

论著·基础研究

Ang II 诱导大鼠 AFB 表型转化、增殖及迁移的作用及其机制研究

穆占义

(前郭尔罗斯蒙古族自治县医院检验科, 吉林 松原 131199)

摘要:目的 探讨血管紧张素Ⅱ(Ang II)诱导的大鼠胸主动脉外膜成纤维细胞(AFB)表型转化、增殖及迁移的作用和机制。方法 采用 Western Blot 法检测 Ang II 诱导的 ERK1/2 磷酸化水平及 AFB 表型转化的标志产物平滑肌肌动蛋白(α-SMA)的表达、其增殖能力应用 CCK-8 法检测, 迁移能力应用 Transwell 及划痕实验进行观察; 在抑制 ERK1/2 磷酸化后对上述结果的影响。结果 Ang II 能诱导 AFB 表型转化, 10^{-7} mol/L Ang II 刺激 24、48 h 后 α-SMA 蛋白表达明显增加, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 且 48 h 略高于 24 h。AFB 在 10^{-7} mol/L Ang II 刺激 10 min 左右 ERK1/2 磷酸化水平明显提高, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 随后逐渐降低, 而总 ERK1/2 蛋白表达水平未见明显变化。U0126 预处理能明显降低 Ang II 诱导的 α-SMA 蛋白表达及 ERK1/2 磷酸化水平增高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); U0126 预处理能抑制 AFB 的增殖及迁移能力。结论 Ang II 能诱导 AFB 表型转化、增殖及迁移, ERK1/2 磷酸化在其中具有重要作用, U0126 能降低 ERK1/2 磷酸化水平, 阻断相关信号通路, 从而抑制 AFB 表型转化、增殖及迁移能力。

关键词:主动脉; 成纤维细胞; 表型; 生物转化; 细胞增殖; 细胞运动

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.23.009

中图法分类号:R543.1

文章编号:1673-4130(2018)23-2879-05

文献标识码:A

Effect of Ang II on the phenotype transformation, proliferation and migration of AFB in rats and its mechanism

MU Zhanyi

(Department of Clinical Laboratory, Qianguoerros Mongolian Autonomous County Hospital, Songyuan, Jilin 131199, China)

Abstract: Objective To investigate the role and mechanism of phenotype transformation, proliferation and migration of rat thoracic aortic adventitia fibroblasts (AFB) induced by angiotensin Ⅱ (Ang II). **Methods** Western Blot was applied to measuring the levels of phosphorylation of ERK1/2 and the mark of its phenotype transformation (α-SMA) under the inducing of Ang II. CCK-8 was used for testing its ability of proliferation. Transwell and the scratch test were used for observing its ability of migration. Furthermore, the influence of restraining the phosphorylation of ERK1/2 on the results above was also observed. **Results** Ang II could induce the phenotype transformation of AFB, Western Blot results showed that after the stimulation of 10^{-7} mol/L Ang II for 24 h and 48 h, the expression level of α-SMA was increased obviously, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$), and the expression of 48h group was slightly higher than that of 24h group. With the stimulation of 10^{-7} mol/L Ang II for 10 min, the level of phosphorylation of ERK1/2 was increased obviously and the difference was statistically significant ($P < 0.05$), on the contrary, total ERK1/2 showed no significant change. With the pretreatment of U0126, the level of phosphorylation of ERK1/2 was decreased and the expression of α-SMA which was induced by Ang II was increased and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). At the same time the ability of proliferation and migration of AFB was reduced which was induced by Ang II with the pretreatment of U0126 in the CCK-8 and Transwell. **Conclusion** Ang II could induce the phenotype transformation, proliferation and migration of AFB, and phosphorylation of ERK1/2 played important role in these progresses; U0126 could reduce the levels of phosphorylation of ERK1/2 and interfere relative signal pathway so as to suppress the ability of phenotype transformation, proliferation and migration of AFB.

Key words:aorta; fibroblasts; phenotype; biotransformation; cell proliferation; cell movement

主动脉夹层(AD)是指血液渗入主动脉壁中膜形 成夹层血肿并沿主动脉壁延伸剥离的一种心血管系

作者简介:穆占义,男,副主任医师,主要从事临床检验方面的研究。

本文引用格式:穆占义. Ang II 诱导大鼠 AFB 表型转化、增殖及迁移的作用及其机制研究[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(23): 2879-2883.

统高病死率的灾难性疾病^[1-3],自AD发生,病死率以每小时1%~2%递增。24 h病死率为25%,2周后高达75%^[4]。外科手术治疗是公认的有效治疗手段,使70%患者获得近期存活机会。但高达10%~26%手术患者死于远期主动脉远端动脉瘤形成并破裂^[5]。临床尚有很多AD患者因各种因素不能得到及时诊断和有效治疗,致使AD成为现代社会威胁人类健康最为严重的心血管疾病之一。成纤维细胞(AFB)是外膜中数量最多且最重要的细胞,新的研究表明,AFB能分化成为肌成纤维细胞(MFB),MFB是一种具有收缩及迁移能力的特殊细胞,在血管损伤应答机制中具有重要作用。Li等^[6]采用体外Transwell侵袭实验证实了自发性高血压大鼠及Wistar-Kyoto大鼠胸主动脉AFB的迁移现象,同时,血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)介导的AFB迁移能被ERK1/2抑制剂——PD98059及P38抑制剂——SB202190阻断,表明ERK1/2、P38MAPK通路参与了AFB迁移的调控。由此可见,干扰ERK1/2信号通道的信号传导,可能对稳定AFB、抑制AFB向MFB表型转化具有重要作用。本研究通过体外培养大鼠胸主动脉AFB,以AngⅡ诱导其表型转化,观察了ERK1/2信号通路蛋白ERK1/2的磷酸化在AFB增殖及迁移中的作用,旨在为阐明AD发病机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF级SD大鼠8只,体质量100~120 g,性别不限,购于四川大学动物试验中心。

1.2 试剂 Alpha-Actin兔单克隆抗体(EPITOMICS公司)、Anti-vimentin抗波形蛋白抗体(武汉博士德)、两步法免疫组织化学检测试剂盒(北京中杉金桥有限公司)、量子点超敏荧光试剂盒(catalogno QK605S武汉珈源量子点技术开发有限公司)、磷酸化蛋白提取试剂盒(BestBio贝博生物)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(增强型,碧云天生物)、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(5X,碧云天生物)、Western一抗稀释液(碧云天生物)、Western二抗稀释液(碧云天生物)、预染蛋白质相对分子质量标准(碧云天生物)、GAPDH抗体(碧云天生物)、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒(碧云天生物)、ERK1/2鼠单克隆抗体(美国Cell Signaling Technology)、phospho-ERK1/2单克隆抗体(美国Cell Signaling Technology)、IRDye 800CW羊抗鼠二抗(LI-COR公司)、IRDye 800CW羊抗兔二抗(LI-COR公司)等。其余试剂均为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 细胞原代培养与传代 (1)细胞培养条件:37℃、5%二氧化碳(CO₂)、恒温细胞培养箱,原代培养使用含20%胎牛血清的DMEM高糖培养基,所加双抗浓度为1%;传代培养使用含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基,所加双抗浓度为1%。(2)换液:细胞培养过程中2~3 d换液1次,视细胞生长速度、密度而定。玻璃吸管吸除旧培养液,加入2 mL磷酸

盐缓冲液(PBS)洗涤2次。移除PBS,加入4 mL含10%胎牛血清DMEM培养基全量换液。(3)传代:生长至80%~90%融合时可进行传代,玻璃吸管吸除旧培养液,加入2 mL PBS洗涤2次,尽量去除胎牛血清;加入1 mL 37℃预热的0.25%胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(EDTA)溶液,并均匀覆盖满细胞表面,进行消化;镜下观察细胞变圆、分散后迅速将培养瓶转至超净台内;加入0.1 mL胎牛血清终止消化;用巴氏吸管反复吹打细胞,动作轻柔又确保能吹落细胞且不能接触瓶底;将细胞悬液转移至4 mL的EP管内,1 000 r/min离心5 min后去除上清液;向EP管内加入2 mL含10%胎牛血清的DMEM培养基重悬细胞;取2~3个已消毒灭菌的25 cm²细胞培养瓶,各加入3 mL含10%胎牛血清的DMEM培养基;取细胞悬液平均分配,各1 mL接种于培养瓶内,用玻璃吸管吹打、混匀,动作轻柔,不能接触瓶底,尽量减少泡沫的产生,后置于37℃、5%CO₂细胞培养箱中培养。

1.3.2 AngⅡ诱导AFB表型转化时间梯度 取处于对数生长期且生长状态良好的细胞3瓶,细胞生长至60%~70%融合时更换2%胎牛血清的高糖DMEM培养液,同步化12 h后用于实验;取其中1瓶细胞按AFB传代的步骤收集细胞,再按细胞总蛋白提取步骤提取总蛋白并冻存备用;取剩余2瓶细胞同时移去培养基,并加入2 mL含10⁻⁷ mol/L AngⅡ的2%胎牛血清的高糖DMEM培养液,标记并计时,置于37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中继续培养;分别于第24、48 h提取总蛋白并进行Western Blot检测α-SMA蛋白表达。

1.3.3 AngⅡ及U0126对ERK1/2磷酸化水平的影响 按AFB传代步骤收集细胞并计数,以1×10⁶个/孔的细胞密度接种6孔板中的4孔并标记,每孔加入2 mL 10%胎牛血清的高糖DMEM培养基置于37℃、5%CO₂细胞培养箱中培养;至AFB长至60%~70%融合时更换2%胎牛血清的高糖DMEM培养液,同步化12 h后用于实验。A组为AFB、2%胎牛血清培养基处理0 min,B组为AFB、10⁻⁷ mol/L AngⅡ的2%胎牛血清培养基处理10 min(或AFB、10 μmol/L U0126预处理2 h),C组为AFB、10⁻⁷ mol/L AngⅡ的2%胎牛血清培养基处理20 min(或AFB、10 μmol/L U0126预处理2 h),D组为AFB、10⁻⁷ mol/L AngⅡ的2%胎牛血清培养基处理30 min。干预完成后按磷酸化蛋白提取方法提取磷酸化蛋白,并进行Western Blot检测ERK1/2磷酸化水平。

1.3.4 ERK1/2磷酸化在AngⅡ诱导AFB表型转化中的作用 按AFB传代步骤收集细胞并计数,以1×10⁶个/孔的细胞密度接种6孔板中的5孔并标记,每孔加入2 mL 10%胎牛血清的高糖DMEM培养基置于37℃、5%CO₂细胞培养箱中培养;至AFB长至60%~70%融合时更换2%胎牛血清的高糖DMEM培养液,同步化12 h后用于实验。A组为

AFB、2% 胎牛血清培养基培养 48 h, B 组为 AFB、10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ U0126 预处理 2 h、10 $^{-7}$ mol/L Ang II 的 2% 胎牛血清培养基培养 48 h, C 组为 AFB、1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ U0126 预处理 2 h、10 $^{-7}$ mol/L Ang II 的 2% 胎牛血清培养基培养 48 h, D 组为 AFB、0.1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ U0126 预处理 2 h、10 $^{-7}$ mol/L Ang II 的 2% 胎牛血清培养基培养 48 h, E 组为 AFB、10 $^{-7}$ mol/L Ang II 的 2% 胎牛血清培养基培养 48 h。干预完成后按总蛋白提取方法提取总蛋白, 并进行 Western Blot 检测 α -SMA 蛋白表达化水平。

1.3.5 CCK-8 检测 AFB 增殖 按 AFB 传代步骤收集细胞并计数, 调整细胞浓度, 以 1.5×10^3 个/孔的细胞密度接种于 96 孔 Costar 培养板中, 工作体积为每孔 100 μL , 接种后置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 4 h, 取出培养板, 依 0、24、48、72 h 时间点划分 4 块区域, 每块区域设为 B、C、D、E 4 组, 每组设 5 个复孔进行干预。B 组为 AFB、2% 胎牛血清培养基, C 组为 AFB、10 $^{-7}$ mol/L Ang II 的 2% 胎牛血清培养基, D 组为 AFB、10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ U0126 预处理 2 h、10 $^{-7}$ mol/L Ang II 的 2% 胎牛血清培养基, E 组为 AFB、10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ U0126 预处理 2 h、2% 胎牛血清培养基。A 组设置为空白对照, 2% 胎牛血清培养基。于培养 0、24、48、72 h 取出培养板, 对应时间点区域内各组每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中继续孵育 120 min, 用酶标仪检测 450 nm 处吸光度值。

1.3.6 Transwell、划痕实验检测 AFB 迁移 按 AFB 传代步骤收集细胞并计数, 2% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基调整细胞浓度为每毫升 1×10^5 个; 取 100 μL 细胞悬液接种于 Transwell 小室(孔径 0.8 μm)上室。A 组为上室 AFB, 下室 2% 胎牛血清培养基 12、24 h; B 组为上室 AFB, 下室 10 $^{-7}$ mol/L Ang II 的 2% 胎牛血清培养基 12、24 h; C 组为上室 AFB、

10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ U0126 预处理 2 h, 下室 10 $^{-7}$ mol/L Ang II 的 2% 胎牛血清培养基 12、24 h; D 组为上室 AFB、10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ U0126 预处理 2 h, 下室 2% 胎牛血清培养基 12、24 h。取出小室, 用棉签将上室正面未迁移的 AFB 拭去, 用 PBS 清洗 2 次; 移除下室培养基, 用 PBS 清洗 2 次; 向小室下室中加入 800 μL 4% 多聚甲醛, 放入上室, 进行细胞固定 20 min; 用 PBS 清洗 2 次, 动作轻柔; 随后向下室中加入 800 μL DAPI 荧光染料, 对细胞核进行染色 10 min; 用 PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min, 动作轻柔, 既要尽量去除未对细胞进行染色的 DAPI 染料, 又要避免迁移细胞脱落; 用 OLYMPUS 倒置荧光显微镜 IX51 观察细胞迁移情况。

1.4 统计学处理 应用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计数据分析, 各实验均重复 3 次($n=8$), 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析(ANOVA), 两组比较采用 Bonferroni 法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞生长特性 血管外膜组织块边缘于第 4 天可见数个细胞萌出, 细胞呈梭形和多边形, 1 周左右即可长至融合状态, 传代后细胞表现为优势生长, 呈放射状或网状交错排列。经 2 次传代后即达到纯化, 可稳定传至 7~8 代。

2.2 Ang II 诱导 AFB 表型转化时间梯度 Ang II 能诱导 AFB 表型转化。AFB 在 10 $^{-7}$ mol/L Ang II 刺激 24、48 h 后 α -SMA 表达分别为 0.311 ± 0.082、0.319 ± 0.051, 48 h 略高于 24 h。与 10 $^{-7}$ mol/L Ang II 刺激 0 h(0.151 ± 0.020)比较, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 1。

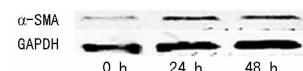


图 1 Ang II 诱导 AFB 表型转化的影响

表 1 各组 ERK1/2 磷酸化水平比较($n=8, \bar{x} \pm s$)

项目	0 min	10 min	20 min	30 min
p-P44/GAPDH	0.443 ± 0.030	0.656 ± 0.099 ^a	0.544 ± 0.109 ^b	0.273 ± 0.095
p-P42/GAPDH	0.492 ± 0.040	0.655 ± 0.046 ^a	0.603 ± 0.039 ^b	0.336 ± 0.007
P44/GAPDH	0.341 ± 0.020	0.434 ± 0.060	0.430 ± 0.050 ^b	0.258 ± 0.026
P42/GAPDH	0.883 ± 0.040	0.863 ± 0.182	0.897 ± 0.154 ^b	0.740 ± 0.073

注: 与 0 min 比较,^a $P<0.05$; 与 30 min 比较,^b $P<0.05$

表 2 Ang II 及 U0126 对 ERK1/2 磷酸化水平的影响($n=8, \bar{x} \pm s$)

项目	对照组	U0126 组	U0126、Ang II 组	Ang II 组
p-P44/GAPDH	0.180 ± 0.018	0.135 ± 0.014	0.320 ± 0.041 ^a	0.431 ± 0.048 ^b
p-P42/GAPDH	0.141 ± 0.006	0.184 ± 0.014	0.386 ± 0.031 ^a	0.595 ± 0.084 ^b

注: 与对照组比较,^a $P<0.05$; 与 U0126、Ang II 组比较,^b $P<0.05$

2.2 Ang II 及 U0126 对 ERK1/2 磷酸化水平的影响

未经 U0126 预处理的 AFB 在 10 $^{-7}$ mol/L Ang II 刺激 10 min 时 ERK1/2 磷酸化水平最高、20、30 min 后逐渐下降, 10 min 时 ERK1/2 磷酸化水平与 0 min 时、20 min 时 ERK1/2 磷酸化水平与 30 min 时比较,

差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 1、图 2。总 ERK1/2 蛋白表达水平未见明显变化。经 U0126 预处理的 Ang II 组 ERK1/2 磷酸化水平较未经 U0126 预处理的 Ang II 组明显降低, 差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2、图 3。

表3 Ang II及U0126对AFB增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	0 h	24 h	48 h	72 h
对照组	8	0.44±0.04	0.60±0.04	0.79±0.03	0.89±0.05
Ang II组	8	0.49±0.05	0.70±0.04 ^a	0.94±0.06 ^a	1.33±0.07 ^a
U0126、Ang II组	8	0.46±0.05	0.61±0.04 ^b	0.85±0.05 ^b	0.97±0.06 ^b
U0126组	8	0.42±0.03	0.52±0.03	0.73±0.02	0.85±0.04

注:与对照组比较,^aP<0.05;与Ang II组比较,^bP<0.05

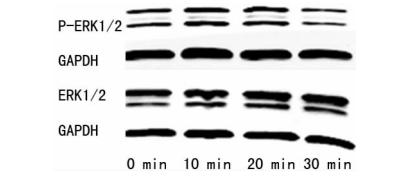


图2 各组ERK1/2磷酸化水平比较

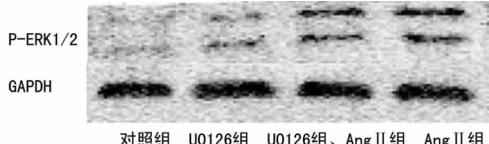


图3 Ang II及U0126对ERK1/2磷酸化水平的影响

2.3 Ang II及U0126对AFB表型转化的影响

U0126能明显抑制Ang II诱导的 α -SMA表达,即AFB表型转化,A、B、C、D、E组AFB的 α -SMA表达分别为 0.582 ± 0.030 、 0.281 ± 0.030 、 0.385 ± 0.074 、 0.553 ± 0.121 、 0.709 ± 0.074 ,B组AFB的 α -SMA表达较E组显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图4。

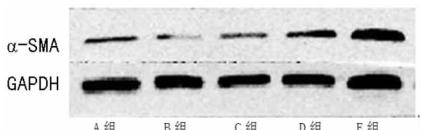


图4 Ang II及U0126对AFB表型转化的影响

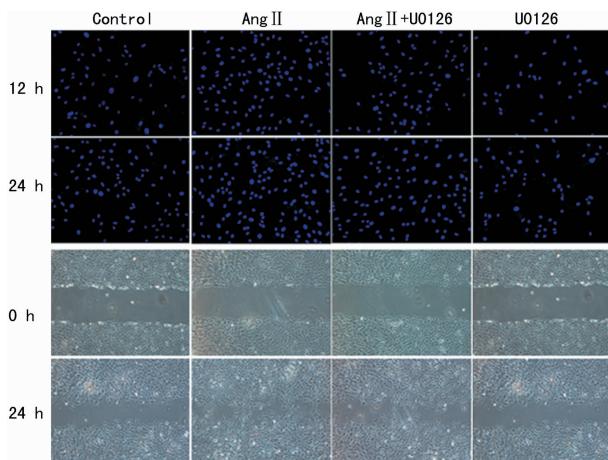


图5 Ang II及U0126对AFB迁移的影响

2.4 Ang II及U0126对AFB增殖的影响

Ang II能明显诱导AFB增殖。24、48、72 h时Ang II组细胞增殖均较对照组显著增强,差异均有统计学意义($P < 0.05$);24、48、72 h时U0126能显著抑制Ang II对AFB的促增殖作用,72 h更为明显,差异均有统计学

意义($P < 0.05$)。见表3。

2.5 Ang II及U0126对AFB迁移能力的影响 Ang II能显著增强AFB迁移能力,且呈时间依赖关系,Ang II刺激12、24 h时AFB迁移能力显著较对照组增强,差异均有统计学意义($P < 0.05$);U0126能显著抑制Ang II对AFB的趋化作用,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图5、表4。

表4 Ang II及U0126对AFB迁移的影响($n=8$)

组别	n	12 h	24 h
对照组	8	72.0±7.5	107.8±9.7
Ang II组	8	131.8±8.2 ^a	170.0±14.3 ^a
U0126、Ang II组	8	85.4±7.4 ^b	119.0±7.1 ^b
U0126组	8	45.8±6.3	67.8±6.1

注:与对照组比较,^aP<0.05;与Ang II组比较,^bP<0.05

3 讨论

AD是一种极其凶险且病死率高的疾病。AD的发病机制尚不清楚,目前,公认的主动脉中层的结构改变为其病理学特征,如中层纤维化、囊性坏死、弹力纤维减少断裂、动脉粥样硬化形成所致的主动脉内膜溃疡等。在大动脉中,主动脉外膜可定义为位于中膜外弹力层外侧,由多量AFB及其合成的富含胶原纤维的细胞外基质所组成的被膜。在极高的血压下致密的外膜结构可防止动脉破裂^[7]。

有研究表明,70% AD患者既往有高血压病史,44%的患者发病时仍伴不同程度高血压^[8]。而肾素-血管紧张素-醛固酮系统在高血压发病中具有重要作用^[9]。动脉内膜损伤后局部血管紧张素转化酶(ACE)的表达及活性明显增高。ACE的表达在肾性高血压大鼠动脉壁组织中明显增加,导致局部Ang II增多,诱导血管局部生长因子如血小板源性生长因子、转化生长因子-β、碱性成纤维细胞生长因子和胰岛素样生长因子的自分泌增加,促进AFB的表型转化及迁移^[10-11]。

ERK1/2是Ras通路中重要的信号分子,位于Ras下游,主要由生长因子受体(或蛋白质酪氨酸激酶受体)介导激活,并需Ras、PKC和Raf蛋白参与。平时ERK位于细胞质内,一旦被激活,ERK迅速穿过核膜,再激活转录因子和(或)P70核蛋白体S6激酶。只有磷酸化的ERK1/2才具有活性,其进一步调节其各自靶基因的转录,引起特定蛋白的表达或活性改变,最终调节细胞代谢和功能,影响细胞产生特定的

生物学效应。

有研究表明,ERK1/2 与 Ang II 导致血管平滑肌细胞 PKC α 和 ERK1/2 表达升高,在 Ang II 通过 AT1 受体诱导的系膜细胞增殖与肥大中 ERK1/2 具有非常重要的作用^[12]。Ang II 可导致内皮功能障碍,激活核因子 κ B,刺激血管细胞黏附分子的表达和白介素-6(IL-6)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、肿瘤坏死因子- α 等炎性细胞因子的释放,造成血管的炎性反应,损伤血管壁结构。

AFB 在 Ang II 的促进下可产生自由基,可使内皮细胞合成的 NO 迅速灭活,从而削弱其抑制血管重构的作用^[13]。Ang II 可通过 AT1 受体激活 AFB,分泌 IL-6、MCP-1 等,IL-6 调节单核细胞向巨噬细胞分化,并伴随着金属蛋白酶(MMPs)的分泌^[14],进而降解中层细胞外基质,致使主动脉壁薄弱。Ang II 通过 AT1 激活 ERK1/2 和 P38MAP 激酶,进一步促进 AFB 的表型转化、增殖和迁移^[15]。

AFB 表型转化及迁移是一个十分复杂的动态过程,该过程的完整机制尚未完全阐明。越来越多的基础研究表明,主动脉外膜及 AFB 在主动脉壁结构重建过程中占有重要地位,形成“outside-in”理论对传统的“inside-out”观念提出挑战,即主动脉血管中层的损伤是一个由外及内动态过程的结果,AFB 的表型转化及向血管内膜的迁移是该过程的首发环节。AFB 的激活、表型转化及迁移所致的相关炎症介质的释放、炎症细胞的聚集均将导致细胞外基质合成与降解的失衡,从而造成中层的损伤。而各种诱因引起的上述变化均不同程度地影响中层结构的稳定。本研究通过 Ang II 诱导体外原代培养大鼠胸主动脉 AFB 表型转化,结果显示,AFB 在 10^{-7} mol/L Ang II 刺激 24、48 h 后细胞质 α -SMA 蛋白表达明显增加,差异均有统计学意义($P<0.05$),且 48 h 略高于 24 h。AFB 在 10^{-7} mol/L Ang II 刺激 10、20、30 min 后于 10 min 左右 ERK1/2 磷酸化水平明显提高,差异均有统计学意义($P<0.05$),而总 ERK1/2 蛋白表达水平未见明显变化,由此可知,Ang II 诱导的 ERK1/2 磷酸化水平明显提高并不是由于基因表达水平的改变。ERK1/2 相关信号通路在 AFB 表型转化,增殖及迁移中发挥了重要作用。U0126 为 MEK1/2 抑制剂,通过阻断 MEK1/2 对 ERK1/2 磷酸化激活而成为常用的 MAPK-ERK1/2 信号通路抑制剂,本研究结果显示,经 U0126 预处理的 Ang II 组 ERK1/2 磷酸化水平较未经 U0126 预处理的 Ang II 组明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),且通过 CCK-8 增殖实验及迁移实验证实,抑制 ERK1/2 磷酸化能明显抑制 AFB 表型转化后的增殖及迁移能力。

4 结 论

Ang II 能明显诱导 AFB 表型转化,促进 AFB 增

殖并增强其迁移能力,且 ERK1/2 磷酸化在其中具有重要作用,抑制 ERK1/2 磷酸化能明显抑制 AFB 表型转化,进而抑制其增殖及迁移能力,由此可推测,ERK1/2 相关信号通路参与了 AFB 表型转化、增殖及迁移。因此,抑制 ERK1/2 磷酸化可能成为稳定主动脉外膜 AFB 迁移的潜在靶点,为研究 AD 发病机制及防治提供进一步的实验依据。

参 考 文 献

- [1] 郭义山,丛超,杨宁,等.主动脉夹层发病机制的研究进展[J].医学综述,2017,23(12):2339-2343.
- [2] 吴琪,王志维.血管中膜与主动脉夹层发病机制的研究进展[J].中国循证心血管医学杂志,2017,9(5):625-628.
- [3] 王宇菲,范文静,姜志胜,等.主动脉夹层模型的最新研究进展[J].中国动脉硬化杂志,2017,25(8):841-844,860.
- [4] 于冠宇,宋超,冯翔,等.血压波动性对主动脉夹层发生发展影响的研究进展[J].现代生物医学进展,2017,17(4):769-772.
- [5] 王河清,唐谦,张喆.急性主动脉夹层循环标志物的研究进展[J].中国心血管病研究,2016,14(4):296-300.
- [6] LI L,ZHU DL,SHEN W L,et al.Increased migration of vascular adventitial fibroblasts from spontaneously hypertensive rats[J].Hypertens Res,2006,29(2):95-103.
- [7] 高新海,徐仲卿,张晓明,等.主动脉夹层患者临床特征及导致死亡相关危险因素分析[J].实用临床医药杂志,2015,19(13):130-131.
- [8] 庞秀慧,买买提艾力·艾则孜,杜宇奎,等.Stanford A 型主动脉夹层术前发生低氧血症的危险因素分析[J].中国医师进修杂志,2017,40(8):752-756.
- [9] 王俏,李学奇.RAAS 基因多态性与原发性高血压的相关性研究进展[J].医学综述,2017,23(11):2120-2124.
- [10] 周剑平,汤葳,冯耘,等.血管紧张素-(1-7)下调转化生长因子- β 1/Smad 通路致胶原蛋白-I 表达减少并抑制成纤维细胞向肌成纤维细胞转化[J].中华结核和呼吸杂志,2016,39(12):952.
- [11] 刘军锋,孔美娟,贾克刚.晚期糖基化终产物与冠心病发病机制的研究进展[J].检验医学,2014,29(1):76-80.
- [12] 靳馥宇,张惠,李倩,等.抗纤维化短肽 Ac-SDKP 对 Ang II 诱导肺泡 II 型上皮细胞向肌成纤维细胞分化的调控作用与机制[J].福建医科大学学报,2017,51(2):92-96.
- [13] 门素珍,马丽娟,石亚男,等.成纤维细胞分化为肌成纤维细胞的调控机制[J].新医学,2017,48(2):74-77.
- [14] 崔琳,王幼平,谢世阳,等.血管紧张素 II 对原代培养大鼠心肌成纤维细胞增殖及转分化的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2017,15(21):2680-2684.
- [15] LU G,XU S,PENG L,et al.Angiotensin II upregulates Kv1.5 expression through ROS-dependent transforming growth factor-beta1 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 signalings in neonatal rat atrial myocytes[J].Biochem Biophys Res Commun,2014,454(3):410-416.