

• 药理 •

## 固本化痰通脉方含药血清对大鼠血管平滑肌细胞增殖及细胞周期素 D<sub>1</sub> 的影响

王平\*, 程静, 田代志, 邹小娟, 刘松林, 程方平  
(湖北中医学院老年医学研究所, 湖北 武汉 430061)

[摘要] 目的: 观察固本化痰通脉方对大鼠血管平滑肌细胞生长增殖、细胞周期及细胞周期素 D<sub>1</sub> 表达的影响, 以探讨其作用机制。方法: 血小板源生长因子 BB(PDGF-BB) 刺激体外培养的大鼠血管平滑肌细胞使其快速增殖生长, 加入不同浓度的固本化痰通脉方含药血清作用一定时间后, 通过 MTT 法测定其对血管平滑肌细胞生长的抑制率, 流式细胞技术测定细胞周期及细胞周期素 D<sub>1</sub> 的表达。结果: 固本化痰通脉方能明显抑制 PDGF-BB 刺激的血管平滑肌细胞增殖, 还以浓度依赖方式减少 S 期细胞、阻滞细胞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期, 并下调细胞周期素 D<sub>1</sub> 的表达。结论: 固本化痰通脉方能抑制血管平滑肌细胞的增殖生长, 阻滞细胞周期的进行, 因而可能具有抗动脉粥样硬化的作用, 其作用机理可能与调控血管平滑肌细胞细胞周期素 D<sub>1</sub> 的活性有关。

[关键词] 血管平滑肌细胞; 细胞周期; 细胞周期素 D<sub>1</sub>

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)09-0022-04

### Effect of Guben Huatan Tongmai Recipe on Expression of Cyclin D<sub>1</sub> and the Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells Caused by PDGF-BB Stimulation in Rat

WANG Ping\*, CHENG Jing, TIAN Dai-zhi, ZOU Xiao-juan, LIU Song-lin, CHENG Fang-ping  
(Institute of Geratology, Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Guben Huatan Tongmai Recipe (GHTR) on the proliferation, cell cycle and cyclin D<sub>1</sub> activity of vascular smooth muscle cells (VSMCs) in rat in order to find out the mechanism of its action. **Methods:** In this study, cell culture technique was used in vitro. VSMCs stimulated by platelet derived growth factor BB (PDGF-BB) were treated by GHTR in different concentration for a certain period, then the inhibitory ratio of cell proliferation was measured by MTT, cell cycle distribution and cyclin D<sub>1</sub> activity of the cells were observed by Flow-Cytometry respectively. **Results:** GHTR could obviously inhibit the proliferation of VSMCs stimulated by PDGF-BB, and it could also decrease S phase cells, increase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase cells and down-regulate cyclin D<sub>1</sub> activity of VSMCs in concentration-dependent fashion, and the results were significant compared with the normal serum plus PDGF-BB-treated. **Conclusion:** GHTR could obviously inhibit the proliferation of VSMCs and may prevent atherosclerosis, which mechanism may be realized by regulating cyclin D<sub>1</sub> activity of VSMC.

[Key words] vascular smooth muscle cell; cell cycle; cyclin D<sub>1</sub>

[收稿日期] 2006-11-03

[基金项目] 国家自然科学基金资助(30271566)

[通讯作者] \* 王平, Tel: (027) 68890008; E-mail: Pwang54@yahoo.com.cn

在动脉粥样硬化的发病中,血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)的异常增殖迁移和表型改变是其关键环节<sup>[1]</sup>,因此,以血管平滑肌细胞为细胞模型筛选出有效抑制其增殖生长而毒副作用较低的药物并研究其作用机制,是近年来医学研究的难点和热点之一。固本化痰通脉方(Guben Huatan Tongmai Recipe, GHTR)是临床防治动脉粥样硬化的有效方。前期实验研究结果显示<sup>[2]</sup>,固本化痰通脉方能抑制主动脉内皮巨噬细胞和黏附分子的表达,提示其有保护血管壁作用。本研究在已有的研究基础上,采用血小板源生长因子 BB(PDGF-BB)刺激体外培养的大鼠血管平滑肌细胞,使其快速增殖,观察固本化痰通脉方对大鼠血管平滑肌细胞增殖,细胞周期及细胞周期素 D<sub>1</sub> 的影响,以探讨其防治动脉粥样硬化的作用机理。

## 1 材料

**1.1 实验动物** 健康 Wistar 雄性大鼠,清洁级,20 只,体重 180~200 g,由湖北省实验动物研究中心提供,合格证号:SCXK(鄂)2003-0005。

**1.2 药品及试剂** 固本化痰通脉方中药(何首乌 20 g,党参 10 g,枸杞 10 g,橘红 5 g,决明子 10g,苍术 15g,薏苡 15 g,山楂 10 g,荷叶 15g)购自湖北中医学院附属医院门诊部,取上述药物 1 剂,用蒸馏水浸泡 30 min 后,水煎 2 次,合并药液,过滤,分别浓缩至每 1 mL 相当于 1.98 g 生药(高剂量组),每 1 mL 相当于 0.99 g 生药(低剂量组)。PDGF-BB(纯度为 97%)购自美国 Sigma 公司,批号:20060311,α-actin 单克隆抗体购自美国 Sigma 公司,批号:20051106,胎牛血清购自武汉三利生物技术有限公司,小鼠抗大鼠 cyclin D<sub>1</sub> 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,分装试剂。其他试剂均为市售分析纯。

**1.3 仪器** 酶标仪(芬兰 Thermol Labsystems),流式细胞仪(美国 BD 公司 FACSCalibur),恒温 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国谢尔登公司),超净工作台(苏州净化设备有限公司),倒置相差显微镜(日本 OLYMPUS-CK<sub>2</sub>)。

## 2 实验方法

**2.1 血管平滑肌细胞的原代培养及鉴定** 无菌条件下取出 Wistar 大鼠的主动脉,将血管中膜剪成 1 mm 大小的组织块,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM,置于 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 培养箱中培养。细胞传至第 3 代时,用抗 α-actin 单克隆抗体鉴定 VSMC。取第 4~5 代血管平滑肌细胞用于实验。

**2.2 含药血清与正常血清的制备** 大鼠随机分为三组:固本化痰通脉方高剂量组、低剂量组和正常血清组,每组 5 只。按人与大鼠体表面积换算法及血清药理学实验方法<sup>[3]</sup>,高剂量组和低剂量组大鼠分别给予水煎剂按 19.8 g 生药·kg<sup>-1</sup>, 9.9 g 生药·kg<sup>-1</sup> 灌胃,正常血清组灌以等容积的生理盐水,每天 1 次,共 7 次。末次给药后 1 h(给药前 12 h 禁食禁饮水),无菌操作从大鼠颈动脉取血,4 °C 静置 1 h,3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min 取得血清,将同组大鼠血清混匀,56 °C,30 min 灭活处理。用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,-20 °C 保存备用。

**2.3 细胞分组及用药** 随机将接种细胞分为以下 5 组:空白对照组、PDGF-BB 刺激组、高含药血清处理组、低含药血清处理组、正常血清处理组。PDGF-BB 用 DMEM 培养基溶解,调整其浓度为 100 ng·mL<sup>-1</sup>。各组用药比例如表 1。

表 1 不同实验组加药情况表(μL/孔)

组别	空白对照组	PDGF-BB 刺激组	高含药组	低含药组	正常血清组
DMEM	180	140	140	140	140
PDGF-BB	—	40	40	40	40
胎牛血清	20	20	—	—	—
含药血清	—	—	20	20	—
正常血清	—	—	—	—	20

每一剂量 8 个复孔,PDGF-BB 终浓度 20 ng/mL。用流式细胞仪测细胞周期及细胞周期素 D<sub>1</sub> 用药比例同上,剂量为上述剂量的 10 倍。

**2.4 含药血清药物含量计算方法<sup>[3]</sup>**

含药血清药物含量(g 生药·kg<sup>-1</sup> 体重·U<sup>-1</sup>) = 动物每公斤体重给药剂量(g 生药·kg<sup>-1</sup> 体重)

含药血清在体外实验系统的稀释倍数(U)

如:本实验中大鼠每日公斤体重给药剂量为 19.8 g 生药/kg 体重,高剂量组每孔加 20 μL 含药血清,每孔终体积为 200 μL,稀释了 10 倍,则其含药血清药物含量为 19.8/10= 1.98 g 生药·kg<sup>-1</sup> 体重,其他剂量依此类推。

**2.5 细胞增殖的检测** 采用 MTT 法测定。取第 4~5 代血管平滑肌细胞,以每孔 10<sup>4</sup> 个细胞密度接种于 96 孔板,细胞贴壁后,用含 0.5% 胎牛血清 DMEM 液培养 24 h,使细胞同步于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期。将细胞按上述分组用药,每组 8 孔,置 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 培养箱中培养 24 h 后,吸弃上清,每孔加入 10% 胎牛血清 DMEM

100  $\mu$ L, MTT 液 50  $\mu$ L ( $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , PBS 配制), 置培养箱中继续培养 4 h, 吸弃上清, 每孔加入 DMSO 150  $\mu$ L, 振荡器上摇匀 10 min, 在吸收波长 570 nm 条件下测定 A 值。

**2.6 细胞周期及细胞周期素 D<sub>1</sub><sup>[4]</sup> 的检测** 将生长良好第 4~5 代细胞以  $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$  密度接种于 6 孔板, 每孔用 2 mL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养 24 h, 细胞贴壁后, 换以含 0.5% 胎牛血清的 DMEM 继续培养 24 h。随机将接种细胞分为 A、B 两组, 每组 40 孔。将 A 组细胞按上述分组, 分为 5 组, 每组 8 孔。用药后置 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 培养箱中培养 24 h。用 0.25% 胰蛋白酶消化, 将收集细胞用 4 °C PBS 洗涤 2 次, 加入 70% 冰乙醇 1 mL, 4 °C 冰箱过夜。将固定细胞用 PBS 洗涤 2 次,  $10 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$  PI 0.3 mL 室温避光染色 30 min 后, 300 目尼龙网过滤, 通过流式细胞仪检测细胞周期。B 组细胞同样分成 5 组, 每组 8 孔, 用药后置 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 培养箱中培养 24 h。用 0.25% 胰蛋白酶消化, 将收集细胞用 4 °C PBS 洗涤 2 次, 加入 70% 冰乙醇 1 mL, 4 °C 冰箱存放 4 h。将固定细胞分别用 PBS 洗涤 2 次后加  $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  triton X-100 冰上处理 5 min, 再用 PBS 洗 2 次, 加入  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  BSA 稀释的 Cyclin D<sub>1</sub> 抗体(滴度 1:100), 4 °C 冰箱过夜。加入 FITC 标记的二抗(滴度 1:100) 37 °C 孵育 30 min。用 PBS 洗 2 次, 加入  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  PI 0.3 mL, 室温下染色 20 min, 通过流式细胞仪测定细胞周期素 D<sub>1</sub> 蛋白表达。

**2.7 统计方法** 所有检测结果以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。采用 SPSS11 软件统计分析, 组间比较采用单因素方差分析。

### 3 结果

**3.1 血管平滑肌细胞原代细胞的形态及鉴定** 光镜下可见细胞呈梭形或长梭形, 放射性生长, 细胞平行排列成束, 相互穿插, 呈现平滑肌细胞典型的“峰”, “谷”状生长。肌动蛋白免疫细胞化学染色, 光镜下见胞浆被染成棕黄色, 胞浆中有丰富的肌丝及与肌丝相连的致密体, 细胞周缘有基膜。随机选 20 个视野, 每个视野计数 100 个细胞, 阳性细胞达 95%, 表明培养细胞经 3 次传代后细胞纯度较高。

**3.2 固本化痰通脉方对 PDGF-BB 刺激的大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响** PDGF-BB 可刺激血管平滑肌细胞的增殖, PDGF-BB 组的血管平滑肌细胞对 MTT 的代谢率较空白对照组有所增加(见表 2), 固

本化痰通脉方高剂量组与正常血清处理组比较, 对 MTT 的代谢率较低, 说明固本化痰通脉方可抑制 PDGF-BB 对血管平滑肌细胞的刺激所产生的增殖作用。

表 2 固本化痰通脉方对 PDGF-BB 诱导 VSMCs 增殖活性的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	PDGF-BB 浓度 ( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	给药剂量 (g 生药 $\cdot \text{kg}^{-1}$ )	A 值
空白对照组	—	—	0.696 $\pm$ 0.036
PDGF-BB 组	20	—	0.797 $\pm$ 0.019 <sup>1)</sup>
固本高量组	20	1.98	0.526 $\pm$ 0.024 <sup>2)</sup>
固本低量组	20	0.99	0.672 $\pm$ 0.042 <sup>2)</sup>
正常血清组	20	—	0.782 $\pm$ 0.007

注: 与空白对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与正常血清组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$  (下同)

**3.2 固本化痰通脉方对细胞周期分布及细胞周期素 D<sub>1</sub> 表达的影响** 正常血清处理组与固本化痰通脉方低剂量组在各期细胞所占的比例有所差异, 正常血清组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞所占比例较固本化痰通脉方低剂量组少, 而合成增殖的 S 期细胞较之增多, 同时与固本化痰通脉方高剂量组比较也有所差异(见表 3), 说明固本化痰通脉方可抑制细胞周期的进行, 而且这种抑制作用与浓度存在依赖关系。对于细胞周期素 D<sub>1</sub> 的表达率, PDGF-BB 组与空白对照组有明显差异, 而且固本化痰通脉方高剂量组的表达率较正常血清处理组低, 说明固本化痰通脉方可下调细胞周期素 D<sub>1</sub> 的表达。

表 3 固本化痰通脉方对 PDGF-BB 诱导 VSMCs 细胞周期及 cyclin D<sub>1</sub> 表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	细胞周期(%)			CyclinD <sub>1</sub> 表达率(%)
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	
空白对照组	78.42 $\pm$ 2.31	10.61 $\pm$ 1.87	8.95 $\pm$ 0.77	34.16 $\pm$ 1.12
PDGF-BB 组	67.16 $\pm$ 1.83 <sup>1)</sup>	17.12 $\pm$ 0.69 <sup>1)</sup>	11.63 $\pm$ 4.14	37.72 $\pm$ 1.76 <sup>1)</sup>
固本高量组	74.12 $\pm$ 2.97 <sup>2)</sup>	11.69 $\pm$ 3.13 <sup>2)</sup>	8.36 $\pm$ 1.71	30.31 $\pm$ 0.93 <sup>2)</sup>
固本低量组	71.31 $\pm$ 1.07 <sup>2)</sup>	13.42 $\pm$ 2.11 <sup>2)</sup>	10.93 $\pm$ 3.62	32.56 $\pm$ 2.15 <sup>2)</sup>
正常血清组	69.34 $\pm$ 0.97	18.63 $\pm$ 0.42	10.93 $\pm$ 0.98	35.43 $\pm$ 0.07

### 4 讨论

血管平滑肌细胞的异常增殖是血管增殖性疾病发生的关键所在, 因此, 抑制血管平滑肌细胞的异常增殖在预防和治疗动脉粥样硬化中尤为重要。有研究证据表明<sup>[5,6]</sup>, 细胞周期对细胞生命活动至关重要, 调节着细胞的增殖、分化和凋亡。通过对细胞周

期的调控,抑制 VSMCs 细胞异常增殖,可能是防治动脉粥样硬化的一个潜在有效的途径。

细胞周期的调控其实也就是细胞周期限制点的调控,是多因素参与的过程。细胞周期中存在两个限制点,一个限制点在 DNA 合成开始,即 G<sub>1</sub>/S 限制点。另一个在有丝分裂开始,即 G<sub>2</sub>/M 限制点。其中 G<sub>1</sub>/S 限制点更为重要,细胞能否越过此限制点是细胞增殖的关键。G<sub>1</sub> 期主要效应细胞周期素是 cyclin D 和 cyclin E,它们是细胞周期进行过程中存在的一类正性调节因子,它们通过蛋白表达量的改变或基因突变调节细胞的增殖程度,并在细胞由非增殖状态向增殖状态的转变过程中起决定性作用。其中 cyclin D<sub>1</sub> 是 cyclin D 的主要亚型,在细胞周期中最早被合成, cyclin D<sub>1</sub> 与 CDK<sub>4</sub> 形成的 cyclin D<sub>1</sub>/CDK<sub>4</sub> 合酶活性在 G<sub>1</sub> 早期至中期达最高,可促进细胞进入 S 期<sup>[7]</sup>。PDGF-BB 是一类强有力的促有丝分裂因子,可明显地促进静止的 VSMCs 增殖<sup>[8]</sup>,在静止期的 VSMCs 中加入 PDGF-BB 后,可增加 cyclin D<sub>1</sub> 蛋白的表达,使静止的 VSMCs 重新进入细胞周期,促进 VSMCs 通过 G<sub>1</sub> 期进入 S 期。因而,我们选用 PDGF-BB 作为刺激因素,细胞周期及 cyclin D<sub>1</sub> 表达作为指标探讨固本化痰通脉方防治动脉粥样硬化的机制。实验结果表明,与正常血清处理组比较,固本化痰通脉方含药血清组能使 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞数明显增多而 S 期细胞数明显减少,并下调 cyclin D<sub>1</sub> 的表达,提示固本化痰通脉方能使 VSMCs 增殖周期停滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期,其抑制血管平滑肌细胞增殖原因可能与其下调 cyclin D<sub>1</sub> 表达有关。

中医学将动脉粥样硬化产生的原因、致病特点和证候表现归纳到痰浊、瘀血的范畴。固本化痰通

脉方重用制首乌为君,辅以党参、薏苡仁、苍术、荷叶健脾益气化湿,枸杞子、决明子补益肝肾,加强君药疗效,佐以橘红化痰通络,山楂健脾消食。新近的研究证实,何首乌、决明子的主要药理成分大黄素能通过降低血管平滑肌细胞 cyclin D<sub>1</sub> 的表达,抑制动脉粥样硬化斑块的形成<sup>[9]</sup>,并能降低血清胆固醇,本实验研究结论与之一致。

### [参考文献]

- [1] 王虹,高秀梅.血管平滑肌细胞增殖调控机制研究进展[J].医学综述,2004,10(6):328.
- [2] 王平,吕帆,刘松林,等.固本化痰通脉方对痰阻血脉大鼠主动脉巨噬细胞和黏附分子表达的影响[J].中西医结合学报,2006,4(5):522-525.
- [3] 陈奇.中药药效研究思路与方法[M].北京:人民卫生出版社,2005.31.
- [4] 龚建平,韦伟,舒丹,等.Cyclin/DNA 多参数流式细胞术分析细胞增殖[J].同济医科大学学报,1999,28(3):177.
- [5] 王钢,汪亚文.冠状动脉粥样硬化与细胞周期调控[J].广东医学,2004,25(3):339.
- [6] Bmurr-Dullaesus RC, Mann MJ, Dzau VJ. Cell cycle progression: new therapeutic target for vascular proliferative disease[J]. Circulation, 1998, 98(1): 82-89.
- [7] Boehmm, Nabel EG. Cell cycle and cell migration: new pieces to the puzzle[J]. Circulation, 2001, 103: 2879-2881.
- [8] 许顶立,袁勇,刘伊丽,等.血管紧张素 II 和血小板源生长因子对血管平滑肌和心肌细胞细胞周期素及 P27 蛋白的不同影响[J].中华医学杂志,1999,79(9):657-660.
- [9] 潘浩,葛均波,王克强,等.大黄素对人血管平滑肌细胞周期蛋白 D<sub>1</sub> 表达影响[J].中国介入心脏病杂志,2005,(1):37-40.