

[文章编号] 1007- 3949(2000) - 01- 0043- 03

• 实验研究 •

## 三七总皂甙对人高脂血清诱发的胎儿血管平滑肌细胞增殖的抑制作用

周晓霞, 苏佩清, 杨鹤梅, 周晓慧

(承德医学院生物化学教研室, 河北省承德市 067000)

[主题词] 三七总皂甙/药理学; 肌, 平滑, 血管; 细胞培养; 高脂血症; 动脉粥样硬化; 透射电镜

[摘要] 为观察三七总皂甙对高脂血清刺激的人胎儿血管平滑肌细胞增殖的抑制作用。利用体外细胞培养技术, 用人高脂血清造成血管平滑肌细胞增殖的模型并通过 MTT 测定、细胞计数及透射电镜下的细胞超微结构的观察等方法, 观察了三七总皂甙对人胎儿血管平滑肌细胞的保护作用。结果发现, 人高脂血清可明显刺激人胎儿血管平滑肌细胞的增殖并引起其表型的改变。而三七总皂甙可呈浓度依赖性地抑制血管平滑肌细胞的增殖并可显著抑制高脂血清对血管平滑肌细胞的促增殖作用。此结果提示, 三七总皂甙的抗动脉粥样硬化作用可能部分是通过抑制血管平滑肌细胞异常增殖来实现的。

[中图分类号] R285.1

[文献标识码] A

### Inhibitory Effect of Panax Notoginseng Saponins on Proliferation of Cultured Vascular Smooth Muscle Cells Stimulated by Serum of Hyperlipidemia

ZHOU Xiao- Xia, SU Pei- Qing, YANG He- Mei, and ZHOU Xiao- Hui

(Department of Biochemistry, Chengde Medical College, Hebei Chengde 067000, China)

**MeSH** Panax Notoginseng Saponins/ pharmacology; Muscle, Smooth, Vascular; Cell Culture; Hyperlipidemia; Atherosclerosis; Microscope, Electron, Scanning Transmission

**ABSTRACT** **Aim** To investigate the protective effect of Panax Notoginseng Saponins (PNS) on the cultured aortic smooth muscle cells (SMC). **Methods** In this study, cell culture technique was used in vitro. The protective effect of PNS on the proliferation of SMC was observed by measuring MTT metabolism and cell numbers and observing cell ultrastructure under TEM.

**Results** The serum hyperlipidemia caused the increases in cell numbers and MTT metabolism of SMC. Under TEM, there are numerous rough endoplasmic reticulum and mitochondria and lipids in the cytoplasm of the cells cultured by serum of hyperlipidemia. The PNS can inhibit the proliferation of SMC dose-dependently and can inhibit the proliferation of SMC stimulated by serum of hyperlipidemia significantly. **Conclusions** The PNS may prevent atherosclerosis and inhibit progression of the atherosclerotic lesions by interfering with the proliferation of arterial SMC.

三七总皂甙(Saponins of Panax Notoginseng, PNS)是中药三七的主要活性成分, 对心脑血管具有广泛的药理作用。已有研究资料表明, PNS 可显著抑制实验性动脉粥样硬化兔主动脉内膜斑块的形成<sup>[1]</sup>, 并可抑制高脂血清刺激的血管平滑肌细胞的异常增殖<sup>[2]</sup>。为排除种属差异性, 本文利用体外细胞培养技术, 观察了人高脂血清对人胎儿血管平滑肌细胞的促增殖作用并观察了 PNS 对高脂血清刺激的人

胎儿血管平滑肌细胞增殖的抑制作用。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

胎儿(20 周龄, 水囊引产)由承德医学院附属医院妇产科提供, PNS(云南白药制药厂惠赠), DMEM 培养粉(GIBCO 公司), 胎牛血清(浙江省金华市清湖犊牛利用研究所), 胰蛋白酶(DIFCO 公司), MTT(Sigma 公司), 其余试剂均为国产分析纯。

#### 1.2 血管平滑肌细胞的原代培养及传代

参照文献[3]采用贴块培养法进行血管平滑肌细胞的原代培养。无菌条件下取胎儿胸主动脉的中膜, 剪成 1~ 2 mm<sup>3</sup> 的小块, 均匀贴于培养瓶底置于

[基金项目] 河北省科委资助课题, (课题号 96216107D)

[作者简介] 周晓霞, 女, 1960 年 2 月出生, 中国协和医科大学生物化学专业硕士研究生毕业。现任承德医学院生物化学教研室主任、分子生物学实验室主任, 副教授。主要研究方向: 高血压、动脉粥样硬化等心血管疾病的发病机制及防治研究。

37℃、CO<sub>2</sub>培养箱中,约4~6h后加入含20%胎牛血清的DMEM培养基静止培养,约2周左右50%的组织块周围均有细胞生长且连接成片时进行传代,传代培养基为含10%胎牛血清的DMEM液,实验用6~8代的传代细胞。

### 1.3 MTT的测定<sup>[4]</sup>

以 $5 \times 10^7/L$ 密度接种于96孔板的细胞长至次汇合状态时,用含0.4%胎牛血清的DMEM培养48h后,随机分为对照组及不同浓度PNS组,每组8孔,传代培养基继续培养72h后,用D-Hank液仔细洗2~3次,每孔加入MTT 15  $\mu L$  (5 g/L),置37℃、CO<sub>2</sub>培养箱中继续培养4h,弃去培养基,每孔加入二甲基亚砷0.2 mL,震荡混匀后于酶标仪570 nm波长下测吸光度值。

### 1.4 人正常血清及高脂血清的制备

人正常血清与高脂血清由附属医院检验科提供。收集后置56℃水浴灭活30 min并用0.2  $\mu m$ 的微孔滤膜过滤除菌。酶法测定高脂血清的胆固醇及甘油三酯的含量分别为5.12 g/L和7.13 g/L。胎盘兰染色排除细胞毒性<sup>[5]</sup>。

### 1.5 细胞计数

细胞以 $5 \times 10^7/L$ 的密度接种于24孔板,培养24h后,用含0.4%胎牛血清的培养基抑制培养48h。之后随机分为对照组及不同浓度PNS组,每组4孔,传代培养基继续培养72h按白细胞计数方法进行细

胞计数。

### 1.6 形态观察

细胞以 $1 \times 10^8/L$ 的密度接种于50 mL培养瓶中,培养24h后,用含0.4%胎牛血清的培养基抑制培养48h,之后随机分为正常人血清组、高脂血清组及高脂血清加PNS组,每组3瓶,培养一周后,胰酶消化收集细胞,D-Hank液洗二次后,戊二醛固定,常规脱水、包埋、切片、染色后,透射电镜下进行形态观察。

### 1.7 统计学处理

按student's *t* 检验

## 2 结果

### 2.1 不同浓度的三七总皂甙对人胎儿血管平滑肌细胞增殖的影响

经0.4%胎牛血清抑制处于G0/G1期的人胎儿血管平滑肌细胞重新换以含10%胎牛血清的DMEM培养基并加入不同浓度的PNS后,可使人胎儿血管平滑肌细胞对MTT的代谢率降低,细胞数目减少,并呈明显的剂量依赖关系(表1, Table 1)。经计算,*r*分别为-0.9977 ( $P < 0.001$ )和-0.9954 ( $P < 0.001$ )。此结果提示,三七总皂甙对人胎儿血管平滑肌细胞的增殖有抑制作用,且随浓度加大抑制作用加强。

表1. 不同浓度的三七总皂甙对培养的人胎儿血管平滑肌细胞增殖的影响

Table 1. Effect of PNS on the numbers and MTT metabolism of cultured vascular smooth muscle cells ( $\bar{x} \pm s$ )

Groups	Concentrations mg/L	MTT measurement		Cell counts	
		<i>n</i>	optical density	<i>n</i>	numbers ( $\times 10^5$ )
Control		8	0.665 $\pm$ 0.062	4	4.5 $\pm$ 1.0
PNS	200	8	0.588 $\pm$ 0.081 <sup>a</sup>	4	3.5 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>
	400	8	0.484 $\pm$ 0.054 <sup>b</sup>	4	2.9 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>
	600	8	0.402 $\pm$ 0.041 <sup>b</sup>	4	2.1 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>

a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ , compared with control group.

### 2.2 三七总皂甙对高脂血清刺激的人胎儿血管平滑肌细胞增殖的影响

人高脂血清可明显刺激人胎儿血管平滑肌细胞的增殖。高脂血清组的血管平滑肌细胞对MTT的代谢率及细胞计数均较对照组明显增加。PNS (600 mg/L)则可抑制高脂血清对人胎儿血管平滑肌细胞的刺激作用,使细胞计数从 $(7.8 \pm 1.7) \times 10^5$ 降低到 $(5.2 \pm 1.3) \times 10^5$ ,差异有极显著性统计学意义(表2,

Table 2)。

### 2.3 细胞形态学观察

透射电镜下,高脂血清组细胞粗面内质网、核糖体、线粒体明显增多,有些粗面内质网呈程度不同的囊性扩张,胞浆内可见有许多大小不一的脂滴,胞膜下有吞饮小泡,肌丝成分较少。与文献[6]描述的合成型SMC相似。而加用了PNS后,胞浆内脂滴明显减少,粗面内质网等细胞器与正常血清组相似。

表 2. 三七总皂甙对高脂血清刺激培养的血管平滑肌细胞增殖的影响

Table 2. Effect of PNS on the proliferation of cultured vascular smooth muscle cells stimulated by hyperlipidemia ( $\bar{x} \pm s$ )

Groups	MTT measurement		Cell counts	
	n	optical density	n	numbers( $\times 10^5$ )
Control	8	0.673 $\pm$ 0.032	4	4.8 $\pm$ 1.0
HL	8	1.031 $\pm$ 0.051 <sup>b</sup>	4	7.8 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>
HL+ PNS	8	0.743 $\pm$ 0.048 <sup>d</sup>	4	5.2 $\pm$ 1.3 <sup>d</sup>

HL: hyperlipidemia. b:  $P < 0.01$ , compared with control group; d:  $P < 0.01$ , compared with HL group.

### 3 讨论

动脉粥样硬化( atherosclerosis, As) 是严重威胁人类健康的疾病之一。而血管平滑肌细胞是动脉粥样硬化斑块中的最主要的细胞成分, 其增殖在动脉粥样硬化的发生、发展中起着关键作用<sup>[7]</sup>, 因而寻求研究抑制血管平滑肌细胞增殖的药物是动脉粥样硬化药物防治中的重要课题。动脉粥样硬化的发生机理十分复杂, 其中高脂血症通过损伤血管内皮细胞、促进血管平滑肌细胞异常增殖而成为导致动脉粥样硬化病变的重要致病因素。我们在本研究中利用体外细胞培养技术, 观察了 PNS 对正常血清培养的人胎儿血管平滑肌细胞及高脂血清刺激的人胎儿血管平滑肌细胞增殖的影响。结果发现: 人高脂血清可明显刺激人胎儿血管平滑肌细胞的增殖并引起其表型的改变, 而 PNS 可呈浓度依赖性地抑制血管平滑肌细胞的增殖并对高脂血清刺激的血管平滑肌细胞异常增生有显著的抑制作用, 此结果与林曙光等研究相一

致。另外, 我们用大鼠血管平滑肌细胞为实验对象, 也观察到相似的实验结果( 论文待发表), 说明 PNS 对不同种属的血管平滑肌细胞均有抑制作用, 提示 PNS 的抗动脉粥样硬化作用的部分机理是由于抑制血管平滑肌细胞异常增殖的结果。

有关 PNS 抑制血管平滑肌细胞增殖的机理尚不十分清楚, 有研究指出: PNS 可减少血管平滑肌细胞对  $Ca^{2+}$  的摄入<sup>[2]</sup>, 而细胞内钙离子是细胞增殖的强烈刺激剂。PNS 抑制平滑肌细胞增殖的部分原因可能是由于减少钙内流的结果, 而其更为确切的作用机制尚有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] 石琳, 范盘生, 吴玲, 等. 三七总皂甙升高颈动脉前列腺素 I<sub>2</sub> 及减低血小板血栓素 A<sub>2</sub> 的作用 [J]. 中国药理学报, 1990, 11(1): 29- 32
- [2] 林曙光, 郑熙隆, 陈绮云, 等. 三七总皂甙对高脂血清所致的培养主动脉血管平滑肌细胞增殖的作用 [J]. 中国药理学报, 1993, 14(4): 314- 316
- [3] 汪浩川, 刘秉文, 傅明德. 人动脉血管平滑肌细胞贴块培养法 [J]. 华西医科大学学报, 1995, 26(1): 105- 108
- [4] 黄文栋, 王亚凡. 一种测定细胞增殖和衰减的快速比色分析法 [J]. 生命的化学, 1994, 14(6): 44- 45
- [5] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养 [M]. 世界图书出版公司, 1996; 181
- [6] 刘青, 邓漪平. 高脂血清对离体培养兔主动脉平滑肌和斑块段细胞的影响 [J]. 中华心血管疾病杂志, 1988, 16(2): 103- 107
- [7] 汪浩川, 刘秉文. 生长因子、癌基因与动脉血管平滑肌细胞增殖 [J]. 生理科学进展, 1994, 25(1): 48- 53

(此文 1999- 11- 08 收到, 2000- 02- 08 修回)

(此文编辑 胡必利)

## • 消息 •

### 本刊加入万方数据资源系统( ChinaInfo) 数字化期刊群的声明

为了实现科技期刊编辑、出版发行工作的电子化, 推进科技信息交流的网络化进程, 我刊现已入网“万方数据资源系统( ChinaInfo) 数字化期刊群”, 所以, 向本刊投稿并录用的稿件文章, 将一律由编辑部统一纳入万方数据资源系统( ChinaInfo), 进入因特网提供信息服务。凡有不同意见者, 请另投它刊。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬, 不再另付。

万方数据资源系统( ChinaInfo) 数字化期刊群是国家“九五”重点科技攻关项目, 截止 1999 年底已有 1000 种期刊全文上网( 网址: <http://www.chinainfo.gov.cn/periodical>)。本刊全文内容按照统一格式制作编入万方数据资源系统( ChinaInfo), 读者可上因特网进入万方数据资源系统( ChinaInfo) 免费( 一年后开始酌情收费) 查询浏览本刊内容, 也欢迎各界朋友通过万方数据资源系统( ChinaInfo) 向我刊提出宝贵意见、建议, 或征订本刊。