

藏红花醛对体外高糖诱导的大鼠血管平滑肌细胞增殖、迁移和表型转变的抑制作用

高逸璇^{1,2}, 汪 鹏^{1,2}, 张思龙³, 高瑞娟⁴, 马莹芳^{1,2}, 张可可^{1,2}, 冯 丹^{1,2}, 黄宗奇^{1,2}, 马克涛^{1,2},
李 丽^{1,5}, 司军强^{1,2}

(1. 石河子大学医学院新疆地方与民族高发病教育部重点实验室, 新疆 石河子 832002; 2. 石河子大学医学院生理学教研室, 新疆 石河子 832002; 3. 新疆维吾尔自治区昌吉州人民医院普外二科, 新疆 昌吉 831100; 4. 石河子大学第一附属医院放射科, 新疆 石河子 832002; 5. 嘉兴大学医学院生理学教研室, 浙江 嘉兴 314000)

[摘要] **目的:** 探讨高糖诱导的藏红花醛对大鼠血管平滑肌细胞(VSMCs)增殖、迁移和表型转变的影响, 阐明藏红花醛在糖尿病(DM)血管病变防治中的作用。**方法:** 选择SD大鼠作为实验对象, 取大鼠胸主动脉原代培养VSMCs, 分为对照组、25 mmol·L⁻¹高糖(HG)组和HG+20、40和80 μmol·L⁻¹藏红花醛组。对照组VSMCs不进行处理, 25 mmol·L⁻¹ HG组VSMCs给予25 mmol·L⁻¹ HG预处理, HG+20、40和80 μmol·L⁻¹藏红花醛组VSMCs在25 mmol·L⁻¹ HG组处理的基础上再分别用20、40和80 μmol·L⁻¹藏红花醛进行48 h干预。采用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)法确定藏红花醛合适浓度并检测各组VSMCs存活率, 细胞划痕愈合实验检测各组VSMCs划痕愈合率, Transwell小室实验检测各组VSMCs迁移细胞数, 免疫荧光法检测各组VSMCs中α平滑肌肌动蛋白(α-SMA)和兔抗骨桥蛋白(OPN)荧光强度, Western blotting法检测各组VSMCs中OPN、α-SMA和增殖细胞核抗原(PCNA)蛋白表达水平。**结果:** 显微镜下可见, 体外培养4 d时, 胸主动脉组织块边缘有梭形或三角形细胞爬出, 其中长梭形为最常见的形态; 第14天时细胞逐渐铺满皿底, 当细胞密度达到80%~90%时, 出现标志性的“谷峰状”生长状态。取第3代细胞进行免疫荧光法鉴定, 采用VSMCs特异性标记物α-SMA蛋白进行细胞免疫荧光染色, 原代培养VSMCs中α-SMA蛋白均表达为阳性。CCK-8实验, 与对照组比较, 160 μmol·L⁻¹藏红花醛组VSMCs活性明显降低($P<0.01$), 即对VSMCs产生了毒性损伤。20、40和80 μmol·L⁻¹藏红花醛干预48 h后, VSMCs活性无明显变化, 综合考虑藏红花醛的作用效果和毒性后, 采用上述3个浓度藏红花醛用于后续的细胞实验。经过48 h的干预, 与对照组比较, 25 mmol·L⁻¹ HG组VSMCs活性升高($P<0.001$); 与25 mmol·L⁻¹ HG组比较, HG+20、40和80 μmol·L⁻¹藏红花醛组VSMCs活性降低($P<0.05$)。细胞划痕愈合实验和Transwell小室实验, 干预48 h后, 25 mmol·L⁻¹ HG组VSMCs划痕愈合率明显高于对照组($P<0.01$), 穿过Transwell小室的穿膜细胞数明显增多($P<0.05$); 与25 μmol·L⁻¹ HG组比较, HG+20、40和80 μmol·L⁻¹藏红花醛组VSMCs划痕愈合率降低($P<0.05$), 穿膜细胞数减少($P<0.05$)。免疫荧光染色, 与对照组比较, 25 mmol·L⁻¹ HG组VSMCs中α-SMA蛋白荧光强度明显减弱($P<0.001$), 而OPN蛋白荧光强度明显增强($P<0.001$); 与25 mmol·L⁻¹ HG组比较, HG+20、40和80 μmol·L⁻¹藏红花醛组VSMCs中α-SMA蛋白荧光强度逐渐增加($P<0.05$), OPN蛋白荧光强度逐渐减弱($P<0.05$)。Western blotting法, 与对照组比较, 25 mmol·L⁻¹ HG组VSMCs中α-SMA蛋白表达水平降低

[收稿日期] 2024-06-29 [录用日期] 2024-11-19

[基金项目] 新疆生产建设兵团科技局指导性科技计划项目(2022DZ004); 石河子大学第一附属医院科研项目(QN202208)

[作者简介] 高逸璇(1998—), 女, 甘肃省张掖市人, 在读硕士研究生, 主要从事心脑血管疾病发病机制方面的研究。

[通信作者] 司军强, 教授, 博士研究生导师(E-mail: sijunqiang@shzu.edu.cn)

($P < 0.05$), PCNA 和 OPN 蛋白表达水平升高 ($P < 0.01$); 与 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HG 组比较, HG+20、40 和 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 藏红花醛组 VSMCs 中 α -SMA 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$), PCNA 和 OPN 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$)。结论: 藏红花醛能够抑制高糖诱导的大鼠 VSMCs 的增殖、迁移和表型转换。

[关键词] 糖尿病; 血管病变; 胸主动脉平滑肌细胞; 细胞迁移; 细胞增殖

[中图分类号] R363.1 [文献标志码] A

Inhibitory effect of safranal on proliferation, migration and phenotypic transformation of vascular smooth muscle cells of rats induced by high glucose *in vitro*

GAO Yixuan^{1,2}, WANG Peng^{1,2}, ZHANG Silong³, GAO Ruijuan⁴, MA Yingfang^{1,2}, ZHANG Keke^{1,2},
FENG Dan^{1,2}, HUANG Zongqi^{1,2}, MA Ketao^{1,2}, LI Li^{1,5}, SI Junqiang^{1,2}

(1. Key Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases, Shihezi University, Shihezi 832002, China;

2. Department of Physiology, School of Medical Sciences, Shihezi University, Shihezi 832002, China;

3. Department of General Surgery, Changji People's Hospital, Changji Hui Autonomous Prefecture,

Xinjiang 831100, China; 4. Department of Radiology, First Affiliated Hospital, Shihezi University,

Shihezi 832002, China; 5. Department of Physiology, School of Medical Sciences, Jiaying University,

Jiaying 314000, China)

ABSTRACT Objective: To discuss whether safranal affects the proliferation, migration, and phenotypic transformation of the vascular smooth muscle cells (VSMCs) in a high-glucose environment and to clarify the function of safranal in the prevention and treatment of diabetic (DM) vascular complications.

Methods: The SD rats were selected as experimental subjects; primary VSMCs were cultured from rat thoracic aortas and divided into control group, $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ high glucose (HG) group, HG+ $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ safranal group, HG+ $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ safranal group, and HG+ $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ safranal group. The cells in control group received no treatment; the cells in $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HG group were pretreated with $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HG; the cells in HG+20, 40, and $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ safranal groups were further treated with 20, 40, and $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ safranal respectively for 48 h on the basis of $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HG group. Cell counting kit-8 (CCK-8) method was used to determine the appropriate concentration of safranal and detect the viabilities of the VSMCs in various groups; cell scratch healing assay was used to detect the scratch healing rates of the VSMCs in various groups; Transwell chamber assay was used to detect the numbers of the migration VSMCs in various groups; immunofluorescence method was used to detect the fluorescence intensities of α -smooth muscle actin (α -SMA) and rabbit anti-osteopontin (OPN) in the VSMCs in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of OPN, α -SMA, and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the VSMCs in various groups. **Results:** Under microscope, on the 4th day of *in vitro* culture, the spindle-shaped or triangular cells crawled out from the edge of the thoracic aorta tissue blocks, with long spindle being the most common morphology. On the 14th, the cells gradually covered the bottom of the dish; when cell density reached 80%–90%, the characteristic “hills and valleys” growth pattern appeared. Third-generation cells were taken for immunofluorescence identification; immunofluorescence staining with VSMC-specific marker α -SMA showed positive expression of α -SMA protein in the primarily cultured VSMCs. The CCK-8 assay results showed that compared with control group, the cell viability of the cells in $160 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ safranal group was significantly decreased ($P < 0.01$), indicating toxic damage to the cells. Under the conditions of safranal concentrations at 20, 40, and $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively, after 48 h intervention on VSMCs, no significant adverse effect

on cell viability was observed; considering both the effect and toxicity of safranal, these three concentrations were used in subsequent cell experiments. After 48 h intervention, compared with control group, the activity of the VSMCs in 25 mmol·L⁻¹ HG group was increased ($P<0.001$); compared with 25 mmol·L⁻¹ HG group, the activities of the VSMCs in HG+20, 40, and 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ safranal groups were gradually decreased ($P<0.05$). The cell scratch healing assay and Transwell assay results showed that after 48 h intervention, the scratch healing rate of the VSMCs in 25 mmol·L⁻¹ HG group was significantly higher than that in control group ($P<0.01$), and the number of transmembrane cells through the Transwell chamber was significantly increased ($P<0.05$); compared with 25 mmol·L⁻¹ HG group, the scratch healing rates of the VSMCs in HG+20, 40, and 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ safranal groups were gradually decreased ($P<0.05$), and the number of transmembrane cells was decreased ($P<0.05$). The immunofluorescence staining results showed that compared with control group, the fluorescence intensity of α -SMA protein in the VSMCs in 25 mmol·L⁻¹ HG group was significantly weakened ($P<0.001$), while the fluorescence intensity of OPN protein was significantly enhanced ($P<0.001$); compared with 25 mmol·L⁻¹ HG group, the fluorescence intensities of α -SMA protein in the VSMCs in HG+20, 40, and 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ safranal groups were gradually increased ($P<0.05$), and the fluorescence intensities of OPN were gradually weakened ($P<0.05$). The Western blotting method results showed that compared with control group, the expression level of α -SMA protein in the VSMCs in 25 mmol·L⁻¹ HG group was decreased ($P<0.05$), and the expression levels of PCNA and OPN proteins were increased ($P<0.01$); compared with 25 mmol·L⁻¹ HG group, the expression level of α -SMA protein in the VSMCs in HG+20, 40, and 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ safranal groups were increased ($P<0.05$), and the expression levels of PCNA and OPN proteins were decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** Safranal can inhibit the proliferation, migration, and phenotypic transformation of the VSMCs induced by high glucose.

KEYWORDS Diabetes mellitus; Vascular diseases; Thoracic aorta smooth muscle cells; Cell migration; Cell proliferation

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 被视为一种慢性代谢性疾病, 其主要表现为患者血糖水平上升。近年来, 随着人们物质生活水平的持续提高, DM 的发生率不仅在全球范围内逐年升高, 患者低龄化现象也逐渐增加。如不采取及时的控制措施, 持续的高血糖可能会诱发多种并发症, 如心血管问题、视力丧失和肾功能衰竭等^[1], 其中心脑血管疾病是导致 DM 患者残疾和死亡的关键原因^[2]。

DM 心脑血管病理主要涉及大血管以及肾脏和视网膜特有的微血管病变。研究^[3-4]显示: 随着 DM 的发生发展, 患者血糖浓度过高对血管壁的慢性刺激会引发血管重构, 从而加速大血管和微血管疾病的发生发展。其中的中心环节是血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 的增殖、迁移和表型转化, 而表型调控又是 VSMCs 增殖和迁移的先决条件。该过程的核心特征是细胞从高分化、增殖迁移能力低下的收缩表型, 转变为去分化、具备高增殖与迁移能力的合成表型^[5]。其通过收缩标志物 [α -平滑肌肌动蛋白 (α -

smooth muscle actin, α -SMA)] 的减少, 促进了细胞器的合成、细胞增殖和迁移以及各种细胞因子和细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 蛋白的分泌^[6-9]。因此, 抑制 VSMCs 的异常增殖、迁移和表型转换成为血管重构预防及 DM 血管病变防治的关键步骤。

藏红花醛是藏红花的主要挥发性成分, 其具有抗炎、抗氧化、调节血糖血脂和心血管保护作用等, 这些作用多是由抗氧化剂、钙离子 (Ca^{2+}) 稳态调节、平滑肌细胞收缩抑制和心血管系统抗凋亡机制所介导的。藏红花醛在调节血糖水平方面也有显著作用。研究^[10]显示: 藏红花醛可能会降低空腹血糖和糖化血红蛋白 (glycated hemoglobin A1c, HbA1c) 水平, 并明显改善血液中胰岛素水平。另一项针对 DM 大鼠的研究^[11]显示: 藏红花醛 (2.5、5.0 和 10.0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 与 5.0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 奥氮平联合使用可有效改善奥氮平代谢并发症, 包括体质量、空腹血糖、甘油三酯和瘦素水平和食物摄入量升高, 并降低血清中高密度脂蛋白 (high-density

lipoprotein, HDL) 水平。藏红花醛在DM大鼠血管病变中的作用及其机制尚无报道,高糖环境下藏红花醛影响VSMCs增殖、迁移和表型转变及其作用机制还有待进一步探讨。因此,本研究采用高糖干预VSMCs构建DM血管病变的体外模型,研究藏红花醛是否改善高糖诱导的VSMCs的增殖、迁移和表型转换,为藏红花醛改善DM大鼠血管并发症提供新的研究思路和理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器 SD大鼠(8周龄,雄性)由斯克贝斯生物科技股份有限公司提供,动物生产许可证号:SCXK(豫)2020-0005,动物标准为SPF级。动物饲养温度和湿度适宜,在光照充足环境内保持自由饮水和进食,适应饲养1周后进入实验。藏红花醛购自美国MCE公司,低糖DMEM培养基($1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)、高糖DMEM培养基($4.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)、1%青-链霉素购自美国Gibco公司,兔抗骨桥蛋白(osteopontin, OPN)和兔抗 α -SMA购自美国Abcam公司,鼠抗增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)购自美国Boster公司,鼠抗 β -肌动蛋白(β -actin)、牛血清(bovine serum albumin, BSA)蛋白、辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG和山羊抗兔IgG购自北京中杉金桥生物技术有限公司,发光试剂购自美国Thermo公司,细胞免疫荧光相关试剂异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的山羊抗兔与抗鼠IgG购自美国Sigma公司,4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)和Triton X-100购自美国索莱宝公司,细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)购自美国Apexbio公司,D-Hank's液、多聚甲醛和结晶紫染液购自武汉博士德生物工程有限公司。24孔Transwell™小室($8.0\text{ }\mu\text{m}$)购自美国Corning公司,超净工作台购自苏州净化设备,CO₂恒温培养箱、涡旋震荡仪、蛋白加热变性仪和酶标仪购自美国Thermo公司,自动曝光仪购自上海天能生命科学有限公司。

1.2 VSMCs分离、原代培养及鉴定 选取体质量150~180 g健康雄性SD大鼠,腹腔注射3%戊巴比妥钠麻醉后,采用75%酒精浸泡3~5 min,在无菌条件下剥取大鼠胸主动脉,并放入提前预冷的D-Hank's液中反复冲洗,直至血管呈半透明状。在显微镜下处理多余脂肪、结缔组织及其分支,沿

纵方向剪开血管后,采用眼科弯镊轻轻地刮去内皮细胞,并通过轻揉血管与外膜进行分离得到中膜。再采用联合酶消化法和组织块贴壁法将剥离下来的中膜转移至含有少许DMEM的培养皿中,采用眼科剪剪成 $1\text{ mm}\times 1\text{ mm}$ 的组织块,并转移至含1 mL消化酶(0.1% II型胶原酶+胰蛋白酶)的EP管中,在37℃的水浴条件下作用6~8 min;消化结束后,在EP管中加入2 mL含20%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的低糖DMEM培养基终止消化。离心后($1\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min),小心吸去上清,加入500 μL 培养基。轻轻吹打重悬后,将组织块均匀放置于培养皿底部,并吸出多余培养液,将培养皿倒置放入培养箱中静置2 h(37℃、5%CO₂),待组织贴壁后将培养皿翻转,并小心沿壁加入适量培养基;绝对静止培养3 d,第4~5天在显微镜下观察到有零星细胞从组织块边缘爬出,第7天细胞呈“峰谷样”,通过免疫荧光法进行鉴定后^[12],细胞传至第3代用于后续实验。

1.3 CCK-8法确定藏红花醛合适浓度并检测各组VSMCs存活率 选用第3代及3代以后的VSMCs,将细胞消化、重悬、在显微镜下进行计数,稀释细胞密度为每孔 8×10^3 个,将细胞悬液种于96孔细胞培养板中进行培养,在镜下观察细胞生长密度约50%时,饥饿细胞24 h。采用100 μL 含不同浓度(5、10、20、40、80和160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)藏红花醛的含10% FBS的低糖DMEM培养细胞。并在48 h后吸去培养液,避光条件下每孔加入100 μL 配制好的含10% CCK-8试剂的无血清培养液,置于37℃恒温箱中并继续培养约2.5 h后,采用酶标仪于450 nm波长处测量各孔吸光度(A)值,计算各组细胞存活率。细胞存活率=(加药孔A值-空白孔A值)/(未加细胞未加药孔A值-空白孔A值) $\times 100\%$ 。

饥饿细胞24 h后,实验分为对照组、25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HG组和HG+20、40和80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 藏红花醛组。各孔添加100 μL 相应培养基继续培养。

1.4 细胞划痕实验检测各组VSMCs划痕愈合率

将适宣传代的VSMCs消化后接种于6孔细胞培养板中,每孔背面至少制作3条平行线条作为参考,待细胞密度生长至80%~90%时,饥饿24 h。采用无酶枪头垂直于横线,在细胞表面划痕,采用磷酸盐缓冲液(phosphated buffer saline, PBS)清洗划下的细胞碎片,对照组加入含有10% FBS的

低糖DMEM培养基, HG组则加入含有10% FBS的高糖DMEM培养基。HG+藏红花醛组则分别添加含有不同浓度(20、40和80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)藏红花醛的10% FBS高糖DMEM培养基, 继续孵育培养, 并在0和48 h时显微镜下观察记录, 采用Image J软件分析不同时间点的划痕面积, 并计算细胞划痕愈合率。细胞划痕愈合率=(0 h划痕面积-48 h划痕面积)/0 h划痕面积 $\times 100\%$ 。

1.5 Transwell小室实验检测各组VSMCs迁移细胞数 在24孔细胞培养板中放置Transwell小室, 然后将细胞密度为每孔 2×10^5 个的200 μL 细胞重悬液垂直加入Transwell小室的上室, 接着在Transwell小室的下室中加入500 μL 含有10% FBS的DMEM培养基作为诱导剂, 确保小室底部与培养基接触。将24孔细胞培养板放入培养箱中孵育细胞约12 h, 将Transwell小室的下室培养基更换为含10% FBS的低糖和高糖培养基以及添加不同浓度藏红花醛的高糖培养基, 继续培养48 h。从24孔细胞培养板中小心取出细胞小室, 并采用棉签轻轻擦去小室微孔膜上的细胞, PBS缓冲液清洗后, 每孔加入600 μL 4%多聚甲醛固定小室微孔膜下的细胞30 min, 弃去固定液, PBS缓冲液清洗后晾干。将小室放入600 μL 1%结晶紫染液染色处理20 min后, 迅速取出浸入到双蒸水中清洗去除多余的染料, 然后用棉签擦去多余的水分, 倒置并完全干燥小室。在显微镜下观察并记录, 随机选取不同的视野采用Image J软件计算细胞数。

1.6 免疫荧光法检测各组VSMCs中 α -SMA和OPN蛋白荧光强度 接种适量细胞于6孔细胞培养板中, 待细胞密度生长至40%左右, 采用PBS缓冲液清洗后, 继续饥饿细胞24 h。弃去旧培养基, PBS缓冲液清洗后根据分组分别更换为各组所需的培养基进行48 h干预。接着进行4%多聚甲醛固定细胞15~20 min, 0.2% Triton-X 100透化细胞3~5 min, 5% BSA溶液封闭30 min, 每步操作结束后需采用PBS缓冲液进行清洗。封闭完, 在盖玻片上滴入50 μL 、1:200稀释的 α -SMA和OPN抗体, 放入湿盒, 4℃冰箱冷藏过夜。次日复温后, 用PBS缓冲液洗去未结合一抗, 并将100 μL 含FITC的荧光素酶二抗抗体(1:100)滴加到玻片上, 避光孵育2 h后, 采用PBS缓冲液清洗。DAPI染液以1:1 000比例稀释后, 15 min染核。封片后于荧光显微镜下观察拍照, 并采用Image J

软件检测平均荧光强度值并进行均一化处理。

1.7 Western blotting法检测各组VSMCs中 α -SMA、OPN和PCNA蛋白表达水平 从培养箱中取出已经充分干预的6孔细胞培养板, 弃去旧培养基后, 采用PBS缓冲液洗涤3次。吸净板中多余的PBS缓冲液, 在每孔中加入100 μL 细胞裂解液, 于冰板上裂解30 min后, 用细胞刮刀刮下收集到标有相应标记的EP管内。通过超声波处理已裂解充分的细胞, 4℃、12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min。采用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白测定法配平各组蛋白, 使得所有蛋白样品最终浓度相同, 100℃将样品煮10 min以确保其充分变性。通过电泳和电转将蛋白转移到聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上, 采用5%脱脂奶粉封闭2~4 h, 采用1 $\times$ Tris缓冲盐溶液(tris-buffered saline with Tween[®] 20, TBST)洗涤后, 加入 α -SMA、OPN和PCNA一抗(1:1 000), 4℃冷藏过夜。一抗孵育后, 使用1 $\times$ 含吐温20的TBST溶液洗涤, 接着加入已稀释的山羊抗小鼠或山羊抗兔的二抗(1:10 000)中, 室温孵化2 h。再次清洗后, 在膜表面均匀滴入ECL发光试剂, 曝光处理, 并采用Image J软件分析目标蛋白灰度值, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

1.8 统计学分析 采用GraphPad Prism 8统计软件进行统计学分析。各组细胞存活率, 增殖活性, 细胞划痕愈合率和细胞中 α -SMA和OPN蛋白荧光强度以及PCNA、OPN和 α -SMA蛋白表达水平经Shapiro-wilk检验均符合正态分布, 以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

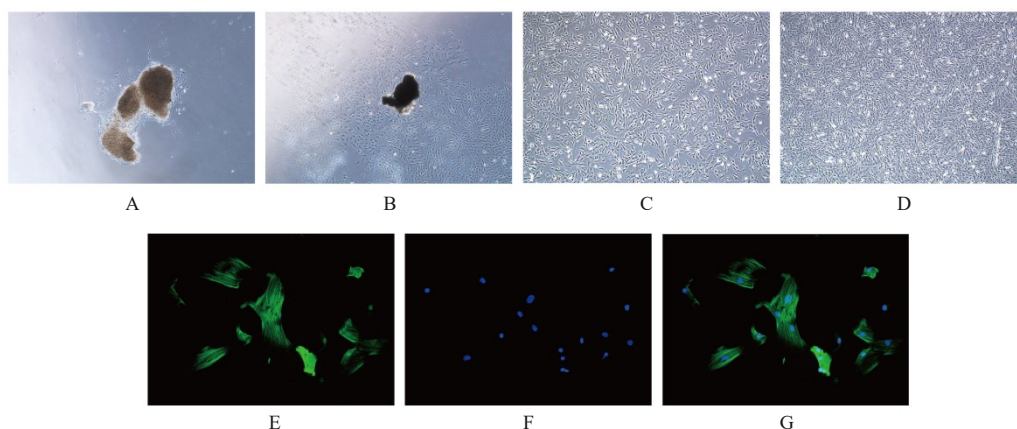
2 结果

2.1 VSMCs培养及鉴定 显微镜下观察结果显示: 体外培养4 d时, 胸主动脉组织块边缘有梭形或三角形细胞爬出, 其中长梭形为最常见的形态。第14天时细胞逐渐铺满皿底, 当细胞密度达到80%~90%时, 出现标志性的“谷峰状”生长状态(图1A~图1D)。取第3代细胞进行免疫荧光法鉴定, 采用VSMCs特异性标记物 α -SMA蛋白进行细胞免疫荧光染色, 结果显示原代培养VSMCs中 α -SMA蛋白均表达为阳性(图1E~图1G), 提示该方法提取和培养出了纯度较高的VSMCs, 可用

于后续实验。

2.2 藏红花醛的合适浓度和处理时间 CCK-8 实验结果显示: 与 $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 藏红花醛组比较, $160 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 藏红花醛组 VSMCs 活性明显降低 ($P<0.01$), 即对 VSMCs 产生了毒性损伤。20、

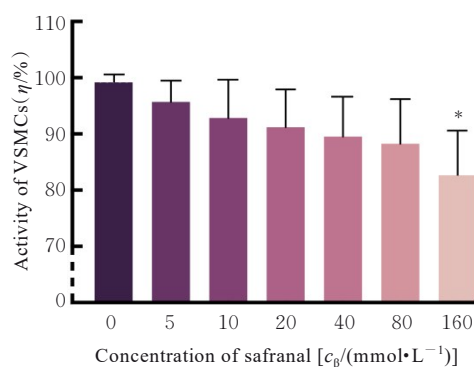
40 和 $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 藏红花醛对 VSMCs 进行 48 h 的干预后, VSMCs 活性无明显变化, 综合考虑藏红花醛的作用效果和毒性后, 采用上述 3 个浓度藏红花醛用于后续的细胞实验。见图 2。



A—D: Adherence and growth process of primary VSMCs ($\times 40$); E—G: Immunofluorescence staining identification of VSMCs ($\times 200$); E: α -SMA; F: DAPI; G: Merge.

图1 SD大鼠胸主动脉VSMCs生长过程及其鉴定

Fig. 1 Growth process of VSMCs in thoracic aorta of SD rats and its identification



* $P<0.01$ vs $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ safranal group.

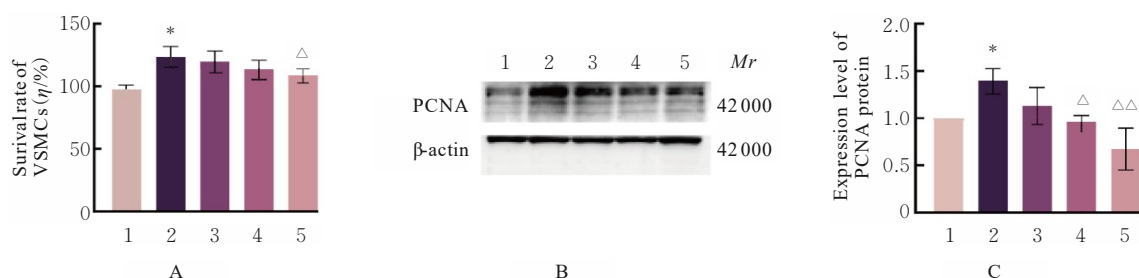
图2 CCK-8法检测不同浓度藏红花醛处理48 h后VSMCs活性

Fig. 2 Activities of VSMCs after treated with different concentrations of safranal for 48 h detected by CCK-8 assay

2.3 各组VSMCs活性和VSMCs中PCNA蛋白表达水平 经过48 h干预, 与对照组比较, $25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HG组 VSMCs 活性升高 ($P<0.001$), VSMCs 中 PCNA 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.01$); 与 $25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HG组比较, HG+20、40和 $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 藏红花醛组 VSMCs 活性降低 ($P<0.05$), VSMCs 中 PCNA 蛋白表达水平降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。见图3。

2.4 各组VSMCs划痕愈合率和穿膜细胞数 细胞划痕实验和 Transwell 小室实验检测结果显示: 48 h 干预后, $25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HG 组 VSMCs 划痕愈合率明显高于对照组 ($P<0.01$), 穿过 Transwell 小室的穿膜细胞数明显增多 ($P<0.05$); 与 $25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HG 组比较, HG+20、40 和 $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 藏红花醛组 VSMCs 划痕愈合率降低 ($P<0.05$), 穿膜细胞数减少 ($P<0.05$)。见图4、图5和表1。

2.5 各组VSMCs中 α -SMA和OPN蛋白表达荧光强度 免疫荧光法检测结果显示: 与对照组比较, $25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HG 组 VSMCs 中 α -SMA 蛋白荧光强度明显减弱 ($P<0.01$), 而 OPN 蛋白荧光强度明显增强 ($P<0.01$); 与 $25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HG 组比较, HG+20、40 和 $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 藏红花醛组 VSMCs 中 α -SMA 蛋白荧光强度逐渐增加 ($P<0.01$), OPN 蛋白荧光强度逐渐减弱 ($P<0.01$)。Western blotting 法检测结果显示: 与对照组比较, $25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HG 组 VSMCs 中 α -SMA 蛋白表达水平降低 ($P<0.05$), OPN 蛋白表达水平升高 ($P<0.05$); 与 $25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HG 组比较, HG+40 和 $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 藏红花醛组 VSMCs 中 α -SMA 蛋白表达水平升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), HG+80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 藏红花醛组 VSMCs 中 OPN 蛋白表达水平降低 ($P<0.05$)。



A: Histogram of survival rates of VSMCs (Lane 1: Control group; Lane 2: 25 mmol·L⁻¹ HG group; Lane 3–5: HG+20, 40, and 80 μmol·L⁻¹ safranal groups); B: Electrophoregram of expression of PCNA protein (1: Control group; 2: 25 mmol·L⁻¹ HG; 3: HG+20 μmol·L⁻¹ safranal; 4: HG+40 μmol·L⁻¹ safranal; 5: HG+80 μmol·L⁻¹ safranal); C: Histogram of PCNA protein expression level (1: Control group; 2: 25 mmol·L⁻¹ HG; 3: HG+20 μmol·L⁻¹ safranal; 4: HG+40 μmol·L⁻¹ safranal; 5: HG+80 μmol·L⁻¹ safranal. * $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs 25 mmol·L⁻¹ HG group).

图3 各组VSMCs存活率和VSMCs中PCNA蛋白表达水平

Fig. 3 Survival rates of VSMCs and expression level of PCNA protein in VSMCs in various groups

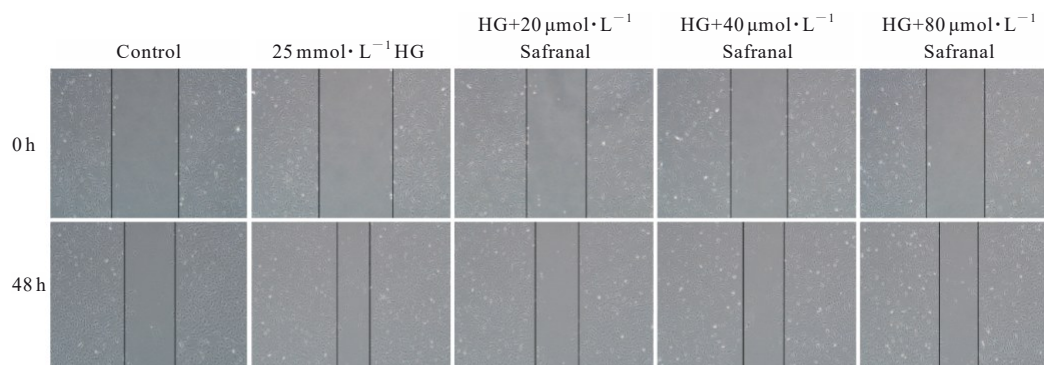


图4 细胞划痕实验检测各组VSMCs划痕愈合率(×200)

Fig. 4 Wound healing rates of VSMCs in various groups detected by cell scratch assay (×200)

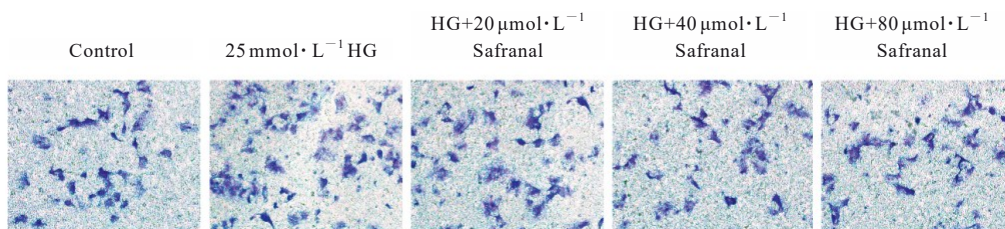


图5 Transwell小室实验检测各组VSMCs穿膜细胞数(结晶紫, ×200)

Fig. 5 Number of transmembrane VSMCs in various groups detected by Transwell chamber assay (Crystal violet, ×200)

见图6~8。

3 讨论

DM作为以慢性高血糖为特征的代谢性疾病,可导致脉管系统不良的结构变化和功能损伤。由于对该生理过程代谢信息的缺乏,减少DM血管病理性重塑的过程仍未达成共识,至今临床实践中还未发现针对DM导致的血管损害特别有效的防治方法。因此,研究如何降低DM血管的损害并减缓血管的

老化过程,成为防治DM引发的血管病变的重点。

本研究利用高糖环境诱导VSMCs增殖、迁移和表型转换,采用细胞培养实验探讨了藏红花醛对体外VSMCs的具体效应。研究^[13-17]显示:高糖诱导后的VSMCs活性、增殖及迁移能力增加,并发生表型转化。在高糖刺激的VSMCs中观察到PCNA、OPN和α-SMA的蛋白表达也明显加强。虽然先前的研究^[18]报道了藏红花醛对DM并发症的有益影响,但仅发现其抗高血糖、抗氧化和抗细

表1 各组VSMCs划痕愈合率和穿膜细胞数

Tab.1 Wound healing rates of VSMCs and number of transmembrane cells in various groups (n=3, $\bar{x}\pm s$)

Group	Wound healing rate(η /%)	Number of transmembrane cells
Control	47.25 $\pm$ 17.18	37.0 $\pm$ 10.0
25 mmol $\cdot$ L ⁻¹ HG	72.34 $\pm$ 7.08**	86.5 $\pm$ 18.5*
HG+20 μ mol $\cdot$ L ⁻¹ safranal	53.56 $\pm$ 9.64 Δ	77.5 $\pm$ 16.5 Δ
HG+40 μ mol $\cdot$ L ⁻¹ safranal	49.33 $\pm$ 12.25 Δ	62.0 $\pm$ 10.0 Δ
HG+80 μ mol $\cdot$ L ⁻¹ safranal	48.39 $\pm$ 11.63 Δ	48.5 $\pm$ 11.5 Δ

*P<0.05, **P<0.01 vs control group; Δ P<0.05 vs 25 mmol $\cdot$ L⁻¹ HG group.

胞凋亡的特性可有效改善藏红花醛神经病变，减轻氧化应激和炎症，并未揭示其在VSMCs增殖、迁移和表型转换中的关键作用。鉴于VSMCs表型转换在脂蛋白滞留、斑块形成和术后再狭窄中起着决定性作用，阐明藏红花醛在增殖、迁移和表型转换

中的作用具有重要意义。

藏红花醛具有一定毒性^[19]。动物研究^[20]显示：藏红花醛在急性口服给药时无毒，在急性腹腔给药时会产生低毒性作用。本研究采用CCK-8实验探讨了不同浓度藏红花醛对正常培养过程中VSMCs产生的负面效应，根据研究结果，选取了3个浓度用于后续实验。但藏红花醛是否具备改善高糖诱导的VSMCs增殖、迁移和表型转换的能力尚不清楚。为评估藏红花醛对VSMCs增殖、迁移和表型转换能力的影响，本实验采用细胞划痕愈合实验、Transwell小室实验、免疫荧光实验和Western blotting法对其进行检测，结果显示：给予藏红花醛治疗可有效抑制高糖诱导后VSMCs的增殖、转移和表型转换能力，并且逆转PCNA、OPN和 α -SMA蛋白表达。本研究首次揭示藏红花醛具有有效抑制DM大鼠VSMCs增殖、迁移和表型转换的效果，为后续的研究提供了有力的支持。

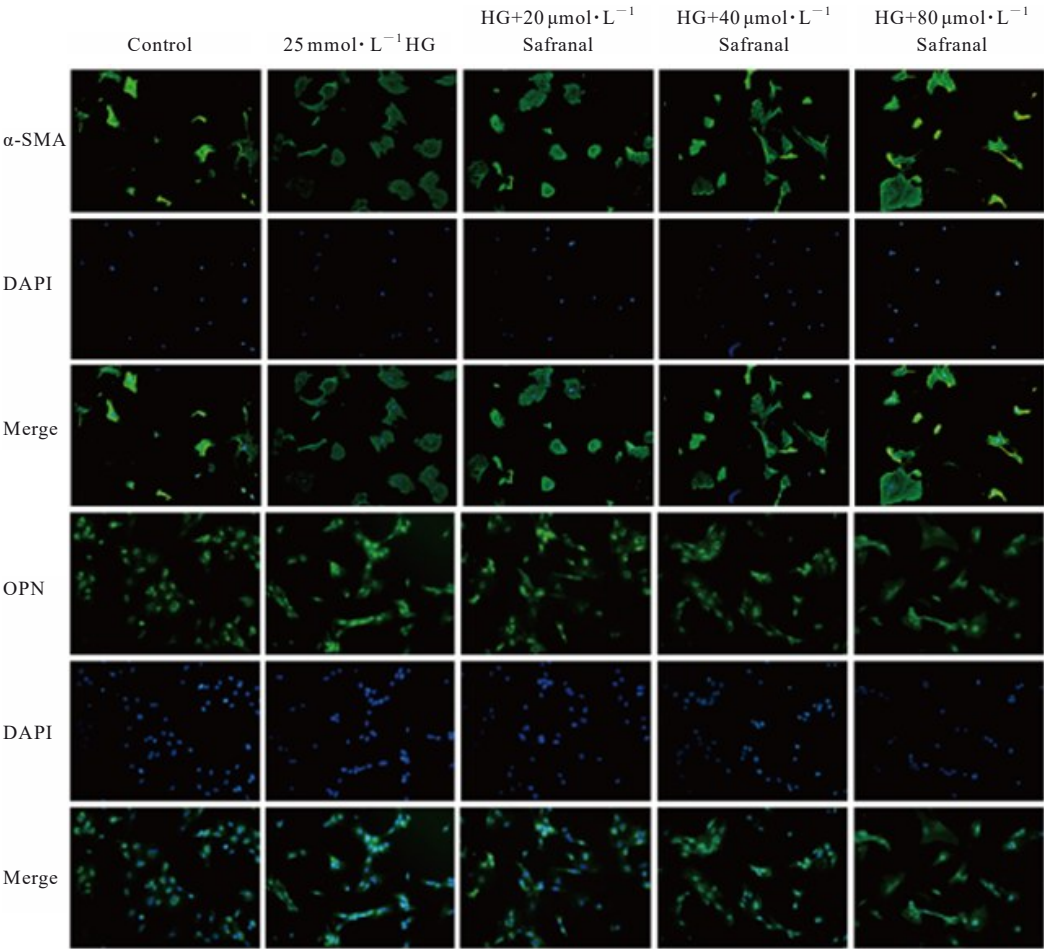
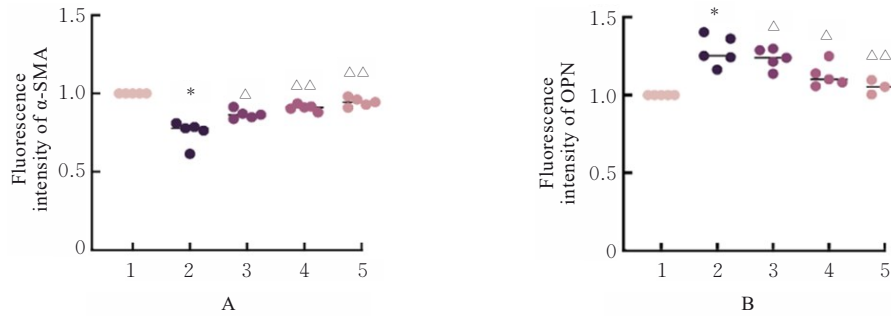


图6 免疫荧光法检测各组VSMCs中 α -SMA和OPN蛋白表达情况($\times 200$)

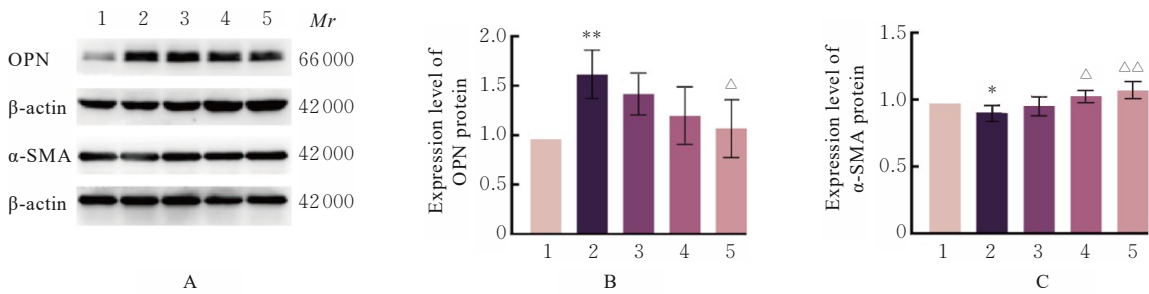
Fig. 6 Expressions of α -SMA and OPN proteins in VSMCs in various groups detected by immunofluorescence staining method ($\times 200$)



1:Control group; 2: 25 mmol·L⁻¹ HG; 3: HG+20 μmol·L⁻¹ safranal; 4: HG+40 μmol·L⁻¹ safranal; 5: HG+80 μmol·L⁻¹ safranal.
**P*<0.01 vs control group; Δ*P*<0.05, ΔΔ*P*<0.01 vs 25 mmol·L⁻¹ HG group.

图7 免疫荧光法检测各组VSMCs中α-SMA(A)和OPN蛋白表达(B)荧光强度

Fig. 7 Fluorescence intensities of α-SMA (A) and OPN proteins (B) expressions in VSMCs in various groups detected by immunofluorescence staining method



Lane 1: Control group; Lane 2: 25 mmol·L⁻¹ HG group; Lane 3–5: HG+20, 40, and 80 μmol·L⁻¹ safranal groups. 1:Control group; 2: 25 mmol·L⁻¹ HG; 3: HG+20 μmol·L⁻¹ safranal; 4: HG+40 μmol·L⁻¹ safranal; 5: HG+80 μmol·L⁻¹ safranal. **P*<0.05, ***P*<0.01 vs control group; Δ*P*<0.05, ΔΔ*P*<0.01 vs 25 mmol·L⁻¹ HG group.

图8 Western blotting法检测各组VSMCs中α-SMA和OPN蛋白表达电泳图(A)及直条图(B和C)

Fig. 8 Electrophoretogram (A) and histograms (B and C) of expressions of α-SMA and OPN proteins in VSMCs in various groups detected by Western blotting method

综上所述, 藏红花醛可以抑制高糖环境下VSMCs的增殖、迁移和表型转换, 但其具体机制尚不清楚, 仍需进一步探讨。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

高逸璇参与研究数据获取和论文撰写, 汪鹏、张思龙和高瑞娟参与研究数据分析, 马莹芳、张可可、冯丹和黄宗奇参与研究设计, 马克涛、李丽和司军强参与论文审阅。

[参考文献]

[1] 国家老年医学中心, 中华医学会老年医学分会, 中国老年保健协会糖尿病专业委员会, 等. 中国老年糖尿病诊疗指南(2024版)[J]. 协和医学杂志, 2024, 15(4): 771-800.
[2] 高明妃, 胡如英, 胡崇高. 中国糖尿病死亡流行特征研

究进展[J]. 预防医学, 2022, 34(7): 692-695.
[3] TOTOŇ-ŽURAŇSKA J, MIKOLAJCZYK T P, SAJU B, et al. Vascular remodelling in cardiovascular diseases: hypertension, oxidation, and inflammation[J]. Clin Sci (Lond), 2024, 138(13): 817-850.
[4] ELMARASI M, ELMAKATY I, ELSAYED B, et al. Phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis, hypertension, and aortic dissection[J]. J Cell Physiol, 2024, 239(4): e31200.
[5] GREEN I D, LIU R J, WONG J J L. The expanding role of alternative splicing in vascular smooth muscle cell plasticity[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(19): 10213.
[6] GROOTAERT M O J, BENNETT M R. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis: time for a re-assessment[J]. Cardiovasc Res, 2021, 117(11): 2326-2339.
[7] SHI J, YANG Y, CHENG A Y, et al. Metabolism of vascular smooth muscle cells in vascular diseases [J].

- Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2020, 319(3): H613-H631.
- [8] BENNETT M R, SINHA S, OWENS G K. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis [J]. Circ Res, 2016, 118(4): 692-702.
- [9] YAP C, MIEREMET A, DE VRIES C J M, et al. Si shades of vascular smooth muscle cells illuminated by KLF4 (Krüppel-like factor 4) [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2021, 41(11): 2693-2707.
- [10] ESMAEALZADEH D, MOODI GHALIBAF A, SHARIATI RAD M, et al. Pharmacological effects of safranal: an updated review [J]. Iran J Basic Med Sci, 2023, 26(10): 1131-1143.
- [11] MALEKZADEH S, HEIDARI M R, RAZAVI B M, et al. Effect of safranal, a constituent of saffron, on olanzapine (an atypical antipsychotic) induced metabolic disorders in rat [J]. Iran J Basic Med Sci, 2019, 22(12): 1476-1482.
- [12] SUN Y Y, XU H J, XU X Y, et al. A novel method to obtain rat aortic media for primary culture of rat aortic smooth muscle cells [J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2021, 57(7): 726-734.
- [13] SANAIE S, NIKANFAR S, KALEKHANE Z Y, et al. Saffron as a promising therapy for diabetes and Alzheimer's disease: mechanistic insights [J]. Metab Brain Dis, 2023, 38(1): 137-162.
- [14] MOHAMMADI Y, REZAEI FARIMANI A, BEYDOKHTI H, et al. Comparison of the effect of saffron, crocin, and safranal on serum levels of oxidants and antioxidants in diabetic rats; a systematic review and meta-analysis of animal studies [J]. Food Sci Nutr, 2023, 11(6): 2429-2439.
- [15] DÜZ M, FIDAN A F. Effects of safranal on tissue oxidative stress in sub-chronic thinner-addicted rats [J]. J Hellenic Vet Med Soc, 2020, 71(1): 1997.
- [16] NANDA S J, MADAN K. The role of Safranal and saffron stigma extracts in oxidative stress, diseases and photoaging: a systematic review [J]. Heliyon, 2021, 7(2): e06117.
- [17] RAAFAT K, ABOUL-ELA M, EL-LAKANY A. Phytochemical and anti-neuropathic investigations of *Crocus sativus* via alleviating inflammation, oxidative stress and pancreatic beta-cells regeneration [J]. Chin Herb Med, 2020, 12(1): 47-55.
- [18] LIU Y X, YUAN P Z, WU J H, et al. Lipid accumulation and novel insight into vascular smooth muscle cells in atherosclerosis [J]. J Mol Med (Berl), 2021, 99(11): 1511-1526.
- [19] CERDÁ -BERNAD D, VALERO-CASES E, PASTOR J J, et al. Saffron bioactives crocin, crocetin and safranal; effect on oxidative stress and mechanisms of action [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2022, 62(12): 3232-3249.
- [20] LI X, XIE J, FAN H, et al. Stigma and petals of crocus sativus L. review and comparison of phytochemistry and pharmacology [J]. Arab J Chem, 2023, 16(8): 104918.