

# 车前子多糖抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的血管平滑肌细胞增殖及其机制

张宁<sup>1</sup> 王素敏<sup>1\*</sup> 车文文<sup>1</sup> 张然<sup>1,2</sup> 郭贇<sup>1</sup> 徐斯佳<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>河北医科大学药理学教研室, 石家庄 050017; <sup>2</sup>河北省沧州医学高等专科学校, 沧州 061001)

**摘要** 采用组织贴壁培养法建立氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导血管平滑肌细胞(VSMC)的增殖模型,以四甲基偶氮唑蓝(MTT)法观察车前子多糖(plantain seed polysaccharide, PSP)对VSMC增殖的影响,结果表明 ox-LDL 诱导的 VSMC 增殖明显( $P<0.05$ ),认为该增殖模型成功建立。利用比色法测定丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性、一氧化氮(NO)含量以及一氧化氮合酶(NOS)的活性,探讨PSP在细胞水平的抗氧化作用,结果显示给予PSP后,MDA含量显著下降,SOD、NO和NOS水平明显升高( $P<0.05$ ),表明PSP具有一定的抗氧化作用。RT-PCR检测原癌基因(c-myc)和单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)水平,观察PSP对c-myc和MCP-1 mRNA表达的影响,以寻找药物的靶点并探讨PSP抗动脉粥样硬化作用的分子机制。结果表明,PSP下调c-myc mRNA和MCP-1 mRNA的表达,可能是抗动脉粥样硬化的机制之一。

**关键词** 车前子多糖;氧化型低密度脂蛋白;血管平滑肌细胞;c-myc;单核细胞趋化蛋白-1

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)是动脉粥样硬化(AS)斑块中的主要细胞成分,它的增殖在AS的形成过程中发挥重要作用。而氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)对VSMC增殖的影响已经受到高度重视<sup>[1]</sup>。它可通过多种途径损伤血管内皮细胞,促进VSMC增殖以及泡沫细胞的形成。给予抗氧化剂抑制LDL的氧化,阻断ox-LDL诱导VSMC增殖,将有助于延缓AS的发生、发展。车前子具有抗氧化作用<sup>[2,3]</sup>,能有效降低高脂血症大鼠的血脂水平,并能减轻脂质代谢紊乱,表明车前子在AS的防治中,具有重要的意义。但车前子的有效成分车前子多糖(plantain seed polysaccharide, PSP)能否抑制LDL的氧化和VSMC的增殖及其发生机制尚不清楚。本研究选择大鼠VSMC作为研究对象,采用ox-LDL诱导VSMC增殖,从细胞水平观察PSP对离体培养的大鼠VSMC增殖,丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、一氧化氮(NO)、一氧化氮合酶(NOS)的影响,从分子水平研究PSP对原癌基因(c-myc)和单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1) mRNA的表达,了解PSP对ox-LDL诱导平滑肌细胞增殖的效应及其调节作用,为进一步探讨AS的发病机制及防治策略提供科学理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

ox-LDL由中国协和医科大学基础医学研究所提供,MDA、SOD、NO、NOS试剂盒均为南京建成生物有限公司产品。胎牛血清(FBS)及DMEM-F12购自美国Gibco公司,四甲基偶氮唑盐(MTT)购自上海华美生物工程公司,RNA提取试剂盒为北京鼎国生物技术公司产品,RT-PCR试剂盒购自Promega公司,DNA marker购自天根生化(北京)有限公司,PSP为本实验室自制产品,已申报发明专利(200810055103.2),其余试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 VSMC的培养与鉴定** VSMC的原代培养采用组织贴块法。实验动物由河北医科大学实验动物中心提供,雄性Wistar大鼠,SPF级,体重150~180g,合格证号为902110。无菌条件下分离胸主动脉中膜,将中膜组织剪切成1 mm×1 mm大小的组织块贴于培养瓶底面。加入含20%胎牛血清的培养液,将培养瓶倒置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中放置1~2 h,待组织块干涸并与瓶壁贴附,将培养瓶翻转继续静置培养3~5 d。培养1周后可见细胞从组织块边缘爬

收稿日期: 2009-06-19 接受日期: 2009-09-15

河北省自然科学基金资助项目(No.C2007000822)

\*通讯作者。Tel: 0311-86266073, Fax: 0311-86057291, E-mail:

wsm001@126.com



Fig.1 Primary rat aortic smooth muscle cells cultured for 6 days (100×)



Fig.2 The third passage rat aortic smooth muscle cells cultured for 3 days (100×)

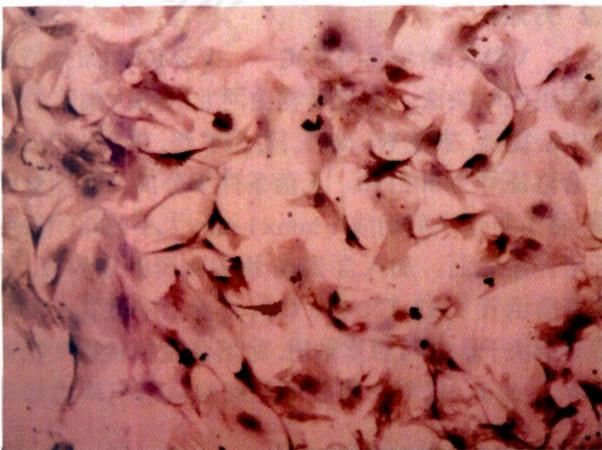


Fig.3 Cultured rat aortic smooth muscle cells were identified by immunocytochemical stain with rabbit anti rat  $\alpha$ -actin antibodies (200×)

出(图1)。待原代培养的细胞达到80%融合时即可进行传代培养。传代细胞形态多呈梭形,并相互交织排列而呈现典型的“峰-谷”状生长(图2)。细胞经抗 $\alpha$ -肌动蛋白抗体免疫组化法鉴定为VSMC(图3)。实验所用VSMC均为第3~5代传代细胞。

1.2.2 实验分组与处理 实验分组:①空白对照组(control),②50 mg/L ox-LDL,③50 mg/L ox-LDL+25 mg/L PSP,④50 mg/L ox-LDL+50 mg/L PSP,⑤50 mg/L ox-LDL+100 mg/L PSP。每组各6例。取对数生长期细胞,按 $1.0 \times 10^5$ 个/ml的密度接种于24孔板中,加入含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基,置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中进行培养,待融合成单层细胞时换成无血清培养基继续培养24 h,使细胞生长同步化,然后按上述分组加入终浓度为50 mg/L的ox-LDL和不同浓度的PSP,继续培养48 h待测。

1.2.3 MTT比色法测定VSMC增殖 上述待测液中加入20  $\mu$ l 5 mg/ml MTT溶液温育4 h后,终止培养。吸弃上清液,每孔加入150  $\mu$ l 二甲基亚砜(DMSO),振荡10 min以充分溶解颗粒,570 nm波长处测定A值,并计算药物对细胞的抑制率(IR%)。

1.2.4 MDA含量测定 采用硫代巴比妥酸(TBA)法测定MDA含量。

1.2.5 SOD活性测定 采用黄嘌呤氧化酶(XO)法(羟胺法)测定SOD。

1.2.6 NO含量测定 利用硝酸还原酶特异性将NO<sub>3</sub><sup>-</sup>还原为NO<sub>2</sub><sup>-</sup>,测定550 nm处A值,NO含量用NO<sub>2</sub><sup>-</sup>含量( $\mu$ mol/L)表示。

1.2.7 NOS活性测定 在NOS的催化作用下,L-精氨酸(L-Arg)和氧分子结合生成NO,且NO与亲核性物质生成有色化合物,在530 nm处测定A值,根据A值的大小可计算出NOS活力。

1.2.8 c-myc、MCP-1 mRNA的表达 采用RT-PCR法。用一步法提取各组细胞的总RNA。分别取总RNA各1  $\mu$ g,逆转录合成cDNA。取1  $\mu$ l cDNA进行PCR扩增(c-myc: 94℃变性45 s, 55℃退火45 s, 72℃延伸90 s,共25个循环,末次延伸为72℃10 min; MCP-1: 94℃变性30 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸1 min,共30个循环,末次延伸为72℃10 min;  $\beta$ -肌动蛋白: 94℃变性30 s, 65℃退火30 s, 72℃延伸1 min,共30个循环,末次72℃延伸10 min)。PCR反应体系总体积25  $\mu$ l,含10×PCR缓冲液、10 mmol/L dNTP、引物各10  $\mu$ mol/L及Taq酶。c-myc引物序列为:上游引物5'-TGCTGCATGAAGAGACACCG-3',

下游引物 5'-TTTCAACTGTTCTCGCCGTT-3', PCR 扩增产物长度 569 bp。MCP-1 引物序列为: 上游引物 5'-CAGGTCTCTGTACGCTTCT-3', 下游引物 5'-AGTATTCATGGAAGGGAATAG-3', PCR 扩增产物长度 525 bp。 $\beta$ -肌动蛋白引物序列为: 上游引物 5'-GAGCACCTGTGCTGCTCACCCCTAGG-3', 下游引物 5'-GTGGTGGTGAAGCTGTAGCCACGCT-3', PCR 扩增产物长度 310 bp。反应完毕, 取 PCR 扩增产物 10  $\mu$ l 于含溴化乙锭的 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳, 并于紫外灯下拍照, TFP-M/WL 凝胶成相系统进行扫描, 图像分析系统检测各组目的基因及其  $\beta$ -肌动蛋白的密度积分值, 计算两者的比值即相对积分(A)值。以此作为各组 c-myc 和 MCP-1 mRNA 的相对表达量。

1.2.9 统计分析 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, SPSS16.0 软件进行统计分析。采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PSP 对 ox-LDL 诱导 VSMC 增殖细胞水平的影响

2.1.1 PSP 对 ox-LDL 诱导 VSMC 增殖的影响 从图 4 可以看出, 与对照组比较, ox-LDL 组 VSMC 增殖明显 ( $P < 0.01$ ); 不同剂量 PSP 干预组 (25、50 和 100 mg/L) VSMC 增殖受到抑制, 其抑制率与 ox-LDL 组比较, 低浓度 PSP 干预组为  $10.47 \pm 1.07$  ( $P < 0.05$ ), 而中、高浓度 PSP 干预组分别为  $26.75 \pm 2.36$  和  $47.68 \pm 2.53$  ( $P < 0.01$ ), 均具有统计学意义。

2.1.2 PSP 对 ox-LDL 诱导大鼠 VSMC MDA 含量的影响 由图 5 可见, ox-LDL 组中 MDA 含量明显增

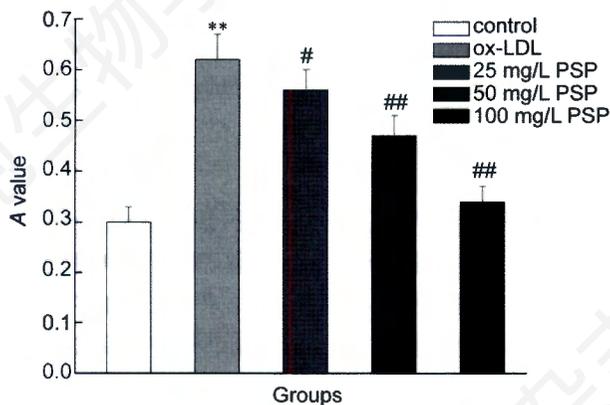


Fig.4 Effect of PSP on inhibition rate of VSMC induced by ox-LDL

$n=6$ , \*\* $P < 0.01$  vs control, # $P < 0.05$  vs ox-LDL, ## $P < 0.01$  vs ox-LDL.

加, 与空白对照组相比, 差异有显著性 ( $P < 0.01$ ); 而不同剂量 PSP 干预组 (25、50 和 100 mg/L) MDA 含量明显降低, 与 ox-LDL 组比较, 具有显著性差异。

2.1.3 PSP 对 ox-LDL 诱导大鼠 VSMC SOD 活性的影响 从图 6 可以看出, 与对照组比较, ox-LDL 组 SOD 活性明显降低 ( $P < 0.01$ ); 与 ox-LDL 组比较, 给予不同浓度 PSP 后, 中剂量和高剂量 (50 mg/L 和 100 mg/L) PSP 组, SOD 活性均比 ox-LDL 组明显升高, 而低剂量组与 ox-LDL 组相比无明显差别 ( $P > 0.01$ )。

2.1.4 PSP 对 ox-LDL 诱导大鼠 VSMC NO 含量的影响 从图 7 可见, 与对照组比较, ox-LDL 组 NO 含量明显下降 ( $P < 0.01$ ), 给予不同剂量 PSP (25、50 和 100 mg/L) 干预后, NO 含量显著升高, 与 ox-LDL

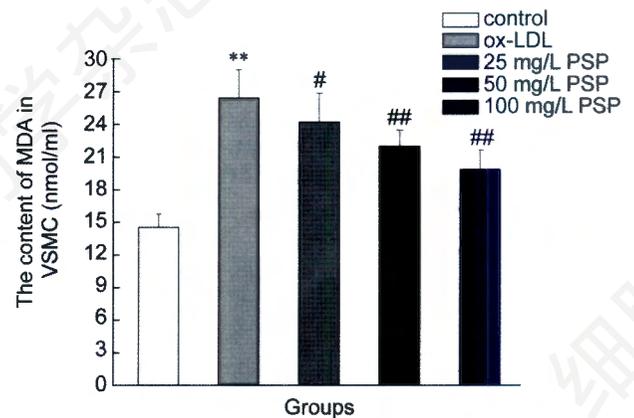


Fig.5 Effect of PSP on the content of MDA in VSMC induced by ox-LDL

$n=6$ , \*\* $P < 0.01$  vs control, # $P < 0.05$  vs ox-LDL, ## $P < 0.01$  vs ox-LDL.

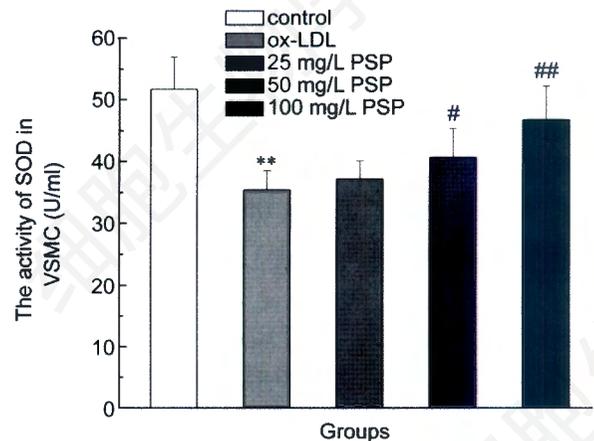
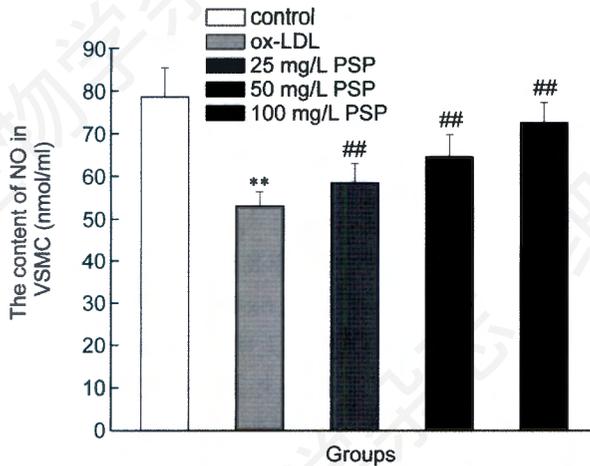


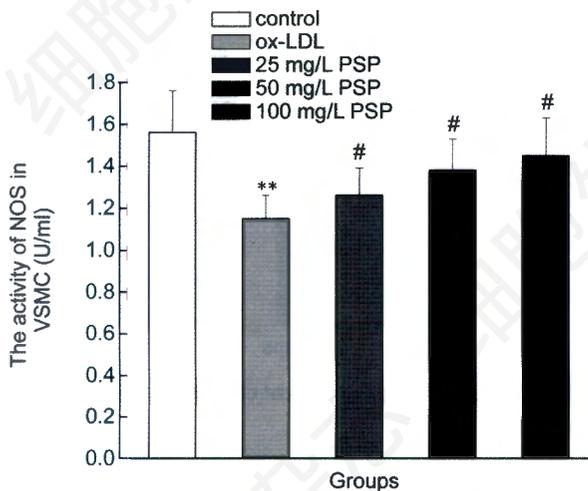
Fig.6 Effect of PSP on the activity of SOD in VSMC induced by ox-LDL

$n=6$ , \*\* $P < 0.01$  vs control, # $P < 0.05$  vs ox-LDL, ## $P < 0.01$  vs ox-LDL.



**Fig.7 Effect of PSP on the content of NO in VSMC induced by ox-LDL**

$n=6$ , \*\* $P<0.01$  vs control, ## $P<0.01$  vs ox-LDL.



**Fig.8 Effect of PSP on the activity of NOS in VSMC induced by ox-LDL**

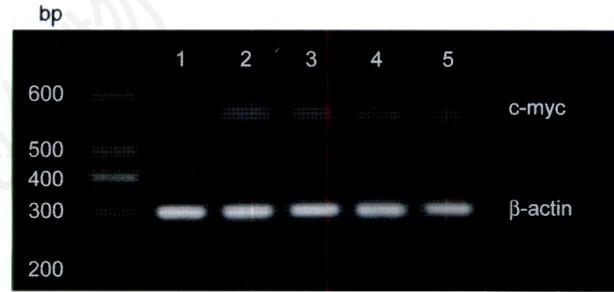
$n=6$ , \*\* $P<0.01$  vs control, # $P<0.05$  vs ox-LDL.

组比较, 具有统计学意义( $P<0.01$ )。

**2.1.5 PSP对ox-LDL诱导大鼠VSMC NOS活性的影响** 由图8可见, 与对照组比较, ox-LDL组NOS活性明显降低( $P<0.01$ ); 与ox-LDL组比较, 不同剂量PSP干预组(25、50和100 mg/L) NOS活性明显升高( $P<0.05$ ), 有统计学意义( $P<0.05$ )。

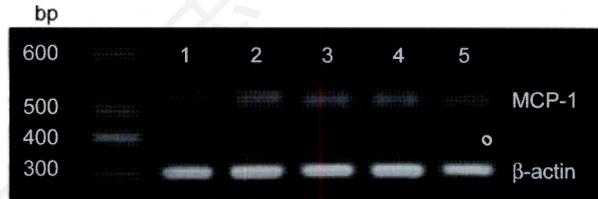
**2.2 PSP对ox-LDL诱导VSMC增殖分子水平的影响**

**2.2.1 PSP对ox-LDL诱导大鼠VSMC c-myc mRNA表达的影响** 由图9中可见, 空白对照组VSMC c-myc mRNA呈现低表达, 而ox-LDL组, c-myc mRNA



**Fig.9 Electrophoresis of RT-PCR, expression of c-myc mRNA in VSMC induced by ox-LDL**

1: control; 2: 50 mg/L ox-LDL; 3: 25 mg/L PSP + 50 mg/L ox-LDL; 4: 50 mg/L PSP + 50 mg/L ox-LDL; 5: 100 mg/L PSP + 50 mg/L ox-LDL.



**Fig.10 Electrophoresis of RT-PCR, expression of MCP-1 mRNA in VSMC induced by ox-LDL**

1: control; 2: 50 mg/L ox-LDL; 3: 25 mg/L PSP + 50 mg/L ox-LDL; 4: 50 mg/L PSP + 50 mg/L ox-LDL; 5: 100 mg/L PSP + 50 mg/L ox-LDL.

的相对表达量明显增加。不同剂量的PSP能显著抑制ox-LDL诱导的c-myc mRNA表达, PSP对c-myc mRNA表达的抑制作用随剂量增加而有增强趋势。

**2.2.2 PSP对ox-LDL诱导大鼠VSMC MCP-1 mRNA的影响** 由图10可见, 空白对照组中, VSMC的MCP-1 mRNA呈现低表达, ox-LDL组MCP-1 mRNA的相对表达量显著增加。不同剂量的PSP可下调ox-LDL诱导的MCP-1 mRNA表达, PSP对MCP-1 mRNA表达的抑制作用随剂量增加而有增强趋势。

### 3 讨论

AS形成过程中, 血管平滑肌细胞增殖受到多种细胞因子、生长因子和活性代谢产物的影响和调节, 主要包括原癌基因c-sis、c-myc和MCP-1的调控。大量的体内外实验证明, AS形成过程中ox-LDL是致AS的重要因素, 可通过损伤内皮细胞, 诱导平滑肌细胞迁移与增殖, 刺激泡沫细胞形成, 增加血小板聚集等途径, 促进AS的发生和发展<sup>[4]</sup>。

VSMC作为研究心血管疾病的成熟体外模型, 已

广泛应用于 AS 的研究。实验中我们以 ox-LDL 诱导 VSMC 增殖, 选择 MTT 比色法测定 VSMC 的活性。MTT 比色法是一种检测细胞存活和增殖的方法, 活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能将淡黄色的 MTT 还原为难溶于水的蓝紫色结晶并沉积于细胞内或细胞周围, 而死细胞中琥珀酸脱氢酶消失, 不能将 MTT 还原。通过测定其吸光度值, 可间接反映出活细胞数量。结果显示, ox-LDL 可诱导平滑肌细胞的增殖, 证明制造模型成功, 而加入不同剂量 PSP 进行干预后, VSMC 的增殖率下降, 表明 PSP 可以抑制 ox-LDL 诱导的平滑肌细胞增殖, 从而有可能阻止血管中膜平滑肌增厚, 这对防止 AS 的进展有重要意义。

高胆固醇血症可导致氧自由基及其他活性氧成分释放增多, 氧自由基介导的脂质过氧化损伤参与了 AS 的形成和发展。自由基对细胞的损伤程度可通过脂质过氧化产物 MDA 含量间接推断。SOD 是生物体内的一种天然抗氧化剂, 它在机体的氧化和抗氧化过程中起着举足轻重的作用, SOD 水平反应了清除氧自由基的能力<sup>[5,6]</sup>。因此, 本研究通过对脂质过氧化物 MDA 和抗氧化剂 SOD 的研究发现: ox-LDL 在诱导平滑肌细胞增殖的同时可使 MDA 含量升高, SOD 活性下降, 说明 ox-LDL 已导致平滑肌细胞发生脂质过氧化, 经 PSP 进行干预后, 脂质过氧化反应减轻。这说明 PSP 对平滑肌细胞增殖的抑制作用有可能是通过减轻脂质过氧化反应而实现的。其可能机制是通过保护抗氧化酶活性, 增强氧自由基清除剂的活性减弱氧自由基、脂质过氧化反应的损害<sup>[7-9]</sup>, 从而抑制 VSMC 的增殖。

NO 是一种新型的细胞信使分子, 是由 L-精氨酸和分子氧在一氧化氮合酶(NOS)催化下生成的, NOS 是 NO 生成的关键酶。NO 具有调节血管张力, 抑制单核细胞与内皮细胞粘附以及 VSMC 的增生、移行<sup>[10]</sup>, 抑制血小板聚集等功能<sup>[11]</sup>。Busses 等<sup>[12]</sup>发现, 血管内皮细胞、SMC、巨噬细胞等均可合成和释放 NO。实验中给予 ox-LDL 刺激后, NO 含量下降, 这与文献<sup>[13]</sup>中报道的 ox-LDL 能抑制平滑肌细胞内 NO 的合成和释放一致。本研究结果表明: 给予 PSP 以后, 可增加细胞培养液中 NO 含量, 提示 PSP 可以拮抗 ox-LDL 对 VSMC 释放 NO 的抑制作用, 使 NO 含量增高, 从而抑制了平滑肌细胞的增殖。而且观察到在 NO 含量升高的同时 NOS 的活性也在增强, 与 NO 的变化趋势一致。因此, 推测 PSP 促进 NO 释放的可能机制是通过 L-精氨酸-NOS-NO 途径。PSP 可促进平滑肌细胞内诱导型 NOS(iNOS)的产生, 使

NO 合成和释放增加。另有研究证实, 将 PSP 作用于 NOS 抑制剂 L-NAME 诱导的高脂血症大鼠, 发现 PSP 能阻止 L-NAME 诱导的高脂血症, 证实 PSP 可拮抗 NOS 抑制剂, 进而使 NO 释放和 NOS 表达增多<sup>[14]</sup>。有关 NO 抑制 VSMC 的机制还不太清楚, 目前认为 NO 可以与靶细胞三羧酸循环及呼吸链上含非血红素铁的酶结合, 阻断有氧代谢, 使细胞的能量代谢产生障碍, 蛋白质合成降低, 抑制细胞的增殖<sup>[15,16]</sup>。综上所述, PSP 促进 NO 的产生, 进而抑制平滑肌细胞的增殖可能是其抗 AS 的作用机制之一。

MCP-1 是单核细胞/巨噬细胞的特异趋化性因子, 其主要功能是趋化和激活单核细胞至炎症部位, 并同时参与炎症反应、调节免疫。虽然在正常情况下, SMC 不产生 MCP-1, 但是在 AS 发展过程中, SMC 可自行合成与分泌 MCP-1<sup>[17]</sup>。ox-LDL 可诱导培养的平滑肌细胞表达 MCP-1 mRNA<sup>[18]</sup>。MCP-1 可使平滑肌细胞向内膜迁移, 刺激平滑肌细胞分裂增殖。PSP 可以抑制 ox-LDL 诱导的平滑肌细胞增殖, 可能是通过下调 MCP-1 的表达实现的。有研究表明 MCP-1 是 VSMC 的促分裂因子, 它通过 PKC 途径或增强细胞外 Ca<sup>2+</sup> 内流而促进 VSMC 增殖和迁移<sup>[19]</sup>。有关 PSP 是通过何种机制抑制 MCP-1 mRNA 的表达还不清楚, 有待进一步的研究。

许多资料表明, 原癌基因 c-myc 表达与 SMC 增殖和分化有着密切的关系, c-myc 是细胞受到刺激分裂时的一种早期即刻反应基因, 在细胞生长调控、细胞分化和损伤修复过程中发挥重要作用。生长静止期的 VSMC 在受到有丝分裂源刺激后 2~4 h 内迅速诱导 c-myc 表达, 作为一种转录调节因子, c-myc 可促进与细胞增殖有关的基因开放, 从而产生细胞增殖效应。c-myc 基因的激活被认为是 VSMC 增殖的始动环节之一<sup>[20]</sup>。因此, c-myc 起着启动和维持细胞增殖的双重作用。本研究发现 PSP 能够抑制 ox-LDL 诱导的大鼠主动脉平滑肌细胞 c-myc 的表达。PSP 可能通过抑制 ox-LDL 诱导的平滑肌细胞活性氧的产生, 阻断 NF- $\kappa$ B 的激活<sup>[10,21]</sup>, 进而抑制 c-myc 的表达。这可能是其抗动脉粥样硬化作用的又一机制。

#### 参考文献(References)

- [1] Zettler ME, Prociuk MA, Austria JA, et al. oxLDL stimulates cell proliferation through a general induction of cell cycle proteins. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 284(2): H644-H653
- [2] 张 杰, 李兴琴, 王素敏, 等. 车前子对高脂血症大鼠血脂水平及抗氧化作用的影响. *中国新药杂志*, 2005, 14(3): 299-301

- [3] 王素敏, 张杰, 李兴琴, 等。车前子对高脂血症大鼠脂质过氧化的影响, *营养学报*, 2003, 25(2): 212-213
- [4] 梁明瑜(综述), 吴兆龙(审校)。氧化低密度脂蛋白与 NO 的相互作用及机制, *国外医学生理、病理科学与临床分册*, 1997, 17(1): 55-58
- [5] Kugiyama K, Kerns S, Morrisett JD, *et al.* Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by lysolecithin in modified low-density lipoproteins, *Nature*, 1990, 344(6262): 160-162
- [6] Yamaoto N, Ostuka Y, Kushiro J. Role of superoxide anion on onset and maintenance of hypertension in spontaneously hypertensive rat, *Nippon Jinzo Gakkai Shi*, 1992, 34(6): 717-732
- [7] 高山, 程焱, 任晓莉, 等。硫辛酸对氧化低密度脂蛋白诱导的大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞增殖的影响, *中国卒中杂志*, 2008, 3(3): 169-173
- [8] Watanabe T, Pakala R, Koba S, *et al.* Lysophosphatidylcholine and reactive oxygen species mediate the synergistic effect of mildly oxidized LDL with serotonin on vascular smooth muscle cell proliferation, *Circulation*, 2001, 103(10): 1440-1445
- [9] de Nigris F, Youssef T, Ciafre S, *et al.* Evidence for oxidative activation of c-Myc-dependent nuclear signaling in human coronary smooth muscle cells and in early lesions of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits: protective effects of vitamin E, *Circulation*, 2000, 102(17): 2111-2117
- [10] 蔡志友, 晏勇。氧化型低密度脂蛋白致动脉粥样硬化的机制, *中国卒中杂志*, 2008, 3(3): 187-190
- [11] 王增春(综述), 陈良万(审校)。阿魏酸钠对受损血管内皮细胞保护作用的研究进展, *福建医科大学学报*, 2008, 42(3): 288-290
- [12] Busse R, Mulsh A. Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells, *FEBS Lett*, 1990, 275(1-2): 87-90
- [13] 董志华(综述), 翟桂兰(审校)。血管平滑肌细胞凋亡与动脉粥样硬化研究进展, *心血管病学进展*, 2009, 30(2): 280-283
- [14] Motoshima H, Wu X, Mahadev K, *et al.* Adiponectin suppresses proliferation and superoxide generation and enhances eNOS activity in endothelial cells treated with oxidised LDL, *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 315(2): 264-271
- [15] Geng YJ, Hansson GK, Holme E. Interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor synergize to induce nitric oxide production and inhibit mitochondrial respiration in vascular smooth muscle cell, *Cir Res*, 1992, 71(5): 1268-1276
- [16] Sarkar R, Meinberg EG, Stanly JC, *et al.* Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells, *Cir Res*, 1996, 78(2): 225-230
- [17] 姜希娟, 赵桂峰, 卢斌, 等。丹参单体对 TNF- $\alpha$  诱导大鼠动脉平滑肌细胞 MCP-1 和 IL-1 $\beta$  的影响, *中华现代中医学杂志*, 2006, 2(7): 583-586
- [18] 张红, 陈纪林。氧化低密度脂蛋白对人血管平滑肌细胞间质胶原酶及其组织抑制因子基因表达的影响, *中国医学科学院学报*, 2002, 24(3): 332-333
- [19] 王川怡(综述), 张怀勤(审校)。动脉粥样硬化与蛋白激酶 C、基质金属蛋白酶表达, *医学综述*, 2004, 10(2): 90-92
- [20] Sun LQ, Cairns MJ, Gerlach WL, *et al.* Suppression of smooth muscle cell proliferation by a c-myc RNA-cleaving deoxyribozyme, *J Biol Chem*, 1999, 274(24): 17236-17241
- [21] Häcker H, Karin M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases, *Sci STKE*. 2006, (357): re13

## Inhibition and Mechanism of Plantain Seed Polysaccharide on Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells Induced by Oxidized Low Density Lipoprotein

Ning Zhang<sup>1</sup>, Su-Min Wang<sup>1\*</sup>, Wen-Wen Che<sup>1</sup>, Ran Zhang<sup>1,2</sup>, Yun Guo<sup>1</sup>, Si-Jia Xu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pharmacology Department, Basic Medical College, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China;

<sup>2</sup>Cangzhou Medical College, Cangzhou 061001, China)

**Abstract** The proliferation model of vascular smooth muscle cells (VSMC) induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) was established with the method of tissue explants adherent. MTT assay was used to measure the proliferation of VSMC. The results shows that cell proliferation obviously increased and the proliferation model was successfully established. The content of malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO), the activity of superoxide dismutase (SOD) and nitric oxide synthase (NOS) in supernatant were tested by colorimetric method to observe the antioxidation effects of plantain seed polysaccharide (PSP). Different concentrations of PSP decreased the MDA content, and increased the SOD, NO and NOS activity ( $P < 0.05$ ). It indicated that PSP had certain antioxidant effect. RT-PCR was used to detect the expression of c-myc and MCP-1 mRNA to select drug targets and explore the molecular mechanism of the anti-atherosclerosis of PSP. PSP had the anti-atherosclerosis, which is related to the down-regulated expression of c-myc and MCP-1.

**Key words** plantain seed polysaccharide; oxidized low density lipoprotein; vascular smooth muscle; c-myc; MCP-1

Received: June 19, 2009 Accepted: September 15, 2009

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (No.C2007000822)

\*Corresponding author. Tel: 86-311-86266073, Fax: 86-311-86057291, E-mail: wsm001@126.com