

## 三七总皂苷对大鼠血管平滑肌细胞增殖及 JNK 磷酸化的影响

刘树迎, 王 娜, 黄锦桃, 谢富康, 李朝红

( 中山大学中山医学院组织胚胎学教研室, 广东 广州 510080 )

**摘 要:**【目的】研究发现,三七总皂苷(TPNS)具有抑制和促进细胞增殖的双向调节作用,但是具体的作用机制尚不明确。本研究旨在观察 TPNS 对大鼠血管平滑肌细胞(VSMC)增殖的影响及经由何种信号通路介导。【方法】采用四甲基偶氮唑盐比色法(MTT法)和蛋白印迹(Western blot)法观察了体外培养的大鼠 VSMC 在不同浓度及一定浓度不同作用时间 TPNS 作用下,VSMC 增殖活性的变化及 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)磷酸化的变化;并用 DAPI 染细胞核,观察 TPNS 作用后核形态的变化。【结果】MTT 法观察到:TPNS 的浓度为 0.5 g/L,1.0 g/L,1.5 g/L 时,无论是处于静息状态或 50 mL/L 血清刺激下,VSMC 的代谢活性均增高;TPNS 的浓度为 3.0 g/L 时,静息培养的 VSMC 的代谢活性没有明显的变化,而 50 mL/L 血清刺激的 VSMC 的代谢活性仍增高;TPNS 的浓度为 6.0 g/L,12.0 g/L 时,静息培养或 50 mL/L 血清刺激下的 VSMC 的代谢活性均降低,并随着浓度的增大,代谢活性降低越明显。同时,Western blot 结果显示:TPNS 能快速的激活 JNK1/2,并呈时间和浓度依赖性。当 TPNS 的浓度为 0.5 g/L 时,即可引起 JNK 的磷酸化,并随着浓度的增大,磷酸化作用增强;当 TPNS 的浓度为 1.5 g/L 时,作用 5 min,JNK 呈现最大程度的激活,随后逐渐减弱。DAPI 染核观察到,6.0 g/L TPNS 作用 48 h 后,VSMC 出现了核固缩、核碎片等细胞凋亡的特征。【结论】较低浓度的 TPNS 可促进血管平滑肌细胞的增殖,而较高浓度的 TPNS 可抑制其增殖,JNK1/2 磷酸化可能是引起细胞增殖受到抑制的机制之一。

**关键词:**三七总皂苷;血管平滑肌细胞;c-Jun 氨基末端激酶;信号转导;动脉粥样硬化

**中图分类号:**R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-3554(2008)04-0393-05

### Effects of Total Panax Notoginseng Saponin on Proliferation and JNK Phosphorylation of Rat Vascular Smooth Muscle Cells

LIU Shu-ying, WANG Na, HUANG Jin-tao, XIE Fu-kang, LI Chao-hong

( Department of Histology and Embryology, Zhongshan School of Medicine, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China )

**Abstract:**【Objective】Studies have been showed that total Panax Notoginseng Saponin (TPNS) have ability to both inhibit and/or prompt cell proliferation, but its mechanisms are largely unknown. To explore the effects of TPNS on proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) and by which signal pathway mediates.【Methods】The cultured VSMC treated by TPNS with different concentrations for different durations were detected for changed proliferative viability via MTT and phosphorylation of c-Jun N-terminal kinase(JNK) of VSMC by Western blot. The morphological changes of VSMC nuclei were observed by DAPI staining.【Results】The metabolic viabilities of quiescent VSMC in the absence or presence of 50 mL/L fetal calf serum(FCS) were increased after treatment with 0.5 g/L, 1.0 g/L, and 1.5 g/L of TPNS. When treated by 3.0 g/L of TPNS, the metabolic viability of quiescent VSMC was no obvious changes, while the metabolic viability of 50 mL/L serum-stimulated VSMC was increased. When treated by 6.0 g/L, 12.0 g/L of TPNS, the metabolic viabilities of quiescent VSMC in the absence or presence of 50 mL/L FCS were decreased and become more declined with increased TPNS concentrations.

收稿日期:2008-01-08

基金项目:国家自然科学基金(30570762);国家教育部博士点研究基金(20060558006)

作者简介:刘树迎(1982-),女,山东潍坊人,组织学与胚胎学博士,E-mail:liushuying212914@126.com;李朝红,通讯作者,教授,博士生导师,E-mail:lichaozhongzq@yahoo.com

Meanwhile, TPNS could rapidly induce the activation of JNK1/2 of VSMC in dose- and time-dependent manners by Western blot analysis. When the VSMC were treated by 0.5 g/L of TPNS, phosphorylation of JNK1/2 was induced and more obvious with increased TPNS concentrations. When the VSMC were treated by 1.5 g/L of TPNS, phosphorylation of JNK1/2 peaked at 5 min and declined thereafter. Furthermore, the VSMC with condensed and/or fragmented nuclei were observed via DAPI staining after 6.0 g/L TPNS treatment. 【Conclusion】 The lower concentration of TPNS can induce VSMC proliferation, whereas the higher concentration of TPNS can inhibit VSMC proliferation, and the activation of JNK1/2 signal pathway may be involved in the inhibitory mechanisms of TPNS on rat VSMC proliferation.

**Key words:** total panax notoginseng saponin; vascular smooth muscle cells; c-Jun N-terminal kinase; signal transduction; atherosclerosis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2008,29(4):393-397]

中膜血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) 迁移到内皮下层并异常增殖或凋亡是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 形成的重要步骤, 如何调控 VSMC 的异常增殖和凋亡是治疗这类疾病的关键问题。三七总皂苷 (total Panax Notoginseng Saponin, TPNS) 是从五加科人参属植物三七根部提取的有效成分, 主要含有人参皂苷 Rb1, Rg1 等, 在治疗心脑血管病方面显示出了良好的应用前景, 但目前对它的作用机制尚不明确。以往大多数的研究发现, TPNS 对于培养的 VSMC 的增殖具有抑制作用<sup>[1-3]</sup>, 而我们先前的研究表明, 低浓度的 TPNS 可以经由细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinases, ERK) 途径促进 VSMC 的增殖<sup>[4]</sup>。本研究采用了四甲基偶氮唑盐比色法 (MTT 法) 和蛋白印迹 (Western blot) 法, 观察了 TPNS 对体外静息培养或 50 mL/L 血清刺激下的 Wistar 大鼠 VSMC 代谢活性的影响及 JNK 磷酸化的变化, 进一步探讨了 TPNS 的作用及其作用机理, 为 TPNS 的临床应用探索最佳条件, 并提供实验室资料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

三七总皂苷 (广西梧州药品制品厂), 兔抗人 JNK, 兔抗人磷酸化 JNK, 鼠抗人磷酸化 ERK 和兔抗人 ERK 一抗 (cellular signal technology, Inc, USA), ECL western blotting 试剂盒 (Amersham), DMEM 干粉培养基 (GIBCO), 优质胎牛血清 (characterized fetal bovine serum, FCS, 天津灏洋生物制品责任有限公司), MTT (sigma-Aldrich), DAPI 染料 (sigma-Aldrich), 酶标仪 (BIO-RAD), 细胞粉

碎仪 (宁波新芝生物科技股份有限公司), 其他试剂均为分析纯产品。

### 1.2 细胞培养

方法见参考文献 [5], 采用贴块培养法进行血管平滑肌细胞的原代培养。无菌条件下分离 Wistar 大鼠的主动脉, 去除内膜和外膜, 将中膜平滑肌组织剪成 1 ~ 2 mm<sup>3</sup> 大小的小块, 用 2.5 mL 200 mL/L FCS DMEM 培养基一同种植到 25 mL 培养瓶中, 静置于 37 °C CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。细胞达融合后, 用含 1.25 g/L 胰蛋白酶和 0.2 g/L EDTA 的消化液消化传代细胞, 组织块可继续培养。传代培养基为含 100 mL/L FCS 的 DMEM。实验用 VSMC 为第 3 ~ 10 代。

### 1.3 血管平滑肌细胞形态学鉴定

方法见参考文献 [6]。

### 1.4 MTT 的测定

参考文献 [1, 3] 的方法。取生长状态良好的 VSMC 制成 5 × 10<sup>4</sup>/mL 的细胞悬液, 接种于 96 孔板, 培养 24 h 之后, 用含 10 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养 48 h, 使细胞静止于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期。实验设对照组 (无 TPNS 处理) 及不同浓度的 TPNS 处理组, 每组设置 7 个复孔, 无血清培养基或含 50 mL/L 血清的培养基继续培养 48 h 后, 每孔加入 MTT 10 μL (终浓度: 0.5 g/L), 置 37 °C CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 5 h, 弃去培养基, 每孔加入二甲亚砜 100 μL, 震荡混匀后于酶标仪 490 nm 波长下测吸光度值, 实验重复 3 次。

### 1.5 Western blot 分析

方法见文献 [5]。传代后的 VSMC 达 80% 融合后, 换用 10 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基培养 72 h, 加入不同浓度的 TPNS, 分别作用不同时间后收集细胞。所收集的 VSMC, 用细胞裂解液及

细胞粉碎机破碎细胞,提取的蛋白用酶标仪定量。每个定量后的样本取 100  $\mu\text{g}$  蛋白热变性后加入到 120 g/L SDS-PAGE 胶中,电泳后电转移到硝酸纤维素膜上,加入 50 g/L 脱脂牛奶封闭 30 min 后,分别用一抗磷酸化 JNK、磷酸化 ERK 和二抗作用。特殊的抗原抗体复合物用 ECL 试剂盒检测。同一膜用洗脱液洗去已检测过的一抗、二抗后,分别用 JNK 或 ERK 的一抗及二抗检测 JNK、ERK 的表达作为细胞内参照,以作校准加载蛋白样品量用。冲洗后的胶片用激光密度扫描仪扫描后,用专用的密度分析软件进行半定量分析。

### 1.6 DAPI 染细胞核

VSMC 接种于 12 孔板,细胞达 60% 融合后,换用 10 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基培养 48 h,加入 6.0 g/L TPNS,无血清培养基或含 50 mL/L 血清的培养基继续培养 48 h 后,吸去细胞液,PBS 洗 3 次,40 g/L 多聚甲醛固定 30 min,同时用 1 mL/L Triton-X-100 破膜,PBS 漂洗之后,用 100 mg/L DAPI 染色 10 min,PBS 漂洗之后,于荧光显微镜下观察细胞核形态的变化。

### 1.7 数据统计分析

每次实验平行设 3 个培养皿,每个实验重复 3 次,所有数据均用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,采用 SPSS 11.0 系统软件中的 One-way ANOVA 检验分析并处理相关数据。 $P < 0.05$  被认为差别有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 血管平滑肌细胞形态学鉴定

血管平滑肌细胞在光镜下呈梭形,核位于细胞中央。细胞达融合后呈典型的“丘与峰”特征。透射电镜下可见,细胞浆内有许多粗面内质网和高尔基复合体,靠近胞膜处可见纵向排列的肌丝及密体、密斑,细胞呈典型的合成型表型。

### 2.2 TPNS 对血管平滑肌细胞增殖的影响

目前常用 MTT 法检测细胞代谢活性来反映细胞增殖能力。我们的结果显示,TPNS 的浓度为 0.5 g/L,1.0 g/L,1.5 g/L 时,无论是处于静息状态或 50 mL/L 血清刺激下,VSMC 的代谢活性均增高;TPNS 的浓度为 3.0 g/L 时,静息培养的 VSMC 的代谢活性没有明显的变化,而 50 mL/L 血清刺

激的 VSMC 的代谢活性仍增高;TPNS 的浓度为 6.0 g/L,12.0 g/L 时,静息培养或 50 mL/L 血清刺激下的 VSMC 的代谢活性均降低,并随着浓度的增大,代谢活性降低越明显,与对照组相比具有显著差异(图 1)。说明较低浓度的 TPNS 能够促进 VSMC 的增殖,而较高浓度的 TPNS 能够抑制 VSMC 的增殖。

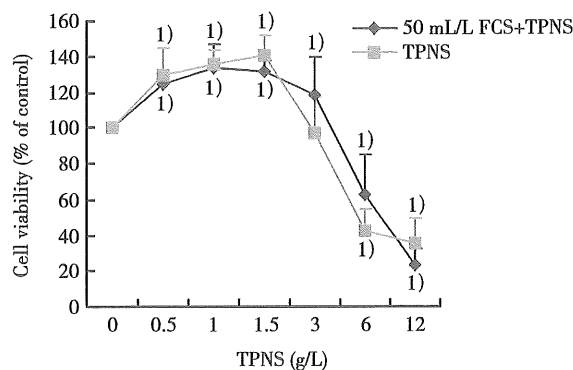


图 1 不同浓度的 TPNS 处理 48 h 对 VSMC 代谢活性的影响

Fig.1 Cell metabolic viability treated 48 h by different concentrations of TPNS

1): Compared with control group,  $P < 0.05$

### 2.3 TPNS 诱导血管平滑肌细胞 JNK1/2 磷酸化的分析

TPNS 能快速的激活 JNK1/2,并呈浓度和时间依赖性。当 TPNS 的浓度为 0.5 g/L 时,即可引起 JNK 的磷酸化,并随着浓度的增大,磷酸化作用增强(图 2)。当 TPNS 的浓度为 1.5 g/L 时,作用 5 min, JNK 呈现最大程度的激活,随后逐渐减弱(图 3)。我们以前的报导也指出,TPNS 能快速的激活 ERK1/2,并呈浓度和时间依赖性(图 4,5)。

### 2.4 DAPI 染核观察 TPNS 作用后血管平滑肌细胞核形态的变化

无论是静息培养或 50 mL/L 血清刺激的 VSMC,加入 6.0 g/L TPNS 作用 48 h 之后,均出现了核固缩,核碎片等细胞凋亡的特征(图 6),说明较高浓度的 TPNS 可以抑制 VSMC 的增殖,凋亡可能是 VSMC 死亡的一种方式。

## 3 讨论

VSMC 异常增殖或凋亡是形成动脉粥样硬化斑块病变、高血压和血管再狭窄的共同细胞病理

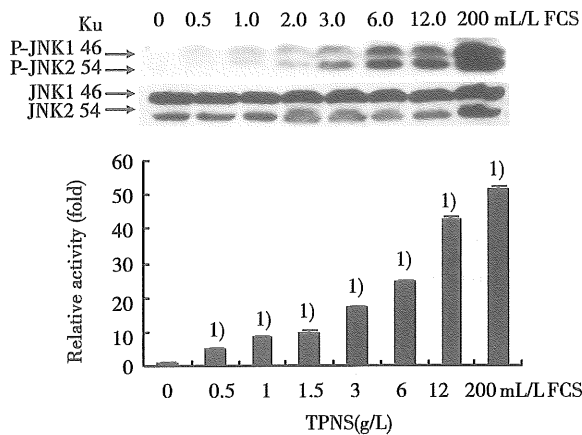


图 2 不同浓度 TPNS 作用 10 min 对 JNK 磷酸化的影响

Fig.2 the effect of TPNS of different concentrations on phosphorylation of JNK1/2

1): Compared with control group,  $P < 0.05$

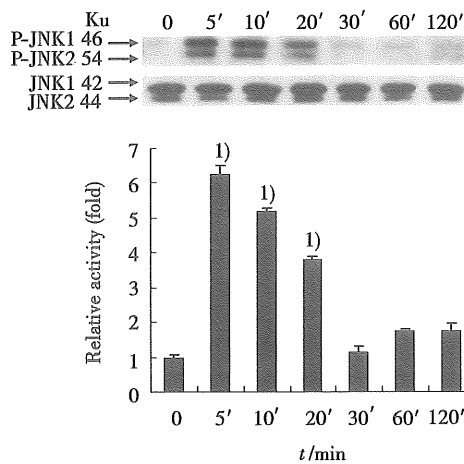


图 3 TPNS 作用不同时间对 JNK 磷酸化的影响

Fig.3 the effect of TPNS of different durations on phosphorylation of JNK1/2

1): Compared with control group,  $P < 0.05$

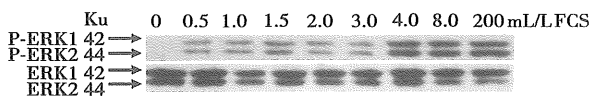


图 4 不同浓度 TPNS 作用 10 min 对 ERK 磷酸化的影响

Fig.4 the effect of TPNS of different concentrations on phosphorylation of ERK1/2

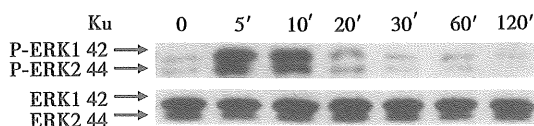


图 5 1.5 g/L TPNS 作用不同时间对 ERK 磷酸化的影响

Fig.5 the effect of 1.5 g/L TPNS of different durations on phosphorylation of ERK1/2

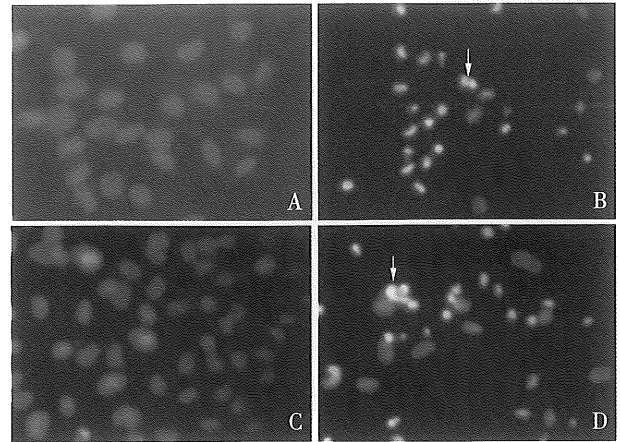


图 6 6.0 g/L TPNS 作用 48 h 对 VSMCs 核形态改变的影响

Fig.6 The morphological changes of VSMC nuclei after treated by 6.0 g/L TPNS for 48 h

A: control group; B: 6.0 g/L TPNS group; C: 50 mL/L FCS-stimulated group; D: 50 mL/L FCS + 6.0 g/L TPNS group( $\times 400$ )

基础,抑制 VSMC 的异常迁移、增殖或凋亡是治疗这类疾病的关键。TPNS 是中药三七的主要活性成分,对心血管系统有强心,抗心肌缺血再灌注损伤,抗 AS,抗心肌肥大,促纤溶及抑制血小板聚集,改善高凝状态等作用<sup>[7]</sup>。近年来不仅在心脑血管疾病治疗方面得以广泛应用,而且其在抗肿瘤和肝肾疾病治疗中的作用也越来越得到重视。

### 3.1 TPNS 对血管平滑肌细胞的增殖具有促进和抑制双向作用

本研究结果显示,TPNS 对 VSMC 的增殖具有双向作用,较低浓度的 TPNS 可促进其增殖,而较高浓度的 TPNS 则抑制其增殖(图 1)。以往大多数的研究显示,TPNS 可抑制血清等刺激引起的 VSMC 的异常增殖<sup>[1-3]</sup>,这可能是 TPNS 抗 AS 的机制之一。而本实验室前期的实验结果表明,较低浓度的 TPNS 可促进 VSMC 的增殖<sup>[4]</sup>。矛盾结果的产生可能与多个方面的原因如实验方法、药物浓度、细胞的存活条件以及测试的时间点不同等有关。本研究中较低浓度的 TPNS 对细胞的促增殖作用也可得到来自于 TPNS 对 VSMC 以外的其他细胞作用的研究报道的支持:玻璃体注射 TPNS 可提高成年地鼠视神经切断后视网膜节细胞的短期存活率<sup>[8]</sup>; TPNS 还可促进大鼠骨髓间充质干细胞体外增殖,并诱导其向心肌样细胞分化<sup>[9]</sup>,这种促细胞增殖和分化的诱导作用似乎与 TPNS 作用的浓度有关。中医理论认为,三七具有活血化淤、通

脉活络、止血消肿等双向调控作用,这种中医学中药物的双向调控作用可能与西医学中药物对细胞的增殖或抑制作用有关。VSMC的异常增殖或凋亡在许多心脑血管疾病的发生发展过程中起关键作用,如何调控VSMCs的增殖或凋亡,使之达到一个稳态的平衡,对于治疗这类疾病具有重要的意义。

### 3.2 TPNS 经由 JNK 通路抑制血管平滑肌细胞的增殖

关于TPNS抑制VSMC增殖的机制已经有许多报道。有研究指出,TPNS可抑制肿瘤坏死因子- $\alpha$ 刺激的VSMC的异常增殖,蛋白激酶C-z和细胞周期蛋白p21可能起重要作用<sup>[10]</sup>。也有研究指出,TPNS可能通过减少钙离子的内流<sup>[11]</sup>和调节一氧化氮的合成<sup>[1]</sup>及下调核因子KappaB的活性<sup>[3]</sup>、调c-myc基因的表达<sup>[2]</sup>等途径抑制VSMCs的增殖,但是更确切的机制,尤其是信号转导的研究还有待深入。

c-Jun氨基末端激酶(JNK1/2)属于丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase,MAPK)家族中的一员,在细胞凋亡过程中起着重要而复杂的作用,各种各样的细胞外刺激,如生长因子、细胞因子、细胞应激等,可激活JNK,诱导细胞凋亡。许多文献报道,JNK1/2的激活在各种刺激诱导的VSMC的凋亡过程中发挥重要作用<sup>[12,13]</sup>。本研究结果显示,TPNS可以明显引起JNK磷酸化,呈时间和浓度依赖性(图2,3),而较大浓度的TPNS也能够明显的抑制VSMC的增殖(图1,6),实验结果提示,这种抑制作用可能是通过激活JNK1/2介导的。我们以前的研究发现,MAPK家族中的另一重要成员细胞外信号调节激酶,在TPNS对VSMC的作用中也被激活,它主要是介导较低浓度的TPNS诱导的VSMC的增殖<sup>[4]</sup>。而我们本次的实验也证实了TPNS对VSMC具有双向调节作用,既能促进(较低浓度),也能抑制(较高浓度)VSMC的增殖,这种双向调节的机制可能就在于TPNS可以同时激活与VSMC增殖和抑制相关的信号通路。寻找维持ERK介导的VSMC增殖与JNK介导的VSMC凋亡之间的动态平衡的干预靶点,可能为心脑血管疾病的治疗提供新的方向。当然,还可能有一些信号通路参与维持VSMC增殖与凋亡的动态平衡,进一步的研究对于AS的治疗具有非常重要的意义。

### 参考文献:

- [1] 庞荣清,陈治龙,朱玉昆,等.三七总皂苷对兔高胆固醇血清刺激的兔主动脉平滑肌细胞增殖及其释放一氧化氮的影响[J].中国现代医学杂志,2003,13(1):56-57,60.
- [2] 周永兰,陈清枝,张延斌,等.三七总皂苷对血管平滑肌细胞增殖及c-myc基因表达的影响[J].中国动脉硬化杂志,2006,14(8):662-664.
- [3] 庞荣清,潘兴华,吴亚玲,等.三七总皂苷对兔血管平滑肌细胞核因子kappaB和细胞周期的影响[J].中国微循环杂志,2004,8(3):154-156.
- [4] LI C, WERNIG F, LEITGES M, et al. Mechanical stress-activated PKC delta regulates Smooth muscle cell migration[J]. FASEB J, 2003,17(14):2106-2118.
- [5] 李朝红,邓漪平,尹小川,等.反义ras寡聚脱氧核苷酸对血管平滑肌细胞生物学行为的影响[J].中国动脉硬化杂志,1997,5(3):217-221.
- [6] 李朝红,谢富康,徐清波.生物机械力诱导蛋白激酶C $\beta$  II活化促进血管平滑肌细胞增殖[J].中国动脉硬化杂志,2005,13(5):553-556.
- [7] 徐辉.三七总皂苷对心血管系统的影响及作用机制[J].现代中西医结合杂志,2006,15(19):2720-2722.
- [8] 魏丽娜,朱永红,李海标.三七总皂苷对成年地鼠视网膜节细胞存活的影响[J].中山大学学报:医学科学版,2007,28(5):495-497,510.
- [9] 李志泉,洗绍祥,汪朝晖,等.三七总皂苷对骨髓间充质干细胞增殖和向心肌样细胞分化的影响[J].广州中医药大学学报,2007,24(6):471-475.
- [10] Ma ZC, Gao Y, Wang YG, et al. Ginsenoside Rg1 inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells stimulated by tumor necrosis factor-alpha [J]. Acta Pharmacol Sin, 2006,27(8):1000-1006.
- [11] Guan YY, Zhou JG, Zhang Z, et al. Ginsenoside-Rd from panax notoginseng blocks Ca<sup>2+</sup> influx through receptor- and store-operated Ca<sup>2+</sup> channels in vascular smooth muscle cells[J]. Eur J Pharmacol, 2006,548(1-3):129-136.
- [12] Allen RT, Krueger KD, Dhume A, et al. Sustained Akt/PKB activation and transient attenuation of c-jun N-terminal kinase in the inhibition of apoptosis by IGF-1 in vascular smooth muscle cells [J]. Apoptosis, 2005, 10(3): 525-35.
- [13] Yuan Q, Jiang DJ, Chen QQ, et al. Role of asymmetric dimethylarginine in homocysteine-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 356(4): 880-885.

(编辑 孙慧兰)