

蒺藜皂苷对血管平滑肌细胞增殖的影响

关利新¹,李孟全¹,衣欣¹,苏云明²,杨世杰³ (1.牡丹江医学院药理学系,黑龙江 牡丹江 157011; 2.黑龙江中医药大学药理学教研室,哈尔滨 150040; 3.吉林大学基础医学院药理学教研室,长春 130021)

摘要:目的 观察蒺藜皂苷 (GSTT)对血管平滑肌细胞 (VSMC)增殖及相关因素的影响。方法 采用培养的牛 VSMC,以血管紧张素 II (AngII) 为刺激因子,应用 MTT法检测细胞增殖;以 H₂O₂为刺激因子,应用激光扫描共聚焦显微镜检测 VSMC内钙离子浓度;应用硝酸还原酶法检测培养的牛血管内皮细胞 NO释放量。结果 GSTT能明显抑制 AngII刺激的 VSMC增殖,具有剂量依赖性;GSTT也能抑制 H₂O₂所致的 VSMC内钙离子浓度升高,使血管内皮细胞释放的 NO明显增多。结论 GSTT能抑制 AngII诱导的 VSMC增殖,此作用可能与抑制活性氧激活钙离子信号转导途径,增加血管内皮细胞 NO含量等因素有关。

关键词:蒺藜皂苷;血管平滑肌细胞;血管紧张素 II;活性氧;钙;一氧化氮

中图分类号: R972; R931.6 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2008)01-0007-04

Effect of Gross Saponins from Tribulus Terrestris on the Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells

GUAN LI-xin¹, LI Meng-quan¹, YI Xin¹, SU Yun-ming², YANG Shi-jie³ (1. Department of Pharmacy, Mudanjiang Medical College, Mudanjiang 157011, China; 2. Department of Pharmacology, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 3. Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects of gross saponins from tribulus terrestris (GSTT) on the proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC). **METHODS** The bovine VSMC were cultured and the effect of GSTT on cellular proliferation in VSMC stimulated by angiotension II (AngII) were assayed by MTT method, and the effect of GSTT on intracellular free calcium ([Ca²⁺]_i) in VSMC stimulated by H₂O₂ were also assayed by laser scanning confocal microscope. The release of nitric oxide (NO) in bovine vascular endothelia cell were detected by the method of nitric acid reductase. **RESULTS** GSTT could significantly inhibit the proliferation of VSMC stimulated by AngII, which has the dose-dependent effects. GSTT also shown to be able to depress increase of [Ca²⁺]_i stimulated by H₂O₂, and increase the release of NO. **CONCLUSION** The inhibition effect of GSTT on the proliferation of VSMC stimulated by AngII may be related with the suppression of reactive oxygen activated Ca²⁺ signal path and increase the release of NO.

KEY WORDS: gross saponins from tribulus terrestris; Vascular smooth muscle cells; angiotension II; reactive oxygen; calcium; nitric oxide

血管平滑肌细胞 (VSMC)增殖是动脉粥样硬化、原发性高血压和血管成形术后再狭窄等多种心血管疾病发生的关键因素,如何抑制 VSMC增殖已成为人们研究的热点。蒺藜皂苷 (gross saponins from tribulus terrestris, GSTT)是从蒺藜科植物蒺藜的全草中提取的甾体皂苷,临床上主要用于缺血性

心脑血管疾病的治疗。采用家兔动脉粥样硬化模型,一些研究证明 GSTT可从多方面起到抗动脉粥样硬化的作用^[1-3],但有关 GSTT对血管平滑肌细胞增殖的影响尚未见报道。本实验采用体外培养的 VSMC,探讨 GSTT对 VSMC增殖及相关因素的影响,为 GSTT的临床应用提供实验依据。

作者简介:关利新,男,在读博士,教授
82196314

E-mail: gxl960@yahoo.com.cn

* 通讯作者:苏云明,男,教授,博士生导师

Tel: (0451)

1 材料和方法

1.1 药品与试剂

GSTT为总皂苷,主要含螺旋甾烷醇皂苷(spirostanol saponin)和呋甾烷醇皂苷(furostanol saponin),纯度>90%,由吉林敖东洮南药业股份有限公司提供;DMEM培养基、胎牛血清(FBS),Invitrogen公司产品;胰酶、噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)及血管紧张素II(AngII),Sigma公司产品;Fluo-3-AM, Molecular Probes (Eugene, Oreg.); NO试剂盒由南京建成生物工程研究所生产,其他试剂均为分析纯。

1.2 细胞培养

1.2.1 VSMC培养 无菌条件下迅速取出新生乳牛的胸主动脉,在含高抗的Hanks溶液中冲洗数次,洗掉残余血污,仔细剥离外膜的纤维脂肪层及内膜。将剩余中膜转移至培养皿中,用眼科剪将平滑肌剪成1 mm³的小块送入培养瓶内,加入20% FBS的DMEM培养液,旋紧瓶盖,使组织块位于培养瓶上方,置37℃ 5% CO₂培养箱中,4 h后翻转培养瓶,使组织块浸入培养液中,约3 d更换培养液,1周左右组织块周围可见梭形平滑肌细胞,细胞长至完全融合时进行传代培养。经组织化学染色鉴定,呈 α -actin阳性,采用生长良好的3~6代进行实验。

1.2.2 血管内皮细胞培养 无菌条件下迅速取出新生乳牛的胸主动脉,在含高抗的Hanks溶液中冲洗数次,洗掉残余血污,仔细剥离外膜的纤维脂肪层,再将其纵向剖开,在其内膜侧加几滴胰酶,用弯镊沿血管纵向轻轻刮下内皮细胞。滴加少量含20% FBS培养液终止消化。收集已消化下来的内皮细胞于离心管中1 000 r·min⁻¹离心5 min,去除上清,加入20% FBS的DMEM培养液,轻轻吹打形成细胞悬液,接种至培养瓶置CO₂培养箱中培养。Ⅷ因子相关抗原染色阳性,证实培养的细胞为血管内皮细胞,3~6代细胞用于实验。

1.3 MTT法测定细胞增殖

将VSMC以 5.0×10^4 浓度接种于96孔板中孵育24 h,以PBS为对照组,GSTT终浓度分别为60,120,240 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 预孵30 min,每组做6个复孔。然后,每组加AngII终浓度为 $3.6 \times 10^{-14} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 刺激24 h,每孔加MTT终浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 继续孵育4 h,小心吸出原液,每孔加150 μL DMSO溶解结晶,在酶联免疫仪上于490 nm测定其吸收值(A)。应用如下公式计算增值率:增值率% = $(A/A_0) \times 100\%$,A为给药组吸光度,A₀为对照组吸光度。

1.4 激光扫描共聚焦显微镜检测细胞内钙离子

将VSMC接种于预先放置盖玻片的6孔板中孵育,24 h后用Hank's液(pH 7.2)洗涤细胞3次,于37℃避光条件下负载Fluo-3-AM,30 min后用PBS洗涤细胞3次,洗去细胞外残余的染料,而后在激光扫描共聚焦显微镜(德国蔡司LSM 510)下进行扫描检测。检测荧光强度代表细胞内钙离子([Ca²⁺]_i)的相对浓度。扫描过程中施加H₂O₂刺激,首先观察单独施加H₂O₂($10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)刺激细胞内荧光强度的变化,然后观察通过GSTT(240 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)37℃预孵30 min后施加H₂O₂刺激细胞内荧光强度的变化,拍摄不同时间

细胞的荧光图,绘制荧光强度随时间变化的曲线。

1.5 一氧化氮含量测定

将主动脉内皮细胞以 5.0×10^4 浓度接种于96孔板中孵育24 h,换成无血清的DMEM培养液培养24 h,使细胞同步化。然后,以PBS为对照组,用终浓度分别为60,120,240 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的GSTT刺激24 h,每组做6个复孔。应用硝酸还原酶法,按照试剂盒说明书操作,测定细胞培养液中NO含量。

1.6 统计学分析

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较用t检验,多组比较用单因素方差分析,P<0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GSTT对AngII刺激VSMC增殖的影响

MTT法测定GSTT对AngII刺激VSMC增殖的影响,见图1。与对照组细胞相比,AngII在终浓度为 $3.6 \times 10^{-14} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,具有明显的刺激VSMC增殖的作用。GSTT终浓度为60,120,240 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,能够抑制AngII刺激VSMC增殖的作用,该抑制作用具有浓度依赖性,说明GSTT对AngII刺激VSMC的增殖具有保护作用。

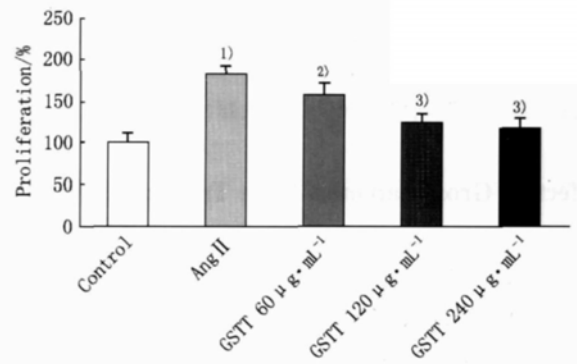


图1 GSTT对AngII刺激VSMC增殖的影响

注:与对照组相比较,1) P<0.01;与AngII组比较,2) P<0.05,3) P<0.01

Fig 1 Effect of GSTT on the proliferation of VSMC induced by Ang II

Note: Comparing with the control group, 1) P<0.01; comparing with the AngII group, 2) P<0.05, 3) P<0.01

2.2 GSTT对H₂O₂刺激VSMC[Ca²⁺]_i浓度的影响

用激光扫描共聚焦显微镜观察[Ca²⁺]_i浓度。单独加入H₂O₂时,细胞的荧光强度增加(图2A),绘制荧光强度的时间曲线向上(图3),说明[Ca²⁺]_i浓度增加。通过GSTT(240 $\mu\text{M} \cdot \text{mL}^{-1}$)37℃预孵30 min后施加H₂O₂刺激细胞内荧光强度不再增加(图2B),绘制荧光强度的时间曲线平稳(图3),说明GSTT对H₂O₂刺激VSMC[Ca²⁺]_i浓度增加具有抑制作用。见图2,3。

2.3 GSTT对血管内皮细胞NO释放的影响

GSTT对血管内皮细胞NO释放的影响见图4。与对照组比较,高、中、低浓度的GSTT均能使血管内皮细胞培养液里NO含量升高,GSTT的浓度为120 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,NO含量升高最明显,达到 $35.79 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,表明GSTT具有促进血管内皮细胞释放NO的作用。

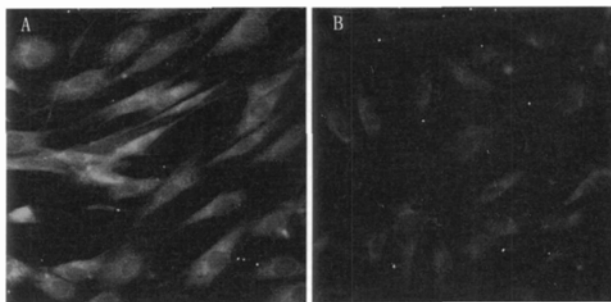


图 2 VSMC $[Ca^{2+}]_i$ 荧光图像 (60 s 拍摄图)

A - H_2O_2 刺激; B - GSTT ($240 \mu g \cdot mL^{-1}$) 预孵 30 min 后用 H_2O_2 刺激

Fig 2 Fluorescence image of $[Ca^{2+}]_i$ in VSMC

A - stimulated with H_2O_2 for 60 s; B - pre-incubation of GSTT ($240 \mu g \cdot mL^{-1}$) for 30 min, and then stimulated with H_2O_2 only for 60 s

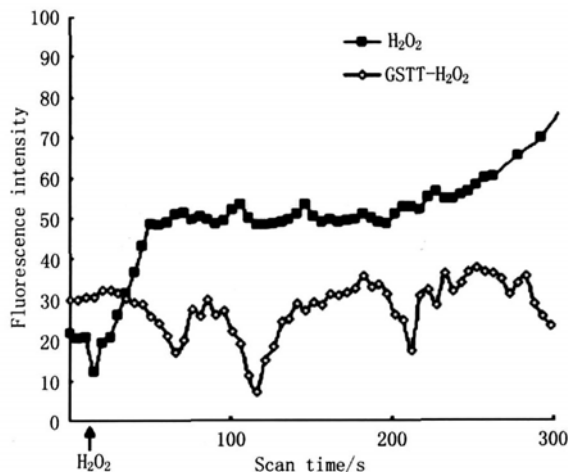


图 3 GSTT 对 H_2O_2 刺激 VSMC $[Ca^{2+}]_i$ 荧光强度的影响

Fig 3 Effect of GSTT on fluorescence intensity of $[Ca^{2+}]_i$ of VSMC stimulated by H_2O_2

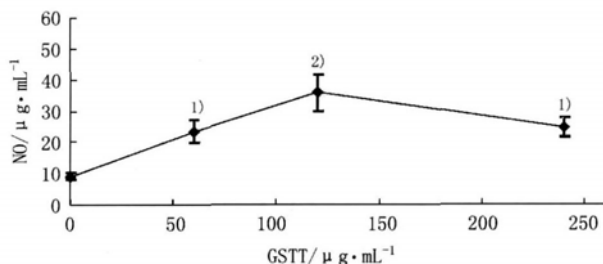


图 4 GSTT 对血管内皮细胞 NO 释放的影响

注:与对照组相比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

Fig 4 Effect of GSTT on NO concentration in the cultural solution of artery endothelial cells

Note: Comparing with the control group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

3 讨论

VSMC 位于血管中膜, 其异常增殖是动脉硬化、高血压和血管成形后再狭窄等疾病共同病理特征之一。AngII 是一种重要的血管活性物质, 可调节机体的生长、发育及循环系统的功能, 对 VSMC 增殖具有较强的刺激作用, 而且现认为 AngII 的促 VSMC 增殖作用至少部分是通过次黄嘌呤/黄

嘌呤 (NADPH/NADH) 氧化酶系统产生的活性氧所介导^[4-5]。活性氧对 VSMC 增殖的影响是通过多个位点对信号转导系统进行调节的, 如钙离子信号转导途径、蛋白酪氨酸激酶途径、丝裂原活化的蛋白激酶途径和核因子 κB 途径等, 其中对钙离子信号转导途径调节主要通过三种方式增加了细胞内的钙离子: 通过三磷酸肌醇敏感性的钙离子通道释放内质网中的钙离子; 活性氧作用于钙离子通道和钠/钙交换体刺激细胞外的钙离子内流; 在强氧化应激时线粒体释放其中的钙离子^[6-7]。 H_2O_2 为 NADPH/NADH 氧化酶系统所产生的主要活性氧之一, 可升高 VSMC 中的钙离子^[7-8]。钙离子参与细胞的增殖过程, 增加细胞内的钙离子可促进细胞的增殖, 降低细胞内的钙离子则抑制细胞增殖^[9-10]。本实验结果显示, GSTT 能明显抑制 AngII 刺激的 VSMC 增殖, 且具有浓度依赖性; 应用 H_2O_2 刺激 VSMC, 可见 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度增加, 而 GSTT 可拮抗 H_2O_2 升高 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度的作用, 提示 GSTT 对通过活性氧介导的 AngII 刺激 VSMC 增殖具有抑制作用。

在生理条件下, NO 是由血管内皮细胞产生的一种主要的舒张因子, 具有强烈的舒张血管作用和维持内皮细胞完整性、抑制血小板和白细胞的黏附与聚集、抑制血管平滑肌增殖等作用, 从而起到防止动脉粥样硬化和高血压等病症形成和发展的效应^[11-12]。在本实验中, GSTT 能够促进血管内皮细胞 NO 的释放, 此结果与 GSTT 能够提高动脉粥样硬化家兔血清 NO 水平的报道^[12]相一致, 提示 GSTT 抑制 VSMC 增殖作用可能与其促进血管内皮细胞释放 NO 有关。

REFERENCES

- [1] ZHANG Y, ZHANG B, YIN H J, *et al.* Effect of GSTT on hyperlipemia and early atherosclerotic lesion of aortic intima in rabbits [J]. Chin J Integr Med Cardio/Cerebrovasc Dis (中西医结合心脑血管病杂志), 2006, 4(2): 126-128.
- [2] YIN H J, ZHANG B, SHI D Z, *et al.* Effect of gossypol on expression of ET/NO and NOS in atherosclerotic rabbits [J]. Chin J Integr Med Cardio/Cerebrovasc Dis (中西医结合心脑血管病杂志), 2005, 3(9): 771-773.
- [3] SONG Y Y, ZHANG B, JIANG Y R, *et al.* Effect of GSTT on vascular remodeling in rabbit with experimental atherosclerosis [J]. Chin J Integr Med Cardio/Cerebrovasc Dis (中西医结合心脑血管病杂志), 2006, 4(1): 37-39.
- [4] ZUO L, USHIO-FUKAI M, IKEDA S, *et al.* Caveolin-1 is essential for activation of Rac1 and NAD(P)H oxidase after angiotensin II type 1 receptor stimulation in vascular smooth muscle cells: role in redox signaling and vascular hypertrophy [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(9): 1824-1830.
- [5] LI J M, AJAYI M S. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004, 287: R1014-R1030.
- [6] SANG H, WANG J F. Involvement of reactive oxygen species in the proliferation of vascular smooth muscle cells by angiotensin II [J]. Chin J Clin Rehabil (中国临床康复), 2006, 10(25): 147-149.

- [7] LUM H, ROEBUCK K A. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2001, 280 (4): C719-C741.
- [8] TABET F, SAVOIA C, SCHIFFRIN E L, *et al.* Differential calcium regulation by hydrogen peroxide and superoxide in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2004, 44(2): 200-208.
- [9] LIPSKAIA L, LOMPER A M. Alteration in temporal kinetics of Ca^{2+} signaling and control of growth and proliferation[J]. Biol Cell, 2004, 96: 55-68.
- [10] LARISSA L, FEDERICADEL M, THIERRY C, *et al.* Sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase gene transfer reduces vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in the rat[J]. Circ Res, 2005, 97: 488-495.
- [11] TOUTOUZAS P C, TOUSOULIS D, DAVIES G J. Nitric oxide synthesis in atherosclerosis[J]. Euro Heart J, 1998, 19: 1504-1511.
- [12] RAKHIT R D, MARBER M S. Nitric oxide: an emerging role in cardioprotection[J]. Heart, 2001, 86: 368-372.

收稿日期: 2007-04-03