

葛根素对血管平滑肌细胞迁移的影响

柴欣楼¹ 王 伟¹ 王绿娅² 张永生¹

(1 北京中医药大学, 北京市朝阳区北三环东路 11 号, 100029; 2 北京市安贞医院)

关键词 葛根素

冠脉形成术造成了血管内皮细胞损伤,加速了血栓的形成。附壁血栓的形成,不仅造成血管的急性闭塞,而且为平滑肌细胞(vessel smooth muscle cell, VSMC)的内迁提供了框架,增殖的 VSMC 由血管中层向内膜的迁移是内膜增厚的一个重要机制。在此过程中,细胞边缘存在大量基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)和纤维蛋白溶解酶,这 2 种物质可降解细胞外基质,加速 VSMC 的迁移^[1]。VSMC 迁移的结果可导致内膜中 VSMC 的大量积聚和结缔组织的形成,进而促进新生内膜形成。

葛根素(Pur)为异黄酮类化合物,属于植物雌激素。现代药理研究证明 Pur 在心血管中具有多种功能,可扩张心、脑血管,降低血黏度,抑制血小板活性,降低血小板黏附率;可对抗 H₂O₂ 引起的无血清培养的 VSMC 凋亡及坏死^[2]。

本研究以葛根素为研究对象,构建 VSMC 迁移模型,Boyden 小室法检测 VSMC 的迁移,ELISA 法检测 MMP-2、MMP-9 的含量,在此基础上采用明胶-聚丙烯酰胺电泳酶谱分析 VSMC 分泌 MMP-2 的活性。

1 材料与方法

1.1 材料与分组 1)主要试剂:DMEM 培养液(美国 GIBCO 公司产品),胎牛血清(FBS, Hyclone 公司产品),凝血酶(冻干粉,美国 Sigma 公司产品),葛根素原粉(纯度 99.7%,由卫生部药品生物制品鉴定所提供),MTT、二甲基亚砜(DMSO)、胰蛋白酶和 EDTA、SP 免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒(北京中杉生物制品有限公司),BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Bio-Rad 公司),MMP-2、MMP-9 ELISA 试剂盒(鼎国试剂公司)。2)VSMC 体外培养及鉴定:常规组织贴块法培养 VSMC。实验用 4~8 代细胞。用光镜和免疫组化方法进行鉴定。3)药物配制及梯度稀释。4)葛根素原粉,选择二甲基亚砜为溶剂,配制浓度分别为 10mM 和

1mM。将 1mM 药物溶液用溶剂以 1:10 的比例进行梯度稀释,使最终药物浓度从 1mM 变化到 1nM。5)分组。正常对照组:用含 1% 小牛血清 DMEM 培养液培养细胞。模型组:加终浓度为 5u/L 凝血酶的 1% 小牛血清 DMEM 培养液培养细胞。葛根素组:加终浓度为 5u/L 凝血酶和浓度为 10⁻²mol·L⁻¹的葛根素溶液的 1% 小牛血清 DMEM 培养液培养细胞。雷帕霉素组:加终浓度为 5u/L 凝血酶和浓度为 10⁻⁴mol·L⁻¹的雷帕霉素溶液的 1% 小牛血清 DMEM 培养液培养细胞。

1.2 实验方法 血管平滑肌细胞培养:1)空气栓塞法处死新西兰大白兔,无菌条件下分离全段胸主动脉,立即置于含青霉素 100u/mL,链霉素 100mg/mL 的无菌生理盐水中。2)超净工作台上,用含青霉素、链霉素的生理盐水反复冲洗,去除脂滴、血凝块等杂质及可能残留的内皮细胞和外膜成纤维细胞,然后将一次取材的 2~3 条血管中膜组织混合在一起,置于无菌培养皿中。3)滴加少许培养液使组织保持湿润,用眼科弯剪反复剪切成 1mm×1mm 大小的组织块。剪切好的组织小块均匀置于瓶底,组织块间距 0.5cm。盖好瓶盖,轻轻翻转培养瓶,让瓶底朝上并向瓶内注入含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液,于 37℃ 孵箱内放置。4)经 2~4h 孵育后,将培养瓶慢慢翻转平放,使组织块完全浸入培养液中,继续静置培养 3~5d。待有细胞从组织块周围游出后换液。5)当细胞长成“峰”“谷”交错的致密细胞层,即可进行传代。

1.3 Boyden 小室法检测 VSMC 的迁移

1.3.1 VSMC 细胞,0.125% 胰酶消化后离心 1000r/min×5min, PBS 液洗涤 2 次,离心,弃上清。

1.3.2 用含 10% CFBS 的 DMEM 培养液配成细胞密度 1×10⁶ 个/L 左右细胞悬液,使细胞在培养液中悬浮 1h 恢复形态。混匀细胞悬液,吸取 0.35mL 加入 Boyden 小室的上室内。

1.3.3 下室加入 2% CFBS 的 DMEM 培养液作为正常对照组,其余加入待测药品等,封闭下室小孔,置 37℃, 5% CO₂ 孵箱内培养 6h。

1.3.4 取出 Boyden 小室内的微孔滤膜, PBS 洗 2 次,冷丙酮固定 10s, PBS 洗 2 次。

1.3.5 以苏木素染色 5min,蒸馏水冲洗,1% 盐酸乙

基金项目:本课题由北京市科委重点实验室项目(No. 953850700-4)、北京市中医药科技联合攻关项目基金(No. 03 I 01)、教育部“新世纪优秀人才培养计划”(NCET-05-0141)、教育部博士点基金(20050026017)、吕亚芳博士研究生科研课题基金资助

醇脱色 3min,流水冲洗,1% NaHCO₃ 显蓝染色 3min。

1.3.6 水洗后,37℃过夜,系列梯度乙醇脱水:70% - 75% - 80% - 90% - 100% 各 0.5min。

1.3.7 二甲苯透明。

1.3.8 以中性树胶封片。设 5 个重复孔。

1.3.9 在显微镜下,随机计数 10 高倍视野下移出滤膜的 VSMC 数,每张膜观察 2 遍,计算其平均数。5 份滤膜内的移动细胞平均数表示 VSMC 的迁移数量。

1.4 ELISA 法检测 MMP-2、MMP-9 的含量

1.4.1 VSMC 细胞,0.125% 胰酶消化后离心 1000r/min × 5min, PBS 液洗涤 2 次,离心,弃上清。

1.4.2 用含 10% CFBS 的 DMEM 培养液配成细胞密度 1×10^6 个/L 左右细胞悬液,6 孔培养板,加入细胞悬液 1000μL 继续培养 48h 后,去培养液。

1.4.3 加入无血清培养基培养 24h 后,弃上清。加入待测药品等,继续培养 24h。

1.4.4 将上述细胞收集,低速离心,保留上清。加入 96 孔培养板,100μL/孔,设 5 个重复孔。

1.4.5 建立标准曲线。酶标仪检测吸光度值 (490nm)。

1.5 明胶-聚丙烯酰胺电泳酶谱分析 VSMC 分泌 MMP-2 的活性

VSMC 细胞,0.125% 胰酶消化后离心 1000r/min × 5min, PBS 液洗涤 2 次,离心,弃上清。

1.5.1 用含 10% CFBS 的 DMEM 培养液配成细胞密度 1×10^6 个/L 左右细胞悬液,6 孔培养板,加入细胞悬液 1000μL 继续培养 48h 后,去培养液。

1.5.2 加入无血清培养基培养 24h 后,弃上清。加入待测药品等,继续培养 24h。

1.5.3 将上述细胞收集,低速离心,保留上清。

1.5.4 Bradford 法测培养液蛋白浓度,牛血清白蛋白作标准。

1.5.5 按常规方法灌制 10% 分离胶和 5% 浓缩胶,但分离胶中含 0.1% 明胶作为底物。取 10μL 上清液样本与等体积的上样缓冲液混合,室温放置 30min,上样,电流 15mA 电泳约 90min,溴酚蓝到达两层胶的分界处,将电流调至 20A,电泳 90min 后溴酚蓝到达底线,停止电泳。

1.5.6 小心将胶剥离,经 2.5% TritonX-100 漂洗 1h,加入反应缓冲液 (50mmol/L Tris-HCL, 10mmol/L CaCl₂, 20mmol/L NaCl) 37℃ 过夜。

1.5.7 次日,0.5% 考马斯亮兰染色 4h,脱色至蓝色背景下白色条带清晰可见。将凝胶扫描成像。

实验重复 3 次,以空白对照的条带的灰度值为 1,

实验数据与空白对照相比取值。

1.6 统计学方法 所有数据由 SPSS 统计软件进行单因素方差分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 认为有统计意义。

2 实验结果

2.1 VSMC 细胞的鉴定结果 倒置相差显微镜观察细胞生长形态及生长规律。VSMC 呈长梭形、三角形或星形等。细胞突起较长,相互接触,对数生长期细胞呈典型“峰与谷”样生长。核较大,原形或卵原形,胞浆丰富。密度大时可重叠生长。

2.2 葛根素对 VSMC 的迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
葛根素组与模型组相比, $P < 0.01$ 。

2.3 葛根素对 VSMC 分泌的 MMP-2、MMP-9 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$) VSMC 分泌的 MMP-2、MMP-9 含量。葛根素高浓度组与模型组相比, $P < 0.01$; 葛根素低浓度组与模型组相比, $P < 0.05$ 。

2.4 葛根素对 VSMC 分泌的 MMP-2 活性的影响
实验原理:实验以明胶为底物,明胶被考马斯亮蓝染为蓝色背景,若样本中含有可以分解明胶的 MMP-2 则在相应分子量处可出现底物被水解的透明条带,且根据条带的灰度值可以反映酶活性的大小。若以不同的胶原或酪蛋白为底物,可以测出不同种类 MMPs 的活性。

表 1 VSMC 分泌的 MMP-2 灰度值

分组	MMP-2
正常组	1
模型组	0.02 ± 0.20
葛根素组	$0.30 \pm 0.12^*$
雷帕霉素组	$0.79 \pm 0.10^*$

注:葛根素高浓度组与模型组相比可显著抑制 MMP-2 的表达, $P < 0.05$, SxImage 软件分析。

3 讨论

早期血管弹性回缩,晚期血管重塑和新内膜增生是直接导致 PTCA 术后再狭窄的三个主要原因^[3]。植入支架虽可扩大管径,防止弹性回缩发生,但支架本身对新生内膜的形成无任何抑制作用,而且它作为异物停留在体内可能导致血栓形成并刺激 VSMC 增生和新生内膜肥厚,最终导致支架内再狭窄的发生^[4]。

VSMC 是血管壁的主要细胞成分之一,是决定血管顺应性和血管重构的重要因素,血管壁增厚和顺应性下降主要源于 VSMC 的肥大、增生,产生和分泌细胞外基质增加等^[5]。内膜损伤后内皮细胞释放的血管活性物质和生长因子与 VSMC 膜受体结合后使癌基因激活、转录、表达异常, VSMC 由收缩表型转化为合成

表型,从细胞周期 G0 期脱逸出并进入细胞增殖周期,发生分裂增殖并分泌大量的细胞外基质^[6]。因此,在新生内膜形成过程中,VSMC 移行、增殖和分泌是血管内膜增生的三个重要步骤^[7]。

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)主要包括胶原、糖蛋白、葡萄糖氨基糖苷和蛋白聚糖四类。在正常组织,这些大分子存在于内膜、中膜、外膜,起保持血管弹性和完整性的作用。研究表明成熟的 VSMC 没有迁移的特性,而且当其处于 S 或 G2/M 期时不能迁移,而只有在 G1 向 G1/S 转化过程中才可能迁移^[8-9]。中膜 VSMC 的迁移除与细胞本身有关外,还须突破细胞周围的迁移屏障即成分复杂的 ECM,因此在损伤早期 ECM 降解,对促进 VSMC 迁移有重要作用,晚期 ECM 沉积对血管重塑起重要作用。MMPs 主要降解 ECM^[10],在正常的血管中内皮细胞和 VSMC 经常产生 MMP-2, TIMP-1 和 TIMP-2,成为血管组织细胞更新必不可少的条件。根据降解的对象不同,将 MMPs 分为 4 类:MMP-1(胶原酶)、MMP-2(明胶酶 A)、MMP-3(基质裂解素 1)、MMP-9(明胶酶 B)、MMP-12(金属蛋白弹性酶),膜型金属蛋白酶。当白介素 1、肿瘤坏死因子、 γ 干扰素、巨噬细胞集落刺激因子、巨噬细胞化学趋化蛋白 I 等炎症细胞因子浓度升高时,促进 VSMC、内皮细胞和泡沫细胞表达 MMPs。这可降解 ECM,促进淋巴细胞和巨噬细胞迁移到内皮下;促进 VSMC 由中膜迁移到内膜。故研究细胞外基质的降解,对于 VSMC 的迁移有重要意义^[11]。本实验建立了细胞迁移模型,并在此基础上观察了 MMP-2 和 MMP-9,结果发现葛根素可抑制 VSMC 的迁移,同时,抑制 MMP-2、MMP-9,在此基础上继续观察了葛根素对 VSMC 分泌的 MMP-2 活性的影响,发现葛根素组与模型组相比可显著抑制 MMP-2 的表达($P < 0.05$)。关于葛根素抑制 VSMC 迁移,通过本实验的研究可以发现,葛根素抑制了 VSMC 的增殖,使处于 G1 期的细胞较多,增加了其迁移到内膜下组织的机会,因而抑制其迁移过程变得尤为重要。但细胞迁移受多种因素影响,不仅仅与 MMP-2、MMP-9 有关。这也成为今后研究关注的焦点问题。

参考文献

- [1] Southgate KM, Davies M, Booth RF, Newby AC. Involvement of extracellular-matrix-degrading metalloproteinases in rabbit aortic smooth-muscle cell proliferation. *Biochem J*. 1992;288:93-99.
- [2] 方放治,戴德哉,王自正,等. 葛根素对抗 H_2O_2 引起血管平滑肌细胞凋亡及坏死. *中国药科大学学报*. 2002;33(3):241-244.
- [3] Faxon DP, Sanborn TA, Weber VJ, Haudenschild C, Gottsman SB, McGovern WA, Ryan TJ. Restenosis following transluminal angioplasty

in experimental atherosclerosis. *Arteriosclerosis*. 1984;4:189-195.

- [4] Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, Fajadet J, Ban Hayashi E, Perin M, Rogers C, Karnovsky MJ, Edelman ER. Inhibition of experimental neointimal hyperplasia and thrombosis depends on the type of vascular injury and the site of drug administration. *Circulation*. 1993;88:1215-1221.
- [5] Thyberg J, Blomgren K, Hedin U, Dryjski M. Phenotypic modulation of smooth muscle cells during the formation of neointimal thickenings in the rat carotid artery after balloon injury: an electron-microscopic and stereological study. *Cell Tissue Res*. 1995;281:421-433.
- [6] Nguyen M, He B, Karaplis A. Nuclear forms of parathyroid hormone-related Liu MW, Roubin GS, King SB III. Restenosis after coronary angioplasty: potential biologic determinants and role of intimal hyperplasia. *Circulation*. 1989;79:1374-1387.
- [7] Hall KL, Harding JW, Hosick HL. Isolation and characterization of clonal vascular smooth muscle cell lines from spontaneously hypertensive and normotensive rat aortas. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1991;27:791-798.
- [8] Toyoshima H, Hunter T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell*. 1994;78:67-74.
- [9] Belknap JK, Grieshaber NA, Schwartz PE, Orton EC, Reidy MA, Mack RA. Tropoelastin gene expression in individual vascular smooth muscle cells: relationship to DNA synthesis during vascular development and after arterial injury. *Circ Res* 1996; 78: 388-94.
- [10] Calis ZS. Metalloproteinases in remodeling of vascular extracellular matrix. *Fibrinolysis Proteolysis*. 1999;13:54-63.
- [11] Kenagy RD, Vergel S, Mattsson E, Bendeck M, Reidy MA, Clowes AW. The role of plasminogen, plasminogen activators, and matrix metalloproteinases in primate arterial smooth muscle cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:1373-1382.

(2009-11-26 收稿) □

《中医皮肤性病学》(临床版)出版

由全国中医皮肤科重点学科带头人范瑞强教授、邓丙戌教授、杨志波教授主编,樊国维教授、欧阳恒教授、徐宜厚教授等全国著名中医皮肤科老专家主审的《中医皮肤性病学》(临床版)已于 2010 年 1 月出版。

全书分总论、各论和附录 3 大部分。主要介绍了中医皮肤性病的发展历史、基本理论、治疗方法和预防护理及对本学科中的常见和疑难少见皮肤性病的中医病因病机、辨证分型、治疗进行了论述。

该书大 16 开精装,140 余万字,近 200 幅临床彩色照片,可供中高级临床医生,尤其是中医皮肤性病科的临床医生阅读,高等医药院校的学生,西医、中西医结合工作者亦可参考使用。定价 138 元。

邮购地址:北京市复兴路 15 号科学技术文献出版社。邮编 100038。电话:010-58882931,13691070855,联系人:薛士槟。