DOI:10.16016/j.1000-5404.202103247

克拉生坦对大鼠蛛网膜下腔出血后脑血管平滑肌细胞表型转化的影响及机制研究

蒋世双[1],何朝晖[2],苟小红[1],张红霞[3],贺学农[3] 402160 重庆,重庆医科大学附属永川医院:重症医学科[1],神经外科[3];400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经外科[2]

[**摘要**] **目的** 探究分析克拉生坦(clazosentan, Cla)对大鼠蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage,SAH)后脑血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,VSMC)表型转化的影响及作用机制。**方法** 采用SD大鼠脑基底动脉及中动脉VSMC构建SAH细胞模型,加入1、5、10 mg克拉生坦干预,Western blot检测空白对照组(Control)、模型组(Model)、克拉生坦低剂量组(L-Cla)、克拉生坦中剂量组(M-Cla)及克拉生坦高剂量组(H-Cla)细胞VSMC表型转化标志蛋白表达;ELISA检测内皮素-1(ET-1)水平;CCK-8检测细胞增殖;划痕实验检测细胞迁移。构建SD大鼠SAH模型,鞘内注射克拉生坦,改良Garcia神经功能缺陷评分评估各组大鼠SAH建模后72 h神经功能状态;HE染色检测基底动脉直径及血管厚度;Western blot检测VSMC表型转化标志蛋白表达;ELISA检测ET-1蛋白表达。**结果** 与Control组比较,Model组和各Cla干预组VSMC细胞中α-SMA、SM-22α蛋白表达降低,MGP、OPN蛋白表达升高,细胞ET-1水平、不同时点细胞增殖活性和迁移能力则较高(P均<0.05);与Model组比较,各Cla干预组VSMC细胞中α-SMA、SM-22α蛋白表达升高,MGP、OPN蛋白表达降低,细胞ET-1水平、不同时间点细胞增殖活性和迁移能力较低(P均<0.05),且随着克拉生坦剂量的增加,各指标改变更明显。与Control组大鼠比较,Model组及各Cla干预组大鼠Garcia评分升高,基底动脉直径较小,血管壁厚度较厚,α-SMA、SM-22α、MGP、OPN蛋白表达及ET-1水平与体内研究结果一致(P均<0.05);与Model组大鼠比较,各Cla干预组大鼠Garcia评分较高,基底动脉直径明显较大,血管壁厚度明显较小,分子水平检测结果与体内研究结果一致,随着克拉生坦干预剂量的增加,各项观察指标进一步改善(P均<0.05)。**结论** 克拉生坦可通过促进收缩型标记蛋白,抑制合成分泌型标记蛋白表达,影响细胞增殖及迁移活性,抑制血红蛋白诱导的脑VSMC表型转化,同时可通过改善基底动脉病理性血管重塑,抑制SAH模型大鼠VSMC表型转化,促进神经功能损伤修复。

[**关键词**] 克拉生坦;蛛网膜下腔出血;血管平滑肌细胞;表型转化
[**中图法分类号**] R743.35; R966; R972.9 [**文献标志码**] A

Effect and mechanism of clazosentan on phenotypic transformation of cerebrovascular smooth muscle cells after subarachnoid hemorrhage in rats

JIANG Shishuang[1], HE Zhaohui[2], GOU Xiaohong[1], ZHANG Hongxia[3], HE Xuenong[3] [1]Department of Critical Care Medicine, [3]Department of Neurosurgery, Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 402160; [2]Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the effect and mechanism of clazosentan (Cla) on phenotype transformation of vascular smooth muscle cells (VSMC) after subarachnoid hemorrhage (SAH) in rats. **Methods** Cell model of SAH was established by VSMC derived from basilar artery and middle artery of SD rats and cultured in the medium containing 10^{-6}mol/L oxyhemoglobin from autologous whole blood. Then 1, 5 and 10 mg Cla were used to treat the cell model. Western blotting was adopted to detect the expression of

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81870927);重庆市自然科学基金面上项目(cstc2019jcyj-msxmX0239)
[**通信作者**] 贺学农,E-mail:875791142@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/)

phenotype transformation marker proteins of VSMC in control group, model group, l-Cla group, m-Cla group and h-Cla group. The content of endothelin-1 (ET-1) was detected by ELISA. CCK-8 assay and cell scratch test were respectively employed to detect cell proliferation and cell migration. The SAH model was established in SD rats, and Cla was injected intrathecally. The neurological function of rats in each group was evaluated 72 h after SAH modeling by modified Garcia neurological deficit scores. The diameter and thickness of basilar artery were detected by HE staining. Western blotting was used to detect the expression of VSMC phenotype transformation marker proteins. The content of ET-1 protein was measured by ELISA. **Results** When compared with the VSMC cells of the control group, the cells in the model group and Cla intervention groups had significantly lower expression levels of α-SMA and SM-22α, increased levels of MGP and OPN, and elevated ET-1 content and stronger proliferation activity and migration ability at different time points ($P<0.05$). Opposite phenomena were observed when the Cla intervention groups compared with the model group ($P<0.05$), and the differences were more significant with the increment of Cla dose. The Garcia scores were higher, diameter of basilar artery was smaller, and thickness of vascular wall was thicker in the model group and the Cla intervention groups of SD rats than the control rats, and the expression trends of α-SMA, SM-22α, MGP, OPN and ET-1 were similar to those in the *in vitro* study (all $P<0.05$). In the rats of the Cla intervention groups, the above indicators showed similar trends as the cell model when compared with the rats of the model group (all $P<0.05$). **Conclusion** Cla can inhibit the phenotypic transformation of brain VSMC induced by hemoglobin by promoting the expression of contractile marker proteins and inhibiting the expression of synthetic secretory marker proteins. It can also inhibit the phenotypic transformation of VSMC in SAH model rats and promote the repair of neural function injury by promoting pathological vascular remodeling of basilar artery.

[**Key words**] clazosentan; subarachnoid hemorrhage; vascular smooth muscle cells; phenotypic transformation

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81870927) and the General Program of Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2019jcyj-msxmX0239). Corresponding author: HE Xuenong, E-mail: 875791142@qq.com

蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage,SAH)是一种致残程度高、致死率高的神经外科急重症[1-2]。既往研究已证实:脑血管痉挛导致的继发性脑损伤是引起 SAH 后脑损伤的主要原因,但关于脑血管痉挛近 20 年的研究并未给治疗 SAH 后脑损伤带来明显的效果[3]。近来大量研究表明:血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,VSMC)表型转化可能在脑卒中后血管功能紊乱中发挥着至关重要的作用,提示早期血管改变可能是 SAH 后早期脑损伤中极其重要的病理生理过程[4-5]。其中,ET-1 与血管平滑肌细胞表型转化密切相关。而克拉生坦(clazosentan,Cla)是一种选择性内皮素受体拮抗剂,预防 SAH 后缺血和梗死事件的双盲随机临床试验表明其可降低严重血管痉挛的发生率[6]。本研究探讨克拉生坦改变 VSMC 表型转化而改善血管损伤的机制,可为临床治疗 SAH 提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 50 只清洁级 SD 雄性大鼠(230~250 g),饲养于湿度(52±2)%、温度(25±3)℃的 SPF 级动物房动物房,采用标准的 12 h 光/暗循环,自由饮水,自由摄食,适应性培养 1 周。所有实验动物购于广东省医学实验动物中心,动物批号:C305-4 [SYXK(粤)2009-0019]。

1.1.2 主要试剂 包括:克拉生坦(豪夫迈·罗氏有限公司,规格:50 mg/150 mg);RIPS 裂解液(美国 Thermo Scientific 公司);BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Sigma 公司);兔抗鼠 β-actin 单克隆抗体、兔抗鼠 α-SMA 单克隆抗体、兔抗鼠 SM-22α 单克隆抗体、兔抗鼠 MGP 单克隆抗体、兔抗鼠 OPN 单克隆抗体(美国 Abcam 公司);ECL 显影试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司);CCK-8 试剂盒(日本同仁公司);ELISA 试剂盒(荷兰 Biotechnology 公司);4%多聚甲醛(上海翊圣生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 SAH 血管痉挛平滑肌细胞模型制备 10%水合氯醛(4 mL/kg)腹腔注射,SD 大鼠麻醉生效后,失血法处死,生理盐水灌注致流出液清亮,无菌环境下剥离出脑组织,小心剥离出基底动脉、Willis 环与大脑中动脉及其分支血管血管,剪成 1~2 mm 长的小段以获

取 VSMC 细胞悬液。行原代细胞培养并传代,向细胞培养基中加入自身全血使氧合血红蛋白终浓度达 10^{-6}mol/L 以构建 SAH 血管痉挛平滑肌细胞模型。

1.2.2 细胞分组及干预 将 VSMC 细胞分为空白对照组(Control)、模型组(Model)、克拉生坦低剂量组(L-Cla)、克拉生坦中剂量组(M-Cla)及克拉生坦高剂量组(H-Cla)。空白对照组采用普通培养液培养,模型组采用 SAH 细胞培养液培养,不同剂量克拉生坦组在采用 SAH 细胞培养液培养的基础上,分别加入 1、5 mg 及 10 mg 克拉生坦进行培养。

1.2.3 SAH 大鼠模型制备 10%水合氯醛腹腔注射,SD 大鼠麻醉生效后,经口气管插管,并以动物专用呼吸机维持呼吸,仰卧于操作台上,固定四肢,颈部备皮,常规消毒后,于显微镜下沿颈部正中分离,暴露左侧颈外动脉并离断,将一端尖锐的丝线由一侧的颈外动脉残端进入,经颈总动脉导入同侧的颈内动脉,直至颅内颈内动脉分叉处,至有阻力即到颈内动脉分叉处,再置入 2~3 mm,即用丝线尖端刺破分叉处并留置 2~3 s,抽出丝线,颈外动脉残端结扎,构建 SAH 模型。

1.2.4 动物分组及干预 40 只 SD 大鼠采用随机数字表法分为 5 组,即空白对照组(Control)、模型组(Model)、克拉生坦低剂量组(L-Cla)、克拉生坦中剂量组(M-Cla)及克拉生坦高剂量组(H-Cla),每组 8 只。空白对照组大鼠不刺破血管,其他操作同 SAH 模型构建,模型组及不同剂量克拉生坦组大鼠常规构建 SAH 模型,且不同剂量克拉生坦组在 SAH 建模成功后 3 h,经分别尾静脉注射 1、5、10 mg 克拉生坦。术后将大鼠放入笼中,并注意保暖。

1.2.5 Wetern blot 检测 VSMC 表型转化标志蛋白表达 细胞弃去培养基,PBS 洗涤 3 次后,加入适量混匀的细胞裂解液及蛋白酶抑制剂,冰上裂解 30 min,收集细胞,4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min,取上清液。使用 BCA 蛋白定量试剂盒对提取的蛋白进行定量,各组以 30~60 μg 相同的蛋白上样量,煮沸变性后进行 10%SDS - PAGE 凝胶电泳。电泳完成后,使用半干转仪转移至 PVDF 膜,然后用 5%脱脂牛奶封闭 1 h,随后用 1%脱脂牛奶稀释一抗,4 ℃孵育过夜。次日使用 TBST 洗脱一抗,37 ℃孵育二抗 1 h,PBS 洗涤 3 次,采用 ECL 化学发光剂显影。

1.2.6 ELISA 检测内皮素-1(ET-1)水平 细胞弃去培养基,PBS 洗涤 3 次后,加入适量混匀的细胞裂解液及蛋白酶抑制剂,冰上裂解 30 min,3 000 r/min 常温离心 10 min,取上清液。各组大鼠经胃静脉取血 2 mL,室温静置 30 min 后,3 000 r/min 常温离心 10 min,分离上层血清。采用双抗体夹心 ELISA 法,检测细胞/血清中 ET-1 水平。所有操作严格按说明书执行,试剂盒批内变异<2.5%,批间变异<5%。

1.2.7 CCK-8 检测细胞增殖 收集对数生长期细胞,离心后重悬细胞,调整悬液细胞浓度至 5 000/mL,96 孔板每孔加入细胞悬液 100 μL,每组 3 个复孔,常规培养。分别于 0、24、48、72 h 时每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,继续置于培养箱中放置 2 h,用酶标仪测定其在 450 nm 处的光密度值 $D(450)$,表示细胞增殖能力,绘制细胞生长曲线,观察各组细胞增殖能力变化情况。

1.2.8 划痕实验检测细胞迁移情况 各组细胞按 2×10^5/孔接种于 6 孔板中,常规培养,待细胞贴壁为单层细胞状态时,于超净台中,采用无菌 10 μL 枪头垂直于 6 孔板划线,各做 3 条横线与垂直的竖线,采用 PBS 缓慢冲洗 6 孔板,去除划线处理的细胞。常规培养 24 h,于光学显微镜下观察划痕处细胞运动情况。细胞运动率=(初始划痕宽度-24 h 后划痕宽度)/初始划痕宽度×100%。

1.2.9 改良 Garcia 评分评估神经功能缺损情况 各组大鼠于术后 72 h 进行神经功能缺陷评分,采用改良 Garcia 量表评分:根据大鼠笼内 5 min 自主活动、四肢对称运动、前肢伸展运动、攀爬能力、本体感觉、触碰胡须反应等 6 个方面神经功能表现情况进行评分,根据严重程度不同记为 0~3 分,总分为 18 分,得分越低,说明神经功能缺损越严重。

1.2.10 HE 染色检测血管平滑肌直径及厚度 显微镜下采用镊子取各组大鼠大脑基底动脉及中动脉,置于包埋盒内,浸于 4%多聚甲醛中固定过夜。常规乙醇梯度脱水,石蜡包埋。将切片置于二甲苯及梯度酒精中依次浸泡脱蜡,苏木精染色 40 s,1%盐酸乙醇冲洗后,置于伊红溶液中染色 3 s,自来水冲洗后,将切片置于梯度酒精及二甲苯溶液中进行脱水和透明处理。随后使用中性树脂覆盖玻片进行封固。于光学显微镜下观察并采集图片,观察不同组别血管平滑肌平均直径及厚度情况。

1.3 统计学分析

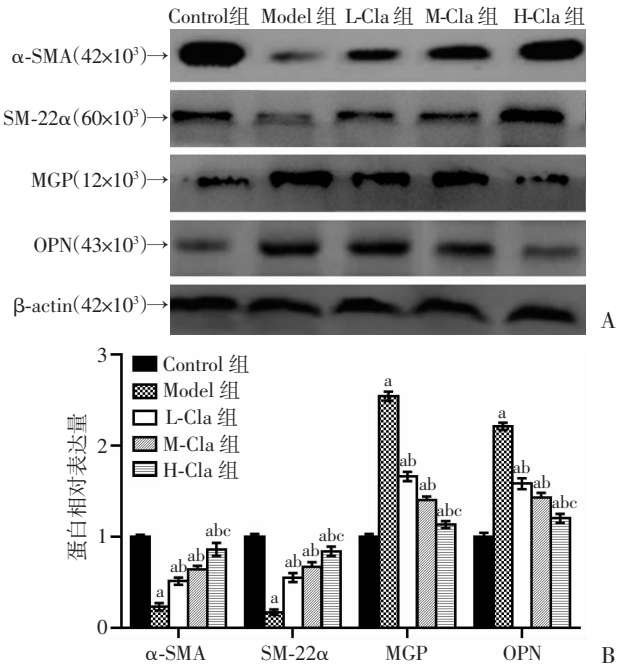
应用 SPSS 19.0 统计软件。采用 Shapro-Wilk 检

验数据是否符合正态分布,Bartlett 检验进行方差齐性检验。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组数据间比较采用单因素方差分析,两组间均数比较采用 SNK-q 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　克拉生坦对 VSMC 表型转化标志蛋白表达的影响

Western blot 检测结果显示:与 Control 组比较,Model 组和各 Cla 干预组 VSMC 细胞中 α-SMA、SM-22α 蛋白表达较低($P<0.05$),MGP、OPN 蛋白表达较高($P<0.05$);与 Model 组比较,L-Cla、M-Cla、H-Cla 组 α-SMA、SM-22α 蛋白表达较高($P<0.05$),MGP、OPN 蛋白表达较低($P<0.05$);H-Cla 组 α-SMA、SM-22α 蛋白表达高于 L-Cla、M-Cla 组($P<0.05$),其 MGP、OPN 蛋白表达低于 L-Cla、M-Cla 组($P<0.05$),见图 1。

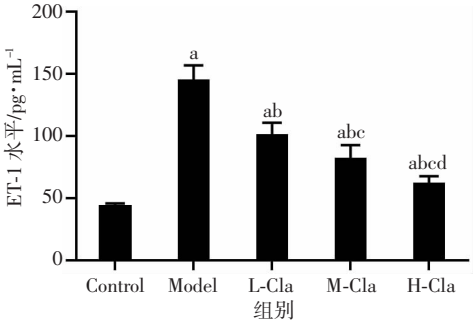


A:Western blot 检测;B:半定量分析　a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 Model 组比较;c:$P<0.05$,与 L-Cla、M-Cla 组比较

图 1　克拉生坦对 VSMC 表型转化标志蛋白表达的影响

2.2　克拉生坦对 VSMC 细胞 ET-1 表达的影响

ELISA 检测结果显示:与 Control 组比较,Model 组和各 Cla 干预组 VSMC 细胞中 ET-1 水平较高($P<0.05$);L-Cla、M-Cla、H-Cla 组低于 Model 组($P<0.05$);M-Cla 组、H-Cla 组 ET-1 水平低于 L-Cla 组($P<0.05$),H-Cla 组低于 M-Cla 组($P<0.05$),见图 2。

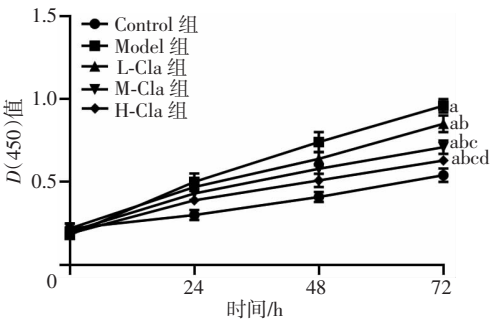


a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 Model 组比较;c:$P<0.05$,与 L-Cla 组比较;d:$P<0.05$,与 M-Cla 组比较

图 2　ELISA 检测克拉生坦对 VSMC 细胞 ET-1 水平的影响

2.3　克拉生坦对 VSMC 细胞增殖能力的影响

CCK-8 检测结果显示:与 Control 组比较,Model 组和各 Cla 干预组 VSMC 细胞在 24、48、72 h 的细胞增殖活性较高($P<0.05$);与 Model 组比较,L-Cla、M-Cla、H-Cla 各组不同时间点的细胞增殖活性较低($P<0.05$);M-Cla 组、H-Cla 组不同时点增殖活性低于 L-Cla 组($P<0.05$),H-Cla 组不同时点增殖活性低于 M-Cla 组($P<0.05$),见图 3。



a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 Model 组比较;c:$P<0.05$,与 L-Cla 组比较;d:$P<0.05$,与 M-Cla 组比较

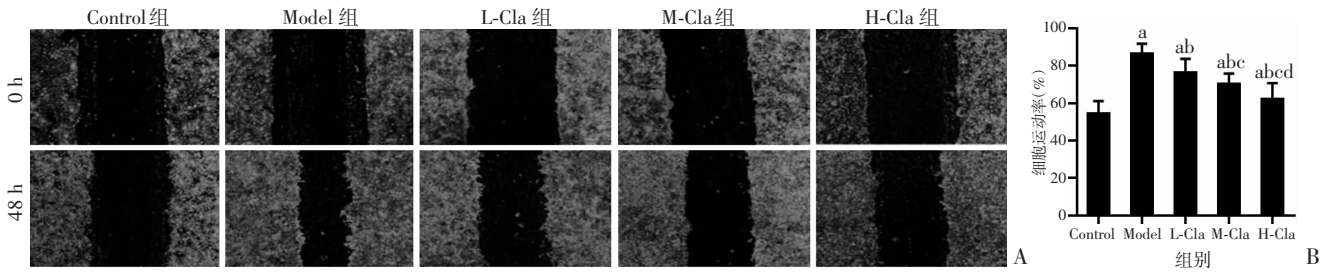
图 3　CCK-8 检测克拉生坦对 VSMC 细胞增殖能力的影响

2.4　克拉生坦对 VSMC 细胞迁移能力的影响

细胞划痕实验结果显示:与 Control 组比较,Model 组和各 Cla 干预组 VSMC 细胞迁移能力较高($P<0.05$);L-Cla 组、M-Cla 组、H-Cla 组低于 Model 组($P<0.05$);M-Cla 组、H-Cla 组低于 L-Cla 组($P<0.05$),H-Cla 组低于 M-Cla 组($P<0.05$),见图 4。

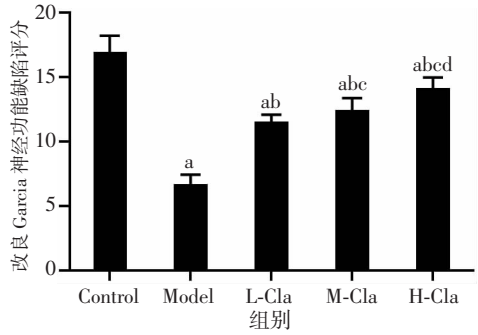
2.5　克拉生坦对 SAH 大鼠神经功能的影响

改良 Garcia 神经功能缺陷评分结果显示:与 Control 组比较,Model 组及各 Cla 干预组大鼠 Garcia 评分较低($P<0.05$);与 Model 组比较,L-Cla、M-Cla、H-Cla 组大鼠 Garcia 评分较高($P<0.05$),且随着 Cla 干预剂量的增加,大鼠 Garcia 评分增加($P<0.05$),见图 5。



A:划痕实验检测各组细胞迁移(×40);B:各组细胞运动率　a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 Model 组比较;c:$P<0.05$,与 L-Cla 组比较;d:$P<0.05$,与 M-Cla 组比较

图 4　克拉生坦对 VSMC 细胞迁移能力的影响



a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 Model 组比较;c:$P<0.05$,与 L-Cla 组比较;d:$P<0.05$,与 M-Cla 组比较

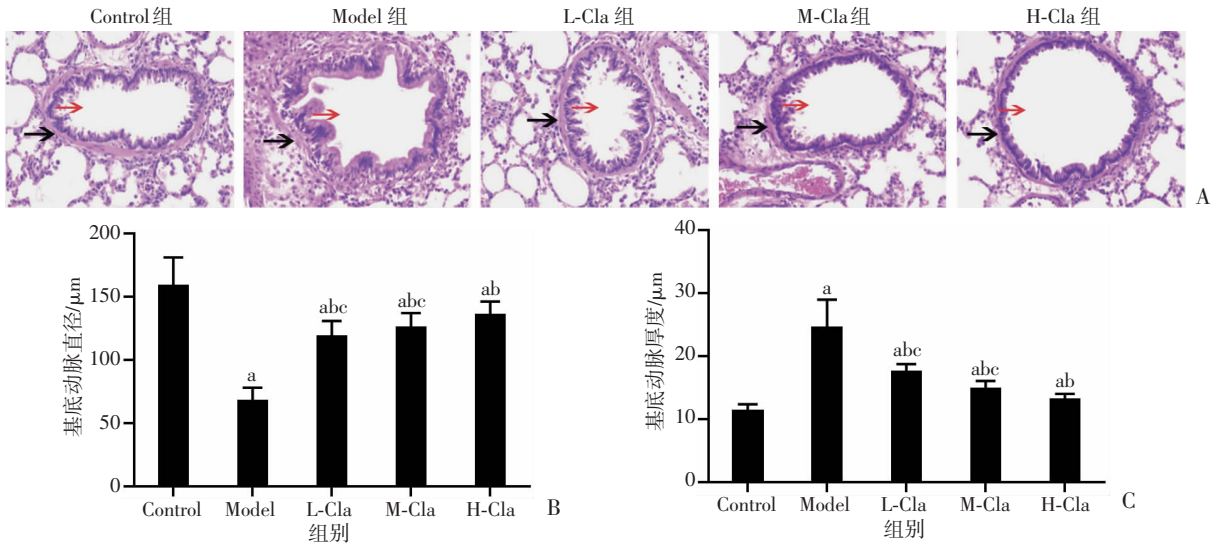
图 5　克拉生坦对 SAH 大鼠神经功能的影响

2.6　克拉生坦对 SAH 大鼠血管重塑的影响

HE 染色结果显示:Model 组各 Cla 干预组大鼠基底动脉直径小于 Control 组($P<0.05$),基底动脉厚度则明显厚于Control组($P<0.05$);与Model组比较,L-Cla、M-Cla、H-Cla 组大鼠基底动脉直径较大($P<0.05$),其基底动脉厚度较小($P<0.05$);H-Cla 组大鼠基底动脉直径大于 L-Cla 组和 M-Cla 组($P<0.05$),其基底动脉厚度则明显小于 L-Cla 组和 M-Cla 组($P<0.05$),见图 6。

2.7　克拉生坦对 SAH 大鼠 VSMC 表型转化标志蛋白表达的影响

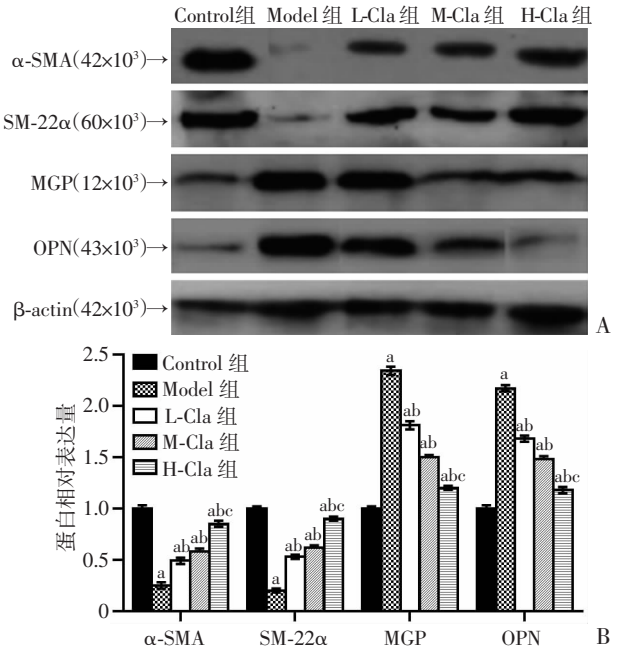
大鼠基底动脉组织蛋白检测结果显示:Model 组和 L-Cla、M-Cla、H-Cla 组大鼠中 α-SMA、SM-22α 蛋白表达低于 Control 组($P<0.05$),MGP、OPN 蛋白表达高于 Control 组($P<0.05$);与 Model 组比较,L-Cla、M-Cla、H-Cla 组 α-SMA、SM-22α 蛋白表达较高($P<0.05$),MGP、OPN 蛋白表达较低($P<0.05$);H-Cla 组 α-SMA、SM-22α 蛋白表达高于 L-Cla 组和 M-Cla 组($P<0.05$),其 MGP、OPN 蛋白表达低于 L-Cla 组和 M-Cla 组($P<0.05$),见图 7。



a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 Model 组比较;c:$P<0.05$,与 H-Cla 组比较

A:HE 染色检测各组大鼠血管平滑肌直径及厚度(×40)　黑色箭头示血管平滑肌的厚度;红色箭头示血管直径;B:各组大鼠血管平滑肌直径;C:各组大鼠血管平滑肌厚度

图 6　克拉生坦对 SAH 大鼠血管重塑的影响

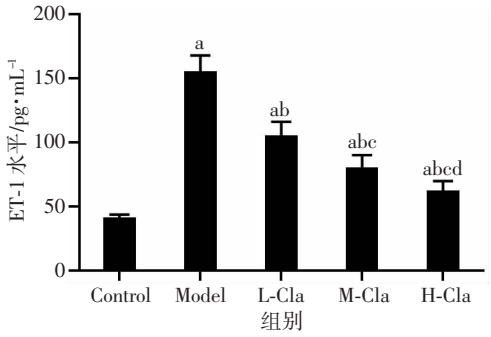


A:Western blot 检测;B:半定量分析 a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 Model 组比较;c:$P<0.05$,与 L-Cla、M-Cla 组比较

图 7 克拉生坦对 SAH 大鼠 VSMC 表型转化标志蛋白表达的影响

2.8 克拉生坦对 SAH 大鼠血清 ET-1 水平的影响

大鼠尾静脉血 ELISA 检测结果显示:与 Control 组比较,Model 组和各 Cla 干预组大鼠血清 ET-1 水平明显较高($P<0.05$);L-Cla、M-Cla、H-Cla 组则明显低于 Model 组($P<0.05$);M-Cla 组、H-Cla 组低于 L-Cla 组($P<0.05$),H-Cla 组低于 M-Cla 组($P<0.05$),见图 8。



a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 Model 组比较;c:$P<0.05$,与 L-Cla 组比较;d:$P<0.05$,与 M-Cla 组比较

图 8 ELISA 检测克拉生坦对 SAH 大鼠血清 ET-1 水平的影响

3 讨论

蛛网膜下腔出血(SAH)死亡率可高达 50%,而且超过 50%的幸存者长期遗留神经功能障碍,严重影响患者的生活质量[7]。针对 SAH 后病理生理变化的研究发现:脑血管痉挛是导致神经功能损害的主要原因之一[8]。血管痉挛是指动脉在一段时间内的异常收缩状态,由于血管壁平滑肌强烈收缩,管腔狭窄,从而造成血液缓慢,局部组织灌注不足。SAH 后由于血管平滑肌细胞的强烈收缩,可导致脑供血不足,严重者可继发脑梗死,进而导致 SAH 患者遗留神经功能障碍,大大降低患者预后质量[9-10]。如何减轻 SAH 后血管痉挛成为亟待解决的问题。

目前常用于神经外科预防或改善血管痉挛的药物为尼莫地平,尼莫地平是一种选择性的脑血管平滑肌钙拮抗剂,可通过改善平滑肌细胞内钙离子稳态,减轻脑血管痉挛[11]。目前,临床上应用尼莫地平预防或改善脑血管痉挛,但仍有部分患者可出现脑缺血或脑梗死的情况。因此,寻找新的药物,更好地减轻脑血管痉挛迫在眉睫。脑血管痉挛的病理机制多样,目前文献指出:血管平滑肌的强烈收缩是导致脑血管痉挛的主要原因[12],由此推论,减轻血管平滑肌的强烈收缩可能减轻血管痉挛。近年来研究发现,VSMC 的表型转化与血管平滑肌的强烈收缩密切相关[13]。众所周知,健康人动脉血管的 VSMC 以收缩型为主,其主要功能是维持血管的弹性和收缩血管,收缩型 VSMC 增殖、迁移能力差,形态上胞体呈梭形或带状,含大量肌丝和结构蛋白,合成细胞器如粗面内质网、高尔基复合体含量较少,合成基质的能力差,体积小。分泌型 VSMC 也称合成型 VSMC,其主要存在于病理血管中,主要功能是增殖、迁移入内膜及合成细胞外基质蛋白,形态上类似成纤维细胞,肌丝和结构蛋白含量少,合成细胞器增多,合成和分泌基质蛋白能力强,体积较收缩型大。当 VSMC 以收缩型为主时,其主要收缩型标志蛋白为 α-SMA,其在收缩型细胞中优势表达,而在分泌型平滑肌细胞中表达甚微;骨桥蛋白(OPN)则是分泌型平滑肌细胞标志蛋白[14-15]。研究发现:当 VSMC 发生表型转化时,即 VSMC 由收缩型向分泌型转变,即出现收缩型 VSMC α-SMA 表达降低,而分泌型 VSMC 的 OPN 表达增加[16]。研究表明血管痉挛与 VSMC 表型转化密切相关,血管痉挛发生时,VSMC 由收缩型向分泌型转换时导致血管壁增厚、血管直径变小[17]。因此,抑制 VSMC 的表型转化可减轻血管痉挛。

克拉生坦是一种选择性内皮素受体拮抗剂,可用于预防 SAH 后缺血和梗死事件,能有效降低严重血管痉挛的发生率[18]。但目前克拉生坦在日本仍处于 3 期临床试验阶段,尚未真正应用于临床[19]。克拉生

坦缓解血管痉挛的机制尚未清楚。研究表明:克拉生坦与 VSMC 表型转化密切相关[20],但其如何导致 VSMC 表型转化的机制尚未明确。传统意义上血管收缩程度与内皮素-1(ET-1)与内皮素-1 受体(ET-1R)的结合度相关,ET-1 与其受体结合只是单纯地通过影响 Ca^{2+} 的稳态而影响血管直径变化,从而影响血管痉挛[21-22]。早期研究表明:克拉生坦抑制血管痉挛的主要机制为 ET-1 与 ET-1R 相结合,二者结合后引起 VSMC 内 Ca^{2+} 稳态失衡进而影响血管直径的变化[23-24]。近年来研究发现,克拉生坦可通过拮抗 ET-1R 从而减轻血管痉挛[25]。基于此,本研究拟通过体内外实验,探究不同剂量克拉生坦对 SAH 体内外模型中 VSMC 表型转化的影响,进一步观察克拉生坦对 ET-1R 的拮抗作用是否参与 VSMC 表型转化及血管痉挛的抑制调节。

本研究结果显示:克拉生坦干预能明显改善 VSMC 中 α-SMA、SM-22α 蛋白等收缩型标志蛋白相对表达量,降低 MGP、OPN 等分泌型蛋白相对表达量,同时改善 VSMC 的增殖活性、迁移能力,降低 ET-1 分泌水平。与此同时,随着克拉生坦干预剂量的增加,VSMC 中 α-SMA、SM-22α 蛋白相对表达量进一步升高,MGP、OPN 蛋白相对表达量则进一步降低,ET-1 水平相对减少,VSMC 的增殖活性和迁移能力也进一步改善,提示克拉生坦可抑制 VSMC 表型转化,参与调节 VSMC 的增殖和迁移能力,且作用效果呈剂量依赖性,且该作用与克拉生坦对 ET-1 的拮抗作用有关。为了进一步验证该实验结论,本研究采用 SD 大鼠构建 SAH 模型,并在造模成功后经尾静脉进行克拉生坦干预,利用体内实验中探究克拉生坦对 VSMC 表型转化的影响。结果显示:克拉生坦干预组大鼠 α-SMA、SM-22α 蛋白等收缩型标志蛋白表达明显高于模型组,MGP、OPN 等分泌型蛋白表达则明显低于模型组,血清 ET-1 水平也明显较低,且随着克拉生坦干预剂量的增加,蛋白相对表达量和血清 ET-1 水平改变明显,与体外研究结果一致,进一步证实克拉生坦对 VSMC 表型转化具有剂量依赖性的抑制作用,其抑制作用可能与克拉生坦自身对 ET-1 的拮抗有关。动物模型实验结果还显示:克拉生坦干预组大鼠神经功能缺损缓解情况具有明显优势,各干预组大鼠 Garcia 评分明显高于模型组水平,且干预组大鼠基底动脉直径明显增大,而血管壁厚度明显减小,提示克拉生坦对 VSMC 表型转化的抑制作用能有效改善 SAH 后血管病理性重塑,改善血管壁厚度和血管直径,从而发挥神经功能损伤修复作用。

综上所述,克拉生坦对脑血管平滑肌细胞表型转化具有一定的抑制作用,主要与其对收缩型标记蛋白表达促进、合成分泌型标记蛋白表达抑制有关,其可通过与 ET-1 的拮抗作用,抑制 VSMC 表型转化,改善细胞增殖和迁移能力,从而参与 VSMC 的病理性重塑和神经功能损伤修复。

参考文献:

[1] 董漪, 郭珍妮, 李琦, 等. 中国脑血管病临床管理指南(节选版):蛛网膜下腔出血临床管理[J]. 中国卒中杂志, 2019, 14(8):814-818.
DONG Y, GUO Z N, LI Q, *et al*. Chinese stroke association guidelines for clinical management of cerebrovascular disorders (excerpts): clinical management of subarachnoid hemorrhage[J]. Chin J Stroke, 2019, 14(8): 814-818.

[2] LIAO W H, SU Y J, LIU C H. Junctional bradycardia caused by subarachnoid hemorrhage[J]. Interdiscip Neurosurg, 2021, 23: 100986. DOI:10.1016/j.inat.2020.100986.

[3] 刘思齐, 张艳, 孙娟, 等. 蛛网膜下腔出血后继发性脑血管痉挛的研究进展[J]. 解剖学报, 2019, 50(4): 537-542. DOI:10.16098/j.issn.0529-1356.2019.04.023.
LIU S Q, ZHANG Y, SUN J, *et al*. Progress of mechanism and therapy on cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage[J]. Acta Anat Sin, 2019, 50(4): 537-542. DOI:10.16098/j.issn.0529-1356.2019.04.023.

[4] 肖雪, 侯翠柳, 王筱筱, 等. NKT 细胞通过下调 PDGFRβ 抑制 Ang Ⅱ诱导的小鼠血管平滑肌细胞表型转换[J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(8): 1345-1350.
XIAO X, HOU C L, WANG X X, *et al*. NKT cells inhibit Ang Ⅱ-induced phenotypic transformation of mouse vascular smooth muscle cells by down-regulating PDGFRβ[J]. Chin J Pathophysiol, 2020, 36(8): 1345-1350.

[5] 邓娟, 于晓江, 杨洋, 等. 血管平滑肌细胞表型转化在心血管疾病中作用的研究进展[J]. 生理科学进展, 2020, 51(2): 107-112.
DENG J, YU X J, YANG Y, *et al*. Research progress of vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in cardiovascular diseases[J]. Prog Physiol Sci, 2020, 51(2): 107-112.

[6] 孙慧, 侯玉立, 崔林林, 等. 克拉生坦防治动脉瘤性蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的疗效及安全性的系统评价[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2016, 10(19): 2887-2891.
SUN H, HOU Y L, CUI L L, *et al*. Efficacy and safety of clazosentan for cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review[J]. Chin J Clin Electron Ed, 2016, 10(19): 2887-2891.

[7] KONCZALLA J, KASHEFIOLASL S, BRAWANSKI N, *et al*. Cerebral vasospasm and delayed cerebral infarctions in 225 patients with non-aneurysmal subarachnoid hemorrhage: the underestimated risk of Fisher 3 blood distribution[J]. J Neurointerv Surg, 2016, 8(12): 1247-1252. DOI:10.1136/neurintsurg-2015-012153.

[8] VARSOS G V, BUDOHOSKI K P, CZOSNYKA M, *et al*. Cerebral vasospasm affects arterial critical closing pressure [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2015, 35(2): 285-291. DOI:10.1038/jcbfm.2014.198.

[9] DINC N, QUICK-WELLER J, TRITT S, *et al*. Vasospasm of the basilar artery following spontaneous SAH-clinical observations and implications for vascular research [J]. Neurosurg Rev, 2019, 42(4): 983-989. DOI:10.1007/s10143-018-1015-4.

[10] KONCZALLA J, KASHEFIOLASL S, BRAWANSKI N, *et al*. Cerebral vasospasm-dependent and cerebral vasospasm-independent cerebral infarctions predict outcome after nonaneurysmal subarachnoid hemorrhage: a single-center series with 250 patients[J]. World Neurosurg, 2017, 106: 861-869.e4. DOI:10.1016/j.wneu.2017.07.017.

[11] KELLER E, KRAYENBÜHL N, BJELJAC M, *et al*. Cerebral vasospasm: results of a structured multimodal treatment[J]. Acta Neurochir Suppl, 2005, 94: 65-73. DOI:10.1007/3-211-27911-3_11.

[12] HANSEN-SCHWARTZ J. Cerebral vasospasm: a consideration of the various cellular mechanisms involved in the pathophysiology[J]. Neurocrit Care, 2004, 1(2): 235-246. DOI:10.1385/NCC:1:2:235.

[13] HALD E S, ALFORD P W. Smooth muscle phenotype switching in blast traumatic brain injury-induced cerebral vasospasm[J]. Transl Stroke Res, 2014, 5(3): 385-393. DOI:10.1007/s12975-013-0300-3.

[14] CHENG M F, SONG J N, LI D D, *et al*. The role of rosiglitazone in the proliferation of vascular smooth muscle cells after experimental subarachnoid hemorrhage[J]. Acta Neurochir(Wien), 2014, 156(11): 2103-2109. DOI:10.1007/s00701-014-2196-4.

[15] ZHANG H R, JIANG L, GUO Z D, *et al*. PPARβ/δ, a novel regulator for vascular smooth muscle cells phenotypic modulation and vascular remodeling after subarachnoid hemorrhage in rats[J]. Sci Rep, 2017, 7: 45234. DOI:10.1038/srep45234.

[16] HE J C, LIU M D, LIU Z, *et al*. Recombinant osteopontin attenuates experimental cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage in rats through an anti-apoptotic mechanism[J]. Brain Res, 2015, 1611: 74-83. DOI:10.1016/j.brainres.2015.03.015.

[17] 袁瑞军, 唐杨烽, 刘晓红, 等. 转录因子 SP1 调控血管平滑肌细胞表型转化在主动脉夹层发病中的作用[J]. 国际心血管病杂志, 2016, 43(6): 365-368,374.
YUAN R J, TANG Y F, LIU X H, *et al*. The effects of transcription factor SP_1 on phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in pathogenesis of aortic dissection[J]. Int J Cardiovasc Dis, 2016, 43(6): 365-368,374.

[18] SCHUBERT G A, SCHILLING L, THOMÉC. Clazosentan, an endothelin receptor antagonist, prevents early hypoperfusion during the acute phase of massive experimental subarachnoid hemorrhage: a laser Doppler flowmetry study in rats[J]. J Neurosurg, 2008, 109(6): 1134-1140. DOI:10.3171/JNS.2008.109.12.1134.

[19] MACDONALD R L. Clazosentan: an endothelin receptor antagonist for treatment of vasospasm after subarachnoid hemorrhage[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2008, 17(11): 1761-1767. DOI:10.1517/13543784.17.11.1761.

[20] BECK J, RAABE A. Clazosentan: prevention of cerebral vasospasm and the potential to overcome infarction[J]. Acta Neurochir Suppl, 2011, 110(Pt 2): 147-150. DOI:10.1007/978-3-7091-0356-2_26.

[21] KÄSTNER S, OERTEL M F, SCHARBRODT W, *et al*. Endothelin-1 in plasma, cisternal CSF and microdialysate following aneurysmal SAH[J]. Acta Neurochir (Wien), 2005, 147(12): 1271-1279; discussion1279. DOI:10.1007/s00701-005-0633-0.

[22] LEI Q, LI S, ZHENG R B, *et al*. Endothelin-1 expression and alterations of cerebral microcirculation after experimental subarachnoid hemorrhage[J]. Neuroradiology, 2015, 57(1): 63-70. DOI:10.1007/s00234-014-1435-y.

[23] VERGOUWENM D. Effect of endothelin-receptor antagonists on delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage remains unclear[J]. Stroke, 2009, 40(12): e714. DOI:10.1161/STROKEAHA.109.565887.

[24] PARENT R, LAVALLÉE M. Endothelin-dependent effects limit flow-induced dilation of conductance coronary vessels after blockade of nitric oxide formation in conscious dogs [J]. Cardiovasc Res, 2000, 45(2): 470-477. DOI:10.1016/s0008-6363(99)00366-1.

[25] MACDONALD R L, HIGASHIDA R T, KELLER E, *et al*. Clazosentan, an endothelin receptor antagonist, in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage undergoing surgical clipping: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial (CONSCIOUS-2)[J]. Lancet Neurol, 2011, 10(7): 618-625. DOI:10.1016/s1474-4422(11)70108-9.

(收稿:2021-03-29;修回:2021-05-20)
(编辑 吴培红)