

[文章编号] 1007-3949(2007)15-04-0261-04

• 实验研究 •

姜黄素水解衍生物对血管平滑肌细胞增殖及低密度脂蛋白受体表达的影响

洪行球, 黄燕芬, 丁志山, 刘海龙

(浙江中医药大学生命科学院, 浙江省杭州市 310053)

[关键词] 药理学; 姜黄素水解衍生物; 血管平滑肌细胞; 低密度脂蛋白受体

[摘要] 目的 研究姜黄素水解衍生物对氧化型低密度脂蛋白促牛主动脉平滑肌细胞增殖和对牛血管平滑肌细胞膜低密度脂蛋白受体表达的影响。方法 用盐酸加三氯化铝水解姜黄素, 获得姜黄素水解衍生物; 用氧化型低密度脂蛋白培养牛血管平滑肌细胞建立促增殖模型, MTT 比色法观察姜黄素水解衍生物对牛血管平滑肌细胞增殖的抑制作用; 流式细胞仪检测血管平滑肌细胞膜上低密度脂蛋白受体表达的影响; 采用逆转录聚合酶链反应检测 α -myc 的表达。结果 姜黄素水解衍生物对 10 mg/L 氧化型低密度脂蛋白培养的血管平滑肌细胞增殖有明显的抑制作用, 高中低剂量组的抑制率分别为 46%、37% 和 22% ($P < 0.01$ 或 0.05); 对血管平滑肌细胞膜上的低密度脂蛋白受体的表达均有明显的上调作用, 高中低剂量组低密度脂蛋白受体表达率分别比对照组高 33.85%、17.95% 和 5.75% ($P < 0.01$ 或 0.05); 能够下调 α -myc 的表达。结论 姜黄素水解衍生物能明显抑制牛主动脉平滑肌细胞增殖, 上调低密度脂蛋白受体的表达, 从而延缓动脉粥样硬化的发生发展。

[中图分类号] R9

[文献标识码] A

The Effects of Ramification of Curcumin Hydrolyzed on Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells and Expression of Low Density Lipoprotein Receptor

HONG Xing-Qiu, HUANG Yan-Fen¹, DING Zhi-San, LIU Yan, and LIU Hai-Long

(Life Science Institute, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

[KEY WORDS] Ramification of Curcumin Hydrolyzed; Smooth Muscle Cell; Low Density Lipoprotein Receptor

[ABSTRACT] Aim To study the effects on the proliferation of ramification of Curcumin hydrolyzed by HCl (RCH) on the bovine vascular smooth muscle cell (VSMC) and the expression of low density lipoprotein receptor (LDLR). Method Curcumin was hydrolyzed by HCl, the proliferation models of the bovine VSMC were stimulated by ox-LDL, MTT was used to observe its effects on proliferation of the bovine VSMC. FCM was used to observe its effects of expression of LDLR. The α -myc mRNA was measured by RT-PCR. Results Ramification of Curcumin Hydrolyzed have obvious effect on anti proliferation of VSMC stimulated by 10 mg/L ox-LDL ($P < 0.01$). And it can obviously increase the expression of LDLR of VSMC and down regulate the expression of α -myc. Conclusion Ramification of Curcumin hydrolyzed have obvious effect on anti proliferation of VSMC, and it can increase the expression of LDLR. That may be the mechanism of delaying the development of arteriosclerosis.

姜黄素是中药姜黄中的一种酚性色素, 具有调血脂、抗氧化、抗肿瘤等广泛的药理作用^[1-3]。但存在生物利用度不高等问题, 引起了许多学者的关注。其中包括 ①寻找合适的载体, 以增加姜黄素的水溶性和口服吸收率, 延缓生物半衰期; ②改变剂型和给药途径等, 探索解决方法。姜黄素一侧或两侧苯环上脱甲氧基后形成的姜黄素水解衍生物(Ramification of Curcumin Hydrolyzed, RCH)有抑制血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)和内皮细胞

增殖^[4,5], 促进低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)表达^[6]的作用。还有报道, RCH能降血脂、抗脂质过氧化和上调脂代谢相关酶活性^[7], 在此基础上, 笔者利用姜黄素分子中的两个苯甲醚结构, 通过去甲基工艺; 制备成姜黄素水解衍生物, 观察其对 VSMC 增殖和 LDLR 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 姜黄素水解衍生物的制备

取纯度大于 98% 的姜黄素溶解于吡啶, 加盐酸、三氯化铝, 加热回流后, 取样在薄层色谱上用氯仿: 甲醇: 甲酸 = (93: 7: 0.7) 展开, 检测, 柱色谱分离, 以国家药品食品管理局生物制品鉴定所提供的姜黄素(批号 823-9401)为对照品, 利用其与姜黄素

[收稿日期] 2006-12-05 [修回日期] 2007-04-02

[基金项目] 浙江省自然科学基金(202015)

[作者简介] 洪行球, 副研究员, 硕士研究生导师, 主要从事药理学研究, 联系电话 0571-86613724, E-mail 为 xqhong20204@163.com。黄燕芬, 助理研究员, 主要从事中药药理研究, 联系电话 0571-86613724, E-mail 为 hyf3797@126.com。丁志山, 副教授, 主要从事分子生物学研究, 联系电话 0571-86613724, E-mail 为 zjtcndzs@163.com。

母核有相同的 β 二酮基,可与硼酸在无水酸性条件下呈红色的原理,测定含量。

1.2 牛主动脉平滑肌细胞培养

无菌条件下取新生小牛主动脉,分离中膜平滑肌层,剪碎,用20%小牛血清的RPMI1640培养基贴块培养,待细胞长满瓶底后,传代培养,取3~6代细胞用于实验。

1.3 氧化型低密度脂蛋白的制备

取新鲜人血浆,经2次密度梯度超速离心分离,取密度在1.019~1.063之间的蛋白层溶液, Sepharose 6B凝胶过滤,得人LDL,以铜离子氧化法氧化,获得氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL), Folin-lowry法测定蛋白含量,抽滤除菌,4℃保存。

1.4 荧光探针 DiI 标记低密度脂蛋白的制备

取2 mL LDL与25 mg不溶性马铃薯淀粉置于试管中混匀后,加入60 μ L DiI(用甲醇溶解浓度为10 g/L) 4℃放置1 h,液氮速冻,真空干燥,然后加入2 mL 10 mmol/L Tricine 4℃孵育48 h,每隔一定时间取出混匀一次。4℃ 2 kr/min离心15 min,去淀粉沉淀。取上清液,4℃ 12 kr/min离心15 min,所得的上清液含DiI-LDL,以Folin-lowry法测定蛋白浓度。4℃保存备用。

1.5 姜黄素水解衍生物对氧化型低密度脂蛋白促牛血管平滑肌细胞增殖的影响

取生长良好的VSMC以 $10^7 \sim 10^8$ /L接种于96孔培养板,每孔100 μ L, 37℃、5% CO₂ 孵育24 h,待细胞贴壁后更换无血清培养基继续培养24 h,使细胞同步于G₁/G₀期后,随机分8组,每组6孔:空白对照组含5%小牛血清RPMI1640培养基100 μ L;模型组(ox-LDL组)为上述等量培养基中加ox-LDL至终浓度为10 mg/L;姜黄素和分别设高、中、低三个剂量组(分别称为姜黄素高剂量组、姜黄素中剂量组、姜黄素低剂量组、RCH高剂量组、RCH中剂量组和RCH低剂量组),依次加ox-LDL至终浓度为10 mg/L;加姜黄素和RCH到66 μ mol/L、33 μ mol/L和16.5 μ mol/L。37℃、5% CO₂继续培养48 h后,弃培养基,每孔加入0.5 g/L MTT 100 μ L,继续孵育4 h,弃MTT液后每孔加DMSO 100 μ L充分溶解深蓝色结晶,酶标仪570 nm测吸光度(A),计算其对ox-LDL促牛VSMC增殖的抑制率,抑制率=(实验组吸光度-模型对照吸光度)÷模型对照组吸光度×100%。

1.6 姜黄素水解衍生物对牛平滑肌细胞上低密度脂蛋白受体表达的影响

血管平滑肌细胞(VSMC)以 6.0×10^8 /L接种于

培养瓶,每瓶4 mL, 37℃、5% CO₂培养,待细胞贴壁后随机分7组:正常对照组含5%小牛血清RPMI1640培养基;姜黄素和RCH分别设高、中、低三个剂量组,各加姜黄素和RCH到66 μ mol/L、33 μ mol/L和16.5 μ mol/L。37℃、5% CO₂培养48 h,弃培养基后加入含DiI-LDL(20 μ g/L)的无小牛血清的RPMI1640培养基,37℃、5% CO₂培养4.5 h,4℃继续培养0.5 h,胰酶消化后各瓶取1 mL细胞液分别转入1.5 mL离心管离心,用D-Hanks液洗三遍,4%甲醛固定,PBS洗涤,制成单细胞悬液,流式细胞仪激发波长488 nm,检测波长500~550 nm,检测荧光强度。

1.7 逆转录聚合酶链反应检测 α -myc 基因 mRNA 表达

使用Trizol Reagent试剂(Gibco公司产品)抽提经RCH高、中、低三个剂量组和空白对照组37℃、5% CO₂培养48 h后VSMC的总RNA,紫外分光光度计测总RNA的纯度及含量。以1 μ L总RNA为模板,用TaKaRa RT-PCR试剂盒扩增 α -myc片段,其中 α -myc上游引物为5'-CAG CCA TCC AGC ACT GCC ATT C-3',下游引物为5'-AGT CAT GGG GAG ACA TGG GCT GG-3',扩增产物长330 bp。同时设置内参 β -actin,上游引物为5'-ATG CCA TCC TGC GTC TG-3',下游为5'-GGA CTC ATC GTA CTC CTG CT-3'。扩增片段长578 bp。引物由上海生工生物技术有限公司合成。反应体系为50 μ L,反应参数为:94℃预变性5 min后,94℃变性30 s \rightarrow 58℃复性30 s \rightarrow 72℃延伸30 s,共30个循环。以扩增产物的电泳条带密度扫描结果的比值作为VSMC中 α -myc基因表达的相对量。

1.8 统计学分析

所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS10.0统计软件,经 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 姜黄素水解衍生物的制备

姜黄素水解后取样经薄层色谱检测,得到两个极性大于二脱甲氧基姜黄素的黄色斑点,经分析应为姜黄素的一去甲基和二去甲基产物。测得纯度为93.5%。

2.2 姜黄素水解衍生物对血管平滑肌细胞增殖的抑制作用

姜黄素及RCH对VSMC增殖的影响见表1。可见10 mg/L的ox-LDL有明显的促牛VSMC增殖作用

($P < 0.01$); 姜黄素和 RCH 66 $\mu\text{mol/L}$ 和 33 $\mu\text{mol/L}$ 有明显抑制 ox-LDL 促牛 VSMC 增殖的作用 ($P < 0.01$); 姜黄素和 RCH 16.5 $\mu\text{mol/L}$ 也有抑制作用 ($P < 0.05$)。

表 1. 姜黄素水解物对氧化型低密度脂蛋白促牛血管平滑肌细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

分 组	平均吸光度(A)	抑制率
空白对照	0.121 \pm 0.001	
ox-LDL 组	0.161 \pm 0.031 ^a	
姜黄素高剂量	0.095 \pm 0.002 ^c	40%
姜黄素中剂量	0.115 \pm 0.011 ^c	28%
姜黄素低剂量	0.122 \pm 0.009 ^b	24%
RCH 高剂量	0.086 \pm 0.019 ^c	46%
RCH 中剂量	0.101 \pm 0.021 ^c	37%
RCH 低剂量	0.125 \pm 0.028 ^b	22%

a 为 $P < 0.01$, 与空白对照组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与 ox-LDL 组比较。

2.3 姜黄素水解衍生物对平滑肌细胞膜低密度脂蛋白受体表达的影响

姜黄素及 RCH 对平滑肌细胞膜低密度脂蛋白受体表达的影响见表 2。可见姜黄素高剂量组和 RCH 高、中剂量组对 VSMC 的 LDLR 表达均有明显的上调作用 ($P < 0.01$), 姜黄素中剂量组和 RCH 中、低剂量组对 VSMC 的 LDLR 的表达也有上调作用 ($P < 0.05$)。

表 2. 姜黄素水解物对牛血管平滑肌细胞上低密度脂蛋白受体表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

分 组	LDLR 表达率
空白对照组	15.50% \pm 2.50%
姜黄素高剂量	42.52% \pm 4.12% ^b
姜黄素中剂量	26.98% \pm 3.77% ^a
姜黄素低剂量	18.92% \pm 2.15%
RCH 高剂量组	49.35% \pm 4.88% ^b
RCH 中剂量组	33.45% \pm 4.50% ^b
RCH 低剂量组	21.25% \pm 2.50% ^a

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与空白对照组比较。

2.4 $\sigma\text{-myc}$ mRNA 的表达

姜黄素水解衍生物(RCH)低(16.5 $\mu\text{mol/L}$)、中(33 $\mu\text{mol/L}$)和高(66 $\mu\text{mol/L}$)三个剂量组 $\sigma\text{-myc}$ 的表达依次减少, 分别为 0.78 ± 0.13 、 0.46 ± 0.11 和 0.28 ± 0.08 (图 1)。

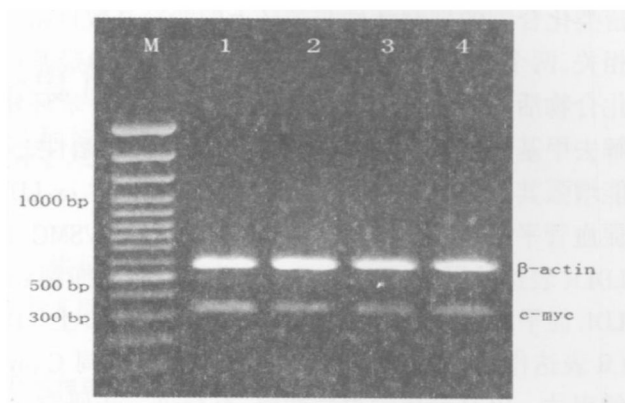


图 1. 血管平滑肌细胞 $\sigma\text{-myc}$ mRNA 表达的检测 M 为 100 bp DNA ladder; 1 为低剂量; 2 为中剂量; 3 为高剂量; 4 为正常对照。

3 讨论

血管平滑肌细胞(VSMC)有收缩型和合成型, 合成型能分泌多种生长因子促进自身增殖, 并由中膜向内膜迁移, 是动脉内膜遭病理损伤后造成狭窄和经皮腔内冠状动脉成形术(PTCA)后再狭窄的主要原因。氧化修饰的脂蛋白与 As 性心脑血管疾病的发生发展有着非常密切的关系, 是目前已知的 As 危险因子。因为 ox-LDL 既可以被巨噬细胞清道夫受体(scavenger receptor)结合、吞噬形成动脉粥样硬化的早期病变一泡沫细胞, 同时又可刺激 VSMC 增殖及向内膜迁移, 并激活血小板致血栓形成等。

低密度脂蛋白受体(LDLR)是一种细胞表面糖蛋白, 广泛分布于动物的大多数细胞表面, 主要功能是通过摄取 LDL 进入细胞内, 产生游离胆固醇, 用于细胞增殖和固醇类激素及胆汁酸盐的合成等, 血清中近三分之二的 LDL 通过这一内吞途径被清除^[8]。而 LDL 被摄入量多少取决于 LDLR 的数量和活性, 因此 LDLR 对维持血浆中的 LDL 和胆固醇浓度发挥着重要作用。 $\sigma\text{-myc}$ 基因是较早发现并研究的原癌基因之一。当 $\sigma\text{-myc}$ 基因被激活后, 大量 G_0/G_1 期细胞提前进入 S 期, 促使细胞增殖, 抑制细胞分化, 与细胞过度增殖性疾病有密切关系^[9]。本文研究结果显示, 姜黄素水解物可降低 $\sigma\text{-myc}$ 基因 mRNA 表达, 说明 $\sigma\text{-myc}$ 表达水平下调, 提示姜黄素水解物可抑制平滑肌细胞增殖, 从而对动脉粥样硬化形成和发展可能具有一定的干预作用。

姜黄素是中药姜黄中的一种酚性色素, 具有调血脂、抗氧化、抗肿瘤等广泛的药理作用^[1-3]。但水溶性较小, 存在生物利用度不高问题。一般认为羟基对生物活性的影响较大, 酚羟基被醚化或酯化会

使活性降低。如酪氨酸蛋白激酶的抑制剂苄叉丙二腈类化合物的抑制活性与苯环上的酚羟基数目密切相关,两个或多个酚羟基比只有1个或无酚羟基的化合物活性强数十倍至数百倍^[10]。姜黄素苯环水解去甲基后理论上即能增大极性,增加水溶性,又能增强其生物活性,通过姜黄素和 RCH,对 ox-LDL 促血管平滑肌细胞增殖的抑制作用和对牛 VSMC 上 LDLR 表达的影响,发现 RCH 和姜黄素都能抑制 ox-LDL 促平滑肌细胞的增殖和有上调牛 VSMC 上 LDLR 表达作用;RCH 对培养的 VSMC 能够下调 C-myc 的表达。RCH 药代动力学如何,有待进一步研究。

[致谢] 姜黄素结构修饰工艺承蒙浙江工业大学药学院苏为科教授悉心指导。

[参考文献]

[1] 丁志山,高承贤,陈锐铍,梁冰冰. 姜黄素具有抗血管生成与诱导肿

瘤细胞凋亡双重作用[J]. 中国药理学通报, 2003, 19 (2): 171-173.

- [2] Hasse BR. A simple and efficient separation of the curcumins, the antiprotozoal constituents of curcuma longa [J]. *Plant Medic*, 2000, 66: 396-368.
- [3] 沃兴德,洪行球,赵革平. 姜黄素对低密度脂蛋白和脂蛋白(a)代谢的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 1999, 7 (4): 339-341.
- [4] 洪行球,赵革平,黄燕芬,刘艳. 姜黄醇提取物中不同组分对血管平滑肌细胞增殖的影响研究[J]. 中医药学刊, 2004, 22 (10): 1 823-824.
- [5] 李剑明,杨和平,刘松青: 3 种姜黄色素单体抑制人内皮细胞作用的实验研究[J]. 重庆医学, 2002, 31 (9): 804-805.
- [6] 洪行球,黄燕芬,符敏敏,刘海龙. 二脱甲氧基姜黄素降血脂和抗脂质过氧化作用研究[J]. 中国天然药物, 2006, 4 (2): 121-124.
- [7] 刘艳,洪行球. 3 种姜黄色素干预 ox-LDL 促平滑肌细胞增殖与影响 LDLR 表达的研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31 (6): 500-503.
- [8] Hannah JS, Yamane K, Berlin E, et al. In vitro regulation of low-density lipoprotein receptor interaction by fatty acids [J]. *Metabolism*, 1995, 44 (11): 1 428-434.
- [9] 曾嵘,李进. c-myc 的结构和功能[J]. 国外医学遗传学分册. 1997, 20 (3): 116-119.
- [10] 郭宗儒. 药物化学总论[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1994; 76-92.

(此文编辑 胡必利)