

## 川芎嗪对血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 诱导的血管平滑肌细胞增殖的抑制作用及机制

郑红花<sup>1</sup>, 李映红<sup>1</sup>, 罗德生<sup>1</sup>, 刘 琴<sup>2</sup>, 屈 伸<sup>3</sup>

(1. 咸宁学院医学院生物化学与分子生物学系, 湖北省咸宁市 437100; 2. 湖北黄石理工学院医学院, 湖北省黄石市 435000; 3. 华中科技大学同济医学院生物化学与分子生物学系, 湖北省武汉市 430030)

[关键词] 病理学与病理生理学; 血管平滑肌细胞增殖抑制; 细胞培养; 川芎嗪; 血管紧张素  $\text{Ang} \text{ II}$ ; 钙调蛋白; 钙调神经磷酸酶

[摘要] 目的 探讨川芎嗪对血管紧张素  $\text{Ang} \text{ II}$  诱导的血管平滑肌细胞增殖的影响。方法 建立血管紧张素  $\text{Ang} \text{ II}$  诱导血管平滑肌细胞增殖模型, 用酶促反应定磷法观察不同浓度的川芎嗪在不同时段内对血管平滑肌细胞中钙调蛋白和钙调神经磷酸酶活性的影响。结果 与正常对照组比较, 血管紧张素  $\text{Ang} \text{ II}$  组能够明显刺激血管平滑肌细胞增殖, 血管紧张素  $\text{Ang} \text{ II}$  处理的血管平滑肌细胞的钙调蛋白和钙调神经磷酸酶活性及细胞增殖活度均较正常对照组显著增高 ( $P < 0.01$ )。同时加川芎嗪处理后, 各组钙调蛋白和钙调神经磷酸酶活性均显著下降 ( $P < 0.01$ )。结论 川芎嗪对血管紧张素  $\text{Ang} \text{ II}$  诱导的血管平滑肌细胞增殖有显著抑制作用, 其抑制机制可能与其干预钙调神经磷酸酶依赖的信号转导途径有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Effects of Tetramethylpyrazine on the Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cell Induced by Angiotensin $\text{Ang} \text{ II}$

ZHENG Hong-Hua<sup>1</sup>, LI Ying-Hong<sup>1</sup>, LUO De-Sheng<sup>1</sup>, LIU Qin<sup>2</sup>, and QU Shen<sup>3</sup>

(1. Department of Biochemistry, School of Medicine, Xianning University, Xianning 437100; 2. School of Medicine, Science and Technology University, Huangshi 435000; 3. Department of Biochemistry, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

[KEY WORDS] Cell Culture In Vitro; Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation; Tetramethylpyrazine; Angiotensin  $\text{Ang} \text{ II}$ ; Calmodulin; Calcineurin

[ABSTRACT] **Aim** To study the effects of tetramethylpyrazine (TMP) on calmodulin (CaM) and calcineurin (CaN) in the proliferation of vascular smooth muscle cell (VSMC) induced by angiotensin  $\text{Ang} \text{ II}$ . **Methods** A cell proliferating model of VSMC induced by angiotensin  $\text{Ang} \text{ II}$  was established; the variety of CaM and CaN activities affected by tetramethylpyrazine (TMP) at different time and different concentration was observed by enzyme reaction phosphorus measurement. **Results** Cell proliferation activity, CaM and CaN activities were increased significantly in VSMC proliferation induced by  $\text{Ang} \text{ II}$  ( $P < 0.01$ ).

While treated with TMP, the index were obviously reduced compared with  $\text{Ang} \text{ II}$  group ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** The VSMC proliferation induced by  $\text{Ang} \text{ II}$  can be inhibited by TMP significantly, and the inhibiting mechanism of TMP may be related to inhibiting CaM and CaN activities then restraining the proliferation of VSMC in a dose and time-dependent manner.

川芎嗪(tetramethylpyrazine, TMP)是中药川芎的有效成分四甲基吡嗪, 具有典型的钙离子拮抗剂的特性<sup>[1]</sup>, 它具有多种药理作用, 客观存在对血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)增殖的作用是否通过影响钙调神经磷酸酶(calcineurin, CaN)的活性而实现的, 目前尚未见报道。本文对此

进行了研究。

### 1 材料与方法

#### 1.1 动物及主要试剂

健康雄性 Wistar 大鼠, 体重  $200 \pm 20$  g, 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。DMEM 培养基干粉、胎牛血清和新生小牛血清均购自 Gibco 公司; 血管紧张素  $\text{Ang} \text{ II}$  (angiotensin  $\text{Ang} \text{ II}$ ) 为 Sigma 公司产品; 蛇毒由中山医科大学顾熊飞教授惠赠; CaN 测定试剂盒由南京建成生物工程研究所配制; 胰蛋白酶和四甲基偶氮唑盐即 3-(4, 5-二甲基-2-噻唑)-2, 5-二苯基溴化四唑[3-(4, 5-dimethylthiazol-2-

[收稿日期] 2005-06-13 [修回日期] 2006-02-08

[基金项目] 湖北省教育厅重点科研基金资助项目(NO. 2003A006)

[作者简介] 郑红花, 硕士, 讲师, 研究方向为动脉粥样硬化发病的分子机制, 联系电话为 0715-8269385, E-mail 为 safflower68@21cn.com。李映红, 博士, 副教授, 研究方向为动脉粥样硬化, 联系电话为 0715-8269385, E-mail 为 yinghli@sohu.com。罗德生, 教授, 研究方向为脂蛋白与动脉粥样硬化, 联系电话为 13997502840, E-mail 为 dsluo50@sohu.com。

yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide, MTT] 由 Serva 公司生产进口分装; SM-actin 免疫试剂盒为北京中山生物技术有限公司提供。其他试剂为国产分析纯。

## 1.2 血管平滑肌细胞的培养及分组

组织贴块法培养血管平滑肌细胞。通过 3 瓶置换法<sup>[2]</sup>纯化 VSMC。倒置相差显微镜下观察细胞形态及生长现象, SP 法进行 SM-actin 免疫细胞化学染色鉴定。阳性表达为胞质呈细颗粒状棕黄色沉淀反应。用光镜和免疫组织化学方法进行细胞鉴定。选择第 3~5 代 VSMC 进行实验。胰蛋白酶消化制备细胞悬液, 调整细胞密度为  $5.0 \times 10^7/L$ , 接种于培养板备用。经 24 h 预培养和 12 h 低浓度(1%) 血清培养基预处理后, 随机分组。对照组: 不加特殊处理因素; ④Ang 组: Ang  $10^{-7}$  mol/L; ④小剂量川芎嗪组: Ang  $10^{-7}$  mol/L+ 0.04 g/L 川芎嗪; 中剂量川芎嗪组: Ang  $10^{-7}$  mol/L+ 0.40 g/L 川芎嗪; 大剂量川芎嗪组: Ang  $10^{-7}$  mol/L+ 4.00 g/L 川芎嗪。

## 1.3 血管平滑肌细胞增殖活度的测定<sup>[3,4]</sup>

将细胞接种于 96 孔培养板, 每孔 200  $\mu$ L 细胞悬液。同上培养和分组后, 继续培养 24 和 48 h, 采用快速自动微量 MTT 比色法测定血管平滑肌细胞增殖活度(AMTT)。

## 1.4 血管平滑肌细胞钙调蛋白活性的测定

细胞培养 24 h 和 48 h 后, 收集细胞于 EP 管中, 加入 50  $\mu$ L 细胞匀浆液(pH7.4, 0.01 mol/L 蔗糖, 0.01 mol/L Tris-HCL, 0.1 mmol/L EDTA-2Na 溶液) 或 0.86% 生理盐水(4℃左右), 反复冻融 3 次破碎细胞, 离心取上清, 应用考马斯亮兰法进行蛋白定量。根据文献[5] 采用磷酸二酯酶(phosphodiesterase, PDE) 法, 即利用钙调蛋白(calmodulin, CaM) 作用于特异依赖于 CaM 的 PDE, 使之定量水解 cAMP, 并且在蛇毒的作用下进一步定量水解成核苷及磷酸, 再用定磷法进行 CaM 活性测定。依赖于 CaM 的 PDE 在无 CaM 存在的条件下无水解环核苷酸的活性; 在适量钙离子存在下, 在一定范围内 PDE 的活性与 CaM 成线性关系。定义每小时每毫克蛋白的 CaM 分解底物对硝基磷酸酚(P-nitrophenyl phosphate, PNPP) 产生 1  $\mu$ mol/L 无机磷的量为一个 CaM 的活力单位, 结果以比活力( $\mu$ molPi/mgPr) 表示。

## 1.5 血管平滑肌细胞钙调神经磷酸酶活性测定

将细胞接种于 12 孔板, 同上培养和分组后, 按 1.4 方法进行蛋白定量。然后根据参考文献[3, 4] 改进的 CaN 测定试剂盒说明书, 以钙调素作激活剂, PNPP 为底物, 用定磷法进行 CaN 活性测定。定

义每小时每毫克蛋白的 CaN 分解底物 PNPP 产生 1  $\mu$ mol/L 无机磷的量为一个 CaN 的活力单位, 结果以比活力( $\mu$ molPi/mgPr) 表示。

## 1.6 统计学处理

所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 输入 SAS 统计软件, 采用方差分析的方法进行比较, 并作多样本均数间两两比较的  $q$  检验, 两因素相关关系采用相关分析, 以  $P < 0.05$  为差异有显著性。

# 2 结果

## 2.1 血管平滑肌细胞体外培养及鉴定

采用组织贴块法成功培养出大鼠主动脉平滑肌细胞, 倒置相差显微镜下观察, 细胞为梭形或长梭形, 排列成放射状、旋涡状, 呈典型“谷”与“峰”生长现象。SM-actin 单克隆抗体免疫组织化学染色可见胞质肌丝呈典型棕黄色细颗粒状沉淀。VSMC 阳性率为 95% 以上, 表明 VSMC 纯度高。

## 2.2 川芎嗪对血管紧张素 Ⅱ刺激的血管平滑肌细胞增殖的影响

与正常对照组比较, Ang Ⅱ组 VSMC 的细胞增殖活度明显升高( $P < 0.01$ )。与 Ang Ⅱ组比较, 各剂量川芎嗪组 VSMC 的细胞增殖活度均显著减少( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 说明川芎嗪能抑制 Ang Ⅱ对 VSMC 的增殖效应。随同一剂量川芎嗪作用时间延长, VSMC 的细胞增殖活度逐渐减少( $P < 0.01$ ); 在同时段内随川芎嗪剂量的增加, VSMC 的细胞增殖活度也逐渐减少( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 4.00 g/L 川芎嗪作用 48 h 能使细胞增殖活度低于正常对照组( $P < 0.01$ , 表 1)。

表 1. 不同剂量川芎嗪作用不同时间对血管紧张素 Ⅱ诱导的血管平滑肌细胞增殖中细胞增殖活度的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

分 组	浓 度	24 h AMTT	48 h AMTT
对照组		0.2298 $\pm$ 0.0471	
Ang Ⅱ组	$10^{-7}$ mol/L	0.3324 $\pm$ 0.0347 <sup>a</sup>	
川芎嗪组	0.04 g/L	0.3047 $\pm$ 0.0038 <sup>b</sup>	0.2898 $\pm$ 0.0023 <sup>ce</sup>
	0.40 g/L	0.2906 $\pm$ 0.0017 <sup>bd</sup>	0.2546 $\pm$ 0.0026 <sup>cde</sup>
	4.00 g/L	0.2555 $\pm$ 0.0027 <sup>cd</sup>	0.2140 $\pm$ 0.0030 <sup>acde</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , c 为  $P < 0.001$ , 与 Ang Ⅱ组比较; d 为  $P < 0.05$ , 与同时段川芎嗪组比较; e 为  $P < 0.05$ , 与同剂量川芎嗪比较。AMTT 为吸光度值。

## 2.3 川芎嗪对血管紧张素 Ⅱ刺激的血管平滑肌细胞钙调蛋白和钙调神经磷酸酶活性的影响

血管紧张素 Ⅱ组 CaM 和 CaN 活性明显高于对

对照组 ( $P < 0.01$ ), 用川芎嗪处理后, CaM 和 CaN 活性明显低于 Ang Ⅱ组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。在相同作用时间内, 随川芎嗪浓度增加, CaM 和 CaN 活性降低 ( $P < 0.05$ ); 在相同作用浓度时, 随川芎嗪作用

时间延长, CaM 和 CaN 活性降低 ( $P < 0.01$ ) (表 2)。结果提示, 川芎嗪能显著抑制 Ang Ⅱ诱导的 VSMC 的 CaM 和 CaN 活性, 随着剂量增加、时间延长其抑制作用逐渐增强。

表 2. 不同剂量川芎嗪在不同时段对血管紧张素 Ⅱ诱导的血管平滑肌细胞增殖中钙调蛋白和钙调神经磷酸酶活性的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ ,  $14 \text{ molPi/mgPr}$ )

分 组	浓度	CaM 活性		CaN 活性	
		24 h	48 h	24 h	48 h
对照组		16.58 $\pm$ 0.47		7.08 $\pm$ 1.10	
Ang Ⅱ组	$10^{-7} \text{ mol/L}$	31.32 $\pm$ 0.61a		12.59 $\pm$ 1.26a	
川芎嗪组	0.04 g/L	29.26 $\pm$ 0.45 <sup>b</sup>	26.04 $\pm$ 0.15 <sup>be</sup>	10.88 $\pm$ 0.53 <sup>b</sup>	9.80 $\pm$ 0.63 <sup>ce</sup>
	0.40 g/L	26.47 $\pm$ 0.48 <sup>bd</sup>	23.93 $\pm$ 0.45 <sup>bde</sup>	10.11 $\pm$ 0.49 <sup>cd</sup>	9.02 $\pm$ 0.44 <sup>cde</sup>
	4.00 g/L	21.92 $\pm$ 0.45 <sup>bd</sup>	17.96 $\pm$ 0.32 <sup>bde</sup>	9.48 $\pm$ 0.33 <sup>cd</sup>	7.89 $\pm$ 0.41 <sup>cde</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , c 为  $P < 0.001$ , 与 Ang Ⅱ组比较; d 为  $P < 0.05$ , 与同时段川芎嗪组比较; e 为  $P < 0.05$ , 与同剂量川芎嗪比较。

## 2.4 钙调蛋白和钙调神经磷酸酶活性与细胞增殖活度的相关关系

相关分析发现, 川芎嗪处理的大鼠血管平滑肌细胞 CaM 活性与细胞增殖活度之间存在正相关 ( $r = 0.9689$ ,  $P < 0.01$ )。CaN 活性与细胞增殖活度之间也存在正相关 ( $r = 0.9499$ ,  $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

研究发现 CaN 依赖的信号转导途径在大鼠 VSMC 增殖中发挥重要作用, 其机制可能与激活  $\sigma$ -fos、 $\sigma$ -myc 表达, 进而促进增殖细胞核抗原转录有关<sup>[3-5]</sup>。也有报道 CaN 或  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM 依赖的 CaM 蛋白激酶可调节白细胞介素 3 相关核因子和腺病毒 E4 启动子结合蛋白的表达, 从而抑制主动脉平滑肌细胞增殖<sup>[6]</sup>。本研究以体外原代培养的大鼠主动脉平滑肌细胞为模型, 应用血管紧张素 Ⅱ诱导 VSMC 增殖, 建立细胞增殖模型, 同时应用川芎嗪随时间、剂量递增观察其对 VSMC 细胞增殖活度的影响及 CaM 和 CaN 活性变化。CaM 是细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的重要受体, 是真核细胞中普遍存在的钙受体蛋白, 涉及多种信号途径的转导, 影响着细胞的增殖及分化<sup>[7]</sup>。CaM 也作为许多药物的受体而发挥药物的干扰作用, 影响 CaM 的活性是某些药物作用的重要环节。

实验观察到, Ang Ⅱ诱导的 VSMC CaM 和 CaN 活性明显高于对照组 ( $P < 0.01$ )。同时细胞增殖活度增高 ( $P < 0.01$ ), 说明 Ang Ⅱ能促进培养的血管平滑

肌细胞增殖。不同剂量的川芎嗪作用不同时间 CaM 和 CaN 的活性明显下降 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 细胞增殖活度也显著减弱 ( $P < 0.01$ ), 说明川芎嗪对其具有抑制作用, 而且这种抑制作用具有量效和时效关系。

本研究结果说明, 川芎嗪能通过降低 CaM 和 CaN 的活性而抑制 Ang Ⅱ诱导的血管平滑肌细胞增殖, 其抑制作用随着浓度增加、时间延长而增强, 其机制可能与干预 CaN 依赖的信号转导途径有关。但其调节 CaN 信号转导途径的具体机制及与其他信号转导途径的相互影响还需进一步阐明。

## [参考文献]

- [1] 胡发明, 胡红丁. 川芎嗪的实验研究及临床应用[J]. 中医研究, 2004, 17 (3): 57-60
- [2] 王关嵩, 杨晓静, 钱桂生, 胡义德, 兰阳君. 大鼠血管平滑肌细胞分离培养的探讨[J]. 第三军医大学学报, 1998, 20 (4): 348-350
- [3] 李映红, 欧阳静萍, 李柯, 王保华, 武军驻, 魏劲波. CaN 信号通路在 Ang Ⅱ刺激的大鼠 VSMCs 增殖中的作用[J]. 武汉大学学报医学版, 2002, 23 (4): 326-329
- [4] 罗德生, 李映红, 李柯, 欧阳静萍. 环孢素 A 对神经肽 Y 刺激的大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20 (10): 1861-865
- [5] 李映红, 欧阳静萍, 魏劲波. CaN 在心血管系统中的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11 (5): 477-480
- [6] Nishimura Y, Tanaka T. Calcium-dependent activation of nuclear factor regulated by interleukin 3/adenovirus E4 promoter-binding protein gene expression by calcineurin/nuclear factor of activated T cell and calcium/calmodulin dependent protein kinase signaling[J]. J Biol Chem, 2001, 276 (23): 19 921-928
- [7] 黄佐, 任雨笙, 杜荣增, 潘晓明, 樊民, 吴宗贵. 血小板源生长因子 BB 对血管平滑肌细胞钙调蛋白的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11 (6): 523-525

(此文编辑 朱雯霞)