

# 丹参酮 II<sub>A</sub> 对血管平滑肌细胞内质网 应激相关基因表达的影响

付强, 张妍, 沈晓君\*, 赵君玫  
(河南中医学院, 郑州 450046)

**[摘要]** 目的:研究丹参酮 II<sub>A</sub> 对同型半胱氨酸(HCY)诱导增殖血管平滑肌细胞(VSMC)内质网应激(ERS)相关基因免疫球蛋白重链结合蛋白(Bip)表达的影响,探讨丹参酮 II<sub>A</sub> 抗动脉粥样硬化的机制。方法:建立 HCY 诱导的兔 VSMC 增殖模型,与不同浓度的丹参酮 II<sub>A</sub> 共同培养,Annexin/PI 双染法、原位缺口末端标记(TUNEL)法检测细胞凋亡率,观察凋亡细胞形态;实时荧光定量 PCR 检测 Bip 基因表达。结果:丹参酮 II<sub>A</sub> 可显著促进兔 VSMC 凋亡,细胞凋亡率与 HCY 组相比差异显著( $P < 0.01$ ),且存在剂量依赖性;丹参酮 II<sub>A</sub> 组 Bip mRNA 表达水平显著升高,与 HCY 组相比差异显著( $P < 0.05, P < 0.01$ )。结论:丹参酮 II<sub>A</sub> 上调 Bip 基因表达,放大 ERS 信号,诱导兔 VSMC 凋亡,可能是其抗动脉粥样硬化的机制之一。

**[关键词]** 丹参酮 II<sub>A</sub>; 血管平滑肌细胞; 同型半胱氨酸; 免疫球蛋白重链结合蛋白; 细胞凋亡

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0280-04

**[doi]** 10.11653/syjf2013140280

## Effect of Tanshinone II<sub>A</sub> on Expression of Genes Related to Vascular Smooth Muscle Cells Endoplasmic Reticulum Stress

FU Qiang, ZHANG Yan, SHEN Xiao-jun\*, ZHAO Jun-mei

(Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

**[收稿日期]** 20130528(147)

**[基金项目]** 河南省基础与前沿技术研究计划项目(112300410051);郑州市科技创新团队项目(121PCXTD520)。

**[第一作者]** 付强,副教授,从事心血管病理及中医药防治研究,Tel:13937163799,E-mail:fuqiang@haictm.edu.cn

**[通讯作者]** \* 沈晓君,教授,从事心血管病理及中医药防治研究,Tel:13526669581,E-mail:shenxiaojun0628@163.com

- [9] 李燕菊,杜浩,李琴山,等. 贵州产天冬醇提液体外氧自由基清除作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15):182.
- [10] 张改平,杨建雄,朱玉安,等. 紫草提取物的体外抗氧化活性研究[J]. 武汉植物学研究, 2007, 25(5):490.
- [11] 吕丽爽. 何首乌中二苯乙烯苷的体外抗氧化研究[J]. 食品科学, 2007, 28(1):313.
- [12] Kumaran A, Karmakaran R J. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Celeus aromaticus* [J]. Food Chem, 2006, 97(1):109.
- [13] Suresh Kumar K, Ganesan K, Subba Rao P V. Antioxidant potential of solvent extracts of *kappaphycus alvarezii* (doty) doty-inedible seaweed [J]. Food Chem, 2008, 107(1):289.
- [14] Contini M, Baccelloni S, Massantini R, et al. Extraction of natural antioxidants from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell and skin wastes by long maceration at room temperature [J]. Food Chem, 2008, 110(3):659.
- [15] 周玖瑶,黄桂英,韩坚. 三叶人字草抗炎镇痛作用研究[J]. 中国医药导报, 2007, 20(4):155.
- [16] 王霞,周玖瑶,孙毅东,等. 三叶人字草对 IgA 肾病模型大鼠的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2010, 27(2):147.
- [17] 余应嘉,王霞,吴俊标,等. 三叶人字草对小鼠免疫系统及胃肠运动的药效作用[J]. 今日药学, 2010, 20(9):9.
- [18] 周玖瑶,陈蔚文,黄桂英,等. 三叶人字草止血作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(3):65.

[责任编辑 李玉洁]

**[ Abstract ] Objective:** Effect of tanshinone Ⅱ<sub>A</sub> on homocysteine (HCY) induced proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) of endoplasmic reticulum stress (ERS) gene of immunoglobulin heavy chain binding protein (Bip) expression, to explore the mechanism of tanshinone Ⅱ<sub>A</sub> in atherosclerosis. **Method:** To establish the proliferation of rabbit VSMC model induced by HCY, incubated with different concentration of tanshinone Ⅱ<sub>A</sub>, Annexin/PI double staining, in situ nick end labeling (TUNEL) method to detect apoptosis rate, to observe the morphology of cell apoptosis; real-time fluorescent quantitative PCR detection the expression of Bip gene. **Result:** Tanshinone Ⅱ<sub>A</sub> can significantly promote the apoptosis of rabbit VSMC, cell apoptosis rate compared with HCY group ( $P < 0.01$ ), and there was a dose dependent; expression levels of tanshinone Ⅱ<sub>A</sub> group Bip mRNA were significantly increased, compared with the HCY group had significant difference ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Expression of tanshinone Ⅱ<sub>A</sub> up-regulation of Bip gene, amplified ERS signal, induce apoptosis of rabbit VSMC, which may be one of the mechanisms of atherosclerosis.

**[ Key words ]** tanshinone Ⅱ<sub>A</sub>; vascular smooth muscle cell; homocysteinemia; immunoglobulin heavy chains binding protein; cell apoptosis

动脉粥样硬化(athemsclerosis, AS)的发病机制至今尚未明了,与其发生发展密切相关的因素主要包括内膜下脂质沉积、血管内皮损伤、平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)和纤维组织增生、血小板黏附以及各种细胞因子、黏附分子介导的炎症反应等<sup>[1]</sup>,其中VSMC迁移、增殖、摄取LDL及VLDL转变成泡沫细胞是AS病变形成的关键环节<sup>[2]</sup>,因此,干预VSMC迁移和增殖是减轻AS程度的有效途径。本实验以AS新型危险因素同型半胱氨酸(homocysteinemia, HCY)为刺激因子,通过观察中药单体丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>对VSMC内质网应激(endoplasmicreticulumstress, ERS)相关基因免疫球蛋白重链结合蛋白(immunoglobulin heavy chains binding protein, Bip)表达的影响,探讨丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>抗动脉粥样硬化药理作用及靶点,为丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>防治AS等心血管疾病的研究提供理论和实验依据。

## 1 材料

**1.1 药物** 丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>对照品由中国药品生物制品鉴定所提供(批号200619)。瑞舒伐他汀(可定),阿斯利康制药有限公司(批号ER322)。HCY为Sigma公司产品(批号C-7352),纯度≥98%。

**1.2 细胞** 兔主动脉平滑肌细胞购自中国协和医科大学基础医学院细胞培养中心。

**1.3 主要仪器与试剂** 7500 Fast Dx实时定量PCR仪(美国Applied Biosystem公司);Tgradient PCR扩增仪(德国Whatman Biometra公司);FACS Calibur流式细胞仪(BD, USA公司产品);IX71-F22FL/PH型倒置相差荧光显微镜(奥林巴斯);DMEM(Gibco, Carlsbad, CA, USA)、胰蛋白酶(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA);胎牛血清(杭州四季青公司产

品);逆转录试剂盒、实时定量试剂盒、总RNA提取试剂(均为日本Takara公司产品)。

## 2 方法

**2.1 原位缺口末端标记法(TUNEL)检测VSMC凋亡率** 制备细胞悬液,实验分为丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>组、瑞舒伐他汀组、模型组和空白对照组,各组细胞按 $1 \times 10^8/L$ 密度稀释,接种于96孔培养板进行培养。24 h后丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>组、瑞舒伐他汀组和模型组加入剂量为 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot L^{-1}$ 的HCY,空白组仅加等体积的培养液,培养24 h后,瑞舒伐他汀组加入终浓度 $10 \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ 的瑞舒伐他汀,丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>处理组分别加入终质量浓度0.5, 1  $\text{mg} \cdot L^{-1}$ 的丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>,培养48 h。PBS洗片3次后与阻断剂(0.03%  $\text{H}_2\text{O}_2$  甲醛溶液)室温孵育30 min,洗片,与通透液(0.1% TritonX-100溶于0.1%枸橼酸钠溶液中冰浴孵育2 min。PBS冲洗2次,擦干样品周围水滴,加反应混合液,37℃孵育60 min,为防止蒸发和保证TUNEL反应混合液的均匀分布,在孵育过程中加盖玻片, PBS冲洗3次,荧光显微镜下观察分析结果。

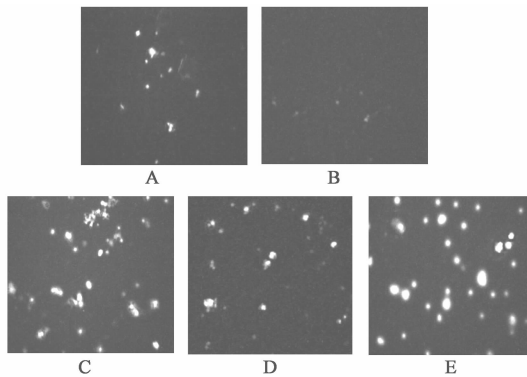
**2.2 Annexin V-PI法检测VSMC凋亡率** 转移至离心管中PBS洗涤培养板孔一次后,胰酶消化细胞。将消化下来的细胞再加入培养液中,混匀,  $1\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min,弃去上清液, PBS轻轻重悬使成单细胞悬液后计数。  $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min,弃去上清液,加入195  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC结合液重悬细胞,再加入5  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC,混匀。20~25℃避光孵育10 min,  $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min,弃去上清液,加入190  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC结合液重悬细胞,再加入10  $\mu\text{L}$  PI混匀,随即用流式细胞仪检测凋亡率。

**2.3 实时荧光定量 PCR 检测 VSMC Bip mRNA 表达** 引物设计: $\beta$ -actin, 上游:5'-CTACAATGAGCTG-GTGTGG-3', 下游:5'-TAGCTCTTCTTCAGGGAGGA-3'。Bip, 上游:5-TCT AGGTGAACGACCCCTAAC-3, 下游:5-GTTCTCTCAATTTTCTCCCAAC-3; 提取每组细胞总 RNA, 逆转录合成 cDNA。PCR 反应体系为 10  $\mu$ L:SYBR Green I Mixture 5  $\mu$ L, 上游引物 0.25  $\mu$ L, 下游引物 0.25  $\mu$ L, 模板 cDNA 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 3.3  $\mu$ L, Rox 0.2  $\mu$ L, 反应条件:95  $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s; 58  $^{\circ}$ C 退火 40 s; 72  $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 共 45 个循环, 每个样本的 RNA 含量均根据各自的  $\beta$ -actin 含量进行标准化, 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> 法分析 Bip 基因相对表达量。

**2.4 统计学处理** 各组测定值以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 10.0 软件包进行单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 方法。P < 0.05 为有显著性差异。

### 3 结果

**3.1 TUNEL 法检测细胞凋亡** 荧光显微镜观察空白组可见个别凋亡细胞和少量细胞碎屑, HCY 模型组未见凋亡细胞; 丹参酮 II<sub>A</sub> 组和可定组镜下见凋亡细胞数目明显增多并可见凋亡小体, 凋亡细胞体积小, 核染色质凝聚、浓缩见图 1。



A. 空白; B. 模型; C. 瑞舒伐他汀; D. 0.5 mg·L<sup>-1</sup>丹参酮 II<sub>A</sub>; E. 1 mg·L<sup>-1</sup>丹参酮 II<sub>A</sub>

图 1 VSMC 凋亡的荧光染色细胞涂片 (×100)

**3.2 Annexin V-FITC/PI 检测结果** 丹参酮 II<sub>A</sub> 组和瑞舒伐他汀组凋亡率均高于模型组 (P < 0.01), 且随丹参酮 II<sub>A</sub> 药物剂量的增加凋亡率增加, 见表 1。

**3.3 丹参酮 II<sub>A</sub> 对 VSMC Bip mRNA 表达的影响** 实时荧光定量 PCR 结果显示, HCY 组 Bip mRNA 表达升高, 与空白组比较差异显著 (P < 0.01); 丹参酮 II<sub>A</sub> 组和瑞舒伐他汀组 Bip mRNA 表达明显升高, 与模型组比较差异显著 (P < 0.05, P < 0.01), 见

表 1 丹参酮 II<sub>A</sub> 作用 48 h 对 VSMC 凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 / mg·L <sup>-1</sup>	凋亡率 / %
空白对照	-	2.73 ± 0.31
HCY <sup>3)</sup>	10 <sup>-4</sup>	0.28 ± 1.02 <sup>1)</sup>
瑞舒伐他汀 <sup>4)</sup>	10	11.04 ± 1.18 <sup>2)</sup>
丹参酮 II <sub>A</sub>	0.5	9.33 ± 0.36 <sup>2)</sup>
	1.0	13.12 ± 0.74 <sup>2)</sup>

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>P < 0.01; 与 HCY 组比较<sup>2)</sup>P < 0.01; <sup>3)</sup>HCY 的浓度单位是“mol·L<sup>-1</sup>”; <sup>4)</sup>瑞舒伐他汀的浓度单位是“ $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>”(表 2 同)。

表 2。

表 2 丹参酮 II<sub>A</sub> 对 VSMC Bip mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 / mg·L <sup>-1</sup>	GRP78mRNA
空白对照	-	0.15 ± 0.36
HCY <sup>3)</sup>	10 <sup>-4</sup>	3.29 ± 0.31 <sup>1)</sup>
瑞舒伐他汀 <sup>4)</sup>	10	8.81 ± 0.23 <sup>2)</sup>
丹参酮 II <sub>A</sub>	0.5	4.52 ± 0.61 <sup>2)</sup>
	1.0	12.72 ± 0.28 <sup>2)</sup>

### 4 讨论

血管内皮细胞损伤、脂质浸润、血管壁炎症反应、VSMC 增生迁移、摄取脂质转化为泡沫细胞等以被确认是 AS 形成的关键环节。血液成分、血管壁组成细胞和细胞外基质相互作用促进 AS 病变发生、发展, 血管内皮功能障碍、VSMC 增殖是 AS 的关键环节已被确立, 因此, 保护内皮细胞、促进 AS 时过度增殖的 VSMC 凋亡是 AS 防治研究领域所面临的重大课题<sup>[3-4]</sup>。HCY 是蛋氨酸代谢的中间产物, 研究证实高 HCY 血症是 AS 的独立危险因素, 循环中的 HCY 水平与 AS 发生及严重程度有明显相关性。研究表明, HCY 对体外培养的 VSMC 和 AS 病灶中的 VSMC 都具有促增殖作用, 提示 HCY 通过诱导 VSMC 的增殖导致 AS 的发生<sup>[5]</sup>。内质网是加工蛋白质的主要细胞器, 各种应激原可通过诱发内质网腔中错误折叠或未折叠蛋白质堆积而激活未折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR) 及细胞凋亡信号通路等, 称为内质网应激。研究证实 ERS 可能是 HCY 所致 VSMC 过度增殖的重要机制, 在 AS 的发生发展过程中发挥重要作用<sup>[6]</sup>。在动脉硬化大鼠模型中, 高同型半胱氨酸血症能加强 ERS, 促进 AS 的进展<sup>[7]</sup>。研究显示<sup>[8]</sup>, HCY 促进 VSMC 增殖的同时内质网应激相关基因表达量增高, 提示 ERS 可能是 HCY 所致 VSMC 过度增殖的机制之一。

Bip/葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated

protein, GRP78) 是位于内质网上重要的分子伴侣, 属热休克蛋白 70 家族成员, 参与调节内质网钙稳态、阻止内质网新生肽聚集以及启动未折叠蛋白反应等细胞生命过程。GRP78 基因启动子上存在内质网应激反应元件, 特异性转录因子 ATF6 等与 Bip 启动子上顺式作用元件发生动态结合, 从而调节 Bip 基础性或诱导性转录表达<sup>[9]</sup>。一定程度的 ERS 可诱导 Bip 表达, 减轻错误折叠或未折叠蛋白质在内质网腔堆积造成的细胞损伤, 使内质网内稳态恢复, 促进细胞存活; 但过强或过久的 ERS 则会启动内质网 CHOP/GADD153、JNK、Caspase12 三条途径诱导细胞凋亡<sup>[10]</sup>。

丹参其化学成分分为脂溶性和水溶性两部分, 丹参酮Ⅱ<sub>A</sub> 是脂溶性成分的代表, 是丹参有效成分之一, 被广泛应用于心血管疾病的治疗<sup>[11]</sup>。促分裂素原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 链是真核生物信号传递网络中的重要途径之一, 活化的 MAPK 可以磷酸化转录因子 AP-1、Elk-1, 从而使增殖信号传递到核内, 启动基因转录, 诱导 VSMC 的增殖。研究证实, 丹参酮Ⅱ<sub>A</sub> 可通过阻断 MAPK 通路抑制 VSMC DNA 合成和异常增殖<sup>[12]</sup>。研究发现丹参酮Ⅱ<sub>A</sub> 可干预 CyclinD1 及 CDK4 的表达, 拮抗 HCY 诱导的 VSMC 增殖, 且丹参酮Ⅱ<sub>A</sub> 抗 VSMC 增殖的作用与其剂量有关<sup>[13]</sup>。本实验中丹参酮Ⅱ<sub>A</sub> 组 VSMC 凋亡显著, 进一步支持丹参酮Ⅱ<sub>A</sub> 促进 VSMC 凋亡的理论; 丹参酮Ⅱ<sub>A</sub> 组 Bip 基因高表达, 提示 ERS 可能与丹参酮Ⅱ<sub>A</sub> 诱导的细胞凋亡过程有关, 可能是其抗动脉粥样硬化的机制之一。

#### [参考文献]

[1] Ghatak S B, Dhamecha P S, Bhadada S V, et al. Investigation of the potential effects of metformin on atherothrombotic risk factors in hyperlipidemic rats[J]. Eur J Pharmacol, 2011, 659(2/3): 213.

- [2] 高爱社, 苗莉, 沈晓君. 淫羊藿苷对大鼠颈总动脉内膜损伤后骨桥蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6): 163.
- [3] 魏晏, 沈晓君. 淫羊藿苷对 HCY 诱导的血管内皮细胞内质网应激的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7): 147.
- [4] 张海燕, 邹伟魁, 贺娅, 等. 中药对血管平滑肌细胞的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21): 273.
- [5] 魏晏, 陈芳, 沈晓君. 淫羊藿苷对 HCY 诱导增殖血管平滑肌细胞的促凋亡作用[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(1): 21.
- [6] 贾方, 孙建辉, 吴春芳, 等. 阿托伐他汀对同型半胱氨酸诱导内皮细胞内质网应激的抑制作用[J]. 江苏大学学报: 医学版, 2012, 22(6): 483.
- [7] Zhou J, Austin R C. Contributions of hyperhomocysteinemia to atherosclerosis: causal relationship and potential mechanisms[J]. Biofactors, 2009, 35(2): 120.
- [8] 沈晓君, 何航. 淫羊藿苷对 HCY 诱导增殖血管平滑肌细胞 GRP78 表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(15): 1964.
- [9] 吴逸园, 杨业鹏, 李载权. 葡萄糖调节蛋白 78 研究进展[J]. 生理科学进展, 2009, 40(2): 135.
- [10] Matsushita E, Asai N, Enomoto A. Protective role of gipie, a girdin family proten, in endoplasmic reticulum stress responses in endothelial cells[J]. Mol Biol Cell, 2011, 22(6): 736.
- [11] 杨征, 邱敏. 丹参酮Ⅱ<sub>A</sub> 的心血管作用及机制研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(4): 372.
- [12] Li X, Du J R, Yu Y, et al. Tanshinone II<sub>A</sub> inhibits smooth muscle proliferation and intimal hyperplasia in the rat carotid balloon-injured model through inhibition of MAPK signaling pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2010, 129(2): 273.
- [13] 韩芬, 杨晓, 沈晓君. 丹参酮Ⅱ<sub>A</sub> 对血管平滑肌细胞 CyclinD1 和 CDK4 表达的影响[J]. 中医学报, 2012, 27(11): 1443.

[责任编辑 蔡仲德]