doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.19.012

Ca²⁺转运通路对金雀异黄酮舒张大鼠脑血管作用的影响*

冯念苹¹ 林静涵² 聂雪丹¹ 孙丽娜² 张黎明² 梁庆成¹ 王正非³ 郑海洪^{4△} (1哈尔滨医科大学附属第二医院神经内科 黑龙江哈尔滨150086;2哈尔滨医科大学附属第一医院神经内科 黑龙江哈尔滨150001; 3齐齐哈尔市中医医院脑病三科 黑龙江齐齐哈尔161000;4哈尔滨医科大学附属第二医院实验动物学部 黑龙江哈尔滨150086)

摘要目的:研究 Ca²⁺转运通路对金雀异黄酮舒张大鼠脑血管作用的影响。方法:75 只大鼠被随机分为3组,分别经由二甲亚砜、 金雀异黄酮和酪氨酸磷酸化抑制剂 A47 处理基底动脉及 Willis 环血管。每组大鼠进一步划分成5个亚组,每个亚组用不同浓度 的细胞外 Ca²⁺处理,分为:0,0.6、1.2、1.8和3.6 mM Ca²⁺组。5-羟色胺诱导血管收缩。测定大鼠基底动脉管壁厚度与官腔周长的比 值;荧光成像分析法测定血管平滑肌细胞细胞内 Ca²⁺浓度;免疫印迹分析检测肌球蛋白轻链激酶(MLCK),蛋白质磷酸酶催化亚 基1(PP1),肌凝蛋白磷酸酶目标亚基1(MYPT1)的表达来测定血管平滑肌细胞 Ca²⁺敏感性。结果:金雀异黄酮和酪氨酸磷酸化抑 制剂 A47 显著降低大鼠基底动脉管壁厚度与官腔周长的比值 (P<0.01),Ca²⁺内流 (P<0.01,P<0.05)及 MLCK 的表达 (P< 0.01);增加 PP1 和 MYPT1 的表达(P<0.01)。细胞外 Ca²⁺ 与金雀异黄酮和酪氨酸磷酸化抑制剂 A47 有协同效应。硝苯地平和毒 胡萝卜素可废除该效应。结论:低细胞外 Ca²⁺水平增强了金雀异黄酮和酪氨酸磷酸化抑制剂 A47 的血管舒张作用。L型电压门控 Ca²⁺通道(L-VGCC)和肌浆网 Ca²⁺库(SR)参与交互效应。

关键词:Ca²⁺运输;金雀异黄酮;5-羟色胺;脑血管收缩 中图分类号:Q95-3;R743 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2015)19-3645-06

Role of Ca²⁺ Transport Pathways in the Effects of Genistein on Serotonin-Activated Cerebrovascular Contraction*

FENG Nian-ping¹, LIN Jing-han², NIE Xue-dan¹, SUN Li-na², ZHANG Li-ming², LIANG Qing-cheng¹, WANG Zheng-fei³, ZHENG Hai-hong⁴

(1 Department of Neurology, Second Clinical Hospital, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150086, China;

2 Department of Neurology, First Clinical Hospital, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China;

3 Department of Cerebropathy, Qiqihaer City Hospital of Traditional Chinese Medicine, Qiqihar, Heilongjiang, 161000, China;

4 Animal experiment center, Second Clinical Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150086, China)

ABSTRACT Objective: To study the role of Ca^{2+} transport pathways in the effects of genistein on serotonin activated cerebrovascular contraction. **Methods:** Seventy five rats were randomly divided into 3 groups. Basilar artery (BA) and Willis ring in different groups were incubated with dimethyl sulfoxide, genistein and tyrphostin A47 (Tyr A47).Each group was further divided into subgroups of 5 rats that were treated with different concentrations of 0, 0.6, 1.2, 1.8 and 3.6 mM Ca^{2+} . Serotonin induced vasoconstriction. The effects of genistein Tyr A47 on serotonin-activated contraction were examined by measuring the ratio of tube wall thickness and the lumen perimeter of the BA. Intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) of vascular smooth muscle cells was determined by ratiometric fluorescence imaging analysis. The Ca^{2+} sensitivity was determined by measuring the expression of myosin light chain kinase (MLCK), protein phosphatase catalytic submit 1 (PP1) and myosin phosphatase target submit 1 (MYPT1) by Western blot analysis. **Results:** Genistein and Tyr A47 significantly reduced the ratio of tube wall thickness and the lumen perimeter of BA (P<0.01), $[Ca^{2+}]_i$, (P < 0.01, P < 0.05) and the expression of MLCK (P < 0.01). Opposite results were observed for PP1 and MYPT1 (P < 0.01). Extracellular Ca^{2+} had a synergistic effect on genistein and Tyr A47. The effect was abolished by nifedipine and thapsigargin. **Conclusions:** Low extracellular Ca^{2+} enhanced the vasodilatation that was stimulated by genistein and Tyr A47. L-type voltage-gated Ca^{2+} channel (L-VGCC) and sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} were involved in the interaction.

Key words: Ca2+ transport pathways; Genistein; Serotonin; Cerebrovascular contraction

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R743 Document code: A Article ID: 1673-6273(2015)19-3645-06

^{*}基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12521336)

作者简介:冯念苹(1981-),女,硕士研究生,主治医师,主要研究方向:脑血管病基础与临床,电话 13946044701,E-mail:mary1981@126.com △通讯作者:郑海洪,女,本科,高级畜牧师,主要研究方向:实验动物模型制作与改良,E-mail:zhenghaihong2014@126.com (收稿日期:2015-02-02 接受日期:2015-02-25)

前言

蛛网膜下腔出血(SAH)是一种常见的神经系统疾病,发病 率高,约 4-28/10,000^[1]。SAH 患者极易发生 SAH 后脑血管痉挛 (CVS),后者造成较高的伤残率和死亡率^[2]。SAH 后 CVS 仍较 为难治^[3]。CVS 的分子机制,包括血管平滑肌收缩、血液成分如 血红蛋白^[3],一氧化氮(NO),endothelin-1 (ET-1)^[4]和 5- 羟色胺 (5-HT)^[5]被广泛研究。平滑肌的收缩主要由增加 Ca²⁺内流和肌 球蛋白轻链磷酸化(Ca²⁺敏感性)来调节。5-HT 参与平滑肌的 收缩调节^[6],但其介导平滑肌钙敏感性的作用尚不确定^[7]。许多 蛋白激酶参与 5-HT 诱发的脑血管收缩复杂的通路。近年来,略 氨酸激酶(TK),因为其在不同的信号通路中的作用而受到极大 的关注。TK 通过酪氨酸磷酸化 L 型 Ca²⁺通道(L-VGCC)^[8]能够 增加平滑肌细胞的细胞内 Ca²⁺。TK 也从三磷酸肌醇(IP3)依赖 的肌浆网(SR)钙库释放增加 Ca²⁺以及肌纤维钙敏感性^[6]。

金雀异黄酮是丰富的大豆产物,是一种 TK 抑制剂^[10]。由于 其血管扩张作用^[11],金雀异黄酮显示出治疗和预防 SAH 后 CVS 的潜质。然而,Ca²⁺转运通路在金雀异黄酮对 5-HT 介导 的脑血管收缩的影响中发挥的作用还有待确定。

本研究的目的是研究 Ca²⁺转运通路在 TK 抑制剂(金雀异 黄酮和酪氨酸磷酸化抑制剂 A47(Tyr A47))影响 5-HT 介导的 脑血管平滑肌细胞收缩中的 Ca²⁺内流, Ca²⁺释放,肌纤维 Ca²⁺ 敏感性中发挥的作用。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

健康男性 SD 大鼠,75 只,体重 200-250 g 由北京维通利华 实验动物技术有限公司提供。所有实验步骤均由哈尔滨医科大 学动物使用和保护委员会批准。除特殊标记的试剂,其余试剂 全部购自美国 Sigma 公司。

1.2 药物处理与实验分组

75 只大鼠被随机分为 3 组:二甲亚砜(DMSO)+5-HT 组, 金雀异黄酮 +5-HT 组和 Tyr A47+5-HT 组。每组大鼠进一步划 分成5个亚组,每个亚组用不同浓度的Ca2+处理,分为:0、0.6、 1.2、1.8 和 3.6 mM Ca²⁺ 组(0 mM Ca²⁺ 加 0.5 mM 乙二醇四乙酸 (EGTA)。水合氯醛麻醉大鼠,断头取脑。从基底动脉(BA)分出 小脑上动脉分支近心端侧 200 µm 的位置前后,分别取两个1 mm 厚冠状脑组织切片。先移除软脑膜,然后小心地移除 Willis 环相关血管及基底动脉的残端。在 37 ℃ 有氧状态下,将脑组织 切片和血管放置到相应含有不同浓度的 Ca2+的 4- 羟乙基哌嗪 乙磺酸(HEPES)缓冲液中,并润洗三次。在 DMSO+5-HT 组中, 组织先在 100 µM DMSO 中孵育 30 分钟。然后加入 1 µM 5-HT, 再孵育 5 分钟。金雀异黄酮 +5-HT 组的组织先用 100 μM金雀异黄酮 30 分钟。然后加入 1 μM 5-HT, 再孵育 5 分 钟。Tyr A47+5-HT 组的组织先用 10 µM Tyr A47 孵育 30 分 钟。然后加入1μM 5-HT,再孵育5分钟。无钙的 HEPES 缓冲 液包含 142 mM 氯化钠, 1.13 mM 氯化镁, 4.7 mM 氯化钾, 7.5 mM 葡萄糖和 10 mMHEPES (用氢氧化钠 pH 值调整到 7.4)。

1.3 血管收缩的测定

按上述方法处理的其中一个脑组织切片在添加 5-HT 之前

取出,将其固定于含4%多聚甲醛(PFA)的0.1 M的磷酸盐缓液 (PBS,pH值7.4)中20小时。另一片脑组织切片于5-HT处理 后固定。组织然后经梯度乙醇(70%,80%,80%,70%)脱水,二甲 苯处理后石蜡包埋。用切片机(HM355S MICROM)切4µm厚 切片,切片黏贴于清洁玻璃载玻片上。在染色之前,置烤箱中加 热至60℃,并用二甲苯脱蜡。此后切片经过梯度乙醇/蒸馏水 混合溶液(100%、95%、70%乙醇),并用蒸馏水润洗10分钟。切 片用苏木精染色1-5分钟,后用蒸馏水润洗10分钟。浸入1% 盐酸酒精20秒之后,用蒸馏水润洗1分钟。此后用切片用伊红 染色20秒至2分钟,用自来水润洗10分钟,紧随其后的是蒸 馏水润洗5分钟。切片经脱水、透明后盖盖玻片。显微镜下 (DM4000B 莱卡)观察并摄取图像。BA 的管壁厚度和管腔周长 的比值使用图像分析系统 Image-Pro Plus 5.0 (Media Cybernetics, USA)计算确定。

1.4 血管平滑肌细胞内 Ca²⁺ 测定

1.4.1 不同的细胞外 Ca²⁺ 水平下细胞内 Ca²⁺ 测定 大鼠脑血 管用 1% triton-100 处理 5 秒钟去除内皮。然后 10 μM Fura-2/AM 孵育 45 分钟,后置于不同的 Ca²⁺浓度的 HEPES 缓冲 液中,并用 DMSO,genistein 或 Tyr A47 处理 30 分钟。以上程 序均在 37 ℃ 有氧条件下进行。用多标记微孔板计数仪 (2104-0010,Perkin Elmer)放射性荧光成像分析来确定 5-HT 引 起的细胞内 Ca²⁺变化的。激发波长是 340 和 380 纳米,发射波 长为 510 纳米。以 3.33 赫兹的频率连续记录从 5-HT 干预之前 0.5 分钟到干预后 5.5 分钟之后的 Fura-2 荧光信号。340 和 380 纳米荧光比率来指示细胞内 Ca²⁺。测定 5-HT 干预前的平均基 线比率,及 5-HT 干预后的平均峰值比率。

1.4.2 阻断 L-VGCC 后的细胞内 Ca²⁺ 测定 去内皮的大鼠脑 血管,先用 10 μM 硝苯地平孵育 30 分钟,然后如 1.4.1 中描述 的用相同的药物处理和仪器设备,测定 340/380 荧光比率(不包 括 0 mM Ca²⁺组)。

1.4.3 SR Ca²⁺ 库耗竭后的细胞内 Ca²⁺ 测定 去内皮的大鼠脑 血管,先用 2 μM 毒胡萝卜素孵育 30 分钟,然后如 1.4.1 中描 述的用相同的药物处理和仪器设备,测定 340/380 荧光比率(不 包括 0 mMCa²⁺ 组)。

1.5 血管平滑肌 Ca2+敏感性测定(免疫印迹法)

用上述方法处理脑血管,并分别于添加 5-HT 之前或之后 取出。用 1% triton-100 处理血管 5 秒去除血管内皮,迅速液态 氮冷冻后 -80 ℃储存。将冷冻组织称重和裂解。首先,置于缓冲 液 A 中,含 50 mMTris-HCl,pH 值 7.5,2 mM 乙二胺四乙酸 (EDTA),150 mM 氯化钠和 0.5 mM 二硫苏糖醇(DTT),用剪刀 切成 1 毫米大小的块状。然后,组织被放置在体积三倍于缓冲 液 A 的的缓冲 B 中,含 Tris-Cl 50 mM,pH 值 7.5,2 mM 乙二 胺四乙酸(EDTA),0.5 mM 二硫苏糖醇(DTT),5 mM 醋酸镁,1 mM 苯甲基磺酰氟化物(PMSF)、10%甘油,然后转移到的匀浆 器中匀浆 30 分钟。匀浆物在 4℃ 离心机 13200 rpm(16100×g), 离心 10 分钟,留取上清。蛋白质浓度使用二喹啉甲酸(BCA)方 法测定。每个样本包含 50 μg 蛋白质,并与五分之一体积的 5× 缓冲液混合,煮 3 分钟。蛋白质样本用十二烷基硫酸钠 - 聚丙 烯酰胺凝胶电泳分离 (SDS-PAGE)(10%)转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF)膜上。这印迹被牛乳封闭 1.5 小时后用以下一抗:MLCK (免抗鼠单克隆抗体,1:5000;Abcam),PP1 (小鼠抗大鼠单克隆 抗体,1:200;Santa Cruz),MYPT1(免抗大鼠多克隆抗体,1:200; Santa Cruz)和 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH)(免抗大鼠单克隆 抗体,1:8000,Sigma)4℃ 孵育过夜。然后,印迹在室温下,用辣 根过氧化物酶(HRP)聚合的山羊抗兔或抗小鼠二级抗体免疫 球蛋白 g(1:20 00,Santa Cruz)孵育 2 小时。使用化学发光试剂 显影(增强化学发光底物,Perkin Elmer)1 分钟,拍摄 X 线胶片。 图像分析系统 (Labwork4.0,Gene Company Limited) 测量 PP1 MLCK,MYPT1和 GAPDH 条带的灰度。最后计算 PP1 MLCK 和 MYPT1 相对于 GAPDH 的免疫反应条带相对灰度值。

1.6 统计分析

数据用均值±标准差表示,使用析因分析进行统计学处理。两组比较用学生t检验。P<0.05被认为具有统计学意义。统计分析是由 SPSS 12.0 版完成。

2 结果

2.1 血管收缩测定

5-HT 刺激后 BA 管壁厚度和管腔周长比值明显增加(P< 0.01,析因分析)。金雀异黄酮,Tyr A47 和 DMSO 组的比值有显著差异(P< 0.01,**P< 0.01,*P< 0.05,t 检验)。金雀异黄酮 组的比例最低,DMSO 组的比例是最高的。随细胞外 Ca²⁺浓度增加,比值逐步增加。不同 Ca²⁺水平间差异显著(P< 0.01,析因分析)。0 和 0.6 mM Ca²⁺水平组较 1.8 mM 明显降低 (**P< 0.01,t 检验)。5-HT 刺激前,0 mM Ca²⁺水平组的比值明显低于 0.6 mM Ca²⁺水平组 (*P< 0.05,t 检验)。细胞外 Ca²⁺ 与金雀异黄酮,Tyr A47 和 DMSO 有协同作用(P< 0.01,析因分析)。在金雀异黄酮组 0 mM Ca²⁺水平的比值是最低的,而 DMSO 组 5-HT 刺激后 3.6 mM Ca²⁺水平的比值是最高的。

2.2 血管平滑肌细胞内 Ca²⁺ 测定

5-HT 刺激后,340/380 纳米荧光比率显著增加(P<0.01, 析因分析),包括 L-VGCCs 被阻滞后的比率以及 SR Ca²⁺储备 被耗竭后的比率,但 L-VGCC 被阻滞后及肌浆网 Ca²⁺储备被 耗竭后的钙峰值较没有硝苯地平和毒胡萝卜素干预时低。金雀 异黄酮,Tyr A47 和 DMSO 组比率明显不同(P<0.01,P<0.05 析因分析)。

Tyr A47 和金雀异黄酮组比率显著低于 DMSO 组,除了 5-HT 刺激前 1.8 mMCa²⁺水平(**P<0.01,t 检验)。比率随细胞 外 Ca²⁺浓度逐渐的增加而逐渐增加。不同 Ca²⁺水平组比率有 显著的差异(P<0.01,析因分析)。0 和 0.6 mMCa²⁺水平的比率 明显低于 1.8 mM Ca²⁺水平的(** P<0.01,t 检验)。5-HT 刺激 后,1.2 mMCa²⁺水平的比率显著低于 1.8 mM Ca²⁺水平的(*P< 0.05,t 检验)。5-HT 刺激前 3.6 mMCa²⁺水平的比率显著高于 1.8 mMCa²⁺水平的(*P<0.05,t 检验)。0.6 mMCa²⁺水平的比率 明显高于 0 mMCa²⁺的水平,明显低于 1.2 mMCa²⁺ 的水平 (**P<0.01,*P<0.05,t 检验)。细胞外 Ca²⁺ 与金雀异黄酮,Tyr A47 和 DMSO 有协同作用(P<0.01,析因分析)。金雀异黄酮组 中 0 mMCa²⁺水平的比值最低,而 5-HT 刺激后 DMSO 组 3.6 mMCa²⁺水平的比值是最高的。

L-VGCC 被阻断后,5-HT 刺激后 3.6 mMCa²⁺水平,金雀异 黄酮组比率显著低于 DMSO 组 (*P<0.05,t 检验)。0.6 和 1.2 mMCa²⁺水平的比率明显低于 1.8 mM 的 Ca²⁺水平(**P<0.01, *P<0.05,t 检验)。0.6 mMCa²⁺水平的比率显著低于 1.2 mM 的 Ca²⁺水平(** P<0.01,t 检验)。5-HT 刺激后,3.6 mMCa²⁺水平比 率显著高于 1.8 mM 的 Ca²⁺水平 (** P<0.01,t 检验)。细胞外 Ca²⁺与金雀异黄酮,Tyr A47 和 DMSO 没有协同作用 (P> 0.05,析因分析)。

SR Ca²⁺储备被耗竭后,金雀异黄酮组比率显著低于 DM-SO 组(** P<0.01,P<0.05,t 检验)。5-HT 刺激后,1.2 mMCa²⁺ 水平 TyrA47 组的比率显著低于 DMSO 组 (*P<0.05,t 检验)。 0,0.6 和 1.2 mMCa²⁺水平的比率明显低于 1.8 mM 的 Ca²⁺级别 (**P<0.01,t 检验)。0.6 mMCa²⁺水平的比率显著高于 0 mM-Ca²⁺水平而低于 1.2 mM 的 Ca²⁺水平(**P<0.01,t 检验)。3.6 mMCa²⁺水平的比率显著高于 1.8 mMCa²⁺水平 (** P<0.01,t 检验)。细胞外 Ca²⁺与金雀异黄酮,Tyr A47 和 DMSO 没有协同 作用(P>0.05,析因分析)。

2.3 血管平滑肌细胞 Ca2+敏感性测定

2.3.1 MLCK 的表达 免疫印迹条带的相对灰度(图 A-B)表明,5-HT 刺激后 MLCK 表达显著增加(P<0.01,析因分析)。金 雀异黄酮,Tyr A47 和 DMSO 组 MLCK 的表达明显不同(P<0.01,析因分析),金雀异黄酮和 Tyr A47 组数值显著低于 DM-SO 组(**P<0.01, t 检验)。随胞外 Ca²⁺浓度逐渐增加,数值逐步增加。不同 Ca²⁺水平间比较有显著差异(P<0.01,析因分析)。0和0.6 mMCa²⁺水平组的 MLCK 表达显著降低于1.8 mM的Ca²⁺水平组(**P<0.01,*P<0.05, t 检验)。5-HT 刺激前0.6 mMCa²⁺水平组数值明显低于1.2 mM的Ca²⁺水平(*P<0.05, t 检验)。细胞外Ca²⁺ 太平组数值明显低于1.2 mM的Ca²⁺ 水平(*P<0.05, t 检验)。细胞外Ca²⁺ 与金雀异黄酮,Tyr A47和DMSO有协同作用(P<0.01,析因分析)。金雀异黄酮组中0mMCa²⁺水平的比值最低,而5-HT刺激后DMSO组3.6 mMCa²⁺水平的比值是最高的。

2.3.2 PP1 的表达 免疫印迹条带的相对灰度(图 C-D)表明, 5-HT 刺激后 PP1 表达显著降低(P<0.01,析因分析)。金雀异 黄酮, Tyr A47 和 DMSO 组 PP1 的表达明显不同(P<0.01, 析 因分析),金雀异黄酮和 Tyr A47 组数值显著高于 DMSO 组 (**P<0.01,*P<0.05,t 检验)。随胞外 Ca²⁺浓度逐渐增加,数 值逐步下降。不同 Ca²⁺水平间比较有显著差异(P<0.01,析因 分析)。0和 0.6 mM Ca2+水平组的 MLCK 表达显著高于 1.8 mM的Ca²⁺水平组(**P<0.01,*P<0.05,t检验)。5-HT 刺激前 0 mM Ca²⁺水平组数值明显高于 0.6 mMCa²⁺水平组(**P< 0.01,*P<0.05,t检验,图C);1.2 mMCa²⁺水平组数值明显高于 1.8 mMCa²⁺水平组(**P<0.01,t 检验,图 3C)。5-HT 刺激后, 3.6 mMCa²⁺ 水平组数值明显低于 1.8 mMCa²⁺ 水平组(*P< 0.05,t 检验,图 3D)。细胞外 Ca2+与金雀异黄酮, Tyr A47 和 DMSO 有协同作用(P<0.01, 析因分析)。金雀异黄酮组中0 mMCa²⁺水平的比值最高,而 5-HT 刺激后 DMSO 组 3.6 mM-Ca²⁺水平的比值是最低的。

2.3.3 MYPT1 的表达 免疫印迹条带的相对灰度(图 E-F)表明,5-HT 刺激后 MYPT1 表达显著降低(P<0.01,析因分析)。在 金雀异黄酮,Tyr A47 和 DMSO 组 MYPT1 的表达明显不同 (P<0.01,析因分析)。5-HT 刺激后,金雀异黄酮组 MYPT1 的 表达显著高于 DMSO 组(**P<0.01,*P<0.05,t 检验,图 F)。

数值随细胞外 Ca²⁺浓度增加逐渐下降。不同 Ca²⁺水平组的数 值有显著差异(P<0.05, 析因分析)。0 和 0.6 mM Ca²⁺组的 MYPT1 表达显著高于 1.8 mM Ca²⁺水平组(**P<0.01, *P< 0.05,t 检验)。5-HT 刺激前,0.6 mMCa²⁺水平的数值明显高于 1.2 mMCa²⁺水平,低于 0 mMCa²⁺水平(*P<0.05,t 检验,图 E)。5-HT 刺激后,1.2 mMCa²⁺水平数值明显高于的 1.8 mMCa²⁺ 水平;3.6 mMCa²⁺水平的数值明显低于 1.8 mMCa²⁺水平(*P< 0.05,t 检验,图 F)。细胞外 Ca²⁺与金雀异黄酮,Tyr A47 和 DMSO 有协同作用(P< 0.05,析因分析)。金雀异黄酮组中 0 mMCa²⁺水平的比值最高,而 5-HT 刺激后 DMSO 组 3.6 mM-Ca²⁺水平的比值是最低的。





图 MLCK, PP1 和 MYPT1 免疫印迹条带的相对灰度 Fig. 1 The relative density for MLCK, PP1 and MYPT1 by Western Blot detection Note: D, DMSO; G, genistein; T, Tyr A47; S, serotonin.*,P<0.05, **, P<0.01.

3.1 SAH 和血管平滑肌收缩

SAH 诱发的 CVS 的发生主要通过血管平滑肌的收缩(Ca2+ 的依赖性和非依赖性)以及收缩性和细胞骨架蛋白的变化四。平 滑肌的收缩是由胞质钙离子浓度的变化和 MLC 磷酸化的 Ca2+ 敏感性调节。MLCK 只有 1 个底物,就是 MLC。被 MLCK 磷酸 化后,MLC被肌球蛋白轻链脱磷酸酶(MLCP)去磷酸化。这就 是所谓的 Ca²⁺ 敏感性。兴奋性受体激动剂激活 Gq^[13],后者进一 步激活磷脂酶 Cβ (PLCβ),产生 IP3 和二酰甘油(DAG)。IP3 诱 发 Ca2+从 SR 释放,增加 MLC 磷酸化以及增加通过激活 Ca2+-钙调蛋白依赖 MLCK 的收缩[14]。当细胞内 Ca2+较低时, MLCK 的调节域和催化域结合,抑制激酶活性。相反,当细胞内 Ca²⁺较 高时,Ca2+诱发调节域从催化域释放及调节域与 Ca2+ 钙调蛋 白复合物结合,激活 MLCK。DAG 激活 Ca²⁺依赖的 PKC,使其 磷酸化 CPI-17 的 Thr38 位点,然后磷酸化的 CPI-17 抑制 ML-CP 活性^[15]。Ca²⁺内流主要通过 L-VGCC 和部分激活 MLCK^[12]。 另外,兴奋性受体激动剂激活 G12/13,序贯激活 Rho A/Rho 相 关蛋白激酶(ROCK),通过磷酸化 MLCP 的肌球蛋白目标亚基 MYPT1^[16],以及 CPI-17 抑制 MLCP^[15]。据报道,其他激酶,如 p21 相关激酶(PAK),蛋白激酶 C(PKC),p38 有丝分裂原蛋白激酶 (MAPK)和钙调蛋白激酶 II 亦磷酸化 MLC 及调节肌肉收缩^[7]。 3.2 5-HT 诱导的血管平滑肌收缩

5-HT 是一种生物单胺。在哺乳动物中,5-HT 主要存在于 血小板、肠嗜铬细胞和脑血管中。5-HT 被认为在脑微血管系统 的调节和 SAH 诱发的 CVS 中发挥作用 ^[18]。几项研究表明, 5-HT 能引起平滑肌:(1) 通过 L-VGCC 的 Ca2+ 内流引起膜电位 去极化(Em)s;(2)从 SR 释放 Ca2+19;(3)改变 MLCK 与 MLCP 活 性间的平衡(Ca²⁺敏感性)。血管收缩剂受体激动剂已知与 ML-CP 抑制有关^[20],但具体机制并不明了。Watanabe 等^[21]在 5-HT 激动的动脉中未能找到 MYPT1 磷酸化的增加,但发现在实验 性 SAH 模型 MYPT1 磷酸化的增加^[2]。而血管壁内压 60 毫米 汞柱时,5-HT 诱导阻力动脉的血管收缩,MYPT1-T697 和 MYPT1-T855 磷酸化均有增加^[7]。在本研究中,我们做了脑血管 收缩测定及 Ca2+ 内流的变化。受陈的研究的启发[23],我们用基 底动脉管壁厚度和管腔周长的比值作为测定血管收缩指标,得 出 5-HT 诱导 BA 收缩,增加血管平滑肌细胞通过 L-VGCCs 的 Ca2+ 内流及 SR 的 Ca2+ 释放,这与其他研究结果一致¹⁰。我们还 发现,5-HT 干扰 MLCK 和 MLCP 的活性之间的平衡,上调 MLCK 而下调 MYPT1 及 PP1。此外,不同浓度细胞外钙离子 通过与其他受体激动剂相同的 Ca2+转运通路影响脑血管收缩 ^[24]。因为不同的细胞外钙离子的影响血管平滑肌细胞 Ca²⁺内 流,而后者激活 Ca2+ 钙调蛋白依赖性 MLCK [14] 和通过 G12/13/RhoA/ROCK/CPI-17 和 G12/13/RhoA /ROCK/MYPT1 (Thr853)途径抑制 MLCP 活性[15]。

3.3 酪氨酸激酶

TK 参与血管平滑肌收缩中的多个信号通路,通过酪氨酸 磷酸化 L-VGCC 增加 Ca²⁺ 内流¹⁸,从 IP3 依赖的 SRCa²⁺ 库释放 Ca²⁺,和诱导肌丝 Ca²⁺敏感性¹⁹。TK 还在平滑肌肌动蛋白细胞 骨架的聚合中发挥作用^[25]。

数项试验研究开展了对 TK 抑制剂在血管平滑肌钙离子

信号转导通路中发挥作用的探讨。一些研究表明,金雀异黄酮 (一种一般酪氨酸激酶抑制剂)在有和无细胞外钙离子的情况 下,降低 5-HT 诱发的 Ca²⁺峰值变化^[26]。有研究报道 TK 诱导 MLC20 和/或 MYPT1 磷酸化^[9],但尚无直接观察 MYPT1 和 PP1研究。此外,没有研究表明细胞外 Ca²⁺浓度与 TK 在 5-HT 介导的 BA 收缩中作用之间的关系。研究表明,ROCK 是一种 经典的 5-HT 介导的血管收缩激酶通路^[27]。然而,Lu^[28]等发现 5-HT 诱发的 TK 活性不受 ROCK 抑制的影响,表明 TK 较 ROCK 位于更上游的位置。

我们的研究结果表明,Tyr A47 和金雀异黄酮均抑制 BA 收缩,抑制血管平滑肌细胞通过 L-VGCCs 和 SR 的 Ca²⁺释放 途径的 Ca²⁺内流增加。我们还发现 Tyr A47 和金雀异黄酮可以 通过上调 MYPT1、PP1 的表达,和下调 MLCK 的表达调节血管 平滑肌细胞由 5-HT 介导 Ca²⁺的敏感性。我们的研究表明,不 同的细胞外钙离子水平影响金雀异黄酮和 Tyr A47 的作用,低 细胞外 Ca²⁺环境增强 TK 抑制剂的血管舒张作用。此外,这种 交互作用可以被硝苯地平和毒胡萝卜素废除。总之,这些结果 表明,L-VGCC 和 SR 的 Ca²⁺释放在交互作用中起到重要作 用。我们推测,细胞外 Ca²⁺对 5-HT 介导的脑血管收缩中 TK 活 性的影响与 L-VGCC 和 IP3 介导 SR 的 Ca²⁺释放耦联。我们的 结果不同于 Ding 和 Murray^[24],二人研究结果显示,Tyr A47 造 成 u-46619 介导的 Ca²⁺内流 - 张力曲线左移。可能的解释是, 用于肺静脉带的 u-46619 浓度(0.1 μM)不在 TK 抑制作用减弱 收缩的范围内。

3.4 金雀异黄酮及其应用前景

金雀异黄酮是异黄酮类的化合物,后者是大豆中含量最丰富的植物雌激素。其结构类似于 17 μ 雌二醇。金雀异黄酮是 TK 抑制剂¹⁰,其在治疗和预防癌症^[29],骨质疏松症^[30],糖尿病^[31] 和血管疾病^[11]方面有优势。本研究中,金雀异黄酮显示治疗和 预防 SAH 诱发的 CVS 的潜能。低 Ca²⁺液可能可以作为一种佐 剂来增强局部注射的金雀异黄酮的作用。可行性和实际效果尚 待进一步检测验证。

参考文献(References)

- [1] Rodrí guez-Rodrí guez A, Egea-Guerrero JJ, Ruiz de Azú a-Ló pez
 Z, et al. Biomarkers of vasospasm development and outcome in aneurysmal subarachnoid hemorrhage[J]. Neurol Sci, 2014, 341(1-2): 119-127
- [2] Leroux P, Winn W, Newell D, et al. Management of Cerebral Aneurysms[M]. Philadelphia: Elsevier, 2004(1): 127-137
- [3] Ryszard M, Pluta Jacob HS, Jens D, et al. Cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage: time for a new world of thought [J]. Neurol Res, 2009, 31(2): 151-158
- [4] Zhou Y, Martin RD, Zhang JH. Advances in experimental subarachnoid hemorrhage [J]. Acta Neurochir Suppl, 2011, 110(1): 15-21
- [5] Hansen Schwartz J, Ansar S, Edvinsson L. Cerebral vasoconstriction after subarachnoid hemorrhage—role of changes in vascular receptor phenotype[J]. Front Biosci, 2008, 1(13): 2160-2164
- [6] Larsen CC, Povlsen GK, Rasmussen MN, et al. Improvement in neurological outcome and abolition of cerebrovascular endothelin B

and 5-hydroxytryptamine 1B receptor upregulation through mitogenactivated protein kinase kinase 1/2 inhibition after subarachnoid hemorrhage in rats[J]. Neurosurg, 2011, 114(4):1143-1153

- [7] El-Yazbi AF, Johnson RP, Walsh EJ, et al. Pressure-dependent contribution of Rho kinase-mediated calcium sensitization in serotonin-evoked vasoconstriction of rat cerebral arteries [J]. Physiol, 2010, 588(10): 1747-1762
- [8] Luke T, Maylor J, Undem C, et al. Kinase-dependent activation of voltage-gated Ca²⁺ channels by ET-1 in pulmonary arterial myocytes during chronic hypoxia [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012, 302(10): L1128-1139
- [9] Tolloczko B, Tao FC, Zacour ME, et al. Tyrosine kinase-dependent calcium signaling in airway smooth muscle cells [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000, 278(6): L1138- L1145
- [10] Wang X, Zhao T, Zhou S, et al. Mg²⁺-dependent modulation of BKCa channels by genistein in rat arteriolar smooth muscle cells [J].J Cell Physiol, 2014, 229(12): 1981-1989
- [11] Lei Z, Wu J, Meng T, et al. The role of tyrosine kinase in Ca²⁺-independent contraction of the ropivacaine on rat aortic smooth muscle[J].Chin J Physiol, 2013, 56(6): 349-356
- [12] Takeya K, Wang X, Sutherland C, et al. Involvement of myosin regulatory light chain diphosphorylation in sustained vasoconstriction under pathophysiological conditions [J]. J Smooth Muscle Res,2014, 50(1): 18-28
- [13] Suzuki T, Nishioka T, Ishizuka S, et al. A novel mechanism underlying phytate-mediated biological action-phytate hydrolysates induce intracellular calcium signaling by a $G\alpha$ q protein-coupled receptor and phospholipase C-dependent mechanism in colorectal cancer cells[J]. Mol Nutr Food Res, 2010, 54(7): 947-955
- [14] Raina H, Zacharia J, Li M, et al. Activation by Ca2+/calmodulin of an exogenous myosin light chain kinase in mouse arteries [J]. J Physiol, 2009, 587(11): 2599-2612
- [15] Ihara E, Yu Q, Chappellaz M, et al. RK and p38MAPK pathways regulate myosin light chain phosphatase and contribute to Ca (2+) sensitization of intestinal smooth muscle contraction [J]. Neurogastroenterol Motil, 2015, 27(1): 135-146
- [16] Khasnis M, Nakatomi A, Gumpper K, et al. Reconstituted human myosin light chain phosphatase reveals distinct roles of two inhibitory phosphorylation sites of the regulatory subunit, MYPT1 [J]. Biochemistry, 2014, 53(16): 2701-2709
- [17] Takashima S. Phosphorylation of myosin regulatory light chain by myosin light chain kinase, and muscle contraction[J]. Circ J, 2009, 73 (2): 208-213
- [18] Edvinsson L, Povlsen GK, Ahnstedt H, et al. CaMKII inhibition with KN93 attenuates endothelin and serotonin receptor-mediated vasoconstriction and prevents subarachnoid hemorrhage-induced

deficits in sensorimotor function [J]. J Neuroinflammation, 2014, 11 (1): 207

- [19] Salomone S, Soydan G, Moskowitz MA, et al. Inhibition of cerebral vasoconstriction by dantrolene and nimodipine [J]. Neurocrit Care, 2009, 10(1): 93-102
- [20] Mahavadi S, Nalli A, Al-Shboul O, et al. Inhibition of MLC20 phosphorylation downstream of Ca²⁺ and RhoA: A novel mechanism involving phosphorylation of myosin phosphatase interacting protein (M-RIP) by PKG and stimulation of MLC phosphatase activity [J]. Cell Biochem Biophys, 2014, 68(1): 1-8
- [21] Watanabe Y, Faraci FM, Heistad DD. Activation of Rho-associated kinase during augmented contraction of the basilar artery to serotonin after subarachnoid hemorrhage [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 288 (6): H2653-H2658
- [22] Sato M, Tani E, Fujikawa H, et al. Involvement of Rho-kinasemediated phosphorylation of myosin light chain in enhancement of cerebral vasospasm[J]. Circ Res, 2000, 87(3): 195-200
- [23] Chen D, Tang J, Khatibi NH, et al. Treatment with Z-ligustilide, a component of Angelica sinensis, reduces brain injury after a subarachnoid hemorrhage in rats[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2011, 337 (3): 663-672
- [24] Ding X, Murray PA. Cellular mechanisms of thromboxane A2mediated contraction in pulmonary veins [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 289(5): L825-L833
- [25] Tang DD. p130 Crk-associated substrate (CAS) in vascular smooth muscle[J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2009, 14(2): 89-98
- [26] Speroni F, Rebolledo A, Salemme S, et al. Genistein effects on Ca²⁺ handling in human umbilical artery: inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release and of voltage-operated Ca²⁺ channels [J]. J Physiol Biochem, 2009, 65(2): 113-124
- [27] Raja SG. Evaluation of clinical efficacy of fasudil for the treatment of pulmonary arterial hypertension [J]. Recent Pat Cardiovasc Drug Discov, 2012, 7(2): 100-104
- [28] Lu R, Alioua A, Kumar Y, et al. c-Src tyrosine kinase, a critical component for 5-HT2A receptor-mediated contraction in rat aorta[J]. J Physiol, 2008, 586(16): 3855-3869
- [29] Mahmoud AM, Yang W, Bosland MC.Soy isoflavones and prostate cancer: a review of molecular mechanisms[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2014, 140(2): 116-132
- [30] Schilling T, Ebert R, Raaijmakers N, et al. Effects of phytoestrogens and other plant-derived compounds on mesenchymal stem cells, bone maintenance and regeneration [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2014, 139(1): 252-261
- [31] Fu Z, Gilbert ER, Pfeiffer L, et al. Genistein ameliorates hyperglycemia in a mouse model of nongenetic type 2 diabetes [J]. Appl Physiol Nutr Metab, 2012, 37(3): 480-488