

本文引用:孙四玉,杨冬梅,戴娜,夏伯侯,庾勤慧.乙酰水杨酸姜黄素酯对血管紧张素II诱导的血管平滑肌细胞增殖的影响及相关机制[J].湖南中医药大学学报,2017,37(11):1222-1225.

乙酰水杨酸姜黄素酯对血管紧张素II诱导的血管平滑肌细胞增殖的影响及相关机制

孙四玉¹,杨冬梅¹,戴娜²,夏伯侯¹,庾勤慧^{2*}

(1.湖南中医药大学药学院,湖南长沙410208;2.湖南中医药大学医学院,湖南长沙410208)

[摘要] 目的 探讨乙酰水杨酸姜黄素酯(curcumin acetylsalicylate, CA)对血管紧张素II(Angiotensin II, AngII)诱导的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)增殖的抑制作用及其相关机制。方法 建立AngII诱导的VSMC增殖模型。采用MTT法、流式细胞术观察CA干预对细胞活力和周期的影响。Western blot检测其对第10号染色体同源缺失性磷酸酶张力蛋白(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN)、磷酸化AKT(p-AKT)、AKT蛋白表达的影响。结果 1、3、10 $\mu\text{mol/L}$ CA可以显著抑制AngII诱导的细胞活力,其中3 $\mu\text{mol/L}$ 为最佳浓度($P<0.05$)。在CA的干预下,与AngII组比较,流式细胞术显示VSMC G0/G1期细胞数量明显增加,S期明显减少;Western blot显示其可以促进PTEN蛋白表达,从而抑制AKT激活($P<0.05$)。结论 CA可以抑制AngII诱导的VSMC增殖,其机制与阻滞VSMC G0/G1期向S期转化,以及调节PTEN/AKT信号通路有关。

[关键词] 乙酰水杨酸姜黄素酯;血管紧张素II;血管平滑肌细胞增殖;PTEN;AKT

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.11.013

Effect and Mechanism of Curcumin Acetylsalicylate on Angiotensin II Induced Proliferation in Vascular Smooth Muscle Cells

SUN Siyu¹, YANG Dongmei¹, DAI Na², XIA Bohou¹, TUO Qinhu^{2*}

(1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Medical School, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect and mechanism of curcumin acetylsalicylate (CA) on Angiotensin II (AngII) induced proliferation in vascular smooth muscle cells (VSMC). **Methods** VSMC proliferation model was induced by AngII. Flow cytometry was used to observe the effect of CA on cell proliferation and cycle. The expressions of PTEN, p-AKT and AKT was detected by Western blot. **Results** 1, 3, 10 $\mu\text{mol/L}$ CA led to a significant inhibition of Ang II-induced proliferation of VSMCs and 3 $\mu\text{mol/L}$ CA was proved to be an optimal inhibitory concentration ($P<0.05$). Flow cytometry showed that the number of cells in G0/G1 phase increased significantly and the number of S phase decreased significantly by the intervention of CA. Western blot showed that it could promote the expression of PTEN protein and inhibit the activation of AKT ($P<0.05$). **Conclusion** CA can obviously inhibit the VSMC proliferation induced by AngII, and its mechanism is related to the inhibition of transformation from G0/G1 phase to S phase and the regulation of PTEN/Akt signaling pathway.

[Keywords] curcumin acetylsalicylate; angiotensin II; vascular smooth muscle cells proliferation; PTEN; AKT

[收稿日期] 2017-05-25

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81673722);湖南省杰出青年基金(14JJ1024);省自然科学基金(2015JJ2117);湖南省教育厅重点项目(16A156)。

[作者简介] 孙四玉,女,在读硕士研究生,研究方向:心血管药理。

[通讯作者] * 庾勤慧,女,教授,博士研究生导师,E-mail:qhtuo@aliyun.com。

经皮冠状动脉介入治疗(PCI)是治疗心血管疾病的主要方法之一,但术后 6 个月内膜增生发生率却高达 30%~50%,给临床带来新的难题。血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,VSMC)异常增殖与迁移是内膜增生的特征之一^[1]。第 10 号染色体同源缺失性磷酸酶张力蛋白(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN)可以抑制 VSMC 的增殖与迁移,还可以抑制血管损伤后的内膜增生,主要通过介导磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(AKT)信号通路实现其功能^[2]。

乙酰水杨酸姜黄素酯(curcumin acetylsalicylate,CA)是乙酰水杨酸和姜黄素的酯化衍生物,目前动物实验已经证实其可以通过抑制核转录因子(NF-KB)信号通路而抑制高脂喂养的 APOE 鼠的动脉粥样硬化的形成^[3],但其作用机制需要进一步探讨。本研究拟通过 AngII 刺激的 VSMC 增殖模型^[4],观察 CA 对体外培养 VSMC 活力的影响,并探讨其机制是否与 PTEN 有关。

1 材料

1.1 细胞与药物

大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞株(VSMC)购自中南大学湘雅细胞库,乙酰水杨酸姜黄素酯由湖南中医药大学药学院提供(质量分数>98%),溶于 DMSO 中(终浓度小于 0.1%)。

1.2 试剂与仪器

胎牛血清(FBS)来自 PAN 公司;培养基 DMEM、0.25% Trypsin-EDTA、磷酸盐缓冲液(PBS)来自 Hyclone 公司,兔单克隆抗体 PTEN,兔单克隆抗体 p-AKT、兔单克隆抗体 AKT 均来自 Cell signaling 公司;兔多克隆抗体 Beta Actin 来自 proteintech 公司;Ang II 溶于 PBS 中,0.22 μ m 膜滤过,-20 $^{\circ}$ C 保存。其他试剂购自于 Sigma 公司。LX800 酶联免疫仪(美国伯腾仪器有限公司);流式细胞分析仪(BD 公司);凝胶成像分析系统(美国 Alpha Innotech 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

VSMC 用含 10% FBS 的高糖培养基(DMEM)于 37 $^{\circ}$ C,5%CO₂,饱和湿度的培养箱中培养。细胞培养至 80%~90%进行传代操作。所有实验选择对数期细胞。

2.2 细胞分组

为检测 CA 对细胞活力的影响,实验分组为:对

照组,1 μ mol/L AngII 组,含 1 μ mol/L AngII 的不同浓度 CA 药物处理组(0.1,0.3,1,3,10 μ mol/L),含 1 μ mol/L AngII 的姜黄素(10 μ mol/L)组。确定最佳浓度后,后续实验将细胞分为:(1)对照组;(2)1 μ mol/L AngII 组;(3)3 μ mol/L CA+1 μ mol/L AngII 组;(4)3 μ mol/L CA 组。

2.3 MTT 法检测细胞活力实验

细胞以 5 000/孔接种于 96 孔板,待细胞融合度达到 60%~80%时,1% FBS 同步化处理 24 h 后,加入不同处理因素孵育 24 h(药物组提前加入不含 AngII 的不同浓度药物孵育 2 h)。加入 0.5 mg/mL 100 μ L MTT 孵育 4 h,弃上清,150 μ L DMSO 溶解紫色结晶沉淀,450 nm 波长处测 OD 值。

细胞活力=实验组 OD 值/对照组 OD 值 $\times$ 100%。

2.4 流式细胞术检测细胞周期

VSMC 细胞以 4×10^5 接种于 60 mm 皿中,待细胞融合度达到 60%~80%时,1% FBS 同步化 24 h。然后用 1 μ mol/L AngII 和含 AngII 的 CA 分别孵育 24 h,收集细胞。PBS 洗涤 1~3 次,用 80%乙醇-20 $^{\circ}$ C 固定 24 h。离心弃乙醇,PBS 洗涤 1 次,50 ng/mL PI(含 200 g/mL RNase A)37 $^{\circ}$ C 避光染色 30 min,染色细胞用流式细胞仪分析周期变化。

2.5 Western blot

取各组实验处理后细胞,用预冷的 PBS 洗 3 次,加入 RIPA 裂解液和 PMSF 的混合液 100 μ L(比例为 100:1)置于冰上裂解 30 min,用细胞刮刮下蛋白,4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min 离心 15 min,收集上清。BCA 蛋白定量的方法测量蛋白浓度。每个样取 30 μ g 并加入 5 $\times$ SDS 凝胶上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min,使其变性。配制 8%聚丙烯酰胺凝胶,进行电泳分离(浓缩胶 80 V,分离胶 120 V),0.22 μ m PVDF 膜 300 mA 湿转 70 min,5%脱脂牛奶慢摇封闭 1h,加入一抗 PTEN(1:1 000),p-AKT(1:2 000),AKT(1:1 000), β -actin(1:3 000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 洗 5 次,每次 5 min,按 1:5 000 的比例加入稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗室温孵育 1 h,然后用 TBST 洗膜 5 次,每次 5 min,用化学发光显影法进行显影,AlphaImager 2200 分析光密度值。

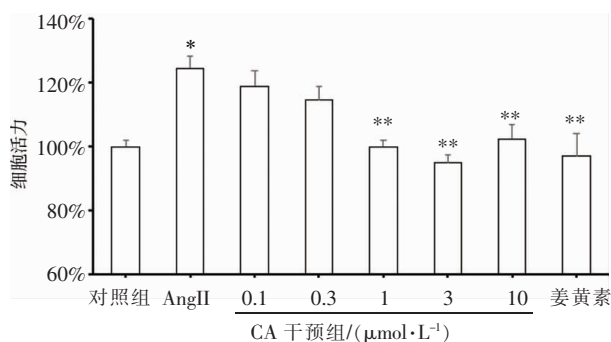
2.6 统计学方法

所有结果均使用“ $\bar{x}\pm s$ ”来表示。用 SPSS 17.0 进行统计处理,组间比较用 t 检验,以 $P<0.05$ 来判定差异有无显著性的意义。

3 结果

3.1 MTT 检测 CA 对 AngII 诱导的 VSMC 活力影响

如图 1 所示,与对照组相比,1 $\mu\text{mol/L}$ AngII 刺激 24 h 后可以显著增强 VSMC 的活力,说明模型组构建成功 ($P<0.05$)。经不同浓度 CA 干预后,VSMC 活力逐渐下降,1、3、10 $\mu\text{mol/L}$ CA 具有统计学意义,其中 CA 浓度为 3 $\mu\text{mol/L}$ 时抑制效果最明显,故选择 3 $\mu\text{mol/L}$ 作为后续实验浓度 ($P<0.05$)。



注:与对照组比较,* $P<0.05$;与 AngII 组比较,** $P<0.05$ 。

图 1 CA 对 AngII 诱导的 VSMC 活力影响 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

3.2 流式细胞术检测 CA 对 AngII 诱导的 VSMC 周期影响

如表 1 所示,与对照组相比,AngII 组 S 期细胞比例明显增加 ($P<0.05$)。而在 CA 的干预下,G0/G1 期细胞比例明显增加 ($P<0.05$),S 期细胞比例减少 ($P<0.05$)。结果表明 CA 抑制 AngII 诱导的 VSMC 增殖,主要通过阻滞 G0/G1 期向 S 期转化实现。

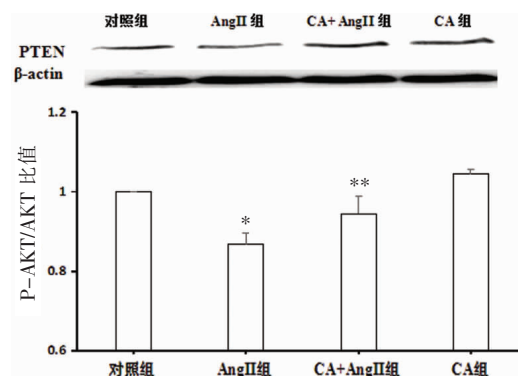
表 1 CA 对 AngII 诱导的 VSMC 增殖的周期影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	G0/G1 期 (%)	S 期 (%)	G2/M 期 (%)
对照组	76.48 $\pm$ 1.92	5.52 $\pm$ 0.06	18.00 $\pm$ 1.94
AngII 组	69.24 $\pm$ 7.90*	12.40 $\pm$ 4.60*	18.82 $\pm$ 3.39
CA+AngII 组	78.91 $\pm$ 1.11**	5.32 $\pm$ 0.99**	15.23 $\pm$ 1.24
CA 组	77.29 $\pm$ 3.10	4.88 $\pm$ 1.22	17.82 $\pm$ 2.03

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与 AngII 组比较,** $P<0.05$ 。

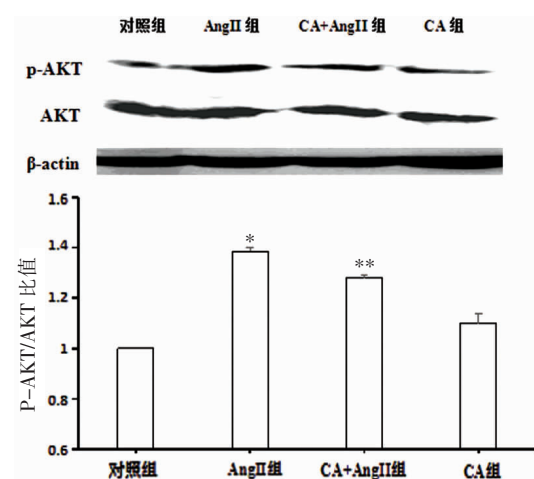
3.3 CA 对 AngII 诱导的 VSMC 的 PTEN, p-AKT, AKT 蛋白的影响

如图 2 所示,与对照组相比,AngII 组 PTEN 蛋白表达呈下降趋势 ($P<0.05$);与模型组相比,CA+AngII 组 PTEN 蛋白表达显著上升 ($P<0.05$)。如图 3 所示,与对照组相比,AngII 组 p-AKT 蛋白含量显著上升 ($P<0.05$);与模型组比较,CA+AngII 组 p-AKT 蛋白含量下降 ($P<0.05$)。



注:与对照组比较,* $P<0.05$;与 AngII 组比较,** $P<0.05$ 。

图 2 CA 对 AngII 诱导的 VSMC 的 PTEN 蛋白的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)



注:与对照组比较,* $P<0.05$;与 AngII 组比较,** $P<0.05$ 。

图 3 CA 对 AngII 诱导的 VSMC 的 p-AKT/AKT 比值的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

4 讨论

支架内血管再狭窄是 PCI 术后的主要并发症,VSMC 过度增殖,迁移至内膜是其发生的主要原因之一。目前研究发现,将抗血栓药物和抗增殖药物包被于支架内可以明显降低血管再狭窄的发生率。因此,寻找特异性抗 VSMC 增殖药物是治疗血管再狭窄的方法之一^[5]。姜黄素作为传统中药姜黄的主要成分,已经被证实具有调脂、保护血管内皮、抑制斑块形成、稳定斑块、保护心肌、抑制心肌重构、改善心功能等多重作用,但由于其生物利用度低等缺点限制了这一化合物的临床应用^[6-7]。乙酰水杨酸,即阿司匹林,是应用最早,最普遍的解热镇痛抗风湿药,还具有抗血小板聚集、抗血栓等方面的药理作用,发挥药效迅速,药效稳定。有文献表明,姜黄素、阿司匹林和胡萝卜素联合应用小剂量即可抑制人胰腺癌细胞的增殖^[8]。姜黄素和阿司匹林对 VSMC 增殖和迁

移也都有抑制作用^[9-11]。目前,为了改变姜黄素在应用中的吸收缺陷问题及提高药物疗效,国内外研究者对姜黄素进行酯化改善,发现其酯化物抗氧化、抗菌、抗肿瘤等效果明显优于姜黄素^[12]。为了改善姜黄素的生物利用度和加强疗效,我们将姜黄素和乙酰水杨酸酯化得到 CA,期望得到具有抗炎、抗血栓以及高效抑制 VSMC 增殖能力的药物。本研究结果显示 1 $\mu\text{mol/L}$ AngII 能显著增强 VSMC 活力,说明模型组构建成功。3 $\mu\text{mol/L}$ CA 可以显著抑制 AngII 诱导的 VSMC 活力。进一步流式细胞术检测周期发现,CA 主要通过阻滞细胞由 G0/G1 期向 S 期转换,从而抑制 AngII 诱导的 VSMC 增殖。

PTEN 是至今发现的第一个具有双重磷酸酶活性的抑癌基因,其对细胞的增殖、迁移、分化、黏附、凋亡等多种生物学行为有重要影响。最近实验结果表明,PTEN 可以抑制 AngII 和 PDGF 诱导的 VSMC 的增殖与迁移,还可以抑制血管损伤后的内膜增生,主要通过介导 PI3K/AKT 信号通路实现其功能^[2,13]。因此,PTEN 是影响 VSMC 增殖的重要靶点之一。本研究结果显示,CA 可能通过增加 PTEN 的表达,从而抑制 AKT 的激活,拮抗 AngII 诱导的 VSMC 增殖。

综上所述,CA 抑制 Ang-II 诱导的 VSMC 细胞增殖,其可能与上调 PTEN 蛋白表达,降低 AKT 活性有关,为 CA 应用于动脉粥样硬化和血管狭窄等疾病的防治提供了一定的实验依据。同时也说明姜黄素酯化衍生物有很大的发展空间,为姜黄素酯化衍物的临床应用研究提供了一些科学依据。

参考文献:

- [1] 梁刚柱,张福先,罗小云,等.单用硫酸氯吡格雷及联合华法林预防股腘动脉经皮腔内血管成形术后再狭窄的随机对照研究[J].中华外科杂志,2012,50(8):704-708.
- [2] Sedding DG, Widmersteke R, Mueller A, et al. Role of the Phosphatase PTEN in Early Vascular Remodeling[J]. Plos One, 2013, 8(3):e55445.
- [3] 龚勇珍,孙少卫,杨慧仙,等.小凹蛋白 1-NF κ B 通路介导乙酰水杨酸姜黄素酯的抗动脉粥样硬化作用[J].中国现代医学杂志,2015,25(9):21-26.
- [4] Xu C, Chen J, Zhang J, et al. Naringenin inhibits angiotensin II-induced vascular smooth muscle cells proliferation and migration and decreases neointimal hyperplasia in balloon injured rat carotid arteries through suppressing oxidative stress[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2013, 36(10):1549-1555.
- [5] Tang R, Chen S. Smooth muscle-specific drug targets for next generation Drug-eluting stent[J]. Expert Review of Cardiovascular Therapy, 2014, 12(1):21-23.
- [6] Jiang S, Han J, Li T, et al. Curcumin as a potential protective compound against cardiac diseases[J]. Pharmacological Research, 2017, 119:373-383.
- [7] 周 曙,田 芳,金海蓉,等.姜黄素调节 Bcl-2,Bax 蛋白表达诱导增生性瘢痕成纤维细胞凋亡[J].湖南中医药大学学报,2015,35(4):6-9.
- [8] Thakkar A, Sutaria D, Grandhi BK, et al. The molecular mechanism of action of aspirin, curcumin and sulforaphane combinations in the chemoprevention of pancreatic cancer[J]. Oncology reports, 2013, 29(4): 1671-1677.
- [9] Qin L, Yang YB, Tuo QH, et al. Effects and underlying mechanisms of curcumin on the proliferation of vascular smooth muscle cells induced by Chol: MbetaCD.[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2009, 379(2):277-282.
- [10] Xin G, Yu L, Min C, et al. miR-145 mediated the role of aspirin in resisting VSMCs proliferation and anti-inflammation through CD40[J]. Journal of Translational Medicine, 2016, 14(1): 1-10.
- [11] Mottola G, Chatterjee A, Wu B, et al. Aspirin-triggered resolvin D1 attenuates PDGF-induced vascular smooth muscle cell migration via the cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A (cAMP/PKA) pathway[J]. Plos One, 2017, 12(3):e0174936.
- [12] 王丽华,彭永练,姜玉才.姜黄素化合物酯缩合前药及活性研究进展[J].海峡药学,2015,27(6):3-8.
- [13] Dong X, Yu LG, Sun R, et al. Inhibition of PTEN expression and activity by angiotensin II induces proliferation and migration of vascular smooth muscle cells[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2013, 114(1):174-182.

(本文编辑 苏 维)