

槲皮素拮抗内皮素 1 对血管平滑肌细胞 L 型钙通道的抑制

周晓^{1,2}, 司艳红¹, 桑慧¹, 李卫红¹, 王家富¹, 商战平¹

(1. 泰山医学院病理生理学教研室, 山东省泰安市 271000; 2. 山东医学高等专科学校病理学教研室, 山东省临沂市 276002)

[关键词] 槲皮素; L 型钙通道; 血管平滑肌细胞; 内皮素 1

[摘要] **目的** 观察内皮素 1(ET-1)作用下人脐动脉平滑肌细胞 L 型钙通道(LCC)的变化,以及槲皮素(Que)对这种变化的影响。**方法** 原代培养第三代的人脐动脉平滑肌细胞随机分组:①空白对照组:只加入培养液;②槲皮素组:80 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素培养 24 h;③模型组:10 nmol/L ET-1 培养 24 h;④ET-1 + U0126(ERK 抑制剂)组:10 $\mu\text{mol/L}$ U0126 预处理 1 h,再加入 10 nmol/L ET-1 共培养 24 h;⑤不同剂量槲皮素预处理组:分别用 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素预处理 1 h,再加入 10 nmol/L ET-1 共培养 24 h;⑥ET-1 + Que + U0126 组:10 $\mu\text{mol/L}$ U0126 和 80 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素共同预处理 1 h,再加入 10 nmol/L ET-1 共培养 24 h;⑦ET-1 + 硝苯地平组:LCC 通道阻滞剂硝苯地平 10 $\mu\text{mol/L}$ 预处理 1 h,再加入 10 nmol/L ET-1 共培养 24 h。选择 LCC 的主要亚基 α_{1C} 为基因表达的观察指标,选择 LCC 电流(ICaL)为 LCC 功能的观察指标,分别检测各组细胞的 α_{1C} 表达量和 ICaL。**结果** 模型组 α_{1C} 的表达和 ICaL 密度均低于其他各组($P < 0.05$),空白对照组与槲皮素组的实验结果差异无显著性。**结论** ET-1 通过 ERK 通道抑制血管平滑肌细胞 L 型钙通道的基因表达和功能,槲皮素对 ET-1 有剂量依赖性的拮抗作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Quercetin Inhibits Endothelin-1-induced L-type Calcium Channel Down-Regulation in Human Umbilical Arterial Smooth Muscle Cells

ZHOU Xiao^{1,2}, SI Yan-Hong¹, SANG Hui¹, LI Wei-Hong¹, WANG Jia-Fu¹, and SHANG Zhan-Ping¹

(1. Department of Pathophysiology, Taishan Medical College, Taian, Shandong 271000; 2. Department of Pathology, Shandong Medical College, Linyi, Shandong 276002, China)

[KEY WORDS] Quercetin; L-type Calcium Channel; Vascular Smooth Muscle Cells; Endothelin-1

[ABSTRACT] **Aim** To examine whether L-type calcium channel (LCC) of human umbilical arterial smooth muscle cells (HUASMC) was influenced by endothelin-1 (ET-1), and whether the possible influence was interfered with by quercetin which has been shown to provide protection against cardiovascular diseases. **Methods** Primary HUASMC at the third passage culture were identified by immunocytochemistry and randomly divided into following groups:①control group: cultured only with vehicle for 24 h. ②Quercetin alone group: cultured with 80 $\mu\text{mol/L}$ quercetin for 24 h. ③Model group: cultured with 10 nmol/L ET-1 for 24 h. ④U0126 plus ET-1 group: pretreated with 10 $\mu\text{mol/L}$ U0126 for 1 h, then coincubated with 10 nmol/L ET-1 for 24 h. ⑤Quercetin pretreatment group: pretreated with quercetin in concentrations of 20 $\mu\text{mol/L}$, 40 $\mu\text{mol/L}$ and 80 $\mu\text{mol/L}$ respectively for 1 h, then coincubated with 10 nmol/L ET-1 for another 24 h. ⑥ET-1 + Que + U0126 group: pretreated with 80 $\mu\text{mol/L}$ quercetin and 10 $\mu\text{mol/L}$ U0126 together for 1 h, then coincubated with 10 nmol/L ET-1 for 24 h. ⑦ET-1 + nifedipine group: pretreated with 10 $\mu\text{mol/L}$ nifedipine for 1 h, then coincubated with 10 nmol/L ET-1 for 24 h. Expression of α_{1C} , a LCC major subunit, was assayed by RT-PCR and Western blot analysis. The LCC currents(ICaL) were detected by technique of whole-cell patch-clamp. **Results** α_{1C} expression, in both mRNA and protein level, as well as ICaL density of model group were significantly down-regulated compared with that of control group or quercetin alone group($P < 0.05$), and the repressing effect of ET-1 on LCC was partly reversed by pretreating with U0126 or quercetin($P < 0.05$). No significant difference between control group and quercetin alone group was detected. **Conclusion** Downregulation of α_{1C} expression and ICaL density in HUASMC by ET-1

[收稿日期] 2013-08-04

[基金项目] 泰山医学院课题(2001086)

[作者简介] 周晓, 硕士, 讲师, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制, E-mail 为 zhouxiaoxing200@163.com。司艳红, 硕士, 研究方向为血脂代谢。通讯作者商战平, 硕士, 教授, 研究方向为心脑血管疾病, E-mail 为 zhpsang@tsmc.edu.cn。

partly via ERK pathway was antagonized by quercetin, which could be an important mechanism contributing to the protective effect of quercetin on cardiovascular system.

以往的研究表明,内皮素 1 (ET-1) 促进血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) 的迁移和增殖,是心血管疾病的危险因子,而槲皮素则保护心血管系统,具有拮抗 ET-1 所致损伤的作用^[1,2]。L 型钙通道属于电压依赖型钙通道 (voltage-dependent calcium channel, VDCC) 之一,具有大电压激活的特性,对 VSMC 的分化和稳定有重要作用^[3]。ET-1 和槲皮素对心血管系统的作用是否涉及 LCC 及其可能的机制尚未见相关报道,本文通过观察 VSMC 在 ET-1、槲皮素和 U0126 作用下 LCC 表达和功能的变化,探讨 ET-1 和槲皮素对心血管损伤或保护的作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

ET-1、U0126、槲皮素、硝苯地平、DMSO 和胰蛋白酶均购于 Sigma-Aldrich 公司;DMEM 培养液、胎牛血清购于美国 Gibco 公司;anti- α -SMA、anti- α _{1c} 和 anti-actin 抗体购于 BioLegend 公司;TritonX-100 和过氧化物酶标记的抗 anti- α _{1c} 抗体购于北京博奥森生物技术有限公司;总 RNA 抽提 Trizol Reagent 购于美国 Invitrogen 公司;反转录试剂盒购于美国 Promega 公司;Taq DNA 聚合酶等 PCR 反应系统购于大连 TaKaRa 公司;ECL solution、BSA 购于上海 Roche 公司;配胶试剂均购自上海 BIOASIA 公司。

1.2 血管平滑肌细胞的培养和鉴定

取自泰安市中心医院的新鲜脐带,在无菌条件下分离脐动脉,去除周围的脂肪和结缔组织。在解剖显微镜下沿长轴剖开动脉,刀片刮除内膜,眼科镊去除外膜,剩余的动脉壁用眼科剪剪成约 3 mm 宽的小组织块。将组织块置于 6 孔培养皿,每孔加入 1 mL DMEM 培养液,内含 10% 胎牛血清,2000 U/L 青霉素,2000 U/L 链霉素,放入 37℃、5% CO₂ 培养箱内培养。3~5 天后,于倒置相差显微镜下可见细胞长出。去除组织块,2~3 天更换一次培养液,直至细胞融合。用 0.05% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 悬浮分散细胞,离心后以 1:5 的比例接种到新培养瓶中。培养的 VSMC 以免疫组织化学 SP 法进行鉴定。细胞在经 Poly-L-Lysine 防脱处理的载玻片上贴片生长至约 70% 融合后,4% 多聚甲醛室温下固定 30 min,封闭后滴加 1:700 稀释的 anti- α -

SMA,4℃ 下过夜,冲洗后滴加生物素化的 II 抗,25℃ 下 20 min,最后按说明书进行 DAB 显色并观察结果。

1.3 血管平滑肌细胞的分组

原代培养第 3 代的 VSMC 经无血清培养 24 h 后充分混合,随机分成 7 组。①空白对照组:只加入培养液;②槲皮素组:80 μ mol/L 槲皮素培养 24 h;③模型组:10 nmol/L ET-1 培养 24 h;④ ET-1 + U0126 组:10 μ mol/L ERK 抑制剂 U0126 预处理 1 h,再加入 10 nmol/L ET-1 共培养 24 h;⑤不同剂量槲皮素预处理组:分别用 20 (低剂量)、40 (中剂量)、80 μ mol/L (高剂量)槲皮素预处理 1 h,再加入 10 nmol/L ET-1 共培养 24 h;⑥ ET-1 + Que + U0126 组:10 μ mol/L U0126 和 80 μ mol/L 槲皮素共同预处理 1 h,再加入 10 nmol/L ET-1 共培养 24 h;⑦ ET-1 + 硝苯地平组:LCC 通道阻滞剂硝苯地平 10 μ mol/L 预处理 1 h,再加入 10 nmol/L ET-1 共培养 24 h。各组细胞培养基的血清浓度均为 5%。

1.4 RT-PCR 检测 α _{1c} 的 mRNA 表达

按照 Trizol Reagent 说明书提取细胞总 RNA,紫外分光光度计 (英国 Biochrom 公司) 测定 A₂₆₀/A₂₈₀ 值,检测 RNA 纯度,计算 RNA 含量。从总 RNA 中取 3 μ g 作为合成 cDNA 的模板,具体步骤按照反转录试剂盒说明书进行。从合成的 cDNA 中取 2.5% 作为管家基因 GAPDH 的 PCR 模板。各基因的 PCR 引物如下: α _{1c} 上游 5'-ACAAGAACCAGCGA-CAGTG-3',下游 5'-GGGTTTGAAGGCAATGAGC-3',产物 278 bp;GAPDH 上游 5'-TGCACCACCAACT-GCTTAGC-3',下游 5'-GGCATGGACTGTGGTCAT-GAG-3',产物 86 bp。PCR 反应在美国 Bio Rad 公司的 Model No. iCycler™ 梯度 PCR 系统中进行,具体过程如下: α _{1c}:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 45 s,共 40 个循环,72℃ 再延伸 5 min。GAPDH:94℃ 预变性 4 min,94℃ 变性 30 s,60℃ 退火 30 s,共 30 个循环,72℃ 再延伸 4 min。GEL DOC 2000 凝胶成像分析系统 (美国 Bio Rad 公司) 检测各条带的灰度值,以 α _{1c}/GAPDH 作为 mRNA 的相对表达量。

1.5 Western blot 检测 α _{1c} 的蛋白表达

倒掉细胞培养液,PBS 冲洗细胞,加入裂解液于冰上裂解 30 min。收集裂解液和细胞碎片,4℃ 下 12000 r/min 离心 5 min,取上清,利用生物分光光度

计 (Bio-Photometer, Eppentoff) 测定蛋白浓度。配制 10% 的分离胶和 4% 的浓缩胶, SDS-PAGE 电泳每孔上样量 50 μg (上样前样品煮沸 5 min), 电压 60 V, 电泳至溴酚蓝跑出即终止电泳。把 PVDF 膜、分离胶、滤纸和海绵垫固定后放入湿电转膜仪, 电压 100 mV, 80 min。PVDF 膜于封闭液中浸泡 1 h 后分别加入 anti- α_{1C} 和 anti- β -actin (1:1000), 室温下孵育 1 h, 冲洗后加入辣根过氧化物酶标记的 II 抗, 室温下孵育 1 h。暗室中加入 ECL solution, 曝光 X 胶片 5 ~ 10 min, 经显影定影后, 冲洗凉干。以 α_{1C}/β -actin 作为蛋白的相对表达量。

1.6 L 型钙通道电流的测定

玻璃毛细管经拉制火烤, 充满电极内液后制成电阻为 2 ~ 5 M Ω 的记录电极。室温 (22 ~ 24 $^{\circ}\text{C}$) 下钳制 VSMC 胞膜, 封接电阻 ≥ 500 M Ω 。细胞溶液的钙浓度为 5 mmol/L, 分别以 30 mmol/L 的 TEA 和 Cs⁺ 阻断电极内液和细胞溶液的 K⁺ 电流。应用 HEKA EPC-9 膜片钳放大器, 在全细胞模式下, 从钳制 -50 mV 电位给予电压 10 mV 时程 250 ms 的单刺激, 电流振幅稳定后开始采集数据。电流信号给予 70% ~ 80% 补偿, 并以 300 $\mu\text{mol/L}$ 的 Cd²⁺ 完全阻断钙电流作为对照进行校正, 于 1 kHz 下过滤, 3 kHz 下转化成数字化模式并储存。将 ICaL 峰值 (pA) 除以细胞的膜电容 (pF), 得到各组细胞的电流密度 (pA/pF) 并作统计分析。

1.7 统计学处理

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 运用 SPSS13.0 统计软件进行数据处理, 采用 Student-Newman-Keuls 检验对各组均数进行多重比较。选取 $\alpha = 0.05$ 作为显著性的检验水准。

2 结果

2.1 血管平滑肌细胞的培养和鉴定

倒置相差显微镜下观察, VSMC 贴壁生长, 胞体呈梭形、多边形, 胞浆均质, 胞核呈椭圆形、杆状。部分区域细胞密度较大, 重叠生长达多层, 与密度较小的区域相间隔, 呈“峰-谷”样分布。 α -SMA 免疫细胞化学结果显示, VSMC 胞浆中有棕黄色颗粒, 呈线性分布, 阳性率约为 95% (图 1)。

2.2 α_{1C} 的 mRNA 和蛋白表达水平

α_{1C} mRNA 和蛋白的表达在空白对照组和槲皮素组最强, ET-1 + Que + U0126 组和高剂量槲皮素预处理组次之, 模型组最弱, 并且槲皮素预处理组的表达量随槲皮素的浓度 (20、40、80 $\mu\text{mol/L}$) 增加而增强。

空白对照组与槲皮素组间、ET-1 + U0126 组与中剂量槲皮素预处理组间 α_{1C} mRNA 和蛋白的表达量差异均无显著性 ($P > 0.05$)。模型组、槲皮素预处理组和空白对照组 α_{1C} mRNA 和蛋白的表达量依次递增 ($P < 0.05$), 提示 ET-1 诱导 HUASMC 降低 α_{1C} mRNA 和蛋白的表达, 槲皮素则对这种抑制有剂量依赖性的逆转作用。ET-1 + U0126 组与模型组 α_{1C} mRNA 和蛋白的表达量差异也有显著性 ($P < 0.05$), 表明 ERK 抑制剂 U0126 可部分逆转 ET-1 诱导的抑制作用, 提示 ET-1 可能通过激活 ERK 途径抑制 α_{1C} mRNA 和蛋白的表达。ET-1 + Que + U0126 组与高剂量槲皮素预处理组比较差异无显著性 ($P > 0.05$), ET-1 + 硝苯地平组与模型组比较差异有显著性 ($P < 0.05$), 提示 U0126 对槲皮素拮抗 ET-1 没有协同作用, LCC 通道阻滞剂硝苯地平则可以拮抗 ET-1 抑制 α_{1C} mRNA 和蛋白表达的作用 (图 2 和表 1)。

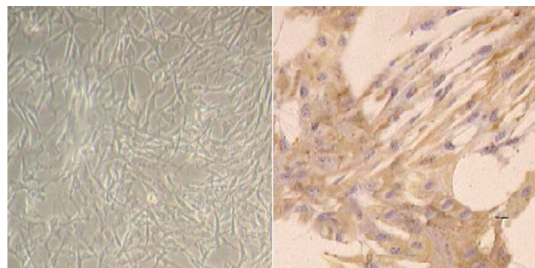


图 1. 原代培养的 VSMC (×50, 左图) 及免疫细胞化学染色结果 (×100, 右图)

Figure 1. Phase contrast microscopic appearance and α -SMA staining of primary cultured VSMC

表 1. 槲皮素对 α_{1C} mRNA 和蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)
Table 1. Effect of quercetin on the expression of α_{1C} mRNA and protein ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

分 组	α_{1C} mRNA	α_{1C} 蛋白
空白对照组	0.81 ± 0.06	0.77 ± 0.02
槲皮素组	0.84 ± 0.05 ^{bc}	0.80 ± 0.03 ^{bc}
模型组	0.21 ± 0.04 ^a	0.17 ± 0.02 ^a
ET-1 + U0126 组	0.59 ± 0.05 ^{ab}	0.38 ± 0.04 ^{ab}
低剂量槲皮素预处理组	0.39 ± 0.03 ^{ab}	0.25 ± 0.01 ^{ab}
中剂量槲皮素预处理组	0.60 ± 0.05 ^{abc}	0.40 ± 0.04 ^{abc}
高剂量槲皮素预处理组	0.72 ± 0.02 ^{abcd}	0.57 ± 0.03 ^{abcd}
ET-1 + Que + U0126 组	0.76 ± 0.05 ^{abcd}	0.61 ± 0.05 ^{abcd}
ET-1 + 硝苯地平组	0.58 ± 0.04 ^{abc}	0.45 ± 0.04 ^{abc}

a 为 $P < 0.05$, 与空白对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与模型组比较; c 为 $P < 0.05$, 与低剂量槲皮素预处理组比较; d 为 $P < 0.05$, 与中剂量槲皮素预处理组比较。

2.3 电生理实验

记录钳制电压 -50 mV 下 10 mV、250 ms 单刺

激的电流,经计算得到各组的电流密度值。除空白对照组和槲皮素组间差异无显著性($P > 0.05$)外,其余各组差异均有显著性($P < 0.05$),提示 ET-1 可减弱 HUASMC 中 LCC 的最大电流密度,槲皮素则对这种减弱有抑制作用,ERK 信号途径可能是 ET-1 影响 ICaL 的机制之一(图 3 和表 2)。

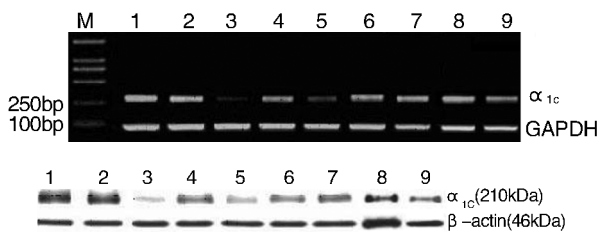


图 2. VSMC α_{1C} mRNA (上图) 和蛋白 (下图) 的表达 1 为空白对照组,2 为槲皮素组,3 为模型组,4 为 ET-1 + U0126 组,5 为低剂量槲皮素预处理组,6 为中剂量槲皮素预处理组,7 为高剂量槲皮素预处理组,8 为 ET-1 + Que + U0126 组,9 为 ET-1 + 硝苯地平组。

Figure 2. α_{1C} mRNA and protein expression of cultured HUASMC

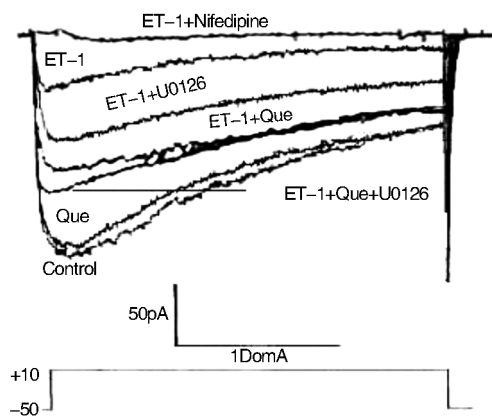


图 3. VSMC 的 L 型钙通道全细胞电流记录
Figure 3. Effect of Que, U0126 and nifedipine on ICaL of cultured HUASMC exposed to ET-1

表 2. 内皮素和槲皮素对 L 型钙通道电流的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Table 2. Effect of ET-1 and quercetin on the expression of Ca^{2+} current of L-type channel ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

分组	ICaL(pA/ Pf)
空白对照组	0.42 ± 0.03
槲皮素组	0.40 ± 0.03
模型组	0.11 ± 0.02 ^a
ET-1 + U0126 组	0.21 ± 0.04 ^{ab}
高剂量槲皮素预处理组	0.31 ± 0.03 ^{ab}
ET-1 + Que + U0126 组	0.33 ± 0.05 ^{ab}
ET-1 + 硝苯地平组	0.02 ± 0.00 ^{abc}

a 为 $P < 0.05$, 与空白对照组和槲皮素组比较; b 为 $P < 0.05$, 与模型组比较; c 为 $P < 0.05$, 与高剂量槲皮素预处理组比较。

3 讨论

在正常成人的动脉中, VSMC 主要起收缩和舒张以调节血流的作用, 这种作用与 VSMC 细胞膜上钙离子通道, 尤其是 LCC 密切相关。LCC 由多个亚基组成, 其中 α_{1C} 是 LCC 在结构和功能上的主要亚基。LCC 在正常的 VSMC 中高表达, 细胞膜的去极化导致 LCC 开放, 一方面, 通过 LCC 内流的钙离子和肌钙蛋白结合引起 VSMC 收缩, 另一方面, 这些钙离子促进收缩相关蛋白 (如 SM α -actin、SM-MHC、myocardin 等) 的表达^[4], 对保持 VSMC 的分化状态发挥重要的作用^[3]。

动脉的损伤可使 ET-1 等内源性因子分泌增多, 促使 VSMC 活化, 从而使 VSMC 中与收缩功能相关的基因表达下降, 而与迁移分泌功能相关的基因表达增强。活化的 VSMC 穿过动脉内弹力膜的窗孔迁移到内膜, 同时增生、分泌细胞因子以及合成细胞外基质的能力增强, 对促进各种动脉损伤, 尤其是动脉粥样硬化的发展有重要的作用^[5]。

以往的研究发现, 在心血管疾病中, VSMC 中 LCC 的表达发生改变, 而且这种改变呈现出多样性。如在自发性高血压大鼠的 VSMC 中 LCC 的表达增强^[6]; 在高胆固醇诱发的动脉粥样硬化中 LCC 表达无显著变化, 但 ICaL 降低^[7]; 还有学者发现动脉粥样硬化斑块中 LCC 表达下降, 同时伴有 α_{1C} 亚基外显子的变异^[8]。

ET-1 是一种重要的心血管激素, 有促进 VSMC 的增殖和活化的作用。本实验以 ET-1 作用于原代培养的 HUASMC, 观察了 α_{1C} 的表达和 ICaL 的变化。结果显示, ET-1 抑制了 α_{1C} 在 mRNA 和蛋白水平的表达, 并相应减弱了 ICaL。这一结果与 Tiwari 等^[8]的观察相似, 但本实验没有进一步观察变异 mRNA 或蛋白的表达。以往的研究发现, ET-1 通过激活 MAPK 等信号途径促进 VSMC 的活化增殖^[9], 本实验利用 ERK 阻滞剂 U0126, 观察了 ET-1 对 VSMC 中 LCC 的抑制与 MAPK 信号途径的相关性。结果显示, U0126 部分抑制了 ET-1 诱导下 LCC 表达和 ICaL 的下调, 提示被 ET-1 活化的 ERK 在增强活化相关基因转录的同时, 抑制了收缩相关基因 (包括 α_{1C}) 的表达和相关的功能, 从而促使 VSMC 转化。

槲皮素作为一种天然类黄酮, 广泛存在于蜂胶、红酒、水果等食品中, 具有抗氧化、抗炎、抗动脉粥样硬化、降血压、降血脂等多种心血管保护作用。

另外, Ishizawa 等^[2] 人的研究证实槲皮素可抑制 PDGF 诱导的小鼠主动脉 SMC 的迁移和活化。为了进一步探讨槲皮素抗心血管疾病的机制, 本实验观察了槲皮素对 ET-1 诱导下 LCC 表达和 ICaL 的影响。结果显示, 槲皮素抑制了 ET-1 诱导下 LCC 表达和 ICaL 的下调, 而且这种抑制呈现出剂量依赖性。因为与 ERK 阻滞剂 U0126 的作用相似, 而且 Ishizawa 的研究提示槲皮素通过抑制 MAPK 信号途径发挥抗增殖的作用, 所以槲皮素可能也是部分地通过抑制 ERK 的活化从而增强 LCC 的表达和 I-CaL。由于槲皮素对细胞的作用比较复杂, 其他可能的途径需要进一步探讨。

本研究结果显示 ET-1 对 HUASMC 中的 α_{1C} 表现出在转录水平的抑制, 并相应地引起蛋白表达和 LCC 功能的抑制。目前 LCC 通道阻滞剂如硝苯地平在临床上广为应用, 主要治疗高血压、动脉粥样硬化等心血管疾病。对于 LCC 表达增强或正常的 SMC, 硝苯地平当然能发挥其 LCC 阻滞剂的作用, 但对于已经发生活化增殖的 SMC, 由于 LCC 的表达降低, LCC 阻滞剂的作用可能就会受到限制。Lüscher 等^[10] 人在对 454 名冠状动脉疾病患者进行降血脂治疗的同时, 一组连续 10~24 个月服用硝苯地平 30~60 mg/d, 另一组则服用安慰剂, 结果显示, 尽管 LCC 阻滞剂表现出明显的降血压、降血脂的作用, 但两组患者冠状动脉粥样硬化斑块的大小没有明显差别。Kawanabe 等^[11] 人对大鼠 VSMC 的体外研究也表明, 硝苯地平对 ET-1 诱导的 VSMC 活化没有拮抗作用。结合本实验的结果, LCC 阻滞剂治疗效果的局限性可能与斑块中活化的 SMC 中 LCC 表达和功能下降有关。由于本实验观察到硝苯地平具有与槲皮素相似的拮抗 ET-1、提高 α_{1C} 表达的作用, 所以硝苯地平对于 LCC 的影响是比较复杂的。

VSMC 的转化是复杂的过程, 具体的机制仍有待研究, 本实验从 LCC 的角度观察了这一过程, 并探讨了可能的机制, 从而进一步明确了槲皮素防治心血管疾病的作用。

[参考文献]

[1] Bkaily G, Choufani S, Avedanian L, et al. Nonpeptidic antagonists of ETA and ETB receptors reverse the ET-1-in-

duced sustained increase of cytosolic and nuclear calcium in human aortic vascular smooth muscle cells[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2008, 86(8): 546-556.

- [2] Ishizawa K, Izawa-Ishizawa Y, Ohnishi S, et al. Quercetin glucuronide inhibits cell migration and proliferation by platelet-derived growth factor in vascular smooth muscle cells[J]. *J Pharmacol Sci*, 2009, 109(2): 257-264.
- [3] Wamhoff BR, Bowles DK, Mc Donald OG, et al. L-type voltage-gated Ca^{2+} channels modulate expression of smooth muscle differentiation marker genes via a rho kinase/myocardin/SRF-dependent mechanism[J]. *Circ Res*, 2004, 95(4): 406-414.
- [4] House SJ, Potier M, Bisailon J, et al. The non-excitabile smooth muscle: calcium signaling and phenotypic switching during vascular disease[J]. *Pflugers Arch*, 2008, 456(5): 769-785.
- [5] 蔡惠, 商战平, 王家富. 在内皮素-1 诱导增殖的血管平滑肌细胞中骨桥蛋白的表达[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2005, 3(10): 871-874.
- [6] Pratt PF, Bonnet S, Ludwig LM, et al. Upregulation of L-type Ca^{2+} channels in mesenteric and skeletal arteries of SHR[J]. *Hypertension*, 2002, 40: 214-219.
- [7] Bowles DK, Heaps CL, Turk JR. Hypercholesterolemia inhibits L-type calcium current in coronary macro-, not microcirculation[J]. *J Appl Physiol*, 2004, 196: 2240-2248.
- [8] Tiwari S, Zhang Y, Heller J, et al. Atherosclerosis-related molecular alteration of the human $CaV1.2$ calcium channel $\alpha1C$ subunit[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 17024-17029.
- [9] Yogi A, Callera GE, Montezano AC, et al. Endothelin-1, but not Ang II, activates MAP kinases through c-Src independent Ras-Raf dependent pathways in vascular smooth muscle cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(9): 1960-1967.
- [10] Lüscher TF, Pieper M, Tendera M, et al. A randomized placebo-controlled study on the effect of nifedipine on coronary endothelial function and plaque formation in patients with coronary artery disease: the ENCORE II study[J]. *Eur Heart J*, 2009, 30(13): 1590-1597.
- [11] Kawanabe Y, Okamoto Y, Hashimoto N, et al. Characterization of Ca^{2+} channels involved in endothelin-1-induced mitogenic responses in vascular smooth muscle cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2001, 422(1-3): 15-21.

(此文编辑 许雪梅)