

· 实验研究 ·

川芎嗪对原代培养血管平滑肌细胞
胶原基因表达的影响*唐利龙¹ 汪丽惠¹ 张均华¹ 朱国英¹ 张小荣²

内容提要 为了观察川芎嗪对冠状动脉成形术(PTCA)后再狭窄的治疗作用及其活血化瘀的可能机制,我们用 40 μg 川芎嗪来处理培养血管平滑肌细胞(VSMCs),应用 Northern 杂交的方法观察了川芎嗪对培养 VSMCs 前胶原 $\alpha_1(\text{I})$ 、 $\alpha_1(\text{III})$ 基因转录的影响,发现川芎嗪能明显抑制 $\alpha_1(\text{I})$ 、 $\alpha_1(\text{III})$ 基因的转录。

关键词 川芎嗪 血管平滑肌细胞 胶原

Effect of Tetramethylpyrazine on Expression of Collagen Genes in Primary Cultured Smooth Muscle Cells in Rats Tang Li-long, Wang Li-hui, Zhang Jun-hua, et al *First Affiliated Hospital, Beijing Medical University, Beijing(100034)*

For the purpose of studying the mechanism of tetramethylpyrazine (TMP) to prevent the restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA) and promote blood circulation to remove stasis, 40 μg of TMP was used to treat cultured vascular smooth muscle cells (VSMs). The total RNA was extracted from treated VSMC. The RNA Northern blot hybridization with procollagen genes $\alpha_1\text{-I}$ and $\alpha_1\text{-III}$ probes was used to investigate its change in mRNA level. The results indicated that TMP could inhibit significantly the transcription of procollagen genes $\alpha_1\text{-I}$ and $\alpha_1\text{-III}$.

Key words collagen, vascular smooth muscle cells, tetramethylpyrazine

胶原的合成在冠状动脉成形术(PTCA)后再狭窄的过程中起重要作用^①。川芎嗪具有抑制血栓形成的作用,我们曾证实它具有直接抑制血管平滑肌细胞(VSMCs)生长分裂的作用^②。为了探讨它对 VSMCs 合成胶原的直接影响及它的活血化瘀的作用机制,我们研究了川芎嗪对原代培养 VSMCs I、III 型前胶原 α 链的 $\alpha_1(\text{I})$ 、 $\alpha_1(\text{III})$ 基因转录的影响。现报告如下。

材料与方法

1 质粒 Pro $\alpha_1(\text{I})$ 重组质粒含有 1.5 kb 的 Pro $\alpha_1(\text{I})$ cDNA 片段, Pro $\alpha_1(\text{III})$ 重组质粒含有 0.5 kb 的 Pro $\alpha_1(\text{III})$ cDNA 片段,该质粒由北京医科大学第三附属医院运动医学研究所提供。

2 试剂 DMEM 培养基干粉、异硫氰酸胍、

DEPC 为 Sigma 公司产品,限制性内切酶、鲑鱼精 DNA、N-十二烷基肌氨酸钠为华美公司产品, MOPS 为 Fluka 公司产品, Sephadex G-50 为 Pharmacia 公司产品, $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -dCTP 为福瑞公司产品,随机引物试剂盒为 Promega 公司产品,其余均为进口分装及国产分析纯试剂。

3 质粒扩增、提取及纯化 参照文献^③方法。

4 质粒酶切鉴定及探针分离纯化与标记 经碱裂解法提取及纯化的重组质粒,分别用 ECOR I、Pst I 酶切, 0.7% 低熔点琼脂糖凝胶电泳回收相应的 cDNA 片段,长度分别为 1.5 kb、0.5 kb,以相应的限制性内切酶鉴定,所得结果与报道酶切图谱一致。cDNA 片段用 $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -dCTP 随机引物标记,放射比活性为 $(7\sim 8)\times 10^7$ 。

5 VSMCs 原代培养 将 1 只体重为 100 g 的 Wistar 大鼠活杀,在严格灭菌的条件下,取出胸主动脉,放入预先除菌的 Hank's 液中清洗 3 次,并除去内、外膜,转入盛有 DMEM 培养液的平皿中剪碎

*国家八五攻关项目资助课题(No:85-915-02-02)

1. 北京医科大学附属第一医院心内科(北京 100034); 2. 甘肃省中医院风湿科

为约 $1\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ 大小, 加入培养瓶中, 用吸管吸出培养液后, 将培养瓶放入 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 孵箱中贴壁 $4\sim 6\text{ h}$, 加入 20% 胎牛血清 DMEM, 当细胞长满以后开始消化传代。到第 3 代时制成 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 细胞悬液, 分别传到 8 瓶 (50 ml 培养瓶), 每瓶加细胞悬液 2 ml 。

6 细胞处理 川芎嗪为北京第四制药厂生产的注射液, 规格为 40 mg/ml 。当培养的第 4 代 VSMCs 贴壁生长至约 90% 时, 弃 20% 小牛血清 DMEM 液, 无血清培养 12 h , 改 2.5% 小牛血清 DMEM 液维持, 同时分别向每瓶培养液中加 $40\text{ }\mu\text{g}$ 川芎嗪 ($1\text{ }\mu\text{l}$), 对照组加 pH3.0 的 PBS $1\text{ }\mu\text{l}$ 。处理后的第 3 天, 采用文献⁽⁴⁾方法提取细胞总 RNA。

7 Northern 杂交 按文献⁽³⁾方法, 将 $30\text{ }\mu\text{g}$ 总 RNA 经甲醛变性和 1% 琼脂糖变性凝胶 (含 0.66 ml/L 甲醛) 电泳后, 转移印迹到硝酸纤维素膜上, 80°C 烘烤 2 h , 烘烤后的印迹膜在含 $6\times\text{SSC}$ 、 $2\times\text{Denhardt}$ 液、 $0.1\%\text{ SDS}$ 和 $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ 鲑鱼精 DNA 的溶液中, 42°C 预杂交 2 h , 再加入 ^{32}P 标记的 cDNA 探针于 42°C 杂交 $16\sim 24\text{ h}$, 洗膜后将杂交膜暴露于 X 光片上, 在 -70°C 曝光 $3\sim 10\text{ 天}$ 。

结 果

$40\text{ }\mu\text{g}$ 川芎嗪可以明显抑制培养 VSMCs 的 I、III 型前胶原 $\alpha_1(\text{I})$ 、 $\alpha_1(\text{III})$ 基因的 mRNA, 见图 1、2。

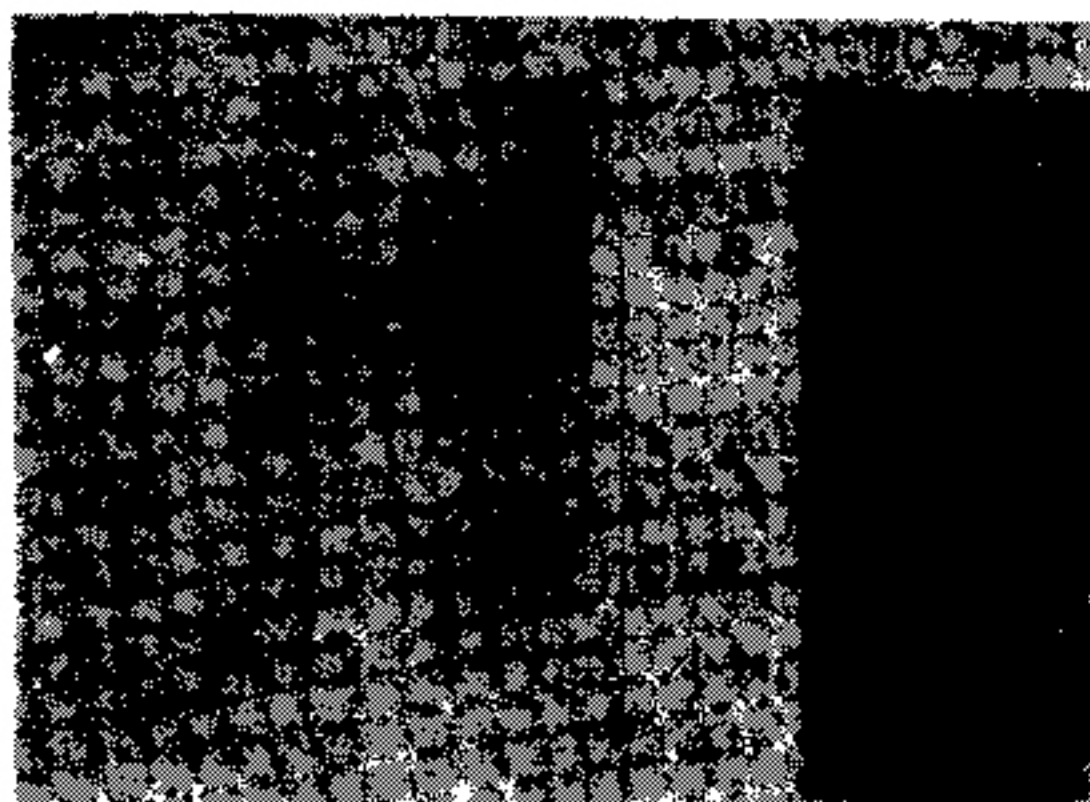


图 1 川芎嗪对 VSMCs Pro $\alpha_1(\text{I})$ 基因 mRNA 影响 Northern 杂交: T 为川芎嗪组, 加 $40\text{ }\mu\text{g}$ 川芎嗪; N 为对照组, 加 pH3.0 PBS $1\text{ }\mu\text{l}$ 图 2 川芎嗪对 VSMCs Pro $\alpha_1(\text{III})$ 基因 mRNA 影响 Northern 杂交: T₁ 为川芎嗪组, 加 $40\text{ }\mu\text{g}$ 川芎嗪; T₀ 为对照组, 加 pH3.0 PBS $1\text{ }\mu\text{l}$

讨 论

胶原基因很大, 大约有 4 万个碱基, 其中插有大量的非编码序列, 因前胶原的 mRNA 前体的加工过程中包含有大量的 RNA 拼接, 产生不同的 mRNA, 所以用前胶原 $\alpha_1(\text{I})$ cDNA 探针杂交产生 4.8 、 5.8 kb 二条带, 用 $\alpha_1(\text{III})$ cDNA 探针杂交产生 4.8 、 5.4 、 5.8 kb 三条带^(5, 6)。

I、III 型胶原导致血小板的粘附、聚集和激活并释放生长因子在 PTCA 术后再狭窄的启动和动脉粥样硬化的形成过程中起重要作用⁽⁷⁾。血小板的粘附、聚集和激活及血栓形成是血瘀证的原因之一⁽⁸⁾。I 型胶原是 PTCA 后再狭窄晚期的主要细胞外基质成分。

川芎嗪是具有活血化瘀作用川芎的有效成份, 具有多种药理作用, 能明显抑制血小板的聚集和激活, 加速血氧自由基的清除, 抑制体内 TXA_2 的合成, 促进前列腺环素 (PGI_2) 的合成⁽⁹⁾。川芎嗪还能抑制血管内皮细胞的生长⁽¹⁰⁾, 在本实验中, 川芎嗪能抑制 I、III 型前胶原 $\alpha_1(\text{I})$ 、 $\alpha_1(\text{III})$ 基因的转录, 川芎嗪的这种作用与我们以前观察到其能抑制 VSMCs 生长分裂一样, 是直接作用于培养 VSMCs 本身⁽²⁾。川芎嗪对 VSMCs I、III 型胶原基因转录的抑制作用提示: (1) 它具有对 PTCA 术后再狭窄起防治作用的潜在可能性, 有进一步作动物实验的价值。(2) 通过抑制 I、III 型胶原而抑制血小板的粘附、聚集和激活, 是川芎嗪具有活血化瘀作用的可能机制之一。

参 考 文 献

1. Forrester JS, Fishbein FM, Helfant RF, et al. A paradigm for restenosis based on cell biology. Clues for development of new preventive therapies. J Am Coll Cardiol 1991;17: 758.
2. 唐利龙, 汪丽惠, 朱国英, 等. 川芎嗪和肝素对原代培养血管平滑肌细胞生长分裂的影响. 中国中西医结合杂志 1995; 15(1): 38.
3. 金冬雁, 黎孟枫译. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992: 453.
4. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochemistry 1987; 162: 156.
5. Vuorio T, Makela JK, Kahari VM, et al. Coordinated regulation of type I and III collagen production and mRNA levels of Pro $\alpha_1(\text{I})$ and Pro $\alpha_1(\text{III})$ collagen in cultured morphae fibroblast. Arch Dermatol Res 1987; 279:154.

6. Albert L L, Nelson DL, Cox MM. Principle of Biochemistry. 2nd. New York: Worth Publishers, 1993:866.
7. Crotendorst GR, Seppa HEJ, Kleinman HK, et al. Attachment of smooth muscle cells to collagen and their migration toward platelet-derived growth factor. Pro Natl Acad Sci 1991; 78:3669.
8. 陈可冀. 活血化瘀研究与临床. 第1版. 北京: 中国协和医科大学

大学、北京医科大学出版社, 1991: 17, 31.

9. 樊光辉, 肖创青, 陈菊梅. 川芎嗪对冠心病患者血脂质过氧化物含量的影响. 中国中西医结合杂志 1994; 14(1): 26.
10. 周伟东, 潘明新, 何红兵. 川芎嗪和阿斯匹林对组织培养内皮细胞的影响. 第一军医大学学报 1992; 12(1): 52.

(收稿: 1995-02-24 修回: 1995-07-10)

益气活血中药合西药治疗慢性心功能不全 60 例

苗 阳 徐凤芹 汪晓芳 钱红宇 袁敬柏 周国栋

1991年2月至1994年12月, 我们以益气活血、温阳利水中药合西药治疗慢性心功能不全60例, 疗效较好, 现总结如下。

资料与方法 100例患者均住院治疗, 随机分治疗组和对照组。治疗组60例, 男36例, 女24例, 年龄21~82岁, 平均54岁; 原发病: 风湿性心脏病15例, 高血压心脏病22例, 冠心病15例, 心肌病8例; 伴发糖尿病16例, 心律失常35例; 心功能II、III、IV级分别为10、28、22例。对照组40例, 男23例, 女17例, 年龄23~80岁, 平均54岁; 原发病: 风湿性心脏病10例, 高血压心脏病13例, 冠心病11例, 心肌病6例; 伴发糖尿病8例, 心律失常21例; 心功能II、III、IV级分别为7、19、14例。按虚证〔中西医结合杂志1986; 6(10): 598〕及血瘀证〔中西医结合杂志1987; 7(3): 129〕诊断标准。两组患者辨证均属气虚血瘀证。中医治疗取益气活血温阳利水法, 处方: 党参15g 黄芪30g 丹参20g 益母草30g 川芎12g 泽泻15g 麦冬12g 桂枝10g 陈皮12g。脾肾阳虚水泛加附子10g 先煎, 茯苓15g, 车前子30g; 阴虚内热舌红少苔加沙参30g, 生地15g; 肺热痰盛加黄芩10g, 鱼腥草30g; 痰瘀互阻加泽兰15g, 苏木10g, 瓜蒌30g, 半夏10g。每日1剂水煎分两次服, 2周为1个疗程, 可连用2~3个疗程。西药治疗用地高辛0.125~0.25mg, 每日1次口服; 消心痛10mg, 每日3次口服; 双氢克尿噻25~50mg或速尿20mg, 每日1次口服; 巯甲丙脯酸12.5~25mg, 每日3次口服。依据患者病情选用上述药物1~3种治疗。疗程同上。对照组仅用上述西药治疗。治疗前后详察患者症状体征、心功能改善情况, 血液流变学、西药停减率及毒副作用。

结 果 疗效标准: 服药后临床主要症状、体征

明显好转, 心功能改善两级者或原来II级达I级者为显效; 症状好转, 心功能改善1级者为好转; 主要症状无改善或病情恶化者为无效。治疗组60例治疗后显效、好转、无效者分别为35、22、3例, 对照组40例分别为17、12、11例, 两组总有效率分别为95.0%和72.5%, 统计学处理有显著性差异($P < 0.05$)。治疗组用药后1~3天心悸、气短明显好转, 罗音、水肿消失, 心率减慢(由治疗前平均119.23次/min减至75.32次/min), 24h尿量明显增加(由治疗前平均530ml增至1500ml)。无1例出现地高辛中毒反应、肝肾损害及电解质紊乱。地高辛停减率达50%, 对照组用药多在3~7天起效, 用药过程中8例因地高辛过量而致各种心律失常, 电解质紊乱达18例, 地高辛治疗好转停减率为0, 加量率15%。治疗组死亡2例, 1例为心衰合并III度房室传导阻滞, 陈旧性心肌梗塞, 心脏骤停; 另1例为III度心衰, 呼吸循环衰竭死亡。对照组死亡6例, 严重电解质紊乱及地高辛中毒4例, 另2例死于心源性休克及肺部感染。治疗组32例, 对照组14例患者做血液流变学检查, 治疗组全血粘度、血浆粘度、红细胞聚集指数治疗前后有明显改善($P < 0.05$), 而对照组治疗前后改变不明显。

讨 论 我们以益气活血中药合西药治疗慢性心功能不全与西药治疗对照组比较, 不仅疗效前者优于后者, 而且前者西药停减率高, 病死率低, 毒副作用少, 说明益气活血中药与小剂量西药配伍, 治疗作用相加, 毒副作用减少, 在改善心功能同时, 对机体内环境干扰甚少, 对顽固性心衰和一些不适合西药治疗的心衰患者提供有效、安全治疗方法。本方不仅与西药的强心、利尿、扩血管药物有协同作用, 还能增加心肌营养血流量, 改善能量代谢及血液流变学指标, 使衰竭的心脏得以恢复, 心衰诸症缓解。

(收稿: 1994-11-25 修回: 1995-08-18)