

· 论 著 ·

G 蛋白偶联受体激酶 4 突变 A142V 基因对大鼠血管平滑肌细胞 AT₁ 受体的影响*

邓 昆^{1,2}, 刘 莉¹, 陈彩宇¹, 陈 垦¹, 王 微¹, 周永巧¹, 何多芬¹, 曾春雨^{1△}

(1. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所心血管内科/重庆心血管病研究所, 重庆 400042;

2. 77263 部队医院, 云南大理 671000)

摘要:目的 研究人 G 蛋白偶联受体激酶 4 (GRK4) 变异体 A142V 对大鼠血管平滑肌细胞 (VMSCs) 血管紧张素 II 1 型 (AT₁) 受体及其介导的 VMSCs 增殖的影响, 以期了解 GRK4 引起原发性高血压的原因。方法 构建与增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 融合表达的慢病毒载体, 包装慢病毒, 感染 A10 细胞并进行鉴定; 免疫印迹方法检测 AT₁ 受体蛋白变化; 采用分光光度法检测 GRK4 活性, 免疫共沉淀检测 GRK4 和 AT₁ 受体的共连接; [³H] 胸腺嘧啶掺入的方法检测增殖变化。结果 转染 hGRK4 γ A142V 细胞的 GRK4 酶活性显著升高, AT₁ 受体表达显著升高, GRK4 和 AT₁ 受体共连接作用降低, Ang II 刺激细胞增殖效应显著增强。结论 转染 hGRK4 变异体 A142V 增加 GRK4 活性, 引起 AT₁ 受体的功能增强和 VMSCs 的增殖作用增加。

关键词: 高血压; G 蛋白偶联受体激酶 4; 受体, 血管紧张素, 1 型; 血管平滑肌细胞

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.33.001

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)33-3977-03

Regulation of human G-coupled protein kinase 4 A142V on AT₁ receptor in rat vascular smooth muscle cells*

Deng Kun^{1,2}, Liu Li¹, Chen Caiyu¹, Chen Ken¹, Wang Wei¹, Zhou Yongqiao¹, He Duofen¹, Zeng Chunyu^{1△}

(1. Department of Cardiology, Institute of Field Surgery, Daping Hospital, the Third Military Medical University/Chongqing Institute of Cardiology, Chongqing 400042, China; 2. No. 77263 Military Hospital, Dali, Yunnan 671000, China)

Abstract: Objective To study the effect of human G-coupled protein kinase 4 (GRK4) A142V overexpression on angiotensin II 1 type (AT₁) receptor and its-mediated proliferation of rat vascular smooth muscle cells. **Methods** We constructed a lentiviral vector carrying human GRK4-EGFP gene and observed its expression in A10 cells. Expression of AT₁ receptor were determined by immunoblotting, GRK4 activity were checked by spectrophotometry; the linkage between GRK4 and AT₁ receptor were determined by co-immunoprecipitation. [³H] thymidine incorporation was used to detect changes of cell proliferation. **Results** As compared with the control cells, A142V-transfected cells had higher GRK4 activity and higher AT₁ receptor expression; there was linkage between GRK4 and AT₁ receptor, the co-immunoprecipitation levels were lower in A142V cells. The basal levels of VSMC proliferation was higher in A142V cells, Ang II increased VSMC proliferation to a greater extent in A142V cells. **Conclusion** GRK4 A142V, via increasing GRK4 activity, increases AT₁ receptor expression and function in vascular smooth muscle cell proliferation.

Key words: hypertension; G-protein-coupled receptor kinase 4; receptor, angiotensin, type 1; vascular smooth muscle cells

原发性高血压 (essential hypertension, EH) 是冠心病、糖尿病肾病以及脑梗死等的重要危险因素。EH 的发生和遗传因素密切相关, 与 EH 基因连锁的 G 蛋白偶联受体激酶 4 (GRK4) 也因此受到越来越多的关注。GRK4 是 GRKs 的一种, 在 GRKs 的几个亚型中, 只有 GRK4 的改变先于高血压的发生而发生^[1-2], 其变异体 A142V 和 EH 的发生密切相关^[3]。肾素血管紧张素 (RAS) 系统激活参与动脉粥样硬化的形成, 血管紧张素 II (Ang II) 是整个 RAS 系统最重要的因子之一, 血管紧张素 II 1 型 (AT₁) 受体是 Ang II 的主要作用受体, 其介导的血管平滑肌细胞 (VMSCs) 增殖是动脉粥样硬化、术后血管再狭窄共同的病理基础^[4]。既往的研究发现转染 GRK4 γ A142V 基因的小鼠 GRK4 升高的同时血压明显升高^[1], Yatabe 等^[5]发现在肾脏组织 AT₁ 受体伴随 GRK4 的改变而发生改变, 本实验室以往研究发现人和大鼠的血管上有 GRK4 的表达, 作者推测血管组织 GRK4 对 AT₁ 受体也有重要的调控作用。因此, 本研究以转染 hGRK4 γ WT 和 hGRK4 γ A142V 的 A10 细胞为研究对象, 检测这两种细胞中

AT₁ 受体的改变和细胞增殖的变化, 以探索 hGRK4 γ A142V 如何影响 RAS 系统而引起 VSMCs 异常增殖导致 EH 的发生。

1 材料与方 法

1.1 材料 大鼠胸主动脉平滑肌细胞株 (A10), hGRK4 γ WT 和 hGRK4 γ A142V 质粒由美国马里兰大学 Dr Pedro A Jose 实验室惠赠, DMEM 高糖型培养基, FBS 胎牛血清购自美国 GIBCO 公司; Ang II 购自美国 Sigma 公司; GRK4 活性测定试剂盒购自上海杰美公司; 兔抗 AT₁R、兔抗 β -actin 一抗购自美国 Santa Cruz 公司; 磷酸化苏氨酸抗体购自美国 cell signaling technology 公司; [³H] 胸腺嘧啶试剂盒购自北京原子能研究所。

1.2 方 法

1.2.1 慢病毒载体的构建、病毒的生产包装及转染 将 hGRK4 γ WT 质粒、hGRK4 γ A142V 质粒和绿色荧光蛋白 (EGFP) 基因克隆至慢病毒表达载体, 利用 lipofectamineTM 2000 脂质体转染试剂将慢病毒包装质粒混合物与包含 hGRK4 γ WT、

hGRK4 γ A142V 的表达载体共转染至病毒生产细胞系 293TN, 48 h 后收集上清液, 使用 0.45 μ m 滤膜过滤上清液, 由此包装、生产出携带 GRK4 γ WT、GRK4 γ A142V 基因的重组慢病毒 (Lv-GRK4 γ WT-EGFP 和 Lv-GRK4 γ A142V-EGFP), 收集上清液, 以 MOI 值为 10 感染 A10 细胞。

1.2.2 荧光共聚焦显微镜下观察 EGFP 表达 hGRK4 γ WT 和 hGRK4 γ A142V 细胞均匀接种于 6 孔培养板中 (内置盖玻片), 置 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱中培养至第 3 天, 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗涤 3 次, 取细胞爬片置荧光共聚焦显微镜下观察。

1.2.3 免疫印迹检测 AT₁ 受体 常规方法提取细胞总蛋白, 采用考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度。将 50 μ g 变性好的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 利用半干转移法将蛋白转移至硝酸纤维素膜, 封闭 1 h, 与 GRK4 抗体, AT₁ 受体抗体 (1:400) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次 \times 10 min, 羊抗兔 IgG (1:5 000) 室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次 \times 10 min, 利用增强化学发光法, 经 X 线片曝光、显影、定影。结果经光密度面积分析, 与内参照 β -actin 产物条带的比值作为相对浓度。

1.2.4 分光光度法检测 GRK4 活性 提取细胞总蛋白, 采用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。65 μ L 缓冲液, 10 μ L 酶促液, 10 μ L 反应液, 10 μ L 底物液于 30 $^{\circ}$ C 培养箱里静置 3 min, 加入 50 μ g 蛋白, 阴性对照加入 5 μ L 阴性液作为背景对照, 用分光光度法测定, 以每微克总蛋白中 GRK4 每分钟 NADH 转化为 NAD 的量表示。

1.2.5 [³H] 胸腺嘧啶的掺入试验 将 hGRK4 γ WT 和 hGRK4 γ A142V 细胞制成单细胞悬液, 计数后将细胞浓度调整为 3×10^4 个/mL, 按 1 mL/孔接种于 24 孔培养板, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h, 然后换等量的无血清培养液培养 2 h, 然后向每孔中加入 [³H] 胸腺嘧啶 0.3 mCi 继续培养 6 h, 吸去含游离 [³H] 胸腺嘧啶的培养液, 用 0.25% 胰酶消化细胞, 真空抽滤法将细胞收集于玻璃纤维滤膜, 依次用 PBS、10% 三氯乙酸及无水乙醇冲洗, 抽干后于 80 $^{\circ}$ C、30 min 烘干, 置液闪杯中, 加入 5 mL 液体闪烁液, 静置平衡过夜, 在液闪仪上计数每分钟的值, 以 3×10^4 细胞表示 [³H] 胸腺嘧啶的掺入率^[4,6]。

1.3 统计学处理 采用 SPSS15.0 软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间采用 *t* 检验, 两组以上的比较采用 ANOVA 法进行统计分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hGRK4 γ WT 和 hGRK4 γ A142V 转基因细胞的建立及蛋白鉴定 构建了野生型 GRK4 γ wild-IRES2-EGFP 表达载体和突变体 GRK4A142V-IRES2-EGFP 表达载体, 慢病毒以 MOI 值为 10 感染 A10 细胞。荧光显微镜下观察, 两种细胞均可见 90% 细胞细胞质内表达 EGFP, 呈绿色荧光, 提示病毒成功转染细胞, 携带基因的蛋白表达。见图 1。

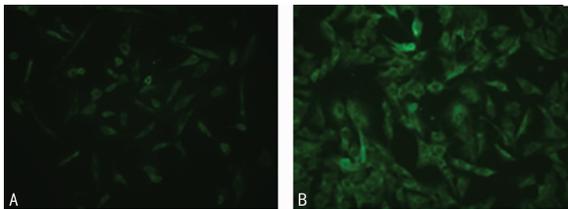


图 1 荧光显微镜下观察转染细胞的绿色荧光 ($\times 200$)
A: A10 细胞慢病毒转染 hGRK4 γ WT 质粒; B: A10 细胞慢病毒转染 hGRK4 γ A142V 质粒。

2.2 hGRK4 γ A142V 转基因细胞 GRK4 活性的改变 结果显

示, hGRK4 γ A142V 细胞的 GRK4 酶活性显著升高。见图 2。

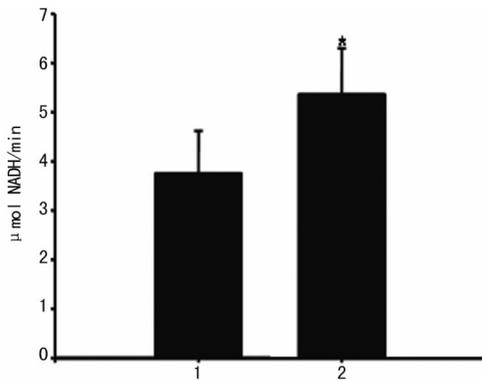


图 2 hGRK4 γ A142V 转染 A10 细胞 GRK4 活性的改变
1: hGRK4 γ WT; 2: hGRK4 γ A142V; *: $P < 0.05$, 与 hGRK4 γ WT 比较; 实验重复 3 次。

2.3 hGRK4 γ A142V 转基因细胞 AT₁ 受体的改变 免疫印迹显示 A10 细胞转染 hGRK4 γ A142V 基因后, AT₁ 受体表达显著升高。见图 3。

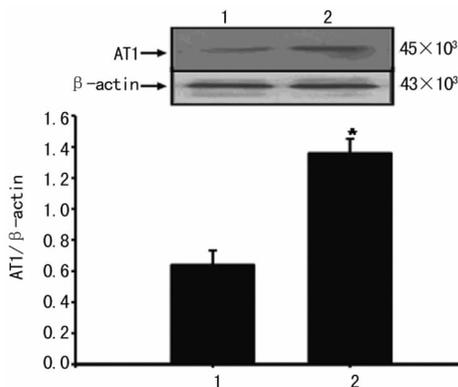


图 3 hGRK4 γ A142V 转染 A10 细胞 AT₁ 受体表达的改变
1: hGRK4 γ WT; 2: hGRK4 γ A142V; *: $P < 0.05$, 与 hGRK4 γ WT 比较; 实验重复 5 次。

2.4 hGRK4 γ A142V 转基因细胞 GRK4 和 AT₁ 受体共连接的变化 免疫沉淀显示, GRK4 和 AT₁ 受体间存在共连接作用, hGRK4 γ A142V 转基因细胞 GRK4 和 AT₁ 受体的共连接作用明显减弱, 这种共连接的变化可能参与了 GRK4 对 AT₁ 受体的调节作用。见图 4。

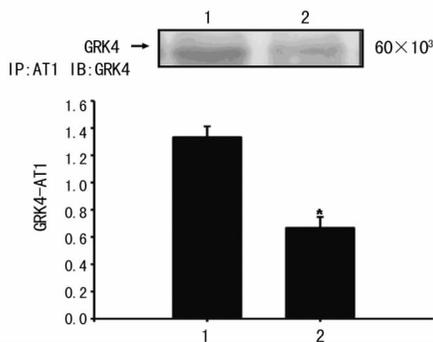
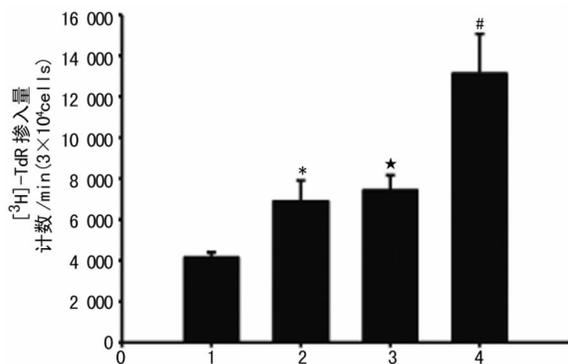


图 4 hGRK4 γ A142V 转基因细胞 GRK4 和 AT₁ 共连接的变化
1: hGRK4 γ WT; 2: hGRK4 γ A142V; *: $P < 0.05$, 与 hGRK4 γ WT 比较; 实验重复 5 次。

2.5 Ang II 刺激转染 hGRK4 γ A142V 转基因细胞增殖效应的

改变 采用 [^3H] 胸腺嘧啶掺入法测定细胞增殖, 结果显示 Ang II 刺激 hGRK4 γ A142V 细胞引起细胞增殖幅度明显高于刺激 hGRK4 γ WT 细胞, 见图 5。



1: hGRK4 γ WT; 2: hGRK4 γ WT + Ang II; 3: hGRK4 γ A142V; 4: hGRK4 γ A142V + Ang II; #: $P < 0.05$, 与 3 组比较; *: $P < 0.05$, 与 1 组比较; 实验重复 3 次。

图 5 Ang II 刺激 hGRK4 γ A142V 转基因细胞引起增殖效应改变

3 讨论

RAS 在调节血管张力及钠水平衡方面发挥了重要作用。Ang II 作为 RAS 系统中最主要的生物活性物质, 其与 AT₁ 受体结合后介导了细胞增殖、肾近曲小管细胞尿钠转运, 与 AT₂ 受体结合则发挥相反的作用。高血压状态下 AT₁ 受体的功能增加, 其发生的原因目前尚不明了。GRKs 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶, 共 7 个亚型, 其主要生理功能是磷酸化 GPCR, 使 GPCR 介导的信号通路失敏, 在这 7 个亚型中只有 GRK4 的改变先于高血压的发生。GRK4 基因所在的染色体部位 (4p16.3) 与 EH 的发生关系密切, 其基因变异体和 EH 的发生密切相关^[6]。人的 GRK4 有 α 、 β 、 γ 、 δ 4 种异构体, γ 异构体的 3 个突变位点 A142V、A486V、R65L 可以引起 GRK4 活性升高和 EH 密切相关, 所以 γ 亚基成为本研究关注的焦点^[7]。Jose 等^[8]发现在 3 个突变体中只有 A142V 转基因小鼠在正常盐饮食的情况下可以发生高血压, 他们还发现在携带 A142V 突变基因的日本高血压患者中, 服用血管紧张素受体阻断剂 (ARB), 血压出现显著性降低, A142V 转基因小鼠服用 ARB 后血压恢复正常。这提示 GRK4 γ A142V 突变引起的血压升高和 RAS 系统及 AT₁ 受体有密切联系。

既往研究发现人的 GRK4 存在于睾丸、肾脏和脑组织中^[9], 而本实验室首次发现 VSMCs 中有 GRK4 表达。在肾脏组织 GRK4 和 AT₁ 受体有密切关系, 那么在血管组织中, GRK4 是否也调节 AT₁ 受体的表达及其介导的平滑肌细胞增殖。本研究转染 hGRK4 γ A142V 到 A10 细胞中, 观察到 GRK4 活性显著升高, 这种现象证实 hGRK4 γ A142V 可以使 GRK4 的活性增强。AT₁ 受体作为 GPCRs 的一种, Zheng 等^[10]发现 hGRK4 γ A142V 转基因小鼠肾脏 AT₁ 受体表达升高, 在血管中, GRK4 是否具有相同的效应, 本研究结果显示 hGRK4 γ A142V 细胞中 AT₁ 受体的表达显著升高。推测这种活性的增强引起的 AT₁ 受体表达的改变参与了高血压的发生、发展。作者还发现转染 hGRK4 γ A142V 可导致 GRK4 和 AT₁ 受体的共连接降低, 推测 GRK4 和 AT₁ 受体的共连接程度减少导致 GRK4 和 AT₁ 受体偶联减少, 而这种偶联的减少可能与 AT₁ 受体磷酸化的改变相关。

据以往报道, AT₁ 受体具有自发活性, 当 Ang II 刺激时 AT₁ 受体的活性明显增强^[11-12], 在血管中 AT₁ 受体介导的 VSMCs 的异常增殖是血管壁增厚和硬化的主要病理、生理基

础^[13]。本研究结果显示, Ang II 刺激后转染 hGRK4 γ A142V 细胞的增殖效应明显高于转染 hGRK4 γ WT 细胞, 在没有 Ang II 刺激的状态下转染 hGRK4 γ A142V 细胞的增殖效应仍然明显高于转染 hGRK4 γ WT 细胞。

综上所述, hGRK4 γ A142V 通过影响的 VSMCs AT₁ 受体表达, 从而影响 AT₁ 受体介导的 VSMCs 增殖, 在心血管系统疾病的病理、生理过程中具有重要意义。

参考文献:

- Zeng C, Eisner GM, Felder RA, et al. Dopamine receptor and hypertension[J]. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*, 2005, 3(1): 69-77.
- Metaye T, Gibelin H, Perdris R, et al. Pathophysiological roles of G-protein-coupled receptor kinases[J]. *Cell Signalling*, 2005, 17(8): 917-928.
- Zeng CY, Wang Z, Yang ZW, et al. G protein kinase 4gamma A142V overexpression induced hypertension by downregulating D1 receptors in transgenic mice[J]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*, 2006, 34(5): 411-414.
- Nishimura J, Bi D, Kanaide H. Dependence of proliferating differentiated vascular smooth muscle contraction on Rho-Rho kinase system[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2006, 16(4): 124-128.
- Yatabe J, Sanada H, Midorikawa S, et al. Effects of decreased renal cortical expression of G protein-coupled receptor kinase 4 and angiotensin type 1 receptors in rats[J]. *Hypertens Res*, 2008, 31(7): 1455-1464.
- Zeng C, Sanada H, Watanabe H, et al. Functional genomics of the dopaminergic system in hypertension[J]. *Physiol Genomics*, 2004, 19(3): 233-246.
- Premont RT, Macrae AD, Aparicio SA, et al. The GRK4 subfamily of G protein coupled receptor kinases; alternative splicing, gene organization and sequence conservation[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(784): 29381-29389.
- Jose PA, Soares-da-Silva P, Eisner GM, et al. Dopamine and G protein-coupled receptor kinase 4 in the kidney: role in blood pressure regulation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1802(12): 1259-1267.
- Premont RT, Macrae AD, Stoffel RH, et al. Characterization of the G protein-coupled receptor kinase GRK4. Identification of four splice variants[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(11): 6403-6410.
- Zheng W, Ines A, Laureano DA, et al. The elevated blood pressure of human GRK4 γ A142V transgenic mice is not associated with increased ROS production[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292(5): H2083-H2092.
- Kai H, Griendling KK, Lassègue B, et al. Agonist-induced phosphorylation of the vascular type 1 angiotensin II receptor[J]. *Hypertension*, 1994, 24(4): 523-527.
- Miura S, Saku K, Karnik SS. Molecular analysis of the structure and function of the angiotensin II type 1 receptor[J]. *Hypertens Res*, 2003, 26(12): 937-943.
- Takemoto M, Egashira K. Vascular remodeling and angiotensin II[J]. *Nihon Rinsho*, 1999, 57(5): 1158-1163.