◆实验研究◆

丹参酮ⅡA调控PKM2/EGFR通路抑制平滑肌细胞增殖和代谢重编程的研究

黄飞燕[1]，吴书玲[2]，钟智强[1]

1. 浙江中医药大学附属第一医院/浙江省中医院医学检验科，浙江 杭州 310006
2. 浙江中医药大学附属第一医院/浙江省中医院老年医学科，浙江 杭州 310006

［摘要］**目的：**探讨丹参酮ⅡA通过PKM2/EGFR信号通路抑制氧化型低密度脂蛋白（ox-LDL）诱导的血管平滑肌细胞增殖和瓦博格效应的分子机制。**方法：**以人主动脉平滑肌细胞为研究对象，分别设置阴性对照组、ox-LDL对照组和丹参酮ⅡA低、高剂量组（10、50 μg/mL）；MTT法检测丹参酮ⅡA干预对ox-LDL诱导的平滑肌细胞增殖的影响，流式细胞术检测细胞周期变化；蛋白质印迹法检测丙酮酸激酶同工酶M2（PKM2）、表皮生长因子受体（pEGFR）、活性β-catenin、细胞周期蛋白D1（cyclin D1）、葡萄糖转运蛋白1（Glut1）、乳酸脱氢酶A（LDHA）蛋白表达变化，荧光定量PCR法检测PKM2mRNA水平变化；分光光度法检测培养基葡萄糖消耗量和乳酸生成量。**结果：**丹参酮ⅡA以剂量依赖性方式抑制ox-LDL诱导的细胞增殖，G1期细胞比例增加，S期和G2/M期细胞比例降低；丹参酮ⅡA从蛋白和转录水平抑制PKM2表达，下调pEGFR、活性β-catenin、cyclin D1、Glut1和LDHA蛋白表达，同时细胞减少葡萄糖摄取和乳酸产生。**结论：**丹参酮ⅡA可通过调控PKM2介导的EGFR，抑制ox-LDL诱导的平滑肌细胞增殖和代谢重编程。

［关键词］丹参酮ⅡA；血管平滑肌细胞；氧化低密度脂蛋白；丙酮酸激酶同工酶M2；表皮生长因子受体；代谢重编程

［中图分类号］R285.6 ［文献标志码］A ［文章编号］0256-7415（2025）10-0171-09

DOI：10.13457/j.cnki.jncm.2025.10.033

Study on Tanshinone ⅡA in Inhibiting Proliferation of Smooth Muscle Cells and Metabolic Reprogramming by Regulating PKM2/EGFR Signaling Pathway

HUANG Feiyan[1], *WU Shuling*[2], *ZHONG Zhiqiang*[1]

1. Medical Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University/Zhejiang Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou Zhejiang 310006, China; 2. Department of Geriatrics, The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University/Zhejiang Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou Zhejiang 310006, China

Abstract: Objective: To explore the molecular mechanism of Tanshinone ⅡA in inhibiting oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) induced proliferation of vascular smooth muscle cells and Warburg effect by regulating the PKM2/EGFR signaling pathway. **Methods:** The human aortic smooth muscle cells were used as the research object. The negative control group, the ox-LDL control group and the low and high doses of Tanshinone ⅡA group(10、50 μg/mL) were respectively set up; MTT assay was used to detect the effect of Tanshinone ⅡA intervention on the proliferation of

［收稿日期］2024-08-13
［修回日期］2025-02-11
［基金项目］浙江省中医药科学研究基金项目（2021A060）
［作者简介］黄飞燕（1981-），男，检验技师，E-mail：920592813@qq.com。
［通信作者］钟智强（1977-），男，主管检验技师，E-mail：zhongzhq@126.com。

smooth muscle cells induced by ox-LDL, and flow cytometry was used to detect the changes in cell cycle; the changes in protein expression of pyruvate kinase isozyme type M2 (PKM2), phosphorylated epidermal growth factor receptor (pEGFR), active β-catenin, cyclin D1, Glut1 and LDHA protein was detected by Western blotting, and the levels of PKM2 mRNA were detected by fluorescence quantitative PCR; glucose consumption and lactic acid production were measured by spectrophotometry. **Results**: Tanshinone Ⅱ A inhibited the ox-LDL-induced cell proliferation in a dose-dependent manner. The proportion of cells in G1 phase was elevated, and reduced in S phase and G2/M phase. Tanshinone Ⅱ A inhibited the expression of PKM2 by the regulation of proteins and transcriptional level, down-regulated the protein expression of pEGFR, active β-catenin, cyclin D1, Glut1 and LDHA, and reduced glucose uptake and lactic acid production. **Conclusion**: Tanshinone Ⅱ A can inhibit the ox-LDL-induced proliferation of smooth muscle cells and metabolic reprogramming by regulating PKM2-mediated EGFR.

Keywords: Tanshinone Ⅱ A; Vascular smooth muscle cells; oxidized low-density lipoprotein; Pyruvate kinase isozyme type M2; Phosphorylated epidermal growth factor receptor; Metabolic reprogramming

动脉粥样硬化(AS)可累及心、脑、肾、眼等多器官及外周血管系统，是泛血管疾病的主要病理基础。血管平滑肌细胞(VSMCs)是AS病理过程中的主要效应细胞，VSMCs增殖对AS的进展及预后起关键作用。然而，VSMCs在AS的病理过程中的作用尚未完全阐明。丹参酮ⅡA是从唇形科鼠尾草植物丹参提取出的主要亲脂性活性成分，临床上常用于预防和治疗心脑血管疾病。丙酮酸激酶同工酶M2(PKM2)既是糖酵解限速酶又是基因调控蛋白激酶，其水平跟肿瘤细胞增殖、侵袭、转移和瓦博格效应相关。氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)可通过上调PKM2介导的表皮生长因子受体(EGFR)活性而促进VSMCs增殖，并且诱导细胞发生瓦博格(Warburg)效应[1]。丹参酮ⅡA不仅能够阻止肿瘤细胞生长和抑制肿瘤瓦博格效应，而且还能抑制VSMCs增殖，降低血脂，保护血管，达到抑制AS斑块形成、延缓AS进展的效果。本研究就丹参酮ⅡA与PKM2/EGFR通路之间的关联以及其在ox-LDL诱导的细胞糖代谢紊乱方面的作用机制作进一步研究。

1 材料与方法

1.1 实验细胞株 人主动脉平滑肌细胞，购自上海中科院细胞研究所；PKM2稳定过表达细胞株为本实验室保存细胞株。

1.2 主要仪器与试剂 StepOne Plus实时荧光定量PCR仪(美国ABI公司)；Mini-PROTEAN Tetra电泳仪(美国Bio-Rad公司)；ChemiDoc凝胶成像分析系统(美国Bio-Rad公司)。丹参酮ⅡA磺酸钠(批号：1611321)购自上海上药第一生化药业有限公司；ox-LDL(批号：20171120)购自广州奕元生物技术有限公司；PKM2抗体(批号：60268-1-Ig)、葡萄糖转运蛋白1(Glut1)抗体(批号：66290-1-Ig)、乳酸脱氢酶A(LDHA)抗体(批号：66287-1-Ig)、β-actin抗体(批号：66009-1-Ig)购自武汉三鹰生物技术有限公司；EGFR抗体(批号：4267S)、活性β-catenin(non-phosphorylated ser-33, Ser-37 and Thr-41)抗体(批号：8814S)、细胞周期蛋白D1(cyclin D1)抗体(批号：2922S)和EGFR抑制剂AG1478(批号：9842S)购自美国Cell Signaling Technology公司；乳酸测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所；葡萄糖测定试剂盒购自美国Sigma-Aldrich公司；达尔伯克改良伊格尔培养液(DMEM)(批号：17101107)、磷酸盐缓冲液(PBS)(批号：17110303)购自杭州吉诺生物技术有限公司；噻唑蓝溶液(MTT)(批号：20170109)购自上海基尔顿生物科技有限公司；二甲基亚砜(DMSO)(批号：20160822)购自杭州萧山化学试剂厂；放射免疫沉淀分析裂解液(RIPA)(批号：20170201)购自上海碧云天生物技术有限公司；碘化丙啶-脱氧核糖核酸酶(PI和DNase)混合液(批号：550825)购自上海优维宁生物有限公司。

1.3 细胞处理与分组 对细胞复苏进行操作，然后持续培养细胞直至其进入对数生长期。细胞用含10%胎牛血清的DMEM培养液，放置于含5% CO_2饱

和湿度的37 ℃培养箱中进行常规培养。待细胞贴壁生长至融合率达60%～70%，弃上清，PBS缓冲液洗细胞2遍，加入无血清DMEM培养基，饥饿培养18 h。将饥饿处理细胞加入含血清完全培养基，进行实验分组，每组设3个复孔。按随机数字表法分为阴性对照组（NC）：细胞正常培养，不施加特殊刺激因素；ox-LDL对照组（ox-LDL）：使用浓度为50 μg/mL的ox-LDL对细胞进行刺激；丹参酮ⅡA低剂量组（10 μg/mL Tan ⅡA+ox-LDL）：用50 μg/mL的ox-LDL与10 μg/mL的丹参酮ⅡA共同刺激细胞；丹参酮ⅡA高剂量组（50 μg/mL Tan ⅡA+ox-LDL）：以50 μg/mL的ox-LDL和50 μg/mL的丹参酮ⅡA一起刺激细胞。

1.4 MTT法检测细胞增殖活性 对处于对数生长期的细胞进行消化处理，使其从培养器皿表面脱离下来，再通过重悬操作，配成浓度1.0×10^5/mL细胞悬液。在96孔板中每孔加入100 μL，每组3个复孔，根据实验分组给予不同处理，将96孔板放置在37 ℃、5% CO_2、饱和湿度的培养箱中培养24 h。每孔加入20 μL 5 mg/mL MTT溶液继续避光孵育4 h，弃上清，每孔加入100 μL DMSO溶液，振荡至溶解结晶物终止反应。酶标仪调至波长490 nm，以空白对照调零，检测光密度值（OD），OD值越高则细胞增殖活性越强。

1.5 流式细胞术检测细胞周期 取生长对数期细胞，丹参酮ⅡA处理细胞24 h，将收集的细胞用1×PBS缓冲液洗1次，1 000 r/min，半径17.5 cm，离心5 min，弃上清，预冷75%乙醇将细胞打散混匀后-20 ℃避光18 h，第二天1 000 r/min，半径17.5 cm，离心5 min，弃上清，1×PBS缓冲液洗2次去除乙醇，每管加入10×10^5/mL细胞，加入500 μL PI和DNase混合液染色，室温避光染色15 min，采用流式细胞仪检测。将G1期视为细胞静止期，将S期和G2/M期视为细胞增殖期，G1期细胞比例增加，S期和G2/M期细胞比例减少说明细胞增殖受到抑制，反之则说明细胞增殖。

1.6 荧光定量PCR检测PKM2 mRNA相对表达 收集对数生长期细胞，按照实验分组进行处理，采用Trizol法提取细胞总RNA，紫外分光光度计确定总RNA纯度和浓度。遵照说明书反转录合成cDNA，以GAPDH作为扩增内参进行荧光定量PCR法扩增，引物序列见表1。PCR扩增条件：95 ℃预变性30 s，95 ℃变性5 s，60 ℃复性30 s，扩增40个循环，融解曲线分析，若出现单一峰且峰形尖锐，则表明扩增产物特异性良好，无明显的引物二聚体或非特异性扩增产物。采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算PKM2相对表达量，ΔCt_1=对照目的基因Ct值-对照内参基因Ct值，ΔCt_2=实验组目的基因Ct值-实验组内参基因Ct值，$\Delta\Delta Ct=\Delta Ct_2-\Delta Ct_1$。代入公式计算即得到PKM2 mRNA相对表达量。

表1 引物序列

基因	序列（5′-3′）
GAPDH	正向：GCACCGTCAAGGCTGAGAAC
	反向：TGGTGAAGAACGCCAGTGGA
PKM2	正向：GCTGCCATCTACCACTTGC
	反向：CCAGACTTGGTGAGGACGATT

1.7 蛋白质印迹法检测蛋白表达 取2.0×10^5/mL对数生长期VSMCs，每孔2 mL接种于6孔板；根据实验分组要求进行处理，加入含苯甲基磺酰氟（PMSF）的RIPA裂解液提取细胞总蛋白；采用BCA法检测蛋白浓度，将一定量的蛋白样品与5×SDS-PAGE上样缓冲液按比例混合后，在100 ℃条件下变性5 min，接着进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE），在80 V恒压电泳2 h；根据蛋白分子量大小切取含目的蛋白条带的凝胶，同时裁剪合适大小的聚偏二氟乙烯膜（PVDF），将凝胶上的蛋白转移到PVDF膜上，用5%脱脂奶粉对PVDF膜封闭；根据实验要求分别加入指定抗体PKM2抗体、EGFR抗体、活性β-catenin抗体、Glut1抗体、LDHA抗体、cyclin D1抗体，4 ℃条件下过夜，之后加入山羊抗鼠IgG二抗，室温反应2 h；利用增强化学发光法（ECL）发光显色，用ImageJ软件对条带灰度进行分析，将目的蛋白表达量以β-actin进行标准化处理，进行3次独立重复实验，对比分析各组间蛋白表达差异。

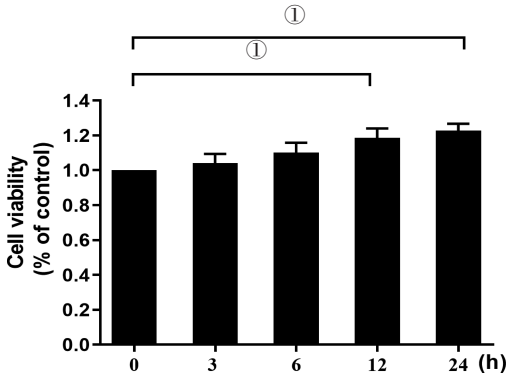
1.8 比色法检测细胞培养基上清液葡萄糖和乳酸含量 按照操作说明书将标准品稀释成不同浓度梯度，绘制标准曲线；使用前将酶贮存液和酶稀释液按规定1∶100比例进行稀释，制备酶工作液；按照1∶50∶10比例将细胞培养上清液、酶工作液和显色剂按比例吹打混合；37 ℃水浴温育10 min；用终止液混匀及时终止反应；用双蒸馏水（ddH_2O）调零，在530 nm（乳酸）或340 nm（葡萄糖）波长下测量OD值，

结合之前制作的标准曲线，利用曲线的数学模型，计算出细胞培养基上清液中葡萄糖和乳酸的实际含量。

1.9 统计学方法 本实验数据用SPSS25.0软件进行处理分析。计量资料符合正态分布以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，多组数据间比较采用单因素方差分析，2组数据间比较采用成组样本t检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

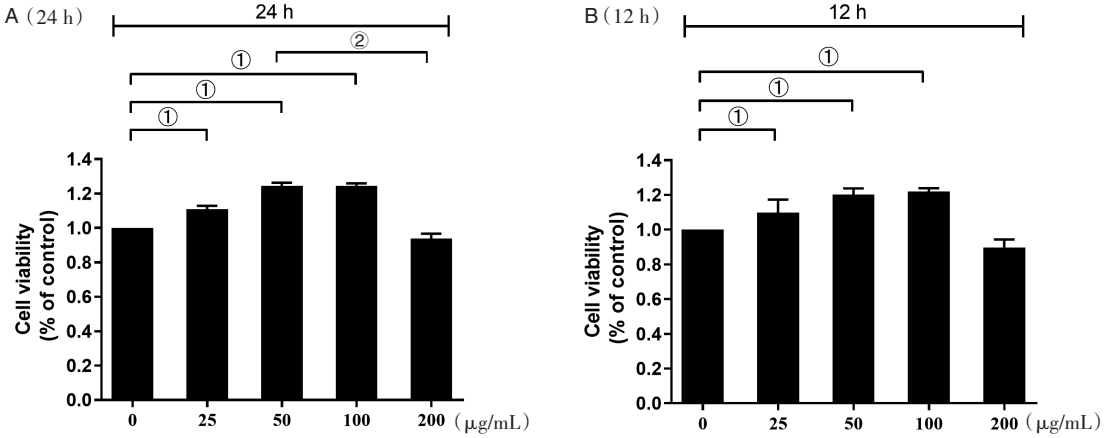
2 结果

2.1 ox-LDL刺激对VSMCs增殖的影响 首先给予VSMCs 50 μg/mL ox-LDL刺激强度，与0 h比较，细胞增殖在3 、6 h时差异无统计学意义($P>0.05$)，在12 、24 h时细胞明显增殖($P<0.05$)；与12 h比较，细胞增殖在24 h时差异无统计学意义($P>0.05$)(见图1)。然后分别给予VSMCs 25、50、100、200 μg/mL浓度的ox-LDL刺激24 h，结果显示：与阴性对照组比较，细胞在25 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL刺激强度下明显增殖($P<0.05$)；与50 μg/mL浓度刺激比较，100 μg/mL的刺激强度对细胞增殖差异无统计学意义($P>0.05$)，200 μg/mL刺激反而抑制细胞增殖($P>0.05$)(见图2A)。上述实验结果在给予50 μg/mL ox-LDL刺激12 h得到验证，与阴性对照组比较，细胞在25 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL刺激强度下亦明显增殖($P<0.05$)(见图2B)。



注：①与0 h比较，$P<0.05$。

图1 50 μg/mL ox-LDL刺激在不同时间对平滑肌细胞增殖的影响



注：①与阴性对照组比较，$P<0.05$；②与50 μg/mL浓度ox-LDL刺激比较，$P<0.05$。

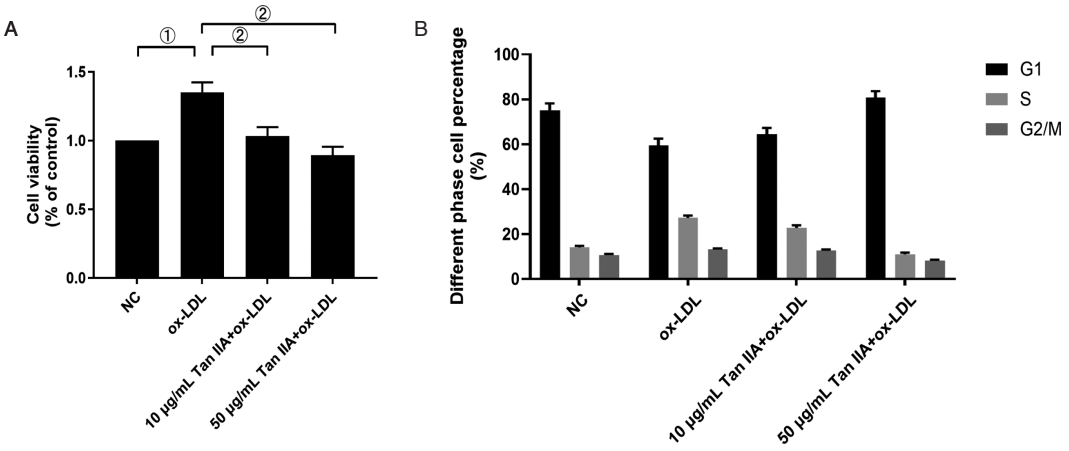
图2 不同浓度ox-LDL刺激在12/24 h时对平滑肌细胞增殖的影响

2.2 丹参酮ⅡA对ox-LDL诱导的VSMCs增殖的影响 用50 μg/mL ox-LDL刺激VSMCs 24 h，结果显示与ox-LDL对照组比较，10、50 μg/mL丹参酮ⅡA处理都抑制ox-LDL诱导的细胞增殖($P<0.05$)(见图3A)。丹参酮ⅡA低剂量组G1期和G2/M期细胞与同细胞周期的ox-LDL对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)，但是S期细胞较同细胞周期的ox-LDL对照组减少($P<0.05$)；丹参酮ⅡA高剂量组G1期细胞较同细胞周期的ox-LDL对照组、丹参酮ⅡA低剂量组均增加($P<0.05$)，丹参酮ⅡA高剂量组S期和G2/M期细胞则较同细胞周期的ox-LDL对照组、参酮ⅡA低剂量丹组细胞减少($P<0.05$)(见表2及图3B)。

表2 4组不同细胞周期细胞比例比较($\bar{x}\pm s$) %

组 别	样本量	G1期	S期	G2/M期
阴性对照组	9	75.20±3.02	14.11±0.66	10.69±0.55
ox-LDL对照组	9	59.49±3.01	27.28±0.99	13.23±0.42
丹参酮ⅡA低剂量组	9	65.47±2.85	21.82±1.12①	12.71±0.49
丹参酮ⅡA高剂量组	9	80.77±2.82①②	11.01±0.76①②	8.22±0.39①②

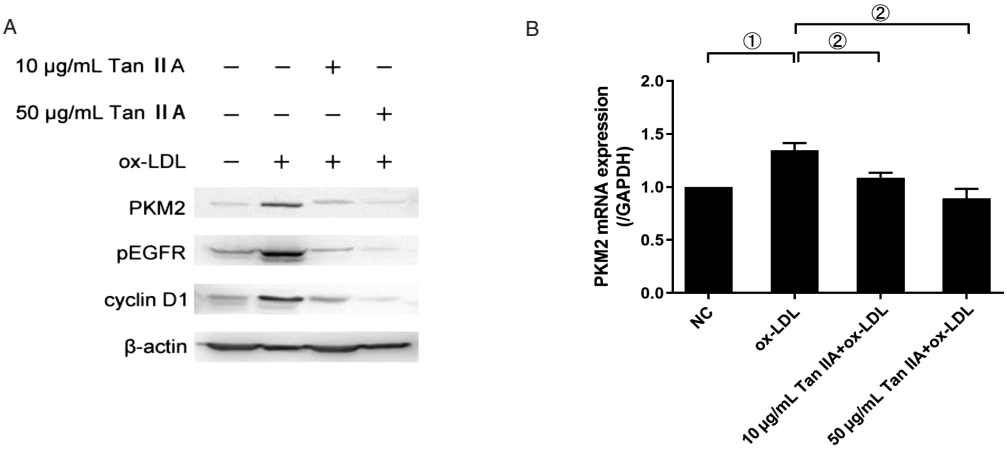
注：①与ox-LDL对照组相同细胞周期比较，$P<0.05$；②与丹参酮ⅡA低剂量组相同细胞周期比较，$P<0.05$。



注：①与NC组比较，$P<0.05$；②与ox-LDL组比较，$P<0.05$。

图3 丹参酮ⅡA对ox-LDL诱导的VSMCs增殖的影响

2.3 丹参酮ⅡA对ox-LDL诱导的VSMCs PKM2、pEGFR和cyclin D1表达的影响 与ox-LDL对照组比较，丹参酮ⅡA高、低剂量组的PKM2蛋白和mRNA表达均降低（$P<0.05$）；与丹参酮ⅡA低剂量组比较，丹参酮ⅡA高剂量组的PKM2蛋白和mRNA表达下降（$P<0.05$），见图4B。在pEGFR和cyclin D1蛋白表达方面，丹参酮ⅡA高、低剂量组低于ox-LDL对照组（$P<0.05$），丹参酮ⅡA高剂量组低于丹参酮ⅡA低剂量组（$P<0.05$），见图4A。



注：图A为对PKM2、pEGFR和cyclin D1蛋白表达的影响；“+”表示进行了该项处理；“−”表示没有进行该项处理（下图同）。图B为对PKM2 mRNA表达的影响。①与NC组比较，$P<0.05$；②与ox-LDL组比较，$P<0.05$。

图4 丹参酮ⅡA对ox-LDL诱导的平滑肌细胞PKM2、pEGFR、cyclin D1表达的影响

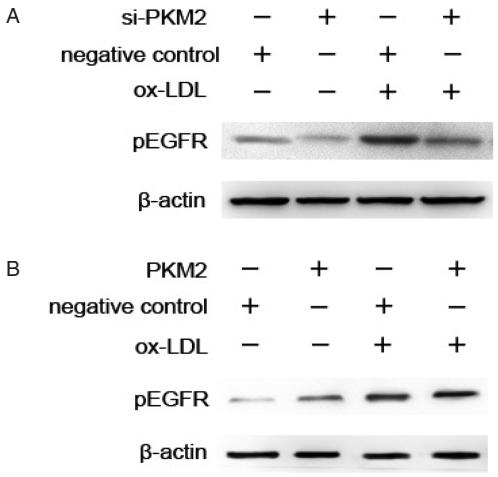
2.4 PKM2对pEGFR、活性β-catenin、cyclin D1蛋白的调控作用 与阴性对照组比较，特异性PKM2 siRNA沉默细胞的pEGFR表达水平下降，PKM2过表达细胞的pEGFR表达水平则明显升高（见图5）。用EGFR特异性抑制剂AG1478进行干预，结果发现与ox-LDL对照组比较，抑制EGFR可以降低活性β-catenin表达水平（见图6）。与阴性对照组比较，PKM2 siRNA降低活性β-catenin和周期蛋白cyclin D1蛋白水平，PKM2过表达细胞则上调活性β-catenin和cyclin D1蛋白水平（见图7）。

2.5 丹参酮ⅡA对ox-LDL诱导的VSMCs细胞糖代谢的影响 葡萄糖消耗量随着丹参酮ⅡA作用浓度的增加而减少，丹参酮ⅡA高、低剂量组均低于ox-LDL对照组（$P<0.05$），而且丹参酮ⅡA高剂量组的葡萄

糖消耗量较丹参酮ⅡA低剂量组下降($P<0.05$)(见图8)。丹参酮ⅡA高、低剂量组的乳酸产生量均低于ox-LDL对照组($P<0.05$),丹参酮ⅡA高、低剂量组之间乳酸产生量无统计学差异($P>0.05$)(见图9)。在Glut1蛋白表达方面,丹参酮ⅡA高、低剂量组均低于ox-LDL对照组($P<0.05$),丹参酮ⅡA高剂量组同样低于丹参酮ⅡA低剂量组($P<0.05$);在LHDA蛋白表达方面,丹参酮ⅡA高、低剂量组均低于ox-LDL对照组($P<0.05$),丹参酮ⅡA高、低剂量组之间没有统计学差异($P>0.05$)(图10)。

3 讨论

心脑血管疾病位于危害人类健康疾病的前列,AS是各种心脑血管疾病的主要病因。AS发病机制十分复杂,血管平滑肌增殖对AS的进展及预后起关键



注:图A为50 μg/mL ox-LDL刺激PKM2表达敲低平滑肌细胞对pEGFR表达的影响;图B为50 μg/mL ox-LDL刺激PKM2过表达平滑肌细胞对pEGFR表达的影响。

图5 PKM2对VSMCs pEGFR表达的影响

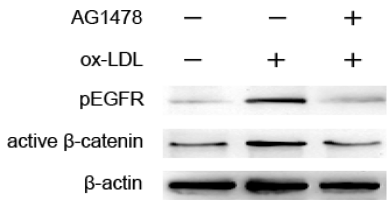
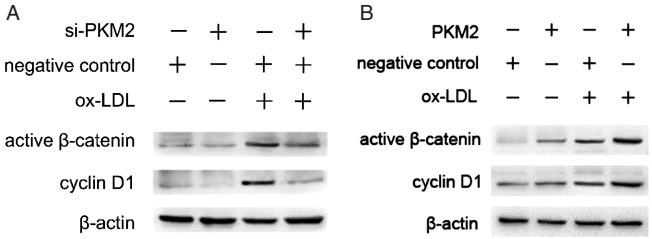
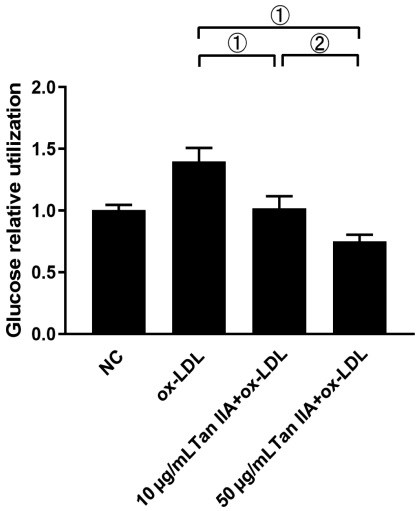


图6 EGFR抑制剂对pEGFR和活性β-catenin表达的影响



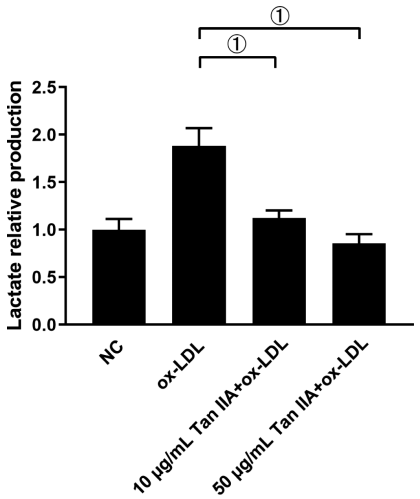
注:图A为50 μg/mL ox-LDL刺激PKM2表达敲低平滑肌细胞活性β-catenin和cyclin D1蛋白表达情况;图B为50 μg/mL ox-LDL刺激PKM2过表达平滑肌细胞活性β-catenin和cyclin D1蛋白表达情况。

图7 PKM2表达对活性β-catenin和cyclin D1的影响



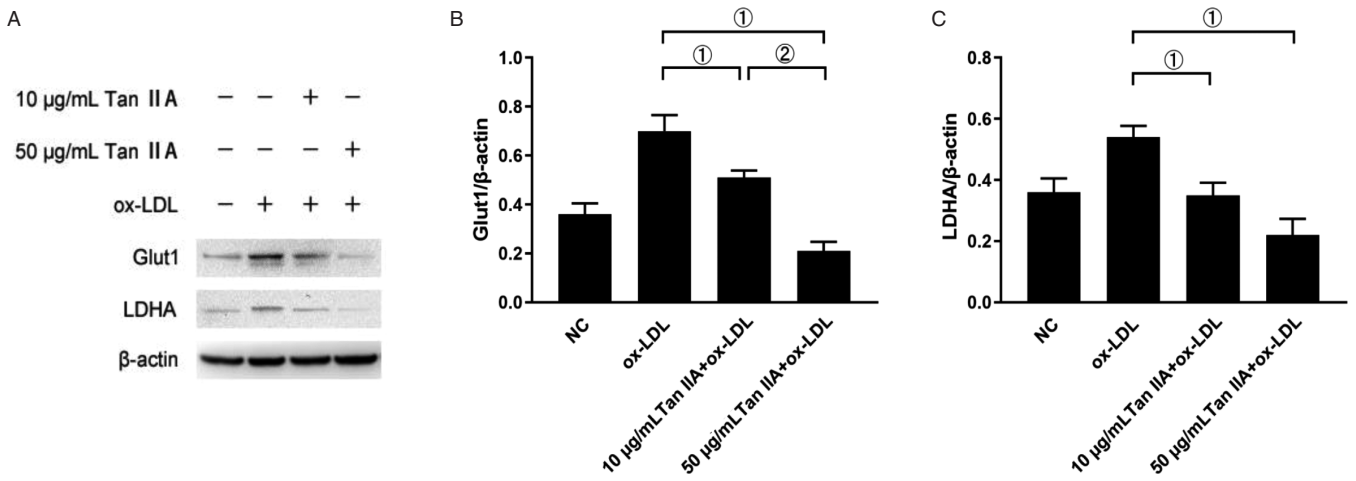
注:①与ox-LDL组比较,$P<0.05$;②与10 μg/mL Tan ⅡA+ox-LDL组比较,$P<0.05$。

图8 丹参酮ⅡA对ox-LDL诱导的平滑肌细胞葡萄糖消耗的影响



注:①与ox-LDL组比较,$P<0.05$。

图9 丹参酮ⅡA对ox-LDL诱导的VSMCs乳酸产生量的影响



注：图A为高、低剂量丹参酮ⅡA、ox-LDL对照组对Glut1和LDHA蛋白表达影响；图B为丹参酮ⅡA对ox-LDL诱导的Glut1表达的影响；图C为丹参酮ⅡA对ox-LDL诱导的LDHA表达的影响。①与ox-LDL组比较，$P<0.05$；②与10 μg/mL Tan ⅡA+ox-LDL组比较，$P<0.05$。

图10 丹参酮ⅡA对ox-LDL诱导的Glut1和LDHA蛋白表达的影响

作用。增殖的VSMCs不仅通过表达多种胆固醇摄入性受体摄入超量脂质转变为肌源性泡沫细胞，而且与血管结构重塑、斑块核心形成、血栓形成、反应活性氧堆积、环境酸化、炎症反应相关[2-3]。因此，抑制血管平滑肌增殖是治疗AS的一种重要策略和手段。目前，VSMCs增殖的机制尚未完全阐明。据报道，具有糖酵解限速酶和蛋白激酶双重身份的PKM2在增殖的VSMCs高表达[4]，然而PKM2在VSMCs增殖中的作用与分子机制仍有待进一步研究。

丹参酮ⅡA是一种来源于丹参的脂溶性物质，除了具有降脂降糖、舒张血管、抗氧化、抗炎、保护心脑血管等多种生物学活性外，还可抑制VSMCs增殖，例如抑制丝裂原活化蛋白激酶，下调c-fos表达，降低细胞内ROS水平；或抑制p38MAPK信号通路，调控miR-145-CD40通路，下调miR-712-5p表达等等[5-7]。研究表明，丹参酮ⅡA通过多途径调控PKM2抑制肿瘤细胞增殖，例如通过下调miR-122介导的PKM2表达抑制人食管癌细胞生长[8]；剂量依赖性下调SIX1表达，致使PKM2、HK2和LDHA表达下调，从而抑制非小细胞肺癌细胞生长和有氧糖酵解[9]；通过转录和蛋白水平抑制PKM2表达，下调PCNA表达，上调Cleaved Capase-3表达，抑制慢性髓细胞白血病细胞增殖[10]。关于PKM2与EGFR关系研究主要集中于肿瘤方面，EGFR调控PKM2导致下游β-catenin表达下调，抑制肿瘤细胞增殖。ox-LDL是导致AS的重要因子，可以不依赖Wnt的方式激活β-catenin，诱导平滑肌细胞从G0/G1期向S期推进，促进细胞增殖，加速AS进程[11]。在本研究前期实验中发现，PKM2从上游对EGFR发挥调控作用，即ox-LDL通过调控PKM2介导的EGFR活性促进VSMCs增殖和糖代谢紊乱[1]。基于前期研究结果和文献报道，本研究旨在探讨丹参酮ⅡA能否通过调控PKM2/EGFR/β-catenin通路下调cyclin D1水平抑制ox-LDL诱导的VSMCs增殖，并且通过下调PKM2介导的Glut1和LDHA表达纠正糖代谢紊乱。

ox-LDL具有随着浓度增加对VSMCs表现出促进增殖转向抑制增殖的特性。本研究首先确定了诱导VSMCs增殖的最适ox-LDL刺激浓度和时间，结果发现ox-LDL促细胞增殖峰值首先出现在50 μg/mL，在100 μg/mL左右细胞增殖达到平台期。这表明ox-LDL只能在一定的浓度范围内对VSMCs发挥促有丝分裂作用，高浓度ox-LDL(200 μg/mL)刺激对细胞具有毒性作用反而抑制细胞增殖，这与之前文献报道结果相一致。另外，在实验时间范围内VSMCs增殖程度随着作用时间的增加而增加，这与AS属于慢性炎症性疾病，ox-LDL对血管壁的伤害是长期的复杂的累积

性损伤过程相吻合。因此，50 μg/mL浓度ox-LDL刺激12 h或24 h是诱导VSMCs增殖的理想条件。基于上述实验数据，本研究选择了50 μg/mL ox-LDL刺激12 h或24 h作为后续实验的ox-LDL刺激条件。在摸索丹参酮ⅡA干预VSMCs增殖的合适剂量与时间时，本研究发现丹参酮ⅡA以浓度依赖方式抑制ox-LDL诱导的VSMCs增殖，说明丹参酮ⅡA不仅能够抑制肿瘤细胞生长，同样可以抑制ox-LDL诱导的血管平滑肌增殖。

为了探究丹参酮ⅡA抑制ox-LDL诱导的细胞增殖机制及其与PKM2之间的关联性，本研究选择低、高剂量丹参酮ⅡA进行后续实验。结果显示丹参酮ⅡA使ox-LDL诱导的VSMCs增殖阻滞在G1期。周期蛋白在推动细胞周期各个时期之间转换中发挥重要作用，其中驱动细胞由G1期进入S期的关键周期蛋白是cyclin D1，其为人类CCND1基因编码的G1/S特异细胞周期调控蛋白，作为细胞周期蛋白依赖性激酶CDKs的调控者，cyclin D1在细胞周期中首先被合成，并且在G1中晚期达峰值，驱动细胞通过G1/S检查点，由G1期进入S期，从而促进细胞增殖[12]。为了验证丹参酮ⅡA阻碍ox-LDL诱导细胞增殖致使细胞停滞于G1期是由于丹参酮ⅡA抑制cyclin D1蛋白表达的推测，本研究检测了cyclin D1表达水平，结果与预期一致，丹参酮ⅡA不仅剂量依赖性下调ox-LDL刺激的cyclin D1蛋白表达，而且丹参酮ⅡA以剂量依赖方式抑制pEGFR、PKM2蛋白表达和PKM2 mRNA水平。随后本研究使用PKM2过表达细胞株和PKM2 siRNA干预细胞PKM2表达水平来观察PKM2作为上游分子对pEGFR和cyclin D1的调控作用。结果发现敲低PKM2表达水平不仅下调了pEGFR和活性β-catenin，而且抑制了cyclin D1蛋白表达，PKM2过表达则呈现截然相反的结果。为了验证pEGFR对活性β-catenin水平的影响，本研究使用EGFR特异性抑制剂AG1478进行干预，结果发现抑制EGFR可以明显降低活性β-catenin水平，结合之前实验结果，说明活性β-catenin表达水平受PKM2介导的EGFR活性调控。因为周期蛋白cyclin D1是β-catenin重要的下游调控因子[13]，所以可以推断丹参酮ⅡA抑制cyclin D1表达是由于下调了PKM2介导的EGFR活性，引起活性β-catenin表达降低造成的。为了探讨丹参酮ⅡA抑制ox-LDL诱导的VSMCs增殖的同时是否能纠正ox-LDL诱导的细胞糖代谢紊乱现象。本研究同时检测了丹参酮ⅡA干预后细胞培养基中的葡萄糖和乳酸含量变化。结果发现丹参酮ⅡA能够降低ox-LDL诱导的VSMCs葡萄糖消耗量和乳酸生成量。

Warburg效应是一种肿瘤代谢重编程方式，即无论是否缺氧，增殖细胞和肿瘤细胞糖利用率增加，并且通过糖酵解途径将其转化为乳酸为主，三羧酸循环反而被抑制。能量代谢调控已经成为近年来医学研究的热点领域。Warburg效应有3个关键分子，即PKM2、Glut1和LDHA。Glut1是细胞糖摄取重要跨膜蛋白分子。LDHA则是催化丙酮酸转化为乳酸以及驱使还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)转变成烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+)的关键代谢酶。据报道，cyclin D1、Glut1和LDHA都是β-catenin的下游靶基因产物[14]。丹参酮ⅡA抑制ox-LDL诱导的Warburg效应机制极可能是下调了β-catenin下游2个重要的调控靶蛋白Glut1和LDHA的表达。

综上所述，本研究从AS病理过程中两个重要因素(ox-LDL和VSMCs)阐明丹参酮ⅡA调控PKM2发挥抗AS的机制。PKM2可能是AS信号通路的交汇点或关键调控分子，本研究成果进一步增强了PKM2作为AS防治重要药物靶点的地位。这为深入挖掘丹参酮ⅡA抗心血管疾病的作用机制提供了基础。然而在整个调控过程中是否存在其它效应分子以及各个分子之间的作用位点，还有待进一步深入研究。

[参考文献]

[1] 钟智强，吴书玲，张航，等. 丙酮酸激酶同工酶M2调控表皮生长因子受体活性促进血管平滑肌细胞增殖和代谢重塑[J]. 中国卫生检验杂志，2021，31(24)：2961-2967.

[2] TANG H Y，CHEN A Q，ZHANG H，et al. Vascular Smooth Muscle Cells Phenotypic Switching in Cardiovascular Diseases[J]. Cells，2022，11(24)：4060.

[3] FASOLO F，PALOSCHI V，MAEGDEFESSEL L. Long non-coding RNAs at the crossroad of vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in atherosclerosis and neointimal formation[J]. Atherosclerosis，2023，374：34-43.

[4] ZHAO X，TAN F，CAO X，et al. PKM2-dependent glycolysis promotes the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells

during atherosclerosis[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2020, 52(1): 9-17.

[5] LI Y, CHEN F, GUO R, et al. Tanshinone ⅡA inhibits homocysteine-induced proliferation of vascular smooth muscle cells via miR-145/CD40 signaling[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 522(1): 157-163.

[6] QIN Y, ZHENG B, YANG G S, et al. Tanshinone ⅡA inhibits VSMC inflammation and proliferation in vivo and in vitro by downregulating miR-712-5p expression[J]. Eur J Pharmacol, 2020, 880: 173140.

[7] LU J, SHAN J, LIU N, et al. Tanshinone IIA Can Inhibit Angiotensin II-Induced Proliferation and Autophagy of Vascular Smooth Muscle Cells via Regulating the MAPK Signaling Pathway[J]. Biol Pharm Bull, 2019, 42(11): 1783-1788.

[8] ZHANG H S, ZHANG F J, LI H, et al. Tanshinone ⅡA inhibits human esophageal cancer cell growth through miR-122-mediated PKM2 down-regulation[J]. Arch Biochem Biophys, 2016, 598: 50-56.

[9] QI H, CHEN Z, QIN Y, et al. Tanshinone IIA inhibits cell growth by suppressing SIX1-induced aerobic glycolysis in non-small cell lung cancer cells[J]. Oncol Lett, 2022, 23(6): 184.

[10] 聂子元，周静，杨高山，等. 丹参酮ⅡA通过下调PKM2表达抑制慢性髓细胞白血病细胞增殖，促进细胞凋亡[J]. 河北医科大学学报，2018，39(12)：1389-1393.

[11] DIAO H, CHENG J, HUANG X, et al. The Chinese medicine Fufang Zhenzhu Tiaozhi capsule protects against atherosclerosis by suppressing EndMT via modulating Akt1/β-catenin signaling pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2022, 293: 115261.

[12] TANG X Y, LUO Z L, XIONG Y L, et al. The Proliferative Role of Immune Checkpoints in Tumors: Double Regulation[J]. Cancers (Basel), 2022, 14(21): 5374.

[13] LIAO Y, LIANG J, WANG Y, et al. Target deubiquitinase OTUB1 as a therapeatic strategy for BLCA via β-catenin/necroptosis signal pathway[J]. Int J Biol Sci, 2024, 20(10): 3784-3801.

[14] TONG Y, GUO D, YAN D, et al. KAT2A succinyltransferase activity-mediated 14-3-3ζ upregulation promotes β-catenin stabilization-dependent glycolysis and proliferation of pancreatic carcinoma cells[J]. Cancer Lett, 2020, 469: 1-10.

（责任编辑：冯天保，邓乔丹）