

# 羟基红花黄色素A抑制PDGF促大鼠血管平滑肌细胞增殖的作用

赵京山<sup>1,2\*</sup> 方明星<sup>3</sup> 郭浅好<sup>4</sup> 李云峰<sup>1</sup> 徐丙元<sup>1</sup> 赖少鸿<sup>4</sup> 冯梦晗<sup>1,4</sup> 刘玉<sup>1</sup> 李爱英<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>河北中医学院基础医学院生物化学与生物学教研室, 石家庄 050200; <sup>2</sup>河北省心脑血管病中医药防治重点实验室, 石家庄 050200; <sup>3</sup>河北医科大学第三医院, 石家庄 050052; <sup>4</sup>河北医科大学, 石家庄 050017)

**摘要** 羟基红花黄色素A是从活血化瘀中草药红花中分离出来的黄酮类化合物, 研究发现其对心血管疾病具有很好的治疗作用, 但该化合物对血管增生性疾病的防治机理还不清楚。该研究通过采用大鼠血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)培养、MTT分析、Western blot、免疫组织化学等方法研究羟基红花黄色素A对VSMCs增殖的影响及其作用机制。实验结果表明, 羟基红花黄色素A浓度依赖性地抑制血小板源生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)诱导的VSMCs增殖, 降低增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的表达, 阻断PDGF受体的激活和MEK/ERK信号通路的活化。该研究证实, 羟基红花黄色素A通过降低PCNA表达和阻断MEK/ERK1/2信号通路抑制大鼠血管平滑肌细胞的增殖。

**关键词** 羟基红花黄色素A; 信号传导; 增殖细胞核抗原; 血管平滑肌细胞; 细胞增殖

## Hydroxysafflor Yellow A Inhibited Rat Vascular Smooth Muscle Cells Proliferation Induced by PDGF

Zhao Jingshan<sup>1,2\*</sup>, Fang Mingxing<sup>3</sup>, Guo Qianshu<sup>4</sup>, Li Yunfeng<sup>1</sup>, Xu Bingyuan<sup>1</sup>, Lai Shaohong<sup>4</sup>,  
Feng Menghan<sup>1,4</sup>, Liu Yu<sup>1</sup>, Li Aiying<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>The Department of Biochemistry and Biology, Basic Medical College, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China; <sup>2</sup>Hebei Key Laboratory of Chinese Medicine Research on Cardiocerebrovascular Disease, Shijiazhuang 050200, China; <sup>3</sup>The Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050052, China; <sup>4</sup>Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

**Abstract** Hydroxysafflor yellow A (HSYA) comes from safflowers that are well known as traditional Chinese medicine for the treatment of cardiovascular disease, and it belongs to flavonoids. Safflowers have the function of activating blood circulation to dissipate blood stasis. HSYA has been used to treat cardiovascular disease in clinic, but the treatment mechanism is unclear. The effect of hydroxysafflor yellow A on the proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) and the related mechanism were studied. The inhibitory effect of hydroxysafflor yellow A on VSMCs proliferation was detected using cell culture, MTT assay, Western blot and immunohistochemical staining. The results showed that HSYA inhibited cell proliferation induced by PDGF in a dose-dependent manner, reduced proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression and blocked PDGFR-MEK-ERK1/2 signaling pathway activated by PDGF in VSMCs. In conclusion, HSYA inhibited VSMCs proliferation via reducing the expres-

收稿日期: 2015-01-19 接受日期: 2015-03-05

河北省科技支撑计划(批准号: 13277739D)、国家自然科学基金(批准号: 31277992)和河北省卫生厅重点科技研究计划(批准号: 20100043)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0311-89926236, E-mail: zjs10@sina.com

Received: January 19, 2015 Accepted: March 5, 2015

This work was supported by Hebei Province Science and Technique Supporting Project (Grant No.13277739D), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31277992) and the Hebei Health Administration Key Science and Technique Research Project (Grant No.20100043)

\*Corresponding author. Tel: +86-311-89926236, E-mail: zjs10@sina.com

网络出版时间: 2015-06-01 14:30

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150601.1430.001.html>

sion of PCNA and blocked signal transduction of MEK/ERK1/2 in VSMCs.

**Keywords** hydroxysafflor yellow A; signal transduction; proliferating cell nuclear antigen; VSMCs; cell proliferation

血管平滑肌细胞位于血管壁的中膜,是构成血管壁组织结构及维持血管张力的主要细胞成分,细胞表型的改变可导致血管壁结构及功能发生变化,是导致高血压、动脉粥样硬化和血管成形术后狭窄等多种心血管病的细胞病理学基础。损伤诱导的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)由中膜向内膜下迁移、增殖、合成和分泌大量细胞外基质等事件是导致血管重构的主要病理机制<sup>[1]</sup>。PCNA(proliferating cell nuclear antigen)是VSMCs增殖的重要标志,其表达水平的高低可反映细胞的增殖活性。血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)是激活VSMCs的主要因素之一<sup>[2]</sup>,它通过与VSMCs膜上受体结合,逐级激活丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinases, MAPK)通路,促进细胞的有丝分裂<sup>[3-4]</sup>,从而引起细胞的增殖。因此,通过阻断生长信号的转导来抑制VSMCs增殖是防治心血管疾病的重要策略之一。

羟基红花黄色素A(hydroxysafflor yellow A, HSYA)是从活血化瘀中草药红花中分离出来的黄酮类化合物,具有抗氧化、清除自由基、抗炎、增强机体免疫功能多种药理作用,对免疫、心脑血管及神经系统等均有保护效应<sup>[5-6]</sup>。大量研究发现,羟基红花黄色素A对心血管疾病具有很好的治疗作用<sup>[7-8]</sup>。但该化合物对血管增生性疾病的防治机理还不清楚。本实验探讨羟基红花黄色素A对VSMCs增殖的影响及其机制,旨在为羟基红花黄色素A在防治血管重塑性中的应用提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

DMEM培养基、胎牛血清(R&D Systems公司);抗体(Santa Cruz公司);羟基红花黄色素A(西安森冉生物工程有限公司),高效液相色谱法测定其纯度为99%;PDGF-BB(Gibco公司);免疫组化试剂盒、DAB显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

### 1.2 细胞培养

清洁II级雄性SD大鼠,体重80~100 g,由河北省

实验动物中心(合格证号:10061783)提供。取大鼠胸腹主动脉,用贴块法分离培养VSMCs<sup>[9]</sup>。取3~6代细胞进行实验。待细胞生长至汇合70%~80%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HSYA(0, 5, 10, 20, 40  $\mu\text{mol/L}$ )预孵育24 h后,加入PDGF(10  $\mu\text{g/L}$ )处理24 h,收集细胞用于部分实验。

### 1.3 MTT分析

参照文献[10]的方法进行操作,每组设6个复孔,分别加入不同浓度(0, 1, 5, 10, 20, 40, 60  $\mu\text{mol/L}$ )的HSYA预孵育24 h,再用PDGF(10  $\mu\text{g/L}$ )刺激24 h,之后在酶标仪570 nm处测吸光度( $D$ )值。

### 1.4 免疫细胞化学染色

接种于盖玻片上的VSMCs生长至60%~70%融合时,换用2% FBS培养液处理24 h,使细胞同步化。之后加入20  $\mu\text{mol/L}$ 的HSYA预孵育24 h,PDGF刺激24 h。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,分别加入大鼠抗PCNA单克隆抗体(1:100),37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育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标记的链霉卵白素进行结合反应,DAB显色,80%甘油封片。

### 1.5 Western blot分析

取等量的VSMCs的蛋白提取液,进行SDS-PAGE。电转移至PVDF膜上。随后与相应的一抗及二抗反应,用化学发光法检测抗原抗体结合区带。用数码成像分析系统软件对电泳条带进行密度扫描,以 $\beta$ -actin为内参进行定量分析。

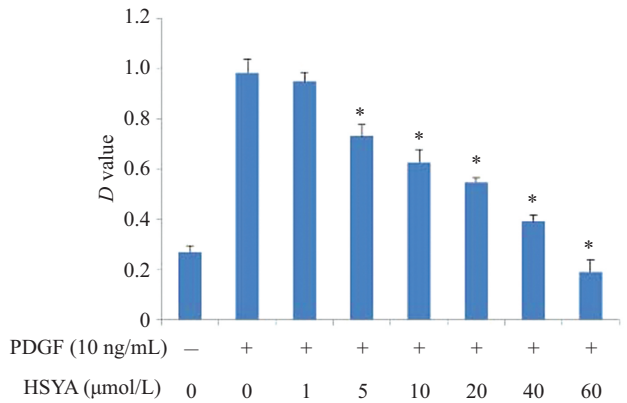
### 1.6 统计学分析

数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间资料应用单因素方差(One-Way ANOVA)分析,各项统计均用SPSS 10.0统计软件进行分析。 $P<0.05$ 表示差异显著。

## 2 结果

### 2.1 羟基红花黄色素A抑制PDGF诱导的VSMCs增殖

羟基红花黄色素A呈浓度(1, 5, 10, 20, 40, 60  $\mu\text{mol/L}$ )依赖性抑制PDGF诱导的VSMCs增殖



\* $P < 0.05$ , 与只用PDGF刺激而不用HSYA刺激的实验组比较( $n=6$ ).  
\* $P < 0.05$  compared with PDGF stimulation without HSYA group ( $n=6$ ).

图1 羟基红花黄色素A抑制PDGF诱导的血管平滑肌细胞增殖

Fig.1 Inhibition of hydroxysafflor yellow A on VSMCs proliferation induced by PDGF

( $P < 0.05$ , 图1)。HSYA在5~40  $\mu\text{mol/L}$ 范围内细胞生长状态良好,当大于60  $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞出现皱缩,开始显示细胞毒性。因此,以下实验选择HSYA在5~40  $\mu\text{mol/L}$ 的浓度范围内进行。

## 2.2 羟基红花黄色素A抑制PDGF诱导的PCNA蛋白表达

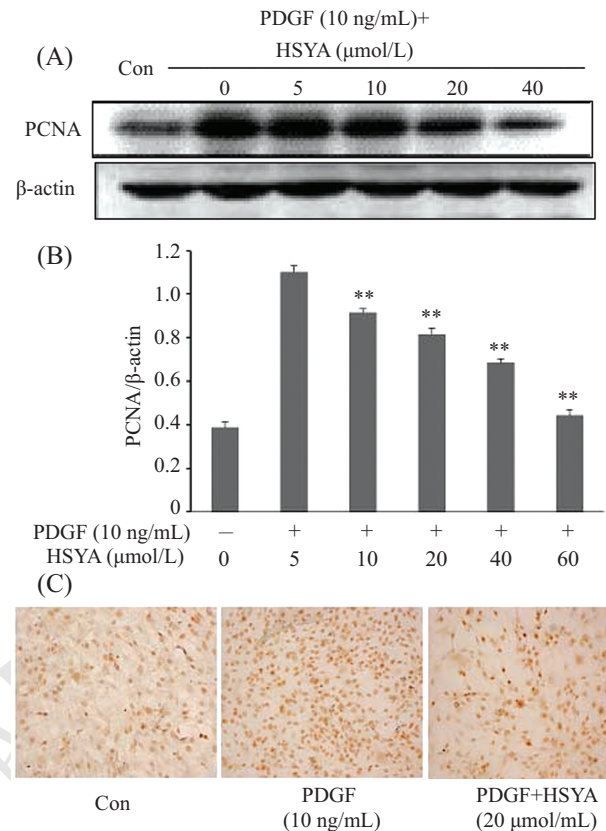
与正常细胞比较,PDGF刺激后,PCNA水平呈剂量依赖性大幅度升高,而羟基红花黄色素A预孵育的细胞经PDGF刺激后,PCNA水平升高的幅度明显降低(图2)。

## 2.3 羟基红花黄色素A抑制PDGF激活的MEK/ERK1/2信号通路

PDGF刺激细胞15 min,PDGFR磷酸化水平明显升高;而经羟基红花黄色素A预处理的VSMCs,磷酸化的PDGFR呈浓度依赖性降低;MEK和ERK1/2磷酸化程度也随着药物浓度的增加逐渐降低(图3A和图3B);但磷酸化的JNK、p38及Akt不受药物处理的影响(图3C和图3D)。

## 3 讨论

血管平滑肌细胞异常增殖是高血压、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<sup>[9-10]</sup>。当血管内膜受损伤后,局部暴露的中膜VSMCs发生表型转化并向内膜下迁移、增殖和分泌细胞外基质,最终导致管腔狭窄。流行病学调查发现,PTCA(percutaneous transluminal coronary angioplasty)术后6个月内,病变部位的再狭窄率高达32%~57%,严重限制了其临床



A: PCNA的Western blot检测结果; B: PCNA Western blot检测灰度值结果分析; C: PCNA的免疫组化结果(40 $\times$ ). \*\* $P < 0.01$ , 与只用PDGF刺激而不用HSYA刺激的实验组比较( $n=6$ ).

A: Western blot analysis of PCNA; B: PCNA densitometric scanning of Western blot analysis; C: PCNA immunocytochemistry (40 $\times$ ). \*\* $P < 0.01$  compared with PDGF stimulation without HSYA group ( $n=6$ ).

图2 羟基红花黄色素A抑制PDGF诱导的VSMC增殖标志基因PCNA的表达

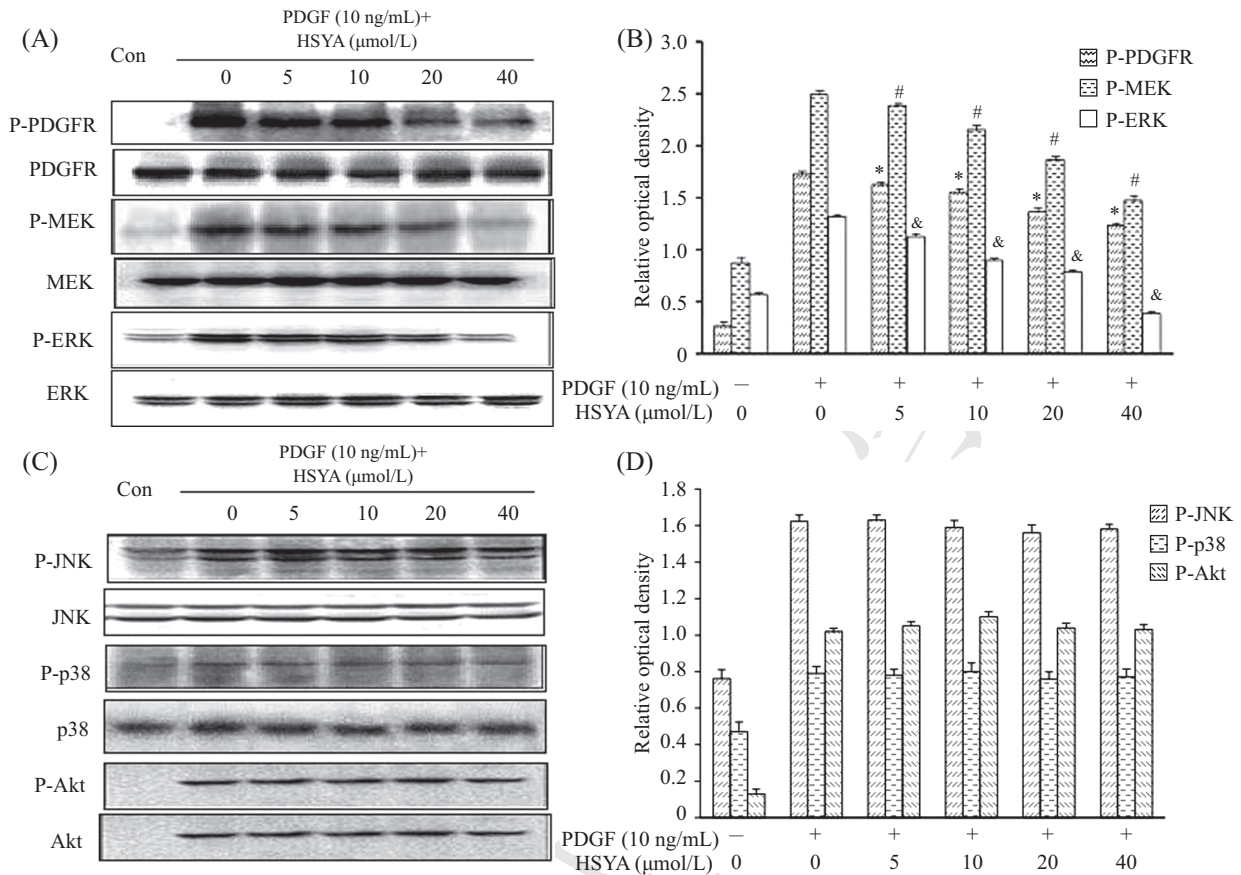
Fig.2 Hydroxysafflor yellow A inhibited marker gene PCNA expression of VSMC proliferation induced by PDGF

疗效。因此,寻找可抑制血管平滑肌细胞增殖、迁移的有效药物,已成为当前防治血管再狭窄的重要策略之一<sup>[11]</sup>。

细胞增殖活力是反映VSMCs增殖程度的指标。MTT结果显示,在羟基红花黄色素A浓度为5, 10, 20, 40  $\mu\text{mol/L}$ 范围内,随着羟基红花黄色素A浓度的增加,VSMCs增殖活力不断下降,且呈剂量依赖性,与对照组相比,分别下降了21%、38%、49%和61%(图1)。MTT检测结果表明,羟基红花黄色素A可显著抑制体外培养的VSMCs增殖,并具有明显的量-效关系。

PCNA是VSMCs增殖的重要标志,其表达水平的高低可反映细胞的增殖活性。本实验采用Western blot检测了羟基红花黄色素A对增殖标志基因PCNA表达的影响。在蛋白水平,随着羟基红花黄色素A浓





A: P-PDGFR、P-MEK和P-ERK的Western blot检测结果; B: P-PDGFR、P-MEK和P-ERK的Western blot检测结果的灰度值扫描结果分析, \*/#&P<0.05, 与只用PDGF刺激而不用HSYA刺激的实验组比较(n=6)(\*P-PDGFR, #P-MEK, &P-ERK); C: P-JNK、P-p38和P-Akt的Western blot检测结果; D: P-JNK、P-p38和P-Akt的Western blot检测结果的灰度值扫描结果分析(n=6)。

A: Western blot analysis of P-PDGFR, P-MEK and P-ERK; B: P-PDGFR, P-MEK and P-ERK densitometric scanning of Western blot analysis, \*/#&P<0.05 compared with PDGF stimulation without HSYA (n=6) (\*P-PDGFR, #P-MEK, &P-ERK); C: Western blot analysis of P-JNK, P-p38 and P-Akt; D: P-JNK, P-p38 and P-Akt densitometric scanning of Western blot analysis (n=6).

图3 羟基红花黄色素A抑制PDGF促细胞增殖信号的跨膜转导

Fig.3 Inhibition of hydroxysafflor yellow A on PDGF-induced transmembrane signal transduction

度的增加(5, 10, 20, 40 μmol/L), PCNA表达逐渐降低(图2A和图2B)。免疫细胞化学结果显示, 20 μmol/L羟基红花黄色素A刺激24 h后, PCNA表达明显低于对照组(图2C)。上述结果印证了MTT分析的结果, 即羟基红花黄色素A能抑制体外培养的VSMCs的增殖。

MAPK信号途径是介导细胞生长应答的重要信号通路, 参与细胞生长、分化、增殖、凋亡、存活等多种生理过程的调控<sup>[12]</sup>。MAPK通路在血管再狭窄中发挥着重要的作用, 血管内皮损伤可以引起VSMCs中MAPK通路信号分子的高表达。MAPK家族主要由p38、ERK1/2和JNK构成<sup>[13]</sup>。ERK包括ERK1和ERK2, 主要调节细胞生长、生存, 某些条件下该通路参与介导细胞的分化; p38蛋白激酶是一种分子量为38 kDa的酪氨酸磷酸化蛋白激酶, 在各种

应激或细胞因子等因素的刺激作用下, 其分子中的苏氨酸、酪氨酸位点发生磷酸化而被激活。该途径主要参与介导抗凋亡、增生和细胞生存信号的转导; JNK由JNK1、JNK2和JNK3组成, 分别由JNK激酶1、2(也分别称为MKK4、MKK7)激活。JNK信号转导途径与ERK、p38等信号途径之间有密切联系, 在细胞应激反应中起重要作用, 并受多种细胞外信号刺激而被活化。

以往研究证明, 羟基红花黄色素A对细胞的凋亡和氧化应激等都有明显的抑制作用, 广泛应用于心血管疾病的临床治疗<sup>[5,14-16]</sup>。但该药物对心血管系统疾病的作用机制尚不清楚, 对VSMCs增殖的影响鲜有报道。为了确定羟基红花黄色素A对VSMCs增殖及其作用机制的影响, 本研究采用PDGF作为增殖刺激因素, 探讨了羟基红花黄色素A对VSMCs增殖

的作用效果。本实验证实, 羟基红花黄色素A能够有效抑制PDGF诱导的VSMCs的增殖(图1), Western blot结果显示, PDGF刺激VSMCs 15 min后, PDGFR磷酸化水平升高; 而给予羟基红花黄色素A预处理24 h后, 该受体激活受到抑制。由于细胞因子与其受体结合后可通过多种途径将信号转导至胞核内调节其靶基因的表达, 进而我们观察了羟基红花黄色素A阻断PDGFR活化后对下游MAPK信号通路的影响。结果显示, 羟基红花黄色素A可选择性抑制PDGF诱导的MEK/ERK1/2的磷酸化活化(图3A和图3B), 但不影响JNK和p38MAPK的活性(图3C)。其可能的机制是HSYA通过促进PDGFR、MEK、ERK的逐级磷酸化, 使MEK/ERK1/2信号通路受阻, 其促VSMCs增殖作用减弱, 从而抑制VSMCs增殖。结果提示, 羟基红花黄色素A对PDGF诱导的VSMCs增殖与其特异性阻断MEK/ERK1/2信号通路有关。

综上所述, 羟基红花黄色素A通过降低PCNA表达和MEK/ERK1/2信号通路抑制大鼠血管平滑肌细胞增殖, 显著抑制PDGF诱导的VSMCs增殖, 为该药物在防治血管重塑性治疗中的应用提供了实验依据。

### 参考文献 (References)

- 1 Kotha J, Zhang C, Longhurst CM, Lu Y, Jacobs J, Cheng Y, *et al.* Functional relevance of tetraspanin CD9 in vascular smooth muscle cell injury phenotypes: A novel target for the prevention of neointimal hyperplasia. *Atherosclerosis* 2009; 203(2): 377-86.
- 2 Shimizu H, Hirose Y, Nishijima F, Tsubakihara Y, Miyazaki H. ROS and PDGF-beta receptors are critically involved in indoxyl sulfate actions that promote vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009; 297(2): C389-96.
- 3 Irazoqui AP, Boland RL, Buitrago CG. Actions of 1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> on the cellular cycle depend on VDR and p38 MAPK in skeletal muscle cells. *J Mol Endocrinol* 2014; 53(10): 331-43.
- 4 Chang HJ, Park JS, Kim MH, Hong MH, Kim KM, Kim SM. Extracellular signal-regulated kinases and AP-1 mediate the up-regulation of vascular endothelial growth factor by PDGF in human vascular smooth muscle cells. *Int J Oncol* 2006; 28(1): 135-41.
- 5 万先惠, 秦亚利, 颜涛. 红花注射液药理作用研究进展. *中医药学报* (Wan Xianhui, Qin Yali, Yan Tao. Research development of drug function on Honghua Injection. *Acta Chinese Medicine and Pharmacology*) 2011; 39(6): 109-11.
- 6 张前, 牛欣, 闫妍, 金鸣, 杨向竹, 李金荣. 羟基红花黄色素A抑制新生血管形成的机制研究. *北京中医药大学学报* (Zhang Qian, Niu Xin, Yan Yan, Jin Ming, Li Xiangrong. Research on the mechanism of hydroxysafflor yellow A in inhibiting angiogenesis. *Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine*) 2004; 27(3): 25-9.
- 7 Nie PH, Zhang L, WH Zhang, Rong WF, Zhi JM. The effects of hydroxysafflor yellow A on blood pressure and cardiac function. *J Ethnopharmacol* 2012; 139(3): 746-50.
- 8 He H, Liu Q, Shi M, Zeng X, Yang J, Wu L, *et al.* Cardioprotective effects of hydroxysafflor yellow A on diabetic cardiac insufficiency attributed to up-regulation of the expression of intracellular calcium handling proteins of sarcoplasmic reticulum in rats. *Phytother Res* 2008; 22(8): 1107-14.
- 9 Dong LH, Wen JK, Liu G, Michael AM, Miao SB, Gao R. Blockade of the Ras-extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway is involved in smooth muscle 22a mediated suppression of vascular smooth muscle cell proliferation and neointima hyperplasia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30(4): 683-91.
- 10 Ozdemir KG, Yilmaz H, Yilmaz S. *In vitro* evaluation of cytotoxicity of soft lining materials on L929 cells by MTT assay. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009; 90(1): 82-6.
- 11 Magalhaes MA, Minha S, Chen F, Torguson R, Omar AF, Loh JP, *et al.* Clinical presentation and outcomes of coronary in-stent restenosis across 3-stent generations. *Circ Cardiovasc Interv* 2014; 7(12): 768-76.
- 12 Wang Z, Yang H, Tachado SD, Capó-Aponte JE, Bildin VN, Koziel H, *et al.* Phosphatase-mediated crosstalk control of ERK and p38 MAPK signaling in corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47(4): 5267-75.
- 13 Lawrence MC, Jivan A, Shao C, Duan L, Goad D, Zaganjo E, *et al.* The roles of MAPKs in disease. *Cell Res* 2008; 18(1): 436-42.
- 14 Liu YN, Zhou ZM, Chen P. Evidence that hydroxysafflor yellow A protects the heart against ischaemia-reperfusion injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008; 35(2): 211-6.
- 15 He H, Yang X, Shi M, Zeng X, Yang J, Wu L, *et al.* Protective effects of hydroxysafflor yellow A on acute and chronic congestive cardiac failure mediated by reducing ET-1, NOS and oxidative stress in rats. *J Pharm Pharmacol* 2008; 60(1): 115-23.
- 16 Wei X, Liu H, Sun X, Fu F, Zhang X, Wang J, *et al.* Hydroxysafflor yellow A protects rat brains against ischemia-reperfusion injury by antioxidant action. *Neurosci Lett* 2005; 386(1): 58-62.