

尾加压素 II 促进血管外膜成纤维细胞表达白细胞介素 6

林家冲¹, 包世林¹, 吴利标¹, 马彦军¹, 杨絮^{2,3}, 张勇刚^{1,2,3}

(汕头大学医学院 1. 第一附属医院心内科分子心脏病学实验室, 2. 第二附属医院心内科, 3. 转化医学研究中心心血管实验室, 广东省汕头市 515041)

[关键词] 尾加压素 II; 白细胞介素 6; 血管外膜成纤维细胞; 动脉粥样硬化

[摘要] **目的** 探讨尾加压素 II (U II) 对大鼠血管外膜成纤维细胞表达白细胞介素 6 (IL-6) 作用的影响及其细胞内信号转导机制。**方法** 雄性 SD 大鼠胸主动脉外膜成纤维细胞体外同步化培养 24 h 后, 于无血清 DMEM 培养基中加入 U II ($10^{-10} \sim 10^{-7}$ mol/L), 共孵育 3~24 h。为了探索 U II 的作用机制, 加入细胞内不同的信号转导通路抑制剂, 处理 30 min 后, 加入 U II (10^{-8} mol/L) 共孵育 3 h 或 12 h。实验结束时, 收集细胞, 采用逆转录-聚合酶链反应法检测细胞 IL-6 mRNA 表达 (3 h); 另外, 细胞实验结束后收集培养液, 采用酶联免疫吸附测定法检测 IL-6 分泌水平 (12 h)。**结果** (1) U II 呈浓度 ($10^{-10} \sim 10^{-7}$ mol/L) 和时间依赖性方式促进外膜成纤维细胞中 IL-6 mRNA 表达和蛋白分泌, 至 10^{-8} mol/L U II 达高峰 ($P < 0.01$); U II (10^{-8} mol/L) 刺激 IL-6 基因表达 3 h 达高峰, 蛋白分泌 24 h 达高峰 ($P < 0.01$)。 (2) U II 促进外膜成纤维细胞表达 IL-6 的效应能被 U II 受体阻断剂 SB710411 (10^{-6} mol/L)、钙离子通道阻断剂尼卡地平 (10^{-5} mol/L)、丝裂原活化蛋白激酶抑制剂 PD980959 (10^{-5} mol/L)、蛋白激酶 C 抑制剂 H7 (10^{-5} mol/L)、Rho 激酶抑制剂 Y-27632 (10^{-5} mol/L) 和钙调神经磷酸酶抑制剂环孢霉素 A (10^{-5} mol/L) 所抑制 ($P < 0.01$)。**结论** U II 明显促进大鼠主动脉外膜成纤维细胞 IL-6 的表达, 该作用通过激活 U II 受体、钙离子通道、丝裂原活化蛋白激酶、蛋白激酶 C、Rho 激酶和钙调神经磷酸酶信号途径来实现, 提示 U II 诱导外膜成纤维细胞表达 IL-6 升高可能是其参与动脉粥样硬化的重要机制之一。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Urotensin II Promotes Interleukin-6 Expression in Aortic Adventitial Fibroblasts

LIN Jia-Chong¹, BAO Shi-Lin¹, WU Li-Biao¹, MA Yan-Jun¹, YANG Xu^{2,3}, and ZHANG Yong-Gang^{1,2,3}

(1. Laboratory of Cardiology, First Affiliated Hospital, 2. Department of Cardiology, Second Affiliated Hospital, 3. Laboratory of Cardiology, Centre for Translational Medicine, Shantou University Medical College, Shantou, Guangdong 515041, China)

[KEY WORDS] Urotensin II; Interleukin-6; Adventitial Fibroblast; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of urotensin II (U II) on expression of interleukin-6 (IL-6) in rat aortic adventitial fibroblast (AF) and its intracellular mechanisms. **Methods** Growth-arrested AF was incubated in serum-free medium with U II ($10^{-10} \sim 10^{-7}$ mol/L). In order to explore the mechanism of U II effects, the cells were pretreated with some inhibitors of signal transduction pathways for 30 min, and then incubated with U II (10^{-8} mol/L) for 3 h to 24 h. The IL-6 mRNA expression in the cells and secretion from the cells induced by U II were evaluated by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), respectively. **Results** (1) U II significantly increased IL-6 mRNA expression and protein secretion in rat AF, in a concentration-dependent ($10^{-10} \sim 10^{-7}$ mol/L) and a time-dependent manner, with maximal effect at 10^{-8} mol/L at 3 h for mRNA expression, or at 24 h for protein secretion (both $P < 0.01$). (2) The effect of U II was inhibited by SB710411 (10^{-6} mol/L), nifedipine (10^{-5} mol/L), PD980959 (10^{-5} mol/L), H7 (10^{-5} mol/L), Y-27632 (10^{-5} mol/L) and cyclosporine A

[收稿日期] 2013-09-16

[基金项目] 国家自然科学基金(30971273、81270223); 广东省自然科学基金(9151051501000016、S2011010000450); 广东省杰出大学生创新实验项目(1056010010)

[作者简介] 林家冲, 硕士, 医师, 研究方向为心血管发病机制, E-mail 为 linjiachong@163.com; 现在深圳市罗湖人民医院心内科工作。吴利标, 主治医师, 研究方向为心血管分子机制, E-mail 为 wu1788@foxmail.com。通讯作者张勇刚, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管发病机制, E-mail 为 zhangyg8686@hotmail.com。

(CsA) (10^{-5} mol/L), the inhibitors of U II receptor, Ca^{2+} channel, mitogen activated protein kinase, protein kinase C, Rho kinase, and calcineurin, respectively. **Conclusion** U II significantly induces IL-6 expression in rat AF, via activation of its receptor, Ca^{2+} channel, mitogen activated protein kinase, protein kinase C, Rho kinase and calcineurin signal transduction pathways, indicating that U II induced-IL-6 expression is one of the important mechanisms responsible for accelerated atherosclerosis.

动脉粥样硬化的发病机制尚未完全阐明。近年发现炎症是其重要的病理特征^[1-4],而血管外膜则是炎症的起始部位之一^[3]。多种炎症介质参与了该过程,其中白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)在动脉粥样硬化组织大量表达,是血管炎症激活和动脉粥样硬化进展的重要标志之一,和心血管事件密切相关^[5,6]。尾加压素II(urotensin II, U II)是一种参与动脉粥样硬化发展的缩血管活性肽^[7],有报道它能够刺激心肌细胞上调IL-6表达^[8],提示U II参与了心血管炎症的调控。我们曾发现U II可促进外膜成纤维细胞(adventitial fibroblast, AF)表型转化、增殖、迁移和胶原合成^[9,10]。但U II可否通过激活外膜炎症来促进动脉粥样硬化尚未见报道。为此,本工作在体外培养的AF上,研究了U II刺激IL-6表达的作用及其细胞内机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

雄性SD大鼠(体重180~200 g)由汕头大学医学院实验动物中心提供。大鼠U II(纯度>99.5%)和U II受体阻断剂SB710411为Phoenix Pharm Inc产品(USA)。DMEM培养基为GiBco产品(Invitrogen-Gibco, USA);胎牛血清为Hyclone产品(Logan, Utah, USA)。钙离子通道阻断剂尼卡地平、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)抑制剂PD980959、蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)抑制剂H7、Rho激酶抑制剂Y-27632和钙调神经磷酸酶抑制剂环孢霉素A(cyclosporine A, CsA)为Sigma公司产品(USA)。余为市售分析纯试剂。

1.2 大鼠AF的培养

大鼠AF的培养采用组织贴块法^[9,10]进行。颈椎脱臼法处死大鼠,无菌操作下取出主动脉,分离血管外膜,剪成约1 mm×1 mm×1 mm大小,均匀贴附于25 cm²培养瓶中,加入含20%小牛血清的DMEM培养液,于37℃、5% CO₂条件下培养。约3~5天左右可见AF从组织块周围长出;采用相差显微镜观察发现,细胞呈纺锤形、多角形或不规则

形状,与中膜平滑肌细胞相比缺乏小山丘样生长方式。待细胞生长融合至85%~95%时,用0.25%胰蛋白酶消化传代。实验选用3~5代细胞。

1.3 实验设计

以 1×10^5 个/孔细胞接种于6孔板,在10% DMEM培养基中生长至70%~80%融合时,换用无血清DMEM培养液同步化培养24 h。根据实验设计随机分组,按下述分组加入不同刺激因素至无血清DMEM培养液继续培养。实验结束时收集细胞,采用逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)测定IL-6 mRNA表达;收集细胞外液检测IL-6分泌水平。

(1)不同浓度U II对AF表达IL-6的影响:分为5组:对照组(不加U II)、 10^{-10} 、 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} mol/L U II刺激组,共孵育3 h,检测IL-6 mRNA表达;另取细胞,分组一样,孵育12 h检测IL-6分泌。(2)U II(10^{-8} mol/L)刺激AF不同时间对IL-6表达的影响:分为对照组(0 h)、1、3、6、12、24 h组,检测IL-6 mRNA表达;另取细胞分为4组:对照组(0 h)、6、12、24 h组,检测IL-6分泌水平。(3)U II受体阻断剂SB710411(10^{-6} mol/L)对U II刺激AF表达IL-6的影响:分为3组:对照组、U II(10^{-8} mol/L)刺激组、U II(10^{-8} mol/L)+SB710411(10^{-6} mol/L)刺激组,孵育3 h检测细胞IL-6 mRNA表达;另取细胞孵育12 h,检测IL-6分泌量。(4)信号转导通路阻断剂+U II组:在培养的细胞中,分别加入钙通道阻断剂尼卡地平(10^{-5} mol/L)、钙调神经磷酸酶抑制剂环孢霉素A(10^{-5} mol/L)、丝裂原活化蛋白激酶抑制剂PD980959(10^{-5} mol/L)、PKC抑制剂H7(10^{-5} mol/L)和Rho激酶抑制剂Y-27632(10^{-5} mol/L)预先孵育30 min后,加入U II(10^{-8} mol/L)继续孵育3 h,检测IL-6 mRNA表达;另取细胞同样孵育12 h后检测IL-6分泌量,以论证这些信号通路是否参与了U II诱导IL-6产生和分泌的作用。

1.4 RT-PCR检测IL-6 mRNA表达

采用异硫氰酸胍-酚-氯仿(Gibco公司)一步抽提法提取细胞总RNA,紫外分光光度计定量,逆转录反应参照试剂盒(TransGen公司)说明进行。PCR反应条件为初始变性94℃ 4 min,然后变性

94℃ 30 s, 退火 54℃ 30 s, 延伸 72℃ 30 s, 经 34 个循环后 72℃ 延伸 8 min。IL-6 引物序列: 正义链: 5'-GTTGCCCTTCTTGGGACTGATGTT-3', 反义链: 5'-TGCTCTGAATGACTCTGGCTTTG-3'; β -actin 引物序列: 正义链: 5'-ATCTGGCACCACACCTTC-3', 反义链: 5'-AGCCAGGTCCAGACGCA-3'; 上海生物工程有限公司合成。PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 (IL-6 400 bp, β -actin 291 bp)。采用凝胶成像仪进行半定量分析。以 β -actin 作为内参照, 比较 U II 组和对照组 IL-6/ β -actin 灰度比值。

1.5 AF 培养液上清 IL-6 含量测定

收集细胞培养液, 采用酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 法检测 IL-6 含量, 参照试剂盒 (R&D 公司, 美国) 说明进行, 最小检测灵敏度为 5 ng/L。于 450 nm 波长下测量各孔的吸光度 (absorbance, A) 值。

1.6 统计学处理

所有数据用 GraphPad Prism 4 软件处理, 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。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 U II 对 AF 表达 IL-6 mRNA 的影响

U II 呈浓度依赖性方式促进 IL-6 mRNA 表达, 在 10^{-8} mol/L U II 组达高峰; 刺激细胞 3 h 后, 10^{-10} 、 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} mol/L U II 组 IL-6 mRNA 表达分别较对照组 (不加 U II) 增加 83.7% ($P < 0.01$)、89.6% ($P < 0.01$)、166.6% ($P < 0.01$)、64.1% ($P < 0.05$; 图 1)。U II 同样以时间依赖性方式促进 IL-6 mRNA 表达, 3 h 达高峰; U II (10^{-8} mol/L) 刺激细胞 1、3、6、12、24 h 后, IL-6 mRNA 表达较对照组 (0 h) 分别增加 72.7% ($P < 0.01$)、98.0% ($P < 0.01$)、59.6% ($P < 0.01$)、35.9% ($P < 0.05$)、30.5% ($P < 0.05$; 图 2)。

2.2 U II 对 AF 分泌 IL-6 蛋白的影响

U II 呈浓度依赖性刺激 IL-6 分泌, 10^{-10} mol/L U II 组即可促进 IL-6 蛋白分泌, 于 10^{-8} mol/L U II 组达高峰 ($P < 0.01$), 10^{-7} mol/L U II 组较 10^{-8} mol/L U II 组作用有所减弱, 但仍高于对照组 (不加 U II) ($P < 0.01$)。 10^{-10} 、 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} mol/L U II 组分别较对照组高 9.86% ($P < 0.05$)、20.28% ($P < 0.01$)、24.84% ($P < 0.01$)、21.32% ($P < 0.01$; 图 3)。U II 同样以时间依赖性促进 IL-6 分泌, 用 10^{-8} mol/L U II 刺

激 AF 6、12、24 h 后, IL-6 蛋白分泌量较对照组 (0 h) 分别增加 22.75% ($P > 0.05$)、32.49% ($P < 0.05$)、58.49% ($P < 0.01$; 图 4)。

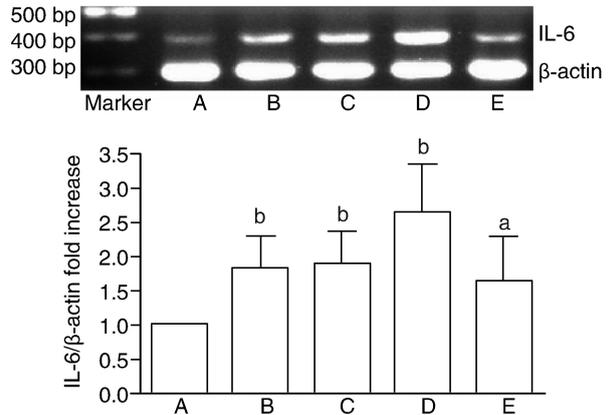


图 1. 不同浓度 U II 对 AF 表达 IL-6 mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$) A 为对照组 (不加 U II), B 为 10^{-10} mol/L U II 组, C 为 10^{-9} mol/L U II 组, D 为 10^{-8} mol/L U II 组, E 为 10^{-7} mol/L U II 组。a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

Figure 1. Effects of different concentrations of U II on IL-6 mRNA expression in adventitial fibroblasts ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

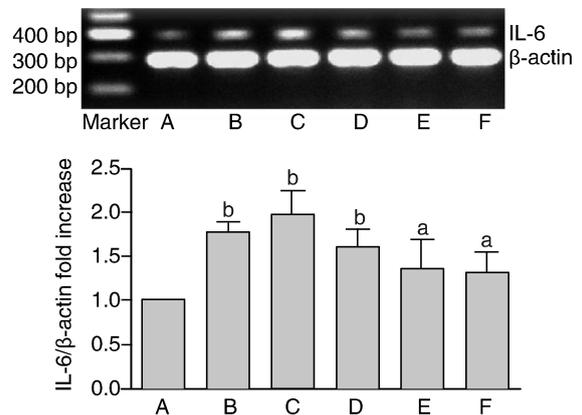


图 2. U II (10^{-8} mol/L) 刺激不同时间对 AF 表达 IL-6 mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$) A 为对照组 (0 h), B 为 1 h 组, C 为 3 h 组, D 为 6 h 组, E 为 12 h 组, F 为 24 h 组。a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

Figure 2. Time course of U II on IL-6 mRNA expression in adventitial fibroblasts ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

2.3 U II 受体阻断剂 SB710411 对 AF 表达 IL-6 的影响

RT-PCR 结果显示 SB710411 (10^{-6} mol/L) 明显抑制 U II 刺激 AF 表达 IL-6 mRNA 的作用, 抑制率为 23.38% ($P < 0.01$; 图 5); U II 促进 IL-6 分泌的作用同样能够被 SB710411 所抑制, 抑制率为 18.95% ($P < 0.01$; 图 6)。

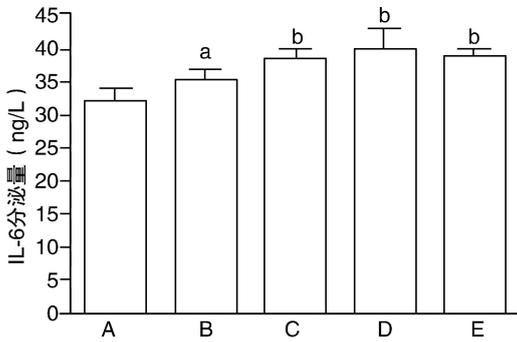


图 3. 不同浓度 U II 对 AF 分泌 IL-6 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

A 为对照组(不加 U II), B 为 10^{-10} mol/L U II 组, C 为 10^{-9} mol/L U II 组, D 为 10^{-8} mol/L U II 组, E 为 10^{-7} mol/L U II 组。a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

Figure 3. Effects of different concentrations of U II on IL-6 secretion from AF ($\bar{x} \pm s, n=4$)

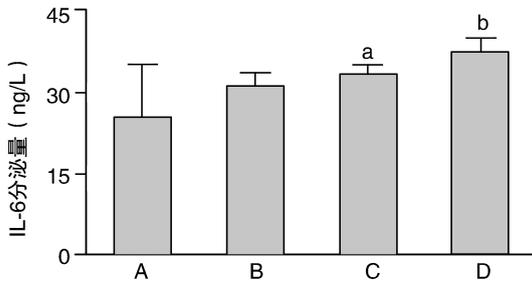


图 4. U II (10^{-8} mol/L) 刺激 AF 不同时间后 IL-6 分泌的变化 ($\bar{x} \pm s, n=6$) A 为对照组(0 h), B 为 6 h 组, C 为 12 h 组, D 为 24 h 组。a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

Figure 4. Time course of U II on IL-6 secretion from adventitial fibroblasts ($\bar{x} \pm s, n=6$)

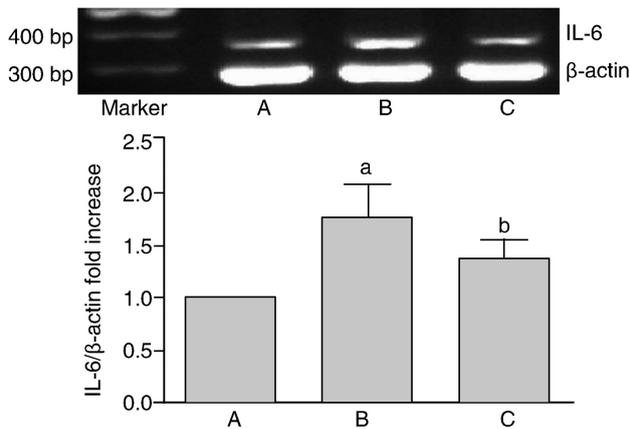


图 5. U II 以 U II 受体依赖性方式刺激大鼠 AF 表达 IL-6 mRNA ($\bar{x} \pm s, n=6$) A 为对照组(不加 U II), B 为 10^{-8} mol/L U II 组, C 为 10^{-8} mol/L U II + 10^{-6} mol/L SB710411 组。a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 10^{-8} mol/L U II 组比较。

Figure 5. U II promotes IL-6 mRNA expression in a urotensin II receptor-dependent way in rat adventitial fibroblasts ($\bar{x} \pm s, n=6$)

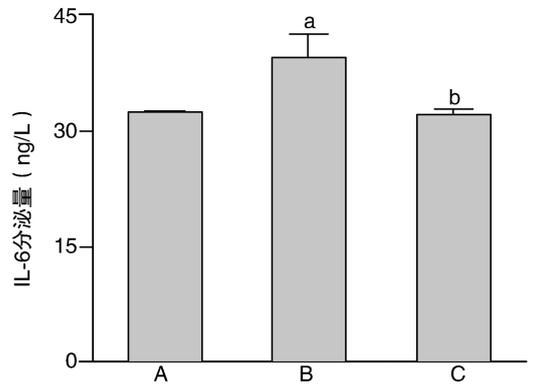


图 6. U II 以 U II 受体依赖性方式刺激大鼠 AF 分泌 IL-6 ($\bar{x} \pm s, n=6$) A 为对照组(不加 U II), B 为 10^{-8} mol/L U II 组, C 为 10^{-8} mol/L U II + 10^{-6} mol/L SB710411 组。a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 10^{-8} mol/L U II 组比较。

Figure 6. U II promotes IL-6 secretion from rat adventitial fibroblasts in a urotensin II receptor-dependent way ($\bar{x} \pm s, n=6$)

2.4 细胞内信号转导通路抑制剂对 U II 促进 AF 表达 IL-6 的影响

U II 上调 IL-6 mRNA 表达的作用能够被钙通道阻断剂尼卡地平 (10^{-5} mol/L)、MAPK 抑制剂 PD98059 (10^{-5} mol/L)、PKC 抑制剂 H7 (10^{-5} mol/L)、Rho 激酶抑制剂 Y-27632 (10^{-5} mol/L) 和钙调神经磷酸酶抑制剂 CsA (10^{-5} mol/L) 明显抑制, 较 U II (10^{-8} mol/L) 组分别减少 17.2% ($P < 0.05$)、57.6% ($P < 0.01$)、32.9% ($P < 0.01$)、40.1% ($P < 0.01$)、28.8% ($P < 0.01$); 图 7)。同样, U II 刺激 IL-6 蛋白分泌的作用亦能够被尼卡地平、PD98059、H7、Y-27632、CsA 所抑制, 分别较 U II (10^{-8} mol/L) 组减少 16.5%、15.6%、17.3%、21.3%、19.0% (均 $P < 0.01$; 图 8)。

3 讨论

U II 是继内皮素之后发现的强力缩血管活性肽, 能够促进血管收缩, 刺激血管平滑肌细胞增殖, 刺激血管和心肌成纤维细胞增殖、胶原合成以及迁移^[7,9,10], 促进泡沫细胞形成^[11], 促进肾间质成纤维细胞表型转化^[12], 促进内皮素产生和释放^[13]。动脉粥样硬化患者血浆 U II 水平明显升高, 冠状动脉粥样硬化斑块组织巨噬细胞浸润部位富含 U II^[7,14]。我们曾在大鼠血管钙化模型上, 发现主动脉和心肌组织 U II 水平及受体基因表达明显上调^[15]。其他学者发现敲除 U II 基因或采用尾加压素 II 受体 (urotensin II receptor, UT) 特异性阻断剂 SB657510A 能够减轻小鼠动脉粥样硬化^[14,16]。这

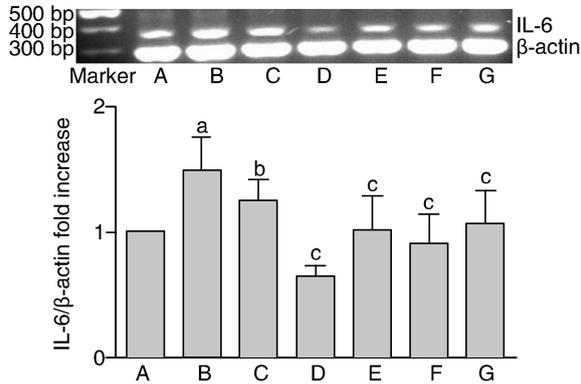


图 7. 不同的信号通路阻断剂对 U II 刺激 AF 表达 IL-6 mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$) A 为对照组 (不加 U II), B 为 10^{-8} mol/L U II 组, C 为 10^{-5} mol/L 尼卡地平 + 10^{-8} mol/L U II 组, D 为 10^{-5} mol/L PD98059 + 10^{-8} mol/L U II 组, E 为 10^{-5} mol/L H7 + 10^{-8} mol/L U II 组, F 为 10^{-5} mol/L Y-27632 + 10^{-8} mol/L U II 组, G 为 10^{-5} mol/L CsA + 10^{-8} mol/L U II 组。a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与 10^{-8} mol/L U II 组比较。

Figure 7. Effect of different inhibitors on U II-induced IL-6 mRNA expression in rat adventitial fibroblasts ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

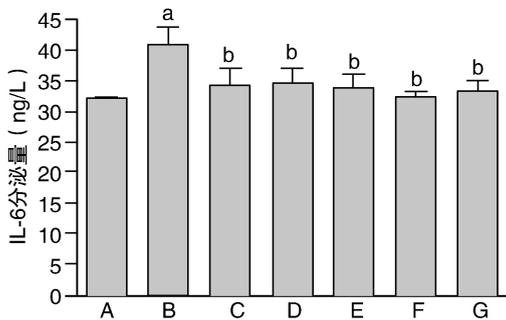


图 8. 不同的信号通路抑制剂对 U II 刺激大鼠 AF 分泌 IL-6 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$) A 为对照组 (不加 U II), B 为 10^{-8} mol/L U II 组, C 为 10^{-5} mol/L 尼卡地平 + 10^{-8} mol/L U II 组, D 为 10^{-5} mol/L PD98059 + 10^{-8} mol/L U II 组, E 为 10^{-5} mol/L H7 + 10^{-8} mol/L U II 组, F 为 10^{-5} mol/L Y-27632 + 10^{-8} mol/L U II 组, G 为 10^{-5} mol/L CsA + 10^{-8} mol/L U II 组。a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 10^{-8} mol/L U II 组比较。

Figure 8. Effect of different inhibitors on U II-induced IL-6 secretion from rat adventitial fibroblasts ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

些研究提示 U II 参与了动脉粥样硬化的发生和发展。然而, U II 在血管炎症中的作用以及参与动脉粥样硬化的机制仍未完全阐明。

本研究发现, 在体外培养的大鼠主动脉外膜成纤维细胞上, U II 呈浓度和时间依赖性方式诱导 IL-6 mRNA 表达和蛋白分泌, 提示 U II 能够刺激 AF 合成和释放炎症因子, 激活血管炎症反应。本研究还发现, U II 促进 IL-6 表达的作用能够被其特异性受

体阻断剂 SB710411、钙离子通道阻断剂尼卡地平、MAPK 特异性抑制剂 PD98059、PKC 抑制剂 H7、Rho 激酶抑制剂 Y-27632 及钙调神经磷酸酶抑制剂 CsA 所抑制, 提示 U II 刺激 AF 表达 IL-6 的作用可通过 U II 受体 UT、钙离子通道、MAPK、PKC、Rho 激酶及钙调神经磷酸酶的激活来实现。

最近研究表明, 在离体培养的血管平滑肌细胞上, U II (10^{-8} mol/L) 能够促进 IL-6 的分泌, U II 受体阻断剂 Urantide 能够下调 IL-6 的分泌。而在高脂饲料喂养及腹腔注射维生素 D3 所致的大鼠模型上, Urantide 不能够下调胸主动脉中膜和内膜 IL-6 的表达^[17]。在培养的人类脐静脉内皮细胞 (EA.hy926) 上, U II 明显促进 IL-1 β 和 IL-6 的基因表达, 该作用能够被 U II 受体阻断剂 SB657510 所抑制^[18]。在本工作中, 我们选择体外培养的外膜成纤维细胞作为研究对象, 首次从基因表达和蛋白分泌水平上, 观察了 U II 对 IL-6 作用的时间和浓度效应曲线, 结果表明 U II 是刺激外膜成纤维细胞分泌 IL-6 的新的因子。在此基础上, 我们探讨了 U II 促进 IL-6 产生的细胞内信号转导机制。结果发现, U II 不仅可通过其受体激活机制促进 IL-6 表达, 还可通过钙离子通道、MAPK、PKC、Rho 激酶及钙调神经磷酸酶激活发挥作用。这与 U II 促进成纤维细胞增殖、胶原合成和迁移的作用具有部分相同的信号机制。我们曾发现 U II 通过与 UT 结合, 启动钙离子通道、MAPK、PKC、Rho 激酶及钙调神经磷酸酶途径促进大鼠外膜成纤维细胞表型转化、增殖、胶原合成和迁移^[9,10]。其他学者也报道 U II 与 UT 特异性结合后, 促进细胞 Ca^{2+} 内流增加, 进一步激活下游信号通路, 如钙离子、MAPK、Rho 激酶、钙调神经磷酸酶等信号转导系统, 发挥促进胶原和细胞增殖作用^[7,19,20]。近年, 我们还发现 U II 能够通过这些信号通路促进外膜成纤维细胞表达骨桥蛋白^[21]。最近, 有报道指 U II 可通过 p38MAPK 信号通路促进人类脐静脉内皮细胞表达 IL-8^[22]。对于 U II 促进 IL-6 以及参与血管炎症的作用机制仍需进一步研究。

炎症反应参与了动脉粥样硬化发展过程。IL-6 作为一种重要的炎症因子, 能够刺激细胞生长, 促进细胞分化, 诱导内皮细胞产生趋化因子和黏附分子, 削弱内皮细胞产生内源性一氧化氮的能力, 促进白细胞浸润, 促进炎症反应和动脉粥样硬化的形成和发展, 增加肝脏纤维蛋白原的释放, 促进血小板凝聚, 增加冠心病患者的风险^[5,6,23], 而阻断 IL-6 能够预防冠心病^[24]。本研究表明, U II 能够刺激 AF 表达 IL-6, 提示 IL-6 上调所致的血管壁炎性激活可

能是 U II 促进动脉粥样硬化发展的重要机制之一。

一系列研究表明, AF 作为生长因子、血管活性肽等多种血管活性物质以及旁、自分泌因子的作用靶点,在动脉粥样硬化过程中发挥重要作用^[25,26]。我们课题组前期研究发现,血管外膜是 U II 作用的重要靶点之一, U II 能够促进大鼠主动脉 AF 增殖、表型转化、细胞迁移和胶原分泌^[9,10]。本研究发现, U II 还能够刺激血管外膜,通过表达促进炎症因子 IL-6 参与血管炎症、乃至动脉粥样硬化的发生发展。

总之, U II 能够诱导 AF 上 IL-6 表达上调;由于 IL-6 是一种重要的炎症因子,推测由此引起的血管壁炎性激活可能是 U II 参与动脉粥样硬化的重要机制之一。通过有效抑制内源性 U II 的产生进而降低血清中 IL-6 的水平,有可能为减轻血管壁炎性的激活,减轻动脉粥样硬化的发生和发展提供新的途径。

[参考文献]

[1] Libby P. Inflammation in atherosclerosis [J]. *Nature*, 2002, 420 (6917): 868-874.

[2] 陈智龙, 田青, 赵俊, 等. 高尿酸水平对高血压患者炎症反应和内皮素-1 水平的影响 [J]. *中国医师杂志*, 2013, 15(1): 36-38.

[3] Rosenfeld ME. Inflammation and atherosclerosis: direct versus indirect mechanisms [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2013, 13(2): 154-160.

[4] 杨丽萍, 张国华. 脑梗死患者颈动脉粥样硬化斑块与血清 YKL40, ox-LDL 水平的相关性 [J]. *中国医师杂志*, 2013, 15(4): 449-452.

[5] Sun H, Lu X, Wu S, et al. The effects of C-reactive protein, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in rat allograft adventitial inflammation and allograft arteriosclerosis [J]. *Transplant Proc*, 2009, 41(9): 3 909-912.

[6] Chen SL, Liu Y, Lin L, et al. Interleukin-6, but not C-reactive protein, predicts the occurrence of cardiovascular events after drug-eluting stent for unstable angina [J]. *J Interv Cardiol*, 2014, 27(2): 142-154.

[7] Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, et al. Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14 [J]. *Nature*, 1999, 401(6750): 282-286.

[8] Johns DG, Ao Z, Naselsky D, et al. Urotensin-II-mediated cardiomyocyte hypertrophy: effect of receptor antagonism and role of inflammatory mediators [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2004, 370(4): 238-250.

[9] Zhang YG, Li YG, Wei RH, et al. Urotensin II is an autocrine/paracrine growth factor for aortic adventitia of rat [J]. *Regul Pept*, 2008, 151(1-3): 88-94.

[10] Zhang YG, Li J, Li YG, et al. Urotensin II induces phenotypic differentiation, migration, and collagen synthesis of adventitial fibroblasts from rat aorta [J]. *J Hypertens*, 2008, 26(6): 1 119-126.

[11] Shiraiishi Y, Watanabe T, Suguro T, et al. Chronic urotensin II in-

fusion enhances macrophage foam cell formation and atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice [J]. *J Hypertens*, 2008, 26(10): 1 955-965.

[12] 曲萌, 王丹, 李蕴潜, 等. 尾加压素 II 诱导肾成纤维细胞转分化的作用及机制 [J]. *中国老年学杂志*, 2011, 31(4): 590-592.

[13] 张勇刚, 魏睿宏, 张辉, 等. 尾加压素 II 促进大鼠主动脉合成和分泌内皮素 1 的机制研究 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, 15(3): 165-168.

[14] Watson AM, Olukman M, Koulis C, et al. Urotensin II receptor antagonism confers vasoprotective effects in diabetes associated atherosclerosis: studies in humans and in a mouse model of diabetes [J]. *Diabetologia*, 2013, 56(5): 1 155-165.

[15] 张勇刚, 张旭升, 魏睿宏, 等. 大鼠钙化血管尾加压素 II 及其受体上调 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18(7): 505-509.

[16] You Z, Genest J Jr, Barrette PO, et al. Genetic and pharmacological manipulation of urotensin II ameliorate the metabolic and atherosclerosis sequelae in mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(8): 1 809-816.

[17] 赵娟, 谢利德, 王红伟, 等. Urotensin II 对实验性动脉粥样硬化大鼠白细胞介素-6 表达的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33(8): 1 823-824.

[18] Park SL, Lee BK, Kim YA, et al. Inhibitory effect of an urotensin II receptor antagonist on proinflammatory activation induced by urotensin II in human vascular endothelial cells [J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2013, 21(4): 277-283.

[19] Zhao J, Ding W, Song N, et al. Urotensin II-induced collagen synthesis in cultured smooth muscle cells from rat aortic media and a possible involvement of transforming growth factor- β 1/Smad2/3 signaling pathway [J]. *Regul Pept*, 2013, 182: 53-58.

[20] Tran L, Kompa AR, Kemp W, et al. Chronic urotensin-II infusion induces diastolic dysfunction and enhances collagen production in rats [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 298(2): H608-H613.

[21] Zhang YG, Kuang ZJ, Mao YY, et al. Osteopontin is involved in urotensin II-induced migration of rat aortic adventitial fibroblasts [J]. *Peptides*, 2011, 32(12): 2 452-458.

[22] Lee CY, Tsai YT, Loh SH, et al. Urotensin II induces interleukin 8 expression in human umbilical vein endothelial cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e90 278.

[23] Brasier AR. The nuclear factor-kappa B-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation [J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 86(2): 211-218.

[24] Hingorani AD, Casas JP. The interleukin-6 receptor as a target for prevention of coronary heart disease: a Mendelian randomisation analysis [J]. *Lancet*, 2012, 379(9822): 1 214-224.

[25] Kazmierski R, Watala C, Podsiadly E, et al. Association of atherosclerotic risk factors with carotid adventitial thickness assessed by ultrasonography [J]. *J Clin Ultrasound*, 2009, 37(6): 333-341.

[26] Campbell KA, Lipinski MJ, Doran AC, et al. Lymphocytes and the adventitial immune response in atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2012, 110(6): 889-900.

(此文编辑 曾学清)