

[文章编号] 1007-3949(2009)17-09-0727-04

• 实验研究 •

## 萘哌地尔衍生物 YM ④对血管紧张素 ①诱导大鼠胸主动脉平滑肌细胞增殖的抑制作用

杨 征<sup>1,2</sup>, 邱 敏<sup>1,3</sup>, 吴 芹<sup>1</sup>, 黄燮南<sup>1</sup>

(1. 遵义医学院药理学教研室, 贵州省遵义市 563003; 2. 包头医学院第一附属医院心内二科, 内蒙古包头市 014010; 3. 包头医学院药理学系, 内蒙古包头市 014010)

[关键词] 萘哌地尔; 动脉平滑肌细胞; 血管紧张素 ①

[摘要] 目的 研究萘哌地尔衍生物 YM ④对血管紧张素 ①诱导 Wistar 大鼠和自发性高血压大鼠胸主动脉平滑肌细胞增殖的抑制作用及机制。方法 将 Wistar 大鼠和自发性高血压大鼠胸主动脉平滑肌细胞进行体外培养, 采用四甲基偶氮唑盐比色法检测 YM ④对胸主动脉平滑肌细胞和血管紧张素 ①诱导胸主动脉平滑肌细胞增殖的影响; 用实时逆转录聚合酶链反应技术检测血管紧张素原、c-myc mRNA 表达。结果 未经血管紧张素 ①处理的胸主动脉平滑肌细胞, 0.1 μmol/L YM ④能抑制 Wistar 大鼠和自发性高血压大鼠胸主动脉平滑肌细胞增殖; YM ④(0.01, 0.05, 0.1 μmol/L)能呈浓度依赖性抑制血管紧张素 ①所致 Wistar 大鼠和自发性高血压大鼠胸主动脉平滑肌细胞的增殖; YM ④(0.05~0.1 μmol/L)作用能使血管紧张素 ①所致 Wistar 大鼠血管紧张素原、c-myc mRNA 表达水平下调, 而各浓度 YM ④均能下调血管紧张素 ①所致自发性高血压大鼠胸主动脉平滑肌细胞的血管紧张素原、c-myc mRNA 表达。结论 YM ④明显抑制血管紧张素 ①诱导大鼠胸主动脉平滑肌细胞的增殖, 且抑制增殖作用在自发性高血压大鼠比在 Wistar 大鼠明显, 其作用机制可能与下调血管紧张素原、c-myc mRNA 的表达有关。

[中图分类号]

[文献标识码] A

### Inhibition of Naftopidil Ramification YM ④ on Cultured Thoracic Aorta Smooth Muscle Cells Proliferation of Rats Induced by Angiotensin ①

YANG Zheng<sup>1,2</sup>, QIU Min<sup>1,3</sup>, WU Qin<sup>1</sup>, and HUANG Xienan<sup>1</sup>

(1. Department of Pharmacology, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China; 2. Second Department of Cardiovascular Internal Medicine, the First Affiliated Hospital, Baotou Medical College, Baotou 014010, China; 3. Department of Pharmacy, Baotou Medical College, Baotou 014010, China)

[KEY WORDS] Naftopidil; Aortic Smooth Muscle Cell; Ang ①

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the inhibition of naftopidil ramification YM ④ on Wistar rat and spontaneously hypertensive rat (SHR) thoracic aorta smooth muscle cell (tASMC) proliferation induced by angiotensin ① (Ang ①), and to explore the possible mechanisms. **Methods** Primary culture of tASMC from Wistar rat and SHR was established in vitro and the effects of YM ④ on tASMC proliferation induced by Ang ① were determined by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The effects of YM ④ on the expressions of angiotensinogen (AGT) and c-myc mRNA were detected by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** 0.1 μmol/L YM ④ depressed Wistar rat and SHR tASMC proliferation and YM ④ (0.01, 0.05, 0.1 μmol/L) depressed tASMC proliferation induced by Ang ① in a concentration-dependent manner. YM ④ (0.05~0.1 μmol/L) down-regulated the expression of AGT and c-myc mRNA on Wistar rat in 24 hours. YM ④ (0.01, 0.05, 0.1 μmol/L) down-regulated the expression of AGT and c-myc mRNA on SHR in 24 hours. **Conclusions** Proliferation of tASMC induced by Ang ① can be inhibited clearly by YM ④ the effect is more significant on SHR than on Wistar rat. The mechanism may be related to down-regulating the expression of AGT and c-myc mRNA.

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 增殖是动脉粥样硬化、高血压、冠心病、经皮冠状动脉内血管成形术后再狭窄的病理基础<sup>[1]</sup>, 探

讨抑制 VSMC 增殖的药物已成为人们研究的热点。萘哌地尔 (naftopidil, Naf) 为苯基哌嗪衍生物, 它是一种新型 α1 受体阻断剂, 已批准为国家一类新型降压药; 萘哌地尔同时还具有抑制 VSMC 增殖的作用<sup>[2]</sup>。在我国临床使用过程中, 发现萘哌地尔具有生物利用度低、较易产生耐药性及体位性低血压等缺点, 故迫切需要对这类药物进一步优化。YM ④是一种萘哌地尔衍生物, 由中国科学院贵州省天然药

[收稿日期] 2009-07-13 [修回日期] 2009-09-05

[作者简介] 杨征, 硕士, 主治医师, 研究方向为高血压病的防治, 联系电话为 (0472) 2178356, E-mail 为 vz798820022002@vahoo.com.cn; 邱敏, 硕士, 讲师, 研究方向为心血管药理学, E-mail 为 qiumin1115@yahoo.com.cn; 黄燮南, 教授, 研究方向为心血管药理学, E-mail 为 huangxienan@yahoo.com.cn.

物化学重点实验室以其母链为基础,对其侧链进行修饰而合成。我们发现,YM ④不仅具有抗高血压作用(已修回,待发表),同时还有抑制血管平滑肌细胞增殖的作用。因此,YM ④具有较好的临床应用前景。本实验观察了YM ④对Wistar大鼠和自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rat SHR)胸主动脉平滑肌细胞(thoracic aorta smooth muscle cell tASMC)增殖的影响并探讨可能的抗动脉粥样硬化作用机制,为该药的开发研究提供基础资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 药品与试剂

YM ④(中国科学院贵州省天然药物化学重点实验室); $\alpha$ -肌动蛋白单克隆抗体( $\alpha$ -actin, Santa Cruz公司);RNA纯化盒(大连宝生物工程有限公司);达尔伯克(氏)改良伊格尔(氏)培养基(Dulbecco's modified Eagle media DMEM);二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide DMSO)、血管紧张素 $\text{I}^{\text{E}}$ (angiotensin  $\text{I}^{\text{E}}$  Ang $\text{I}^{\text{E}}$ )、噻唑兰(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、cmyc、血管紧张素原(angiotensinogen, AGT)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPDH)(美国Sigma公司)。

### 1.2 仪器

MS-1015倒置显微镜(日本OLYMPUS公司),实时(real time)逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)扩增仪(美国Bio-Rad公司),TU 1810紫外可见分光光度计(北京普析仪器有限责任公司)。

### 1.3 实验动物

Wistar大鼠和SHR,购自上海市高血压研究所,合格证书:医动字第2237-1, 0237-2号。

### 1.4 实验方法

1.4.1 胸主动脉平滑肌细胞培养及鉴定<sup>[3]</sup> 采用组织贴块法培养大鼠tASMC,胰蛋白酶消化法传代培养,倒置相差显微镜下观察并作VSMC特异性抗 $\alpha$ -actin免疫组织化学染色鉴定,选用3~8代tASMC用于实验。

1.4.2 YM ④对胸主动脉平滑肌细胞增殖活性的作用<sup>[4]</sup> 四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测tASMC增殖活性:取生长良好的tASMC,0.2%胰蛋白酶消化后,用含10%胎牛血清(fetal calf serum, FCS)的DMEM培养基制成细胞悬液,每孔以 $5 \times 10^5$ 个/L细胞密度接种于96孔培养板中,每孔体积200  $\mu\text{L}$ ,放入培养箱中培养,在细胞长到70%融合时,更换

5% FCS的DMEM培养24 h,再换成10% FCS的DMEM培养液进行实验。按照如下分组:Wistar大鼠对照组(10% FCS的DMEM培养液)、Wistar大鼠YM ④组(10% FCS的DMEM培养液+不同浓度的YM ④)、Wistar大鼠Ang $\text{I}^{\text{E}}$ 组(10% FCS的DMEM培养液+1  $\mu\text{mol/L}$  Ang $\text{I}^{\text{E}}$ )、Wistar大鼠Ang $\text{I}^{\text{E}}$ +YM ④组(10% FCS的DMEM培养液+1  $\mu\text{mol/L}$  Ang $\text{I}^{\text{E}}$ +不同浓度的YM ④)、SHR对照组(10% FCS的DMEM培养液)、SHR YM ④组(10% FCS的DMEM培养液+不同浓度的YM ④)、SHR Ang $\text{I}^{\text{E}}$ 组(10% FCS的DMEM培养液+1  $\mu\text{mol/L}$  Ang $\text{I}^{\text{E}}$ )、SHR Ang $\text{I}^{\text{E}}$ +YM ④组(10% FCS的DMEM培养液+1  $\mu\text{mol/L}$  Ang $\text{I}^{\text{E}}$ +不同浓度的YM ④),YM ④先于Ang $\text{I}^{\text{E}}$  30 min加入各孔中,在培养箱中共同孵育24 h后,测前每孔加入MTT溶液(5 g/L噻唑蓝)20  $\mu\text{L}$ ,继续孵育4 h弃上清液,再加入150  $\mu\text{L}$ 二甲基亚砜,振荡10 min,于酶标仪490 nm波长处通过测定各孔吸光度值来确定tASMC生存率。

1.4.3 实时逆转录聚合酶链反应技术检测YM ④对胸主动脉平滑肌细胞cmyc、血管紧张素原mRNA表达的影响 实时RT-PCR按照如下进行分组:

Wistar大鼠组:包括Wistar大鼠对照组, Wistar大鼠Ang $\text{I}^{\text{E}}$ (1  $\mu\text{mol/L}$ )组, Wistar大鼠Ang $\text{I}^{\text{E}}$ (1  $\mu\text{mol/L}$ ) +不同浓度YM ④组; SHR组:包括SHR对照组, SHR Ang $\text{I}^{\text{E}}$ (1  $\mu\text{mol/L}$ )组, SHR Ang $\text{I}^{\text{E}}$ (1  $\mu\text{mol/L}$ ) +不同浓度YM ④组。Trizol法提取RNA并纯化。紫外分光光度计测定 $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 值在1.8~2.0之间。将其逆转录为cDNA并稀释,进行定量PCR。GAPDH为内参,上游引物:5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TAG-3',下游引物:5'-GAC CAC AGT CCA TGC CAT CAC T-3',扩增片段456 bp; AGT上游引物:5'-TGT TGC TGC TGA GAA GAT TG-3',下游引物:5'-CCG GAG AGT TGT CCT GGA TG-3',扩增片段256 bp; cmyc上游引物:5'-CCT ACC CTC TAA CGA CAG C-3',下游引物:5'-CTC TGA CCT TTT GCC AGG AG-3',扩增片段240 bp。总反应体积20  $\mu\text{L}$ 。实时RT-PCR扩增条件:第一步:95 $^{\circ}\text{C} \times 8.5\text{min}$ ;第二步:(95 $^{\circ}\text{C} \times 15\text{s}$ , 60 $^{\circ}\text{C} \times 1\text{min}$ , 72 $^{\circ}\text{C} \times 20\text{s}$ ) $\times 45$ 个循环。目的基因的相对表达量以“目的基因/内参基因”表示。

### 1.5 统计学方法

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,全部资料的整理、分析均用SPSS 11.5统计软件进行。两组间比较采用t检验,多组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 胸主动脉平滑肌细胞形态学观察结果

在倒置显微镜下连续观察,组织块贴壁后 5天,有少量细胞从组织块边缘长出;第 8天时,细胞生长旺盛,交织成网状;第 10天,组织块周围形成明显的生长晕,细胞沿着组织块周边放射性生长;第 14天,组织块被推掉,相邻生长晕汇集成片,细胞平行排列呈“峰”、“谷”样结构特征,即可传代。传代细胞接种于培养瓶,8 h后即已贴壁。24 h后进入细胞增殖期,细胞排列呈梭形或束状,形态亦呈多样性,并保持“峰”、“谷”样结构特征。

### 2.2 免疫组织化学鉴定结果

取培养的细胞进行特异性  $\alpha$ -肌动蛋白 ( $\alpha$ -actin)单克隆抗体免疫组织化学鉴定,结果可见胞质着色,胞核清晰可见(图 1A)。光学显微镜下可见胞质呈棕黄色,胞质中有向细胞两极放射的条丝状物与细胞长轴平行,形态清晰,即为肌动蛋白(图 1B)。免疫组化结果证实培养的细胞为 VSMC。

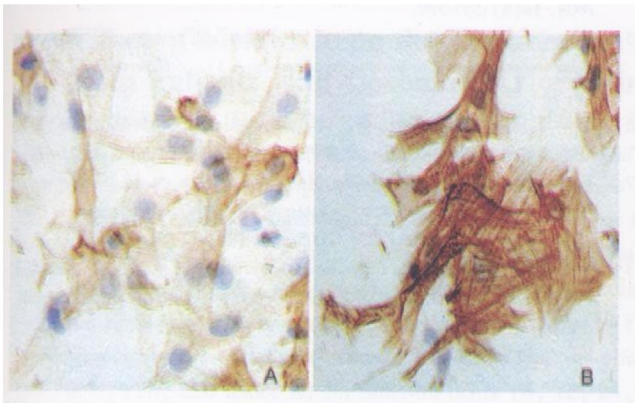


图 1 动脉平滑肌细胞  $\alpha$ -肌动蛋白免疫组织化学染色

### 2.3 YM 对 Wistar大鼠和自发性高血压大鼠胸主动脉平滑肌细胞增殖的影响

自发性高血压大鼠 tSMC增殖速度快于 Wistar大鼠 ( $P < 0.01$ )。未经 Ang 处理的 tSMC,  $0.1 \mu\text{mol/L}$  YM 能抑制 Wistar大鼠和 SHR tSMC增殖 ( $P < 0.01$ )。经  $1 \mu\text{mol/L}$  Ang 作用 24 h能诱导 Wistar大鼠和 SHR tSMC增殖 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ),不同浓度的 YM ( $0.01, 0.05, 0.1 \mu\text{mol/L}$ )呈浓度依赖性抑制 Ang 所致的 tSMC增殖 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$  表 1)。

### 2.4 实时逆转录聚合酶链反应结果

2.4.1 RNA完整性鉴定 总 RNA 电泳结果,可见清晰的两个条带,且 28 s 条带亮度大于 18 s 条带,说明提取的 RNA 完整性好,未发生降解。

表 1 萘哌地尔衍生物 YM 对 Wistar大鼠和 SHR tSMC增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

分 组	浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	Wistar大鼠	SHR
空白对照组	—	$0.243 \pm 0.010$	$0.284 \pm 0.011^a$
YM 组	0.01	$0.242 \pm 0.037$	$0.252 \pm 0.053$
	0.05	$0.232 \pm 0.041$	$0.241 \pm 0.052$
	0.10	$0.219 \pm 0.042^a$	$0.139 \pm 0.014^d$
Ang 组	1.00	$0.306 \pm 0.022^a$	$0.437 \pm 0.101^e$
YM II+ Ang 组	0.01	$0.238 \pm 0.046^b$	$0.235 \pm 0.081^f$
	0.05	$0.231 \pm 0.017^c$	$0.239 \pm 0.070^f$
	0.10	$0.224 \pm 0.017^c$	$0.162 \pm 0.053^g$

a为  $P < 0.01$ ,与 Wistar大鼠空白对照组比较; b为  $P < 0.05$ , c为  $P < 0.01$ ,与 Wistar大鼠 Ang 组比较; d为  $P < 0.01$ , e为  $P < 0.05$  与 SHR 大鼠空白对照组比较; f为  $P < 0.05$ , g为  $P < 0.01$ ,与 SHR Ang 组比较。

2.4.2 YM 对 Wistar大鼠和自发性高血压大鼠胸主动脉平滑肌细胞血管紧张素及 c-myc 原基因表达的影响 与 Wistar大鼠和 SHR 对照组相比, Ang 作用 24 h 可明显使 tSMC 的 AGT 和 c-myc mRNA 表达上调 ( $P < 0.05$ ),不同浓度 YM 预作用 30 min,共同孵育 24 h,中至高浓度 YM 能使 Wistar大鼠 AGT、c-myc mRNA 表达下调,各浓度 YM 均能使 SHR AGT、c-myc mRNA 表达下调 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ; 表 2)。

## 3 讨论

血管平滑肌细胞迁移和过度增殖是高血压、动脉粥样硬化及血管成形术后再狭窄等血管增生性疾病的基本特征,抑制 VSMC 过度增殖对于防治血管增生性疾病的发生有重要意义。抗高血压药物若同时具有抑制血管平滑肌细胞增殖的作用,其临床应用价值将显著提高。目前研究发现 SHR 血管平滑肌细胞增殖高于正常大鼠,与本实验结果一致<sup>[5]</sup>。这可能与自发性高血压大鼠体内 Ang 等多种血管活性物质分泌增加有关。Ang 主要通过作用于 VSMCs 上的特异  $AT_1$  受体,经 PLC-PKA- $Ca^{2+}$  等细胞内信号转导途径使  $Ca^{2+}$  增多,促进 VSMCs 大量增生<sup>[6]</sup>。在 MTT 比色实验中显示,YM 能抑制 Ang 诱导的 Wistar大鼠和 SHR tSMC 的增殖,并且呈浓度依赖性。但对未经 Ang 处理的 tSMC,只有高浓度 YM 对 Wistar大鼠和 SHR tSMC 增殖具有抑制作用。

血管紧张素 还可诱导细胞内 c-myc 等原癌基

表 2 萘哌地尔衍生物 YM 对血管紧张素所致 Wistar大鼠和 SHR tSMC血管紧张素原和 c-myc mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , n = 8)

分 组	浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	AGT mRNA 表达		c-myc mRNA 表达	
		Wistar大鼠	SHR	Wistar大鼠	SHR
空白对照组	—	10.82 ± 2.12	13.50 ± 1.86	23.40 ± 3.65	40.80 ± 4.70
Ang 组	1.00	75.50 ± 10.20 <sup>a</sup>	183.70 ± 20.70 <sup>c</sup>	151.80 ± 10.51 <sup>e</sup>	476.60 ± 35.10 <sup>g</sup>
Ang + YM 组	0.01	51.20 ± 6.78	45.70 ± 6.90 <sup>d</sup>	82.50 ± 9.89	67.70 ± 9.30 <sup>h</sup>
	0.05	42.00 ± 6.97	42.80 ± 3.16 <sup>d</sup>	59.40 ± 8.49 <sup>f</sup>	48.90 ± 6.12 <sup>h</sup>
	0.10	11.70 ± 1.37 <sup>b</sup>	17.90 ± 2.27 <sup>d</sup>	49.70 ± 6.64 <sup>f</sup>	34.30 ± 4.45 <sup>h</sup>

a为  $P < 0.05$  与 AGT Wistar大鼠空白对照组比较; b为  $P < 0.05$  与 AGT Wistar大鼠 Ang 组比较; c为  $P < 0.05$  与 AGT SHR 空白对照组比较; d为  $P < 0.05$  与 AGT SHR Ang 组比较; e为  $P < 0.05$  与 c-myc Wistar大鼠空白对照组比较; f为  $P < 0.01$  与 c-myc Wistar大鼠 Ang 组比较; g为  $P < 0.05$  与 c-myc SHR 空白对照组比较; h为  $P < 0.05$  与 c-myc SHR Ang 组比较。

因的表达,体内 c-myc过度表达与细胞增殖及肿瘤有关<sup>[7]</sup>,细胞内的原癌基因 c-myc是细胞核内的DNA结合蛋白,能促进增殖相关基因的开放,促进细胞复制核转录,产生细胞增殖效应,所以 c-myc基因表达是触发 tSMC增殖的始动因素和关键因素<sup>[8-9]</sup>。此外,李运伦<sup>[10]</sup>也报道,VSMCs增殖与丝裂素活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号转导途径下游靶基因 c-fos和 c-myc mRNA的转录有关。AGT是 Ang前体,同时也是血压、电解质平衡、心肌细胞生长因子重要的生理调控因子,在体内外试验均已经证实 Ang能刺激AGT mRNA表达<sup>[11,12]</sup>。本实验采用实时 RT-PCR技术,结果证实,Ang使 Wistar大鼠和 SHR tSMC中 c-myc和 AGT mRNA表达明显增多,各浓度 YM均能使 SHR tSMC c-myc和 AGT mRNA表达下调,而 YM只有在高和中高浓度组才能使 Wistar大鼠 tSMC AGT和 c-myc mRNA表达下调。提示 YM对 SHR tSMC的增殖具有明显抑制作用而对 Wistar大鼠影响较小,对 tSMC c-myc、AGT mRNA表达的抑制可能是 YM抑制平滑肌细胞增殖的早期机制之一。

#### [参考文献]

- [1] 王生兰,苏娟,徐一洲,等. 大鼠血管平滑肌细胞体外培养的表型转换及其鉴定[J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16(4): 268-272
- [2] 李利生,孙安盛,余丽梅,等. 萘哌地尔抗大鼠血管平滑肌细胞增殖的作用[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(12): 1579-581
- [3] Ma R, Wu SZ, Lin QS. Testosterone regulation of androgen receptor protein expression in cultured vascular smooth muscle cells [J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2004, 84(6): 491-495
- [4] 易斌,钱桂生,白莉,等. 丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶 2蛋白表达在低氧致大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖中的作用. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16(8): 597-599
- [5] Felix CT, Helen G, Christine B, et al. Different cell cycle regulation of vascular smooth muscle in genetic hypertension [J]. *Hypertension*, 2003, 42: 184
- [6] 李艳菊,孙安盛,余丽梅,等. 钩藤碱对 Ang诱导大鼠血管平滑肌细胞增殖的抑制作用[J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(21): 1621-624
- [7] Esther Baena, Alberto Gandarillas, Mireia Vallespinos, et al. c-myc regulates cell size and ploidy but is not essential for postnatal proliferation in liver [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(20): 7286-291
- [8] Amy M Sylvester, Dongfen Chen, Kevin Krasinski, et al. Role of c-fos and F2F in the induction of cyclin A transcription and vascular smooth muscle cell proliferation [J]. *J Clin Invest* 1998, 101(5): 940
- [9] Lun-Quan Sun, Mussary J Cains, Wayne L Gerlach, et al. Suppression of smooth muscle cell proliferation by a transcription and vascular smooth muscle cell proliferation by a c-myc RNA-cleaving deoxyribozyme [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(24): 17236
- [10] 李运伦. 钩藤碱和异钩藤碱抑制血管紧张素 诱导血管平滑肌细胞增殖及相关机制[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(1): 53-58
- [11] Kobori H, Harrison-Bernard LM, Navar LC. Expression of angiotensinogen mRNA and protein in angiotensin-dependent hypertension [J]. *J Am Soc Nephrol* 2001, 12: 431-439
- [12] L Gabriel Navar, Lisa M, Harrison-Bernard, et al. Regulation of intrarenal angiotensin in hypertension [J]. *Hypertension*, 2002, 39: 316

(此文编辑 曾学清)