

补阳还五汤抑制同型胱氨酸介导的血管平滑肌细胞增殖

袁禄根¹, 刘玉晖^{1*}, 游宇², 佟阳¹, 严雪梅¹

(1. 江西中医学院药学院, 南昌 330004; 2. 南昌大学第一附属医院消化内科, 南昌 330006)

[摘要] 目的: 探讨补阳还五汤抑制同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)介导的血管平滑肌细胞增殖及其作用机制。方法: 雄性 SD 大鼠补阳还五汤给药剂量为 $14.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 给药 7 d 制备含药血清, 取适量含药血清配制含药血清为 5%, 10%, 20% 3 种培养基, 取对数期细胞, 按照分组将 5%, 10%, 20% 含药血清培养基预处理细胞 1 h 后加入 Hcy $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用 24 h, 流式细胞技术测定细胞周期, Western-blotting (WB) 测定增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 的蛋白表达量, 用荧光探针 DCFH-DA 试剂盒对细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的聚积量进行测定。结果: 补阳还五汤能抑制血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 细胞周期的进程, 其中 5% 含药血清组细胞处在 S + G₂ 期为 47.34% ($P < 0.05$), 10% 含药血清组为 38.81% ($P < 0.01$), 20% 含药血清组为 27.95% ($P < 0.01$), 下调细胞内 PCNA 的表达 ($P < 0.01$), 测得补阳还五汤给药组细胞内 ROS 的荧光强度较 Hcy 组弱。结论: 补阳还五汤能显著抑制 Hcy 介导的 VSMC 增殖, 其作用机制可能是通过降低细胞内 ROS 的聚积量。

[关键词] 补阳还五汤; 同型半胱氨酸; 血管平滑肌细胞; 增殖细胞核抗原; 活性氧

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0187-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121107.1337.005.html>

[网络出版时间] 2012-11-7 13:37

Buyang Huanwu Tang Inhibits Homocysteine-mediated Smooth Muscle Cell Proliferation

YUAN Lu-gen¹, LIU Yu-hui^{1*}, YOU Yu², TONG Yang¹, YAN Xue-mei¹

(1. Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. Department of Digestive Medicine, the First Affiliated Hospital, Nanchang University, Nanchang 330006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate whether Buyang Huanwu decoction inhibits homocysteine (Hcy) - mediated smooth muscle cell proliferation and related mechanisms. **Method:** Thirty male mice were treated with Buyang Buyang Huanwu decoction ($14.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) for 7 days to obtain Buyang Huanwu decoction contained serum, concentration of which was as 5%, 10%, 20% and added to smooth muscle cells. After 1 hour homocysteine was added and cultured for 24 hours. Cell cycle distribution and the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) were detected by Western-blotting, DCFH-DA was used for examining the levels of reactive oxygen species (ROS). **Result:** Buyang Huanwu decoction could decrease ROS content, significantly inhibited cell cycle of VSMc, as 20% doses make 27.95% ($P < 0.01$) cells at cell cycle of S + G₂; and down regulated the expression of PCNA ($P < 0.01$); significantly inhibited ROS production induced by Hcy in VSMCs. **Conclusion:** Buyang Huanwu decoction significantly inhibit Hcy-mediated proliferation of VSMCs, and inhibition of ROS production may be related molecular mechanisms.

[Key words] Buyang Huanwu Tang; Hcy; VSMc; PCNA; ROS

[收稿日期] 20120614(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30960505, 81160526)

[第一作者] 袁禄根, 研究生, E-mail: 344561939@qq.com

[通讯作者] * 刘玉晖, 博士, 副教授, 从事中药药理学研究, Tel: 079187118919, E-mail: liuyuhui77@126.com

近期研究发现,由同型半胱氨酸的代谢异常导致的高同型半胱氨酸血症是动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)疾病的独立危险因素^[1]。同型半胱氨酸是蛋氨酸代谢过程中的一个重要中间产物,主要通过再甲基化途径,转硫代途径及释放到细胞外液代谢。它可能主要损伤血管内皮细胞,促进血管平滑肌细胞增殖及脂质代谢而导致动脉粥样硬化。血管内皮功能紊乱,血管平滑肌异常增殖以及细胞外基质的聚集,是动脉粥样硬化发展的关键步骤^[2]。

增殖细胞抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)作为反映平滑肌细胞增殖程度的一个可靠指标可用于观测 AS 的进程。越来越多的证据表明活性氧物质(reactive oxygen species, ROS)可以作为细胞内信号刺激细胞增殖^[3]。中药在 AS 等血管疾病的防治中具有良好的效果,结合中药血清药理学等方法,加强中药活性单体化合物对 VSMC 调节作用的深入研究或将给血管疾病的防治带来新的希望。^[4]通过本实验初步探讨研究补阳还五汤对同型半胱氨酸介导的血管平滑肌细胞增殖的影响以及其影响机制。

1 材料

1.1 药品 补阳还五汤(黄芪 120 g,当归尾 6 g,赤芍 5 g,川芎 3 g,红花 3 g,桃仁 3 g,地龙 3 g)水煎 2 次,生药含量为 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。由江西中医学院附属医院提供。

1.2 试剂 同型半胱氨酸(Hcy, Sigma 公司);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, GIBCO 公司),高糖完全培养基(DMEM, Hyclone 公司),活性氧(ROS)检测试剂盒、抗氧化剂 N 乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)均购于碧云天生物技术有限公司;PCNA 小鼠单克隆抗体(购于武汉博士德生物工程有限公司);actin 小鼠单克隆抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司);辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG(H + L)(康成生物),十二烷基磺酸钠(SDSNa),过硫酸胺(ammolomium persulfate, APS),聚丙烯酰胺(acrylamide), (均为 Sigma 公司);四甲基乙二胺(TEMED, Gibco 公司);Tris · HCl, SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液($5 \times$), 30% Acr-Bis(29:1), BeyoECL Plus(超敏 ECL 化学发光试剂盒), 预染蛋白质相对分子质量标准显影定影试剂盒;BCA 蛋白浓度测定试剂盒, PMSF($100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), IP 细胞裂解液, 20% Tween 20(均为碧云天生物技术研究所), 10% 过硫酸胺(天津市大茂化学试剂厂)。

1.3 仪器 台式高速冷冻离心机(Thermo Scientific Biofuge Stratos), CO₂ 细胞培养箱(美国 Forma 公司), PB-10 精密 pH 计(梅特勒公司), 全自动立式电热压力蒸气灭菌器(上海博迅实业有限公司设备厂), Western blotting 电泳仪、Western blot 电转仪(美国 Bio-Rad 公司), GelPro 4.5 凝胶成像分析系统(美国), Leica DMI3000 B 荧光倒置显微镜(德国 Leica 公司)。

1.4 细胞株 人血管平滑肌细胞株(编号 RS20228), 购自上海瑞奇生物科技有限公司。

1.5 动物 SD 雄性大鼠 200 ~ 220 g, 由江西中医学院动物中心提供, 许可证号 SCXK(赣)2005-0001。

2 方法

2.1 大鼠含药血清的制备 取 30 只 SD 雄性大鼠, 随机分成给药组和空白组两组。给药组 ig 剂量为 $14.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每天 ig 1 次, 连续 ig 7 d。末次给药禁食不禁水 12 h, 给药后 1 h 乙醚麻醉, 腹主动脉采血, 采用一次性非抗凝真空采血管收集全血。4 ℃ 静置 4 h, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 分离血清, 经 56 ℃ 恒温灭活 30 min 处理后, $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜除菌, -20 ℃ 保藏备用。

2.2 人血管平滑肌细胞的培养及分组 用含有 10% 灭活胎牛血清、 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素、 $100 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素的 DMEM 培养液, 37 ℃ 5% CO₂ 饱和湿度条件下传代培养。实验用细胞均处于对数生长期, 将对数生长期细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化, 调整细胞密度为 $2 \times 10^5 / \text{mL}$, 根据培养板取相应的量接种(6 孔板每孔接种 2 mL, 96 孔板每孔接种 200 μL)。实验分为对照组、Hcy 组终浓度 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、Hcy + 终浓度 5% BYHW 含药血清组、Hcy + 10% BYHW 含药血清组、Hcy + 终浓度 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 20% BYHW 含药血清组。

2.3 细胞周期分析 将处于对数生长期的血管平滑肌细胞, 按 $2 \times 10^5 / \text{mL}$ 以 2 mL 体积接种于 6 孔板中。待血管平滑肌平铺后加入含药血清使其终浓度分别为 5%, 10%, 20%, 37 ℃ 5% CO₂ 饱和湿度下培养 1 h 后加入 Hcy 使其终浓度为 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($n = 6$), 在细胞培养环境下作用 24 h, 终止培养。取 $0.5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^6$ 个细胞离心弃上清, PBS 洗涤离心后弃上清;混匀细胞沉淀形成混悬液后, 加入 2 mL 预冷的 70% 乙醇室温孵育 20 min, 离心弃上清; $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PI 重悬细胞, 常温孵育 30 min 后上以标准程序用流式细胞仪检测, 用 Medfit 软件分析结果,

计算各组 S 期 + G₂ 期细胞所占的百分比。

2.4 细胞总蛋白提取和 Western-blotting 检测 收集细胞,用冷 PBS 洗涤 3 次,将细胞重悬于细胞裂解液 [150 mmol·L⁻¹氯化钠,1% 乙基苯基聚乙二醇 (NP40),0.5% 脱氧胆酸钠,0.1% 十二烷基硫酸钠 (SDS),50 mmol·L⁻¹三羟甲基氨基甲烷 (pH 7.9),10 mmol·L⁻¹氟化钠,苯甲基磺酰氟 (PMSF) 和蛋白酶抑制剂],冰浴 30 min,16 000 r·min⁻¹离心 30 min,取上清液,用 BCA 试剂盒测定其中的蛋白浓度。

灌制 5% 的浓缩胶和 10% 的分离胶,每泳道加总蛋白量 40 μg 进行电泳分离,电泳时,以 150 V 恒压电泳,至溴酚蓝指示剂离 SDS-PAGE 胶底部约 1 cm 处结束,取出凝胶,进行转膜。将电泳凝胶取出,置入转膜夹中,按阴极、滤纸、凝胶、PVDF、滤纸、阳极依次放好,在转膜槽中以 4 ℃ 120 V 电压转硝酸纤维素膜约 2 h。经半干转印至 PVDF 膜上。在含有 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液中常温封闭 1 h,将封闭好的膜转入杂交袋中加封闭液稀释的一抗 (鼠抗人 PCNA:1:500;鼠抗人 β-actin:1:1 000),4 ℃ 孵育过夜;加入 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 多抗 (1:2 000 稀释);37 ℃ 孵育 1 h,TBST 洗涤,ECL 化学发光试剂自显影。Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件进行吸光度分析。

2.5 ROS 含量的测定 各组细胞处理过程同 2.3,阳性对照组加入 Rosup (活性氧阳性对照试剂) 刺激细胞 30 min,按照 1:1 000 的比例用无血清 DMEM 将 DCFH-DA 稀释,去除细胞原培养液,加入稀释好的 DCFH-DA,6 孔板每孔 1 mL,在细胞培养箱内孵育 20 min。用无血清 DMEM 洗涤 3 次,充分除去细

胞外的 DCFH-DA。最后利用荧光倒置显微镜拍照、观察比较荧光强度。

2.6 统计分析 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异比较用 ANOVA 及 Newman-Student 多重比较 *t* 检验分析,由 SPSS 11.0 统计软件完成。双侧 $P < 0.05$ 为有统计学显著意义。

3 结果

3.1 Hcy 对血管平滑肌细胞周期的影响及补阳还五汤含药血清的干预作用 Hcy 处理后,可以诱导血管平滑肌细胞进入 S 或 G₂ 期 ($P < 0.01$),3 个剂量的 BYHW 呈剂量依赖性抑制 Hcy 诱导的血管平滑肌细胞的细胞周期进程 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 1。

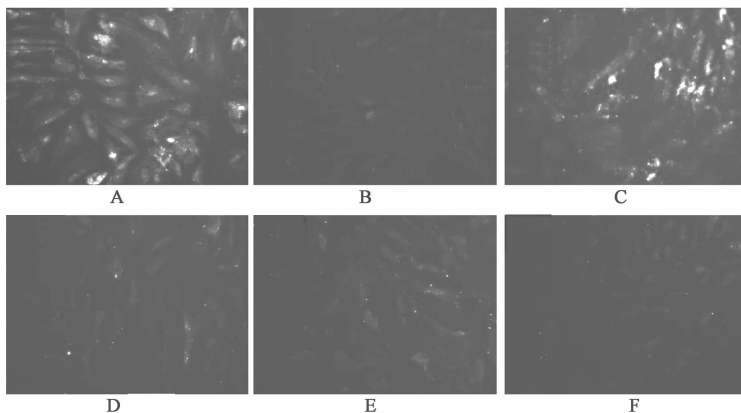
3.2 Hcy 对血管平滑肌细胞增殖标志物 PCNA 表达的影响及补阳还五汤含药血清的干预作用 Hcy 处理后,血管平滑肌细胞的增殖标志物 PCNA 表达明显增加 ($P < 0.01$),3 个剂量的 BYHW 呈剂量依赖性抑制 Hcy 诱导的 PCNA 的增加 (均 $P < 0.01$)。见表 1。

表 1 血管平滑肌细胞周期与 PCNA 表达 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	S 期或 G ₂ 期 /%	PCNA 灰度值
对照	17.85 ± 0.32	0.52 ± 0.03
Hcy 2 mmol·L ⁻¹	58.54 ± 1.45 ²⁾	2.01 ± 0.08 ²⁾
Hcy + 5% BYHW 含药血清	47.34 ± 1.94 ^{2,3)}	1.12 ± 0.07 ^{2,4)}
Hcy + 10% BYHW 含药血清	38.81 ± 0.62 ^{2,4)}	0.88 ± 0.04 ^{1,4)}
Hcy + 20% BYHW 含药血清	27.95 ± 0.95 ^{1,4)}	0.65 ± 0.04 ⁴⁾

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与 Hcy 组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 Hcy 对血管平滑肌细胞内 ROS 聚积量的影响及补阳还五汤含药血清的干预作用 HCY 诱导后



A. ROS 阳性组;B. 对照组;C. Hcy 2 mmol·L⁻¹;D. Hcy + 5% BYHW 含药血清组;
E. Hcy 2 mmol·L⁻¹ + 10% BYHW 含药血清组;F. Hcy 2 mmol·L⁻¹ + 20% BYHW 含药血清组

图 1 ROS 在平滑肌细胞内的聚积量

ROS 在平滑肌细胞内的聚积量明显增加,3 个给药剂量组能明显降低平滑肌细胞内 ROS 含量。见图 1。

4 讨论

同型半胱氨酸致动脉粥样硬化的机制主要包括促进炎症、诱导氧化应激、促进血管平滑肌细胞增殖以及促内皮细胞发生死亡^[5]。增殖细胞核抗原(PCNA)在细胞处于静止期,表达量降低,本实验结果显示,补阳还五汤含药血清对 Hcy 诱导的细胞周期进程呈现剂量依赖性抑制作用,同时能显著降低平滑肌细胞内 Hcy 诱导的 PCNA 表达上调。

氧化应激是指机体组织或细胞内氧自由基生成增加和清除能力降低,导致活性氧(ROS)家族在体内或细胞内蓄积而引起的氧化损伤过程。同型半胱氨酸上的自由巯基很容易自身氧化形成二硫键,同时产生包括超氧化物阴离子、过氧化氢及羟自由基等活性氧,进而引起细胞膜及血浆脂质过氧化^[6]。ROS 可以激活相应的包括丝裂素活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、细胞外调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK) 1/2 信号蛋白酶或转录因子,从而促进平滑肌细胞增殖^[7-11]。我们前期研究证实,补阳还五汤能明显抑制 Hcy 所致 ApoE^{-/-}小鼠 AS 病变的产生和发展与降低高 Hcy 症所致 ROS 含量的升高、抑制 MAPK、ERK 蛋白表达有关^[12]。本实验结果显示,经 Hcy 诱导的平滑肌细胞内 ROS 聚积量明显增高,补阳还五汤含药血清能降低细胞内 ROS 聚积量。

补阳还五汤是清代名医王清任创制的补气活血名方,由黄芪、赤芍、当归、地龙、川芎、红花、桃仁组成。现代医学研究表明,它不仅具有扩张血管,增加脑血流量,改善微循环的作用,还有抗自由基氧化损伤作用^[13-14]。通过本研究证实,补阳还五汤通过影响细胞进入 S₀ 期上调 G₀/G₁ 期细胞比例,下调 PCNA 的表达达到抑制血管平滑肌细胞增殖的作用,其作用机制可能是通过减少 Hcy 诱导的 ROS 生成,起到抗氧化应激的作用。

[参考文献]

[1] Refsum H, Ueland P M, Nygard O, et al. Homocysteine and cardiovascular disease [J]. *Annu Re-v Med*, 1998, 49(1): 31.

[2] 高娟,郭力. 同型半胱氨酸与动脉硬化[J]. *医学研究与教育*, 2010, 27(1): 82.

[3] Thannickal V J, Fanburg B L. Reactiveoxygen speciesin cell signaling [J]. *Am J Physiol: Lung Cell Mol Physiol*, 2000, 279(6): L1005.

[4] 张海燕,杨明,贺娜,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] Wang Z, Castresana M R, Newman W H. NF-kappa B is required for TNF-alpha-directed smooth muscle cell migration [J]. *FEBS Lett*, 2001, 508(3): 360.

[6] 江河,王宪. 高同型半胱氨酸上调醛糖还原酶表达的病理生理意义[J]. *生理通讯*, 2005, 24(3): 65.

[7] Aerbajinai W, Zhu J, Gao Z, et al. Thalidomide induces gamma globulin gene expression through increased reactive oxygen species-mediated p38 MAPK signaling and histone H4 acetyl at ion in adult erythropoiesis [J]. *Blood*, 2007, 110(8): 2864.

[8] Hsu W H, Hsieh Y S, Kuo HC, et al. Berberine induces apoptosis in SW 620 human colonic carcinoma cells through generation of reactive oxygen species and activation of JNK/p38 MA-PK and FasL [J]. *Arch Toxicol*, 2007, 81(10): 719.

[9] Kang K A, Lee K H, Zhang R, et al. Protective effect s of *Castanopsis cuspidate* through act-ivation of ERK and NF-kappa B on oxidative cell death induced by hydrogen peroxide [J]. *Toxicol Environ Health A*, 2007, 70(15/16): 1319.

[10] Miller F J, Filali M, Huss G J, et al. Cytokine activation of nuclear factor kappa B in vascular smooth muscle cells requires signaling endosomes containing Nox1 and CIC-3 [J]. *Circ Res*, 2007, 101(7): 663.

[11] 邱顺辉,刘玉晖,高书亮,等. 补阳还五汤抗动脉粥样硬化与间隙连接蛋白关系的研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(18): 161.

[12] 刘玉晖,邱顺辉. 补阳还五汤抗 Hcy 致动脉硬化作用与调控核因子-κB 活性相关性的研究 [J]. *中国药学杂志*, 2012, 47(2): 10.

[13] 杜生华,夏致. 补阳还五汤研究及其应用 [J]. *甘肃中医*, 2000(4): 63.

[14] 石关桐,石印玉,李文凯,等. 补阳还五汤对周围神经损伤修复的实验研究 [J]. *中国中医骨伤科杂志*, 1997, 5(5): 1.

[责任编辑 聂淑琴]