DOI:10.16016/j.1000-5404.202103139

褪黑素抑制氧化型低密度脂蛋白诱导血管平滑肌细胞增殖

唐 杨,刘 川,康华利,晋 军 400037 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第二附属医院心血管内科

[摘要] **目的** 观察褪黑素(melatonin,Mel)对氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,VSMCs)增殖功能的影响并探讨其可能的分子机制。**方法** ①选用不同浓度(0、10、20、50、100 μg/mL)的 ox-LDL 诱导 VSMCs 48 h 后检测细胞增殖功能,观察各浓度 ox-LDL 对 VSMCs 功能的影响。②选择最佳浓度(50 μg/mL)的 ox-LDL 诱导 VSMCs 0、6、12、24、48 h 后检测细胞增殖功能,观察各时间点 ox-LDL 对 VSMCs 功能的影响。③50 μg/mL 的 ox-LDL 诱导 VSMCs 24 h 后,再用 1、1×10^3、1×10^5、1×10^6 nmol/L 的 Mel 处理 VSMCs 48 h,观察 Mel 作用不同时间对 VSMCs 增殖功能的影响。④使用 ox-LDL 联合 Mel 处理 VSMCs。实验分 4 组:空白对照组(VSMCs 正常培养不进行任何处理),Mel 组(1×10^5 nmol/L Mel 处理 VSMCs 48 h),ox-LDL 组(50 μg/mL ox-LDL 诱导 VSMCs 24 h),ox-LDL+ Mel 组(使用 50 μg/mL 的 ox-LDL 诱导 VSMCs 24 h 后,接着使用 1×10^5 nmol/L 的 Mel 处理 VSMCs 48 h)。采用 CCK-8 法检测细胞增殖,流式细胞术检测细胞周期,免疫荧光染色和 Western blot 检测增殖标记物(PCNA)、α 平滑肌肌动蛋白(α-SMA)、细胞周期素 A(Cyclin A)、细胞周期抑制蛋白 p21 以及细胞外调节蛋白激酶 1/2(ERK1/2)信号通路相关蛋白表达。**结果** 与空白对照组比较,50 μg/mL ox-LDL 处理 VSMCs 24 h 能显著诱导细胞增殖,经 ox-LDL(50 μg/mL)诱导 24 h 后,S 期与 G_1 期细胞显著增加,G_2 期细胞显著减少,促进细胞迁移,上调 PCNA、α-SMA、Cyclin A、p-ERK1/2 蛋白表达,并下调 p-p21 蛋白水平,差异均具有统计学意义($P<0.01$)。1、1×10^3、1×10^5、1×10^6 nmol/L Mel 均可不同程度抑制 ox-LDL 诱导的 VSMCs 增殖,与 ox-LDL 组比较,ox-LDL(50 μg/mL)处理 VSMCs 24 h 后接着使用 Mel(1×10^5 nmol/L)处理 48 h,可使 G_1 期与 S 期细胞显著减少,G_2 期细胞显著增加,降低 PCNA、α-SMA、Cyclin A、p-ERK1/2 蛋白表达,上调 p-p21 蛋白表达,差异均具有统计学意义($P<0.01$)。**结论** Mel 可显著抑制 ox-LDL 诱导的 VSMCs 的增殖,其作用机制可能与激活 P21、阻断 ERK1/2 信号通路相关。

[关键词] 动脉粥样硬化;血管平滑肌细胞;褪黑素;氧化型低密度脂蛋白;增殖

[中图法分类号] R322.12;R329.28;R977.1 [文献标志码] A

Melatonin inhibits ox-LDL-induced proliferation of vascular smooth muscle cells

TANG Yang, LIU Chuan, KANG Huali, JIN Jun Department of Cardiovascular Diseases, Second Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400037, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the effect of melatonin (Mel) on the proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) induced by oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) and investigate the potential molecular mechanism. **Methods** ① ox-LDL at different concentrations (0, 10, 20, 50 and 100 μg/mL) was used to treat VSMCs for 48 h, and cell proliferation was measured with CCK-8 assay.

[基金项目] 重庆英才·创新创业领军人才项目(2019)

[通信作者] 晋 军,E-mail:jjxqyy@163.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/)

② The effect of different time points (0, 6, 12, 24 and 48 h) on the cell viability was also detect after the VSMCs was treated with the optional concentration of ox-LDL (50 μg/mL). ③ After the VSMCs were induced by 50 μg/mL ox-LDL for 24 h, the cells were treated with Mel at 1, 1×10^3, 1×10^5 and 1×10^6 nmol/L for 48 h to determine the effect of Mel on cell viability. ④ The VSMCs were divided into 4 groups, that is, blank control group, Mel group (1×10^5 nmol/L Mel for 48 h), ox-LDL group (50 μg/mL ox-LDL for 24 h), and ox-LDL+Mel group (50 μg/mL ox-LDL for 24 h followed by 1×10^5 nmol/L Mel for 48 h). CCK-8 assay and flow cytometry were employed to detect cell proliferation and cell cycle, respectively. Immunofluorescence staining and Western blotting were adopted to determine the expression of cell proliferation markers, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and α-smooth muscle actin (α-SMA), cell cycle-related protein cyclin A (Cyclin A) and cyclin-dependent kinase inhibitor p21, as well as extracellular regulatory protein kinase 1/2 (ERK1/2). **Results** Compared with the blank control group, treatment of 50 μg/mL ox-LDL for 24 h in VSMCs significantly promoted cell proliferation, induced cell arrested at S and G_1 phase, decreased the proportion of cells at G_2 phase, improved cell migration, up-regulated the expression of PCNA, α-SMA, Cyclin A and p-ERK1/2, and down-regulated that of p-p21 protein (all $P<0.01$). Mel of 1, 1×10^3, 1×10^5 and 1×10^6 nmol/L inhibited the proliferative ability of VSMCs induced by ox-LDL treatment. Compared with the ox-LDL group, the ox-LDL+Mel group had significantly reduced proportion of G_1 and S phase cells, enhanced proportion of G_2 phase cells, decreased protein levels of PCNA, α-SMA, Cyclin A and p-ERK1/2, and increased level of p-p21 ($P<0.01$). **Conclusion** Mel significantly inhibits the proliferation in VSMCs induced by ox-LDL, which might be related to activation of P21 and block of ERK1/2 signaling pathway.

[**Key words**] atherosclerosis; vascular smooth muscle cells; melatonin; oxidized low-density lipoprotein; proliferation

Supported by the Chongqing Meritocratic Project for Leading Talents in Innovation and Entrepreneurship (2019). Corresponding author: JIN Jun, E-mail: jjxqyy@163.com

动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)是一种慢性炎症疾病,为多种心脑血管病的共同基础,其特征是炎性细胞和胆固醇在动脉壁中积聚并涉及全血管病变[1]。近年来,AS 造成的心脑血管病死率在逐年上升,严重威胁着人类的健康[2]。而血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell,VSMCs)过度增殖和异常迁移是 AS 发生发展中的关键环节[3-4],维持 VSMCs 增殖与凋亡之间的动态平衡,减少 VSMCs 的异常迁移对于维持血管正常生理功能至关重要,也是 AS 潜在的治疗靶点[5]。褪黑素(melatonin,Mel)是松果体分泌的一种吲哚类激素,具有抗炎与抗氧化、调节心血管系统功能的作用。既往的研究[6-7]发现,Mel 可以作用于血管 VSMCs,具有调节血管 VSMCs 的作用,但其具体的调节机制目前尚不明确,考虑可能与其抑制 VSMCs 的过度增殖有关。氧化型低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL)是导致动脉粥样硬化和血管钙化的关键因素,可促进血管平滑肌细胞成骨样分化和钙化。本研究拟通过探讨不同浓度 Mel 对 ox-LDL 诱导的 VSMCs 增殖、细胞周期的影响,并检测与细胞周期及增殖相关蛋白的变化以阐明 Mel 调控血管 VSMCs 的分子机制,以期为治疗 AS 提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

细胞株:人 VSMCs 购于中国科学院上海细胞库。ox-LDL、Mel、胎牛血清与胰蛋白酶购自美国 Sigma 公司,DMEM 培养基购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司,CCK-8 试剂盒与 PI 试剂盒购自美国 Promega 公司,化学发光液(ECL)、RIPA 裂解液与 BCA 蛋白检测试剂盒购自上海碧云天生物研究所。鼠抗 PCNA、兔抗 α-SMA、兔抗 Cyclin A、兔抗 P21、兔抗 p-P21 以及鼠抗 β-actin 抗体购自英国 Abcam 公司,兔抗 ERK1/2 与兔抗 p-ERK1/2 抗体购自美国 CST 公司,TRITC 标记山羊抗兔 IgG、FITC 标记山羊抗鼠 IgG 以及 HRP 标记山羊抗兔 IgG 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 细胞培养

将 VSMCs 置于含 10%胎牛血清、1% 青-链霉素的 DMEM 培养基中,在 37 ℃、5%CO_2 细胞培养箱内进行培养,每隔 2 天更换 1 次培养液。待细胞长满培养瓶瓶底后,采用 PBS 缓冲液洗涤细胞,加入 0.25%胰蛋白酶消化并传代培养,本实验选用第 3~6 代细胞进行。

1.3 细胞分组与处理

使用终浓度分别为 0、10、20、50、100 μg/mL 的 ox-LDL 诱导 VSMCs 48 h,检测各组细胞增殖情况。使用 50 μg/mL 的 ox-LDL 诱导 VSMCs 0、6、12、24、48 h,检测各组细胞增殖情况。在 50 μg/mL 的 ox-LDL 诱导 VSMCs 24 h 基础上,使用终浓度分别为 1、1×10^3、1×10^5、1×10^6 nmol/L 的 Mel 处理 VSMCs 48 h,检测各组细胞增殖情况。使用 ox-LDL 联合 Mel 处理 VSMCs,具体分组包括:空白对照组(VSMCs 正常培养不进行任何处理),Mel 组(1×10^5 nmol/L Mel 处理 VSMCs 48 h),ox-LDL 组(50 μg/mL ox-LDL 诱导 VSMCs 24 h),ox-LDL+ Mel 组(使用 50 μg/mL 的 ox-LDL 诱导 VSMCs 24 h 后,接着使用 1×10^5 nmol/L 的 Mel 处理 VSMCs 48 h),并进行后续实验。

1.4 CCK-8 实验

将生长良好的 VSMCs 以 1×10^4/孔接种于 96 孔细胞培养板上,在 37 ℃、5%CO_2 的细胞培养箱中过夜培养。按照 1.3 进行不同处理,每孔设置 3 个复孔。接着,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,混合均匀并置于细胞培养箱内继续培养 1 h,培养结束后,使用酶联免疫检测仪测定每孔在波长 450 nm 处的光密度值 $D(450)$。

1.5 流式细胞术

将生长良好的 VSMCs 接种于 6 孔细胞培养板,按照使用 ox-LDL 联合 Mel 处理 VSMCs,并进行实验分组及药物干预,实验结束后收集细胞,PBS 洗涤细胞,用预冷的 75%乙醇重悬细胞,在-20 ℃下固定 24 h,弃去乙醇,再次使用 PBS 洗涤并重悬细胞,每组取 450 μL 细胞悬液,加 2 μL RNase 在 37 ℃下孵育 10 min,再加入 500 μL 碘化丙啶,37 ℃避光孵育 30 min,通过流式细胞仪检测细胞周期分布。

1.6 免疫荧光染色

细胞爬片,处理完毕后,取出 6 孔板中的载玻片,PBS 洗涤玻片,用 4% 多聚甲醛固定 15 min。室温下采用 0.2%Triton X-100 透化 15 min。用 PBS 洗涤玻片。用 5%胎牛血清室温封闭 1 h,分别将鼠抗 PCNA(1∶100)、兔抗 α-SMA(1∶50)作为一抗加入,以在 4 ℃下孵育过夜。次日 PBS 洗涤玻片后,滴加 TRITC 标记的山羊抗兔 IgG(1∶100)或 FITC 标记山羊抗鼠 IgG(1∶100)作为二抗,暗室室温孵育 1 h,PBS 洗涤。滴加 DAPI 染细胞核 10 min,PBS 再次洗涤后封片,在荧光显微镜观察并进行图像采集。

1.7 Western blot 检测

将 VSMCs 按照 ox-LDL 联合 Mel 处理 VSMCs,并进行实验分组及药物干预,收集各组细胞,使用 RIPA 裂解液抽提细胞总蛋白,按 BCA 蛋白检测试剂盒步骤测定蛋白浓度。制备 10% SDS-PAGE 胶,通过 50 V 恒压电泳 1.5 h,各条带明显分开后将电压调整为 110 V 电泳 1 h 来分离蛋白,分离后切胶并在恒流 200 mA 下转膜 4 h,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h。分别加鼠抗 PCNA(1∶2 000)、兔抗 α-SMA(1∶1 000)、兔抗 Cyclin A(1∶1 000)、兔抗 P21(1∶1 000)、兔抗 p-P21(1∶1 000)、兔抗 ERK1/2(1∶1 000)、兔抗 p-ERK1/2(1∶1 000)、鼠抗 β-actin(1∶1 000)抗体,在 4 ℃下孵育过夜,次日加 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(1∶5 000)后室温孵育 2 h,滴加化学发光液 ECL 显影,使用 Image-Pro Plus 6.0 分析蛋白质的灰度值。

1.8 统计学分析

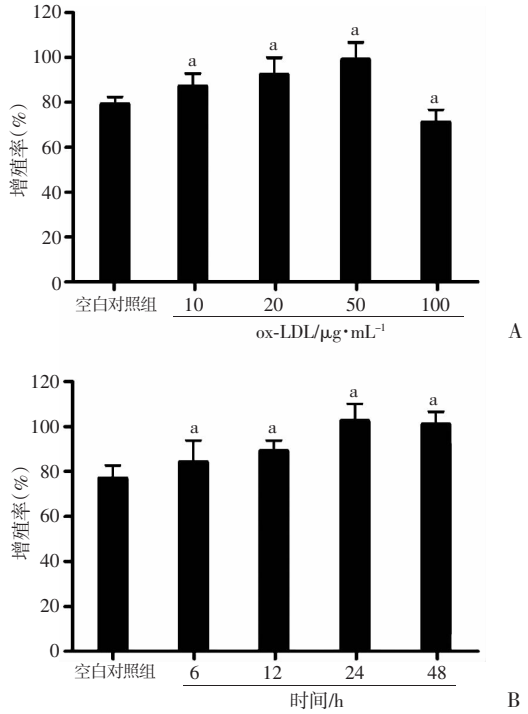
采用 SPSS 23.0 软件分析,实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ox-LDL 对 VSMCs 增殖的影响

CCK-8 法细胞活力测定结果表明,与空白对照组比较,10、20、50 μg/mL 的 ox-LDL 处理 VSMCs 48 h 可显著促进细胞增殖($P<0.01$),说明在一定范围(0~50 μg/mL)内,ox-LDL 呈浓度依赖性地促进 VSMCs 增殖,其中 50 μg/mL ox-LDL 作用效果最为显著($P<0.01$)。而 ox-LDL 浓度继续增加至 100 μg/mL 时,VSMCs 增殖率较对照组显著下降($P<0.01$,图 1A)。

接着使用 50 μg/mL ox-LDL 处理 VSMCs 6、12、24、48 h,与空白对照组(0 h)比较,6~24 h 时 ox-LDL 呈时间依赖性地促进 VSMCs 增殖,其中 50 μg/mL ox-LDL 作用 24 h 效果最为显著($P<0.01$,图 1B)。因此后续实验选择 50 μg/mL ox-LDL 处理 VSMCs 24 h 建立 ox-LDL 诱导模型。



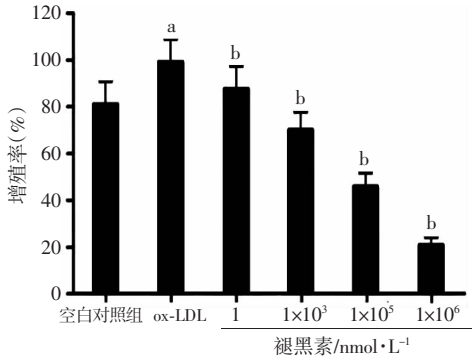
a:$P<0.01$,与空白对照组比较

A:不同浓度 ox-LDL 对 VSMC 增殖的影响;B:50 μg/mL ox-LDL 作用不同时间对 VSMC 增殖的影响

图 1　ox-LDL 对 VSMCs 增殖的影响($n=5,\bar{x}\pm s$)

2.2　Mel 对 ox-LDL 诱导的 VSMCs 增殖的影响

CCK-8 法细胞活力测定结果表明,与空白对照组比较,ox-LDL 组(50 μg/mL ox-LDL 处理 VSMCs 24 h)VSMCs 细胞存活率显著提高($P<0.01$);而 1、1×10^3、1×10^5、1×10^6 nmol/L 的 Mel 均可不同程度抑制 ox-LDL 诱导的 VSMC 增殖($P<0.01$),其中 1×10^5 nmol/L Mel 处理下细胞存活率为 50%左右,因此 Mel 处理浓度以 1×10^5 nmol/L 为宜(图 2)。

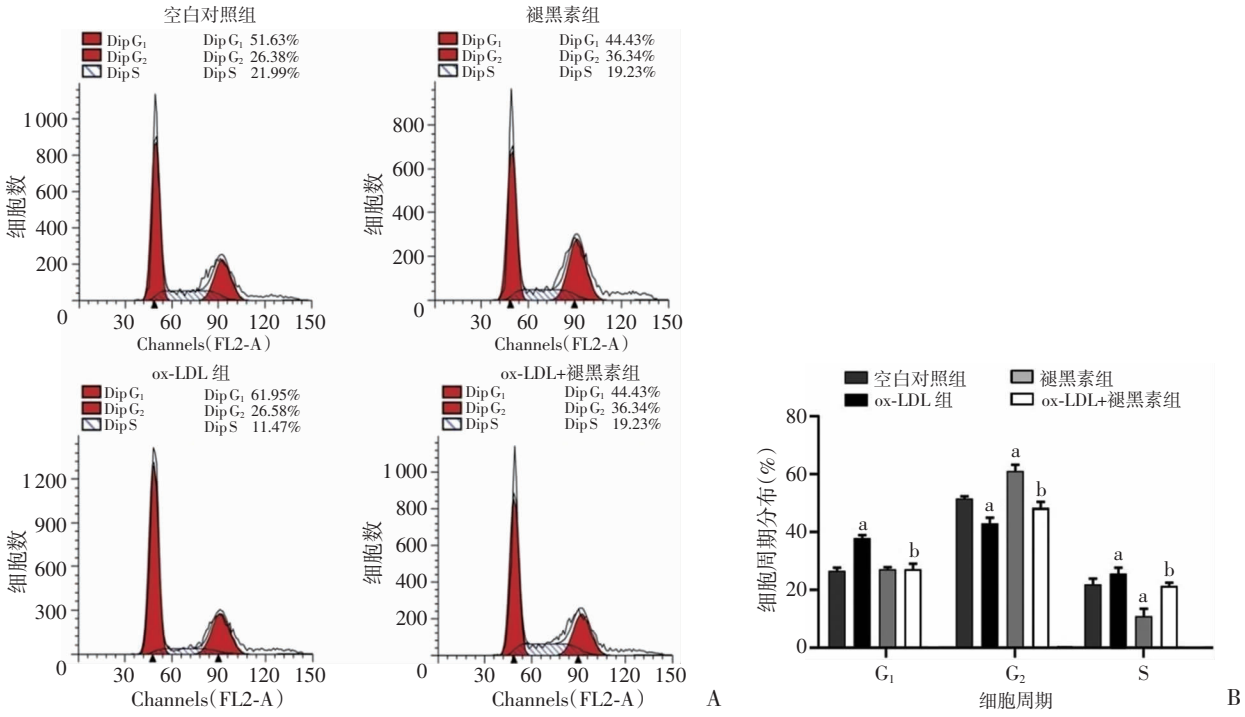


a:$P<0.01$,与空白对照组比较;b:$P<0.01$,与 ox-LDL 组比较

图 2　Mel 对 ox-LDL 诱导下 VSMCs 增殖的影响($n=5,\bar{x}\pm s$)

2.3　Mel 对 ox-LDL 诱导的 VSMCs 细胞周期的影响

流式细胞仪分析细胞周期,结果显示,与空白对照组比较,ox-LDL 组 VSMCs 内 S 期与 G_1 期细胞显著增加,G_2 期细胞显著下降($P<0.01$),而 Mel 组 S、G_1 期细胞显著下降,G_2 期细胞显著增加($P<0.01$);与 ox-LDL 组比较,ox-LDL+Mel 组 G_1 期与 S 期细胞显著下降,G_2 期细胞显著增加($P<0.01$,图 3)。



A:流式细胞术检测结果;B:各组细胞周期统计分析　a:$P<0.01$,与空白对照组比较;b:$P<0.01$,与 ox-LDL 组比较

图 3　各组 VSMCs 细胞周期分布情况($n=5,\bar{x}\pm s$)

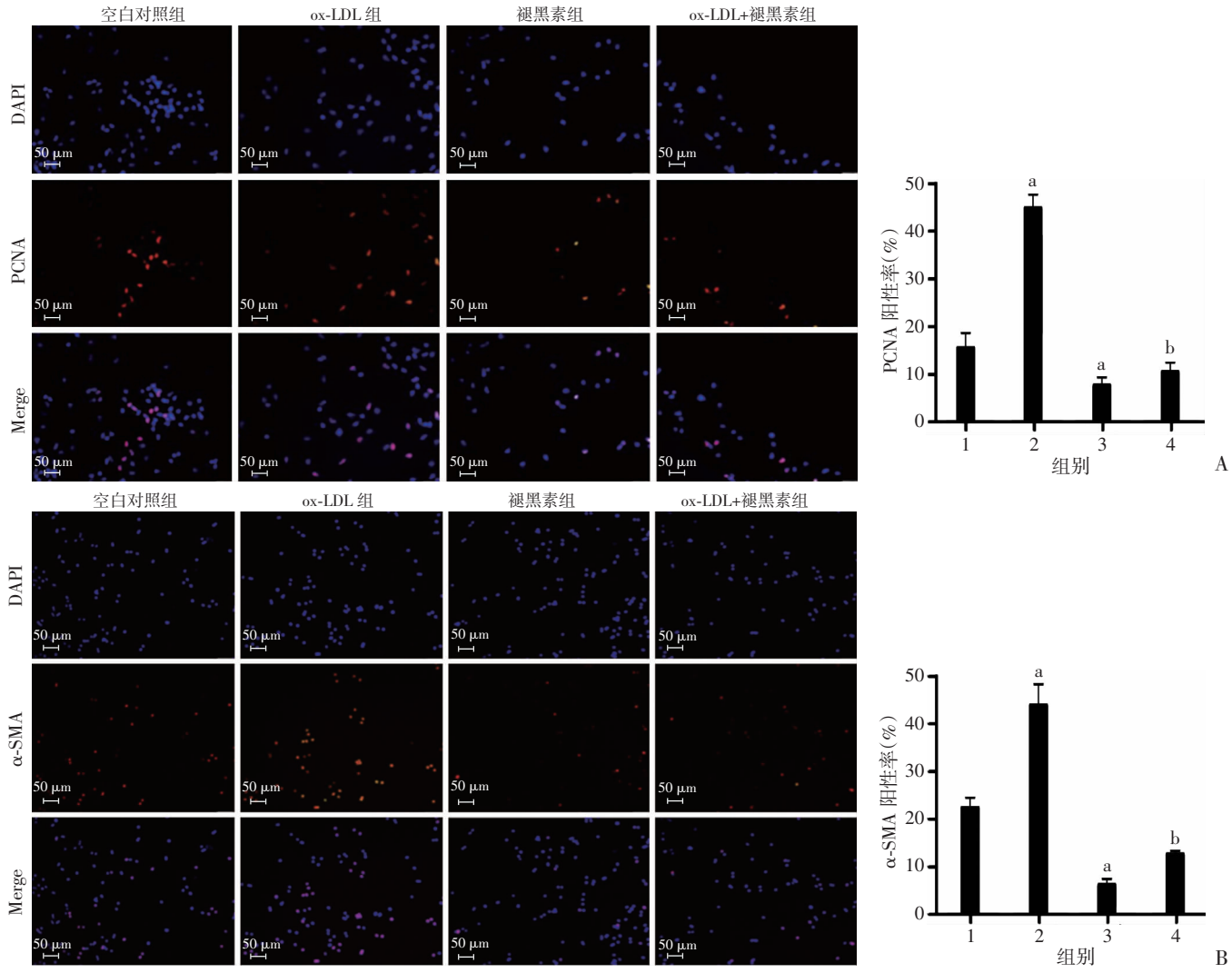
2.4 Mel 对 ox-LDL 诱导的 VSMCs 内 PCNA 与 α-SMA 蛋白表达的影响

免疫荧光染色检测结果显示,ox-LDL 组 VSMCs 内有大量 PCNA、α-SMA 表达,均较空白对照组显著升高($P<0.01$),而 Mel 组 PCNA 与 α-SMA 的阳性率较对照组显著下降($P<0.01$);与 ox-LDL 组比较,ox-LDL+Mel 组 PCNA 与 α-SMA 的阳性率显著下降($P<0.01$,图 4)。

Western blot 检测结果与上述结果一致,与空白对照组比较,ox-LDL 组 VSMCs 内 PCNA 蛋白与 α-SMA 蛋白表达显著升高,而 Mel 组 PCNA、α-SMA 蛋白表达显著下降($P<0.01$);ox-LDL+Mel 组 PCNA、α-SMA 蛋白表达较 ox-LDL 组显著下降($P<0.01$,图 5)。

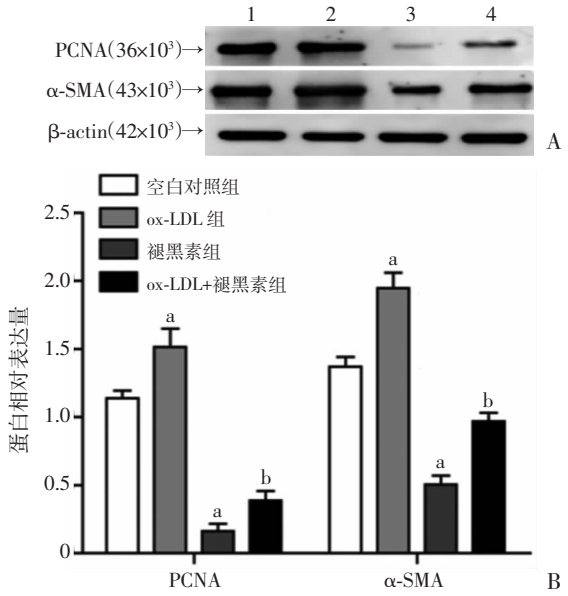
2.5 Mel 对 ox-LDL 诱导的 VSMCs 内 Cyclin A、p-ERK1/2、p-P21 蛋白表达的影响

Western blot 检测结果显示,ox-LDL 组 VSMCs 内 Cyclin A、p-ERK1/2 蛋白表达显著升高,而 p-P21 蛋白表达显著下降($P<0.01$)。Mel 组检测结果与此相反,即 Cyclin A 与 p-ERK1/2 蛋白表达显著下降,p-P21 蛋白表达显著升高($P<0.01$);与 ox-LDL 组比较,ox-LDL+Mel 组 Cyclin A 与 p-ERK1/2 蛋白表达显著下降,而 p-P21 蛋白表达显著升高($P<0.01$,图 6)。



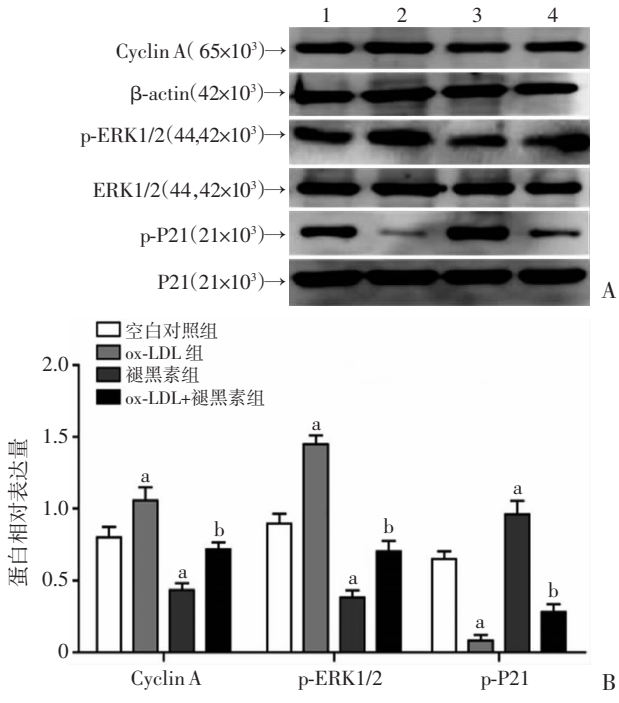
1:空白对照组;2:ox-LDL 组;3:褪黑素组;4:ox-LDL+褪黑素组;a:$P<0.01$,与空白对照组比较;b:$P<0.01$,与 ox-LDL 组比较

图 4 各组 VSMCs 细胞 PCNA(A)、α-SMA(B)免疫荧光染色(左)与阳性表达定量分析(右) ($n=5$,$\bar{x}\pm s$)



1:空白对照组;2:ox-LDL 组;3:褪黑素组;4:ox-LDL+褪黑素组;a:$P<0.01$,与空白对照组比较;b:$P<0.01$,与 ox-LDL 组比较

图 5 各组 VSMCs 细胞 PCNA 与 α-SMA 的蛋白表达量($n=5$,$\bar{x}\pm s$)



1:空白对照组;2:ox-LDL 组;3:褪黑素组;4:ox-LDL+褪黑素组;a:$P<0.01$,与空白对照组比较;b:$P<0.01$,与 ox-LDL 组比较

图 6 各组 VSMCs 细胞 Cyclin A、p-ERK1/2 和 p-P21 的蛋白表达量($n=5$,$\bar{x}\pm s$)

3 讨论

AS 是多种心血管疾病病理与生理的病变基础,虽然经过多年研究,但目前 AS 的发病机制尚未完全明确,其病变复杂漫长,并涉及脂质代谢紊乱、炎症免疫、氧化应激、细胞增殖等多种过程间的相互作用[4,8]。VSMCs 在维持血管形状和机械稳定性中起着主要作用,而 VSMCs 的异常增殖与迁移是 AS 发病的基础[3]。有研究表明,VSMCs 过度增殖跟 ox-LDL 诱导的体内氧化和抗氧化平衡失调有关,氧化损伤导致了细胞向内膜下增殖,血管壁增厚和管腔狭窄,从而加速了 AS 病变进程[9-10]。因此,寻找控制 VSMCs 过度增殖的靶点和有效药物,已成为当前防治 AS 性心血管疾病的重要方法之一。既往的研究已经发现 Mel 可以影响 VSMCs 的增殖与迁移[6],但其具体的机制尚不十分明确,我们考虑其可能是通过干预 VSMCs 细胞周期,从而抑制 ox-LDL 诱导的 VSMCs 增殖。

3.1 Mel 可能通过干预细胞周期来实现对 VSMCs 功能的影响

本研究使用不同浓度 ox-LDL 刺激 VSMCs 后发现 ox-LDL 在一定范围(0~50 μg/mL)内能够明显促进 VSMCs 的增殖,与他人既往的研究结果相一致。同时发现 50 μg/mL ox-LDL 诱导 24 h 可通过增加细胞 S 期与 G_2/M 期比例、减少 G_0/G_1 期比例来加速细胞周期进程,并促进细胞增殖。细胞增殖活力是反映增殖程度的重要指标[11],抑制 VSMCs 的周期循环进程已被认为是控制 VSMCs 增殖与迁移的有效策略[12]。

既往的研究提示 Mel 具有保护血管 VSMCs 功能,减少细胞凋亡的作用。因此,我们拟通过研究不同浓度 Mel 对 ox-LDL 诱导的 VSMCs 增殖的影响,来揭示 Mel 影响 VSMCs 的可能分子机制。首先,通过流式细胞仪分析细胞周期发现不同浓度的 Mel 可以抑制 ox-LDL 诱导的 VSMCs 增殖,并且这种作用随着 Mel 浓度增加而增强,但当 Mel 浓度超过 1×10^5 nmol/L 时,细胞存活明显减少。在 1×10^5 nmol/L Mel 作用下,细胞 S 期与 G_2/M 期比例减少,并可使 G_0/G_1 期阻滞。由此表明,Mel 可以通过干预细胞周期来抑制由 ox-LDL 诱导的 VSMCs 增殖。进一步的分子生物学研究也证实了这一点。通过上述实验结果,我们认为 Mel 可能通过干预细胞周期来实现对 VSMCs 功能的影响。

3.2 抑制 ERK1/2 信号通路,调控 VSMCs 细胞周期,可抑制 VSMCs 过度增殖

细胞外调节蛋白激酶 1/2(ERK1/2)是 MAPK 的一个亚家族,是将信号从表面受体传导至细胞核并产

生生物学效应的关键。磷酸化激活的 ERK1/2 由胞质转位到核内,进而介导 ELK-1、ATF、Ap-1、c-fos 和 c-Jun 的转录活化,参与细胞增殖与分化、细胞形态维持及细胞凋亡等多种生物学反应。既往的研究证实,激活 ERK 信号通路可促进主动脉平滑肌细胞增殖[13]。ox-LDL 诱导 VSMC 增殖的同时,伴随 MAPK 的活化,并可诱导 ERK1/2 的活化。ERK1/2 活化可激活其下游底物 MSKl、P90RSK、C-Myc、ELK-1 的磷酸化,从而启动细胞增殖功能。使用 ERK1/2 的特异阻断剂可抑制 ox-LDL 诱导的 VSMCs 的增殖。本研究在利用 Mel 干预 ox-LDL 诱导的 VSMCs 增殖过程,使用 Western blot 分析观察到 ERK1/2 信号通路变化,结果显示,ox-LDL 可以诱导 ERK1/2 蛋白磷酸化,从而启动 VSMCs 增殖过程。而在使用 Mel 进行干预后,该过程可以被明显抑制。该结果提示,Mel 抑制 VSMCs 增殖与其特异性阻断 ERK1/2 信号通路有关。

细胞增殖是通过细胞周期调控的,而细胞周期又受正调节因子和负调节因子的调节。Cyclin A 作为一种细胞周期蛋白,能够通过调节 DNA 合成和促进细胞有丝分裂起到正向作用[14]。p21 是一种重要的细胞周期调控蛋白,参与细胞的生长、分化、衰老及死亡过程,同时又与肿瘤发生密切相关,在细胞的生理、病理过程中发挥着重要的作用。过去的研究证实 p21 能够与 Cyclin D/cdk 形成复合物使细胞周期停滞在 G_1 期;它还可以通过 C 端与 PCNA 相互作用,阻断 PCNA 活化 DNA 聚合酶的活性从而抑制 DNA 的合成,使细胞周期停滞[15]。既往研究发现 Mel 具有调节 P21 蛋白的功能[16]。本研究通过 Western blot 分析发现,Mel 可以通过上调 p21 表达并抑制 Cyclin A 蛋白的作用,从而起到调控 VSMCs 细胞周期的作用。VSMC 表型的转化是许多血管增生性疾病,如动脉粥样硬化、血管成形术后再狭窄等和移植性血管病变中共同的细胞病理基础。α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)是平滑肌的标志物,常用来反映 VSMCs 数量及其收缩能力的改变[17],是 VSMCs 早期分化的特异性标志,也是应用最多的收缩型标志蛋白。增殖细胞核抗原(PCNA)是反映细胞增殖的标志物,其表达水平的高低可反映细胞的增殖活性[18]。本研究分别通过免疫荧光染色和 Western blot 检测观察 Mel 对 ox-LDL 诱导的 VSMC 增殖标志物 PCNA 以及 α-SMA 表达的影响,结果发现,Mel 可显著抑制由 ox-LDL 诱导的 VSMCs 内 PCNA、α-SMA 表达的升高。这些结果进一步揭示了 Mel 对 VSMCs 细胞周期的作用,可能通过调控 VSMCs 细胞周期,起到抑制 VSMCs 增殖的作用。VSMCs 并不是终末端分化型的细胞,在血管发育过程中 VSMCs 从去分化型逐渐发展为分化型,在病理条件下又可以从分化型转化回去分化型。VSMCs 这种随微环境因素变化调控表型发生逆转,在内膜损伤修复、血管性疾病发生发展进程中发挥重要作用。

综上所述,Mel 具有抑制 VSMCs 增殖的作用,其机制可能是通过抑制 ERK1/2 信号通路,使得 ERK1/2 表达减弱,从而调节 PCNA、α-SMA、Cyclin A 蛋白及 p21 蛋白表达,调控 VSMCs 细胞周期,起到抑制 VSMCs 过度增殖的作用。本研究的结果可望为探索 AS 的发病机制及药物作用靶点提供新的思路和实验依据。

参考文献:

[1] PARMA L, BAGANHA F, QUAX P H A, *et al*. Plaque angiogenesis and intraplaque hemorrhage in atherosclerosis[J]. Eur J Pharmacol, 2017, 816: 107-115. DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.04.028.

[2] JAIN T, NIKOLOPOULOU E A, XU Q B, *et al*. Hypoxia inducible factor as a therapeutic target for atherosclerosis[J]. Pharmacol Ther, 2018, 183: 22-33. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2017.09.003.

[3] LACOLLEY P, REGNAULT V, NICOLETTI A, *et al*. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles[J]. Cardiovasc Res, 2012, 95(2): 194-204. DOI: 10.1093/cvr/cvs135.

[4] 袁帅, 廖思聪, 王大新. 血管平滑肌细胞与动脉粥样硬化关系的研究进展[J]. 实用心脑肺血管病杂志, 2018, 26(2): 6-8, 12. DOI: 10.3969/j.issn.1008-5971.2018.02.002.
YUAN S, LIAO S C, WANG D X. Progress on relationship between vascular smooth muscle cell and atherosclerosis[J]. Pract J Cardiac Cereb Pneumal Vasc Dis, 2018, 26(2): 6-8, 12. DOI: 10.3969/j.issn.1008-5971.2018.02.002.

[5] 张强,徐立. Ox-LDL 在动脉粥样硬化中的致病机制及检测方法研究进展[J]. 国际检验医学杂志,2018,39(19):2432-2436. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.19.025.
ZHANG Q, XU L. Pathogenesis and detection of ox-LDL in atherosclerosis[J]. Int J Lab Med, 2018, 39(19): 2432-2436. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.19.025.

[6] ZHAO T, ZHANG H, JIN C, *et al*. Melatonin mediates vasodilation through both direct and indirect activation of BK_{Ca} channels[J]. J Mol Endocrinol, 2017, 59(3): 219-233. DOI: 10.1530/JME-17-0028.

[7] 刘振华, 李步潇, 段维勋, 等. 褪黑素抑制磷酸钙诱导的大鼠主动脉血管平滑肌细胞凋亡[J]. 中国体外循环杂志, 2016, 14(2): 112-115, 119. DOI: 10.13498/j.cnki.

chin. j. ecc. 2016. 02. 13.
LIU Z H, LI B Y, DUAN W X, *et al*. Melatonin inhibits apoptosis of rat aortic vascular smooth muscle cells induced by $CaPO_4$[J]. Chin J Extracorpor Circ, 2016, 14(2): 112-115, 119. DOI:10.13498/j.cnki.chin.j.ecc.2016.02.13.

[8] ZHANG Y, LIU N M, WANG Y, *et al*. Endothelial cell calpain as a critical modulator of angiogenesis[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017, 1863(6): 1326-1335. DOI:10.1016/j.bbadis.2017.03.021.

[9] 雷灵亮, 贝俊杰. 动脉粥样硬化斑块内血管生成的研究进展及治疗策略[J]. 心血管病学进展, 2019, 40(3): 478-482. DOI:10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2019.03.044.
LEI L L, BEI J J. Progress and treatment strategies of plaque angiogenesis in atherosclerosis[J]. Adv Cardiovasc Dis, 2019, 40(3): 478-482. DOI:10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2019.03.044.

[10] CORNELISSEN A, GUO L, SAKAMOTO A, *et al*. New insights into the role of iron in inflammation and atherosclerosis[J]. EBio Medicine, 2019, 47: 598-606. DOI:10.1016/j.ebiom.2019.08.014.

[11] KWON H, LEE J J, LEE J H, *et al*. Cinnamon and its components suppress vascular smooth muscle cell proliferation by up-regulating cyclin-dependent kinase inhibitors[J]. Am J Chin Med, 2015, 43(4): 621-636. DOI:10.1142/S0192415X1550038X.

[12] OZER N K, TAHA S, AZZI A. Homocysteine induces DNA synthesis and proliferation of vascular smooth muscle cells by interfering with MAPK kinase pathway[J]. Biofactors, 2005, 24(1/2/3/4): 193-199. DOI: 10.1002/biof.5520240123.

[13] WANG S C. PCNA: a silent housekeeper or a potential therapeutic target? [J]. Trends Pharmacol Sci, 2014, 35(4): 178-186. DOI:10.1016/j.tips.2014.02.004.

[14] SHINDE A V, HUMERES C, FRANGOGIANNIS N G. The role of α-smooth muscle actin in fibroblast-mediated matrix contraction and remodeling[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017, 1863(1): 298-309. DOI:10.1016/j.bbadis.2016.11.006.

[15] ELKADY A I, HUSSEIN R A, ABU-ZINADAH O A. Differential control of growth, apoptotic activity and gene expression in human colon cancer cells by extracts derived from medicinal herbs, Rhazya stricta and Zingiber officinale and their combination[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(41): 15275-15288. DOI:10.3748/wjg.v20.i41.15275.

[16] 徐丽, 金清东, 宫喜, 等. 褪黑素的抗胃癌效应及其引起的 Bcl-2、Bax、p21 和 p53 的表达变化[J]. 生理学报, 2014, 66(6): 723-729. DOI: 10.13294/j.aps.2014.0086.
XU L, JIN Q D, GONG X, *et al*. Anti-gastric cancer effect of melatonin and Bcl-2, Bax, p21 and p53 expression changes[J]. Acta Physiol Sin, 2014, 66(6): 723-729. DOI:10.13294/j.aps.2014.0086.

[17] YU S, CHEN Y, CHEN S, *et al*. Klotho inhibits proliferation and migration of angiotensin Ⅱ-induced vascular smooth muscle cells (VSMCs) by modulating NF-κB p65, Akt, and extracellular signal regulated kinase (ERK) signaling activities[J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 4851-4860. DOI:10.12659/msm.908038.

[18] LI T, WANG F, DANG Y, *et al*. P21 and P27 promote tumorigenesis and progression *via* cell cycle acceleration in seminal vesicles of TRAMP mice[J]. Int J Biol Sci, 2019, 15(10): 2198-2210. DOI:10.7150/ijbs.35092.

(**收稿**:2021-03-17;**修回**:2021-04-12)
(编辑 栾 嘉)