

# 瓜蒌皮提取物对 PDGF-BB 所致血管平滑肌细胞增殖周期的影响

杨征<sup>1</sup>, 邱敏<sup>2</sup>, 郭晓华<sup>1</sup>, 李俊萍<sup>1</sup>, 陈丽珠<sup>1</sup>, 孙淑艳<sup>1</sup>

(1. 包头医学院第一附属医院心内二科, 内蒙古包头市 014010; 2. 包头医学院药学院, 内蒙古包头市 014060)

[关键词] 瓜蒌皮提取物; 血小板源生长因子; 血管平滑肌细胞; 细胞增殖; 细胞周期

[摘要] **目的** 研究瓜蒌皮提取物对血小板源生长因子 BB 所致血管平滑肌细胞增殖周期的影响并探讨其可能机制。**方法** 组织块贴块法培养 SD 大鼠胸主动脉平滑肌细胞, <sup>3</sup>H-TdR 掺入观察瓜蒌皮提取物(10、20 和 30 mg/L)对血小板源生长因子 BB(20 μg/L)所致血管平滑肌细胞 DNA 合成的影响; 流式细胞仪分析细胞增殖周期; real time RT-PCR 检测血管平滑肌细胞中 c-fos、c-myc mRNA 表达。**结果** 血小板源生长因子 BB 可明显升高细胞每分钟脉冲数( $P < 0.01$ ), 并增加 S 期细胞比例而降低 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例( $P < 0.01$ ), 并上调 c-fos、c-myc mRNA 表达( $P < 0.01$ )。瓜蒌皮提取物各浓度组均明显抑制血小板源生长因子 BB 诱导的每分钟脉冲数升高( $P < 0.01$ ), 降低 S 期细胞比例而升高 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例, 明显下调血小板源生长因子 BB 所致的 c-fos、c-myc mRNA 高表达( $P < 0.01$ )。**结论** 瓜蒌皮提取物通过阻止血管平滑肌细胞由 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期进入 S 期而抑制血小板源生长因子 BB 所致的增殖, 其作用机制可能与降低细胞内 c-fos、c-myc mRNA 高表达有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Effect of Extractive of Pericarpium Trichosanthis on Cell Cycle of Rat Vascular Smooth Cell Proliferation Induced by PDGF-BB

YANG Zheng<sup>1</sup>, QIU Min<sup>2</sup>, GUO Xiao-Hua<sup>1</sup>, LI Jun-Ping<sup>1</sup>, CHEN Li-Zhu<sup>1</sup>, and SUN Shu-Yan<sup>1</sup>

(1. Second Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou, Inner Mongolia 014010, China; 2. Department of Pharmacy, Baotou Medical College, Baotou, Inner Mongolia 014060, China)

[KEY WORDS] Extractive of Pericarpium Trichosanthis; Platelet Derived Growth Factor; Vascular Smooth Muscle cell; Proliferation; Cell Cycle

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of extractive of pericarpium trichosanthis (EPT) on cell cycle of rat vascular smooth muscle (VSMC) proliferation induced by platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) and to probe especially into its mechanism. **Methods** VSMC from the thoracic aorta of SD rats were cultured by tissue explant method. Effect of EPT (10, 20 and 30 mg/L) on PDGF-BB-induced VSMC proliferation was assessed by <sup>3</sup>H-TdR method, the cell cycle was analyzed by flow cytometry, expression of c-fos and c-myc mRNA in VSMC were detected by real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (real-time RT-PCR). **Results** PDGF-BB could significantly increase the rate of <sup>3</sup>H-TdR incorporation ( $P < 0.01$ ) and the percentage of S phase cells, and degrade the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase cell percentage in the cell cycle ( $P < 0.01$ ). At the same time, PDGF-BB could up-regulate c-fos and c-myc mRNA expression ( $P < 0.01$ ). Addition of EPT (10, 20 and 30 mg/L) markedly inhibited the PDGF-BB-induced proliferation of the VSMC ( $P < 0.01$ ), decreased the S phase cell percentage and upgraded the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase cell percentage in the cell cycle, EPT could also depress the elevated expression of c-fos and c-myc mRNA induced by PDGF-BB. **Conclusions** EPT could inhibit the VSMC proliferation induced by PDGF-BB through preventing the transformation of the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase cell to S phase cell in the cell cycle. The mechanism may be related to its down-regulatory effect on c-fos and c-myc mRNA expressions.

瓜蒌的来源为 *Trichosanthes kirilowii* Maxim 及双边栝楼 *T. rosthornii* Harms 的干燥成熟果实, 近年

的一些研究表明, 瓜蒌皮提取物 (extractive of pericarpium trichosanthis, EPT) 有扩张冠状动脉, 增加血

[收稿日期] 2011-11-06

[作者简介] 杨征, 硕士, 主治医师, 主要从事心血管疾病诊治, E-mail 为 yz798820022002@163.com。郭晓华, 硕士, 主任医师, 主要从事心血管疾病的诊治。通讯作者邱敏, 硕士, 讲师, 主要从事心血管药理学研究, E-mail 为 yzqmyzx@163.com。

流量,提高耐缺氧能力,降低血清胆固醇,抗动脉粥样硬化等多种作用<sup>[14]</sup>。血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)增殖是动脉粥样硬化、高血压、冠心病、经皮冠状动脉内血管成形术后再狭窄的病理基础<sup>[5]</sup>,而细胞增殖周期是 VSMC 增殖的基础。本研究旨在观察 EPT 对血小板源生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)所致 VSMC 增殖周期的影响并探讨可能的机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 药品与试剂

瓜蒌皮提取物(上海第一生化药业有限公司,编号 101103);二甲基亚砜(DMSO)、PDGF-BB(Sigma 公司); $\alpha$ -肌动蛋白单克隆抗体( $\alpha$ -actin, Santa Cruz 公司);DMEM 培养基(Gibco 公司);胎牛血清(杭州四季清公司);噻唑兰(MTT, Sigma 公司);<sup>3</sup>H-TdR(中国科学院原子能研究所);碘化丙啶(索莱宝科技有限公司);原癌基因 c-fos、c-myc 和 GAPDH 引物及逆转录试剂盒(大连宝生物工程有限公司)。

### 1.2 仪器

MS-1015 倒置显微镜(日本 Olympus), TDGC2J-0.5 超净工作台(上海先锋电器厂), TU1810 紫外可见分光光度计(北京普析仪器有限公司), SL-SHELNB CO<sub>2</sub> 孵箱、LS6500 液体闪烁计数仪(美国 Beckman 公司),多头微量细胞收集器(浙江绍兴卫星医疗设备有限公司), FACS-CALIRUR 型流式细胞仪(美国 BD 公司),实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad 公司)。

### 1.3 实验动物

SD 大鼠,清洁级,体重 200 ± 20 g,雌雄兼用,均由本学院实验动物中心提供。

### 1.4 大鼠血管平滑肌细胞的分离与培养

采用杨征等<sup>[6]</sup>改进的组织贴块法培养大鼠 VSMC,  $\alpha$ -actin 免疫细胞化学染色鉴定大鼠 VSMC, 实验取 3~8 代细胞。

### 1.5 <sup>3</sup>H-TdR 掺入测定瓜蒌皮对 DNA 合成的影响

将生长良好的 VSMC 以 5 × 10<sup>8</sup> cells/L 密度接种于 96 孔板,每孔 200  $\mu$ L, 每组设 8 个平行孔,放入培养箱中培养,待细胞长到 70% 汇合时,更换质量分数为 5% FCS 的 DMEM 培养 24 h,再换成 10% FCS 的 DMEM 培养液进行实验。按照如下分组:对照组(培养液中不加任何干扰因素)、PDGF 组(加入 PDGF-BB 20  $\mu$ g/L)、PDGF + 低剂量 EPT 组(加入

PDGF-BB 20  $\mu$ g/L 和 EPT 10 mg/L)、PDGF + 中剂量 EPT 组(加入 PDGF-BB 20  $\mu$ g/L 和 EPT 20 mg/L)、PDGF + 高剂量 EPT 组(加入 PDGF-BB 20  $\mu$ g/L 和 EPT 30 mg/L)。瓜蒌皮提取物先于 PDGF-BB 30 min 加入各孔中,在培养箱中共同孵育 24 h,收获细胞(收获 6 h 前加入<sup>3</sup>H-TdR), LS6500 液体闪烁计数仪测定每份样品每分钟脉冲数(cpm)。

### 1.6 流式细胞仪检测瓜蒌皮提取物对血管平滑肌细胞周期的影响

取 5 × 10<sup>8</sup> cells/L 细胞密度接种于 6 孔板中,每孔 2 mL 同步化后,同<sup>3</sup>H-TdR 掺入实验分组加药作用 24 h,制成细胞悬液,收集细胞,4℃ PBS 洗涤 2 次,加入 70% 冷乙醇 3 mL 固定,4℃ 冰箱过夜;经离心,0.5 mL/LPI 染料染色和 300 目尼龙网过滤后,用流式细胞仪进行细胞周期测定。

### 1.7 real time RT-PCR 检测瓜蒌皮提取物对血管平滑肌细胞 c-fos、c-myc mRNA 表达的影响

同<sup>3</sup>H-TdR 掺入实验分组,Trizol 法提取 RNA 并纯化。紫外分光光度计测定 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 值在 1.8 ~ 2.0 之间。将其逆转录为 cDNA 并稀释,进行定量 PCR。GAPDH 为内参,上游引物 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TAG-3',下游引物 5'-GAC CAC AGT CCA TGC CAT CAC T-3',扩增产物 456 bp;c-myc 上游引物 5'-CCT ACC CTC TAA CGA CAG C-3',下游引物 5'-CTC TGA CCT TTT GCC AGG AG-3',扩增片段 240 bp;c-fos 上游引物 5'-ATC CGA AGG GAA AGG AAT AAG A-3',下游引物 5'-GCT GCC AAA ATA AAC TCC AGT T-3',扩增片段 173 bp。总反应体积 20  $\mu$ L。实时 RT-PCR 扩增条件:第一步 95℃ × 8.5 min,第二步 95℃ × 15 s、60℃ × 1 min、72℃ × 20 s,45 个循环。目的基因的相对表达量以“目的基因/内参基因”表示。

### 1.8 统计学方法

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用方差分析, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 瓜蒌皮提取物对 PDGF-BB 诱导的血管平滑肌细胞 DNA 合成的影响

与对照组相比,PDGF-BB 组每分钟脉冲数值明显增高(*P* < 0.01),提示 PDGF-BB 能促进血管平滑肌细胞 DNA 合成;与 PDGF-BB 组相比,PDGF-BB + 各剂量 EPT 组每分钟脉冲数值明显下降(*P* <

0.01), 表明 EPT 能抑制 PDGF-BB 诱导的 VSMC DNA 合成(表 1)。

表 1. 瓜蒌皮提取物对大鼠血管平滑肌细胞 DNA 合成的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 1. Effect of EPT on the synthesis of DNA in the cultured rat vascular smooth muscle cells

分 组	每分钟脉冲数
对照组	4010 ± 588
PDGF-BB 组	8050 ± 579 <sup>a</sup>
PDGF-BB + 低剂量 EPT 组	5563 ± 516 <sup>b</sup>
PDGF-BB + 中剂量 EPT 组	4722 ± 498 <sup>b</sup>
PDGF-BB + 高剂量 EPT 组	4263 ± 612 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与 PDGF-BB 组比较。

## 2.2 瓜蒌皮提取物对 PDGF-BB 诱导的血管平滑肌细胞细胞周期的影响

与对照组相比, PDGF-BB 组可使 S 期细胞比例明显增高, 而  $G_0/G_1$  期细胞比例明显降低 ( $P < 0.01$ ); 与 PDGF-BB 组相比, PDGF-BB + 各剂量 EPT 组 S 期细胞比例减少,  $G_0/G_1$  期细胞比例增高, 表明细胞增殖阻滞于  $G_0/G_1$  期(表 2)。

表 2. 瓜蒌皮提取物对大鼠 VSMC 细胞周期的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 2. Effect of EPT on the cell cycle in the cultured rat vascular smooth muscle cells

分 组	$G_0/G_1$	$G_2/GM$	S
对照组	85.34 ± 4.26	4.91 ± 1.37	9.62 ± 2.05
PDGF-BB 组	56.18 ± 3.79 <sup>a</sup>	4.61 ± 1.12	39.21 ± 2.73 <sup>a</sup>
PDGF-BB + 低剂量 EPT 组	79.16 ± 5.03 <sup>b</sup>	3.78 ± 1.55	17.04 ± 2.86 <sup>b</sup>
PDGF-BB + 中剂量 EPT 组	78.55 ± 4.37 <sup>b</sup>	5.86 ± 1.17	15.79 ± 3.11 <sup>b</sup>
PDGF-BB + 高剂量 EPT 组	76.41 ± 3.91 <sup>b</sup>	7.33 ± 1.46 <sup>b</sup>	16.16 ± 2.58 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与 PDGF-BB 组比较。

## 2.3 瓜蒌皮提取物对血管平滑肌细胞 c-fos 和 c-myc mRNA 表达的影响

PDGF-BB 可促进 c-fos 和 c-myc mRNA 表达 ( $P < 0.01$ ), PDGF-BB + 各剂量 EPT 组可抑制 PDGF-BB 诱导的 c-fos 和 c-myc mRNA 表达上调 ( $P < 0.01$ ; 表 3)。

## 3 讨 论

VSMC 迁移和过度增殖是高血压、动脉粥样硬化等血管增生性疾病的基本特征, 抑制 VSMC 过度

表 3. 瓜蒌皮提取物对大鼠血管平滑肌细胞 c-fos, c-myc mRNA 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 3. Effect of EPT on the SD rat VSMC c-fos, c-myc mRNA expression

分 组	c-fos mRNA	c-myc mRNA
对照组	21.38 ± 3.9	622.79 ± 4.26
PDGF-BB 组	193.66 ± 10.75 <sup>a</sup>	152.83 ± 9.98 <sup>a</sup>
PDGF-BB + 低剂量 EPT 组	152.47 ± 9.68 <sup>b</sup>	93.45 ± 7.87 <sup>b</sup>
PDGF-BB + 中剂量 EPT 组	149.39 ± 7.49 <sup>b</sup>	87.33 ± 8.64 <sup>b</sup>
PDGF-BB + 高剂量 EPT 组	141.11 ± 9.43 <sup>b</sup>	79.70 ± 5.64 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与 PDGF-BB 组比较。

增殖对防治血管增生性疾病的发生具有重要意义<sup>[7]</sup>。目前研究表明, 当某些病理因子将血管内膜损伤后, 周围内皮细胞将释放一些促生长因子, 如 PDGF、内皮素等, 启动 VSMC 增殖<sup>[8,9]</sup>。细胞周期是控制细胞增殖的关键环节, 其不同时相之间存在着关键检查点, 决定细胞是否继续增生或进入静止状态, 最重要的检查点是  $G_1/S$  期检查点<sup>[10]</sup>。PDGF 是一种重要的促细胞分裂剂, 可促进多种细胞分裂和增殖<sup>[11]</sup>, 因此, 我们选用 PDGF-BB 作为诱导剂。胸腺嘧啶核苷是 DNA 合成的原料, 如果 VSMC 增殖快速, DNA 合成活跃, 摄取<sup>3</sup>H-TdR 增多, 则细胞中的每分钟脉冲数值升高; 反之, VSMC 增殖受抑制, 则每分钟脉冲数值降低。因此, 测定<sup>3</sup>H-TdR 掺入量能反映 VSMC 增殖状态。本研究中, PDGF-BB 能明显促进 VSMC DNA 合成并能使 S 期细胞比例增高,  $G_0/G_1$  期细胞比例降低, 这提示 PDGF-BB 能促进 VSMC 增殖且其作用点为使 VSMC 突破  $G_1/S$  限制点进入 S 期。EPT 可抑制 PDGF-BB 诱导的 VSMC DNA 合成并使  $G_0/G_1$  期细胞比例增加, S 期细胞比例降低, 由此推测, EPT 能阻止 VSMC 由  $G_0/G_1$  期进入 S 期, 使其不能通过  $G_1/S$  限制点, 从而抑制 PDGF-BB 诱导的 VSMC 增殖。

c-fos 和 c-myc 原癌基因是重要的调控基因, 在细胞生长调控、细胞分化和损伤修复过程中发挥重要作用。c-fos 和 c-myc 基因高表达可调控促细胞增殖相关的基因表达, 从而产生细胞增殖效应, c-fos 和 c-myc 基因的激活被认为是 VSMC 增殖的启动环节之一<sup>[12,13]</sup>。本研究中, PDGF-BB 能诱导 VSMC c-fos、c-myc 表达增高, 而 EPT 能抑制 PDGF-BB 诱导的 c-fos、c-myc mRNA 高表达。由此推测, EPT 可能通过作用于 c-fos、c-myc 上游的信号转导通路或 c-fos、c-myc 本身下调该基因表达, 发挥其抗增殖作用。

综上所述, EPT 通过阻止 VSMC 由  $G_0/G_1$  期进入 S 期而抑制 PDGF-BB 所诱导的增殖, 其机制可能与其降低 c-fos、c-myc mRNA 高表达有关, 确切信号转导通路有待于进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] 谭斌, 刘韵, 谷彬, 等. 瓜蒌皮提取物对大鼠血管内皮损伤的保护作用[J]. 中国现代医药杂志, 2010, 12 (9): 9-11.
- [2] 吴波, 曹红, 陈思维, 等. 瓜蒌提取物对缺血缺氧及缺血后再灌注损伤心肌的保护作用[J]. 沈阳药科大学学报, 2000, 17 (6): 450-453.
- [3] 吴波, 王敏伟, 陈思维, 等. 瓜蒌提取物对离体家兔胸主动脉条收缩的影响[J]. 沈阳药科大学学报, 1999, 16 (1): 24-27.
- [4] 李自成, 常青. 瓜蒌注射液对兔血管平滑肌细胞增殖细胞核抗原表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16 (6): 516-519.
- [5] 杨征, 邱敏, 吴芹, 等. 萘哌地尔衍生物 YMIII 对血管紧张素 II 诱导大鼠胸主动脉平滑肌细胞增殖的抑制作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17 (9): 727-730.
- [6] 杨征, 邱敏, 吴芹, 等. 家兔动脉血管平滑肌细胞培养方法的改进[J]. 中国药理学通报, 2008, 24 (5): 696-699.
- [7] 杨征, 商黔惠, 吴芹, 等. 内皮素 1 和 BQ-123 对自发性高血压大鼠动脉平滑肌细胞腺苷三磷酸酶活性及 mRNA 表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18 (7): 514-518.
- [8] 何维东, 陈如坤. 血管平滑肌细胞迁移、增殖致冠状动脉搭桥术后再狭窄分子机制的研究进度[J]. 微循环学杂志, 2006, 16 (2): 62-64.
- [9] Choi KH, Kim J-E, Song NR, et al. Phosphoinositide 3-Kinase is a novel target of piceatannol for inhibiting PDGF-BB-induced proliferation and migration in human aortic smooth muscle cells[J]. Cardiovasc Res, 2010, 85 (4): 836-844.
- [10] Pardee AB. A restriction point for control of normal animal cell proliferation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1974, 71 (4): 1 286-290.
- [11] Mc Kinnon RD, Waldron S, Kiel ME. PDGF alpha receptor signal strength controls an RTK rheostat that integrates phosphoinositol 3'-kinase and phospholipase C gamma pathways during oligodendrocyte maturation[J]. J Neurosci, 2005, 25 (14): 3 499-508.
- [12] 许轶洲, 李佩璋, 王宁夫, 等. 葛根素对血管平滑肌细胞增殖及对 c-fos 蛋白和凝血酶受体 mRNA 表达的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2005, 10 (4): 401-406.
- [13] 刘向祎, 刘小超, 杨凌. 川芎嗪对兔血管平滑肌细胞增殖及 c-fos 和 c-myc 基因表达的影响[J]. 实用医学杂志, 2009, 25 (9): 1 382-383.

(此文编辑 文玉珊)