

酸化环境对血管平滑肌细胞(VSMC)增殖的影响及姜黄素对此的作用

邱 韵, 李家富, 冯 健, 钟 毅*

西南医科大学附属医院, 泸州 646000

摘要:探讨姜黄素对缺血缺氧引起细胞外环境酸化下血管平滑肌增殖的影响及可能机制。在 pH 6.9 的环境下体外培养大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞(VSMC), 分别以姜黄素、PCTX-1 等处理细胞, 并设置空白对照组; 采用 Western-Blot 法测定 ASICS 1a 蛋白及磷酸化 ERK1/2 蛋白表达, CCK-8 法测定各处理组对 VSMC 增殖影响。结果显示 pH 6.9 组显著刺激 VSMC 的 ASICS 1a 和 ERK1/2 磷酸化表达, 并促使 VSMC 增殖; 而姜黄素显著抑制大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞上 ASICS 1a 及细胞内磷酸化 ERK1/2 蛋白表达, 从而抑制 VSMC 增殖。在缺血缺氧所致酸化环境下, 大鼠胸主动脉血管平滑肌上的 ASIC 1a 表达增多, 引起细胞内 ERK1/2 磷酸化, 从而对血管平滑肌的增殖进行调控, 而姜黄素则表现出抑制作用。

关键词:姜黄素; 血管平滑肌细胞; 细胞增殖; 酸敏感离子通道 1a; ERK1/2

中图分类号: R541.4

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.2.005

Effect of Acidification Environment on Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells and the Influence of Curcumin on It

QIU Yun, LI Jia-fu, FENG Jian, ZHONG Yi*

Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

Abstract: To explore the effect and possible mechanism of curcumin on proliferation of vascular smooth muscle in the acidification environmental caused by ischemic hypoxia. The rats' thoracic aorta VSMC cells were cultured *in vitro* in pH 6.9, treated with curcumin and PCTX-1 respectively, and the blank control group was set. The expression of ASICS 1a protein and phosphorylation ERK1/2 protein was measured by Western-Blot assay, the effect of each treatment group on the proliferation of VSMC was measured by CCK-8 method. The results showed that the pH 6.9 group can significantly stimulate the expression of ASICS 1a and phosphorylation of ERK1/2 in VSMC and promote the proliferation of VSMC. However, curcumin can significantly inhibit the expression of ASICS 1a and intracellular phosphorylation of ERK1/2 protein in the vascular smooth muscle cells of rats' thoracic aorta, thereby inhibiting the proliferation of VSMC. In the acidification environment caused by ischemia hypoxia, the expression of ASICS 1a protein on rats' thoracic aortic vascular smooth muscle increased, caused ERK1/2 phosphorylation in cells, managed the proliferation of vascular smooth muscle, while curcumin showed the inhibitory effect.

Key words: curcumin; vascular smooth muscle cells; cell proliferation; acid-sensing ion channel 1a; extracellular signal-regulated kinase 1/2

维持体内 pH 值的稳定是维持机体内环境稳态 (Homeostasis) 的重要标志之一。在病理条件下 (如缺血、缺氧等), 局部细胞糖酵解增加, 产生的乳酸等酸性物质增多, 引起局部 pH 值降低、细胞外环境酸化, 从而影响内环境稳态^[1]。已有研究发现, 急

性哮喘患者支气管渗出液 pH 值、肿瘤微环境、类风湿关节炎中 pH 值皆显著降低, 甚至可降至 $5.0^{[2]}$ 。局部 pH 值的改变可引起细胞的功能发生改变。在心血管领域, 心肌缺血缺氧时, 细胞外环境酸性物质增多, 病灶局部 H^+ 浓度升高。在心肌缺血、梗死最早的阶段内 pH 变化的范围为 $6.7 \sim 7.1^{[3,20]}$, 在这种微环境下心肌细胞、血管平滑肌细胞等细胞的功能将发生改变。

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell,

收稿日期: 2017-09-18 接受日期: 2017-10-30

基金项目: 国家自然科学基金 (31300946); 泸州市-泸州医学院合作科技项目 (2013LZLY-J53)

* 通信作者 E-mail: zhongyi1982529@163.com

VSMC),在病理因素刺激下,血管平滑肌细胞获得较强的增殖和迁移能力,而此即是高血压、动脉粥样硬化、血管成形术后再狭窄等心血管疾病的病理生理学基础^[6-8]。

ASICs 是一类由胞外酸化后被酸(H⁺)激活的阳离子通道,属 DEG/ENaC 家族中的一员。目前已发现 7 个 ASICs 亚基(ASIC 1a、ASIC 1b、ASIC2a、ASIC2b、ASIC3、ASIC4)。当细胞外 H⁺ 增多时,可以激活 ASICs,导致大量 Na⁺ 内流,细胞发生功能改变。而其中 ASIC 1a 是 ASICs 家族中唯一同时对 Na⁺ 和 Ca²⁺ 皆具有通透性的亚基,已有文献报道,同聚体酸敏感离子通道 1a 亚型(ASIC 1a)通道激活后对 Ca²⁺ 有较大的通透性,可引起细胞 Ca²⁺ 内流增多^[1,4,9]。而大量胞外的 Ca²⁺ 内流会通过激活 MAPK、PI3K/Akt 等信号通路对血管平滑肌细胞(VSMC)的增殖产生影响,但机制较多且复杂^[17,19]。

姜黄素(Curcumin),是一种相对分子质量小的多酚类物质,具有多种分子靶向作用。大量的研究证明,姜黄素具有对心血管系统、消化系统等多方面药理作用:如抗氧化、抗炎、抗癌、清除自由基抗微生物等。目前姜黄素主要应用于急慢性炎症中、自身免疫性疾病方面、抗肿瘤等领域,具有巨大的临床应用潜力^[14-16]。并且姜黄素的研究历史悠久,药理作用广泛。探究姜黄素对缺血缺氧下血管平滑肌增殖的作用及机制将为心血管疾病预防和治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验药物

实验所用姜黄素购自 Sigma 公司(纯度 > 98%),相对分子量为 368.38,化学名称:(E,E)-1,7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-庚二烯-3,5-二酮(图 1),为二酮类化合物。根据本课题组研究人员钟毅的实验结果显示:浓度波动于 0~40 μmol/L 的姜黄素对大鼠血管平滑肌细胞无毒性作用^[7,8];根据刘成的实验结果:高浓度(>30 μmol/L)的姜黄素对血管平滑肌细胞有促凋亡的作用,而低于此浓度未观察到对血管平滑肌细胞的促凋亡作用^[8]。故拟选取浓度为 20 μmol/L 的姜黄素来进行实验。称取 1.47 g 姜黄素粉末溶于 1 mL DMSO 中,配制成浓度为 4 mmol/L 的原液,-20 °C 保存,临用时用培养基稀释至所需浓度(20 μmol/L)。

1.2 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠,7~8 周,体重 180~220

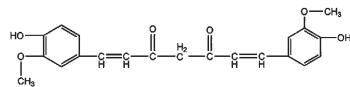


图 1 姜黄素的化学结构式

Fig. 1 Chemical structure of curcumin

g,由武汉阿斯本生物技术有限公司提供。许可证号 SCXK 2015-0018。

1.3 实验试剂

DMEM/F-12 培养基购自 HyClone,生产批号 SH30023;胎牛血清购自杭州天杭生物科技有限公司,生产批号 141215;ASICs 1α 抗体购自 Millipore 公司;PCTX-1(ASIC 1a 特异性抑制剂)购自 Alomone labs,生产批号 STP-200;PD98059(ERK1/2 阻断剂)购自 Selleck 公司,生产批号 S1177;姜黄素购自 Sigma 公司,生产批号 78246, Anti-Rat aSMA FITC 购自 Abcam 公司,生产批号 ab8211。CCK-8 检测试剂盒购自碧云天生物技术有限公司,生产批号 C0038。其他试剂均为国产分析纯。

1.4 实验仪器

CO₂ 恒温培养箱, SHEL LAB 公司。TSE400D 超低温冰箱、Multiskan GO 全波长酶标仪、Multifuge X3 台式超速离心机、Micro CL 冷冻离心机为美国 Thermo Fisher 公司产品;HH-4 型恒温水浴锅,江南仪器厂;sw-cj-2f 型超净工作台,苏州净化公司;倒置生物显微镜、TS100-F 倒置显微镜均为日本 Nikon 公司产品;DYCP-36 型电泳仪,北京六一仪器厂。FACSCalibur 型流式仪, BD 公司。

1.5 实验方法

1.5.1 VSMCs 的培养及鉴别

贴块法。选用 SPF 级雄性 SD 大鼠,7~8 周,体重 180~220 g,由武汉阿斯本生物技术有限公司提供。标准鼠食喂养,采用麻醉后断颈法处死大鼠,无菌条件下分离大鼠主动脉血管,用 Hanks 液冲洗 3 遍。剥去血管外膜,血管内膜用眼科弯镊钝性刮除,去除内皮细胞。待血管呈现板透明状,且具有韧性时,停止刮擦,此为血管中膜层。将中膜血管放入盛有含培养液的平皿中,剪碎成小的组织块,并均匀平铺在培养瓶内,加入含血清的 DMEM/F12,放入培养箱中以贴壁面向上静置 4~6 h。组织块浸在培养瓶中静置培养 5~7 d 即可见原代血管平滑肌细胞。使用流式细胞法、细胞抗 a-SMA 抗体进行鉴定:血管平滑肌细胞纯度为 98.6%,此时即传代。实验所用的血管平滑肌细胞均为第 4~6 代的细胞。

1.5.2 酸性环境下血管平滑肌细胞 ASCIS 1a 的表达量

取对数生长期、状态良好的 VSMCs 细胞,以 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 细胞浓度接种于 6 孔培养板,每孔 1 mL,每组 3 孔。设计分组: pH6.9 + 空白对照, pH6.9 + 姜黄素 (20 $\mu\text{mol/L}$), pH6.9 + PCTX1、pH6.9 + PCTX1 + 姜黄素 (20 $\mu\text{mol/L}$), pH7.4 + 空白对照共五组。待细胞约 80% 融合时,用 pH 6.9 酸性环境培养基刺激,同时加用不同干预药物处理,孵育 3 h,重新更换 pH7.4 培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养培养 48 h,然后 Western-Blot 法检测各组 ASICS 1a 蛋白表达。重复实验 3 次。

1.5.3 酸性环境下细胞内磷酸化 ERK1/2 蛋白的表达量

取对数生长期、状态良好的 VSMCs 细胞,常规消化后以完全培养基重悬,以 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 细胞浓度接种于 6 孔培养板,每孔 1 mL,每组 3 孔。设计分组:1. pH7.4 + 空白对照组;2. pH6.9 + 空白对照组;3. pH6.9 + 姜黄素;4. pH6.9 + PCTX1;5. pH6.9 + PD98059;6. pH6.9 + 姜黄素 + PD98059;7. pH6.9 + PCTX-1 + PD98059 共七组。重复实验 3 次。

1.5.4 CCK-8 法测定血管平滑肌细胞的增殖

将对数生长期 VSMC 细胞配制成浓度为 1×10^5 个/mL 的细胞悬液,按 10000 细胞/孔接种于 96 孔板,每孔加 100 μL ,置于 CO_2 (5%) 培养箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 24 h 以贴壁。设计分组:1. pH7.4 + 空白对照;2. pH6.9 + 空白对照;3. pH6.9 + 姜黄素 (20 $\mu\text{mol/L}$);4. pH6.9 + PCTX1;5. pH6.9 + PCTX1 + 姜黄素 (20 $\mu\text{mol/L}$);按上述分组处理细胞后继续培养 24h。每个浓度的样本设 3 个重复。

所有孔中加入 10 μL CCK-8 溶液,培养箱中孵

育 1~4 h。使用酶标仪测定 450 nm 光吸收值,以溶剂处理的细胞为对照组,不含细胞的培养基为空白组,按公式计算药物对细胞的增殖活力及相对增殖率。

细胞增殖活力 % = $(A(\text{加药}) - A(\text{空白})) / (A(0 \text{加药}) - A(\text{空白})) \times 100\%$

注:A(加药):具有细胞,CCK 溶液和药物溶液的吸光度;A(空白):具有培养基和 CCK 溶液而没有细胞的吸光度;A(0 加药):具有细胞、CCK 溶液而没有药物溶液的吸光度。

相对增殖率: $\text{OD}(\text{实验组}) / \text{OD}(\text{阴性对照组}) \times 100\%$

1.5.5 统计学方法

使用 SPSS 17.0、GraphPad Prism 5 软件进行统计分析和作图。计量资料均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用方差分析,处理组之间的比较采用 *SNK-q* 法检验、处理组与空白组比较采用 *Dunnnett-t* 法检验。以双侧检验、 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 姜黄素对酸化环境下血管平滑肌细胞 (VSMC) 表达 ASIC 1a 的影响

酸化环境下即 pH6.9 组 ASIC 1a 的表达量与 pH7.4 组比较显著增多 ($P < 0.05$, 差异具有统计学意义,图 2,表 1)。且在 pH6.9 的环境下 ASIC1a 通道特异性阻断剂 PCTX-1 组及浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素对 ASIC 1a 的表达皆有抑制作用,但 PCTX-1 组的抑制程度高于姜黄素, ($P < 0.05$, 差异具有统计学意义)。在 pH6.9 的酸化环境下姜黄素及 PCTX-1 共同作用的 ASIC 1a 表达量与 pH7.4 组的表达量相近 ($P > 0.05$, 差异无统计学意义)。

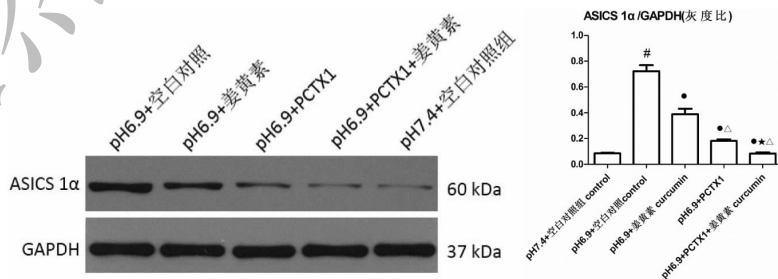


图 2 姜黄素对酸化环境下 VSMC 表达 ASIC 1a 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of curcumin on VSMC expression ASIC 1a in acidification environment ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与 pH7.4 + 空白对照组比较, $\#P < 0.05$; 与模型组比较, $\bullet P < 0.05$; 与姜黄素组比较, $\Delta P < 0.05$; 与 PCTX-1 组比较, $\star P < 0.05$;

Note: Compare with pH7.4 + control, $\#P < 0.05$; Compare with pH6.9 + control, $\bullet P < 0.05$; Compare with pH6.9 + Curmin, $\Delta P < 0.05$; Compare with pH6.9 + PCTX 1, $\star P < 0.05$

表 1 不同处理组的 Western-Blot 的 ASICS 1 α /GAPDH (灰度比) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 1 Western-blot ASICS 1 α /GAPDH (Grayscale Ratio) of different processing groups ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分组 Groups	ASICS 1 α /GAPDH (Gray Level Ratio)
pH6.9 + 空白对照 Control	0.721 \pm 0.084
pH6.9 + 姜黄素 Curcumin	0.423 \pm 0.016
pH6.9 + PCTX1	0.181 \pm 0.023
pH6.9 + PCTX1 + 姜黄素 Curcumin	0.083 \pm 0.017
pH7.4 + 空白对照组 Control	0.086 \pm 0.009

2.2 姜黄素 (20 $\mu\text{mol/L}$) 对酸化环境下细胞内磷酸化 ERK1/2 蛋白表达量的影响

采用 Western-Blot 法检测酸化环境 pH 6.9 下, 姜黄素及 AISC 1a 特异性抑制剂 PCTX-1 对 VSMC 细胞内的磷酸化 ERK1/2 表达量的影响。如图 3 所示: pH6.9 组 VSMC 细胞内磷酸化 ERK1/2 蛋白表达量较 pH7.4 组显著增加 ($P < 0.05$, 差异具有统计

学意义)。而与 pH6.9 组相比, 姜黄素组、PCTX-1 组及 ERK1/2 通路抑制剂 (PD98059) 组均显著抑制 VSMC 细胞磷酸化 ERK1/2 蛋白的表达, 且各组抑制程度不同 ($P < 0.05$, 差异有统计学意义)。姜黄素加 PD98059 组及 PCTX-1 加 PD98059 组对磷酸化 ERK1/2 的蛋白表现出更强的抑制作用, 且两组的抑制程度不同 ($P < 0.05$, 差异有统计学意义, 表 2)。

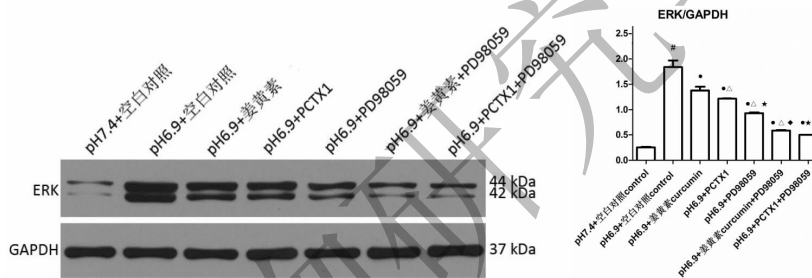
图 3 姜黄素对酸化环境下细胞内磷酸化 ERK1/2 蛋白表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of curcumin on the expression of intracellular phosphorylation ERK1/2 protein in acidic environment ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
注: 与 pH7.4 + 空白对照组比较, $\#P < 0.05$; 与模型组比较, $\bullet P < 0.05$; 与姜黄素组比较, $\Delta P < 0.05$; 与 PCTX 1 组比较, $\star P < 0.05$; 与 PD98059 组比较, $\blacklozenge P < 0.05$; 与姜黄素 + PD98059 组相比, $\ast P < 0.05$

Note: Compare with pH7.4 + control, $\#P < 0.05$; Compare with pH6.9 + control, $\bullet P < 0.05$; Compare with pH6.9 + Curmin, $\Delta P < 0.05$; Compare with pH6.9 + PCTX 1, $\star P < 0.05$; Compare with pH6.9 + PD98059, $\blacklozenge P < 0.05$; Compare with pH6.9 + curcumin + PD98059, $\ast P < 0.05$

表 2 不同处理组 Western-Blot 测定 ERK/GAPDH (灰度比) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 2 Determination of ERK/GAPDH in different treatment groups by Western-blot assay ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分组 Groups	ERK/GAPDH (Gray level ratio)
pH7.4 + 空白对照 Control	0.255 \pm 0.025
pH6.9 + 空白对照 Control	1.844 \pm 0.221
pH6.9 + 姜黄素 Curcumin	1.377 \pm 0.131
pH6.9 + PCTX1	1.215 \pm 0.014
pH6.9 + PD98059	0.927 \pm 0.033
pH6.9 + 姜黄素 Curcumin + PD98059	0.590 \pm 0.021
pH6.9 + PCTX1 + PD98059	0.503 \pm 0.002

2.3 姜黄素 (20 $\mu\text{mol/L}$) 对 VSMCs 增殖的影响

酸化环境下血管平滑肌 (VSMC) 的 OD 值较 pH7.4 组下降, 差异具有统计学意义, 考虑可能是细

胞内钙负荷增大后引起细胞损伤所致。余三组皆可见 OD 值明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 4~6)。增殖活力方面, pH6.9 组明显高于其他各

组,差异有统计学意义。姜黄素组与 PCTX-1 组相比,抑制程度较低,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。姜黄素与 PCTX-1 共同作用下,对细胞增殖抑制程度最大(表 3 ~ 5)。

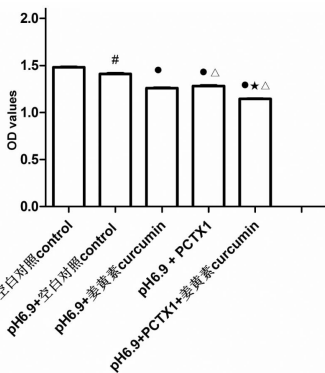


图 4 不同干预下 CCK-8 法测定各处理组的 OD 值

Fig. 4 OD values of each treatment group by CCK-8 under different intervention

注:与 pH7.4 + 空白对照组比较, # $P < 0.05$; 与 pH6.9 + 空白对照组比较, ● $P < 0.05$; 与姜黄素组比较, △ $P < 0.05$; 与 PCTX-1 组比较, * $P < 0.05$

Note: Compare with pH7.4 + control, # $P < 0.05$; Compare with pH6.9 + control, ● $P < 0.05$; Compare with pH6.9 + Curcumin, △ $P < 0.05$; Compare with pH6.9 + PCTX 1, * $P < 0.05$

表 3 不同处理组的 OD 值 ($M \pm S$) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 OD values for different treatment groups ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分组 Groups	OD 值 OD values
pH7.4 + 空白对照 Control	1.482 ± 0.004
pH6.9 + 空白对照 Control	1.411 ± 0.011
pH6.9 + 姜黄素 Curcumin	1.261 ± 0.008
pH6.9 + PCTX1	1.282 ± 0.012
pH6.9 + PCTX1 + 姜黄素 Curcumin	1.146 ± 0.005
空白 Control	0.063 ± 0.007

表 4 不同处理组增殖活力 ($M \pm S$) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Proliferative activity of different treatment groups ($M \pm S$) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分组 Groups	增殖活力 Proliferative Activity (%)
pH6.9 + 空白对照 Control	94.9 ± 1.16
pH6.9 + 姜黄素 Curcumin	84.4 ± 0.83
pH6.9 + PCTX1	85.9 ± 1.22
pH6.9 + PCTX1 + 姜黄素 Curcumin	76.2 ± 0.52

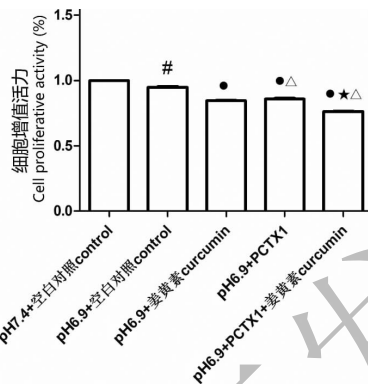


图 5 不同处理组的增殖活力 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 The proliferative activity of each treatment groups ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与模型组比较, ● $P < 0.05$; 与 pH6.9 + 姜黄素组比较, △ $P < 0.05$; 与 PCTX-1 组比较, * $P < 0.05$

Note: Compare with pH6.9 + control, ● $P < 0.05$; Compare with pH6.9 + Curcumin, △ $P < 0.05$; Compare with pH6.9 + PCTX 1, * $P < 0.05$

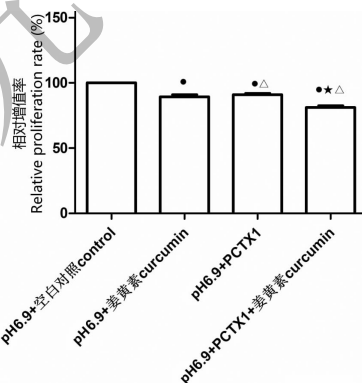


图 6 不同处理组的相对增值率 ($M \pm S$) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Relative increment rate of different treatment groups ($M \pm S$) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与模型组比较, ● $P < 0.05$; 与姜黄素组比较, △ $P < 0.05$; 与 PCTX-1 组比较, * $P < 0.05$

Note: Compare with pH7.4 + control, # $P < 0.05$; Compare with pH6.9 + control, ● $P < 0.05$; Compare with pH6.9 + Curcumin, △ $P < 0.05$; Compare with pH6.9 + PCTX 1, * $P < 0.05$

表 5 不同处理组的相对增值率 ($M \pm S$) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Relative increment rate of different treatment groups ($M \pm S$) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分组 Groups	相对增值率 Relative Multiplication Rate (%)
pH6.9 + 空白对照 Control	100.000 ± 0.000
pH6.9 + 姜黄素 Curcumin	89.367 ± 2.721
pH6.9 + PCTX1	90.933 ± 1.645
pH6.9 + PCTX1 + 姜黄素 Curcumin	81.233 ± 2.246

3 讨论与结论

在心肌缺血的早期阶段,局部 H^+ 浓度升高,pH 下降,导致细胞微环境改变,诱发细胞功能发生改变^[3,20],而血管平滑肌细胞的增殖与迁移对于冠状动脉粥样硬化、血管成形术后再狭窄等心血管疾病病理生理改变起着极其重要的作用。

近年来研究者们对 ASICs 研究越来越多,其研究领域不仅在神经系统中对疼痛、感觉、味觉等起调节作用,还在非神经系统如肿瘤、炎症、缺血性损伤等领域中有着重要的作用,其中共同的特点是局部组织环境酸化、pH 值下降,进而引起 ASICs 激活,激活的 ASICs 引起胞外 Na^+ 、 Ca^{2+} 等阳离子内流入胞内,通过一系列反应,将信号传递到胞内及核内,从而产生各种病理生理效应。而研究 ASICs 在心血管领域尤其是微环境酸化下对血管病变的作用及机制将进一步拓宽临床思路及相关药物的开发研制。根据 Grifoni SC^[18,24] 的研究结果已经证实大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞上存在并表达 ASICs 家族,并且对大鼠的胸主动脉血管平滑肌细胞的迁移存在影响。但他们并未对血管平滑肌细胞的增殖进行研究,故本实验着重 ASICs 对血管平滑肌细胞的增殖进行探究以及姜黄素对此的作用及可能机制。

根据 Waldmann R, Champigny G 等的研究证实,当 ASIC 1a 激活后会致 Ca^{2+} 大量内流,胞内钙信号活动增强^[9,10]。当胞内 Ca^{2+} 持续升高时,钙离子作为第二信使,可以激活对 Ca^{2+} 依赖的下游丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 信号通路,从而进而激活 NF-AT、NF- κ B 或位于核内的 CREB 等转录因子,细胞进入增殖周期开始增殖,产生生物反应。MAPK 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族成员,目前已发现三种 MAPK 亚族,分别为细胞外信号调节激酶 (extracellular signal regulated protein kinase, ERK1/2)、p38 MAPK、c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun amino-terminal kinase, JNK),而三者的调控作用彼此存在差异。ERK 是其中序列高度保守的进化蛋白,能被胞外 Ca^{2+} 内流激活,对细胞的增殖、分化、迁移、凋亡都起着重要作用。而 Lee GL 等人证实 ERK1/2 通道的激活会促进血管平滑肌细胞的增殖及迁移^[19]。ERK1/2 路径是 MAPK 信号通路中中介细胞增殖效应中最重要的途径。故探究酸化环境下激活的 ASIC 1a 的表达量与胞内磷酸化 ERK1/2 蛋白表达量的关系可以间接证

实两者是否存在联系。

姜黄素已经被证实具有多种药理作用,尤为重要的是其具有显著的心血管保护活性^[15]。近年来流行病学调查显示姜黄的摄入量与动脉粥样硬化 (AS) 的发病呈负相关^[5]。故探究姜黄素对酸化环境下血管平滑肌细胞的增殖是否有抑制作用,以及对于近年来愈发被重视的 ASICs 通道是否具有调节作用以及可能机制,为本实验的创新之处。

本实验发现,当模拟缺血缺氧的细胞外环境 pH6.9 时,采用 WB 法测定大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞上 ASIC 1a 的表达量,与正常细胞外环境 pH7.4 组相比,ASIC 1a 表达显著增加。而 ASIC 1a 通道特异性抑制剂 PCTX-1 组可见 ASIC 1a 蛋白表达量明显减少。浓度为 20 μ mol/L 的姜黄素组对 ASIC 1a 的表达也显著减少,与 PCTX-1 组的抑制程度相比较小,且差异有统计学意义。在酸化环境下姜黄素 (20 μ mol/L) 和 PCTX-1 共同孵育组,ASIC 1a 的表达程度明显被抑制,与空白对照组 (pH7.4) 相比, $P > 0.05$,无统计学差异。实验结果提示,姜黄素可以抑制酸化环境下 ASIC 1a 的表达,其抑制程度与 ASIC 1a 特异性抑制剂 PCTX-1 相比具有差异,且有统计学意义。姜黄素和 PCTX-1 共同作用下,ASIC 1a 的表达量被抑制接近 pH7.4 组,且两者无统计学意义。考虑原因可能为姜黄素对 ASIC 1a 的特异性抑制作用较弱,对 ASICs 家族其他成员皆有一定的抑制作用,从而通过某种机制影响 ASIC 1a 的表达,需进一步研究。

本实验通过 WB 法测量酸化环境下大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞 (VSMC) 的 ERK1/2 的表达量,结果提示细胞外 pH6.9 时细胞内磷酸化 ERK1/2 表达量显著升高,且 ASIC 1a 特异性抑制剂 PCTX-1 对酸化环境下磷酸化 ERK1/2 的表达量有明显的抑制作用。同时,姜黄素也有同样显著的抑制作用,抑制程度较 PCTX-1 组弱,差异具有统计学意义。姜黄素组及 PCTX-1 组对磷酸化 ERK1/2 的表达量的抑制程度差异与两组对 ASIC 1a 抑制程度差异一致。而 ERK1/2 阻断剂 PD98059 可以从下游阻断 ERK1/2 磷酸化,从而抑制使磷酸化 ERK1/2 表达量减少,并且分别与姜黄素、PCTX-1 共同作用,磷酸化 ERK1/2 的表达量进一步被抑制。而当用 PCTX-1 或者姜黄素阻断 ASIC 1a 的表达时,细胞内磷酸化 ERK 1/2 的量明显减少。而使用阻断 ERK 磷酸化的试剂 PD98059 则抑制磷酸化 ERK1/2 蛋白表达,抑制程

度高于姜黄素及 PCTX-1 组,差异具有统计学意义。而将 PD98059 分别与姜黄素、PCTX-1 共同孵育,细胞内磷酸化 ERK1/2 表达进一步减少。结果提示 ASIC 1a 激活增加大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞磷酸化 ERK1/2 蛋白表达;由此推断胞外酸化激活 ASIC 1a,而 ASIC 1a 的开放引起胞外离子,主要是 Ca^{2+} 的内流,引起 Ca^{2+} 依赖的 ERK 激活,从而对 VSMC 的功能进行调节,而在信号通路中 ASIC 1a 扮演发起者的角色。

本实验通过 CCK-8 法对平滑肌细胞增殖活性进行探究。结果显示与 pH7.4 组相比,pH6.9 组的 OD 值有所下降,考虑原因可能为在酸化环境下 ASIC 1a 的激活导致细胞外 Ca^{2+} 的内流导致细胞损伤甚至死亡。而在增殖活力及相对增殖率方面,pH6.9 组 VSMC 呈增殖趋势,而 PCTX-1 及姜黄素可以抑制血管平滑肌细胞增殖,且抑制程度不同,差异具有统计学意义。并且在 PCTX-1 与姜黄素共育组,抑制程度更大。这一结果也与本实验第一步结果符合。结果提示当 ASIC 1a 激活后对平滑肌细胞产生促增殖的影响,而通过特异性阻断剂 PCTX-1 和姜黄素阻断 ASIC 1a 后,细胞的增殖被抑制,且两者共同作用下抑制程度更大。由此推断:ASIC 1a 参与酸化环境下血管平滑肌细胞增殖的,姜黄素通过作用于 ASIC 1a 达到对血管平滑肌细胞增殖的抑制。

根据上述实验结果推断:在局部缺血缺氧所致的酸化环境下,大鼠胸主动脉血管平滑肌上的 ASIC 1a 表达增多,引起胞外离子主要是 Ca^{2+} 内流增多,从而激活 Ca^{2+} 依赖的 ERK1/2 磷酸化,从而对血管平滑肌的增殖进行调控。而姜黄素则表现出抑制酸化环境下血管平滑肌细胞 ASIC 1a 的表达,并进一步影响通道下游的磷酸化 ERK1/2 的表达量,最终表现出对大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞增殖的抑制作用。但姜黄素是否对 ASIC 家族其他成员有抑制作用,以及对 ASIC1a 激活后细胞内 Ca^{2+} 的影响尚需进一步实验验证。

然而该实验中,仍然存在诸多不足。首先,由于实验条件及资金受限未能检测 ASIC 1a 激活后以及各处理组出现的细胞内钙离子的变化。其次,实验采用的 CCK-8 法的基本原理决定了无法排除死亡细胞的影响,从而可能对实验结果产生影响。而且 ASIC 1a 激活后对细胞内其他信号通路及所产生作用也未完全在实验中探明,需要在以后的研究中进

一步揭示。

综上,姜黄素可以抑制缺血缺氧下导致局部酸化下血管平滑肌细胞的 ASIC 1a 表达量,从而抑制下游磷酸化 ERK1/2 表达量从而对血管平滑肌细胞增殖产生抑制作用。再加上其副作用小、药源广、价格廉、服用方便,因此在临床上具有广阔的应用价值。但是姜黄素不溶于水,体内吸收差,易代谢,因此在进一步的研究中,需要不断优化加工程序,以提高其溶解度,增强其药理作用及方便给药途径。

参考文献

- 1 Wu FR (吴繁荣). Expression, function and mechanism of acid-sensitive ion channel 1a in hepatic stellate cells of liver fibrosis [D]. Anhui: Anhui Medical University (安徽医科大学), 2013.
- 2 Fei WJ (费文君), Yuan LP (袁丽萍), Wu L (吴琳), et al. The expression of acid-sensitive ion channels in vascular endothelial cells of Henoch-Schonlein purpura [J]. *J Anhui Med Univ* (安徽医科大学学报), 2012, 47: 189-193.
- 3 Song JR (宋建人). Expression, distribution and electrophysiological characteristics of acid-sensitive ion channels in myocardium [D]. Wuhan: Huazhong Medical University (华中医科大学), 2009.
- 4 Wei D (魏东). Open channel of acid sensitive ion channel 1a, Drug regulation and its role in epileptic occurrence [D]. Xi'an: The Fourth Military Medical University (第四军医大学), 2014.
- 5 Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curecumin": From kitchen to clinic [J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 75: 787-809.
- 6 Su SY (粟舒娅). Mechanism of Apelin promoting proliferation and migration of vascular smooth muscle cells [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University (河北医科大学), 2013.
- 7 Zhong Y, Yu W, Feng J, et al. Curcumin suppresses tumor necrosis factor- α -induced matrix metalloproteinase 2 expression and activity in rat vascular smooth muscle cells via the NF- κ B pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2014, 7: 1653-1658.
- 8 Liu C (刘成). Inhibition of curcumin on proliferation and mechanism of vascular smooth muscle cells in rats [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology (华中科技大学), 2004.
- 9 Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, et al. Molecular cloning and functional expression of a novel amiloride-sensitive Na^+ channel [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270: 27411-27414.

- 10 Waldmann R, Lazdunski M. H⁺-gated cation channels: neuronal acid sensors in the NaC/DEG family of ion channels [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 1998, 8(3):18-24.
- 11 Yermolaieva O, Leonard AS, Schnizler MK, et al. Extracellular acidosis increases neuronal cell calcium by activating acid-sensing ion channel 1a [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101:6752-6757.
- 12 Jiang Q, Zha XM, Chu XP. Inhibition of human acid-sensing ion channel 1b by zinc [J]. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, 2012, 94(2):84-93.
- 13 Lingueglia E, de Weille JR, Bassilana F, et al. A modulatory subunit of acid sensing ion channels in brain and dorsal root ganglion cells [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272:29778-29783.
- 14 Wang S (王琛), Meng Z (孟哲), Ma YQ (马艳秋), et al. Effects of curcumin on the proliferation and oxidative stress of vascular smooth muscle cells induced by angiotensin II [J]. *J Xian Jiaotong Univ* (西安交通大学学报), 2016, 37:441-446.
- 15 Yu NR (余美荣), Jiang FS (蒋福升), Ding ZS (丁志山). Advance in studies on curcumin [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2009, 40:828-831.
- 16 Zhang LK (张力康), Wang XZ (汪小珍), Li WS (李婉姝), et al. Study on pharmacokinetics and bioavailability of curcumin in rats [J]. *Chin Pharm Bull* (中国药理学通报), 2011, 27:1458-1462.
- 17 Li XL (李晓蕾). Effect of T-type calcium ion channel on proliferation of vascular smooth muscle cells [D]. Tianjin: Tianjin Medical University (天津医科大学), 2011.
- 18 Grifoni SC, Jernigan NL, Hamilton G, et al. ASIC proteins regulate smooth muscle cell migration [J]. *Microvasc Res*, 2008, 75:202-210.
- 19 Lee GL, Wu JY, Tsai CS, et al. TLR4-activated MAPK-IL-6 axis regulates vascular smooth muscle cell function [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17:E1394.
- 20 Sabharwal R, Stauss HM, Lazartigues E, et al. Abnormalities in baroreflex sensitivity and autonomic control in conscious ASIC2^{-/-} mice [J]. *FASEB J*, 2006, 20:A1186.
- 21 Wang MY (王明月). Effects of CaN and NFATC on proliferation and migration of pulmonary artery smooth muscle cells in rats with pulmonary hypertension [D]. Fuzhou: Fujian Medical University (福建医科大学), 2014.
- 22 Wang WC (王文聪), Xie CY (谢春毅). Research progress in the relationship between MAPK signaling pathway of mitogen-activated protein kinase and diabetic cardiomyopathy [J]. *Contemporary Med* (当代医学), 2016, 22(14):8-10.
- 23 Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, et al. Bio-availability of curcumin: problems and promises [J]. *Mol Pharm*, 2007, 4:807-818.
- 24 Grifoni SC, McKey SE, Drummond HA. Hsc70 regulates cell surface ASIC2 expression and vascular smooth muscle cell migration [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 294:2022-2030.

《天然产物研究与开发》青年编委会

青年编委 (以姓氏笔划为序)

Members

丁克	王红兵	戈惠明	尹文兵	尹胜	吕兆林
DING Ke	WANG Hongbing	GE Huiming	YIN Wenbing	YIN Sheng	LV Zhaolin
伍婉卿	刘相国	孙昊鹏	孙桂波	孙黔云	李芸霞
WU Wanqing	LIU Xiangguo	SUN Haopeng	SUN Guibo	SUN Qianyun	LI Yunxia
李良成	李国友	邱莉	汪海波	沐万孟	张炳火
LI Liangcheng	LI Guoyou	QIU Li	WANG Haibo	MU Wanmeng	ZHANG Binghuo
陈益华	林茂祥	林昌俊	欧阳杰	易华西	罗应刚
CHEN Yihua	LIN Maoxiang	LIN Changjun	OU Yangjie	YI Huaxi	LUO Yinggang
周文	胡友财	袁涛	夏永刚	高慧敏	唐金山
ZHOU Wen	HU Youcai	YUAN Tao	XIA Yonggang	GAO Huimin	TANG Jinshan
黄胜雄	韩淑燕	蓝蔚青	廖晨钟	潘卫东	薛永波
HUANG Shengxiong	HAN Shuyan	LAN Weiqing	LIAO Chenzhong	PAN Weidong	XUE Yongbo