

• 实验研究 •

黄芪皂苷 III 抑制小鼠动脉平滑肌细胞 TNFR1 介导信号转导*

王海芳¹, 张琳萍², 霍雪萍¹, 赵向绒¹, 赵苗苗¹, 曹情雯³, 胡 军¹, 刘勤社^{4△}

(1. 陕西省人民医院中心实验室, 陕西 西安 710068; 2. 西安交通大学医学部, 陕西 西安 710061;

3. 陕西省中医医院急诊科, 陕西 西安 710003; 4. 陕西中医药大学, 陕西 西安 712046)

摘要: **目的** 研究黄芪皂苷 III (astragaloside III, AS III) 对小鼠动脉平滑肌细胞 (arterial smooth muscle cells, ASMCs) 中 I 型 TNF- α 受体 (TNF- α receptor type 1, TNFR1) 介导信号通路的抑制作用, 为中药黄芪的抗炎作用和抗动脉粥样硬化作用提供证据。**方法** 以不同浓度 AS III 预处理 ASMCs, 之后以 TNF- α 诱导细胞。采用 WST-1 实验检测细胞活力变化; 采用实时定量 RT-PCR 技术检测细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、凝集素样氧化低密度脂蛋白受体 (lectin-like oxidized LDL receptor-1, Lox-1) 和 ATP 结合盒转运蛋白 A1 (ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1) mRNA 表达变化; 采用 Western Blot 方法检测 ICAM-1、Lox-1 和 ABCA1 蛋白表达变化, 并检测 AS III 对转录因子 NF- κ B (nuclear factor- κ B) 上游抑制蛋白 I κ B α (NF- κ B inhibitor- α)、以及对信号分子 AKT、细胞外受体活化激酶 (extracellular receptor-activated kinases, ERKs) 和 p38 磷酸化的影响。**结果** (1) AS III 在 30 nM~10 μ M 范围内不抑制细胞活力; (2) AS III 剂量依赖性抑制 TNF- α 对 ICAM-1、Lox-1 和 ABCA1 mRNA 表达的调控; (3) AS III 剂量依赖性抑制 TNF- α 对 ICAM-1、Lox-1 和 ABCA1 蛋白表达的调控; (4) AS III 显著抑制 TNFR1 介导的 I κ B α 磷酸化和降解; (5) AS III 显著抑制 TNFR1 介导的 AKT、ERKs 和 p38 磷酸化。**结论** AS III 可全面抑制 ASMCs 中 TNFR1 介导信号通路激活, 参与其抗炎和抗动脉粥样硬化作用。

关键词: 黄芪皂苷 III; 动脉平滑肌细胞; 肿瘤坏死因子- α ; TNFR1; NF- κ B; 抗炎作用

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2017)03-0001-06

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.03.001

黄芪皂苷 (astragaloside, AST) 是中医补气要药黄芪中的主要活性组分之一。现代药理学研究显示, AST 在心脑血管方面具有诸多作用, 包括保护心肌重构、强心作用、对血管炎症的抑制作用、对缺血缺氧心肌的保护作用、以及对血流动力的影响^[1]。临床用药证据表明, 黄芪皂苷注射液用作冠状动脉粥样硬化心脏病 (冠心病) 的辅助治疗时, 对临床症状的疗效明显优于单纯西医常规治疗, 而且对气虚血瘀证具有显著的改善作用^[2]。AST 由黄芪皂苷 I、II、III、IV 等一系列具有相似结构的皂苷类物质组成, 其中黄芪甲苷 (astragaloside IV, AS-IV) 含量最高, 公认是 AST 的主要活性成分^[3]。

肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 是体内最重要的炎性细胞因子, 参与多种慢性心

血管疾病的发生发展过程^[4]。TNF- α 对体内免疫细胞之外其他细胞的功能调节主要与其 I 型受体 (TNF- α receptor type 1, TNFR1) 介导, 体内外研究显示减少 TNF- α 产生或抑制 TNFR1 介导信号均可在一定程度上抑制动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 斑块的形成^[5]。我们之前的研究^[6]显示, AST 可抑制小鼠动脉内皮细胞 (arterial endothelial cells, AECs) 中 TNF- α 诱导的经典 NF- κ B (nuclear factor- κ B) 信号通路激活, 从而抑制细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 的表达, 并抑制巨噬细胞与内皮细胞之间的黏附过程, 发挥内皮细胞保护作用。然而与此同时我们也发现, AST 中公认的主要活性 AS-IV 虽可抑制 NF- κ B 向细胞核转位, 但却不影响其上游抑制因子 I κ B α (NF- κ B inhibitor- α) 的降解,

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81573823)

收稿日期: 2017-04-28

作者简介: 王海芳 (1972-), 女, 山西阳泉人, 博士, 助理研究员, 研究方向: 中药抗动脉粥样硬化分子机制。

△通信作者: 刘勤社, E-mail: lqssp@126.com

表明其并不通过抑制经典 NF- κ B 信号通路而发挥作用,这提示 AST 中其他皂苷类组分可能负责这一药理学作用。

动脉平滑肌细胞 (arterial smooth muscle cells, ASMCs) 是 AS 斑块中的另一种重要细胞成分, TNF- α 可通过激活 TNFR1 介导细胞内信号通路而调控 ASMCs 中细胞黏附分子和胆固醇代谢相关分子凝集素样氧化低密度脂蛋白受体 (lectin-like oxidized LDL receptor-1, Lox-1) 和 ATP 结合盒转运蛋白 A1 (ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1) 的表达, 参与平滑肌细胞泡沫化和 AS 斑块形成^[7]。本研究针对 AST 中另一重要组分黄芪皂苷 III (astragaloside III, AS III, 化学结构式见图 1) 是否可抑制 ASMCs 中 TNFR1 介导信号途径激活和相关分子表达进行研究, 有助于进一步阐明 AST 的抗炎和抗 AS 作用物质基础, 为临床应用黄芪和 AST 防治心脑血管疾病提供更多理论和实验依据。

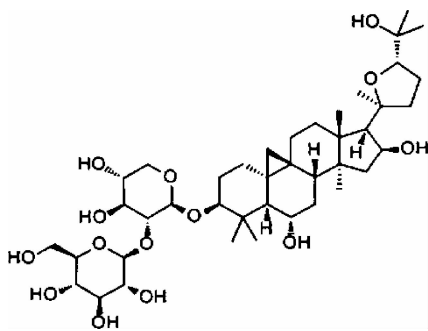


图 1 ASIII 化学结构式

1 材料和方法

1.1 材料

ASMCs 购自上海诺晨生物技术有限公司, 并进行 α -平滑肌肌动蛋白 (α smooth muscle Actin, α -SMA) 免疫荧光染色鉴定^[8]。DMEM 高糖培养基、胎牛血清、细胞培养用青霉素/链霉素和胰蛋白酶购自美国 Clontech 公司。AS III 标准品购自中国药品生物制品检定所。重组小鼠 TNF α 购自北京义翘神州生物技术公司。实验所用一抗主要有: 抗-ICAM-1、抗-Lox-1 和抗-ABCA1 抗体 (美国 Abcam 公司), ph-I κ B α /I κ B α 、ph-AKT 和 ph-p38 抗体 (美国 Cell signaling 公司), ph-ERK1/2 抗体 (美国 Santa Cruz 公司); 抗 β -actin 抗体和二抗 (包括山羊抗兔和山羊抗小鼠抗体) 购自北京康为世纪生物科技公司。主要仪器: CO₂ 细胞培养箱 (美国 Napco 公司); 倒置光学显微镜 (日本

Olympus 公司); 台式冷冻离心机 Allegra 64R (德国 Beckman 公司); Model 680 型酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司); Eco Real-Time PCR 扩增仪 (美国 Illumina 公司); 化学发光仪 (美国 Alpha Innotech 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及药物处理

ASMCs 细胞贴壁生长于含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 高糖完全培养液中, 在 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度的恒温密闭细胞培养箱内培养, 0.025% 胰蛋白酶消化传代, 取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 细胞活力检测

利用 WST-1 细胞毒性检测试剂盒 (购自碧云天生物技术研究所) 检测 AS III 对 ASMCs 细胞活力的影响。简述之, 按照 1×10^4 个/孔的密度将细胞接种于 96 孔细胞培养板中, 每组设 5 个复孔, 次晨加入 100 μ L 含不同浓度 AS III 的新鲜培养液处理 8 h, 之后每孔加入 10 μ L WST-1 溶液, 在细胞培养箱内继续孵育 1~2h, 充分混匀待检测体系, 在 450 nm 处测定吸光度。

采用公式“相对细胞活力值_(实验组)=[OD_(实验组)/OD_(对照组)] $\times 100\%$ ”计算各组细胞活力值。

1.2.3 实时定量荧光 RT-PCR 检测 AS III 对 TNF- α 调控 ICAM-1、Lox-1 和 ABCA1 mRNA 表达的影响

ASMCs 接种于 6 孔细胞培养板中培养至 90% 铺满, 分别以 30 nM、300 nM 和 3 000 nM AS III 预处理细胞 2 h, 加入 30 ng/mL TNF- α 诱导 6 h, 利用 TRIzol 试剂 (美国 Invitrogen 公司) 裂解细胞, 收集裂解液, 利用 TaKaRa 细胞总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。采用 TaKaRa 公司反转录试剂盒按照说明书以 RNA 为模板反转录出 cDNA 链; 采用 TaKaRa 荧光定量 PCR 试剂盒按照说明书以 cDNA 为模板进行 PCR 反应。引物: m β -actin: 正向引物 TAGGCGGACTGT-TACTGAGC, 反向引物 TGCTCCAACCAACTGCT-GTC; mICAM-1: 正向引物 GTGGGTCTGAAGGTG-GTTCTT; 反向引物 AGGCCTGGCATTTCAGAGTC; mLox-1: 正向引物 CCCTCCAAAGTCTCCCAACC, 反向引物 GCCTGCACTTGAGGAGGATT; mABCA1: 正向引物 CCTTGGGGACAGAATTGCCA, 反向引物 TCACCTTCATGGTCGCTGCC。反应条件: 95℃变性 1 min, 58℃退火 45 s, 72℃延伸 45 s, 设 35 个循环。以 β -actin 为内参基因, 计算同一样本中目的基

因与内参基因的含量比值,评价目的基因表达水平。

1.2.4 Western Blot 检测 AS III 对 TNF- α 调控 ICAM-1、Lox-1 和 ABCA1 蛋白表达的影响

将生长于 6 孔细胞培养板中的 ASMCs 以不同浓度 AS III 预处理细胞 2 h,加入 TNF- α 诱导 8~12 h,将细胞收集到 100 μ L 2 $\times$ SDS 样品缓冲液中,用以检测 ICAM-1、Lox-1 和 ABCA1 的蛋白表达;或将细胞进行血清饥饿 4~6 h 后再进行 AS III 预处理和 TNF- α 诱导 5~30 min,收集细胞裂解液,检测细胞内信号分子 I κ B α 、ph-AKT、ph-p38 和 ph-ERKs 的蛋白表达水平)。以氨基黑法检测蛋白浓度。蛋白变性后进行 10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白(蛋白上样量 25 μ g),转硝酸纤维素膜,用 50 g/L 脱脂牛奶室温封闭 30~60 min,一抗(1:500)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,二抗(1:2 000)室温孵育 1 h,TBST 洗膜,ECL 法发光,在化学发光影像分析系统检测抗体信号并进行灰度分析,以 β -actin 作为内参计算蛋白相对表达水平的变化。蛋白表达检测实验进行至少 3 次,实验结果中给具有代表性的 Western Blot 结果。

1.2.5 统计学分析

统计分析采用 SPSS 14.0 统计软件完成,结果均以“均数 $\pm$ 标准差”表示。首先用方差分析来检验各组间是否有显著性差异,当存在显著性差异时,用 t 检验分析各均数间是否有显著性差异。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义, $P<0.01$ 为极显著差异。

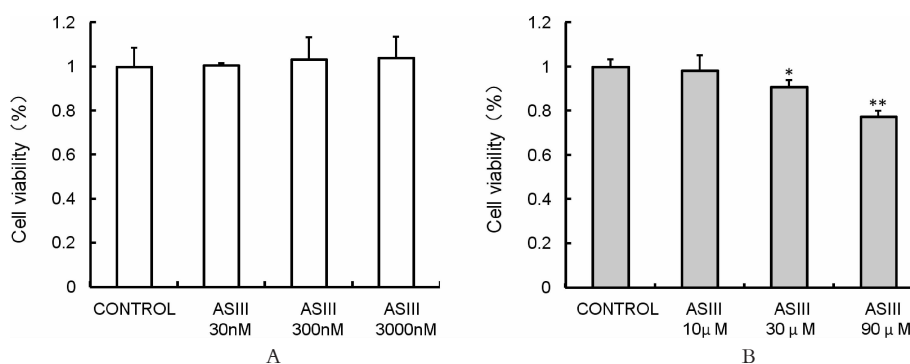
2 结果

2.1 AS III 对 ASMCs 细胞活力的影响

检测不同浓度 AS III 处理 8 h 对 ASMCs 细胞活力的影响,结果如图 2 所示,AS III 在 30 nM、300 nM 及 3 000 nM(本实验中所采用的最高浓度)范围内对 ASMCs 细胞活力无显著影响(图 2A)。不过,在实验中我们发现,AS III 浓度在 30 μ M 以上时可能引起细胞活力降低(图 2B)。

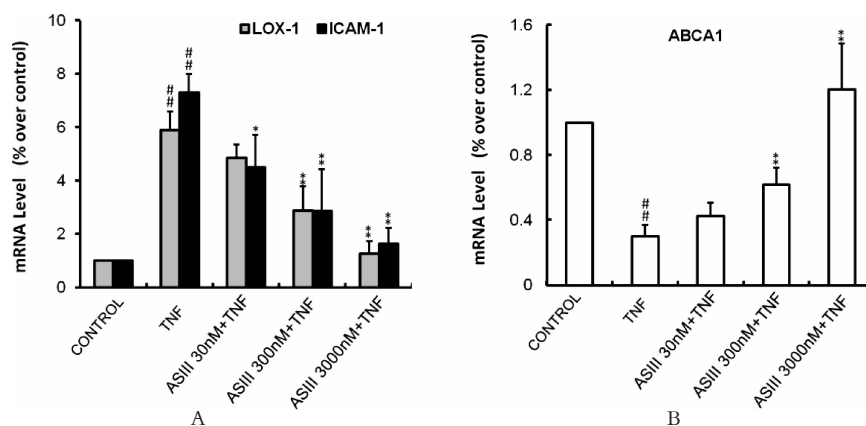
2.2 AS III 抑制 TNF- α 对 ICAM-1、Lox-1 和 ABCA1 mRNA 表达的调控

图 3 显示,应用不同浓度 AS III 预处理细胞 2 h 可抑制 TNF- α 对上述基因表达的调控作用,AS III 高剂量组(3 000 nM)的抑制作用最为显著($P<0.01$),



注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

图 2 ASIII 对 ASMCs 细胞活力的影响



注:与对照组比较,### $P<0.01$;与 TNF 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

图 3 ASIII 抑制 TNF α 对 ICAM-1、Lox-1 和 ABCA1 mRNA 表达的调控

中、低剂量也表现一定的抑制作用。AS III 单独应用对 ICAM-1、Lox-1 和 ABCA1 mRNA 表达无影响。

2.3 AS III 抑制 TNF- α 对 ICAM-1、Lox-1 和 ABCA1 蛋白表达的调控

结果如图 4 所见, 30 ng/mL TNF- α 可显著诱导 ASMCs 中 ICAM-1 和 Lox-1 蛋白表达水平上调, 而 ABCA1 蛋白表达下调; AS III 预处理细胞 2 h 可抑制 TNF- α 对这些蛋白分子表达水平的调控作用。AS III 高剂量组 (3 000 nM) 对蛋白表达的抑制作用最为显著, 中、低剂量也表现一定的抑制作用, 这与其对基因表达的调控相一致。

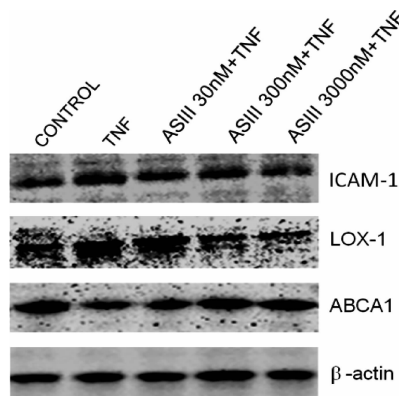


图 4 ASIII 抑制 TNF α 对 ICAM-1、Lox-1 和 ABCA1 蛋白表达的调控

2.4 AS III 抑制 TNF- α 诱导的经典 NF- κ B 信号通路激活

由图 5 可见, TNF- α 处理细胞 5 min 时可检测到细胞中 I κ B α 发生显著磷酸化, 随后 I κ B α 水平迅速下降, 表明其发生了降解; 采用 AS III 高剂量 (3 000 nM) 预处理 2 h 可显著抑制 TNF- α 诱导的 I κ B α 蛋白磷酸化和降解, 提示经典 NF- κ B 信号通路激活受到抑制。

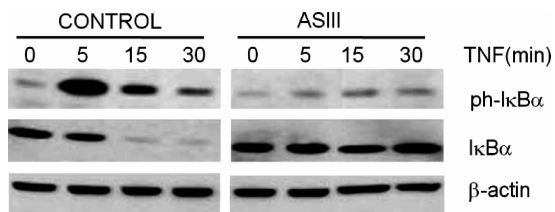


图 5 ASIII 抑制 TNF α 诱导的 I κ B α 磷酸化修饰和降解

2.5 AS III 抑制 TNF- α 诱导的 AKT、ERKs 和 p38 磷酸化

检测 AS III 是否可抑制 TNFR1 介导的 AKT、ERKs

和 p38 信号途径的激活, 结果如图 6 所示, 30 ng/mL TNF- α 可在 30 min 内迅速引起 AKT、ERKs 和 p38 磷酸化, 表明其被激活; 高剂量 (3 000 nM) AS III 预处理 2 h 则可显著抑制 TNF- α 诱导的 AKT、ERKs 和 p38 的磷酸化, 中剂量 (300 nM)、低剂量 (30 nM) AS III 也具有一定的抑制作用。

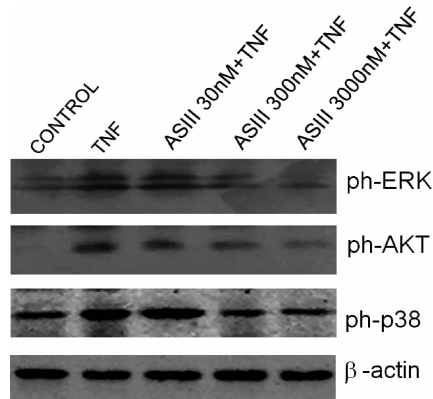


图 6 ASIII 抑制 TNF α 诱导的 ph-AKT 和 MAPKs 信号通路

3 讨论

本研究对 ASIII 是否可抑制 ASMCs 中 TNFR1 介导的细胞内信号通路进行了系统研究。结果发现, ASIII 可呈剂量依赖性抑制 TNFR1 介导的 ICAM-1 和 Lox-1 基因和蛋白表达上调, 同时抑制 ABCA1 基因和蛋白表达下调 (见图 3、4), 提示 ASIII 可通过抑制 TNF- α 对 ASMCs 黏附分子表达和胆固醇转运相关分子的调控而发挥抗炎和抗 AS 作用。

既往研究显示, TNF- α 与其细胞膜表面受体结合后, 可通过一个复杂的酶促过程诱导 NF- κ B 抑制因子 I κ B α 磷酸化, 随后其发生泛素化而被降解, 释放 NF- κ B p65 蛋白, 允许其转运入细胞核而调节核内基因表达, 此即为经典 NF- κ B 激活途径^[9]。本研究显示 ASIII 可显著抑制 TNF- α 诱导的 I κ B α 磷酸化和降解, 提示经典 NF- κ B 激活途径受到抑制, 这与上文对 ICAM-1、Lox-1 和 ABCA1 分子表达的调节相一致。此外, TNF- α 还可通过反式激活表皮生长因子受体 (epithelial growth factor receptor, EGFR) 而引起 AKT 和 ERKs 磷酸化激活^[10], 以及通过产生活性氧类 (reactive oxygen species, ROS) 而诱导 p38 磷酸化激活^[11], 参与对细胞增殖分化等生物学行为的调控。我们的研究结果显示, TNF- α 诱导的 AKT、ERKs 和 p38 磷酸化激活均受到 ASIII 抑制 (见图 5)。

体内外证据表明 TNF- α 在大血管和微血管循环

的破坏中起关键作用。在 AS 中, TNF- α 不仅通过引起血管内皮细胞氧化损伤, 诱导 ICAM-1 等黏附因子表达上调, 以及调节 NO 的产生而有利于 AS 的始动, 还通过对血管平滑肌细胞表型转化、增殖、迁移、泡沫细胞化和钙化等生物学性状进行调控, 进一步加速 AS 的发展, 并且可在后期通过影响基质金属蛋白酶 MMPs 的表达和活性而影响 AS 斑块的稳定性^[4]。TNF- α 的这些活性均主要通过细胞膜上 TNFR1 结合, 从而炎症转录因子 NF- κ B, 以及激活 PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)/AKT、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs, 包括 ERKs 和 p38) 等多条细胞内信号通路而达成。因此, 抑制 TNF- α 产生或抑制其 TNFR1 介导信号转导的药物对心血管系统具有保护作用。研究显示, 他汀类降脂药物的抗 AS 作用不仅与其降脂作用有关, 更与其抑制 TNF- α 产生和抑制 TNFR1 功能活性的作用相关^[12]。

黄芪作为传统医学治疗慢性炎症性疾病和心血管系统疾病的经典药物, 其活性成分十分复杂, 导致其药理学活性和作用机制至今未能完全解读。以往对于其标志性活性成分 ASIV 的研究难以全面解释黄芪、甚至黄芪皂苷的药理学活性。ASIII 作为 AST 中的另一种重要组分, 近年来已引起了研究者的关注。Wang 等^[13]报告 ASIII 对乳腺癌细胞生长具有抑制作用; 万春平等^[14]对 ASIII 的免疫调节作用进行了初步探讨, 认为其可能通过促进 IFN- γ 产生而介导免疫调节活性; Liu 等^[15]对 ASIII 在动物体内的药代动力学特性进行了研究。本研究中, 我们观察到 ASIII 对 ASMCs 中 TNFR1 介导信号的抑制作用, 以及对 ICAM-1 和 Lox-1、ABCA1 蛋白的调控, 提示 ASIII 至少可在膜受体水平上抑制 TNF- α 对 ASMCs 的功能调控, 为黄芪及 AST 的抗 AS 作用提供了新的实验依据。更为重要的是, 我们在小鼠 MC3T3 成骨细胞系和人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞系中也观察到类似的 ASIII 对 TNFR1 介导信号的抑制作用, 鉴于 TNF- α 在女性绝经期后骨质疏松和阿尔茨海默症等老年性疾病中的重要作用, 本研究为黄芪及 AST 在这些疾病中的应用提供了理论支持。后续研究中, 我们将对 ASIII 抑制 TNFR1 介导信号转导的分子机制进行深入研究。

此外, 据史静超等报告, 山西、甘肃、内蒙古以及

宁夏产黄芪中 ASIV 含量高于 AS III, 而吉林产黄芪样品中 AS III 含量是 ASIV 的 2.5~4.5 倍^[16], 结合本研究结果, 一定程度上为不同产地黄芪的作用特点或强度有所不同提供了背景资料。

参考文献:

- [1] 黄玫, 曲晶, 李晓天, 等. 黄芪化学成分及对心血管系统作用的研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2009, 29 (11): 1451-1453.
- [2] 王海芳, 曹情雯, 王娜娜, 等. 黄芪注射液和黄芪总皂苷注射液治疗冠心病心绞痛临床疗效的系统评价 [J]. 云南中医学院学报, 2017, 40 (1): 22-27.
- [3] Lee DY, Noh HJ, Choi J, et al. Anti-inflammatory cytochrome c-type saponins of *Astragalus membranaceus* [J]. *Molecules*, 2013, 18 (4): 3725-3732.
- [4] Zhang H, Park Y, Wu J, et al. Role of TNF- α in vascular dysfunction [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2009, 116 (Pt3): 219-230.
- [5] Zhang L, Connelly JJ, Peppel K, et al. Aging-related atherosclerosis is exacerbated by arterial expression of tumor necrosis factor receptor-1: evidence from mouse models and human association studies [J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19 (14): 2754-2766.
- [6] Liu QS, Wang HF, Sun AK, et al. A comparative study on inhibition of total astragalus saponins and astragaloside IV on TNFR1-mediated signaling pathways in arterial endothelial cells [J]. *PLoS one*, 2014, 9 (7): e101504.
- [7] Kroetsch JT, Levy AS, Zhang H, et al. Constitutive smooth muscle tumour necrosis factor regulates microvascular myogenic responsiveness and systemic blood pressure [J]. *Nat Commun*, 2017 (8): 14805.
- [8] 赵苗苗, 王海芳, 曹情雯, 等. 中药活性成分对 oxLDL 诱导血管平滑肌细胞泡沫化的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2017, 15 (3): 310-313.
- [9] Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway [J]. *Science*, 2002, 296 (5573): 1634-1635.
- [10] Broekman W, Amatngalim GD, de Mooij-Eijk Y, et al. TNF- α and IL-1 β -activated human mesenchymal stromal cells increase airway epithelial wound healing in vitro via activation of the epidermal growth factor receptor [J]. *Respir Res*, 2016, 17 (1): 3.
- [11] Potera RM, Jensen MJ, Hilkin BM, et al. Neutrophil azurophilic granule exocytosis is primed by TNF- α and partially regulated by NADPH oxidase [J]. *Innate Immun*,

- 2016, 22(8): 635–646.
- [12] Lin CP, Huang PH, Lai CF, et al. Simvastatin Attenuates Oxidative Stress, NF- κ B Activation, and Artery Calcification in LDLR $^{-/-}$ Mice Fed with High Fat Diet Via Down-regulation of Tumor Necrosis Factor- α and TNF Receptor 1[J]. PLoS One, 2015, 10(12): e0143686.
- [13] Wang SM, Tang LL, Chen FY. Astragaloside III from Astragalus membranaceus antagonizes breast cancer growth[J]. Afr J Tradit Complem, 2015, 12(3): 183.
- [14] 万春平. 黄芪皂苷 III 通过 IFN- γ 介导体外免疫调节作用的研究[J]. 云南中医中药杂志, 2011, 32(9): 69–71.
- [15] Liu XH, Guo L, Yang YL, et al. Development and Validation of a Rapid and Simple UPLC-ESI-MS Method for Pharmacokinetics and Tissue Distribution of Astragaloside III in Rats [J]. J Chromatogr Sci, 2016, 54(5): 811–818.
- [16] 史静超, 李浩铮, 王永辉, 等. 不同产地蒙古黄芪中黄芪甲苷、黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II 和黄芪皂苷 III 含量的比较与分析[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2015, 17(5): 1016–1021.

(编辑: 徐建平)

Inhibition of Astragaloside III on TNFR1-mediated Signaling Pathways in Mouse Arterial Smooth Muscle Cells

WANG Haifang¹, ZHANG Linping², HUO Xueping¹, ZHAO Xiangrong¹,
ZHAO Miaomiao¹, CAO Qingwen³, HU Jun¹, LIU Qinshe⁴

(1. Laboratory Center of Shaanxi Province People's Hospital, Xi'an 710068, China;

2. Medical School of Xi'an JiaoTong University, Xi'an 710061, China;

3. Department of Emergency, Shaanxi Province Hospital of Chinese Medicine, Xi'an 710003, China;

4. University of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 712046, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the inhibitory effect of astragaloside III (ASIII) on TNFR1-mediated signaling pathways in mouse arterial smooth muscle cells (ASMCs) and provide experimental evidence for the anti-inflammatory and anti-atherosclerotic actions of Chinese herbal medicine Radix Astragali (Huangqi). **Methods** The effect of ASIII on the cell viability of ASMCs was evaluated by conducting a WST-1 assay. The mRNA levels of ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), Lox-1 (lectin-like oxidized LDL receptor-1) and ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1) in ASMCs were measured using quantitative RT-PCR technique. Western Blot was performed to detect the effect of ASIII on TNF- α -induced modulation of ICAM-1, Lox-1 and ABCA1 protein levels. TNFR1-mediated phosphorylation and degradation of I κ B α , and phosphorylation of AKT, ERKs and p38 were also measured by using Western Blot analysis. **Results** (1) ASIII, when used at a concentration between 30 nM and 10 μ M, did not reduce the cell viability of ASMCs; (2) The TNF α -stimulated up-regulation of ICAM-1 and Lox-1, and down-regulation of ABCA1 expression level were inhibited by ASIII in a concentration-dependent manner; (3) ASIII suppressed the TNFR1-mediated phosphorylation and degradation of I κ B α protein; (4) ASIII suppressed TNFR1-mediated phosphorylation of AKT, ERKs and p38. **Conclusion** ASIII inhibits the TNFR1-mediated intracellular signaling pathways in ASMCs, which may in part explain its anti-inflammatory and anti-atherosclerotic effects.

KEY WORDS: astragaloside III; arterial smooth muscle cells; tumor necrosis factor- α ; TNFR1; NF- κ B; anti-inflammatory effect