

• 基础研究 •

缬沙坦对血管平滑肌细胞迁移及丝裂原活化蛋白激酶的影响

徐杰丰 严松彪 陈晖 高红丽 南芳 王永亮 李虹伟

【摘要】 目的 观察缬沙坦(Val)对血管紧张素Ⅱ(Ang Ⅱ)刺激下大鼠血管平滑肌细胞(VSMC)迁移及磷酸化42/44丝裂原活化蛋白激酶(p42/44MAPK)表达的影响。方法 组织贴块法培养大鼠胸主动脉平滑肌细胞,transwell小室检测细胞的迁移能力,免疫印迹法检测p42/44 MAPK蛋白表达的水平。结果 (1)Ang Ⅱ能明显促进VSMC迁移,该作用可被Val和MAPK激酶的特异性抑制剂PD98059所抑制。(2)Ang Ⅱ刺激VSMC 5min时,p42/44 MAPK的表达量最大,该作用可被Val和PD98059所抑制。(3)Val单独作用于VSMC时,对细胞的迁移及p42/44 MAPK的表达均无明显影响。结论 Val抑制Ang Ⅱ诱导的VSMC迁移与其抑制Ang Ⅱ诱导的p42/44 MAPK的表达相关。

【关键词】 肌,平滑,血管;缬沙坦;血管紧张素Ⅱ;丝裂原活化蛋白激酶

Valsartan on migration of vascular smooth muscle cell via MAPK pathway

XU Jiefeng, YAN Songbiao, CHEN Hui, et al

Cardiovascular Center, Beijing Friendship Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100050, China

【Abstract】 Objective To determine the effect of valsartan(val) on the migration of isolated rat vascular smooth muscle cell(VSMC) and the expression of phospho-42/44 mitogen-activated protein kinase(p42/44 MAPK) promoted by angiotensin Ⅱ. Methods VSMC from the rat thoracic aorta was cultured by attachment-block culture. VSMC migration was measured by migration chamber system. p42/44 MAPK expression was determined by Western blot. Results (1) Angiotensin Ⅱ obviously promoted VSMC migration, the effect was inhibited by valsartan and PD98059. (2) Angiotensin Ⅱ obviously promoted p42/44 MAPK expression, and the expression was at maximal in 5 min, the effect was inhibited by val and PD98059. (3) Compared with the control, val didn't inhibit VSMC migration and p42/44 MAPK expression. Conclusion The effect that val inhibits angiotensin Ⅱ-induced VSMC migration is related to its inhibiting angiotensin Ⅱ-induced p42/44 MAPK expression.

【Key words】 muscle, smooth, vascular; valsartan; angiotensin Ⅱ; mitogen-activated protein kinase

支架植入术是目前治疗冠心病的主要方法,但仍存在术后再次狭窄的问题^[1,2]。探讨支架术后再次狭窄的发展过程及有效的干预机制对临床工作的指导有重要意义。研究发现,血管中膜的平滑肌细胞过度增殖与迁移到内膜并分泌大量的细胞外基质导致内膜增厚是支架术后再次狭窄的主要机制^[3]。多项实验研究表明,血管紧张素受体-1(angiotensin receptor-1, AT₁R)的激活与支架术后再次狭窄的发展密切

相关^[4],而且血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ, Ang Ⅱ)激活AT₁R后促进血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)的增殖、迁移与细胞外信号通路丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)的表达上调密切相关^[5,6]。同时,一些临床试验显示血管紧张素受体拮抗剂(angiotensin receptor blocker, ARB)缬沙坦(valsartan, Val)在预防支架术后再次狭窄方面是有效的。

收稿日期:2008-11-21

基金项目:教育部博士点基金(20050025012)

作者单位:100050 北京市,首都医科大学附属北京友谊医院心血管中心

通讯作者:严松彪, Tel:010-63138280, E-mail: mhua2005@163.com

但是,关于 Val 预防支架术后再狭窄的机制的研究并不多。本文探讨了 Val 对 Ang II 刺激下离体大鼠胸主动脉 VSMC 的迁移及磷酸化 p42/44 MAPK (p42/44 MAPK)表达的影响。

1 材料和方法

1.1 动物、试剂及器材 雄性 Wistar 大鼠,体重(200±20)g,购自中国医学科学院药物研究所实验动物中心。Val 由北京赛科药业责任有限公司惠赠,Ang II 和 PD98059 购自美国 Sigma 公司。DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司,胎牛血清(FBS)购自美国 Hyclone 公司,胰蛋白酶购自美国 Merck 公司,兔抗鼠 p42/44 MAPK 一抗购自美国 CST 公司。培养瓶、6 孔板及 96 孔板购自美国 Corning 公司,插入式培养皿购自美国 Millipore 公司,硝酸纤维素(NC)膜购自美国 Amersham 公司。

1.2 VSMC 的培养与鉴定 取雄性 Wister 大鼠胸主动脉,去除血管内膜和外膜,将中膜剪成 1mm×1mm 的组织块,贴块于培养瓶瓶底,用含 20% FBS 的 DMEM 培养基培养细胞。细胞生长覆盖 60%以上瓶底后,用 0.25%胰蛋白酶消化传代。传代的细胞改用含 10%FBS 的 DMEM 培养基培养。细胞鉴定在光镜下呈典型的“峰-谷”状,免疫细胞化学染色显示抗 α -肌动蛋白(α -actin)抗体阳性,阳性率达 95%以上方可用于实验。实验选用第 5~10 代的细胞。

1.3 细胞迁移评价 取对数生长期的细胞,在 0.5%FBS 的 DMEM 培养基中培养 24h,使细胞同步于静止生长期;换用 1% FBS 的 DMEM 培养基,以 1×10^5 /ml 的密度,1ml/室,接种细胞于 transwell 小室上室,并根据实验分组加入药物干预,下室加入 10% FBS 的 DMEM 液 3.5ml/室,继续培养 24h。取出 transwell 小室,甲醇固定、苏木素染色、流水冲洗,棉棒拭去上室的细胞,刀片切下聚酯膜置于载玻片上,在高倍显微镜 200 倍视野下拍照、计数下室的细胞数。Val 和 PD98059 在 Ang II 刺激前 30min 使用。实验重复 3 次。

1.4 p42/44 MAPK 的免疫印迹测定 取静止生长期的 VSMC,按实验分组加入药物干预相应时间后,使用裂解液与酶抑制剂于冰上裂解细胞 30min 以上,刮取细胞碎片,4℃、2000r/min 离心 20min,吸取蛋白上清液,用加样缓冲液稀释,98℃

加热 10min 使蛋白变性,然后-20℃或-80℃冰箱保存;配胶,上样,用 10%SDS-聚丙烯酰胺电泳分离蛋白质,待蛋白区带分离后用电转仪将目的蛋白转至 NC 膜上;取出 NC 膜,5%脱脂奶粉室温下封闭非特异性结合部位 3h,p42/44 MAPK 一抗(1:1000 稀释)4℃孵育过夜,辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2500 稀释)室温孵育 2h,化学发光法检测蛋白印迹条带,影像软件 Smart view 分析条带结果。实验中首先使用 β -肌动蛋白一抗调整各组上样量中 β -肌动蛋白的含量一致,然后检测 p42/44 MAPK 的表达量。Val 和 PD98059 在 Ang II 刺激前 30min 使用。实验重复 3 次。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 11.5 统计软件对实验结果进行分析,多组间的均数比较采用单因素方差分析。检验显著性取 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Val 和 PD98059 对 Ang II 促进 VSMC 迁移的影响 与对照组相比,Ang II ($0.1\mu\text{mol/L}$)能明显促进 VSMC 的迁移,这一作用可被 Val($10\sim 100\mu\text{mol/L}$)呈剂量依赖性地抑制,亦可被 PD98059($10\mu\text{mol/L}$)抑制,在统计学上均有显著性差异。与对照组相比,Val 单独作用于 VSMC 时,对细胞迁移的影响无统计学意义(表 1;图 1)。

表 1 Val 和 PD98059 对 VSMC 干预 24h 后的细胞迁移数量($\bar{x}\pm s$)

组别	细胞迁移数量(单位)
对照组	11.6±1.96*
Val($10\mu\text{mol/L}$)	10.7±1.57
PD98059($10\mu\text{mol/L}$)+Ang II ($0.1\mu\text{mol/L}$)	27.5±2.07*
Val($100\mu\text{mol/L}$) +Ang II ($0.1\mu\text{mol/L}$)	23.4±1.71*
Val($10\mu\text{mol/L}$) +Ang II ($0.1\mu\text{mol/L}$)	32.3±4.24*
Ang II ($0.1\mu\text{mol/L}$)	57.2±9.51

注:与 Ang II 组相比,* $P<0.01$

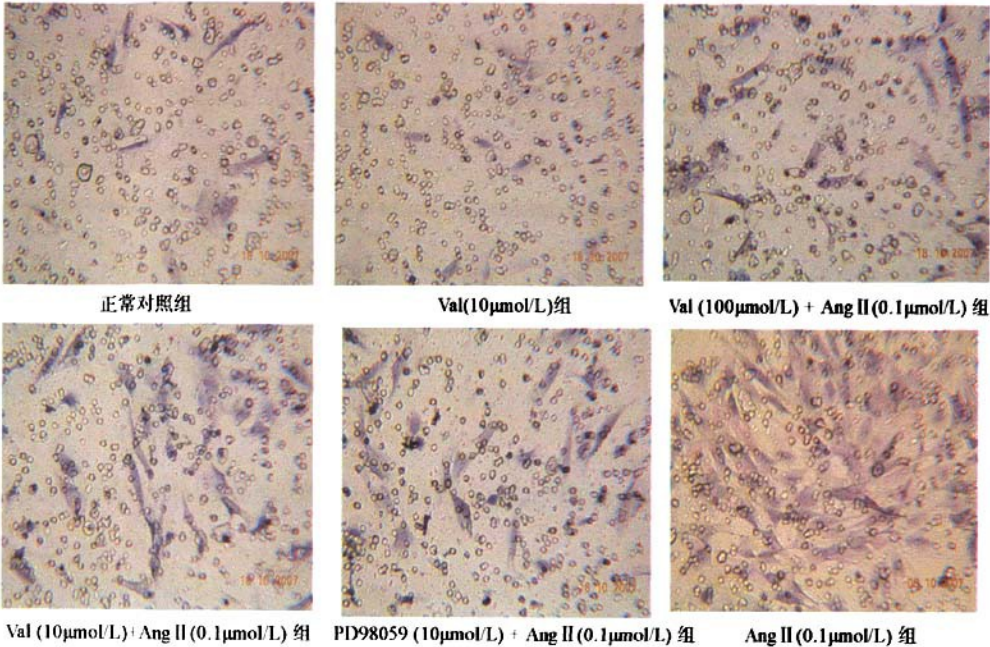


图 1 Val 和 PD98059 对 VSMC 干预 24h 后的细胞迁移图

2.2 Val 和 PD98059 对 Ang II 促进 VSMC 的 p42/44 MAPK 表达的影响 用 Ang II(0.1μmol/L) 刺激静止期的 VSMC,选取 5,15,30min 三个时间观察点,发现 5min 时 p42/44 MAPK 的表达水平最大,随着时间的延长,其表达量逐渐减少,30min 时与对照组表达水平基本相当。选择 5min 作为观察时间,在 Ang II(0.1μmol/L) 的刺激下 Val(10μmol/L) 和 PD98059 (10μmol/L) 作用于 VSMC,与 Ang II 单独作用相比,p42/44 MAPK 的表达水平被 Val 和 PD98059 所抑制,在统计学上均有显著性差异。与对照组相比,Val 单独作用于 VSMC 时,对 p42/44 MAPK 表达的影响无统计学意义(表 2,3;图 2,3)。

表 2 Ang II 干预 VSMC 不同时间后 p42/44 MAPK 表达的灰度值检测($\bar{x} \pm s$)

组别	时间(min)	灰度值
对照组	5	0.101±0.048
	15	0.120±0.045
	30	0.188±0.045
Ang II (0.1μmol/L)	5	0.428±0.033
	15	0.351±0.042
	30	0.251±0.042

表 3 Val 和 PD98059 干预 VSMC 后 p42/44 MAPK 表达的灰度值检测(观察时间为 5min)

组别	灰度值
对照组	0.379±0.037*
Val(10μmol/L)	0.368±0.029
Val(10μmol/L)+Ang II (0.1μmol/L)	0.434±0.037*
Ang II (0.1μmol/L)	0.521±0.027
PD98059(10μmol/L)+Ang II (0.1μmol/L)	0.451±0.032*

注:与 Ang II 组相比,* $P<0.01$,* $P<0.05$

3 讨论

支架术后再狭窄包括机体针对损伤应答的一系列复杂的级联反应。支架植入后血管内皮受损,启动凝血反应,促进炎症的发生,释放各种酶、生长因子和细胞因子等活性物质,诱导血管中膜的 VSMC 过度增殖与迁移到内膜并分泌大量细胞外基质,造成再狭窄发生[3]。

肾素-血管紧张素-醛固酮系统(renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS)是机体内重要的内分泌激素调节系统,与心血管系统疾病的病理生理过程密切相关。Ang II 是 RAAS 的重要产物,AT₁R、

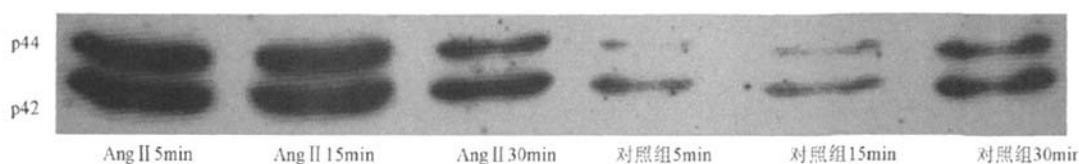


图 2 Ang II 干预 VSMC 不同时间后对 p42/44 MAPK 表达的蛋白印迹条带

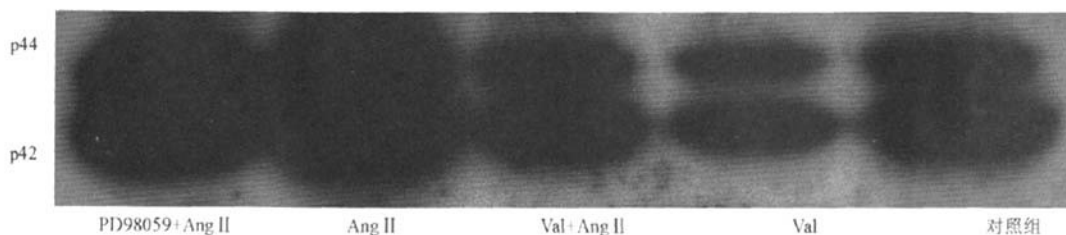


图 3 Val 和 PD98059 干预 VSMC 后 p42/44 MAPK 表达的蛋白印迹条带

AT₂R 是 Ang II 的特异性受体,在细胞生长和增殖方面显示出相反的作用^[7]。研究发现,AT₁R 活化后,可促进 VSMC 的增殖与迁移,细胞外基质的沉积,炎症的发生,血栓的形成,以及活性氧的产生^[4]。RAAS 的干预可能降低支架术后再狭窄的发生率。目前的研究表明,血管紧张素转换酶抑制剂(angiotensin converting enzyme inhibitor, ACEI)虽然能减少急性心肌梗死事件、不稳定性心绞痛的再发及心衰的死亡率,但不能降低支架术后的再狭窄率^[8]。而 ARB 可能通过高选择性地拮抗 AT₁R 的活性并促发 Ang II 对 AT₂R 的激活而降低再狭窄率。2001 年 Peters 等^[9]进行了 Val-PREST 临床试验,2005 年 Peters 等^[10]又进行了 VALVACE 临床试验。2007 年 Iwata 等^[11]进行的 Val 与氯沙坦预防支架术后再狭窄方面的比较研究,均提示 Val 预防支架术后再狭窄是有效的。相关的基础研究并不多,王雷等^[12,13]发现,Val 能减少新生内膜的生成,其机制可能与 AT₂R 的表达上调、胶原的沉积减少有关。林阳等^[14]发现,Val 能抑制 Ang II 诱导的 VSMC 的增殖,而且可能通过上调 Bax 和半胱天冬酶(caspase)基因表达而促进 VSMC 的凋亡。胡斌等^[15]研究发现 Val 能拮抗 Ang II 对 VSMC 的促增殖与迁移作用。

在本实验中,笔者参照张玉珍等^[16]的研究结果,设定细胞迁移与 p42/44 MAPK 表达的观察时间,笔者应用 transwell 小室评估了 VSMC 的迁移情况,发现 Val 明显抑制了 Ang II 诱导的 VSMC 的迁移。

MAPK 家族是一类重要的细胞外信号传导

路,包括 p42/44 MAPK、c-jun N 端激酶与 p38 MAPK 三种激酶,其中 p42/44 MAPK 与细胞的增殖、迁移是最密切相关的。研究发现,多种酶、生长因子、细胞因子参与再狭窄过程中 VSMC 的增殖与迁移,MAPK 可能是其共同的细胞外信号传导通路^[17]。同时,亦有研究表明,MAPK 可能是 Ang II 激活 AT₁R 后促进 VSMC 的增殖与迁移的重要信号通路。Xi 等^[5]研究发现,在 Ang II 介导的 VSMC 的增生与迁移中,p42/44 MAPK 是一个重要的调节因子,尤其在 VSMC 的增生方面。Lee 等^[6]研究发现,Ang II 可通过诱导 p38 MAPK 与 p42/44 MAPK 的表达上调而促进 VSMC 的迁移,尤其是 p38 MAPK 通路。

在本实验中,笔者应用 transwell 小室评估了 PD98059 对 VSMC 的影响,发现 PD98059 能显著抑制 Ang II 诱导的 VSMC 的迁移,提示 Ang II 诱导的细胞迁移与细胞内 p42/44 MAPK 表达上调有关。笔者应用免疫印迹法评估了 Val 和 PD98059 对 Ang II 诱导的细胞内 p42/44 MAPK 表达上调的影响,发现 Ang II 刺激 5min 时,p42/44 MAPK 的表达水平最大,选择 5min 作为观察时间,Val 和 PD98059 明显抑制了 Ang II 诱导的 p42/44 MAPK 的表达。这一实验结果表明,Val 能抑制 Ang II 诱导的 p42/44 MAPK 表达。

综合上述实验结果,提示 Val 预防支架术后再狭窄的机制可能与其抑制 Ang II 诱导的 VSMC 的迁移及细胞内 p42/44 MAPK 表达有关,这为今后临床应用 Val 预防支架植入后再狭窄提供了依据。

(下转第 369 页)

汀主要是影响缺血区心肌的活动,缩短缺血心肌复极化过程,使之与正常心肌相接近。所以,辛伐他汀对于血脂正常的冠心病患者,还具有缩短 Q-Td,改善缺血心肌电不稳定性的作用,可降低心脏猝死的风险。推测其机制可能与他汀类药物的多效性有关,包括他汀的稳定斑块、改善内皮细胞功能、抑制血小板活性、抗炎抗氧化、改善左室功能、减少心肌梗死面积等效应。这些作用可改变跨膜离子通道的特性,影响通道蛋白的表达和合成^[5],改善心肌细胞电生理稳定性。并且,他汀类药物没有传统抗心律失常药物可能出现的促心律失常的副作用。所以,阻断或逆转缺血心肌异常电重构的形成,应当成为临床治疗心律失常的一个新的重要靶点。

参考文献

- [1] Hii JT, Wyse DG, Gillis AM, et al. Precardial Q-T interval dispersion as a marker of torsade de pointes. Disparate effects of class Ia anti-arrhythmic drugs and

amiodarone. *Circulation*, 1992, 86: 1376-1382.

- [2] 丁超,何振山,崔俊玉,等. 兔心肌梗死1周及2月后心室肌细胞瞬间外向钾电流的变化. *中国病理生理杂志*, 2004, 20: 1472-1475.
- [3] Sotiriou CG, Cheng JW. Beneficial effects of statins in coronary artery disease—beyond lowering cholesterol. *Ann Pharmacother*, 2000, 34: 1432-1439.
- [4] Zareba W, Moss AJ, Lécassie S. Dispersion of ventricular repolarization and arrhythmic cardiac death in coronary heart disease. *Am J Cardiol*, 1994, 4: 550-553.
- [5] Shiroshita-Takeshita A, Schram G, Lavoie J, et al. Effect of simvastatin and antioxidant vitamins on atrial fibrillation promotion by atrial tachycardia remodeling in dogs. *Circulation*, 2004, 110: 2313-2319.

(上接第367页)

参考文献

- [1] Haude M, Erbel R, Hafner G, et al. Multicenter results of coronary implantation of balloon expandable Palmaz-Schatz vascular stents. *Z Kardiol*, 1993, 82: 77-86.
- [2] Mehran R, Dangas G, Abizaid AS, et al. Angiographic patterns of in-stent restenosis: classification and implications for long-term outcome. *Circulation*, 1999, 100: 1872-1878.
- [3] Mitra AK, Agrawal DK. In stent restenosis: bane of the stent era. *J Clin Pathol*, 2006, 59: 232-239.
- [4] Langeveld B, Roks AJ, Tio RA, et al. Renin-angiotensin system intervention to prevent in-stent restenosis. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2005, 45: 88-98.
- [5] Xi XP, Graf K, Goetze S, et al. Central role of the MAPK pathway in Ang II-mediated DNA synthesis and migration in rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, 19: 73-82.
- [6] Lee HM, Lee CK, Lee SH, et al. P38 mitogen-activated protein kinase contributes to angiotensin II-stimulated migration of rat aortic smooth muscle cells. *J Pharmacol Sci*, 2007, 105: 74-81.
- [7] 戴悦,戴学伟. 血管紧张素受体及受体拮抗剂临床应用进展. *辽宁药物与临床*, 2003, 6: 170-173.
- [8] Ribichini F, Ferrero V, Rognoni A, et al. Angiotensin antagonism in coronary artery disease. *Drugs*, 2005, 65: 1073-1096.
- [9] Peters S, Gotting B, Trummel M, et al. Valsartan for

prevention of restenosis after stenting of type B2/C lesions: the VAL-PREST trial. *J Invasive Cardiol*, 2001, 13: 93-97.

- [10] Peters S, Trummel M, Meyners W, et al. Valsartan versus ACE inhibition after bare metal stent implantation—results of the VALVACE trial. *Int J Cardiol*, 2005, 98: 331-335.
- [11] Iwata A, Miura S, Imaizumi S, et al. Do valsartan and losartan have the same effects in the treatment of coronary artery disease? *Circ J*, 2007, 71: 32-38.
- [12] 王雷,贾三庆,李贵华,等. 缬沙坦涂层支架对支架术后狭窄中胶原沉积的影响. *中华心血管病杂志*, 2006, 34: 450-453.
- [13] Wang L, Li GH, Chen H, et al. Effect of valsartan-eluting stents on the expression of angiotensin II type 2 receptor. *Chin Med J*, 2006, 119: 601-604.
- [14] 林阳,赵秀丽,温绍君,等. 缬沙坦对人脐静脉平滑肌细胞凋亡的作用. *中国新药杂志*, 2005, 14: 1202-1205.
- [15] 胡斌,李书国,周敬群. 缬沙坦对血管紧张素 II 诱导的牛主动脉血管平滑肌增殖及迁移的影响. *河南医学研究*, 2002, 11: 325-327.
- [16] 张玉珍,朱鼎良,高平进,等. 丝裂素活化蛋白激酶的激活和转核与大鼠血管平滑肌细胞增殖关系的研究. *中华心血管病杂志*, 2001, 29: 173-177.
- [17] Yu PJ, Ferrari G, Pirelli L, et al. Vascular injury and modulation of MAPKs: a targeted approach to therapy of restenosis. *Cell Signal*, 2007, 19: 1359-1371.