

· 博士之窗 ·

昆明山海棠提取物对血管平滑肌细胞增殖及凋亡的影响

喻卓^{1△} 孟磊¹ 郭艳红² 吴大刚³ 高炜²

摘要 目的 探讨昆明山海棠提取物 (THW-4) 对离体血管平滑肌细胞 (VSMC) 增殖及凋亡的影响。方法 培养家兔主动脉平滑肌细胞, 加入不同浓度的 THW-4 进行处理, 用 MTT 法测定细胞生长曲线, 以 Annexin V-FITC/PI 双标记、透射电镜、原位末端标记法检测细胞凋亡。结果 THW-4 可以明显抑制 VSMC 增殖, 呈剂量和时间依赖性, 作用 48h 的半有效抑制浓度 (IC₅₀) 为 15.6 μg/L, VSMC 在含 10~100 μg/L THW-4 的培养液中孵育 56h, 可检测到细胞早期凋亡, 且凋亡率随 THW-4 浓度增加而升高, 延长孵育时间至 72h, 透射电镜下可观察到典型的凋亡细胞形态学改变, 原位末端标记法显示 DNA 片段化增多, 有核碎裂、固缩等改变, 细胞周期时相分布显示 THW-4 主要阻滞 VSMC 于 G₂/M 期。结论 THW-4 能有效抑制体外培养的 VSMC 增殖及诱导其凋亡, 提示 THW-4 可能会作为防治血管成形术后再狭窄的候选药物。

关键词 昆明山海棠 提取物 血管平滑肌细胞 增殖 凋亡

Effect of Extract from Tripterygium Hypoglaucom on Proliferation and Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells YU Zhuo, MENG Lei, GUO Yan-hong, et al. *Department of Cardiology, the First Hospital, Peking University, Beijing (100034)*

Objective To study the effect of THW-4, an extract from *Tripterygium hypoglaucom* on proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cells (VSMC). **Methods** VSMC derived from rabbit aorta were cultured in vitro and different concentrations of THW-4 were added in experimental groups. Cell proliferation was evaluated by MTT and apoptosis by transmission electron microscopy (TEM), TUNEL assay and Annexin V-FITC/PI double labelled assay. **Results** The inhibitory effects of THW-4 on proliferation of VSMC displayed dose-time dependently, with the IC₅₀ value of 15.6 μg/L at 48 hrs. Incubated with THW-4 (10 - 100 μg/L) for 56 hrs, VSMC mainly appeared early stage apoptosis and the percentage of apoptosis was found to raise along with the increase of the THW-4 concentration. Typical images of apoptosis could be observed under TEM and TUNEL assay showed increase of DNA segments with karyorrhexis and pyknosis after THW-4 treatment for 72 hrs. Analysis of cell cycle indicated the THW-4 mainly lead to the blockage of VSMC in G₂/M stage. **Conclusion** THW-4 could inhibit the proliferation and induce the apoptosis of VSMC in vitro, suggesting that THW-4 is a potential agent for prevention of restenosis following angioplasty.

Key words *Tripterygium hypoglaucom*; extract; vascular smooth muscle cells; proliferation; apoptosis

经皮冠状动脉介入术 (percutaneous coronary intervention, PCI) 已成为当前治疗冠心病的主要手段, 但部分患者术后再狭窄 (restenosis, RS) 的发生却严重制约了该技术的推广应用^[1]。研究发现在 RS 的形成过程中不仅有血管平滑肌细胞 (VSMC) 过度增殖为特

点的内膜增生, 而且存在 VSMC 和巨噬细胞的凋亡失调 (或) 凋亡小体的清除不足等主要病理机制^[2]。近年来针对 VSMC 过度增殖及凋亡不足等重要环节, 通过药物对其进行干预一直是国内外研究的主要热点。THW-4 是从我国传统中药昆明山海棠 [*Tripterygium hypoglaucom* (Levl.) Hutch, THH] 中提取的一种活性单体成分, 为探讨 THW-4 对防治 RS 的潜在作用, 本实验采用兔 VSMC 为研究对象, 对 THW-4 抑制 VSMC 增殖及诱导其凋亡效应进行了研究。

作者单位: 1. 北京大学第一医院心内科 (北京 100034) 2. 北京大学第三医院心内科 3. 中国科学院昆明植物研究所

通讯作者 喻卓, △ 博士研究生, 现在昆明医学院第一附属医院心内科 (昆明) 石市数据: 0871 - 5324888 转 2502, E-mail: yuzhuo0718@vip.sina.com

材料与方 法

1 药品 THW-4 由中国科学院昆明植物研究所提供,以二甲基亚砷(DMSO)助溶,磷酸缓冲液按倍数稀释,微孔滤膜(0.22 μ m)除菌后于-20 $^{\circ}$ C 储存;噻唑蓝(MTT)及碘化丙啶(PI)购自 Sigma 公司;DMEM 培养基购自 GIBCO 公司;小牛血清购自天津灏洋生物制品公司;细胞凋亡原位末端标记试剂盒购自中山生物公司;Annexin V 试剂盒购自宝赛生物公司。

2 细胞培养 健康纯种大耳白兔,雄性,体重 2.0kg(购自北京大学医学部实验动物科学部)按组织贴块法进行胸主动脉 VSMC 培养。待细胞长成致密单层后消化传代,通过相差显微镜形态学观察及抗 α -actin 单克隆抗体染色证实为 VSMC。取 5~8 代 VSMC 用于实验。

3 细胞增殖测定 采用 MTT 法。将 VSMC 以每毫升 1×10^5 密度,接种于 96 孔培养板中,待细胞融合为单层后,加入不同浓度 THW-4(10、50、100 μ g/L),每组设 6 个平行孔,对照组加入等量的含 0.2% DMSO 的 PBS 代替,另设空白孔(无细胞)。分别于加药后 0、24、48、72、96h 终止培养,终止培养前每孔加入 MTT 溶液(5g/L)20 μ l,37 $^{\circ}$ C 反应 4h,吸去孔内培养液,每孔再加入 150 μ l DMSO,溶解后在 BIO-RAD 550 型酶标仪下测定 OD 值。取平均数,绘制生长曲线,计算细胞生长抑制率。

4 细胞早期凋亡测定 采用 Annexin V-FITC/PI 双标记法。将 VSMC 接种于 6 孔培养板中,在含有不同浓度的 THW-4(10、50、100 μ g/L)培养液中孵育 56h,收集细胞并用 1ml 冷 PBS 制成 1×10^6 细胞悬液,1000r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10min,弃上清,将细胞重悬于 200 μ l Binding Buffer,加入 10 μ l Annexin V-FITC 和 5 μ l PI,轻轻混匀,闭光室温反应 15min,加入 300 μ l Binding Buffer,于 1h 内用流式细胞仪进行检测,以激发波长 488nm 进行检测 FITC 和 PI 荧光。每样本计数 20000 个细胞,用 CELL Quest 软件分析细胞凋亡率。

5 原位检测 DNA 裂解片段 采用 TUNEL 法。按上述分组及给药方法,于培养 72h 后收集各组细胞,制成细胞悬液,甩片。实验步骤按试剂盒说明进行:(1)40g/L 多聚甲醛室温固定 30min (2)加入 0.3% (体积分数)过氧化氢甲醇溶液作用 30min,阻断内源性酶活性 (3)加入 TUNEL 反应混合液 37 $^{\circ}$ C 孵育 60min (4)加入转化剂-POD 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min (6)加入 DAB 底物,室温 37 $^{\circ}$ C 孵育 10min (7)光学显微镜下观察并照相。细胞核呈现棕色颗粒为凋亡细胞。

6 超微结构观察 VSMC 经不同浓度 THW-4 作用 72h 后,每组取 1×10^6 细胞进行离心沉淀,去上清后常规固定、脱水、浸透、包埋、超薄切片、铀-铅双染色,透射电镜下观察及摄片。

7 细胞周期时相分布测定 VSMC 经 THW-4 (10、50、100 μ g/L)作用 24h 和 72h 后,分别收集并制成 1×10^6 细胞悬液,1000r/min 离心 5min,PBS 洗涤 2 次,加入-20 $^{\circ}$ C 预冷的 70% 乙醇 4 $^{\circ}$ C 固定过夜,用 4 $^{\circ}$ C PBS 洗 2 次,加 RNase A 至终浓度为 50mg/L,于 37 $^{\circ}$ C 水浴中孵育 30min。终浓度 50mg/L 的 PI 于 4 $^{\circ}$ C 避光染色 30min,用流式细胞仪测定荧光强度,分析 DNA 含量。

8 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间的差异应用 *t* 检验,多组间比较采用 ANOVA 方差分析。

结 果

1 THW-4 对 VSMC 增殖的影响 见表 1。各浓度组对 VSMC 生长均有明显的抑制作用,在终浓度为 10~50 μ g/L 范围内随浓度的增加和时间延长而增强 ($P < 0.01$);而在 50~100 μ g/L 范围内,对 VSMC 的抑制作用随浓度的增加无明显增强 ($P > 0.05$)。对不同浓度 THW-4 作用 48h 后的生长抑制率进行回归分析,IC₅₀ 为 15.6 μ g/L。

表 1 不同浓度 THW-4 对 VSMC 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	OD 值			
		24h	48h	72h	96h
对照	6	0.419 \pm 0.036	0.711 \pm 0.009	1.163 \pm 0.084	2.136 \pm 0.155
THW-4 10 μ g/L	6	0.388 \pm 0.025 *	0.392 \pm 0.024 *	0.552 \pm 0.030 *	1.069 \pm 0.034 **
50 μ g/L	6	0.293 \pm 0.024 **	0.197 \pm 0.035 **	0.213 \pm 0.015 **	0.168 \pm 0.041 **
100 μ g/L	6	0.249 \pm 0.039 **	0.154 \pm 0.028 **	0.168 \pm 0.024 **	0.102 \pm 0.023 **

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

2 THW-4 诱导 VSMC 的早期凋亡及细胞坏死率 见表 2。不同浓度 THW-4 与 VSMC 孵育 56h,Annexin V-FITC/PI 双标记参数图可见对照组细胞主要分布于第 III 象限,随着 THW-4 浓度增加,VSMC 分布发生改变,第 I、IV 象限细胞逐渐增多。流式细胞仪分析显示,早期凋亡细胞比例随 THW-4 的浓度增加明显上升,最高达 40% 左右;而继发性坏死细胞仅有轻度上升($P < 0.05$)。

表 2 不同浓度 THW-4 诱导 VSMC 的早期凋亡及细胞坏死率比较 (% $\bar{x} \pm s$)

组别	n	活细胞	凋亡细胞	坏死细胞
对照	3	93.9 \pm 2.3	2.6 \pm 1.0	2.9 \pm 1.0
THW-4 10 μ g/L	3	89.0 \pm 4.5 *	7.7 \pm 3.5 *	2.9 \pm 1.1
50 μ g/L	3	60.6 \pm 1.9 **	32.2 \pm 3.3 **	6.6 \pm 1.2 *
100 μ g/L	3	53.7 \pm 1.7 **	39.8 \pm 1.7 **	5.9 \pm 2.2 *

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

3 TUNEL 法检测 DNA 裂解片段 THW-4

(10、50、100 $\mu\text{g/L}$) 作用于 VSMC 72h 后进行 TUNEL 染色, 光镜下可见部分 VSMC 细胞核固缩或碎裂成数个颗粒, 且随着 THW-4 浓度的增高, 阳性细胞数目明显增多。计数阳性细胞占总细胞数的百分比, 结果依次为 (11.2 \pm 0.9)%、(27.8 \pm 1.3)% 和 (46.4 \pm 2.9)%, 与对照组比较, 差异均有显著性 ($P < 0.01$)。

4 THW-4 诱导 VSMC 的超微结构 见图 1。

透射电镜下观察对照组 VSMC 周围微绒毛完整, 细胞核形态规则, 核仁清晰。用 THW-4 处理后细胞微绒毛消失, 核仁消失, 核染色质固缩、聚集于核膜下, 部分细胞核崩解, 形成多个致密小体, 随着 THW-4 浓度的增加, 细胞凋亡特征更加明显, 胞浆中有空泡增多, 并见凋亡小体。

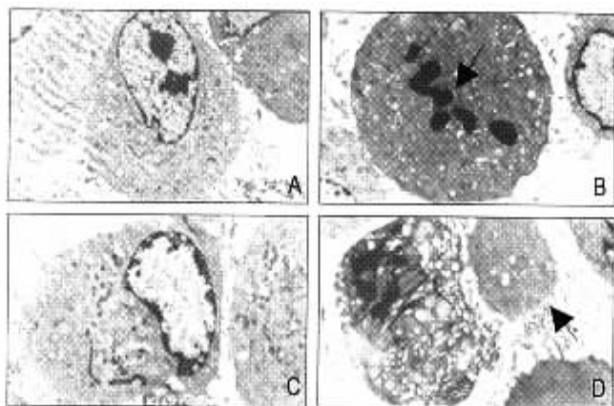


图 1 电镜下 VSMC 凋亡的形态学观察

注: A: 正常 VSMC; B: 染色质固缩、断裂; C: 染色质边集; D: 凋亡小体

5 THW-4 对 VSMC 细胞周期时相分布的影响

见表 3。细胞周期时相分布的分析结果表明低剂量 THW-4 (10 $\mu\text{g/L}$) 在 24h 主要是阻滞 G_0/G_1 期 ($P < 0.01$) 随着剂量的加大 (50~100 $\mu\text{g/L}$) 则以阻滞 G_2/M 期为主, 将药物作用时间延长至 72h, 各组细胞均阻滞在 G_2/M 期, 并呈现时间和剂量的依赖性 ($P < 0.01$)。

表 3 THW-4 作用 24 和 72h 后 VSMC 的细胞周期分布 (% $\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间(h)	G_0/G_1	S	G_2/M
对照	3	24	59.4 \pm 0.7	25.1 \pm 1.3	15.5 \pm 0.6
		72	57.0 \pm 3.0	28.1 \pm 2.5	14.9 \pm 0.5
THW-4 10 $\mu\text{g/L}$	3	24	70.7 \pm 0.9*	18.5 \pm 1.4	10.8 \pm 0.7*
		72	62.7 \pm 1.3	10.4 \pm 1.0	26.9 \pm 0.5* Δ
50 $\mu\text{g/L}$	3	24	61.5 \pm 0.4	15.1 \pm 1.7	23.4 \pm 1.8*
		72	48.8 \pm 0.5	9.4 \pm 1.8	41.8 \pm 1.4* Δ
100 $\mu\text{g/L}$	3	24	58.5 \pm 0.6	16.5 \pm 0.6	25.0 \pm 1.0*
		72	35.8 \pm 2.1	7.0 \pm 1.9	57.2 \pm 0.1* Δ

注: 与对照组比较, * $P < 0.01$; 与同组 24h 比较, $\Delta P < 0.01$

讨 论

近年来, 药物涂层支架技术的不断改进以及免疫抑制剂雷帕霉素和抗肿瘤制剂泰素的成功应用不仅为再狭窄的彻底解决带来了希望, 同时也为如何进一步开发有效的抗再狭窄药物指明了方向^[3,4]。昆明山海棠 (THH) 系卫茅科雷公藤属植物的一种, 临床上用于治疗类风湿性关节炎、肾小球肾炎、系统性红斑狼疮等免疫性疾病具有较好的疗效。近年来研究发现 THH 除了具有强力的抗免疫活性外, 还具有抗炎、抗肿瘤、抗生育及抗移植排斥等药理活性^[5], 因此 THH 在药理活性方面基本兼有雷帕霉素和泰素两种药物的共同特性。THW-4 是近年来从 THH 根木中提取的一种主要活性单体成分, 为探讨 THW-4 对预防再狭窄的潜在作用, 本实验从细胞增殖及凋亡的角度观察了 THW-4 对 VSMC 的影响, 结果发现 THW-4 能有效抑制 VSMC 增殖, 并具有浓度和时间依赖性, 与 VSMC 连续作用 48h 的 IC_{50} 为 15.6 $\mu\text{g/L}$ 。透射电镜下观察发现, THW-4 作用的 VSMC 发生核固缩、染色质边集、核碎裂及凋亡小体等细胞凋亡的典型改变, 通过 TUNEL 标记法进一步证实了 THW-4 具有诱导 VSMC 凋亡的作用。

以往的研究发现 THH 水提取物对肿瘤细胞, 如 Jurkat、HL-60 等白血病细胞, 除了诱导其发生凋亡外, 还存在直接杀伤细胞的毒性作用^[6,7]。通常在细胞发生凋亡的早期, 虽然细胞膜的完整性尚还维持, 但膜磷脂酯已失去平衡, 位于细胞膜上的磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 会从细胞膜的内层转移到外层, 而 Annexin V 是一种与磷脂酯具有高度亲合力的蛋白, 它可与转移到膜外的磷脂酰丝氨酸结合, 在这些早期凋亡细胞还未出现形态学改变和 DNA 降解以前, 即通过 Annexin V 荧光染色而检测到, 并且利用 PI 不能透过完整细胞膜的特点, 可以使用 Annexin V-FITC 及 PI 双标记法将凋亡细胞、坏死细胞、损伤细胞与正常细胞区别开^[8]。实验结果发现, 将不同浓度 THW-4 与 VSMC 共同孵育延长至 56h, 虽然此时 VSMC 已受到明显抑制, 但 Annexin V FITC 及 PI 双标记结果显示, 此时 THW-4 引起的 VSMC 坏死率均在 10% 以下, 而早期细胞凋亡率则随着 THW-4 浓度的增加明显升高, 最高可达 40% 以上, 认为 THW-4 抑制 VSMC 的机制主要是通过诱导细胞发生凋亡而非细胞毒性。

细胞周期是增殖信号转导的最终共同通路, 进入细胞周期和细胞周期的推进是血管增殖性疾病中的关键事件^[9]。本实验通过流式细胞仪对细胞周期分析的

结果表明, VSMC 经 THW-4 处理 24h 时, 低剂量 THW-4(10 μ g/ml) 细胞主要阻滞于 G₀/G₁ 期, 高剂量则阻滞于 G₂/M 期, 进一步延长 THW-4 与 VSMC 作用时间至 72h, 各剂量组均表现为 G₂/M 期阻滞, 且随药物浓度的增加及作用时间延长阻滞越明显。因此, 我们认为 THW-4 抑制 VSMC 的增殖及诱导其凋亡作用可能与其引起细胞 G₂/M 期阻滞有关, 其作用的详细机制还有待进一步研究, 但从目前的结果看, THW-4 的应用有可能为预防 PTCA 术后再狭窄的药物研究提供一个新思路。

参 考 文 献

- Horlitz M, Sigwart U, Niebauer J. Fighting restenosis after coronary angioplasty: contemporary and future treatment options. *Int J Cardiol* 2002; 83(3): 199—205.
- Durand E, Mallat Z, Addad F, et al. Time courses of apoptosis and cell proliferation and their relationship to arterial remodeling and restenosis after angioplasty in an atherosclerotic rabbit model. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39(10): 1680—1685.
- Serruys PW, Regar E, Carter AJ. Rapamycin eluting stent: the onset of a new era in interventional cardiology. *Heart* 2002; 87(4): 305—307.
- Park SJ, Shim WH, Ho DS, et al. A paclitaxel-eluting stent for the prevention of coronary restenosis. *N Engl J Med* 2003; 348(16): 1537—1545.
- 张航行, 耿会玲, 杨维霞. 昆明山海棠的化学成分及药理活性研究进展. *动物医学进展* 2002; 23(6): 42—44.
- Zhang HX, Geng HL, Yang WX. Advances in studies on chemical constituents and pharmacological activities of *Tripterygium hypoglaucum* (Level.) Hutch. *Prog Vet Med* 2002; 23(6): 42—44.
- 敖琳, 曹佳, 徐颖, 等. 昆明山海棠总生物碱诱发 HL-60 细胞凋亡的观察. *第三军医大学学报* 2001; 23(11): 1273—1275.
- Ao L, Cao J, Xu Y, et al. Apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells induced by total alkaloids of *Tripterygium hypoglaucum* (Level.) Hutch. *J Thir Milit Med Univ* 2001; 23(11): 1273—1275.
- 赵钦军, 杨录军, 刘晋祚, 等. 昆明山海棠碱通过 Fas 受体介导途径诱导 Jurkat 淋巴瘤细胞株凋亡. *第三军医大学学报* 2003; 25(17): 1521—1523.
- Zhao QJ, Yang LJ, Liu JY, et al. *Tripterygium hypoglaucum* (Level.) Hutch alkaloids induce apoptosis of Jurkat lymphoma cells via the fas receptor-mediated pathway. *J Third Milit Med Univ* 2003; 25(17): 1521—1523.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, et al. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995; 184(1): 39—51.
- Welt FG, Edelman ER. Cell cycle regulation and control of angioplasty restenosis. *Adv Drug Deliv Rev* 1997; 24(1): 45—51.

(收稿 2004-02-15 修回 2004-05-28)

《天津中医药》原名《天津中医》创刊于 1984 年, 是由天津市卫生局主管, 天津中医学院、天津中医药学会和天津中西医结合学会主办的综合性中医药学术期刊。本刊设有专家论坛、名医精粹、博士之窗、临床论著、针灸与推拿、理论探讨、实验研究、中药现代化、国际交流、留学生园地、临床报道、科研动态、综述等专栏, 以满足广大读者日益增长的需要。欢迎广大读者订阅珍藏。本刊为双月刊, 国内外公开发行, ISSN 1672—1519, CN 12—1349/R。国内邮发代号 6—83, 国外发行代号: 1040—BM, 每册定价: 6.00 元, 全年共 36 元。邮购地址: 天津市南开区玉泉路 88 号天津中医编辑部收; 邮政编码: 300193; 电话: (022) 23051018; 传真: (022) 27470216; Email: xuebaobj@tjutm.edu.cn; http://www.tjutm.edu.cn

《天津中医学院学报》创刊于 1982 年, 是由天津市教委主管, 天津中医学院主办的综合性中医药学术期刊。本刊设有理论探讨、实验研究、中药研究与应用、中医教学、临床集萃、研究生园地、针灸与推拿、雏鹰之窗、综述等专栏, 以满足广大读者日益增长的需要。欢迎广大读者订阅珍藏。

本刊为季刊, 国内外公开发行, ISSN 1005—7145, CN 12—1180/R。国内邮发代号 6—153, 国外发行代号: 1271—QR, 每册定价 4.00 元, 全年共 16 元。

邮购地址: 天津市南开区玉泉路 88 号天津中医学院学报编辑部收; 邮政编码: 300193; 电话: (022) 23051018; 传真: (022) 27470216; Email: xuebaobj@tjutm.edu.cn; http://www.tjutm.edu.cn