

3-芳基香豆素衍生物抑制血管钙化的机制

李雨霏^{1,2}, 初海平¹, 李妍¹, 王晓静¹, 牟艳玲^{1*}, 孙捷^{1**}

(¹山东第一医科大学(山东省医学科学院)药学与制药科学学院, 济南 250014; ²山东第一医科大学第一附属医院(山东省千佛山医院)麻醉与围术期医学科, 济南 250014)

摘要 为揭示3-芳基香豆素衍生物3-(4'-羟基苯基)-6-羟基香豆素(SJ-6)对抗血管钙化的作用机制,采用晚期糖基化终产物(AGEs)对人体主动脉血管平滑肌细胞(HCASMCs)进行钙化诱导并通过茜素红染色及定量进行钙化鉴定。分别检测了化合物SJ-6对碱性磷酸酶(ALP)活力、细胞增殖率、钙含量、总活性氧(ROS)、超氧化物歧化酶(SOD)、AGEs、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)、白细胞介素 β (IL- β)、成骨相关转录因子2 mRNA(Runx2 mRNA)、晚期糖基化终产物受体(RAGE)、核因子 κ B(NF- κ B)、NADPH氧化酶-1(NOX-1)、蛋白激酶C(PKC)、蛋白激酶B(AKT)、p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)、 α -平滑肌肌动蛋白(SMA- α)蛋白表达的影响。根据研究结果发现化合物SJ-6可明显降低钙化细胞模型中AGEs含量、ALP活性、细胞内钙离子含量、ROS含量、Runx2 mRNA以及炎症因子TNF- α 、IL-6和IL- β 的含量($P < 0.05$),并升高SOD的含量($P < 0.01$),这些作用与阳性对照药氨基胍盐酸盐(AGH)相似。进一步对化合物SJ-6进行深入的药理机制研究,发现化合物SJ-6能够明显抑制钙化细胞模型中关键信号蛋白RAGE、NF- κ B、NOX-1、PKC、Akt、p-p38等蛋白的表达($P < 0.01$),并增加平滑肌肌动蛋白SMA- α 的表达($P < 0.01$),通过抑制氧化应激和AGEs/RAGE、Akt/PKC及NF- κ B信号通路的表达抑制血管钙化,提示化合物SJ-6有望成为治疗血管钙化的新型药物。

关键词 3-芳基香豆素衍生物;血管钙化;晚期糖基化终产物

中图分类号 R966 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2022)02-0222-10

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20220213

引用本文 李雨霏,初海平,李妍,等.3-芳基香豆素衍生物抑制血管钙化的机制[J].中国药科大学学报,2022,53(2):222-231.

Cite this article as: LI Yufei, CHU Haiping, LI Yan, et al. Mechanism of 3-aryl coumarin derivatives inhibiting vascular calcification [J]. J China Pharm Univ, 2022, 53(2): 222 - 231.

Mechanism of 3-aryl coumarin derivatives inhibiting vascular calcification

LI Yufei^{1,2}, CHU Haiping¹, LI Yan¹, WANG Xiaojing¹, MU Yanling^{1*}, SUN Jie^{1**}

¹Institute of Materia Medica, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250014;

²Department of Anesthesiology and Perioperative Medicine, The First Affiliated Hospital of Shandong First Medical University & Shandong Provincial Qianfoshan Hospital, Shandong University, Jinan 250014, China

Abstract To reveal the pharmacological mechanism of 3-aryl coumarin derivative 3-(4'-hydroxyphenyl)-6-hydroxycoumarin (SJ-6) against vascular calcification, advanced glycation end products (AGEs) were used to induce the calcification of human aortic vascular smooth muscle cells (HCASMCs), and calcification was identified by alizarin red staining and quantification. The effects of SJ-6 on alkaline phosphatase (ALP) activity, cell proliferation rate, calcium content, and total reactive oxygen species (ROS), superoxide dismutase (SOD), AGEs, and tetra methylethylene diamine proteinase factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin- β (IL- β), runt-related transcription factor 2 mRNA (Runx2 mRNA), the receptor of advanced glycation endproducts (RAGE), nuclear factor kappa-B (NF- κ B), napdh oxidase-1 (NoX-1), protein kinase C (PKC), protein kinase b (AKT), p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK), and smooth muscle actin- α (SMA- α) protein

收稿日期 2021-02-01 通信作者 *Tel: 18678839180 E-mail: muyanling@sdfmu.edu.cn

**Tel: 18754109979 E-mail: 635775299@qq.com

基金项目 山东省自然科学基金资助项目(No. ZR2020KH020)

expression were determined. According to our results, **SJ-6** significantly decreased AGEs content, ALP activity, intracellular calcium content, ROS content, Runx2 mRNA and inflammatory factors TNF- α , IL-6 and IL- β ($P < 0.05$) and increased SOD content ($P < 0.01$), with similar to those of the positive control drug aminoguanidine hydrochloride (AGH). Therefore, we investigated the pharmacological mechanism of compound **SJ-6**, which was found to significantly inhibit the expression of RAGE, NF- κ B, NoX-1, PKC, Akt, p-p38 and other essential signaling proteins in the calcified cell model ($P < 0.01$) and increases the expression of smooth actin SMA- α ($P < 0.01$). **SJ-6** inhibits vascular calcification by inhibiting oxidative stress and the expression of AGEs/RAGE, Akt/PKC and NF- κ B signaling pathways, suggesting that it may be a novel drug for the treatment of vascular calcification.

Key words 3-aryl coumarin derivatives; vascular calcification; advanced glycation end products

This study was supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province (No. ZR2020KH020)

血管钙化是一种类似于骨形成的过程,具有高度可调节性和主动性^[1],其发生与高血糖、氧化应激、炎症反应等各种刺激因素下导致的血管平滑肌细胞向成骨样细胞表型转换的过程有关^[2-4],糖尿病患者中广泛存在血管钙化现象^[5-6]。目前常用的他汀类药物和二甲双胍等^[7-9]可以通过减少与钙化相关的氧化应激反应和阻断炎症反应的信号分子及通路来减少机体的血糖和血脂,从而延缓血管钙化的进展^[10-12]。

近年来,越来越多的研究表明,与单一靶点药物相比,多靶点的天然药物在心血管的保护中具有不可替代的优势,尤其是香豆素类化合物具有良好的 AGEs 生成抑制活性,异黄酮类化合物具有良好的抗氧化、抗炎活性,近年来备受关注^[13-15]。若能设计一类药物同时兼具两类化合物的优点,将会在血管保护领域迈出重要一步。前期本课题组利用李药的设计原理,将具有相关活性的香豆素与异黄酮类化合物重叠结合,设计了 500 多个芳基香豆素类化合物,通过体外筛选发现其中基于伞形花内酯、大豆异黄酮设计的 3-(4'-羟基苯基)-6-羟基香豆素($C_{15}H_{10}O_4$, 代号 **SJ-6**, 相对分子质量 225.5)具有较好的体外降糖、清除氧自由基、抑制晚期糖基化终产物(AGEs)生成活性,本研究进一步对化合物 **SJ-6** 的作用靶点及相关的药理活性开展研究^[16-17],化合物 **SJ-6** 的合成路线见图 1。

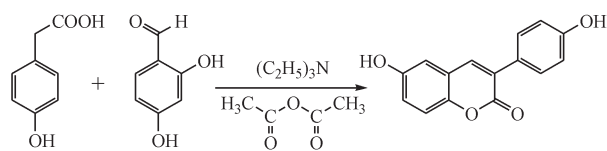


Figure 1 Synthetic route of compound **SJ-6**

1 材料

1.1 药品与试剂

SJ-6(纯度:99.07%)由山东第一医科大学药学与制药科学学院孙捷课题组提供。0.2% 茜素红 S 染液、MTT、超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒、总 RNA 提取试剂盒、40% 多聚甲醛(北京 Solarbio 公司);胎牛血清、DMEM 培养基、(美国 Gibco 公司);十六烷基氯化吡啶(美国 Sigma 公司);碱性磷酸酶活力检测试剂盒(上海 Beyotime 公司);WB-KLS0100(美国 Millipore 公司);钙离子检测试剂盒(北京 Leagene 公司);p-p38 抗体、t-p38 抗体、PKC 抗体、NF- κ B 抗体(上海 Cell Signaling Technology 公司);Akt 抗体、RAGE 抗体(美国 Immunoway 公司);NOX-1 抗体、 β -actin 抗体、辣根标记山羊抗小鼠 gG(H+L)(美国 Proteintech 公司);辣根标记山羊抗兔 IgG(H+L)(北京 Zsbio 公司);IL- β 酶联免疫试剂盒、IL-6 酶联免疫试剂盒、TNF- α 酶联免疫试剂盒、AGEs 酶联免疫试剂盒(上海朗顿生物科技有限公司);总蛋白提取试剂盒(上海 Bestbio 公司);Real Time q-PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司);其他试剂均为市售分析纯;引物委托 Biosune 生物技术公司设计合成引物序列(基因:RUNX2;序列:5'-TCTC-CAACCCACGAATGCAC-3', 5'-ATACCGAGGGA-CATGCCTGA-3';引物长度:76 bp)。

1.2 仪器

3111 型 CO₂ 培养箱、Evolution 220 紫外分光光度计(美国 Thermo 公司);Eclipse TE 2000-S 荧光显微镜(日本 Nikon 公司);Infinite M200 PRO 型酶标仪(法国 Tecan 公司);CFX96 TOUCH 荧光定量 PCR 仪、Trans-Blot SD 半干转印系统(美国 Bio-Rad

公司); Azure cSeries 200 型化学发光成像仪(美国 Azure Biosystems 公司)。

1.3 细胞

人主动脉血管平滑肌细胞(HCASMCs)由山东第一医科大学药学与制药科学学院药理室提供。使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养, 隔天更换培养液, 37 °C、5% CO₂ 孵育。

2 方法

2.1 人主动脉血管平滑肌细胞钙化诱导

取生长状态良好的第 2~5 代 HCASMCs, 按照每皿 1×10^6 个的密度接种于 35 mm 培养皿中, 5% CO₂、37 °C 条件下培养至 80%~90% 细胞融合贴壁, 加入含 100 mg/L 晚期糖基化终产物-牛血清白蛋白(AGEs-BSA)的钙化诱导液进行培养, 隔天换液, 4 d 后对细胞进行茜素红染色并于显微镜下观察, 若视野中细胞出现密集钙化斑时, 视为造模成功。

2.2 茜素红染色实验

取生长状态良好的第 2~5 代 HCASMCs, 按照每皿 1×10^6 个的密度接种于 35 mm 培养皿中, 各组细胞诱导及药物干预 4 d, 隔天换液, 各组细胞培养完成后, 吸弃培养基并用磷酸缓冲盐溶液(PBS)冲洗 2 次, 4% 多聚甲醛固定 15 min, 去离子水洗涤 3 次, 加入 0.2% 茜素红 S 溶液(pH 8.3), 室温避光染色 30 min, 去离子水洗涤 5 次, 显微镜下观察钙结节染色情况并拍照。染色后进行茜素红定量, 每孔加入十六烷基氯化吡啶 200 μ L, 37 °C 孵育 1 h, 于 562 nm 波长处检测吸收度, 记录并分析数据。

2.3 ALP 酶活力测定

将细胞以每孔 5.0×10^4 个细胞的密度接种于 24 孔板, 参考并依据本课题组已进行的体外活性筛选的最佳浓度, 分别设置正常对照组(HCASMCs 正常培养)、溶媒对照组(HCASMCs + 0.5% DMSO)、钙化诱导组(HCASMCs + 100 mg/L AGEs-BSA)、阴性对照组(HCASMCs + 100 mg/L AGEs-BSA + 0.5% DMSO)、阳性对照氨基胍盐酸盐(AGH)组(HCASMCs + 100 mg/L AGEs-BSA + 0.5% DMSO + 5.7×10^{-2} mmol/L AGH)、SJ-6 处理组(HCASMCs + 100 mg/L AGEs-BSA + 0.5% DMSO + 0.025 mmol/L SJ-6)、SJ-6 处理组(HCASMCs + 100 mg/L AGEs-

BSA + 0.5% DMSO + 0.012 mmol/L SJ-6)、SJ-6 处理组(HCASMCs + 100 mg/L AGEs-BSA + 0.5% DMSO + 0.006 mmol/L SJ-6), 诱导及药物干预 4 d, 隔天换液, 各组细胞培养完成后, 按照碱性磷酸酶活力测定试剂盒说明进行裂解和加样, 测定各组在 405 nm 处的吸收度, 根据各组吸收度计算各组 ALP 活性。

2.4 细胞存活率实验

取生长状态良好的第 2~5 代 HCASMCs, 按照每皿 1×10^6 个的密度接种于 35 mm 培养皿中, 各组细胞诱导及药物干预 4 d, 隔天换液, 培养完成后, 用 0.25% 胰酶消化细胞, 以每孔 5.0×10^4 个细胞的密度接种于 96 孔板, 培养贴壁后, 将各组培养液更换为不含血清的 DMEM 培养液以使细胞同步化, 分组及处理同每组做 6 个孔, 重复 3 次。采用 MTT 法测定各组细胞增殖情况。每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 20 μ L, 37 °C 孵育 4 h。小心吸出培养液, 每孔加入 DMSO 150 μ L 溶解结晶, 振荡混匀后于波长 490 nm 下测定各孔吸收度。

2.5 AGEs 含量测定

取生长状态良好的第 2~5 代 HCASMCs, 按照每皿 1×10^6 个的密度接种于 35 mm 培养皿中, 各组细胞诱导及药物干预 4 d, 隔天换液, 各组细胞诱导完成后, 按照 ELISA 试剂盒说明进行操作, 向预先包被了抗体的酶标孔中加入样本, 再加入生物素标记的识别抗原, 在 37 °C 下孵育 30 min, 两者与固相抗体竞争结合形成免疫复合物, 经 PBS 洗涤后加入亲和素-HRP, 在 37 °C 下孵育 30 min, 亲和素-HRP 与生物素抗原相结合, 洗涤后加入反应终止液, 于波长 450 nm 下检测各孔吸收度。

2.6 细胞内钙离子浓度测定

取生长状态良好的第 2~5 代 HCASMCs, 按照每皿 1×10^6 个的密度接种于 35 mm 培养皿中, 各组细胞诱导及药物干预 4 d, 隔天换液, 各组细胞培养完成后, 取适当细胞进行匀浆, 低速离心取上清液, 邻甲酚酞络合铜法测定各组细胞钙含量。

2.7 细胞内总活性氧含量测定

取生长状态良好的第 2~5 代 HCASMCs, 按照每皿 1×10^6 个的密度接种于 35 mm 培养皿中, 各组细胞诱导及药物干预 4 d, 隔天换液, 各组细胞培养完成后, 采用活性氧检测试剂盒检测细胞内总活性氧(ROS)含量, 去除培养液, 用 PBS 溶液洗细

胞后加入荧光染料 DCFH-DA, 孵育 20 min, 然后用 PBS 清洗细胞, 荧光显微镜下进行拍摄。使用 IPP5.0 进行荧光面积分析。

2.8 超氧化物歧化酶含量测定

取生长状态良好的第 2~5 代 HCASMCs, 按照每皿 1×10^6 个的密度接种于 35 mm 培养皿中, 各组细胞诱导及药物干预 4 d, 隔天换液, 各组细胞培养完成后, 收集细胞至离心管, 超声破碎并离心, 按照超氧化物歧化酶(SOD)活性测定试剂盒(黄嘌呤氧化酶法)检测各组细胞 SOD 的含量。

2.9 炎症因子表达量测定

取生长状态良好的第 2~5 代 HCASMCs, 按照每皿 1×10^6 个的密度接种于 35 mm 培养皿中, 各组细胞诱导及药物干预 4 d, 隔天换液, 各组细胞诱导完成后, 按照 ELISA 试剂盒说明进行操作, 向预先包被了抗体的酶标孔中加入样本, 再加入生物素标记的识别抗原, 在 37 °C 下孵育 30 min, 两者与固相抗体竞争结合形成免疫复合物, 经 PBS 洗涤后加入亲和素-HRP, 在 37 °C 下孵育 30 min, 亲和素-HRP 与生物素抗原相结合, 洗涤后加入反应终止液, 于波长 450 nm 下检测各孔吸光度。

2.10 Runx2 mRNA 的表达量测定

取生长状态良好的第 2~5 代 HCASMCs, 按照每皿 1×10^6 个的密度接种于 35 mm 培养皿中, 各组细胞诱导及药物干预 4 d, 隔天换液, 各组细胞诱导完成后, 提取各组细胞总 mRNA, 逆转录为互补脱氧核糖核酸(cDNA), 并以 cDNA 为模板行实时荧光定量 PCR。反应步骤: 预热: 95 °C (30 s), 1 个循环; 扩增: 95 °C (10 s), 60 °C (20 s), 40 个循环; 熔解: 95 °C (15 s), 60 °C (60 s), 95 °C (60 s), 1 个循环; 冷却: 40 °C (60 s) 1 个循环。以 GAPDH 作为内参, 计算各组别成骨相关转录因子 2 mRNA (Runx2 mRNA) 表达的倍比关系即为各组别 Runx2 mRNA 相对表达量。

2.11 RAGE、NF- κ B、NOX-1、PKC、Akt、p38、SMA- α 蛋白表达量测定

取生长状态良好的第 2~5 代 HCASMCs, 按照每皿 1×10^6 个的密度接种于 35 mm 培养皿中, 各组细胞诱导及药物干预 4 d, 隔天换液, 各组细胞诱导完成后, 用预冷的 PBS 冲洗 2 遍, 参照总蛋白提取试剂盒的操作说明, 刮取细胞并提取总蛋白, 取上清液后采用 BCA 法进行蛋白定量。取蛋白 20 μ g 进行

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜, 封闭, 加入兔抗人晚期糖基化终产物受体(RAGE)抗体(1:1 000)、兔抗人蛋白激酶 C(PKC)抗体(1:1 000)、兔抗人核因子 κ B(NF- κ B)抗体(1:1 000)、兔抗人蛋白激酶 B(AKT)抗体(1:1 000)、兔抗人 NADPH 氧化酶-1(NADPH oxidase-1, NOX-1)抗体(1:1 000)、兔抗人 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)抗体(1:1 000)、兔抗人 α -平滑肌肌动蛋白(SMA- α)抗体(1:1 000) 4 °C 孵育过夜, 加入二抗 Ig G(1:10 000), 室温孵育 1 h, ECL 试剂盒显影, 以 β -actin 为内参进行数据标准化, 以对照组为参照样本, 计算各组目的蛋白的相对表达水平。

2.12 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件对数据进行分析, 所有的数据结果均按照平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用方差分析及 *t* 检验进行组间差异的比较。采用独立样本 *t* 检验比较两组指标的组间差异; 采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)比较各项指标的组间差异, 用 $P < 0.05$ 来表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 不同浓度 SJ-6 对细胞存活率的影响

MTT 测定的结果表明, AGEs 和化合物 SJ-6 均对细胞存活没有显著影响($P > 0.05$)(图 2)。这些结果表明该化合物对细胞无毒。

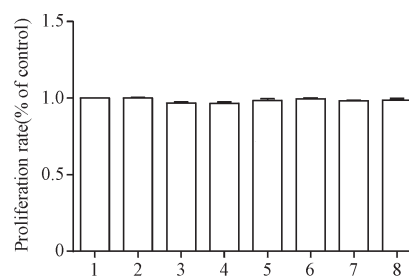


Figure 2 Effects of different concentrations of compound SJ-6 on cell viability ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

1: Normal; 2: DMSO; 3: AGEs; 4: AGEs+DMSO; 5: AGH; 6: 0.025 mmol/L SJ-6; 7: 0.012 mmol/L SJ-6; 8: 0.006 mmol/L SJ-6
AGEs: Advanced glycation end products; AGH: Aminoguanidine hydrochloride

3.2 茜素红染色的平滑肌细胞钙化结节

AGEs 能促进血管平滑肌细胞的钙化^[18]。根据显微镜拍摄的照片和茜素红的定量结果, 与对

照组相比,AGEs组与AGEs+DMSO组细胞内及细胞外钙结节数量明显增多。相比于AGEs组与AGEs+DMSO组,不同浓度化合物SJ-6处理组,随化

合物浓度增加,钙结节数量及区域面积逐渐减少,呈浓度依赖性(图3)。

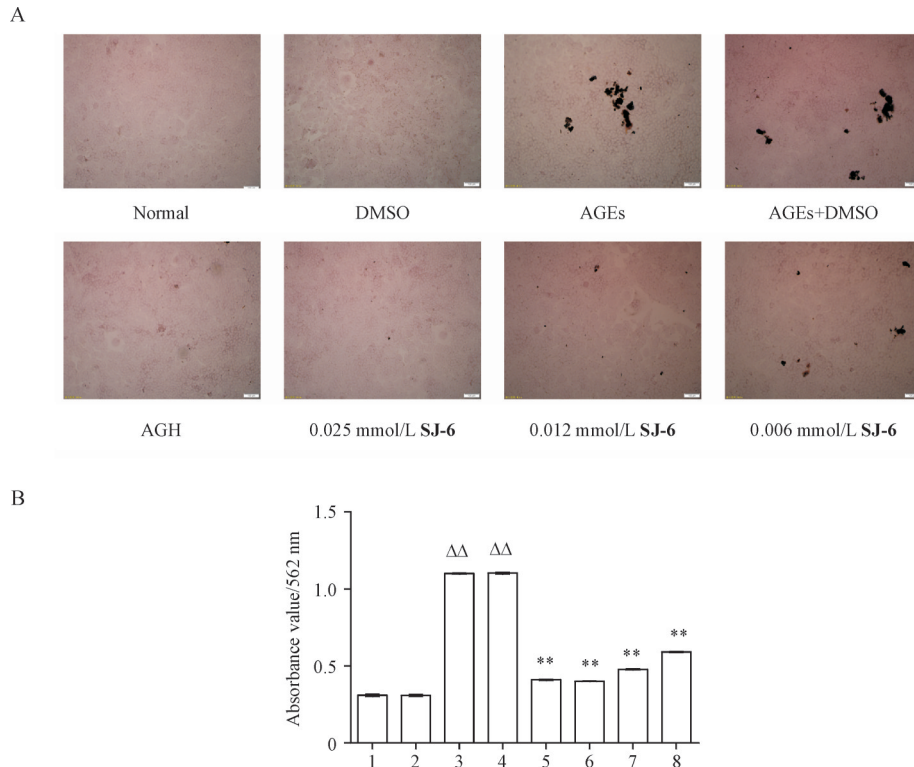


Figure 3 Calcified nodules of smooth muscle cells stained with alizarin red

1: Normal; 2: DMSO; 3: AGEs; 4: AGEs+DMSO; 5: AGH; 6: 0.025 mmol/L SJ-6; 7: 0.012 mmol/L SJ-6; 8: 0.006 mmol/L SJ-6

A: Alizarin red stained calcium nodules under microscope(100 μm); B: Alizarin red staining quantitative results ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

^{ΔΔ} $P < 0.01$ vs normal group; ^{**} $P < 0.01$ vs AGEs group

3.3 化合物SJ-6对平滑肌细胞ALP活力的影响

研究表明,ALP与主动脉钙化密切相关^[19-20],是评估血管钙化和骨质疏松症的可靠指标。通过测量各个组别中的ALP活性,发现各个浓度梯度的SJ-6均可显著抑制钙化的血管平滑肌细胞中的ALP的增加($P < 0.01$)(表1),推测化合物SJ-6对主动脉钙化可能具有良好的抑制作用。

3.4 不同浓度SJ-6对AGEs含量的影响

与对照组相比,AGEs组的细胞内AGEs含量显著增加($P < 0.01$)(图4)。随着浓度的增加,化合物SJ-6逐渐降低细胞中的AGEs($P < 0.01$)。推测这些化合物可能能够直接裂解AGEs或加速AGEs的自然分解。

3.5 不同浓度SJ-6对细胞内钙含量的影响

相比对照组,AGEs组细胞内钙含量明显增加($P < 0.01$),说明AGEs可以诱导HCASMCs钙化。

Table 1 Effects of compound SJ-6 on alkaline phosphatase (ALP) activity ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Group	ALP activity/(U/mg)
Normal	0.117 ± 0.003
DMSO	0.116 ± 0.003
AGEs	0.245 ± 0.003 ^{ΔΔ}
AGEs +DMSO	0.241 ± 0.002 ^{ΔΔ}
AGH	0.183 ± 0.003 ^{**}
0.025 mmol/L SJ-6	0.180 ± 0.004 ^{**}
0.012 mmol/L SJ-6	0.187 ± 0.005 ^{**}
0.006 mmol/L SJ-6	0.208 ± 0.003 ^{**}

^{ΔΔ} $P < 0.01$ vs normal group; ^{**} $P < 0.01$ vs AGEs group

与AGEs组相比,不同浓度的SJ-6干预组细胞内钙含量明显降低($P < 0.01$),在不同浓度组之间,随着化合物的浓度增加,细胞内钙含量逐渐下降,说明化合物SJ-6可以抑制AGEs诱导的HCASMCs钙化,且细胞内钙含量减少与化合物

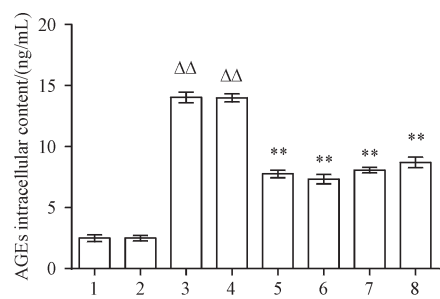


Figure 4 Effects of different concentrations of compound **SJ-6** on AGEs content ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
1: Normal; 2: DMSO; 3: AGEs; 4: AGEs+DMSO; 5: AGH; 6: 0.025 mmol/L **SJ-6**; 7: 0.012 mmol/L **SJ-6**; 8: 0.006 mmol/L **SJ-6**
 $\Delta\Delta P < 0.01$ vs normal group; ** $P < 0.01$ vs AGEs group

SJ-6呈浓度依赖性(图5)。研究证明胞内钙含量以及ALP活性均与HCASMCs钙化呈正相关,因此再次间接证明化合物**SJ-6**可抑制AGEs诱导的血管钙化。

3.6 不同浓度**SJ-6**对各组细胞ROS荧光强度表达的影响

氧化应激可以诱发心血管疾病^[21-22]。与对照

组相比,AGEs组细胞绿色荧光面积明显增大($P < 0.01$),且荧光强度更加聚集。与AGEs组对比,加入不同浓度化合物**SJ-6**组绿色荧光面积明显减少($P < 0.01$),且随浓度增加而面积逐渐减少,说明AGEs可诱导HCASMCs发生氧化应激反应,但化合物**SJ-6**抑制这一效应,对HCASMCs起到保护作用(图6)。

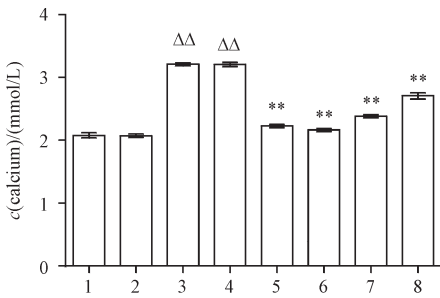


Figure 5 Effects of different concentrations of **SJ-6** on intracellular calcium content ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
1: Normal; 2: DMSO; 3: AGEs; 4: AGEs+DMSO; 5: AGH; 6: 0.025 mmol/L **SJ-6**; 7: 0.012 mmol/L **SJ-6**; 8: 0.006 mmol/L **SJ-6**
 $\Delta\Delta P < 0.01$ vs normal group; ** $P < 0.01$ vs AGEs group

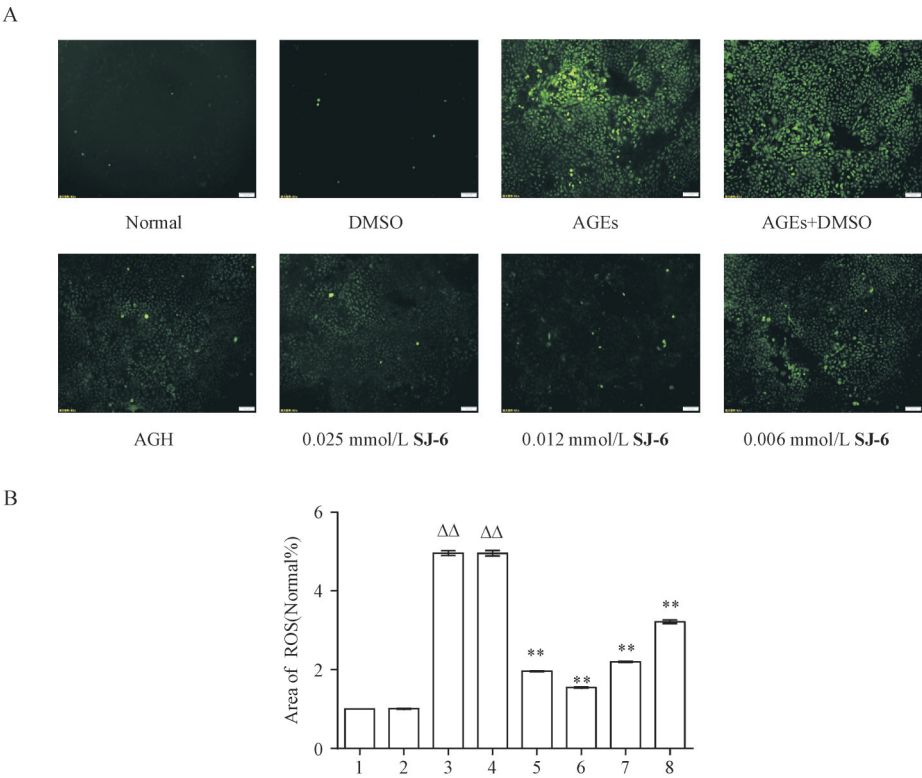


Figure 6 Effects of compound **SJ-6** on ROS. The induction of AGEs increases the ROS content in vascular smooth muscle cells, and each compound group can reduce the ROS content
A: Effects of different concentrations of **SJ-6** on ROS fluorescence intensity of each group (100 μm); B: Quantitative results of ROS fluorescence intensity of cells in each group with different concentrations of **SJ-6** ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
1: Normal; 2: DMSO; 3: AGEs; 4: AGEs+DMSO; 5: AGH; 6: 0.025 mmol/L **SJ-6**; 7: 0.012 mmol/L **SJ-6**; 8: 0.006 mmol/L **SJ-6**
 $\Delta\Delta P < 0.01$ vs normal group; ** $P < 0.01$ vs AGEs group

3.7 不同浓度SJ-6对SOD表达量的影响

与对照组相比, AGEs组细胞的抗氧化指标SOD的活性显著降低($P < 0.01$)。相比AGEs组不同浓度化合物SJ-6干扰组细胞内SOD的活性明显升高($P < 0.01$), 且不同浓度组之间, SOD的活性随化合物浓度增加而逐渐升高, 说明化合物SJ-6可以增强细胞的抗氧化能力, 且抗氧化能力的增强与化合物SJ-6呈浓度依赖性(图7)。

3.8 不同浓度SJ-6对炎症因子TNF- α 、IL-6、IL- β 表达的影响

与对照组相比, AGEs组细胞的炎症细胞因子TNF- α 、IL-6和IL- β 显著增加($P < 0.01$), 表明AGEs可以诱导HCASMCs发生炎症反应。相比AGEs组不同浓度SJ-6干扰组细胞内炎症因子TNF- α 、IL-6、IL- β 的表达明显降低($P < 0.01$), 且

不同浓度组之间, 炎症因子表达量随化合物浓度增加而逐渐下降, 说明化合物SJ-6可以抑制AGEs诱导的HCASMCs的炎症反应, 且炎症因子表达量的减少与化合物SJ-6呈浓度依赖性(图8)。

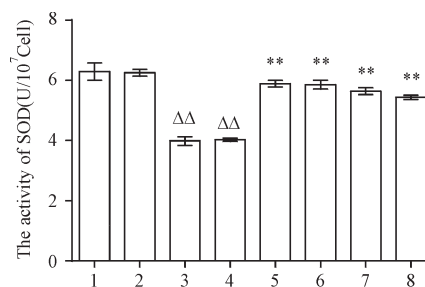


Figure 7 Effect of different concentrations of compound SJ-6 on SOD expression ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

1: Normal; 2: DMSO; 3: AGEs; 4: AGEs+DMSO; 5: AGH; 6: 0.025 mmol/L SJ-6; 7: 0.012 mmol/L SJ-6; 8: 0.006 mmol/L SJ-6

ΔΔ $P < 0.01$ vs normal control group; ** $P < 0.01$ vs AGEs group

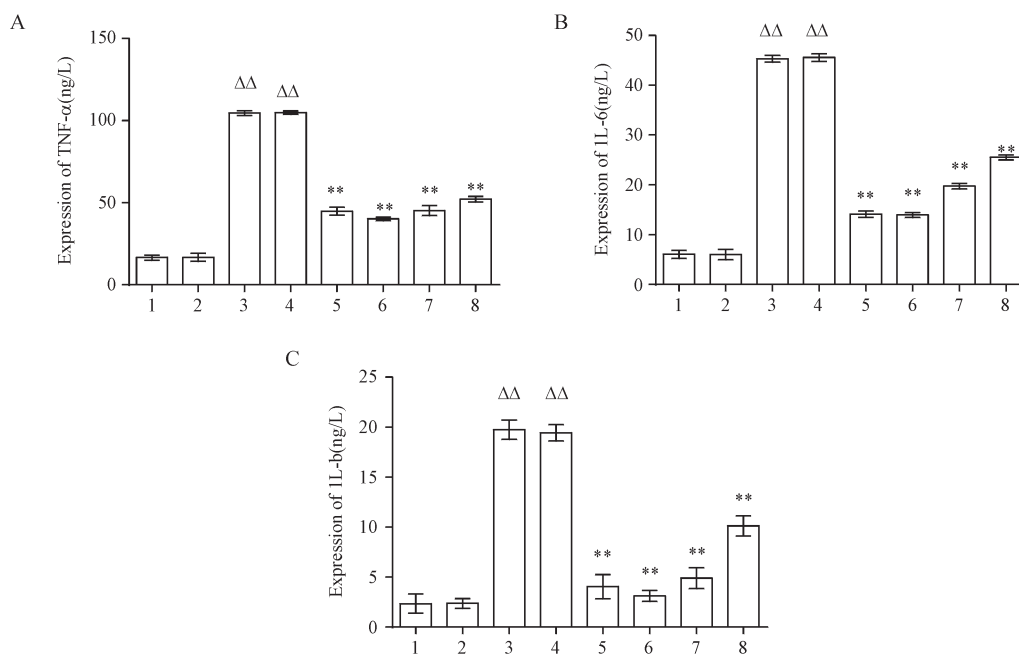


Figure 8 Influence of different concentrations of compound SJ-6 on the expression of inflammatory factors TNF- α (A), IL-6(B), IL- β (C). The induction of AGEs increased the content of TNF- α , IL-6, IL- β ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

1: Normal; 2: DMSO; 3: AGEs; 4: AGEs+DMSO; 5: AGH; 6: 0.025 mmol/L SJ-6; 7: 0.012 mmol/L SJ-6; 8: 0.006 mmol/L SJ-6

ΔΔ $P < 0.01$ vs normal control group; ** $P < 0.01$ vs AGEs group

3.9 不同浓度SJ-6对Runx 2 mRNA表达量的影响

Runx2 mRNA是正常骨骼形成所必需的, AGEs显著增加了Runx2 mRNA($P < 0.01$), 表明AGEs可以诱导HCASMCs的成骨转化。与AGEs组相比, 化合物SJ-6的浓度升高时, 细胞中Runx2 mRNA的表达逐渐降低($P < 0.01$), 提示化合物

SJ-6可以抑制AGEs诱导的HCASMCs的成骨转化且Runx 2 mRNA表达量的减少与化合物SJ-6呈浓度依赖性(图9)。

3.10 不同浓度SJ-6对AGEs诱导的RAGE, SMA- α , NF- κ B, p38, Akt, PKC, NOX-1蛋白表达的影响

与对照组相比, AGEs组RAGE, NF- κ B, p-p38, Akt, PKC, NOX-1蛋白达量明显增高($P <$

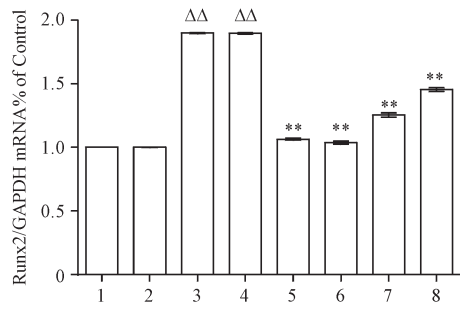


Figure 9 Effect of different concentrations of compound **SJ-6** on the expression of Runx2 mRNA ($\bar{x} \pm s, n = 3$). The induction of AGEs increased the Runx2 mRNA content of the osteogenic transcription factor in vascular smooth muscle cells, and each compound group could reduce the Runx2 mRNA content

1: Normal; 2: DMSO; 3: AGEs; 4: AGEs+DMSO; 5: AGH; 6: 0.025 mmol/L **SJ-6**; 7: 0.012 mmol/L **SJ-6**; 8: 0.006 mmol/L **SJ-6**

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs normal control group; $**P < 0.01$ vs AGEs group

0.01),平滑肌动蛋白SMA- α 的蛋白表达量明显降低($P < 0.01$),与AGEs组相比,化合物**SJ-6**处理组中RAGE, NF- κ B, p-p38, Akt, PKC, NOX-1蛋白达量表达量明显降低($P < 0.01$),SMA- α 的蛋白表达量明显增多($P < 0.01$),且表达量随化合物浓度增加而逐渐降低,说明化合物**SJ-6**可以抑制AGEs诱导的HCASMCs向成骨细胞分化的相关通路,且这种抑制具有浓度依赖性(图10)。

4 讨论

血管钙化是糖尿病、动脉粥样硬化、高血压、慢性肾脏病等多种疾病的共同病理表现,而目前

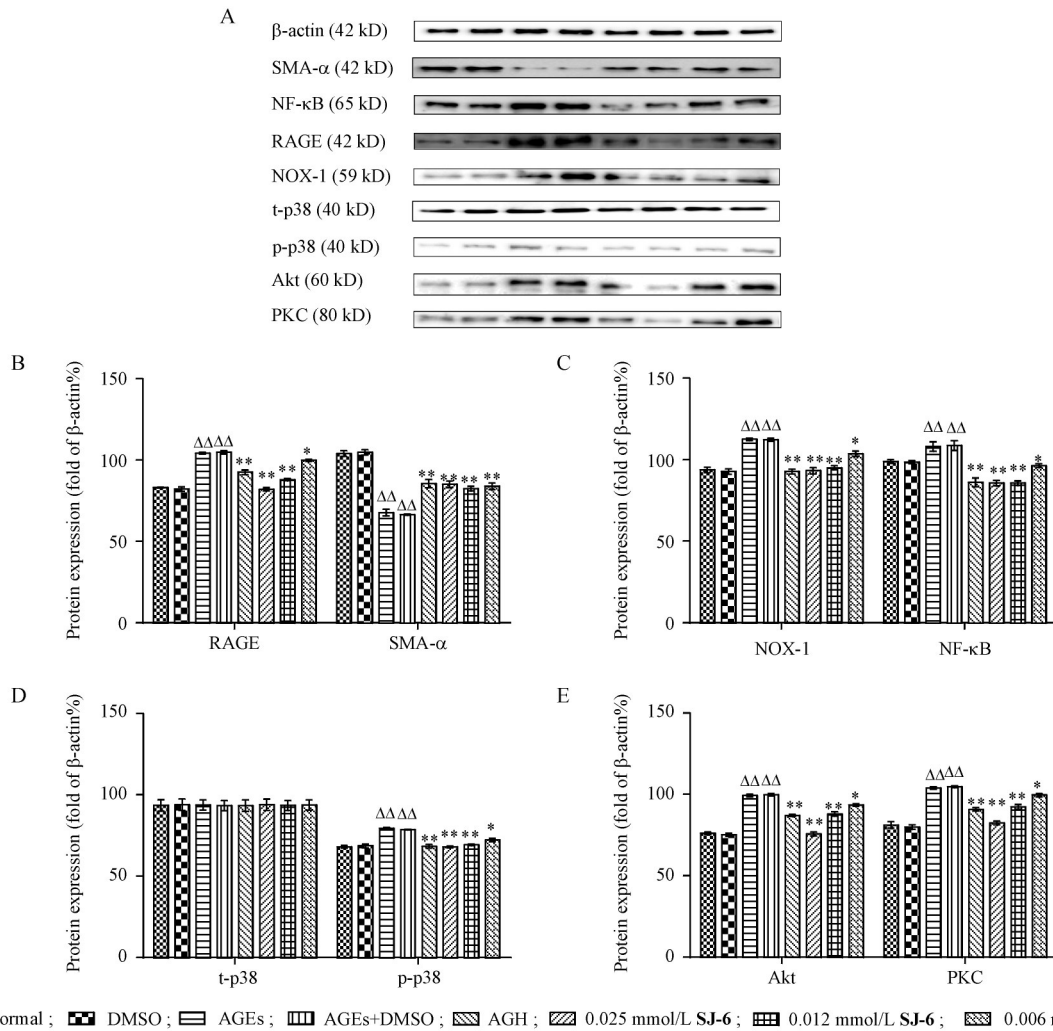


Figure 10 Effects of compound **SJ-6** at different concentrations on RAGE, SMA- α , NF- κ B, p38, Akt, PKC, NOX-1 protein expression induced by AGEs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A: Protein expression trends of RAGE, SMA- α , NF- κ B, p38, Akt, PKC, NOX-1 at different concentrations of **SJ-6** were detected by western blot; B: Gray analysis of the relative gray value of RAGE and SMA- α protein bands; C: Gray analysis of the relative gray value of NOX-1 and NF- κ B protein bands; D: Gray analysis of the relative gray value of p-p38 and t-p38 protein bands; E: Gray analysis of the relative gray value of Akt and PKC protein bands

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs normal group; $**P < 0.01$ vs AGEs group

血管钙化的发病机制尚不十分清楚^[23]。目前尚无直接逆转血管钙化的手段,但多种干预措施可用于减慢或延缓血管钙化的进展,例如控制高血糖等传统危险因素、阻断AGEs生成、抑制AGEs/RAGE的相互作用、降低氧化应激等,但这些干预措施存在作用靶点单一、副作用大、治疗效果差等缺点,所以治疗血管钙化仍是目前研究的难点和热点。本研究首次发现多靶点化合物SJ-6能直接对抗钙化对平滑肌细胞的损害,这对于血管钙化发病机制的深入理解和防治靶点的开发具有重要意义。

化合物SJ-6在不影响细胞的正常增殖的情况下呈剂量依赖性地降低血管平滑肌细胞的钙化程度,包括促进AGEs的裂解、降低胞内的钙离子浓度、减弱ALP酶活力、抑制成骨相关转录因子以及相关信号蛋白的表达并增强平滑肌动蛋白的表达,同时伴随着氧化应激以及部分炎症反应的减弱和抗氧化能力的增强。因此推测化合物SJ-6对于钙化的保护作用机制可能与其抗氧化特性以及对AGEs/RAGE通路的抑制有关。

化合物SJ-6降低了ROS、OX-1、NF- κ B、p38、Akt、PKC蛋白和炎症因子TNF- α 、IL-6、IL- β 的总量,同时增加了细胞内SOD的含量,推测该化合物可抑制氧化应激过程,从而抑制NF- κ B和PKC信号通路并减少 β 细胞的炎症反应,最终减轻钙化过程。

AGEs的刺激增加了RAGE的表达,并且AGEs/RAGE途径与血管钙化密切相关^[24-26]。随着化合物SJ-6浓度的增加,AGEs和RAGE的表达均受到明显抑制,推测化合物SJ-6可能促进AGEs的裂解,进而下调RAGE受体的表达并抑制下游信号通路和多种信号转导蛋白,包括NF- κ B, p38, Akt, PKC, ROS, NOX-1等,抑制了Runx2 mRNA的表达并刺激SMA- α 的表达,最终减少AGEs诱导的HCASMCs向成骨细胞的分化。

氨基胍同样能够缓解钙化对平滑肌细胞的损害,氨基胍的保护作用与0.012 mmol/L的化合物SJ-6的保护作用相似,而0.025 mmol/L的化合物SJ-6的延缓钙化效果更好。化合物SJ-6对于更多其他相关的信号通路蛋白表达的影响以及其是否可以有效抑制实验动物的血管钙化,有待进一步探索。总之,3-芳基香豆素衍生物SJ-6的抑制血

管钙化作用使其成为潜在的候选药物,并有望开发成为治疗血管钙化的新药。

References

- [1] Zhang XC, Chen JQ, Wang SX. Serum amyloid A induces a vascular smooth muscle cell phenotype switch through the p38 MAPK signaling pathway [J]. *Biomed Res Int*, 2017, **2017**: 4941379.
- [2] Mazzone A, Clemente A, Sbrana S, *et al*. Statins association with calcification in coronary plaque and heart valves: a possible different clinical significance: montignoso HEart and Lung Project (MHELP) study preliminary data in primary cardiovascular prevention [J]. *Eur J Prev Cardiol*, 2020, **28**(8): e15-e17.
- [3] Lei Y, Sinha A, Nosoudi N, *et al*. Hydroxyapatite and calcified elastin induce osteoblast-like differentiation in rat aortic smooth muscle cells [J]. *Exp Cell Res*, 2014, **323**(1): 198-208.
- [4] Lacolley P, Regnault V, Segers P, *et al*. Vascular smooth muscle cells and arterial stiffening: relevance in development, aging, and disease [J]. *Physiol Rev*, 2017, **97**(4): 1555-1617.
- [5] Wang C, Tang Y, Wang YM, *et al*. Label-free quantitative proteomics identifies Smarca4 is involved in vascular calcification [J]. *Ren Fail*, 2019, **41**(1): 220-228.
- [6] Schalkwijk CG, Stehouwer CDA. Methylglyoxal, a highly reactive dicarbonyl compound, in diabetes, its vascular complications, and other age-related diseases [J]. *Physiol Rev*, 2020, **100**(1): 407-461.
- [7] Rifai MA, Blaha MJ, Patel J, *et al*. Coronary artery calcification, statin use and long-term risk of atherosclerotic cardiovascular disease events (from the multi-ethnic study of atherosclerosis) [J]. *Am J Cardiol*, 2020, **125**(6): 835-839.
- [8] Sun YY, Yu QG, Xie J. Investigating the changes in the levels of HbA1c, blood fat and insulin sensitivity in elder patients with type II diabetes mellitus due to combined medication of pioglitazone and melbine and single-use of pioglitazone [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2020, **66**(6): 21-28.
- [9] He Q, Liu J, Lan JS, *et al*. Coumarin-dithiocarbamate hybrids as novel multitarget AChE and MAO-B inhibitors against Alzheimer's disease: design, synthesis and biological evaluation [J]. *Bioorg Chem*, 2018, **81**: 512-528.
- [10] Potu BK, Bhat KMR, Rao MS, *et al*. Petroleum ether extract of *Cissus quadrangularis* (Linn.) enhances bone marrow mesenchymal stem cell proliferation and facilitates osteoblastogenesis [J]. *Clinics (Sao Paulo)*, 2009, **64**(10): 993-998.
- [11] Won KJ, Lee KP, Baek S, *et al*. Desalted *Salicornia europaea* extract attenuated vascular neointima formation by inhibiting the MAPK pathway-mediated migration and proliferation in vascular smooth muscle cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, **94**: 430-438.

- [12] Li WF, Zhi WB, Liu F, *et al.* Paeoniflorin inhibits VSMCs proliferation and migration by arresting cell cycle and activating HO-1 through MAPKs and NF- κ B pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, **54**: 103-111.
- [13] Lichota A, Gwozdziński L, Gwozdziński K. Therapeutic potential of natural compounds in inflammation and chronic venous insufficiency[J]. *Eur J Med Chem*, 2019, **176**: 68-91.
- [14] Wang T, Peng T, Wen XX, *et al.* Design, synthesis and evaluation of 3-substituted coumarin derivatives as anti-inflammatory agents[J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2020, **68**(5): 443-446.
- [15] Giordano E, Dávalos A, Crespo MC, *et al.* Soy isoflavones in nutritionally relevant amounts have varied nutrigenomic effects on adipose tissue[J]. *Molecules*, 2015, **20**(2): 2310-2322.
- [16] Wang B. Synthesis and preliminary bioactivity of 3- arylcoumarins(3-芳基香豆素类化合物的合成及初步生物活性)[D]. Ji'nan: University of Jinan, 2018.
- [17] Wang B, Li N, Liu T, *et al.* Synthesis and biological evaluation of novel neoflavonoid derivatives as potential antidiabetic agents[J]. *RSC Adv*, 2017, **7**(55): 34448-34460.
- [18] Panagiotopoulos S, O'Brien RC, Bucala R, *et al.* Aminoguanidine has an anti-atherogenic effect in the cholesterol-fed rabbit [J]. *Atherosclerosis*, 1998, **136**(1): 125-131.
- [19] Cartledge JJ, Eardley I, Morrison JF. Nitric oxide-mediated corpus cavernosal smooth muscle relaxation is impaired in ageing and diabetes[J]. *BJU Int*, 2001, **87**(4): 394-401.
- [20] Tang LR, Xu YE, Wei Y, *et al.* Uric acid induces the expression of TNF- α via the ROS-MAPK-NF- κ B signaling pathway in rat vascular smooth muscle cells[J]. *Mol Med Rep*, 2017, **16**(5): 6928-6933.
- [21] Shi L, Yu XM, Yang HL, *et al.* Advanced glycation end products induce human corneal epithelial cells apoptosis through generation of reactive oxygen species and activation of JNK and p38 MAPK pathways[J]. *PLoS One*, 2013, **8**(6): e66781.
- [22] Jain A, Anand-Srivastava MB. Natriuretic peptide receptor-C-mediated attenuation of vascular smooth muscle cell hypertrophy involves Gq α /PLC β 1 proteins and ROS-associated signaling[J]. *Pharmacol Res Perspect*, 2018, **6**(1): e00375.
- [23] Yang R, Zhu Y, Wang Y, *et al.* Recent progress in autophagy and vascular calcification[J]. *J China Pharm Univ (中国药科大学学报)*, 2018, **49**(4): 401-406.
- [24] Nakajima Y, Inagaki Y, Hiroshima Y, *et al.* Advanced glycation end-products enhance calcification in cultured rat dental pulp cells[J]. *J Endod*, 2013, **39**(7): 873-878.
- [25] Kay AM, Simpson CL, Stewart JA Jr. The role of AGE/RAGE signaling in diabetes-mediated vascular calcification [J]. *J Diabetes Res*, 2016, **2016**: 6809703.
- [26] Tanikawa T, Okada Y, Tanikawa R, *et al.* Advanced glycation end products induce calcification of vascular smooth muscle cells through RAGE/p38 MAPK[J]. *J Vasc Res*, 2009, **46**(6): 572-580.

· 征订启事 ·

欢迎订阅 2022 年《中国药科大学学报》

《中国药科大学学报》是由国家教育部主管、中国药科大学主办的药学中文核心期刊,主要刊登合成药物化学、天然药物化学、生药学、中药学、药剂学、药物分析、药代动力学、药物生物技术、药理学、药事管理等学科的原创新研究论著。

《中国药科大学学报》在药学界享有较高的学术声誉,目前已被国际上多家著名权威数据库(CA, IPA, SCOPUS, JST, IC, EMBASE/Excerpta Medica, CAS)等所收录,被国内权威数据库《中文核心期刊要目总览》(2020 年版)、中国科学引文核心数据库(CSCD 核心)、中国科技论文统计源数据库等列为药学类核心期刊,屡获原国家新闻出版总署、教育部、科技部等各种优秀期刊奖。

2008 年,《中国药科大学学报》被评为中国精品科技期刊,2006、2008、2010 年连续 3 次被教育部评为中国高校精品科技期刊。据中国科学技术信息研究所最新发布的《2017 年版中国科技期刊引证报告(核心版)》,《中国药科大学学报》2016 年度核心被引半衰期为 9.1,在 47 种药学核心期刊中排名第一。学术影响力极高,在高等院校、科研机构、制药企业、医院等单位拥有众多读者。

本刊为双月刊,128 页。国际标准开本,国内外公开发行。欢迎到当地邮局订阅,漏订者可直接与编辑部联系。

国内刊号:CN 32-1157/R

国内邮发代号:28-115

地址:南京市童家巷 24 号

电话:025-83271566

E-mail: xuebao@cpu.edu.cn

ISSN: 1000-5048

定价:40 元/期,全年 240 元

邮政编码:210009

传真:025-83271279

http://zgykdx.xb.cpu.edu.cn