

脱氢表雄酮抑制血管平滑肌细胞增殖的体外研究

张曼莉¹, 佟飞¹, 张曼娜², 陈慧¹, 王霞¹, 赵昆¹, 温进坤³

(河北医科大学第二医院 1. 急诊科, 2. 检验科, 河北省石家庄市 050000; 3. 河北医科大学神经与血管生物学教育部重点实验室, 河北省石家庄市 050017)

[关键词] 脱氢表雄酮; 血管紧张素 II; Krüppel 样因子 5; 血管平滑肌细胞; 细胞增殖

[摘要] **目的** 研究脱氢表雄酮(DHEA)在血管紧张素 II(Ang II)诱导的血管平滑肌细胞(VSMC)增殖过程中的作用及机制。**方法** Ang II 处理体外培养的 VSMC, 再用 DHEA 处理 VSMC, MTS、细胞计数检测 DHEA 对 Ang II 诱导的 VSMC 增殖的影响。定量实时聚合酶链反应(qRT-PCR)、Western blot 检测 DHEA 对 Ang II 诱导的 VSMC 中增殖细胞核抗原(PCNA)、Krüppel 样因子 5(KLF5)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)表达的影响。酶联免疫吸附法(ELISA)检测 DHEA 对 Ang II 诱导的 VSMC 的培养基中过氧亚硝基阴离子(ONOO⁻)浓度的影响。用小干扰 RNA(siRNA)内源性敲低 iNOS, Western blot 检测 VSMC 中 PCNA 的表达。**结果** MTS 和细胞计数结果显示, DHEA 能显著抑制 Ang II 诱导的 VSMC 增殖($P < 0.05$)。qRT-PCR 和 Western blot 结果显示, 在 mRNA 和蛋白质水平, DHEA 显著抑制 Ang II 诱导的 VSMC 中 PCNA、KLF5 和 iNOS 表达($P < 0.05$)。ELISA 结果显示, DHEA 显著减少 Ang II 处理的 VSMC 培养基中 ONOO⁻ 的浓度($P < 0.05$)。内源性敲低 iNOS 后, Western blot 结果显示, DHEA 对 Ang II 诱导的 PCNA 蛋白表达无影响($P > 0.05$)。**结论** DHEA 可能通过抑制 iNOS 产生的 ONOO⁻, 使 KLF5 的表达下调, 进而发挥抑制 Ang II 诱导的 VSMC 增殖的作用。

[中图分类号] R543

[文献标识码] A

Inhibitory effect of dehydroepiandrosterone on proliferation of vascular smooth muscle cells in vitro

ZHANG Manli¹, TONG Fei¹, ZHANG Manna², CHEN Hui¹, WANG Xia¹, ZHAO Kun¹, WEN Jinkun³

(1. Department of Emergency, 2. Clinical Laboratory, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050000, China; 3. Key Laboratory of Neurology and Vascular Biology of Ministry of Education, Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050017, China)

[KEY WORDS] dehydroepiandrosterone; angiotensin II; Krüppel-like factor 5; vascular smooth muscle cell; cell proliferation

[ABSTRACT] **Aim** To study the role and mechanism of dehydroepiandrosterone (DHEA) in the proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) induced by angiotensin II (Ang II). **Methods** VSMCs were cultured with Ang II in vitro, then treated with DHEA. The effect of DHEA on the proliferation of VSMCs induced by Ang II was detected by MTS and cell counting. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blot were used to detect the effects of DHEA on the expressions of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Krüppel-like factor 5 (KLF5) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in Ang II-induced VSMCs. The effect of DHEA on the concentration of peroxynitrite anion (ONOO⁻) in the medium of Ang II-induced VSMCs was examined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Endogenous iNOS was knocked down by transfecting VSMCs with iNOS-specific siRNA (si-iNOS) or nonspecific siRNA (si-Ctrl), and then treated the cells with or without DHEA; Western blot was performed to examine the expression of PCNA. **Results** The results of MTS and cell counting showed that DHEA could significantly inhibit the proliferation of VSMCs induced by Ang II ($P < 0.05$). The results of qRT-PCR and Western blot showed that DHEA significantly inhibited the expressions of PCNA, KLF5 and iNOS in VSMCs induced by Ang II at the level of protein and mR-

[收稿日期] 2018-11-13

[修回日期] 2019-02-01

[基金项目] 河北省医学科学研究重点课题(20180314)

[作者简介] 张曼莉, 博士, 主治医师, 研究方向为心血管分子生物学, E-mail 为 185006036@qq.com。通信作者佟飞, 博士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为危重症心血管分子生物学, E-mail 为 tongfei168@163.com。

NA ($P < 0.05$). ELISA results showed that DHEA could reduce the concentration of ONOO^- in culture medium of VSMCs treated with Ang II ($P < 0.05$). Western blot results suggested that DHEA had no effect on Ang II-induced PCNA protein expression after knocked down endogenous iNOS ($P > 0.05$). **Conclusion** DHEA may inhibit the proliferation of VSMCs induced by Ang II probably through down-regulation of KLF5 expression by inhibiting ONOO^- produced by iNOS.

血管重塑 (vascular remodeling) 是许多血管疾病的共同病理基础,是血管壁结构发生改变,包括细胞增殖、迁移及细胞外基质合成降解所致的动态性变化的综合过程,与炎症、细胞增殖、氧化应激和凋亡等关系密切。尽管有不少研究发现,血管重塑参与动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的发生发展过程,但至今为止,As 的机制尚不完全清楚。血管损伤后,血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 的生物学行为发生一系列改变,包括表型转换、增殖和迁移等,这些变化对 As 至关重要。研究发现,As 疾病的发病率具有明显的性别差异,男性性别是一个独立危险因素^[1]。脱氢表雄酮 (dehydroepiandrosterone, DHEA) 是肾上腺皮质分泌的一种类固醇激素,自身不具有雄激素的活性,可在外周组织中转化为雄激素或雌激素而发挥间接生物学效应。DHEA 的生物学效应不仅局限于作为甾体激素前体,其在免疫、代谢、心血管及血脂等方面也有独特的作用,特别是其对心血管系统的作用越来越引起人们的关注。目前笔者所见较少有关 DHEA 对 VSMC 增殖的作用及机制的报道。本研究通过观察 DHEA 对体外培养的小鼠主动脉 VSMC 增殖的影响,探讨其在 As 等血管重塑性疾病中发挥可能的机制。

1 材料和方法

1.1 细胞培养、试剂和仪器

(1) 细胞培养:小鼠主动脉平滑肌细胞株购自 ATCC (American Type Culture Collection),用含 10% 胎牛血清、 10^5 U/L 青霉素和 10^5 pg/L 链霉素的 DMEM 高糖培养基培养,放置于 37°C 、含 5% CO_2 的细胞培养箱。待细胞生长至 70% ~ 80% 密度时,进行传代。

(2) 试剂:DHEA (Sigma 公司);血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) (Sigma 公司);鼠抗增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 单克隆抗体 (Abcam 公司);兔抗 Krüppel 样因子 5 (Krüppel-like factor 5, KLF5) 多克隆抗体 (GeneTex 公司);兔抗诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 多克隆抗体 (Abcam 公司);鼠

抗 β -actin 多克隆抗体 (Santa Cruz 公司);高效蛋白裂解液;蛋白标记 Marker;化学发光二抗;总 RNA 提取试剂盒;QIAGEN OneStep RT-PCR Kit;PowerUp™ SYBR® Green Master Mix;CellTiter 96 AQueous MTS 溶液 (Promega 公司);lipofectamine 2000 细胞转染试剂 (Invitrogen 公司)。

(3) 仪器:核酸定量仪 (德国 Eppendorf 公司);PCR 扩增仪 (德国 Eppendorf 公司);实时荧光定量 PCR 仪 ABI 7500 Fast (美国 ABI 公司);电泳仪 (Bio-rad 公司);ECL 化学发光仪 (Vilber Lourmat 公司)。

1.2 细胞分组和处理

细胞分为对照组、模型组 (100 nmol/L Ang II)、DHEA 组 (100 nmol/L Ang II + 100 nmol/L DHEA)。体外培养的 VSMC,用 100 nmol/L Ang II 和 100 nmol/L DHEA 处理 24 h,对照组不给予 Ang II 和 DHEA 处理,收集细胞用于以下实验。转染的细胞分为 4 组:si-Ctrl + Ang II 组、si-Ctrl + Ang II + DHEA 组、si-iNOS + Ang II 组、si-iNOS + Ang II + DHEA 组。将细胞分别用 si-Ctrl 或 si-iNOS 转染 24 h 后再按照分组给予 Ang II 和/或 DHEA 处理 24 h。收集细胞用于以下实验。转染使用 Lipofectamine 2000 对细胞转染,具体步骤参照该 Lipofectamine 2000 细胞转染试剂说明书。

1.3 MTS 测定细胞增殖

将 2×10^4 个 VSMC 接种于 96 孔板上,待细胞充分贴壁展开后,撤血清,按照实验设计给予细胞刺激,刺激一定时间后,将培养基更换为含有 100 μL 无血清 DMEM 和 10 μL 的 CellTiter 96 AQueous MTS 溶液,放回培养箱 37°C 培养。4 h 后,轻轻震动孔板,用排枪从每个孔中取 60 μL 的培养基转移到一个新的 96 孔板,用多功能酶标仪测定各个孔在 490 nm 处的吸光度 (absorbance, A) 值。以没加 CellTiter 96 AQueous MTS 溶液的孔作为对照。每个处理样品做 3 个复孔。实验重复 6 次。

1.4 细胞计数

使用 Countess 细胞自动计数仪进行细胞增殖计数。将 1×10^5 个 VSMC 接种于 6 孔板上,待细胞充分贴壁展开后,按照实验设计给予细胞刺激,刺激一定时间后,用胰酶消化细胞,收集细胞,加入 10%

的台盼蓝,混匀后取 10 μ L 加入计数板中,然后用 Countess 细胞计数仪自动计数,读板 3 次,每组做 3 个复孔。实验重复 6 次。

1.5 RNA 提取和定量实时 PCR

收集各组 VSMC,用 Trizol 法提取细胞总 RNA,核酸定量仪检测 RNA 的纯度和浓度。按照 Invitrogen 公司“用于 qRT-PCR 的 M-MLV 第一链合成系统”操作说明,取 1~3 μ g 总 RNA 建立 20 μ L 反转录体系合成 cDNA。用 Invitrogen 公司的“Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with ROX”试剂盒和 ABI7500 Fast Real-time PCR 扩增仪进行荧光扩增。定量实时聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 结果分析:以 GAPDH rRNA 为内参,采用 $\Delta\Delta Ct$ ($Ct_{目的} - Ct_{内参}$) 法进行相对定量分析,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 作为目的 RNA 的相对表达量,进行统计学分析。实验重复 3 次。引物序列见表 1。

表 1. GAPDH、PCNA、KLF5 和 iNOS 引物序列

Table 1. Primer sequences of GAPDH, PCNA, KLF5 and iNOS

引物	上游	下游
GAPDH	AAGGTGAAGGTCG-GAGTC	TCGATTTTGGAGG-GATCG
PCNA	AGGGTTGCTAGTT-GTCGCTG	CAAACATGCTGGCG-GAGTTG
KLF5	ACCAGACGGCAGTA-ATGGACAC	ATTGTAGCGGCAT-AGGACGGAG
iNOS	ACCTTGTTTCAGC-TACGCCTT	CATTCCCAAATGT-GCTTGTC

1.6 Western blot 分析

收集各组细胞,提取总蛋白,用改良的 Lowry 法进行蛋白定量。取等量蛋白样品加入装有 5 $\times$ SDS 上样缓冲液的 EP 管中吹打混匀,100 $^{\circ}$ C 沸水使蛋白质充分变性。取等量蛋白上样,进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,电泳完毕,取出凝胶进行半干转膜。转膜完毕,取出二氟化树脂膜,牛奶封闭,洗膜,然后放入用一抗稀释液稀释的一抗中 (β -actin, 1:1 000 稀释;PCNA, 1:5 000 稀释;KLF5, 1:500 稀释;iNOS, 1:1 000 稀释),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日,洗膜,将二氟化树脂膜置入稀释的化学发光二抗中,室温反应 2 h,洗膜,化学发光仪检测抗体特异结合条带。实验重复 3 次。

1.7 酶联免疫吸附测定

收集各组细胞培养基,按照过氧亚硝基阴离子

(peroxynitrite anion, ONOO $^{-}$) 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒说明书进行操作,在 450 nm 波长读取各孔的 A 值。应用 Logit-log 双对数标准曲线,以 6 个标准品 A 值的 Logit 值为纵坐标,以标准品浓度的 log 值为横坐标,绘制标准曲线图。根据待测样品的 A/A0 从坐标纸上查出样品的浓度值。Logit 值 = $\ln(A/A0)/(1 - A/A0)$ 。实验重复 3 次。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,计量资料均经正态性及方差齐性检验,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。统计资料采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 方法。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DHEA 抑制 Ang II 诱导的 VSMC 增殖

细胞增殖活力是反映 VSMC 增殖程度的重要指标。体外培养的 VSMC,Ang II 处理制造细胞增殖的模型组,Ang II +DHEA 处理为 DHEA 组。MTS 结果显示,模型组吸光度 A 值 (5.38 ± 0.19) 与对照组 (4.24 ± 0.17) 相比明显增高 ($P < 0.05$);DHEA 组 A 值 (4.31 ± 0.19) 与模型组 (5.38 ± 0.19) 相比明显降低 ($P < 0.05$;图 1)。细胞计数实验结果显示,与对照组 (1.00 ± 0.01) 相比,模型组 (2.42 ± 0.08) 细胞计数明显增多,约增加 2.5 倍 ($P < 0.05$);DHEA 组 (1.25 ± 0.09) 细胞计数明显减少 ($P < 0.05$;图 2)。随后从 mRNA 和蛋白质水平检测 DHEA 对增殖相关基因 PCNA 的影响。qRT-PCR 结果显示,与对照组 (1.00 ± 0.01) 相比,模型组 (2.83 ± 0.07) PCNA mRNA 表达水平明显上调,升高约 2.8 倍 ($P < 0.05$);与模型组 (2.83 ± 0.07) 相比,DHEA 组 (1.42 ± 0.08) PCNA mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$;图 3)。Western blot 结果显示,与对照组相比,模型组 PCNA 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$);与模型组相比,DHEA 组 PCNA 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$;图 4)。以上结果表明,Ang II 能显著促进 VSMC 增殖,DHEA 可显著抑制 Ang II 诱导的 VSMC 增殖。

2.2 DHEA 抑制 Ang II 诱导的 KLF5 表达

qRT-PCR 结果显示,与对照组 (1.00 ± 0.01) 相比,模型组 (2.72 ± 0.08) KLF5 mRNA 表达水平显著上调,至少升高约 2.7 倍 ($P < 0.05$);与模型组 (2.72 ± 0.08) 相比,DHEA 组 (1.29 ± 0.08) KLF5 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$;图 5)。Western blot 结果

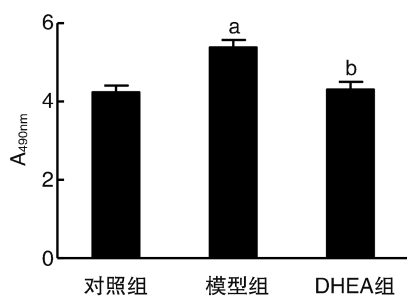


图 1. MTS 检测 DHEA 对 VSMC 增殖的影响 ($n=6$) a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与模型组比较。

Figure 1. Effect of DHEA on VSMCs proliferation was detected by MTS ($n=6$)

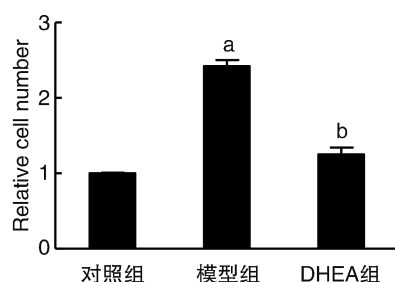


图 2. 细胞计数检测 DHEA 对 VSMC 增殖的影响 ($n=6$)

a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与模型组比较。

Figure 2. Effect of DHEA on VSMCs proliferation was detected by cell counting ($n=6$)

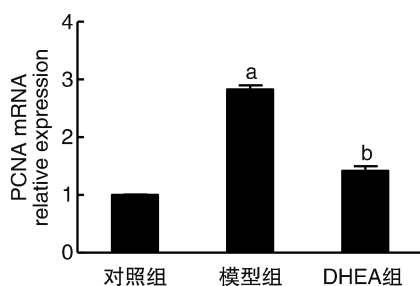


图 3. DHEA 对 VSMC 中 PCNA mRNA 表达水平的影响 ($n=3$) a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与模型组比较。

Figure 3. Effect of DHEA on PCNA mRNA expression in VSMCs ($n=3$)

显示,与对照组相比,模型组 KLF5 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$);与模型组相比,DHEA 组 KLF5 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$;图 6)。以上结果表明 DHEA 显著抑制 Ang II 诱导的 KLF5 表达。

2.3 DHEA 抑制 Ang II 诱导的 iNOS 表达

qRT-PCR 结果显示,与对照组 (1.00 ± 0.01) 相比,模型组 (3.28 ± 0.10) iNOS mRNA 表达水平显著上调,至少升高 3 倍 ($P<0.05$);与模型组 ($3.28 \pm$

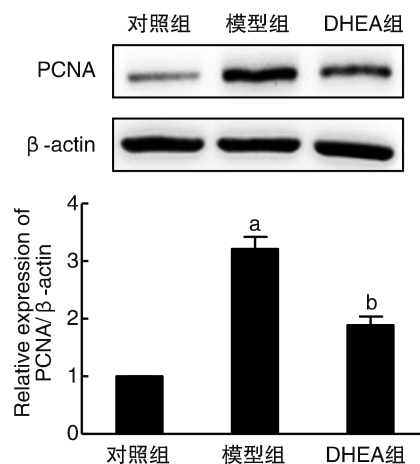


图 4. DHEA 对 VSMC 中 PCNA 蛋白表达水平的影响 ($n=3$) a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与模型组比较。

Figure 4. Effect of DHEA on PCNA protein expression in VSMCs ($n=3$)

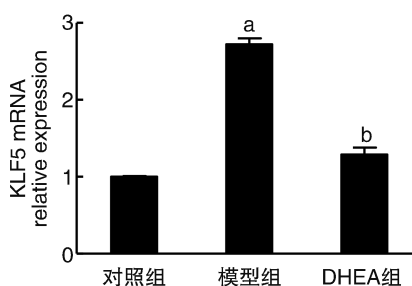


图 5. DHEA 对 VSMC 中 KLF5 mRNA 表达水平的影响 ($n=3$) a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与模型组比较。

Figure 5. Effect of DHEA on KLF5 mRNA expression in VSMCs ($n=3$)

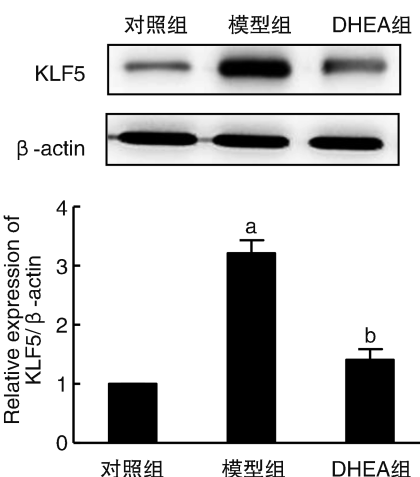


图 6. DHEA 对 VSMC 中 KLF5 蛋白表达水平的影响 ($n=3$) a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与模型组比较。

Figure 6. Effect of DHEA on KLF5 protein expression in VSMCs ($n=3$)

0.10)相比,DHEA组(1.43 ± 0.09) iNOS mRNA 表达水平显著降低($P < 0.05$;图7)。Western blot 结果显示,与对照组相比,模型组 iNOS 蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$);与模型组相比,DHEA组 iNOS 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$;图8)。综合以上结果,DHEA 显著抑制 Ang II 诱导的 iNOS 表达。

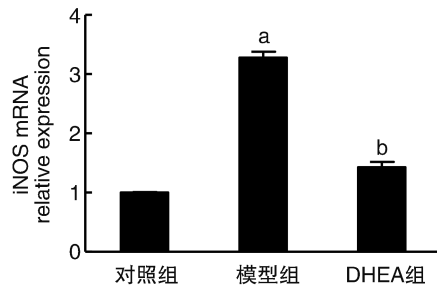


图7. DHEA对VSMC中iNOS mRNA表达水平的影响($n=3$) a为 $P < 0.05$,与对照组比较;b为 $P < 0.05$,与模型组比较。

Figure 7. Effect of DHEA on iNOS mRNA expression in VSMCs ($n=3$)

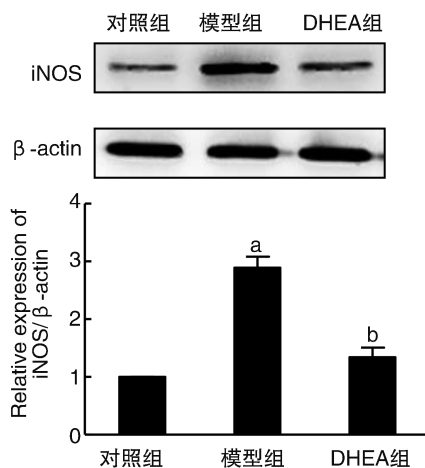


图8. DHEA对VSMC中iNOS蛋白表达水平的影响($n=3$) a为 $P < 0.05$,与对照组比较;b为 $P < 0.05$,与模型组比较。

Figure 8. Effect of DHEA on iNOS protein expression in VSMCs ($n=3$)

2.4 DHEA抑制Ang II诱导的ONOO⁻生成

用ELISA检测培养基中ONOO⁻的浓度。结果显示,与对照组(14.65 ± 2.51)相比,模型组(47.32 ± 3.14) ONOO⁻的浓度明显升高($P < 0.05$);与模型组(47.32 ± 3.14)相比,DHEA组(19.43 ± 2.91) ONOO⁻的浓度显著降低($P < 0.05$;图9)。结果表明,DHEA显著抑制Ang II诱导的ONOO⁻生成。

2.5 DHEA通过iNOS抑制Ang II诱导的VSMC增殖

为了研究DHEA抑制Ang II诱导的VSMC增殖

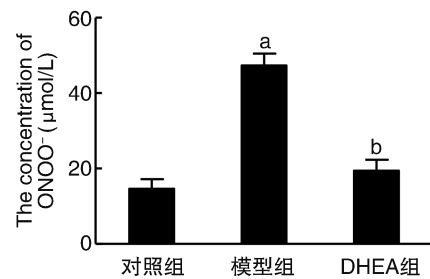


图9. DHEA对VSMC培养基中ONOO⁻浓度的影响($n=3$)

a为 $P < 0.05$,与对照组比较;b为 $P < 0.05$,与模型组比较。

Figure 9. Effect of DHEA on ONOO⁻ concentration in the medium of VSMCs ($n=3$)

是否通过iNOS,我们应用靶向iNOS的si-RNA (si-iNOS)内源性敲低iNOS表达后,再用Ang II、DHEA处理VSMC。Western blot结果显示,si-Ctrl+Ang II+DHEA组与si-Ctrl+Ang II组相比,iNOS和PCNA蛋白表达明显降低($P < 0.05$)。si-iNOS+Ang II组与si-Ctrl+Ang II组相比,iNOS和PCNA蛋白表达明显降低($P < 0.05$)。而si-iNOS+Ang II+DHEA组与si-Ctrl+Ang II+DHEA组相比,iNOS和PCNA蛋白表达无明显变化($P > 0.05$)。说明敲低iNOS后,DHEA抑制Ang II诱导的VSMC增殖作用消失,iNOS介导了DHEA抑制Ang II诱导的VSMC增殖(图10)。

3 讨论

血管重塑是As、高血压等血管疾病的病理学基础。虽然人们对As发生发展的机制进行了多年研究,但是其发病机制尚不完全清楚。研究表明,VSMC的增殖、迁移、异常表型转换是As和血管成形术后再狭窄等血管疾病的标志^[2-3]。肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 表达或活性异常与血管重塑密切相关。Ang II是RAS中的重要因子,可通过激活VSMC中促增殖和促炎症基因的表达,促进高血压和As。Lee等^[4]研究发现Ang II通过APE/Ref-1介导的S1PR1的过表达来增加VSMC增殖和迁移,进而促进As新生内膜生成。本研究以体外培养的小鼠主动脉VSMC为研究对象,Ang II为促增殖因素,应用了体外VSMC增殖的模型,为接下来的实验提供了基础。

Krüppel样因子家族是一类锌指型转录因子,参与胚胎发育、细胞增殖、分化、凋亡、转移和应激反应等过程。研究发现,在As过程中,KLF5发挥重要作用。Zheng等^[5]研究发现,KLF5、miR-29a和

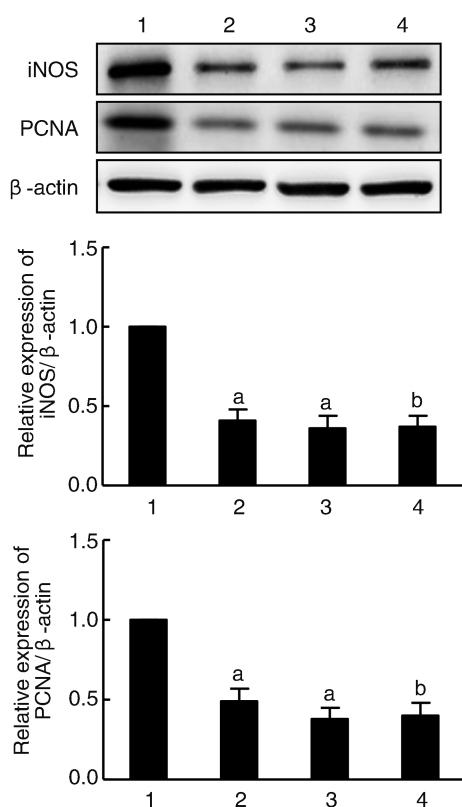


图 10. 各组 VSMC 中 iNOS、PCNA 蛋白表达水平 ($n=3$)

1 为 si-Ctrl+Ang II 组; 2 为 si-Ctrl+Ang II + DHEA 组; 3 为 si-iNOS+Ang II 组; 4 为 si-iNOS+Ang II + DHEA 组。a 为 $P<0.05$, 与 si-Ctrl+Ang II 组比较; b 为 $P<0.05$, 与 si-Ctrl+Ang II + DHEA 组比较。

Figure 10. Protein expressions of iNOS and PCNA in VSMCs of each group ($n=3$)

Fbw7/CDC4 三者的交互调节促进了 As 的发展。Zhang 等^[6]在 As 的临床标本和体外培养的 VSMC 中发现, As 发生过程中, miR-145 通过 KLF5 和 Myocardin 基因调控 VSMC 的表型转换。诸多研究表明, KLF5 参与许多和细胞增殖相关的信号通路。He 等^[7]研究发现, Ang II 既可诱导 KLF5 表达, 又可通过激活 ERK1/2 信号途径促进 KLF5 磷酸化, 磷酸化型 KLF5 与 c-Jun 结合, 阻抑细胞周期负调控基因 p21 表达, 进而发挥促增殖作用。Liu 等^[8]研究证明了 Ang II 通过 ERK 和 p38MAPK 通路诱导 KLF5 激活, Ang II 可以增强 KLF5 和 c-Jun 的相互作用, 进而增强细胞周期蛋白 D1 的表达, 从而发挥促增殖的作用。本实验中, Ang II 促进 VSMC 中 KLF5 的表达, 与先前的结果一致。

动脉粥样硬化时, 炎症等多种因素可激活 iNOS 表达, 产生过量的一氧化氮 (nitric oxide, NO), NO 与超氧阴离子形成 ONOO⁻。过量产生的 ONOO⁻可导致血管内皮细胞、VSMC 等结构破坏和功能丧失,

导致血管病变发生。多项研究发现, iNOS 能调控某些基因表达, 促进 As 斑块的发展。Sagar 等^[9]证明了, 2-氯乙基硫化物诱导巨噬细胞中超氧阴离子产生增加, 上调 iNOS 的表达, 增加 NO 产生和 ONOO⁻积累, 促进炎症基因表达。笔者前期研究发现, 在体外培养的 VSMC 中, iNOS 产生的 ONOO⁻上调 KLF5 的表达和硝基化, 介导了高糖诱导的炎症基因表达^[10]。本研究显示, Ang II 上调 iNOS 的表达, 同时 ONOO⁻的生成明显增多。结合 Ang II 上调 KLF5 的表达, 因此推测在 Ang II 作用下, iNOS 产生的 ONOO⁻上调 KLF5 的表达。

脱氢表雄酮是肾上腺皮质分泌的人体血浆中浓度最高的类固醇激素, 主要以脱氢表雄酮硫酸酯 (DHEA-S) 的形式进入血液循环中, 在外周组织中转化为雄激素或雌激素发挥间接生物学效应。血液循环中 DHEA-S 的浓度有明显的性别差异, 男性明显高于女性, 并且随着年龄增长开始下降。近年来, DHEA 在心血管系统的作用越来越引人注目, 尽管已有体内和体外实验证明 DHEA 的抗 As 作用, 但是具体作用机制仍不完全清楚^[11]。Yamakawa 等^[12]研究发现, 给予载脂蛋白 E 敲除小鼠 As 模型 DHEA 后, DHEA 治疗组主动脉 As 病变面积减少 45%, 并且抑制巨噬细胞浸润, 从而发挥抑制 As 的作用。Urata 等^[13]在 DHEA 抑制血小板源性生长因子诱导的 VSMC 表型转换分子机制的研究中证明了 DHEA 抑制 VSMC 增殖的作用。本研究以体外培养的 VSMC 为研究对象, Ang II 为促增殖因素, 研究了 DHEA 对细胞增殖的影响及可能机制。结果表明, DHEA 能显著抑制 Ang II 诱导的 VSMC 增殖。此外, DHEA 能明显抑制 iNOS、ONOO⁻以及有促增殖作用的 KLF5 生成和表达。为了证明 DHEA 抑制 Ang II 诱导的 VSMC 增殖是否通过 iNOS, 我们用靶向 iNOS 的 si-RNA (si-iNOS) 内源性敲低 iNOS 表达后, 再用 Ang II 和/或 DHEA 处理 VSMC。结果显示, 将 iNOS 敲低后, DHEA 抑制 Ang II 诱导的 VSMC 增殖作用消失, 说明 iNOS 介导了 DHEA 抑制 Ang II 诱导的 VSMC 增殖。因此推测 DHEA 发挥抑制 VSMC 增殖的作用可能是通过抑制 iNOS 产生的 ONOO⁻, 使 KLF5 的表达下调, 进而发挥抑制 VSMC 增殖的作用。

综上所述, VSMC 增殖在血管重塑性疾病, 尤其是 As 的发生发展过程中发挥重要作用。DHEA 可以抑制体外培养的 VSMC 增殖。其机制很有可能是通过抑制 iNOS 产生的 ONOO⁻, 使 KLF5 的表达下调, 进而发挥抑制 VSMC 增殖的作用。目前, DHEA

已应用于临床,给予 DHEA 水平低下的冠心病患者适当补充 DHEA 是有临床获益的。但是 DHEA 补充过量或补充时机选择不当也会带来一系列不良后果。因此,尚需进一步研究 DHEA 的作用机制,为 DHEA 的合理使用提供理论依据,也为冠心病的预防和治疗提供新的思路和方法。

[参考文献]

- [1] Song P, Xia W, Zhu Y, et al. Prevalence of carotid atherosclerosis and carotid plaque in Chinese adults: A systematic review and meta-regression analysis[J]. *Atherosclerosis*, 2018, 276: 67-73.
- [2] 舒刘芳. 血管平滑肌细胞表型转换对动脉粥样硬化的作用研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26(1): 99-102.
- [3] 温进坤. 不要低估血管平滑肌细胞在动脉粥样硬化斑块形成中的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26(7): 649-654.
- [4] Lee DY, Won KJ, Lee KP, et al. Angiotensin II facilitates neointimal formation by increasing vascular smooth muscle cell migration: Involvement of APE/Ref-1-mediated overexpression of sphingosine-1-phosphate receptor 1[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2018, 347: 45-53.
- [5] Zheng B, Zheng CY, Zhang Y, et al. Regulatory crosstalk between KLF5, miR-29a and Fbw7/CDC4 cooperatively promotes atherosclerotic development[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2018, 1864(2): 374-386.
- [6] Zhang YN, Xie BD, Sun L, et al. Phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in the 'normal region' of aorta from atherosclerosis patients is regulated by miR-145[J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(6): 1049-1061.
- [7] He M, Han M, Zheng B, et al. Angiotensin II stimulates KLF5 phosphorylation and its interaction with c-Jun leading to suppression of p21 expression in vascular smooth muscle cells[J]. *J Bio Chem*, 2009, 146(5): 683-691.
- [8] Liu Y, Wen JK, Dong LH, et al. Krüppel-like factor (KLF) 5 mediates cyclin D1 expression and cell proliferation via interaction with c-Jun in Ang II-induced VSMCs[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31(1): 10-18.
- [9] Sagar S, Parida SR, Sabnam S, et al. Increasing NO level regulates apoptosis and inflammation in macrophages after 2-chloroethyl ethyl sulphide challenge[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2017, 83: 1-14.
- [10] Zhang ML, Zheng B, Tong F, et al. iNOS-derived peroxynitrite mediates high glucose-induced inflammatory gene expression in vascular smooth muscle cells through promoting KLF5 expression and nitration[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2017, 1863(11): 2821-2834.
- [11] 覃旺军, 李朋梅, 崔刚, 等. 脱氢表雄酮与老年性疾病关系的研究进展[J]. *临床药物治疗杂志*, 2015, 13(2): 5-8.
- [12] Yamakawa T, Ogihara K, Nakamura M, et al. Effect of dehydroepiandrosterone on atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2009, 16(4): 501-508.
- [13] Urata Y, Goto S, Kawakatsu M, et al. DHEA attenuates PDGF-induced phenotypic proliferation of vascular smooth muscle A7r5 cells through redox regulation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 396(2): 489-494.

(此文编辑 曾学清)