

本文引用: 林宁, 刘树迎, 蔡晓东, 等. 小檗碱抑制机械牵张力诱导的小鼠血管平滑肌细胞 PKC $\delta$  磷酸化及增殖/迁移[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(3): 211-218.

[文章编号] 1007-3949(2022)30-03-0211-08

· 实验研究 ·

## 小檗碱抑制机械牵张力诱导的小鼠血管平滑肌细胞 PKC $\delta$ 磷酸化及增殖/迁移

林宁, 刘树迎, 蔡晓东, 芮睿, 杨浩澜, 李朝红

(中山大学中山医学院组织学与胚胎学教研室, 广东省广州市 510089)

[关键词] 小檗碱; 机械牵张力; 血管平滑肌细胞; PKC $\delta$ ; 细胞增殖; 细胞迁移

[摘要] 目的 观察机械牵张力(SS)是否通过激活 PKC $\delta$  诱导小鼠血管平滑肌细胞(VSMC)增殖和迁移, 并进一步探究小檗碱(BBR)对其的影响及作用机制。方法 体外常规培养小鼠 VSMC 分为 6 组: 阴性对照组(NC)、小檗碱组(BBR)、PKC $\delta$  抑制剂 Sotrasaurin 组(Sotras)、SS 组、SS+BBR 组和 SS+Sotras 组。静息培养的 VSMC 分别用 BBR 或 Sotrasaurin 或 ddH<sub>2</sub>O 预处理 1 h, 继而机械牵张力(10% 牵张强度)牵拉不同时间或不牵拉作为对照。收集各组 VSMC, Western blot 检测 PKC $\delta$  磷酸化水平; 免疫荧光法检测 VSMC 增殖; 细胞划痕实验检测 VSMC 迁移。结果 免疫荧光和细胞划痕实验结果显示, 与阴性对照组相比, 机械牵张力刺激显著提高 VSMC 中 Ki67 阳性水平约 469% ( $P<0.05, n=3$ ), 划痕宽度缩小约 54.9% ( $P<0.05, n=3$ ), 而 BBR 和 Sotrasaurin 能明显抑制机械牵张力引起的上述变化, 与 SS 组相比, Ki67 阳性水平分别下降约 66.9% 和 80.2% ( $P<0.05, n=3$ ), 划痕宽度增加约 79.4% 和 120.1% ( $P<0.05, n=3$ ); Western blot 结果显示, 与阴性对照组相比, 机械牵张力刺激可诱导 PKC $\delta$  磷酸化水平呈时间依赖性升高, 以 30 min 最显著, 提升约 97.5% ( $P<0.05, n=3$ ); 而 BBR 可呈浓度依赖性抑制机械牵张力刺激诱导的 PKC $\delta$  磷酸化水平升高, 以 200  $\mu$ mol/L 效果最显著, 降低约 37.6% ( $P<0.05, n=3$ )。结论 BBR 可通过抑制 PKC $\delta$  磷酸化进而阻断机械牵张力诱导的 VSMC 增殖和迁移。

[中图分类号] R363; R5

[文献标识码] A

### Berberine inhibited the proliferation/migration of mouse vascular smooth muscle cells induced by mechanical stretch stress via inhibition of PKC $\delta$ phosphorylation

LIN Ning, LIU Shuying, CAI Xiaodong, RUI Rui, YANG Haolan, LI Chaohong

(Department of Histology and Embryology, Zhongshan Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510089, China)

[KEY WORDS] berberine; mechanical stretch stress; vascular smooth muscle cell; PKC $\delta$ ; cell proliferation; cell migration

[ABSTRACT] Aim To observe whether mechanical stretch stress (SS) induces the proliferation and migration of mouse vascular smooth muscle cells (VSMC) through PKC $\delta$  activation, and to further explore the effect and mechanism of berberine (BBR) on the proliferation and migration of VSMC. Methods Mouse VSMC in vitro were divided into six groups: negative control group (NC), berberine group (BBR), PKC $\delta$  inhibitor Sotrasaurin group (Sotras), SS group, SS+BBR group and SS+Sotras group. The cultured VSMC in each group, which were pretreated with BBR or Sotrasaurin or ddH<sub>2</sub>O for 1h, followed by SS (10% tensile strength) for different time or no treatment for control, were collected for the detection of PKC $\delta$  phosphorylation, proliferation and migration by Western blot, immunofluorescence and scratch assay respectively. Results Immunofluorescence and cell scratch test results showed that compared with NC group, SS stimulation significantly increased Ki67 positive level in VSMC by 469% ( $P<0.05, n=3$ ), and reduced scratch width by

[收稿日期] 2021-04-23

[修回日期] 2021-09-14

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81070124、81870219 和 81500337); 广东省自然科学基金项目(2017A030313574、2014A020212109); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(19ykpy171)

[作者简介] 林宁, 硕士研究生, 研究方向为心血管重构分子机制与防治, E-mail 为 780496331@qq.com。通信作者李朝红, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管重构分子机制与防治, E-mail 为 lichaoh@mail.sysu.edu.cn。

54.9% ( $P<0.05$ ,  $n=3$ ), while BBR and Sotрастaurin could significantly inhibit the changes caused by SS, Ki67 positive level decreased by 66.9% and 80.2% ( $P<0.05$ ,  $n=3$ ), and scratch width increased by 79.4% and 120.1% ( $P<0.05$ ,  $n=3$ ) compared with SS group, respectively. Meanwhile, Western blot results showed that SS stimulation induced a time-dependent increase in PKC $\delta$  phosphorylation compared with NC group, with the most significant increase of 97.5% ( $P<0.05$ ,  $n=3$ ) at 30 min, which also inhibited by berberine in a concentration-dependent manner, and the effect was the most significant at 200  $\mu$ mol/L, with a decrease of about 37.6% ( $P<0.05$ ,  $n=3$ ). **Conclusion** Berberine inhibits SS-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration by inhibiting PKC $\delta$  phosphorylation.

血管重塑(vascular remodeling, VR)是指血管壁因物理、化学、遗传或环境等改变而引起其结构和功能变化<sup>[1]</sup>。在血管中,血流对血管壁产生的机械力刺激主要包括水平管壁方向的剪切力和垂直于管壁的牵张力(stretch stress, SS),前者对内皮细胞起作用,而后者同时对管壁的内皮细胞、平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)和成纤维细胞均能产生作用。正常血流所产生的SS是维持管壁的结构功能及细胞表型所必须的,高血压产生的异常升高的SS对血管重塑发生起重要促进作用<sup>[2-4]</sup>。在高血压患者中,血管长期受到异常升高的机械力刺激,引起血管内膜损伤,中膜VSMC增殖并迁移入内膜,诱导血管重塑发生。此外,持续的高流速、高压力促使血管分泌相关细胞因子及活性物质,影响血管结构,使血管壁厚度与管腔直径之比增加,促进血管重塑发生<sup>[5-6]</sup>。我们实验室前期研究表明,SS可非特异性激活VSMC膜上多种跨膜受体蛋白,包括血管紧张素Ⅱ受体<sup>[7]</sup>、肾上腺素能受体<sup>[8]</sup>和钙离子通道<sup>[9]</sup>等,进而激活细胞内一系列信号通路,引起VSMC增殖和凋亡水平的同步提高,促进血管重塑发生。因此,如何有效防治由高血压SS刺激引起的VSMC结构与功能异常显得尤为重要。

蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)是由脂质衍生的第二信使激活的丝氨酸/苏氨酸激酶的家族蛋白,其中细分为三类:经典或传统PKC( $\alpha$ ,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\gamma$ )、新型PKC( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ )和非典型PKC( $\zeta$ ,  $\lambda$ )。所有亚型均由一条单肽链组成,结构分为四个保守区(C1~C4)和五个可变区(V1~V5),其中C1为膜结合区,C2为Ca<sup>2+</sup>敏感区,C1和C2统称为调节区,具有结合Ca<sup>2+</sup>、DAG以及磷脂的能力;C3区和C4区则分别为催化区和底物识别区<sup>[10]</sup>。研究表明<sup>[10-11]</sup>,SS可激活VSMC中的PKC $\delta$ 并促进其迁移。同时VSMC中PKC $\delta$ 的磷酸化激活介导了后续SM22 $\alpha$ 的磷酸化,影响VSMC的骨架重塑和氧化应激<sup>[12]</sup>,提示PKC $\delta$ 在VSMC中的重要调节作用,且抑制PKC $\delta$ 的磷酸化有望达到抑制VSMC的迁移与异常增殖的目的。

小檗碱(berberine, BBR)是一种传统的中草药,一直以来广泛用于治疗消化道感染性腹泻、清热解毒。近期研究表明,BBR有降血压<sup>[13-14]</sup>、降糖<sup>[15]</sup>、降脂<sup>[16-17]</sup>等作用,在心血管疾病治疗上有巨大潜力。本实验室近年来专注于研究BBR在治疗异常SS所引起的移植静脉动脉化及粥样硬化中的作用机制,近期研究发现<sup>[18-19]</sup>,SS可通过激活VSMC蛋白二硫键异构酶(protein disulfide isomerase, PDI)及其下游的内质网应激通路及MAPK通路诱导VSMC增殖和凋亡同时增加,而BBR可通过抑制该信号通路抑制SS诱导的VSMC增殖、凋亡与迁移<sup>[19-20]</sup>,提示BBR在抑制SS诱导的VSMC功能改变中的重要作用。

本实验旨在观察SS对VSMC中PKC $\delta$ 磷酸化水平的影响及BBR对此影响的作用,并以PKC $\delta$ 为靶点探究BBR抑制SS诱导的VSMC增殖、迁移的作用机制,阐明BBR在阻断高血压SS引起的血管病变中的作用与机制,为高血压防治机制的研究提供实验资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂

DEME培养基购自Gibco公司;胎牛血清购自TBD公司;胰酶购自Sigma公司;BBR购自成都曼思特公司;Sotрастaurin购自Selleck Chemicals公司;Ki67抗体、p-PKC $\delta$ 抗体、PKC $\delta$ 抗体均购自Cell Signal Technology公司。

### 1.2 细胞培养及分组

本实验所用细胞均来源于前期实验冻存的VSMC<sup>[18]</sup>,原代细胞培养方法简述为C57小鼠主动脉分离贴块培养VSMC,原代培养的VSMC经过传代培养至第3代后达到一定数量放入液氮冻存,后续从液氮中复苏VSMC用于实验。细胞培养于含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素的DMEM培养基并置于37℃、5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中。VSMC每隔1~2天更换一次培养基,并在细胞达到80%融

合时按 1:2 的比例传代。正式实验所用 VSMC 均为 3~10 代的细胞。

用于免疫荧光和划痕实验的常规培养 VSMC 分为 6 组, 分别为阴性对照组 (NC)、BBR 组 (BBR)、PKC $\delta$  抑制剂 Sotрастaurin 组 (Sotras)、SS 组 (SS)、SS + BBR 组 (SS + BBR) 和 SS + Sotрастaurin 组 (SS + Sotras)。静息的各组细胞分别在施加 BBR (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 或 Sotрастaurin (100 nmol/L) 或 ddH<sub>2</sub>O (NC) 预处理 1 h 后, 施加 SS (10% 牵张强度) 1 h, 而后继续培养 23 h, 非 SS 刺激组则在施加相同预处理后不加 SS 刺激作为对照。

用于 Western blot 实验的常规培养 VSMC, 检测 SS 时间梯度的各组细胞分别施加不同时间 SS 刺激 (5、10、20、30、60、120 min); 检测 BBR 浓度梯度的各组细胞分别以等体积 ddH<sub>2</sub>O、不同浓度的 BBR (10、100、200  $\mu\text{mol/L}$ ) 及 100 nmol/L PKC $\delta$  抑制剂 Sotрастaurin 预处理 1 h 后, 施加 SS 刺激 10 min, 非 SS 刺激组则在施加相同预处理后不加 SS 刺激作为对照。

### 1.3 细胞机械牵张处理

细胞牵张处理根据实验室前期实验方法改进<sup>[18]</sup>, 简述为小鼠 VSMC 种于硅胶弹性膜底的 6 孔牵拉板 (BioFlex, BF-3001U), 待细胞生长至 80% 融合时, 换用无血清培养基饥饿处理 24 h, 而后将牵拉板置于真空牵拉仪进行 SS 处理。根据实验室前期结果显示, 5% 牵张强度为正常血压强度, 10% 牵张强度为模拟高血压强度, 故牵拉时, 细胞置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 环境培养箱中, 牵拉仪施加 10% 牵张强度。检测 PKC $\delta$  磷酸化实验的牵拉时间为 5、10、20、30、60、120 min, 而细胞增殖及迁移实验的牵拉时间根据实验室前期增殖与迁移实验结果设定为 1 h。BBR 组则在施加 BBR 预处理 1 h 后再进行相应的机械力牵拉处理。

### 1.4 免疫荧光检测细胞增殖

免疫荧光根据前期实验方法改进<sup>[18]</sup>, 简述为细胞传代时, VSMC 以每孔  $2 \times 10^4$  个细胞接种于 6 孔牵拉板中, 待细胞融合达到 50% 时 (而非原方法的 80%, 以确保荧光信号不重叠), 更换无血清培养基饥饿处理 24 h。细胞分组见 1.2。各组细胞进行荧光染色与观察: 牵拉板中的各组细胞均用 4 °C 预冷的 PBS 缓冲液冲洗 2 遍后用 4% 多聚甲醛固定 20 min, 用含 0.5% Triton-X 的 PBS 室温破膜 10 min, 再用含 5% BSA 的 PBS 室温封闭 30 min, 而后用细胞增殖标记 Ki67 抗体 4 °C 孵育过夜, 后续用相应二抗 37 °C 孵育 2 h 并用 DAPI 标记细胞核。结果用徕

卡 DMI8 全自动倒置荧光显微镜进行观察拍照并记录 Ki67 阳性细胞数进行阳性率统计分析。

### 1.5 划痕实验检测细胞迁移

划痕实验根据前期实验方法改进<sup>[11]</sup>, 简述为细胞传代时, 将 VSMC 以每孔  $1 \times 10^6$  个细胞接种于 6 孔牵拉板中, 当细胞融合达到 80% 时, 更换为无血清培养基饥饿处理 24 h。各组细胞均用 20  $\mu\text{L}$  的无菌枪头在牵拉板底部硅胶弹性膜上做竖直单层划痕, 长度为 1~2 cm, 再用无菌 PBS 洗 2 遍, 洗去脱落的细胞, 而后各组施加对应药物预处理后, SS 各组施加 SS 处理 1 h 后再分别继续培养 11、23 及 47 h (而非原方法中的仅 24 h 一个时间点, 以更清楚显示迁移趋势, 并增加 48 h 时间点细胞核荧光染色显示细胞划痕边缘), 非 SS 组则直接培养 12、24 及 48 h 对照, 于各时间点用倒置相差显微镜进行划痕宽度的测量, 并在处理后 48 h 固定各组细胞进行 DAPI 荧光染色标记细胞核, 用徕卡 DMI8 全自动倒置荧光显微镜观察细胞边界, 统计各组划痕边界作为细胞迁移距离进行统计分析。

### 1.6 Western blot 检测 PKC $\delta$ 磷酸化水平

实验方法设计根据前期实验改进<sup>[19]</sup>, 简述为以每孔  $1 \times 10^6$  个细胞种于 6 孔牵拉板中, 当细胞融合达到 80% 时, 更换为无血清培养基饥饿处理 24 h。细胞分组见 1.2 (根据前期实验结果, 排除过长 SS 时间点和过高 BBR 浓度点, 以显示 BBR 的显效浓度)。各组细胞均用 4 °C 预冷的 PBS 洗涤 2 遍后在冰上用细胞刮收集细胞, 加入含蛋白酶抑制剂和磷酸化酶抑制剂的裂解液提取细胞蛋白, 后续取等量蛋白做 SDS-PAGE 凝胶电泳, 转至硝酸纤维素膜后用含 5% 脱脂奶粉的 TBS 溶液封闭, p-PKC $\delta$ 、PKC $\delta$ 、GAPDH 抗体 4 °C 孵育过夜, 相应二抗孵育后显影并计算灰度值进行统计分析。

### 1.7 统计分析

各组实验均进行 3 次独立重复实验 ( $n=3$ ), 实验数据使用 SPSS20 进行分析, 采用单因素方差分析进行多组间均数比较, 两两比较采用 LSD-t 检验,  $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 小檗碱抑制机械牵张力诱导的平滑肌细胞增殖

为了探究 PKC $\delta$  是否介导了 SS 诱导的 VSMC 增殖, 实验通过 BBR (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 和 Sotрастaurin (100 nmol/L) 预处理 1 h 后施加 SS 刺激, 免疫荧光

检测不同组间 VSMC 增殖标志物 Ki67 水平的改变。实验结果显示, BBR 组及 Sotras 组与阴性对照组相比, Ki67 阳性水平差异无统计学意义 ( $P>0.05, n=3$ ), 说明单独 BBR 或 Sotras 预处理不会引起 VSMC 增殖水平上升。而 SS 组与阴性对照组相比, Ki67 阳性水平上升约 469% ( $P<0.05, n=3$ ), 此外,

SS+BBR 组和 SS+Sotras 组 Ki67 阳性水平较 SS 组分别下降约 66.9% 和 80.2% ( $P<0.05, n=3$ ), 证明了通过抑制 PKC $\delta$  激活可以抑制 SS 诱导的 VSMC 增殖, 提示 PKC $\delta$  介导或至少部分介导了 SS 诱导的 VSMC 增殖, 且 BBR 具有与 Sotrasurin 相同的抑制 SS 诱导的 VSMC 增殖的作用(图 1)。

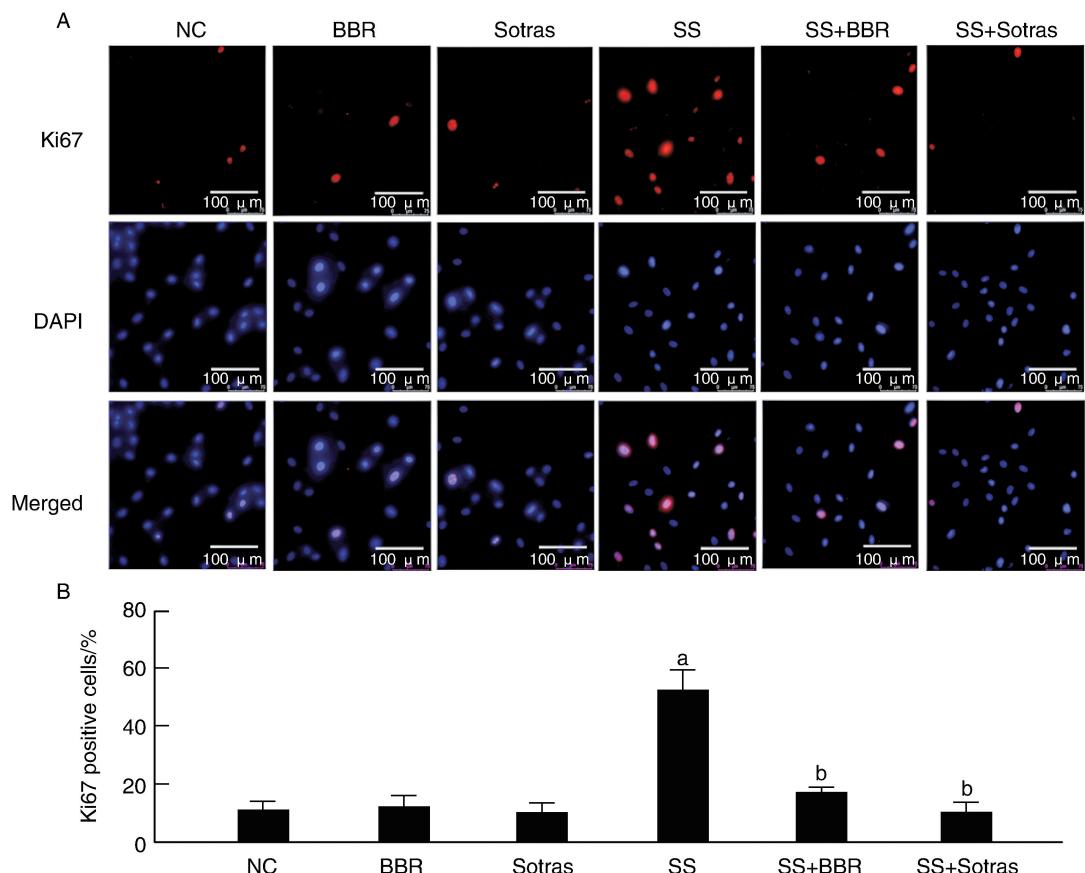


图 1. BBR 对 SS 诱导的 VSMC 增殖的影响 ( $n=3$ )

A 为免疫荧光检测 BBR 对 SS 诱导的 VSMC 增殖的影响; B 为 Ki67 阳性比例柱状统计图。

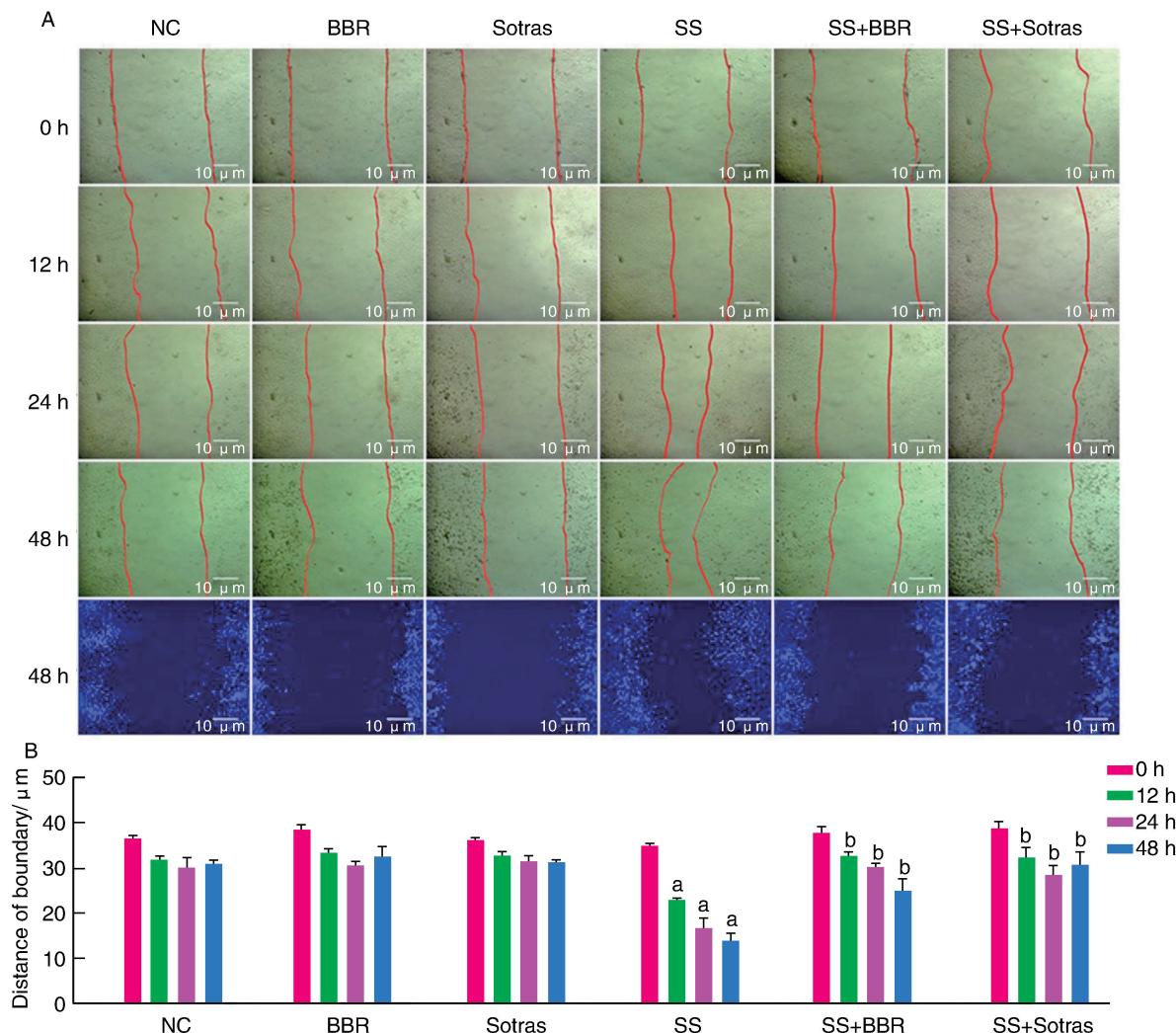
a 为  $P<0.05$ , 与阴性对照组相比; b 为  $P<0.05$ , 与 SS 组相比。

Figure 1. Effect of berberine on SS-induced VSMC proliferation ( $n=3$ )

## 2.2 小檗碱抑制机械牵张力诱导的平滑肌细胞迁移

由于前期实验已证明 SS 可同时诱导 VSMC 增殖和迁移, 故而进一步探究 PKC $\delta$  是否同时介导了 SS 诱导的 VSMC 迁移, 在细胞经划痕处理后施加 BBR (10  $\mu$ mol/L) 或 Sotrasurin (100 nmol/L) 预处理 1 h, 再施加 SS 刺激, 最后观察不同时间点 (0、12、24、48 h) 各组划痕宽度的变化以评估 VSMC 迁移水平。结果显示, BBR 组或 Sotrasurin 组与阴性对照组相比, 在各个时间点划痕宽度差异均无统计学意义 ( $P>0.05, n=3$ ), 提示单独 BBR 或 Sotrasurin 处

理不会促进 VSMC 迁移。而 SS 组与阴性对照组相比, 划痕宽度在 12 h 时间点就已经有约 28.2% 的缩小 ( $P<0.05, n=3$ ), 且随着培养时间延长进一步缩短, 并在 48 h 时缩小约 54.9% ( $P<0.05, n=3$ ), 提示 SS 能显著提高 VSMC 迁移能力; 更重要的是, 相较于 SS 组, SS+BBR 组和 SS+Sotrasurin 组在 48 h 时划痕宽度分别增加约 79.4% 和 120.1% ( $P<0.05, n=3$ ), 证明通过抑制 PKC $\delta$  激活可明显抑制 SS 诱导的 VSMC 迁移, 提示 PKC $\delta$  介导或至少部分介导了 SS 诱导的 VSMC 迁移, 且 BBR 具有与 Sotrasurin 相同的抑制 SS 诱导的 VSMC 迁移的作用(图 2)。

图 2. BBR 对 SS 诱导的 VSMC 迁移的影响( $n=3$ )

A 为划痕实验培养不同时间下各组倒置显微镜光镜图及荧光图;B 为培养不同时间下各组划痕边界距离的柱状统计图。

a 为  $P<0.05$ ,与同一时间点阴性对照组相比;b 为  $P<0.05$ ,与同一时间点 SS 组相比。

Figure 2. Effect of berberine on SS-induced VSMC migration( $n=3$ )

### 2.3 小檗碱抑制机械牵张力诱导的 PKC $\delta$ 磷酸化

由于 BBR 与 Sotrasaurin 均能抑制 SS 诱导的 VSMC 增殖与迁移,为了进一步探明 BBR 是否通过抑制 PKC $\delta$  激活进而起到以上作用,实验采用 Western blot 检测 SS 刺激对 VSMC 中 PKC $\delta$  的磷酸化水平的影响以及 BBR 对其的作用。首先对 VSMC 施加不同时间(0、5、10、20、30、60、120 min)的 SS 刺激,结果显示,与阴性对照组相比,PKC $\delta$  磷酸化水平在 10 min 时间点就已经出现约 45.0% 的升高,并随着牵拉时间的延长而提升,最终在牵拉 30 min 达到 97.5% 的峰值( $P<0.05, n=3$ ),而后磷酸化水平逐渐降低并恢复到静息水平(图 3),提示 SS 可呈时间依赖性激活 PKC $\delta$ ,并在 30 min 时间点达到激活峰值,且过长的刺激会导致 PKC $\delta$  磷酸化

水平下降。

在此基础上,用 0、10、100、200  $\mu\text{mol/L}$  的 BBR 以及 100  $\text{nmol/L}$  的 Sotrasaurin 预处理细胞 1 h,再用 10% SS 处理细胞 10 min 后检测 PKC $\delta$  磷酸化水平。结果显示,与 non-SS(0  $\mu\text{mol/L}$  BBR)组比较,单独施加 BBR 组 PKC $\delta$  磷酸化水平差异无统计学意义( $P>0.05, n=3$ ),提示单独施加 BBR 处理不会引起 PKC $\delta$  磷酸化水平上升。相反的,与 SS 组相比,仅 10  $\mu\text{mol/L}$  的 BBR 预处理就已经出现 PKC $\delta$  磷酸化水平约 26.1% 的下降,且抑制作用呈现 BBR 浓度依赖性( $P<0.05, n=3$ ;图 3),提示 BBR 能明显抑制 SS 诱导的 VSMC 中 PKC $\delta$  磷酸化水平上升,进而抑制 SS 诱导的 VSMC 增殖和迁移。

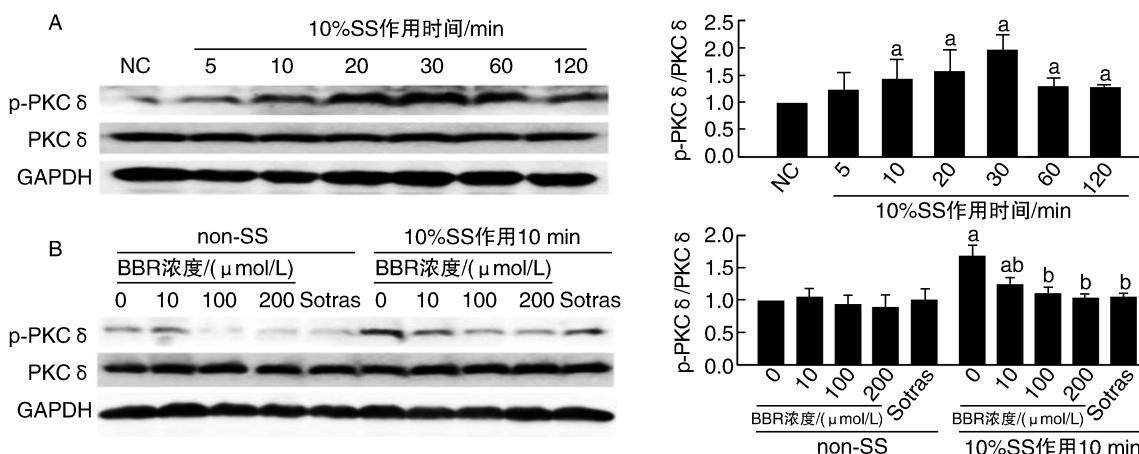


图 3. BBR 对 SS 介导的 VSMC 中 PKC $\delta$  磷酸化的影响 (n=3)

A 为不同 SS 刺激时间下 PKC $\delta$  的磷酸化水平; B 为不同浓度 BBR 对 SS 刺激下 PKC $\delta$  磷酸化水平的影响。

a 为  $P < 0.05$ , 与阴性对照组或 non-SS 情况下 0  $\mu\text{mol/L}$  BBR 组相比; b 为  $P < 0.05$ , 与 SS 情况下 0  $\mu\text{mol/L}$  BBR 组相比。

Figure 3. Effect of berberine on phosphorylation of PKC $\delta$  induced by SS in VSMC (n=3)

### 3 讨 论

本研究观察了 BBR 在 SS 诱导的 VSMC 增殖和迁移中的作用与机制。实验有三个重要发现:①SS 可激活 PKC $\delta$ , 引起其磷酸化增加;②SS 可引起 VSMC 增殖与迁移增加;③BBR 和 PKC $\delta$  抑制剂 Sotrasaurin 均能抑制 SS 诱导的 VSMC 中 PKC $\delta$  磷酸化增加, 进而抑制 VSMC 增殖和迁移。证明了 BBR 可通过抑制 PKC $\delta$  激活进而抑制 SS 诱导的 VSMC 增殖和迁移, 提示 PKC $\delta$  是介导 SS 诱导 VSMC 增殖和迁移的信号传递分子, 且 BBR 能以 PKC $\delta$  为靶点阻断 SS 的信号传递, 为血管重塑的发病机制提供参考依据, 并进一步为传统中药 BBR 应用于临床血管重塑病变的机制研究提供资料。

VSMC 作为动脉中膜的主要组成细胞, 其增殖和迁移在血管重塑的病变过程中起决定性的作用。既往已有大量实验证明高血压产生的 SS 可调控 VSMC 的功能改变, Ghantous 等<sup>[21]</sup>研究表明 SS 可诱导 VSMC 中活性氧 (ROS) 生成增多, 促进 VSMC 增生肥大, 进而介导血管重塑发生。本实验室最近研究也显示 BBR 可通过抑制蛋白质二硫键异构酶及其下游的 MAPK 信号通路 (ERK1/2, P38, JNK) 及内质网应激通路 (PERK, IRE1 $\alpha$ , ATF6) 抑制 SS 诱导的 VSMC 增殖和凋亡的同时增加<sup>[19-20]</sup>。为了进一步探究 BBR 的作用机制, 我们选取 MAPK 的上游信号分子 PKC 为研究方向。近年来大量研究也证明 PKC 的不同亚型对 VSMC 均有不同程度的调节功能, 例如, PKC $\alpha$  的激活介导了 RhoA 蛋白的下调进而促进 VSMC 的去分化, 且 PKC $\alpha$  的缺失可导致

VSMC 中 MAP 减少进而导致低血压及血管收缩性下降<sup>[22-23]</sup>; Raghuraman 等<sup>[24]</sup>研究证明抵抗素可通过激活 PKC $\epsilon$  促进 ROS 的产生, 进而介导 VSMC 的增殖、迁移和去分化。

PKC $\delta$  作为新型 PKC 的亚型之一, 与 PKC 家族的其他成员不同, 它通过多个位点磷酸化进行调控, 从而决定其激活、定位和底物特异性。有报道<sup>[25]</sup>指出血管紧张素 II 通过 PKC $\delta$  磷酸化依赖方式激活盐皮质激素受体 (MR) 转录活性, 促进 VSMC 的增殖和血管重塑的发生。早期的实验也提示 PKC $\delta$  介导了 SS 诱导的 VSMC 迁移<sup>[11]</sup>, 但到目前为止, 关于 SS 刺激信号在 VSMC 中传递途径仍未有明确报道。本研究首次证明通过抑制 PKC $\delta$  的磷酸化可同时抑制 SS 诱导的 VSMC 增殖和迁移。但也有报道指出 PKC $\delta$  的磷酸化可能介导了其转位到细胞膜、线粒体、内质网和溶酶体, 在 VSMC 凋亡的初始阶段起作用<sup>[26]</sup>。这是由于 PKC $\delta$  的激活是刺激依赖性和细胞类型特异性的, 例如, 在神经瘤母细胞中 PKC $\delta$  可在内质网应激后瞬间移位到内质网, 与 Abl (一种酪氨酸激酶) 结合, 并在线粒体中积累, 诱导细胞凋亡<sup>[27]</sup>; 而在胶质瘤细胞中, PKC $\delta$  内质网易位保护细胞免受 TNF 配体诱导的细胞死亡<sup>[28]</sup>。后续实验也将对不同刺激所导致的 PKC $\delta$  激活后产生的不同效应做进一步探究, 并深入探索 SS 刺激在 VSMC 中的信号传递通路。

近年来, 越来越多证据表明 BBR 可用于治疗心血管相关疾病<sup>[14, 29]</sup>。多篇报道均指出 BBR 可明显减少粥样斑块面积, 抑制炎症和氧化标志物表达, 降低主动脉细胞间黏附分子 1 (intercellular adhesion

molecule-1, ICAM-1)、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)和白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)的水平,同时减少核因子κB(nuclear factor kappa-B, NF-κB)向核的转运,对动脉粥样硬化病变有治疗效果<sup>[30-32]</sup>。同时有研究表明BBR可通过影响相关miRNA和lncRNA分子表达进而抑制高血压导致的血管功能障碍<sup>[33-34]</sup>,且BBR具有PKC $\alpha$ 活性抑制的作用<sup>[35]</sup>,结合本实验发现抑制PKC $\delta$ 活性能同时抑制SS诱导的VSMC增殖与迁移,推测BBR可能通过抑制PKC $\delta$ 的激活在VSMC增殖与迁移中起到调节作用。实验结果表明,BBR可通过抑制PKC $\delta$ 的激活明显抑制SS诱导的VSMC增殖与迁移。这一发现可能也解释了BBR抑制下游MAPK通路及VSMC增殖和凋亡同时增加的作用。但也有报道指出BBR可通过诱导巨噬细胞中清道夫受体的表达促进泡沫细胞的形成及动脉粥样硬化的发展<sup>[36]</sup>,这可能是由不同细胞对药物刺激的不同反应所导致的,且由于动脉粥样硬化是多细胞多因素导致的血管病理改变,故而后续研究可考虑采用BBR与其他药物的联合使用来起到更好的治疗效果。

综上所述,本研究证明了BBR通过抑制PKC $\delta$ 磷酸化抑制SS诱导的VSMC增殖与迁移,并发现通过抑制PKC $\delta$ 的激活可明显抑制SS诱导的VSMC增殖与迁移。揭示了PKC $\delta$ 在SS诱导的VSMC增殖和迁移中的作用及BBR的作用机制,为临幊上对动脉粥样硬化性疾病的治疗提供机制参考,并为传统中药BBR在临幊上的更广泛应用提供重要理论依据。

#### [参考文献]

- JAMINON A, REESINK K, KROON A, et al. The role of vascular smooth muscle cells in arterial remodeling: focus on calcification-related processes[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(22): 5694.
- 周琴怡, 龚邵新, 彭琴, 等. 肺动脉平滑肌细胞: 肺动脉高压的关键治疗靶点[J]. 中国动脉硬化杂志, 2021, 29(6): 543-547.
- SUN H J, REN X S, XIONG X Q, et al. NLRP3 inflammasome activation contributes to VSMC phenotypic transformation and proliferation in hypertension[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(10): e3074.
- CHEN J, ZHOU Y, LIU S, et al. Biomechanical signal communication in vascular smooth muscle cells[J]. *J Cell Commun Signal*, 2020, 14(4): 357-376.
- 齐书涵, 张欣, 尹新华. 血管重构在高血压中的研究进展[J]. 心脏杂志, 2017, 29(4): 474-477.
- 谭宏伟, 许春容, 王刚, 等. 微小RNA对血管重塑的调节作用及研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2019, 27(12): 1094-1100.
- NEVES J S, CASTRO-FERREIRA R, LADEIRAS-LOPES R, et al. The effects of angiotensin II signaling pathway in the systolic response to acute stretch in the normal and ischemic myocardium[J]. *Peptides*, 2013, 47: 77-84.
- LIU S, LI Y, ZHANG Z, et al.  $\alpha$ 1-Adrenergic receptors mediate combined signals initiated by mechanical stretch stress and norepinephrine leading to accelerated mouse vein graft atherosclerosis[J]. *J Vasc Surg*, 2013, 57(6): 1645-1656.
- WAN X J, ZHAO H C, ZHANG P, et al. Involvement of BK channel in differentiation of vascular smooth muscle cells induced by mechanical stretch[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2015, 59(59): 21-29.
- RINGVOLD H C, KHALIL R A. Protein kinase C as regulator of vascular smooth muscle function and potential target in vascular disorders[J]. *Adv Pharmacol*, 2017, 78: 203-301.
- LI C, WERNIG F, LEITGES M, et al. Mechanical stress-activated PKC delta regulates smooth muscle cell migration[J]. *FASEB J*, 2003, 17(14): 2106-2108.
- LV P, MIAO S B, SHU Y N, et al. Phosphorylation of smooth muscle 22 $\alpha$  facilitates angiotensin II-induced ROS production via activation of the PKC $\delta$ -P47phox axis through release of PKC $\delta$  and actin dynamics and is associated with hypertrophy and hyperplasia of vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo[J]. *Circ Res*, 2012, 111(6): 697-707.
- MA Y G, LIANG L, ZHANG Y B, et al. Berberine reduced blood pressure and improved vasodilation in diabetic rats[J]. *J Mol Endocrinol*, 2017, 59(3): 191-204.
- CHEN M, SHEN H, ZHU L, et al. Berberine attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension via bone morphogenetic protein and transforming growth factor- $\beta$  signaling[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 17482-17493.
- YIN S, BAI W, LI P, et al. Berberine suppresses the ectopic expression of miR-133a in endothelial cells to improve vascular dementia in diabetic rats[J]. *Clin Exp Hypertens*, 2019, 41(8): 708-716.
- PIRILLO A, CATAPANO A L. Berberine, a plant alkaloid with lipid and glucose-lowering properties: from in vitro evidence to clinical studies[J]. *Atherosclerosis*, 2015, 243(2): 449-461.
- CHANG X, WANG Z, ZHANG J, et al. Lipid profiling of the therapeutic effects of berberine in patients with non-alcoholic fatty liver disease[J]. *J Transl Med*, 2016, 14(14): 266.

- [18] PING S, LIU S, ZHOU Y, et al. Protein disulfide isomerase-mediated apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells induced by mechanical stress and advanced glycosylation end products result in diabetic mouse vein graft atherosclerosis [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(5): e2818.
- [19] WANG L, DENG L, LIN N, et al. Berberine inhibits proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by mechanical stretch via the PDI/ERS and MAPK pathways[J]. *Life Sci*, 2020, 259(259): 118253.
- [20] 邓烈, 王林丽, 刘树迎, 等. 黄连素抑制机械牵张力诱导的血管平滑肌细胞MAPK磷酸化以及细胞增殖和迁移[J]. 中山大学学报(医学版), 2020, 41(1): 44-52.
- [21] GHANTOUS C M, FARHAT R, DJOUHRI L, et al. Molecular mechanisms of adiponectin-induced attenuation of mechanical stretch-mediated vascular remodeling[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020. DOI: 10.1155/2020/6425782.
- [22] GONZÁLEZ-MONTELONGO M, PORRAS-GONZÁLEZ C, GONZÁLEZ-MONTELONGO R, et al. PKC $\alpha$ -mediated downregulation of RhoA activity in depolarized vascular smooth muscle: synergistic vasorelaxant effect of PKC $\alpha$  and ROCK inhibition[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2019, 52(1): 76-93.
- [23] WYNNE B M, MCCARTHY C G, SZASZ T, et al. Protein kinase C $\alpha$  deletion causes hypotension and decreased vascular contractility[J]. *J Hypertens*, 2018, 36(3): 510-519.
- [24] RAGHURAMAN G, ZUNIGA M C, YUAN H, et al. PKC $\epsilon$  mediates resistin-induced NADPH oxidase activation and inflammation leading to smooth muscle cell dysfunction and intimal hyperplasia[J]. *Atherosclerosis*, 2016, 253: 29-37.
- [25] LU Q, DAVEL A P, MCGRAW A P, et al. PKC $\delta$  mediates mineralocorticoid receptor activation by angiotensin II to modulate smooth muscle cell function[J]. *Endocrinology*, 2019, 160(9): 2101-2114.
- [26] ZHAO M, XIA L, CHEN G Q. Protein kinase C $\delta$  in apoptosis: a brief overview [J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2012, 60(5): 361-372.
- [27] QI X, MOCHLY-ROSEN D. The PKC $\delta$ -Abl complex communicates ER stress to the mitochondria: an essential step in subsequent apoptosis[J]. *J Cell Sci*, 2008, 121(Pt 6): 804-813.
- [28] GOMEL R, XIANG C, FINNISS S, et al. The localization of protein kinase C delta in different subcellular sites affects its proapoptotic and antiapoptotic functions and the activation of distinct downstream signaling pathways[J]. *Mol Cancer Res*, 2007, 5(6): 627-639.
- [29] CAI Y, XIN Q, LU J, et al. A new therapeutic candidate for cardiovascular diseases: berberine[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 631100.
- [30] WU M, YANG S, WANG S, et al. Effect of berberine on atherosclerosis and gut microbiota modulation and their correlation in high-fat diet-fed ApoE $^{-/-}$  mice[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 223.
- [31] FENG M, ZOU Z, ZHOU X, et al. Comparative effect of berberine and its derivative 8-cetylberberine on attenuating atherosclerosis in ApoE $^{-/-}$  mice[J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 43: 195-202.
- [32] FATAHIAN A, HAFTCHESHMEH S M, AZHDARI S, et al. Promising anti-atherosclerotic effect of berberine: evidence from in vitro, in vivo, and clinical studies[J]. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 2020, 178: 83-110.
- [33] RAJABI S, NAJAFIPOUR H, JAFARINEJAD-FARSANGI S, et al. Quercetin, perillyl alcohol, and berberine ameliorate right ventricular disorders in experimental pulmonary arterial hypertension: effects on miR-204, miR-27a, fibrotic, apoptotic, and inflammatory factors[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2021, 77(6): 777-786.
- [34] TAN N, ZHANG Y, ZHANG Y, et al. Berberine ameliorates vascular dysfunction by a global modulation of lncRNA and mRNA expression profiles in hypertensive mouse aortae [J]. *PLoS One*, 2021, 16(2): e0247621.
- [35] ZHANG H N, DONG J H, LAU C W, et al. Berberine reverses nitroglycerin tolerance through suppressing protein kinase C alpha activity in vascular smooth muscle cells [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2021. DOI: 10.1007/s10557-021-07193-z.
- [36] LI K, YAO W, ZHENG X, et al. Berberine promotes the development of atherosclerosis and foam cell formation by inducing scavenger receptor A expression in macrophage [J]. *Cell Res*, 2009, 19(8): 1006-1017.

(此文编辑 许雪梅)