

· 论 著 ·

白藜芦醇对糖尿病大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响

李 佳¹, 姜 鲜², 章 卓³

(泸州医学院:1. 附属医院内分泌科;2. 附属医院麻醉科;3. 药学院药理教研室, 四川泸州 646000)

摘 要:目的 观察白藜芦醇对糖尿病大鼠血管平滑肌细胞(VSMC)增殖影响及对核因子- κ B(NF- κ B)的影响。方法 采用一次性腹腔注射链脲佐菌素(STZ)55 mg/kg 诱发糖尿病大鼠模型,取建模成功大鼠胸主动脉中膜血管平滑肌细胞进行培养,倒置显微镜下观察细胞形态,SMA 免疫组化染色鉴定细胞,计数法观察细胞的生长曲线,CCK-8 法测定白藜芦醇 IC_{50} ,共聚焦显微镜下观察白藜芦醇对 VSMC 中 NF- κ B 核转移的影响。结果 与正常组对比,糖尿病组 VSMC 生长速度快,白藜芦醇能明显抑制糖尿病血管平滑肌细胞增殖, IC_{50} 为 $(38.96 \pm 2.14) \mu\text{mol/L}$,有剂量依赖性;白藜芦醇能抑制糖尿病 VSMC 中 NF- κ B 从胞浆转移到胞核。结论 白藜芦醇能抑制糖尿病 VSMC 增殖与 NF- κ B 的核转移。

关键词:白藜芦醇;糖尿病;血管平滑肌细胞;核转录因子- κ B

中图分类号:R543;R331.3

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)14-1822-02

Effects of resveratrol on the proliferation of diabetes mellitus rats vascular smooth muscle cells

LI Jia¹, JIANG Xian², ZHANG Zhuo³

(1. Department of Endocrinology, The Affiliated Hospital; 2. Department of Anesthetic, The Affiliated Hospital; 3. Department of Pharmacology, Luzhou Medical College, Sichuan 646000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of resveratrol (Res) on nuclear factor- κ B(NF- κ B) activity in proliferation of Diabetes Mellitus rats vascular smooth muscle cells (VSM-C). **Methods** Diabetes model of rat were established with STZ55mg/kg 1 once through intraperitoneal injection, thoracic aortic vascular smooth muscle cell membrane of diabetes rat were cultured, the cells were observed with inverted microscope, identified with SMA immunohistochemistry and the cell growth curve were described, the inhibitory rate of 50% concentration were determined by CCK-8, the localization of NF- κ B in VSMC with or without breviscapine were estimated by laser confocal microscopy. **Results** Compared with the normal group, Diabetes VSMC group was grow faster, Res could inhibit DM VSMC proliferation in a dose-dependent manner, IC_{50} was $(38.96 \pm 2.14) \mu\text{mol/L}$; Res could inhibit NF- κ B in DM VSMC transfer from the cytoplasm to the nucleus. **Conclusion** Res inhibit the proliferation of DM VSMC and NF- κ B transfer.

Key words: resveratrol; Diabetes Mellitus; Vascular smooth muscle cell; NF- κ B

大量基础和临床研究已证实,血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)的异常增殖迁移和表型改变是糖尿病大血管病变的主要病理学基础之一^[1],而血管平滑肌的异常增殖可能与核因子- κ B 激活有关。白藜芦醇(Resveratrol, Res)是从多年生草本植物蓼科蓼属虎杖的根茎中提取的单体,分子式为 $C_{14}H_{12}O_3$ 。研究显示,白藜芦醇能够降低血糖,抑制 ROS 诱导的核转录因子(NF- κ B)信号途径激活^[2-3]。本实验通过培养和建立糖尿病大鼠 VSMC 模型^[4],观察白藜芦醇对大鼠 VSMC 的增殖及 NF- κ B 核转移的影响,以此评价白藜芦醇体外抗糖尿病血管病变作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级 SD 大鼠,雄性,体质量 200~240 g,由泸州医学院实验动物科提供(合格证号:川医动字 2401115)。

1.1.2 样品及试剂 白藜芦醇(陕西森弗生物技术公司,纯度 98%,白色粉末);链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)(美国 Sigma 公司,批号 S0130);RPMI1640(GIBCO 公司);胰蛋白酶(美国 Sigma 公司);胎牛血清(天津灏洋生物制品科技有限责任公司);CCK-8(碧云天生物技术研究);免疫组化染色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);NF- κ B 激活-核转运检测试剂盒(碧云天生物技术研究);DAB 显色剂(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.1.3 仪器 倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司,CKX41 型);CO₂ 培养箱(日本 Sanyo 公司, MCO-15AC 型);超净工作台(苏州净化设备有限公司, SW-CJ-1F 型);离心机(北京医用离心机厂, LG10-3A 型);电子天平(上海民桥精密科学仪器有限公司, FA1104N 型);超低温冰箱(日本 Sanyo 公司, MDF-192 型);高压消毒锅(上海申安医疗器械厂, LDZX-40BI 型);酶标分析仪(北京普朗新技术有限公司, DNM-9602 型);优普超纯水机(成都超纯科技有限公司, UPH-IV-10T 型);激光共聚焦扫描显微镜(德国 LEICA 公司, TCS SP5 型);日本京都血糖仪(日本爱科来株式会社, GT-1640 型)。

1.2 方法

1.2.1 糖尿病大鼠模型建立 大鼠一次性腹腔注射 STZ, pH 4.5, 0.1% 枸橼酸缓冲液新鲜配制)55 mg/kg 造糖尿病大鼠模型。72 h 后采用大鼠断尾取血测血糖值,连续测 3 d。以血糖水平大于 16.7 mmol/L 为糖尿病建模成功。

1.2.2 VSMC 的培养 取建模成功大鼠正常喂饲 1 个月后颈椎脱臼处死, 75% 乙醇浸泡 2~3 min, 在无菌环境中迅速取出胸主动脉, 剥去血管外膜, 去除内膜, 取中膜血管平滑肌, 剪成 1.5~2.0 mm³ 大小的组织块, 平铺于培养瓶, 加入含血清的 RPMI1640, 放入 37 °C、5% 的 CO₂ 培养箱中静置培养 3 d。倒置显微镜下观察细胞生长状况。

1.2.3 VSMC 的鉴定 (1)用相差倒置显微镜观察细胞;(2)SMA 免疫组织化学染色:将细胞接种于置有小玻片的 6 孔板

中,培养至细胞成致密单层后取出玻片,PBS 冲洗后用冷丙酮固定,二步法进行 SMA 免疫组织化学染色。

1.2.4 细胞生长曲线测定 取生长良好细胞,胰酶消化后计数,调整细胞为 5×10^4 /mL 接种 24 孔板。24 h 后开始计数细胞,以后每隔 24 h 计数 1 次,每次取 3 个复孔,连续计数 7 d,计算平均值。根据结果,以单位细胞数(细胞数/mL)为纵坐标,时间为横坐标绘制生长曲线。

1.2.5 白藜芦醇 50%抑制率浓度测定 将 96 孔板分为空白(培养基)、阴性对照(细胞+培养基)、白藜芦醇 100、50、25、12.5、6.25、3.125 μ mol/L 组(细胞+培养基+药物),取生长良好的糖尿病 VSMC 细胞,调浓度为 1×10^5 /L 后接种于 96 孔细胞培养板,采用 CCK-8 法测定相应的吸光度(absorbent, A)值,按公式 $(1-A_{\text{实验}} \div A_{\text{对照}}) \times 100\%$ 得出不同浓度对应的抑制率,计算 50%抑制率浓度(IC₅₀)。

1.2.6 NF- κ B 核转运检测 调整 VSMC 细胞浓度为 1×10^5 /L 接种于 6 孔板中(板中事先放盖玻片),培养 1 d 待细胞贴壁,加入 100、50、25、12.5、6.25、3.125 μ mol/L 白藜芦醇培养 1 d,按 NF- κ B 激活-核转运检测试剂盒说明书进行操作。于波长 460 nm 处在共聚焦显微镜下观察细胞核、细胞浆颜色,拍照。

1.3 统计学方法 计量资料结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 13.0 统计软件包分析,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准。

2 结 果

2.1 糖尿病血管平滑肌的鉴定 倒置相差显微镜下单个平滑肌细胞呈梭形、扇形或三角形,有多个细胞突起,胞浆丰富,胞质密度高,不透明,核卵圆形居中,有多个核仁。细胞生长致密时平行排列成束,部分重叠,表现为旋涡状生长(见彩插 II 图 1)。经特异的平滑肌 α -actin 免疫细胞化学染色后,胞浆着色,呈阳性反应,高倍镜下可见胞浆内大量棕色、与细胞长轴平行的纤维细丝,即平滑肌 α 肌动蛋白丝(见彩插 II 图 2)。

2.2 正常组与糖尿病组大鼠血管平滑肌生长曲线比较 两者细胞增长程度与时间呈 S 型关系,但糖尿病组血管平滑肌增长速度比正常组快,见图 3。

表 1 白藜芦醇对正常 VSMCs 和糖尿病 VSMCs 细胞的 IC₅₀ 值 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

细胞	IC ₅₀ (μ mmol/L)
正常 VSMCs	41.79 $\pm$ 5.21
糖尿病 VSMCs	38.96 $\pm$ 2.14

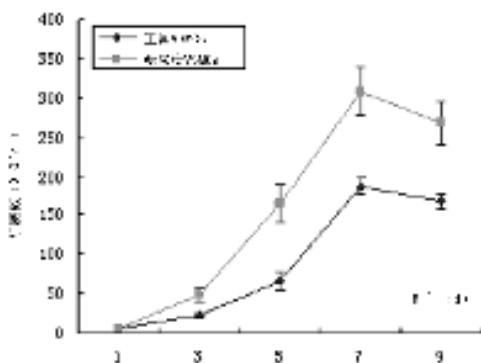


图 3 糖尿病大鼠与正常组 VSMC 生长曲线

2.3 白藜芦醇 50%抑制率浓度 白藜芦醇对正常 VSMC 生长有一定抑制作用,同模型组比较差异有统计学意义($P<0.05$);

对糖尿病 VSMC 增殖抑制呈明显的剂量相关性,IC₅₀ 值见表 1。

2.4 白藜芦醇对 VSMCs 中 NF- κ B 核转位的影响 正常组 VSMC 呈梭形、扇形或三角形,散在成簇生长,胞质中有中等强度红色荧光着色,胞核为蓝色荧光着色(见彩插 II 图 4),糖尿病组 VSMCs 胞质中红色着色稍减弱,胞核中红色荧光着色强(见彩插 II 图 5),白藜芦醇组可见胞质中的红色较糖尿病组强,正常组弱,胞核中红色着色较模型组弱,较正常组强(见彩插 II 图 6~9)。

3 讨 论

糖尿病患者发生心血管并发症的危险性较正常人高 3~4 倍,糖尿病大血管并发症即动脉粥样硬化是造成患者残疾和死亡的主要原因之一。VSMC 是动脉壁的主要成分,在血管内膜增生及血管重塑中起重要作用。内皮细胞损伤与平滑肌细胞增殖是动脉粥样硬化的重要病理基础,而在糖尿病患者,高血糖、胰岛素抵抗更通过激活 MAPK 等进一步促进 VSMC 的增殖和迁移,同时产生过量的细胞外基质,导致纤维组织增生,最终导致动脉粥样硬化斑块的形成和破裂[5]。

NF- κ B 是存在于细胞浆中的一种快反应转录因子,参与了动脉粥样硬化的过程。研究显示动脉粥样硬化的 VSMC 和巨噬细胞中都大量存在激活的 NF- κ B[6]。Ramana 等[7]的研究直接证明了 NF- κ B 调节 VSMC 增殖的重要作用。NF- κ B 激活参与糖尿病血管病变也得到了证实:糖尿病时,在某些刺激因素如 AGEs、氧化应激、脂代谢紊乱及细胞因子等的作用下,NF- κ B 被激活后即发生核转位,p65 亚基由胞质转移至胞核,与特定基因启动子或增强子上的特异性 κ B 序列结合,调节基因转录,启动血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)合成,促进单核细胞与血管内皮细胞的黏附,从而导致动脉粥样硬化的发生[8]。

本研究观察到体外培养糖尿病 VSMC 增长速度明显高于正常血管平滑肌,同时糖尿病大鼠 VSMC 出现 NF- κ B 的核转移,提示糖尿病 VSMC 有异常增殖,NF- κ B 在糖尿病大鼠 VSMC 中出现激活,与文献报道一致。采用白藜芦醇干预后,白藜芦醇各剂量组明显抑制血管平滑肌的增殖,并抑制了 NF- κ B 的核转移,提示白藜芦醇能够抑制糖尿病血管平滑肌的异常增殖,而此作用可能与抑制 NF- κ B 的核转移有关。至于与其他血管异常增殖因素有无关系尚需进一步研究。

参考文献:

[1] 李艳平,李新荣,邓湘蕾.糖尿病大鼠血管平滑肌细胞体外培养方法的探讨[J].东南大学学报:医学版,2005,24(3):186.

[2] 欧阳昌汉,吴基良,郑敏,等.白藜芦醇对糖尿病脑病小鼠保护作用的实验研究[J].中国药理通讯,2008,25(3):49.

[3] Leonard SS,Xia C,Jiang BH,et al. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical induced cellular responses[J]. Biochem Biophys Res Commun,2003,309:1017.

[4] 周晓莉,雷寒,柳青.血管平滑肌细胞的培养与鉴定[J].重庆医学,2005,34(6):877.

[5] 傅春江,何作云,王旭开,等.胰岛素对 SHR 血管平滑肌细胞增殖和表型转化的 MAPK 机制的研究[J].重庆医学,2008,37(6):569.

[6] 庞荣清,潘兴华,吴亚玲.三七总皂甙对兔血管平滑肌细胞核因子- κ B 和细胞周期的影响[J].中(下转第 1826 页)

色质重建和核小体共价修饰共同存在于同一蛋白复合物 NuRD 中,而 MTA1 是 NuRD 的一个亚单位之一,与组蛋白的去乙酰化呈正相关,因此是转录过程中的一个辅助抑制因子。因此,MTA1 可通过此种功能直接或者间接作用于某些抑制肿瘤浸润转移的基因,下调其转录。

MTA1 在肿瘤的侵袭转移中扮演了重要角色。Toh 等^[2]发现具有高转移能力乳腺癌细胞株 MTA1 表达水平是无转移能力细胞株的 4 倍。Sasaki 等^[8]研究表明,MTA1 mRNA 表达水平与非小细胞肺癌的临床分期密切相关,伴有淋巴结转移的非小细胞肺癌组织明显高于无淋巴结转移的癌组织,其差异有统计学意义。Toh 等^[9]运用 RT-PCR 技术检测人胃癌和大肠癌标本中 MTA1 基因 mRNA 的表达水平,并结合临床病理特征分析其与 MTA1 基因表达水平的关系,结果现,MTA1 基因过表达的大肠癌,其肠壁浸润的深度更深,淋巴结转移率更高,并多处于 Duke's 分期的晚期,常伴淋巴细胞包绕。这说明 MTA1 基因过表达与胃肠癌的浸润和转移有关,MTA1 mRNA 的高表达可作为估计胃癌和大肠癌恶性潜能的潜在指标。Iguchi 等^[10]研究发现,MTA1 基因可能与胰腺癌的侵袭,尤其是淋巴结转移有关。王会河等^[11]研究了 MTA1 基因与鼻咽癌浸润转移的关系,他们应用逆转录聚合酶链反应技术,检测了 43 例鼻咽癌组织和 20 例正常鼻咽部组织 MTA1 mRNA 的表达。MTA1 基因在鼻咽癌组织中的表达明显高于正常组织,其高表达与鼻咽癌浸润转移关系密切。刘海等^[12]采用荧光定量 PCR 及 Western 印迹技术,分别在 mRNA 和蛋白水平检测 42 例手术切除的人胃癌组织及癌旁组织中 MTA1 的表达,并结合胃癌的临床生物学特征分析 MTA1 表达与胃癌病理类型、淋巴结转移的关系,发现伴有淋巴结转移的胃癌组织中 MTA1 mRNA 的相对量表达明显高于不伴有淋巴结转移的胃癌组织。

本研究设计、合成了针对 MTA1 基因的特异性 RNA 干扰片断,构建了其 siRNA 真核表达质粒(pRNAi-1,pRNAi-2),然后转染高表达 MTA1 的大肝癌 HepG2 细胞株,并使其在细胞中稳定表达。转染 MTA1 siRNA 后,通过荧光定量 PCR 检测了各组细胞中 MTA1 基因的表达,发现与脂质体对照和空质粒转染对照比较,pRNAi-1 组与 pRNAi-2 组的 MTA1 mRNA 表达均显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明构建的 siRNA 载体可有效沉默 MTA1 mRNA 表达。同时应用 MTT 和流式细胞技术分析细胞的生长曲线和周期分布,发现 MTA1 siRNA 能够使细胞增殖速度减慢,并诱导细胞凋亡。

总之,本研究通过使用靶向 MTA1 的 siRNA,不仅有效抑制了 MTA1 基因在肝癌中的表达,还能在体外特异性抑制肝癌细胞的分裂增殖及诱导细胞的凋亡。

参考文献:

- [1] Toh Y,Pencil SD,Nicolson GL. A novel candidate metastasis-associated gene, mta1, differentially expressed in high metastatic mammary adenocarcinoma cell lines[J]. J Biol Chem,1994,269(37):22958.
- [2] Toh Y,Pencil SD,Nicolson GL. Analysis of the complete sequence of the novel candidate metastasis-associated gene, mta1, differentially expressed in highly metastatic mammary adenocarcinoma and breast cancer cell lines[J]. Gene,1995,159(1):97.
- [3] Nicolson GL,Nawa A,Toh Y,et al. Tumor metastasis-associated human MTA1 gene and its MTA1 protein product;role in epithelial cancer cell invasion,proliferation and nuclear regulation[J]. Clin Exp Metastasis,2003,20(1):19.
- [4] Elbashir SM,Harborth J,Lendeckel W,et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells[J]. Nature,2001,411:494.
- [5] 黄环,吴永忠. RNA 干扰技术及其在肿瘤研究中的进展[J]. 重庆医学,2008,37(2):198.
- [6] 杨松华,赵国强,郑红. RNAi 干扰食管癌 EC9706 细胞 MTA1 基因表达对侵袭和迁移的影响[J]. 第三军医大学学报,2008,30(6):503.
- [7] Xue Y,Wong J,Moreno GT,et al. NURD,a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities[J]. Mol Cell,1998,2(6):851.
- [8] Sasaki H,Moriyama S,Nakashima Y,et al. Expression of the MTA1 mRNA in advanced lung cancer[J]. Lung Cancer,2002,35(2):149.
- [9] Toh Y,Oki E,Oda S,et al. Over expression of the MTA1 gene in gastrointestinal carcinomas;correlation with invasion and metastasis[J]. Int J Cancer,1997,74(4):459.
- [10] Iguchi H,Imura G,Toh Y,et al. Expression of MTA1,a metastasis-associated gene with histone deacetylase activity in pancreatic cancer[J]. Int J Oncol,2000,16(6):1211.
- [11] 王会河,黄光武,莫立根,等. MTA1 表达与鼻咽癌浸润转移的关系[J]. 广西医科大学学报,2006,23(4):546.
- [12] 刘海,胡俊波,王志强,等. MTA1 基因表达与人胃癌的浸润和转移[J]. 世界华人消化杂志,2006,14(34):3317.

(收稿日期:2009-11-25 修回日期:2010-03-09)

(上接第 1823 页)

国微循环,2004,8(3):154.

- [7] Ramana KV,Chandra D,Srivastava S,et al. Aldose reductase mediates mitogenic signaling in vascular smooth muscle cells[J]. J Biol Chem,2002,277(35):32063.

- [8] 王芙蓉,高聆,于建中,等. 西洛他唑对糖尿病大鼠主动脉 VCAM-1、NF- κ B 及 PPARs 的影响[J]. 中国药理学通报,2006,22(2):197.

(收稿日期:2009-10-14 修回日期:2009-12-20)