

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2004)12-06-0632-03

沥水调脂胶囊对轻度修饰低密度脂蛋白诱导血管平滑肌细胞丝裂原活化蛋白激酶信号转导的影响

陈 杲, 宋剑南, 陈 冰, 金 红, 牛晓红

(中国中医研究院基础理论研究所, 北京市 100700)

[关键词] 中药学; 中药调节血管平滑肌细胞信号转导; Western Blot 检测; 健脾祛痰化痰方; 丝裂原活化蛋白激酶; 轻度修饰低密度脂蛋白; 血管平滑肌细胞

[摘要] 为了探讨健脾祛痰化痰方——沥水调脂胶囊对轻度修饰低密度脂蛋白诱导的血管平滑肌细胞丝裂原活化蛋白激酶信号转导的影响, 采用血清药理学通法制备含药血清, 以甲醇除蛋白预处理; 以 Cu^{2+} 氧化制备轻度修饰低密度脂蛋白; 用磷酸化抗体以 Western Blot 方法分析 c-jun N 端激酶 1、细胞外信号调节激酶 1 和 2 的磷酸化。结果发现, 20% 含药血清可明显降低 0.5 h 和 1 h 轻度修饰低密度脂蛋白诱导的 c-jun N 端激酶 1 磷酸化 ($P < 0.05$), 而对细胞外信号调节激酶 1 和 2 无明显影响。结果提示, 降低 c-jun N 端激酶/应激活蛋白激酶信号可能是沥水调脂胶囊抑制血管平滑肌细胞增殖的机制之一。

[中图分类号] R28

[文献标识码] A

Effect of Serum Containing of Protein-Removed Li Shui Tiao Zhi Capsule on Mitogen-Activated Protein Kinases Signal of Vascular Smooth Muscle Cells Induced by Mildly Modified Low Density Lipoprotein

CHEN Gao, SONG Jian-Nan, CHEN Bing, JIN Hong, and NIU Xiao-Hong

(Institute of Basic Theory, China Academy of TCM, Beijing 100700, China)

[KEY WORDS] Jianpi Qutan Huayu Recipe; Mitogen-Activated Protein Kinase; Mildly Modified Low Density Lipoprotein; Vascular Smooth Muscle Cell; Atherosclerosis; Serum Containing; Western Blot

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of Li Shui Tiao Zhi capsule (LSTZ) on mitogen-activated protein kinases signal of vascular smooth muscle cells induced by mildly oxidized low density lipoprotein. **Methods** Serum containing LSTZ was produced by general serum pharmacology assay method and protein was removed by methanol. LDL was oxidized by incubation with Cu^{2+} . c-Jun N-terminal kinase (JNK1), extracellular signal regulated kinase (ERK1/2) phosphorylation was examined by Western Blot assay. **Results** 20% serum containing LSTZ significantly reduced the phosphorylated JNK1 level, but ERK1 and ERK2 phosphorylation level after mmr-LDL stimulation was not altered significantly. **Conclusions** The preferential reduction of the activation of the JNK/SAPK signal transduction pathway might be one of the mechanisms for inhibition of VSMC proliferation caused by LSTZ.

沥水调脂胶囊是根据健脾祛痰化痰治法组方开发的国家级新药。以往的研究表明, 该药对高脂血症和动脉粥样硬化有明显的疗效, 能明显抑制轻度修饰低密度脂蛋白 (mildly modified low density lipoprotein, mmr-LDL) 诱导的血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 增殖^[1,2]。在丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信

号系统中细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 和 c-jun N 端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 信号在动脉粥样硬化平滑肌细胞异常增殖过程中具有重要作用^[3], mmr-LDL 能够诱导出 VSMC 内 MAPK 级联反应。因此, 本实验就沥水调脂胶囊含药血清对 mmr-LDL 诱导的平滑肌细胞 ERK 和 JNK 两条信号途径的影响进行分析, 深入探讨健脾祛痰化痰法抑制平滑肌细胞增殖的机制。

[收稿日期] 2004-04-05 [修回日期] 2004-11-10

[基金项目] 国家自然科学基金 (39970883) 资助

[作者简介] 陈杲, 博士, 助理研究员, 从事动脉粥样硬化机理的分子生物学研究, 联系电话为 010-64014411-2505。宋剑南, 生物化学研究员, 博士研究生导师, 从事脂蛋白代谢与动脉粥样硬化关系的研究, 为本文通讯作者, 联系电话为 010-64076065, E-mail 为 sjn_2003@sina.com.cn。陈冰, 硕士, 住院医师, 从事中西医结合抗动脉粥样硬化机理的研究, 联系电话为 010-64014411-2505, E-mail 为 bingchen1205@163.com。

1 材料与方法

1.1 药品和试剂

健脾祛痰化痰方药——沥水调脂胶囊, 根据健脾祛痰化痰治法组方开发, 由半夏、陈皮、水蛭和川芎等组成。DMEM 培养基和胎牛血清购自 Hyclone

公司, HEPES、L-谷氨酰氨、胶原酶 ④型和胰蛋白酶购自 GIBCO 公司, 低密度脂蛋白由中国医学科学院基础所脂蛋白组提供, α -actin 抗体和二抗购自北京中山生物技术有限公司, ERK1/2 和 JNK1 兔抗人的磷酸化单克隆抗体购自 Promega 公司, 羊抗兔二抗购自北京中山生物技术公司。

1.2 血管平滑肌细胞的培养及鉴定^[4]

取新鲜人脐带, 剥离脐动脉, 剪为 1~2 mm 大小的组织块, 放入用 DMEM 配置的 2 g/L 胶原酶消化液中消化 40~60 min, 然后放置于含 20% 胎牛血清的 DMEM 中孵育 24 h, 再放入 2 g/L 胶原酶及 0.1 g/L 胰蛋白酶的复合消化液中, 37℃ 消化至完全溶解, 离心, 细胞计数, 用含 20% 胎牛血清的 DMEM 液接种于培养皿中, 第 3~4 代用于实验。在倒置显微镜下观察细胞为梭形呈“峰”“谷”分布, 用 α -actin 抗体鉴定为阳性。

1.3 轻度修饰低密度脂蛋白的制备

根据 Watanabe 等^[5]报道, 将低密度脂蛋白在磷酸盐缓冲液中透析 24 h 后, 置于含 5 μ mol/L CuSO_4 的磷酸盐缓冲液中氧化至硫代巴比妥酸反应物值为 2~4 mmol/g, 且琼脂糖电泳迁移率无改变为止。以含 0.1% 乙二胺四乙酸二钠的磷酸盐缓冲液透析, 充氮低温保存备用。本实验巴比妥酸反应物值为 2.58 nmol/mg。

1.4 含药血清的制备和实验分组

大鼠 12 只, 雌雄各半, 体重 227~338 g, 购自军事医学科学院实验动物中心。分为 2 组, 一组按成人体表面积换算等效剂量的 8 倍, 每天 2 次给药, 连续 3 天; 另一组以等量水代替, 第 3 天将 1 日量 1 次给药, 1.5 h 后心脏取血, 分离血清, 用 3 倍体积的甲醇沉淀蛋白, 冻干充氮低温保存备用。临用前用三蒸水等量稀释, 0.2 μ m 滤膜过滤除菌。将血清以 DMEM 培养基配制成 2 种, 按所加血清不同将实验分为两组。对照组: 10 μ mol/L mmr-LDL+20% 正常血清 (100 mL 含 20 mL 正常鼠血清); ④实验组: 10 μ mol/L mmr-LDL+20% 含药血清 (100 mL 含 20 mL 含药血清)。

1.5 磷酸化 σ -jun N 端激酶 1 和细胞外信号调节激酶 1 和 2 的检测

将平滑肌细胞用 0.1% 的胎牛血清培养基培养 24 h 使细胞静止, 然后换成无血清培养基培养。按照分组加入 mmr-LDL 和血清, 在分别作用 0.5 和 1 h 后倒掉培养基, 用磷酸盐缓冲液快速清洗细胞后, 校正裂解缓冲液裂解细胞, 收集细胞裂解液, 于 -20℃ 保存。Bradford 法检测蛋白含量。Western Blot 法检

测磷酸化 JNK1 和 ERK1/2, 将含有相同蛋白量的细胞裂解液与上样缓冲液混合, 煮沸 5 min; 在 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶上电泳样品, 电泳结束后用含有钨酸钠的转移缓冲液将蛋白质转移至硝酸纤维素膜上; 在塑料容器内, 将膜与不含叠氮钠的封阻液室温温育 1 h; 吸出封阻液, 将膜与用封阻液配制的单克隆兔抗人抗体 (1:1 000) 室温温育 2 h, 间或摇动; 将膜取出放入一个干净的塑料容器内, 用 TN 缓冲液洗膜 2 次, 每次 10 min, 再用 0.05% NP-40 洗膜液洗膜 2 次, 每次 10 min, 最后再用 TN 缓冲液洗膜 2 次, 每次 5 min, 弃洗液; 加入羊抗兔辣根过氧化物酶偶联的第二抗体 (封阻液配制, 1:1 000), 室温温育 1 h; 用 TN 缓冲液洗膜 2 次, 然后用 NP-40 洗膜液洗膜 2 次, 再用 TN 缓冲液洗膜 2 次, 弃洗液; 在比膜稍大的塑料盒内, 等体积混合用于 ECL 检测的鲁米诺试剂和氧化剂。将膜放入塑料盒内 (蛋白质样品面朝上) 浸入混合试剂, 轻摇 60 s。取出膜, 沥干多余液体, 放置于塑料保护膜内, 蛋白质面朝上。在暗室中对感光胶片曝光 15 min。用 ERK1/2 和 JNK1 兔抗人的磷酸化单克隆抗体, 照相后扫描, 以 0.5 h 对照组的信号强度为标准分析信号相对强度。

1.6 统计学分析

各组实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间比较用单因素方差分析, 组间两两比较采用 q 检验。

2 结果

2.1 含药血清对 σ -jun N 端激酶 1 磷酸化的影响

如图 1 (Figure 1) 所示, 实验组 JNK1 磷酸化强度在 0.5 h 和 1 h (分别为 0.781 ± 0.078 和 0.701 ± 0.071) 明显低于对照组 (分别为 1.000 ± 0.098 和 0.978 ± 0.096) ($P < 0.05$)。



图 1. Western Blot 法检测磷酸化 σ -jun N 端激酶 1 的蛋白印迹 1 为对照组 0.5 h, 2 为实验组 0.5 h, 3 为对照组 1 h, 4 为实验组 1 h。

Figure 1. The western blot of JNK1

2.2 含药血清对细胞外信号调节激酶 1 和 2 磷酸化的影响

如图 2 (Figure 2) 所示, 在 0.5 h 和 1 h 实验组磷

酸化 ERK1、2 与对照组比较均无明显差异 ($P > 0.05$, 表 2, Table 2)。

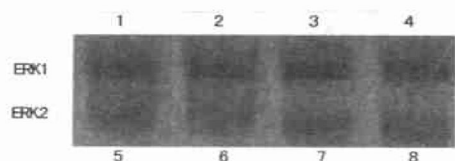


图 2. Western Blot 法检测磷酸化细胞外信号调节激酶 1 和 2 的蛋白印迹 1 和 5 为对照组 0.5 h, 2 和 6 为实验组 0.5 h, 3 和 7 为对照组 1 h, 4 和 8 为实验组 1 h。

Figure 2. The western blot of ERK 1 and ERK 2

表 2. 各检测时间细胞外信号调节激酶的相对密度值 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 2. Relative intensities of ERK1/2 at each detected time

分 组		ERK1	ERK2
对照组	0.5 h	1.000 \pm 0.374	1.000 \pm 0.386
	1.0 h	1.230 \pm 0.460	1.005 \pm 0.388
实验组	0.5 h	1.065 \pm 0.427	0.763 \pm 0.351
	1.0 h	1.156 \pm 0.464	1.017 \pm 0.468

3 讨论

在动脉粥样硬化发生发展中,氧化应激对血管平滑肌细胞的异常增殖起着重要作用,我们已往的研究表明,沥水调脂胶囊可在体外抑制铜离子对低密度脂蛋白的氧化修饰^[6],影响与血管平滑肌细胞增殖相关的基因表达,明显下调高脂组动物主动脉 α -myc mRNA 的表达,上调 P53 mRNA 的表达^[7]。从大体及体外角度证实了沥水调脂胶囊的抗氧化和抑制平滑肌细胞增殖的作用,本实验从细胞生物学和分子生物学角度在信号转导方面对该药抑制平滑肌细胞增殖的机理作进一步的探讨。

丝裂原活化蛋白激酶是细胞内作用蛋白网络的重要一环,参与细胞外信号经细胞表面到细胞内的过程,为细胞内信号转导的共同通路,哺乳动物细胞中 MAPK 主要包括细胞外信号调节激酶、 α -jun N 端激酶/应激活化蛋白激酶信号途径和 P38 MAPK 信号 3 个亚族,介导细胞生长、发育、分化及死亡全过程。显性负性实验表明,其中 ERK 和 JNK 在平滑肌细胞异常增殖中具有关键作用^[3]。在本实验中沥水调脂胶囊优先减少 mmr-LDL 引起的平滑肌细胞 JNK 的磷酸化,可能降低 JNK 的激活是沥水调脂胶囊抑制

mmr-LDL 诱导平滑肌细胞增殖的机制之一。

体外实验证明 JNK 由两个双特异性有丝分裂蛋白激酶 MAPK 激酶 4 和 7 激活。通过表达和显性负性突变实验证明,能够激活 JNK 信号途径的 MAPK 激酶有多种:MAPK 的激酶 1~4、凋亡信号调节激酶家族的凋亡信号调节激酶 1 和 2 以及转化生长因子- β 激酶等^[8]。JNK 可通过使 α -jun 第 63 和 73 位丝氨酸双磷酸化,提高其转录活性和增加其基因的表达^[9]。研究表明,不同形式的应激可通过不同的信号通路介导 JNK 的活化,细胞因子如肿瘤坏死因子、白细胞介素 1 和许多环境应激如热休克、渗透压、放射线等都能激活 JNK,故这条信号途径被称为应激激活信号途径^[10]。我们在以往研究中发现^[11],沥水调脂胶囊除蛋白含药血清优先降低了 mmr-LDL 所诱导的 α -jun mRNA 的表达,结合本次实验结果,提示抗氧化和降低 α -jun N 端激酶/应激活化蛋白激酶信号途径可能是健脾祛痰化痰方抑制动脉粥样硬化 VSMC 异常增殖的机制之一。

[参考文献]

- [1] 陈 昊,宋剑南,史国峰,刘卫红,陈 冰. 沥水调脂胶囊在体外对轻度修饰低密度脂蛋白诱导的血管平滑肌细胞增殖的影响. 中国中医基础医学杂志, 2003, 9 (4): 52-55
- [2] 李亚俊,宋剑南,周瑕菁,牛晓红,金 红,王宇辉,等. 脂泰胶囊对实验性 As 家兔 NOS、ET 活性及基因表达的影响. 中国动脉硬化杂志, 1999, 7 (1): 4-6
- [3] Hoshiga M, Kaneda Y, Morishita R. Gene transfer of dominant-negative mutants of extracellular signal-regulated kinase and α -Jun NH2-terminal kinase prevents neointimal formation in balloon-injured rat artery. Circ Res, 2001, 88: 1120-1126
- [4] 涂永生,黄红林,朱炳阳. ④型胶原酶/弹性蛋白酶消化法培养大鼠血管平滑肌细胞. 中国动脉硬化杂志, 2001, 9 (5): 438-440
- [5] Watanabe T, Pakala R, Koba S. Ysophosphatidylcholine and reactive oxygen species mediate the synergistic effect of mildly oxidized LDL with serotonin on vascular smooth muscle cell proliferation. Circulation, 2001, 103: 1440-1445
- [6] 牛晓红,金 红,宋剑南. 健脾祛痰化痰方药-沥水调脂胶囊抗低密度脂蛋白氧化修饰作用的研究. 中国中医基础医学杂志, 2002, 8 (10): 12-14
- [7] 薛士滨,宋剑南,周瑕菁,何 丽,牛晓红,金 红,等. 痰瘀同治方药脂泰胶囊抗动脉粥样硬化的机理. 中国中医基础医学杂志, 1998, 4 (12): 29-31
- [8] Hwang IS, Jung YS, Kim E. Interaction of ALG-2 with ASK1 influences ASK1 localization and subsequent JNK activation. FEBS Lett, 2002, 529 (2-3): 183-187
- [9] Ventura JJ, Kennedy NJ, Lamb JA. C-Jun NH(2)-terminal kinase is essential for the regulation of AP-1 by tumor necrosis factor. Mol Cell Biol, 2003, 23 (8): 2871-2882
- [10] Dent P, Yacoub A, Contessa J. Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signaling pathways. Radiat Res, 2003, 159 (3): 283-300
- [11] 陈 昊,宋剑南,刘卫红,史国峰,陈 冰. 沥水调脂胶囊对轻度修饰低密度脂蛋白诱导的血管平滑肌细胞 α -jun, α -fos, α -myc mRNA 表达的影响. 中国中医基础医学杂志, 2003, 9 (5): 365-371

(此文编辑 朱雯霞)