

## 杜仲多糖通过 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路抑制 ox-LDL 诱导的血管平滑肌细胞增殖和迁移

邓华

(四川中医药高等专科学校临床医学系内科教研室,四川省绵阳市 621000)

**[关键词]** 杜仲多糖; TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路; 氧化型低密度脂蛋白; 血管平滑肌细胞; 细胞增殖; 细胞迁移

**[摘要]** **目的** 探讨杜仲多糖对氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的血管平滑肌细胞(VSMC)增殖及迁移的影响。**方法** 体外培养大鼠 VSMC,用 ox-LDL 及不同浓度的杜仲多糖处理。甲基噻唑基四唑法检测细胞增殖;酶联免疫吸附试验检测白细胞介素 6(IL-6)和肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的水平;Transwell 实验检测细胞迁移;划痕实验检测划痕愈合率;Western blot 检测转化生长因子  $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)/Smad 信号通路相关蛋白 Smad2/3、p-Smad2/3 的表达。**结果** ox-LDL 处理 VSMC 后,细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)、细胞周期蛋白依赖激酶 2(CDK2)、p-Smad2/3 蛋白水平显著升高( $P < 0.05$ ),细胞培养上清液中 IL-6、TNF- $\alpha$  水平显著升高( $P < 0.05$ ),细胞活力显著升高( $P < 0.05$ ),迁移细胞数、划痕愈合率显著增高( $P < 0.05$ );杜仲多糖处理后可明显逆转 ox-LDL 对 VSMC 增殖及迁移的作用( $P < 0.05$ );添加 TGF- $\beta$ 1 后,Cyclin D1、CDK2、p-Smad2/3 蛋白水平显著升高( $P < 0.05$ ),IL-6、TNF- $\alpha$  水平显著升高( $P < 0.05$ ),细胞活力显著升高( $P < 0.05$ ),迁移细胞数显著增多( $P < 0.05$ )。**结论** 杜仲多糖可能通过抑制 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路的活化从而抑制 ox-LDL 诱导的 VSMC 增殖及迁移。

[中图分类号] R96;R5

[文献标识码] A

### Eucommia ulmoides polysaccharide inhibits the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells induced by oxidized low density lipoprotein through TGF- $\beta$ 1/Smad signaling pathway

DENG Hua

(Department of Internal Medicine, Department of Clinical Medicine, Sichuan College of Traditional Chinese Medicine, Mianyang, Sichuan 621000, China)

**[KEY WORDS]** eucommia ulmoides polysaccharide; TGF- $\beta$ 1/Smad signaling pathway; oxidized low density lipoprotein; vascular smooth muscle cell; cell proliferation; cell migration

**[ABSTRACT]** **Aim** To investigate the effect of eucommia ulmoides polysaccharide on the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells (VSMC) induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL). **Methods** Rat VSMCs were cultured in vitro and treated with ox-LDL and different concentrations of eucommia ulmoides polysaccharide. Methyl thiazolyl tetrazolium assay was used to detect cell proliferation. The levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Transwell experiment was used to detect cell migration. The scratch healing rate was detected by scratch test. Western blot was used to detect the expressions of transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)/Smad signaling pathway-related proteins Smad2/3 and p-Smad2/3. **Results** After ox-LDL treatment, the levels of Cyclin D1, cyclin dependent kinase 2 (CDK2) and p-Smad2/3 proteins were significantly increased ( $P < 0.05$ ), the levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  in cell culture supernatant were significantly increased ( $P < 0.05$ ), the cell viability was significantly increased ( $P < 0.05$ ), and migration cell number and scratch healing rate were significantly increased ( $P < 0.05$ ). The effect of ox-LDL on VSMC proliferation and migration was significantly reversed after treatment with eucommia ulmoides polysaccharide ( $P < 0.05$ ). After adding TGF- $\beta$ 1, the levels of Cyclin D1, CDK2 and p-Smad2/3 proteins were significantly increased ( $P < 0.05$ ), the levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  were significantly increased ( $P < 0.05$ ), the cell viability was significantly increased ( $P < 0.05$ ), and the number of migrating cells was signifi-

cantly increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Eucommia ulmoides polysaccharide may inhibit the proliferation and migration of VSMC induced by ox-LDL by inhibiting the activation of TGF- $\beta$ 1/Smad signaling pathway.

冠心病等心血管疾病已严重威胁人类生命安全,目前临床也有采用中药方法进行治疗。研究表明血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)异常增殖与迁移是促使冠心病发生的重要原因之一<sup>[1-3]</sup>,因而如何抑制 VSMC 增殖及迁移成为治疗动脉粥样硬化的研究重点。既往研究主要采用氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)处理 VSMC,并作为探究 VSMC 增殖及迁移分子机制的主要细胞模型<sup>[4]</sup>。杜仲具有祛风湿、强筋骨的作用,研究表明杜仲多糖具有降血糖、降血压等作用,并可能参与软骨细胞增殖过程<sup>[5]</sup>。但杜仲多糖对 VSMC 增殖及迁移的作用机制尚未阐明。研究表明抑制转化生长因子  $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)/Smad 信号通路的活化可促进肺动脉平滑肌细胞增殖<sup>[6]</sup>。因此,本研究主要探讨杜仲多糖对 ox-LDL 处理的 VSMC 增殖及迁移的影响,探究其对 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路的调控作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与试剂

杜仲多糖提取:20 g 杜仲皮磨碎,使用无水乙醇回流,冷却处理,过滤,加入纯水,重复提纯 3 次,收集滤液;使用三氯甲烷与正丁醇反复萃取,分离,直至水相 Molish 反应为阴性,得到水相溶液;使用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤,沉淀,烘干,得到杜仲多糖;提取出 10 g 杜仲多糖,得率 50.00% (符合《混合型饲料添加剂杜仲叶提取物》2014 企业标准),纯度 85.00%。将杜仲多糖置于二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶液中,制备 2 g/L 的母液,根据实验需要进行稀释<sup>[7]</sup>。

杜仲皮购自长沙上禾生物科技有限公司;大鼠 VSMC 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库;ox-LDL 购自北京索莱宝生物科技有限公司;TGF- $\beta$ 1 购自美国 Sigma 公司;杜氏改良培养基(DMEM)、胎牛血清、胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司;甲基噻唑基四唑(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)与 DMSO 购自美国 Sigma 公司;白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)与肿瘤坏死因子  $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒

购自广州艾思生物科技有限公司;Transwell 小室购自美国 Corning 公司;RIPA 裂解液购自上海士锋生物科技有限公司;二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量检测试剂盒与增强型化学发光试剂(enhanced chemiluminescence, ECL)购自北京全式金生物技术有限公司;兔抗鼠细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)、细胞周期蛋白依赖激酶 2(cyclin dependent kinase 2, CDK2)抗体购自美国 CST 公司;兔抗鼠 Smad2/3、p-Smad2/3 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗购自美国 Abcam 公司。

### 1.2 实验分组

参照文献<sup>[8]</sup>,大鼠 VSMC 培养于含有 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素与 100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养基,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养,待细胞生长至 80% 融合度时将细胞接种于 96 孔板,分别加入含有 30 mg/L ox-LDL 的培养基处理 24 h,记作 ox-LDL 组。同时将正常培养的细胞作为空白组。参照文献<sup>[9]</sup>,分别使用 2.0、4.0、8.0 mg/L 杜仲多糖与含 30 mg/L ox-LDL 的培养基共同处理 24 h,分别记作 ox-LDL+杜仲多糖 2.0 mg/L 组、ox-LDL+杜仲多糖 4.0 mg/L 组、ox-LDL+杜仲多糖 8.0 mg/L 组。为探究杜仲多糖是否通过调控 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路而发挥作用,参照文献<sup>[10]</sup>,加入含 10  $\mu$ g/L TGF- $\beta$ 1、8.0 mg/L 杜仲多糖及 30 mg/L ox-LDL 的培养基培养 24 h,记作 ox-LDL+杜仲多糖+TGF- $\beta$ 1 组。同时将含有 8.0 mg/L 杜仲多糖、30 mg/L ox-LDL、10  $\mu$ g/L PBS 的培养基培养 VSMC 24 h,记作 ox-LDL+杜仲多糖+PBS 组。

### 1.3 MTT 检测细胞增殖

收集各组对数生长期 VSMC 接种于 96 孔板( $3 \times 10^5$  个/孔),每组设置 3 个复孔,每孔加入 5 g/L MTT 溶液 20  $\mu$ L,继续培养 4 h,弃上清,每孔加入 150  $\mu$ L DMSO,室温避光振荡孵育 5 min,应用酶标仪检测各孔吸光度值。

### 1.4 ELISA 检测 IL-6、TNF- $\alpha$ 水平

收集各组细胞培养上清液,采用 ELISA 法检测 IL-6、TNF- $\alpha$  的水平,严格按照试剂盒说明书进行操作。

### 1.5 Transwell 实验检测细胞迁移

收集各组对数生长期 VSMC,加入 Transwell 小室的上室(200  $\mu$ L/孔),Transwell 小室的下室加入

含有 10% 胎牛血清的培养液 (600  $\mu\text{L}$ /孔), 置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱内培养 24 h, PBS 洗涤, 多聚甲醛固定 20 min, PBS 洗涤, 0.1% 结晶紫染液染色 10 min, 显微镜下观察迁移细胞数。

### 1.6 划痕实验

取对数生长期 VSMC 接种于 6 孔板 ( $3 \times 10^4$  个/孔), 使用细胞刮刀在孔中央划一条划痕, PBS 洗涤, 按照“1.2”分组处理后, 置于倒置相差显微镜下观察, 检测划痕两侧细胞间的距离, 划痕愈合率 (%) = (0 h 细胞间距 - 24 h 细胞间距) / 0 h 细胞间距  $\times 100\%$ 。

### 1.7 Western blot 检测 Smad2/3、p-Smad2/3、Cyclin D1、CDK2 蛋白表达

收集各组对数生长期 VSMC, 加入 RIPA 蛋白裂解液提取细胞总蛋白, 用 BCA 蛋白定量检测试剂盒检测蛋白浓度, 以 50  $\mu\text{g}$  蛋白样品与上样缓冲液充分混匀后点样。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 转膜、封闭, 加入 Smad2/3、p-Smad2/3、Cyclin D1、CDK2 与内参  $\beta$ -actin 一抗稀释液 (1 : 1 000), 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育 24 h, TBST 洗膜, 加入二抗稀

释液 (1 : 5 000), 室温孵育 1 h, 滴加 ECL, 暗室内曝光显影, 应用自动凝胶成像系统分析各蛋白条带灰度值。

### 1.8 统计学处理

采用 SPSS 21.0 统计学软件分析数据, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 且均符合正态分布, 两组间比较采用独立样本  $t$  检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 杜仲多糖抑制 ox-LDL 诱导的 VSMC 存活率和炎症因子分泌

与空白组比较, ox-LDL 组 Cyclin D1 和 CDK2 蛋白水平、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平以及细胞活力显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与 ox-LDL 组比较, ox-LDL+杜仲多糖 2.0 mg/L 组、ox-LDL+杜仲多糖 4.0 mg/L 组、ox-LDL+杜仲多糖 8.0 mg/L 组 Cyclin D1 和 CDK2 蛋白水平、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平以及细胞活力显著降低 ( $P < 0.05$ ; 图 1)。

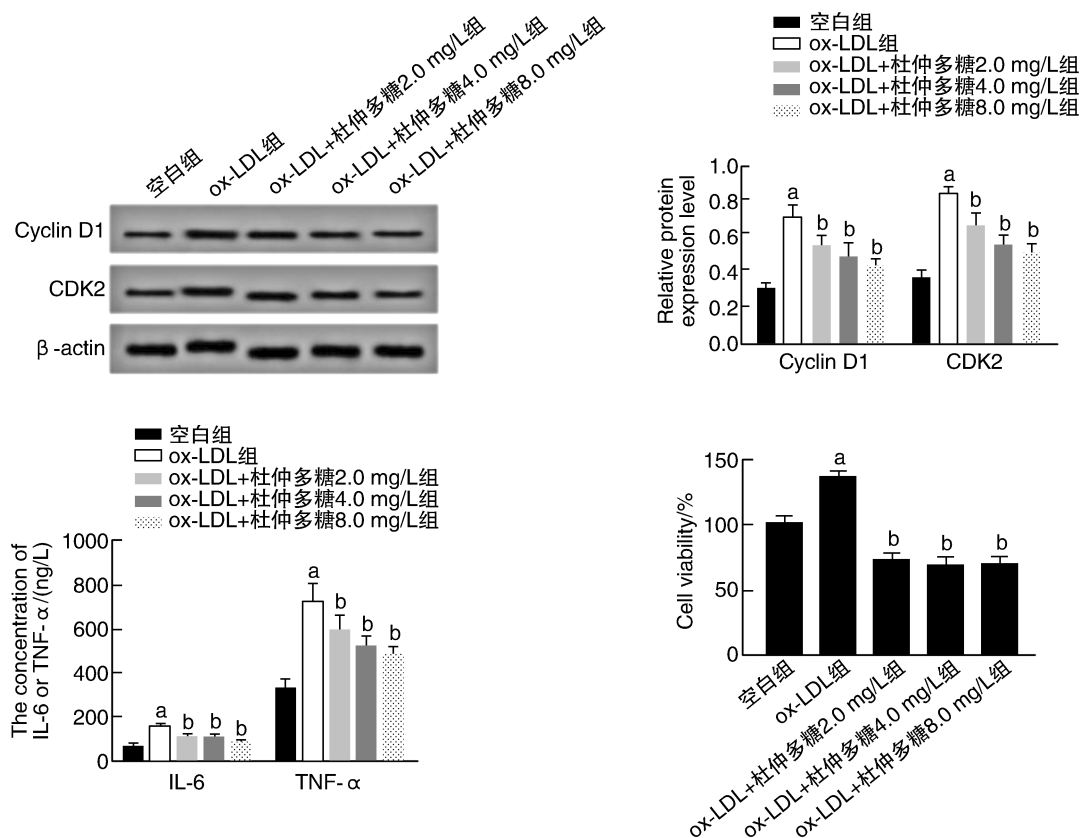


图 1. 杜仲多糖对 ox-LDL 诱导的 Cyclin D1、CDK2、IL-6、TNF- $\alpha$  水平及细胞活力的影响

a 为  $P < 0.05$ , 与空白组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 ox-LDL 组比较。

Figure 1. Effects of eucommia ulmoides polysaccharide on the levels of Cyclin D1, CDK2, IL-6, TNF- $\alpha$  and cell viability induced by ox-LDL

2.2 杜仲多糖抑制 ox-LDL 诱导的 VSMC 迁移

与空白组比较, ox-LDL 组迁移细胞数显著增多, 划痕愈合率升高 ( $P < 0.05$ ); 与 ox-LDL 组比较, ox-LDL+杜仲多糖 2.0 mg/L 组、ox-LDL+杜仲多糖

4.0 mg/L 组、ox-LDL+杜仲多糖 8.0 mg/L 组迁移细胞数显著减少, 划痕愈合率降低 ( $P < 0.05$ ; 图 2 和表 1)。

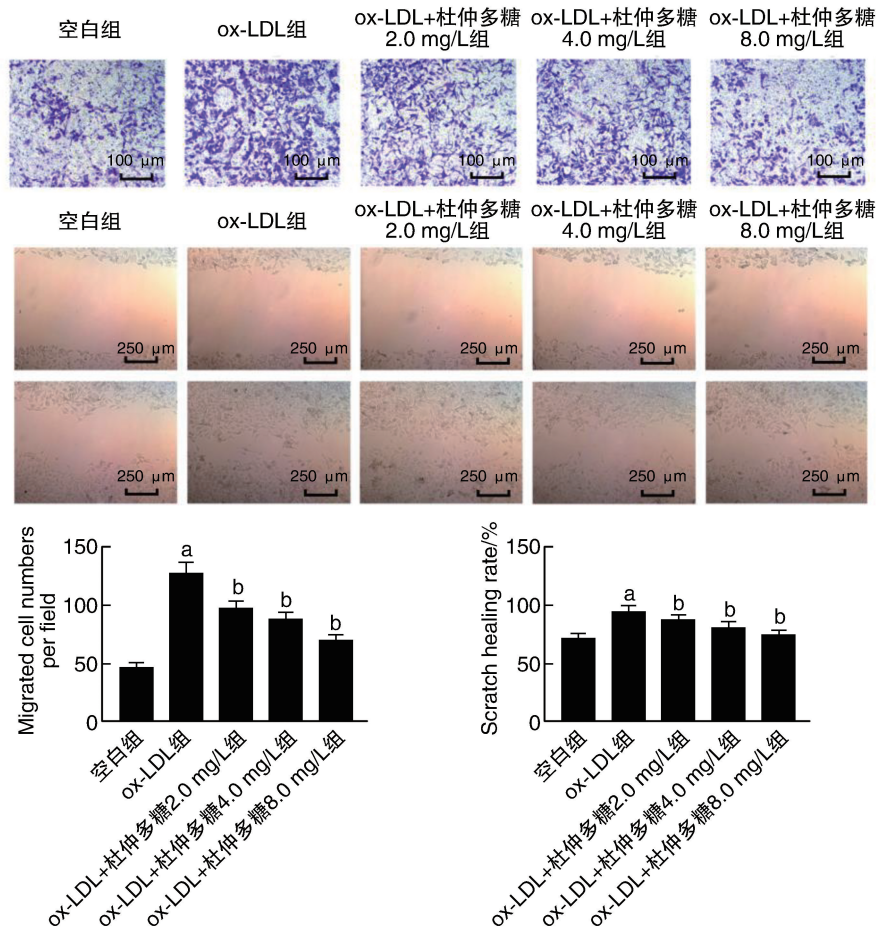


图 2. Transwell 实验检测 VSMC 迁移

a 为  $P < 0.05$ , 与空白组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 ox-LDL 组比较。

Figure 2. VSMC migration detected by Transwell experiment

表 1. 杜仲多糖对 ox-LDL 诱导的 VSMC 迁移的影响 ( $n=9$ )

Table 1. Effects of eucommia ulmoides polysaccharide on the VSMC migration induced by ox-LDL ( $n=9$ )

分组	细胞迁移数/个	划痕愈合率/%
空白组	47.76±3.26	72
ox-LDL 组	128.53±9.48 <sup>a</sup>	95
ox-LDL+杜仲多糖 2.0 mg/L 组	98.56±6.16 <sup>b</sup>	88
ox-LDL+杜仲多糖 4.0 mg/L 组	89.46±5.52 <sup>b</sup>	81
ox-LDL+杜仲多糖 8.0 mg/L 组	71.30±4.47 <sup>b</sup>	75
F	217.420	
P	0.000	

注: a 为  $P < 0.05$ , 与空白组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 ox-LDL 组比较。

2.3 杜仲多糖抑制 ox-LDL 诱导的 VSMC TGF-β1/Smad 信号通路

与空白组比较, ox-LDL 组 p-Smad2/3 蛋白水平显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与 ox-LDL 组比较, ox-LDL+杜仲多糖 2.0 mg/L 组、ox-LDL+杜仲多糖 4.0 mg/L 组、ox-LDL+杜仲多糖 8.0 mg/L 组 p-Smad2/3 蛋白水平显著降低 ( $P < 0.05$ ; 图 3)。各组间 Smad2/3 蛋白水平比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

2.4 TGF-β1 对杜仲多糖、ox-LDL 诱导的 VSMC 的逆转作用

与 ox-LDL+杜仲多糖+PBS 组比较, ox-LDL+杜仲多糖+TGF-β1 组 p-Smad2/3、Cyclin D1 和 CDK2 蛋白水平、IL-6 和 TNF-α 水平以及细胞活力显著升

高( $P < 0.05$ ; 图 4 和表 2)。

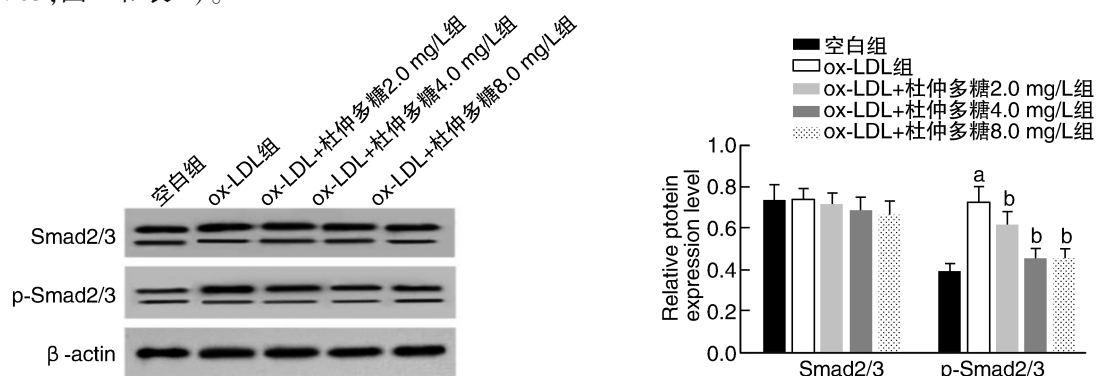


图 3. Western blot 检测 VSMC Smad2/3 和 p-Smad2/3 蛋白的表达

a 为  $P < 0.05$ , 与空白组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 ox-LDL 组比较。

Figure 3. Expression of Smad2/3 and p-Smad2/3 proteins in VSMC detected by Western blot

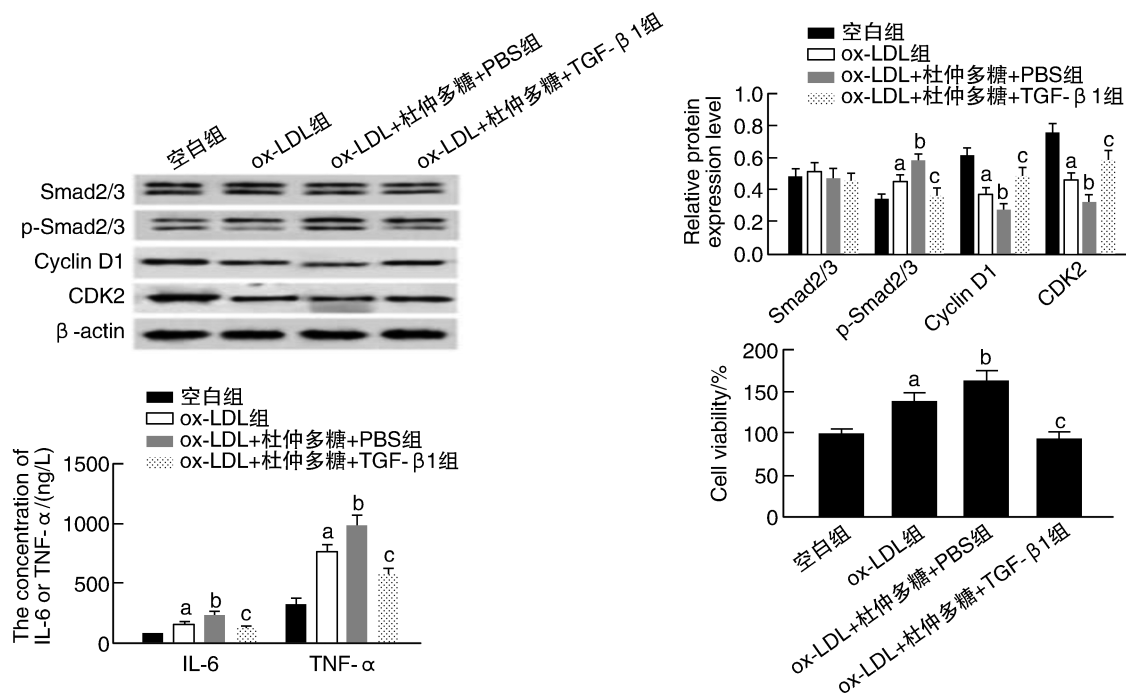


图 4. TGF- $\beta$ 1 对杜仲多糖、ox-LDL 诱导的 VSMC 的逆转作用

a 为  $P < 0.05$ , 与空白组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 ox-LDL 组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与 ox-LDL+杜仲多糖+PBS 组比较。

Figure 4. Reverse effect of TGF- $\beta$ 1 on VSMC induced by eucommia ulmoides polysaccharide and ox-LDL

表 2. 各组蛋白、炎症因子和细胞活力的比较 ( $n=9$ )

Table 2. Comparison of proteins, inflammatory factors and cell viability in each group ( $n=9$ )

分组	Smad2/3	p-Smad2/3	IL-6/(ng/L)	TNF- $\alpha$ /(ng/L)	Cyclin D1	CDK2	细胞活力/%
空白组	0.48 $\pm$ 0.05	0.34 $\pm$ 0.03	68.57 $\pm$ 6.43	323.64 $\pm$ 44.14	0.61 $\pm$ 0.05	0.75 $\pm$ 0.06	99.47 $\pm$ 5.37
ox-LDL 组	0.51 $\pm$ 0.06	0.45 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	152.64 $\pm$ 18.36 <sup>a</sup>	763.46 $\pm$ 64.23 <sup>a</sup>	0.37 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.46 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	138.42 $\pm$ 10.67 <sup>a</sup>
ox-LDL+杜仲多糖+PBS 组	0.47 $\pm$ 0.06	0.58 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	227.95 $\pm$ 26.34 <sup>b</sup>	978.64 $\pm$ 87.67 <sup>b</sup>	0.27 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.32 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	162.64 $\pm$ 12.82 <sup>b</sup>
ox-LDL+杜仲多糖+TGF- $\beta$ 1 组	0.45 $\pm$ 0.05	0.36 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	117.37 $\pm$ 13.64 <sup>c</sup>	564.66 $\pm$ 59.32 <sup>c</sup>	0.48 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>	0.58 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>	92.67 $\pm$ 9.08 <sup>c</sup>
F	1.844	65.227	128.735	162.818	82.677	106.062	101.128
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: a 为  $P < 0.05$ , 与空白组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 ox-LDL 组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与 ox-LDL+杜仲多糖+PBS 组比较。

## 2.5 TGF- $\beta$ 1 降低杜仲多糖对 ox-LDL 诱导的 VSMC 迁移的抑制作用

与空白组比较, ox-LDL 组迁移细胞数显著增多 ( $P < 0.05$ ); 与 ox-LDL 组比较, ox-LDL+杜仲多糖+

PBS 组迁移细胞数显著增多 ( $P < 0.05$ ); 与 ox-LDL+杜仲多糖+PBS 组比较, ox-LDL+杜仲多糖+TGF- $\beta$ 1 组迁移细胞数显著减少 ( $P < 0.05$ ; 图 5 和表 3)。

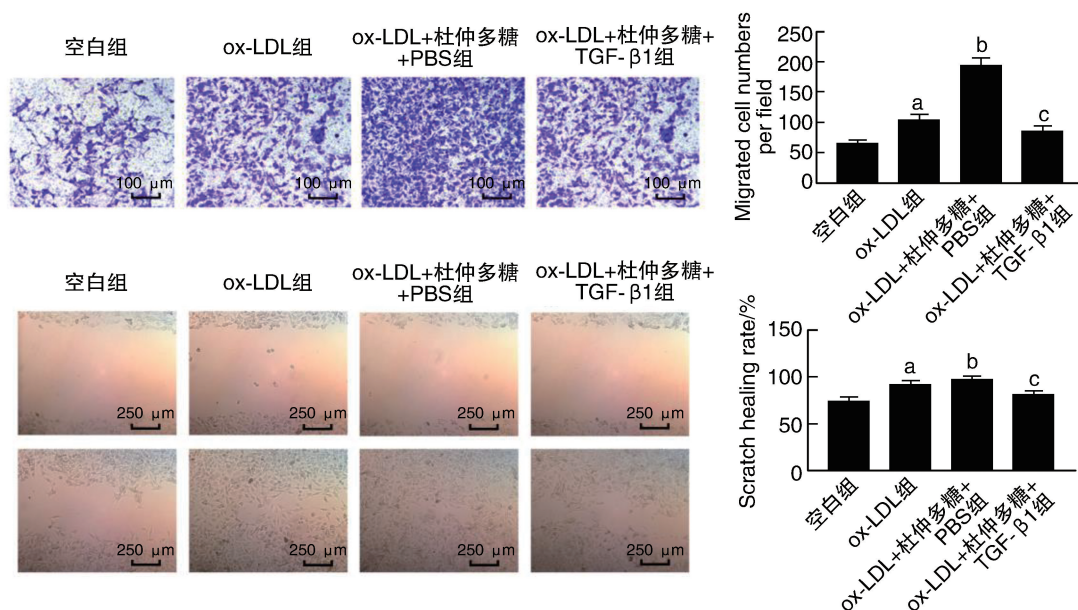


图 5. TGF- $\beta$ 1 降低杜仲多糖对 ox-LDL 诱导的 VSMC 迁移的抑制作用

a 为  $P < 0.05$ , 与空白组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 ox-LDL 组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与 ox-LDL+杜仲多糖+PBS 组比较。

Figure 5. TGF- $\beta$ 1 reduces the inhibitory effect of eucommia ulmoides polysaccharide on ox-LDL induced VSMC migration

表 3. 各组 VSMC 迁移比较 ( $n=9$ )

Table 3. Comparison of VSMC migration in each group

( $n=9$ )

分组	细胞迁移数/个	划痕愈合率/%
空白组	67.39 $\pm$ 5.35	75
ox-LDL 组	105.58 $\pm$ 8.64 <sup>a</sup>	93
ox-LDL+杜仲多糖+PBS 组	194.13 $\pm$ 12.342 <sup>b</sup>	98
ox-LDL+杜仲多糖+TGF- $\beta$ 1 组	87.38 $\pm$ 7.36 <sup>c</sup>	81
<i>F</i>	363.571	
<i>P</i>	0.000	

注: a 为  $P < 0.05$ , 与空白组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 ox-LDL 组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与 ox-LDL+杜仲多糖+PBS 组比较。

## 3 讨论

血管平滑肌细胞增殖与迁移在动脉粥样硬化发生及发展过程发挥重要作用。目前对动脉粥样硬化患者采取降胆固醇、降血压药物及手术治疗已取得一定进展, 但仍有部分患者的治疗效果较

差<sup>[11-13]</sup>, 因而寻求新的治疗药物或治疗方式具有重要意义。

杜仲多糖可能通过降低 TGF- $\beta$ 1 表达从而抑制肝脏纤维化<sup>[14-15]</sup>。相关报道指出杜仲多糖可提高免疫抑制小鼠的免疫功能<sup>[16]</sup>。本研究结果显示 ox-LDL 诱导后 VSMC 活力显著升高, 而杜仲多糖处理后可明显抑制 VSMC 活力, 提示杜仲多糖可抑制 ox-LDL 诱导后的 VSMC 增殖。研究表明 Cyclin D1 可正向调控细胞周期, 并可与 CDK2 等结合从而促进细胞增殖<sup>[17]</sup>。本研究结果显示 ox-LDL 诱导后 VSMC 中 Cyclin D1、CDK2 表达上调, 杜仲多糖处理后可明显降低 Cyclin D1、CDK2 的表达量, 提示杜仲多糖可能通过调控 Cyclin D1、CDK2 蛋白表达从而抑制 ox-LDL 诱导后的 VSMC 增殖。研究表明 IL-6、TNF- $\alpha$  水平升高可加重体内炎症反应从而加重细胞损伤程度<sup>[18]</sup>。本研究结果显示 ox-LDL 处理 VSMC 后 IL-6、TNF- $\alpha$  水平升高, 而杜仲多糖可明显降低 IL-6、TNF- $\alpha$  水平, 提示杜仲多糖可能通过抑制炎症反应从而减轻 ox-LDL 诱导后的 VSMC 炎症损伤。同时本研究结果显示 ox-LDL 处理后 VSMC 迁移能

力显著增强,杜仲多糖处理后 VSMC 迁移能力显著降低,提示杜仲多糖可减弱 ox-LDL 诱导的 VSMC 迁移能力。

TGF- $\beta$ 1 是多种组织器官中的促纤维化因子,其下游调控蛋白为 Smad 蛋白,TGF- $\beta$ 1 激活后可促进 Smad2/3 发生磷酸化形成 p-Smad2/3 从而发挥作用,并可在腹膜间皮细胞纤维化过程中发挥重要作用<sup>[19]</sup>。研究表明抑制 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路可抑制高糖诱导的大鼠肾系膜细胞增殖<sup>[20]</sup>。本研究结果显示 ox-LDL 处理后 p-Smad2/3 表达上调,而杜仲多糖处理后 p-Smad2/3 表达下调,提示杜仲多糖可能通过抑制 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路而发挥作用。为探究杜仲多糖是否可通过调控 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路而影响 ox-LDL 诱导的 VSMC 增殖及迁移,本研究使用 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路的激活剂 TGF- $\beta$ 1 与杜仲多糖共同处理 ox-LDL 诱导的 VSMC,结果显示 p-Smad2/3、Cyclin D1、CDK2 表达上调,IL-6、TNF- $\alpha$  水平升高,细胞增殖与迁移能力增强,提示杜仲多糖可能通过抑制 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路的激活从而抑制 ox-LDL 诱导的 VSMC 增殖及迁移,并可抑制炎症反应从而减轻 VSMC 炎症损伤。

综上所述,杜仲多糖可抑制 ox-LDL 诱导的 VSMC 增殖及迁移,其作用机制可能是通过抑制 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路的活化而发挥作用,可为心血管疾病的预防及治疗提供新方向。

#### [参考文献]

- [1] 韩芬. 丹参酮IIA 抑制血管平滑肌细胞增殖的作用机制探讨[J]. 中国现代药物应用, 2018, 12(5): 219-220.
- [2] 郭丽蓉,李卫华,孙常青,等. 西洛他唑对血管平滑肌细胞增殖抑制作用及其机制研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(15): 1640-1643.
- [3] 钟广伟,万玲,王东生,等. 平肝潜阳方含药血清对血管紧张素 II 诱导血管平滑肌细胞增殖、迁移及 DNA 甲基化水平的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(5): 580-585.
- [4] 郑茜,张勇,杨东伟. miR-126 通过 MAPK 信号通路抑制 ox-LDL 处理的血管平滑肌细胞增殖和迁移[J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34(2): 192-198.
- [5] 付长龙,潘彩彬,刘国强,等. 药对巴戟天-杜仲总多糖的含量测定及其对大鼠软骨细胞增殖的影响[J]. 风湿病与关节炎, 2014, 3(6): 23-26.
- [6] 任周新,李建生,沈俊岭,等. 补肺益肾方对 TGF- $\beta$ 1/BMP-4 诱导的肺血管平滑肌细胞 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通

路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(11): 126-132.

- [7] 郭晓臣,欧阳辉,张近宝,等. 杜仲多糖对兔心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 药物评价研究, 2014, 37(1): 34-36.
- [8] 邹小明,周大兴,丁志山,等. 怀牛膝总皂苷对 ox-LDL 诱导的大鼠血管平滑肌细胞增殖与迁移的影响[J]. 浙江中医药大学学报, 2010, 34(3): 416-417.
- [9] 李晖,骆志国. 杜仲总多糖 EOP 高调肺癌 LLC 细胞中 caspase3 表达来抑制肿瘤细胞增殖的机制研究[J]. 实用癌症杂志, 2018, 33(7): 1045-1060.
- [10] 张永,史秀岩,罗昌霞,等. miR-346 在糖尿病肾病 TGF- $\beta$  介导的 Smad 信号通路中的作用[J]. 湖北医药学院学报, 2016, 35(3): 240-245.
- [11] 周晓茂,薛偕华. 24-乙酰泽泻醇 A 对 ox-LDL 诱导的大鼠血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶-9 表达的影响[J]. 亚太传统医药, 2015, 11(4): 7-9.
- [12] 邱伟文,郑丽云,郭至平,等. 脑心通对氧化低密度脂蛋白诱导血管平滑肌细胞增殖和自噬的影响[J]. 温州医科大学学报, 2016, 46(5): 340-347.
- [13] 王玉玲,员旭红,贺彧彬,等. 瑞舒伐他汀、依折麦布对 ox-LDL 诱导的血管平滑肌细胞 LXR $\alpha$ /ABCA1 及 Caveolin-1 mRNA 表达的影响[J]. 山西医科大学学报, 2019, 50(3): 257-261.
- [14] 王乾宇,王文佳,奚锦,等. 杜仲多糖对肝纤维化模型大鼠 I, III 型胶原蛋白, MMP-1, TIMP-1 及 TGF- $\beta$ 1 mRNA 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(23): 153-158.
- [15] 周程艳,艾凌艳,王美,等. 杜仲多糖抗肝纤维化作用的实验研究[J]. 中草药, 2011, 42(2): 324-329.
- [16] 叶颖霞,林岚,赵菊香,等. 杜仲叶多糖对免疫抑制小鼠免疫功能的影响[J]. 中药材, 2015, 38(7): 1496-1498.
- [17] 杨娟,贾晓康,张楚天,等. 基于 Cyclin D1 基因敲减探讨健骨颗粒促进成骨细胞增殖的机理[J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(8): 1067-1072.
- [18] 欧学兰,杨春艳,魏锦秋,等. 洋葱精油对 ox-LDL 诱导人脐静脉内皮细胞损伤的保护作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2018, 26(7): 698-704.
- [19] 孟立锋,向彩春,杨端云,等. 加味六君子汤对腹膜纤维化大鼠 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路的影响[J]. 中医临床研究, 2016, 8(12): 18-20.
- [20] 娄凯,何永,魏静,等. 糖肾康中药复方含药血清对高糖环境下 RMCs 的增殖及 TGF- $\beta$ 1/Smad2/3 信号通路的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(1): 88-92.

(此文编辑 曾学清)