

黄芪注射液体外对大鼠血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶-2 活性的抑制作用

黄进宇¹ 单江² 程刚² 翁少翔²

摘要 目的:探讨黄芪对大鼠血管平滑肌细胞(VSMC)分泌的基质金属蛋白酶-2(MMP-2)活性的抑制作用及其调节机制。方法:以黄芪注射液刺激体外培养的SD大鼠VSMC, Zymography法检测培养细胞上清液中MMP-2的活性, Western印迹法观察MMP-2蛋白水平变化。结果:黄芪在体外抑制大鼠VSMC分泌MMP-2的活性,且此作用呈浓度依赖性。结论:黄芪在体外抑制大鼠VSMC分泌MMP-2的活性,此作用为转录后调节。

关键词 肌,平滑,血管/药物作用 黄芪注射液/治疗应用 肽水解酶类/代谢

经皮腔内冠状动脉成形术(PTCA)已成为治疗冠心病最有效的方法之一,其成功率在95%以上,但术后再狭窄的发生影响了其远期疗效。据统计,PTCA术后再狭窄发生率为30%~50%,且主要发生在术后3~6个月内^[1]。PTCA术后,血管平滑肌细胞(VSMC)在中层增殖,并通过细胞外基质(ECM)的降解而迁移至内膜而形成新生内膜是再狭窄病理过程的特征性表现^[2]。基质金属蛋白酶(MMPs)是近年来发现的参与ECM降解及VSMC增殖和迁移的一类Zn²⁺依赖性的内肽酶所组成的蛋白酶家族,研究认为其在再狭窄发生、发展的病理过程中起重要作用。目前中药对VSMC表达MMPs活性的调节作用尚少报道。本研究探讨了中药黄芪对大鼠VSMC分泌的MMPs活性的影响并探讨其可能作用机理,现报告如下。

1 材料

1.1 动物:8周龄雄性SD大鼠。

1.2 主要试剂:胎牛血清和DMEM培养基由美国Gibco公司生产;L-精氨酸由Sigma公司生产;明胶由华美生物工程公司生产;高分子量蛋白标准为Gibco, Cat. No. 16001-018,分子量(KDa)标准分别为200, 97.4, 68, 43, 29, 18.4, 14.3;考马斯亮蓝R250为Amresco公司产品;Triton X-100由上海生工生物工程技术有限公司生产;MMP-2一抗、辣根过氧化物标记的羊抗兔IgG二抗及SM- α actin单克隆抗体由

北京中山生物技术有限公司生产;PVDF膜为Boehringer Mannheim公司产品;ECL显色试剂盒由Santa Cruz公司生产;黄芪注射液由成都地奥九泓制药厂生产(批号0010096),规格为10ml/支(相当于原生药20g)。

2 方法

2.1 血管平滑肌细胞的体外培养及鉴定:组织贴块法培养血管平滑肌细胞。大鼠活杀,在严格灭菌的条件下取出胸主动脉,放入预先灭菌的Hank's液中清洗3次,剪去小分支,刮除内、外膜,在含有10%胎牛血清的DMEM培养液中将血管条剪成1mm²大小的组织块,将组织块均匀种植到25ml的培养瓶内,瓶底朝上置于培养箱内,95%O₂、5%CO₂、37℃培养4~6小时后轻轻翻转培养瓶,加入10%胎牛血清DMEM培养液使培养液覆盖于组织块上,继续培养。细胞长满瓶底后以1:3的比例消化传代。以光镜及 α -actin免疫组化方法鉴定VSMC。

2.2 细胞处理:当培养的第3~6代VSMC贴壁生长至约90%时,弃10%胎牛血清DMEM培养液,无血清培养24h,换10%胎牛血清DMEM培养液(含0.4mM L-精氨酸)4ml/瓶,然后进行如下实验。将大鼠分为对照组、黄芪注射液2mg/4ml组(低剂量组)、黄芪注射液20mg/4ml组(中剂量组)、黄芪注射液200mg/4ml组(高剂量组)共4组,每组标本数为4,95%O₂、5%CO₂、37℃继续培养24小时。

2.3 Zymography^[3]:提取细胞培养液置入1.5ml的离心管中,2000r/min离心10min,取上清液行Zymography,采用SDS-PAGE电泳(Bio-Rad公司)。在配制10%分离胶过程中,加入一定量的明胶使其浓度为1mg/ml。细胞培养液上清(总蛋白10 μ g)与加样缓冲液[10%SDS, 4%蔗糖, 0.25mol/L Tris-HCl (pH6.8)和0.1%溴酚蓝]以3:1比例混合后直接加入4%浓缩胶的加样孔内,4℃、200V电压下电泳。电泳时加入经煮沸2~5min的高分子量蛋白标准10 μ l作为参照。电泳后将胶浸泡于2.5%Triton X-100中4℃下轻轻摇动,15min,2次,然后在含50mmol/L Tris-HCl (pH8.0)、5mmol/L CaCl₂和0.02%NaN₃的缓冲液内孵育,37℃过夜。孵育后,将胶放在0.1%

1 浙江省中西医结合医院,浙江省杭州市环城东路38号(310003)

2 浙江大学医学院附属第二医院内科

收稿日期:2002-04-15;修回日期:2002-06-03

考马斯亮蓝 R250 染色液中染色 30min,然后在脱色液中脱色,采用 Bio-Rad 公司 Quantity One 4.0 图像分析软件对降解带密度、面积进行扫描和照相。以降解条带面积 $\times$ (背景密度-降解条带密度)表示 MMP-2 活性。以对照组 MMP-2 活性为 100%,余各组 MMP-2 活性相应折算成百分比。

2.4 Western 印迹分析^[4]:细胞经 24 小时培养后搜集细胞培养液,2 000r/min 离心 10min 后取上清液真空干燥浓缩,蛋白浓度的测定采用 Lowry 法。取总蛋白 20 μ g,100℃煮沸 3min,10%SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离蛋白。电泳结束后,将蛋白转印到 PVDF 膜,转膜结束后,用 5%脱脂奶粉封闭 30min,加入稀释好的 MMP-2 一抗(1:250 稀释)室温振荡 0.5h 后,4℃过夜,次日弃一抗后 1 $\times$ TBST 40ml 洗膜 10min,3 次;再加入辣根过氧化酶标记的羊抗兔 IgG 二抗孵育 1h,1 $\times$ TBST 40ml 洗 6~8 次,每 10min 换液,此后按 ECL 显色试剂盒说明书操作,曝光后 X 线片采用 Bio-Rad 公司 Quantity One 4.0 图像分析软件进行光密度分析。以降解条带面积 $\times$ (背景密度-降解条带密度)表示 MMP-2 蛋白表达水平。以对照组 MMP-2 蛋白表达水平为 100%,余各组 MMP-2 蛋白表达水平相应折算成百分比。

2.5 统计处理方法:数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,输入 SPSS10.0 软件统计处理,数据比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

3 结果

3.1 黄芪对 VSMC 分泌的 MMP-2 活性抑制作用的量效关系:不同种类的动物其 VSMC 表达的 MMPs 种类有所区别。本实验结果显示,以明胶为底物,凝胶上 72KDa 及 92KDa 处浅染,以 72KDa 处明显,说明 SD 大鼠 VSMC 分泌的 MMPs 主要为 MMP-2,而 MMP-9 仅有少量表达。表 1 示,黄芪对 VSMC 分泌的 MMP-2 活性有抑制作用,且此作用呈浓度依赖性增强。

表 1 不同浓度的黄芪注射液对 MMP-2 活性影响的比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	MMP-2 活性
对照组	100
低剂量组(2mg/4ml)	81.86 $\pm$ 6.40*
中剂量组(20mg/4ml)	67.00 $\pm$ 11.75*
高剂量组(200mg/4ml)	52.75 $\pm$ 11.18*

* 与对照组比较, $P < 0.01$

3.2 黄芪对 VSMC 分泌的 MMP-2 蛋白表达作用的量效关系:表 2 示,随着黄芪刺激剂量的加大,培养上清中 MMP-2 蛋白表达水平呈逐渐下降的趋势,表

表 2 不同浓度的黄芪注射液对 MMP-2 蛋白表达的影响比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	MMP-2 蛋白表达水平
对照组	100
低剂量组(2mg/4ml)	85.22 $\pm$ 12.56
中剂量组(20mg/4ml)	62.49 $\pm$ 10.52*
高剂量组(200mg/4ml)	46.87 $\pm$ 9.75*

* 与对照组比较, $P < 0.01$

明黄芪在蛋白水平对大鼠 VSMC 分泌的 MMP-2 起抑制作用。

4 讨论

在 PTCA 术后,冠状动脉内皮结构和功能都遭到不同程度的破坏。损伤内膜表面的巨噬细胞和血小板释放白细胞介素 1(IL-1)、肿瘤坏死因子(TNF)、血小板衍生生长因子(PDGF)等多种生长因子和血管活性物质,诱导 VSMC 表达 MMPs 活性增加,促使 ECM 降解,导致 VSMC 增殖并由中层移行至内膜形成新生内膜。Kenagy 等^[5]通过建立与人较为接近的体外培养灵长类动物主动脉条 VSMC 迁徙模型来研究 MMPs 与 VSMC 增殖的相关性,发现 PDGF 诱导的 VSMC 增殖与 MMP-2 的活性相关,而碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)诱导的 VSMC 增殖则与 MMP-2 和 MMP-9 两者的活性均呈相关性。在 Wistar 大鼠颈动脉球囊扩张造成内膜损伤后发现,新生内膜中 MMP-2 蛋白表达水平和活性明显上升,且与内膜的增厚水平呈正相关^[6]。因此,MMPs 被认为与血管重构密切相关。Pauly 等^[7]的研究则发现,离体 VSMC 在增殖阶段能通过血管中层移行至内膜,这种能力能通过抑制 MMPs 活性而被削弱。近来一项前瞻性研究^[8]结果显示,发生再狭窄的患者其外周血和冠状静脉窦血流中 MMP-2 活性在 PTCA 术后 4h 和 24h 较未发生再狭窄的患者明显增高。因此,通过药物抑制 MMPs 活性,减少 ECM 的降解而阻止 VSMC 的增殖和迁移是改善 PTCA 术后再狭窄程度的一个可能的切入点。

黄芪为豆科植物膜荚黄芪和蒙古黄芪的干燥根。其味甘,性温,有补气升阳、固表止汗、利水消肿、托毒排脓等功效,是传统的心血管疾病治疗药物。多年来对单味黄芪、复方及其有效成分进行了大量的心血管药理研究,证实黄芪具有强心、保护缺血、再灌注损伤及感染心肌等多种明确的药理作用,并对相应作用的机理进行了深入的探讨^[9~13]。但其对 PTCA 术后再狭窄是否有作用目前尚少见报道。

一氧化氮(NO)是一种具有高度反应性的细胞信使,在体内经 NO 合酶催化,从 L-精氨酸产生,其生物学作用是近年来的研究热点。通过以复制缺陷的腺病

毒为载体的基因转导技术,将内皮型 NO 合酶基因转入 VSMC, Milind 等^[14]证实 NO 抑制了 VSMC 分泌的 MMP-2 和 MMP-9 活性,与此同时 VSMC 迁徙能力也明显下降。Fukuda^[15]以黄芪的水提物刺激培养的 VSMC,发现 VSMC 中诱导型 NO 合酶(iNOS)的信使核糖核酸和蛋白表达水平显著增加,并能通过 NO-sGC-cGMP 介导的信号转导途径调节 VSMC 的细胞功能。本研究结果表明,在 NO 合成前体 L-精氨酸存在的情况下,黄芪通过转录后水平的调节抑制 VSMC 分泌的 MMP-2 活性,推测此作用与黄芪刺激 VSMC 产生 NO 有关,值得对此进行深入的基础和临床研究。志谢 本研究在浙江省邵逸夫医院中心实验室完成,谨向方向明主任、王琦老师和全体实验室工作人员表示衷心的感谢。

参考文献

- Califf RM, Fortin DF, Frid DJ, et al. Restenosis after coronary angioplasty. J Am Coll Cardiol, 1991, 17(6 Suppl B): 2B-13B.
- Bendeck MP, Zempo N, Clowes AW, et al. Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat. Circ Res, 1994, 75(3): 539-545.
- Kleiner DE, Stetler - Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. Anal Biochem, 1994, 218(2): 325-329.
- 金冬雁,黎孟枫译.分子克隆.第2版.北京:科学出版社,1995:888-897.
- Kenagy RD, Hart CE, Stetler-Stevenson WG, et al. Primate smooth muscle cell migration from aortic explants is mediated by endogenous platelet - derived growth factor and basic fibroblast growth factor acting through matrix metalloproteinases 2 and 9. Circulation, 1997, 96(10): 3555-3560.
- Jenkins GM, Crow MT, Bilato C, et al. Increased expression of membrane-type matrix metalloproteinase and preferential localization of matrix metalloproteinase-2 to the neointima of balloon-injured rat carotid arteries. Circulation, 1998, 97(1): 82-90.
- Pauly RR, Passaniti A, Bilato C, et al. Migration of cultured vascular smooth muscle cells through a basement membrane barrier requires type IV collagenase activity and is inhibited by cellular differentiation. Circ Res, 1994, 75(1): 41-54.
- Hojo Y, Ikeda U, Katsuki T, et al. Matrix metalloproteinase expression in the coronary circulation induced by coronary angioplasty. Atherosclerosis, 2002, 161(1): 185-192.
- 赵卫. 正性肌力作用的单味中药实验研究近况. 中国中西医结合杂志, 1995, 15(7): 443-445.
- 陈羽, 吕文伟, 雷春利, 等. 黄芪皂甙与黄芪多糖对急性心梗的保护作用及其机制分析. 中药药理与临床, 1994, 10(3): 12-16.
- Miller AL. Botanical influences on cardiovascular disease. Altern Med Rev, 1998, 3(6): 422-431.
- Zhou S, Shao W, Zhang W. Clinical study of Astragalus injection plus ligustrazine in protecting myocardial ischemia reperfusion injury. 中国中西医结合杂志, 2000, 20(7): 504-507.
- 郭棋, 彭天庆, 杨家珍, 等. 药物对病毒感染培养心肌细胞 Ca^{2+} 内流及 CVB3-RNA 复制的影响. 中国病毒学, 1996, 11(1): 40-43.
- Milind VG, Ram VS, Ramesh CB. eNOS gene transfer inhibits smooth muscle cell migration and mmp-2 and mmp-9 activity. Arterioscler Thromb Vasc Bio, 1999, 19: 2871-2877.
- 王柯慧译. 通过黄芪、人参和黄芪水提物的处理增加血管平滑肌细胞中 NO 合酶和环磷鸟苷. 国外医学中医中药分册, 1996, 18(2): 38-39.

中医杂志医海林音像书店向您推荐以下医学光盘

新出版 VCD

内科常见病证的推拿治疗 48 元
小儿支气管哮喘的中医治疗 48 元
小儿营养不良的中医治疗 48 元
中枢神经系统疾病的 CT 诊断 48 元
膝部筋伤的推拿治疗 48 元
外科体查 48 元
妇产科体格检查 48 元
小针刀(2 盘)370 元
注射止痛法(2 盘)350 元
脑卒中的外科治疗 38 元
骨折科临床常用检查方法 38 元
老年糖尿病的防治 38 元
前列腺炎增生症的诊断和治疗 38 元
皮肤良性肿瘤的鉴别和治疗 38 元
急性脑血管疾病的鉴别和治疗 38 元
急性胰腺炎的鉴别和治疗 38 元
急性白血病的分类鉴别和治疗 38 元
再生障碍性贫血 38 元
心血管活动的神经体液调节 38 元
有机磷农药中毒及解救 38 元
老年常见急症的鉴别 38 元
脂肪肝的预防与治疗 38 元
肺结核的诊断和治疗 38 元
甲型肝炎的诊断与治疗 38 元
乙型肝炎的诊断和治疗 48 元
丙型肝炎的诊断和治疗 38 元
消化性溃疡 38 元
慢性肺原性心脏病 38 元
水、电解质代谢、酸碱平衡失调 38 元
心肌梗塞 38 元 外科感染 38 元
面部除皱术 38 元 腹壁整形 38 元
原发性高血压 38 元
慢性肾功能衰竭的诊断和治疗 38 元
原发性肾小球肾炎的诊断和治疗 38 元
糖尿病的诊断与治疗 38 元

急性心肌梗死的鉴别和治疗 38 元
急性心力衰竭的鉴别和治疗 38 元
慢性阻塞性肺气肿的鉴别和治疗 38 元
类风湿关节炎的鉴别与治疗 48 元
外科手术基本技术 38 元
腰椎间盘突出症(西医为主)38 元
皮炎和湿疹的鉴别与治疗 38 元
银屑病的治疗 38 元
淋病的鉴别与治疗 38 元
病毒性皮肤病的鉴别与治疗 38 元
真菌性皮肤病的鉴别与治疗 38 元
生殖器疱疹的鉴别与治疗 38 元
女性生殖道常见性病的鉴别 38 元
白内障的鉴别和治疗 38 元
全身体格检查 38 元
神经系统阳性体征 38 元
痔 38 元 复术 38 元
心脏体格检查 38 元
常用专科护理技术 58 元
人工流产 38 元 正常分娩 38 元
不孕症 38 元 异位妊娠 38 元
宫腔镜的临床应用 38 元
产褥感染 38 元 产褥出血 38 元
性病的防治 38 元
尖锐湿疣的鉴别与治疗 38 元
妇产科超声诊断(上、下)76 元
小儿常见病的推拿治疗 38 元
小儿肥胖症 38 元 新生儿窒息 38 元
小儿精神神经发育过程 38 元
中医舌诊 48 元 拔罐法 38 元
常用穴位取穴法 38 元
经外奇穴的部位和临床应用 38 元
针灸法 38 元 灸法 38 元
颈椎病的鉴别与治疗 38 元
中风的康复治疗 38 元
耳针疗法 38 元

常见腰腿痛病推拿治疗 38 元
足部按摩 38 元 八纲辨证 38 元
推拿手法治疗颈椎病 48 元
癫痫的鉴别与治疗 38 元
口腔检查与口腔卫生保健 38 元
解剖学
四肢断面解剖 48 元
消化系统解剖 48 元
运动系统解剖(骨、关节)48 元
运动系统解剖(肌肉)48 元
呼吸系统解剖 48 元
心血管系统解剖 38 元
感觉器解剖 38 元
淋巴系统解剖 38 元
神经系统解剖(中枢神经)38 元
神经系统解剖(脑神经)48 元
神经系统解剖(脊神经)38 元
人体表面解剖学(头颈部)50 元
人体表面解剖学(腹部)50 元
人体表面解剖学(胸部)50 元
人体表面解剖学(上下肢)50 元
诊断学
骨关节疾病的影像学诊断 38 元
肝、胆、胰病的影像学诊断 38 元
临床常用诊断技术(2 盘)76 元
心电图向量与心电图 50 元
体检诊断学(2 盘)100 元
体格检查与阳性体征(3 盘)150 元
体格检查手法操作规范 50 元
超声检查 50 元
心脏检查 35 元
腹部检查 30 元
肺部检查 30 元
肾功能检查 38 元
呼吸系疾病常用治疗方法 50 元

脊柱与四肢体格检查 38 元
皮肤病诊断 30 元
眼科检查法 38 元
护理学基础操作
出入院护理、生命体征观察 38 元
搬运法、舒适与安全 38 元
无菌技术、隔离技术 38 元
口腔卫生、头发护理 38 元
皮肤护理 38 元
晨间护理、晚间护理 38 元
鼻饲法、洗胃法 38 元
灌肠术、导尿术 38 元
口服给药法、吸入法 38 元
注射法、静脉输液和输血 38 元
中国肛肠病学
总论 50 元 痔 50 元 肛瘘 50 元
肛周脓肿 50 元 肛裂 50 元
中医基础、针灸、按摩
阴阳 50 元 五行 50 元 六淫 50 元
七情 50 元 藏象 50 元
金匱要略 50 元
脉诊 50 元 舌诊 50 元
舌体内脏部位的九区分法 50 元
舌下络脉诊法 50 元
中医四诊 35 元
邱茂良教授针刺手法 50 元
耳穴的取法 50 元
小儿指纹诊法 50 元
针灸推拿应用精选 45 元
实用针灸 45 元
针挑疗法 50 元
中国腕踝针疗法 35 元
针刺治疗腰痛 50 元
针刺治疗颈肩肘腕痛 50 元
针刺透刺治疗疑难杂症 50 元
耳穴的激光疗法 50 元

督脉灸 50 元 头针 50 元
经络灸法 50 元
实用电针疗法(3 盘)150 元
中国芒针实用疗法(2 盘)100 元
实用推拿手法 50 元
常见肩部筋伤的推拿治疗 38 元
腰椎间盘突出症归位操(2 盘)90 元
腰椎间盘突出的治疗 50 元
杨天鹏推拿手法 50 元
河南正骨 50 元 学按摩(2 盘)80 元
颈椎小关节紊乱腰椎间盘突出 40 元
急性腰扭伤 50 元
《全息经络刮痧》教学 VCD(上、下 2 盘)85 元
计算机光盘(CD-ROM)
超声检查的临床应用 100 元
临床常用诊断技术 100 元
心肺复苏 100 元
血液一般检查 100 元
小儿水电解质酸碱平衡紊乱 100 元
妇科常用体格检查及常见症状鉴别 100 元
泌尿、男性生殖系统外科检查和诊断 100 元
以上音像制品全部免邮资,详细目录,函索即寄。
欲购者汇款地址:北京东直门内南小街 16 号中医杂志社,收款人:北京医海林音像书店,邮编:100700。
本店地址:北京东直门内南小街 16 号,中国中医研究院基础所楼 5 层 517 房间(星期六、日休息)。联系人:曹阿京。电话:(010)64014411 转 3038, 64035632, 传真:(010)86472013
E-mail:jtcmm@public3.bta.net.cn
(广告编号:20030217)