

复方丹参滴丸对高糖/高胰岛素诱导兔胸主动脉平滑肌细胞增殖的抑制作用

陈 频, 徐向进

(南京军区福州总医院内分泌科, 福建 福州 350025)

【摘要】 目的: 观察复方丹参滴丸对高糖/高胰岛素诱导兔胸主动脉血管平滑肌细胞(VSMCs)增殖的抑制作用及其机制。方法: 组织贴块法原代培养 VSMCs, 用高糖/高胰岛素诱导细胞增殖。设正常对照组, 模型组, 一氧化氮合酶(NOS)抑制剂 N-硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME)组, 吡格列酮以及联合 L-NAME 组, 复方丹参滴丸浸膏低、中、高剂量干预组, 低、中、高剂量复方丹参滴丸浸膏合用 L-NAME 组。采用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法测定 VSMCs 增殖, 试剂盒检测细胞总 NOS 及一氧化氮(NO)含量。结果: 高糖/高胰岛素可诱导 VSMCs 增殖, 表现为模型组 VSMCs 含 MTT 溶解物的吸光度(A)值显著高于正常对照组, 总 NOS 活性及 NO 含量显著低于正常对照组(P 均 <0.01); 与模型组比较, 吡格列酮及中、高剂量复方丹参滴丸浸膏组 VSMCs 含 MTT 溶解物的 A 值均明显降低, 总 NOS 活性及 NO 含量明显增加, 并且能被 L-NAME 部分阻断($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 低剂量复方丹参滴丸浸膏组上述结果比较差异均无显著性(P 均 >0.05)。结论: 复方丹参滴丸浸膏可以通过 NO 介导而抑制 VSMCs 增殖。

【关键词】 复方丹参滴丸; 血管平滑肌细胞; 增殖; 一氧化氮; 一氧化氮合酶

中图分类号: R285.5; Q253 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2007)05-0313-04

Anti-proliferative effects of compound Danshen dripping pill (复方丹参滴丸) on rabbit aortic smooth muscle cells during the insulin resistance state CHEN Pin, XU Xiang-jin. Department of Endocrinology, Fuzhou General Hospital of PLA, Fuzhou 350025, Fujian, China

Corresponding author: XU Xiang-jin

【Abstract】 **Objective:** To study the anti-proliferative effects and possible mechanisms of compound Danshen dripping pill (复方丹参滴丸) on rabbit aortic smooth muscle cells during the insulin resistance state. **Methods:** The primary vascular smooth muscle cells (VSMCs) were cultured by planting rabbit thoracic smooth muscle pieces. The proliferation of VSMCs was induced by high concentrations of glucose and insulin. The rabbits were divided into following groups: a model group, a normal control group, treated groups including a pioglitazone (PIO) group, compound Danshen dripping pill (low, middle and high dose) subgroups and the various treated groups with respectively the addition of nitric oxide synthase (NOS) inhibitor N-nitro-L-arginine methylester (L-NAME) groups and L-NAME group. Cell proliferation was measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay, total NOS activities and nitrogen oxide (NO) content of VSMCs were determined by assay kits, respectively. **Results:** The proliferation of VSMCs was markedly induced by high concentrations of glucose and insulin, representing that the observation degree (A value) of the MTT soluble substance in VSMCs in the model group was higher than that of normal control group, but the total content and activity of NOS were lower than those of normal control group (all $P<0.01$). Compared with the model group, the observation degree (A value) of MTT soluble substance in VSMCs was markedly decreased, and the total NOS activities and NO content of VSMCs were significantly increased in the PIO group, middle and high compound Danshen dripping pill groups, and the above effects could be partially blocked by NOS inhibitor L-NAME ($P<0.05$ or $P<0.01$); while there were no significant differences in above indexes in low compound Danshen dripping pill group (all $P>0.05$). **Conclusion:** In the valid concentration range, compound Danshen dripping pill inhibits proliferation by involving in NO pathway in cultured VSMCs during the insulin resistance state.

【Key words】 compound Danshen dripping pill; vascular smooth muscle cells; proliferation; nitrogen oxide; nitric oxide synthase

通讯作者: 徐向进, 教授, 主任医师

作者简介: 陈 频 (1969-), 女 (汉族), 福建省人, 主治医师 (Email: chenpin@21cn.com)。

血管平滑肌细胞(VSMCs)的异常增殖是高血压、糖尿病血管病变以及血管增生性疾病共同的病理结构基础,胰岛素抵抗(IR)是导致 VSMCs 增殖的重要原因。复方丹参滴丸由丹参、三七、冰片组成,以其多成分、多途径、多靶点的作用特点,在抗血小板黏附和聚集、扩张动脉血管、调节血脂、改善血液流变学状态等方面具有独特而肯定的疗效,但其对 VSMCs 增殖的抑制作用机制尚不完全清楚。本研究以兔胸主动脉平滑肌细胞为对象,探讨复方丹参滴丸对高糖/高胰岛素诱导 VSMCs 增殖的影响及其与一氧化氮(NO)的关系,揭示复方丹参滴丸抑制 VSMCs 增殖的机制。

1 材料与方

1.1 兔胸主动脉平滑肌细胞传代培养:原代细胞由我院药学科惠赠^[1]。传代后细胞置于含有体积分数为 20%的小牛血清、100 kU/L 青霉素和 10 g/L 链霉素的 RPMI 1640 培养基中,在 37 °C、体积分数为 5%的 CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。

1.2 主要试剂和仪器:复方丹参滴丸浸膏由天津天士力制药集团有限公司惠赠,吡格列酮原料药由杭州中美华东制药有限公司惠赠;小牛血清为杭州江滨生物技术有限公司产品;RPMI 1640 培养基为美国 Gibco 公司产品;N-硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME)及四甲基偶氮唑盐(MTT)为美国 Sigma 公司产品;二甲基亚砜(DMSO)购于宜兴市洋溪徐渡化工厂;NO 及一氧化氮合酶(NOS)测定试剂盒(批号:060901)购于南京汇标生物科技有限公司。CO₂ 培养箱由美国 Shel-Lab 公司生产;酶联免疫检测仪由芬兰 Thermo Labsys 公司生产;可见紫外分光光度计由上海尤尼柯仪器有限公司生产。

1.3 实验分组:将细胞按照正常培养和高糖/高胰岛素模拟 IR 培养(正常培养基中加入终浓度为 2.5×10^{-2} mol/L 葡萄糖及 100 U/L 胰岛素),并在高糖/高胰岛素模拟 IR 培养的基础上设模型组、L-NAME 组(终浓度为 10^{-4} mol/L)、吡格列酮组(10^{-4} mol/L)、复方丹参滴丸浸膏低、中、高剂量(0.1、0.5 和 1.0 g/L)干预组以及各干预药物合用 L-NAME 组。以不含细胞的培养基空白孔调零。将 VSMCs 接种在 96 孔板中,每孔 10^4 个细胞,在 37 °C、5%CO₂ 条件下培养。细胞传代 36 h 后,用含 0.4%小牛血清的培养基使细胞同步化,再分别给药干预 3 d。

1.4 MTT 比色法检测细胞增殖:细胞给药后 3 d 每孔加入 MTT 溶液(浓度 5 g/L)20 μ l,37 °C 继续培养 4 h。终止培养后吸弃孔内培养上清液,每孔加入 150 μ l DMSO 振荡混匀 15 min,使结晶充分溶解,选择 490 nm 波长,以不含细胞的培养基空白孔调零,用酶联免疫检测仪测定各孔吸光度(A)值。

1.5 NO 含量测定:收集细胞上清,利用硝酸还原酶法按照 NO 试剂盒说明书测定 NO 含量。

1.6 NOS 活性测定:收集 VSMCs,用 NOS 试剂盒测定总 NOS 活性。细胞 NOS 活性定义为每毫克蛋白每分钟生成 1 nmol 的 NO 为 1 个活性单位。

1.7 统计学分析:数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用 SPSS11.0 统计软件,多组间比较采用单向方差分析(One-way ANOVA),两组间比较采用 Student's *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 复方丹参滴丸对 VSMCs 增殖的影响(表 1):高糖/高胰岛素培养基可明显促进 VSMCs 增殖

表 1 复方丹参滴丸对模拟 IR 培养的兔胸主动脉 VSMCs 增殖、NO 含量和总 NOS 活性的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of compound Danshen dripping pill on the proliferation, NO content and total NOS activities of cultured rabbit VSMCs during the insulin resistance state ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	VSMCs 增殖(A 值)	NO 含量(μ mol/L)	总 NOS 活性(nmol/mg)
正常对照组	6	0.370 \pm 0.008	1.976 \pm 0.125	1.766 \pm 0.165
模型组	6	0.541 \pm 0.014 [#]	1.372 \pm 0.208 [#]	0.962 \pm 0.201 [#]
L-NAME 组	6	0.624 \pm 0.024 [▲]	1.024 \pm 0.184 [△]	0.558 \pm 0.128 [△]
吡格列酮组	6	0.294 \pm 0.016 [▲]	5.239 \pm 0.116 [▲]	6.537 \pm 0.131 [▲]
吡格列酮+L-NAME 组	6	0.436 \pm 0.016 [*]	3.736 \pm 0.156 [*]	3.571 \pm 0.133 [*]
低剂量复方丹参滴丸组	6	0.536 \pm 0.019	1.426 \pm 0.119	0.982 \pm 0.152
低剂量复方丹参滴丸+L-NAME 组	6	0.620 \pm 0.012	1.390 \pm 0.172	0.610 \pm 0.127
中剂量复方丹参滴丸组	6	0.317 \pm 0.026 [▲]	5.367 \pm 0.126 [▲]	5.943 \pm 0.153 [▲]
中剂量复方丹参滴丸+L-NAME 组	6	0.439 \pm 0.021 [*]	4.032 \pm 0.128 [*]	4.823 \pm 0.178 [*]
高剂量复方丹参滴丸组	6	0.286 \pm 0.017 [▲]	5.068 \pm 0.197 [▲]	6.105 \pm 0.162 [▲]
高剂量复方丹参滴丸+L-NAME 组	6	0.415 \pm 0.018 [*]	3.851 \pm 0.213 [*]	5.463 \pm 0.196 [*]

注:与正常对照组比较:[#] $P < 0.01$;与模型组比较:[△] $P < 0.05$,[▲] $P < 0.01$;与相应 L-NAME 组比较:^{*} $P < 0.01$

($P < 0.01$)。吡格列酮以及中、高剂量复方丹参滴丸对高糖/高胰岛素培养基中 VSMCs 增殖均有抑制作用(P 均 < 0.01)。L-NAME 促进模拟 IR 组的 VSMCs 增殖,吡格列酮及中、高剂量复方丹参滴丸能部分阻断 L-NAME 对模拟 IR 培养基 VSMCs 的促增殖作用(P 均 < 0.01)。而低剂量复方丹参滴丸对高糖/高胰岛素培养基中 VSMCs 增殖的抑制作用无显著性。

2.2 复方丹参滴丸对 VSMCs 培养液中 NO 含量的影响(表 1):VSMCs 经模拟 IR 培养,其培养液中 NO 含量较正常培养液中低($P < 0.01$)。吡格列酮及中、高剂量复方丹参滴丸干预均可使 VSMCs 在模拟 IR 培养时的 NO 含量增加(P 均 < 0.01)。模拟 IR 培养组单用 L-NAME 时,细胞的培养液中 NO 含量明显降低($P < 0.05$),在联用吡格列酮及中、高剂量复方丹参滴丸后,明显改善 VSMCs 生成 NO 的作用(P 均 < 0.01)。而低剂量复方丹参滴丸对细胞培养液中 NO 含量的影响无显著性。

2.3 复方丹参滴丸对 VSMCs 总 NOS 活性的影响(表 1):模拟 IR 培养组 VSMCs 的总 NOS 活性明显下降($P < 0.01$)。吡格列酮及中、高剂量复方丹参滴丸干预均能明显增加模拟 IR 培养 VSMCs 总 NOS 活性(P 均 < 0.01)。单用 L-NAME 能明显抑制总 NOS 活性($P < 0.05$),且这一作用可被吡格列酮及中、高剂量复方丹参滴丸部分阻断(P 均 < 0.01)。而低剂量复方丹参滴丸对细胞培养液中总 NOS 活性的影响不明显。

3 讨论

胰岛素与靶细胞表面胰岛素受体结合,激活酪氨酸激酶导致一系列胰岛素受体底物磷酸化,进而激活丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)和磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)两条信号转导途径。当发生 IR 时,一方面高水平胰岛素通过 MAPK 途径刺激 VSMCs 增殖,促使血管腔狭窄、血管壁弹性降低;另一方面 PI3K 途径障碍,除影响糖代谢,还直接导致 NOS 活性下降,L-精氨酸(L-Arg)-NOS-NO 通路受损,血管内皮细胞合成、释放血管收缩物质内皮素(ET)增加,致 NO 生成减少、活性下降。因而在 IR 的状态下,VSMCs 呈现异常增殖,导致血管壁增厚、弹性下降、动脉粥样硬化等多种病理改变^[2]。因此,改善 IR、抑制或逆转 VSMCs 增殖是防治血管增殖性疾病的重要措施。

NO 是迄今所知最强的内源性血管舒张剂,维持体内心血管系统功能的重要活性分子之一,与血

管结构和功能密切相关,具有舒张血管、调节血流、清除超氧自由基、抑制血小板聚集等重要功能,是心血管系统抑制 VSMCs 增殖、抗动脉粥样硬化、防止血栓形成和维持正常血管舒缩反应中必不可少的保护因子^[3-5]。NO 激活可溶性鸟苷酸环化酶,通过升高细胞内环磷酸鸟苷(cGMP)的水平舒张血管、降低血压、抑制 VSMCs 分裂增殖和血小板黏附^[6]。NO 还可以经细胞外信号调节激酶引起周期依赖性蛋白激酶抑制剂 p21^{waf1/Cip1}蛋白水平的增加,抑制 VSMCs 增殖^[7-9]。IR 时 PI3K/蛋白激酶 B(PKB)信号转导异常,内皮功能受损,NOS 活性降低,下游信号 NO 生成减少^[10]。NOS 抑制剂 L-NAME 可逆转 L-Arg 的作用,抑制 NO 合成,加重 IR^[11]。

高糖/高胰岛素培养基模拟 IR 状态,是体外细胞培养实验中常用的模型^[12]。本实验结果表明,与正常培养比较,高糖/高胰岛素培养可以明显诱导 VSMCs 增殖。

噻唑烷二酮类药(TZDs)是目前最有效的 IR 干预药物,它激活核转录因子过氧化酶体增殖受体 γ (PPAR γ)^[13],能显著抑制体外培养的相关细胞增殖反应、细胞外基质的分泌表达以及多种炎症细胞因子的分泌,显示了它的抗炎、抗纤维化作用^[14]。激活 PPAR γ 可以改变细胞周期调节因子活性,阻断 Rb 的磷酸化,抑制 Cdk 的活性,上调 p27^{kip1}的表达,抑制细胞从 G1 期进入 S 期;抑制基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的表达与活性,抑制 VSMCs 增殖^[15];还增加细胞因子介导的 NOS 表达,提高 NO 含量,促进 VSMCs 凋亡^[16]。本研究同样观察到吡格列酮在模拟 IR 培养状态下可上调 NOS 活性,增加 NO 含量,抑制 VSMCs 增殖,并被 NOS 抑制剂部分阻断。

中药是我国传统文化的瑰宝,有数千年使用历史,其作用温和、不良反应较少。有报道中药及其有效成分具有较好的抑制 VSMCs 增殖作用。复方丹参滴丸通过扩张血管、改善血流、调节血脂、上调 NOS 活性、增加 NO 含量,发挥抑制 VSMCs 增殖的作用^[17,18]。在动脉硬化模型家兔实验中发现,复方丹参滴丸干预后家兔脂质斑块中血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)表达明显下调,而且颈动脉斑块面积、内膜-中膜厚度及其比例均明显降低^[19]。在另一髂动脉球囊损伤家兔模型实验中也观察到,复方丹参滴丸干预后内膜增生程度较模型组明显减轻,内膜中平滑肌细胞和纤维组织明显减少,管腔狭窄程度减轻^[20]。在人脐静脉内皮细胞损伤实验中观察到,复方丹参滴丸干预可使 NOS 活性增加,ET-1

分泌减少, NO 分泌增加, 细胞活性提高^[21,22]。本研究中进一步观察到, 复方丹参滴丸在模拟 IR 培养状态下可上调 NOS 活性, 增加 NO 含量, 抑制 VSMCs 增殖, 并被 NOS 抑制剂部分阻断, 且此作用呈现一定剂量依赖性。可以预期, 复方丹参滴丸作为我国第一个通过美国食品与药物管理局 (FDA) 临床试验许可 (IND) 审查的中药复方制剂^[23], 在防治 VSMCs 增殖性疾病中将具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 陈鹭颖, 徐江平, 庞建新, 等. 一氧化氮部分介导吡格列酮抑制培养兔胸主动脉平滑肌细胞增殖[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2005, 10(6): 642-645.
- [2] Trovati M, Anfossi G. Influence of insulin and of insulin resistance on platelet and vascular smooth muscle cell function [J]. J Diabetes Complications, 2002, 16(1): 35-40.
- [3] 王绪栋, 张平, 张承芳. 一氧化氮与糖尿病[J]. 社区医学杂志, 2006, 4(11): 45-46.
- [4] 张成秋, 杨纯珍, 葛志明. 糖尿病心血管病变与一氧化氮及一氧化氮合酶的关系[J]. 中国老年学杂志, 2006, 26(3): 419-421.
- [5] 李海聪, 史载祥. 心血管一氧化氮异常及中西医结合治疗进展[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2001, 8(1): 57-59.
- [6] Minamiyama Y, Takemura S, Hai S, et al. Nicorandil elevates tissue cGMP levels in a nitric-oxide-independent manner [J]. J Pharmacol Sci, 2007, 103(1): 33-39.
- [7] Zuckerbraun B S, Stoyanovsky D A, Sengupta R, et al. Nitric oxide-induced inhibition of smooth muscle cell proliferation involves S-nitrosation and inactivation of RhoA [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 292(2): C824-831.
- [8] 檀战山, 刘军生, 耿晓军, 等. 平滑肌细胞凋亡在自然消退动脉粥样硬化中作用的实验研究[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14(12): 739-742.
- [9] 陆俊羽, 姚伟, 钱桂生, 等. bcl-2, bax 在 NHE-1 核酶基因转染所致缺氧大鼠肺动脉平滑肌细胞凋亡中的作用[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16(7): 394-398.
- [10] 向光大. 胰岛素抵抗与血管内皮功能[J]. 中华糖尿病杂志, 2005, 13(5): 321-323.
- [11] Koshinaka K, Oshida Y, Han Y Q, et al. The effect of nitric oxide synthase inhibitor on improved insulin action by pioglitazone in high-fructose-fed rats [J]. Metabolism, 2004, 53(1): 22-27.
- [12] Begum N, Ragolia L. High glucose and insulin inhibit VSMC MKP-1 expression by blocking iNOS via p38 MAPK activation [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2000, 278(1): C81-91.
- [13] Hsueh W A, Jackson S, Law R E. Control of vascular cell proliferation and migration by PPAR-gamma: a new approach to the macrovascular complications of diabetes [J]. Diabetes Care, 2001, 24(2): 392-397.
- [14] 阳晓, 张海燕, 张亚杰, 等. PPAR α 和 α -SMA 在单侧输尿管梗阻大鼠肾组织中的表达及其意义[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(10): 611-614.
- [15] Game B A, Maldonado A, He L, et al. Pioglitazone inhibits MMP-1 expression in vascular smooth muscle cells through a mitogen-activated protein kinase-independent mechanism [J]. Atherosclerosis, 2005, 178(2): 249-256.
- [16] Aizawa Y, Kawabe J, Hasebe N, et al. Pioglitazone enhances cytokine-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells and reduces intimal hyperplasia [J]. Circulation, 2001, 104(4): 455-460.
- [17] 张雪琨. 复方丹参滴丸对动脉粥样硬化治疗作用的超声观察研究[J]. 重庆医学, 2005, 34(11): 1755-1756.
- [18] 诸葛丽敏, 吴清, 楼正家. 复方丹参滴丸对动脉硬化粥样斑块及颈动脉血流的影响[J]. 中医学杂志, 2004, 22(11): 2114-2115.
- [19] 陈建宗, 田季雨, 顾宜, 等. 复方丹参滴丸对动脉粥样硬化家兔颈动脉血管壁血管细胞黏附分子-1 表达的影响[J]. 中国临床康复, 2004, 8(24): 5048-5049.
- [20] 马晓静, 张兴华, 马红军, 等. 复方丹参滴丸对球囊损伤血管内膜增生修复的影响[J]. 临床心血管病杂志, 2006, 22(7): 437-438.
- [21] 王东霞, 王孝铭, 许晶兰. 复方丹参滴丸对血管内皮细胞功能及形态保护作用的研究[J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(5): 933-937.
- [22] 许晶兰, 王孝铭, 王东霞. 复方丹参滴丸对过氧化氢损伤的人脐静脉血管内皮细胞的保护作用[J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(5): 929-932.
- [23] 郭治昕. 复方丹参滴丸的中药现代化研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2000, 7(4): 14-15.

(收稿日期: 2007-05-13 修回日期: 2007-07-18)

(本文编辑: 李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

欢迎订阅《中国危重病急救医学》杂志

《中国危重病急救医学》杂志系中华医学会和天津市天和医院主办的中华医学会系列杂志, 是我国急救医学界权威性学术期刊, 为中文核心期刊和中国科技核心期刊。本刊为月刊, 每月 10 日出版, 国际通用 16 开大版本, 内文用 80 克铜版纸印刷, 内容丰富, 且适合各种病理图片印刷。欢迎广大读者到当地邮局办理 2007 年的订阅手续。邮发代号: 6-58; 定价: 8.6 元/期, 全年 103.2 元。

订阅本刊的读者如果遇有本刊装订错误, 请将刊物寄回编辑部调换, 我们将负责免费邮寄新刊。

《中国危重病急救医学》杂志已进入美国《医学索引》(MEDLINE)、美国《化学文摘》(CA)、荷兰《医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、CMCC 数据库、“万方数据网络系统 (China Info)”、“中文科技期刊数据库”、CNKI“中国期刊全文数据库”、“中国期刊网”、“中国学术期刊 (光盘版)”和“em120.com 危重病急救在线”。投本刊论文作者需对本刊以上述方式使用论文无异议, 并由全部作者或由第一作者全权代表其他作者在版权转让协议和投稿上签字同意。稿酬已在本刊付酬时一次付清, 不同意者论文可不投本刊。本刊设有各种栏目, 欢迎广大作者踊跃投稿。

2007 年以前的合订本和单行本请在杂志社发行部电话订购: 022-23042150。

地址: 天津市和平区睦南道 122 号天和医院内; 邮编: 300050。

(期刊编辑部)