

卡立泊来德对 AGEs 所致新内膜形成的抑制作用及相关机制*

吴树金^{1, 2)} 杨青山³⁾ 宋 涛²⁾ 周寿红²⁾ 刘玉辉²⁾ 刘立英^{2)**}

(¹⁾ 甘肃省人民医院药剂科, 兰州 730000; ²⁾ 中南大学药学院药理教研室, 长沙 410078; ³⁾ 甘肃省人民医院骨科, 兰州 730000)

摘要 为了观察 Na⁺/H⁺ 交换蛋白 1(NHE1)选择性抑制剂卡立泊来德(cariporide)对糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)所致大鼠颈动脉球囊损伤后新内膜形成的作用, 以球囊损伤大鼠颈总动脉, 取标本 HE 染色后进行形态学观察并计算内膜、中膜面积及内膜/中膜面积比。为探讨相关机制, 原代培养大鼠主动脉平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC), [³H] thymidine 检测 VSMC 增殖; RT-PCR 及实时 RT-PCR 检测 VSMC 基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinases-2, MMP-2)、基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinases-9, MMP-9)及环氧酶 2(cyclooxygenase-2, COX-2) mRNA 水平; Western blot 检测核因子 κ B(NF- κ B)的表达及抑制蛋白 κ B α (I- κ B α)的降解。大鼠颈动脉球囊损伤后, cariporide (0.1, 10 mg/kg)能显著抑制 AGEs 所致新内膜增生($P < 0.01$)。细胞实验结果显示, cariporide 可以浓度依赖性地抑制 AGEs 诱导 VSMC 中 COX-2、MMP-2 及 MMP-9 mRNA 表达, 同时显著抑制 I- κ B α 降解及 NF- κ B 表达。结果表明, cariporide 能显著抑制血管损伤后 AGEs 所致新内膜的形成, 其机制与抑制 NHE1 活性从而抑制 NF- κ B 活化, 下调 MMP-2、MMP-9 及 COX-2 mRNA 有关。提示 NHE1 可能是 AGEs 致血管损伤信号通路中的重要组成部分。

关键词 糖基化终末产物, cariporide, 新内膜形成, NF- κ B

学科分类号 R966

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00468

糖尿病可增加血管对机械损害的反应(如冠脉介入治疗时出现更高的再狭窄率)^[1-3], 糖尿病的这种加速作用主要与高血糖环境下形成的糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)有关^[4-6]。研究表明, AGEs 与其受体(receptor for AGEs, RAGE)结合后, 通过受体后的信号转导引起 NF- κ B 的持续活化是其典型变化, 进而诱导下游相关效应分子的表达, 促进主动脉平滑肌细胞(VSMC)的增殖、迁移, 加速血管损伤后的反应^[7-9], 但是 AGEs 加速血管损伤后反应的具体机制并不清楚。钠/氢交换蛋白 1(NHE1)是依赖于细胞内外的 Na⁺ 和 H⁺ 的浓度梯度按 1:1 的电中性比例从细胞外泵入 Na⁺, 从细胞内泵出 H⁺ 以调节细胞内 pH 值的重要跨膜蛋白^[10-11], 因此以往研究主要聚焦在心肌缺血再灌注损伤时 NHE1 活化后, 细胞内 H⁺ 减少, 激活 Na⁺/Ca²⁺ 交换, 从而引起心肌细胞损伤; 实验亦证明 NHE1 的选择性抑制剂有较强的抗心肌缺血

再灌注损伤的作用^[6]。近年发现, NHE1 的功能并不局限于维持细胞内 pH 值和细胞容积的稳态, 而且还能起到信号装配复合体的作用, 参与细胞增殖、分化、细胞骨架重组等细胞内信号转导过程^[12-13]。我们以往的研究首次报道了 AGEs 通过其受体 RAGE 诱导大鼠 VSMC 的 NHE1 显著并持续活化^[14]。中南大学药理实验室其他研究亦表明 NHE1 选择性抑制剂卡立泊来德(cariporide)在体内和体外实验中能保护由 AGEs 所致大鼠内皮损伤^[15-16]。在 1 型和 2 型糖尿病患者或动物模型中, NHE1 活性明显增加^[17-18], 其活化引起细胞的迁移与增殖和糖尿病患者术后再狭窄有着密切的关系,

* 国家自然科学基金资助项目(30600248)。

** 通讯联系人。

Tel: 0731-82355085, E-mail: liyingliu2004@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-09-25, 接受日期: 2012-11-19

但以往的研究中其动物模型的选择并不能排除是否与高糖所致 AGEs 的产生有关。基于本实验室以往的研究,我们大胆推测,NHE1 可能是 AGEs 所致糖尿病加速血管损伤信号通路的重要组成部分。故此,本实验采用外源性制备的 AGEs 作为直接损伤因子,以排除糖尿病时体内其他因素影响,观察 NHE1 特异性阻断剂 cariporide 是否对大鼠颈动脉球囊损伤后 AGEs 所致新内膜形成具有抑制作用,并在体外培养的大鼠 VSMC 上探讨了相关机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

SD 雄性大鼠由中南大学动物学部提供。主要试剂:cariporide(德国 Hoechst 公司赠送);牛血清白蛋白(BSA)、MTT 和兔抗人平滑肌肌动蛋白(α_2 smooth muscle actin, SMA)为 Sigma 公司产品;其余试剂均为化学分析纯。主要仪器:LS-50B 型荧光分光光度计(Shimadzu, Japan);IX-70 型荧光显微镜(Olympus, Japan);CO₂ 细胞培养箱(SHEL-LAB, USA)。本研究中动物实验遵循的所有程序均符合国家及中南大学动物学部制订的有关实验动物的福利规则和制度。

1.2 AGEs 的体外制备

配制 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, 含 NaCl 8.00 g/L, KCl 0.20 g/L, Na₂HPO₄·H₂O 1.56 g/L, KH₂PO₄ 0.20 g/L, pH 7.4),然后将 BSA(10 g/L)、葡萄糖(90 g/L)、青霉素(100 000 U/L)与链霉素(100 g/L)分别溶于上述 PBS 中,充分摇匀、室温过夜;0.22 μ m 针头滤器过滤,灭菌封口后置 37℃ 恒温箱避光孵育 12 周后取出,再转移至 4℃ 冰箱无菌保存备用。使用前,将制备的 AGEs-BSA 装入透析袋,放入 pH 7.4 的无菌 PBS 透析液中,透析 48 h,中途更换 PBS 液 3~4 次,除去未结合的葡萄糖,再次用 0.22 μ m 针头滤器过滤。取制备的样品用 LS-50B 型荧光分光光度计鉴定,在激发波 370 nm,发射波 440 nm 处释放荧光。以同样条件制备不含葡萄糖的 BSA 作为 AGEs 的对照。

1.3 血管平滑肌细胞的培养

采用贴块法原代培养 VSMC:取 120~180 g 雄性 SD 大鼠,麻醉后迅速取出胸主动脉,剪成 1 mm×1 mm 组织块,贴于培养瓶内,加入含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基,置于 CO₂ 培养箱培养 3 周后,细胞融合成片,呈“峰、谷”状生长。用 0.25 %胰蛋白酶消化,采用爬片法接种于 6 孔培养

板的盖玻片上至单层融合后取出晾干,经 SMA 单抗免疫组织化学染色证实为 VSMC,纯度 > 95% 时,继续传代培养,取 4~8 代生长良好的细胞用于实验。

1.4 大鼠颈动脉球囊损伤模型建立

将 40 只健康 SD 大鼠随机分为 4 组,每组 10 只,分别为:① AGEs 损伤组:大鼠每天尾静脉注射 AGEs 100 mg/kg;② AGEs 100 mg/kg 损伤 + cariporide 0.1 mg/kg 治疗组;③ AGEs 100 mg/kg 损伤 + cariporide 10 mg/kg 治疗组;④ 正常对照组:每天尾静脉注射相同体积的生理盐水。4 周后所有大鼠进行颈动脉球囊损伤手术造模,其中,组②、③于术前 3 天加用 cariporide 灌胃,持续至术后 2 周;组①于术前 3 天用等体积的生理盐水灌胃持续至术后 2 周;①~③组球囊损伤后仍继续尾静脉注射 AGEs 至术后 2 周。

腹腔注射 3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉大鼠后暴露左侧颈总动脉及左颈内、外动脉。在左颈外动脉近心端作一“V”形切口,向近心端插入 2F 球囊导管至颈总动脉起始部 2~2.5 cm,球囊充水 0.1~0.15 ml,使其充分扩张至轻度阻力感,然后慢速回拉,重复 3 次。取右侧颈总动脉作为对照,只分离血管不做球囊损伤。血管内膜损伤后新内膜的形成在 14 天时最为明显,因此术后第 14 天取出损伤部位的左颈总动脉约 1 cm,进行 HE 染色,光镜下观察损伤动脉病理学改变。应用 Imagepro6.0 图像分析系统进行图像分析并计算指标。

1.5 大鼠血管平滑肌细胞增殖测定

采用 [³H] thymidine 渗入法检测大鼠血管平滑肌细胞增殖。细胞接种于 24 孔培养板,孵育 24 h 后弃上清液,加入相应药物后继续培养 24 h,每孔加入 1 μ Ci/ml [³H] thymidine,继续培养 6 h,收集细胞于玻璃纤维膜上,进行漂洗、脱色、烤干,置入闪烁杯中,加入二甲苯闪烁液,用液体闪烁计数器测定每分钟脉冲数。以上各组实验均重复 3 次以上。

1.6 RT-PCR 和实时 PCR

采用 Trizol 法提取总 RNA 5 μ l, oligo(dT)1 μ l,加 DEPC 处理水至 12 μ l,混匀,4 000 r/min 离心 5 s,70℃ 孵育 5 min 后于冰上冷却 5 min,再加入 5×缓冲液 4 μ l,10 mmol/L dNTP 2 μ l,40U/ μ l RNase 抑制剂 1 μ l,加 DEPC 处理水到 19 μ l 混匀,4 000 r/min 离心 5 s,37℃ 反应 5 min,冰上骤冷 5 min,加入逆转录酶 1 μ l,总反应体系 20 μ l

混匀, 4 000 r/min 离心 5 s, 之后于 42℃ 反应 60 min, 72℃ 反应 10 min, 冰上骤冷结束反应. 逆转录产物可以继续 PCR 扩增或 -20℃ 冻存备用. 引物分别为: 基质金属蛋白酶 2(MMP-2), 5' GCTGATACTGACACTGGTACTG 3', 5' CAA-TCTTTTCTGGGAGCTC 3' (217 bp); MMP-9, 5' GGATTACCTGTACCGCTATGGTTA 3', 5' TT-GGATCCAATAGGTGATGTTATG 3' (241 bp); COX-2, 5' TCCAATCGCTGTACAAGCAG 3', 5' TCCCCAAAGATAGCA TCTGC 3' (230 bp); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH), 5' ACCACAGTCC-ATGCCATCAC 3', 5' TCCACCACCCTGTTGC-TGTA 3' (450 bp). Real-time PCR 引物分别为: MMP-2, 5' CCCCATGAAGCCTTGTTTACC 3', 5' TTGTAGG AGGTGCCCTGGAA 3'; MMP-9, 5' AGACCAAGGGTACAGCCTGTTC 3', 5' GGC-ACGCTGGAATGATCTAAG 3'; GAPDH, 5' GA-AGGTGAAGGTCGGAGTC 3', 5' GAAGATGGTG-ATGGGATTTC 3'.

1.7 Western blot

细胞经过相应药物预处理后, 提取总蛋白并用牛血清白蛋白标准曲线调整为一致浓度后溶解在 10 g/L 十二烷基硫酸钠(SDS)中, 每份样品取 28 μ l (含 20 μ g 总蛋白)进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 并转移至 PVDF 膜上, 将膜置于 37℃ 干燥 1 h, 放

入封闭液中封闭 1 h, 分别与相应抗体 4℃ 孵育过夜, 洗涤(5 min $\times$ 2), 抗兔二抗 37℃ 孵育 1 h, 洗涤(5 min $\times$ 3), ECL 底物显色, X 片曝光, 凝胶成像系统(美国 UVP 公司)分析, 数据用样品与 β -actin 的比值表示.

1.8 统计分析

所有数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示. 组间差异用 ANOVA 及 Newman-Student 多重比较 t 检验分析, 由 SPSS11.0 统计软件完成. 双侧 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为差异有统计学显著意义.

2 结 果

2.1 各组大鼠颈动脉球囊损伤后新生内膜组织学表现

为观察 cariporide 对 AGEs 诱导的大鼠颈动脉球囊损伤后新生内膜的影响, 我们计算了目标血管环标本的内膜面积(I), 中膜面积(M), 内膜/中膜面积比(I/M), 结果如图 1a, b, c, d 及表 1 所示, AGEs(100 mg/kg)损伤组, AGEs(100 mg/kg)+cariporide(0.1 mg/kg)及 AGEs(100 mg/kg)+cariporide(10 mg/kg)保护组($n = 10$)各自的 I/M 值分别为 4.154 ± 0.689 , 1.584 ± 0.317 , 0.789 ± 0.087 , 而各组的 M 值差异无统计学意义, 此结果表明 cariporide 能显著抑制 AGEs 诱导的血管损伤后内膜的增生.

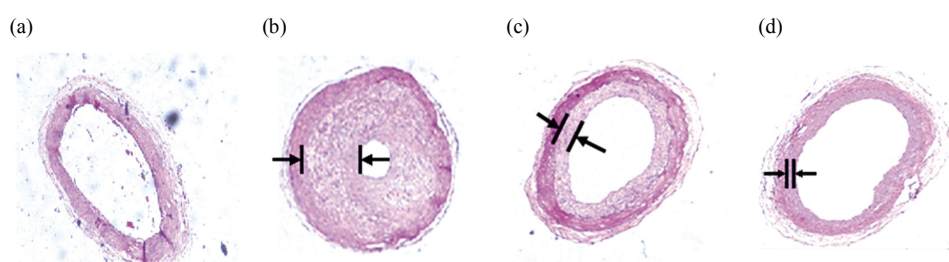


Fig. 1 Effect of cariporide on AGEs-induced neointimal formation 2 weeks after balloon injury

(a) Control. (b) AGEs(100 mg/kg). (c) AGEs(100 mg/kg)+cariporide (0.1 mg/kg). (d) AGEs(100 mg/kg)+cariporide (10 mg/kg).

Table 1 Effect of cariporide on AGEs-induced neointimal formation

				mm ²
	Control	AGEs(100 mg/kg)	AGEs(100 mg/kg)+cariporide(0.1 mg/kg)	AGEs(100 mg/kg)+cariporide(10 mg/kg)
I	0.334 ± 0.068	$0.953 \pm 0.128^{**}$	$0.365 \pm 0.072^{**}$	$0.182 \pm 0.031^{**}$
M	0.221 ± 0.041	0.235 ± 0.031	0.228 ± 0.039	0.231 ± 0.040
I/M	1.480 ± 0.231	4.154 ± 0.689	1.584 ± 0.317	0.789 ± 0.087

I : Intima; M : Media; I/M : Intima-to-media ratios. Data are expressed by $\bar{x} \pm s$. $^{**}P < 0.01$ vs control; $^{**}P < 0.01$ vs AGEs treatment ($n=10$).

2.2 Cariporide 对 AGEs 诱导 VSMC 增殖的影响

结果如图 2a 所示, 不同浓度的 AGEs

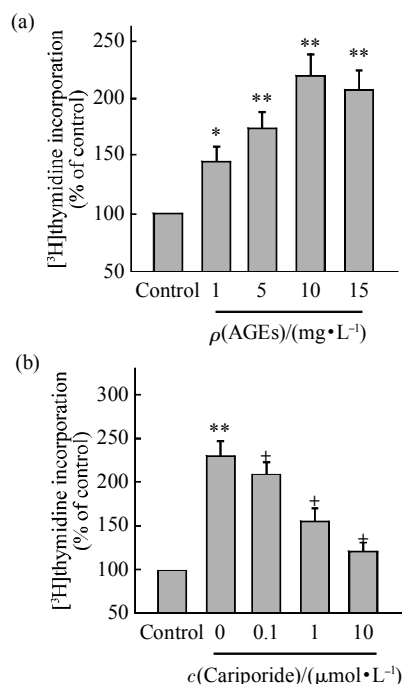


Fig. 2 The VSMC proliferation of different treatment

(a) Effects of different concentrations of AGEs (1, 5, 10, 15 mg/L) on VSMC proliferation. (b) Effects of different concentrations of cariporide on VSMC proliferation induced by 10 mg/L AGEs. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control; † $P < 0.05$ vs AGEs treatment.

(1, 5, 10, 15 mg/L) 与 VSMC 共孵育 24 h 后, 能明显诱导大鼠 VSMC 增殖($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 同时 cariporide (0.1, 1, 10 $\mu\text{mol/L}$) 呈浓度依赖性地抑制 AGEs 诱导 VSMC 的增殖(图 2b).

2.3 Cariporide 对 AGEs 诱导的大鼠 VSMC MMP-2 及 MMP-9 mRNA 表达的抑制作用

结果如图 3 所示, AGEs (10 mg/L) 与大鼠 VSMC 共孵育 48 h 后能显著刺激 MMP-2 及 MMP-9 mRNA 表达增多. Real-time PCR 结果显示, 相比正常对照组, AGEs (10 mg/L) 处理组 MMP-2 mRNA 的表达增加了 3.29 倍, MMP-9 mRNA 表达增加了 5.78 倍, 而 cariporide 0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$ 可以浓度依赖性地抑制由 AGEs 刺激的 MMP-2 及 MMP-9 mRNA 表达增多, cariporide 10 $\mu\text{mol/L}$ 单独处理组与正常对照组相比差异无统计学意义.

2.4 Cariporide 对 AGEs 诱导的大鼠 VSMC COX-2 mRNA 表达的抑制作用

结果如图 4a, b 所示, cariporide 0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$ 可以浓度依赖性地抑制由 AGEs 刺激的 COX-2 mRNA 表达增多, cariporide 10 $\mu\text{mol/L}$ 单独处理组与正常对照组相比差异无统计学意义.

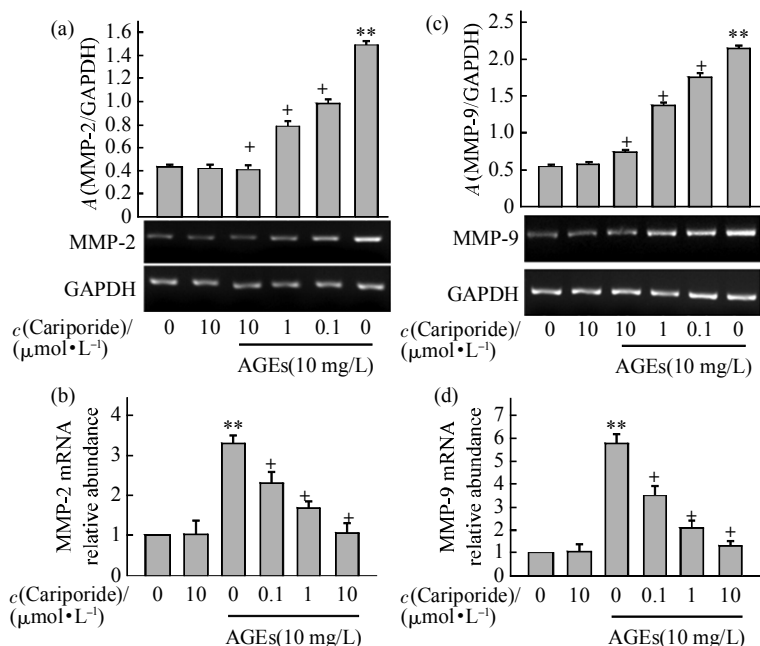


Fig. 3 Effects of different concentrations of cariporide on MMP-2 and MMP-9 mRNA expression induced by AGEs

The mRNA expression profiles of MMP-2 (a, b) and MMP-9 (c, d) were quantified by semi-quantitative RT-PCR (a, c) or real-time PCR with GAPDH as an internal control (b, d). ** $P < 0.01$ vs control, † $P < 0.05$ vs AGEs treatment.

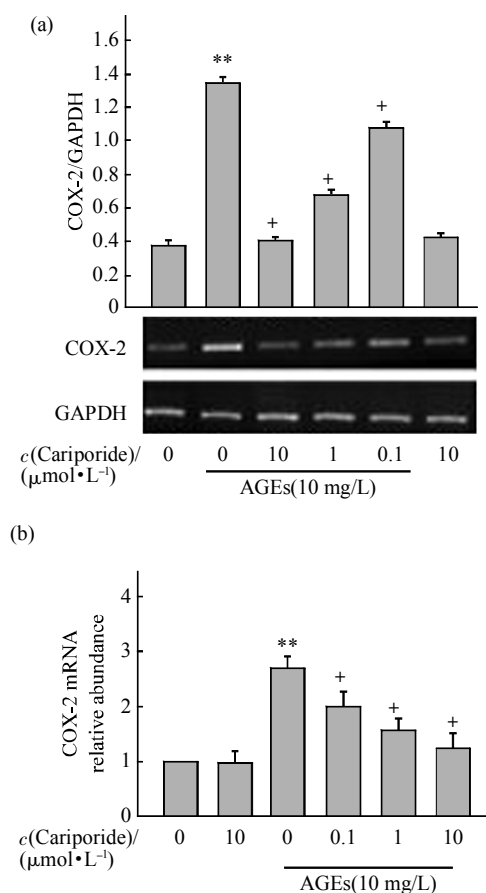


Fig. 4 Effect of cariporide on COX-2 mRNA expression induced by AGEs

The COX-2 mRNA expression was quantified by semi-quantitative RT-PCR (a) or Real-time PCR (b) with GAPDH as an internal control.

** $P < 0.01$ vs control, * $P < 0.05$ vs AGEs treatment.

2.5 Cariporide 对 AGEs 诱导的大鼠 VSMC NF- κ B p65 活化的抑制作用

AGEs (10 mg/L) 能显著诱导 NF- κ B p65 表达增多 (2.3 ± 1.2 倍 vs 正常对照组), cariporide 0.1、1、10 μ mol/L 可以浓度依赖性地抑制 AGEs 诱导的 NF- κ B 表达增多 (图 5a)。通常情况下 NF- κ B 与其抑制子 I- κ B α 结合成三聚体复合物存在于胞浆中, 胞外刺激可以通过降解 I- κ B α 而激活 NF- κ B, 活化的 NF- κ B 进入胞核发挥作用。因此为了进一步探讨相关机制, 我们检测了 AGEs 及 cariporide 对 I- κ B α 降解的影响, 结果如图 5b 所示, AGEs (10 mg/L) 能显著诱导 I- κ B α 降解, 而 cariporide 预处理后可以浓度依赖性地抑制 AGEs 诱导的 I- κ B α 降解。

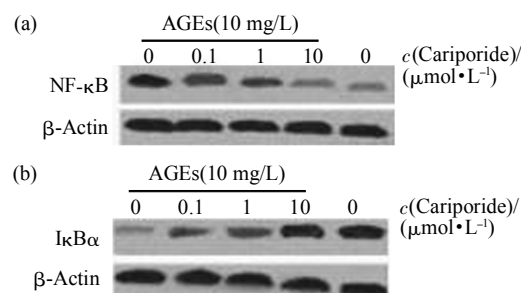


Fig. 5 Effect of cariporide on AGEs-induced activation of NF- κ B (a) and degradation of I- κ B α (b)

3 讨 论

本研究首次证明, NHE1 选择性抑制剂 cariporide 能显著抑制大鼠颈动脉球囊损伤后 AGEs 所致新内膜的形成, 同时 cariporide 能浓度依赖性地抑制 AGEs 所致基质金属蛋白酶和炎症分子的表达, 此结果提示 NHE1 参与了 AGEs 所致血管加速损伤的细胞信号转导通路。

平滑肌细胞的增殖是研究较为明确的导致球囊损伤后血管内膜增生的主要因素, 因此关于防止再狭窄的研究主要致力于抑制平滑肌细胞的增殖^[19-21]。我们以往研究发现 AGEs 可以诱导 VSMC NHE1 活化^[14], 在本实验中再次验证了 cariporide 可以有效抑制 AGEs 诱导的 VSMC 增殖, 从而减少球囊损伤后生成新内膜的面积。

细胞外基质 (extra cellular matrix, ECM) 是血管细胞传递增殖、迁移、分化和凋亡等调控信号的介质, 其合成与降解的平衡在再狭窄的发生过程中有重要作用^[22-23]。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMPs) 是降解 ECM 的主要酶, 已有研究证实 MMP 作用的失衡在支架植入后再狭窄的形成中起着重要作用, 其中 MMP-2 和 MMP-9 的活化是血管平滑肌细胞向内膜增生、迁移所必需的^[24-25]。因此在本实验中我们观察了 NHE1 在 AGEs 诱导 MMPs 产生中的作用。本研究的另一重要发现即为 cariporide 可以浓度依赖性地抑制 AGEs 诱导的 MMP-2 及 MMP-9 mRNA 表达增多。与我们研究结果相一致, 有研究报道 氨氯吡啶 (amiloride)——另一种 NHE1 抑制剂, 可以抑制低氧诱导的肝癌细胞 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 表达增多^[26]。

血管损伤后修复的实质即为一种炎症反应, 其中 COX-2 起着至关重要的作用, 而文献报道 NHE1 可能是新的炎症介质, 我们观察了 cariporide 对 AGEs 诱导 COX-2 表达的影响, 其结果与 MMPs 相一致, cariporide 可以浓度依赖性地抑制 AGEs 诱导的 COX-2 mRNA 表达增多. NF- κ B 是炎症的核心调节因子, 故本实验进一步研究了 cariporide 对 AGEs 诱导 MMP-2、MMP-9 和 COX-2 mRNA 表达的抑制作用是否与下调 NF- κ B 有关. 研究结果显示 cariporide 能显著抑制 AGEs 诱导的 NF- κ B 活化, 而此作用机制与 cariporide 抑制 I- κ B α 的降解有关. 以往的研究表明, 应用 NHE1 的抑制剂可以有效地抑制 IL-8、TNF- α 的释放, 其机制可能涉及到 P42/43 MAPK-NF- κ B 信号转导途径^[27]. 关于 NHE1 抑制 NF- κ B 活化的相关机制, 可能与 NHE1 与 ezrin/radixin/moesin(ERM) 蛋白直接结合导致细胞骨架重构有关^[28-29]. 亦有文献报道 AGEs 与 ERM 蛋白相结合, 但结合后的效应尚不清楚^[30], 因此本实验室将进一步研究 AGEs、NHE1、ERM 蛋白与 NF- κ B 活化之间的关系, 以探讨 AGEs 致血管损伤的信号通路.

参 考 文 献

- Addison D, Aguilar D. Diabetes and cardiovascular disease: the potential benefit of incretin-based therapies. *Curr Atheroscler Rep*, 2011, **13**(2): 115-122
- Brown A, Reynolds L R, Bruemmer D. Intensive glycemic control and cardiovascular disease: an update. *Nat Rev Cardiol*, 2010, **7**(7): 369-375
- Macisaac R J, Jerums G. Intensive glucose control and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes. *Heart Lung Circ*, 2011, **20**(10): 647-654
- Chokrungravanon N, Deer J, Reaven P D. Intensive glycemic control and cardiovascular disease: are there patients who may benefit?. *Postgrad Med*, 2011, **123**(6): 114-123
- Günter S, Martin B, Andreas M, *et al.* Are advanced glycation end products cardiovascular risk factors in patients with CRF?. *Am J Kidney Dis*, 2003, **41**(3 Suppl 1): 52-56
- Knight D R, Smith A H, Flynn D M, *et al.* A novel sodium-hydrogen exchanger isoform-1 inhibitor, zoniporide, reduces ischemic myocardial injury *in vitro* and *in vivo*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, **297**(1): 254-259
- Yu W F, Ru L B, Stephanie S, *et al.* RAGE signaling mediates post-injury arterial neointima formation by suppression of liver kinase B1 and AMPK activity. *Atherosclerosis*, 2012, **222**(2): 417-425
- Liu Y Y, Liang C, Liu X, *et al.* AGEs increased migration and inflammatory responses of adventitial fibroblasts *via* RAGE, MAPK and NF- κ B pathways. *Atherosclerosis*, 2010, **208**(1): 34-42
- Kim J B, Song B W, Park S, *et al.* Alagebrium chloride, a novel advanced glycation end-product cross linkage breaker, inhibits neointimal proliferation in a diabetic rat carotid balloon injury model. *Korean Circ J*, 2010, **40**(10): 520-526
- Sarigianni M, Tsapas A, Mikhailidis D P, *et al.* Na⁺/H⁺ exchanger-1: a link with atherogenesis?. *Expert Opin Investig Drugs*, 2010, **19**(12): 1545-1556
- Reshkin S J, Cardone R A, Harguindey S. Na⁺-H⁺ exchanger, pH regulation and cancer. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2013, **8**(1): 85-99
- De Vito P. The sodium/hydrogen exchanger: a possible mediator of immunity. *Cell Immunol*, 2006, **240**(2): 69-85
- Sarigianni M, Tsapas A, Mikhailidis D P, *et al.* Involvement of signaling molecules on Na/H exchanger-1 activity in human monocytes. *Open Cardiovasc Med J*, 2010, **28**(4): 181-188
- Wu S J, Song T, Zhou S H, *et al.* Involvement of Na⁺/H⁺ exchanger 1 in advanced glycation end products-induced proliferation of vascular smooth muscle cell. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, **375**(3): 384-389
- Shuang X W, Li Y L, Hu M, *et al.* Na⁺/H⁺ exchanger inhibitor prevented endothelial dysfunction induced by high glucose. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2005, **45**(6): 586-590
- Song T, Wu S J, Liu Y H, *et al.* Protective effect of cariporide on the endothelial impairment caused by advanced glycation end products in rats. *Central South Pharmacy*, 2007, **5**(5): 429-432
- Siffert W, Düsing R. Na⁺/H⁺ exchange in hypertension and in diabetes mellitus—facts and hypotheses. *Basic Res Cardiol*, 1996, **91**(3): 179-190
- 房晓伟, 李玉光, 林吉进, 等. 兔髂动脉球囊损伤后血管平滑肌钠氢交换体蛋白变化及阿米洛利对血管狭窄的干预作用. *中华心血管病杂志*, 2005, **33**(11): 1037-1042
- Fang X Y, Li Y G, Lin J J, *et al.* *Chin J Cardiol*, 2005, **33**(11): 1037-1042
- Mitsuka M, Nagae M, Berk BC. Na⁺-H⁺ exchange inhibitors decrease neointimal formation after rat carotid injury. Effects on smooth muscle cell migration and proliferation. *Circ Res*, 1993, **73**(2): 269-275
- Yi N, Chen S Y, Ma A, *et al.* Tunicamycin inhibits PDGF-BB-induced proliferation and migration of vascular smooth muscle cells through induction of HO-1. *Anat Rec (Hoboken)*, 2012, **295**(9): 1462-1472
- Kwon J S, Joung H, Kim Y S, *et al.* Sulforaphane inhibits restenosis by suppressing inflammation and the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 2012, **225**(1): 41-49
- Guzeloglu M, Reel B, Atmaca S, *et al.* The effects of PPARgamma agonist rosiglitazone on neointimal hyperplasia in rabbit carotid anastomosis model. *J Cardiothorac Surg*, 2012, **7**(1): 57-65
- Newby A C. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev*, 2005, **85**(1): 1-31
- Johnson C, Galis Z S. Matrix metalloproteinase-2 and -9

- differentially regulate smooth muscle cell migration and cell-mediated collagen organization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24**(1): 54–60
- [25] Cho A, Reidy M A. Matrix metalloproteinase-9 is necessary for the regulation of smooth muscle cell replication and migration after arterial injury. *Circ Res*, 2002, **91**(9): 845–851
- [26] Yang X, Wang D, Dong W, *et al.* Inhibition of Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger 1 by 5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride reduces hypoxia-induced hepatocellular carcinoma invasion and motility. *Cancer Lett*, 2010, **295**(2): 198–204
- [27] Ne'meth Z H, Deitch E A, Szabo C, *et al.* NHE blockade inhibits chemokine production and NF-κB activation in immunostimulated endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002, **283**(2): 396–403
- [28] Are A F, Galkin V E, Pospelova T V, *et al.* The p65/RelA subunit of NF-κB interacts with actin-containing structures. *Exp Cell Res*, 2000, **256** (2): 533–544
- [29] Zhu P, Rodgers G, Qwarnstrom E E. Regulation of interleukin 1 signalling through integrin binding and actin reorganization: dispa-rate effects on NF-κB and stress kinase pathways. *Biochem J*, 1998, **330**(2): 975–981
- [30] Guo X, Wang L, Chen B, *et al.* ERM protein moesin is phosphorylated by advanced glycation end products and modulates endothelial permeability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, **297**(1): 238–246

Inhibition Effect and Mechanism of Cariporide on Neointimal Proliferation Induced by Advanced Glycation End Products*

WU Shu-Jin^{1,2)}, YANG Qing-Shan³⁾, SONG Tao²⁾, ZHOU Shou-Hong²⁾, LIU Yu-Hui²⁾, LIU Li-Ying^{2)**}

⁽¹⁾ Department of Pharmacy, Gansu Province Hospital, Lanzhou 730000, China;

⁽²⁾ Department of Pharmacology, Pharmaceutical College, Central South University, Changsha 410078, China;

⁽³⁾ Department of Orthopedics, Gansu Province Hospital, Lanzhou 730000, China)

Abstract In order to investigate the inhibitory effect of cariporide, a specific Na⁺/H⁺ exchanger 1 (NHE1) blocker, on neointimal proliferation induced by AGEs in a carotid artery balloon injury model, the rats carotid artery was balloon injured. The exemplars were collected and stained by HE. The morphology changes were observed. The intima area, media area and the ratio of area between intima and media were calculated using image analysis system. In order to explore the precise mechanism, the experiments were done on the isolated rat vascular smooth muscle cells (VSMC). Cell proliferation was assessed by [³H] thymidine incorporation. RT-PCR and Real-time RT-PCR were used to assay the cyclooxygenase-2 (COX-2) matrix metalloproteinases-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinases-9 (MMP-9) expression; Western blot was used to assay NF-κB protein and the degradation of the inhibitor I-κBα. The *in vivo* results shows that neointima hyperplasia is significantly suppressed treated with cariporide in balloon-injured rats compared with AGEs treatment lonely. The *in vitro* study shows that cariporide dose-dependently inhibited AGEs-induced upregulation of COX-2, MMP-2 and MMP-9 expression. We also found that cariporide blocked AGEs-induced activation of nuclear factor-κB (NF-κB) and pointed out that inhibition of NF-κB was achieved by inhibiting the degradation of the inhibitor I-κBα. The results identified that NHE1 inhibitor cariporide inhibited AGEs-induced neointimal hyperplasia in rats balloon-injured model by suppressing the proliferation of VSMC and the upregulation of COX-2, MMP-2 and MMP-9 *via* inhibiting NF-κB activation in VSMC. These results indicated that NHE1 might be a considerable ingredient of the signal pathway in which AGEs played a key role in the processes of vascular damage.

Key words advanced glycation end products, cariporide, neointimal formation, nuclear factor-κB

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00468

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30600248).

**Corresponding author.

Tel: 86-731-82355085, E-mail: liyingliu2004@yahoo.com.cn

Received: September 25, 2012 Accepted: November 19, 2012