论著·基础医学

血管外膜注射HGF裸质粒通过促进再内皮化并抑制血管平滑肌细胞表型转化减轻大鼠颈动脉球囊损伤后内膜增生

夏 晗[1],张 珂[1],吴明东[1],黄 凯[1],金 钱[1],刘 超[1],王泓钧[1],王 咏[2],陈以宽[1] [1]重庆医科大学附属第二医院血管外科,重庆;[2]陆军军医大学(第三军医大学)第二附属医院心血管外科,重庆

[摘要] **目的** 血管腔内介入治疗是目前临床上应对治疗血管病变的主要手段,但机械性操作引发的再狭窄问题日益突出,故拟通过大鼠动物模型和体外实验探讨肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)裸质粒用于血管腔内介入治疗后管腔再狭窄的可能性和潜在机制。**方法** ①用拖拽充气球囊的方法构建大鼠颈动脉损伤模型,根据干预方式将SD雄性大鼠(6~8周龄,体质量260~280 g)以随机数字表法分为(n=6):假手术组、生理盐水组和HGF组(动脉外膜注射HGF裸质粒),通过颈动脉彩超测量收缩期峰值流速,颈动脉组织HE染色和HGF免疫荧光染色检测血管内膜面积和HGF表达情况,Western blotting检测颈动脉中膜血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)表型转换标志物表达水平。②通过原代培养从大鼠颈动脉获得血管内皮细胞(endothelial cells, ECs)和VSMCs,对ECs和VSMCs进行HGF质粒转染。通过CCK-8实验和细胞划痕实验检测未转染HGF质粒的ECs和转染HGF质粒ECs的增殖能力和迁移能力。在Ang Ⅱ诱导VSMCs转化后,通过细胞划痕实验检测仅Ang Ⅱ诱导、Ang Ⅱ诱导后转染HGF质粒和Ang Ⅱ诱导后外源性HGF处理对VSMCs迁移能力的影响,并通过RT-qPCR和Western blotting检测VSMCs表型标志物表达水平。**结果** ①动物实验显示,与生理盐水组大鼠相比,损伤后第3日和第7日时,HGF组大鼠颈动脉的收缩期峰值流速均显著更低[第3日:(422.62±16.99) *vs* (1 050.58±40.92)mm/s;第7日:(631.81±26.11) *vs* (1 309.78±73.13)mm/s;P<0.001],颈动脉内膜面积增加量均显著更少[第3日:(0.16±0.03) *vs* (0.83±0.09)mm^2;第7日:(0.17±0.03) *vs* (1.15±0.31)mm^2;P<0.001],颈动脉组织中HGF的绿色荧光强度均显著更高(P<0.001),合成表型标志物vimentin、OPN和PCNA的蛋白表达水平均显著更低(P<0.001),但收缩表型标志物α-SMA的蛋白表达水平则相当(P>0.05)。②细胞实验结果显示,与未转染HGF质粒的ECs相比,转染HGF质粒的ECs的增殖活性和迁移能力显著增强(P<0.05)。与仅接受Ang Ⅱ诱导的VSMCs相比,Ang Ⅱ诱导后转染HGF质粒和外源性HGF处理的VSMCs的迁移能力均显著降低(P<0.01),而合成表型标志物vimentin的mRNA和蛋白表达水平均显著降低(P<0.05),收缩表型标志物SM-MHC的mRNA和蛋白表达水平则显著升高(P<0.05)。**结论** 肝细胞生长因子或可通过增强血管内皮细胞的增殖能力和迁移能力,并抑制血管平滑肌细胞向合成表型转化,来起到促进损伤后血管再内皮化,抑制血管内膜增生的作用。

[关键词] 再狭窄;肝细胞生长因子;血管外膜;血管内皮细胞;血管平滑肌细胞

[中图法分类号] R364.31;R543.4;R977.6 [文献标志码] A

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82370502)

[通信作者] 王 咏,E-mail:wy003236@163.com

陈以宽,E-mail:300354@hospital.cqmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2026, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议 (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

引用格式:夏晗,张珂,吴明东,等. 血管外膜注射HGF裸质粒通过促进再内皮化并抑制血管平滑肌细胞表型转化减轻大鼠颈动脉球囊损伤后内膜增生[J]. 陆军军医大学学报,2026,48(09):1194-1207. DOI:10.16016/j.2097-0927.202603059.

Citation: XIA H, ZHANG K, WU M D, *et al*. Adventitial delivery of HGF naked plasmid attenuates neointimal hyperplasia after rat carotid balloon injury via promoting re-endothelialization and inhibiting VSMC phenotypic switching[J]. J Army Med Univ, 2026, 48(09): 1194-1207. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202603059.

Adventitial delivery of HGF naked plasmid attenuates neointimal hyperplasia after rat carotid balloon injury via promoting re-endothelialization and inhibiting VSMC phenotypic switching

XIA Han[1], ZHANG Ke[1], WU Mingdong[1], HUANG Kai[1], JIN Qian[1], LIU Chao[1], WANG Hongjun[1], WANG Yong[2], CHEN Yikuan[1] [1]Department of Vascular Surgery, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing; [2]Department of Cardiovascular Surgery, Second Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, China

[**Abstract**] Objective Currently, endovascular interventional therapy represents the primary clinical approach for vascular lesions. Restenosis caused by mechanical procedures, however, has become increasingly prominent. This study aimed to explore the feasibility and underlying mechanisms of naked plasmid encoding hepatocyte growth factor (HGF) for preventing post-interventional luminal restenosis through a rat animal model and *in vitro* experiments. Methods ① A rat carotid artery injury model was established by pulling inflated balloon. Eighteen male SD rats (6 to 8 weeks old, weighing 260 to 280 g) were randomly divided into a sham operation group, normal saline group, and HGF group (adentitial injection of HGF naked plasmid) (n=6 for each group). Peak systolic velocity was measured using carotid ultrasound, and the area of the vascular intima and HGF expression were assessed through HE staining and HGF immunofluorescence staining, respectively. The expression levels of phenotypic markers in the carotid media were determined by Western blotting. ② Vascular endothelial cells (ECs) and vascular smooth muscle cells (VSMCs) were obtained from rat carotid arteries through primary culture, and both ECs and VSMCs were transfected with the plasmids haboring HGF. The proliferative and migratory abilities of transfected and untransfected ECs were assessed through CCK-8 assay and cell scratch assay, respectively. After Ang Ⅱ-induced VSMC transformation, the effects of Ang Ⅱ induction alone, Ang Ⅱ induction followed by HGF plasmid transfection, Ang Ⅱ induction followed by exogenous HGF treatment on VSMC migratory ability were detected by cell scratch assay, and the expression levels of phenotypic markers in VSMCs were determined by RT-qPCR and Western blotting. Results ① Animal experiments showed that, compared with the normal saline group, the peak systolic velocity of the carotid artery in the HGF group was significantly lower on post-injury day 3 and day 7 (day 3: 422.62±16.99 *vs* 1 050.58±40.92 mm/s; day 7: 631.81±26.11 *vs* 1 309.78±73.13 mm/s; P<0.001), the increase in carotid artery intimal area was significantly less (day 3: 0.16±0.03 *vs* 0.83±0.09 mm^2; day 7: 0.17±0.03 *vs* 1.15±0.31 mm^2; P<0.001), the green fluorescence intensity of HGF in the carotid artery tissue was significantly higher (P<0.001), and the protein expression levels of synthetic phenotype markers vimentin, OPN, and PCNA were all significantly lower (P<0.001), whereas the protein expression level of contractile phenotype marker α-SMA was comparable (P>0.05). ② Cell experiment results showed that, compared with untransfected ECs, HGF plasmid-transfected ECs exhibited significantly enhanced proliferative activity and migratory ability (P<0.05). Compared with VSMCs receiving Ang Ⅱ induction alone, both Ang Ⅱ-induced VSMCs subsequently transfected with HGF plasmid and those treated with exogenous HGF demonstrated significantly reduced migratory ability (P<0.01), significantly decreased mRNA and protein expression levels of the synthetic phenotype marker vimentin (P<0.05), and significantly elevated mRNA and protein expression levels of the contractile phenotype marker SM-MHC (P<0.05). Conclusion HGF may promote vascular re-endothelialization and inhibit intimal hyperplasia by enhancing the proliferative and migratory abilities of vascular ECs and inhibiting the transition of VSMCs to a synthetic phenotype.

[**Key words**] restenosis; hepatocyte growth factor; adventitia; vascular endothelial cells; vascular smooth muscle cells

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (82370502). Corresponding authors: WANG Yong, E-mail: wy003236@163.com; CHEN Yikuan, E-mail: 300354@hospital.cqmu.edu.cn

随着近年来血管腔内介入治疗的快速发展,包括血管腔内球囊扩张、支架植入等腔内治疗已经成为了血管病变治疗的主要手段,但机械性操作引发的血管内皮损伤及血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)异常增殖导致的再狭窄问题日益突出[1]。血管内皮损伤及炎性反应是形成血管内再狭窄的起始条件,而血管内皮修复的再内皮化过程以及VSMCs过度增殖与迁移在血管再狭窄中占重要地位[2]。研究发现,血管内皮损伤后的再内皮化在一定程度上依赖于邻近的血管内皮细胞(endothelial cells, ECs)和循环中的血管内皮祖细胞的增殖、迁移和分化,但该过程常常需耗费较长的时间[3]。与此同时,生理状态下以收缩表型为主的VSMCs会在血管损伤等多种因素刺激下,由收缩表型转化为合成表型,合成并分泌多种血管活性物质。此阶段VSMCs的增殖、迁移能力显著增强,导致新生内膜增生,最终导致血管壁增厚、管腔狭窄[4]。众多研究表明,VSMCs表型转化是动脉粥样硬化、血管成型术后再狭窄、高血压和肺动脉高压等心血管疾病共同的病理基础[5-6]。因此,探索血管内皮修复的再内皮化过程和VSMCs在血管损伤性重塑中的功能和机制,或可为防治血管腔内介入治疗后血管内再狭窄提供理论基础。

肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)是一种血管生成因子,具有促进血管生成、调节炎症、抑制纤维化和激活组织再生等多种功能[7]。有研究者通过CREST试验发现,抗血小板药物西斯台唑可抑制支架置入后的动脉再狭窄,其机制在于西斯台唑可引起支架置入部位HGF水平升高,而升高的HGF能抑制异常的VSMCs增殖并改善内皮功能,从而刺激内皮快速再内皮化,提示HGF或许能直接通过调控VSMCs改善动脉再狭窄[8]。后续的动物实验发现,在颈动脉置入药物洗脱支架的兔模型中,重组HGF质粒皮下注射可加速内皮修复并改善新生内膜形成,从而减轻支架置入引起的血管反应[9]。另有临床试验发现,编码HGF的质粒pUDK-HGF直接用于严重下肢缺血患者的患肢时,可促进血管新生、改善组织缺血缺氧,从而改善重症下肢缺血(critical limb ischemia, CLI)患者的缺血症状[10]。然而,目前尚没有研究探讨HGF质粒直接注射是否能通过参与VSMCs表型转换等生物学过程,促进修复血管内皮并抑制机械性损伤后血管内再狭窄。本研究拟通过大鼠颈动脉球囊损伤模型分析HGF裸质粒注射液直接注射对损伤后内膜修复的影响,并通过体外实验分析其分子机制,探讨HGF质粒临床应用于治疗血管腔内介入治疗后血管再狭窄的可能性。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级SD雄性大鼠(6~8周龄,体质量260~280 g)购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,生产许可证:SCKX(湘)2024-0009。实验通过重庆医科大学附属第二医院伦理委员会审批[科伦预审第(2022)780号]。所有动物饲养于重庆医科大学附属第二医院动物实验中心SPF级大鼠饲养系统,饲养环境控制为(23±1)℃,相对湿度50%±5%,光照周期12 h/12 h,自由摄食、饮水。实验过程中严格遵从国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》规定,受试大鼠在麻醉下进行手术操作,并最大限度地减少其疼痛等痛苦。

1.2 实验主要试剂与仪器

Anti-CD31/FITC抗体购自博奥森公司,重组HGF蛋白购自中国Sino Biological公司,β-actin抗体购自美国Zenbio公司,OPN抗体和PCNA抗体购自博奥龙公司,SM-MHC抗体和GAPDH抗体购自爱博泰克公司,vimentin抗体、α-SMA抗体、兔抗鼠IgG、山羊抗兔IgG和抗HGF抗体均购自英国Abcam公司。HGF质粒由北京诺思兰德生物制药有限公司合成构建,引物由擎科公司合成。超声检查采用Vevo2100高分辨率小动物超声系统,扩张球囊采用雅培(Abbott)2.0 mm×15.0 mm球囊。胎牛血清、M199培养基、RT-qPCR反应试剂盒、CCK-8试剂盒、荧光显微镜等试剂和仪器均为重庆医科大学附属第二医院科研实验平台常备。

1.3 动物实验

1.3.1 颈动脉球囊法构建大鼠颈动脉损伤模型

利用随机数字表法将SPF级SD雄性大鼠分为(n=6):假手术组、生理盐水组和HGF组。参考已有报道[11],生理盐水组的操作为:异氟烷吸入麻醉固定后,经右侧颈外动脉插入2 mm冠脉球囊导管至右颈总动脉,充气至607.95 kPa,持续3 min后匀速回拉,造成内皮损伤后,在动脉外膜注射生理盐水0.1 mL,结扎右侧颈外动脉,缝合皮肤。HGF的操作与生理盐水组相同,但在动脉外膜注射的是0.1 mL HGF裸质粒(2 mg/mL)。假手术组仅暴露血管,无球囊损伤,无注射处理。

1.3.2 超声检查球囊损伤后大鼠的颈动脉参数

在球囊损伤后的第3日和第7日分别行大鼠颈动脉彩超检查,测量收缩期峰值流速。具体操作为:异氟烷吸入麻醉大鼠,仰卧位固定于加热平台,监测心率、呼吸、体温。颈部用脱毛膏脱毛,涂超声耦合凝胶。选择MS-250探头,固定于机械臂,探头置于颈部,血管长轴视图扫描,清晰显示损伤侧颈动脉管壁和管腔。叠

加彩色血流框,调整增益和PRF,观察血流方向和分布,确认有无涡流或异常。在彩色引导下置取样门于血管中心,角度校正≤60°,记录频谱波形,测量峰值收缩期速度(peak systolic velocity, PSV)和舒张末期速度(end-diastolic velocity, EDV)。

1.3.3 获取模型大鼠颈动脉组织 第3日和第7日超声检查后,将大鼠在异氟烷深度麻醉下开胸处死。充分暴露心脏后,经左心室插入灌注针头,缓慢灌注4 ℃预冷的生理盐水,同时剪开右心房放血,直至右心房流出液清亮、肝脏颜色转为苍白色为止,随后迅速分离损伤侧及对侧颈动脉组织(1.0~1.5 cm)。冰PBS冲洗去除血液,滤纸吸干。一部分颈动脉组织4%多聚甲醛固定后,修剪、脱水、石蜡包埋,以4 μm厚度连续切片,用于后续HE染色和免疫荧光染色;另一部分颈动脉组织于解剖镜下剥离血管中膜,液氮速冻后-80 ℃保存,用于后续Western blotting实验。

1.3.4 HE染色检测模型大鼠颈动脉组织学改变 采用HE染色试剂盒,处理颈动脉石蜡切片进行HE染色,显微镜下观察血管组织病理形态改变,使用PANNORAMIC全景切片扫描仪获取切片全图像,并使用Image-Pro Plus 6.0软件进行形态学分析,测算血管内膜面积(内膜面积=内弹力板以内面积-血管的空腔面积)。

1.3.5 免疫荧光染色检测大鼠颈动脉组织HGF表达情况 切片脱蜡、复水、清洗,组化笔在组织周围画圈,滴加BSA封闭30 min。将切片与抗HGF抗体(一抗)在4 ℃下孵育过夜,随后置于PBS中,在脱色摇床上晃动洗涤3次,每次5 min。加入山羊抗兔IgG(二抗),避光室温孵育50 min。再次PBS冲洗后,DAPI染液复染细胞核,避光室温孵育10 min。切片稍甩干后将切片平放于避光湿盒(SIB-20F),圈内加入自发荧光淬灭剂(G1221)5 min,流水冲洗10 min,抗荧光淬灭封片剂封片。荧光显微镜下采集图像。

1.3.6 Western blotting检测大鼠颈动脉中膜组织vimentin、OPN、α-SMA、PCNA和β-actin表达情况 利用RIPA裂解缓冲液从冻存的颈动脉中膜提取总蛋白。BCA法测定蛋白浓度,调整各样品至相同浓度。根据目标蛋白分子量,配置10%分离凝胶用于vimentin、OPN、α-SMA、PCNA和β-actin。凝胶置于80 V下电泳30 min,随后在140 V下电泳35 min,直至溴酚蓝至胶底。SDS-PAGE电泳后,通过湿转法将蛋白质转移到PVDF膜。用5%脱脂牛奶封闭膜1 h,与对应一抗在4 ℃下摇床过夜孵育。将膜与HRP标记二抗孵育1 h,ECL增强化学发光。采用Image J软件测定各条带灰度值,以目的蛋白/β-actin灰度比值进行半定量统计。每组至少进行3次独立重复实验。

1.4 细胞实验

1.4.1 大鼠颈动脉ECs原代培养与流式细胞术鉴定 通过2%戊巴比妥钠腹腔注射充分麻醉SD大鼠后,无菌条件下分离颈总动脉,于培养皿中用含1%青霉素-链霉素的M199培养基反复冲洗,眼科镊完整剥离血管后,眼科剪离碎成0.2 mm大小的组织块,加入0.1%胶原酶溶液1 mL。随后37 ℃水浴锅中振荡消化15 min,再加入胰蛋白酶消化10 min,去上清液。重复胰酶消化-去上清操作2次后,加含20%胎牛血清的M199培养基,1 500 r/min离心3 min,弃上清。补充20%胎牛血清的M199培养基,吹打均匀后,细胞悬液移入T25培养瓶,37 ℃、5%CO_2条件下培养箱中培养。原代细胞生长至80%~90%汇合时即达到传代条件。取达到传代条件的细胞悬液2 mL,在4 ℃下以1 000 r/min离心4 min,弃上清重悬,200 μL加入5 μL Anti-CD31/FITC室温避光孵育20 min,PBS清洗,在4 ℃下以1 000 r/min离心10 min,弃上清重悬,备1 mL含双抗的培养基,流式上机分选。分选后获得的细胞重悬至T25培养瓶中,37 ℃、5%CO_2条件下培养。待细胞生长融合率达到80%~90%时进行传代,取100 μL细胞悬液进行Anti-CD31/FITC抗体孵育,另取100 μL细胞悬液作为空白对照组,流式上机分析鉴定。

1.4.2 大鼠颈动脉VSMCs原代培养与免疫荧光染色鉴定 通过2%戊巴比妥钠腹腔注射充分麻醉SD大鼠后,无菌条件下分离颈总动脉并置入无菌PBS表面皿中,解剖镜下剥离血管中膜,眼科剪离碎成为0.1 mm大小组织块,置入含0.25%胰酶的玻璃培养瓶中于37 ℃下消化,镜下观察到组织块表面出现大量细胞时立即加入DMEM终止消化。随后,玻璃培养瓶置于37 ℃空气摇床上振摇10 min,吹打使组织块表面的细胞尽可能脱落,120目细胞筛过滤,转入离心管内以1 000 r/min离心5 min,弃上清,再用含20%胎牛血清的DMEM培养基吹打细胞,最后接种于25 mL培养瓶,放入CO_2孵箱培养,48 h后换液。细胞融合后,弃旧培养液,加入适量的0.25%胰酶,镜下见细胞收缩后即去除消化液,然后以适量培养液吹打细胞,接种于新培养瓶中,37 ℃、5%CO_2孵箱中培养。将传代获得的细胞接种于盖玻片上,制成细胞爬片,PBS清洗后用4 ℃纯丙酮固定、晾干。针对平滑肌标志物α-SMA进行免疫荧光染色鉴定培养细胞,简要步骤为:培养细

胞接种爬片,培养至融合度60%~80%;4%多聚甲醛室温固定15 min,PBS冲洗;加入0.1%Triton X-100,室温孵育10 min,PBS冲洗;5%牛血清白蛋白室温封闭30 min;稀释后的α-SMA一抗室温孵育2 h,PBS冲洗;Cy3标记的二抗室温避光孵育1 h,PBS冲洗;DAPI染液室温避光孵育5 min,PBS冲洗3次;抗荧光淬灭封片液封片,荧光显微镜下观察图像。

1.4.3 Ang Ⅱ诱导VSMCs表型转化和HGF干预 以原代培养获得的VSMCs和转染HGF质粒的VSMCs为实验对象进行表型转化诱导和干预实验。实验分为4组:空白对照组(未转染的VSMCs,加入生理盐水作为对照)、诱导转化组(未转染HGF质粒的VSMCs,使用Ang Ⅱ 0.01 μmol/L处理细胞72 h)、HGF处理组(未转染HGF质粒的VSMCs,先使用40 μg/L HGF处理细胞24 h,再使用Ang Ⅱ 0.01 μmol/L处理细胞72 h)、HGF质粒组(转染HGF质粒的VSMCs,使用Ang Ⅱ 0.01 μmol/L处理细胞72 h)。

1.4.4 HGF质粒转染VSMCs与ECs 采用脂质体转染法,以HGF质粒分别转染原代培养获得的ECs和1.4.3中分组处理的VSMCs。简要步骤为:取生长状态良好的细胞,经PBS清洗、0.25%胰酶消化、DMEM培养基吹打、离心后,制成细胞悬液,血球计数板上计数调整为2×10^5个/mL,在24孔板上铺板。细胞贴壁后,依照Lipofectamine 3000试剂盒说明书转染HGF质粒。转染后继续培养,收集对数期生长的细胞开展后续实验。

1.4.5 RT-qPCR验证HGF质粒转染结果 RT-qPCR验证HGF质粒转染VSMCs和ECs后的表达情况。实验步骤参照RT-qPCR反应试剂盒说明书,引物序列见表1,简要步骤为:选择对数生长期的细胞作为检测样本,PBS清洗,加入1 mL TRIzol,研磨仪上研磨匀浆,室温静置10 min;加入1/5体积的氯仿,涡旋仪上振荡1 min,充分乳化后室温静置10 min;在4 ℃下以3 000 r/min离心15 min后,将上层水相转入预冷的1.5 mL EP管,等体积异丙醇沉淀RNA,充分混匀后室温静置10 min,在4 ℃下以13 000 r/min离心15 min;去上清,75%乙醇洗涤,室温干燥;加入适量的DEPC水溶解RNA,分光光度计检测总RNA浓度,于-80 ℃保存。逆转录和qPCR实验采用2步法,参照试剂盒说明书进行,反应体系为:2×T5 Fast qPCR Mix 10 μL,10 μmol/L上游引物0.8 μL,10 μmol/L下游引物0.8 μL,cDNA 1 μL,ddH_2O补足20 μL。反应条件为:预变性95 ℃ 30 s;热循环95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,40个循环。利用以下公式计算相对表达量:△Ct=Ct(目的基因)-Ct(内参基因)。

表1 RT-qPCR引物序列

Table 1 Primer sequences for RT-qPCR

Target gene	Sequence(5′→3′)
HGF	Forward: CATCGCAATAAAAGCAGCTCA
	Reverse: AGTTTGGTCCCCCACATCAT
SM-MHC	Forward: CCCAACCATCAACTGCCTGA
	Reverse: AAAGTGTCCGTGGGTGCAAA
vimentin	Forward: CTCTGGCACGTCTTGACCTT
	Reverse: TCATACTGCTGGCGGACATC
rGAPDH	Forward: TGGTGCTGAGTATGTCGTGG
	Reverse: GGCGGAGATGATGACCCTTT

1.4.6 细胞划痕实验观察HGF质粒转染后VSMCs和ECs的迁移能力变化 实验分为2次独立实验进行,分别为:实验一(未转染HGF质粒的ECs、转染HGF质粒的ECs);实验二(1.4.3中构建的空白对照组、诱导转化组、HGF处理组、HGF质粒组)。简要步骤为:记号笔和直尺在12孔板背后均匀地划横线,间隔1 cm,每孔穿过3条线;选择对数生长期的细胞制成细胞悬液,随后调整细胞悬液密度至5×10^5个/孔接种于12孔板中,37 ℃、5%CO_2条件下培养过夜;10 μL枪头在培养板中划痕,PBS洗涤,每孔加入1 mL无血清培养基,37 ℃、5%CO_2条件下培养12 h,随后显微镜下拍照记录细胞运动的距离,Image J计算各组细胞迁移。

1.4.7 CCK-8实验检测ECs增殖活性 CCK-8实验检测未转染HGF质粒的Ecs和转染HGF质粒的ECs的增殖活性。实验步骤参照说明书,参照以下公式计算细胞活力:细胞活力=(实验组-调零孔)/(对照组-调零孔)×100%。

1.4.8 RT-qPCR和Western blotting检测VSMCs表型标志物 使用RT-qPCR和Western blotting检测1.4.6中各组细胞的VSMCs表型标志物SM-MHC和vimentin。RT-qPCR的引物序列见表1,实验步骤同1.4.5。Western blotting检测以GADPH作为内参,实验步骤同1.3.6。采用Image J软件测定各条带灰度值,以目的蛋白/GAPDH灰度比值进行半定量统计。每个实验至少进行3次独立重复实验。

1.5 统计学分析

采用SPSS 20.0软件进行统计分析,用GraphPad Prism 8.0软件分析和作图,符合正态分布的计量资料以$\bar{x}\pm s$表示。多组数据间比较时,符合正态分布且方差齐性的,采用单因素方差分析;不符合正态性分布的,则使用非参数检验。以$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　HGF裸质粒可降低球囊损伤后大鼠颈动脉的收缩期峰值流速

在损伤建模后第3日和第7日分别行大鼠颈动脉彩超检查,测量收缩期峰值流速。结果显示,生理盐水组大鼠第3日[(1 050.58±40.92)mm/s]和第7日[(1 309.78±73.13)mm/s]的颈动脉收缩期峰值流速均显著高于相对应时间点的假手术组[第3日(260.98±4.16)mm/s;第7日(485.09±25.92)mm/s;P<0.001];HGF组大鼠第3日[(422.62±16.99)mm/s]和第7日[(631.81±26.11)mm/s]的颈动脉收缩期峰值流速均显著高于相对应时间点的假手术组(P<0.01),但也显著低于相对应时间点的生理盐水组(P<0.001,图1)。

2.2　HGF裸质粒可升高大鼠颈动脉组织中HGF表达水平

在第3日和第7日行大鼠颈动脉彩超检查后,处死大鼠取颈动脉组织,针对HGF行免疫荧光染色,显微镜下观察组织荧光强度。结果显示,HGF组大鼠第3日和第7日颈动脉组织的绿色荧光强度均高于相对应时间点的假手术组和生理盐水组(P<0.001,图2),而生理盐水组与假手术组的绿色荧光强度差异无统计学意义。

2.3　HGF裸质粒可减小球囊损伤后大鼠颈动脉的颈动脉内膜面积

在第3日和第7日行大鼠颈动脉彩超检查后,处死大鼠取颈动脉组织行HE染色,显微镜下观察颈动脉内膜面积。结果显示,以假手术组大鼠的颈动脉内膜面积作为基线对比,HGF质粒组大鼠第3日[(0.16±0.03)mm^2]和第7日[(0.17±0.03)mm^2]颈动脉的内膜面积增加量均显著低于相对应时间点的生理盐水组[第3日(0.83±0.09)mm^2;第7日(1.15±0.31)mm^2;P<0.001,图3]。

2.4　HGF裸质粒可降低大鼠颈动脉组织中VSMCs合成表型标志物表达水平并升高VSMCs收缩表型标志物表达水平

Western blotting检测显示,VSMCs合成表型标志物方面,第3日时生理盐水组大鼠颈动脉组织中vimentin、OPN和PCNA的表达水平均显著高于假手术组和HGF组(P<0.001),并且第7日时仍显著高于假手术组和HGF组(P<0.001);此外,第7日时HGF组大鼠颈动脉组织中OPN和PCNA的表达水平也显著高于假手术组(P<0.001)。VSMCs收缩表型标志物方面,第3日时假手术组大鼠颈动脉组织中α-SMA的表达水平显著高于生理盐水组和HGF组(P<0.001),并且第7日时生理盐水组和HGF组大鼠颈动脉组织中α-SMA的表达水平均显著高于假手术组(P<0.001,图4)。

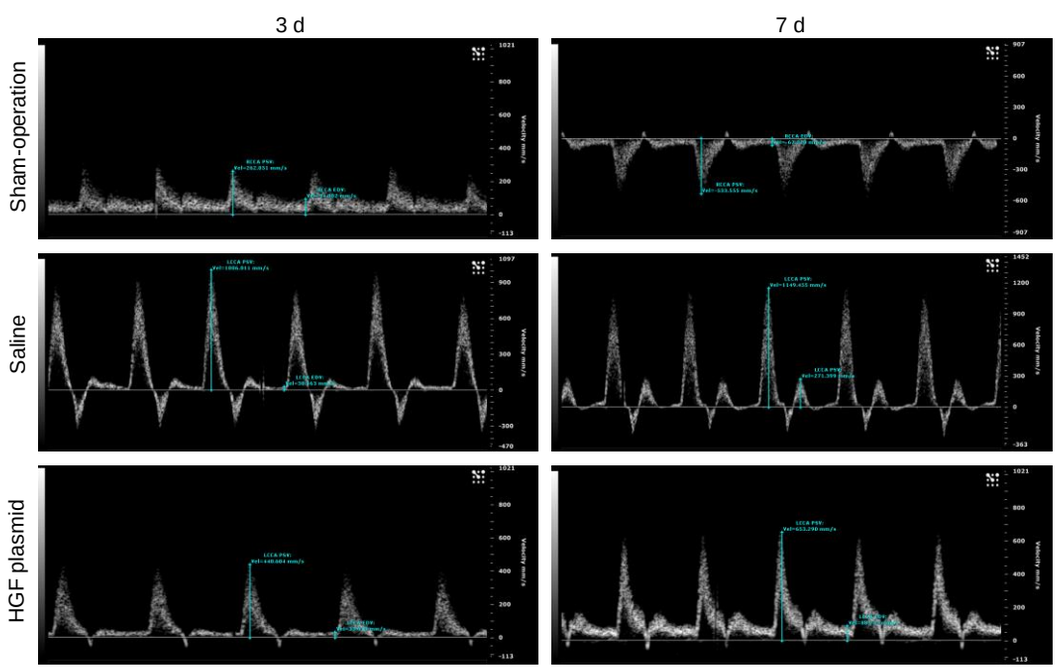


图1　颈动脉彩超测量各组大鼠颈动脉收缩期峰值流速

Figure 1　Peak systolic velocity of carotid artery in rats of each group by color ultrasound

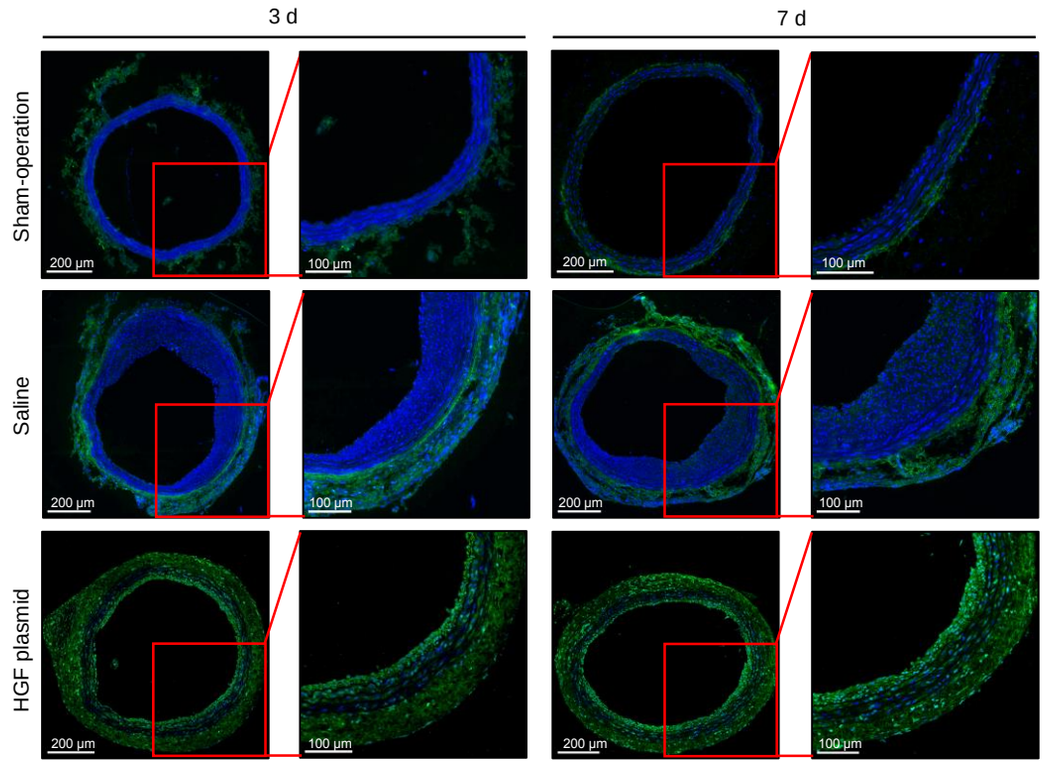


图2 各组大鼠颈动脉组织HGF免疫荧光染色

Figure 2 Immunofluorescence assay of hepatocyte growth factor (HGF) in carotid artery tissues from rats of each group

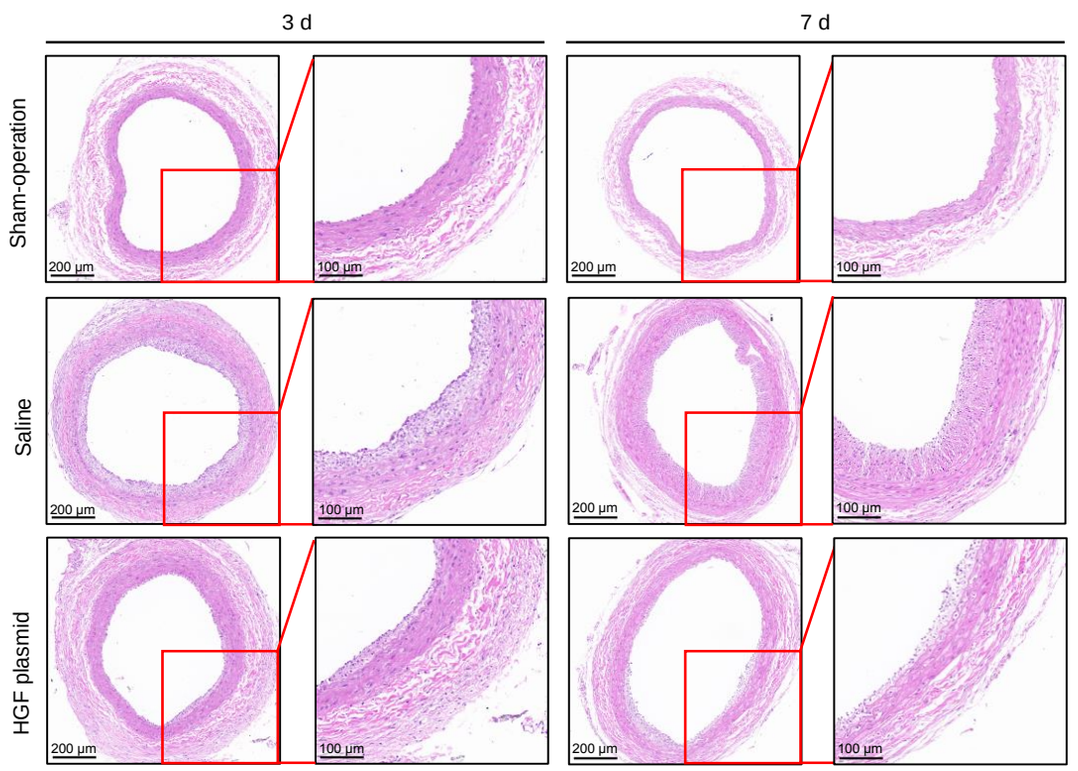


图3 各组大鼠颈动脉组织HE染色

Figure 3 HE staining images of carotid artery tissues from rats of each group

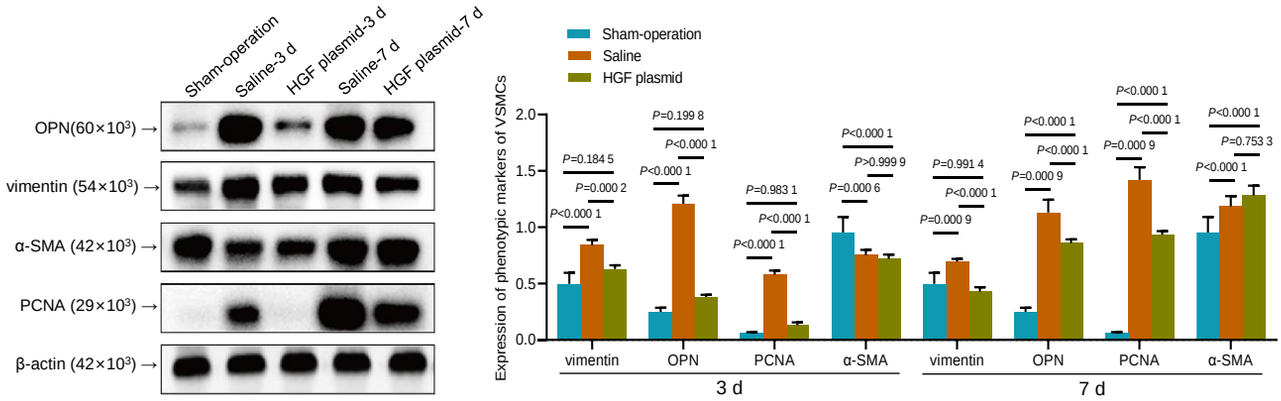


图4　Western blotting检测大鼠颈动脉组织中VSMCs表型转换标志物vimentin、OPN、PCNA和α-SMA的表达水平(n=6,$\bar{x}\pm s$)

Figure 4　Expression of VSMCs phenotypic markers vimentin, OPN, PCNA, and α-SMA in rat carotid arterial tissues by Western blotting(n=6,$\bar{x}\pm s$)

2.5　原代培养法获得大鼠颈动脉ECs和VSMCs

为了更好地模拟生理状态下HGF对ECs和VSMCs的影响,本研究通过原代培养法获取大鼠颈动脉ECs和VSMCs。经分离、培养、分选后,流式细胞术结果显示(图5A),原代培养获得的ECs具有较高的纯度,并且在培养3、7 d后生长状态良好(图5B);免疫荧光染色结果显示,原代培养获得的VSMCs亦具有较高的纯度(图5C),并且在培养3、7 d后生长状态良好(图5D)。

2.6　转染HGF质粒的ECs和VSMCs稳定表达HGF

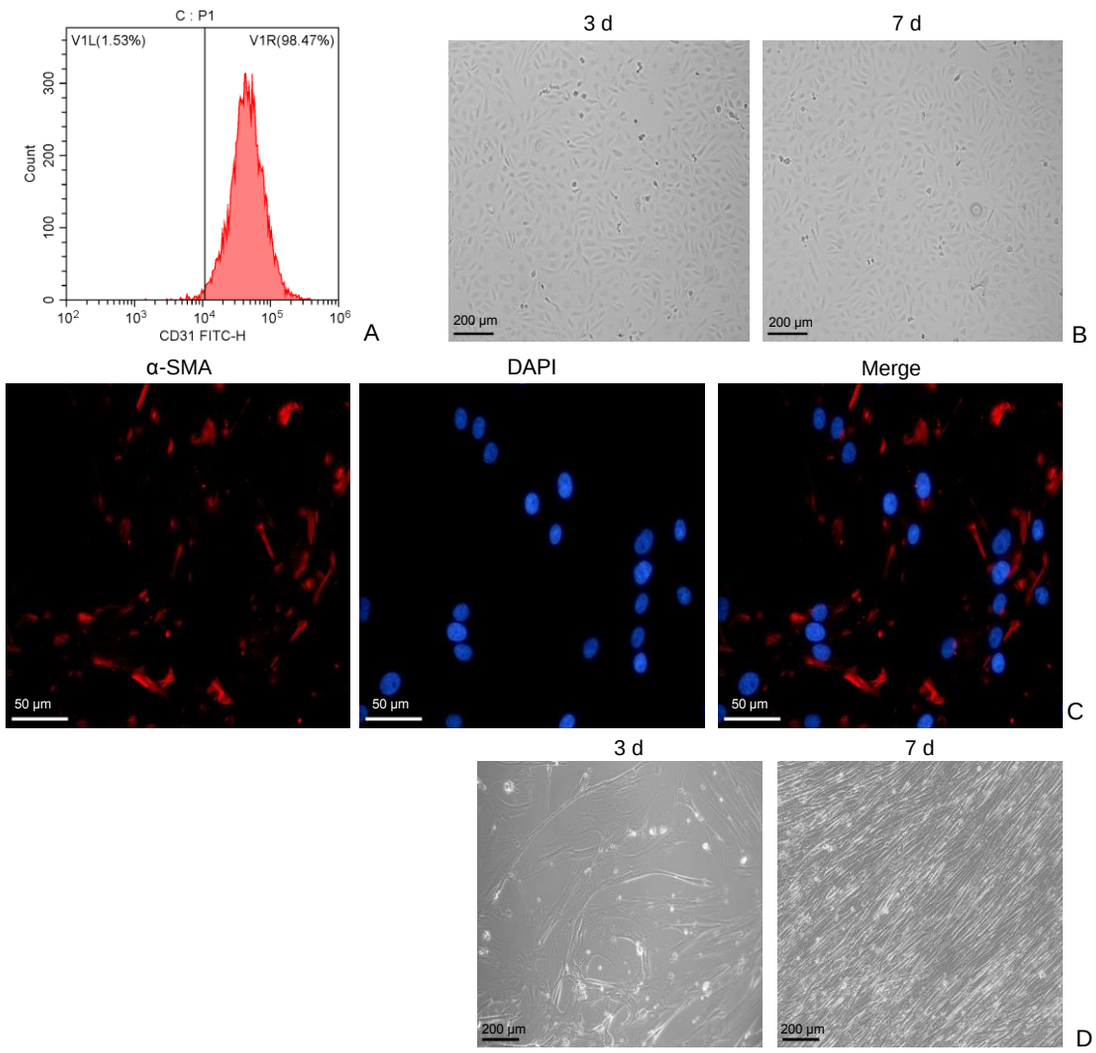
为探讨HGF对大鼠颈动脉ECs和VSMCs的影响,本研究通过脂质体转染法将HGF质粒分别转染原代培养获得的颈动脉ECs和VSMCs。结果显示,转染组ECs和VSMCs的HGF表达水平均显著高于对应的对照组(P<0.001,图6)。

2.7　HGF表达显著增强ECs的增殖活性和迁移能力

为了探讨HGF表达对颈动脉ECs的影响,本研究通过CCK-8实验分析转染HGF质粒后ECs的增殖活性,并通过细胞划痕实验分析转染HGF质粒后ECs的迁移能力。CCK-8实验结果显示,转染组细胞的增殖活性显著高于对照组(P<0.001,图7A),提示HGF表达增强了ECs的增殖能力。细胞划痕实验结果显示,转染组细胞的迁移率显著高于对照组(P<0.05,图7B)。

2.8　外源性HGF干预和HGF质粒可逆转Ang Ⅱ对VSMCs的诱导效果

为了探讨HGF对颈动脉VSMCs表型的影响,本研究利用Ang Ⅱ诱导VSMCs发生表型转化,再通过细胞划痕实验分析外源性HGF干预和转染HGF质粒后VSMCs的迁移能力,并通过RT-qPCR和Western blotting检测平滑肌表型标志物SM-MHC和vimentin的表达水平。细胞划痕实验结果显示(图8),经Ang Ⅱ诱导表型转化的诱导转化组VSMCs的迁移率显著高于对照组(P<0.001),而HGF处理组和HGF质粒组的VSMCs的迁移率均显著低于诱导转化组(P<0.01);此外,HGF质粒组的迁移率显著低于HGF处理组(P<0.05),并且与空白对照组的迁移率差异无统计学意义。RT-qPCR检测结果显示(图9A),诱导转化组、HGF处理组和HGF质粒组的SM-MHC mRNA相对表达量显著低于空白对照组(P<0.001),但HGF处理组和HGF质粒组显著高于诱导分化组(P<0.001),并且HGF质粒组则显著高于HGF处理组(P<0.01);另外,诱导转化组、HGF处理组和HGF质粒组细胞的vimentin mRNA相对表达量显著高于空白对照组(P<0.001),但HGF处理组和HGF质粒组显著低于诱导分化组(P<0.001),并且HGF质粒组则显著低于HGF处理组(P<0.05)。Western blotting检测结果显示(图9B),诱导转化组、HGF处理组和HGF质粒组的SM-MHC蛋白相对表达量显著低于空白对照组(P<0.05),但HGF处理组和HGF质粒组显著高于诱导分化组(P<0.05),并且HGF质粒组显著高于HGF处理组(P<0.05);另外,诱导转化组、HGF处理组和HGF质粒组细胞的vimentin蛋白相对表达量显著高于空白对照组(P<0.001),但HGF处理组和HGF质粒组显著低于诱导分化组(P<0.05),而HGF质粒组与HGF处理组的差异则无统计学意义。



A: Identification of primary cultured ECs by flow cytometry; B: Morphological observation of primary cultured ECs on days 3 and 7 under microscope; C: Immunofluorescence images of primary cultured VSMCs; D: Morphological observation of primary cultured VSMCs on days 3 and 7 under microscope

图5 大鼠颈动脉ECs和VSMCs原代培养与鉴定

Figure 5 Primary culture and identification of ECs and VSMCs from rat carotid artery

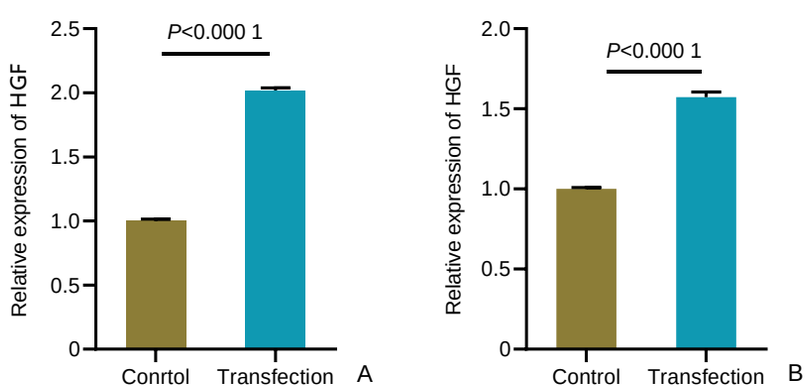
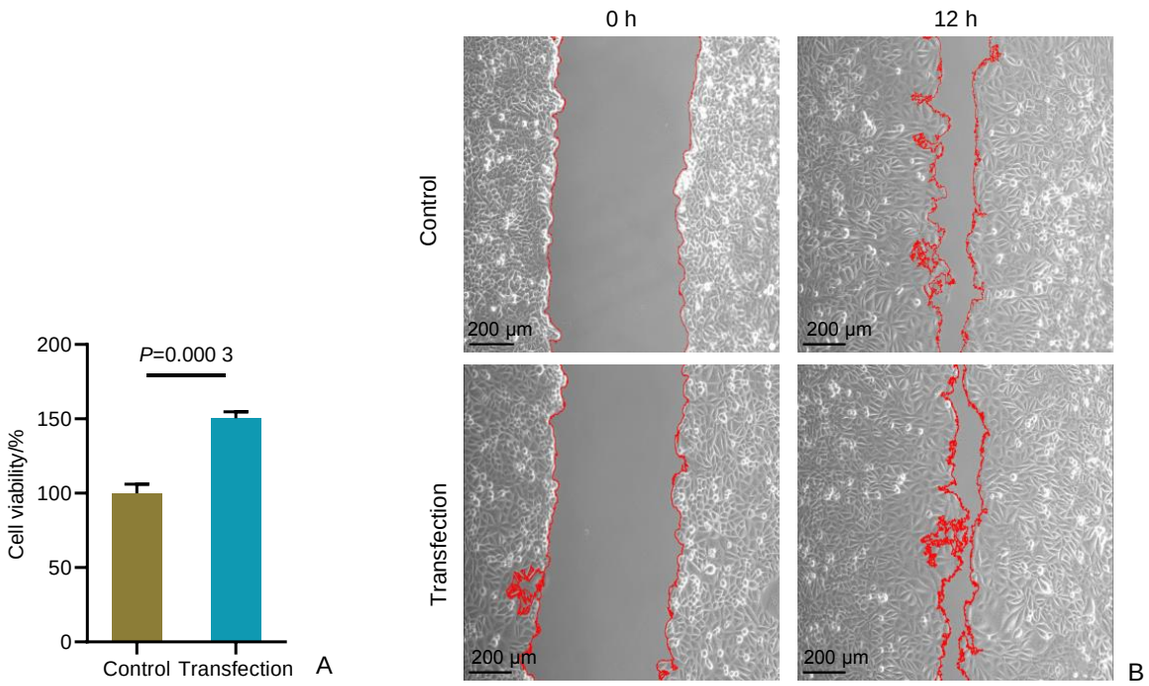


图6 转染大鼠颈动脉ECs(A)和VSMCs(B)中HGF的mRNA相对表达量(n=3,$\bar{x}\pm s$)

Figure 6 Relative expression level of HGF mRNA in transfected ECs(A)aand VSMCs(B) from rat carotid artery (n=3,$\bar{x}\pm s$)



A: Cell viability of ECs with and without HGF plasmid transfection by CCK-8 assay (n=3, $\bar{x}\pm s$); B: Migration ability of ECs with and without HGF plasmid transfection by cell scratch assay

图7 大鼠颈动脉ECs的CCK-8实验和细胞划痕实验结果

Figure 7 CCK-8 assay and cell scratch assay results of ECs from rat carotid artery

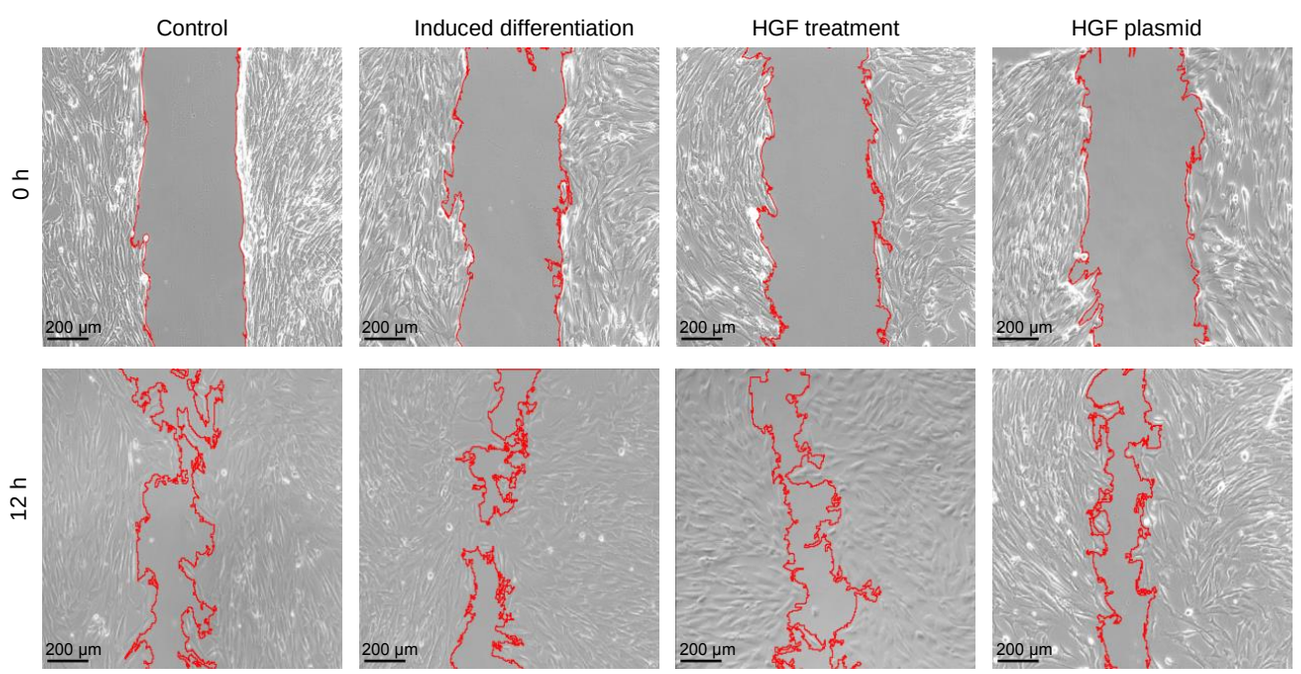
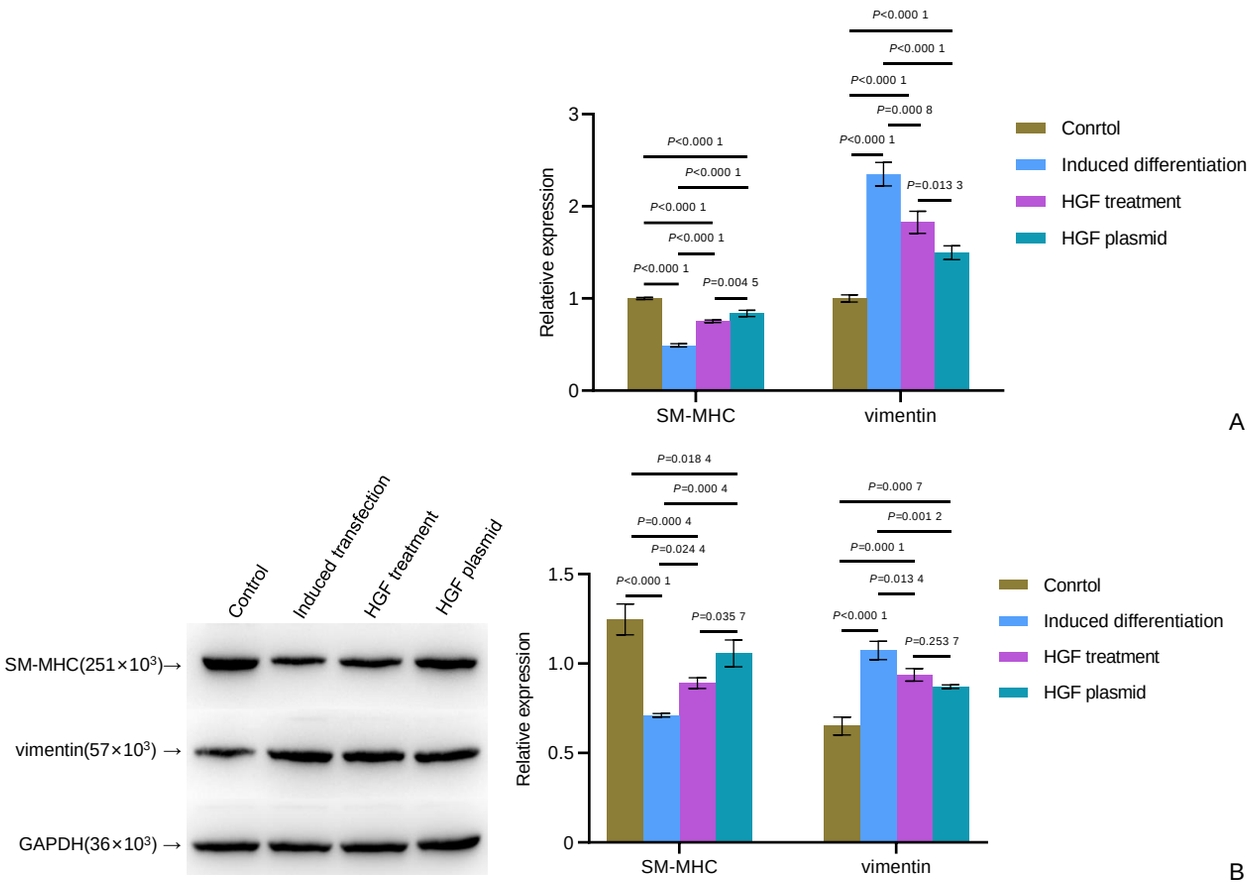


图8 大鼠颈动脉VSMCs划痕实验结果

Figure 8 Cell scratch assay of VSMCs from rat carotid artery



A: RT-qPCR results of SM-MHC and vimentin; B: Western blotting results of SM-MHC and vimentin

图9 大鼠颈动脉VSMCs表型标志物SM-MHC和vimentin的RT-qPCR(A)和Western blotting(B)检测结果(n=3,$\bar{x}\pm s$)

Figure 9 RT-qPCR(A) and Western blotting(B) results of phenotypic markers SM-MHC and vimentin in VSMCs from rat carotid artery(n=3,$\bar{x}\pm s$)

3 讨 论

血管腔内介入治疗是目前治疗血管病变重要的手段之一,但治疗后难以避免的管腔再狭窄会导致一系列严重后果。因此,如何降低血管再狭窄风险已成为临床亟待解决的问题[12-13]。近年来,有大量研究探索并证实了重组人HGF质粒可直接注射用于治疗CLI并改善患者下肢缺血症状[8,14],其机制可能在于HGF能刺激内皮细胞生长[15]并促进VSMCs迁移[16]。因此,本研究尝试通过动物实验和细胞实验探讨HGF质粒直接注射是否能通过促进血管内皮细胞修复并抑制VSMCs表型转换,达到预防管腔内再狭窄的效果。

3.1 HGF质粒注射通过抑制VSMCs向合成表型转化来逆转因球囊损伤引起的大鼠颈动脉狭窄

为了探讨HGF质粒直接注射是否可用于逆转介入治疗后血管内皮损伤导致的再狭窄,本研究构建了颈动脉球囊损伤的大鼠动物模型,直接在颈动脉外膜中注射HGF裸质粒作为干预手段,并以仅暴露颈动脉但不进行球囊损伤的假手术组作为阴性对照,以球囊损伤颈动脉并在血管外膜中注射生理盐水的生理盐水组作为阳性对照。大鼠颈动脉彩超显示,球囊损伤会造成大鼠颈动脉内膜增厚而出现为管腔狭窄,导致颈动脉峰值流速增高,而颈动脉外膜中注射HGF质粒可在一定程度上逆转球囊损伤带来的后果。免疫荧光染色结果显示,HGF质粒在损伤后的第3日和第7日时仍维持在较高的表达水平,故很有可能是高表达的HGF阻碍了球囊损伤后管腔内膜的增厚改变。

本研究还通过Western blotting检测了颈动脉中膜组织中VSMCs表型标志物vimentin、OPN、PCNA和α-SMA的表达水平。vimentin、OPN和PCNA均为VSMCs合成表型的常用标志物,其中vimentin和OPN的表达水平反映VSMCs的合成能力,而PCNA的表达水平则反映了VSMCs的增殖能力[17]。α-SMA则是平滑肌特异性的表型标志物,其表达水平反映了VSMCs

收缩能力[18]。实验结果提示,建模处理后第3日时,损伤会导致大鼠颈动脉中膜VSMCs的合成和增殖能力大幅增强,而HGF的表达能抑制这种VSMCs的反应性改变,从而阻碍VSMCs向合成表型转化。而在第7日时,HGF组VSMCs的增殖和合成水平相比于假手术组显著升高,但仍显著低于生理盐水组,提示HGF表达对VMSCs合成表型转化的抑制效果虽有所降低,但仍维持在较高的水平,这可能是因为:①免疫荧光染色结果显示,第7日时HGF组的HGF表达水平虽然仍显著高于假手术组和生理盐水组,但相比于第3日时已有所降低。②现有研究显示,在大鼠颈动脉球囊损伤模型中,这3种合成表型标志物通常于损伤早期(损伤后1~3 d)快速上调,其主要功能是促进细胞迁移、粘附和增殖。但在修复中期(损伤后7~14 d),伴随新生内膜初步形成和炎症消退,其诱导合成和增殖的作用减弱,修复过程转而受其他因子(如Ang Ⅱ或PDGF)调控[19]。因此,HGF的抑制效应可能因质粒转染效率衰减或局部生物可用性降低而减弱。③在大鼠动物模型中,VSMCs表型的转换并非单一线性过程,第7日时可能出现代偿性机制,如内源性修复因子上调或细胞亚群异质性等,使得第7日时HGF的抑制效应有所减弱。另外,损伤后第3日和第7日,HGF组和生理盐水组的α-SMA水平相似,且均未显示出HGF裸质粒注射对VSMCs收缩表型维持的显著促进作用。这可能反映了血管损伤模型中VSMCs表型转换的复杂动态以及HGF干预的潜在局限性。具体而言,在大鼠颈动脉球囊损伤模型中,α-SMA作为VSMCs收缩表型的经典标志,其表达在损伤早期(例如损伤后3 d内)往往出现暂时性下调,这与损伤诱导的急性炎症和细胞去分化过程相关,此时VSMCs从收缩型向合成型转换以促进修复,但这种转换并非线性且可能受时间依赖性调控[20]。实验结果显示,第3日时HGF组和生理盐水组的α-SMA均显著低于对照组,这符合文献报道的损伤后VSMCs去分化模式[20],其中机械损伤导致内皮剥脱和局部炎症,促使VSMCs快速丢失收缩标志以增强增殖和迁移能力。然而到第7日时,HGF组和生理盐水组α-SMA表达均显著高于对照组,这可能提示损伤后修复阶段的启动,VSMCs开始部分恢复收缩表型,或伴随新生内膜形成的代偿性上调,但尚未达到显著水平。

总体而言,这些结果提示HGF防止损伤后血管再狭窄的机制可能在于抑制VSMCs向合成表型转化,而非促进或维持VSMCs的收缩表型。既往有研究发现,在球囊导管损伤大鼠颈动脉内膜后,直接将插入了HGF基因的质粒-脂质体复合物在损伤血管管腔中进行转染表达,可显著抑制VSMCs向分泌表型转化并减少损伤后内膜增生[21-22]。然而,由于脂质体本身存在细胞毒性,这种方法此后并未实现进一步的临床转化。在此基础上,鉴于已有临床研究证明搭载HGF基因的质粒直接注射具有良好的安全性[9-10],本研究创新性地将HGF质粒直接注射进入动脉外膜,取得了与上述研究相似的结果,同时规避了使用脂质体存在的安全隐患,故而这种给药方式或具有更高的临床转化可能性。此外,除了通过增强ECs的增殖能力和迁移能力并抑制VSMCs向合成表型转化来达成减轻血管再狭窄之外,由于已有研究证实血管外膜中就存在一定量的内皮祖细胞和周细胞[23],而HGF可以诱导内皮祖细胞迁移和分化以及募集周细胞至损伤部位以修复血管内皮损伤[24-25],因此,除了可以作用于ECs和VSMCs以修复血管内皮之外,直接在血管外膜中注射HGF质粒或许还能作用于外膜中的内皮祖细胞和周细胞来发挥作用。当然,这一推测还需要进一步研究证实。

3.2 HGF增强ECs的增殖和迁移能力并逆转Ang Ⅱ对VSMCs的表型诱导效果

为了进一步探讨HGF逆转球囊损伤引起的大鼠颈动脉狭窄的机制,本研究使用从大鼠颈动脉中原代培养获得的ECs和VSMCs,探讨HGF对这两种细胞的作用。

对于ECs,细胞划痕实验和CCK-8实验结果显示,转染组细胞的迁移能力和增殖活性均显著高于对照组,提示HGF表达能显著增强ECs的增殖能力和迁移能力。现有研究发现,在血管内皮损伤后的修复过程中,ECs的增殖与迁移起到了关键作用[26],故HGF表达可能有助于血管内皮损伤修复。

对于VSMCs,细胞划痕实验结果显示,外源性HGF处理和HGF质粒转染均能抑制Ang Ⅱ诱导引起的VSMCs运动能力增强,并且HGF质粒转染的效果强于外源性HGF处理。Western blotting和RT-qPCR实验结果显示,外源性HGF处理和HGF质粒转染均能一定程度上抑制Ang Ⅱ引起的VSMCs表型标志物水平改变,并且HGF质粒转染的效果强于外源性HGF处理。这些结果提示,外源性HGF和转染HGF质粒均可一定程度上抑制Ang Ⅱ的表型转化效果。研究发现,血管内皮损伤会激活肾素-血管紧张素系统产生大量Ang Ⅱ,而Ang Ⅱ可通过与Ang Ⅱ受体1结合后激活Ras等多种途径导致VSMCs向合成表型转化,使VSMCs在具备增殖迁移能力的同时分泌胶原蛋白等大量细胞外基质成分,导致血管内膜增厚和血管纤维

化,最终引起管腔狭窄[4,27]。此外,本研究还观察到转染HGF质粒的抑制效果要强于外源性HGF。这一差异可能源于质粒转染带来的HGF持续表达的优势,与重组HGF的短暂作用相比,前者能维持更高的局部浓度和更持久的c-Met信号激活,从而增强生物学效应[7,28]。例如,现有研究显示,在放射性复合损伤的小鼠模型中,局部注射编码HGF的重组质粒能显著加速复合损伤恢复,这种保护效应可能是由HGF的持续表达上调Nrf2并抑制凋亡引起[29]。这一现象进一步支持HGF质粒作为干预手段的潜力,提示其在预防介入后再狭窄中的临床应用价值。然而,未来研究需探讨转染效率和HGF表达动态,以优化递送策略。

本研究也存在一些不足之处:①本研究仅观察到第7日,未进行14/28 d等更长时间的观察;②大鼠模型可能与人体实际情况存在差异;③未对HGF影响VSMCs表型转化的机制进行研究;④HGF防止血管再狭窄的效果可能并非仅通过抑制VSMCs表型转化来实现,本研究未能探讨其他可能的机制。

综上所述,本研究显示HGF或可通过增强ECs的增殖能力和迁移能力,并抑制VSMCs向合成表型转化,来起到促进损伤血管再内化,减轻损伤后血管再狭窄的作用。这为后续优化实验设计(如增加时间点、联合抑制剂验证c-Met通路)提供了方向,并强调了从基础机制到临床转化的挑战性。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] XU S W, DONG X, ZHANG Q Z. Net meta-analysis: comparison of bare metal stent, drug-coated balloon and drug-eluting stent in the treatment of cerebral arterial stenosis[J]. Front Neurol, 2026, 16: 1637301. DOI: 10.3389/fneur.2025.1637301.

[2] LI L, WANG S, HUANG H L, *et al*. Effects of rosuvastatin and aspirin on retinal vascular structures in hypercholesterolemic patients with low-to-moderate risk of coronary artery disease[J]. Am J Cardiovasc Drugs, 2019, 19(4): 415-420. DOI:10.1007/s40256-019-00330-y.

[3] BENÍTEZ-CAMACHO J, BALLESTEROS A, BELTRÁN-CAMACHO L, *et al*. Endothelial progenitor cells as biomarkers of diabetes-related cardiovascular complications[J]. Stem Cell Res Ther, 2023, 14(1): 324. DOI:10.1186/s13287-023-03537-8.

[4] ZHU Q, NI X Q, LU W W, *et al*. Intermedin reduces neointima formation by regulating vascular smooth muscle cell phenotype *via* cAMP/PKA pathway[J]. Atherosclerosis, 2017, 266: 212-222. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.10.011.

[5] AHMED A S I, DONG K Z, LIU J H, *et al*. Long noncoding RNA NEAT1 (nuclear paraspeckle assembly transcript 1) is critical for phenotypic switching of vascular smooth muscle cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(37): E8660-E8667. DOI:10.1073/pnas.1803725115.

[6] ZENG Z, XIA L X, FAN X J, *et al*. Platelet-derived miR-223 promotes a phenotypic switch in arterial injury repair[J]. J Clin Invest, 2019, 129(3): 1372-1386. DOI: 10.1172/JCI124508.

[7] WANG L S, WANG H, ZHANG Q L, *et al*. Hepatocyte growth factor gene therapy for ischemic diseases[J]. Hum Gene Ther, 2018, 29(4): 413-423. DOI: 10.1089/hum.2017.217.

[8] MORISHITA R. A scientific rationale for the CREST trial results: evidence for the mechanism of action of cilostazol in restenosis[J]. Atheroscler Suppl, 2005, 6(4): 41-46. DOI: 10.1016/j.atherosclerosissup.2005.09.007.

[9] HUANG C, ZHENG X B, MEI H J, *et al*. Rescuing impaired re-endothelialization of drug-eluting stents using the hepatocyte growth factor[J]. Ann Vasc Surg, 2016, 36: 273-282. DOI:10.1016/j.avsg.2016.07.001.

[10] GU Y Q, CUI S J, LIU C J, *et al*. pUDK-HGF gene therapy to relieve CLI rest pain and ulcer: a phase II double-blind, randomized placebo-controlled trial[J]. Hum Gene Ther, 2021, 32(15/16): 839-849. DOI:10.1089/hum.2020.290.

[11] TULIS D A. Rat carotid artery balloon injury model[M]// Vascular biology protocols. Totowa: Humana Press, 2007: 1-30. DOI:10.1007/978-1-59745-571-8_1.

[12] 任李, 张定国.《2021 ACC/AHA/SCAI冠状动脉血运重建指南》解读[J].实用心电学杂志, 2022, 31(4): 229-237. DOI:10.13308/j.issn.2095-9354.2022.04.001.
REN L, ZHANG D G. Interpretation of "2021 ACC/AHA/SCAI Guideline for coronary artery revascularization"[J]. J Pract Electrocardiol, 2022, 31(4): 229-237. DOI: 10.13308/j.issn.2095-9354.2022.04.001.

[13] GAO H B, BIBI H, TAN H T, *et al*. Research progress on risk factors for in-stent restenosis following cerebrovascular stent implantation[J]. Front Neurol, 2025, 16: 1660202. DOI:10.3389/fneur.2025.1660202.

[14] HAMMER A, STEINER S. Gene therapy for therapeutic angiogenesis in peripheral arterial disease—a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials[J]. Vasa, 2013, 42(5): 331-339. DOI: 10.1024/0301-1526/a000298.

[15] MATSUMOTO K, MORISHITA R, TOMITA N, *et al*. Improvement of endothelial dysfunction by angiotensin II

blockade accompanied by induction of vascular hepatocyte growth factor system in diabetic spontaneously hypertensive rats[J]. Heart Vessels, 2003, 18(1): 18-25. DOI:10.1007/s003800300003.

[16] TAHER T E I, DERKSEN P W B, DE BOER O J, *et al*. Hepatocyte growth factor triggers signaling cascades mediating vascular smooth muscle cell migration [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 298(1): 80-86. DOI:10.1016/s0006-291x(02)02397-5.

[17] HUYNH D T N, JIN Y J, VAN NGUYEN D, *et al*. Ginsenoside Rh1 inhibits angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell migration and proliferation through suppression of the ROS-mediated ERK1/2/p90RSK/KLF4 signaling pathway [J]. Antioxidants, 2022, 11(4): 643. DOI:10.3390/antiox11040643.

[18] YAMIN R, MORGAN K G. Deciphering actin cytoskeletal function in the contractile vascular smooth muscle cell[J]. J Physiol, 2012, 590(17): 4145-4154. DOI: 10.1113/jphysiol.2012.232306.

[19] 冯世斌. 炎症微环境响应性纳米药物抑制血管内皮损伤后内膜增生的实验研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2016.
FENG S B. Construction of inflammatory microenvironment-responsive nanotherapies for targeted treatment of neointimal hyperplasia in rat carotid artery balloon injury model [D]. Chongqing: Third Military Medical University, 2016.

[20] CAO G M, XUAN X Z, HU J, *et al*. How vascular smooth muscle cell phenotype switching contributes to vascular disease[J]. Cell Commun Signal, 2022, 20(1): 180. DOI: 10.1186/s12964-022-00993-2.

[21] HAYASHI K, NAKAMURA S, MORISHITA R, *et al*. *In vivo* transfer of human hepatocyte growth factor gene accelerates re-endothelialization and inhibits neointimal formation after balloon injury in rat model[J]. Gene Ther, 2000, 7(19): 1664-1671. DOI:10.1038/sj.gt.3301284.

[22] BILLAUD M, DONNENBERG V S, ELLIS B W, *et al*. Classification and functional characterization of Vasa vasorum-associated perivascular progenitor cells in human aorta[J]. Stem Cell Reports, 2017, 9(1): 292-303. DOI: 10.1016/j.stemcr.2017.04.028.

[23] PATRY C, BETZEN C, FATHALIZADEH F, *et al*. Endothelial progenitor cells accelerate endothelial regeneration in an *in vitro* model of Shigatoxin-2a-induced injury *via* soluble growth factors [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2018, 315(4): F861-F869. DOI: 10.1152/ajprenal.00633.2017.

[24] LIU Y, WILKINSON F, KIRTON J, *et al*. Hepatocyte growth factor and c-Met expression in pericytes: implications for atherosclerotic plaque development [J]. J Pathol, 2007, 212(1): 12-19. DOI:10.1002/path.2155.

[25] SUN H W, LI C J, CHEN H Q, *et al*. Involvement of integrins, MAPK, and NF-kappaB in regulation of the shear stress-induced MMP-9 expression in endothelial cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 353(1): 152-158. DOI:10.1016/j.bbrc.2006.12.002.

[26] NUS M, MARTÍNEZ-POVEDA B, MACGROGAN D, *et al*. Endothelial Jag1-RBPJ signalling promotes inflammatory leucocyte recruitment and atherosclerosis [J]. Cardiovasc Res, 2016, 112(2): 568-580. DOI:10.1093/cvr/cvw193.

[27] 薛灵霞, 龙瑶琳, 冯佳艳, 等. 血管紧张素Ⅱ-1型受体自身抗体-AT1R-Bmal1轴促进血管平滑肌细胞表型转换和血管纤维化[J]. 陆军军医大学学报, 2025, 47(11): 1155-1164. DOI:10.16016/j.2097-0927.202412142.
XUE L X, LONG Y L, FENG J Y, *et al*. Angiotensin Ⅱ type 1 receptor autoantibody-AT1R-Bmal1 axis promotes phenotypic transition of vascular smooth muscle cells and vascular fibrosis [J]. J Army Med Univ, 2025, 47(11): 1155-1164. DOI:10.16016/j.2097-0927.202412142.

[28] FUNAKOSHI H, NAKAMURA T. Hepatocyte growth factor: from diagnosis to clinical applications[J]. Clin Chim Acta, 2003, 327(1/2): 1-23. DOI: 10.1016/S0009-8981(02)00302-9.

[29] LI D J, LU Y X, XIAO F J, *et al*. A recombinant plasmid encoding human hepatocyte growth factor promotes healing of combined radiation-trauma skin injury involved in regulating Nrf2 pathway in mice[J]. J Radiat Res, 2024, 65(3): 279-290. DOI:10.1093/jrr/rrae011.

(**收稿**:2026-03-12;**修回**:2026-03-28)

(编辑 栾 嘉)