DOI:10.16016/j.1000-5404.202009032

1-磷酸鞘氨醇1型受体促进小鼠颈动脉损伤后血管内膜增生

任宏强,刘益均,罗贵全,赵 利 629000 四川 遂宁,遂宁市中心医院心血管内科

[摘要] **目的** 探究1-磷酸鞘氨醇1型受体(sphingosine-1-phosphate type 1 receptor,S1PR1)对小鼠颈动脉损伤后血管内膜增生的作用及其机制。**方法** 40只C57BL/6小鼠按随机数字表法分为4组:假手术+AAV-LacZ组、假手术+AAV-S1PR1组、导丝损伤+AAV-LacZ组和导丝损伤+AAV-S1PR1组,每组10只。各组小鼠尾静脉分别注射对应AAV-LacZ病毒或AAV-S1PR1病毒,2周后,假手术组仅切开颈部皮肤,颈动脉未损伤;导丝损伤组行颈动脉导丝损伤。4周后取颈动脉,HE染色检测新生内膜增生程度,组织免疫荧光检测颈动脉α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin,α-SMA)表达水平,组织免疫组化检测颈动脉组织增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)和IL-6表达水平。分离并培养小鼠原代主动脉血管平滑肌细胞,腺病毒Ad-S1PR1或Ad-LacZ转染后,加入1 μmol/L 1-磷酸鞘氨醇(sphingosine-1-phosphate,S1P)干预,Western blot和细胞免疫荧光检测原代主动脉平滑肌细胞表型转化,EdU染色检测细胞增殖,划痕实验和Transwell实验检测细胞迁移,Western blot检测IL-6/STAT3通路激活情况。**结果** 小鼠颈动脉损伤4周后,与假手术+AAV-LacZ组相比,导丝损伤+AAV-LacZ组小鼠颈动脉可见显著的血管内膜增生、表型转化和细胞增殖($P<0.05$);同时,导丝损伤后颈动脉IL-6表达上调。与导丝损伤+AAV-LacZ组相比,导丝损伤+AAV-S1PR1组颈动脉组织S1PR1过表达($P<0.05$),上述病理生理学改变加重($P<0.05$)。细胞实验结果显示:S1P诱导血管平滑肌细胞表型转化和增殖迁移,激活IL-6/STAT3通路($P<0.05$)。腺病毒介导S1PR1过表达后,上述病理改变进一步加重($P<0.05$)。**结论** S1P/S1PR1促进血管平滑肌细胞表型转化和增殖迁移,加重血管损伤后内膜增生,可能与S1P/S1PR1激活血管平滑肌细胞IL-6/STAT3通路有关。

[关键词] 血管内膜增生;1-磷酸鞘氨醇受体;表型转化;增殖;迁移
[中图法分类号] R363.21; R364.31; R543.4 [文献标志码] A

Sphingosine-1-phosphate type 1 receptor aggravates neointimal hyperplasia after carotid artery injury in mice

REN Hongqiang, LIU Yijun, LUO Guiquan, ZHAO Li Department of Cardiology, Suining Central Hospital, Suining, Sichuan Province, 629000, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role and mechanism of sphingosine-1-phosphate type 1 receptor (S1PR1) in neointimal hyperplasia after carotid artery injury in mice. **Methods** A total of 40 C57BL/6 mice were randomly and equally subjected to 4 groups: sham operation+AAV-LacZ group, sham operation+AAV-S1PR1 group, model+AAV-LacZ group, and model+AAV-S1PR1 group. In 2 weeks after the delivery of AAV-LacZ or AAV-S1PR1 adenovirus to corresponding mice *via* tail vein injection, a mouse model of carotid artery injury was established with a flexible wire inserting into the common carotid artery. After 4 weeks, the carotid artery was harvested to measure the severity of neointimal hyperplasia by HE staining, the expression of α-smooth muscle actin (α-SMA) by immunofluorescence staining, and the levels of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and interleukin-6 (IL-6) by immunohistochemistry. In the isolated and primarily cultured mouse aortic vascular smooth muscle cells (VSMCs), the adenovirus Ad-S1PR1 or Ad-LacZ were transfected respectively, and then the cells were incubated with 1 μmol/L S1P. The hallmarks of phenotypic switch of VSMCs were detected with Western blotting and immunofluorescence assay, cell

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81770379)
[通信作者] 赵 利,E-mail:420105321@qq.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

proliferation with EdU staining, migration by scratch wound healing assay and transwell migration assay, and activation of IL-6/STAT3 pathway by Western blotting. **Results** In 4 weeks after model establishment, the mice of the model + AAV-LacZ group had obvious neointimal hyperplasia, phenotypic switch and cell proliferation ($P<0.05$), and significant upregulation of IL-6 in the carotid artery injury when compared with the mice of the sham operation+AAV-LacZ group. In the mice of the model+AAV-S1PR1 group, the level of S1PR1 was over-expressed ($P<0.05$), and above phenomena were aggravated when compared with the mice from the model+AAV-LacZ group ($P<0.05$). In the *in vitro* study, S1P treatment induced the phenotypic switch, proliferation and migration, and activation of the IL-6/ STAT3 pathway in the primary VSMCs ($P<0.05$), and the pathophysiological changes above were further aggravated after the transfection of Ad-S1PR1 ($P<0.05$). **Conclusion** S1P/S1PR1 can promote the phenotypic switch and proliferation and migration of VSMCs, and aggravate the intimal hyperplasia after vascular injury, which may be due to the activation of IL-6/STAT3 pathway.

[**Key words**] intimal hyperplasia; sphingosine 1-phosphate receptor; phenotypic switch; proliferation; migration

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81770379). Corresponding author: ZHAO Li, E-mail: 420105321@qq.com

近年来,我国心血管疾病发病率逐年攀升,尤其是冠状动脉粥样硬化性疾病。尽管经皮冠状动脉腔内成形术、经皮冠状动脉支架植入术等血管介入技术可有效再通梗阻血管,实现血流重建和再灌注,但术中血管机械损伤、支架术后再狭窄,导致患者远期生存率下降[1]。血管机械损伤和支架术后再狭窄的主要病理生理学改变为受损的内皮细胞、浸润炎症细胞等释放大量生长因子和炎症因子,刺激血管平滑肌细胞表型转化和增殖迁移,表型转化主要表现为血管平滑肌细胞收缩型标记分子(如平滑肌肌动蛋白 α-SMA、钙调蛋白 calponin、结蛋白 desmin 等)表达下调,合成型标记分子(如波形蛋白 Vimentin、骨桥蛋白 OPN、基质金属蛋白酶 MMP 等)表达上调,释放大量细胞外基质,血管中层平滑肌细胞增殖并迁移至内膜,血管内膜增厚,导致血管狭窄和血管重构[2]。

1-磷酸鞘氨醇(sphingosine-1-phosphate,S1P)在心血管系统中有着重要作用,参与内皮细胞稳定、血管新生、心肌肥厚、动脉粥样硬化、心脏干细胞归巢、心肌缺血再灌注等病理生理学过程[3-5]。1-磷酸鞘氨醇受体(sphingosine-1-phosphate receptor,S1PR)分为 1~5 型,在内皮细胞主要表达 S1PR1、S1PR2 和 S1PR3;在血管平滑肌细胞各种亚型中均有表达,主要为 S1PR2;在心肌细胞表达 S1PR1、S1PR2 和 S1PR3[6]。S1PR 均属 G 蛋白偶联受体,其引起的细胞内信号转导途径有:①Gi 激活 Ras/ERK 通路,促进细胞增殖;激活 PI3K/Akt 通路,抑制凋亡;激活 PI3K/Rac 通路,促进细胞骨架结构重排和迁移。②G12/13 激活 Rho/ROCK 通路,抑制 Rac 途径,抑制细胞增殖迁移。③Gq 激活 PLC 途径,增加细胞内钙离子浓度[7]。S1PR1 主要激活 Gi 通路,促进细胞增殖、迁移、维持血管内皮屏障、促进正常血管发育;S1PR2 激活 Gi、G12/13、Gq,抑制细胞增殖、迁移、血管新生,促进血管收缩;S1PR3 激活 Gi、G12/13、Gq 通路,协同 S1PR1 和 S1PR2 发挥作用,调节内皮屏障完整性,调节血管舒缩,促进正常血管发育。在血管成熟过程中,血管平滑肌细胞 S1PR1 表达明显减少,主要表达 S1PR2[8]。研究表明,S1PR2 抑制血管平滑肌细胞增殖迁移,$S1PR2^{-/-}$小鼠颈动脉结扎后,新生内膜增厚更加严重[9]。而 S1PR1 在动脉损伤后血管内膜增生中的作用及具体机制尚不明确。因此,本研究采用导丝损伤诱导小鼠颈动脉内膜增生模型,腺相关病毒过表达 S1PR1,观察 S1PR1 在血管内膜增生中的作用;进一步通过细胞实验,探讨 S1PR1 在血管平滑肌细胞表型转化、增殖、迁移中的作用及可能机制,为血管内膜增生的治疗提供指导。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

40 只雄性 C57BL/6 小鼠,SPF 级,6~8 周龄,购自四川省人民医院实验动物研究所[生产许可证编号 SCXK(川)2018-15]。S1P 购自美国 Sigma 公司。AAV2 型腺相关病毒(AAV-LacZ 和 AAV-S1PR1)和腺病毒(Ad-LacZ 和 Ad-S1PR1)购自汉恒公司。实验相关一抗均购自 Abclonal 或 Proteintech 公司。所需金属导丝(0.38 mm in diameter, No. C-SF-15-15)购自美国 Bloomington Cook 公司。免疫组化及免疫荧光二抗购自碧云天公司。Transwell 板购自美国 Corning 公司。Cell-Light™ EdU 染色试剂盒购自中国广州 RiboBio 公司。

1.2 实验动物分组

40 只小鼠采用随机数字表法分为 4 组:①假手术+AAV-LacZ 组(AAV-LacZ),10 只,尾静脉注射 AAV-LacZ 病毒,2 周后行假手术(仅切开颈部皮肤,未行颈动脉损伤);②假手术+AAV-S1PR1 组(AAV-S1PR1),

10 只,尾静脉注射 AAV-S1PR1 病毒,2 周后行假手术(仅切开颈部皮肤,未行颈动脉损伤);③导丝损伤+AAV-LacZ 组(Injury+AAV-LacZ),10 只,尾静脉注射 AAV-LacZ 病毒,2 周后行颈动脉导丝损伤手术;④导丝损伤+AAV-S1PR1 组(Injury+AAV-S1PR1),10 只,尾静脉注射 AAV-S1PR1 病毒,2 周后行颈动脉导丝损伤手术。各组尾静脉注射 1×10^{11} PFU AAV2 病毒液。

1.3 颈动脉导丝损伤术

导丝损伤组小鼠 3%戊巴比妥钠麻醉(80 mg/kg),消毒后行颈部前正中切口,分离颈外动脉和颈内动脉。结扎颈外动脉,血管夹暂时夹闭颈内动脉和颈总动脉。显微剪于颈外动脉结扎线上方剪一横向小口,插入直径 0.38 mm 金属导丝进入颈总动脉,旋转进退 5~6 次后退出导丝。在切口近心端结扎颈外动脉,松开颈内动脉和颈总动脉血管夹,剪断线头,缝合皮肤。假手术组除不插入导丝和旋转进退外,其他操作与导丝损伤组均相同。

1.4 组织学检测

颈动脉导丝损伤 4 周后,取手术侧颈总动脉,固定包埋后行 HE 染色。免疫组化染色:组织切片脱蜡置水后,柠檬酸钠高温 15 min 进行抗原修复,3% H_2O_2 封片 1 h,阻断内源性过氧化物酶干扰,山羊血清封闭 1 h,滴加 PCNA 一抗(1∶100)或 IL-6 一抗(1∶100),4 ℃封闭过夜,PBS 洗涤加生物素化二抗,室温孵育 0.5 h,PBS 洗 3 遍。辣根过氧化物酶抗生物素三抗,室温孵育 0.5 h,PBS 洗 3 遍。DAB 显色,阳性表达区域为黄褐色。组织免疫荧光:α-SMA 一抗(1∶150),FITC 标记二抗(1∶100),DAPI 染细胞核,阳性表达区域呈绿色。

1.5 小鼠原代主动脉平滑肌细胞分离培养

取 3 月龄的 C57BL/6 普通小鼠 6 只,购自四川省人民医院实验动物研究所。麻醉后打开胸腔,取胸主动脉,用眼科剪去除肋间动脉分支,轻柔去除血管外层脂肪组织。用生理盐水冲洗血管腔后,放入 1 mL Ⅱ型胶原酶溶液(2 mg/mL)中浸泡 15 min,用眼科镊剥除血管外膜(呈脱袜状),勿牵拉血管,纵行剪开血管,用无菌棉签刮除内皮细胞,将中层平滑肌组织剪碎,放入 3 mL 消化液(2 mg/mL Ⅱ型胶原酶+1% BSA)中,室温摇床上消化 1.5 h。1 000×*g* 离心 10 min 后,弃上清。加入 5 mL 含 20%胎牛血清和 100 U/L 双抗的 DMEM 培养基重悬,将组织块平铺在培养瓶瓶底,竖立培养瓶,使组织稍干,紧贴于培养瓶底。20 min 后,将培养瓶放平,使培养基浸润组织块,动作轻柔,勿使组织块飘起。培养箱培养 7 d,观察血管平滑肌细胞生长情况。用 α-SMA(1∶200)鉴定原代小鼠主动脉平滑肌细胞,FITC 标记荧光二抗染色。

1.6 细胞实验

小鼠原代主动脉平滑肌细胞消化后,接种于 6 孔板,融合度达到 30%~40%时,实验分 4 组:①saline+Ad-LacZ 组加入腺病毒 Ad-LacZ(MOI=100)孵育 12 h;②saline+Ad-S1PR1 组加入腺病毒 Ad-S1PR1(MOI=100)孵育 12 h;③S1P+Ad-LacZ 组加入腺病毒 Ad-LacZ(MOI=100)孵育 12 h 后换含 1%胎牛血清的 DMEM 新鲜培养基 1 mL,加入 S1P(1 μmol/L)继续孵育 24 h;④S1P+Ad-S1PR1 组加入腺病毒 Ad-S1PR1(MOI=100)孵育 12 h 后换含 1%胎牛血清的 DMEM 新鲜培养基 1 mL,加入 S1P(1 μmol/L)继续孵育 24 h。

1.7 Western blot 检测

取各组小鼠颈动脉或原代血管平滑肌细胞,加入 RIPA 裂解液后匀浆,BCA 法测定匀浆蛋白浓度,加入 6×loading buffer,上样后行 SDS-PAGE 胶电泳,转膜 2 h。5% BSA 封闭 2 h,相应一抗(1∶1 000)4 ℃孵育过夜。TBST 洗 3 次后,二抗室温孵育 2 h,加入显影液后曝光。采用 Gel-Pro Analyzer 4.0 进行分析。

1.8 细胞免疫荧光

24 孔板培养原代血管平滑肌细胞,各组细胞处理同 1.7。弃去培养基,PBS 洗 3 遍;4%多聚甲醛固定 15 min,PBS 洗 3 遍;0.5% TritonX-100 室温通透 20 min,PBS 洗 3 遍;5%BSA 封闭 2 h,PBS 洗 3 遍;加入 α-SMA 一抗工作液(1∶200)75 μL,4 ℃孵育过夜,PBS 洗 3 遍;加入 FITC 标记荧光二抗,室温孵育 1.5 h,PBS 洗 3 遍;DAPI 复染 5 min,PBS 洗 3 遍,荧光显微镜拍照。

1.9 EdU 染色

采用 Cell-Light™ EdU 染色试剂盒检测增殖活性。细胞融合度达到 40%~50%时,换含 1%胎牛血清的 DMEM 新鲜培养基 1 mL,加入腺病毒 Ad-LacZ 或 Ad-S1PR1(MOI=100)孵育 12 h,加入 S1P(1 μmol/L)孵育 1 h 后,加 EdU(终浓度 10 μmol/L)继续孵育 24 h,固定细胞,DAPI 染细胞核,倒置显微镜观察并拍照。红染细胞核为阳性,用 Image Pro Plus 6.0 观察并计算 EdU 阳性细胞比例,检测细胞增殖活性。

1.10 划痕实验

细胞融合度达到 40%~50%时,加入腺病毒 Ad-LacZ 或 Ad-S1PR1(MOI=100)孵育,待细胞长至 90%左右,用高压灭菌枪头在 6 孔板中央区域作一条平整划痕,加入 S1P(1 μmol/L)孵育 24 h 后,Image Pro Plus 6.0 测定并计算细胞迁移距离。

1.11 Transwell 实验

选用 8 μm 孔径 Transwell 板进行相关实验。上室加入 200 μL 含有 2×10^4 细胞和腺病毒(MOI=100)的悬液,下室加入 750 μL 含 1%胎牛血清培养基,培养 12 h。弃去上室和下室培养基,上室加入 200 μL 新鲜无血清培养基,下室加入 750 μL 新鲜无血清培养基(含终浓度为 1 μmol/L 的 S1P),继续孵育 24 h。PBS 洗涤 Transwell 小室后,棉签轻轻擦除上室内侧细胞,甲醇固定后 DAPI 染色,倒置显微镜下拍照并进行染色细胞计数。

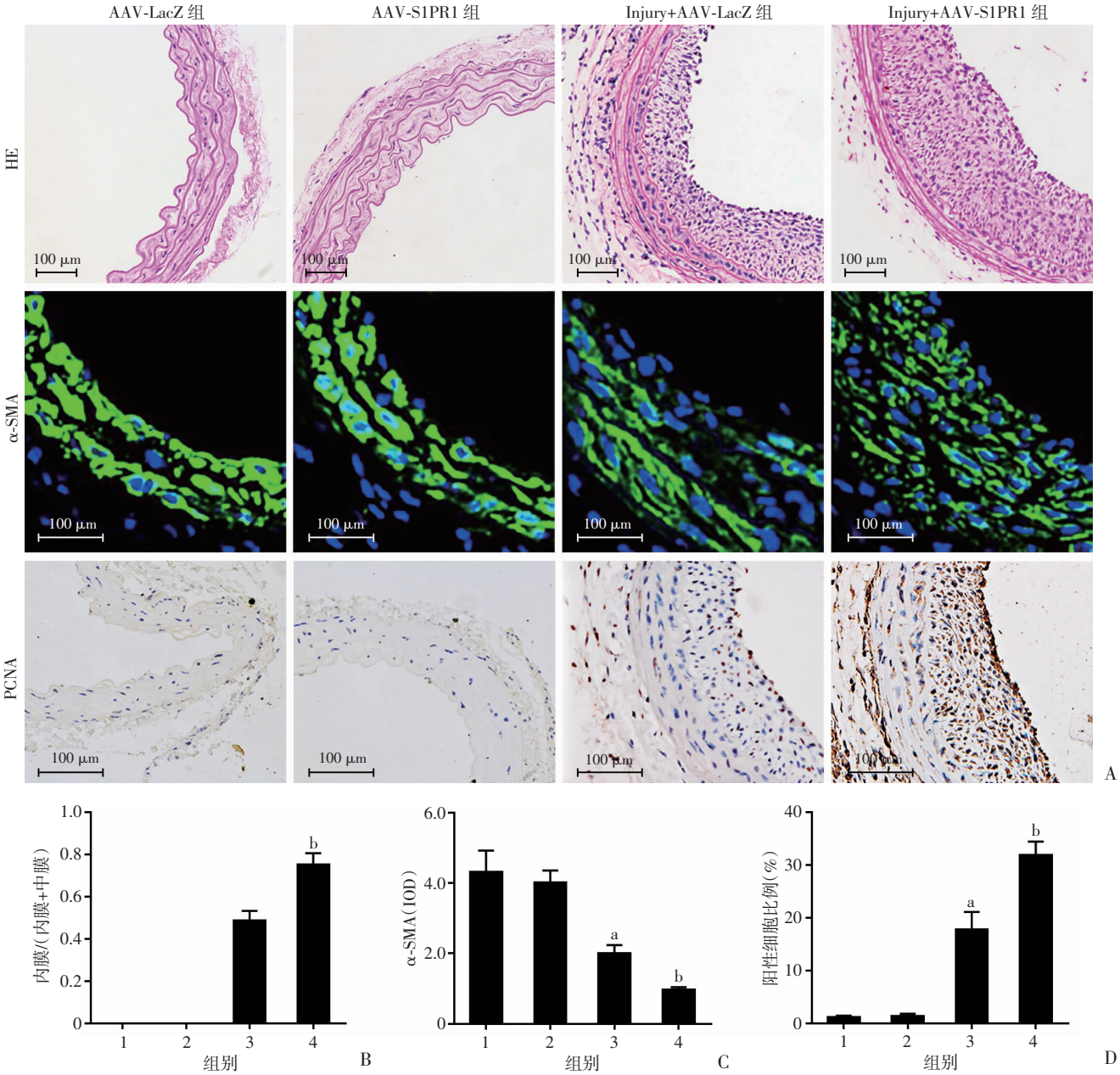
1.12　统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。确定为正态分布后,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$。

2　结果

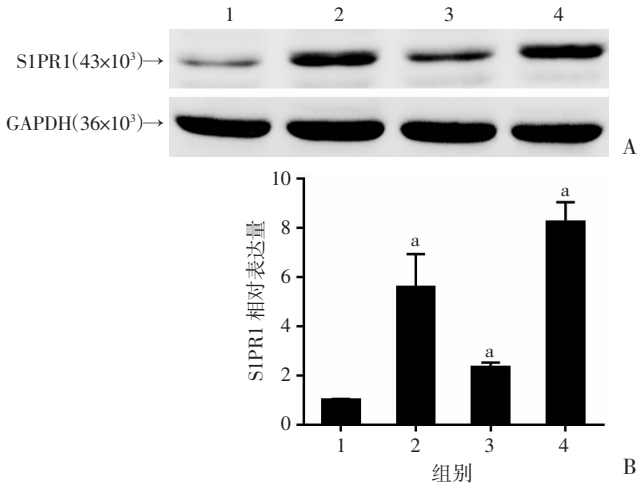
2.1　过表达 S1PR1 加重导丝损伤后血管内膜增生

导丝损伤 4 周后,成功诱导小鼠颈动脉内膜增生。与 AAV-LacZ 组相比,Injury+AAV-LacZ 组小鼠颈动脉可见明显血管重构:血管内膜增生,血管平滑肌细胞表型转化和内膜细胞增殖(图 1A)。HE 染色可见显著内膜增生和管腔狭窄(图 1A、B),免疫组化和免疫荧光观察显示:损伤后血管平滑肌细胞 α-SMA 表达下调($P<0.05$,图 1A、C),内膜增殖标记蛋白 PCNA 阳性细胞比例上调($P<0.05$,图 1A、D);同时,Western blot 检测发现导丝损伤后颈动脉 S1PR1 表达上调($P<0.05$),AAV-S1PR1 组和 Injury+AAV-S1PR1 组颈动脉组织 S1PR1 表达均上调($P<0.05$,图 2)。与 Injury+AAV-LacZ 组相比,Injury+AAV-S1PR1 组血管内膜增生,血管平滑肌细胞表型转化和内膜细胞增殖现象更加严重(图 1)。



A:各组颈动脉组织形态学检测;B:各组颈动脉内膜/(内膜+中膜)厚度比值;C:各组颈动脉组织 α-SMA 免疫荧光光密度值;D:各组颈动脉组织 PCNA 阳性细胞比例　1:AAV-LacZ 组;2:AAV-S1PR1 组;3:Injury+AAV-LacZ 组;4:Injury+AAV-S1PR1 组　a:$P<0.05$,与 AAV-LacZ 组比较;b:$P<0.05$,与 Injury+AAV-LacZ 组比较

图 1　过表达 S1PR1 加重导丝损伤后血管内膜增生



1:AAV-LacZ 组;2:AAV-S1PR1 组;3:Injury+AAV-LacZ 组;4:Injury+AAV-S1PR1 组;a:$P<0.05$,与 AAV-LacZ 组比较
A:Western blot 检测结果;B:半定量分析

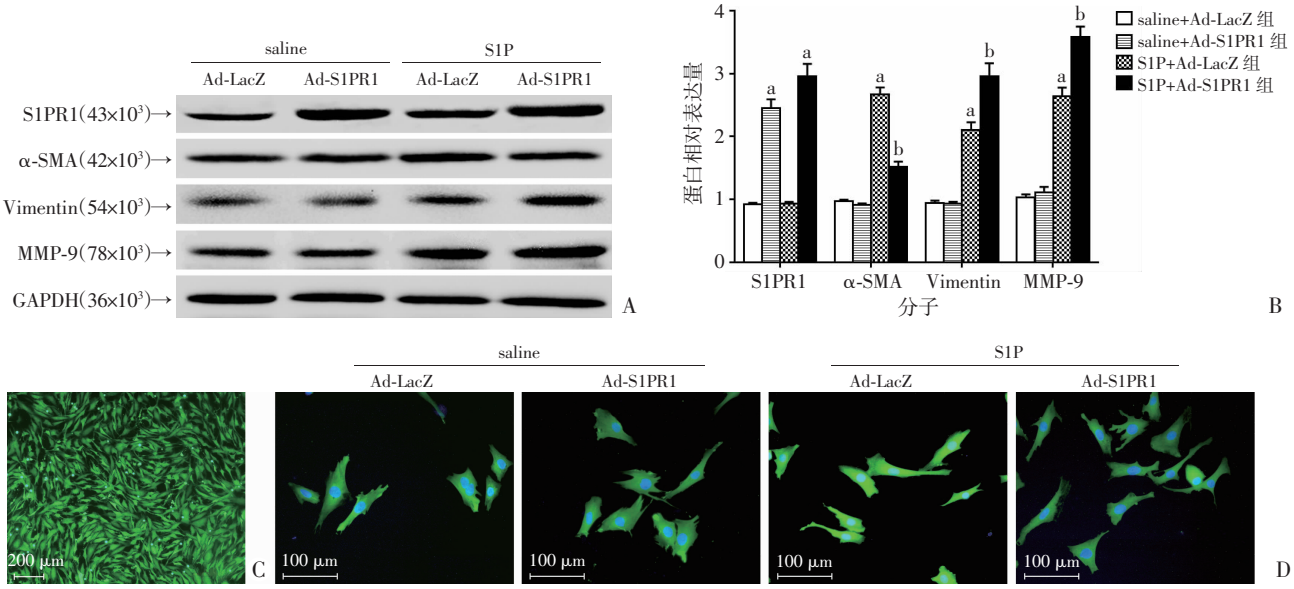
图 2　Western blot 检测各组颈动脉组织 S1PR1 表达及半定量分析

2.2　S1PR1 加重 S1P 诱导的小鼠原代血管平滑肌细胞表型转化

成功分离培养小鼠原代血管平滑肌细胞,经 α-SMA 染色鉴定,纯度在 95%以上(图 3C)。Western blot 检测结果显示:与 saline+Ad-LacZ 组(对照)相比,S1P+Ad-LacZ 组 α-SMA 表达上调($P<0.05$),Vimentin 和 MMP-9 表达也上调($P<0.05$)。利用 Ad-S1PR1 诱导原代血管平滑肌细胞 S1PR1 高表达($P<0.05$)。与 S1P+Ad-LacZ 组相比,S1P+Ad-S1PR1 组 α-SMA 表达水平下降,Vimentin 和 MMP-9 表达水平进一步上升($P<0.05$),出现显著的血管平滑肌细胞表型转化现象(图 3A、B)。而细胞免疫荧光发现类似变化(图 3D)。结果提示:S1PR1 加重 S1P 诱导的小鼠原代血管平滑肌细胞表型转化。

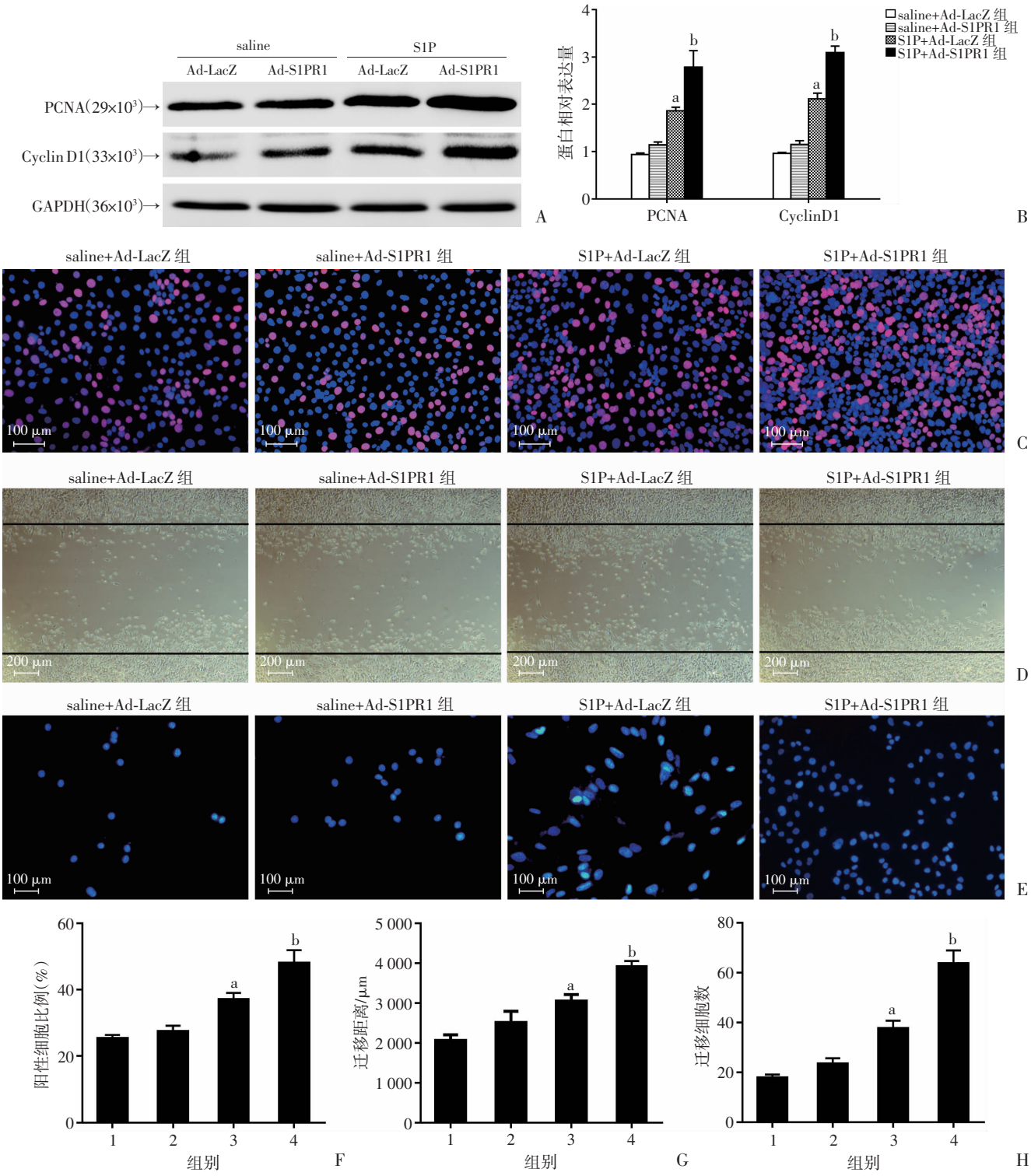
2.3　S1PR1 促进 S1P 诱导的小鼠原代血管平滑肌细胞增殖和迁移

Western blot 检测结果显示:与 saline+Ad-LacZ 组相比,S1P+Ad-LacZ 组增殖标志性蛋白分子 PCNA 和 Cyclin D1 表达上调($P<0.05$);与 S1P+Ad-LacZ 组相比,S1P+Ad-S1PR1 组 PCNA 和 Cyclin D1 表达水平进一步升高($P<0.05$,图 4A、B)。EdU 染色结果显示:与 saline+Ad-LacZ 组相比,S1P+Ad-LacZ 组阳性细胞比例上升($P<0.05$),说明 S1P 可诱导血管平滑肌细胞增殖;过表达 S1PR1 后,与 S1P+Ad-LacZ 组相比,S1P+Ad-S1PR1 组 EdU 染色阳性细胞比例进一步上升($P<0.05$,图 4C、F)。划痕实验和 Transwell 实验结果显示:与 saline+Ad-LacZ 组相比,S1P+Ad-LacZ 组血管平滑肌细胞迁移能力增强;与 S1P+Ad-LacZ 组相比,S1P+Ad-S1PR1 组血管平滑肌细胞迁移能力进一步增强($P<0.05$,图 4D、E、G、H)。结果提示:S1P 可诱导血管平滑肌细胞增殖和迁移,过表达 S1PR1 后,S1P 诱导小鼠原代血管平滑肌细胞增殖和迁移能力进一步增强。



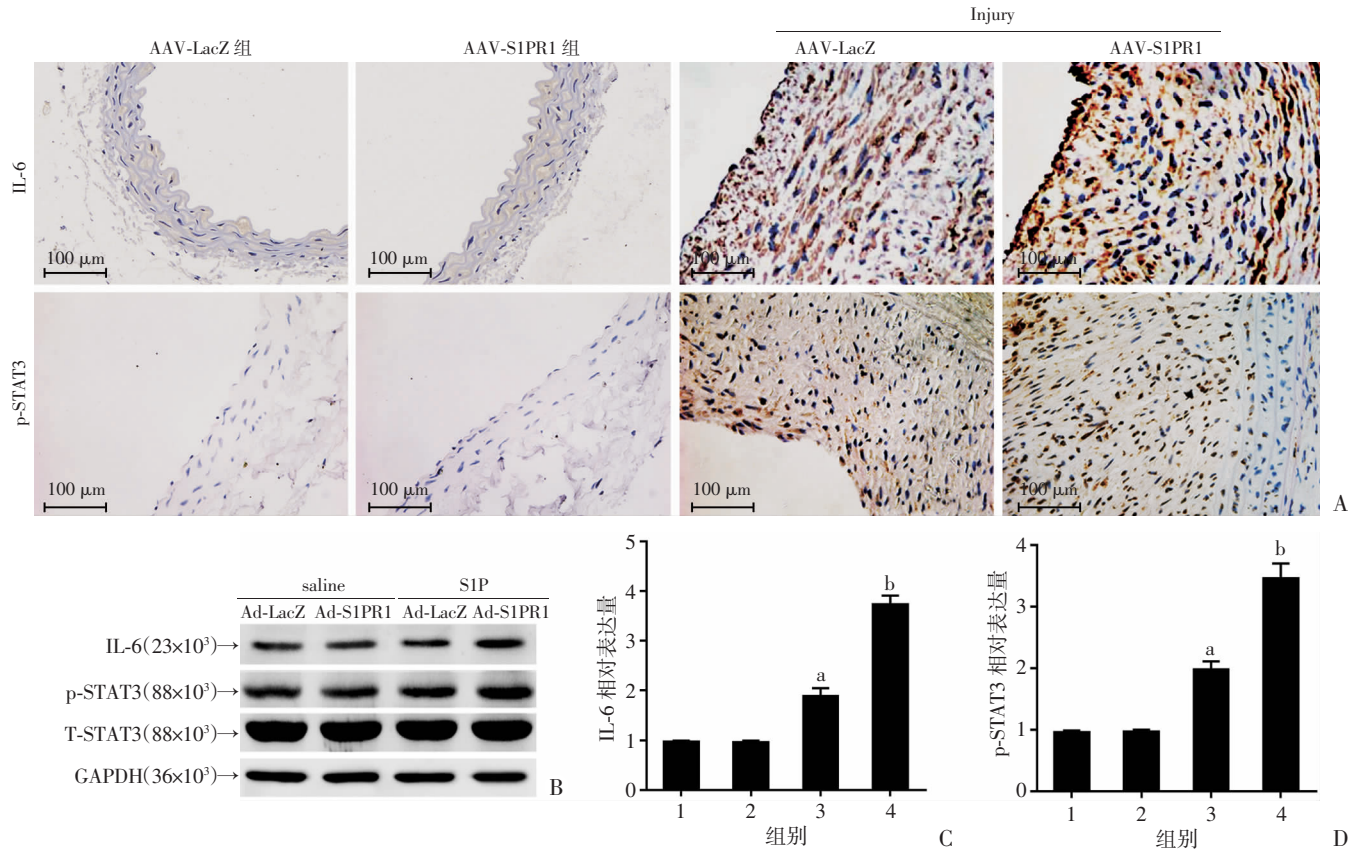
A、B:Western blot 检测各组原代血管平滑肌细胞表型转化相关蛋白表达及半定量分析　a:$P<0.05$,与 saline+Ad-LacZ 组比较;b:$P<0.05$,与 S1P+Ad-LacZ 组比较;C:α-SMA 染色鉴定原代血管平滑肌细胞;D:细胞免疫荧光检测各组原代血管平滑肌细胞 α-SMA 表达水平　绿色:α-SMA;蓝色:DAPI

图 3　S1PR1 加重 S1P 诱导的小鼠原代血管平滑肌细胞表型转化



A、B:Western blot 检测各组原代血管平滑肌细胞增殖相关蛋白表达水平及半定量分析;C、F:EdU 染色观测各组原代血管平滑肌细胞增殖能力及相应定量分析　红色:EdU;蓝色:DAPI;D、G:划痕实验检测各组原代血管平滑肌细胞迁移能力及迁移距离分析;E、H:Transwell 实验检测各组原代血管平滑肌细胞迁移能力及迁移细胞数分析　1:saline+Ad-LacZ 组;2:saline+Ad-S1PR1 组;3:S1P+Ad-LacZ 组;4:S1P+Ad-S1PR1 组;a:$P<0.05$,$n=3$,与 saline+Ad-LacZ 组比较;b:$P<0.05$,与 S1P+Ad-LacZ 组比较

图 4　S1PR1 促进 S1P 诱导的小鼠原代血管平滑肌细胞增殖和迁移



A:免疫组化检测各组小鼠颈动脉组织 IL-6 表达水平;B~D:分别为 Western blot 检测各组原代血管平滑肌细胞 IL-6、p-STAT3 和总 STAT3 表达水平及半定量分析 1:saline+Ad-LacZ 组;2:saline+Ad-S1PR1 组;3:S1P+Ad-LacZ 组;4:S1P+Ad-S1PR1 组;a:$P<0.05$,与 Saline+Ad-LacZ 组比较;b:$P<0.05$,与 S1P+Ad-LacZ 组比较

图 5 S1P/S1PR1 激活原代血管平滑肌细胞 IL-6/STAT3 通路从而促进血管内膜增生

2.4 S1P/S1PR1 激活血管平滑肌细胞 IL-6/STAT3 通路从而促进血管内膜增生

动物组织免疫荧光检测结果显示:与 AAV-LacZ 组相比,Injury+AAV-LacZ 组小鼠颈动脉组织 IL-6 和 p-STAT3 表达上调;而与 Injury+AAV-LacZ 组相比,Injury+AAV-S1PR1 组颈动脉组织 IL-6 和 p-STAT3 表达上调更加显著(图 5A)。Western blot 检测结果显示:与 saline+Ad-LacZ 组相比,S1P+Ad-LacZ 组原代血管平滑肌细胞 p-STAT3 和 IL-6 表达上调($P<0.05$);与 S1P+Ad-LacZ 组相比,S1P+Ad-S1PR1 组血管平滑肌细胞 p-STAT3 和 IL-6 表达水平进一步升高($P<0.05$,图 5B~D)。

3 讨论

支架植入术后再狭窄、冠脉搭桥术后旁路再狭窄及血管损伤后血管重构的主要病理生理学改变为血管内膜增生。血管平滑肌细胞表型转化、增殖和迁移是血管内膜增生的病理生理学基础[10]。血管损伤后,受损内皮细胞和炎症细胞释放炎症因子和细胞因子(如血小板源生长因子 PDGF),促进血管平滑肌细胞发生显著表型转化(静止/收缩型标记蛋白平滑肌肌动蛋白 α-SMA、钙调蛋白 calponin、平滑肌分化特异性抗原 smoothelin 等表达减少,合成型标记蛋白波形 Vimentin、基质金属蛋白 MMP、骨桥蛋白 OPN 等表达增多);同时血管平滑肌细胞增殖和迁移能力增强,迁移至血管内膜,合成分泌大量细胞外基质,形成新生内膜和管腔狭窄[10-11]。本研究发现导丝损伤后新生内膜增厚,伴有显著的血管平滑肌细胞表型转化、增殖,这与以往研究结果一致。

鞘氨醇(sphingosine,Sph)在鞘氨醇激酶(SphK)催化下形成具有生物活性的 1-磷酸鞘氨醇(S1P)。血浆中 60%~80% 的 S1P 与高密度脂蛋白(HDL)相结

合。S1P 作为具有生物活性的脂质代谢产物,在心血管系统和免疫系统中有着重要作用[12-13]。S1PR 有 5 型,血管系统主要表达 1~3 型。研究表明,成熟血管平滑肌细胞主要表达 S1PR2,抑制血管平滑肌细胞增殖和迁移,维持血管平滑肌静止状态[7,14-15],S1PR2$^{-/-}$小鼠颈动脉损伤后血管内膜增生严重[9]。成熟血管平滑肌细胞 S1PR1 表达水平低,而在血管损伤修复过程中 S1PR1 表达有上调趋势,提示 S1PR1 可能在血管重构发生、发展中有着重要作用[7]。本研究动物实验结果显示:颈动脉损伤后内膜新生增厚,血管 S1PR1 表达上调,与上述推断一致。既往研究表明,S1P 通过激活 S1PR1,促进 PDGF 分泌,促进血管平滑肌细胞增殖迁移[16]。VPC25239 选择性抑制 S1PR1/3 后,S1P 诱导的血管平滑肌细胞增殖效应受到一定程度抑制,收缩型标记分子 α-SMA、smoothelin 荧光报告基因表达活性增高;JTE013 特异性抑制 S1PR2 后,S1P 诱导的血管平滑肌细胞增殖能力增强,α-SMA、smoothelin 荧光报告基因表达活性降低[14],说明 S1P 通过激活 S1PR1 促进血管平滑肌细胞增殖、迁移和表型转化。本研究动物实验结果显示,过表达 S1PR1 加重颈动脉损伤后血管内膜新生;细胞实验结果显示,S1PR1 促进 S1P 诱导的血管平滑肌细胞表型转化、增殖和迁移。细胞实验中 S1P 诱导血管平滑肌表型转化时收缩型标记分子 α-SMA 和合成型标记分子 Vimentin 均表达上调。这可能是由于原代血管平滑肌细胞同时表达较高丰度 S1PR1 和 S1PR2,S1P/S1PR1 促进血管平滑肌细胞表型转化和增殖迁移,S1P/S1PR2 促进血管平滑肌细胞向收缩型分化并上调 α-SMA 表达。

血管损伤后血管重构局部炎症激活,聚集的炎症细胞和受损血管平滑肌细胞炎症通路激活,释放大量炎症因子和细胞因子,加重血管内膜增生。作为重要的细胞因子,IL-6 与动脉粥样硬化、心肌梗死等多种心血管疾病发病率正相关[17]。研究表明,血管平滑肌细胞 IL-6 表达上调后,血管损伤后内膜增生更加严重[18]。S1P/S1PR1 可通过 Gi 激活 JAK2-STAT3 通路,促进 IL-6 表达上调,而 IL-6 与 IL-6R 结合后,继续激活 JAK2-STAT3,形成正反馈效应,从而促进肿瘤的发生、发展[19]。本研究动物实验结果显示,导丝损伤后颈动脉组织 IL-6 表达上调,激活血管平滑肌细胞 IL-6/STAT3 通路。过表达 S1PR1 后,颈动脉组织 IL-6 表达进一步上调,IL-6/STAT3 通路进一步激活,可能级联激活下游其他炎症转录因子和增殖相关基因,促进血管平滑肌细胞增殖迁移,加重损伤后血管重构。

综上,本研究发现过表达 S1PR1 后,S1P/S1PR1 促进血管平滑肌细胞表型转化和增殖迁移,加重损伤后血管内膜增生,可能与血管平滑肌细胞 IL-6/STAT3 通路激活有关,其具体机制需进一步探究。

参考文献:

[1] WEINTRAUB W S. The pathophysiology and burden of restenosis[J]. Am J Cardiol, 2007, 100(5): S3-S9. DOI: 10.1016/j.amjcard.2007.06.002.

[2] ZHANG S M, ZHU L H, CHEN H Z, *et al*. Interferon regulatory factor 9 is critical for neointima formation following vascular injury[J]. Nat Commun, 2014, 5: 5160. DOI:10.1038/ncomms6160.

[3] SANCHEZ T. Sphingosine-1-phosphate signaling in endothelial disorders[J]. Curr Atheroscler Rep, 2016, 18(6): 1-13. DOI:10.1007/s11883-016-0586-1.

[4] VESTRI A, PIERUCCI F, FRATI A, *et al*. Sphingosine 1-phosphate receptors: do they have a therapeutic potential in cardiac fibrosis? [J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 296. DOI:10.3389/fphar.2017.00296.

[5] ŻAK M M, GKONTRA P, CLEMENTE C, *et al*. Sequential bone-marrow cell delivery of VEGFA/S1P improves vascularization and limits adverse cardiac remodeling after myocardial infarction in mice[J]. Hum Gene Ther, 2019, 30(7): 893-905. DOI:10.1089/hum.2018.194.

[6] DAI M, WU L, HE Z, *et al*. Epoxyeicosatrienoic acids regulate macrophage polarization and prevent LPS-induced cardiac dysfunction[J]. J Cell Physiol, 2015, 230(9): 2108-2119. DOI:10.1002/jcp.24939.

[7] TAKUWA Y. Sphingosine-1-phosphate signaling and biological activities in the cardiovascular system[J]. Biochim et Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids, 2008, 1781(9): 483-488. DOI:10.1016/j.bbalip.2008.04.003.

[8] 张大棣, 张智超, 伍荣, 等. 1-磷酸鞘氨醇受体在心血管系统中的作用及机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(11): 1047-1052.
ZHANG D D, ZHANG Z C, WU R, *et al*. Effects and mechanisms of sphingosine-l-phosphate receptors in cardiovascular system[J]. Chin J Arterioscler, 2013, 21(11): 1047-1052.

[9] SHIMIZU T, NAKAZAWA T, CHO A, *et al*. Sphingosine 1-phosphate receptor 2 negatively regulates neointimal formation

in mouse arteries[J]. Circ Res, 2007, 101(10): 995-1000. DOI:10.1161/circresaha.107.159228.

[10] O'BRIEN E R, MA X, SIMARD T, *et al*. Pathogenesis of neointima formation following vascular injury[J]. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2011, 11(1): 30-39. DOI: 10.2174/187152911795945169.

[11] MCDONALD O G, OWENS G K. Programming smooth muscle plasticity with chromatin dynamics[J]. Circ Res, 2007, 100(10): 1428-1441. DOI: 10.1161/01.res.0000266448.30370.a0.

[12] ZHANG F, XIA Y, YAN W, *et al*. Sphingosine 1-phosphate signaling contributes to cardiac inflammation, dysfunction, and remodeling following myocardial infarction [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2016, 310(2): H250-H261. DOI:10.1152/ajpheart.00372.2015.

[13] PETERS S L, ALEWIJNSE A E. Sphingosine-1-phosphate signaling in the cardiovascular system[J]. Curr Opin Pharmacol, 2007, 7(2): 186-192. DOI:10.1016/j.coph.2006.09.008.

[14] WAMHOFF B R, LYNCH K R, MACDONALD T L, *et al*. Sphingosine-1-phosphate receptor subtypes differentially regulate smooth muscle cell phenotype[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28(8): 1454-1461. DOI:10.1161/atvbaha.107.159392.

[15] WANG Y, CHEN D, ZHANG Y, *et al*. Novel adipokine, FAM19A5, inhibits neointima formation after injury through sphingosine-1-phosphate receptor 2[J]. Circulation, 2018, 138(1): 48-63. DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.032398.

[16] TANIMOTO T, LUNGU A O, BERK B C. Sphingosine 1-phosphate transactivates the platelet-derived growth factor β receptor and epidermal growth factor receptor in vascular smooth muscle cells[J]. Circ Res, 2004, 94(8): 1050-1058. DOI:10.1161/01.res.0000126404.41421.be.

[17] KAPTOGE S, SESHASAI S R, GAO P, *et al*. Inflammatory cytokines and risk of coronary heart disease: new prospective study and updated meta-analysis[J]. Eur Heart J, 2014, 35(9): 578-589. DOI:10.1093/eurheartj/eht367.

[18] MORIYA J. Critical roles of inflammation in atherosclerosis [J]. J Cardiol, 2019, 73(1): 22-27. DOI:10.1016/j.jjcc.2018.05.010.

[19] LEE H, DENG J, KUJAWSKI M, *et al*. STAT3-induced S1PR1 expression is crucial for persistent STAT3 activation in tumors[J]. Nat Med, 2010, 16(12): 1421-1428. DOI:10.1038/nm.2250.

(**收稿**:2020-09-05;**修回**:2020-10-05)

(编辑 汪勤俭)