论著

文章编号:1000-5404(2014)14-1472-05

降钙素基因相关肽抑制动脉损伤后 NF-κB 表达及其对新生内膜增殖的作用

赵然尊,龙仙萍,刘志江,盛 瑾,王冬梅,石 蓓 (563003 贵州 遵义,遵义医学院第一附属医院心血管内科)

[摘要] **目的** 通过降钙素基因相关肽(calcitonin gene related peptide,CGRP)处理血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,VSMCs)和颈动脉损伤大鼠模型,探讨 NF-κB 在 CGRP 调节 VSMCs 表型改变和动脉损伤后新生内膜增殖中的作用。**方法** 建立颈动脉损伤大鼠模型,并分为对照组和 CGRP 组($n=24$),通过 HE 染色观察新生内膜形成情况,并 Western blot 检测两组动物损伤动脉中 NF-κB p65 蛋白表达情况。以组织块贴壁培养法获得 VSMCs,并分为对照组、IL-1β 组(给予 IL-1β 处理)、CGRP 组(给予 IL-1β + CGRP 处理)和 CGRP8-37 组(在 IL-1β + CGRP 基础上,加 CGRP8-37)($n=24$),Western blot 法检测细胞内 NF-κB p65 蛋白和细胞表型标志蛋白表达变化,MTT 法检测细胞增殖能力。**结果** ①对照组大鼠的颈动脉损伤后 7 d 时新生内膜明显增加,至 28 d 时基本稳定,而 CGRP 组 7 d 和 28 d 时新生内膜面积较对照组同时间点显著降低[7d:(2.09±0.26) *vs* (3.76±0.33);14 d:(3.52 ±0.41) *vs* (6.38±0.61),$P<0.05$];且与对照组比较,CGRP 组 1 周时 NF-κB p65 蛋白表达水平明显降低($P<0.05$),而 28 d 时两组 NF-κB p65 表达水平无差异($P>0.05$)。②在体外培养 VSMCs 中,IL-1β处理显著激活细胞 NF-κB p65 蛋白表达($P<0.05$),伴随着 VSMCs 收缩表现标志蛋白 SM α-actin 表达减少和 OPN 表达增加($P<0.05$);同时再给予 CGRP 处理后,则显著减弱 IL-1β 诱导的 NF-κB p65 蛋白表达($P<0.05$),且使 VSMCs 合成表现标志蛋白 OPN 表达减少。RT-PCR 分析获得相一致的结果。同时,CGRP 显著抑制 IL-1β 引起的 VSMCs 增殖。③CGRP 受体阻断剂 CGRP8-37 可以阻断 CGRP 减弱 IL-1β 诱导的 NF-κB p65 蛋白表达作用,并抑制 CGRP 对 VSMC 表达蛋白调节作用。**结论** CGRP 与受体结合后抑制 NF-κB 激活,促进 VSMCs 分化标志基因表达,从而抑制细胞增殖,降低动脉损伤后新生内膜增殖,这对于防治动脉粥样硬化和血管成形术后再狭窄可能具有重要应用价值。

[关键词] 血管平滑肌细胞;表型改变;降钙素基因相关肽;核因子-κB
[中图法分类号] R341;R363.22;R543.4 [文献标志码] A

Effect of calcitonin gene-related peptide on NF-κB expression and neointima formation after artery injury *in vivo* and *in vitro*

Zhao Ranzun, Long Xianping, Liu Zhijiang, Sheng Jin, Wang Dongmei, Shi Bei (Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Guizhou Zunyi 563000, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of calcitonin gene-related peptide (CGRP) on nuclear factor-κB (NF-κB) expression and neointima formation after artery injury through CGRP treatment of vascular smooth muscle cells (VSMCs) *in vitro* and rats with balloon-injured carotid arteries *in vivo*. **Methods** Rats with balloon-injured carotid arteries were divided into a control group ($n=24$) and a CGRP group ($n=24$). Neointima formation was observed by HE staining. The expression of NF-κB p65 protein in the injured arteries was detected by Western blot. Furthermore, VSMCs were obtained by aortic tissue adherent culture and divided into a control group, an interleukin-1β (IL-1β) group, an IL-1β + CGRP group and an CGRP8-37 (a receptor blocker of CGRP) group (IL-1β + CGRP + CGRP8-37). The expression of phenotypic proteins of VSMCs and NF-κB p65 was detected by Western blotting. Cell proliferation was determined by MTT assay. **Results** As compared to the control group, both the area of neointima formation at 7 d and 28 d (7 d: 2.09±0.26 *vs* 3.76±0.33; 14 d: 3.52±0.41 *vs* 6.38±0.61, $P<0.05$) and the expression of NF-κB p65 protein at 7 d ($P<0.05$) (but not 28 d, $P>0.05$) significantly reduced in the CGRP group. In *in vitro* cultured VSMCs,

[基金项目] 国家自然科学基金(30860100);贵州省国际合作项目(黔科合外G字[2010]0732)
[通信作者] 石 蓓,E-mail:shibei2147@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140702.1414.005.html(2014-07-01)

IL-1β induced obvious expression up-regulation of NF-κB p65 along with the expression decrease of SM α-actin (the contractile phenotypic marker of VSMCs) and the expression increase of osteopontin (the synthetic phenotypic marker of VSMCs) ($P<0.05$). However, CGRP treatment significantly alleviated the effects of IL-1β-induced up-regulation of NF-κB p65 and induced the down-regulation of osteopontin. Similar results were found by RT-PCR. Also, CGRP significantly inhibited the effect of IL-1β-induced VSMCs proliferation by MTT assay. The use of CGRP8-37 blocked the above-mentioned effects of CGRP on the expression NF-κB p65 and the phenotypic proteins of VSMCs. **Conclusion** CGRP binds its receptor and subsequently inhibits the activation of NF-κB, and then contributes to the expression of VSMCs differentiation genes, the inhibition of cell proliferation and the reduction of neointima formation, which may be important in the treatment of atherosclerosis and restenosis after angioplasty.

[**Key words**] vascular smooth muscle cells); phenotypic switching; calcitonin gene related peptide; nuclear factor-κB

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30860100) and the International Cooperation Project of Guizhou Province (2010-0732). Corresponding author: Shi Bei, Tel: 86-852-8608406, E-mail: shibei2147@163.com

动脉粥样硬化和血管成形术后再狭窄是常见的血管增殖性疾病,其继发的心脑血管并发症是引起死亡的重要原因。动脉粥样硬化和血管损伤后新生内膜形成是一种血管的慢性炎症性疾病,其主要特征是血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)迁移、表型改变和过度增殖,且伴随着多种炎症细胞浸润和相互作用,如单核-巨噬细胞、淋巴细胞、中性粒细胞等。有研究显示,核因子 κB(nuclear factor κB, NF-κB)家族中 p65 参与血管增殖性疾病的病理机制[1],但 NF-κB p65 具体参与的分子机制尚未清楚。本课题组先前的研究显示,骨髓源间充质干细胞可能通过抑制血管损伤后 NF-κB p65 表达而减轻新生内膜增殖[2]。

降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)属于神经肽家族的一种血管活性多肽,广泛分布于神经和心血管系统,神经末梢通过释放 CGRP,发挥强大的扩血管作用。本课题组既往实验及其他研究还显示 CGRP 能抑制体外培养 VSMCs 增殖。由于 VSMCs 迁移和过度增殖是动脉损伤后新生内膜形成的重要机制。因此在动脉粥样硬化炎症条件下,CGRP 对 VSMCs 的作用是否涉及 NF-κB p65 及相关机制,尚未明确。本实验通过建立球囊损伤颈动脉大鼠模型,观察 CGRP 处理对颈动脉损伤后 NF-κB p65 表达的影响及其与 VSMCs 表型改变和细胞增殖的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性 SD 大鼠 74 只,4~16 周龄,体质量 100~300 g,购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心[清洁级,证书号: SCXK(渝)2007-0005]。IL-1β、CGRP、CGRP8-37 以及抗大鼠 SM α-actin、OPN 和 NF-κB p65 抗体均购自美国 Abcam 公司;噻唑蓝(MTT)购自美国 Promega 公司;FOGARTY 2F 球囊购自上海慧尔科技有限公司;免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。其余试剂由遵义医学院中心实验室提供。

1.2 颈动脉损伤模型建立、分组和 CGRP 处理

球囊损伤大鼠颈动脉模型的建立:取雄性 SD 大鼠 55 只,体质量 250~300 g,10% 水合氯醛腹腔注射麻醉,颈部正中切口,显露左侧颈总、颈内和颈外动脉,结扎颈外动脉远端,动脉夹临时阻断颈总动脉近心端及颈内动脉,自劲外动脉向近心端插入 2F 球囊至颈总动脉起始部,0.2 mL 生理盐水充盈球囊,缓慢回拉球囊至颈内外动脉分叉处,重复 3 次,损伤血管约 2.5 cm。实验中死亡 7 只,建模成功的颈动脉损伤模型分为 2 组:CGRP 组和对照组,每组 24 只;CGRP 组给予 CGRP 0.04 mg/kg,腹腔注射,每天 2 次,连用 1 周;对照组以相应生理盐水替代。

1.3 损伤颈动脉修复情况和内膜 NF-κB p65 蛋白表达检测

两组大鼠于 CGRP 应用后 3、7、28 d 取血管标本行 HE 染色,利用图像分析软件,检测新生内膜增殖情况。同时以 Western blot 法检测颈动脉损伤后局部 NF-κB p65 蛋白的水平。取损伤动脉段内膜标本,提取总蛋白,以 50 μL 上样,10% 十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳后将蛋白转移至硝酸纤维素膜上,用 TBST 配置的 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,封闭膜与抗 NF-κB p65 单克隆抗体(1∶1 000)共孵育,4 ℃过夜,再与二抗共同孵育 2~3 h,显色曝光,实验重复 3 次。以 β-actin 作为内参,利用凝胶成像系统分析各条带吸光度值,计算各条带与内参条带的比值作为蛋白含量半定量分析。

1.4 VSMCs 培养与鉴定

雄性 SD 大鼠 19 只,体质量 100~150 g,断颈处死,超净工作台中分离主动脉,去除动脉内外膜,将其剪切为 1 mm×1 mm×1 mm大小的组织块后均匀铺置于培养瓶底,加入 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清),4~5 d 时换液并去除组织块后,继续培

养至细胞铺满瓶底后传代培养。使用第4~6代细胞用于实验研究。分别取第5代和第6代细胞玻片，给予FITC-α-SMA(α-平滑肌肌动蛋白)和DAPI双染色后激光共聚焦显微镜鉴定。

1.5 VSMCs分组培养与处理

取培养VSMCs，根据不同的处理方案，分为对照组、IL-1β组、CGRP组和CGRP8-37组，每组细胞数约为10^6。其中常规VSMCs培养为对照组，加入IL-1β培养VSMCs为IL-1β组，同时加入IL-1β和CGRP培养VSMCs为CGRP组，在CGRP组基础上加入CGRP受体拮抗剂CGRP8-37者为CGRP8-37组。各组加入IL-1β的终浓度为10 ng/mL，CGRP终浓度为3.5×10^7 mol/L，CGRP8-37终浓度为10.0×10^7 mol/L。

1.6 VSMC表型标志蛋白测定

采用Western blot法检测各组VSMCs表型标志蛋白变化，检测平滑肌α-肌动蛋白(SM α-actin)代表VSMCs收缩表型，骨桥蛋白(OPN)代表细胞合成表型。加入CGRP培养后不同时间点(24、48、72 h和1周)，收集VSMCs，提取细胞总蛋白，以50 μL上样，10%十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳后将蛋白转移至硝酸纤维素膜上，用TBST配置的5%脱脂奶粉封闭2 h，封闭膜与骨桥蛋白(OPN)(1∶1 000)和SM α-actin(1∶500)的单克隆抗体共孵育，4 ℃过夜，再与二抗共同孵育2 h，显色曝光，实验重复3次。以β-actin作为内参，利用凝胶成像系统分析各条带光密度值，计算各条带与内参条带的比值作为蛋白含量半定量分析。

1.7 细胞增殖能力测定

采用MMT法测定细胞增殖能力：取96孔培养板分别加入CGRP或生理盐水(每组3个复孔)后24、48、72 h加入MTT溶液(5 mg/mL)40 μL，37 ℃孵育4 h，弃上清液，每孔再加入200 μL二甲基亚砜(DMSO)，振荡10 min混匀，使结晶物完全溶解，30 min内使用酶联免疫检测仪测定各孔490 nm波长的光密度值[D(490)]，以时间为横坐标，D(490)值为纵坐标，绘制细胞生长曲线，上述实验重复3次。测定细胞增殖前均取少量细胞应用台盼蓝染色测定细胞活力。

1.8 统计学分析

应用SPSS 16.0统计软件进行分析。据以$\bar{x}\pm s$表示，组间采用单因素方差分析和t检验检测组间的差异。

2 结果

2.1 颈动脉损伤模型建立和VSMCs培养情况

在体外VSMCs培养实验中，分离的胸主动脉组织块静置培养3~5 d后，光学显微镜下可见组织块边缘见梭形排列的少量细胞生长，细胞换液后继续培养至1周左右时细胞数目明显增多，呈放射性生长；传代培养时，细胞呈单层或多层重叠生成，即典型"峰-谷"样生长。取第4~5代培养细胞行α-SMA和DAPI免疫荧光双染色鉴定，结果阳性细胞细胞质为绿色，细胞核为蓝色；同时免疫细胞化学法染色α-SMA，阳性细胞细胞质为棕褐色，提示培养细胞为VSMCs。

2.2 CGRP降低动脉损伤后NF-κB表达，减少新生内膜形成

在对照组颈动脉损伤大鼠模型中，7 d新生内膜明显增加，直至28 d时基本稳定；CGRP组中，7 d和28 d时新生内膜面积较对照组同时间点比较显著降低[7 d：(2.09±0.26) *vs* (3.76±0.33)；28 d：(3.52 ±0.41) *vs* (6.38±0.61)]，差异具有显著统计学意义($P<0.05$，图1)。同时，在对照组中，损伤显著增加NF-κB p65蛋白表达，第3天时最显著，以后逐渐降低，28 d降至基线水平；CGRP应用后显著降低1周内NF-κB p65蛋白表达水平，与对照组同时间点比较，差异具有统计学意义($P<0.05$)，但28 d时两组NF-κB p65表达水平无差异($P>0.05$，图2)。

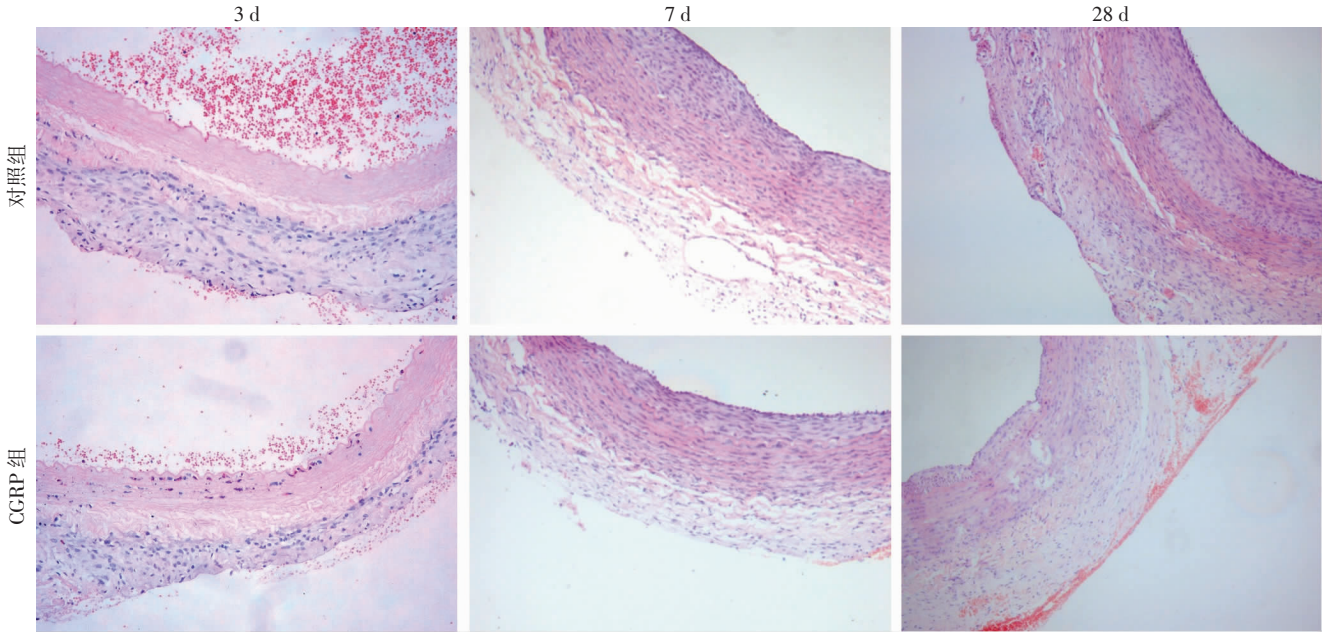
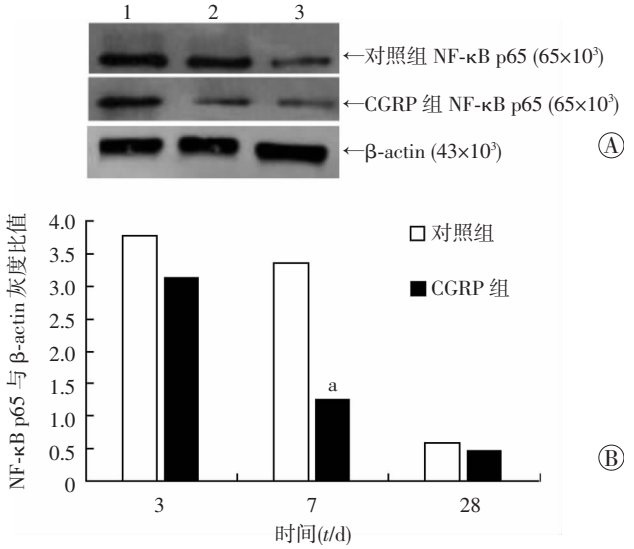


图1 降钙素基因相关肽对各组大鼠颈动脉损伤后不同时间新生内膜影响(HE ×200)



A:Western blot 检测结果;B:半定量分析结果($n=3$, $\bar{x}\pm s$) a:$P<0.05$,与对照组比较

图 2 降钙素基因相关肽对各组大鼠颈动脉损伤后 NF-κB p65 表达的影响

2.3 抑制 NF-κB 表达,促进 VSMCs 分化标志基因表达,抑制细胞增殖

在培养的 VSMCs 中,IL-1β 处理后引起细胞 NF-κB p65 表达增加($P<0.05$),同时细胞收缩表型标志基因 SM α-actin 表达明显下降($P<0.05$),伴随着细胞合成表型标志基因 OPN 表达增加;而加入 IL-1β 的同时给予 CGRP 处理,则显著减弱前者的作用,表现为 NF-κB p65 表达减少($P<0.05$),同时,VSMC 的表型标志基因 SM α-actin 和 OPN 表达亦相应改变,使细胞维持在收缩表型状态。RT-PCR 分析显示,IL-1β 明显降低 VSMCs 中收缩表型分化基因 SM α-actin mRNA 水平,伴随 OPN mRNA 水平增加;给予 IL-1β 同时加入 CGRP 处理,同样逆转 IL-1β 对于 VSMC 表型分化基因 mRNA 水平的作用(数据未提供)。同时,应用 MTT 法检测 IL-1β 和 CGRP 对体外培养的 VSMCs 增殖的影响。在体外培养的 VSMCs 中,IL-1β 处理显著增加细胞增殖,与对照组比较,差异具有显著统计学意义($P<0.05$);而加入 IL-1β 的同时给予 CGRP 处理,则显著抑制 IL-1β 的促细胞增殖作用,与 IL-1β 组比较,差异具有显著统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 不同细胞因子处理对 VSMCs 的增殖能力比较

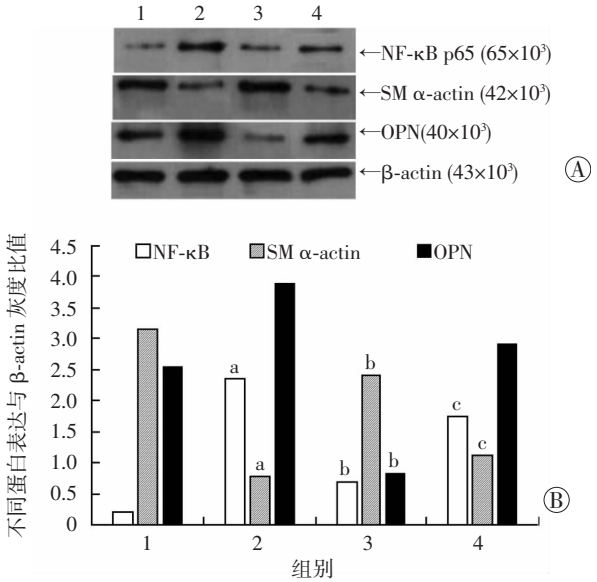
[D(490)值, $n=3$, $\bar{x}\pm s$]

组别	24 h	48 h	72 h
对照组	0.21±0.03	0.25±0.03	0.54±0.06
IL-1β 组	0.27±0.04	0.91±0.07[a]	2.65±0.25[a]
CGRP 组	0.20±0.05	0.45±0.06[b]	1.14±0.41[b]
CGRP8-37 组	0.23±0.07	1.11±0.29[a]	1.76±0.38[ac]

a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 IL-1β 组比较;c:$P<0.05$,与 CGRP 组比较

2.4 CGRP 与受体结合,抑制 NF-κB 表达

MTT 实验检测结果见表 1,在体外培养的 VSMCs 中,加入 CGRP 受体阻断剂 CGRP8-37 后,与加入 CGRP 组比较,显著减弱 CGRP 对细胞增殖抑制作用($P<0.05$);Western blot 分析显示(图 3),CGRP 抑制 NF-κB p65 表达,而 CGRP8-37 可以拮抗这一作用,恢复 IL-1β 诱导的 NF-κB p65 表达增加,同时亦拮抗 CGRP 对 VSMCs 表型标志基因的调节作用。



1:对照组;2:IL-1β 组;3:CGRP 组;4:CGRP8-37 组 A:Western blot 检测结果;B:半定量分析结果($n=3$,$\bar{x}\pm s$) a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 IL-1β 组比较;c:$P<0.05$,与 CGRP 组比较

图 3 不同处理对 VSMCs 的 NF-κB p65 表达及细胞表型标志蛋白表达的影响

3 讨论

动脉粥样硬化病变形成或血管损伤反应中,分化的 VSMCs 改变其表型,并其增强其迁移和增殖活性[3]。在这一过程中,VSMCs 表型改变表现为细胞分化标记基因的表达下调,包括 SM α-actin、SM22α 和 SM MHC 等基因表达下调,同时合成基因(如 OPN 等)表达增加[4]。既往研究结果显示,神经调节多肽 CGRP 通过与 VSMC 受体结合后直接发挥强大扩张血管作用[5],但在病理条件下(如动脉粥样硬化形成),CGRP 对 VSMCs 的作用尚未完全明确。本研究结果显示,CGRP 显著下调体外培养的 VSMCs 收缩标志基因 SM α-actin 表达,促进合成表型标志基因 OPN 表达增加;进一步实验发现,CGRP 这一作用可能是通过其与受体结合,部分通过调节 NF-κB p65 表达作用实现的;且 CGRP 能显著降低颈动脉损伤后 NF-κB p65 的表达,并抑制新生内膜形成。

一般地,NF-κB 存在与细胞质中,通过与抑制蛋白 IκB 结合,以未激活的二聚体形式存在;在炎症反应存在条件下,IκB 的特异性丝氨酸残基 S32 和 S36 磷酸化,导致泛素化和系列蛋白降解,NF-κB 从 IκB 释放

后,进入细胞核内,结合DNA,激活多种基因的转录和表达。由于NF-κB被认为是血管增殖性疾病的潜在治疗靶点,因此许多研究报道了调节NF-κB对血管损伤后新生内膜形成的影响。腺病毒介导的IκB上游抑制剂可以显著抑制小鼠血管损伤后内膜增生[6]。应用双链寡核苷酸链可以结合NF-κB,并使其固定于细胞质,降低大鼠和猪动脉损伤诱导的新生内膜形成,以及高胆固醇的大鼠的支架内再狭窄[7];且反义寡核苷酸链可以降低NF-κB p65合成,进而减轻大鼠颈动脉损伤后新生内膜形成。这些结果表明,抑制NF-κB是治疗血管增殖性疾病的有效措施。本研究结果显示,神经调节多肽CGRP通过抑制NF-κB减少大鼠颈动脉损伤后新生内膜形成,降低新生内膜面积,有效增加管腔面积;进一步实验发现,CGRP的这一作用是通过作用于靶细胞VSMCs实现的,即在VSMCs培养中,CGRP通过抑制NF-κB p65激活,进而抑制IL-1β诱导的VSMCs表型改变,促进VSMCs分化标记基因SM α-actin的表达,从而减少VSMCs增殖。

NF-κB是多种炎症因子的最后共同作用通路。新近的研究显示[8],在VSMCs中,抑制NF-κB激活后导致细胞分化标志基因SM α-actin表达下调的作用可能是通过抑制myocardin表达实现的,后者是一种血浆反应因子共激活剂。NF-κB p65可以结合于myocardin启动子区,通过调节myocardin活性而涉及VSMCs表现改变和细胞增殖[9]。但需要进一步实验探讨CGRP对myocardin的作用及其分子机制。

CGRP作为一种配体,一般需要与降钙素受体样受体/受体活性修饰蛋白1(receptor activity modifying protein 1, RAMP1)组成的复合受体结合才能发挥作用,其中RAMP1决定CGRP受体的活性。先前研究显示,在大鼠主动脉VSMCs中过表达RAMP1引起CGRP依赖性的细胞增殖率明显降低[10]。本课题组先前研究也显示,腺病毒介导RAMP1基因转染VSMCs可显著抑制细胞增殖[11];同时,在RAMP1基因修饰的骨髓间充质干细胞较单纯间充质干细胞具有更强的抗VSMCs增殖作用[12]。这些研究结果表明,CGRP与受体结合是CGRP调节VSMCs表型和抗细胞增殖的基础。本实验结果也显示,给予CGRP受体阻断剂CGRP8-37可以消除CGRP抑制NF-κB活性以及促进SM α-actin表达作用,进而减弱CGRP抑制VSMCs增殖效应。进一步实验研究可能需要涉及CGRP与受体结合后发挥作用所涉及的分子通路及其机制。

总之,本研究显示,CGRP与受体结合,通过抑制NF-κB活性,发挥调节VSMCs表型和抗VSMCs增殖作用,因此,CGRP对于临床防治血管增殖性疾病如动脉粥样硬化和血管成形术后再狭窄具有重要的应用价值。同时,研究尚存在一定缺陷,因为在病理条件下,平滑肌细胞表型调节涉及表观遗传学、蛋白质组学和小分子RNA等多种机制,CGRP对血管平滑肌细胞表型调节机制是否涉及这些机制,需要进一步实验予以阐明。

参考文献:

[1] Davies P F, Civelek M, Fang Y, *et al*. The atherosusceptible endothelium: endothelial phenotypes in complex haemodynamic shear stress regions *in vivo*[J]. Cardiovasc Res, 2013, 99(2): 315-327.

[2] 刘志江, 石蓓, 许官学, 等. 骨髓间充质干细胞移植后颈动脉损伤球囊核转录因子κBp65和增殖细胞核抗原的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(10): 1814-1818.

[3] Gomez D, Owens G K. Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis[J]. Cardiovasc Res, 2012, 95(2): 156-164.

[4] Davis-Dusenbery B N, Wu C, Hata A. Micromanaging vascular smooth muscle cell differentiation and phenotypic modulation[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(11): 2370-2377.

[5] Shevel E. The vasodilatory activity of CGRP [J]. Headache, 2014, 54(4): 747.

[6] Grassia G, Maddaluno M, Musilli C, *et al*. The I{kappa}B kinase inhibitor nuclear factor-{kappa}B essential modulator-binding domain peptide for inhibition of injury-induced neointimal formation[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30(12): 2458-2466.

[7] Ohtani K, Egashira K, Nakano K, *et al*. Stent-based local delivery of nuclear factor-kappaB decoy attenuates in-stent restenosis in hypercholesterolemic rabbits[J]. Circulation, 2006, 114(25): 2773-2779.

[8] Yoshida T, Yamashita M, Horimai C, *et al*. Smooth muscle-selective inhibition of nuclear factor-kappaB attenuates smooth muscle phenotypic switching and neointima formation following vascular injury[J]. J Am Heart Assoc, 2013, 2(3): e000230.

[9] Tang R H, Zheng X L, Callis T E, *et al*. Myocardin inhibits cellular proliferation by inhibiting NF-kappaB(p65)-dependent cell cycle progression[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(9): 3362-3367.

[10] Zhang Z, Dickerson I M, Russo A F. 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.

[11] 龙仙萍, 赵然尊, 石蓓, 等. 腺病毒介导hRAMP1基因转染血管平滑肌细胞的增殖和凋亡[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(46): 8598-8602.

[12] 龙仙萍, 赵然尊, 石蓓, 等. hRAMP1修饰的骨髓间充质干细胞移植对兔球囊损伤血管再狭窄及心功能的影响[J]. 中华医学杂志, 2012, 92(30): 2134-2139.

(**收稿**:2014-04-10;**修回**:2014-05-05)

(编辑 王 红)