

葛根素对血管平滑肌细胞增殖及 Bcl-2 蛋白和凝血酶受体 mRNA 表达的影响

许轶洲, 李佩璋, 王宁夫, 高炎, 马辉, 彭文辉

(杭州市第一人民医院心血管内科, 浙江省杭州市 310006)

[关键词] 细胞生物学; 葛根素对血管平滑肌细胞的作用; 流式细胞术; 葛根素; 血管平滑肌细胞; Bcl-2 蛋白; 凝血酶受体

[摘要] 目的 观察葛根素对凝血酶诱导的血管平滑肌细胞增殖及 Bcl-2 蛋白和凝血酶受体 mRNA 表达的影响, 旨在认识葛根素作用的分子机制。方法 以细胞计数法和流式细胞仪 DNA 含量测定, 细胞周期分析法观察凝血酶及葛根素对血管平滑肌细胞增殖和 DNA 合成的影响。凝血酶及葛根素等各处理因素作用 24 h 后, 用免疫印迹法检测 Bcl-2 蛋白表达, 以半定量逆转录聚合酶链反应检测凝血酶受体 mRNA 的表达。结果 凝血酶对血管平滑肌细胞有明显促增殖作用, 促增殖效应在 24 h 末达峰值, 且凝血酶浓度在 0.1~1.0 u/L 之间有剂量依赖关系; 葛根素呈剂量依赖性地抑制凝血酶诱导的细胞增殖、DNA 合成及血管平滑肌细胞 Bcl-2 蛋白的表达; 高浓度 (1.5×10^{-3} mol/L) 葛根素可显著抑制凝血酶诱导的凝血酶受体 mRNA 上调。结论 葛根素能抑制凝血酶诱导的血管平滑肌细胞增殖, 这可能与抑制 Bcl-2 蛋白有关, 并部分与其抑制凝血酶受体 mRNA 表达有关。

[中图分类号] Q2

[文献标识码] A

Effects of Puerarin on Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells and Expression of Bcl-2 Protein and Thrombin Receptor mRNA

XU Yi-Zhou, LI Pei-Zhang, WANG Ning-Fu, GAO Yan, MA Hui, and PENG Wen-Hui

(Department of Cardiology, the First People's Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310006, China)

[KEY WORDS] Puerarin; Vascular Smooth Muscle Cell; Bcl-2 Protein; Thrombin Receptor; Flow Cytometry; Western blot

[ABSTRACT] **Aim** To observe the role of puerarin on the proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) induced by thrombin and the effect of puerarin on the Bcl-2 protein and thrombin receptor (TR) mRNA expression. **Methods** Cell number and cell cycle analysis using flow cytometry were adopted as two different indicators of effects on proliferation of VSMC. Western blot was used to indicate the changes of Bcl-2 protein, and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to evaluate TR mRNA expression, with treatment of thrombin and puerarin after 24 h. **Results** Thrombin can significantly increase the cell numbers of VSMC, the peak of proliferation curve is at 24 h, and the effect of T is in a dose dependent manner (0.1~1.0 u/L). 1.5×10^{-5} ~ 1.5×10^{-3} mol/L puerarin can significantly suppress this stimulation of VSMC proliferation and DNA synthesis. Western blot demonstrated that treated with thrombin and puerarin after 24 h, thrombin can significantly increase Bcl-2 protein. 1.5×10^{-5} ~ 1.5×10^{-3} mol/L puerarin can significantly suppress this increase. RT-PCR demonstrated that thrombin can increase TR mRNA expression significantly, and 1.5×10^{-3} mol/L puerarin can suppress this increase.

Conclusions Puerarin can suppress the proliferation and DNA synthesis of VSMC promoted by thrombin. This inhibitory effects of puerarin are closely related with the suppression of Bcl-2 protein, and partly related with the suppression on TR mRNA.

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)增殖在动脉粥样硬化、经皮腔内冠状动脉成形术后再狭窄和高血压等多种心血管疾病的发生发展过程中起关键作用^[1]。凝血酶是一种强促有丝分裂物质,其效应由凝血酶受体(thrombin receptor, TR)

介导,TR活化可导致细胞内一系列信息传递物质的改变,从而调节细胞增殖。葛根素是从豆科植物野葛干燥根中提取的一种异黄酮类化合物,具有降血脂、抗动脉硬化等作用,并广泛应用于心脑血管疾病的治疗,但有关葛根素治疗血管性疾病的作用靶点及分子机制的研究目前还不多见。本研究建立凝血酶诱导的VSMC增殖模型,以葛根素作为干预因素观察其对凝血酶诱导的VSMC增殖的影响,并进一步观察葛根素对TR的表达以及原癌基因Bcl-2表达的影响,探讨其可能存在的抑制VSMC增殖的

[收稿日期] 2005-03-21

[修回日期] 2005-12-28

[作者简介] 许轶洲, 硕士, 副主任医师, 主要研究方向为冠心病诊治及药物防治的分子机理研究, E-mail 为 qqyzx@hotmail.com。李佩璋, 主任医师, 主要从事心血管疾病的诊治。王宁夫, 博士, 主任医师, 主要从事冠心病的介入治疗及研究。

分子机制,从而为葛根素药物的临床应用和深入开发提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)和 Trizol Reagent 试剂盒(Gibco 公司),凝血酶(Sigma 公司),葛根素注射液(浙江康恩贝集团),兔抗大鼠 Bcl-2 多克隆抗体(Sant Cruz 公司)。

1.2 血管平滑肌细胞体外培养及鉴定

组织贴块法培养 VSMC。无菌条件下分离 SD 大鼠胸主动脉,剪碎后加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基,37℃、5% CO₂ 孵箱内静置培养。实验用 4~9 代细胞。用光镜和免疫组织化学方法进行鉴定。

1.3 细胞计数

细胞以 10⁵/孔接种于 6 孔培养板,培养至 70% 汇合,换成 0.5% 新生小牛血清和 DMEM 培养基,静息 48 h,以不同剂量(0.1、0.3、1.0、3.0 及 10 u/L)的凝血酶刺激 24 h、或 1 u/L 凝血酶刺激不同时间(0、6、12、24、36 和 48 h)、或 1 u/L 凝血酶和不同浓度的葛根素(1.5×10⁻⁵、1.5×10⁻⁴及 1.5×10⁻³ mol/L)刺激 24 h,然后将各孔细胞消化,再悬浮成为单细胞悬液,置细胞计数板内计数,每孔重复 3 次,取平均值。

1.4 流式细胞仪细胞周期分析

在上述各处理因素作用 24 h 末,制成单细胞悬液,预冷 PBS 漂洗 2 次,200 目滤网过滤,70% 冷乙醇固定 4~24 h。加 Rnase(1 g/L) 100 μL/管,37℃水浴 10 min,再加入碘化丙啶染液(50 mg/L) 800 μL/管,4℃反应 30 min 以上。上流式细胞仪,每个样本检测 10 000 个细胞,用计算机求细胞周期各时相分布比率,计算增殖指数(proliferation index, PI)。

1.5 蛋白免疫印迹分析

在上述各处理因素作用 24 h 末,以预冷的 PBS 清洗 3 次,加入 1 mL 细胞裂解液 4℃裂解细胞 1 h,4℃、15 000 g 离心 5 min。取上清以 Folin 酚法测定蛋白含量。每个样本取总蛋白 10 μg,沸水浴 5 min 变性,12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,将蛋白转至硝酸纤维素膜上(100 V, 1 h)。转印蛋白质后的硝酸纤维素膜以含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 30 min,与稀释于封闭液中的一抗(1:200 稀释)孵育,4℃过夜,漂洗后,与辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗于室温下摇床孵育 2 h,再用 TBST 洗膜 1 h,其间更换 TBST 4 次,然后将膜于 ECL 试剂中准确温浴 1 min, X 光片曝光显影后经激光光密度扫描仪

测定信号条带的积分吸光度值。

1.6 逆转录聚合酶链反应

采用一步法抽提 RNA。紫外分光光度计测总 RNA 的纯度及含量。取总 RNA 1 μg,加 Olig(dT) 1 μg,在总体积 20 μL、42℃逆转录反应 1 h。TR、内参照 β-actin 引物由上海生物工程公司合成。TR 上游引物 5' GTG GTG TAT CCG ATC CAG TC3',下游引物 5' GAA GGC CGA GAA GTA GTA CG3',扩增片段长度 437 bp;β-actin 上游引物 5' GCT CTT CTA CTG GGT CTA GTA3',下游引物 5' ATC TAC CCG TGT CAC ACC CA3',扩增片段长度 150 bp。PCR 反应体系:逆转录产物 1 μL,引物 20 pmol/L,反应体积 25 μL。反应条件:95℃预变性 5 min;然后 95℃变性 45 s→55℃退火 30 s→72℃延伸 30 s,循环 30 次。取 6 μL 产物 2% 琼脂糖电泳,以 TR 与 β-actin 的 mRNA 扩增产物的电泳带密度扫描结果比值为细胞中 TR 基因表达的相对量。

1.7 统计学方法

所有实验重复 3 次,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 凝血酶与血管平滑肌细胞增殖的量效关系

对照组细胞计数为 $(4.08 \pm 0.054) \times 10^7/L$,分别以 0.1、0.3、1.0、3.0 及 10 u/L 的凝血酶处理 VSMC 24 h, VSMC 细胞计数分别为 $(4.82 \pm 0.11) \times 10^7/L$ 、 $(6.37 \pm 0.09) \times 10^7/L$ 、 $(8.78 \pm 0.08) \times 10^7/L$ 、 $(7.37 \pm 0.07) \times 10^7/L$ 和 $(5.28 \pm 0.12) \times 10^7/L$,与对照组相比显著增加(P 均 < 0.05)。其中凝血酶浓度在 0.1~1.0 u/L 之间呈剂量依赖关系。

2.2 凝血酶刺激血管平滑肌细胞增殖的时相关系

在 0、6、12、24、36 和 48 h,对照组细胞计数分别为 $(4.00 \pm 0.02) \times 10^7/L$ 、 $(4.10 \pm 0.05) \times 10^7/L$ 、 $(4.24 \pm 0.09) \times 10^7/L$ 、 $(4.20 \pm 0.11) \times 10^7/L$ 、 $(4.26 \pm 0.08) \times 10^7/L$ 和 $(4.29 \pm 0.13) \times 10^7/L$,凝血酶组细胞计数分别为 $(4.00 \pm 0.06) \times 10^7/L$ 、 $(4.78 \pm 0.10) \times 10^7/L$ 、 $(6.36 \pm 0.08) \times 10^7/L$ 、 $(8.64 \pm 0.12) \times 10^7/L$ 、 $(6.92 \pm 0.09) \times 10^7/L$ 和 $(4.98 \pm 0.07) \times 10^7/L$ 。与对照组比较,各时间段均有明显促增殖作用(P 均 < 0.05),24 h 时细胞计数达到峰值。

2.3 葛根素对细胞数量的影响

与对照组相比,凝血酶引起细胞计数显著增加($P < 0.05$),葛根素显著抑制这种增殖作用(P 均 < 0.05),并呈剂量依赖关系(表 1)。

表 1. 葛根素对凝血酶诱导的血管平滑肌细胞细胞计数和增殖指数的影响

分 组	细胞计数 ($\times 10^7/L$)	增殖指数
对照组	4.08 \pm 0.03	1
凝血酶	8.92 \pm 0.34 ^a	3.85 \pm 0.26 ^a
凝血酶+ 葛根素		
1.5×10^{-5} mol/L	7.94 \pm 0.45 ^b	2.97 \pm 0.12 ^b
1.5×10^{-4} mol/L	6.05 \pm 0.51 ^b	2.61 \pm 0.18 ^b
1.5×10^{-3} mol/L	5.12 \pm 0.22 ^b	1.61 \pm 0.11 ^b
葛根素	4.09 \pm 0.29	1.06 \pm 0.08

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与凝血酶组比较。

2.4 葛根素对细胞 DNA 含量的影响

与对照组相比, 凝血酶引起 DNA 含量显著增加 ($P < 0.05$), 葛根素显著抑制这种促 DNA 复制合成的作用 (P 均 < 0.05), 并呈剂量依赖关系 (表 1)。

2.5 葛根素对 Bcl-2 蛋白的影响

以对照组为 100%, 凝血酶作用 24 h 使 VSMC 的 Bcl-2 蛋白显著增加 ($P < 0.05$), 葛根素显著抑制凝血酶的这种促进作用 (P 均 < 0.05), 并呈剂量依赖关系 (表 2 和图 1)。

表 2. 葛根素对凝血酶诱导的血管平滑肌细胞 Bcl-2 蛋白表达的影响

分 组	Bcl-2 蛋白
对照组	1
凝血酶	1.97 \pm 0.09 ^a
凝血酶+ 葛根素	
1.5×10^{-5} mol/L	1.83 \pm 0.12 ^b
1.5×10^{-4} mol/L	1.60 \pm 0.05 ^b
1.5×10^{-3} mol/L	1.19 \pm 0.14 ^b
葛根素	1.05 \pm 0.03

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与凝血酶组比较。

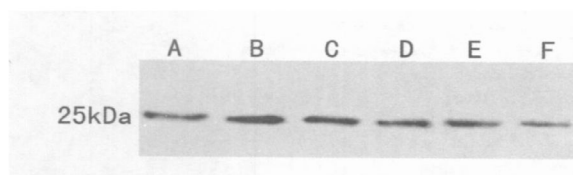


图 1. 葛根素对凝血酶诱导的血管平滑肌细胞 Bcl-2 蛋白表达的影响 A 为对照组, B 为凝血酶组, C 为凝血酶+ 1.5×10^{-5} mol/L 葛根素组, D 为凝血酶+ 1.5×10^{-4} mol/L 葛根素组, E 为凝血酶+ 1.5×10^{-3} mol/L 葛根素组, F 为 1.5×10^{-3} mol/L 葛根素组。

2.6 葛根素对凝血酶受体 mRNA 表达的影响

与对照组相比, 凝血酶使 VSMC 的 TR mRNA 表达量显著增加 ($P < 0.05$), 1.5×10^{-5} mol/L 和 1.5×10^{-4} mol/L 葛根素使凝血酶诱导的 TR mRNA 表达略

有下降, 但无统计学意义 ($P > 0.05$)。而 1.5×10^{-3} mol/L 葛根素显著抑制凝血酶诱导的 TR mRNA 表达的增加 ($P < 0.05$), 见表 3 和图 2。

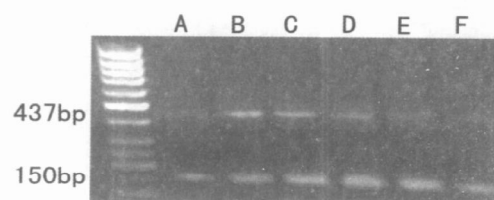


图 2. 葛根素及凝血酶对血管平滑肌细胞的凝血酶受体 mRNA 表达的影响 A 为对照组, B 为凝血酶组, C 为凝血酶+ 1.5×10^{-5} mol/L 葛根素组, D 为凝血酶+ 1.5×10^{-4} mol/L 葛根素组, E 为凝血酶+ 1.5×10^{-3} mol/L 葛根素组, F 为 1.5×10^{-3} mol/L 葛根素组。

表 3. 葛根素对凝血酶诱导的血管平滑肌细胞凝血酶受体 mRNA 表达的影响

分 组	凝血酶受体 mRNA
对照组	0.56 \pm 0.05
凝血酶+ 葛根素	
1.5×10^{-5} mol/L	1.55 \pm 0.04
1.5×10^{-4} mol/L	1.49 \pm 0.08
1.5×10^{-3} mol/L	1.31 \pm 0.06 ^b
葛根素	0.55 \pm 0.03

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与凝血酶组比较。

3 讨论

血管平滑肌细胞 (VSMC) 的异常增殖是内膜肌层和内皮损伤的重要标志, 在高血压、动脉硬化及 PTCA 术后再狭窄^[1] 的形成中具有重要的作用。许多促 VSMC 增殖的因子, 如血管紧张素、内皮素等可通过其促 VSMC 增殖效应而引起上述病变的形成。凝血酶在血管机械性受损的急性期即可出现并在整个血管损伤的形成过程中持续高表达^[2], 且是这一过程的一个重要介质。凝血酶除了在血栓形成中起重要作用外, 作为丝氨酸蛋白酶, 还有许多其他细胞效应。如凝血酶可影响血管内皮细胞功能, 尤其对 VSMC 的生长起调节作用; 凝血酶尚能调节其他生长因子的表达^[3]。本研究以凝血酶作为 VSMC 的丝裂原, 探讨其促 VSMC 增殖的作用及其量效、时效关系。结果发现凝血酶明显促进细胞数量增加, 并且凝血酶浓度在 0.1~1.0 u/L 之间有剂量依赖性, 高浓度时则量效关系不明显。研究表明凝血酶是通过 TR 介导而刺激 VSMC 增殖^[4], 可能当凝血酶浓度在

1.0 u/L 时已达到受体饱和,因而高浓度不能进一步刺激 VSMC 增殖。这与 Schieffer 等^[5]的实验结果一致。本研究中凝血酶的作用在 24 h 达峰值,此后有所回落,但与对照组相比仍有显著的促增殖作用,提示凝血酶具有后发迟缓的促细胞增殖作用。凝血酶可诱导 VSMC 自分泌碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和血小板源生长因子 A(platelet derived growth factor-A, PDGF-A),用抗 bFGF 抗体或抗 PDGF-A 抗体均可减少凝血酶的促 VSMC 增殖效应^[3]。推测凝血酶的促增殖作用可能部分与其诱导 bFGF 和 PDGF-A 的自分泌有关。

葛根素有效成分为 4,7-二羟基 8-β-D 葡萄糖异黄酮,具有扩张血管、改善微循环作用,并能降低血浆中儿茶酚胺及内皮素的含量;调节一氧化氮合酶活性,升高体内一氧化氮水平^[6]。葛根素对心脑血管具有有益的作用,但机制未明。王绿娅等^[7]研究发现葛根素在诱导兔 VSMC 凋亡的过程中上调了葡萄糖调节蛋白 94 基因的表达。韩静等^[8]发现葛根素可抑制人脐动脉 VSMC 的增殖,在 0.1~25 μmol/L 时有剂量依赖关系。本研究发现浓度范围 1.5 × 10⁻⁵~1.5 × 10⁻³ mol/L 的葛根素可抑制凝血酶诱导的大鼠主动脉 VSMC 的增殖,并具有量效关系,与韩静等的研究结果基本一致,但葛根素有效浓度范围存在差异,可能是细胞增殖模型、处理因素作用时间等的不同所造成的。

与 VSMC 增殖一样,VSMC 的凋亡是调节内膜厚度演变的重要机制之一。细胞凋亡发生率和细胞增殖活性成正比以保持细胞总数不变。在 PTCA 术后再狭窄等病变中,可能这种平衡破坏,细胞凋亡受抑,增殖活跃。Bcl-2 是一种原癌基因,是调节细胞凋亡的基因家族—Bcl-2 家族的一员。Bcl-2 家族可分为抗凋亡基因(包括 Bcl-2、Bcl-XL、Bcl-w 等)和促凋亡基因(包括 Bax、Bak 等)两大亚族。康铁朵等^[9]研究认为,葛根素促 VSMC 凋亡与 Bax 表达增加,Bax/Bcl-XL 比值上升有关。本研究发现,凝血酶刺激 24 h 后,VSMC 中 Bcl-2 蛋白表达增加,而各浓度葛根素可使凝血酶诱导的 Bcl-2 蛋白表达显著下调,故认为葛根素抑制 VSMC 增殖的作用亦涉及对 Bcl-2 蛋白家族的调节。

在正常动脉 TR 呈低水平表达,在粥样斑块和动脉损伤处呈高水平表达,凝血酶能够持续定位于血管损伤部位并保持蛋白裂解活性说明凝血酶和 TR 在动脉粥样硬化等病变中起着重要作用。凝血酶的促细胞增殖作用是由 TR 介导,TR 活化随后导致细胞内一系列信息传递物质水平的改变,最终促

进 VSMC 增殖。因此 TR 是凝血酶诱导的细胞增殖信号转导通路上的一个重要环节。本研究中,凝血酶对体外培养的 VSMC 作用 24 h 可使其 TR mRNA 表达显著增加,推测可能的机制为:凝血酶作用于 TR 使其活化以后,TR 便快速地、不可逆地失活,需要新合成的 TR 重新分布到细胞膜表面才能恢复对凝血酶的反应性^[10]。TR 的合成增加,故 TR mRNA 表达上调。④凝血酶诱导了 VSMC 自分泌某些生长因子。凝血酶可诱导 VSMC 释放 PDGF-A 和 bFGF^[3],而 bFGF 和 PDGF 可促进 VSMC 上 TR 的表达。凝血酶作为一种丝裂源,与 PDGF、bFGF 等生长因子协同作用,在血管损伤后细胞增殖的启动和维持过程中发挥了重要作用。本研究亦证实了凝血酶的促 VSMC 增殖作用与其直接和/或间接诱导 TR mRNA 上调有关。同时,本实验发现较高浓度(1.5 × 10⁻³ mol/L)的葛根素可减轻凝血酶诱导的 TR mRNA 的上调。因此认为葛根素对凝血酶诱导的 VSMC 增殖,除了直接的抑制作用外,可能/至少在部分程度上与其抑制凝血酶诱导的 TR mRNA 表达增加,从而减轻对凝血酶的增殖作用的反应性有关。

本研究只是从一个侧面揭示了葛根素的作用机制,有关其抑制 VSMC 增殖的全面的、确切的机制,还有待于今后继续深入地研究。

[参考文献]

- [1] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s[J]. *Nature*, 1993, **362** (29): 801-809
- [2] Hatton MW, Ross B, Southward SM, Timleck-DeReske M, Richardson M. Platelet and fibrinogen turnover at the exposed subendothelium measured over 1 year after a balloon catheter de-endothelializing injury to the rabbit aorta: thrombotic eruption at the late re-endothelialization stage[J]. *Atherosclerosis*, 2002, **165** (1): 57-67
- [3] Bydlowski SP, Pares MM, Soares RP, Lopes AA. Stimulation of human smooth muscle cell proliferation by thrombin involves increased synthesis of platelet-derived growth factor[J]. *Chest*, 1998, **114** (1): 236-240
- [4] Li J, Gamette CS, Cahn M, Claytor RB, Rohrer MJ, Dobson JG Jr, et al. Recombinant thrombomodulin inhibits arterial smooth muscle cell proliferation induced by thrombin[J]. *J Vasc Surg*, 2000, **32** (4): 804-813
- [5] Schieffer B, Drexler H, Ling BN, Marrero MB. G protein-coupled receptors control vascular smooth muscle cell proliferation via pp60c-src and p21 ras[J]. *Am J Physiol*, 1997, **272** (6 Pt 1): 2 019-030
- [6] 高鹏,夏成青,王佩燕,刘禹庚,梅雪. 葛根素对全脑缺血再灌注后脑组织诱导型一氧化氮合酶影响的实验观察[J]. *中华急诊医学杂志*, 2001, **10** (2): 85-86
- [7] 王绿娅,刘舒,王伟,荆涛,吕燕宁,杜兰平,等. 葛根素能诱导血管平滑肌细胞凋亡部分相关基因差异表达[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (6): 487-490
- [8] 韩静,王伟,王绿娅,刘舒,康铁朵. 葛根素与大豆苷元对血管平滑肌细胞的抑制作用[J]. *中国中药杂志*, 2004, **29** (5): 437-440
- [9] 康铁朵,吕树铮. 葛根素诱导血管平滑肌细胞凋亡的实验研究[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2003, **12** (1): 703-705
- [10] Brass LF. Homologous desensitization of HEL cell thrombin receptor: distinguishable roles for proteolysis and phosphorylation[J]. *J Biol Chem*, 1992, **267**: 6 044-050

(此文编辑 文玉珊)