

灯盏花素对兔血管平滑肌细胞增殖的影响

庞荣清¹, 潘兴华¹, 龙沛然², 覃敏², 吴亚玲³

(成都军区昆明总医院 1. 医学实验科, 3. 中医科; 2. 成都军区军事医学研究所电镜室, 云南省昆明市 650032)

[关键词] 细胞生物学; 灯盏花素对血管平滑肌细胞增殖的影响; 细胞培养; 灯盏花素; 血管平滑肌细胞; 细胞周期; 核因子 KB

[摘要] 观察灯盏花素对兔血管平滑肌细胞生长增殖、细胞超微结构及其细胞周期和核因子 KB 活性的影响, 以探讨其药理机制。胎牛血清刺激体外培养的兔血管平滑肌细胞使其快速增殖生长, 加入不同浓度的灯盏花素作用一定时间后, 通过 MTT 法测定灯盏花素对血管平滑肌细胞生长的抑制率, 流式细胞技术测定细胞周期和核因子 KB 活性以及用透射电镜观察细胞超微结构的变化。结果发现, 灯盏花素能明显抑制胎牛血清刺激的血管平滑肌细胞增殖 (IC₅₀ 为 17.9 mg/L), 并改变细胞的超微结构, 包括使细胞电子密度增大, 部分胞膜断裂, 粗面内质网和高尔基体呈空泡状扩张, 部分线粒体呈凝固性变化, 嵴减少或消失, 或呈凝固性坏死。灯盏花素还以浓度依赖方式减少 S 期细胞, 阻滞细胞于 G₀/G₁ 期, 并下调核因子 KB 活性。结果提示, 灯盏花素能显著抑制血管平滑肌细胞的增殖生长, 可能具有抗动脉粥样硬化的作用, 其作用机理可能部分是通过调控血管平滑肌细胞核因子 KB 活性来实现的。

[中图分类号] Q2

[文献标识码] A

Effect of Breviscapine on the Proliferation of Rabbit Vascular Smooth Muscle Cells

PANG Rong-Qing, PAN Xing-Hua, LONG Pei-Ran, QIN Min, and WU Ya-Lin

(Kunming General Hospital of Chengdu Military District, Kunming 650032, China)

[KEY WORDS] Breviscapine; Vascular Smooth Muscle Cell; Cell Cycle; Nuclear Factor- κ B; Atherosclerosis; Cell Culture

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of breviscapine on the proliferation, cell ultrastructure, cell cycle and nuclear factor- κ B (NF- κ B) activity of rabbit vascular smooth muscle cell (VSMC) in order to find out the mechanism of its action.

Methods By techniques of cell culture in vitro, VSMC stimulated by fetal bovine serum were treated by breviscapine in different concentration for a certain period, then the inhibitory ratio of cell proliferation was measured by MTT, cell cycle distribution and NF- κ B activity of the cell were measured by Flow-Cytometry respectively, and the cell ultrastructure was observed by transmission electron microscopy (TEM).

Results Breviscapine could obviously inhibit the proliferation of VSMC stimulated by fetal bovine serum (IC₅₀ value was 17.9 mg/L), and change the cell ultrastructure, which included that electron density increased, a part of cytomembrane lysed, endoplasmic reticulum and Golgi apparatus showed vacuolar degeneration, some mitochondrion showed coagulation and mitochondrial crista disappeared or showed coagulation. Breviscapine could also decrease S phase cells, increase G₀/G₁ phase cells and down regulate NF- κ B activity of VSMC by concentration dependent fashion, and the results were significant compared with the control ($P < 0.01$).

Conclusion Breviscapine could obviously inhibit the proliferation of VSMC and may prevent atherosclerosis, which mechanism may be realized partly by regulating NF- κ B activity of VSMC.

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 的异常增殖迁移和表型改变是动脉粥样硬化和血管成形术后狭窄的关键环节, 也是高血压等心脑血管疾病的主要病理学基础。随着基础研究的深入, 人们认识到 VSMC 成为心血管疾病药物治疗作用的靶细胞之一, 因此, 以 VSMC 为细胞模型筛选出有效抑制其生长增殖而毒副作用较低的药物并研

究其作用机理, 是近年来医学研究的难点和热点之一。本研究运用体外培养的兔 VSMC 为模型, 观察中药灯盏花素 (breviscapine) 对兔 VSMC 增殖、细胞超微结构、细胞周期及其核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 活性的影响, 以探讨灯盏花素在动脉粥样硬化防治中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1 ± 0.3 kg 的新西兰兔由昆明总医院实验动物基地提供, 灯盏花素购自云南省生物制药厂, DMEM 培养基、 α -型胶原酶和精制胎牛血清 (FBS) 均

[收稿日期] 2003-07-04 [修回日期] 2004-03-25

[基金项目] 云南省自然科学基金(2001C029Q)资助

[作者简介] 庞荣清, 硕士, 主治医师, 主要研究方向是动脉粥样硬化的防治及其药理学研究, E-Mail 为 pangrq2000@yahoo.com.cn。潘兴华, 博士, 博士后, 副主任医师, 主要研究方向是骨髓干细胞的临床应用研究。龙沛然, 副研究员, 电镜室主任, 主要从事电子显微镜技术及细胞超微结构研究。

为 GIBCO 产品; MTT 和 α -SM-actin 为 Sigma 公司产品, 单克隆抗体核因子 κ B p65 为美国 Santa Cruz 公司产品, 酶标仪为美国产 DYNEX REVELATION3. 2, 流式细胞仪为美国产 COULTER EPICS \times L, CO_2 培养箱为 HERAUSE 公司生产。

1.2 血管平滑肌细胞的分离和培养

无菌条件下取兔胸主动脉中膜, 剪成小块, 0.1% Ⅲ型胶原酶 37℃ 消化 2 h, 换成 10% FBS 的 DMEM 于 37℃、5% CO_2 培养箱中静置培养 3~4 天后更换培养基。细胞生长汇合后, 经胰蛋白酶消化传代培养, 用 α -SM-actin 进行鉴定。第 6~7 代 VSMC 用于实验。

1.3 灯盏花素 50% 抑制率浓度测定

取生长良好的细胞, 调浓度为 $4.5 \times 10^7/\text{L}$ 后接种于 96 孔细胞培养板, 参照文献[1]采用 MTT 法测定不同浓度灯盏花素作用的兔 VSMC 的相应吸光度 (absorbent, A) 值, 按公式 $(1 - A_{\text{实验}} \div A_{\text{对照}}) \times 100\%$ 得出不同浓度对应的抑制率, 通过回归分析获得灯盏花素 50% 抑制率浓度 (IC₅₀)。

1.4 药物处理

取生长良好的细胞用无血清的 DMEM 培养基调整细胞浓度为 $4.5 \times 10^7/\text{L}$, 接种到 100 mL 小方瓶中培养 24 h 后, 弃培养基, 换成含 15% FBS 的 DMEM 培养基, 参照 IC₅₀ 浓度分别加入不同浓度的灯盏花素, 继续培养一定时间后消化收集细胞作以下实验。

1.5 细胞周期测定

加入药物继续培养 72 h 后, 消化收集的细胞用 PBS 洗 2 次制成单细胞悬液, 70% 冷乙醇固定, 调整细胞浓度为 $10^9/\text{L}$, 加入 RNase 消化, PBS 洗涤, 加碘化丙啶 (PI) 反应 30 min, 过滤后用流式细胞仪分析测定各组份细胞所占检测细胞数的比例。

1.6 核因子 κ B 活性测定

加入药物继续培养 5 天后, 参照试剂盒说明书的方法, 消化收集细胞用 PBS 洗 2 次制成单细胞悬液, 加入稀释的一抗核因子 κ B p65, 37℃ 反应 30 min, 洗涤后加入二抗 FITC-IgG100 μL , 37℃ 反应 30 min, 离心洗 2 次, 加入 100 μL PBS, 过滤后上流式细胞仪检测。以标记上荧光的细胞为阳性细胞, 计算阳性细胞占细胞总数的百分比, 即阳性细胞标记率。

1.7 细胞形态学观察

加入药物继续培养 5 天后, 消化收集细胞, 用 3% 戊二醛固定, 按电镜标本处理方法制备电镜超薄切片进行形态学观察。

1.8 统计学分析

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS8.0 系统软件中的 t 检验和相关分析进行统计处理。

2 结果

2.1 灯盏花素的 50% 抑制率浓度

15% FBS 显著刺激 VSMC 增殖生长, 使其对 MTT 的代谢率明显提高, 而灯盏花素显著抑制 FBS 的这种增殖效应, 使其对 MTT 的代谢率显著降低, IC₅₀ 为 17.9 mg/L。

2.2 灯盏花素对细胞周期分布的影响

随着灯盏花素浓度加大, G₀/G₁ 期细胞所占比例增多, 而合成增殖的 S 期细胞明显减少, 与对照组相比有显著差异 (表 1, Table 1)。说明灯盏花素能抑制细胞 DNA 的合成, 而且这种抑制作用与浓度存在明显的依赖关系。

2.3 灯盏花素对核因子 κ B 活性的影响

灯盏花素下调 VSMC 核因子 κ B 的表达率, 二者呈负相关 ($r = -0.989$), 灯盏花素能以浓度依赖方式降低 p65 蛋白表达, 与对照组相比有显著差异 (表 1, Table 1)。

表 1. 不同浓度灯盏花素对兔血管平滑肌细胞核因子 κ B 活性及其细胞周期分布的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Effect of different concentration of breviscapine on NF- κ B activity and cell cycle of rabbit VSMC

灯盏花素剂量 (mg/L)	细胞周期			NF- κ B 阳性 表达率
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
0	32.8% \pm 1.5%	53.4% \pm 1.6%	13.8% \pm 1.1%	46.3% \pm 0.9%
10	40.9% \pm 2.5% ^a	48.8% \pm 2.5% ^a	10.3% \pm 1.4% ^a	37.9% \pm 2.3% ^b
20	55.5% \pm 2.0% ^b	36.4% \pm 3.2% ^b	8.1% \pm 2.5% ^b	21.3% \pm 1.5% ^b
30	85.6% \pm 2.8% ^b	11.2% \pm 1.4% ^b	3.2% \pm 1.1% ^b	4.1% \pm 1.7% ^b

a: $P < 0.05$. b: $P < 0.01$. 与对照组相比。

2.4 细胞形态学观察

电镜下可见对照组细胞呈圆形或椭圆形, 细胞

器丰富,粗面内质网呈空泡状扩张,可见大量溶酶体和线粒体,高尔基体丰富。核膜核孔较多,核仁小,核内以常染色质为主;而灯盏花素作用的细胞,出现明暗两种细胞,电子密度增大,部分胞膜断裂,有的变成突起似绒毛状,甚至细胞界限不清。粗面内质

网和高尔基体呈空泡状扩张,部分线粒体呈凝固性变化,嵴减少或消失,甚至细胞核、细胞质电子密度呈均匀增高,细胞器结构不清,大片空泡变性,或呈凝固性坏死(图 1, Figure 1)。

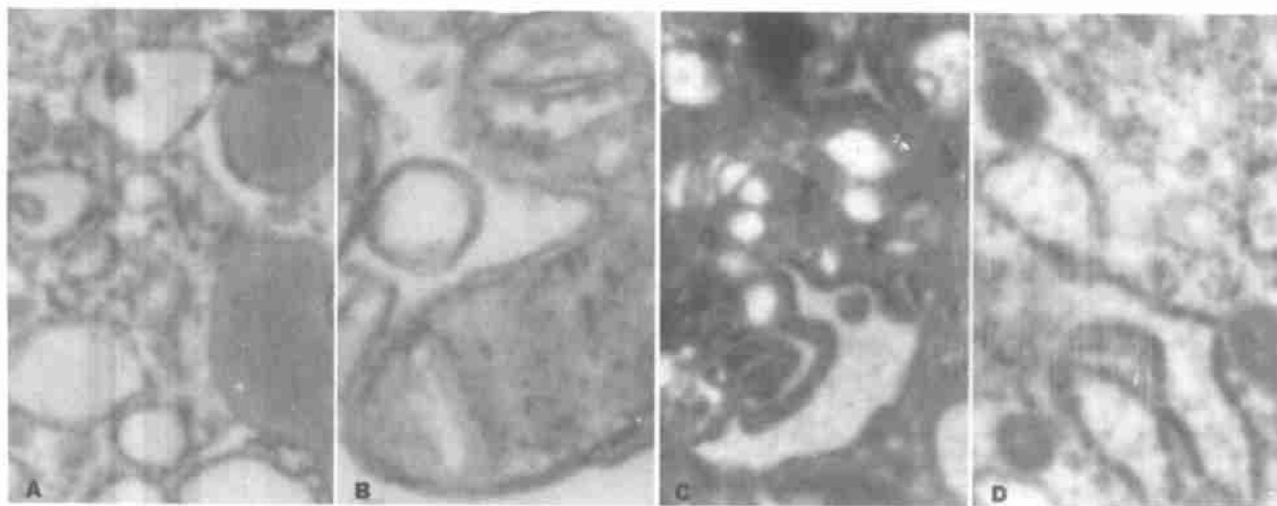


图 1. 电镜观察血管平滑肌细胞 A 为对照组, 5000 \times ; B 为对照组, 20000 \times ; C 为灯盏花素组, 5000 \times ; D 为灯盏花素组, 10000 \times 。

Figure 1. The vascular smooth muscle cell morphology under electromicroscope

3 讨论

动脉粥样硬化是心血管疾病的主要病理生理基础,其细胞学实质之一则是血管平滑肌细胞的异常增殖及由中膜层向内膜层迁移,同时产生过量的细胞外基质,导致纤维组织增生,最终形成斑块或血栓^[2]。按传统的中医药学理论来说,现代医学所指的“动脉粥样硬化”应属“血瘀”的范畴,因此,抗动脉粥样硬化治疗就是中医药学中“活血化瘀”疗法的一部分。灯盏花素是从云南特有的菊科植物中药——灯盏细辛(*erigeron brevicaupine*)提取到的黄酮类化合物,具有较强的活血化瘀功效。临床上常用于治疗脑血管意外所致的瘫痪、视网膜静脉阻塞、冠心病等,其药理作用是扩张血管,降低血液粘稠度,抗血小板和红细胞聚集,改善微循环^[3]。通常认为黄酮类化合物的生理活性是抗氧化,清除氧自由基。

本研究发现,灯盏花素能显著抑制胎牛血清刺激的兔 VSMC 的快速增殖生长,并能以浓度依赖方式影响细胞周期分布和下调核因子 κB 的活性,提示灯盏花素可能具有抗动脉粥样硬化的作用,其作用机理可能部分是通过调控 VSMC 的核因子 κB 活性来实现的。灯盏花素影响细胞周期分布的结果与王昌明等^[4]对牛肺动脉平滑肌细胞的研究结论相一致。此外,相关的动物实验也证实灯盏花素可抑制

豚鼠气道上皮细胞核因子 κB 活性^[5],这说明灯盏花素对不同物种细胞的药理作用具有普遍性。事实上,灯盏花素是蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 的抑制剂,而 PKC 在包括 VSMC 在内的多种细胞中广泛存在,在增殖调控的信号通路中起着关键作用。Zhou 等^[6]研究发现 PKC 对肺动脉胶原的表达具有调控作用,灯盏花素能通过抑制 PKC 活性和降低胶原表达而降低肺动脉高压。Ramana 等^[7]研究了醛糖酶抑制剂对 VSMC 增殖抑制机理后发现,抑制剂是通过阻止抑制蛋白 (IKB) 磷酸化和降解,即通过核因子 κB 调节介导肿瘤坏死因子 α 的作用,间接降低 PKC 活性的方式来调节 VSMC 的,即核因子 κB 活性降低与 PKC 主导的信号通路受阻有关。动脉粥样硬化是一种慢性炎症过程^[8],受核因子 κB ^[9]、PKC^[5]等因素调控的 VSMC 异常增殖导致血管壁增生就是这种“炎症学说”的一种表现形式。从这个意义上说,具有抗氧化作用的灯盏花素同样具有抗炎作用,因为灯盏花素可以调节核因子 κB 和 PKC 而调控 VSMC 的增殖生长。

核因子 κB 是普遍存在于细胞浆中的一种快反应转录因子,它由 p65 和 p50 等五个亚基组成。静息状态下核因子 κB 的 p65 亚基与 IKB 结合,覆盖 p50 蛋白的核电位信号,使核因子 κB 以非活性形式

存在于细胞浆中。受到免疫刺激因子刺激时, IKB 磷酸化而解离, 暴露 p50 亚基上的核电位信号使核因子 κ B 活化, 迅速发生核易位而进入细胞核与相应序列结合而启动靶基因转录。众多研究提示核因子 κ B 存在于动脉粥样硬化病变的主要组成细胞, 即单核细胞、血管内皮细胞和 VSMC 中, 而单核细胞粘附于血管壁进而迁入内皮下间隙又被认为是动脉粥样硬化的最早期病变^[10, 11]。正常的血管内膜及中膜都没有激活的核因子 κ B 存在, 而发生动脉粥样硬化的 VSMC 和巨噬细胞中都大量存在激活的核因子 κ B^[12]。核因子 κ B 的激活是 VSMC 的必经和始动环节。Ramana 等^[7]的研究直接证明了核因子 κ B 在调节 VSMC 增殖的重要作用。核因子 κ B 还参与细胞周期的调节, 它可结合在细胞周期素 D1(cyclin D1) 的启动子激活其转录, 有利于细胞的 G₁ 期向 S 期转移, 促进细胞增殖^[13]。抗炎因子白细胞介素 11 能通过抑制核因子 κ B 表达而抑制人 VSMC 增殖的研究结果^[14]进一步验证了核因子 κ B 调节细胞周期的机制。可见以多条途径交织而成的、以核因子 κ B 为核心的调控网络主导着动脉粥样硬化的发生发展过程。本研究中灯盏花素抑制 VSMC 的作用机理可能就是通过上述的调控网络完成的。

[参考文献]

- [1] 庞荣清, 陈志龙, 朱玉昆, 张悦. 三七总皂甙对兔高胆固醇血清刺激的兔主动脉平滑肌细胞增殖及其释放一氧化氮的影响. 中国现代医学杂志, 2003, **13** (1): 56-57
- [2] Mitchell ME, Sidawy AN. The pathophysiology of atherosclerosis. *Semin Vasc Surg*, 1998, **11** (3): 134-141
- [3] 杨菊美. 灯盏花素临床应用进展. 中国药学, 2000, **9** (12): 64
- [4] 王昌明, 莫碧文, 曾锦荣. 灯盏花素对原代培养的牛肺动脉平滑肌细胞增殖的抑制作用. 中国药理学通报, 2002, **18** (4): 416-418
- [5] 熊维宁, 徐永健, 张珍祥, 王孝养, 莫碧文, 丁毅鹏, 等. 豚鼠哮喘模型核因子 κ B 的表达特点及灯盏花素对其作用的研究. 中国病理生理杂志, 2002, **18** (3): 272-275
- [6] Zhou H, Chen S, Wang L, He Q, Fan X. Regulation of the expression of pulmonary arterial collagen by protein kinase C and breviscapine in chronic hypoxic rats. 中华结核和呼吸杂志, 2002, **25** (6): 347-351
- [7] Ramana KV, Chandra D, Srivastava S, Bhatnagar A, Aggarwal BB, Srivastava SK. Aldose reductase mediates mitogenic signaling in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 2002, **277** (35): 32 063-070
- [8] 徐也鲁. 动脉粥样硬化——一种慢性炎症过程. 中国动脉硬化杂志, 2001, **9** (2): 93-95
- [9] 孙璐, 韦立新. 核因子 κ B 活化机制及其对粥样斑块细胞的作用. 中国动脉粥样硬化, 2001, **9** (2): 182-184
- [10] Ritchie ME. Nuclear factor- κ B selectively and markedly activated in humans with unstable angina pectoris. *Circulation*, 1998, **98** (17): 1 707-713
- [11] Wilson SH, Caplice NM, Simari RD, Holmes DR Jr, Carlson PJ, Lerman A. Activated nuclear factor- κ B is present in the coronary vasculature in experimental hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, 2000, **148** (1): 23-30
- [12] Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Kneuechel R, et al. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest*, 1996, **97** (7): 1 715-722
- [13] Hinz M, Krappmann D, Eichen A. NF- κ B function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G₀/G₁-to S-phase transition. *Mol Cell Biol*, 1999, **19** (4): 2 690-698
- [14] Zimmerman MA, Selzman CH, Reznikov IL, Raeburn CD, Barsness K, McIntyre RC. Interleukin 11 attenuates human vascular smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, **283** (1): H175-180

(此文编辑 文玉珊)

•资料•

《中国动脉硬化杂志》第三届编辑委员会

(2002- 08- 03)

名誉主编: 蔡海江*

主 编: 杨永宗*

副 主 编: 唐朝枢* 陈保生* 廖端芳* 叶 平* 胡必利*

秘 书 长: 胡必利 (兼)

编 委(按姓名拼音字母顺序排列):

陈 琪*	陈 媛	陈生弟	陈文垲	陈孝曙	范乐明*	高广道	高钰琪	葛均波
顾 瑛	关永源	何作云	胡维诚*	黄达德	霍 勇	金惠铭	李建军	李立明
李元建*	林曙光*	凌文华	凌亦凌	刘秉文	刘德文	刘乃丰	卢 建	欧阳静萍
潘敬运	阮长耿	阮秋蓉*	沈卫峰*	宋剑南	栗秀初	徐玉林*	王 炬	王家富
王建枝	王士雯	王树人*	韦立新*	温进坤*	沃兴德	吴可贵	吴立玲*	吴其夏
吴满平*	吴伟康	夏辉明	肖献忠	徐仓宝*	杨宝峰	杨向红*	杨英珍	尹卫东
詹思延	张 运	张道友	张闾珍	赵克森	赵水平*	周 新	朱广瑾	朱晓东

特邀编委: 陈富生 范江霖

注: 姓名右上角标* 者为常务编委