

川芎嗪抑制血管平滑肌细胞增殖及胶原合成的作用机制研究

华军益¹ 何煜舟² 蒋旭宏² 叶 武¹ 杨美雅²

摘要 **目的** 研究川芎嗪抑制血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)增殖的作用机制,为中药有效预防血管再狭窄提供实验依据。**方法** 体外培养大鼠胸主动脉 VSMCs,分为:阴性对照组、血管紧张素 II (Ang II)组(Ang II 10^{-6} mol/L)、低剂量组(川芎嗪 20 μ mol/L 加 Ang II)、中剂量组(川芎嗪 40 μ mol/L 加 Ang II)及高剂量组(川芎嗪 80 μ mol/L 加 Ang II)。MTT 法检测细胞增殖率;Western blot 和实时荧光定量 PCR 法分别检测 Wnt 通路相关蛋白 Wnt4、 β -catenin、Dvl-1、CyclinD1 及胶原 I (Col I)、胶原 III (Col III)蛋白、基因表达。**结果** 与阴性对照组比较,Ang II 组细胞增殖率明显升高($P < 0.05$)。与 Ang II 组比较,中、高剂量组细胞增殖率明显降低($P < 0.05$)。与阴性对照组比较,Ang II 组 Wnt4、 β -catenin、Dvl-1、CyclinD1、Col I、Col III 蛋白和 mRNA 表达均明显上调($P < 0.05$)。与 Ang II 组比较,中、高剂量组 Wnt4、 β -catenin、Dvl-1、CyclinD1、Col I、Col III 蛋白和 mRNA 表达均明显下调($P < 0.05$)。上述指标在低、中、高剂量组均具有浓度依赖性。**结论** 川芎嗪通过下调 Wnt 信号通路在一定程度上抑制了 Ang II 诱导的 VSMCs 的增殖及胶原分泌。

关键词 经皮冠状动脉介入;再狭窄;血管平滑肌细胞;增殖;川芎嗪

Effect of Tetramethylpyrazine on the Proliferation and Collagen Synthesis of Vascular Smooth Muscle Cells HUA Jun-yi¹, HE Yu-zhou², JIANG Xu-hong², YE Wu¹, and YANG Mei-ya² 1 Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou (310006), China; 2 Department of Emergency, First Affiliated Hospital of Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou (310006), China

ABSTRACT **Objective** To study the action mechanism of tetramethylpyrazine (TMP) on the proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs), thus providing experimental evidence for Chinese medicating to effectively prevent restenosis. **Methods** Rats' thoracic aorta VSMCs *in vitro* cultured (cell line A7r5) were divided into five groups, i.e., the negative control group, the angiotensin II (Ang II, 10^{-6} mol/L) group, the low dose TMP (20 μ mol/L) plus Ang II group, the middle dose TMP (40 μ mol/L) plus Ang II group, the high dose TMP (80 μ mol/L) plus Ang II group. The proliferation ratio was detected by MTT. Gene and protein expressions of Wnt4, Dvl-1, β -catenin, CyclinD1, and collagen I and III were detected with real-time fluorescent quantitative PCR and Western blot respectively. **Results** Compared with the negative control group, the proliferation ratio of VSMCs obviously increased in the Ang II group ($P < 0.05$). Compared with the Ang II group, the proliferation ratio of VSMCs obviously decreased in the middle dose TMP plus Ang II group and the high dose TMP plus Ang II group ($P < 0.05$). Compared with the negative control group, gene and protein expressions of Wnt4, Dvl-1, β -catenin, CyclinD1, Col I, and Col III were obviously up-regulated in the Ang II group ($P < 0.05$). Compared with the Ang II group, mRNA and protein expressions of Wnt4, Dvl-1, β -catenin, CyclinD1, Col I, and Col III were obviously down-regulated in the middle dose TMP plus Ang II group and the high dose TMP plus Ang II group ($P < 0.05$). The aforesaid indices were dose-dependent in the low, middle, and high dose TMP

基金项目:浙江省中医药科学研究基金计划资助项目(No. 2011ZA027);浙江省医药卫生科技计划项目(No. 2010KYA155)

作者单位:1. 浙江中医药大学附属第一医院心内科(杭州 310006);2. 浙江中医药大学附属第一医院急诊科(杭州 310006)

通讯作者:何煜舟, Tel: 0571-87390946, E-mail: huajunyi1973@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2013.09.1226

plus Ang II groups. Conclusion TMP inhibited Ang II induced proliferation and collagen secretion of VSMCs through down-regulating Wnt signal pathway.

KEYWORDS percutaneous coronary intervention; restenosis; vascular smooth muscle cell; proliferation; tetramethylpyrazine

血管再狭窄是影响经皮冠脉介入(PCI)疗效的主要因素,深入研究血管再狭窄的基因调控通路及影响因素对解决这一临床难题具有重要意义。近年来,国外有研究发现 Wnt 信号分子参与调节血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)增殖^[1]。笔者前期的研究也证实了血管损伤后再狭窄过程中 Wnt 信号通路起了重要作用,其上调可以促进 VSMCs 增殖和胶原分泌^[2]。本实验探讨中药单体川芎嗪防治血管再狭窄的分子机制和寻求有效作用靶点,将为深入研发有效防治血管再狭窄的中药活性成分开辟新途径。

材料与方法

1 细胞来源 大鼠胸主动脉 VSMCs(A7r5),购于中国科学院细胞库,批号:GNR 7,由浙江大学附属邵逸夫医院实验室馈赠。

2 试剂及仪器 血管紧张素Ⅱ(AngⅡ,纯度≥93%,美国 Sigma, A9525);川芎嗪(纯度≥98%,南京泽朗植提技术有限公司, ZL20101216-A6B);DMEM 低糖培养基(杭州科易生物有限公司);新生牛血清(杭州四季青有限公司);各引物合成(上海生工生物工程有限公司);四甲基偶氮唑蓝 MTT(美国 AMRESCO, 298-93-1);十二烷基磺酸钠(SDS,美国 AMRESCO, 151-21-3); β -actin antibody[美国 Sigma, A1978(AC-15)]; β -catenin antibody(Cell Signaling Technology, 美国, 1247-1);Dvl-1 antibody(美国 Santa Cruz, bs-0598R);Wnt4 antibody(美国 Proteintech Group, bs-6134R);Cyclin D1 antibody(Cell Signaling Technology, 美国, 2292);HRP 标记的抗鼠二抗、抗兔二抗(Jackson Immuno Research, 美国, 115-035-003, 111-035-003);Col1a 1 抗体(美国 Santa Cruz, sc-8784);Col3a1 抗体(美国 Santa Cruz, sc-8781);CO₂ 培养箱(Thermo Forma, 美国);荧光定量仪(7900HT, 美国 Applied Biosystems)。

3 方法

3.1 细胞培养 将冻存的 VSMCs 从液氮罐中取出后迅速置于 37 ℃ 水浴融化, 800 r/min 离心 5 min, 去上清, 吸取适量配好的含 10% 小牛血清的 DMEM 低糖培养基, 混匀。将细胞悬液移入 25 cm²

培养瓶, 37 ℃ 5% CO₂、饱和湿度培养箱内静置培养, 次日换液, 细胞长满后按 1:2 传代。取 3~5 代生长状态好的 VSMCs 进行实验。待细胞长至 60%~70% 融合时, 进行分组, 共分为 5 组: 阴性对照组、Ang II 组及低、中、高剂量组。Ang II 组加入 10⁻⁶ mol/L Ang II 刺激 24 h; 低、中、高剂量组在 Ang II 刺激前, 细胞先分别予 20、40、80 μ mol/L 川芎嗪预培养 24 h; 阴性对照组为正常培养的 VSMCs, 不加干预药物。所有实验至少重复 3 次。使用倒置相差显微镜观察各组细胞形态。

3.2 MTT 法检测细胞增殖活度 取 VSMCs 贴壁细胞, 按照细胞传代的操作对其进行消化、制备细胞悬液, 并对细胞进行计数, 根据接种量稀释细胞悬液, 取 96 孔细胞培养板, 每孔中加 100 μ L 含 0.8 $\times$ 10⁴~1.0 $\times$ 10⁴ 个 VSMCs 的完全培养液(共 5 个实验组, 每组设 3 个复孔), 将 96 孔板置于 37 ℃ 5% CO₂ 培养箱中培养, 细胞长成单层后, 按上述分组处理细胞, 并置 37 ℃ 5% CO₂ 培养箱中, 继续培养 24 h。取出 96 孔板, 吸出孔中的培养液, 用 PBS 液漂洗细胞表面, 弃漂洗液; 每孔加入 DMEM 低糖培养液 200 μ L, MTT 液(5 mg/mL)20 μ L, 继续培养 4 h。倒掉原培养液后, 加入 DMSO(150 μ L/孔), 摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解呈紫红色溶液后测量。将 96 孔板置于酶标仪上, 在 490 nm 波长下检测各孔吸光值(OD 值), 计算各组均值。计算细胞增殖率。细胞增殖率(%)=(处理组 OD 值-空白组 OD 值)/空白组 OD 值 $\times$ 100%。

3.3 Western blot 检测 Wnt4、 β -catenin、Dvl-1、CyclinD1、胶原 I(Col I)及胶原 III(Col III)蛋白表达 取 VSMCs 贴壁细胞, 消化、制备细胞悬液并对细胞进行计数, 取细胞培养 dish, 每个 dish 中加 3 mL 含 25 $\times$ 10⁴~30 $\times$ 10⁴ 个 VSMCs 的完全培养液(5 个实验组), 将 dish 置于 37 ℃ 5% CO₂ 培养箱中培养, 继续培养 24 h。分别收集细胞, 冷 PBS 洗 2 次, 加入预冷细胞裂解液裂解细胞, 提取物冰上孵育 30 min, 12 000 r/min, 4 ℃ 离心 5 min, 上清液中的蛋白浓度经 DC 蛋白定量法定量。上样前将蛋白样品按 1:1 比例加入 2 $\times$ SDS 上样缓冲液, 100 ℃ 煮沸 5~10 min 使蛋白变性, 立即放冰上。每组取 30 μ g 蛋白

进行 SDS-PAGE 电泳分离,电泳时先清洗玻璃板,两面都擦洗过后用自来水冲洗,再用蒸馏水冲洗干净后晾干,然后进行配胶和灌胶。先配分离胶,灌胶,胶上加 1 mL 异丙醇去除气泡及加速凝胶,等分离胶凝固后再配浓缩胶,灌胶,插上梳子,胶凝固好后上样,再进行电泳,电泳电压浓缩胶 60 ~ 80 V,分离胶 90 ~ 120 V,时间 2 ~ 4 h。溴酚蓝到达胶底端时,终止电泳,转移到硝酸纤维素膜上,4 ℃ 层析柜中 30 mA 转膜过夜,或 250 mA 转膜 2.5 h,5% 脱脂奶粉的 TBST 4 ℃ 封闭 1 ~ 2 h,加入一抗(鼠抗鼠 β -actin 单抗,1:1 000;兔抗鼠 Wnt4 多抗,1:500;鼠抗鼠 β -catenin 单抗,1:1 000;鼠抗鼠 Dvl-1 单抗,1:200;兔抗鼠 Cyclin D1 单抗,1:1 000;兔抗鼠 ColI 多抗,1:800;兔抗鼠 ColIII 多抗,1:1 000) 4 ℃ 过夜,隔日 1 $\times$ TBST 洗膜 10 min $\times$ 3 次,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG、山羊抗小鼠 IgG 室温孵育 1 h,常规洗膜,化学发光试剂显色,蛋白印记检测系统摄片,凝胶图像处理系统分析。

3.4 实时荧光定量 PCR 检测 Wnt4、 β -catenin、Dvl-1、CyclinD1、Col I 及 Col III mRNA 表达 取 VSMCs 贴壁细胞,消化、制备细胞悬液并计数,取 6 孔细胞培养板,每孔加 2 mL 含 $15 \times 10^4 \sim 20 \times 10^4$ 个 VSMCs 的完全培养液(5 个实验组),将 6 孔细胞培养板置于 37 ℃ 5%CO₂ 培养箱中培养。将不同实验组的细胞按说明书步骤用 Trizol 法提取总 RNA。根据逆转录所需 RNA 量,将各 RNA 样品用 DEPC 水调至相同浓度,然后取相同体积进行逆转录反应,以尽量避免加样误差。逆转录方法参照逆转录试剂盒说明书,总反应体系 10 μ L 中包含逆转录酶、oligo dT 引物、6 聚体随机引物各 0.5 μ L、5 $\times$ 缓冲液 2 μ L 以及 DEPC 水 1.5 μ L 和 RNA 模板 5 μ L。反应条件:37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s。然后根据荧光定量试剂盒进行荧光定量,结果用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析,统计相对表达量(RQ)。荧光定量反应体系 10 μ L 中包含 2SYBR Premix Ex Taq 5 μ L、PCR Forward Primer(10 μ mol/L)0.4 μ L、PCR Forward Primer(10 μ mol/L) 0.4 μ L、Total RNA 2 μ L、dH₂O 2.2 μ L。相关引物序列见表 1,荧光定量扩增程序:stage1 预变性 95 ℃ 30 s,1 个循环;stage2 PCR 反应:95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,40 个循环;stage3 Dissociation Curve:95 ℃ 15 s,60 ℃ 15 s,95 ℃ 15 s。

3.5 统计学方法 应用 SPSS 13.0 统计处理软件分析,常规进行方差齐性检验、正态性检验。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。方差齐者,多组资料之间的比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 相关引物序列

引物名称	序列(5' ~ 3')
内参 β -actin	上游-TGCTGTCCCTGTATGCCTCTG
	下游-GAGGTCCTTACGGATGTCAACG
Wnt4	上游-TCAGGTTGGCCACGCACTAAAGGAGAA
	下游-AGTCTGGACTTGGCTCCAGGTACACC
β -catenin	上游-GCTGACCTGACGGAGTTGGA
	下游-GCTACTTGCTCTTGCGTGAA
Dvl-1	上游-CCTTCCATCCAAATGTTGC
	下游-GTGACTGACCATAGACTCTGTGC
Col I	上游-TACAGCACGCTTGTTGGATG
	下游-TTGAGTTTGGGTTGTTGGTC
Col III	上游-TGATGGGATCCAATGAGGGAGA
	下游-GAGTCTCATGGCCTTGCGTGTTT
CyclinD1	上游-GTTCTCGGCCAGCACCAT
	下游-GCAGCATACAATCTCGCACC

结 果

1 各组 VSMCs 形态学比较(图 1) 在倒置相差显微镜下可观察到大鼠 VSMCs 呈长梭形、放射性生长,部分区域细胞重叠生长,部分区域高低起伏呈“峰、谷”状生长。传代后 80% ~ 90% 的细胞可重新贴壁生长。培养基加入 Ang II 后,细胞生长加速,中、高剂量川芎嗪可以使 VSMCs 生长减缓,形态略变大。

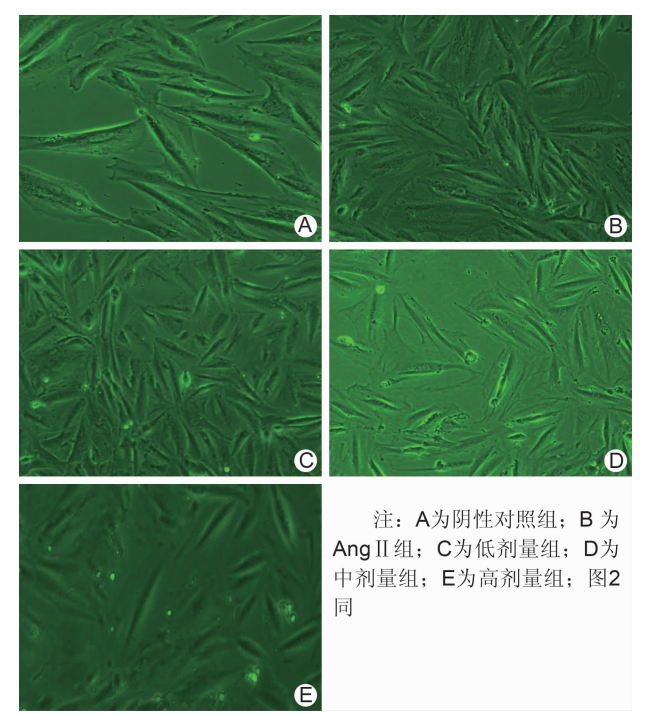


图 1 各组 VSMCs 形态学比较 ($\times 100$)

2 各组细胞增殖率比较(表 2) 与阴性对照组比较,Ang II 组细胞增殖率明显升高($P < 0.05$)。与 Ang II 组比较,中、高剂量组细胞增殖率明显降低($P < 0.05$),且随川芎嗪浓度增加,抑制作用增强。高剂量组细胞增殖率明显低于低剂量组($P < 0.01$)。

表 2 各组细胞增殖率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	OD 值	细胞增殖率 (%)
阴性对照	3	0.227 8 ± 0.003 4	—
Ang II	3	0.330 4 ± 0.012 3 *	45.04 *
低剂量	3	0.329 2 ± 0.007 1	44.51
中剂量	3	0.298 2 ± 0.002 3 [△]	30.90 [△]
高剂量	3	0.271 4 ± 0.040 1 ^{△△}	19.14 ^{△△}

注:与阴性对照组比较,* $P < 0.05$;与 Ang II 组比较,[△] $P < 0.05$;与低剂量组比较,^{△△} $P < 0.01$

3 各组 Wnt4、β-catenin、Dvl-1、CyclinD1、Col I 及 Col III 蛋白表达比较(图 2、3) 与阴性对照组比

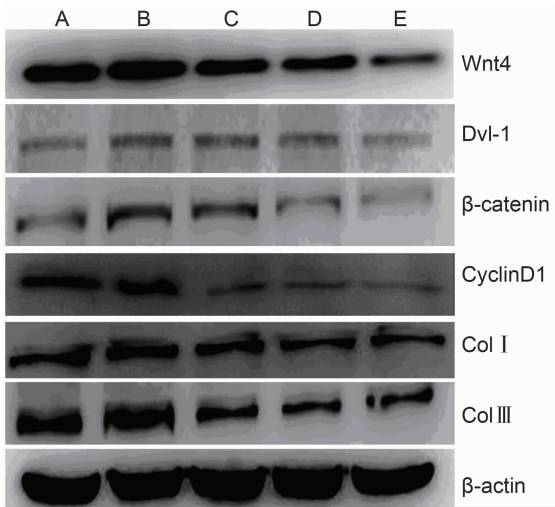
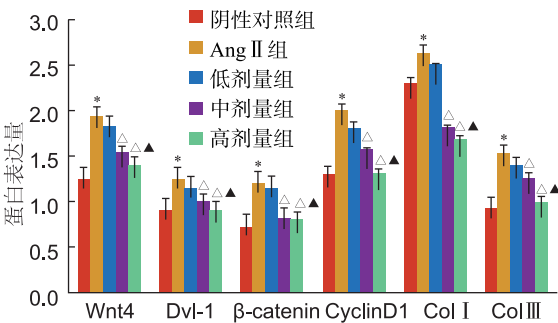


图 2 各组 Wnt 通路相关蛋白及胶原蛋白表达条带



注:与阴性对照组比较,* $P < 0.05$;与 Ang II 组比较,[△] $P < 0.05$;与低剂量组比较,^{△△} $P < 0.05$

图 3 各组 Wnt 信号通路相关蛋白及胶原蛋白与 β-actin 蛋白灰度比值比较

表 3 各组 Wnt4、β-catenin、Dvl-1、CyclinD1、Col I 及 Col III 基因相对表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Wnt4	Dvl-1	β-catenin	CyclinD1	Col I	Col III
阴性对照	3	1	1	1	1	1	1
Ang II	3	1.450 0 ± 0.006 2 *	1.323 4 ± 0.001 7 *	1.388 4 ± 0.030 2 *	1.307 ± 0.013 7 *	1.315 0 ± 0.001 7 *	1.302 0 ± 0.019 0 *
低剂量	3	1.433 1 ± 0.001 2	1.311 0 ± 0.013 0	1.363 2 ± 0.019 1	1.298 ± 0.008 3	1.297 0 ± 0.008 0	1.281 0 ± 0.002 2
中剂量	3	1.377 6 ± 0.008 2 [△]	1.287 7 ± 0.001 8 [△]	1.313 6 ± 0.027 2 [△]	1.274 ± 0.102 6 [△]	1.282 5 ± 0.003 4 [△]	1.265 8 ± 0.001 9 [△]
高剂量	3	1.344 8 ± 0.005 1 [△]	1.277 1 ± 0.007 2 [△]	1.278 1 ± 0.003 4 [△]	1.224 ± 0.010 1 [△]	1.273 5 ± 0.001 6 [△]	1.250 0 ± 0.003 0 [△]

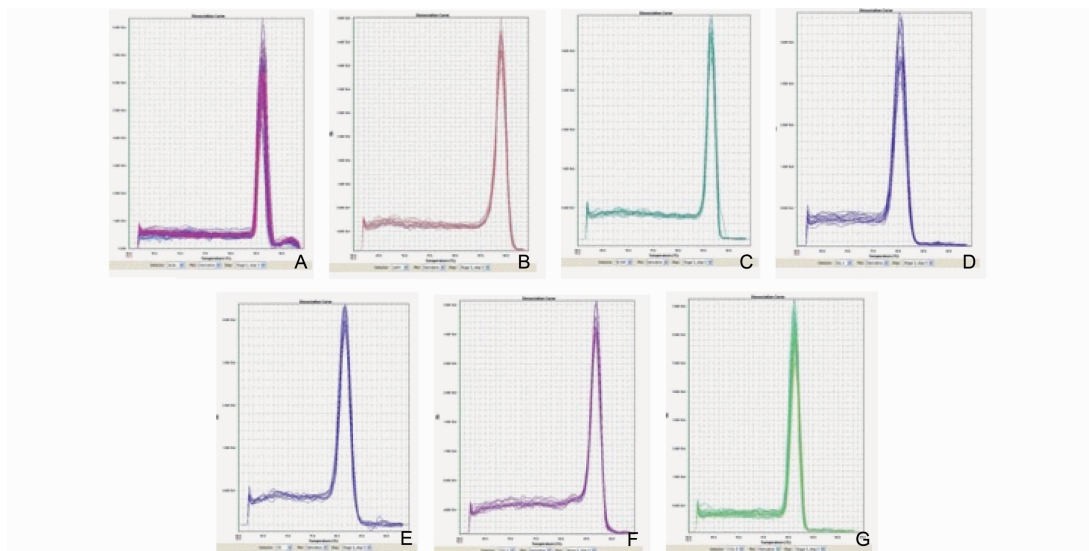
注:与阴性对照组比较,* $P < 0.05$;与 Ang II 组比较,[△] $P < 0.05$

较,Ang II 组 Wnt4、β-catenin、Dvl-1、CyclinD1、Col I 及 Col III 蛋白表达明显上调($P < 0.05$)。与 Ang II 组比较,中、高剂量组 Wnt4、β-catenin、Dvl-1、CyclinD1、Col I 及 Col III 蛋白表达明显下调($P < 0.05$),且随川芎嗪浓度增加,Wnt 信号蛋白和 Col I、Col III 蛋白表达有进一步下调趋势。高剂量组上述蛋白表达明显低于低剂量组($P < 0.05$)。

4 各组 Wnt4、β-catenin、Dvl-1、CyclinD1、Col I 及 Col III mRNA 表达比较(表 3,图 4、5) 与阴性对照组比较,Ang II 组 VSMCs Wnt4、β-catenin、Dvl-1、CyclinD1、Col I、Col III mRNA 表达明显增高($P < 0.05$)。与 Ang II 组比较,中、高剂量组 VSMCs Wnt4、β-catenin、Dvl-1、CyclinD1、Col I 及 Col III mRNA 表达明显降低($P < 0.05$)。用 Real-time PCR 方法检测 Wnt4、Dvl-1、β-catenin、CyclinD1、Col I、Col III mRNA 表达,结果示各个引物扩增具有单峰的融解曲线图(图 4),说明这些引物的荧光定量 PCR 扩增具有较强的特异性。每个样品扩增曲线(图 5)用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析统计相对表达值。

讨 论

PCI 术后再狭窄一直是冠心病治疗的一大难题。再狭窄的发生机制尚未明确,目前认为 VSMCs 异常增殖是 PCI 术后再狭窄的一个主要病理改变^[3],即血管内膜的增厚主要源于中膜平滑肌细胞肥大、增生、细胞外基质的增加等。通常情况下平滑肌细胞有 2 种表型:合成表型与收缩表型。正常动脉壁平滑肌细胞为收缩表型,呈分化状态,不能分裂增殖;而合成表型平滑肌细胞则呈去分化状态,具有很强的分裂增殖能力,能合成分泌大量胶原纤维等细胞外基质^[4]。PCI 治疗时,球囊扩张或金属支架引起局部血管壁内皮损伤,使血小板黏附、聚集和激活,导致附壁血栓形成。血管损伤、附壁血栓、支架压迫和金属异物刺激血循环中性粒细胞和组织中巨噬细胞,释放促使 VSMCs 增生的细胞因子和生长因子^[5]。同时,使调控细胞分裂的基因(如 c-myc、CyclinD1)表达上调,引起细胞增生;基质



注:A 为 β -actin; B 为 Wnt4; C 为 β -catenin; D 为 Dvl-1; E 为 CyclinD1; F 为 Col I; G 为 Col III; 下图同

图 4 相关基因融解曲线图

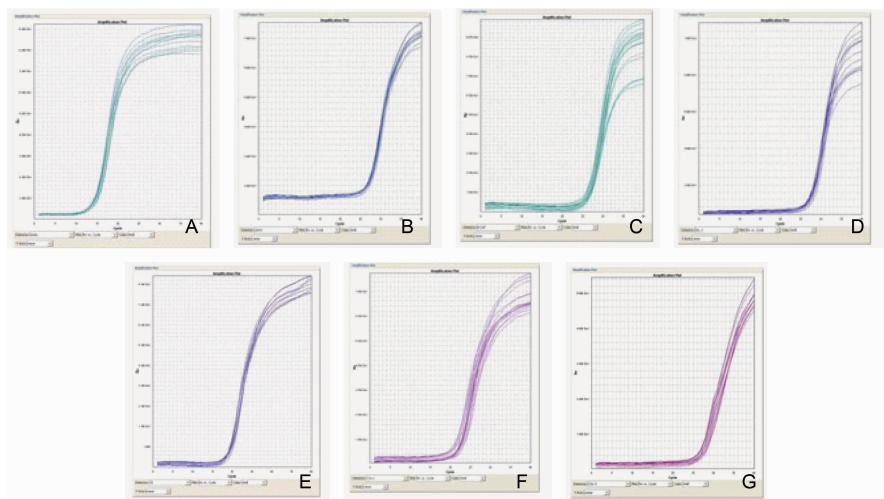


图 5 相关基因扩增曲线图

金属蛋白酶上调,引起细胞外基质重塑和平滑肌细胞移行。这种 VSMCs 不能控制地增生、凋亡和大量细胞外基质的沉积,导致再狭窄。因此,如何抑制 VSMCs 的增殖,运用一种安全可靠的针对再狭窄的药物来预防和治疗 PCI 术后再狭窄,并明确该药物作用相关通路机制成为心血管领域的研究热点。

Ang II、血小板源生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 在 VSMCs 增殖中作用明显^[6,7]。Ang II 是 VSMCs 强大的丝裂原,可与 VSMCs 上其 1 型受体 (angiotensin II type 1 receptor, AT1R) 结合后,可经丝裂原激活蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 等多条信号通路,刺激 VSMCs 的 DNA 和蛋白质合成增加等,启动 VSMCs 的增殖和迁移^[8]。

川芎,原名芎藭,一种中药植物,为伞形科蒿木鼠植物的根茎,常用于活血行气,祛风止痛。而川芎嗪是从中药川芎中分离提纯的有效成分,其化学结构为四甲基吡嗪,广泛用于高血压病、冠心病等的防治。研究表明川芎嗪具有扩张冠状动脉、抗凝、抗血小板聚集、抗心肌缺血/再灌注损伤降低血压、降低肺动脉高压以及抑制 VSMCs 增殖等多种心血管药理作用^[9]。有临床研究证明,川芎嗪具有降低血小板黏附、聚集,防止血栓形成,保护血管内皮细胞,抑制 VSMCs 增殖的作用,可以防治冠心病患者冠脉支架介入术后再狭窄^[10]。也有研究认为川芎嗪抑制 Ang II 诱导的 VSMCs 增殖,可能与其降低钙调蛋白 (CaM) 和钙调神经磷酸酶 (CaN) 的活性有关^[11]。川芎嗪还可减轻大鼠内皮损伤后内膜的增生,其作用机制与降低纤维

细胞生长因子(FGF)和c-myc的表达有关^[12],但不排除涉及其他信号通路的可能。国外有研究发现Wnt信号可以调节血管内皮细胞生长,也发现某些Wnt信号分子参与调节VSMCs的增殖,提示Wnt信号可能与VSMCs增殖有关。Wang XH等^[13]的研究显示大鼠颈动脉损伤后 β -catenin/TCF(T cell factor)信号激活。笔者前期在细胞和动物2个水平证实了Wnt信号通路参与调控血管再狭窄病理过程^[2]。

Wnt是一组分泌型糖蛋白家族,调控着个体的发育和细胞的分化。目前认为Wnt信号通路的主要组分包括:细胞外因子(Wnt家族分子)、跨膜受体(Frizzled家族分子和LRP5/6)、胞浆调节蛋白(Dsh/Dvl、APC、Axin、GSK-3 β 、 β -catenin等)及核内转录因子(TCF/LEF家族)等一系列蛋白。当细胞外因子与受体结合后,通过一系列胞质蛋白的相互作用使 β -catenin蛋白在胞质内累积,进而入核与转录因子TCF/LEF共同作用激活靶基因的转录^[14]。Wnt通路的下游靶基因多数是参与细胞增生与凋亡的基因,如CyclinD1、c-myc等。

本研究采用培养的大鼠胸主动脉VSMCs,以Ang II作为细胞刺激因子,经MTT检测增殖率,用Real-Time PCR和Western blot法检测Wnt4、 β -catenin、Dvl-1、CyclinD1、Col I、Col III基因和蛋白表达。结果发现VSMCs增殖,调控细胞分裂的靶基因CyclinD1表达上调,同时伴随Wnt4/Dvl-1/ β -catenin通路的mRNA和蛋白表达水平升高,提示Wnt4/Dvl-1/ β -catenin信号通路参与调控Ang II刺激的VSMCs的病理性增殖。40、80 μ mol/L川芎嗪对Ang II刺激下增殖状态的VSMCs具有明显抑制作用,并呈现浓度依赖性,伴随Wnt4/Dvl-1/ β -catenin/CyclinD1通路的mRNA和蛋白表达水平下降,故临床上使用40、80 μ mol/L川芎嗪对防治PCI术后损伤处血管再狭窄可能有效。提示川芎嗪抑制VSMCs增殖的作用部分是通过抑制Wnt信号通路来实现的,可能还存在调控其他路径的机制。

本实验同时研究了川芎嗪对Ang II诱导VSMCs胶原合成的影响,发现VSMCs在Ang II刺激下合成胶原增加,40、80 μ mol/L川芎嗪可抑制Ang II刺激平滑肌细胞分泌胶原,说明Ang II及川芎嗪对Col I、Col III的基因转录和蛋白水平都有调控作用。其部分机制可能是通过调控Wnt信号通路来实现的。下一步实验将运用小干扰RNA技术沉默Wnt信号通路后,进一步观察川芎嗪对VSMCs增殖和胶原合成的影响。

参 考 文 献

- [1] Tsaousi A, Mill C, George SJ. The Wnt pathways in vascular disease: lessons from vascular development [J]. Curr Opin Lipidol, 2011, 22(5): 350-357.
- [2] 华军益. Wnt信号通路与动脉损伤后再狭窄的关系研究[D]. 杭州:浙江大学医学院, 2012.
- [3] Yang W, Ge JB, Liu HL, et al. Arsenic trioxide eluting stent reduces neointima formation in a rabbit iliac artery injury model [J]. Cardiovasc Res, 2006, 72(3): 483-493.
- [4] Bennett MR, Evan GI, Schwartz SM. Apoptosis of human smooth muscle cell derived from normal vessel and coronary atherosclerotic plaques [J]. J Clin Invest, 1995, 95(5): 2266-2274.
- [5] Farb A, Sangiorgi G, Carter AJ, et al. Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans [J]. Circulation, 1999, 99(1): 44-52.
- [6] 罗德生, 郑红花, 李映红, 等. 川芎嗪抗血管紧张素 II 诱导的离体培养血管平滑肌细胞增殖的实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(3): 321-323.
- [7] Kim TJ, Yun YP. Antiproliferative activity of NQ304, a synthetic 1,4-naphthoquinone, is mediated via the suppressions of the PI3K/Akt and ERK1/2 signaling pathways in PDGF-BB-stimulated vascular smooth muscle cells [J]. Vascu Pharmacol, 2007, 46(1): 43-51.
- [8] 景涛, 何国祥, 刘建平, 等. 大鼠血管平滑肌细胞迁移能力变化与血管紧张素 II 的关系 [J]. 高血压杂志, 2001, 9(3): 247-249.
- [9] 梁爱群. 川芎嗪的药理及机理研究 [J]. 时珍国医国药, 2005, 16(6): 532-533.
- [10] 肖勇, 谷文学, 高妍. 川芎嗪预防冠心病患者支架术后狭窄的临床研究 [J]. 陕西医学杂志, 2010, 39(8): 1070-1071.
- [11] 郑红花, 李映红, 罗德生, 等. 川芎嗪对血管紧张素 II 诱导的血管平滑肌细胞增殖的抑制作用及机制 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14(4): 301-303.
- [12] 张健, 蔡生业, 姚成芳, 等. 川芎嗪对 PDGF-BB 诱导的大鼠血管平滑肌细胞增殖和骨桥蛋白 mRNA 表达的影响 [J]. 山东中医药大学学报, 2005, 29(3): 230-232.
- [13] Wang XH, Xiao Y, Mou YS, et al. A role for the β -catenin/T-cell factor signaling cascade in vascular remodeling [J]. Circ Res, 2002, 90(3): 340-347.
- [14] Cadigan KM, Liu YI. Wnt signaling: complexity at the surface [J]. J Cell Sci, 2006, 119(3): 395-402.

(收稿:2012-07-09 修回:2013-05-28)