

高表达受体活性修饰蛋白 1 对血管紧张素 II 和降钙素基因相关肽诱导的 A10 细胞降钙素受体样受体膜分布的影响

孙 飞^{1,2}, 唐江琼¹, 郑元斌¹, 秦又发¹, 陈临溪¹, 秦旭平¹

(1. 南华大学药物药理研究所, 湖南 衡阳 421001; 2. 成都军区昆明总医院药剂科, 云南 昆明 650032)

摘要: 目的 探索受体活性修饰蛋白 1 (RAMP1) 对血管紧张素 II (Ang II) 和(或)降钙素基因相关肽 (CGRP) 诱导的降钙素受体样受体 (CRLR) 在血管平滑肌细胞 (VSMC) 的表达和分布的影响, 进一步揭示 CGRP 抑制 VSMC 增殖的机制。方法 通过酶切、连接、转化等方法构建 pCDNA3.1(+)-RAMP1 真核表达载体并稳定转染至鼠源性血管平滑肌细胞株 A10 中, 获得稳定高表达 RAMP1 的细胞系。无转染细胞、转染空载体 [pCDNA3.1(+)] 细胞和 RAMP1 高表达组细胞 [pCDNA3.1(+)-RAMP1] 分别用 Ang II 100 nmol·L⁻¹、CGRP 100 nmol·L⁻¹ 和 CGRP + Ang II 处理 24 h, 用 MTT 法检测细胞存活; 逆转录 PCR、Western 印迹和免疫荧光法分别检测 CRLR mRNA 含量、蛋白表达及细胞膜分布。结果 单纯转染空质粒或 RAMP1 对细胞增殖无明显影响。Ang II 处理对 3 种细胞存活的影响无显著差异。pCDNA3.1(+)-RAMP1 细胞经 CGRP 处理 24 h 后, 细胞存活明显高于其他两组细胞 ($P < 0.05$); 经 CGRP + Ang II 处理, 细胞存活明显低于其他两组 ($P < 0.05$)。Ang II, CGRP 和 CGRP + Ang II 处理对 3 种细胞 CRLR mRNA 表达无明显影响, 但 CGRP 处理使 pCDNA3.1(+)-RAMP1 细胞中 CRLR 蛋白明显高于其他两种细胞 ($P < 0.05$), 而 CGRP + Ang II 处理使 pCDNA3.1(+)-RAMP1 细胞中 CRLR 蛋白明显低于其他两种细胞 ($P < 0.05$)。免疫荧光结果显示, 经无血清或 CGRP 处理后, 无转染细胞和 pCDNA3.1(+)-RAMP1 细胞中的 RAMP1 和 CRLR 主要分布在胞浆区域; 经 Ang II 或 CGRP + Ang II 处理后, pCDNA3.1(+)-RAMP1 细胞中 RAMP1 和 CRLR 在细胞膜上的分布多于无转染细胞和 pCDNA3.1(+)-RAMP1 细胞。结论 高表达 RAMP1 能增强 CGRP 抑制 Ang II 诱导的血管平滑肌细胞增殖, 其机制可能是通过 RAMP1 增加 CRLR 的膜分布, 从而增强 CGRP 受体对 CGRP 的敏感性有关。

关键词: 血管紧张素 II; 降钙素基因相关肽; 降钙素受体样受体; 受体活性修饰蛋白 1

中图分类号: R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3002(2013)02-0209-07

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2013.02.015

降钙素基因相关肽 (calcitonin gene-related peptide, CGRP) 是辣椒素敏感性感觉神经末梢释放的神经肽, 在调节心血管功能方面发挥重要作用。前期研究证实, 一定浓度的 CGRP 能抑制血清或血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 诱导大鼠血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 的增殖^[1-2]。CGRP 功能发挥是通过其受体而实现的。CGRP 受体是由降钙素受体样受体 (calcitonin receptor-like receptor, CRLR), 受体活性修饰蛋白 1 (receptor activity modifying protein 1, RAMP 1),

受体组分蛋白 (receptor component protein, RCP) 3 个组分组成。目前研究表明, 对 CGRP 的应答作用主要是磷酸化 CRLR 的过程, 而 RAMP1 的主要作用是糖基化 CRLR 和作为一种分子伴侣蛋白, 将 CRLR 转运至胞膜上^[3-4]。有实验证实, 增加 RAMP1 表达可以加强 VSMC 对 CGRP 的应答作用^[5-6]。本实验观察高表达 RAMP1 后, CGRP 对 Ang II 诱导的 VSMC 增殖及 CRLR 蛋白表达的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 由南华大学生物化学教研室胡小波博士馈赠; pCDNA3.1/+ 质粒由本实验室保存。

1.2 主要试剂

CGRP, Ang II 和 MTT, 购自 Sigma 公司;

基金项目: 国家自然科学基金 (30572192); 国家自然科学基金 (81173060)

作者简介: 孙 飞 (1984 -), 女, 初级药师, 硕士; 秦旭平 (1963 -) 男, 教授, 博士, 主要从事心血管药理学研究。

通讯作者: 秦旭平, E-mail: qinxp333@sina.com, Tel: (0734)8160781

DMEM 培养基和胎牛血清, 购自 Gibco 公司; BCA Protein Assay Kit, 购自 HyClone-PIERCE Biotechnology 公司; RAMP1 (兔多克隆抗体)、CRLR (山羊多克隆抗体) 一抗及 Western blotting Luminol Reagent, 均购自 Santa Cruz 公司; β 肌动蛋白一抗 (兔多克隆抗体) 及二抗 (HRP-兔抗山羊和 HRP-山羊抗兔), 购自博士德公司; 无内毒素质粒小提试剂盒, 购自百泰克; GenClean 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒和 DNA 快速连接试剂盒, 均购自上海捷瑞生物公司; LipofectamineTM2000 转染液和 Trizol 试剂, 购自 Invitrogen 公司; EcoRI 和 BamHI 内切酶、RevertAidTMFirst Stand cDNA Synthesis Kit, 购自 Fermentas LIFE SCIENCES 公司; 通用 PCR 试剂, 购自上海生工生物工程有限公司; 其他实验所需试剂均为分析纯。

1.3 主要仪器

Mini PROTEANR 3 cell, 美国; 凝胶成像系统 (Alphamager TM 2200, 美国), Centrifuge5810/5810R 型离心机, 德国; IX70 型荧光倒置显微镜, 日本; TRANS-BLOTR SD SEMI-DRY TRANSFER CELL, 美国; MyCyclerTM Thermal cycler, 美国。

1.4 大鼠血管平滑肌细胞株 A10 细胞培养

A10 购自 ATCC。常规培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中, 置于 37°C 5% CO₂ 恒湿恒温培养箱中培养。待细胞长满后进行传代培养用于实验。

1.5 pCDNA3.1 (+)-RAMP1 载体构建

从 A10 细胞中提取总 RNA 进行 RT-PCR, 获取带有酶切位点 (*EcoR*I 和 *Bam*H I) 的 RAMP1 的开放阅读框, 再经过酶切、连接、转化至 *E. coli* DH5 α 中, 挑单克隆经初步鉴定后, 送北京诺赛生物公司测序。

1.6 细胞转染

将对数生长期的 A10 细胞消化接种于 24 孔板中, 每孔 1×10^5 个细胞, 待细胞长至 80% 融合时, 换成完全培养基进行转染。转染前 1 h 用 PBS 洗 2 次, 每孔加上 500 μ l opti-MEM 培养基。按转染试剂产品说明书提供的方法, 用脂质体 LipofectamineTM2000 介导将带有 RAMP1 的基因载体转染入 A10 细胞, 转染 4 h 后换成 10% FBS 培养基, 24 h 后按 1:10 比例进行传代, 再常规培养 24 h 后各组加入 500 μ l G418 500 mg·L⁻¹ 进行筛选, 3 d 更换 1 次筛选培养基。2 周后可见克隆形成, 将单克隆胰酶消化移至 25 ml 培养瓶中扩大培养 (G418 250 mg·L⁻¹), 冻存细胞。

1.7 细胞分组处理

取生长良好的对数生长期的正常细胞 (无质粒转染)、仅转染 pCDNA3.1 (+) 细胞 [pCDNA3.1 (+)] 及转染 pCDNA3.1 (+)-RAMP1 质粒的细胞 [pCDNA3.1 (+)-RAMP1], PBS 洗 2 次, 胰蛋白酶消化后, 用含 10% FBS 的 DMEM 制成细胞悬液, 接种于 96 孔板, 置于 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 更换为含 0.1% FBS 的 DMEM 培养 24 h 使细胞同步化, 按照分组, 3 种细胞分别用 Ang II 100 nmol·L⁻¹、CGRP 100 nmol·L⁻¹ 和 CGRP (预处理 30 min) + Ang II 处理 24 h。

1.8 MTT 法检测 A10 细胞存活率

取 1.7 处理的细胞, PBS 洗 3 次, 加 20 μ l MTT 5 g·L⁻¹ 处理 4 h 后, 加 DMSO 振荡 10 min, 用酶联免疫仪在波长 570 nm 处读取吸光度 (absorbance, A) 值, 根据公式计算细胞存活率, 存活率 (%) = $A_{\text{处理组}} / A_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。

1.9 逆转录 PCR 检测 RAMP1 和 CRLR mRNA 水平

取 1.7 处理的细胞, 提取细胞总 RNA。细胞总 RNA 的提取按 Trizol 抽提试剂说明书进行。逆转录反应按 RevertAidTMFirst Stand cDNA Synthesis Kit 说明书进行。PCR 反应体系组成: 9.5 μ l ddH₂O, 12.5 μ l 2 × PCR Master, 1 μ l cDNA, 上下游引物分别是: RAMP1 为 5'-CGGGATCCACGGGGCTCTGCTTGCCATG-3' 和 5'-CCCAGGAATTCCTACACGATGCCCTCTGTGCG-3'; CRLR 为 5'-CAGCAGGAACCGAGTCAA-3' 和 5'-AGGCAGGAAGCAGAGGAA-3'; β 肌动蛋白为 5'-CACCCGCGAGTCAACCTTC-3' 和 5'-CCCATACCCACCATCACACC-3'。取各引物 1 μ l (10 μ mol·L⁻¹), 混匀后, 短速离心, 按以下条件进行反应: 预变性 94°C 5 min, 变性 94°C 40 s, 退火 40 s (RAMP1: 65°C, β 肌动蛋白: 62°C, CRLR: 62°C), 延伸 72°C 40 s, 进行 30 个循环, 最后 72°C 延伸 10 min。结束后, 取产物 5 μ l, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳 (80 V, 40 min), 用灰度扫描目标条带的积分吸光度值 (integrated absorbance, IA) 与内标 IA 比值的半定量法分析目的基因的表达变化。

1.10 Western 印迹法检测 RAMP1 和 CRLR 蛋白的水平

取 1.7 处理的细胞, 提取细胞总蛋白。用细胞裂解液裂解细胞, 收集蛋白质, 采用 BCA 法测定细胞蛋白质含量。蛋白质变性后每孔上样 65 μ g, 经 SDS-PAGE (RAMP1: 12%; CRLR: 10%, β 肌动蛋白

白:10%)电泳后,10 V, 400 mA 半干式电转至 PVDF 膜上(RAMP1:10 V,20 min;CRLR:10 V,40 min; β 肌动蛋白:10 V,25 min)。TBST(Tris·Cl 50 mmol·L⁻¹, pH 7.6, NaCl 150 mmol·L⁻¹,0.1% Tween 20)配制的 5% 脱脂牛奶室温摇床封闭 1 h,加入一抗(RAMP1 效价为 1:100;CRLR 为 1:200; β 肌动蛋白为 1:1000)4℃ 孵育过夜,TBST 洗膜 4 次(每次 10 min)后加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(效价为 1:1000)或兔抗山羊二抗(1:1000),室温下摇床孵育 2 h,TBST 洗膜 4 次(每次 15 min),暗室中加发光剂 A、B 混液各 200 μ l 于 PVDF 膜上激发荧光后压片 30 min 后显影、定影,洗片晾干后,用灰度扫描目标条带与内标 IA 比值的半定量法来分析靶蛋白表达的变化。

1.11 免疫荧光检测 RAMP1 和 CRLR 的膜分布

取 1.7 处理的细胞,PBS 洗 3 次(5 min \times 3);4%多聚甲醛室温固定 30 min 后,PBS 洗 3 次(5 min \times 3);0.1% TritonX-100 处理 10 min 后,PBS 洗 3 次(5 min \times 3);5% BSA 封闭 1 h 后,加入一抗[RAMP1(1:30);CRLR(1:60)]4℃ 过夜,PBS 洗 3 次(5 min \times 3),避光加入荧光标记的荧光

二抗[FITC 标记的驴抗兔 IgG(1:20);TRITC 标记的驴抗山羊(1:60)]室温下 2 h 后,PBS 避光洗 3 次(5 min \times 3)。倒置荧光显微镜下观察,RAMP1 带表现为绿色荧光,CRLR 带表现为红色荧光。

1.12 统计学处理

结果数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。均采用 SPSS14.0 软件进行分析,组间差异比较用单因素方差分析(one-way ANOVA)检验,用 $P < 0.05$ 判断统计差异有无显著性。

2 结果

2.1 转染 RAMP1 细胞的鉴定

图 1A 结果显示,pCDNA3.1(+)-RAMP1 转染组细胞中 RAMP1 mRNA 水平明显高于无转染的正常细胞和 pCDNA3.1(+)-RAMP1 转染组细胞($P < 0.05$)。图 1B 结果显示,pCDNA3.1(+)-RAMP1 组细胞中 RAMP1 蛋白水平高于正常细胞和 pCDNA3.1(+)-RAMP1 组($P < 0.05$)。这表明用脂质体能成功地将 RAMP1 基因转染于 A10 细胞并能正常表达。

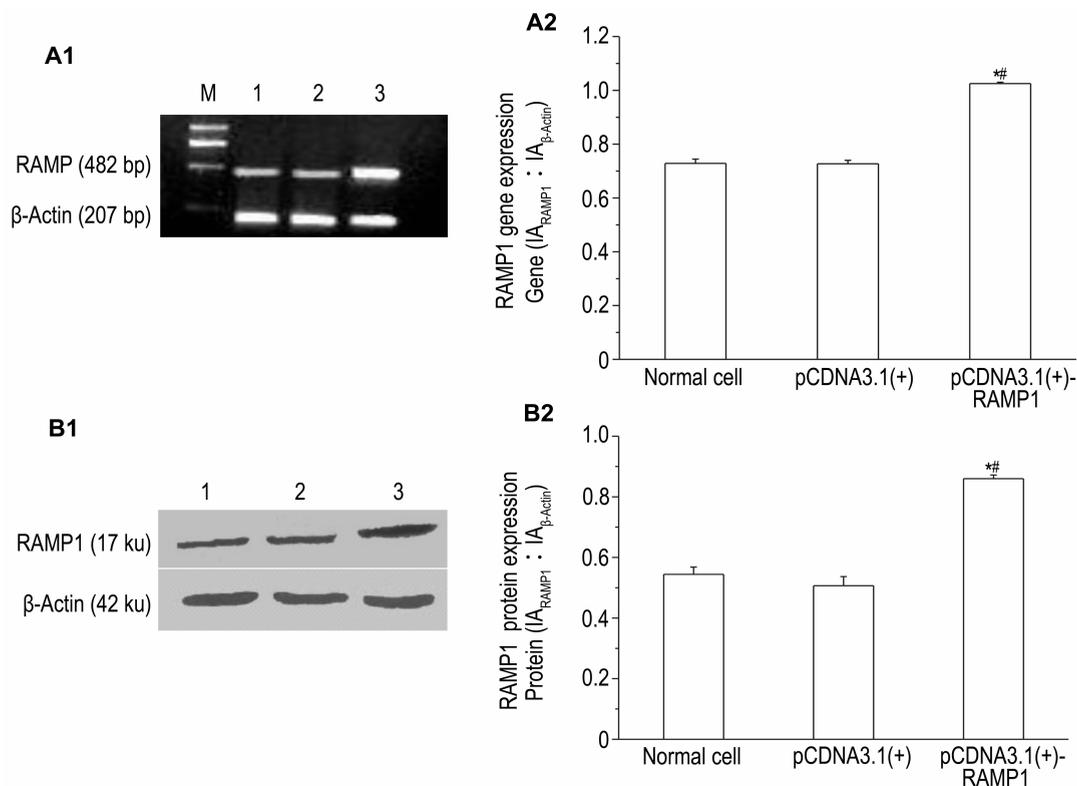


Fig. 1 Determination of receptor activity modifying protein 1 (RAMP1) gene expression by RT-PCR (A) and protein expression by Western blotting (B) in A10 cells. A2 and B2 were the semiquantitative result of A1 and B1, respectively. Lane 1: normal cells; lane 2: pCDNA3.1(+)-cells; lane 3: pCDNA3.1(+)-RAMP1 cells. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. * $P < 0.05$, compared with normal cells; [#] $P < 0.05$, compared with pCDNA3.1(+)-cells.

2.2 高表达 RAMP1 对 CGRP 抑制 Ang II 诱导的 A10 细胞存活的影响

图 2 结果显示,转染对 3 种细胞的存活率无影响。但单独用 CGRP、Ang II 处理细胞或两者合并则能显著增加 3 组细胞的存活率 ($P < 0.05$)。CGRP 处理使 pCDNA3.1(+)-RAMP1 细胞存活率明显高于其他两组细胞,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),提示高表达 RAMP1 能增加 CGRP 对静止期细胞的增殖活性;Ang II 能增加 3 组细胞的存活率,但组间无明显差异,说明 RAMP1 高表达对 Ang II 引起的细胞存活率无影响;高表达 RAMP1 用 CGRP 预处理细胞 30 min,再加入 Ang II 培养作用 24 h,细胞存活率明显低于单纯 Ang II 处理组 ($P < 0.05$),说明高表达 RAMP1 能增强 CGRP 抑制 Ang II 诱导的 A10 细胞增殖作用。

2.3 高表达 RAMP1 对 CRLR 表达的影响

图 3 结果显示,正常细胞、pCDNA3.1(+)细胞和 pCDNA3.1(+)-RAMP1 细胞经 Ang II 和(或)CGRP 处理 24 h 后,CRLR mRNA 水平无统计学意义(图 3A);无血清或 Ang II 对 3 种细胞的 CRLR 蛋白表达无差异,单独使用 CGRP 处理使

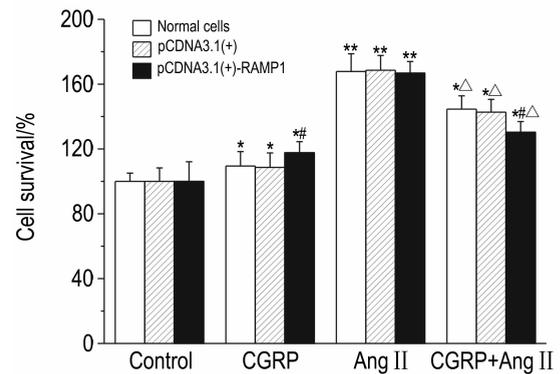


Fig. 2 Effect of RAMP1 overexpression on A10 proliferation by MTT. Three kinds of cells were treated with AngII, CGRP or CGRP + AngII for 24 h. $\bar{x} \pm s$, $n=5$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the cells of control group; # $P < 0.05$, compared with corresponding pCDNA3.1(+) cells with the same treatment; $\Delta P < 0.05$, compared with the cells of AngII treated group.

RAMP1 高表达组细胞中 CRLR 蛋白表达增加 ($P < 0.05$),而 RAMP1 高表达组细胞用 CGRP 预先处理 30 min 再加入 Ang II 处理 24 h 后,细胞 CRLR 蛋白表达低于其他两组 ($P < 0.05$) (图 3B)。

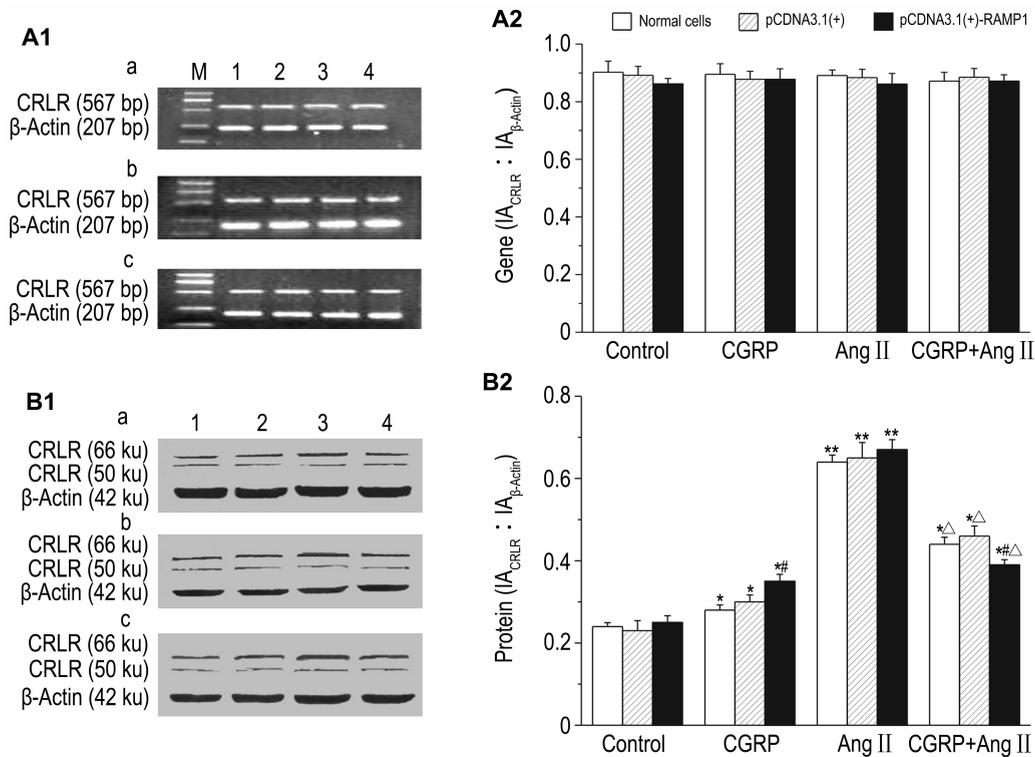


Fig. 3 Effect of RAMP1 overexpression on expression of CRLR gene (A) and protein (B) in A10 cell by RT-PCR (A) and Western blotting (B). A2 and B2 were semiquantitative result of A1 and B1, respectively. a: normal cells; b: pCDNA3.1(+) transfected cells; c: pCDNA3.1(+)-RAMP1 cells. Lane 1: normal control group; lane 2: CGRP group; lane 3: Ang II group; lane 4: CGRP + AngII group. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with normal control group; # $P < 0.05$, compared with pCDNA3.1(+) cells with the same treatment; $\Delta P < 0.05$, compared with Ang II group.

2.4 高表达 RAMP1 对 CRLR 在细胞膜上分布的影响

免疫荧光检测 RAMP1 和 CRLR 的膜分布结果 (图 4) 显示, 使用无血清或 CGRP 后, 正常细胞和 pCDNA3.1 (+) 细胞中的两种蛋白主要分布于胞核周围的胞浆区域 (图 4A, B: a1 ~ a3, b1 ~ b3), 而高表达 RAMP1 组细胞中 RAMP1 与 CRLR 在膜上分布增加 (图 4A, B: c1 ~ c3); 单独使用 Ang II 或联合使用 CGRP 和 Ang II 处理的 3 种细胞, 其 RAMP1 和 CRLR 在膜上都有分布 (图 4C, D), 且高表达组细胞中 RAMP1 与 CRLR 在膜上分布 (图 4C, D: c1 ~ c3) 多于正常细胞和空载体转染组细胞, 说明细胞高表达 RAMP1 能促进 CRLR 向膜转移。

3 讨论

本实验结果表明, 高表达 RAMP1 能增强

CGRP 抑制 Ang II 诱导的 A10 细胞增殖作用, 其作用可能是通过增加 CRLR 的膜分布从而增强 CGRP 敏感性来实现。从本实验可以看出, 静止期细胞无论是否高表达 RAMP1, 细胞的存活率均无改变, 但给予 CGRP 和 (或) Ang II 均能促使细胞增殖 (存活率增加), Ang II 对未转染的正常细胞、pCDNA3.1 (+) 质粒转染细胞或 pCDNA3.1 (+)-RAMP1 细胞的增殖作用最强, 但 3 种细胞增殖率无差异; 而在 CGRP 处理组细胞, 高表达 RAMP1 组细胞的存活率却显著高于未转染组和空载体组, 这说明高表达 RAMP1 能增加对 CGRP 的应答作用。

目前已明确 CGRP 受体活化是由 RAMP1 和 CRLR 介导的。CRLR 主要以 3 种形式存在: 即 50 ku, 66 ku 和 110 ku。但是, 本实验只检测到了 CRLR 的 66 ku 和 50 ku 形式, 而并没有检测到 110 ku 的二聚体形式。本实验结果显示, 无论是在正常细胞、pCDNA3.1 (+) 质粒转染细胞或 pCDNA3.1 (+)-RAMP1 细胞, 无论有无 CGRP 和 (或) Ang II 处理,

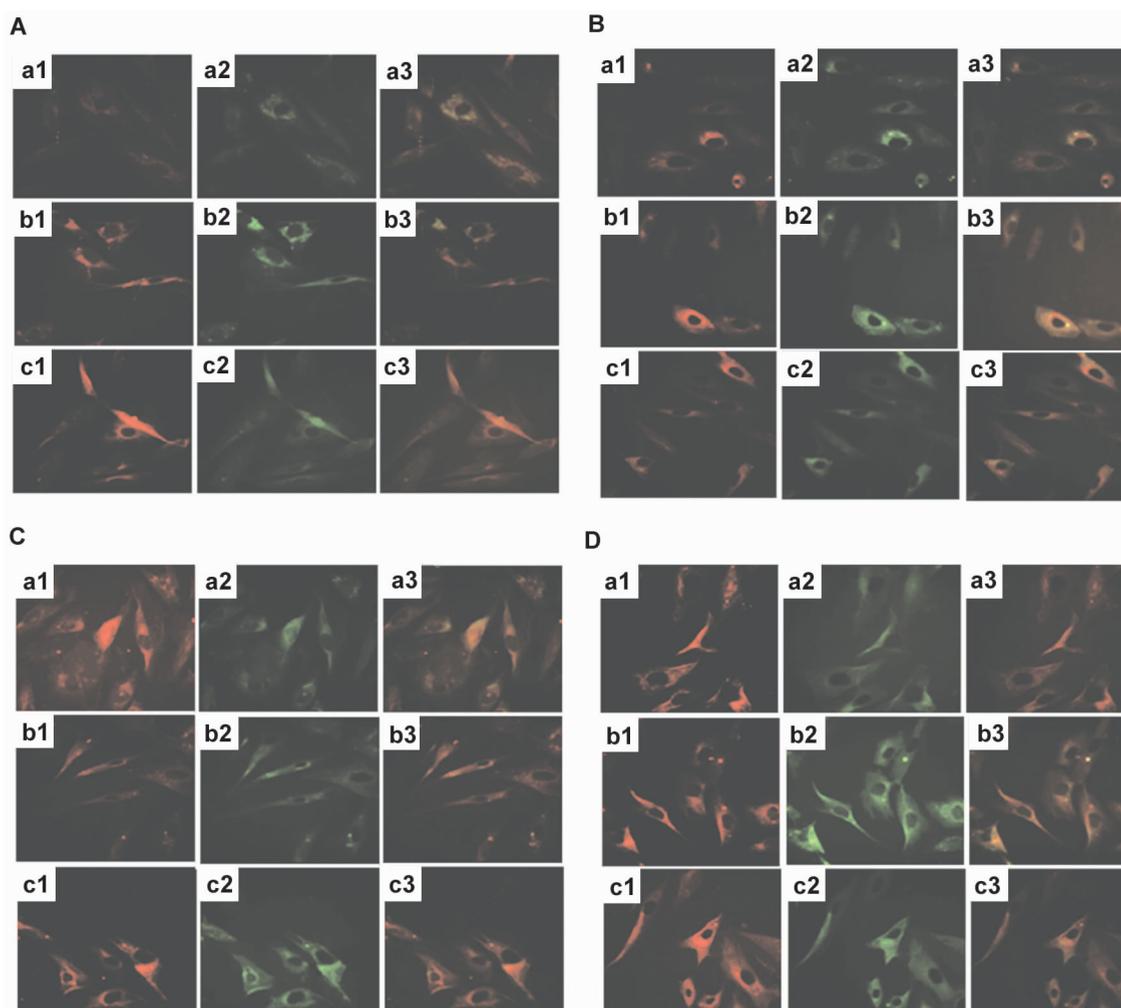


Fig. 4 Distribution of RAMP1 and CRLR on normal A10 cell membrane (a1 - a3), pCDNA3.1 (+) transfected cells (b1 - b3) and pCDNA3.1 (+)-RAMP1 cells (c1 - c3). A: normal control group; B: CGRP treated group; C: AngII treated group; D: CGRP + AngII treated group.

各组细胞的中 CRLR mRNA 水平没有变化,但是经 CGRP 和(或) Ang II 处理的 3 种细胞 CRLR (66 ku) 的蛋白表达水平与未经 CGRP 或 Ang II 处理的细胞却显著增加,说明 CGRP 或 Ang II 能增加细胞 CRLR 的表达。但是 CRLR 蛋白之间的变化并不是因为高表达 RAMP1 所引起的,而可能是由于 CGRP 或 Ang II 引起细胞增殖导致的,这一推测已在其他研究中得到证实^[7]。本实验室前期结果也表明,RAMP1 高表达可延长 CGRP 和 Ang II 诱导的 VSMC 的倍增时间^[8]。对上述现象的解释,Cueille 等^[9]认为可能与 CRLR 基因启动子序列中的一个反式作用元件低氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor-1 alpha, HIF-1 α) 表达增加有关,认为 HIF-1 α 表达增加加强了 CRLR 的转录后调节,进而使 CRLR 蛋白表达水平升高,CRLR 的启动子序列中除了包含 HIF-1 α 的顺式作用元件外,还有 Sp-1、Pit-1 和糖皮质激素结合位点^[10]。所以猜想该实验结果很有可能是 CGRP 或 Ang II 增加了 CRLR 启动子序列中某个调节元件的表达,从而加强了 CRLR 的转录后调节,使 CRLR 蛋白表达水平升高。另外,在本实验中需要说明的是,在联合使用 CGRP 和 Ang II 后,RAMP1 高表达细胞的 CRLR (66 ku) 蛋白表达水平低于未转染的正常细胞和空载体转染细胞;而单独使用 CGRP 处理后,高表达 RAMP1 细胞的 CRLR (66 ku) 蛋白表达水平高于未转染组和空载体组;这表明在静止期细胞,CGRP 能通过增加 CRLR 的表达增加细胞的生存率,而在 CGRP 预处理细胞能抑制细胞的增殖,使单位体积细胞的数量减少,从而高表达 RAMP1 细胞的 CRLR (66 ku) 蛋白总体水平降低,但这并不能说明单个细胞 CRLR 的表达降低。

本实验的免疫荧光结果显示,在无血清和 CGRP 处理因素的条件下,未转染组和空载体组细胞中的 RAMP1 和 CRLR 大多分布于胞核周围的胞浆区域,而高表达组中的这两个蛋白在膜上的分布增加;单独使用 Ang II 或联合使用 CGRP 的 3 种细胞,其两种蛋白都趋向于膜上分布,尤其在高表达组中,这种趋势更加明显。这一结果表明高表达 RAMP1 增强 CGRP 的抗增殖作用可能是通过增加 CRLR 膜分布,从而增强 CGRP 受体对 CGRP 的敏感性起作用。

RAMP1 促进 CRLR 的膜分布的机制还不清楚。已证实,血管平滑肌细胞中存在 CRLR 和 3 种 RAMP^[11],即 RAMP1, RAMP2 和 RAMP3,3 种亚型之间与 CRLR 结合存在竞争。所以当 RAMP1

表达增加时,可能增加了 RAMP1 与 CRLR 结合的竞争力,加强了对 CGRP 的应答作用。除此之外,Héroux 等^[12]用双分子荧光互补和化学发光共振能量转移等技术证实:RAMP1 和 CRLR 都能形成同源二聚体存在与内质网上。但是,只有当一分子的 RAMP1 与 CRLR 的同源二聚体形成异源三聚体时,才能被转运至胞膜上。另外,RAMP1 也存在同源二聚体形式,其功能不清。推测 RAMP1·RAMP1 在调节功能型 CGRP 受体形成方面起重要作用;其次,RAMP1 同源二聚体主要分布于内质网中。研究发现内质网分泌蛋白,如 VIP36 和 ERGIC-53,能以同源二聚体的形式转运其他蛋白,RAMP1 与这些分泌蛋白有着相同的膜拓扑结构^[13-14],提示同源二聚体 RAMP1 可能与转运 CRLR 到细胞膜有关。总之,弄清 RAMP1 调节 CGRP 受体活化机制对发现心血管药物的作用靶点有重要意义。

参考文献:

- [1] Li Y, Fiscus RR, Wu J, Yang L, Wang X. The antiproliferative effects of calcitonin gene-related peptide in different passages of cultured vascular smooth muscle cells [J]. *Neuropeptides*, 1997, **31**(5):503-509.
- [2] Qin XP, Ye F, Hu CP, Liao DF, Deng HW, Li YJ. Effect of calcitonin gene-related peptide on angiotensin II-induced proliferation of rat vascular smooth muscle cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, **488**(1-3):45-49.
- [3] Hilairet S, Bélanger C, Bertrand J, Laperrière A, Foord SM, Bouvier M. Agonist-promoted internalization of a ternary complex between calcitonin receptor-like receptor, receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1), and beta-arrestin [J]. *J Biol Chem*, 2001, **276**(45):42182-42190.
- [4] Sexton PM, Albiston A, Morfis M, Tilakaratne N. Receptor activity modifying proteins [J]. *Cell Signal*, 2001, **13**(2):73-83.
- [5] Zhang Z, Dickerson IM, Russo AF. Calcitonin gene-related peptide receptor activation by receptor activity-modifying protein-1 gene transfer to vascular smooth muscle cells [J]. *Endocrinology*, 2006, **147**(4):1932-1940.
- [6] Sabharwal R, Zhang Z, Lu Y, Abboud FM, Russo AF, Chapleau MW. Receptor activity-modifying protein 1 increases baroreflex sensitivity and attenuates angiotensin-induced hypertension [J]. *Hypertension*, 2010, **55**(3):627-635.
- [7] Li J, Wang DH. Development of angiotensin II-induced hypertension: role of CGRP and its receptor [J]. *J Hypertens*, 2005, **23**(1):113-118.
- [8] Zheng YB, Qin XP, Sun F, Tang JQ, Liao DF. Construction of receptor activity modifying protein gene vector and effect on proliferation of rat VSMC [J]. *J Univ South China (Med Ed)* [南华大学学报(医学版)], 2010, **38**(1):1-5.

- [9] Cueille C, Birot O, Bigard X, Hagner S, Garel JM. Post-transcriptional regulation of CRLR expression during hypoxia[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **326**(1): 23-29.
- [10] Nikitenko LL, Smith DM, Bicknell R, Rees MC. Transcriptional regulation of the CRLR gene in human microvascular endothelial cells by hypoxia [J]. *FASEB J*, 2003, **17**(11):1499-1501.
- [11] Fukai N, Shichiri M, Ozawa N, Matsushita M, Hirata Y. Coexpression of calcitonin receptor-like receptor and receptor activity-modifying protein 2 or 3 mediates the antimigratory effect of adrenomedullin[J]. *Endocrinology*, 2003, **144**(2):447-453.
- [12] Héroux M, Hogue M, Lemieux S, Bouvier M. Functional calcitonin gene-related peptide receptors are formed by the asymmetric assembly of a calcitonin receptor-like receptor homo-oligomer and a monomer of receptor activity-modifying protein-1[J]. *J Biol Chem*, 2007, **282**(43):31610-31620.
- [13] Appenzeller C, Andersson H, Kappeler F, Hauri HP. The lectin ERGIC-53 is a cargo transport receptor for glycoproteins[J]. *Nat Cell Biol*, 1999, **1**(6):330-334.
- [14] Fiedler K, Parton RG, Kellner R, Etzold T, Simons K. VIP36, a novel component of glycolipid rafts and exocytic carrier vesicles in epithelial cells[J]. *EMBO J*, 1994, **13**(7):1729-1740.

Effect of overexpression of RAMP1 on membrane distribution of CRLR induced by angiotensin II and calcitonin gene-related peptide in A10 cell line

SUN Fei^{1,2}, TANG Jiang-qiong¹, ZHENG Yuan-bing¹, QIN You-fa¹, CHEN Lin-xi¹, QIN Xu-ping¹
(1. Institute of Pharmacology and Pharmacy, University of South China, Hengyang 421001, China;
2. Department of Pharmacology, Kunming General Hospital of Chendu Military Command, Kunming 650032, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To investigate the effect of overexpression of receptor activity modifying protein 1 (RAMP1) on distribution of the calcitonin receptor like receptor (CRLR) in vascular smooth muscle cell (VSMC) in order to reveal the antiproliferative mechanism of calcitonin gene-related peptide (CGRP) for VSMC. **METHODS** pCDNA3.1(+)-RAMP1 eukaryon expression vector was successfully constructed by digestion, ligation, transform and transfected to the mouse VSMC cell line A10. After that the normal cells, pCDNA3.1(+) cells and pCDNA3.1(+)-RAMP1 cells were treated by Ang II, CGRP and CGRP + Ang II for 24 h. The proliferation of cell line A10 was determined by MTT assay while mRNA and proteins levels of CRLR and RAMP1 were determined by RT-PCR and Western blotting, respectively. The distribution of RAMP1 and CRLR in cell line A10 was observed by immunofluorescence. **RESULTS** Proliferation was not significant in three kinds of cells treated by 0.1% FBS or Ang II. Proliferation in RAMP1 overexpression cell higher than in normal cells and the pCDNA3.1(+) cells treated by CGRP groups ($P < 0.05$), but lower than treated by CGRP + Ang II ($P < 0.05$). Cells treated with CGRP and Ang II decreased the CRLR proteins expression in RAMP1 overexpression group ($P < 0.05$) while the difference of mRNA levels of CRLR in each group had no significance. However, after treated with 0.1% FBS or CGRP, the RAMP1 and CRLR proteins were distributed into cytoplasm in normal cells and pCDNA3.1(+) cells, but the membrane distribution of RAMP1 and CRLR in pCDNA3.1(+)-RAMP1 cells were higher than that of normal and pCDNA3.1(+) cells treated by Ang II or CGRP + Ang II. **CONCLUSION** Overexpression of RAMP1 significantly enhances the inhibitory effect of CGRP on proliferation of VSMC induced by Ang II. The mechanism may be related to the increased distribution of CRLR in the membrane induced by RAMP1.

Key words: angiotensin II; calcitonin gene-related peptide; calcitonin receptor-like receptor; receptor, activity modifying protein 1

Foundation item: The project supported by National Natural Science Foundation of China (30572192); National Natural Science Foundation of China (81173060)

Corresponding author: QIN Xu-ping, E-mail: qinxp333@sina.com, Tel: (0734)8160781

(收稿日期: 2012-06-14 接受日期: 2012-12-31)

(本文编辑: 乔虹)