

白藜芦醇调节 TRPC1/STIM1 介导的 SOCC 抗动脉粥样硬化机制

刘海梅, 闫福曼*, 徐进文, 周乐全, 伍志学, 张韧, 刘娜
(广州中医药大学基础医学院, 广州 510006)

[摘要] **目的:**研究白藜芦醇通过调节瞬时受体电位通道蛋白 1(transient receptor potential channel protein 1, TRPC1)及基质交互分子 1(stromal interaction molecule 1, STIM1)介导的钙库操纵性钙通道(store-operated calcium channel, SOCC)发挥抗动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的具体机制。**方法:**雌性 C57BL/6J 小鼠卵巢去势后高脂饮食建立 AS 模型,分为空白组,模型组,白藜芦醇低、中、高剂量组(50, 100, 150 mg·kg⁻¹),雌激素组(0.3 mg·kg⁻¹)。高脂喂养 16 周后,收集血清检测各组小鼠血清中血脂 4 项及 Ca²⁺水平;油红 O 染色从形态学观察动脉粥样硬化斑块形成;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠胸主动脉 TRPC1, STIM1 及内皮型一氧化氮合成酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)蛋白表达水平;实时荧光定量 PCR 法(Real-time PCR)检测小鼠胸主动脉血管中 TRPC1 与 STIM1 mRNA 信号表达。**结果:**与模型组相比,白藜芦醇高剂量组及雌激素组小鼠血清总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),低密度脂蛋白(LDL)均降低($P < 0.05$),但高密度脂蛋白表达(HDL)升高,血清 Ca²⁺浓度下降;油红 O 染色提示,与空白组相比,模型组 AS 病理改变明显,内膜增厚,不完整,连续性被破坏,有较明显的脂质斑块;补充白藜芦醇或雌激素后,动脉管壁 AS 病理改变明显减轻,脂滴明显减少。Western blot 结果显示,补充白藜芦醇中、高剂量及雌激素后,与模型组相比,TRPC1 与 STIM1 蛋白表达明显减少,而 eNOS 蛋白表达增加($P < 0.05$);通过 Real-time PCR 检测发现,与模型组相比,白藜芦醇中、高剂量组及雌激素组 TRPC1 与 STIM1 mRNA 基因表达的水平明显降低($P < 0.05$)。**结论:**白藜芦醇可通过下调 TRPC1 及 STIM1 基因表达及蛋白水平,抑制 SOCC 介导的 Ca²⁺内流,增加 eNOS 蛋白表达及活性,发挥抗动脉粥样硬化的作用。

[关键词] 白藜芦醇; 动脉粥样硬化; 瞬时受体电位通道蛋白 1; 基质交互分子 1

[中图分类号] R22; R24; R363.1; R543 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)04-0096-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018040096

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171125.1518.026.html>

[网络出版时间] 2017-11-25 15:18

Effect of Resveratrol in Regulating TRPC1/STIM1-mediated SOCC to Inhibit Atherosclerosis

LIU Hai-mei, YAN Fu-man*, XU Jin-wen, ZHOU Le-quan, WU Zhi-xue, ZHANG Ren, LIU Na
(School of Basic Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To study the anti-atherosclerosis (AS) mechanism of resveratrol (RES) by regulating store-operated calcium channel (SOCC) induced by transient receptor potential channel protein 1 (TRPC1) and stromal interaction molecule 1 (STIM1). **Method:** Atherosclerosis model was established with female C57BL/6J mice that were fed with high-fat diet after ovariectomy, and then the mice were divided into control group, model group, low-dose resveratrol group, medium-dose resveratrol group, high-dose resveratrol group (50, 100, 150 mg·kg⁻¹) and estradiol (E₂) group (0.3 mg·kg⁻¹). After 16 weeks, serum was

[收稿日期] 20170923(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81202816)

[第一作者] 刘海梅, 博士, 副教授, 从事中医中药心血管保护机制的研究, Tel: 020-39358028, E-mail: lhmei99@gzucm.edu.cn

[通信作者] * 闫福曼, 博士, 副教授, 从事中药防治心脑血管疾病机制的研究, Tel: 020-39358028, E-mail: 974842116@qq.com

collected, and the lipid level and Ca^{2+} concentration were detected. The morphological changes were measured by oil red O staining. The protein expressions of TRPC1, STIM1 and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) were detected by Western blot and Real-time PCR. The activity of eNOS was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** Compared with model group, total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein (LDL) were decreased, while the high density lipoprotein (HDL) was increased in supplementary high-dose resveratrol or estrogen groups ($P < 0.05$). The pathological changes in the model group were obvious compared with control group, after supplementation with RES or estrogen, the pathological changes were significantly reduced in thoracic aorta. Western blot and Real-time PCR results showed that in model group, the protein expressions of TRPC1 and STIM1 were increased, while the protein expression of eNOS was decreased ($P < 0.05$); in supplementary high-dose resveratrol or estrogen group, these changes were reversed ($P < 0.05$). **Conclusion:** RES could down-regulate TRPC1 and STIM1 gene and protein expressions, inhibit SOCC-mediated Ca^{2+} influx, increase eNOS expression and resist atherosclerosis.

[Key words] resveratrol; atherosclerosis; transient receptor potential channel protein 1; stromal interaction molecule 1

白藜芦醇是具有多种生物学效应的多酚类物质,主要存在于葡萄、花生、虎杖和果浆等多种植物中,是天然的抗氧化、抗炎剂及自由基清除物,具有调节免疫功能,抗病毒的功效^[1-2]。流行病学调查指出,适当饮用葡萄酒可降低心血管疾病发病率和死亡率,此现象已证实与葡萄酒中含有较高浓度的白藜芦醇有关。近年来研究显示,白藜芦醇是一种尚未发现毒副作用的植物性雌激素,结构类似己烯雌酚,可通过调节脂质代谢,抑制血小板聚集,减轻炎症反应等机制保护心血管,抑制动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)发生,但具体机制尚未明确^[3-5]。本课题组前期的实验也证实,白藜芦醇可通过抑制诱导型一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)表达,降低过量一氧化氮(nitric oxide, NO)带来的毒性作用,发挥抗 AS 效应^[6]。本课题是以前期工作为基础,选用雌性 C57BL/6J 小鼠卵巢去势后高脂饮食建立 AS 模型,以钙池操纵性钙通道(store-operated calcium channel, SOCC)为突破口,观察 SOCC 主要结构蛋白瞬时受体电位通道蛋白 1(transient receptor potential channel protein 1, TRPC1),基质交互分子 1(stromal interaction molecule 1, STIM1)及内皮型一氧化氮合成酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)在 AS 发展过程中的表达变化,从而明确白藜芦醇调节 SOCC 抗 AS 的具体作用机制。

1 材料

1.1 药品与试剂 白藜芦醇(上海 Aladdin 生化科技股份有限公司,批号 R107315);TRPC1 多克隆抗体(Proteintech 公司,批号 19482-1-AP);STIM1 多克

隆抗体, β -actin 抗体多克隆抗体(美国 Sigma 公司,批号分别为 S5668, A5060);eNOS 抗体(英国 Abcam 公司,批号 ab76198);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(美国 Thermo 公司,批号 23225);RIPA 蛋白裂解液(上海碧云天生物有限公司,批号 P0013B);trizol reagent(美国 Thermo Fisher 公司,批号 15596026);STIM1, TRPC1 及 β -actin 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;血清 Ca^{2+} 测定试剂盒(南京建成生物有限公司,批号 C004-2);eNOS 灭联免疫吸附(ELISA)试剂盒(武汉默沙克生物科技有限公司,批号为 69-20142);其他试剂均为国产分析纯。

1.2 动物 雌性 C57BL/6J 小鼠 60 只,体质量 18 ~ 22 g,购于广东省实验动物中心,合格证号 SCXK(粤)2013-0002。实验前,小鼠禁食 12 h,自由饮水;实验过程中动物的处置方法符合广州中医药大学动物伦理委员会规范。

1.3 仪器 AU5800 型生化分析仪[贝克曼库尔特实验系统(苏州)有限公司];Tanon4200 型全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司);PowerPac 型电泳仪,Trans-Blot Turbo 型干转膜系统,iMark 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);CM1860 型冰冻切片机(德国 Leica 公司);HR/T16M 型台式高速冰冻离心机(湖南赫西仪器装备有限公司);CX21FS1 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);Image Station 2000MM 成像系统(美国 Kodak 公司)。

2 方法

2.1 分组及去势模型建立 60 只雌性 C57BL/6J 小鼠(6 ~ 8 周龄)适应性普通饲料喂养 1 周,随机分为 6 组,每组 10 只,即空白组,模型组,白藜芦醇低、

中、高剂量组 (50, 100, 150 mg·kg⁻¹), 雌激素组 (0.3 mg·kg⁻¹)。其中模型组, 白藜芦醇组及雌激素组均需摘除双侧卵巢。具体步骤为术前禁食 12 h, 以 10% 的水合氯醛 300 mg·kg⁻¹ 腹腔注射麻醉后, 仰卧固定, 碘伏消毒, 平髂脊处向下剪开皮肤 1 cm, 依次剪开肌肉, 皮下组织, 腹白线, 寻找子宫, 并沿子宫末端找到输卵管, 结扎后切除双侧卵巢组织, 分层缝合后。术后给予青霉素预防伤口感染。空白组行假手术操作, 即切开腹壁找到输卵管后只切除部分脂肪后缝合^[7-9]。以上各组小鼠卵巢去势手术 1 周后, 开始给药, 并高脂饲料喂养。干预 16 周。

2.2 取材 实验 16 周末禁食 12 h, 摘眼球取血 0.5~1 mL, 收集血液样品静置后 4 ℃, 7 500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 收集血清, -80 ℃ 保存。小鼠脱臼处死, 开胸取出胸主动脉置于磷酸盐缓冲液 (PBS) 中去除血管外膜, PBS 冲洗后 -80 ℃ 保存待用。

2.3 血清中血脂及 Ca²⁺ 浓度水平检测 从 -80 ℃ 中取出血清样品, 生化分析仪检测血脂 4 项, 即总胆固醇 (TC), 甘油三酯 (TG), 低密度脂蛋白胆固醇 (LDL), 高密度脂蛋白胆固醇 (HDL); 微板法测定血清 Ca²⁺ 浓度, 用酶标仪在 610 nm 处测定吸光度 A, 血清钙含量 = (测定 A - 空白 A) / (对照 A - 空白 A) × 对照品浓度 (1 mmol·L⁻¹) × 样本测试前稀释倍数。

2.4 油红 O 染色显示胸主动脉形态学变化 将小鼠胸主动脉取出, 制备冰冻切片, 片厚 10 mm。配置 5 g·L⁻¹ 的油红储备液, 取油红储备液 6 mL 加蒸馏水 4 mL, 混匀过滤后使用。滴加油红工作液于组织切片上, 并用滤纸吸干组织周边油红, 后将切片置于 60% 的异丙醇中, 显微镜下观察待背景变成无色后取出, 水洗后滴加苏木素溶液镜下观察染核, 流水冲洗 10 min, 甘油明胶封片, 镜检观察拍片。

2.5 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 TRPC1, STIM1 及 eNOS 蛋白表达 RIPA 法提取组织蛋白, BCA 法进行蛋白定量。SDS-PAGE 电泳, 电转至 PVDF 膜上, 转膜条件为恒压 100 V 90 min。转膜完毕后用含 0.1% 吐温的 TBS 洗膜 3 次, 5% BSA 室温封闭 3 h。依次滴加 TRPC1 (1:1 000), STIM1 (1:2 000), eNOS (1:500) 抗体 4 ℃ 孵育过夜后, 再用 HRP 标记的相应二抗室温孵育 1.5 h, 洗膜后将 PVDF 膜上放于化学发光图像分析仪器中, 添加化学发光剂于膜上进行显影, 定影, 拍照, 蛋白条带用凝胶图像分析软件进行定量与灰度值分析。

2.6 实时荧光定量 PCR 法 (Real-time PCR) 检测 TRPC1 及 STIM1 mRNA 表达水平 RNA 提取, 将组织在液氮中研磨, 加入 trizol 1 mL, 匀浆, 三氯甲烷抽提后, 用异丙醇沉淀, 75% 乙醇洗涤, 后用无 RNase 的水溶解沉淀; 琼脂糖电泳检测 RNA 的完整性, Thermo Nanodrop 上测定 RNA 浓度。荧光定量 PCR, 应用 TAKARA One Step SYBR 反应试剂盒, 按照试剂盒配置反应液, 扩增条件为第一阶段反转录反应: 42 ℃, 5 min; 95 ℃, 10 min, 1 个循环; 第二阶段 PCR 反应: 95 ℃, 5 s; 60 ℃, 20 s, 40 个循环; 第三阶段溶解曲线分析: 95 ℃, 0 s; 65 ℃, 15 s; 95 ℃, 0 s。用 delta Ct 法进行相对量计算。各引物的序列为 TRPC1 (基因序列号 22063): 上游 5'-GATGTGCTTGGGAGAAATGCT-3', 下游 5'-ACTGACAACCGTAGTCCAAAAG-3', 长度 88 bp; STIM1 (基因序列号 20866): 上游 5'-ATTGTGTCGCCCTTGCCAT-3', 下游 5'-GGGTCAAATCCCTCTGAGATCC-3', 长度 103 bp; β -actin (基因序列号 11461): 上游 5'-AGAGGGAAATCCTGCGTGAC-3', 下游 5'-CAATAGTGTGACCTGGCCGT-3', 长度 138 bp。检测结果进行标准曲线分析, 得出 C_t 值, 用目的基因的 C_t 值减去 β -actin 的 C_t 值即为 ΔC_t , 以 2^{- ΔC_t} 作为目的基因的相对含量进行分析。

2.7 ELISA 检测胸主动脉 eNOS 活性 小鼠胸主动脉匀浆后 14 000 ×g 离心 10 min, 取上清液检测 eNOS 活性。取上清液 1:100 稀释后, 取样品 100 μ L 加入微孔板室温孵育 30 min, 冲洗后加入酶结合物孵育 15 min, 洗涤, 底物显色后酶标仪 450 nm 测定 A。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计学分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 白藜芦醇对 C57BL/6J 小鼠血脂水平的影响 与空白组比较, 模型组 HDL-C 明显降低, 而 TC, TG 和 LDL-C 均显著升高 (P < 0.05); 与模型组比较, 白藜芦醇高剂量或雌激素预处理后, 小鼠血清中 TC, TG 和 LDL-C 水平明显降低, 同时 HDL-C 水平升高 (P < 0.05)。见表 1。

3.2 白藜芦醇对各组小鼠胸主动脉形态的影响 高脂喂养 16 周后, 冰冻切片油红 O 染色结果显示, 空白组血管结构清晰, 内膜连续完整, 未观察到明显脂质颗粒; 模型组血管形态发生变化, 内膜增厚, 不完整, 连续性被破坏, 有较明显的脂质斑块; 而补充

表 1 白藜芦醇对 C57BL/6J 小鼠血脂水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TC	TG	LDL	HDL
空白	-	1.931 ± 0.217	0.583 ± 0.075	0.335 ± 0.038	1.524 ± 0.132
模型	-	2.997 ± 0.460 ¹⁾	0.902 ± 0.117 ¹⁾	0.653 ± 0.081 ¹⁾	1.142 ± 0.264 ¹⁾
白藜芦醇	50	2.734 ± 0.156	0.875 ± 0.094	0.567 ± 0.410	1.178 ± 0.619
	100	2.437 ± 0.135 ²⁾	0.795 ± 0.251	0.487 ± 0.177 ²⁾	1.229 ± 0.704
	150	2.104 ± 0.486 ²⁾	0.697 ± 0.023 ²⁾	0.474 ± 0.065 ²⁾	1.308 ± 0.173 ²⁾
雌激素	0.3	2.055 ± 0.446 ²⁾	0.682 ± 0.155 ²⁾	0.487 ± 0.108 ²⁾	1.284 ± 0.149 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2~4 同)。

不同浓度白藜芦醇及雌激素后,与模型组比较,血管内膜增厚程度均较轻,斑块较少,以高浓度白藜芦醇组及雌激素组效果最为明显。见图 1。

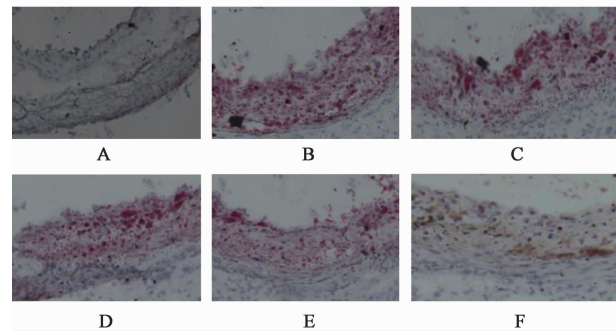


图 1 白藜芦醇对小鼠胸主动脉形态的影响(油红 O, ×200)
A. 空白组; B. 模型组; C. 低剂量白藜芦醇组; D. 中剂量白藜芦醇组; E. 高剂量白藜芦醇组; F. 雌激素组(图 2 同)

图 1 白藜芦醇对小鼠胸主动脉形态的影响(油红 O, ×200)

Fig. 1 Effect of resveratrol on thoracic aortic morphology of mice (oil red O, ×200)

3.3 白藜芦醇对小鼠血清 Ca²⁺ 水平的比较 高脂喂养 16 周后,应用钙离子检测试剂盒分析各组小鼠血清中 Ca²⁺ 水平变化情况,结果显示,与空白组比较,模型组 Ca²⁺ 水平显著上升($P < 0.05$);而补充高浓度白藜芦醇或雌激素后,血清中 Ca²⁺ 水平明显下降($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 白藜芦醇对小鼠血清 Ca²⁺ 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of resveratrol on calcium concentration of serum in mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Ca ²⁺ /mmol·L ⁻¹
空白	-	1.636 ± 0.233
模型	-	2.096 ± 0.131 ¹⁾
白藜芦醇	50	2.028 ± 0.202
	100	1.931 ± 0.184
	150	1.881 ± 0.010 ²⁾
雌激素	0.3	1.810 ± 0.078 ²⁾

3.4 白藜芦醇对小鼠胸主动脉血管 TRPC1 蛋白及 mRNA 表达情况 为了探究 TRPC1 介导的 SOCC 在白藜芦醇抗 AS 中的作用,与空白组比较,模型组 TRPC1 蛋白及 mRNA 表达明显增强($P < 0.05$);与模型组相比,中浓度及高浓度白藜芦醇灌胃后小鼠胸主动脉血管组织中 TRPC1 蛋白及 mRNA 表达水平下降($P < 0.05$)。补充雌激素也可降低血管组织中 TRPC1 蛋白及 mRNA 表达水平($P < 0.05$)。见图 2,表 3。

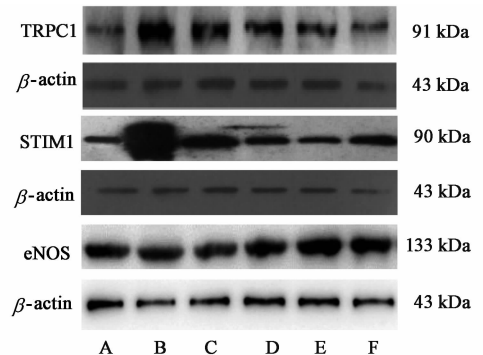


图 2 白藜芦醇对小鼠胸主动脉 TRPC1, STIM1, eNOS 蛋白表达电泳

Fig. 2 Effect of resveratrol on TRPC1, STIM1, eNOS protein expression in mice aortic arteries

3.5 各组小鼠胸主动脉 STIM1 蛋白及 mRNA 表达 与空白组比较,模型组 STIM1 蛋白表达明显增强,同时 Real-time PCR 结果也显示 STIM1 mRNA 表达也增加($P < 0.05$);与模型组相比,中、高浓度白藜芦醇及雌激素灌胃后均可降低血管组织中 STIM1 蛋白及 mRNA 表达水平($P < 0.05$)。见图 2,表 3。

3.6 各组小鼠胸主动脉 eNOS 蛋白活性及蛋白表达情况 与空白组相比,模型组 eNOS 蛋白表达显著下降,活性降低($P < 0.05$);与模型组比较,白藜芦醇中、高剂量组及雌激素组可增强血清 eNOS 活性及蛋白表达($P < 0.05$)。见图 2,表 3,4。

表 3 白藜芦醇对小鼠胸主动脉 TRPC1, STIM1, eNOS 蛋白表达及 STIM1, TRPC1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of resveratrol on TRPC1, STIM1, eNOS protein and STIM1 and TRPC1 mRNA expression in mice aortic arteries ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	蛋白			mRNA	
		TRPC1/ β -actin	STIM1/ β -actin	eNOS/ β -actin	STIM1	TRPC1
对照	-	147.13 ± 20.41	232.41 ± 15.21	267.94 ± 14.74	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
模型	-	588.72 ± 32.18 ¹⁾	1342.17 ± 23.47 ¹⁾	214.32 ± 26.43 ¹⁾	1.253 ± 0.151 ¹⁾	1.299 ± 0.043 ¹⁾
白藜芦醇	50	470.85 ± 57.63	833.07 ± 19.74 ²⁾	242.16 ± 32.45	1.111 ± 0.083	1.213 ± 0.075
	100	308.97 ± 60.31 ²⁾	555.49 ± 32.68 ²⁾	402.91 ± 38.63 ²⁾	1.085 ± 0.095 ²⁾	1.158 ± 0.068
	150	235.41 ± 40.54 ²⁾	277.69 ± 30.75 ²⁾	482.29 ± 40.82 ²⁾	1.061 ± 0.056 ²⁾	1.073 ± 0.026 ²⁾
雌激素	0.3	220.68 ± 15.83 ²⁾	370.25 ± 48.31 ²⁾	455.21 ± 50.31 ²⁾	1.075 ± 0.044 ²⁾	1.106 ± 0.052 ²⁾

表 4 白藜芦醇对小鼠胸主动脉 eNOS 活性影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab. 4 Effect of resveratrol on eNOS activity in mice aortic arteries ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	eNOS 活性/%
空白	-	100.0 ± 0.0
模型	-	80.1 ± 8.6 ¹⁾
白藜芦醇	50	89.3 ± 19.5
	100	144.6 ± 22.4 ²⁾
	150	177.4 ± 23.2 ²⁾
雌激素	0.3	173.7 ± 28.7 ²⁾

4 讨论

AS 是一种慢性疾病,也是众多心血管疾病的共同病理基础,严重危害人类健康。AS 病理过程复杂,是多种致病因素综合作用的结果,包括血管内皮损伤,血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)的过度增殖及凋亡异常,血小板聚集,血脂代谢异常,炎症反应,氧化应激等。其中在高血脂等因素的作用下,LDL 导致血管内皮损伤,使内皮细胞合成及分泌的血管舒张因子一氧化氮(nitric oxide, NO)明显降低,血管舒张障碍,进而导致 VSMCs 过度增殖,迁移及凋亡异常是 AS 形成的关键。

Ca²⁺ 离子作为重要的细胞内第二信使,是介导 VSMCs 增殖与凋亡,诱导线粒体功能紊乱,促进 AS 发生发展的重要因素。以往的研究证实,金属离子对动脉粥样硬化斑块的形成起促进作用,动脉斑块 Ca²⁺ 浓度显著高于正常组织^[10]。而 VSMCs 上的 SOCC 与细胞内 Ca²⁺ 稳态的维持密切相关。TRPC 家族编码的通道蛋白及 STIM1 是构成 SOCC 的结构基础。当 VSMCs 肌浆网内的 Ca²⁺ 被耗竭后,STIM1 激活并移位到细胞膜上,与 TRPC1 结合形成 SOCC,介导钙库操纵性钙内流(store-operated calcium

entry, SOCE),从而增加细胞内钙浓度^[11-12],诱导一系列病理改变的发生。有研究显示,溶血软磷脂可通过刺激 Ca²⁺ 内流降低冠状动脉 VSMCs 活性,改变其结构,介导 AS 发生,且此效应可被 SOCE 阻断剂 SKF-96365 或沉默 TRPC1 或 TRPC3 逆转^[13]。内皮祖细胞功能异常将导致内皮修复障碍,促进 AS 发生,WANG 等^[14]在利用 apoE(-/-)小鼠高脂喂养建立 AS 模型,研究发现与空白组相比,AS 模型组内皮祖细胞增殖及迁移活性下降,SOCE 介导的 Ca²⁺ 内流减少,此现象与 STIM1, TRPC1 及 Orail 表达下降有关。研究还显示,水蛭素可减低 apoE(-/-)小鼠血管组织中 STIM1, Orail 及 TRPC1 表达,减少动脉斑块面积,延缓 AS 发生^[15]。笔者在实验中选用 C57BL/6J 小鼠高脂喂养,建立 AS 模型,实验结果显示,AS 模型组血清中 TC, TG, LDL 含量明显增加,而 HDL 含量下降,血清 Ca²⁺ 浓度显著增加;胸主动脉血管组织 TRPC1 及 STIM1 蛋白及 mRNA 表达也显著增加。以上结果均提示,在 AS 发生过程中,TRPC1, STIM1 介导的 SOCC 诱导的 Ca²⁺ 明显增强,进而通过增加细胞内 Ca²⁺ 浓度,加速内皮损伤及 VSMCs 增殖,凋亡紊乱,从而加速 AS 发展过程。

目前研究认为,生理状态下 eNOS 可合成生理浓度的 NO,舒张血管,抑制 VSMCs 过度增殖及血小板聚集,发挥心血管保护作用。eNOS 主要存在于内皮细胞,在调节机体 NO 合成方面发挥重要作用。而细胞内 Ca²⁺ 稳态是激活 eNOS 生成 NO 的关键。实验证实,在培养的猪主动脉内皮细胞中加入血管紧张素 II(Ang II)后,内皮细胞内游离 Ca²⁺ 浓度([Ca²⁺]_i)升高,同时 eNOS 及 NO 表达下降^[16]。Yoon 等^[17]选用 apoE(-/-)小鼠建立 AS 模型后,研究发现模型组小鼠收缩压明显升高,同时血管组

织中 eNOS 蛋白表达显著减少。WANG 等^[18] 在研究内皮祖细胞功能障碍在 AS 发生中的作用时也发现, AS 模型组内皮祖细胞中 eNOS 表达明显下降。笔者在研究中也采用 C57BJ/6L 卵巢去势后高脂饮食建立小鼠 AS 模型, 结果提示, 与空白组相比, 模型组小鼠血管组织中 eNOS 表达明显下降, 活性降低。提示内皮损伤后 eNOS 分泌减少, 从而使血管舒张因子 NO 释放减少, 血管痉挛, 舒张障碍, 也进一步加速 AS 发展。

白藜芦醇是一种天然的多酚类物质, 也是目前尚未发现有毒副作用的植物雌激素, 可通过抗氧化, 抗炎, 清除氧自由基等机制发挥抗 AS 作用^[1-2]。已有研究显示, 在高脂饮食诱导的 AS 小鼠, 白藜芦醇预处理可显著降低其血清中 TC, TG, LDL-C 水平及动脉粥样硬化指数 (LDL-C/HDL-C), 减轻动脉斑块形成^[19], 这与笔者的实验结果相一致, 提示白藜芦醇可通过调节血脂代谢延缓 AS 发生。氧化应激反应诱导的 VSMCs 过度增殖是加速 AS 发生及形成动脉斑块的关键, 而白藜芦醇的衍生物虎杖苷可通过上调 eNOS/SIRT1 信号转导通路明显抑制 H₂O₂ 诱导的 VSMCs 增殖反应, 且此过程可被 SIRT1 阻断剂 EX527 及 eNOS 阻断剂 L-NAME 逆转^[20]。Breen 等^[21] 在研究白藜芦醇抑制血管损伤后新生内膜形成的实验中指出, 与空白组相比, RES 可使新生内膜的生成下降 50%, 新生内膜中细胞增殖减少 37%, 同时炎症反应标记物 PECAM 及 MMP-9 表达明显下降, 此效应在应用 L-NAME 后或在 eNOS 敲除鼠中消失。笔者在实验中选用 C57BL/6J 小鼠卵巢去势后高脂饮食建立 AS 模型, 研究发现, 中、高剂量白藜芦醇灌胃组 eNOS 表达与模型组相比显著上升, eNOS 活性增强。以上结果提示 eNOS 参与了白藜芦醇的抗 AS 效应。Ca²⁺ 作为细胞信号传导过程中常见的第二信使, 参与调节细胞增殖等多种效应。研究发现, 白藜芦醇可通过激活细胞凋亡机制诱导癌症细胞死亡 (PC3 及 DU145), 抑制前列腺癌发生, 且此过程是通过下调 PC3 及 DU145 细胞内质网储存钙, 抑制 STIM1, TRPC1 介导的 Ca²⁺ 内流实现的^[22]。Campos-Toimil 等^[23] 利用膜片钳技术研究 RES 对 A7r5 血管细胞的非内皮依赖性舒张血管的效应时发现, 白藜芦醇可通过抑制电压依赖式钙通道介导的钙内流发挥舒张血管的效应^[22]。研究证实, 肥大细胞参与了 AS 斑块的形成, 对 AS 斑块的稳定发挥重要作用, YANG 等^[24] 通过实验发现, 白藜芦醇衍生物虎杖苷可通过抑制 SOCC, 降低 Ca²⁺

内流, 减轻肥大细胞增殖, 发挥稳定肥大细胞活性的作用。研究还发现, 实验中应用 SKF-96365 抑制 SOCC, 可明显抑制心肌细胞的过度增殖^[22]。笔者在实验中也发现, 与 AS 组相比, RES 干预后, 小鼠主动脉血管中 TRPC1 与 STIM1 蛋白表达水平及基因转录水平显著降低。结合笔者的实验结果, 认为白藜芦醇可通过降低细胞内 Ca²⁺ 浓度, 抑制 AS 发生, 而 TRPC1/STIM1 介导的 SOCC 是介导外钙内流的重要通路, 白藜芦醇可通过下调 TRPC1 及 STIM1 表达, 抑制 SOCC 介导的外钙内流, 发挥心血管保护作用。

综上所述, 白藜芦醇可下调 TRPC1 与 STIM1 基因转录水平, 抑制 TRPC1 与 STIM1 蛋白表达, 减少 SOCC 介导的钙内流, 增加血管组织 eNOS 表达及活性, 发挥抗 AS 的作用。此研究结果对进一步明确 TRPC1/STIM1 介导的 SOCC 在白藜芦醇抗 AS 过程中的作用机制, 全面揭示白藜芦醇心血管保护作用提供新的理论依据。

[参考文献]

- [1] Prasad K. Resveratrol, wine, and atherosclerosis [J]. *Int J Angiol*, 2012, 21(1):7-18.
- [2] Bonnefont-Rousselot D. Resveratrol and cardiovascular diseases [J]. *Nutrients*, 2016, 8(5): E250.
- [3] Diaz M, Degens H, Vanhees L, et al. The effects of resveratrol on aging vessels [J]. *Exp Gerontol*, 2016, 85(1):41-47.
- [4] Tanko Y, Jimoh A, Ahmed A, et al. Resveratrol protects rabbits against TC diet-induced hyperlipidaemia [J]. *Niger J Physiol Sci*, 2016, 31(1):71-75.
- [5] ZHANG Y, ZHANG Y. Pterostilbene, a novel natural plant conduct, inhibits high fat-induced atherosclerosis inflammation via NF-kappaB signaling pathway in toll-like receptor 5 (tlr5) deficient mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 81(4):345-355.
- [6] 秦丽, 关莉, 林锐珊, 等. 白藜芦醇通过调节 iNOS 抑制 C57BL/6J 小鼠动脉粥样硬化的机制探讨 [J]. *中国病理生理杂志*, 2015, 31(9):1601-1605
- [7] 王蕊, 傅强, 厉璐帆, 等. 更年安胶囊对去势雌性小鼠的治疗作用 [J]. *药学与临床研究*, 2010, 18(3):247-249.
- [8] 刘波, 秦雪, 莫武宁, 等. 雌激素对去势小鼠血脂影响的研究 [J]. *广西医科大学学报*, 2005, 22(5):68-69.
- [9] 刘欣, 殷惠军. 雌激素与动脉粥样硬化 [J]. *医学综述*, 2012, 18(8):1124-1127.

- [10] 边宁, 龚博君, 郭军, 等. 一氧化氮/诱导型一氧化氮合酶在动脉粥样硬化过程中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2014, 30(3):414-418.
- [11] LIU J, XIN L, Benson V L, et al. Store-operated calcium entry and the localization of stim1 and orail proteins in isolated mouse sinoatrial node cells[J]. Front Physiol, 2015, doi:10.3389/fphys.2015.00069.
- [12] Albarran L, Lopez J J, Dionisio N, et al. Transient receptor potential ankyrin-1 (trpa1) modulates store-operated Ca²⁺ entry by regulation of stim1-orail association[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1833(12):3025-3034.
- [13] WANG Y, WANG Y, LI G R. Trpc1/trpc3 channels mediate lysophosphatidylcholine-induced apoptosis in cultured human coronary artery smooth muscles cells[J]. Oncotarget, 2016, 7(32):50937-50951.
- [14] WANG L Y, ZHANG J H, YU J, et al. Reduction of store-operated Ca²⁺ entry correlates with endothelial progenitor cell dysfunction in atherosclerotic mice[J]. Stem Cells Dev, 2015, 24(13):1582-1590.
- [15] TIAN J F, GE C J, LU S Z, et al. Effect and mechanism of recombinant hirudin on atherosclerotic plaques in apolipoprotein E knockout (ApoE(-/-)) mice[J]. Chin J Int Trad West Med, 2015, 35(2):198-203.
- [16] 李永胜, 王照华, 梁黔生, 等. 丹参酮II A对血管紧张II所致动脉内皮细胞游离钙离子及产生一氧化氮的影响[J]. 中华高血压杂志, 2006, 14(11):882-886.
- [17] Yoon J J, Lee Y J, HAN B H, et al. Protective effect of betulinic acid on early atherosclerosis in diabetic apolipoprotein-e gene knockout mice [J]. Eur J Pharmacol, 2016, 796(16):30757-30759.
- [18] WANG L Y, ZHANG J H, YU J, et al. Reduction of store-operated Ca²⁺ entry correlates with endothelial progenitor cell dysfunction in atherosclerotic mice[J]. Stem Cells Dev, 2015, 24(13):1582-1590.
- [19] CHANG G R, CHEN P L, HOU P H, et al. Resveratrol protects against diet-induced atherosclerosis by reducing low-density lipoprotein cholesterol and inhibiting inflammation in apolipoprotein e-deficient mice[J]. Iran J Basic Med Sci, 2015, 18(11):1063-1071.
- [20] MA Y, GONG X, MO Y, et al. Polydatin inhibits the oxidative stress-induced proliferation of vascular smooth muscle cells by activating the enos/sirt1 pathway[J]. Int J Mol Med, 2016, 37(6):1652-1660.
- [21] Breen D M, Dolinsky V W, ZHANG H, et al. Resveratrol inhibits neointimal formation after arterial injury through an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism[J]. Atherosclerosis, 2012, 222(2):375-381.
- [22] Selvaraj S, Sun Y, Sukumaran P, et al. Resveratrol activates autophagic cell death in prostate cancer cells via downregulation of stim1 and the mtor pathway[J]. Mol Carcinog, 2016, 55(5):818-831.
- [23] Campos-Toimil M, Elies J, Alvarez E, et al. Effects of trans-and cis-resveratrol on Ca²⁺ handling in a7r5 vascular myocytes[J]. Eur J Pharmacol, 2007, 577(1/3):91-99.
- [24] YANG B, LI J J, CAO J J, et al. Polydatin attenuated food allergy via store-operated calcium channels in mast cell[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(25):3980-3989.

[责任编辑 邹晓翠]