延胡索乙素改善PDGF-BB诱导的VSMCs氧化应激损伤的机制Δ

陈文明*，蹇明辉（遵义医科大学附属医院心血管内科，贵州 遵义 563000）

中图分类号 R965；R543 **文献标志码** A **文章编号** 1001-0408（2024）15-1855-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.15.10

摘 要 目的 研究延胡索乙素（Thp）对血小板衍生生长因子-BB（PDGF-BB）诱导的大鼠主动脉血管平滑肌细胞（VSMCs）氧化应激损伤的保护作用，并基于核因子红系2相关因子2（Nrf2）/血红素加氧酶1（HO-1）信号通路探究其可能机制。**方法** 在Thp抑制PDGF-BB诱导的VSMCs氧化应激损伤效应研究中，将VSMCs分为对照组、PDGF-BB组（25 ng/mL）及Thp低、中、高浓度组（5、10、20 mg/mL）。在Thp作用机制研究（沉默Nrf2）中，将VSMCs分为PDGF-BB+阴性对照siRNA（NC-siNrf2）组（25 ng/mL PDGF-BB+NC-siNrf2），PDGF-BB+Thp+NC-siNrf2组（25 ng/mL PDGF-BB+10 mg/mL Thp+NC-siNrf2），PDGF-BB+Nrf2小干扰RNA（siNrf2）组（25 ng/mL PDGF-BB+siNrf2），PDGF-BB+Thp+siNrf2组（25 ng/mL PDGF-BB+10.0 mg/mL Thp+siNrf2）。2个实验均检测VSMCs的增殖、迁移能力，活性氧（ROS）水平，超氧化物歧化酶（SOD）和过氧化氢酶（CAT）活性以及Nrf2和HO-1蛋白表达。**结果** 与对照组比较，PDGF-BB组VSMCs的增殖、迁移能力显著增强（$P<0.01$），ROS水平显著升高（$P<0.01$），SOD、CAT活性及Nrf2、HO-1蛋白的相对表达量均显著降低（$P<0.01$）；与PDGF-BB组比较，Thp不同浓度组VSMCs的增殖、迁移能力均显著下降（$P<0.01$），ROS水平均显著降低（$P<0.01$），SOD、CAT活性及Nrf2、HO-1蛋白的相对表达量均显著升高（$P<0.01$）。沉默Nrf2可显著逆转Thp对PDGF-BB诱导VSMCs氧化应激损伤的改善作用（$P<0.01$）。**结论** Thp可以通过激活Nrf2介导的抗氧化防御途径来降低VSMCs的氧化应激水平，从而抑制VSMCs的增殖、迁移。

关键词 延胡索乙素；血小板衍生生长因子-BB；血管平滑肌细胞；Nrf2/HO-1信号通路；氧化应激

Mechanism of tetrahydropalmatine inhibiting oxidative stress damage of VSMCs induced by PDGF-BB

CHEN Wenming, JIAN Minghui (Dept. of Cardiovascular Medicine, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Guizhou Zunyi 563000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE To study the protective effect of tetrahydropalmatine (Thp) on platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) induced oxidative stress injury in vascular smooth muscle cells (VSMCs) of rats, and to explore its possible mechanism based on the nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase (HO-1) signaling pathway. **METHODS** In the study about Thp inhibiting PDGF-BB-induced oxidative stress injury in VSMCs, VSMCs were divided into control group, PDGF-BB group (25 ng/mL), and Thp low-concentration, medium-concentration and high-concentration groups (5, 10, 20 mg/mL). In the Thp mechanism experiment (silencing Nrf2), VSMCs were divided into PDGF-BB+negative control of siRNA (NC-siNrf2) group (25 ng/mL PDGF-BB+NC-siNrf2), PDGF-BB+Thp+NC-siNrf2 group (25 ng/mL PDGF-BB+10 mg/mL Thp+NC-siNrf2), PDGF-BB+Nrf2 small interfering RNA (siNrf2) group (25 ng/mL PDGF-BB+siNrf2) and PDGF-BB+Thp+siNrf2 group (25 ng/mL PDGF-BB+10.0 mg/mL Thp+siNrf2). The proliferative and migratory capabilities of VSMCs, the level of reactive oxygen species (ROS), the activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) as well as the protein expressions of Nrf2 and HO-1 in VSMCs were all detected in two experiments. **RESULTS** Compared with the control group, the proliferative and migratory capabilities of VSMCs in the PDGF-BB group were significantly enhanced ($P<0.01$), and the level of ROS significantly increased ($P<0.01$), while the activities of SOD and CAT, and the relative expressions of Nrf2 and HO-1 protein significantly decreased ($P<0.01$). Compared with the PDGF-BB group, the proliferative and migratory capabilities of VSMCs in the Thp groups at different concentrations were significantly reduced ($P<0.01$), the levels of ROS were significantly reduced, while the activities of SOD and CAT, and relative expressions of Nrf2 and HO-1 were significantly enhanced ($P<0.01$). Silencing Nrf2 significantly reversed the improvement of Thp on the oxidative stress damage of VSMCs induced by PDGF-BB ($P<0.01$). **CONCLUSIONS** Thp can reduce the oxidative stress level of VSMCs by activating the Nrf2-mediated antioxidant defense pathway, thereby inhibiting the proliferation and migration of VSMCs.

KEYWORDS tetrahydropalmatine; platelet-derived growth factor-BB; vascular smooth muscle cells; Nrf2/HO-1 signaling pathway; oxidative stress

Δ**基金项目** 遵义市科技计划项目[No.遵市科合HZ字（2020）227号，No.遵市科合HZ字（2021）51号]

＊**第一作者** 高级实验师，硕士。研究方向：冠心病发病机制及药物干预。E-mail：254936118@qq.com

经皮冠状动脉介入治疗（percutaneous coronary intervention，PCI）是目前治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病最有效的手段之一，且效果显著；然而PCI术后血管再狭窄的发生，严重影响了患者的远期疗效[1－2]。在PCI术后血管再狭窄发生的过程中，血管平滑肌细胞（vascular smooth muscle cells，VSMCs）的过度增殖、迁移起着非常重要的作用[3]。如果能有效抑制VSMCs的过度增殖、迁移，那么PCI术后血管再狭窄的发生就有可能得到有效控制。

近年来，中草药因其更低的毒性、更少的副作用，受到广泛关注。延胡索是祖国传统中医的常用药材，具有行气止痛、活血化瘀的功效。延胡索乙素（tetrahydropalmatine，Thp）是从延胡索块茎中分离出来的一种生物碱类化合物。现代药理学研究表明，Thp具有抗炎、抗氧化、改善心血管功能等作用[4]。然而，现有的报道尚不明确Thp是否对VSMCs的过度增殖、迁移具有抑制作用。本课题组前期研究发现，Thp可通过抗氧化作用来保护心肌细胞免受高糖诱导的损伤[5]，故笔者推测Thp有可能通过抗氧化作用来抑制VSMCs的过度增殖、迁移。

核因子红系2相关因子2（nuclear factor-erythroid 2-related factor 2，Nrf2）/血红素加氧酶1（heme oxygenase-1，HO-1）信号通路具有调节细胞氧化-抗氧化的生物学活性，参与调节VSMCs增殖、迁移等过程，是调控血管再狭窄发生的重要环节[6－7]。但目前Nrf2/HO-1信号通路在Thp对VSMCs过度增殖、迁移中的作用尚不明确。因此，本研究通过观察Thp对血小板衍生生长因子-BB（platelet-derived growth factor-BB，PDGF-BB）诱导的VSMCs过度增殖、迁移的影响，并基于Nrf2/HO-1信号通路探究其可能的作用机制，为将Thp用于血管再狭窄的治疗提供理论依据。

1 材料

1.1 主要仪器

MULTISKAN型全波长酶标仪、3131型CO_2细胞培养箱、ST16型低速台式离心机均购自美国Thermo Fisher Scientific公司；全自动凝胶成像系统购自美国Bio-Rad公司；CKX-41型倒置荧光显微镜购自日本Olympus公司；Milli-Q型纯水系统购自美国Merck公司。

1.2 主要药品与试剂

Thp对照品（批号AF8111993，纯度≥98%）购自成都埃法生物科技有限公司；兔源Nrf2、HO-1和β-肌动蛋白（β-actin）单克隆抗体均购自美国R&D Systems公司；胎牛血清、胰蛋白酶和青-链霉素均购自美国HyClone公司；PDGF-BB购自美国Sigma公司；EdU细胞增殖检测试剂盒（批号U0831）购自广州锐博生物技术有限公司；活性氧（reactive oxygen species，ROS）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、过氧化氢酶（catalase，CAT）、CCK-8以及细胞核和细胞质蛋白质提取试剂盒（批号分别为051123230901、120822230525、07312323-1218、101623240117、010423230824）均购自上海碧云天生物技术股份有限公司；Nrf2小干扰RNA（siNrf2）和阴性对照siRNA（NC-siNrf2）均购自上海吉玛制药技术有限公司。

1.3 动物

本研究所用的动物为SPF级雄性SD大鼠，共10只，8周龄，体重180～200 g，购自遵义医科大学实验动物中心，动物生产许可证号为SCXK（黔）2021-0002。所有大鼠均饲养于12 h光照/12 h黑暗交替、温度19～23 ℃、相对湿度55%～65%的动物房内，饲养期间自由摄食和饮水。

2 方法

2.1 大鼠胸主动脉VSMCs的分离及培养

根据参考文献方法[8]，从成年雄性SD大鼠的胸主动脉中分离VSMCs。操作步骤如下：将麻醉的SD大鼠置于仰卧位，打开胸部，取下胸主动脉，并将其转移至含有DMEM/F12培养基（4 ℃）的培养皿中。去除胸主动脉周围的脂肪组织后，纵向切割动脉并将其放置在另一个含有DMEM/F12培养基的培养皿中，用弯曲眼科镊轻轻刮取内膜，清除内皮细胞。然后，将动脉剪成大小约1.0 mm^2的组织块，均匀铺在培养皿中，在细胞培养室中培养约30 min，使小组织块黏附到板上；加入含有20%胎牛血清的DMEM/F12培养基，并置于37 ℃、5%CO_2饱和湿度培养箱中培养。用显微镜观察VSMCs的生长状态，7 d左右可见长梭形VSMCs的密度达60%。待VSMCs的密度达到80%左右时，用0.25%胰酶消化传代培养，取第4～5代VSMCs进行后续实验。

2.2 细胞分组

根据实验目的，本研究分为2部分实验：（1）第1部分实验为Thp抑制PDGF-BB诱导的VSMCs氧化应激损伤作用的效应研究。在该部分实验中，将VSMCs分为5个组，分别为对照组、PDGF-BB组和Thp低、中、高浓度组，每组设置5个复孔。其中，对照组VSMCs不经过任何处理，正常培养；PDGF-BB组VSMCs以25 ng/mL PDGF-BB[9]处理48 h；Thp低、中、高浓度组VSMCs分别予以5、10、20 mg/mL Thp（浓度参考文献[10]并结合预实验结果确定）处理2 h后，加入25 ng/mL PDGF-BB共同孵育48 h。（2）第2部分实验为Thp抑制PDGF-BB诱导的VSMCs氧化应激损伤的机制研究。将VSMCs接种于6孔细胞培养板中，待VSMCs生长密度在50%～60%时，进行转染。采用Lipofectamine 2000转染技术转染细胞，转染24 h。确定转染成功后，将VSMCs分为4个组，分别为PDGF-BB+NC-siNrf2组（25 ng/mL PDGF-BB+NC-siNrf2），PDGF-BB+Thp+NC-siNrf2组（25

ng/mL PDGF-BB+10 mg/mL Thp+NC-siNrf2），PDGF-BB+siNrf2组（25 ng/mL PDGF-BB+siNrf2），PDGF-BB+Thp+siNrf2组（25 ng/mL PDGF-BB+10 mg/mL Thp+siNrf2），每组设5个复孔。Nrf2的siRNA序列为：5′-GGCAUUUCACUAAACACAATT-3′。

2.3 Thp抑制PDGF-BB诱导VSMCs氧化应激损伤的效应研究

2.3.1 VSMCs的增殖能力检测

（1）采用CCK-8法检测。将处于对数生长期的VSMCs以2.0×10^5个/mL的密度接种于96孔细胞培养板中，100 μL/孔。按“2.2（1）”项下方法分组、给药，并另设空白孔调零。培养48 h后，每孔加入CCK-8溶液100 μL，振荡混匀后，在37 ℃、5%CO_2培养箱中孵育4 h，使用酶标仪检测各孔在450 nm波长处的光密度（optical density，OD）值。

（2）采用EdU法检测。将处于对数生长期的VSMCs以2.0×10^5个/mL的密度接种于24孔细胞培养板中，400 μL/孔。按“2.2（1）”项下方法分组、给药。培养48 h后，更换含有EdU的培养基继续孵育2 h，然后按照EdU细胞增殖检测试剂盒说明书进行固定和染色。在显微镜下观察，随机选取5个视野进行拍照采样，然后计算EdU染色阳性细胞数量（EdU染色阳性细胞为红色）。

2.3.2 VSMCs的迁移能力检测

采用Transwell实验检测。取处于对数生长期的VSMCs，制备细胞密度为2.0×10^5个/mL的细胞悬液。取100 μL细胞悬液加入Transwell小室的上室，下室加入含15%胎牛血清的DMEM培养基500 μL，按“2.2（1）”项下方法分组、给药。培养48 h后，取出上室，用磷酸盐缓冲液（PBS）清洗3次，多聚甲醛固定20 min，风干后用0.1%结晶紫染色30 min。在显微镜下随机选取5个视野拍照并计数穿膜细胞数。

2.3.3 细胞中ROS水平检测

将处于对数生长期的VSMCs细胞以2.0×10^5个/mL的密度接种于24孔细胞培养板中，400 μL/孔。按“2.2（1）”项下方法分组、给药。培养48 h后，收集细胞，按照ROS试剂盒说明书步骤操作，加入10 μmol/L DCFH-DA荧光探针避光孵育30 min，用PBS洗涤3次，上流式细胞仪检测（激发波长488 nm、发射波长525 nm），以相对平均荧光强度表示细胞中ROS水平。

2.3.4 细胞中SOD、CAT活性检测

将处于对数生长期的VSMCs以2.0×10^5个/mL的密度接种于24孔细胞培养板中，400 μL/孔。按“2.2（1）”项下方法分组、给药。培养48 h后，收集细胞，按照SOD、CAT试剂盒说明书方法操作，测定细胞中SOD、CAT活性。

2.3.5 细胞中Nrf2和HO-1蛋白表达检测

采用Western blot法检测。将处于对数生长期的VSMCs以2.0×10^5个/mL的密度接种于6孔细胞培养板中，2.0 mL/孔。按“2.2（1）”项下方法分组、给药。培养48 h后，收集细胞，用含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液处理细胞，提取细胞中总蛋白，采用BCA法检测总蛋白浓度。将蛋白变性处理后，通过10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质，用湿转法（电流为220 mA）将分离的蛋白质转移至聚偏二氟乙烯膜上，在室温条件下用5%脱脂奶粉封闭1.5 h；加入Nrf2、HO-1和β-actin一抗（稀释比例分别为1∶200、1∶200、1∶1 000），4 ℃孵育过夜；洗膜后，加入二抗（稀释比例为1∶2 000），在室温条件下孵育1 h；加入化学发光剂，采用全自动凝胶成像系统进行拍照，利用Gel-Pro Analyzer软件分析蛋白条带的灰度值。目的蛋白的相对表达量＝目的蛋白的条带灰度值/内参蛋白（β-actin）的条带灰度值。

2.4 Thp抑制PDGF-BB诱导VSMCs氧化应激损伤的机制研究

将处于对数生长期的VSMCs以2.0×10^5个/mL的密度接种于6孔细胞培养板中，2.0 mL/孔。待细胞生长密度为50%～60%时，进行转染。按“2.2（2）”项下方法分组、给药，收集各组细胞。按照“2.3”项下方法分别检测VSMCs的增殖、迁移能力，氧化应激水平，以及Nrf2、HO-1蛋白表达情况。

2.5 统计学方法

采用GraphPad Prism 6.0软件对数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料以$\bar{x}\pm s$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-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 效应研究实验结果

3.1.1 Thp对PDGF-BB诱导的VSMCs增殖的影响

与对照组比较，PDGF-BB组VSMCs的OD值显著升高（$P<0.01$），EdU染色阳性细胞数量显著增加（$P<0.01$）；与PDGF-BB组比较，Thp低、中、高浓度组VSMCs的OD值均显著降低（$P<0.01$），EdU染色阳性细胞数量均显著减少（$P<0.01$），且具有浓度依赖性趋势。结果见图1、表1。

3.1.2 Thp对PDGF-BB诱导的VSMCs迁移的影响

与对照组[穿膜细胞数为（48.69±0.08）个，$n=5$]比较，PDGF-BB组的穿膜细胞数[（189.64±0.07）个，$n=5$]显著增加（$P<0.01$）；与PDGF-BB组比较，Thp低、中、高浓度组的穿膜细胞数[分别为（142.33±0.05）、（111.24±0.09）、（81.31±0.08）个，$n=5$]均显著减少（$P<0.01$），且具有浓度依赖性趋势。结果见图2。

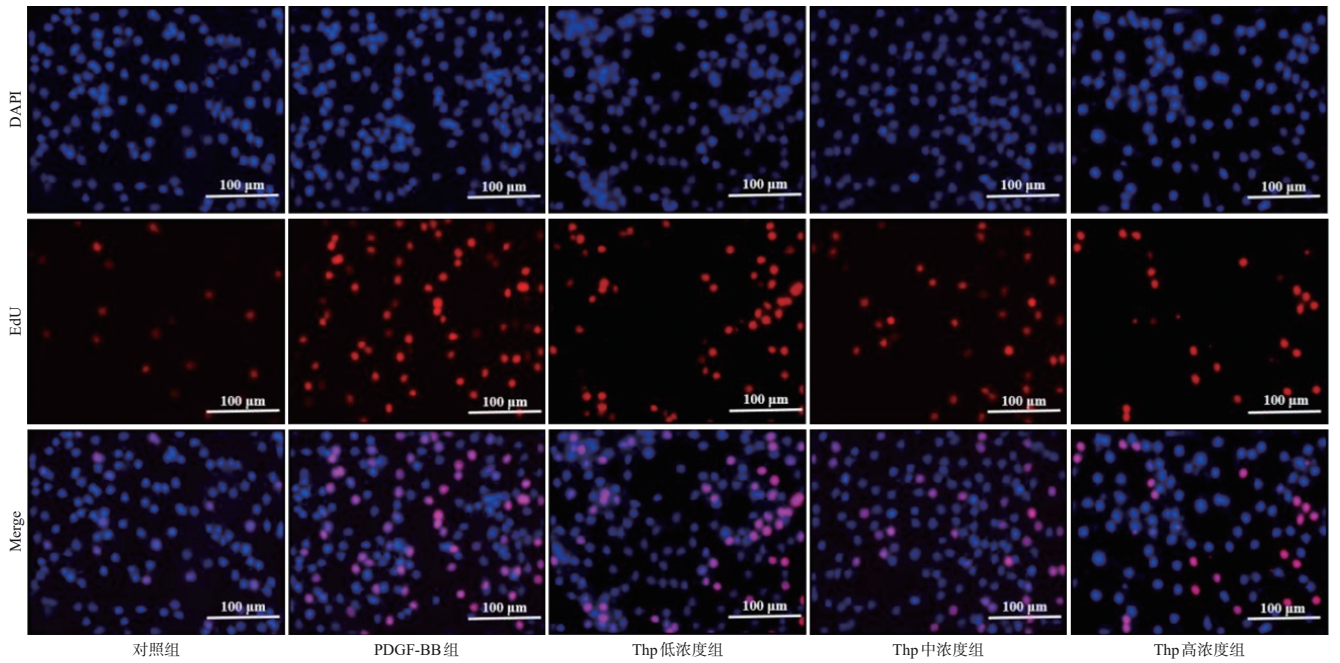


图1　各组细胞的EdU染色结果

表1　各组细胞的OD值、EdU染色阳性细胞数量测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	OD值	EdU染色阳性细胞数量/个
对照组	0.70±0.09	21.22±0.08
PDGF-BB组	1.11±0.10[a]	153.43±0.07[a]
Thp低浓度组	0.90±0.07[b]	117.30±0.05[b]
Thp中浓度组	0.82±0.08[b]	92.51±0.09[b]
Thp高浓度组	0.74±0.07[b]	52.44±0.08[b]

a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与PDGF-BB组比较，$P<0.01$。

3.1.3　Thp对PDGF-BB诱导的VSMCs氧化应激水平的影响

与对照组比较，PDGF-BB组VSMCs中ROS水平显著升高（$P<0.01$），SOD、CAT活性均显著降低（$P<0.01$）；与PDGF-BB组比较，Thp不同浓度组VSMCs中ROS水平均显著降低（$P<0.01$），SOD和CAT活性均显著升高（$P<0.01$），且具有浓度依赖性趋势。结果见表2。

3.1.4　Thp对PDGF-BB诱导的VSMCs中Nrf2、HO-1蛋白表达的影响

与对照组比较，PDGF-BB组VSMCs中Nrf2、HO-1蛋白的相对表达量均显著降低（$P<0.01$）；与PDGF-BB组比较，Thp不同浓度组VSMCs中Nrf2、HO-1蛋白的相对表达量均显著升高（$P<0.01$），且具有浓度依赖性趋势。结果见图3、表3。

3.2　机制研究实验结果

3.2.1　沉默Nrf2后Thp对PDGF-BB诱导的VSMCs增殖、迁移的影响

与PDGF-BB+NC-siNrf2组比较，PDGF-BB+siNrf2组、PDGF-BB+Thp+siNrf2组VSMCs的OD值均显著升高（$P<0.01$），EdU染色阳性细胞数量、穿膜细胞数均显著增加（$P<0.01$）；与PDGF-BB+Thp+NC-siNrf2组比较，PDGF-BB+siNrf2组、PDGF-BB+Thp+siNrf2组VSMCs的OD值均显著升高（$P<0.01$），EdU染色阳性细胞数量、穿膜细胞数均显著增加（$P<0.01$）。结果见图4、图5和表4。

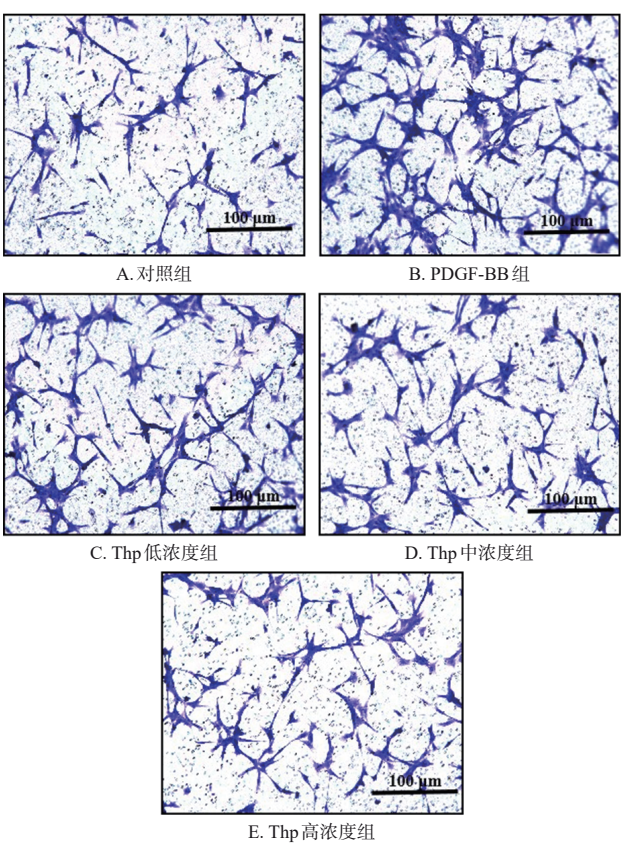
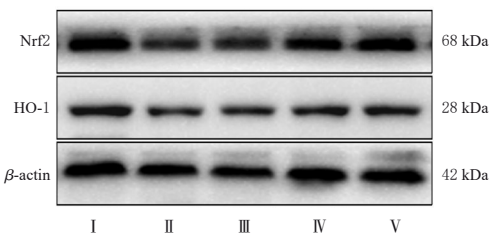


图2　各组细胞的迁移能力检测结果

表2　各组细胞中ROS水平和SOD、CAT活性检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	ROS	SOD/(U/mg)	CAT/(U/mg)
对照组	1.01±0.08	6 523.23±389.42	106.28±5.89
PDGF-BB组	3.11±0.07[a]	2 849.31±301.77[a]	49.22±5.14[a]
Thp低浓度组	2.25±0.05[b]	3 351.94±335.55[b]	61.27±5.69[b]
Thp中浓度组	1.78±0.09[b]	4 231.75±348.42[b]	73.66±6.17[b]
Thp高浓度组	1.34±0.08[b]	5 425.59±394.37[b]	88.41±5.88[b]

a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与PDGF-BB组比较，$P<0.01$。



Ⅰ：对照组；Ⅱ：PDGF-BB组；Ⅲ：Thp低浓度组；Ⅳ：Thp中浓度组；Ⅴ：Thp高浓度组。

图3　各组细胞中Nrf2、HO-1蛋白表达的电泳图

表3　各组细胞中Nrf2、HO-1蛋白的相对表达量测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	Nrf2/β-actin	HO-1/β-actin
对照组	1.02±0.08	0.79±0.08
PDGF-BB组	0.59±0.07[a]	0.31±0.07[a]
Thp低浓度组	0.71±0.05[b]	0.43±0.05[b]
Thp中浓度组	0.89±0.09[b]	0.59±0.09[b]
Thp高浓度组	0.98±0.08[b]	0.68±0.08[b]

a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与PDGF-BB组比较，$P<0.01$。

3.2.2　沉默Nrf2后Thp对PDGF-BB诱导的VSMCs氧化应激的影响

与PDGF-BB+NC-siNrf2组比较，PDGF-BB+siNrf2组、PDGF-BB+Thp+siNrf2组VSMCs中ROS水平显著升高（$P<0.01$），SOD、CAT活性均显著降低（$P<0.01$）；与PDGF-BB+Thp+NC-siNrf2组比较，PDGF-BB+siNrf2组、PDGF-BB+Thp+siNrf2组VSMCs中ROS水平显著升高（$P<0.01$），SOD、CAT活性均显著降低（$P<0.01$）。结果见表5。

3.2.3　沉默siNrf2后Thp对PDGF-BB诱导的VSMCs中Nrf2、HO-1蛋白表达的影响

与PDGF-BB+NC-siNrf2组比较，PDGF-BB+siNrf2组、PDGF-BB+Thp+siNrf2组VSMCs中Nrf2、HO-1蛋白的相对表达量均显著降低（$P<0.01$）；与PDGF-BB+Thp+NC-siNrf2组比较，PDGF-BB+siNrf2组、PDGF-BB+Thp+siNrf2组VSMCs中Nrf2、HO-1蛋白的相对表达量均显著降低（$P<0.01$）。结果见图6、表6。

4　讨论

PCI术后血管再狭窄的发生是局部血管损伤后的一种修复反应过程，其作用机制主要包括血管弹性回缩、血管重塑、血栓形成、血小板沉积以及VSMCs过度增殖、迁移等，其中VSMCs过度增殖和迁移在血管再狭窄发生的过程中占据主导地位[11]。本研究使用PDGF-BB处理VSMCs，观察VSMCs的增殖、迁移情况，结果发现，经PDGF-BB处理的VSMCs的增殖、迁移能力显著

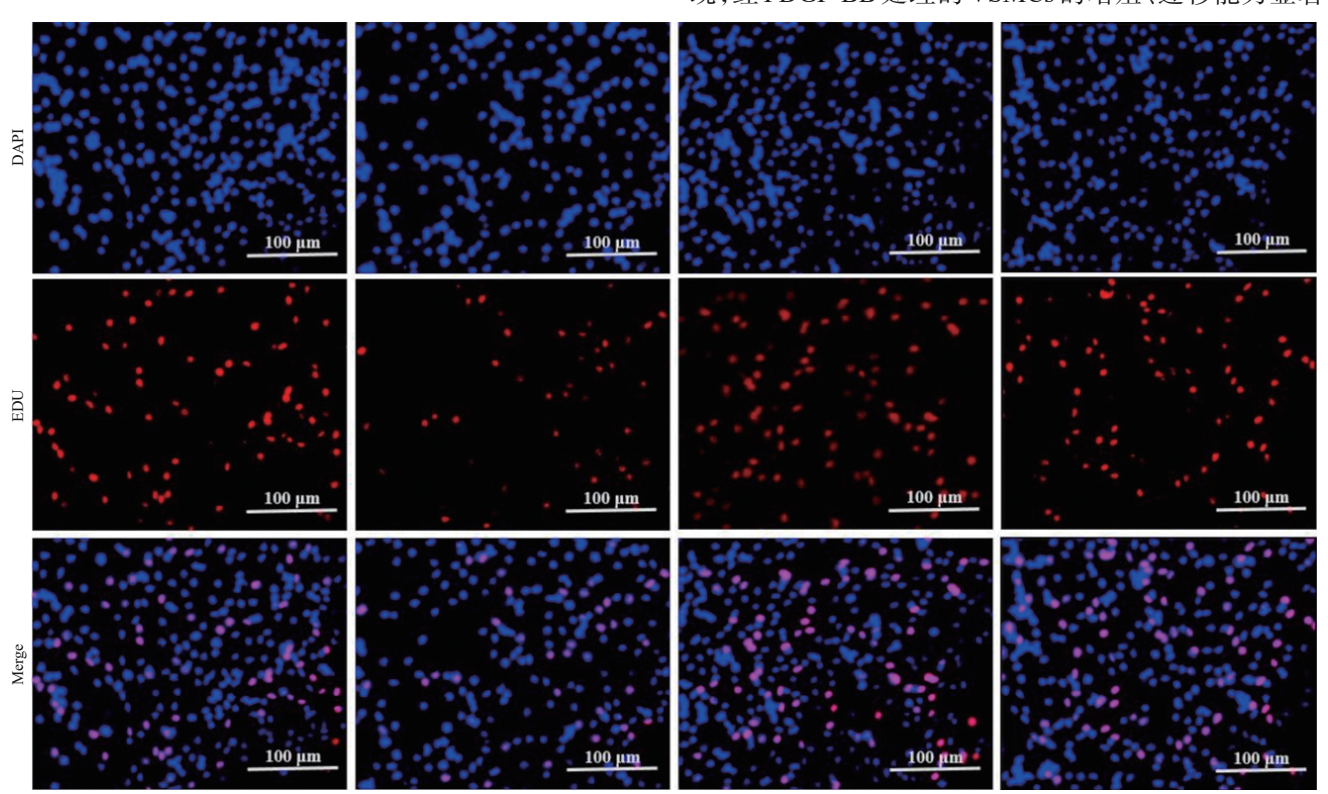
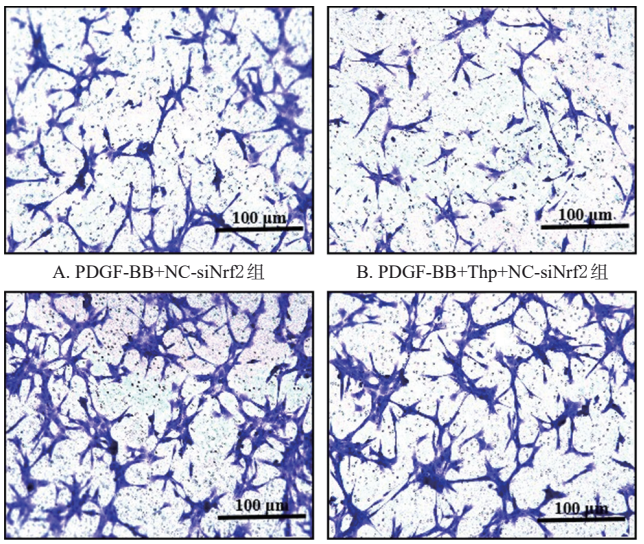


图4　沉默Nrf2后各组细胞的EdU染色结果



A. PDGF-BB+NC-siNrf2组　B. PDGF-BB+Thp+NC-siNrf2组

C. PDGF-BB+siNrf2组　D. PDGF-BB+Thp+siNrf2组

图5　沉默Nrf2后各组细胞的迁移能力检测结果

表4　沉默Nrf2后各组细胞的OD值、EdU染色和迁移情况测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

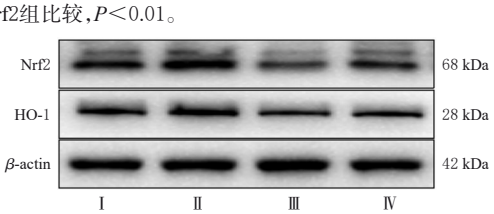
组别	OD值	EdU染色阳性细胞数量/个	穿膜细胞数/个
PDGF-BB+NC-siNrf2组	1.06±0.07	106.4±11.4	180.3±15.4
PDGF-BB+Thp+NC-siNrf2组	0.74±0.08	65.3±9.2	102.5±13.4
PDGF-BB+siNrf2组	1.35±0.09[ab]	141.2±14.3[ab]	254.2±19.9[ab]
PDGF-BB+Thp+siNrf2组	1.32±0.08[ab]	136.4±12.7[ab]	244.3±21.7[ab]

a：与PDGF-BB+NC-siNrf2组比较，$P<0.01$；b：与PDGF-BB+Thp+NC-siNrf2组比较，$P<0.01$。

表5　沉默Nrf2后各组细胞中ROS水平和SOD、CAT活性检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	ROS	SOD/(U/mg)	CAT/(U/mg)
PDGF-BB+NC-siNrf2组	3.25±0.24	2 978.5±221.1	50.1±4.3
PDGF-BB+Thp+NC-siNrf2组	1.74±0.13	4 232.4±318.8	77.3±5.2
PDGF-BB+siNrf2组	4.28±0.39[ab]	2 147.5±227.7[ab]	34.2±3.8[ab]
PDGF-BB+Thp+siNrf2组	4.42±0.28[ab]	2 295.9±217.4[ab]	36.5±4.4[ab]

a：与PDGF-BB+NC-siNrf2组比较，$P<0.01$；b：与PDGF-BB+Thp+NC-siNrf2组比较，$P<0.01$。



Ⅰ：PDGF-BB+NC-siNrf2组；Ⅱ：PDGF-BB+Thp+NC-siNrf2组；Ⅲ：PDGF-BB+siNrf2组；Ⅳ：PDGF-BB+Thp+siNrf2组。

图6　沉默siNrf2后各组细胞中Nrf2、HO-1蛋白表达的电泳图

表6　沉默siNrf2后各组细胞中Nrf2、HO-1蛋白的相对表达量测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	Nrf2/β-actin	HO-1/β-actin
PDGF-BB+NC-siNrf2组	0.57±0.04	0.49±0.05
PDGF-BB+Thp+NC-siNrf2组	0.92±0.05	0.72±0.06
PDGF-BB+siNrf2组	0.24±0.03[ab]	0.34±0.04[ab]
PDGF-BB+Thp+siNrf2组	0.29±0.03[ab]	0.37±0.05[ab]

a：与PDGF-BB+NC-siNrf2组比较，$P<0.01$；b：与PDGF-BB+Thp+NC-siNrf2组比较，$P<0.01$。

增强，与文献报道一致[12]。给予Thp干预后，上述情况发生了逆转。这提示Thp能抑制PDGF-BB诱导的VSMCs的增殖、迁移。

氧化应激是指机体或细胞内氧自由基的产生与清除失衡，导致ROS在体内或细胞内蓄积而引起的氧化损伤过程。SOD、CAT等各种抗氧化酶从不同角度协助清除体内的ROS，在抗氧化过程中起着非常重要的作用。ROS积累引起的氧化应激增强可进一步促进VSMCs的增殖、迁移[13]。本研究发现，PDGF-BB可升高VSMCs中ROS水平，降低SOD、CAT活性；然而，用Thp预处理VSMCs后，可显著减轻PDGF-BB引起的氧化应激损伤，主要表现在VSMCs中ROS水平降低，SOD、CAT活性增强。这提示Thp抑制VSMCs增殖、迁移的作用可能与抗氧化应激有关。

VSMCs的氧化应激受到多种途径的调节，其中Nrf2驱动的抗氧化防御途径尤为重要[14]。Nrf2参与氧化应激诱导VSMCs的增殖、迁移，一旦受到氧化应激的刺激，Nrf2就会进入细胞核并激活HO-1，从而缓解氧化应激[15]。研究表明，中药有效成分酸浆苦素可促进Nrf2活化，且被活化的Nrf2通过介导抗氧化防御途径来降低VSMCs的氧化应激水平，从而抑制VSMCs的增殖、迁移[12]。本研究发现，PDGF-BB处理后下调了VSMCs中Nrf2蛋白的表达，而给予Thp干预后，Nrf2蛋白的表达上调。这提示Thp抑制VSMCs增殖、迁移的作用与活化Nrf2有关。

Nrf2活化后，进入细胞核与抗氧化反应元件结合，引起抗氧化基因的转录。其中，*HO-1*基因的产物具有较强的抗氧化作用[15]。研究表明，HO-1在VSMCs增殖、迁移中发挥重要作用，酸浆苦素通过促进HO-1表达，进而抑制PDGF-BB诱导的VSMCs的增殖、迁移[12]。本研究发现，Thp显著上调了HO-1的蛋白表达，提示Thp抑制PDGF-BB诱导VSMCs增殖、迁移的作用可能与上调HO-1蛋白表达相关。为了进一步证实Thp是否通过激活Nrf2/HO-1信号通路而发挥作用，本研究设计了Nrf2沉默实验。结果显示，沉默Nrf2逆转了Thp对PDGF-BB诱导VSMCs氧化应激损伤的改善作用，进一步证实了Thp是通过激活Nrf2/HO-1信号通路发挥作用的。

综上所述，Thp可以通过激活Nrf2/HO-1信号通路介导的抗氧化防御途径来降低VSMCs的氧化应激水平，从而抑制VSMCs的增殖、迁移。本研究表明，Thp可能是一种比较有前景的血管再狭窄治疗药物。然而，Thp是否可作用于其他通路直接或间接参与调控VSMCs的增殖、迁移，还有待进一步证实。

参考文献

[1] REMPAKOS A，KOSTANTINIS S，SIMSEK B，et al. Update on chronic total occlusion percutaneous coronary in-

tervention[J]. J Invasive Cardiol,2023,35(4):E194-E204.
[2] TAO S Y,TANG X W,YU L T,et al. Prognosis of coronary heart disease after percutaneous coronary intervention:a bibliometric analysis over the period 2004-2022[J]. Eur J Med Res,2023,28(1):311.
[3] PELLICCIA F,ZIMARINO M,NICCOLI G,et al. In-stent restenosis after percutaneous coronary intervention:emerging knowledge on biological pathways[J]. Eur Heart J Open,2023,3(5):oead083.
[4] DU Q Y,MENG X L,WANG S H. A comprehensive review on the chemical properties,plant sources,pharmacological activities,pharmacokinetic and toxicological characteristics of tetrahydropalmatine[J]. Front Pharmacol,2022,13:890078.
[5] 蹇明辉,陈文明,张怡. 延胡索乙素对高糖诱导H9c2细胞凋亡和氧化应激的抑制作用[J]. 遵义医科大学学报,2022,45(3):317-321.
JIAN M H,CHEN W M,ZHANG Y. Inhibitory effect of tetrahydropalmatine on apoptosis and oxidative stress of H9c2 cells induced by high glucose[J]. J Zunyi Med Univ,2022,45(3):317-321.
[6] MCCORD J M,GAO B F,HYBERTSON B M. The complex genetic and epigenetic regulation of the Nrf2 pathways:a review[J]. Antioxidants (Basel),2023,12(2):366.
[7] SI J Y,MENG R R,GAO P,et al. Linagliptin protects rat carotid artery from balloon injury and activates the Nrf2 antioxidant pathway[J]. Exp Anim,2019,68(1):81-90.
[8] 仇治梅,陈文明,王艳,等. 人参皂苷Rg_3对大鼠血管平滑肌细胞凋亡及凋亡相关基因表达的影响[J]. 遵义医科大学学报,2020,43(4):419-424.
QIU Z M,CHEN W M,WANG Y,et al. Effect of ginsenoside Rg_3 on apoptosis and expression of apoptosis related genes of vascular smooth muscle cells in rats[J]. J Zunyi Med Univ,2020,43(4):419-424.
[9] 李岩,安芸,张赫彬,等. 华良姜素对PDGF-BB诱导血管平滑肌细胞增殖和迁移的影响[J]. 中国动脉硬化杂志,2023,31(10):865-871.
LI Y,AN Y,ZHANG H B,et al. Effects of jaranol on proliferation and migration of vascular smooth muscle cells induced by PDGF-BB[J]. Chin J Arterioscler,2023,31(10):865-871.
[10] YIN X Z,LI W B,ZHANG J X,et al. AMPK-mediated metabolic switching is high effective for phytochemical levo-tetrahydropalmatine (l-THP) to reduce hepatocellular carcinoma tumor growth[J]. Metabolites,2021,11(12):811.
[11] TANG H Y,CHEN A Q,ZHANG H,et al. Vascular smooth muscle cells phenotypic switching in cardiovascular diseases[J]. Cells,2022,11(24):4060.
[12] QIU L Q,HU L L,LIU X X,et al. Physalin B inhibits PDGF-BB-induced VSMC proliferation,migration and phenotypic transformation by activating the Nrf2 pathway[J]. Food Funct,2021,12(21):10950-10966.
[13] KIM N,HWANGBO C,LEE S,et al. Eupatolide inhibits PDGF-induced proliferation and migration of aortic smooth muscle cells through ROS-dependent heme oxygenase-1 induction[J]. Phytother Res,2013,27(11):1700-1707.
[14] ZHANG J,CAI W Y,FAN Z X,et al. MicroRNA-24 inhibits the oxidative stress induced by vascular injury by activating the Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. Atherosclerosis,2019,290:9-18.
[15] ZHANG C C,KONG X H,MA D L.MiR-141-3p inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and migration via regulating Keap1/Nrf2/HO-1 pathway[J]. IUBMB Life,2020,72(10):2167-2179.

(收稿日期:2024-03-21 修回日期:2024-06-05)
(编辑:林 静)