

丹参酮 II_A抑制同型半胱氨酸诱导的大鼠主动脉血管平滑肌细胞增殖和迁移及其机制研究

董宜旋*,李 静[#](山东中医药大学药学院,济南 250355)

中图分类号 R543.3[†] 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)22-3072-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.22.15

摘要 目的:研究丹参酮 II_A抑制同型半胱氨酸(Hcy)诱导的大鼠主动脉血管平滑肌细胞(VSMCs)增殖和迁移及其机制。方法:取VSMCs用于试验。在验证丹参酮 II_A抑制Hcy诱导的VSMCs增殖和迁移试验(验证试验)中,将细胞分为对照组、Hcy组(1 000 μmol/L)及丹参酮 II_A低、中、高剂量组(5、10、20 μg/L)。在丹参酮作用机制试验(细胞通路试验)中,将细胞分为对照组、丹参酮 II_A组(20 μg/L)、雷帕霉素组(20 nmol/L)、MHY1485组(10 μmol/L)、丹参酮 II_A+雷帕霉素组(丹参酮 II_A,20 μg/L+雷帕霉素,20 nmol/L)、丹参酮 II_A+MHY1485组(丹参酮 II_A,20 μg/L+MHY1485,10 μmol/L)。验证细胞通路P70S6K和p-P70S6K的表达时,雷帕霉素(抑制试验)与MHY1485(激动试验)分别进行试验。酶标仪测定VSMCs的增殖,细胞划痕试验、Transwell法测定VSMCs的迁移,增强化学发光法测定VSMCs中P21、P27、基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9、P70S6K和p-P70S6K的表达。结果:验证试验中,与对照组比较,Hcy组细胞24、48 h吸光度值,迁移面积和VSMCs穿透数量,MMP-2、MMP-9和p-P70S6K表达水平显著升高,P21、P27表达水平显著降低($P<0.01$);与Hcy组比较,丹参酮 II_A低剂量组细胞48 h,中、高剂量组24、48 h吸光度值,MMP-2水平,低、中、高剂量组细胞迁移面积和VSMCs穿透数量,MMP-9和p-P70S6K表达水平显著降低,丹参酮 II_A中、高剂量组细胞中P21、P27表达水平显著升高($P<0.01$);各组细胞P70S6K水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。细胞通路试验中,与对照组比较,丹参酮 II_A+雷帕霉素组细胞24、48 h吸光度值,迁移面积和VSMCs穿透数量显著降低,MHY1485组24、48 h吸光度值显著升高($P<0.01$);与丹参酮 II_A组比较,丹参酮 II_A+雷帕霉素组细胞24、48 h吸光度值显著降低,丹参酮 II_A+MHY1485组细胞12、24、48 h吸光度值,迁移面积和VSMCs穿透数量显著升高($P<0.01$)。抑制试验中,与对照组比较,丹参酮 II_A组细胞p-P70S6K表达水平显著降低($P<0.01$);与丹参酮 II_A组比较、雷帕霉素、丹参酮 II_A+雷帕霉素组细胞p-P70S6K表达水平显著降低($P<0.01$)。激动试验中,丹参酮 II_A组细胞p-P70S6K水平显著降低($P<0.01$);与丹参酮 II_A组比较,MHY1485、丹参酮 II_A+MHY1485组细胞p-P70S6K水平显著升高($P<0.01$)。结论:丹参酮 II_A可以抑制VSMCs的增殖和迁移,并通过抑制mTOR/P70S6K信号通路而发挥作用。

关键词 血管平滑肌细胞;丹参酮 II_A;雷帕霉素受体/P70S6K;增殖;迁移

Study on Tanshinone II_A Inhibiting the Proliferation and Migration Induced by Homocysteine of VSMCs and Its Mechanism

DONG Yixuan, LI Jing (School of Pharmacy, Shandong University of TCM, Jinan 250355, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study tanshinone II_A inhibiting the proliferation and migration induced by homocysteine (Hcy) of rat aortic vascular smooth muscle cells (VSMCs) and its signal pathway. METHODS: VSMCs were selected for the following experiments. In order to validate Tanshinone II_A inhibiting the proliferation and migration induced by Hcy of VSMCs, VSMCs were divided into control group, Hcy group (1 000 μmol/L), Tanshinone II_A low-dose, medium-dose and high-dose groups (5, 10, 20 μg/L). In mechanism study test, VSMCs were divided into control group, Tanshinone II_A group (20 μg/L), rapamycin group (20 nmol/L), MHY1485 group (10 μmol/L), Tanshinone II_A+rapamycin group (Tanshinone II_A, 20 μg/L+rapamycin, 20 nmol/L), Tanshinone II_A+MHY1485 group (Tanshinone II_A, 20 μg/L+MHY1485, 10 μmol/L). In validation test of P70S6K and p-P70S6K pathway expression, rapamycin and MHY1485 were used for inhibitory test and activation test, respectively. The proliferation of VSMCs was determined by ELIASA, and Transwell chambers and wound healing test were employed to test the migratory ability of VSMCs. Western blotting were used to investigate the expressions of P21, P27, MMP-2, MMP-9, P70S6K and p-P70S6K in VSMCs. RESULTS: In validation test, compared with control group, 24, 48 h absorbance, migration area, the number of VSMCs penetration and the expression of MMP-2, MMP-9 and p-P70S6K increased significantly, while the expression of P21 and P27 decreased significantly ($P<0.01$). Compared with Hcy group, 48 h absorbance of Tanshinone II_A low-dose group, 24, 48 h absorbance and the expression of MMP-2 of Tanshinone II_A medium-dose and high-dose groups, migration area, the number of VSMCs penetration, the expression of MMP-9 and p-P70S6K in low-dose, medium-dose and high-dose groups all decreased significantly; the expression of P21 and P27 increased significantly in Tanshinone II_A medium-dose and high-dose groups ($P<0.01$); there was no statistical significance in P70S6K level among those groups ($P>0.05$). In cell pathway test, compared with control group, 24, 48 h absorbance, migration area and the number of VSMCs penetration decreased significantly in Tanshinone II_A group and

* 博士研究生。研究方向:中药学。E-mail: Dong012aD@163.com

[#] 通信作者:讲师,博士研究生。研究方向:中药学。E-mail: 406124939@qq.com

rapamycin group, while 24, 48 h absorbance increased significantly in MHY1485 group ($P < 0.01$). Compared with Tanshinone II_A group, 24, 48 h absorbance decreased significantly in Tanshinone II_A+rapamycin group, while 12, 24, 48 h absorbance, migration area and the number of VSMCs penetration increased significantly in Tanshinone II_A+MHY1485 group ($P < 0.01$). In inhibitory test, compared with control group, the expression of p-P70S6K decreased significantly in Tanshinone II_A group ($P < 0.01$); compared with Tanshinone II_A group, the expression of p-P70S6K decreased significantly in rapamycin group and Tanshinone II_A+rapamycin group ($P < 0.01$); in activation test, the expression of p-P70S6K decreased significantly in Tanshinone II_A group ($P < 0.01$), compared with Tanshinone II_A group, the expression of p-P70S6K increased significantly in MHY1485, Tanshinone II_A+MHY1485 group ($P < 0.01$). CONCLUSIONS: Tanshinone II_A can inhibit the proliferation and migration of VSMCs by suppressing mTOR/P70S6K signal pathway.

KEYWORDS Vascular smooth muscle cells; Tanshinone II_A; mTOR/P70S6K; Proliferation; Migration

血管平滑肌细胞(VSMCs)的增殖和迁移是动脉粥样硬化发展过程中重要的病理基础,也是造成支架植入或冠状动脉搭桥术后血管再狭窄的重要原因。高同型半胱氨酸(Hcy)血症是目前公认的冠状动脉粥样硬化的独立危险因素。大量研究证实Hcy可以增强VSMCs的增殖和迁移,诱导VSMCs分泌基质金属蛋白酶(MMPs)等影响细胞外基质动态平衡的蛋白酶^[1]。丹参酮II_A是传统中药丹参中主要的脂溶性有效成分,结构中含有醌型结构,容易被氧化还原。丹参酮II_A参与了机体的多重生化反应且具有多种生物活性,在心脑血管保护领域具有广泛的药理学作用,在抑制VSMCs的增殖迁移方面具有巨大潜力^[2-3]。本研究拟设计相关试验证实丹参酮II_A具有抑制VSMCs的增殖迁移的作用。

研究表明,哺乳动物雷帕霉素受体(mTOR)信号通路在VSMCs的增殖和迁移中起到关键的作用^[4]。当mTOR通路受到抑制时,VSMCs的增殖和迁移能力下降,最终抑制机体内血管重构的发生^[5];而mTOR通路的激活则可导致细胞内自噬消失,细胞功能紊乱,细胞增殖迁移加快^[6]。P70S6K是mTOR下游的一个分子通路;雷帕霉素、MHY1485分别是mTOR、P70S6K通路的特异性抑制剂和激动剂^[7-8]。本研究拟通过用雷帕霉素或MHY1485抑制或激活VSMCs中的mTOR通路后,再给予丹参酮干预VSMCs,证实丹参酮是否通过抑制mTOR/P70S6K通路来发挥其抗VSMCs增殖和迁移的作用。

1 材料

1.1 仪器

Eclipse TS100 倒置荧光光学显微镜(日本Nikon公司);SOIF/XTZ-E 体视显微镜(上海光学仪器厂);ChemDocT-MXRS 凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司);Forma Class II 生物安全柜(美国Thermo Scientific公司);Anthos 2010 酶标仪(奥地利Anthos Labtec公司);5417R 离心机(美国Eppendorf公司)。

1.2 药品与试剂

丹参酮II_A(中国食品药品检定研究院,纯度:99%,批号:110766-200518,化学标准品);Hcy(美国Sigma公司,纯度:99%);兔抗大鼠平滑肌肌动蛋白(SMA)、 β -actin 单克隆抗体、兔抗大鼠P21、P27、MMP-2、MMP-9 多克隆抗体(英国Abcom公司);兔抗P70S6K、p-P70S6K 多克隆抗体(美国Cell Signaling公司);辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔或者抗鼠二抗,FITC、FRITC 标记的山羊抗兔免疫球蛋白IgG(美国Jackson公司);MHY1485、雷帕霉素(美国Sigma公司,纯度:99%)。

1.3 动物

SPF级SD大鼠,♂♀不限,日龄50 d左右,体质量150~

180 g,由山东中医药大学实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(鲁)20050015。

2 方法

2.1 分组与给药

采用组织贴块法培育大鼠胸主动脉VSMCs,采用形态学观察,并通过细胞免疫荧光检测SMA,通过SMA与4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)核染之间的关系测定VSMCs的纯度。取第4~7代VSMCs用于后续试验,试验中施加干预时用含1.0%胎牛血清的DMEM高糖培养基作为基质。在验证丹参酮II_A抑制Hcy诱导的VSMCs增殖和迁移试验(验证试验)中,将细胞分为对照组、Hcy组(1 000 μ mol/L)及丹参酮II_A低、中、高剂量组(5、10、20 μ g/L)。在丹参酮作用机制试验(细胞通路试验)中,将细胞分为对照组、丹参酮II_A组(20 μ g/L)、雷帕霉素组(20 nmol/L)、MHY1485组(10 μ mol/L)、丹参酮II_A+雷帕霉素组(丹参酮II_A, 20 μ g/L+雷帕霉素, 20 nmol/L)、丹参酮II_A+MHY1485组(丹参酮II_A, 20 μ g/L+MHY1485, 10 μ mol/L)。验证细胞通路P70S6K和p-P70S6K的表达时,雷帕霉素(抑制试验)与MHY1485(激动试验)分别进行试验。

2.2 VSMCs的增殖测定

取4~7代培养细胞,加入0.25%胰蛋白酶消化单层VSMCs,用含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基配成细胞悬液并计数,以每孔 6×10^3 个细胞接种于96孔培养板中。细胞贴壁后,待细胞长到70%~80%后,采用血清饥饿使细胞同步化,按“2.1”项下分组并加入含相应药物的培养基培养8 h,每组设3个复孔、2个不加细胞的空白对照孔。细胞于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂孵箱分别培养12、24、48 h。培养结束后,每孔加入MTT液20 μ l,于37 $^{\circ}$ C继续孵育4~6 h后终止培养,小心弃去上清液,每孔加入150 μ l二甲基亚砜(DMSO),震荡10 min。采用酶标仪于490 nm波长处测定各孔吸光度值。

2.3 VSMCs迁移的测定

2.3.1 细胞划痕试验测定VSMCs迁移 取4~7代培养细胞,加入0.25%胰蛋白酶消化单层VSMCs,用含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基配成细胞悬液并计数,以每孔 10^5 个细胞接种于6孔培养板中,每孔2 ml。细胞贴壁后,待细胞长到70%~80%后,采用血清饥饿使细胞同步化,加入1.8 mmol/L羟基胍作用12 h抑制细胞增殖,用100 μ l黄色枪头垂直于孔板制造细胞划痕,吸去细胞培养液,用磷酸盐缓冲溶液(PBS)冲洗孔板3次,洗去划痕产生的细胞碎片,按“2.1”项下分组并加入含相应药物的培养基培养8 h。48 h后拍照记录,用Image pro plus 6.0 图像分析软件分析并计算出细胞迁移的面积。细胞迁移面积=划痕面积-迁移后细胞之间剩余面积;细胞迁

移率=细胞迁移面积/划痕面积×100%。

2.3.2 Transwell法测定VSMCs迁移 取4~7代VSMCs,血清饥饿使细胞同步化,加入1.8 mmol/L 羟基脲作用12 h抑制细胞增殖,按“2.1”项下分组并加入含相应药物的培养基配成细胞悬液并计数(3×10⁴个/ml)。每组24孔板配套的Transwell小室(0.8 μm)中,上室加入200 μl细胞悬液,下室加入含有10%胎牛血清的DMEM高糖培养基500 μl,培养48 h。培养结束后以棉签轻轻擦去上层未穿透膜的VSMCs,取下Transwell半透膜,TBS洗涤3次,3.7%多聚甲醛室温固定5 min,流水冲洗后,用2 μg/ml的DAPI染核,PBS冲洗。荧光显微镜下随机取5个视野计数穿膜细胞数并记录。

2.4 VSMCs中P21、P27、MMP-2、MMP-9、P70S6K和p-P70S6K表达的检测

按“2.1”项下方法分组、加药、培养48 h后,裂解VSMCs提取蛋白,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)每孔加入20 μl样品,80 V行蛋白浓聚30 min,120 V凝胶电泳2 h,并用孔径0.45 μm的硝酸纤维素膜以250 mA转膜90 min。转膜完毕后在常温(25 ℃)下以三羟甲基氨基甲烷缓冲液(TBST)洗膜3次、脱脂奶粉封闭2 h后,以1:1 000比例分别加入兔抗大鼠P21、P27、MMP-2、MMP-9多克隆抗体,兔抗P70S6K、p-P70S6K多克隆抗体,兔抗大鼠β-actin单克隆抗体(细胞通路试验仅加入兔抗P70S6K、p-P70S6K多克隆抗体,兔抗大鼠β-actin单克隆抗体),4 ℃孵育过夜。常温下(25 ℃)TBST洗膜3次,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗孵育后,采用增强化学发光(ECL)法检测目标蛋白和内参的表达。暗室柯达胶片显影,采用Quantity One 4.4软件进行定量分析。蛋白相对表达量=目的蛋白的灰度值/β-actin灰度值。

2.5 统计学方法

用SPSS 20.0统计软件对所得数据进行分析。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用单因素方差分析,多组间比较采用单因素方差分析和LSD法。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 VSMCs原代培养测定结果

用组织贴块法培养大鼠胸主动脉VSMCs,8 d左右组织块周围有细胞爬出,2周左右细胞融合可以传代。传代后细胞呈典型“峰谷”状排列生长,用SMA细胞免疫荧光法测定VSMCs,DAPI核染之后确定细胞纯度在99%以上,详见图1。

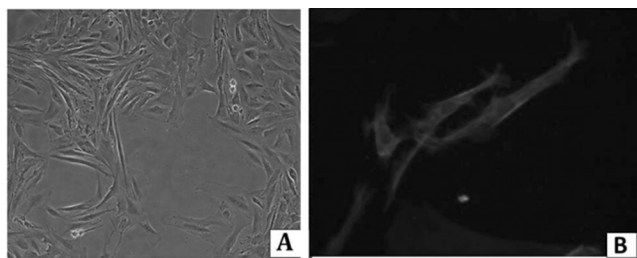


图1 大鼠主动脉VSMCs原代培养测定结果

A.形态学观察(×100);B.细胞免疫荧光鉴定(×400)

Fig 1 Determination of rat aortic VSMCs primary culture

A. morphology observation (×100); B. immunocytochemistry identification (×400)

3.2 验证试验结果

3.2.1 各组细胞增殖情况测定结果 与对照组比较,Hcy组细胞24、48 h吸光度值显著升高($P < 0.01$);与Hcy组比较,丹

参酮II_A低剂量组细胞48 h及中、高剂量组24、48 h吸光度值显著降低($P < 0.01$),表明细胞增殖明显减少,详见表1。

表1 各组细胞吸光度值测定结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 1 OD value of cell in each group($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量, μg/L	12 h	24 h	48 h
对照组		0.32±0.02	0.41±0.06	0.73±0.09
Hcy组		0.38±0.02	0.62±0.06*	1.14±0.15*
丹参酮II _A 低剂量组	5	0.36±0.02	0.57±0.06	0.93±0.18*
丹参酮II _A 中剂量组	10	0.31±0.01	0.49±0.04*	0.87±0.05*
丹参酮II _A 高剂量组	20	0.31±0.01	0.39±0.02*	0.79±0.11*

注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与Hcy组比较,# $P < 0.01$

Note: vs. control group,* $P < 0.01$; vs. Hcy group,# $P < 0.01$

3.2.2 各组细胞迁移情况测定结果 与对照组比较,Hcy组细胞迁移面积和VSMCs穿透数量显著升高($P < 0.01$);与Hcy组比较,丹参酮II_A低、中、高剂量组细胞迁移面积和VSMCs穿透数量显著降低($P < 0.01$),详见表2。

表2 各组细胞迁移情况测定结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 2 Migration of cell in each group($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量, μg/L	迁移面积,%	VSMCs穿透数量,个
对照组		0.22±0.02	46±9.6
Hcy组		0.58±0.05*	245±27.6*
丹参酮II _A 低剂量组	5	0.46±0.04*	199±21.6*
丹参酮II _A 中剂量组	10	0.41±0.04*	147±23.4*
丹参酮II _A 高剂量组	20	0.39±0.05*	139±15.2*

注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与Hcy组比较,# $P < 0.01$

Note: vs. control group,* $P < 0.01$; vs. Hcy group,# $P < 0.01$

3.2.3 各组细胞中P21、P27、MMP-2、MMP-9、P70S6K和p-P70S6K表达水平的检测结果 与对照组比较,Hcy组细胞中P21、P27表达水平显著降低($P < 0.01$),MMP-2、MMP-9和p-P70S6K表达水平显著升高($P < 0.01$)。与Hcy组比较,丹参酮II_A低剂量组细胞中P27表达水平,丹参酮II_A中、高剂量组细胞中P21、P27表达水平显著升高($P < 0.01$);丹参酮II_A中、高剂量组细胞中MMP-2,丹参酮II_A低、中、高剂量组细胞中MMP-9和p-P70S6K表达水平显著降低($P < 0.01$);各组细胞P70S6K水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),详见表3。ECL法检测目标蛋白和内参的表达结果见图2。

表3 各组细胞中P21、P27、MMP-2、MMP-9、P70S6K和p-P70S6K表达水平的检测结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 3 The expression levels of P21, P27, MMP-2, MMP-9, P70S6K and p-P70S6K of cell in each group($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量, μg/L	P21	P27	MMP-2	MMP-9	P70S6K	p-P70S6K
对照组		1.35±0.15	0.54±0.04	0.12±0.01	0.14±0.01	0.76±0.05	0.12±0.01
Hcy组		0.89±0.12*	0.21±0.01*	0.64±0.02*	0.57±0.05*	0.69±0.06	1.43±0.21*
丹参酮II _A 低剂量组	5	1.04±0.17	0.64±0.02*	0.62±0.03	0.48±0.03*	0.75±0.07	0.78±0.08*
丹参酮II _A 中剂量组	10	1.78±0.13	0.84±0.05*	0.31±0.01*	0.32±0.02*	0.86±0.03	0.55±0.34*
丹参酮II _A 高剂量组	20	1.73±0.21*	0.76±0.02*	0.29±0.01*	0.24±0.02*	0.67±0.06	0.32±0.02*

注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与Hcy组比较,# $P < 0.01$

Note: vs. control group,* $P < 0.01$; vs. Hcy group,# $P < 0.01$

3.3 细胞通路试验结果

3.3.1 各组细胞增殖情况测定结果 与对照组比较,丹参酮II_A、雷帕霉素组细胞24、48 h吸光度值显著降低($P < 0.01$),MHY1485组24、48 h吸光度值显著升高($P < 0.01$);与丹参酮II_A组比较,丹参酮II_A+雷帕霉素组细胞24、48 h吸光度值显著

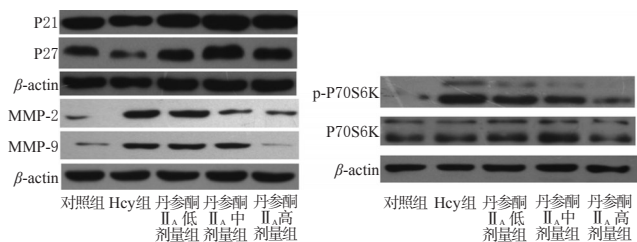


图2 各组细胞中P21、P27、MMP-2、MMP-9、P70S6K与p-P70S6K的表达情况

Fig 2 The expression of P21, P27, MMP-2, MMP-9, P70S6K and p-P70S6K of cell in each group

降低($P < 0.01$),丹参酮II_A+MHY1485组细胞12、24、48 h吸光度值显著升高($P < 0.01$),详见表4。

表4 各组细胞吸光度值结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 4 OD value of cell in each group($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	12 h	24 h	48 h
对照组	0.42 ± 0.03	0.69 ± 0.04	1.13 ± 0.19
丹参酮II _A 组	0.31 ± 0.01	0.52 ± 0.06*	0.74 ± 0.15*
雷帕霉素组	0.34 ± 0.01	0.49 ± 0.07*	0.64 ± 0.08*
丹参酮II _A +雷帕霉素组	0.31 ± 0.02	0.42 ± 0.02*	0.61 ± 0.05*
MHY1485组	0.52 ± 0.02	0.81 ± 0.08*	1.22 ± 0.18*
丹参酮II _A +MHY1485组	0.54 ± 0.02*	0.78 ± 0.09*	1.09 ± 0.13*

注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与丹参酮II_A组比较,* $P < 0.01$

Note: vs. control group,* $P < 0.01$; vs. Tan II_A group,* $P < 0.01$

3.3.2 各组细胞迁移情况测定结果 与对照组比较,丹参酮II_A、雷帕霉素组细胞迁移面积和VSMCs穿透数量显著降低($P < 0.01$);与丹参酮II_A组比较,丹参酮II_A+MHY1485组细胞迁移面积和VSMCs穿透数量显著升高($P < 0.01$),详见表5。

表5 各组细胞迁移情况测定结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 5 Migration of cell in each group($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	迁移面积,%	VSMCs穿透数量,个
对照组	0.72 ± 0.07	243 ± 21.4
丹参酮II _A 组	0.31 ± 0.04*	155 ± 12.4*
雷帕霉素组	0.24 ± 0.02*	98 ± 7.7*
丹参酮II _A +雷帕霉素组	0.22 ± 0.01	79 ± 6.9
MHY1485组	0.82 ± 0.07	268 ± 17.9
丹参酮II _A +MHY1485组	0.74 ± 0.07*	237 ± 22.7*

注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与丹参酮II_A组比较,* $P < 0.01$

Note: vs. control group,* $P < 0.01$; vs. Tan II_A group,* $P < 0.01$

3.3.3 各组细胞中P70S6K和p-P70S6K表达水平的检测结果

抑制试验中,与对照组比较,丹参酮II_A组细胞p-P70S6K表达水平显著降低($P < 0.01$);与丹参酮II_A组比较,雷帕霉素、丹参酮II_A+雷帕霉素组细胞的p-P70S6K表达水平显著降低($P < 0.01$),详见表6、图3。

表6 抑制试验中各组细胞P70S6K和p-P70S6K表达水平的检测结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 6 The expression level of P70S6K and p-P70S6K of cell in each group in inhibitory test($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	P70S6K	p-P70S6K
对照组	0.66 ± 0.05	0.87 ± 0.07
丹参酮II _A 组	0.59 ± 0.06	0.43 ± 0.06*
雷帕霉素组	0.65 ± 0.07	0.08 ± 0.01*
丹参酮II _A +雷帕霉素组	0.66 ± 0.03	0.05 ± 0.01*

注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与丹参酮II_A组比较,* $P < 0.01$

Note: vs. control group,* $P < 0.01$; vs. Tan II_A group,* $P < 0.01$

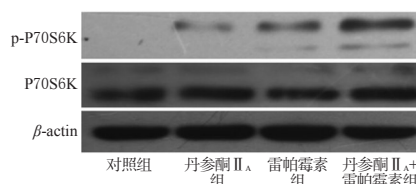


图3 抑制试验中各组细胞P70S6K和p-P70S6K表达情况

Fig 3 The expression of P70S6K and p-P70S6K of cell in each group in inhibitory test

激动试验中,丹参酮II_A组细胞p-P70S6K水平显著降低($P < 0.01$);与丹参酮II_A组比较,MHY1485、丹参酮II_A+MHY1485组细胞p-P70S6K水平显著升高($P < 0.01$),详见表7、图4。

表7 激动试验中各组细胞P70S6K和p-P70S6K表达水平的检测结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 7 The expression level of P70S6K and p-P70S6K of cell in each group in activation test($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	P70S6K	p-P70S6K
对照组	0.64 ± 0.06	0.47 ± 0.05
丹参酮II _A 组	0.57 ± 0.05	0.13 ± 0.01*
MHY1485组	0.55 ± 0.03	0.58 ± 0.05*
丹参酮II _A +MHY1485组	0.56 ± 0.02	0.75 ± 0.15*

注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与丹参酮II_A组比较,* $P < 0.01$

Note: vs. control group,* $P < 0.01$; vs. Tan II_A group,* $P < 0.01$

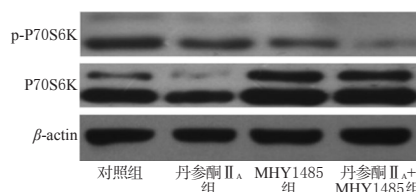


图4 激动试验中各组细胞P70S6K和p-P70S6K表达情况

Fig 4 The expression of P70S6K and p-P70S6K of cell in each group in activation test

4 讨论

丹参酮II_A作为传统中药丹参中的一种提取成分,在心血管疾病的治疗中已有广泛的应用^[9]。丹参酮II_A不仅可以抑制血小板黏附、聚集发挥抗凝血作用,还具有抗氧化、保护血管内皮细胞等作用^[10-13]。研究证实,P21和P27可以抑制VSMCs的增殖^[14-15]。在本研究中,丹参酮II_A通过抑制mTOR/P70S6K通路,增加与细胞增殖相关的P21和P27的表达,抑制Hcy诱导的VSMCs增殖和迁移,这可能是其抗动脉粥样硬化的机制之一。

VSMCs位于动脉血管的中层,在正常状态下主要起收缩血管的功能,当遇到炎症因子等血管损伤因素时,VSMCs可被激活而增加增殖和迁移能力^[16]。VSMCs大量增殖、迁移、吞噬氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)后形成肌源性泡沫细胞,进一步分泌炎症因子,使炎症反应级联放大,细胞外基质降解,最终导致冠状动脉粥样硬化斑块的形成以及斑块的破裂^[17]。MMP在平滑肌细胞的侵袭和转移中发挥着重要作用,一方面其可通过与细胞黏附分子相互作用降解细胞外基质,为VSMCs向周围组织增殖迁移提供空间;另一方面MMP还可以激活细胞内PI3K/AKT通路,增加细胞的迁移和增殖能力^[18-19]。本研究结果显示,丹参酮II_A可以抑制VSMCs中MMP-2和MMP-9的

表达,这可能是丹参酮 II_A抑制 VSMCs 增殖迁移的机制之一。

VSMCs 的增殖和迁移受大量信号通路的调控,mTOR 信号通路的激活可以增加 p-P70S6K 的表达,增加 VSMCs 的增殖和迁移。本研究结果显示,丹参酮 II_A在抑制 VSMCs 的增殖和迁移的同时,减少 p-P70S6K 的表达。

为了进一步证实丹参酮 II_A是否通过抑制 mTOR/P70S6K 信号通路而发挥作用,笔者在本研究中设计了抑制试验与激动试验。结果显示,雷帕霉素可以抑制 p-P70S6K 的表达,与丹参酮 II_A一样可以抑制 VSMCs 的增殖和迁移;MHY1485 可以逆转丹参酮 II_A抑制 VSMCs 增殖迁移的作用,进一步证实丹参酮 II_A是通过抑制 mTOR/P70S6K 信号通路发挥作用。综上所述,丹参酮 II_A可以抑制 VSMCs 的增殖和迁移,并通过抑制 mTOR/P70S6K 信号通路而发挥作用。

参考文献

- [1] Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis[J]. *Acta Physiol: Oxf*,2015,14(1):33.
- [2] Chaabane C, Coen M, Bochaton-Piallat ML. Smooth muscle cell phenotypic switch: implications for foam cell formation[J]. *Curr Opin Lipidol*,2014,25(5):374.
- [3] Han XB, Zhang HP, Cao CJ, et al. Aberrant DNA methylation of the PDGF gene in homocysteine mediated VSMC proliferation and its underlying mechanism[J]. *Mol Med Rep*,2014,10(2):947.
- [4] Zhang D, Chen Y, Xie X, et al. Homocysteine activates vascular smooth muscle cells by DNA demethylation of platelet-derived growth factor in endothelial cells[J]. *J Mol Cell Cardiol*,2012,53(4):487.
- [5] Zheng L, Liu M, Wei M, et al. Tanshinone II_A attenuates hypoxic pulmonary hypertension via modulating KV currents[J]. *Respir Physiol Neurobiol*,2015,205:120.
- [6] Grundmann S, Hans FP, Kinniry S, et al. MicroRNA-100 regulates neovascularization by suppression of mammalian target of rapamycin in endothelial and vascular smooth muscle cells[J]. *Circulation*,2011,123(9):999.
- [7] Munson MJ, Ganley IG. mTOR, PIK3C3, and autophagy: signaling the beginning from the end[J]. *Autophagy*,2015,11(12):2375.
- [8] Cheng Y, Kim J, Li XX, et al. Promotion of ovarian follicle growth following mTOR activation: synergistic effects of AKT stimulators[J]. *PLoS One*,2015,10(2):117769.
- [9] 黄菁菁,张伟霞,杨婉花.丹参酮 II_A磺酸钠治疗冠心病心绞痛的临床观察[J].*中国药房*,2016,27(2):219.
- [10] Yang Y, Cai F, Li PY, et al. Activation of high conduc-

tance Ca(2+)-activated K(+) channels by sodium tanshinone II_A sulfonate (DS-201) in porcine coronary artery smooth muscle cells[J]. *Eur J Pharmacol*,2008,598(1/2/3):9.

- [11] Xu S, Little PJ, Lan T, et al. Tanshinone II_A attenuates and stabilizes atherosclerotic plaques in apolipoprotein-E knockout mice fed a high cholesterol diet[J]. *Arch Biochem Biophys*,2011,515(1/2):72.
- [12] Wu WY, Yan H, Wang XB, et al. Sodium tanshinone II_A silicate inhibits high glucose-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration through activation of AMP-activated protein kinase[J]. *PLoS One*,2014,9(4):94957.
- [13] Wang J, Jiang Q, Wan L, et al. Sodium tanshinone II_A sulfonate inhibits canonical transient receptor potential expression in pulmonary arterial smooth muscle from pulmonary hypertensive rats[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*,2013,48(1):125.
- [14] Tan XQ, Cheng XL, Yang Y, et al. Tanshinone II_A sodium sulfonate (DS-201) enhances human BKCa channel activity by selectively targeting the pore-forming alpha subunit[J]. *Acta Pharmacol Sin*,2014,35(11):1351.
- [15] Auge N, Maupas-Schwalm F, Elbaz M, et al. Role for matrix metalloproteinase-2 in oxidized low-density lipoprotein-induced activation of the sphingomyelin/ceramide pathway and smooth muscle cell proliferation[J]. *Circulation*,2004,110(5):571.
- [16] Vanhoutte D, Heymans S. TIMPs and cardiac remodeling: 'Embracing the MMP-independent-side of the family' [J]. *J Mol Cell Cardiol*,2010,48(3):445.
- [17] Lee SJ, Lee YS, Seo KW, et al. Homocysteine enhances MMP-9 production in murine macrophages via ERK and Akt signaling pathways[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*,2012,260(1):89.
- [18] Wagner RJ, Martin KA, Powell RJ, et al. Lovastatin induces VSMC differentiation through inhibition of Rheb and mTOR[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*,2010,299(1):119.
- [19] Martin KA, Rzczidlo EM, Merenick BL, et al. The mTOR/p70 S6K1 pathway regulates vascular smooth muscle cell differentiation[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*,2004,286(3):507.

(收稿日期:2016-01-02 修回日期:2016-06-17)

(编辑:刘明伟)

《中国药房》杂志——RCCSE 中国核心学术期刊,欢迎投稿、订阅