

· 论 著 ·

## 小檗碱对 Ang IV 诱导血管平滑肌细胞增殖的影响\*

王全华<sup>1</sup>, 陈加飞<sup>1</sup>, 王 平<sup>2</sup>, 吴 芹<sup>3</sup>, 蒋青松<sup>1△</sup>

(1. 重庆医科大学药理学教研室 400016; 2. 重庆科瑞制药公司 400060;

3. 遵义医学院药理教研室, 贵州遵义 563003)

**摘要:**目的 研究小檗碱(BBR)对血管紧张素Ⅳ(Ang Ⅳ)诱导大鼠血管平滑肌细胞(VSMCs)增殖的作用及机制。方法 体外培养大鼠胸主动脉 VSMCs, 采用 BCA 法测细胞总蛋白含量和 MTT 法观察 VSMCs 的增殖; Real-time RT-PCR 方法检测内皮型一氧化氮合酶(eNOS)mRNA 的表达; 比色法和硝酸还原法分别检测细胞培养液中一氧化氮合酶(NOS)活性和一氧化氮(NO)含量。结果 BBR(10、30、100 μmol/L)呈浓度依赖性地抑制 Ang Ⅳ(0.1 nmol/L)诱导的 VSMCs 的增殖和蛋白含量的增加( $P < 0.05$ ); 并上调 Ang Ⅳ所致 eNOS mRNA 表达的减少( $P < 0.05$ ), 同时升高 Ang Ⅳ降低的 NOS 活性和 NO 浓度( $P < 0.05$ )。L-精氨酸也有类似作用( $P < 0.05$ ), 而 NG-硝基-L-精氨酸甲酯可以抵消 BBR 和 L-精氨酸的上述作用( $P < 0.05$ )。结论 BBR 可抑制 Ang Ⅳ诱导的 VSMCs 增殖, 该作用可能与其激活 eNOS mRNA 的表达, 增加 NOS 活性, 促进 NO 释放有关。

**关键词:**小檗碱; 血管平滑肌细胞; 增殖; 血管紧张素Ⅳ; 一氧化氮

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.21.003

文献标识码: A

文章编号:1671-8348(2012)21-2131-03

## Inhibitory effects of berberine on proliferation of vascular smooth muscle cells induced by angiotensin Ⅳ\*

Wang Quanhua<sup>1</sup>, Chen Jiafei<sup>1</sup>, Wang Ping<sup>2</sup>, Wu Qin<sup>3</sup>, Jiang Qingsong<sup>1△</sup>

(1. Department of Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Research Institute of Chongqing Kerui Pharmacy CO., LTD, Chongqing 400060, China; 3. Department of Pharmacology,

Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of berberine on the proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) induced by angiotensin Ⅳ (Ang Ⅳ), and explore the possible mechanisms related to nitric oxide (NO). **Methods** Primary VSMCs were cultured by tissue explant method. Cell proliferation were measured by MTT and total protein contents assays to observe the effects of berberine (10, 30, 100 μmol/L) on VSMCs proliferation induced by Ang Ⅳ (0.1 nmol/L). The expression of endothelial NO synthase (NOS) mRNA was determined by real time RT-PCR method. The NOS activity and NO concentration in culture media were assayed by spectrophotometry and nitrate reduction methods, respectively. **Results** Berberine remarkably inhibited VSMCs proliferation induced by Ang Ⅳ in a dose-dependent manner ( $P < 0.05$ ), and increased the activity of NOS and the contents of NO in cultured cells ( $P < 0.05$ ). Furthermore, berberine up-regulated the expression level of endothelial NOS mRNA ( $P < 0.05$ ). L-arginine had a similar effect to berberine ( $P < 0.05$ ). NG-nitro-L-arginine methyl ester, NOS inhibitor, could abolish above effects of both berberine and L-arginine ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Berberine obviously attenuated the cultured VSMCs proliferation induced by Ang Ⅳ. The mechanisms are, at least partly, due to up-regulating the expression of eNOS, then increasing NOS activity, and promoting the synthesis and release of NO.

**Key words:** berberine; vascular smooth muscle cells; proliferation; angiotensin Ⅳ; nitric oxide

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)异常增殖是许多血管增殖性疾病如高血压、冠心病、动脉粥样硬化和血管成形术后再次狭窄的共同病理基础<sup>[1-2]</sup>。抑制 VSMCs 的异常增殖是治疗血管增生性疾病的根本途径。黄连是中国传统中药, 具有“清热燥湿, 泻火解毒”的功效, 对心血管系统有重要作用。小檗碱(berberine, BBR)是其主要有效成分, 近年发现 BBR 具有抗动脉粥样硬化的药理作用<sup>[3]</sup>, 但其机制尚未完全明了。血管紧张素Ⅳ(angiotensin Ⅳ, Ang Ⅳ)是血管紧张素Ⅱ C 末端的六肽片段, 也是肾素-血管紧张素系统的重要活性物质之一, 在 VSMCs 的异常增殖中亦有重要作用<sup>[4]</sup>。那么, 对于 Ang Ⅳ诱导的 VSMCs 增殖, BBR 会产生什么样的影响? 本实验利用大鼠 VSMCs 离体培养模型首次进行了研究。

## 1 材料与方法

**1.1 动物与主要试剂** 清洁级 Sprague-Dawley 大鼠, 体质量(165±15)g, 雄性, 8 只, 由第三军医大学实验动物中心提供, 动物许可证: SCXK(渝)2007-0005。BBR 粉剂购自四川亚宝光泰制药有限公司; L-精氨酸、NG-硝基-L-精氨酸甲酯(NG-nitro-L-arginine-methyl ester, L-NAME)、RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型)、总一氧化氮(nitric oxide, NO)检测试剂盒均购自江苏碧云天公司; Ang Ⅳ、噻唑蓝(MTT)、胰蛋白酶均购自 Sigma 公司; 一氧化氮合酶(NO synthase, NOS)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所; Trizol 试剂和逆转录试剂盒、SYBR® GREEN PCR Master Mix(ABI)购自宝生物工程(大连)有限公司; 其余试剂均为国产分析纯。

## 1.2 方法

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81100905); 重庆市自然科学基金资助项目(2010BB5108)。△ 通讯作者, E-mail: cqjiangqs@yahoo.cn。

**1.2.1 血管平滑肌细胞培养与分组** 参考徐正云等<sup>[5]</sup>贴块法进行。实验所用 VSMCs 均为第 3~8 代传代细胞。分为 6 组, (1) 对照组: 加入等体积含 10% 血清 DMEM 培养液; (2) Ang IV (0.1 nmol/L) 组; (3) Ang IV (0.1 nmol/L) + 不同浓度 BBR (10, 30, 100  $\mu\text{mol/L}$ ) 组; (4) L-精氨酸 (1 mmol/L) + Ang IV (0.1 nmol/L) 组; (5) Ang IV (0.1 nmol/L) + L-NAME (1 mmol/L) + L-精氨酸 (1 mmol/L) 组; (6) Ang IV (0.1 nmol/L) + L-NAME (1 mmol/L) + BBR (30  $\mu\text{mol/L}$ ) 组。

**1.2.2 MTT 法检测 VSMCs 增殖作用** 在 96 孔板中以  $5 \times 10^3$  细胞/孔的密度铺板。70%~80% 融合后, 用无血清 DMEM 同步化 24 h, 更换含 10% 血清 DMEM, 同时加入不同试剂 48 h 后, 每孔加入 MTT (5 g/L) 10  $\mu\text{L}$  孵育 4 h, 弃上清液, 每孔加 DMSO 100  $\mu\text{L}$ , 震荡混合 10 min, 在酶标仪上测定 490 nm 波长的吸光度 ( $A_{490}$ )。实验重复 6 次。

**1.2.3 细胞总蛋白含量测定** 细胞密度为  $5 \times 10^4$  个/mL, 接种于 24 孔板, 加入 RIPA 裂解缓冲液, 冰浴条件下超声破碎细胞,  $10 \text{ s} \times 3$  次;  $4^\circ\text{C}$ ,  $12\,000 \times \text{g}$  离心 20 min, 取上清液按 BCA 蛋白检测试剂盒说明书操作。重复 6 次。

**1.2.4 Real-time RT-PCR 测定了内皮型 NOS (endothelial NOS, eNOS) mRNA 表达** 细胞密度为  $5 \times 10^4$  个/mL, 接种于 25 mL 培养瓶中。Trizol 提取 RNA, 按照两步法进行逆转录-聚合酶链反应 (反应条件: 第 1 步,  $95^\circ\text{C} \times 3 \text{ min}$ ; 第 2 步,  $95^\circ\text{C} \times 10 \text{ s}$ , 退火温度均为  $60^\circ\text{C} \times 45 \text{ s}$ , 循环 40 次)。以  $\beta$ -actin 为内参, 用相对定量法计算 eNOS mRNA 的表达。每组重复 4 次。引物序列, eNOS, sense: 5'-CCT CGT GGT AGC GTT GCT GA-3', antisense: 5'-AGC TGG TGA AGC CGG TGA C-3';  $\beta$ -actin, sense: 5'-GGC CAA CCG TGA AAA GAT GA-3', antisense: 5'-CAG CCT GGA TGG CTA CGT ACA-3', 引物由宝生物工程 (大连) 有限公司合成。

**1.2.5 NOS 活性及 NO 含量测定**  $5 \times 10^4$  细胞/孔接种于 24 孔板中, 取培养细胞上清液, 用 721 分光光度计测定 530 nm 波长吸光度, 按照试剂盒说明书操作, 计算 NOS 活性; 或用酶标仪测定 540 nm 波长吸光度, 按照试剂盒说明书作并计算 NO 含量。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 11.0 统计软件进行统计学处理, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间两两比较采用单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

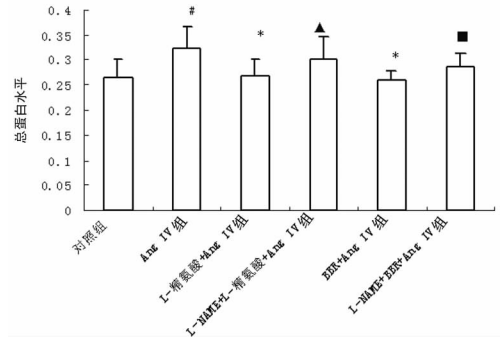
**2.1 BBR 对 VSMCs 增殖的影响** 与对照组相比, Ang IV 0.1 nmol/L 具有明显的促进 VSMCs 增殖的作用, 其  $A_{490}$  与蛋白含量分别增加了 14.3% 和 14.0% ( $P < 0.01$ )。BBR (10, 30, 100  $\mu\text{mol/L}$ ) 呈浓度依赖性抑制 Ang IV 诱导的 VSMCs 增殖, 使  $A_{490}$  分别降低了 6.8%、12.2% 和 19.4% ( $P < 0.01$ ); 蛋白含量分别降低了 3.2%、9.8% 和 19.6% ( $P < 0.01$ )。见表 1。NO 供体 L-精氨酸 (1 mmol/L) 也可以抑制 Ang IV 诱导的 VSMCs 增殖,  $A_{490}$  与蛋白含量分别降低了 3.8% 和 18.1% ( $P < 0.01$ )。NOS 抑制剂 L-NAME (1 mmol/L) 可以抵消 BBR 与 L-精氨酸的作用 ( $P < 0.05$ )。见图 1。

**2.2 BBR 对 VSMCs 中 eNOS mRNA 表达的影响** 正常 VSMCs 中 eNOS mRNA 表达较高, Ang IV 使其明显降低 ( $P < 0.01$ )。BBR 30  $\mu\text{mol/L}$  明显改善 Ang IV 的作用, 使 eNOS mRNA 表达增加了 195.2% ( $P < 0.01$ )。L-精氨酸亦可上调 Ang IV 降低的 eNOS mRNA 表达 ( $P < 0.05$ )。L-NAME 可以取消 BBR 和 L-精氨酸的作用 ( $P < 0.05$ )。见图 2。

表 1 BBR 对 Ang IV 诱导大鼠 VSMCs 增殖的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

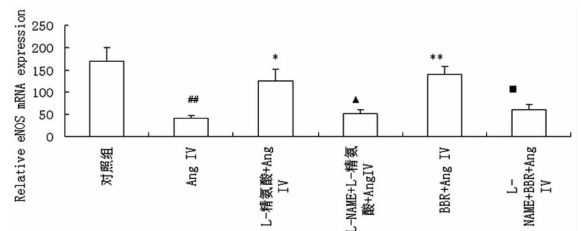
组别	$A_{490}$	总蛋白水平 ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
对照组	0.244 $\pm$ 0.010	0.349 $\pm$ 0.066
Ang IV 0.1 nmol/L 组	0.279 $\pm$ 0.007 <sup>#</sup>	0.398 $\pm$ 0.075 <sup>#</sup>
BBR 10 $\mu\text{mol/L}$ + Ang IV 0.1 nmol/L 组	0.260 $\pm$ 0.004 <sup>*</sup>	0.385 $\pm$ 0.066
BBR 30 $\mu\text{mol/L}$ + Ang IV 0.1 nmol/L 组	0.245 $\pm$ 0.010 <sup>*</sup>	0.359 $\pm$ 0.068 <sup>*</sup>
BBR 100 $\mu\text{mol/L}$ + Ang IV 0.1 nmol/L 组	0.225 $\pm$ 0.014 <sup>*</sup>	0.320 $\pm$ 0.053 <sup>*</sup>

<sup>#</sup>:  $P < 0.01$ , 与对照组比较; <sup>\*</sup>:  $P < 0.01$ , 与 Ang IV 组比较。



<sup>#</sup>:  $P < 0.01$  与对照组比较; <sup>\*</sup>:  $P < 0.01$ , 与 Ang IV 组比较; <sup>▲</sup>:  $P < 0.05$ , 与 L-精氨酸 + Ang IV 组比较; <sup>■</sup>:  $P < 0.05$ , 与 BBR + Ang IV 组比较。

图 1 L-NAME 对 BBR 抑制 Ang IV 诱导大鼠 VSMCs 增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )



<sup>#</sup>:  $P < 0.01$ , 与对照组比较; <sup>\*</sup>:  $P < 0.01$ , <sup>\*</sup>:  $P < 0.05$ , 与 Ang IV 组比较; <sup>▲</sup>:  $P < 0.05$ , 与 L-精氨酸 + Ang IV 组比较; <sup>■</sup>:  $P < 0.05$ , 与 BBR + Ang IV 组比较。

图 2 BBR 对 Ang IV 诱导大鼠 VSMCs eNOS mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

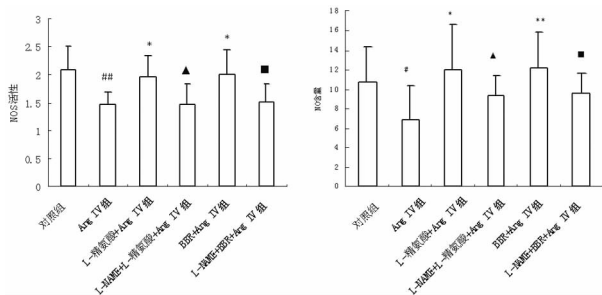
表 2 BBR 对 Ang IV 诱导大鼠 VSMCs NOS 活性和 NO 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	NOS (U/L)	NO ( $\mu\text{mol/L}$ )
对照组	1.930 $\pm$ 0.438	13.158 $\pm$ 2.029
Ang IV 0.1 nmol/L 组	1.049 $\pm$ 0.216 <sup>#</sup>	9.474 $\pm$ 0.723 <sup>#</sup>
BBR 10 $\mu\text{mol/L}$ + Ang IV 0.1 nmol/L 组	1.522 $\pm$ 0.301 <sup>*</sup>	10.858 $\pm$ 1.498 <sup>*</sup>
BBR 30 $\mu\text{mol/L}$ + Ang IV 0.1 nmol/L 组	1.763 $\pm$ 0.369 <sup>**</sup>	12.651 $\pm$ 0.830 <sup>**</sup>
BBR 100 $\mu\text{mol/L}$ + Ang IV 0.1 nmol/L 组	1.413 $\pm$ 0.277 <sup>**</sup>	11.501 $\pm$ 0.860 <sup>**</sup>

<sup>#</sup>:  $P < 0.01$ , 与对照组比较; <sup>\*</sup>:  $P < 0.01$ , <sup>\*</sup>:  $P < 0.05$ , 与 Ang IV 组比较。

**2.3 BBR 对 Ang IV 诱导 VSMCs 中 NOS 活性及 NO 含量的影响** Ang IV 明显降低细胞上清液中 NOS 活性和 NO 含量, 使其分别降低了 45.6% 和 26.5% ( $P < 0.01$ ), BBR 使之明显增加 ( $P < 0.05$ ), 以 30  $\mu\text{mol/L}$  作用最强, 二者分别增加了 68.1% ( $P < 0.01$ ) 和 35.0% ( $P < 0.01$ )。见表 2。L-精氨酸的作用与 BBR 相似, 也使 NOS 活性及 NO 含量分别提高了

34.4%和 92.6% ( $P < 0.05$ )。L-NAME 亦可以抵消 BBR 与 L-精氨酸的上述作用 ( $P < 0.05$ )。见图 3。



##:  $P < 0.01$ , 与对照组比较; \*:  $P < 0.01$ , \*:  $P < 0.05$ , 与 Ang IV 组比较; ▲:  $P < 0.05$ , 与 L-精氨酸 + Ang IV 组比较; ■:  $P < 0.05$ , 与 BBR + Ang IV 组比较。

图 3 L-NAME 对 BBR 增加 Ang IV 诱导大鼠 VSMCs NOS 活性和 NO 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

### 3 讨论

VSMCs 增生是心脑血管疾病发生和发展的病理学基础, 对其研究一直是相关领域的热点。Ang IV 作为肾素-血管紧张素系统的一员, 在心血管系统的病理生理过程中也有重要影响<sup>[6]</sup>, 但目前的研究主要集中在血管紧张素 II 的作用方面。本研究结果显示, Ang IV 在纳摩尔水平 (0.1 nmol/L) 可刺激 VSMCs 数量增多, 总蛋白含量升高。与 Ruiz-Ortega 等<sup>[6]</sup>的报道一致, 提示 Ang IV 亦是一个促进 VSMCs 增殖的独立因素。

研究已经证实<sup>[7-8]</sup>, 中国传统医学对于很多慢性疾病具有独特的治疗作用, 现已经有很多中药活性成分应用于临床。BBR 是目前临床常用的一个毒性较低的中药单体, 在毛茛科植物黄连、芸香科植物黄芩、小檗科植物小檗中含量较高。最近的研究证明, BBR 对心血管疾病具有良好的改善作用, 包括抗心肌缺血、降血压、降血糖、降低胆固醇以及抗动脉粥样硬化等<sup>[3,9]</sup>。已有研究证明, BBR 可能通过 AMPK/p53/p21 及 ERK 等通路的作用, 抑制 VSMCs 处于 G<sub>0</sub> 期, 从而抑制 VSMCs 的增殖<sup>[3-4,10]</sup>。本研究显示, BBR 能够浓度依赖地抑制 Ang IV 诱导的 VSMCs 细胞数量增多和总蛋白升高, 提示 BBR 具有抗 Ang IV 诱导 VSMCs 增殖的作用。但在此过程中, 是否还有别的因子参与? 本实验进行了进一步研究。

在心血管疾病的发生、发展过程中, NO 是一个重要的参与因子。现已证明<sup>[11]</sup>, NO 具有调节血压、抑制血小板聚集、抑制白细胞黏附和抑制 VSMCs 增殖等作用。许多研究证实, BBR 的心血管作用与其活化 eNOS, 促进 NO 的释放有关<sup>[12-14]</sup>。但 eNOS-NO 信号通路的激活是否也参与了 BBR 的抗 Ang IV 诱导 VSMCs 增殖作用, 目前尚不清楚。本研究结果显示, Ang IV 诱导 VSMCs 增殖的同时, eNOS mRNA 表达明显下调, NOS 活性降低, NO 含量减少。与 NO 供体 L-精氨酸的作用相似, BBR 抗 Ang IV 诱导 VSMCs 增殖的同时, 明显上调 eNOS mRNA 的表达, 提高 NOS 活性, 增加 NO 的释放。NOS 抑制剂 L-NAME 可阻断 L-精氨酸和 BBR 的上述作用。这些结果提示, 促进 NO 释放增加可能是 BBR 抑制 Ang IV 诱导 VSMCs 增殖的机制之一。

综上所述, BBR 具有抗 Ang IV 诱导的 VSMCs 增殖的作用; 该作用的产生可能与其上调 eNOS-NO 信号通路, 最终使 NO 释放增加有关。

### 参考文献:

[1] Chang CC, Lee JJ, Chiang CW, et al. Inhibitory effect of

PMC, a potent hydrophilic alpha-tocopherol derivative, on vascular smooth muscle cell proliferation; the pivotal role of PKC-alpha translocation [J]. *Pharm Biol*, 2010, 48 (8): 938-946.

[2] Huang F, Xiong X, Wang H, et al. Leptin-induced vascular smooth muscle cell proliferation via regulating cell cycle, activating ERK1/2 and NF-kappaB [J]. *Acta Biochim Biophys Sin(Shanghai)*, 2010, 42 (5): 325-331.

[3] Wu M, Wang J, Liu LT. Advance of studies on anti-atherosclerosis mechanism of berberine [J]. *Chin J Integr Med*, 2010, 16 (2): 188-192.

[4] Esteban V, Ruperez M, Sánchez-López E, et al. Angiotensin IV activates the nuclear transcription factor-kappa B and related proinflammatory genes in vascular smooth muscle cells [J]. *Circ Res*, 2005, 96 (9): 965-973.

[5] 徐正云. 大鼠胸主动脉平滑肌的培养与鉴定 [J]. *岭南医学杂志*, 2005, 11 (2): 202-204.

[6] Ruiz-Ortega M, Esteban V, Egido J. The regulation of the inflammatory response through nuclear factor-kappa B pathway by angiotensin IV extends the role of the renin angiotensin system in cardiovascular diseases [J]. *Cardiovasc Med*, 2007, 17 (1): 19-25.

[7] 贺国洋, 李永真, 李新强, 等. 人参皂苷 Rg1 抗同型半胱氨酸诱导人脐静脉内皮细胞凋亡的作用及相关机制研究 [J]. *重庆医学*, 2011, 40 (14): 1376-1378.

[8] 伍陈海. 姜黄素对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *重庆医学*, 2011, 40 (1): 25-29.

[9] Bulhak AA, Jung C, Ostenson CG, et al. PPAR-alpha activation protects the type 2 diabetic myocardium against ischemia-reperfusion injury: involvement of the PI3-Kinase/Akt and NO pathway [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 296 (3): 719-727.

[10] Tanabe H, Suzuki H, Nagatsu A, et al. Selective inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by coptisine isolated from *Coptis rhizoma*, one of the crude drugs composing Kampo medicines Unsei-in [J]. *Phytomedicine*, 2006, 13 (5): 334-342.

[11] 马丽雅, 张辉锋. 一氧化氮合酶与心血管疾病 [J]. *医学临床研究*, 2010, 27(2): 349-352.

[12] 杨雨民, 王世君, 金丹丹, 等. 大黄素对血管紧张素 II 诱导血管平滑肌细胞增殖的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2008, 33 (1): 63-67.

[13] Wang C, Li J, Zhang M, et al. Ameliorative effect of berberine on endothelial dysfunction in diabetic rats induced by high-fat diet and streptozotocin [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 620(1/3): 131-137.

[14] 杨静, 周祖玉, 徐建国, 黄连素对 L-甲状腺素诱发大鼠心肌肥厚的保护作用 [J]. *四川大学学报: 医学版*, 2004, 35 (2): 223-225.

(收稿日期: 2012-01-09 修回日期: 2012-03-06)