

[文章编号] 1007-3949(2004)12-06-0659-03

• 实验研究 •

## 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

韩 英, 谢良地, 许昌声, 王华军

(福建省高血压研究所 福建医科大学附属第一医院, 福建省福州市 350005)

[关键词] 药理学; 血小板源生长因子; 内皮素 1; 细胞内游离钙离子; 阿魏酸钠; 血管平滑肌细胞; 细胞迁移

[摘要] 为探讨阿魏酸钠对血小板源生长因子二聚体和内皮素 1 诱导的血管平滑肌细胞迁移的影响, 采用组织块外生法体外培养血管平滑肌细胞, 采用改良的 Boyden 微孔膜双槽法进行细胞迁移实验, 荧光染料 Fura2/AM 法测定细胞内游离钙离子浓度。结果发现, 血小板源生长因子二聚体和内皮素 1 均可诱导血管平滑肌细胞迁移, 作用峰值浓度分别为  $10 \mu\text{g/L}$  和  $10^{-7} \text{ mol/L}$ 。阿魏酸钠 ( $10^{-7} \sim 10^{-3} \text{ mol/L}$ ) 呈浓度依赖性抑制上述物质诱导的细胞迁移,  $10^{-3} \text{ mol/L}$  阿魏酸钠对血小板源生长因子二聚体和内皮素 1 诱导的细胞迁移的抑制率分别为 85.04% 和 81.92%。血小板源生长因子二聚体和内皮素 1 促进细胞内游离钙离子浓度升高 ( $P < 0.05$ ), 作用峰值浓度分别为  $10 \mu\text{g/L}$  和  $10^{-8} \text{ mol/L}$ 。阿魏酸钠明显抑制该作用, 峰抑制率分别为 80.14% 和 76.69%。以上提示, 阿魏酸钠可能通过抑制细胞内游离钙离子浓度的升高来抑制上述物质诱导的血管平滑肌细胞迁移。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

### Effect of Sodium Ferulate on Migration Induced by Platelet Derived Growth Factor and Endothelin-1 in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells

HAN Ying, XIE Liang-Di, XU Chang-Sheng, and WANG Hua-Jun

(Fujian Hypertension Research Institute, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, China)

[KEY WORDS] Platelet Derived Growth Factor; Endothelin-1;  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ; Sodium Ferulate; Vascular Smooth Muscle Cells; Migration

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of sodium ferulate(SF), one of the principal components of rhizoma ligustici wallichii, on the migration induced by endothelin-1 (ET-1) and platelet derived growth factor (PDGF) in vascular smooth muscle cells (VSMC). **Methods** Cultured VSMC derived from spontaneously hypertensive rats (SHR) were used. Cell migration was determined by modified Boyden chamber assays.  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  was measured with fluorescent  $\text{Ca}^{2+}$  indicator Fura2/AM.

**Results** ET-1 and PDGF significantly induced a migration of VSMC in a dose-dependent manner, which was inhibited by pretreatment of VSMC with SF ( $10^{-7} \sim 10^{-3} \text{ mol/L}$ ) dose-dependently. The peak inhibition rate of migration induced by ET-1 and PDGF were 85.04% and 81.92% ( $P < 0.01$ ) respectively. ET-1 and PDGF provoked the rise of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in VSMC which was significantly suppressed by  $10^{-3} \text{ mol/L}$  SF ( $P < 0.01$ ) with a inhibitory peak at 80.14% and 76.69%. **Conclusions** The migration and rise of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induced by ET-1 and PDGF in VSMC from SHR may be suppressed by SF.

血小板源生长因子 (platelet derived growth factor, PDGF) 和内皮素 1 (endothelin-1, ET-1) 作为强有力的化学趋化剂和丝裂原, 在血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) 的迁移过程中扮演重要的角色<sup>[1]</sup>, 而抑制 VSMC 的迁移, 可有利于防治冠状动脉再狭窄的形成<sup>[2]</sup>。阿魏酸钠 (sodium ferulate, SF)

是当归和川芎等中药的主要成份之一, SF (3-甲氧基-4-羟基-苯丙烯酸钠) 的羟基结构可清除自由基, 抗血管内皮脂质过氧化损伤, 它的苯烯结构可拮抗内皮素 1 的生物活性, 减轻血管内皮的继发性损伤, 具有双重保护血管内皮、扩张血管和调节血压等多种作用<sup>[3]</sup>。本研究观察 SF 对 VSMC 迁移的影响及其可能机制, 为其在临床上的发展提供一定的理论依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 药品和试剂

RPMI1640 干粉培养基、胰蛋白酶 (Gibco 公司);

[收稿日期] 2004-05-13 [修回日期] 2004-10-20

[基金项目] 福建省医学创新课题 (C2003-CX-12)

[作者简介] 韩英, 硕士, 住院医师, 研究方向为动脉粥样硬化的机制, E-mail 为 hyhanying@yahoo.com.cn。谢良地, 博士, 教授, 博士研究生导师, 为本文通讯作者, 研究方向为高血压病的流行病学、病理生理和发病机制、高血压心血管重塑、心力衰竭及心肌病的发病机制, E-mail 为 ldxie@hotmail.com。许昌声, 大专, 技师, 研究方向为心血管病理生理分子学, E-mail 为 xcseng2005@yahoo.com.cn。

新生小牛血清/FCS(杭州四季青生物工程材料研究所); Boyden 迁移槽和聚碳酸酯微孔膜(Molecular Probes 公司); 血小板源生长因子二聚体(PDGF-BB)、二甲基亚砜、内皮素 1、Fura-2/AM 和 Gelatin 均为 Sigma 公司产品; 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)(上海生物工程公司);  $\alpha$ -actin 单克隆抗体(Zymed 公司); 阿魏酸钠由成都制药一厂提供(川卫药 1981 第 000420 号)。

## 1.2 血管平滑肌细胞培养及鉴定

自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)由本研究所动物室自行繁殖,组织块外生法体外培养 VSMC。通过相差显微镜形态学观察以及抗  $\alpha$ -actin 单克隆抗体染色阳性标记鉴定 VSMC。取第 5~14 代细胞用于实验<sup>[4]</sup>。

## 1.3 血管平滑肌细胞迁移实验

采用改良的 Boyden 微孔膜双槽法进行迁移实验<sup>[5]</sup>。用相差显微镜计算相对固定的 5 个高倍视野( $\times 200$ )的细胞数,每个浓度做两张膜,取均值。PDGF-BB 浓度为 0.1、1、3、10、30 和 100  $\mu\text{g/L}$ , 内皮素 1 浓度为  $10^{-10}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$  和  $10^{-5}$  mol/L, SF 浓度为  $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-4}$  和  $10^{-3}$  mol/L。

## 1.4 细胞内游离钙离子浓度的测定

已生长汇合的 VSMC,加入终浓度为 5  $\mu\text{mol/L}$  的 Fura-2/AM, 37  $^{\circ}\text{C}$  温育 30 min, 除去培养基, 用 PSS 冲洗细胞 2 次, 用 5 mL 0.125% 胰蛋白酶消化, 使细胞脱离培养瓶底, 用含 15% FBS 的 RPMI1640 中和胰酶后离心, 加入 3 mL 含 1 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  的磷酸盐缓冲溶液[各种物质的浓度(mmol/L)为: NaCl 127, KCl 5.9,  $\text{MgCl}_2$  1.2,  $\text{CaCl}_2$  1, glucose 14, Hepes 10.6, pH 为 7.2]。37  $^{\circ}\text{C}$  双波长荧光分光光度计(RF-501 岛津)测定荧光强度, 激发波长 340 和 380 nm, 发射波长 510 nm; 记录静息状态下荧光强度后, 加入不同刺激物, 分别采用 0.1% Trixon 和 10 mmol/L EDTA 作最大值和最小值校正。按公式计算细胞内游离钙离子浓度 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ <sup>[4]</sup>。PDGF 浓度为 0.1、1、10 和 100  $\mu\text{g/L}$ , 内皮素 1 浓度为  $10^{-10}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-7}$  和  $10^{-6}$  mol/L。SF 浓度为  $10^{-3}$  mol/L, 预先 1 h 在细胞悬液里加入 SF, 然后进行测定。

## 1.5 统计学处理

数据用均数  $\pm$  标准差表示。组间差异用多个样本均数比较的 one-way ANOVA 方差分析。  $P < 0.05$  为差异有显著性。

# 2 结果

## 2.1 血小板源生长因子和内皮素 1 对平滑肌细胞迁移的影响

在基础状态下血管平滑肌细胞很少迁移, PDGF-BB 和内皮素 1 均可明显诱导 VSMC 迁移, 并呈量效关系, 作用的峰值浓度分别为 10  $\mu\text{g/L}$  和  $10^{-7}$  mol/L(图 1, Figure 1)。

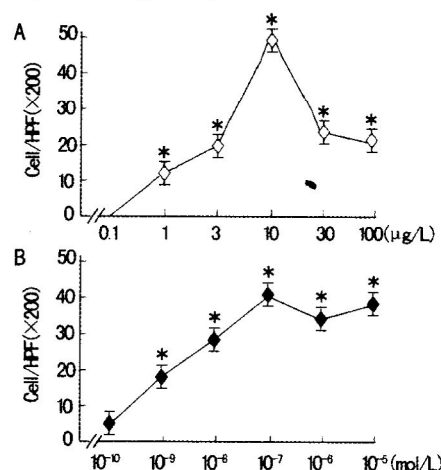


图 1. 血小板源生长因子(A)和内皮素 1(B)对血管平滑肌细胞迁移的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ ) \* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.01$ , 与空白对照组比较。

Figure 1. PDGF BB(A) and ET-1 (B) induced the migration of VSMC

## 2.2 阿魏酸钠对平滑肌细胞迁移的影响

阿魏酸钠呈浓度依赖性抑制 PDGF-BB 和内皮素 1 诱导的细胞迁移。SF 浓度为  $10^{-3}$  mol/L 时, 对两种趋化物诱导的细胞迁移的抑制均达峰值作用, 抑制率分别为 85.04% 和 81.92% ( $P < 0.01$ ) (图 2, Figure 2)。

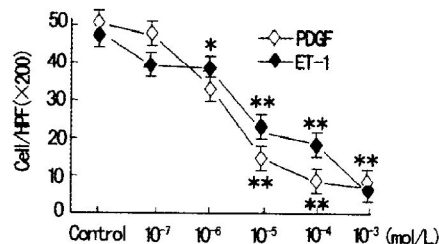


图 2. 阿魏酸钠对血小板源生长因子和内皮素 1 诱导的平滑肌细胞迁移的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ ) \* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.01$ , 与空白对照组比较。

Figure 2. The effect of SF on the migration of VSMC induced by the PDGF BB and ET-1

## 2.3 阿魏酸钠对细胞内游离钙离子浓度的影响

静息状态下  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  为  $153 \pm 20$  nmol/L, PDGF-BB (0.01~100  $\mu\text{g/L}$ ) 呈剂量依赖性诱发  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  升高, 从  $153 \pm 20$  nmol/L 到  $291 \pm 34$  nmol/L ( $P <$

0.01)。内皮素 1 诱发  $[Ca^{2+}]_i$  升高, 从  $133 \pm 17$  nmol/L 升高到  $256 \pm 28$  nmol/L ( $P < 0.01$ ), 这种作用也呈量效关系。 $10^{-3}$  mol/L SF 明显抑制 PDGF 和内皮素 1 诱导的  $[Ca^{2+}]_i$  升高, 抑制率分别为 80.14% 和 76.69% (表 1, Table 1)。

表 1. 阿魏酸钠对血小板源生长因子和内皮素 1 促发的平滑肌细胞内游离钙离子浓度的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1. Changes of  $[Ca^{2+}]_i$  in VSMC induced by PDGF BB, ET-1 and SF

分 组	n	细胞内游离钙浓度 (nmol/L)
对照组	14	153 $\pm$ 20
PDGF 组	14	291 $\pm$ 34 <sup>a</sup>
PDGF+ SF 组	14	188 $\pm$ 29 <sup>b</sup>
内皮素 1 组	14	256 $\pm$ 28 <sup>a</sup>
内皮素 1+ SF 组	14	184 $\pm$ 26 <sup>c</sup>

a:  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b:  $P < 0.01$ , 与 PDGF 组比较; c:  $P < 0.01$ , 与内皮素 1 组比较。

### 3 讨论

本研究结果表明, PDGF-BB 能显著促进 VSMC 的迁移。已知 PDGF 是通过磷脂酶 C 信号转导通路来启动细胞内游离钙的释放而起作用的。由于细胞内钙  $Ca^{2+}$  是多条信号转导途径的交汇点, 无论是何原因导致的  $[Ca^{2+}]_i$  增高, 只要它达到一定的浓度则必定引发其下游的信号转导过程, 随后  $Ca^{2+}$  与钙调蛋白结合形成复合物, 激活其靶酶, 继而引发一系列的细胞内信号连锁反应, 导致细胞发生一系列的病理生理变化。本研究结果显示, PDGF-BB 显著促进 VSMC  $[Ca^{2+}]_i$  的升高, 由此可见,  $[Ca^{2+}]_i$  升高是 VSMC 对 PDGF 反应的细胞内信号传递通路之一。谢良地等<sup>[6]</sup> 研究指出 PDGF 可显著促进 VSMC 的细胞外钙内流和内钙的释放, 其中前者起主要的作用。而且, PDGF-BB 促进  $[Ca^{2+}]_i$  升高可能需要细胞内某些蛋白的磷酸化<sup>[7]</sup>。

本研究结果显示, SF 可抑制 PDGF-BB 诱导的 VSMC 迁移和  $[Ca^{2+}]_i$  的升高, 从上述研究来看, SF 可能是通过磷脂酶 C 信号途径来抑制 PDGF-BB 诱导 VSMC 的迁移和  $[Ca^{2+}]_i$  的升高。内皮素是一种活跃的促有丝分裂物质, 它是 Yanagisawa 等于 1988 年从培养的猪主动脉的内皮细胞中分离、纯化的一种生物活性多肽, 内皮素尤其是内皮素 1, 是迄今为止所发现的作用最强、持续时间最久的一种缩血管物质<sup>[8]</sup>。在人体的 VSMC 培养中, 内皮素 1 ( $10^{-11} \sim 10^{-7}$  mol/L) 可浓度依赖性地诱发 VSMC 迁移和增

殖, 在大鼠的主动脉培养中也有该效应<sup>[9]</sup>, 本研究结果也证实了这一点。内皮素发挥血管活性作用的机制与  $Ca^{2+}$  学说密切相关, 它通过关闭电压依赖性  $Ca^{2+}$  通道引起 VSMC 收缩。内皮素有促进细胞内  $Ca^{2+}$  释放的作用<sup>[10]</sup>。内皮素是通过与其受体 (G 蛋白耦联受体) 结合而起作用的, 它通过与 PDGF 相同的 PLC 信号传递途径, 最终引起细胞内  $Ca^{2+}$  的释放。

本研究结果显示内皮素可激发 VSMC  $[Ca^{2+}]_i$  的增加, SF 可抑制内皮素 1 诱导的 VSMC 迁移和  $[Ca^{2+}]_i$  的升高。内皮素是通过 G 蛋白信号转导途径起作用的, SF 是内皮素受体拮抗剂, 而细胞的迁移必需有  $Ca^{2+}$  启动的肌动蛋白的参与, 因此, 我们推测 SF 可能是通过抑制 G 蛋白信号途径启动的  $[Ca^{2+}]_i$  的升高来抑制内皮素 1 诱导的细胞迁移。

总之, PDGF 和内皮素是两种不同的生物活性物质, 可以通过相同或不同的信号转导途径促进 VSMC 的迁移, 而 SF 对上述进程均呈现明显的抑制作用, 预示其可能抑制细胞迁移的共同的细胞内信号转导路径, 即细胞内  $Ca^{2+}$  信号转导途径, 抑制了细胞内游离钙离子的释放。我们可推测  $[Ca^{2+}]_i$  的变化可能是 SF 抑制 PDGF 和内皮素诱导的 VSMC 迁移的机制之一。

### [参考文献]

- [1] Charles EH, Lary WK, Selina V. PDGF- $\beta$  receptor block-ade inhibits intimal hyperplasia in the baboon. *Circulation*, 1999, **99**: 564-569
- [2] Doanes AM, Irani K, Goldschmidt-Clermont PJ, Finkel T. A requirement for rac1 in the PDGF-stimulated migration of fibroblast and vascular smooth muscle cells. *Biochem Mol Biol Int*, 1998, **45**: 279-287
- [3] 王峰, 刘敏, 杨连春. 阿魏酸: 新的非肽类内皮素拮抗剂. *中国临床药理学与治疗学杂志*, 1999, **4**: 85
- [4] Hughes AD, Schachter M. Multiple pathways for entry of calcium and other divalent cations in a vascular smooth muscle cell line (A7r5). *Cell Calcium*, 1994, **15**: 317-330
- [5] Naito M, Hayashi T, Kuzuya M, Funaki C, Asai K, Kuzuya F. Effects of fibrinogen and fibrin on the migration of vascular smooth muscle cells in vitro. *Atherosclerosis*, 1990, **83**: 9-14
- [6] 谢良地, 吴可贵, 陈达光, Hughes AD, Clunn Z, Lynn J. 血小板源生长因子诱导血管平滑肌细胞迁移及机制. *中国动脉硬化杂志*, 1998, **6**: 10-14
- [7] Wijetung S, Hughes AD. PP60-src increases voltage-operated calcium channel currents in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **217**: 1 039-044
- [8] Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 1988, **332**: 411
- [9] Rizvi MA, Katwa L, Spadone DP, Myers PR. The effects of endothelin 1 on collagen type iv and type  $\alpha$  synthesis in cultured porcine coronary artery vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol*, 1996, **28**: 243-252
- [10] Katusic ZX, Shepherd JT. Endothelin derived vasoactive factor:  $\alpha$  endothelin-unr dependent contraction. *Hypertension*, 1991, **18**: 11 186-192

(此文编辑 朱雯霞)