

大黄素对兔主动脉平滑肌细胞 Cat K, Cat D mRNA 表达的影响

柴艺汇¹, 杨长福², 陈云志², 高洁³, 王世娇³, 钟梅⁴, 王和生^{2*}

(1. 贵阳中医学院 实验中心, 贵阳 550002; 2 贵阳中医学院 基础医学院, 贵阳 550002;
3. 贵阳中医学院 研究生院, 贵阳 550002; 4. 贵阳中医学院, 贵阳 550002)

[摘要] **目的:**探讨大黄素对兔主动脉平滑肌细胞(CCC-SMC-1)组织中蛋白酶 K(Cat K),组织蛋白酶 D(Cat D)mRNA 表达的影响。**方法:**以 2×10^4 /mL 密度接种细胞,实验分 5 个实验组,大黄素 0.01,0.05,0.1,0.15,0.2,0.25 mmol·L⁻¹组,对照组为培养基空白组,培养 24 h,每组设 5 个复孔。MTT 法观察大黄素对兔主动脉平滑肌细胞增殖的抑制作用,PCR 法检测大黄素对兔主动脉平滑肌细胞 Cat K,Cat D mRNA 的表达。**结果:**MTT 法显示大黄素在 0.05 ~ 0.25 mmol·L⁻¹浓度对 CCC-SMC-1 细胞增殖有抑制作用,作用 24 h 后的半数抑制浓度(IC₅₀)为 0.10 mmol·L⁻¹,且 IC₅₀随作用时间的延长显著前移。PCR 法显示,不同浓度的大黄素作用于兔主动脉平滑肌细胞 24 h 后,与正常组细胞相比,Cat K,Cat D mRNA 表达上调($P < 0.05$)。**结论:**大黄素能抑制 CCC-SMC-1 细胞的增殖,其机制可能与上调 Cat K,Cat D mRNA 表达有关。

[关键词] 大黄素; 主动脉平滑肌细胞; 组织蛋白酶 K; 组织蛋白酶 D

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)16-0093-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015160093

Inhibition of Emodin on Rabbit Aortic Smooth Muscle Cell Proliferation and Effect on Gene of Cathepsin D, K Expression Levels CHAI Yi-hui¹, YANG Chang-fu², CHEN Yun-zhi², GAO Jie³, WANG Shi-jiao³, ZHONG Mei⁴, WANG He-sheng^{2*} (1. *Experimental Center of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine (TCM), Guiyang 550002, China*; 2. *Basic Medical College of Guiyang College of TCM, Guiyan 550002, China*; 3. *Graduate School of Guiyang College of TCM, Guiyang 550002, China*; 4. *Guiyang College of TCM, Guiyan 550002, China*)

[Abstract] **Objective:** The purpose of this study is to study the inhibition of emodin on rabbit aortic smooth muscle cell proliferation (CCC-SMC-1) and on gene expression of cathepsin D, K. **Method:** In a 2×10^4 /mL density vaccination cells, the experiment was divided into seven groups, including 0.01, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 mmol·L⁻¹ of emodin groups, control group. Cells in each group were cultured for 24 h ($n = 6$). The rabbit aortic smooth muscle cells was cultured, to observe emodin on rabbit aortic smooth muscle cell proliferation was determined by MTT method. The impact of emodin on gene expression of relative amount of cathepsin K (Cat K) and cathepsin D (Cat D) of rabbit aortic smooth muscle cells was assayed with PCR. **Result:** MTT result suggested that emodin had the inhibition effect on rabbit aortic smooth muscle cell proliferation when the concentration was in the range of 0.05-0.25 mmol·L⁻¹. The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) was 0.1 mmol·L⁻¹. The results of PCR showed that the expression of Cat K and Cat D gene in emodin groups was significantly increased ($P < 0.05$) after 24 h compared with control cells. **Conclusion:** Emodin can inhibit the proliferation of CCC-SMC-1 cells, the mechanism of which may be related to up-regulation of the gene of Cat K and Cat D expression.

[Key words] emodin; aortic smooth muscle cell; cathepsin K; cathepsin D

[收稿日期] 20141201(012)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81160473, 81460670);贵州省科技厅项目(黔科合SY字[2013]3021号);贵阳中医学院2012年大学生创新项目

[第一作者] 柴艺汇, 硕士, 助理实验师, 从事中西医结合基础研究, Tel:18286037206, E-mail:yihuichai@163.com

[通讯作者] *王和生, 教授, 硕士生导师, 从事中西医结合基础研究, Tel:13511962401, E-mail:wanghsh0413@126.com

动脉粥样硬化(AS)是一种严重危害人类生命健康的常见病及多发病,是冠心病、心肌梗死等许多心脑血管疾病的主要病理基础。血管平滑肌细胞(VSMC)增殖和凋亡的动态平衡调控动脉斑块的发生发展是 AS 的一个重要机制^[1],组织蛋白酶(Cat)参与了维持斑块稳定性的过程,在 AS 斑块形成中也起重要作用^[2]。大黄素为何首乌游离蒽醌类化合物中主要的有效成分,具有降血脂、抑菌、抗炎、抗肿瘤、抗氧化抑制血小板聚集,改善微循环等作用^[3-4],本研究旨在探讨大黄素对血管平滑肌细胞增殖的抑制作用及其对 Cat K, Cat D mRNA 表达的影响,为防治 AS 提供实验依据。

1 材料

1.1 试剂 大黄素(西安飞达生物技术有限公司,含量 98.17%,批号 BH20140618),高糖型 DMEM 培养基(HyClone 公司,批号 NXH0684),胎牛血清(GIBCO,批号 1036489),0.25% 胰蛋白酶(北京索莱宝科技有限公司,批号 NWK0125),二甲基亚砜(DMSO,北京索莱宝科技有限公司,批号 302A0319),3-(4,5)-双甲基-2-噻唑-(2,5)-二苯基溴化四氮唑蓝(MTT,北京索莱宝科技有限公司,批号 705B0514),超纯 RNA 提取试剂盒(CWbio 有限公司,CW0581),HiFi-MMLV cDNA 第一链合成试剂盒(CW 有限公司,CW0744)。引物设计与合成由上海生工生物工程股份有限公司完成。

1.2 细胞 CCC-SMC-1 细胞(中国科学院上海细胞库)。

1.3 仪器 TS-100F 型倒置相差显微镜(日本尼康公司),SW-CJ-2FD 型双人超净工作台(苏州净化设备有限公司),CUSA31311 型二氧化碳培养箱(美国 SHELDON 公司),MSL-3020 型三洋全自动高压灭菌锅(日本三洋有限公司),ELX808IU 型自动酶标仪(美国 Bio-Tek 公司),DYY-6C 型 PCR 电泳仪(北京六一仪器厂),Chemi Doc™ XRS⁺ 化学发光凝胶成像系统(美国 BIO-RAD 公司)。

2 方法

2.1 对 CCC-SMC-1 细胞生长的增殖抑制作用 取对数生长期细胞,用含 10% 胎牛血清 DMEM 培养液重悬细胞,细胞密度成 2×10^4 /mL。分别接种于无菌 96 孔培养板,待细胞贴壁,同步 24 h 去除全培养液,用 37 °C 预热的 PBS 洗涤 1 次,加入稀释于培养液的不同浓度的药物。实验分 6 组,每组 5 个复孔,大黄素 0.05,0.1,0.15,0.2,0.25 mmol·L⁻¹ 组,对照组为培养基空白组,分别培养 12,24,48 h 后各取出

1 块培养板,加入 MTT 溶液($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)20 μL ,37 °C 继续培养 4 h 以上,终止培养,弃上清液。每孔加入 150 μL DMSO,室温振荡 10 min,于酶标仪 490 nm 波长处测定各孔吸光度 A,以下式计算抑制率。实验重复 3 次,计算平均值。

$$\text{抑制率} = \left(\frac{A_{\text{对照组}} - A_{\text{加药组}}}{A_{\text{对照组}}} \right) \times 100\%$$

2.2 对 CCC-SMC-1 细胞中 Cat K, Cat D mRNA 表达的影响 取对数生长期的兔主动脉平滑肌细胞,细胞密度为 1×10^4 个/mL,37 °C,5% CO₂ 饱和湿度条件下二氧化碳培养箱中培养,培养 24 h 使细胞同步。按不同浓度大黄素 0.05,0.1,0.15,0.2,2.5 mmol·L⁻¹ 作用于细胞,对照组加等体积不含大黄素的无血清培养基,继续培养 24 h,药物作用 24 h 收获细胞。按超纯 RNA 提取试剂盒说明提取兔主动脉平滑肌细胞总 RNA,分光光度计检测 260,280 nm 处 A,测定 RNA 纯度和浓度。取 5 μL RNA 用 2% 琼脂糖凝胶进行电泳,确定检测 RNA 的完整性。取 1 μg 总 RNA 进行逆转录,逆转录条件:42 °C 孵育 30 min,70 °C 孵育 15 min。以 β -actin 为内参照。PCR 反应体系为 20 μL ,引物序列为 β -actin, F:5'-GT-GCGGGACATCAAGGAGAA-3', R:5'-GTGCTTCTAG-GCGGACTGTT-3'; Cat-D, F:5'-CGTCTTCTCCTTC-TACCTGAACA-3', R:5'-GGCTGGACACCTTCTCA-CAG-3'; Cat-K, F:5'-TCCAGAAGGGAAATAAG-CACTG-3', R:5'-GAAGGAAAGAGGTAGGGGTATCA-3',通过逆转录合成的 cDNA 进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为预变性 94 °C,2 min;变性 94 °C,30 s;退火温度 56.5 °C,30 s;延伸 72 °C,30 s;终延伸 72 °C,2 min。循环次数为 30 个。反应全部结束后,取 5 μL 的 PCR 产物置于 0.2 g·L⁻¹ 琼脂糖凝胶上电泳,采用化学发光凝胶成像系统软件对图像进行分析,各组相对表达量为各组目的基因体积与内参照基因体积的比值来表示。

2.3 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 18.0 统计软件,以单因素方差进行统计分析。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 大黄素对 CCC-SMC-1 细胞生长的增殖抑制作用 不同浓度(0.01 ~ 0.25 mmol·L⁻¹)的大黄素分别在 12,24,48 h 3 个时间点对 CCC-SMC-1 细胞增殖均有抑制作用,其细胞增殖抑制率随着大黄素浓度的增加明显增高。药物作用时间越长,细胞增殖抑制率越高。见表 1。

表 1 不同浓度大黄素对 CCC-SMC-1 细胞的增殖抑制率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Expression of cell proliferation inhibition rate of CCC-SMC-1 effected by different concentrations of emodin ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度 /mmol·L ⁻¹	12 h		24 h		48 h	
		A	抑制率/%	A	抑制率/%	A	抑制率/%
对照	-	0.581 ± 0.038	-	0.515 ± 0.007	-	0.875 ± 0.015	-
大黄素	0.01	0.516 ± 0.004 ¹⁾	11.13	0.439 ± 0.061 ¹⁾	14.63	0.674 ± 0.013 ¹⁾	22.92
	0.05	0.393 ± 0.007 ¹⁾	32.33	0.347 ± 0.0246 ¹⁾	32.56	0.529 ± 0.03 ¹⁾	39.47
	0.10	0.279 ± 0.013 ¹⁾	51.91	0.235 ± 0.024 ¹⁾	54.34	0.331 ± 0.012 ¹⁾	62.17
	0.15	0.242 ± 0.010 ¹⁾	58.23	0.214 ± 0.009 ¹⁾	58.38	0.229 ± 0.016 ¹⁾	73.78
	0.20	0.224 ± 0.005 ¹⁾	61.30	0.197 ± 0.004 ¹⁾	61.68	0.216 ± 0.003 ¹⁾	75.29
	0.25	0.215 ± 0.006 ¹⁾	62.85	0.188 ± 0.007 ¹⁾	63.50	0.204 ± 0.005 ¹⁾	76.68

注:与对照组比较¹⁾P < 0.05(表 2 同)。

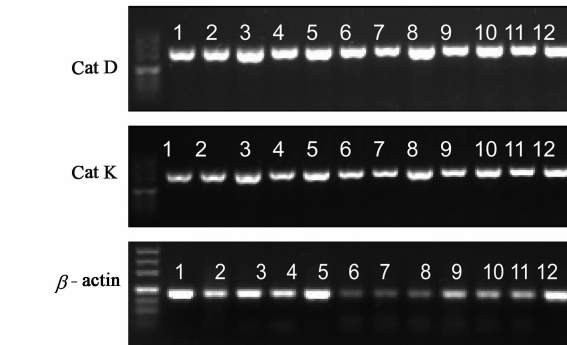
3.2 大黄素对 CCC-SMC-1 细胞中 Cat K, Cat D mRNA 表达的影响 与对照组相比,大黄素在 0.05, 0.1, 0.15 mmol·L⁻¹ 浓度处理的细胞 Cat K, Cat D mRNA 的相对表达量均升高(P < 0.05), 大黄素为 0.15 mmol·L⁻¹ 时 Cat D mRNA 相对表达量达到最高峰值; 大黄素为 0.1 mmol·L⁻¹ 时 Cat K mRNA 相对表达量达到峰值。见图 1, 表 2。

表 2 PCR 检测不同浓度大黄素对 CCC-SMC-1 细胞中 Cat K, Cat D mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 2 Different concentrations of emodin impact on gene expression of relative amount of Cat K and Cat D of CCC-SMC-1 were found with help of PCR ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	浓度 /mmol·L ⁻¹	相对表达量	
		Cat D	Cat K
对照	-	1.62 ± 0.51	0.53 ± 0.06
大黄素	0.05	2.51 ± 0.34 ¹⁾	1.27 ± 0.25 ¹⁾
	0.10	3.60 ± 0.49 ¹⁾	1.55 ± 0.21 ¹⁾
	0.15	4.97 ± 0.60 ¹⁾	1.19 ± 0.16 ¹⁾
	0.20	1.76 ± 0.15	0.71 ± 0.10
	0.25	1.55 ± 0.13	0.64 ± 0.14

作用^[8]。Cat K 是在动脉粥样硬化斑块的形成、发展、破裂以及破裂后修复均发挥重要作用。早期动脉粥样硬化斑块中, Cat K 主要存在于内膜和中膜的平滑肌细胞中, 进展期粥样斑块中, Cat K 则主要存在于巨噬细胞和平滑肌细胞中^[9]。白细胞 Cat K 缺陷导致斑块中弹性薄层破碎减少、胶原蛋白含量明显下降、巨噬细胞数量和斑块中凋亡、坏死面积增加, 提示白细胞 Cat K 是决定动脉粥样硬化斑块组成和易损性的重要因素^[10]。本实验结果表明, 大黄素在 0.05, 0.10, 0.15 mmol·L⁻¹ 均能上调 CCC-SMC-1 细胞中 Cat K mRNA 的表达, 与对照组比较统计学意义显著, 且在剂量为 0.1 mmol·L⁻¹ 时 Cat K mRNA 表达量最高。表明大黄素可促进 Cat K 在 CCC-SMC-1 细胞中的活化, 推测其可能触发溶酶体途径激活 Cat K, 降解细胞外基质中胶原, 抑制 CCC-SMC-1 细胞的增殖。有研究发现 Cat D 可能在动脉粥样硬化发病过程中也发挥重要作用^[11]。本课题研究结果显示大黄素在 0.05, 0.10, 0.15 mmol·L⁻¹ 也可上调 CCC-SMC-1 细胞中 Cat D mRNA 的表达。同时



1, 2. 大黄素 0.25 mmol·L⁻¹; 3, 4. 大黄素 0.2 mmol·L⁻¹; 5, 6. 大黄素 0.15 mmol·L⁻¹; 7, 8. 大黄素 0.1 mmol·L⁻¹; 9, 10. 大黄素 0.05 mmol·L⁻¹; 11, 12. 对照组

图 1 不同浓度大黄素对 CCC-SMC-1 细胞中 Cat K, Cat D mRNA 表达的影响

Fig. 1 Different concentrations of emodin up Cat K and Cat D expression in cell lines CCC-SMC-1

4 讨论

AS 是导致冠心病等心脑血管疾病的主要病理基础^[5]。血管平滑肌细胞的异常增生和迁移, 斑块破裂及血栓形成, 是导致 AS 发生的一个重要病理改变^[6]。实验研究表明大黄素能有效的抑制血管平滑肌细胞(VSMC)的增殖^[7]。

组织蛋白酶主要通过调节炎症反应、促使新血管形成、改变斑块形态学、调节胆固醇代谢等环节在动脉粥样硬化斑块的形成与稳定的维持中发挥重要

本实验结果显示,在大黄素浓度为 0.05,0.10,0.15 mmol·L⁻¹时,CCC-SMC-1 细胞中 Cat K,Cat D mRNA 相对表达量均显著上调,且两者的峰值分别为 0.10 mmol·L⁻¹和 0.15 mmol·L⁻¹,提示二者在兔主动脉平滑肌细胞中发挥的效应可能是相互协调的;当大黄素浓度提高至 0.20 mmol·L⁻¹后,CCC-SMC-1 细胞中 Cat K,Cat D mRNA 相对表达量与正常组相比无显著性差异,可能是超过大黄素对 CCC-SMC-1 细胞的半数抑制浓度,细胞出现较多的坏死,细胞存活率降低,影响了 Cat K,Cat D mRNA 表达的总量。

综上所述,大黄素抑制体外培养的 CCC-SMC-1 细胞增殖可能机制与其活化细胞溶酶体 Cat 活化有关,对于大黄素的综合利用及抗 AS 药物的开发有重要意义。

[参考文献]

[1] 史旭波,胡大一. 动脉粥样硬化发病机制的新认识[J]. 临床荟萃,2006,21(24):1751-1753.
[2] Rodgers K J, Watkins D J, Miller A L, et al. Destabilizing role of cathepsin S in murine atherosclerotic plaques[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2006,26(4):851-856.
[3] 管淑玉,苏薇薇. 何首乌的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中南药学,2008,6(4):454-455.
[4] 邱炳林,张风森,王文峰,等. 大黄素衍生物的合成及

其应用研究进展[J]. 海峡药学,2010,22(1):6-12.

[5] 张微,黄小民. 动脉粥样硬化的中医辨证论治[J]. 中医药研究,2011,9(2):216-218.
[6] 王翔飞,葛均波,孙爱军,等. 大黄素自身抑制血管平滑肌细胞迁移和增殖[J]. 中国介入心脏病学杂志,2006,14(4):241-244.
[7] Qin Yanwen, Shi Guo-Ping. CysteinyI cathepsins and mast cell proteases in the pathogenesis and therapeutics of cardiovascular diseases [J]. Pharmacol Therapeutics, 2011, 131(3):338-350.
[8] 吴建芳,金沂,李国元. 组织蛋白酶 K,S 与动脉粥样硬化及其斑块不稳定性关系[J]. 临床心血管病杂志,2008,24(11):867-869.
[9] Barascuk N, Register T C, Larsen L, et al. Human macrophage foam cells degrade atherosclerotic plaques through cathepsin K mediated processes [J]. BMC Cardiovasc Disord, doi:10.1186/1471-2261-10-19.
[10] Lutgens E, Lutgens S P, Faber B C, et al. Disruption of the cathepsin K gene reduces atherosclerosis progression and induces plaque fibrosis but accelerates macrophage foam cell formation [J]. Circulation, 2006, 113(1):98-107.
[11] 张志钢,张晓兰,舒青,等. 动脉粥样硬化大鼠动脉的基因芯片分析及组织蛋白酶 D 的表达变化[J]. 现代生物医学进展,2008,8(2):252-254,251.

[责任编辑 聂淑琴]