三军医大学大坪医院野战外科研究所第二研究室, 创伤烧伤与复合伤国家重点实验室, 重庆 400042)

摘要: 目的 观察血管加压素 1a (V_{1a}) 受体与 V_2 受体拮抗剂对精氨酸加压素 (AVP) 调节缺氧血管平滑肌细胞 (VSMC) 蛋白激酶 C (PKC) α , δ 和 ϵ 亚型表达的影响, 以及磷脂酶 C (PLC)、磷脂酶 D (PLD) 和磷脂酶 A_2 (PLA₂) 活性的变化。方法 缺氧培养大鼠肠系膜上动脉 VSMC, 采用 Western 蛋白印迹法检测 PKC α , δ 和 ϵ 亚型蛋白表达; 采用酶偶联荧光分析法测定 PLC 和 PLD 的活性, 酸碱滴定法检测 PLA₂ 的活性。结果 缺氧处理 1.5 h, VSMC 胞膜 PKC- α 和 ϵ 亚型蛋白表达量明显升高, AVP 进一步升高胞膜 PKC- α 和 ϵ 的表达。 V_{1a} 受体拮抗剂 $d(CH_2)_5[Tyr^2(Me)]AVP$ 预处理可明显拮抗 AVP 诱导的胞膜 PKC α 和 ϵ 亚型蛋白表达升高, 同时也明显拮抗 AVP 诱导的缺氧 VSMC 中 PLC 和 PLD 活性升高。而 V_2 受体拮抗剂 $d(CH_2)[d-Ile^2Abu^4]AVP$ 对缺氧诱导的胞膜 PKC- α 和 ϵ 表达增加和 VSMC 中 PLC 和 PLD 活性升高无明显作用。结论 AVP 诱导 PKC 激活的机制可能与 V_{1a} 受体介导的 PLC/PLD 途径有关, 而 V_2 受体在这一信号传导途径中可能并不起主要作用。

关键词: 受体, 血管加压素; 血管平滑肌细胞; 缺氧; 精氨酸加压素; 蛋白激酶 C; 磷脂酶 C; 磷脂酶 D; 磷脂酶 A_2

中图分类号: R972, R966

文献标识码: A

收稿日期: 2008-07-14 接受日期: 2008-10-27

基金项目: 国家杰出青年科学基金资助项目 (30625037); 国家重点基础发展计划 (973) 资助项目 (2005CB522601); 教育部创新团队资助计划 (IRT0712)

作者简介: 杨光明 (1979 -), 男, 四川省广元人, 医学博士, 主要从事休克病理生理及防治的研究, Tel: (023) 68757420, 15823090897, E-mail: ygm971@yahoo.com.cn

* 联系作者 E-mail: Liuliangming2002@yahoo.com
Tel: (023) 68767421 Fax: (023) 68813806

文章编号: 1000-3002(2009)01-0029-05

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2009.01.006

精氨酸加压素 (argipressin, AVP) 是维持心血管功能稳定的重要内源性物质^[1]。国内外研究报道, 给予 AVP 对儿茶酚胺抵抗导致的血管扩张性休克、失血性休克和败血症性休克具有明显的升压效应^[2-3]。本实验室前期研究发现, AVP 对失血性休克后血管低反应性和缺氧血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 收缩反应性降低均有较好的恢复作用, 并可能通过调节蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 的 α , δ 和 ϵ 亚型来发挥作用^[4-5], 但 AVP 介导 PKC 激活并参与细胞内活动的网状调节机制十分复杂, 而休克后的 AVP 激活 PKC 亚型的具体机制尚不清楚。

研究认为, AVP 主要通过与其受体结合来发挥细胞内不同的生物效应, 其中血管加压素 1a (vasopressin-1a, V_{1a}) 受体和 V_2 受体在心血管系统中分布广泛, 在 AVP 介导的血容量和血管平滑肌舒缩调节中具有重要作用^[6]。经典的 AVP 诱导 PKC 活化的机制为 V_{1a} 受体-磷脂酶 C (phospholipase C, PLC) 途径, 即 AVP 与 V_{1a} 受体结合后, 激活特异的 PLC, 通过多条信号途径引起胞浆中的 Ca^{2+} 水平升高和 PKC 激活, 产生血管收缩等效应^[7]。通常情况下, PKC 以低活性的状态存在于胞质中, 当细胞受刺激后, PKC 从胞浆转移到胞膜上而激活并发挥作用。此外, 磷脂酶 D (PLD)^[8] 和磷脂酶 A_2 (PLA₂)^[9] 也参与了 AVP 诱导 PKC 活化的过程, 并且 AVP 对 PKC 各亚型的激活作用并不相同^[7,9]。在某些动物中, V_2 受体也参与了 AVP 的血管舒缩功能的调节^[6]。但是, 在休克血管低反应性状态下, AVP 是否通过 V_{1a} 受体或 V_2 受体介导的 PKC 调节途径参与 VSMC 钙敏感性和血管反应性的调节, PLC, PLD 和 PLA₂ 是否参与了这一过程目前尚不清楚。因此, 本实验

采用缺氧培养 VSMC, 观察 AVP 调节缺氧 VSMC 中 PKC- α , δ 和 ϵ 亚型蛋白表达与 V_{1a} 及 V_2 受体的关系, 以及 PLC, PLD 和 PLA₂ 在其中的变化, 进一步阐明 AVP 改善失血性休克血管反应性的机制, 为其临床应用提供一定的理论基础。

1 材料与方 法

1.1 动物和试剂

Wistar 大鼠, 60 只, 雌雄各半, 体重 200 ~ 240 g, 由第三军医大学野战外科研究所实验动物中心提供。AVP([Arg⁸]-vasopressin), V_{1a} 受体拮抗剂 [β -mercapto- β , β -cyclopentamethylenepropionyl¹, *O*-me-Tyr², Arg⁸]-vasopressin [d(CH₂)₅[Tyr²(Me)]AVP]、 V_2 受体拮抗剂 [adamantaneacetyl¹, *O*-Et-D-Tyr², Val⁴, aminobutyryl⁶, Arg^{8,9}]-vasopressin [d(CH₂)₅[d-Ile²Abu⁴]AVP]、兔抗大鼠 PKC- α , δ 和 ϵ 亚型抗体、Tris、甘氨酸、氟化钠 (NaF)、钼酸钠 (Na₃VO₄)、 β -巯基乙醇、二硫苏糖醇 (DTT)、蛋白酶抑制剂 cocktail 均购自美国 Sigma 公司, 细胞培养用 DMEM/F12 培养基购自美国 Hyclone 公司, 胎牛血清为奥地利 PAA 公司产品, 电泳相关试剂购自美国 Promega 公司, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗、BCA 蛋白定量试剂盒、Supersignal 发光增强试剂盒为美国 Pierce 公司产品, Amplex Red 荧光检测 PLC 和 PLD 分析试剂盒购自美国 Molecular Probes 公司, 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 细胞培养和实验分组

取大鼠肠系膜上动脉, 采用贴块法进行 VSMC 原代培养, 传代至第 3 ~ 5 代用于实验。实验分 5 组: 正常对照组、缺氧模型组、缺氧 + AVP 组、缺氧 + d(CH₂)₅[Tyr²(Me)]AVP + AVP 组和缺氧 + d(CH₂)₅[d-Ile²Abu⁴]AVP + AVP 组。实验当日将培养的 VSMC 移入缺氧培养罐内缺氧 1.5 h, 之后加入 d(CH₂)₅[Tyr²(Me)]AVP (100 nmol·L⁻¹) 或 d(CH₂)₅[d-Ile²Abu⁴]AVP (100 nmol·L⁻¹) 孵育 10 min, 再用 AVP 0.5 nmol·L⁻¹ 孵育 10 min, 然后消化收集 VSMC。

1.3 胞浆、胞膜蛋白的分离提取

取已处理的 VSMC, 加入 200 μ L 胞浆蛋白提取液 (mmol·L⁻¹: Tris-HCl 20, pH 6.8, EDTA 2, EGTA 1, NaF 10, Na₃VO₄ 1; 0.1% β -巯基乙醇; 蛋白酶抑制剂 cocktail [4-(2-氨基乙基)苯磺酰氟 2 mmol·L⁻¹, 氨

肽酶抑制剂 130 μ mol·L⁻¹, E-64 14 μ mol·L⁻¹, 亮肽素 1 μ mol·L⁻¹, 抑肽酶 0.3 μ mol·L⁻¹], 置于冰上裂解 1 h, 离心 16 000 $\times g$, 4 $^{\circ}$ C 20 min, 上清即为胞浆蛋白成分, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。沉淀加入 100 μ L 胞膜蛋白提取液 (含 1% Triton X-100 和 0.1% SDS 的胞浆蛋白提取液), 反复吹打后于 4 $^{\circ}$ C 摇床平缓摇动 1 h, 离心 16 000 $\times g$, 4 $^{\circ}$ C 20 min, 取上清液即为胞膜蛋白成分。采用 BCA 法蛋白定量, 将各组样本调定至等蛋白浓度, -70 $^{\circ}$ C 储存备用。

1.4 Western 蛋白印迹法检测 PKC- α , δ 和 ϵ 亚型蛋白表达

取等蛋白量的样本用 10% SDS-PAGE 进行蛋白电泳, 电泳条件为: 4 $^{\circ}$ C、恒定电压堆积胶 80 V、分离胶 100 V。电泳结束后, 将凝胶上的蛋白电转印至硝酸纤维素膜, 20 V, 4 $^{\circ}$ C 过夜。然后用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, TBS 溶液 (Tris-HCl 50 mmol·L⁻¹, pH 7.4, NaCl 150 mmol·L⁻¹) 漂洗 3 次, 再将膜从中间剪开, 分为上、下两部分, 上半部加入抗 PKC 亚型抗体 (1:10 000), 下半部加入抗 β -肌动蛋白抗体 (1:2000), 4 $^{\circ}$ C 过夜。TBS 溶液漂洗后加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗稀释液 (1:8000), 室温孵育 1 h。TBS 溶液漂洗 4 次, 将膜与增强发光底物 (Supersignal 发光增强试剂盒, A, B 液以 1:1 混合) 反应 5 min, 暗室中用 X 胶片感光、显影及定影。用 Quantity One 分析软件测定图像的吸光度 (A) 值, PKC 亚型的蛋白表达水平以 PKC 亚型蛋白条带的 A 值与其自身 β -肌动蛋白条带 A 值的比值表示。

1.5 PLC, PLD 和 PLA₂ 活性测定

消化收集细胞, 加入样本裂解液 A (甘氨酸 0.1 mol·L⁻¹、硼酸 3.57 mmol·L⁻¹、去氧胆酸钠 6.03 mmol·L⁻¹) 匀浆后 60 $^{\circ}$ C 水浴 30 min, 采用陈思锋法^[10]检测 PLA₂ 活性。细胞加入裂解液 B (mmol·L⁻¹: HEPES 10, EDTA 0.5, EGTA 0.5 和蛋白酶抑制剂, pH 7.4), 冰上匀浆 60 min, 400 $\times g$ 离心 10 min, 取上清, 按照 Amplex Red PLC 和 PLD 分析试剂盒说明书操作检测 PLC 和 PLD 活性。用纯化 PLC (蜡样芽孢杆菌, *Bacillus cereus*) 和 PLD (褐色链霉菌, *Streptomyces chromofuscus*) 作标准曲线, 计算样本中的 PLC 和 PLD 活性。

1.6 统计学分析

结果数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较用单因素方差分析; 当方差分析显示差别有显著意义时, 多组平均数的两两比较采用 Newman-Keuls 检验。

2 结果

2.1 V_{1a}及 V₂受体拮抗剂对 AVP 调节缺氧的 VSMC 中 PKC-α, δ 和 ε 亚型蛋白表达的影响

缺氧处理的 VSMC 胞膜成分中 PKC-α 和 ε 亚型的蛋白表达量明显升高, 而胞浆成分中的蛋白量相应降低。AVP 0.5 nmol·L⁻¹ 进一步升高胞膜 PKC-α 和 ε 亚型表达, V_{1a}受体拮抗剂 d(CH₂)₅[Tyr²(Me)]AVP 100 nmol·L⁻¹ 预处理可明显拮抗 AVP 诱导的胞膜成

分 PKC-α 和 ε 的蛋白表达升高; 而 V₂受体拮抗剂 d(CH₂)₅[d-Ile²Abu⁴]AVP 100 nmol·L⁻¹ 无明显作用 (图 1A 和 1B)。胞浆成分和胞膜成分中 PKC-δ 亚型的蛋白表达也显示了相似的变化趋势, 但各组间差别无显著意义 ($P > 0.05$, 图 1C)。

2.2 V_{1a}及 V₂受体在 AVP 调节 PLC, PLD 和 PLA₂ 活性中的作用

表1结果表明, 缺氧1.5 h后, VSMC的PLC和

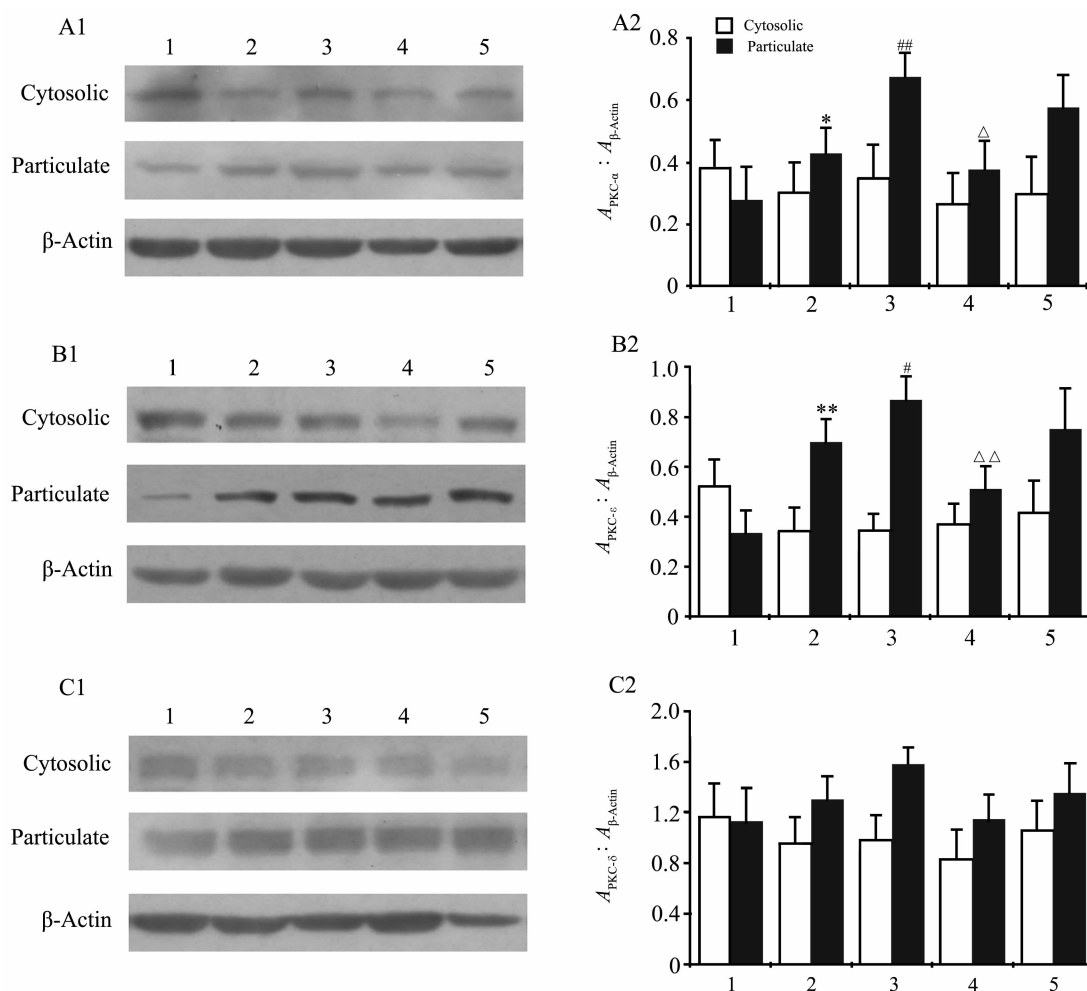


Fig 1. Effect of vasopressin 1a (V_{1a}) receptor antagonist d(CH₂)₅[Tyr²(Me)]AVP and V₂ receptor antagonist d(CH₂)₅[d-Ile²Abu⁴]AVP on argipressin (AVP) induced expression of protein kinase C (PKC)-α, ε and δ isoforms in vascular smooth muscle cells (VSMC) after hypoxia. d(CH₂)₅[Tyr²(Me)]AVP: [β-mercapto-β,β-cyclopentamethylenepropionyl¹, O-me-Tyr², Arg⁸]-vasopressin; d(CH₂)₅[d-Ile²Abu⁴]AVP: [adamantaneacetyl¹, O-Et-D-Tyr², Val⁴, aminobutyryl⁶, Arg^{8,9}]-vasopressin. 1: Normal control group; 2: hypoxia group; 3: hypoxia + AVP group; 4: hypoxia + d(CH₂)₅[Tyr²(Me)]AVP + AVP group; 5: hypoxia + d(CH₂)₅[d-Ile²Abu⁴]AVP + AVP group. After 1.5 h hypoxia, VSMC were incubated with d(CH₂)₅[Tyr²(Me)]AVP 100 nmol·L⁻¹ and d(CH₂)₅[d-Ile²Abu⁴]AVP 100 nmol·L⁻¹ respectively for 10 min, then incubated with AVP 0.5 nmol·L⁻¹ for 10 min. PKC-α, δ and ε isoforms expression in the cytosol and particulate fractions of VSMC was detected by Western blotting. A2, B2 and C2: the quantitative results of A1, B1 and C1, respectively. $\bar{x} \pm s$, $n = 4$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with normal control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with hypoxia group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, compared with hypoxia + AVP group.

Tab 1. Effect of argipressin on activities of PLC, PLD and PLA₂ in VSMC after hypoxia

Group	PLC activity	PLD activity	PLA ₂ activity
	/μmol·min ⁻¹ ·g ⁻¹ protein	/μmol·h ⁻¹ ·g ⁻¹ protein	/nmol·min ⁻¹ ·g ⁻¹ protein
Normal control	16 ± 51	30 ± 6	32 ± 6
Hypoxia	20 ± 4	40 ± 11 [*]	37 ± 11
Hypoxia + AVP	26 ± 6 [#]	63 ± 14 ^{##}	41 ± 10
Hypoxia + d(CH ₂) ₅ [Tyr ² (Me)]AVP + AVP	16 ± 6 ^{△△}	32 ± 14 ^{△△}	33 ± 10
Hypoxia + d(CH ₂) ₅ [d-Ile ² Abu ⁴]AVP + AVP	24 ± 6	50 ± 16	36 ± 10

PLC: phospholipase C; PLD: phospholipase D; PLA₂: phospholipase A₂. See Fig 1 legend for VSMC treatments. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$.
^{*} $P < 0.05$, compared with normal control group; [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, compared with hypoxia group; ^{△△} $P < 0.01$, compared with hypoxia + AVP group.

PLD 活性升高, AVP 0.5 nmol·L⁻¹ 处理可使 PLC 和 PLD 活性进一步升高, 与缺氧组比较, 差异有显著意义。V_{1a} 受体拮抗剂 d(CH₂)₅[Tyr²(Me)]AVP 100 nmol·L⁻¹ 预处理可明显拮抗 AVP 诱导 PLC 和 PLD 活性升高的作用; 而 V₂ 受体拮抗剂 d(CH₂)₅[d-Ile²Abu⁴]AVP 100 nmol·L⁻¹ 无明显作用。各组间 PLA₂ 活性均无明显差异。

3 讨论

本研究结果显示, 缺氧处理 VSMC 胞膜中 PKC-α 和 ε 亚型的蛋白表达量明显升高, AVP 进一步升高胞膜 PKC-α 和 ε 的表达, V_{1a} 受体拮抗剂预处理可明显拮抗 AVP 诱导的胞膜 PKC α 和 ε 亚型的蛋白表达升高, 同时 V_{1a} 受体拮抗剂也明显拮抗 AVP 诱导缺氧 VSMC 中 PLC 和 PLD 活性升高的作用, 而 V₂ 受体拮抗剂对 AVP 升高的胞膜 PKC-α 和 ε 表达和 AVP 诱导缺氧 VSMC 中 PLC 和 PLD 活性升高无明显作用。

文献报道 PLA₂ 的代谢产物, 如花生四烯酸^[11], 可通过激活 PKC 来调节 VSMC 钙敏感性, 在平滑肌收缩过程中起着重要调节作用。但在本研究中, 缺氧后 PLA₂ 活性略有升高, AVP 处理后也有一定升高, 但各组间均无明显差异。PLA₂ 可以分为 3 种类型: 分泌型 PLA₂、胞浆型 PLA₂ 和非钙依赖型 PLA₂, 它们具有不同的组织分布、氨基酸顺序同源性和生物学特性^[12]。由于方法所限, 本研究中主要检测的是 VSMC 中钙依赖的胞浆型 PLA₂ 活性变化, 结果提示, 这种钙依赖性调节的胞浆型 PLA₂ 可能未参与 AVP 介导的休克后血管反应性和钙敏感性的调节, 而非钙依赖型 PLA₂ 的作用有待于进一步研究。

上述研究表明, AVP 诱导缺氧 VSMC 中 PKC 亚

型激活的机制可能主要是通过 V_{1a} 受体激活 PLC/PLD 所介导的, V₂ 受体在这一信号传导途径中可能并不起主要作用。但它具体的信号传导途径尚需进一步研究阐明。

4 参考文献:

- [1] Holmes CL, Landry DW, Granton JT. Vasopressin and the cardiovascular system. Part 1-Receptor physiology [J]. *Crit Care*, 2003, 7(6):427-434.
- [2] Landry DW, Levin HR, Gallant EM, Seo S, D'Alessandro D, Oz MC, et al. Vasopressin pressor hypersensitivity in vasodilatory septic shock [J]. *Crit Care Med*, 1997, 25(8):1279-1282.
- [3] Dünser MW, Mayr AJ, Ulmer H, Knotzer H, Sumann G, Pajk W, et al. Arginine vasopressin in advanced vasodilatory shock: a prospective, randomized, controlled study [J]. *Circulation*, 2003, 107(18):2313-2319.
- [4] Yang GM, Liu LM. Effect of arginine vasopressin on vasoreactivity in hemorrhagic shock rats [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 2005, 19(5):347-351.
- [5] Yang GM, Li T, Xu J, Ming J, Liu LM. Effect of arginine vasopressin on vascular reactivity and calcium sensitivity of vascular smooth muscle and its relationship to protein kinase C following hemorrhagic shock in rats [J]. *Chin Crit Care Med* (中国危重病急救医学), 2008, 20(3):133-137.
- [6] Martín de Aguilera E, Vila JM, Irurzun A, Martínez MC, Martínez Cuesta MA, Lluch S. Endothelium-independent contractions of human cerebral arteries in response to vasopressin [J]. *Stroke*, 1990, 21(12):1689-1693.
- [7] Fan J, Byron KL. Ca²⁺ signalling in rat vascular smooth muscle cells: a role for protein kinase C at physiological

- vasoconstrictor concentrations of vasopressin [J]. *J Physiol*, 2000, **524**(Pt 3):821-831.
- [8] Ohguchi K, Banno Y, Nakashima S, Nozawa Y. Regulation of membrane-bound phospholipase D by protein kinase C in HL60 cells. Synergistic action of small GTP-binding protein RhoA [J]. *J Biol Chem*, 1996, **271**(8):4366-4372.
- [9] Chen WC, Chen CC. Signal transduction of arginine vasopressin-induced arachidonic acid release in H9c2 cardiac myoblasts: role of Ca^{2+} and the protein kinase C-dependent activation of p42 mitogen-activated protein kinase [J]. *Endocrinology*, 1999, **140**(4):1639-1648.
- [10] Chen SF, Wu ZL. A simple and accurate assay method for phospholipase A_2 activity in body fluids and tissue [J]. *Acad J Second Mil Med Univ* (第二军医大学学报), 1989, **10**(3):254-256.
- [11] Bauldry SA, Wooten RE. Induction of cytosolic phospholipase A_2 activity by phosphatidic acid and diglycerides in permeabilized human neutrophils: interrelationship between phospholipases D and A_2 [J]. *Biochem J*, 1997, **322**(Pt 2):353-363.
- [12] Dennis EA. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A_2 [J]. *J Biol Chem*, 1994, **269**(18):13057-13060.

Vasopressin-1a and vasopressin-2 receptors in argipressin regulating expression of protein kinase C of vascular smooth muscle cell after hypoxia

YANG Guang-Ming, XU Jing, LI Tao, MING Jia, CHEN Wei, LIU Liang-Ming*
(State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Research Institute of Surgery,
Daping Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: AIM To investigate the effects of vasopressin-1a (V_{1a}) receptor and V_2 receptor antagonists on argipressin (AVP) regulating the expression of protein kinase C (PKC)- α , δ and ϵ isoforms of vascular smooth muscle cell (VSMC) and the changes in phospholipases C (PLC), D (PLD) and A_2 (PLA $_2$) activity. **METHODS** VSMCs from superior mesenteric artery of rats were hypoxia-treated for 1.5 h. The expression of PKC- α , δ and ϵ isoforms was detected with Western blot. The PLC and PLD activities were assayed by enzyme-coupled fluorimetric analysis, and PLA $_2$ activity was assayed by acid-base titration. **RESULTS** After hypoxia, the expression of VSMC particulate PKC- α and ϵ increased, and AVP treatment further increased expression of PKC- α and ϵ in the particulate fractions. V_{1a} Receptor inhibitor $d(CH_2)_5[Tyr^2(Me)]AVP$ significantly antagonized this effect of AVP, simultaneously, also antagonized AVP-induced increase in PLC and PLD activities of VSMC after hypoxia. But V_2

receptor antagonist $d(CH_2)_5[d-Ile^2Abu^4]AVP$ had no significant influence on AVP-induced increase in expression of PKC- α and ϵ isoforms and the activities of PLC and PLD.

CONCLUSION AVP induces translocation/activation of PKC isoforms in VSMC mainly through a V_{1a} receptor-dependent PLC/PLD mechanism, while V_2 receptor plays a lesser role in the signal transduction pathway.

Key words: receptors, vasopressin; vascular smooth muscle cell; hypoxia; argipressin; protein kinase C; phospholipase C; phospholipase D; phospholipase A_2

Foundation item: The project supported by National Natural Science Foundation for Distinguished Young Scholar of China (30625037); National Basic Research Program of China (2005CB522601); and Innovation Group Plan of Education Ministry (IRT0712)

* Corresponding author.

(本文编辑 乔虹)