

doi: 103969/j. issn. 0490-6756. 2017. 06. 032

改构黄藤素对钙化细胞的作用机制

乔洁¹, 李怡², 杨黎³, 齐庆荣⁴, 王莉², 林宏辉¹

(1. 四川大学生命科学学院, 成都 610065;

2. 电子科技大学附属医院, 四川省人民医院肾内科暨肾脏病研究所, 成都 610072;

3. 四川大学华西医院协同创新中心, 成都 610041; 4. 四川大学华西药学院药化系, 成都 610041)

摘要: 通过建立 β -半胱氨酸磷酸盐诱导大鼠血管平滑肌细胞(RASMCs)钙化的模型, 研究改构黄藤素在血管钙化中的作用. 通过 Von Kossa 染色技术检测发现改构黄藤素可以显著降低钙化细胞内的钙盐沉积; 利用实时定量 PCR(Real-time Quantitative PCR)技术检测发现改构黄藤素可以将钙化细胞内的 Nrf-2 mRNA 水平由原来的 0.09 ± 0.01 显著升高到 2.54 ± 0.35 ; 采用 Western Blot 技术检测发现改构黄藤素可以显著增强钙化细胞内的蛋白表达量; 试剂盒检测活性氧(ROS)的含量发现改构黄藤素可以将钙化细胞内的荧光强度由原来的 1.04 ± 0.03 显著降低到 0.82 ± 0.01 ; 试剂盒检测一氧化氮(NO)的含量, 发现改构黄藤素可以将钙化细胞内的 NO 含量由原来的 $5.73 \pm 0.05 \mu\text{mol/L}$ 显著降低到 $3.73 \pm 0.15 \mu\text{mol/L}$.

关键词: 血管钙化; 黄藤素; 氧化应激; 炎症; 核因子 NF-E2 相关因子

中图分类号: Q25 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2018)06-1319-05

The underlying mechanism of modified palmatine for calcified cells

QIAO Jie¹, LI Yi², YANG Li³, QI Qing-Rong⁴, WANG Li², LIN Hong-Hui¹

(1. College of Life Sciences of Sichuan University, Chengdu 610065, China;

2. Renal Division and Institute of Nephrology, Sichuan Academy of Medical Science and Sichuan Provincial People's Hospital, School of Medicine, University of Electronic Science and Technology, Chengdu 610072, China;

3. Cancer Center, West China Hospital, Sichuan University and Collaborative Innovation Center, Chengdu 610041, China;

4. Department of Medicinal Chemistry, West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: To explore the role of palmatine in vascular calcification, we employed a calcific cell model using β -glyceophosphate to stimulate the rat aortic smooth muscle cells (RASMCs). We performed a Von Kossa staining assay to detect the effect of palmatine on calcific RASMCs upon calcium deposition, we found that the modified palmatine could significantly inhibit intracellular calcium deposition of RASMCs after calcification. The mRNA level of the nuclear transcription factor nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf-2) was determined by Real-time Quantitative PCR, we found that the modified palmatine could significantly increase the mRNA level of Nrf-2 from (0.09 ± 0.01) -fold to (2.54 ± 0.35) -fold in RASMCs following calcification. Further, we measured the protein level of Nrf-2 by Western Blot, we found that the modified palmatine could significantly activate the expression of Nrf-2 in RASMCs following calcification. We used a Reactive Oxygen Species (ROS) kit to detect the fluorescence intensity of ROS, we observed that the modified palmatine could respectively decrease the fluorescence intensity in-

收稿日期: 2017-10-27

基金项目: 国家自然科学基金(81770742)

作者简介: 乔洁(1993-), 女, 河南濮阳人, 硕士, 研究方向为终末期肾病血管钙化的机制. E-mail: 13330876113@163.com

通讯作者: 林宏辉. E-mail: hlin@scu.edu.cn

dicating ROS from (1.04 ± 0.03) to (0.82 ± 0.01) in RASMCs after calcification. We used a Nitric Oxide (NO) kit to measure the production of NO, we observed that the modified palmatine could decrease the production of NO from $(5.73 \pm 0.05) \mu\text{mol/L}$ to $(3.73 \pm 0.15) \mu\text{mol/L}$ in RASMCs after calcification.

Keywords: Vascular calcification; Palmatine; Oxidative stress; Inflammation; Nuclear transcription factor nuclear factor-erythroid 2-related factor 2

1 引言

血管钙化是终末期肾病患者(ESRD)心血管疾病高发率和高死亡率的主要诱因,也是可以预测患者死亡的一个独立的危险因素^[1]. 血管钙化涉及血管平滑肌细胞的氧化损伤,是一种可以主动调节的过程^[2,3]. 无钙的磷酸盐结合剂和选择性维生素 D 是治疗血管钙化的常规方法. 然而,由于血管钙化的病理机制尚不完全明确,血管钙化的常规治疗方法仍存在一定的局限性.

核因子 NF-E2 相关因子(Nrf-2)是细胞抗氧化的核心因子^[4]. 动物实验证明 Nrf-2 可以有效对炎症和氧化应激, Nrf-2 在肾脏疾病的治疗方面也发挥了重要作用^[5]. 然而, Nrf-2 在 ESRD 患者血管钙化中的作用尚不完全明确,许多问题仍未得到解答.

黄藤素,又名巴马汀,这一天然药物,是一种季胺异喹啉生物碱^[6]. 黄藤素具有多种生物活性. 临床上,黄藤素常用作肠炎、腹痛、慢性子宫内膜炎、胃炎和盆腔炎症的补救措施^[7,8]. 吴等人研究发现:黄藤素可以通过诱导细胞凋亡来杀死 MCF-7 乳腺癌细胞^[9]. 以前的研究也阐明了黄藤素在实验动物模型中的抗炎机制^[10]. 但是,关于黄藤素在血管钙化方面的研究,则鲜有报道. 在本研究中,为了改善黄藤素的构效关系(SAR),达到更好的实验效果,我们使用的是四川大学华西医院协同创新中心改构后的黄藤素. 相对于原来的黄藤素分子,改构后的分子结构中多了一个氯原子.

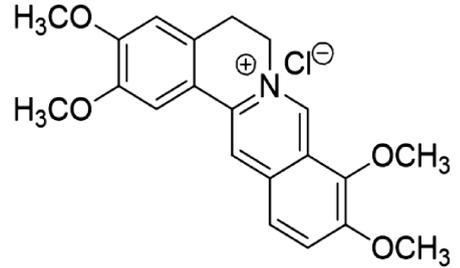
本文的目的旨在研究黄藤素对 ESRD 患者血管钙化的作用和可能的机制. 我们的研究表明,黄藤素可以通过激活 Nrf-2 的表达来保护大鼠血管平滑肌细胞(RASMCs),使其免受氧化损伤. 这些研究表明,黄藤素在高磷诱导的终末期肾病血管钙化中具有潜在的积极作用,对该天然药物在血管钙化治疗中的可能应用提供了科学依据,具有潜在的应用前景.

2 材料和方法

2.1 材料

黄藤素由四川大学华西医院协同创新中心合

成(图 1). 大鼠血管平滑肌细胞购买于美国 Scien-cell 科学研究实验室.



Chemical structure of palmatine

387.86

图 1 改构黄藤素的分子结构式

Fig. 1 The molecular structure of palmatine

Von Kossa 试剂盒购买于台湾 BASO 公司. Trizol 购买于美国 Invitrogen 公司. q-PCR 和 RT-PCR 的试剂盒均购买于日本 Takara 公司. RIPA 购买于北京碧云天公司. HRP 标记 β -actin (1 : 10000) 抗体和兔多克隆 Nrf-2 (1 : 600) 抗体均购买于美国 proteintech 公司. NO 和 ROS 试剂盒均购买于北京碧云天公司.

CO₂ 细胞培养箱,美国赛默飞公司;共聚焦显微镜,德国 Leica 公司;实时定量 PCR 仪,美国 Applied Biosystems 公司;FUSION FX7 成像系统,法国 Vilber 公司. 酶标仪,美国赛默飞公司;荧光酶标仪,美国赛默飞公司.

2.2 实验方法

2.2.1 大鼠血管平滑肌细胞的培养和加药处理

将大鼠血管平滑肌细胞培养在含 10% 胎牛血清、100 $\mu\text{g/mL}$ 青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的 DMEM 培养基中^[11,12]. 根据张文松等人以前的研究,将 770 mg β -甘油磷酸酯,11 mg L-抗坏血酸和 1 μL 10^{-8} mol/L 的地塞米松溶于 250 mL 上述培养基中制成钙化培养基^[13]. 待细胞铺板密度达到 90% 左右时,将细胞以 1×10^6 个/孔的密度接种到 6 孔板中,每孔加入 2 mL 培养基;或以 1×10^4 个/孔的密度接种到 96 孔板中,每孔加入 0.1 mL 培养基. 过夜培养之后,吸弃培养基,分别加入相应浓度的黄

藤素,注射用生理盐水做空白对照.处理8 h后,吸弃黄藤素,按照实验分组分别加入钙化培养基和DMEM培养基,培养72 h.

2.2.2 Von Kossa 染色 除尽六孔板中的培养基,每孔加入2 mL 75%的酒精固定细胞5 min,PBS清洗三次,将六孔板置于暗室下,硝酸银染色30 min,紫外照射30 min,流水适当冲洗,硫代硫酸钠还原5 min,等待细胞自然风干后,放置于共聚焦显微镜下检测黄藤素对钙化细胞内钙盐沉积的影响.

2.2.3 RT-PCR 除尽六孔板中的培养基后,按照Trizol试剂盒的说明书提取RNA并检测RNA浓度.按照Takara的说明书,构建以下10 μ L的反应体系:2 μ L的5 \times Primer Scribe Buffer,0.5 μ L的Primer Scribe RT Enzyme Mix,0.5 μ L的Oligo dT Primer,0.5 μ L的Random 6 mers,4.5 μ L的Rnase-Free water,2 μ L的RNA.混匀体系,设置反应程序为:37 $^{\circ}$ C,15 min;85 $^{\circ}$ C,5 s;4 $^{\circ}$ C,10 min.

2.2.4 qPCR 将合成的上述cDNA用Rnase-Free water稀释10倍后,按照Takara 820A试剂盒的说明书,构建如下20 μ L的反应体系:10 μ L的SYBR,0.8 μ L的上游引物,0.8 μ L的下游引物,0.4 μ L的Rox Dye II,3 μ L的Rnase-Free water,5 μ L的cDNA.运行程序为:50 $^{\circ}$ C,2 min;95 $^{\circ}$ C,10 min;95 $^{\circ}$ C,15 s;58 $^{\circ}$ C,30 s;72 $^{\circ}$ C,40 s.以GAPDH作内参,上游引物:5'-TCCATTGAAGGCATCCACCC-3'下游引物:5'-AAGAAGCTCCTCCTGCTTGGC-3'.

2.2.5 Western Blot 将载有细胞的六孔板置于冰上,去除六孔板内的培养基,PBS清洗后,每孔加入100 μ L RIPA,刮板刮下六孔板中的细胞并收集到1.5 mL离心管中,超声破碎后,4 $^{\circ}$ C,12000 r/min离心10 min,收集上清液到新的1.5 mL离心管中,使用BCA法测定蛋白浓度,根据测定的浓度按比例加入5 \times Loading Buffer,97 $^{\circ}$ C加热5 min.然后制备Western Blot所需的凝胶,待浓缩胶凝固后,拔掉梳齿,将预染Marker及蛋白样本依次加入凝胶孔内,以100 V恒压电泳至溴酚蓝跑至凝胶底部时停止电泳,120 V转膜1.5 h,取出膜后,室温下5%牛奶摇床封闭1 h,4 $^{\circ}$ C冰箱摇床敷育一抗过夜,TBST清洗三次,室温摇床敷育二抗1 h后,曝光.

2.2.6 NO的检测 待NO检测试剂盒的温度达到室温时,取一新的96孔板,对应培养细胞的96

孔板,每孔吸取50 μ L的培养液,按照说明书稀释标准品到不同浓度,同样取50 μ L加入到96孔板中,而后每孔先加入100 μ L的Regent I,再加入100 μ L的Regent II,轻微震荡混匀后,540 nm波长检测吸光度值.

2.2.7 ROS的检测 按照ROS检测试剂盒说明书,以1:1000的比例用无血清培养基DMEM稀释DCFH-DA,取100 μ L稀释后的DCFH-DA加入到去除培养基的96孔板中,而后将载有细胞的96孔板放置于培养箱中孵育20 min,用无血清DMEM清洗三次,0.5 h内,488 nm激发波长、525 nm发射波长荧光酶标仪进行检测.

2.2.8 数据统计及分析 每组数据重复3次,SPSS 13.0对数据进行统计分析,结果以“平均值 \pm 标准差”的形式表现. $P<0.05$ 认为数据有统计学意义,用*表示; $P<0.01$ 用#表示.(缩写:Pal,黄藤素;CTRL,对照组;CAL,钙化组)

3 结果与分析

3.1 不同处理条件下大鼠血管平滑肌细胞内的钙盐沉积

Paloianet等人已发现血管钙化可增加细胞内的钙盐沉积^[8].Von Kossa染色后,我们观察到,与正常对照组相比,72 h钙化后,大鼠血管平滑肌细胞内的钙盐沉积显著增加.但是,5 μ mol/L和10 μ mol/L黄藤素预处理8 h可以显著抑制钙化后大鼠血管平滑肌细胞内的钙盐沉积(图2).这一结果说明,黄藤素可以有效抑制钙化细胞内的钙盐沉积.

3.2 不同处理条件下大鼠血管平滑肌细胞内Nrf-2基因的表达情况

血管钙化涉及血管平滑肌细胞的氧化损伤,而Keap1-Nrf-2-ARE信号通路在保护细胞免受氧化损伤中起到关键的作用^[14].在我们的研究中,我们发现,钙化72 h后,RASMCs中Nrf-2的mRNA水平和蛋白质水平显著降低.但是,5 μ mol/L和10 μ mol/L黄藤素均可以显著提高钙化细胞中Nrf-2的表达水平(图3A,图3B).对蛋白条带进行Image J分析,测定的结果也表明加药处理后,钙化细胞中Nrf-2的表达水平显著升高(图3C).这些结果表明,黄藤素可以通过激活Nrf-2的核转位对抗大鼠血管平滑肌细胞的血管钙化.可能因为高浓度黄藤素存在一定的副作用,所以在激活Nrf-2方面,5 μ mol/L的作用效果优于10 μ mol/L.

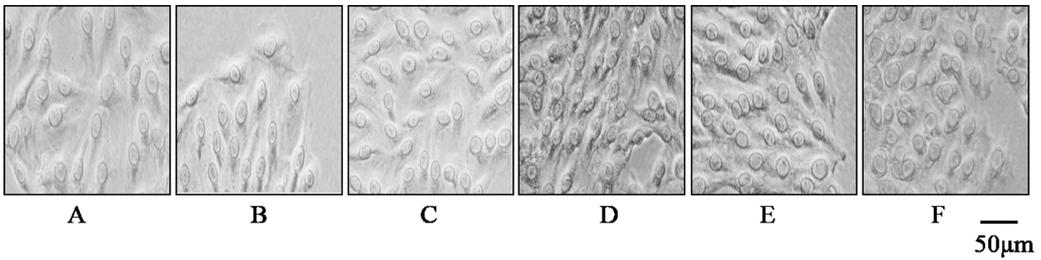


图 2 不同处理条件下细胞内的钙盐沉积

A: 对照组; B: 5 $\mu\text{mol/L}$ 黄藤素处理组; C: 10 $\mu\text{mol/L}$ 黄藤素处理组; D: 钙化处理组; E: 5 $\mu\text{mol/L}$ 黄藤素+钙化处理组; F: 10 $\mu\text{mol/L}$ 黄藤素+钙化处理组

Fig. 2 The calcium deposition in RASMCs in different concentrations of palmatine

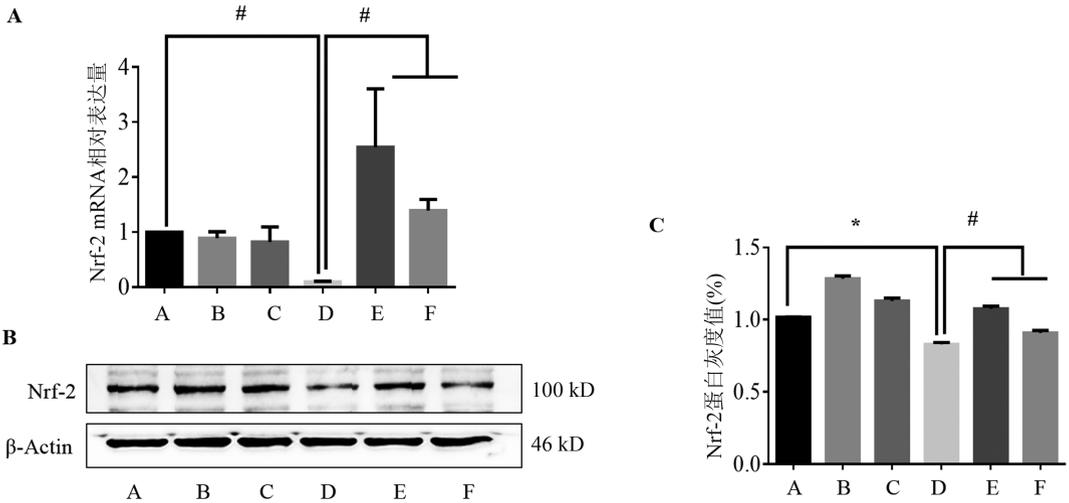


图 3 不同处理条件下细胞内 Nrf-2 基因 mRNA 和蛋白质的相对表达量变化

(A: 对照组; B: 5 $\mu\text{mol/L}$ 黄藤素处理组; C: 10 $\mu\text{mol/L}$ 黄藤素处理组; D: 钙化处理组; E: 5 $\mu\text{mol/L}$ 黄藤素+钙化处理组; F: 10 $\mu\text{mol/L}$ 黄藤素+钙化处理组)

Fig. 3 The relative content of the mRNA and protein of Nrf-2 in RASMCs in different concentrations of palmatine

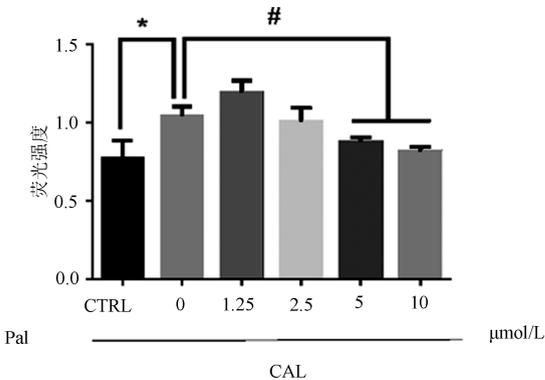


图 4 不同处理条件下细胞内 ROS 的含量变化

Fig. 4 The relative content of ROS in RASMCs in different concentrations of palmatine

3.3 不同处理条件下细胞内 ROS 的含量

氧化应激这一存在于各种代谢性疾病如糖尿病、慢性炎症和心血管疾病的主要因素,也是发生血管钙化的主要原因之一^[15,16]. 活性氧(ROS)这一可能对 DNA、脂质和蛋白质造成损害的物质,通常伴随着氧化应激发生^[17]. 在我们的研究中,我们

发现黄藤素可以减少 ROS 的产生,并且在黄藤素浓度达到 10 $\mu\text{mol/L}$ 的时候,效果较好(图 4). 这一结果表明,当达到一定浓度时,黄藤素可以显著保护大鼠血管平滑肌细胞,使其免受氧化损伤.

3.4 不同处理条件下细胞内 NO 的含量

炎症与血管钙化的发生高度相关,大量的 NO 可促进炎症的发生^[18,19]. 在我们的研究中,我们观察到黄藤素可以以剂量依赖的方式减少钙化后大鼠血管平滑肌细胞内 NO 的含量,并且在黄藤素浓度达到 10 $\mu\text{mol/L}$ 的时候,效果最佳(图 5). 这一结果表明,黄藤素可以通过减少 NO 的产生、有效缓解炎症的发生,对抗血管钙化.

4 结论

血管钙化导致细胞内 Nrf-2 含量的显著降低,而黄藤素可以显著增强细胞内 Nrf-2 的表达水平、同时显著降低细胞内 ROS 和 NO 的含量. 推测黄藤素通过激活 Nrf-2、抑制炎症和氧化应激,显著改

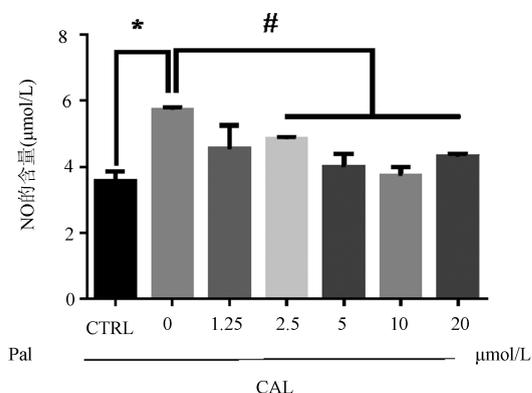


图 5 不同处理条件下细胞内 NO 的含量变化

Fig. 5 The relative content of NO in RASMCs in different concentrations of palmitate

善大鼠平滑肌细胞的钙化。这些研究结果表明,黄藤素在高磷诱导的终末期肾病血管钙化中具有潜在的积极作用,对该天然药物在血管钙化治疗中的可能应用提供了科学依据,具有潜在的应用前景。

参考文献:

- [1] Jablonski K L, Chonchol M. Vascular calcification in end-stage renal disease [J]. *Hemodial Int*, 2013, 17: S17.
- [2] Becs G, Zarjou A, Agarwal A, *et al.* Pharmacological induction of ferritin prevents osteoblastic transformation of smooth muscle cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20: 217.
- [3] 覃春美, 魏晓, 龚财判, 等. 血管钙化大鼠肾动脉 BMP2/Smad1/Runx2 信号通路的表达[J]. *四川大学学报: 医学版*, 2016, 47: 180.
- [4] Ma Q. Role of Nrf-2 in oxidative stress and toxicity [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2013, 53: 401.
- [5] Ruiz S, Pergola P E, Zager R A, *et al.* Targeting the transcription factor Nrf2 to ameliorate oxidative stress and inflammation in chronic kidney disease [J]. *Kidney Int*, 2013, 83: 1029.
- [6] Yan B, Wang D, Dong S, *et al.* Palmatine inhibits TRIF-dependent NF- κ B pathway against inflammation induced by LPS in goat endometrial epithelial cells[J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 45: 194.
- [7] Jimbo R, Kawakami-Mori F, Mu S, *et al.* Fibroblast growth factor 23 accelerates phosphate-induced vascular calcification in the absence of Klotho deficiency [J]. *Kidney Int*, 2014, 85: 103.

- [8] Paloian N J, Leaf E M, Giachelli C M. Osteopontin protects against high phosphate-induced nephrocalcinosis and vascular calcification [J]. *Kidney Int*, 2016, 89: 1027.
- [9] Wu J, Xiao Q, Zhang N, *et al.* Palmatine hydrochloride mediated photodynamic inactivation of breast cancer MCF-7 cells: Effectiveness and mechanism of action [J]. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2016, 15: 133.
- [10] K peli E, Kosar M, Yesilada E, *et al.* A comparative study on the anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects of isoquinoline alkaloids from the roots of Turkish Berberis species [J]. *Life Sci*, 2002, 72: 645.
- [11] 魏士杰, 陈文强. 云芝多糖影响人宫颈癌 HeLa 细胞的增殖和凋亡的研究[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2016, 53: 1162.
- [12] Park E K, Rhee H I, Jung H S, *et al.* Antiinflammatory effects of a combined herbal preparation (RAH13) of Phellodendron amurense and Coptis chinensis in animal models of inflammation [J]. *Phytother Res*, 2007, 21: 746.
- [13] Zhang P, Li Y, Du Y, *et al.* Resveratrol ameliorated vascular calcification by regulating Sirt-1 and Nrf2 [J]. *Transplant Proc*, 2016, 48: 3378.
- [14] Kensler T W, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2007, 47: 89.
- [15] 张海伶, 马骁. 白花丹参对糖尿病大鼠胰岛 B 细胞凋亡的影响[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2017, 54: 1341.
- [16] Nyitrai M, Balla G, Balla J. Oxidative stress: one of the major causes of vascular calcification in chronic kidney disease patients [J]. *Orv Hetil*, 2015, 156: 1926.
- [17] Schieber M, Chandel N S. ROS function in redox signaling and oxidative stress [J]. *Curr Biol*, 2014, 24: R453.
- [18] Bessueille L, Magne D. Inflammation; a culprit for vascular calcification in atherosclerosis and diabetes [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72: 2475.
- [19] Guzik T J, Korbout R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2003, 54: 469.

引用本文格式:

中文: 乔洁, 李怡, 杨黎, 等. 改构黄藤素对钙化细胞的作用机制[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2018, 55: 1319.

英文: Qiao J, Li Y, Yang L, *et al.* The underlying mechanism of modified palmatine for calcified cells [J]. *J Sichuan Univ; Nat Sci Ed*, 2018, 55: 1319.