

黄芪抑制血管平滑肌细胞增殖及其作用机制

黄进宇¹, 单江¹, 徐耕¹, 傅国胜¹, 高炎² (1. 浙江大学医学院附属第二医院心内科, 浙江 杭州 310009; 2. 杭州市第六医院, 浙江 杭州 310004)

摘要:目的 观察黄芪(AS)对血管平滑肌细胞(VSMC)增殖的抑制作用,了解黄芪是否通过刺激VSMC产生一氧化氮(nitric oxide, NO),使细胞周期停滞于G₀/G₁期,从而抑制平滑肌细胞增殖。方法 [³H]-胸腺嘧啶核苷酸([³H]-TdR)掺入测定VSMC DNA合成,流式细胞仪检测细胞周期情况,硝酸还原酶法测定细胞培养上清中NO水平。结果 黄芪以剂量依赖关系抑制血清诱导的VSMC [³H]-胸腺嘧啶核苷酸掺入,使G₀/G₁期细胞比例明显增多,S期细胞比例显著减少,黄芪刺激VSMC后,细胞培养上清中NO水平呈剂量依赖上升。结论 黄芪能抑制VSMC增殖,使细胞周期停滞于G₀/G₁期,这一过程可能与黄芪刺激VSMC产生NO有关。

关键词:

中图分类号: R916.691; R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2003)04-0277-03

Astragalus inhibit proliferation on vascular smooth muscle cells and it's mechanism

HUANG Jin-yu¹, SHAN Jiang¹, XU Geng¹, FU Guo-sheng¹, GAO Yan² (1. Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital, Zhejiang University, Medical School, Hangzhou, 310009, China; 2. The Number Sixth Hospital of Hangzhou 310004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the inhibition effect of Astragalus(AS) on the proliferation and cell cycle of vascular smooth muscle cells(VSMC). To investigate if this effect is through increasing NO level of VSMC. **METHOD** The DNA synthesis was determined by [³H]-TdR incorporation, cell cycle was examined with flow cytometry, and NO content of medium was detected. **RESULTS** (1) Astragalus inhibited [³H]-TdR incorporation in a dose dependent manner(0.5 mg/mL-50 mg/mL). (2) Flow cytometric DNA analysis revealed that Astragalus induced significantly enhancement of G₀/G₁ phase compared with control group and decreasing of S phase VSMC. (3) NO content of medium was increased in a dose dependent manner. **CONCLUSION** Astragalus may inhibit proliferation of VSMC and retarded cell cycle in G₀/G₁ phase by increasing NO level.

KEY WORDS:

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)的增殖是经皮冠状动脉腔内血管成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA)后再狭窄发生的关键因素,如何抑制VSMC增殖成为近年来心血管内科领域研究的热点。黄芪是治疗心血管疾病的传统中药,实验和临床药理研究表明:黄芪对缺血、再灌注损伤心肌均具有良好的保护作用^[1,2]。新近发现,以黄芪的水提取物刺激培养的VSMC, VSMC中诱导型NO合酶(iNOS)的信使核糖核酸和蛋白表达水平显著增加,并能通过NO-sGC-cGMP介导的信号转导途径调节VSMC的细胞功能^[3]。我们研究了黄芪对VSMC增殖和细胞周期的影响并检测了与细胞增殖密切相关的一氧化氮(nitric oxide, NO)水平,以揭示黄芪抑制VSMC增殖可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

胎牛血清(FBS)和DMEM培养基(Gibco公司产品),

[³H]-TdR(中科院上海原子能所产品), S-M α actin单克隆抗体(北京中山生物技术有限公司), NO测试试剂盒(南京建成生物工程研究所产品), 黄芪注射液(成都地奥九泓制药厂生产,批号0010096,规格为10 mL/支,相当于原生药20g)。

1.2 血管平滑肌细胞的体外培养及鉴定与细胞毒性试验

组织贴块法培养血管平滑肌细胞。大鼠活杀,在严格灭菌的条件下取出胸主动脉,放入预先灭菌的Hank's液中清洗3次,剪去小分支,刮除内、外膜,在含有10%胎牛血清的DMEM培养液中将血管条剪成1 mm²大小的组织块,将组织块均匀种植到25 mL的培养瓶内,瓶底朝上置于培养箱内,95%O₂ 5%CO₂ 37℃培养4~6h后轻轻翻转培养瓶,加入10%胎牛血清DMEM培养液使培养液覆盖于组织块上,继续培养。细胞长满瓶底后以1:3的比例消化传代。用光镜和免疫化学方法进行鉴定。实验用4~6代细胞。细胞毒性试验采用Trypan Blue染色,细胞计数方法,本研究所用黄芪注射液浓度无毒性,细胞存活率达95.0%以上。

作者简介:黄进宇:浙江省中西医结合医院委托培养博士研究生;单江:博士生导师。

1.3 细胞处理

当培养的第3~6代 VSMC 贴壁生长至约90%时,弃10%胎牛血清 DMEM 培养液,无血清培养24h,换10%胎牛血清 DMEM 培养液(含0.4mmol/L L-精氨酸)4mL/瓶,然后进行如下实验:分对照、黄芪注射液0.5 2/mL,黄芪注射液5 2/mL,黄芪注射液50 2/mL共4组,每组n=4,95% O₂,5%CO₂,37℃继续培养24h。

1.4 [³H]-TdR 掺入量测定

选用生长良好的第4至第6代 VSMC,用培养液调整细胞密度为1×10⁵个/mL,接种于24孔培养板,每孔1mL。培养24h后更换无血清 DMEM 培养液24h,然后加入10% FBS及不同浓度黄芪注射液,孵育16h后每孔内加入1μCi/³H]-TdR,孵育8h,加入冷PBS液终止反应,并用10%三氯醋酸固定,1mol·L⁻¹氢氧化钠裂解,加入闪烁液在液闪计数器上测定³H]的放射性读数。重复3次,每次取3复孔平均值。

1.5 细胞周期

细胞经上述血清饥饿24h后加入10%FBS及不同浓度黄芪注射液,对照组只加10%FBS不加黄芪注射液,作用24h后,将细胞制成单细胞悬液,收集后70%冷乙醇固定,经离心0.5mL/LPI染料染色和300目筛网过滤处理后,用流式细胞仪(Coulter, Berkman公司)进行细胞周期测定。

1.6 细胞培养上清 NO 水平测定

收集细胞培养上清2000r/min离心3min后去沉渣,参照试剂盒说明书以硝酸还原酶法测定细胞培养上清中NO水平。

1.7 统计处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,输入SPSS10.0软件统计处理,比较采用t检验。

2 结果

2.1 黄芪对 VSMC 的³H]-TdR 掺入量的影响

黄芪呈剂量依赖关系抑制血清诱导的 VSMC³H]-TdR 掺入,与对照组相比,各剂量组均有显著差异(P<0.05)。见图1

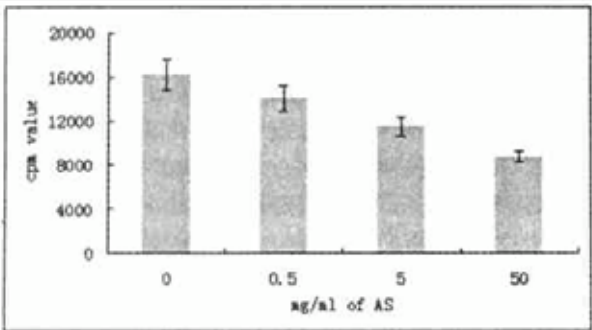


图1 黄芪对 VSMC 的³H]-TdR 掺入量的影响

Fig 1 Effect of Astragalus on VSMC [³H]-TdR cpm value

2.2 黄芪对 VSMC 细胞周期的影响

加入0.5,5及50mg/mL黄芪24h后,G₀/G₁期细胞所占比例均显著高于对照组,而S期细胞均少于对照组,G₂/M细

胞则无显著变化,说明加入黄芪后细胞停滞于G₀/G₁期。见表1。

表1 黄芪对 VSMC 细胞周期的影响

Tab 1 Effects of Astragalus on VSMC cell cycle(%)

Group	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Control	46.57±5.47	43.47±3.00	9.97±2.95
AS 0.5 2/mL	68.80±1.55 ¹⁾	21.27±4.06 ¹⁾	9.93±5.44 ²⁾
AS 5 2/mL	73.20±3.32 ¹⁾	13.93±4.79 ¹⁾	12.87±2.47 ²⁾
AS 50 2/mL	78.20±4.35 ¹⁾	9.43±1.53 ¹⁾	12.37±4.59 ²⁾

注:n=3,¹⁾P<0.01,²⁾P>0.05,均与对照组比较

Note:n=3,¹⁾P<0.01,²⁾P>0.05,vs control group

2.3 黄芪对 VSMC 细胞培养上清 NO 水平的影响

0.5,5及50mg/mL黄芪注射液刺激 VSMC 24h后,细胞培养上清中的NO水平分别为(51.82±13.19)μmol、(120.57±29.85)μmol、(185.46±37.23)μmol,与对照组(15.32±4.38)μmol比较均有显著差异(均P<0.05,n=4),提示黄芪呈浓度依赖刺激 VSMC 产生NO。

3 讨论

随着导管质量的不断改进和临床经验的不断积累,PTCA的成功率逐渐提高,适应范围日益拓宽,已成为冠心病的常规治疗手段之一。但是众多的实验和临床研究发现PTCA术后6个月的再狭窄率高达30%~60%^[4],这限制了其治疗的远期疗效及临床应用,也给患者加重了生理上和经济上的负担。

血管内膜损伤后大量 VSMC 在各种细胞因子的作用下从中层迁移至内膜表面增殖进而形成新内膜是PTCA术后再狭窄发生的重要病理表现^[5]。目前,国外许多专家正致力于研究和开发阻止 VSMC 的增殖和迁移能力的药物,从而预防和改善PTCA术后的再狭窄程度。

近年的研究表明,NO是一种具有多种确定的生物学作用的活性分子,它除具备可调节血管张力,抑制血小板向血管损伤部位的黏附和聚集,抑制白细胞与内皮下基质的黏附等有益作用外^[6,7],还能抑制 VSMC 的增殖,其机制与NO能阻止 VSMC 细胞周期的运行、抑制 VSMC 的有丝分裂及脱氧核糖核酸(DNA)的合成有关^[8]。与此同时,Sarkar等^[9]的研究还发现多种NO供体药可剂量依赖性抑制大鼠主动脉 VSMC 的迁移,减少迁移细胞数量,缩短最大迁移距离,且此抗迁移效应不依赖于其对 VSMC 增殖的抑制及细胞不良反应。Tarry等^[10]及Gro^[11]等通过实验观察了补充NO合成底物L-精氨酸或NO供体对动物血管成形术后粥样斑块形成的影响,结果均证实L-精氨酸或NO供体确能显著减轻粥样斑块形成的进程度。

细胞周期是细胞增殖的最后共同通道,通过对细胞周期相关基因的调控,阻断 VSMC 的增殖可能是再狭窄防治的一个潜在有效的途径。本研究表明本实验结果表明黄芪能有效抑制 VSMC³H]-TdR 掺入。更有意义的是黄芪使G₀/G₁期细胞数明显增多而S期细胞数明显减少,说明黄芪使

VS MC 增殖周期停滞于 G_0/G_1 期。细胞周期中存在两个限制点,决定细胞是否继续增殖或是进入静止状态,一个限制点在 DNA 合成开始即 G_1-S 限制点,另一个在有丝分裂开始即 G_2-M 限制点,这其中 G_1-S 限制点更为重要,是细胞中很多调节因子及胞外刺激作用的位点。p21, p27 为细胞中 G_1/S 限制点的重要调节因子^[12],属细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂家族(cyclin-dependent kinase inhibitor,CKI),主要通过抑制 G_1-S 限制点中的各种周期蛋白(cyclin)及周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase,CDK)而使细胞停滞于 G_0/G_1 期。已有研究表明 p21, p27 在动脉粥样硬化及血管重构中起着重要的作用,与正常组织相比,粥样硬化病变组织中的 p21, p27 均表达增高^[13]。晚近,Sato 等^[14]在体外利用腺病毒介导将(eNOS)基因转染到 VS MC 中,发现能通过上调 P21 和 P27 表达引起细胞周期停滞而抑制 VS MC 增殖。因此,黄芪可能通过刺激 VS MC 产生 NO,使细胞周期停滞于 G_0/G_1 期,从而抑制平滑肌细胞增殖,值得对其在相关信号转导途径中的具体作用进行深入的研究。

参考文献

- [1] 顾娟红,沈惟堂,李自普,等.黄芪对缺血大鼠心肌钙及脂质过氧化物的影响[J].上海医科大学学报,1997,24(4):270.
- [2] 英明中,李小鹰,孙存普,等.黄芪总黄酮对大鼠心肌缺血/再灌注自由基的影响[J].中国中药杂志,1996,21(5):304.
- [3] Fukuda K.通过黄芪、人参和黄芪水提物的处理增加血管平滑肌细胞中 NO 合酶和环磷鸟苷[J].和汉医学杂志,1995,12(1):38.
- [4] Laird JR, Carter AJ, Kufs WM, et al. Inhibition of Neointimal proliferation with low-dose irradiation from a β particle-emitting stent[J]. Circulation, 1996, 93:529.
- [5] Schwartz SM, deBlois D, O'Brien ERM. The intima: soil for atherosclerosis and restenosis[J]. Circ Res, 1995, 77:445.
- [6] Provost P, Tremblay J, Merhi Y. The antiadhesive and antithrombotic effects of the nitric oxide donor SIN-1 are combined with a decreased vasoconstriction in a porcine model of balloon angioplasty[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997, 17:1806.
- [7] Takanashi M, Ikeda U, Masuyama J, et al. Nitric oxide attenuates adhesion molecule expression in human endothelial cells[J]. Cytokine, 1996, 8:817.
- [8] Nakaki T, Nakayama M, Kato R. Inhibition by nitric oxide and nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells[J]. Eur J Pharmacol, 1990, 189:347.
- [9] Sarkar R, Meinberg EG, Stanley JC, et al. Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells[J]. Circ Res, 1996, 78:225.
- [10] Tarry WC, Makhoul RG. L-arginine improve endothelium-dependent vasorelaxation and reduces intimal hyperplasia after angioplasty[J]. Arterioscler Thromb, 1994, 14:938.
- [11] Gro J, Milhoa K, Tuan R, et al. Beneficial effects of SPM-5185, a cysteine-containing nitric oxide donor, in rat carotid artery intimal injury[J]. Circ Res, 1994, 4:232.
- [12] Toyoshima H, Hunter T. p27, a novel inhibitor of G_1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21[J]. Cell, 1994, 78:67.
- [13] Ihling C, Menzel G, Wellens E, et al. Topographical association between the cyclin-dependent kinases inhibitor P21, p53 accumulation, and cellular proliferation in human atherosclerotic tissue[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997, 17:2218.
- [14] Sato J, Nair K, Hiddinga J, et al. eNOS gene transfer to vascular smooth muscle cells inhibits cell proliferation via upregulation of P27 and P21 and apoptosis[J]. Circ Res, 2000, 47:697.