

茶多酚对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响

欧阳平, 彭文烈, 赖文岩, 徐安龙*

(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘要: 目的 探讨茶多酚对离体大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞增殖的影响。方法 体外培养大鼠主动脉血管平滑肌细胞, 应用不同剂量的茶多酚作用 24 h 后, 采用 MTS/PES 法确定血管平滑肌细胞的增殖状态。应用流式细胞术测定细胞周期。结果 与对照组相比, 茶多酚对血管平滑肌细胞增殖具有明显的抑制作用 ($P < 0.001$)。流式细胞术检测结果表明, 茶多酚可以使血管平滑肌细胞大部分处于 G_0/G_1 期, 与对照组相比有明显差异 ($P < 0.05$), 并且可以诱导其凋亡。结论 茶多酚可明显抑制离体大鼠血管平滑肌细胞的增殖。

关键词: 茶多酚; 平滑肌; 血管; 细胞增殖

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)12-1102-03

Effects of tea polyphenols on rat vascular smooth muscle cells proliferation

OUYANG Ping, PENG Wen-lie, LAI Wen-yan, XU An-long

(College of Life Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract Object The purpose of this study was to determine the effects of tea polyphenols on rat vascular smooth muscle cells (VSMCs) proliferation. **Methods** Rat aortic VSMCs were cultured and treated with tea polyphenols for 24 h. Cell proliferation was quantified by colormetric assay and defined by MTS/PES. Cell cycle analysis was performed by flow cytometry. **Results** Compared with the control group, VSMCs growth was significantly inhibited by tea polyphenols ($P < 0.001$). Cell number in G_0/G_1 phase of tea polyphenols (1 mg/mL) group was higher than those of the control group ($P < 0.05$) by flow cytometry analysis. Apoptosis was observed in tea polyphenols groups by flow cytometry. **Conclusion** The tea polyphenols can markedly inhibit the rat VSMCs proliferation.

Key words tea polyphenols; smooth muscle; vascular; cell proliferation

血管平滑肌细胞 (VSMC) 增殖和表型改变是动脉粥样硬化及血管成形术后再狭窄的主要病理基础^[1]。茶多酚 (tea polyphenols, TP) 是从天然植物茶叶中分离提纯出来的多酚类化合物的复合体。近年来研究表明, 茶多酚具有多种药理效应, 如抗氧化、调血脂、防止血栓形成和抗衰老、抑制已形成肿瘤的大小、数目及其转移^[2,3]等作用。但茶多酚能否抑制血管平滑肌细胞增殖及其作用机制目前尚不清楚。本研究观察了绿茶茶多酚对离体大鼠血管平滑肌细胞增殖和细胞周期的影响, 为治疗以血管平滑肌细胞增殖为主的心血管疾病筛选新的天然药物先导物。

1 材料与方法

1.1 材料: DMEM 培养基购自 Gibco 公司, 胎牛血清 (FBS), 0.25% 胰酶均购自 Hyclone 公司。一次性细胞培养瓶、96孔板购自 Corning 公司。HEP-

ES 碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 均购自 Sigma 公司, 茶多酚复合物系从广西桂平西山绿茶中经本实验室采用特殊工艺提取制备, 为浅褐色粉末, 多酚类化合物含量 $> 95\%$ 。

1.2 血管平滑肌细胞的原代培养: 参考王道生贴块法^[4]进行。选用 6 周龄雄性 SD 大鼠 (第一军医大学实验动物中心提供), 断头处死, 取胸主动脉中膜以贴块法培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 置于 37°C 、5% CO_2 孵箱中培养, 一周后可见细胞从组织块边缘爬出, 2~3 周出现致密细胞层, 此时即可传代, 传代细胞呈典型的“峰与谷”样生长, 细胞经抗 α -actin 抗体鉴定为平滑肌细胞。实验所用的血管平滑肌细胞均为第 3~6 代传代细胞。

1.3 实验所用的 TP 用含 0.5% FBS 的 PBS 重新配制, 用 $0.22\mu\text{m}$ 的滤膜过滤, 而后用含 5% FBS

* 收稿日期: 2002-04-26

基金项目: 广州市科技攻关项目资助 (JB00000448165)

作者简介: 欧阳平 (1965-), 男, 医学博士, 1987年毕业于广州第一军医大学, 现为第一军医大学附属南方医院心血管内科主治医师、讲师, 2000年中山大学生命科学学院博士后。Tel (020) 61647640

* 通讯作者: 徐安龙 Tel (020) 84113655; E-mail ls36@zsu.edu.cn

的 DMEM 培养液稀释至所需的终浓度

1.4 细胞增殖评价: SD 大鼠血管平滑肌细胞用 0.25% 胰酶消化,然后在 96 孔板中以 5 000 个细胞/孔的密度铺板。8 h 后,换成无血清、含谷氨酸的 DMEM 培养基,无血清条件维持 48 h 以获得同步的细胞生长停止,然后,换成含 5% FBS 的 DMEM 培养基及相应的实验试剂,每组实验重复 6 次,每一组每次为 6 个孔,对照组为含 5% FBS 的 DMEM 培养基,24 h 后细胞的增殖率通过应用 CellTiter 96 Assay MTS/PES 试剂盒 (Promega Co. U. S. A, Cat 5421) 确定。具体方法是 MTS/PES 20 μ L 加入相应的孔中,96 孔板在 5% CO₂, 37℃ 孵箱中孵育 90 min,然后在 Bio-Rad 550 型 Microplate reader 以 490 nm 测吸光度,每孔重复 3 次,细胞的增殖率用吸光度来表达

1.5 流式细胞仪对血管平滑肌细胞周期的检测: 4℃, 1 000 r/min 离心 5 min,收获细胞; PBS 洗两次,4℃, 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,用含 2% FBS 的 PBS 制备单细胞悬液,使细胞数为 $\times 10^6$ /mL;吸取 1 mL 细胞到 15 mL 离心管中,加 3 mL 冰无水乙醇;在 4℃ 固定细胞 24 h; PBS 洗细胞两次,加入 1 mL 的 PI 染色液至离心管,加入 50 μ g/mL 的 RNase A 原液,4℃ 孵育 3 h,然后在流式细胞仪 Elite (美国 Coulter 公司) 上进行检测,采用 MUTICYCLE 软件 (Phoenix 公司) 分析结果

1.6 统计学分析: 资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 软件包,采用 ANOVA 和 Student-Newman-Keuls 检验分析。

2 结果

SD 大鼠血管平滑肌细胞生长静止后,以不同浓度的 TP 与 5 000 个细胞/孔的离体大鼠血管平滑肌细胞共同孵育 24 h,观察 TP 对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响。反映各组细胞增殖的吸光度结果及统计分析见表 1,结果表明,TP 能有效地抑制大鼠血管平滑肌细胞的增殖 ($P < 0.001$),但抑制作用不呈药物浓度依赖性 ($P > 0.05$)。流式细胞术测定的结果显示 1 mg/mL 的 TP 可以使 VSMC 大部分处于 G₀/G₁ 期,与对照组相比有明显差异 ($P < 0.05$),结果见表 2;同时,1 mg/mL 和 100 μ g/mL 的 TP 分别可诱导部分细胞发生凋亡,流式细胞术检测显示 DNA 直方图出现 DNA 降解的亚 G₁ 期凋亡峰 (AP),而对照组则没有显示 AP 峰,结果见图 1

3 讨论

表 1 TP 对大鼠血管平滑肌

细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	浓度 (μ g/mL)	细胞增殖率 (λ)
对照	—	0.935 $\pm$ 0.178
TP	1 000	0.575 $\pm$ 0.197 **
	900	0.594 $\pm$ 0.125 **
	800	0.629 $\pm$ 0.156 **
	700	0.672 $\pm$ 0.052 **
	600	0.687 $\pm$ 0.146 **
	500	0.627 $\pm$ 0.077 **
	400	0.681 $\pm$ 0.132 **
	300	0.544 $\pm$ 0.087 **
	200	0.697 $\pm$ 0.147 **
	100	0.599 $\pm$ 0.098 **

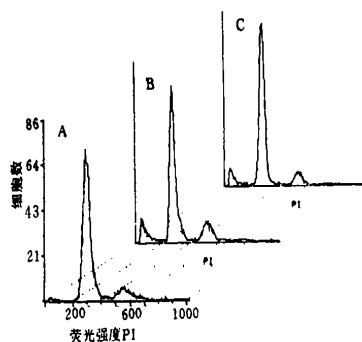
与对照组相比: *** $P < 0.001$

表 2 TP 对大鼠血管平滑肌

细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	浓度 (μ g/mL)	24 h		
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照	—	79.0 $\pm$ 3.8	5.3 $\pm$ 1.6	15.7 $\pm$ 1.7
TP	1 000	86.1 $\pm$ 4.3	3.6 $\pm$ 1.3	10.3 $\pm$ 0.8
	100	81.7 $\pm$ 2.6	9.5 $\pm$ 0.6	8.8 $\pm$ 1.5

与对照组相比: * $P < 0.05$



A 对照组 B-TP 1 000 μ g/mL C-TP 100 μ g/mL

图 1 TP 诱导大鼠血管平滑肌细胞凋亡的效应

研究表明,TP 对金属离子、生物碱和生物大分子,如碳水化合物、蛋白质和核酸有高度的亲和力,这是 TP 多种作用的结构基础^[5]。国内谢冰芬等用流式细胞术发现 TP 可使鼻咽癌 CNE₂ 细胞停滞于 G₁ 期,并诱导其凋亡^[6]。另有学者发现 TP 可诱导人肺癌细胞 PC-9 停滞于 G₂/M 期^[7],诱导 Molt 4B 淋巴细胞性白血病细胞的凋亡^[8]。但目前 TP 对血管平滑肌细胞的增殖作用的影响尚不清楚。我们的初步研究结果表明,绿茶茶多酚在体外能够抑制大鼠血管平滑肌细胞的增殖,流式细胞术检测结果显示 TP 能够使血管平滑肌细胞停滞于 G₁ 期,并且能够诱导其凋亡。说明 TP 不仅对肿瘤细胞有作用,而且对良性生长的血管平滑肌细胞也有抑制增殖的作用,此作用系通过使细胞停滞于 G₁ 期,并且诱导其

凋亡来实现的。

最近,有报道 TP能够强烈抑制细胞端粒酶的活性,引起肿瘤细胞端粒的缩短、染色体的改变和抑制与细胞寿命相关的β半乳糖苷酶的表达,从而使肿瘤细胞产生凋亡^[9]。因此,TP可能亦通过此效应诱导血管平滑肌细胞产生凋亡。

综上所述,研究结果表明,绿茶茶多酚能够明显抑制离体大鼠血管平滑肌细胞的增殖,使得血管平滑肌细胞停滞于G₁期,并且能够诱导其凋亡,可望开发成为一种治疗以血管平滑肌细胞增殖为主的心血管疾病如血管成形术后再狭窄的药物。

参考文献:

[1] Lusis A J. Atherosclerosis [J]. Nature, 2000, 407: 233-241.
[2] 何皎. 茶多酚的药理学研究概况 [J]. 数理医药学杂志, 1999,

12(4): 372-374.
[3] Sazuka M, Mirakami S, Isemura M. Inhibitory effects of green infusion on in vitro invasion and in vivo metastasis of mouse lung carcinoma cells [J]. Cancer Lett, 1995, 98(1): 27-31.
[4] 徐叔云. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991.
[5] Yang C S, Wang Z Y. Tea and cancer [J]. J Natl Cancer Inst, 1993, 85(8): 1038-1049.
[6] 郝东磊, 谢冰芬, 刘宗潮. 茶多酚对人鼻咽癌 CNE₂细胞周期影响的流式细胞术的检测 [J]. 国外医学 药学分册, 1998, 25(5): 64-66.
[7] Okabe S, Suganuma M, Hayashi M, et al. Mechanisms of growth inhibition of human lung cancer cell line, PC-9, by tea polyphenols [J]. Jpn J Cancer Res, 1997, 88(7): 639-643.
[8] Achiwa Y, Hibasami H, Katsuzaki H. Inhibitory effects of persimmon (Diospyros kaki) extract and related polyphenol compounds on growth of human lymphoid leukemia cells [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1997, 61(7): 1099-1101.
[9] Imad Naasani, Hiroyudi Seimiya. Telomerase inhibition, telomere shortening and senescence of cancer cells by tea catechins [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998, 249(2): 391-396.

沙苑子提取物对小鼠四氯化碳肝损伤的保护作用

刘春宇¹, 顾振纶¹, 韩蓉¹, 朱路佳¹, 周文轩², 郭次议^{2*}

(1. 苏州大学医学院 药理学系, 苏州中药研究所, 江苏 苏州 215007; 2. 香港保健协会, 香港)

摘要:目的 探讨沙苑子醇提物石油醚部位 (LACE) 和水溶液部位 (WACE) 对小鼠 CCl₄肝损伤的保护作用。方法 采用 CCl₄小鼠急性肝损伤模型,测定血清谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 活性、肝组织 MDA 含量,并观察肝组织病理变化。结果 0.1% CCl₄ 0.1 mL/10 g 可使小鼠血清 ALT、AST 活性和肝组织 MDA 含量明显升高 ($P < 0.001$)。沙苑子醇提物 LACE 和 WACE (相当于生药 5, 15 g/kg) 均可使肝损伤小鼠的 ALT 和 MDA 显著降低 ($P < 0.001$), WACE 并能显著降低 AST 活性;病理镜检结果显示 WACE 能显著减轻肝细胞炎症反应和碎屑样坏死 ($P < 0.01$)。结论 沙苑子提取物有显著的抗肝损伤作用,以 WACE 部位更明显,其作用机制可能与抗脂质过氧化有关。

关键词: 沙苑子; 四氯化碳; 肝损伤; 抗氧化作用

中图分类号: R286.55 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)12-1104-03

Protective effect of extract in seed of *Astragalus complanatus* on acute hepatic injury induced by carbon tetrachloride in mice

LIU Chun-yu¹, GU Zhen-lun¹, HAN Rong¹, ZHU Lu-jia¹, ZHO U Wen-xuan², GUO Ci-yi²

(1. Department of Pharmacy, Medical College of Suzhou University, Suzhou Institute of Chinese

Materia Medica, Suzhou 215007, China; 2. Hong Kong Health Care Association, Hong Kong, China)

Key words the seed of *Astragalus complanatus* Bge.; carbon tetrachloride; hepatic injury; antioxidation

沙苑子为豆科植物扁茎黄芪 *Astragalus complanatus* R. Br 干燥成熟的种子^[1]。具有温补肝肾,固精,缩尿,益肝明目的功能。药理研究表明沙苑子提取物具有改善血液流变学指标、降低血压、调节血

脂、抑制血小板聚集、保护肝脏、增强免疫功能、抗炎、镇痛及调节中枢神经系统等作用^[2]。为了进一步阐明沙苑子保肝有效成分,本实验观察了沙苑子醇提物的石油醚部位 (LACE) 和水溶液部位

* 收稿日期: 2002-06-07
基金项目: 香港保健协会资助项目
作者简介: 刘春宇 (1961-), 女, 江苏人, 副教授, 苏州大学医学院药理学系天然药物教研室主任, 主要从事中药有效成分及药理作用研究, 目前主要研究中药保肝抗纤维化有效成分。 Tel: (0512) 65125091 65226475