

白杨素对动脉损伤后新生内膜增生的影响及机制

严 玲 关红菁 朱丽华 唐其柱

摘 要 **目的** 利用小鼠颈动脉导丝损伤的动物模型和血小板衍生生长因子(PDGF)-BB刺激血管平滑肌细胞(VSMCs)增殖的细胞模型,研究白杨素对动脉损伤后新生内膜增生的抑制作用及相关机制。**方法** 建立小鼠颈动脉导丝损伤模型,随机分成模型对照组与白杨素组,分别喂以正常啮齿类动物饲料和含0.09%白杨素[w/w,相当于150mg/(kg·d)白杨素]的正常啮齿类动物饲料。取术后28天损伤侧颈动脉,检测指标。苏木素-伊红染色评价新生内膜增生,测算内膜面积和内膜中膜比值;免疫组化法测定损伤动脉内增殖细胞核抗原(PCNA)阳性细胞表达状态,评价白杨素对内膜增生的影响。同时体外培养VSMCs,给予20ng/ml PDGF-BB和(或)12.5μmol/L白杨素处理,流式细胞仪检测细胞增殖,Western blot法测定c-Jun氨基末端激酶(JNK)和信号转导及转录激活因子(STAT)3的总蛋白和磷酸化蛋白水平。**结果** 白杨素显著抑制导丝损伤所致颈动脉内膜增生,降低内膜面积、内中膜比值以及损伤侧颈动脉新生内膜内PCNA阳性细胞表达数。PDGF-BB明显促进VSMCs增殖,并显著升高VSMCs中JNK和STAT3的磷酸化水平,白杨素导致PDGF-BB引起的VSMCs增殖停滞在G₀/G₁期,并显著减弱PDGF-BB诱导的JNK和STAT3磷酸化。**结论** 白杨素可能通过阻止JNK和STAT3通路活化降低VSMCs增殖,从而遏制动脉损伤后新生内膜增生。

关键词 白杨素 再狭窄 新生内膜增生 血小板衍生生长因子 信号转导

中图分类号 R5 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.02.006

Inhibitory Effects of Chrysin on Neointimal hyperplasia after Artery Injury. Yan Ling, Guan Hongjing, Zhu Lihua, et al. Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract **Objective** To investigate the effects and possible mechanism of chrysin on neointimal hyperplasia after artery injury through guide wire-injured murine carotid artery in vivo and platelet derived growth factor (PDGF-BB)-treated vascular smooth muscle cells (VSMCs) in vitro. **Methods** Male C57BL/6 mice aged 10 weeks underwent operation of guide wire injury in left carotid arteries, and then the mice were randomly divided into injured control group and chrysin group. After the surgery, the mice were fed either normal rodent chow or normal chow containing 0.09% chrysin [w/w, which corresponded to 150mg/(kg·d) chrysin if a 30g mouse consumed 5g of chow] for 28d before they were euthanized. The left carotid arteries were isolated and processed for pathological analysis. Using hematoxylin-eosin (HE) staining, the intimal (I) and medial (M) areas were measured and I/M ratios were calculated. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemistry staining was performed to evaluate neointimal cell proliferation. Furthermore, cultured VSMCs were treated with 20ng/ml PDGF-BB and/or 12.5μmol/L chrysin pretreatment, flow cytometric analysis was carried out to detect cell proliferation, Western blot was performed to evaluate total and phosphorylated protein levels of c-Jun amino-terminal kinase (JNK) and signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3). **Results** Morphologic analysis based on HE staining of carotid cross-sections showed that the neointimal area and I/M ratio in the chrysin group were significantly reduced compared with the injured controls at day 28 after carotid injury. Chrysin also markedly suppressed neointimal cell proliferation, as evidenced by reduced numbers of PCNA-positive cells in the neointima. 20ng/ml PDGF-BB induced VSMCs proliferation and a significant increase in the levels of phosphorylated JNK and STAT3. 12.5μmol/L chrysin pretreatment caused PDGF-BB-stimulated VSMCs to arrest at G₀/G₁ phases and attenuated the PDGF-BB-induced JNK and STAT3 activation. **Conclusion** Chrysin may suppress VSMCs proliferation via the inhibition of the JNK and STAT3 signaling pathways, and therefore inhibit neointima hyperplasia after artery injury.

Key words Chrysin; Restenosis; Neointimal hyperplasia; Platelet derived growth factor; Signal transduction

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81000095);武汉大学人民医院引导基金资助项目(RMYD2018M39)

作者单位:430060 武汉大学人民医院心血管内科、武汉大学心血管病研究所、心血管病湖北省重点实验室

通讯作者:唐其柱,电子邮箱:qztang@whu.edu.cn

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)的异常过度增殖是经皮冠状动脉介入治疗后再次狭窄的主要病理机制之一^[1]。在促有丝分裂刺激下,如血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)-BB或血管损伤状况,多种细胞内信

号通路被激活,促进 VSMCs 异常增殖和再狭窄的发生、发展。这些信号通路包括丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen - activated protein kinase, MAPK) 通路、Janus 激酶/信号转导及转录激活蛋白 (Janus kinase, JAK/ signal transducer and activator of transcription, STAT) 通路等^[2-4]。针对于抑制 VSMCs 增殖以及调节信号通路的药物干预可能成为防治再狭窄的治疗策略。

白杨素 (chrysin) 又被称为 5,7 - 二羟黄酮 (5,7 - dihydroxyflavone), 是一种可从蜂胶、蜂蜜及多种植物中提取出的天然化合物,具有抗炎/抗氧化、促凋亡/抗肿瘤、扩张血管、降低血脂、改善内皮功能和胰岛素抵抗相关血管并发症等多种药理学效应,近年来其心血管保护作用也倍受重视^[5-12]。笔者前期的体外实验显示白杨素可显著抑制 PDGF - BB 引起的 VSMCs 表型转换、细胞迁移和异常增殖,然而其对体内小鼠颈动脉损伤后新生内膜增生的作用尚未见报道^[13,14]。本研究首次在小鼠动物水平,探讨白杨素对颈动脉导丝损伤后新生内膜增生的抑制效应,并且从 JNK 和 STAT 信号通路方面,研究白杨素血管保护作用的可能分子机制。

材料与方法

1. 材料:SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠购自中国医学科学院医学实验动物研究所;金属导丝 (直径 0.38mm, No. C - SF - 15 - 15) 购于美国 Cook 公司;白杨素购于美国 Sigma 公司;抗增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 抗体购于美国 Cell Signaling Technology 公司;抗总的及磷酸化的 JNK 和 STAT3 抗体购于美国 Cell Signaling Technology 公司;对二甲氨基偶氮苯 (3,3' - diaminobenzidine, DAB) 试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司;Biotinylated Goat Anti - Mouse IgG (H + L) 和 Horseradish Peroxidase Streptavidin 购于美国 Vector 公司;柠檬酸盐抗原修复溶液 (pH 值为 6.0) 购于福州迈新生物技术开发有限公司;PDGF - BB 购于美国 ProSpec 公司;DMEM/F12 液及胎牛血清购于美国 Gibco 公司;Immobilon - FL 膜购于美国 Millipore 公司。

2. 颈动脉导丝损伤小鼠动物模型的建立、分组与白杨素处理:参照笔者以往建模方法^[15-17],选取 10 周龄雄性 C57BL/6 小鼠,腹腔注射戊巴比妥钠 (3%, 90mg/kg) 以麻醉小鼠,于颈前部正中切口,分离出颈外动脉后将其结扎,继而用血管夹夹闭颈内与

颈总动脉,阻断其血流,用显微剪剪开颈外动脉,将金属导丝 (直径 0.38mm) 插入,来回进行 5 次扭转进退操作以摩擦动脉管壁,导致颈总动脉的损伤,之后将导丝撤出,结扎颈外动脉切口近心端,缝合皮肤。术后小鼠分成模型对照组 (Vehicle 组) 和白杨素组 (Chrysin 组),模型对照组小鼠喂以正常啮齿类动物饲料,白杨素组小鼠喂以含 0.09% 白杨素 [w/w, 如果根据每 30g 小鼠每天消耗 5g 饲料计算,相当于 150mg/(kg · d) 的白杨素给药剂量] 的正常啮齿类动物饲料,饲养 28 天。于术后 28 天将小鼠处死,分离获取损伤侧的颈动脉,用于检测指标。

3. 评价新生内膜形成:4% 多聚甲醛固定颈动脉,常规脱水、石蜡包埋、连续切片 (3 μ m),苏木素 - 伊红 (HE) 染色评价颈动脉组织形态结构。用 Image - Pro Plus 6.0 软件分析计算:内膜面积为内弹力板环绕面积与管腔面积的差值,中膜面积为外弹力板与内弹力板环绕面积的差值,内/中膜比值为内膜与中膜面积的比值。

4. PCNA 免疫组化:石蜡切片经脱蜡水化,柠檬酸盐抗原修复液高压修复抗原,3% H₂O₂ 溶液室温孵育 10min, PBS 漂洗后加入 10% 羊血清 37℃ 封闭 1h,滴加抗 PCNA 抗体 4℃ 孵育过夜, PBS 漂洗后加入 Biotinylated Goat Anti - Mouse IgG (H + L) 室温孵育 2h, PBS 漂洗后加入 Horseradish Peroxidase Streptavidin 37℃ 孵育 30min, DAB 显色,阳性表达为深褐色,显色完全后用 Mayer 苏木素复染,脱水透明封片。在显微镜成像系统 (BX51FL/DP72, 日本 Olympus 公司) 下观察拍照,用 Image - Pro Plus 6.0 软件进行图像分析,数据显示为新生内膜内 PCNA 阳性染色的细胞数目。

5. 细胞培养:参照参考文献 [13, 14], 采用酶消化法分离大鼠主动脉平滑肌细胞,培养在 DMEM/F12 液 (10% 胎牛血清) 里,待 VSMCs 生长到近融合状态时予以传代。VSMCs 的纯度利用细胞形态和 α - SMA 染色鉴定。实验使用 VSMCs 为 5 ~ 12 代。

6. 细胞周期检测:参照以往方法,见参考文献 [14]。碘化丙锭 (propidium iodide, PI) 染色法流式细胞仪测定细胞周期分布状态。VSMCs 生长至 70% 融合时无血清培养 24h。12.5 μ mol/L 白杨素预处理 1h 后,加入 PDGF - BB (20ng/ml) 刺激 24h。胰酶消化 VSMCs, 70% 乙醇固定过夜, 800r/min 离心 10min, 收集细胞将其重悬于 1ml 的 PI 染色液 (含 20 μ g/ml PI 和 50 μ g/ml RNase A) 中,避光孵育

30min, 流式细胞仪检测各时期的细胞百分比。

7. Western blot 法检测: 同以往方法, 见参考文献 [13, 14]。VSMCs 接种至 6cm 培养皿中, 待生长至 70% ~ 80% 融合时换无血清继续培养 24h。12.5 $\mu\text{mol/L}$ 白杨素预处理 2h 后, 给予 PDGF - BB (20ng/ml) 刺激相应的时间。VSMCs 用含蛋白酶抑制剂 Complete 及磷酸酶抑制剂 PhosSTOP 的细胞裂解溶液裂解, 12000r/min 离心 20min, 取上清, BCA 法测定蛋白质浓度。十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶 (SDS - PAGE) 电泳分离蛋白 (上样量为 20 μg 蛋白/样本), 随后转印至 Immobilon - FL 膜上。TBST 洗膜液封闭 1h, 加不同的一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 之后加 IRDye[®] 800CW 标记的二抗, 室温孵育 1h, Odyssey Imaging System (Li - COR) 获取荧光信号。

8. 统计学方法: 采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计分析。数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 经正态检验及方差齐性检验, 多组间均数比较用 One Way ANOVA, 两组间均数比较用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 白杨素遏制颈动脉损伤后新生内膜增生: 本实验 12 只小鼠术后均存活, Vehicle 组有 1 只形成血栓未纳入分析。颈动脉 HE 染色显示, Vehicle 组术后 28 天新生内膜形成非常明显, 而 Chrysin 组新生内膜增生较模型对照组明显减轻。形态学数据分析显示, 与 Vehicle 组比较, Chrysin 组的内膜面积和内膜中膜比值均显著降低, 分别为 Vehicle 组的 59.91% 和 56.04%, 差异均有统计学意义 (图 1)。

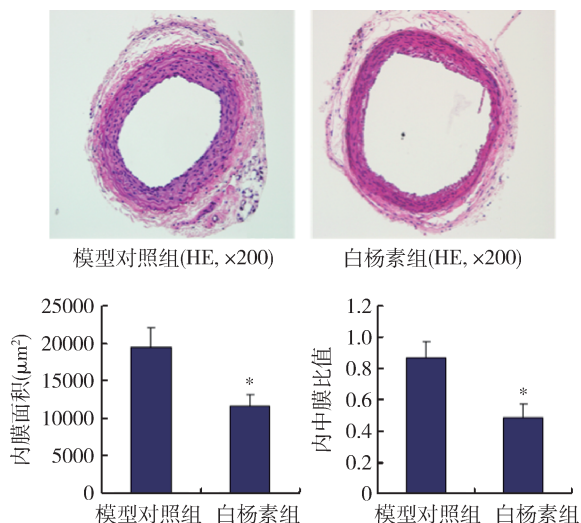


图 1 白杨素遏制颈动脉损伤后新生内膜增生

与模型对照组比较, * $P < 0.05$

2. 白杨素遏制新生内膜细胞增殖: 颈动脉免疫组化染色显示术后 28 天 Chrysin 组 PCNA 阳性细胞表达数较 Vehicle 组显著减少, 阳性细胞数仅为 Vehicle 组的 67.93% (图 2), 白杨素可显著遏制颈动脉损伤后新生内膜内 VSMCs 增殖, 从而减轻新生内膜增生。

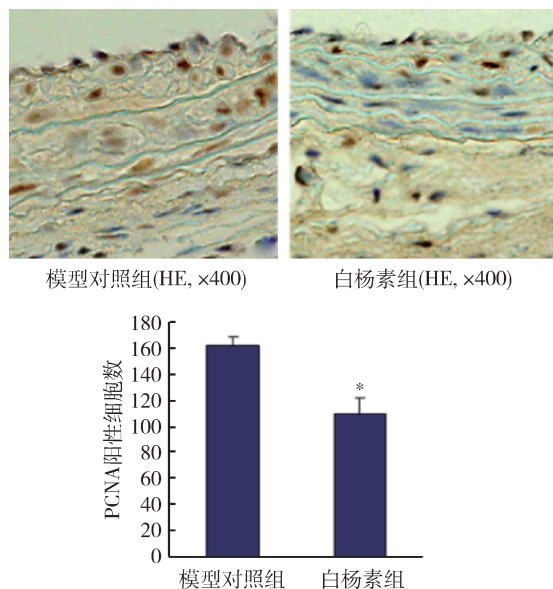


图 2 白杨素对新生内膜内 PCNA 表达的影响

与模型对照组比较, * $P < 0.05$

3. 白杨素对 PDGF - BB 处理的 VSMCs 细胞周期的作用: 各组别的细胞周期分布代表图参见图 3。PDGF - BB 刺激 VSMCs 24h 使 G_0/G_1 期细胞占比显著低于模型对照组, 而 S 期细胞占比明显高于模型对照组。白杨素预处理显著抑制 PDGF - BB 刺激的 VSMCs 增殖周期变化, 使 G_0/G_1 期细胞比例显著升高, 而 G_2/M 期细胞比例显著降低 (表 1)。

4. 白杨素对 PDGF - BB 引起的 VSMCs 中 JNK 磷酸化的作用: Western blot 法检测结果显示 20ng/ml PDGF - BB 作用 15min 后显著升高 VSMCs 中 JNK 的磷酸化表达水平, 然而 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 白杨素预处理几乎完全抑制 PDGF - BB 引起的 JNK 磷酸化, PDGF - BB 和白杨素对 JNK 总蛋白水平没有明显影响 (图 4)。

5. 白杨素对 PDGF - BB 引起的 VSMCs 中 STAT3 磷酸化的作用: Western blot 法检测结果显示 PDGF - BB 作用 15min 后 STAT3 即发生显著磷酸化, 并持续到 30min, 而白杨素预处理显著降低 PDGF - BB 对 STAT3 的磷酸化, PDGF - BB 和白杨素对 STAT3 的总蛋白表达水平没有显著影响 (图 4)。

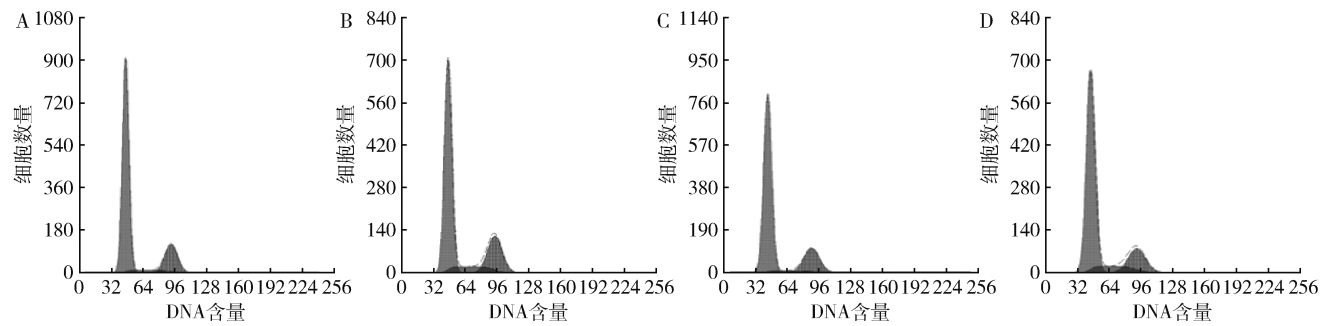


图 3 流式细胞术分析各组别的细胞周期分布
A. 对照组; B. PDGF 组; C. 白杨素组; D. PDGF + 白杨素组

表 1 白杨素对 PDGF - BB 处理的 VSMCs 细胞
周期分布的作用 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期
对照组	75.90 ± 0.10	4.69 ± 0.33	19.30 ± 0.30
PDGF 组	69.80 ± 1.35 *	9.57 ± 0.60 *	20.63 ± 1.67
白杨素组	75.97 ± 0.49	2.60 ± 0.23	21.43 ± 0.73
PDGF + 白杨素组	73.13 ± 0.55 #	10.06 ± 0.45 *	16.77 ± 0.39 #

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 PDGF 组比较, # $P < 0.05$

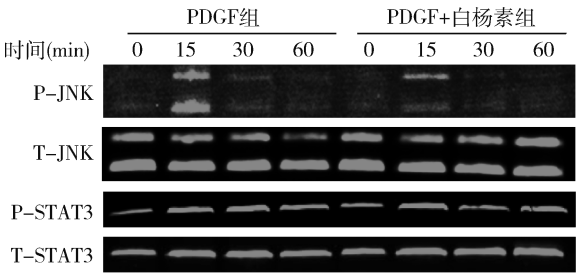


图 4 白杨素对 PDGF - BB 引起的 VSMCs 中 JNK 和
STAT3 信号通路活化的作用

讨 论

VSMCs 表型转换、迁移和异常增殖参与了动脉损伤后新生内膜增生的发生发展。笔者前期研究发现白杨素预处理能阻止 PDGF - BB 引起的 VSMCs 收缩表型向合成表型转换,并显著抑制 PDGF - BB 引起的 VSMCs 迁移^[13]。同时,笔者还发现白杨素明显抑制 PDGF - BB 引起的 VSMCs 增殖与 DNA 合成^[14]。这些体外研究结果促使进一步探讨白杨素对体内颈动脉损伤后新生内膜增生的作用。本研究利用前期建立的成熟稳定的小鼠颈动脉导丝损伤模型,首次发现口服给予白杨素可显著抑制新生内膜增生,并明显降低新生内膜中 PCNA 阳性细胞表达数^[15-17]。该体内实验结果又进一步验证了前期体外实验结果,强有力地支持白杨素对损伤诱导的血管重构的保护效应。

白杨素抑制动脉损伤后新生内膜增生的详细机制尚未完全阐明。鉴于 VSMCs 异常增殖加速新生内膜增生,而 PDGF - BB 能强效刺激 VSMCs 增殖,本实验利用体外 PDGF - BB 诱导 VSMCs 增殖细胞模型进一步探寻白杨素血管保护作用的可能分子机制。与前期研究一致的是,流式细胞术分析显示白杨素预处理使 PDGF - BB 引起的 VSMCs 增殖停滞在 G₀/G₁ 期,从而遏制 VSMCs 增殖^[14]。既往研究显示,JNK 通路和 STAT3 通路的活化与 VSMCs 异常增殖和新生内膜形成密切相关^[2-4]。

本实验随后测定了白杨素对上述信号蛋白的影响,结果显示,在体外培养的 VSMCs 中,20ng/ml PDGF - BB 刺激诱导 JNK 和 STAT3 快速磷酸化,而 12.5μmol/L 白杨素预处理显著抑制 PDGF - BB 对 JNK 和 STAT3 的磷酸化。该结果提示白杨素抑制 PDGF - BB 引起的 VSMCs 增殖的分子机制可能与其减弱 JNK 和 STAT3 活化相关。Lee 等^[18]报道白杨素在人成巨核细胞性白血病 MO7e 细胞中可抑制干细胞因子诱导的 STAT3 活化,Lin 等^[19]报道白杨素还能在人脐静脉内皮细胞中抑制白介素 - 6 诱导的 STAT3 活化,这些结果从一定程度上验证了本研究的可靠性。然而,白杨素究竟通过哪种具体的上游信号分子同时对 JNK 通路和 STAT3 通路发挥抑制效应,尚待进一步深入研究。白杨素抑制动脉损伤后新生内膜形成是否与其抑制 JNK 和 STAT3 通路活化有直接因果关系还有待进一步动物实验研究证实。

综上所述,本研究结果证实白杨素可能经由抑制 JNK 通路和 STAT3 通路活化,阻止血管平滑肌细胞异常过度增殖,从而减轻动脉损伤后的新生内膜增生。白杨素有望成为经皮冠状动脉介入治疗后再狭窄的有效防治药物。