

## 维生素 C 对内皮细胞和平滑肌细胞增殖的影响

郝 亚,白 雪,阮世超,庄青叶,陈 岑

(浙江理工大学生命科学学院,杭州 310018)

**摘 要:** 药物洗脱支架(Drug-eluting stent, DES)释放抗增殖的药物来抑制平滑肌细胞(Smooth muscle cells, SMCs)增殖,阻止内膜增生。但这些药物不可避免地会延迟内皮化,因此有必要寻找合适的药物选择性的抑制 SMC 增殖,同时促进内皮细胞(Endothelial cells, ECs)增殖。维生素 C(L-ascorbic acid, L-AA)是一种用于口服或是直接加入细胞培养的药物,因此实验中在培养过夜的 EC 和 SMC 细胞中加入浓度为 300  $\mu\text{g/mL}$  的 L-AA、浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$  的雷帕霉素(Sirolimus, SIR)、高糖培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)、杜氏磷酸缓冲液(Dulbecco's phosphate buffered saline, DPBS)和乙醇各 100  $\mu\text{L}$ ,培养 7 d 观察,结果表明:SIR 能够抑制 EC 增殖,而 L-AA 能够显著促进 EC 的增殖,同时也能够抑制 SMC 的生长;在培养过夜的 EC 和 SMC 细胞中加入 100  $\mu\text{L}$  不同浓度的 L-AA(1、100、300、500  $\mu\text{g/mL}$  和 1000  $\mu\text{g/mL}$ ),培养 7 d 后,1、100  $\mu\text{g/mL}$  和 300  $\mu\text{g/mL}$  的 L-AA 有利于 EC 增殖,而 500  $\mu\text{g/mL}$  和 1000  $\mu\text{g/mL}$  的 L-AA 会抑制 EC 增殖,并且 300  $\mu\text{g/mL}$  和 500  $\mu\text{g/mL}$  的 L-AA 可以显著抑制 SMC 增殖。由此表明维生素 C 可以成为潜在的用于药物洗脱支架的药物。

**关键词:** 药物洗脱支架;内皮细胞;平滑肌细胞;维生素 C;雷帕霉素

**中图分类号:** Q28

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-3851(2018)05-0352-05

### 0 引 言

每年有数百万患者植入心血管支架,但心血管支架的主要问题之一是人造材料与血液接触有形成血栓或血块的趋势,血栓阻碍血液流向心脏或其他重要器官,可能具有致命的后果,因此,心血管支架的内皮化对预防血栓的形成至关重要<sup>[1-2]</sup>。正常和健康的内皮细胞(Endothelial cells, ECs)通过释放前列环素和一氧化氮来防止血栓形成,前列环素和一氧化氮可以阻止血栓形成的关键步骤是抑制血小板粘附、聚集和活化,并且内皮细胞表面含有血栓调节蛋白,该蛋白在为这些细胞提供抗凝血过程中起着至关重要的作用<sup>[3-4]</sup>。尽管过去已经研发多种材料来改善血管支架的血液相容性,但是内皮化仍然被认为是长期避免血栓形成的最佳方法。

目前可用的药物洗脱支架(Drug-eluting stent, DES)通过释放抗增殖药物如雷帕霉素(Sirolimus,

SIR)和紫杉醇(Paclitaxel, PAT)来治疗内膜增生<sup>[5]</sup>。内膜增生是在植入支架期间发生动脉损伤的伤口愈合反应,内膜增生发生的主要原因是平滑肌细胞(Smooth muscle cells, SMCs)的生长和迁移导致管腔内的细胞外基质沉积阻塞动脉<sup>[6-7]</sup>。支架释放的抗增殖药物能够抑制 SMC 的生长来控制内膜增生,但这些药物同时也会抑制 EC 生长<sup>[8]</sup>。药物洗脱支架的受损或延迟内皮化被认为是晚期支架血栓形成的主要原因,严重的并发症可能导致心脏病发作或死亡<sup>[9-10]</sup>。PAT 血管支架表现出显著的延迟内皮化,这可能会导致晚期血栓的形成<sup>[11]</sup>。因此,有必要寻找一种既能抑制 SMC 生长又能促进 EC 生长的药物。维生素 C(L-ascorbic acid, L-AA)是一种用于口服给药或者直接添加到细胞培养中的药物,相关研究发现 L-AA 在调节炎症反应中发挥作用,同时也对 EC 有一定的保护作用<sup>[12-14]</sup>。

本文研究的长期目标是从 DES 释放 L-AA 来改

收稿日期:2017-9-30 网络出版日期:2017-12-29

基金项目:国家自然科学基金项目(51502265);浙江省自然科学基金项目(LQ16E020006)

作者简介:郝 亚(1993-),女,甘肃酒泉人,硕士研究生,主要从事生物材料方面的研究。

通信作者:陈 岑, E-mail: chencen313@gmail.com

善支架的内皮化,防止晚期血栓形成以及抑制 SMC 生长,从而防止新生内膜增生。作为实现这一研究目标的第一步,本文进行四组体外细胞培养实验,以验证与其他常用于心血管支架的药物(SIR)相比,L-AA 可以促进 EC 生长的同时抑制 SMC 的生长。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

大鼠主动脉平滑肌细胞、内皮祖细胞(中国科学院上海科学院),胎牛血清和胰酶消化液(美国 Gibco 公司),高糖 DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司),MTT/维生素 C 和雷帕霉素(美国 sigma-aldrich 公司),DMSO 和 live/dead 染液(美国 Thermo Fisher 公司)。所用试剂均为分析纯。

### 1.2 溶液配制

MTT(5 mg/mL):称取 500 mg MTT,溶于 100 mL PBS 中,磁力搅拌器搅拌至溶解,4 °C 避光保存。

L-AA 母液:称取 20 mg L-AA,溶于 1 mL 杜氏磷酸缓冲液(Dulbecco's phosphate buffered saline, DPBS)中,4 °C 避光保存。

SIR 母液:称取 20 mg SIR,溶于 1 mL 无水乙醇中,4 °C 保存。

### 1.3 L-AA 和 SIR 对两种细胞增殖作用的研究

将 L-AA 母液用高糖培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)稀释至 300  $\mu\text{g/mL}$ ,SIR 母液用 DMEM 培养基稀释至 100  $\mu\text{g/mL}$ 。取对数生长期的 EC 和 SMC 细胞均以  $1.5 \times 10^4$  个/mL 的浓度、100  $\mu\text{L}$  接种于 96 孔板中,37 °C 二氧化碳培养箱培养过夜,分别加入 100  $\mu\text{L}$  L-AA、SIR、DMEM、0.5% DPBS 和 0.5%乙醇溶液。1、3、5 d 和 7 d(每隔 1 d 换一次液)观察细胞生长形态,再加入 10  $\mu\text{L}$  MTT 溶液,放置细胞培养箱培养 4 h 后,吸净孔板中的细胞培养基,每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO,放在摇床上 10 min,转速为 120 r/min。用酶标仪在 490 nm 处测量吸光值。计算细胞存活率,利用 Sigmaplot 软件进行统计学分析。

### 1.4 不同的 L-AA 浓度对两种细胞增殖作用的研究

将 L-AA 母液用 DMEM 培养基稀释至 1、100、300、500  $\mu\text{g/mL}$  和 1000  $\mu\text{g/mL}$ 。取 100  $\mu\text{L}$  对数生长期、浓度为  $1.5 \times 10^4$  个/mL 的 EC 和 SMC 细胞接种于 96 孔板中,37 °C 二氧化碳培养箱培养过夜,分别加入 1、100、300、500  $\mu\text{g/mL}$  和 1000  $\mu\text{g/mL}$  的 L-AA 溶液和 DMEM、DPBS 溶液各 100  $\mu\text{L}$ 。分别在 1、3、5 d 和 7 d(每隔 1 d 换一次液)观察细胞生长形态,加入 10  $\mu\text{L}$  MTT 溶液,再放置细胞培养箱培养

4 h 后,吸净孔板中的细胞培养基,每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO,放在摇床上 10 min,转速为 120 r/min。用酶标仪在 490 nm 处测量吸光值。计算细胞存活率,利用 Sigmaplot 软件进行统计学分析。

### 1.5 live/dead 荧光染色观察细胞形态

#### 1.5.1 L-AA 和 SIR 对两种细胞增殖作用的影响

将 L-AA 母液用 DMEM 培养基稀释至 300  $\mu\text{g/mL}$ ,SIR 母液用 DMEM 培养基稀释至 100  $\mu\text{g/mL}$ 。取对数生长期的 EC 和 SMC 细胞以  $1.5 \times 10^4$  个/mL 的浓度、500  $\mu\text{L}$  接种于 24 孔板中,37 °C 二氧化碳培养箱培养过夜,分别加入 L-AA、SIR、DMEM、0.5% DPBS、0.5%乙醇溶液。在 1、3、5 d 和 7 d(每隔 1 d 换一次液),加入 live/dead 荧光染料,室温避光染色 30 min,在倒置荧光显微镜下观察,并拍照记录。

#### 1.5.2 不同的 L-AA 浓度对两种细胞增殖作用的影响

将 L-AA 母液用 DMEM 培养基稀释至 1、100、300、500  $\mu\text{g/mL}$  和 1000  $\mu\text{g/mL}$ 。取对数生长期的细胞 EC 和 SMC 均以  $1.5 \times 10^4$  个/mL 的浓度、500  $\mu\text{L}$  接种于 24 孔板中,37 °C 二氧化碳培养箱培养过夜,分别加入 1、100、300、500  $\mu\text{g/mL}$  和 1000  $\mu\text{g/mL}$  的 L-AA 溶液、DMEM 和 DPBS 溶液。在 1、3、5 d 和 7 d(每隔 1 d 换一次液),加入 live/dead 荧光染料,室温避光染色 30 min,在倒置荧光显微镜下观察,并拍照记录。

在实验 1.3 和 1.5.1 中,将不同的药物加入 EC 和 SMC 细胞中,由于 0.5%乙醇(溶于 SIR)或是 0.5% DPBS(溶于 L-AA)都溶于培养基,因此以上实验设有 3 个对照组,对照组 1 为 DMEM 并且不加药和任何溶剂(乙醇溶液或是 DPBS),对照组 2 为 0.5% DPBS 溶于 DMEM(不加 L-AA),对照组 3 为 0.5%乙醇溶于 DMEM(不加 SIR)。

在实验 1.4 和 1.5.2 中,将不同剂量的 L-AA 加入细胞 EC 和 SMC,由于 L-AA 溶于 DPBS,因此以上实验设有 2 个对照组,对照组 1 为 DMEM 并且不加药和任何溶剂(乙醇溶液或是 DPBS),对照组 2 为 10% DPBS 溶于 DMEM(不加 L-AA)。

## 2 实验结果与分析

### 2.1 L-AA 和 SIR 对内皮细胞增殖作用的影响

用 MTT 法检测 EC 细胞在加入不同药物处理后的活性,结果如图 1 所示。在第 1 d,3 个对照组和 L-AA 没有明显的差异,而 SIR 与对照组或是 L-AA 相比,只有较少的细胞数量。在第 3 d,L-AA 相比于第 1 d 细胞有一定增殖趋势,但与对照组相比略低;而 SIR 与第 1 d 相比,细胞数量没有明显的增殖,第 5 d 和第 7 d 可以看到相似的规律。以上结果表明,L-

AA 有促进 EC 增殖的能力,而 SIR 能够抑制 EC 的增殖。采用 live/dead 荧光染色观察细胞形态及数量,结果如图 2 所示,结果表明,与 3 个对照组和 L-AA 相比,随着天数的增加,SIR 的细胞数量无明显的增长,而 L-AA 细胞数量有一个稳定的增长,但与对照组相比略低,这与图 1 所述的 MTT 检测结果一致。

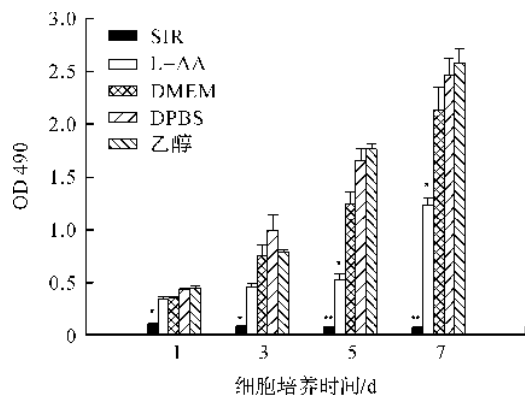


图 1 L-AA 和 SIR 对 EC 细胞增殖作用的影响

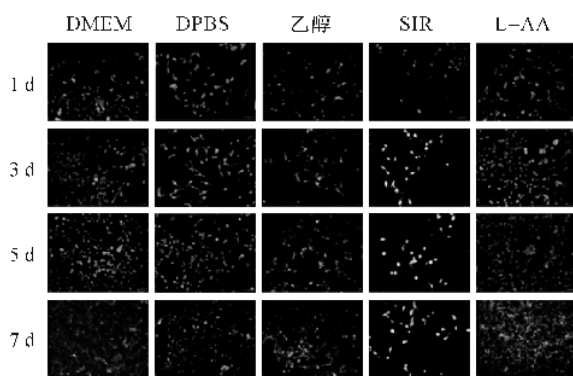


图 2 L-AA 和 SIR 对 EC 细胞增殖作用的 live/dead 荧光染色

## 2.2 不同的 L-AA 浓度对内皮细胞的增殖影响

EC 细胞中加入不同浓度 L-AA 的 MTT 检测结果如图 3 所示,在第 1 d,500  $\mu\text{g/mL}$  的 L-AA 和对照组与其他浓度组有明显的差异。第 3 d 时,除了 500  $\mu\text{g/mL}$  和 1000  $\mu\text{g/mL}$ ,对照组和其他浓度组都有明显的增长,第 5 d 有相似的增长趋势。在第 7 d,1、100、300  $\mu\text{g/mL}$  的 L-AA 与其他浓度组及对照组相比,达到最高的细胞增殖量,1000  $\mu\text{g/mL}$  的 L-AA 细胞增殖量最少。以上结果表明,1、100、300  $\mu\text{g/mL}$  的 L-AA 有利于 EC 增殖,而 500  $\mu\text{g/mL}$  和 1000  $\mu\text{g/mL}$  的 L-AA 会抑制 EC 细胞增殖。live/dead 荧光染色的结果如图 4,与两个对照组相比,随着天数的增加,1、100  $\mu\text{g/mL}$  和 300  $\mu\text{g/mL}$  的 L-AA 处理 EC 细胞保持较高的增殖水平,而 500  $\mu\text{g/mL}$  和 1000  $\mu\text{g/mL}$  的 L-AA 的细胞增殖量不高,这与所述的 MTT 结果一致。

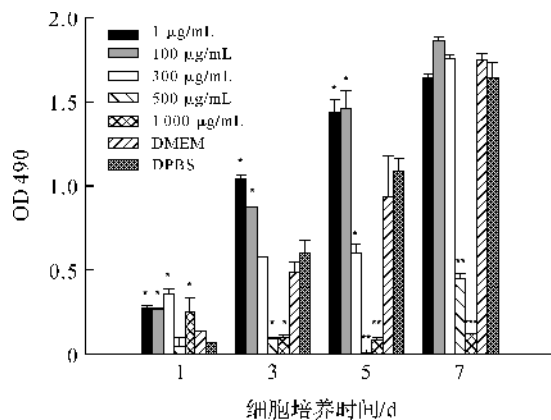


图 3 不同浓度的 L-AA 对 EC 细胞增殖作用的影响

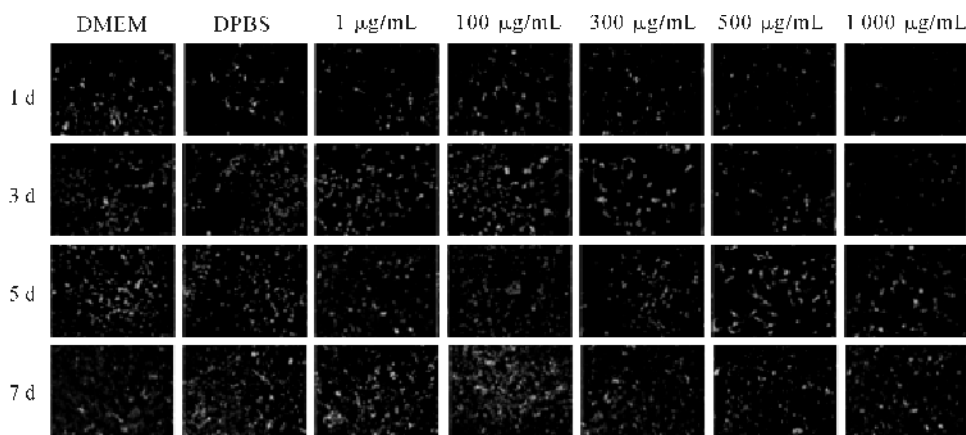


图 4 不同浓度的 L-AA 对 EC 细胞增殖作用的 live/dead 荧光染色

## 2.3 L-AA 和 SIR 对平滑肌细胞增殖作用的影响

用 MTT 法检测 SMC 细胞在加入不同药物之后的活性的结果如图 5 所示。在第 1 d,L-AA 和 SIR 处理细胞数目明显低于对照组;第 3 d,加入 L-AA 和 SIR 后 SMC 细胞有微量的增长,与对照组相比较仍

旧很低,同时 L-AA 和 SIR 之间没有明显的差异。第 5 d 和第 7 d 有相似的趋势。因此 L-AA 可以显著的抑制 SMC 的增殖,尽管抑制效果稍低于 SIR。live/dead 荧光染色的结果如图 6,与 3 个对照组相比,随着天数的增加,SIR 和 L-AA 组的细胞数量极少,并

且没有明显的增长,这与所述 MTT 结果一致。

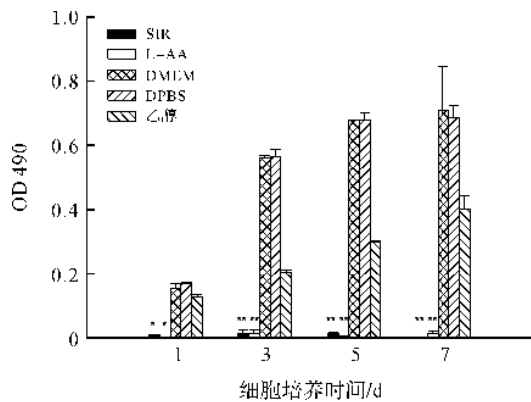


图 5 L-AA 和 SIR 对 SMC 细胞增殖作用的影响

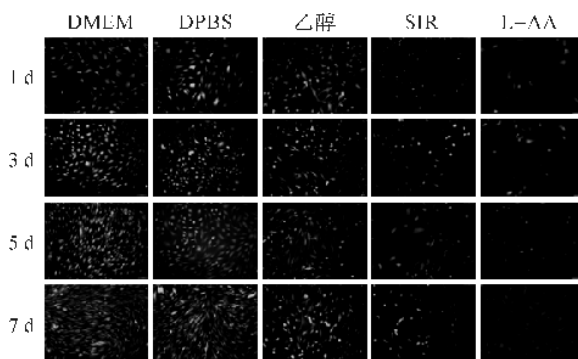


图 6 L-AA 和 SIR 对 SMC 细胞增殖作用的 live/dead 荧光染色

## 2.4 不同浓度 L-AA 对平滑肌细胞增殖作用的影响

SMC 细胞中加入不同浓度 L-AA 的 MTT 结果

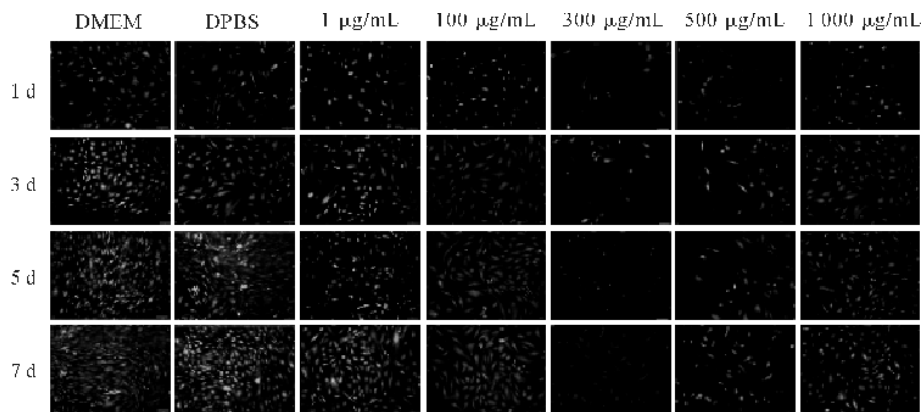


图 8 不同浓度的 L-AA 对 SMC 细胞增殖作用的 live/dead 荧光染色

## 3 结 论

本文通过比较在相同条件下 L-AA 和 SIR 对 EC 和 SMC 的影响,发现 SIR 能够抑制 EC 增殖,而 L-AA 可以促进 EC 增殖的同时抑制 SMC 增殖。不同浓度 L-AA 对 EC 和 SMC 的研究表明 1、100、300  $\mu\text{g/mL}$  的 L-AA 有利于 EC 增殖,而 500  $\mu\text{g/mL}$  和 1000  $\mu\text{g/mL}$  的 L-AA 会抑制 EC 增殖;300  $\mu\text{g/mL}$

如图 7 所示。第 1 d,与对照组相比较而言,300  $\mu\text{g/mL}$  和 500  $\mu\text{g/mL}$  的 L-AA 显示较低的增殖量,1  $\mu\text{g/mL}$  和 100  $\mu\text{g/mL}$  与对照组相比无明显差异。第 3 d,300  $\mu\text{g/mL}$  和 500  $\mu\text{g/mL}$  的 L-AA 和对照组相比依旧显示较低水平的增殖量,而 1000  $\mu\text{g/mL}$  的 L-AA 与第 1 d 相比增殖量显著下降。第 5 d 和第 7 d 有显示相似的规律。同时,笔者采用 live/dead 荧光染色观察细胞形态及数量,结果如图 8 所示,结果表明,与 2 个对照组相比,1、100  $\mu\text{g/mL}$  和 1000  $\mu\text{g/mL}$  的 L-AA 随着天数的增加细胞数量也在不断增加,而 300  $\mu\text{g/mL}$  和 500  $\mu\text{g/mL}$  的 L-AA 细胞增殖量较低。这与上述的 MTT 检测结果一致,300  $\mu\text{g/mL}$  和 500  $\mu\text{g/mL}$  的 L-AA 与其他浓度组及对照组相比能够显著抑制 SMC 增殖。

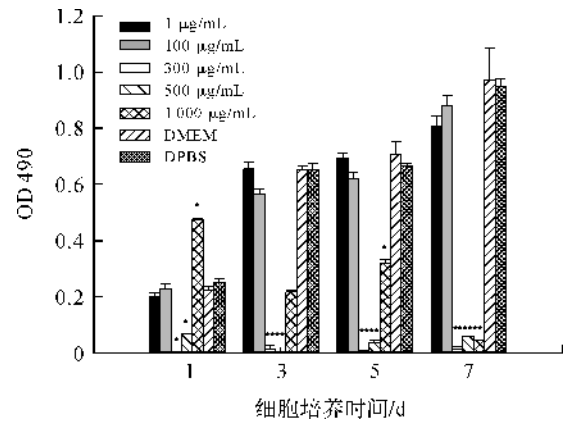


图 7 不同浓度的 L-AA 对 SMC 细胞增殖作用的影响

和 500  $\mu\text{g/mL}$  的 L-AA 可以显著抑制 SMC 增殖。因此本文表明 L-AA 的作用效果优于 SIR,可以成为潜在的应用于药物洗脱支架的药物。

## 参考文献:

- [1] Li G, Yang P, Qin W, et al. The effect of coimmobilizing heparin and fibronectin on titanium on hemocompatibility and endothelialization[J]. Biomaterials, 2011, 32 (21):



- 4691-4703.
- [2] Li J, Zhang K, Yang P, et al. Human vascular endothelial cell morphology and functional cytokine secretion influenced by different size of HA micro-pattern on titanium substrate[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013, 110:199-207.
- [3] 刘涛. Ti表面固定层粘连蛋白/肝素/SDF-1 $\alpha$ 以构建抗凝及诱导内皮再生微环境的研究[D]. 成都:西南交通大学, 2014.
- [4] Morser J. Thrombomodulin links coagulation to inflammation and immunity[J]. *Current Drug Targets*, 2012, 13(3):421-431.
- [5] Cai Y, Nagel D J, Zhou Q, et al. Role of cAMP-phosphodiesterase 1C signaling in regulating growth factor receptor stability, vascular smooth muscle cell growth, migration, and neointimal hyperplasia[J]. *Circulation Research*, 2015, 116:1120-1132.
- [6] Thiruppathi E, Mani G. Vitamin-C delivery from CoCr alloy surfaces using polymer-free and polymer-based platforms for cardiovascular stent applications[J]. *Langmuir*, 2014, 30(21):6237-6249.
- [7] Chen C, Yao C, Yang J, et al. Biomimetic apatite formed on cobalt-chromium alloy: A polymer-free carrier for drug eluting stent[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2017, 151:156-164.
- [8] Hu T, Yang J, Cui K, et al. Controlled slow-release drug-eluting stents for the prevention of coronary restenosis: recent progress and future prospects[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015, 7(22):11695-11712.
- [9] Liang C, Hu Y, Wang H, et al. Biomimetic cardiovascular stents for in vivo re-endothelialization[J]. *Biomaterials*, 2016, 103:170-182.
- [10] Lee J M, Choe W S, Kim B K, et al. Comparison of endothelialization and neointimal formation with stents coated with antibodies against CD34 and vascular endothelial-cadherin[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(35):8917-8927.
- [11] Yang Z, Tu Q, Wang J, et al. The role of heparin binding surfaces in the direction of endothelial and smooth muscle cell fate and re-endothelialization[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(28):6615-6625.
- [12] Farbstein D, Kozak-Blickstein A, Levy A P. Antioxidant vitamins and their use in preventing cardiovascular disease[J]. *Molecules*, 2010, 15(11):8098-8110.
- [13] Maggini S, Maldonado P, Cardim P, et al. Vitamins C, D and Zinc: synergistic roles in immune function and infections[J]. *Vitamins Minerals*, 2017, 6(167):2376-1318.
- [14] Ashor A W, Siervo M, Lara J, et al. Effect of vitamin C and vitamin E supplementation on endothelial function: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials[J]. *British Journal of Nutrition*, 2015, 113(8):1182-1194.

## Effects of vitamin C on proliferation of endothelial cells and smooth muscle cells

HAO Ya, BAI Xue, RUAN Shichao, ZHUANG Qingye, CHEN Cen

(College of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** Drug-eluting stents (DES) release anti-proliferation drugs to inhibit the proliferation of smooth muscle cells (SMCs) and prevent intimal hyperplasia. However, these drugs inevitably delay endothelialization. Therefore, it is necessary to find the suitable drugs which selectively inhibit the proliferation of SMC and promote the proliferation of endothelial cells (ECs). Vitamin C (L-ascorbic acid [L-AA]) is a kind of drug for oral administration or directly added into cell culture. Therefore, in this experiment, EC and SMC cells cultured overnight were added to 100  $\mu\text{L}$  L-AA (300  $\mu\text{g/mL}$ ), 100  $\mu\text{L}$  Sirolimus (SIR) (100  $\mu\text{g/mL}$ ), 100  $\mu\text{L}$  dulbecco's modified eagle medium (DMEM), 100  $\mu\text{L}$  dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) and 100  $\mu\text{L}$  ethanol cultured for 7 days. It was found that SIR could inhibit the proliferation of EC, while L-AA could significantly promote the proliferation of EC and also inhibit the growth of SMC. After adding different concentrations of 100  $\mu\text{L}$  of L-AA (1, 100, 300, 500  $\mu\text{g/mL}$  and 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) in overnight cultured EC and SMC cells for 7 days. The L-AA dosage study demonstrated that L-AA with the concentrations of 1  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$  and 300  $\mu\text{g/mL}$  could encourage EC proliferation, while L-AA with the concentrations of 500  $\mu\text{g/mL}$  and 1000  $\mu\text{g/mL}$  could inhibit EC proliferation. At the same time, L-AA with the concentrations of 300  $\mu\text{g/mL}$  and 500  $\mu\text{g/mL}$  could significantly inhibit SMC proliferation. Thus, this study demonstrates that vitamin C can be a potential drug for drug-eluting stents.

**Key words:** drug-eluting stents; endothelial cells; smooth muscle cells; vitamin C; sirolimus

(责任编辑:唐志荣)