

·实验研究 Experimental research·

酸枣仁皂苷 B 通过调节自噬抑制血小板衍生生长因子-BB 诱导的血管平滑肌细胞增殖和迁移

嵇再雄, 李家祺, 王建波

【摘要】 目的 探讨酸枣仁皂苷 B(JuB)对血管介入术后血小板衍生生长因子(PDGF)-BB 诱导的血管平滑肌细胞(VSMC)增殖和迁移的潜在影响及其可能机制。**方法** 25 ng/mL PDGF-BB 刺激大鼠胸主动脉平滑肌细胞 A7r5 建立损伤模型。不同剂量 JuB 预处理后,用细胞计数试剂盒(CCK)-8 检测 A7r5 活性,选出合适的用药浓度。实验分组为正常对照(NC)组、PDGF-BB 组、JuB(10、25、50 $\mu\text{mol/L}$)+PDGF-BB 组。免疫印迹法检测增殖细胞核抗原(PCNA)蛋白表达,划痕愈合实验检测各组 A7r5 细胞迁移能力,免疫印迹法检测 A7r5 细胞自噬标记物微管相关蛋白 1 轻链 3(MAP1LC3,LC3)B 蛋白表达。**结果** PDGF-BB 处理后,A7r5 细胞增殖和迁移能力显著上调 ($P<0.001$),JuB 呈浓度依赖性显著抑制 PDGF-BB 诱导的 A7r5 细胞增殖和迁移($P<0.001$),JuB 显著逆转 PDGF-BB 诱导的 LC3B- II 蛋白表达水平($P<0.001$)。**结论** JuB 可抑制 VSMC 异常增殖和迁移,机制上可能与其抑制 PDGF-BB 诱导的 VSMC 自噬有关,提示对血管介入术后新内膜增生引起的再狭窄具有治疗作用。

【关键词】 酸枣仁皂苷 B; 血小板衍生生长因子-BB; 血管平滑肌细胞; 自噬; 再狭窄

中图分类号:R473.5 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2021)-02-0149-04

Jujuboside B inhibiting PDGF-BB-invoked proliferation and migration of vascular smooth muscle cells through regulating autophagy JI Zaixiong, LI Jiaqi, WANG Jianbo. Department of Interventional Radiology, Affiliated Sixth People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China

Corresponding author: WANG Jianbo, E-mail: jeanbob_wang@163.com

【Abstract】 Objective The long-term prognosis of restenosis after vascular intervention is a vital clinical challenge. Abnormal changes in vascular smooth muscle cells(VSMC) are deemed to be a committed step in the process of restenosis. Jujuboside B(JuB) has anti-tumor and anti-inflammatory activities. However, the potential influence of JuB on VSMC fate after vascular intervention remains unknown. This study is to probe the role of JuB on platelet derived growth factor BB(PDGF-BB)-induced VSMC proliferation and migration as well as its possible mechanism. **Methods** The rat thoracic artery smooth muscle cells(A7r5) were stimulated with 25 ng/ml PDGF-BB to establish the injury model. After pretreatment with different doses of JuB, cell viability was assessed by cell counting Kit-8(CCK-8) assay to explore the appropriate drug concentration. The cells were divided into normal control group(NC group), PDGF-BB group, PDGF-BB+JuB (10, 25 and 50 $\mu\text{mol/L}$) group. The proliferating cell nuclear antigen(PCNA) expression was determined by Western blot analysis. The migration ability of A7r5 was examined by the scratch-healing testing. The expression level of LC3B protein was evaluated by using immunoblotting to detect autophagy. **Results** After processed by PDGF-BB, the proliferation and migration ability of A7r5 was notably up-regulated($P<0.001$), JuB showed a significant and concentration-dependent inhibition effect on PDGF-BB-induced proliferation and migration of A7r5($P<0.001$), and JuB obviously reversed the PDGF-BB-invoked expression level of LC3B protein($P<0.001$). **Conclusion** JuB can inhibit the abnormal proliferation and migration of VSMC invoked by

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2021.02.010

基金项目:上海市卫生计生委智慧医疗专项研究项目(2018ZHYL0217)

作者单位:200233 上海交通大学附属第六人民医院介入放射科(嵇再雄、王建波);201203 上海中医药大学研究生院(李家祺)

通信作者:王建波 E-mail: jeanbob_wang@163.com

PDGF-BB, its mechanism may be related to its inhibition effect of PDGF-BB-induced autophagy of VSMC, which suggests that JuB has therapeutic effect for restenosis caused by neointimal hyperplasia after vascular intervention. (J Intervent Radiol, 2021, 30: 149-152)

【Key words】 Jujuboside B; platelet derived growth factor BB; vascular smooth muscle cell; autophagy; restenosis

血管介入术是治疗危重肢体缺血的有效方法,但其远期成功仍受到术后高发再狭窄影响^[1]。糖尿病引起的下肢动脉病变管径小且时间长,术后远期效果更加不理想^[2]。药物洗脱支架可防止再狭窄^[3],但术后血管愈合延迟和晚期血栓形成风险增加使之并不能成为再狭窄长远解决方案^[4-5]。介入操作无可避免地损伤动脉内膜,内膜撕裂可导致胶原暴露和持续性炎症。血管损伤血小板、炎性细胞和血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)释放血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF),刺激其发生去分化。PDGF 可与 PDGF 受体(PDGFR) α 或 β 结合,激活 PI3K/Akt、MAPK 等多条信号转导通路,导致 VSMC 增殖和迁移^[6],而 VSMC 过度增殖和迁移是血管介入术后再狭窄的主要原因。目前针对血管新内膜增生和再狭窄的临床药理学干预仍不令人满意,寻找更有效药物防治再狭窄及阐明其潜在机制仍具挑战。酸枣仁是亚洲国家著名传统药物,具有催眠镇定、抗焦虑、抗氧化应激等功能^[7-8]。酸枣仁皂苷 B(jujuboside B, JuB)作为天然皂苷三萜类化合物,是酸枣仁中主要生物活性成分之一^[9]。研究表明 JuB 具有抗血小板聚集^[10]、诱导肿瘤细胞自噬和凋亡^[11]、降低血管张力^[12]、抗炎^[13]等作用,然而 JuB 对血管介入术后 VSMC 增殖和迁移的潜在影响仍未知。本研究旨在对 JuB 在 VSMC 生理调节中的作用及其机制进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 实验药品和试剂

JuB(高效液相色谱法检测纯度 $\geq 98\%$,化学结构 C52H84O21,分子量 1045.223,上海贝吉生物科技公司);高糖 Dulbecco 改良伊格尔培养基(DMEM)、胎牛血清(FBS)、乙二胺四乙酸(EDTA)-胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);重组人 PDGF-BB(美国 R&D 公司);细胞计数试剂盒(CCK)-8(上海翊圣生物科技公司)。

1.2 细胞培养和实验分组

将大鼠胸主动脉 VSMC——A7r5(中国科学院生物化学与细胞生物学研究所)置于含 10%FBS 的

DMEM 并于 37℃、5%CO₂ 湿润条件下培养。取 3~5 代细胞用于实验。25 ng/mL PDGF-BB 刺激 A7r5 建立损伤模型。实验分为 5 组:正常对照(NC)组、PDGF-BB 组、JuB(10 μ mol/L)+PDGF-BB 组、JuB(25 μ mol/L)+PDGF-BB 组、JuB(50 μ mol/L)+PDGF-BB 组。

1.3 CCK-8 测定

将 5×10^3 个 A7r5 种入 96 孔板每孔中,并在 37℃下培养过夜以贴壁。细胞达到 70%时,吸出培养基,用 PDGF-BB(25 ng/mL)和 JuB(0、1、10、25、50、100 μ mol/L)分别处理细胞;向每孔中补充 CCK-8 溶液 10 μ L,将样品于 37℃下孵育 2 h;用 SpectraMax i3x 型多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司)于 450 nm 下测试细胞光密度(OD);基于对照的百分比计算细胞活性(%)。每组设置 5 个重复孔。

1.4 划痕愈合实验

将 A7r5 接种在 12 孔板中,培养至 80%密度,置于含 PDGF-BB(25 ng/mL)或 JuB(50 μ mol/L)培养基中培养 24 h;用 20 μ L 移液管尖在平板上划出一道笔直划痕,24 h 后用倒置显微镜($\times 50$,德国 Leica 公司)拍摄伤口,采用 ImageJ 1.53a 版图像处理软件(美国国立卫生研究院)并根据恢复面积百分比分析细胞迁移程度。迁移指数=实验组迁移距离/对照组迁移距离。

1.5 免疫印迹检测

将 A7r5 接种在 6 孔板中,细胞达到 70%~80%时用 PDGF-BB 和/或 JuB 处理各组细胞;用裂解缓冲液(上海碧云天生物技术公司)从细胞中提取蛋白质样品,提取液于 4℃、12 000 转离心 20 min,取上清液,用二辛可酸(BCA)蛋白质分析试剂盒(上海碧云天生物技术公司)评估蛋白质样品浓度;按照标准规程处理获得等体积等量蛋白质样品;经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)胶(10%分离胶)电泳后,样品中蛋白条带被分离,行聚偏二氟乙烯(PVDF)(美国 Millipore 公司)转膜;5%脱脂牛奶封闭膜上非特异性结合位点 1 h,膜与一抗在摇床上 4℃孵育 12 h,所用一抗为小鼠抗增殖细胞核抗原(PCNA)单抗(美国 CST 公司,1:1 200 稀释)、

兔抗 LC3B 单抗(英国 Abcam 公司,1:1 200 稀释);将膜与二抗在摇床上室温孵育 1 h,所用二抗为抗兔二抗(上海碧云天生物技术公司,1:1 500 稀释)、抗小鼠二抗(上海冠泰生物技术公司,1:40 000 稀释);洗膜 5 次后,用超敏显影液(南京诺唯赞生物科技公司)和化学发光成像系统曝光可视化所得目的条带,根据条带灰度值用 ImageJ 1.53a 版软件作半定量分析。 β -微管蛋白(tubulin)作为内参。

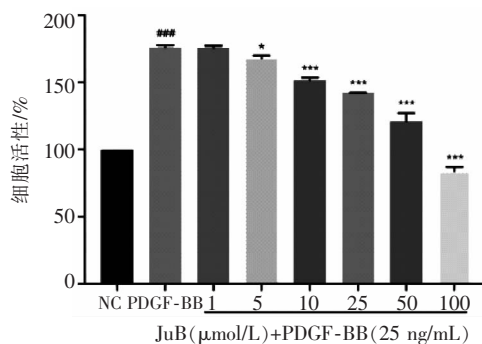
1.6 统计学分析

实验数据获得至少通过 3 次独立重复实验。采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行单因素方差分析,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, $P<0.05$ 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 JuB 抑制 PDGF-BB 诱导的 A7r5 增殖

各浓度(0~100 $\mu\text{mol/L}$)JuB 预处理 A7r5 24 h,再用 PDGF-BB(25 ng/mL)刺激 24 h,结果显示 JuB 呈浓度依赖性显著抑制 PDGF-BB 诱导的 A7r5 增殖;与正常对照组相比,25 ng/mL PDGF-BB 处理后 A7r5 增殖能力显著增加,而 5~100 $\mu\text{mol/L}$ JuB 预处理显著降低 PDGF-BB 诱导的 A7r5 增殖能力,见图 1。由于 JuB 在 100 $\mu\text{mol/L}$ 作用浓度时细胞活力低于正常对照组,后续选用 10、25、50 $\mu\text{mol/L}$ JuB 进行多剂量实验。免疫印迹法检测增殖标记物 PCNA 蛋白显示,PDGF-BB(25 ng/mL)显著诱导 PCNA 表达($P<0.001$);与 PDGF-BB 组相比,JuB 预处理呈浓度依赖性显著降低 PCNA 表达,见图 2。



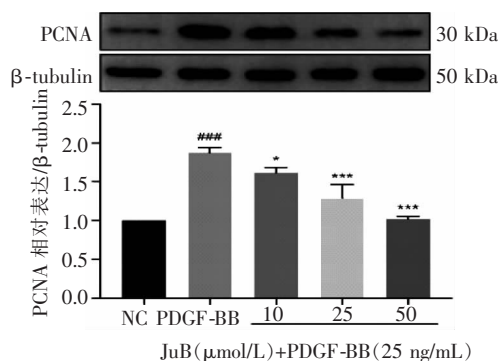
与 NC 组比较,*** $P<0.001$;与 PDGF-BB 组比较,* $P<0.05$,*** $P<0.001$

图 1 不同浓度 JuB 对 A7r5 活力的影响

2.2 JuB 减弱 PDGF-BB 诱导的 A7r5 细胞迁移

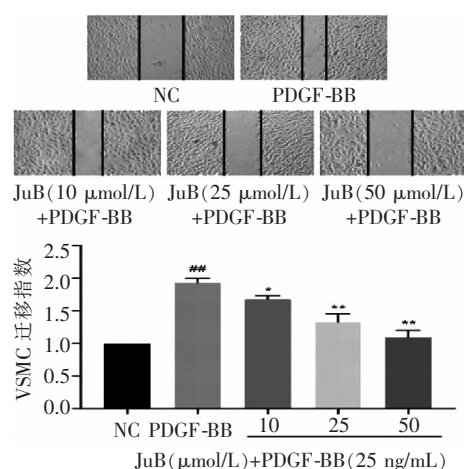
划痕愈合实验结果显示,与正常对照组相比,PDGF-BB 刺激 24 h 显著缩小划痕开口($P<0.001$);相比于 PDGF-BB 刺激组,10、25、50 $\mu\text{mol/L}$ JuB 预

处理可呈剂量依赖性显著抑制 PDGF-BB 诱导的 A7r5 细胞迁移,见图 3。



与 NC 组比较,*** $P<0.001$;与 PDGF-BB 组比较,* $P<0.05$,*** $P<0.001$

图 2 各组 A7r5 PCNA 相对表达量



与 NC 组比较,*** $P<0.01$;与 PDGF-BB 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

图 3 24 h 时各组 A7r5 细胞迁移情况(倒置显微镜,×50)

2.3 JuB 逆转 PDGF-BB 诱导的 A7r5 细胞自噬

免疫印迹法检测自噬的分子标记物微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3,MAP1LC3,LC3)B 蛋白,结果显示 A7r5 细胞 LC3B 蛋白表达在 PDGF-BB 组显著高于正常对照组($P<0.001$),提示 PDGF-BB 激活 A7r5 细胞自噬;PDGF-BB+JuB 组显著低于 PDGF-BB 组,表明 JuB 可抑制 PDGF-BB 诱导的 A7r5 细胞自噬,见图 4。

3 讨论

新内膜增生是血管介入术后再狭窄的关键进程^[14]。VSMC 过度增殖和迁移在新内膜增生发生发展中起着关键作用,因此抑制 VSMC 异常增殖和迁移对预防再狭窄具有重要意义。PDGF-BB 是从受损血管释放出的最有效促分裂原之一,在促进 VSMC

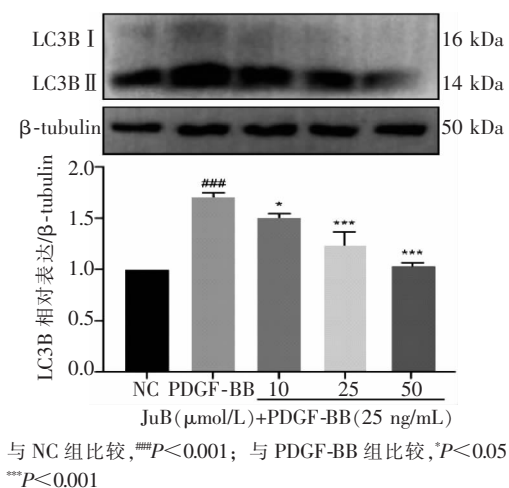


图 4 各组 A7r5 细胞 LC3B 蛋白相对表达量

增殖中起重要作用^[6]。本研究选择 PDGF-BB 作为体外刺激剂建立细胞模型并用 JuB 进行干预, 观察 JuB 对 VSMC 增殖和迁移能力的影响。

有研究表明 JuB 具有抗肿瘤作用, 然而其是否可抑制 PDGF-BB 诱导的 VSMC 增殖和迁移尚未见报道。本研究通过 CCK-8 检测 A7r5 细胞活性间接反应细胞增殖情况, 免疫印迹实验检测到增殖标记物 PCNA 被 JuB 下调, 并用划痕愈合实验检测 JuB 对 VSMC 迁移调节作用, 首次发现 JuB 可能是一种能有效阻止 PDGF-BB 诱导的 VSMC 增殖和迁移的药物。

为进一步探究 JuB 对 VSMC 增殖和迁移的抑制机制, 本研究检测自噬标记物 LC3 蛋白表达水平。细胞处于能量匮乏、应激状态时, 可通过上调自噬分解更多蛋白质, 从而提供细胞存活需要的能量^[15]。已有文献报道, PDGF-BB 可诱导自噬^[16]。自噬激活可促进细胞增殖、迁移^[17]。本研究通过免疫印迹检测显示, JuB 可显著抑制 PDGF 刺激的 A7r5 细胞 LC3B 蛋白表达, 因此 JuB 可能通过抑制自噬发挥对 VSMC 增殖和迁移的抑制作用。

综上所述, 本研究结果显示 JuB 可抑制 VSMC 异常增殖和迁移, 机制上可能与其抑制 PDGF-BB 诱导的 VSMC 自噬有关, 提示对血管介入术后新内膜增生引起的再狭窄具有治疗作用。更为具体的生物学机制有待进一步深入研究。

[参考文献]

[1] Lagrauw HM, Kuiper J, Bot I. Acute and chronic psychological stress as risk factors for cardiovascular disease: Insights gained from epidemiological, clinical and experimental studies[J]. Brain

Behav Immun, 2015, 50: 18-30.

- [2] 马旭, 李跃华, 王建波. 糖尿病下肢血管病的血管内治疗进展[J]. 介入放射学杂志, 2015, 24: 1011-1015.
- [3] 周阳, 林少芒, 萧剑彬, 等. 普通球囊、裸金属支架、药物洗脱球囊及药物洗脱支架治疗膝下动脉闭塞症的网络 Meta 分析[J]. 中华血管外科杂志, 2019, 4: 238-246.
- [4] Haude M, Ince H, Abizaid A, et al. Safety and performance of the second-generation drug-eluting absorbable metal scaffold in patients with de-novo coronary artery lesions(BIOSOLVE-II): 6 month results of a prospective, multicentre, non-randomised, first-in-man trial[J]. Lancet, 2016, 387: 31-39.
- [5] 杜发旺. 冠状动脉支架内血栓形成患者的危险因素及预后[J]. 介入放射学杂志, 2016, 25: 160-163.
- [6] Ma X, Jiang C, Li Y, et al. Inhibition effect of tacrolimus and platelet-derived growth factor-BB on restenosis after vascular intimal injury[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 93: 180-189.
- [7] Peng WH, Hsieh MT, Lee YS, et al. Anxiolytic effect of seed of Zizyphus jujuba in mouse models of anxiety[J]. J Ethnopharmacol, 2000, 72: 435-441.
- [8] Al-Reza SM, Bajpai VK, Kang SC. Antioxidant and antilisterial effect of seed essential oil and organic extracts from Zizyphus jujuba[J]. Food Chem Toxicol, 2009, 47: 2374-2380.
- [9] Liu J, Chen B, Yao S. Simultaneous analysis and identification of main bioactive constituents in extract of Zizyphus jujuba var. sapinosa (Zizyphi spinosi semen) by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection-electrospray mass spectrometry[J]. Talanta, 2007, 71: 668-675.
- [10] Seo EJ, Lee SY, Kang SS, et al. Zizyphus jujuba and its active component jujuboside B inhibit platelet aggregation[J]. Phytother Res, 2013, 27: 829-834.
- [11] Jia MM, Li YQ, Xu KQ, et al. Jujuboside B promotes the death of acute leukemia cell in a RIPK1/RIPK3/MLKL pathway-dependent manner[J]. Eur J Pharmacol, 2020, 876: 173041.
- [12] Zhao Y, Zhang X, Li J, et al. Jujuboside B reduces vascular tension by increasing Ca²⁺ influx and activating endothelial nitric oxide synthase[J]. PLoS One, 2016, 11: e0149386.
- [13] Ninave PB, Patil SD. Antiasthmatic potential of Zizyphus jujuba Mill and Jujuboside B.-Possible role in the treatment of asthma[J]. Respir Physiol Neurobiol, 2019, 260: 28-36.
- [14] Kruger D. Neo-intimal hyperplasia, diabetes and endovascular injury[J]. Cardiovasc J Afr, 2012, 23: 507-511.
- [15] White E, Mehnert JM, Chan CS. Autophagy, Metabolism, and Cancer[J]. Clin Cancer Res, 2015, 21: 5037-5046.
- [16] Salabei JK, Cummins TD, Singh M, et al. PDGF-mediated autophagy regulates vascular smooth muscle cell phenotype and resistance to oxidative stress[J]. Biochem J, 2013, 451: 375-388.
- [17] 朱焕勉, 陈然, 薛峰, 等. 自噬抑制剂氯奎对低氧诱导肺动脉平滑肌细胞增殖的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2014, 30: 8-12.

(收稿日期: 2020-09-03)

(本文编辑: 边 倩)