

中药对血管平滑肌细胞增殖的抑制作用的研究*

王 威,徐宗佩,刘红隐,刘 生

摘要: [目的]研究中药抑制血管平滑肌细胞(VSMC)生长增殖的作用和机制。[方法]采用³H-TdR(氚胸腺苷)掺入和外源性 c-jun cDNA 在血管平滑肌细胞中表达的方法,观察血管平滑肌细胞(VSMC)生长增殖变化。[结果]与对照血清+内皮素组(cpm 2 534.54±54.22/10⁵ 细胞)相比,中药血清+内皮素组(cpm 1 104.33±37.31/10⁵ 细胞)血管平滑肌细胞³H-TdR 掺入量有显著下降($P<0.01$),而且血管平滑肌细胞原癌基因的 c-jun mRNA 表达也较弱。[结论]本实验表明复方丹参对血管平滑肌细胞增殖及其原癌基因 c-jun mRNA 的表达有明显的抑制作用。

关键词: 中药;血管平滑肌细胞;细胞培养; c-jun

Inhibition of Chinese material medica on vascular smooth muscle cell hyperplasia

WANG Wei, XU Zong-pei, LIU Hong-yin, *et al*
(Tianjin Medical College, Tianjin 300052, China)

Abstract: [Objective] To study the effect and mechanism of Chinese material medica on the inhibition of vascular smooth muscle cell (VSMC) hyperplasia. [Methods] ³H-TdR incorporation and expression of c-jun cDNA in VSMC was used. The growth and hyperplasia of VSMC were observed. [Results] The amount of ³H-TdR incorporation in serum+endothelin-1 with Chinese herbs group (cpm 1104.33±37.31/10⁵ cell) was lowered than that in serum+endothelin-1 group (cpm 2534.54±54.22/10⁵ cell) with a significant difference ($P<0.01$). And the c-jun mRNA expression of carcinoma insitu was also weaker in the former group. [Conclusion] It shows that compound Danshen dripping pills can inhibit the hyperplasia of VAMC and c-jun mRNA expression of carcinoma insitu.

Key words: Chinese material medica; vascular smooth muscle cell (VSMC); cellular culture; c-jun

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1005-7145(2003)02-0023-03

近年来,国内外对血管平滑肌进行了大量的研究,发现血管平滑肌细胞的异常增殖是引起高血压动脉粥样硬化等心脑血管疾病的主要原因^[1],血管平滑肌细胞的异常增殖又与某些生长因子的过量释放有关。另外在细胞生长调控研究过程中发现 c-fos 和 c-jun 是与细胞调控相关的主要原癌基因^[2],其编码的核蛋白作为主要的转录调控因子,通过结合在次级反应基因 5'侧翼区的某些序列上,促进其表达而参与细胞的增殖调控。本研究以中药作为干预因素,观察中药对血管平滑肌细胞增殖调控相关基因

表达的影响,以期对高血压和动脉粥样硬化等心血管疾病的中医药治疗奠定分子水平的理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

津白 2 号小鼠,由天津肿瘤研究所动物室提供。RPMI-1640, GIBCO 产品。胰蛋白酶, Sigma 公司购入。³H-TdR 购自中国原子能研究院。随机引物试剂盒, Promega 公司产品。c-jun 探针由河北医科大学刘进芳博士提供。丹参、川芎、麝香 3 味中药按一定比例配伍,水煎醇提法制成浓度为 2.5 g/mL(总生药量)的药液。

1.2 方法

1.2.1 小鼠血清制备 健康津白 2 号小鼠,体质量 20~22 g, 40 只,随机分成两组:中药组 20 只,按每只鼠每天 2.5 g 生药量分早晚两次灌喂中药 0.5 mL/次,连续 14 d,末次给药 6 h 后,眼球取血,离心提取血清。-20℃保存备用。对照组 20 只生理盐水灌喂,其他同中药组。

* 基金项目:河北省自然科学基金课题(97256)

作者单位:300052 天津医学高等专科学校(王 威)

300193 天津中医学院(徐宗佩)

300200 天津肿瘤研究所(刘红隐)

300204 天津肿瘤医院(刘 生)

作者简介:王 威(1956-),男,硕士,副教授,从事中西医结合治疗心血管疾病和扶正祛邪带瘤生存的机制研究。

1.2.2 细胞培养 选 4 周龄的津白 2 号小鼠,在超净工作台中取胸主动脉浸入 R-1640 培养液中,沿纵向剖开,用无菌生理盐水湿布擦除血管内膜后,用 R-1640 培养液冲洗,然后,剪成 1 mm^3 的小组织块植于 25 mL 培养瓶中,每瓶 20 块,在培养箱内贴壁 4 h 后加入含有小牛血清和适量抗生素的 R-1640 培养液,在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ $5\%\text{CO}_2$ 温箱中做原代培养,待血管平滑肌细胞(VSMC)爬满培养瓶后用 0.25%胰酶消化传代,取 6~8 代细胞进行实验。

1.2.3 实验分组 将浓度为 $1\times 10^5\cdot\text{mL}^{-1}$ 的第 6~8 代细胞种植在 96 孔板上,分为 3 组,再按组分别加入: 1) 对照组,加入对照组血清(终浓度为 20%)+R-1640 培养液。2) 内皮素组,加入对照组血清(终浓度为 20%)+内皮素(终浓度 10^{-4} mmol/L)+R-1640 培养液。3) 中药血清组,给中药血清(终浓度为 20%)+内皮素(终浓度为 10^{-4} mmol/L)+R-1640 培养液。每组 30 孔。

1.2.4 cDNA 探针的标记 按随机引物说明书进行标记,取分装的 cDNA 探针 1 μg 放入 Eppendorf 管中,加入 dATP, dGTP, dTTP 3 种非标记核苷酸与一种标记 [$a^{32}\text{P}$]dCTP,再加入 $10\times\text{buffer}$ 5 μL , DNA 聚合酶 I/DN 酶 I 5 μL ,加三蒸水混均 $15\sim 16\text{ }^\circ\text{C}$ 1.5 h 反应结束时,加终止液 5 μL 。

1.2.5 总 RNA 提取 采用异硫氰酸胍法对对照组、内皮素组和中药组的细胞中提取总 RNA。每孔细胞中加入 0.5 mL 变性液,充分裂解细胞后,加入 2 mol/L NaAC 50 μL , 氯仿 100 μL , 水饱和酚 500 μL , 强烈振荡 15 s 后,置冰浴中 15 min, 12 000 r/min $4\text{ }^\circ\text{C}$ 离心后,取其上清,加等体积的异丙醇,置 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 4 h 沉淀,12 000 r/min $4\text{ }^\circ\text{C}$ 离心 20 min 弃上清液,沉淀加 75%乙醇离心 5 min,弃上清液,干燥后,加入 0.1%焦碳酸二乙酯 (DEPC) 水配置的 0.5%SDS 液 25 μL ,取 20 μL 经琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.6 Northern 印迹分析 用甲醛变性琼脂糖凝胶分离 RNA 后,将凝胶用三蒸水洗 3 次,5 min/次,再放入 $20\times\text{SSC}$ 中浸泡 45 min 倒置于滤纸上,其上依次放置尼龙膜两层,滤纸两层,吸水纸若干层, $10\times\text{SSC}$ 转移 48 h, $20\times\text{SSC}$ 漂洗, $80\text{ }^\circ\text{C}$ 固定 2 h 后,置杂交袋中,于 $42\text{ }^\circ\text{C}$ 预杂交 2 h,然后弃去预杂交液,加入含同位素标记的探针的杂交液 0.2 mL/cm² 膜面积, $42\text{ }^\circ\text{C}$ 杂交 2 h 后洗膜然后压膜于暗合 $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 放射自显影 48 h。

1.2.7 ^3H -TdR 掺入实验 传代培养的 VSMC 细胞接种于 96 孔板上,待其生长至 80%融合后,换用含

0.5%FCS-1640 培养液饥饿培养 24 h,使细胞同步于 G_0 期,随机分为 3 组,分组方法见 1.2.3 实验分组。继续培养 24 h,于收集细胞前 6 h 加入 ^3H -TdR,每孔加入量为 0.2 uci/100 μL 培养液。收集细胞时先吸去培养液,用 PBS 洗 3 次,最后每孔加入 0.25%胰蛋白酶消化细胞,细胞 3 次冻融消化后,收集细胞裂解液于滤纸片上,吹干,放入闪烁瓶中,测细胞样品 ^3H -TdR 掺入率。计算公式为:

$$\text{增加或抑制的百分率 } (\%) = \frac{\text{实验组 cpm 值} - \text{对照组 cpm 值}}{\text{对照组 cpm 值}} \times 100\%$$

2 结果

2.1 中药对 VSMC 的 DNA 合成的影响

实验结果表明,中药能显著降低 VSMC 的 DNA 合成。1) 对照组细胞的 ^3H -TdR 掺入量 (cpm $1\ 301.64\pm 47.11/10^5\text{ cell}$),这是因为对照组 VSMC 在含有正常小鼠血清培养液中的 VSMC 一部分呈增殖状态,一部分处于静止期,成为不均一的细胞群。2) 内皮素组的 ^3H -TdR 掺入量 (cpm $2\ 534.54\pm 54.22/10^5\text{ cell}$),这是因为内皮素刺激 VSMC 快速增殖。3) 中药组 VSMC ^3H -TdR 掺入量 (cpm $1\ 104.33\pm 37.31/10^5\text{ cell}$) 与内皮素组 (cpm $2\ 534.54\pm 54.22/10^5\text{ cell}$),相比显著降低 ($P<0.01$),表明中药对内皮素的刺激作用有明显的拮抗作用。见图 1。

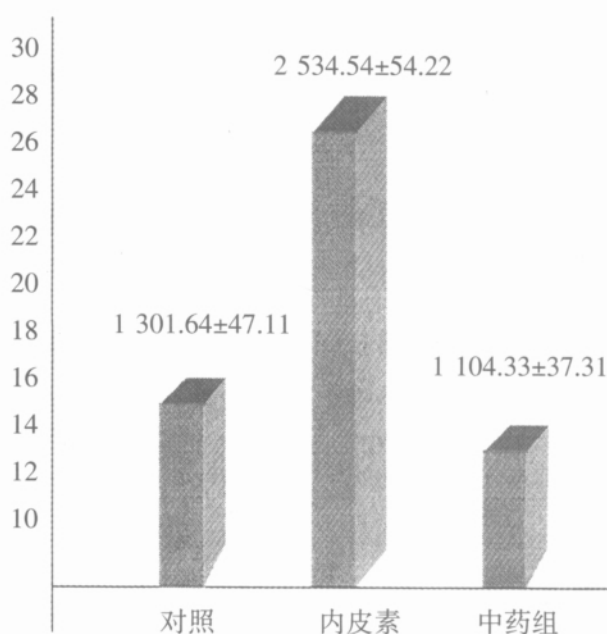


图 1 ^3H -TdR 掺入量

2.2 中药对原癌基因 c-jun 表达的影响

内皮素组的 VSMC 中提取的总 RNA 与 c-jun 探针杂交信号较强,中药组杂交信号较弱,说明该方药可抑制 VSMC 原癌基因 c-jun mRNA 的表达,从而抑制了 VSMC 的增殖。见图 2。

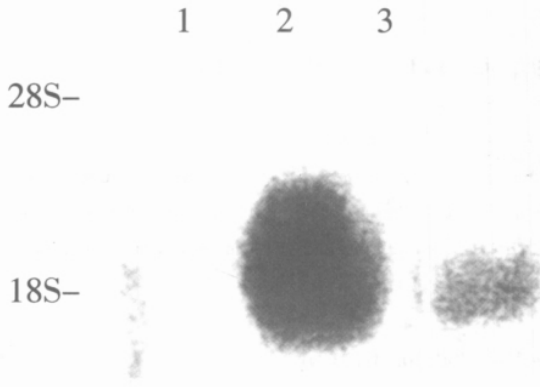


图 2 原癌基因 C-jun 的表达

3 讨论

动脉粥样硬化是一种与血管平滑肌增生和载脂蛋白代谢异常为主的病变。近年来研究发现 c-jun 是与细胞增殖调控相关的主要原癌基因。因此,若能抑制某些与 VSMC 增殖调控相关的基因的表达,就可以抑制 VSMC 的增殖。

本研究结果表明,体外培养的 VSMC 在中药的作用下原癌基因 c-jun 表达下降,这表明中药可以抑制丝裂原(如生长激素、内皮素等)从而抑制原癌基因 c-jun 的表达,实现了细胞增殖调控。并且在中药血清培养下 VSMC 的 DNA 合成量也降低, DNA 合成下降表明细胞的增值数量减少,内皮素作为一种强效促有丝分裂物质,通过与 VSMC 上 G 蛋白偶联的受体而激活磷脂酶 D,磷脂酶 C,蛋白激酶 C 和酪氨酸激酶等,这些酶被活化可导致细胞内三磷酸肌醇及 Ca^{2+} 浓度升高,三磷酸肌醇及 Ca^{2+} 作为细胞内第 2 信使通过激活某些转录因子而诱导 c-fos 和

c-jun 基因的表达。在胞浆中合成 c-fos 和 c-jun 转入细胞核内,以异源性二聚体方式同某些基因的 AP-1 位点相结合,这样便将内皮素的刺激信号转变为 VSMC 内基因表达与细胞增殖信号。以 c-fos 和 c-jun 为代表的一类原癌基因,其表达产物位于细胞核内,这是一类 DNA 结合蛋白质即转录因子。在不分裂的静止细胞中,这些癌基因不表达或表达很低,而在细胞增殖信号作用下,这些癌基因的表达明显升高。c-jun 的表达产物 c-Jun 可形成同源二聚体与 DNA 结合,c-Jun 也可以与 c-fos 的表达产物 c-Fos 通过“亮氨酸拉链”彼此相连形成异源性二聚体,此复合物借助各自的碱性氨基酸区域与 DNA 结合以促进细胞分裂基因的表达而导致细胞增生^[3-5]。

中药抑制内源性 c-jun 表达,使 c-Fos/c-Jun 异源性二聚体生成减少,故内皮素基因表达活性降低。推测中药对 VSMC 的 DNA 合成的抑制作用是由于阻断内源性 c-jun 表达所致。

VSMC 异常增殖在高血压和动脉粥样硬化的发生、发展中起重要作用。某些癌基因的异常表达是 VSMC 异常增殖的原因。复方中药抑制与细胞增殖相关的基因的表达,从而抑制细胞 DNA 合成,这为治疗由 VSMC 增生引起的心血管疾病奠定了实验基础。

参考文献:

- [1] 温进疆.内皮素促进细胞增殖相关基因的表达和血管平滑肌细胞增殖[J].中国动脉粥样硬化杂志,1995,(6):5.
- [2] Morgan JJ, Curran T. Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes[J]. TINS, 1989,12:459.
- [3] Kyriakis JM. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases[J]. Nature, 1994,369:156.
- [4] Binetruy B. Ha-ras augments c-Jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain[J]. Nature, 1991,351:122.

(收稿日期 2003-03-08)

欢迎订阅 欢迎投稿 欢迎刊登广告!