

黄芩苷抑制血小板源性生长因子诱导的 血管平滑肌细胞增殖机制

孙荣华 董丽华 韩梅 呼海娟 刘彬 温进坤*

(河北医科大学基础医学研究所, 石家庄 050017)

摘要 用黄芩苷处理体外培养的血管平滑肌细胞(VSMC), 采用流式细胞分析、免疫细胞化学染色、Western 印迹及免疫共沉淀等方法, 探讨不同浓度的黄芩苷对血小板源性生长因子(PDGF)诱导的 VSMC 增殖的影响及其作用机制。结果表明, 与单独 PDGF 刺激组比较, 黄芩苷预处理可明显抑制 PDGF 诱导的细胞增殖和迁移活性, 同时伴有增殖和迁移相关蛋白 PCNA、VCAM-1、ICAM-1、cyclinE、CDK2 的表达减少; 细胞周期分析显示, 黄芩苷处理可明显减少处于细胞周期 S 时相的细胞数, 而 G₀/G₁ 期细胞增加, 黄芩苷抑制增殖和迁移、阻滞细胞周期进程的作用具有浓度依赖性。免疫共沉淀分析证实, 黄芩苷可抑制 cyclinE-CDK2 复合物的形成, 上调 p27 蛋白水平, 二者变化程度具有反相关关系。结果提示, 黄芩苷是一种具有抗 VSMC 增殖和迁移活性的天然单体, 其作用机制可能与抑制 cyclinE-CDK2 复合物的形成和上调 p27 水平有关。

关键词 黄芩苷; 血管平滑肌细胞; 增殖; 迁移; 细胞周期

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)增殖是动脉粥样硬化、冠状动脉血管成形术后狭窄等心血管疾病共同的病理基础。多种炎症因子和生长因子可通过与细胞膜受体的相互作用, 进而激活胞内相关信号通路, 将其生长信号转导至细胞核, 启动增殖相关基因的表达, 继而引起 VSMC 增殖和受损血管的狭窄^[1,2]。基于已知的 VSMC 增殖调节机制, 设计药物干预与此相关的病理过程已经成为目前防治心血管疾病的重要策略之一。

近年研究证实, 黄芩苷是传统中草药黄芩的主要有效成分之一, 属黄酮类化合物, 具有清除氧自由基、减轻组织缺血再灌注损伤、改善微循环、促进细胞凋亡、抗肿瘤以及降压和抗动脉粥样硬化等功效^[3]。但是, 黄芩苷调节心血管功能、抗动脉粥样硬化的作用机制尚不清楚。基于 VSMC 增殖在心血管病变中的地位, 本研究以血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)为诱导剂, 观察黄芩苷对 PDGF 诱导的 VSMC 增殖、迁移的影响以及对细胞周期的干预作用, 并对其作用机制进行深入探讨, 为该药物在防治心血管疾病中的应用提供理论依据。

黄芩苷由河北以岭药业集团分离及鉴定, 高效液相色谱法(HPLC)测定其纯度为99%, 其化学结构见图1, 用 DMSO 溶解为 100 mmol/L 的储备浓度, 分装后, -20 °C 避光保存备用。PDGF 购于 R & D 公司, DMEM 培养基购自 Gibco 公司; 抗血管细胞黏附分子(VCAM-1)、细胞间黏附分子(ICAM)多克隆抗体, 抗增殖细胞核抗原(PCNA)、cyclinE、CDK2、p27、 β -肌动蛋白单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司; 免疫组化染色试剂盒、DAB 显色试剂盒购自北京中杉公司; SD 大鼠(80~100 g)由河北省实验动物中心提供。

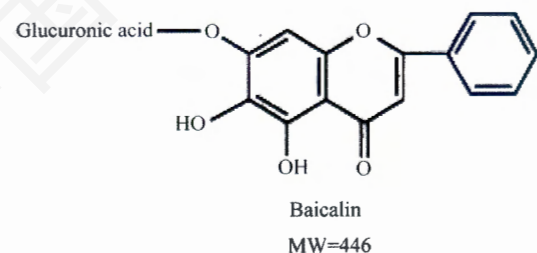


Fig.1 Chemical structure of baicalin

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期: 2009-11-24 接受日期: 2010-01-25

国家自然科学基金(No.30971457)和河北省自然科学基金(No. C2007000831)资助项目

* 通讯作者。Tel/Fax: 0311-86265563, E-mail: wjk@hebm.edu.cn

1.2 细胞培养与实验分组

选取 80~100 g 健康雄性 SD 大鼠, 取胸腹主动脉, 用贴块法分离、培养 VSMC^[4]。细胞在含 10% 新生小牛血清的 DMEM 培养基中生长至汇合后, 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 取 3~6 代细胞进行实验。待细胞生长至 70%~80% 汇合后换用无血清培养液饥饿培养 24 h, 使细胞同步于静止期, 分别加入不同浓度黄芩苷 (0、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 预温育 24 h, 加入 10 ng/ml PDGF 处理 24 h, 收集细胞用于下述实验。

1.3 细胞增殖分析

利用常规细胞计数方法进行细胞增殖分析。

1.4 伤口愈合实验

将 VSMC 接种于玻片上, 细胞生长至 100% 汇合后, 用无菌枪头在玻片上划痕。PBS 冲洗被刮下的悬浮细胞后, 换用无血清培养液, 细胞分组与处理条件同上。取出玻片, 于低倍镜下观察细胞伤口愈合情况。任意取 3 个视野, 计数迁移细胞的数量, 以此表示细胞的迁移活性。以未用黄芩苷预处理的细胞作为平行对照。

1.5 免疫细胞化学染色

接种于盖玻片上的 VSMC 生长至 60% 融合时, 后换用无血清培养液饥饿培养 24 h, 使细胞处于静止期。按上述分组处理细胞后取出玻片, 冷 PBS 清洗两次, 4% 多聚甲醛固定 20 min, 1% Triton X-100 处理 20 min, 10% 山羊血清室温封闭 15 min, 加入小鼠 PCNA 单克隆抗体(1:100), 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min。经 PBS 充分漂洗后, 依次滴加生物素标记的二抗和辣根过氧化物酶(HRP)标记的链霉卵白素进行结合反应, DAB 显色, 80% 甘油封片后照相观察。阴性对照用 PBS 代替一抗, 随机选取 5 个视野, 计数阳性染色细胞。

1.6 细胞周期分析

各组 VSMC 以 0.25% 胰蛋白酶+0.02% EDTA 液消化 4~6 min, 用 PBS 吹打细胞, 移入 10 ml 离心管, 4 $^{\circ}\text{C}$, 1 000 g 离心 5 min, PBS 洗涤 2~3 次, 弃上清液。最后以 1 ml 预冷的 70% 乙醇吹打成单细胞悬液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜。检测前, 1 000 g, 离心 10 min, 去上清液, PBS 漂洗 3 次。加碘化丙锭(propidium iodide, PI) 荧光染料, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光染色 30 min 后, 350 目尼龙网滤膜过滤去除细胞团块, 用流式细胞仪(FCM)检测各期细胞 DNA 的含量, 计算 5 000 个细胞, 观察细胞周期的分布特征。

1.7 细胞总蛋白提取与 Western 印迹分析

收集细胞, 按文献^[4]方法用冷 PBS 洗涤 3 次后, 将细胞重悬于裂解液(1% NP40, 150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 10% 甘油, 1 mmol/L Na_3VO_4 , 1 mmol/L PMSF)中, 冰浴 30 min, 使细胞充分裂解。4 $^{\circ}\text{C}$ 8 000 g 离心 10 min, 收集上清液, 进行蛋白质定量。各组取等量蛋白质, 经 8% SDS-PAGE 分离后, 电转膜至 PVDF 膜上。依次与一抗、二抗进行结合反应, 用 ECL 发光法检测。

1.8 免疫共沉淀分析

用裂解液分别裂解不同条件处理的细胞, 离心收集上清液, 各取 80 μg 蛋白质加入 IPH 缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 0.1 mmol/L PMSF, 0.5% NP40, 150 mmol/L NaCl) 至总体积为 175 μl 后, 分别加入鼠抗 cyclinE 或 CDK2 单克隆抗体 5 μl , 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇动 2 h。加入 20 μl protein A-agarose 至总体积为 200 μl , 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇动过夜。4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 g 离心 20 s, 收集 protein A-agarose- 抗原-抗体三元复合物。依次用 0.5 ml IPH 缓冲液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下洗涤 4 次, 每次 20 min。4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 g 离心 20 s, 最后用 2 \times SDS 上样缓冲液悬浮沉淀, 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 3 min, 12 000 g 离心 20 s, 取上清液进行 SDS-PAGE 分离蛋白质, 随后电转移至 PVDF 膜上, 用抗 CDK2 抗体或抗 cyclinE 抗体检测两种蛋白质的相互作用。

1.9 统计学处理

所有实验均重复三次。实验结果采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件进行组间方差分析, 以 $P<0.05$ 表示统计学上有显著差异。

2 结果

2.1 黄芩苷抑制 PDGF 诱导的 VSMC 增殖

细胞计数结果显示, 用 PDGF 刺激 VSMC 24 h 后, 细胞数目明显增加, 约是对照组的 1.9 倍, 而用黄芩苷预处理 24 h 后, 随着黄芩苷浓度的增加(5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$), VSMC 增殖活性不断降低, 与 PDGF 组相比, 分别减少了 7%、15%、47% 和 70%, 黄芩苷对 PDGF 诱导的 VSMC 增殖的抑制效应具有明显的剂量依赖关系(图 2)。然而, 黄芩苷对未经 PDGF 刺激的细胞的增殖活性无明显影响(结果未显示)。

PCNA 是反映细胞增殖活性的标志物, 为了进一步证明黄芩苷对 VSMC 增殖的抑制效应, 采用免疫细胞化学方法检测 VSMC 中 PCNA 的表达情况, 发现黄芩苷(20 $\mu\text{mol/L}$) 预温育 24 h 能明显抑制 PDGF 诱导

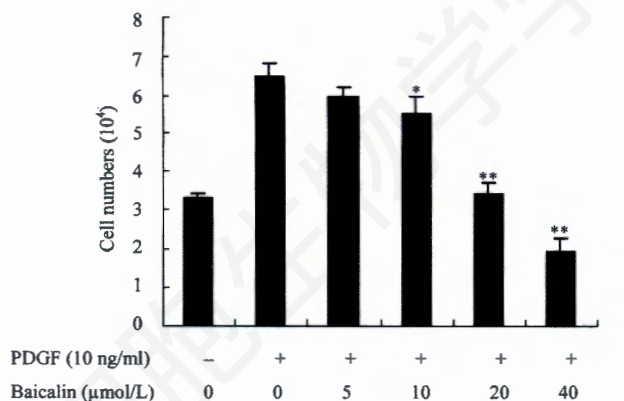
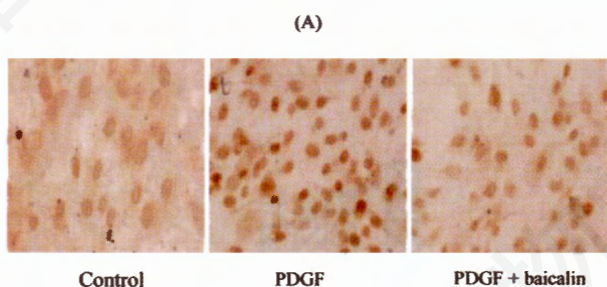
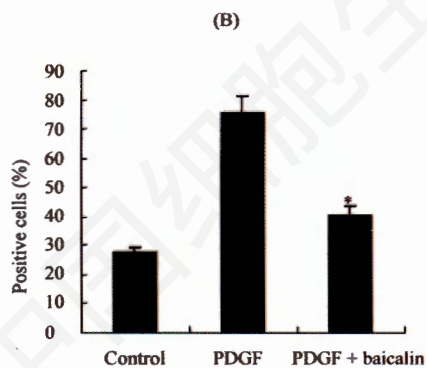


Fig.2 Effects of baicalin on PDGF-induced VSMC proliferation

* $P < 0.05$ or ** $P < 0.01$, compared with VSMCs treated by PDGF.



Control PDGF PDGF + baicalin



(B)

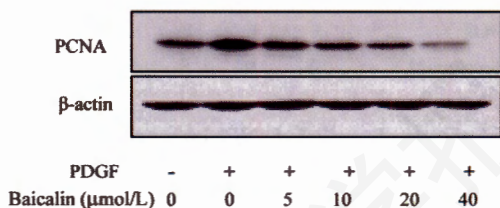


Fig.3 Effects of baicalin on PCNA expression in VSMCs treated by PDGF

A and B: immunocytochemistry assays (200x). * $P < 0.05$, compared with VSMCs treated by PDGF. C: Western blot analysis.

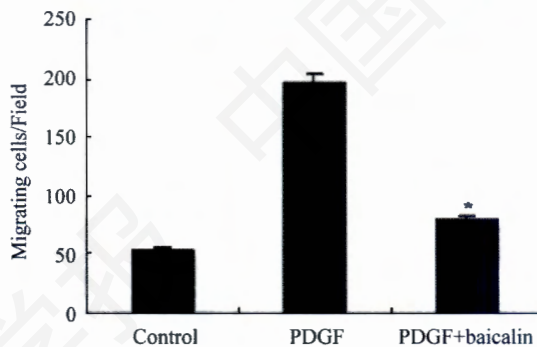
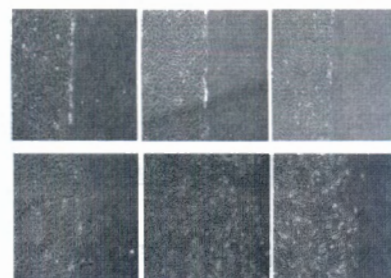


Fig.4 Effects of baicalin on PDGF-induced VSMC migration

* $P < 0.05$, compared with VSMCs treated by PDGF.

的 PCNA 的表达, PCNA 阳性细胞数较 PDGF 组减少了 45% (图 3A 和图 3B)。同时, Western 印迹结果发现, 不同浓度黄芩苷预温育 VSMC, 导致 PCNA 表达量较 PDGF 组呈剂量依赖性减少, 与细胞计数结果一致(图 3B)。

2.2 黄芩苷抑制 PDGF 诱导的 VSMC 迁移

伤口愈合实验结果显示, 黄芩苷(20 μmol/L)可明显抑制 PDGF 诱导的 VSMC 迁移活性, 较 PDGF 组下降了 59% (图 4)。VSMC 迁移活性的降低与迁移相关蛋白——ICAM-1 和 VCAM-1 的表达减少具有平行关系(图 5)。提示黄芩苷抑制 PDGF 诱导的 VSMC 迁移与抑制 VCAM-1、ICAM-1 的表达有关。

2.3 黄芩苷阻滞 PDGF 诱导的 VSMC 细胞周期进程

如图 6 所示, 与 PDGF 单独处理比较, 黄芩苷(5、10、20、40 μmol/L)预温育 VSMC 24 h, 可使进入 S 期的细胞数显著减少($P < 0.05$); 而 G₀/G₁ 期的细胞数增加, 较 PDGF 组分别增加了 5%、19%、25% 和 29%。黄芩苷对细胞周期的阻滞作用具有浓度依赖性。

2.4 黄芩苷抑制 cyclinE 和 CDK2 的表达及二者的相互作用

为了进一步确定黄芩苷抑制细胞周期的分子机制, 本实验采用 Western 印迹检测了细胞周期相关蛋白的表达情况。结果显示, 黄芩苷在 5、10、20、

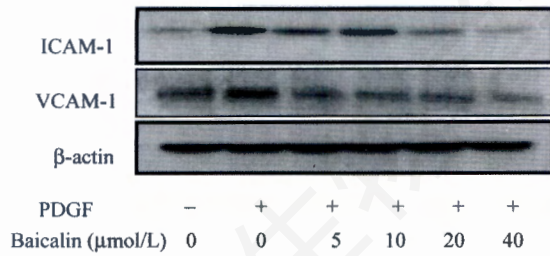


Fig. 5 Effects of baicalin on VCAM-1 and ICAM-1 expression in VSMCs

40 μmol/L 的浓度范围内, 可剂量依赖性的抑制 PDGF 诱导的 cyclinE 和 CDK2 的表达, 上调 p27 蛋白水平 ($P < 0.05$), 而对 cyclinD1、CDK4、CDK6 和 p21 蛋白的表达没有明显影响(图 7)。免疫共沉淀分析结果显示, 黄芩苷剂量依赖性地抑制 cyclinE-CDK2 复合物的形成(图 8)。黄芩苷对细胞周期相关蛋白表达的调节作用与其抗细胞增殖活性具有一致关系。由此推测, 黄芩苷可能具有抑制 cyclinE-CDK2 复合物的活性和提高 p27 蛋白稳定性的作用。

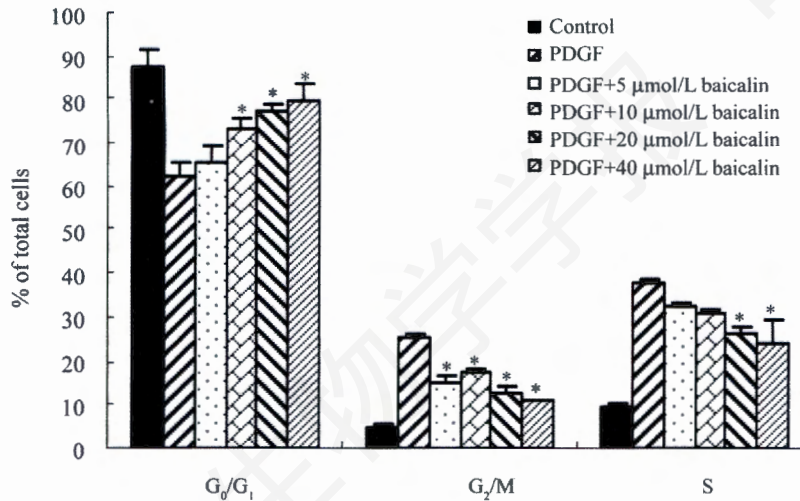


Fig. 6 Effect of baicalin on cell cycle in VSMCs
* $P < 0.05$, compared with VSMCs treated by PDGF.

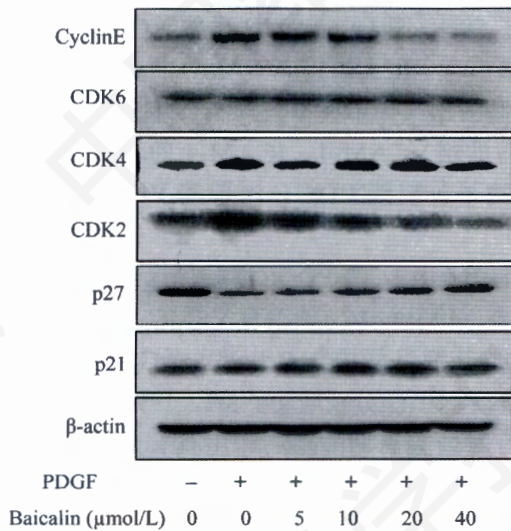


Fig. 7 Effects of baicalin on the expression of cell cycle-related proteins

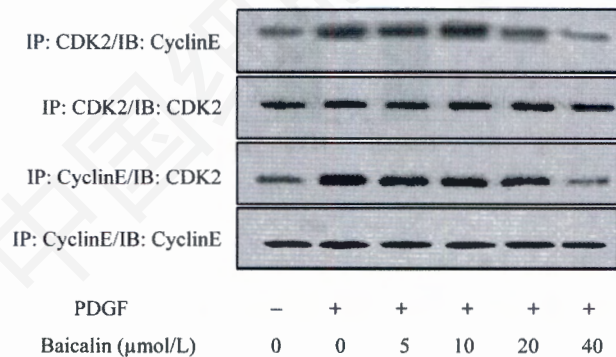


Fig. 8 Analysis of cyclinE-CDK2 interaction in VSMCs

3 讨论

VSMC 的异常增殖、迁移和细胞外基质的大量合成是高血压、动脉粥样硬化和血管成形术后再狭

窄等血管重塑性疾病发生、发展的重要细胞病理学基础。寻找可抑制 VSMC 增殖的有效药物并阐明其作用机制, 对于防治血管重塑性疾病具有重要的意义。

利用中草药治疗动脉粥样硬化、高血压等疾病已取得了很好的临床疗效。近年发现, 中草药中含有的黄酮类化合物具有确切的心血管保护作用。黄芩苷是传统中药黄芩的主要有效成分之一, 属黄酮类化合物^[5]。本研究探讨了黄芩苷对 PDGF 诱导的 VSMC 增殖的影响及相关分子机制, 发现黄芩苷可剂量依赖性抑制 PDGF 诱导的 VSMC 增殖和迁移, 使细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期; Western 印迹也显示, 黄芩苷处理的 VSMC 其增殖和迁移相关蛋白 PCNA、ICAM-1 和 VCAM-1 的表达均被抑制, 而增殖抑制蛋白 p27 水平被上调。进一步的研究证实, 黄芩苷明显抑制细胞周期相关蛋白 cyclinE 和 CDK2 的表达及二者的相互作用。已有研究显示, 黄芩苷通过其抗氧化性质而展示明显的心脏保护作用。黄芩甲苷是黄芩苷的同系物, 具有明确的抑制肿瘤细胞增殖和诱导凋亡的作用^[6,7], 而黄芩苷对细胞增殖的影响尚不清楚。本研究证实, 黄芩苷通过阻滞细胞周期进程而有效阻断 PDGF 的促增殖效应, 其作用机制与抑制促增殖蛋白表达和上调增殖抑制蛋白水平有关。

细胞周期进程有赖于各种 cyclins 和 CDKs 的相互作用^[8], 该过程受到 cyclin-CDK 抑制因子 (CKI) 的严格调控^[9]。其中, cyclinE 与 CDK2 结合形成的 cyclinE-CDK2 复合物, 是细胞通过 G₁ 末期控制点的关键因素, 对于细胞由 G₁ 期进入 S 期至关重要^[10]。p27 作为一种 CKI, 通过与 cyclins-CDKs 复合物相互作用而调节细胞周期进程^[11]。p27 不仅是 cyclins-CDKs 复合物活性的抑制因子, 同时, 也是 cyclin-CDK 复合物的底物, 受其催化而发生磷酸化降解^[12]。近年研究证实, p27 是血管增殖性疾病发生的关键性负调控因子。过表达 p27 可抑制 CDK2 的活性进而引起 VSMC 细胞周期停滞^[13]。本实验证实, 黄芩苷可下调 CDK2 和 cyclinE 的表达和二者的相互作用, 逆转 PDGF 对 p27 表达的抑制效应。然而, cyclinE-CDK2 复合物减少与 p27 水平升高之间的因果关系还有待进一步探讨。

综上所述, 黄芩苷是一种具有抗 VSMC 增殖和迁移活性的天然单体, 其作用机制与抑制 cyclinE-CDK2 复合物的形成和上调 p27 水平, 进而阻滞细胞周期进程有关。本研究结果为解释黄芩苷的心血管效应提

供了研究依据。

参考文献(References)

- 1 Zheng B, Han M, Bernier M, Zhang XH, Meng F, Miao SB, *et al.* Krüppel-like factor 4 inhibits proliferation by platelet-derived growth factor receptor beta-mediated, not by retinoic acid receptor alpha-mediated, phosphatidylinositol 3-kinase and ERK signaling in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2009; 284(34): 22773-85.
- 2 Wang L, Zheng J, Bai X, Liu B, Liu CJ, Xu Q, *et al.* ADAMTS-7 mediates vascular smooth muscle cell migration and neointima formation in balloon-injured rat arteries. *Circ Res* 2009; 104(5): 688-98.
- 3 文敏, 李雪, 付守廷. 黄芩苷药理作用研究新进展. *沈阳药科大学学报* 2008; 25(2): 158-61.
- 4 Han M, Wen JK, Zheng B, Cheng Y, Zhang C. Serum deprivation results in redifferentiation of human umbilical vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 291(1): 50-8.
- 5 Liu JJ, Huang TS, Cheng WF, Lu FJ. Baicalin and baicalin are potent inhibitors of angiogenesis: Inhibition of endothelial cell proliferation migration and differentiation. *Int J Cancer* 2003; 106(4): 559-65.
- 6 Ma Z, Otsuyama K, Liu S, Abroun S, Ishikawa H, Tsuyama N, *et al.* Baicalin, a component of *Scutellaria radix* from Huang-Lian-Jie-Du-Tang (HLJDT), leads to suppression of proliferation and induction of apoptosis in human myeloma cells. *Blood* 2005; 105(8): 3312-8.
- 7 Lu HF, Hsueh SC, Ho YT, Kao MC, Yang JS, Chiu TH, *et al.* ROS mediates baicalin-induced apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells through the expression of the Gadd153 and mitochondrial-dependent pathway. *Anticancer Res* 2007; 27(1A): 117-25.
- 8 Porter LA, Dellinger RW, Tynan JA, Barnes EA, Kong M, Lenormand JL, *et al.* Human Speedy: a novel cell cycle regulator that enhances proliferation through activation of Cdk2. *J Cell Biol* 2002; 157(3): 357-66.
- 9 Tanner FC, Greutert H, Barandier C, Frischknecht K, Lüscher TF. Different cell cycle regulation of vascular smooth muscle in genetic hypertension. *Hypertension* 2003; 42(2): 184-8.
- 10 Dulić V, Lees E, Reed SI. Association of humane cyclin E with a periodic G₁-S phase protein kinase. *Science* 1992; 257(5078): 1958-61.
- 11 Larrea MD, Liang J, Da Silva T, Hong F, Shao SH, Han K, *et al.* Phosphorylation of p27^{Kip1} regulates assembly and activation of cyclin D1-Cdk4. *Mol Cell Biol* 2008; 28(20): 6462-72.
- 12 Egozi D, Shapira M, Paor G, Ben-Izhak O, Skorecki K, Hershko DD. Regulation of the cell cycle inhibitor p27 and its ubiquitin ligase Skp2 in differentiation of human embryonic stem cells. *FASEB J* 2007; 21(11): 2807-17.
- 13 Fasciano S, Patel RC, Handy I, Patel CV. Regulation of vascular smooth muscle proliferation by heparin: inhibition of cyclin-dependent kinase 2 activity by p27^{Kip1}. *J Biol Chem* 2005; 280(16): 15682-9.

Baicalin Inhibits the Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells Induced by Platelet-derived Growth Factor

Rong-Hua Sun, Li-Hua Dong, Mei Han, Hai-Juan Hu, Bin Liu, Jin-Kun Wen*
(*Institute of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China*)

Abstract To investigate the effects of baicalin on the proliferation in vascular smooth muscle cells (VSMCs) treated with platelet-derived growth factor (PDGF) and the action mechanism of baicalin. Flow cytometry, immunocytochemistry, Western blotting and co-immunoprecipitation assays were performed, respectively. The results showed that proliferation and migration of VSMCs induced by PDGF were significantly inhibited by baicalin in a concentration-dependent manner. The expression of proliferation- and migration-related proteins — PCNA, VCAM-1, ICAM-1, cyclinE, and CDK2 decreased markedly in baicalin-treated VSMCs. Baicalin treatment resulted in an increased cell population in the G₀/G₁-phase and a decreased distribution in S phase. Co-immunoprecipitation assay showed that the formation of cyclinE-CDK2 complex was reduced, and p27 level was elevated in the baicalin-treated VSMCs. Taken together, our results demonstrated that baicalin is a natural active compound which inhibits the proliferation and migration of VSMCs, and arrests cell cycle progression via inhibiting the cyclinE-CDK2 complex formation and up-regulating p27 expression.

Key words baicalin; vascular smooth muscle cells; proliferation; migration; cell cycle

Received: November 24, 2009 Accepted: January 25, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30971457), and the Natural Science Foundation of Hebei Province (No.C2007000831)

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-311-86265563, E-mail: wjk@hebmu.edu.cn