

荷叶碱通过上调 SDF-1/CXCR4 信号通路促进人主动脉内皮细胞增殖

陈云宪, 唐良秋, 梁家荣, 张社兵, 陈宝峰, 陈锦峰

(粤北人民医院心血管内科, 广东省韶关市 512026)

[关键词] 荷叶碱; 基质细胞衍生因子 1; 趋化因子受体 4; 人主动脉内皮细胞; 血管再生

[摘要] 目的 探讨荷叶碱是否通过调控基质细胞衍生因子 1(SDF-1)/趋化因子受体 4(CXCR4)信号通路影响动脉内皮细胞增殖。方法 分别使用不同质量浓度(0 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、50 mg/L、100 mg/L)的荷叶碱培养人主动脉内皮细胞(HAEC)24 h, 通过 RT-QPCR 和 Western blot 技术分别检测各组细胞中 SDF-1 和 CXCR4 mRNA 及其蛋白的表达情况。采用体外内皮细胞小管形成实验观察不同质量浓度荷叶碱对 HAEC 增殖能力的影响。结果 SDF-1、CXCR4 蛋白和 mRNA 在荷叶碱组 HAEC 中表达升高, 在 50 mg/L 荷叶碱组中表达最显著。荷叶碱组 HAEC 体外小管形成能力与荷叶碱呈浓度依赖性增强, 在 50 mg/L 荷叶碱组中最明显。结论 荷叶碱可能通过上调 SDF-1/CXCR4 信号通路的表达促进血管内皮细胞增殖。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Nuciferine promotes proliferation of human aortic endothelial cell by up-regulating SDF-1/CXCR4 signaling pathway

CHEN Yunxian, TANG Liangqiu, LIANG Jiarong, ZHANG Shebing, CHEN Baofeng, CHEN Jinfeng

(Department of Cardiology, Yuebei People's Hospital, Shaoguan, Guangdong 512026, China)

[KEY WORDS] Nuciferine; SDF-1; CXCR4; human aortic endothelial cell; angiogenesis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether Nuciferine affect the proliferation of arterial endothelial cell by regulating SDF-1/CXCR4 signaling pathway. **Methods** Human aortic endothelial cell (HAEC) were co-cultured with Nuciferine of different concentrations (0 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L) for 24 hours. The expressions of SDF-1, CXCR4 mRNA and their proteins in each group were detected by RT-QPCR and Western blot techniques, respectively. The effects of different concentrations of Nuciferine on the colonization ability of HAEC were observed by endothelial cell tubule formation experiment in vitro. **Results** The expression of SDF-1/CXCR4 protein and mRNA increased in Nuciferine group, especially in 50 mg/L group. The tubule formation energy of HAEC in vitro was enhanced in a concentration-dependent manner in the Nuciferine group, which was the most obvious in the 50 mg/L group. **Conclusion** Nuciferine can promote the proliferation of vascular endothelial cell by up-regulating the expression of SDF-1/CXCR4 signaling pathway.

心脑血管缺血性疾病是严重威胁人类生命的致死性疾病,虽然目前大量的抗血栓药物和手术等治疗手段取得了可喜的进展,但仍有不少患者无法耐受手术,或者无法解决微血管缺血的问题。近年来,治疗性血管新生已成为缺血性疾病治疗研究的热点^[1]。血管新生是指在原有血管网的基础上,通

过内皮细胞迁移、增殖、伸展及管状结构形成等步骤,最终长成新生毛细血管的复杂过程^[2]。治疗性血管新生即将外源性促血管生长因子、基因或干细胞转入缺血组织中,诱导侧支血管生成,从而使缺血组织获得血运重建^[3]。研究表明,基质细胞衍生因子 1(stromal cell-derived factor-1, SDF-1)及其特异

[收稿日期] 2019-10-23

[修回日期] 2020-10-12

[基金项目] 广东省医学科研基金项目(A2020383)

[作者简介] 陈云宪,硕士研究生,主治医师,研究方向为心血管疾病防治,E-mail 为 805170047@qq.com。通信作者唐良秋,主任医师,硕士研究生导师,研究方向为心血管疾病防治,E-mail 为 tlq_550488@sina.com。

性受体 CXC 趋化因子受体 4 (CXCR4) 构成的 SDF-1/CXCR4 信号通路在血管平滑肌细胞增殖、新生血管形成中起着重要作用^[4]。SDF-1/CXCR4 生物轴可以通过调控多种细胞信号通路影响细胞周期及细胞增殖,促进生长因子介导的内皮祖细胞迁移,参与血管新生。

荷叶碱 (Nuciferine, $C_{19}H_{21}NO_2$) 是从荷叶获得的主要生物活性成分,具有多种生物学作用^[5],包括抑制细胞炎症^[6],改善脂质代谢^[7],抑制肿瘤细胞增殖^[8]等。已有研究表明荷叶碱具有调节平滑肌细胞增殖和抗动脉粥样硬化的作用^[9],那么荷叶碱是否通过调控 SDF-1/CXCR4 信号通路参与血管平滑肌细胞增殖并不清楚,所以本课题旨在探索荷叶碱在治疗性血管新生中的作用,研究荷叶碱对主动脉内皮细胞 SDF-1/CXCR4 信号通路的影响,观察荷叶碱是否具有促进血管内皮细胞增殖的作用。

1 材料和方法

1.1 主要材料

人主动脉内皮细胞株 (human aortic endothelial cell, HAEC) 购于 ATCC 公司 (货号 PCS-100-011)。荷叶碱 (世纪奥科生物技术有限公司), RPMI-1640 培养基、BCA 蛋白含量测定试剂盒 (美国 Thermo 公司), 胎牛血清 (FBS 公司)、EDTA-胰酶 (美国 Gicbo 公司), 总 RNA 提取试剂盒、荧光实时定量 PCR 试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司), PCR 引物 (睿博兴科生物技术有限公司), 兔抗人 VEGF-A 一抗 (Immunoway 公司), 兔抗人 GAPDH 一抗 (CST 公司), 羊抗兔二抗 (北京康为世纪), Trizol (美国 Invitrogen 公司), Matrigel 基质胶 (美国 BD 公司)。

1.2 细胞培养与分组

HAEC 复苏后接种于 25 cm^2 培养瓶中,以含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基在适宜环境 ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 以及饱和湿度) 的细胞培养箱中进行培养。当细胞铺满培养瓶底部时,加入 0.25% 胰酶消化细胞,进行传代培养。取第 2~4 代处于对数生长期的 HAEC 进行后续研究。将正常培养 HAEC 从培养瓶中消化下来,按照 2×10^5 个/mL 接种于 6 孔板,待细胞贴壁后,镜下观察每个孔细胞生长至汇合 60%~80% 后,进行实验分组:空白对照组 (单纯 RPMI-1640 培养基)、10 mg/L 荷叶碱组、20 mg/L 荷叶碱组、50 mg/L 荷叶碱组、100 mg/L 荷叶碱组,继续培养 24 h。

1.3 Western blot 检测 SDF-1 和 CXCR4 蛋白的表达

弃去 6 孔板内培养基, PBS 漂洗 2 次,离心收集细胞沉淀。加入适量 RIPA 裂解液,将离心管放入冰上裂解至少 30 min,离心后吸取上清液至新 EP 管。用 BCA 测定法测量蛋白质浓度。通过 SDS-PAGE 分离蛋白质裂解物,每孔蛋白质上样量为 30 μg 。电泳完成后,将分离的蛋白质转移至硝酸纤维素膜,并用 5% 脱脂奶粉封闭。加入提前准备好的 SDF-1、CXCR-4 和 GAPDH 的兔抗人一抗 (1:1 000),置于摇床上 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜。次日回收一抗, TBST 洗膜,加入羊抗兔二抗 (1:5 000) 室温孵育 1 h,回收二抗, TBST 洗膜。加入适量的混合发光液,避光下使用化学显影成像系统 Image Quant Las4000 显影,使用 Image J 软件分析条带的灰度值。

1.4 Real-time PCR 检测 mRNA 的表达

按照试剂盒说明,通过 Trizol 试剂从每组培养的 HAEC 中提取总 RNA。用 RNA 测量仪测定其纯度,如果 A_{260}/A_{280} 为 1.8~2.0 即符合后续 RT-PCR 实验要求。用 RT 试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA,然后进行实时 PCR。引物序列见表 1。GAPDH 用作管家基因进行标准化。反应条件如下: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 min,然后经 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、30 s, $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、30 s,循环 40 次,在每个循环的 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、30 s 时收集荧光信号。结束反应后所得结果直接在荧光定量操作软件中进行分析比较。按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算靶基因 mRNA 的相对表达量。

表 1. Real-time PCR 引物序列

Table 1. The sequences of the primers for real-time PCR

名称	序列 (5'→3')
SDF-1	F: CCCGAAGCTAAAGTGGATTC R: TTCAGAGCTGGGCTCCTACT
CXCR4	F: GGAGGGGATCAGTATATACA R: GAAGATGATGGAGTAGATGG
GAPDH	F: GGGTGTGAACCATGAGAAGT R: GACTGTGCTCATGAGTCCT

1.5 体外 HAEC 小管形成实验

将不同质量浓度荷叶碱处理的 HAEC 消化下来,将每个组细胞制备成 2×10^5 个/mL 细胞悬液。将细胞外基质胶充分溶解,铺于 96 孔板置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中孵育 60 min。每孔加入 150 μL 上述细胞悬液于凝胶表面,继续培养 18 h,同一浓度荷叶碱组设置 3 个副孔。在 20 倍显微镜下观察各组小管形成情况并拍照,每组随机选取 5 个视

野统计其每个视野下小管形成数量,取均值。

1.6 统计学处理

实验流程重复进行 3 次,取结果平均值进行比较,计量资料表示为 $\bar{x} \pm s$ 。数据分析采用单因素方差分析(ANOVA),然后采用最小显著差异(LSD)检验,两两比较行 t 检验。所有统计分析均使用 SPSS 23.0 进行。 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 荷叶碱促进 HAEC 表达 SDF-1/CXCR4

在(10~100) mg/L 荷叶碱质量浓度梯度范围内,SDF-1、CXCR-4 mRNA 和蛋白表达均较空白对照组增加($P < 0.05$, $P < 0.01$),其中 50 mg/L 荷叶碱组 SDF-1、CXCR4 mRNA 和蛋白表达较空白对照组增加最显著($P < 0.01$;图 1)。

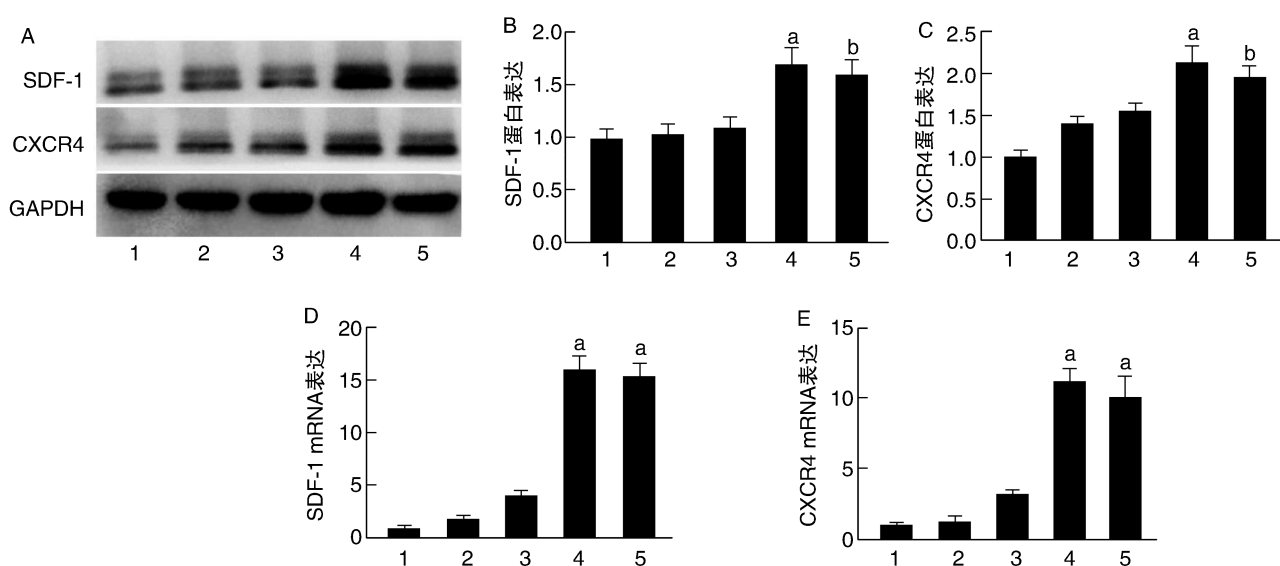


图 1. 不同质量浓度荷叶碱对 SDF-1、CXCR4 mRNA 和蛋白相对表达量的影响($n=3$) 1 为空白对照组(0 mg/L 荷叶碱);2 为 10 mg/L 荷叶碱组;3 为 20 mg/L 荷叶碱组;4 为 50 mg/L 荷叶碱组;5 为 100 mg/L 荷叶碱组。a 为 $P < 0.01$, b 为 $P < 0.05$,与空白对照组(0 mg/L)比较。

Figure 1. Effects of different concentrations of Nuciferine on the expression of SDF-1 /CXCR4 mRNA and protein($n=3$)

2.2 不同质量浓度荷叶碱对 HAEC 体外小管形成的影响

体外小管形成实验结果显示,在荷叶碱(0~100) mg/L 质量浓度梯度范围内,随着荷叶碱质量浓度的升高,HAEC 体外小管形成能力逐渐增强。

其中 50 mg/L 荷叶碱组($P=0.028$)和 100 mg/L 荷叶碱组($P=0.040$)HAEC 体外小管形成的能力与空白对照组相比有统计学意义($P < 0.05$),而 50 mg/L 荷叶碱组 HAEC 体外小管形成的能力最强(图 2 和图 3)。

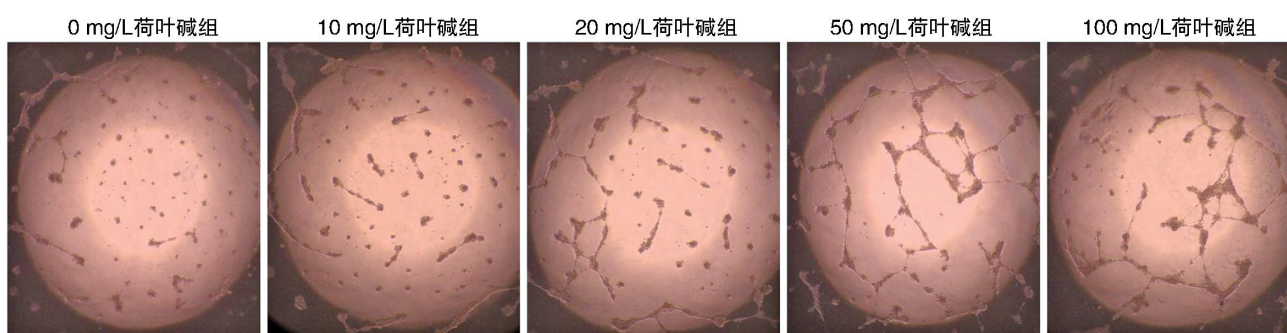


图 2. 不同质量浓度荷叶碱对 HAEC 体外小管形成的影响(20×)

Figure 2. Effects of different concentrations of Nuciferine on tube formation of HAEC in vitro (20×)

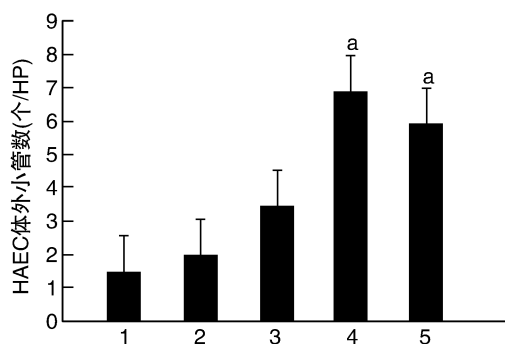


图3. 不同质量浓度荷叶碱对 HAEC 体外小管形成的影响
1 为空白对照组(0 mg/L 荷叶碱);2 为 10 mg/L 荷叶碱组;3 为 20 mg/L 荷叶碱组;4 为 50 mg/L 荷叶碱组;5 为 100 mg/L 荷叶碱组。a 为 $P < 0.05$, 与空白对照组比较。

Figure 3. Effects of different concentrations of Nuciferine on the tubule formation of HAEC in vitro

3 讨论

刺激缺血组织形成新生血管,建立良好的侧枝循环,从而恢复缺血组织供血,是目前治疗心肌梗死等缺血性疾病的一种新理念。血管生成是由先前存在的毛细血管床形成新毛细血管的过程,是一个涉及多种血管生成细胞和促血管生成分子高度协调的复杂过程^[10]。血流动力学和缺血性刺激是促进血管生成的重要因素,研究发现当机体血管供血障碍时,局部的缺氧环境会刺激各种血管生成因子的产生,包括血管内皮生长因子(VEGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、转化生长因子 β (TGF- β)、血管生成素、趋化因子等,各种血管生成因子将骨髓来源的细胞(BMDC)或内皮祖细胞募集到损伤组织,促进血管内皮细胞增殖,从而完成血管的修复和新生^[11]。血管新生能使缺血组织建立新的血液循环,或形成良好的侧枝供血,从而使器官功能得以改善。研究发现,良好的冠状动脉侧枝循环能明显缩小心肌梗死面积,减少主要不良心血管事件和全因死亡率^[12-13]。于是研究人员希望通过给机体补充外源性促血管生成因子刺激内皮祖细胞释放,促进内皮细胞迁移、增殖,从而达到血管再生的作用。随着对血管生长因子和血管新生研究的不断深入,治疗性血管新生已成为心肌梗死等缺血性疾病治疗研究的新领域,并且取得一定的成效^[10]。

CXCR4 是 SDF-1 的特异性趋化因子受体,在多种淋巴细胞和干细胞表面表达,具有强大的趋化活性^[4]。近年研究表明,SDF-1/CXCR4 通路不仅趋化干细胞靶向受损组织,还有扩大旁分泌、加强干细

胞黏附、促进血管新生的作用^[14-15]。研究表明在缺氧环境刺激下,缺氧诱导因子 HIF-1 α 和 HIF-2 α 与 Arnt 形成异源二聚体并激活 SDF-1 转录,从而使其表达升高,最终形成损伤组织中高 SDF-1、外周低 SDF-1 的浓度梯度。表达 CXCR4 的内皮细胞可以感知 SDF-1 的浓度梯度,逆浓度靶向受损组织,从而促进新血管的形成^[16-17]。目前已发现 SDF-1/CXCR4 生物轴的这种募集细胞帮助损伤修复的过程在骨骼肌肉损伤、心肌梗死、脑卒中等多种器官损伤修复中发挥着重要作用^[18-21]。SDF-1/CXCR4 与多种信号通路存在紧密联系,有研究证实,SDF-1/CXCR4 生物轴可以通过调控 ERK 及 PI3K/Akt 信号通路影响细胞周期及细胞的增殖,还可以影响细胞 Rac1/ERK、JNK 及 AP-1 信号通路从而促进生长因子的表达^[22]。目前有多种药物已被证实能作用于 SDF-1/CXCR4 生物轴改善血管再生^[23],在治疗性血管新生中起着重要作用。

近年来,有研究报道中药在治疗缺血性疾病中发挥着独特的优势,例如熟地能使 SDF-1 的表达上调,促进内皮细胞增殖^[24]。近年来研究发现从荷叶提取的荷叶碱具有调脂、清除自由基、抗氧化、抗动脉粥样硬化等药物作用^[5,9,25]。因此猜测荷叶碱可能具有调控 SDF-1/CXCR4 生物轴的作用,本实验通过不同质量浓度的荷叶碱培养 HAEC,发现 HAEC 被荷叶碱刺激后,其 SDF-1、CXCR4 mRNA 和蛋白的表达相对于空白对照组均有不同程度增加,且在荷叶碱质量浓度为 50 mg/L 时表达量最大。此外,本文直接观察了不同浓度荷叶碱对 HAEC 体外小管形成的影响,同样表明荷叶碱能促进 HAEC 增殖,且在荷叶碱质量浓度为 50 mg/L 时成管效应最大。提示荷叶碱能上调 SDF-1/CXCR4 信号,促进血管内皮细胞增殖,可能具有促进血管新生的作用。本研究结果对荷叶碱调控 SDF-1/CXCR4 生物轴的详细级联通路尚不明确,需要更进一步的研究证实荷叶碱在血管新生中的具体作用。

[参考文献]

- [1] Potz BA, Parulkar AB, Abid RM, et al. Novel molecular targets for coronary angiogenesis and ischemic heart disease [J]. Coron Artery Dis, 2017, 28(7): 605-613.
- [2] Semenza GL. Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: Mechanisms of blood vessel formation and remodeling [J]. J Cell Biochem, 2007, 102(4): 840-847.
- [3] Rubanyi GM. Mechanistic, technical, and clinical perspectives in therapeutic stimulation of coronary collateral

- development by angiogenic growth factors[J]. *Mol Ther*, 2013, 21(4): 725-738.
- [4] Pozzobon T, Goldoni G, Viola A, et al. CXCR4 signaling in health and disease[J]. *Immunol Lett*, 2016, 177: 6-15.
- [5] Sharma BR, Gautam LN, Adhikari D, et al. A comprehensive review on chemical profiling of nelumbo nucifera: potential for drug development[J]. *Phytother Res*, 2017, 31(1): 3-26.
- [6] Zhang C, Deng J, Liu D, et al. Nuciferine inhibits proinflammatory cytokines via the PPARs in LPS-induced RAW264.7 cells[J]. *Molecules*, 2018, 23(10): 2-11.
- [7] Ma C, Li G, He Y, et al. ProNuciferine and Nuciferine inhibit lipogenesis in 3T3-L1 adipocytes by activating the AMPK signaling pathway[J]. *Life Sciences*, 2015, 136: 120-125.
- [8] Li Z, Chen Y, An T, et al. Nuciferine inhibits the progression of glioblastoma by suppressing the SOX2-Akt/STAT3-Slug signaling pathway[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 139-144.
- [9] Karki R, Jeon ER, Kim DW. Nelumbo nucifera leaf extract inhibits neointimal hyperplasia through modulation of smooth muscle cell proliferation and migration[J]. *Nutrition*, 2013, 29(1): 268-275.
- [10] Robich MP, Chu LM, Oyamada S, et al. Myocardial therapeutic angiogenesis: a review of the state of development and future obstacles[J]. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2011, 9(11): 1469-1479.
- [11] Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis[J]. *Nature*, 2011, 473(7347): 298-307.
- [12] Meier P, Hemingway H, Lansky AJ, et al. The impact of the coronary collateral circulation on mortality: a meta-analysis[J]. *Eur Heart J*, 2012, 33(5): 614-621.
- [13] 王天博, 刘婷婷, 孙芳玲, 等. 治疗性血管新生在心肌梗死后的应用进展[J]. *心脏杂志*, 2019, 31(2): 217-221.
- [14] Ying JW, Wen TY, Pei SS, et al. Stromal cell-derived factor-1 α promotes recruitment and differentiation of nucleus pulposus-derived stem cells[J]. *World J Stem Cells*, 2019, 11(3): 196-211.
- [15] Dimova I, Karthik S, Makanya A, et al. SDF-1/CXCR4 signalling is involved in blood vessel growth and remodeling by intussusception[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(6): 3916-3926.
- [16] Tu TC, Nagano M, Yamashita T, et al. A chemokine receptor, CXCR4, which is regulated by Hypoxia-Inducible factor 2 α , is crucial for functional endothelial progenitor cells migration to ischemic tissue and wound repair[J]. *Stem Cells Dev*, 2016, 25(3): 266-276.
- [17] Choi JH, Nguyen MP, Lee D, et al. Hypoxia-induced endothelial progenitor cell function is blunted in angiotensinogen knockout mice[J]. *Mol Cells*, 2014, 37(6): 487-496.
- [18] Kawakami Y, Li M, Matsumoto T, et al. SDF-1/CXCR4 axis in Tie2-lineage cells including endothelial progenitor cells contributes to bone fracture healing[J]. *J Bone Miner Res*, 2015, 30(1): 95-105.
- [19] Tian XQ, Yang YJ, Li Q, et al. Combined therapy with atorvastatin and atorvastatin-pretreated mesenchymal stem cells enhances cardiac performance after acute myocardial infarction by activating SDF-1/CXCR4 axis[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(7): 4214-4231.
- [20] Wang ML, Zhang LX, Wei JJ, et al. Granulocyte colony-stimulating factor and stromal cell-derived factor-1 combination therapy: A more effective treatment for cerebral ischemic stroke[J]. *Int J Stroke*, 2020, 15(7): 743-754.
- [21] 周浩, 张颖, 李丹丹, 等. SDF-1/CXCR4 通路在干细胞心肌梗死治疗中的研究进展[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2016, 10(1): 89-92.
- [22] 张博, 刘娜, 刘洪臣. SDF-1/CXCR-4 生物轴的研究进展[J]. *中华老年口腔医学杂志*, 2015, 13(2): 101-104.
- [23] Huang X, Mao W, Zhang T, et al. Baicalin promotes apoptosis and inhibits proliferation and migration of hypoxia-induced pulmonary artery smooth muscle cells by up-regulating A2a receptor via the SDF-1/CXCR4 signaling pathway[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2018, 18: 330.
- [24] Macarthur JJ, Cohen JE, Mcgarvey JR, et al. Preclinical evaluation of the engineered stem cell chemokine stromal cell-derived factor 1 α analog in a translational ovine myocardial infarction model[J]. *Circ Res*, 2014, 114(4): 650-659.
- [25] 佟文娟, 徐新, 张社兵, 等. 荷叶生物碱下调 THP-1 源性巨噬细胞 microRNA-33a-5p 的表达及上调 ABCA1/G1 的表达[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(12): 1219-1223.
- (此文编辑 朱雯霞)