

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.07.005

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20181126.1330.002.html(2018-11-27)

丹参凝集素促进血管平滑肌细胞的增殖机制研究*

沈艳花,牛成群,覃韦宁,李珊,武福云[△]

(湖北医药学院基础医学院,湖北十堰 442000)

[摘要] **目的** 探究丹参凝集素蛋白(SMLP)对大鼠血管平滑肌细胞(VSMCs)增殖的影响机制。**方法** 通过蛋白分离纯化技术从中药丹参中分离得到具有活性的凝集素蛋白,噻唑蓝(MTT)法检测 SMLP 对大鼠 VSMCs 的增殖作用,蛋白质印迹法(Western blot)检测相关增殖基因的表达水平。构建 pet-28a-sml 原核表达载体,利用蛋白质亲和层析等技术纯化体外表达的 SMLP,并通过红细胞凝集实验确认纯化的 SMLP 的活性。**结果** 丹参中分离的 SMLP 能够促进大鼠 VSMCs 增殖,增殖相关基因蛋白激酶 B(AKT)基因与哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)的磷酸化水平明显增加,而凋亡相关基因 JNK1 和 Bax 表达水平明显降低。成功构建了 pet-28a-smlp 原核表达载体,并在体外表达纯化了 SMLP;红细胞凝集实验表明,体外表达纯化的 SMLP 具有活性。**结论** SMLP 能够促进大鼠 VSMCs 的增殖;成功建立 SMLP 的体外表达纯化方法,为进一步研究其功能奠定了基础。

[关键词] 植物凝集素类;血管平滑肌细胞;细胞增殖**[中图分类号]** R285;Q512**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2019)07-1099-04**Mechanisms of promoting proliferation of vascular smooth muscle cells by Salvia miltiorrhiza lectin***SHEN Yanhua, NIU Chengqun, QIN Weining, LI Shan, WU Fuyun[△]

(College of Basic Medicine, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the mechanism of the effect of Salvia miltiorrhiza lectin (SMLP) on the proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) in rats. **Methods** The SMLP was isolated from Salvia miltiorrhiza by protein separation and purification technology. The MTT assay was performed to detect the proliferation of VSMCs in rats after SMLP treatment. The expression levels of proliferation-related genes were detected by Western blot. The prokaryotic expression vector of pet-28a-sml was constructed, and SMLP was purified by affinity chromatography. The activity of purified SMLP was tested by RBC agglutination experiment. **Results** The SMLP isolated from Salvia miltiorrhiza could promote the proliferation of VSMCs in rats, and the expression levels of proliferation-related genes (p-AKT and p-mTOR) were significantly increased, while the expression levels of apoptosis-related genes (JNK1 and Bax) were decreased obviously. The prokaryotic expression vector pet-28a-sml was successfully constructed, and the SMLP was purified in vitro. The RBC agglutination experiment showed that the purified SMLP protein was functional in vitro. **Conclusion** SMLP can promote the proliferation of VSMCs in rats. The expression and purification method of SMLP in vitro was established, which lays a foundation for further study on the function of the protein.

[Key words] plant lectins; vascular smooth muscle cells; cell proliferation

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)位于血管中膜,是构成血管壁组织结构及维持血管张力的主要细胞,并且在多种生理过程中发挥重要作用。VSMCs 的增殖分化与血管发育、血管损伤修复和血管重塑等密切相关^[1]。而异常的 VSMCs 增殖可造成许多病理性损伤,如动脉粥样硬化、血管成形术后再狭窄和高血压血管重塑等心血管疾病^[2-4]。中草药在治疗心血管疾病方面具有独特的优势,如益气活血化瘀的中药丹参^[5]。丹参的主要提取物包括脂溶性的丹参酮和水溶性的丹酚酸类^[6]。以

往研究表明,丹参酮能够抑制 VSMCs 增殖,具有抗动脉粥样硬化的作用,而丹酚酸对 VSMCs 及内皮细胞具有保护作用^[7-8]。除此之外,中草药活性蛋白在心血管疾病方面的作用也得到了重视,但是如何保证分离纯化蛋白的纯度及活性至关重要^[9]。利用蛋白质纯化及质谱鉴定技术笔者得到了具有生物活性的丹参凝集素蛋白(SMLP),并研究了其对大鼠 VSMCs 增殖的影响,以及利用丹参基因组已经测序这一优势,获得丹参凝集素基因,并利用蛋白质原核表达系统在体外表达纯化有功能的 SMLP,为进一步研究丹

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81502637、81702639);湖北省教育厅科学技术研究计划青年项目(Q20162105);大学生创新创业训练计划项目(201810929034)。作者简介:沈艳花(1996—),在读硕士,主要从事中药药理方面的研究。△ 通信作者,E-mail:wufuyun100@126.com。

参凝集素的功能、其促进 VSMCs 增殖的机制及在其他领域的应用提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料 中药丹参购自药店,并经湖北医药学院鉴定。大鼠 VSMCs A7r5 购自上海慧颖生物科技有限公司,抗体购自武汉三鹰生物技术公司。分子克隆相关试剂:DNA 聚合酶、限制性内切酶及 T4 DNA 连接酶购自日本 TaKaRa 公司,感受态细胞 Trans I-TI、BL21 购自全式金生物技术公司。蛋白表达相关试剂:LB 培养基、卡那霉素、诱导剂异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)购自上海生工。蛋白纯化相关试剂:镍柱(Ni NTA beads)、阴离子交换柱及分子筛购自美国 GE 公司。

1.2 方法

1.2.1 丹参蛋白的提取分离 丹参药材经粉碎后,按照 1:5(g/mL)加入磷酸盐缓冲液(PBS),4 °C 浸泡 24 h 后,4 °C,5 000×g 离心 10 min 后将上清液转移到浓缩管,浓缩后,经分子筛 superdex 200 分离,并利用阴离子交换柱进一步分离得到目的蛋白,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测分离纯化后的蛋白,并用于后续的质谱鉴定。

1.2.2 噻唑蓝(MTT)实验 以 3 000 个/孔的细胞密度将 A7r5 细胞接种于 96 孔板,设置 3 个复孔。培养箱培养 12 h,使细胞贴壁。实验组每孔加入不同浓度的丹参凝集素蛋白,继续培养 24 h,每孔加 10 μL 的 MTT(5 g/L)继续培养 4 h,弃上清液,加 150 μL 的二甲基亚砷(DMSO),振荡 5 min,使 MTT 结晶完全溶解,以空白对照孔调零,酶联免疫检测分析仪测定 490 nm 处的吸光度值(A 值),各复孔 A 值的平均值作为统计数据,所检测的 A 值的大小可反映活细胞数量。MTT 实验至少重复 3 次。

1.2.3 免疫印迹法(Western blot) 对照组和 SMLP 处理组细胞用 RAPA 裂解液裂解后,二喹啉甲酸(BCA)法测蛋白浓度,利用 SDS-PAGE 分离蛋白,并将蛋白转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜,5%奶粉封闭 1 h 后,加入一抗 4 °C 孵育过夜,Tris 缓冲盐-吐温溶液(TBST)洗膜后,二抗孵育 2 h,显色。

1.2.4 pet-28a-sml 原核表达载体构建 以丹参为材料,抽提其叶片总 RNA,利用反转录 PCR(RT-PCR)的方法得到其 cDNA 第一链。以 cDNA 为模板,通过 PCR 的方法体外扩增出丹参凝集素基因 sml,通过 NheI 和 XhoI 限制性内切酶及 T4 DNA 连接酶将 sml 基因插入到原核表达载体 pet-28a,转化感受态细胞 DH5α,提质粒送武汉擎科生物公司测序,确认序列正确,引物合成及质粒测序由武汉擎科生物公司完成。所用上下游引物中正向:5'-CTA GCT AGC ATG GCC AAC CTT CCC CAA AC-3';反向:5'-CCG CTC GAG TCA AAT CTG CTT AAG GCT GAC-3'。

1.2.5 蛋白表达及纯化 取测序正确的 pet-28a-sml 质粒转化表达蛋白的感受态细胞 BL21,将菌接种到 LB 培养基,并加入卡那霉素(50 μg/mL),37 °C 振荡

培养至 A 值达到 0.8,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的诱导剂异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG),24 °C 诱导 12 h 后,5 000 r/min 离心 15 min 收集菌体,超声破碎后 12 000×g 离心 30 min,收集上清液与镍柱结合,Wash buffer(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,200 mmol/L NaCl,20 mmol/L 咪唑)洗掉非特异结合的蛋白,Elution buffer(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,200 mmol/L NaCl,500 mmol/L 咪唑)将凝集素蛋白从镍柱上洗脱下来,经离子交换柱进一步纯化后,浓缩到 5 mg/mL,并过滤除菌,用于后续细胞实验或冷冻于-80 °C 保存。

1.2.6 红细胞凝集实验 制备 2% 小鼠红细胞悬液,吸取少许滴两滴到干净的玻片上,分别加入 PBS 和 0.6 μmol/L SMLP,2 min 后观察红细胞凝集的结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS10.0 统计软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 丹参活性蛋白的分离 将中药丹参粉碎后,用 PBS 浸提丹参蛋白后,将总蛋白经过分子筛分离,得到 3 个主要的组分 P1、P2 和 P3。将这 3 个组分经 SDS-PAGE 分离后,得到了一个相对分子质量 25×10^3 左右,并且含量较多的蛋白,见图 1A。为进一步纯化该蛋白,将 P1 组分继续通过阴离子交换柱,得到了纯化的丹参蛋白,见图 1B。

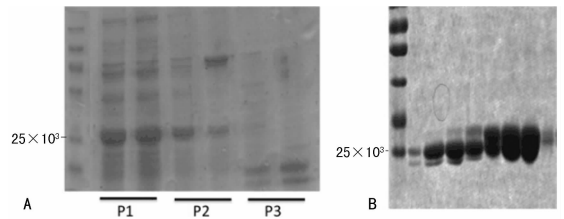


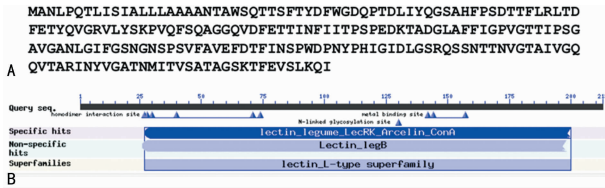
图 1 分子筛分离丹参蛋白电泳分析;B:阴离子交换柱分离蛋白电泳分析

图 1 丹参蛋白的分离纯化及电泳分析

2.2 丹参活性蛋白的鉴定 采用质谱鉴定纯化的丹参活性蛋白,并与丹参基因组数据库比对得到该蛋白的氨基酸序列,见图 2A。使用美国国立生物技术信息中心(NCBI)数据库的 Blast 功能进行蛋白质序列比对,得出该蛋白是一种 L 型的植物凝集素,将该蛋白称为 SMLP。

2.3 SMLP 素促进 VSMCs 增殖 为检测 SMLP 对 VSMCs 的增殖作用,将从丹参中分离纯化的 SMLP 加入到 A7r5 细胞培养液中,处理 24 h 后,利用 MTT 实验检测细胞的增殖率。结果表明,SMLP 能够明显促进 VSMCs 的增殖,见图 3A。为进一步确认 SMLP 对 A7r5 细胞的促增殖作用,利用 Western blot 检测增殖相关基因蛋白激酶 B(AKT)基因与哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)总蛋白表达水平,以及二者的磷酸化水平,见图 3B;同时,检测凋亡相关基因 JNK1 和 Bax,见图 3C。结果表明,SMLP 能够促进 ATK 及 mTOR 的磷酸化,磷酸化 AKT(p-AKT)和磷酸化

mTOR(p-mTOR)水平升高,总 ATK 及 mTOR 未发生明显变化,而相关凋亡基因的表达水平被抑制。



A:丹参活性蛋白的氨基酸序列;B:蛋白质序列对比

图 2 丹参活性蛋白质谱鉴定

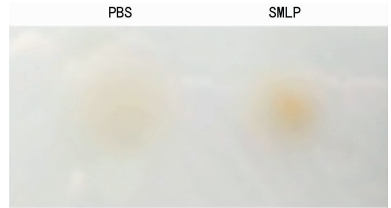
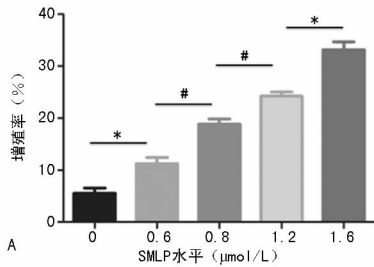


图 5 SMLP 血细胞凝集实验

4B;经测序确认序列正确后,将其转化至感受态细胞 BL21,诱导表达带有 His 标签的 SMLP,纯化后得到了高纯度的 SMLP,见图 4C。

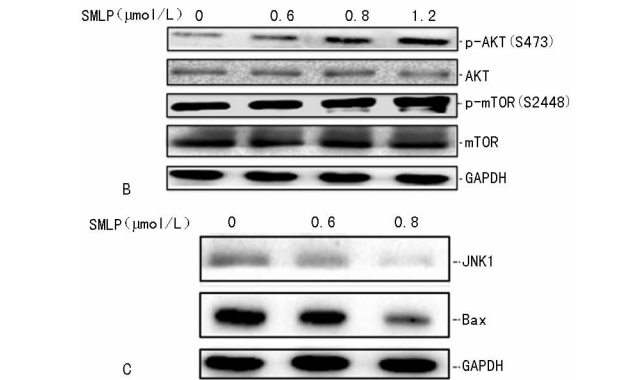
2.5 SMLP 活性检测 为分析体外表达纯化的丹参凝集素蛋白是否具有功能,检测其凝集红细胞的功能。结果显示,左侧红细胞悬液加入 PBS,红细胞均匀分散,并无凝集;右侧红细胞悬液加入纯化的凝集素蛋白 SMLP,红细胞凝集成块,颜色加深,见图 5。

3 讨论

目前,中草药小分子化合物的分离鉴定取得了很大的进展,多种小分子被应用于抗肿瘤及心血管疾病的治疗,包括生物碱类、甙类、酮类、萜类和挥发油类等^[10]。但是,中草药中除了这些重要的次生代谢产物外,还存在很多活性蛋白,它们的重要性往往被忽视。主要原因是从中草药中提纯蛋白质有一定的难度。如何在提取过程中保证蛋白质的纯度及活性非常关键。并且,由于大多数中草药基因组尚未测序,很难得到确切的蛋白序列并了解其功能,也很难利用一些基因工程技术手段大量地表达这些蛋白,影响了其应用价值。

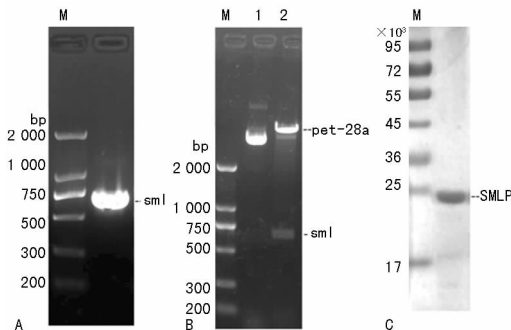
丹参作为常用的活血化瘀药物,在治疗心血管疾病方面具有重要的作用。丹参含有多种化学成分,具有多种药理活性。目前,从丹参中分离的化学成分达 100 多种,有效成分主要包括脂溶性的丹参酮类和水溶性的酚酸类。多项研究表明,丹参酮类具有改善缺血、抑制心肌肥厚、抗动脉粥样硬化及抑制血小板聚集等功能。而丹酚酸类则具有活血通络的作用,常用于心脑血管疾病的治疗^[11]。丹参小分子的分离鉴定及药理作用研究取得了很大的进展,但在活性蛋白研究方面仍存在不足。丹参作为第一个基因组测序的中草药,研究其活性蛋白有很大的优势。因此,笔者选择丹参作为研究对象,分离纯化及鉴定其有功能的蛋白。本研究分离并纯化得到一个相对分子质量约为 25×10^3 的蛋白,通过 MTT 实验及 Western blot 检测发现,该蛋白能够明显促进大鼠 VSMCs 增殖。通过质谱鉴定得到其氨基酸序列,经蛋白 BLAST 比对证明,该蛋白是 L 型的植物凝集素。根据丹参基因组序列,得到了丹参凝集素基因 sml 的 DNA 序列,利用分子克隆及蛋白表达纯化技术,得到大量高纯度的 SMLP,并利用红细胞凝集实验证明体外表达纯化的 SMLP 具有红细胞凝集的功能。

通过本研究证明,SMLP 能够促进大鼠 VSMCs 增殖,其可能通过激活 PI3K-AKT-mTOR 信号通路。VSMCs 的增殖受多种生长刺激因子和抑制因子的双



A:MTT 实验检测 SMLP 对 A7r5 细胞的增殖作用;B:不同浓度 SMLP 处理细胞后 AKT、mTOR 及其磷酸化水平;不同浓度 SMLP 处理细胞后凋亡相关基因 JNK1 和 Bax 的变化水平;*: $P < 0.05$,#: $P < 0.01$

图 3 SMLP 促进 VSMCs 增殖



A:PCR 扩增丹参凝集素基因 sml;B:双酶切验证 sml 基因插入到原核表达载体 pet-28a;泳道 1:未经酶切的重组质粒;泳道 2:酶切之后的重组质粒;C:体外表达纯化 SMLP;M:蛋白标志物

图 4 SMLP 的原核表达载体构建及蛋白表达纯化

2.4 SMLP 的原核载体构建及蛋白表达纯化 丹参是首个基因组测序的中草药,利用这一优势,构建了丹参凝集素基因的原核表达载体。通过 PCR 的方法体外扩增出丹参凝集素基因 sml,见图 4A;通过酶切连接的方法将 sml 基因插入到原核表达载体 pet28a,经双酶切验证,成功构建了 pet28a-sml 载体,见图

重调节。它们通过多种信号转导通路参与 VSMCs 的增殖及凋亡,其中 PI3K-AKT 信号通路被证明是非常重要的通路^[12-14]。AKT 蛋白在各种组织中广泛表达,如在心脏、肝脏、肾脏和骨骼肌等组织中表达,主要通过上游的 PI3K 磷酸化被激活,并调节下游的多个靶基因,如 mTOR、核因子- κ B(NF- κ B)、糖原合酶激酶-3 β (GSK-3 β)和 FKHR 等,进而调节细胞的增殖、分化、凋亡及迁移等^[15]。本研究结果表明,SMLP 能够促进 VSMCs AKT 和 mTOR 蛋白的磷酸化,并且能够抑制相关凋亡蛋白水平,从而促进其增殖。但 SMLP 能否促进其他细胞的增殖,以及是否还会通过其他信号通路,仍需进一步研究。

VSMCs 是唯一能通过迁移、增殖和合成细胞外基质来修复受损血管壁的血管细胞,是构成血管中膜并执行相应生理功能的物质基础,具有保持血管完整性和维持血管张力的作用。SMLP 能够促进其增殖,这对于 VSMCs 发挥正常生理功能具有重要意义。但在病理过程中,VSMCs 功能障碍与疾病的发生、发展密切相关。VSMCs 通过自身增殖、迁移及合成细胞外基质参与高血压、动脉粥样硬化、血管成形术后再狭窄等多种血管疾病的病理过程^[16-18]。因此,阐明 VSMCs 增殖的调节机制,对于理解心血管疾病的发病过程及临床治疗非常关键。本研究初步发现 SMLP 能够促进 VSMCs 增殖,下一步通过体外蛋白质相互作用方法 pull-down 等,可以找到与 SMLP 相互作用的细胞表面受体,以及其激活的增殖相关的信号通路,将进一步揭示 VSMCs 增殖的机制,对于理解心血管疾病的发病机制有重要意义。除此之外,植物凝集素具有多种重要的功能,如凝集红细胞、参与植物的防御反应及促进淋巴细胞的分裂等,而且植物凝集素被广泛地应用于靶向性药物载体^[19-20]。目前多种植物凝集素被分离鉴定,但是只能利用传统的蛋白质分离办法,其纯度及活性都很难得到保证。丹参的全基因组已经测序,这对于研究其功能蛋白就简单了很多,利用基因工程技术,可以很容易地获得高纯度并且具有活性的 SMLP,这对于后续研究其功能、药物开发及应用多个领域都非常重要。

参考文献

- [1] 赵京山,方明星,郭浅好,等. 羟基红花黄色素 A 抑制 PDGF 促大鼠血管平滑肌细胞增殖的作用[J]. 中国细胞生物学学报,2015,37(6):827-831.
- [2] 温进坤,韩梅. 血管平滑肌细胞[M]. 北京:科学出版社,2005:6-8.
- [3] 罗寅,马占龙. 血管平滑肌细胞在动脉粥样硬化病变中作用的研究进展[J]. 陕西医学杂志,2012,41(3):360-361.
- [4] 张文通,李俊,吴玉婷,等. 山柰酚-3-O-芸香糖苷对血管平滑肌细胞增殖,迁移及 TGFBR1 信号通路活化的影响[J]. 中国病理生理杂志,2018,34(5):832-838.

- [5] 王冰瑶,吴晓燕,樊官伟. 丹参素保护心血管系统的药理作用机制研究进展[J]. 中草药,2014,45(17):2571-2575.
- [6] 李向军,范文成,李奉勤,等. 丹参有效成分提取的研究[J]. 中国现代中药,2011,13(5):33-35.
- [7] LI X, DU J R, YU Y, et al. Tanshinone II A inhibits smooth muscle proliferation and intimal hyperplasia in the rat carotid balloon-injured model through inhibition of MAPK signaling pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2010, 129(2):273-279.
- [8] HO J H, HONG C Y. Salvianolic acids: small compounds with multiple mechanisms for cardiovascular protection[J]. J Biomed Sci, 2011, 18:30.
- [9] 李春红,陈岑,夏之宁,等. 植物源活性蛋白的药理作用及分析方法研究进展[J]. 中国中药杂志,2015,40(13):2508-2517.
- [10] 杨瑾,杨照华. 中草药治疗心血管疾病进展研究[J]. 内蒙古中医药,2013,34(51):120-121.
- [11] 赵志芳. 丹参对心血管疾病治疗的研究进展[J]. 海峡药学,2016,28(5):41-44.
- [12] STABILE E, ZHOU Y F, SAJI M, et al. Akt controls vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo by delaying G1/S exit[J]. Circ Res, 2003, 93(11):1059-1065.
- [13] WANG A B, LI H L, ZHANG R, et al. A20 attenuates vascular smooth muscle cell proliferation and migration through blocking PI3k/Akt signaling in vitro and in vivo[J]. J Biomed Sci, 2007, 14:357-371.
- [14] YU S, CHEN Y, CHEN S, et al. Klotho inhibits proliferation and migration of angiotensin II-induced vascular smooth muscle cells (VSMCs) by modulating NF- κ B p65, Akt, and extracellular signal regulated kinase (ERK) signaling activities[J]. Med Sci Monit, 2018, 24:4851-4860.
- [15] FANG H, YANG S, LUO Y, et al. Notoginsenoside R1 inhibits vascular smooth muscle cell proliferation, migration and neointimal hyperplasia through PI3K/Akt signaling[J]. Sci Rep, 2018, 8(1):7595.
- [16] 阎卉芳,徐昊,彭熙炜,等. 黄芪和当归配伍对大鼠血管内膜增生血管平滑肌细胞增殖的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学,2018,23(4):361-369.
- [17] 张东雪,张胜雷,张璐,等. SET8-shRNA 抑制血管平滑肌细胞增殖和迁移[J]. 中国动脉硬化杂志,2018,26(2):152-156.
- [18] 常遵辉,朱岑,陈璟,等. 高糖促进大鼠血管平滑肌细胞 A7r5 增殖及相关基因表达[J]. 宁夏医科大学学报,2016,38(2):154-158.
- [19] 王鼎,宋兵,钟旋,等. 植物凝集素刺激外周血单个核细胞增殖及分泌因子表达的变化[J]. 中国组织工程研究,2014,18(23):3707-3714.
- [20] 谈浩琪,张楚楚,屈雪,等. 植物凝集素在生物医用领域中的应用[J]. 高分子通报,2016,29(5):91-102.