

香青兰总黄酮对 TNF- α 诱导的 大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响

曹文疆¹, 邢建国², 王新春¹, 金家贵³, 彭克军^{3*}

(1. 石河子大学医学院第一附属医院, 新疆 石河子 832008; 2. 新疆维吾尔自治区药物研究所, 乌鲁木齐 830004; 3. 成都医学院检验医学院, 成都 610083)

[摘要] **目的:**通过观察香青兰总黄酮对肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 诱导的大鼠主动脉血管平滑肌细胞 (VSMC) 增殖的影响, 探讨其治疗动脉粥样硬化的可能药效机制。**方法:**采用体外贴块法培养大鼠主动脉 VSMC, SABC-Cy3 荧光免疫组化技术鉴定其纯度; 分别应用质量浓度为 0.02 mg·L⁻¹ TNF- α , TNF- α + 不同浓度香青兰总黄酮组 (25, 50, 100 mg·L⁻¹) 作用 24 h, 并设对照组进行比较。采用 MTT 法检测细胞的增殖; 免疫组化法检测细胞内增殖细胞核抗原 (PCNA) 的表达水平。**结果:**与对照组比较, TNF- α 组能显著刺激大鼠 VSMC 的增殖, 香青兰总黄酮不同剂量组联合 TNF- α 可一定程度抑制 TNF- α 诱导的 VSMC 增殖以及细胞内 PCNA 的表达, 且呈现一定的剂量依赖关系趋势。**结论:**香青兰总黄酮通过抑制 TNF- α 对 VSMC 的增殖作用, 可能是其治疗动脉粥样硬化的药效机制之一。

[关键词] 香青兰总黄酮; 血管平滑肌细胞; 肿瘤坏死因子- α ; 增殖

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)21-0159-03

[DOI] CNKI:11-3495/R.20110809.1706.015 **[网络出版时间]** 2011-08-09 17:06

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110809.1706.015.html>

Inhibitory Effects of *Dracocephalum* Total Flavoes on Proliferation of Rat Vascular Smooth Muscle Cells Induced by TNF- α

CAO Wen-jiang¹, XING Jian-guo², WANG Xin-chun¹, JIN Jia-gui³, PENG Ke-jun^{3*}

(1. The First Affiliated Hospital of Medical College, Shihezi University, Xinjiang 832008, China;
2. Xinjiang Institute of Meteria, Urumqi 830004, China;
3. Laboratory Medical School of Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the possible mechanism of pharmacological activity of tilianin by observing the effects of *Dracocephalum* total flavoes on proliferation of rat vascular smooth muscle cells (VSMCs) induced by TNF- α . **Method:** The rat VSMCs were cultured *in vitro*, and the purity of cells was identified by SABC-Cy3 immunofluorescence technique. Cell proliferation model was established by stimulation with 0.02 mg·L⁻¹ TNF- α . After TNF- α stimulation, cells were treated with three dose of *Dracocephalum* total flavoes (25, 50, 100 mg·L⁻¹); MTT assay was used to evaluate the proliferation of cells. The expression of intracellular proliferating cell nuclear antigen (PCNA) were measured by immunoenzymatic histochemistry. **Result:** Compared with control group, three dose groups of *Dracocephalum* total flavoes could inhibit, in varying degrees, the proliferation and expression of intracellular PCNA of VSMCs induced by TNF- α , in a dose-dependent manner. **Conclusion:** The *Dracocephalum* total flavoes could inhibit the proliferation of VSMC induced by TNF- α , which might be one of pharmacological mechanisms of *Dracocephalum* total flavoes in treatment for atherosclerosis.

[收稿日期] 20110118(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81160525)

[通讯作者] * 彭克军, 副教授, Tel:028-68289237, E-mail: pengkejungym@163.com

[**Key words**] *Dracocephalum* total flavoies; vascular smooth muscle cell; TNF- α ; proliferation

香青兰 *Dracocephalum moldovica* L, 为唇形科青兰属植物, 是维吾尔民族药之一, 主要用于治疗冠心病及高血压、心绞痛、动脉粥样硬化、心肌缺血等疾病^[1-2]。其主要化学成分有黄酮类、挥发油、萜类、氨基酸、微量元素及多肽等^[3], 其中黄酮类化合物具有降血脂、抑制血小板聚集及保肝、抗炎等作用^[4]。本文通过研究香青兰总黄酮对 TNF- α 诱导的大鼠动脉血管平滑肌细胞增殖的影响, 探讨其在临床治疗动脉粥样硬化中的可能药效机制。

1 材料

1.1 仪器与试剂 倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司), CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司), 酶标仪(美国 BIO-RAD 公司), 香青兰总黄酮(总黄酮含量为 57%, 新疆加斯特药业, 批号 20100708)。DMEM 高糖培养基和胎牛血清(Gibco 公司), MTT(Sigma), 抗鼠 α -SMA 抗体(批号 201008), 鼠抗 PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen, 批号 201007), 抗体 SABC-Cy3(批号 201008), SABC 免疫组化试剂盒(批号 201008), 均购自武汉博士德生物工程有限公司, 重组大鼠 TNF- α (美国 PeproTech 公司)。

1.2 动物 SPF 级健康雄性 Wistar 大鼠, 体重 150 ~ 180 g, 购自新疆医科大学实验动物中心, 合格证号新医动字第 2003-0001 号。

2 方法

2.1 大鼠 VSMC 培养及纯度鉴定 取大鼠 1 只, 脱臼处死后在 75% 乙醇中浸泡 5 min, 沿腹中线切开皮肤, 暴露胸腔和腹腔, 取出胸主动脉, 小心剥去外膜, 刮下内膜, 贴块法植入 2% 明胶包被的培养瓶中, 加入含有 20% 胎牛血清及 1 万 U·L⁻¹ 青霉素、100 mg·L⁻¹ 链霉素的 DMEM 高糖培养基, 置于 5% CO₂, 37 °C 培养箱中进行培养, 3 d 换液 1 次, 待细胞生长接近融合时按 1:3 传代。倒置显微镜下观察细胞形态, 并制作细胞爬片, 以抗鼠 α -SMA 抗体作为一抗, 采用 SABC-Cy3 荧光免疫组织化学法染色技术对培养的 VSMC 进行纯度鉴定, 荧光显微镜下红色荧光代表 α -SMA 抗原阳性。

2.2 实验细胞分组 细胞均按 2×10^5 /mL 的密度接种于培养板中, 待细胞约 80% 汇合时, 换用无胎牛血清的 DMEM 高糖培养基继续培养 12 h, 随机分为空白对照组(未加任何干预因素), TNF- α 刺激组

(20 μ g·L⁻¹), TNF- α + 不同质量浓度香青兰总黄酮组(25, 50, 100 mg·L⁻¹), 继续培养 24 h 后进行以下检测。

2.3 细胞活力实验 采用台盼蓝染色细胞计数法, 结果发现本研究所用浓度的香青兰总黄酮对 VSMC 生长无任何毒性, 细胞存活率达 95% 以上。

2.4 检测细胞的增殖 将各组细胞分别接种于 96 孔板中, 每组 6 个复孔, 每孔加入 200 μ L, 培养 24 h 后, 弃去培养液上清, 每孔加入含 5 g·L⁻¹ 的 MTT 溶液 10 μ L, 继续培养 4 h 后, 弃去 MTT 上清, PBS 洗涤 3 次, 每孔加入溶解液 DMSO 100 μ L, 振荡 5 ~ 10 min, 待结晶完全溶解, 酶标仪检测 A_{490 nm}。

2.5 检测细胞中 PCNA 分子的表达水平 取各组细胞爬片, 用 4% 多聚甲醛固定, 0.5% Triton-X 处理细胞, 3% H₂O₂ 灭活内源性酶, 正常血清封闭, 以鼠抗 PCNA 抗体作为一抗(阴性对照用正常鼠源血清代替一抗), 生物素化羊抗鼠 IgG 作为二抗, 先后孵育后再滴加 SABC 工作液, 最后以 DAB 显色, 苏木素轻度复染, 常规脱水、透明及封闭后于显微镜下观察。PCNA 以细胞核被染成棕黄色为阳性, 每张爬片随机选取 6 个视野, 通过计数 PCNA 阳性细胞数占视野总细胞数的百分比, 计算细胞中 PCNA 分子的表达水平。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 10.0 统计学软件处理, 所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较用单因素方差分析, 两两比较用 q 检验, 率的检验采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

3 结果与分析

3.1 VSMC 培养及纯度鉴定 倒置显微镜下观察, 培养细胞呈梭形, 长至融合状态时呈现典型的“峰”与“谷”特征。细胞爬片以抗 α -SMA 单克隆抗体作免疫组化 SABC-Cy3 荧光染色后, 可见 95% 以上的细胞在荧光显微镜下呈红色荧光(见图 1)。

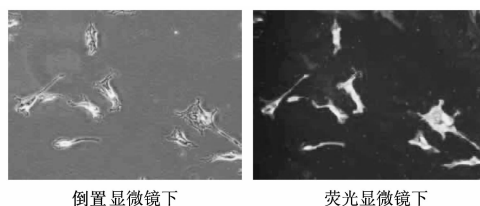


图 1 培养平滑肌细胞的纯度鉴定($\times 200$)

3.2 对 TNF- α 诱导 VSMC 增殖的影响 TNF- α 作用 VSMC 后,与空白组比较显著刺激了 VSMC 的增殖,而不同浓度的香青兰总黄酮对 TNF- α 诱导的 VSMC 增殖具有不同程度的抑制作用,且表现出一定的剂量依赖关系趋势(见表 1)。

表 1 香青兰总黄酮对 TNF- α 诱导大鼠 VSMC 增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	药物终质量浓度 /mg·L ⁻¹	VSMC 增殖 /A
空白对照	-	0.573 ± 0.049 ²⁾
TNF- α	0.02	0.769 ± 0.066
TNF- α + 香青兰总黄酮 ³⁾	25	0.670 ± 0.057 ¹⁾
	50	0.643 ± 0.060 ²⁾
	100	0.630 ± 0.047 ²⁾

注:与 TNF- α 组相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; ³⁾ TNF- α 终质量浓度 0.02 mg·L⁻¹(表 2 同)。

3.3 对 TNF- α 诱导 VSMC 中 PCNA 分子表达的影响 免疫组化结果显示,空白对照组 VSMC 在没有任何干预下,PCNA 阳性细胞所占比例较少,在 TNF- α 刺激后 PCNA 阳性细胞比例显著增多,而不同浓度的香青兰总黄酮均对 TNF- α 诱导的 PCNA 分子表达具有不同程度的抑制作用,且表现出一定的剂量依赖关系趋势(见表 2)。

表 2 香青兰总黄酮对 TNF- α 诱导 VSMC 中 PCNA 分子表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	药物终质量浓度 /mg·L ⁻¹	PCNA 阳性率 /%
空白对照	-	31.4 ± 3.50 ²⁾
TNF- α	0.02	58.3 ± 6.44
TNF- α + 香青兰总黄酮 ³⁾	25	52.0 ± 4.57
	50	48.6 ± 3.91 ¹⁾
	100	40.0 ± 3.48 ²⁾

4 讨论

动脉粥样硬化的炎症学说已成为阐述动脉粥样硬化发病机制的一个重要学说,该学说认为动脉粥样硬化是以慢性炎症过程为基础,炎症细胞因子、血管内皮细胞、血管平滑肌细胞及免疫因素等环节共同参与的复杂发生发展过程^[5]。其中,TNF- α 是一种重要的前炎性细胞因子,出现在炎症早期,由多种炎症细胞释放,具有多种生物学活性,如趋化、活化中性粒细胞和单核细胞,促进 VSMC 的分裂、增殖和迁移等^[6]。

香青兰作为新疆传统治疗心血管疾病的天然药

物,但其药理作用机制仍不十分清楚。由于平滑肌细胞的增殖是动脉粥样硬化形成和发展过程中的重要环节,本研究采用体外培养的大鼠主动脉 VSMC 为模型,探讨香青兰对 TNF- α 诱导的 VSMC 增殖的影响。

本实验结果显示,香青兰总黄酮可有效抑制 TNF- α 诱导的大鼠主动脉 VSMC 的增殖能力,表现出一定的剂量依赖关系趋势。由于本研究使用的香青兰总黄酮药物浓度范围内对细胞贴壁无影响,台盼蓝染色显示细胞存活率达 95% 以上,因此可以排除其对 VSMC 增殖的抑制作用是由于药物自身毒性的原因。

PCNA 作为一种核蛋白,其表达为细胞进入细胞周期进行 DNA 复制和分裂增殖所必需,表达水平与细胞增殖程度成正比,检测 PCNA 是评价细胞增殖状态的可靠指标^[7]。本研究发现,VSMC 在 TNF- α 的刺激下,其细胞核中 PCNA 的表达水平明显增强,但香青兰总黄酮在一定剂量下可显著抑制 TNF- α 的这种刺激作用,进一步说明香青兰总黄酮可抑制 TNF- α 诱导的 VSMC 增殖效应。因此本研究充分表明,香青兰总黄酮通过抑制 TNF- α 对 VSMC 的增殖作用,可能是其治疗动脉粥样硬化的药效机制之一。

[参考文献]

- [1] 亚森·吐尔逊,田如玮. 中华人民共和国卫生部药品标准[S]. 维吾尔药分册,乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1999:181.
- [2] 麦路德木,麦麦吐逊,李敏,胡君萍,等. 益心巴迪然吉布亚(香青兰)颗粒中总黄酮含量测定[J]. 新疆医科大学学报,2009,32(5):568.
- [3] 冯长根,李琼. 香青兰化学成分研究[J]. 中成药,2006,28(1):94.
- [4] 张丽,贺金华,王新堂. 香青兰中总黄酮的纯化与含量测定[J]. 新疆中医药,2009,27(2):67.
- [5] Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease[J]. N Engl J Med, 1999,340(2):115.
- [6] Zhang H, Park Y, Wu J, et al. Role of TNF- α in vascular dysfunction[J]. Clin Sci, 2009,116(3):219.
- [7] Naryzhny S N. Proliferating cell nuclear antigen: a proteomics view [J]. Cell Mol Life Sci, 2008, 65(23):3789.

[责任编辑 聂淑琴]