

## 硝普钠对培养的猪主动脉平滑肌细胞增殖的影响

杨小毅 杨永宗 涂玉林 黄红林 万载阳 钟 星

(衡阳医学院心血管病研究所, 衡阳 421001)

### Effects of Sodium Nitroprusside on proliferation of Cultured Porcine Aortic Smooth Muscle Cells

YANG Xiao-Yi, YANG Yong-Zong, TU Yu-Lin, HUANG Hong-Lin, WAN Zai-Yang and ZHONG Xin  
(Institute of Cardiovascular Disease, Hengyang Medical College, Hengyang 421001, China)

**ABSTRACT** Vascular endothelial cell damage and excessive smooth muscle cell (SMC) proliferation are considered to play a key role in the development of an atherosclerotic disease. In present study, it was observed that nitric oxide-generating vasodilator-sodium nitroprusside (SNP) induced endothelium-independent relaxation on porcine coronary arterial rings and inhibited mitogenesis and proliferation of cultured porcine vascular smooth muscle cells in dose-dependent manner with MTT colorimetric assay. The results suggest that endogenous nitric oxide (NO) may play an important role as mediator of smooth muscle cell growth, and the long-term administration of SNP and other nitrovasodilators which release NO in the body favors inhibiting the development of atherosclerosis to patients with atherosclerotic disease.

**KEY WORDS** Sodium nitroprusside; NO; Coronary artery; Endothelial cell; Smooth muscle cell; Atherosclerosis

**摘要** 内皮细胞损伤和血管平滑肌细胞增殖在动脉粥样硬化发生发展过程中起关键作用,本工作用离体冠状动脉实验证明硝普钠呈剂量依赖性松弛冠状动脉,且与内皮去除与否无关。用噻唑蓝比色法观察到硝普钠也能剂量依赖性抑制主动脉平滑肌细胞增殖。结果表明,NO对平滑肌细胞增殖具有调节作用。提示在

临床上对于动脉粥样硬化及冠心病病人,长期使用硝普钠等与NO合成及释放有关的硝基化合物不仅可以缓解冠状动脉痉挛,而且还可抑制平滑肌细胞增殖,可能有助于延缓动脉粥样硬化的进一步发展。

**关键词** 硝普钠; 一氧化氮; 冠状动脉; 内皮细胞; 平滑肌细胞; 动脉粥样硬化

内皮细胞损伤和血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)增殖在动脉粥样硬化发生发展过程中起关键作用,硝普钠及其硝基扩血管药(nitrovasodilator)尽管在临床上用于心绞痛,慢性心衰等心血管疾病已达百余年,但以往主要侧重于对血管平滑肌舒缩功能的研究,而对平滑肌细胞增殖功能作用如何,国内尚少见报道,本工作在观察内皮细胞对硝普钠扩张作用的基础上,研究了硝普钠对猪主动脉平滑肌细胞增殖的影响。

### 1 材料与方法

硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)和5-羟色胺(serotonin, 5-HT)瑞士进口分装,噻唑蓝[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT]购自Fluke。新鲜的猪冠状动脉和主动脉取自市肉联加工厂。

#### 1.1 离体冠状动脉实验

自屠宰现场将心脏取出后,立即置于冰冷Krebs-Ringer液中,分离冠状动脉右旋支,制备成3.5~4 mm血管环置于37℃ Krebs-Ringer液浴槽中,通入95% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>混合气,借助张力传感器,用生理记录仪记录血管环的张力。给药前血管环在静息张力2.0克下平衡2 h,先用1 μmol·L<sup>-1</sup> 5-HT使血管环收缩,待收缩达到稳定状态后,在依次向浴槽内加入不同浓度的SNP。记录血管环张力的变化。Krebs-Ringer液成分(mmol·L<sup>-1</sup>): NaCl 118, KCl 4.8, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgSO<sub>4</sub> 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 24, Glucose 11。部分血管环去除内皮,以缓激肽测定其效果。

## 1.2 猪主动脉平滑肌细胞培养

自屠宰现场无菌取材,猪主动脉经 Hank 氏液洗涤,沿纵轴剪开,刮去内膜,剥离外膜,将中膜剪成 0.2~0.3 mm 小块,按贴块法<sup>[1]</sup>接种于培养瓶内,用 20% FCS 血清的 M-199 培养。细胞长成致密层时,以 0.125% 胰蛋白酶及 0.02% EDTA 混合液消化处理后传代。实验用 5~10 代细胞。

## 1.3 平滑肌细胞增殖的测定

采用文献[2]方法,  $(5\sim10)\times10^7$  细胞  $\cdot L^{-1}$  接种于 96 孔培养板上,每孔 100  $\mu l$ , 37℃ 正常培养过夜,无 Ca、Mg-Hank 液洗三遍,根据实验要求加入含 10% FCS 血清培养液配制的不同浓度的 SNP 培养液 100  $\mu l$ ,继续培养 72 h,然后加入 MTT 溶液 10  $\mu l$ ;继续培养 4 h,吸弃培养液;每孔加 100  $\mu l$  酸化异丙醇,并混匀呈紫蓝色甲潜(formazane)结晶完全溶解,1 h 内用 DG-3022 型酶标仪(华东电子管厂)于 570 nm 处测定吸光值 A,每个药物浓度设 6 个培养孔。

实验结果以均值士标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,差异显著性用 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 内皮对硝普钠舒张冠状动脉作用的影响

硝普钠对离体猪冠状动脉环舒张实验结果见 Figure 1。可见硝普钠呈剂量依赖性舒张冠状动脉,半数有效量在保留内皮和去除内皮的冠状动脉环上分别为 7.48 和 7.34,差异无显著性意义( $P>0.05$ )。表明硝普钠为非内皮依赖性舒张冠状动脉。

### 2.2 硝普钠对平滑肌细胞增殖的影响

硝普钠对培养的猪主动脉平滑肌细胞增殖的影响见 Figure 2。可见随着剂量加大,平滑肌细胞的增殖活性逐渐降低,表明硝普钠呈剂量依赖性抑制平滑肌细胞增殖活性。

## 3 讨论

离体猪冠状动脉实验表明,不管内皮去除与否,硝普钠对冠状动脉均呈剂量依赖性舒张效应,提示即使在发生动脉粥样硬化、已有内皮细胞损害的冠状血管,使用硝普钠仍然可以解除冠状动脉痉挛。硝普钠及硝基类化合物的扩血管机制直到 80 年代才逐渐被查清与内皮源性舒张因子(endothelium-derived relaxing factor, EDRF)有关,现在认为 EDRF 实质就是一

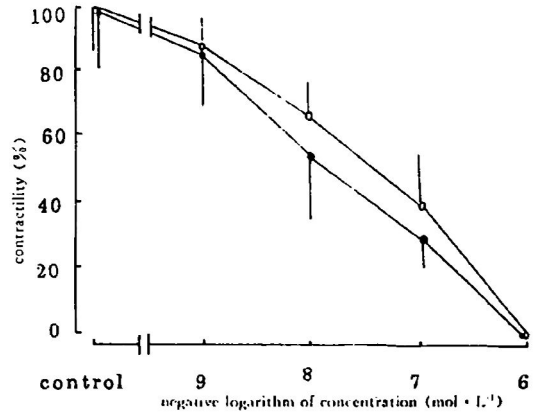


Figure 1. Effect of sodium nitroprusside on porcine coronary arterial rings. —o—: to retain endothelium; —: to remove endothelium;  $n=5$ ,  $\bar{x}\pm s$ .

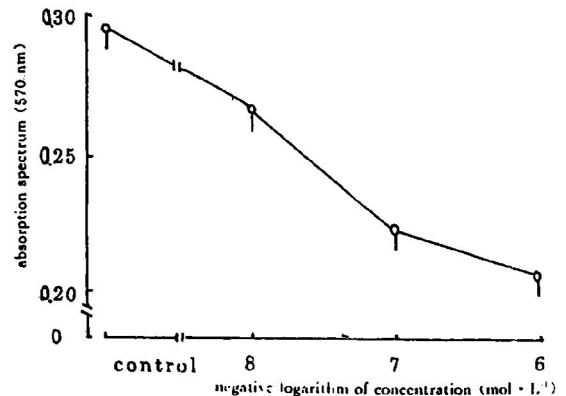


Figure 2. Effect of sodium nitroprusside on proliferation of cultured porcine aortic smooth muscle cells.

氧化氮(nitric oxide, NO)。硝普钠在体液中能自发释放 NO,后者作为信号传递体通过激活鸟苷酸环化酶(guanylate cyclase, GC)发挥作用,由于 NO 的亲脂性特点在邻近细胞间,如内皮细胞—平滑肌细胞以及平滑肌细胞本身之间迅速扩散,并与其中含有 GC 的血红素基因(heme)结合,形成 NO-Heme-Ge 复合物作为 GC 的活化形式。激活的 GC 使细胞内 cGMP 大量产生与堆积,继而松弛血管平滑肌<sup>[3]</sup>。

血管平滑肌细胞是一种高度特化的细胞,大量文献表明,它至少有两种表型:“收缩型”和

“合成型”,在胚胎期或新生动物,它主要表现为“合成型”,在成年动物表现为“收缩型”,但在动脉粥样硬化、高血压时,它可由“收缩型”向“合成型”转化,形成具有较强分裂、增殖及分化能力的细胞。SMC增殖的机制目前并不甚明确,可能与原癌基因的激活与表达、生长因子及细胞因子的刺激等作用有关<sup>[4]</sup>,但是否也与SMC松弛机制一样,有L-arginine: NO: cGMP通路的参与尚不清楚。1987年Moncada等<sup>[5]</sup>肯定EDRF的化学本质即为NO以来,对它的生物学作用认识迅速加深,NO兼有第二信使和神经递质的功能,是一种新的细胞间信息交换的重要载体,参与多种生理功能的调节。本实验结果表明硝普钠作为一种外源性NO供体,具有剂量依赖性抑制SMC增殖活性,间接证明NO的大量补充可抑制SMC增殖,而在动脉粥样硬化发生发展过程中,由于内皮细胞受损,NO合成及释放明显下降,是否这也是刺激SMC增殖的原因之一有待进一步证实。

本工作提示,在临床上使用与NO合成及

释放有关的药物如硝基类化合物,对于动脉粥样硬化及冠心病病人,不仅可以缓解冠状动脉痉挛,而且还可抑制SMC增殖,可能有助于延缓As的进一步发展。

### 参考文献

- 1 Ross R. The smooth muscle cell. I. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. *J Cell Biol*, 1971, **50**: 172.
- 2 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Method*, 1983, **65**: 55.
- 3 Kelm M, Schrader J. Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Circ Res*, 1990, **66**: 1561~75.
- 4 杨小毅,杨永宗. 动脉粥样硬化时动脉平滑肌细胞增殖及表型转变的若干分子调控机制. 衡阳医学院学报, 1991, **19**(3): 45~50.
- 5 Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol*, 1989, **28**: 1709~15.

(本文1995-08-15收到)