



(OSID 码)

· 论著 ·

同型半胱氨酸通过 YAP 通路调控大鼠冠状动脉血管平滑肌细胞高反应性的作用机制研究

陈玉龙¹, 万招飞², 刘小军², 范佳丽², 薛嘉虹², 王新宏²

【摘要】 背景 冠状动脉血管平滑肌细胞 (VSMC) 高反应性是导致冠状动脉痉挛的关键, 而高同型半胱氨酸 (Hcy) 能诱导冠状动脉痉挛, 但其具体作用机制尚不完全清楚。目的 探讨 Hcy 通过 YAP 通路调控冠状动脉 VSMC 高反应性的作用机制。方法 2018 年 1—10 月, 将 SD 大鼠实施安乐死后在无菌环境中迅速去除心脏并制成长 1.0~1.5 mm 血管环。将新鲜的冠状动脉血管环作为 A 组; 在 37 °C、5%CO₂ 条件下, 将在 DMEM 低糖培养基中培养的冠状动脉血管环作为 B 组, 将在 Hcy+DMEM 低糖培养基中培养的冠状动脉血管环作为 C 组, 将在维替泊芬 (VP)+DMEM 低糖培养基中培养的冠状动脉血管环作为 D 组, 将在 Hcy+VP+DMEM 低糖培养基中培养的冠状动脉血管环作为 E 组; 除 A 组外冠状动脉血管环均培养 24 h。采用微血管张力检测仪检测内皮素 B 型受体激动剂蛇毒类似物 (S6c) 和内皮素 1 (ET-1) 诱导的冠状动脉血管张力, 采用 Western blot 法检测内皮素 A 型 (ET_A) 受体、内皮素 B 型 (ET_B) 受体、YAP、磷酸化 ERK_{1/2} (p-ERK_{1/2})、ERK_{1/2}、磷酸化 mTOR (p-mTOR)、mTOR、磷酸化 AMPK (p-AMPK)、AMPK 及 Sirt1 的表达水平。结果 (1) Hcy 可增强 S6c 和 ET-1 呈浓度依赖方式诱导的冠状动脉血管收缩。C 组冠状动脉血管环的 ET_A 受体/β-actin、ET_B 受体/β-actin 及 YAP/β-actin 高于 A 组和 B 组, B 组冠状动脉血管环的 ET_B 受体/β-actin 及 YAP/β-actin 高于 A 组 ($P<0.05$)。 (2) VP 能有效抑制由 Hcy 上调的 S6c 和 ET-1 呈浓度依赖方式诱导的冠状动脉血管收缩。C 组大鼠冠状动脉血管环 ET_A 受体/β-actin、ET_B 受体/β-actin 及 YAP/β-actin 高于 B、D、E 组 ($P<0.05$)。 (3) C 组冠状动脉血管环 p-ERK_{1/2}/ERK_{1/2}、p-mTOR/mTOR 高于 B、D、E 组 ($P<0.05$); B 组冠状动脉血管环 p-ERK_{1/2}/ERK_{1/2} 高于 D 组, p-AMPK/AMPK 及 Sirt1/β-actin 高于 C、D、E 组 ($P<0.05$)。结论 Hcy 可能通过 YAP 通路激活 ERK_{1/2} 和 mTOR 信号通路, 上调 VSMC 内皮素受体, 进而增强冠状动脉 VSMC 高反应性, 这将为高 Hcy 致冠状动脉痉挛的具体作用机制研究提供新的理论依据。

【关键词】 冠状动脉血管痉挛; 同型半胱氨酸; 血管平滑肌; YAP 通路; 大鼠

【中图分类号】 R 541.4 **【文献标识码】** A DOI: 10.3969/j.issn.1008-5971.2019.09.009

陈玉龙, 万招飞, 刘小军, 等. 同型半胱氨酸通过 YAP 通路调控大鼠冠状动脉血管平滑肌细胞高反应性的作用机制研究 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2019, 27 (9): 39-44. [www.syxnf.net]

CHEN Y L, WAN Z F, LIU X J, et al. Action mechanism of homocysteine in the regulation of hyperresponsiveness of coronary artery smooth muscle cells through YAP pathway in rats [J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2019, 27 (9): 39-44.

Action Mechanism of Homocysteine in the Regulation of Hyperresponsiveness of Coronary Artery Smooth Muscle Cells through YAP Pathway in Rats CHEN Yulong¹, WAN Zhaofei², LIU Xiaojun², FAN Jiali², XUE Jiahong², WANG Xinhong²

1. Institute of Basic and Translational Medicine, Xi'an Medical University (Shaanxi Provincial Key Laboratory of Ischemic Cardiovascular Disease), Xi'an 710021, China

2. Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China

Corresponding author: WANG Xinhong, E-mail: wangxinhongshx@163.com

【Abstract】 **Background** Hyperresponsiveness of coronary artery smooth muscle cells (VSMC) is the key to result in coronary artery spasm, however hyperhomocysteinemia (HHcy) may lead to coronary artery spasm, but its specific mechanism is not yet clear. **Objective** To investigate action mechanism of homocysteine (Hcy) in the regulation of hyperresponsiveness of coronary artery VSMC through YAP pathway in rats. **Methods** From January to October 2018, some SD rats were euthanized and rapidly removed the hearts in a aseptic condition to make a 1.0-1.5 mm vascular rings. The fresh coronary vascular ring was

基金项目: 陕西省科技创新基地-科技资源开放共享平台项目 (2019PT-26); 陕西省重点研发计划一般项目 (2018SF-105)

1.710021 陕西省西安市, 西安医学院基础与转化医学研究所 陕西省缺血性心血管疾病重点实验室 2.710004 陕西省西安市, 西安交通大学第二附属医院心内科

通信作者: 王新宏, E-mail: wangxinhongshx@163.com

served as A group, that cultured for 24 hours in DMEM medium with low sugar content (37 °C and 5%CO₂) as B group, that cultured for 24 hours in DMEM medium with low sugar content and Hcy (37 °C and 5%CO₂) as C group, that cultured for 24 hours in DMEM medium with low sugar content and verteporfin (37 °C and 5%CO₂) as D group, and that cultured for 24 hours in DMEM medium with low sugar content, Hcy and verteporfin (37 °C and 5%CO₂) as E group. Vascular tension of coronary artery mediated by S6c and ET-1 was detected by Microvascular tension detector, respectively, moreover Western blot method was used to detect expressions of ET_A receptor, ET_B receptor, YAP, p-ERK_{1/2}, ERK_{1/2}, p-mTOR, mTOR, p-AMPK, AMPK and Sirt1. **Results** (1) Hcy could enhance the vasoconstriction of coronary artery mediated by S6c and ET-1 with concentration-dependent mode. ET_A receptor/ β -actin, ET_B receptor/ β -actin and YAP/ β -actin of coronary vascular ring in C group were statistically significantly higher than those in groups A and B, meanwhile ET_B receptor/ β -actin and YAP/ β -actin of coronary vascular ring in B group were statistically significantly higher than those in A group ($P < 0.05$). (2) Verteporfin could effectively inhibit the vasoconstriction of coronary artery mediated by S6c and ET-1 with concentration-dependent mode. ET_A receptor/ β -actin, ET_B receptor/ β -actin and YAP/ β -actin of coronary vascular ring in C group were statistically significantly higher than those in groups B, D and E ($P < 0.05$). (3) p-ERK_{1/2}/ERK_{1/2} and p-mTOR/mTOR of coronary vascular ring in C group were statistically significantly higher than those in groups B, D and E ($P < 0.05$); p-ERK_{1/2}/ERK_{1/2} of coronary vascular ring in B group was statistically significantly higher than that in D group, meanwhile p-AMPK/AMPK and Sirt1/ β -actin of coronary vascular ring in B group were statistically significantly higher than those in groups C, D and E ($P < 0.05$). **Conclusion**

Hcy may enhance the hyperresponsiveness of coronary artery VSMC through activating the ERK_{1/2} and mTOR signaling pathway via YAP pathway and up-regulating the endothelin receptors of VSMC, which may provide a new theoretical basis for the studies about specific action mechanism of HHcy-induced coronary artery spasm.

【Key words】 Coronary artery vasospasm; Homocysteine; Vascular smooth muscle; YAP pathway; Rats

冠状动脉痉挛指冠状动脉骤然强烈收缩引起血管闭塞或接近闭塞, 导致心肌缺血, 进而引发冠状动脉痉挛型心绞痛、心肌梗死或猝死等严重心血管事件, 目前其发病率较高^[1]。冠状动脉痉挛常突然发病, 不易预测^[2], 目前研究认为冠状动脉血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 高反应性是其发生的关键^[3]。同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 是蛋氨酸代谢过程中产生的含硫非必需氨基酸, 高 Hcy (血 Hcy $\geq 15 \mu\text{mol}$) 是冠状动脉粥样硬化性心脏病的独立危险因素。既往研究表明, 高 Hcy 可作为冠状动脉痉挛型心绞痛的生物学标志物之一^[4]; 另外, 高 Hcy 还能诱导小鼠冠状动脉痉挛^[5]。但 Hcy 引发冠状动脉痉挛的具体机制尚不清楚。YAP 是一种调控细胞增殖、分化及凋亡的转录共激活子, 由 YAP1 基因表达, 是 Hippo 信号通路下游的主要效应子, 因此其表达水平和功能受 Hippo 信号通路调控。Hippo 信号通路被抑制, YAP 从胞质转入胞核并结合转录增强子, 促进基因转录, 进而调控多种生物学功能^[6]。既往研究表明, YAP 激活可导致肺动脉高压^[7]。但 YAP 在冠状动脉 VSMC 高反应性中扮演何种角色及相关机制尚不明确。本研究旨在探讨 Hcy 通过 YAP 通路调控大鼠冠状动脉 VSMC 高反应性的作用机制, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 2018 年 1—10 月, 雄性 SD 大鼠均购自西安交通大学实验动物中心, 体质量 300~350 g, 在清洁级动物房单笼饲养, 自由摄食饮水, 保持大鼠生活环境通风及清洁卫生, 温度为 (24 ± 1) °C, 相对湿度

为 40%~60%, 12 h 光照 / 黑暗交替。本次动物实验步骤经西安交通大学医学部伦理委员会审核批准。

1.2 主要仪器及试剂 DMT620 微血管张力测定仪 (丹麦 DMT 公司生产)、CO₂ 细胞培养箱 (美国 Thermo 公司生产)、电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司生产)、ChemiDoc XRS 化学发光成像系统 (美国 Bio-Rad 公司生产); DL-Hcy、内皮素 1 (ET-1)、内皮素 B 型受体激动剂蛇毒类似物 (sarafotoxin 6c, S6c)、YAP1 抑制剂维替泊芬 (verteporfin, VP) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 抗 β -actin、内皮素 A 型 (ET_A) 受体、内皮素 B 型 (ET_B) 受体、YAP、ERK_{1/2}、mTOR、AMPK、磷酸化 ERK_{1/2} (p-ERK_{1/2})、磷酸化 mTOR (p-mTOR)、磷酸化 AMPK (p-AMPK) 抗体及抗 Sirt1 抗体均购自美国 Abcam 公司或美国 Cell Signaling 公司。

1.3 离体血管环制备及培养 对 SD 大鼠实施安乐死后, 在无菌环境中迅速去除心脏, 置于 4 °C 标准钠盐缓冲液 (NaCl 119 mmol/L, KCl 4.6 mmol/L, NaHCO₃ 15 mmol/L, NaH₂PO₄ 1.2 mmol/L, MgCl₂ 1.2 mmol/L, CaCl₂ 1.5 mmol/L, 葡萄糖 5.5 mmol/L) 中, 缓慢挤压出心脏残留血液。在体视显微镜下分离出间隔支、对角支和前降支, 置于 4 °C 标准钠盐缓冲液中, 细金属丝 (40 μm) 穿入血管腔去除内皮, 剥离外膜组织, 将血管横切成长 1.0~1.5 mm 的血管环。将新鲜的冠状动脉血管环作为 A 组; 在 37 °C、5%CO₂ 条件下, 将在含青霉素 (100 U/L) 和链霉素 (100 $\mu\text{g/L}$) 的 DMEM 低糖培养基中培养的冠状动脉血管环作为 B 组, 将在 Hcy (200 $\mu\text{mol/L}$) + 含青霉素 (100 U/L) 和链霉素 (100 $\mu\text{g/L}$) 的 DMEM 低糖

培养基中培养的冠状动脉血管环作为 C 组, 将在 VP (1 nmol/L) + 含青霉素 (100 U/L) 和链霉素 (100 μg/L) 的 DMEM 低糖培养基中培养的冠状动脉血管环作为 D 组, 将在 Hcy (200 μmol/L) + VP (1 nmol/L) + 含青霉素 (100 U/L) 和链霉素 (100 μg/L) 的 DMEM 低糖培养基中培养的冠状动脉血管环作为 E 组; 除 A 组外冠状动脉血管环均培养 24 h。

1.4 血管收缩张力测定 在新鲜或培养 24 h 的冠状动脉血管环 (去除内皮) 内穿两根微细钢丝, 其中一端连接 myograph system 传感器, 另一端连接微调装置, 接入 PowerLab 系统持续记录血管收缩张力。每个血管环给予 2 mN 的预张力后稳定 1.0~1.5 h, 期间每 15 min 更换 1 次恒温 (37 °C) 的标准钠盐缓冲液, 血管环稳定后采用高钾缓冲液 (K⁺ 60 mmol/L) 检验血管收缩活性两次并计算平均值, 将平均值作为 ET_A 受体或 ET_B 受体激动剂收缩强度的参照标准, 高钾缓冲液引起的血管收缩张力 >1.0 mN 的血管环可用于正式实验。S6c 使用前先采用标准钠盐缓冲液稀释成浓度梯度, 以浓度累加法将药物由最低浓度依次加入浴槽, 数秒内引起血管收缩, 当收缩曲线达到最高不再继续上升时即加入下一浓度的药物, 所测累积浓度 - 反应曲线即代表 ET_B 受体诱导的血管收缩情况。待血管张力恢复基线后 (提示 ET_B 受体已完全消耗分解) 以同样的方法加入 ET-1, 所测累积浓度 - 反应曲线即代表 ET_A 受体诱导的血管收缩情况。S6c 和 ET-1 诱导的血管压力变化以 60 mmol/L K⁺ 诱导的血管收缩百分比表示。

1.5 Western blot 法 采用 Western blot 法检测 ET_A 受体、ET_B 受体、YAP 及 ERK_{1/2}、p-ERK_{1/2}、mTOR、p-mTOR、AMPK、p-AMPK、Sirt1 表达水平, 具体如下: 采用细胞裂解液裂解离体培养血管环, 4 °C 环境下 12 000 × g 离心 20 min, 取上清液, 严格按照 Pierce BCA 蛋白定量试剂盒说明书操作步骤检测蛋白表达, 蛋白变性后 SDS-PAGE 凝胶电泳后转 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后加入适当浓度的一抗, 将膜在 4 °C 环境下孵育过夜, 洗脱后加入适当浓度的二抗, 置于 37 °C 环境下孵育 60 min, 显色后利用 ChemiDoc XRS 化学发光成像系统采集图像, Quality One 软件分析目标条带灰度值, 并与内参 β-actin 比较。

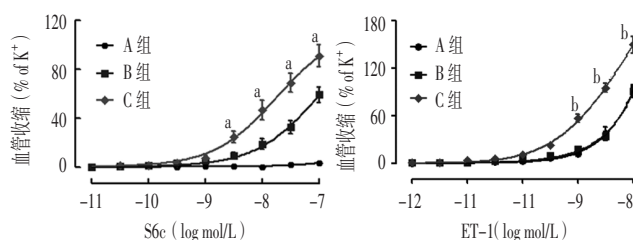
1.6 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计学软件进行数据处理, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 *q* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Hcy 上调冠状动脉 VSMC 的 ET_A 受体、ET_B 受体、YAP 表达及其受体介导的血管收缩 Hcy 可增强 S6c 和 ET-1 呈浓度依赖方式介导的冠状动脉血管收缩, 见图 1。

A、B、C 组冠状动脉血管环的 ET_A 受体 / β-actin、ET_B 受体 / β-actin 及 YAP / β-actin 比较, 差异有统计学意义 (*F* 值分别为 5.516、30.028、40.494, *P* 值分别为 0.044、0.001、<0.01); C 组冠状动脉血管环的 ET_A 受体 / β-actin、ET_B 受体 / β-actin 及 YAP / β-actin 高于 A 组和 B 组, B 组冠状动脉血管环的 ET_B 受体 / β-actin 及 YAP / β-actin 高于 A 组, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05, 见图 2~3)。

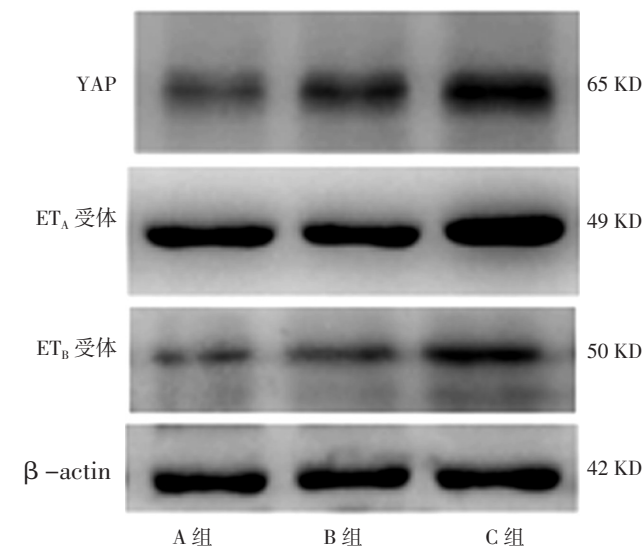
2.2 VP 抑制由 Hcy 上调冠状动脉 VSMC 的 ET_A 受体、ET_B 受体、YAP 表达及其受体介导的血管收缩 VP 能有效抑制由 Hcy 上调的 S6c 和 ET-1 呈浓度依赖方式介导的冠状动脉血管收缩, 见图 4。B、C、D、E 组大鼠冠状动脉血管环 ET_A 受体 / β-actin、ET_B 受体 / β-actin 及 YAP / β-actin 比较, 差异有统计学意义 (*F* 值分别



注: A 组为新鲜的冠状动脉血管环, B 组为在 DMEM 低糖培养基中培养的冠状动脉血管环, C 组为在同型半胱氨酸 (Hcy) + DMEM 低糖培养基中培养的冠状动脉血管环; S6c= 内皮素 B 型受体激动剂蛇毒类似物, ET-1= 内皮素 1; 与 A 组比较, ^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01

图 1 A、B、C 组 S6c、ET-1 诱导的冠状动脉血管环收缩的累积浓度 - 反应曲线

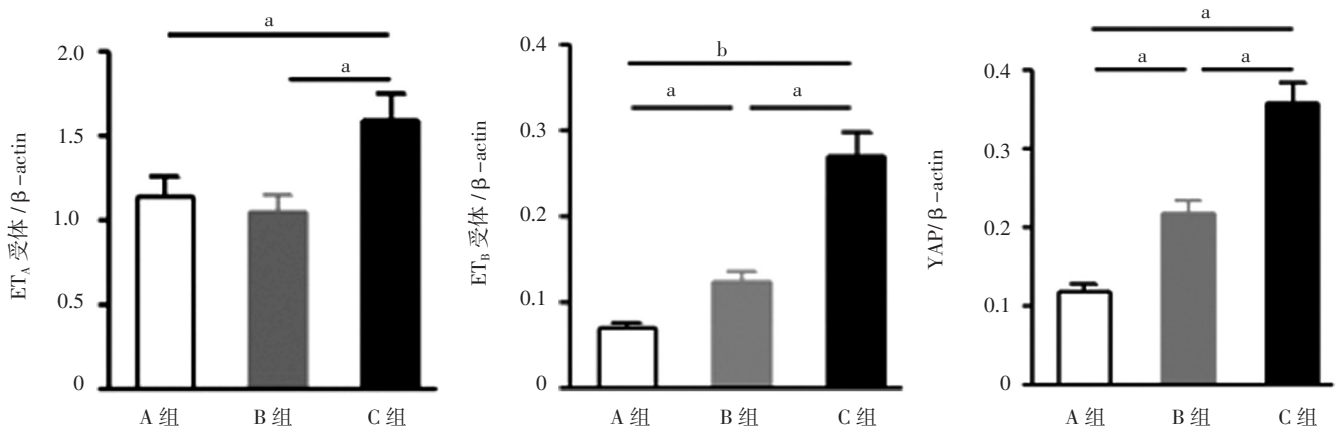
Figure 1 Cumulative concentration-reaction curve for vasoconstriction of coronary artery mediated by S6c and ET-1 in groups A, B and C



注: ET_A= 内皮素 A 型, ET_B= 内皮素 B 型

图 2 A、B、C 组冠状动脉血管环 ET_A 受体、ET_B 受体及 YAP 电泳结果

Figure 2 Electrophoretic results of ET_A receptor, ET_B receptor and YAP of coronary vascular ring in groups A, B and C



注: ^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01

图3 A、B、C组冠状动脉血管环 ET_A 受体/β-actin、ET_B 受体/β-actin 及 YAP/β-actin 比较的条形图

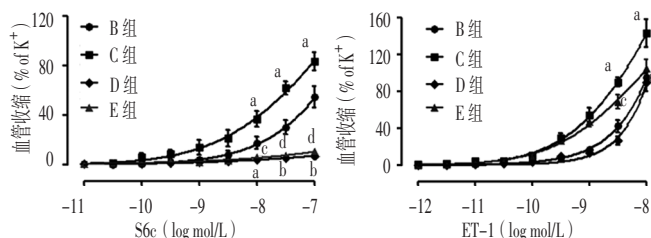
Figure 3 Bar charts for comparison of ET_A receptor/β-actin, ET_B receptor/β-actin and YAP/β-actin of coronary vascular ring in groups A, B and C

为 17.593、109.180、149.356, *P* 均 <0.01); C 组大鼠冠状动脉血管环 ET_A 受体/β-actin、ET_B 受体/β-actin 及 YAP/β-actin 高于 B、D、E 组, 差异有统计学意义 (*P*<0.05, 见图 5~6)。

2.3 Hcy 上调冠状动脉 VSMC p-ERK_{1/2} 和 p-mTOR 表达 B、C、D、E 组冠状动脉血管环 p-ERK_{1/2}/ERK_{1/2}、p-mTOR/mTOR、p-AMPK/AMPK 及 Shirt1/β-actin 比较, 差异有统计学意义 (*F* 值分别为 37.903、15.229、24.202、46.071, *P* 均 <0.01); C 组冠状动脉血管环 p-ERK_{1/2}/ERK_{1/2}、p-mTOR/mTOR 高于 B、D、E 组, 差异有统计学意义 (*P*<0.05); B 组冠状动脉血管环 p-ERK_{1/2}/ERK_{1/2} 高于 D 组, p-AMPK/AMPK 及 Shirt1/β-actin 高于 C、D、E 组, 差异有统计学意义 (*P*<0.05, 见图 7~8)。

3 讨论

ET-1 是一种有效的血管收缩因子, 能诱导血管持续且强烈地收缩, 其与受体结合后可发挥生物学功能。



注: *n*=6~8; D 组为在维替泊芬 (VP)+DMEM 低糖培养基中培养的冠状动脉血管环, E 组为在 Hcy+VP+DMEM 低糖培养基中培养的冠状动脉血管环; 与 B 组比较, ^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01; 与 C 组比较, ^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01

图4 B、C、D、E组 S6c、ET-1 诱导的冠状动脉血管环收缩的累积浓度-反应曲线

Figure 4 Cumulative concentration-reaction curve for vasoconstriction of coronary artery mediated by S6c and ET-1 in groups B, C, D and E

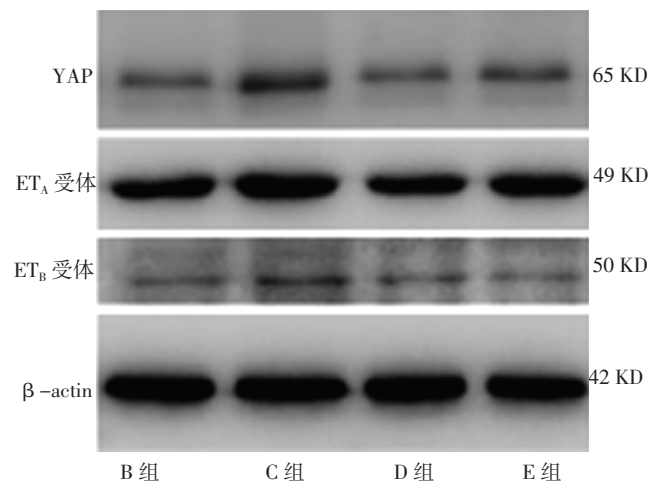
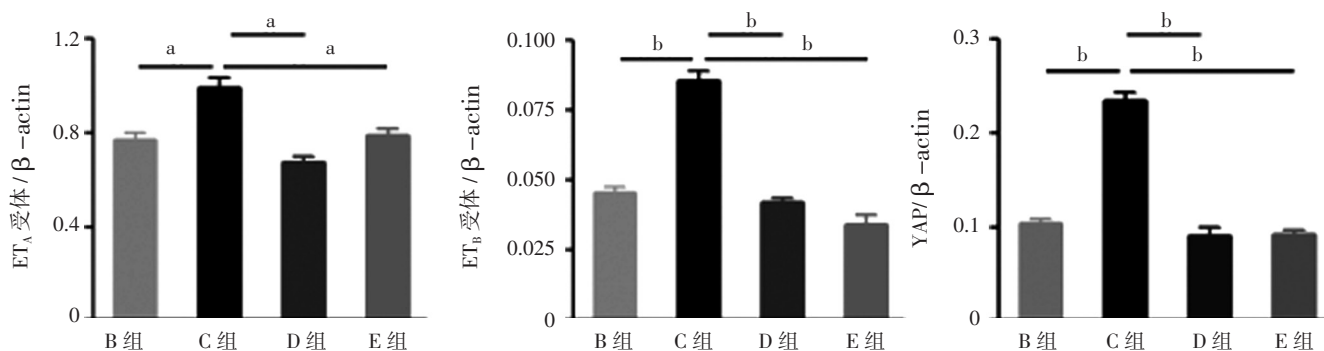


图5 B、C、D、E组冠状动脉血管环 ET_A 受体、ET_B 受体及 YAP 电泳结果

Figure 5 Electrophoretic results of ET_A receptor, ET_B receptor and YAP of coronary vascular ring in groups B, C, D and E

ET-1 的受体主要包括 ET_A 受体和 ET_B 受体, 正常生理状态下 ET_A 受体表达于 VSMC, 可介导血管收缩; 而 ET_B 受体则表达于血管内皮细胞, 可通过释放一氧化氮和前列腺环素而介导血管舒张。病理状态下, ET_B 受体仅表达于 VSMC 且呈高表达状态, 介导血管强烈收缩, 增强 VSMC 对 ET-1 的高反应性^[8]。既往研究表明, 心脏缺血再灌注能诱导冠状动脉 VSMC 高表达 ET_B 受体^[9]。另外, 一些心血管危险因素如吸烟^[10]、微氧化的低密度脂蛋白^[11]和大气细颗粒物 (PM_{2.5})^[12]等均能上调冠状动脉 VSMC 的 ET_A 和 ET_B 受体表达, 进而增强血管平滑肌收缩的敏感性, 提示冠状动脉 VSMC 高反应性在冠状动脉痉挛过程中具有关键作用, 而上调内皮素受体表达可能是冠状动脉 VSMC 高反应性的关键原因之一。本研究结果显示, Hcy 可增强 S6c 和 ET-1 呈浓度依赖方式介导的冠状动脉血管收缩, 且 C 组冠状动



注: n=3; ^aP<0.05, ^bP<0.01

图 6 B、C、D、E 组冠状动脉血管环 ET_A 受体/β-actin、ET_B 受体/β-actin 及 YAP/β-actin 比较的条形图

Figure 6 Bar charts for comparison of ET_A receptor/β-actin, ET_B receptor/β-actin and YAP/β-actin of coronary vascular ring in groups B, C, D and E

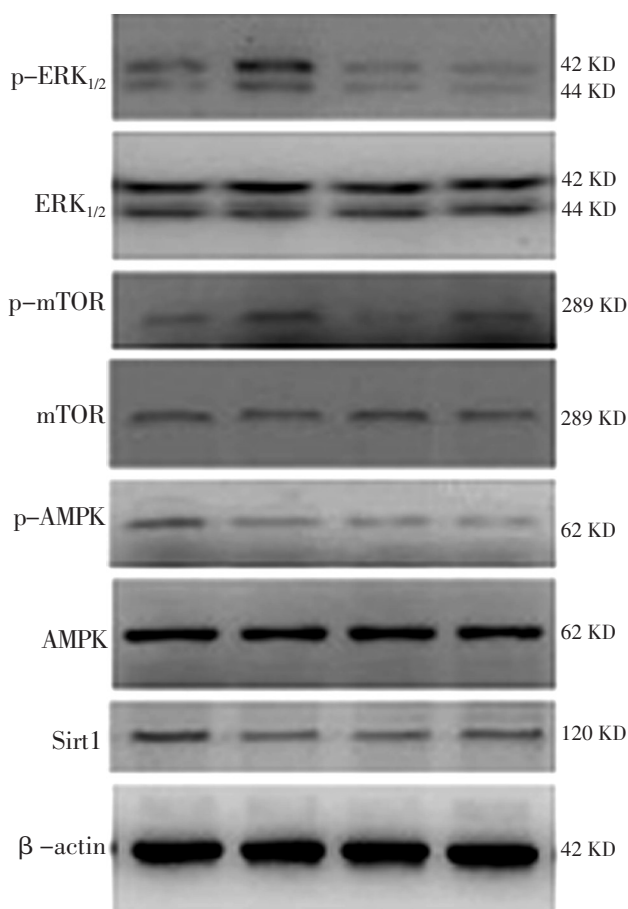


图 7 B、C、D、E 组冠状动脉血管环 p-ERK_{1/2}、ERK_{1/2}、p-mTOR、mTOR、p-AMPK、AMPK 及 Sirt1 电泳结果

Figure 7 Electrophoretic results of p-ERK_{1/2}, ERK_{1/2}, p-mTOR, mTOR, p-AMPK, AMPK and Sirt1 of coronary vascular ring in groups B, C, D and E

脉血管环的 ET_A 受体/β-actin、ET_B 受体/β-actin 高于 A 组和 B 组, B 组冠状动脉血管环的 ET_B 受体/β-actin 高于 A 组, 提示 Hey 通过上调内皮素受体而增强冠状动脉 VSMC 高反应性。

既往研究表明, YAP 是关键的血管生成调节因

子^[13-14], 其激活能促进肺动脉高压发生^[7]。但目前 YAP 与冠状动脉 VSMC 高反应性的关系尚不清楚。本研究结果显示, C 组冠状动脉血管环的 YAP/β-actin 高于 A 组和 B 组, B 组冠状动脉血管环的 YAP/β-actin 高于 A 组, 提示 Hey 能上调冠状动脉 VSMC 的 YAP 表达。为了进一步明确 YAP 在 Hey 调控冠状动脉 VSMC 内皮素受体中的作用, 本研究通过阻断 YAP 而观察 Hey 对大鼠冠状动脉 VSMC 内皮素受体表达及其受体血管收缩的影响, 结果发现 YAP 抑制剂 VP 能有效抑制 Hey 上调的冠状动脉 VSMC 的 ET_A 和 ET_B 受体及其受体介导的血管收缩。前期研究发现, Hey 或高糖可通过 ERK_{1/2}、Sirt1、AMPK、mTOR 信号通路介导调控 VSMC 内皮素受体^[15-17], 那么 YAP 能否通过以上通路影响 Hey 对冠状动脉 VSMC 内皮素受体的调控? 本研究结果显示, C 组冠状动脉血管环 p-ERK_{1/2}/ERK_{1/2}、p-mTOR/mTOR 高于 B、D、E 组; B 组冠状动脉血管环 p-ERK_{1/2}/ERK_{1/2} 高于 D 组, p-AMPK/AMPK 及 Sirt1/β-actin 高于 C、D、E 组, 提示 YAP 抑制剂仅能抑制由 Hey 上调的 ERK_{1/2}、mTOR 磷酸化表达, 但对 Hey 下调的 AMPK 磷酸化和 Sirt1 表达无影响, 提示 ERK_{1/2} 和 mTOR 信号通路可能参与 YAP 对内皮素受体的调控。

综上所述, Hey 可能通过 YAP 通路激活 ERK_{1/2} 和 mTOR 信号通路, 上调 VSMC 内皮素受体, 进而增强冠状动脉 VSMC 高反应性, 这将为高 Hey 致冠状动脉痉挛的具体作用机制研究提供新的理论依据, 也为高 Hey 所致缺血性心血管疾病的诊断和临床研究提供新的线索。

作者贡献: 陈玉龙进行文章的构思与设计; 万招飞进行研究的实施与可行性分析; 刘小军进行数据收集、整理、分析; 范佳丽进行结果分析与解释; 王新宏负责撰写论文, 对文章整体负责, 监督管理; 薛嘉虹进行论文的修订, 负责文章的质量控制及审校。

本文无利益冲突。

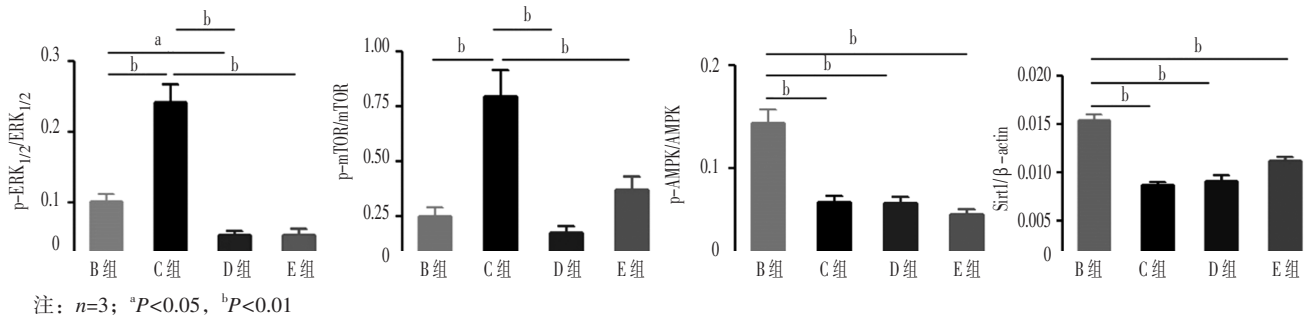


图8 B、C、D、E组冠状动脉血管环 p-ERK_{1/2}/ERK_{1/2}、p-mTOR/mTOR、p-AMPK/AMPK 及 Sirt1/β-actin 比较的条形图

Figure 8 Bar charts for comparison of p-ERK_{1/2}/ERK_{1/2}, p-mTOR/mTOR, p-AMPK/AMPK and Sirt1/β-actin of coronary vascular ring in groups B, C, D and E

参考文献

- [1] BELTRAME J F, CREA F, KASKI J C, et al. International standardization of diagnostic criteria for vasospastic angina [J]. *Eur Heart J*, 2017, 38 (33): 2565–2568. DOI: 10.1093/eurheartj/ehv351.
- [2] AZIZ A, HANSEN H S, SECHTEM U, et al. Sex-related differences in vasomotor function in patients with angina and unobstructed coronary arteries [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2017, 70 (19): 2349–2358. DOI: 10.1016/j.jacc.2017.09.016.
- [3] LANZA G A, CARERI G, CREA F. Mechanisms of coronary artery spasm [J]. *Circulation*, 2011, 124 (16): 1774–1782. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.037283.
- [4] YAMAGUCHI H, HOMMA Y, HANDA S. Biochemical markers of vasospastic coronary artery disease [J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2003, 13 (6): 365–371. DOI: 10.1016/s0939-4753 (03) 80005-4.
- [5] QIPSHIDZE N, METREVELI N, LOMINADZE D, et al. Folic acid improves acetylcholine-induced vasoconstriction of coronary vessels isolated from hyperhomocysteinemic mice: an implication to coronary vasospasm [J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226 (10): 2712–2720. DOI: 10.1002/jcp.22621.
- [6] WANG W, XIAO Z D, LI X, et al. AMPK modulates Hippo pathway activity to regulate energy homeostasis [J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17 (4): 490–499. DOI: 10.1038/ncb3113.
- [7] BERTERO T, OLDHAM W M, COTTRILL K A, et al. Vascular stiffness mechanoactivates YAP/TAZ-dependent glutaminolysis to drive pulmonary hypertension [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126 (9): 3313–3335. DOI: 10.1172/JCI86387.
- [8] XU C B, SUN Y, EDVINSSON L. Cardiovascular risk factors regulate the expression of vascular endothelin receptors [J]. *Pharmacol Ther*, 2010, 127 (2): 148–155. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2010.04.013.
- [9] SKOVSTED G F, KRUSE L S, LARSEN R, et al. Heart ischaemia-reperfusion induces local up-regulation of vasoconstrictor endothelin ET_B receptors in rat coronary arteries downstream of occlusion [J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171 (11): 2726–2738. DOI: 10.1111/bph.12606.
- [10] CAO L, ZHANG Y, CAO Y X, et al. Cigarette smoke upregulates rat coronary artery endothelin receptors in vivo [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (3): e33008. DOI: 10.1371/journal.pone.0033008.
- [11] LI J, CAO L, XU C B, et al. Minimally modified LDL upregulates endothelin type A receptors in rat coronary arterial smooth muscle cells [J]. *Mediators Inflamm*, 2013: 656570. DOI: 10.1155/2013/656570.
- [12] XIAO X, CAO L, WANG R, et al. Airborne fine particulate matter alters the expression of endothelin receptors in rat coronary arteries [J]. *Environ Pollut*, 2016, 218: 487–496. DOI: 10.1016/j.envpol.2016.07.028.
- [13] CHOI H J, ZHANG H, PARK H, et al. Yes-associated protein regulates endothelial cell contact-mediated expression of angiotensin-2 [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6943. DOI: 10.1038/ncomms7943.
- [14] HE J, BAO Q, ZHANG Y, et al. Yes-associated protein promotes angiogenesis via signal transducer and activator of transcription 3 in endothelial cells [J]. *Circ Res*, 2018, 122 (4): 591–605. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311950.
- [15] CHEN Y, ZHANG H, LIU E, et al. Homocysteine regulates endothelin type B receptors in vascular smooth muscle cells [J]. *Vascul Pharmacol*, 2016, 87: 100–109. DOI: 10.1016/j.vph.2016.08.011.
- [16] CHEN Y, LIU H, ZHANG H, et al. The sirt1/NF-κB signaling pathway is involved in regulation of endothelin type B receptors mediated by homocysteine in vascular smooth muscle cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84: 1979–1985. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.11.011.
- [17] CHEN Y, ZHANG H, LIU H, et al. High glucose upregulated vascular smooth muscle endothelin subtype B receptors via inhibition of autophagy in rat superior mesenteric arteries [J]. *Ann Vasc Surg*, 2018, 52: 207–215. DOI: 10.1016/j.avsg.2018.02.028.

(收稿日期: 2019-06-12; 修回日期: 2019-09-16)

(本文编辑: 谢武英)