

姜黄素通过抑制 ERK1/2 磷酸化减弱 ET-1 诱导的大鼠 VSMCs 增殖

孙秀才¹, 施霞¹, 曾辉¹, 孟娟¹, 盛艳华¹, 冯建章²

(1. 深圳市第三人民医院心内科, 广东深圳 518112; 2. 广东省心血管病研究所心内科)

摘要: **目的** 观察姜黄素(curcumin)对内皮素-1(ET-1)诱导培养的离体大鼠血管平滑肌细胞(VSMCs)增殖及 p44/42 丝裂原活化蛋白激酶(p44/42 MAPK, ERK1/2)表达的影响。 **方法** 组织贴块法培养大鼠胸主动脉 VSMCs。分别以 ET-1 10^{-8} mol/L, ET-1 10^{-8} mol/L 联合浓度为 10^{-6} mol/L、 10^{-5} mol/L、 10^{-4} mol/L 的姜黄素作用于体外培养的 VSMCs 24 h, 采用细胞计数检测 VSMCs 的增殖, ^3H -胸腺密啶掺入(^3H -TdR)法测定 VSMCs 的 DNA 合成, western bolt 法检测 VSMCs 磷酸化 ERK1/2 的表达。 **结果** 与对照组比较, ET-1 能显著刺激 VSMCs 增殖, 姜黄素能显著抑制 ET-1 诱导的 VSMCs 增殖, 且呈剂量依赖关系; ET-1 能显著刺激 VSMCs 磷酸化 ERK1/2 的表达, 该作用可被姜黄素所抑制。 **结论** 姜黄素能抑制 ET-1 刺激的 VSMCs 的增殖, 其作用可能与抑制磷酸化 ERK1/2 的表达相关。

关键词: 姜黄素; 内皮素-1; 血管平滑肌细胞; p44/42 丝裂原活化蛋白激酶

中图分类号: R972 文献标识码: A

Effect of Curcumin on Proliferation of Rat Vascular Smooth Muscle Cells Induced by Endothelin-1 and Expression of Phosphorylated ERK1/2

SUN Xiucui, SHI Xia, ZENG Fei, et al

(Department of Cardiology, the Third People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen, Guangdong 518112, China)

Abstract: **Objective** To study effect of curcumin on proliferation of rat vascular smooth muscle cells(VSMCs) induced by endothelin-1(ET-1) and expression of phosphorylated p44/42 mitogen-activated protein kinase(p44/42 MAPK, ERK1/2). **Methods** Rat VSMCs cultured in vitro were exposed for 24 h to 10^{-8} mol/L ET-1, 10^{-8} mol/L ET-1 plus 10^{-6} mol/L, 10^{-5} mol/L, 10^{-4} mol/L curcumin repectively. The effect of curcumin on VSMCs growth and DNA synthesis were investigated by cell counting, ^3H -thymidine incorporation, the expression of phosphorylated ERK1/2(p-ERK1/2) were determined by western blotting. **Results** Compaered with control group, VSMCs exposed to ET-1 showed significantly enhanced proliferation ($P < 0.05$), curcumin could inhibit proliferation of VSMCs induced by ET-1 ($P < 0.05$), there are dose dependent inhibitory effects in different concentration of curcumin. ET-1 treatment also increased significantly the expression of p-ERK1/2, curcumin could decrease the effection ($P < 0.05$). **Conclusion** Curcumin can inhibit the proliferation of rat VSMCs and the expression of p-ERK1/2 induced by ET-1.

Key words: curcumin; endothelin-1; vascular smooth muscle cell; p44/42 mitogen-activated protein kinase

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,

VSMCs)增殖是动脉粥样硬化、高血压病、支架内再狭窄等多种心血管疾病的共同病理特征。各种生长因子、细胞因子与血管平滑肌细胞表面的受体结合,在细胞内引起一系列复杂的级联反应,致使外界刺

激转变为胞内信号并被逐级放大,最终导致 DNA 合成和细胞的分裂增殖^[1-3]。丝裂素活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)是细胞内多种促细胞增殖信号传递的交汇点和信息的共同通路,在细胞增殖中起关键作用。由内皮素-1(endothelin, ET-1)等许多促 VSMCs 增殖的有丝分裂刺激都是通过 ERK1/2 途径起作用^[4-5]。姜黄为姜科植物 *Curcuma longa* L 的根茎,姜黄素(curcumin)是姜黄的主要有效成分,为天然的酚类抗氧化剂,具有多种分子靶向作用,包括转录因子、生长因子以及受体,细胞活素、酶和基因调控的细胞增殖和凋亡^[5-6]。有研究表明^[7]姜黄素能抑制血管平滑肌细胞的增殖。为探讨其分子机制,本研究以体外培养的大鼠 VSMCs 为模型,观察姜黄素对 ET-1 诱导 VSMCs 增殖及 ERK1/2 信号通路的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料

DMEM 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清购于 Gibco 公司,内皮素-1、姜黄素购自 Sigma 公司,³H-胸苷(放射性比活度 28Ci/mmol)中国原子能科学院提供。ERK1/2 Assaykit, NEB 公司产品。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 VSMCs 的原代培养

参照王道生^[8]贴块法进行。选用 10 周龄 Wistar kyoto 大鼠(中山大学实验动物中心提供)断头处死,取胸主动脉中膜以贴块法培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,置于 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养,1 周后可见细胞从组织块边缘爬出,2~3 周出现致密细胞层,此时即可传代,传代细胞光镜下呈典型的“峰与谷”样生长,细胞抗 β -actin 抗体鉴定为血管平滑细胞。实验所用的血管平滑肌细胞均为第 4~6 代的细胞。

1.3 血管平滑肌细胞增殖率的测定

取对数生长期的 VSMCs,以 2×10^5 /mL 细胞浓度接种于 6 孔培养板,每孔 1 mL,每组 3 孔。以不含血清的细胞培养液培养 24 h,使细胞处于静止期后,内皮素组加入 ET-1 10^{-8} mol/L,姜黄素组加入 ET-1 10^{-8} mol/L 与浓度分别为 10^{-6} mol/L、 10^{-5} mol/L、 10^{-4} mol/L 姜黄素,并设对照组。按上述分组处理后孵育 24 h,取出 6 孔板,制成 1 mL 细胞悬液,取 18 μ L,假如 0.1% 胎盼兰 2 μ L,染色,在

显微镜下用细胞计数板计数活细胞数,每孔计 3 次,取 3 孔的均数为细胞计数的结果。

1.4 ³H-胸腺密啶掺入(³H-TdR)法测定血管平滑肌的 DNA 合成量

选择生长良好的第 4 代培养 VSMCs,用 0.25% 胰酶消化、计数,以 2×10^5 /孔的密度接种于 96 孔板中。用无血清的培养液继续培养 24 h,使 VSMCs 获得同步的细胞生长停止。按组分别加入 ET-1 10^{-8} mol/L, ET-1 10^{-8} mol/L 与浓度为 10^{-6} mol/L、 10^{-5} mol/L、 10^{-4} mol/L 的姜黄素,并设对照组。培养 16 h 后,每孔再加入 1 mCi/mL ³H 胸腺密啶,孵育 12 h 后,弃去培养基, PBS 冲洗两次,给予胰蛋白酶消化,加入冷 PBS 终止反应。以 0.45 mm 微孔滤膜负压抽滤收集细胞,生理盐水和 10% 三氯醋酸冲洗滤膜,滤膜烘干后置闪烁瓶中,加入闪烁液(PPO/POPOP/二甲苯/无水乙醇)静置过夜,在液闪计数仪上测定³H 放射强度,结果以 CPM 表示。重复测定 3 次,取均数。

1.5 ERK1/2 表达的免疫印迹测定

应用 ERK1/2 检测试剂盒进行检测。取静止的 VSMCs 按组分别加入 ET-1 10^{-8} mol/L,浓度为 10^{-5} mol/L 的姜黄素, ET-1 10^{-8} mol/L 与浓度为 10^{-5} mol/L 的姜黄素,并设对照组。反应 24 h 后,移除原孵育液终止反应。加入 100 μ L SDS 样品缓冲液溶解细胞,迅速刮取细胞并移至试管中,置于冰上。超声处理 15s 以去除 DNA 和减少样品粘滞度。在 95~100 °C 中加热 5 min,冰上冷却。离心 5 min,取蛋白质上清 20 mL 用 10% SDS 聚丙烯酰胺电泳分离蛋白质,将已分离的区带用电转移仪转移到 PVDF 膜上,室温下,用 25 mL TBS 洗硝化纤维膜 5 min。室温下,在 25 mL 终止缓冲液中孵育膜 1 h。15 mL TBS 洗膜 5 min,共 3 次。膜中加入适当比例的-抗(1:1 000 稀释)孵育,4 °C 过。15 mL TBS 洗膜,5 min \times 3 次。膜中加入适当比例的二抗孵育 1 h。15 mL TBS 洗膜 5 min \times 3 次。室温下,用 10 mL LumiGLO 孵育膜 1 min,轻搅动。倒掉过剩液体,用薄膜包好,用化学发光法检测蛋白印记条带,结果用影像软件 Smartview 分析。

1.6 统计学处理

各组数据以均数 \pm 标准差表示,多组资料的两两比较用 *t* 检验,数据应用 SPSS 15.0 软件处理,以 $P < 0.05$ 为差别有统计学意义。

2 结 果

2.1 姜黄素对 ET-1 刺激的血管平滑肌细胞增殖及 DNA 合成的影响

与对照组比较, ET-1 组 VSMCs 计数、³H-TdR 的掺入量明显增加 ($P < 0.01$), ET-1 刺激了 VSMCs 的增殖和 DNA 的合成; 3 个不同剂量的姜黄素组 VSMCs 计数、³H-TdR 与 ET-1 组比较, 均显著降低 ($P < 0.05$)。说明 ET-1 刺激 VSMCs 增殖, 而姜黄素能抑制 ET-1 刺激 VSMCs 的增殖。姜黄素抑制 ET-1 诱导 VSMCs 增殖呈剂量依赖关系(见表 1)。

表 1 姜黄素对 ET-1 诱导血管平滑肌细胞增殖和 DNA 合成的影响 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	细胞计数 ($\times 10^3/\text{mL}$)	³ H 胸腺嘧啶 掺入(cpm)
对照组	214.83 \pm 5.42	1 563 \pm 347
ET-1 组	384.11 \pm 7.23 ^a	2 847 \pm 366 ^a
ET-1 + 10^{-6} /mol 姜黄素组	364.04 \pm 4.51 ^b	2 471 \pm 310 ^b
ET-1 + 10^{-5} /mol 姜黄素组	341.21 \pm 4.73 ^b	2 154 \pm 308 ^b
ET-1 + 10^{-4} /mol 姜黄素组	319.43 \pm 3.83 ^b	1 834 \pm 328 ^b

与对照组比较, a: $P < 0.01$; 与 ET-1 组比较, b: $P < 0.05$

2.2 姜黄素对 VSMCs 磷酸化 ERK1/2 活性表达的影响

用免疫印迹法检测 VSMCs 磷酸化 ERK1/2 的表达, 以对照组磷酸化 ERK1/2 表达的相对值为 1, 各组磷酸化 ERK1/2 表达相对值见图 1。浓度为 10^{-8} mol/L 的 ET-1 刺激 VSMCs 后, 与对照组比较, VSMCs 磷酸化 ERK1/2 活性的表达显著增加 ($P < 0.05$); 无 ET-1 存在时, 浓度为 10^{-5} mol/L 的姜黄素组与对照组比较, 对磷酸化 ERK1/2 的表达无影响 ($P > 0.05$)。在浓度为 10^{-8} mol/L 的 ET-1 刺激后, 10^{-5} mol/L 的姜黄素对 VSMCs 磷酸化 ERK1/2 的表达有显著的抑制作用 ($P < 0.05$), 提示姜黄素抑制 ET-1 诱导的 VSMCs 增殖与阻断磷酸化 ERK1/2 的表达有关。

3 讨 论

血管平滑肌细胞是动脉血管壁的主要成份, 血管平滑肌细胞向内膜下迁移及过度增生, 分泌细胞基质是动脉粥样硬化和支架内再狭窄的病理基础^[1,2]。细胞的增殖在细胞数量表现为细胞个数的增加, 而细胞本身的生物学行为则表现为蛋白质的

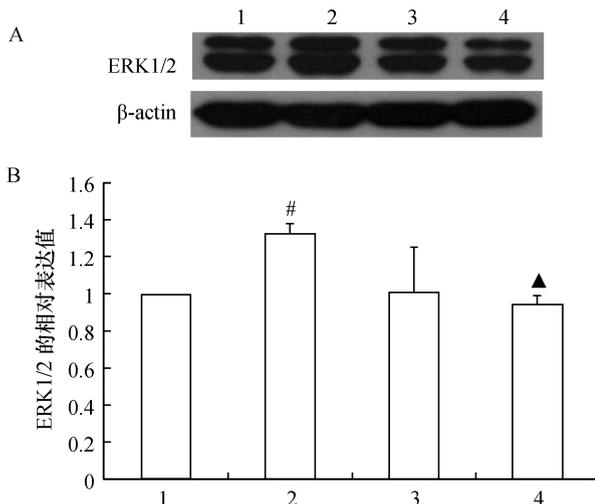


图 1 姜黄素对血管平滑肌细胞 ERK1/2 磷酸化的影响

A: 电泳图; B: 相对密度. 1: 对照组; 2: 10^{-8} mol/L ET-1 组; 3: 10^{-5} mol/L 姜黄素组; 4: 10^{-8} mol/L ET-1 + 10^{-5} mol/L 姜黄素. 与对照组比较, #: $P < 0.05$; 与内皮素-1 组比较, ^: $P < 0.05$

合成增加、DNA 的复制。其中 DNA 合成是细胞分裂增殖的主要标志, 细胞增殖越快, DNA 合成亦越快。胸腺嘧啶是 DNA 合成的原料, 当 DNA 合成时, ³H-TdR 掺入率增高, ³H-TdR 掺入率是反映细胞 DNA 合成, 细胞增殖状态敏感和理想的指标。我们的研究结果显示: 经 ET-1 刺激后, VSMCs 计数增多, ³H-TdR 掺入率明显增加 ($P < 0.05$), 而不同剂量的姜黄素则能显著抑制 VSMCs 个数的增多和 ³H-TdR 掺入率的增加, 提示姜黄素能抑制 ET-1 诱导的血管平滑肌细胞的增殖。

丝裂素活化蛋白激酶 (MAPK) 家族是一组广泛存在细胞内具有丝氨酸和苏氨酸双磷酸化能力的蛋白激酶。MAPKs 是与细胞增殖关系最为密切的细胞内信号转导蛋白激酶, 是细胞外信号与细胞核之间信息转导的共同通路^[5,9]。在哺乳动物的细胞中并存多条 MAPK 信号转导通路, 其中 ERK1/2 (P44/P42 MAPK) 途径被认为是经典的 MAPK 信号转导通路, 是细胞因子、生长因子介导细胞增殖效应中最重要的途径^[10-11]。ERK1/2 在细胞信号转导方面有二大特征: ①活化的 MAPK 通过转位方式进入细胞核, 激活其下游底物, 主要是一些编码核转录因子的早反应基因 (如原癌基因 c-fos、c-myc、c-jun 和 Eng-1 等) 表达, 调控细胞生长反应, 导致次级反应基因 (如基因 ANF、MHC、MLC-2 等) 的异常表达, 影响细胞功能; ② MAPK 可将多个不同受体系统 (如 G 蛋白耦联受体和蛋白酪氨酸激酶受体) 介导的信号加以整合, 起着

多种信号的交汇点或共同通路作用。VSMCs 增殖与 MAPK 的激活有关^[12-13]。ET-1 是 VSMCs 增殖的强力刺激剂,已发现 ET-1 引起 VSMCs 增殖是通过促进 MAPK 活性上调而实现的^[14-15]。

本研究发现,ET-1 诱导 VSMCs 的增殖伴有磷酸化 ERK1/2 表达的上调,与文献[14]报道一致。姜黄素在抑制 ET-1 诱导的 VSMCs 增殖的同时,也抑制磷酸化 ERK1/2 的表达。表明姜黄素抑制 ET-1 诱导的 VSMCs 的增殖,可能与下调细胞增殖信号传导通路中关键的分子—ERK1/2 的表达,从而阻断增殖信号在胞内的级联反应有关。

最近 Kapakos 等^[16-17]报道姜黄素可以通过 PKB、ERK1/2 等通路抑制胰岛素、内皮素等引起的 A10 血管平滑肌细胞增殖,说明姜黄素的作用有更复杂的机理,2013 年 Yu 等^[18]报道了 sek-1, skn-1, sir-2.1 等通路介导了姜黄素参与氧化应激抵抗,如此看来,姜黄素的更广泛的作用还需要继续深入研究。

参考文献:

[1] Motterlini R, Foreti R, Bassi R, et al. Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress [J]. *Free Radic Biol Med*, 2000, 28 (8): 1303-1312.

[2] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: perspective for the 90s [J]. *Nature*, 1993, 362(29): 801-809.

[3] Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspective and therapeutic strategies [J]. *Nat Med*, 2002, 8(11): 1249-1256.

[4] Yu PJ, Ferrari G, Pirelli L, et al. Vascular injury and modulation of MAPK: a targeted approach to therapy of restenosis [J]. *Cell Signal*, 2007, 19: 1359-1371.

[5] Begum N, Hockman S, Manganiello VC. Phosphodiesterase 3a (PDE3A) deletion suppresses proliferation of culture murine vascular smooth muscle cells via inhibition of mitogen-activated protein kinase signaling and alterations in critical cell cycle regulatory protein [J]. *Biol Chem*, 2011, 286(29): 26238-26249.

[6] 宋露萍, 廖端芳. 姜黄素治疗动脉粥样硬化性心血管病的研究进展 [J]. *中南医学科学杂志*, 2013, 41 (4): 417-420.

[7] Pae Ho, Jeong GS, Jeong SO, et al. Roles of heme oxygenase-1 in curcumin-induced growth inhibition in rat smooth muscle cell [J]. *Exp Mol Med*, 2007, 39(3): 267-277.

[8] 徐叔宇, 卞如濂, 陈修, 等. *药理实验方法* [M]. 3 版. 北

京: 人民卫生出版社, 2001: 573-576.

[9] 许研, 刘海梅, 徐进文, 等. ERK1/2 蛋白在 17 β -雌二醇抑制睾酮诱导的心肌细胞肥大反应中的作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20(10): 876-880.

[10] Dong LH, Wen JK, Miao SB, et al. Baicalin inhibits PDGF-BB-stimulated vascular smooth muscle cell proliferation through suppressing PDGFB-ERK signaling and increase p27 accumulation and prevents injury-induced neointimal hyperplasia [J]. *Cell Res*, 2010, 20 (11): 1252-1262.

[11] Lin SJ, Shyue SK, Shih MC, et al. Superoxide dismutase and catalase inhibit oxidized low-density lipoprotein-induced human aortic smooth muscle cell proliferation: role of cell-cycle regulation, mitogen-activated protein kinase, and transcription factors [J]. *Atherosclerosis*, 2007, 190 (1): 124-349.

[12] Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs [J]. *Oncogene*, 2007, 26 (22): 1439-1455.

[13] Boutros T, Chevet C, Metrakos P. Mitogen-activated protein kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death and cancer [J]. *Pharmacol Rev*, 2008, 60 (3): 261-310.

[14] Landau D, Eshet R, Troib A, et al. Increased renal Akt/mTOR and MAPK signaling in type1 diabetes in the absence of IGF type 1 receptor activation [J]. *Endocrine*, 2009, 36(1): 126-134.

[15] Merkus D, Duncker DJ, Chilian WM. Metabolic regulation of coronary vascular tone: role of endothelin-1 [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, 283(5): 191-192.

[16] Kapakos G, Youreva V, Srivastava AK. Attenuation of endothelin-1-induced PKB and ERK1/2 signaling, as well as Egr-1 expression, by curcumin in A-10 vascular smooth muscle cells [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2012, 90(9): 1277-1285.

[17] Youreva V, Kapakos G, Srivastava AK. Insulin-like growth-factor-1-induced PKB signaling and Egr-1 expression is inhibited by curcumin in A-10 vascular smooth muscle cells [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2013, 91(3): 241-247.

[18] Yu CW, Wei CC, Liao VH. Curcumin-mediated oxidative stress resistance in *Caenorhabditis elegans* is modulated by age-1, akt-1, pdk-1, osr-1, unc-43, sek-1, skn-1, sir-2.1, and mev-1 [J]. *Free Radic Res*, 2014, 48 (3): 371-379.