

本文引用: 郭丽媛, 桂丹丹, 袁厚琴, 等. TFPIct32 抑制血管平滑肌细胞增殖迁移及其抗动脉粥样硬化作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2026, 34(5): 392-402. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2026.05.002.

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2026)34-05-0392-11

TFPIct32 抑制血管平滑肌细胞增殖迁移及其抗动脉粥样硬化作用

郭丽媛, 桂丹丹, 袁厚琴, 邓伟, 徐倩, 周坤, 张玥欣, 罗心雨, 李想,
邓新梅, 秦昕怡, 谈有泽, 任重, 刘慧婷, 姜志胜

南华大学心血管疾病研究所 动脉硬化化学湖南省重点实验室 湖南省动脉硬化性疾病国际科技
创新合作基地, 湖南省衡阳市 421001

[摘要] **[目的]** 探究组织因子途径抑制物羧基末端(TFPIct)一段由32个氨基酸序列构成的小肽段TFPIct32对ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化(As)病变进展的影响及初步机制。**[方法]** 采用高脂饲料喂养ApoE^{-/-}小鼠10周,构建As动物模型。将建模成功的小鼠随机分为4组,每组10只($n=10$),分别为:模型组、生理盐水组(模型基础上尾静脉注射生理盐水)、TFPI组(阴性对照肽,每周2.5 nmol/g TFPI尾静脉注射)、TFPIct32组(每周2.5 nmol/g TFPIct32尾静脉注射),各组均持续给药4周。给药结束后,检测各组小鼠尾部出血时间;采集血清样本,检测血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)及高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平。分离小鼠主动脉并进行油红O染色,对主动脉窦组织切片行HE、Masson和油红O染色。采用血小板源生长因子BB(PDGF-BB)处理血管平滑肌细胞(VSMC)构建细胞增殖迁移模型,分为对照组、PDGF-BB组、PDGF-BB+TFPI组、PDGF-BB+TFPIct32组以及PDGF-BB+蛋白激酶B(Akt)激动剂SC79组、PDGF-BB+TFPIct32+SC79组。运用CCK-8法检测细胞增殖能力,划痕实验及Transwell法检测细胞迁移能力,Western blot检测增殖细胞核抗原(PCNA)、磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)、磷酸化Akt(p-Akt)及总Akt(t-Akt)的蛋白表达水平。**[结果]** 动物实验结果显示,与生理盐水组和TFPI组相比,TFPIct32组ApoE^{-/-}小鼠血清LDL-C水平降低($P<0.05$),同时主动脉壁及主动脉斑块面积减小(均 $P<0.01$)。TFPIct32对PDGF-BB诱导的VSMC增殖与迁移具有显著抑制作用(均 $P<0.05$),Akt特异性激动剂SC79可部分恢复TFPIct32抑制的VSMC增殖与迁移能力($P<0.05$),提示PI3K/Akt通路在TFPIct32抑制的VSMC增殖与迁移及促进As病变进展中发挥重要作用。**[结论]** TFPIct32可显著减缓高脂饮食喂养的ApoE^{-/-}小鼠As病变进展,其机制可能与抑制VSMC增殖和迁移有关。

[关键词] TFPIct32; 血管平滑肌细胞; 血管重塑; 动脉粥样硬化; PI3K/Akt信号通路

[中图分类号] R5;R363

[文献标识码] A

TFPIct32 inhibits proliferation and migration of vascular smooth muscle cells and exerts anti-atherosclerotic effects

GUO Liyuan, GUI Danan, YUAN Houqin, DENG Wei, XU Qian, ZHOU Kun, ZHANG Yuexin, LUO Xinyu, LI Xiang, DENG Xinmei, QIN Xinyi, TAN Youze, REN Zhong, LIU Huiting, JIANG Zhisheng

Institute of Cardiovascular Disease, University of South China & Key Laboratory for Arteriosclerosis of Hunan Province & Hunan Province Arteriosclerotic Disease International Scientific and Technological Innovation Cooperation Base, Hengyang, Hunan 421001, China

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of TFPIct32, a 32-amino acid peptide segment of tissue factor pathway inhibitor C-terminal (TFPIct), on the progression of atherosclerosis (As) lesions in ApoE^{-/-} mice and its preliminary mechanisms. **Methods** ApoE^{-/-} mice were fed with a high-fat diet for 10 weeks to establish an As animal model.

Mice successfully modeled were randomly divided into four groups of 10 ($n=10$) each: model group, saline group (tail

[收稿日期] 2026-02-08

[修回日期] 2026-03-27

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81670429)

[作者简介] 郭丽媛, 硕士, 研究方向为糖脂代谢及动脉粥样硬化, E-mail: 13269981210@163.com。郭丽媛、桂丹丹和袁厚琴为共同第一作者。通信作者姜志胜, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化及心肌缺血损伤机制研究, E-mail: zsjiang2005@163.com。

vein injection of saline on top of the model), TFPI group (negative control peptide group, 2.5 nmol/g TFPI per week, tail vein injection), TFPIct32 group (2.5 nmol/g TFPIct32 per week, tail vein injection). All groups received continuous treatment for 4 weeks. After treatment completion, tail bleed time was measured in mice from each group; Serum samples were collected to measure serum levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDLC), and high density lipoprotein cholesterol (HDL). Mouse aortas were isolated and stained with oil red O. Sections of aortic sinus tissue were stained with hematoxylin and eosin (HE), Masson's trichrome, and oil red O. A cell proliferation and migration model was established using platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) treatment on vascular smooth muscle cells (VSMC), divided into control group, PDGF-BB group, PDGF-BB+TFPI group, PDGF-BB+TFPIct32 group, PDGF-BB+protein kinase B (Akt) agonist SC79 group and PDGF-BB+TFPIct32+SC79 group. Cell proliferation was assessed using the CCK-8 assay, while cell migration was evaluated via the scratch assay and Transwell method. Protein expression levels of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), phosphoinositide 3-kinase (PI3K), phosphorylated Akt (p-AKT), and total Akt (t-Akt) were detected by Western blot analysis.

Results Animal experimental results showed that, compared with the saline group and the TFPI group, the TFPIct32 group significantly reduced serum LDLC levels in ApoE^{-/-} mice ($P<0.05$), while simultaneously decreased plaque area in the aortic wall and aortic sinus (both $P<0.01$). TFPIct32 significantly inhibited PDGF-BB-induced proliferation and migration of VSMC (both $P<0.05$), while the Akt-specific agonist SC79 partially restored the TFPIct32-inhibited VSMC proliferation and migration ($P<0.05$). These findings suggested that the PI3K/Akt pathway played a crucial role in the regulation of TFPIct32-mediated inhibition of VSMC proliferation, migration, and subsequent atherosclerosis progression.

Conclusion TFPIct32 significantly slows the progression of atherosclerotic lesions in ApoE^{-/-} mice fed a high-fat diet, a mechanism likely involving the inhibition of VSMC proliferation and migration.

[**KEY WORDS**] TFPIct32; vascular smooth muscle cell; vascular remodeling; atherosclerosis; PI3K/Akt signaling pathway

心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 的发病率与死亡率仍居全球首位,其高致残率与高致死率给全球公共卫生系统带来沉重负担,而动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 作为绝大多数 CVD 的核心病理基础,是诱发冠心病、脑卒中等严重心脑血管事件的重要病因^[1-2]。As 是累及大、中型动脉的慢性炎症性血管病变,以血管内膜脂质异常沉积、炎症细胞浸润、血管壁纤维化及斑块形成为主要特征,随着病变进展,可导致血管管腔狭窄及弹性下降,最终引起靶器官缺血性损伤,甚至危及生命^[3-4]。As 的发生发展是涉及多细胞与多机制协同作用的复杂病理过程^[5],其中血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 的异常增殖与迁移是贯穿 As 全程的核心病理事件^[6-7]。在生理状态下, VSMC 以收缩表型为主,参与维持血管张力及血压稳态的调节;而在病理条件下,如受脂质毒性、炎症刺激等因素驱动, VSMC 转换为具有高增殖与高迁移能力的合成表型^[8-9]。转换后的 VSMC 出现异常增殖并迁移至动脉内膜,与沉积的脂质、浸润的巨噬细胞以及过度积聚的细胞外基质共同构成纤维脂质斑块。该过程不仅加速血管病理性重塑,还推动斑块的进展并增加其不稳定性,最终可引发急

性心脑血管事件。因此,调控 VSMC 的增殖与迁移是干预 As 进展的关键环节^[4,10-11],而阐明其关键调控因子有望为 As 的防治提供新的治疗策略。

组织因子途径抑制物 (tissue factor pathway inhibitor, TFPI) 作为组织因子 (tissue factor, TF) 介导的外源性凝血途径的关键生理性抑制因子,对 As 的抑制作用已得到证实,主要机制包括抑制血管内皮细胞活化、遏制 VSMC 异常增殖与迁移、减少炎症细胞募集及调节脂质代谢^[12-14]。TFPI 结构包含 N 端、三个功能特异的 Kunitz 结构域 (K1、K2、K3) 及高度碱性的羧基末端尾部, K1 结构域可特异性抑制 TF-活化因子 VII 复合物的活性, K2 结构域抑制活化因子 X, K3 结构域则是其与辅因子蛋白 S 结合的必需结构,而其碱性羧基末端尾部与因子 V-short (FV-short) 具有高亲和力^[15]。近年来研究发现, TFPI 的羧基末端尾部 (TFPI C-terminal, TFPIct) 不仅是其发挥凝血抑制功能的关键结构,还可独立于全长 TFPI,通过多种途径参与血管疾病的调控。TFPIct 不仅可直接抑制血管内皮生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2) 的活化,从而削弱内皮细胞迁移能力^[16];还可与极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) 受体或

脂蛋白结合,促进胆固醇代谢,降低血浆胆固醇水平,从而延缓 As 进展^[17]。TFPIct32 是 TFPI 的羧基末端由 32 个氨基酸组成的小分子肽段,作为机体快速凝血抑制的必需结构,其具备与 TFPI、TFPIct 相似的抗 As 效应,且相较于全长 TFPI 出血倾向更低,展现更优的临床应用前景。然而,TFPIct32 对已形成的 As 病变具有何种作用及其机制尚需进一步探索。此外,As 的发生发展与磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB/Akt) 信号通路的活化密切相关。该通路不仅参与调控 VSMC 源性泡沫细胞的形成,以及脂噬、自噬等细胞代谢过程^[17-19],还能介导 E3 泛素连接酶 TRIM65 所促进的 VSMC 增殖与迁移^[20]。因此,本文旨在探究 TFPIct32 是否通过该信号通路调控 VSMC 的增殖与迁移以及是否影响 As 病变的进展,为 As 的干预提供新的策略和靶点,为推动 TFPIct32 的临床转化提供重要的实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂

使用 ApoE^{-/-}小鼠及高脂饲料(常州卡文斯实验动物有限公司),酶联免疫吸附试验试剂盒(美国 CUSABIO Technology LLC 公司),Masson 三色染色试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司),Akt 激动剂 SC79,油红 O 粉末(美国 Sigma 公司),苏木精(南华大学显微形态中心提供),DMEM 高糖培养基(美国 Gibco 公司),Transwell 小室(8 μm 规格,美国 Corning 公司),结晶紫染液(中国碧云天公司),CCK-8 检测试剂盒(日本同仁公司),OCT 冰冻切片包埋剂(美国 SAKURA 公司),多聚甲醛(江苏碧云天生物技术公司),抗 GAPDH 多克隆抗体、抗增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)多克隆抗体、抗 PI3K 多克隆抗体、抗 Akt 多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗、辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗(武汉三鹰生物技术公司),抗 p-Akt 多克隆抗体(美国 CST 公司),TFPI 羧基末端小肽(TFPIct32)和 TFPI 阴性对照肽(TFPI)(上海生工生物公司)。TFPIct32 序列:IQRISKGLIKTKRKRKKQVRKIAEYEEIFVKN;TFPI 阴性对照序列:MQNDRRKLIQRKRKYREKRKVKRRTRKQKK。血小板源生长因子 BB(platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB)(美国 Peprotech 公司)。

1.2 动物模型构建

将 40 只 8 周龄 ApoE^{-/-}小鼠(体重均 ≥ 20.0 g)饲养于南华大学动物部 SPF 级饲养室,随机分成 4 组(每组 10 只),即模型组、生理盐水组、TFPI 组、TFPIct32 组。所有小鼠均高脂喂养 10 周后,模型组处死并取材,其余各组继续高脂喂养并给予相应干预措施处理 4 周后处死取材。具体干预措施如下:TFPIct32 组小鼠每周尾静脉注射一次 TFPIct32 溶液(剂量为 2.5 nmol/g),TFPI 组小鼠每周尾静脉注射一次阴性对照肽 TFPI(剂量为 2.5 nmol/g),生理盐水组尾静脉注射同等体积生理盐水。

1.3 血脂检测

取材前小鼠禁食过夜,次日常安乐死后眼球取血。全血于室温静置 1 h,随后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、5 000 r/min 条件下离心 10 min,吸取血清置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。小鼠血清标本送至南华大学附属第一医院检验科检测总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)和高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)水平。

1.4 小鼠出血时间测定

小鼠麻醉后从尖端起 3 mm 处切掉尾巴并立即浸入 37 $^{\circ}\text{C}$ 生理盐水(0.9% NaCl)中,开始计时直至止血,所用时间为出血时间(bleeding time, BT)^[21],记录数据进行后续分析。

1.5 酶联免疫吸附试验

采用酶联免疫吸附试验试剂盒检测血清 D-二聚体(D-dimer, D-D)和凝血酶抗凝血酶(thrombin-antithrombin, TAT)浓度。具体步骤如下:试剂盒恢复室温后,D-D 标准品稀释为 0~2 000 ng/L 梯度,血清样本按 1:500 稀释;TAT 标准品稀释为 0~1 000 ng/L 梯度,血清样本按 1:50 稀释。两组均取 100 μL /孔加入酶标板(双孔检测),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h;弃废液后加入工作液孵育 1 h 并洗涤 3 次;再加辣根过氧化物酶标记亲和素工作液孵育 1 h 后并洗涤 3 次;避光显色 30 min 后终止反应,5 min 内以 450 nm 波长测 OD 值。采用 Curve Expert 1.4 软件以吸光度为 X 值、浓度为 Y 值制作标准曲线($r=0.9999$),根据标准曲线计算浓度。

1.6 实验动物取材及相关染色

小鼠安乐死后固定于操作板上,打开胸腹腔,经左心室灌注预冷 PBS 溶液,于体视显微镜下分离主动脉。取下的心脏置于 4% 多聚甲醛固定 24 h,

固定完成后于生理盐水中浸洗,再经 OCT 包埋剂包埋后使用冰冻切片机制备切片,暴露主动脉窦后,收集相应组织切片,切片厚度为 5 μm 。后续 HE 染色、Masson 染色和油红 O 染色步骤按照相应试剂盒说明书进行。其中油红 O 染色分为两种:对分离后的整条主动脉浸染,展示脂质斑块整体分布;对主动脉窦斑块组织冰冻切片进行染色,苏木精复染细胞核,观察局部脂质蓄积情况。

1.7 细胞培养

本研究采用来源于中国科学院细胞库的小鼠血管平滑肌细胞株。将溶解后的 100 μL PDGF-BB 原液转移至无菌 15 mL 离心管中,加入 9.9 mL 0.1% BSA 溶液稀释后轻轻吹打混匀。以 40 $\mu\text{g/L}$ PDGF-BB 诱导 VSMC 增殖、迁移。将 1 mg TFPI 或 TFPIct32 冻干粉从 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出恢复至室温,低速离心 20~30 s。在超净工作台内用 1 mL 无菌生理盐水进行溶解。观察对照组,以及在 40 $\mu\text{g/L}$ PDGF-BB 诱导 VSMC 后分别用 50 mg/L TFPI 和 50 mg/L TFPIct32 处理 VSMC,以及用 10 $\mu\text{mol/L}$ Akt 激动剂 SC79 处理细胞 6 h。

1.8 细胞增殖检测

采用 CCK-8 法检测细胞增殖。取生长良好、处于对数生长期的 VSMC,以 1×10^4 个/孔细胞接种于 96 孔板中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养过夜,后续根据实验设计给予相应的药物:40 $\mu\text{g/L}$ PDGF-BB 处理 VSMC 24 h,50 mg/L TFPI 及 TFPIct32 处理 VSMC 24 h。药物处理完毕后每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,继续在培养箱内孵育 2 h,随后用酶标仪在 450 nm 处测定各孔的 OD 值,比较各组 OD 值分析细胞增殖情况。

1.9 Transwell 实验

采用含血清的完全培养基将 VSMC 制成细胞悬液,以 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 接种于 Transwell 上室中,于培养箱中培养过夜后,先使用 PDGF-BB 处理 24 h,弃去上室培养液,PBS 溶液漂洗 3 次后加入 50 mg/L TFPI 或 50 mg/L TFPIct32 至 200 μL 无血清培养基中。向 Transwell 下室中加入完全培养基 500 μL ,培养 24 h。培养完成后,取出 Transwell 小室,弃去培养基,PBS 溶液漂洗 3 次。将小室放入 800 μL 甲醇中室温固定 30 min,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。随后用 0.1% 结晶紫染液染色 10~15 min,使用润湿的棉签轻轻擦去上层细胞后,再用 PBS 漂洗 3 次,每次 3 min。在显微镜下随机选取 5 个视野(400 $\times$)拍

照并计数迁移细胞数,进行统计分析。

1.10 划痕实验

使用完全培养基将 VSMC 制成细胞悬液,按 $1.2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 接种于 24 孔板中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养,待细胞融合至 80%~90% 时,用无血清培养基饥饿 24 h 后进行划痕处理,划痕后使用 PBS 漂洗 3 次,第 3 遍加入 PBS 后进行拍照,弃去 PBS 后分别用 50 mg/L TFPI 和 50 mg/L TFPIct32 处理 VSMC,放入培养箱中继续培养 24 h 后,再次进行拍照并统计细胞迁移率。

1.11 Western blot

细胞处理完成后,提取细胞总蛋白,取 5 μg 蛋白样本采用 BCA 法进行蛋白定量。随后取 10 μg 蛋白样本进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,电泳结束后将蛋白转移至 PVDF 膜上。转膜完毕后转移至 5% 脱脂牛奶封闭液中室温封闭 2 h。根据抗体说明书建议配制一抗孵育液(PCNA:1:1 000,PI3K:1:2 000,Akt:1:1 000,p-Akt:1:1 000,GAPDH:1:5 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。一抗孵育结束后,使用 TBST 缓冲液洗涤 3 次,每次 5 min。以 1:5 000 配制二抗孵育液,室温孵育 2 h。再用 TBST 缓冲液洗涤 3 次,每次 5 min。最后在全自动化学发光成像分析系统下显影并保存图像,采用 Image J 软件分析各条带灰度值。

1.12 统计学分析

统计分析以及统计作图采用 Graph Pad Prism 9.0 软件,采用 Image J 检测蛋白条带灰度值。实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,三组或多组之间的比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 TFPIct32 对高脂喂养的 ApoE^{-/-}小鼠凝血功能无明显影响

通过高脂饮食喂养 ApoE^{-/-}小鼠 10 周构建 As 模型,实验设计模式图如下(图 1A)。小鼠按照实验计划分别干预 4 周后,于处死前测量其尾部 BT。小鼠安乐死后采集全血样本,经离心后取血清,采用酶联免疫吸附试验检测血清中 D-D 与 TAT 含量。结果提示,模型组、生理盐水组、TFPI 组和 TFPIct32 组之间 BT、D-D、TAT 指标差异均无显著性(均 $P > 0.05$,图 1B)。

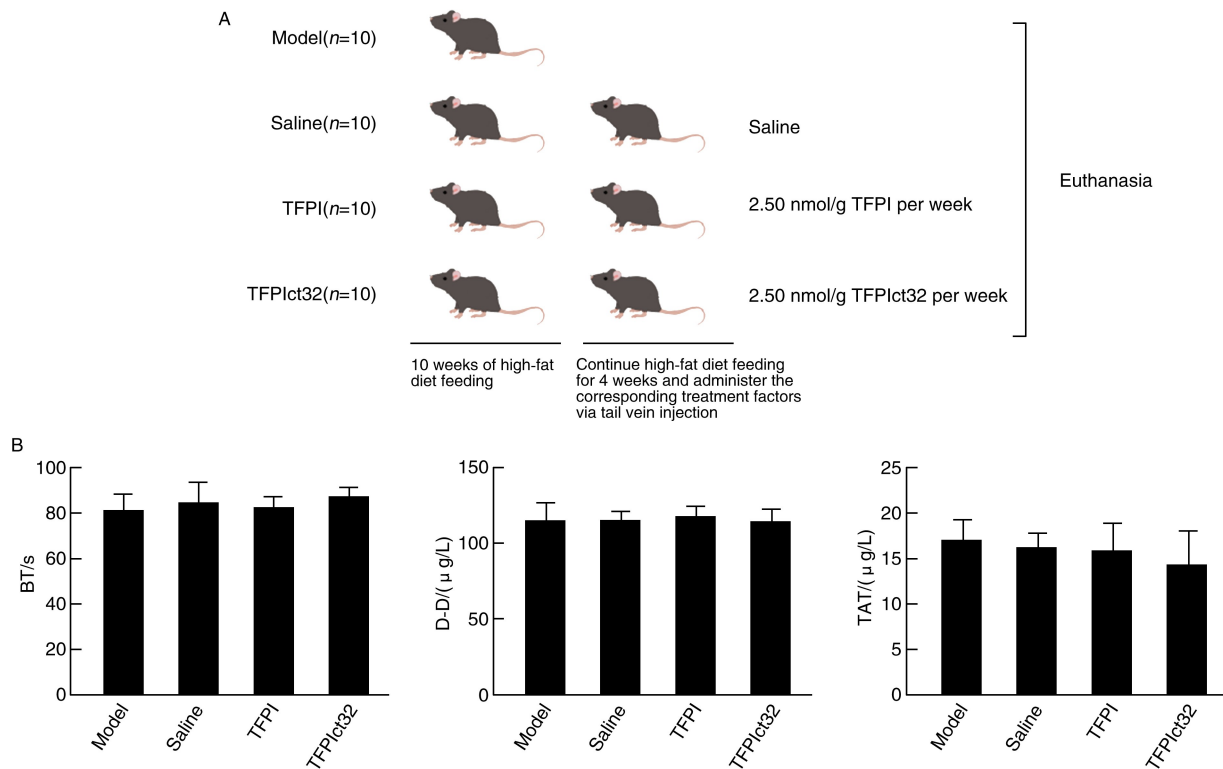


图 1. 动物模型设计图和 TFPIct32 对 ApoE^{-/-} 小鼠 BT 及血清 D-D、TAT 水平的影响

A 为动物实验设计模式图, B 为小鼠 BT 及血清 D-D 和 TAT 水平 (n=10)。

Figure 1. Animal model design diagram and effects of TFPIct32 on BT, serum D-D, and TAT levels in ApoE^{-/-} mice

2.2 TFPIct32 抑制高脂喂养的 ApoE^{-/-} 小鼠 As 进展

对小鼠血清 TC、TG、LDLC 和 HDLC 水平进行检测,结果显示,与模型组相比,生理盐水组 TC、TG 水平分别升高 27.07% 与 24.03% (均 $P < 0.05$);与生理盐水组相比,TFPI 组的 TC 和 TG 水平分别升高 17.18% 和 12.02% (均 $P < 0.05$),而 TFPIct32 组的 TC 和 TG 水平与生理盐水组及 TFPI 组相比差异均无显著性 (均 $P > 0.05$)。LDLC 水平方面,TFPIct32 组较生理盐水组和 TFPI 组相比分别下降 15.60% 和 18.14% (均 $P < 0.05$)。此外,HDLC 水平方面,生理盐水组较模型组下降 24.75%,而 TFPI 组和 TFPIct32 组相比生理盐水组升高了 14.20% 和 6.79% ($P < 0.01$,图 2A)。主动脉油红 O 大体染色及 Image-Pro Plus 分析显示,与模型组相比,生理盐水组和 TFPI 组小鼠整条主动脉斑块面积分别增加 118.53% 与 126.28% (均 $P < 0.01$),而 TFPIct32 组小鼠主动脉根部斑块面积较生理盐水组及 TFPI 组相比分别减少 42.65% 和 44.61% (均 $P < 0.01$);此外,与模型组相比,TFPIct32 组小鼠主动脉根部斑块面积仍增加 25.34% ($P < 0.05$,图 2B)。进一步

通过 HE、油红 O 及 Masson 染色评估主动脉窦斑块的脂质蓄积和纤维化程度。结果显示,与模型组相比,生理盐水组和 TFPI 组斑块面积分别增加 36.84% ($P < 0.01$) 和 33.38% ($P < 0.05$),表明病变仍在持续进展;而 TFPIct32 组斑块面积较生理盐水组和 TFPI 组分别减少 28.83% 和 26.98% (均 $P < 0.01$,图 2C)。上述结果均提示 TFPIct32 可抑制 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉窦斑块内的脂质蓄积。

2.3 PDGF-BB 处理 VSMC 最适剂量与时间筛选

为确定 PDGF-BB 诱导 VSMC 增殖最佳条件,本研究使用不同剂量 (0 ~ 80 μg/L) PDGF-BB 处理,以及 40 μg/L PDGF-BB 处理不同时间 (0 ~ 48 h)。CCK-8 结果显示,40 μg/L PDGF-BB 处理 VSMC 24 h 后存活率最高 (图 3A 和 3B)。Western blot 检测 PCNA 蛋白表达,与 0 μg/L 组相比,40 μg/L 组的 PCNA 表达量增加了 47.26% ($P < 0.05$,图 3C);与 0 h 组相比,40 μg/L PDGF-BB 处理 24 h 后 PCNA 表达量增加了 58.31% ($P < 0.05$,图 3D)。以上结果证实,PDGF-BB 促进 VSMC 增殖最适条件为 40 μg/L 处理 24 h,故后续实验均采用该处理时间及剂量。

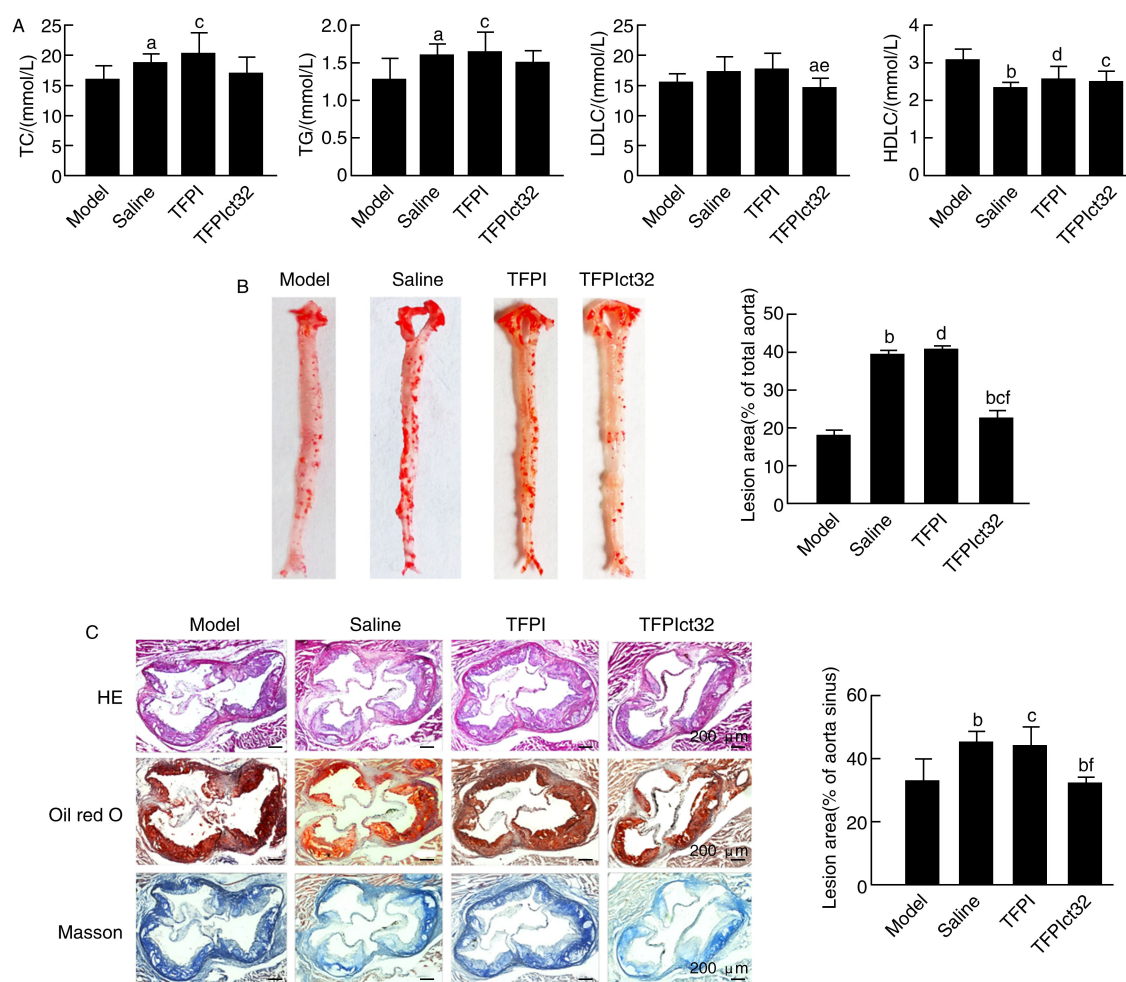


图 2. TFPIct32 对 ApoE^{-/-} 小鼠血清脂质水平及主动脉斑块面积的影响 (n=8~10)

A 为 TFPIct32 对 ApoE^{-/-} 小鼠血清 TC、TG、LDLC 和 HDLC 水平的影响。B 为主动脉内膜油红 O 染色及斑块面积百分比量化图。

C 为主动脉窦斑块组织 HE 染色、油红 O 染色、Masson 染色及主动脉窦斑块面积百分比量化图。

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与模型组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与生理盐水组比较; e 为 $P < 0.05$, f 为 $P < 0.01$, 与 TFPI 组比较。

Figure 2. Effects of TFPIct32 on serum lipid and aortic plaque area in ApoE^{-/-} mice (n=8~10)

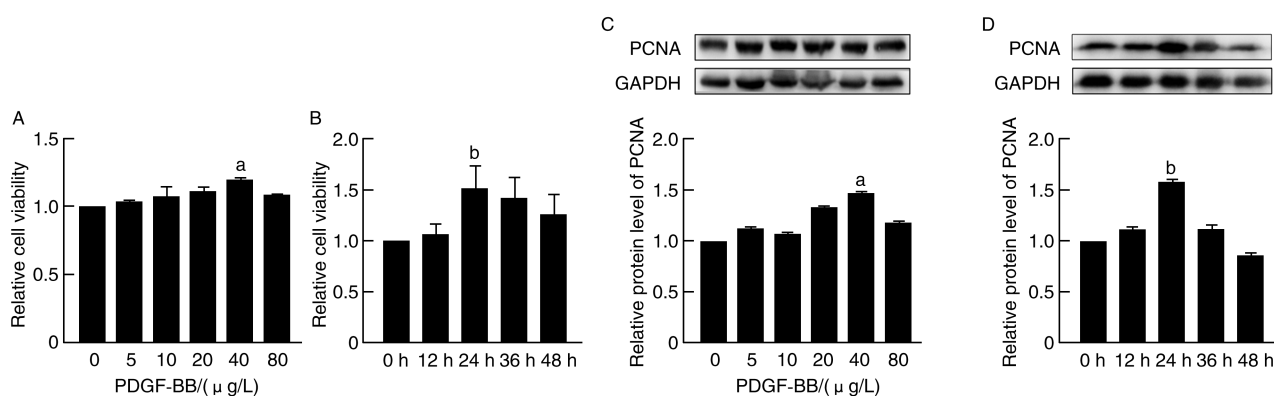


图 3. PDGF-BB 促进 VSMC 增殖的剂量与时间效应 (n=3)

A 为 0~80 $\mu\text{g/L}$ PDGF-BB 处理 VSMC 24 h 对存活率的影响。a 为 $P < 0.01$, 与 0 $\mu\text{g/L}$ 组比较。B 为 40 $\mu\text{g/L}$ PDGF-BB 处理 VSMC 不同时间对存活率的影响。b 为 $P < 0.01$, 与 0 h 组比较。C 为 0~80 $\mu\text{g/L}$ PDGF-BB 处理 VSMC 24 h 对 PCNA 蛋白表达的影响。

a 为 $P < 0.01$, 与 0 $\mu\text{g/L}$ 组比较。D 为 40 $\mu\text{g/L}$ PDGF-BB 处理 VSMC 不同时间对 PCNA 蛋白表达的影响。b 为 $P < 0.01$, 与 0 h 组比较。

Figure 3. Dose- and time-dependent effects of PDGF-BB on VSMC proliferation (n=3)

2.4 TFPIct32 对 VSMC 存活率和增殖的影响

单独使用 TFPIct32 处理 VSMC, 在 0 ~ 200 mg/L 范围内和 0 ~ 36 h 范围内, 对 VSMC 的存活率均未产生显著影响 (均 $P > 0.05$, 图 4A 和 4B)。而在使用 PDGF-BB 诱导基础上加入不同浓度 TFPIct32 处理 VSMC, 结果显示, 与 0 mg/L 组相比, 50 mg/L TFPIct32 处理使 VSMC 存活率降低 16.34% ($P < 0.05$, 图 4C), 同时 PCNA 的表达下降 30% ($P <$

0.01, 图 4E)。进一步在 PDGF-BB 与 50 mg/L TFPIct32 共处理 VSMC 的时间梯度实验 (0、12、24、36 h) 中, 与 0 h 组相比, 处理 24 h 后细胞存活率升高 14.70% (图 4D), PCNA 的表达降低了 8% ($P < 0.05$, 图 4F)。以上结果提示 TFPIct32 可抑制 PDGF-BB 诱导的 VSMC 增殖, 其最适处理条件为使用 50 mg/L 处理 24 h, 后续实验均按照该条件进行。

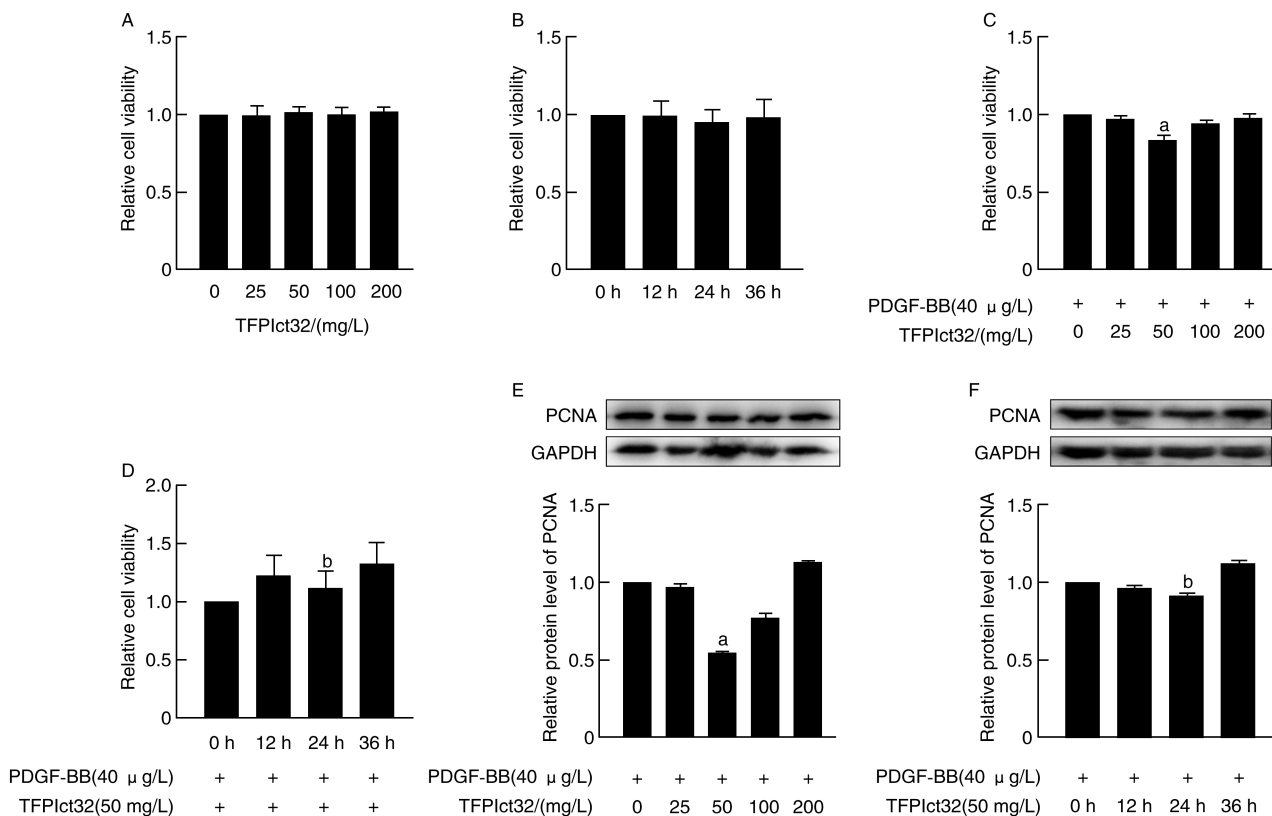


图 4. TFPIct32 抑制 PDGF-BB 诱导的 VSMC 增殖的最适剂量与时间效应 ($n=3$)

A 为 0 ~ 200 mg/L TFPIct32 处理 VSMC 24 h 对存活率的影响。B 为 50 mg/L TFPIct32 处理 VSMC 不同时间对存活率的影响。

C 为 0 ~ 200 mg/L TFPIct32 处理对 40 μg/L PDGF-BB 诱导的 VSMC 存活率的影响。a 为 $P < 0.01$, 与 0 mg/L 组比较。

D 为 50 mg/L TFPIct32 处理不同时间对 40 μg/L PDGF-BB 诱导的 VSMC 存活率的影响。b 为 $P < 0.01$, 与 0 h 组比较。

E 为 0 ~ 200 mg/L TFPIct32 处理对 PDGF-BB 诱导的 VSMC 中 PCNA 蛋白表达的影响。a 为 $P < 0.01$, 与 0 mg/L 组比较。

F 为 50 mg/L TFPIct32 处理不同时间对 PDGF-BB 诱导的 VSMC 中 PCNA 蛋白表达的影响。b 为 $P < 0.01$, 与 0 h 组比较。

Figure 4. Optimal dose and time-dependent effects of TFPIct32 on inhibiting PDGF-BB-induced proliferation in VSMC ($n=3$)

2.5 TFPIct32 抑制 PDGF-BB 诱导的 VSMC 增殖

为进一步明确 TFPIct32 对 PDGF-BB 诱导的 VSMC 增殖能力的影响, 增加了 TFPI 阴性对照肽组 (PDGF-BB+TFPI) 作为阴性对照, 使用 CCK-8 法检测各组 VSMC 的存活率。结果显示, PDGF-BB + TFPI 组与 PDGF-BB 组间细胞存活率差异无显著性; 而 PDGF-BB+TFPIct32 组细胞存活率, 与 PDGF-BB 组比较降低 23.22%, 与 PDGF-BB+TFPI 组比较

降低 24.96% ($P < 0.01$, 图 5A)。Western blot 检测 PCNA 蛋白表达显示, PDGF-BB+TFPIct32 组 PCNA 蛋白表达水平, 与 PDGF-BB 组比较降低 25.48%, 与 PDGF-BB + TFPI 组比较降低 23.82% (均 $P < 0.01$); 而 PDGF-BB+TFPI 组与 PDGF-BB 组之间 PCNA 表达差异无显著性 ($P > 0.05$, 图 5B)。以上实验结果表明, TFPIct32 能够显著抑制 PDGF-BB 诱导的 VSMC 增殖。

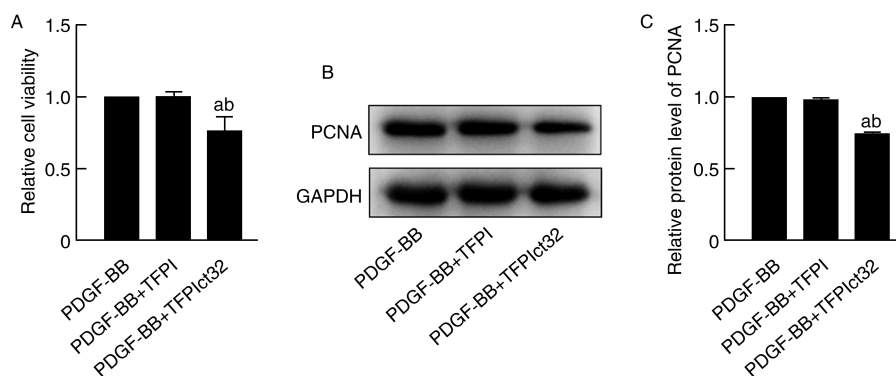


图 5. TFPIct32 抑制 PDGF-BB 诱导的 VSMC 增殖 ($n=3$)

A 为 TFPIct32 对 PDGF-BB 诱导的 VSMC 存活率的影响。B 为 Western blot 检测 PCNA 蛋白表达。

a 为 $P<0.01$, 与 PDGF-BB 组比较; b 为 $P<0.01$, 与 PDGF-BB+TFPI 组比较。

Figure 5. TFPIct32 inhibits PDGF-BB-induced proliferation of VSMC ($n=3$)

2.6 TFPIct32 抑制 PDGF-BB 诱导的 VSMC 迁移

细胞划痕实验结果显示,与 PDGF-BB 组和 PDGF-BB+TFPI 组相比,PDGF-BB+TFPIct32 组细胞迁移率分别降低 44.52% 和 45.40% (均 $P<0.01$, 图 6A)。Transwell 迁移实验进一步表明,PDGF-BB+TFPIct32 组穿过小室的细胞数量,与 PDGF-BB 组和

PDGF-BB+TFPI 组相比分别降低 73.64% 和 68.99% (均 $P<0.01$, 图 6B);与 PDGF-BB 组相比,PDGF-BB+TFPI 组的上述指标差异均无显著性 ($P>0.05$)。以上实验结果均提示 TFPIct32 能够显著抑制 PDGF-BB 诱导的 VSMC 迁移。

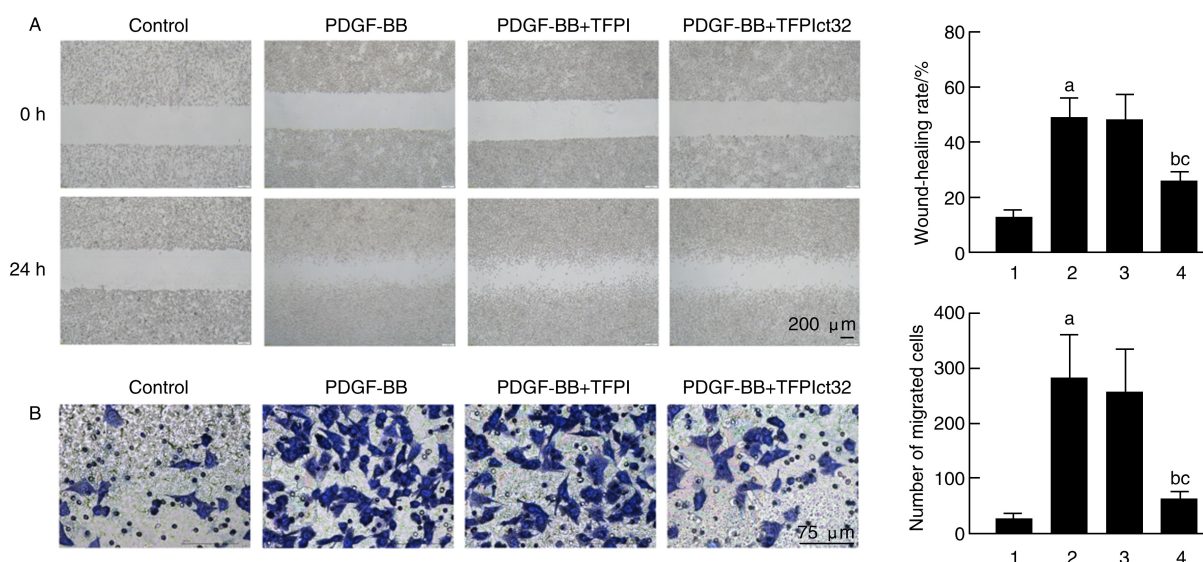


图 6. TFPIct32 抑制 PDGF-BB 诱导的 VSMC 迁移 ($n=3$)

A 为划痕实验结果及迁移率统计分析图。B 为 Transwell 实验结果及每个视野细胞数的统计分析图。

1 为对照组,2 为 PDGF-BB 组,3 为 PDGF-BB+TFPI 组,4 为 PDGF-BB+TFPIct32 组。

a 为 $P<0.01$, 与对照组比较; b 为 $P<0.01$, 与 PDGF-BB 组比较; c 为 $P<0.01$, 与 PDGF-BB+TFPI 组比较。

Figure 6. TFPIct32 inhibits PDGF-BB-induced migration of VSMC ($n=3$)

2.7 TFPIct32 抑制 PDGF-BB 诱导的 VSMC 中 PI3K/Akt 信号通路

为进一步探索 TFPIct32 抑制 VSMC 增殖与迁移的潜在机制,本研究检测了与 VSMC 表型转换密

切相关的 PI3K/Akt 信号通路活性。Western blot 结果显示,与 PDGF-BB 组相比,PDGF-BB+TFPIct32 组的 PI3K 表达下降了 18.71%,与 PDGF-BB+TFPI 组相比下降了 17.29% (均 $P<0.05$, 图 7)。同时,

PDGF-BB+TFPIct32 组的 p-Akt/Akt 比值,与 PDGF-BB 组相比降低了 32.15%,与 PDGF-BB+TFPI 组相比降低了 30.38% ($P<0.05$,图 7)。以上结果提示,TFPIct32 可能通过下调 PI3K/Akt 通路,从而抑制 PDGF-BB 诱导的 VSMC 增殖与迁移。

2.8 TFPIct32 通过抑制 PI3K/Akt 信号通路减少 PDGF-BB 诱导的 VSMC 增殖与迁移

为了进一步明确 PI3K/Akt 信号通路在 TFPIct32 抑制 PDGF-BB 诱导的 VSMC 增殖与迁移中的作用,采用 Akt 特异性激动剂 SC79 进行干预。CCK-8 检测结果显示,与 PDGF-BB 组相比,PDGF-BB+SC79 组的 VSMC 存活率升高了 13.24% ($P<$

0.01,图 8A);与 PDGF-BB + TFPIct32 组相比,PDGF-BB+TFPIct32+SC79 组 VSMC 存活率升高了 27.95% ($P<0.01$,图 8A)。划痕实验和 Transwell 实验结果显示,PDGF-BB+SC79 组的 VSMC 迁移率和迁移细胞数量,与 PDGF-BB 组比较分别上升了 50.06% ($P<0.01$) 和 25.28% ($P<0.05$,图 8B 和 8C)。此外,与 PDGF-BB+TFPIct32 组相比,PDGF-BB+TFPIct32+SC79 组 VSMC 的迁移率和迁移细胞数量分别增加了 24.55% ($P<0.05$) 和 33.89% ($P<0.01$,8B 和 8C)。以上结果表明,TFPIct32 通过抑制 PI3K/Akt 通路阻止 PDGF-BB 诱导的 VSMC 增殖与迁移。

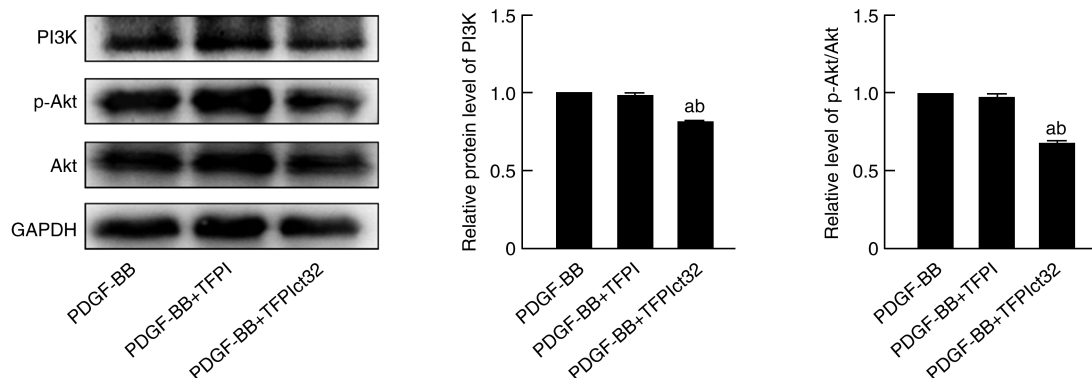


图 7. TFPIct32 抑制 PDGF-BB 诱导的 VSMC 中 PI3K/Akt 信号通路 ($n=3$)

a 为 $P<0.01$,与 PDGF-BB 组比较;b 为 $P<0.01$,与 PDGF-BB+TFPI 组比较。

Figure 7. TFPIct32 inhibits the PI3K/Akt signaling pathway in VSMC induced by PDGF-BB ($n=3$)

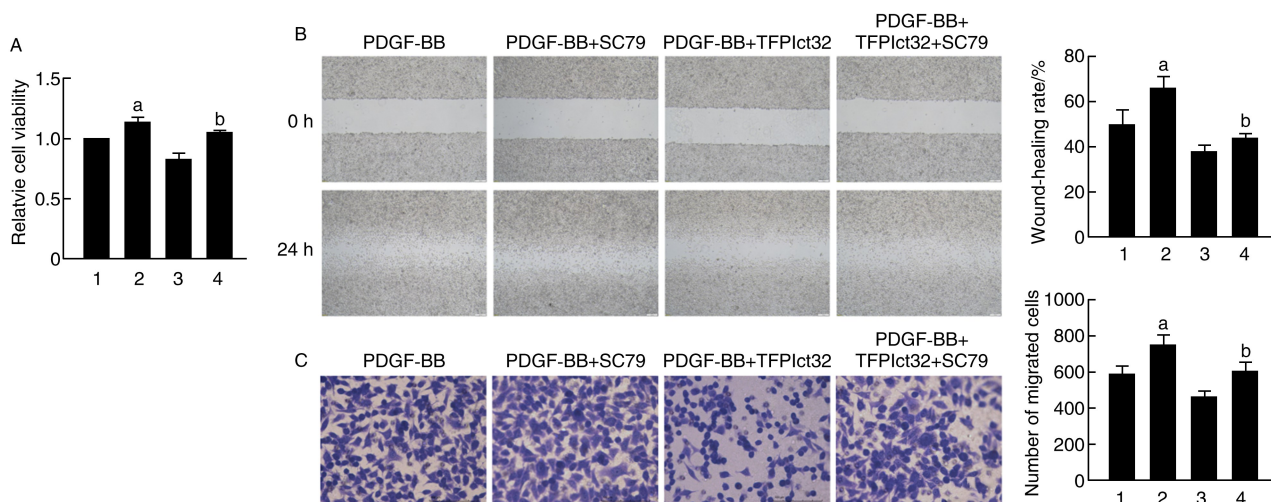


图 8. TFPIct32 通过下调 Akt 表达抑制 PDGF-BB 诱导的 VSMC 增殖与迁移 ($n=3$)

A 为加入 SC79 对 VSMC 存活率的影响。B 为划痕实验结果及迁移率统计分析图。C 为 Transwell 实验结果及每个视野细胞数的统计分析图。1 为 PDGF-BB 组,2 为 PDGF-BB+SC79 组,3 为 PDGF-BB+TFPIct32 组,4 为 PDGF-BB+TFPIct32+SC79 组。

a 为 $P<0.01$,与 PDGF-BB 组比较;b 为 $P<0.01$,与 PDGF-BB+TFPIct32 组比较。

Figure 8. Inhibition of PDGF-BB-induced VSMC proliferation and migration by TFPIct32 via reduction of Akt expression ($n=3$)

3 讨 论

As 是心脑血管疾病的主要病理基础,涉及单核巨噬细胞浸润、炎症反应、血栓形成、脂质沉积及血管重塑等多项病理过程^[21-22],已成为人类健康的头号“杀手”。而 VSMC 异常增殖与迁移是驱动血管重塑、促进 As 斑块形成和进展的关键因素^[23],同样也是导致经皮冠状动脉介入治疗后再狭窄以及血管旁路移植术失败的核心原因^[24]。因此,深入探究调控 VSMC 增殖、迁移的关键分子并阐明其作用机制,对 As 的靶向防治具有重要理论与临床意义。VSMC 位于血管壁中膜,生理状态下以收缩型为主,负责维持血管张力及血管壁稳定性;当受到 PDGF-BB、炎症因子等外部刺激时,VSMC 由收缩型转变为合成型,并伴随增殖与迁移能力增强^[25],从血管中膜迁移至内膜后异常增殖,从而加速血管狭窄与 As 进展^[26-27]。TFPI 是一类含 Kunitz 型结构域的抗凝血丝氨酸蛋白酶抑制剂,也是组织因子介导的外源性凝血途径唯一的生理性抑制因子,包含 TFPI α 和 TFPI β 两个亚型,二者均含有三个串联的 Kunitz 区域^[28],其中 TFPI α 的羧基末端因具备独特生物学功能而成为近年来的研究热点^[15]。已有研究证实,TFPI 可通过抑制脂质代谢、降低内皮细胞活性、减轻巨噬细胞凋亡、阻断线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 活性及 VSMC 增殖、迁移等多环节延缓 As 发生发展^[14,29-30],说明 TFPI 具备成为 As 防治新靶点的潜力,但其临床应用仍受出血风险等潜在不良反应的限制^[31]。

本研究聚焦于 TFPI 羧基末端 32 个氨基酸残基的小分子多肽 TFPIct32,发现经尾静脉注射后对小鼠凝血功能无明显影响 (BT、D-D 和 TAT 检测差异无显著变化),提示该段多肽没有明显凝血功能相关的不良反应,具备一定的应用安全性。同时 TFPIct32 可显著降低小鼠血清 LDLC 水平,减少主动脉窦及主动脉斑块面积,抑制斑块内脂质蓄积,显著延缓 ApoE^{-/-} 小鼠 As 病变进展。体外实验结果显示,TFPIct32 可显著抑制 PDGF-BB 诱导的 VSMC 增殖和迁移,该效应通过抑制 PI3K/Akt 通路活性实现。后者是调控 VSMC 增殖与迁移的经典通路,其异常激活在 As 及血管再狭窄的病理过程中发挥重要作用^[32]。已有研究证实京尼平苷通过抑制聚 (ADP-核糖) 聚合酶 1 [poly (ADP-ribose) polymerase 1, PARP1] /PI3K/Akt 信号通路恢复 VSMC 脂噬从而延缓 As 进展^[18];在晚期 As 中,P2Y 嘌呤能受体 12 (P2Y purinergic receptor 12) 可通过 PI3K/Akt 信

号通路阻断胆固醇外排促进 VSMC 源性泡沫细胞的形成^[17]。本研究结果与上述报道相互印证,充分佐证了 PI3K/Akt 通路在 VSMC 功能调控及 As 进展中的核心作用^[33],也进一步揭示了 TFPIct32 通过抑制该信号通路发挥抗 As 作用的潜在机制,为 As 病变进展的干预提供了新的实验依据和策略。

[参考文献]

- [1] ROTH G A, JOHNSON C, ABAJOBIR A, et al. Global, regional, and national burden of cardiovascular diseases for 10 causes, 1990 to 2015[J]. J Am Coll Cardiol, 2017, 70 (1): 1-25.
- [2] PAGIDIPATI N J, GAZIANO T A. Estimating deaths from cardiovascular disease: a review of global methodologies of mortality measurement [J]. Circulation, 2013, 127 (6): 749-756.
- [3] 齐炳才, 靳琦文, 胡杰, 等. 颈动脉粥样硬化斑块内新生血管的研究现状及进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2021, 29(4): 359-362, 368.
QI B C, JIN Q W, HU J, et al. Research status and progress of carotid atherosclerotic intraplaque neovascularization [J]. Chin J Arterioscler, 2021, 29(4): 359-362, 368.
- [4] MIANO J M, FISHER E A, MAJESKY M W. Fate and state of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis[J]. Circulation, 2021, 143(21): 2110-2116.
- [5] 徐倩, 姜志胜. 动脉粥样硬化机制研究的新认识[J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(11): 921-931.
XU Q, JIANG Z S. New insights into the mechanisms of atherosclerosis[J]. Chin J Arterioscler, 2024, 32 (11): 921-931.
- [6] AHERRAHOU R, GUO L, NAGRAJ V P, et al. Genetic regulation of atherosclerosis-relevant phenotypes in human vascular smooth muscle cells [J]. Circ Res, 2020, 127 (12): 1552-1565.
- [7] 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.
SHU L F. Phenotypic transformation of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis [J]. Chin J Arterioscler, 2018, 26(1): 99-102.
- [8] CHAKRABORTY A, LI Y, ZHANG C, et al. Epigenetic induction of smooth muscle cell phenotypic alterations in aortic aneurysms and dissections [J]. Circulation, 2023, 148(12): 959-977.
- [9] ZHANG H, LIU J, SUN D, et al. RBM24 regulates phenotypic switching of smooth muscle cell in vascular remodeling by stabilizing JAK2 mRNA [J]. Cardiovasc Res, 2025, 121(17): 2791-2808.

- [10] BASATEMUR G L, JØRGENSEN H F, CLARKE M C H, et al. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2019, 16(12): 727-744.
- [11] HESS D A, VERMA S, BHATT D, et al. Vascular repair and regeneration in cardiometabolic diseases [J]. *Eur Heart J*, 2022, 43(6): 450-459.
- [12] WINCKERS K, TEN CATE H, HACKENG T M. The role of tissue factor pathway inhibitor in atherosclerosis and arterial thrombosis [J]. *Blood Rev*, 2013, 27(3): 119-132.
- [13] WESTRICK R J, BODARY P F, XU Z, et al. Deficiency of tissue factor pathway inhibitor promotes atherosclerosis and thrombosis in mice [J]. *Circulation*, 2001, 103(25): 3044-3046.
- [14] PAN S, WHITE T A, WITT T A, et al. Vascular-directed tissue factor pathway inhibitor overexpression regulates plasma cholesterol and reduces atherosclerotic plaque development [J]. *Circ Res*, 2009, 105(7): 713-720.
- [15] AHNSTRÖM J, PETRI A, CRAWLEY J T B. Tissue factor pathway inhibitor-cofactor-dependent regulation of the initiation of coagulation [J]. *Curr Opin Hematol*, 2024, 31(6): 315-320.
- [16] PI S, MAO L, CHEN J, et al. The P2RY12 receptor promotes VSMC-derived foam cell formation by inhibiting autophagy in advanced atherosclerosis [J]. *Autophagy*, 2021, 17(4): 980-1000.
- [17] HOLROYD E W, DELACROIX S, LARSEN K, et al. Tissue factor pathway inhibitor blocks angiogenesis via its carboxyl terminus [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(3): 704-711.
- [18] LIN J, WANG X, GU M, et al. Geniposide ameliorates atherosclerosis by restoring lipophagy via suppressing PARP1/PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2024, 129: 155617.
- [19] LI M, HU X, HU X, et al. Inhibition of PHB1/PHB2 suppresses atherosclerotic plaque formation by interrupting PI3K/AKT/mTOR signaling [J]. *PLoS One*, 2025, 20(4): e0320509.
- [20] ZHOU Z X, MA X F, XIONG W H, et al. TRIM65 promotes vascular smooth muscle cell phenotypic transformation by activating PI3K/Akt/mTOR signaling during atherogenesis [J]. *Atherosclerosis*, 2024, 390: 117430.
- [21] KONG P, CUI Z Y, HUANG X F, et al. Inflammation and atherosclerosis: signaling pathways and therapeutic intervention [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 131.
- [22] BERGER M, LUTZ D R J, LUTZ J, et al. Alterations in platelet alpha-granule secretion and adhesion on collagen under flow in mice lacking the atypical Rho GTPase RhoBTB3 [J]. *Cells*, 2019, 8(2): 149.
- [23] ZHANG F, GUO X, XIA Y, et al. An update on the phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 79(1): 6.
- [24] INOUE T, NODE K. Molecular basis of restenosis and novel issues of drug-eluting stents [J]. *Circ J*, 2009, 73(4): 615-621.
- [25] LIN Z, WANG C, WEN Z, et al. NEXN regulates vascular smooth muscle cell phenotypic switching and neointimal hyperplasia [J]. *JCI Insight*, 2025, 10(13): e190089.
- [26] ZHAI M, LEI Z, SHI Y, et al. TEAD1-mediated trans-differentiation of vascular smooth muscle cells into fibroblast-like cells contributes to the stabilization and repair of disrupted atherosclerotic plaques [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2025, 12(5): e2407408.
- [27] AZAR P, JARR K U, GOMEZ D, et al. Smooth muscle cells in atherosclerosis: essential but overlooked translational perspectives [J]. *Eur Heart J*, 2025, 46(45): 4862-4875.
- [28] MÜLLER-CALLEJA N, HOLLERBACH A, RITTER S, et al. Tissue factor pathway inhibitor primes monocytes for antiphospholipid antibody-induced thrombosis [J]. *Blood*, 2019, 134(14): 1119-1131.
- [29] CHEN D, XIA M, HAYFORD C, et al. Expression of human tissue factor pathway inhibitor on vascular smooth muscle cells inhibits secretion of macrophage migration inhibitory factor and attenuates atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice [J]. *Circulation*, 2015, 131(15): 1350-1360.
- [30] WITTIG J, DREKOLIA M K, KYSELOVA A, et al. Endothelial-dependent S-sulphydration of tissue factor pathway inhibitor regulates blood coagulation [J]. *Redox Biol*, 2023, 62: 102694.
- [31] ABRAHAM E, REINHART K, OPAL S, et al. Efficacy and safety of tifacogin (recombinant tissue factor pathway inhibitor) in severe sepsis: a randomized controlled trial [J]. *JAMA*, 2003, 290(2): 238-247.
- [32] LI Q, FU J, PARK K, et al. Insulin receptors in vascular smooth muscle cells regulate plaque stability of atherosclerosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2024, 120(16): 2017-2030.
- [33] ZHANG Y, HAN L, WANG Y, et al. The role of the PI3K/Akt/mTOR pathway in atherosclerosis: mechanisms, therapeutic potential, and emerging targeted treatments [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2025, 27(1): 115.

(此文编辑 许雪梅)