

## • 基础研究 •

血红素氧合酶-1 在姜黄素抑制氧化型低密度脂蛋白  
诱导大鼠血管平滑肌细胞增殖中的作用钟 毅, 赖文岩, 刘挺榕, 郭志刚<sup>△</sup>

(南方医科大学南方医院心内科, 广州 510515)

**摘要:**目的 观察姜黄素对氧化型低密度脂蛋白(Ox-LDL)诱导的大鼠血管平滑肌细胞(VSMC)增殖的影响,并探讨血红素氧合酶-1(HO-1)在姜黄素抑制血管平滑肌细胞增殖中的作用及机制。方法 体外分离培养大鼠血管平滑肌细胞并行免疫组化鉴定,以四甲基偶氮唑盐(MTT)法测定细胞增殖率、逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 HO-1 mRNA 水平,蛋白免疫印迹法(Western blot)分别检测 HO-1 及增殖细胞核抗原(PCNA)蛋白表达水平。结果 Ox-LDL 呈浓度依赖性(0~150  $\mu\text{g/mL}$ )地诱导 VSMC 增殖,达到 200  $\mu\text{g/mL}$  具有细胞毒性;姜黄素呈浓度依赖性(40、80  $\mu\text{mol/L}$ )地抑制 Ox-LDL(100  $\mu\text{g/mL}$ )所诱导的 VSMC 增殖,HO-1 抑制剂锌原卟啉 IX(ZnPP<sub>IX</sub>)可明显减弱此抑制效应;姜黄素可诱导 VSMC 上调 HO-1 mRNA 和蛋白表达;姜黄素可减弱 Ox-LDL 诱导 VSMCs 增殖细胞核抗原的高表达,此效应可被 HO-1 抑制剂 ZnPP<sub>IX</sub> 抑制。结论 姜黄素通过降低 HO-1 介导的 PCNA 表达,进而抑制 Ox-LDL 诱导大鼠血管平滑肌增殖。

**关键词:**姜黄素;氧合酶类;脂蛋白类, LDL

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.16.018

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)16-1609-03

Role of heme oxygenase-1 on curcumin inhibiting rat vascular smooth muscle cells  
proliferation induced by oxidized low density lipoproteinZhong Yi, Lai Wenyan, Liu Tingrong, Guo Zhigang<sup>△</sup>

(Department of Cardiology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

**Abstract:** Objective To investigate the inhibitory effect of curcumin on oxidized(Ox)-low density lipoprotein(LDL)-induced rat vascular smooth muscle cells proliferation and to explore the role of heme oxygenase-1 in this process. **Methods** The cultured aortic smooth muscle cells isolated from male Sprague-Dawley rats were verified by immunohistochemistry. The cell viability was assayed by MTT, and reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) was performed to determine the level of HO-1 mRNA. In addition, HO-1 and PCNA expression were analyzed by Western blotting. **Results** The Ox-LDL remarkably stimulated VSMCs proliferation in a concentration-dependent manner(0-150  $\mu\text{g/mL}$ ), however, the doses that exceeded 200  $\mu\text{g/mL}$  had a cytotoxic effect. Curcumin also attenuated the VSMCs proliferation effect of Ox-LDL in a concentration-dependent manner(40, 80  $\mu\text{M}$ ), the inhibitory effect was blocked by a HO-1 inhibitor(zinc protoporphyrin IX, ZnPP<sub>IX</sub>). Curcumin significantly upregulated HO-1 mRNA and protein expression in a concentration-dependent manner. Furthermore, ZnPP<sub>IX</sub> blocked the inhibitory effect of curcumin on Ox-LDL-induced PCNA expression. **Conclusion** Curcumin inhibits Ox-LDL-induced rat vascular smooth muscle cells proliferation via HO-1-mediated down-regulation of PCNA expression.

**Key words:** curcumin; oxygenases; lipoproteins, LDL

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的发生机制十分复杂,目前研究表明氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, Ox-LDL)及血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)增殖是动脉粥样硬化斑块形成的重要病理基础<sup>[1]</sup>。姜黄素是从姜黄、郁金、莪术等植物中提取的一种生物多酚化合物,研究显示姜黄素具有抗炎、抗氧化、促细胞凋亡和抑制细胞增殖等药理作用,这些作用可有效拮抗 AS 的发生与发展。血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)是血红素降解的起始酶和限速酶,发挥着抗炎、抗氧化、抑制细胞凋亡和改善组织微循环作用,动物研究已经证明过表达 HO-1 可以明显延缓 AS 进展<sup>[2]</sup>,但是姜黄素抗 AS 的相关机制还不甚清楚。本研究旨在细胞水平探讨姜黄素对 Ox-LDL 诱导血管平滑肌细胞增殖的影响及其相关机制,为其药理作用提供理论基础。

## 1 材料与方

**1.1 材料** DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司;姜黄素、锌原卟啉 IX(zinc protoporphyrin IX, ZnPP<sub>IX</sub>)购自 Sigma 公司;Ox-LDL 购于北京普博斯生物科技有限公司;反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂均购自美国 In-

vitrogen 公司;一抗、二抗均购于美国 Santa Cruz 公司;SD 大鼠购自南方医科大学实验动物中心;其余实验相关产品购自碧云天生物技术公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养与实验分组**按常规组织贴块方法<sup>[3]</sup> 原代培养并传代,取用第 3~8 代细胞。免疫组化法鉴定血管平滑肌细胞。血管平滑肌细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  下培养。实验分组:(1)正常对照组:不加任何处理;(2)不同终浓度 Ox-LDL 刺激组(0、50、100、150、200、250  $\mu\text{g/mL}$ );(3)不同终浓度姜黄素组(0、20、40、80  $\mu\text{mol/L}$ );(4)不同终浓度姜黄素组(0、20、40、80  $\mu\text{mol/L}$ ) + Ox-LDL(100  $\mu\text{g/mL}$ )组;(5)Ox-LDL(100  $\mu\text{g/mL}$ ) + 姜黄素组;(6)姜黄素 + ZnPP<sub>IX</sub> + Ox-LDL(100  $\mu\text{g/mL}$ )组。

**1.2.2 反转录-聚合酶链反应检测 HO-1 mRNA** 按 Trizol 试剂盒说明提取总 RNA。取细胞 RNA 1  $\mu\text{L}$  根据试剂盒说明书逆转录合成 cDNA,进行 PCR 扩增。HO-1:上游 5' GGGT-GACAGAAGAGGCTAAGACC 3', 下游 5' AGATTCTC-CCCTGCAGAG AGAAG 3'。扩增条件:94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,

<sup>△</sup> 通讯作者, Tel: (020) 61641508; E-mail: guozhigang126@126.com。

56℃退火 30 s,72℃延伸 45 s,循环 30 次。电泳条带采用凝胶成像系统分析。

**1.2.3 四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium,MTT)法比色测定 VSMC 增殖率** VSMC 接种 96 孔培养板中(每孔  $1\times 10^4$  个细胞)孵育 24 h,换无血清 DMEM 培养基 24 h 后弃培养液,按实验分组加入药物。20 h 后加入 5 mg/mL MTT 10  $\mu$ L,孵育 4 h,终止反应。弃孔内培养液上清液加二甲亚砜 100  $\mu$ L,选择 492 nm 自动酶标光度计测定各孔吸光度值。细胞增殖率计算公式:细胞增殖率(cell viability)=处理孔  $A_{492}$ /对照孔  $A_{492}\times 100\%$ 。

**1.2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 HO-1 及增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)蛋白表达水平** 收集细胞并加入细胞裂解液裂解细胞,离心收集上清液,二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)法测蛋白浓度。蛋白(30  $\mu$ g)经 12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)分离后转移至聚偏(二)氟乙烯(polyvinylidene difluoride,PVDF)膜。5%牛血清清蛋白室温封闭 4 h,加入一抗 4℃过夜、二抗室温孵育 2 h,最后显像。

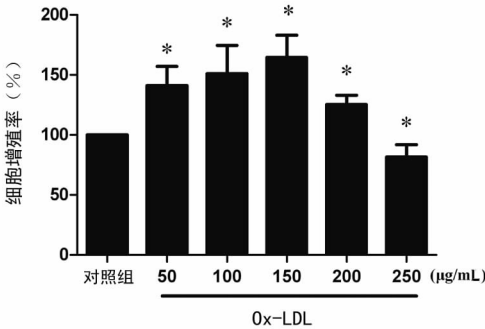
**1.3 统计学处理** 数据均采用  $\bar{x}\pm s$  表示,采用单因素方差分析,总体有差异两两比较采用最小显著差数法。采用 SPSS13.0 软件进行分析, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

**2.1 大鼠血管平滑肌细胞鉴定** 培养的第 3 代细胞经免疫细胞化学检测,特异性的  $\alpha$ -actin 在免疫细胞化学染色后,胞浆着色,呈阳性反应,在镜下可见胞浆内大量棕色、与细胞长轴平行的纤维细丝,即平滑肌  $\alpha$  肌动蛋白,见封 3 图 1。

**2.2 Ox-LDL 对诱导大鼠血管平滑肌细胞(VSMC)增殖的影响** Ox-LDL 呈浓度依赖性(0~150  $\mu$ g/mL)地诱导 VSMC 增殖,但是当达到 200  $\mu$ g/mL 刺激组时,细胞数目减少,提示到达此浓度可能具备细胞毒性。各个浓度刺激组与空白对照组相比,细胞增殖显著,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 2。

**2.3 姜黄素对 Ox-LDL 刺激的 VSMCs 增殖的影响** 不同终浓度的姜黄素(40、80  $\mu$ mol/L)可明显抑制 Ox-LDL(100  $\mu$ g/mL)诱导的细胞增殖效应,且呈浓度依赖性;姜黄素(40、80  $\mu$ mol/L)+Ox-LDL 组与 Ox-LDL 单独作用组相比,细胞增殖率显著降低,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 3。



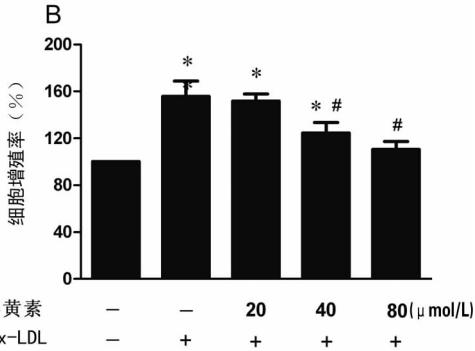
\*: $P<0.05$ ,与空白对照组比较。

图 2 Ox-LDL 对诱导大鼠血管平滑肌细胞(VSMC)增殖的影响

**2.4 HO-1 抑制剂 ZnPPiX 对姜黄素抑制 Ox-LDL 所诱导的 VSMC 增殖的影响** 给予 HO-1 抑制剂 ZnPPiX 预处理细胞后,姜黄素抑制 Ox-LDL 所诱导的 VSMCs 增殖效应减弱;姜黄素+ZnPPiX+Ox-LDL 组与姜黄素+Ox-LDL 组相比,细胞增殖率增加明显( $P<0.05$ ),见图 4。

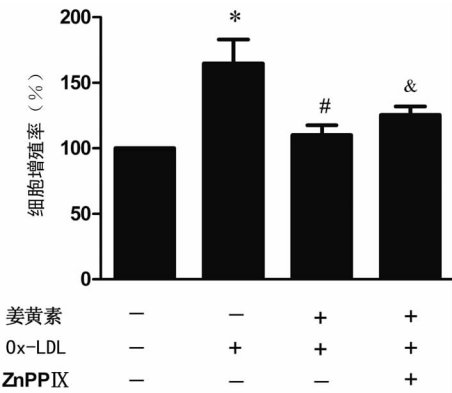
**2.5 姜黄素对 VSMC 的 HO-1 表达的影响** 不同浓度姜黄素组干预 VSMC 的 HO-1 mRNA 和蛋白表达水平明显高于空白对照组,实验重复 3 次,见封 4 图 5。

**2.6 姜黄素对 Ox-LDL 刺激 VSMC 的 PCNA 表达的影响** 相比较于空白对照组,Ox-LDL 可明显增强 PCNA 的表达;而姜黄素+Ox-LDL 组与 Ox-LDL 组单独作用比较,可明显抑制 PCNA 的表达;在加入 HO-1 抑制剂 ZnPPiX 后,姜黄素+Ox-LDL 组的抑制 PCNA 表达效应可被减弱,实验重复 3 次,见封 4 图 6。



\*: $P<0.05$ ,与空白对照组比较;#:  $P<0.05$ ,与 Ox-LDL 单独作用组比较。

图 3 姜黄素对 Ox-LDL(100  $\mu$ g/mL)所诱导的 VSMC 增殖的影响



\*: $P<0.05$ ,与空白对照组比较;#:  $P<0.05$ ,与 Ox-LDL 单独作用组比较; &:  $P<0.05$ ,与姜黄素+Ox-LDL 组。

图 4 ZnPPiX 对姜黄素抑制 Ox-LDL 所诱导的 VSMCs 增殖的影响

3 讨 论

平滑肌细胞增殖是 AS 斑块形成过程中的重要环节,大量研究表明动脉血管壁增厚至斑块形成是 AS 病变的主要病理特征。Ox-LDL 促进 AS 形成的作用已被大量的研究所证实。目前认为 AS 形成初期步骤是 LDL 进入内皮损伤部位的血管壁,氧化、诱导多种趋化因子,并激活单核细胞分泌不同的生长因子和细胞因子,刺激平滑肌细胞迁移、增殖。因此,Ox-LDL 在 AS 中起到关键作用。

HO-1 是血红素降解的起始酶和限速酶,HO-1 通过降解血红素产生一氧化碳(carbon monoxide,CO)、胆绿素和铁离子。胆绿素进一步经胆绿素还原酶作用生成胆红素,而铁离子能诱导铁蛋白的合成[4]。HO-1 的这些终产物具有抗炎、抗氧化、抗凋亡和抗血栓的作用;另外,CO 和胆色素通过影响血管平滑肌细胞、内皮细胞、内皮祖细胞和粒细胞的增殖、迁移和黏附保护受损动脉血管内平衡[5]。姜黄素是中药姜黄的主要成分,其抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗血栓以及心血管的保护作用已

经被证实<sup>[6]</sup>。目前已经有研究表明姜黄素具有抗细胞增殖的作用,但是具体机制还不甚清楚<sup>[7-8]</sup>。根据其众多药理作用与 HO-1 保护作用相似,姜黄素的相关保护作用是否经过 HO-1 介导值得研究。

本研究结果显示,Ox-LDL 在一定浓度范围内浓度依赖性地诱导血管平滑肌细胞增殖,当超过一定浓度,具备细胞毒性。此实验发现与 Chang 等<sup>[9]</sup>的研究结果相类似,说明了 Ox-LDL 对血管平滑肌细胞增殖影响的特点,其机制可能是通过激活 Ras/Raf/MEK/MAPK 通路促进细胞有丝分裂<sup>[10]</sup>。与之类似,Schwer 等<sup>[11]</sup>也发现姜黄素 HO-1 介导抑制胰腺星状细胞的增殖由阻遏 ERK1/2 磷酸化的机制实现。同时,本组也发现姜黄素可有效抑制 Ox-LDL 诱导血管平滑肌细胞增殖,并且此抑制效应可被 HO-1 的抑制剂 ZnPPIX 部分阻断。这提示 HO-1 很可能参与了姜黄素抑制 Ox-LDL 诱导血管平滑肌细胞增殖的保护效应。同样,有学者发现在球囊损伤的大鼠模型中,HO-1 介导 NO 抑制大鼠血管平滑肌增殖,从而显著地抑制了内膜增生<sup>[12]</sup>。为了进一步证实此发现,本组观察了姜黄素对血管平滑肌细胞 HO-1 mRNA 和蛋白表达的影响,发现姜黄素可显著地上调血管平滑肌细胞 HO-1 mRNA 和蛋白表达。综上所述,提示姜黄素抗 Ox-LDL 诱导血管平滑肌细胞增殖的作用经过 HO-1 介导。

PCNA 又称周期蛋白,是一种与细胞增殖周期有关的核内糖蛋白,是 DNA 复制的必需成分,其表达与细胞增殖活性有关,是使细胞由静息期进入 S 期的关键蛋白<sup>[13]</sup>,已成为评价细胞增殖状态的一项客观指标。本组研究发现 HO-1 抑制剂上调姜黄素抑制 Ox-LDL 诱导 VSMCs 增殖细胞核抗原高表达,提示 HO-1 介导的抑制增殖的效应可能部分通过抑制 PCNA 表达实现。另外研究发现 HO-1 的抗增殖效应通过上调细胞周期蛋白依赖激酶抑制因子 P21<sup>[14]</sup>,P21 是细胞周期素蛋白 cdk-2 抑制蛋白,cdk-2 亦是细胞周期 G<sub>1</sub> 和 S 期调节关键。Liu 等<sup>[15]</sup>以含 HO-1 基因的重组腺病毒转染大鼠主动脉平滑肌细胞,被转染的大鼠主动脉平滑肌细胞以剂量依赖方式表达 HO-1 mRNA、HO-1 蛋白和提高酶的活性,刺激促凋亡基因 p53 表达,促进 VSMCs 凋亡而抑制血清刺激的 VSMCs 增殖。

综上所述,姜黄素显著地抑制 Ox-LDL 诱导的大鼠 VSMC 增殖,其机制是由 HO-1 介导的 PCNA 表达下调实现的。这为进一步研究姜黄素防治 AS 提供了一定的理论依据。

参考文献:

[1] Lusis AJ. Atherosclerosis[J]. *Nature*,2000,407(6801):233-241.

[2] Li Q,Guo Y,Ou Q,et al. Gene transfer of inducible nitric oxide synthase affords cardioprotection by upregulating heme oxygenase-1 via a nuclear factor- $\kappa$ B-dependent pathway[J]. *Circulation*,2009,120(13):1222-1230.

[3] Owens GK,Loeb A,Gordon D,et al. Expression of smooth muscle-specific  $\alpha$ -isoactin in cultured vascular smooth muscle cells:relationship between growth and cytodifferentia-

of 47 mm at a clinical 1.5 T scanner[J]. *J Neurosci Methods*,2008,172(2):168-172.

[8] 张海琴,李坤成,于春水,等. 临床应用型 MR 大鼠中枢神经系统成像的初步研究[J]. *中国医学影像技术*,2008,24

tion[J]. *J Cell Biol*,1986,102(2):343-352.

[4] Durante W. Protective role of heme oxygenase-1 against inflammation in atherosclerosis[J]. *Front Biosci*,2011,17:2372-2388.

[5] Durante W. Targeting heme oxygenase-1 in vascular disease[J]. *Curr Drug Targets*,2010,11(12):1504-1516.

[6] Goel A,Kunnumakkara AB,Aggarwal BB. Curcumin as "Curecumin":from kitchen to clinic[J]. *Biochem Pharmacol*,2008,75(4):787-809.

[7] Huang HC,Jan TR,Yeh SF. Inhibitory effect of curcumin,an anti-inflammatory agent,on vascular smooth muscle cell proliferation[J]. *Eur J Pharmacol*,1992,221(2/3):381-384.

[8] Qin L,Yang YB,Tuo QH,et al. Effects and underlying mechanisms of curcumin on the proliferation of vascular smooth muscle cells induced by Chol;MbetaCD[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2009,379(2):277-282.

[9] Chang WC,Yu YM,Chiang SY,et al. Ellagic acid suppresses oxidised low-density lipoprotein-induced aortic smooth muscle cell proliferation;studies on the activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and proliferating cell nuclear antigen expression[J]. *Br J Nutr*,2008,99(4):709-714.

[10] Yang CM,Chien CS,Hsiao LD,et al. Mitogenic effect of oxidized low-density lipoprotein on vascular smooth muscle cells mediated by activation of Ras/Raf/MEK/MAPK pathway[J]. *Br J Pharmacol*,2001,132(7):1531-1541.

[11] Schwer CI,Guerrero AM,Humar M,et al. Heme oxygenase-1 inhibits the proliferation of pancreatic stellate cells by repression of the extracellular signal-regulated kinase1/2 pathway[J]. *J Pharmacol Exp Ther*,2008,327(3):863-871.

[12] Cerrito MG,Scagliarini A,Froio A,et al. Heme oxygenase-1 inhibition prevents intimal hyperplasia enhancing nitric oxide-dependent apoptosis of vascular smooth muscle cells[J]. *Biol Pharm Bull*,2011,34(8):1204-1214.

[13] Morris GF,Mathews MB. Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle[J]. *J Biol Chem*,1989,264(23):13856-13864.

[14] Notoya M,Nishimura H,Woo JT,et al. Curcumin inhibits the proliferation and mineralization of cultured osteoblasts[J]. *Eur J Pharmacol*,2006,534(1-3):55-62.

[15] Liu XM,Chapman GB,Wang H,et al. Adenovirus-mediated heme oxygenase-1 gene expression stimulates apoptosis in vascular smooth muscle cells[J]. *Circulation*,2002,105(1):79-84.

(收稿日期:2011-09-11 修回日期:2011-12-22)

(9):1352-1355.

[9] 王秀彬,曹和涛,李敏,等. 串联线圈大鼠 MR 成像的初步应用研究[J]. *中华放射学杂志*,2010,44(9):991-994.

(收稿日期:2011-11-08 修回日期:2011-12-27)