

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2002)-10-03-0234-02

多沙唑嗪抑制大鼠血管平滑肌细胞增殖的实验研究

杨 君, 赵仙先, 秦永文, 文军慧¹

(解放军第二军医大学长海医院心内科; 1. 检验科, 上海市 200433)

[主题词] 多沙唑嗪; 肌, 平滑, 血管; 细胞增殖; 氘-胸腺嘧啶核苷

[摘要] 为探讨多沙唑嗪对大鼠血管平滑肌细胞增殖的抑制作用, 将不同浓度的多沙唑嗪作用于体外培养的血管平滑肌细胞, 采用氘-胸腺嘧啶核苷(³H-TdR)掺入的方法检测平滑肌细胞的增殖。结果发现, 多沙唑嗪能够抑制血管平滑肌细胞和不表达 α_1 受体的成纤维细胞的增殖。用不可逆的 α_1 受体阻滞剂酚苄明处理平滑肌细胞, 多沙唑嗪仍表现为抑制增殖的作用。以上提示, 多沙唑嗪对大鼠血管平滑肌细胞增殖的抑制作用与其对 α_1 受体的阻滞作用无关。

[中图分类号] R364.3

[文献标识码] A

Inhibition of Doxazosin on Proliferation of Rat Vascular Smooth Muscle Cells

YANG Jun, ZHAO Xian-Xian, QIN Yong-Wen, and WEN Jun-Hui

(Department of Cardiology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[MeSH] Doxazosin; Muscle, Smooth, Vascular; Proliferation; ³H-Thymidine

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of Doxazosin on the proliferation of rat vascular smooth muscle cells (VSMCs) cultivated in vitro. **Methods** Various concentrations of Doxazosin were added to the cultured rat VSMCs. ³H-TdR incorporation were used to detect proliferation of VSMCs. **Results** Doxazosin inhibited the proliferation of VSMCs. The proliferation of NIH3T3 cells, which do not express α_1 -receptors, also were inhibited. Pretreatment of cells with phenoxybenzamine, an irreversible α_1 -receptor antagonist, did not change the effect of Doxazosin. **Conclusions** These results suggest that doxazosin inhibited the proliferation of VSMCs through a mechanism unrelated to α_1 -receptor.

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)的增殖及迁移是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)及经皮腔内冠状动脉成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA)后再狭窄形成的一个关键因素^[1]。抑制平滑肌细胞增殖可能是预防PTCA术后再狭窄的有效途径之一。多沙唑嗪(Doxazosin)是一类长效 α_1 肾上腺素能受体阻滞剂, 不良反应少, 安全性高, 在国外已广泛用于治疗高血压和前列腺肥大, 而对其抑制平滑肌细胞增殖的作用少有报道。我们应用³H-TdR掺入的方法, 观察多沙唑嗪对培养的大鼠VSMCs增殖的影响, 并探讨这种作用与 α_1 受体的关系。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

多沙唑嗪由上海中华制药厂提供(批号980802); 酚苄明购于河南豫中制药厂[批号卫药准

字X-162-(2)号]; DMEM和胰蛋白酶为美国Gibco公司产品; 新生小牛血清为杭州四季青生物制品公司产品; α -平滑肌肌动蛋白单克隆抗体为Sigma公司产品; ³H-TdR购于中科院上海原子能研究所; NIH3T3细胞株购于中科院上海细胞所。

1.2 平滑肌细胞的培养与鉴定

7~8周雄性SD大鼠购于第二军医大学实验动物中心。用贴块法进行细胞培养。SD大鼠颈椎脱臼处死, 无菌条件下取出主动脉弓, 去除内、外膜, 将中膜组织剪成约1 mm³的小块接种于培养瓶内, 贴壁3 h后浸入20% DMEM培养基中培养。平滑肌肌动蛋白单克隆抗体免疫组织化学染色鉴定细胞。实验均采用6代以内的VSMCs。

1.3 多沙唑嗪对血管平滑肌细胞增殖的影响

血管平滑肌细胞以 $5.0 \times 10^6/L \times 100 \mu L$ /孔的密度种于96孔板, 细胞贴壁后继续培养48 h至次融合。换无血清DMEM同步化培养48 h, 加入不同浓度的多沙唑嗪(0、0.1、1、10、25 μ mol/L), 每浓度组10孔。1 h后加入20%新生小牛血清。20 h后加入³H-TdR 37 kBq/孔, 继续培养6 h。用微量细胞收集器收集样本, 液体闪烁计数法测定放射性强度的每分钟计数值(cpm)。

[收稿日期] 2001-10-15 [修回日期] 2002-04-08

[作者简介] 杨君, 女, 1971年出生, 硕士, 现工作单位为济南军区总医院保健一科。秦永文, 男, 1952年出生, 教授, 博士生导师。

1.4 多沙唑嗪对平滑肌细胞增殖的作用与 α_1 受体的关系

按上述密度将 VSMCs 种于 96 孔板, 无血清 DMEM 同步化培养 48 h 后, 加入酚苄明 (1 $\mu\text{mol/L}$) 作用 30 min, DMEM 冲洗 3 次后, 换无酚苄明的 DMEM, 并加入多沙唑嗪 (10 $\mu\text{mol/L}$), 1 h 后按上述方法加入各种试剂, 测定放射性强度。

1.5 多沙唑嗪对 NIH3T3 细胞增殖的影响

将 NIH3T3 细胞接种于 96 孔板, 按上述方法依次加入各种试剂, 测定各组的放射性强度。

1.6 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间两两比较采用方差分析。

2 结果

2.1 多沙唑嗪对血管平滑肌细胞 DNA 合成的影响

在 1、10 和 25 $\mu\text{mol/L}$ 多沙唑嗪作用下, VSMCs 的 $^3\text{H-TdR}$ 掺入量分别为 $1\,038 \pm 119$ 、 728 ± 104 和 462 ± 112 cpm, 与对照组的掺入量 $1\,575 \pm 112$ cpm 比较有显著差异 ($P < 0.01$)。随着药物浓度的增加, cpm 值逐渐减小, 各浓度组间有显著差异 ($P < 0.01$)。

2.2 酚苄明对多沙唑嗪抑制血管平滑肌细胞 DNA 合成的影响

在 10 $\mu\text{mol/L}$ 多沙唑嗪作用下, 经酚苄明处理后 VSMCs 的 $^3\text{H-TdR}$ 掺入量为 699 ± 110 cpm, 与对照组的掺入量 $1\,534 \pm 105$ cpm 比较有显著差异 ($P < 0.01$)。与未处理的 VSMCs 掺入量 (728 ± 104 cpm) 比较无差异 ($P > 0.05$)。

2.3 多沙唑嗪对 NIH3T3 细胞 DNA 合成的影响

在 1、10 和 25 $\mu\text{mol/L}$ 多沙唑嗪作用下, NIH3T3 细胞的 $^3\text{H-TdR}$ 掺入量分别为 957 ± 112 、 654 ± 107 、 403 ± 103 cpm, 与对照组的掺入量 $1\,496 \pm 104$ cpm 比较有显著差异 ($P < 0.01$)。随着药物浓度的增加, cpm 值逐渐减小, 各浓度组间有显著差异 ($P < 0.01$)。

3 讨论

本文结果显示, 多沙唑嗪在体外呈剂量依赖性抑制 VSMCs DNA 的合成。用不可逆的 α_1 受体阻滞剂酚苄明处理 VSMCs, 使 α_1 受体失活^[2], 多沙唑嗪

仍表现抑制增殖的作用。对于不表达 α_1 受体的 NIH3T3 成纤维细胞^[3], 多沙唑嗪也能抑制其 DNA 的合成。以上结果说明多沙唑嗪抑制 VSMCs 和 NIH3T3 成纤维细胞增殖的作用与其对 α_1 受体的阻滞作用无关。Ulrich 等^[4]在研究中发现, 多沙唑嗪可抑制平滑肌细胞 G₁ 期至 S 期的转换, 使细胞分裂停止在静止期 (G₀ 期)。这种作用是通过增加 p27 的表达、抑制 Rb 的磷酸化来实现的。cAMP 及 Rho / GTP 途径均可调节细胞内 p27 的表达。cAMP 作为第二信使可以通过增加 p27 的表达引起细胞生长的停滞^[5], Rho / GTP 途径则通过对 p27 表达的负调控来影响细胞的增殖^[6]。多沙唑嗪抑制 VSMCs 增殖的作用是否通过 VSMCs 表面的其他受体作用于上述两条途径, 还需要做进一步的实验证明。

多沙唑嗪对再狭窄的治疗作用已有动物试验证实。Vashisht 等^[7]对兔的腹主动脉行内膜剥脱术, 术后应用多沙唑嗪治疗。发现内膜的增生明显被抑制, 而且这种抑制作用呈剂量依赖性。这与体外试验的结果是一致的。

由于多沙唑嗪抑制 VSMCs 增殖的机理与雷帕霉素相似, 即通过调节 p27 和 Rb 蛋白的浓度影响 VSMCs 的增殖, 且其副作用小、安全性高, 在与发挥降压作用相同的血浆浓度下就能抑制 VSMCs 的增殖, 因而对 PTCA 术后伴高血压的患者可能具有双重治疗作用。多沙唑嗪有可能成为预防 PTCA 术后再狭窄的一种有效治疗药物。

参考文献

- [1] Gibbons GH, Dzau VJ. Molecular therapies for vascular disease. *Science*, 1996, **272**: 689-693
- [2] Hu ZW, Shi XY, Okazaki M, et al. Angiotensin II induces transcription and expression of α_1 -adrenergic receptors in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 1995, **268**: H1 006-014
- [3] Hu ZW, Shi XY, Lin R, et al. α_1 -Adrenergic receptor subtypes: activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Biol Cell Suppl*, 1995, **6**: 128
- [4] Ulrich K, Shu W, Sarah K, et al. Doxazosin inhibits retinoblastoma protein phosphorylation and G1-S transition in human coronary smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20**: 1 216-224
- [5] Kato JY, Matsuoka M, Polyak K, et al. Cyclic AMP-induced G₁ phase arrest mediated by an inhibitor (p27Kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell*, 1994, **79**: 487-496
- [6] Laufs U, Marra D, Node K, et al. 3 Hydroxy- 3 -methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing rho GTPase-induced down-regulation of p27(Kip1). *J Biol Chem*, 1999, **274**: 21 926-931
- [7] Vashisht R, Sian M, Franks PJ, et al. Long-term reduction of intimal hyperplasia by the selective α_1 adrenergic antagonist doxazosin. *Br J Surg*, 1992, **79**: 1 285-288

(此文编辑 朱雯霞)