

甲基莲心碱对人脐静脉血管平滑肌细胞增殖及表型调节的影响

童国新¹, 李晓春², 王宁夫¹, 来蕾¹, 冷建杭¹(1.杭州市第一人民医院心内科, 南京医科大学附属杭州医院, 杭州 310006; 2.浙江大学医学院附属第二医院干部科, 杭州 310006)

摘要: 目的 研究甲基莲心碱对人脐静脉平滑肌细胞增殖及表型调节的影响。方法 以 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲基莲心碱处理平滑肌细胞, 采用 MTT 法和流式细胞术观察甲基莲心碱对人脐静脉血管平滑肌细胞增殖的影响。用免疫印迹法检测收缩型平滑肌细胞特异性标志物 SM1, calponin 1 和 α -actin 蛋白的表达。结果 甲基莲心碱(0.1~5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理 12, 24, 48 h 后, 人脐静脉血管平滑肌细胞的增殖具有明显的抑制作用, 并具有剂量依赖关系和时间依赖关系。在缺乏甲基莲心碱的干预下, 血管平滑肌细胞 SM1, calponin 1 和 α -actin 蛋白表达减少, 在用 0.5, 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲基莲心碱处理 48 h 后, 可显著逆转 SM1, calponin 1 和 α -actin 蛋白表达的减少, 且具有剂量依赖性。结论 甲基莲心碱具有抑制血管平滑肌细胞增殖及表型转化的作用, 可用于防治动脉粥样硬化和再狭窄。

关键词: 甲基莲心碱; 平滑肌细胞; 流式细胞术; 增殖; 表型

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2011)05-0387-04

Effect of Neferine on the Proliferation and Phenotype of Human Umbilical Vein Smooth Muscle Cells

TONG Guoxin¹, LI Xiaochun², WANG Ningfu¹, LAI Lei¹, LENG Jianhang¹(1.Department of Cardiology, the First People's Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310006, China; 2.Department of Geratology, The Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effect of neferine on the proliferation and phenotypic modulation of human umbilical vein smooth muscle cells (HUVSMCs) cultured *in vitro*. **METHODS** The effect of neferine(0.1, 0.5, 1.0, 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on HUVSMCs proliferation was studied by using MTT colorimeter and flow cytometry. Western blotting was used to indicate the changes of protein levels of the contractile-phenotype smooth muscle specific markers, such as smooth muscle myosin heavy chain-1 (SM1), calponin 1 and α -actin. **RESULTS** Neferine could significantly decrease the cell numbers of HUVSMCs after treatment for 12, 24, 48 h, and the anti-proliferation effects were in a concentration-dependent and time-dependent manner when the concentrations of neferine were between 0.1 and 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. In the absence of neferine treatment, the protein levels of the smooth muscle specific markers (SM1, calponin 1 and α -actin) decreased during culture. However, the treatment of VSMCs with neferine (0.5 or 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 48 h reversed the effect in a concentration-related manner. **CONCLUSION** These data suggest that neferine may arrest the growth of VSMCs and inhibit phenotypic modulation, thereby preventing cell dedifferentiation. These properties of neferine suggest that the drug can provide useful therapy for atherosclerosis and restenosis.

KEY WORDS: neferine; smooth muscle cell; flow cytometry; proliferation; phenotype

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是冠心病、脑卒中、下肢动脉闭塞等疾病的共同病理生理过程, 其病变基础以血管平滑肌细胞(vein smooth muscle cell, VSMCs)增生和血管内皮细胞受损为主要特征^[1]。血管平滑肌细胞的增殖和迁移在AS和冠脉成形术后再狭窄的进展中起着重要的作用^[2]。因此, 如何防治AS和降低冠脉成形术后再狭窄, 仍然是心血管疾病领域研究的热点。为此, 寻找有效的手段抑制VSMCs的增殖对防治AS和降低冠脉介入术后再狭窄具有重要的临床意义。

甲基莲心碱是从睡莲科植物莲成熟种子的绿色胚芽中提取出的一种双苄基异喹啉类生物碱。

已有的研究表明它具有扩血管、降压、抗脂质过氧化等药理作用, 还能抑制巨噬细胞对脂蛋白的摄取及巨噬源性泡沫细胞的形成^[3-5], 因此推测甲基莲心碱可以作用于AS的多个环节, 可能具有抑制VSMCs增殖的作用。本试验就甲基莲心碱对体外培养的人脐静脉血管平滑肌细胞(human umbilical vein smooth muscle cells, HUVSMCs)的影响进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 药品及试剂

DMEM培养基、胎牛血清(FBS) (Gibco, USA); ascorbic acid 2-phosphate(Sigma Aldrich, USA);

基金项目: 浙江省中医药科技计划基金资助项目(2007CA112)

作者简介: 童国新, 男, 硕士, 主治医师 Tel: 13588858590

E-mail: tonner1977@yahoo.com.cn

兔抗人 α -actin单克隆抗体、兔抗人calponin单克隆抗体、兔抗人平滑肌肌球蛋白重链-1(smooth muscle myosin heavy chain-1, SM1)单克隆抗体(cell signaling technology, USA); 甲基莲心碱(天津马克生物科技有限公司, 批号: 2292-16-2)。

1.2 主要设备

25 cm 细胞培养瓶、24 孔和 96 孔细胞培养板(Corning 公司, 美国); BIO-TekELx800 全自动酶标仪(BIO-RAD 公司, 美国); FACSCalibur 型流式细胞仪(Becton Dickinson 公司, 美国); PB303-S 电子天平(MonoBloc 公司, 瑞士); Sterile 1.5 型超净工作台(Forma Scientific 公司, 美国); BB15 型 CO₂ 细胞培养箱(Heraeus 公司, 德国)。

1.3 血管平滑肌细胞的培养

人脐静脉平滑肌细胞系(HUVSMCs)(编号 06090725), 源自英国国家细胞库细胞, 购自上海晶赛生物工程有限公司。胰酶/EDTA 消化收获细胞后常温 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, PBS 漂洗, 用 1~2 mL 含 10%DMSO 和 90%胎牛血清的冻存液重悬 HUVSMCs, 按照 4 °C 30 min, -20 °C 2 h, -80 °C 过夜顺序逐级降温处理后, 转入液氮中长期保存。使用时将冻存管取出, 立即放入 37~40 °C 温水中不断摇晃, 使冰冻的细胞液在 30 s 内迅速解冻, 移入无菌离心管, HUVSMCs 加入含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养液 5 mL, 轻轻吹打成悬液, 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 吸弃上清液, 加入含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养液, 轻轻吹打成细胞悬液, 种入 25 mL 培养瓶, 置于 37 °C 含 5% CO₂ 饱和湿度孵箱培养。3~5 d 长满瓶底 90%, 用含 0.01%EDTA 的 0.25%胰蛋白酶消化传代, 选择 4~8 代 HUVSMCs 用于实验。

1.4 实验分组及 MTT 测定

取对数生长期 HUVSMCs 细胞一瓶, PBS 洗涤 2 次, 含 0.01%EDTA 的 0.25%胰蛋白酶消化, 用含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养液配成单细胞悬液, 计数。无菌条件下按 150 μ L 细胞接种于 96 孔培养板, 接种细胞数为每孔 6×10^3 个。待细胞培养至培养板内的细胞呈 60%左右的融合状态, 换低血清 DMEM 培养 24 h 后, 根据不同的实验分组加入不同浓度的甲基莲心碱(0.1, 0.5, 1.0, 5.0 μ mol·L⁻¹)分别处理 12, 24, 48 h, 并设空白对照组。培养一定时间后, 每孔加入浓度为 5 mg·mL⁻¹ MTT 溶液 20 μ L, 37 °C CO₂ 孵箱继续培

养 4 h 后, 可见有紫蓝色的甲瓚结晶体形成, 小心吸弃孔内液体, 加 150 μ L 二甲基亚砷, 充分振荡 10 min, 溶解结晶物。选择 490 nm 波长, 在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值(A_{490 nm} 值), 空白对照调零, 记录结果。以上实验至少重复 3 次。

1.5 流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测甲基莲心碱对 HUVSMCs 细胞周期的作用

细胞以 1×10^6 接种于 25 mL 培养瓶中, 按“1.4”项下分组条件处理 HUVSMCs, 分别于 37 °C、5%CO₂ 饱和湿度条件下培养 24 h 后胰酶消化收获细胞, 冷 PBS 洗涤 2 次后, 用 75%预冷酒精固定过夜。用前将细胞悬液离心后 PBS 洗涤 2 次, PBS 调整细胞浓度为 1×10^6 ·mL⁻¹, 加入 Rnase A(10 mg·mL⁻¹)100 μ L, 室温孵育 10 min, 加入碘化丙啶染液(50 μ g·mL⁻¹)800 μ L, 混匀后 4 °C 避光放置 30 min, 以 FACSCalibur 型流式细胞仪检测细胞周期, 结果用专业软件 Modfit 3.1 分析数据。每组实验重复 3 次。

1.6 Western blot 印迹

在上述各处理因素作用时间末, 以预冷的 PBS 清洗 3 次, 加入 1 mL 细胞裂解液 4 °C 裂解细胞 1 h, 4 °C、12 500 r·min⁻¹ 离心 5 min。取上清以 Bradford 法测定蛋白含量。加适量的 2 \times 上样缓冲液 100 °C 变性 5 min, 每泳道加 30 μ g 蛋白, 以 12%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白。样品进入分离胶前用 50 V 电泳, 再用 110 V 电泳至胶下端 1 cm 左右。分别用甲醇、转移缓冲液浸泡 PVDF 膜, 4 °C 恒流 220 mA \times 2 h 将蛋白印迹到 PVDF 膜上。转印蛋白质后的 PVDF 膜以含 5%脱脂奶粉的 PBST 封闭 2 h, 与稀释于封闭液中的一抗(1:500 稀释)孵育, 4 °C 过夜, 漂洗后, 与辣根过氧化物酶标记的二抗于室温下摇床孵育 2 h, 再用 PBST 洗膜 1 h, 期间更换 PBST 4 次, 然后将膜于 ECL 试剂中温浴 1 min, 吸掉混合液, 保鲜膜固定。X 光胶片显影、定影后, 对胶片进行扫描, 根据信号强弱用图像软件对条带进行灰度分析。

1.7 统计学方法

数据均采用 SPSS 16.0 软件进行统计学处理, 结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较用单因素方差分析(one-way ANOVA), 多样本均数之间两两比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 甲基莲心碱抑制 HUVSMCs 的增殖

甲基莲心碱在 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度时, 抑制 HUVSMCs 增殖的作用具有剂量依赖性, 随着浓度的增高, 抑制作用逐渐增强。与对照组相比较, 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲基莲心碱作用 24 h 其 $A_{490\text{ nm}}$ 值减少了 17.2% ($P<0.05$)。甲基莲心碱抑制 HUVSMCs 增殖的作用同样具有时间依赖性, 随着时间的延长, 抑制作用逐渐增强。5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲基莲心碱作用至 12, 48 h, 其 $A_{490\text{ nm}}$ 值较对照组分别减低了 11.1% 和 26.4% ($P<0.05$)。以对照组细胞为 100%, 经过换算后的 HUVSMCs 增殖率, 结果见图 1。

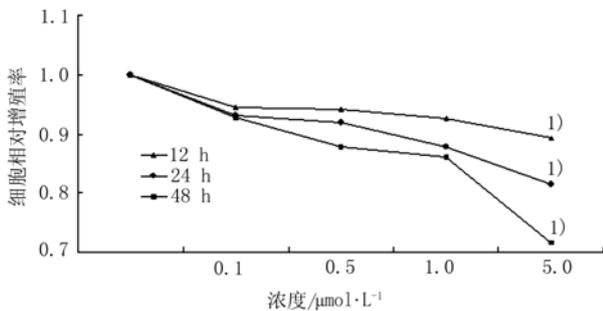


图 1 甲基莲心碱抑制 HUVSMCs 的增殖
与对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$

Fig 1 Neferine can inhibit the proliferation of HUVSMCs in a concentration-dependent and time-dependent manner Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$

2.2 甲基莲心碱对 HUVSMCs 细胞周期的影响

所得数据经 Modfit 3.1 软件处理后得到不同时相细胞数目的百分比。当加入 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲基莲心碱预处理 24 h 后, 与对照组比较, 细胞 G0/G1 期、S 期和 G2/M 期的变化具有显著性差异 ($P<0.01$), 细胞由 G0/G1 期向 S 期的转化受到抑制。提示甲基莲心碱可通过抑制 DNA 的合成, 从而显著抑制血清诱导的 HUVSMCs 增殖, 结果见表 1。

表 1 HUVSMCs 在细胞周期各期中所占的比例 ($n=3, \bar{x}\pm s$)

Tab 1 The proportion of HUVSMCs in various periods of the cell cycle ($n=3, \bar{x}\pm s$)

组别	G0/G1 期/%	S 期/%	G2/M 期/%
对照组	46.02±1.41	38.54±0.84	15.44±0.58
甲基莲心碱组	63.59±0.65 ¹⁾	26.18±0.41 ¹⁾	10.23±0.47 ¹⁾

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$

2.3 甲基莲心碱对人脐静脉平滑肌细胞 SM1, calponin 1 和 α -actin 蛋白表达的影响

本试验通过观察甲基莲心碱对 SM1, calponin

1 和 α -actin 蛋白表达的影响, 来研究其对 VSMCs 表型调节的作用。在缺乏甲基莲心碱干预的情况下, SM1 蛋白水平在培养 24 h 后显著降低, 在 48 h 时几乎未见表达。以 Asp 2-P (ascorbic acid 2-phosphate, 可调节 VSMCs 表型, 促进平滑肌细胞特异性标志物的表达^[6]) 作为阳性对照组, 在实验中同样观察到 Asp 2-P 可促进 SM1, calponin 1 和 α -actin 蛋白的表达。与对照组相比, 甲基莲心碱处理 24 h 可显著抑制 SM1, calponin 1 和 α -actin 蛋白的表达, 且具有剂量依赖性, 结果见图 2。

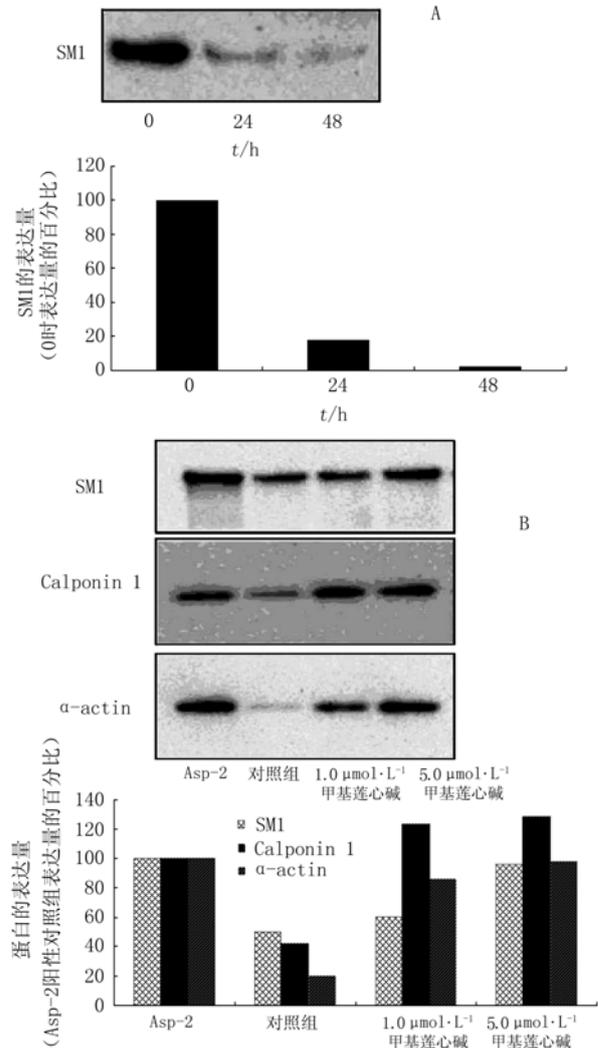


图 2 甲基莲心碱对人脐静脉平滑肌细胞 SM1, calponin 1, 和 α -actin 蛋白表达的影响

A-人脐静脉平滑肌细胞在培养 0, 24, 48 h 后, 未加甲基莲心碱处理的 HUVSMCs 中 SM1 蛋白表达的时间变化过程; B-加入 1.0, 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲基莲心碱或 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Asp 2-P 培养 24 h

Fig 2 Effects of neferine on protein expression of SM1, calponin 1 and α -actin in HUVSMCs

A-Time course of protein expression of SM1 in HUVSMCs which were cultured and harvested at 0, 24 and 48 h; B-HUVSMCs were cultured with neferine (1.0 or 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) or Asp 2-P (300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 24 h

3 讨论

VSMCs的异常增殖及表型转化是内膜肌层和
内皮损伤的重要标志,在高血压、AS及PCI术后再
狭窄的形成中具有重要的作用^[7]。AS病变中的
VSMCs主要来自动脉中膜,在AS形成过程中,动
脉中膜平滑肌细胞向内皮下迁移,VSMCs迁入内
膜后由收缩型转化为合成型,增殖成为纤维斑块
及粥样斑块的主要细胞成分^[8]。斑块内及动脉中膜
的VSMCs均可摄取脂质而成为泡沫细胞,内膜的
增殖和脂质的沉积造成AS性病变^[9]。增殖的
VSMCs和泡沫细胞容易坏死,细胞死后与细胞
间质成分、脂质成分一起构成典型的粥样病变。
表型改变的平滑肌细胞还合成分泌多种血管活性
物质、细胞因子及细胞外基质,促进自身发生肥
大、增殖和迁移,促进AS的发生^[10]。因此研究抑
制VSMCs增殖及表型转化的手段一直是心血管领
域的热点问题之一。

本实验采用 MTT 法检测甲基莲心碱对
HUVSMCs 增殖的影响,结果表明,甲基莲心碱浓
度在 0.1~5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内,可呈剂量及时间依赖性
地抑制 HUVSMCs 的增殖。细胞增殖是刺激细胞增
殖的外界信号作用于细胞受体后产生的一种以细
胞周期改变为主的综合性细胞行为,细胞周期时相
的改变是推动细胞增殖的重要原因^[11-13]。激活的
VSMCs 最终通过细胞周期来完成其分裂、增生,
VSMCs 的增生周期是生长因子和细胞因子所共有
的最终通路。因此,除用 MTT 法测定细胞增殖外,
笔者还采用了流式细胞术来进一步证实甲基莲心
碱对 HUVSMCs 增殖的影响。结果同样表明,5.0
 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的甲基莲心碱可抑制 HUVSMCs 的增殖。

体外培养的VSMCs具有一定的收缩能力,但
很快由收缩型转化为合成型,合成型VSMC的特点
是肌球蛋白减少,而增生、分泌和可塑性增强,
接近处于动脉硬化、血管成形术后再狭窄和高血
压病等病理状态下的VSMCs^[14]。VSMCs一旦由收
缩型向合成型转化,细胞骨架蛋白的特异性亚型,
如SM1、calponin 1, α -actin表达就会减少^[15-16]。
因此检测细胞骨架蛋白的特异性亚型的变化可作
为VSMCs表型转化的重要指标。在本试验中观察
到,血管平滑肌细胞在体外培养时,其“收缩型”
VSMCs的特异性标志物SM1, calponin 1和 α -actin
水平逐渐下降,但是用1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 或5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
甲基莲心碱处理后,这种下降的势头可以得到有

效地抑制。因此本试验证明甲基莲心碱能影响
VSMCs的表型,抑制VSMCs的去分化作用。

综上所述,甲基莲心碱可抑制血管平滑肌细
胞增殖以及表型转化,对防治AS具有有益的作用,
但是对血管平滑肌细胞增殖产生抑制作用的确切
机制还有待进一步研究。

REFERENCE

- [1] SINGHAL A. The early origins of atherosclerosis [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2009, 646: 51-58.
- [2] ANDRES V. Control of vascular smooth muscle cell growth and its implication in atherosclerosis and restenosis [J]. *Int J Mol Med*, 1998, 2(1): 81-89.
- [3] CHEN J, QI J, CHEN F, et al. Relaxation mechanisms of neferine on the rabbit corpus cavernosum tissue *in vitro* [J]. *Asian J Androl*, 2007, 9(6): 795-800.
- [4] CHEN J, LIU J H, WANG T, et al. Effects of plant extract neferine on cyclic adenosine monophosphate and cyclic guanosine monophosphate levels in rabbit corpus cavernosum *in vitro* [J]. *Asian J Androl*, 2008, 10(2): 307-312.
- [5] JIA J F, AO M Z, HU B R, et al. The Effects of neferine on lipid peroxides and active oxygen free radical [J]. *Acta Univ Med Tongji*(*同济医科大学学报*), 1994, 23(1): 62-64.
- [6] ARAKAWA E, HASEGAWA K, IRIE J, et al. L-Ascorbic acid stimulates expression of smooth musclespecific markers in smooth muscle cells both *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2003, 42(6): 745-751.
- [7] ROSS R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s [J]. *Nature*, 1993, 362(29): 801-809.
- [8] ORR A W, HASTINGS N E, BLACKMAN B R, et al. Complex regulation and function of the inflammatory smooth muscle cell phenotype in atherosclerosis [J]. *J Vasc Res*, 2010, 47(2): 168-180.
- [9] HAO H, GABBIANI G, BOCHATON-PIALLAT M L. Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(9): 1510-1520.
- [10] RIVARD A, ANDRÉS V. Vascular smooth muscle cell proliferation in the pathogenesis of atherosclerotic cardiovascular diseases [J]. *Histol Histopathol*, 2000, 15(2): 557-571.
- [11] CHARRON T, NILI N, STRAUSS B H. The cell cycle: a critical therapeutic target to prevent vascular proliferative disease [J]. *Can J Cardiol*, 2006, 22(Suppl B): 41B-55B.
- [12] BICKNELL K A, BROOKS G. Reprogramming the cell cycle machinery to treat cardiovascular disease [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2008, 8(2): 193-201.
- [13] JACKSON L N, EVERS B M. Regulation of proliferation, apoptosis and cell cycle in gastro intestinal disorders [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2009, 9(6): 708-714.
- [14] CHAMLEY J H, CAMPBELL G R, MCCONNELL J D, et al. Comparison of vascular smooth muscle cells from adult human, monkey and rabbit in primary culture and in subculture [J]. *Cell Tissue Res*, 1977, 177(4): 503-522.
- [15] KURO-O M, NAGAI R, NAKAHARA K, et al. cDNA cloning of a myosin heavy chain isoform in embryonic smooth muscle and its expression during vascular development and in arteriosclerosis [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266(6): 3768-3773.
- [16] SHANAHAN C M, WEISSBERG P L, METCALFE J C. Isolation of gene markers of differentiated and proliferating vascular smooth muscle cells [J]. *Circ Res*, 1993, 73(1): 193-204.

收稿日期: 2010-07-15