

去甲乌药碱对大鼠主动脉平滑肌细胞增殖和迁移的影响研究

翁嘉灏 周 苗 孙思明
(上海市中医医院, 上海 200071)

摘 要 目的:探讨去甲乌药碱对大鼠主动脉平滑肌细胞迁移和增殖的影响。方法:体外培养大鼠主动脉平滑肌细胞,使用不同浓度去甲乌药碱(0、10、30、100 $\mu\text{mol/L}$)培养24 h后,通过划痕试验观察去甲乌药碱对平滑肌细胞趋化迁移能力的影响,通过CCK-8试验检测去甲乌药碱对平滑肌细胞增殖能力的影响。结果:划痕试验结果示,去甲乌药碱10 $\mu\text{mol/L}$ 有抑制大鼠主动脉平滑肌细胞迁移的趋势,但无统计学意义($P>0.05$);30 $\mu\text{mol/L}$ 及以上浓度均具有抑制细胞迁移的作用($P<0.01$),且具有剂量依赖性($P<0.05$, $P<0.01$)。CCK-8试验结果示,去甲乌药碱各剂量均有明显的抑制大鼠主动脉平滑肌细胞增殖的作用($P<0.05$, $P<0.01$),且具有剂量依赖性($P<0.05$)。结论:去甲乌药碱能抑制大鼠主动脉平滑肌细胞的迁移与增殖,且呈剂量依赖性。推测去甲乌药碱可能具有预防血管再狭窄的作用。

关键词 去甲乌药碱;主动脉;平滑肌细胞;细胞迁移;细胞增殖;SD大鼠;雄性;实验研究

中图分类号 R285.5 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X (2020) 01-0083-04

基金项目 上海市卫生和计划生育委员会面上项目(201640047)

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)是构成血管壁组织结构及维持其正常生理功能的物质基础,其结构和功能的改变如异常增殖、迁移、表型转化等是导致动脉粥样硬化、高血压和血管成形术后再狭窄等多种心血管疾病共同的细胞

病理学基础^[1]。附子是“回阳救逆第一品”,自《伤寒论》开始,就被用于治疗心力衰竭类似症状。近年来研究发现去甲乌药碱作为附子主要水溶性单体,具有抗血小板凝集、增加心脏收缩力及收缩频率、抗心肌细胞及神经元细胞凋亡等作用^[2-4]。本课题组前期

- [13] BONCLER M, KEHREL B, SZEWCZYK R, et al. Oxidation of C-reactive protein by hypochlorous acid leads to the formation of potent platelet activator[J]. Int J Biol Macromol, 2018, 107 (Pt B): 2701.
- [14] LIBBY P. Interleukin-1 Beta as a target for atherosclerosis therapy: biological basis of CANTOS and beyond[J]. J Am Coll Cardiol, 2017, 70 (18): 2278.
- [15] SUN L F, AN D Q, NIYAZI G L, et al. Effects of Tianxianglan Granule treatment on atherosclerosis Via NF- κ B and p38 MAPK signaling pathways[J]. Mol Med Rep, 2018, 17 (1): 1642.
- [16] KIM E K, CHOI E J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1802 (4): 396.
- [17] CSEH B, DOMA E, BACCARINI M. “RAF” neighborhood: protein-protein interaction in the Raf/Mek/Erk pathway[J]. FEBS Lett, 2014, 588 (15): 2398.
- [18] LI T J, SONG T, NI L, et al. The p-ERK-p-c-Jun-cyclinD1

- pathway is involved in proliferation of smooth muscle cells after exposure to cigarette smoke extract[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 453 (3): 316.
- [19] FENG M, KONG S Z, WANG Z X, et al. The protective effect of coptisine on experimental atherosclerosis ApoE-/- mice is mediated by MAPK/NF- κ B-dependent pathway[J]. Biomedicine Pharmacother, 2017, 93: 721.
- [20] 李玉杰, 李宁, 张会永, 等. 失功能高密度脂蛋白结构改变及功能变化[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36 (4): 903.
- [21] 尔璐, 边云飞, 宋晓苏, 等. 失功能高密度脂蛋白与心血管疾病研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2017, 25 (3): 309.

第一作者: 刘学谦(1993—), 男, 医学硕士, 住院医师, 研究方向为中药治疗动脉粥样硬化机制研究。

通讯作者: 曹守沛, 博士, 主任中医师, 硕士研究生导师。caosp336@126.com

修回日期: 2019-07-19

编辑: 吴 宁

研究发现去甲乌药碱能够通过 $\beta 2$ /PI3K/AKT通路抑制成年小鼠心肌细胞氧化应激引起的凋亡,亦有研究证明其能够通过兴奋 $\beta 2$ 受体松弛气管平滑肌,而对于VSMC的研究尚未见报道。因此本研究通过体外培养大鼠VSMC,观察去甲乌药碱对VSMC迁移和增殖的影响。

1 实验材料

1.1 实验动物 SD大鼠购自上海杰思捷实验动物有限公司,体重180~200 g,雄性,许可证号:SCXK(沪)2018-0004。

1.2 试剂与仪器 去甲乌药碱(上海同田生物技术有限公司,批号5843-65-2),水合氯醛(由上海市中医医院实验中心提供),II型胶原酶(美国Worthington Biochemical公司,批号F8H18380),胰弹性蛋白酶(美国Sigma公司,批号SLBV9311),DMEM培养基(美国Hyclone公司,批号SH30243.01),磷酸缓冲盐溶液(PBS,美国Hyclone公司,批号SH30256.01),胎牛血清(FBS,南美AnLite公司,批号170216),CCK-8试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号C0039)。

生物安全柜(Heal Force),隔水式恒温培养箱(上海博迅),超净工作台(上海博迅),CO₂培养箱(美国Thermo公司),恒温摇床(上海精宏实验设备),酶标系统多功能仪(上海百基生物),倒置显微镜(莱卡),低温高速离心机(Sigma公司),纯水机Cascada TMIX(颇尔),6孔板、96孔板(美国Corning公司)。

2 实验方法

2.1 血管平滑肌细胞的原代培养 雄性SD大鼠3~5只,用10%水合氯醛0.1 mL/100g腹腔注射麻醉,无菌条件下迅速取出胸主动脉,取出后用DMEM培养基将主动脉腔内残留的血液冲洗干净。用镊子去除血管周围脂肪及结缔组织,并用PBS冲洗3次。将冲洗干净的胸主动脉放入0.1%II型胶原酶培养皿中,在37℃、5%CO₂培养箱中消化45 min左右,消化后的组织转到DMEM培养基中。在显微镜下剥除外膜,刮除内膜,再将剩余的血管中膜移至干净的培养皿中剪碎(约1 mm×1 mm左右大小),加入0.1%的胰蛋白酶溶液和胰弹性蛋白酶的平衡盐溶液,于37℃、5%CO₂培养箱中消化,放置1h后置37℃摇床中,消化过夜。将消化好的组织块1 000 r/min离心10 min(离心半径10 cm),倒去上清液,加入20%FBS的DMEM培养基,吹打混匀后,于37℃、5%CO₂培养箱中静置培养,每3 d换液1次。实验所用细胞选用4~6代细胞进行。

2.2 细胞划痕试验观察去甲乌药碱对细胞迁移能力的影响 待细胞生长至80%汇合时,将细胞分为不同浓度(0,10,30,100 μ mol/L)去甲乌药碱处理组。在备用的6孔板背面做好标记,每孔间隔相等距离水平横向画出3条线。选对数生长期的VSMC按照每孔 5×10^5 个细胞均匀接种于6孔板中,待细胞生长至均匀铺满时,按标记线以垂直方向平均相等距离使用无菌200 μ L枪头快速划下,PBS漂洗,去除漂浮细胞,加入无血清DMEM培养液,使用倒置显微镜观察细胞迁移程度并拍照,即0h细胞迁移状态。再将细胞放入37℃、5%CO₂培养箱中培养24 h,拍照记录。以上均用显微镜在4倍镜下记录细胞迁移状态,每孔平均9张图片,采用Image-Pro plus 6.0软件对迁移距离进行分析。

细胞迁移率=(0h划痕宽度-培养后划痕宽度)/0h划痕宽度×100%

2.3 CCK-8试验检测去甲乌药碱对平滑肌细胞增殖功能的影响 在96孔细胞培养板中,将培养至80%左右的VSMC消化、离心、计数,用含10%血清的DMEM培养基将细胞浓度调整至 5×10^4 个/mL,每孔加入100 μ L细胞悬液,每组设3个复孔,放入37℃、5%CO₂培养箱中培养过夜。第2天将原培养基换成0.1%FBS的DMEM培养基培养,在37℃、5%CO₂培养箱中培养24 h后换含有去甲乌药碱的培养基,浓度分别为0、10、30、100 μ mol/L,孵育24 h后弃去培养基。弃去上清后,每孔加入100 μ L、10%FBS的DMEM培养基,再加入10 μ L CCK-8液,将培养板继续放入37℃、5%CO₂培养箱中孵育4 h。置酶联检测仪上测定各孔于450 nm处光密度(OD)值,根据每孔OD值计算药物干预后细胞的增殖率。

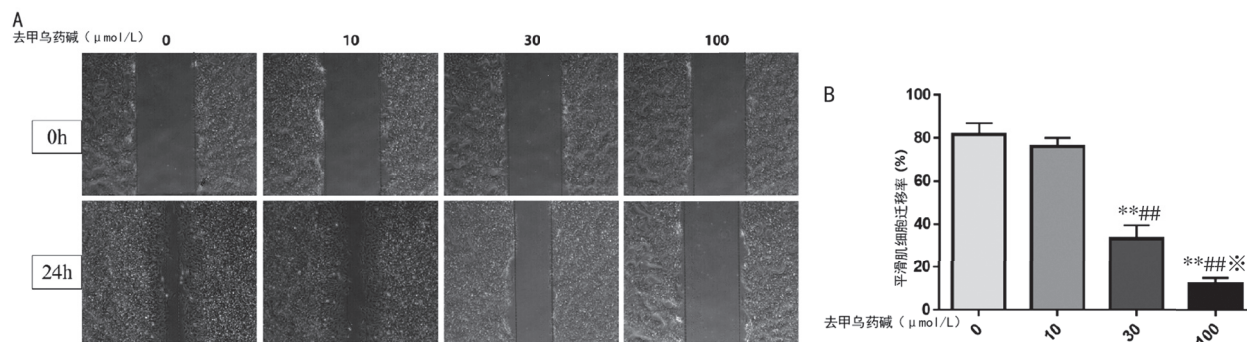
增殖率(细胞活力)=(OD_{实验组}-OD_{空白对照组})/(OD_{阴性对照组}-OD_{空白对照组})×100%。

2.4 统计学方法 以上试验各组重复3次,所有数据均使用SPSS 21.0统计软件进行处理分析,以($\bar{x} \pm s$)表示。2组之间统计分析使用student's t分析。P<0.05为差异具有统计学意义。

3 实验结果

3.1 不同浓度去甲乌药碱对平滑肌细胞迁移能力的影响 结果表明,30 μ mol/L及以上浓度去甲乌药碱具有明显的抑制细胞迁移距离的作用,且呈剂量依赖性,见图1。

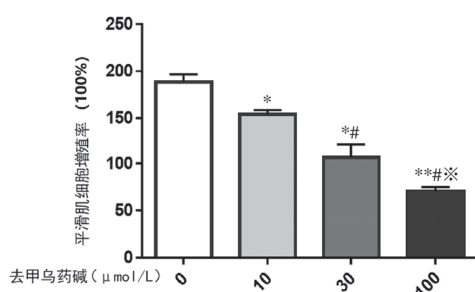
3.2 不同浓度去甲乌药碱对平滑肌细胞增殖能力的影响 本研究各剂量去甲乌药碱均能明显抑制血管平滑肌细胞增殖,且呈现剂量依赖性,见图2。



A. 光镜下平滑肌细胞迁移状态; B. 迁移距离柱状图

注: 与 0 μmol/L 去甲乌药碱组比较, ** $P < 0.01$; 与 10 μmol/L 去甲乌药碱组比较, ## $P < 0.01$; 与 30 μmol/L 去甲乌药碱组比较, ※ $P < 0.05$ 。

图1 不同浓度去甲乌药碱对平滑肌细胞趋化迁移能力的影响



注: 与 0 μmol/L 去甲乌药碱组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 10 μmol/L 去甲乌药碱组比较, # $P < 0.05$; 与 30 μmol/L 去甲乌药碱组比较, ※ $P < 0.05$ 。

图2 不同浓度去甲乌药碱对平滑肌细胞增殖能力的影响

4 讨论

血管重塑性疾病指因内皮损伤、血管平滑肌细胞增生、细胞外基质沉积所致的血管壁增厚和管腔狭窄性心血管疾病, 包括动脉粥样硬化、血管成形术后再狭窄、高血压等, 随着病程的进展会不同程度地影响靶器官的功能^[5]。VSMC是动脉中层的主要成分, 主要分为收缩型和分泌型两种表型。正常成人动脉血管的平滑肌细胞以收缩型为主, 其主要功能是维持血管的弹性和收缩血管。在各种刺激下, VSMC在静态收缩和增殖合成表型之间发生表型转换, 进而导致平滑肌细胞的异常活化、增殖、迁移以及表达SMC标记- α 平滑肌肌动蛋白等, 是病理性血管重建的重要病理标志, 在动脉粥样硬化、血管成形术后再狭窄、旁路静脉移植失败、同种异体移植血管病变等多种血管疾病的发生发展中发挥关键作用^[6-8]。

冠状动脉粥样硬化心脏病可归属于中医学“胸痹”“胸痛”“真心痛”等范畴, 其主要病机是“瘀血阻滞, 郁结于血脉”, 根据“久病多瘀”“久病多虚”的理论, 临床以“活血, 温通”为治疗大法。附子具有

回阳救逆、温阳散寒之效。现代药理学发现附子具有强心、抗心衰、抗心脑血管缺血和抗心律失常等功能^[9]。有研究表明附子中表达强心作用的主要成分去甲乌药碱^[10]。

去甲乌药碱作为附子强心成分的主要水溶性单体, 具有强心、扩血管、抗血小板凝集等心血管多靶点作用^[11]。现代药理学认为, 去甲乌药碱还具有血流动力学作用, 亦可作为一种血管扩张剂来降低主动脉阻力和全身血管阻力以及降低后负荷。此外, 相比其他正性肌力药物, 去甲乌药碱还具有一个优势, 其血流动力学作用只有几分钟, 从而能快速达到所需的血流动力学反应, 但也意味着输液停止后去甲乌药碱的作用也会迅速消失。去甲乌药碱通过静脉给药后有短时间内起效快的药理作用, 对急性心力衰竭的短期治疗很有价值。同时, 去甲乌药碱的血管扩张作用, 以及强大的正性肌力作用, 除了可以作用于VSMC, 还对血管内皮细胞和巨噬细胞起到抗炎作用, 从而抑制新生内膜的形成^[12-14]。因此, 去甲乌药碱通过抑制平滑肌细胞的合成状态阻断血管狭窄性疾病的发展代表了一种新的治疗方法。本实验结果显示, 去甲乌药碱有抑制平滑肌细胞趋化迁移和增殖的作用, 且浓度越高细胞的迁移能力越弱, 增殖率越低。

本研究结果从体外证明了去甲乌药碱能够抑制平滑肌细胞的增殖和迁移能力, 但是关于去甲乌药碱引起VSMC功能改变的具体作用机制仍在探索中。在多种影响平滑肌细胞生物学行为和功能的因素中, 血管紧张素 II (Ang II) 作为一种多功能肽, 是VSMC重要的调节因素, 对VSMC有着广泛的调节。它能调节血管紧张度, 调节VSMC生长凋亡, 促进细胞迁移和胞外基质沉积, 促进细胞炎症反应。因此, Ang II 介导的VSMC信号通路机制也显得十

分重要。下一步我们将以Ang II 信号通路作为切入点,从体内及体外进一步深入研究去甲乌药碱的具体作用机制,从而为心血管疾病的防治提供药理学依据。

参考文献

- [1] 温进坤,韩梅.血管平滑肌细胞[M].北京:科学出版社,2005:364.
- [2] WU M P,ZHANG Y S,ZHOU Q M,et al.Higenamine protects ischemia/reperfusion induced cardiac injury and myocyte apoptosis through activation of $\beta 2$ -AR/PI3K/AKT signaling pathway[J].Pharmacol Res,2016,104:115.
- [3] CICCARELLI M,CIPOLLETTA E,SANTULLI G,et al.Endothelial beta2 adrenergic signaling to AKT: role of Gi and SRC[J].Cell Signal,2007,19(9):1949.
- [4] NAGAI H,KUWAHIRA I,SCHWENKE D O,et al.B2-Adrenergic receptor-dependent attenuation of hypoxic pulmonary vasoconstriction prevents progression of pulmonary arterial hypertension in intermittent hypoxic rats[J].PLoS One,2014,9(10):e110693.
- [5] GAO J M,SUN L,HUO L H,et al.CYLD regulates angiogenesis by mediating vascular endothelial cell migration[J].Blood,2010,115(20):4130.
- [6] LIU R J,LESLIE K L,MARTIN K A.Epigenetic regulation of smooth muscle cell plasticity[J].Biochim Biophys Acta,2015,1849(4):448.
- [7] MARTIN K A,RZUCIDLO E M,MERENICK B L,et al.The mTOR/p70 S6K1 pathway regulates vascular smooth muscle cell differentiation[J].Am J Physiol Cell Physiol,2004,286(3):507.
- [8] OWENS G K,KUMAR M S,WAMHOFF B R.Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease[J].Physiol Rev,2004,84(3):767.
- [9] 阎爱荣,张宏.附子的药理研究[J].中国药物与临床,2008,8(9):745.
- [10] 周远鹏.作用于心血管系统的附子水溶性活性成分研究回顾和评价[J].中药药理与临床,2011,27(6):106.
- [11] ZHANG N N,LIAN Z Q,PENG X Y,et al.Applications of higenamine in pharmacology and medicine[J].J Ethnopharmacol,2017,196:242.
- [12] PARK C W,CHANG K C,LIM J K.Effects of higenamine on isolated heart adrenoceptor of rabbit[J].Arch Int Pharmacodyn Ther,1984,267(2):279.
- [13] BAI G,YANG Y,SHI Q,et al.Identification of higenamine in radix aconiti lateralis preparata as a beta2-adrenergic receptor agonist1[J].Acta Pharmacol Sin,2008,29(10):1187.
- [14] HA Y M,KIM M Y,PARK M K,et al.Higenamine reduces HMGB1 during hypoxia-induced brain injury by induction of heme oxygenase-1 through PI3K/Akt/Nrf-2 signal pathways[J].Apoptosis,2012,17(5):463.

第一作者:翁嘉灏(1981—),女,医学硕士,主治医师,研究方向为中西医结合治疗心血管疾病。wengjiahao@hotmail.com

收稿日期:2019-07-21

编辑:吴宁

文末参考文献著录规则之文献类型和标识代码

根据国家标准GB/T 7714—2015《信息与文献 参考文献著录规则》中的文末参考文献著录格式,应在题名后注明“文献类型标识”,各类文献类型对应的标识代码如下:

普通图书:M;会议录:C;汇编:G;报纸:N;期刊:J;学位论文:D;报告:R;标准:S;专利:P;数据库:DB;计算机程序:CP;电子公告:EB;档案:A;舆图:CM;数据集:DS;其他:Z。

举例:

- (普通图书) 黄亚博.新世纪江苏省中医药学科发展报告[M].南京:江苏科学技术出版社,2012:前言.
- (标准) 国家中医药管理局.中医病证诊断疗效标准[S].南京:南京大学出版社,1994:201.
- (期刊) 谈勇,胡荣魁.夏桂成国医大师调治复发性流产经验探赜[J].江苏中医药,2015,47(9):1.
- (报纸) 周蔓仪.109项中医药团体标准发布[N].中国中医药报,2015-11-27(1).
- (学位论文) 毕承明.肺癌证治规律文献研究[D].南京:南京中医药大学,2015.

更多参考文献著录规则及举例见本刊网站(www.jstcm.cn)首页下载专区。