

[文章编号] 1007-3949(2006)14-02-0107-04

•实验研究•

半边莲生物碱抑制内皮素诱导的大鼠主动脉平滑肌细胞增殖

王婧婧¹, 范秀珍², 刘尚明¹, 魏欣冰¹, 任冬梅³, 陈融¹, 李莉¹, 胡维诚¹

(山东大学 1. 医学院; 2. 护理学院; 3. 药学院, 山东省济南市 250012)

[关键词] 病理学与病理生理学; 半边莲生物碱对血管平滑肌细胞增殖的影响; 免疫细胞化学; 半边莲生物碱; 内皮素; 增殖细胞核抗原; 增殖

[摘要] 目的 研究半边莲生物碱对内皮素诱导的血管平滑肌细胞增殖的作用。方法 用内皮素 1 刺激大鼠主动脉平滑肌细胞增殖, 以细胞计数试剂盒计数细胞个数、氘标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入检测 DNA 的合成量、免疫细胞化学技术观察增殖细胞核抗原的表达活性作为细胞增殖的指标, 并应用台盼兰拒染、乳酸脱氢酶检测观察半边莲生物碱的细胞毒性反应。结果 内皮素 1 (10^{-7} mol/L) 可明显促进细胞增殖(与对照组相比, $P < 0.01$); 半边莲生物碱和 BQ-123 均可抑制内皮素 1 所诱导的细胞增殖(与内皮素 1 组相比, $P < 0.05$); 半边莲生物碱的抑制作用与浓度存在明显的依赖关系, 但对活细胞数目和乳酸脱氢酶释放量均没有影响($P > 0.05$)。结论 半边莲生物碱(50~200 mg/L) 可浓度依赖性地抑制内皮素 1 所诱导的大鼠主动脉平滑肌细胞增殖, 且此抑制作用并非是通过细胞毒性作用实现的。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Lobelia Chinensis Lour Alkaloids Inhibiting Rat Aortic Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation Induced by Endothelin

WANG Jing-Jing¹, FAN Xiur Zhen², LIU Shang-Ming¹, WEI Xiur Bing¹, REN Dong-Mei³, CHEN Rong¹, LI Li¹, and HU Wei-Cheng¹

(1. School of Medicine; 2. School of Nursing; 3. School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250012, China)

[KEY WORDS] Lobelia Chinensis Lour; Aortic Vascular Smooth Muscle Cell; Endothelin; Proliferating Cell Nuclear Antigen; Proliferation; Rat

[ABSTRACT] Aim To determine the effect of scutellaria barbata alkaloid (LCLAs) on proliferation of cultured vascular smooth muscle cell (VSMC) induced by endothelin (ET). Methods Rat aortic VSMC was cultured and divided into four groups: ET group, ET+ LCLAs group, ET+ BQ-123 (the selective ETA receptor antagonist) group and control group, then the cell proliferation activity was subsequently quantified by cell counting kit-8 to count cell number, ^3H -TdR incorporation to measure DNA synthesis and quantitative immunohistochemical technique to investigate the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in VSMC. Cytotoxicity was measured by Lactate Dehydrogenase (LDH) colorimetry and Trypan blue exclusion tests.

Results Compared with the control group, ET-1 (10^{-7} mol/L) significantly enhanced the proliferation activity of VSMC ($P < 0.01$), 50 mg/L LCLAs inhibited the increase of cell number (6.01 ± 0.05 , $P < 0.05$) and ^3H -TdR incorporation (1464 ± 45 counts/min, $P < 0.05$) compared with ET group, but has no evident effect on the proliferation activity of PCNA. 100, 200 mg/L LCLAs and 10^{-6} mol/L BQ-123 markedly decrease the cell number (5.73 ± 0.09 , 4.81 ± 0.08 , 4.77 ± 0.06 , respectively), ^3H -TdR incorporation (1263 ± 41 , 1129 ± 49 , 1140 ± 56 counts/min, respectively) and the expression of PCNA (350 ± 29 , 341 ± 53 , 336 ± 39 , respectively) compared with ET group ($P < 0.01$).

Conclusions LCLAs (50~200 mg/L) inhibited ET-1-induced proliferation of VSMC in a dose-dependent manner and the effect was not due to nonspecific cytotoxicity.

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 的异常增殖是高血压、冠状动脉硬化和经皮

腔内冠状动脉成形术后再狭窄等疾病的共同病理基础。VSMC 的增殖受多种神经内分泌因子的调节, 其中内皮素 1 (endothelin-1) 作为一种强烈的促有丝分裂原, 能促进 VSMC 分裂和增殖。本实验室发现含有半边莲的清热解毒液可以使高脂血症大鼠内皮细胞合成和释放内皮素 1 减少^[1], 并进而发现半边莲生物碱 (scutellaria barbata alkaloid, LCLA) 可显著降低高脂血症大鼠血清内皮素 1 含量和抑制主动脉中膜平滑肌细胞增殖^[2]。本研究建立内皮素 1 刺激的

[收稿日期] 2005-04-11 [修回日期] 2005-12-01

[基金项目] 教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (No. 39730210) 和山东省自然科学基金资助项目 (No. Q2004C03)

[作者简介] 王婧婧, 博士研究生, 研究方向为心血管病理生理学, E-mail 为 jmsberry@163.com。范秀珍, 博士研究生, 副教授, 硕士研究生导师。通讯作者胡维诚, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为心血管病理生理学, 联系电话为 0531-8382044, E-mail 为 huweicheng@sdu.edu.cn。

大鼠主动脉平滑肌细胞增殖模型, 观察半边莲生物碱对 VSMC 增殖的影响。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

SD 大鼠购自山东大学医学院实验动物中心; 内皮素 1、BQ-123、台盼兰和二甲基亚砜(DMSO)等购自 Sigma 公司; DMEM、胰蛋白酶和新生小牛血清(NCS)等购自 Gibco 公司; 氚标胸腺嘧啶脱氧核苷(tritium-labelled thymidine, $^3\text{H-TdR}$)购自中国原子能研究所; 细胞计数试剂盒(cell counting kit-8)购自日本株式会社同仁化学研究所; α -actin、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)单克隆抗体和免疫组织化学 SP 试剂盒购于福州迈新生物技术公司, 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)测试盒购自南京建成生物工程研究所; 其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 半边莲生物碱的制备

由山东大学药学院天然药物化学教研室提供。半边莲产自广东省, 将半边莲药材粉碎, 粗粉置索氏提取器中, 加入约 5 倍量 95% 乙醇(含适量浓盐酸), 水浴加热提取 2 h, 过滤, 滤液减压浓缩得流浸膏; 流浸膏加适量热水混悬, 冷却后用乙醚多次萃取, 得到水溶液用浓氨水调 pH 值至 8~9 后乙醚多次萃取, 乙醚液加入无水硫酸钠放置过夜, 过滤, 回收溶剂得黄色油状物, 再加入 1 mol/L 盐酸将此油状物溶解, 过滤, 浓缩, 于冰箱中静置过夜, 析出 LCLA 结晶。将 LCLA 溶于 DMSO 中, 并以条件培养基(含 0.2% NCS 的 DMEM 培养基)配成所需浓度, DMSO 的最终浓度均小于 0.01%。

1.3 大鼠主动脉平滑肌细胞培养及鉴定

组织块贴壁法进行 VSMC 培养。倒置显微镜和 α -actin 免疫组织化学染色阳性证实为 VSMC, 纯度 > 95%。待细胞生长汇合出现“峰与谷”结构后, 用含 0.25% 胰蛋白酶消化液消化、传代培养。选 3~8 代细胞用于实验。

1.4 细胞计数^[3]

按细胞密度 $0.4 \times 10^8/\text{L}$ 将 VSMC 接种于 96 孔培养板, 每孔 0.1 mL, 细胞生长至次汇合状态时, 更换无血清 DMEM 饥饿培养 24 h, 使细胞同步化于 G_0/G_1 期。根据不同的实验分组加药: ①对照组加 0.2% NCS 的条件培养基; ②内皮素组加内皮素 1 终浓度为 10^{-7} mol/L 的条件培养基; ③内皮素 + LCLA 组加内皮素 1 (10^{-7} mol/L) 和不同剂量的 LCLAs

(终浓度为 50、100、200 mg/L); ④内皮素 + BQ-123 组加内皮素 (10^{-7} mol/L) 和 BQ-123 (10^{-6} mol/L) 的条件培养基; 孵育 24 h 后参照细胞计数试剂盒 (cell counting kit-8) 说明书在酶标仪 450 nm 波长处读取各孔吸光度值 (absorbance, A), 其数值大小与细胞的数目成正比。

1.5 氚标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入

将 VSMC 消化分离制成细胞悬液, 调整密度为 $5 \times 10^7/\text{L}$ 种入 24 孔培养板, 按以上实验分组及给药方案对细胞处理后, 继续孵育 18 h, 向各孔培养基中加入 $^3\text{H-TdR}$ 至终浓度为 0.1 Ci/100 L, 孵育 8 h, 加入冷 PBS 液终止反应。回收细胞, 液体闪烁计数器行放射活性计数测定。

1.6 免疫细胞化学染色

血管平滑肌细胞消化传代至 6 孔培养板上(板内预先置入 1 cm^2 消毒盖玻片), 实验分组及给药方案同上, 取出盖玻片, 按照免疫组织化学试剂盒步骤检测增殖细胞核抗原的表达。采用 SimplePCI (Compix, Inc.) 图像分析系统对各组免疫细胞化学结果进行图像分析, 所有玻片均在同一放大倍数 ($\times 200$)、同一光强度下分析。每组细胞各取 5 张玻片, 每张玻片随机抽取 3 个视野, 计算出阳性反应细胞的平均吸光度值 (average absorbance, A), 以上数据均由图像分析系统自动计算, 定量细胞中 PCNA 表达水平的高低。

1.7 不同浓度半边莲生物碱的细胞毒性实验

细胞接种于 96 孔培养板内, 在不同浓度 (0、50、100 和 200 mg/L) 的 LCLAS 溶液中孵育 24 h, 观察细胞的毒性反应 (变性、坏死、脱落), 台盼蓝染色排斥实验计算细胞存活率, 并按乳酸脱氢酶测试盒说明用紫外分光光度计测定乳酸脱氢酶释放量。

1.8 统计学处理

检测结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计学分析用 SPSS12.0 软件进行单因素方差分析 (one-way ANOVA), 多样本均数之间两两比较采用 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 血管平滑肌细胞鉴定

倒置相差显微镜下观察, 细胞呈长梭形放射状生长, 细胞疏密相间, 呈典型峰谷状排列。 α -actin SMC 单克隆抗体免疫细胞化学检测, 可见 90% 细胞胞浆中有大量与细胞长轴平行的细丝状棕褐色免疫反应产物 (图 1)。说明培养 VSMC 纯度达到 90%。

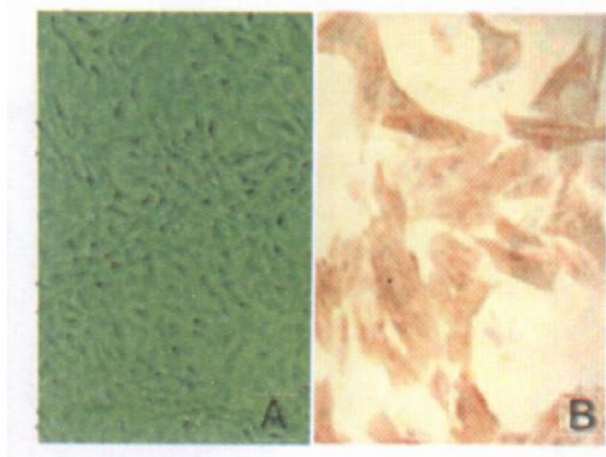


图 1. 血管平滑肌细胞鉴定 A 为显微镜下所见, 典型峰谷样排列 ($\times 40$), B 为 α -actin 免疫细胞化学鉴定 ($\times 100$)

2.2 各组药物对细胞增殖的影响

与对照组比较, 内皮素 1 (10^{-7} mol/L) 可明显增加 VSMC 增殖 ($P < 0.01$); 10^{-6} mol/L BQ-123 抑制内皮素 1 所诱导的 VSMC 增殖 ($P < 0.01$); 50、100 和 200 mg/L LCLA 预孵育使内皮素 1 诱导的细胞增殖均下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 并且 LCLA 的抑制作用呈剂量依赖性(表 1)。

2.3 各组药物对细胞 DNA 合成量的影响

10^{-7} mol/L 内皮素 1 使 VSMC $^3\text{H-TdR}$ 掺入量明显高于对照组 ($P < 0.01$), 10^{-6} mol/L BQ-123 抑制内皮素 1 所诱导的 VSMC 增殖 ($P < 0.01$); 50、100 和 200 mg/L LCLA 预孵育使内皮素 1 诱导的 VSMC $^3\text{H-TdR}$ 掺入量均下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 并且 LCLA 的抑制作用呈剂量依赖性(表 1)。

表 1. 实验各组药物对大鼠主动脉平滑肌细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

分 组	LCLAs 浓度 (mg/L)	细胞数目 (A450 nm/well)	氟标胸腺嘧啶掺入 (counts/min/well)	PCNA 表达水平 (A)
对照组		3.69 ± 0.11	1097 ± 53	316 ± 25
内皮素组		6.49 ± 0.12^a	1557 ± 48^a	419 ± 34^a
内皮素+ LCLAs 组	50	6.01 ± 0.05^b	1464 ± 45^b	396 ± 68
	100	5.73 ± 0.09^c	1263 ± 41^c	350 ± 29^c
	200	4.81 ± 0.08^c	1129 ± 49^c	341 ± 53^c
内皮素+ BQ-123 组		4.77 ± 0.06^c	1140 ± 56^c	336 ± 39^c

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与内皮素 1 组比较。

2.4 各组药物对增殖细胞核抗原表达活性的影响

增殖细胞核抗原的免疫阳性染色位于细胞核, 呈棕褐色, 核着色深浅不一。图像分析结果为: 内皮素组 VSMC 中的 PCNA 表达较对照组明显上调 ($P < 0.01$), 而内皮素+ LCLA (100 和 200 mg/L) 组、内皮素+ BQ-123 (10^{-6} mol/L) 组均可下调 VSMC 中 PCNA 的表达活性 ($P < 0.01$), 50 mg/L 的 LCLA 对此没有影响(表 1 和图 2)。

2.5 不同浓度半边莲生物碱的细胞毒性反应

倒置显微镜下各浓度 LCLA 组细胞生长良好, 形态正常, 无细胞脱落区, 无细胞碎片。台盼蓝染色排斥实验显示, 各浓度组细胞存活率均大于 95%, 上清液 LDH 差异无显著性 ($P > 0.05$)。结果表明 LCLA 抑制 VSMC 增殖不是非特异性细胞毒作用所致(表 2)。

3 讨论

内皮素 1 不仅具有强大的缩血管作用, 还是一

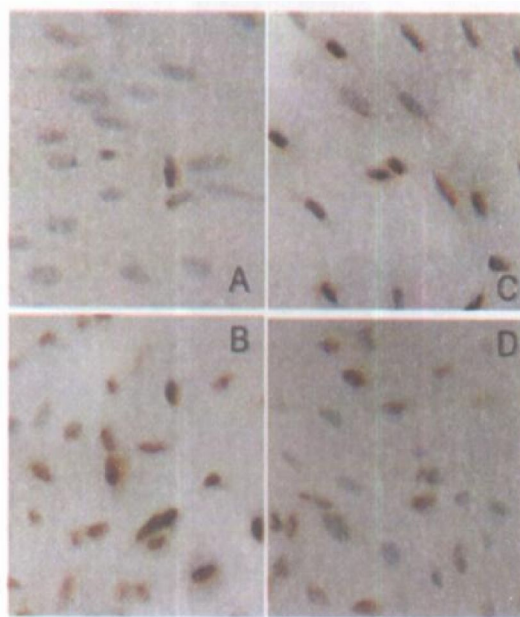


图 2. 各组药物对增殖细胞核抗原表达活性的影响 ($\times 200$)

A 为对照组; B 为内皮素组; C 为内皮素+ 100 mg/L LCLA 组; D 为内皮素+ BQ-123 组。

表 2. 不同浓度半边莲生物碱对细胞生存率和上清液乳酸脱氢酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

分 组	LCLA 浓度 (mg/L)	细胞生存率 (%)	乳酸脱氢酶活性 (U/L)
对照组		97.5 \pm 3.1	523 \pm 22
LCLAs 组	50	98.8 \pm 2.8	530 \pm 20
	100	97.4 \pm 5.2	518 \pm 36
	200	97.1 \pm 3.9	522 \pm 39

种平滑肌细胞促有丝分裂原,能促进细胞增殖与 DNA 合成^[4]。本文通过细胞计数试剂盒计数细胞个数、³H-TdR 掺入检测细胞 DNA 的合成量、免疫细胞化学染色观察 PCNA 的表达活性方法证实了上述理论。

内皮素只有与靶细胞膜上的内皮素受体(ETR)结合后,启动一系列细胞内信号传递过程,方可实现其生物学效应。内皮素受体(ETR)分为 ETAR、ETBR 和 ETCR 3 类,其中 ETAR 主要分布于 VSMC,对内皮素 1 有选择性亲和性,介导内皮素 1 对血管的收缩和血管壁增殖的作用,在动脉粥样硬化等血管增生性疾病的发生、发展过程中起着重要的中介作用^[5]。有报道,动脉粥样硬化和高血压患者血浆内皮素 1 的水平增高^[6],在粥样硬化斑块中 ETAR 表达增高,本文结果发现,内皮素 1 的上述促增殖作用能完全被 ETAR 特异性阻断剂 BQ123 所阻断,说明内皮素 1 的促 VSMC 增殖作用主要是由 ETAR 所介导的。

内皮素与自然界存在的某些生物毒素有一定亲缘关系^[7],包括蛇毒、蝎毒和蜂毒。SRTX 是从蛇毒中提取的一种毒素,可分为 SRTX-a(S6a)、SRTX-b(S6b)、SRTX-c(S6c)和 Btx(S6c)4 个亚型。对内皮素的 4 种亚型进行氨基酸序列分析发现,所有这些异构肽均包括 21 个氨基酸,其一级结构具有明显的同源性,至少有 60%~80% 氨基酸同源,而且有相同的 C-末端。研究证实,内皮素的 C-末端特别是 Trp21、两个二硫键、氨基和羧基端以及 Asp8 和 Glu10 的羧基对它的生物学活性起了重要的作用,构成了 SRTX 和内皮素表面的“共同和基本”的生物活性位点^[8]。SRTX 和内皮素构成一组同源性异构肽家族,竞争性结合相同的 G 蛋白偶联受体,通过 IP₃、Ca²⁺ 钙调蛋白激酶途径,引发各类生物学效应^[9],因此从抗蛇毒中药中探寻防治动脉粥样硬化和高血压等疾病

病的方法是可行的。

近年来发现抗蛇毒中药在拮抗内皮素作用、抑制 VSMC 增殖和保护血管内皮细胞(vascular endothelial cell, VEC) 功能及损伤修复方面,有着独到的作用^[10]。LCLA 为我国传统抗蛇毒中草药半边莲的有效成分,本研究也证明它可呈浓度依赖性抑制内皮素 1 所诱导的 VSMC 增殖活性,使细胞数目和³H-TdR 掺入减少,PCNA 蛋白表达减弱。说明 LCLA 具有抑制 VSMC 增殖的作用。

半边莲生物碱抑制内皮素 1 所诱导的 VSMC 增殖并非源自它的细胞毒性作用,因为用上述方法测得用药后 VSMC 的增殖活性、³H-TdR 掺入量和 PCNA 蛋白合成均比内皮素 1 处理组显著降低,但台盼兰染色和培养基上清中乳酸脱氢酶活力并无改变,后者是反映细胞膜功能状况的一种重要指标。因此可以断定 VSMC 活性下降并非细胞坏死所致。

多年来用活血化瘀法和芳香温通法治疗动脉粥样硬化性心脑血管病取得良好效果。但尚未有用清热解毒类中药防治心脑血管病的报道,本研究首次用离体细胞培养技术发现 LCLAs 能够抑制 VSMC 增殖,提示该类中药有可能用于临床防治动脉粥样硬化性心脑血管疾病。

[参考文献]

- [1] 杜艳芝, 闫晓梅, 胡维城, 刘玉梅, 张宝华, 李莉, 等. 清热解毒液对高脂血症大鼠内皮素影响的研究[J]. 中国病理生理杂志, 1999, 15 (12): 1134-137
- [2] 李瑞峰, 温海涛, 李莉, 陈融, 任冬梅, 胡维城, 等. 半边莲不同组分对内皮细胞内皮素及内皮源一氧化氮合酶代谢的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10 (1): 19-22
- [3] Ryuji H, Yoichi F, Masashi M, Yuko I, Fabio P, Silval, et al. SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cell[J]. *Nature Cell Biology*, 2004, 7 (6): 731-740
- [4] Komuro I, Kurihara H, Sugiyama T, Yoshizumi M, Takaku F, Yazaki Y. Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cell[J]. *FEBS Lett*, 1988, 238 (2): 249-252
- [5] Sakurai T, Yanagisawa M, Masaki T. Molecular characterization of endothelin receptors[J]. *TIPS Rev*, 1992, 13: 103
- [6] 荆清. 内皮素及其受体与动脉粥样硬化[J]. 中国动脉硬化杂志, 1997, 5 (2): 172-176
- [7] Sokolovsky M. Structure-function relationships of endothelins, sarafotoxins, and their receptor subtypes[J]. *J Neurochem*, 1992, 59 (3): 809-821
- [8] Ducancel F, Matre V, Dupont C, Lajeunesse E, Wollberg Z, Bdelah A, et al. Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding precursors of sarafotoxins. Evidence for an unusual "rosary-type" organization[J]. *J Biological Chemistry*, 1993, 268 (5): 3052-055
- [9] Pollock DM, Keith TL, Highsmith RF. Endothelin receptor and calcium signaling[J]. *FASEB J*, 1995, 9: 1196-204
- [10] 范秀珍. 清热解毒类中药抗动脉粥样硬化作用机制的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12 (2): 246-248

(此文编辑 朱雯霞)