

川芎嗪、丹参对心肌成纤维细胞胶原合成和细胞增殖的影响*

宋德明[△] 苏 海 吴美华 黄学明

内容提要 **目的:**为了研究川芎嗪、丹参两味中药对体外培养心肌成纤维细胞(fibroblasts, Fbs)的胶原合成与细胞增殖的影响。**方法:**采用胶原酶和胰蛋白酶消化 SD 大鼠的心肌组织块,制备成纤维细胞的单细胞悬液,按不同药物及药物的不同浓度分组研究它们对成纤维细胞的胶原合成和增殖影响。**结果:**中、高浓度的川芎嗪、丹参能有效地抑制成纤维细胞的胶原合成和增殖。低浓度的川芎嗪、丹参能对抗去甲肾上腺素对成纤维细胞的胶原合成与细胞增殖。**结论:**川芎嗪、丹参能抑制成纤维细胞的胶原合成与细胞增殖。这些效应的机制可能与它们的钙离子拮抗有关。

关键词 川芎嗪 丹参 心肌成纤维细胞 胶原 增殖

Effects of Tetramethylpyrazine and Radix Salviae Miltiorrhizae on Collagen Synthesis and Proliferation of Cardiac Fibroblasts Song Deming, Su Hai, Wu Meihua, et al *Second Affiliated Hospital, Jiangxi Medical College, Nanchang (330006)*

Objective: To explore the effects of Tetramethylpyrazine (TMP) and Radix Salviae Miltiorrhizae (RSM) in collagen synthesis and proliferation of cardiac fibroblasts. **Methods:** Using collagenase and trypsinase digested rat cardiac tissue assay to isolate cardiac fibroblasts (Fbs). Different dosage of TMP, RSM and norepinephrine (NE) were used to study their effects on the collagen synthesis and proliferation of cultured cardiac Fbs. **Results:** Compared with the control group, moderate or high dosage TMP and RSM could significantly inhibit the collagen synthesis and the proliferation of cultured cardiac Fbs. Moreover, low-dose TMP(50mg/L) and low-dose RSM(3g/L) could antagonize the collagen synthesis and the proliferation of cultured cardiac FB stimulated by NE (500μg/L). **Conclusion:** Both TMP and RSM could inhibit these processes. The mechanisms of these effect might be correlated to their Ca^{++} antagonistic action.

Key words cardiac fibroblasts, tetramethylpyrazine, Radix Salviae Miltiorrhizae, collagen, proliferation

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)在心血管系统组织中不仅起支持、修复作用,而且在疾病的病理生理过程中起重要的作用,心肌肥厚与纤维化是多种心血管疾病的最重要的病理结果,最终可导致心律失常,心力衰竭,左右着患者的预后。预防与逆转上述改变已是治疗的重要目标。本研究利用体外培养的心肌成纤维细胞(fibroblasts, Fbs)实验研究川芎嗪、丹参两味中药对心肌 Fbs 的胶原合成与细胞生长的影响,为临床上心肌胶原重构的防治提供理论依据。

材料与方法

1 动物 雄性 SD 大鼠 4 只,鼠龄 8 周,体重 200~250g,由江西医学院实验动物科学部提供。

2 药物 川芎嗪注射液(50mg/ml,广东省利民制药厂生产,批号:940104),丹参注射液(每支 2ml,含生药丹参 3g,上海市新冈制药厂生产,批号:941203),去甲肾上腺素(1mg/ml,上海天丰药厂生产,批号:9403041)。

3 主要试剂与仪器 DMEM 培养粉、胶原酶与胰蛋白酶(均为上海细胞生物化学研究所产品);小牛血清(CS,为江西医学院研究所提供)。CO₂ 细胞培养箱(HIRASAWA, JAPAN); YJ-1300^S D 医用超净工作台(苏州净化设备公司生产);24 孔细胞培养板(华美

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39369937)

江西医学院第二附属医院(南昌 330006)

[△] 现在安徽省安庆市立医院(安徽 246003)

生物工程公司);微量进样器(上海医用激光仪器厂产品)。

4 实验方法

4.1 大鼠心肌 Fbs 培养 参照文献^[1]方法,在无菌条件下取出心室,用含 0.20% 胰蛋白酶和 0.01% 胶原酶的 Hank's 液 10ml,在 37℃ 水浴中反复消化(10 分钟/次),收集细胞。用贴壁分离法将 Fbs 分离出来,接种于 20% CS-DMEM 培养基瓶中,放在 CO₂ 培养箱内培养(37℃, 5% CO₂, 95% O₂),取 3~6 代细胞用于实验。

4.2 胶原合成实验 取 24 孔细胞培养板,根据不同药物及其不同浓度分为 16 组,每组 8 孔,每孔加细胞数为 5×10^5 /L,在 37℃, 5% CO₂ 孵育箱中培养 24h 后,弃 20% CS-DMEM,改无血清培养 24h 后,吸弃去各组孔培养液,各组孔根据要求分别加入所需药物和浓度的含维生素 C 50mg/L 的 DMEM 培养液 2ml (所有的药物用含维生素 C 50mg/L DMEM 进行稀释到所需的最终浓度)。其最终浓度分别为:(1)去甲肾上腺素(NE, 20μg/L、100μg/L、500μg/L)3 组;(2)川芎嗪(50mg/L、500mg/L、5000mg/L)3 组;(3)丹参(3g/L、30g/L、300g/L)3 组;(4)NE(500μg/L)加川芎嗪(50mg/L、500mg/L、5000mg/L)3 组;(5)NE(500μg/L)加丹参(3g/L、30g/L、300g/L)3 组;(6)对照组 1 组。各组在 37℃、5% CO₂ 孵育箱培养 40h 后,吸取上清液测羟脯氨酸含量。

4.3 羟脯氨酸标准曲线和胶原含量计算 利用羟脯氨酸标准品(中国科学院上海生化研究所生产)来制作标准曲线(吸光度-羟脯氨酸含量)。参考文献^[2]方法,利用氯胺 T 氧化上清液羟脯氨酸成吡咯,再与对二甲氨基苯甲醛显色定量测定,读出吸光度 A,再根据羟脯氨酸的标准曲线求其值。以胶原 = $100/13 \times$ 羟脯氨酸的值公式,从羟脯氨酸的值求得胶原浓度值。

4.4 细胞生长实验 另在 24 孔细胞培养板,根据药物浓度分为 13 组,每组 9 孔,每孔加细胞数为 1×10^7 /L,在孵箱中培养 24h 后,弃 20% CS-DMEM,改无血清培养 24h 后,各组分别加入所需药物和浓度的 2.5% CS-DMEM 培养液(所有药物用含 2.5% 的 CS-DMEM 进行稀释到所需的最终浓度)。其各组的最终浓度分别为:(1)NE(500μg/L)2 组;(2)川芎嗪(50mg/L、500mg/L、5000mg/L)3 组;(3)丹参(3g/L、30g/L、300g/L)3 组;(4)NE(500μg/L)加川芎嗪(50mg/L)1 组;(5)NE(500μg/L)加丹参(3g/L)1 组;(6)对照组 3 组。每组在培养的第 1、3、6 天作细胞计数。同时每天更换相应药物浓度的培养液。

5 统计学处理 所有的数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,均数之间差别检验以 *t* 检验分析。

结 果

1 不同浓度的 NE、川芎嗪、丹参对心肌 Fbs 胶原合成作用影响 见表 1。在相同的培养条件下,中、高浓度 NE(100、500μg/L)组的胶原浓度有显著增加,而川芎嗪、丹参在中、高浓度(500、5000mg/L 和 30、300g/L)都有降低心肌 Fbs 的胶原蛋白的合成作用,其作用并有剂量依赖倾向。

表 1 不同浓度的 NE、川芎嗪、丹参对心肌 Fbs 胶原合成的影响比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	浓度	样本数	胶原浓度(mg/L)
对照	—	8	126.85 ± 31.85
NE	20μg/L	8	124.46 ± 32.38
	100μg/L	8	140.54 ± 41.31
	500μg/L	8	196.61 ± 39.84 **
川芎嗪	50mg/L	8	124.62 ± 30.23
	500mg/L	8	78.46 ± 29.62 *
	5000mg/L	8	42.46 ± 20.08 **
丹参	3g/L	8	120.46 ± 28.07
	30g/L	8	83.08 ± 32.30 *
	300g/L	8	48.49 ± 22.31 **

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2 不同浓度川芎嗪、丹参与 NE 共同培养下对心肌 Fbs 胶原合成作用 见表 2。在 NE(500μg/L)促使胶原合成的条件下,3 种浓度的川芎嗪、丹参均有抑制心肌 Fbs 胶原蛋白合成。表明 Fbs 在 NE 促使胶原蛋白的分泌旺盛条件下,低浓度的川芎嗪(50mg/L)或丹参(3g/L)也有抑制作用。

表 2 不同浓度川芎嗪、丹参与 NE(500μg/L)共同培养下对心肌 Fbs 胶原合成的影响比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	浓度	样本数	胶原浓度(mg/L)
NE	500μg/L	8	196.61 ± 39.84
NE 加川芎嗪	50mg/L	8	147.54 ± 28.23 *
	500mg/L	8	122.62 ± 25.31 **
	5000mg/L	8	74.69 ± 22.62 **
NE 加丹参	3g/L	8	142.00 ± 26.54 *
	30g/L	8	116.92 ± 38.07 **
	300g/L	8	68.62 ± 37.08 **

注:与 NE 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 不同浓度川芎嗪、丹参及 NE 对心肌 Fbs 增殖的影响 见表 3、4。NE 对 Fbs 的增殖有促进作用,NE 组在实验第 3、6 天的细胞计数与对照组相比明显增多;而不同浓度的川芎嗪及丹参各组在实验第 3、6 天的细胞数与各自的对照组相比明显减少,特别在第 6

天时。而且两组的效应均呈剂量依赖性。另外在 NE 存在条件下,低浓度的川芎嗪、丹参对 NE 的促进 Fbs 增殖效应有明显的抑制作用,作用在 3 天后明显。

表 3 不同浓度川芎嗪、丹参及 NE 对心肌 Fbs 增殖影响比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	浓度	Fbs 细胞数($1 \times 10^7/L$)		
		1d	3d	6d
对照	—	1.42 ± 0.25	4.25 ± 0.27	10.50 ± 1.56
NE	500 $\mu g/L$	1.52 ± 0.20	8.40 ± 0.14*	18.30 ± 2.49*
对照	—	1.50 ± 0.30	4.50 ± 0.48	13.20 ± 1.65
川芎嗪	50mg/L	1.45 ± 0.22	2.10 ± 0.17*	1.25 ± 0.04*
	500mg/L	1.39 ± 0.34	1.86 ± 0.08*	0.95 ± 0.06*
	5000mg/L	1.43 ± 0.26	1.20 ± 0.06*	0.75 ± 0.04*
对照	—	1.50 ± 0.28	5.10 ± 0.45	12.75 ± 1.52
丹参	3g/L	1.49 ± 0.24	1.95 ± 0.25*	1.30 ± 0.10*
	30g/L	1.45 ± 0.32	1.68 ± 0.10*	0.85 ± 0.05*
	300g/L	1.40 ± 0.25	1.25 ± 0.08*	0.75 ± 0.05*

注:与各自的对照组比较,* $P < 0.01$

表 4 在 NE(500 $\mu g/L$)条件下川芎嗪、丹参对心肌 Fbs 增殖影响比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	浓度	Fbs 细胞数($1 \times 10^7/L$)		
		1d	3d	6d
NE	500 $\mu g/L$	1.60 ± 0.32	7.95 ± 0.72	17.25 ± 2.65
NE 加川芎嗪	50mg/L	1.51 ± 0.47	4.05 ± 0.48*	7.95 ± 1.24*
NE 加丹参	3g/L	1.49 ± 0.53	3.89 ± 0.64*	8.95 ± 1.36*

注:与 NE 组比较,* $P < 0.05$

讨 论

许多心血管疾病可导致心肌肥厚和纤维化,心肌纤维化主要是因心肌成纤维细胞的活化、增殖以及通过它释放的一些介质对自身的反馈作用产生大量 ECM,并在心肌间的沉积所致。心肌胶原纤维主要为 I、III 型胶原纤维,已发现成纤维细胞有 I、III 型胶原 mRNA 的表达^[3]。另外,成纤维细胞能分泌基质金属蛋白酶(MMPs)和它的抑制物——蛋白酶抑制剂(TIMPs)。已知间质胶原酶(MMP₁)是一种存在于心肌中且是降解心肌胶原纤维的关键酶;而 TIMPs 能抑制 MMP₁ 的活性,减少胶原的降解^[4]。由此可见,心肌成纤维细胞调控着心肌组织的胶原合成和降解的动态平衡。

川芎嗪、丹参都具有活血化瘀、改善微循环的作用,且研究表明皆具有“钙拮抗作用”^[5,6]。国内有人发现川芎嗪对血管内皮细胞、平滑肌细胞培养有抑制作用,并抑制平滑肌细胞 I、III 型前胶原的基因转录^[7],丹参也有类似作用的报道^[8]。本研究也发现川芎嗪、丹参对培养心肌成纤维细胞的胶原合成有抑制

作用,且对成纤维细胞增殖也有抑制作用。低浓度都能对抗 NE 的胶原合成和细胞增殖作用。

参与调控 ECM 的胶原纤维的合成有多种生长因子和细胞因子,转化生长因子 β_1 (TGF β_1)上调 ECM 基因表达的作用尤以突出^[9]。激活的 TGF β_1 能增加各种 ECM 类型细胞的纤维粘连蛋白和胶原的基因表达,且显示出抑制 MMPs 的活性,使胶原降解减少,同时激活 TIMPs,两者的综合作用从而导致胶原合成增加,降解减少,使胶原在组织中堆积。其中的机制最终结果是通过细胞内钙离子浓度变化来实现对细胞活动的调控^[10]。川芎嗪、丹参抑制成纤维细胞胶原分泌与细胞增殖作用的机制可能与:(1)钙离子阻滞作用;(2)膜稳定作用;(3)刺激成纤维细胞产生更多的 MMPs 和减少 TIMPs 分泌有关。

参 考 文 献

1. Brilla CG, Zhou G, Masubarn L, et al. Collagen Metabolism in Cultural adult rat cardiac fibroblasts: Response to Angiotensin II and Aldosterone. J Mol Cell Cardiol 1994;26:809—820.
2. Elias G, Eleftheriades MD, Alam G, et al. Cyclosporine A has no direct effect on collagen metabolism by cardiac fibroblasts in vitro. Circulation 1993;86:1377—1386.
3. Eghbali M, Blumenfeld O, Seifter S, et al. Localization of types I, III and IV collagen mRNAs in rat heart cells by in situ hybridization. J Mol Cell Cardiol 1989;21:103—113.
4. Clare M, Jean R, McEwan M, et al. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. Circ Res 1995;77(51):863—868.
5. 毛象刚. 川芎嗪的药理作用及临床应用. 医师进修杂志 1989;16(8):31—33.
6. 黄 熙. 003 丹参酮 II A 磺酸钠心血管药理. 国外医学中医中药分册 1995;17(1):9—12.
7. 唐利龙, 汪丽惠. 川芎嗪对原代培养血管平滑肌细胞胶原基因表达的影响. 中国中西医结合杂志 1995;15(11):666—669.
8. 孙宝华. 丹参对缺氧性内皮细胞条件培养液促平滑肌细胞增生和胶原合成的影响. 同济医科大学学报 1995;24(1):5—8.
9. Marvin O, Boluyt EC, Oscar HL, et al. The lonely failing heart: a case for ECM genes. Cardiovascular Research 1995;30:835—840.
10. Gibbons GH, Luscher TF, Noll G, et al. Angiotensin II is a bifunctional vascular smooth muscle cell growth factor. Hypertension 1989;14:358—362.

(收稿:1997-07-21 修回:1998-03-18)