

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.21.003

文章编号: 1005-8982(2017)21-0012-06

## 降钙素基因相关肽对脂多糖诱导血管平滑肌细胞 TLR4/NK- $\kappa$ B 及炎症因子表达的影响\*

王芳<sup>1</sup>, 周祥群<sup>1</sup>, 付洁<sup>2</sup>

(1. 海南省第三人民医院 心血管内科, 海南 三亚 572000; 2. 新乡医学院  
组织胚胎学教研室, 河南 新乡 453003)

**摘要:目的** 探讨降钙素基因相关肽(CGRP)对脂多糖(LPS)诱导的血管平滑肌细胞(VSMCs)TLR4/NK- $\kappa$ B 及炎症因子表达的影响。**方法** 贴壁法培养 VSMCs, 根据不同的处理方案, 分为对照组、LPS 处理组、CGRP 组、(LPS+CGRP)组及(LPS+CGRP+C8-37)组; ELISA 检测不同组 VSMCs 中白介素 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和 CGRP 基因表达水平, 免疫印迹法(Western blot)检测不同组 VSMCs 中 Toll 样受体 4 (TLR4)、I $\kappa$ Ba 及 p65 蛋白表达水平。**结果** ①LPS 处理 VSMCs 后, 随着 LPS 浓度的升高, IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  表达水平成梯度增加, 并于 1 000 ng/ml 时分泌水平最高( $P < 0.05$ ), 在 8 h 时达到峰值( $P < 0.05$ ); ②CGRP 剂量依赖性降低 LPS 诱导 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的表达( $P < 0.05$ ), 并于 100 nmol/L 时达到低峰点( $P < 0.05$ ); ③CGRP 能抑制 LPS 诱导的细胞 TLR4 蛋白的积累( $P < 0.05$ ), 抑制 I $\kappa$ Ba 与 p65 蛋白的磷酸化水平( $P < 0.05$ ); ④CGRP 阻断剂 C8-37 可以逆转 CGRP 对 LPS 刺激的 VSMCs 中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  表达( $P < 0.05$ ), 拮抗 CGRP 对 TLR4 和 NK- $\kappa$ B 的抑制( $P < 0.05$ )。**结论** CGRP 通过抑制 TLR4 蛋白的积累, 阻断 NF- $\kappa$ B 信号蛋白 I $\kappa$ Ba 与 p65 的磷酸化, 进而削弱 LPS 诱导的细胞炎症因子 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的激活, 抑制 LPS 诱导的 VSMCs 炎症的激活。

**关键词:** 降钙素基因相关肽; 血管平滑肌细胞; Toll 样受体 4; NF- $\kappa$ B

**中图分类号:** R685.6

**文献标识码:** A

## Effect of CGRP on lipopolysaccharide-induced expressions of TLR4/NK- $\kappa$ B and inflammatory factors of vascular smooth muscle cells\*

Fang Wang<sup>1</sup>, Xiang-qun Zhou<sup>1</sup>, Jie Fu<sup>2</sup>

(1. Department of Cardiology, the Third People's Hospital of Hainan Province,  
Sanya, Hainan 572000, China; 2. Department of Histology and Embryology,  
Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan 453003, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of calcitonin gene-related peptide (CGRP) on lipopolysaccharide (LPS)-induced expressions of Toll-like receptor 4 (TLR4)/NK- $\kappa$ B and cytokines in vascular smooth muscle cells (VSMCs). **Methods** VSMCs were cultured and divided randomly into five groups: blank control group, LPS-insulted group, CGRP-stimulated group, LPS+CGRP stimulated group and LPS+CGRP+C8-37 group. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure concentrations of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . Western blot was used to detect the expression of TLR4, I $\kappa$ Ba and p65. **Results** LPS upregulated the expressions of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in a both time- and dose-dependent manner ( $P < 0.05$ ), which reached the peak value when the cells were insulted by LPS at 1,000 ng/ml for 8 hours. CGRP reduced the LPS-induced expressions of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in a dose-dependent manner, which reached the lowest values when CGRP

收稿日期: 2017-02-28

\* 基金项目: 海南省卫生厅课题 (No: 1421320.24A1004)

was under 100 nmol/L ( $P < 0.05$ ). Moreover, LPS-treated cells exhibited significant decrease of TLR4 and phosphorylation of I $\kappa$ Ba and p65, which was attenuated significantly by CGRP ( $P < 0.05$ ). As a specific CGRP antagonist, C8-37 reversed the expression levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in VSMCs stimulated by LPS.

**Conclusions** The present study demonstrates that CGRP can significantly block LPS-induced inflammatory response in VSMCs through inhibition of TLR4-mediated NF- $\kappa$ B signaling pathway.

**Keywords:** calcitonin gene-related peptide; vascular smooth muscle cell; Toll-like receptor 4; NK- $\kappa$ B

动脉粥样硬化是由多种因素共同作用的一种慢性炎症性血管疾病,在其发展过程中,血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMCs)发生特异性形态与功能改变,细胞收缩和合成表型发生转换,进而激活炎症过程,促使 VSMCs 分泌多种促炎症介质(如细胞因子、趋化因子及黏附分子),最终促进血管病理生理发展、疾病进展,导致不良临床事件发生<sup>[1]</sup>。当前研究显示,慢性炎症是动脉粥样硬化性心血管疾病的主要致病机制<sup>[2]</sup>,因此,识别调节 VSMCs 的炎症反应机制对于治疗动脉粥样硬化性心血管疾病的具有重要意义。降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)是由 37 个氨基酸组成的重要生物活性多肽,具有下降血压、降低外周阻力、舒张肾动脉及增加肾血流量等作用,参与机体多种生理和病理过程<sup>[3]</sup>。最近的研究证实,CGRP 在免疫应答和抗炎方面具有重要调节作用<sup>[4-5]</sup>,但对 CGRP 是否调节 VSMCs 炎症激活及相关机制尚未明确。本实验通过脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的 VSMCs 炎症反应,探讨 CGRP 对 LPS 诱导的 VSMCs TLR4/NK- $\kappa$ B 表达及其炎症的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

无特殊病原体(SPF)级雄性 SD 大鼠[许可证号:SCXK(京)2012-0001,北京维通利华实验动物技术有限公司],9~11 周龄,体重 300~350 g。不含钙镁磷酸盐缓冲液(D-PBS)、DMEM 细胞培养液及 L-谷氨酰胺(购自美国 Hyclone 公司), $\alpha$ -Sarcomeric actin( $\alpha$ -SM-actin)、Anti-TLR4、Anti-I $\kappa$ Ba、Anti-p-I $\kappa$ Ba、Anti-p-p65、Anti-p65 及 Anti- $\alpha$ -Tubulin(购自美国 Abcam 公司),辣根过氧化物酶标记二抗(HRP)(购自美国 Cell Signaling Technology 公司),DMEM、胎牛血清及 Trypsin-EDTA 胰酶消化液(购自美国 Gibco 公司);BCA 蛋白定量检测试剂盒(购自陕西省西安飞扬生物科技有限公司),RIPA 裂解液(中)(购自上海碧云天生物技术有限公司),Calcitonin Gene Related Peptide(购自美国 Abbiotec 公

司)、Calcitonin Gene Related Peptide Fragment 8-37(购自美国 Sigma-Aldrich 公司),白介素 1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)定量检测试剂盒(购自美国 R&D 公司);其他试剂为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

酶联免疫检测仪、Power Pac™ 电泳仪、Trans-blot 电转仪及凝胶成像系统 Chemi Doc XRS(购自美国 BIO-RAD 公司),倒置荧光显微镜(日本奥林巴斯公司)。

### 1.3 方法

**1.3.1 VSMCs 培养与鉴定** 雄性 SD 大鼠,颈椎脱臼处死,75%酒精浸泡消毒 5 min,用弯镊剥离主动脉,去除主动脉外膜,用剪刀剪碎为 1 mm<sup>3</sup> 大小组织块,用 PBS 冲洗 2 次以去除血细胞,然后将其均匀置于培养皿瓶底,加入 10% FBS 的 DMEM 完全培养基,培养 5 d,至皿底铺满后进行传代培养。

**1.3.2 VSMCs 分组培养与处理** 第 3 代的 VSMCs 在 37℃、50 ml/L 二氧化碳 CO<sub>2</sub> 条件下,置于含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基中贴壁培养,隔天换液。当细胞长至培养皿 80% 时,用含 0.05% 胰酶-EDTA 溶液进行细胞消化传代,接种于培养板上,接种细胞密度 2 × 10<sup>4</sup> ~ 4 × 10<sup>6</sup> 个/ml,培养 24 h 后,进行分组实验。实验分为 4 组:①对照组(control):不作任何处理;②LPS 处理组:使用 1 000 ng/ml LPS 处理心肌细胞 8 h;③CGRP 组:给予 100 nmol/L CGRP 处理 8 h;④LPS+CGRP 组:给予 1 000 ng/ml LPS 和 100 nmol/L CGRP 处理 8 h;⑤LPS+CGRP+C8-37 组:给予 100 nmol/L CGRP 和 1  $\mu$ mol/L 的 CGRP 受体拮抗剂 C8-37 同时处理 8 h。

**1.3.3 细胞免疫荧光鉴定 VSMCs 细胞表型** 将灭菌的细胞爬片放入 24 孔培养板中,然后以 2 × 10<sup>4</sup> ~ 5 × 10<sup>4</sup> 个/ml 细胞密度将 VSMCs 接种至爬片上,培养 48 h 后用 PBS 洗涤细胞,之后加入 4% 多聚甲醛固定 10 min,用 PBS 漂洗 3 次,1% Triton-100 通透细胞

10 min, PBS 漂洗 3 次, 5% BSA 室温封闭 30 min, 加入一抗( $\alpha$ -SM-actin), 放置 4℃ 孵育过夜。PBS 洗涤 3 次, 加入二抗 Cy3, 37℃ 孵育 1 h。PBS 洗涤 3 次, DAPI(1:1 000) 孵育 10 min, PBS 洗涤 3 次, 封片剂封片, 荧光显微镜观察。

**1.3.4 炎症因子的 ELISA 检测** 细胞培养于含有 10% FBS 的 DMEM/ 培养基中, 按照  $3 \times 10^6$  个/ml 的细胞密度种植于 96 孔板内, 培养 24 h 后, 进行分组细胞刺激处理。细胞处理结束后, 收集培养基上清进行 ELISA 检测。按照 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  检测试剂盒的操作步骤进行 ELISA 检测。使用酶标仪于 450 nm 处测各孔 OD 值, 每个样本重复 3 个复孔。然后绘制标准品线性回归曲线, 按曲线方程计算各样本浓度值。最后取平均值进行统计学分析。

**1.3.5 免疫印迹法(Western blot)检测** 提取细胞总蛋白, 测定蛋白含量。以 50  $\mu$ g/ 每孔道的蛋白上样量进行 SDS-PAGE 电泳, 然后半干转将蛋白转移到 PVDF 膜上, 于 50 g/L 的脱脂奶粉 TBST 溶液中室温封闭 120 min, 然后分别加入 1:1 000 兔抗 TLR4、I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-p65、p65 及  $\alpha$ -Tubulin, 4℃ 振摇孵育过夜。TBST 洗膜 10 min  $\times$  3 次, 加入 HRP 二抗(1:5 000) 室温振摇孵育 120 min, 洗膜。然后加入 ECL 试剂发光, 采用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行数据分析靶蛋白的相对表达水平。

**1.4 统计学方法**

数据分析采用 SPSS 13.0 统计软件, 计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较用方差分析, 两两比较用 LSD-*t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 VSMCs 的鉴定**

原代 VSMCs 接种 48 h 后, 在显微镜下呈梭形或不规则扁平状细胞。 $\alpha$ -SM-actin 免疫荧光染色结果显示 95% 以上细胞均为  $\alpha$ -SM-actin 蛋白(红色)。见图 1。

**2.2 LPS 诱导下炎症因子 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  表达变化**

经 0、10、100 及 1 000 ng/ml LPS 诱导 VSMCs

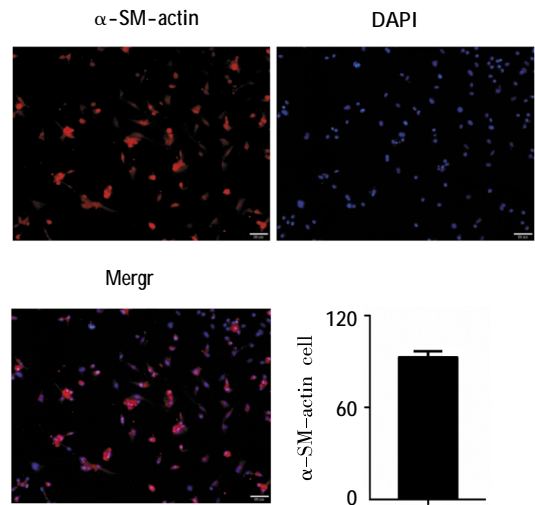


图 1 免疫荧光检测 VSMCs 标志物  $\alpha$ -SM-actin (标尺 = 50  $\mu$ m)

细胞的炎症反应, 各组 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  表达比较, 经方差分析, 差异有统计学意义(见表 1); 随着 LPS 浓度的增加, IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  表达成梯度上升, 并于 1 000 ng/ml 时分泌水平最高( $P < 0.05$ )。使用 1 000 ng/ml 浓度的 LPS 在不同时间处理 VSMCs, 观察 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  表达水平随作用时间的变化, 经方差分析, 差异有统计学意义(见表 2)。LPS 在作用 4 h 后, IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  表达逐渐增加, 在 8 h 时达到峰值, 随后逐渐降低( $P < 0.05$ )。

**2.3 外源 CGRP 剂量依赖性降低 LPS 诱导 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的表达**

与 0 ng/ml 组比较, 1 000 ng/ml LPS 能增加 VSMCs 释放炎症因子 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$ , 但同时给予 0、0.1、10、100 及 1 000 nmol/L 的 CGRP 预处理后, 各组 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  表达比较, 经方差分析, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 随着 CGRP 浓度的上升, LPS 诱导 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  呈浓度依赖性降低, 并于 100 nmol/L 时达到低峰点( $P < 0.05$ )。见表 3。

**2.4 CGRP 拮抗剂对 VSMCs 分泌 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的影响**

给予 CGRP 拮抗剂后, 各组 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  表达比较, 经方差分析, 差异有统计学意义(IL-1 $\beta$ :  $F = 39.339, P = 0.000$ ; TNF- $\alpha$ :  $F = 87.166, P = 0.000$ ); 与

表 1 不同 LPS 浓度诱导下炎症因子 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  表达水平的比较 (pg/ml,  $\bar{x} \pm s$ )

因子	0 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml	1 000 ng/ml	F 值	P 值
IL-1 $\beta$	35.000 $\pm$ 2.887	49.236 $\pm$ 2.309	64.667 $\pm$ 4.372	97.667 $\pm$ 7.623	31.930	0.000
TNF- $\alpha$	221.333 $\pm$ 25.075	389.667 $\pm$ 11.141	484.667 $\pm$ 10.990	646.667 $\pm$ 34.954	60.434	0.000

表 2 不同作用时间 LPS 浓度诱导下炎症因子 IL-1β 和 TNF-α 表达变化 (pg/ml,  $\bar{x} \pm s$ )

LPS 作用时间	IL-1β	TNF-α
0 h	32.667 ± 2.901	242.667 ± 4.485
2 h	42.333 ± 2.028	316.333 ± 10.990
4 h	64.334 ± 8.021	457.334 ± 12.991
8 h	99.667 ± 8.762	642.000 ± 20.133
12 h	72.667 ± 4.726	570.000 ± 24.333
24 h	62.000 ± 2728	547.000 ± 14.640
F 值	27.719	95.291
P 值	0.000	0.000

对照组比较,1 000 ng/ml LPS 引起 VSMCs IL-1β 和 TNF-α 的增加( $P < 0.05$ ),而单独给予 CGRP 预处

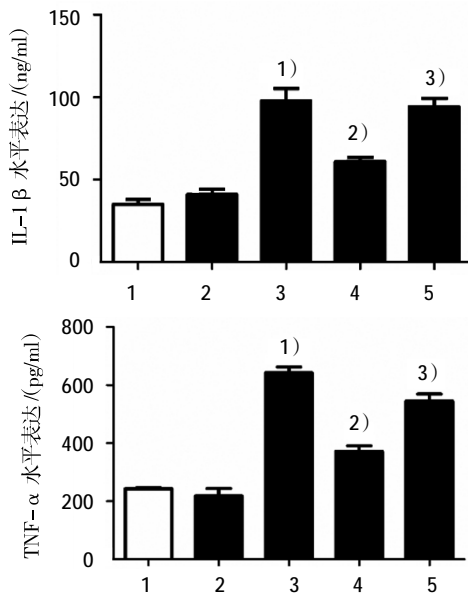
表 3 CGRP 剂量依赖性降低 LPS 诱导 IL-1β 和 TNF-α 的表达 (pg/ml,  $\bar{x} \pm s$ )

因子	0 nmol/L	0.1 nmol/L	10 nmol/L	100 nmol/L	1 000 nmol/L	F 值	P 值
IL-1β	97.667 ± 7.623	96.667 ± 7.535	78.000 ± 1.528	65.124 ± 2.309	79.667 ± 2.646	11.379	0.001
TNF-α	642.032 ± 20.133	622.315 ± 19.053	542.101 ± 11.790	371.667 ± 17.786	515.534 ± 18.818	49.179	0.000

增加( $P < 0.05$ );而 CGRP 的抑制剂 C8-37 却又能拮抗 CGRP 对 TLR4 的抑制作用( $P < 0.05$ )。见图 3。

### 2.6 CGRP 抑制 LPS 诱导的 VSMCs IκBa 和 p65 的磷酸化

Western blot 检测比较各组 IκBa 和 p65 的活化



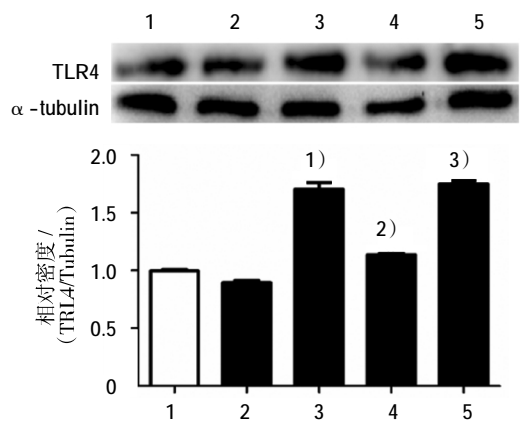
1:对照组;2:CGRP 组;3:LPS 组;4:LPS+CGRP 组;5:LPS+CGRP+C8-37 组。1)与对照组比较, $P < 0.05$ ;2)与 LPS 组比较, $P < 0.05$ ;3)与 LPS+CGRP 组比较, $P < 0.05$

图 2 CGRP 抑制 LPS 诱导 VSMCs 内 IL-1β 和 TNF-α 的表达

理后,并未改变 IL-1β 和 TNF-α 的表达( $P > 0.05$ );但是在 LPS 基础上同时给予 CGRP 预处理后,却能抑制 LPS 引起的细胞内 IL-1β 和 TNF-α 表达的增加( $P < 0.05$ );而与 LPS+CGRP 组比较,添加 CGRP 的抑制剂 C8-37 能拮抗 CGRP 的该作用( $P < 0.05$ )。见图 2。

### 2.5 CGRP 对 VSMCs 分泌 TLR4 的影响

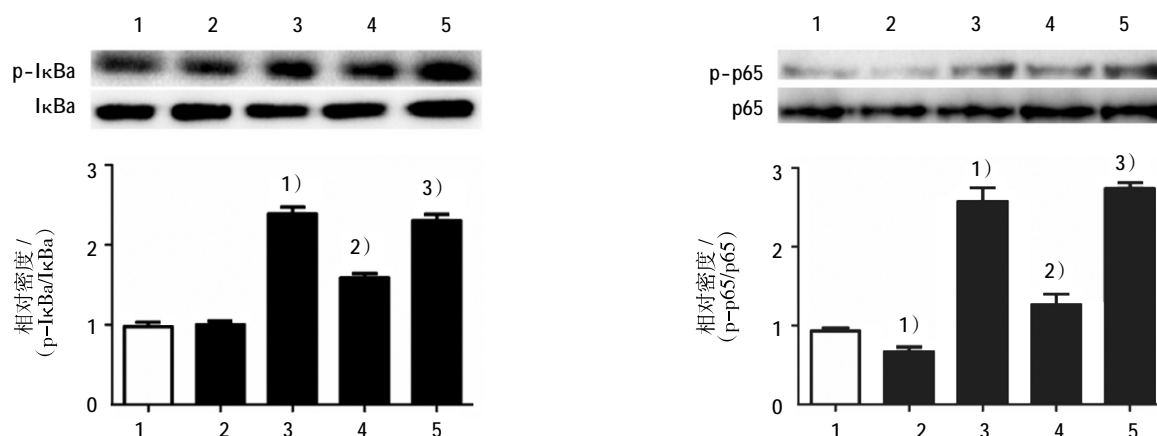
Western blot 检测比较各组 TLR4 的表达差异,经方差分析,差异有统计学意义( $F = 170.026, P = 0.000$ )。与对照组比较,LPS 增加 VSMCs TLR4 的积累( $P < 0.05$ ),单独给予 CGRP 预处理,对 TLR4 蛋白表达未影响( $P > 0.05$ );但同时给予(LPS+CGRP)预处理后,却能抑制 LPS 引起的细胞内 TLR4 蛋白表达的



1:对照组;2:CGRP 组;3:LPS 组;4:LPS+CGRP 组;5:LPS+CGRP+C8-37 组。1)与对照组比较, $P < 0.05$ ;2)与 LPS 组比较, $P < 0.05$ ;3)与 LPS+CGRP 组比较, $P < 0.05$

图 3 CGRP 抑制 LPS 诱导的 VSMCs 内 TLR4 的积累

差异,经方差分析,差异有统计学意义(IκBa:  $F = 116.188, P = 0.000$ ;p65:  $F = 88.403, P = 0.000$ )。与对照组比较,LPS 激活 VSMCs IκBa and NF-κB p65 的磷酸化( $P < 0.05$ ),而单独给予 CGRP 预处理,对 IκBa 磷酸化无明显作用( $P > 0.05$ ),但却抑制 p65 的磷酸化水平( $P < 0.05$ );但同时给予(LPS+CGRP)预处理后,更进一步抑制 LPS 促进的细胞内 IκBa 和 p65 蛋白磷酸化( $P < 0.05$ );而 CGRP 的抑制剂 C8-37 却又能拮抗 CGRP 对 IκBa 和 p65 的抑制作用( $P < 0.05$ )。见图 4。



1: 对照组; 2: CGRP 组; 3: LPS 组; 4: LPS+CGRP 组; 5: LPS+CGRP+C8-37 组。1) 与对照组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与 LPS 组比较,  $P < 0.05$ ; 3) 与 LPS+CGRP 组比较,  $P < 0.05$

图 4 CGRP 抑制 LPS 诱导的 VSMCs 内 IκBa 和 p65 磷酸化

### 3 讨论

动脉粥样硬化是一种慢性炎症性血管疾病, 它由多种因素共同诱导作用形成, 在其发展过程中, VSMCs 发生表型转换, 由收缩静止型变为增殖迁移型细胞, 分泌细胞外基质, 激活炎症信号, 而且释放炎症细胞因子和趋化因子, 进而与浸润炎症细胞相互作用, 最终促进炎症和病变<sup>[1,6]</sup>。

CGRP 是一种广泛分布于神经和心血管系统的血管活性肽, 其分布与血管紧密联系, 在血管中 CGRP 的含量高于心脏。生理条件下, CGRP 与降钙素受体样受体 1 受体活性修饰蛋白 1 (receptor activity modifying protein 1, RAMP1) 组成的复合受体结合才能发挥作用<sup>[7]</sup>。本研究显示, CGRP 涉及神经类疾病, 如三叉神经和偏头痛等<sup>[8]</sup>, 并在心血管的自我稳态调节和血管结构中具有关键调节作用<sup>[9-10]</sup>。KROEGER 等研究显示, 在肝脏中, CGRP 还能通过减少促炎症介质富集而发挥抗炎作用<sup>[11]</sup>。但是 CGRP 对 VSMCs 炎症的作用, 却尚不明确。

本研究首先通过 LPS 刺激建立 VSMCs 炎症模型<sup>[12]</sup>, 观察 CGRP 对 LPS 诱导的 VSMCs 炎症因子 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  表达表达的影响。结果显示, 与对照组比较, 随着 LPS 浓度的增加, IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  表达成梯度上升, 并于 1 000 ng/ml LPS 作用 8 h 时, 炎症因子 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  表达达到峰值 ( $P < 0.05$ )。单独给予 CGRP 预处理后, 并未改变 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的表达; 但是在 LPS 基础上同时给予 CGRP 预处理后, 却能抑制 LPS 引起的细胞内 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  表达的增加 ( $P < 0.05$ ); 而 CGRP 的抑制剂 C8-37

能拮抗 CGRP 的该作用 ( $P < 0.05$ ), 以上结果表明, CGRP 能够抑制 LPS 诱导的 VSMCs 炎症因子 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  表达, 从而抑制细胞炎症反应。

大量研究证实, LPS 可以与 TLR4 受体相结合, 激活 NF- $\kappa$ B, 引起炎症介质和细胞因子的表达, 起到免疫调节的作用<sup>[13-15]</sup>。但 CGRP 是否能通过 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路, 抑制细胞因子和炎症介质的释放, 抵抗 LPS 介导的 VSMCs 炎症反应呢? 本实验结果证实, CGRP 通过阻断 LPS 诱导的细胞内 TLR4 的积累, 抑制 NF- $\kappa$ B 信号蛋白 IκBa 与 p65 蛋白激活, 削弱细胞炎症因子 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的表达, 从而抑制 VSMCs 的炎症激活反应。

本研究显示, CGRP 通过抑制 TLR4 积累和 NF- $\kappa$ B 信号蛋白 IκBa 与 p65 的活性, 进而削弱 LPS 诱导的细胞炎症因子 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的上调, 抑制 LPS 诱导的 VSMCs 炎症的激活, 发挥抗炎作用, 这为以慢性炎症为主要发病机制的动脉粥样硬化的防治提供新的靶点和治疗策略。但本研究也存在一定局限性, 对 CGRP 与 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 上下游信号通路之间的关系, 还不深入, 仍需进一步研究。

### 参 考 文 献:

- [1] ROSS R. Atherosclerosis—an inflammatory disease[J]. *N Engl J Med*, 1999, 340(2): 115-126.
- [2] 朱芹英, 张卉, 杨铁骊. 桂枝提取物对动脉粥样硬化大鼠白细胞介素信号转导子和转录活化子信号通路的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2016, 26(10): 11-15.
- [3] RUSSELL F A, KING R, SMILLIE S J, et al. Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology[J]. *Physiol Rev*, 2014, 94(4): 1099-1142.

- [4] LEE J K, JUNG J S, PARK S H, et al. Deficiency of alpha-calcitonin gene-related peptide induces inflammatory responses and lethality in sepsis[J]. *Cytokine*, 2013, 64(2): 548-554.
- [5] HOLZMANN B. Antiinflammatory activities of CGRP modulating innate immune responses in health and disease[J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2013, 14(4): 268-274.
- [6] 韩庆, 沈德良, 王勃, 等. 瑞舒伐他汀抑制血管平滑肌细胞表型转化的机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2017, 27(3): 27-33.
- [7] EDVINSSON L, EFTEKHARI S, SALVATORE C A, et al. Cerebellar distribution of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and its receptor components calcitonin receptor-like receptor (CLR) and receptor activity modifying protein 1 (RAMP1) in rat[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2011, 46(1): 333-339.
- [8] RAMOS-ROMERO M L, SOBRINO-MEJIA F E. Calcitonin gene-related peptide: a key player neuropeptide in migraine[J]. *Rev Neurol*, 2016, 63(10): 460-468.
- [9] PFEIL U, BHARATHALA S, MURTAZA G, et al. Spatial of components of a calcitonin receptor-like receptor (CRL) signalling system (CRL, calcitonin gene-related peptide, adrenomedullin, adrenomedullin-2/intermedin) in mouse and human heart valves[J]. *Cell Tissue Res*, 2016, 366(3): 587-599.
- [10] SUN T, GUO Z, LIU C J, et al. Preservation of CGRP in myocardium attenuates development of cardiac dysfunction in diabetic rats[J]. *Int J Cardiol*, 2016(220): 226-234.
- [11] KROEGER I, ERHARDT A, ABT D, et al. The neuropeptide calcitonin gene-related peptide (CGRP) prevents inflammatory liver injury in mice[J]. *J Hepatol*, 2009, 51(2): 342-353.
- [12] MA W, DUMONT Y, VERCAUTEREN F, et al. Lipopolysaccharide induces calcitonin gene-related peptide in the RAW264.7 macrophage cell line[J]. *Immunology*, 2010, 130(3): 399-409.
- [13] MOLTENI M, GEMMA S, ROSSETTI C. The role of Toll-like receptor 4 in infectious and noninfectious inflammation[J]. *Mediators Inflamm*, 2016, 2016(7): 1-9.
- [14] DOYLE S L, O'NEILL L A J. Toll-like receptors: from the discovery of NF kappa B to new insights into transcriptional regulations in innate immunity[J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 72(9): 1102-1113.
- [15] KAWAI T, AKIRA S. Signaling to NF-kappa B by toll-like receptors[J]. *Trends Mol Med*, 2007, 13(11): 460-469.