

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.16.012

阿魏酸钠对人动脉平滑肌细胞和内皮细胞作用的机制研究*

朱晓斐¹ 李江² 王宝² 李玉骞² 赵振伟^{2△}

(1 成都军区昆明总医院神经内科 云南 昆明 650001; 2 第四军医大学唐都医院神经外科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:研究阿魏酸钠(SF)对人主动脉平滑肌(HASMC)和内皮细胞(HAEC)的影响,探讨 SF 成为抑制支架内再狭窄药物的机制。**方法:**HASMC 和 HAEC 经 SF 处理后(0-1000 $\mu\text{g/ml}$),用 CCK-8 试剂和划痕愈合试验检测不同药物浓度对两种生长和细胞迁移能力的影响;采用免疫细胞化学和 Western blot 检测 HAECs 中 FoxM1 和 VEGF 的表达。**结果:**SF 对两种细胞的作用呈剂量依赖性,SF 在 10-1000 $\mu\text{g/ml}$ 浓度时,HASMC 的生长活力明显降低,在 0.1-100 $\mu\text{g/ml}$ HAECs 生长活力显著增强($P < 0.05$)。在 1-1000 $\mu\text{g/ml}$ 浓度下 HASMCs 迁移能力受到抑制,HAECs 的迁移能力明显增加 (0.1-100 $\mu\text{g/ml}$)($P < 0.05$)。同时 HAECs 内 FoxM1 和 VEGF 表达明显增高($P < 0.05$),程度与 SF 浓度有剂量依赖关系。**结论:**阿魏酸钠能抑制血管平滑肌的增值和迁移;同时增加内皮细胞 FoxM1 和 VEGF 的表达,促进内皮细胞的增值和迁移,这些特征使其可能成为抑制支架内再狭窄的药物。

关键词:阿魏酸钠;血管细胞;抑制再狭窄

中图分类号:R543 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)16-3046-05

Effects and Mechanisms of Sodium Ferulate on Human Aortic Smooth Muscle Cells and Endothelial Cells*

ZHU Xiao-fei¹, LI Jiang², WANG Bao², LI Yu-qian², ZHAO Zhen-wei^{2△}

(1 Department of Neurology, Kunming General Hospital of PLA, Kunming, Yunnan, 650001, China;

2 Department of Neurosurgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To study the effects and mechanisms of Sodium ferulate (SF) on human aortic smooth muscle cells (HASMCs) and endothelial cells (HAECs) to approach its potential possibility for in-stent restenosis. **Methods:** HASMCs and HAECs were treated with different concentrations of SF and divided into 6 groups (0 $\mu\text{g/ml}$, 0.1 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, and 1000 $\mu\text{g/ml}$). Cell viability was determined by CCK-8 kit. Cell migration distance was evaluated by Scratch wound healing assay. Changes of FoxM1 and VEGF expression in HAECs were detected through the Immunocytochemistry method, Western blot and image analysis. **Results:** SF inhibited proliferation and migration of HASMCs in a dose-dependent manner (10-1000 $\mu\text{g/ml}$)($P < 0.05$). However, SF promoted proliferation and migration of HAECs in a dose-dependent manner (0.1-100 $\mu\text{g/ml}$)($P < 0.05$). The expression of FoxM1 and VEGF was increased in a dose-dependent manner in HAECs ($P < 0.05$). **Conclusion:** SF may inhibit proliferation of HASMCs, and promote vascular endothelial healing through increasing the expression of FoxM1 and VEGF. It suggests that SF may be an effective agent for in-stent restenosis.

Key words: HASMCs; HAECs; In-stent restenosis

Chinese Library Classification(CLC): R543 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)16-3046-05

前言

颈动脉狭窄是指颈动脉血管官腔的变窄或收缩,多由颈动脉粥样硬化,大动脉炎及纤维肌性发育不良等引起。在欧美约 35% 的缺血性脑血管病是由颈动脉狭窄引起。症状性颈动脉狭窄是由颈动脉狭窄引起的短暂或持久的脑功能或视网膜功能障碍,这些症状包括:一过性黑朦,病变对侧的单瘫、偏瘫和面瘫、及这些部位感觉障碍,视野缺损,构音障碍,优势半球受累

可出现失语等。颈动脉支架植入术(carotid artery stenting)已成为治疗症状性颈动脉狭窄的一个新选择^[1,2],接受支架植入术的病人逐年增多,支架植入后发生支架内再狭窄(in-stent restenosis)将导致发生缺血性卒中的风险显著增高^[3],因此 ISR 是影响患者预后的重要因素。以雷帕霉素和紫杉醇作为涂层药物的洗脱支架在近期内降低了 ISR 的发生率^[4,5],但是这些影响细胞周期药物明显抑制血管平滑肌细胞的增生和内皮细胞的生长。这种不可控的、非特异的抗细胞增值作用损害了内皮修复的过

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81101022)

作者简介:朱晓斐,男,医学硕士,主治医师,主要从事脑血管疾病的基础与临床研究,电话:15697053450, Email: never83927@hotmail.com

△通讯作者:赵振伟,男,博士生导师,研究方向:脑血管病的介入治疗和临床研究,

电话:13909299990, E-mail: zhaozhenweipa_per@hotmail.com

(收稿日期:2014-01-05 接受日期:2014-01-30)

程,导致内皮缺乏生长、晚期的血栓形成和晚期支架内再狭窄^[6,7]。理想的药物涂层应能够抑制平滑肌的生长,同时促进内皮的生长、愈合;完整光滑功能良好的内皮也是防止血栓形成的重要条件。因此,重视内皮功能恢复就有可能降低再狭窄率发生^[8-10],新的涂层药物成为研究的热点,同时也是临床治疗的关键。

阿魏酸钠(sodium ferulate, SF)是阿魏酸的钠盐,阿魏酸普遍存在许多植物中,它是当归和川芎的有效成分之一。先前的研究表明 SF 具有抗炎^[11],抑制血小板凝聚^[12]等作用。目前 SF 对大鼠动脉平滑肌和内皮细胞作用的研究较少,其作用机制仍不清楚。本研究观察了 SF 对大鼠动脉平滑肌细胞(HASMC)和人大动脉内皮细胞(HAEC)增值和迁移的影响,以期 SF 的临床应用提供理论和实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

HASMC 和 HAEC 购于 ScienCell, SF 由武汉威顺达生物科技有限公司提供, CCK-8 kit 购自日本同仁, FoxM1 抗体(K-19 sc-500, Senta Cruz) 和抗 -VEGF 抗体(ab46154, abcam) 用于免疫细胞化学和 Western blot 试验。

1.2 细胞分组及处理

将原代细胞复苏培养, 将第 5-6 代处于对数生长期的 HASMC 和 HAEC 传代接种到 96 孔板, HASMC 接种密度为 5000 个/孔, HAEC 接种密度为 2000 个/孔, 每孔加入 100 μ L 培养基, 用不同浓度的阿魏酸钠分别处理两种细胞, 各分为 6 组, 空白对照组(0 μ g/ml), 0.1 μ g/mL, 1 μ g/mL, 10 μ g/mL, 100 μ g/mL 和 1000 μ g/mL 组。每个样本设置 5 个复孔, 每 24 小时更换培养基, 处理后 48 小时, 检测细胞活性。

1.3 CCK-8 细胞活性检测

不同浓度阿魏酸钠处理两种细胞 48 小时后, 用 CCK-8 检测细胞活性。为减少阿魏酸钠本身对吸光度的影响, 检测前每孔更新培养液 100 μ L, 并加入 10 μ L CCK-8 试剂, 反应 3 小时后用酶标仪检测吸光度值(450 nm), 并计算细胞活力。

1.4 细胞划痕愈合实验

体外划痕实验可以模拟细胞水平方向的迁移能力或伤口愈合能力。取生长良好的 HASMC 和 HAEC 接种到 6 孔板, 置于 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 中孵育。当单层细胞生长至 70-80%, 用 20 μ L 枪头轻划培养皿底制作划痕, 随后 PBS 轻洗脱落细胞。用 2% 低血清培养基培养细胞, 同时用不同浓度的阿魏酸钠处理细胞(0 μ g/mL, 0.1 μ g/mL, 1 μ g/mL, 10 μ g/mL, 100 μ g/mL 和 1000 μ g/mL)。在两个时间点(0 和 48 小时)分别记录观察划痕愈合的情况, 标记第一次视野的位置, 保持观察点的一致和记录数据的统一, 并在显微镜下观察拍照。Imag-pro plus 6.0 software 计算平均划痕间距的改变, 并转换为细胞平均迁移距离。

1.5 免疫细胞化学分析细胞内 FoxM1 和 VEGF

用不同浓度的阿魏酸钠处理 HAEC (分组: 0 μ g/mL, 0.1 μ g/mL, 1 μ g/mL, 10 μ g/mL, 100 μ g/mL) 12 小时后, 弃去培养液, 细胞在 -20 $^{\circ}$ C 冰甲醇中固定 20 分钟, 1 $\times$ PBS 清洗 3 次, 封闭剂(1 $\times$ PBS/5%山羊血清 /0.3% Triton X-100)封闭 60 分钟, 随后加入 FoxM1 和 VEGF 抗体(稀释浓度 1:200)在 4 $^{\circ}$ C 下孵育样本过夜, 之后加入 2 抗(Alexa Fluor 594)孵育 2 小时, DAPI 复染 15 分钟。荧光显微镜下拍照并记录, 用 Imag-pro plus 6.0 software 分析荧光图像。

1.6 Western blot 检测 FoxM1 和 VEGF 的表达

用不同低浓度阿魏酸钠处理 HAEC 24 小时, 收细胞裂解, 提取总蛋白, BCA 法进行蛋白定量。取等量蛋白进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 将凝胶上蛋白转至 PVDF 膜上(Millipore 美国), 室温封闭(含 20%脱脂奶粉的 TBST)2 小时。随后一抗(FoxM1 1:800, VEGF 1:800, α -tubulin 1:1000)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, HRP 偶联的二抗室温孵育 2 小时后进行 ECL 显色。Bio-Rad 扫描仪记录数据并拍照。

1.7 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件进行分析, 所测值以均数 $\pm$ 标准差表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 阿魏酸钠对 HASMCs 和 HAECs 细胞活力影响

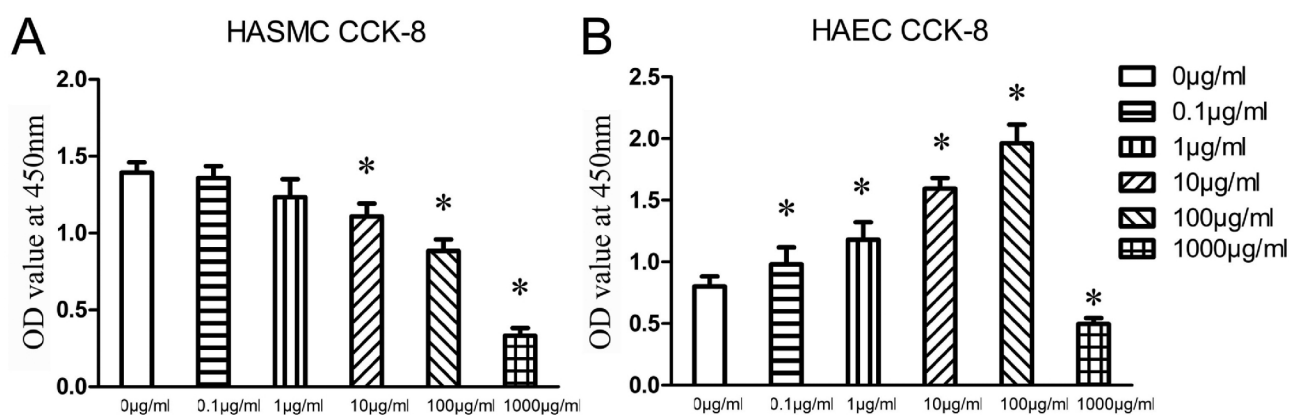


图 1 不同浓度阿魏酸钠处理下 HASMCs 活力(A)和 HAECs 活力的变化(B),与对照组相比较, * $P < 0.05$ 。

Fig. 1 Cellular viability changes in HASMCs and HAECs cultured with different concentrations of SF, * $P < 0.05$ vs. 0 μ g/mL.

阿魏酸钠对两种细胞的作用并不相同。如图 1A 所示,处理 48 小时后,随着药物浓度的增高 (10-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), HASMCs 活力有下降趋势,具有统计学意义 ($P < 0.05$),说明阿魏酸钠对 HASMC 的增殖有抑制作用。而阿魏酸钠能促进 HAECs 的

增殖,如图 1B,阿魏酸钠在 0.1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时促进了 HAECs 增殖,当浓度达到 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,HAECs 增殖受到明显抑制,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 阿魏酸钠对 HASMC 和 HAEC 细胞迁移的影响

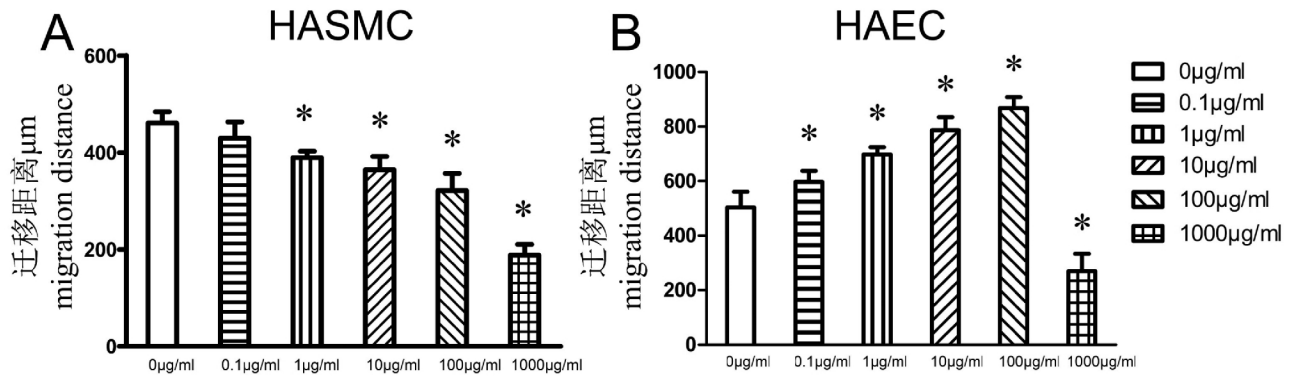


图 2 不同浓度阿魏酸钠处理对 HASMCs 和 HAECs 迁移能力的影响,与对照组 (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 相比较, $*P < 0.05$

Fig. 2 Migration distance changes in HASMCs and HAECs cultivated with different concentrations of SF $*P < 0.05$ vs. 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$

如图 2A 所示,用 2% 低浓度血清培养基培养两种细胞,加入不同浓度阿魏酸钠 48 小时后,发现在 1-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理组,细胞迁移距离与对照组相比有减少,HASMCs 迁移能力受到抑制,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。HAECs 经阿魏酸钠处理后,其迁移距离有明显增加,随着药物浓度的升高 (0.1-100

$\mu\text{g}/\text{mL}$), 迁移能力也逐渐提高。而在 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 阿魏酸钠处理组中,HAECs 迁移能力明显降低,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 阿魏酸钠对 HAECs 内 FoxM1 和 VEGF 表达的影响

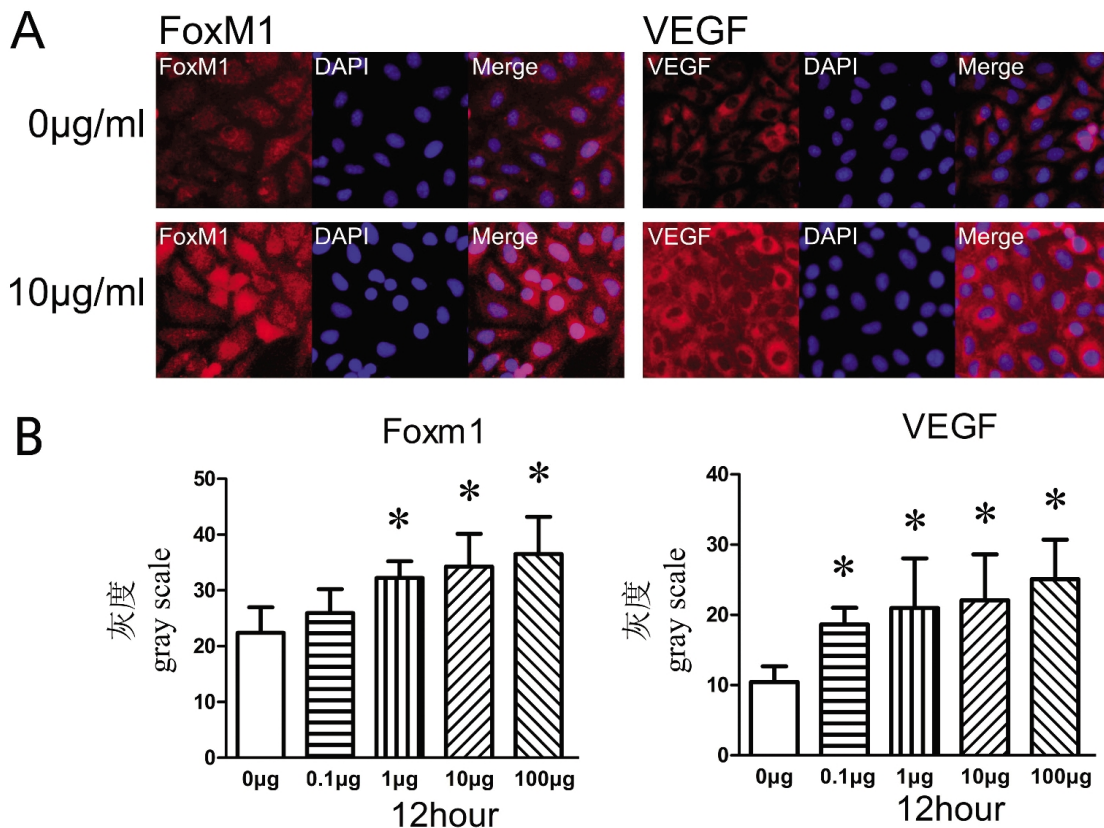


图 3 HAECs 中 FoxM1 和 VEGF 的免疫荧光染色, A 图上为对照组 (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 下为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理组。B 图是 FoxM1 和 VEGF 在不同处理组中荧光强度的改变, 用每个细胞平均灰度表示。与对照组相 (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 相比较, $*P < 0.05$

Fig. 3 Immunofluorescence staining of FoxM1 and VEGF in HAECs (A): control group (top), 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group (bottom). Quantitation of FoxM1 and VEGF expressed in gray value per cell in different groups (B). $*P < 0.05$ vs. 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$

FoxM1 主要表达在 HAECs 的胞浆和胞核内 (图 3A 左), 红色荧光强度与 FoxM1 表达量成正比, 10 $\mu\text{g/mL}$ 处理组中 FoxM1 荧光强度明显高于对照组。细胞平均灰度分析 (图 B 左) 表明在 1-100 $\mu\text{g/mL}$ 阿魏酸钠处理下 FoxM1 的表达高于对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

VEGF 的表达主要集中在细胞质, 如图 A 右 10 $\mu\text{g/mL}$ 阿魏酸钠处理 HAECs 12 小时后, VEGF 的荧光强度明显高于对照组, 细胞平均灰度分析 (图 B 右) 结果表明 VEGF 在 0.1-100

$\mu\text{g/mL}$ 处理组中表达明显高于对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。这些结果表明阿魏酸钠促进了 HAECs 中 FoxM1 和 VEGF 表达。

2.4 阿魏酸钠诱导 HAECs 细胞 FoxM1 和 VEGF 表达

Western blot 分析 (图 4A), 结果显示阿魏酸钠增加了 HAEC 细胞 FoxM1 和 VEGF 的表达。如图 4B, 处理组与对照组相比, FoxM1 和 VEGF 表达明显增高, 程度与阿魏酸钠浓度有明显的剂量依赖关系, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

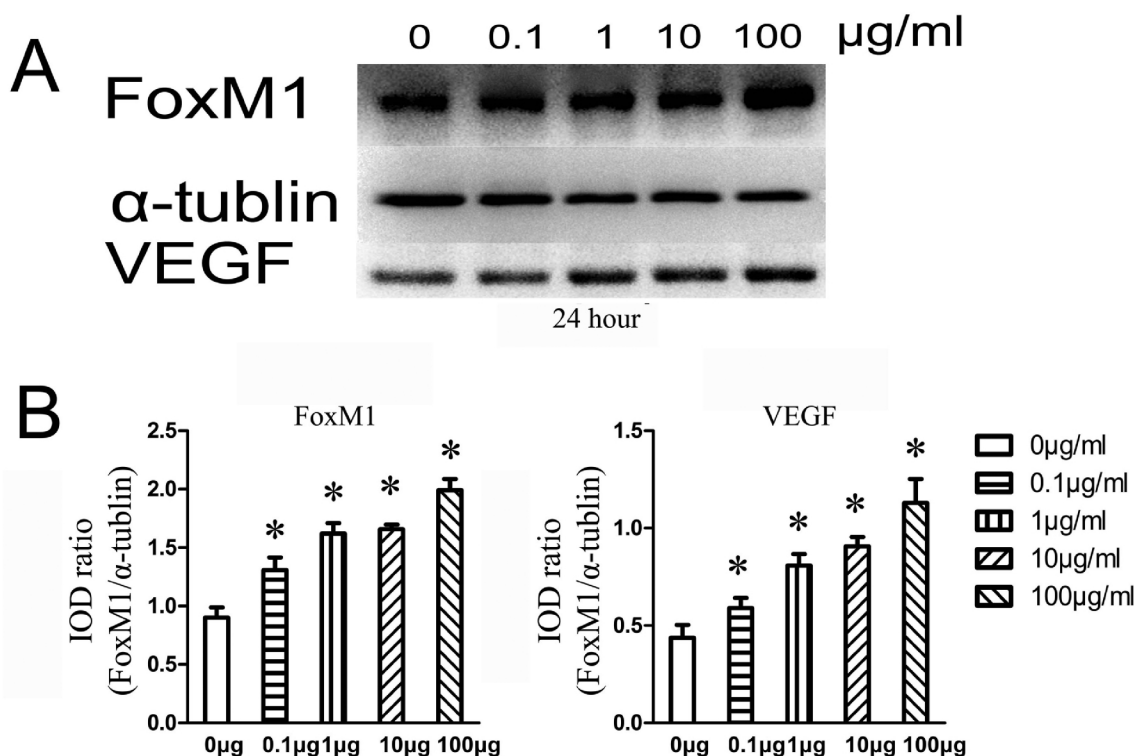


图 4 阿魏酸钠处理 24 小时后, 处理组与对照组 FoxM1 和 VEGF 表达水平的变化 (A), Western blot 灰度分析结果 (B), 与对照组相 (0 $\mu\text{g/mL}$) 相比较, * $P < 0.05$ (IOD: 直接光密度)

Fig. 4 Expression of FoxM1 and VEGF in HAECs cultivated with SF at 24h (A), Western blot analysis of FoxM1 and VEGF at 24h (B). * $P < 0.05$ vs. 0 $\mu\text{g/mL}$ (IOD: integral optical density)

3 讨论

在临床上 SF 主要用于心、脑血管疾病, 缺血和血栓性疾病的辅助治疗, 其多重的药理作用机制仍未被阐明。一些研究表明, SF 能够抑制血管紧张素 II 诱导的大鼠平滑肌细胞增值^[13]。魏酸钠能够抑制血小板源生长因子和内皮素 1 诱导的大鼠平滑肌细胞迁移^[14], 同时 SF 能明显抑制兔 SMC 增值, 其作用可能与抗脂质过氧化有关^[15]。SF 对人原代动脉平滑肌和内皮细胞作用研究较少, 细胞活性检测中我们发现阿魏酸钠能抑制 HASMCs 生长, 与药物浓度呈剂量依赖性, 但药物抑制 HASMCs 增值的作用比较“温和”, 在浓度达到高浓度时 (1000 $\mu\text{g/mL}$) 抑制 HASMCs 作用最明显; 同时阿魏酸钠能抑制 HASMCs 迁移, 这些结果同之前的研究结果相一致。单纯抑制平滑肌生长, 而缺少良好的内皮功能, 对减少再狭窄的发生是远远不够的, 因此阿魏酸钠对 HAECs 的作用引起了我们的关注。

SF 在高剂量 (1000 $\mu\text{g/mL}$) 对 HAECs 生长有明显抑制作

用, 但在 0.1-100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下均能促进细胞增值, 可见 SF 的应用剂量相对安全。FoxM1 是与细胞增值密切相关的转录因子^[16], 对染色体稳定性和有丝分裂至关重要^[17]。免疫细胞化学发现 SF (0.1-100 $\mu\text{g/mL}$) 可提高 FoxM1 的表达, 从而促进了 HAECs 的增值, Western blot 分析也证实了同样的变化趋势。

VEGF 与内皮细胞的迁移和增值密切相关^[18,19]。同样, SF 剂量依赖性的诱导 VEGF 的表达, 促进 HAECs 迁移和增值。可见 FoxM1 和 VEGF 的上调, 促进 HAECs 的增值和迁移。Zhang 等^[20]的研究发现 FoxM1 能增强 VEGF 基因的转录, 过表达 FoxM1B 将提高 VEGF 的表达, 而阻断 FoxM1, 将抑制 VEGF 表达。可见 FoxM1 可能调控 VEGF, 其具体关系和机制仍在进一步研究。

阿魏酸钠具有多种药理作用, 本研究显示, SF 抑制平滑肌的增值, 更重要的是, 通过上调 FoxM1 和 VEGF 的表达, 促进了内皮细胞的增值和迁移。内皮愈合后可能会间接抑制平滑肌的增值和迁移, 同时光滑完整的内皮也能减少血栓的发生发

展。由此可见,阿魏酸钠及其衍生物可能是一种新的抑制再狭窄的涂层药物,然而这一结论尚待动物体内试验验证。

参考文献(References)

- [1] Gahremanpour A, Perin E C, Silva G. Carotid artery stenting versus endarterectomy: a systematic review[J]. Texas Heart Institute Journal, 2012, 39(4): 474
- [2] Maud A, Vázquez G, Nyman J A, et al. Cost-effectiveness analysis of protected carotid artery stent placement versus endarterectomy in high-risk patients [J]. Journal of Endovascular Therapy, 2010, 17(2): 224-229
- [3] Randall M S, McKevitt F M, Kumar S, et al. Long-term results of carotid artery stents to manage symptomatic carotid artery stenosis and factors that affect outcome[J]. Circulation: Cardiovascular Interventions, 2010, 3(1): 50-56
- [4] Morice M C, Serruys P W, Sousa J E, et al. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization [J]. New England Journal of Medicine, 2002, 346(23): 1773-1780
- [5] Stone G W, Ellis S G, Cox D A, et al. A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease [J]. New England Journal of Medicine, 2004, 350(3): 221-231
- [6] Joner M, Finn A V, Farb A, et al. Pathology of drug-eluting stents in humans Delayed healing and late thrombotic risk [J]. Journal of the American College of Cardiology, 2006, 48(1): 193-202
- [7] Daemen J, Wenaweser P, Tsuchida K, et al. Early and late coronary stent thrombosis of sirolimus-eluting and paclitaxel-eluting stents in routine clinical practice: data from a large two-institutional cohort study[J]. The Lancet, 2007, 369(9562): 667-678
- [8] Werner N, Junk S, Laufs U, et al. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury[J]. Circulation research, 2003, 93(2): e17-e24
- [9] Kong D, Melo L G, Mangi A A, et al. Enhanced inhibition of neointimal hyperplasia by genetically engineered endothelial progenitor cells[J]. Circulation, 2004, 109(14): 1769-1775
- [10] Aoki J, Serruys P W, van Beusekom H, et al. Endothelial progenitor cell capture by stents coated with antibody against CD34 the HEALING-FIM (Healthy Endothelial Accelerated Lining Inhibits Neointimal Growth-First In Man) registry[J]. Journal of the American College of Cardiology, 2005, 45(10): 1574-1579
- [11] Yang X, Zhao Y, Wang H, et al. Macrophage activation by an acidic polysaccharide isolated from Angelica sinensis(Oliv.) Diels[J]. Journal of biochemistry and molecular biology, 2007, 40(5): 636-643
- [12] 李家明, 赵永海, 钟国琛, 等. 阿魏酸衍生物的合成及抗血小板聚集活性[J]. 药学报, 2011, 46(3): 305-310
- [12] Li Jia-ming, Zhao Yong-hai, Zhong Guo-chen, et al. Synthesis of ferulic acid derivatives and their inhibitory effect on platelet aggregation[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2011, 46(3): 305-310
- [13] Hou Y Z, Yang J, Zhao G R, et al. Ferulic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation induced by angiotensin II [J]. European journal of pharmacology, 2004, 499(1): 85-90
- [14] 韩英, 谢良地, 许昌声, 等. 阿魏酸钠对血小板源生长因子和内皮素 1 诱导的血管平滑肌细胞迁移的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12(6): 659-661
- [14] Han Ying, Xie Liang-di, Xu Chang-sheng, et al. Effect of Sodium Ferulate on Migration Induced by Platelet Derived Growth Factor and Endothelin-1 in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells [J]. Chin J Arterioscler, 2004, 12(6): 659-661
- [15] 喻红, 吴东方, 洪嘉玲, 等. 阿魏酸钠拮抗氧化型脂蛋白 (a) 对动脉平滑肌细胞的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(8): 938-941
- [15] Yu Hong, Wu Dong-fang, Hong Jia-ling, et al. Sodium Ferulate protects human aortic smooth muscle cells against oxidized Lipoprotein(a)[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2002, 18(8): 938-941
- [16] Wierstra I, Alves J. FOXM1. A typical proliferation-associated transcription factor[J]. Biological chemistry, 2007, 388(12): 1257-1274
- [17] Laoukili J, Kooistra M R H, Brás A, et al. FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability [J]. Nature cell biology, 2005, 7(2): 126-136
- [18] Rousseau S, Houle F, Huot J. Integrating the VEGF signals leading to actin-based motility in vascular endothelial cells [J]. Trends in cardiovascular medicine, 2000, 10(8): 321-327
- [19] van Nieuw Amerongen G P, Koolwijk P, Versteilen A, et al. Involvement of RhoA/Rho kinase signaling in VEGF-induced endothelial cell migration and angiogenesis in vitro [J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2003, 23(2): 211-217
- [20] Zhang Y, Zhang N, Dai B, et al. FoxM1B transcriptionally regulates vascular endothelial growth factor expression and promotes the angiogenesis and growth of glioma cells[J]. Cancer research, 2008, 68(21): 8733-8742