

白杨素抑制血小板源性生长因子诱导的血管平滑肌细胞增殖的机制研究

严 玲 廖正凯 关红菁 唐其柱

摘 要 **目的** 研究白杨素对血小板源性生长因子(PDGF) - BB 诱导的血管平滑肌细胞(VSMCs)增殖的影响及细胞周期调控机制。**方法** WST-1 法测定 VSMCs 增殖,5-溴-2'-脱氧尿苷掺入法测定 DNA 合成,流式细胞术分析 VSMCs 细胞周期,Western blot 法测定细胞周期关键调控因子周期蛋白依赖性激酶(CDK)4、CDK6 和 CDK 抑制物 p27^{kip1} 的表达。**结果** 20ng/ml PDGF - BB 显著增强 VSMCs 增殖及 DNA 合成,而白杨素呈剂量依赖性抑制 PDGF - BB 刺激的 VSMCs 增殖及 DNA 合成。12.5 μmol/L 白杨素预处理使 PDGF - BB 刺激的 VSMCs 阻滞于 G₀/G₁ 期,并能显著降低 VSMCs 中 CDK4 和 CDK6 的蛋白表达水平,同时升高 p27^{kip1} 蛋白水平。**结论** 白杨素抑制 PDGF - BB 刺激的 VSMCs 增殖,其机制可能与 CDK4 和 CDK6 表达下调而 p27^{kip1} 表达上调导致的细胞周期阻滞有关。

关键词 白杨素 血小板源性生长因子 血管平滑肌细胞 增殖 细胞周期

中图分类号 R5 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.12.010

Effects of Chrysin on Platelet Derived Growth Factor - induced Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells. Yan Ling, Liao Zhengkai, Guan Hongjing, et al. Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract Objective To investigate the effects of chrysin on the proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) induced by platelet derived growth factor (PDGF) - BB and the possible mechanism. **Methods** Proliferation of VSMCs was measured by WST - 1 assay. DNA synthesis of VSMCs was determined by 5 - bromo - 2' - deoxyuridine (BrdU) incorporation. Flow cytometric analysis was carried out to analyze cell cycle of VSMCs. Western blot was performed to evaluate protein levels of cyclin - dependent kinase (CDK) 4, CDK6 and p27^{kip1} (a CDK inhibitor). **Results** Chrysin inhibited PDGF - BB - induced VSMCs proliferation and DNA synthesis in a concentration - dependent manner. 12.5 μmol/L chrysin pretreatment caused PDGF - BB - stimulated VSMCs to arrest at G₀/G₁ phases, and this arrest was accompanied by decreases in CDK4 and CDK6 protein levels, and an increase in p27^{kip1} expression. **Conclusion** Chrysin can suppress the proliferation of VSMCs induced by PDGF - BB. The possible mechanism is related to cell cycle arrest mediated by reduced protein levels of CDK4 and CDK6 as well as elevated p27^{kip1} levels.

Key words Chrysin; Platelet derived growth factor; Vascular smooth muscle cells; Proliferation; Cell cycle

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)异常过度增殖是动脉粥样硬化病变形成的重要原因,也是血管成形术后再狭窄的主要病理机制^[1]。在多种参与 VSMCs 异常增殖的血管活性物质和生长因子中,血小板源性生长因子(platelet derived growth factor, PDGF) - BB 是一种强有力的促细胞分裂剂,能显著促进动脉粥样硬化和再狭窄中血管重构的发生发展^[2]。针对于抑制 VSMCs 异常增殖的药物

干预可能成为防治动脉粥样硬化和再狭窄的有效策略。

白杨素(chrysin)又名 5,7 - 二羟黄酮(5,7 - dihydroxyflavone),是一种拥有生物活性的天然黄酮类化合物,普遍存在于蜂蜜、蜂胶和多种植物体内。研究证实白杨素可发挥抗氧化、抗炎、肝脏保护、神经保护、抗肿瘤等多种药理效应^[3-7]。近来的研究表明白杨素还能抑制内皮功能障碍、诱导血管舒张、降低血脂和改善胰岛素抵抗相关血管并发症,提示白杨素在血管疾病中具有潜在保护效应^[8-11]。研究发现白杨素可抑制 VSMCs 增殖,但其细胞周期调控机制尚无研究报道^[12]。本研究首次从细胞周期调控方面探讨白杨素抑制 PDGF - BB 诱导的 VSMCs 增殖的可能机制。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81000095, 30800278);高等学校新教师基金资助项目(200804861048)

作者单位:430060 武汉大学人民医院心血管内科(严玲、关红菁、唐其柱);430071 武汉大学中南医院放化疗科(廖正凯)

通讯作者:唐其柱,电子邮箱:qztang@whu.edu.cn

对象与方法

1. 材料:白杨素购自 Sigma 公司;PDGF-BB 购自 ProSpec 公司;DMEM/F12 液及胎牛血清购于 Gibco 公司;colorimetric WST-1 assay kit、5-溴-2'-脱氧尿苷(BrdU) cell proliferation ELISA kit、蛋白酶抑制剂 Complete 及磷酸酶抑制剂 PhosSTOP 购于 Roche 公司;抗周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)4 抗体、抗 CDK6 抗体、抗 p27^{kip1} 抗体及抗 GAPDH 抗体购于 Cell Signaling Technology 公司;Immobilon-FL 膜购于 Millipore 公司。

2. 细胞培养:采取酶消化法获得大鼠主动脉平滑肌细胞,培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 液中,细胞生长至接近融合状态时传代。VSMCs 纯度通过细胞形态和 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)染色鉴定。实验使用的 VSMCs 为 5~12 代。

3. 细胞增殖测定:WST-1 法测定细胞增殖情况。将 VSMCs 以 5×10^3 /孔接种于 96 孔板中,VSMCs 生长至 60% 融合时,无血清培养 24h 获得同步化。不同浓度的白杨素预处理 1h 后,加入 PDGF-BB (20ng/ml) 刺激 48h,最后 2h 加入 WST-1 试剂,用酶标仪读取 450nm 波长吸光度。

4. 细胞 DNA 合成测定:BrdU 掺入法检测 DNA 合成情况,具体步骤参照 BrdU cell proliferation ELISA 试剂盒说明书。将 VSMCs 以 5×10^3 /孔接种于 96 孔板中,VSMCs 生长至 60% 融合时,无血清培养 24h 获得同步化。不同浓度的白杨素预处理 1h 后,加入 PDGF-BB (20ng/ml) 刺激 48h,最后 2h 加入 BrdU 试剂,固定细胞后再加入抗 BrdU 抗体,显色后用酶标仪读取 370nm 波长吸光度。

5. 细胞周期分析:采取碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色法用流式细胞仪(fluorescence activating cell sorter, FACS)分析细胞周期情况。VSMCs 生长至 70% 融合时无血清培养 24h 获得同步化。12.5 μ mol/L 白杨素预处理 1h 后,加入 PDGF-BB (20ng/ml) 刺激 24h。胰酶消化 VSMCs,70% 的乙醇固定过夜,800r/min 离心 10min,收集固定细胞,重悬细胞于 1ml 含 PI(20 μ g/ml)和 RNaseA (50 μ g/ml)的 PI 染色缓冲液中,避光孵育 30min,用 FACS 测定细胞周期中不同时期的细胞比例。

6. Western blot 法检测:VSMCs 接种到 6cm 培养皿,细胞生长至 70%~80% 融合时无血清培养 24h 获得同步化。12.5 μ mol/L 白杨素预处理 2h 后,予以 PDGF-BB (20ng/ml) 刺激 24h。用含蛋白酶抑制剂 complete 及磷酸酶抑制剂 PhosSTOP 的裂解液裂解 VSMCs,12000r/min 离心 20min,收集上清,BCA 法检测蛋白浓度。SDS-PAGE 电泳分离蛋白,上样量为 20 μ g 蛋白/样本。待 SDS-PAGE 电泳完毕后,将 PAGE 胶转印到 immobilon-FL 膜上。用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 洗膜缓冲液封闭 1h,加入不同的一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 漂洗,加入 IRDye[®] 800CW 标记的二抗,室温孵育 1h, TBST 漂洗,Odyssey imaging system (Li-COR) 获取荧光信号。

7. 统计学方法:使用 SPSS 13.0 进行统计学分析,数据用

均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,经正态性及方差齐性检验,多组之间的均数比较用 One Way ANOVA,两组之间的均数比较用 Dunnett *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 白杨素抑制 PDGF-BB 诱导的 VSMCs 增殖:本研究首先用 WST-1 法评价了白杨素对 VSMCs 增殖的影响。与对照组比较,PDGF-BB 刺激 48h 显著促进 VSMCs 增殖,然而白杨素显著抑制 PDGF-BB 诱导的 VSMCs 增殖,白杨素的抑制增殖效应表现出剂量依赖性。高浓度白杨素(12.5 和 25.0 μ mol/L)几乎完全阻止了 PDGF-BB 诱导的 VSMCs 增殖。与对照组比较,VSMCs 单独用白杨素(2.5~12.5 μ mol/L)处理 48h 细胞活力差异无统计学意义,但 25.0 μ mol/L 白杨素轻度降低细胞活力(图 1)。

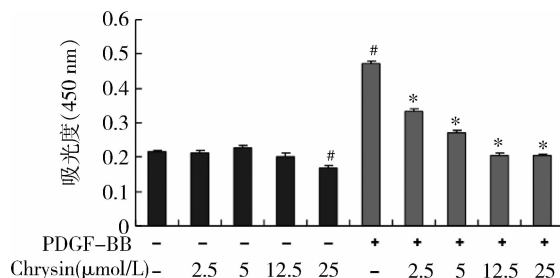


图 1 白杨素抑制 PDGF-BB 诱导的 VSMCs 增殖
与对照组比较, # $P < 0.05$;与 PDGF-BB 组比较, * $P < 0.05$

2. 白杨素抑制 PDGF-BB 诱导的 VSMCs 的 DNA 合成:本研究进一步探讨了白杨素对 VSMCs DNA 合成的影响。BrdU 掺入实验显示 PDGF-BB 显著促进 VSMCs 的 DNA 合成,白杨素呈剂量依赖性抑制 DNA 合成,25.0 μ mol/L 白杨素几乎完全抑制了 DNA 合成,单独用白杨素(2.5~25.0 μ mol/L)处理 48h 对 DNA 合成没有明显影响(图 2)。但考虑到 25.0 μ mol/L 白杨素的轻度细胞毒性作用,笔者选择 12.5 μ mol/L 白杨素用于后续实验。

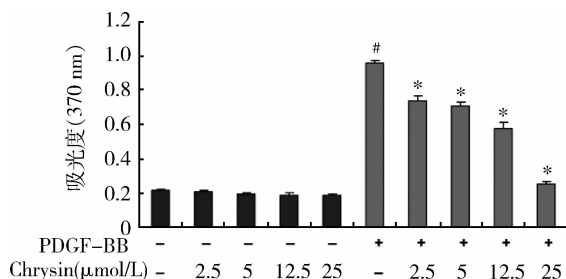


图 2 白杨素抑制 PDGF-BB 诱导的 VSMCs 的 DNA 合成

与对照组比较, # $P < 0.05$;与 PDGF-BB 组比较, * $P < 0.05$

3. 白杨素诱导 VSMCs 细胞周期阻滞:为明确白杨素诱导的 VSMCs 生长抑制是否伴随细胞周期阻滞,本研究利用流式细胞术分析了细胞周期。与对照组比较,PDGF - BB 刺激 24h 显著降低 G_0/G_1 期细胞比例,并增高 S 期细胞比例,对 G_2/M 期细胞比例无显著影响,提示 PDGF - BB 可促进 VSMCs 从 G_0/G_1 期向 S 期转化。12.5 $\mu\text{mol/L}$ 白杨素预处理显著增高 G_0/G_1 期细胞比例并降低 G_2/M 期细胞比例,对 S 期细胞比例无明显影响(图 3),提示白杨素可使 PDGF - BB 刺激的 VSMCs 阻滞于 G_0/G_1 期,具有拮抗 VSMCs 增殖的作用。

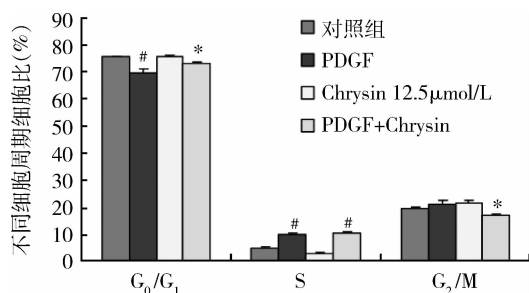


图 3 白杨素对 PDGF - BB 刺激的 VSMCs 细胞周期的影响

与对照组比较, # $P < 0.05$; 与 PDGF - BB 组比较, * $P < 0.05$

4. 白杨素对 VSMCs 细胞周期关键调控蛋白的影响:为阐明白杨素诱导的 VSMCs 细胞周期阻滞的可能机制,本研究应用 Western blot 法检测了多种细胞周期关键调控蛋白的表达,包括 CDK4、CDK6 和 CDK 抑制物 $p27^{kip1}$ 。结果显示,PDGF - BB 刺激导致 VSMCs 中 CDK4 和 CDK6 表达增强而 $p27^{kip1}$ 表达减弱。与 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 白杨素预处理使 PDGF - BB 刺激的 VSMCs 阻滞于 G_0/G_1 期相符,白杨素显著降低 VSMCs 中 CDK4 和 CDK6 的蛋白水平,同时升高 $p27^{kip1}$ 蛋白水平(图 4),提示白杨素抑制 VSMCs 细胞周期的机制可能与 CDK4 和 CDK6 表达下调而 $p27^{kip1}$ 表达上调有关。

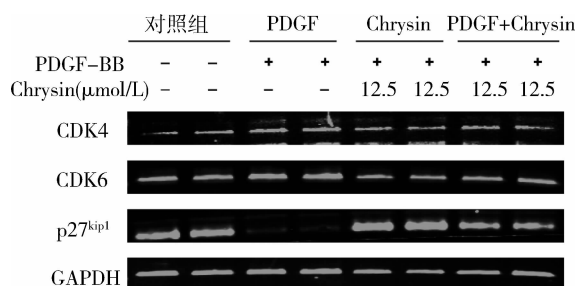


图 4 白杨素对 PDGF - BB 刺激的 VSMCs 中 CDK4、CDK6 和 $p27^{kip1}$ 蛋白表达的影响

讨 论

黄酮类化合物是普遍存在于水果、蔬菜和种子内的天然多酚类植物化学物质。流行病学研究发现摄入富含黄酮类化合物的饮食有助于减少冠心病发生的风险^[13,14]。白杨素是一种具有强有力抗氧化和抗炎特性的天然饮食黄酮类化合物,其潜在的心血管保护效应正日益受到关注。与以往报道一致,本研究发​​现白杨素对于 PDGF - BB 诱导的 VSMCs 增殖具有显著抑制作用^[12]。该增殖抑制效应主要与抑制 DNA 合成有关,而并非由于细胞毒作用。

白杨素抑制 PDGF - BB 诱导的 VSMCs 增殖的细胞周期调控机制目前尚无报道。本研究中细胞周期分析显示白杨素可使 PDGF - BB 刺激的 VSMCs 停滞在 G_0/G_1 期,提示白杨素在 PDGF - BB 刺激的 VSMCs 中的抗增殖机制可能与 G_0/G_1 期细胞周期阻滞有关,而并非涉及细胞凋亡。这一结果与之前报道的白杨素在神经胶质瘤细胞和黑色素瘤细胞中诱导 G_1 期阻滞发挥生长抑制效应相一致^[6,15]。然而,白杨素在其他一些肿瘤细胞中的研究显示,白杨素通过诱导 G_2/M 期阻滞和细胞凋亡抑制肿瘤细胞生长^[16,17]。这些不一致的研究报道可能归因于不同的细胞类型和(或)白杨素处理的不同浓度和持续时间。

细胞周期从一个时期过渡到下一个时期的进程由 CDK 及其抑制剂分别驱动的刺激信号和抑制信号组成的复杂立体调控网络所严格精密调控^[18]。CDK4 和 CDK6 在细胞周期进程中早期 G_1 期发挥正性调控作用,驱动细胞从 G_1 期前行进入 S 期,使细胞分裂加速。 $p27^{kip1}$ 是一种强有力 CDK 抑制剂,可以使 G_1 期 CDK 失活,阻碍细胞由 G_1 期过渡至 S 期,抑制细胞分裂增殖。因此,本研究检测了白杨素对这些细胞周期关键调控蛋白的影响。结果显示,在 PDGF - BB 刺激的 VSMCs 中,白杨素预处理显著降低 CDK4 和 CDK6 的蛋白表达水平,并升高 $p27^{kip1}$ 蛋白表达水平,提示白杨素阻滞 G_1 期的机制可能与 CDK4 和 CDK6 表达下调而 $p27^{kip1}$ 表达上调相关。白杨素调节 CDK4、CDK6 和 $p27^{kip1}$ 的具体信号转导通路还有待于深入研究。

综上所述,本研究证实白杨素抑制 PDGF - BB 诱导的 VSMCs 增殖和 DNA 合成,这一作用可能与其下调 CDK4 和 CDK6 而上调 $p27^{kip1}$ 蛋白表达所致的 G_0/G_1 期细胞周期阻滞有关。此结果为临床上使用天然无毒性不良反应的白杨素作为防治动脉粥样硬化和再狭窄的有效药物提供了实验和理论基础。

参考文献

- 1 Shi N, Chen SY. Mechanisms simultaneously regulate smooth muscle proliferation and differentiation [J]. J Biomed Res, 2014, 28(1): 40-46
- 2 Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet - derived growth factors in physiology and medicine [J]. Genes Dev, 2008, 22(10): 1276-1312
- 3 Rehman MU, Ali N, Rashid S, *et al.* Alleviation of hepatic injury by chrysin in cisplatin administered rats: probable role of oxidative and inflammatory markers [J]. Pharmacol Rep, 2014, 66(6): 1050-1059
- 4 Huang CS, Lii CK, Lin AH, *et al.* Protection by chrysin, apigenin, and luteolin against oxidative stress is mediated by the Nr2 - dependent up - regulation of heme oxygenase 1 and glutamate cysteine ligase in rat primary hepatocytes [J]. Arch Toxicol, 2013, 87(1): 167-178
- 5 Gresa - Arribas N, Serratos J, Saura J, *et al.* Inhibition of CCAAT/ enhancer binding protein delta expression by chrysin in microglial cells results in anti - inflammatory and neuroprotective effects [J]. J Neurochem, 2010, 115(2): 526-536
- 6 Weng MS, Ho YS, Lin JK. Chrysin induces G1 phase cell cycle arrest in C6 glioma cells through inducing p21Waf1/Cip1 expression: involvement of p38 mitogen - activated protein kinase [J]. Biochem Pharmacol, 2005, 69(12): 1815-1827
- 7 Kasala ER, Bodduluru LN, Madana RM, *et al.* Chemopreventive and therapeutic potential of chrysin in cancer: mechanistic perspectives [J]. Toxicol Lett, 2015, 233(2): 214-225
- 8 Zou XQ, Peng SM, Hu CP, *et al.* Synthesis, characterization and vasculoprotective effects of nitric oxide - donating derivatives of chrysin [J]. Bioorg Med Chem, 2010, 18(9): 3020-3025
- 9 秦小江, 侯晓敏, 梁泰刚. 白杨素对大鼠离体肾动脉的舒张作用 [J]. 中国药物与临床, 2014, 14(8): 1009-1011

- 10 Pushpavalli G, Veeramani C, Pugalendi KV. Influence of chrysin on hepatic marker enzymes and lipid profile against D - galactosamine - induced hepatotoxicity rats [J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48(6): 1654-1659
- 11 El - Bassossy HM, Abo - Warda SM, Fahmy A. Chrysin and luteolin alleviate vascular complications associated with insulin resistance mainly through PPAR - γ activation [J]. Am J Chin Med, 2014, 42(5): 1153-1167
- 12 Lo HM, Wu MW, Pan SL, *et al.* Chrysin restores PDGF - induced inhibition on protein tyrosine phosphatase and reduces PDGF signaling in cultured VSMCs [J]. J Nutr Biochem, 2012, 23(6): 667-678
- 13 Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, *et al.* Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study [J]. Lancet, 1993, 342(8878): 1007-1011
- 14 Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, *et al.* Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study [J]. BMJ, 1996, 312(7029): 478-481
- 15 Pichichero E, Cicconi R, Mattei M, *et al.* Acacia honey and chrysin reduce proliferation of melanoma cells through alterations in cell cycle progression [J]. Int J Oncol, 2010, 37(4): 973-981
- 16 Zhang Q, Zhao XH, Wang ZJ. Cytotoxicity of flavones and flavonols to a human esophageal squamous cell carcinoma cell line (KYSE - 510) by induction of G2/M arrest and apoptosis [J]. Toxicol In Vitro, 2009, 23(5): 797-807
- 17 Araújo JR, Gonçalves P, Martel F. Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines [J]. Nutr Res, 2011, 31(2): 77-87
- 18 Lim S, Kaldis P. Cdk, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation [J]. Development, 2013, 140(15): 3079-3093

(收稿日期:2015-04-24)

(修回日期:2015-05-19)

(上接第 17 页)

- 5 Liu C, Kurokawa R, *et al.* Estimation of the hydrogen concentration in rat tissue using an airtight tube following the administration of hydrogen via various routes[J]. Sci Rep, 2014, 4: 5485
- 6 Zheng X, Mao Y, Cai J, *et al.* Hydrogen - rich saline protects against intestinal ischemia/reperfusion injury in rats [J]. Free Radic Res, 2009, 43(5): 478-484
- 7 Sun Q, Kang Z. Hydrogen - rich saline protects myocardium against ischemia/reperfusion injury in rats [J]. Exp Bio Med, 2009, 234(10): 1212-1219
- 8 卞学艺, 姜保成. 含饱和氢气生理盐水减轻小鼠肝脏缺血再灌注损伤[J]. 中华器官移植杂志, 2011, 32(3): 177-181
- 9 Li H, Zhou R. Hydrogen - rich saline attenuates lung ischemia - reperfusion injury in rabbits [J]. J Surg Res, 2012, 174(1): 11-16
- 10 Shigu C, Koga H. Hydrogen - rich saline solution attenuates renal ischemia - reperfusion injury [J]. J Anesth, 2010, 24(4): 569-574
- 11 Buchholz BM, Kaczorowski DJ, Sugimoto R, *et al.* Hydrogen inhalation ameliorates oxidative stress in transplantation induced intestinal graft injury [J]. Am J Transplant, 2008, 8(10): 2015-2024
- 12 Zhang Y, Sun Q. Anti - inflammatory effect of hydrogen - rich saline

in a rat model of regional myocardial ischemia and reperfusion [J]. Int J Cardiol, 2011, 148(1): 91-95

- 13 Liu Y, Yang L, Tao K, *et al.* Protective effects of hydrogen enriched saline on liver ischemia reperfusion injury by reducing oxidative stress and HMGB1 release [J]. BMC Gastroenterol, 2014, 14: 12
- 14 杨邵杰, 孟金萍. 细胞凋亡信号传导通路的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(5): 297-301
- 15 Zhao L, Wang YB. Protective effect of hydrogen - rich saline on ischemia/reperfusion injury in rat skin flap [J]. J Zhwhjiang Univ Sci B, 2013, 14(5): 382-391
- 16 Cui Y, Zhang H. Hydrogen - rich saline attenuates neuronal ischemia - reperfusion injury by protecting mitochondrial function in rats [J]. J Surg Res, 2014, 192(2): 564-572
- 17 Zhao Y, Tang Y. Effects of hydrogen - rich saline on endoplasmic reticulum stress during myocardial ischemia - reperfusion in rats [J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2014, 94(38): 3024-3028
- 18 Zhou L, Wang X. Beneficial effects of hydrogen - rich saline against spinal cord ischemia - reperfusion injury in rabbits [J]. Brain Res, 2013, 1517: 150-160

(收稿日期:2015-04-11)

(修回日期:2015-04-24)