

## 研究论文

# Roc-A通过调节自噬和活性氧积累抑制血管平滑肌细胞增殖迁移

朱虹颖<sup>1</sup> 段晓清<sup>2</sup> 王建波<sup>1\*</sup><sup>1</sup>上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306; <sup>2</sup>上海交通大学附属第六人民医院放射介入科, 上海 200233)

**摘要** 该研究探讨了在PDGF-BB诱导下, Roc-A对血管平滑肌细胞(VSMCs)增殖和迁移的抑制作用及调控机制。用25 ng/mL PDGF-BB刺激大鼠A7r5细胞建立细胞损伤模型, 再将细胞分为对照组(NC)、PDGF-BB模型组、PDGF-BB+10 nmol/L Roc-A组、PDGF-BB+25 nmol/L Roc-A组和PDGF-BB+50 nmol/L Roc-A组。通过CCK8和Transwell分别检测细胞活力和增殖迁移能力; 流式细胞术检测细胞内EdU掺入情况和细胞周期水平; DCFH-DA荧光探针检测活性氧积累水平; Western blot检测PCNA、LC3B、P62蛋白表达水平。结果显示, PDGF-BB处理使细胞活力显著增加, 并促进了细胞增殖和迁移。Roc-A处理下调了PDGF-BB诱导的细胞活性和PCNA表达, 抑制了细胞增殖和迁移; Roc-A使细胞周期受阻, S期细胞比例呈剂量依赖性的减少。同时, Roc-A逆转了PDGF-BB诱导的活性氧积累和LC3B II、P62自噬相关蛋白表达。5 mmol/L 3-MA与25 nmol/L Roc-A处理均抑制了平滑肌细胞增殖迁移。这说明Roc-A抑制PDGF-BB诱导的大鼠VSMCs增殖和迁移, 其可能是通过下调PDGF-BB诱导的自噬和氧化应激发挥作用的, 提示了其对内皮增生引起的再狭窄具有治疗作用。

**关键词** Roc-A; 血管平滑肌细胞; 自噬; 活性氧; 再狭窄

## Roc-A Inhibits Proliferation and Migration of Vascular Smooth Muscle Cells by Regulating Autophagy and Reactive Oxygen Species Accumulation

ZHU Hongying<sup>1</sup>, DUAN Xiaoqing<sup>2</sup>, WANG Jianbo<sup>1\*</sup><sup>1</sup>College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; <sup>2</sup>Department of Interventional Radiology, Affiliated Sixth People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China)

**Abstract** This study investigated the inhibitory effect of Roc-A on the proliferation and migration of VSMCs (vascular smooth muscle cells) induced by PDGF-BB and the regulatory mechanism. The rat A7r5 cells were stimulated with 25 ng/mL PDGF-BB to establish a cell injury model. The cells were divided into five groups: control group (NC), PDGF-BB model group, PDGF-BB+10 nmol/L Roc-A group, PDGF-BB+25 nmol/L Roc-A group and PDGF-BB+50 nmol/L Roc-A group. The cell viability and proliferation migration ability separately were measured by CCK8 and Transwell; intracellular EdU admixture and cell cycle level were measured by flow cytometry; reactive oxygen species accumulation was measured by DCFH-DA fluorescent probe; PCNA, LC3B and

收稿日期: 2023-03-30

接受日期: 2023-05-04

上海市第六人民医院院级临床研究重点专项(批准号: DYZD201801)和国家自然科学基金(批准号: 82274252)资助的课题

\*通信作者。Tel: 13162891902, E-mail: jeanbob\_wang@163.com

Received: March 30, 2023

Accepted: May 4, 2023

This work was supported by the Shanghai Sixth People's Hospital Hospital-Level Clinical Research Key Special Project (Grant No.DYZD201801), and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82274252)

\*Corresponding author. Tel: +86-13162891902, E-mail: jeanbob\_wang@163.com

P62 protein expression levels were measured by Western blot. The results showed that PDGF-BB treatment led to a significant increase in cell viability and promoted cell proliferation and migration. Roc-A treatment down-regulated PDGF-BB-induced cell activity and PCNA expression, and inhibited cell proliferation and migration. The cell cycle was blocked by Roc-A and the proportion of S-phase cells was reduced in a dose-dependent manner. Meanwhile, Roc-A reversed PDGF-BB-induced reactive oxygen species accumulation and the expression of LC3B II and P62 autophagy-related proteins. Both 5 mmol/L 3-MA and 25 nmol/L Roc-A treatments inhibited smooth muscle cell proliferation and migration. This suggests that Roc-A inhibits PDGF-BB-induced proliferation and migration of VSMCs in rats. This inhibitory effect may be mediated by down-regulation of PDGF-BB-induced autophagy and oxidative stress. It implies a therapeutic effect of Roc-A on endothelial proliferation-induced restenosis.

**Keywords** Roc-A; vascular smooth muscle cells; autophagy; reactive oxygen species; restenosis

血管介入是治疗肢体严重缺血的一种有效手段。然而,机械损伤引起的血管内再狭窄是血管内介入治疗的主要副作用,尤其是对于糖尿病引起的下肢动脉疾病,由于其病变范围广泛、血管直径小,治疗效果不尽如人意<sup>[1-2]</sup>。血管内再狭窄主要由血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)过度增殖和迁移引起<sup>[3]</sup>。

机械损伤刺激 VSMCs 向分泌表型转换并释放大量细胞因子,如血小板衍生生长因子 BB(platelet derived growth factor-BB, PDGF-BB)<sup>[4-6]</sup>。PDGF-BB 诱导 VSMCs 增殖迁移能力增强,促进细胞外基质合成,导致新内膜增生<sup>[7]</sup>。PDGF-BB 与 PDGF 受体结合激活 PI3K/Akt、MAPK 等通路,参与 VSMCs 向内迁移的过程,刺激内膜增生<sup>[8]</sup>。因此抑制 VSMCs 增殖迁移有助于抑制血管内再狭窄的发生。

自噬是通过溶酶体降解一些细胞成分的过程,在 VSMCs 中可以被一些细胞因子(如 Ang-II、PDGF-BB)、脂质和活性氧(reactive oxygen species, ROS)激活,成为平滑肌细胞存活的重要机制<sup>[9]</sup>。在应激条件下,自噬激活调节细胞内 ROS 的产生,并通过 MAPK、PI3K/Akt 等信号通路诱导 VSMCs 异常增殖和迁移<sup>[10-11]</sup>。PDGF-BB 诱导的自噬调节 VSMCs 表型转换,从而促进 VSMCs 增殖<sup>[12]</sup>。

近年来,天然植物活性成分 Roc-A(Rocaglamides)作为新的药用化合物来源引起了相当多的关注。Roc-A 是四氢苯并咪唑的衍生物,用于治疗炎症性疾病。BAUMANN 等<sup>[13]</sup>的研究显示, Roc-A 通过抑制 NF- $\kappa$ B 活性来抑制循环 T 细胞中各种炎症细胞因子的表达。此外, Roc-A 抑制真核翻译起始因子 4A(eukaryotic translation initiation factor 4A, eIF4A)表达,使热休克因子 1 失活,从而抑制肿瘤细胞增殖<sup>[14]</sup>。然

而,目前关于 Roc-A 在 VSMCs 增殖和迁移方面的作用尚不清楚。因此,本研究探究了 Roc-A 对 VSMCs 增殖迁移的作用及其潜在机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞与试剂

大鼠胸主动脉平滑肌细胞 A7r5 购自中国科学院上海细胞库。

Roc-A(化学结构式为  $C_{29}H_{31}NO_7$ )和 3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)购自 MCE 公司。DMEM 高糖培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和 EDTA 胰酶购自 Gibco 公司。重组大鼠 PDGF-BB 购自 R&D 公司。CCK8 试剂盒购自 NCM 公司。Transwell 小室购自 Corning 公司。PCNA(货号为 ab29, 1:1 000)抗体购自 Abcam 公司。P62(货号为 A7758, 1:1 000)和 LC3B(货号为 A19665, 1:1 000)购自 Abclonal 公司。 $\alpha$ -tubulin(货号为 66031-1-Ig, 1:20 000)和 GAPDH(货号为 60004-1-Ig, 1:50 000)购自 Proteintech 公司。辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔及抗鼠 IgG 二抗购自上海碧云天生物技术有限公司。

### 1.2 细胞培养

将平滑肌细胞放置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中,使用含有 10% FBS 和 100 U/mL 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基培养平滑肌细胞。

### 1.3 细胞活性测定

将细胞等量( $1 \times 10^4$  个/孔)接种于 96 孔板中,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 24 h。当细胞生长到 70% 汇合度时,分别加入不同浓度(0、1、5、10、25、50、75 和 100 nmol/L)的 Roc-A,同时设置空白调零组和 PDGF-BB(25 ng/mL)阳性刺激组,处理 24 h 后,每孔加入 10  $\mu$ L CCK8 试剂,并于 37 °C、5% CO<sub>2</sub>

细胞培养箱中孵育1 h, 最后, 用酶标仪在450 nm波长处测量吸光度( $D$ )值。每个处理组设置3个复孔。

#### 1.4 EdU细胞增殖和细胞周期检测

将细胞等量( $1 \times 10^5$ 个/孔)接种于6孔板中, 10、25和50 nmol/L Roc-A处理24 h后, 加入EdU(终浓度为10  $\mu$ mol/L)于37  $^{\circ}$ C孵育2 h, 胰酶消化后, 室温下1 000  $\times$ g离心5 min, 弃上清液, 用4%多聚甲醛室温下固定细胞15 min, 用含0.3% Triton X-100的PBS使细胞通透15 min, 随后, 每个样品中加入500  $\mu$ L Click反应液(现配现用), 室温下避光孵育30 min。弃上层Click反应液, 用含3% BSA的PBS洗涤细胞, 26  $^{\circ}$ C、1 000  $\times$ g离心5 min, 弃上清液, 向离心后的每个样品中加入500  $\mu$ L碘化丙啶染色液, 于37  $^{\circ}$ C避光染色30 min。使用流式细胞仪根据所染荧光颜色, 选择合适激发波长检测细胞悬液样品(在650 nm激发波长处检测Azide 647荧光, 在488 nm激发波长处检测PI荧光)。

#### 1.5 Transwell细胞迁移实验

使用孔径为8.0  $\mu$ m, 适配24孔板的Transwell小室完成Transwell迁移实验。24孔板内加入600  $\mu$ L含有10% FBS的DMEM培养基, 将Transwell小室放入孔板内, 并向小室内中加入200  $\mu$ L含有25 ng/mL PDGF-BB和不同浓度Roc-A的细胞悬液( $5 \times 10^4$ 个/孔), 于37  $^{\circ}$ C恒温培养箱内培养24 h。随后, 将Transwell小室在4%多聚甲醛中室温固定20 min, 去除固定液后, 用结晶紫染液室温下染色15 min。PBS清洗晾干后, 于显微镜下, 随机选取3个视野, 观察并拍照。

#### 1.6 ROS检测

使用DCFH-DA荧光探针检测细胞内ROS生成量, DCFH-DA在细胞内可以被酯酶水解生成DCFH(无荧光), 细胞内的ROS氧化DCFH生成DCF(有荧光), 检测DCF的荧光强度即可知细胞内ROS的水平。将细胞( $5 \times 10^4$ 个/孔)接种于12孔板中, 使用25 ng/mL PDGF-BB和不同浓度Roc-A处理细胞24 h后, 加入DCFH-DA(终浓度为10  $\mu$ mol/L), 37  $^{\circ}$ C培养箱内孵育20 min, 随后用PBS洗涤3次, 使用荧光显微镜在488 nm激发波长下观察荧光的强弱。

#### 1.7 细胞划痕实验

通过细胞划痕实验检测VSMCs的迁移能力。在6孔板中接种VSMCs( $1 \times 10^5$ 个/孔), 培养至细胞汇合度达到100%, 使用200  $\mu$ L枪头进行划痕, 25 nmol/L Roc-A和5 mmol/L 3-MA分别处理细胞24 h后, 于倒置

显微镜下拍照。

#### 1.8 蛋白质免疫印迹实验(Western blot, WB)

使用RIPA缓冲液裂解细胞样品, 提取细胞总蛋白, 并使用BCA蛋白测定试剂盒检测蛋白浓度。通过SDS-PAGE电泳分离蛋白质, 100 V恒压下将其湿转到PVDF膜上。用5%的脱脂奶粉在室温下封闭1 h, 去除非特异性结合位点, 孵育PCNA(1:1 000)、P62(1:1 000)、LC3B(1:1 000)一抗在4  $^{\circ}$ C下过夜, 回收一抗, TBST洗膜3次后, 于室温摇床上孵育HRP偶联山羊抗兔或抗鼠IgG二抗(1:1 000) 1 h, 洗膜3次后, 将其置于凝胶成像仪中, 使用化学发光法进行曝光。

#### 1.9 数据处理

全部实验数据取自3次独立实验, 以均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )来表示。使用Graphpad Prism 7.0软件进行统计学分析, 采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)进行多组间比较,  $t$ 检验进行两组数据之间的比较。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

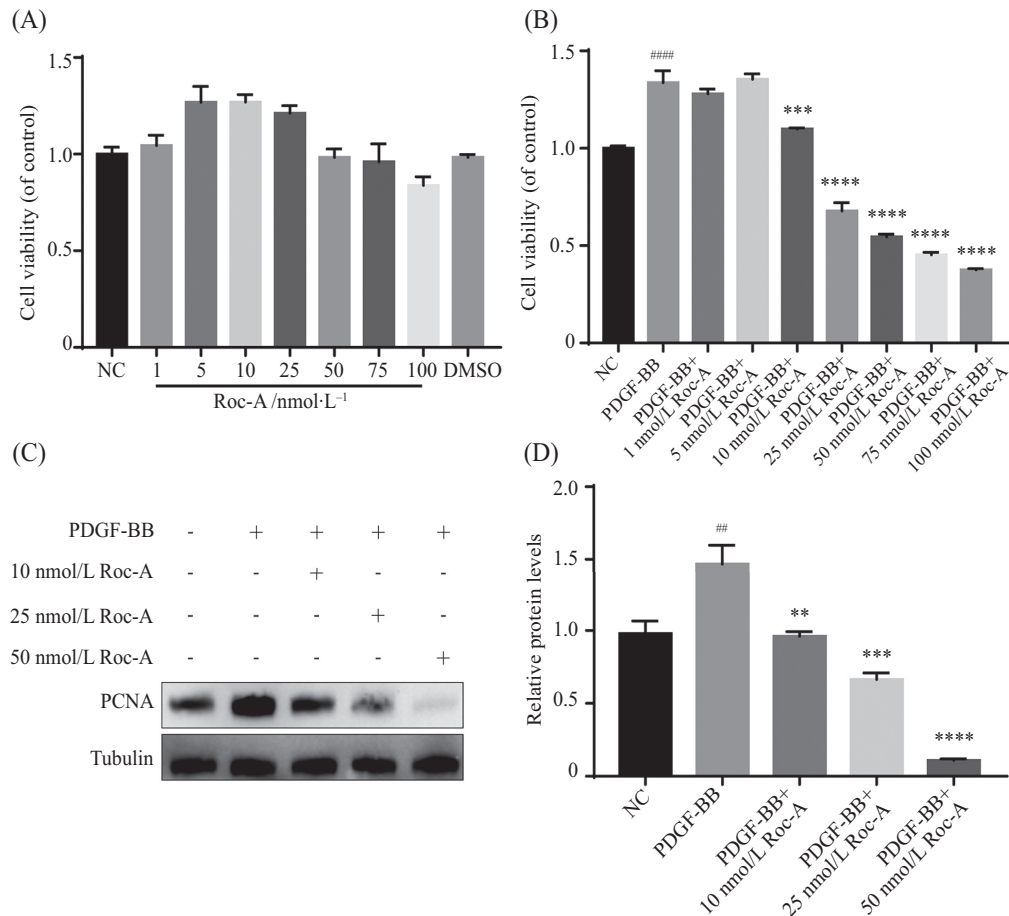
## 2 结果

### 2.1 Roc-A降低PDGF-BB诱导的VSMCs细胞活力

为确定Roc-A的合理作用范围, 用1、5、10、25、50、75和100 nmol/L的Roc-A分别处理VSMCs 24 h。100 nmol/L浓度以内的Roc-A对VSMCs无明显杀伤作用, 但在5、10和25 nmol/L Roc-A作用下细胞活力增加(图1A), 这可能是因为低浓度的Roc-A对细胞具有一定的保护作用<sup>[15]</sup>。为了检测在PDGF-BB诱导下, Roc-A对VSMCs细胞活性的影响, 使用25 ng/mL PDGF-BB联合不同浓度Roc-A共同处理细胞24 h。结果显示PDGF-BB处理使细胞活性加强, 而PDGF-BB+10 nmol/L Roc-A组、PDGF-BB+25 nmol/L Roc-A组、PDGF-BB+50 nmol/L Roc-A组、PDGF-BB+75 nmol/L Roc-A组和PDGF-BB+100 nmol/L Roc-A组的细胞活性呈剂量依赖性的显著降低( $P < 0.001$ ), 细胞增殖受到抑制(图1B)。

### 2.2 Roc-A抑制PDGF-BB诱导的VSMCs增殖

PCNA是细胞增殖的重要生物学指标, 有研究认为PCNA与VSMCs增殖和迁移有关<sup>[16]</sup>。因此, 采用蛋白质免疫印迹分析检测PCNA表达水平以进一步分析Roc-A对VSMCs增殖的抑制作用。如图1C和图1D所示, PDGF-BB组的PCNA表达量显著增加, 经Roc-A处理后, PCNA表达水平呈剂量依赖性降低, 平滑肌细胞的增殖受到了抑制。



A: 通过CCK8测定不同浓度的Roc-A处理对VSMCs存活率的影响。B: Roc-A处理对PDGF-BB诱导的VSMCs存活率的影响。C: 蛋白质免疫印迹检测PCNA表达水平。D: 组间定量分析PCNA蛋白表达水平。## $P < 0.01$ , #### $P < 0.0001$ , 与NC组相比; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , 与PDGF-BB组相比。n=3。

A: the effects of different concentrations of Roc-A treatment on the viability of VSMCs were detected by CCK8 assay. B: the effects of Roc-A treatment on the viability of VSMCs induced by PDGF-BB. C: PCNA expression levels were detected by Western blot. D: quantification of PCNA protein expression levels between groups. ## $P < 0.01$ , #### $P < 0.0001$  vs NC group; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  vs PDGF-BB group. n=3.

图1 Roc-A对VSMCs细胞活力的影响

Fig.1 Effect of Roc-A on the cell viability of VSMCs

### 2.3 Roc-A抑制VSMCs细胞周期进程

为了检测Roc-A对PDGF-BB诱导的VSMCs细胞周期进程的影响,采用流式细胞仪结合EdU实验检测药物处理后的VSMCs细胞周期情况。如图2所示,与对照组相比,PDGF-BB组EdU掺入的细胞显著增加( $P < 0.01$ ),但加入Roc-A后,EdU掺入的细胞呈剂量依赖性减少( $P < 0.001$ ),细胞周期由G<sub>2</sub>+S期向G<sub>1</sub>期转变,细胞周期进程受阻,VSMCs增殖受到抑制。

### 2.4 Roc-A抑制PDGF-BB诱导的VSMCs迁移

通过Transwell细胞迁移实验来判断在PDGF-BB存在的情况下,Roc-A对平滑肌细胞迁移的影响。如图3所示,在25 ng/mL PDGF-BB的刺激下,细胞跨膜迁移能力显著增强( $P < 0.0001$ );经Roc-A处理后,跨膜迁移的细胞呈浓度依赖性的减少。这说明

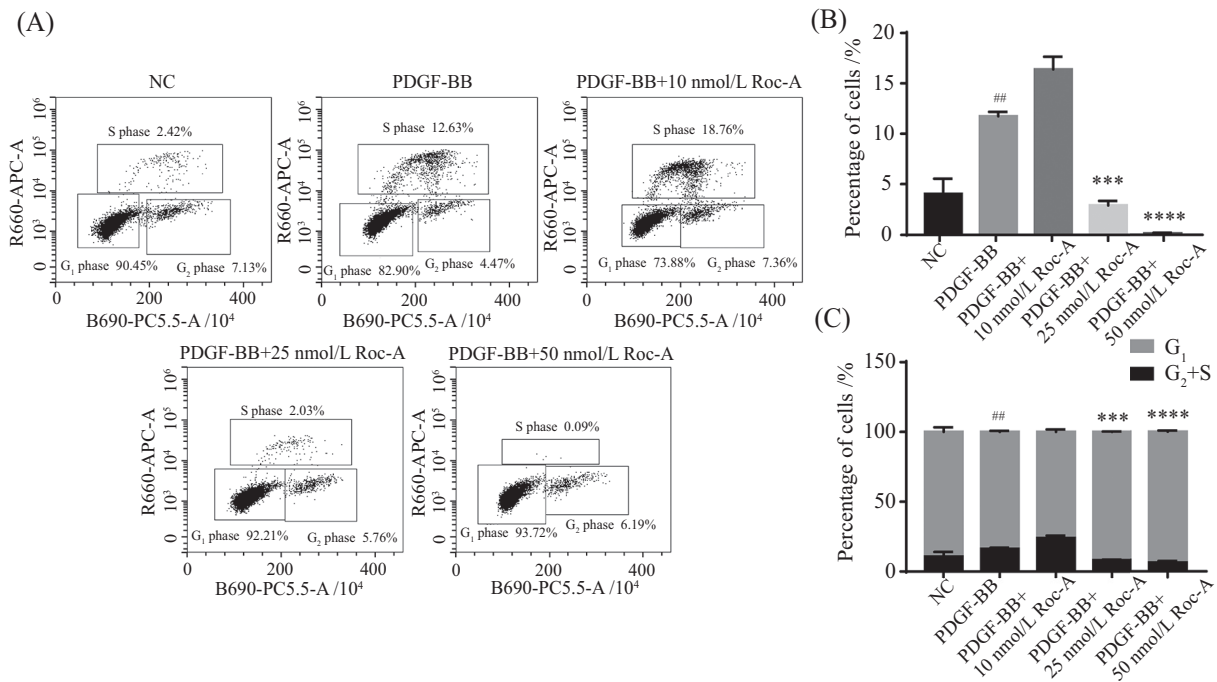
Roc-A可延缓PDGF-BB诱导的VSMCs迁移。

### 2.5 Roc-A调节PDGF-BB诱导的VSMCs自噬

为探究Roc-A调节平滑肌细胞增殖迁移的机制是否涉及自噬,我们采用蛋白质免疫印迹法检测25 ng/mL PDGF-BB和Roc-A(10、25和50 nmol/L)处理后P62和LC3B的表达情况。结果显示,PDGF-BB引起P62表达水平降低,LC3B II表达水平增加;经Roc-A处理后,P62表达水平相对增加,LC3B II表达水平减少(图4)。这表明,Roc-A抑制了PDGF-BB介导的VSMCs自噬。

### 2.6 Roc-A逆转PDGF-BB诱导的ROS积累

自噬通常与ROS的生成存在密切的联系。我们采用DCFH-DA检测PDGF-BB和Roc-A(10、25和50 nmol/L)对细胞ROS的影响。如图5所示,PDGF-BB

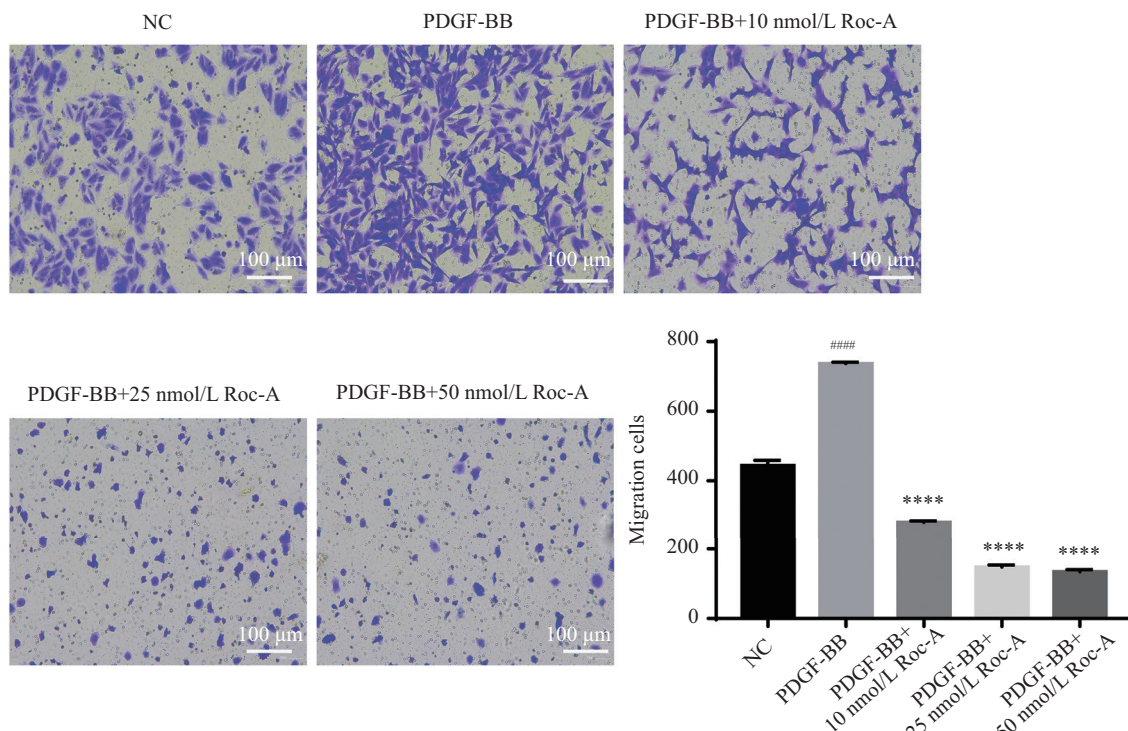


A: 流式细胞术分析VSMCs的细胞周期进程。B: EdU掺入S期细胞的定量分析。C: 每组细胞周期分布的定量分析。<sup>##</sup> $P < 0.01$ , 与NC组相比; <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ , <sup>\*\*\*\*</sup> $P < 0.0001$ , 与PDGF-BB组相比。n=3。

A: flow cytometry analysis of the cell cycle progression of VSMCs. B: quantitative analysis of EdU incorporation into S-phase cells. C: quantitative analysis of cell cycle distribution per group. <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs NC group; <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ , <sup>\*\*\*\*</sup> $P < 0.0001$  vs PDGF-BB group. n=3.

图2 Roc-A抑制PDGF-BB诱导的VSMCs增殖

Fig.2 Roc-A inhibited the proliferation of VSMCs induced by PDGF-BB

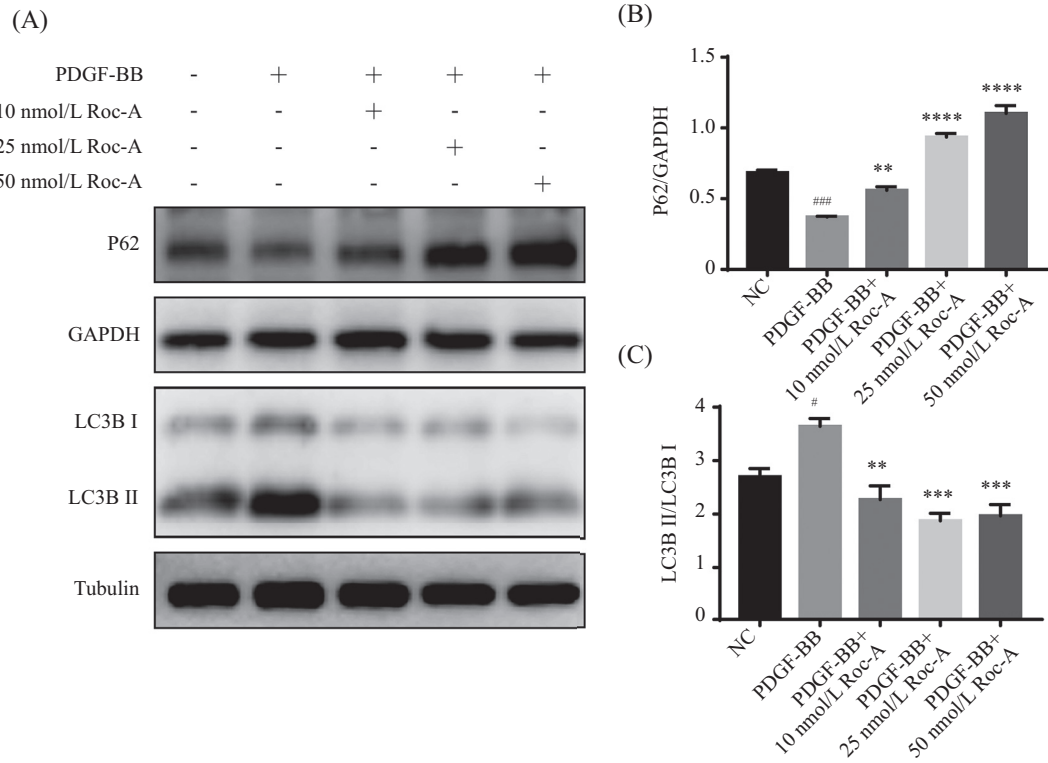


通过Transwell检测不同组别之间VSMCs迁移的程度。<sup>####</sup> $P < 0.0001$ , 与NC相比; <sup>\*\*\*\*</sup> $P < 0.0001$ , 与PDGF-BB组相比。n=3。

The extent of VSMCs migration between the different groups was examined by Transwell. <sup>####</sup> $P < 0.0001$  vs NC group; <sup>\*\*\*\*</sup> $P < 0.0001$  vs PDGF-BB group. n=3.

图3 Roc-A抑制PDGF-BB诱导的VSMCs迁移

Fig.3 Roc-A inhibited the migration of VSMCs induced by PDGF-BB

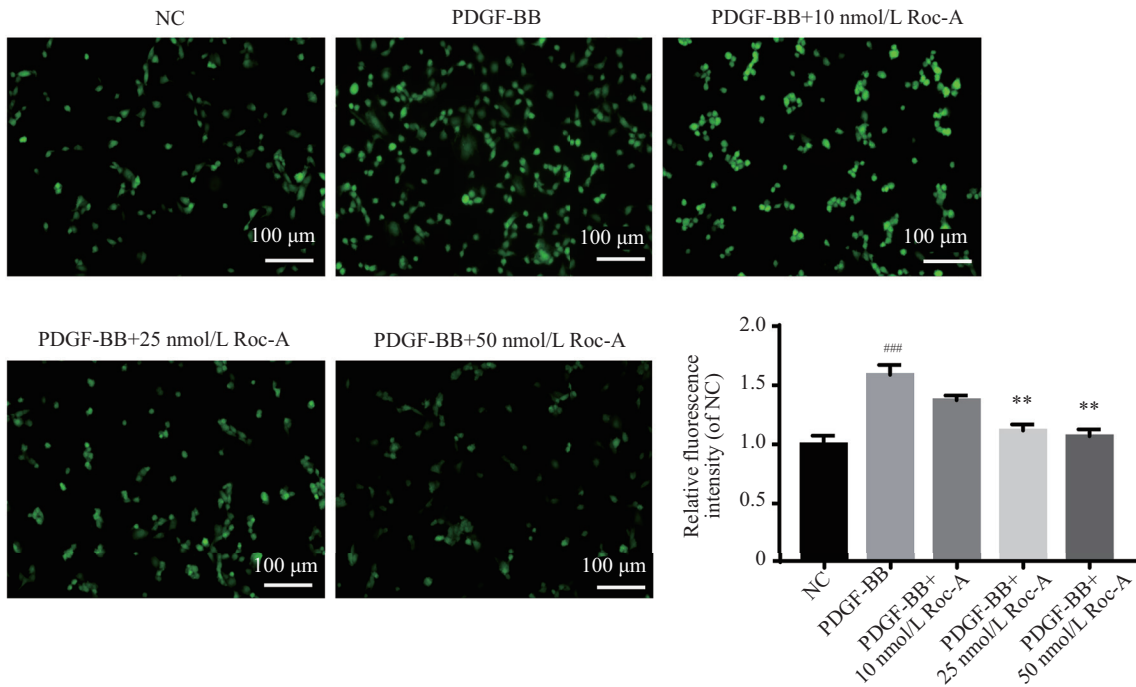


A: VSMCs中P62和LC3B蛋白的免疫印迹分析。B: P62量化分析。C: LC3B II与LC3B I比值的量化分析。<sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>###</sup> $P < 0.001$ , 与NC组相比; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ , <sup>\*\*\*\*</sup> $P < 0.0001$ 与PDGF-BB组相比。 $n = 3$ 。

A: P62 and LC3B protein expression in VSMCs was detected by Western blot analysis. B: quantification of P62. C: quantification analysis of the ratio of LC3B II to LC3B I. <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>###</sup> $P < 0.001$  vs NC group; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ , <sup>\*\*\*\*</sup> $P < 0.0001$  vs PDGF-BB group.  $n = 3$ .

图4 Roc-A抑制PDGF-BB诱导的VSMCs自噬

Fig.4 Roc-A inhibited PDGF-BB-induced autophagy in VSMCs

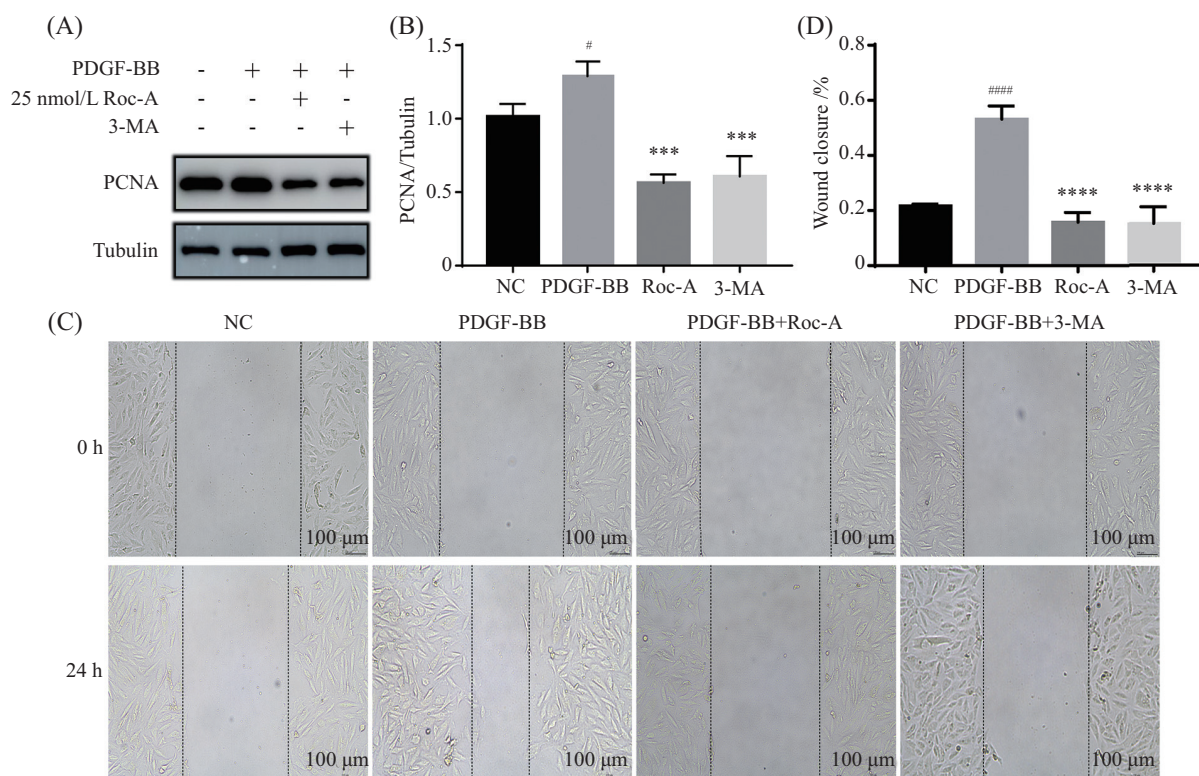


利用DCFH-DA荧光探针进行ROS相对荧光强度量化分析。<sup>###</sup> $P < 0.001$ , 与NC组相比; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , 与PDGF-BB组相比。 $n = 3$ 。

Quantification of ROS relative fluorescence intensity by DCFH-DA fluorescent probes. <sup>###</sup> $P < 0.001$  vs NC group; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs PDGF-BB group.  $n = 3$ .

图5 Roc-A抑制PDGF-BB诱导的VSMCs中ROS生成

Fig.5 Roc-A inhibited PDGF-BB-induced ROS generation in VSMCs



A: VSMCs中PCNA蛋白质免疫印迹分析。B: PCNA量化分析。C: 通过细胞划痕实验测定细胞迁移程度。D: 细胞划痕实验定量分析。<sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>####</sup> $P<0.0001$ , 与NC组相比; <sup>\*\*\*</sup> $P<0.001$ , <sup>\*\*\*\*</sup> $P<0.0001$ , 与PDGF-BB组相比。n=3。

A: PCNA protein expression in VSMCs was detected by Western blot analysis. B: quantification of PCNA. C: determination of the extent of cell migration by cell scratch assay. D: quantitative analysis of cell scratch assay. <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>####</sup> $P<0.0001$  vs NC group; <sup>\*\*\*</sup> $P<0.001$ , <sup>\*\*\*\*</sup> $P<0.0001$  vs PDGF-BB group. n=3.

图6 Roc-A通过调节自噬抑制PDGF-BB诱导的VSMCs增殖迁移

Fig.6 Roc-A inhibited PDGF-BB-induced proliferation and migration of VSMCs through regulation of autophagy

组荧光强度显著增强 ( $P<0.001$ ), 25和50 nmol/L Roc-A组荧光信号强度显著低于PDGF-BB组 ( $P<0.01$ ), 说明Roc-A逆转了PDGF-BB诱导的VSMCs ROS积累。

### 2.7 Roc-A通过调节自噬抑制PDGF-BB诱导的VSMCs增殖迁移

为进一步探究在Roc-A调节VSMCs过度增殖和迁移过程中, 抑制PDGF-BB诱导的自噬的重要性, 我们使用自噬抑制剂5 mmol/L 3-MA处理细胞24 h, 然后检测PCNA的表达和细胞划痕迁移面积的变化。如图6A和图6B所示, 与25 nmol/L Roc-A作用效果一致, 5 mmol/L 3-MA显著抑制了PCNA表达 ( $P<0.001$ )。细胞划痕实验进一步显示, 3-MA和Roc-A处理逆转了PDGF-BB诱导的VSMCs迁移(图6C和图6D)。这些结果表明, 在体外Roc-A通过调节自噬抑制PDGF-BB诱导的VSMCs增殖和迁移。

## 3 讨论

血管损伤后的新内膜增生是介入术后再狭窄

的关键问题之一。PDGF-BB是从受损血管中释放的有丝分裂原之一, 调节细胞增殖迁移并影响炎症介质产生, 参与各种血管疾病<sup>[7]</sup>。研究表明, 内源性PDGF-BB在新内膜增生中起重要作用, 可促进VSMCs增殖, 因此, 实验中选择PDGF-BB作为建立细胞模型的激动剂<sup>[17-18]</sup>。与以往研究一致, 25 ng/mL PDGF-BB成功诱导了VSMCs增殖和迁移。Roc-A作为NF- $\kappa$ B活化的一种抑制剂, 可用于缓解炎症, 并抑制蛋白质翻译, 研究结果显示, Roc-A的处理显著拮抗了PDGF-BB诱导的VSMCs的增殖和迁移<sup>[19-21]</sup>。

PCNA作为细胞增殖的重要生物学指标, 我们检测了PCNA表达量, 发现Roc-A处理下调了PCNA在细胞中的表达, CCK8检测结果显示Roc-A降低了VSMCs细胞活力。此外, 采用Transwell实验证实了Roc-A对PDGF-BB诱导的平滑肌细胞迁移的抑制作用。这说明Roc-A可能是一种新的可有效抑制VSMCs增殖迁移的药物。

自噬调节细胞稳态, 并在缺氧和一些生长因子

刺激下调节细胞功能, 在新内膜增生中起着重要作用<sup>[22]</sup>。PDGF-BB诱导的自噬促进VSMCs转变为分泌表型, 抑制收缩蛋白如 $\alpha$ -SMA表达, 促进VSMCs向过度增殖迁移发展<sup>[23-24]</sup>。以往的研究显示, 自噬抑制剂3-MA通过抑制自噬激活而发挥抗VSMCs增殖的作用<sup>[10,25]</sup>。在本研究中, 经PDGF-BB刺激后, VSMCs中自噬标志物LC3 II水平增加, 而自噬底物P62水平降低, 表明自噬被激活, 3-MA与25 nmol/L Roc-A抑制VSMCs增殖和迁移。由此, 我们发现Roc-A可以抑制自噬的激活, 这表明Roc-A通过调节自噬抑制PDGF-BB诱导的VSMCs过度增殖和迁移。

ROS积累与PDGF-BB诱导的自噬密切相关。血管损伤后, 血管重塑通常伴随着ROS积累, PDGF-BB刺激VSMCs产生大量的ROS, 而过量的ROS诱导自噬激活<sup>[26]</sup>。自噬在应激条件下被激活, 通过调节细胞内ROS水平调控VSMCs增殖, 低水平的ROS是各种细胞功能所必需的, 但高水平的ROS会对细胞功能产生有害影响<sup>[27-28]</sup>。由此, 我们探究了不同浓度Roc-A处理对PDGF-BB诱导的ROS积累的影响。荧光探针DCFH-DA检测结果显示相较于PDGF-BB组, Roc-A处理组的ROS积累量显著减少。这表明, Roc-A抑制PDGF-BB诱导的ROS积累。然而, 氧化应激和自噬之间的具体调控机制仍有待进一步研究。

综上所述, Roc-A可以抑制VSMCs增殖和迁移, 这种抑制作用可能与Roc-A抑制PDGF-BB诱导的自噬和氧化应激有关, 提示Roc-A可能作为一种新型治疗药物, 用来预防和介入治疗介入损伤后的再狭窄。但Roc-A抑制VSMCs增殖迁移更为具体的机制仍需进一步深入探讨。

### 参考文献 (References)

- [1] HINCHLIFFE R J, FORSYTHE R O, APELQVIST J, et al. 国际糖尿病足工作组: 糖尿病足溃疡周围动脉病变诊断、预后与管理指南——《国际糖尿病足工作组: 糖尿病足防治国际指南(2019)》的一部分[J]. 感染、炎症、修复(HINCHLIFFE R J, FORSYTHE R O, APELQVIST J, et al. International working group on the diabetic foot guideline on diagnosis, prognosis and management of peripheral artery disease in patients with a foot ulcer and diabetes: part of the 2019 IWGDF guidelines on the prevention and management of diabetic foot disease [J]. Infection, Inflammation, Repair), 2019, 20(4): 195-206.
- [2] SOYOYE D O, ABIODUN O O, IKEM R T, et al. Diabetes and peripheral artery disease: a review [J]. World J Diabetes, 2021, 12(6): 827-38.
- [3] 李红梅, 王显. 冠状动脉介入术后炎症微环境与支架内再狭窄的相关性研究进展[J]. 中国循证心血管医学杂志(LI H M, WANG X. Research progress in correlation between post-operative inflammatory microenvironment and in-stent restenosis after PCI [J]. Chinese Journal of Evidence-Based Cardiovascular Medicine), 2018, 10(11): 1425-7.
- [4] DÍAZ DEL CAMPO L S, RODRIGUES-DÍEZ R, SALAICES M, et al. Specialized pro-resolving lipid mediators: new therapeutic approaches for vascular remodeling [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(7): 3592.
- [5] ZHANG F S, HE Q Z, QIN C H, et al. Therapeutic potential of colchicine in cardiovascular medicine: a pharmacological review [J]. Acta Pharmacol Sin, 2022, 43(9): 2173-90.
- [6] NWADIUGWU M C. Inflammatory activities in type 2 diabetes patients with co-morbid angiopathies and exploring beneficial interventions: a systematic review [J]. Front Public Health, 2020, 8: 600427.
- [7] CHEN C, MA J, XU Z, et al. Rosmarinic acid inhibits platelet aggregation and neointimal hyperplasia *in vivo* and vascular smooth muscle cell dedifferentiation, proliferation, and migration *in vitro* via activation of the Keap1-Nrf2-ARE antioxidant system [J]. J Agric Food Chem, 2022, 70(24): 7420-40.
- [8] DONG X, HU H, FANG Z, et al. CTRP6 inhibits PDGF-BB-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 103: 844-50.
- [9] WU Y C, WANG W T, LEE S S, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor agonist attenuates autophagy to ameliorate pulmonary arterial hypertension through Drp1/NOX- and Atg-5/Atg-7/Becn1-1/LC3 $\beta$  pathways [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(14): 3435.
- [10] TAI S, HU X Q, PENG D Q, et al. The roles of autophagy in vascular smooth muscle cells [J]. Int J Cardiol, 2016, 211: 1-6.
- [11] GROOTAERT M O, DA COSTA MARTINS P A, BITSCH N, et al. Defective autophagy in vascular smooth muscle cells accelerates senescence and promotes neointima formation and atherogenesis [J]. Autophagy, 2015, 11(11): 2014-32.
- [12] 蔡婷, 明平红, 樊光辉. 血管平滑肌细胞自噬及其在动脉粥样硬化中的作用[J]. 中国心血管病研究(CAI T, MING P H, FAN G H. Vascular smooth muscle cell autophagy and its role in atherosclerosis [J]. Chinese Journal of Cardiovascular Research), 2022, 20(11): 1045-50.
- [13] BAUMANN B, BOHNENSTENGEL F, SIEGMUND D, et al. Rocaglamide derivatives are potent inhibitors of NF-kappa B activation in T-cells [J]. J Biol Chem, 2002, 277(47): 44791-800.
- [14] ZHOU Z, DIXON D D, JOLIT A, et al. The evolution of the total synthesis of rocaglamide [J]. Chemistry, 2016, 22(44): 15929-36.
- [15] BECKER M S, SCHMEZER P, BREUER R, et al. The traditional Chinese medical compound Rocaglamide protects nonmalignant primary cells from DNA damage-induced toxicity by inhibition of p53 expression [J]. Cell Death Dis, 2014, 5(1): e1000.
- [16] O'BRIEN E R, ALPERS C E, STEWART D K, et al. Proliferation in primary and restenotic coronary atherectomy tissue. Implications for antiproliferative therapy [J]. Circ Res, 1993, 73(2): 223-31.
- [17] WANG Z, LIU C, FANG H. Blood cell parameters and predicting coronary in-stent restenosis [J]. Angiology, 2019, 70(8): 711-8.
- [18] GORI T. Vascular wall reactions to coronary stents-clinical implications for stent failure [J]. Life, 2021, 11(1): 63.
- [19] LI A, YANG L, GENG X, et al. Rocaglamide-A potentiates os-



- teoblast differentiation by inhibiting NF- $\kappa$ B signaling [J]. *Mol Cells*, 2015, 38(11): 941-9.
- [20] NILEWSKI C, MICHELS T D, XIANG A X, et al. Strategic diastereoselective C1 functionalization in the aza-rocaglamide scaffold toward natural product-inspired eIF4A inhibitors [J]. *Org Lett*, 2020, 22(16): 6257-61.
- [21] BECKER M S, MÜLLER P M, BAJORAT J, et al. The anticancer phytochemical rocaglamide inhibits Rho GTPase activity and cancer cell migration [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(32): 51908-21.
- [22] SALABEI J K, HILL B G. Autophagic regulation of smooth muscle cell biology [J]. *Redox Biol*, 2015, 4: 97-103.
- [23] SALABEI J K, CUMMINS T D, SINGH M, et al. PDGF-mediated autophagy regulates vascular smooth muscle cell phenotype and resistance to oxidative stress [J]. *Biochem J*, 2013, 451(3): 375-88.
- [24] HAN J H, PARK H S, LEE D H, et al. Regulation of autophagy by controlling Erk1/2 and mTOR for platelet-derived growth factor-BB-mediated vascular smooth muscle cell phenotype shift [J]. *Life Sci*, 2021, 267: 118978.
- [25] WANG X, WU J, ZHANG H, et al. Dihydroartemisinin ameliorates balloon injury-induced neointimal formation through suppressing autophagy in vascular smooth muscle cells [J]. *Biol Chem*, 2021, 402(4): 451-60.
- [26] PARK H S, HAN J H, JUNG S H, et al. Anti-apoptotic effects of autophagy via ROS regulation in microtubule-targeted and PDGF-stimulated vascular smooth muscle cells [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2018, 22(3): 349-60.
- [27] WANG Z, LIU B, ZHU J, et al. Nicotine-mediated autophagy of vascular smooth muscle cell accelerates atherosclerosis via nAChRs/ROS/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Atherosclerosis*, 2019, 284: 1-10.
- [28] LI D, CHEN A, LAN T, et al. SCAP knockdown in vascular smooth muscle cells alleviates atherosclerosis plaque formation via up-regulating autophagy in ApoE<sup>-/-</sup> mice [J]. *FASEB J*, 2019, 33(3): 3437-50.