

- SIGIRR to inhibit NF- κ B signaling pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37(4): 1257-1270.
- [14] Bowie A G, Haga I R. The role of Toll-like receptors in the host response to viruses [J]. *Mol Immunol*, 2005, 42(8): 859-867.
- [15] 尚立芝, 季书, 王国强, 等. 二陈汤加味对慢性阻塞性肺疾病大鼠 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(23): 65-72.
- [16] Liu L, Gu H L, Liu H M, et al. Protective effect of resveratrol against IL-1 β -induced inflammatory response on human osteoarthritic chondrocytes partly via the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway: an "in vitro study" [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(4): 6925-6940.
- [17] 周岐鸣, 张一凡, 郑培永, 等. 清肠栓脐贴调控 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路减轻小鼠溃疡性结肠炎[J]. 上海中医药大学学报, 2019, 33(3): 68-74.

白藜芦醇对 PM2.5 诱导的血管平滑肌细胞增殖与迁移的影响

吴玉莲¹, 李昕倡¹, 李明², 孙雪¹, 罗雨渊², 赵佳仪², 李岩^{1*}

(1. 广州中医药大学基础医学院, 广东广州 510006; 2. 广东药科大学生命科学与生物制药学院, 广东广州 510006)

摘要: **目的** 研究白藜芦醇对 PM2.5 诱导的血管平滑肌细胞增殖与迁移的影响。**方法** 体外培养人血管平滑肌细胞, 分为对照组、PM2.5 组 (12.5 μ g/mL)、白藜芦醇组 (5、10、20 μ mol/L), 采用 CCK8 法、EdU 法检测细胞增殖情况, 划痕实验、Transwell 实验检测细胞迁移能力, Western blot 法检测 p38 MAPK、JNK 蛋白磷酸化表达。**结果** 白藜芦醇干预后, 血管平滑肌细胞增殖率和 EdU 阳性细胞比例均降低, 血管平滑肌细胞划痕愈合率和穿膜细胞数减少, p38 MAPK、JNK 蛋白磷酸化表达降低 ($P < 0.05$)。**结论** 白藜芦醇可通过降低 p38 MAPK 和 JNK 蛋白磷酸化表达来抑制 PM2.5 诱导的血管平滑肌细胞增殖和迁移, 有望作为防治 PM2.5 心血管毒性的有效手段。

关键词: 白藜芦醇; 血管平滑肌细胞; 增殖; 迁移; PM2.5; p38 MAPK; JNK

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)07-2304-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.07.043

动脉粥样硬化是严重影响健康的常见疾病, 血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 在其中扮演着重要角色, 衣原体、氧化低密度脂蛋白等通过丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、PI3K/Akt、NF- κ B 等信号通路, 促使中膜 VSMCs 增殖、肥大, 最终导致病情发生^[1-2]。研究表明, 抑制 VSMCs 增殖和迁移可有效减缓动脉粥样硬化斑块形成, 这不仅证实了它在动脉粥样硬化发生发展中的重要作用, 也为相关治疗提供了靶点^[3-4]。目前发现, 益气固本汤、白藜芦醇、红景天等多种中药复方或单体都具有抗 VSMCs 增殖和迁移作用^[5-7]。

PM2.5 作为新发现的动脉粥样硬化致病因素, 它与该病发生发展的关系已经得到确认^[8]。课题组前期发现 PM2.5 不仅可引起血管内皮细胞凋亡, 还能促进 VSMCs 的

增殖和迁移, 并且 MAPKs 家族中的 p38 MAPK 和 JNK 参与该过程^[9-10], 但中药对 PM2.5 诱导的 VSMCs 增殖和迁移的影响尚不明确。因此, 本实验建立 PM2.5 染毒的 VSMCs 模型, 采用白藜芦醇进行干预, 观察该成分对 VSMCs 增殖和迁移的影响, 并探讨其作用机制, 以期寻找防治 PM2.5 心血管毒性的新方法。

1 材料

1.1 细胞株 VSMCs 购自深圳市豪地华拓生物科技有限公司, 用含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基于 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养, 取对数生长期细胞进行实验。

1.2 试剂 白藜芦醇 (纯度 $\geq 99\%$, 货号 R5010-100MG, 美国 Sigma-Aldrich 公司), 参考 Gueguen 等^[11]报道的方法, 用 DMSO 配制成 40 mmol/L 贮存液, 置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中避光保存, 实验时取适量加入完全培养基中稀释至所需浓液

收稿日期: 2021-03-07

基金项目: 广东省科技计划项目 (2017A020215140, 2017A020215145)

作者简介: 吴玉莲 (1990—), 女, 硕士生, 从事心血管方向的中西医结合基础研究。Tel: 13317569289, E-mail: 1123586393@qq.com

* **通信作者:** 李岩 (1977—), 女, 副教授, 从事心血管方向的中西医结合基础研究。Tel: (020) 39358007, E-mail: Liy506@gzucm.edu.cn

网络出版日期: 2021-08-18

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20210818.1045.002.html>

度。PM2.5 (货号 SRM1649b, 美国 Sigma-Aldrich 公司), 用培养基配制为 50 mg/mL 贮存液, 置于 -20 °C 冰箱中保存, 实验时先混匀, 再取适量加入完全培养基中稀释至所需终浓度。CCK-8 试剂盒 (货号 JE603) 购自日本同仁化学研究所; MAPK 抗体 (货号 A10832)、Phospho-p38 MAPK 抗体 (货号 AP0297)、JNK 抗体 (货号 9258T)、Phospho-JNK 抗体 (货号 4668S)、GAPDH 抗体 (货号 AC033)、HRP 标记的二抗均购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; RIPA 细胞裂解液 (货号 P0013B)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (货号 P0012S)、ECL 显色试剂盒 (货号 P0018S) 均购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 仪器 MCO-175 型 CO₂ 培养箱 (日本 Sanyo 公司); H1850R 型高速冷冻离心机 (湖南长沙湘仪检测设备有限公司); 680 型酶标仪、1645050 型电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); Tanon 5200 型全自动化学发光图像分析系统 (上海天能科技有限公司); MS800 共聚焦显微镜 (日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 分组及给药 将细胞随机分为对照组、PM2.5 组、白藜芦醇组, 其中 PM2.5 组根据课题组前期报道, 终质量浓度采用 12.5 μg/mL PM2.5 染毒^[9]; 白藜芦醇组先用不同终浓度 (5、10、20 μmol/L) 白藜芦醇预处理 24 h, 再用 12.5 μg/mL PM2.5 染毒; 对照组、PM2.5 组培养基中分别含有与白藜芦醇组 (20 μmol/L) 相同浓度的 DMSO, 以排除溶剂可能造成的影响。根据检测要求, 在染毒后不同时间收集样品进行后续操作。

2.2 CCK-8 法检测 VSMCs 增殖率 取 100 μL 细胞悬液 (含 5×10³ 个细胞) 接种于 96 孔板内, 按“2.1”项下方法分组及给药, 每组 6 个复孔, 另设空白孔调零。培养 24 h 后, 每孔加入 CCK-8 溶液 100 μL, 孵育 4 h 后用酶标仪在 450 nm 波长处测定光密度 (OD) 值, 计算细胞增殖率。

2.3 EdU 法检测 VSMCs 增殖能力 取 1 mL 细胞悬液 (含 1×10⁵ 个细胞) 接种于 24 孔板内预置的载玻片上, 待细胞贴壁后按“2.1”项下方法分组及给药, 每组 3 个复孔, 培养 24 h 后, 更换为含 50 μmol/L EdU 的培养基继续孵育 3 h, 再按说明书进行固定和染色, 最后用 Hoechst 33342 标记细胞。在共聚焦显微镜下随机选取 5 个视野进行采样, 计算 EdU 染色阳性细胞率。

2.4 划痕实验观察 VSMCs 迁移能力 取 1 mL 细胞悬液 (含 5×10⁵ 个细胞) 接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后用 100 μL 枪头垂直在培养板中划线, PBS 清洗脱落的细胞, 按“2.1”项下方法分组及给药, 每组 3 个复孔。于染毒 0、24 h 对细胞进行观察并拍照, 测量划痕面积, 计算划痕愈合率。

2.5 Transwell 法检测 VSMCs 迁移能力 取 200 μL 细胞悬液 (含 1×10⁴ 个细胞) 加入 Transwell 小室上室, 下室加入含 15% FBS 的 DMEM 培养基 500 μL, 按“2.1”项下方法分组

及给药, 每组 3 个复孔, 培养 24 h 后取出上室, PBS 清洗 3 次, 多聚甲醛固定 20 min, 风干后用 0.1% 结晶紫染色 30 min。在显微镜下随机选取 5 个视野拍照计数穿膜细胞数, 以实验组与对照组穿膜细胞数的比值代表细胞迁移能力。

2.6 Western blot 法检测 p38 MAPK 和 JNK 蛋白磷酸化表达 取 1 mL 细胞悬液 (含 5×10⁵ 个细胞) 接种于 6 孔板内, 贴壁后按“2.1”项下方法分组及给药, 每组 3 个复孔。根据课题组前期结果, 在染毒 20 min 后收集细胞, RIPA 裂解液提取蛋白, BCA 法测定蛋白浓度^[9]。取 15 μg 变性蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 常规转膜, BSA 封闭, 一抗 (1:1 000) 4 °C 孵育过夜后 TBST 洗涤 3 次, 再用二抗 (1:5 000) 孵育 2 h, 最后加入 ECL 发光液曝光、拍照。采用 Image J 软件对结果进行灰度值分析, 计算磷酸化蛋白与总蛋白的比值。

2.7 统计学分析 通过 SPSS 23.0 软件进行处理, 结果以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 2 组间比较采用 *t* 检验。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 白藜芦醇对 PM2.5 诱导的 VSMCs 细胞增殖的影响 图 1A 显示, 与对照组比较, PM2.5 组可促进 VSMCs 增殖 (P<0.05); 与 PM2.5 组比较, 不同浓度白藜芦醇组均可抑制 PM2.5 诱导的 VSMCs 增殖 (P<0.05)。图 1B~1C 显示, 与 PM2.5 组比较, 白藜芦醇组 EdU 染色阳性细胞数目减少, 比例降低 (P<0.05), 白藜芦醇浓度为 20 μmol/L 时抑制效果最强。

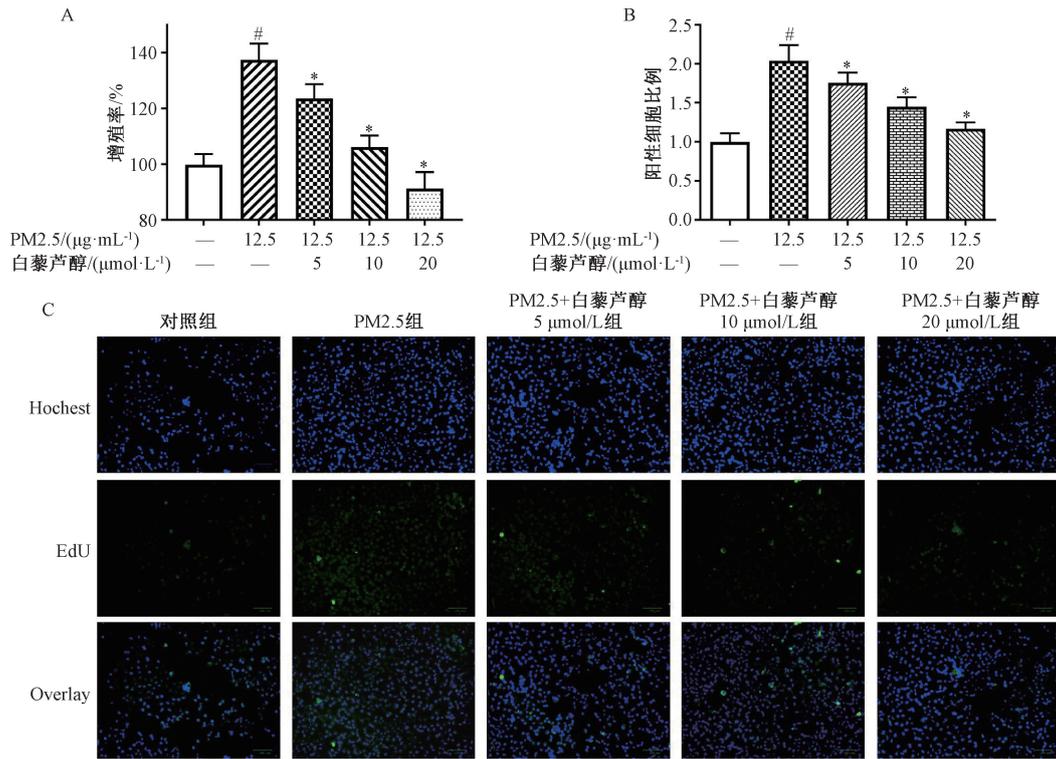
3.2 白藜芦醇对 PM2.5 诱导的 VSMCs 细胞迁移的影响 图 2A 显示, 与对照组比较, PM2.5 组细胞划痕愈合率升高 (P<0.05); 与 PM2.5 组比较, 白藜芦醇组细胞划痕愈合率降低 (P<0.05)。图 2B 显示, 与对照组比较, PM2.5 组穿膜细胞数增加 (P<0.05); 与 PM2.5 组比较, 白藜芦醇组穿膜细胞数减少 (P<0.05)。

3.3 白藜芦醇对 PM2.5 诱导的 VSMCs 细胞 p38 MAPK、JNK 蛋白磷酸化表达的影响 图 3 显示, 与对照组比较, PM2.5 组细胞 p38 MAPK、JNK 蛋白磷酸化表达升高 (P<0.05); 与 PM2.5 组比较, 白藜芦醇组细胞 p38 MAPK、JNK 蛋白磷酸化表达降低 (P<0.05)。

4 讨论

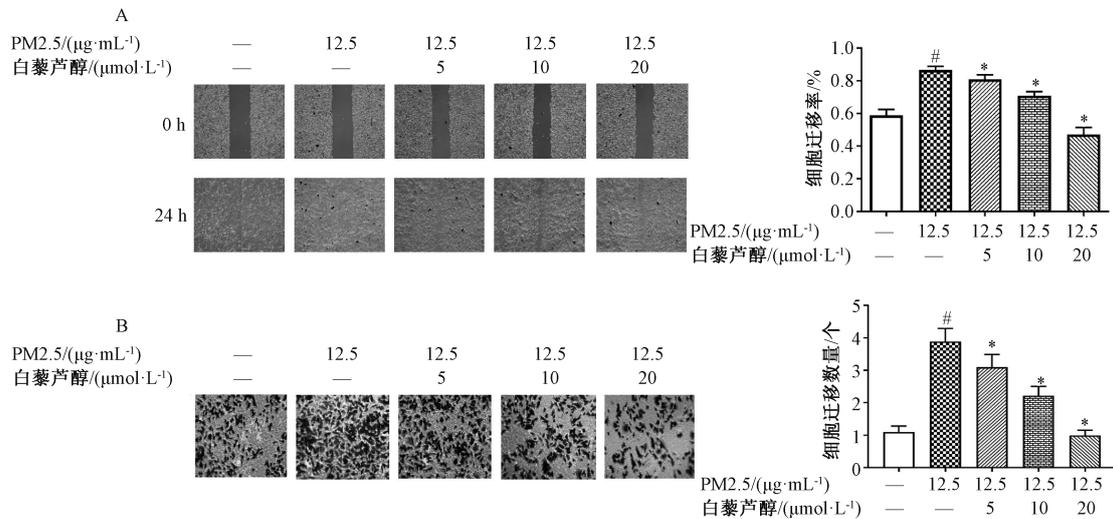
VSMCs 主要存在于血管壁中膜, 生理状态下其增殖和凋亡处于动态平衡, 病理情况下其发生增殖、肥大并向内皮下迁移, 同时分泌细胞外基质, 参与动脉粥样硬化斑块形成^[1]。在动脉粥样硬化斑块内 VSMCs 来源的细胞占 70% 左右, 因此 VSMCs 的增殖和迁移在动脉粥样硬化发病中占重要地位^[12]。多种动脉粥样硬化致病因子均可影响 VSMCs, 本实验室和其他研究者都证实大气污染物中的 PM2.5 致动脉粥样硬化作用也与影响 VSMCs 的增殖和迁移有关, 并认为 p38 MAPK 和 JNK 途径参加介导了该过程^[9-10, 13]。

中药具有多靶点、多层次等优势, 在干预 VSMCs 方面具有独特的优势, 多种中药复方或有效成分被证实具有抗



注：与对照组比较，[#] $P < 0.05$ ；与PM2.5组比较，^{*} $P < 0.05$ 。

图1 白藜芦醇对PM2.5诱导的VSMCs细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



注：与对照组比较，[#] $P < 0.05$ ；与PM2.5组比较，^{*} $P < 0.05$ 。

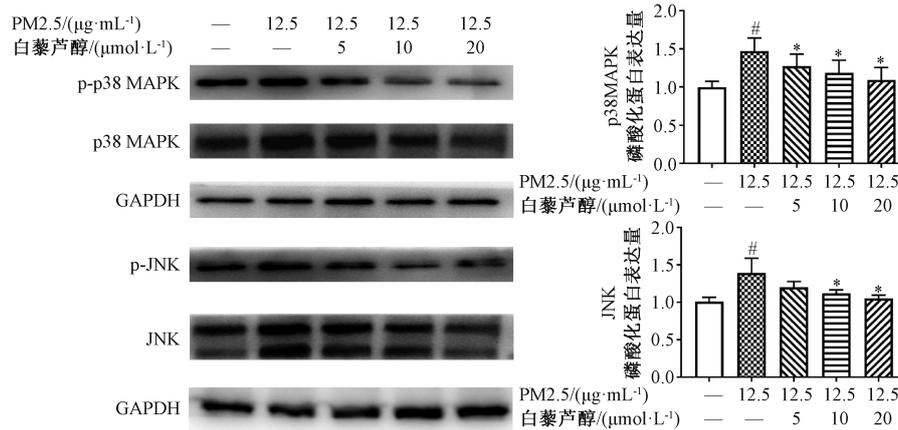
图2 白藜芦醇对PM2.5诱导的VSMCs细胞迁移的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

VSMCs增殖和迁移作用^[14-15]。研究显示白藜芦醇可通过影响氧化应激、炎症反应等多种途径，抑制Ox-LDL、血管紧张素II等动脉粥样硬化致病因子诱导的VSMCs细胞增殖和迁移^[7,15-17]。然而白藜芦醇对PM2.5染毒VSMCs细胞的影响并不清楚。本研究结果显示，白藜芦醇干预后VSMCs细胞增殖能力、细胞迁移能力均下降，表明白藜芦醇可抑制PM2.5诱导的VSMCs细胞增殖和迁移。

p38 MAPK和JNK均属于MAPKs家族成员，是多种细胞增殖、分化、凋亡的重要调节通路^[18-19]。以往研究发

现，PM2.5染毒会使VSMCs细胞的p38 MAPK和JNK蛋白磷酸化表达升高，并且相应的抑制剂可以抑制VSMCs细胞增殖和迁移，证明p38 MAPK和JNK参与介导PM2.5对VSMCs的毒性^[9]。本研究结果显示，白藜芦醇干预后细胞p38 MAPK和JNK蛋白磷酸化表达降低，提示白藜芦醇的作用效果与抑制二者磷酸化表达有关。其他研究者发现大蒜素、川穹嗪等中药有效成分也可以通过影响p38 MAPK等MAPKs家族蛋白来抑制PM2.5引起的VSMCs增殖^[10]。

综上所述，白藜芦醇可能通过降低p38 MAPK和JNK



注：与对照组比较，[#] $P < 0.05$ ；与 PM2.5 组比较，^{*} $P < 0.05$ 。

图3 白藜芦醇对 PM2.5 诱导的 VSMCs 细胞 p38 MAPK、JNK 蛋白磷酸化表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

磷酸化表达来抑制 PM2.5 诱导的血管平滑肌细胞增殖和迁移，有望为进一步利用白藜芦醇防治 PM2.5 诱导的心血管毒性提供了实验基础。

参考文献：

[1] Basatemur G L, Jørgensen H F, Clarke M C H, et al. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2019, 16(12): 727-744.

[2] Kyotani Y, Takasawa S, Yoshizumi M. Proliferative pathways of vascular smooth muscle cells in response to intermittent hypoxia [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(11): 2706.

[3] Jiang D H, Yang Y, Li D Y. Lipopolysaccharide induced vascular smooth muscle cells proliferation: a new potential therapeutic target for proliferative vascular diseases [J]. *Cell Prolif*, 2017, 50(2): e12332.

[4] Harman J L, Jørgensen H F. The role of smooth muscle cells in plaque stability: therapeutic targeting potential [J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176(19): 3741-3753.

[5] Kong Y B, Ding L Z, Xu Y, et al. Yiqi Guben formula inhibits PDGF-BB-induced proliferation and migration of airway smooth muscle cells [J]. *Pharmacology*, 2020, 105(7-8): 424-433.

[6] Fan Z Y, Guo C C, Zhang Y H, et al. Hongjingtian injection inhibits proliferation and migration and promotes apoptosis in high glucose-induced vascular smooth muscle cells [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 4115-4126.

[7] 何丽因, 兰钰茹, 贺光明, 等. 白藜芦醇通过调控 HIF-1 α /NOX4/ROS 通路抑制低氧诱导的大鼠肺动脉平滑肌细胞氧化应激与增殖 [J]. *生理学报*, 2020, 72(5): 551-558.

[8] An Z, Jin Y F, Li J, et al. Impact of particulate air pollution on cardiovascular health [J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2018, 18(3): 15.

[9] 李昕倡, 吴玉莲, 吴彤, 等. PM2.5 通过 p38 MAPK 信号通路影响血管平滑肌细胞增殖和迁移 [J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36(5): 810-815.

[10] Wan Q, Liu Z Y, Yang Y Q. Puerarin inhibits vascular

smooth muscle cells proliferation induced by fine particulate matter via suppressing of the p38 MAPK signaling pathway [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2018, 18(1): 146.

[11] Gueguen N, Desquiere-Dumas V, Leman G, et al. Resveratrol directly binds to mitochondrial complex I and increases oxidative stress in brain mitochondria of aged mice [J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0144290.

[12] Bentzon J F, Majesky M W. Lineage tracking of origin and fate of smooth muscle cells in atherosclerosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114(4): 492-500.

[13] Geng J, Liu H Y, Ge P B, et al. PM2.5 promotes plaque vulnerability at different stages of atherosclerosis and the formation of foam cells via TLR4/MyD88/NF κ B pathway [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 176: 76-84.

[14] 王彬, 周欢. 中药抑制血管平滑肌增殖和迁移的作用机制研究概况 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2020, 18(15): 2454-2456.

[15] Kim E N, Kim M Y, Lim J H, et al. The protective effect of resveratrol on vascular aging by modulation of the renin-angiotensin system [J]. *Atherosclerosis*, 2018, 270: 123-131.

[16] Uhrin P, Wang D D, Mocan A, et al. Vascular smooth muscle cell proliferation as a therapeutic target. Part 2: natural products inhibiting proliferation [J]. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(6): 1608-1621.

[17] Breuss J M, Atanasov A G, Uhrin P. Resveratrol and its effects on the vascular system [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(7): 1523.

[18] Chen Z, Cai Y, Zhang W L, et al. Astragaloside IV inhibits platelet-derived growth factor-BB-stimulated proliferation and migration of vascular smooth muscle cells via the inhibition of p38 MAPK signaling [J]. *Exp Ther Med*, 2014, 8(4): 1253-1258.

[19] Chen J T, Shi S, Cai X N, et al. DR1 activation reduces the proliferation of vascular smooth muscle cells by JNK/c-Jun dependent increasing of Prx3 [J]. *Mol Cell Biochem*, 2018, 440(1-2): 157-165.