

确率存在差异,为降低右颈内静脉穿刺失败率,笔者认为如果患者颈部条件容许,应首选前路,其次是中路实施右颈内静脉穿刺。

参考文献

- 1 Schummer W,Schummer C,Rose N, *et al.* Mechanical complications and malpositions of central venous cannulations by experienced operators. A prospective study of 1794 catheterizations in critically ill patients[J]. *Intensive Care Med*, 2007, 33(6): 1055 - 1059
- 2 Hind D,Calvert N,McWilliams R, *et al.* Ultrasonic locating devices for central venous cannulation: meta - analysis[J]. *BMJ*, 2003, 327(7411): 361
- 3 Oda M,Fukushima Y,Hirota T, *et al.* The para - carotid approach for internal jugular catheterization[J]. *Anaesthesia*, 1981, 36(9): 896 - 900
- 4 Denys BG,Uretsky BF. Anatomical variations of internal jugular vein location: impact on central venous access[J]. *Crit Care Med*, 1991, 19(12): 1516 - 1519
- 5 Daily PO,Griep RB,Shumway NE. Percutaneous internal jugular vein cannulation[J]. *Arch Surg*, 1970, 101(4): 534 - 536
- 6 Denys BG,Uretsky BF,Reddy PS. Ultrasound - assisted cannulation of the internal jugular vein. A prospective comparison to the external landmark - guided technique[J]. *Circulation*, 1993, 87(5): 1557 - 1562
- 7 Gordon AC,Saliken JC,Johns D, *et al.* US - guided puncture of the

- internal jugular vein: complications and anatomic considerations[J]. *J Vasc Interv Radiol*, 1998, 9(2): 333 - 338
- 8 Ray BR,Mohan VK,Kashyap L, *et al.* Internal jugular vein cannulation: a comparison of three techniques[J]. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*, 2013, 29(3): 367 - 371
- 9 Rao TL,Wong AY,Salem MR. A new approach to percutaneous catheterization of the internal jugular vein[J]. *Anesthesiology*, 1977, 46(5): 362 - 364
- 10 Park SY,Kim MJ,Kim MG, *et al.* Changes in the relationship between the right internal jugular vein and an anatomical landmark after head rotation[J]. *Korean J Anesthesiol*, 2011, 61(2): 107 - 111
- 11 Wang R,Snoey ER,Clements RC, *et al.* Effect of head rotation on vascular anatomy of the neck: an ultrasound study[J]. *J Emerg Med*, 2006, 31(3): 283 - 286
- 12 Sulek CA,Gravenstein N,Blackshear RH, *et al.* Head rotation during internal jugular vein cannulation and the risk of carotid artery puncture [J]. *Anesth Analg*, 1996, 82(1): 125 - 128
- 13 Lieberman JA,Williams KA,Rosenberg AL. Optimal head rotation for internal jugular vein cannulation when relying on external landmarks [J]. *Anesth Analg*, 2004, 99(4): 982 - 988
- 14 Gwak MJ,Park JY,Suk EH, *et al.* Effects of head rotation on the right internal jugular vein in infants and young children [J]. *Anaesthesia*, 2010, 65(3): 272 - 276 (收稿日期:2015 - 01 - 26)
(修回日期:2015 - 02 - 09)

二苯乙烯苷对低氧肺动脉平滑肌细胞增殖的影响

张志勇 杨水珍

摘 要 **目的** 探讨二苯乙烯苷对低氧肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)增殖的影响及其机制。**方法** SD大鼠PASMCs经低氧及TSG干预24h后,CCK-8检测细胞增殖及TSG的细胞毒作用,流式细胞仪分析细胞周期,实时定量PCR(RT-PCR)检测HIF-1 α mRNA的表达,酶标仪检测活性氧(ROS)的产生。**结果** 二苯乙烯苷能够抑制低氧PASMCs增殖,阻滞细胞周期于G₀/G₁~S期,并且实验浓度的二苯乙烯苷无明显细胞毒作用,进一步的研究发现二苯乙烯苷能够抑制HIF-1 α mRNA的表达及ROS的产生。**结论** 二苯乙烯苷可抑制低氧PASMCs增殖,其机制可能与抑制HIF-1 α mRNA的表达及ROS产生有关。

关键词 低氧 肺动脉平滑肌细胞 二苯乙烯苷 增殖

中图分类号 R3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.10.043

Effect of 2,3,4',5 - Tetrahydroxystilbene - 2 - O - beta - D - glucoside on the Proliferation of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells Induced by Hypoxia. Zhang Zhiyong,Yang Shuizhen. *Zhongxiang People's Hospital, Hubei 431900, China*

Abstract Objective To investigate the effects of the 2,3,4',5 - Tetrahydroxystilbene - 2 - O - beta - D - glucoside on the proliferation of PASMCs induced by hypoxia, in order to search new drugs for the treatment and prevention of hypoxic pulmonary vascular remodeling. **Methods** 3% O₂ hypoxia was used to induced the proliferation of PASMCs. After hypoxic and TSG treatment for 24h, cell growth was determined by cell counting kit - 8 (CCK - 8), cell cycle was analysed by flow cytometry, the mRNA expression of HIF - 1 α was measured by quantitative real - time PCR, and the reactive oxygen species (ROS) production was determined by the fluorescence micro-

作者单位:431900 钟祥市人民医院耳鼻喉科(张志勇),呼吸科(杨水珍)

通讯作者:张志勇,电子信箱:zhangzhiyong2014@163.com

plate reader. **Results** TSG can block the proliferation of PSMCs through G_0/G_1 to S phase of the cell cycle arrest without cell cytotoxicity. Further experiments showed that TSG blocking the proliferation of PSMCs was associated suppression the mRNA expression of HIF-1 α and the production of intracellular ROS in hypoxia-stimulated-PSMCs. **Conclusion** TSG can inhibit the proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells induced by hypoxia through suppression the mRNA expression of HIF-1 α and the production of intracellular ROS.

Key words Hypoxia; Pulmonary artery smooth muscle cells; 2,3,4',5-Tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside; Proliferation

低氧肺血管结构重构是慢性低氧肺动脉高压的重要病理生理基础,其对低氧肺动脉高压的发生、发展以及预后具有重要意义。低氧肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)的异常增殖、迁移以及细胞外基质的异常沉积,可导致肺血管壁变厚、管腔狭窄顺应性降低是导致肺血管重构的基础,低氧肺血管重构的机制目前尚未完全阐明^[1,2]。二苯乙烯苷(2,3,5,4-tetrahydroxyl diphenylethylene-2-O-glucoside, TSG)是从中药何首乌分离的一种主要有效活性成分单体,研究表明 TSG 可通过调节 NO、血管内皮生长因子、MMP-2/9 等的表达,抑制血管的内膜增厚及脂质沉积^[3,4]。研究还发现,TSG 通过调节 ERK1/2 和 NO/cGMP/PKG 信号通路,抑制血管平滑肌细胞(VSMCs)增殖,起到抑制动脉粥样硬化的作用^[5,6]。有关 TSG 在低氧 PASMCs 增殖中的作用及其机制未见相关研究。本研究通过观察低氧条件下 TSG 对大鼠 PASMCs 增殖影响,从细胞水平探讨 TSG 对低氧肺血管重构的影响及其机制。

材料与方法

1. 材料:SD 大鼠(150~200g)购自武汉大学实验动物中心;I 胶原酶、溴化乙锭(PI)、RNA 酶、DCFH-DA 购自 Sigma 公司;CCK-8 试剂盒购自碧云天生物科技有限公司;DMEM/F12 培养基、0.25% 胰酶、双抗(青霉素+链霉素)、胎牛血清等购自 Hyclone 公司;HIF- α 抗体以及 GAPDH 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司。低氧培养箱购自 Coylab 公司,荧光酶标仪购自 Bio-Tek 公司。

2. SD 大鼠 PASMCs 原代培养:采用 0.2% I 胶原酶消化分离 PASMCs,细胞传至第 3 代时经 SM- α -actin 免疫细胞化学染色法进行血管平滑肌细胞鉴定(纯度>95%),使用 0.25% 的胰酶消化 PASMCs 并以 1:2 的比例传代,4~10 代细胞生长稳定用于本研究。

3. 实验分组:①空白对照组;②低氧组;③10 μ mol/L TSG 低氧组;④20 μ mol/L TSG 低氧组;⑤50 μ mol/L TSG 低氧组。常氧组采用 95% 空气+5% CO₂ 培养,低氧培养采用低氧培养采用 3% O₂、92% N₂ 和 5% CO₂ 培养,当细胞融合度达到 70% 左右时,采用不含血清的培养基饥饿细胞 24h,完全排除血清的影响后,分别进行常氧或低氧培养,其中 TSG 干预组给予不

同浓度的 TSG 预处理 2 h 后进行低氧培养。

4. PCR 检测 HIF-1 α :细胞生长于 6 孔板,冷 PBS 洗涤两次,每孔加入 1ml TRIzol 提取细胞的总 RNA,采用紫外分光光度法测定其含量与纯度。取大约 5 μ l 总 RNA,使用罗氏反转录试剂盒反转录为 cDNA。PCR 扩增后采用 GAPDH 比较得出标准化值。引物序列为:GAPDH:上游引物:5'-GACATGCCGCTTGGAGAAAC-3',下游引物:5'-AGCCAGGATGCCCTTTAGT-3';HIF-1 α :上游引物:5'-GTCGGACAGCCTCACCAAACAGAGC-3',下游引物:5'-GTAACTTGATCAAAGCTCTGAG-3'。

5. CCK-8 检测细胞增殖及细胞毒作用:将细胞接种至 96 孔板中,各组低氧或常氧培养 24h 后,每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液,继续在培养箱中孵育 3h,测定 450nm 吸光度。

6. 细胞周期检测:细胞接种至 6 孔板中,各组低氧或常氧培养 24h 后,胰酶消化并收集细胞,70% 乙醇(无水乙醇+PBS)于 4℃ 固定过夜。1500r/min 离心 5min,1ml 的 PBS 洗细胞 2 次,加入 485 μ l PBS 重悬细胞、Triton X-100 1 μ l、1mg/ml RNase 5 μ l、1mg/ml 溴化乙锭(PI)10 μ l,4℃ 避光孵育 30min 后,通过流式细胞仪分析细胞周期。

7. ROS 的检测:将细胞以 100 μ l,5 $\times 10^3$ /孔均匀接种于 96 孔板中,置于培养箱培养,细胞融合度达到 70% 时,将培养基更换为无血清的培养基饥饿 24h,然后采用不同处理因素干预 24h,将 96 孔板中的培养基换为用无血清培养液稀释终浓度为 10 μ mol/L DCFH-DA,继续孵育 20min 之后将培养基吸出,使用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次,以排除未进入细胞内部的 DCFH-DA 的影响,最后再次加入磷酸盐缓冲液(PBS)100 μ l,置于酶标仪下检测,激发光波长为 485nm,发射光波长为 525nm。

8. 统计学方法:采用 SPSS 16.0 统计学软件处理实验数据,计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组之间比较采用两独立样本的 *t* 检验,多组比较采用双侧方差分析,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. TSG 能够抑制低氧 PASMCs 增殖:低氧刺激 24h 能够促进 PASMCs 增殖(*P* < 0.05),TSG(10、20、50 μ mol/L)抑制低氧诱导的 PASMCs 增殖具有浓度依赖性(*P* < 0.05,图 1)。

2. TSG 对 PASMCs 存活率无影响:结果显示,与对照组相比,3 种药物浓度(10、20、50 μ mol/L)二苯乙

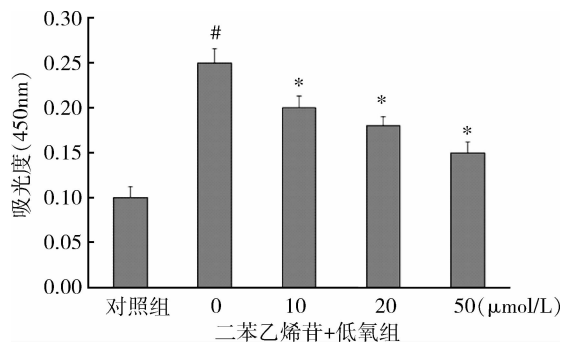


图 1 TSG 对低氧 PASMCS 增殖的影响 ($n=6$)

与对照组比较, $^{\#}P<0.05$; 与 $0\mu\text{mol/L}$ 二苯乙烯苷 + 低氧组比较, $^*P<0.05$

烯苷干预 24h 对 PASMCS 的存活率差异无统计学意义 ($P>0.05$, 图 2)。

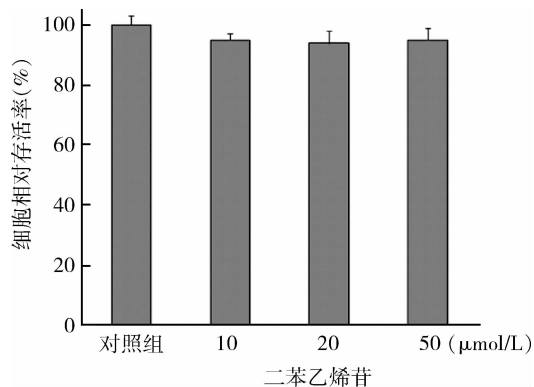


图 2 TSG 对 PASMCS 存活率的影响 ($n=6$)

3. TSG 可抑制 PASMCS 细胞周期于 G_0/G_1 期: 低氧刺激 PASMCS 24h 后, 处于 G_0/G_1 细胞比例减少, S 期细胞比例增加, G_2/M 期细胞比例增加。与 $0\mu\text{mol/L}$ 二苯乙烯苷 + 低氧组相比 TSG ($10, 20, 50\mu\text{mol/L}$) 可使 G_0/G_1 细胞比例增加, S 期细胞比例增加 ($P<0.05$), 对 G_2/M 期细胞比例无明显影响 ($P>0.05$)。结果表明 TSG 可阻滞 PASMCS 细胞周期于 G_0/G_1 (图 3)。

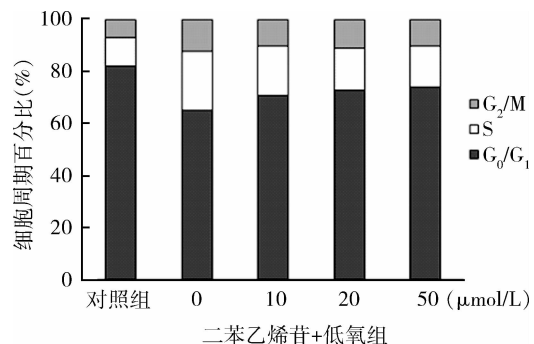


图 3 TSG 对 PASMCS 细胞周期的影响 ($n=6$)

4. TSG 可抑制 HIF-1 α mRNA 的表达: 与对照组相比, 低氧刺激 PASMCS 24 h 后, PASMCS 内 HIF-1 α mRNA 的表达增加 ($P<0.05$)。与 $0\mu\text{mol/L}$ 二苯乙烯苷 + 低氧组相比, TSG ($10, 20, 50\mu\text{mol/L}$) 可抑制 PASMCS 内 HIF-1 α mRNA 的表达, 且具有浓度依赖性 ($P<0.05$, 图 4)。

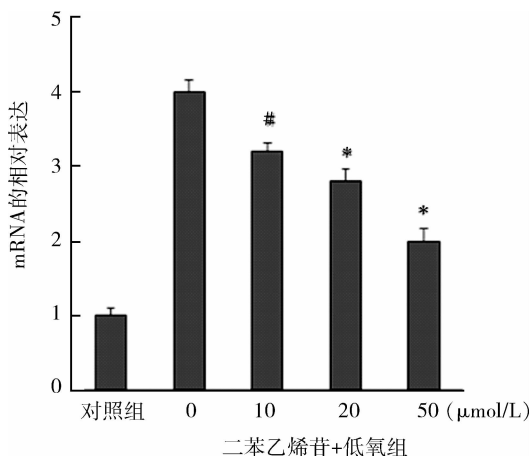


图 4 TSG 对 HIF-1 α mRNA 的表达的影响 ($n=6$)

与对照组比较, $^{\#}P<0.05$; 与 $0\mu\text{mol/L}$ 二苯乙烯苷 + 低氧组比较, $^*P<0.05$

5. TSG 可抑制 ROS 产生: 与对照组相比, 低氧刺激 PASMCS 24h 后, PASMCS 内 ROS 增加 ($P<0.05$), 与 $0\mu\text{mol/L}$ 二苯乙烯苷 + 低氧组相比, TSG ($10, 20, 50\mu\text{mol/L}$) 可抑制 PASMCS 内 ROS 产生, 且具有浓度依赖性 ($P<0.05$, 图 5)。

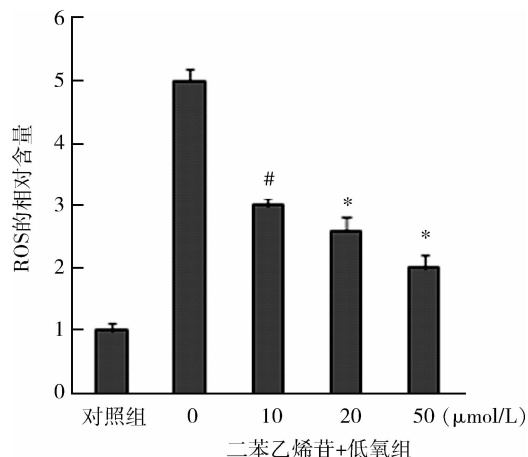


图 5 TSG 对 ROS 产生的影响 ($n=6$)

与对照组比较, $^{\#}P<0.05$; 与 $0\mu\text{mol/L}$ 二苯乙烯苷 + 低氧组比较, $^*P<0.05$

讨 论

本研究发现, TSG 抑制低氧 PASMCS 增殖, 并且

实验浓度的 TSG 对 PSMCs 无明显毒性作用。本研究还表明 TSG 是通过阻滞细胞周期于 G_0/G_1 期抑制低氧 PSMCs 增殖。进一步的研究表明, TSG 抑制 PSMCs 增殖的机制是通过降低细胞内 HIF-1 α 表达及 ROS 产生来实现的。这些结果提示, TSG 可抑制 PSMCs 增殖, 继而低氧肺血管重构。

低氧能够使肺动脉壁各层细胞一系列结构和功能的变化, 尤其是中膜层 PSMCs 的异常增殖在低氧肺血管重构中发挥关键作用^[7,8]。细胞增殖受细胞周期的严格调控, 正常生理情况下 PSMC 处于静止 G_0 期, 肺血管重构时需要处于静止 G_0 期 PSMCs 进入和通过细胞周期各阶段^[9]。本研究表明 TSG 可抑制 PSMCs 细胞周期于 G_0/G_1 期, 从而抑制低氧 PSMCs 增殖。

HIF-1 是低氧条件下广泛表达于哺乳动物和人体的一种转录因子, 由一个由调节性亚基 HIF-1 α 和一个构成性亚基 HIF-1 β 组成, HIF-1 α 决定 HIF-1 的活性, HIF-1 α 常氧条件下会经泛素途径降解而丧失活性, 低氧时 HIF-1 α 表达上调, 并进入细胞核与 HIF-1 β 结合形成二聚体后调节相关靶基因的转录, 是细胞适应低氧的核心调控因子, 与低氧性肺动脉高压和肺动脉平滑肌细胞增殖关系密切^[10]。HIF-1 α 可增加细胞内 Ca^{2+} 浓度的以及调节多种活性介质的表达, 进而刺激肺动脉平滑肌细胞增殖^[11]。活性氧族 (reactive oxygen species, ROS) 是起源于线粒体呼吸链和电子传递链的反应分子和自由基, 作为细胞内信号分子, 参与细胞增殖及凋亡的调控。低氧条件下 PSMCs 内 ROS 产生增加, 运用抗氧化剂清除 ROS, 可以抑制低氧 PSMCs 增殖^[12]。研究表明 ROS 可能是通过调节 HIF-1 α 表达及活性来调控低氧 PSMCs 增殖^[12,13]。另外 ROS 还可以通过调控 ERK1/2 信号通路促进低氧 PSMCs 增殖^[14]。本研究发现低氧能够促进 PSMCs 内 HIF-1 α mRNA 的表达及 ROS 产生, 而 TSG 可抑制 PSMCs 内 HIF-1 α mRNA 的表达及 ROS 产生。因此, 推测 TSG 抑制低氧 PSMCs 增殖机制可能与抑制 HIF-1 α mRNA 的表达及 ROS 产生有关。TSG 有可能对低氧肺血管重构起到抑制作用。

参考文献

- 1 Luo C, Yi B, Bai L, *et al.* Suppression of Akt1 phosphorylation by adenoviral transfer of the PTEN gene inhibits hypoxia-induced proliferation of rat pulmonary arterial smooth muscle cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 397(3): 486-492

- 2 Leggett K, Maylor J, Udem C, *et al.* Hypoxia-induced migration in pulmonary arterial smooth muscle cells requires calcium-dependent upregulation of aquaporin 1 [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 303(4): L343-L353
- 3 Zhang W, Xu XL, Wang YQ, *et al.* Effects of 2,3,4',5-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside on vascular endothelial dysfunction in atherogenic-diet rats [J]. *Planta Med*, 2009, 75(11): 1209-1214
- 4 Zhang W, Wang CH, Li F, *et al.* 2,3,4',5-Tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside suppresses matrix metalloproteinase expression and inflammation in atherosclerotic rats [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2008, 35(3): 310-316
- 5 Xu XL, Huang YJ, Chen XF, *et al.* 2,3,4',5-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells: involvement of NO/cGMP/PKG pathway [J]. *Phytother Res*, 2012, 26(7): 1068-1074
- 6 Xu XL, Huang YJ, Wang YQ, *et al.* 2,3,4',5-Tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside inhibits platelet-derived growth factor-induced proliferation of vascular smooth muscle cells by regulating the cell cycle [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2011, 38(5): 307-313
- 7 Yi B, Cui J, Ning J, *et al.* Over-expression of PKG1 α inhibits hypoxia-induced proliferation, Akt activation, and phenotype modulation of human PSMCs: the role of phenotype modulation of PSMCs in pulmonary vascular remodeling [J]. *Gene*, 2012, 492(2): 354-360
- 8 易斌, 陆俊羽, 白莉, 等. 野生型蛋白激酶 $GI\alpha$ 腺病毒抑制低氧肺动脉平滑肌细胞表型转换及细胞增殖 [J]. *中华内科杂志*, 2010, 49(5): 385-388
- 9 Fouty BW, Grimison B, Fagan KA, *et al.* p27(Kip1) is important in modulating pulmonary artery smooth muscle cell proliferation [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, 25(5): 652-658
- 10 李焱观, 戴爱国, 严鹏科. 低氧诱导因子 1 在低氧致肺动脉平滑肌细胞增殖中的作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2007, 23(7): 1301-1305
- 11 Aaronson PI. TRPC Channel upregulation in chronically hypoxic pulmonary arteries: the HIF-1 bandwagon gathers steam [J]. *Circ Res*, 2006, 98(12): 1465-1467
- 12 Zhao J, Zhou Z, Hu H, *et al.* The relationships among reactive oxygen species, hypoxic factor 1α and cell proliferation in rat pulmonary arterial smooth muscle cells under hypoxic [J]. *Physiologica Sinica*, 2007, 59(3): 319-324
- 13 Sanders KA, Hoidal JR. The NOX on pulmonary hypertension [J]. *Circ Res*, 2007, 101(3): 224-226
- 14 汤娜娜, 刘先胜, 徐永健, 等. 活性氧和 ERK1/2 信号通路在缺氧大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖和凋亡中的作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2009, 25(1): 36-41

(收稿日期: 2015-02-05)

(修回日期: 2015-02-26)