

4 种活血化瘀中药有效成分对血管紧张素 II 诱导的血管外膜成纤维细胞增殖及胶原合成的影响

鹿燕敏, 李兰芳, 霍海如, 谭余庆*
(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 体外观察盐酸川芎嗪、葛根素、丹参酮 II_A、丹皮酚对血管紧张素 II(ANG- II) 诱导的大鼠血管外膜成纤维细胞(VAF) 的增殖及胶原蛋白合成的影响。方法: MTT 法检测细胞增殖活性; 羟脯氨酸比色法测定细胞培养上清液中胶原蛋白含量。结果: 4 种中药成分能够显著降低 ANG- II 诱导的 VAF 增殖及细胞培养上清液中羟脯氨酸含量。结论: 盐酸川芎嗪、葛根素、丹参酮 II_A、丹皮酚能够抑制 ANG- II 诱导的 VAF 增殖和胶原合成。

[关键词] 胶原合成; 成纤维细胞; 中药有效成分; 血管紧张素- II

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)11-0068-03

Effects of Four Active Components from Traditional Herbs on the Proliferation and Collagen Synthesis of Rat Vascular Adventitial Fibroblasts Induced by Angiotensin II

LU Yan-min, LI Lan-fang, HUO Hai-ru, TAN Yu-qing*

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** The purpose of this study is to explore the effects of four active components from traditional herbs including tetramethylpyrazine, puerarin, tanshinone II_A and paeonol on the proliferation and collagen synthesis of vascular adventitial fibroblasts(VAF) induced by angiotensin II(ANG- II). **Methods:** MTT assay was used for observing cell proliferation, and hydroxyproline chromatometry was used for detecting collagen synthesis. **Results:** These four herbs significantly decreased the proliferation rate and the amount of hydroxyproline of VAF components from respectively. **Conclusions:** Tetramethylpyrazine, puerarin, tanshinone II_A and paeonol could decrease the proliferation and collagen synthesis of VAF.

[Key words] collagen synthesis; fibroblasts; active components of traditional herbs; angiotensin II

血管成形术后再狭窄严重影响了心脏介入治疗的远期疗效。目前认为再狭窄的发生过程早期主要是内膜撕裂, 血小板黏附聚集导致血栓形成, 以及血管痉挛或弹性回缩; 中后期为血管平滑肌细胞, 成纤维细胞增殖及细胞外基质堆积^[1]。血管外膜成纤维

细胞(vascular adventitial fibroblasts, VAF) 的异常增殖及胶原的过度沉积参与了血管纤维化及再狭窄过程^[2]。临床证明活血化瘀中药对心血管疾病的防治有很好的疗效, 本实验探讨盐酸川芎嗪、葛根素、丹参酮 II_A、丹皮酚 4 种活血化瘀中药有效成分对血管紧张素 II(angiotensin II, ANG- II) 诱导的 VAF 的增殖及胶原合成的作用, 以期揭示活血化瘀中药在防治血管再狭窄可能的作用机理。

1 材料与仪器

[收稿日期] 2008-03-17

[通讯作者] * 谭余庆, Tel: (010) 64011599; E-mail: tanyq@263.net

1.1 试药 盐酸川芎嗪(批号: 110817-200305), 葛根素(批号: 110752-200511), 丹参酮 II_A(批号: 110766-200417), 丹皮酚(批号: 110708-200505), 购自中国药品生物制品检定所, ANG- II (CALBIOCHEM, 批号: B77445), DMEM 高糖液体培养基(北京天润善达生物科技有限责任公司, 批号: 12803), 优级新生牛血清(GIBCO, 批号: 613551)、胰蛋白酶为(GIBCO, 批号: 27250-018), 噻唑蓝(CORNING, 批号: 102227), DMSO(Dimethyl Sulfoxide, PIERCE, 批号: GF98991), 羟脯氨酸试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号: 200712224)。

1.2 仪器 酶标仪为美国 BIO-RAD 公司产品; 紫外分光光度计为美国 BECKMAN 公司产品。

2 方法

2.1 细胞的原代培养 采用组织块贴壁培养法, 大鼠断头处死, 75% 乙醇浸泡 5 min, 无菌条件下取胸主动脉, 放入无菌预冷的 PBS 中, 清洗后纵向剖开血管腔, 刮去血管内膜和中膜, 剩下薄层的血管外膜, 转移入含有 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 剪成约 1 mm² 小块, 吸弃多余的培养基, 将组织块均匀铺于培养皿上, 置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱干涸 24 h, 待组织块贴壁后向培养皿中滴加少量含有 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中, 1 次/2 d 更换培养液, 待细胞生长达到 70% ~ 80% 融合状态时, 用 0.25% 胰酶消化细胞, 以 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基传代培养。实验取第(3~ 5)代细胞。

2.2 细胞增殖活性的检测 采用噻唑盐比色法(MTT 法)。将 VAF 消化吹打成单细胞悬液, 调整细胞浓度为 2 × 10⁴ 个·mL⁻¹, 接种于 96 孔培养板, 每孔 200 μL。置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养, 待细胞贴壁生长后, 将细胞分为细胞对照组, 模型组(ANG- II 终浓度为 1 × 10⁻⁷ mol·L⁻¹), 以及加药组, 每组 5 个复孔。配制药物使其终浓度分别为: 盐酸川芎嗪(5.0 × 10⁰ ~ 8.0 × 10²) mg·L⁻¹, 葛根素: (2.5 × 10⁰ ~ 4.0 × 10²) mg·L⁻¹, 丹参酮 II_A(2.5 × 10⁻² ~ 4.0 × 10⁰) mg·L⁻¹, 丹皮酚(2.5 × 10⁰ ~ 4.0 × 10²) mg·L⁻¹。培养箱培养 24 h 后检测 MTT, 具体步骤如下: 每孔加入 5 mg·mL⁻¹ MTT 溶液 20 μL, 置于培养箱中继续培养 4 h 后, 弃去上清, 每孔加入 200 μL DMSO, 酶标仪检测 490 nm 波长处吸光值(A 值)。

2.3 胶原合成量的测定 采用羟脯氨酸试剂盒法

测定。将 VAF 消化吹打成单细胞悬液, 调整细胞浓度为 5 × 10⁴ 个·mL⁻¹, 接种于 24 孔培养板, 每孔 1 mL。置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养, 待细胞贴壁后, 更换无血清 DMEM 培养基继续培养 24 h。按上述分组方案分别加入 ANG- II 和药物, 使终浓度同上, 每组设 5 个复孔。培养箱培养 48 h 后吸取各孔上清液, 根据羟脯氨酸试剂盒测试方法操作, 紫外分光光度计测各孔上清液吸光度, 计算羟脯氨酸含量。

2.4 统计方法 结果以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间差异比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 细胞培养观察 血管外膜组织块干涸 24 h 后贴附于培养皿底部, 第(3~ 4)天可见长梭形的细胞从组织块边缘萌出, 显微镜下观察细胞呈梭形或多角形, 之后迅速增殖, 1 周左右即可长至融合状态, 胰酶消化进行传代培养, 传代后细胞表现为优势生长, 呈放射状或网状交织走行。细胞经两次传代后即可达到纯化, 台盼兰染色活力大于 97%。

3.2 对 VAF 增殖的影响 实验结果显示, ANG- II 刺激 VAF 24 h 后细胞增殖明显, 与对照组比较差异显著($P < 0.01$), 4 种药物在所选浓度范围内能够抑制 ANG- II 诱导的 VAF 增殖, 与 ANG- II 组比较有统计学差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 结果见表 1。

3.3 对 VAF 胶原合成的影响 羟脯氨酸含量测定显示, ANG- II 刺激 VAF 48 h 后细胞培养上清液羟脯氨酸含量明显增多, 与对照组比较有统计学差异($P < 0.01$), 4 种药物在上述浓度范围内能够抑制 ANG- II 诱导的 VAF 羟脯氨酸的增多, 与 ANG- II 组比较有统计学差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 结果见表 1。

4 讨论

血管损伤后再狭窄涉及许多复杂的病理过程, 包括内皮细胞分泌细胞因子, 平滑肌细胞增殖, 血小板活化, 细胞外基质合成降解失调等, 所以在治疗过程中应寻求多方面综合调节, 中药具有多途径多靶点整合作用的特点, 对防治血管再狭窄具有较好效果。川芎嗪、葛根素、丹参酮 II_A、丹皮酚分别为川芎、葛根、丹参、丹皮活血化瘀的有效成分, 现代药理研究证实其具有保护血管内皮细胞、抑制平滑肌细胞增殖、抑制血小板聚集等作用^[3-6], 但其是否对 VAF 起作用, 以及对胶原合成是否有影响尚未见到相关文献报道。

羟脯氨酸是合成胶原蛋白的主要成分, 在胶原

表 1 药物对 ANG- II 刺激下的 VAF 增殖作用和胶原合成的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

分组	药物浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞增殖 (A 值)	胶原合成(羟脯氨酸)($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
对照组	—	0.392 ± 0.016 ²⁾	0.743 ± 0.028 ²⁾
ANG- II	$1 \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.543 ± 0.031	0.893 ± 0.033
盐酸川芎嗪	5.0×10^0	0.378 ± 0.021 ²⁾	0.827 ± 0.031 ¹⁾
	2.0×10^1	0.375 ± 0.016 ²⁾	0.788 ± 0.036 ²⁾
	1.0×10^2	0.368 ± 0.022 ²⁾	0.779 ± 0.029 ²⁾
	4.0×10^2	0.371 ± 0.022 ²⁾	0.760 ± 0.043 ²⁾
	8.0×10^2	0.363 ± 0.034 ²⁾	0.737 ± 0.037 ²⁾
葛根素	2.5×10^0	0.360 ± 0.024 ²⁾	0.816 ± 0.046 ¹⁾
	1.0×10^1	0.341 ± 0.015 ²⁾	0.809 ± 0.025 ¹⁾
	4.0×10^1	0.340 ± 0.024 ²⁾	0.785 ± 0.034 ²⁾
	1.6×10^2	0.344 ± 0.023 ²⁾	0.753 ± 0.040 ²⁾
丹参酮 II _A	6.4×10^2	0.328 ± 0.021 ²⁾	0.736 ± 0.024 ²⁾
	2.5×10^{-2}	0.468 ± 0.032 ¹⁾	0.754 ± 0.031 ²⁾
	1.0×10^{-1}	0.353 ± 0.026 ²⁾	0.752 ± 0.029 ²⁾
	5.0×10^{-1}	0.346 ± 0.031 ²⁾	0.753 ± 0.037 ²⁾
丹皮酚	2.0×10^0	0.345 ± 0.025 ²⁾	0.750 ± 0.034 ²⁾
	4.0×10^0	0.332 ± 0.028 ²⁾	0.747 ± 0.031 ²⁾
	5.0×10^0	0.395 ± 0.029 ²⁾	0.788 ± 0.039 ²⁾
	2.5×10^1	0.360 ± 0.023 ²⁾	0.764 ± 0.043 ²⁾
	1.0×10^2	0.345 ± 0.030 ²⁾	0.745 ± 0.035 ²⁾
	2.0×10^2	0.339 ± 0.031 ²⁾	0.742 ± 0.041 ²⁾
	4.0×10^2	0.334 ± 0.026 ²⁾	0.738 ± 0.030 ²⁾

注: 与 ANG- II 组比较 ¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.01$

中的含量比较稳定, 胶原含量的测定常采用羟脯氨酸法, 间接反映其胶原蛋白的含量^[7]。预实验研究发现这些中药成分在无毒剂量范围内对正常的 VAF 增殖及胶原合成作用不明显, 推测这些中药对生理状态下的血管作用微弱, 因此采用 ANG- II 刺激细胞以模拟血管损伤时的病理变化。文献报道血管损伤后, 局部 ANG- II 分泌增加, 能够诱导 VAF 增殖^[8], 在

促狭窄形成过程中起重要作用^[9]。本实验也证实了 ANG- II 对 VAF 有明显的促增殖及促胶原合成的作用。

通过实验我们得出结论, 盐酸川芎嗪、葛根素、丹参酮 II_A、丹皮酚具有明显的抑制病理状态下 VAF 增殖和胶原合成的作用。推断这可能是活血化瘀中药有效成分防治血管再狭窄的作用机制之一。

[参考文献]

[1] 张文高, 邵念方, 管昌益, 等. 中医药防治经皮腔内冠状动脉成形术后再狭窄的现状和思路[J]. 山东中医药大学学报, 2000, 24(1): 7-9.

[2] Sartore S, Chiavegato A, Faggini E, *et al.* Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant [J]. *Circ Res.*, 2001, 89(12): 1111-1121.

[3] 郑红花, 罗德生, 李映红, 等. 川芎嗪对 Ang II 诱导的大鼠 VSMCs 增殖的干预作用[J]. 解放军医学杂志, 2006, 31(11): 1082-1086.

[4] 许轶洲, 王宁夫, 李佩璋, 等. 葛根素对凝血酶诱导的血管平滑肌细胞增殖的影响[J]. 中华医学杂志, 2006, 86(7): 476-480.

[5] 戴敏, 李后开. 丹皮酚对动脉粥样硬化家兔血管平滑肌细胞增殖的影响[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(5): 587-591.

[6] 李新荣, 李艳平, 邓湘蕾, 等. 丹参酮 II_A 对大鼠血管平滑肌细胞的增殖作用[J]. 中国临床康复, 2006, 10(31): 55-58.

[7] Edwards CA, O'Brien WD Jr. Modified assay for determination of hydroxyproline in a tissue hydrolyzate [J]. *Clin Chim Acta*, 1980, 104(2): 161-167.

[8] An SJ, Boyd R, Wang Y, *et al.* Endothelin-1 expression in vascular adventitial fibroblasts [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 2006, 290(2): 700-708.

[9] Russo F, Marci M, Raffa S. Physiopathology of angiotensin II and vascular lesion [J]. *Clin Ter.*, 1997, 148(11): 537-541.