

[文章编号] 1000-4718(2008)12-2324-04

银杏叶提取物诱导大鼠主动脉平滑肌细胞 HO-1 的表达及细胞信号通路研究*

杨晓瑜, 汪红霞, 魏宗德, 黄维义[△]
(泸州医学院附属医院心内科, 四川 泸州 646000)

[摘要] 目的: 旨在研究银杏叶提取物(Ginkgo Biloba Extract, EGB761)对大鼠主动脉平滑肌细胞(RVSMC)血红素氧合酶-1(HO-1)蛋白的影响,并探讨其中涉及的细胞信号通路。**方法:**大鼠主动脉平滑肌细胞株复苏、传代培养到第6代,再复孔培养用于实验,分别给予空白对照、单纯 EGB761、EGB761+ 锌原卟啉 IX(Zn-PPIX)或不同的细胞内信号途径特异性阻断剂进行处理,采用 Western blotting 法定量检测 HO-1 蛋白表达。**结果:**EGB761 能呈剂量依赖性诱导 HO-1 蛋白表达,加用 ZnPPIX(血红素氧合酶特异性阻断剂)及酪氨酸蛋白激酶(TPK)阻断剂木黄酮均能显著抑制 EGB761 诱导的 HO-1 蛋白表达(均 $P < 0.01$),但 calphostin-C(蛋白激酶 C 阻断剂)、LY294002(磷脂酰肌醇-3 激酶阻断剂)及 Bay11-7082(核因子- κ B 阻断剂)对 EGB761 诱导的 HO-1 蛋白表达无明显影响(均 $P > 0.05$)。**结论:**(1) EGB761 能显著诱导 RVSMC 中 HO-1 蛋白的表达,并且这种诱导作用能被血红素氧合酶的特异性阻断剂 ZnPPIX 所阻断。(2) EGB761 通过 TPK 途径介导大鼠主动脉平滑肌细胞 HO-1 蛋白的表达。

[关键词] 二裂银杏; 血红素氧合酶-1; 血管平滑肌细胞; 信号转导

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Correlative cell signaling pathway for expression of heme oxygenase - 1 induced by ginkgo biloba extract in rat vascular smooth muscle cells

YANG Xiao-yu, WANG Hong-xia, WEI Zong-de, HUANG Wei-yi

(Department of Cardiology, Affiliated Hospital, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China. E-mail: hwy6881@126.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To explore the effects of heme oxygenase - 1 (HO - 1) protein expression induced by ginkgo biloba extract (EGB761) in rat vascular smooth muscle cells (RVSMC) and the correlative cell signaling pathway. **METHODS:** The RVSMC lines were revived. Serial passage to 6 generation was carried out and divided into different groups. The cells were treated respectively with vehicle, purely EGB761, EGB761 plus zinc protoporphyrin IX or other specific inhibitors of cell signaling pathway. Western blotting method was used to detect the expression of HO - 1 in RVSMC. **RESULTS:** EGB761 induced HO - 1 protein expression in a dose dependent manner. ZnPPIX and genistein significantly inhibited HO - 1 protein expression induced by EGB761 (0.10 ± 0.01 , 0.07 ± 0.01 vs 0.61 ± 0.07 , $P < 0.01$, respectively). However, calphostin - C, LY294002, Bay11 - 7082 had no apparent effects on HO - 1 protein expression induced by EGB761 (0.63 ± 0.07 , 0.65 ± 0.07 , 0.64 ± 0.06 vs 0.61 ± 0.07 , $P > 0.05$, respectively). **CONCLUSION:** (1) EGB761 significantly induces HO - 1 protein expression in RVSMC, and the effect can be inhibited by a specific HO inhibitor ZnPPIX. (2) The HO - 1 protein expression induced by EGB761 in RVSMC is mediated by tyrosine protein kinase pathway.

[KEY WORDS] Ginkgo biloba; Heme oxygenase - 1; Vascular smooth muscle cells; Signal transduction

在我国,动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)及冠心病患病率正迅猛上升,成为危害人民健康的主要疾病,研究其病因、致病机理及有效防治方法仍然是

医学界面临的重要课题。大量研究表明,血红素氧合酶 1(oxygenase - 1, HO - 1)及其酶解产物一氧化碳(carbon monoxide, CO)、胆红素共同组成了机体不

[收稿日期] 2007-09-11 [修回日期] 2008-04-25

* [基金项目] 四川省自然科学基金资助项目(No. 04jy029-021-3)

[△]通讯作者 E-mail: hwy6881@126.com

可缺少的内源性保护系统,在防止高血压、动脉粥样硬化、哮喘等多种疾病中起重要作用,合理调控 HO-1 的表达以防治疾病正成为当前研究的热点^[1-3]。已知血管平滑肌细胞与血管内皮细胞及单核细胞一样是动脉粥样硬化病理过程的重要参与者。有研究揭示,诱导 HO-1 高表达能抑制血管平滑肌细胞增殖与迁移,从而拮抗 AS 的发生与发展。银杏叶提取物(ginkgo biloba extract, EGB761)被广泛用于冠心病、脑梗塞等缺血性心血管病的防治并取得了显著疗效,但 EGB761 能否诱导 HO-1 表达并因此发挥其抗缺血性心血管病作用尚缺乏研究报道。本研究拟探讨 EGB761 诱导体外培养的大鼠主动脉平滑肌细胞(rat vascular smooth muscle cells, RVSMC)表达 HO-1 的效果及有关的细胞内信号转导通路。

材 料 和 方 法

1 材料

大鼠主动脉平滑肌细胞株由四川大学华西医院传染科侯洁博士惠赠;银杏叶提取物购自德国威玛舒博博士厂;酪氨酸蛋白激酶(tyrosine protein kinase, TPK)阻断剂木黄酮、PVDF 膜、HO-1 的特异性阻断剂锌原卟啉 IX(zinc protoporphyrin IX, ZnPP IX)、内参照 β -actin、胰蛋白酶均购自 Sigma; DMEM/F12 购自 Gibco;胎牛血清购自北京元亨公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒、Western blotting 及 IP 细胞裂解液购自碧云天生物技术研究;核因子- κ B 阻断剂 BAY11-7082 购自 Alexis;磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphatidyl inositol 3-kinase, PI3K)阻断剂 LY294002 购自 Cell Signalling;蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)阻断剂 calphostin-C 购自 Merck;预染蛋白 marker 及 2 \times 上样缓冲液购自上海生工;小鼠抗大鼠 HO-1 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG 抗体购自 Stressgen;Western blotting 增强化学发光试剂盒购自 Bio-Rad。

2 方法

2.1 细胞培养和分组 复苏大鼠主动脉平滑肌细胞株,置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养、传代,再以 4 \times 10⁵ cells/well 转至 6 孔板中继续培养,生长至 80% 融合时,用含 1% 胎牛血清的培养液预处理细胞 24 h 使细胞生长同步化。实验分两部分进行,各组均为 5 个复孔。

① 诱导实验 用于探明 EGB761 诱导 HO-1 蛋白表达效果及量效关系。分 5 组,其相应处理方法如下:对照组给予空白液,不加 EGB761,其余 4 组均给

予 EGB761 并使其终浓度分别达到 50 mg/L、100 mg/L、200 mg/L、400 mg/L,细胞均孵育 8 h。

② 阻断实验 分 6 组,其相应处理方法如下: EGB761 组,给予 EGB761 200 mg/L; ZnPP IX 组,给予 EGB761 200 mg/L + ZnPP IX 20 μ mol/L; 木黄酮组,给予 EGB761 200 mg/L + 木黄酮 100 μ mol/L; calphostin-C 组,给予 EGB761 200 mg/L + calphostin-C 1 μ mol/L; LY294002 组,给予 EGB761 200 mg/L + LY294002 50 μ mol/L; Bay11-7082 组,给予 EGB761 200 mg/L + Bay11-7082 20 μ mol/L,细胞均孵育 8 h。

2.2 HO-1 蛋白表达的 Western blotting 分析 各组细胞药物处理结束后, PBS 洗涤 2 次,收集细胞,加入裂解液 300 μ L,反复冻融 3 次,置于冰上,摇床轻摇 30 min,再于超速低温离心机上 14 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min。收集上清,用 BCA 法测定蛋白含量; SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳采用 12% 的分离胶,最终蛋白转到 PVDF 膜上。膜置于含 5% 脱脂奶粉的封闭液中, 4 $^{\circ}$ C 过夜; 弃去封闭液用 TBST 稀释的 I 抗稀释液 5 mL (1:5 000), 室温, 摇床平摇 2 h, 弃去 I 抗稀释液, TBST 洗膜 3 次, 加入辣根过氧化物酶标记的 II 抗稀释液 5 mL (1:10 000), 室温, 摇床平摇 1 h; 最后用增强化学发光试剂(ECL)孵育膜 5 min, 置于凝胶成像分析系统暗室中, 显示蛋白条带。用凝胶成像分析系统中的 Quantity One 软件分别测得和 β -actin 的光密度, 两者之比作为 HO-1 蛋白的相对含量。

3 统计学处理

数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS14.0 统计软件包进行 *F* 及 *q* 检验。

结 果

1 EGB761 诱导 HO-1 蛋白表达结果

空白对照组 HO-1 蛋白仅有微量表达,加用 EGB761 各组 HO-1 蛋白量均明显增加,且 HO-1 蛋白表达量随 EGB761 浓度升高而升高。见图 1、2。

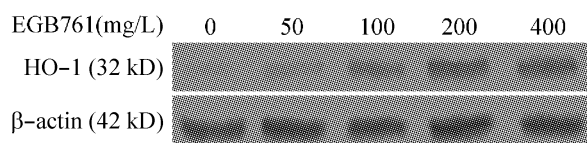


Fig 1 Western blotting analysis of HO-1 protein expression in RVSMC treated with different concentrations of EGB761.

图 1 Western blotting 分析不同浓度 EGB761 组 HO-1 蛋白表达

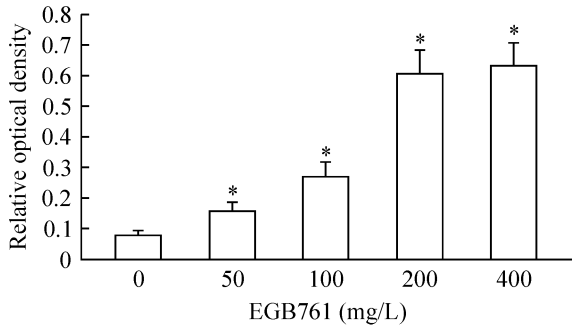


Fig 2 Comparison of HO - 1 protein expression in RVSMC treated with different concentrations of EGB761. $\bar{x} \pm s$. $n = 5$. * $P < 0.01$ vs control group.

图2 不同浓度 EGB761 组间 HO - 1 蛋白表达量的比较

2 ZnPP IX对 EGB761 诱导 HO - 1 蛋白表达的影响

与单纯 EGB761 (200 mg/L) 组相比, ZnPP IX 组 HO - 1 蛋白条带明显变细变浅, 显示 HO - 1 蛋白表达量显著降低, 两组相对吸光度值分别为 0.10 ± 0.01 与 0.61 ± 0.07 ($P < 0.01$)。

3 细胞信号通路阻断剂对 EGB761 诱导 HO - 1 蛋白表达的影响

与单纯 EGB761 (200 mg/L) 组相比, 木黄酮组 HO - 1 蛋白表达量显著降低, 而 calphostin - C 组、LY294002 组、Bay11 - 7082 组的 HO - 1 蛋白表达量则无明显变化, 见图 3、4。

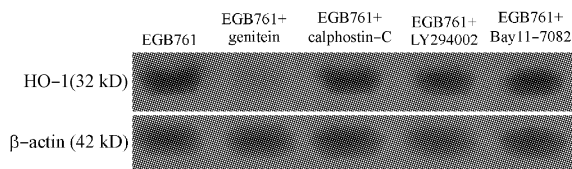


Fig 3 Western blotting analysis of HO - 1 protein expression in RVSMC treated with EGB761 (200 mg/L) or EGB761 plus genistein, calphostin - C, LY294002, Bay11 - 7082.

图3 加用不同特异性细胞信号通路阻断剂, 各组中 HO - 1 蛋白表达的 Western blotting 分析

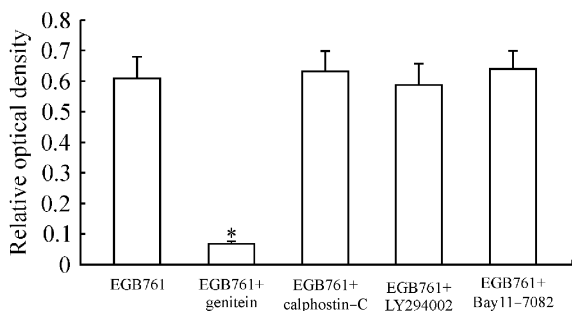


Fig 4 Comparison of HO - 1 protein expression in RVSMC between EGB761 group and EGB761 plus different cell signaling pathway blocker groups. $\bar{x} \pm s$. $n = 5$. * $P < 0.01$ vs EGB761 group.

图4 加用不同特异性细胞信号通路阻断剂各组中 HO - 1 蛋白表达量与单用 EGB761 组的比较

讨 论

银杏为银杏科银杏属植物, 又名公孙树, 银杏叶在我国已有上千年的药用历史, EGB761 是应用现代工艺获得的银杏叶标准提取物, 主要包含银杏黄酮和萜类内酯两类有效药用成分, 其中银杏黄酮具有清除自由基、扩张血管、抗炎、抑制血小板聚集、调血脂等药理作用。此前, 国内外已有研究揭示, 银杏黄酮能诱导体外培养的心肌细胞及神经元细胞高表达 HO - 1 蛋白, 且蛋白表达峰约在 8h 出现, 而萜类内酯则不能诱导 HO - 1 表达^[4,5]。本研究显示, 用不同浓度的 EGB761 孵育 RVSMC 8h 均能诱导 HO - 1 蛋白表达显著增加, 且 HO - 1 蛋白表达呈明显的 EGB761 浓度依赖性特点。

据研究, HO - 1 基因启动子内不仅包含多个特定的反应元件和调控位点, 而且 HO - 1 表达的细胞信号通路还具有细胞和物种特异性, 这就决定了 HO - 1 表达的调控异常复杂。已知, HO - 1 表达的细胞内信号通路包括上游蛋白激酶和下游转录因子。迄今已发现的诱导 HO - 1 表达的信号转导通路主要有蛋白激酶 C (PKC)、TPK、磷脂酰肌醇 (- 3) 激酶 (PI3K) 等途径。通常, HO - 1 主要由致细胞损伤的氧化应激性因素如: H_2O_2 、内毒素、重金属离子等通过改变细胞内氧化还原平衡所诱导, 但近年发现, 一些本身具有抗氧化、清除自由基能力的生物黄酮如: 姜黄素、黄芩黄酮、槲皮素、鼠尾草苦酯、霍香叶提取物、葡萄皮提取物等均能诱导 HO - 1 的表达, 其诱导 HO - 1 表达的活性与它们的化学结构, 特别是其中的一些基团如: 羟基、巯基、酚羟基有关^[6-10]。这些基团并非通过促氧化应激诱导 HO - 1 表达, 而是通过与特定的信号转导蛋白结合发挥作用的, 生物黄酮类化合物所含的酚羟基还能与自由基反应生成较稳定的半醌式自由基, 从而更强地诱导 HO - 1 表达^[11]。由于 EGB761 中富含的银杏黄酮本身具有清除氧自由基的功能, 它显然不是通过致氧化应激机制来诱导 HO - 1 的表达。本实验显示, 除血红素氧合酶特异性拮抗剂 ZnPP IX 可显著抑制 EGB761 诱导血管平滑肌细胞表达 HO - 1 外, 我们还采用不同细胞信号通路的特异性阻断剂做干预, 发现 TPK 途径的阻断剂木黄酮能明显抑制 EGB761 诱导的 HO - 1 表达, 而 PKC 阻断剂 calphostin - C 和 PI3K 阻断剂 LY294002 均不能减少 EGB761 诱导的 HO - 1 表达, 说明 EGB761 诱导 RVSMC 中 HO - 1 的表达通过了 TPK 途径, 而没有

PKC 和 PI3K 信号途径的参与。TPK 很可能是经 Ras 蛋白激活 MAPK 从而诱导 HO-1 表达,但这需要进一步研究证实。此外,诱导 HO-1 的转录因子主要有以下几种:核因子 κ B (NF- κ B)、核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)、活化蛋白-1 (AP1)。许多促氧化应激因素均通过激活 NF- κ B 诱导 HO-1 表达,本实验采用 NF- κ B 的阻滞剂 BAY11-7082 处理 RVSMC,发现并不能减少 HO-1 蛋白表达,表明 EGB761 诱导 RVSMC 中 HO-1 表达不是由 NF- κ B 介导的。有报道,同样是生物黄酮的姜黄素诱导单核细胞表达 HO-1 蛋白是由 Nrf2 介导的^[12], EGB761 是否也由 Nrf2 介导 RVSMC 表达 HO-1 则需进一步研究证实。

HO-1 为血红素氧合酶的诱导型,能降解血红素生成胆红素和 CO 等重要产物,其中,胆红素是内源性抗氧化剂,能清除多种氧自由基;CO 则是与 NO 类似的气体信号分子,通过激活可溶性鸟苷酸环化酶,参与扩张血管、抑制血小板聚集和血管平滑肌细胞增殖、调控细胞凋亡等作用。由于自由基的形成与脂质过氧化、血小板聚集和血管平滑肌细胞增殖等参与动脉粥样硬化的病理生理过程,因此,HO-1/胆红素/CO 系统具有抗动脉粥样硬化作用^[13]。本文结果表明,EGB761 可能通过 TPK 途径诱导 RVSMC 高表达 HO-1 蛋白,从而为深入研究 EGB761 通过激活 HO-1/胆红素/CO 这一内源性保护系统而发挥抗动脉粥样硬化作用奠定了基础。

[参 考 文 献]

- [1] Takahashi T, Morita K, Akagi R, et al. Heme oxygenase - 1: a novel therapeutic target in oxidative tissue injuries [J]. *Curr Med Chem*, 2004, 11(12): 1545 - 1561.
- [2] 郭钰珍, 陈汉平. 缺氧促进人脐静脉内皮细胞血红素氧合酶表达及 $[Ca^{2+}]_i$ 变化 [J]. *中国病理生理杂志*, 2007, 23(7): 1281 - 1284.
- [3] 黄新莉, 韦 鹏, 周晓红, 等. HO-1 在 CCK-8 减轻脂多糖所致的急性肺损伤中的作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2007, 23(12): 2385 - 2389.
- [4] Chen JX, Zeng H, Chen X, et al. Induction of heme oxygenase - 1 by ginkgo biloba extract but not its terpenoids partially mediated its protective effect against lysophosphatidylcholine induced damage [J]. *Pharmacol Res*, 2001, 43(1): 63 - 69.
- [5] Zhuang H, Pin S, Christen Y, et al. Induction of heme oxygenase - 1 by ginkgo biloba in neuronal cultures and potential implications in ischemia [J]. *Cell Mol Biol*, 2002, 48(6): 647 - 653.
- [6] Rushworth SA, Ogborne RM, Charalambos CA, et al. Role of protein kinase C delta in curcumin - induced antioxidant response element - mediated gene expression in human monocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 341(4): 1007 - 1016.
- [7] Lin HY, Juan SH, Shen SC, et al. Inhibition of lipopolysaccharide - induced nitric oxide production by flavonoids in RAW 264.7 macrophages involves heme oxygenase - 1 [J]. *Biochem Pharmacol*, 2003, 66(9): 1821 - 1832.
- [8] Martin D, Rojo AI, Salinas M, et al. Regulation of heme oxygenase - 1 expression through the phosphatidylinositol 3 - kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol [J]. *Biol Chem*, 2004, 279(10): 8919 - 8929.
- [9] Juan SH, Cheng TH, Lin HC, et al. Mechanism of concentration - dependent induction of heme oxygenase - 1 by resveratrol in human aortic smooth muscle cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2005, 69(1): 41 - 48.
- [10] Oh HM, Kang YJ, Lee YS, et al. Protein kinase G - dependent heme oxygenase - 1 induction by Agastache rugosa leaf extract protects RAW264.7 cells from hydrogen peroxide - induced injury [J]. *Ethnopharmacol*, 2006, 103(2): 229 - 235.
- [11] 魏朝良, 于德红, 安利佳. 黄酮类化合物及清除自由基机制的探讨 [J]. *中成药*, 2005, 27(2): 239 - 241.
- [12] Balogun E, Hoque M, Gong PF, et al. Curcumin activates the heme oxygenase - 1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant - responsive element [J]. *Biochem J*, 2003, 371(Pt 3): 887 - 895.
- [13] Ishikawa K, Maruyama Y. Heme oxygenase as an intrinsic defense system in vascular wall: implication against atherosclerosis [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2001, 8(3): 63 - 70.