

论著·实验研究

抑制 Notch 信号对血管紧张素 II 诱导的肺血管重构的影响

乔莉娜¹ 许红波² 石坤³ 周同甫¹ 华益民¹ 刘瀚旻¹

(1. 四川大学华西第二医院儿科, 四川 成都 610041; 2. 成都军区总医院儿科, 四川 成都 610083;
3. 成都市儿童医院, 四川 成都 610017)

[摘要] 目的 Notch 信号对胚胎发育、血管损伤修复、肿瘤生长过程中的血管重构发挥了重要作用, 但对肺动脉高压肺血管重构研究很少, 本研究旨在探讨抑制 Notch 信号对血管紧张素 II (AngII) 诱导的肺血管重构的影响。方法 采用 Ang II 持续刺激培养 7 d 的肺动脉血管条, 测定血管管壁厚度及血管壁细胞增殖细胞核抗原 (PCNA) 和 caspase-3 阳性率。同时部分血管条还加入 γ -分泌酶抑制剂 DAPT 抑制 Notch 信号, 测定血管条 Notch 1~4 受体及其下游转录因子 HERP1、HERP2 mRNA 水平。结果 Ang II 持续刺激血管 7 d, 血管壁厚度增加近 50%, 伴有血管壁细胞 PCNA 阳性率升高和 caspase-3 阳性率降低 ($P < 0.05$)。加入 DAPT 后, 血管条 Notch 1~4 受体 mRNA 水平无明显改变, 但 HERP 1, 2 mRNA 水平降低 ($P < 0.05$), 管壁厚度、PCNA 和 caspase-3 阳性率的改变程度明显降低 ($P < 0.05$)。结论 抑制 Notch 信号能抑制 Ang II 诱导的肺血管重构, 可能成为肺动脉高压治疗的一个新思路。
[中国当代儿科杂志, 2011, 13(6):503-508]

[关键词] Notch 信号; 血管紧张素; 肺; 血管重构; 大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)06-0503-06

Effect of inhibition of Notch signal on pulmonary vascular remodeling induced by angiotensin II

QIAO Li-Na, XU Hong-Bo, SHI Kun, ZHOU Tong-Fu, HUA Yi-Min, LIU Han-Min. Department of Pediatrics, Second West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, China (Email: iaqiao@163.com)

Abstract: Objective It is known that Notch signal is very important to vascular remodeling during the process of embryonic development, vessel repair and tumor growth, but there are few studies about pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. This study was to explore the effect of inhibiting Notch signal on pulmonary vascular remodeling induced by angiotensin II. **Methods** Vessel strips taken from healthy Wistar rats were co-cultured with exogenous angiotensin II and the potent smooth muscle cell proliferation stimulators for 7 days. Vascular wall thickness, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) positive cell rate and caspase-3 positive cell rate were examined in vessel strips. Then some vessel strips were cultured with angiotensin II and γ -secretase inhibitor DAPT, a Notch signaling inhibitor for 7 days. The levels of Notch 1 to 4 receptor and HERP1/2 mRNA were ascertained by FQ-PCR. **Results** Angiotensin II stimulation in the cultured normal pulmonary arteries resulted in an increase in the vascular medial thickness by nearly 50%, and a significant increase in the PCNA positive cell rate and a decrease in the caspase-3 positive cell rate. DAPT treatment did not result in the alterations of Notch 1 to 4 receptor levels, but decreased remarkably HERP1 and HERP2 mRNA expression. DAPT treatment also decreased angiotensin II-induced vascular medial thickness and PCNA positive cell rate and increased caspase-3 positive cell rate. **Conclusions** Inhibiting Notch signal by γ -secretase inhibitor may lead to the suppression of pulmonary vascular remodeling induced by angiotensin II, suggesting that the inhibition of Notch signal pathway might be a novel strategy for the treatment of pulmonary hypertension.

[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13(6):503-508]

Key words: Notch signal; Angiotensin; Pulmonary; Vascular remodeling; Rats

肺动脉高压 (pulmonary hypertension, PH) 是心血管领域的常见病症, 其发生发展机制并不明确。研究发现肺血管重构是各种严重 PH 的共同病理表

现, 提示血管重构是肺循环对各种病理刺激的共同病理过程, 研究肺血管重构成为研究 PH 的关键^[1-3]。现有研究发现: 在胚胎发育、血管损伤修复、

肿瘤生长等过程中,Notch 信号对其血管重构发挥了重要作用^[4-10],但对 PH 肺血管重构研究很少。血管紧张素Ⅱ(Angiotensin Ⅱ, Ang Ⅱ)是血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)的强丝裂原,对 PH 肺血管重构发生发展有重要作用^[11-16]。但是目前关于血管重构中 Ang Ⅱ对于 Notch 信号影响的报道较少。本研究利用 Ang Ⅱ诱导培养的肺动脉条发生血管重构,体外模拟 PH 肺血管重构,探讨用 γ -分泌酶抑制剂 DAPT 抑制 Notch 信号及其下游基因 HERP1-2 对肺血管重构的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级健康成年 Wistar 大鼠 36 只,年龄 8 周,体重 180 ~ 210 g,由四川大学华西医学中心动物实验中心提供。

1.2 主要试剂

M199 培养基(购自 GIBCO™, Invitrogen Corporation, Part No. P1504); γ -分泌酶抑制剂 N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylalycine t-butyl ester (DAPT), C₂₃H₂₆F₂N₂O₄ (购自 Sigma 公司, D5942, Synonym LY-374973), 溶解于二甲基亚砷(DMSO); Ang Ⅱ(分子量 1047.2) 购自 AnaSpec 公司(美国);小鼠抗大鼠增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)单克隆抗体,兔抗大鼠 caspase-3 单克隆抗体,购自 Neomarker 公司;免疫组化染色试剂盒 SP-9002, 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。细胞裂解液 Trizol 购自美国 MRC 公司;RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (#K1622), 购自立陶宛 MBI 公司;Taq DNA 聚合酶, 购自北京博大泰克(BioDev)生物基因技术有限责任公司;dNTP: 购自美国 Promega 公司;SYBR Green I, 购自瑞士 Roche 公司。Notch1 引物,上游系列:5'-TCTCAACTGCCAGAACCTTGT-3',下游系列:5'-ATGCCTCGCTTCTGTGCAG-3'(扩增的 cDNA 长度 171 bp); Notch2 引物,上游系列:5'-CACTGAGAGCTCCTGTTTCAA-3',下游系列:5'-CAGGCCATCAACACACGTTC-3'(cDNA 长度 160 bp); Notch3 引物,上游系列:5'-ATGGCAGGCTTCACAGGAAC-3',下游系列:5'-TGCAGCTGAAGCCATTGACT-3'(cDNA 长度 109 bp); Notch4 引物,上游系列:5'-AGTGTCTCCAGGCTTTGAA-3',下游系列:5'-GAAGATCAAGGCAGCTGGCT-3'(cDNA 长度 96 bp); HERP1 引物,上游系列:5'-GATGCTCCAGGCAACAGG-3',下游系

列:5'-GTGGGTCCGAAGGGTCAA-3'(cDNA 长度 143 bp); HERP2 引物,上游系列:5'-CCAACCA-CATCGTCCCA-3',下游系列:5'-CTAGCTTCG-CAGATCCCTG-3'(cDNA 长度 145 bp); GAPDH 引物,上游系列:5'-CCTCAAGATTGTCAGCAAT-3',下游系列:5'-CCATCCACAGTCTTCTGAGT-3'(cDNA 长度 141 bp)。由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.3 肺动脉血管条的制备及培养

大鼠断颈处死后,75% 酒精消毒,剪开胸腔,分离并剪下主肺动脉,置于装有无菌 PBS 缓冲液的培养皿中清洗,并去除血管外膜周围脂肪组织,在不损伤血管内膜的情况下,沿纵轴剪开肺动脉(约 4 mm × 5 mm),制成 1 条肺动脉血管条。将来自 36 只大鼠的 36 条肺动脉条随机分成 6 组,每组 6 条血管条。其中 1 组(正常肺动脉组)直接用 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋。其余 5 组肺动脉条培养于 35 mm 培养皿内,包埋于鼠尾胶原制成的凝胶中[鼠尾胶原 700 μ L, M199 (10 × liquid) 100 μ L, 无菌 NaHCO₃ (11.76 mg/mL) 200 μ L (总量 1 mL) 在冰上培养皿内混匀,铺布于培养皿中]。将肺动脉条内皮面朝上平铺在凝胶中,培养皿置 37℃ CO₂ 细胞培养箱中约 15 min。随胶原纤维形成,肺动脉条轻轻陷于并固定于凝胶之中。加入 M199 (1 × liquid) 1.5 mL, 1 h 后更换培养基为含 100 u/mL 双抗(青霉素、链霉素)的 M199 (1 × liquid)。这 5 组分别为:①空白对照(M199)组,②Ang Ⅱ + M199 组,③Ang Ⅱ + DMSO 组,④Ang Ⅱ + DAPT 低剂量组(培养基内 DAPT 浓度 1 μ M),⑤Ang Ⅱ + DAPT 高剂量组(培养基内 DAPT 浓度 10 μ M)。具体做法:培养 1 d 后,每日更换培养基并向 1.5 mL 培养基中分别加入①培养基 M199 4.5 μ L,②稀释好的 Ang Ⅱ 1.5 μ L (终浓度 1 × 10⁻⁷ M) 和 M199 3 μ L,③Ang Ⅱ 1.5 μ L (终浓度 1 × 10⁻⁷ M) 和 DMSO 3 μ L,④Ang Ⅱ 1.5 μ L (终浓度 1 × 10⁻⁷ M) 和 DAPT 3 μ L (终浓度 1 μ M),⑤Ang Ⅱ 1.5 μ L (终浓度 1 × 10⁻⁷ M) 和 DAPT 3 μ L (终浓度 10 μ M)。共 7 d。

第 9 天收集培养的肺动脉条,每条切成两半,一半液氮保存作 RT-PCR 用;另一半在 4℃ 4% 多聚甲醛内固定 2 h,常规脱水,透明,石蜡包埋,5 μ m 厚连续切片,行苏木精-伊红染色、弹力纤维染色、PCNA 和 caspase-3 免疫组化染色。

1.4 免疫组化染色

按 SP 染色试剂盒说明书进行。PCNA (1:300)、caspase-3 (1:100)。用 PBS 缓冲液 (0.01 mol/L, pH 7.4) 代替一抗作为阴性对照。结果采用 Image-Pro

Plus 软件扫描, 每条血管条随机观察 5 个视野 (×400), 计数血管壁 PCNA 或 caspase-3 阳性细胞比率, 取平均值, 反映血管壁细胞的增殖度与凋亡情况。

1.5 血管条管壁厚度测定

用 Verhoeff 铁苏木素染色法。染色结果采用 Image-Pro Plus 软件扫描, 每条血管随机观察 4 个视野 (×400), 每个视野测定 3 次内外弹力板之间的距离, 取平均值, 即管壁厚度。

1.6 血管条 Notch1、2、3、4 受体及其下游效应因子 HES 相关抑制因子蛋白 1、2 (HERP1、2) 的 mRNA 表达

采用 SYBR 染料法, 结果用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对待测样品的 mRNA 进行相对定量分析。组织总 RNA 提取按照 Trizol 说明书进行。cDNA 合成按照 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书进行。在 FTC2000 型荧光定量 PCR 仪 (加拿大枫岭公司) 上进行目的基因 RT-PCR 检测, 反应条件: 94℃ 预变性 2 min, 然后 94℃ 变性 20 s, 52℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 40 s, 进行 45 个循环。以无 cDNA 样品的空白管做为阴性对照。采集每一循环反应时的各反应管的荧光强度增长指数 (DRn) 分析绘制每一反应管的扩增动力学曲线, 从而确定每个样品管荧光强度增加到某一特定阈值时的扩增循环数 (Ct 值)。 $\Delta\Delta Ct = [Ct\ GI(\text{待测样品}) - Ct\ GAPDH(\text{待测样品})] - [Ct\ GI(\text{校正样品}) - Ct\ GAPDH(\text{校正样品})]$ 。计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 得到的目的基因相对于内参基因的定量。

1.7 统计学分析

用 SPSS 12.0 软件包进行数据处理, 计量数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析或重复测量的方差分析, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AngII 诱导后肺动脉血管变化

PCNA 是一种稳定的细胞周期相关核蛋白, 直接参加 DNA 的合成, 其阳性率反映细胞的增殖情况。而 caspase-3 表达具有反映凋亡启动因素存在和凋亡发生的双重生物学效应, 其阳性率反映了细胞的凋亡情况。

本研究发现, 空白对照组大鼠肺动脉在无血清的培养基中培养 8 d, 与未培养的正常肺动脉相比, 血管中膜厚度略有增加, 同时伴有血管壁细胞 PCNA 阳性率和 caspase-3 阳性率升高 (*P* < 0.05), 说明正常大鼠肺动脉血管条在无血清的培养基中可以存

活用于研究。在培养基中加入 AngII 后, 与空白对照组相比, 血管中膜厚度显著增加近 50% (*P* < 0.05), 同时伴有血管壁细胞 PCNA 阳性率升高 (*P* < 0.05) 和 caspase-3 阳性率的降低 (*P* < 0.05), 提示 Ang II 可促进 VSMC 增殖、抑制其凋亡, 诱导肺血管重构 (表 1、图 1 ~ 2)。

表 1 Ang II 对肺动脉的中膜厚度、血管壁细胞 PCNA、caspase-3 阳性率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

分组	鼠数	中膜厚度 (μm)	PCNA 阳性率 (%)	caspase-3 阳性率 (%)
正常肺动脉组	6	77 ± 12	1.23 ± 0.24	3.7 ± 0.8
空白对照组	6	84 ± 13	4.47 ± 0.96 ^a	15.9 ± 3.2
Ang II + M199 组	6	139 ± 11 ^{a, b}	29.11 ± 6.11 ^{a, b}	8.8 ± 1.8 ^{a, b}
<i>F</i> 值		33.330	14.076	6.855
<i>P</i> 值		<0.001	0.002	0.012

a: 与正常肺动脉组比较, *P* < 0.05; b: 与空白对照组比较, *P* < 0.05

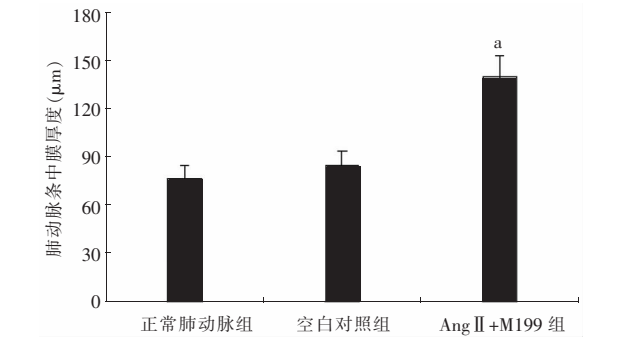


图 1 Ang II 对培养肺动脉条中膜厚度的影响 (*n* = 6)

a: 与正常肺动脉和空白对照组比较, *P* < 0.05

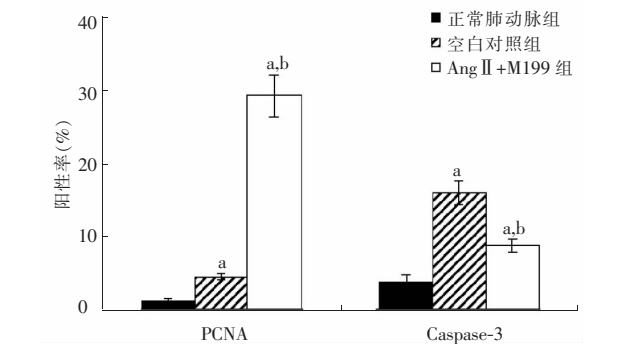


图 2 Ang II 对培养肺动脉 PCNA、caspase-3 阳性率的影响 (*n* = 6)

a: 与正常肺动脉组比较, *P* < 0.05; b: 与空白对照组比较, *P* < 0.05

2.2 DAPT 对肺动脉血管 Notch 信号的影响

在培养基中加入 γ -分泌酶抑制剂 DAPT 后, 不论低剂量组还是高剂量组, 肺动脉血管条 Notch 1 ~ 4 受体的 mRNA 水平无明显改变 (*P* > 0.05), 但 Notch 信号的下游转录因子 HERP1、2 mRNA 水平显著降低 (*P* < 0.05)。提示 DAPT 抑制 Notch 信号是通过抑制 Notch 受体活化, 进而抑制 Notch 信号下游基因 HERP1、2 的转录而实现, 对 Notch 受体本身的

表达无明显影响。见表2。

表2 DAPT 对各组肺动脉血管条 Notch1 ~ 4 受体及 HERP1、2 mRNA 表达的影响

组别	鼠数	Notch1	Notch2	Notch3	Notch4	HERP1	HERP2
空白对照	6	0.0251	0.0105	0.0059	0.0254	0.1215	0.0207
Ang II + M199	6	0.0270	0.0117	0.0079	0.0319	0.1769	0.0244
Ang II + DMSO	6	0.0313	0.0098	0.0112	0.0375	0.1521	0.0273
AngII + DAPT 低剂量	6	0.0364	0.0082	0.0121	0.0443	0.0021 ^a	0.0154 ^a
AngII + DAPT 高剂量	6	0.0301	0.0110	0.0079	0.0374	0.0015 ^a	0.0039 ^a
F 值		0.743	1.001	1.696	0.705	7.125	5.522
P 值		0.542	0.418	0.208	0.563	0.003	0.009

a: 与 Ang II + M199 组和 Ang II + DMSO 组相比, $P < 0.05$

2.3 DAPT 对肺动脉血管变化的影响

Ang II 能使培养的肺动脉血管中膜厚度显著增

加近 50%、血管壁细胞 PCNA 阳性率显著上升、caspase-3 阳性率下降。加入 DAPT 抑制 Notch 信号后,能抵抗 Ang II 带来的这种变化。见表3,图3~5。

表3 DAPT 对肺动脉血管管壁厚度、血管壁细胞PCNA 阳性率及 caspase-3 阳性率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	中膜厚度 (μm)	PCNA 阳性率 (%)	caspase-3 阳性率(%)
空白对照组	6	84 ± 13	4.5 ± 1.0	15.9 ± 3.2
Ang II + M199 组	6	139 ± 11 ^a	29.1 ± 6.1 ^a	8.8 ± 1.8 ^a
Ang II + DMSO 组	6	154 ± 35 ^a	28.4 ± 6.0 ^a	9.3 ± 1.9 ^a
AngII + DAPT 低剂量组	6	76 ± 12 ^{b,c}	6.6 ± 1.4 ^{b,c}	12.2 ± 2.6 ^{a,b,c}
AngII + DAPT 高剂量组	6	84 ± 16 ^{b,c}	5.8 ± 1.2 ^{b,c}	12.5 ± 2.8 ^{a,b,c}
F 值		7.589	4.760	6.255
P 值		0.010	0.037	0.015

a: 与空白对照组比较, $P < 0.05$; b: 与 Ang II + M199 组比较, $P < 0.05$; c: 与 Ang II + DMSO 组比较, $P < 0.05$

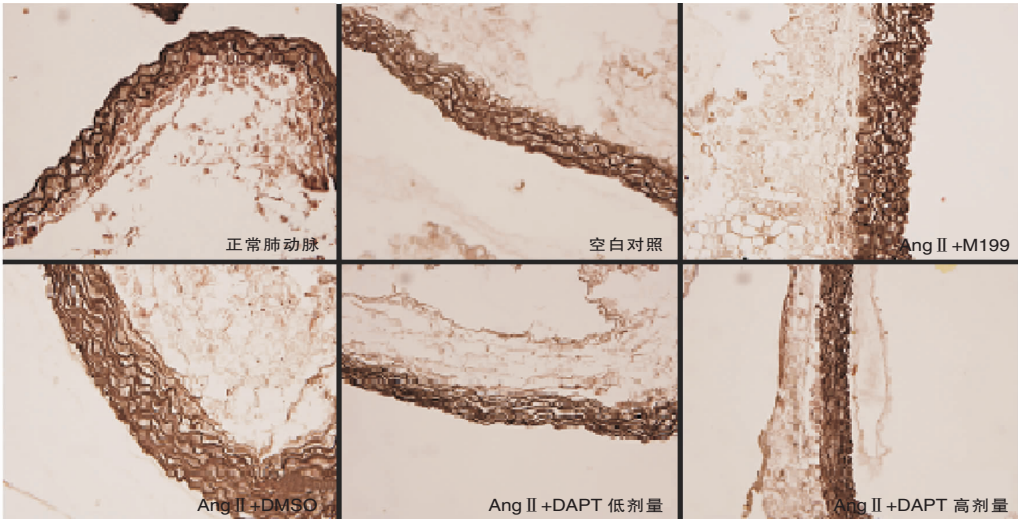


图3 Ang II 及 Ang II 加 DAPT 对血管中膜厚度的影响 (弹力纤维染色, ×400) 正常大鼠肺动脉培养 8 d 后中膜厚度略有增加,Ang II 能使培养的血管条中膜厚度显著增加,Ang II + DAPT 低剂量组和 Ang II + DAPT 高剂量组的血管中膜厚度较 Ang II + M199 组和 Ang II + DMSO 组明显降低。

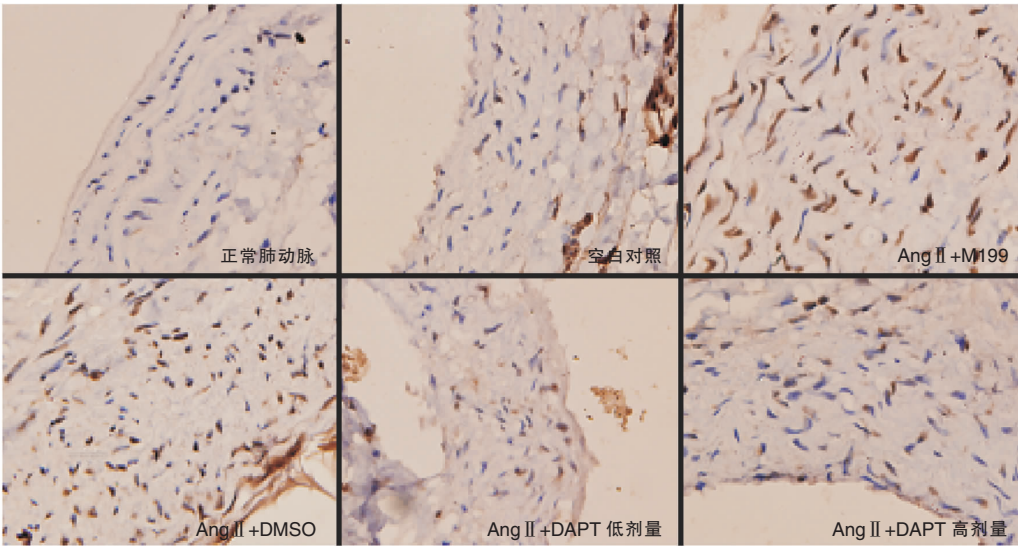


图4 Ang II 及 Ang II 加 DAPT 对血管壁细胞 PCNA 阳性率的影响 (免疫组化染色, ×400) 正常大鼠肺动脉培养 8 d 后血管壁细胞 PCNA 阳性率略有增加,Ang II 能使培养的血管条血管壁细胞 PCNA 阳性率显著增加,Ang II + DAPT 低剂量组和 Ang II + DAPT 高剂量组的血管壁细胞 PCNA 阳性率较 Ang II + M199 组和 Ang II + DMSO 组明显降低,阳性染色细胞呈棕色。

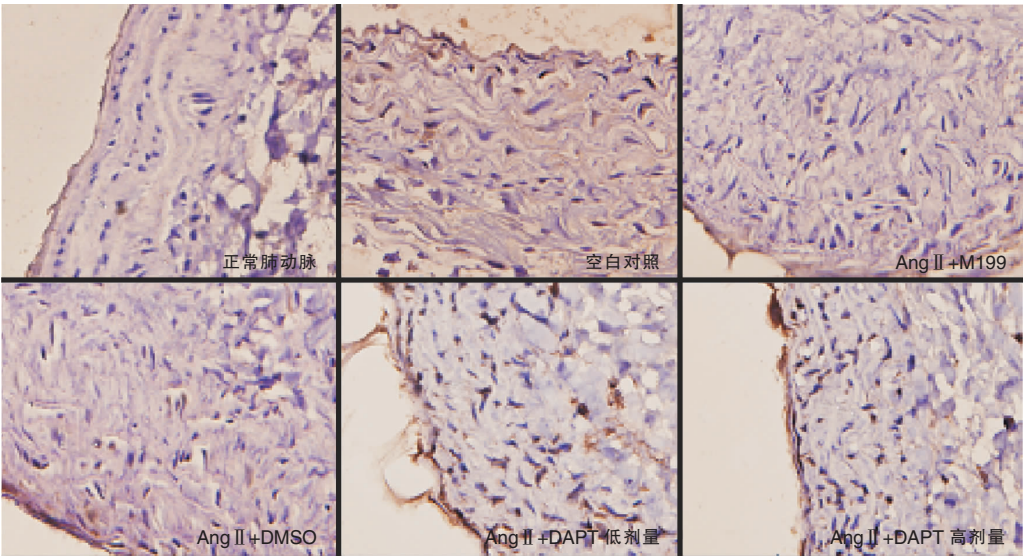


图5 Ang II 及 Ang II 加 DAPT 对血管壁细胞 caspase-3 阳性率的影响 (免疫组化染色, ×400)
正常大鼠肺动脉培养8 d 后血管壁细胞 caspase-3 阳性率明显增加, Ang II 能使培养的血管条血管壁细胞 caspase-3 阳性率显著降低, Ang II + DAPT 低剂量和 Ang II + DAPT 高剂量组的血管壁细胞 caspase-3 阳性率较 Ang II + M199 组和 Ang II + DMSO 组明显升高, 阳性染色细胞呈棕色。

3 讨论

Ang II 是 VSMC 强丝裂原, 临床和动物实验证明发生 PH 时, 肺组织的 Ang II 活性显著增加, 促进肺动脉平滑肌细胞的增殖、肥大、迁移; 动物实验发现血管紧张素转化酶抑制剂 (angiotensin-converting enzyme inhibitor, ACEI)、AT1 受体拮抗剂能降低 PH 大鼠的肺动脉压、缓解其右室肥厚的程度、减轻甚至逆转肺血管重构, 对 PH 肺血管重构的进展具有极为重要作用^[11-16]。本研究发现体外 Ang II 能使肺动脉中膜变厚, 诱导出类似 PH 的肺血管重构。

Notch 信号是在进化中具有高度保守性, 是在生理状态和多种疾病的血管重构过程中起关键作用的一个信号系统。目前在哺乳动物中克隆出了 4 种 Notch 受体 (Notch1~4)。由于 Notch 受体和配体都具有跨膜结构域, 因此该信号传导只能通过局部细胞和细胞之间相互接触、相互作用而实现。配体和受体相互作用引起 Notch 受体发生两次酶解, 从细胞膜上释放出 Notch 胞内域 (NICD)。NICD 直接入核, 激活转录阻遏因子 HES (hairly enhancer of split)-1, -5, -7 和 HERP-1, -2, -3, 发挥生物学效应。Notch 信号传导需要局部细胞和细胞之间相互接触、相互作用这种方式, 使其受细胞之间的相互作用和环境因素影响非常大^[4-6]。

本研究采用鼠尾胶原构建三维凝胶进行肺动脉培养的方式, 保留了肺动脉的内皮、平滑肌、成纤维

细胞、细胞外基质, 将最大限度地保证肺动脉平滑肌细胞和 Notch 信号与体内环境保持一致。

DAPT 是一种特异性的小分子 γ -分泌酶抑制剂, 已在细胞培养和果蝇身上证实能抑制 Notch 受体第二次酶解必需的 γ -分泌酶, 抑制 Notch 信号。而且近来还发现它不仅能抑制 Notch 蛋白水解, 还能抑制 NICD 核转位和 NICD 信号传递, 具有强大的抑制 Notch 信号的作用^[16-18]。本研究发现在培养的血管条中加入 DAPT, 血管条 Notch 受体 mRNA 水平无明显影响, 但 Notch 下游目的基因 HERP1 和 HERP2 mRNA 水平明显下降, 说明 DAPT 的确能显著抑制 Notch 信号, 这种抑制作用与 Notch 受体表达无关。

Notch 系统在血管上的主要成分有 3 种受体 (Notch1, 3, 4) 和 3 个下游效应物 (HERP1, 2, 3), 主要表达于动脉^[4-6]。目前对 Notch 信号影响血管重构 (尤其对平滑肌细胞) 的机制研究不多, 综合现有研究结果, 其影响机制可能包括: 通过 Notch1、Notch3 受体促进 VSMC 增殖、并使 VSMC 失去生长抑制和细胞周期停滞; 抑制 VSMC 凋亡; 促进 VSMC 迁移, 聚集; 并促进内皮细胞和成纤维细胞转化为平滑肌细胞^[4-10]。

研究发现 Ang II 持续刺激肺动脉血管条 7 d, 血管条的中膜厚度显著增加, 伴有血管壁细胞增殖增加 (PCNA 阳性率增加)、凋亡减少 (caspase-3 阳性率增加)。加入 DAPT 抑制 Notch 信号后, 血管条的中膜厚度较只加 Ang II 的血管条明显降低, 伴有血

管壁细胞增殖增加程度降低,凋亡减少程度降低,说明抑制 Notch 信号在强力的丝裂原持续刺激的情况下仍然能够抑制血管重构,提示抑制 Notch 信号通路可能是效力强大的抗重构措施。这一现象发生的机制并不清楚,可能与 Notch 信号影响平滑肌细胞生物学行为、进而影响血管重构有关。但这一结果提示抑制 Notch 信号有可能达到缓解肺血管重构的效果,可能成为 PH 治疗的一个新思路。

致谢:感谢四川大学公共卫生学院病理科王文冬老师、四川大学华西第二医院病理科黄琴老师在课题实施过程中提供的帮助;感谢四川大学华西第二医院妇儿实验中心袁粒星老师、唐茜萍老师为课题实施提供的指导与支持。

[参 考 文 献]

[1] Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms[J]. *Circ Res*, 2006, 99(7): 675-691.

[2] Chan SY, Loscalzo J. Pathogenic mechanisms of pulmonary arterial hypertension[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2008, 44(1): 14-30.

[3] 魏丽,刘童,刘斌,王献民,赵亮,周同甫. 雷公藤甲素对实验性肺动脉高压肺脏基质金属蛋白酶 MMP2 和 MMP9 的影响[J]. *中国当代儿科杂志*, 2007,9(5):479-483.

[4] Hofmann JJ, Iruela-Arispe ML. Notch signaling in blood vessels: who is talking to whom about what? [J]. *Circ Res*, 2007, 100(11):1556-1568.

[5] Ehebauer M, Hayward P, Arias AM. Notch, a universal arbiter of cell fate decision[J]. *Science*, 2006, 314(5804):1414-1415.

[6] Morrow D, Guha S, Sweeney C, Birney Y, Walshe T, O'Brien C, et al. Notch and vascular smooth muscle cell phenotype[J]. *Cir Res*, 2008, 103(12): 1370-1382.

[7] Kurpinski K, Lam H, Chu J, Wang A, Kim A, Tsay E, et al. Transforming growth factor-beta and notch signaling mediate stem cell differentiation into smooth muscle cells[J]. *Stem Cell*, 2010, 28(4): 734-742.

[8] Kennard S, Liu H, Lilly B. Transforming growth factor-beta

(TGF-1) down-regulates Notch3 in fibroblasts to promote smooth muscle gene expression[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(3): 1324-1333.

[9] Hellström M, Phng LK, Hofmann JJ, Wallgard E, Coultas L, Lindblom P, et al. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis [J]. *Nature*, 2007, 445(7129): 776-780.

[10] Morrow D, Sweeney C, Birney YA, Guha S, Collins N, Cummins PM, et al. Biomechanical regulation of hedgehog signaling in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 292(1): C488-C496.

[11] 王献民,周同甫,刘斌,魏丽,石坤,赵姗姗,等. 卡托普利及氯沙坦干预大鼠肺动脉高压与 MMP-2、MMP-9、TIMP-1 表达的关系[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2009,40(2):255-259.

[12] 王献民,刘斌,魏丽,周同甫,王晓琴,乔丽娜,等. 卡托普利及氯沙坦对肺动脉高压大鼠肺组织细胞凋亡的影响[J]. *实用儿科临床杂志*, 2009, 24(13):999-1003.

[13] McKie PM, Cataliotti A, Boerrieger G, Chen HH, Sangaralingham SJ, Martin FL, et al. A novel atrial natriuretic peptide based therapeutic in experimental angiotensin II mediated acute hypertension [J]. *Hypertension*, 2010, 56(6): 1152-1159.

[14] Bradford CN, Ely DR, Raizada MK. Targeting the vasoprotective axis of the renin-angiotensin system: a novel strategic approach to pulmonary hypertensive therapy[J]. *Curr Hypertens Rep*, 2010, 12(4): 212-219.

[15] Shenoy V, Ferreira AJ, Qi Y, Fraga-Silva RA, Díez-Freire C, Dooies A, et al. The angiotensin-converting enzyme 2/angiogenesis-(1-7)/Mas axis confers cardiopulmonary protection against lung fibrosis and pulmonary hypertension[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 182(8): 1065-1072.

[16] 杨栋,谢燕. 西拉普利对缺氧性大鼠肺动脉高压肺血管结构的保护[J]. *中国临床医学*, 2008;15(4):471-473.

[17] Morohashi Y, Kan T, Tominari Y, Fuwa H, Okamura Y, Watanabe N, et al. C-terminal fragment of presenilin is the molecular target of a dipeptidic gamma-secretase-specific inhibition DAPT (N-[N-(3, 5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-Butyl ester)[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(21):14670-14676.

[18] Nelson BR, Hartman BH, Georgi SA, Lan MS, Reh TA. Transient inactivation of Notch signaling synchronizes differentiation of neural progenitor cells[J]. *Dev Biol*, 2007, 304(2): 479-498.

(本文编辑:王庆红)