

芦荟大黄素对动脉损伤后血管平滑肌细胞增殖的影响^{*}

尹春琳 徐成斌

内容提要 **目的:**探讨中药大黄的活性提取成分——芦荟大黄素对兔髂动脉损伤后离体培养的平滑肌细胞的增殖动力学的影响。**方法:**纯种日本大耳白兔髂动脉内皮剥脱术后 48h, 取中膜做平滑肌细胞原代培养。指数增长期中的平滑肌细胞同步化于 G_0 期后, 加入浓度梯度为 $10^{-1} \sim 10^{-5} \text{g/L}$ 的芦荟大黄素于含 10% 胎牛血清的细胞培养液中, 24h 后, 用 $^3\text{H-TdR}$ 脉冲标记 6h, 然后测平滑肌细胞中 TdR 掺入量 (cpm, 每份样品每分钟脉冲数)。同样地, 细胞同步化于 G_0 期后, 加入 20mg/L 芦荟大黄素于含 10% 胎牛血清的细胞培养液中, 作用 24h 后, 用流式细胞仪对细胞周期时相进行了测定。以上两实验与对照组加入等体积的细胞培养液。**结果:**药物组与对照组比较, $^3\text{H-TdR}$ 的掺入量有显著性差异 ($P < 0.05$), 药物浓度为 $10^{-1} \sim 10^{-2} \text{g/L}$ 时, 抑制率 (对照组 cpm - 药物组 cpm / 对照组 cpm $\times 100\%$) 高达 90% 以上。药物对平滑肌细胞的抑制呈剂量依赖关系, 药物浓度越高, 抑制作用越大。与对照组比较, 加入芦荟大黄素后, G_0/G_1 期细胞百分比升高, S 期百分比下降。细胞由 G_0 期向 S 期的转化受到阻滞。**结论:**芦荟大黄素是一种强平滑肌细胞抑制剂, 这种药理作用在体内可能有利于减轻平滑肌细胞的增殖, 从而减轻导致动脉损伤后再狭窄的内膜增生病变的形成。

关键词 芦荟大黄素 血管平滑肌细胞 再狭窄 内膜增生 增殖

Effect of Aloe-Emodin on Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells after Arterial Injury Yin Chunlin, Xu Chengbin *People's Hospital, Beijing Medical University, Beijing (100044)*

Objective: To study the effect of Aloe-emodin (AE), an active ingredient of Rhubarb, on the kinetics of proliferation of smooth muscular cells (SMCs) cultured in vitro after rabbit iliac arterial injury. **Methods:** Forty-eight hours after de-endothelialization (balloon endothelial denudation), the iliac arteries of the Japanese white rabbits were isolated and the smooth muscle cells were cultured primarily. AE was added to culture medium containing 10% fetal calf serum (FCS). The cultures were pulse-labeled with $^3\text{H-TdR}$ and TdR uptake into VSMC were measured and the cell cycle of the cultures were analyzed by using flow cytometer. **Results:** Compared with control, when the concentration gradient ranged from 10^{-1} to 10^{-5}g/L , the amount (cpm, count per minute) of $^3\text{H-TdR}$ uptake into SMCs has significant differences ($P < 0.05$) and 10^{-1} and 10^{-2}g/L AE showed strong inhibitory effects on TdR uptake into VSMC, and the percentage of inhibition [$\% \text{ inhibition} = (\text{cpm without AE} - \text{cpm with AE}) / \text{cpm without AE} \times 100\%$] was more than 90%. AE displayed concentration dependent inhibitory effects. The percentage of cells in G_0/G_1 phase was increased, but the percentage of cells in S phase was decreased in AE group, the transition of SMC cycle phase from G_0 to S was blocked. **Conclusions:** AE is a strong inhibitor to the proliferation of SMCs and the pharmacological action of AE might reduce SMC proliferation in vivo and decrease intimal hyperplasia of restenosis.

Key words Aloe-emodin, vascular smooth muscle cell, restenosis, intimal hyperplasia, proliferation

^{*}卫生部基金资助课题 (No. 94-2-207)

北京医科大学人民医院心内科 (北京 100044)

球囊血管成形术后原扩张成形术部位因动脉内膜增生形成再狭窄。内膜增生主要表现为血管平滑肌细胞的非正常迁移、增殖和细胞外结缔组织基质的沉积。因此抑制平滑肌细胞增殖便可有效地减轻内膜增生,进而减轻再狭窄。本实验观察了中药大黄的主要有效成分——芦荟大黄素对离体培养的兔动脉损伤后血管平滑肌细胞增殖动力学的影响。为进一步探索其在再狭窄中的应用提供实验依据。

材料与方法

1 动物 纯种雄性日本大耳白兔 6 只,体重 1.5kg 左右,购自军事医学科学院动物所。

2 药品 芦荟大黄素系从中药植物大黄中提取,由北京医科大学实验药厂提供。

3 试剂及仪器 氢氧化钠、乙醇购自北京化学试剂总公司;0.01mol PBS 液, pH 7.2, 北京医科大学人民医院制剂室提供;碘化丙啶 (PI)、RNase A, 1mg/ml, 均为 Sigma 产品;胎牛血清 (FCS), 天津川页生化制品有限公司;DMEM 培养液, GIBCO BRL 胰蛋白酶, Serva 产品; α -actin 单克隆抗体, Dako 产品; ^3H -TdR (比度 18Ci/mmol, 放射纯度 > 95%, 放射性浓度 0.5mCi/ml), 上海原子能所提供。3F Fogarty 拉栓导管(美国 Baxter 保健公司产品);Wallac1410 液体闪烁计数器(瑞典 pharmacia 公司产品);多头细胞样品收集器(PYQ - II 型, 浙江绍兴坡矿医疗器械厂生产);FACSTAR 流式细胞仪(美国 BD 产品);相差显微镜(ULWCD 0.30 OLYMPUS CK2, 日本产)。

4 实验方法

4.1 药品配制 以 0.02N 氢氧化钠配成不同浓度的原液, 高压蒸气消毒 30min, 于实验前配制, 并注意避光。

4.2 兔髂动脉损伤模型 细胞培养前 48h, 用 3F Fogarty 拉栓导管先行兔髂动脉内皮剥脱术。

4.3 体外平滑肌细胞培养及鉴定 用组织块种植法进行兔髂动脉平滑肌细胞培养。无菌条件下取出兔髂动脉, 分离动脉中膜层, 剪成 1mm × 1mm 的小块, 接种于培养瓶中, 培养液为含 20% FCS 的 DMEM。培养成功后用 0.25% 的胰蛋白酶消化传代。此时细胞经相差显微镜下形态学观察细胞呈长梭形, 放射性生长, 成束的细胞平行排列, 部分区域细胞多层重叠, 部分区域呈单层, 高低起伏, 呈现平滑肌细胞特征性的“峰”、“谷”状生长;细胞经抗 α -actin 单克隆抗体标记后呈阳性反应, 证明是平滑肌细胞。取 1~3 代细胞用于以下实验。

4.4 ^3H -标记胸腺嘧啶核苷(^3H -TdR)掺入量的测定 用含 10% FCS 的 DMEM 培养液调整细胞密度至 $1 \times 10^5/\text{L}$, 以每孔 200 μl 加入 96 孔细胞培养板。培养 48h 后, 更换无血清的 DMEM 培养液继续培养 24h, 然后换为实验培养液[实验组(每个药物浓度设 4 个复孔): 芦荟大黄素 $10^{-1} \sim 10^{-5} \text{g/L}$ 加 10% FCS 加 DMEM 培养液;对照组: 10% FCS 加 DMEM 培养液], 继续培养 24h。细胞收集前 6~8h 加入 ^3H -TdR, 终浓度为 500 $\mu\text{Ci/L}$, 用细胞收集器将细胞收集于玻璃纤维滤膜上, 用 1410 液体闪烁计数器测定每份样品每分钟脉冲数(cpm)。

4.5 流式细胞仪测定 细胞以 $1 \times 10^5/\text{L}$ 接种于培养瓶, 每瓶 4ml, 用含 10% FCS 的 DMEM 培养 48h 后, 换无血清的 DMEM 培养液, 继续培养 24h, 换为实验培养液(实验组: 10% FCS 加 DMEM 培养液加 20mg/L 芦荟大黄素;对照组: 10% FCS 加 DMEM 培养液), 继续培养 24h 后, 去除培养液, 胰酶消化收集细胞约 $1 \times 10^6/\text{L}$, PBS 洗后制成单细胞悬液, 于 70% 乙醇中固定, 4℃ 保存。染色前用 PBS 进行离心沉淀去除固定液, 加入 25 μl RNase A, 37℃ 30min, 去除 RNA。再加入 PI 染色液 250 μl 和 PBS175 μl , 混匀, 4℃ 避光 30min, 上机测试。

5 观察项目及检测方法

5.1 DNA 合成 同位素液闪测定平滑肌细胞 ^3H -TdR 掺入量。

5.2 细胞周期时相 流式细胞计法。

6 统计学方法 不同浓度药物组与对照组的 cpm 值差异用两个正态总体的方差齐性的成组比较 t 检验。置信系数 $\alpha = 0.05$ 。

结 果

1 DNA 合成 以 ^3H -TdR 的掺入量(cpm)表示 DNA 的合成情况, 见表 1。药物浓度为 $10^{-1} \sim 10^{-4} \text{g/L}$ 时, 实验组与对照组比较有显著性差异, 药物浓度为 $10^{-1} \sim 10^{-2} \text{g/L}$ 时, 抑制率[抑制率(%) = (对照组

表 1 芦荟大黄素对平滑肌细胞 DNA 合成的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	药物浓度(g/L)	样本数	cpm	抑制率(%)
实验	10^{-1}	4	$88.05 \pm 4.15^{**}$	95.0
	10^{-2}	4	$154.35 \pm 21.65^{**}$	91.3
	10^{-3}	4	$1088.30 \pm 84.70^{*}$	38.7
	10^{-4}	4	$1357.85 \pm 3.05^{*}$	23.5
	10^{-5}	4	1605.40 ± 58.00	0.1
对照	等体积细胞培养液	8	1773.96 ± 146.40	—

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

cpm - 实验组 cpm)/对照组 cpm × 100%] 高达 90% 以上。药物对平滑肌细胞的抑制呈剂量依赖关系, 药物浓度越高, 抑制作用越大。

2 细胞周期 所得数据经专用的 DNA 拟合软件处理后即可得到不同时相细胞的数目和百分比(按每秒钟测量的 5000 个细胞计, 见附图)。图中左边第①峰为样品中的碎片峰, 第②峰为二倍体细胞峰, 代表 G_0/G_1 期细胞, 第③峰为四倍体峰, 代表 G_2/M 期细胞, ②、③峰中间部分代表 S 期细胞。实验组各期百分比 G_0/G_1 期 76.2%, S 期 3.5%, G_2/M 期 13.3%; 对照组相应值分别为 45.7%, 14.3% 和 17.1%。与对照组比较, 加入芦荟大黄素后, G_0/G_1 期细胞百分比升高, S 期百分比下降。细胞由 G_0 期向 S 期的转化受到阻滞。

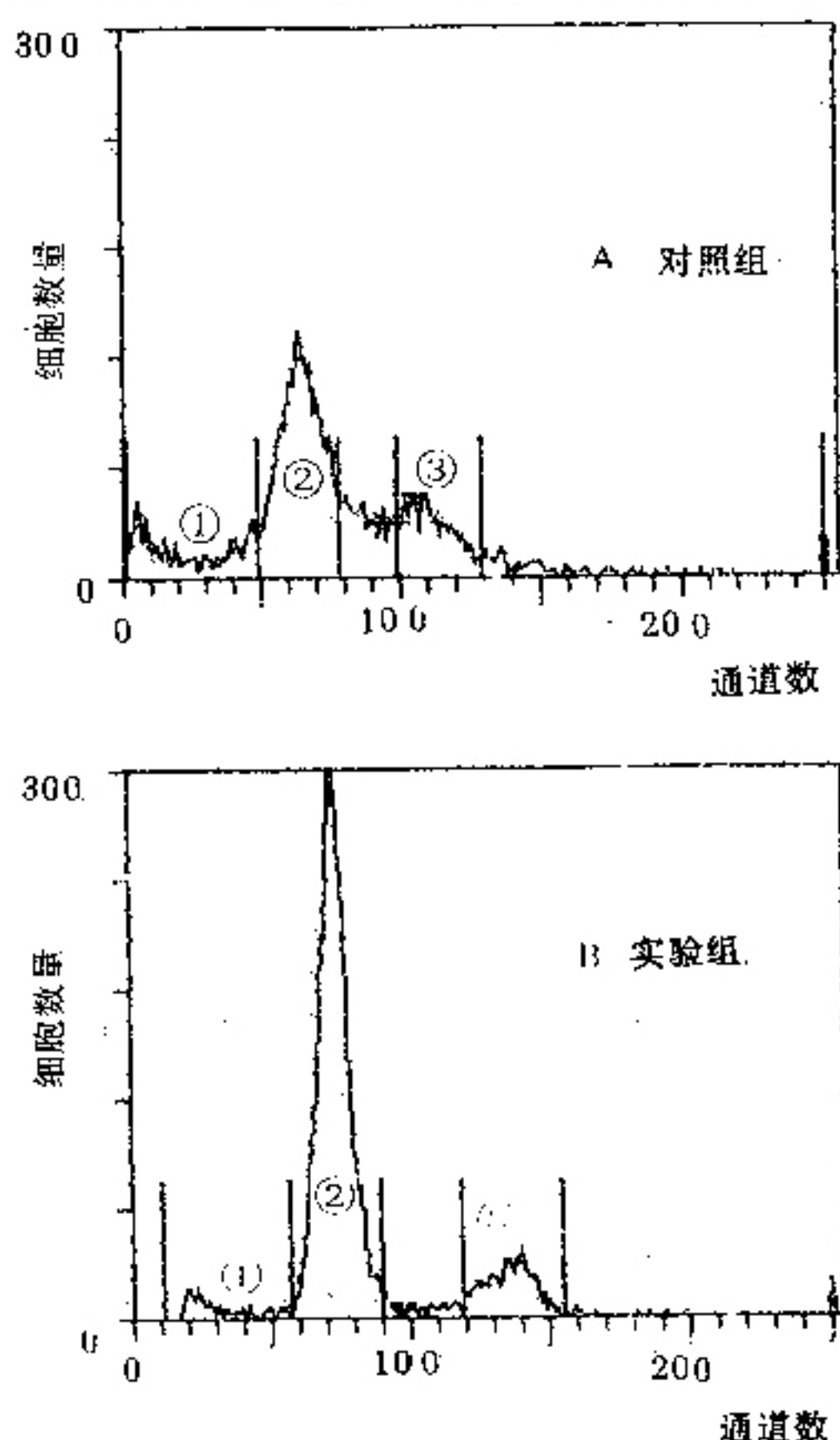


图 平滑肌细胞的 DNA 分布曲线及数学拟合曲线

附图 平滑肌细胞的 DNA 分布曲线及数学拟合曲线

讨 论

血管内皮剥脱后, 触发了一系列的复杂的级联反应, 中膜平滑肌细胞由静息/收缩状态转变为增殖/合成表型, 损伤后 24h, 中膜平滑肌细胞开始增殖, 48h 达高峰⁽¹⁾。兔髂动脉球囊损伤模型是研究单纯平滑肌细

胞增殖的最简单的在体模型之一⁽²⁾。本研究利用这一技术观察了芦荟大黄素对体外原代培养的平滑肌细胞增殖的影响。从大黄中提纯的蒽醌类衍生物, 主要包括大黄素、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素甲醚和大黄酚等 5 种成分, 具有抗炎、抗菌、抗肿瘤等药理作用⁽³⁾。以往的研究发现大黄素可以抑制动脉粥样硬化及球囊扩张模型兔离体培养的平滑肌细胞的增殖⁽⁴⁾, 本实验发现, 芦荟大黄素纯品直接加入平滑肌细胞培养液中对细胞增殖的抑制作用也很强烈。在一定的药物浓度范围内, 这种抑制作用也呈剂量依赖性, 药物浓度越高, 抑制作用越强。与大黄素比较, 在我们所选择的浓度梯度范围内, 芦荟大黄素在高浓度 (10~100mg/L) 时的抑制作用明显高于低浓度, 而大黄素的抑制作用随浓度的递减逐渐降低; 在同一浓度下, 芦荟大黄素的抑制作用高于大黄素的抑制作用。说明芦荟大黄素的抑制作用受药物浓度变化的影响更大, 芦荟大黄素是较大黄素更强的平滑肌细胞抑制剂。这或许与二者的化学结构差异有关。从流式细胞仪的研究结果判断, 芦荟大黄素抑制作用的产生是由于药物阻断了细胞由 G_0 期向 S 期的转化。由此推断, 药物对细胞增殖的影响并非直接的杀伤作用, 我们所观察到的平滑肌细胞水平上的增殖抑制是芦荟大黄素在分子水平上的作用结果。在离体的情况下, 芦荟大黄素可能是通过抑制培养液中的血清致丝裂原, 进而抑制相关的细胞增殖基因的表达, 使细胞增殖受到抑制。在体时平滑肌细胞的增殖与动脉损伤后各种致丝裂因子的产生和刺激有关⁽⁵⁾, 因而芦荟大黄素或许能抑制在体平滑肌细胞的增殖。但在分子水平上的作用机制及在体作用情况尚待研究。

(本实验用药芦荟大黄素由沈家祥教授提供, 特此致谢)

参 考 文 献

1. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury I. Smooth muscular growth in the absence of endothelium. *Lab Invest* 1983;49(3):327-333.
2. Muller DW, Ellis SG, Topol EG. Experimental models of coronary artery restenosis. *J Am Coll Cardiol* 1992;19(2):267-274.
3. 西冈五夫. 大黄的生物活性及其有效成分. 国外医学中医中药分册 1986;8(3):27-30.
4. 郭丹杰, 徐成斌, 陈源源. 大黄素对血管平滑肌细胞增殖影响的实验研究. *中华内科杂志* 1996;3(35):3.
5. Davies MG, Hagen PO. Pathobiology of intimal hyperplasia. *Br J Surgery* 1994;81:1254-1269.

(收稿:1997-12-08 修回:1998-03-25)